

第17回日本エイズ学会 ECC 山口メモリアルエイズ研究奨励賞受賞研究

サルエイズモデルを用いた長期ウイルス複製制御機序の解析

Analysis of Mechanism of Long-Term Viral Control in
SIV Infected Rhesus Macaque AIDS Model

野村 拓志

Takushi NOMURA

熊本大学エイズ学研究センター・国立感染症研究所エイズ研究センター

Center for AIDS Research, Kumamoto University・AIDS Research Center, National Institute of Infectious Diseases

日本エイズ学会誌 19: 144-149, 2017

はじめに

筆者の所属研究室ではヒトにおける HIV 感染症と高い近似性を示す、サル免疫不全ウイルス (SIV) 感染アカゲザルエイズモデルを用い、DNA プラスミドを prime, Gag 発現センダイウイルス (SeV) ベクターを boost として用いた CTL 誘導型予防エイズワクチンを開発中である。筆者はこれまでに特に長期 SIV 複製制御サルを用いて複製制御下におけるウイルス複製状態と免疫動態を解析することで、複製制御維持の機構を研究してきた。本稿では筆者のこれまでの本領域における研究を紹介し、今後の展望について紹介したい。

1. 背景

HIV 感染症においては感染急性期に有効な免疫応答は認められず、慢性持続感染が成立し最終的に宿主は AIDS 発症に至る。特に一般的な急性感染症ではみられる有効なウイルス特異的中和抗体の誘導は、HIV 感染症の感染急性期にみられない¹⁾。HIV 感染症が自然治癒することは基本的になく、ウイルスが宿主の免疫応答によって体内から完全に排除されることもない。慢性持続感染に至る事由としては、ウイルスの感染標的細胞が CCR5 陽性 CD4 陽性メモリー T 細胞であり宿主の免疫応答を阻害すること、Env の抗原性の低さ、ウイルス抗原による免疫担当細胞への傷害、レトロウイルスの特徴であるウイルスゲノムの宿主染色体 DNA へのプロウイルスとしてのインテグレーションなどの複合要因であると考えられる。一方でウイルス特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 応答は、一定のウイルス複製制御への寄与を示し、血中ウイルス量は急性期のピークか

らセットポイント期の水準までに抑制される^{2,3)}。

HIV 感染症に対する有効な予防ワクチンは現在までに実用化されていない。現在までに予防ワクチンが開発されている感染症の多くは自然治癒が見込めるものであり、自然感染時に惹起される免疫応答をあらかじめワクチン接種により誘導しておくことでワクチン効果がもたらされていると言える。例外は狂犬病ワクチンであり、自然感染においては自然治癒の可能性はないものの、不活化ワクチンの曝露前接種により有効な中和抗体誘導がなされる。HIV 感染症においては前述のように自然感染時に免疫応答による自然治癒はなく、一般的な急性感染症においては効果が期待される不活化ワクチン、サブユニットワクチンおよび弱毒生ワクチンといった古典的な手技のワクチンは試みられたものの、いずれも実用化に至らなかった。ART の登場により AIDS の発症の遅延と死亡率の低下がみられるようになったが、病態の進行を抑えるためには抗 HIV 薬の服用を続ける必要があり、感染者自身への負担とともに、累積の社会保障費用の負担も大きい。また HIV 感染症のセットポイント期は無症状であることから、初期感染時に鑑別されなかった場合に感染者は ART を施されることなく経過し、無治療の期間中に HIV の伝播の機会を増やしてしまう結果となる。現段階における予防エイズワクチンの効果の目標は、HIV の完全な感染防御ではなく、HIV 感染時の血中ウイルス量を減少させるとともに AIDS 発症までの期間を延長し、集団中の HIV の伝播を抑制することである。また、作製が困難な予防エイズワクチンの開発に際し得られるであろう免疫学的知見は、他の感染症や疾病の理解のためにも有益である。

2. ビルマ産アカゲザルにおける MHC クラス I ハプロタイプの SIV 感染への影響の解析

HIV および SIV 感染症の制御に主な役割を果たす CTL

著者連絡先: 野村拓志 (〒162-8655 東京都新宿区戸山 1-21-1 国立感染症研究所エイズ研究センター内)

2017 年 6 月 9 日受付

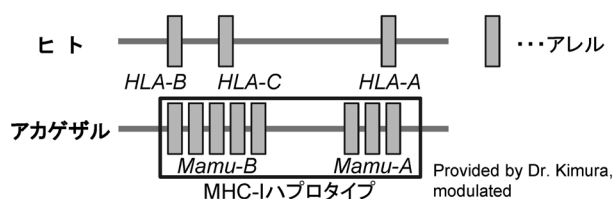


図 1 ヒトおよびアカゲザルにおける MHC-I sub region の遺伝子図

ヒトでは古典的 MHC-I 遺伝子は *HLA-A*, *HLA-B* および *HLA-C* アレルで構成されるが、アカゲザルにおいては複数の *Mamu-A* および *Mamu-B* アレルで構成される。

は、主要組織適合遺伝子複合体クラス I (MHC-I) 分子に結合して感染細胞表面に提示された抗原エピートを、TCR を介して認識するため、CTL の反応性は MHC-I の遺伝子型に大きく影響される。MHC-I の遺伝子型と HIV-1 の病態進行の関連が報告されており、*HLA-B*5801* といった protective allele を保有する感染者ではセットポイント期の血中ウイルス量が低く、AIDS 発症までの期間が長くなる傾向があり、逆に *HLA-B*3502* を保有する場合は AIDS 発症までの期間が短くなる傾向がある⁴⁻⁶⁾。アカゲザルにおいては MHC-I 遺伝子は複数のアレルの集合体で構成されており、このアレルの集合体を MHC-I のハプロタイプとよぶ (図 1)。SIV 感染アカゲザルエイズモデルにおいても、MHC-I 遺伝子型と病態進行が関連することが報告されているが、多くの解析は単一の MHC-I アレルレベルのものであり、MHC-I をハプロタイプレベルでの共有する群を用いた解析はほとんど行われていなかった。所属研究室ではビルマ産アカゲザルにおける MHC-I ハプロタイプ共有群の樹立が進められていた。筆者は、1000 TCID₅₀ の SIVmac239 の静脈内接種により SIVmac239 に感染した MHC-I ハプロタイプ 90-120-1a (A 共有群, $n=6$), 90-010-1e (E 共有群, $n=6$), 90-120-1b (B 共有群, $n=4$) または 90-088-1j (J 共有群, $n=4$) をそれぞれ共有する 4 つのビルマ産アカゲザル群の SIV 病態進行の比較解析を行った⁷⁾。多くの個体は急性期につづくセットポイント期に高い持続的なウイルス血症を呈し、4 年以内にエイズ発症に至った。A 共有群の 6 個体中 2 個体は一時血漿中ウイルス RNA 量を検出限界以下まで抑制する複製制御個体となった。他群では、すべての個体が高いセットポイント期の血中ウイルス量を示し、特に J 共有群では 4 個体のうち 3 個体が 1 年以内の早期に AIDS 発症に至った。セットポイント期の血中ウイルス量は、A 共有群では低く、J 共有群では高く、E・B 共有群では中間の値をとる傾向がみられ、多群間検定解析で A 共有群と J 共有群の間に有意差がみられた。図 2 に各共有群における血中ウイルス量の推移の概要を示した。病態

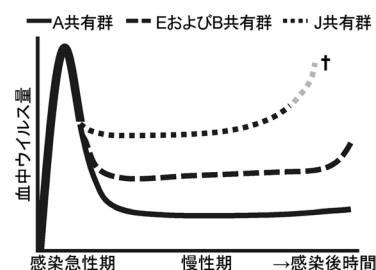


図 2 SIV 感染時の各 MHC-I ハプロタイプ共有群における血中ウイルス量の推移

セットポイント期の血中ウイルス量は、A 共有群では他群に比べて低く、J 共有群は高く、E 共有群および B 共有群はこれらの中間の傾向であった。

の進行を示す指標である CD4 陽性 T 細胞数についても A 共有群で減少が小さく、J 共有群で減少が大きい傾向にあった。感染早期である感染後 3 カ月および感染慢性期である感染後 1 年の SIV 特異的 CTL 応答を評価したところ、A 共有群は Gag 特異的 CTL 応答を、A・E・B 共有群は Nef 特異的 CTL 応答を示した。A 共有群は他群に対し優位に高い Gag 特異的 CTL 応答を示し、Gag 特異的 CTL 応答と血中ウイルス量には逆相関がみられた。感染後 1 年の血漿中ウイルス RNA より、アミノ酸置換変異体数を解析比較したところ、A 共有群は他群に対し優位に Gag におけるアミノ酸変異数が多かった。これらの結果から A 共有群は、SIV 感染に対して Gag 特異的 CTL 応答が強い複製抑制圧を示していることが示唆された。このようにビルマ産アカゲザルにおいて、SIVmac239 感染後の病態進行と CTL 応答の変化が MHC-I ハプロタイプの遺伝子型に関連することが示唆され、特に A 共有群は SIV 感染に対して比較的 protective な群であると判明した。

3. MHC-I ハプロタイプ A の拘束する CTL エピートの解析

MHC-I ハプロタイプ A 共有群は SIVmac239 の自然感染に対し、Gag 特異的 CTL 応答をドミナントに誘導する。当研究室で開発中の Gag を発現する SeV ベクターを用いた CTL 誘導型予防エイズワクチンは、A 共有群において Gag 特異的 CTL 反応を強く誘導し、ほとんどの個体が SIV 複製を制御することを当研究室では過去に報告している^{8,9)}。特にワクチン接種により誘導された、Gag₂₀₆₋₂₁₆ および Gag₂₄₁₋₂₄₉ エピート特異的な CTL 応答が SIV の複製制御に有効であることが示されている¹⁰⁾。MHC-I ハプロタイプ A の拘束する Gag の CTL エピートは、ほかに Gag₃₇₃₋₃₈₀ が過去に報告されていた。いっぽうで、他のウイルスタンパクに存在する CTL エピートは未同定であり、A 共有

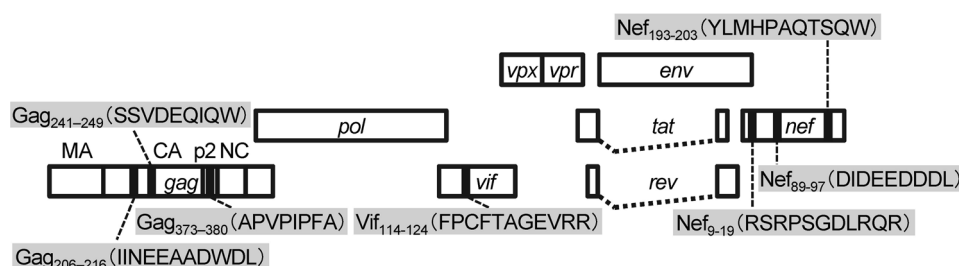


図 3 MHC-I haplotype 90-120-Ia が拘束する SIVmac239 特異的 CTL エピトープ

群の誘導するサブドミナントな CTL 応答の解析のために特に Vif および Nef に存在する MHC-I ハプロタイプ A の拘束する CTL エピトープの同定を行った¹¹⁾。まず SIV 感染慢性期の血中ウイルス RNA よりゲノム配列を解析し、A 共有群に特異的に選択される非同義置換を解析した。次に非同義置換の選択される領域周辺に作製したオーバーラッピングペプチドをパルスしたヘルペスパピオ不死化自己 B 細胞と、A 共有群の SIV 感染慢性期の PBMC を共培養し、CD8 陽性 T 細胞の IFN- γ 産生刺激能を解析することで、反応の惹起に必要なペプチド領域を決定した。さらに慢性期にみられる選択変異をもつペプチドを作製し、A 共有群の CD8 陽性 T 細胞の IFN- γ 産生刺激能を wild type のペプチドと比較することで、当該の変異が CTL 逃避変異であるか確認し、CTL エピトープの同定とした。Vif₁₁₄₋₁₂₄、Nef₉₋₁₉、Nef₈₉₋₉₇ および Nef₁₉₃₋₂₀₃ の 4 カ所が新たに MHC-I ハプロタイプ A の拘束する CTL エピトープと同定された (図 3)。MHC-I ハプロタイプは前述したように複数の Mamu アレルによって構成されており、さらなる解析により Nef₈₉₋₉₇ は Gag₂₀₆₋₂₁₆ と同じ Mamu-A1*043:01 に、Nef₁₉₃₋₂₀₃ は Gag₂₄₁₋₂₄₉ と同じ Mamu-A1*065:01 に拘束されることが明らかとなった。本研究により MHC-I ハプロタイプ A の拘束する CTL エピトープが新たに 4 カ所同定され、これまでに判明していた Gag の 3 カ所とあわせて計 7 カ所の CTL エピトープが同定された。この知見により A 共有群におけるドミナントおよびサブドミナント SIV 特異的 CD8 陽性 T 細胞応答の解析が可能となり、つづく A 共有複製制御アカゲザル群における免疫誘導機序の解析に寄与した。

4. SIV 複製制御サルにおける複製制御維持機構の解析

A 共有群は他群よりウイルス複製制御能に優れ、当研究室で開発中の Gag を抗原とした CTL 誘導型予防エイズワクチンを接種した個体の多くは有効な Gag 特異的 CTL 応答を誘導し、SIV 感染後に血中ウイルス量を検出限界未満に抑制する。一方で感染後 2 年以上の長期にわたって SIV の複製制御を果たした個体でも、CTL 逃避変異体が選択

個体	グループ	E116	V145	P172	D205	L216	P223	V243	D244	I247	K315	V340	L372	A373	V375	P390	M424
N1	N																
N2	N																
N3	N																
N4	N																
N5	N																
N6	N																T
M1	M					S		E			R			T	M		
M2	M	G	S		S	S		A	E					M	M		
M3	M		A	E	S	L		E	L		M			M	S		
M4	M		S		S			A			F						

図 4 長期複製制御個体における感染後 2 年のプロウイルス gag のアミノ酸非同義置換変異
末梢血 CD4 陽性 T 細胞より得られたプロウイルス配列よりアミノ酸非同義置換変異を解析したところ、wild type の配列に近いグループ N と、グレーで示す CTL エピトープの逃避変異を含む複数の非同義置換変異が選択されているグループ M に分かれた (Nomura *et al* : PLoS Pathog 11 (11): e1005247, 2015 より改編)。

され増殖することで、最終的に AIDS 発症に至る場合が存在する。このように複製制御個体においても CTL 逃避変異の蓄積による病態進行の可能性のあるものの、より長く複製制御を維持する個体もあり、複製制御下での病態進行に関与する免疫動態と体内のプロウイルス性状は不明であった。そこでまず 2 年以上の長期間にわたって SIV 複製を制御している A 共有群 10 個体における感染後 2 年の gag プロウイルスゲノムの検出を試みたところ、末梢血 CD4 陽性 T 細胞由来プロウイルスの gag 塩基配列に変異がほとんど認められず、wild type の配列に近い群 (グループ N) と、CTL 逃避変異を含む複数の非同義置換変異が選択されている群 (グループ M) に分かれた (図 4)¹²⁾。さらにウイルスタンパク特異的 CTL 応答を経時的に解析し、その遷移とウイルスゲノム変異解析結果との関連を検討した。グループ N では感染後 2 年にわたり CTL 応答パターンに大きな変化はなく Gag および Nef 特異的なドミナント CTL 応答が優位でありつづけた。一方グループ M では

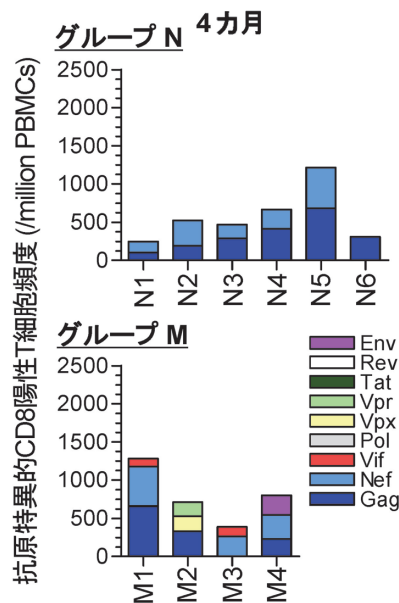


図 5 長期複製制御個体における SIV タンパク特異的 CTL 応答
(Nomura *et al* : PLoS Pathog 11 (11) : e1005247, 2015 より改編)

感染 4 カ月より Gag/Nef 特異的 CTL 応答に加えて、他のタンパク特異的 CTL 応答も誘導されて CTL 標的が広範化しており、サブドミナントな CTL 応答が認められ、Gag/Nef 特異的 CTL 応答の SIV 全タンパク特異的 CTL 応答に対する比率は低下していた (図 5)。つづいて、感染後 2 年の時点でグループ M の個体において Gag の CTL エピトープに逃避変異の選択されたプロウイルスがドミナントになっているにもかかわらず、複製制御が維持されていることの要因を解明するため、7 カ所のエピトープ特異的 CTL 応答をそれぞれ解析した。グループ N では Gag のエピトープ特異的 CTL 応答は感染後 2 年にわたり持続して誘導されており、SIV タンパク特異的 CTL 応答解析で得られた傾向と同じく、ドミナント CTL 応答が維持されていることを示していた (図 6)。グループ M では Gag のエピトープ特異的 CTL 応答は減退する傾向がみられたが、Vif および Nef のエピトープ特異的 CTL 応答がグループ N と比較して有意に高く誘導されており、特にグループ N ではほとんどみられない Vif₁₁₄₋₁₂₄ および Nef₁₉₃₋₂₀₃ エピトープ特異的 CTL 応答がグループ M では強く誘導されていた。またグループ M の感染後 2 年における *vif* および *nef* のプロウイルスゲノム配列解析では、Vif₁₁₄₋₁₂₄ および Nef₁₉₃₋₂₀₃ における非同義置換がみられず、これらのエピトープにおける CTL 逃避変異は選択されていなかった。これらの結果より、グループ N は Gag のドミナント CTL 応答が長期にわ

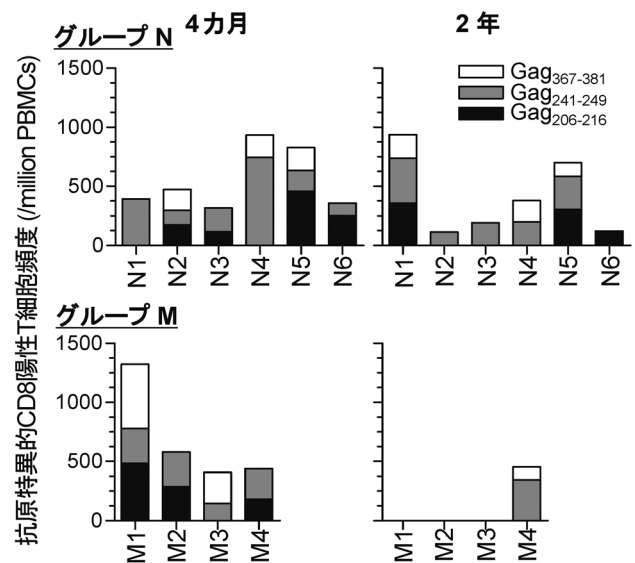


図 6 長期複製制御個体における SIV エピトープ特異的 CTL 応答の推移
Gag エピトープ特異的 CTL 応答 (Nomura *et al* : PLoS Pathog 11 (11) : e1005247, 2015 より改編)。

たり複製制御に寄与し続けるが、いっぽうでグループ M においては Gag 特異的 CTL によるウイルス複製制御能は感染後 2 年までに低下するものの、特に Vif₁₁₄₋₁₂₄ および Nef₁₉₃₋₂₀₃ エピトープ特異的なサブドミナント CTL 応答が新たに誘導され、感染後 2 年時点での複製制御維持に寄与することが示唆された。実際に感染後 2 年以降の経過観察において、グループ M の 4 個体中 2 個体で血中ウイルス量の再出現が認められた。グループ N において完全なウイルス排除が達成されているか否かを確認するために、グループ N の個体に抗 CD8 抗体を投与し、CTL を枯渇することで体内に存在しているウイルスの増殖を促したところ、血中ウイルス量が再出現し、ウイルスゲノムの解析の結果、すべてのエピトープに対してではないものの複数の CTL 逃避変異が認められた。このことからグループ N においてウイルスの完全な排除はなされていないものの、体内におけるウイルス複製がきわめて小さくドミナント CTL で複製制御の維持が可能であると考えられる。

本研究により、A 共有 SIV 長期複製制御個体において、プロウイルスゲノムにおける変異蓄積と、CTL 応答パターンの変化が関連し、病態を反映することが示された。この模式図を図 7 に示す。Gag のドミナントエピトープに CTL 逃避変異が選択されたグループ M においては、サブドミナント CTL 応答が誘導され、これを置換することで複製制御を維持するものの、のちに複製制御の破綻に至る可能性が示唆された。グループ N は比較的安定した複製制御

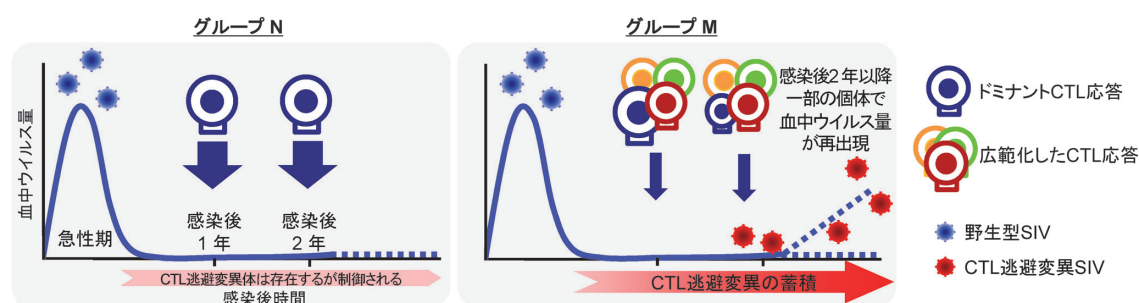


図 7 長期複製制御群に見出した 2 つのグループの模式図

状態にあることが示唆された。

5. 今後の展望

一連の研究により血中ウイルス量が検出限界未満の MHC-I ハプロタイプ A 共有複製制御個体でも複製制御の状態に差異があり、それを区別することが新規に可能となった。しかしながら、グループ M とグループ N に分岐する機序の解明は不十分であり、A 共有複製制御個体における急性期の免疫応答の差異やウイルス逃避変異の選択・増殖メカニズムのより詳細な解析を行っている。また、一般的に HIV 感染症の Reservoir の解析は ART 下でのものを指し、A 共有複製制御個体を用いた解析はこれとは異なることに留意が必要ではあるが、特に複製制御の状態のよいグループ N を用いることで、CTL 依存的な複製制御個体において Reservoir となる組織および細胞分画の解析が可能である。これらの解析は、CTL の賦活の ART との併用による HIV 感染症の治療を目指した治療法や、AIDS 発症の完全な防御を目標とした CTL 誘導型予防エイズワクチンの開発の前進に寄与すると考えられる。

謝辞

本研究の 2016 年度日本エイズ学会 ECC 山口メモリアルエイズ研究奨励賞の受賞にあたり、長年ご指導いただき、本研究を推薦していただいた国立感染症研究所エイズ研究センター俣野哲朗先生に深く御礼申し上げます。また本研究の遂行にあたり、ビルマ産アカゲザルの MHC クラス I 遺伝子の解析においては成瀬妙子先生および木村彰方先生（東京医科歯科大学難治疾患研究所難治病態研究部門）に、CTL の多機能性解析においては寺原和孝先生および横田恭子先生（国立感染症研究所免疫部）に、MHC クラス I ハプロタイプの SIV 感染への影響の解析では椎野禎一郎先生（国立感染症研究所エイズ研究センター）、岩田奈織子先生および長谷川秀樹先生（国立感染症研究所病理部）に、SIV 複製制御サルにおける複製制御維持機構の解析では明里宏文先生（京都大学霊長類研究所人類進化モデル研究セン

ター）に多大なご協力とご指導をいただきました。深く御礼申し上げます。またアカゲザルの動物実験においては国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所霊長類医科学研究センターおよび一般社団法人予防衛生協会の先生方のご協力をいただき完遂されました。この場をおかりして深く御礼申し上げます。最後に実際の実験にご助力をいただき、またディスカッションを通してご指導いただきました、国立感染症研究所エイズ研究センターの皆様と、熊本大学エイズ学研究センター滝口プロジェクト研究室の滝口雅文先生、そして動物実験にて使用した動物たちに深い感謝と御礼を申し上げます。

利益相反：本研究において利益相反に相当する事項はない。

文 献

- 1) Burton DR, Desrosiers RC, Doms RW, Koff WC, Kwong PD, Moore JP, Nabel GJ, Sodroski J, Wilson IA, Wyatt RT : HIV vaccine design and the neutralizing antibody problem. Nat Immunol 5 : 233-236, 2004.
- 2) Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MB : 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, 1994.
- 3) Matano T, Shibata R, Siemon C, Connors M, Lane HC, Martin MA : Administration of an anti-CD8 monoclonal antibody interferes with the clearance of chimeric simian/human immunodeficiency virus during primary infections of rhesus macaques. J Virol 72 : 164-169, 1998.
- 4) Goulder PJ, Watkins DI : Impact of MHC class I diversity on immune control of immunodeficiency virus replication. Nat Rev Immunol 8 : 619-630, 2008.
- 5) Migueles SA, Sabbaghian MS, Shupert WL, Bettinotti MP, Marincola FM, Martino L, Hallahan CW, Selig SM, Schwartz D, Sullivan J, Connors M : HLA B*5701 is highly

- associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 : 2709–2714, 2000.
- 6) Carrington M, Nelson GW, Martin MP, Kissner T, Vlahov D, Goedert JJ, Kaslow R, Buchbinder S, Hoots K, O'Brien SJ : HLA and HIV-1 : heterozygote advantage and B*35-Cw*04 disadvantage. *Science* 283 : 1748–1752, 1999.
- 7) Nomura T, Yamamoto H, Shiino T, Takahashi N, Nakane T, Iwamoto N, Ishii H, Tsukamoto T, Kawada M, Matsuoka S, Takeda A, Terahara K, Tsunetsugu-Yokota Y, Iwata-Yoshikawa N, Hasegawa H, Sata T, Naruse TK, Kimura A, Matano T : Association of major histocompatibility complex class I haplotypes with disease progression after simian immunodeficiency virus challenge in burmese rhesus macaques. *J Virol* 86 : 6481–6490, 2012.
- 8) Matano T, Kobayashi M, Igarashi H, Takeda A, Nakamura H, Kano M, Sugimoto C, Mori K, Iida A, Hirata T, Hasegawa M, Yuasa T, Miyazawa M, Takahashi Y, Yasunami M, Kimura A, O'Connor DH, Watkins DI, Nagai Y : Cytotoxic T lymphocyte-based control of simian immunodeficiency virus replication in a preclinical AIDS vaccine trial. *J Exp Med* 199 : 1709–1718, 2004.
- 9) Tsukamoto T, Takeda A, Yamamoto T, Yamamoto H, Kawada M, Matano T : Impact of cytotoxic-T-lymphocyte memory induction without virus-specific CD4+ T-Cell help on control of a simian immunodeficiency virus challenge in rhesus macaques. *J Virol* 83 : 9339–9346, 2009.
- 10) Kawada M, Tsukamoto T, Yamamoto H, Iwamoto N, Kurihara K, Takeda A, Moriya C, Takeuchi H, Akari H, Matano T : Gag-specific cytotoxic T-lymphocyte-based control of primary simian immunodeficiency virus replication in a vaccine trial. *J Virol* 82 : 10199–10206, 2008.
- 11) Nomura T, Yamamoto H, Takahashi N, Naruse TK, Kimura A, Matano T : Identification of SIV Nef CD8(+) T cell epitopes restricted by a MHC class I haplotype associated with lower viral loads in a macaque AIDS model. *Biochem Biophys Res Commun* 450 : 942–947, 2014.
- 12) Nomura T, Yamamoto H, Ishii H, Akari H, Naruse TK, Kimura A, Matano T : Broadening of virus-specific CD8+ T-cell responses is indicative of residual viral replication in aviremic SIV controllers. *PLoS Pathog* 11 : e1005247, 2015.