

熊本大学学術リポジトリ

Kumamoto University Repository System

Title	エイズ発症遅延と関連するHLA抗原に拘束されるHIV-1特異的細胞傷害性CD8+T細胞の解析
Author(s)	川島, 夕佳
Citation	
Issue date	2008-03-25
Type	Thesis or Dissertation
URL	http://hdl.handle.net/2298/11107
Right	

学位論文
Doctor's Thesis

エイズ発症遅延と関連するHLA抗原に拘束される

HIV-1特異的細胞傷害性CD8⁺ T細胞の解析

**(Analysis of HIV-1 specific cytotoxic CD8⁺T lymphocyte restricted
by HLA alleles associated with slow progression to AIDS)**

川島 夕佳

Yuka Kawashima

熊本大学大学院医学教育部博士課程病態制御学専攻ウイルス制御学

指導教員

滝口 雅文 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程病態制御学専攻ウイルス制御学

2008年3月

目次

1 要 旨	3
2 学位論文の骨格となる参考論文	
2-1) 関 連 論 文	5
2-2) そ の 他 の 論 文 リ ス ト	5
3 謝 辞	6
4 略 語 一 覧	7
5 研究背景と目的	
5-1) はじめに	8
5-2) HIV-1 感染における CTL の役割	8
5-3) ウイルス感染における HLA の役割	9
5-4) HIV-1 感染症における病態進行と HLA の遺伝子型	9
5-5) HIV-1 の CTL からの逃避	10
5-6) HIV-1 特異的 CTL と AIDS 病態進行	11
5-7) 本研究の目的	12
6 実験方法	
6-1) 本研究に使用した材料	
a. 細胞と培地	13
b. ペプチド	13
c. 血液検体	13
d. 抗体	13
e. HIV-1 特異的 CTL クローン	14
f. HLA クラスIテトラマー	14
g. HIV-1 クローン	14
6-2) リバーシムノジェネティックス法の概要	15
6-3) HLA-ペプチド結合アッセイ	16
6-4) HIV-1 感染者由来末梢血単核細胞の in vitro 刺激	16
6-5) ワクシニアウイルス感染細胞	17
6-6) IFN- γ 産生能の測定	17
6-7) 細胞傷害活性の測定	17
6-8) テトラマーを用いた細胞染色	18

6-9) HIV-1 感染細胞	
a. CD4 ⁺ T 細胞の分離と培養	18
b. ウイルスストックの作成	18
c. HIV-1 感染	18
6-10) CTL による HIV-1 増殖抑制能の測定	19
6-11) HIV-1 シークエンス	19
7 実験結果	
7-1) <i>HLA-A*2602</i> および <i>HLA-A*2603</i> に提示される HIV-1 特異的 CD8 ⁺ T 細胞エピトープの同定	
a. <i>HLA-A*2602</i> および <i>A*2603</i> に対する HIV-1 由来ペプチドの結合能	21
b. ペプチド特異的 CD8 ⁺ T 細胞の誘導	23
c. CD8 ⁺ T 細胞エピトープの同定	25
d. <i>HLA-A26</i> サブタイプをもつ慢性 HIV-1 感染者におけるエピトープ特異的 CD8 ⁺ T 細胞の誘導頻度	26
7-2) <i>HLA-B*5101</i> 特異的 CTL の解析	
a. エピトープ特異的 Tetramer を用いた <i>HLA-B*5101</i> 拘束性 Pol283-8、Pol743-9 特異的 CD8 T 細胞の解析	28
b. Gag328-9、Pol283-8、Pol743-9 エピトープ領域における CTL からの逃避変異の解析	31
c. CTL の免疫選択圧による逃避変異の選択	34
d. Pol283-8 特異的 CD8 ⁺ T 細胞の維持と Pol283-8 変異特異的 CD8 ⁺ T 細胞の解析	35
8 考察	37
9 結語	41
10 参考文献	42

1. 要旨

【目的】細胞傷害性T細胞(CTL)は HIV-1 感染細胞の除去に重要な役割を果たしていることが知られているが、HIV-1 を完全に排除することはできず、感染者は後天性免疫不全症候群(AIDS)を発症する。一方、AIDS の病態進行と HLA の間には相関があることが知られている。HLA-A26 と HLA-B51 は AIDS 発症遅延と相関することが報告されている HLA クラス I アレルであり、これらの HLA に提示されるエピトープを認識する CTL によって HIV-1 の増殖が抑制されると推測される。そこで、日本人にみられる 3 つの HLA-A26 のうち、HIV-1 特異的な CTL エピトープが報告されていない *HLA-A*2602*、*-A*2603* に提示されるエピトープの同定を行い、3 つの HLA-A26 アレルに拘束されるエピトープに特異的な CTL の詳細な解析を行った。*HLA-B*5101* では、3 つのエピトープ(Gag327-9、Pol283-8、Pol743-9)特異的な CTL が HIV-1 感染者で高頻度に検出され、これらのエピトープ特異的 CTL の AIDS 発症遅延への関与が示唆された。そこで、この 3 つのエピトープ特異的 CTL が *HLA-B*5101* を持つ長期未発症者(LTNP)で HIV-1 の増殖抑制に働いているのかを明らかにするために解析を行った。AIDS 発症遅延と相関する HLA に拘束される CTL の解析によって、これらの CTL が生体内でのウイルス増殖抑制にどのように働いているのかを明らかにすることを目的とした。

【方法】リバーシムノジェネティクス法を用いて *HLA-A*2602*、*A*2603* 拘束性エピトープの同定を行い、同定したエピトープ特異的 CD8⁺ T 細胞が感染者で誘導される頻度を調べた。また、3 つの *HLA-B*5101* 拘束性エピトープ(Gag327-9、Pol283-8、Pol743-9)特異的 CD8⁺ T 細胞を、感染後 20 年以上を経過する血友病患者で解析した。まず、LTNP、発症遅延者でこれらの CD8⁺ T 細胞検出されるかをテトラマーを用いて調べた。さらに、これらのエピトープの変異を調べ、変異に対する特異的 CTL の認識能を ⁵¹Cr 放出試験と HIV-1 増殖抑制試験によって測定した。

【結果と考察】*HLA-A*2602* 拘束性エピトープ(Gag169-177)、*HLA-A*2603* 拘束性エピトープ(Gag169-177、Env63-72)を同定した。Gag169-177 特異的 CD8⁺ T 細胞は *HLA-A*2602* を持つ感染者で誘導される頻度は低かったが、一方 *HLA-A*2601*、*-A*2603* を持つ HIV-1 感染者では高頻度に誘導された。2 つのサブタイプで高頻度に誘導されるこのエピトープ特異的 CD8⁺ T 細胞は感染者体内で HIV-1 の増殖抑制に主要な役割を果たしている可能性が考えられた。

HIV-1 感染者で高頻度に誘導される *HLA-B*5101* 拘束性の 3 つのエピトープ特異的 CD8⁺ T 細胞を解析したところ、LTNP と 1 名の発症遅延者のウイルス量が低い時点でのみ Pol283-8 特異的 CD8⁺ T 細胞が検出された。また、発症遅延者では Pol283-8

領域に CTL から逃避する変異があり、LTNP では CTL から認識される変異があった。これらのことから Pol283-8 特異的 CTL が発症遅延に関与していることが示唆された。

【結論】Gag169-177 特異的 CD8⁺ T 細胞は *HLA-A*2601*、*-A*2603* においては高頻度に誘導されるエピトープであると考えられた。*HLA-B*5101* を持つ HIV-1 感染者においては Gag327-9 特異的 CD8⁺T 細胞や、Pol1743-9 特異的 CD8⁺ T 細胞よりも、Pol283-8 特異的 CD8⁺ T 細胞が効果的に働いていると考えられ、Pol283-8 特異的 CTL が認識する変異は *HLA-B*5101* を持つ LTNP における長期間の HIV-1 の抑制に関与している可能性を示した。

2. 学位論文の骨格となる参考論文

2-1) 関連論文

Kawashima, Y., Satoh, M., Oka, S., and Takiguchi, M.

Identification and characterization of HIV-1 epitopes presented by *HLA-A*2603*:

Comparison between HIV-1 epitopes presented by A*2601 and A*2603

Human Immunol. 66: 1155-1166. 2005

Kawashima, Y., Satoh, M., Oka, S., Shirasaka, T., and Takiguchi, M.

Different immunodominance of HIV-1-specific CTL epitopes among 3 subtypes of HLA-A*26 associated with slow progression to AIDS

BBRC, 2007, In press

川島 夕佳, 滝口 雅文

HIV の観点から

分子細胞治療. 2007. 6:52-56

2-2) その他の論文リスト

Fujiwara, M., Tanuma, J., Koizumi, H., Kawashima, Y., Honda, K., Mastuoka-Aizawa, S., Dohki, S., Oka, S., and Takiguchi, M.

Different Ability of Escape Mutant-Specific Cytotoxic T Cells to Suppress Replication of Escape Mutant and Wild-type HIV-1 in New Hosts

J. Virol., 2007, In press

3. 謝辞

本研究は熊本大学エイズ学研究センターウイルス制御分野にて行われた。本研究にあたり、多大なるご指導・ご支援を賜りましたエイズ学研究センターウイルス制御分野 滝口 雅文 教授、並びに度重なるご助言をくださいました上野 貴将 准教授に心から感謝申し上げます。貴重な患者検体を提供してくださいました国立国際医療センター・エイズ治療研究センターの岡 慎一 先生には心から感謝申し上げます。ウイルスシーケンスに関して多大なご助力を頂きました、国立国際医療センター・エイズ治療研究センターの潟永 博之 先生、蜂谷 敦子さんに心から感謝申し上げます。また、技術的なサポートを賜りましたエイズ学研究センターウイルス制御分野、道木 佐知 技術補佐員、また、事務的支援を賜りました酒井 幸子 教務補佐員、浦田 桂子 技術補佐員、有村 由香子 技術補佐員に合わせて御礼申し上げます。

最後に、多方面にわたりご協力頂き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教室員の皆様に心から感謝申し上げます。

4. 略語一覽

HIV: Human Immunodeficiency Virus

CTL: Cytotoxic T Lymphocyte

CD: Cluster of Differentiation

HLA: Human Lymphocyte Antigen

AIDS: Acquired Immunodeficiency Syndrome

SIV: Simian Immunodeficiency Virus

PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cell

PCR: Polymerase chain reaction

mAb: monoclonal Antibody

FCS: Fetal Bovine Serum

IL-2/-4: Interlokin-2/-4

FITC: Fluorescein Isothiocyanate

PE: Phycoerythrin

IgG: Immunoglobulin G

MACS: Magnetic Activated-Cell Sorting

NCS: Newborn Calf Serum

PBS: Phosphate Buffered Saline

FACS: Fluorescence Activated Cell Sorter

ELISA: Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay

E/S or E/T: Effector/Stimulator or Effector/Target

IFN- γ : Interferon- γ

MFI: Mean Fluorescent Intensity

HAART: Highly Activated Anti-retroviral Therapy

LTNP: long term nonprogressor

MHC: major histocompatibility complex

5. 研究の背景と目的

5-1)はじめに

HIV-1はヒトの体内でCD4⁺ T細胞やマクロファージを標的として感染し、増殖する。このため獲得免疫の誘導に重要な役割を果たす CD4⁺ T 細胞が徐々に減少し、感染者はやがて AIDS を発症する。

HIV-1 感染症においても、急性期に HIV-1 特異的免疫応答が誘導されることが知られており(1, 2)、これまでの研究によって、CTL が重要な役割を果たしていることが明らかになってきた(3, 4)。しかしながら、いまだなぜ免疫は HIV-1 の複製を制御できないのかは完全には明らかでなく、HIV-1 の複製を制御するためにはどのような免疫応答を誘導すればよいのか、ということがワクチン開発においても大きな課題となっている。

5-2) HIV-1 感染における CTL の役割

一般的なウイルス感染において細胞傷害性 T 細胞 (CTL) と中和抗体は、免疫応答の中心的役割を果たしている。また、サイトメガロウイルス (CMV) や Epstein-barr ウィルス (EBV) 感染に関する研究では CTL が抗ウイルス免疫において重要な役割を果たしていることが報告されている(5-7)。

ヒト免疫不全ウイルス I 型 (HIV-1) 感染においても HIV-1 特異的 CTL や中和抗体が誘導されることが知られている(1, 2)。

HIV-1 感染初期にはウイルス量の増加に伴い CD4⁺ T 細胞の減少が見られる。その後 CTL が誘導されて HIV-1 感染 CD4⁺ T 細胞は排除され、CD4⁺ T 細胞数は回復する。抗体は感染後、1～2ヶ月たってから検出されることが多い。このように HIV-1 感染においても免疫応答は起こっている、しかしながら、ヒトの免疫は HIV-1 を完全に排除することはできず、やがて CD4⁺ T 細胞が減少し、感染者は後天性免疫不全症候群 (AIDS) を発症する。

一方で、HIV-1 感染者には長期間にわたって AIDS を発症しない、長期未発症者 (LTNP) が存在することが知られている(8-9)。このような LTNP では CTL 活性が高く、進行の早いヒトでは CTL 活性が低いという報告や高頻度に HIV-1 に暴露されながらも HIV-1 に感染していないヒトで HIV-1 特異的 CTL 活性がみられたという報告もある(11-17)。さらにサルとサル免疫不全ウイルス (SIV) を用いた動物モデルによる研究からも CTL が HIV-1 感染における免疫応答に重要な役割を果たしていることが示されている(18, 19)。

5-3) ウイルス感染における HLA の役割

ウイルス感染細胞では細胞質内でウイルスタンパク質が合成され、細胞質内のプロテアソームで切断されて 9~15 アミノ酸残基からなるペプチドになる。このペプチドは抗原処理関連トランスポーター(transporters associated with antigen processing : TAP)によって粗面小胞体(endoplasmic reticulum : ER)内に運ばれ、さらにアミノペプチダーゼによって 8~9 アミノ酸残基程度のペプチドになる。そして ER 内でペプチドは HLA クラスIの重鎖、 $\beta 2$ マイクログロブリン($\beta 2m$)と結合し、安定した HLA-ペプチド複合体を形成し、膜輸送によって細胞表面へ運ばれる。抗原特異的 CTL は T 細胞レセプター(TCR)を介して感染細胞表面上の HLA-ペプチド複合体を認識する。提示されるペプチドは HLA クラス I の型によって異なっており、HLA 分子とペプチドをつなぐ役割をしているアミノ酸をアンカーと呼んでいる。さらに、HLA クラス I は多様性の高い遺伝子であるため、HLA ハプロタイプによって異なった細胞性免疫を誘導する。このため、細胞性免疫誘導型のワクチン開発のためにはそれぞれの HLA に提示されるペプチドである、エピトープの同定が重要になる。

5-4) HIV 感染症における病態進行と HLA 遺伝子型

HIV 感染症において、病態進行と関係するさまざまな遺伝学的要因が報告されている。HIV-1 が感染する際のコレセプターである、CCR5 の変異体 CCR5 Δ 32 は感染抵抗性と発症遅延に関係する因子として有名である(20, 21)。また、HLA 遺伝子型も AIDS の病態進行との相関が知られている。HLA クラスIは主に HLA-A、B、C の 3 つのローカスで構成され、一人のヒトはこれを二つの染色体上にもつ、つまり最大 6 つの HLA クラスIを持つことになる。この種類が多いほど提示できる抗原ペプチドの種類が多くなり、より多様な CTL の反応を期待できる。両方の染色体上に同一の HLA を持つヒト(Homozygote)も存在する。Homozygote は二つの染色体上に異なる HLA を持つヒト(Heterozygote)に比べて、AIDS への病態進行が早いことが報告されている(22, 23)。また、HLA-B27、-B57、-B51、-A26、-A11 は病態進行の遅延と、HLA-B35 は病態の早期進行との相関が報告されている(24-27)。実際に AIDS 長期未発症者では発症遅延と相関するアレルを持つ人が多く存在する(28)。これらは HLA 分子を介する CTL による免疫応答が HIV 感染の制御において重要であること、HIV 特異的な CTL の有効性は提示されるペプチドの種類や構造によって異なることを示している。

さらに近年、大規模な HIV 感染者コホートを対象に HLA 遺伝子と病態進行の集団遺伝学的解析と HIV-1 特異的 CTL の機能解析が行われ、HLA クラス I の A、B、C のうち HLA-B に拘束性の CTL が最も病態進行の遅延と相関すると報告された(27)。

5-5) HIV-1 の CTL からの逃避

HIV-1 ゲノム RNA は逆転写される際のエラーが多いため、HIV-1 は非常に変異性が高い。計算上はゲノム上のいずれかの塩基に変異を持つウイルスが毎日複製されていることになる。抗 HIV 薬存在下では HIV-1 は変異を起こすことで、薬剤耐性を獲得する事が知られている。CTL 応答に対しても、HIV-1 は CTL エピトープ領域やその近傍に変異を獲得し、CTL から逃避することが明らかになってきた(3, 4, 11, 29, 30)。エピトープ領域の変異による CTL からの逃避はいくつかの機序が考えられている(図1)。

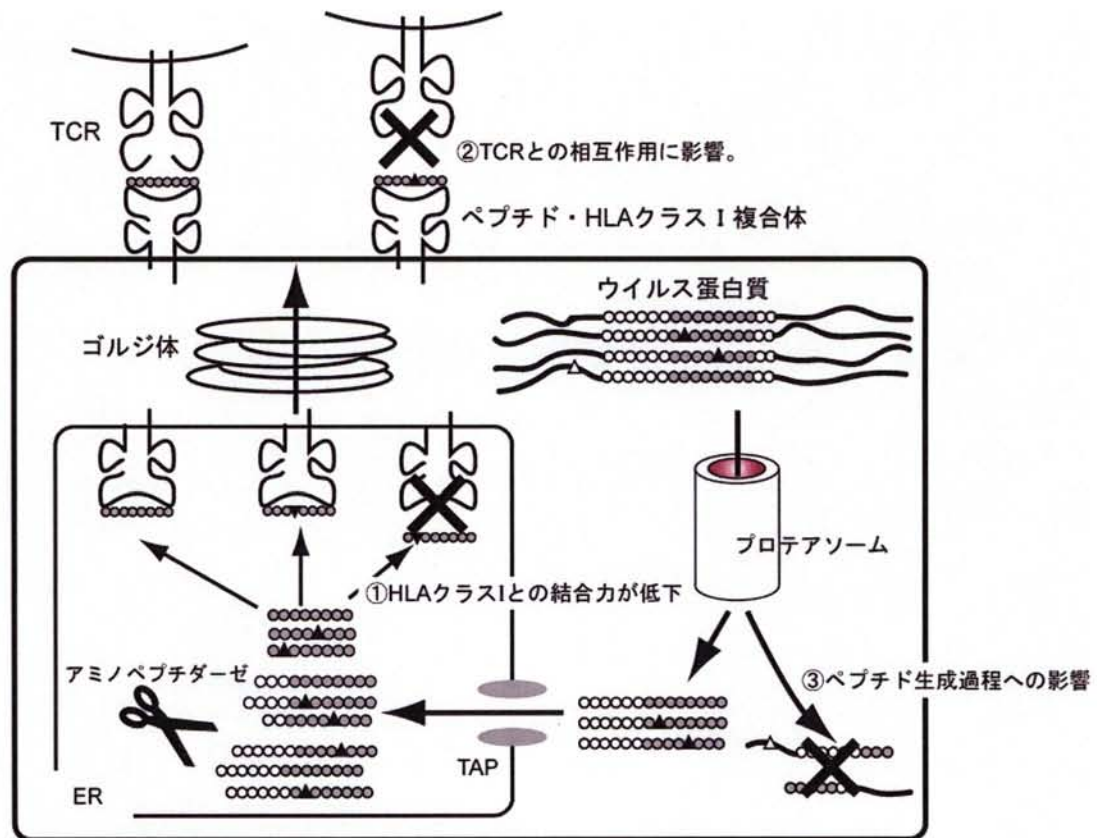


図1. 変異獲得によるCTLからの逃避

HIV-1は、CTLエピトープ領域およびその隣接領域に変異を獲得し、CTLから逃避する。

①エピトープ内の変異によってHLAクラスIとの結合能が低下。②エピトープ内の変異によってT細胞レセプター(TCR)による認識が低下。③エピトープ領域または隣接領域の変異によってプロセッシングされる位置が変化しエピトープペプチドの生成が阻害される。

第一に、エピトープ領域の変異によって HLA 分子との結合力が低下し、感染細胞表面への抗原提示量が減少する。第二に、エピトープ領域の変異が TCR との相互作用に影響を及ぼす。第三に、CTL エピトープの近傍の変異による HIV-1 の CTL からの逃避がある。エピトープ領域の近傍に変異が起きると、プロテアーゼがタンパク質を切断する位置が変化することがあり、これによってエピトープペプチドが生成されなくなるという報告がある(30)。HIV 感染者の HIV-1 遺伝子配列を調べると、同じ HLA 分

子を持つ人でエピトープ、またその近傍に共通の変異が認められることが知られている。これは CTL による免疫選択圧のため、変異を持たない HIV-1 は CTL によって排除されることで、CTL から逃れる変異を持つ HIV-1 が選択され、増殖していることを示している。

5-6) HIV-1 特異的 CTL と AIDS 病態進行

HLA-B27 拘束性の Gag エピトープ KK10(KRWIILGLNK)は HLA-B27 を持つ感染者の多くで誘導され、CTL 応答を示すことが知られている(31, 32)。HIV-1 感染後、数年間、血中のウイルス量が低く抑えられていた感染者ではこのエピトープ特異的 CTL が誘導されていた(31, 32)。しかし、このエピトープ領域に CTL が認識できない変異が起るのとはほぼ同時期に血中のウイルス量の増加が認められた(32)。また、*HLA-B*5701* 拘束性エピトープ ISW9(ISPRTLNAW)では N 末から 1 アミノ酸外側の隣接領域の変異は CTL からの逃避変異であり、患者のウイルス量と相関するという報告がある(30)。こうしたことから、変異の獲得による HIV-1 の CTL からの逃避が病態進行に関わっていることが示唆されている。しかしながら、どのような CTL エスケープ変異と病態の進行が関連するのかについては明らかになっていない。

また HIV-1 の変異にかかわる要因として HIV-1 の複製効率への影響がある。HIV-1 の複製に重要な領域に CTL エピトープが存在した場合、逃避変異が HIV-1 の複製効率を低下させ、HIV-1 の増殖抑制に働く可能性が考えられる。SIV を用いた感染モデルの研究からこのような現象が報告されている(33)。ヒトにおける研究では HLA-B57 拘束性エピトープ TW10(TSTLQEQIAW)は N 末から 3 番目のアミノ酸(P3)の変異は特異的 CTL からの逃避変異であり、この変異はウイルスの増殖に影響を与える(34, 35)。このため、HLA-B57 を持たないヒトに感染した場合はこの変異は野生型の配列に戻ることが報告されている(34)。このことから、ヒトにおいてもウイルスの複製に影響を与える変異が病態進行に関連していることが推察される(36)。

一方で、近年大規模な HIV-1 感染者集団における CTL の反応性を調べた研究により、HLA の型によらず、HIV-1 の Gag に特異的な CTL 反応を示す集団では Gag 特異的な CTL の反応が無い集団と比較してウイルス量が有意に低いことが報告された(37)。また、HLA-B08 を持つ AIDS 長期未発症者において、HIV-1 の Nef 由来のエピトープ特異的 CTL を解析した研究では、特定の TCR を持つ CTL は他の TCR を持つ CTL と比べて、CTL の増殖能が高く、変異エピトープも認識できることが報告されている(38)。この結果から同一の抗原を認識する CTL であっても、TCR の違いによって抗ウイルス活性に違いがあることが示された。

当研究室の Tomiyama らは Nef タンパクによる HLA クラス I 抗原の発現低下が HIV-1 特異的 CTL の抗ウイルス活性に与える影響を網羅的に解析することによって、

その影響が抗原依存的であることを明らかにした(39)。

これらのことから、抗ウイルス効果の優れた CTL が存在すること、さらに抗原によって抗ウイルス効果の異なる CTL が誘導されていることが示唆されており、近年、HIV-1 の抑制における CTL の質が注目されている。

5-7) 本研究の目的

本研究では、AIDS 発症遅延と関連する HLA クラス I アレルである HLA-A26 と HLA-B*5101 に注目し解析を行った。HLA-B27 や HLA-B57 については欧米で多くの研究がなされている。しかし、日本人ではこれらの HLA クラス I アレルを持つヒトは非常にまれである。このため、日本においてそれぞれ 11.5%、8.3%の遺伝子頻度である(40)、HLA-A26とHLA-B51に拘束される CTL の解析は日本人の HIV-1 感染者における病態進行と免疫応答を解析する上できわめて重要である。

HLA-A26には25のサブタイプが同定されており、日本人においては、HLA-A*2601、-A*2602、-A*2603の3つのサブタイプが主に見られる。当研究室の Satoh らによって、これまでに HLA-A*2601 に提示されるエピトープが同定されているが(41)、-A*2602、-A*2603 に提示されるエピトープについては報告がない。このため、まず HLA-A*2602、-A*2603 に提示されるエピトープの同定を行い、3つの HLA-A26 のサブタイプに拘束されるエピトープ特異的な CTL の解析を行った。

発症遅延と関連するもう一つのアレルである、HLA-B*5101 についてはエピトープが同定されている。さらに、3つのエピトープ(Gag327-9、Pol283-8、Pol743-9)特異的な CTL が HIV-1 感染者で高頻度に誘導される。これらのエピトープ特異的 CTL の AIDS 発症遅延への関与が示唆された。そこで、この3つのエピトープ特異的 CTL が HLA-B*5101 を持つ長期未発症者(LTNP)で HIV-1 の増殖抑制に働いているのかを明らかにするために解析を行った。AIDS 発症遅延と関連する HLA に拘束される CTL の解析によって、これらの CTL が生体内でのウイルス増殖抑制にどのように働いているのかを明らかにすることを目的とした。

6. 実験方法

6-1) 本研究に使用した材料

a. 細胞と培地

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%FCS を含む RPMI1640 で培養した。RMA-S-A*2603、RMA-S-A*2602、RMA-S-B*5101 は RMA-S 細胞にヒトβ2m と *HLA-A*2603*、*-A*2602*、*-B*5101* をそれぞれ発現させた細胞であり、以前に樹立された(42, 43)。RMA-S-A*2603 は 0.3mg/ml hygromycine B と 10%ウシ胎仔血清 (FCS)を含む RPMI1640 で、RMA-S-A*2602、RMA-S-B*5101 は 0.15mg/ml hygromycine B と 10%ウシ胎仔血清 (FCS)を含む RPMI1640 で培養した。C1R-A*2603、C1R-A*2602、C1R-B*5101 は C1R 細胞に *HLA-A*2603*、*-A*2602*、*-B*5101* をそれぞれ発現させた細胞であり、以前に樹立された(44, 45)。C1R-A*2602、*-A*2603* は 0.15mg/ml neomycine と 10%FCS を含む RPMI1640 で、C1R-B*5101 は 0.15mg/ml hygromycine B と 10%ウシ胎仔血清 (FCS)を含む RPMI1640 で培養した。721.221-B*5101 細胞は HLA-class Iを発現していない B 細胞株である 721.221 細胞にヒト CD4 遺伝子と *HLA-B*5101* 遺伝子を導入して作製したものであり(46)、0.15mg/ml hygromycine B と 10%ウシ胎仔血清 (FCS)を含む RPMI1640 で培養した。

b. ペプチド

合成ペプチドは、automated multiple synthesizer で作成された。作成したペプチドは 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. 血液検体

本研究で用いた血液はすべて、熊本大学大学院医学薬学研究部等倫理委員会承認の研究計画に則し、また国立国際医療センター倫理委員会、国立病院機構大阪病院倫理委員会の承認を受け、インフォームドコンセントの得られた成人健常人および HIV-1 感染者から採取した。Ficoll (Ficoll-Paque PLUS; GE Healthcare UK Ltd, Buckinghamshire, England) 比重遠心法によって末梢血単核球細胞 (PBMCs) と血漿に分離した。

d. 抗体

抗マウス IgG FITC 標識抗体は CHEMICON(Australia)より購入した。抗ヒト IFN-γ FITC 標識は BD Biosciences (San Jose, USA)より購入した。抗ヒト CD8 PE 標識、抗ヒト CD8 FITC 標識抗体 Daco Cytomation(Denmark)より購入した。抗 HIV p24 FITC 標識抗体は Beckman Coulter (Fullerton, USA)より購入した。抗 HLA class I α3

domein 抗体 TP25.99 はアメリカ Roswell Park Cancer Institute の Soldano Ferrone 先生より分与して頂いた。

e. HIV-1 特異的 CTL クローン

2種類の *HLA-B*5101* 拘束性 HIV-1 由来エピトープ (Pol743-9[LPPVVAKEI]、Pol283-8[TAFTIPSI])(47)は HIV-1 感染者由来の PBMCs から樹立した。各エピトープペプチドで PBMCs を刺激後2週間培養し、バルク CTL を作製した。X 線照射した健康人由来の PBMCs (5×10^5 /well)と特異的ペプチドをパルスした C1R-B*5101 (1×10^5 /well)をバルク CTL (0.8/well)と共に 96 穴 U 底プレートに播種し、2週間培養した。培地には、10%FCS と 200U/ml 組換え型ヒト IL-2(味の素株式会社より分与)を含んだ RPMI-1640(クローニング培地)を用いた。2週間後、増殖した細胞の抗原特異的な細胞傷害活性を ^{51}Cr 放出試験によって評価した。

f. HLA クラスIテトラマー

以前に報告されている方法で作成した(48)。組み換え HLA クラスIタンパク (HLA-B5101)と $\beta 2\text{m}$ 発現プラスミドを導入した大腸菌で産生させた。HLA クラス I の α 鎖は膜貫通細胞内末端を欠損させ、C 末端に BirA のビオチン化部位を含む配列を付加した。4 種類の *HLA-B*5101* 拘束性 HIV-1 由来エピトープ (Pol743-9 [LPPVVAKEI]、Pol283-8 [TAFTIPSI]、Gag327-9 [NANPDCKTI]、Rev71-11 [VPLQLPPLERL])(47,49)と HLA-B5101 分子を用いてリホールディングを行った。形成された HLA クラス I ペプチド複合体は superdex G75 カラム(GE Healthcare Bio-Sciences 社)にてゲル濾過し精製した。精製した HLA クラスIペプチド複合体は BirA 酵素(Avidity; Sigma-Aldrich 社)にてビオチン標識を行い、その後再度 superdex G75 カラムにて精製し、さらに MonoQ カラム(GE Healthcare Bio-Sciences 社)にて精製した。精製した HLA クラスIペプチド複合体(モノマー)を分子比 4:1 で PE 標識された streptavidin (Molecular Probes 社)と反応させて4量体化しテトラマーを得た。

g. HIV-1 クローン

pNL-432 は、徳島大学 足立教授より分与いただいた。pNL-Pol283-8T、pNL-Pol283-8V、pNL-Pol283-8L、pNL-Pol283-8R、pNL-Pol743-4I5I、pNL-Pol743-5I、pNL-Pol743-1Iは pNL432 の Pol 領域に変異を導入した変異体である。

pNL-432 への変異の導入には、GeneTailorTM Site-Directed Mutagenesis System (Invitrogen, California, USA)を使用した。まず、プラスミド DNA を DNA メチラーゼでメチル化した。メチル化プラスミド DNA をテンプレートにして、変異導入用プライマ

ーを用いてPCR (Polymerase chain reaction)を行い、変異を導入したプラスミド DNAを増幅した。増幅した DNA を *McrBC*⁺大腸菌株 DH5 α TMT1^R にトランスフォームした。*McrBC* エンドヌクレアーゼはメチル化したテンプレートのみを消化するので、メチル化されていない変異を導入した DNA は環状化されて残る。増殖したコロニーから変異を導入したプラスミド DNA を抽出した。

6-2)リバーシ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 CD8⁺ T 細胞エピトープの同定はリバーシムノジェネティクス法を用いた(41, 47, 49)。

【ステップ1】

目的とする HLA のペプチド結合モチーフを検索する。

HLA クラスIはアレルによって特有のペプチド結合モチーフがあることがわかっている。*HLA-A*2602*、*-A*2603* では N 末から 2 番目 (Position 2:P2) にバリン (Val: V)、スレオニン (Thr: T)、イソロイシン (Ile: I)、ロイシン (Leu: L)、また、C 末端にチロシン (Tyr: Y)、フェニルアラニン (Phe: F)、メチオニン (Met: M)、ロイシンである(44)。さらに、ペプチドの 1 残基目に酸性のアミノ酸、アスパラギン酸 (Asp: D)、グルタミン酸 (Glu: E) が C 末端には陽電荷のアミノ酸以外の広範囲のアミノ酸がアンカーとして働くことが報告されている(42)。

【ステップ2】

HLA クラスI の結合ペプチドモチーフに該当するアンカーをもつアミノ酸配列を HIV-1 たんぱくのアミノ酸シーケンスデータから検索し、これらのペプチドを合成する。

【ステップ3】

HLA-ペプチド結合アッセイにより、HLA クラス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。

【ステップ4】

結合したペプチドを用いて、目的とする HLA を持つ HIV-1 感染者由来の PBMC を *in vitro* で刺激し培養する。PBMC 中にペプチド特異的 CD8⁺ T が存在する場合には、選択的に特異的 CD8⁺ T が増殖する。

【ステップ5】

In vitro で培養、刺激した PBMC をペプチドパルスした細胞(目的の HLA を発現)で

刺激し、CD8⁺ T 細胞中の IFN- γ 産生能を測定する。また、目的のペプチドが細胞内でプロセッシングされ、細胞表面に提示されることを示すために、HIV-1 タンパクを発現する組み換えワクシニアウイルスに感染した細胞で刺激し、CD8⁺ T 細胞中の IFN- γ 産生能を測定する。両方の細胞に対し IFN- γ 産生能が認められたときに CD8⁺ T 細胞エピソードとして同定した。

6-3) HLA-ペプチド結合アッセイ

HIV-1 由来のペプチドと HLA との結合能はすでに確立されている HLA stabilization assay を用いて測定した(42)。各 HLA を発現した RMA-S 細胞を 26°C で 16 時間培養した後、 10^{-3} ~ 10^{-7} M のペプチドを加え 26°C で 1 時間培養した。その後さらに 37°C で 3 時間培養した。これらの細胞は HLA class I $\alpha 3$ ドメイン特異的単クローン抗体 TP25.99(50)と FITC-conjugated sheep IgG anti-mouse immunoglobulin を用いて染色した。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 で培養した細胞の 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、 10^{-3} M の濃度でパルスしたときの MFI が 25%以上のものを結合ペプチドとし決定した。また、50%の MFI を与えるペプチド濃度を BL₅₀として算出した。

HLA stabilization assay の原理は次の通りである。RMA-S 細胞は抗原提示に関連している、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である。RMA-S 細胞に HLA 遺伝子を形質導入した細胞は、26°C で培養するとペプチドを結合していない空の HLA を細胞表面に発現する。26°C で培養後、合成ペプチドを添加し、その後さらに 37°C で培養するとペプチドと結合していない空の HLA は細胞表面から消失する。その割合を HLA 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の HLA 分子を FACS で測定することで、HLA に対するペプチドの結合能が解析できる。

6-4) HIV-1 感染者由来末梢血単核細胞の *in vitro* 刺激

HIV-1 感染者の血液より分離した末梢血単核細胞(PBMC)は合成ペプチドを用いて刺激し、*in vitro* において HIV-1 特異的 CD8⁺ T 細胞の誘導を試みた。

PBMC を 10^6 M のペプチド、またはペプチドカクテルを添加した culture medium (10% FCS と 200U/ml 組換え型ヒト IL-2 を含む培地)と混合し 96 穴 U 底プレートに播種して 10~14 日培養した。その後、刺激したのと同じペプチドに対する反応性を IFN- γ の産生能を測定することで、ペプチド特異的 CD8⁺ T 細胞であることを確認した。IFN- γ の産生を確認できた細胞をバルク CD8⁺ T 細胞とした。

6-5) ワクシニアウイルス感染細胞

ワクシニアウイルス溶液 (1×10^6 PFU) に HLA 発現 C1R 細胞 (1×10^5) を懸濁し、14~16 時間 37°C で培養した。反応後、培養液中のウイルス粒子を取り除くために細胞を R10 培地で3回洗浄し、実験に用いた。

6-6) IFN- γ 産生能の測定

HLA を発現させた C1R 細胞に 37°C で 1 時間 10^{-6} M のペプチドをパルスした後、10%NCS を含む RPMI-1640 培地で 2 回洗浄した。ペプチドをパルスした HLA 発現 C1R 細胞、または HIV-1 組み換えワクシニアウイルス感染 HLA 発現 C1R 細胞と *in vitro* でペプチド刺激し、培養した HIV-1 感染者由来の PBMC は Brefeldin A (10 μ g/ml) を加えたのち 37°C で 6 時間共培養した。その後、抗 CD8 PE 標識抗体で染色し、4% paraformaldehyde を含む PBS を用いて 4°C で 20 分間固定し、さらに 0.1% の界面活性剤 (saponin) と 20%NCS を含んだ PBS (Permeabilizing buffer) で細胞膜透過処理を 4°C で 10 分間行った。続いて抗 IFN- γ FITC 標識抗体を用いて、室温で 20 分染色した。染色後、Permeabilizing buffer にて細胞を3回洗浄した。CD8 陽性細胞における IFN- γ の産生能を FACS Calibur (BD Biosciences) を用いて測定した。

6-7) 細胞傷害活性の測定

CTL の細胞傷害活性は、以下の標準的な ^{51}Cr 放出試験によって解析した(39, 51)。HIV-1 感染細胞に対する細胞傷害活性を解析するときは、p24 陽性細胞の頻度が 40~50% に達していることをフローサイトメトリーによって確認した細胞を標的細胞として用いた。標的細胞 (2×10^5) を 3.7 MBq $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (Perkin Elmer, Massachusetts, USA) を用いて 37°C で 1 時間標識した。標識後、10%NCS を含む RPMI-1640 培地で 3 回洗浄した。標識した細胞をエプトープペプチド溶液または PBS の入った 96 穴 U 底プレートに播種 (2×10^3 /well) し、37°C で 1 時間培養した。その後エフェクター細胞として HIV-1 特異的 CTL クローンを播種 (4×10^3 /well) し、4~6 時間 37°C で混合培養した。培養終了後、細胞を遠心分離し、各ウェルから培養上清を回収して γ 線カウンタにて放射線量を測定した。

標的細胞のみで培養したウェルの培養上清中の放射線量を spontaneous の ^{51}Cr 放出量 (cpm spt) とした。また、2.5% Triton X-100 を添加して標的細胞を溶解したウェルの培養上清中の放射線量を maximum の ^{51}Cr 放出量 (cpm max) とした。特異的細胞傷害活性 (specific lysis) は、エフェクター細胞を添加したウェルによる ^{51}Cr 放出量 (cpm exp) を用いて下記のように算出した。Specific lysis = {(cpm exp - cpm spt) /

(cpm max – cpm spt)} x 100。

6-8) テトラマーを用いた細胞染色

HIV-1 感染者から分離した PBMC を HLA クラス I テトラマーにて 37℃ で 30 分間反応させた。反応後、細胞を 10%NCS を含む RPMI-1640 培地で 2 回洗浄し、抗 CD8 抗体にて 4℃ で 30 分間染色した。その後、FACS Calibur (BD Biosciences) を用いて測定した。

6-9) HIV-1 感染細胞

a. CD4⁺T 細胞の分離と培養

CD4⁺ T 細胞は、Ficoll 比重遠心法によって分離した PBMCs から MACS (Magnetic activated-cell sorting) 法を用いて分離した。分離には、磁気ビーズ標識抗ヒト CD4 抗体 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) と AutoMACS (Miltenyi Biotec) を使用した。分離後、CD4 分子の発現をフローサイトメトリーで確認し、実験に用いた (>95% CD4⁺細胞)。

b. ウイルスストックの作製

293T 細胞をコラーゲン IV コート 75cm² フラスコ (IWAKI) で 90~95%コンフルエントな状態まで培養する。プラスミド DNA とリポフェクトアミン 2000 (Invitrogen, California, USA) の混合溶液を培養液に添加し、10%FCS を含んだ D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 培地で培養した。48、72 時間後に回収した培養液からアリコートを作製し、実験に用いるまで -80℃ で保存した。

c. HIV-1 感染

分離した CD4⁺T 細胞を、抗ヒト CD3 抗体 (OKT3) を固層化した 6 穴プレートに播種し、200U/ml IL-2 と 10ng/ml IL-4 (R&D Systems, Minnesota, USA) を含む R10 培地で 1 週間培養した。活性化した CD4⁺ T 細胞 (2x10⁶) を 1ml R10 培地に懸濁し、ウイルスストック溶液 (100~200ng p24 タンパク) を加えた。ウイルスストック溶液に懸濁したあと、6~12 時間 37℃ で培養した。反応後、培養液中のウイルス粒子を取り除くために細胞を R10 培地で 3 回洗浄し、実験に用いた。

6-10) CTL による HIV-1 増殖抑制能の測定

HIV-1 特異的 CTL のウイルス増殖抑制能は、研究室で確立された方法を用いて

測定した(38, 50)。ウイルスストック溶液(100~200ng p24 タンパク)に CD4⁺ T 細胞を懸濁し、6~12 時間 37℃で培養した。反応後、培養液中のウイルス粒子を取り除くために細胞を R10 培地で3回洗浄した。感染細胞 (2x10⁵/well) を HIV-1 特異的 CTL クローンと共に 96 穴プレートに播種する。CD4⁺ T 細胞は 96 穴 U 底プレートに播種した。培養には、クローニング培地を用いた。CTL との混合培養から 3、6、9、12 日目に培養上清を半量回収し、新しい培地を加えた。回収した培養上清中の p24 タンパク量を ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay; HIV-1 p24 ELISA kit, ZeptMetrix, New York, USA) を用いて測定した。HIV-1 特異的 CTL のウイルス増殖抑制能(%) は、以下のように算出した。ウイルス増殖抑制能(%) = (1 - CTL と混合培養したウイルスの p24 濃度 / CTL を加えていないウェルの p24 濃度) x 100。

6-11) HIV-1 シークエンス

HIV-1 ゲノム DNA は HIV-1 感染者由来 PBMC から QIAamp DNA Blood Mini kit (QIAGEN) を用いて抽出した。ウイルス RNA は感染者由来の血漿から QIAamp Mini Elute Virus spin Kit (QIAGEN) を用いて抽出した。ウイルス RNA からの cDNA の合成は superscript III と random primer (Invitrogen) を用いて行った。HIV-1 の reverse transcriptase (RT) 領域(Pol283-8 を含む領域)と Integrase 領域(Pol743-9 を含む領域)と Gag 領域(Gag327-9 を含む領域)は以下に示すプライマーセットを用いて nested PCR 法により増幅した。RT 特異的プライマー 5'-CCAAAAGTTAAGCAATGGCC-3' と 5'-CCCATCCAAAGGAATGGAGG-3' または 5'-CCTTGCCCCTGCTTCTGTAT-3' を 1 回目の PCR プライマーとして、5'-AGTTAGGAATACCACACCCC-3' と 5'-GTAAATCCCCACCTCAACAG-3' または 5'-AATCCCCACCTCAACAGAAG-3' を 2 回目の PCR プライマーとして使用した。また Integrase 特異的プライマー 5'-ATCTAGCTTTGCAGGATTCGGG-3' と 5'-CCTTAACCGTAGTACTGGTG-3' または 5'-CCTGATCTCTTACCTGTCC-3' を 1 回目の PCR プライマーとして、5'-AAAGGTCTACCTGGCATGGG-3' または 5'-TTGGAGAGCAATGGCTAGTG-3' と 5'-AGTCTACTTGTCATGCATGGC-3' を 2 回目の PCR プライマーとして使用した。また Gag 特異的プライマー 5'-GGAAGTACTAGTACCCTTCAGG-3' または 5'-GGATAGATTGCATCCAGTGC-3' と 5'-GGATACAGTTCCTTGTCTATCG-3' を 1 回目の PCR プライマーとして、5'-GTAAGAATGTATAGCCCTACC-3' と 5'-GGAGTTGTTGTCTCTTCCCC-3' または 5'-GGAAGTACTAGTACCCTTCAGG-3' と 5'-CCAACAGCCCTTTTCCTAGG-3' を 2 回目の PCR プライマーとして使用した。PCR 産物を直接シークエンスするか、またはクローニングしてシークエンスした。クローニングは TOPO TA cloning kit (Invitrogen) を用いて行い、その後シークエンスした。シークエンスは Big dye terminator v1.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems) を用い

て行い、ABI PRISM 310 genetic analyzer を用いて解析した。

7. 実験結果

7-1) *HLA-A*2602* および *-A*2603* に提示される HIV-1 特異的 CD8⁺ T 細胞エピートープの同定

a. *HLA-A*2602* および *-A*2603* に対する HIV-1 由来ペプチドの結合能

*HLA-A*2602*、*HLA-A*2603* 結合ペプチドは2つのアンカーを持つことが報告されている。報告されているアンカーはペプチドのN末から2番目 (Position 2: P2) にバリン(Val: V)、スレオニン(Thr: T)、イソロイシン(Ile: I)、ロイシン(Leu: L)、また、カルボキシ末端 (C 末端) にチロシン(Tyr: Y)、フェニルアラニン(Phe: F)、メチオニン(Met: M)、ロイシンである(44)。さらに、ペプチドの 1 残基目に酸性のアミノ酸、アスパラギン酸(Asp: D)、グルタミン酸(Glu: E)が C 末端には陽電荷のアミノ酸以外の広範囲のアミノ酸がアンカーとして働くことが報告されている(42)。これらのことから、HIV-1 SF2 株の Gag、Pol、Env、Nef のシークエンスから *HLA-A*2602*、*-A*2603* の binding motif(P1: Asp または Glu、P2: Val、Thr、Ile、Phe、C 末端:陽電荷以外のアミノ酸)に一致する 8~11 残基のペプチド 110 個を選択し、合成した。

TAP 欠損細胞である RMA-S-A*2602 または RMA-S-A*2603 細胞を用いて HLA-stabilization assay によって *HLA-A*2602* または *HLA-A*2603* とのペプチドの結合能を測定した。26℃で培養した RMA-S-A*2603 の蛍光強度の 25%以上を示すペプチドを結合ペプチドとした。その結果 32 個のペプチドが *HLA-A*2602* に、31 個のペプチドが *HLA-A*2603* に結合した。これら結合ペプチドの結合能を BL₅₀ によって表した(表 1、2)。

表 1. HLA-A*2602 に結合したペプチド

Sequence	Position	BL50(M)*
EVFRPGGGDM	env 464-473	3.9×10^{-7}
EVIPMFSAL	gag 169-177	5.8×10^{-7}
ELKKIIGQV	pol 872-880	9.8×10^{-6}
EVNIVTDSQY	pol 647-656	1.2×10^{-5}
EVVIRSDNF	env 272-280	4.1×10^{-5}
ELNKRTQDF	pol 234-242	1.0×10^{-4}
EIKGEIKNCSF	env 147-157	1.6×10^{-4}
DIVIYQYMDDL	pol 332-342	1.9×10^{-4}
DTTNQKTEL	pol 626-634	2.7×10^{-4}
EIVASCDKCQL	pol 750-760	3.5×10^{-4}
ETVPVKLKPGM	pol 161-171	4.2×10^{-4}
ETWEAWWMEYW	pol 551-561	6.2×10^{-4}
ETWEAWWMEY	pol 551-560	$>1 \times 10^{-3}$
EICGHKAIGTV	pol 121-131	$>1 \times 10^{-3}$
EVVLGNVTENF	env 82-92	$>1 \times 10^{-3}$
DLRSLCLFSY	env 758-767	$>1 \times 10^{-3}$
DLWIYHTQGYF	nef 115-125	$>1 \times 10^{-3}$
EVIPLTEEA	pol 446-454	$>1 \times 10^{-3}$
ETPGIRYQY	pol 293-301	$>1 \times 10^{-3}$
EVYYDPSKDLV	pol 471-481	$>1 \times 10^{-3}$
EVYYDPSKDL	pol 471-480	$>1 \times 10^{-3}$
ETKLKGAGYV	pol 604-613	$>1 \times 10^{-3}$
EVHNVWATHAC	env 63-73	$>1 \times 10^{-3}$
EVQLGIPHPA	pol 244-253	$>1 \times 10^{-3}$
ELYPLTSLRS	gag 484-493	$>1 \times 10^{-3}$
DLNTMLNTV	gag 185-193	$>1 \times 10^{-3}$
DVKQLTEAV	pol 519-527	$>1 \times 10^{-3}$
ELYPLTSLRSL	gag 484-494	$>1 \times 10^{-3}$
DIQKLVGKL	pol 411-419	$>1 \times 10^{-3}$
DIAGTTSTL	gag 235-245	$>1 \times 10^{-3}$
ELRQHLLRW	pol 359-367	$>1 \times 10^{-3}$
DTKEALEKI	gag 96-104	$>1 \times 10^{-3}$

表 2. HLA-A*2603 に結合したペプチド

Sequences	Position	BL50(M)*
EVHNVWATHA	env 63-72	7.6×10^{-7}
EVIPMFSAL	gag 169-177	2.1×10^{-6}
EVIPLTEEA	pol 446-454	1.4×10^{-6}
ELYPLTSLRSL	gag 484-494	1.3×10^{-5}
ETINEEAAEW	gag 205-214	3.3×10^{-5}
ETPGIRYQY	pol 293-301	5.9×10^{-5}
EVFRPGGGDM	env 464-473	3.7×10^{-5}
ELKKIIGQV	pol 872-880	1.1×10^{-4}
EVAQRAYRA	env 830-838	5.5×10^{-4}
ELVSQIEQLI	pol 671-681	6.3×10^{-4}
EVNIVTDSQYA	pol 647-657	6.6×10^{-4}
EVHNVWATHAC	env 63-73	$10^{-4}-10^{-3}$
DIVIYQYMDDL	pol 332-342	$10^{-4}-10^{-3}$
ETKLKGAGYV	pol 603-613	$10^{-4}-10^{-3}$
EVYYDPSKDL	pol 471-480	$10^{-4}-10^{-3}$
EILGHRGWEA	env 782-791	$10^{-4}-10^{-3}$
EVVIRSDNF	env 272-280	$10^{-4}-10^{-3}$
DIVIYQYM	pol 332-339	$10^{-4}-10^{-3}$
EVNIVTDSQY	pol 647-656	$10^{-4}-10^{-3}$
EVQLGIPHPA	pol 244-253	$10^{-4}-10^{-3}$
ELRSLYNTV	gag 74-82	$10^{-4}-10^{-3}$
ELYPLTSLRS	gag 484-493	$10^{-4}-10^{-3}$
EICGHKAIGTV	pol 121-131	$>10^{-3}$
EIKGEIKNCSF	env 147-157	$>10^{-3}$
ETWEAWWMEY	pol 551-560	$>10^{-3}$
EILGHRGWEAL	env 782-792	$>10^{-3}$
EVYYDPSKDLV	pol 471-481	$>10^{-3}$
EVVLGNVTENF	env 82-92	$>10^{-3}$
ETVPVKLKPGM	pol 161-171	$>10^{-3}$
DLLLIAARTV	env 786-795	$>10^{-3}$
ELVSQIEQL	pol 671-680	$>10^{-3}$

b. ペプチド特異的 CD8⁺ T 細胞の誘導

*HLA-A*2602* に結合した 32 個のペプチド、または *HLA-A*2603* に結合した 31 個のペプチド、5~7 個をまとめてペプチドカクテルとし(*HLA-A*2602*-カクテル 1: Env464-473、Gag169-177、Pol647-656、Pol872-880、Pol551-560； カクテル 2: Env272-280、Pol121-131、Env82-92、Pol551-561、Env758-767、Pol234-242、Nef115-125； カクテル 3: Pol446-454、Pol293-301、Pol471-481、Pol471-480、Pol604-613、Env 147-157、Env 63-73； カクテル 4: Pol244-253、Gag484-493、Gag185-193、Pol626-634、Pol519-527、Gag484-494、Pol411-419； カクテル 5: Gag235-243、Pol359-367、Pol161-171、Gag96-104、Pol750-760、Pol332-342； *HLA-A*2603*-カクテル 1: Gag169-177、Pol446-454、Env63-72、Gag484-494、Gag205-214； カクテル 2: Pol293-301、Env464-473、Pol121-131、Env147-157、Pol551-560、Env63-73； カクテル 3: Pol332-342、Pol872-880、Pol647-657、Env830-838、Pol603-613、Pol471-480； カクテル 4: Env782-792、Env782-791、Env272-280、Pol471-481、Env82-92、Pol332-339、Pol647-656； カクテル 5: Pol161-171、Pol671-681、Env786-795、Pol244-253、Pol671-680、Gag74-82、Gag484-493)、これを用いて *HLA-A*2602*、または *HLA-A*2603* を持つ HIV-1 感染者の PBMC を刺激し、CD8⁺ T 細胞を誘導した。*HLA-A*2602* を持つ 3 名の HIV-1 感染者(KO-003、KI-030、KI-082)の PBMC をペプチドカクテルで刺激後、培養した。ペプチドカクテルをパルスした C1R-A*2602 で培養した PBMC を刺激し、IFN- γ の産生を測定した(図2)。

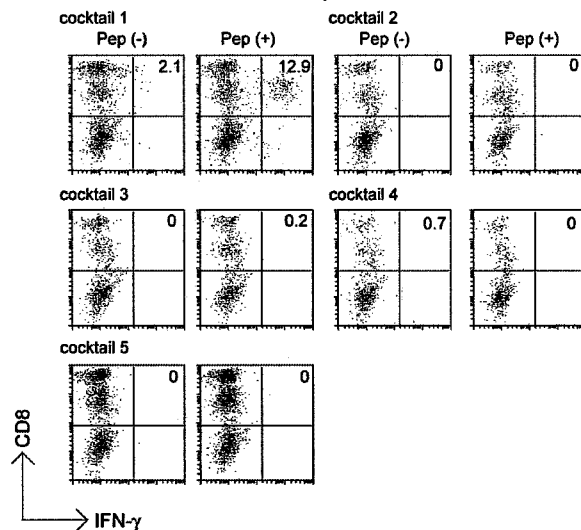


図2 *HLA-A*2602* を持つ HIV-1 感染者の PBMC におけるペプチドカクテル刺激に対する IFN- γ 産生能
*HLA-A*2602* を持つ HIV-1 感染者 (KO-003) 由来 PBMC はペプチドカクテルで刺激し、培養した。ペプチドカクテルをパルスした C1R-A*2603 細胞で E:S=1:4 で刺激し、CD8⁺ T 細胞中の IFN- γ 産生細胞を測定した。プロット内の右上に CD8⁺ T 細胞中の IFN- γ 陽性のパーセントを表示した。

その後、IFN- γ の産生の認められたカクテルに含まれる各ペプチドをパルスした C1R-A*2602 で刺激し IFN- γ 産生能を測定することで、ペプチド特異的な CD8⁺ T 細胞の誘導を確認した。KO-003 では Gag169-177 に対して CD8⁺ T 細胞中 9.2% IFN- γ を産生した(図 3)。また、ペプチドをパルスしていない C1R-A*2602 に対しては IFN- γ の産生は確認できなかった。このことから Gag169-177 に特異的な CD8⁺ T 細胞がこの患

者末梢血中に存在していることが明らかになった。しかし、KI-030とKI-082ではIFN- γ の産生を確認できなかった。

KO-003

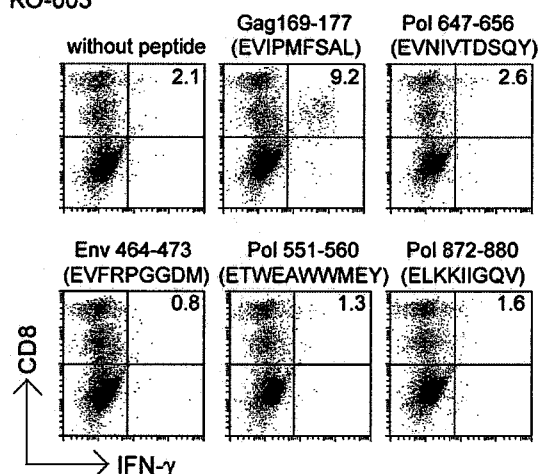


図3 *HLA-A*2602*を持つHIV-1感染者のPBMCにおけるHIV-1特異的CD8⁺T細胞の誘導

*HLA-A*2602*を持つHIV-1感染者(KO-003)由来PBMCはペプチドカクテル1で刺激し、培養した。カクテル1に含まれるペプチドをそれぞれパルスしたC1R-A*2603細胞でE:S=1:4で刺激し、CD8⁺T細胞中のIFN- γ 産生細胞を測定した。プロット内の右上にCD8⁺T細胞中のIFN- γ 陽性のパーセントを表示した。

また、*HLA-A*2603*を持つ3名のHIV-1感染者(KI-001、KI-010、KI-093、KI-177)に対しても同様の実験を行ったところ、KI-001ではGag169-177に対してCD8⁺T細胞中37.6%、KI-010では21.3%、KI-093では56.7%(図4)、KI-177では2.5%がIFN- γ を産生した(表3)。さらにKI-001、KI-010、KI-177ではEnv63-72に対してCD8⁺T細胞中それぞれ1.8%、2.8%、75.6%がIFN- γ を産生した(図4、表3)。またペプチドをパルスしていないC1R-A*2603に対してはIFN- γ の産生は見られなかった。このことからGag169-177とEnv63-72に特異的なCD8⁺T細胞がこれらの患者末梢血中に存在しており、これらのペプチドがエпитープである可能性が示唆された。

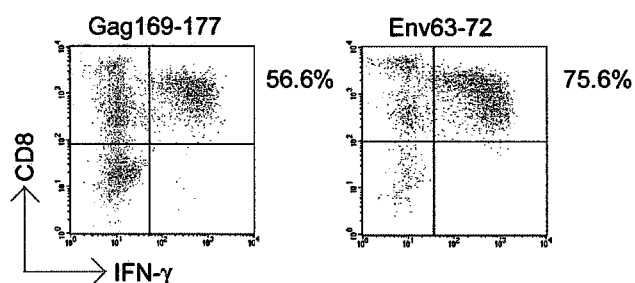


図4 *HLA-A*2603*を持つHIV-1感染者のPBMCにおけるHIV-1特異的CD8⁺T細胞の誘導

*HLA-A*2603*を持つHIV-1感染者(KI-093とKI-177)由来PBMCは*HLA-A*2603*結合ペプチドカクテルで刺激し、培養した。各ペプチドをパルスしたC1R-A*2603細胞でE:S=1:4で刺激し、CD8⁺T細胞中のIFN- γ 産生細胞を測定した。KI-093由来の培養したPBMCをGag169-177をパルスしたC1R-A*2603細胞で刺激した(左)。KI-177由来の培養したPBMCをEnv63-72をパルスしたC1R-A*2603細胞で刺激した(右)。それぞれのプロットの右側にCD8⁺T細胞中のIFN- γ 陽性のパーセントを表示した。

表3. *HLA-A*2603*を持つHIV-1感染者における特異的CD8⁺T細胞の誘導

Sequences	Position	% of IFN- γ -producing cells in CD8 ⁺ T cells			
		KI-001	KI-010	KI-093	KI-177
EVIPMFSA	Gag 169-177	37.6	21.3	56.7	2.5
EVHNVWATHA	Env 63-72	1.8	2.8	0.5	75.6

c. CD8⁺ T 細胞エピトープの同定

実際にこれらのペプチドが感染細胞内でプロセッシングされ、*HLA-A*2602*、または *HLA-A*2603* に提示されるかどうかを調べるために実験を行った。HIV-1 の Gag を発現させた組換えワクシニアウイルスを C1R-A*2602 に、HIV-1 の Gag、Env それぞれを発現させた組換えワクシニアウイルスを C1R-A*2603 に感染させた。この感染細胞によって刺激し、ペプチドで刺激し培養してきたバルク CD8⁺ T 細胞の IFN- γ 産生能を測定した。その結果、組換えワクシニアウイルスを感染させた C1R-A*2602 に対して Gag169-177 で刺激し培養した *HLA-A*2602* を持つ感染者 (KO-003) 由来バルク CD8⁺ T 細胞は CD8⁺ T 細胞中 4.7% の IFN- γ 産生細胞が確認できた。また、野生型ワクシニアウイルスを感染させた C1R-A*2602 と非感染の C1R-A*2602 では IFN- γ の産生細胞は認められなかった (図 5)。

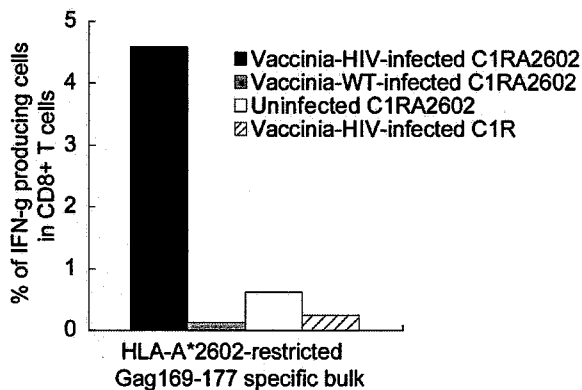


図 5 *HLA-A*2602* を持つ HIV-1 感染者由来 Gag169-177 特異的 CD8⁺ T 細胞による HIV-1 組み換えワクシニアウイルス感染細胞の認識

*HLA-A*2602* を持つ HIV-1 感染者 (KO-003) 由来 Gag169-177 特異的 CD8⁺ T 細胞を HIV-1 Gag 組み換えワクシニアウイルス、野生型ワクシニアウイルス感染 C1R-A*2602 細胞を用いて E:S=1:4 で刺激した。CD8⁺ T 細胞中の IFN- γ 陽性の頻度を示した。

HIV-1 の Gag または Env を発現した組換えワクシニアウイルスを感染させた C1R-A*2603 に対して *HLA-A*2603* を持つ HIV-1 感染者から誘導した、Gag169-177 特異的バルク CD8⁺ T 細胞 (KI-010 由来) は CD8⁺ T 細胞中 7.7%、Env63-72 特異的バルク CD8⁺ T 細胞 (KI-177 由来) は CD8⁺ T 細胞中 80.2% の IFN- γ 産生細胞が確認できた (図 6)。また、野生型ワクシニアウイルスを感染させた C1R-A*2603 と非感染の C1R-A*2603 では IFN- γ の産生細胞は認められなかった (図 6)。このことから Gag169-177 は *HLA-A*2602*、*-A*2603* に提示される CD8⁺ T 細胞エピトープであり、Env63-72 は *HLA-A*2603* に提示される CD8⁺ T 細胞エピトープであることがわかった。

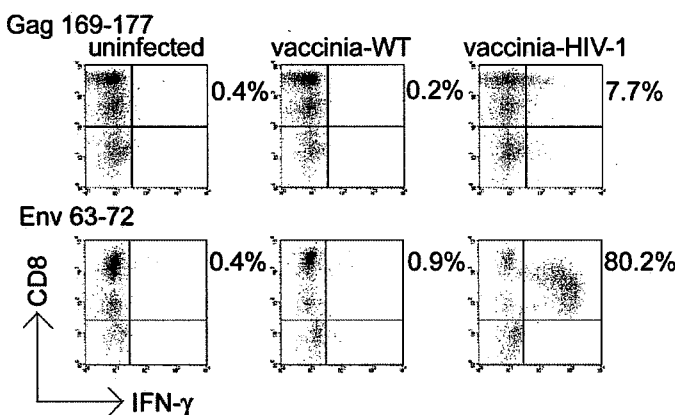


図 6 *HLA-A*2603* を持つ HIV-1 感染者由来 Gag169-177 特異的および Env63-72 特異的 CD8⁺ T 細胞による HIV-1 組み換えワクシニアウイルス感染細胞の認識 *HLA-A*2603* を持つ HIV-1 感染者由来 Gag169-177 特異的 CD8⁺ T 細胞 (KI-093 由来) と Env63-72 特異的 CD8⁺ T 細胞 (KI-177 由来) を HIV-1 Gag 組み換えワクシニアウイルスまたは Env 組み換えワクシニアウイルス、野生型ワクシニアウイルス感染 C1R-A*2603 細胞を用いて E:S=1:4 で刺激した。それぞれのプロットの右側に CD8⁺ T 細胞中の IFN- γ 陽性細胞のパーセントを示した。

d. HLA-A26 サブタイプをもつ慢性 HIV-1 感染者におけるエピートープ特異的 CD8⁺ T 細胞の誘導頻度

HLA-A26 のサブタイプに提示されるエピートープ特異的 CD8⁺T 細胞が HIV-1 感染者において誘導される頻度を明らかにするために、3 つの HLA-A26 サブタイプすべてで提示されるエピートープである Gag169-177、*HLA-A*2601* 拘束性エピートープである Pol604-612(ETKLGKAGY)、Pol647-656(EVNIVTDSQY)、Env464-473(EVFRPGGG DM)、*HLA-A*2603* 拘束性エピートープである Env63-72 を用いて、*HLA-A*2601* または、*-A*2602*、*-A*2603* を持つ HIV-1 感染者由来の PBMC を刺激し培養後、IFN- γ の産生能を調べた。

この結果、*HLA-A*2601* を持つ HIV-1 感染者では Gag169-177 特異的 CD8⁺ T 細胞は 11 人中 8 人、*HLA-A*2603* では 8 人中 7 人で誘導されたが、一方で *HLA-A*2602* では 6 人中 2 人のみであった(図 7)。

使用した各 HLA-A26 サブタイプを持つ HIV-1 感染者の CD4⁺ T 細胞の平均値と標準偏差は *HLA-A*2601*:458 \pm 257、*HLA-A*2602*:564 \pm 299、*HLA-A*2603*:314 \pm 109 であり、統計的に有意な差はなかった。

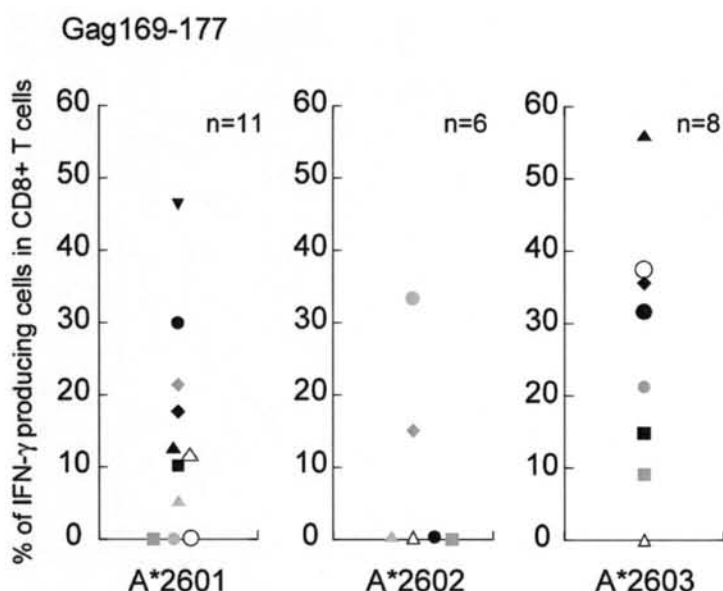


図 7 HLA-A26 を持つ HIV-1 感染者における Gag169-177 特異的 CD8⁺ T 細胞の誘導
HLA-A26 を持つ HIV-1 感染者由来 PBMC を Gag169-177 で刺激し、培養した。Gag169-177 パルスした HLA 発現 C1R 細胞で E:S=1:4 で刺激し、CD8⁺ T 細胞中の IFN- γ 産生細胞を測定した。ペプチドをパルスしていない HLA 発現 C1R 細胞で刺激した時の CD8⁺ T 細胞中の IFN- γ 陽性細胞のパーセントを引いた値を CD8⁺ T 細胞中の IFN- γ 産生細胞として示している。

これらのことから *HLA-A*2601*、*-A*2603* を持つ HIV-1 感染者において、Gag169-177 はイムノドミナントなエピートープであり、*-A*2602* を持つ HIV-1 感染者ではサブドミナントなエピートープであることが示唆された。また、Gag169-177 と *HLA-A*2602* との結合能は、*HLA-A*2601*、*-A*2603* との結合能と同程度であった(表 4)。このことから、*HLA-A*2602* をもつ HIV-1 感染者において、Gag169-177 はサブドミナントなエピートープではあるが *HLA-A*2602* 分子は Gag169-177 を効果的に提示されていると考えられる。一方で、

*HLA-A*2601* 拘束性エピトープである Pol604-612 に関しては *HLA-A*2602*、*-A*2603* には結合しなかった。Pol647-656、Env464-473 は *HLA-A*2602*、*-A*2603* と結合するが特異的 CD8⁺T 細胞は誘導されなかった(表 4)。*HLA-A*2603* 拘束性エピトープである Env63-72 は *HLA-A*2601* と結合するが、特異的 CD8⁺ T は誘導されなかった(表 4)。

表 4. HLA-A26 の 3 つのサブタイプ間でのエピトープペプチド結合能とペプチド特異的 CD8⁺ T 細胞の誘導能の比較

	Binding affinity (BL ₅₀)			comparison of binding affinity		Frequency*		
	A*2601	A*2602	A*2603	affinity		A*2601	A*2602	A*2603
				A*2602/ A*2601	A*2602/ A*2603			
Gag169-177	7.5×10 ⁻⁷	5.8×10 ⁻⁷	2.1×10 ⁻⁶	0.77	0.28	8/11	2/6	7/8
Env63-72	1.1×10 ⁻⁴	no binding	7.6×10 ⁻⁷	-	-	0/11	NT	3/8
Pol604-612	6.5×10 ⁻⁵	no binding	no binding	-	-	10/11	NT	NT
Pol647-656	6.3×10 ⁻⁵	1.2×10 ⁻⁵	6.6×10 ⁻⁴	0.19	0.02	1/11	0/5	0/8
Env464-473	1.5×10 ⁻⁶	4.0×10 ⁻⁷	3.7×10 ⁻⁵	0.27	0.01	1/11	0/5	0/8

NT: 結合しないペプチドについては実験を行っていない

*(ペプチド特異的 CD8⁺ T 細胞が誘導された人数)/(実験を行った人数)

7-2) HLA-B*5101 特異的 CTL の解析

a. エピトープ特異的 Tetramer を用いた HLA-B*5101 拘束性 Gag349-9、Pol283-8、Pol743-9 特異的 CD8⁺ T 細胞の解析

HLA-B*5101 拘束性のエピトープである Gag327-9、Pol283-8、Pol743-9 特異的 CTL は HLA-B*5101 を持つ HIV-1 感染者で高頻度に誘導される(47,未発表のデータ)。この3つのエピトープ特異的 CTL が HLA-B*5101 を持つ長期未発症者において重要な働きを果たしているのかもしれないと考えた。

そこで、感染から 20 年以上経過している、HLA-B*5101 を持つ 3 名の長期未発症者(KI-021、KI-051、KI-124)と 4 名の発症遅延者(KI-127、KI-121、KI-032、KI-007)を用いて、この3つのエピトープ特異的 CD8⁺ T 細胞の解析を行った。7名の感染者の HLA を表 5 に示した。

表5. 長期未発症者及び発症遅延者における HLA-B*5101拘束性 HIV-1特異的 CD8⁺T 細胞

Patient	HLA				VL, CD4 number and their average			Average number of B*5101-restricted CD8 ⁺ T cells in PBMC (μl)				
	A allele	B allele			VL(ml)	CD4(μl)	Period ^{*1}	Pol743	Pol283	Gag327	Rev71	PBMC tested
KI-021	2402	2602	5101	6701	<50-780 (0) ^{*2}	252-878 (635) ^{*3}	1/1997 - 6/2006	2013	1917	0	0	10 different times ^{*4}
KI-051	206	3101	4002	5101	<50-660 (58)	629-957 (765)	8/1997 - 9/2005	3504	6577	787	0	5 different times ^{*4}
KI-124	1101	206	5101	1501	<50-600 (250)	511-924 (743)	7/1997 - 8/2001	3126	1745	1381	0	8/1999
KI-127	2402	206	5101	4002	<400-18,000 (2600)	258-828 (537)	7/1997 - 7/2006	10579	441	23411	0	9 different times ^{*4}
KI-121	3303	1101	4403	5101	370-32,000 (4950)	200-638 (334)	12/1996 - 5/2003	4853	0	0	0	12/1999, 8/2001
KI-032	2402	3303	5101	5201	3,700-96,000 (24000)	126-389 (268)	10/2002 - 11/2005	9153	0	0	0	10/2002, 9/2005
KI-007	33	31	44	51	12,000-100,000 (33000)	162-561 (302)	4/2000 - 3/2006	1084	0	6278	602	6/2001, 4/2002

*1 ウイルス量と CD4⁺ T 細胞の数を測定した

*2 ウイルス量の中央値

*3 CD4⁺ T 細胞数の平均値

*4 図 11 を参照

この 7 名の感染者は血友病患者であり、感染から 20 年以上経過しているが抗レトロウイルス療法を受けていない。長期未発症者は測定されているすべてのポイントのウイルス量が 1000 コピー/ml 以下、発症遅延者は測定されているポイントのうち 1 回以上ウイルス量 1000 コピー以上のポイントがある患者とした。患者のウイルス量、CD4⁺ T 細胞数を図 10A に示した。

まず HLA-B*5101 拘束性の 4 つのエピトープ (Pol283-8、Pol743-9、Gag327-9、Rev71-11) の HLA-ペプチド 4 量体 (tetramer) を作成し、これを用いて各感染者内における、エピトープ特異的 CD8⁺ T 細胞の頻度を測定した。

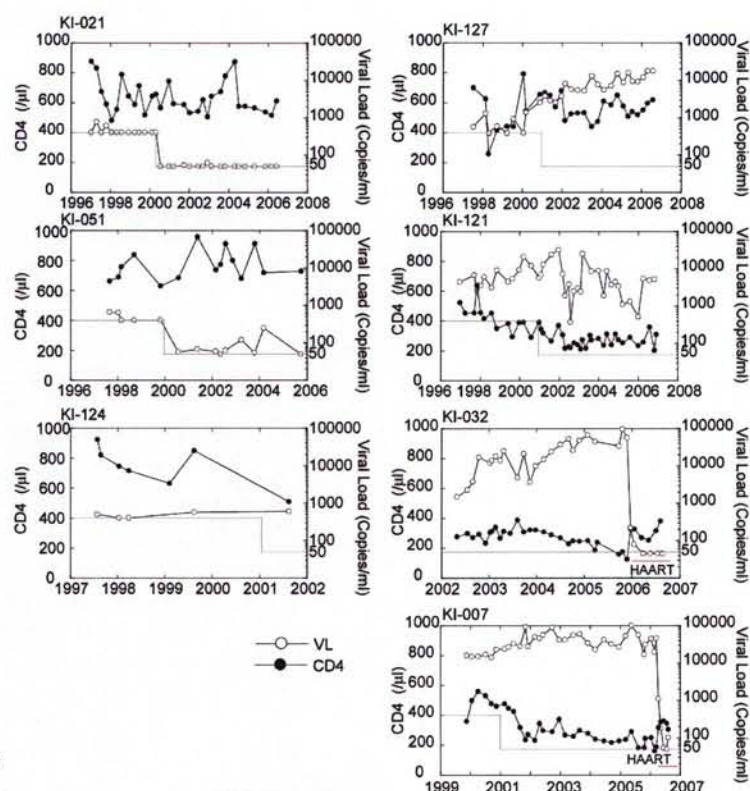
この結果、KI-021 では 1999 年から 2006 年の測定したポイントでは、Pol283-8 と

Pol743-9 にそれぞれ特異的な CD8⁺ T 細胞両方が検出できたが、Gag327-9 と Rev71-11 に特異的な CD8⁺ T 細胞はどちらも検出できなかった(図 8B)。KI-051 においても、1999 年から 2005 年の測定したポイントでは、Pol283-8 と Pol743-9 にそれぞれ特異的な CD8⁺ T 細胞両方が検出できたが、Gag327-9 特異的な CD8⁺ T 細胞は非常に少なく、Rev71-11 特異的な CD8⁺ T 細胞は検出できなかった(図 8C)。KI-124 では 1999 年から 2006 年の測定したポイントでは、Pol283-8、Pol743-9、Gag327-9 にそれぞれ特異的な CD8⁺ T 細胞が検出できた(表 5)。このことから Gag327-9 や Rev71-11 よりも Pol283-8、Pol743-9 特異的 CD8⁺ T 細胞が *HLA-B*5101* を持つ長期未発症者におけるウイルス増殖の抑制に関与している可能性が示唆された。

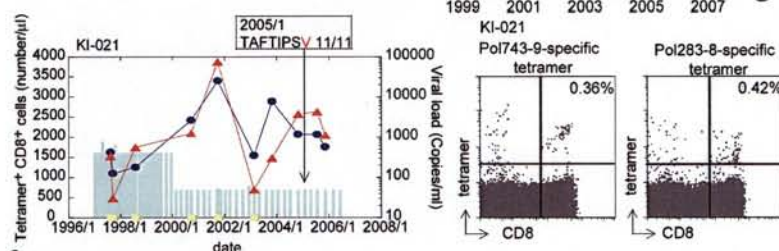
また、4 人の発症遅延者のうちの一人、KI-127 は 1998 年の時点ではウイルス量は低く保たれており、さらに、非常に少数ではあるが Pol283-8 特異的 CD8⁺ T 細胞が検出された(図 8D)。しかし、その後 Pol283-8 特異的 CD8⁺ T 細胞は検出できなくなり、ウイルス量が増加した(図 8D)。一方、測定したすべてのポイントで Pol743-9 特異的 CD8⁺ T 細胞は検出されている(図 8D)。KI-121、KI-032、KI-007 では Pol743-9 特異的 CD8⁺ T 細胞は検出されたが、Pol283-8 特異的 CD8⁺ T 細胞は検出できなかった(表 5)。

これらのことから、*HLA-B*5101* を持つ HIV-1 感染者において、Pol743-9 特異的 CD8⁺ T 細胞よりも、Pol283-8 特異的 CD8⁺ T 細胞が HIV-1 の増殖抑制に重要な働きをしている可能性が示唆された。

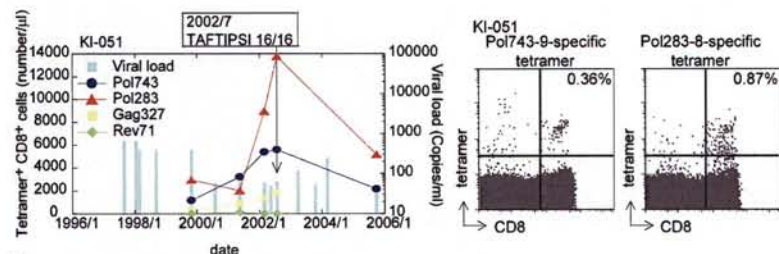
A



B



C



D

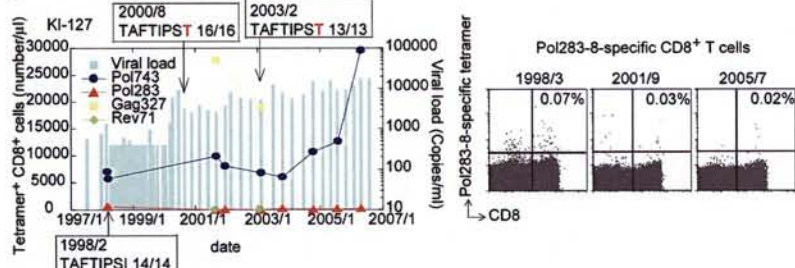


図 8 長期未発症者と発症遅延者の臨床経過と *HLA-B*5101* 拘束性 $CD8^+$ T 細胞の解析

A. 3 名の長期未発症者と 4 名の発症遅延者ウイルス量と $CD4^+$ T 細胞数の経過。灰色の線はウイルス量の検出限界を示している。B、C、D. 長期未発症者と発症遅延者における長期間にわたる 4 つの *HLA-B*5101* 拘束性エピトープ特異的 $CD8^+$ T 細胞の解析。KI-021(B)、KI-051(C)の Pol283-8 特異的 $CD8^+$ T 細胞と Pol743-9 特異的 $CD8^+$ T 細胞のテトラマーによる解析の代表的なデータをそれぞれ右側に示している。KI-127(D)の Pol283-8 特異的 $CD8^+$ T 細胞のテトラマーによる解析データを右側に示している。 $CD8^+$ T 細胞中のテトラマー陽性細胞のパーセントをプロット中の右上に示している。また、ウイルスのシーケンスをグラフ中に示している。

b. Gag327-9、Pol283-8、Pol743-9 エピトープ領域における CTL からの逃避変異の解析

CTL は HIV-1 に対し強い免疫選択圧をかけていることが知られている(3, 4, 11, 29, 30)。このことから、この Gag327-9、Pol283-8、Pol743-9 領域においても CTL の免疫選択圧によって CTL から逃避する変異が選択されている可能性がある。

これらのことから、長期未発症者、発症遅延者由来の HIV-1 のシーケンスを行い、エピトープ領域の変異を調べた。

また、変異が CTL による認識に影響を与える変異かどうかを調べた。*HLA-B*5101* と各ペプチドの結合能と特異的 CTL によってこれらの変異ペプチドをパルスした細胞が認識されるかを調べた。さらに、これらの変異を持つ HIV-1 を作成し、特異的 CTL によるウイルス感染細胞に対する細胞傷害活性、ウイルス増殖抑制能を調べた。

3 名中 2 名の長期未発症者では Pol283-8 の 8 番目のアミノ酸が V(Pol283-8V)であり、Pol743-9 には変異は認められなかった。もう一人の長期未発症者では Pol283-8、Pol743-9、Gag327-9 に変異は認められなかった(表 6)。

Pol283-8V ペプチドと *HLA-B*5101* との結合能は Pol283-8 ペプチドとの結合能と同程度であり、Pol283-8 特異的 CTL による細胞傷害活性も同程度であった(図 9A、C)。

さらに、Pol283-8 特異的 CTL は、Pol283-8V 変異をもつ HIV-1 (NL-Pol283-8V) 感染 721.221-B*5101 細胞に対し、野生型株である NL-432 感染 721.221-B*5101 細胞に対すると同程度の細胞傷害活性を示した(図 9E)。また、Pol283-8 特異的 CTL は効果的に NL-Pol283-8V の増殖を抑制した(図 9F 上)。しかしながら、NL-Pol283-8V に対する増殖抑制能は NL-432 に対する増殖抑制能よりも有意に低かった(図 9F 上)。

発症遅延者においても、Gag327-9 には変異は認められなかった。また、Pol283-8 では 8 番目のアミノ酸が T (Pol283-8T) または、Pol283-8 の 8 番目のアミノ酸が R (Pol283-8R) という配列であった(表 8)。また、KI-127 に関しては長期間の解析を行った。1998 年では Pol283-8 に変異は認められず、2000 年、2003 年では Pol283-8T に変異していた(図 8)(表 8 には 2003 年のデータを示している)。

表6. 長期未発症者と発症遅延者におけるPol283-8、Pol743-9、Gag327-9エピトープのシーケンス

Patient	sequence						source
	Pol283-8 TAFTTIPSI	Clonal frequency	Pol743-9 LPPVVAKEI	Clonal frequency	Gag327-9 NANPDCKTI	Clonal frequency	
long-trem non-progressor							
KI-021	-----V	11/11* ¹	-----	10/12* ¹	ND* ⁴		2005/1* ²
KI-051	-----	16/16* ¹	-----	15/15* ¹	ND* ⁴		2002/7* ³
KI-124	-----V	14/14* ¹	-----	14/15* ¹	-----	16/16* ¹	2001/8* ³
slow progressor							
KI-127	-----T	13/13* ¹	-----	17/17* ¹	-----	14/14* ¹	2003/2* ³
KI-121	-----T	16/16* ¹	I-----	12/13* ¹	-----	13/13* ¹	1999/12* ³
KI-032	-----T	13/13* ¹	-----	15/15* ¹	-----	14/15* ¹	2002/10* ³
KI-007	-----R	15/16* ¹	---II---	18/18* ¹	-----	14/15* ¹	2001/6* ³

*¹ (検出された変異の数) / (シーケンスしたクローンの数)

*² プロウイルスDNAからシーケンスを行った

*³ 血漿中のウイルスRNAからシーケンスを行った

*⁴ PCRによって領域を増幅できなかった

Pol283-8 特異的 CTL による細胞傷害能は Pol283-8T ペプチドに対し、Pol283-8 ペプチドよりも 10 倍程度低下していた(図 9C)。また、Pol283-8T 変異を持つ HIV-1(NL-Pol283-8T) 感染 721.221-B*5101 細胞に対しては細胞傷害活性を示さず、NL-Pol283-8T ウイルスに対する増殖抑制能は低かった(図 9E、F)。

Pol283-8T ペプチドは *HLA-B*5101* との結合能が Pol283-8 ペプチドよりも低かった(図 9A)。これらのことから、Pol283-8T 変異エピトープ-HLA-B*5101 複合体の細胞表面への発現が低いために、Pol283-8 特異的 CTL は Pol283-8T 感染細胞を認識できないと考えられる。

Pol283-8 特異的 CTL は Pol283-8R ペプチドをパルスした細胞に対し細胞傷害活性を示さなかった、またこのペプチドは *HLA-B*5101* と結合しなかった(図 9A、C)。さらに、Pol283-8 特異的 CTL は Pol283-8R 変異を持つ HIV-1(NL-Pol283-8R) 感染 721.221-B*5101 細胞に対して細胞傷害活性を示さず、NL-Pol283-8R ウイルス増殖抑制能は低かった(図 9E、F上)。

これらのことから Pol283-8T と Pol283-8R という変異は Pol283-8 特異的 CTL から逃避する変異であることが明らかになった。

2 名の発症遅延者では Pol743-9 領域は 1 番目のアミノ酸が I(Pol743-1I)、または 4 番目と 5 番目のアミノ酸が I(Pol743-4I5I)という配列であった(表 6)。Pol743-9 特異的 CTL は効果的に Pol743-1I 変異 HIV-1(NL-Pol743-1I)の増殖を抑制した(図 9F下)。一方で、Pol743-4I5I 変異 HIV-1(NL-Pol743-4I5I)に対する増殖抑制能は減少した(図

9F下)。Pol743-9 特異的 CTL の Pol743-4I5I ペプチドパルス細胞に対する細胞傷害活性は Pol743-9 ペプチドパルス細胞に対するよりも 10 倍程度低いが、*HLA-B*5101* 分子に対する結合能は同程度であった(図 9B、D)。これらのことから、Pol743-4I5I 変異は Pol743-9 特異的 CTL の T 細胞レセプターによる認識に影響を与えることが示唆された。Pol743-4I5I 変異は、発症遅延者の中でもウイルス量の高い KI-007 において Pol743-9 特異的 CTL による HIV-1 の増殖抑制に影響を与えているのかもしれない。

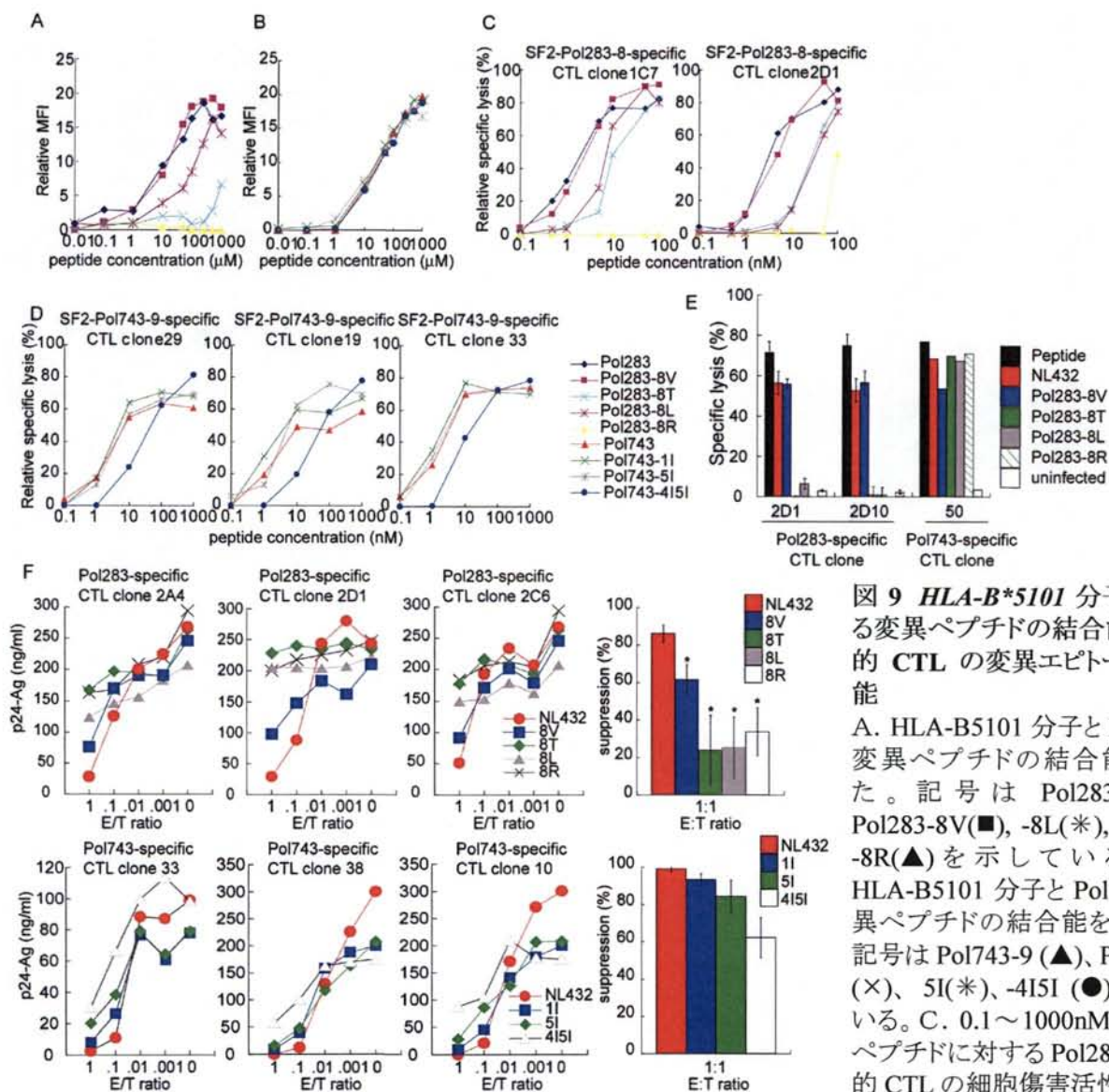


図 9 *HLA-B*5101* 分子に対する変異ペプチドの結合能と特異的 CTL の変異エピトープ認識能

A. *HLA-B*5101* 分子と Pol283-8 変異ペプチドの結合能を示した。記号は Pol283-8 (◆) Pol283-8V(■), -8L(*), -8T(×), -8R(▲)を示している。B. *HLA-B*5101* 分子と Pol743-9 変異ペプチドの結合能を示した。記号は Pol743-9 (▲), Pol743-11 (×), 5I(*), -4I5I (●)を示している。C. 0.1~1000nM の変異ペプチドに対する Pol283-8 特異的 CTL の細胞傷害活性を示した。記号はAと同様。D. 0.1~1000nM の変異ペプチドに対する Pol743-9 特異的 CTL の細胞傷害活性を示した。記号はBと同様。E. 1000nM ペプチドパルス 721.221-B*5101 細胞(黒)、NL-432(赤)、NL-Pol283-8V(青)、NL-Pol283-8T(緑)、NL-Pol283-8L(灰色)、NL-Pol283-8R(緑斜線)それぞれに感染させた 721.221-B*5101 細胞、非感 721.221-B*5101 染細胞(白)に対する Pol283-8 特異的 CTL およびコントロールとして Pol743-9 特異的 CTL の細胞傷害活性を E:T=2:1 で測定した。F. Pol283-8 特異的 CTL(上段)と Pol743-9 特異的 CTL(下段)による変異ウイルス増殖抑制能を示した。Pol283-8 特異的 CTL と Pol743-9 特異的 CTL をそれぞれ HIV-1 感染 CD4⁺ T 細胞と E:T=1:1~0.001:1 で共培養した、培養上清中の HIV-1 p24(ng/ml)を測定した。また、E:T=1:1 で共培養したときの、それぞれ 3 つの CTL の増殖抑制能の平均を示した。アスタリスク(*)は NL-432 と比較した際に統計的に有意な差(p<0.05)を示している。

c. CTL の免疫選択圧による逃避変異の選択

HIV シークエンスデータベース(Los Alamos National Laboratory)を検索したところ、HIV-1 クレード B として登録されている配列のうち Pol283-8 は 74%、Pol743-9 は 73% がそれぞれ Pol283-8:TAFTIPSI、Pol743-9:LPPVVAKEI の配列であった(図 11A、E)。また Pol283-8 の 8 番目のアミノ酸の変異と Pol743-9 の 1 番目のアミノ酸の変異は比較的多く認められた。そこで、*HLA-B*5101* を持つ HIV-1 感染者 (Pol283-8 に関しては 60 名、Pol743-9 に関しては 41 名)と *HLA-B*5101* を持たない HIV-1 感染者 (Pol283-8 に関しては 217 名、Pol743-9 に関しては 27 名)の血漿または PBMC より分離した HIV-1 遺伝子の Pol283-8 と Pol743-9 エピトープ領域の配列を調べた。

Pol283-8 の 8 番目のアミノ酸(P8)の変異の頻度は *HLA-B*5101* 陽性で 97.2%、陰性 69.1%であり、これはデータベースに登録されているこの領域の変異の頻度よりも高かった。このことは、日本の HIV-1 感染者の中で Pol283-8 の P8 の変異が蓄積されてきていることを示している。さらに、Pol283-8 の P8 の変異の頻度は *HLA-B*5101* 陰性と比較して *HLA-B*5101* 陽性の HIV-1 感染者の中で統計学的に有意に増加している(図 10B)。このことから、Pol283-8 の P8 の変異は *HLA-B*5101* 拘束性 CTL の免疫圧によって選択されてきたことが示唆された。また、Pol283-8 の P8 は Thr、Leu、Arg、Val の 4 つのアミノ酸への変異が比較的多く認められる。このうち Thr への変異は *HLA-B*5101* 陰性と比較して *HLA-B*5101* 陽性の HIV-1 感染者で統計学的に有意に多い(図 10C)。このことから Pol283-8 の P8 の Thr への変異は *HLA-B*5101* 拘束性 CTL の免疫圧によって選択されたと考えられた。Pol283-8 特異的 CTL が Lue への変異 (Pol283-8L)を持つウイルス(NL-Pol283-8L)感染細胞に対し細胞傷害活性を示さず、変異ウイルスにたいする増殖抑制能が低いことから、逃避変異であることを明らかにした(図 10E、F 上)。しかしながら、その頻度には *HLA-B*5101* 陰性と *HLA-B*5101* 陽性の HIV-1 感染者間で統計学的に有意な差はなかった(図 10C)。

Pol743-9 の変異の頻度は *HLA-B*5101* を持つ HIV-1 感染者で 61.0%、*HLA-B*5101* を持たない HIV-1 感染者で 40.7%であり、これはデータベースに登録されているこの領域の変異の頻度よりも高かった(図 10E)。このことは、日本の HIV-1 感染者の中で Pol743-9 領域に変異が蓄積されてきていることを示している。しかしながら、日本の HIV-1 感染者の Pol743-9 の配列を *HLA-B*5101* 陰性と陽性で比較したところ統計学的に有意な差はなかった(図 10F)。

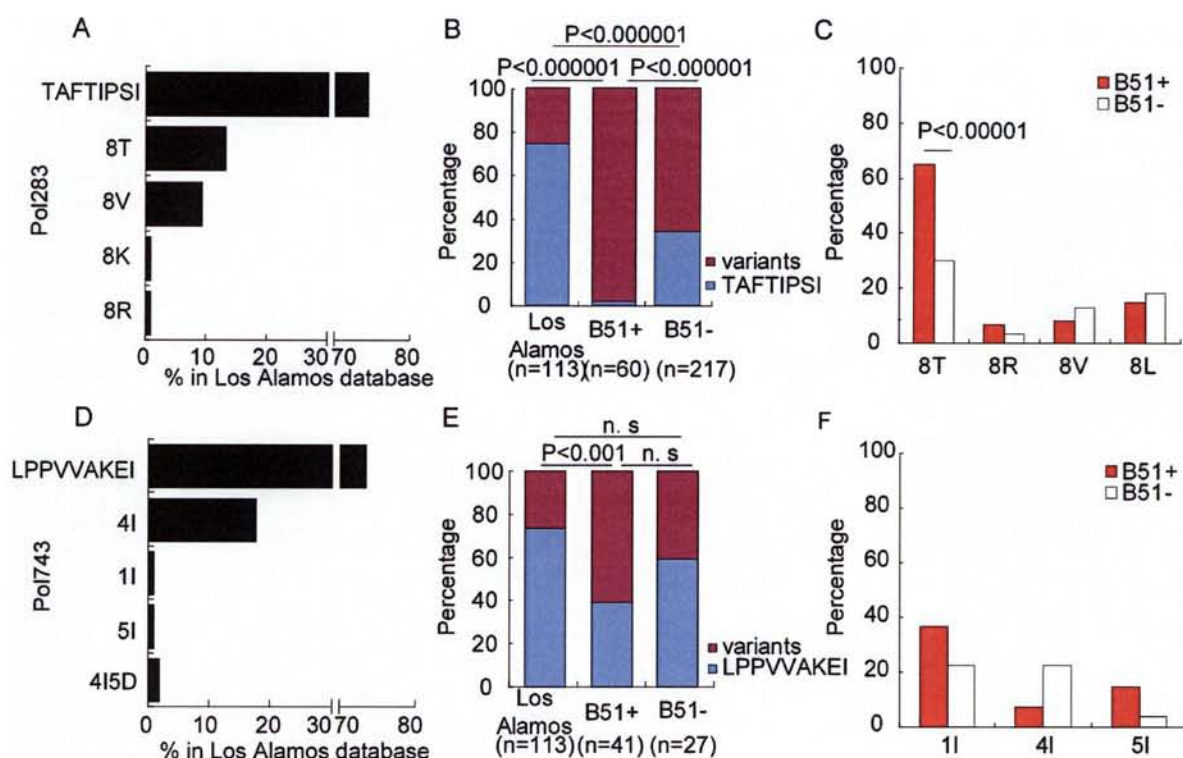


図 10 Pol283-8 と Pol743-9 エピトープにおける変異

A、D. HIV-1 データベース(Los Alamos National Laboratory)に登録されている Pol283-8 と Pol743-9 の変異を示した。B、C. 60 名の *HLA-B*5101* 陽性と 217 名の *HLA-B*5101* 陰性 HIV-1 感染者由来 HIV-1 の Pol283-8 エピトープのシーケンスを調べ変異の頻度を示した。E、F. 41 名の *HLA-B*5101* 陽性と 27 名の *HLA-B*5101* 陰性 HIV-1 感染者由来 HIV-1 の Pol743-9 エピトープのシーケンスを調べ変異の頻度を示した。統計解析はカイ二乗検定を用いた。

d. Pol283-8 特異的 CD8⁺ T 細胞の維持と Pol283-8 変異特異的 CD8⁺ T 細胞の解析

*HLA-B*5101* を持つ HIV-1 感染者の中で実際に、Pol283-8 特異的 CTL の免疫圧によって、HIV-1 が Pol283-8 から Pol283-8T へと変異しているとすれば、Pol283-8 の配列を持つ HIV-1 に感染した *HLA-B*5101* 陽性感染者体内には Pol283-8 特異的メモリー CD8⁺ T 細胞が存在しており、さらに Pol283-8T 特異的 CD8⁺ T 細胞は誘導されていないと予測される。

Pol283-8T 配列を持つウイルスが検出された 4 人の *HLA-B*5101* 陽性 HIV-1 感染血友病患者(3 人の発症遅延者 KI-127, KI-121, KI-032 と 1 名の HAART を受けている患者 KI-078)由来の PBMC を Pol283-8 特異的テトラマーを用いて解析すると、Pol283-8 特異的テトラマー陽性 CD8⁺ T 細胞は検出できなかった(表 5, KI-078 についてはデータを示していない)。

そこで、メモリー T 細胞から Pol283-8 特異的 CD8⁺ T 細胞を誘導するため、4 名の感染者由来の PBMC を Pol283-8 ペプチドで刺激し、培養後、Pol283-8 特異的 CD8⁺ T

細胞が誘導されたかを IFN- γ 産生能を測定することで確認した。培養した KI-127 と KI-078 由来 PBMC からは Pol283-8 特異的 CD8⁺ T 細胞を検出することができた(図 11)。しかし、2006 年 4 月の KI-127 由来 PBMC では Pol283-8 特異的 CD8⁺ T 細胞を検出できず、このことは Pol283-8 特異的メモリー T 細胞の枯渇を示唆しているのかもしれない。しかしながら、この 2 名の感染者では 20 年以上にわたって、Pol283-8 特異的メモリー CD8⁺ T 細胞が維持されていたことが明らかになった。一方、KI-121 と KI-032 由来の培養した PBMC からは Pol283-8 特異的 CD8⁺ T 細胞を検出できなかった(図 11)。また 4 名とも、Pol283-8T で刺激した場合、Pol283-8T 特異的 CD8⁺ T 細胞は検出できなかった(図 11)。このことから、Pol283-8T 変異は Pol283-8T 特異的 CD8⁺ T 細胞を誘導できないことが示された。これらのことは、Pol283-8T が Pol283-8 に変異を持たないウイルスに感染した患者体内で選択された逃避変異であることを示唆している。

同様に Pol283-8R 変異を持つ KI-007 に関して調べたところ、KI-007 は Pol283-8 特異的 CD8⁺ T 細胞を持っているが、Pol283-8R 特異的 CD8⁺ T 細胞は持たないことが示された(図 11)。このことは、Pol283-8R 変異もまた Pol283-8 特異的 CD8⁺ T 細胞を誘導することができない、Pol283-8 特異的 CTL から逃避する変異であることを示している。

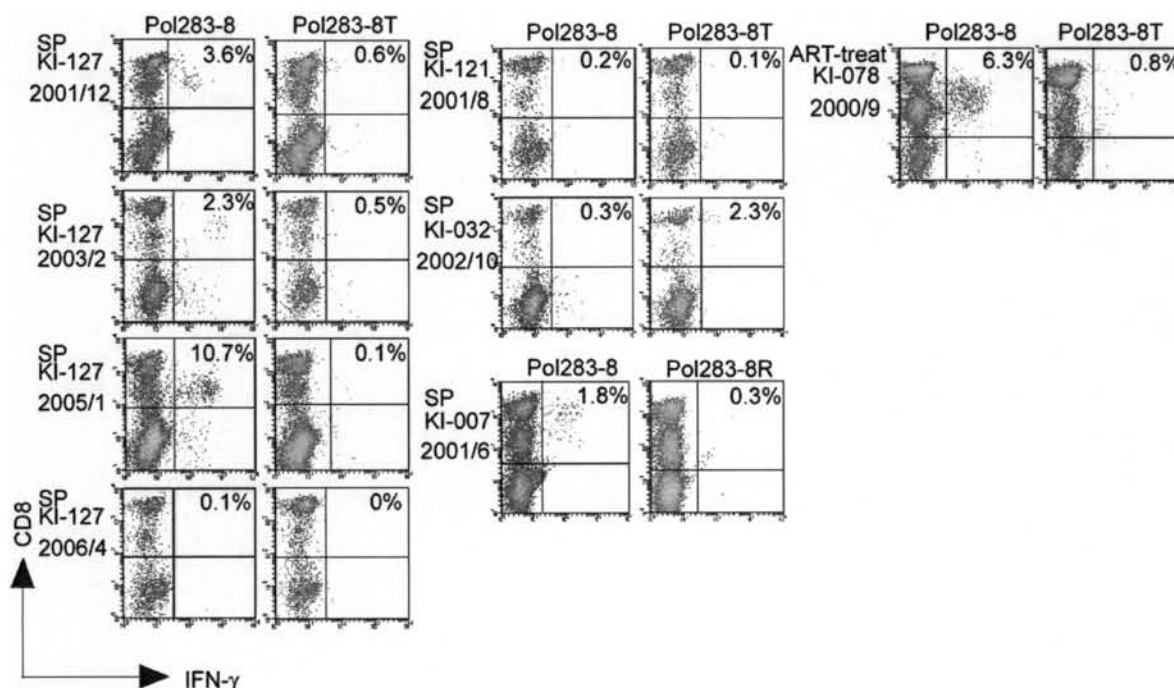


図 11 Pol283-8 特異的 CD8⁺ T 細胞の誘導

4 名の発症遅延者(KI-127, KI-121, KI-032, KI-007)と抗ウイルス療法を受けている感染者(KI-078)由来 PBMC を Pol283-8 および Pol283-8T または Pol283-8R ペプチドで刺激し、培養後、各ペプチドをパルスした C1R-B*5101 細胞で刺激した。CD8⁺ T 細胞中の IFN- γ をフローサイトメリーにて解析した。CD8⁺ T 細胞中の IFN- γ 陽性細胞のパーセントをプロット中の右上に示した。

8. 考察

本研究において、AIDS の発症遅延と相関する HLA クラス I アレルである HLA-A26 の 2 つサブタイプ、*HLA-A*2602*、*A*2603* に提示されるエピトープを同定した。同定したエピトープのうち *HLA-A*2602* と *HLA-A*2603* 両方に提示される Gag169-177(EVIPMFSAL)はもう一つのサブタイプである、*HLA-A*2601* 拘束性のエピトープとしても報告されている(41)。Gag169-177 特異的 CD8⁺ T 細胞は *HLA-A*2601*、*-A*2603* を持つ HIV-1 感染者で高頻度に誘導され、一方で *HLA-A*2602* を持つ感染者では誘導される頻度が低かった。興味深いことに、Gag169-177 特異的 CD8⁺ T 細胞が誘導された 2 人の *HLA-A*2602* を持つ感染者は長期未発症者と比較的ウイルス量の低い感染者であった。

一方で、Gag169-177 は *HLA-Cw*0102* 拘束性の 8 アミノ酸からなるエピトープ (VIPMFSAL)を含んでいる。*HLA-Cw*0102* は多くの日本人が持つ HLA-C アレルである。このことから *HLA-A*2601* や *-A*2603* を持つヒトが同時に *HLA-Cw*0102* を持つ可能性があり、そうしたヒトにおいては両方の HLA に提示され、特異的 CD8⁺ T 細胞が誘導される可能性が示唆される。また、Gag169-177 は AIDS の発症遅延と強く相関する HLA-B57 のイムノドミナントなエピトープ KF11(KAFSPEVIPMF)と重複している(52)。これまでに HLA-B57 のこのエピトープを解析した研究でこのエピトープ特異的 CTL の変異ウイルスに対する交差活性が高さとウイルス量の間には相関があるという報告もあり(53-55)、KF11 特異的 CTL が病態進行に寄与している可能性が示唆されている。また、HIV-1 感染者を対象とした大規模な解析によって、HIV-1 の Gag に特異的な CTL 反応を示す集団では Gag 特異的な CTL の反応が無い集団と比較してウイルス量が有意に低いことが報告されている(37)。このことから、Gag 特異的 CTL がウイルスの増殖抑制に重要であることが示されている。

さらに、当研究室において *HLA-A*2601* 拘束性 Gag169-177 特異的 CTL のウイルス増殖抑制試験を行ったところ、*HLA-B*5101* 拘束性の 2 つのエピトープ特異的 CTL と同様に Gag169-177 特異的 CTL は HLA クラス I 抗原の発現低下の影響をほとんど受けず強いウイルス増殖抑制能を示した(当研究室の未発表のデータ)。これらのことから Gag169-177 特異的 CTL は *HLA-A*2601*、*-A*2603* を持つ HIV-1 感染者において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。しかしながら、Gag169-177 特異的 CD8⁺ T 細胞が実際に生体内において HIV-1 の複製を制御できるかは明確ではなく、発症遅延と HLA-A26 サブタイプ、Gag169-177 特異的 CD8⁺ T 細胞の関係を明らかにするためには今後、大規模な患者集団をもちいた解析が必要になると考えられた。

一方、AIDS の発症遅延と相関するもう一つの HLA クラス I アレルである、

*HLA-B*5101* に関しては、すでに Pol283-8、Pol743-9、Gag327-9 特異的 CD8⁺ T 細胞は *HLA-B*5101* を持つ HIV-1 感染者において高頻度に誘導される(47, 当研究室の未発表データ)エピトープがあることが分かっている。本研究では、*HLA-B*5101* を持つエイズ長期未発症者と発症遅延者における、3 つのエピトープ特異的 CD8⁺ T 細胞についての解析を行った。

これまでの研究で *in vitro* で Pol283-8 と Pol743-9 特異的 CTL は強いウイルス増殖抑制能を示すが、Gag327-9 特異的 CTL のウイルス増殖抑制能は弱いことが示されている(39)。このことから *in vivo* でのウイルス増殖抑制に Pol283-8 と Pol743-9 特異的 CTL が関与している可能性が考えられた。

本研究において、Pol283-8 特異的 CD8⁺ T 細胞は *HLA-B*5101* を持つ長期未発症者とウイルス量の低い発症遅延者で検出され、Pol743-9 特異的 CD8⁺ T 細胞は 7 名の長期未発症者と発症遅延者全員において検出された。また、HAART を受けている *HLA-B*5101* を持つ HIV-1 感染者においても、Pol743-9 特異的 CD8⁺ T 細胞は検出されたが、Pol283-8 特異的 CD8⁺ T 細胞は検出されなかった(データは示していない)。

これらのことから以下に示す、2 つの可能性が示唆された。1) Pol283-8 特異的 CTL と Pol743-9 特異的 CTL 両方が感染者体内で働くことが HIV-1 の増殖を抑制に重要である可能性。2) Pol283-8 特異的 CTL が感染者体内で働くことが HIV-1 の増殖を抑制に重要である可能性。しかしながら、我々のこれまでの解析では Pol283-8 特異的 CD8⁺ T 細胞を持つが、Pol743-9 特異的 CD8⁺ T 細胞は持たない感染者は見つかっておらず、Pol743-9 の *in vivo* における機能は明らかでない。このことから、Pol283-8 特異的 CTL が *in vivo* における HIV-1 の増殖抑制に強く寄与している可能性が高いと考えられた。

3 つの Pol283-8 逃避変異のうち Pol283-8T は *HLA-B*5101* を持つ HIV-1 感染者で統計学的に有意に多かった。また、長期間にわたる KI-127 の解析で、HIV-1 感染の比較的早い時期に Pol283-8 の配列が Pol283-8T へと変異していることを示した。このことから Pol283-8T が *HLA-B*5101* 拘束性 Pol283-8 特異的 CTL の免疫選択圧によって選択された変異であることが示唆された。Pol283-8 特異的 CTL によって感染細胞が認識されないことから、Pol283-8R と Pol283-8L も CTL からの逃避変異ではあるが、この変異の頻度は *HLA-B*5101* を持つ HIV-1 感染者と持たない HIV-1 感染者の間で統計学的に有意な差はなかった。このことはこの 2 つの変異は *HLA-B*5101* 特異的 CTL の免疫選択圧によって選択された変異ではない可能性がある。しかしながら Pol283-8L 変異は HIV-1 シークエンスデータベース(Los Alamos national institute)に登録されている配列の頻度と比較すると、日本人において高い頻度で認められた。一方で、ある HLA 持つヒトが多い集団内では逃避変異が蓄積されるという報告がある(56)。このことから、Pol283-8L 変異が日本人において蓄積されているため、

*HLA-B*5101* を持つ HIV-1 感染者と *HLA-B*5101* を持たない HIV-1 感染者で差が認められないのかもしれない。Pol283-8T、-8L、-8R 変異 HIV-1 をそれぞれ野生型の株である NL-432 と競合させて細胞に感染させると、Pol283-8T、-8L、-8R 変異 HIV-1 は NL-432 と同様に増殖し、その割合は長期間の培養においてもほぼ 1:1 である(未発表であり共同研究先より提供されたデータ)。この結果は逃避変異ウイルスの *HLA-B*5101* を持たない集団における蓄積を説明できる。つまり、Pol283-8T、-8L、-8R 変異ウイルスはウイルスの増殖に影響を与えない変異であるため、*HLA-B*5101* 拘束性 CTL の免疫選択圧がない場合も元の配列に戻ることなく維持されていくと考えられる。しかしながら、日本人において *HLA-B*5101* の遺伝子頻度は 8.3% であり(40)、これから予測される *HLA-B*5101* を持つヒトの頻度は 16% 程度とそれほど高くない。このことから Pol283-8 特異的 CTL の免疫選択圧のみによって Pol283-8L 変異が蓄積するとは考えにくく、この変異を選択するような他の HLA 拘束性 CTL の存在が予想される。

Pol283-8V をもつウイルスは 60 名の *HLA-B*5101* を持つ HIV-1 感染者のうち 5 名(このうち 2 名は LTNP)でのみ検出された。この変異は頻度が低いため 20 年以上前に HIV-1 に感染した、長期未発症の感染者がもともと Pol283-8V を持つウイルスに感染した可能性は低いと考えられる。Pol283-8 特異的 CTL は NL-Pol283-8V 感染細胞に対し細胞傷害活性を持つが、一方で、NL-Pol283-8V に対するウイルス増殖抑制能は NL-432 に対するよりも有意に低い。これまでの研究で、HIV-1 特異的 CTL が HIV-1 感染 CD4⁺ T 細胞を殺すことができないが、HIV-1 増殖抑制試験においては HIV-1 に対し部分的ではあるが増殖抑制能をもつことが示されており(39)、細胞傷害試験よりも HIV-1 増殖抑制試験の検出感度が良いと考えられる。また、本研究では細胞傷害試験においては HLA を高発現している細胞株を用いていることから、HIV-1 増殖抑制試験の結果がより生体内での反応を反映していると考えられる。これらのことから、Pol283-8 特異的 CTL は Pol283-8V ウイルスを完全に抑制することはできないと考えられる。Pol283-8 特異的 CTL によるウイルス抑制能の違いによって、Pol283-8V を持つ HIV-1 は長期未発症者の中で時間をかけて選択されてくると予想される。

Pol283-8V 変異 HIV-1 を野生型の株である NL-432 と競合させて細胞に感染させると、Pol283-8V 変異ウイルスは NL-432 よりも増殖が遅く、長期間培養すると、NL-432 の割合が増加する(未発表であり共同研究先より提供されたデータ)。これらのことをまとめて考えると、Pol283-8V が出現することによって、長期未発症者においてウイルス量が低く保たれているのかもしれない。

HIV-1 シークエンスデータベースに登録されている HIV-1 の配列と比較すると、Pol283-8 の 8 番目のアミノ酸の変異は日本の HIV-1 感染者において蓄積されている。そして、Pol283-8 特異的 CTL からの逃避変異を持つ感染者において変異エпитープ特異的 CTL は誘導されていない。このことは逃避変異ウイルスが *HLA-B*5101* を持た

ないヒトに感染した場合も野生型の配列に戻らないということを示唆している。

これらのことは *HLA-B*5101* を持つヒトが逃避変異ウイルスに感染する可能性が高くなっていることを示している。最初から逃避変異ウイルスに感染した *HLA-B*5101* を持つヒトでは変異ウイルスの増殖制御が困難になることが示唆される。つまり、日本の HIV-1 感染者における逃避変異の蓄積によって過去に感染した *HLA-B*5101* を持つヒトと比較して、最近の感染者では感染の急性期に免疫応答が低下することが予測される。このことから、日本で新規に感染したヒトにおいては、*HLA-B*5101* と AIDS の発症遅延との相関は見られなくなっていく可能性が推測された。

本研究において、HLA-A26 に提示されるイムノドミナントなエピトープを同定した。またこのエピトープ特異的 CTL は生体内でウイルスの増殖抑制に重要である可能性を示唆した。さらに、*HLA-B*5101* を持つ HIV-1 感染者においては Gag327-9 特異的 CD8⁺T 細胞や、Pol1743-9 特異的 CD8⁺ T 細胞よりも、Pol283-8 特異的 CD8⁺ T 細胞が効果的に働いていると考えられ、ウイルスの複製能が減少し、Pol283-8 特異的 CTL が認識する変異は *HLA-B*5101* を持つ LTNP における長期間の HIV-1 の抑制に関与している可能性を示した。これらの知見は AIDS の発症遅延のメカニズムを理解する上で重要であり、今後のワクチン開発に寄与するものと期待する。

9. 結語

HIV-1 感染者において、Highly active antiretroviral therapy (HAART) が行われるようになり、感染者の予後は飛躍的に改善された。しかしながら、先進国では抗ウイルス薬による副作用、長年薬を飲み続けることに対するストレスが問題になっており、一方、抗ウイルス薬は高価であるため、発展途上国において治療は困難である。また、世界的にも日本においても HIV-1 感染者は年々増加しており、これらの問題を克服するためにワクチンの開発が望まれている。これまで、HIV-1 ワクチンに関しては、生ワクチンや中和抗体誘導型のワクチンが試験されてきた。しかし、その安全性やヒトにおける有効性の問題によって、いまだ実用化には至っていない。現在、細胞性免疫誘導型のワクチンを目指し、効果的なワクチン開発のためにベクターや動物モデルの研究が多く進められている。また、ワクチンのために誘導すべき免疫機構の解明も重要な課題となっており、近年、効果的に HIV-1 の増殖を抑制することができる CTL、またそうした CTL の標的となりうる抗原が研究されている。

本研究によって 1 種類の *HLA-A*2602* 拘束性 CTL エピトープ (Gag169-177)、2 種類の *HLA-A*2603* 拘束性 CTL エピトープ (Gag169-177、Env63-72) を同定した。これらのエピトープ、中でも *HLA-A26* の 3 つのサブタイプに提示される Gag169-177 は今後のワクチン研究開発や病態解析に寄与することが期待される。また、長期未発症者と発症遅延者における *HLA-B*5101* 拘束性 Pol283-8 の解析によって、エピトープ領域にウイルスの増殖に影響しない逃避変異と、CTL によって認識されるがウイルスの増殖に影響を与える変異という 2 種類の変異を発見した。ウイルスの増殖に影響を与えるが CTL によって認識される変異の出現によって、長期未発症者においてウイルスが低く保たれていると考えられ、これが長期未発症のメカニズムの一因であることを示唆した。

今後の抗ウイルス活性の優れた CTL のより詳細な解析、ワクチンの研究開発や病態進行に関連する要因の解明、さらに HIV-1 の進化に関する研究に寄与すると考えられる。

10. 参考文献

1. Borrow, P., H. Lewicki, X. Wei, M. S. Horwitz, N. Pfeffer, 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.
2. Goulder, P. J., R. E. Philips, 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.
3. 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 1 syndrome. *J. Virol.* 68:4650-4655.
4. Borrow, P., H. Lewicki, B. H. Hahn, G. M. Shaw, and M. B. Oldstone. 1994. Virus-specific CD8⁺ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* 68:6103-6110.
5. Lin, Y. L. and B. A. Askonas. 1981. Biological properties of an influenza A virus-specific killer T cell clone. Inhibition of virus replication in vivo and induction of delayed-type hypersensitivity reactions. *J. Exp. Med.* 154:225-234.
6. Lukacher, A. E., V. L. Braciale, and T. J. Braciale. 1984. In vivo effector function of influenza virus-specific cytotoxic T lymphocyte clones is highly specific. *J. Exp. Med.* 160:814-826.
7. Riddell S. R., K. S. Watanabe, J. M. Goodrich, C. R. Li, M. E. Agha, and P. D. Greenberg. 1992. Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science* 257:238-41.
8. Pantaleo, G., S. Menzo, M. Vaccarezza, C. Graziosi, O. J. Cohen, J. F. Demarest, D. Montefiori, J. M. Orenstein, C. Fox, L. K. Schrager, J. B. Margolick, S. Buchbinder, J. V. Giorgi, and A. S. Fauci. 1995. Studies in subjects with long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection. *N. Engl. J. Med.* 332:209-216.
9. Buchbinder, S. P., M. H. Katz, and N. A. Hessel, P. M. O'Malley, and S. D. Holmberg. 1994. Long-term HIV-1 infection without immunologic progression. *AIDS* 8:1123-1128.

10. Keet, I. P., A. Krol, M. R. Klein, P. Veugelers, J. de Wit, M. Roos, M. Koot, J. Goudsmit, F. Miedema, and R. A. Coutinho. 1994. Characteristics of long-term asymptomatic infection with human immunodeficiency virus type 1 in men with normal and low CD4+ cell counts. *J. Infect. Dis.* 169:1236-1243.
11. 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. Morkowitz, 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.
12. Klein, M. R., C. A. van Baalen, A. M. Holwerda, S. R. Kerkhof 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.
13. Harrer, T., E. Harrer, S. A. Kalams, T. Elbeik, S. I. Staprans, M. B. Feinberg, Y. Cao, D. D. Ho, T. Yilma, A. M. Caliendo, R. P. Johnson, S. P. Buchbinder, and B. D. Walker. 1996. Strong cytotoxic T cell and weak neutralizing antibody responses in a subset of persons with stable nonprogressing HIV type 1 infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 12: 585-592.
14. Harrer, T., E. Harrer, S. A. Kalams, P. Barbosa, A. Trocha, R. P. Johnson, T. Elbeik, M. B. Feinberg, S. P. Buchbinder, and B. D. Walker. 1996. Cytotoxic T lymphocytes in asymptomatic long-term nonprogressing HIV-1 infection. Breadth and specificity of the response and relation to in vivo viral quasiespecies in a person with prolonged infection and low viral load. *J. Immunol.* 156: 2616-2623.
15. Pinto, L. A., J. Sullivan, J. A. Berxofsky, M. Clerici, H. A. Kessler, A. L. Landay, and G. M. Shearer. 1995. Env-specific cytotoxic T lymphocyte responses in HIV seronegative health care workers occupationally exposed to HIV contaminated body fluids. *J. Clin. Investig.* 96: 867-876.
16. 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. Investig.* 102: 1758-1765.
17. Kaul, R., F. A. Plummer, J. Kimani, T. Dong, P. Kiama, T. Rostron, E. Njagi, K.

- S. MacDonald, J. J. Bwayo, A. J. McMichael and S. L. Rowland-Jones. 2000. HIV-1-specific mucosal CD8⁺ lymphocyte responses in the cervix of HIV-1-resistant prostitutes in Nairobi. *J. Immunol.* 164: 1602-1611.
18. Jin, X., D. E. Bauer, S. E. Tuttleton, S. Lewin, A. Gettie, J. Blanchard, E. E. Irwin, J. T. Safrit, J. Mittler, L. Weinberger, L. G. Kostrikis, L. Zhang, A. S. Perelson, and D. D. Ho. 1999. Dramatic rise in plasma viremia after CD8⁺ T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *J. Exp. Med.* 189: 991-998.
 19. 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.
 20. Dean, M., M. Carrington, C. Winkler, G. A. Huttley, M. W. Smith, R. Allikmets, J. J. Goedert, S. P. Buchbinder, E. Vittinghoff, E. Gomperts, S. Donfield, D. Vlahov, R. Kaslow, A. Saah, C. Rinaldo, R. Detels, S. J. O'Brien. 1996. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CCR5 structural gene. *Science* 273: 1856-1862.
 21. Dean, M., L. P. Jacobson, G. McFarlane, J. B. Margolick, F. J. Jenkins, O. M. Howard, H. F. Dong, J. J. Goedert, S. Buchbinder, E. Gomperts, D. Vlahov, J. J. Oppenheim, S. J. O'Brien, M. Carrington. 1999. Reduced risk of AIDS lymphoma in individuals heterozygous for the CCR5-Δ32 mutation. *Cancer Res.* 59: 3561-3564.
 22. Carrington, M., G. W. Nelson, M. P. Martin, T. Kissner, D. Vlahov, J. J. Goedert, R. Kaslow, S. Buchbinder, K. Hoots, S. J. O'Brien. 1999. Heterozygote advantage and B*35-Cw*04 disadvantage. *Science* 283: 1748-1752.
 23. Tang, J., C. Costello, I. P. Keet, C. Rivers, S. Leblanc, E. Karita, S. Allen, and R. A. Kaslow. 1999. HLA class I homozygosity accelerates disease progression in human immunodeficiency virus type I infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 15: 317-324.
 24. Carrington, M., and S. J. O'Brien. 2003. The influence of HLA genotype on AIDS. *Ann. Rev. Med.* 54: 535-551,
 25. Kaslow, R. A., M. Carrington, R. Apple, L. Park, A. Munoz, A. J. Saah, J. J. Goedert, C. Winkler, S. J. O'Brien, C. Rinaldo, R. Detels, W. Blattner, J. Phair, H. Erlich, and D. L. Mann. 1996. Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection. *Nat. Med.*

2:405-411.

26. O'Brien, S. J., X. Gao, and M. 2001. Carrington. HLA and AIDS: a cautionary tale. *Trends. Mol. Med.* 7: 379-381.
27. Kiepiela, P., A. J. Leslie, I. Honeyborne, D. Ramduth, C. Thobakgale, S. Chetty, P. Rathnavalu, C. Moore, K. J. Pfafferott, L. Hilton, P. Zimbwa, S. Moore, T. Allen, C. Brander, M. M. Addo, M. Altfeld, I. James, S. Mallal, M. Bunce, L. D. Barber, J. Szinger, C. Day, P. Klenerman, J. Mullins, B. Korber, H. M. Coovadia, B. D. Walker, and P. J. Goulder. 2004. Dominant influence of HLA-B in mediating the potential co-evolution of HIV and HLA. *Nature* 432:769-775.
28. Migueles, S. A., M. S. Sabbaghian, W. L. Shupert, M. P. Bettinotti, F. M. Marincola, L. Martino, C. W. Hallahan, S. M. Selig, D. Schwartz, J. Sullivan, and M. Connors. 2000. HLA B*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. *PNAS* 97: 2709-2714.
29. Draenert, R., S. Le Gall, K. J. Pfafferott, A. J. Leslie, P. Chetty, C. Brander, E. C. Holmes, S. C. Chang, M. E. Feeney, M. M. Addo, L. Ruiz, D. Ramduth, P. Jeena, M. Altfeld, S. Thomas, Y. Tang, C. L. Verrill, C. Dixon, J. G. Prado, P. Kiepiela, J. Martinez-Picado, B. D. Walker, and P. J.R. Goulder. 2004. Immune selection for altered antigen processing leads to cytotoxic T lymphocyte escape in chronic HIV-1 infection. *J. Exp. Med.* 199: 905-915.
30. Yokomaku, Y., H. Miura, H. Tomiyama, A. Kawana-Tachikawa, M. Takiguchi, A. Kojima, Y. Nagai, A. Iwamoto, Z. Matsuda, and K. Ariyoshi. 2004. Impaired processing and presentation of cytotoxic-T-lymphocyte (CTL) epitopes are major escape mechanism from CTL immune pressure in human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* 78: 1324-1332.
31. Goulder, P. J., C. Brander, Y. Tang, C. Tremblay, R. A. Colbert, M. M. Addo, E. S. Rosenberg, T. Nguyen, R. Allen, A. Trocha, M. Altfeld, S. He, M. Bunce, R. Funkhouser, S. I. Pelton, S. K. Burchett, K. McIntosh, B. T. Korber, and B. D. Walker. 2001. Evolution and transmission of stable CTL escape mutations in HIV infection. *Nature* 412: 334-338.
32. Feeney, M. E., Y. Tang, K. A. Roosevelt, A. J. Leslie, K. McIntosh, N. Karthas, B. D. Walker, and P. J. Goulder. 2004. Immune escape precedes breakthrough human immunodeficiency virus type 1 viremia and broadening of the cytotoxic T-lymphocyte response in an HLA-B27-positive long-term-nonprogressing child. *J. Virol.* 78:8927-8930.
33. Matano, T., M. Kobayashi, H. Igarashi, A. Takeda, H. Nakamura, M. Kano, C.

- Sugimoto, K. Mori, A. Iida, T. Hirata, M. Hasegawa, T. Yuasa, M. Miyazawa, Y. Takahashi, M. Yasunami, A. Kimura, D. H. O'Connor, D. I. Watkins, and Y. Nagai. 2004 Cytotoxic T lymphocyte-based control of simian immunodeficiency virus replication in a preclinical AIDS vaccine trial. *J. Exp. Med.* 199: 1709-1718.
34. Leslie AJ, Pfafferoth KJ, Chetty P, et al. HIV evolution: CTL escape mutation and reversion after transmission. *Nat. Med.* 2004;10:282-289.
 35. Martinez-Picado, J., J. G. Prado, E. E. Fry, K. Pfafferoth, A. Leslie, S. Chetty, C. Thobakgale, I. Honeyborne, H. Crawford, P. Matthews, T. Pillay, C. Rousseau, J. I. Mullins, C. Brander, B. D. Walker, D. I. Stuart, P. Kiepiela, and P. Goulder. 2006. Fitness cost of escape mutations in p24 Gag in association with control of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 80:3617-3623..
 36. Gao, X., A. Bashirova, A. K. Iversen, J. Phair, J. J. Goedert, S. Buchbinder, K. Hoots, D. Vlahov, M. Altfeld, S. J. O'Brien, and M. Carrington. 2005. AIDS restriction HLA allotypes target distinct intervals of HIV-1 pathogenesis. *Nat. Med.* 11:1290-1292.
 37. Kiepiela, P., K. Ngumbela, C. Thobakgale, D. Ramduth, I. Honeyborne, E. Moodley, S. Reddy, C. de Pierres, Z. Mncube, N. Mkhwanazi, K. Bishop, M. van der Stok, K. Nair, N. Khan, H. Crawford, R. Payne, A. Leslie, J. Prado, A. Prendergast, J. Frater, N. McCarthy, C. Brander, G. H. Learn, D. Nickle, C. Rousseau, H. Coovadia, J. I. Mullins, D. Heckerman, B. D. Walker, and P. Goulder. 2007 CD8⁺ T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load *Nat. Med.* 13: 46-53
 38. Dong, T., G. Stewart-Jones, N. Chen, P. Easterbrook, X. Xu, L. Papagno, V. Appay, M. Weekes, C. Conlon, C. Spina, S. Little, G. Screaton, A. van der Merwe, D. D. Richman, A. J. McMichael, E. Y. Jones, and S. L. Rowland-Jones. 2004 HIV-specific Cytotoxic T Cells from Long-Term Survivors Select a Unique T Cell Receptor. *J. Exp. Med.* 200: 1547-1557.
 39. Tomiyama, H., M. Fujiwara, S. Oka, and M. Takiguchi. 2005. Epitope-dependent effect of Nef-mediated HLA class I down-regulation on ability of HIV-1-specific CTLs to suppress HIV-1 replication. *J. Immunol.* 174:36-40.
 40. Itoh, Y., N. Mizuki, T. Shimada, F. Azuma, M. Itakura, K. Kashiwase, E. Kikkawa, J. K. Kulski, M. Satake, and H. Inoko, 2005. High-throughput DNA typing of HLA-A, -B, -C, and -DRB1 loci by a PCR-SSOP-Luminex method in the Japanese population. *Immunogenetics* 57: 717-729
 41. Satoh, M., Y. Takamiya, S. Oka, K. Tokunaga, and M. Takiguchi. 2005 Identification and characterization of HIV-1-specific CD8⁺ T cell epitopes presented

by *HLA-A*2601*. *Vaccine* 23: 3783-3790

42. Yamada, N., Y. Ishikawa, T. Dumrese, K. Tokunaga, T. Juji, T. Nagatani, K. Miwa, H. G. Rammensee, and M. Takiguchi. 1999. Role of anchor residues in peptides binding to three HLA-A26 molecules. *Tissue Antigens* 54: 325-32
43. Kikuchi, A., T. Sakaguchi, K. Miwa, Y. Takamiya, H. G. Rammensee, Y. Kaneko, and M. Takiguchi. 1996. Binding of nonamer peptides to three HLA-B51 molecules which differ by a single amino acid substitution in the A-pocket. *Immunogenetics* 43: 268-76.
44. Dumrses, T., S. Stevanovic, F. H. Seefer, N. Yamada, Y. Ishikawa, K. Tokunaga, T. Juji, M. Takiguchi, and H. G. Rammensee 1998 HLA-A26 subtype A pockets accommodate acidic N-termini of ligands. *Immunogenetics* 48: 350-3.
45. Hayashi, H., P. D. Ennis, H. Ariga, R. D. Salter, P. Parham, K. Kano, and M. Takiguchi. 1989. HLA-B51 and HLA-Bw52 differ only by two amino acids which are in the helical region of $\alpha 1$ domain. *J. Immunol.* 142:306-311.
46. Tomiyama, H., N. Yamada, H. Komatsu, K. Hirayama, and M. Takiguchi. 2000. A single CTL clone can recognize a naturally processed HIV-1 epitope presented by two different HLA class I molecules. *Eur. J. Immunol.* 30:2521-2530.
47. Tomiyama, H., T. Sakaguchi, K. Miwa, S. Oka, A. Iwamoto, Y. Kaneko, and M. Takiguchi. 1999. Identification of multiple HIV-1 CTL epitopes presented by *HLA-B*5101* molecules. *Human Immunol.* 60:177-186.
48. Altman, J. D., P. A. H. Moss, P. J. R. Goulder, D. H. Barouch, M. G. McHeyzer-Williams, J. I. Bell, A. J. McMichael, M. M. Davis. 1996. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 274:94-96.
49. 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.
50. Tanabe, M., M. Sikiyata, 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.
51. Tomiyama, H., H. Akari, A. Adachi, and M. Takiguchi. 2002. Different effects of Nef-mediated HLA class I down-regulation on HIV-1-specific CD8⁺ T cell cytokine activity and cytokine production. *J. Virol.* 76:7535-7543.
52. Goulder, P. J., M. Bunce, P. Krausa, K. McIntyre, S. Crowley, B. Morgan, A. Edwards, Giangrande, R. E. Phillips, A. J. McMichael. 1996 Novel, 1996 cross-restricted, conserved, and immunodominant cytotoxic T lymphocyte

epitopes in slow progressors in HIV type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 12:1691-1698

53. Gillespie GM, Kaul R, Dong T, et al. Cross-reactive cytotoxic T lymphocytes against a HIV-1 p24 epitope in slow progressors with B*57. *AIDS* 2002;16:961-972.
54. Turnbull, E. L., A. R. Lopes, N. A. Jones, D. Cornforth, P. Newton, D. Aldam, P. Pellegrino, J. Turner, I. Williams, C. M. Wilson, P. A. Goepfert, M. K. Maini, and P. Borrow. 2006. HIV-1 epitope-specific CD8+ T cell responses strongly associated with delayed disease progression cross-recognize epitope variants efficiently. *J. Immunol*. 176:6130-6146.
55. Bailey, J. R., T. M. Williams, R. F. Siliciano, and J. N. Blankson. 2006. Maintenance of viral suppression in HIV-1-infected HLA-B*57+ elite suppressors despite CTL escape mutations. *J. Exp. Med*. 203:1357-1369.
56. Leslie, A., D. Kavanagh, I. Honeyborne, K. Pfafferott, C. Edwards, T. Pillay, L. Hilton, C. Thobakgale, D. Ramduth, R. Draenert, S. Le Gall, G. Luzzi, A. Edwards, C. Brander, A. K. Sewell, S. Moore, J. Mullins, C. Moore, S. Mallal, N. Bhardwaj, K. Yusim, R. Phillips, P. Klenerman, B. Korber, P. Kiepiela, B. Walker, and P. Goulder. 2005. Transmission and accumulation of CTL escape variants drive negative associations between HIV polymorphisms and HLA. *J. Exp. Med*. 201:891-902.