

SIV 感染におけるウイルス潜伏化機構と CTL 応答

研究分担者 山本 浩之 国立感染症研究所 エイズ研究センター 研究員

研究要旨：

SIV 感染サルエイズモデルの先行解析により、CTL を主体とした安定な初期 SIV 制御に至る MHC クラス I ハプロタイプ共有アカゲサル群が同定された。本群における潜伏 SIV の長期制御に結びつく宿主免疫応答の実態は不明である。本研究では SIV 潜伏感染状態の評価を目的に、SIV 初期制御後の潜伏プロウイルスの安定的な検出を確立し、感染慢性期の配列を解析することで CTL エスケープの様式と病態の関連の評価を試みた。前年度では、末梢血 CD4 陽性 T 細胞中の SIV 長期制御中のプロウイルス配列は、感染後 2 年の時点でコードする Gag 蛋白に CTL エスケープ変異が蓄積しない群 (A 群) と蓄積する群 (B 群) に二分されることを見出した。本年度は当該群の時系列的な解析を行った結果、A 群と B 群のプロウイルス配列の差は感染後 1 年以降に主に生じることが見出された。CTL エスケープの有無は、感染後 2 年以降の血中ウイルス再出現例の有無と対応した。また制御持続の質を評価する目的で、A 群の 1 頭につき CD8 陽性細胞枯渇実験を行ったところ血中に再出現したウイルスは Gag 特異的 CTL エスケープを蓄積した変異株であり、持続制御中に SIV プロウイルスが存在する分画には変異体を選択されてゆく active reservoir と野生株が主に残存する abortive reservoir の 2 種以上が存在する事が示唆された。今後は上記結果を踏まえ当該群における IL-7+IL-15 の個体レベルの投与試験を行い、SIV を初期制御・潜伏後に再増殖に至らない形に至らせる手法の探索を行うことを検討する。

A. 研究目的

HIV の潜伏感染・再活性化を左右する細胞内因子および免疫学的要因を明らかにすることを目的に、本研究では個体レベルの初期エイズウイルス制御に至った SIV (サル免疫不全ウイルス) 感染サルエイズモデルを用い、持続的なウイルス制御下におけるウイルス潜伏化・CTL 応答の探索を行う。CTL 主体に初期 SIV 複製制御に至ったアカゲサル群に関し、持続制御期における CTL 応答と潜伏ウイルス中のエスケープ変異の蓄積状況を時系列的に遡って明らかにする。さらに各種の個体レベルでの病態介入実験を行うことで、持続制御の関連因子を明らかにしてゆくことを目標とする。

B. 研究方法

前年度に着手した、MHC クラス I ハプロタイプ 90-120-Ia 共有 SIV_{mac239} 初期制御群 ($n = 11$) の潜伏プロウイルスの解析の更なる検討を行

った。当該群の感染後 2 カ月、及び 1 年時 [血中ウイルスが制御直前、および検出下限 (400 RNA copies/ml plasma) 以下の時期] に遡り、末梢血単核球 (PBMC) より CD4 陽性 T 細胞を磁気分離した。分離には non-human primate CD4⁺ T cell isolation kit を用いた。非培養の細胞、あるいは IL-7 (10 ng/ml) + IL-15 (10 ng/ml) 存在下で 8 日間刺激培養を行う手法で 1.0×10^6 個の細胞につき DNeasy extraction kit を用い total DNA を抽出し、KOD FX neo を用いた nested PCR 法により SIV gag 領域の塩基配列解析を行った。一部個体については、nef 領域の解析も行った。

各頭の血中ウイルス量に関しては、感染後 2 年以降までの長期フォローアップを行った。

感染各期の Gag 特異的 CTL 応答のパターンを評価した。手法としては樹立済み自家 B 細胞芽球に当該の Gag エピトープ領域ペプチドを一

定濃度で載せ、評価対象の PBMC とゴルジ体阻害剤 (monensin) 存在下で 6 時間共培養し、抗原特異的な IFN- γ 産生に関し、細胞内サイトカイン染色と CD3/CD4/CD8 表面染色を組み合わせ、処理しフローサイトメーターで評価した。

初年度の評価で SIV 持続制御を示した A 群の 1 個体 (個体番号 Mq3) につき個体レベルでの CD8 枯渇実験を行った。抗 CD8 cM-T807 抗体を、皮下注/静注 2 回/2 週 計 4 回、初回 10mg/kg、2 回目以降 5mg/kg で投与した。その後の SIV 特異的 CTL 応答、及び血中ウイルス RNA の gag 領域配列解析を行った。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え生物等を用いる実験には、所属機関承認・文部科学大臣承認を取得済みであり、医用霊長類の利用時は、所属機関、医薬基盤研究所の動物実験委員会の審査・承認を得て動物愛護の精神に則って取扱いを行った。

C. 研究結果

1. SIV 初期制御個体群における CD4 陽性 T 細胞中プロウイルス検出を行った。前年度では、感染後 2 年の時点で gag 領域に CTL エスケープ変異が蓄積する群 (B 群 5 頭) と蓄積しない群 (A 群 6 頭) に二分されたが、時系列的に遡った結果、感染後 2 カ月では両群とも野生株 Gag が主体であり、感染後 1 年では CTL エスケープ蓄積群の 1 頭に単独の CTL エスケープが検出された以外は全頭で野生株であった (図 1)。また、nef 領域配列を A 群 2 頭の感染 2 年時検体につき解析した結果、当該領域には高度の G-to-A 変異が認められる場合があることが判明した。

2. CTL エスケープの蓄積の有無は、感染後 2 年を過ぎての血中ウイルスの再検出例の有無と対応した (図 2)。

3. 当該の期間中において Gag エピトープ特異的 CTL は B 群において消退傾向を示し、A 群においては比較的維持された。

4. 持続制御が生じていると目された A 群の 1 頭につき、抗 CD8 抗体を用いた CD8 陽性細胞

枯渇実験を施行した。施行後、予定通りに末梢血中より CD8 陽性細胞集団の消失を認めた。それに伴って速やかに血中ウイルスの再出現を認め、同時に SIV 特異的 CTL 応答の広汎化が生じていた。再出現した血中ウイルスの gag 領域塩基配列を解析した結果、それまで野生株であった配列が主要な Gag 特異的 CTL 全てからエスケープを呈した変異体 (Gag L216S, D244E, V375M) の配列に置き換わっていた (図 3)。

D. 考察

SIV 初期制御群は、感染後 2 年時点の末梢血 CD4 陽性 T 細胞中プロウイルスにおける CTL エスケープの有無で層別化されることが昨年度までに明らかになった。本年度はその差異が出現する時期をまず調べた結果、感染後 1 年までは B 群において同様のエスケープの兆候は明らかではなく、それ以降の変化であることが見出された。また、CTL エスケープの有無は以後の病態進行と直接的な連関がある可能性が見出され、それは制御経過中の Gag エピトープ特異的 CTL レベルの推移とよく対応した。

本年度の特徴的な成果として、CD8 枯渇実験時の再出現血中ウイルスの性状が挙げられる。即ち、再出現ウイルスは、感染 2 年次までの制御経過中の野生株プロウイルスと異なり、CTL エスケープ蓄積を来したものであった。

他方、nef 領域に G-to-A 変異を蓄積した A 群個体の持続制御期プロウイルスが、PBMC 刺激培養上清中に RNA 検出を認めなかった例と対応することを併せて考慮すると、

プロウイルスとして PBMC 中に検出される野生株ウイルスは、(active reservoir ではない) 一種の abortive reservoir に由来する。即ち抗原としての Gag は産生され続けているものの極低レベルである、もしくは特異的 CTL に認識されにくい局所に存在するため、当該の野生株の形で末梢血中を循環している。

末梢血にリアルタイムにウイルス表現型が反映されない active reservoir 中では、持続感染中に Gag 特異的 CTL エスケープ変異体がすでに優位となっているが、Gag 以外の SIV 特異的 CTL 群によって複製が高度に抑制されている。

以上の 2 要素の組み合わせから成る個体レベルの

SIV 持続制御の図式が考えられた。

E. 結論

SIV 初期制御アカゲサル群にて、長期制御期の末梢血 CD4 陽性 T 細胞中プロウイルス Gag 配列を時系列的に解析した結果、CTL エスケープの蓄積の存否は感染後 1 年以降に生じ、また変異蓄積が生じない A 群でも末梢血に反映されにくい分画で変異蓄積が既に生じている可能性が明らかとなった。本研究は、潜伏後に再増殖に至らないエイズウイルスの性状解明への重要な基礎的知見を与えるものである。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shi S, Seki S, Matano T, Yamamoto H. IL-21-producer CD4⁺ T cell kinetics during primary simian immunodeficiency virus infection. *Microbes Infect.* 15:697-707, 2013.
- 2) Nakane T, Nomura T, Shi S, Nakamura M, Naruse TK, Kimura A, Matano T, Yamamoto H. Limited impact of passive non-neutralizing antibody immunization in acute SIV infection on viremia control in rhesus macaques. *PLoS ONE* 8:e73453, 2013.
- 3) Iwamoto N, Takahashi N, Seki S, Nomura T, Yamamoto H, Inoue M, Shu T, Naruse TK, Kimura A, Matano T. Control of simian immunodeficiency virus replication by vaccine-induced Gag- and Vif-specific CD8⁺ T cells. *J Virol.* 88:425-433, 2014.

2. 学会発表

- 1) Yamamoto H. Selection of a survival signal-modulating CTL escape mutant precedes SIV neutralizing antibody induction. 12th Awaji International Forum of Infection and Immunity (AIFI12), Hyogo, Japan, September 2013.
- 2) Yamamoto H. & Matano, T. Selection of a survival signal-modulating CTL escape mutant precedes neutralizing antibody induction against highly resistant SIV. Cold Spring Harbor Meeting Harnessing Immunity to Prevent and Treat Disease, New York, USA, November 2013.

- 3) 山本浩之, 俣野哲朗. センダイウイルスベクターを用いたエイズワクチン. 第 17 回日本ワクチン学会学術集会 (シンポジウム 1: ウイルスベクターとワクチン), 津, 2013 年 11 月.
- 4) Yamamoto H. Neutralizing antibodies against highly antibody-resistant SIV: protective activity and induction correlates. Weekly Young Investigator's Seminar (WYIS), Univ. Kumamoto, Kumamoto, Japan, February 2014.

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。

ID/provirus	2mo p.c.	1Y p.c.	2Y p.c.		
Group A	WT	WT	WT		
Mq1	WT	WT	WT		
Mq2	WT	WT	WT		
Mq3	WT	WT	WT		
Mq4	WT	WT	WT		
Mq5	WT	WT	WT		
Mq6	WT	WT	WT		
Group B					
Mq7	WT	WT	L216S	D244E	A373T
Mq8	WT	WT	L216S	V243A	D244E
Mq9	WT	WT	L216S	V243A	D244E
Mq10	WT	WT	D205E	L216S	D244E I247L
Mq11	WT	L216S	L216S	V243A	L372F

図 1. SIV 持続制御群における末梢血 CD4 陽性 T 細胞中プロウイルスの gag 領域配列解析.

SIV 感染後 2 カ月、1 年、2 年の各ウイルス複製制御期における、対応する Gag 蛋白中に生じた非同義置換を示す。D205E, L216S は Gag₂₀₆₋₂₁₆ 特異的 CTL エスケープ、V243A, D244E, I247L は Gag₂₄₁₋₂₄₉ 特異的 CTL エスケープ、L372F, A373T は Gag₃₇₃₋₃₈₀ 特異的 CTL エスケープをそれぞれ示す。

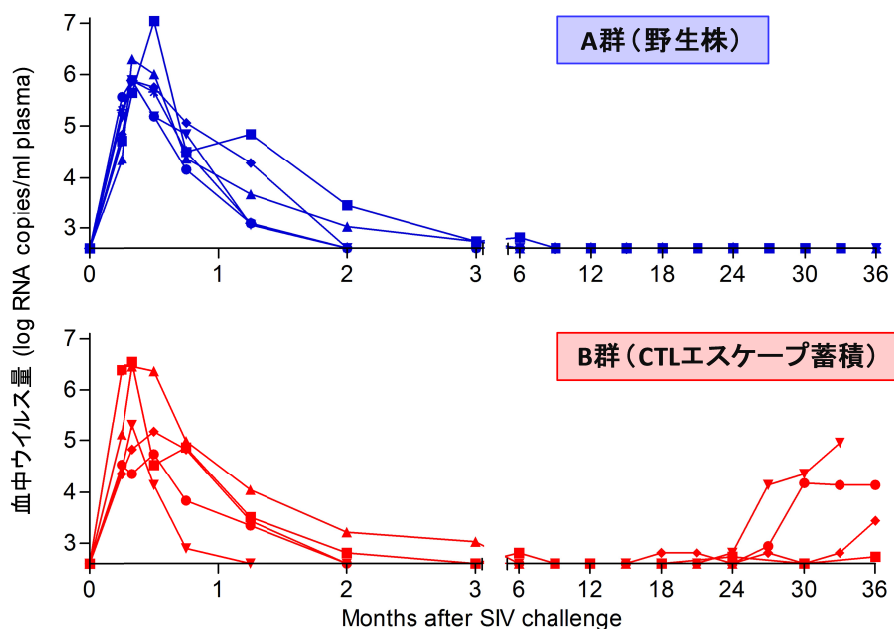
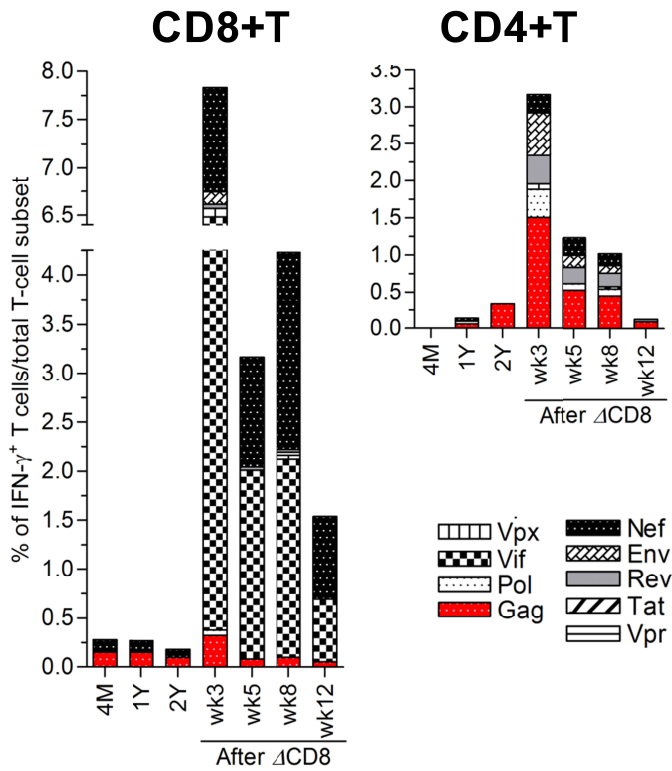


図 2. SIV 持続制御群における血中ウイルス量の解析.

SIV 感染後の血中ウイルス量 (*gag* RNA コピー数/ml 血漿) の経時変化を示す。

A



B

ID/viral RNA	2 wks post-CD8 depletion		
Group A			
Mq3	L216S	D244E	V375M

図 3. SIV 持続制御・A 群(末梢血プロウイルス Gag 配列:野生株)個体 Mq3 における CD8 陽性細胞枯渇試験の解析.

A: CD8 陽性細胞枯渇試験前後の各 SIV 蛋白抗原特異的 CTL レベル(全 CD3 陽性 T 細胞に対する存在比率)を示す。B: CD8 枯渇試験の開始 2 週後に血中に再検出されたウイルス RNA 中の gag 領域変異に対応する Gag 非同義置換の内、代表的なエピトープ特異的 CTL に対するエスケープ変異を示す。