



表1 B\*3505 および B\*5701 と関連した Gag アミノ酸変異について、相関の強度を Odds ratio および p 値(Fisher's Exact Test)にて示した。また、B\*3505 および B\*5701 保有感染者における各アミノ酸変異の有無とウイルス量との関係を右端に示した。S499L 変異においてのみ、変異が認められた B\*3505 感染者のウイルス量が高かった。

	Position	Restricted HLA	HLA	Mutatnt	Wild	Odds_ratio	p value(Fisher)	Viral load (Log)
p17	S9K	B*3505	+	2	14	$\infty$	0.00066778	4.468604823
			-	0	584			4.540243043
p17	I60L	B*3505	+	11	5	7.46015	0.000136356	4.523770518
			-	133	451			4.54782731
p24	L334F	B*3505	+	2	14	83.28571	0.001956438	4.675881997
			-	1	583			4.510632018
p6	S499L	B*3505	+	5	11	9.377104	0.00082449	5.013818452
			-	27	557			4.311956362
p24	T242N	B*5701	+	9	0	$\infty$	2.479E-07	4.630586159
			-	105	486			n.d.

## 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、大規模な合成ペプチドライブラリーを用いて HIV 特異的細胞傷害性 T 細胞(CTL)の交差反応性を評価し、それを指標として CTL の多様性・共通性を解析した。その結果、HIV 特異的 CTL は、もともとの野生型ペプチドに対して非常に強い応答を示すため、微小な変異に対して応答性を失いやすく、CTL 逃避の一因となると考えられた。また、HIV 特異的 CTL が、インフルエンザウイルス由来抗原ペプチドに対して、交差反応性を示すことを明らかとした。このことは、他の感染症への免疫応答や免疫学的メモリーの形成が、HIV に対する免疫応答に影響することを示唆しており、HIV 感染病態の理解や今後のワクチン開発に重要な知見となると考えられた。

### 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、大規模なペプチドライブラリーを用いて、交差反応性に関する HIV 特異的 T 細胞の多様性について検討した。

### 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・岡先生および潟永先生の協力の下)から、CTL クロンの樹立を行った。ペプチドライブラリーについては、イギリスのカーディフ大学の本園千尋博士および A. Sewell 教授との共同研究として実施した。

(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。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 クローン

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 蛋白質由来の VY8 (VPLRPMTY)が、感染早期に主要な CTL 応答を与えていた。そこで、数人の感染者からこのエピトープに特異的な CTL クロンを樹立した。中でも、S1, 139, K51 という 3 つのクローンは、それぞれ異なる感染者から樹立したが、T 細胞レセプター(TCR)遺伝子は極めて高い共通性を示した(表 1)。

表 1 VY8 特異的 TCR

patient	CTL clone	α chain			β chain		
		V Gene	J Segment	CDR3 sequence	V Gene	J Segment	CDR3 sequence
Pt-19	CTL-139	AV1-1*01	AJ28*01	CAVTDNYGQNFVF	BV11-2*01	BJ1-1*01	CASSLIDVSTVEAFF
Pt-33	CTL-S1	AV1-2*01	AJ28*01	CAVTDNYGQNFVF	BV4-2*01	BJ2-3*01	CASSQAADPAITDAEIQYF
Pt-100	CTL-K51	AV1-1*01	AJ28*01	CAVSDNYGQNFVF	BVZ7*01	BVZ-5*01	CASSFLGKGTQYF

## (2) ペプチドライブラリーを用いた交差反応性の解析

次に、Positional Scanning Synthetic Combinatorial Library (PS-SCL) と呼ばれる 8mer ペプチドの各アミノ酸変異をほぼすべて網羅するライブラリーを用いて、各 CTL クロンの交差反応性を解析した。CTL クローン S1 での結果を例として、図 1 に示す。それぞれの CTL クロンは、いくつかのアミノ酸変異に対しては、異なった応答性を示したが、総じて、野生型配列が最も高い反応性を示した。このことから、HIV 特異的 CTL では、野生型の抗原に対する応答性がきわめて高いために、抗原ペプチドの微小な変異に対して応答性が減弱化する結果になると考えられた。

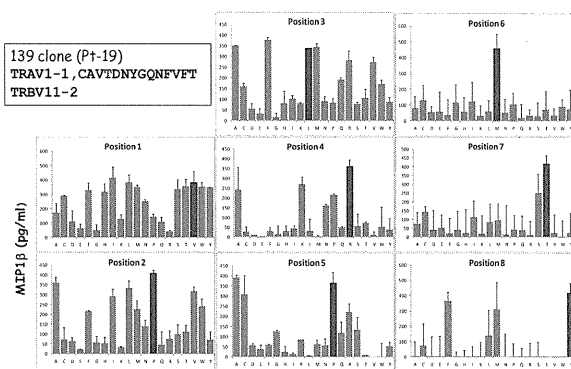


図 1 CTL クローン S1 の交差反応性

## (3) アゴニストペプチドの探索

CTL クローン S1 で許容性が認められたアミノ酸変異をさまざまに組み合わせたペプチドを合成し、S1 に対する応答性を解析した。その結果、IPVRAWSY というペプチドが、もとの VY8(VPLRPMTY) とほぼ同程度の反応性を与えることを見出した。

## (4) 他の病原体由来抗原との交差反応性

このアゴニストペプチド (IPVRAWSY) に対して、ヒト病原体の中から良く似ているアミノ酸配列を持つペプチド候補の検索を行った。その結果、インフルエンザウイルスのヘマグルチニンに、LPARSWSY という配列を見つけた。このペプチドを合成して、S1

CTL クロンの感受性を解析したところ、抗原特異的な応答を示した (図 2)。もとの HIV-1 Nef 由来の配列 (VPLRPMTY) に比較すると、10~100 倍程度弱い感度ではあったが、非常に明確な交差反応性であった。

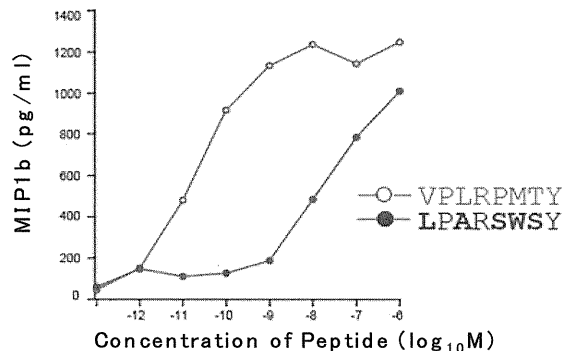


図 2 インフルエンザ由来エпитープに対する交差反応性

## D. 考察

HLA-B35 拘束性で、感染早期に主要な HIV-1 Nef 由来の CTL エピトープ (VPLRPMTY) に特異的な CTL クロンの交差反応性を解析した。各クローンによって交差反応プロファイルがわずかに異なっていたが、総じて、Nef 由来の配列に極めて強い応答を示した。このことが、わずかなアミノ酸の違い (たとえば CTL 逃避変異) に対して活性を失ってしまう結果となると考えられた。また、他の病原体由来の抗原ペプチドに対して交差反応性を示したことは、ワクチン開発などを進める上で極めて重要な知見となると考えられる。

## E. 結論

本研究では、CTL の交差反応性という指標をもとに、HIV 特異的 CTL の多様性と共通性を明らかにするとともに、HIV の抗原変異に対する CTL 逃避が起こるメカニズムの一端を明らかとした。また、HIV 特異的 CTL が、インフルエンザ由来抗原に対して、交差反応性を示したことは極めて興味深い。免疫応答が、遺伝的な因子だけでなく、個体ごとの感染症に関する経験・履歴が、次の感染に対する免疫応答に影響することが示唆され、

ヒト感染免疫やワクチン研究に重要な知見となると期待される。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) Philip Mwimanzi, Zafrul Hasan, Ranya Hassan, Shinya Suzu, Masafumi Takiguchi and Takamasa Ueno (2011) Effects of naturally-arising HIV Nef mutations on cytotoxic T lymphocyte recognition and Nef's functionality in primary macrophages. *Retrovirology* 8:50
- (2) Nopporn Chutiwitoonchai, Masateru Hiyoshi, Philip Mwimanzi, Takamasa Ueno, Akio Adachi, Hirotaka Ode, Hironori Sato, Oliver T. Fackler, Seiji Okada, Shinya Suzu (2011) The identification of a small molecule compound that reduces HIV-1 Nef-mediated viral infectivity enhancement. *PLoS ONE* 6(11): e27696

### 2. 学会発表

- (1) Philip Mwimanzi, Tristan Markle, Michiyo Tokunaga, Toshiyuki Miura, Eric Martin, Florencia Pereyra, Bruce Walker, Zabrina Brumme, Mark Brockman, Takamasa Ueno. Impaired viral infectivity and viral replication capacity by nef alleles from HIV elite controllers. 25th Annual Meeting of Japanese Society for AIDS Research, Tokyo Hyatt Regency, Tokyo, Japan. November 30th - 2nd December, 2011.
- (2) Philip Mwimanzi, Tristan Markle, Michiyo Tokunaga, Toshiyuki Miura, Eric Martin, Florencia Pereyra, Bruce Walker, Zabrina Brumme, Mark Brockman, Takamasa Ueno. Population analysis of viral replication capacity by nef alleles of HIV elite controllers. 12th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 19-21 October 2011.
- (3) Philip Mwimanzi, Tristan Markle, Michiyo Tokunaga, Toshiyuki Miura, Eric Martin, Florencia Pereyra, Bruce Walker, Zabrina Brumme, Mark Brockman, Takamasa Ueno. Impairment of viral replication capacity by nef

- alleles from HIV elite controllers. *Frontiers of Retrovirology, Complex retroviruses, retroelements and their hosts*, Amsterdam, Netherlands, 3-5 October 2011.
- (4) Philip Mwimanzi, Tristan Markle, Michiyo Tokunaga, Toshiyuki Miura, Eric Martin, Florencia Pereyra, Bruce Walker, Zabrina Brumme, Mark Brockman, Takamasa Ueno. Impairment of virion infectivity by nef alleles from HIV elite controllers. Nef activity in enhancement of virion infectivity is impaired in HIV elite controllers. XV, International Congress of Virology, Sapporo, Japan, 11-16 September 2011.
  - (5) Philip Mwimanzi, Tristan Markle, Michiyo Tokunaga, Toshiyuki Miura, Eric Martin, Florencia Pereyra, Bruce Walker, Zabrina Brumme, Mark Brockman, Takamasa Ueno. Impairment of virion infectivity by nef alleles from HIV elite controllers. Keystone Symposia HIV Evolution, Genomics and Pathogenesis, Canada, March 20-25, 2011.
  - (6) Zafrul Hasan, J. Carlson, H. Gatanaga, A. Le, C. Brumme, S. Oka, Z. Brumme, T. Ueno. Impact of HLA class I-driven genetic variability in HIV-1 accessory genes in Japanese sequences. Keystone Symposia HIV Evolution. Genomics and Pathogenesis: Whistler, Canada; March 20 - 25, 2011.
  - (7) Zafrul Hasan, J. Carlson, H. Gatanaga, A. Le, C. Brumme, S. Oka, Z. Brumme, T. Ueno. Subtle effect of HLA class I-driven selective forces on the variability of HIV-1 accessory genes. 12th Kumamoto AIDS Seminar and GCOE Joint International Symposium. Hotel Nikko Kumamoto and Aso Resort Grandvrio Hotel, Kumamoto, Japan; October 19-21, 2011.
  - (8) Zafrul Hasan, J. Carlson, H. Gatanaga, A. Le, C. Brumme, S. Oka, Z. Brumme, T. Ueno. Effect of HLA class I-mediated selective pressure on HIV-1 accessory genes. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress: Virus and host response, Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan; September 11-16, 2011.

- (9) Zafrul Hasan, J. Carlson, H. Gatanaga, A. Le, C. Brumme, S. Oka, Z. Brumme, T. Ueno. Impact of HLA class I-driven genetic variability in HIV-1 accessory genes. 2011 The Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. Chiba, Makuhari Messe, Japan; November 27-30, 2011
- (10) Chihiro Motozono, John J. Miles, Linda Wooldridge, David A. Price, Takamasa Ueno, Andrew K. Sewell. The cross-reactivity footprints of HIV-specific CTLs. 12th Kumamoto AIDS Seminar and GCOE Joint International Symposium. Hotel Nikko Kumamoto and Aso Resort Grandvrio Hotel, Kumamoto, Japan; October 19-21, 2011.
- (11) 緒方陽子、大津家裕仁、Philip Mwimanzi、徳永美知代、Tristan Markle、三浦聡之、Bruce Walker、Zabrina Brumme、Mark Brockman、上野貴将：Nef のウイルスレセプター発現低下機能と病態、一般演題「アクセサリー遺伝子-2」第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、ハイアットリージェンシー東京、2011 年 11 月 30 日－12 月 2 日

G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
無し							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Terahara, K., Yamamoto, T., Mitsuki, Y-y, Shibusawa, K., Ishige, M., Mizukoshi, F., Kobayashi, K., and <u>Tsunetsugu-Yokota, Y.:</u>	Fluorescent reporter signals, EGFP and DsRed, encoded in HIV-1 facilitate the detection of productively infected cells and cell-associated viral replication levels.	Front. Microbiol.	2	1-11	2012
Fujii1, H, Ato, M., Takahashi, Y., Otake, K., Hashimoto, S-I., Kaji, T., <u>Tsunetsugu-Yokota, Y.</u> , Fujita, M., Adachi, A., Nakayama, T., Taniguchi, M., Koyasu, S., and Takemori, T.	HIV-Nef impairs multiple T cell functions in antigen- specific immune response in mice.	Int. Immunol.	23	433-441	2011
Salaun, B., Yamamoto, T., Bardran, B., <u>Tsunetsugu-Yokota, Y.</u> , Roux, A., Baitsch, L., Rouas, R., Fayyad-Kazan, H., Baumgaertner, P., Devedre, E., Ramesh, A., Braun, M., Speiser, D., Autran, B., Martiat, P., Appay, V., and Romero, P.	Differentiation associated regulation of microRNA expression in vivo in human CD8+ T cell subsets.	J. Transl. Med.	9	44-52	2011
Arias, J.A., Iwabu, Y., and Tokunaga, K.	Structural basis for antiviral activity of BST-2/tetherin and its viral antagonisms.	Front Microbiol.	2	250	2011



Ikeda, T., Abd El Galil, K., <u>Tokunaga, K.</u> , Maeda, K., Sata, T., Sakaguchi, N., Harada, S., Heidmann, T., and Koito, A.	Intrinsic restriction activity by apolipoprotein B mRNA editing enzyme APOBEC1 against the mobility of autonomous retrotransposons.	Nucleic Acids Res.	39	5538-5554	2011
Taneichi, D., Iijima, K., Doi, A., Koyama, T., Minemoto, Y., <u>Tokunaga, K.</u> , Shimura, M., and Ishizaka, Y.	Identification of SNF2h, a Chromatin-Remodeling Factor, as a Novel Binding Protein of Vpr of Human Immunodeficiency Virus Type 1.	J. Neuroimmune Pharm.	6	177-87	2011
Sapsutthipas, S., Kitagawa, Y., <u>Tokunaga, K.</u> , Ikuta, K., and Kameoka, M.	Viral factors involved in adapter-related protein complex 2 alpha 1 subunit-mediated regulation of human immunodeficiency virus type 1 replication.	Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health	42	311-319	2011
Shimura, M., Toyoda, Y., Iijima, K., Kinomoto, M., <u>Tokunaga, K.</u> , Yoda, K., Yanagida, M., Sata, T. and <u>Ishizaka, Y.</u>	Epigenetic displacement of HP1 from heterochromatin by HIV-1 Vpr causes premature sister chromatid separation.	J. Cell. Biol.	194	721-35	2011
Taneichi, D., Iijima, K., Doi, A., Koyama, T., Minemoto, Y., <u>Tokunaga, K.</u> , Shimura, M., <u>Ishizaka, Y.</u>	Identification of SNF2h, a chromatin-remodeling factor, as a novel binding protein of Vpr of human immunodeficiency virus type 1.	J. Neuroimmune Pharmacol	6	177-87	2011
Kobayashi, T., Ode, H., Yoshida, T., Sato, K., Gee, P., Yamamoto, S.P., Ebina, H., Strebel, K., Sato, H., <u>Koyanagi, Y.</u>	Identification of amino acids in the human tetherin transmembrane domain responsible for HIV-1 Vpu interaction and susceptibility.	Journal of Virology	85	932-945	2011
Sato, K., Misawa, N., Nie, C., Satou, Y., Iwakiri, D., Matsuoka, M., Takahashi, R., Kuzushima, K., Ito, M., Takada, K., <u>Koyanagi, Y.</u>	A novel animal model of Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in humanized mice.	Blood	117	5663-5673	2011

Sato, K., <u>Koyanagi, Y</u>	The mouse is out of the bag: insights and perspectives on HIV-1-infected humanized mouse models.	Experimental Biology and Medicine	236	977-985	2011
Gee, P., Ando, Y., Kitayama, H., Yamamoto, S.P., Kanemura, Y., Ebina, H., Kawaguchi, Y., <u>Koyanagi, Y.</u>	APOBEC1-mediated editing and attenuation of herpes simplex virus 1 DNA indicate that neurons have an antiviral role during herpes simplex encephalitis.	Journal of Virology	85	9726-9736	2011
Watanabe, T., Urano, E., Miyauchi, K., Ichikawa, R., Hamatake, M., Misawa, N., Sato, K., Ebina, H., <u>Koyanagi, Y.</u> , Komano, J.	The hematopoietic cell-specific Rho GTPase inhibitor ARHGDI/D4GDI limits HIV-1 replication.	AIDS Research and Human Retroviruses,	27	In press	2011
Sato, K., Misawa, N., Fukuhara, M., Iwami, S., An, D.S., Ito, M., <u>Koyanagi, Y.</u>	Vpu augments the initial burst phase of HIV-1 propagation and downregulates BST2 and CD4 in humanized mice.	Journal of Virology		In press	2012
Ogawa, T., S. Tsuji-Kawahara, T. Yuasa, S. Kinoshita, T. Chikaishi, S. Takamura, H. Matsumura, T. Seya, T. Saga, and <u>M. Miyazawa.</u>	Natural killer cells recognize Friend retrovirus-infected erythroid progenitor cells through NKG2D-RAE-1 interactions in vivo.	J. Virol.	85	5423-5435	2011
Sironi, M., F. R. Guerini, C. Agliardi, M. Biasin, R. Cagliani, M. Fumagalli, D. Caputo, A. Cassinotti, S. Ardizzone, M. Zanzottera, E. Bolognesi, S. Riva, Y. Kanari, <u>M. Miyazawa,</u> and M. Clerici.	An evolutionary analysis of RAC2 identifies haplotypes associated with human autoimmune diseases.	Mol. Biol. Evol.	28	3319-3329	2011
<u>Miyazawa, M.,</u> S. Takamura, S. Tsuji-Kawahara, E. Kajiwara, T. Chikaishi, and M. Kato	A hole in the T-cell repertoire induced after retroviral infection of immunocompetent adult mice.	Retrovirology	8 (Suppl. 2)	O30	2011

Li, J., Y. Hakata, E. Takeda, Q. Liu, Y. Iwatani, C. A. Kozak, and <u>M. Miyazawa</u>	Two genetic determinants acquired late in Mus evolution regulate the inclusion of exon 5, which alters mouse APOBEC3 translation efficiency.	PLoS Pathog.	8	e1002478	2012
Adachi T, Tanaka R, Kodama A, Saito M, Takahashi Y, Ansari AA, <u>Tanaka Y.</u>	Identification of an unique CXCR4 epitope whose ligation inhibits infection by both CXCR4 and CCR5 tropic human immunodeficiency type-I viruses.	Retrovirology	8	84	2012
Nakayama K, Nakamura H, Koga M, Koibuchi T, Fujii T, Miura T, Iwamoto A, <u>Kawana-Tachikawa A.</u>	Imbalanced Production of Cytokines by T Cells Associates with the Activation/Exhaustion Status of Memory T Cells in Chronic HIV Type 1 Infection.	AIDS Res Hum Retroviruses.		In press	2011
Mori M, Sriwanthana B, Wichukchinda N, Boonthimat C, Tsuchiya N, Miura T, Pathipvanich P, <u>Ariyoshi K,</u> Sawanpanyalert P.	Unique CRF01_AE Gag CTL Epitopes Associated with Lower HIV-Viral Load and Delayed Disease Progression in a Cohort of HIV-Infected Thais.	PLoS One	6(8)	e22680	2011
Rojanawiwat A, Tsuchiya N, Pathipvanich P, Pumpradit W, Schmidt WP, Honda S, Auwanit W, Sawanpanyalert P, <u>Ariyoshi A.</u>	Impact of the National Access to Antiretroviral Program on the incidence of opportunistic infections in Thailand.	International Health	3(2)	101-107	2011
P Mwimanzi, Z Hasan, R Hassan, S Suzu, M Takiguchi, * <u>T. Ueno</u>	Effects of naturally-arising HIV Nef mutations on cytotoxic T lymphocyte recognition and Nef's functionality in primary macrophages	Retrovirology	8	50	2011
N. Chutiwitoonchai, M. Hiyoshi, P. Mwimanzi, T. <u>Ueno,</u> <u>A.</u> Adachi, H. Ode, H. Sato, O.T. Fackler, S. Okada, S. Suzu	The identification of a small molecule compound that reduces HIV-1 Nef-mediated viral infectivity enhancement	PLoS ONE	6(11)	e27696	2011

