

学 位 論 文 題 名

A clearer distinction between HIV-1 paired isolates from peripheral blood mononuclear cells of asymptomatic carriers with and without CD8⁺ T-cells at *nef* rather than *env* V3 loci

(HIV-1無症候性キャリアの末梢血単核球からCD8⁺T細胞存在下及び非存在下において分離されたウイルスにおける*nef*と*env* V 3 遺伝子の解析)

学位論文内容の要旨

一般に、ヒト免疫不全ウイルス 1 型(human immunodeficiency virus type1:HIV-1)の感染を受けると、感染者の多くは、急性感染期と呼ばれるウイルス血症が起こる。生体内のウイルス量は、急性感染期に一過性に増加するが、免疫応答の上昇に伴い、その後は低いレベルに抑制される。しかしながらHIV-1は生体内から完全に排除されることはなく、感染した後、平均10年にも及ぶ無症候期(AC期)を経過し、AIDSへと進行する。最近、AC期においても、HIV-1は生体内で活発に複製、増殖を繰り返していることが明らかにされているが、一方においてAC期とAIDS期ではウイルスの細胞傷害性やトロピズムに違いがあること、さらに生体内のウイルス量が病気の進行と深く関係することも報告されている。

一般にウイルス特異的CD8陽性T細胞は、生体内からのウイルスの排除やウイルスの増殖を抑制することが知られており、HIV-1感染者においてもHIV-1に対するCTL活性が病気の進行を抑制すると考えられている。しかし、ウイルスは免疫機構等の宿主側の圧力から逃れるために多様な変異ウイルスを産生する。HIV-1の多様性は、主として逆転写反応における忠実度の低さに起因すると考えられるが、このような現象は、細胞性免疫および中和抗体の最大の標的であるHIVエンベロップ蛋白質のV3ドメインが高頻度に変異しているウイルスや抗ウイルス剤であるAZT投与後に迅速に出現する薬剤耐性ウイルス等により顕著に認められる。

HIV-1の遺伝子は*gag*、*pol*および*env*といったウイルス粒子を構成する構造タンパク質をコードする遺伝子、さらに*tat*および*rev*といったウイルスの複製を助ける調節タンパク質をコードする遺伝子の他に*vif*、*vpr*、*vpu*および*nef*といったアクセサリー遺伝子(ウイルス複製には、必ずしも必要性が認められない)により構成されている。この中でGag、PolおよびEnvタンパク質は強いCTL誘導能があることが知られており、特にEnvのV3ドメインは主要

な中和抗体およびCTLエピトープであることが明らかにされている。一方アクセサリー遺伝子がコードするタンパク質の中ではNefに対するCTL応答が、HIV-1感染者に認められる。HIV-1感染の動物モデルとなるアカゲザルに対するSIV(simian immunodeficiency virus)の感染実験から、*nef*遺伝子がAIDS発症に必須であることが指摘されており、またヒトにおいても、病気の進行が認められない長期生存者(long-term survivor)の中に、*nef*遺伝子が欠損している例があることも報告されている。したがって、生体内におけるNefの多様性およびCTL応答との関連性を明らかにすることは、HIV-1感染者の病態を理解する上で極めて重要であると考えられる。

本研究では、HIV-1感染者由来の末梢血単核球(PBMC)からCD8陽性細胞の有無によるウイルス分離を試み、そのペアウイルス間の*nef*遺伝子の遺伝子型の比較を試みた。対照として、同じペアウイルス間の*env* V3領域の比較を行った。検体として、4人の血友病患者(#53、#57、#67、#68)と、凝固因子製剤の家庭内投与の際の事故接種にて感染した#69(#67と#68の母親)の計5名のPBMCを用いた。#68と#69は、CD4/CD8比が比較的安定しているのに対し、#53、#57は、検査時点では前者とほぼ同じCD4/CD8比だったものの、#53はその半年後に急激にCD4/CD8比の低下が起こりCDCIIからCDCIIIへと進行し、#67はCD4陽性細胞の低下が顕著であった。これら5名のPBMC全体(A法)およびCD8陽性細胞を除いたPBMC(B法)をHIV-1非感染者のPBMCと共培養することにより、HIV-1を分離した。前者の分離法では、宿主の免疫応答から逃れたエスケープ株が選択的に分離されることが予想されるのに対し、後者の方法ではエスケープ株も含めた全てのウイルスが分離されることが考えられる。こうして分離したウイルスの感染細胞から抽出したプロウイルスDNAを鋳型とするPCRを行い、増幅したDNA産物をクローニングベクターに組み込み、*nef*領域77クローンおよび対照として*env* V3領域44クロンの塩基配列の解読を行った。

その結果、CD4/CD8比が安定している#68と#69においてはAとBウイルス間の*nef*遺伝子の相同性が他の3名(#53、#57、#67)に比べて低かった。それとは対照的に*env* V3遺伝子のAとBウイルス間の相同性は#53、#57、#67の方が#68と#69に比べて低かった。これらの結果から、#68と#69においてはNefに対するCD8特異的な免疫応答が上昇していることが予測され、一方、#53、#57および#67ではNefよりはEnv V3に対する免疫応答によりウイルス産生が抑制されていることが示唆された。したがって比較的病態の進行が緩やかな感染者においては、Nefに対する強いCTL応答が誘導、維持されていることが示唆され、Nefタンパク質に対するCTL応答はEnv V3以上にHIV-1感染に伴う病態進行の制御に関連する可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 細 川 眞澄男
副 査 教 授 柿 沼 光 明
副 査 教 授 生 田 和 良

学 位 論 文 題 名

A clearer distinction between HIV-1 paired isolates from peripheral blood mononuclear cells of asymptomatic carriers with and without CD8⁺ T-cells at *nef* rather than *env* V3 loci

(HIV-1無症候性キャリアの末梢血単核球からCD8⁺T細胞存在下及び非存在下において分離されたウイルスにおける*nef*と*env* V3 遺伝子の解析)

ヒト免疫不全ウイルス1型(HIV-1)の感染を受けると、急性感染期と呼ばれるウイルス血症が起こる。この時期に生体内のウイルス量は、一過性に増加するが、免疫応答の上昇に伴い、その後は低いレベルに抑制される。しかし、HIV-1は生体内から完全に排除されることはなく、平均10年に及ぶ無症候期(AC期)を経て、AIDSへと進行する。一般にCD8陽性T細胞は、生体内からのHIV-1の排除やその増殖抑制に寄与することが知られている。しかし、ウイルスは宿主側の免疫機構等の圧力から逃れるために多様な変異ウイルスを産生する。

HIV-1の遺伝子は*gag*、*pol*および*env*といったウイルス粒子構造蛋白質をコードする遺伝子、さらに*tat*および*rev*といったウイルス複製に関わる調節蛋白質をコードする遺伝子の他に*vif*、*vpr*、*vpu*および*nef*といったアクセサリー遺伝子(ウイルス複製には、必ずしも必要性が認められない)により構成されている。この中でGag、PolおよびEnv蛋白質は強いCTL誘導能があることが知られている。一方アクセサリー遺伝子がコードする蛋白質の中ではNefに対するCTL応答が最も顕著に認められる。HIV-1感染の動物モデルとなるアカゲザルに対するサル免疫不全ウイルスの感染実験から、*nef*遺伝子がAIDS発症に必須であることが指摘されており、またヒトにおいても、病気の進行が認められない長期未発症者の中に、*nef*遺伝子に変異している例があることも報告されている。したがって、生体内におけるNefの多様性およびCTL応答との関連性を明らかにすることは、HIV-1感染者の病態を理解する上で極めて重要であると考えられる。

本研究では、HIV-1感染者由来の末梢血単核球(PBMC)からCD8陽性細胞の有無によるウイルス分離を試み、そのペアウイルス間の*nef*遺伝子の遺伝子型の比較を試みた。対照として、同じペアウイルス間の*env* V3領域の比較を行った。検体として、4人の血友病患者

者(#53、#57、#67、#68)と、凝固因子製剤の家庭内投与の際の事故接種にて感染した#69(#67と#68の母親)の計5名のPBMCを用いた。#68と#69は、CD4/CD8比が比較的安定しているのに対し、#53、#57は、検査時点では前者とほぼ同じCD4/CD8比だったものの、#53はその半年後に急激にCD4/CD8比の低下が起こりCDCIIからCDCIIIへと進行し、#67はCD4陽性細胞の低下が顕著であった。これら5名のPBMC全体(A法)およびCD8陽性細胞を除いたPBMC(B法)をHIV-1非感染者のPBMCと共培養することにより、HIV-1を分離した。前者の分離法では、宿主の免疫応答から逃れたエスケープ株が選択的に分離されると予想されるのに対し、後者の方法ではエスケープ株も含めた全てのウイルスが分離されると予想される。こうして分離したウイルス感染細胞から抽出したプロウイルスDNAを鋳型とするPCRを行い、増幅したDNA産物について、*nef* 領域77クローンおよび対照として*env* V3領域44クロンの塩基配列の解読を行った。

その結果、CD4/CD8比が安定している#68と#69においてはAとBウイルス間の*nef*遺伝子の相同性が他の3名(#53、#57、#67)に比べて低かった。対照的に*env* V3遺伝子のAとBウイルス間の相同性は#53、#57、#67の方が#68と#69に比べて低かった。これらの結果から、#68と#69においてはNefに対する特異的なCD8免疫応答が上昇していること、#53、#57および#67ではNefよりはEnv V3に対する免疫応答が働いていることが示唆された。即ち、比較的病態が安定している感染者においては、Nefに対する強いCTL応答が誘導、維持されていること、このCTL応答はEnv V3以上にHIV-1感染に伴う病態進行の制御に関連する可能性が示唆された。

公開發表にあたり、副査の柿沼教授よりNef蛋白質の機能について、ウイルス分離を行ったキャリアのHLAを調べているか、A・Bウイルス間で違いが認められたアミノ酸残基がエピトープである可能性について、主査の細川教授より今回の結果はAIDS発症を予測できるマーカーとなり得るのか、CTL活性とウイルス負荷の関連性について、ウイルス分離時に共培養を行う理由とその解釈について、また副査の生田教授より一般的にCTLの標的となるウイルス蛋白の種類について、などの質問がなされたが、発表者はおおむね妥当な回答を行った。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。