

粘膜・リンパ組織の抗原提示細胞への感染様式の解明

研究分担者 五十嵐 樹彦 国立大学法人京都大学ウイルス研究所
附属感染症モデル研究センター霊長類モデル研究領域 教授

研究要旨：

HIV 潜伏・再活性化サルモデルを構築する目的で、非病原性分子クローン SIV 1A11 を低感受性である事が知られている中国産アカゲザルに昨年度接種した。SIV1A11 は接種後数週間ウイルス血症を誘導したがその後制御された。接種 32 週後に抗 CD8 抗体を投与した所、一過性のウイルス血症及びリンパ節におけるウイルス抗原陽性細胞の出現が観察された。正常サル粘膜組織生検試料から抗原提示細胞の精製を試行したが、収率が低く更に検討を要する。

A. 研究目的

慢性的なウイルス抗原刺激による T 細胞の活性化及び疲弊は HIV 感染症の病原性として特徴付けられる。T 細胞活性化は、樹状細胞に代表される抗原提示細胞との相互作用により誘導される事から、ウイルス感染により抗原提示細胞の質または量が変化し、慢性的な T 細胞活性化を引き起こしている可能性が考えられる。先行研究では、感染により血中の樹状細胞数の推移が主に報告されているが、樹状細胞の感染状況に関する報告は多くない。更に、個体におけるウイルス複製の主要な場であるリンパ節及び消化管に代表される粘膜における樹状細胞感染に関しては、SIV サルエイズモデルを用いて極めて限られた研究が行われているにすぎず (Choi *et al.*, J.Pathol.201:616-28, 2003.) 理解が進んでいるとは言えない。

本分担研究の目的は、個体レベルにおける主要なウイルス複製の場であるリンパ節及び粘膜における抗原提示細胞の感染様態を明らかにする事である。

B. 研究方法

非病原性 SIV 1A11/中国産アカゲザルモデル系を構築し、ウイルスの潜伏・再活性化時に組織で起きる事象を検索する。

・サル感染実験

1.1 × 10⁷TCID₅₀ の SIV1A11 ウイルスストックを麻醉下のアカゲザル直腸にシリコンチューブを用いて非観血的に導入し、30 分間静置した。ウイルス接種前より採血を行い、血漿の保存及び末梢血リンパ球サブセットの測定を行った。接種 1 週間前に、麻醉下で直腸組織を生

検し、RNA 抽出、組織学的検索のために固定、保存した。

・ウイルス RNA の定量

経時的に採取した末梢血より血漿を調製、RNA を抽出し、逆転写/リアルタイム PCR により SIV gag 領域を増幅、定量した。

・リンパ球サブセット測定

経時的に採取した末梢血を蛍光標識単クローン抗体 (抗 CD3, CD4, CD8 および CD20) と反応させ、フローサイトメトリーにより解析した。また、生検したリンパ節から細胞浮遊液を調製し、蛍光標識抗体を用いて同様に解析した。

・抗 CD8 抗体処理

ウイルス接種 32 週後に 1 頭の感染サルに抗 CD8 抗体 (M-T087R1, NIH Nonhuman Primate Reagent Resource より入手) 10 mg/kg を麻醉下で皮下投与した。

・腸管組織からの抗原提示細胞の調製

非感染アカゲザルの直腸組織を麻醉下で生検鉗子を用いて採取、キレート剤及び蛋白質分解酵素処理により細胞浮遊液を調製した。更に、抗 CD1b 抗体 (京都大学ウイルス研究所杉田昌彦博士より分与を受けた) 及び磁気ビーズを用いて細胞を精製、フローサイトメトリーにより発現抗原を検索した。

C. 研究結果

・腸管組織からの抗原提示細胞の調製

抗原提示細胞に感染するウイルスの量、ウイルスの存在様式 (持続的複製があるか、プロウイルスとして潜伏しているか) を明らかにする

ため、直腸組織生検材料から細胞浮遊液を調製し、代表的抗原提示細胞である樹状細胞を精製する目的で抗 CD1b 抗体及び磁気ビーズを用いて細胞を精製した。精製した細胞の多くは形態的に単核で細胞質が豊富で空胞を含み、マクロファージ様であった。この細胞に関して CD11c、CD123 および HLA-DR 抗原の発現をフローサイトメトリーにより解析した所、HLA-DR 陽性でかつ CD11c 陽性（骨髄系樹状細胞）または HLA-DR 陽性でかつ CD123 陽性（形質細胞様樹状細胞）の細胞がそれぞれ検出された。2mm × 2mm × 2mm の生検組織 10 片から $1-6 \times 10^5$ 細胞が、磁気ビーズ精製後は総計 10^4 台の細胞が調製されたが、収率は低かった。

・ SIV 1A11 の中国産アカゲザルにおける複製

ウイルス曝露後接種 10 週後まで 10^3-10^4 コピー/ml の血中ウイルス RNA が断続的に検出されたが、その後検出限界以下 (200 コピー/ml) に抑制された。接種 15-25 週後の血漿に関して、遠心沈渣から RNA 抽出する事で 1 反応あたりの実効試料投入量を増やし検出感度を上げると、1 頭のサルで接種 26 週後に 17 コピー/ml のウイルス RNA が検出された。

CD4 陽性および CD8 陽性リンパ球サブセットはウイルス感染によって変動しなかった。感染サルは観察期間中臨床的に霊長類レンチウイルス関連疾患を示さなかった。

・ 抗 CD8 抗体処理

接種 32 週後に 1 頭の感染サルに抗体を投与した所、血中ウイルス RNA が投与 3 日以内に検出限界以下から 10^4 コピー/ml まで一過性に上昇した。

抗体投与直前及び投与 2 日後に生検したリンパ節細胞の解析の結果、投与前に検出されなかった gag ウイルス抗原陽性細胞 (0.03%) が、2 日後に 0.12% 検出された (寺原和孝博士による解析)。

D. 考察

SIV 1A11 は当初予想した通り、一過性のウイルス血症の後制御され「潜伏」したが、抗 CD8 抗体処理による「抑制解除」により少なくとも末梢血及びリンパ節において「再活性化」した事から、恐らく全身性にウイルスの再活性化は起こっていると考えられる。現在、同様に抗体投与前及び 2 日後に生検した直腸組織におけるウイルス遺伝子発現を *in situ hybridization* により解析中であるが、こちらでもウイルスシグナルが検出される事が期待される。

直腸生検試料からの樹状細胞の精製は当初予想していたよりも困難である事が明らかとなった。採取出来る組織の量に限りがあるため、取りこぼしが無い様調製する必要がある。従来のキレート剤及び蛋白分解酵素 (主にコラゲナーゼ) 処理では組織片を完全に可溶化する事が出来ないため、細胞を取りこぼしていると考えられる。そこで、酵素処理に加え緩徐な器械的破碎を加える事を検討している。

同時に直腸組織の組織化学的検索に向けて非感染サル直腸組織を用いて条件を検討しているが、明らかになった事として、アカゲザル下部消化管の粘膜固有層では、リンパ球は上部と比較して少なく、CD68 陽性のマクロファージは豊富に存在する事である。現在まで数種の単クローン抗体を用いて樹状細胞の検出を試みているが検出されない事から、本組織における樹状細胞の分布は CD68 陽性マクロファージと比較して少ない事が予想される。そこで来年度は抗原提示細胞としてマクロファージに焦点を当てて検索を進める (生検試料からの細胞調製及び組織化学的検索) 事が現実的であろう。

E. 結論

非病原性 SIV 1A11 および中国産アカゲザルを用いてエイズウイルス潜伏・再活性化モデルを確立した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Oue, M., Sakabe, S., Horiike, M., Yasui, M., Miura, T., and Igarashi, T. No viral evolution in the lymph nodes of SIV-infected rhesus macaques during combined antiretroviral therapy. *J. Virol.* 87:4789-93, 2013.
- 2) Nomaguchi, M., Yokoyama, M., Kono, K., Nakayama, E.E., Shioda, T., Doi, N., Fujiwara, S., Saito, A., Akari, H., Miyakawa, K., Ryo, A., Ode, H., Iwatani, Y., Miura, T., Igarashi, T., Sato, H., and Adachi, A. Generation of rhesus macaque-tropic HIV-1 clones that are resistant to major anti-HIV-1 restriction factors. *J. Virol.* 87:11447-61, 2013.
- 3) Otsuki, H., Hishiki, T., Miura, T., Hashimoto, C., Narumi, T., Tamamura, H., Yoshimura, K., Matsushita, S., and Igarashi, T. Generation of a replication-competent simian-human immunodeficiency virus, the neutralisation sensitivity of which can be enhanced in the

presence of a small molecule CD4 mimic. J Gen Virol. 94:2710-6, 2013.

- 4) Hashimoto, C., Narumi, T., Otsuki, H., Hirota, Y., Arai, H., Yoshimura, K., Harada, S., Ohashi, N., Nomura, W., Miura, T., Igarashi, T., Matsushita, S., and Tamamura, H. A CD4 mimic as an HIV entry inhibitor: Pharmacokinetics. Bioorg. Med. Chem. 21:7884-9, 2013.

2. 学会発表

- 1) 米田舞、大附寛幸、一瀬裕太郎、松田健太、松下修三、五十嵐樹彦、三浦智行：新規 CCR5 指向性 SHIV のサルへの順化と中和抵抗性の解析 第 155 回日本獣医学会、東京、2013 年 3 月 28-30 日
- 2) 加藤文博、小林剛、三浦智行、五十嵐樹彦、日紫喜隆行：分泌型ルシフェラーゼ遺伝子を有するデングウイルス 1 型レプリコンの構築 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013 年 11 月 10-12 日
- 3) 日紫喜隆行、Han Qi ' En、下遠野邦忠、五十嵐樹彦、鈴木陽一、山本直樹：ISGylation (ISG15-conjugation) によるデングウイルスの複製制御機構 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013 年 11 月 10-12 日
- 4) 石田裕樹、加藤文博、川岸崇裕、小林剛、日紫喜隆行、三浦智行、五十嵐樹彦：フィリピンカニクイザルにおけるデングウイルス自然

感染、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013 年 11 月 10-12 日

- 5) 大附寛幸、五十嵐樹彦、三浦智行：CCR5 指向性サブタイプ C エンベローを持つサル指向性 HIV-1 のブタオザルにおける複製 第 61 回日本ウイルス学会学術交流会、神戸、2013 年 11 月 10 日-12 日
- 6) 大附寛幸、丸田泰広、橋本知恵、鳴海哲夫、廣田雄樹、原田恵嘉、三浦智行、吉村和久、玉村啓和、松下修三、五十嵐樹彦：抗 V3 抗体および低分子 CD4 ミミック曝露後投与によるアカゲザルでの SHIV 複製抑制 第 27 回日本エイズ学会学術集会、熊本、2013 年 11 月 20 日-22 日
- 7) 米田舞、大附寛幸、松下修三、五十嵐樹彦、三浦智行：新規 CCR5 指向性かつ中和抵抗性 SHIV 分子クローンの作製及び解析 第 27 回日本エイズ学会学術集会、熊本、2013 年 11 月 20-22 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし