

学位論文
Doctor's Thesis

論文名： 日本人およびタイ人の HIV-1 感染者において認識されている HIV-1 特異的細胞傷害性 T 細胞エピトープの解析
(Cytotoxic T lymphocyte recognition of HIV-1-specific epitopes in HIV-1-infected Thais and Japanese)

著者名： 深田 勝彦
Katsuhiko Fukada

指導教官名： ウイルス制御学 教授
滝口 雅文

審査委員名： 免疫識別学 担当教授 西村 泰治
感染防御学 担当教授 原田 信志
病態制御学 担当教授 松下 修三

2002年3月

目次

	頁
目次.....	1
1 要旨 (和文).....	3
(英訳).....	5
2 発表論文リスト.....	6
3 謝辞.....	7
4 略語一覧.....	8
5 研究の背景と目的.....	9
5-1) はじめに.....	9
5-2) CTLによるHIV-1感染細胞の認識.....	9
5-3) HIV-1のサブタイプ.....	11
5-4) 本研究の目的.....	12
6 実験方法.....	14
6-1) 本研究に使用した材料.....	14
a. 細胞および培地.....	14
b. ペプチド.....	14
c. 抗体.....	14
d. HIV-1感染者のPBMC.....	15
e. CTLクローン.....	15
f. HIV-1 clade Eウイルスクローン.....	15
6-2) リバースイムノジェネティクス法の概要.....	16
6-3) ペプチド結合アッセイ.....	17
6-4) PBMCの <i>in vitro</i> 刺激.....	18
6-5) 統計解析.....	19
6-6) CTLクローンの作製.....	19
6-7) ペプチドパルスした標的細胞に対する細胞傷害活性の測定..	20
6-8) HIV-1組換えワクチニアウイルス感染細胞に対する細胞 傷害活性の測定.....	21

6-9)	HIV-1 clade E ウイルス感染細胞に対する細胞傷害活性の測定.....	21
6-10)	HIV-1 clade E 感染細胞のフローサイトメトリック解析.....	22
7	実験結果.....	23
7-1)	HLA-A*1101 拘束性 HIV-1 clade B 特異的 CTL エピトープの同定.....	23
7-2)	HIV-1 clade B 特異的 CTL エピトープを基にした clade E エピトープ候補ペプチドの検索.....	26
7-3)	HIV-1 clade B と clade E で共通に認識される cross-clade CTL エピトープの解析.....	27
7-4)	各 clade の配列それぞれが認識される clade 特異的な CTL エピトープの解析.....	28
7-5)	clade B のみが認識される CTL エピトープの解析....	30
7-6)	HIV-1 clade E ウイルス感染細胞に対する HIV-1 clade E CTL の細胞傷害性.....	32
8	考察.....	34
9	結語.....	39
10	図表およびその説明.....	41
11	参考文献.....	59

1 要旨

HIV-1（ヒト免疫不全ウイルス）特異的な細胞傷害性 T 細胞（CTL）エピトープを同定することは、AIDS（後天性ヒト免疫不全症候群）の病態やワクチン開発など様々な研究のために必須である。これまでに HIV-1 clade B 感染者において比較的多数の clade B 特異的 CTL エピトープが同定されているのと対照的に、それ以外の non-clade B 特異的 CTL エピトープは報告が少なく、clade E においては全くない。そこで、アジア人に高頻度にみられるヒトリンパ球抗原（HLA）である HLA-A*1101 に拘束される clade B 特異的 CTL エピトープの同定を行い、さらにこれを用いて東南アジアにおいて主なサブタイプである clade E に 特異的な CTL エピトープの同定を試み、clade E ウイルスに対する CTL の認識を解析した。

はじめに、リバーシムノジェネティクス法によって、日本人の HIV-1 clade B 感染者で認識されている 4 種の HLA-A*1101 拘束性 clade B 特異的 CTL エピトープを同定した。これらと既知の 4 種の HLA-A*1101 拘束性 clade B CTL エピトープを用いて、clade E の CTL エピトープを同定することを試みた。まず、タイ人の clade E 感染者の末梢血単核球を、clade B CTL エピトープ部位に相当する clade E ペプチドで刺激することによって特異的 CTL を誘導できるか調べた。さらに、誘導された clade E CTL が clade B ペプチドを認識するか、clade B CTL が clade E ペプチドを認識するか調べることによって、CTL エピトープが clade 間で共通（cross-clade）に認識されるか、あるいは clade 特異的に認識されるか解析した。その結果、Pol 由来の 3 種の CTL エピトープは、タイ人の clade E 感染者でも認識されている cross-clade CTL エピトープであった。また、3 種の CTL エピトープ部位に相当する clade B、clade E ペプチドは、それぞれが日本人の clade B 感染者、タイ人の clade E 感染者で認識されている clade 特異的 CTL エピトープであった。

HIV-1 clade E 感染 T 細胞におけるこれらの CTL エピトープの抗原提示能を明らかにするために、それぞれ 3 種の cross-clade CTL および clade E 特異的 CTL が clade E ウイルスに感染した CD4⁺ CXCR4⁺細胞を認識するか観察した。その結果、これらの CTL エピトープを認識する CTL は clade E ウイルスに感

染した標的細胞を特異的に傷害したことから、6種の CTL エピトープは clade E ウイルス感染細胞の細胞内でプロセッシングされ抗原提示されていることが示された。

本研究において、HIV-1 clade B 特異的 CTL エピトープを利用したこの解析法は、clade E 特異的 CTL エピトープを決定するためにきわめて有効であることが示され、この既知の clade B CTL エピトープを利用する方法を用いて、ほとんど解明されていない clade E CTL エピトープの同定が可能となった。

1 Summary

Identification of HIV-1-specific cytotoxic T cell (CTL) epitopes is necessary for various HIV-1 studies such as AIDS pathogenesis and vaccine development. In contrast to the large number of clade B CTL epitopes identified in HIV-1 clade B-infected individuals, limited number of non-clade B epitopes have been reported. Especially, no clade E epitope have been identified. We attempted to identify HLA-A*1101-restricted HIV-1 clade B-specific CTL epitopes because HLA-A*1101 is one of the most common allele in Asian people. Furthermore, we attempted to identify CTL epitopes for HIV-1 clade E, which is the predominant clade in South-East Asia using these clade B epitopes.

First of all, we identified four HLA-A*1101-restricted HIV-1 clade B-specific CTL epitopes in HIV-1 clade B-infected Japanese by reverse immunogenetics. We attempted to identify HIV-1 clade E-specific CTL epitopes using these four epitopes in addition to four known HLA-A*1101-restricted HIV-1 clade B epitopes. Induction of clade E-specific CTLs were examined by stimulating PBMCs from clade E-infected Thai individuals with the clade E-specific peptides corresponding to the clade B epitopes. Cross-clade and clade-specific CTL recognition for these epitopes was analyzed using CTL clones and lines specific for these epitopes. Three Pol epitopes were recognized as cross-clade CTL epitopes in clade B-infected Japanese and clade E-infected Thai individuals. Clade B and E sequences corresponding to three epitopes were recognized as clade-specific epitopes in clade B-infected Japanese and clade E-infected Thai individuals, respectively.

To clarify the presentation of these epitopes in HIV-1-infected T cells, CTL recognition for the three cross-clade and three clade E-specific epitopes was investigated using CD4⁺ CXCR4⁺ cells infected with an HIV-1 clade E clone. CTLs specific for these epitopes effectively lysed target cells infected with HIV-1 clade E virus, indicating that these six epitopes are processed naturally in HIV-1 clade E-infected cells.

We show here that a strategy utilizing HIV-1 clade B epitopes is very useful for identifying clade E CTL epitopes which have not been identified.

2 発表論文リスト

Fukada, K., H. Tomiyama, C. Wasi, T. Matsuda, S. Kusagawa, H. Sato, S. Oka, Y. Takebe, and M. Takiguchi. (2002). Cytotoxic T Cell Recognition of HIV-1 Cross-Clade and Clade-Specific Epitopes in HIV-1-infected Thais and Japanese. AIDS. in press.

Fukada, K., H. Tomiyama, Y. Chujoh, K. Miwa, Y. Kaneko, S. Oka, and M. Takiguchi. (1999). HLA-A*1101-Restricted cytotoxic T lymphocyte recognition for a novel epitope derived from the HIV-1 Env protein. AIDS. 13: 2597-2599.

Fukada, K., Y. Chujoh, H. Tomiyama, K. Miwa, Y. Kaneko, S. Oka, and M. Takiguchi. (1999). HLA-A*1101-restricted cytotoxic T lymphocyte recognition of HIV-1 Pol protein. AIDS. 13: 1413-1414.

Fukada, K., Y. Sobao, H. Tomiyama, S. Oka, and M. Takiguchi. (2002). Functional Expression of the Chemokine Receptor CCR5 on Virus Epitope-Specific Memory and Effector CD8⁺ T Cells. J Immunol. in press.

深田勝彦, 滝口雅文. (1999). HLA と HIV 感染症. 治療学. 33: 1281-1284.

3 謝辞

本研究を行うにあたり、全面的に御指導くださいました熊本大学エイズ学研究センターウイルス制御分野滝口雅文教授に深く感謝申し上げます。

また、本研究の詳細な研究方法などに関して適切な御指導、御助言くださいました当研究センター富山宏子助手に深く感謝いたします。討論などを通して適切な御助言くださいました上野貴将助手に深く感謝いたします。

本研究に用いた日本人の HIV-1 cladeB 感染者の血液を提供いただきました国立国際医療センター岡愼一博士に深く感謝いたします。タイ人の HIV-1 cladeE 感染者の血液を提供いただきましたタイ国立感染症研究所 (NIH) Chantapong Wasi 博士に深く感謝いたします。HIV-1 clade E ウイルスクローンを分与いただきました国立感染症研究所武部豊博士に深く感謝いたします。

本研究の一部を技術的にサポートしていただきました松田智子技能補佐員に感謝いたします。発表論文などの作成をサポートしていただきました酒井幸子、山下久美子事務補佐員に感謝いたします。また、本研究を行うにあたり、終始励ましの御言葉をいただきました当研究センター各位に感謝いたします。

最後になりましたが、当研究センターにおいて研究を行う機会を与えていただき、終始にわたって御支援いただきました財団法人化学及血清療法研究所酒匂光郎前所長、内野矜自所長、本田憲之助副所長、水野喬介部長、時吉幸男部長、江田康幸元室長、城野洋一郎室長はじめ当研究所職員各位に対しましてこの場を借りて深く感謝申し上げます。

4 略語一覽

AIDS, acquired immunodeficiency disease syndrome

CCR5, CC chemokine receptor 5

CTL, cytotoxic T lymphocyte

CXCR4, CXC chemokine receptor 4

EBV, Epstein-Barr virus

FACS, fluorescence-activated cell sorter

FCS, fetal calf serum

FITC, fluorescein isothiocyanate

HARRT, highly active antiretroviral therapy

HIV-1, human immunodeficiency virus type 1

HLA, human histocompatibility leukocyte antigens

Ig(G), immunoglobulin (G)

LTNP, long-term non-progressor

MFI, mean fluorescence intensity

MHC, major histocompatibility complex

NCS, newborn calf serum

PBMC, peripheral blood mononuclear cell

PE, phycoerythrin

PHA, phytohemagglutinin

SIV, simian immunodeficiency virus

TAP, transporter associated with antigen processing

TCR, T cell receptor for antigen

5 研究の背景と目的

5-1) はじめに

HIV-1 特異的な細胞傷害性 T 細胞 (CTL) は、HIV-1 感染者においてウイルス複製を抑制している (Borrow, P. *et al.*, 1997, Goulder, P.J. *et al.*, 1997, Koenig, S. *et al.*, 1995, Koup, R.A. *et al.*, 1994, Klein, M. R. *et al.*, 1995, Ogg, G.S. *et al.*, 1998)、あるいは HIV-1 感染を防御している (Langlade-Demoyen, P. *et al.*, 1994, Rowland-Jones, S. *et al.*, 1995) ことが明らかになってきている。すなわち、HIV-1 感染者におけるウイルス量と PBMC 中の HIV-1 特異的 CTL 量との間には逆相関があることが示されている (Ogg, G.S. *et al.*, 1998)。また、HIV-1 に感染しているが 10 年以上にわたって発症しない長期未発症者 (LTNP) では HIV-1 特異的 CTL 活性が高く、早期に AIDS を発症する HIV-1 感染者では特異的 CTL 活性が低いことが示されている (Klein, M. R. *et al.*, 1995)。さらに、HIV-1 感染にハイリスクでありながら感染していない人では、高い特異的 CTL 活性がみられることが示されている (Langlade-Demoyen, P. *et al.*, 1994, Rowland-Jones, S. *et al.*, 1995)。最近のサル免疫不全ウイルス (SIV) に関する研究では、SIV 特異的 CTL 活性と病気の発症には逆相関があることが示されている (Allen, T.M. *et al.*, 2000, Evans, D.T. *et al.*, 1999, Kuroda, M.J. *et al.*, 1999, Schmitz, J.E. *et al.*, 1999)。これらの知見は、HIV-1 特異的 CTL を誘導するワクチンは HIV-1 感染を防御するだけでなく AIDS の症状進行を遅らせる効果があることを強く示唆している。したがって、HIV-1 特異的 CTL が認識する CTL エピトープは、AIDS の病態を解明することや予防用あるいは治療用 HIV ワクチンの開発など様々な研究のために必須である。

5-2) CTLによるHIV-1感染細胞の認識

HIV-1 は、細胞表面上の CD4 と CCR5、または CD4 と CXCR4 を利用してヒト T 細胞に感染する。その受容体の指向性から、それぞれ R5 ウイルス、

または X4 ウイルスと称される。細胞に感染した HIV-1 は、自身の逆転写酵素によりウイルス RNA から cDNA を生成し、さらにインテグラーゼ (integrase) のはたらきにより cDNA を感染細胞の染色体上に組み込む。細胞の転写、翻訳機構を利用して産生されたウイルス蛋白のうちの一部は、細胞質内の蛋白分解酵素集合体であるプロテアソーム (proteasome) で適当な長さに分解される。プロセッシングされたこれらのペプチド断片は、小胞体上のトランスポーター TAP を通って小胞体内に運ばれ、そこで HLA-class I と結合する。この HLA-class I 複合体は、ゴルジ体を通して細胞表面上に輸送される。このようなメカニズムで HIV-1 感染細胞上に提示されたウイルス由来の抗原ペプチドは、CD8 陽性の HIV-1 特異的 CTL によって、その T 細胞受容体 (TCR) を介して認識される。自己抗原の一部も同じ経路でペプチド断片化、抗原提示が行われるが、通常は免疫寛容により CD8 陽性 CTL による認識を受けない。

HLA-class I 分子は、免疫グロブリンと相同性を有し、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する。その構造は、 α 鎖 (44kDa) と $\beta 2$ ミクログロブリン (12kDa) の 2 種の蛋白が非共有結合で会合したヘテロ 2 量体で構成される複合体で、 α 鎖のみが膜を貫通している。これに抗原ペプチドが非共有的に結合している。 α 鎖は、 $\alpha 1 \sim 3$ 、膜貫通部および細胞質内の各ドメインからなり、N 末を細胞の外側にもつ I 型膜蛋白である。3 次元構造の解析結果より、細胞表面に出ている $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ ドメイン上に溝 (groove) が存在することが明らかになっており (Bjorkman, P. J. *et al.*, 1987)、外来性の抗原ペプチドや自己抗原ペプチドはこの溝に結合している。HLA-class I は、 α 鎖の多型性から HLA-A、B、C、E、F、および G に分類される。 $\beta 2$ ミクログロブリンには多型性がない。HLA-A、B および C の各サブクラスは、ほとんどすべての有核細胞と血小板に発現している。

HLA-class I の溝は両端が開じた構造をしているので、結合できるペプチドの長さは 8~11 アミノ酸残基 (8-mer~11-mer) 程度で、多くは 9-mer である。HLA-class I の多型は溝内部のアミノ酸に集中しているため、結合できるペプチドのシーケンスは基本的にそれぞれの HLA-class I 毎に異なるモチーフに従っている (Falk, K. *et al.*, 1991, Jardetzky, T. S. *et al.*, 1991, Falk, K. *et al.*, 1994, Rammensee, H. G. *et al.*, 1995)。抗原ペプチドを構成するアミノ酸のう

ち、特定のポジションが特に HLA-class I との結合には重要である。このようなアミノ酸残基をアンカー (anchor; 錨) と称している。特に、抗原ペプチドの N 末 2 番目 (Position2; P2) および C 末に位置するアミノ酸がアンカーになる場合が多いようである。アンカーの側鎖は、HLA-class I の溝にある A~F ポケットと疎水性相互作用、静電氣的結合、水素結合、ファンデルワールス力により結合している。アンカーになる抗原ペプチドの P2 および C 末のアミノ酸は、それぞれ B ポケットと F ポケットに結合することが結晶構造の解析から明らかにされている。抗原ペプチド特異的な CTL は、その TCR を介して、HLA-class I の溝から露出したアミノ酸の側鎖と HLA-class I の複合体を認識している (Bjorkman, P. J. *et al.*, 1987)。

HLA-class I の各ハプロタイプにおいて、各タイプの出現頻度は人種によって異なる。HLA-A 領域での HLA-A*1101 の出現頻度は、日本人において A*2402 (65.4%)、A*3303 (25.6%) に次いで高い (22.2%) (Tokunaga, K. *et al.*, 1997)。これに対して、タイ人においてはもっとも頻度が高い (50.0%) (Clayton, J. *et al.*, 1997)。

5-3) HIV-1 のサブタイプ

HIV は非常に変異性が高く、多数の変異株が存在する。それらは Env 蛋白のシーケンスを系統樹解析することにより大きくいくつかのサブタイプに分類される。これらの HIV-1 サブタイプは、地域ごとに異なった型が流行していることが疫学的解析によって明らかになっている。北米やヨーロッパのほとんどの HIV-1 感染者は、HIV-1 clade B ウイルスに感染している。一方、世界的に見て HIV-1 感染者の増加が顕著な地域であるアフリカやアジアにおいては、ほとんどの HIV-1 感染者は非 clade B (non-clade B) ウイルスに感染している。

(Kato, K. *et al.*, 1999, Ou, C.Y. *et al.*, 1993, Weniger, B.G. *et al.*, 1994)。アジア各国では、HIV-1 clade E または clade C ウイルスの感染が高頻度であり (Weniger, B.G. *et al.*, 1994)、前者は東南アジアでもっとも広範囲にみられるウイルスで、後者はインドで急速に広まっているウイルスである。両サブタイ

プのウイルス感染が中国南部で拡大していることが最近わかってきている (Chen, J. *et al.*, 1999, Yu, X.F. *et al.*, 1999)。日本においては、血友病患者が非加熱血液製剤を通して clade B ウイルスに感染している一方で、異性間性的接触による clade E ウイルスの増加傾向が認められている。以上の知見より、HIV-1 clade E ウイルスは、アジアの HIV-1 感染者の病態解析やワクチン作製のために重要なサブタイプであるばかりでなく、将来は日本においても重要になると考えられる。

これまでに同定されている HIV-1 特異的 CTL エピトープのほとんどは、clade B ウイルスに対するものである (Brander, C. *et al.*, 1999)。それ以外の non-clade B 特異的 CTL エピトープは報告が少ない。いくつかの研究では clade A 特異的なエピトープ (Dorrell, L. *et al.*, 1999, Rowland-Jones, S.L. *et al.*, 1998) や clade C 特異的なエピトープ (Dorrell, L. *et al.*, 1999) が明らかにされている。しかしながら、HIV-1 clade E に対する CTL エピトープの報告はない。HIV-1 clade E や clade C に特異的な CTL エピトープを決定することは、これらのウイルスの感染者における CTL の役割を解明するために重要と考えられ、また、アジア地域に向けた CTL 誘導型の HIV-1 ワクチンをデザインする上においても非常に重要となる。

5-4) 本研究の目的

本研究では、日本人の HIV-1 clade B 感染者およびタイ人の clade E 感染者で認識されている HLA-A*1101 拘束性 CTL エピトープを同定し、CTL エピトープが clade 間で共通 (cross-clade) に認識されるのか、あるいは clade 特異的に認識されるのか明らかにすることを目的とした。HLA-A*1101 拘束性 CTL エピトープに焦点を絞ったのは、HLA-A*1101 がタイ人においてもっとも高頻度で (Clayton, J. *et al.*, 1997)、日本人においても比較的高頻度にみられるためであり (Tokunaga, K. *et al.*, 1997)、CTL エピトープが HIV-1 clade E で同定されていないばかりでなく、clade B での報告も少ないためである。

はじめに、リバーシムノジェネティクス法によって、日本人の HIV-1

clade B 感染者で認識されている HLA-A*1101 拘束性 clade B 特異的 CTL エピトープの同定を行った。同定された CTL エピトープと既知の HLA-A*1101 拘束性 clade B 特異的 CTL エピトープを用いて、clade E に特異的な CTL エピトープを試みた。まず、タイ人の clade E 感染者の PBMC を、clade B CTL エピトープ部位に相当する clade E ペプチドで刺激することによって特異的 CTL を誘導できるか調べた。さらに、タイ人の HIV-1 clade E 感染者から誘導された特異的 CTL が clade B ペプチドを認識するか、日本人の clade B 感染者から誘導された特異的 CTL が clade E ペプチドを認識するか調べることによって、CTL エピトープが clade 間で共通 (cross-clade) に認識されるか、あるいはそれぞれの clade のシークエンスに特異的に (clade-specific) 認識されるか解析した。

既知の clade B 特異的 CTL エピトープを利用した clade E 特異的 CTL エピトープの解析法が有効であることが示されれば、様々な HIV-1 サブタイプの CTL エピトープがきわめて効率的に同定できる。これらの解析で得られた情報は、AIDS 病態の解明やワクチン開発など様々な HIV-1 研究に大きく寄与する。さらに、多数の HLA-class I と HIV-1 サブタイプで同様の解析を行い、CTL エピトープに関する情報を蓄積することによって、世界的に使用可能な HIV ワクチンがデザイン可能になる。

6 実験方法

6-1) 本研究に使用した材料

a. 細胞および培地

C1R 細胞 (HLA-A、B 欠損ヒト B 細胞株) および RMA-S 細胞 (TAP 欠損マウス細胞株) は、10% の FCS を含む RPMI1640 培地で培養した。HLA-A*1101 を発現する C1R 細胞 (C1R-A*1101 細胞) および HLA-A*1101 を発現する RMA-S 細胞 (RMA-S-A*1101 細胞) は以前に作製されており (Chujoh, Y. *et al.*, 1998)、これらは 0.15mg/mL の hygromycin B と 10% の FCS を含む RPMI1640 培地で培養した。Epstein-Barr virus (EBV) で形質転換した cell line の Tm 細胞 (Tm-EBV 細胞) は、健康な成人 Tm (HLA-A*1101/A*2402, B*5201/B*5201, Cw*0701/Cw*1202) の PBMC より既に作製されており (Yamamoto, J. *et al.*, 1990)、これは 10% の FCS を含む RPMI1640 培地で培養した。721.221-CD4 細胞は、721.221 細胞 (CXCR4 を発現しているが (データは示さず)、HLA-class I を発現していない B 細胞) にヒト CD4 遺伝子 (pBMG hyg CD4) を形質導入したものである。721.221-CD4-A*1101 細胞は、721.221-CD4 細胞に引き続き HLA-A*1101 遺伝子を導入して作製したものであり、これは 0.15mg/mL の hygromycin B と 10% の FCS を含む RPMI1640 培地で培養した。

b. ペプチド

合成ペプチドは、automated multiple peptide synthesizer (Shimadzu Model PSSM-8, Shimadzu Co.) で作製された。精製したペプチドは、HPLC および mass spectrometry による分析を行い、90%以上の精製度が確認されたもののみを本研究に使用した。

c. 抗体

HIV-1 感染細胞の細胞内染色に使用した PE 標識抗 HIV-1 p24 抗体 (KC57 クローン) は、Beckman Coulter (Fullerton, CA) より購入した。FITC 標識抗マウス Ig 抗体は、Silenius Laboratories (Hawthorn Victoria, Australia) より購入した。

d. HIV-1 感染者の PBMC

HLA-A*1101 陽性の HIV-1 clade E 感染者 7 人 (TT-005, TT-007, TT-008, TT-009, TU-002, TU-003, TU-007) の血液サンプルは、タイの Siriraj Hospital においてインフォームドコンセントを得て集められた。HLA-A*1101 陽性の HIV-1 clade B 感染者 5 人 (KI-005, KI-015, KI-030, KI-035, KI-036) の血液サンプルは、日本の国立国際医療センターにおいてインフォームドコンセントを得て集められた。本研究に使用したこれらの感染者の HLA-class I を HLA 遺伝子型タイピングによって調べ、すべての感染者が HLA-A*1101 陽性であることを確認した。感染している HIV-1 のサブタイプは、Env 領域のシークエンス解析によって決定された。PBMC は、Ficoll-Paque™ (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) を用いた比重遠心法によりヘパリン処理血液、あるいは EDTA 処理血液より分離された。

e. CTL クローン

HIV-1 clade E ウイルス感染細胞に対する細胞傷害活性の測定における陰性コントロールとして使用した HLA-A*2402 拘束性 HIV-1 clade B 特異的 CTL クローンは、以前に作製された (Ikeda-Moore, Y. *et al.*, 1997)。

f. HIV-1 clade E ウイルスクローン

複製能を有する HIV-1 clade E (CRF01_AE) の分子クローン、p93JP-NH1 は、日本人の HIV-1 clade E 感染者より分離されたウイルスを基にして作製された。ウイルスの全塩基配列をシークエンスし、このウイルスが clade E であるこ

とを確認した。HIV-1 clade E ウイルスクローン p93JP-NHI1 のストックは、ウイルス全長の遺伝子を含むプラスミドを形質導入した HeLa 細胞から数日後に産生されたウイルスを回収して調整された。

6-2) リバースイムノジェネティクス法の概要

本研究における HIV-1 特異的 CTL エピトープの解析法の基本的方策は、リバースイムノジェネティクス法による (Hill, A. V. S. *et al.*, 1992, 滝口雅文, 1997)。その概要を図 1 に示した。

〔ステップ 1〕

HLA-class I 分子に結合するペプチドのモチーフを決定する。

HLA-class I 分子の 3 次元構造は、その結晶を X 線構造解析した結果より明らかになっており、細胞表面に出ているドメイン上には溝 (groove) が存在する (Bjorkman, P. J. *et al.*, 1987)。外来性の抗原ペプチドや自己由来の抗原ペプチドは HLA-class I 分子のこの溝に結合している。細胞から HLA-class I 複合体を精製し、これに結合している自己抗原ペプチドのアミノ酸配列を解析すると、HLA-class I の型によって特有の結合ペプチドモチーフがあることがわかっている (Falk, K. *et al.*, 1991, Jardetzky, T. S. *et al.*, 1991, Falk, K. *et al.*, 1994, Rammensee, H. G. *et al.*, 1995)。HLA-A*1101 分子の結合ペプチドモチーフは、N 末 2 番目 (Position 2; P2) にバリン、イソロイシン、スレオニン、ロイシン、チロシンあるいはフェニルアラニンのいずれかを持ち、C 末にリジンをもつ 8~12mer の長さのペプチドであることが明らかになっている (Falk, K. *et al.*, 1994, Rammensee, H. G. *et al.*, 1995)。抗原ペプチドの P2 および C 末などに位置するアミノ酸は、HLA-class I 分子の溝に結合するアンカー (anchor; 錨) の役割をしていると考えられる。

〔ステップ 2〕

HLA-class I 分子の結合ペプチドモチーフに該当するアンカーをもったアミノ酸配列を HIV-1 蛋白のアミノ酸シーケンスデータから検索する。これら

の候補ペプチドを合成する。本研究においては、HLA-A*1101 拘束性 HIV-1 clade B 特異的 CTL エピトープを決定するために、HIV-1 SF-2 株のシークエンスを基に HLA-A*1101 分子の結合ペプチドモチーフのアミノ酸配列をもつペプチドを検索した。

〔ステップ 3〕

ペプチド結合アッセイにより HLA-class I 分子と合成ペプチドとの結合親和性を解析し、結合能のあるペプチドを選別する。本研究においては、peptide stabilization assay 法を用いて HLA-A*1101 分子に結合するペプチドを解析、選別した。

〔ステップ 4〕

結合ペプチドを用いて同じ HLA-class I をもつ HIV-1 感染者の PBMC を *in vitro* で刺激、培養する。PBMC 中にペプチド特異的 CTL が存在する場合には、選択的に特異的 CTL が増殖する。本研究では、HLA-A*1101 陽性の日本人の HIV-1 clade B 感染者およびタイ人の HIV-1 clade E 感染者の PBMC を使用した。

〔ステップ 5〕

in vitro で刺激、培養した bulk PBMC の細胞傷害活性を 2 種の標的細胞を用いて調べる。[A]ペプチドに対して特異的な細胞傷害活性を調べるために、ペプチドをパルスした細胞 (HLA-class I-matched cells) を標的細胞として用いた。[B]目的とするペプチドが細胞内部でプロセッシングされ細胞表面に抗原提示されることを確認するために、HIV-1 蛋白を発現する組換えワクチニアウイルスに感染した細胞を標的細胞として用いた。両者に対して細胞傷害活性が認められたとき CTL エピトープと決定した。

6-3) ペプチド結合アッセイ

HIV-1 由来ペプチドの HLA-A*1101 に対する結合性は、既に確立されている peptide stabilization assay 法に従って測定した (Chujoh, Y. *et al.*, 1998)。図 2 にその概要を示した。RMA-S-A*1101 細胞を 26°C で 16 時間培養した後に

10^{-3} ~ 10^{-7} M のペプチドを 26°C で 1 時間パルスラベルした。その後さらに 37°C で 3 時間培養した。ペプチドパルスした細胞は抗 HLA-class I α_3 抗体である TP25.99 (Tanabe, M. *et al.*, 1992)、引き続き FITC 標識抗マウス Ig 抗体で染色した。細胞の平均蛍光強度 (MFI) を FACS Calibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA) を用いて測定した。ペプチドを添加せずに 26°C で培養し続けた RMA-S-A*1101 細胞の MFI を 100%、同様に 37°C で 3 時間培養した細胞の MFI を 0% として、HLA-A*1101 結合ペプチドは 10^{-3} M の濃度でパルスしたときの MFI が 25% 以上であるものとして決定した。50% の MFI を与えるペプチド濃度を BL_{50} として算出した。

peptide stabilization assay 法の原理は次の通りである (図 2 参照)。RMA-S 細胞 (抗原提示に関与している TAP の機能を欠損しているため、内在性の抗原ペプチドの提示能が低いマウス由来細胞株) に HLA-A*1101 遺伝子を形質導入した RMA-S-A*1101 細胞は、 26°C で培養するとペプチドを結合していない空の A*1101 分子を細胞表面上に発現させることができる。 26°C で培養後合成ペプチドを添加し、さらに 37°C で培養すると、ペプチドと結合していない空の A*1101 分子は細胞表面から消失する。その割合は、A*1101 分子とペプチドとの結合親和性に依存する。したがって、 37°C で培養した後に細胞表面上の A*1101 分子の量を FACS で測定すれば、ペプチドの結合能が解析できる。

6-4) PBMC の *in vitro* 刺激

特異的 CTL の誘導を HLA-A*1101 陽性のタイおよび日本の HIV-1 感染者の PBMC を用いて試みた。

1×10^6 の PBMC を、 10^{-6} M の HLA-A*1101 結合ペプチド (あるいは数種類のペプチドのカクテル) を添加した culture medium (10% の FCS を含む RPMI1640 培地に 200 Units/ml の組換えヒト IL-2 を添加した培地) と混合して、U 底 96 穴プレートで培養した。1~2 週間培養後、培養細胞のペプチド特異的細胞傷害活性を測定した。HLA-A*1101 に結合しない非特異的ペプチド (HLA-B*3501 結合ペプチド: DPNPQEVVL) で刺激した培養細胞のペプチド

特異的な細胞傷害活性 relative specific lysis の平均値±標準偏差は、5 人の HIV-1 clade B 感染者で $2.7 \pm 3.0\%$ 、7 人の HIV-1 clade E 感染者で $3.5 \pm 3.5\%$ であったことから、10 %以上の relative specific lysis が認められたときに CTL 活性があると判定した。

bulk CTL および CTL クローンを樹立するためにさらに複数回の *in vitro* 刺激を行った。2 回目以降の刺激は、X 線照射 (35 Gy) とペプチド (あるいは数種類のペプチドのカクテル) のパルスを施した自己の PHA blastoid cell line (1×10^6) を加えて行った。

6 - 5) 統計解析

HIV-1 clade B および clade E 特異的 CTL エピトープに対する認識の強さが有意であるのか調べるために、ノンパラメトリックな Mann-Whitney の U 検定によって、それぞれのペプチドで刺激した培養細胞のペプチド特異的な細胞傷害活性 relative specific lysis の値を非特異的ペプチドの活性値と比較し、統計的有意差を解析した。解析には StatView ソフトウェア (StatView 4.02; Abacus Concepts, Berkeley, CA) を使用し、 $P < 0.05$ の差が認められたとき有意であると判定した。

6 - 6) CTL クローン の 作 製

HIV-1 特異的 CTL クローンは、HIV-1 感染者の PBMC をペプチド刺激して樹立された特異的 bulk CTL 培養細胞から作製した。bulk CTL を 0.8 cells/well で U 底 96 穴プレート (Nunc, Roskilde, Denmark) に 200 μ l の cloning mixture と混合して播種した。cloning mixture は、culture medium (10% の FCS を含む RPMI1640 培地に 200 Units/ml の組換えヒト IL-2 を添加した培地) 中に 5% の PHA-sup、ならびに健康なドナー由来の allogeneic PBMC に X 線照射 (35 Gy) した feeder cells (5×10^5)、C1R-A*1101 細胞に X 線照射 (100 Gy) した

stimulator cells (1×10^5)、およびペプチド (10^{-6}M) を含んだ混合液である。このうち PHA-sup は、健康なドナー由来の PBMC を 0.2% PHA 入りの culture medium で 48 時間培養した後の培地上清である。約 2 週間培養後に細胞の増殖が認められた well は、feeder cells 及びペプチドをパルスした stimulator cells を加えた 48 穴プレートに移し替えてさらに培養した。数日後、ペプチド特異的な細胞傷害活性を指標にスクリーニングした。さらに、HIV-1 蛋白を発現するワクチニアウイルスに感染した標的細胞に対して細胞傷害活性が認められた細胞を CTL クローンとした。すべての CTL クローンの作製において U 底 96 穴プレートで細胞の増殖が認められた well 数は 10% 以下であったことから、これら CTL クローンは単クローンであると推定された。

6-7) ペプチドパルスした標的細胞に対する細胞傷害活性の測定

CTL 活性は、次に示す標準的な ^{51}Cr リリースアッセイにより測定した。標的細胞 (5×10^5) は、 3.7MBq の $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ と混合して 37°C で 1 時間培養し、その後 10% の NCS を含む RPMI1640 培地で 3 回洗浄して調製した。標識された標的細胞をペプチド添加した U 底 96 穴プレートに播種した ($5 \times 10^3/\text{well}$)。 37°C で 1 時間培養した後、エフェクター細胞を加えてさらに 37°C で 4 時間培養した。培養後低速遠心を行い、培養上清を回収して γ 線カウンターで放射線量を測定した。標的細胞のみを添加した well の培養上清中の放射線量を測定し、spontaneous の ^{51}Cr リリース量とした (cpm spn)。また、2.5% の Triton X-100 を加えた標的細胞の培養上清中の放射線量を測定し、maximum の ^{51}Cr リリース量とした (cpm max)。細胞傷害活性 (specific lysis) は、エフェクター細胞を添加した標的細胞の ^{51}Cr リリース量を測定した値 (cpm exp) から次式により算出した。 $\text{specific lysis} = \{(\text{cpm exp} \cdot \text{cpm spn}) / (\text{cpm max} \cdot \text{cpm spn})\} \times 100$ 。ペプチド特異的な細胞傷害活性 (relative specific lysis) は、ペプチドパルスした標的細胞に対するエフェクター細胞の活性からパルスしていない標的細胞に対する活性を引いて算出した。

6-8) HIV-1 組換えワクチニアウイルス感染細胞に対する細胞傷害活性の測定

HIV-1 clade B の Gag-Pol または Env を発現する組換えワクチニアウイルスは、いずれも HIV-1 SF2 株から既に作製されていたものを用いた (Shioda, T. *et al.*, 1990)。2 種の組換えワクチニアウイルス、vT141 (Nef 84-92-2F6F のシーケンスを有する HIV-1 clade A の分離株 90CR402 由来の Nef 蛋白を発現する組換えウイルス) および vT157 (Gag 349-359-9S のシーケンスを有する HIV-1 clade D の分離株 94UG114 由来の Gag 蛋白を発現する組換えウイルス) は、NIH AIDS Research and Reference Reagent Program (NIAID, NIH, internet web の URL は <http://www.aidsreagent.org/>) から分与された。標的細胞を 10 plaque-forming-units の組換えウイルスまたは野生型 (wild type) のワクチニアウイルスに感染させ、一夜培養した。この感染細胞 (1×10^5) を前項と同様に ^{51}Cr で標識した。標識された標的細胞を U 底 96 穴プレートに播種して ($5 \times 10^3/\text{well}$)、エフェクター細胞と混合した。37°C で 4 時間 (標的細胞が vT157 感染細胞など Nef 以外の組換えウイルスの場合) または 6 時間 (標的細胞が vT141 感染細胞など Nef の組換えウイルスの場合) 4 時間の培養では、HIV-1 nef の組換えワクチニアウイルス感染細胞に対する CTL の認識が弱いため (データは示さず) 培養後、CTL クローンまたは bulk T cell の組換えワクチニアウイルス感染細胞に対する活性を測定した。標的細胞には、C1R-A*1101 および C1R 細胞を用いた。ターゲット細胞 : エフェクター細胞比 (E/T ratio) は、それぞれの図中に示されている。

6-9) HIV-1 clade E ウイルス感染細胞に対する細胞傷害活性の測定

721.221-CD4-A*1101 細胞に HIV-1 clade E ウイルスクローン p93JP-NHI1 を数日間暴露させた。細胞内 HIV-1 p24 蛋白の染色を行い、80%

以上の陽性細胞率（感染率）が確認された細胞を CTL アッセイの標的細胞として使用した。HIV-1 clade E 感染細胞 (1×10^5) は、前述と同様に ^{51}Cr で標識した。標識された標的細胞を U 底 96 穴プレートに播種し ($5 \times 10^3/\text{well}$)、エフェクター細胞と混合して 37°C で 4 時間培養した。CTL クローンまたは bulk T cell の HIV-1 clade E 感染細胞に対する CTL 活性を図中に示した E/T ratio で調べた。

6-10) HIV-1 clade E 感染細胞のフローサイトメトリー解析

HIV-1 clade E 感染細胞の細胞内 HIV-1 p24 コア蛋白の染色は、PE 標識抗 HIV-1 p24 抗体 (KC57 クローン) の購入先である Beckman Coulter (Fullerton, CA) のプロトコールに従って行った。陰性コントロールとして PE 標識マウス IgG を用いた染色を毎回行い、非特異的な結合がないことを確認した。細胞表面上の HLA-A*1101 の染色を同時に行う場合は、細胞内 HIV-1 p24 コア蛋白の染色に先立って、抗 HLA-A11 および A24 抗体 (A11.1M クローン) と FITC 標識抗マウス Ig 抗体を用いた染色を行った。フローサイトメトリー解析は FACS Calibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA) を用いて行った。

7 実験結果

7-1) HLA-A*1101 拘束性 HIV-1 clade B 特異的 CTL エピトープの同定

はじめに、リバーシムノジェネティクス法により日本人の HIV-1 clade B 感染者で認識されている HLA-A*1101 拘束性 HIV-1 clade B 特異的 CTL エピトープの同定を行った。

HLA-A*1101 に結合する HIV-1 clade B ペプチドは既に決定されていた (Chujoh, Y. *et al.*, 1998)。それによると、HIV-1 SF2 株のアミノ酸シークエンスより HLA-A*1101 の結合ペプチドモチーフ (N 末 2 番目 (Position 2; P2) にバリン、イソロイシン、スレオニン、ロイシン、チロシンあるいはフェニルアラニンのいずれかを持ち、C 末にリジンを有する 8~12mer の長さのペプチド) を含むペプチドを検索して、136 本の候補ペプチドを合成した。次に、HLA-A*1101 と合成ペプチドとの結合親和性をペプチド結合アッセイにより解析した結果、136 本中 98 本の合成ペプチドが結合することがわかった (表 1) (Chujoh, Y. *et al.*, 1998)。

日本人の HIV-1 clade B 感染者においてペプチド特異的な CTL が誘導されるか調べるために、HLA-A*1101 陽性の HIV-1 clade B 感染者 2 人の PBMC を上記の 98 種の HLA-A*1101 結合ペプチド (あるいは数種類のペプチドのカクテル) で *in vitro* 刺激した。2 回目以降の刺激は、X 線照射 (35 Gy) と同一ペプチド (あるいは数種類のペプチドのカクテル) のパルスを実施した自己の PHA blastoid cell line (1×10^6) を加えて 1 週間隔で実施した。2 回刺激後、ペプチドをパルスした Tm-EBV 細胞 (HLA-A*1101-matched cell line) を標的細胞として ^{51}Cr リリースアッセイ法により細胞傷害活性を測定した。その結果、5 種のペプチドに対して特異的細胞傷害活性が誘導された (表 2)。このうち Pol 313-321 (AIFQSSMTK) は、すでに HLA-A*1101 拘束性 CTL エピトープとして報告されている (Culmann, B. *et al.*, 1991)。残り 4 種 (Pol 424-432 (QIYAGIKVK)、Pol 675-683 (QIIEQLIKK)、Pol 894-903 (AVFIHNFKRK) および Env202-210 (SVITQACPK)) は、新たな HLA-A*1101 拘束性 HIV-1 clade

B 特異的 CTL エピトープであることが示唆された。

これら 4 種について詳細な解析を行うために、それぞれに特異的な bulk CTL から CTL クローンを作製した。各 CTL クローンが HLA-A*1101 拘束性、かつそれぞれのペプチドを特異的に認識していることを確かめるために、HLA-class I をほとんど発現していないヒト cell line である C1R 細胞とその形質導入体である C1R-A*1101 細胞にそれぞれ 10^{-6} ~ 10^{-11} M のペプチドをパルスした標的細胞を用いて、各 CTL クローンの細胞傷害活性を調べた。その結果、調べたすべての CTL クローンは、C1R-A*1101 細胞に対してパルスしたペプチド濃度依存性の細胞傷害活性を示す一方で、C1R 細胞に対してほとんど活性を示さなかった (図 3)。これらの結果は、すべての CTL クローンが HLA-A*1101 拘束性であり、かつそれぞれのペプチド特異的に TCR を介した認識をしていることを示している。

これら 4 種のペプチドが細胞内部でプロセッシングされ細胞表面に抗原提示される真のエピトープであることを明らかにするために、それぞれのペプチドを含む HIV-1 蛋白を発現する組換えワクチニアウイルスを感染させた標的細胞に対する各 CTL クローンの細胞傷害活性を調べた。その結果、すべての CTL クローンは、それぞれが認識するペプチドを含む HIV-1 組換えワクチニアウイルスに感染した C1R-A*1101 細胞に対して細胞傷害活性を示したが、野生型 (wild type) のワクチニアウイルスに感染した C1R-A*1101 細胞を傷害しなかった (図 4)。これらの結果より、HLA-A*1101 陽性の HIV-1 clade B 感染者の PBMC で特異的な CTL 活性が誘導された 4 種のペプチドは、細胞内部から抗原提示されている真の CTL エピトープを含んでいることが明らかになった。

Pol 675-683 ペプチドは、その内部に CTL エピトープの候補となり得る HLA-A*1101 結合ペプチドモチーフをもつ 2 種のシーケンス (QIIEQLIK および IIEQLIKK) を含んでいる。最適の CTL エピトープを決定するために、それぞれのペプチドをパルスした C1R-A*1101 細胞に対する特異的 CTL クローンの細胞傷害活性を調べた。この CTL クローンは、9-mer ペプチドを効率的に認識する一方で、2 種の 8-mer ペプチドを認識することができなかった (図 3)。HLA-A*1101 に対する 2 種の 8-mer ペプチドの結合親和性は、9-mer ペプチドのそれと比較して 100 倍低かった (データは示さず)。これらの結果より、9-mer

ペプチド (QIIEQLIKK) がこの CTL クローンにより認識される最適のエピトープであることが示された。

Pol 894-903 ペプチドは、その内部に HLA-A*1101 結合ペプチドモチーフの N 末 2 番目 (Position2; P2) アンカーが異なる 9-mer の長さのシークエンス VFIHNFKRK を含んでいる。この 9-mer ペプチドも、HLA-A*1101 拘束性 CTL エピトープの候補である。しかし、この 9-mer ペプチドは HLA-A*1101 と結合しなかったことから、CTL エピトープでないことがわかった(データは示さず)。以前の検討により、アルギニンも HLA-A*1101 に結合する C 末のアンカーであることが示されている (Chujoh, Y. *et al.*, 1998)。したがって、Pol 894-903 ペプチドは、その内部に異なる C 末アンカーを持つ 2 種の長さのシークエンス AVFIHNFK および AVFIHNFKR を含んでいる。最適の CTL エピトープを決定するために、2 種のペプチドをそれぞれパルスした C1R-A*1101 細胞に対する特異的 CTL クローンの細胞傷害活性を調べた。この CTL クローン (Pol894-903-14) は、10-mer ペプチドを濃度依存性に認識する一方で、8-mer および 9-mer ペプチドを認識することができなかった (図 3)。この結果より、10-mer ペプチド (AVFIHNFKRK) がこの CTL クローンにより認識される最適のエピトープであることが示された。9-mer ペプチドは 10-mer ペプチドと比較して HLA-A*1101 に対してより強い結合親和性を持っていたにもかかわらず (データは示さず)、10-mer ペプチドのみが CTL クローンにより認識されていたことから、C 末に位置する P10 のリジンはこの CTL クローンによる TCR を介した認識に重要であることが示された。

Env202-210 ペプチドは、その内部に HLA-A*1101 結合ペプチドモチーフの N 末 2 番目 (Position2; P2) アンカーが異なる 8-mer の長さのシークエンス VITQACPK を含んでいる。この 8-mer ペプチドも、HLA-A*1101 拘束性 CTL エピトープの候補である。最適の CTL エピトープを決定するために、8-mer と 9-mer のペプチドをそれぞれパルスした C1R-A*1101 細胞に対する特異的 CTL クローンの細胞傷害活性を調べた。この CTL クローンは、9-mer ペプチドを効率的に認識する一方で、8-mer ペプチドを認識することができなかった(図 3)。この結果より、9-mer ペプチド (SVITQACPK) がこの CTL クローンにより認識される最適のエピトープであることが示された。

以上まとめると、リバーシムノジェネティクス法を用いた解析により、日本人の HLA-A*1101 陽性の HIV-1 clade B 感染者で認識されている 4 種 (Pol 由来 3 種および Env 由来 1 種) の新たな HLA-A*1101 拘束性 HIV-1 clade B 特異的 CTL エピトープを決定した。

7-2) HIV-1 clade B 特異的 CTL エピトープを基にした clade E エピトープ候補ペプチドの検索

これまでに同定した 4 種の HLA-A*1101 拘束性 HIV-1 clade B 特異的 CTL エピトープ (Pol 424-432, Pol 675-683, Pol 894-903 および Env202-210) に加えて、既に 4 種の HLA-A*1101 拘束性 HIV-1 clade B 特異的 CTL エピトープ (Pol 313-321, Nef 84-92, Gag 83-90 および Gag 349-359) が報告されている (Culmann, B. *et al.*, 1991, Harrer, T. *et al.*, 1998, Sipsas, N. V. *et al.*, 1997 and Threlkeld, S. C. *et al.*, 1997)。これらの 8 種の CTL エピトープに関して、これまでに報告された HIV-1 シークエンスが登録されているロスアラモス研究所のデータベース (HIV sequence database, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, internet web の URL は <http://hiv-web.lanl.gov/>) を基にして HIV-1 clade A から clade E のサブタイプでみられる主要な変異 (variant) の検索を行った。結果を表 3 に示した。この検索により、Pol 894-903 (AVFIHNFKRK) および Pol 313-321 (AIFQSSMTK) は HIV-1 clade A から clade E のサブタイプ間で高度に保存されていること、また Pol 424-432 (QIYAGIKVK) は clade B と clade E で保存されていることが明らかになった。他の 5 種の CTL エピトープ領域に関しては主要なシークエンスが clade B と clade E で異なっていた。以上のことは、Pol 894-903 および Pol 313-321 特異的な CTL は HIV-1 clade A から clade E いずれの HIV-1 感染者においても誘導されること、これに対して他の 6 種に関しては各 clade に特異的かあるいはいくつかの clade に共通な CTL がそれぞれの HIV-1 感染者で誘導される可能性を示唆している。そこで、HIV-1 clade E CTL エピトープを同定するため、ならびに誘導された CTL が clade B と clade E エピトープを共通 (cross-clade) に

認識するか、それぞれの clade を特異的 (clade-specific) に認識するか調べるために、タイ人の HIV-1 clade E 感染者におけるこれら 8 種のエピトープ領域に対する CTL の認識について焦点を絞って解析した。

7-3) HIV-1 clade B と clade E で共通に認識される cross-clade CTL エピトープの解析

HIV-1 clade B 感染者および clade E 感染者の間で保存されている clade B 特異的 CTL エピトープである Pol 894-903、Pol 313-321 および Pol 424-432 エピトープが、実際に HIV-1 clade E 感染者においても認識される CTL エピトープであるのか明らかにするために、タイ人の HLA-A*1101 陽性 HIV-1 clade E 感染者 7 人 (TT-005、TT-007、TT-008、TT-009、TU-002、TU-003 および TU-007)、および日本人の HLA-A*1101 陽性 HIV-1 clade B 感染者 5 人 (KI-005、KI-015、KI-030、KI-035 および KI-036) から分離した PBMC を用いて、これらのペプチドに特異的な CTL 活性の誘導を試みた。その結果、これら 3 種のエピトープに特異的な CTL 活性が両方の感染者由来の PBMC で認められた (図 5 A、B および C)。Pol 313-321 および Pol 424-432 に特異的な CTL 活性は、clade B 感染者に比べ、clade E 感染者においてより高頻度にみられる傾向があった。

Pol 424-432 は HIV-1 clades A から clade E の間で 2 種の主要な variant がある。Pol 424-432-9R (QIYAGIKVR) は、clades B と clade E でみられ、一方 Pol 424-432-4P9R (QIYPGIKVR) は、clades C と clade D で主にみられる (表 3)。これら 2 種の主な variant に対する CTL の認識を Pol 424-432 特異的な CTL クローン (Pol 424-432-34) を用いて解析した。その結果、この CTL クローンは Pol 424-432-9R ペプチドを認識したが Pol 424-432-4P9R ペプチドを認識することができなかった (図 6、上段)。この結果は、Pol 424-432 ペプチドと同様に、Pol 424-432-9R ペプチドも clades B と clade E で共通に認識されている (cross-clade) CTL エピトープであることを示唆している。Pol 424-432-9R ペプチドに対する CTL クローンの認識は、Pol 424-432 ペプチドのそれと比べて約 10 倍低かった (図 6、上段)。HLA-A*1101 に対する 2 種の variant の結

合親和性はほとんど同じであったが、Pol 424-432 ペプチドのそれと比べると約 10 倍低かった (図 6、下段)。この結果は、Pol 424-432 特異的な CTL クローンによる Pol 424-432-9R ペプチドに対する認識の低下は、C 末のリジンからアルギニンへのアミノ酸置換による HLA-A*1101 との結合性の低下に依存したものであること、および CTL エピトープペプチドの 4 番目 (Position4; P4) におけるアラニンからプロリンへの置換はこの CTL クローンによる TCR を介した認識に重大な影響を与えることを示している。

7-4) 各 c l a d e の配列それぞれが認識される c l a d e 特異的な CTL エピトープの解析

次に HIV-1 clade B と clade E でエピトープ領域の配列が異なる場合の CTL による認識を調べた。

HIV-1 clade B CTL エピトープである Pol 675-683、Nef 84-92 および Gag 349-359 は、日本人の HLA-A*1101 陽性 HIV-1 clade B 感染者の少なくとも 1 人の PBMC で特異的 CTL を誘導することができた (図 5 D1、E1 および F1)。この結果より、これらのペプチドが HLA-A*1101 拘束性 CTL エピトープであることが確認された。これら 3 種の CTL エピトープに相当する clade E で主にみられる variant は、同様にタイ人の HLA-A*1101 陽性 HIV-1 clade E 感染者 7 人のうち少なくとも 2 人の PBMC で特異的 CTL を誘導することができた (図 5 D2、D3、E3 および F2)。

HIV-1 clade E CTL エピトープである Pol 675-683-5E 特異的な CTL クローンを HIV-1 clade E 感染者 (TT-007) 由来の PBMC から作製した。この CTL クローン (Pol 675-683-5E-3) および以前に作製した Pol 675-683 特異的 CTL クローン (Pol 675-683-133) を用いて、Pol 675-683 領域に相当する HIV-1 clade B および clade E の variant に対する相互の認識を解析した。その結果、Pol 675-683-133 CTL クローンは、Pol 675-683-5E および Pol 675-683-5K8E ペプチドを認識しなかった (図 7 A、上段)。一方で、Pol 675-683-5E-3 CTL クローンは、Pol 675-683 に対して弱い認識を示したが、Pol 675-683-5K8E は認識し

なかった (図 7 A、中段)。これらのペプチドの HLA-A*1101 に対する結合親和性はほぼ同じであった (図 7 A、下段)。以上の結果は、Pol 675-683 と Pol 675-683-5E ペプチドの間で、5 番目 (P5) のアミノ酸の違いがこれらの CTL クローンによる TCR を介した認識に重要であることを示している。同様に Pol 675-683-5K8E と Pol 675-683 ペプチド、または Pol 675-683-5K8E と Pol 675-683-5E ペプチドとの間で、5 番目 (P5) と 8 番目 (P8) の両者もしくはどちらか一方のアミノ酸の違いが CTL クローンによる TCR を介した認識に影響を与えていることが示された。

HIV-1 clade B CTL エピトープ Nef 84-92 の variant である Nef 84-92-2L ペプチドは、clade B において主なもう 1 つのシーケンスである。一方、Nef 84-92-2F6F ペプチドは、HIV-1 clades C と clade E に比較的多くみられる (表 3)。HIV-1 clade B 感染者より樹立された Nef 84-92-2L 特異的な bulk CTL は Nef 84-92 ペプチドを認識するが、Nef 84-92-2F6F ペプチドを認識することができなかった (図 7 B、上段)。逆に、clade E 感染者から樹立した Nef 84-92-2F6F 特異的な bulk CTL は Nef 84-92 ペプチドおよび Nef 84-92-2L ペプチドの両方とも認識しなかった (図 7 B、中段)。HLA-A*1101 に対する Nef 84-92-2F6F ペプチドの結合性は、Nef 84-92 ペプチドおよび Nef 84-92-2L ペプチドのそれと比べて 10 倍から 50 倍低かった (図 7 B、下段)。以上の結果は、この CTL エピトープ領域における 2 番目 (P2) および 6 番目 (P6) のアミノ酸置換が HLA-A*1101 に対するペプチドの結合性と特異的 CTL による TCR を介した認識の両方に重大な影響を与えることを示唆している。

HIV-1 clade B CTL エピトープである Gag 349-359 は HIV-1 clade A、clade B および clade C で比較的多くみられるシーケンスである。一方、その variant である Gag 349-359-9S ペプチドは、clade C、clade D および clade E で比較的多くみられる (表 3)。HIV-1 clade B 感染者から樹立された Gag 349-359 特異的な bulk CTL は、Gag 349-359-9S ペプチドを認識しなかった (図 7 C、上段)。同様に、HIV-1 clade E 感染者より樹立された Gag 349-359-9S 特異的な bulk CTL は、Gag 349-359 ペプチドを認識することができなかった (図 7 C、中段)。HLA-A*1101 に対するこれらのペプチドの結合親和性はほとんど同じであった (図 7 C、下段)。以上の結果より、このエピトープ領域の 9 番目 (P9) のアミ

ノ酸置換は HLA-A*1101 との結合性ではなく特異的 CTL による TCR を介した認識に影響を与えていることが示唆された。

以上まとめると、CTL による相互の認識に関するこれらの結果は、Pol 675-683、Nef 84-92 および Gag 349-359 領域の HIV-1 clade B、clade E 特異的なペプチドシーケンスは、日本人の HIV-1 clade B 感染者およびタイ人の HIV-1 clade E 感染者のそれぞれにおいて clade 特異的な CTL エピトープとして認識されていることを示唆している。

HIV-1 clade E 特異的なペプチドが真の CTL エピトープであるのか、すなわちペプチドが細胞内部でプロセッシングされ抗原提示されているのか明らかにするために、Nef 84-92-2F6F または Gag 349-359-9S ペプチドのシーケンスを含む蛋白を発現する HIV-1 組換えワクチニアウイルスに感染した標的細胞に対する clade E 特異的 CTL の細胞傷害活性を調べた。Nef 84-92-2F6F または Gag 349-359-9S 特異的な bulk CTL は、それぞれのペプチドを発現する HIV-1 組換えワクチニアウイルスを感染させた HLA-A*1101 陽性の標的細胞を効率よく特異的に傷害した (図 8 A および B)。これらの結果は、これら 2 種の HIV-1 clade E 特異的なペプチドが細胞内部でプロセッシングされ細胞表面に抗原提示されるエピトープであることを示している。

7-5) clade B のみが認識される CTL エピトープの解析

HIV-1 clade B CTL エピトープ Env 202-210 領域には HIV-1 clade A から clade E においてみられる 3 種の主要なシーケンスがある。Env 202-210 ペプチドは clade B に比較的多くみられ、Env 202-210-4K ペプチドは clade E に多くみられる。Env 202-210-2A ペプチドは clade A、clade C および clade D によくみられるシーケンスである (表 3)。Env 202-210 に対する CTL 活性は、日本人の HLA-A*1101 陽性 HIV-1 clade B 感染者由来の PBMC で誘導される。しかしながら、Env 202-210-4K ペプチドに対する CTL 活性は、タイ人の HIV-1 clade E 感染者の PBMC では誘導されなかった (図 5 G1 および G2)。これらの結果は、Env 202-210 ペプチドは clade B 特異的な CTL エピトープであるが、

Env 202-210-4K ペプチドはエピトープとしての機能を持たないことを示唆している。事実、Env 202-210 特異的 CTL クローン (Env 202-210-56) は、Env 202-210-2A ペプチドを認識するが、Env 202-210-4K ペプチドを認識できなかった (図 9 A、上段)。HLA-A*1101 に対するこれら 3 種のペプチドの結合親和性はほとんど同じであった (図 9 A、下段) ので、この領域の 4 番目 (P4) のトレオニン (Thr) からリジン (Lys) へのアミノ酸置換はこの CTL クローンによる TCR を介した認識に多大な影響を与えていることが示唆された。またはもう 1 つの可能性として、Env 202-210-4K ペプチドは HIV-1 clade E 感染者で広く認識されているドミナントエピトープではないので、これら 7 人の HIV-1 clade E 感染者では認識されなかったことが考えられる。

HIV-1 clade B CTL エピトープ Gag 83-90 領域には HIV-1 clade A から clade E においてみられる 4 種の主要なシーケンスがある。Gag 83-90 ペプチドおよび Gag 83-90-8K ペプチドは clade B に比較的多くみられ、Gag 83-90-3W ペプチドおよび Gag 83-90-7E ペプチドは、それぞれ clade E および clade D で比較的高頻度に見られるシーケンスである (表 3)。Gag 83-90 ペプチドに対する CTL 活性は、日本人の HLA-A*1101 陽性 HIV-1 clade B 感染者 5 人の PBMC では誘導されなかった。一方、Gag 83-90-8K ペプチドに対する CTL 活性は、これらの感染者のうち 1 人の PBMC で誘導された (図 5 H1 および H2)。HIV-1 clade E 特異的シーケンスである Gag 83-90-3W ペプチドに対する CTL 活性は、タイ人の HIV-1 clade E 感染者 7 人のいずれにおいても認められなかった (図 5 H3)。これら結果は、Gag 83-90-8K が clade B 特異的な CTL エピトープであるがそれはドミナントエピトープではないこと、Gag 83-90-3W ペプチドは clade E CTL エピトープではないか、もしくはドミナントエピトープではないことを示唆している。Gag 83-90-8K ペプチドによって誘導された CTL は、他の 3 種の Gag 83-90 variant ペプチドを認識しなかった (図 9 B、上段)。これらすべてのペプチドは、HLA-A*1101 に対して同様の結合親和性を示した (図 9 B、下段) ことから、この CTL エピトープ領域の 3 番目 (P3)、7 番目 (P7) および 8 番目 (P8) のアミノ酸置換は特異的 CTL による TCR を介した認識に大きな影響を与える可能性が示唆された。

7-6) HIV-1 clade E ウイルス感染細胞に対する HIV-1 clade E CTL の細胞傷害性

本研究および以前の研究において、3種の cross-clade CTL エピトープおよび2種の clade E 特異的 CTL エピトープは、HIV-1 組換えワクチニアウイルスを感染させた標的細胞の細胞内部でプロセッシングされ細胞表面に抗原提示されていることが示されている (Threlkeld, S. C. *et al.*, 1997)。しかしながら、HIV-1 組換えワクチニアウイルスを感染させた細胞は HIV-1 感染細胞の正確なモデルとは言えない。それ故に、これらのエピトープに特異的な T 細胞が HIV-1 感染細胞によって提示されたエピトープを認識しているかを明らかにすることは重要である。そこで、HIV-1 clade E ウイルスクローンである p93JP-NH1 を感染させた標的細胞に対する、3種の cross-clade CTL エピトープおよび3種の clade E CTL エピトープに特異的な CTL の細胞傷害活性を調べた。このウイルスクローンがこれら6種の CTL エピトープのシークエンスを持っていることは確認されている。標的細胞として、HLA class I⁺ CXCR4⁺ の 721.221 細胞に HLA-A*1101 およびヒト CD4 遺伝子を導入することによって、CXCR4⁺ CD4⁺ の HLA-A*1101 陽性 cell line (721.221-CD4-A*1101 細胞) を作製した。この 721.221-CD4-A*1101 細胞に HIV-1 clade E ウイルスクローンを感染させ、6~7 日後から 2 日毎に細胞内 HIV-1 p24 抗原を染色し、フローサイトメトリーによって細胞の感染状態を測定した。およそ 95% の細胞が抗 HIV-1 p24 抗体で染色されたとき、CTL アッセイの標的細胞として使用した。細胞表面における HLA-A*1101 の発現抑制 (downregulation) が約 30% の感染細胞でみられた (図 1 0)。陰性コントロールの HLA-A*2402 拘束性 Gag 263-272 特異的 CTL クローン (Ikeda-Moore, Y. *et al.*, 1997) は、この HIV-1 clade E 感染細胞を傷害しなかった (図 1 1 G)。その一方で、Pol 424-432 特異的および Pol 894-903 特異的 CTL クローンならびに Pol 313-321 特異的な bulk CTL はこの感染標的細胞を効率よく傷害し、未感染の 721.221-CD4-A*1101 細胞を傷害しなかった (図 1 1 A, B および C)。以上の結果は、これらの cross-clade CTL エピトープが HIV-1 clade E ウイルスクローン 93JP-NH1 に感染した細胞内でプロセッシン

グされ、抗原提示されていることを示している。同様に、Pol 675-683-5E 特異的 CTL クローンならびに Nef 84-92-2F6F 特異的および Gag 349-359-9S 特異的 bulk CTL も効率的に HIV-1 clade E ウイルス感染した標的細胞を傷害し、未感染の 721.221-CD4-A*1101 を傷害しなかった (図 1 1 D、E および F)。この結果も同様に、clade E 特異的 CTL エピトープが HIV-1 clade E ウイルスクローン 93JP-NH1 に感染した細胞内でプロセッシングされ、抗原提示されていることを示している。

以上の結果より、3 種の cross-clade CTL エピトープおよび 3 種の clade E CTL エピトープに特異的な CTL は、HIV-1 clade E ウイルスに感染した CD4⁺CXCR4⁺の HLA-A*1101 陽性細胞を認識することから、これら 6 種の CTL エピトープは、HIV-1 clade E ウイルス感染細胞内でプロセッシングされ細胞表面に抗原提示されている真の CTL エピトープであることが示された。

8 考察

本研究において、はじめにリバーシジェネティクス法により、日本人の HIV-1 clade B 感染者で認識されている 4 種の HLA-A*1101 拘束性 clade B 特異的 CTL エピトープを同定した。さらに、これらと既知の 4 種の HLA-A*1101 拘束性 clade B 特異的 CTL エピトープの計 8 種を用いて、タイ人の HIV-1 clade E 感染者で認識される 6 種の HLA-A*1101 拘束性 CTL エピトープを同定した。そのうち Pol 由来の 3 種は HIV-1 clade B と clade E で共通に認識されている cross-clade CTL エピトープであり、3 種は clade E 特異的 CTL エピトープであった。これらの結果をまとめたものを表 4 に示した。統計学的な解析により、3 種の cross-clade エピトープのうち Pol 313-321 エピトープは HIV-1 clade E 感染者では免疫学的にドミナントなエピトープであり (図 5 A, $p = 0.03$)、HIV-1 clade B 感染者ではそうではないことが示唆された。HIV-1 clade B 感染者 5 人のうち 2 人でこのエピトープに対する強い特異的 CTL 活性が誘導された (ペプチド特異的活性が 53.5 % および 67.3%) ので、このエピトープは clade B 感染者でも比較的強いサブドミナントなエピトープとして認識されているのかもしれない。このエピトープのアミノ酸シーケンスは clade A、clade B、clade C、clade D および clade E 分離株において比較的頻度が高いことから、この CTL エピトープは HIV-1 clade A、clade C および clade D に感染した人においても認識されている可能性が示唆された。同様に、Pol 424-432 は、特異的 CTL 活性が HIV-1 clade E に感染した多くの人で検出され、clade B 感染者では検出される人が少なかったことから、統計学的解析により HIV-1 clade E に感染した人では免疫学的にドミナントな CTL エピトープである (図 5 B, $p = 0.02$) 一方で、clade B に感染した人ではドミナントではないことがわかった。Pol 424-432 特異的 CTL は、HIV-1 clade B および clade E 分離株のそれぞれ約 20% でみられる variant である Pol 424-432-9R ペプチドを認識することができた。故に、この両方のシーケンスともに cross-clade CTL エピトープである可能性が示唆された。

以前の研究により cross-clade CTL エピトープの存在が示唆されている。すなわち、ある HIV-1 clade のウイルスに感染した人の PBMC における HIV-1 特

異的 CTL 活性が別の HIV-1 clade 由来の蛋白を発現する組換えワクチニアウイルスに感染した標的細胞に対してみられることが示されている (Betts, M. R. *et al.*, 1997, Buseyne, F. *et al.*, 1998, Cao, H. *et al.*, 1997, Durali, D. *et al.*, 1998, McAdam, S. *et al.*, 1998, Wilson, S. E. *et al.*, 1998)。これらの研究においては、clade A、clade B、clade C、clade D、clade F および clade G の間での CTL の相互の反応性が示されている。他方、cross-clade CTL エピトープはまだ決定されていないけれども、HIV-1 clade B と clade E 間で cross-clade の CTL 認識がみられることが、HIV-1 clade B に感染した北米アメリカ人と HIV-1 clade E に感染したタイ人との間の解析で示されている (Lynch, J. A. *et al.*, 1998)。つまり、cross-clade の CTL は HIV-1 感染者で多数検出されている。clade A、clade B および clade D の間の cross-clade CTL エピトープも既に示されている (Dorrell, L. *et al.*, 1999, Rowland-Jones, S. L. *et al.*, 1998)。本研究において、clade B と clade E の間の 3 種の cross-clade CTL エピトープを決定した。CTL を誘導する HIV ワクチンは、様々なサブタイプ間で共通に認識される CTL エピトープを含んでいることが重要であるので、このような CTL エピトープは、HIV ワクチンをデザインする上で有用であると考えられる。

3 種の HIV-1 clade E 特異的 CTL エピトープのうち、Pol 675-683-5E は特異的 CTL 活性が clade E 感染者 7 人中 3 人で誘導されたことから、免疫学的に比較的強いサブドミナントなエピトープであることがわかった。Pol 675-683-5E のシーケンスは HIV-1 clade B の分離株でもごく少数みられることから (表 3)、これは clade B 感染者ではエスケープ変異になり得るかもしれない。Pol 675-683-5K8E の variant は HIV-1 clade A および clade E 分離株で見られる。このペプチドは Pol 675-683 特異的または Pol 675-683-5E 特異的 CTL によって認識されず、また同一感染者において Pol 675-683-5E より弱い特異的 CTL 活性を誘導した (clade E 感染者 TT-007 および TT-008 それぞれにおいて) (図 5 D2 および D3)。この結果は Pol 675-683-5K8E がドミナントな CTL エピトープではないことを示している。

Nef 84-92 は以前に HLA-A11 拘束性 HIV-1 clade B 特異的 CTL エピトープとして同定されている (Culmann, B. *et al.*, 1991)。これは本研究においても確認された。Nef 84-92 および Nef 84-92-2L は HIV-1 clade B の分離株で比較

的高頻度にみられるシーケンスである。その 2 番目 (P2) におけるバリンからロイシンへのアミノ酸置換は、Nef 84-92 特異的 CTL によるこれらのペプチドの認識に影響しなかった。HIV-1 clade B 感染者由来の PBMC を *in vitro* 刺激したときの特異的 CTL の誘導能はこれらのペプチド間で異なっている。例えば、clade B 感染者 KI-015 において、Nef 84-92 は特異的 CTL 活性を誘導したが Nef 84-92-2L は誘導しなかった。他方 3 人の clade B 感染者 KI-005、KI-035 および KI-036 においては、Nef 84-92-2L によって誘導された特異的 CTL 活性は Nef 84-92 で誘導された活性より強かった。これらの違いは、それぞれの人に感染している特定の HIV-1 clade B ウイルスでこの CTL エピトープシーケンスが異なっていることが原因かもしれない。今後、詳しく解析する必要がある。Nef 84-92-2F6F は、HIV-1 clade C および clade E で比較的多くみられる (表 3)。Nef 84-92-2L 特異的 CTL は Nef 84-92-2F6F ペプチドを認識することができず、Nef 84-92-2F6F 特異的 CTL は 2 種の clade B ペプチドを認識できなかった。一方、HLA-A*1101 に対する Nef 84-92-2F6F ペプチドの結合親和性は、Nef 84-92 ペプチドと Nef 84-92-2L ペプチドの結合性と比べてかなり低かった。したがって、Nef 84-92-2L 特異的 CTL が Nef 84-92-2F6F ペプチドを認識しなかったのは、Nef 84-92-2F6F ペプチドが Nef 84-92-2L に比べ HLA-A*1101 との結合性が低かったこと、および Nef 84-92-2F6F ペプチドに対する Nef 84-92-2L 特異的 CTL による TCR を介した認識が低下したことの 2 つが原因であるのかもしれない。Nef 84-92-2F6F 特異的 CTL が Nef 84-92 および Nef 84-92-2L ペプチドを認識しなかったのは、2 種のペプチドに対する Nef 84-92-2F6F 特異的 CTL による TCR を介した認識効率が低下したことが原因かもしれない。Nef 84-92-2F6F 特異的 CTL が HIV-1 clade E ウイルスに感染したほとんどの人の PBMC で誘導されたことから、統計学的な解析によって Nef 84-92-2F6F は強力かつドミナントな HIV-1 clade E 特異的 CTL エピトープであることが示された (図 5 E3、 $p = 0.02$)。

Gag 349-359 は HIV-1 clade A、clade B および clade C の分離株で比較的多くみられ、Gag 349-359-9S は clade C、clade D および clade E の分離株で多くみられるシーケンスである (表 3)。前者のペプチドは、clade B 分離株の 80%、clade E の 20%にみられるシーケンスで、後者は逆に clade B 分離株の

20%、clade E の 80%にみられるシーケンスである。統計学的な解析により、Gag 349-359-9S は HIV-1 clade E 感染者においてドミナントな CTL エピトープであることが示されなかった。しかしながら Gag 349-359-9S は、特異的 CTL 活性が HIV-1 clade E 感染者 7 人中 3 人で強く誘導されていることから、clade E 感染者ではサブドミナントな CTL エピトープである可能性が示唆された。clade B の variant に特異的な CTL は clade E の variant ペプチドを認識できず、逆に clade E の variant に特異的な CTL は clade B の variant ペプチドを認識できなかったため、この両者は HIV-1 clade B 感染者および clade E 感染者の両方でそれぞれがエスケープの変異になっている可能性が示唆された。

Pol 675-683-5E、Nef 84-92-2F6F および Gag 349-359-9S の 3 種の HIV-1 clade E 特異的 CTL エピトープの HIV-1 clade E 感染者における認識についてさらに解析することによって、CTL エピトープの特徴をより確かに掴むことができるかと期待される。

HIV-1 特異的 CTL エピトープは、通常、特異的 CTL が HIV-1 組換えワクチニアウイルスに感染した標的細胞に対して細胞傷害活性を示すことによって、そのペプチドが細胞内からプロセッシングされ抗原提示されていることを確認されている (Ikeda-Moore, Y. *et al.*, 1997, Johnson, R. P. *et al.*, 1991, Nixon, D. F. *et al.*, 1988, Shiga, H. *et al.*, 1996, Tomiyama, H. *et al.*, 1997, 1999)。この方法は CTL エピトープの質的な解析を行うために有用である。しかしながら、このシステムでは HIV-1 由来の蛋白がワクチニアウイルスの一部として発現されているので、組換えワクチニアウイルス感染細胞による抗原提示は HIV-1 感染細胞による抗原提示を完全に反映しているとは言えない面もある。したがって、HIV-1 特異的 CTL が HIV-1 に感染した標的細胞を傷害するか確かめることは重要な意味がある。しかしながら、HLA-class I の情報が十分に得られている細胞で、かつヒト CD4 陽性の HIV-1 感染可能な T 細胞は数少ない。よって、HIV-1 感染細胞に対する CTL の認識を様々な HLA-class I 拘束性の CTL について解析することは困難である。事実、HIV-1 特異的 CTL が HIV-1 clade B に感染した CD4 陽性 T 細胞株を傷害することを示した研究はきわめて少ない (Tomiyama, H. *et al.*, 1999, Yang, O. O. *et al.*, 1997, Yang, O. O. *et al.*, 1996)。本研究において、HIV-1 感染細胞に対する特異的 CTL の細胞傷害活性

を測定するために、HLA-A*1101のみを発現している CD4⁺ CXCR4⁺の細胞株を標的細胞として作製した。この細胞株 (721.221-CD4-A*1101) は、HLA-class I を発現していない CXCR4⁺の 721.221 細胞にヒト CD4 および HLA-A*1101 遺伝子を導入することによって作製された。この細胞株はヒト CD4 および CXCR4 を高いレベルで発現しているため、HIV-1 に高率に感染する。HIV-1 clade E ウイルスクローンに感染した 721.221-CD4-A*1101 細胞株が 6 種の HLA-A*1101 拘束性 HIV-1 エピトープ特異的 CTL によって効率的に認識されていることを明確に示すことができた。一方、最近の研究によって、HIV-1 に感染した CD4 陽性 T 細胞では HLA-class I の発現抑制 (downregulation) が起こっており、HIV-1 抗原の提示量が減少していることが明らかになっている (Collins, K. L. *et al.*, 1998)。本研究において、HIV-1 に感染した 721.221-CD4-A*1101 細胞株でも HLA-A*1101 の発現抑制が起こっていることを明らかに確認することができた。しかし、そのように発現抑制された細胞は全 HIV-1 感染細胞中の約 30%のみであったため、CTL の認識におけるこの発現抑制の影響は小さかった。つまり、単一の HLA-class I のみを発現している 721.221-CD4 細胞は、HIV-1 に感染した標的細胞に対する HIV-1 特異的 CTL の認識に関する研究を行うためにきわめて有用であると言える。

本研究において、HIV-1 clade E 特異的 CTL エピトープをはじめて明らかにした。さらに、non-clade B の CTL エピトープを同定するために、既に明らかになっている clade B 特異的 CTL エピトープを利用した解析の方策がきわめて有効であることを示した。しかし、この解析法は Env 特異的な CTL エピトープを決定するためには有用ではないかもしれないことは注意すべきであると考えられる。なぜなら、Env は他の HIV-1 蛋白に比べて HIV-1 clade 間の変異が非常に多いからである。この理由により、HIV-1 clade E における Env 特異的な CTL エピトープの同定は、そのような CTL エピトープを決定するためにより有効な方法であるリバーシムノジェネティクス法を用いて現在解析されているところである。本研究において同定された HIV-1 clade E 特異的 CTL エピトープは、アジア地域における HIV-1 特異的 CTL の様々な研究、例えば免疫学的な病態解析や HIV ワクチンなどの研究に大きく寄与するものと期待される。

9 結語

HIV 感染症は、欧米や日本などの先進国では最近開発された HARRT 療法（多剤併用療法）の導入により症状の進行を遅らせることが可能になったことからさほど深刻な状況とはとらえられていない。しかしながら、日本においては予防啓発活動などの対策が行われているものの HIV 感染者は確実に増加していること、また世界的規模で見ても、特にアフリカおよび東南アジア地域でいまだに顕著に感染が拡大していることから、HIV 感染を予防するワクチンあるいは AIDS 発症を抑制する治療用のワクチンは社会的要請として求められている。したがって、HIV ワクチンの研究開発は世界的な観点で考えると重要である。事実、現在も国外で積極的な開発が行われている。それらの多数は HIV 特異的 CTL を誘導することを目指したワクチンである。ワクチン剤型は、HIV 組換えウイルス（カナリボックスウイルス、アデノウイルスやアデノ関連ウイルスなど）、HIV 組換え細菌（結核菌）またはこれと HIV 組換え蛋白（サブユニットワクチン）との組み合わせに加えて、最近では Oxford 大学のグループより多数の CTL エピトープ（多数の HLA-class I 拘束性 CTL エピトープ、サル由来の CTL エピトープ、ヘルパー T 細胞エピトープ）をそれぞれにつなげた DNA ワクチンおよび組換えアデノウイルスの臨床試験がケニヤで予定される（Hanke, T. *et al.*, 2000）など多岐にわたる。

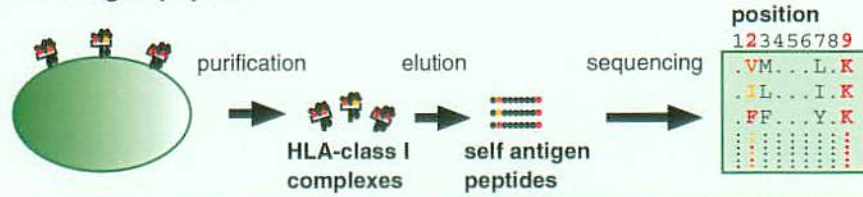
本研究において、HLA-A*1101 拘束性の 3 種の cross-clade CTL エピトープ（Pol 313-321、Pol 424-432 および Pol 894-903）、2 種の HIV-1 clade B 特異的 CTL エピトープ（Pol 675-683 および Env 202-210）および 3 種の clade E 特異的 CTL エピトープ（Pol 675-683-5E、Nef 84-92-2F6F および Gag 349-359-9S）を同定した。これらの CTL エピトープは、今後の HIV ワクチンの研究開発、特にアジアにおけるワクチンの研究開発に大きく寄与するであろう。中でも、HIV-1 clade B と clade E のサブタイプで共通に認識される 3 種の cross-clade CTL エピトープは、前述の DNA ワクチンおよび組換えアデノウイルスのような多数の CTL エピトープを組み込んだグローバルに使用できる HIV ワクチンに適用可能な、実用的 CTL エピトープである。また、本研究で試みた既知の CTL エピトープを基にしたサブタイプの異なる新たな CTL エピトープ

の同定法は、様々な HLA-class I 拘束性で様々なサブタイプ間の cross-clade CTL エピトープを決定することを可能にした。この研究がさらに進展し、もっと多くの有効な CTL エピトープが同定され、アジアで広く使用できるような HIV ワクチンのデザインが作製されることを期待する。

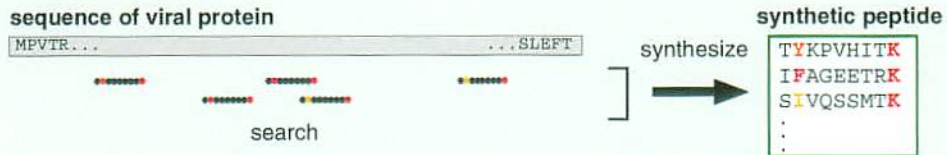
このようにして同定された多数の CTL エピトープは、HIV ワクチンの研究開発ばかりではなく、他方面の HIV 研究を促進することにも貢献するであろうと考えられる。特に、多数の non-clade B CTL エピトープは、これまでほとんど研究が進んでいない non-clade B の HIV の病態解析に重要であると思われる。

10 図表およびその説明

1. Definition of the binding peptide motif to HLA-class I by peptide sequencing of the self antigen peptides



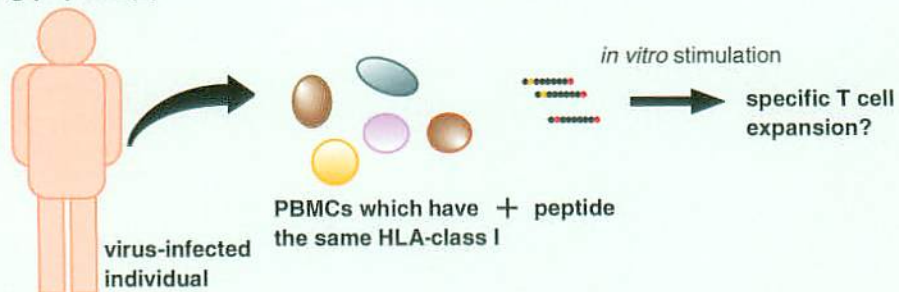
2. Search of the candidate peptide(s) from viral sequence which have binding motif to HLA-class I



3. Selection of the peptide(s) to bind to HLA-class I by peptide stabilization assay



4. Induction of the peptide-specific CTLs in PBMCs from virus-infected individuals carrying the same HLA-class I by stimulating them with the binding peptide(s)



5. Confirmation of the cytolytic activities of the CTLs for [A] the peptide(s) and for [B] the naturally processed and presented peptide(s)

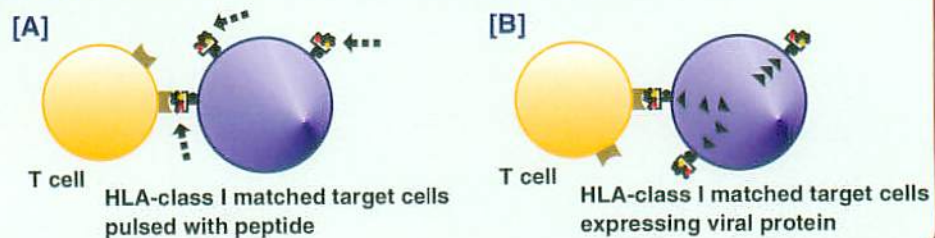


図1 リバースイムノジェネティクスによる HIV-1 CTL エピトープの決定法

リバースイムノジェネティクス法の概要を示した。

〔ステップ1〕

HLA-class I 分子に結合するペプチドのモチーフを決定する。

〔ステップ2〕

結合ペプチドモチーフに適合するアミノ酸配列を検索し、これらの候補ペプチドを合成する。

〔ステップ3〕

ペプチド結合アッセイにより HLA-class I 分子と結合能のあるペプチドを選別する。

〔ステップ4〕

結合ペプチドを用いて同じ HLA-class I をもつ HIV-1 感染者の PBMC を *in vitro* で刺激、培養する。

〔ステップ5〕

in vitro で刺激、培養した bulk PBMC の細胞傷害活性を測定する。[A]ペプチドに対して特異的な細胞傷害活性を調べるために、ペプチドをパルスした細胞（HLA-class I-matched cells）を標的細胞として用いる。[B]目的とするペプチドが細胞内部でプロセッシングされ細胞表面に抗原提示されることを確認するために、ペプチドを含む蛋白を発現する組換えワクチニアウイルスに感染した細胞を標的細胞として用いる。両者に対して細胞傷害活性が認められたとき CTL エピトープと決定される。

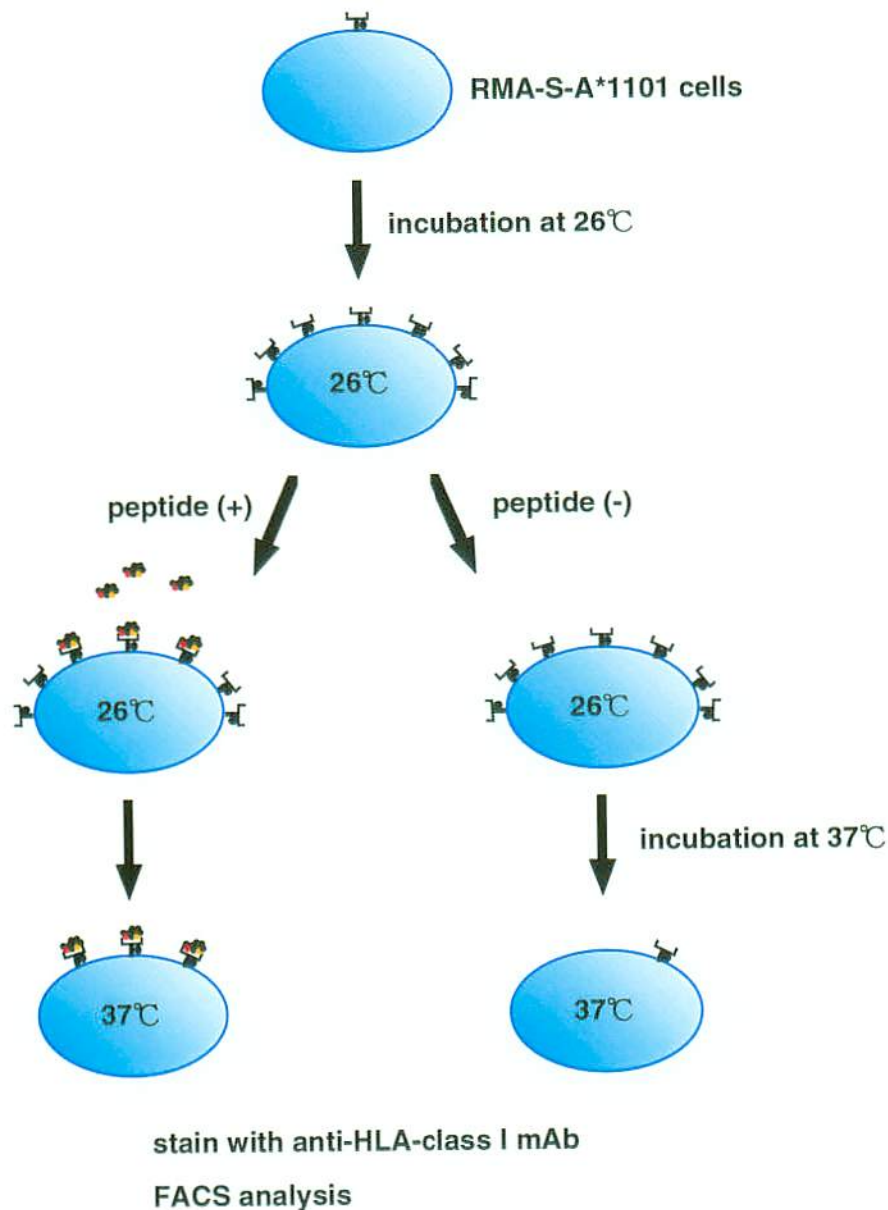


図2 ペプチド結合アッセイの方法 (peptide stabilization assay 法)

RMA-S-A*1101 細胞は抗原提示に関与する TAP の機能を欠損しているため、37°C で培養すると HLA-A*1101 を発現しないが、26°C で培養すると自己抗原ペプチドを結合していない空の A*1101 分子を細胞表面上に発現させることができる。26°C で培養後合成ペプチドを添加し、さらに 37°C で培養すると、ペプチドと結合していない空の A*1101 分子は細胞表面から消失する。その割合は、A*1101 分子とペプチドとの結合親和性に依存する。したがって、37°C で培養した後に細胞表面上の A*1101 分子の量を FACS で測定すれば、ペプチドの結合能がわかる。

表1 HLA-A*1101 に対するペプチドの結合親和性

peptide	sequence	BL ₅₀ (M) *	peptide	sequence	BL ₅₀ (M)
high binder			low binder		
Env 136-145	ATNTNSSNWK	1.50 x10 ⁻⁶	Pol 939-946	RVYYRDNK	1.00 x10 ⁻⁴
Env 202-210	SVITQACPK	2.15 x10 ⁻⁶	Env 488-498	KIEPLGIPTK	1.02 x10 ⁻⁴
Gag 283-292	SILDIRQGP	2.15 x10 ⁻⁶	Pol 865-874	VVESMNNELK	1.15 x10 ⁻⁴
Pol 865-875	VVESMNNELKK	2.90 x10 ⁻⁶	Pol 189-198	LVECTEMEK	1.16 x10 ⁻⁴
Pol 623-631	SIADTTNQK	4.05 x10 ⁻⁶	Env 227-234	AILKCNK	1.40 x10 ⁻⁴
Env 88-96	VTENFMWK	5.10 x10 ⁻⁶	Env 410-418	TILPCRK	1.70 x10 ⁻⁴
Gag 6-15	SVLSGGELDK	5.40 x10 ⁻⁶	Pol 894-901	AVFIHNFK	1.95 x10 ⁻⁴
Env 674-682	ITNWLWYIK	5.60 x10 ⁻⁶	Pol 493-502	TYQIQEPFK	2.10 x10 ⁻⁴
Pol 313-321	AIFQSSMTK	6.00 x10 ⁻⁶	Pol 811-818	ETAYFLLK	2.50 x10 ⁻⁴
Pol 87-97	TVLEEMNLPGK	6.75 x10 ⁻⁶	Pol 965-973	VIQNSDIK	3.20 x10 ⁻⁴
Pol 675-683	QIEQLIKK	6.80 x10 ⁻⁶	Pol 675-685	QIEQLIKKEK	3.30 x10 ⁻⁴
Pol 685-695	KVYLAWVPAHK	7.15 x10 ⁻⁶	Pol 675-682	QIEQLIK	3.40 x10 ⁻⁴
Pol 395-404	TVQPMILPEK	7.20 x10 ⁻⁶	Vif 84-92	GVAIEWRKK	3.65 x10 ⁻⁴
Pol 894-903	AVFIHNFKRK	7.55 x10 ⁻⁶	Pol 495-502	QIQEPFK	3.85 x10 ⁻⁴
Nef 141-148	LTFGWCFK	8.10 x10 ⁻⁶	Rev 108-115	AVLDSGK	3.85 x10 ⁻⁴
Pol 67-76	VTIRGGQLK	8.40 x10 ⁻⁶	Pol 917-926	DIATDIQTK	3.95 x10 ⁻⁴
Pol 531-540	STESIVWGK	9.30 x10 ⁻⁶	Env 37-45	VYGVVWVK	4.10 x10 ⁻⁴
medium binder			Vif 84-91	GVAIEWRK	4.65 x10 ⁻⁴
Tat 119-129	RTACNNCYCKK	1.20 x10 ⁻⁵	Pol 496-505	IYQEPFKNLK	5.40 x10 ⁻⁴
Pol 713-722	KVLFNLGIDK	1.21 x10 ⁻⁵	Pol 686-695	VYLAWVPAHK	6.10 x10 ⁻⁴
Pol 571-579	FVNTPLVK	1.90 x10 ⁻⁵	Vif 147-157	YLALAAALITPK	8.10 x10 ⁻⁴
Env 26-35	VTLNCTDLGK	2.45 x10 ⁻⁵	Pol 940-951	VYYRDNKDP LWK	>1 x10 ⁻³
Pol 424-432	QIYAGIKVK	2.60 x10 ⁻⁵	Pol 740-749	DFNLPPVVAK	>1 x10 ⁻³
Pol 535-543	IVIWGKIPK	2.75 x10 ⁻⁵	Vif 86-93	AIEWRKKK	>1 x10 ⁻³
Tat 19-28	RTACNNCYCK	3.05 x10 ⁻⁵	Vpu 25-32	IVLIEYRK	>1 x10 ⁻³
Pol 535-545	IVIWGKIPKFK	3.65 x10 ⁻⁵	Env 323-330	RIGDIRK	>1 x10 ⁻³
Pol 408-418	TVNDIQKLVGK	3.75 x10 ⁻⁵	Pol 981-988	KIIRDYK	>1 x10 ⁻³
Pol 659-667	GIIQAQPK	4.05 x10 ⁻⁵	Pol 746-757	VVAKEIVASCDK	>1 x10 ⁻³
Env 342-350	NTLEQIVKK	4.60 x10 ⁻⁵	Pol 676-683	IIEQLIKK	>1 x10 ⁻³
Pol 751-761	IVASCDKQCLK	4.65 x10 ⁻⁵	Env 138-145	NTNSSNWK	>1 x10 ⁻³
Vif 147-158	YLALAAALITPKK	5.10 x10 ⁻⁵	Gag 428-438	CTERQANFLGK	>1 x10 ⁻³
Pol 321-328	KILEPFRK	5.25 x10 ⁻⁵	Vif 169-176	LTEDRWNK	>1 x10 ⁻³
Gag 324-333	LVQANPDK	5.90 x10 ⁻⁵	Pol 298-309	RYQYNVLPQGWK	>1 x10 ⁻³
Env 720-729	IINMWQEVGK	6.60 x10 ⁻⁵	Env 411-418	IILPCRK	>1 x10 ⁻³
Pol 918-926	IATDIQTK	7.00 x10 ⁻⁵	Pol 702-713	QVDKLVSAIRK	>1 x10 ⁻³
Gag 152-159	RTLNAWVK	7.15 x10 ⁻⁵	Pol 890-901	AVQMAVFIHNFK	>1 x10 ⁻³
Pol 964-973	VVIQNSDIK	8.40 x10 ⁻⁵	Pol 915-926	IVDIATDIQTK	>1 x10 ⁻³
			Vif 110-121	HYFDCFSSEAIK	>1 x10 ⁻³
			Vif 146-157	QYLALAAALITPK	>1 x10 ⁻³
			Gag 402-412	HIAKNCRAPRK	>1 x10 ⁻³
			Vif 12-22	QVDRMIRTWK	>1 x10 ⁻³
			Env 156-166	SFNITTSIRDK	>1 x10 ⁻³
			Pol 302-309	NVLPQGWK	>1 x10 ⁻³
			Pol 314-321	IFQSSMTK	>1 x10 ⁻³
			Pol 613-620	VTDRGRQK	>1 x10 ⁻³
			Pol 84-93	GVAIEWRKKK	>1 x10 ⁻³
			Gag 87-95	CVHQRIDVK	>1 x10 ⁻³
			Pol 229-237	LVDFRELNK	>1 x10 ⁻³
			Gag 91-98	RIDVKDTK	>1 x10 ⁻³
			Env 493-500	GIAPTKAK	>1 x10 ⁻³
			Nef 183-192	EVLVWRFDSK	>1 x10 ⁻³
			Vif 111-121	YFDCFSSEAIK	>1 x10 ⁻³
			Env 419-429	QIINMWQEVGK	>1 x10 ⁻³
			Env 342-349	NTLEQIVK	>1 x10 ⁻³
			Vif 169-179	LTEDRWNKPKD	>1 x10 ⁻³
			Env 782-793	EILGHRGWEALK	>1 x10 ⁻³
			Vpr 18-27	WTLELLEELK	>1 x10 ⁻³
			Vpu 23-32	WTIVLIEYRK	>1 x10 ⁻³
			Gag 434-444	NFLGKIWPSYK	>1 x10 ⁻³
			Pol 210-220	PYNTPVFAIKK	>1 x10 ⁻³
			Env 225-234	GFAILKCNK	>1 x10 ⁻³
			Pol 269-277	AYFSVPLDK	>1 x10 ⁻³

* データは、それぞれ2回のアッセイで得られた数値の平均値を示している。>1 x10⁻³は、結合しているが数値化できない程低い結合親和性であることを示している。結合しなかった38本のペプチドは、省略した。

表2 日本人の HLA-A*1101 陽性 HIV-1 clade B 感染者の PBMC を HLA-A*1101 結合ペプチドで *in vitro* 刺激した後のペプチドを パルスした細胞に対する細胞傷害活性

peptide	sequence	KI-005				KI-035					
		1st. stimulation		2nd. stimulation		1st. stimulation		2nd. stimulation			
		50:1 ^a	10:1	20:1	10:1	50:1	10:1	20:1	10:1		
high binder											
Env 136-145	ATNTSSSNWK	10.2 ^b	17.0	-16.3	9.1	20.6	5.6	3.9	NT		
Env 202-210	SVITQACPK	57.2	51.1	NT	NT			91.9	NT		
Gag 283-292	SILDIRQGPK	3.1	15.3	8.7	7.4			1.1	NT		
Pol 865-875	VVESMNNELKK	3.5	4.3	NT	NT			2.9	NT		
Pol 623-631	SIADTTNQK	1.3	3.0	NT	NT			4.0	NT		
Env 88-96	VTENFMWK	4.0	0.4	NT	NT	13.3	8.5	2.8	NT		
Gag 6-15	SVLSGGELDK	3.1	-1.2	NT	NT			4.2	NT		
Env 674-682	ITNWLWYIK	15.0	6.3	-3.7	-4.0			1.0	NT		
Pol 313-321	AIFQSSMTK	50.5	25.6	71.9	74.3			62.3	NT		
Pol 87-97	TVLEEMNLPGK	9.6	4.5	NT	NT			3.6	NT		
Pol 675-683	QIIEQLIKK	14.6	3.2	39.3	22.4	24.1	6.7	67.1	NT		
Pol 685-695	KVYLAWVPAHK	3.3	3.2	NT	NT			0.3	NT		
Pol 395-404	TVQPIMLPEK	1.4	-2.0	NT	NT			-0.3	NT		
Pol 894-903	AVFIHNFKRK	21.6	3.8	2.1	-0.2			66.6	NT		
Nef 141-148	LTFGWCFK	-9.6 ^c	-1.3	NT	NT			1.3	NT		
Pol 67-76	VTIRIGGQLK					1.7	NT				
Pol 531-540	STESIVIWVK					2.8	NT				
medium binder											
Tat 119-129	RTACNNCYCKK	7.2	5.3	NT	NT	-2.4	2.2	1.2	NT		
Pol 713-722	KVLFLNGIDK							NT	NT	NT	NT
Pol 571-579	FVNTPLPVK							NT	NT	NT	NT
Env 26-35	VTLNCTDLGK	17.7	0.0	6.3	-7.0	7.9	-0.5	NT	NT		
Pol 424-432	QIYAGIKVK			60.2	72.4			NT	NT		
Pol 535-543	IVIWKIPK			-1.2	-8.7			NT	NT		
Tat 19-28	RTACNNCYCK	-8.0	1.0	NT	NT	2.1	0.3	NT	NT		
Pol 535-545	IVIWKIPKFK			NT	NT			NT	NT		
Pol 408-418	TVNDIQKLVGK			NT	NT			NT	NT		
Pol 659-667	GIIQAQPK	-2.6	-3.7	NT	NT	0.4	2.1	NT	NT		
Env 342-350	NTLEQIVKK			NT	NT			NT	NT		
Pol 751-761	IVASCDKQK			NT	NT			NT	NT		
Vif 147-158	YLALAALITPKK	-2.2	0.6	NT	NT	-2.5	-0.5	NT	NT		
Pol 321-328	KILEPFRK			NT	NT			NT	NT		
Gag 324-333	LVQANPDCK			NT	NT			NT	NT		
Env 720-729	IINMWQEVGK	8.8	3.9	NT	NT	NT	NT	NT	NT		
Pol 918-926	IIATDIQTK			NT	NT			NT	NT		
Gag 152-159	RTLNAWVK			NT	NT			NT	NT		
Pol 964-973	VVIQDNSDIK			NT	NT	NT	NT	NT	NT		
low binder^d											

^a エフェクター：ターゲット細胞比 (E:T ratio)

^b ペプチド特異的CTL活性 (relative % specific lysis) は、ペプチドをパルスした (1 μM) Tm-EBV細胞に対する CTL活性からパルスしていない細胞に対する活性を引いた値である。

^c bulk PBMCは、それぞれのペプチドを含む数種類のペプチドのカクテルで刺激された。ペプチド特異的CTL活性は、同じペプチドのカクテルをパルスした (各1 μM) Tm-EBV細胞に対するCTL活性からパルスしていない細胞に対する活性を引いた値である。

^d HLA-A*1101との結合親和性が低いペプチドに対して特異的なCTL活性はみられなかったため、省略した。

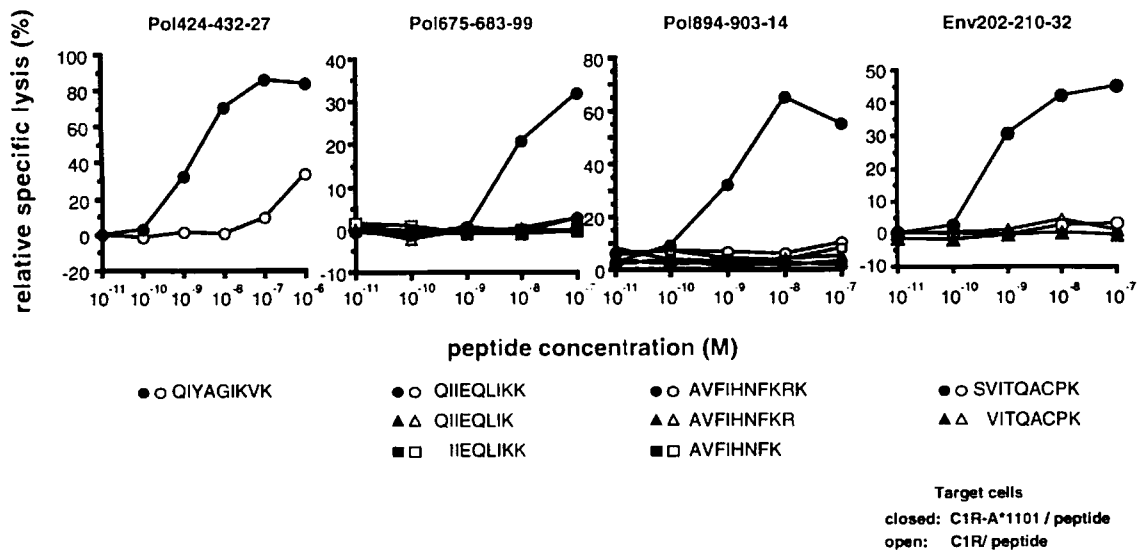


図3 作製した CTL クローンによる HLA-A*1101 拘束性 HIV-1 clade B 特異的 CTL エピトープの認識、ならびに長さの異なる各種ペプチドの認識

各種ペプチドを様々な濃度でパルスした標的細胞に対するそれぞれの CTL クローン (Pol 424-432-27, Pol 675-683-99, Pol 894-903-14 および Env 202-210-32) の CTL 活性を、エフェクター：ターゲット細胞比 (E/T ratio) 2:1 で調べた。C1R-A*1101 細胞 (closed symbols) および C1R 細胞 (open symbols) が標的細胞として使用された。各々のシンボルは次のペプチドをパルスした標的細胞に対する CTL 活性を示している。Pol 424-432 (QIYAGIKVK)、Pol 675-683 (QIIEQLIKK)、Pol 894-903 (AVFIHNFKRK) および Env 202-210 (SVITQACPK) ペプチド (●○)、Pol 675-682 (QIIEQLIK)、Pol 894-902 (AVFIHNFKR) および Env 203-210 (VITQACPK) ペプチド (▲△)、Pol 676-683 (IIEQLIKK) および Pol 894-901 (AVFIHNFK) ペプチド (■□)。ペプチド特異的細胞傷害活性 relative specific lysis (%) は、ペプチドをパルスした標的細胞に対する活性からパルスしていない標的細胞に対する活性を引いた値 (%) である。解析は、それぞれについて 2 つ以上の特異的 CTL クローンをを用いて行い、図には代表としてそれぞれ 1 つの結果を示した。

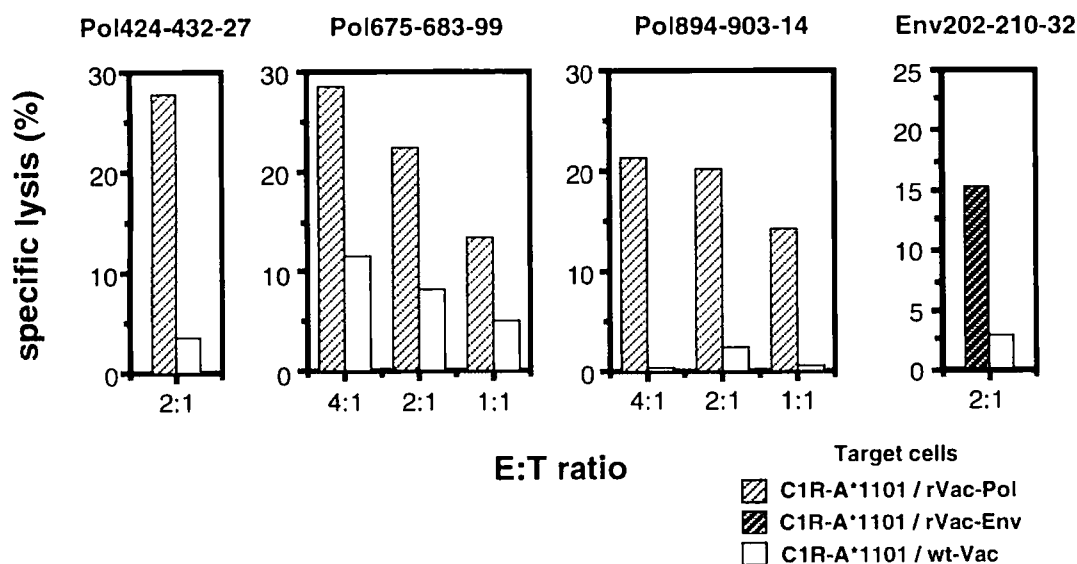


図4 HIV-1 組換えワクチニアウイルスに感染した標的細胞に対する HLA-A*1101 拘束性 HIV-1 clade B 特異的 CTL の認識

HIV-1 SF-2 株由来の Pol 蛋白を発現する HIV-1 組換えワクチニアウイルス (hatched bar) または野生型 (wild-type) のワクチニアウイルス (open bar) に感染した C1R-A*1101 標的細胞に対する Pol 424-432、Pol 675-683 および Pol 894-903 特異的 CTL クローン (それぞれ Pol 424-432-27、Pol 675-683-99、Pol 894-903-14) の細胞傷害活性、ならびに HIV-1 SF-2 株由来の Env 蛋白を発現する HIV-1 組換えワクチニアウイルス (hatched bar) または野生型 (wild-type) のワクチニアウイルス (open bar) に感染した C1R-A*1101 標的細胞に対する Env 202-210 特異的 CTL クローン (Env 202-210-32) の細胞傷害活性を図中に示した E:T ratio で調べた。

表3 HLA-A*1101 拘束性 HIV-1 clade B 特異的 CTL エピトープに相当する clade A から clade E 分離株の変異 (variant)

ID ^a	peptide	sequence	frequencies of naturally occurring variants in each clade ^b				
			clade A	clade B	clade C	clade D	clade E
A	Pol313-321	AIFQSSMTK	5/9	19/29	6/15	4/5	4/5
B	Pol424-432	QIYAGIKVK	6/9	15/29	1/15	1/5	3/5
	Pol424-432-9R	-----R	1/9	6/29			1/5
	Pol424-432-4P9R	---P----R		2/29	11/15	3/5	
C	Pol894-903	AVFIHNFKRK	8/9	27/29	11/15	4/5	5/5
D1	Pol675-683	QIIEQLIKK		24/29	9/15	5/5	
D2	Pol675-683-5E	----E----		2/29			3/5
D3	Pol675-683-5K8E	----K--E-	4/9				1/5
E1	Nef84-92	AVDLSHFLK	3/12	91/231		2/4	
E2	Nef84-92-2L	-L-----	4/12	75/231		1/4	
E3	Nef84-92-2F6F	-F---F---	3/12	1/231	17/32		20/26
F1	Gag349-359	ACQGVGGPGHK	7/9	27/35	6/15	1/5	1/5
F2	Gag349-359-9S	-----S--	2/9	8/35	8/15	4/5	4/5
G1	Env202-210	SVITQACPK		76/95	1/28		
	Env202-210-2A	-A-----	15/17	1/95	15/28	10/14	
G2	Env202-210-4K	---K----		2/95			16/20
H1	Gag83-90	TLYCVHQR	5/9	11/35			
H2	Gag83-90-8K	-----K	1/9	8/35	1/15		
H3	Gag83-90-3W	--W----	1/9				5/5
	Gag83-90-7E	-----E-		1/35		3/5	

^a それぞれのペプチドに記されたIDは、図5の各パネルに使用したものに対応している。

^b シークエンスは、ロスアラモス研究所のデータベース (HIV sequence database 1999, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos) から得られた。太字は、それぞれのcladeにおける主な変異 (variant、各cladeの分離株の20%以上) を示している。

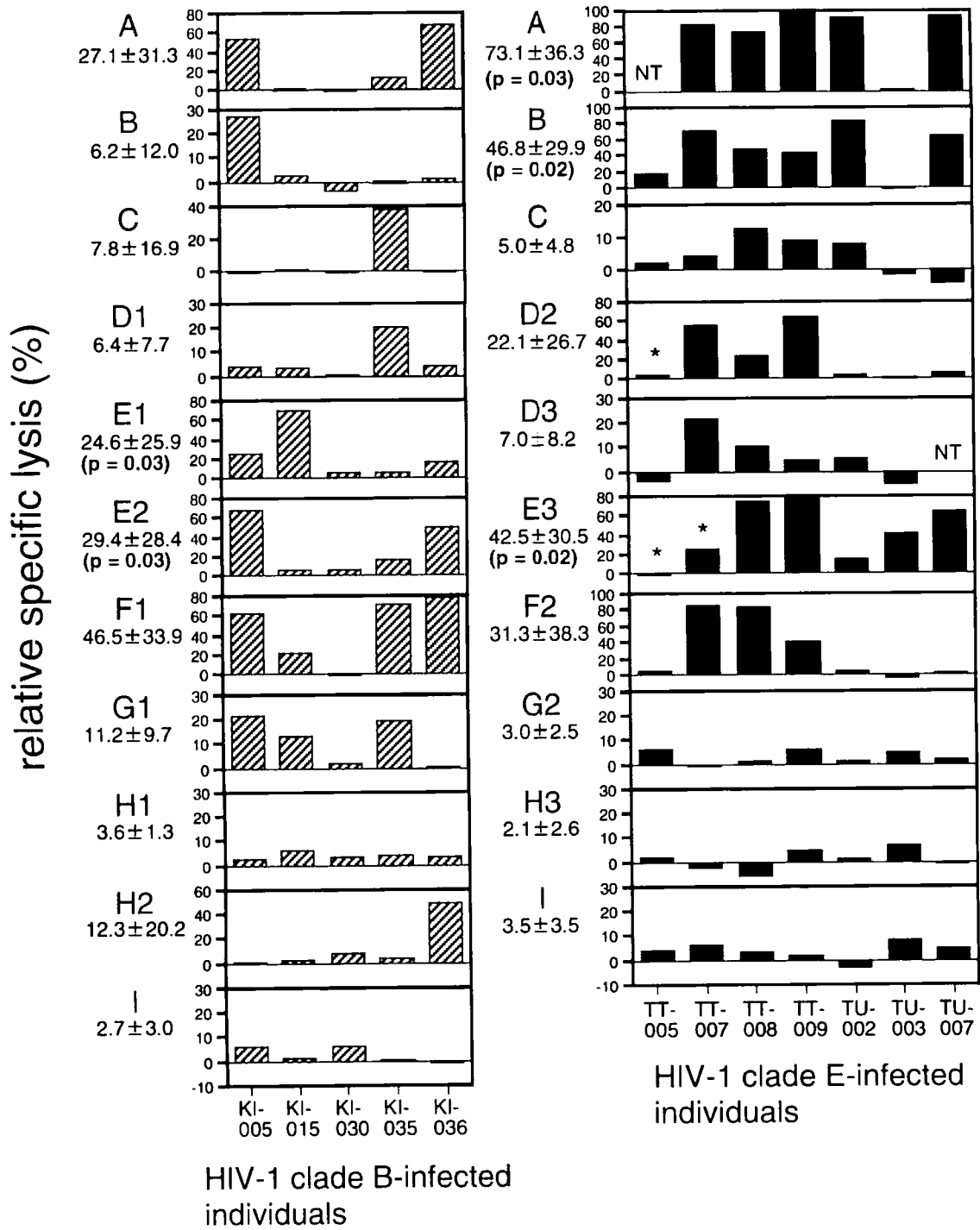


図5 日本人の HLA-A*1101 陽性 HIV-1 clade B 感染者またはタイ人の clade E 感染者の PBMC を HIV-1 ペプチドで *in vitro* 刺激した後の HIV-1 ペプチドをパルスした細胞に対する細胞傷害活性

日本人の HLA-A*1101 陽性 HIV-1 clade B 感染者またはタイ人の clade E 感染者の PBMC をそれぞれ HIV-1 clade B CTL エピトープペプチドまたはそれに相当する位置の clade E ペプチドで *in vitro* 刺激、培養した。2 週間後に Tm-EBV 細胞を標的細胞としてそれぞれのペプチドに対する CTL 活性を測定した。エフェクター：ターゲット細胞比 (E/T ratio) は 40:1 で測定した。図中、*印を付けたところは 30:1 で測定した。図左が 5 人の HIV-1 clade B 感染者の PBMC の測定結果、右が 7 人の clade E 感染者の PBMC の測定結果である。それぞれのパネルで用いたペプチドは表 3 の左側に示した A~I に対応している。A, Pol 313-321 (AIFQSSMTK) ペプチド; B, Pol 424-432 (QIYAGIKVK) ペプチド; C, Pol 894-903 (AVFIHNFKRK) ペプチド; D1, Pol 675-683 (QIIEQLIKK) ペプチド; D2, Pol 675-683-5E (QIIEELIKK) ペプチド; D3, Pol 675-683-5K8E (QIIEKLIEK) ペプチド; E1, Nef 84-92 (AVDLSHFLK) ペプチド; E2, Nef 84-92-2L (ALDLSHFLK) ペプチド; E3, Nef 84-92-2F6F (AFDLSFFLK) ペプチド; F1, Gag 349-359 (ACQGVGGPGHK) ペプチド; F2, Gag 349-359-9S (ACQGVGGPSHK) ペプチド; G1, Env 202-210 (SVITQACPK) ペプチド; G2, Env 202-210-4K (SVIKQACPK) ペプチド; H1, Gag 83-90 (TLYCVHQR) ペプチド; H2, Gag 83-90-8K (TLYCVHQK) ペプチド; H3, Gag 83-90-3W (TLWCVHQR) ペプチド; I, HLA-A*1101 に結合しない非特異的ペプチド(DPNPQEVVL)。

Pol424-432

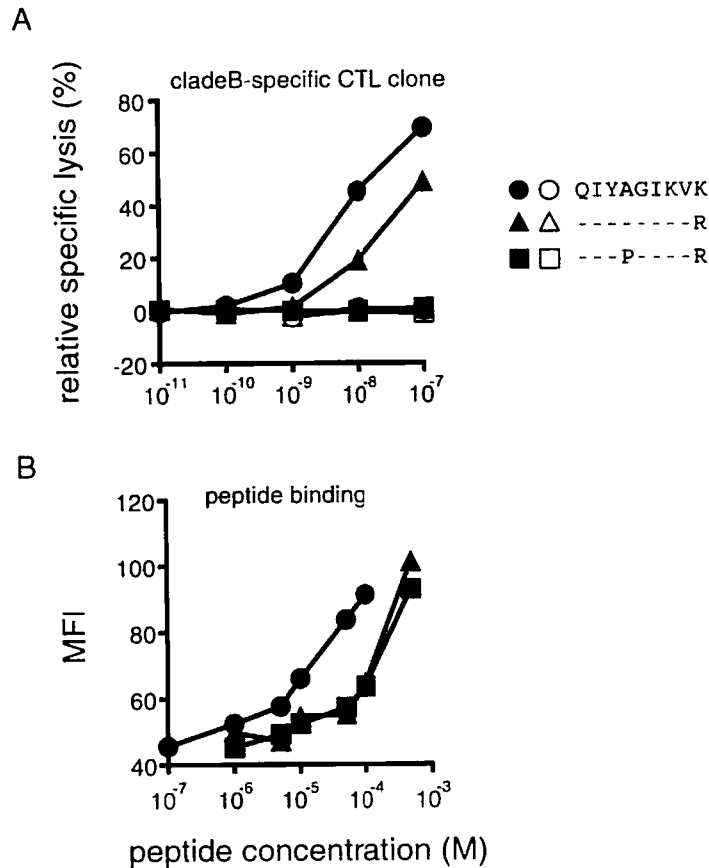


図6 Pol 424-432 特異的 CTL による HIV-1 clade B および clade E で共通な (cross-clade) CTL エピトープの認識

A. HLA-A*1101 拘束性 HIV-1 clade B 特異的 CTL クローン (Pol 424-432-34) による HIV-1 clade B および clade E の variant の認識。variant ペプチドを様々な濃度でパルスした標的細胞に対する CTL クローンの細胞傷害活性をターゲット細胞：エフェクター細胞比 (E:T ratio) 2:1 で調べた。C1R-A*1101 細胞 (closed symbols) および C1R 細胞 (open symbols) が標的細胞として使用された。各々のシンボルは次のペプチドをパルスした標的細胞に対する CTL 活性を示している。Pol 424-432 (QIYAGIKVK) ペプチド (●○)、Pol 424-432-9R (QIYAGIKVR) ペプチド (▲△)、Pol 424-432-4P9R (QIYPGIKVR) ペプチド (■□)。ペプチド特異的細胞傷害活性 relative specific lysis (%)は、ペプチドをパルスした標的細胞に対する活性からパルスしていない標的細胞に対する活性を引いた値(%)である。

B. HLA-A*1101 に対する HIV-1 clade B および clade E の variant ペプチドの結合親和性。それぞれのシンボルは、A と同じ各ペプチドの結合性を示している(●▲■)。MFI は、平均蛍光強度である。

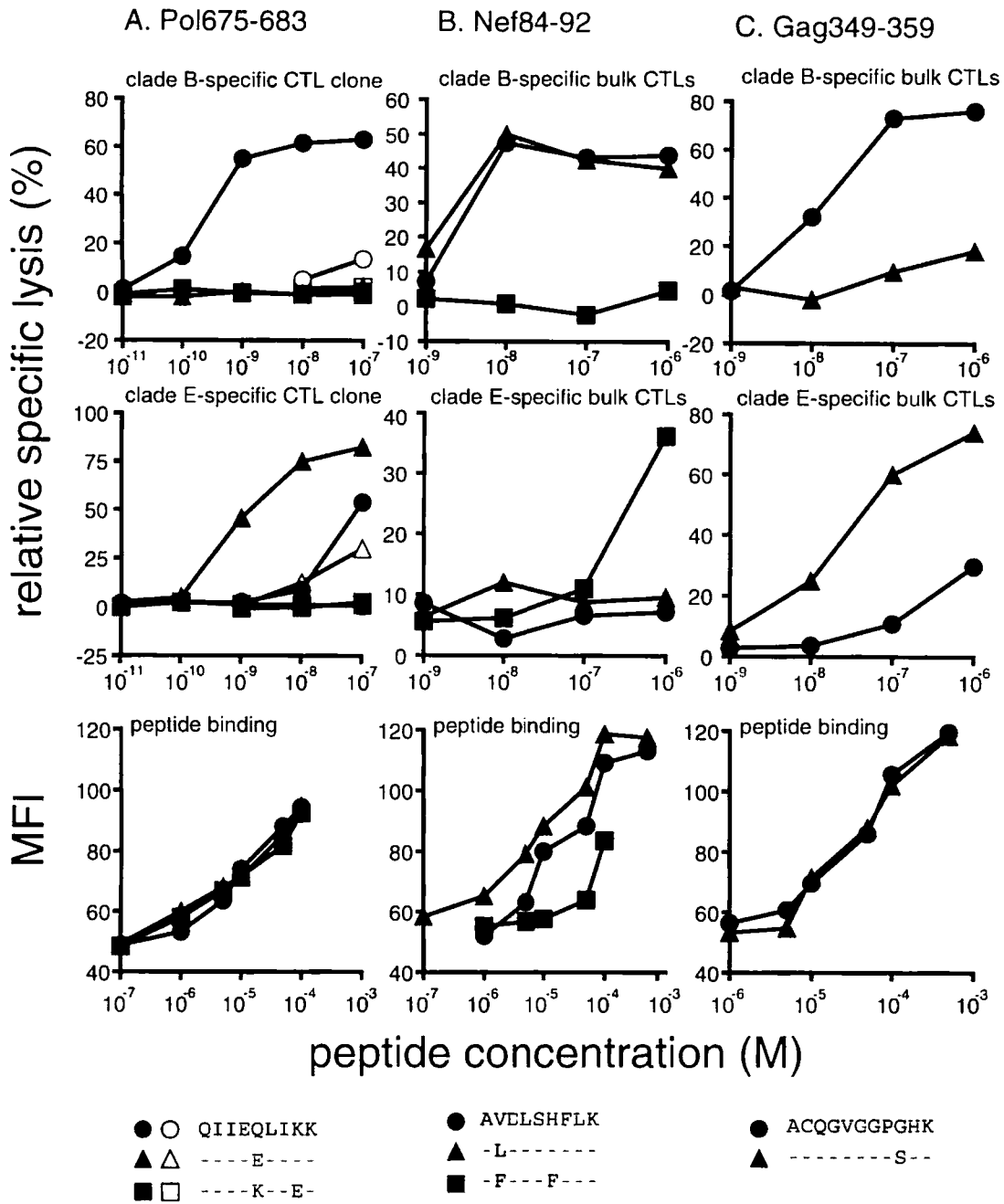


図7 3種のHLA-A*1101拘束性HIV-1エピトープ領域におけるclade Bまたはclade Eの配列特異的CTLの認識

[上段および中段] HIV-1 clade B 特異的およびclade E 特異的 CTL クローン (A、それぞれ Pol 675-683-133 および Pol 675-683-5E-3) ならびに HIV-1 clade B 特異的およびclade E 特異的 bulk T 培養細胞 (B および C、それぞれ HIV-1 clade B および clade E のペプチドで2回 *in vitro* 刺激された PBMC) による HIV-1 clade B および clade E の variant の認識。様々なペプチド濃度でパルスした標的細胞に対する CTL クローンまたは bulk T 培養細胞の細胞傷害活性をターゲット細胞：エフェクター細胞比 (E:T ratio) 2:1 または 10:1 (それぞれ CTL クローンまたは bulk T 培養細胞のとき) で調べた。C1R-A*1101 細胞 (closed symbols) および C1R 細胞 (open symbols) が CTL クローンの標的細胞として使用され、Tm-EBV 細胞株 (closed symbols) が bulk T 培養細胞の標的細胞として使用された。各々のシンボルは次のペプチドをパルスした標的細胞に対する CTL 活性を示している。Pol 675-683 (QIEQLIKK)、Nef 84-92 (AVDLSHFLK) および Gag 349-359 (ACQGVGGPGHK) ペプチド (●○)、Pol 675-683-5E (QIEELIKK)、Nef 84-92-2L (ALDLSHFLK) および Gag 349-359-9S (ACQGVGGPSHK) ペプチド (▲△)、Pol 675-683-5K8E (QIEKLIK) および Nef 84-92-2F6F (AFDLSFFLK) ペプチド (■□)。ペプチド特異的細胞傷害活性 relative specific lysis (%)は、ペプチドをパルスした標的細胞に対する活性からパルスしていない標的細胞に対する活性を引いた値(%)である。

[下段] HLA-A*1101 に対する HIV-1 clade B および clade E の variant ペプチドの結合親和性。それぞれのシンボルは、上段および中段と同じ各ペプチドの結合性を示している(●▲■)。MFI は、平均蛍光強度である。

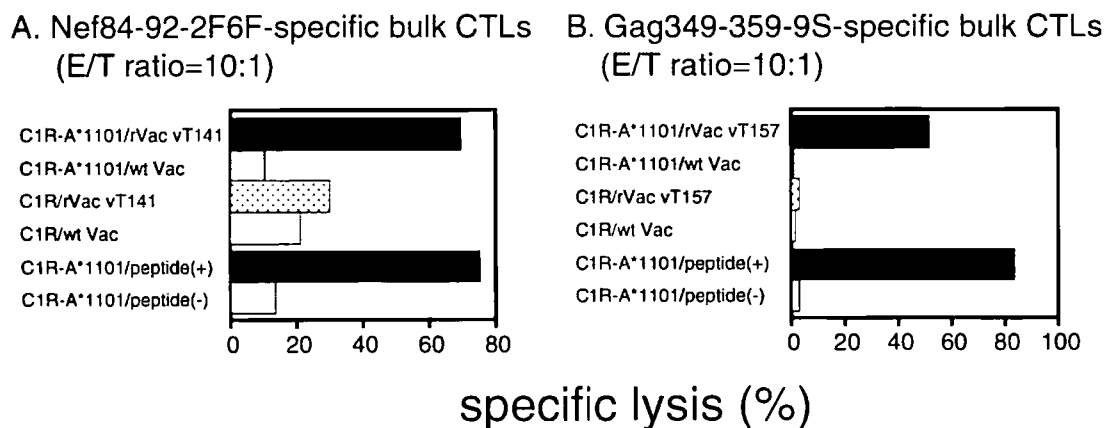


図8 HIV-1 組換えワクチニアウイルスに感染した標的細胞に対する HIV-1 clade E 特異的 CTL の認識

HIV-1 組換えワクチニアウイルス vT141 (Nef 蛋白を発現する)に感染した標的細胞に対する Nef 84-92-2F6F 特異的 bulk T 培養細胞の細胞傷害活性 (A)、または HIV-1 組換えワクチニアウイルス vT157 (Gag 蛋白を発現する)に感染した標的細胞に対する Gag 349-359-9S 特異的 bulk T 培養細胞の細胞傷害活性 (B) を E:T ratio = 10:1 で調べた。

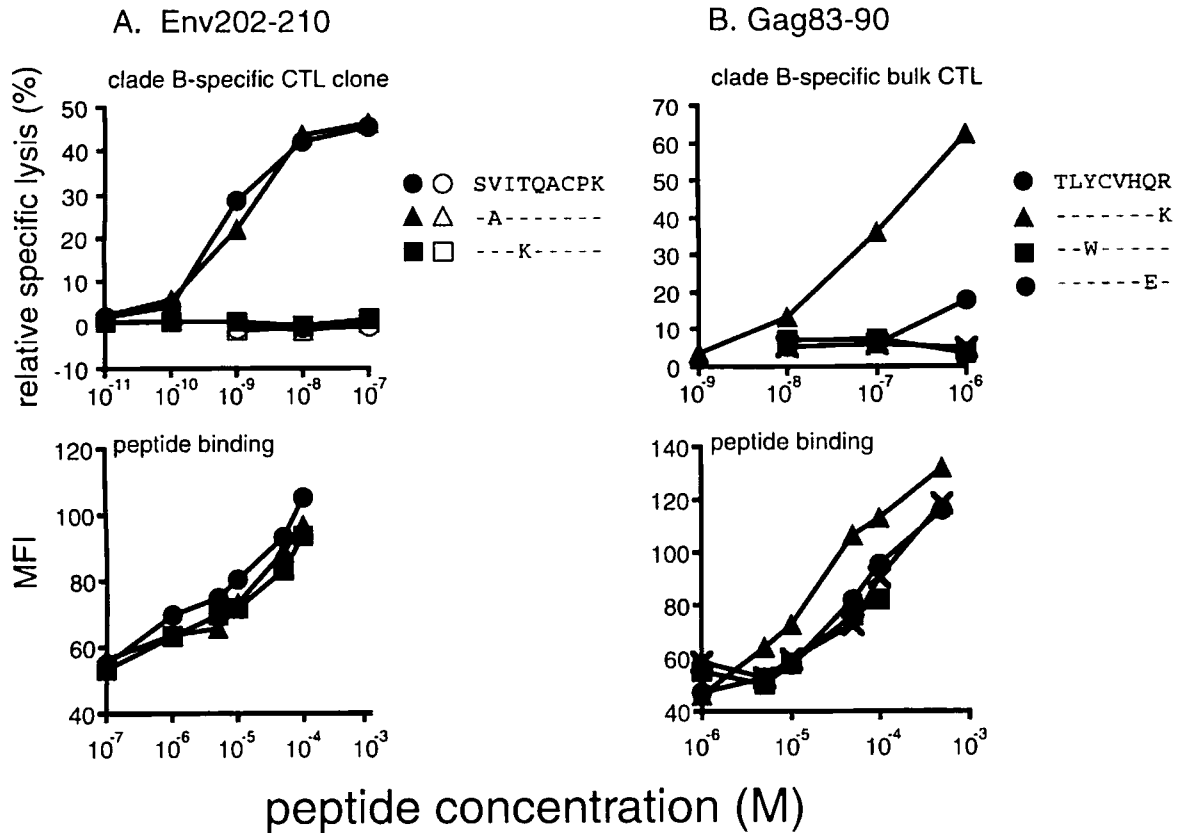


図9 2種のHLA-A*1101拘束性HIV-1エピトープにおけるHIV-1 clade Bのみに特異的なCTLの認識

[上段] HIV-1 clade B 特異的 CTL クローン (A, Env 202-210-56) または HIV-1 clade B 特異的 bulk T 培養細胞 (B, HIV-1 clade B ペプチドで 2 回 *in vitro* 刺激された PBMC) による HIV-1 clade B および clade E の variant の認識。様々なペプチド濃度でパルスした標的細胞に対する CTL クローンまたは bulk T 培養細胞の細胞傷害活性をターゲット細胞 : エフェクター細胞比 (E:T ratio) 2:1 または 10:1 (それぞれ CTL クローンまたは bulk T 培養細胞のとき) で調べた。C1R-A*1101 細胞 (closed symbols) および C1R 細胞 (open symbols) が CTL クローンの標的細胞として使用され、Tm-EBV 細胞株 (closed symbols) が bulk T 培養細胞の標的細胞として使用された。各々のシンボルは次のペプチドをパルスした標的細胞に対する CTL 活性を示している。Env 202-210 (SVITQACPK) または Gag 83-90 (TLYCVHQR) ペプチド (●○)、Env 202-210-2A (SAITQACPK) または Gag 83-90-8K (TLYCVHQK) ペプチド (▲△)、Env 202-210-4K (SVIKQACPK) または Gag 83-90-3W (TLWCVHQR) ペプチド (■□)、Gag 83-90-7E (TLYCVHER) ペプチド (X)。ペプチド特異的細胞傷害活性 relative specific lysis (%) は、ペプチドをパルスした標的細胞に対する活性からパルスしていない標的細胞に対する活性を引いた値 (%) である。

[下段] HLA-A*1101 に対する HIV-1 clade B および clade E の variant ペプチドの結合親和性。それぞれのシンボルは、上段と同じ各ペプチドの結合性を示している (●▲■X)。MFI は、平均蛍光強度である。

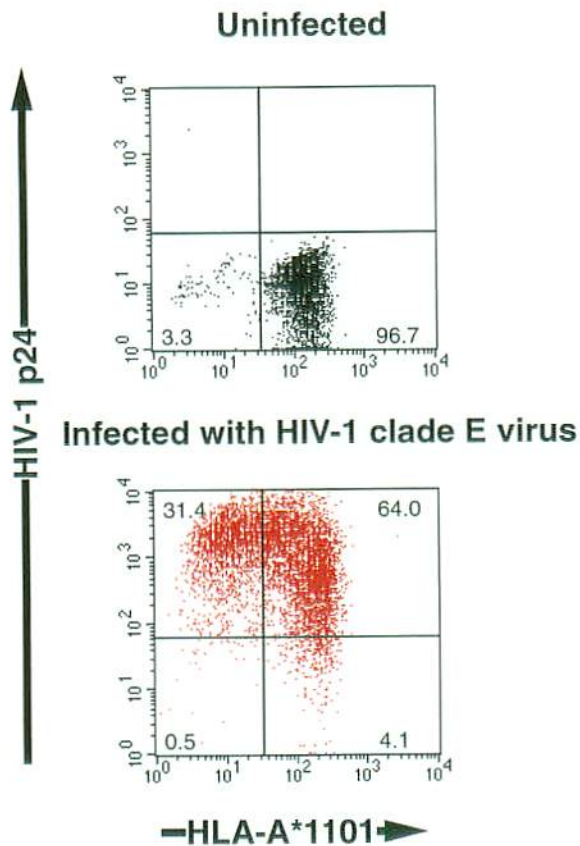


図 1 0 HIV-1 clade E ウイルスに感染した標的細胞における HLA-A*1101 の発現

721.221-CD4-A*1101 細胞を HIV-1 clade E ウイルスクローン p93JP-NH1 に感染させた。未感染の細胞（上段）または感染させた細胞（下段）を抗 HIV-1 p24 モノクローナル抗体および抗 HLA-A11 モノクローナル抗体で染色して解析した。95%の細胞が HIV-1 p24 抗原陽性であり、その陽性細胞のうち約 30%で HLA-A*1101 の発現抑制 (downregulation) が認められた。

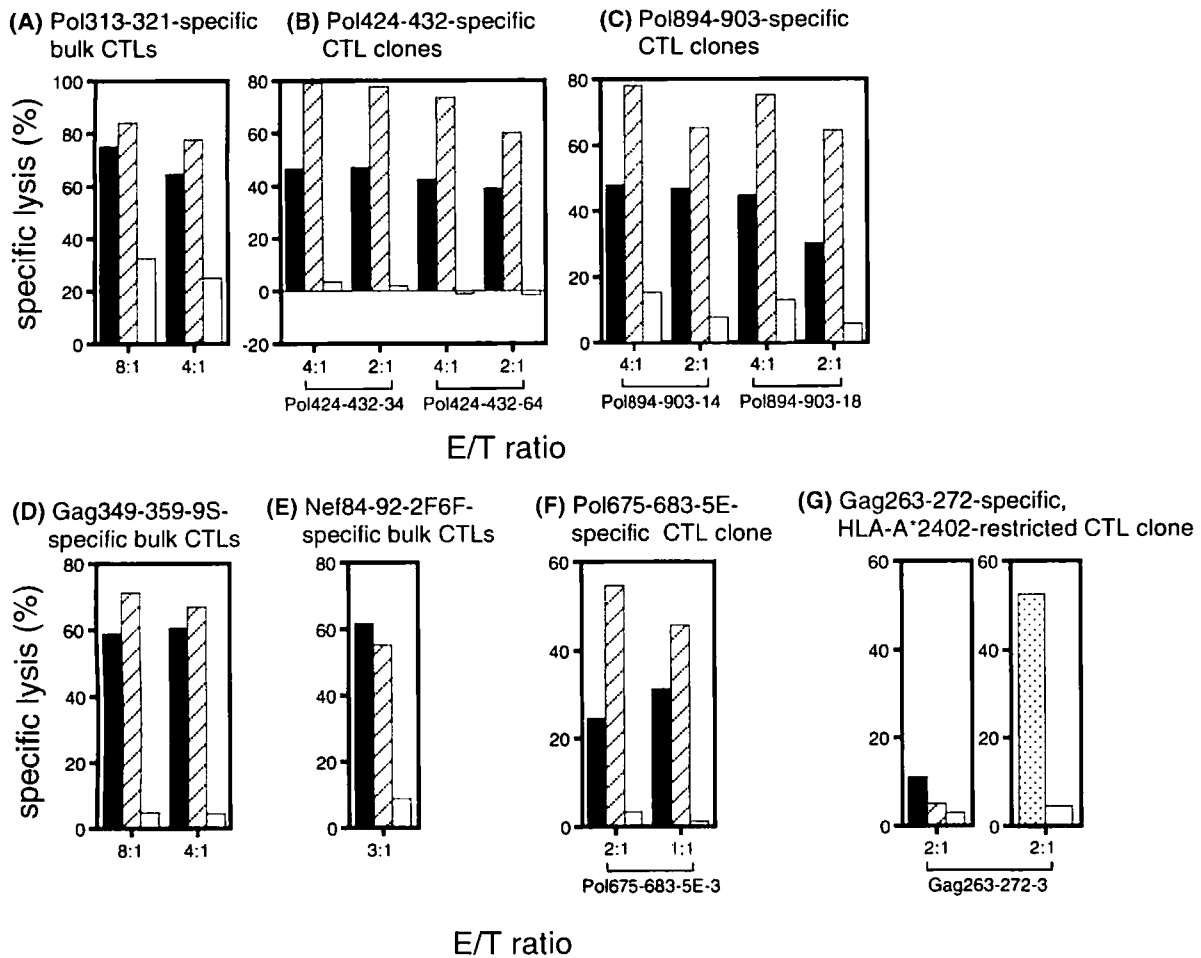


図 1 1 3種の cross-clade エピトープ特異的 CTL および 3種の HIV-1 clade E エピトープ特異的 CTL による HIV-1 clade E ウイルス感染した標的細胞の細胞傷害性

HIV-1 clade E ウイルスクローン p93JP-NH1 に感染した 721.221-CD4-A*1101 細胞 (closed bar)、ならびに適当なペプチドでパルスした (shaded bar) またはラベルしていない (open bar) 未感染の 721.221-CD4-A*1101 細胞を標的細胞として使用した。3種の cross-clade エピトープ特異的 CTL (A-C) および 3種の HIV-1 clade E エピトープ特異的 CTL (D-F) の細胞傷害活性は、図中に示した様々なターゲット細胞：エフェクター細胞比 (E:T ratio) で調べられた。Gag 263-272 特異的で HLA-A*2402 拘束性の CTL クローン (Gag 263-272-3) は、陰性コントロールとして使用された (G)。この CTL クローンのペプチド特異的な細胞傷害活性は、Gag 263-272 ペプチドをパルスした (dotted bar) またはラベルしていない (open bar) C1R-A*2402 細胞に対して測定された (G: Right)。

表4 HLA-A*1101 拘束性 HIV-1 cross-clade CTL エピトープ、ならびに
clade B 特異的、clade E 特異的 CTL エピトープのまとめ

peptide	sequence	clade specificity	Induction of CTL in individuals infected with		
			cladeB	cladeE	cross-clade recognition
Pol313-321	AIFQSSMTK	A B C D E ^a	3/5 ^b	5/6	B E (A C D)
Pol424-432	QIYAGIKVK	A B E	1/5	6/7	B E (A)
Pol894-903	AVFIHNFKRK	A B C D E	1/5	1/7	B E (A C D)
Pol675-683	QIIEQLIKK	B C D	1/5	-	B (C D)
Pol675-683-5E	----E----	E	-	3/7	E
Pol675-683-5K8E	----K--E-	A E	-	2/6	E (A)
Nef84-92	AVDLSHFLK	A B D	3/5	-	B (A D)
Nef84-92-2L	-L-----	A B D	3/5	-	B (A D)
Nef84-92-2F6F	-F---F---	C E	-	6/7	E (C)
Gag349-359	ACQGVGGPGHK	A B C E	4/5	-	B (A C E)
Gag349-359-9S	-----S--	C D E	0/2	3/7	E (C D)
Env202-210	SVITQACPK	B	3/5	-	B
Env202-210-4K	---K-----	E	-	0/7	-
Gag83-90	TLYCVHQR	A B	0/5	-	-
Gag83-90-8K	-----K	B	1/5	-	B
Gag83-90-3W	--W-----	E	-	0/7	-

^a AからEは、ペプチドがそれぞれclade Aからclade Eにおける主な変異 (variant)であることを示している。

^b データは、それぞれのHIV-1 cladeウイルスの感染者のPBMCをペプチド刺激して調べたサンプル数の内、ペプチド特異的CTL活性が誘導された数を示している。

1 1 参考文献

Allen, T.M., D. H. O'Connor, P. Jing, J. L. Dzuris, B. R. Mothe, T. U. Vogel, E. Dunphy, M. E. Liebl, C. Emerson, N. Wilson, K. J. Kunstman, X. Wang, D. B. Allison, A. L. Hughes, R. C. Desrosiers, J. D. Altman, S. M. Wolinsky, A. Sette, and D. I. Watkins. (2000). Tat-specific cytotoxic T lymphocytes select for SIV escape variants during resolution of primary viraemia. *Nature*. 407:386-390.

Betts, M. R., J. Krowka, C. Santamaria, K. Balsamo, F. Gao, G. Mulundu, C. Luo, N. N'Gandu, H. Sheppard, B. H. Hahn, S. Allen, and J. A. Frelinger. (1997). Cross-clade human immunodeficiency virus (HIV)-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in HIV-infected Zambians. *J Virol*. 71:8908-8911.

Bjorkman, P. J., M. A. Saper, B. Samraoui, W. S. Bennett, J. L. Strominger, and D. C. Wiley. (1987). Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature*. 329:506-512.

Bjorkman, P. J., M. A. Saper, B. Samraoui, W. S. Bennett, J. L. Strominger, and D. C. Wiley. (1987). The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature*. 329:512-518.

Borrow, P., H. Lewicki, X. Wei, M. S. Horwitz, N. Peffer, H. Meyers, J. A. Nelson, J. E. Gairin, B. H. Hahn, M. B. Oldstone, and G. M. Shaw. (1997). Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nat Med*. 3:205-211.

Brander, C., P. J. Goulder. (1999). Recent Advances in HIV-1 CTL Epitope

Characterization. HIV Molecular Immunology Database, HIV Sequence Database, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM.

Buseyne, F., M. L. Chaix, B. Fleury, O. Manigard, M. Burgard, S. Blanche, C. Rouzioux, and Y. Riviere. (1998). Cross-clade-specific cytotoxic T lymphocytes in HIV-1-infected children. *Virology*. 250:316-324.

Cao, H, P. Kanki, J. L. Sankale, A. Dieng-Sarr, G. P. Mazzara, S. A. Kalams, B. Korber, S. Mboup, and B. D. Walker. (1997). Cytotoxic T-lymphocyte cross-reactivity among different human immunodeficiency virus type 1 clades: implications for vaccine development. *J Virol*. 71: 8615-8623.

Chen, J., N. L. Young, S. Subbarao, P. Warachit, S. Saguanwongse, S. Wongsheree, C. Jayavas, C. C. Luo, and T. D. Mastro. (1999). HIV type 1 subtypes in Guangxi Province, China, 1996. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 15:81-84.

Chujoh, Y., Y. Sobao, K. Miwa, Y. Kaneko, and M. Takiguchi. (1998). The role of anchor residues in the binding of peptides to HLA-A*1101 molecules. *Tissue Antigens*. 52:501-509.

Clayton, J., C. Lonjon, and D. Whittle. (1997). Allele and haplotype frequencies for HLA loci in various ethnic group. In: HLA volume I Genetic diversity of HLA functional and medical implication : Edited by Charron D. Paris: EDK Medical and Scientific International Publisher:665-820

Collins, K. L., B. K. Chen, S. A. Kalams, B. D. Walker, and D. Baltimore. (1998). HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocyte. *Nature*. 391: 397-401.

Culmann, B., E. Gomard, M. P. Kieny, B. Guy, F. Dreyfus, A. G. Saimot, D. Sereni, D. Sicard, and J. P. Levy. (1991). Epitopes reacting with human cytotoxic CD8⁺ T cells in the central region of the HIV-1 Nef protein. *J Immunol.* 146:1560-1565

Dorrell, L., T. Dong, G. S. Ogg, S. Lister, S. McAdam, T. Rostron, C. Conlon, A. J. McMichael, and S. L. Rowland-Jones. (1999). Distinct recognition of non-clade B human immunodeficiency virus type 1 epitopes by cytotoxic T lymphocytes generated from donors infected in Africa. *J Virol.* 73:1708-1714.

Durali, D., J. Morvan, F. Letourneur, D. Schmitt, N. Guegan, M. Dalod, S. Saragosti, D. Sicard, J. P. Levy, and E. Gomard. (1998). Cross-reactions between the cytotoxic T-lymphocyte responses of human immunodeficiency virus-infected African and European patients. *J Virol.* 72:3547-3553.

Evans, D. T., D. H. O'Connor, P. Jing, J. L. Dzuris, J. Sidney, J. da Silva, T. M. Allen, H. Horton, J. E. Venham, R. A. Rudersdorf, T. Vogel, C. D. Pauza, R. E. Bontrop, R. DeMars, A. Sette, A. L. Hughes, and D. I. Watkins. (1999). Virus-specific cytotoxic T-lymphocyte responses select for amino-acid variation in simian immunodeficiency virus Env and Nef. *Nat Med.* 5:1270-1276.

Falk, K., O. Rotzschke, S. Stevanovic, G. Jung, and H. G. Rammensee. (1991). Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature.* 351:290-296.

Falk, K., O. Rotzschke, M. Takiguchi, B. Grahovac, V. Gnau, S. Stevanovic, G. Jung, and H. G. Rammensee. (1994). Peptide motifs of HLA-A1, -A11, -A31, and -A33 molecules. *Immunogenetics.* 40:238-241.

Goulder, P. J., R. E. Phillips, R. A. Colbert, S. McAdam, G. Ogg, M. A. Nowak, P. Giangrande, G. Luzzi, B. Morgan, A. Edwards, A. J. McMichael, and S. Rowland-Jones. (1997). Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS. *Nat Med.* 3:212-217.

Hanke, T., and A. J. McMichael. (2000). Design and construction of an experimental HIV-1 vaccine for a year-2000 clinical trial in Kenya. *Nat Med.* 6:951-955.

Harrer, T., E. Harrer, P. Barbosa, F. Kaufmann, R. Wagner, S. Bruggemann, J. R. Kalden, M. Feinberg, R. P. Johnson, S. Buchbinder, and B. D. Walker. (1998). Recognition of two overlapping CTL epitopes in HIV-1 p17 by CTL from a long-term nonprogressing HIV-1-infected individual. *J Immunol.* 161:4875-4881

Hill, A. V. S., J. Elvin, A. C. Willis, M. Aidoo, C. E. M. Allsopp, F. M. Gotch, X. M. Gao, M. Takiguchi, B. M. Greenwood, A. R. M. Townsend, A. J. McMichael, and H. C. Whittle. (1992). Molecular analysis of the association of HLA-B53 and resistance to severe malaria. *Nature.* 360:434-439.

Ikeda-Moore, Y., H. Tomiyama, K. Miwa, S. Oka, A. Iwamoto, Y. Kaneko, and M. Takiguchi. (1997). Identification and characterization of multiple HLA-A24-restricted HIV-1 CTL epitopes: Strong epitopes are derived from V regions of HIV-1. *J. Immunol.* 159:6242-6252

Jardetzky, T. S., W. S. Lane, R. A. Robinson, D. R. Madden, and D. C. Wiley. (1991). Identification of self peptides bound to purified HLA-B27. *Nature.* 353:326-329.

Johnson, R. P., A. Trocha, L. Yang, G. P. Mazzara, D. L. Panicali, T. M. Buchanan, and B. D. Walker. (1991). HIV-1 gag-specific cytotoxic T lymphocytes recognize multiple highly conserved epitopes. *J Immunol.* 147:1512-1521

Kato, K., T. Shiino, S. Kusagawa, H. Sato, K. Nohtomi, K. Shibamura, T. H. Nguyen, K. C. Pham, X. L. Truong, H. A. Mai, T. L. Hoang, G. Bunyaraksyotin, Y. Fukushima, M. Honda, C. Wasi, S. Yamazaki, Y. Nagai, and Y. Takebe. (1999). Genetic similarity of HIV type 1 subtype E in a recent outbreak among injecting drug users in northern Vietnam to strains in Guangxi Province of southern China. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 15:1157-1168.

Klein, M. R., C. A. van Baalen, A. M. Holwerda, S. R. K. Garde, R. J. Bende, I. P. Keet, J. K. Eeftinck-Schattenkerk, A. D. Osterhaus, H. Schuitemaker, and F. Miedema. (1995). Kinetics of Gag-specific cytotoxic T lymphocyte responses during the clinical course of HIV-1 infection: a longitudinal analysis of rapid progressors and long-term asymptomatics. *J Exp Med.* 181:1365-1372.

Koenig, S., A. J. Conley, Y. A. Brewah, G. M. Jones, S. Leath, L. J. Boots, V. Davey, G. Pantaleo, J. F. Demarest, C. Carter, C. Wannebo, J. R. Yanelli, S. A. Rosenberg, and H. C. Lane. (1995). Transfer of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes to an AIDS patient leads to selection for mutant HIV variants and subsequent disease progression. *Nat Med.* 1:330-336.

Koup, R. A., J. T. Safrit, Y. Cao, C. A. Andrews, G. McLeod, W. Borkowsky, C. Farthing, and D.D. Ho. (1994). Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type I syndrome. *J Virol.* 68: 4650-4655.

Kuroda, M. J., J. E. Schmitz, W. A. Charini, C. E. Nickerson, M. A. Lifton, C. I. Lord, M. A. Forman, and N. L. Letvin. (1999). Emergence of CTL coincides with clearance of virus during primary simian immunodeficiency virus infection in rhesus monkeys. *J Immunol.* 162:5127-5133.

Langlade-Demoyen, P., N. Ngo-Giang-Huong, F. Ferchal, and E. Oksenhendler. (1994). Human immunodeficiency virus (HIV) nef-specific cytotoxic T lymphocytes in noninfected heterosexual contact of HIV-infected patients. *J Clin Invest.* 93:1293-1297.

Lynch, J. A., M. deSouza, M. D. Robb, L. Markowitz, S. Nitayaphan, C. V. Sapan, D. L. Mann, D. L. Birx, and J. H. Cox. (1998). Cross-clade cytotoxic T cell response to human immunodeficiency virus type 1 proteins among HLA disparate North Americans and Thais. *J Infect Dis.* 178:1040-1046.

McAdam, S., P. Kaleebu, P. Krausa, P. Goulder, N. French, B. Collin, T. Blanchard, J. Whitworth, A. McMichael, and F. Gotch. (1998). Cross-clade recognition of p55 by cytotoxic T lymphocytes in HIV-1 infection. *AIDS.* 12:571-579.

Nixon, D. F., A. R. M. Townsed, J. G. Elvin, C. R. Rizza, J. Gallwey, and A. J. McMichael. (1988). HIV-1 gag-specific cytotoxic T lymphocytes defined with recombinant vaccinia virus and synthetic peptides. *Nature.* 336: 484-487

Ogg, G. S. , X . Jin, S. Bonhoeffer, P. R. Dunbar, M. A. Nowak, S. Monard, J. P. Segal, Y. Cao, S. L. Rowland-Jones, V. Cerundolo, A. Hurley, M. Markowitz, D. D. Ho, D. F. Nixon, and A. J. McMichael. (1998). Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. *Science.* 279: 2103-2106.

Ou, C. Y., Y. Takebe, B. G. Weniger, C. C. Luo, M. L. Kalish, W. Auwanit, S. Yamazaki, H. D. Gayle, N. L. Young, and G. Schochetman. (1993). Independent introduction of two major HIV-1 genotypes into distinct high-risk populations in Thailand. *Lancet*. 341:1171-1174.

Rammensee, H. G., T. Friede, and S. Stevanovic. (1995). MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics*. 41:178-228.

Rowland-Jones, S., J. Sutton, K. Ariyoshi, T. Dong, F. Gotch, S. McAdam, D. Whitby, S. Sabally, A. Gallimore, T. Corrah, M. Takiguchi, T. Schultz, A. McMichael, and H. Whittle. (1995). HIV-1 specific cytotoxic T cells in HIV-exposed but uninfected Gambian women. *Nat Med*. 1: 59-64.

Rowland-Jones, S. L., T. Dong, K. R. Fowke, J. Kimani, P. Krausa, H. Newell, T. Blanchard, K. Ariyoshi, J. Oyugi, E. Ngugi, J. Bwayo, K. S. MacDonald, A. J. McMichael, and F. A. Plummer. (1998). Cytotoxic T cell responses to multiple conserved HIV epitopes in HIV-resistant prostitutes in Nairobi. *J Clin Invest*. 102:1758-1765.

Schmitz, J.E., M. J. Kuroda, S. Santra, V. G. Sasseville, M. A. Simon, M. A. Lifton, P. Racz, K. Tenner-Racz, M. Dalesandro, B. J. Scallon, J. Ghayeb, M. A. Forman, D. C. Montefiori, E. P. Rieber, N. L. Letvin, and K. A. Reimann. (1999). Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science*. 283:857-860.

Shiga, H., T. Shioda, H. Tomiyama, Y. Takamiya, S. Oka, S. Kimura, Y. Yamaguchi, T. Gojoubori, H.-G. Rammensee, K. Miwa, and M. Takiguchi. (1996). Identification of multiple HIV-1 T cell epitopes presented by HLA-B35 molecules. *AIDS*. 10: 1075-1083.

Shioda, T., and H. Shibuta. (1990). Production of human immunodeficiency virus (HIV)-like particles from cells infected with recombinant vaccinia viruses carrying the gag gene of HIV. *Virology*. 175:139-148.

Sipsas, N. V., S. A. Kalams, A. Trocha, S. He, W. A. Blattner, B. D. Walker, and R. P. Johnson. (1997). Identification of type-specific cytotoxic T lymphocyte responses to homologous viral proteins in laboratory workers accidentally infected with HIV-1. *J Clin Invest*. 99:752-762

Tanabe, M., M. Sekimata, S. Ferrone, and M. Takiguchi. (1992). Structural and functional analysis of monomorphic determinants recognized by monoclonal antibodies reacting with the HLA class I alpha 3 domain. *J Immunol*. 148: 3202-3209.

Threlkeld, S. C., P. A. Wentworth, S. A. Kalams, B. M. Wilkes, D. J. Ruhl, E. Keogh, J. Sidney, S. Southwood, B. D. Walker, and A. Sette. (1997). Degenerate and promiscuous recognition by CTL of peptides presented by the MHC class I A3-like superfamily. *J Immunol*. 159:1648-1657.

Tokunaga, K., Y. Ishikawa, A. Ogawa, H. Wang, S. Mitsunaga, S. Moriyama, L. Lin, M. Bannai, Y. Watanabe, K. Kashiwase, H. Tanaka, T. Akaza, K. Tadokoro, and T. Juji. (1997). Sequence-based association analysis of HLA class I and II alleles in Japanese supports conservation of common haplotypes. *Immunogenetics*. 46:199-205.

Tomiya, H., K. Miwa, H. Shiga, Y. Ikeda-Moore, S. Oka, A. Iwamoto, Y. Kaneko, and M. Takiguchi. (1997). Evidence of presentation of multiple HIV-1 cytotoxic T lymphocyte epitopes by HLA-B*3501 molecules that are associated with the accelerated progression of AIDS. *J Immunol*.

158:5026-5034.

Tomiyama, H., T. Sakaguchi, K. Miwa, S. Oka, A. Iwamoto, Y. Kaneko and M. Takiguchi. (1999). Identification of Multiple HIV-1 Epitopes presented by HLA-B*5101 Molecules. *Hum Immunol.* 60: 177-186.

Tomiyama, H., Y. Chujoh, T. Shioda, K. Miwa, S. Oka, Y. Kaneko, and M. Takiguchi. (1999). Cytotoxic T lymphocyte recognition of HLA-B*5101-restricted HIV-1 Rev epitope which is naturally processed in HIV-1-infected cells. *AIDS.* 13:861-863.

Weniger, B. G., Y. Takebe, C. Y. Ou, and S. Yamazaki. (1994). The molecular epidemiology of HIV in Asia. *AIDS.* 8: Suppl 2:S13-28.

Wilson, S. E., S. L. Pedersen, J. C. Kunich, V. L. Wilkins, D. L. Mann, G. P. Mazzara, J. Tartaglia, C. L. Celum, and H. W. Sheppard. (1998). Cross-clade envelope glycoprotein 160-specific CD8+ cytotoxic T lymphocyte responses in early HIV type 1 clade B infection. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 14:925-937.

Yamamoto, J., A. Kariyone, N. Akiyama, K. Kano, and M. Takiguchi. (1990). Presentation of human minor histocompatibility antigens by HLA-B35 and HLA-B38 molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:2583-2587.

Yang, O. O., S. A. Kalams, M. Rosenzweig, A. Trocha, N. Jones, M. Koziel, B. D. Walker, and R. P. Johnson. (1996). Efficient lysis of human immunodeficiency virus type 1-infected cells by cytotoxic T lymphocytes. *J Virol.* 70: 5799-5806.

Yang, O. O., A. C. Tran, S. A. Kalams, R. P. Johnson, M. R. Roberts, and B. D.

Walker. (1997). Lysis of HIV-1-infected cells and inhibition of viral replication by universal receptor T cells. Proc Natl Acad Sci USA. 94:11478-1183.

Yu, X. F., J. Chen, Y. Shao, C. Beyrer, B. Liu, Z. Wang, W. Liu, J. Yang, S. Liang, R. P. Viscidi, J. Gu, G. Gurri-Glass, and S. Lai. (1999). Emerging HIV infections with distinct subtypes of HIV-1 infection among injection drug users from geographically separate locations in Guangxi Province, China. J Acquir Immune Defic Syndr. 22:180-188.

滝口雅文. (1997). パーソナルワクチン. 日経サイエンス. 27:92-101.