HIV 蛋白に対する細胞性免疫応答の分子制御

日本医科大学微生物学免疫学教室 高橋秀実

As the major targets of immunity have been changing from extracellular antigens, such as harmful bacteria and their toxins, to intracellular events caused by viral genes or oncogenes, the main stream of immunology appears to have been shifted from humoral arm to cellular arm. The key effectors of the latter arm are T lymphocytes, in particular CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes (CTL) which can recognize fragmented viral parts or tumor antigens and may control intracellular virus replication or tumor progression. In this review, by modeling human immune deficiency virus (HIV) envelope protein, possible molecular control of cellular immune responses to viral components will be discussed.

HIV / cellular immunity / CTL / epitope / viral mutation

1. はじめに

今から遡ること200年前の1796年、イギリスの外科医Edward Jennerにより種痘が開始されたことに端を発した「免疫」の解明は、当初から肺炎球菌、連鎖球菌、あるいはジフテリア菌など培養可能な細菌群およびそれらが放出する毒素に対する応答を基に進められて行った。こうした細菌群は主として細胞外で自己増殖する異物、また毒素はその異物が放つ細胞外遊離物質であるため、その後の「免疫」学はごく最近に至るまで、細胞外異物を排除・処理するシステムを主として研究する方向へと流れたわけである。しかしながら、1981年になりこつ然とその姿を露呈し、急速な感染拡大によって現在全世界を恐怖に陥れている後天性免疫不全症候群 (acquired immune deficiency syndrome : AIDS エイズ) の原因とされるヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus : HIV) や、1989年になり漸く明らかにされた主たる輸血後肝炎およびそれに起因する肝硬変・肝臓癌の原因であるC型肝炎ウイルスなどのウイルス群は、上記の細胞外自己増殖性を有する細菌群とは異なり細胞内でのみ増殖・複製が可能であるため、従来の「免疫」学のみでは対処できなくなってきたのが現状である。また本邦における死亡原因のトップを独走する自己細胞が変化した悪性腫瘍(癌)も、ウイルス感染細胞のように細胞内の異常によ

ると考えた場合、これからの「免疫」学は異常をきたした自己細胞そのもののコントロールに、その主眼が注がれるべきであろう。

一般に、細菌や毒素のような細胞外に存在する異物は、その異物に直接結合する抗体の産生を担うBリンパ球を主体とした「体液性免疫」によって破壊・処理されるのに対し、ウイルス感染細胞や腫瘍細胞のような異常を来たした細胞は、Tリンパ球による「細胞性免疫」によって識別され破壊・統御される。本論文はこのような立場から、異常をきたした細胞を識別し破壊・統御する「免疫」システム、すなわち「細胞性免疫」に焦点を合わせ、その認識応答のメカニズムを筆者らがこれまで解析を進めてきたエイズウイルスをモデルとして分子レベルで論じたものである。

2. 「体液性免疫」および「細胞性免疫」による異物排除のメカニズム

「体液性免疫」を担うBリンパ球によって産生された抗体は、ウイルス自身やその破壊産物のような「非自己」であると判定された異物の表面に直接結合し、それらの動きを阻止するとともに、マクロファージや好中球による貪食および補体を介した破壊により、異物を「自己」の内部から排除する役割を担っているものと推測される。こうした「体液性免疫」に対し、ウイルス感染細胞や腫瘍細胞などの異常をきたした自己細胞を

Molecular control of cellular immune responses to HIV protein

Hidemi Takahashi

Department of Microbiology and Immunology, Nippon Medical School

破壊・制御すると想定されるのが、Tリンパ球による「細胞性免疫」である。このTリンパ球はウイルスの潜伏している細胞や腫瘍化した細胞と正常の細胞を識別し、その内部に異常を来たしている細胞を細胞ごと破壊・排除したり、また最近では各種の液性因子を介して内部に潜伏するウイルスの増殖を抑制することが判明してきた^{1)・3)}。ウイルス感染細胞や腫瘍化した細胞を破壊する場合、細胞を表面から破壊するのではなく、興味深いことにウイルス遺伝子の組み込まれた宿主細胞DNAあるいは異常をきたした癌細胞DNAの断裂を誘発し、その内部から細胞を破壊に導く方法 (apoptosis) をとる。この方法によれば、感染性のあるウイルス遺伝子や腫瘍化に連なる癌遺伝子が生体に拡散することなく、その後の恒常性を維持する上でも実に合目的な細胞死を誘導していると考えられる。

こうしたT細胞は抗体と異なり異物を直接に認識することはできず、細胞内で作られた異物の一断片、主としてアミノ酸10個程度から構成されるペプチド断片が、細胞表面に存在する情報提供分子であるMHC (major histocompatibility complex: 主要組織適合性遺伝子複合体) 分子とともに提示されたものを、そのレセプターを介してキャッチする。このMHC分子には、すべての核を有する細胞表面に出ているクラス I MHC分子とマクロファージ、B細胞、あるいは樹状細胞などの免疫系に情報を提供すると考えられている細胞の表面にのみ発現しているクラス II MHC分子とが存在する。このように2種類の異なったMHC分子が存在するのに相当し、レセプターを介して情報をキャッチするT細胞も、CD8分子を発現しているものとCD4分子を発現しているものの2種類が存在する。そ

して図1にまとめたように、細胞内で産生された異物、例えば感染したウイルス由来のmRNAが翻訳されて作成された蛋白や癌特異的蛋白などは、小胞体内でクラス I MHC分子と結合し細胞表面上へ提示され、CD8分子を有するT細胞によって認識される。これに対し、ウイルスの分泌産物や破壊産物などを取り込んだマクロファージなどは、こうした異物の組成を検討するため、細胞内の検査センターとも言うべきエンドゾームに運び、そこで分解した異物の断片をクラス II MHC分子とともに細胞表面に提示し、CD4分子を有するT細胞がこの情報をキャッチする⁴⁾。こうした個々のT細胞の作用を基に、前者のCD8T細胞をキラーあるいは統御T細胞³⁾と呼ぶのに対し、後者のCD4T細胞をヘルパーT細胞と呼んでいる。このヘルパーT細胞には、インターロイキン (IL) -2, インターフェロン (IFN) - γ などの放出を介し「細胞性免疫」の誘導・維持を担うTh1型と、IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13などを介し「体液性免疫」の誘発を担うTh2型とが存在し、免疫応答のバランスを保っている。

3. エイズウイルス (HIV) のエンヴェロープ蛋白内のキラー-T細胞の認識部分

図2のごとくHIVの表面はキノコのような形をしたエンヴェロープ (gp160) という蛋白で覆われており、この表面蛋白はさらに傘の部分に相当するgp120とその柄の部分に相当するgp41から構成される。HIV感染者の体内にはHIV感染細胞を特異的に認識排除するCD8キラーT細胞が存在し、その中にはおよそ900個のアミノ酸から構成されるgp160蛋白のどこかを認識するCD8キラーT細胞が存在するという報告⁵⁾に基づき、当初ヒトにおけるキラー-T細胞の認識部位 (エピト

図1 抗原提示とT細胞による認識応答

図2 HIVの構造とエンヴェロープ蛋白

ープ)の同定を種々の合成ペプチドを用いて検討した。その結果、個々のMHC分子が異なるためか、一定の認識部位を見出すには至らなかった。そこで、他の動物の免疫システムがこのHIVエンヴェロップ蛋白抗原を異物として認識応答するならば、その認識エピトープは比較的種を越えて認識応答される抗原性を有した部分であり、将来のキラーT細胞を誘導するようなペプチドワクチンの開発にとっても重要な意味を持つ部分であろうとの考えに立ち研究を進めた。エイズウイルスの中で最も頻繁に実験に使用されているⅢB株由来のペプチド群、および種々のマウスを用いて検討した結果、ウイルス変異性の激しいgp120内のV3領域と呼ばれる部分に、非常に抗原性の強いCD8陽性キラーT細胞の認識エピトープを見出すことができた⁶⁾。当初この認識エピトープは15個のアミノ酸から成るペプチド(P18ⅢB:アミノ酸番号315-329:RIQRGPGRAFVTIGK)として同定されたが、その後この内部の10個のアミノ酸I-10(318-327:RGPGRAFVTI)が、マウスのクラスI MHC分子(D^d)によって提示されるCD8陽性キラーT細胞の最小認識部分であることが確められた⁷⁾。また、P18はヒトのクラスI MHC分子(HLA-A2, A3, A11)などによっても提示され、ヒトのキラーT細胞によって認識される部分であることも確認された⁸⁾。更に興味深いことに、P18ⅢBは同時にマウスクラスII MHC分子(A^d)に拘束されたCD4陽性ヘルパーT細胞の認識部分を内包しており⁹⁾、その最小認識部分はI-13と右端を共有した13個のアミノ酸から成るI-13(315-327:RIQRGPGRAFVTI)であった¹⁰⁾。このI-13特異的なCD4陽性ヘルパーT細胞を誘導したところIL-2、IFN- γ を分泌しIL-4を分泌しなかったことから、その主体は「細胞性免疫」の誘導・維持を担うTh1型のヘルパーT細胞であると想定された。

こうしたエピトープ内には、MHC分子と直接に結合し抗原の提示を支配するアミノ酸、およびT細胞のレセプターと直接に接触し抗原の特異性を決定するアミノ酸が存在すると想定される。詳細な実験の結果、P18ⅢB内のクラスI MHC分子との主たる結合部位は320番目の(R)および322番目の(F)であり、CD8キラーT細胞レセプターとの接触部位は325番目の(V)であった¹¹⁾。また、驚いたことにクラスII MHCとの主たる結合部位も320番目の(R)および322番目の(F)であり、クラスI MHC分子との結合部位と完全に一致していたが、特異性に関わるCD4ヘルパーT細胞レセプターとの接触部位は317番目の(Q)および318番目の(R)であった¹²⁾。以上の様相をまとめたのが図3であるが、P18ⅢBの配列がTrypstatin(TL2)という蛋白

図3 エピトープ内のMHC及びTCR結合部位

分解酵素阻害剤とホモロジーを有するという報告¹³⁾を考慮すると、ウイルス由来のエピトープペプチドとそれを提示するMHC分子との間には、酵素と基質あるいは酵素阻害剤と基質のような蛋白化学的関係が存在しているのかも知れない。今後のこうした分野の更なる飛躍が望まれる。

4. ウイルス変異とキラーT細胞の特異性

このキラーT細胞の認識部位P18(315-329)は非常に変異の激しい部分であるものの、初めて実験に使用したⅢB株のみならず他のMN株やRF株においても主たるキラーT細胞の認識部位であった(表1)。この表1から明らかなように、ⅢB株、MN株、RF株特異的なキラーT細胞はそれぞれ非交差性であった。そこでP18部分におけるⅢB株およびMN株のアミノ酸配列を比較したところ、MHC分子との結合部位である320番目の(R)および322番目の(F)が共通であるものの、特異性の鍵を握る325番目のアミノ酸がⅢB株(P18ⅢB)では(V)であり、MN株(P18MN)では(Y)であったため、それぞれのアミノ酸を相互置換したペプチドP18ⅢB(V→Y)およびP18MN(Y→V)を作成し、それぞれのペプチドに対する応答性を追跡したところ、わずかに一箇所のアミノ酸置換による特異性の逆転現象が認められた¹⁴⁾(図4)。更に、325番目のアミノ酸を種々に置換したペプチド群を作成し、上記のキラーT細胞株を用いて交差性の検討を行ったところ、ⅢB株特異的なキラーT細胞はこの部位にV, I, Lなどの分枝鎖型のアミノ酸が、またMN株特異的なキラーT細胞はこの部位にY, F, H, W, Pなどの環状型のアミノ酸が配列された場合に交差性を示すことが判明した¹⁵⁾(表2)。ここで、あらためて表1の結果を見直すと、MN株特異的なキラーT細胞が交差性を示した変異株は、すべて325番目のアミノ酸がSC株(Y), SF2株(H), Z321株(F), NY5株(Y)と環状構造を有して

表1 HIV-IIB, MN, RF株特異的キラーT細胞の示す他主の株との交差障害性

HIV 変異株	Sequence			IIB株特異的 キラーT細胞	MN株特異的 キラーT細胞	RF株特異的 キラーT細胞
	315	325	329			
IIB	RIQRGPGRF	V	TTGK	+++a, b)	—	—
MN	RIHIGPGRF	Y	TTKN	—	+++	—
RF	SITKGPGRVI	Y	ATGQ	—	—	+++
SC	SIHIGPGRF	Y	AYGD	—	+++	—
WMJ-2	SLSIGPGRF	R	TREI	—	—	—
Z321	SISIGPGRF	F	ATTD	—	++	—
SF2	SIYIGPGRF	H	TTGR	—	++	—
NY5	GIAIGPGRTL	Y	AREK	—	+	—
CDC4	RVTIGPGRVW	Y	TTGE	—	—	—
Z3	SIRIGPGKVF	T	AKGG	—	—	—
MAL	GIHEGPGQAL	Y	TTGI	—	—	—
Z6	STPIGLGQAL	Y	TTRG	—	—	—
JY1	STPIGLGQAL	Y	TTRI	—	—	—
ELI	RTPTGLGQSL	Y	TTRS	—	—	—

a) エフェクター：ターゲット比は10:1。
b) 細胞傷害活性スコアは以下の基準をもとに決定した。
+++：45%傷害以上，++：25～45%，+：10～25%，—：5%以下
(文献15) H.Takahashi, et al.: Science 255: 333-336, 1992より改変)

MHC結合部位 V _H V _D V _J		TCR結合部位 TCR α TCR β		IIB株特異的 キラーT細胞	MN株特異的 キラーT細胞
P18IIB:	-R-I-Q-R-G-P-G- ³¹⁵ A- ³²⁵ V-T-I-G-K-			+++	—
P18MN:	-R-I-H-I-G-P-G- ³¹⁵ A- ³²⁵ Y-T-T-K-N-			—	+++
P18IIB(V-Y):	-R-I-Q-R-G-P-G- ³¹⁵ A- ³²⁵ V-T-I-G-K-			—	+++
P18MN(V-Y):	-R-I-H-I-G-P-G- ³¹⁵ A- ³²⁵ Y-T-T-K-N-			+++	—

図4 アミノ酸相互置換による特異性の変換

表2 18MN (325) 置換ペプチド群に対するキラーT細胞の認識応答

18MN置換 ペプチド群	Sequence			IIB株特異的 キラーT細胞	MN株特異的 キラーT細胞
	315	325	329		
18IIB	RIQRGPGRF	V	TTGK	+++a, b)	—
18MN	RIHIGPGRF	Y	TTKN	—	+++
18MN (Y→V)	RIHIGPGRF	V	TTKN	+++	—
18MN (Y→I)	RIHIGPGRF	Y	TTKN	++	—
18MN (Y→P)	RIHIGPGRF	P	TTKN	—	++
18MN (Y→L)	RIHIGPGRF	L	TTKN	++	—
18MN (Y→W)	RIHIGPGRF	W	TTKN	—	+
18MN (Y→F)	RIHIGPGRF	F	TTKN	—	+++
18MN (Y→S)	RIHIGPGRF	S	TTKN	—	—
18MN (Y→E)	RIHIGPGRF	E	TTKN	—	—
18MN (Y→R)	RIHIGPGRF	R	TTKN	—	—
18MN (Y→H)	RIHIGPGRF	H	TTKN	—	++
18MN (Y→K)	RIHIGPGRF	K	TTKN	—	—
18MN (Y→Q)	RIHIGPGRF	Q	TTKN	—	—

a) エフェクター：ターゲット比は10:1。
b) 細胞傷害活性スコアは以下の基準をもとに決定した。
+++：45%傷害以上，++：25～45%，+：10～25%，—：5%以下
(文献15) H.Takahashi, et al.: Science 255: 333-336, 1992より改変)

いた。

5. おわりに

以上のように、特異的キラーT細胞はクラス I MHC 分子より提示されたウイルス抗原のアミノ酸一つ一つを識別しながら、その提示を行ったウイルス感染細胞を確実に生体から排除するわけであるが、通常感染早期よりこのキラーT細胞が出現して来るにもかかわらず、一般的にウイルスは体内に残存し持続感染状態が

招来される。そのメカニズムの一つとして最近筆者らが見い出した現象に、ウイルス抗原がキラーT細胞の表面上にあるクラス I MHC分子に直接結合した場合に生ずる、一時的なキラーT細胞麻痺状態がある¹⁶⁾。この現象は図5に示したように、ちょうどウイルス感染細胞を破壊した際に「返り血」のごとくウイルスの破片を浴び、それを自分のレセプターという「手」で触った場合、あるいは2個のキラーT細胞が同時に相手についている「返り血」を双方の「手」で認識した場合、すなわちT細胞レセプターを介しての「認識した」というシグナルと、MHC分子を介しての「認識された」というシグナルが同時一つの細胞内で伝達された場合、キラー活性が抑制される回路が回り出すために引き起こされると考えられる。そして、こうした抑制機序によって感染細胞の完全除去がなされず、ウイルスの持続感染が招来されるものと推測される。したがって、ウイルスに対する「細胞性免疫」応答の状況を数量化し、感染後の経過を予測する場合には、このようなウイルス分子自体による免疫抑制効果をも考慮に入れる必要がある。

また始めに述べたように、従来の抗体を主体とした「体液性免疫」の主たる目的は、おそらく生体内に侵入した細菌群などの謂わば植物性異物の排除、あるいはその放出毒素の処理であり、細胞内でのみ複製可能な

図5 ウイルスペプチドによるキラーT細胞の抑制

ウイルス群や自己細胞の変化した腫瘍などに対しては、その破壊産物や放出産物の排除・処理にあたる程度なのであろうと推察される。これに対し、T細胞、特にクラス I MHC分子からの情報を受け取るキラーT細胞を主体とした「細胞性免疫」こそ、ウイルス感染や自己細胞の腫瘍化、すなわち、我々の身体を構成する動物細胞を統御する主たる防御システムではないだろうか。したがって、今後ワクチンによる能動免疫賦活を行う場合、ことに対象がウイルスや癌である場合にはこれまでのように単に「体液性免疫」としての抗体を誘発するものではなく、主として「細胞性免疫」を賦活するようなものを考案して行くことが肝要であろう^{17), 18)}。

免疫学の矛先が体内に寄生していた病原性細菌群などの制御から、細胞内を活動の場とする持続感染性ウイルスや癌に向けてきた現在、異物の破壊・排除にあたってきた抗体による「体液性免疫」の研究から、細胞内異常の統御・調節を主眼としたT細胞による「細胞性免疫」を介した疾病との共生へ目を転ずる時代の訪れを感じる。本論文が、我々に内在する細胞内の変化をキャッチするシステムである「細胞性免疫」の仕組みを理解する上に、いささかでも役に立つことができれば望外の喜びである。

文 献

- 1) Cocchi, F., DeVico, A. L., Garzino-Demo, A., Arya, S. K., Gallo, R. C., Lusso, P. (1995) *Science* **270**, 1811-1815.
- 2) Baier, M., Werner, A., Bannert, N., Metzner, K., Kurth, R. (1995) *Nature* **378**, 563.
- 3) Levy, J. A., Mackewicz, C. E., Barker, E. (1996) *Immunol. Today* **17**, 217-224.
- 4) Takahashi, H. (1993) *Microbiol. Immunol.* **37** : 1-9
- 5) Walker, B. D., Chakrabarti, S., Moss, B., Paradis, T. J., Flynn, T., Durno, A. G., Blumberg, S., Kaplan, C., Hirsch, M. S., Schooley, R. T. (1987) *Nature* **328**, 345-348.
- 6) Takahashi, H., Cohen, J., Hosmalin, A., Cease, K. B., Houghten, R., Cornette, J. L., DeLisi, C., Moss, B., Germain, R. N., Berzofsky, J. A. (1988) *PNAS. USA* **85**, 3105-3109.
- 7) Shirai, M., Pendleton, C. D., Berzofsky, J. A. (1992) *J. Immunol.* **148**, 1657-1667.
- 8) Clerich, M., Lucey, D. R., Zajac, R. A., Boswell, R. N., Gebel, H. M., Takahashi, H., Berzofsky, J. A., Shearer, G. M. (1991) *J. Immunol.* **146**, 2214-2219.
- 9) Takahashi, H., Germain, R. N., Moss, B., Berzofsky, J. A. (1990) *J. Exp. Med.* **171**, 571-576.
- 10) Takahashi, H., Takeshita, T., Kozlowski, S., Nakagawa, Y., Ahlers, J., Pendleton, C., Moore, R., Fox, B., Yokomuro, K., Margulies, D. H., Berzofsky, J. A. (1994) *Vaccine* **94**, 181-188.
- 11) Takahashi, H., Houghten, R., Putney, S. D., Margulies, D. H., Moss, B., Germain, R. N., Berzofsky, J. A. (1989) *J. Exp. Med.* **170**, 2023-2035.
- 12) Takeshita, T., Takahashi, H., Kozlowski, S., Ahlers, J., Pendleton, C., Moore, R., Nakagawa, Y., Yokomuro, K., Fox, B., Margulies, D. H., Berzofsky, J. A. (1995) *J. Immunol.* **154**, 1973-1986.
- 13) Kido, H., Fukutomi, A., Katsunuma, N. (1991) *FEBS Lett.* **286**, 233-236.
- 14) Takahashi, H., Merli, S., Putney, S. D., Houghten, R., Moss, B., Germain, R. N., Berzofsky, J. A. (1989) *Science* **246**, 118-121.
- 15) Takahashi, H., Nakagawa, Y., Pendleton, C. D., Houghten, R., Yokomuro, K., Germain, R. N., Berzofsky, J. A. (1992) *Science* **255**, 333-336.
- 16) Takahashi, H., Nakagawa, Y., Leggett, G., Ishida, Y., Saito, T., Yokomuro, K., Berzofsky, J. A. (1996) *J. Exp. Med.* **183**, 879-889.
- 17) Takahashi, H., Takeshita, T., Morein, B., Putney, S. D., Germain, R. N., Berzofsky, J. A. (1990) *Nature* **344**, 873-875.
- 18) Takahashi, H., Nakagawa, Y., Yokomuro, K., Berzofsky, J. A. (1993) *Int. Immunol.* **5**, 849-857.