—臨床医のために—

遺伝子組み換え技術を用いたウイルス特異的 キラーT細胞の誘導およびその解析

AIDS ウイルス (HIV) をモデルとして

高橋 秀実*

日本医科大学微生物学・免疫学教室

Induction and analysis of viral specific cytotoxic T lymphocytes with modern biotechnology

Hidemi Takahashi

Department of Microbiology and Immunology, Nippon Medical School

はじめに

抗生物質の開発・進歩により、感染症の時代は克服されたかのごとく見えたが、近年、欧米を中心に瞬く間に世界中に蔓延した AIDS を始めとし、ATL や輸血などに伴う B あるいは C 型の肝炎、さらには難治性の神経痛を引き起こす帯状疱疹の原因とされるヘルペスなど、これまでの細菌に代わりウイルスによる感染症が増大してきている。また、ATL、B、C 型肝炎ウイルスのように生体の免疫力が完全にウイルスを排除出来ない場合、そのウイルスが持続的に生体内に存在し続け、時には発ガンを惹起することもわかってきた。したがって、このようなウイルスに対する免疫系の応答を明らかにしていくことは、ウイルス感染症を克服し、その真の病態に迫り予防手段を構ずる上でも重要である。本稿では、近年急速に進歩を遂げている分子生物学的手法を駆使することにより、こうしたウイルス感染と戦う免疫応答の仕組みが次第に解明されてきた現状を、著者らがこれまで取り組んできた AIDS ウイルス (Human Immunodeficiency Virus: HIV) をモデルとして論を進めていくことにしたい。

1. ウイルス感染に対する免疫応答

異物としてのウイルスが生体内に侵入すると、これを不活化・排除しようとして免疫系が作動を開始する。

一般に、ウイルス感染に対し特異的に応答する免疫系は、主としてリンパ球によって構成され、図1に示したように、ウイルスと直接結合し不活化する(中和)抗体を産生する B 細胞を中心とした体液性免疫と、ウイルスが侵入した感染細胞を直接障害排除するキラー T 細胞の誘導、および種々のサイトカインを分泌し抗体ならびにキラー T 細胞の誘導を補助するヘルパー T 細胞を惹起する T 細胞を中心とした細胞性免疫とに大別される。抗体はウイルスそのものの構造を認識し直接結合するのに対し、T 細胞はウイルス由来の蛋白体が感染細胞内で断片化されたウイルス由来のペプチ

図1 ウイルス感染に対する免疫応答

ドを、細胞表面に存在する主要組織適合遺伝子複合体 (Major Histocompatibility Complex : MHC) 産物とともに提示された形で認識する¹⁾ (図2)。ここで、MHC 産物とはヒトにおける移植抗原としての HLA (Human Leukocyte Antigen) と同義である。つまり、ウイルスの侵入を受けた宿主細胞は、そのウイルスに関する情報を、ウイルス由来のペプチド断片と自己の HLA を組み合わせた形で細胞表面に提示し、T 細胞に伝達するという複雑な方法をとっているのである。さらにこの MHC (HLA) は、すべての有核細胞に存在するクラス I 型 (HLA-A, B, C に相当) と、マクロファージや B 細胞などの免疫系細胞に主として表出しているクラス II 型 (HLA-DP, DQ, DR に相当) に大別される。そして、クラス I 型の MHC からの情報は、CD 8 分子がその表面上にでている T 細胞によって認識され、クラス II MHC からの情報は、CD 4 分子がでている T 細胞によって認識される。この場

図2 T細胞による抗原認識

合、細胞内で産生されるウイルス由来の蛋白体などは、クラス I MHC 分子とともに提示され、細胞外で産生されたインスリンやヘモグロビン、あるいはウイルスが分泌、あるいは破壊された結果の蛋白体などを細胞が取り込んだ場合には、その蛋白体はエンドゾームで断片化され、クラス II MHC 分子とともに提示されることがわかってきた²⁾。また、一般に、ウイルス感染に対しては、主として CD 8 分子陽性の細胞がキラーT細胞であり、CD 4 分子陽性の細胞がヘルパーT細胞であると考えられている。以上のことをまとめたのが図3である。

2. ウイルス特異的キラーT細胞の誘導

これまで、ウイルス感染に対する防御能を検討する場合、抗ウイルス抗体の検出のみにその主眼が注がれる傾向があった。ところが、AIDS にせよ C 型肝炎にせよ、生体が抗体を産生しているにも拘らず病状が進んでいくこと、さらに、ウイルス増殖を逆に促進してしまう Enhancing antibody³⁾ の存在が明らかとなるに及び、特に細胞内に潜み抗体の影響を受けずに持続感染を生じていくウイルスに対しては、そのウイルスが感染している細胞を、細胞ごと破壊するキラーT細胞を活性化することが、ワクチン開発も含め重要であると考えられるようになってきた⁴⁾。このキラーT細胞の特性およびT細胞が認識しているウイルスの蛋白部分を検討する目的で、AIDS の原因とされる HIV

図3 キラーT細胞およびヘルパーT細胞への抗原提示

図4 Townsendのモデル。ウイルス感染細胞に対する特異的キラーT細胞は、ウイルス遺伝子挿入細胞、あるいはウイルス蛋白の一部を人工的に合成したペプチドを結合させた細胞をウイルス感染細胞のごとく認識し障害する。

をモデルとしてその解析を以下のように進めていった。

まず、HIV そのものはヒト、あるいはチンパンジーにしか感染しない。ところが、ヒトあるいはチンパンジーを用いて感染実験をし、種々の解析を進めていくことは実際問題として不可能である。また、例えば感染はしなくとも、HIV そのものを他の動物に接種して研究を進めることは、その動物の飼育・廃棄などを含め多くの問題が残る。以上の点より、われわれは、ウイルスそのものではなく、ウイルスの一部の蛋白体を人工的に作製し、ウイルスに対する免疫応答を、遺伝系に確立されたマウスの免疫系を用いて惹起する方法を考えた。そして、ウイルス由来の蛋白体として、ウイルスの表面に存在し、最も抗原性が強いと考えられていた *env* 遺伝子にコードされたエンヴェロープ蛋白を免疫応答のターゲットとした。1986 年末までの時点で、米国の Bennink & Moss⁵⁾により、インフルエンザウイルスの一部の遺伝子を組み込んだワクチニアウイルスでマウスを免疫すると、組み込まれたインフルエンザウイルス蛋白に対し、キラーT細胞が誘導されることがあるという報告、および英国の Townsend⁶⁾により、ウイルス感染細胞に対する CD8 分子陽性のキラーT細胞は、ウイルスの遺伝子の一部を移入した細胞を、あたかもウイルス感染細胞のごとく障害し、さらにその遺伝子にコードされた蛋白由来のペプチドをクラス I MHC 分子とともに提示した細胞をも、ウイルス感染細胞のように障害排除したという報告⁶⁾がなされた(図4)。

以上の事実に基づき、著者らは HIV の *env* 遺伝子を組み込んだワクチニアウイルスと、その遺伝子をマ

図5 HIV エンヴェロープ抗原特異的キラー細胞の誘導。エンヴェロープ遺伝子を組み込んだワクチニアウイルスで免疫した BALB/c マウスの細胞をエンヴェロープを表現した BALB/c 3T3 線維芽細胞で再刺激するとエンヴェロープ抗原を表現した細胞(●—●)は障害するが、抗原を表現していない細胞(○—○)は障害しなかった。また、コントロールのワクチニアウイルスで免疫した BALB/c マウスの細胞をエンヴェロープを表現した BALB/c 3T3 線維芽細胞で再刺激した場合には、エンヴェロープ抗原を表現した細胞(■—■)および表現しない細胞(□—□)に対する障害活性は認められなかった。

ウスの線維芽細胞に移入し発現させたトランスフェクタントを作製した。そして、この組み換えワクチニアウイルスで種々のマウスを免疫し、この免疫マウスより調整した免疫脾臓細胞を上述のトランスフェクタントで再刺激して、エンヴェロープ蛋白特異的キラーT細胞が誘導されるか否かを検討した。その結果、H-2^d という遺伝形質を持った BALB/c マウスが、このヒト

図6 特異的CTLの認識するエピトープの同定 (No. 18に非常に強い活性が認められた.)

に感染する HIV のエンヴェロップ蛋白に対し特異的キラーT細胞を誘導することが明らかとなった⁷⁾ (図5)。ここで誘導されてきたキラーT細胞は抗CD4抗体と補体で処理しても全く影響を受けなかったが、抗CD8抗体と補体とで処理すると完全に失活したため、CD8陽性のキラーT細胞であることが判明した。

3. キラーT細胞の認識する部位の同定

以上のように、BALB/cマウスの免疫系を用いてクラスI MHC分子により提示される HIV エンヴェロップ抗原に特異的なCD8陽性のキラーT細胞を誘導することに成功した。このエンヴェロップは、およそ900のアミノ酸から成る蛋白体であるが、ここで誘導されたキラーT細胞は、この蛋白体のどの部分を認識しているのだろうか？ 図4に示した Townsend のウイルス抗原特異的キラーT細胞の抗原認識モデルに則り、そのT細胞の認識する抗原部位を、DeLisi & Berzofsky のたてた仮説⁸⁾に基づいて、全エンヴェロップ蛋白より15-20アミノ酸より成る重複し

たペプチドおよそ50カ所を予測し、人工的に合成した。そしてそれぞれの合成ペプチドを、クラスI MHC分子を表出している BALB/c 3T3 線維芽細胞とともに培養し、ペプチドをクラスI分子に結合させ、キラーT細胞によって障害性を受けるか否かを検討した。その結果、特定の1つの合成ペプチドが結合した3T3細胞のみが障害されることが明らかとなり、エンヴェロップ蛋白のキラーT細胞に対する15個のアミノ酸より成る抗原決定基 (エピトープ) (P18: RI-QRGPGRFVTVIGK) がこの領域に存在することを見いだした⁷⁾ (図6)。このエピトープは、極めてウイルス変異の激しい領域に存在した。その後、他の変異株においても、キラーT細胞は、この部分を認識することが判明した⁹⁾。興味あることには、患者血液中のリンパ球にも、この部分に反応するCD8陽性のキラーT細胞の存在することが確認された¹⁰⁾。さらに、この部位はクラスII MHC分子によってヘルパーT細胞にも提示され、これを活性化する¹¹⁾一方、ウイルス中和抗体の主たる認識部分でもあった¹²⁾。こうした結果は、ウイルスにとってみれば、この部分を変異するだけで、あらゆる免疫系の追跡から逃れうることを示しており、まさに生体内でウイルスと免疫系が壮絶な戦いを演じていることを示唆している。

おわりに

以上、現代の遺伝子工学を駆使することにより、ウイルスそのものを用いずともウイルスに対する免疫応答を惹起し、その解析を進めることができることを示した。本稿が、諸兄にウイルス感染に対する細胞性免疫応答の重要性を示唆し、些かでも理解に役に立つことができれば、著者望外の喜びである。

稿を終えるにあたり、ご校閲を賜りました日本医科大学微生物学・免疫学教室横室公三教授に深謝いたします。

文 献

- 1) Berzofsky, J.A., Brett, S.J., Sreicher, H.Z. and Takahashi, H.: Antigen processing. *Immunol. Rev.*, 106, 5-31, 1988.
- 2) Germain, R.N.: The ins and outs of antigen processing and presentation. *Nature*, 322, 687-689, 1986.
- 3) Robinson, W.E., Jr., Montefiori, D.C. and Michell, W.M.: Antibody-dependent enhancement of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Lancet*, i, 830-831, 1988.
- 4) Takahashi, H., Takeshita, T., Morein, B., Putney, S., Germain, R.N. and Berzofsky, J.A.: Induction of CD8+

- cytotoxic T cells by immunization with purified HIV-1 envelope protein in ISCOMs. *Nature*, **344**, 873~875, 1990.
- 5) Bennink, J.R., Yewdell, J.W., Smith, G.L., Moller, C. and Moss, B.: Recombinant vaccinia virus primes and stimulates influenza haemagglutinin-specific cytotoxic T cells. *Nature*, **311**, 578~579, 1984.
 - 6) Townsend, A.R.M., Rothbard, J., Gotch, F.M., Bahadur, G., Wraith, D. and McMichael, A.J.: The epitopes of influenza nucleoprotein recognized by cytotoxic T lymphocytes can be defined with short synthetic peptides. *Cell*, **44**, 959~968, 1986.
 - 7) Takahashi, H., Cohen, J., Hosmalin, A., Cease, K.B., Houghten, R., Cornette, J., DeLisi, C., Moss, B., Germain, R.N. and Berzofsky, J.A.: An immunodominant epitope of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp160 recognized by class I major histocompatibility complex molecule-restricted murine cytotoxic T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 3105~3109, 1988.
 - 8) DeLisi, C. and Berzofsky, J.A.: T cell antigenic sites tend to be amphipathic structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 7048~7052, 1985.
 - 9) Takahashi, H., Merli, S., Putney, S.D., Houghten, R., Moss, B., Germain, R.N. and Berzofsky, J.A.: A single amino acid interchange yield reciprocal CTL specificities for HIV-1 gp160. *Science*, **246**, 118~121, 1989.
 - 10) Clerich, M., Lucey, D.R., Zajac, R.A., Boswell, R.N., Gebel, H.M., Takahashi, H., Berzofsky, J.A. and Shearer, G.M.: Detection of cytotoxic T lymphocytes specific for synthetic peptides of gp160 in HIV-seropositive individuals. *J. Immunol.*, **146**, 2214~2219, 1991.
 - 11) Takahashi, H., Germain, R.N., Moss, B. and Berzofsky, J. A.: An immunodominant class I-restricted cytotoxic T lymphocyte determinant of human immunodeficiency virus type 1 induces CD4 class II-restricted help for it self. *J. Exp. Med.*, **171**, 571~576, 1990.
 - 12) Palker, T.J., Clark, M.E., Langlois, A.J., Matthews, T.J., Weinhold, K.J., Randall, R.R., Bolognesi, D.P. and Haynes, B.F.: Type-specific neutralization of the human immunodeficiency virus with antibodies to env-encoded synthetic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 1932~1936, 1988.

(受付: 1991年 8月16日)