

るものなどマウス個体の CD4⁺T 細胞の分化・活性化状態によってそれぞれ感染細胞の分布に特徴があり、in vitro 同様 CCR5 陽性記憶 CD4⁺T 細胞では R5 型 HIV-1 の感染が優位におこることが示唆された。従って、ヒト化マウスは初期感染時の様々な病態を反映する HIV-1 感染モデルとして、また新しい治療法の in vivo 評価系として将来有望である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tsunetsugu-Yokota, Y. and Yamamoto, T.: Mammalian microRNAs.: post-transcriptional gene regulation in RNA virus infection and therapeutic applications. *Frontiers in Microbiology* 1:1-9, 2010
- 2) Hagiwara, K., Murakami, T., Xue, G. Shimizu, Y., Takeda, E., Hashimoto, Y., Honda, K., Kondoh, Y., Osada, H., Tsunetsugu-Yokota, Y., and Aida, Y.: Identification of a novel Vpr-binding compound that inhibits HIV-1 multiplication in macrophages by chemical array. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 403:40-45, 2010
- 3) Terahara, K., Nochi, T., Yoshida, M., Takahashi, Y., Goto, Y., Hatai, H., Kurokawa, S., Ho Jang, M., Kweon, M-N., Domino, S.E., Hiroi, T., Yuki, Y., Tsunetsugu-Yokota, Y., Kobayashi, K., and Kiyono, H.: Distinct fucosylation of M cells and epithelial cells by Fut1 and Fut2, respectively, in response to intestinal environmental stress. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 404:822-828, 2011

2. 学会発表

- 1) Tsunetsugu-Yokota, Y.: The impact of chemokine receptor usage of HIV-1 in the pathogenesis of HIV infection. The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan, September, 2010.
- 2) Terahara, K., Ishige, M., Mitsuki, Y-y, Shibusawa, K., Watanabe, S., Okada, S., Kobayashi, K., Tsunetsugu-Yokota, Y.: Characteristic activation/differentiation phenotype of CD4⁺ T cells and their distinct susceptibility to X4-type and/or R5-type HIV-1 infection in humanized NOD/SCID/Jak3-null mice. The 14th International Congress of Immunology, Kobe, Japan, August, 2010.
- 3) Shibusawa, K., Mitsuki, Y-y, Terahara, K.,

Yanagi, Y. Kogayashi, K., Tsunetsugu-Yokota, Y.: Inhibition of HIV-1 replication by engineered lentivirus vectors: a potential advantage of SLAM-mediated virus entry. The 14th International Congress of Immunology, Kobe, Japan, August, 2010.

- 4) Mitsuki, Y-y, Shibusawa, K., Tsuchiya, T., Terahara, K., Kobayashi, K., Takeda, M., Yanagi, Y., Tsunetsugu-Yokota, Y.: HIV-1 infection enhances the susceptibility of T cells to measles virus infection by upregulating signaling lymphocyte activation molecule (SLAM) expression. The 14th International Congress of Immunology, Kobe, Japan, August, 2010.
- 5) Tsunetsugu-Yokota, Y. and Terahara, K.: Factors crucial for the preferential propagation of R5-tropic HIV-1 in the early phase of HIV-1 infection. The 5th Japanese-German HIV-Symposium, Tokyo, Japan, May, 2010.
- 6) Shibusawa, K., Mitsuki, Y-y, Terahara, K., Yanagi, Y. Kogayashi, K., Tsunetsugu-Yokota, Y.: Inhibition of HIV-1 replication by engineered lentivirus vectors: a potential advantage of SLAM-mediated virus entry. The 5th Japanese-German HIV-Symposium, Tokyo, Japan, May, 2010.
- 7) Mitsuki, Y-y, Shibusawa, K., Tsuchiya, T., Terahara, K., Kobayashi, K., Takeda, M., Yanagi, Y., Tsunetsugu-Yokota, Y.: HIV-1 infection enhances the susceptibility of T cells to measles virus infection by upregulating signaling lymphocyte activation molecule (SLAM) expression. The 5th Japanese-German HIV-Symposium, Tokyo, Japan, May, 2010.
- 8) 石毛真行、寺原和孝、光木裕也、渋谷謙太郎、小林和夫、岡田誠治、横田(恒次)恭子: HIV-1 感染モデルとしてのヒト化マウスの妥当性と X4 および R5 HIV-1 感染, 第 58 回ウイルス学会、徳島、平成 22 年 11 月。
- 9) 渋谷謙太郎、光木裕也、寺原和孝、石毛真之、柳雄介、小林和夫、横田(恒次)恭子: 麻疹ウイルスエンベロープを用いた HIV-1 増殖抑制性レンチウイルスベクターの開発とその有効性、第 58 回ウイルス学会、徳島、平成 22 年 11 月。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

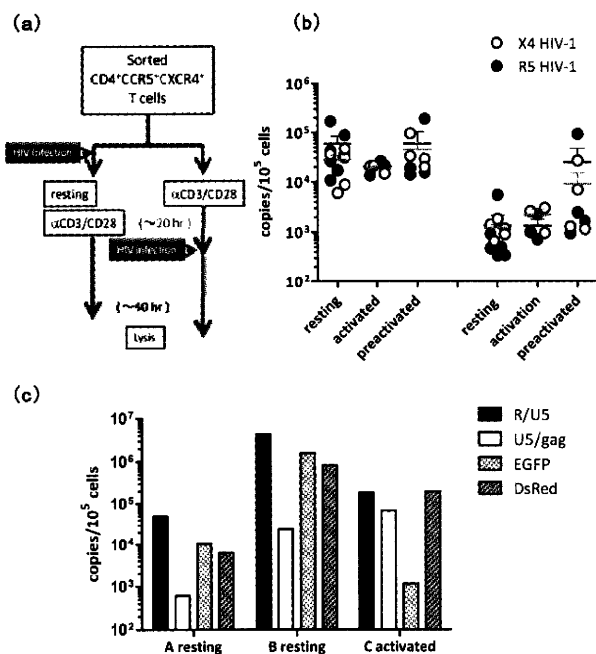


図1. CCR5 陽性 CD4+T 細胞の in vitro X4/R5 HIV-1 感染過程の qPCR 解析。

(a) X4 あるいは R5 HIV-1 を静止ある CCR5+CD4+T 細胞に感染させた後、未刺激 (resting) あるいは抗 CD3/CD28 抗体で刺激して (activated) 40 時間後の細胞を溶解した。一部の細胞は先に抗 CD3/CD28 抗体で刺激し、翌日 HIV-1 を感染させた。(b) 感染 40 時間後の R/U5 (左側) と U5/Gag (右側) 逆転写産物を PCR 定量した。(c) 同様の未刺激あるいは活性化細胞細胞に X4/R5 型 HIV-1 を同時に感染させた細胞の 24 時間後の逆転写産物を PCR 定量した。

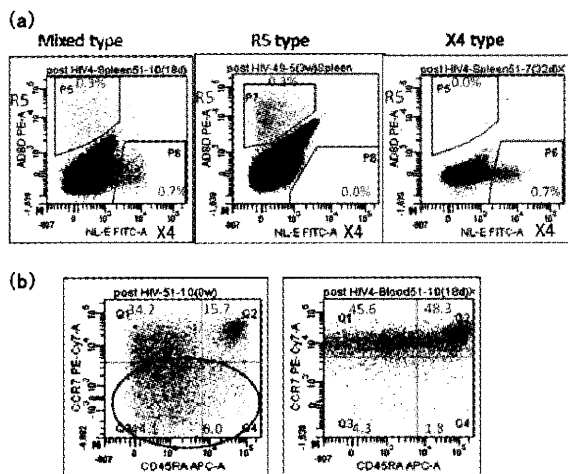


図2. X4 型と R5 型 HIV-1 に同時感染したヒト化マウスにおけるウイルス感染細胞の分布。

同腹のヒト化マウスに X4/R5 型 HIV-1 同時感染させ、CD4+T 細胞が顕著に減少した時の個体における感染細胞分布を解析した。(a) 脾臓細胞中の R5 (DsRed) 型あるいは X4 (EGFP) 型 HIV-1 陽性細胞を示した。両方とも (mixed type)、R5 のみ (R5 type)、X4 のみ感染増殖している個体 (X4 type) に分かれた。(b) 感染前後の末梢血中 T 細胞分化パターンの変化。横軸は CD45RA、縦軸は CCR7 の発現を示す。

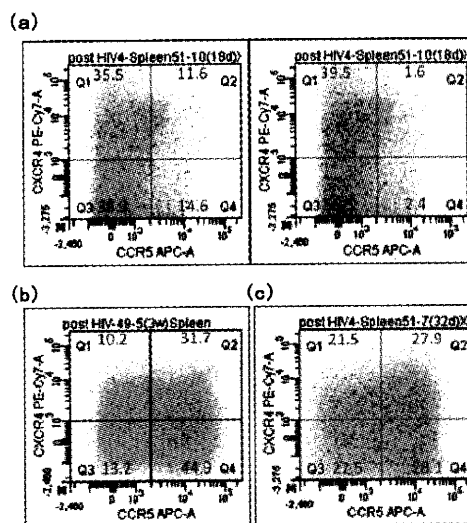


図3. X4 型と R5 型 HIV-1 に同時感染したヒト化マウスにおけるウイルス感染とケモカインレセプター発現。図2 同様、(a) Mixed type、(b) R5 type、(c) X4 型の脾臓細胞中の R5 (DsRed) 型あるいは X4 (EGFP) 型 HIV-1 感染細胞のケモカインレセプター発現。横軸は CCR5 縦軸は CXCR4 の発現を示す。

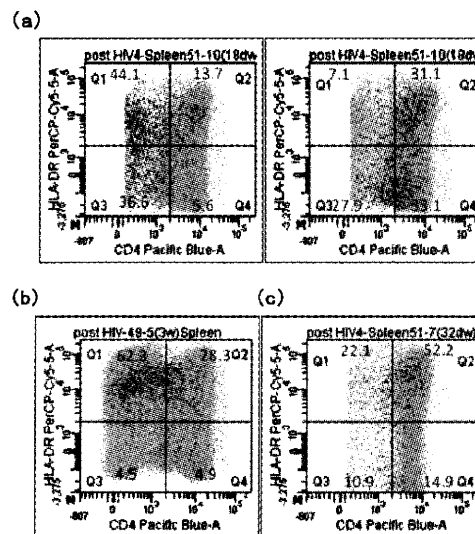


図4. X4 型と R5 型 HIV-1 に同時感染したヒト化マウスにおけるウイルス感染と CD4 発現。

図2 同様、(a) Mixed type、(b) R5 type、(c) X4 type の脾臓細胞中の R5 (DsRed) 型あるいは X4 (EGFP) 型 HIV-1 感染細胞の活性化と CD4 発現。横軸は CD4、縦軸は HLA-DR の発現を示す。

OX40L/OX40 を介する HIV 感染増殖抑制の研究

研究分担者 田中 勇悦 琉球大学大学院医学研究科 教授

研究要旨：活性化 T 細胞が発現する OX40 への刺激は、 β ケモカインの産生を促し CCR5 使用 HIV-1 感染を抑制する。本年度の研究では、T 細胞受容体の刺激に加えて CD28 への刺激が OX40 の発現をより強く促進し、OX40L 添加による R5-HIV-1 の感染増殖阻止を後押しすることを見いだした。合わせて、活性化末梢血単核球(PBMC)において、抗 CXCR4 抗体による CXCR4 の架橋が R5 と X4 の両タイプの HIV-1 の感染増殖を抑制することを新たに見いだした。

A. 研究目的

OX40 は活性化 CD4+T 細胞に一過性に発現する TNFR ファミリー分子であり、対応するリガンド OX40L(gp34)との結合は T 細胞を刺激し、細胞の生存やサイトカイン産生に寄与することが知られている。我々は OX40L による T 細胞への OX40 刺激が CCR5 使用 HIV-1 の活性化新鮮 PBMC における感染を抑制することを見いだした。本年度の研究では、そのメカニズムの詳細な検討をすること、より効果的な OX40 刺激を可能とする環境を見いだすこと、さらに他の新たな HIV-1 抑制宿主因子とその誘導法を探ることを目的とした。

B. 研究方法

健康人由来の新鮮 PBMC を抗 CD3 (OKT-3) 固相化プレート内で抗 CD28 抗体（可溶性）存在下/非存在下、あるいは種々のサイトカイン存在下で活性化し、翌日、細胞を集めて CCR5 使用 (R5-)HIV-1 (JR-FL 株)あるいは CXCR4 使用 (X4-)HIV-1 (NL4-3 株)に m.o.i. 0.005 で 2 時間感染させた。洗浄後、OX40L 発現細胞 (CEM/OX40L)や組換え OX40L (R&D 社製)、あるいは種々の抗体を添加して 37° C で培養した。HIV-1 の増殖は、培養上清中の p24 抗原を ELISA で測定することによりモニターした。HIV-1 感染細胞数の計測には、細胞内 p24 染色を行い、フローサイトメトリー用の細胞計測ビーズを用いて絶対数を計測した。サイトカインの定量は市販のキットで行った。OX40 や OX40L、あるいは β ケモカインに対する阻止抗体は、自家製のもの、あるいは市販のものを用いた。一方、他の新たな試みとして自家製の抗 CXCR4 抗体の効果を上記の実験条件を利用して検討した。本研究は本学バイオハザード委員会、動物実験委員会、遺伝子組換え生物等使用実験安全委員会、倫理委員会の承認を得て行った。ヒト細胞

材料入手は提供者の同意を得て行いその人の利益ならびに人権保護の取り扱いに十分配慮した。

C. 研究結果

(1) OX40 刺激の抗 R5-HIV-1 効果を最大限に引き出すには、機能的な OX40 分子をより多く細胞上に発現させる必要がある。マウスの系では、OX40 発現促進には TCR からの刺激の他に、CD80/CD86 からの CD28 を介した副刺激が働くことが報告されている。そこで、ヒトの系で確認するため、抗 CD28 抗体有り無し、および IL-12 や IL-4 の Th1/2 タイプ極性誘導サイトカインの有り無しの環境で、PBMC を刺激し、培養 1 日目の新鮮 PBMC の OX40 発現の度合いを抗体染色で、その機能を組み換え OX40L の結合性で比較検討した。OX40 は Th1 環境でかつ抗 CD28 抗体での副刺激がある場合に最も強く、しかも機能性をもって発現した。実際にこれらの PBMC に R5 HIV-1 を感染させ、OX40L で刺激したところ、抗 CD28 抗体無しの場合は OX40 刺激を介する R5 HIV-1 の抑制は弱かった。抗 CD28 抗体で刺激した場合は、Th1 環境でも Th2 環境でも R5 HIV-1 抑制活性が保持されることを確認した。したがって、OX40L を用いた OX40 刺激を行う場合、抗原提示細胞上の CD80/CD86 の発現を高めることが必須であろう。将来的にはエイズの OX40L 療法の効果を高めるために、ヒト化抗 CD28 抗体を併せて投与するなどの工夫が考えられる。

(2) 今回、HIV-1 抑制のための新たな方法として検討したのは、自家製の抗 CXCR4 単クローン抗体(mAb)の機能である。これら抗体が活性化初期の PBMC における R5-HIV-1、X4-HIV-1 感染増殖にどのような影響を与えるかを検討した。抗 CXCR4 mAb 群にはエピトープ認識の違いから 3 種の抗体がある。大変興味深い結果は、抗 CXCR4 mAb である A120 というラッ

ト由来の IgG 抗体が、X4-HIV-1 のみならず、同時に R5-HIV-1 の増殖を抑制するというものである。この抗 CXCR4 抗体による R5-HIV-1 抑制のメカニズムについては現在までの解析の結果、 β ケモカイン、特に MIP-1 α の産生促進であることが判明している。その他の詳細については解明を急いでいる。

D. 考察

OX40L による OX40 の刺激は、活性化 PBMC に R5-HIV-1 の感染抑制性 β ケモカインの産生を促し、R5-HIV-1 感染を優位に抑制する。この抑制効果は T 細胞上の CD28 を同時に刺激することによりさらに促進されることが明らかとなった。故に、将来臨床的に OX40 刺激療法の治療効果を高めるためには、抗 CD28 抗体の投与を併用することが必要と考えられる。これにより、HIV-1 感染増殖阻止およびエイズ阻止への応用が期待される。

しかしながら、OX40 刺激による免疫刺激効果は、R5-HIV-1 感染には抑制的に働いても、X4-HIV-1 の感染には全く効果がないか、場合によっては感染促進に働くことが懸念され、CXCR4 アンタゴニスト等の併用が不可欠である。そこで、X4-HIV-1 感染対策として新たに抗 CXCR4 抗体の効果を試してみることにした。結果は、非常に興味深いものであり、CXCR4 の外部ループ構造 ECL1 と ECL2 からなる構造異存のエピトープを認識する A120 抗体が X4-と R5-HIV-1 の両者の感染を抑制することが明らかになった。A120 抗体による X4-HIV-1 抑制は、直接的な CXCR4 の結合阻止つまり中和であろう。R5-HIV-1 感染抑制は間接的であり、活性化 PBMC に A120 抗体が結合することにより主に MIP-1 α の産生が刺激され、結果的に CCR5 の発現抑制がおこると推測される。このメカニズムについては更なる研究が必要であり次年度のテーマである。

今後、安全な OX40L のソースの開発や A120 抗体のヒト化を進めることにより、本発見が対エイズ阻止戦略の一翼となりうることを期待される。

E. 結論

本年の研究では、OX40 の発現は CD28 の刺激で促進され、OX40L 添加による R5 HIV-1 の感染増殖阻止を後押しすることを見いだした。この方法と合わせて、抗 CXCR4 抗体 A120 が R5 と X4 両タイプの HIV-1 の感染増殖を抑制することを見いだした。本研究の成果はエイズ阻止を目的とする社会的要請において新たな HIV-1 戦略を提供するという面で意義があると考えられる。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Tsuruno C, Okuma K, Takahashi Y, Tanaka R, Tanaka Y, Takahama Y, Hamaguchi Y, Hamaguchi I, Yamaguchi K. A recombinant

vesicular stomatitis virus encoding HIV-1 receptors and human OX40 ligand efficiently eliminates HIV-1-infected CD4-positive T cells expressing OX40. *Human Immunology*. in press.

- (2) Tanaka R, Takahashi Y, Kodama A, Saito M, Ansari AA, Tanaka Y. Suppression of CCR5-tropic HIV type 1 infection by OX40 stimulation via enhanced production of β -chemokines. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 26(10): 1147-54, 2010.
- (3) Sato K, Nie C, Misawa N, Tanaka Y, Ito M, Koyanagi Y. Dynamics of memory and naive CD8⁺ T lymphocytes in humanized NOD/SCID/IL-2Ry^{null} mice infected with CCR5-tropic HIV-1. *Vaccine*. 28S: B32-7, 2010.
- (4) Kodama A, Tanaka R, Zhang LF, Adachi T, Saito M, Ansari AA, Tanaka Y. Impairment of *in vitro* generation of monocyte-derived human dendritic cells by inactivated human immunodeficiency virus-1: Involvement of type I interferon produced from plasmacytoid dendritic cells. *Human Immunology*. 71(6): 541-50, 2010.

2. 国際学会発表

- (1) Tanaka Y, Tanaka R, Takahashi Y, Ansari AA. Suppression of CCR5-tropic HIV-1 infection by OX40 stimulation via enhanced production of beta-chemokines. August 2010. Vol.22, Suppl 1, *International Immunology*. 14th international Congress of immunology Kobe, Japan. Day 4(4/5). Thursday, August 26 2010: 63. (PP-074-13)

3. 国内学会発表

- (1) 田中礼子, 田中勇悦. TNF 受容体スーパーファミリー分子 OX40 共刺激による CCR5 HIV の感染抑制. 第 63 回日本細菌学会九州支部総会・第 47 回日本ウイルス学会九州支部総会・プログラム及び抄録, 2010. 9. 3-4: 宮崎県. 39.
- (2) 久保嘉直, 吉居廣朗, 神山陽香, 田中勇悦, 佐藤裕徳, 山本直樹. カテプシン B は CD4 非依存性 HIV 感染感受性の重要な決定因子の一つである. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会・プログラム・抄録集, 2010. 11. 7-9: 徳島県. 449.
- (3) 大隈和, 深川耕次, 高馬卓也, 田中礼子, 田中勇悦, 浜口功. R5 HIV-1 感染を制御する組換え VSV の開発と OX40L 発現による効果増強. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会・プログラム・抄録集, 2010. 11. 7-9: 徳島県. 461.
- (4) 深川耕次, 高馬卓也, 田中勇悦, 岸浩司, 高浜洋一, 浜口功, 大隈和. 活性化 T 細胞免疫刺激分子 OX40 を介した HIV-1 感染抑制効果の検討. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会・プログラム・抄録集,

2010. 11. 7-9 : 徳島県. 462.
- (5) 田中勇悦. HIV 感染増殖を抑制する二つの方法 : 樹状細胞ワクチンと OX40 刺激. 第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集, 2010. 11. 24-26 : 東京都. 305(97).
 - (6) 大隈和, 深川耕次, 渡辺哲, 高馬卓也, 田中勇悦, 山本直樹, 浜口功. ヒト化 NOG マウスを用いた X4 HIV-1 標的組換え VSV の治療効果の検討. 第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集, 2010. 11. 24-26 : 東京都. 371(163).
 - (7) 児玉晃, 田中勇悦, 田中礼子. エイズ免疫

療法開発に向けた新規簡便樹状細胞分化養法の開発. 第 24 回エイズ学会学術集会・総会抄録集, 2010. 11. 24-26 : 東京都. 375(167).

H. 知的財産権の出願・取得状況(予定を含む):
(予定)
CXCR4指向性およびCCR5指向性HIV-1の感染を阻止する抗CXCR4抗体を利用したHIV-1の感染阻止および治療

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

HIV-1 感染における調節性 T 細胞の意義

研究分担者 神奈木 真理 東京医科歯科大学 医歯学総合研究科 教授

研究要旨：抗ウイルス剤の多剤併用療法 HAART 施行中にも HIV-1 潜在感染細胞は生存し続け、治療を中止すればウイルス量は再び増加する。HIV-1 感染症の制圧には初感染の感染防御とともに、HIV-1 潜在感染細胞を標的とした治療戦略が必要である。潜伏感染細胞は静止期のメモリータイプの長命な T 細胞とされているが、試験管内実験系が無いいため研究アプローチが難しい。本研究では、このような潜在感染細胞の HIV-1 複製および発現調節機構の解明のため、HIV-1 潜在感染細胞株の実験系樹立を目標とした。メモリータイプの細胞として調節性 T 細胞 (Treg) に焦点を当て、まずラットから樹立できた誘導性 Treg 様 (iTreg) の IL-2 依存性 CD4 陽性 T 細胞株に luciferase をレポーターとする HIV-1 pseudotype virus の持続感染を試みた。しかし、PMA/Ionomycin 刺激後も検出可能な luciferase 活性が得られなかったため断念し、新たにヒト由来の T 細胞株を作成した。健康人由来の末梢血単核球に CD3/CD28 および retinoic acid 刺激を加え、TGF-beta IL-2 存在下に Treg 様 CD4 陽性 T 細胞を樹立した。これとは別にアロ細胞刺激により抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞株を樹立した。これらの細胞にレポーター HIV-1 を感染させたところ有意な luciferase 活性が検出され抗原刺激による増加が認められた。現在長期持続感染を試みている。一方、エイズ対策研究事業で従来から行って来た単球/マクロファージにおける感染抵抗性の研究では、いくつかの共生微生物が TLR4 刺激を介したインターフェロン応答により HIV-1 転写を抑制することを論文にまとめ J. Gen. Virol. 誌に発表した。共生微生物の応用は HIV-1 感染抑制効果を誘導する戦略の一つと考えられた。

A. 研究目的

HIV-1 感染症の治癒を目指すには、HAART 療法中も維持される HIV-1 潜伏感染細胞を標的とした治療戦略が必要である。HIV-1 潜伏感染細胞は静止期のメモリータイプの CD4 陽性細胞でありウイルス発現が低く長命と考えられている。しかし、試験管内実験系が無いため研究アプローチが難しい。本研究では、このような特徴を有する細胞の代表である調節性 T 細胞に焦点を当て、HIV-1 潜在感染細胞株の実験系を樹立し HIV-1 複製および発現調節機構について明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1) 細胞株

F344 系ラット由来 T 細胞株 8L-6 は、同系の自己応答 T 細胞 G14 を免疫接種した同系ラット脾細胞から IL-2 存在下で誘導した。ヒト iTreg 様細胞は、健康人由来の末梢血単核球 (PBMC) から CD4 陽性細胞を分離し、CD3/CD28 および retinoic acid 刺激を加え、TGF-beta IL-2 存在下で誘導した。これとは別に健康人 PBMC をアロ由来の T 細胞株で繰り返し刺激し IL-2 存

在下に培養することにより、アロ抗原特異的 T 細胞株を樹立した。

2) T 細胞の形質

T 細胞の表面抗原 (CD3, CD4, CD8, CD25, CD19, Foxp3) はモノクロナル抗体で染色後フローサイトメトリーで評価した。培養上清中のサイトカイン産生量は ELISA 法で測定した。

3) Pseudotype HIV-1 感染

293T 細胞に VSV-G 発現 plasmid と pNL43/Luc Δ env を cotransfection し、上清中の VSV-G/HIV-1NL43 pseudotype virus を培養細胞に添加した。

4) マクロファージの HIV-1 発現評価

レポーター遺伝子を含む HIV-1 持続感染 THP-1 細胞株を作成し、これを用いて種々の常在菌による自然免疫応答の HIV-1 複製抑制効果を調べた。

C. 研究結果

1) ラット iTreg 様細胞への HIV-1 感染

ラットを自己 T 細胞で免疫し、その脾細胞から IFN-γ, IL-10 を産生する CD4+CD25+Foxp3-T 細胞株を樹立した。しかし、pseudotype HIV-1

感染後、PMA/Ionomycin 刺激しても検出可能なレベルの luciferase 発現が無く、HIV-1 評価系としては不適であると判断した。

2) ヒト T 細胞株の樹立と HIV-1 感染

健康人 PBMC から CD3/CD28 および retinoic acid 刺激により誘導した T 細胞株は CD4+CD25+Foxp3+ であり、iTreg 様の形質をもっていた。この細胞株には pseudotype HIV-1 感染後高い luciferase 活性を示した。IL-2 非存在下では活性は低下し、CD3 刺激により活性は増加した。また、アロ特異的 T 細胞株は、一部に CD8 陽性細胞が残存するがほぼ CD4 陽性 T 細胞であり、やはり pseudotype HIV-1 感受性を示した。

3) 常在菌による HIV-1 発現抑制効果

マクロファージ細胞株の HIV-1 複製がいくつかの常在菌 (*Escherichia coli*, *Veillonella parvula* and *Neisseria mucosa*) により抑制された。この抑制は TLR4 中和抗体、interferon α/β receptor 中和抗体で阻止された。これらの現象は末梢血由来のマクロファージでも再現された。

D. 考察

潜在感染の研究に関しては、ラット由来の T 細胞株では感染がうまく行かず断念したが、今回ヒト由来の HIV-1 感染感受性 T 細胞株が得られた点で本年度の目標の 70% は達成できたと考える。HIV-1 感染感受性のヒト由来 CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T 細胞株を in vitro で誘導できたことは、今後の HIV-1 潜在状態や賦活化条件を解析する上で有用なツールとなる。従来からエイズ対策研究事業で数年間行って来たマクロファージにおける自然免疫の研究成果を J. Gen. Virol 誌に論文発表した。この内容は、常在菌が HIV-1 初感染時の感染効率を低下させる一つの条件となり得ることを示した点で評価され、Society of General Microbiology の関連雑誌 Microbiology Today にトピックスとして紹介された。

E. 結論

ヒト由来 CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) iTreg 様細胞株を樹立し HIV-1 持続感染に成功した。TLR4 を選択的に刺激する常在菌は自然免疫応答を介して HIV-1 複製を抑制する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ahmed, N., Hayashi, T., Hasegawa, A.,

Furukawa, H., Okamura, N., Chida, T., Masuda, T., and Kannagi, M. Suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication in macrophages by commensal bacteria preferentially stimulating Toll-like receptor 4. J Gen Virol, 91: 2804-2813, 2010.

2) Hayashi, T., Nishitsuji, H., Takamori, A., Hasegawa, A., Masuda, T., and Kannagi, M. DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors enhances the transcription of HIV-1 through NF-kappaB. Microbes Infect, 12: 937-947, 2010.

3) Saeng-aroon, S., Tsuchiya, N., Auwanit., W., Ayuthaya. P.I. N., Pathipvanich, P., Sawanpanyalert, P., Rojanawiwat, A., Kannagi, M., Ariyoshi, K., Sugiura, W. Drug-resistant mutation patterns in CRF01_AE cases that failed d4T+3TC+nevirapine fixed-dosed, combination treatment: Follow-up study from the Lampang cohort. Antiviral Research, 87: 22-29, 2010.

2. 学会発表

1) Ahmed N, Hayashi T, Hasegawa A, Furukawa H, Okamura N, Chida T, Masuda T, and Kannagi M. Potential control of HIV-1 replication in macrophages by commensal organisms stimulating TLR4.

第 14 回 国際免疫学会、2010 年 8 月、神戸

2) 宮野 正史、林 隆也、望月 和歌菜、長谷川 温彦、小柳 義夫、神奈木 真理、増田 貴夫。HIV-1 インテグラーゼの細胞内多量体形成能評価系の確立。

第 58 回 日本ウイルス学会
2010 年 11 月、徳島

3. その他

1) 紹介記事

“Vaginal microflora protects against HIV”, in the section of “Meriel Jones highlights hot papers in recent SGM journals”. Microbiology Today, November 2010, p250.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

HIV 感染の病態進行に関わる免疫関連宿主因子の研究

研究分担者 立川 愛

東京大学医科学研究所 先端医療研究センター感染症分野 助教

研究要旨：病態進行の早い血中 HIV 量の高い慢性期 HIV 感染者では持続的な活性化に起因するメモリーT細胞による MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, IL-17 などの Th1, Th17 型サイトカイン・ケモカイン産生能が低下しており、これらの低下は CD8 陽性 T 細胞による Interferon- γ 産生の低下が引き金となっている可能性が示唆された。

A. 研究目的

HIV 感染症において、AIDS 発症のメカニズムは未だ明らかとなっていない。HIV に感染してから AIDS 発症までの期間は感染者によって大きく異なっており、未治療の感染者でも感染後 1 年で AIDS を発症する場合もあれば、長期未発症者と呼ばれる感染者では 20 年以上 AIDS を発症しない場合もある。このような感染者間では宿主側あるいはウイルス側になんらかの相違があると考えられ、その相違を明らかにすることは AIDS 発症のメカニズムを明らかにすることとなる。

AIDS 発症までの期間と最も強い相関を示す臨床的指標が慢性期の血中 HIV 量 (VL) である。HIV 感染では感染直後に一過性の高ウイルス血症を示すが、その後特異的免疫応答の出現と共に VL は減少し、慢性期へと移行する。慢性期には比較的安定した VL が維持され、VL が低い程 AIDS 発症までの期間が長いことが明らかとなっている。そこで、本研究では VL に注目し、VL の高い感染者と低い感染者での免疫学的特性を明らかにすることで AIDS 発症の分子メカニズムを解明し、AIDS 発症を遅延させる治療法の開発への分子基盤を築くことを目的とした。

昨年度までの研究で、VL の高い HIV 感染者 (HVL 群) ではメモリーT細胞による Th1, Th17 型免疫応答に関連するサイトカイン、ケモカイン (IFN- γ , MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, IL-17) の産生能が特異的に低下しており相互の産生能には強い相関あること、またこの産生能低下と T 細胞の活性化／疲弊の程度との間に関連があることを明

らかにした。本年度は上記サイトカイン、ケモカイン特異的な産生能低下のメカニズム、原因となっている要因を明らかにすることを目的とした。

まず、IFN- γ , MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, IL-17 の産生細胞の特定を行い、どの T 細胞サブセットに起因するのかを明らかにした。また上記サイトカイン・ケモカイン産生能は PBMC を PHA にて刺激し長時間 (48 時間) 培養後に解析を行ったものであるため、逐次的な反応による結果である可能性が考えられる。そこで本年度は時間経過を考慮に入れた解析を行い、上記サイトカイン・ケモカイン産生能低下の原因を探ることとした。PBMC を非特異的に刺激し、IFN- γ , MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, IL-17 に関して 5 時間後にフローサイトメトリーにより蛋白質レベルで、18 時間後に定量 RT-PCR により mRNA レベルで、発現量の解析を行った。

B. 研究方法

＜フローサイトメトリーによる多重染色解析を用いた VL の異なる HIV 感染者の T 細胞機能解析＞

未治療 HIV 感染者のうち、VL の低い LVL 群、VL の高い HVL 群、対照として抗 HIV 治療群、健常人群、各 10 名ずつの PBMC を用いた。

PBMC を PMA+ionomycin により刺激し、5 時間培養後に IFN- γ , MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, IL-17 に対する抗体を用いて細胞内染色を行い、これらのサイトカイン・ケモカインの発現量を解析した。同時に CD3,

CD4, CD8 に対する抗体を用いて細胞表面を染色し、産生細胞の特定も行った。

<定量 RT-PCR によるサイトカイン・ケモカイン mRNA 発現量の解析>

未治療 HIV 感染者の LVL 群、HVL 群、各 7 名ずつの PBMC を用いた。PHA にて刺激し、18 時間培養後に PBMC から RNA を抽出し、IFN- γ , MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, IL-17 をコードする遺伝子の mRNA 量を real-time PCR により定量した。

(倫理面への配慮)

臨床材料の提供を受ける場合には研究目的や必要事項を文書を用いて説明し、書面でインフォームドコンセントを得た。本研究内容は東京大学医科学研究所倫理審査委員会により承認されている。

C. 研究結果

まず、IFN- γ , MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, IL-17 産生細胞を特定するために、T 細胞を非特異的に刺激した 5 時間後に IFN- γ , MIP-1 α /MIP-1 β /RANTES, IL-17 の細胞内染色を行った。その結果、CD4 陽性 T 細胞では MIP-1 α /MIP-1 β /RANTES は IFN- γ 産生細胞の一部により産生されており、IL-17 は別の細胞集団により産生されていた。一方、CD8 陽性 T 細胞においては IFN- γ と MIP-1 α /MIP-1 β /RANTES は同一の細胞により産生されており、IL-17 産生細胞は見られなかった。

続いて HVL 群と LVL 群における上記サイトカイン・ケモカイン産生細胞について比較解析を行ったところ、CD4、CD8 陽性 T 細胞いずれにおいても各発現細胞の頻度は LVL 群と HVL 群で有意差は見られなかった。しかしながら、個々の細胞での発現量を反映する各抗体の蛍光強度を解析したところ、CD8 陽性 T 細胞における IFN- γ のみ、HVL 群で LVL 群に比較して有意に低いことが明らかとなった (図 1)。

また、刺激 18 時間後での PBMC より抽出した mRNA の定量発現解析では、MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, IL-17 をコードする遺伝子の発現には両群間で差が見られなかったが、IFN- γ 遺伝子に関してのみ、HVL 群で有意な低下が見られた (図 2)。

D. 考察

HVL 群で産生能低下が見られ、互いの産生能に強い相関が見られた IFN- γ , MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, IL-17 において、IFN- γ , MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES と IL-17 は異なる T 細胞サブセットにより産生されていることが明らかとなった。また 5 時間、18 時間培養後では IFN- γ のみで HVL 群で有意な産生低下が、特に CD8 陽性 T 細胞で顕著に見られた。これらの結果から長時間培養で見

られた HVL 群での MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, IL-17 産生の低下は、IFN- γ の産生低下が原因となり生じている可能性が考えられる。MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES は CCR5 のリガンドであり HIV 感染の阻害因子として働くだけでなく、細胞性免疫応答にも重要な役割を担っている。また Th17 細胞により産生される IL-17 は細菌等に対する免疫応答に重要であり、近年 HIV 感染症において Th17 細胞が減少することも明らかとなってきた。IFN- γ は免疫応答に関して多様な機能を有する。まず、CD8 陽性 T 細胞による IFN- γ 産生低下と MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, IL-17 産生との因果関係を明らかにする必要があるが、IFN- γ が HIV 感染症における免疫破綻の鍵となる分子である可能性が考えられる。CD8 陽性 T 細胞における IFN- γ 産生低下の分子メカニズムを明らかにできれば AIDS 発症を阻止する治療法開発の分子基盤を確立することができる。

E. 結論

病態進行の早い (AIDS 発症までの期間が短い) HIV 感染者で見られる T 細胞による MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, IL-17 産生能低下は、CD8 陽性 T 細胞による IFN- γ 産生能低下に起因している可能性が示唆された。HIV 感染症の病態進行を規定する因子として IFN- γ 産生能低下の機序を明らかにしていきたい。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Iwamoto A, Hosoya N, Kawana-Tachikawa A. HIV-1 tropism. *Protein & Cell*. 1, 510-3. 2010
2. Nakamura H, Miyazaki N, Hosoya N, Koga M, Odawara T, Kikuchi T, Koibuchi T, Kawana-Tachikawa A, Fujii T, Miura T, Iwamoto A. Long-term successful control of super-multidrug-resistant human immunodeficiency virus type 1 infection by a novel combination therapy of raltegravir, etravirine, and boosted-darunavir. *J Infect Chemother*. Jun 30. (Epub ahead of print) 2010
3. Koga M, Kawana-Tachikawa A, Heckerman D, Odawara T, Nakamura H, Koibuchi T, Fujii T, Miura T, Iwamoto A. Changes in impact of HLA class I allele expression on HIV-1 plasma virus loads at a population level over time. *Microbiol Immunol*. 54, 196-205. 2010

2. 学会発表

1. Gu L, Kawana-Tachikawa A, Shiino T, Hosoya N, Nunoya J, Koibuchi T, Fujii T, Miura T, Matsushita M, Sugiura W, and Iwamoto A. Development of a PCR-SSOP-Liminex Assay

for HIV-1 Drug Resistance. Session IV: Virology, Novel Therapies, and New Technologies. 24th Joint Meeting of the AIDS Panels, United States-Japan Cooperative Medical Science Program. HIV Resistance: Impact in Asia. Grand Copthorne Hotel, Singapore. December, 2010

2. Teeranaipong P, Hosoya N, Kawana-Tachikawa A, Kondo N, Hoshino H, Matsuda Z, and Iwamoto A. Novel HIV-1 Phenotypic Tropism Assay without Pseudotyped Virions. Session IV: Virology, Novel Therapies, and New Technologies. 24th Joint Meeting of the AIDS Panels, United States-Japan Cooperative Medical Science Program. HIV Resistance: Impact in Asia. Grand Copthorne Hotel, Singapore. December, 2010
3. Nakayama K, Kawana-Tachikawa A, Nakamura H, Miuta T, Fujii T, Koibuchi T, Iwamoto A. T cell activation and exhaustion

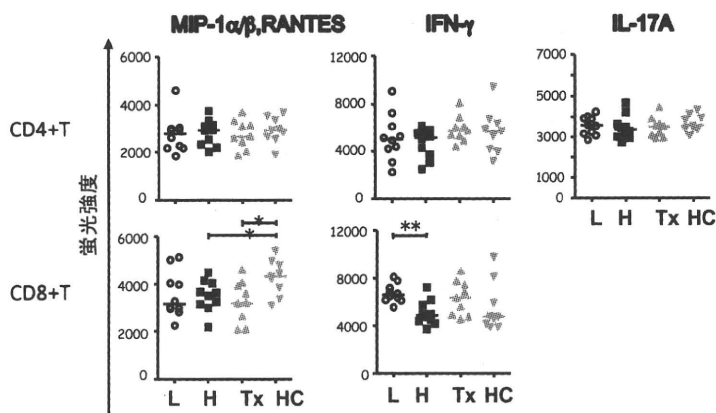
associates with skewed cytokines/chemokines production in chronic HIV-1 infection. 14th International Congress of Immunology. Kobe, Japan. August, 2010

4. Nakayama K, Kawana-Tachikawa A, Nakamura H, Miura T, Fujii T, Koibuchi T, Iwamoto A. HIV-1 viral burden has an impact on Th1- and Th17-related cytokines/chemokines production of T cells. 18th International AIDS Conference. Wien, Austria. July, 2010

H. 知的財産権の出願・登録状況

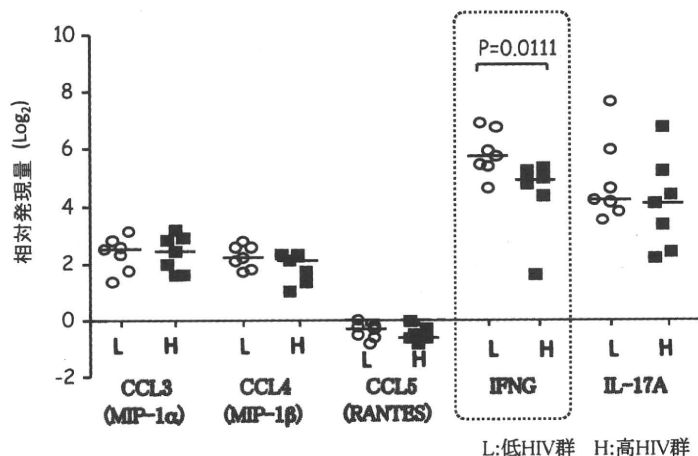
(予定を含む。)

1. 特許取得
特許取得なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし



L:低HIV群 H:高HIV群 Tx:治療群 HC:健常人群

図1: 刺激後5時間における各サイトカイン・ケモカインの発現量(細胞内染色)



L:低HIV群 H:高HIV群

図2: 刺激後18時間における各遺伝子のmRNA量発現量

北タイ HIV-1 CRF01_AE 感染長期未発症者における
CTL 活性の分子レベルの研究

研究分担者 有吉 紅也 長崎大学熱帯医学研究所臨床医学分野 教授
研究協力者 Nuanjun Wichukchinda タイ国立衛生研究所研究員
研究協力者 森 正彦 エイズ予防財団リサーチレジデント

研究要旨：アジア流行株 CRF01_AE の HIV 宿主内増殖を効率的に抑制する細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 免疫応答の特徴を解明し、アジアで有効な HIV・エイズワクチン開発に資することが本分担研究の目的である。本年度は、北タイの CRF01_AE 感染者コホート患者の HLA とウィルス量の関係よりウィルス抑制に関わる HLA アリールを検討した。これまで他の人種でも報告されてきた B*57 (B*5701) のウィルス量抑制が今回我々の解析でも確認され、本アリールによる全人類共通のウィルス量抑制が確認された。また B*3505、B*5102、Cw*0401 によるウィルス量抑制、及び B*5801 による抑制の消失といったアジア人特有の傾向が確認された。また B*3505、B*5102、Cw*0401 によるウィルス量抑制、及び B*5801 による抑制の消失といったアジア人特有の傾向が確認された。また低頻度 Cw アリール及び NK 細胞のリガンドである C2 グループの保有によるウィルス抑制傾向、KIR2DL3 保有とウィルス量増加といった関連が認められた。

A. 研究目的

近年、組換えアデノウィルスベクターによる細胞性免疫誘導型 HIV ワクチンが臨床治験で失敗したことから、ワクチンによって誘導される免疫応答の質が以前よりも増して問われるようになった。

細胞傷害性 T リンパ細胞 (Cytotoxic T-Lymphocyte, CTL) は、宿主内の HIV 増殖抑制に重要な役割を担っており、また有効な予防的もしくは治療的ワクチンの開発に不可欠な免疫応答であると考えられている。これら CTL 免疫応答による HIV 感染予防および HIV 増殖抑制効果は宿主によって異なることが知られている。これらは主に HIV ウィルス蛋白の多様性や宿主遺伝子 (特に HLA class I) の多様性によって決定されると考えられ、有効なワクチン開発には、特に HIV 感染後長期にわたって免疫不全が進行しない長期生存感染者の有する良質の免疫応答をより深く理解することが重要である。

しかし、アジアに流行している CRF01_AE サブタイプに関する CTL エピトープ情報は限られている。また、長期生存者に特徴的な CTL エピトープに関しては殆どない。そこで、本分担研究の最終目標は、アジア地域のエイズ流行最先端の北タイにおいて、HIV-1

CRF01_AE 感染長期未発症者を 100 名以上集めたコホートを立ち上げ、HIV 宿主内増殖を効率的に抑制できる良質な CTL 免疫応答を HLA 解析、HLA 関連 Gag タンパク変異、Gag 特異的 CTL エピトープの 3 側面において解析し、良質な CTL 免疫について分子レベルで明らかにすることにある。

本年度は、宿主側の因子である HLA アリールとウィルス量抑制との関連について新たな知見が得られたので報告する。

B. 研究方法

1) 対象集団および HLA タイピング

北タイランパン病院 HIV 外来を受診した長期間免疫能が保たれている CD4+ T cell > 200/ul の長期未発症 HIV 感染者 209 名 (女性 159 名 男性 50 名 平均年齢 31 歳 (年齢幅 15-63 歳)) を含む、抗 HIV 薬未治療 HIV 感染患者 557 名 (女性 300 名 男性 257 名 平均年齢 32 歳 (年齢幅 15-63 歳)) を対象に HLA A、B、Cw アリールを Luminex 法で 4 桁の解析を行い、初診時に測定されたウィルス量を用いて各 HLA アリールもしくは supertype とウィルス量の関係について ANOVA を用いて統計解析を行う

た。アリアル頻度とウイルス量との相関関係については、Spearman 解析を用いた。

2) NK 細胞に関する解析について

HLA B 及び Cw アリアルは CTL のみならず NK 細胞のリガンドとして NK 活性にも影響を及ぼしている。NK 細胞への結合部位は B アリアルで Bw4・Bw6、Cw アリアルで C1・C2 に大別される。これらの組み合わせとウイルス量の関係についても ANOVA 統計解析を行った。

さらに NK 細胞側にも HLA への結合部位に多型が存在し (KIR : Killer Immunoglobulin-like Receptor)、臨床経過への影響が指摘されている。本解析でも各 KIR 遺伝子の多型を focus specific primer を用いた PCR によるジェノタイプングにて解析しウイルス量の関係について統計解析を行った。

(倫理面への配慮)

本分担研究にて活用した北タイ HIV コホートは、2006 年 3 月に新たにタイ政府保健省医学研究倫理委員会にて承認され、承認内容の中に本分担研究の研究目的が含まれている。本研究に協力したすべてのコホート参加者から署名入り同意書が得られている。

C. 研究結果

1) HLA アリアルとウイルス量の解析について:

209 名において平均 CD4 陽性 T 細胞数 86/ μ l (幅 0-1,191)、平均ウイルス量 5.26 log copies/ml (幅 2.60-6.72)であった。

92 種類の HLA アリアル (23 A、48 B、21 Cw) が検出され、このうち保有者数が 4 名以上 (=1.9%) のアリアル間で解析を行った。全アリアル間で有意なウイルス量差を認めた (図 1A) ($p=0.028$)。さらに各遺伝子座でウイルス量との関係を調べたところ、B 遺伝子座についてのみ有意な相関がみられ ($p=0.029$)、A 遺伝子座と C 遺伝子座については有意差は認められなかった (図 1B)。

個別のアリアルとウイルス量との相関を調べたところ、その保有者に有意にウイルス量低下が認められたのは、A 遺伝子座では A*2407 (ウイルス量 4.83 ± 0.69 平均 \pm SD log copies/ml $p=0.036$)、B 遺伝子座では B*3505 (4.56 ± 0.87 log copies/ml $p=0.00070$)、B*5701 (4.55 ± 0.96 log copies/ml $p=0.016$)、C 遺伝子座では Cw*0406 (4.70 ± 0.89 log copies/ml $p=0.031$) と Cw*0602 (4.75 ± 0.85 log copies/ml $p=0.032$) であった。一方、その保有者に有意にウイルス量の増加が認めら

れたのは、A*1102 (5.46 ± 0.55 log copies/ml $p=0.022$)、B*5601 (5.61 ± 0.37 log copies/ml $p=0.016$)、B*0705 (5.47 ± 0.50 log copies/ml $p=0.048$)、B*3802 (5.36 ± 0.55 log copies/ml $p=0.039$) であった。

B*5701-Cw*0602 と A*2407-B*3505-Cw*0401 に認められた連鎖不均衡について、さらに解析したところ (図 1C)、B*5701-Cw*0602 については、ウイルス量の低下は、Cw*0602 とは独立して B*5701 保有者に相関していること ($p=0.025$)、A*2407-B*3505-Cw*0401 ハプロタイプについては、A*2407、Cw*0401 とは独立して B*3505 保有者と相関してウイルス量が低下していることが判明した (1 図 C)。

2) HLA supertype とウイルス量の解析について

HLA A 及び B アリアルはその共通構造により 12 群に大別される (supertype)。我々は supertype 間でのウイルス量差を統計解析したところ、A supertypes ($p=0.38$) と B supertypes ($p=0.82$) のどちらにおいてもウイルス量との有意な相関は認められなかった。一方、B07s 構成 6 アリアル間 ($p=0.045$)、B58s 構成 2 アリアル間 ($p=0.058$) において有意なウイルス量差及びその傾向が確認された (図 2)。

3) HLA アリアルの保有頻度とウイルス量の相関について

低頻度 HLA アリアルはより多くのウイルス変異をもたらすことが知られており、その臨床経過への影響を評価することから、各個人の保有する HLA アリアル頻度の総和とウイルス量の相関についても統計解析を行ったところ、Cw 遺伝子座についてのみ各アリアルの保有頻度の総和とウイルス量に正の相関を認めた ($p=0.019$)、その他の遺伝子座及び全アリアル間では有意な相関は認められなかった (図 3)。

4) NK 細胞結合 HLA リガンドとウイルス量の解析について

NK 細胞リセプター KIR3D の対応リガンドである HLABw4・Bw6 保有とウイルス量との相関を解析したところ、いずれも有意差は認められなかった。一方、KIR2D の対応リガンドである HLAC アリアルを 1・C2 グループに分類し解析したところ、C2 グループホモ保有者に有意なウイルス量減少傾向を確認した ($p=0.024$) (図 3)。

5) KIR とウイルス量の解析について

HLA C1/C2 グループとウィルス量との相関関係をさらに詳細に調べるため、KIR2Dの多型を決定しウィルス量との相関を解析した。その結果、全感染者を対象に解析した場合有意なウィルス量差は認めなかったものの、CD4 値が 200/ μ l以上の免疫能が比較的保たれている感染者群に限定して解析した場合において、KIR2DL3 の保有者にウィルス量の増加傾向を認めた (C1 保有者で $p=0.067$ 及び C1/C1 ホモ保有者で $p=0.070$) が、その他の KIR 保有者に有意なウィルス量差は認めなかった (表 1)。加えて、Bw4/Bw6 の NK 細胞リセプターである KIR3D の多型についても調べ、ウィルス量との相関を解析してみたが、有意な結果は得られなかった。

D. 考察

本研究により、これまでに報告されていなかった A*2408、B*3505、Cw*0406、Cw*0602 がウィルス量減少と相関することが新たに発見された。作用するアレルが確認された。B*35 はその F ポケット部構造により Px (Tyrosine 以外の結合モチーフ) と PY (Tyrosine が結合モチーフ) に分類され、後者の有意なウィルス量減少が報告されている。B*3505 は後者に分類され、アジアにおける PY アレルとして確認された。B*51 のウィルス抑制はこれまで欧米系で報告され、アフリカ系では報告されていなかった。反対に Cw*04 の有効性はアフリカ系で報告され、欧米系では報告されていなかった。Cw*04 については、最近 Cw アレル拘束性エピトープが全 CTL 反応の約半分を誘導していたという報告もあり、また今回 Cw アレルの保有頻度の総和とウィルス量に正の相関を認めたことからその重要性が示唆されるものの、本研究の対象集団においては、B*3505 との連鎖不均衡が優位に関与していることが推測された。

一方、これまでサブタイプ C 感染アフリカ系及びサブタイプ B 感染欧米系で報告されていた B*57 アレルと低ウィルス量との相関が、今回 CRF01_AE 感染アジア系でも初めて確認されたことは興味深い。これは本アレルが、HIV サブタイプ間の多様性や宿主集団のもつ HLA 多型に依存せず有意に低ウィルス量と相関があることを示しており、B*57 分子によって拘束される CTL 活性に、これらのサブタイプ間の多様性を克服する何らかの特性が存在する可能性や、B*57 遺伝子に連鎖する別の遺伝子多型の存在が考えられる。

今回これまでに報告されていない新たな知見として Cw アレルと低ウィルス量との相関は NK 細胞との関係からも示唆された。HLA 側では C2、NK 細胞側では KIR2DL3 非保有者にウィルス量抑制が確認された。これは過去に報告されたセックスワーカーでの KIR2DL3 保有者に見られた有意な HIV 感染増加では見解が一致するものの、針刺しによる HCV 感染では反対に KIR2DL3 保有者での有意な治癒が認められるなど、今後更なる研究が求められるところである。

また今回 B*5801 によるウィルス量抑制傾向は認められず、これまでのアフリカ系・欧米系とは異なる結果であった。これは既に CRF01_AE 株がアジア人の HLA 環境下において、B*5801 による免疫圧に適応していることが示唆され、我々が昨年報告した Gag 遺伝子の変異によるウィルス量回復の報告と合致している。またサブタイプ構成アレル間でのウィルス量に差を認めており、HLA の構造のみでウィルス抑制が規定される訳ではなく、感染集団での HLA 多型およびウィルスの多様性の調和下に HLA の有効性が決定されることが示唆される。

E. 結論

- 1) 個々の保有する HLA アレルとウィルス量との間に有意な相関があることが確認された。
- 2) 今回新たにアジア人特有の傾向として A*2408、B*3505、Cw*0406、Cw*0602 のウィルス量抑制傾向及び A*1102、B*5601、B*0705 の増加傾向、B*5801 の有効性消失が確認され、感染地域での HLA 分布とウィルス変異のバランスによる HLA とウィルス量との相関の強さの違いが確認された。
- 3) B*5701 によるウィルス量低下傾向はこれまでのアフリカ系・欧米系の結果と一致し、本アレルによるウィルス量抑制は宿主・ウィルス双方の多様性を含めても共通であることが確認された。
- 4) 今回 Cw アレルによるウィルス抑制が CTL のみならず NK 細胞にも由来している可能性が示唆され、今後 NK 細胞側の KIR との更なる研究が期待されるところである。

F. 健康危険情報

(総括報告書を参照)

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) A Rojanawiwat, N Tsuchiya, P Pathipvanich, W Pumpradit, W-P Schmidt, S Honda, W Auwanit, P

Sawanpanyalert, K Ariyoshi. Impact of the National Access to Antiretroviral Program on the incidence of opportunistic infections in Thailand. *International Health* 2011 (in press)

- 2) N Wichukchinda, T Nakajima, N Saipradit, E E. Nakayama, H Ohtani, A Rojanawiwat, P Pathipvanich, K Ariyoshi, P Sawanpanyalert, T Shioda, A Kimura. TIM1 haplotypes control the disease progression to AIDS in a HIV-1-infected female cohort in Thailand. *AIDS* 2010; 24(11): 1625-31
- 3) G Gesprasert, N Wichukchinda, M Mori, T Shino, W Auwanit, B Sriwanthana, P Pathipvanich, P Sawanpanyalert, T Miura, P Auewarakul, A Thitithanyanont, K Ariyoshi. HLA-associated immune pressure on Gag protein in CRF01_AE infected individuals and its association with plasma viral load. *PLoS One* 2010; 5(6): e11179
- 4) Saeng-aroon S, Tsuchiya N, Auwanit W, Ayuthaya PI, Pathipvanich P, Sawanpanyalert P, Rojanawiwat A, Kannagi M, Ariyoshi K, Sugiura W. Drug-resistant mutation patterns in CRF01_AE cases that failed d4T+3TC+nevirapine fixed-dosed, combination treatment: Follow-up study from the Lampang cohort. *Antiviral Res.* 2010; 87(1):22-9

2. 学会発表

- 1) Masahiko Mori, Nuanjun

Wichukchinda, Archawin Rojanawiwat, Reiko Miyahara, Michio Yasunami, Panita Pathipvanich, Pathom Sawanpanyalert, and Koya Ariyoshi: Favorable and unfavorable HLA alleles for HIV-viral control among CRF01_AE infected Thai population. CROI 2011, Boston USA. (Poster & Winning of Young Investigator Award)

- 2) 有吉紅也：シンポジウム 北タイ HIV コホートから学ぶエイズ免疫・病態. 第24回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京, 2010年11月24日-26日. (口頭演題)
- 3) 土屋 菜歩、Panita Pathipvanich, Nuanjun Wichukchinda, Pathom Sawanpanyalert、有吉紅也：北タイ政府系病院 HIV 外来における多剤併用療法の副作用と宿主遺伝子多型の関連. 第24回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京, 2010年11月24日-26日. (ポスター)
- 4) 土屋 菜歩、Panita Pathipvanich, Pathom Sawanpanyalert、有吉紅也：多剤併用療法後の北タイ政府系病院 HIV 外来における B 型肝炎、C 型肝炎重複感染の実態と肝機能障害について. 第24回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京, 2010年11月24日-26日. (ポスター)

H. 知的財産権の出願・登録状況
特記すべき事項なし。

図1 HLA アリールとウイルス量の相関：

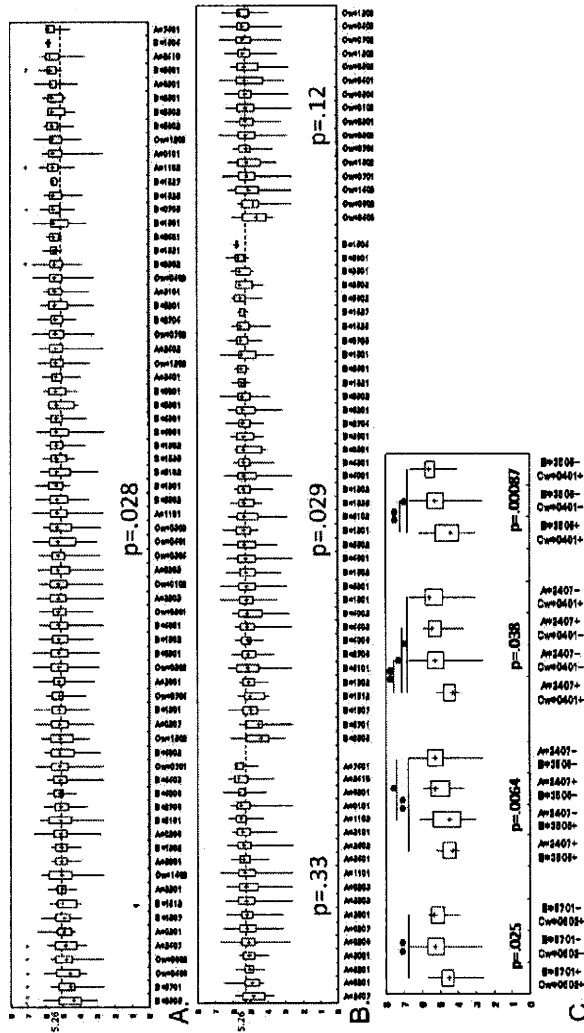


Figure 1. Class I HLA allele expression and viral load association. The associations among whole 71 class I HLA alleles and viral load were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA); * and ** showed a significant difference of $p < 0.05$ (*) and $p < 0.01$ (**), respectively, by unpaired t-test between allele positives and negatives (A). Viral load difference was also analyzed among each of A, B, Cw loci (B). Viral load difference among linkage disequilibrium associations was shown (C).

図2 HLA supertype 構成アレルとウイルス量の相関：

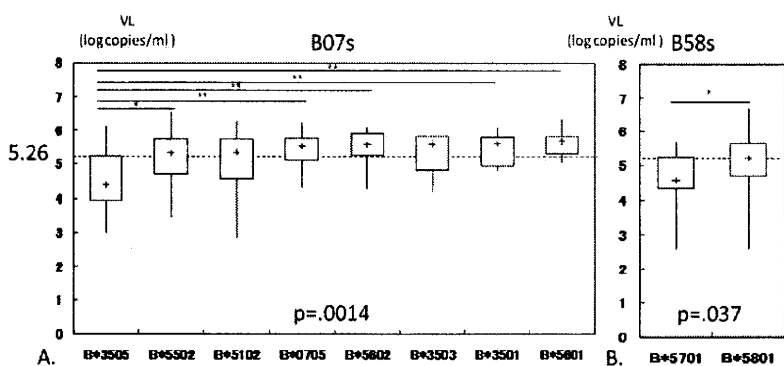


Figure 2. Viral load difference among HLA supertype composing alleles.
 The associations among supertype composing alleles and viral load were analyzed in B07s (A) using one-way analysis of variance (ANOVA) and B58s (B) using unpaired t-test; * and ** showed a significant difference of $p < .05$ (*) and $p < .01$ (**) by unpaired t-test between allele positives.

図3 HLA アレル保有頻度の総和とウイルス量の相関：

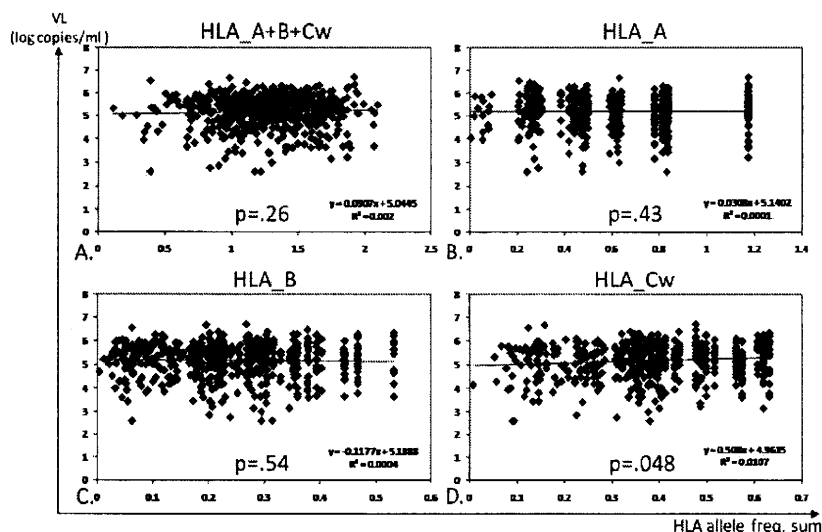


Figure 3. Correlation between sum of HLA allele frequency and viral load.
 Sum of allele population frequency in each individual and viral load association was analyzed with Pearson's correlation test. It was analyzed among sum of all alleles (A), A alleles (B), B alleles (C), and Cw alleles (D).

図4 KIR リガンド保有とウイルス量の相関：

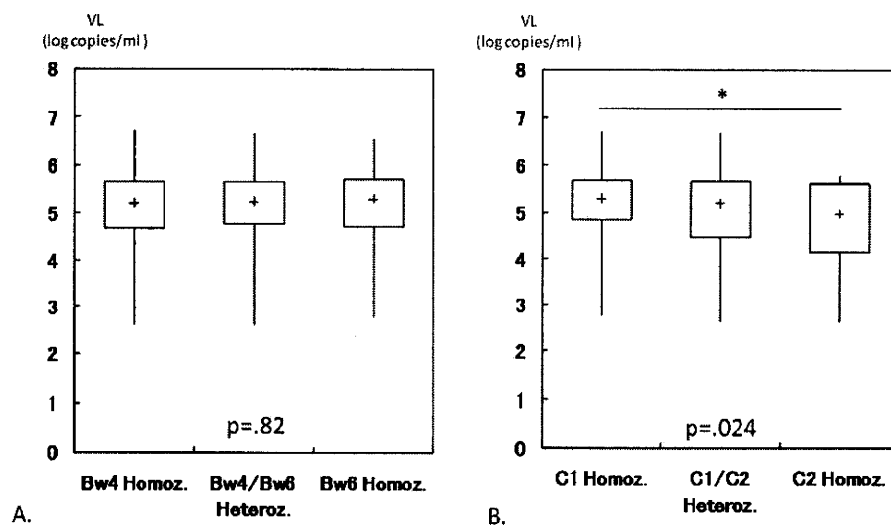


Figure 4. KIR ligand expression and viral load association.

The associations among Bw4/Bw6 expression (A) or C1/C2 expression (B) and viral load were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA); * and ** showed a significant difference of $p < .05$ (*) and $p < .01$ (**) by unpaired t-test between expression positives.

表1 KIR 遺伝子型とウイルス量の差：

	Viral load (log copies/ml)			p	n	Viral load (log copies/ml)			p	n
	n	+	-			n	+	-		
n=557				n=209						
C1+				C1+						
KIR2DL2	189	5.14±0.73	355	5.18±0.71	0.60	77	4.71±0.74	128	4.68±0.75	0.82
KIR2DL3	530	5.17±0.71	14	5.07±0.86	0.62	200	4.71±0.75	5	4.09±0.37	0.067
KIR2DS2	206	5.13±0.73	338	5.19±0.70	0.30	79	4.67±0.74	126	4.71±0.75	0.74
C2+				C2+						
KIR2DL1	136	5.08±0.77	0	-	-	45	4.37±0.71	0	-	-
KIR2DS1	55	5.08±0.83	81	5.08±0.73	0.99	17	4.21±0.68	28	4.47±0.72	0.22
C1/C1+				C1/C1+						
KIR2DL2	145	5.16±0.70	276	5.20±0.71	0.63	61	4.81±0.72	103	4.73±0.75	0.52
KIR2DL3	410	5.19±0.70	11	5.15±0.87	0.85	161	4.77±0.74	3	4.00±0.49	0.070
KIR2DS2	155	5.14±0.71	266	5.21±0.70	0.27	63	4.76±0.72	101	4.76±0.75	0.97
C2/C2+				C2/C2+						
KIR2DL1	13	4.88±0.99	0	-	-	4	3.80±0.25	0	-	-
KIR2DS1	8	4.88±0.89	5	4.88±1.25	1	2	3.72±0.39	2	3.88±0.09	0.22

Table 1. C1/C2 expression with or without KIR2D and viral load association.

Viral load association between C1/C2 expression with or without KIR2D expression was analyzed by unpaired t-test. C1+ or C2+ means their positives including both heterozygous and homozygous. C1/C1+ or C2/C2+ means their homozygous positives only.

CTL の多様性と抗 HIV 機能の制御

研究分担者 上野貴将 熊本大学エイズ学研究センター 准教授

研究要旨：本研究は、病態形成に関わる感染細胞と免疫細胞の相互作用の解析をするために、免疫サイドからアプローチすることを分担課題としている。本年度は、HIV 特異的 CD8 陽性 T 細胞の多様性について、T 細胞抗原レセプターの構造、抗ウイルス機能、抗原変異に対する交差反応性を解析した。HLA-B35 拘束性の CTL 応答に着目して、多数の HIV 感染者の検体を用いて CTL の性質を解析することによって、抗原特異的 CTL 集団が経時的に変遷すること、CTL の抗ウイルス機能や抗原変異に対する交差反応性が一様ではないことを明らかにした。これらの結果は、T 細胞免疫系とエイズ病態進行との関連を明らかにしていくうえで重要なだけでなく、ワクチン等による抗ウイルス免疫応答の誘導を考えるうえで貴重な情報となると期待される。

A. 研究目的

本研究では、研究班の主要な柱の一つである「病態形成に関わる感染細胞と免疫細胞の相互作用」に取り組む。具体的には、HIV 特異的 CD8 陽性 T 細胞の多様性が、抗 HIV 制御に与える影響を明らかにすることを分担課題として研究を遂行する。本年度は、HIV 特異的 T 細胞の細胞傷害活性、T 細胞抗原レセプター(TCR)の構造、および抗原変異に対する TCR の交差反応性について検討を行った。

B. 研究方法

さまざまな病態にある HIV 感染者から提供していただいた血液検体（国立国際医療センター・岡先生および瀧永先生の協力の下）から、CTL クローンの樹立を行った。CTL クローンから TCR をコードする遺伝子をクローニングし、そのタイプをデータベースを用いて解析した。さらに、レトロウイルスベクターに組み込んで、T 細胞株に導入することにより、TCR の機能的再構築を試みた。抗原ペプチドの各アミノ酸残基に一つずつ変異を導入した変異ペプチドライブラリーを

合成して、アッセイに用いた。

（倫理面への配慮）

HIV 感染者から供与いただいた検体を用いた研究に関しては、関連する機関（熊本大学および国立国際医療センター）の倫理審査会の審議を受け、承認を得ている。また、HLA 遺伝子タイピングについては、ヒト遺伝子解析に関わる研究として、同じく関連機関の倫理審査委員会の審議を受け、承認されている。どちらの場合も、提供者の文書による承諾と個人情報の保護に万全を期すことを含め、承認を受けた研究計画に厳密にしたがって遂行した。

C. 研究結果

（1）CTL の抗ウイルス活性

我々のこれまでの研究から、HIV-1 に対する HLA-B35 拘束性 CTL 応答では、Nef 蛋白質が主要なターゲットとなっていた。Nef 特異的な CTL クローンを数多く樹立して、それぞれの CTL が認識する抗原ペプチドを詳細に解析したところ、2つの相重なるペプチドを抗原とする少なくとも2つの集団で構成

されていることが分かった。興味深いことに、短い方の VY8 (VPLRPMTY) というペプチドは、感染早期の感染者で CTL の主要なターゲットであった (図 1)。対照的に、VY8 よりもアミノ末端が 3 アミノ酸長い RY11 (RPQVPLRPMTY) というペプチドは、慢性感染期の感染者で主要な抗原であった (図 1)。

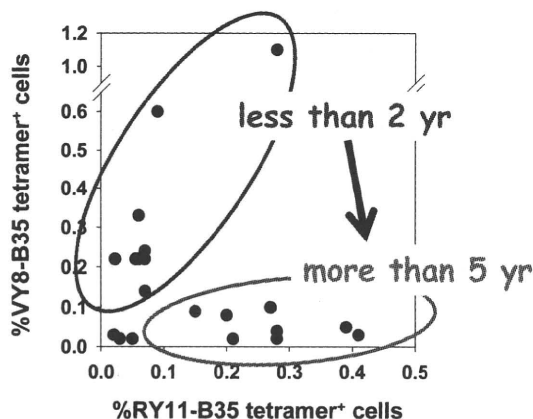


図 1 : CTL 応答の経時的変化

次に、HIV 感染細胞に対する細胞傷害活性を測定し、CTL の特性を解析した。健康人の血液検体から CD4 陽性 T 細胞を調製し、HIV-1 を感染させて、CTL のターゲットとして用いた。その結果、VY8 に特異的な CTL クローンの方が、RY11 に特異的な CTL クローンよりも、HIV 感染細胞に対する傷害活性が高いことが明らかとなった (図 2)。

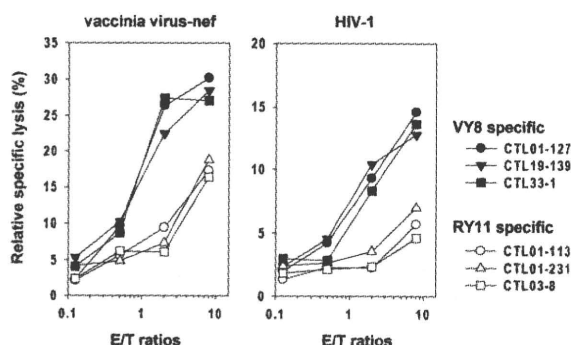


図 2 : CTL の抗ウイルス活性

(2) T細胞レセプター(TCR)の解析

次に、各 CTL クローンから mRNA を調製

して、PCR を用いて TCR 遺伝子を特異的に増幅した。可変領域の解析を行ったところ、VY8 特異的な TCR は共通した構造を有していた。それに比べて、RY11 特異的な TCR には構造的な共通性は認められなかった (表 1)。

表 1 TCR の一次構造

Specificity	patient	CTL clone	α chain		
			V Gene	J Segment	CDR3 sequence
VY8	Pt-01	CTL-H127	AV1-1*01	AJ31*01	CAVTSGDARLMF
	Pt-19	CTL-136	AV1-1*01	AJ31*01	CAVRDGGNNARLMF
		CTL-139	AV1-1*01	AJ26*01	CAVTDNYGQNFVF
	Pt-33	CTL-S1	AV1-2*01	AJ26*01	CAVRDNYGQNFVF
RY11	Pt-01	CTL-H113	AV21*02	AJ24*02	CAVLKSDSWGKLF
		CTL-H231	DV1*01	AJ10*01	CALGEALTGGNKLF
	Pt-03	CTL-G8	AV19*01	AJ20*01	CALHNDYKLSF
	Pt-19	CTL-27	AV12-3*01	AJ49*01	CAMSEGTGNQFYF
		CTL-142	AV1-1*01	AJ3*01	CAVRGKYSSASKIF

(3) TCR の機能的再構成

クローニングした TCR 遺伝子をレトロウイルスベクターに組み込んで、TCR を欠損した TG40 細胞に導入した。フローサイトメトリーによる TCR/CD3 複合体の発現や抗原刺激に対する IL-2 産生を指標として、TCR が機能的に再構成され、元の CTL と同一の抗原特異性を示していることを確認した (図 3)。

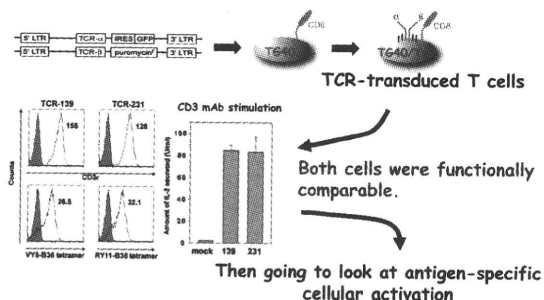


図 3 : TCR の機能的再構成

(4) TCR の交差反応性の解析

HIV-1 の抗原変異が著しいこと、CTL から逃避する変異ウイルスが選択されてくることを考えると、CTL の交差反応性は抗ウイルス機能として重要である。そこで、RY11