

## 15. 母乳細胞による DC-SIGN を介した HIV-1 感染伝播の可能性

分担研究者 高橋 秀実 日本医科大学微生物学免疫学教室 教授

研究要旨 最近の研究によれば、およそ 30-50% の HIV-1 母児感染者は母乳を介したものであることが判明してきたが、母乳感染が成立するメカニズムに関しては不明な点が多い。今回我々は HIV-1 の母乳感染が、ことに生直後に分泌される初乳を介しての感染率が高いとの報告に基づき、初乳をターゲットして母乳感染が成立する機序を探った。この際、母乳感染の主体が R5 タイプウイルスによって惹起されていることを勘案し、HIV-1 NLAD8 株を用いて研究を実施した。産褥 3-6 日の初乳より細胞成分を分離採取し、様々な抗体を用いて表面分子を解析したところ、T 細胞の割合が非常に少なく、CD14 陽性のマクロファージが大多数を占めることが判明した。この母乳 CD14 陽性細胞の大半は CD4 陽性で、ケモカインレセプター CCR5 や CXCR4、および HIV-1 を捕捉し感染の補助をする DC-SIGN 分子を発現しており、その発現は IL-4 の添加により著しく増強した。これら IL-4 で刺激した母乳細胞は CCR5 や CXCR4 の発現は低下しウイルス産生量も低下していたものの、他の細胞への HIV-1 感染伝播力が著しく増強していた。またこの感染伝播力は抗 DC-SIGN 抗体により特異的に抑制された。さらに、胃酸と同等の酸性条件下で HIV-1 の感染力を検討したところ、Free ウイルスの場合 1 分間処理で失活するものの、DC-SIGN を介して捕捉されたと考えられる場合には 3 分間処理によっても 30-40% の感染力が残ることが判明した。以上、初乳マクロファージ群表面に発現した DC-SIGN を介して捕捉された R5 型の HIV-1 が、胃酸の粘膜バリアーを通過し小腸に存在する HIV 感受性を有する T 細胞群に伝播される可能性が示唆された。

### A. 研究目的

妊娠中からの抗ウイルス薬の内服あるいは選択的帝王切開による産道感染の回避により、エイズウイルス(HIV)の垂直感染が予防可能とはなってきたものの、アフリカなどの HIV 浸淫地域では母児感染の拡大が続いている。最近の研究によれば、およそ 30-50% の HIV 母児感染者は母乳を介したものであることが判明してきたが、こうした母乳感染が成立するメカニズムに関しては不明な点が多い。今回我々は HIV 母乳感染が、ことに生直後に分泌される初乳を介しての感染率が高いとの報告に基づき、初乳をターゲットして母乳感染が成立する機序を探った。この際、一般に HIV は細胞表面のケモカインレセプターを侵入門戸として細胞に感染するが、母乳感染の主体がケモカインレセプターの一つである CCR5 を標的門戸としたマクロファージ指向性の R5 タイプウイル

スによって惹起されていることを勘案し、HIV-1 NLAD8 株を用いて研究を展開した。

### B. 研究方法

正常分娩後の褥婦からインフォームドコンセントを得た上で初乳を採取し、検体を得た。初乳から、Ficoll-Hypaque 法により母乳細胞を採取し、その表面マーカーを Flow Cytometry にて解析した。また母乳細胞をサイトカインで刺激し培養しその表面マーカーの変化を比較した。次に母乳中に含まれるマクロファージ (BrMMF) は IL-4 サイトカインの刺激で DC-SIGN を発現した樹状細胞に分化することより、BrMMF を IL-4 サイトカインの刺激の有無により HIV-1 ウイルスに感染させた時の感染力を NLAD8 に感受性を有する MAGIC-5 細胞を利用して追跡した。そしてこの感染伝播力が、抗 DC-SIGN 分子を介したものであること

を確認するため、抗 DC-SIGN 抗体を用い blocking の実験を行なった。最後に、BrMMF が経口ほ乳され胃酸に曝露されると感染力がどう変化するか確認するため、Free の HIV ウイルスと HIV 感染細胞を酸性条件にし、それらの感染伝播力を検討した。

### C. 研究結果

- 1) 初乳中の HIV 感受性を有する CD4 陽性細胞群を調べたところ、予想に反して T 細胞のマークである CD3 陽性細胞はほとんど検出できず、その大半は CD14 分子陽性のマクロファージ群(BrMMF)であった (図 1)。
- 2) この CD4 陽性かつ CD14 陽性の BrMMF は、HIV-1 の細胞内侵入に必要なケモカインレセプター CCR5, CXCR4 も発現しており、興味深いことに HIV-1 ウイルスを捕捉し感染の補助をする DC-SIGN 分子も陽性である事が判明した。また、IL-4 で刺激した場合には、DC-SIGN の発現が著しく増強し逆にケモカインレセプターは低下していた。なお、IL-2 とともに培養した場合には、これらの分子の発現は殆ど変化しなかった (図 2)。
- 3) 母乳細胞を IL-4 の有無で培養し、それらの細胞に HIV-1 ウイルスを感染させたところ、IL-4 刺激した細胞ではウイルスの産生が低下していたものの (図 3 A)、MAGIC-5 細胞への感染伝播力は DC-SIGN が強発現した IL-4 刺激細胞の方がウイルス放出量の多い未刺激群と比較し優位に高かった (図 3 B)。
- 4) 次に IL-4 により刺激された母乳細胞による MAGIC-5 細胞への HIV-1 感染伝播が、DC-SIGN を介したものであるのか否かを確認するため、抗 DC-SIGN 抗体による感染阻止実験を施行した。その結果、isotype-matched コントロールの抗体群では全く NL(AD8)株の感染伝播が抑制されなかったものの、抗 DC-SIGN 抗体の存在下でウイルスを感染後、Free Virus を wash out した IL-4 刺激母乳細胞の感染

伝播力は著明に抑制された (図 4)。このことは、BrMMF 上に発現した DC-SIGN を介して捕捉された R5-type の HIV-1 が Free Virus よりも強い感染伝播力を保持していることを示唆している。

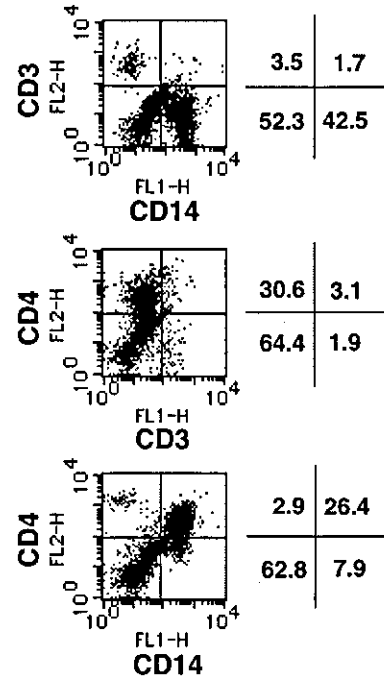


図 1. 初乳中 CD4 陽性細胞の特性

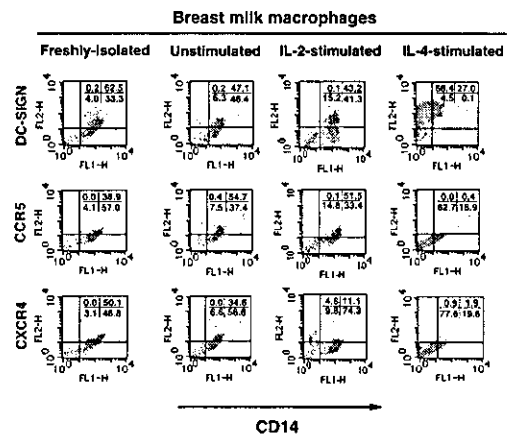


図 2. IL-4 の添加培養が母乳細胞表面分子発現へ及ぼす影響

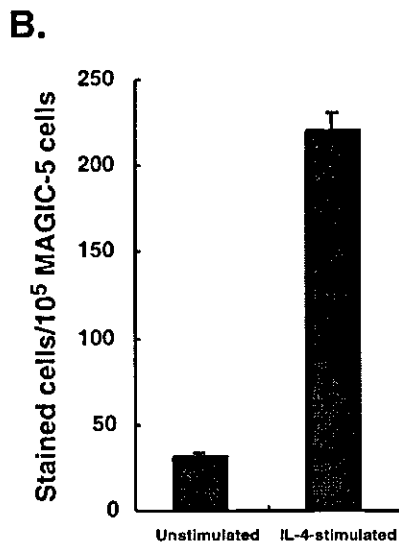
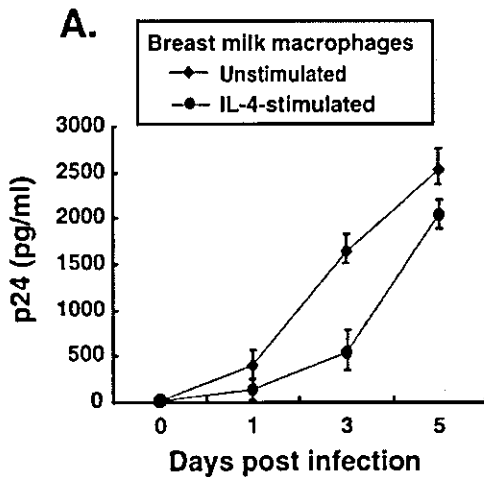


図3. Free Virus と DC-SIGN を介して捕捉された HIV-1 との感染性の差異

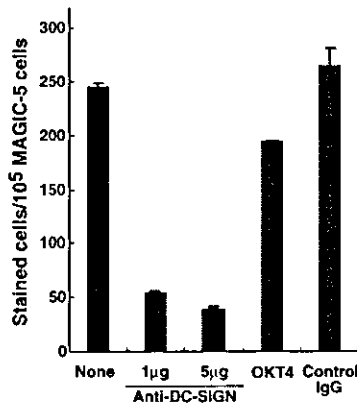


図4. 抗 DC-SIGN 抗体による HIV-1 感染伝播阻止能の検討

5) 一般に、母乳を介した HIV-1 ウイルスの初感染の場合は Tリンパ球に富む小腸と考えられている。従って、母乳から放出された感染性 HIV は小腸のリンパ球に感染する前に胃酸に曝されることになる。胃酸と同等の酸性条件下で HIV の感染力を検討したところ Free のウイルスの場合、1 分間処理で感染力を失うが (図 5 A)、DC-SIGN を介して捕捉されたと考えられる HIV は 3 分処理しても 30-40% の感染力が残ることが判明した (図 5 B)。

#### D. 考 察

発展途上国における HIV 感染爆発の重要な因子である母児感染、ことにその大半を占める母乳を介した HIV-1 の感染伝播の実体は、これまでほとんど知られていなかった。今回の研究により、母乳中には HIV-1 感受性のある Tリンパ球はごく僅かしか存在しないこと、また感受性ある細胞の主体は樹状細胞への分化能を有したマクロファージ系細胞 (BrMMF) であることが明らかとなった。また、この BrMMF は IL-4 の添加培養により、容易に DC-SIGN を強発現した樹状細胞へ分化し、この DC-SIGN により捕捉されたウイルス粒子が、感染細胞より放出された Free Virus 粒子よりも遙かに高い感染伝播力を有することが見いだされた。さらには、こうした Free Virus の感染伝播力は胃液に短時間接触することで失活すること、また DC-SIGN を介して捕捉された HIV-1 粒子は胃液に曝された後も感染伝播能を保持していることも確認された。

以上の知見は、これまで感染細胞より放出された Free Virus Particle が母乳感染の主たるによるものと推測を完全に覆すものであり、DC-SIGN を介した感染伝播こそが、母乳感染を防ぐための標的であることを示している。また、IL-4 を添加することによって BrMMF 上の DC-SIGN の発現が増強する事実は、母乳中の IL-4 の分泌が引き金となって母乳感染が増大することを示唆している。従って、IL-4 の分

泌・遊離に関与する母乳中の炎症反応を出来るだけおさえることが、DC-SIGN の発現ならびに感染伝播能を有する樹状細胞の出現を抑制するものと推測される。従って、乳腺関連部分を消毒などにより絶えず清潔に保つこと、ならびに細菌感染などに起因する乳腺炎を適切な抗菌剤の使用によりできるだけ速やかに治療すること、また体内環境を IL-4 産生を抑制するような Th1 型優位の状態に出来るだけ保つことなどが、HIV の母乳感染を抑制する上で非常に重要であると考えられる。

現在、母乳感染を防ぐための手だてとして、上述したような IL-4 の遊離抑制の他に、加熱・凍結融解などの様々な手法を用いての母乳処理による感染伝播抑制の可能性を検討中である。

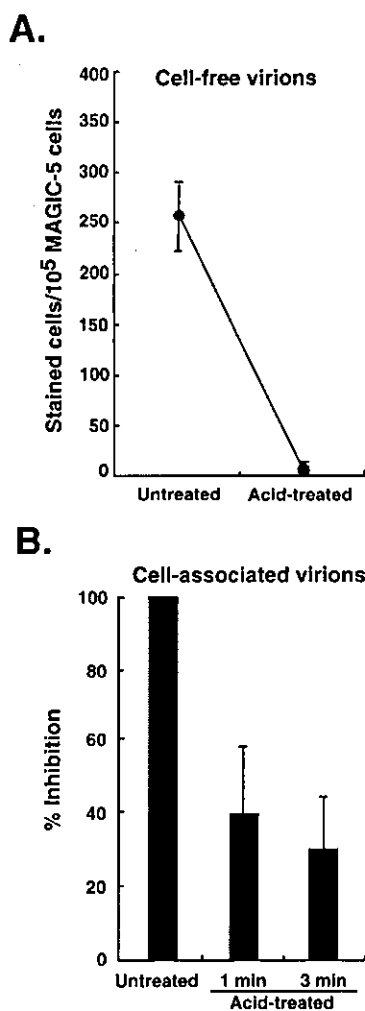


図5. 酸処理による HIV-1 感染伝播阻害の検討

## E. 結 論

以上、本研究により初乳中マクロファージ群表面に発現した HIV レセプター DC-SIGN を介して捕捉された R5 型の HIV が、胃酸の粘膜バリアーを通過し小腸に存在する HIV 感受性を有する T 細胞群に伝播されることが、母乳を介した HIV 感染の実体であるものと推測される。この際、乳汁中に炎症性サイトカインである IL-4 が存在した場合、こうした感染伝播力が増強されたことから、IL-4 の産生を抑制することで母乳感染が回避される可能性が示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Fujimoto, C., Nakagawa, Y., Ohara, K., Takahashi, H.: Polyriboinosinic polyribocytidylic acid [poly(I:C)]/TLR3 signaling allows class I processing of exogenous protein and induction of HIV-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *Int. Immunol.*, 2004, 16:55-63.
- 2) Kuribayashi, H., Wakabayashi, A., Shimizu, M., Kaneko, H., Norose, Y., Nakagawa, Y., Wang, J., Kumagai, Y., Margulies, D.H., Takahashi, H.: Resistance to viral infection by intraepithelial lymphocytes in HIV-1 P18-I10-specific T-cell receptor transgenic mice. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 2004, 316:356-363.
- 3) Iida, T., Kuwata, T., Imai, M., Suzuki, H., Miura, T., Ibuki, K., Takahashi, H., Yamamoto, T., Imanishi, J., Hayami, M., Kita, M.: Augmentation of antigen-specific cytokine responses in the early phase of vaccination with a live-attenuated simian/human immunodeficiency chimeric virus expressing IFN-gamma. *Arch. Virol.*, 2004, 149:743-757.
- 4) Hidaka, C., Norose, Y., Nakagawa, Y., Shimizu, M., Takahashi, M., Owaki, A., Nohtomi, K., Toda, M., Kusagawa, S., Sakaguchi, M., Kudo, S., Takebe, Y., Takahashi, H.: Dermal dendritic cells

sensitized with plasmid DNA encoding immunostimulatory sequence by gene gun efficiently prime murine HIV-1-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *Biomed. Res.*, 2004, 25:83-91.

- 5) Shinya, E., Owaki, A., Shimizu, M., Takeuchi, J., Kawashima, T., Hidaka, C., Satomi, M., Watari, E., Sugita, M., Takahashi, H.: Endogenously expressed HIV-1 nef down-regulates antigen-presenting molecules, not only class I MHC but also CD1a, in immature dendritic cells. *Virology*, 2004, 326:79-89.
- 6) Satomi, M., Shimizu, M., Shinya, E., Watari, E., Owaki, A., Hidaka, C., Ichikawa, M., Takeshita, T., Takahashi, H.: Transmission of macrophage-tropic HIV-1 by breast milk macrophages via DC-SIGN.
- 7) *J. Infect. Dis.*, 2005, 191:174-181.
- 8) Watari, E., Shimizu, M., Takahashi, H.: Langerhans cells stimulated by mechanical stress are susceptible to measles virus infection. *Intervirology*, 2005 (in press).
- 9) 高橋秀実: サイトカイン: AIDS 病態とサイトカイン. *医学のあゆみ*, 29(2): 191-194, 2004.
- 10) 高橋秀実: AIDS 病態形成に関する新たな視点. *日本エイズ学会誌*, 6(2): 91-96, 2004.
- 11) 高橋秀実: 感染症における様々な症候の本体. *国際歯科学士会日本部会雑誌*, 35(1): 10-15, 2004.
- 12) 高橋秀実: 自然免疫と獲得免疫の基礎: 樹状細胞を介したウイルス特異的キラーT細胞の誘導. *最新医学*, Vol. 60 (印刷中).

## 2. 学会発表 国際学会

- 1) Takahashi, H., Fujimoto, C., Yohko, N.: Polyriboinosinic Polyribo-cytidylic Acid (Poly(I:C))/TLR3 signalling allows class I processing of exogenous protein and induction of HIV-1 gp120-specific CD8<sup>+</sup> CTLs. *Japan-US Cooperative Medical Science Program: The*

16th Joint Scientific Meeting of AIDS. March 8-10, 2004 (Nashville, USA).

- 2) Kumagai, Y., Yanagihara, T., Norose, Y., Moro, I., Nanno, M., Yamanishi, S., Iizumi, T., Murakami, M., Takahashi, H.: Age-dependent decrease of polymeric Ig receptor expression and IgA elevation in ddY mice: A possible cause of IgA nephropathy. 12<sup>th</sup> International Congress of Immunology, July 18-23, 2004 (Montreal, Canada).
- 3) Hidaka, C., Saito, T., Tada, K., Kaneko, A., Shimizu, M., Watanabe, E., Shinya, E., Takahashi, H.: Orally administrated risedronate can commit V $\gamma$ 2Vd2 T cells to IFN- $\gamma$  secreting effectors in patients with osteoporosis. 12<sup>th</sup> International Congress of Immunology, July 18-23, 2004 (Montreal, Canada).
- 4) Wakabayashi, A., Nakagawa, Y., Nishiyama, Y., Watanabe, Y., Goto, R., Kumagai, Y., Takahashi, H.: Induction of ovalbumin-specific cytotoxic cells in both intestinal intraepithelial lymphocytes and spleen cells by oral administration of ovalbumin plus Cholera toxin. 12<sup>th</sup> International Congress of Immunology, July 18-23, 2004 (Montreal, Canada).
- 5) Takahashi, H., Fujimoto, C., Watanabe, E., Shimizu, M., Owaki, A., Watari, E., Nakagawa, Y.: Polyriboinosinic Polyribo-cytidylic Acid (Poly(I:C))/TLR3 signalling mediates cross-presentation of exogenous protein via MHC class I and primes HIV-specific CD8<sup>+</sup> CTLs. 12<sup>th</sup> International Congress of Immunology, July 18-23, 2004 (Montreal, Canada).
- 6) Shinya, E., Owaki, A., Shimizu, M., Takeuchi, J., Kawashima, T., Hidaka, C., Satomi, M., Watari, E., Sugita, M., Takahashi, H.: HIV-1 Nef down-regulates CD1a as well as class I MHC surface expression in immature dendritic cells. 12<sup>th</sup> International Congress of Immunology, July 18-23, 2004 (Montreal, Canada).
- 7) Goto, R., Kim, Y., Nakagawa, Y., Sugiyama,

- H., Shimizu, M., Wakabayashi, A., Kuribayashi, H., Takeshita, T., Takahashi, H.: Induction of murine natural killer T-like cells by immunization with syngeneic thymoma cells expressing genetically-encoded embryonic alpha-fetoprotein gene. 12<sup>th</sup> International Congress of Immunology, July 18-23, 2004 (Montreal, Canada).
- 8) Ishii, R., Shimizu, M., Nakagawa, Y., Enomoto, Y., Shimizu, K., Takahashi, H.: Dendritic cells pulsed with hepatoma-derived acid-eluted substances primed natural killer T cells in vivo. 12<sup>th</sup> International Congress of Immunology, July 18-23, 2004 (Montreal, Canada).
- 9) Takahashi, H.: Transmission of macrophage-tropic HIV-1 by breast milk macrophages via DC-SIGN. Japan-US Cooperative Medical Science Program: The 17th Joint Scientific Meeting of AIDS. December 8-10, 2004 (Kyoto, Japan).
- 国内学会
- 1) 高橋秀実：Innate Immunity と Acquired Immunity との相互関連：エイズワクチン開発に向けて。平成 16 年富山医科薬科大学学術講演会（富山）2004.2.6.
- 2) 高橋秀実：粘膜免疫とアレルギー。第 60 回小児アレルギー研究会（東京）2004.6.26.
- 3) Norose, Y., Owaki, a., Shinya, E., Kumagai, Y., Takahashi, H.: Effective application of RAPD method to DNA typing analysis of *Pseudomonas aeruginosa*. 第 72 回日本医科大学医学部総会（東京）2004.9.4.
- 4) 高橋秀実：腫瘍制御のための新たな視点：内在する基本免疫活性化について。日本ホリスティック医学シンポジウム 2004（東京）2004.11.14.
- 5) 高橋めぐみ、渡理英二、新谷英滋、高橋秀実：麻疹ウイルス変異株の持続感染細胞株の樹立とその解析。第 52 回日本ウイルス学会総会（横浜）2004.11.21-23.
- 6) 栗林秀樹、若林あや子、清水真澄、金子礼志、野呂瀬嘉彦、中川洋子、熊谷善博、高橋秀実：HIV-1 P18-I10 特異的な CTL の T 細胞レセプターを発現したトランスジェニックマウスにおける粘膜上皮内リンパ球による感染抵抗性の解析。第 52 回日本ウイルス学会総会（横浜）2004.11.21-23.
- 7) 渡理英二、清水真澄、飯泉匡、山西慎吾、高橋めぐみ、高橋秀実：機械的刺激によって活性化した培養 Langerhans 様細胞における麻疹ウイルス感受性について。第 52 回日本ウイルス学会総会（横浜）2004.11.21-23.
- 8) 齊藤尚紀、高橋めぐみ、赤畑渉、清水真澄、日高千鶴乃、新谷英滋、伊吹謙太郎、三浦智行、速水正憲、高橋秀実：霊長類における CD1d 分子の保存性の解析と SIV/HIV 感受性。第 52 回日本ウイルス学会総会（横浜）2004.11.21-23.
- 9) Takahashi, H., Ishii, R., Shimizu, M., Wakabayashi, A., Goto, R., Sugiyama, H., Nakagawa, Y.: In vivo priming of NKT cells by dendritic cells pulsed with hepatoma-derived acid-eluted substances. 第 34 回日本免疫学会総会（札幌）2002.12.1-3.
- 10) 中川洋子、菊地浩人、清水真澄、栗林秀樹、渡邊恵理、高橋秀実：HIV 外被糖蛋白 gp160 に特異的な細胞傷害性 T 細胞の認識特異性に関する新たな知見。第 34 回日本免疫学会総会（札幌）2002.12.1-3.
- 11) 若林あや子、守屋慶一、中川洋子、野呂瀬嘉彦、熊谷善博、高橋秀実：OVA 経口免疫による小腸上皮間リンパ球における OVA 特異的 CTL の誘導と OVA 発現腫瘍に対する成長抑制効果。第 34 回日本免疫学会総会（札幌）2002.12.1-3.
- 12) 渡理英二、清水真澄、飯泉匡、八木幸恵、高橋めぐみ、高橋秀実：機械的刺激によって活性化した培養ランゲルハンス様細胞における麻疹ウイルスの感受性について。第 34 回日本免疫学会総会（札幌）2002.12.1-3.
- 13) Shinya, E., Owaki, A., Shimizu, M., Wartanabe, E., Yamanishi, S., Satomi, M., Hidaka, C., Watari, E., Takahashi, H.: HIV-1 augmented (IL)-12p70 production but inhibited phenotypic

maturation of LPS stimulated-dendritic cells.

第 34 回日本免疫学会総会（札幌）

2002.12.1-3.

- 14) 熊谷善博、柳原剛、野呂瀬嘉彦、山西慎吾、飯泉匡、渡邊恵理、高橋秀実：加齢 ddy マウスの血中 IgA 濃度の上昇は、poly-Ig receptor 発現不全による粘膜面での IgA 分泌能の低下に原因する。第 34 回日本免疫学会総会（札幌）2002.12.1-3.
- 15) 20. 渡辺嘉之、中川洋子、大脇敦子、榎本豊、新谷英滋、渡理英二、野呂瀬嘉彦、高橋秀実、広松賢治、矢野郁也、杉田昌彦：マウスにおける CD1-脂質抗原提示系の構築と解析。第 34 回日本免疫学会総会（札幌）2002.12.1-3.
- 16) 日高千鶴乃、渡邊恵理、清水真澄、山西慎吾、里見操緒、新谷英滋、高橋秀実：CD4 陽性 NKT 細胞による HIV-1 感染拡大の可能性。第 18 回日本エイズ学会総会（静岡）2004.12.9-11.
- 17) Takahashi, H. : Control of HIV-1-specific acquired immunity by modulation of innate immunity. 第 18 回日本エイズ学会総会（静岡）2004.12.9-11.
- 18) 23. 高橋秀実：新たなる未病への挑戦—現代免疫学的視点からみた疾病の本態に関する洞察。第 11 回日本未病システム学会総会（大宮）2005.1.8-9.
- 19) 高橋秀実：腸管における innate immunity. 第 38 回日本無菌生物ノートバイオロジー学会総会（大阪）2005.1.26-27.
- 20) 高橋秀実：免疫学の最新情報：新たな医学をめざして。平成 16 年度自己治癒力研究会総会（大宮）2005.2.10.
- 21) 高橋秀実：粘膜免疫とアレルギー。第 16 回多摩小児アレルギー臨床懇話会（多摩）2005.3.12.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし