

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: HIV 慢性感染に伴う免疫活性化と免疫制御の関連を明らかにする目的で、HIV を自発的に制御している極めて稀な感染者であるコントローラーの検体を用いて、ウイルス病原性に関わる Nef の遺伝学的特徴と機能解析を行なう。本年度は、後にコントローラーとなる感染者の急性感染期の検体を集め、Nef 機能の解析を行った。病態が進行する感染者グループの急性感染期の検体を対照群とした。その結果、コントローラーでは Nef 機能が減弱化しており、感染者の HLA 型に相関する変異が機能の減弱化に関係することが分かった。これらのことから、感染急性期に免疫逃避によって選択される変異が Nef の機能の減弱化および病態制御に影響することが明らかとなった。治療なしに HIV 感染制御ができていない検体を用いたユニークなアプローチをとることで、生体内で実際に起きている免疫活性化と免疫応答の複雑な関係の一端を明らかにできた。

A. 研究目的

HIV 慢性感染に伴う免疫活性化と免疫制御の関連を明らかにする目的で、HIV を自発的に制御している極めて稀な感染者であるコントローラーの検体を用いて、ウイルス病原性に関わる Nef の遺伝学的特徴と機能解析を行なう。

B. 研究方法

ポストンなどでリクルートしたコントローラーと急性感染者の検体から nef 遺伝子を増幅して、配列解析をするとともに、プロウイルスベクターにクローニングして、Nef の機能を解析した。遺伝子系統樹解析や医学統計学的手法で、対照群間での差を解析した。経時的にサンプリングした検体を用いて、個体内での変化を解析した。

（倫理面への配慮）

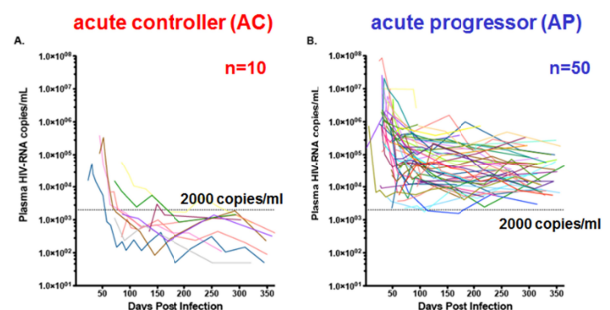
米国マサチューセッツ総合病院より、臨床材料の提供を受けた。研究倫理委員会の承認を得、書面による同意確認と提供者の個人情報の保管管理を徹底しつつ実施する。また、研究の実施に当たっては、熊本大学の倫理審査会の審議を受け、承認を得ている。承認を受けた研究計画に厳密にしたがって遂行した。

C. 研究結果

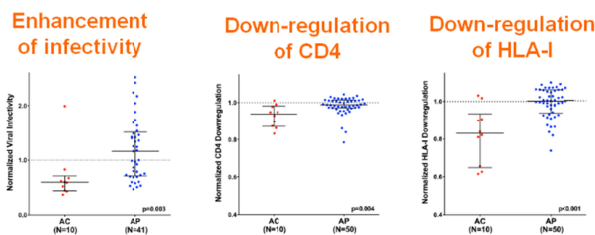
ウイルス複製を自発的に制御しているコントローラーでは、慢性的な免疫活性化が非常に低い頻度でしか観察されないことが知られている。そこで、免疫活性化と関連するウイルス蛋白質である Nef の機能について、さまざまな病態にある感染者の検体を用いて解析した。

（1）感染急性期の検体

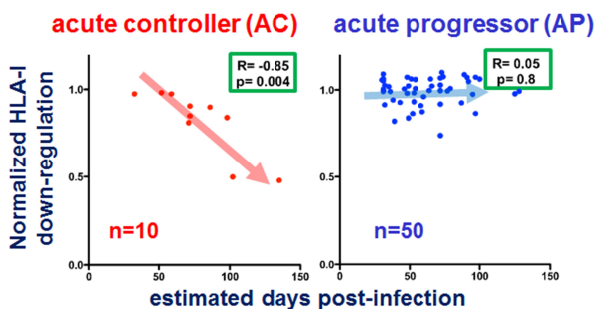
急性感染期からフォローアップしている検体で、後にコントローラー（1年後に 2000 RNA copy/ml 未満）となる 10 名を用いた。対照群として、同じ地域の急性期の感染者で、病態が制御されない 50 名の検体を用いた。両群のウイルス RNA から、HIV-1 Nef 遺伝子を増幅した。急性コントローラーを AC、急性病態進行者を AP と記す。



(2) Nef の機能解析
 遺伝子配列の系統樹解析からは、特に両群に特徴的なクラスター等は認められなかった。また、Nef 蛋白質の発現量や、組換えウイルスの生産量などには、両群由来の Nef に差は認めなかった。次に、Nef の 3 つの特徴的な機能として、ウイルス感染性の増強作用、HLA クラス I (HLA-I) および CD4 の発現抑制作用について解析した。その結果、3 つの機能とも急性コントローラ群由来の Nef では、顕著に減弱化していた。



(3) HLA-I 発現抑制機能は、経時的に減弱化している
 3 つの機能について、経時的な変化を調べたところ、AC において、HLA-I 発現抑制機能が経時的に減弱化していることが分かった。他の機能にそうした特徴は見られなかった。



AC01: A*01:01/A*31:01, B*37:01/B*51:09, C*01:02/C*06:02

(No typical protective allele in AC01)



(4) HLA 相関変異 (CTL 逃避変異) が、Nef 機能の減弱化に関係する

1 年後のウイルス量が著しく低くなっていた AC01 という検体について、Nef の変異と機能との関連を解析した。まず、2 つのサンプリングポイントで Nef のアミノ酸配列を比較したところ、4 つの変異を見出した。この感染者の HLA アリルを見たところ、4 つの変異とも感染者の持つ HLA アリルに相関する変異であった。このことは、感染者の細胞性免疫応答による淘汰圧が働いたと推察される。

次に、4 つの変異をさまざまに組み合わせて導入して機能に与える影響を調べたところ、4 つの変異が組み合わさったときのみ、顕著な機能低下を認めた。また、このとき、蛋白質質量も著しく低下していた。

D. 考察

ウイルスに対する細胞性免疫応答がウイルス感染制御に関わるとともに、逃避変異の選択を通じて (免疫学的な選択圧) Nef 蛋白質の機能と免疫活性化に影響することが明らかとなった。

E. 結論

極めて特徴的な臨床検体を用いて、ウイルス学的、免疫学的な包括的解析を行うことによって、免疫活性化と抗ウイルス免疫応答の関連性の一端を明らかにすることができた。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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* 16: 320-327, 2014
- 2) Hasan C, Kamori D, Ueno T. Role of host immune responses in sequence variability of HIV-1 Vpu. *World Journal of Immunology* 4, 107-115, 2014
- 3) Kuang X, Li X, Anmole G, Mwimanzi P, Shahid A, Le A, Chong L, Qian H, Miura T, Markle T, Baraki B, Connick E, Daar E, Jessen H, Kelleher A, Little S, Markowitz M, Pereyra F, Rosenberg E, Walker B, *Ueno T, *Brumme Z, *Brockman M. Impaired Nef function is associated with early control of HIV-1 viremia. *J Virol* 88, 10200-10213, 2014 *co-senior authors
- 4) Yanaka S, Ueno T, Shi Y, Qi J, Gao G, Tsumoto K, Sugase K. Peptide-dependent conformational fluctuation determines the stability of the human leukocyte antigen class I complex. *J Biol Chem*. 289, 24680-24690, 2014
- 5) Kuse N, Akahoshi T, Gatanaga H, Ueno T, Oka S, Takiguchi M. Selection of T18-8V mutant associated with long-term control of HIV-1 by cross-reactive HLA-B*51:01-restricted cytotoxic T cells. *J Immunol*, 193, 4814-4822, 2014
- 6) Chen J, Tibroni N, Sauter D, Galaski J, Miura T, Alter G, Mueller B, Haller C, Walker B, Kirchhoff F, Brumme Z, Ueno T, Fackler O. Modest Attenuation of HIV-1 Vpu Alleles Derived from Elite Controller Plasma. *PLoS ONE*, 2015 in press
- 7) Motozono C, Bridgeman J, Price D, Sewell A, Ueno T. Clonotypically similar hybrid $\alpha\beta$ TCRs can exhibit markedly different surface expression, antigen specificity and cross-reactivity. *Clinic Exp Immunol*, 2015 in press

2. 学会発表

- 1) Kamori D, Murakami T, Hasan Z, Meribe S, Carlson J, Siarot L, Miura T, Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A, Gatanaga

H, Oka S, Aida Y, Ueno T. Effects of natural variability of an immunodominant Vpr region on immunological footprints, clinical outcome and protein functions. The 62nd Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Nov 10-12, 2014.

- 2) Kamori D, Murakami T, Hasan Z, Meribe S, Carlson J, Siarot L, Miura T, Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A, Gatanaga H, Oka S, Aida Y, Ueno T. Effects of natural variability of Vpr on immunological footprints and protein functions. *Keystone Symposia HIV Vaccines (X5)*, March 22-27, 2015.
- 3) Mahiti M, Jia X, Toyoda M, Mwimanzi F, Walker BD, Brumme ZL, Brockman MA, Xiong Y, Ueno T. Differential down-regulation of the HLA class I allotypes by HIV-1 Nef primary isolate. The annual Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI). Seattle, Washington, USA Feb 23-26, 2015,
- 4) Mahiti M, M. Toyoda M, Mwimanzi F, Walker BD, Brumme ZL, Brockman MA, Ueno T. HIV-1 Nef differentially recognizes the cytoplasmic tails of HLA-A and HLA-B molecules for down-regulation. The 43rd Annual Meeting for Japanese Society of the Immunology. Kyoto, Japan, Dec 10-12, 2014
- 5) Mahiti M, Toyoda M, Mwimanzi F, Walker BD, Brumme ZL, Brockman MA. Ueno T. Naturally- isolated HIV-1 Nef differentially recognize the cytoplasmic tails of HLA-A and HLA-B molecules for down-regulation. 15th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan. Oct 01-03, 2014
- 6) Mahiti M, Toyoda M, Mwimanzi F, Walker BD, Brumme ZL, Brockman MA. Ueno T. Natural variability of HIV-1 Nef responsible for selective recognition of the HLA-A over HLA-B molecules for down-regulation. 16th Hakuba Symposium, Kumamoto, Japan. Jun 13-14, 2014

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。