

こうした因子の放出と T 細胞レセプター及び IL-2 を介するシグナル伝達との関連性については現在検討中であるが、抗 CD3 抗体で CTL を刺激しても軽度のキラー活性の抑制と Granzyme B 放出が観察されることから、T 細胞レセプターからの刺激は、細胞傷害因子を放出するスイッチを ON にするものと考えられる。正常な CTL の場合には IL-2 を介し消費した細胞傷害因子の補給が可能であるが、今回のように CTL 上の IL-2 レセプター b 鎖の発現が低下し、IL-2 からのシグナル伝達が遮断された状態ではその補給がなされず、Anergy に陥ったものと推察される。IL-2 レセプター b 鎖の発現が低下する機序は未だ不明であるが、通常 T 細胞は適切な刺激により IL-2 レセプターの発現が増強し、IL-2 による増殖反応が活発になる正の反応が惹起される。逆にここで示した如く、T 細胞に不適切な刺激が入った場合には、IL-2 レセプターの発現が低下し、その増殖が抑制され機能が低下するものと考えられる。

キラー活性の低下とは対照的に、Anergy に陥った CTL は大量の細胞傷害能を有する IFN-g を放出するが、自身はそのレセプターの発現を低下させ、IFN-g による細胞自身の傷害を受けないようにしている。こうした IFN-g は多様な生物活性を有しており CTL だけではなくヘルパー T 細胞やマクロファージなどにも作用する考えられ、これら細胞間のネットワークへの影響が生体防御にとって有利なのか不利益なのかを見極めることも今後の検討課題の一つである。

E. 結論

CTL がエピトープペプチドにより Anergy に陥る機序を検討したところ、1) キラー活性の抑制は一時的であり、時間の経過とともに回復すること、2) キラー活性抑制時には IL-2 レセプター b 鎖発現が低下しているが、活性の回復に伴い経時的に b 鎖の発現が上昇すること、3) キラー活性の低下は Granzyme B 等の放出による細胞傷害因子の枯渇に起因すること、4) Anergy に陥った CTL は、大量の IFN-g を放出するとともに、自らが放出した IFN-g の影響を受けないように IFN-g レセプターの発現を著明に低下させていることなどを見いだした。

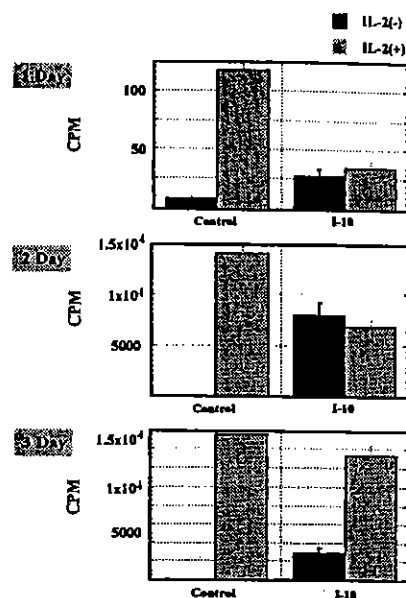


図3 IL-2依存性増殖におけるペプチドI-10の影響

Treatment	1day	2days	3days
Non	5.9 *	5.2	5.7
I-10	1.7	2.5	3.6
18MN	6.3	5.6	5.4
Anti-CD3	4.4	4.7	3.8

* Units/mg protein

表1 Granzyme B活性に対するペプチド I-10の影響

Treatment	1day	2days	3days
Non	ND #	ND	ND
I-10	132000 *	27000	10900
18MN	12	10	10
Anti-CD3	1900	145	97

* :pg/ml

:below detection sensitivity

表2 IFN-γ産生に対するペプチドI-10の影響

F.研究発表

1.論文発表

1. Takahashi, H., Chiba, M., Kato, K., Nakagawa, Y., Iinuma, H., Nerome, K. Predominant priming of epitope-specific CD8+ CTL with recombinant vaccinia virus expressing an immunodominant epitope of HIV-1 envelope protein within an influenza hemagglutinin cassette. AIDS Research Newsletter pp.116, 1998.
2. Kmiecik, D., Wasik, T.J., Tepler, H., Pientka, J., Hus, S., Takahashi, H., Okumura, K., Kaneko, Y., and Kozbor, D. The effect of deletion of the V3 loop of gp120 on cytotoxic T cell responses and HIV gp120-mediated pathogenesis. J. Immunol. 160: 5676-5683, 1998.
3. Futagami, S., Takahashi, H., Norose, Y., Kobayashi, M. Systemic and local immune responses against Helicobacter pylori urease in patients with chronic gastritis: distinct IgA and IgG productive sites. Gut 43: 168-175, 1998.
4. Chen, M., Shirai, M., Liu, Z., Arichi, T., Takahashi, H., Nishioka, M. Efficient class II MHC presentation of endogenously synthesized structural proteins of hepatitis C virus by EVB-transformed B lymphoblastoid cell lines. J.Virol. 72: 8301-8308, 1998.
5. Ohashi, T., Kubo, M., Kato, H., Iwamoto, A., Takahashi, H., Fujii, M., Kannagi, M. Role of class I major histocompatibility complex-restricted and -unrestricted suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication CD8+ T lymphocytes. J.Gen.Virol. 80: 209-216, 1999.
6. Shirai, M., Arichi, T., Chen, M., Nishioka, M., Ikeda, K., Takahashi, H., et al.. T cell recognition of hypervariable region-1 from hepatitis C virus envelope protein with multiple class II MHC molecules in mice and humans: Preferential help for induction of antibodies to the hypervariable region. J. Immunol. 162: 568-576, 1999.
7. Terabe, M., Hatabu, T., Takahashi, H., Onodera, T., Matsumoto, Y. Leishmania amazonensis infection in nude mice. Exp. Animals., (in press).
8. Nakatsuka, K., Sugiyama, H., Nakagawa, Y., Takahashi, H. Purification of antigenic peptide from murine hepatoma cells recognized by class-I major histocompatibility complex molecule-restricted cytotoxic T-lymphocytes induced with B7-1-gene transfected hepatoma cell. J. Hepatol. (in press).
9. 高橋秀実：生体防御機構としての免疫システム (10) 臓器移植と免疫抑制. 治療 80: 161-166, 1998.
10. 高橋秀実：可溶性抗原ペプチドによるキラー T 細胞の抑制. 臨床免疫 30: 139-145, 1998.
11. 高橋秀実：微生物と生体応答. 日本医科大学雑誌 65: 127-134, 1998.
12. 二神生爾、高橋秀実、大橋和史、鷹取美雪、辰口篤志、廣田 薫、小林正文：胃炎の慢性化の機序について. 消化器科 26: 41-46, 1998.
13. 高橋秀実：生体防御機構としての免疫システム (11) 免疫反応としてのアレルギー. 治療 80: 1447-1453, 1998.
14. 高橋めぐみ、高橋秀実：感染とサイトカイン. CLINICAL NEUROSCIENCE 44: 396-398, 1998.
15. 渡理英二、高橋秀実：エイズワクチン研究の現状. 臨床と微生物 25: 351-354, 1998.
16. 高橋秀実：ウイルスに対する免疫と持続感染 1.ウイルスに対する免疫防御機構. 治療学 32: 615-621, 1998.
17. 高橋秀実：成分ワクチンの新たな展開：DNA ワクチンの可能性. 臨床と微生物 25: 771-778, 1998.
18. 高橋秀実：DNA ワクチン-ワクチン史における新たな展開. Immunology Frontier 8: 359-365, 1998.
19. 高橋秀実：DNA ワクチンによる免疫誘導. ウイルス 48: 201-210, 1998.
20. 高橋秀実：DNA ワクチン:その実体と可能性. 医学のあゆみ, 189, (1999 印刷中).

2.口頭発表

1. 高橋秀実：HIV に対する細胞性免疫の制御. 第 598 回京都大学ウイルス研究所セミナー 1998 年 1 月 28 日
2. 高橋秀実：ウイルスと宿主との攻防—共存への模索. 東京大学公開シンポジウム「ホメオスタシスの現在」1998 年 2 月 28 日
3. Takahashi, H., Yohko Nakagawa, Yoshihiko Norose, Megumi Takahashi, Kyoko Nohtomi, Masako Toda, Sakaguchi Masahiro, Yutaka Takebe: Effect and analysis of DNA vaccination to prime HIV-1 specific CD8+CTL using gene gun method. Japan-US Cooperative Medical Science Program: The 10th Joint Scientific Meeting of AIDS March 18~20, 1998.
4. 高橋秀実：エイズウイルス感染に対する細胞性免疫応答とその賦活. 日本産婦人科感染症研究会 1998 年 7 月 4 日
5. Kumagai, Y., Takahashi, H. : Polyvalent V3 epitope-grafted immunoglobulin with the high V3-antigen presenting efficacy. The 10th International Congress of Immunology. November 1 ~ 6, 1998.
6. Takahashi, H. : Activation of host defence mechanism against HIV: The future prospects of HIV vaccine development. AIDS International Symposium November 8, 1998.
7. 高橋秀実：ヘリコバクター・ピロリと胃病変：ウレアーゼに対する免疫応答との関連. 第 80 回日本細菌学会関東支部総会 199

- 8年11月25日～26日
8. 高橋秀実、中川洋子、野呂瀬嘉彦、納富香子、草川茂、戸田雅子、阪口雅弘、武部豊：Gene Gun を用いた HIV-1 env 遺伝子による特異的 CTL の誘導. 第12回日本エイズ学会総会 1998年12月1日～2日
 9. 高橋秀実：Damage of CD8+T cells and HIV pathogenesis. 第28回日本免疫学会総会 1998年12月2日～4日
 10. 中川洋子、清水真澄、本間季里、竹下俊行、高橋秀実：HIV-env 抗原特異的キラーT細胞の認識エピトープに関する研究—細胞外 processing の可能性について(II). 第28回日本免疫学会総会 1998年12月2日～4日
 11. 熊谷善博、沢田信一郎、清島保江、大脇敦子、高橋秀実：抗体超可変部に多価に表現した HIV-1 V3 エピトープを利用した gp120 とコレセプター相互作用の解析. 第28回日本免疫学会総会 1998年12月2日～4日
 12. 高橋めぐみ、中川洋子、渡理英二、高橋秀実：浮遊ペプチド抗原によるキラーT細胞のキラー活性抑制の機序：(I) IL-2 レセプターを介したシグナル伝達抑制の可能性. 第28回日本免疫学会総会 1998年12月2日～4日
 13. 横須賀忠、高瀬完、荒瀬尚、高橋秀実、斉藤隆：単一の抗原ペプチドによる TCR の選択性. 第28回日本免疫学会総会 1998年12月2日～4日
 14. 中塚雄久、杉山弘高、清水真澄、中川洋子、高橋秀実：マウス肝細胞癌特異的 CTL が認識する class I MHC 分子拘束性 peptide の解析. 第28回日本免疫学会総会 1998年12月2日～4日
 15. 高橋秀実、二神生爾、野呂瀬嘉彦、廣田薫、小林正文：Helicobacter pylori 感染マウス由来 urease に対する IgA, IgG 抗体産生と胃炎慢性化との関連. 第28回日本免疫学会総会 1998年12月2日～4日
 16. Takahashi, H.: Induction of HIV specific cellular immunity by HIV-DNA using gene gun. France-Japan AIDS Research Meeting, December 4 ~ 55, 1998.
 17. Takahashi, H. ,Yohko Nakagawa, Yoshihiko Norose, Megumi Takahashi, Kyoko Nohtomi, Masako Toda, Sakaguchi Masahiro, Yutaka Takebe:Dendritic cells as a major target to prime HIV-specific CD8+CTL by HIV-DNA plasmid using gene gun. Japan-USCooperative Medical Science Program: The 11th Joint Scientific Meeting of AIDS. March 17~19, 1999.
 18. Takahashi, H.: Importance and elicitation of cellular immunity to HIV: An major target for vaccine development. International AIDS Symposium on "Frontiers of HIV/AIDS Research" March 20, 1999.

14. HIV クワシスピーシスと免疫応答

分担研究者 松下 修三 (熊本大学エイズ学研究センター病態制御分野)

研究要旨 我々は昨年までに交叉中和活性を示す単クローン抗体による分離株の中和が病状の進行に伴って困難となった症例について検索し、その HIV クワシスピーシスが急激に変化していたことを報告した。主要中和領域(PND)のアミノ酸配列をたどると tip 配列の両側の4個所を含む5個所に変異があり、トロピズムにも変化が見られた。この PND の変化に対応するペプチドをアミノ酸1個ずつあるいは2個ずつ置き換えたものとして合成して反応性を調べると、tip 配列の両側の置換により血清抗体の反応は低下した。すなわち、IGPGR の両側のアミノ酸の置換が in vivo におけるエスケープミュータントの選択に重要であると考えられた。現在このような中和抗体からのエスケープ変異を抑制する免疫強化が可能かどうか検討中である。

A. 研究目的

HIV 感染症に対する免疫療法の開発に向けた基礎研究として、HIV 感染症例における抗 HIV 免疫応答を解析している。HIV は生体内ではお互いに似ているが少しずつ異なる集団(クワシスピーシス、準種)として存在することが知られている。クワシスピーシスとしての病原体を抑制する免疫応答を明らかにしそれに対する感染予防～治療法を確立する。

B. 研究方法

広範囲の HIV 臨床分離株の V3 に反応し、感染を阻止するヒト型化モノクローナル抗体 RC25 の存在下に感染者由来の末梢血単核球(Peripheral blood mononuclear cell; PBMC)より CD8 を除いた細胞を抗 CD3 抗体で刺激して培養し、上澄中の P24 抗原を測定して中和活性を判定した。感染者の血清より、RT-PCR にて gp120 の V3 部分を増幅し、クローニングして主要中和決定領域(PND; principal neutralizing determinant)の配列を決定した。PND のアミノ酸配列に基づき同一症例より、92~93年に分離されたウイルスを A 型、95年に分離されたウイルスを B 型として合成ペプチド[A 型(AFY)と B 型(VYY)]を合成した。これらのペプチドおよびリコンビナント gp120(IIIB)や MN 株の V3 に対する抗体価を ELISA にて測定した。血清の中和活性は血漿(1:50 希釈)存在下に(A)AFY, (B)VYY 株及び MN 株について CD8 細胞を除去した PBMC を標的細胞として調べた。3033 培養 tube で 8 日目の上澄中の P24 抗原を測定した。A 株の PND シークエンスをもとにして B 株の変異アミノ酸に1つずつ置換した PND ペプチドと2つずつ置換した

PND ペプチドを計 10 本作製し、A クワシスピーシスのみが存在した 93 年の血漿 IgG の反応を調べた。

C. 研究結果

広範囲の HIV 分離株を中和する単クローン抗体 RC25 の存在下又はコントロール抗体の存在下に CD8+細胞を除去した HIV 感染者末梢血単核球を培養した。培養 11 日後には培養細胞の 1/3 を分け CD8+細胞を除き活性化された末梢血リンパ球を加えて共培養した。培養開始後 17 日~19 日目と、共培養後 7 日目(CT)の上澄中の p24 抗原を測定した。1993 年の末梢血では 240mg/ml の RC25 存在下に HIV 感染の完全な中和が得られたが、1995 年の 12 月の実験では全く中和はみられなかった。1993 年に分離した分離株 A は合胞体を形成せず T 細胞株に感染しない株(NSI/MT virus; non-syncytia inducing/macrophage tropic virus)でエンベロープ V3 ドメインの主要中和決定部位 (PND; principal neutralizing determinant)のアミノ酸配列は CTRPNNNTRKSINIGPGRAFYTTGQIIGDIRQAC であった。一方、1995 年 12 月以降に分離できた分離株 B は分離株 A から S11R, N13T, I14L, A19V, D29N の変異とこれにさらに F20Y の変異の加わった株で合胞体を形成し T 細胞株に感染する株(SI/TT virus; syncytia inducing/ T-cell line tropic virus)であった。これらの変異がいつ起こったのか?これらの変化は連続して起こったのか?などの疑問点を調べるために経時的に末梢血中のウイルスクワシスピーシスを調べた。1993 年 12 月に突然 B 型のウイルスが出現し、特に 1994 年以後はこれが多数を示すようになってい

る。これらの変化と臨床症状の関連を明らかにするために臨床経過とウイルスクワシスピーシスの変化を比較した。A型からB型への変化はAZT単剤投与下におこり、とくに症状やCD4の変化はなかったが、B型ウイルスの出現以降免疫不全の進行が見られた。A型ウイルスのPND配列をもつペプチド(AFY)とB型のPND配列をもつペプチド(VYY)に加え、リコンビナントgp120、MN型PNDペプチド(MN)、IIIB型PNDペプチド(NNT24)、さらにコントロールとしてホモロジーの低い分離株KMTのPNDペプチド(KMT)及びHIV-2 RODのPNDペプチド(NKT25ROD)を合成し、これらに対する血清抗体の反応をELISAにて検索した。gp120やMNペプチドに対する中和抗体は死亡するまではほぼ同等の力価を保っていたが、A型ウイルスに対する抗体はB型の出現した1994年以降低下した。一方、B型に対する抗体の出現はみられなかった。また、AからBへの変化はA型のペプチドに対する抗体が十分存在している状況で起こっていることがわかった。AとBの臨床分離株および実験室株であるMN株に対する血清の中和抗体活性を調べたところ、Aに対しては94年の血清は中和能が認められたが、95年には活性が低下していた。一方、Bに対する中和は全く認められなかった。MN株に対しては一貫して中和活性が認められた。AとBのPNDのアミノ酸変化で、中和抗体の認識に重要と考えられる4アミノ酸に注目し反応を調べた。S11R又はN13TとA19Vの2つの変異を伴うペプチドに対する血清の反応が低下していた。これらよりin vivoにおける中和エスケープミュータントの出現にはPNDのtip配列であるIGPGRの両側の配列の変化が重要であることがわかった。現在、Bクワシスピーシスの出現を抑制できるような免疫が誘導可能かどうか検討中である。

D. 考察

本症例の免疫不全の進行には中和エスケープミュータントの出現が関連していると考えられるが、PND領域のtip部分であるIGPGRの両側のアミノ酸の変化が重要な影響を及ぼしているN端例のS11RはまたCXCR4をコレセプターとして使用しうるようになる変化であり、中和抗体からのエスケープと宿主域の拡大がいきなり起こったと考えられる。

E. 結論

生体内でのHIVの増殖を効果的に抑制するためには現在使用可能な複数の抗ウイルス剤による多剤併用療法を行いながら、細胞性免疫と液性免疫の両方を強化する方法を開発していく必要がある。エスケープ変異株の増殖を阻止するためにはどのような免疫療法が可能であるか現在検討中である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Y. Hakata, T. Umemoto, S. Matsushita, H. Shida: Involvement of human CRM1 (Exportin 1) in the export and multimerization of the Rex protein of the human T-cell leukemia virus type 1. *J. Virol.*, 72: 6602-6607, 1998.
- 2) S. Shoji, K. Kazuchika, A. Ogata, K. Yamataka, K. Tachibana, R. Mukai, A. Uda, K. Harano, S. Matsushita, S. Misumi: An allisteric drug, o'-bismyristoyl thiamine disulfide, suppresses HIV-1 replication through prevention of nuclear translocation of both HIV-1 tat and NF- κ B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 249, 745-753, 1998.
- 3) J. Wang, K. Harada, S. Matsushita, S. Matsumi, Y. Zhang, T. Shioda, Y. Nagai, and K. Matsushita: IL-4 and a glucocorticoid up-regulate CXCR4 expression on human CD4+ T lymphocytes and enhance HIV-1 replication. *J. of Leukocyte Biology.*, 64:642-649, 1998.

2. 学会発表

- 1) 木村哲也、村上利夫、松見信太郎、樋口浩文、江田康幸、松下修三: HIVクワシスピーシスと中和抗体. 第12回日本エイズ学会. 12.1-2.1998. 東京
- 2) 松下修三、谷口 泉、松見信太郎、木村哲也、満屋裕明: 多剤併用療法(HAART療法): 臨床的耐性、耐性変異およびサルベージ療法への反応性についての熊本大学での経験. 第12回日本エイズ学会. 12.1-2.1998. 東京.
- 3) 松見信太郎、前田洋助、木村哲也、松下修三: Th1細胞またはTh2細胞を分化誘導するサイトカイン、IL-12とIL-4のHIV-1特異的CTL活性に対する効果. 第12回日本エイズ学会. 12.1-2.1998. 東京.
- 4) Matsumi S, Maeda Y, Matsushita S. Effect of the Th1 and Th2 stimulatory cytokines, IL-12 and IL-14, on HIV-1 specific CTL activity. 12th World AIDS Conference Geneva, June 28-July 3, 1998, Geneva
- 5) Matsushita S, Kimura T, Yoshimura K, Matsumi S, Tokiyoshi S, Eda Y. HIV quasispecies and neutralizing antibody. 1998 Meeting of the Institute of Human Virology. August 27, 1998. Baltimore, MD.

15. CTL による HIV-1 の認識と排除に関する研究

分担研究者 滝口雅文 (熊本大学エイズ学研究センター・ウイルス制御分野)

研究要旨 CTL による HIV-1 の認識を明らかにするために、AIDS の発症を遅らせる因子と考えられている HLA-B51 が提示する HIV-1 CTL エピトープをリバーシ・イムノジェネティックス法を用いて明らかにした。39 種類の 8-mer から 11-mer の HLA-B*5101 結合 HIV-1 ペプチドを用いて、7 種類の HLA-B*5101 拘束性 CTL エピトープを同定した。これらのエピトープは変異性が少ないものが多かった。一方、HIV-1 の CTL からの逃避機序と考えられている Nef 蛋白による HLA クラス I 分子の Down-regulation による CTL 認識の効果を調べた。その結果、NL4-3 株を感染させた細胞は IIB 株 (Nef 欠損株) を感染させた細胞と比べて、HLA クラス I の細胞表面の発現が低下しており、CTL による認識も低下していた。このことから Nef による HLA クラス I の細胞表面への発現の低下によって、CTL の認識が低下したと考えられた。

A. 研究目的

CTL による HIV-1 の認識を明らかにするためにリバーシ・イムノジェネティックス法を用いて、AIDS の発症を遅らせる因子として知られている HLA-B51 が提示する HIV-1 CTL エピトープを同定する。また HIV-1 の CTL からの逃避機序の 1 つとして考えられている、Nef による HLA クラス I の down-regulation による抗原提示の障害があるかを、NL4-3 と Nef 欠損株 IIB を細胞に感染させ、CTL クローンを用いて調べた。

B. 研究方法

(1) HLA-B*5101 結合 HIV-1 ペプチドの同定

HLA-B*5101 結合ペプチドモチーフに一致した 8-mer から 11-mer のシーケンスを HIV-1 SF2 株より抜き出し、ペプチドを合成する。これを用いて、RMA-S-B*5101 細胞を用いた HLA-B*5101 stabilization assay により、HLA-B*5101 ペプチドを同定する。

(2) HLA-B51 拘束性、HIV-1 特異的 CTL の誘導

3 人の HLA-B51 をもった HIV-1 感染者の末梢血リンパ球を、HLA-B*5101 結合ペプチドで刺激し、4 週間培養後特異的 CTL が誘導されているかを調べる。

(3) 特異的 CTL クローンをを用いた CTL エピトープの同定

特異的 CTL が誘導できたペプチドに対して CTL クローンを作製し、これを用いて HIV-1 ・ワクチニアリコンピナントウイルスを感染させた細胞を傷害するのを確認する事

により、CTL エピトープであるかを明らかにする。

(4) Nef(+)および Nef(-) HIV-1 感染 T1 細胞の HLA クラス I 抗原の細胞表面の発現

NL4-3 および IIB 株を HLA-B51 陽性 T 細胞株 T1 に感染させ、感染率を p24 特異的抗体を用いて、フローサイトメトリーを調べるとともに、HLA クラス I の細胞表面の発現を抗 HLA クラス I 抗体を用いて調べる。

(5) Nef(+)および Nef(-) HIV-1 感染 T1 細胞に対する HLA-B51 拘束性 HIV-1 特異的 CTL クローンの認識

NL4-3 および IIB の T1 に対する感染率が上がった時点で、CTL クローンをを用いて細胞傷害活性を 51Cr releasing assay によって調べる。

C. 研究成果

(1) HLA-B*5101 拘束性 HIV-1 特異的 CTL エピトープの同定

HIV-1 SF 株のアミノ酸シーケンスから、HLA-B*5101 結合モチーフのアンカー部位をもった 8-mer から 11-mer の 175 種類のシーケンスを抜き出し、ペプチドを合成した。合成したペプチドが、HLA-B*5101 分子に結合するかを RMA-S-B*5101 細胞をもちいて調べたところ、39 種類のペプチドが結合した。

次に 39 種類の HLA-B*5101 結合ペプチドを用いて、3 人の HLA-B51 をもった HIV-1 感染者の末梢血リンパ球を 4 回刺激し、4 週間培養後 CTL 活性を調べた。9 種類のペプチドに対して特異的 CTL が誘導できた。さらにこれらのペプチドに対して特異的な CTL クローンの作製し、これらのクローンが、

HIV-1・ワクチニアリコンビナントウイルスを感染させた細胞を傷害するかを調べたところ、7種類のペプチドに対してのクローンが特異的に細胞傷害を示した(表1)。このことから、これらの7種類のペプチドはHLA-B51が提示するエピトープであると確認できた。

(2) HIV-1感染細胞のCTLによる認識

HIV-1 NL4-3とIIIB(Nef欠損株)をT細胞株T1(B51陽性)に感染させて、HLAクラスI抗原の発現とCTLによる細胞傷害活性を調べた。感染後5日で、NL4-3を感染させたT1細胞では、軽度のHLAクラスI抗原の発現低下がみられた。一方IIIB感染細胞ではHLAクラスI抗原の低下が認められなかった。これらの細胞に対するHLA-B51拘束性CTLクローンの認識は、明らかにIIIB株感染細胞において低下していた。このことから、HIV-1感染細胞ではNef蛋白によりHLAクラスI抗原の細胞表面の発現の低下がおり、これによりCTLへの抗原提示が低下していると考えられた。

D. 考察

HLA-B51はAIDS発症を遅らせる因子として知られている。このようなHLA-クラスI分子では、HLA-B27、HLA-B57が知られているが、日本人ではこれらのHLAクラスI分子の頻度はきわめて低く、唯一HLA-B51が発症遅延の機序を調べる事ができるHLAクラスI抗原である。今回我々は7種類のHLA-B*5101によって提示されるCTLエピトープを同定したが、このうちPol由来の2種類のエピトープとGag由来の1種類のエピトープは、報告されているHIV-1間できわめて保存されていた。すでに報告されているHLA-B27およびHLA-B57のエピトープの多くが、変異性が少ない事が明らかになっており、この事より変異性が少ないエピトープが提示される事により安定したCTL活性を維持され、AIDS発症が遅れる事が示唆された。

HIV-1 Nef蛋白はHLAクラスI抗原の細胞表面への移行を障害する事が知られており、このことよりCTLエピトープのT細胞への提示が障害され、HIV-1がCTLから逃避す

る事が考えられる。我々はNefによる抗原提示の低下およびCTLによるHIV-1の認識低下がどの程度おきているかを調べるために、IIIB株(Nef欠損株)とNL4-3株を感染させた細胞に対するCTLクローンの細胞傷害活性を調べた。T細胞株であるT1細胞に対しては、IIIBを感染させたものに対してよりNL4-3を感染させたものに対しての方が、細胞傷害活性が低く、HLA-B51の発現低下が見られる事から、HLAクラスIの発現低下がCTLの細胞傷害活性を低下と考えられた。

E. 結論

(1) リバーシ・イムノジェネティックス法を用いて、AIDS発症を遅らせる因子として知られているHLA-B51が提示する7種類のHIV-1 CTLエピトープを同定した。これらのエピトープのうち3種類は変異性の少ないエピトープであり、変異性の少ないエピトープが提示され安定したCTL活性が維持される事により、AIDS発症が遅延する事が示唆された。

(2) IIIB株(Nef欠損株)とNL4-3株を感染させたT1細胞株の細胞表面上のHLAクラスIの発現とそれらの細胞に対するCTLクローンの細胞傷害活性の測定より、Nef蛋白による細胞表面へのHLAクラスI分子の輸送阻害によりHIV-1エピトープの抗原提示が低下する事が明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ikeda-Moore, Y., H. Tomiyama, M. Ibe, S. Oka, K. Miwa, Y. Kaneko and M. Takiguchi: Identification of a novel HLA-A24-restricted CTL epitope derived from HIV-1 Gag protein. *AIDS* 12: 2073-2074, 1998.
- 2) Kmiecik, D., I. Bednarek, M. Takiguchi, T. J. Wasik, J. Bratosiewicz, A. Wierzbicki, H. Tepler, J. Pientka, S. H. Hsu, Y. Kaneko and D. Kozbor: The effect of epitope variation on the profile of cytotoxic T lymphocyte responses to the HIV envelope glycoprotein. *Int. Immunol.* 10: 1789-1799, 1998.
- 3) Chujoh, Y., Y. Sobao, K. Miwa, Y. Kaneko and M. Takiguchi: The role of anchor residues in the binding of peptides to HLA-A*1101 molecules. *Tissue Antigens.* 52: 501-509, 1998.

- 4) Tomiyama, H., T. Sakaguchi, K. Miwa, S. Oka, A. Iwamoto, Y. Kaneko and M. Takiguchi: Identification of Multiple HIV-1 Epitopes presented by HLA-B*5101 Molecules. Hum. Immunol. in press.
- 5) Tomiyama, H., Y. Chujoh, T. Shioda, K. Miwa, S. Oka, Y. Kaneko and M. Takiguchi: Cytotoxic T-lymphocyte recognition of HLA-B*5101-restricted HIV-1 Rev epitope which is naturally processed in HIV-1 infected cells. AIDS. in press.

2. 学会発表

- 1) 富山宏子, 坂口隆, 三輪清志, 岡慎一, 岩本愛吉, 金子有太郎, 滝口雅文. HLA-B51 分子によって提示される HIV CTL エピトープの解析. 第 46 回日本ウイルス学会 (東京) 平成 10 年 10 月 12 日~14 日
- 2) 滝口雅文. 多数の HIV-1 由来のエピトープが CTL によって認識される. 第 28 回日本免疫学会総会, 学術集会 (神戸) 平成 10 年 12 月 2 日~4 日
- 3) 富山宏子, 坂口隆, 三輪清志, 岡慎一, 岩本愛吉, 金子有太郎, 滝口雅文. AIDS 発症を遅延させると考えられる HLA-B51 拘束性 HIV-1 CTL エピトープの解析. 第 28 回日本免疫学会総会, 学術集会 (神戸) 平成 10 年 12 月 2 日~4 日
- 4) 滝口雅文, 富山宏子, Moore 池田由紀, 伊部正明, 岡慎一, 三輪清志, 金子有太郎. HLA-A24 拘束性の新しい HIV-1 Gag · CTL エピトープの解析. 第 12 回日本エイズ学会総会 (東京) 平成 10 年 12 月 1 日~2 日
- 5) 富山宏子, 滝口雅文, 中條剛具, 三輪清志, 金子有太郎, 塩田達雄, 岡慎一. HLA-B51 拘束性の HIV-1 Rev 由来の CTL エピトープの解析. 第 12 回日本エイズ学会総会 (東京) 平成 10 年 12 月 1 日~2 日

表1 HLA-B*5101拘束性CTLクローンの認識

peptides	clone	C1R		C1R-B*5101		C1R-B*5101	
		vac W*	vac R**	vac W	vac R	peptide-	peptide+
SF2-Pol-268-8	SF2-Pol-268-8-633	1.3***	2.6	2.5	14.0	-3.9	69.5
SF2-Pol-283-8	SF2-Pol-283-8-54	0.0	1.2	18.0	29.9	2.3	67.4
	SF2-Pol-283-8-61	0.0	2.5	13.2	27.2	0.7	65.2
SF2-Pol-306-9	SF2-Pol-306-9-47	5.6	2.3	10.9	28.7	5.2	66.3
SF2-Pol-743-9	SF2-Pol-743-9-13	0.0	0.0	8.4	25.5	0.5	63.2
SF2-Gag-327-9	SF2-Gag-327-9-101	7.9	3.7	-1.0	21.8	3.1	87.0
	SF2-Gag-327-9-122	7.3	2.4	3.6	26.2	1.8	75.6
SF2-Env-413-9	SF2-Env-413-9-246	0.9	0.0	5.8	59.7	4.9	93.9
	SF2-Env-413-9-335	1.2	0.4	7.6	59.8	8.4	90.2
SF2-Rev-71-11	SF2-Rev-71-11-1	4.6	-4.0	-0.2	15.1	1.2	84.6
	SF2-Rev-71-11-7	6.2	-2.7	0.0	10.3	5.5	91.3

* Wild type vaccinia virus

** HIV-1 recombinant vaccinia virus

*** % specific lysis at 0.5:1 (SF2-Pol-283-8 specific CTL clones) or 2:1 (CTL clones specific for other peptides) of effector target ratio

16. 単一エピトープによるCD4陽性T細胞感作はレトロウイルス感染細胞を早期に排除し免疫抑制を防止する

分担研究者： 宮澤正顕（近畿大学医学部免疫学教室）

研究協力者： 丹羽淳子（近畿大学医学部免疫学教室）

研究協力者： 上西博英（農林水産省畜産試験場）

研究要旨： 我々がフレンド白血病レトロウイルスenv遺伝子産物上に同定したCD4陽性Tリンパ球認識抗原エピトープは、微量の一回投与で極めて強力な感染防御能を誘導する。この単一エピトープワクチンの有効性の機序を解析した。その結果、1) 最初に同定した18merのエピトープからN-末のアミノ酸を順次削除すると、CD4陽性T細胞活性可能の低下と感染防御能の低下が同時に起こった。2) この単一CD4T細胞エピトープワクチンにより免疫された動物の体内では、レトロウイルス感染後CD8陽性T細胞が活性化しており、感染防御にはCD8陽性T細胞の存在が必須であった。3) ペプチドワクチンで免疫した動物ではレトロウイルス感染後に生じるCD4/CD8T細胞比の低下が防止され、ウイルス感染細胞のMHC class I 抗原発現が増加した。

A. 研究目的

HIVの持続及び急性感染者において、HIV抗原特異的なCD4陽性Tリンパ球の増殖反応と血中からのウイルス排除とが相関することが報告され(Rosenberg, E. S. et al. *Science* 278: 1447-50, 1997)、HIV感染症の免疫療法及びワクチンによる予防にCD4陽性T細胞の活性化が重要と考えられるようになった。

フレンド白血病レトロウイルス複合体(FV)は、免疫系の完成した成熟マウスへの接種により重篤な免疫不全症を伴う致死性の赤白血病を誘発する。FVは静脈内接種で感染し、感受性マウスは極微量のウイルス接種で確実に死に至るほか、感染マウスから性行為を介して伝搬することも証明されており、ヒトレトロウイルス感染に対する宿主免疫応答解析の有効なモデルとなりうる。

我々は長年にわたり、FV感染に対する宿主免疫反応の遺伝的制御機構と、免疫系の認識するウイルス抗原エピトープ構造を解析してきた。今年度は、我々が同定しその感染防御における有効性を証明してきたフレンド白血病レトロウイルスenv遺伝子産物上のCD4陽性T細胞認識エピトープについて、その作用メカニズムを詳細に解析し、レトロウイルス感染防御ワクチンの備えるべき要件を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

FVのenv遺伝子産物上に我々が同定し(Iwashiro, M. et al. *J. Virol.* 68: 4921-26, 1994) その感染防御に於ける有効性を証明した(Miyazawa, M. et al. *J. Immunol.* 155: 748-758, 1995) 18merのCD4陽性T細胞認識エピトープ

プ(ペプチド i)について、その最小有効構造を同定するため、N-末から順次アミノ酸残基を欠落させた、或いは 18merのまま で順次 C-末側に向かってアミノ酸配列をずらしたペプチドを、固相Fmoc法により合成し、HPLCで精製した。T細胞クローンの増殖反応は、同系マウス脾細胞を抗原提示細胞とし、³H-チミジンの取り込みにより計測した。

実験に用いた (BALB/c × C57BL/6)F₁ (CB6F₁)マウス (H-2^{dh}) は、15 spleen-focus forming units (SFFU)のFV接種で全ての個体が60日以内に、また 150 SFFUの投与で全個体が50日以内に死亡する。β2ミクログロブリン遺伝子ノックアウトマウスは、BALB/cの遺伝的背景を持つものとC57BL/6の遺伝的背景を持つものを The Jackson Laboratoryより購入し、交配によりF₁を得た。マウスの免疫に当たっては、合成ペプチドを完全 Freund アジュバント(CFA)とともにエマルジョンとし、1匹当たり 100μlを皮下数カ所に分けて接種した。免疫したマウスには4週間後に 150 SFFUのFVを静脈内接種し、経時的に触診を行って脾腫の有無を調べるとともに、生存個体数を毎日確認し、死亡した個体は 12時間以内に解剖して脾重量を測定した。

またウイルス感染マウスの脾細胞を採取し、抗CD4、抗CD8、抗MHC class I (H2 D) 抗体

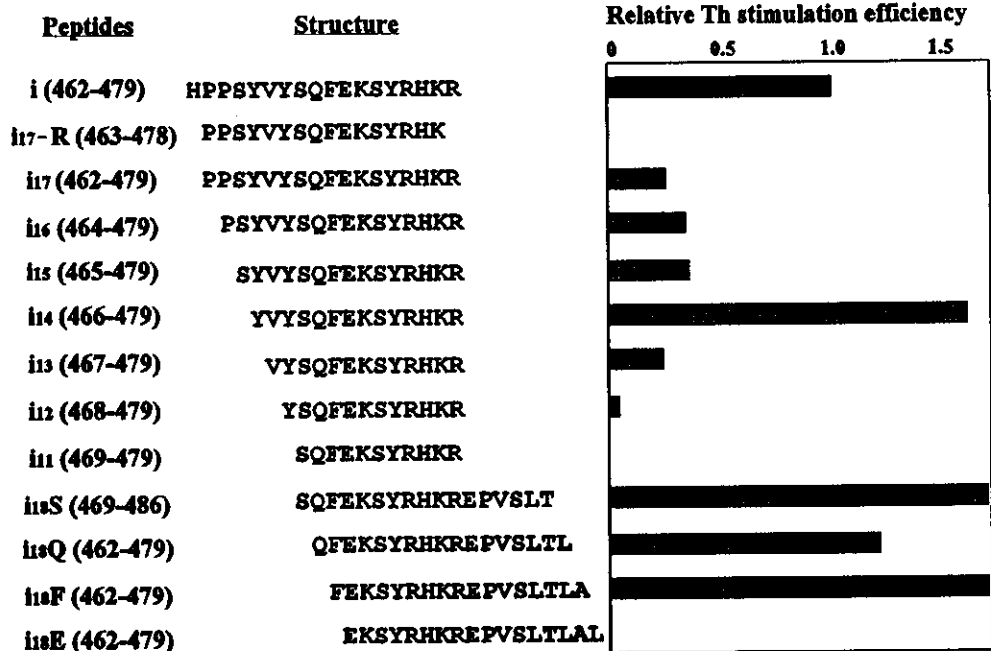


図 1. フレンド白血病レトロウイルス *env* 遺伝子産物上の CD4 陽性 T 細胞認識エピトープと、その改変ペプチドに対する T 細胞クローンの反応性。

で染色して蛍光セルソータ(FACS)解析を行うと共に、抗TER-119抗体による染色で赤芽球数を、抗CD69抗体でTリンパ球の活性化を、抗FV *env* 遺伝子産物抗体 720 (Robertson M. N. et al. *J. Virol. Methods* 34:255-271, 1991) でフレンド白血病ウイルス感染細胞数を調べた。

C. 研究結果

マウス一匹当たり 1μgの一回投与により、CB6F₁マウスでフレンドウイルスに対するほぼ完璧な感染防御効果を示す *env* 遺伝子産物上の CD4 陽性 T 細胞認識エピトープ "i" (18mer) について、より短い、或いは C-末側へフレームをずらしたペプチドを合成し、ヘルパー T 細胞クローンの反応性を解析した(図 1)。C-末の Arg を固定して N-末側を順次削除すると、13mer 迄は T 細胞クローンの反応性がほぼ保たれたが、12mer ではこれが著しく低下した。また、CB6F₁ マウスを免疫後に FV を接種

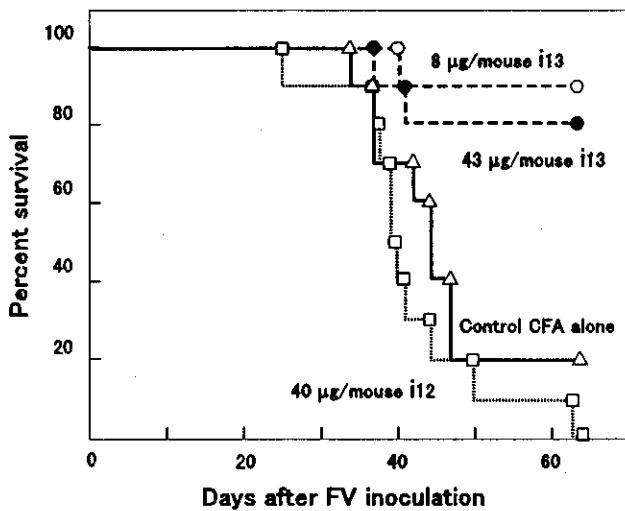


図2. ペプチド i (図 1) より N-末側のアミノ酸を削除した 13mer (i13) 及び 12mer (i12) の感染防御効果

して同じ 13mer と 12mer の感染防御免疫誘導能を較べると、13mer はほぼ完璧な感染防御効果を示したが、12mer はモル比で 10 倍量を用いても効果がなかった (図 2)。

これら結果は、FV に対する感染防御効果は CD4 陽性 T 細胞の単独感作により実現されており、18mer に含まれていた可能性のあるそれ以外のエピトープの作用によるものではない

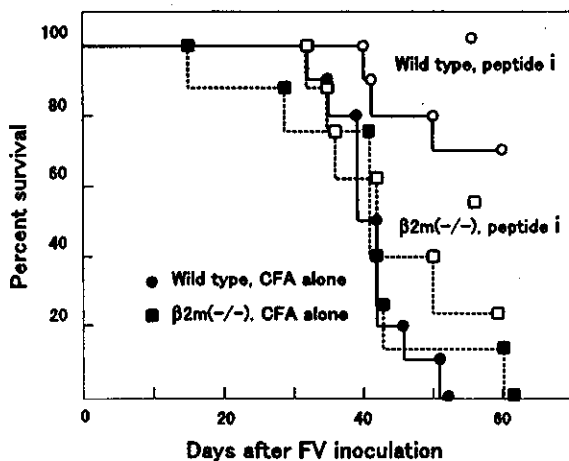


図3. $\beta 2$ ミクロglobulin 遺伝子ノックアウトマウスに於ける CD4 陽性 T 細胞エピトープペプチド免疫効果の欠如

ことを示唆する。そこで、18mer の i ペプチド投与による感染防御効果が、免疫マウスの体内で CD4 陽性 T 細胞のみによって担われているか否かを検討した。CD4 陽性 T 細胞エピトープを単独で含む i ペプチドで免疫した場合の感染防御効果は、MHC class I 分子の発現を欠く $\beta 2$ ミクロglobulin 遺伝子ノックアウトマウスでは失われた (図 3)。既報の T 細胞サブセット除去実験と合わせ、効果細胞としての CD8 陽性 T 細胞の必要性がわかる。

実際、CD4 陽性 T 細胞エピトープで免疫されたマウスにフレンドウイルスを接種すると、CD8 陽性 T 細胞に早期活性化マーカー CD69 の発現が増した。これに伴い、CD4 陽性 T 細胞認識エピトープで免疫されたマウスでは、無免疫のマウスと比較し、明らかに早期にウイルス感染細胞が排除された (図 4)。

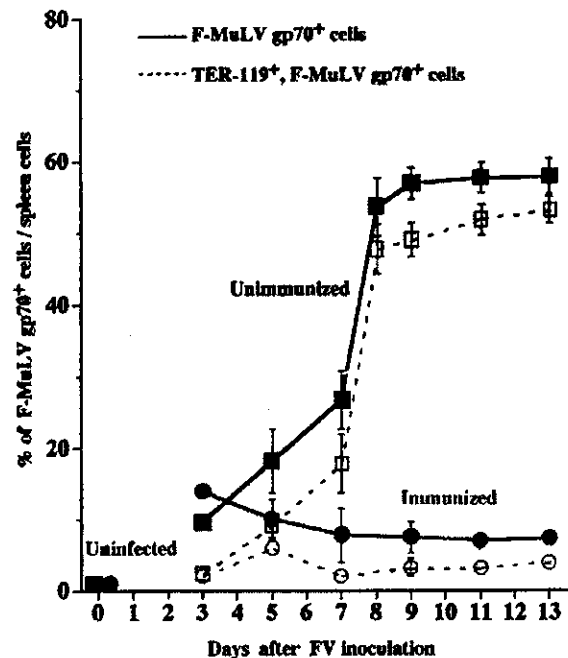


図4. ペプチド免疫後 FV を接種したマウスの脾細胞中に占めるウイルス抗原陽性細胞とウイルス抗原陽性赤芽球の割合 (未免疫感染マウスとの比較)。

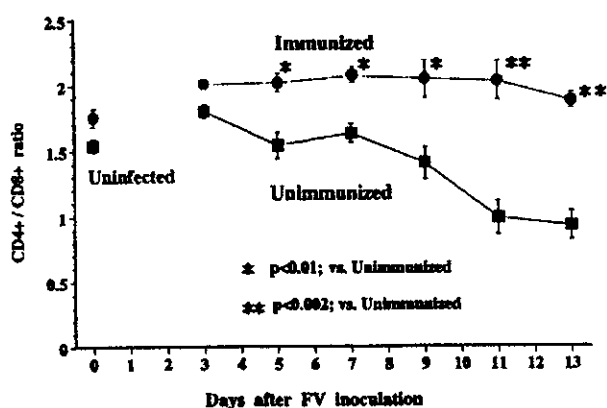


図5. 感染マウス脾細胞中のCD4陽性細胞とCD8陽性細胞の比率。無免疫で感染したマウスではこの比が次第に低下するが、ペプチド免疫マウスでは一定に保たれる。

フレンドウイルス感染マウスでは、感染の進行に伴って強い免疫抑制が起こり、ウイルス蛋白質以外の抗原に対する抗体産生能が低下することが知られている (Morrison, R. P. et al. *J. Exp. Med.* 163:301-314, 1986)。我々は今回、FV感染に伴って HIV感染と同様 CD4/CD8T細胞比の低下も起こることを確認した(図5)。ところが、単一CD4T細胞エ

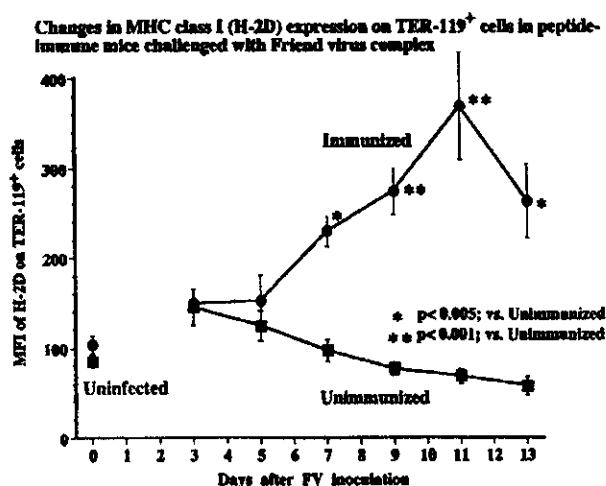


図6. フレンドウイルス感染マウスにおける赤芽球の MHC class I 発現量。無免疫の感染マウスでは低下する class I の発現が、ペプチド免疫マウスでは増加する。

トープで予め免疫しておく、CD4/CD8比の低下が阻止され(図5)、ウイルス感染細胞にも MHC class I 抗原の発現が増加する(図6)。前述したCD8陽性Tリンパ球に於ける早期活性化マーカーCD69の発現も、無免疫でFVを感染したマウスではウイルス接種後11日目で2%に低下するが、予めCD4陽性T細胞を iペプチドで感作しておいたマウスではFV感染後8日目で13%、11日目で14%と高値を保つ。

D. 考察

レトロウイルス感染に対する防御免疫反応には、これまでウイルス中和抗体とCD8陽性細胞傷害性Tリンパ球(CTL)の機能が最も重要と考えられてきた。このため、ヒトレトロウイルス感染に対するワクチン開発に当たっても、中和抗体とCTLの誘導に主眼がおかれている。しかしながら、今日までに実験動物或いは家畜で検討された多くのペプチドワクチンの中で、単一の中和抗体エピトープ或いはCTLエピトープが有効であったとされるものは極めて少数でしかない。むしろ、ペプチドワクチンでCTLは誘導されたが、感染防御には有効でなかったとの報告が目立つ。我々が今回実験に用いたフレンドウイルスの系でも、env遺伝子産物上のCTLエピトープは感染防御免疫に有効ではないことが示唆されている。

FV env遺伝子産物上のCD4陽性T細胞認識エピトープは、単独で感染防御に有効である。短縮ペプチドを用いた今回の実験結果から、この実験系ではペプチドワクチンによってCD4陽性Tリンパ球のみが選択的に感作されていると考えられる。しかしながら、β2ミクログロブリンノックアウトマウスの実験結果からも明らかな通り、実際のレトロウイルス感染防御に

はウイルス感染後にCD8陽性Tリンパ球が活性化されることが必要である。即ち、CD4陽性Tリンパ球を予め単独で感作しておくことにより、ウイルスの侵入に伴って急激なCD8陽性エフェクターT細胞の誘導が起こり、後者が体内から急速にウイルス感染細胞を排除したものと推測される。

この場合、CD4陽性T細胞そのものに感染細胞排除のエフェクター効果が無いことは、最近行っている免疫群から非免疫群へのTリンパ球サブセットの移入実験により確認された。一方、CD8陽性Tリンパ球には、確かにウイルス感染細胞排除に有効なエフェクター成分が含まれていることも明らかにしつつある。

尤も、CD4陽性Tリンパ球の作用は、CD8陽性Tリンパ球の活性化のみには留まらないと考えられる。実際、ペプチドワクチンによりCD4陽性T細胞が感作されていた動物では、ウイルス接種後の免疫抑制が防がれ、標的細胞でのMHC class I発現も増加した。

免疫抑制の防止と、MHC class I発現の増加が、CD8陽性T細胞の早期活性化によるウイルス感染細胞排除の結果であるのか、それとも免疫抑制の防止とMHC class I発現増加が、CD8陽性T細胞活性化と相俟って感染細胞の早期排除に働いたのかは今のところ明らかでない。恐らく両者は同時に進行し、相互に関連すると思われるが、ペプチド免疫マウスからウイルス接種時にCD4陽性Tリンパ球を完全に除去すると、無免疫マウスより早く死亡する事実から、CD4陽性Tリンパ球はCD8陽性Tリンパ球の活性化以上の役割を担っているものと推測される。現在、ペプチド免疫マウスでウイルス感染後にCD4陽性T細胞から産

生されるサイトカインを解析中であり、IFN- γ の重要性が明らかになりつつある。

E. 結論

単一エピトープのペプチドワクチンを用いて予めCD4陽性(ヘルパー)T細胞を感作しておく、レトロウイルス感染後CD8陽性T細胞を急速に活性化し、感染細胞を早期に排除できる。この際、レトロウイルス感染に伴って誘発される免疫抑制状態も回避でき、CD4/CD8比の低下を防止できると共に、感染細胞のMHC class I発現も増加する。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Tsumura, H., M. Miyazawa, S. Ogawa et al. Detection of endogenous retrovirus antigens in NOD mouse pancreatic beta-cells. *Lab. Anim.* 32:86-94, 1998.
2. Onoyama, H., Y. Saitoh, and M. Miyazawa: Tumor imaging. In: Delves. P. J. And I. M. Roitt, eds. *Encyclopedia of Immunology*, 2nd Ed., Academic Press, London 1998: pp2431-2435.
3. Iijima, H., M. Miyazawa, J. Sasaki et al. Expression and characterization of a very low density lipoprotein receptor variant lacking the O-linked sugar region generated by alternative splicing. *J. Biochem.* 124:747-755, 1998.
4. Ohashi, M. and A. Niwa. Production of eosinophil chemotactic factor by CD8⁺ T-cells in *Toxocara canis* infected mice. *Parasitol. Res.* 84:136-138, 1998.
5. Uenishi, H., N. Iwanami, H. Yamagishi et al. Induction of cross-reactivity in an endogenous viral peptide non-reactive to FBL-3 tumor-specific helper T-cell clones. *Microrbiol. Immunol.* 42:479-484, 1998.

6. Uenishi, H., N. Iwanami, K. Kuribayashi et al. Overlapping epitopes of Friend murine leukemia virus gag-encoded leader sequence recognized by single cytotoxic T-lymphocyte clones. *Immunol. Let.* **62**:33-38, 1998.
 7. Sakamoto, M., M. Miyazawa, S. Mori, and R. Fujisawa. Anti-cytoplasmic autoantibodies reactive with epithelial cells of the salivary gland in sera from patients with Sjögren's syndrome: their disease- and organ-specificities. *J. Oral Pathol. Med.* **28**:20-25, 1999.
 8. Okuda, H., M. Adachi, M. Miyazawa et al. Protein kinase C α augments anoikis in anchorage-dependent gastric cancer cells. *Oncogene*: in press, 1999.
 9. Miyazawa, M., Y. Yanai and M. Kurimoto. Squirrel monkey retrovirus (SMRV) sequence from an SMRV-negative cell line? *Submitted for publication*, 1999.
 10. Izuma, M., K. Kobayashi, M. Miyazawa et al. In vitro cytokine production of peripheral blood mononuclear cells in response to HCV core antigen stimulation during IFN- β treatment and its relevance to sCD8 and sCD30. *Submitted for publication*, 1999.
 11. Kanamasa, K., N. Ishida, M. Miyazawa et al. Suppression of cell proliferation during early phase after balloon injury by tissue plasminogen activator leads to minimal intimal hyperplasia in hypercholesterolemic rabbits. *Submitted for publication*, 1999.
 12. Niwa, A., M. Miyazawa, N. Iwanami et al. Immunization with a single CD4⁺ T-cell epitope protects mice against immunosuppressive retrovirus infection by inducing CD8⁺ effector cells. *Submitted for publication*, 1999.
 13. Miyazawa, M., C. Ishihara, H. Abe et al. Overcoming the *Rfv-3* gene-associated unresponsiveness to Friend retrovirus infection by immunization with a recombinant vaccinia virus expressing the *env* gene. *Submitted for publication*, 1999.
 14. 宮澤正顕. 分子相同性と自己免疫. *Mebio* **15**:48-54, 1998.
 15. 松村治雄、宮澤正顕. 自己免疫病の発症と細菌ストレス蛋白. *医学の歩み* **187**:251-254, 1998.
 16. 宮澤正顕. ウイルスと血管炎. *治療学* **33**:157-162, 1999.
2. 学会発表
 1. 岩波礼将、丹羽淳子、宮澤正顕 他. マウス白血病発症阻止効果を持つフレンドウイルスgag遺伝子産物上の抗原ペプチド. 第57回日本癌学会総会(横浜), 1998.
 2. 丹羽淳子、岩波礼将、宮澤正顕 他. 単一ヘルパーT細胞エピトープワクチンによるフレンド白血病の発症阻止機構. 第57回日本癌学会総会(横浜), 1998.
 3. 丹羽淳子、岩波礼将、宮澤正顕. 単一ヘルパーT細胞エピトープワクチンによるフレンド白血病発症阻止機構. 第28回日本免疫学会総会・学術集会(神戸), 1998.
 4. 橋本圭二、藤澤隆一、宮澤正顕 他. 精製モノクローナル抗gp70抗体一回静注による血小板減少症の誘発. 第28回日本免疫学会総会・学術集会(神戸), 1998.
 5. 田端信忠、橋本圭二、宮澤正顕 他. 精製抗gp70自己抗体静注による糸球体腎炎誘発機構. 第28回日本免疫学会総会・学術集会(神戸), 1998.

17. CD8 陽性 T 細胞による HIV 抑制の分類と病期による変化

研究協力者 神奈木 真理 (東京医科歯科大学医学系研究科免疫治療学講座教授)

要旨 無症候 HIV-1 キャリア(AC)末梢血 CD8 陽性リンパ球は、HIV-1 抑制作用を持ち、無症候期のウイルス量の低下に貢献していると考えられている。これまでに複数の機序が示唆されてきたが、関与が確認されているものは CTL による感染細胞傷害、CCケモカインによる M-tropic HIV-1 侵入阻害、機序不明の CD8 細胞による抑制である。我々は、これらが CD8 陽性細胞による HIV 抑制現象にどの程度貢献するのかを調べる目的で、まず MHC-I 拘束の有無によって抑制活性を区別して検出する実験系を作成した。次に可溶性因子が全体の抑制には部分的にしか関与しない事を確認した。最後に、HIV-1 感染の各ステージ患者についてこれらの活性を調べ、末梢 CD4 陽性細胞数が 50~200/ml の発症移行期には、MHC-I 非拘束性の CD8 陽性細胞の HIV 抑制能は、拘束性抑制に先行して減弱することを明らかにした。

A. 研究目的

本研究の目的は、AIDS 発症予防免疫治療法への応用を前提として、無症候 HIV 感染者 CD8 陽性 T 細胞による HIV 複製抑制の複数ある機序のうち、どれが臨床的重要性を持つのかを明らかにすることである。

B. 研究方法

1) 細胞とウイルス：末梢 CD4 陽性細胞数が 200/ml 以上の種々の HLA タイプを持つ無症候 HIV-1 感染者(AC)とから分離した末梢血単核球分画 (PBMC) を PHA で刺激後、約 1 週間 IL-2 存在下に培養し、CD4 陽性細胞除去分画を AC-CD8 細胞とした。非感染健康者由来の PBMC を同様に培養し CD8 陽性細胞除去分画を感染標的に使用した。細胞分画を得るためにモノクローナル抗体で処理された磁気ビーズを用いた。HIV に感受性の樹立細胞株として HTLV-I でトランスフォームした ILT-KK 細胞も感染標的にして用いた。一部の試験では、末梢 CD4 陽性細胞数が 50~200/ml、50/ml 以下の HIV-1 感染者由来 CD8 細胞を用いた。HIV-1 源として HIV-1 (LAI 株) に持続感染した MOLT-4 細胞の培養上清を用いた。

2) ウイルス産生量測定：CD4 陽性 PBMC に HIV-1 感染させ、洗浄し、HLA-A, B, C の一致するあるいは全く一致しない AC-CD8 とともに IL-2 を含む培地で 4~6 日間培養した。培養上清中のウイルスの定量には、ELISA 法による p24 抗原量測定をおこなった。

C. 研究成果

1) CD4 陽性 PBMC に試験管内で HIV-1 感染させ、AC 由来の CD8 陽性細胞と共培養したところ、HIV-1 産生量の低下が見られた。この抑制

は自己標的の場合に強い傾向があるが、全く MHC-I を共有しない標的に対しても有効性を示した。

2) 一方、HTLV-I トランスフォーム細胞株 ILT-KK 株に HIV-1 感染させ、AC 由来の CD8 陽性細胞と共培養したところ、MHC-I を共有する組み合わせの場合のみ抑制が認められた。即ち、PBMC に有効であった MHC-I 非拘束性の抑制は、ILT-KK 細胞株には無効であった。

3) これらの観察から、MHC-I 非拘束性の抑制は MHC-I の一致しない PBMC を標的とし、MHC-I 拘束性の抑制は ILT-KK を標的にすれば、別々に検出できることが分かった。(MHC-I を共有する PBMC に対しては両活性が有効であり、区別はできない。)

4) このような検出系を用いて、種々のステージにある HIV-1 感染者の CD8 陽性細胞の抑制能を調べた。その結果、末梢 CD4 陽性細胞数が 200 < の患者では MHC-I 拘束、非拘束性両活性とも保たれ、CD4 数が 50 > の患者では両者とも減弱していた。しかし、その中間の末梢 CD4 数 50 ~200 (AIDS 発症への移行期) の患者では、MHC-I 拘束性の抑制は保たれていたが非拘束性のものは減弱していた。

D. 考察

MHC-I 拘束の有無により、の CD8 陽性細胞の HIV-1 抑制能を分けることができた。しかし、MHC-I 非拘束性抑制だけでは試験管内の HIV-1 抑制は明らかに拘束性のものより劣っていた。

CTL 活性は HIV-1 感染の比較的後期まで保たれているが、AIDS 期には消失することが知られている。本研究の MHC-I 拘束性の活性が主に CTL によると仮定すると、末梢 CD4 陽性細胞数

が 50~200/ml の AIDS 発症への移行期には MHC-I 非拘束性活性の減弱が先行したことになる。

E. 結論

以上のことから、細胞接触を介する CTL 活性と MHC-I 非拘束性抑制活性はともに重要であり、両者の存在下ではじめて HIV 産生は効率良く抑えられ CD4 細胞数減少を阻止できると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) M. Kubo, Ohashi T., Fujii M., Oka S., Iwamoto S., Harada S., and Kannagi M. Abrogation of in vitro suppression of HIV-1 replication mediated by CD8+ T lymphocytes of asymptomatic HIV-1 carriers by staphylococcal enterotoxin B and phorbol esters through induction of TNF- α . *J. Virol.* 71:7560-7566, 1997.
- 2) T. Ohashi, M. Arai, H. Kato, M. Kubo, M. Fujii, N. Yamamoto, A. Iwamoto, M. Kannagi. High SDF-1 expression in HIV-1 carriers does not correlate with CD8+ T cell-mediated suppression of viral replication. *Virology.* 244: 467-472, 1998.
- 3) T. Ohashi, M. Kubo, H. Kato, A. Iwamoto, H. Takahashi, M. Fujii, and M. Kannagi. Role of class I major histocompatibility complex-restricted and -unrestricted suppression of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication by CD8+ T lymphocytes. *J. Gen. Virol.* 80:209-216, 1999.

2. 学会発表

- 1) 久保誠、増田貴夫、大橋貴、加藤第智、岩本愛吉、神奈木真理。試験管内 de novo および持続感染細胞に対する CD8 陽性 T 細胞介在性 HIV-1 抑制活性の MHC-I 拘束性による有効性の違い。第 12 回日本エイズ学会（東京）1998年12月。
- 2) 神奈木真理、大橋貴、久保誠、藤井雅寛、高橋秀実、岩本愛吉。HIV-1 感染者 CD8 陽性細胞によるウイルス抑制の MHC-I 拘束による分類とその役割。第 46 回日本ウイルス学会、（東京）1998年10月。

18. ヒト単球系細胞株 U937 およびその HHV6B 耐性変異株を用いた HIV-1 感染・増殖に関する宿主因子の研究

—HIV-1 の潜伏感染した U1 細胞からのウイルス再活性化における MAP キナーゼの関与—

研究協力者 天野富美夫 (国立感染症研究所・細胞化学部)

研究要旨 ヒト単球・マクロファージへの HIV-1 の感染および増殖に関する宿主因子について研究するため、HIV-1 が潜伏感染している U1 細胞に TNF α 、PMA、アラキドン酸等を添加して、HIV-1 の再活性化における細胞内のシグナル伝達系の変化をとくに MAP キナーゼに注目して調べた。その結果、ERK1/2 のリン酸化を介した活性化が示唆されたが、他の MAP キナーゼ系の JNK や p38 の活性化は余り顕著ではなかった。また、MAP キナーゼ阻害剤のうち、ERK1/2 を活性化するキナーゼである MEK1 の特異的な阻害剤である PD98059 は、細胞を障害せずに U1 細胞の再活性化を広く阻害した。一方、ラジカル除去剤である N-アセチルシステイン(NAC)は U1 からの HIV-1 再活性化に対して阻害的に作用したが、とりわけ ERK1/2 を強く活性化する PMA に対する阻害効果が強かった。U1 細胞の再活性化の制御という観点からは、ERK1/2 の活性化の抑制に焦点を当てることが重要であると考えられた。

A. 研究目的

ヒト単球・マクロファージへの HIV-1 の感染および増殖に関する宿主因子については不明な点が多く、同じウイルスが感染しても、宿主によって感受性が異なり、AIDS 発症までの経過に差が現れることが指摘されている。この点を研究するため、ヒト単球系細胞株 U937 およびその HHV6B 耐性変異株、ならびに U937 由来の HIV-1 潜伏感染細胞株、U1 細胞を用いて、HIV-1 の感染あるいは再活性化に関する宿主因子を生化学的に解析することを目的とする。本年度は特に、U1 細胞からの HIV-1 再活性化の過程における MAP キナーゼの関与について検討した。

B. 研究方法

(1) マクロファージ系細胞株と細胞培養

ヒト単球系細胞株、U937 由来の HIV-1 潜伏感染細胞株、U1 細胞を用いた。細胞は F12 培地に 10% FBS を添加した培地中で、プラスチックフラスコ (T-25, Falcon #3108) 内、CO₂ インキュベーター (5% CO₂, 37°C) で培養した。継代は毎週 2 回、細胞を 1/10 に希釈して行った。このほか、U937 細胞の親株ならびにヒト Tリンパ球系細胞株 MT-2 を用いた。これらの細胞培養も U1 細胞株と同様に行った。

(2) U1 細胞の再活性化

U1 細胞を 24 穴プレートに 1×10^5 cells/well/0.5 ml で播き、10-100 ng/ml TNF α または 10 nM PMA を添加して 37°C、4 日間、培養した。最後に、培養

上清を回収し、p24 の定量に用いた。HIV-1 の p24 抗原の検出は、ダイナボット社のキット、HIV 抗原・ELISA「アボット」によって定量した。また、再活性化の阻害剤としてプロテインキナーゼ等の阻害剤を用いる場合には、あらかじめ阻害剤を添加して 37°C、15 分間、加温した後、TNF α もしくは PMA を添加した。

(3) MAP キナーゼの活性化の分析

種々の細胞外刺激に応答して活性化することが知られ、最近、HIV-1 感染においても注目されつつある MAP キナーゼ (Mitogen-Activated Protein Kinases) について、U1 細胞における再活性化の初期過程において活性化が起こるか否かを、3 種類の MAP キナーゼ (ERK1/2, JNK, p38) のおのおのの活性化体でリン酸化型酵素にのみ特異的に反応する抗体 (NEN/Bio-Labs) を用いて、SDS-PAGE/Western blotting した細胞抽出液について反応させて検出した。なお、対照として、リン酸化の有無に拘わらず反応する抗体を用いて、それぞれの抽出液中の MAP キナーゼの全量を測定した。

(4) HIV-1NDK の感染

潜伏感染した HIV-1 の再活性化とは別に、HIV-1NDK を U937 もしくは MT-2 細胞に感染させ、感染細胞中のウイルス増殖における MAP キナーゼの役割を検討した。そのため、U937 あるいは MT-2 細胞 5×10^5 cells/0.05ml/tube で、HIV-1 を 100 TCID₅₀ で 37°C、1 時間、振盪しながら感染させ、培地で 3 回洗浄後、新鮮な培地に細胞を 5×10^4 cells

/mlとなるように懸濁した。これを24穴プレートに0.5 ml/wellでまき、それぞれの培養系にMAPキナーゼの阻害剤を添加して37℃、4日間、培養した。培養上清を回収しp24の定量を行った。

C. 研究結果

(1) U1細胞のHIV-1再活性化の初期過程におけるMAPキナーゼのリン酸化。

HIV-1の潜伏感染したヒト単球系細胞株U1細胞を、無添加(nothing)、あるいは100 ng/ml TNF α 、10nM PMAで処理し37℃、0-60分間、加温して反応を停止し、細胞を洗浄後細胞を抽出してSDS/Western blottingによって分析を行った。3種類のMAPキナーゼの活性化体(リン酸化型)に対する特異抗体(p-ERK1/2, p-p38, p-JNK)と、それぞれに対応するリン酸化、非リン酸化の両者を認識するMAPキナーゼの抗体(ERK1/2, p38, JNK)を反応させた。その結果、+noneでは、培地交換によってERK1/2が0 timeのレベルから一旦下がり、30分をピークに弱い活性化を起こし、60分には再び減少して元のレベルまで低下した。TNF α の添加によってこの変化は全体的に大きく減少し、30分において弱い一過性のリン酸化が起こり60分には再び低下した。また、PMAは7.5分で既に非常に強く活性化され15分をピークに30分まで続き、60分になって若干低下したものの引き続いて活性化状態が保たれた(図1)。

JNKのリン酸化は無添加およびTNF α 添加では全く観察されず、PMA添加によって7.5分からリン酸化され30分をピークにして60分には観察されなくなった。p38のリン酸化は0 timeのレベルから無添加群では30分まで変化が無く、60分で減少した。TNF α 添加ではこれよりもずっと弱く、時間的な変化が見られなかった。また、PMA添加では15分をピークに30分までリン酸化の上昇が見られたが60分目には非常に弱くなった。一方、いずれの条件下においても、対照のMAPキナーゼ全体のレベルはERK1/2, JNK, p38のどれもがほぼ一定であり、これらの結果から、リン酸化がある条件下で特異的に起こっていることが示された。

以上の結果、およびU1におけるHIV-1のp24産生がPMAで非常に強く誘導されることを考えると、ERK1/2の活性化がPMAによるシグナル伝達とHIV-1の再活性化にとって重要な意味を持つことが示唆された。しかし、TNF α 添加で誘導さ

れるHIV-1の再活性化と対応するMAPキナーゼのリン酸化の上昇はERK1/2の弱いリン酸化以外に認められなかった。

(2) MAPキナーゼ阻害剤によるU1細胞のHIV-1再活性化の調節。

TNF α あるいはPMAによるU1細胞のHIV-1再活性化におけるMAPキナーゼの関与を調べるため、MAPキナーゼカスケードのうち、(1)ERK1/2のリン酸化酵素であるMEK1の特異的な阻害剤であるPD98059を用いてERK1/2の経路を止める、(2)p38 MAPキナーゼの特異的阻害剤であるSB202190とその対照としての不活性化型アナログであるSB202474を用いて、p38 MAPキナーゼの経路を止める、ことによって、p24産生を指標にして影響を評価した。その結果、10 μ Mの濃度で、TNF α による再活性化はPD98059が30-50%阻害したが、SB202190は無効であった(図2)。これに対して、SB202474は、p38もERK1/2も阻害しないにも拘わらず、TNF α による再活性化を50-70%阻害した。

一方、PMAによる再活性化はPD98059で強く阻害された。逆に、SB202190で処理するとPMAによる再活性化が有意に上昇したが、この効果はSB202474では認められず、むしろ抑制的に働いた。これらの結果から、少なくともPMAによる再活性化はERK1/2の活性化を介しており、p38の関与は複雑であることが示唆された。図1の結果と併せると、TNF α もPMAもERK1/2の活性化を介してHIV-1の再活性化を引き起こしていることが示唆された。

(3) N-アセチルシステイン(NAC)によるU1細胞におけるHIV-1再活性化に及ぼす影響。

図1、2で、様々な刺激剤によるU1細胞の再活性化がERK1/2の活性化を介していることが示唆された。そこで、ERK1/2の下流にあるNF κ Bの活性化阻害剤として知られ、ラジカル除去作用のあるNACを添加して、U1細胞のHIV-1再活性化に及ぼす影響を調べた。その結果、10mMでは、いずれの刺激による再活性化も抑制されたが、低濃度ではPMAによる再活性化が最も強く抑制された(図3)。10mM程度のNACは人体にも毒性が少ないと言われているが、調べた限りではU1細胞の細胞障害性やアポトーシスは誘導しないものの、細胞増殖を抑制した。これらの結果から、1-3mMの、細胞増殖に影響を及ぼさない濃度でのNACの阻害作用が顕著であったPMAの経路が、

恐らく ERK1/2 と酸化ラジカルの産生を介した HIV-1 の再活性化に関与しているものと思われる。

(4) MAP キナーゼ阻害剤による U937 およびヒト T 細胞系培養株 MT-2 の HIV-1NDK の増殖に及ぼす影響。

次に、HIV-1 の感染したヒト単球あるいは T リンパ球における HIV-1 の増殖に及ぼす MAP キナーゼ阻害剤の影響を調べた。HIV-1NDK を感染させた直後にこれらの阻害剤を添加して影響を調べたところ、U937 における 4 日間のウイルス産生量は、1 μ M SB202474 によって 40%程度阻害されたが、SB202190 や PD98059 による阻害の為に高濃度(10 μ M)が必要であった(図 4)。一方、T 細胞株 MT-2 に対してはこれとは異なり、SB202190 のみが阻害を示し、PD98059 や SB202474 はウイルス産生を亢進した。これらの結果は、単球と T リンパ球とでは、HIV-1 の感染後における細胞内のシグナル伝達経路の利用形態が異なっていることを示唆している。また、HIV-1NDK の感染に関する限り、U937 と U1 において 10 μ M PD98059 で ERK1/2 の活性化を完全に停止すると、ウイルス増殖も再活性化も共に抑制されることが示唆された。

D. 考察

HIV-1 が潜伏感染した U1 細胞からの再活性化は、TNF α 、PMA 等の細胞外からの種々の刺激によって誘導されるが、その初期に、細胞の MAP キナーゼカスケードの活性化を介していることが示唆された(図 5)。ここで述べた薬剤の他に、アラキドン酸-BSA 結合体(AA-BSA)添加でも ERK1/2 の 30 分をピークとする弱い一過性のリン酸化の上昇と、15 分をピークとする p38 のリン酸化の一過性の上昇が観察された(図示せず)。これらの MAP キナーゼカスケードの下流には転写制御因子の c-Jun、ATF-2、NF κ B があり、すくなくともこれまでの研究から、HIV-1LTR を遺伝子導入した HeLa 細胞で c-Jun と NF κ B の関与が示唆されている。しかし、潜伏感染単球からの HIV-1 の再活性化における MAP キナーゼのカスケードを調べた研究報告はなく、これが最初である。

本研究の結果、とりわけ、ERK1/2 の活性化が顕著であるだけでなく、この経路を止める PD98059 (MEK1 の阻害剤)で HIV-1 の再活性化が抑制されたことから、ERK1/2 の活性化の抑制が重要であると考えられる。NAC のような、この経路を

止める薬剤が HIV-1 の再活性化に伴う p24 産生を抑制したことは、今後の新規抗 HIV 薬剤の開発を行う上で重要な知見であると考えられる。U1 細胞の再活性化が p38 や JNK のような他の MAP キナーゼの活性化による調節を受ける可能性も考えられるが、それ以上に、SB202474 によって制御される未知の標的分子が、HIV-1 の再活性化にとって重要である可能性が示唆された。また、HIV-1NDK を感染した U937 細胞では阻害したものの、T リンパ球において PD98059 および SB202474 が見かけのウイルス産生を上昇させたことは、患者に薬剤を投与する可能性を考慮すると重要な問題を提起すると思われる。すなわち、潜伏感染の有無に拘わらず、単球/マクロファージと T リンパ球の中での HIV-1 産生に拘わる宿主因子の中で、MAP キナーゼそのものの活性阻害を行うよりも、その周辺のカスケードの制御を含めた検討の方がより大切であることを示唆する結果であると考えられる。

E. 結論

ヒト単球系細胞株 U937 由来の HIV-1 潜伏感染細胞株、U1 細胞において、TNF α 、PMA、アラキドン酸等による HIV-1 の再活性化に伴い、MAP キナーゼ、特に ERK1/2 のリン酸化を介した活性化が示唆された。他の MAP キナーゼ系の JNK や p38 の活性化は余り顕著ではなく、MAP キナーゼ阻害剤のうち、ERK1/2 を活性化するキナーゼである MEK1 の特異的な阻害剤である PD98059 は、細胞を障害せずに U1 細胞の再活性化を広く阻害した。以上より、U1 細胞の再活性化の制御には、ERK1/2 の活性化の抑制に焦点を当てることが重要であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ohki, K., Amano, F., Yamamoto, S., and Kohashi, O.: Suppressive effects of serum on the lipopolysaccharide (LPS)-induced production of nitric oxide and TNF- α by a macrophage-like cell line, WEHI-3, are dependent on the structure of polysaccharide chain in LPS. *Immunology*, in press.
2. Katsuyama, M., Ikegami, R., Karahashi, H., Amano, F., Sugimoto, Y., Ichikawa, A.: Characterization of the LPS-stimulated expression of EP2 and EP4 prostaglandin E receptors in mouse macrophage-like cell line, J774.1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **251**,727-731(1998).