

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・グループ長

研究要旨：

SIV 感染サルエイズモデルにおいて、CTL 主体の初期 SIV 制御を示す動物群が同定された。長期制御を担う応答解明のため、プロウイルス検出系を確立して配列を解析し、*in vivo* 介入実験を加え CTL エスケープと病態の相関評価を試みた。

当該群は、末梢血 CD4 陽性 T 細胞中 SIV プロウイルス配列中 Gag 特異的 CTL エスケープ変異蓄積の有無で二分された。変異蓄積は制御喪失に対応した。CD8 枯渇試験により、プロウイルス残存分画として、変異体選択が生じる active なものと野生株が残る abortive なものの 2 種が示唆された。

本年度は、T 細胞の homeostatic proliferation (HSP) 関連刺激が SIV 増殖を促進し制御破綻を促す可能性を考え、IL-7+IL-15 投与試験を行った。SIV 特異的 CTL・CD4 陽性 T 細胞応答の促進を認めたが、ウイルス再出現は認めなかった。以上から、高度の CTL 応答存在下でもエスケープ変異の選択の場が T 細胞 HSP 非依存的に存在し、当該領域外のウイルス複製の阻止が、SIV 初期制御・潜伏後に再増殖に至らない条件として示唆された。

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。

手法としては、CTL 応答を主体に初期 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。

平成 24-25 年度は当該群の末梢中プロウイルス中の Gag 特異的 CTL エスケープ変異蓄積パターンの時系列の解析を主に行い、感染後 1 年以降 2 年目までに病態が 2 群に大別されることを明らかにした。これに続いて平成 25-26 年度は、個体レベルの病態介入実験（CD8 枯渇試験・IL-7+IL-15 投与試験）に重点をおいて研究を進めた。

B. 研究方法

過去 2 年間に扱った、MHC クラス I ハプロタイプ 90-120-1a 共有・SIV_{mac239} 初期制御群 ($n = 11$) を引き続き研究対象として次の試験を行った。

初年度の評価で感染後 2 年時点にて SIV 安定制御を示した A 群の 2 個体（個体番号 Mq1, Mq2）および CTL エスケープ変異の蓄積（制御準喪失）を認めた B 群の 1 個体（個体番号 Mq9）につき個体レベルでの IL-7+IL-15 投与実験を行った。

具体的には、感染後 2 年以降の Mq1（感染後 221 週）、Mq2（同 140 週）、Mq9（同 206 週）に対し、IL-7+IL-15 皮下注射 3 回/2 週 計 6 回、クール毎に初回 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、2 回目・3 回目 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ で投与した。

上記開始後、末梢血単核球（PBMC）における CD4 陽性・CD8 陽性 T 細胞メモリー分画の変動、SIV 特異的 CTL 応答、血中ウイルス量の測定を主として 7 日毎に介入開始後 35-42 日の安楽殺時まで評価を行った。

手法としては、樹立済み自家 B 細胞芽球に (1)

各蛋白領域をカバーするオーバーラッピングペプチドを一定濃度で載せ、あるいは(2) VSV シュードタイプ SIV を 72 時間感染させてから、評価対象の PBMC とゴルジ体阻害剤存在下で 6 時間共培養し、抗原特異的な IFN- γ 産生の細胞内染色と CD3/CD4/CD8/CD28/CD95 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。

(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

IL-7+IL-15 投与試験により、次の結果を得た。

1. 投与後 7 日目 (クール 1 終了時) までに全 3 頭で、PBMC 中の CD4 陽性及び CD8 陽性 T 細胞中の CD95 陽性 CD28 陽性セントラルメモリー分画が増多した (図 1)。

2. VSV シュードタイプ SIV 特異的 CTL 応答は、全 3 頭につき投与開始後 21 日目 (クール 2 終了後 7 日) までに 3 倍-4 倍の応答亢進を示した (図 2 上段)。

3. SIV 各蛋白特異的 CTL 応答は、全頭で 21 日目にピーク値を示し、Mq1 で約 1.7 倍、Mq2 及び Mq9 で約 3 倍の全応答亢進を認めた (図 2 下段)。

4. 感染分画となりうる SIV 特異的各蛋白 CD4 陽性 T 細胞応答についても評価した結果、全 3 頭につき投与開始後 14 日目までに 1.5 倍-2 倍の応答亢進を示した (図 3)。

5. 血中ウイルス量については、(制御喪失と相関傾向にある) SIV 特異的 CTL 応答の著明な亢進を来したにも拘わらず再検出を認めることはなかった。

D. 考察

高度のウイルス特異的 CTL 応答を主徴とした SIV 初期制御群は、感染後 1 年以降 2 年時点までの末梢血 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 2 群に層別化されることを昨年度までに明らかにした。本年度はその両群から利用可能であった計 3 頭につき、T 細胞集団のターンオーバー (homeostatic proliferation) に関与する因子が個体レベル潜伏下のウイルス複製を促進する可能性を検討するため、IL-7+IL-15 の投与試験を行った。結果、IL-7+IL-15 投与により SIV 特異的 CTL 応答の全体的な亢進が投与開始後 21 日目までに生じる事を示した。この際に応答レパトワの著明な変化はなく、SIV 特異的 CD4 陽性 T 細胞応答の亢進を全頭で投与開始後 14 日目までに伴うものであった。この結果からは、直接的にはウイルス感染分画を含む SIV 特異的 CD4 陽性 T 細胞の増多による抗原刺激活性化と、それに直後に対応する SIV 特異的 CTL 応答の亢進が推察される。しかしその一方で、CD8 枯渇試験で生じたような血中ウイルス出現は認めなかった。この結果からは、次の 2 通りの可能性が考えられる。

個体レベルで (二次リンパ節などに) active reservoir に潜伏する SIV につき増殖の亢進が認められ、それに対し反応性に CTL 応答が生じた結果、血中ウイルス量が検出不能なレベルで推移した。

IL-7+IL-15 が刺激を呈した SIV 感染細胞の対象が abortive reservoir のみに留まり、そもそも SIV 複製が再度生じる可能性が限定されていた。上記に関連して、近年他のグループより、B 細胞濾胞中の CD4 陽性 T 細胞が組織学的な意味での初期制御下の SIV 潜伏感染細胞となっている (Fukazawa Y et al., Nat Med 2015) ことが報告されている。濾胞 CD4 陽性 T 細胞は、表面抗原の表現型として IL-7, IL-15 に対して不応性であることがこれまでに認められていないのを鑑みると、は否定的であり、またはそれに準じた可能性が有力と思われる。

また今回の実験結果と対照的に、SIV 感染急性期に IL-7 を個体内投与した際には血中ウイルス量の増加傾向が認められるという結果が報告されている (Vassena L et al., PLoS Pathogens 2012)。同様に、予防ワクチン接種後 SIV 感染

初期の IL-15 投与が CD4 陽性 T 細胞増殖をともなってセットポイントウイルス量削減の規模を減少させるという報告も過去に存在する (Hryniewicz A et al., J Immunol 2007)。

SIV 初期制御下で認めた IL-7+IL-15 投与の作用はこれらとは逆の、病態制御に対して促進的な役割を果たす可能性もある。他方、今回の投与量・期間では示さなかった形で、当初予想した持続制御の破綻の方向に IL-7+IL-15 が作用する可能性もあり、今後の追加評価が期待される。また今後の解析対象として、IL-7+IL-15 投与試験中の SIV プロウイルス配列などが考えられる。

E. 結論

SIV 初期制御アカゲサル群において、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 エスケープの感染後 1 年以降 2 年目までの蓄積の有無で病態が大別されることが判明し、さらに変異蓄積を認めない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示唆された。本年度の結果から、このような SIV 持続制御は、これまで考えられているのとは異なり、homeostatic proliferation 関連因子の存在により急速に促進されるものではないことも示唆された。これらの結果より本研究は、初期制御・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) Nomura T, Yamamoto H, Takahashi N, Naruse TK, Kimura A, Matano T. Identification of SIV Nef CD8(+) T cell epitopes restricted by a MHC class I haplotype associated with lower viral loads in a macaque AIDS model. *Biochem Biophys Res Commun* 450:942-947, 2014.

2. 学会発表

- 1) Yamamoto H. *In vivo* determinants of SIV neutralizing antibody induction. 15th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, October 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。

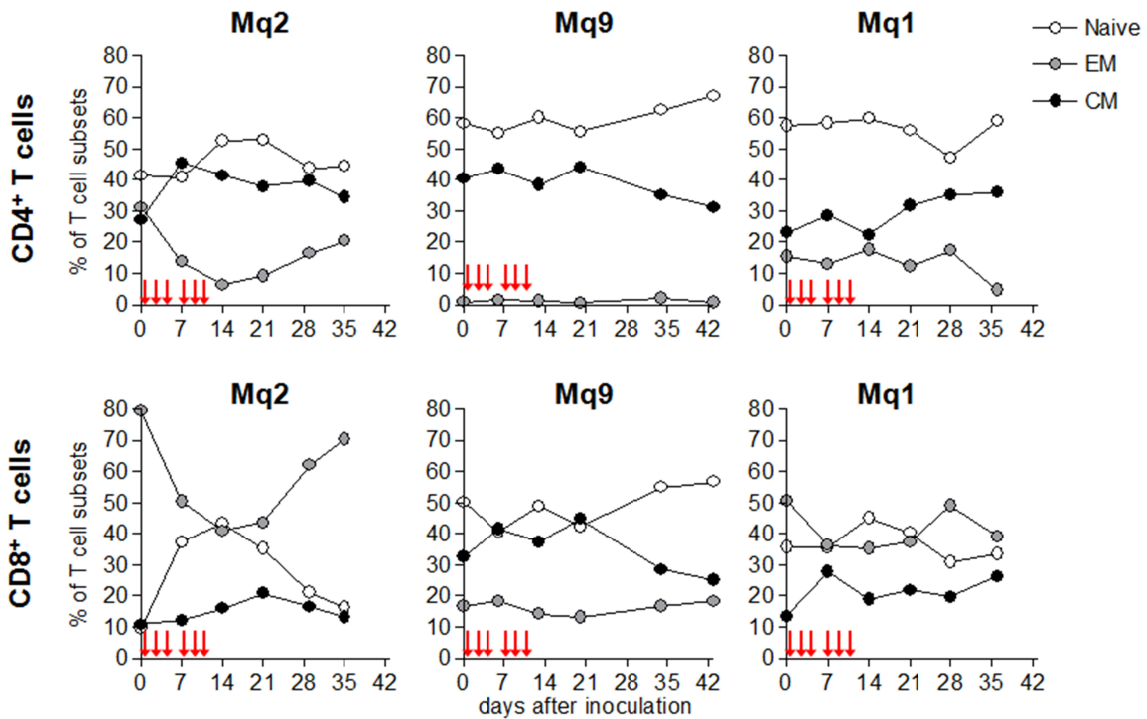


図 1. SIV 持続制御個体における IL-7+IL-15 投与試験時の末梢血中 T 細胞分画の推移

MHC クラス I ハプロタイプ *90-120-1a* 共有・SIV_{mac239} 初期制御個体の持続制御期 (感染後 2 年以降) における、個体レベルの IL-7+IL-15 投与試験の結果。Mq1, Mq2 は A 群 (感染後 2 年時点で末梢血 CD4 陽性 T 細胞中 Gag プロウイルスの CTL エスケープ蓄積陰性)、Mq9 は B 群 (感染後 2 年時点で末梢血 CD4 陽性 T 細胞中 Gag プロウイルスの CTL エスケープ蓄積陽性) に由来する。Naïve: CD28+CD95-, CM (central memory): CD28+CD95+, EM (effector memory): CD28-CD95+ でゲーティングした結果の、全 CD4 陽性 T 細胞 (上段)・CD8 陽性 T 細胞 (下段) に対する百分率を経時的に示す。

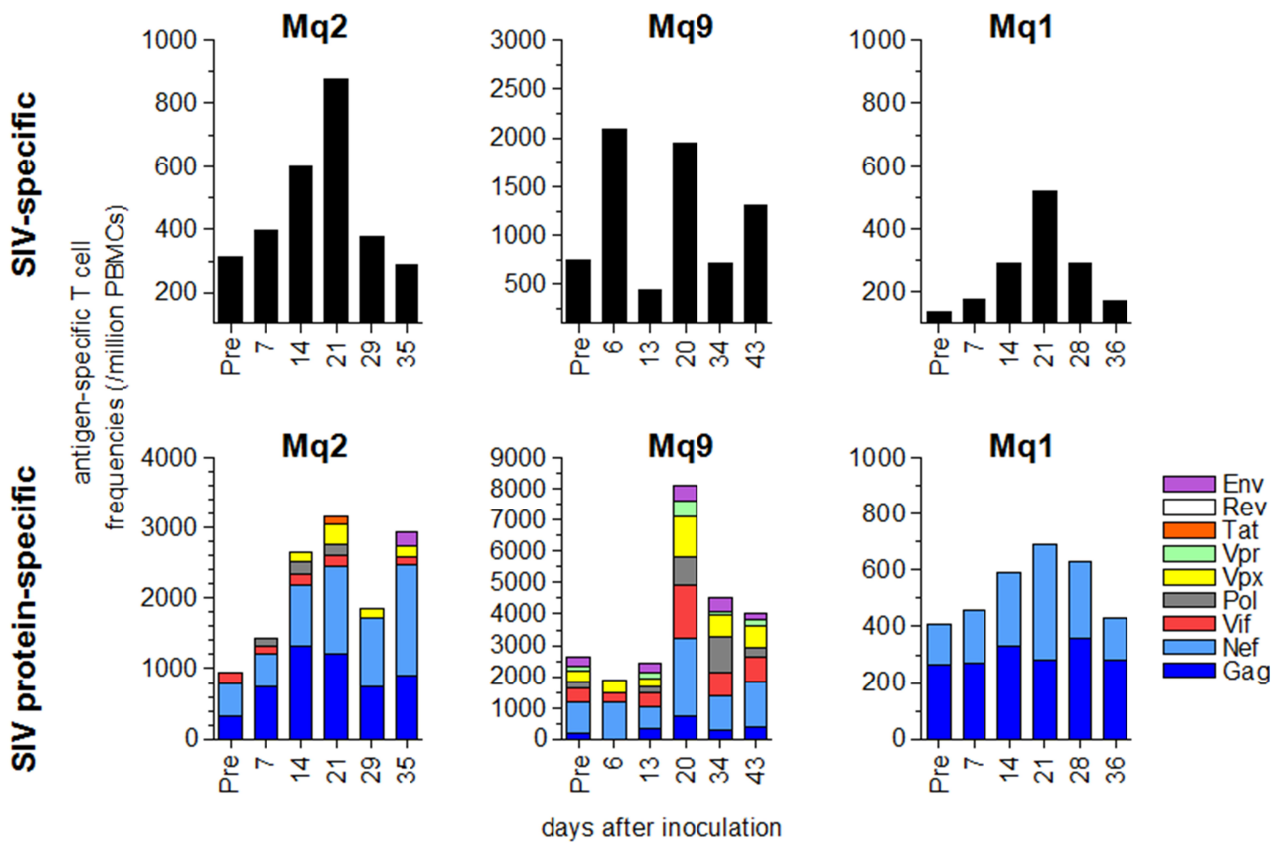


図 2. SIV 持続制御個体における IL-7+IL-15 投与後のウイルス特異的 CTL 応答

VSV-G でシュードタイプした SIV(上段)、SIV 各蛋白特異的ペプチドプール(下段)で PBMC を特異刺激した時の応答の経時変化を示す。

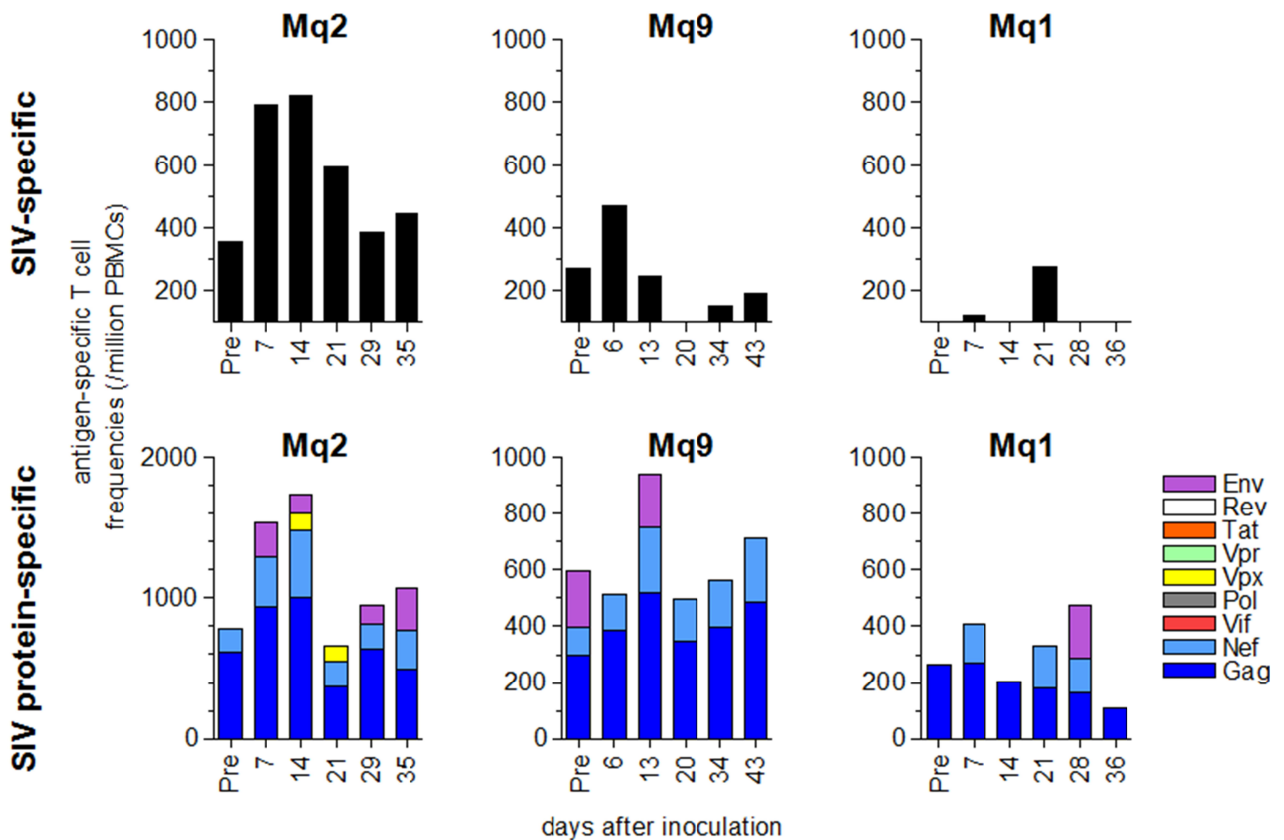


図 3. SIV 持続制御個体における IL-7+IL-15 投与後のウイルス特異的 CD4 陽性 T 細胞応答

VSV-G でシュードタイプした SIV(上段)、SIV 各蛋白特異的ペプチドプール(下段)で PBMC を特異刺激した時の応答の経時変化を示す。