

HIV 複製を自発的に制御する感染者群でのウイルス蛋白質 Nef の 機能と免疫活性化における役割

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：非常に稀ではあるが（全感染者の1%以下）、自身の免疫系で HIV-1 を制御する感染者が知られておりエリートコントローラー（EC）と呼ばれている。EC では、慢性的な免疫活性化は多くの場合認められないため、ウイルス制御や HIV 感染に伴う免疫活性化を研究する上で良いモデルとなりうる。本研究では、免疫活性化に直接的に関わると考えられているウイルス蛋白質である Nef に着目し、EC 由来 Nef の遺伝的、機能的、構造的な特徴を解析した。その結果、EC 由来の Nef では多くの機能が減弱化されており、機能減弱化に関連するアミノ酸変異の多くが HLA アリルと相関していた。こうしたことから、EC で見られる HLA 拘束性免疫応答が、選択圧を通じて、Nef 蛋白質の機能の減弱化に関与していると考えられた。

A. 研究目的

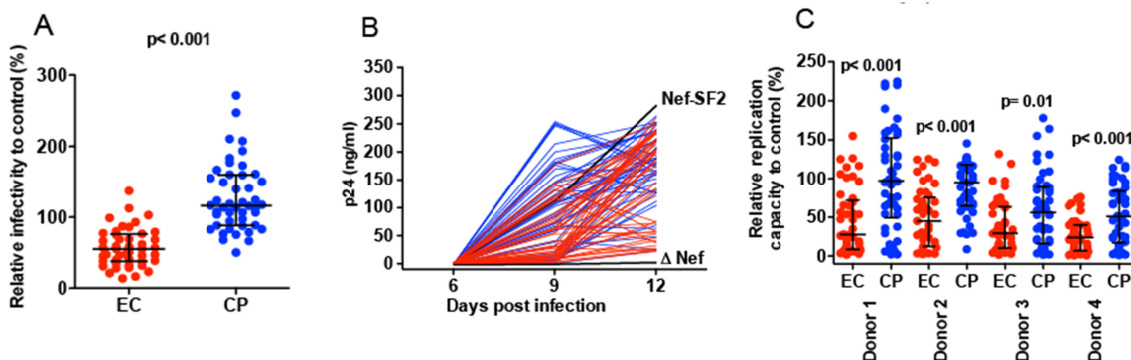
HIV 感染の慢性期には、免疫系は全身的に活性化され、細胞性免疫系による抗原特異的な抗ウイルス機能は疲弊する。一方、非常に稀ではあるが（全感染者の1%以下）、自身の免疫系で HIV-1 を制御する感染者が知られておりエリートコントローラー（EC）と呼ばれている。こうした感染者では、慢性的な免疫活性化は多くの場合認められないため、ウイルス制御や HIV 感染に伴う免疫活性化を研究する上で良いモデルとなりうる。本研究では、免疫活性化に直接的に関わると考えられているウイルス蛋白質である Nef に着目する。EC 由来の Nef について、慢性感染者由来の Nef を比較対照群として、その機能的、遺伝学的特徴を解析した。

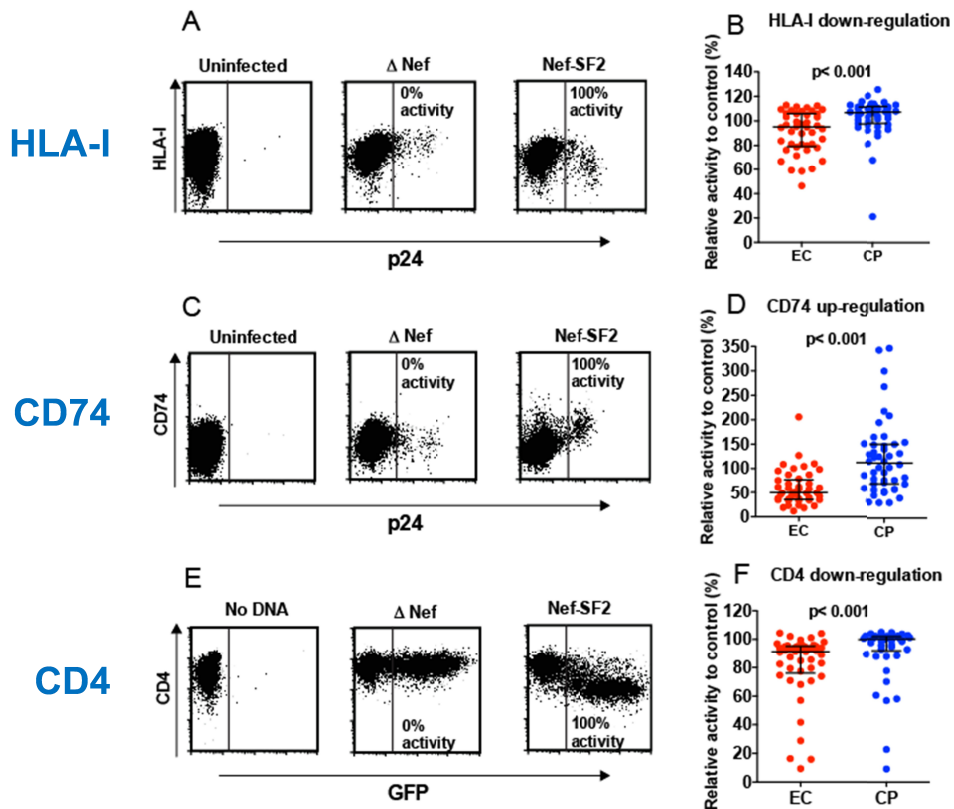
B. 研究方法

ボストン地区で集められた45名の EC および46名の慢性感染期の HIV 感染者の血漿から、ウイルス RNA を抽出し、nef 遺伝子を増幅、クローニングした。pNL43 の nef 領域と入れ替えて、組換えウイルスを作成した。これを用いて、Nef のさまざまな機能解析を行った。

（倫理面への配慮）

HIV 感染者のリクルートと、検体の採取は、米国マサチューセッツ総合病院で実施した。すべての感染者から同意文書に承諾を得ている。感染者の個人情報は入手していない。また、研究の実施に当たっては、熊本大学の倫理審査会の審議を受け、承認を得ている。承認を受けた研究計画に厳密にしたがって遂行した。



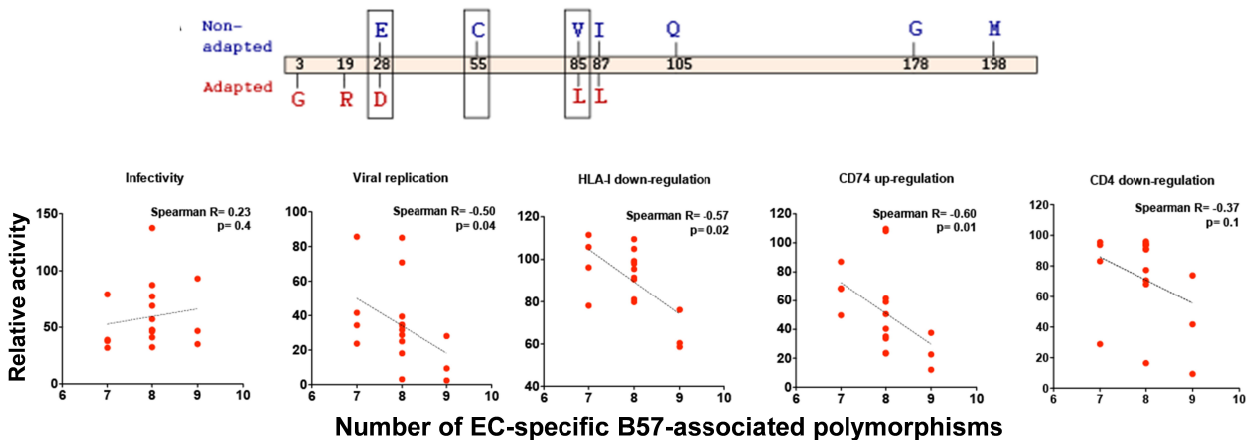


C. 研究結果

(1) ウイルス感染および複製への影響。
 HIV-1 Nef は、ウイルス粒子の感染性を増強するとともに、未刺激の PBMC を用いたウイルス複製を昂進させることが知られている。EC と CP 由来の Nef を持つ組換えウイルスを用いて、両方の機能を測定したところ、それぞれのグループの中央値と比較すると、EC 由来の Nef では統計的に有意に CP 由来 Nef に比較して機能が減弱化していた (図 1A, 1B)。また、PBMC ドナーによって、ウイルス複製は異なるため、4 人の健常人由来の PBMC を用いた。どのドナーに

おいても、EC 由来 Nef の方が低い活性を示した (図 1C)。

(2) 細胞表面抗原発現への影響。
 Nef は、HLA クラス I (HLA-I) や CD4 分子の細胞表面での発現を低下させる。一方、Nef は CD74 分子の発現を昂進させる。これらの活性を測定したところ、同じく中央値と比較すると、EC 由来 Nef の方が CP 由来 Nef に比べて有意に減弱化していた (図 2A, 2B, 2C)。



(3) EC で特徴的に見られるアミノ酸多型と Nef 機能との関連。

nef 遺伝子配列を調べたところでは、EC および CP 間に系統樹上の顕著な違いや、クラスターなどは認められなかった(データ未掲載)。一方、EC と CP 間の Nef 機能の差から、EC 由来 Nef にある何か共通のアミノ酸多型あるいは変異が、Nef 機能の差として現れて来るものと考えた。そこで、EC と CP 由来の Nef のアミノ酸配列で、どちらかに有意に頻度高く認められるコドンを検索した。その結果、11個のアミノ酸多型が EC 由来 Nef に有意に多く認められた。一方、HLA-B57 を持つ感染者は EC に有意に多く認められる。EC 由来の Nef で、HLA-B57 を有する検体に多く認められる Nef 多型を調べたところ、先ほどの11個のうち、9個が相当することが分かった(図3)。9か所のうち、3か所のアミノ酸多型は、Nef クローンによって配列がことなっていた。そこで、これらの変異の有無と、各 Nef 機能との相関を調べたところ、非常に興味深いことに、変異の総数と機能に逆相関が認められた。解析した5つの機能のうち、4つで同様の傾向が認められた(図3)。

D. 考察

EC では、自身の免疫系で HIV-1 複製が制御されていると考えられている。病原性との関連が強い Nef の機能が、こうした感染者で減弱化されており、機能に関連するアミノ酸変異の多くが HLA アリルと相関していた。こうしたことから、EC で見られる HLA 拘束性免疫応答が、選択圧を通じて、Nef 蛋白質の機能の減弱化に関与していると考えられた。

E. 結論

薬剤治療なしに HIV-1 複製が制御されている検体では、Nef の機能が有意に減弱化されていることが明らかとなった。また、こうした減弱化には、ヒト宿主の免疫系が関与していると示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mwimanzani P, Markle TJ, Ogata Y, Martin E, Tokunaga M, Mahiti M, Kuang XT, Walker BD, Brockman MA, Brumme ZL, Ueno T. Dynamic range of Nef functions in chronic HIV-1 infection. *Virology* 439:74-80, 2013
- 2) Motozono C, Miles JJ, Hasan Z, Gatanaga H, Meribe SC, Price DA, Oka S, Sewell AK, Ueno T. CD8⁺ T cell cross-reactivity profiles and HIV-1 immune escape towards an HLA-B35-restricted immunodominant Nef epitope. *PLoS ONE* 8: e66152, 2013
- 3) Motozono C, Yokoyama M, Sato H, Ueno T. Cross-reactivity analysis of T cell receptors specific for overlapping HIV-1 Nef epitopes of different lengths. *Microbes Infect* 2014 in press

2. 学会発表

- 1) Stanley M, Kawana-Tachikawa A, Ueno T. Naturally arising amino-acid polymorphisms within functional regions of HIV-1 nef influence viral persistence in vivo. Annual meeting of the Japanese Society for Immunology, Dec 11-13, 2013
- 2) Stanley M, Hasan Z, Gatanaga H, Miura T, Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A, Oka S, Ueno T. Effects of naturally occurring polymorphisms in functional domains of HIV-1 nef on in vivo disease progression. The 27th Annual meeting of Japanese Society for AIDS Research, Nov 20-22, 2013
- 3) Mahiti M, Mwimanzani P, Ogata Y, Tokunaga M, Walker BD, Brumme ZL, Brockman MA, Ueno T. Differential modulation of Nef-mediated downregulation activity of HLA-A and B in HIV-1 chronic infection. The 27th Annual meeting of Japanese Society for AIDS Research, Nov 20-22, 2013
- 4) 豊田真子, Mwimanzani P, Markle TJ, 緒方陽子, Mahiti M, Brumme ZL, Brockman MA, 上野貴将: HIV-1 感染者由来の Nef を用いた機能ドメインの解析、第 27 回日本エイズ学会 学術集会・総会-熊本、2013 年 11 月 20 日 11 月 22 日
- 5) Mahiti M, Mwimanzani P, Ogata Y, Tokunaga M, Walker BD, Brumme ZL, Brockman MA, Ueno T. Impact of naturally-occurring HIV-1 polymorphisms on differential modulation of Nef-mediated down-regulation between HLA class I loci. 61st Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Kobe International Conference Center, Kobe, Japan.

November 10th-12th, 2013

- 6) Stanley M, Hasan Z, Gatanaga H, Miura T, Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A, Oka S, Ueno T. Acceleration of disease Progression by a single naturally-arising polymorphism, within functional region of HIV-1 nef. 14th Kumamoto AIDS Seminar, Oct 29-31, 2013
- 7) Mahiti M, Mwimanzi P, Ogata Y, Tokunaga M, Walker BD, Brumme ZL, Brockman MA, Ueno T. Differential modulation of Nef-mediated downregulation activity of HLA class I alleles in HIV-1 chronic infection. 14th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan. October 29-31, 2013
- 8) Kamori D, Hasan Z, Gatanaga H, Oka S, Miura T, Iwamoto A, Kawana-Tachikawa A, Ueno T. HLA-A*02 allelic variants differently influence amino acid polymorphisms in an immunodominant epitope of HIV-1 Vpr. 14th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan. October 29-31, 2013
- 9) Toyoda M, Mwimanzi P, Mahiti M, Walker BD, Brumme ZL, Brockman MA, Ueno T. Analysis of naturally-occurring polymorphisms of HIV-1 Nef that impair CD4 down-regulation activity. 14th Kumamoto AIDS Seminar, Oct

29-31, 2013

- 10) Mahiti M, Mwimanzi P, Ogata Y, Tokunaga M, Walker BD, Brumme ZL, Brockman MA, Ueno T. Differential Nef-mediated down-regulation of HLA-A and B in chronic HIV-1 infection. Immune Activation in HIV Infection: Basic Mechanisms and Clinical Implications (D2), [Breckenridge, Colorado USA] April 3-8, 2013
- 11) Mahiti M, Mwimanzi P, Ogata Y, Tokunaga M, Walker BD, Brumme ZL, Brockman MA, Ueno T. Naturally-arising amino acid polymorphisms of HIV-1 Nef that differentially modulate downregulation of HLA-A and HLA-B molecules. Frontiers of Retrovirology conference, at Churchill College, Cambridge, UK. September 16th -18th 2013

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1 . 特許取得
該当なし。
- 2 . 実用新案登録
該当なし。