

HIV 感染細胞の潜伏・再活性化における宿主免疫への抗原提示の解析

研究分担者 立川 愛 国立感染症研究所エイズ研究センター 室長
(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 准教授)

研究要旨：再活性化した HIV 潜伏感染細胞における HIV 特異的 CTL への抗原提示の様態を明らかにするため、HIV 潜伏感染モデル細胞株を用いて抗原提示解析系の構築を行った。再活性化した特定の HLA を発現する HIV 潜伏感染細胞と HIV 特異的 CTL クローンとを共培養することによって、再活性化により発現された Nef タンパク質由来の CTL エピトープは、速やかに HIV 感染細胞表面で提示されていることが示された。本システムは新たな治療戦略としての潜伏感染細胞再活性化の実用化に向けて、再活性化後の速やかな HIV 感染細胞除去に有用な CTL の探索に有用である。

A. 研究目的

抗 HIV 薬の進歩により、HIV 感染症は先進国では致死性の疾患ではなくなったが、現状の抗 HIV 療法(cART)では治癒の可能性はない。若年層での感染が主である HIV 感染において、長期 cART による薬物毒性、副作用、医療経済上の問題は深刻であり、治癒を目指す治療法の確立が急務である。

HIV 感染症において治癒を妨げているのは長期生存可能な潜伏感染細胞である。ウイルスタンパク質の発現を伴わない HIV 潜伏感染細胞は宿主の免疫監視機構から完全に逃れることができる。近年潜伏感染細胞を再活性化し、宿主免疫応答により感染細胞除去を目指す治療戦略が提唱されている。HIV 特異的細胞傷害性 T 細胞(CTL)は、再活性化後の HIV 感染細胞排除の重要なエフェクターとして位置づけられる。しかしながら、どのような CTL が再活性化後の HIV 潜伏感染細胞排除に効果的に作用するか、明らかでない。

HIV 特異的 CTL は、個々でその抗 HIV 効果が異なる。それぞれの CTL が認識するエピトープの、細胞表面での抗原提示量、すなわち個々のエピトープを提示する HLA 分子の数や、その抗原提示のタイミングが大きく影響すると考えられる。そこで、本研究では、再活性化後の HIV 感染細胞における抗原提示の動態を明らか

にするために、抗原提示解析系の構築を試みた。

B. 研究方法

HLA-A*24:02 発現 HIV 潜伏感染細胞株の樹立

HIV 潜伏感染モデル細胞として、CD4 陽性 T 細胞株の ACH-2 を用いた。ACH-2 にウイルスベクターを用いて HLA-A*24:02 遺伝子を導入後、薬剤選択、クローニングを行い、HLA-A24 恒常発現 ACH-2 細胞株(A24-ACH2)を樹立した。複数のクローンについて、定常状態(未刺激)と TNF- α で活性化後の HIV 産生について明らかにするため、培養上清中の RT 活性試験を行った。

HLA-A24 恒常発現 HIV 潜伏感染細胞株での抗原提示の解析

A24-ACH2 を TNF- α で再活性化後、継時的に HLA-A*24:02 陽性 HIV 感染者末梢血から樹立した HLA-A*24:02 拘束性 CTL エピトープ特異的 CTL クローンと共培養を開始した。4 時間の培養後、IFN- γ ELISpot assay により、IFN- γ 産生細胞数を定量した。

(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。研究対象者への負担は、臨床上必要な採血に加えての少量の血液採取のみであり、倫理面への問題はないと判断される。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

ウイルスベクターを用いて ACH-2 細胞に HLA-A*2402 遺伝子を導入し、薬剤選択後クローニングを行い、複数の A24-ACH2 クローンを得た。TNF- α にて再活性化後 RT 活性を測定したところ、再活性化後の活性化レベルと定常状態でのバックグラウンドレベル(未刺激での RT 活性)は、クローンによって大きく異なっていた。バックグラウンドが低く、再活性化後の活性化レベルが高いクローンを選び、実験に用いた。

A24-ACH2 を TNF- α にて再活性化後、継時的に Nef 由来の HLA-A*24:02 拘束性 CTL エピトープ特異的 CTL クローンとの共培養を行い、IFN-ELISpot assay を行うことで、Nef 特異的 CTL クローンへの抗原提示を解析した。その結果、TNF- α による刺激をしなかった場合、また A24 を発現しない ACH-2 ではほとんど IFN- γ 産生細胞が見られなかったのに対して、TNF- α 刺激 6 時間以内で IFN- γ 産生細胞が出現し、24 時間後まで徐々に増加していた。

D. 考察

A24-ACH2 を用いた潜伏感染モデル細胞を用いて、抗原提示動態の解析系を構築し、Nef 特異的 CTL を用いて解析を行った。再活性化による HIV タンパク発現開始後、早期タンパク質である Nef に由来するエピトープは、速やかに抗原提示されていることが示された。定常状態(未刺激)での HIV 産生がほとんどない A24-ACH2 細胞株を用いた本システムは、抗原提示動態の解析に有用であることが明らかとなった。今後、タンパク質発現のタイミングが異なる Gag や Pol 由来のエピトープに対しても同様の検討を行い、由来するウイルスタンパク質の発現動態と抗原提示の関連性を明らかにする。さらに、切り出し効率やペプチドの安定性等も抗原提示に影響を与えるため、同じウイルスタンパク質由来の複数のエピトープ特異的 CTL を用いて同様の検討をすることも重要である。

E. 結論

再活性化 HIV 潜伏感染細胞における抗原提示動態の解析系を構築した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakayama-Hosoya K, Ishida T, Youngblood B, Nakamura H, Hosoya N, Koga M, Koibuchi T, Iwamoto A, Kawana-Tachikawa A. Epigenetic repression of interleukin-2 expression in senescent CD4⁺ T cells during chronic human immunodeficiency virus type-1 infection. *J Infect Dis*. 211:28-39, 2015.
- 2) Gu L, Kawana-Tachikawa A, Shiino T, Nakamura H, Koga M, Kikuchi T, Adachi E, Koibuchi T, Ishida T, Gao GF, Matsushita M, Sugiura W, Iwamoto A, Hosoya N. Development and Customization of a Color-Coded Microbeads-Based Assay for Drug Resistance in HIV-1 Reverse Transcriptase. *PLoS One*. 9:e109823, 2014.
- 3) Han C, Kawana-Tachikawa A, Shimizu A, Zhu D, Nakamura H, Adachi E, Kikuchi T, Koga M, Koibuchi T, Gao GF, Sato Y, Yamagata A, Martin E, Fukai S, Brumme ZL, Iwamoto A. Switching and emergence of CTL epitopes in HIV-1 infection. *Retrovirology*. 11:38, 2014.

2. 学会発表

- 1) Kawana-Tachikawa A. Disruption of T cell immunity during chronic HIV-1 infection. The 21st East Asia Joint Symposium on Biomedical Research. Seoul, Korea. Jul 2014.
- 2) Hirao M, Suzuki K, Kawana-Tachikawa A, Nakauchi H, Cooper DA, Kelleher AD, Kaneko S. Proposal of new immune cell source for HIV-1 infection study based on iPSCs and evaluation of impact of viral replication in iPSCs-derived macrophage expressing shRNAs targeting HIV-1 promoter. 20th International AIDS Conference, Melbourne, Australia, Jul 2014
- 3) Kamori D, 村上知行, Hasan Z, Meribe S, Carlson J, Siarot L, 三浦聡之, 立川(川名)愛, 岩本愛吉, 湯永博之, 岡慎一, 間陽子, 上野貴将: Effects of natural variability of an immunodominant Vpr region on immunological footprints, clinical outcome and protein functions. 第 62 回日本ウイルス学

- 会学術集会、横浜、2014年11月
- 4) 細谷(中山)香、石田尚臣、中村仁美、細谷紀彰、古賀道子、鯉淵智彦、岩本愛吉、立川(川名)愛: HIV-1 感染における CD4 陽性 T 細胞の IL2 遺伝子発現低下分子メカニズムの解明. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月
- 5) Gu L, Han Y, Guan S, Yang F, Zhu T, 合田仁、Cao Y, 立川(川名)愛、細谷紀彰、Gao FG, 岩本愛吉、Li T, 石田尚臣: 中国 HIV-1 感染者の未治療検体における副受容体指向性の検査. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月
- 6) 佐藤秀憲、細谷(中山)香、菊地正、安達英輔、古賀道子、中村仁美、鯉淵智彦、岩本愛吉、立川(川名)愛: HIV 感染者の CD8 陽性 T 細胞における補助刺激分子 OX40 の検討. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月
- 7) 石坂彩、佐藤秀憲、立川(川名)愛、中村仁美、古賀道子、細谷紀彰、鯉淵智彦、野本明男、岩本愛吉、水谷壮利: HIV-1 残存感染細胞の活性と免疫活性化の相関. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月
- 8) 和田倭、小林(石原)美栄、寺原和孝、池野翔太、徳永研三、立川(川名)愛、山岸誠、竹山春子、横田(恒次)恭子. 恒常的に培養維持された CD4 陽性 T 細胞への HIV-1 の感染とその転写制御機構の解明. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月
- 9) 藤田由利子、小野敏明、落合央、立川愛、Leen AM, Heslop HE, 森尾友宏、高橋聡: 実臨床応用に向けたウイルス特異的 T 細胞療法の開発. 第 6 回血液疾患免疫療法研究会学術集会、京都、2014年9月
- 10) 小野敏明、藤田由利子、立川(川名)愛、高橋聡、森尾友宏: 臨床応用に向けた多ウイルス特異的 T 細胞培養法の確立とその特性解析. 第 42 回日本臨床免疫学会総会、東京、2014年9月

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

国内特許出願 (申請中)

出願人: 公益財団法人微生物化学研究会、発明者: 水谷壮利、石坂彩、立川愛

「免疫状態の判定方法、CD4⁺T細胞数の増加予測方法、及び CD4⁺T細胞数の減少予測方法、並びにそれらのためのキット」特願 2014-128028、出願日: 2014年6月23日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

【HIV潜伏感染細胞再活性化時の抗原提示解析】