

の存在を、Haplotype Trend Regression (HTR)法により解析した。

2) Rac2 遺伝子イントロン多型の機能解析

ゲノム塩基配列決定とHTR解析の結果、*Rac2*の第5イントロンに、両コホートで ESN 個体群へ有意な集積を認めるハプロタイプを見出したので、このイントロン多型が遺伝子発現に与える影響を明らかにするため、ルシフェラーゼ遺伝子発現ベクターを用いた調節機能の検定を行った。また、イントロン領域の部分断片挿入と、曝露非感染者に集積するハプロタイプと HIV-1 感染者に高頻度に見出されるハプロタイプ間での塩基置換とを行うにより、発現調節機能領域を絞り込むことを試みた。

3) siRNA による *Rac2* 遺伝子発現抑制とその効果

Rac2 遺伝子高発現が HIV-1 複製に与える効果と、*Rac2* 分子の下流エフェクター機構解析のため、*Rac2* 遺伝子発現産物内に3ヶ所の標的配列を設定し、siRNA 発現による遺伝子発現抑制を試みた。それぞれ独立の siRNA 発現ベクター、または既知のいかなる遺伝子とも相互作用しない対照配列を発現するベクターを、高発現型の *Rac2* イントロンハプロタイプを持つ THP-1 細胞に導入し、安定発現細胞株を樹立した。これらの siRNA 発現細胞株に CCR5 指向性の HIV-1 BaL 株を感染させ、上清中の p24 を定量した。また、IFN- α または LPS 刺激後の *Rac2*, *CCR5*, *CXCR4*, *CCL3*, *CCL4*, *CCL5* 各遺伝子の発現変動を、real-time PCR 法、Western blot 法、及び上清中タンパク質の ELISA 法により定量した。

【倫理面への配慮】

イタリア及びタイの HIV 感染状態非一致カップルコホートについては、現地各病院倫理委員会及びタイ国立衛生研究所倫理委員会による許可を受け、書面による研究目的の説明と署名による同意を得た上で、ゲノム解析・発現解析のための末梢血採血を行った。連結不能匿名化試料を用いたヒトゲノム遺伝子解析の実施については、近畿大学医学部ゲノム倫理委員会より許可を得た（「新型チップ等を用いた第 22 染色体新規 SNPs 多型の網羅的解析による HIV 感染防御ワクチン及び抗 HIV 治療薬の効果判定改善と新しい免疫治療法の開発」、平成20年5月30日承認、19-61）。

C. 研究結果

1) HIV-1 感染抵抗性遺伝子 *Rac2* イントロン多

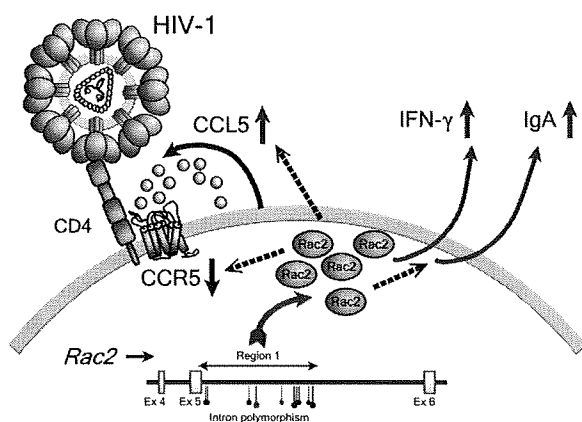
型の機能部位解析

HIV-1 曝露非感染者の末梢血を HIV-1 抗原で刺激すると *Rac2* の発現が上昇した。そこで、イタリアコホートの曝露非感染者 36 名と HIV-1 感染者 48 名、及びタイ・ランパンコホートの曝露非感染者 74 名と HIV-1 感染者 198 名について、それぞれ *Rac2* 遺伝子座のゲノム塩基配列を決定し、見出された多型の遺伝子型頻度を統計的に解析した。近接する SNPs 間には明らかなハプロタイプ形成が認められたので、多型座位間の連鎖を考慮して HTR 法により多重比較の補正を行ったところ、第5イントロンの8座位ハプロタイプ [rs33917324: -, rs813343: C, rs9610683: C, rs9610682: A, rs2284037: T, rs4140870: A, rs739042: T, rs5845330: -] (ハプロタイプ T) が、イタリアコホート ($P = 0.011$, OR = 4.8) でもタイコホート ($P = 0.042$) でも曝露非感染者に有意に集積すること、タイコホートでは HIV-1 感染者に上記と重複する8座位のハプロタイプ [rs9610682: G, rs2284037: C, rs4140870: A, rs739042: C, rs11089831: C, rs2284036: C, rs739041: C] (ハプロタイプ C) が強く集積し ($P < 0.00092$, OR < 0.22)、これと rs4140870 が一塩基違い (A/G) のハプロタイプ C2 は、逆に曝露非感染者に強く集積すること ($P < 0.0001$, OR > 3.41) が明らかとなった。

曝露非感染者に集積する上記のイントロン多型が、この遺伝子の機能と関係するかどうかを調べるため、多型のない *Rac2* コアプロモーターと共に第5イントロン各ハプロタイプのゲノム DNA 断片を挿入したルシフェラーゼ発現ベクターを構築し、Jurkat ヒト T 細胞株に導入、発現酵素活性を定量した。その結果、曝露非感染者に集積するハプロタイプ T または C2 を挿入した場合、HIV 感染者に集積するハプロタイプ C を挿入した場合より有意に高いルシフェラーゼの発現が起こった。そこで、ハプロタイプ T の部分断片を同様にして発現ベクターに挿入したところ、上流 1,000 bp を削除しても遺伝子高発現を誘導する機能に変化は見られなかったが、rs4140870 のすぐ下流までの 1,800 bp を削除すると遺伝子高発現誘導機能が失われた。また、ハプロタイプ間で多型のある SNPs 部位についてそれぞれ単独で塩基置換を行ったところ、ハプロタイプ T の rs2284037: T を C に置換すると、遺伝子高発現を誘導する機能が失われた。

2) siRNA による *Rac2* 遺伝子発現抑制とその効果

Rac2 遺伝子第5イントロンにハプロタイプ T を持つ個体の末梢血単核球に CCR5 指向性の HIV-1 分離株を感染させると、ハプロタイプ C の個体の末梢血単核球に同じウイルスを感染させた場合に



較べ、上清中の p24 増加が有意に抑制された。

そこで、*Rac2* 遺伝子第5イントロンにハプロタイプ T を持つヒト単球系細胞株 THP-1 に *Rac2* の siRNA を導入し、*Rac2* 発現が低下したクローンを複数得た。

Rac2 発現の低下した THP-1 細胞では、対照の siRNA を発現する細胞に較べ、HIV-1 BaL 株の複製が有意に促進した。また、複製能のない HIV-1 遺伝子発現ベクターである pNL4-3-Luc⁺ Env⁻ を VSV-G で pseudotype としてこれらの細胞に感染させたところ、*Rac2* の発現が低下した細胞では luciferase 遺伝子の発現は却って低下していた。そこで、これらの細胞株を用いて、*Rac2* の下流で発現が変化する HIV-1 複製に関連した遺伝子を解析した。

Rac2 siRNA を発現する細胞株では、対照の siRNA を発現する細胞に較べ、IFN-α 刺激後の *CCR5* 遺伝子発現が上昇していたが、*CXCR4* 遺伝子発現には大きな変化はなかった。また、*Rac2* siRNA 発現細胞では、LPS 刺激後の *CCL5* 遺伝子発現誘導が低く、対照の THP-1 細胞では刺激前から発現している *CCL5* が、siRNA による *Rac2* 発現抑制により検出されなくなっていた。

さらにタンパク質レベルで解析したところ、*Rac2* siRNA 発現細胞では *CCR5* 分子の発現が増加しており、LPS 刺激による上清中への *CCL5* 分泌は有意に減少していることが明らかとなった。これらの結果は、*Rac2* 高発現が *CCR5* の低発現と *CCL5* の高発現に結び付くことを示す。

なお、これらの結果については現在原著論文が審査中のため、図表の提示は控える。

D. 考察

Rac2 遺伝子第5イントロンの特定ハプロタイプが、イタリアコホートとタイ・ランパンコホートの両方で曝露非感染者に集積していることは、この遺伝子の多型が民族差を超えて HIV-1 感染抵抗性に関与することを示しており、遺伝的解析結果の信頼性を高めている。また、第5イントロン部分断

片を用いた luciferase assays の結果は、イタリアコホートで曝露非感染者に集積するハプロタイプ T と、タイコホートで HIV-1 感染者に集積するハプロタイプ C の重複部位約 800 bp が機能的に重要であることを示しており、統計的に抽出されたハプロタイプと表現型との相関に信頼性を与えている。

これまで、*Rac2* 遺伝子第5イントロンに高発現型のハプロタイプ T を持つ個体では、その末梢血単核球が *CCR5* 指向性 HIV-1 の複製に対して抵抗性を示すことを観察してきた。しかしながら、*Rac2* 高発現が *CCR5* 指向性 HIV-1 の複製制御に繋がる分子機構は明らかでなかった。

本年度の研究では、*Rac2* 遺伝子第5イントロンにハプロタイプ T を持つヒト単球系細胞株 THP-1 を用い、siRNA を用いて *Rac2* の発現を抑制することに成功した。*Rac2* 発現抑制は予想通り *CCR5* 指向性 HIV-1 の複製促進に繋がったが、VSV-G で pseudotype とした HIV-1 発現ベクターからの遺伝子発現はむしろ低下した。このことは、*Rac2* による HIV-1 複製抑制が、プロウイルス発現のレベルではなく、ウイルス粒子の吸着侵入、または粒子形成・出芽の過程で起こることを示唆する。実際、*Rac2* siRNA 発現細胞では *CXCR4* の発現には著しい変化がないものの、IFN-α 刺激後の *CCR5* 発現が mRNA レベルでもタンパク質レベル上昇し、LPS 刺激後の *CCL5* 発現は、mRNA レベルでも上清中のタンパク質レベルでも有意に低下していた。特に、LPS 刺激前の *CCL5* 産生が、*Rac2* siRNA 発現により認められなくなったことは重要と考える。

これらの結果は、*Rac2* 高発現が HIV-1 共受容体である *CCR5* の発現低下と、*CCR5* リガンドである *CCL5* の発現上昇を介して、*CCR5* 指向性 HIV-1 の標的細胞への吸着侵入を機能的に阻害していることを示唆する(左上の図)。実際、*Rac2* 第5イントロンにハプロタイプ T を持つ個体では、同じ部位の遺伝子型がハプロタイプ C である者に比較して、末梢血 CD4 陽性 T 細胞でも CD14 陽性単球でも細胞表面の *CCR5* 発現が有意に低く、HIV-1 感染後の *CCL5* 産生が有意に高いことがわかっている(投稿済み)。

E. 結論

イタリアコホートとタイ・ランパンコホートの両方で、HIV 曝露非感染者の持つ第22染色体領域の遺伝的特徴を、*Rac2* 第5イントロンの機能的なハプロタイプ多型として同定した。遺伝子発現調節機能に特に重要なのは、曝露非感染者群と HIV-1 感染者群で塩基置換のある rs2284037 と rs4140870 を含む約 800 bp の範囲である。

siRNA を用いた *Rac2* 発現抑制実験の結果、

Rac2 高発現は CCR5 発現抑制と CCL5 発現増強を介して機能的に CCR5 指向性 HIV-1 の吸着侵入過程を阻害している可能性が示された。

F. 健康危機情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miyazawa M., L. Lopalco, F. Mazzotta, S. Lo Caputo, F. Veas, and M. Clerici. The "immunologic advantage" of HIV-exposed seronegative individuals. *AIDS* 23:161-175, 2009.
- 2) Miyazawa, M. and M. Clerici. The 'immunologic advantages' of HIV-exposed seronegative individuals: authors' reply. *AIDS* 23:1612, 2009.
- 3) Miyazawa, M., S. Tsuji-Kawahara, T. Chikaishi, M. Kato and S. Takamura. Mouse APOBEC3 affects the production of virus-neutralizing antibodies by restricting early retroviral replication, not by altering the B-cell repertoire. *Retrovirology* 6 (Suppl. 2):O9, 2009.
- 4) Takamura, S., Tsuji-Kawahara, S., Yagita, H., Akiba, H., Sakamoto, M., Chikaishi, T., Kato, M., and Miyazawa, M. Premature terminal exhaustion of Friend virus-specific effector CD8⁺ T cells by rapid induction of multiple inhibitory receptors. *J. Immunol.* in press, 2010..

2. 学会発表

- 1) Miyazawa, M., Takamura, S., Tsuji-Kawahara, S., Chikaishi, T., Kato, M., Takeda, E., and Yagita, H. Mechanisms of immune evasion by Friend virus: T-cell exhaustion, B-cell hyperactivation, and their genetic control. 21st International Workshop on Retroviral Pathogenesis. September 13-17, 2009. Castelnuovo Garfagnana, Lucca, Italy.
- 2) Sitbon, M., Mongellaz, C., Touhami, J., Montel-Hagen, A., Lavanya, M., Abe, H., Giovannini, D., Petit, V., Castelnau, P., Lagrue, E., Kim, F., Kinet, S., Manel, N., Miyazawa, M., Taylor, N., and Battini, J.-L. New metabolic markers derived from gamma and deltaretrovirus envelope glycoproteins. 21st International Workshop on Retroviral Pathogenesis. September 13-17, 2009. Castelnuovo Garfagnana, Lucca, Italy.
- 3) Miyazawa, M., Tsuji-Kawahara, S., Chikaishi, T., Kato, M., and Takamura, S. Mouse APOBEC3 affects the production of virus-neutralizing antibodies by restricting

early retroviral replication, not by altering the B-cell repertoire. *Frontiers of Retrovirology*. September 21-23, 2009. Montpellier, France.

- 4) Miyazawa, M., Kanaril, Y., Clerici, M., Wichukchinda, N., and Auwanit, W. Genetic factors that confer resistance to HIV-1 acquisition in HIV-1-exposed but seronegative individuals in Italy and Thailand. 4th Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases. November 26-28, 2009. Nagasaki.

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

ウイルスベクターワクチン抗原に対する免疫応答と HIV 感染制御

研究分担者 横田 恭子 国立感染症研究所 免疫部 第一室長
研究協力者 寺原 和孝 同部 研究員、石毛 真行 研究生
光木 裕也 研究生、 渋谷謙太郎 エイズ予防財団 RR

研究要旨：HIV-1 感染により活性化 T 細胞の麻疹ウイルス受容体 SLAM の発現が増強し、envelope 以外の HIV-1 由来蛋白の関与が示唆された。ヒト化マウスでは活性化した CCR5 陽性細胞が高頻度に存在し、X4/R5 型 HIV-1 混合感染時に R5 が優位に増殖したが、R5 感染 CD4⁺T 細胞は X4 感染 CCR5 陰性細胞と同程度に CXCR4 を発現していた。一方、ヒト末梢血 CCR5 陽性 CD4⁺T 細胞への *in vitro* HIV-1 感染において X4 と R5 の細胞内侵入や逆転写過程に差は認められず、R5 選択的増殖にケモカインレセプター発現以外の機構が存在すると考えられる。今後、ヒト化マウスの感染モデルは、病態だけでなく治療やワクチン効果の評価としても有望なモデルとなりうる。

A. 研究目的

抗原提示細胞である樹状細胞(DC)や記憶 T 細胞への潜伏感染およびウイルス再活性化制御がエイズ病態進行阻止に最も重要と考えられる。本研究では、Gag 発現麻疹ウイルスや改良型 HIV 抑制性レンチウイルスベクターを利用し、DC による抗原提示を受けて活性化される T 細胞の機能、およびそれに影響を与える HIV-1 とベクターウイルス感染について *in vivo* および *in vitro* で解析することを目的とする。

B. 研究方法

1) 蛍光マーカー発現 HIV-1 の作製

NL432 をベースに X4(Lai)あるいは R5(AD8) 型 env と nef 遺伝子の間に EGFP あるいは DsRed を IRES につないだ遺伝子を挿入し、感染により蛍光を発する組換え HIV-1 provirus (HIV-1_{NL-E} あるいは HIV-1_{NLAD8-D})を構築した。これら proviral DNA を 293T 細胞にトランスフェクトしてウイルスを調整した。細胞融合活性の測定のため、proviral DNA の 1/3 量の pMM310(Vpr-BlaM 発現ベクター：感染病理部・飛梅実研究員より供与)を同時にトランスフェクトしてβ-lactamase を粒子中に含むウイルスを作製した(HIV-1_{NL-E/Vpr-BlaM} と

HIV-1_{NLAD8-D/Vpr-BlaM})。

2) 細胞の調製

健常人より PBMC を調整した。また、CD4 陽性 T 細胞あるいは total T 細胞は negative selection kit を用いて調整した(StemCell Tech.)。HIV-1 の侵入効率を比較するため、分画した CD4 陽性 T 細胞を HIV-1 感染を阻害しない抗 CCR5 抗体(琉球大学医学部・田中勇悦教授より供与)で染色し、FACSSaria を用いて CCR5 陽性細胞と陰性細胞にソートした。

3) HIV-1 および麻疹ウイルス(MV)*in vitro* 感染と細胞培養

全ての HIV-1 感染は 10⁶ 個の細胞に対して p24 Gag の量にして 200 ng 加え、室温で 2 時間 spinoculation した後 3 回洗浄して培養した。HIV-1_{NLAD8-D} (DsRed)に感染した PBMC を SEB で刺激後 5 日間培養し、GFP 発現 MV ワクチン株 (MVvac) あるいは MV 野生株(MVwt) (それぞれ北里生命研・森川裕子教授と九大ウイルス学・柳教授より供与された)を感染させて 3 日後の感染細胞を FACScalibur あるいは FACScanto で解析した。

4) ヒト化マウスの確立

免疫不全(NOD/SCID Jak3KO: NOJ、熊本エイズ学研究センター・岡田誠治教授より供与)マ

ウスを繁殖させ、ヒト臍帯血由来造血幹細胞 (CD34+あるいは CD133+)を新生マウスの肝臓に移植してヒト化マウスを作製した。移植 20 週前後で CD4 陽性 T 細胞が分化増殖してきたマウスに経静脈的に HIV-1 を感染させた。

5) 細胞融合活性

FACS により分画した T 細胞に CCF2/AM 色素を取り込ませた後 HIV-1_{NL-E/Vpr-BlaM} あるいは HIV-1_{NLAD8-D/Vpr-BlaM} を感染させ、37 度で 2 時間培養した。FBS 入り培地にもどして室温で 3 時間あるいは一晩遮光放置した細胞内の β -lactamase 活性による蛍光放出波長の変化 (520nm から 447nm) を FACScanto で解析した。

6) 逆転写産物の定量

細胞に HIV-1 を感染させて洗浄後 40 時間培養し、 10^5 個の細胞あたり 5 μ l の細胞溶解液を調整した。これらの溶解液をテンプレートとして LTR の R と U5 あるいは U5 と Gag 領域のプライマーで proviral DNA を増幅し、TaqMan assay による Real-time PCR を行った。細胞あたりの HIV-1 のコピー数は β -globin 遺伝子で normalize した。

健常人 PBMC の利用に関しては感染研医学研究倫理委員会で承認され、献血者のインフォームドコンセントを得た。また、免疫不全マウスにヒト臍帯血幹細胞を移入して HIV-1 感染モデルを確立する研究に関しては、東京臍帯血バンクと感染医学研究倫理委員会および実験動物委員会の承認を得た。動物愛護の精神に則り、動物に与える苦痛の軽減と排除に努める。

C. 研究結果

HIV-1Gag 発現麻疹ウイルス(MV)ワクチンの応用を考慮し、まず MV と HIV-1 の相互作用について検討した。麻疹ウイルスを PBMC に感染させると 4~5 日後にはウイルスによる細胞傷害で多くの細胞が死ぬことから、まず DsRed を発現する HIV-1_{NLAD8-D} を感染させて SEB 刺激を加え、培養 5 日後に GFP を発現する MVvac あるいは MVwt を MOI を合わせて感染させた。更に 3 日間培養を続けた後の HIV-1 と MV 感染細胞を FACS で検出したとこ

ろ、図 1 に示すように、HIV-1 非感染 PBMC 中の T 細胞においては MVvac および MVwt 感染細胞はそれぞれ 4.66% (a)および 4.53% (c)で、ほぼ同程度であった。一方、HIV-1 感染 PBMC に同様に麻疹ウイルスを感染させた場合、MVvac では MV 感染 T 細胞の割合が減少 (0.98%)したが、MVwt ではむしろ増加 (5.28%)していた。この MV 被感染率の違いを更に検討したところ、HIV-1 感染 T では MVwt の受容体である SLAM の発現細胞が増加することが観察された。T 細胞活性化に伴って SLAM の発現が増加することは知られているが、HIV-1 の関与は知られていない。これまでの解析では、外被蛋白以外の HIV-1 関連蛋白が T 細胞における SLAM の発現増加に関与していることが示唆され、更にその機構を解析している。

これまで得られた in vitro の結果を in vivo で確認するため、ヒト化マウスの感染モデルを確立した。マウスの体内で分化増殖してきたヒト CD4 陽性 T 細胞はヒト末梢血中のそれと比較して CCR5+細胞の頻度が高く、CXCR4 の発現レベルが低い。このケモカインレセプター発現パターンは骨髄で顕著であった。これらヒト化マウスの CD4 陽性 T 細胞は高度に活性化されており (HLA-DR, CD69 陽性)、R5 型 HIV-1 がより増殖しやすい条件となっていることが明らかとなった。このヒト化マウスに X4 型と R5 型 HIV-1 を同時に感染させると、予期したように脾臓(図 2a)および骨髄で R5 型 HIV-1 感染細胞が優位に増えていた。このマウスでは R5 感染細胞のほとんどが HLA-DR 陽性の活性化細胞で CD4 の発現が低下していたのに対し、X4 感染細胞は様々であった (図 2b)。更に、R5 感染細胞の約半分は CCR5 の発現 (横軸) が低下していた (図 2c)。一方、X4 感染細胞は全て CCR5 陰性で (図 2d)、CXCR4 (縦軸) の発現は R5 感染細胞も X4 感染細胞もほぼ同程度であった。従って、in vitro で認められたと同様、CCR5+CD4 陽性 T 細胞では、CXCR4 の発現はあるにもかかわらず、R5 型優位に感染増殖する機構が働いていると考えられた。

そこで、ヒト末梢血中の CCR5+CD4 陽性 T 細胞(CXCR4+)を FACS で分画し、R5 あるいは X4 型ウイルスの entry 効率を比較した。5 人の

ドナーの結果を図3に示す。NH, AM, STの3人の結果ではR5の方がX4ウイルスよりもentry効率が2倍高い結果になっているが、細胞を一晩放置して β -lactamase活性を十分発揮させたドナーでは、全く差がなかった(TTとK)ことから、CCR5陽性細胞でのHIV-1感染効率はR5とX4でほぼ等しいことが示された。また、同様にソートした7名のドナーの細胞にHIV-1を感染させ、40時間後の細胞溶解液を調整してR/U5およびU5/GagプライマーによるHIV-1 proviral DNAの定量的PCRを行った。その結果、未刺激CCR5+CD4+(CXCR4+) T細胞におけるHIV-1のentry効率および逆転写の過程は、X4型もR5型もほぼ同程度に進行していることが明らかとなった(図4)。

D. 考察

慢性HIV-1感染小児に麻疹が感染するとより重篤化しやすいことが知られていたが、この機構に関しては不明であった。今回HIV-1感染により活性化T細胞のSLAM発現が増強されることが示され、HIV-1感染が直接SLAMの発現に影響している可能性が示唆された。免疫応答におけるSLAM発現調節については不明な点が多く、その機構の解明は重要である。

HIV感染者の体内に潜伏するHIVは、抗HIV免疫応答を担うHIV特異的記憶T細胞に高率に存在することが知られている。これは、HIVに感染あるいはウイルス抗原を取り込んだ抗原提示細胞(DC)によるHIV抗原提示の際にDCとT細胞とで形成される免疫シナプスを介したHIV-1特異的な記憶T細胞への効率よい感染が関与していると考えられる。我々はこれまでの研究から、このin vitroの培養系で増殖しやすいのはR5型HIV-1であることを明らかにした。一方、ヒト化マウスでは活性化型CCR5陽性T細胞の頻度が高く、CXCR4の発現はヒト末梢血T細胞よりもかなり低い。このことから、R5型HIV-1はより増殖しやすい環境にあると想像されるが、X4とR5が同時に感染した場合ケモカインレセプター発現の有無だけでは説明できないR5型優位の感染がヒト化マウスモデルでも認められた。ヒト化マウス体内で活性化されたT細胞の表現型はヒ

トのリンパ組織における一部のT細胞に類似すると考えられ、R5およびX4型HIV-1の侵入後の過程がT細胞の活性化のレベルでどのように影響されるのか、更に解析する必要がある。このようなヒト化マウスを用いたHIV-1感染早期のT細胞の動態をもとに、現在開発中のレンチウイルスベクターや麻疹ワクチンの評価を行い、HIV-1感染制御をめざす。

E. 結論

HIV-1感染により活性化T細胞のSLAM発現が増強されることが明らかとなった。これにはHIV-1がコードするenvelope以外の何らかの蛋白が関与していることが示唆された。免疫応答におけるSLAMの発現調節については不明な点が多く、今後その機構の解明が必要である。また、ヒト化マウスを用いたin vivoの解析でX4型とR5型HIV-1の混合感染時にR5型が優位に増殖することを確認したが、R5に感染したCCR5陽性CD4⁺T細胞はX4に感染したCCR5陰性細胞と同程度にCXCR4を発現していた。一方、ヒト末梢血CCR5陽性CD4⁺T細胞にin vitroでHIV-1を感染させた時、細胞内侵入や逆転写の過程においてX4型とR5型で差は認められず、R5型の選択的な増殖にはケモカインレセプター発現以外の何らかの機構が関与していると考えられた。ヒト化マウスの感染モデルはヒトでしか増殖しないウイルス感染の病態のみならず、治療やワクチン効果の評価のための有望なモデルあることが示された。更にこのモデルの開発を進め、HIV-1Gag発現麻疹ワクチンや改良型レンチウイルスベクターの評価に役立てることが期待される。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamamoto, T., Samri, A., Mitsuki, Y.-Y., Mizukoshi, F., Kobayashi, K., Inoue, J.-I., Autran, B. and Tsunetsugu-Yokota, Y.: siRNA inhibiting HIV-1 reactivation restores function of HIV-specific CD4⁺ T cells in chronically HIV-infected individuals. AIDS,

23:2265-2275, 2009

- 2) Konno, H., Yamamoto, T., Yamazaki, K., Gohda, J., Akiyama, T., Semba, K., Goto, H., Kato, A., Yujiri, T., Imai, T., Kawaguchi, Y., Su, B., Takeuchi, O., Akira, S., Tsunetsugu-Yokota, Y., Inoue, J-I.: TRAF6 established innate immune responses by activating NF-kB and IRF7 upon sensing cytosolic viral RNA and DNA. PLoS One, 4:e5674, 2009
- 3) Terahara, K., Yoshida, M., Taguchi, F., Igarashi, O., Nochi, T., Gotoh, Y., Yamamoto, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Beauchemin, N., Kiyono, H.: Expression of newly identified secretory CEACAM1 isoforms in the intestinal epithelium. BBRC, 383:340-346, 2009
- 4) Yamamoto, T., Iwamoto, N., Yamamoto, H., Tsukamoto, T., Kuwano, T., Takeda, A., Kawada, M., Tsunetsugu-Yokota, Y., Matano, T.: Polyfunctional T-cell induction in neutralizing antibody-triggered simian immunodeficiency virus control., J. Virol., 83:5514-5524, 2009
- 5) Yamamoto, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Mitsuki, Y-Y, Mizukoshi, F., Terahara, K., Inagaki, Y., Yamamoto, N., Kobayashi, K. and Inoue, J-I. : Selective transmission of R5 HIV-1 over X4 HIV-1 at the dendritic cell-T cell infectious synapse is determined by the T cell activation state. PLoS Pathogen, 5 :e1000279, 2009

2. 学会発表

- 1) 光木裕也、水越文徳、渋谷謙太郎、寺原和孝、竹田誠、柳雄介、森川裕子、山岡昇司、横田(恒次)恭子 : HIV-1感染と麻疹ウイルス感染が相互の及ぼす影響およびその機構の解析、第57回ウイルス学会、東京、平成21年11月。
- 2) 岩田奈織子、永田典代、辻隆裕、長谷川秀樹、佐藤由子、横田恭子、水谷哲也、西條政幸、森川茂、佐多徹太郎 : SARS-CoV感染動物モデルを用いたUV不活化SARS-CoVの免疫効果と副反応について、第57回ウイルス学会、東京、平成21年11月。
- 3) 森一泰、杉本知恵、横田恭子、鈴木康夫、山本直樹、永井美之 : 糖鎖修飾による組織・細胞指向性はエイズウイルスの病原性・感染防御免疫誘導を決定する、第57回ウイルス学会、東京、平成21年11月。
- 4) 渋谷謙太郎、光木裕也、寺原和孝、柳雄介、小林和夫、横田(恒次)恭子 : 樹状細胞を標的としたHIV-1増殖抑制shRNA発現レンチウイルスの開発、第39回日本免疫学会、大阪、平成21年12月。
- 5) 土屋貴嗣、光木裕也、寺原和孝、渋谷謙太郎、小林和夫、渡邊俊樹、横田(恒次)恭子 : CD4標的レンチウイルスベクターの開発、第32回日本分子生物学会、横浜、平成21年12月。

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

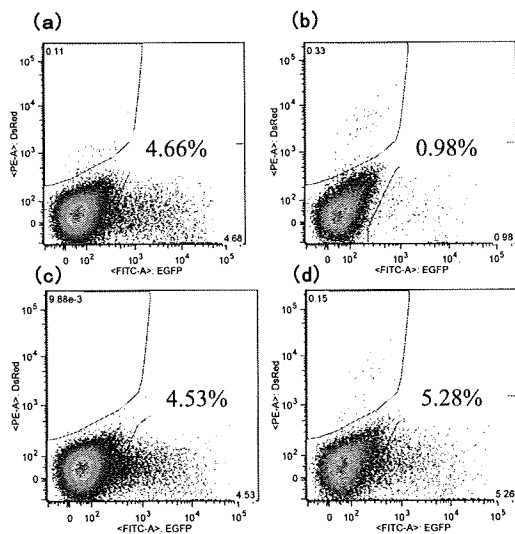


図1. HIV-1 感染による麻疹(MV) ワクチン株あるいは野生株感染への影響。HIV-1 非感染(a, c)及び感染(b, d)PBMCをSEBで刺激5日目に麻疹ワクチン株(MVvac: a, b)あるいは野生株(MVwt: c, d)を感染させ、3日後にFACSでHIV(縦軸)およびMV(横軸)感染細胞の頻度を解析した。図の数値はMV感染細胞頻度を示す。

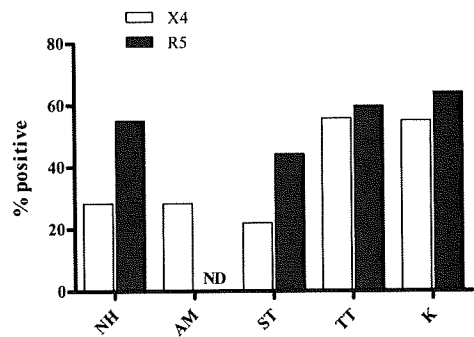


図3. X4型とR5型HIV-1のCCR5陽性細胞への侵入過程の解析。5人の健康人末梢血中のCD4陽性T細胞からCCR5陽性T細胞をソートし、Vpr-BlaMを粒子中に含むX4型(open box)あるいはR5型(closed box) HIV-1を感染させて膜融合効率をFACSで解析した。CCR5陽性CD4陽性T細胞はCXCR4も高発現し、両ウイルスとも同程度に細胞内侵入することができる。Y軸はCCF2/AMの蛍光変換細胞率、X軸はそれぞれのドナーをあらわす。NH, AM, STは室温で3時間放置後、TTとKは一晩放置後の蛍光変換した細胞頻度(%)を示した。

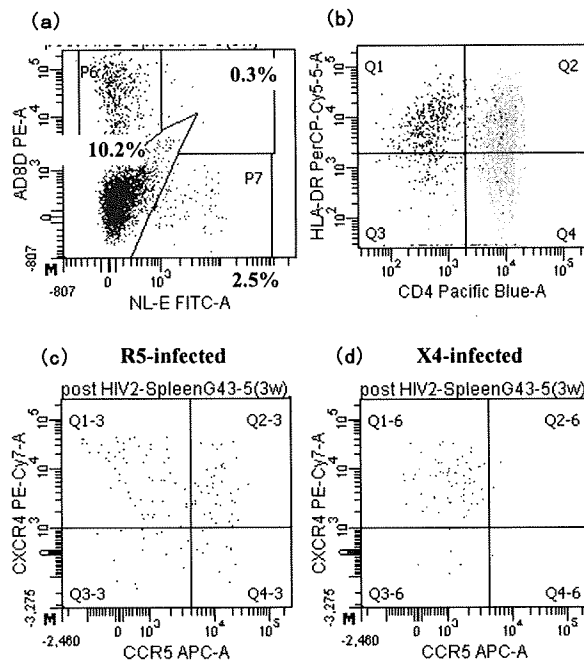


図2. R5型とX4型HIV-1を重感染させたヒト化マウスのHIV-1感染細胞の性状

(a) 脾臓細胞中にはR5型HIV-1_{NLAD8-D}(左上: 10.2%)とX4型HIV-1_{NL-E}(右下: 2.5%)感染細胞が存在していた。両方に感染した細胞もわずかながら認められた(右上: 0.3%)。(b)感染細胞のうちR5型HIV-1に感染した細胞はほとんどがCD4の発現が低下したHLA-DR陽性細胞であったのに対し、X4型HIV-1に感染した細胞は様々であった。(c) R5型HIV-1感染細胞の約半数でCCR5発現が低下していたが、CXCR4は発現している。(d) X4型HIV-1感染細胞はCCR5を発現しない細胞集団であるが、CXCR4の発現レベルはR5型HIV-1感染細胞のそれとほぼ等しい。

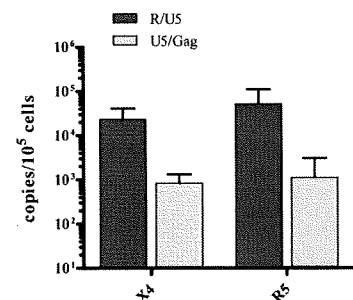


図4. X4型あるいはR5型HIV-1感染CCR5陽性細胞における逆転写産物の比較。

図3同様7人の健康人末梢血中のCD4陽性T細胞からCCR5陽性T細胞をソートした。この細胞にX4型あるいはR5型HIV-1を感染させて培養し、40時間後に細胞を溶解し、R/U5あるいはU5/Gagのプライマーを用いてReal Time qPCRによる逆転写産物の定量を行った。

OX40L/OX40 を介する HIV 感染増殖抑制の研究

研究分担者：田中 勇悦 琉球大学医学部 教授

研究要旨：OX40 は活性化 CD4⁺T 細胞に一過性に発現する TNFR ファミリー分子である。そのリガンド OX40L(gp34)との結合は T 細胞を共刺激する。我々はこれまで OX40L-OX40 刺激が CXCR4 使用 HIV-1 の潜伏感染細胞株を刺激しウイルスの複製を促すことを示した。本研究では、活性化新鮮末梢血単核球(PBMC)における CCR5 HIV-1 感染に対する効果を明らかにすることを目的とした。可溶性 anti-CD28 抗体存在下、anti-CD3 (OKT-3)固相化プレート内で健常人由来の新鮮 PBMC を活性化し、翌日、細胞を集めて CCR5 使用 HIV-1 (JR-FL)に m. o. i. 0.005 で 2 時間感染させ、洗浄後、OX40L 発現細胞や組換え OX40L (R&D)を添加して培養した。HIV-1 の増殖を培養上清中の p24 抗原でモニターした。p24 産生を指標とすると、1 次刺激 1 日目の新鮮 PBMC の R5 HIV-1 感染は、OX40L の添加により濃度依存的に抑制された。この効果は、anti-OX40L または anti-MIP-1 α , anti-MIP-1 β , anti-RANTES 抗体の混合液により解除された。また、R5 HIV-1 による合胞体形成も有意に抑制した。また、X4 HIV-1 の感染はどの時点の PBMC でも抑制は観察できなかった。これらの結果より、OX40L による活性化 PBMC の刺激は、R5 HIV-1 の感染を CCR5 リガンドの産生に依存的に抑制することが示唆された。また、OX40 刺激による HIV-1 の合胞体形成抑制には、細胞間接着分子の変動も関与する可能性もあることが示唆された。

A. 研究目的

OX40 は活性化 CD4⁺T 細胞に一過性に発現する TNFR ファミリー分子である。対応するリガンドである OX40L(gp34)との結合は T 細胞を共刺激し、細胞の生存やサイトカイン産生に寄与することが知られている。我々はこれまで OX40L による T 細胞への OX40 刺激が CXCR4 使用 HIV-1 の潜伏感染細胞株を刺激しウイルスの複製を促すことを示した。そこで本研究では、HIV-1 の初期感染における OX40L-OX40 応答の関与を明らかにするために、CCR5 使用 HIV-1 の活性化新鮮 PBMC における感染に対する OX40 刺激効果を検討することを目的とした。新鮮 PBMC を標的細胞とすることは、より *in vivo* に近い環境で OX40 刺激の影響を見るためである。

B. 研究方法

健常人由来の新鮮 PBMC を抗 CD28 抗体(可溶性)存在下で anti-CD3 (OKT-3) 固相化プレート内で活性化し、翌日、細胞を集めて CCR5 使用 HIV-1 (JR-FL 株)に m.o.i. 0.005～0.01 で 2 時間感染させた。洗浄後、OX40L 発現細胞(CEM/OX40L)や組換え OX40L (R&D 社製)を添加して 37° C で培養した。同様な感染実験を 2 次刺激 PBMC でも検討した。HIV-1 の増殖は、培養上清中の p24 抗原を ELISA で測定することによりモニターした。感染細胞の計測には、細胞内 p24 染色を行い、フローサイトメトリー用の細胞計測ビーズで絶対数を計測した。サイトカインの定量は市販のキットで行った。OX40 や OX40L、あるいは β ケモカインに対する阻止抗体は、自家製のもの、あるいは市販のものをを用いた。本研究は本学バイオハザード委員会、動物実

験委員会、遺伝子組換え生物使用実験安全委員会、倫理委員会の承認を得て行った。ヒト細胞材料入手は提供者の同意を得て行いその人の利益ならびに人権保護の取り扱いに十分配慮した。

C. 研究結果

(1) 培養上清への p24 産生、および感染細胞の細胞内 p24 染色による感染細胞の数を指標とすると、初回刺激から 1 日目の新鮮 PBMC での R5 HIV-1 感染増殖は、OX40L の添加により濃度依存的に抑制されることが明らかにされた。

(2) この効果は、anti-OX40L や anti-OX40 阻止抗体、および anti-MIP-1 α 、anti-MIP-1 β 、anti-RANTES 中和抗体の混合液により解除された。

(3) HIV-1JR-FL 株による PBMC での合胞体形成の形成は、OX40 刺激によりほぼ完全に抑制された。

(4) 2 次刺激された PBMC での R5 HIV-1 の感染増殖は OX40 刺激では抑制できなかった。

(5) また、以前の観察のように X4 HIV-1 である NL4-3 株の感染は抑制できなかった。

(6) R5 HIV-1 感染細胞の絶対数も OX40 刺激により有意に減少した。

(7) 3 種類の β ケモカインである MIP-1 α 、MIP-1 β 、RANTES は、OX40 刺激により産生が増強され、その産生は anti-OX40 抗体で阻害された。

D. 考察

OX40L による活性化 PBMC の OX40 に対する副刺激は、R5 HIV-1 抑制能をもつ 3 種類の β ケモカインの産生を促進することにより、活性化 PBMC 培養内での R5 HIV-1 感染の広がりを抑制することが示唆された。これにより、HIV-1 感染における OX40L-OX40 応答の新たな免疫学的機能が明らかにされた。また、今回の研究で、HIV-1JR-FL が R5 HIV-1 ではあるが活性化 PBMC でよく合法体を形成すること、およびその形成が OX40 刺激により抑制されることも明らかにされた。OX40-OX40L はそれ自身が細胞間の接着に関与することから、OX40 刺激が HIV-1 の増

殖を抑制するメカニズムにおいて何らかの形で細胞接着分子の変動が関与する可能性も示唆される。

今回の研究により、OX40L による OX40 副刺激が、活性化 PBMC における HIV-1 の感染増殖を HIV-1 抑制 β ケモカイン依存的に抑制することを初めて明らかにできたので、次のステップへの基盤とすることができた。

本研究の成果はエイズ阻止を目的とする社会的要請において新たな HIV-1 戦略を提供するという面で意義があると考えられる。今回使用した OX40L のソースは組換え体や細胞株に発現させたものであるため、臨床応用面で問題がある。そこで、OX40L を自家 T 細胞に大量に発現させる方法を開発し、臨床応用へと進めたい。

E. 結論

OX40L による OX40 の副刺激は、活性化 PBMC に R5 HIV-1 の感染抑制性 β ケモカインの産生を促し、R5 HIV-1 感染初期の増殖を優位に抑制することから、HIV-1 感染阻止およびエイズ阻止への応用が期待される。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kodama A, Tanaka R, Zhang LF, Adachi T, Saito M, Ansari AA, Tanaka Y. Impairment of in vitro generation of monocyte-derived human dendritic cells by inactivated HIV-1: involvement of type-I interferon produced from plasmacytoid dendritic cells. Human Immunol. in press
- 2) Kamiyama H, Yoshii H, Tanaka Y, Sato H, Yamamoto N, Kubo Y. Raft localization of CXCR4 is primarily required for X4-tropic human immunodeficiency virus type 1 infection. Virology. 386:23-31, 2009.
- 3) Murakami T, Kumakura S, Yamazaki T, Tanaka R, Hamatake M, Okuma K, Huang W, Toma J, Komano J, Yanaka M, Tanaka Y, Yamamoto N. The novel CXCR4 antagonist KRH-3955 is an orally bioavailable and extremely potent inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 infection: comparative studies with AMD3100. Antimicrob Agents Chemother. 53:2940-48, 2009.

- 4) Nie C, Sato K, Misawa N, Kitayama H, Fujino H, Hiramatsu H, Heike T, Nakahata T, Tanaka Y, Ito M, Koyanagi Y. Selective infection of CD4+ effector memory T lymphocytes leads to preferential depletion of memory T lymphocytes in R5 HIV-1-infected humanized NOD/SCID/IL-2R γ manull mice. *Virology*. 394(1):64-72. 2009
- 5) Ohba K, Ryo A, Dewan MZ, Nishi M, Naito T, Qi X, Inagaki Y, Nagashima Y, Tanaka Y, Okamoto T, Terashima K, Yamamoto N. Follicular dendritic cells activate HIV-1 replication in monocytes/macrophages through a juxtacrine mechanism mediated by P-selectin glycoprotein ligand 1. *J Immunol*. 183:524-32, 2009.

2. 学会発表

- 1) 児玉晃, 張麗峰, 田中礼子, 田中勇悦. HIV-1 によるミエロイド樹状細胞のアポトーシスと成熟促進に関与する宿主細胞因子. 日本エイズ学会誌 第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会、2009 年、愛知県.
- 2) 田中勇悦, 児玉晃, 張麗峰, 田中礼子. エイズ制御を目的とする樹状細胞(DC)免疫:DCの簡単培養法とヒト化マウスでの評価. 日本エイズ学会誌 第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会、2009 年、愛知県.
- 3) 田中礼子, 田中勇悦. OX40 共刺激を介する活性化 PBMC での CCR5 HIV-1 の感染抑制. 日本エイズ学会誌 第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会、2009 年、愛知県.

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

HIV-1 感染における調節性 T 細胞の意義

研究分担者 神奈木真理 東京医科歯科大学 医歯学総合研究科 教授

研究要旨：HIV-1 感染症の治癒を目指すには、HAART 施行中にも維持される HIV-1 潜在感染細胞を標的とした治療戦略が必要である。潜伏感染細胞はメモリータイプの長命な静止期 T 細胞であることが示唆されている。しかし、試験管内実験系が無い場合研究アプローチが難しい。本研究では、このような特徴を有する細胞の代表である調節性 T 細胞に焦点を当て、HIV-1 潜在感染細胞株の実験系を樹立し HIV-1 複製および発現調節機構を解明したい。本年度は、以前我々が樹立した自己応答性の IL-2 依存性ラット T 細胞株を同系ラットに免疫接種し、その脾 T 細胞から自己応答性細胞の刺激に反応して増殖する T 細胞株を樹立した。この細胞株は CD4+CD25+ CTLA4+ であり、刺激特異的に IFN- γ および IL-10 を産生した。また、培養上清は、刺激に用いた自己応答性 T 細胞の増殖を抑制した。これらの特徴は、誘導型の調節性 T 細胞に合致する。現在この細胞を用いて HIV-1 pseudotype virus の持続感染を試みている。今回得られた調節性 T 細胞と思われる細胞株を用いて HIV-1 潜在感染 T 細胞の実験系が確立できれば、今後、T 細胞の HIV-1 潜在感染におけるウイルス発現調節の解析の有用なツールとなると考えられる。

A. 研究目的

最近の抗ウイルス薬の開発により生体内で HIV-1 複製を抑制する事が可能になった。しかし、抗ウイルス薬の服用を停止すると HIV-1 複製は再開しウイルス量が増加する。これは、HAART 療法中も HIV-1 感染細胞が潜伏していることを意味する。HIV-1 感染症の治癒を目指すには、HIV-1 潜在感染細胞を標的とした治療戦略が必要である。臨床検体の細胞分画に基づいた報告では、HIV-1 潜伏感染細胞はメモリータイプの静止期 CD4 陽性細胞でありウイルス発現は低い。また、HIV-1 特異的 CTL や抗ウイルス剤の存在下においても維持されることから、獲得免疫に抵抗性で且つ長命と考えられる。しかし、試験管内実験系が無い場合研究アプローチが難しい。本研究では、このような特徴を有する細胞の代表である調節性 T 細胞に焦点を当て、HIV-1 潜在感染細胞株の実験系を樹立し HIV-1 複製および発現調節機構について明らかにすることを目的と

した。

B. 研究方法

1) 細胞株

以前に樹立した F344 系ラット由来 T 細胞株 G14 および Tax-G14 は、rhIL-2 (10 u/ml)10%FCS 添加 RPMI1640 培地で維持した。

2) T 細胞応答の評価

T 細胞の種々の刺激への反応性は、in vitro の細胞増殖アッセイ、サイトカイン産生アッセイを用いて検定した。培養上清中のサイトカイン産生量は ELISA 法で、細胞増殖は 3H チミジン取り込み法で測定した。この際、CD4, CD8, MHC-I, MHC-II 特異的なブロック抗体を添加した。

3) ラットへの免疫

G14 細胞(～107/頭)をマイトマイシン C 処理し、同系の免疫正常ラットに 1 週間隔で 3 回皮下投与した。最終接種の 1 週後に脾 T 細胞を分離した。

4) Pseudotype HIV-1

293T 細胞に VSV-G 発現 plasmid と pNL43/Luc Δenv を cotransfection し、上清中の VSV-G/HIV-1NL43 pseudotype virus を培養細胞に添加した。

C. 研究結果

1) G14 細胞の自己反応性

G14 細胞は、CD4+CD8+CD25+ T 細胞であり、IL-2 依存性であるが、無刺激でも自律的に増殖し恒常的に IFN- γ を産生していた。G14 細胞の IFN- γ 産生は、抗ラット CD4 抗体あるいは MHC class II 抗体の添加により有意に抑制されたが、CD8, MHC-I 抗体では変化が無いか軽度増加した。これは、G14 が自身の MHC class-II 分子に提示された自己抗原を認識して IFN- γ を産生する自己反応性の T 細胞であることを示唆する。

2) G14 特異的 T 細胞の誘導

次に自己反応性 T 細胞 G14 に対する応答を見るため、G14 細胞を同系ラットに免疫接種した。免疫ラットの脾 T 細胞を分離し、Tax-G14 細胞でくりかえし刺激したところ、IL-2 存在下で抗原刺激依存的に増殖する T 細胞株 8L を得た。8L 細胞は CD4+CD25+CTLA4+であり、G14 細胞特異的に IFN- γ および IL-10 を産生した。8L 細胞の培養上清を G14 の培養液に添加すると G14 の増殖が低下した。これらの特徴は、誘導型の調節性 T 細胞に合致する。

3) G14 特異的 T 細胞への pseudotype HIV-1 感染

8L 細胞培養に VSV-G/HIV-1NL43 pseudotype virus を添加し、限界希釈法によりクローニングを行った。現在 luciferase 活性を指標に陽性クローンをスクリーニング中である。

4) 自然免疫による HIV-1 複製抑制

前年度からエイズ対策研究事業の中で継続して行なってきた、自然免疫を介した常在菌による HIV-1 複製抑制の研究結果を論文にまとめ投稿した。

D. 考察

自己応答性に自律的に増殖する G14 細胞株の樹立は偶発的であったが、これを免疫した個体から調節性と思われる T 細胞が誘導される現象は複数の個体で再現された。この現象に、G14 が自己応答性であることが関与するかどうかは推測の域を得ない。むしろ、活性化した自己 T 細胞に対する必然的な応答の一つと思われる。

このような誘導型調節性 T 細胞と思われる T 細胞で HIV-1 発現調節がどのように行われるかは極めて興味深い。実験系として、ラット由来の細胞を HIV-1 新規感染に用いることはできないが、すでに宿主遺伝子に組み込まれた状態からの転写調節に関しては情報が得られる可能性がある。

今回得られた調節性 T 細胞と思われる細胞株を用いて HIV-1 潜在感染 T 細胞の実験系が確立されれば、今後の HIV-1 潜在感染に関する研究の有用なツールとなる。潜在感染 T 細胞実験系が作成でき次第、ウイルス発現調節の条件を解析する予定である。また、ヒト細胞を用いて類似の実験系の作成を試みている。

E. 結論

自己反応性 T 細胞株を免疫したラットから反応性の T 細胞を誘導し、HIV-1 潜在感染実験系を作成するために必要となる調節性 T 細胞株を樹立した。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takatsuka, N., Hasegawa, A., Takamori, A., Shimizu, Y., Kato, H., Ohashi, T., Amagasa, T., Masuda, T., and Kannagi, M. Induction of IL-10- and IFN-gamma-producing T-cell responses by autoreactive T-cells expressing human T-cell leukemia virus type I Tax. *Int. Immunol.* 21:1089-100, 2009.
- 2) Nishitsuji, H., Hayashi, T., Takahashi, T., Miyano, M., Kannagi, M., and Masuda, T.

Augmentation of reverse transcription by integrase through an interaction with host factor, SIP1/Gemin2 is critical for HIV-1 infection. PLoS One 4:e7825, 2009.

- 3) Kinpara, S., Hasegawa, A., Utsunomiya, A., Nishitsuji, H., Furukawa, H., Masuda, T., and Kannagi, M. Stromal cell-mediated suppression of human T-cell leukemia virus type 1 expression in vitro and in vivo by type I interferon. J. Virol. 83:5101-8, 2009.
- 4) Shimizu Y, Takamori A, Utsunomiya A, Kurimura M, Yamano Y, Hishizawa M, Hasegawa A, Kondo F, Kurihara K, Harashima N, Watanabe T, Okamura J, Masuda T, Kannagi M. Impaired Tax-specific T-cell responses with insufficient control of HTLV-1 in a subgroup of individuals at asymptomatic and smoldering stages. Cancer Science, 100: 481-489, 2009.
- 5) Ahmed, N, Hayashi, T., Hasegawa, A., Furukawa, H., Okamura, N., Chida, T., Masuda, T., and Kannagi, M. Suppression of HIV-1 replication in macrophages by commensal bacteria preferentially stimulating TLR4. (paper submitted).

2. 学会発表

- 1) Ahmed, N., Hayashi, T., Hasegawa, A., Furukawa, H., Okamura, N., Chida, T., Masuda, T., and Kannagi, M. Effects of commensal organisms on HIV-1 replication in macrophage-like cells. 第23回日本エイズ学会、2009年、名古屋.
- 2) 増田貴夫、西辻裕紀、高橋卓也、林隆也、宮野正史、長谷川温彦、神奈木真理. HIV-1 インテグラーゼと宿主因子 HIV-1 インテグラーゼの逆転写過程への直接関与とその作用機序. 第23回日本エイズ学会、2009年、名古屋.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

HIV 感染の病態進行に関わる免疫関連宿主因子の研究

研究分担者 立川 愛 東京大学医科学研究所

先端医療研究センター感染症分野 助教

研究要旨：HIV 感染における病態進行に最も関連のある血中ウイルス量の異なる HIV 感染者間での免疫学的特性を明らかにした。血中ウイルス量が高い感染者では非特異刺激に対する型特異的なサイトカイン・ケモカイン産生能が低下しており、その低下はメモリー T 細胞の持続的な活性化による疲弊に起因していることが明らかとなった。

A. 研究目的

HIV 感染症において、AIDS 発症のメカニズムは未だ明らかとなっていない。HIV に感染してから AIDS 発症までの期間は感染者によって大きく異なっており、未治療の感染者でも感染後 1 年で AIDS を発症する場合もあれば、長期未発症者と呼ばれる感染者では 20 年以上 AIDS を発症しない場合もある。このような感染者間では宿主側あるいはウイルス側になんらかの相違があると考えられ、その相違を明らかにすることは AIDS 発症のメカニズムを明らかにすることとなる。

AIDS 発症までの期間と最も強い相関を示す臨床的指標が慢性期の血中 HIV 量 (VL) である。HIV 感染では感染直後に一過性の高ウイルス血症を示すが、その後特異的免疫応答の出現と共に VL は減少し、慢性期へと移行する。慢性期には比較的安定した VL が維持され、VL が低い程 AIDS 発症までの期間が長いことが明らかとなっている。そこで、本研究では VL に注目し、VL の高い感染者と低い感染者での免疫学的特性を明らかにすることで AIDS 発症の分子メカニズムを解明し、AIDS 発症を遅延させる治療法の開発への分子基盤を築くことを目的とした。

これまでの研究で、VL の高い HIV 感染者 (HVL 群) と VL の低い HIV 感染者 (LVL 群) の末梢血単

核球 (PBMC) によるサイトカイン・ケモカインの産生能について解析し、HVL 群で MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, IL-2R の産生が LVL 群と比べて低いこと、HVL 群と LVL 群の PBMC 中の各細胞分画 (T, B, NK 細胞, 単球) の絶対数には相違がないことを明らかにした。MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES は HIV のコレセプターである CCR5 のリガンドであり、また細胞性免疫応答の誘導に重要な役割を担っており、これらのケモカイン産生の低下は宿主の抗 HIV 作用の低下を意味する。本研究ではサイトカイン・ケモカイン産生能の解析について対象者数をさらに増やし再解析を行うとともに、MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, IL-2R の主たる産生細胞である T 細胞について、その性状を明らかにし、HVL 群における低産生のメカニズムの解明を試みた。

B. 研究方法

1) PBMC の刺激とサイトカイン・ケモカインの測定

未治療 HIV 感染者 35 名 (LVL 群 19 名 (CD4 数 488 ± 110 , 血中 HIV 量 $\log_{10} 3.06 \pm 0.40$), HVL 群 16 名 (CD4 数 377 ± 114 , 血中 HIV 量 $\log_{10} 5.0 \pm 0.25$), 対照として抗 HIV 治療群 15 名 (CD4 数 550 ± 155 , 血中 HIV 量 $\log_{10} 1.78$

±0.18)、健常人8名のPBMCを用いた。

PBMCをPHAにて刺激し48時間後に培養上清を回収した。培養上清中のサイトカインの測定にはBiosource社のHuman Cytokine 25-plex Kitを用いた。測定対象としたサイトカインは以下の25種類である：IL-1 β , IL-1Ra, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, GM-CSF, TNF- α , IFN- γ , IFN- α , IL-8, IP-10, MIG, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, RANTES, Eotaxin。

2) T細胞の性状解析

PBMC中のT細胞の性状を解析するため、各群10名ずつのPBMCを用いて、抗CD3, CD4, CD8抗体と同時に分化段階を表す分子であるCD45RA, CCR7、活性化状態を表すCD38, Ki67, Bcl-2、さらに疲弊状態を表すPD-1, CTLA-4に対する抗体で多重染色を行い、発現パターンの解析をフローサイトメトリーにより行った。

(倫理面への配慮)

臨床材料の提供を受ける場合には研究目的や必要事項を文書を用いて説明し、書面でインフォームドコンセントを得た。本研究内容は東京大学医科学研究所倫理審査委員会により承認されている。

C. 研究結果

VLの異なる感染者におけるPBMCによるサイトカイン・ケモカインの産生能の解析

HVL群とLVL群における免疫学的機能の相違について明らかにするため、非特異刺激に対する多種類のサイトカイン・ケモカイン産生量を測定した。その結果、MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, IL-2R, IL17, IL-7においてHVL群で産生が有意に低く、それらの産生量はVLと逆相関していた(図1)。またIFN- γ はHVL群とLVL群で有意差はなかったが、産生量とVL間で逆相関の関係が見られた。また、これらすべてのサイトカイン・ケモカインの産生能は治療群では回復していた。

VLの異なる感染者間におけるT細胞の性状解析

産生量がVLと逆相関の関係にあった上記7種類のサイトカイン・ケモカインについて、HVL群での低産生の機序を明らかにするため、その主たる産生細胞であるT細胞の性状を解析した。低産生の機序として「産生細胞数の低下」と「各細胞の産生量の低下」が考えられる。T細胞はCD45RA, CCR7の発現パターンによってナイーブ(N)、セントラルメモリー(CM), エフェクターメモリー(EM), エフェクター(E)細胞に分画することができ、そのうちサイトカイン・ケモカインを主に産生するのはメモリー細胞(CM, EM)である。そこでCM, EM細胞の頻度を調べたところ、HVL群とLVL群でCD4, CD8陽性T細胞ともにメモリーT細胞の頻度に有意差は認められず、産生量の低下は「産生細胞数の低下」に起因するのではなかった。

続いてT細胞の活性化状態、疲弊状態を明らかにするために、活性化状態を表すCD38, Bcl-2, Ki67、制御性のT細胞補助レセプターであり疲弊状態に陥っている細胞で発現が上昇するPD-1, CTLA-4について、その発現頻度を比較した。CD4陽性T細胞ではKi67+, Bcl-2-, PD-1+, CTLA-4+細胞の頻度が、CD8陽性T細胞ではCD38+, Ki67+, PD-1+細胞の頻度がHVL群で有意に高かったことから(図2)、HVL群ではCD4, CD8陽性T細胞ともに高度に活性化され、疲弊した状態にあることが明らかとなった。さらにメモリーT細胞(CM, EM)におけるPD-1+, CTLA-4+細胞の頻度と有意差のあった上記サイトカイン・ケモカイン産生能との相関を調べたところ、すべてのサイトカイン・ケモカインにおいて、CD4, CD8陽性T細胞ともにPD-1+, CTLA-4+細胞の頻度と逆相関していた。

D. 考察

測定対象とした25種類のサイトカイン・ケモカインのうち、HVL群で産生能の低下が見ら

れたのは Th1 型 (MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, IFN- γ)、Th17 型 (IL-17) のサイトカイン・ケモカインのみであり、Th2 型のサイトカイン・ケモカインは有意差が見られなかったことから、HVL 群では Th1 型、Th17 型の免疫応答で特異的に機能低下が起きていることが示唆された。また、これらのサイトカイン・ケモカイン産生量とメモリーT 細胞の活性化/疲弊状態とは逆相関の関係にあったことから、HVL 群では Th1 型、Th17 型の免疫応答に参与するメモリーT 細胞が慢性的な活性化による疲弊により機能不全に陥っていることが示唆された。本研究で見られたメモリーT 細胞の機能不全の分子メカニズムを明らかにすることで、VL を減少させ得る免疫治療の標的候補となる分子を見出すことができるであろう。

E. 結論

病態進行の早い (AIDS 発症までの期間が短い) VL の高い感染者では、慢性的な活性化、疲弊が原因と考えられる型特異的なメモリーT 細胞の機能不全が顕著であった。

今後は Th1、Th17 型メモリーT 細胞特異的な機能低下の分子メカニズムを明らかにする予定である。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A, Kitamura Y. Influence of polymorphism in dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin-related (DC-SIGNR) gene on HIV-1 trans-infection. Zhu D, Biochem Biophys Res Commun. 2010 Feb 10. [Epub ahead of print]
- 2) Mizutani T, Ishizaka A, Tomizawa M, Okazaki T, Yamamichi N,

Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A, Iba H. Loss of the Brm-type SWI/SNF chromatin remodeling complex is a strong barrier to the Tat-independent transcriptional elongation of HIV-1 transcripts. J Virol. 83:11569-80. 2009

- 3) Nunoya J, Nakashima T, Kawana-Tachikawa A, Kiyotani K, Ito Y, Sugimura K, Iwamoto A. Short communication: generation of recombinant monoclonal antibodies against an immunodominant HLA-A*2402-restricted HIV type 1 CTL epitope. AIDS Res Hum Retroviruses. 25:897-904. 2009

2. 学会発表

- 1) Kawana-Tachikawa A, Nakayama K, Odawara T, Fujii T, Iwamoto A. Importance of Gag-specific cellular immunity to control HIV in Japanese population. 5th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. July 2009. Capetown, South-Africa
- 2) Koga M, Kawana-Tachikawa A, Odawara T, Heckerman D, Miura T, Iwamoto A. The impact of HLA class I alleles on HIV-1 plasma virus loads in a unique Asian population with a narrow spectrum of HLA, and their changes at the population level over time. 5th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. July 2009. Capetown, South-Africa
- 3) HIV感染におけるGag特異的細胞性免疫による免疫監視機構の重要性. 立川 (川名) 愛、中山香、古賀道子、鯉渕智彦、小田原隆、藤井毅、岩本愛吉. 第57回日本ウイルス学会学術集会. 東京 2009年10月.
- 4) 血中HIV量の異なる慢性期HIV感染者における末梢血単核球の液性因子産生能と各細胞分画の性状解析. 中山香、立川 (川名)

愛、藤井毅、鯉渕智彦、小田原隆、岩本愛吉. 第57回日本ウイルス学会学術集会. 東京 2009年10月.

- 5) 日本人集団におけるHIV特異的細胞性免疫応答の解析. 立川 (川名) 愛、中山香、古賀道子、鯉渕智彦、小田原隆、藤井毅、岩本愛吉. 第23回日本エイズ学会学術集会. 名古屋 2009年11月.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む.)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし



図1 HIV群とLVL群で産生量に有意差の見られたサイトカイン・ケモカイン

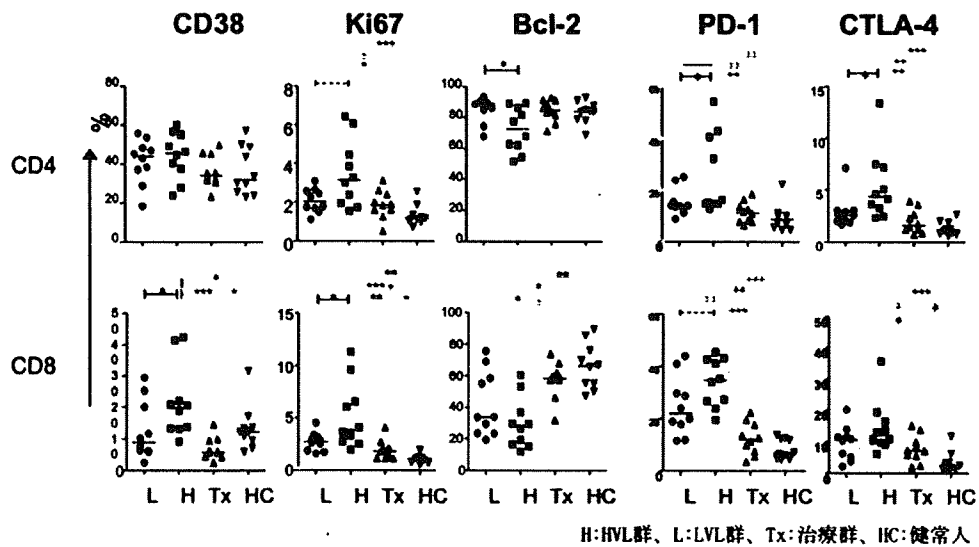


図2 HIV感染者におけるT細胞の性状 (活性化・疲弊状態)

北タイ HIV-1CRF01_AE 感染長期未発症者における CTL 活性の分子レベルの研究

研究分担者 有吉 紅也 長崎大学熱帯医学研究所臨床医学分野 教授
研究協力者 プサラワン スリワンタナ タイ国立衛生研究所研究員

研究要旨：アジア流行株 CRF01_AE の HIV 宿主内増殖を効率的に抑制する細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 免疫応答の特徴を解明し、アジアで有効な HIV・エイズワクチン開発に資することが本分担研究の目的である。北タイの CRF01_AE 感染者コホート患者の Gag に対する CTL をオーバーラッピングペプチドを用いた Elispot アッセイにより系統的に評価した結果、CTL 認識の広さ (Breadth) と強さ (Magnitude) が良い臨床経過 (CD4 値・ウイルス量) と相関することが分かった。また、p24 領域の HLA と相関するアミノ酸変異数やペプチド認識が、より良い臨床経過と相関することが判明した。今回観察された 45 か所の CTL エピトープ候補のうち 41 か所については過去に報告例のないものであり、CTL エピトープの大部分はサブタイプ特異的であることが示唆された。

A. 研究目的

近年、組換えアデノウイルスベクターによる細胞性免疫誘導型 HIV ワクチンが臨床治験で失敗したことから、ワクチンによって誘導される免疫反応の質が以前よりも増して問われるようになった。

細胞傷害性 T リンパ細胞 (Cytotoxic T-Lymphocyte, CTL) は、宿主内の HIV 増殖抑制に重要な役割を担っており、また有効な予防的もしくは治療的ワクチンの開発に不可欠な免疫反応であると考えられている。これら CTL 免疫反応による HIV 感染予防および HIV 増殖抑制効果は宿主によって異なることが知られている。これらは主に HIV ウイルス蛋白の多様性や宿主遺伝子 (特に HLA class I) の多様性によって決定されると考えられ、有効なワクチン開発には、特に HIV 感染後長期にわたって免疫不全が進行しない長期生存感染者の有する良質の免疫反応をより深く理解することが重要である。

しかし、アジアに流行している CRF01_AE サブタイプに関する CTL エピトープ情報は限られている。また、長期生存者に特徴的な CTL エピトープに関しては殆どない。そこで、本分担研究の最終目標は、アジア地域のエイズ流行最先端の北タイにおいて、HIV-1CRF01_AE 感染長期未発症者を 100 名以上集めたコホートを立ち上げ、HIV 宿主内増殖を効率的に抑制でき

る良質な CTL 免疫反応を HLA 解析、HLA 関連 Gag タンパク変異、Gag 特異的 CTL エピトープの 3 側面において解析し、良質な CTL 免疫について分子レベルで明らかにすることにある。

本年度は、HLA アリールと関連する Gag タンパク変異と臨床経過との関連について、Gag 特異的 CTL エピトープ認識と臨床経過との関連について新たな知見が得られたので報告する。

B. 研究方法

1) CRF01_AEGag ペプチド認識パターンと臨床像の比較について

北タイ HIV 感染者由来の Gag アミノ酸配列情報を基に北タイ流行 HIV 株に最適化された Gag オーバーラッピングペプチド (15-mer, 98 本) を用いて Matrix 法に従って、ペプチドプール 10 組 2 パターンを作成、これらのペプチドプールを認識して反応する γ IFN 産生リンパ細胞を Elispot 法にて定量測定した。実験はひとつのターゲットにつき 3 回行い、最も強く反応するペプチドプールおよび次に強く反応するペプチドプールを同定した。対象者は北タイランパン病院にて HIV コホート研究に参加さひた抗 HIV 薬未治療で CD4 値 200 / μ l 以上の HIV 感染者とした。

さらに、これらの感染者の Gag ペプチド

認識と臨床経過との相関を調べるため、認識した Gag ペプチドの数を CTL 認識の“Breadth(広さ)”として定義し、Breadth と臨床状態(ウイルス量、CD4 値)との相関を統計的に調べた。また、各ペプチドに対するスポット数を CTL 認識の“Magnitude(強さ)”を定義して同様に臨床状態との相関を統計的に調べた。

さらに、ウイルス量と関係する CTL 認識部位を特定するためにウイルス量の最も高い群(上位 25 百分位; 25%ile)と最も低い群(下位 25 百分位; 25%ile)にわけ、両群の間でペプチド認識パターンの比較を行った。

2) HLA アリールと相関する Gag アミノ酸変異と臨床像との比較について

我々は、これまで HLA アリール情報のある 144 名の系統樹上独立した関係にある感染者から得られた Gag シーケンス情報を解析することにより、56 パターンの HLA アリールと HLA との相関を同定してきた。今回、これらの HLA 関連アミノ酸変異の数と CD4 値およびウイルス量との相関について調べた。

3) Gag CTL エピトープマッピング

CRF01_AEGag エピトープ領域をマッピングするためにペプチド認識と感染者の HLA アリールとの相関を統計的に調べ過去に報告されたエピトープ情報を比較検討した。

(倫理面への配慮)

本分担研究にて活用した北タイ HIV コホートは、2006 年 3 月に新たにタイ政府保健省医学研究倫理委員会にて承認され、承認内容の中に本分担研究の研究目的が含まれている。本研究に協力したすべてのコホート参加者から署名入り同意書が得られている。

C. 研究結果

1) CRF01_AEGag ペプチド認識パターンと臨床状態との相関について

2003 年 9 月 2 日から北タイランパン病院 HIV 外来を受診し、本 CTL 研究へ参加した CD4 値 $200/\mu\text{l}$ 以上の未治療 HIV 感染患者数は 139 名の HIV 感染者について Elispot 実験を実施した。平均年齢 31 歳(年齢幅 16~56 歳)、平均 CD4 陽性細胞数 $461/\mu\text{l}$ (幅 204~1,191)、平均ウイルス量 $4.21 \log \text{copies/ml}$ (幅 2.06 ~5.88)であった。

55 か所のペプチドが少なくとも一名によって認識され、112 名(80.6%)の感染者が少なくとも一か所のペプチドを認識していた。さらに各感染者の認識するペプチド数、すなわち CTL 認識の“Breadth(広さ)”は、CD4 値との間に正の相関があり、また、ウイルス量との間に負の有意な相関があることが判明した(図 1)。

次に各ペプチドに対するスポット数、すなわち CTL 認識の“Magnitude(強さ)”においても、CD4 値と正の相関およびウイルス量と負の相関があることが判明した(図 2)。

さらに、ウイルス量の最も高い群と最も低い群にわけ、両群の間でペプチド認識パターンの比較を行ったところ、低ウイルス量群では高ウイルス量群に比べ有意に p24 コア領域のペプチドを認識していることが判明した(図 3)。個々のペプチドレベルで両群の間で有意差が出たものはない。

2) HLA アリールと相関する Gag アミノ酸変異と臨床像との比較について

HLA アリールと相関する Gag アミノ酸変異の数と CD4 値およびウイルス量との相関を調べたところ、CD4 値とは負の相関が、またウイルス量とは正の相関があることが判明した。さらに、この関係を詳細に調べたところ、これらの関係は p24 コア抗原において明らかな相関があることが判明した(図 4)。

3) Gag CTL エピトープマッピング

今回 25 本のペプチドについて、45 とおりのペプチド認識と HLA アリールとの相関を認めた。このうち 4 か所については既に CRF01_AE エピトープとして過去に報告されていたものであったが、残り 41 とおり(34 か所の CRF01_AE に特異的なもの、9 か所の CRF01_AE 以外の Subtype では報告例のある Cross-Clade エピトープ)のペプチド認識と HLA アリールとの相関は過去に報告のないものであった。

本研究の目標である 100 名以上の長期生存者については、本年度は新たにチェンライ病院から 17 名、チェンマイ県病院から 3 名の長期生存者がリクルートされた。今後これらの長期生存者の CTL 認識パターンについても調べてゆく予定である。

D. 考察

今年度の研究結果から、HLA に拘束され