

潜伏感染細胞の同定とその成立機構

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	国立感染症研究所	免疫部	主任研究官
研究協力者	池野 翔太	国立感染症研究所	免疫部	研究生

研究要旨：

末梢の CD4 陽性 T 細胞を用いて静止期 T 細胞を長期培養維持可能な HSP (HomeoStatic Proliferation) 培養系を確立した。この培養系において静止期細胞の一部には HIV-1 感染後プロウイルスが integration して低レベルのウイルス発現が誘導されていた。HSP 培養系は今後潜伏感染成立過程を解析するための有用な試験管内モデルとなりうると思われる。

A. 研究目的

静止期で維持される試験管内潜伏感染モデルシステムを確立し、ゲノムに挿入された proviral DNA の発現制御、及びヒト化マウスにおける HIV 潜伏感染細胞集団の同定とその性状を解析することにより、潜伏化の成立に関与する細胞因子を明らかにする。

B. 研究方法

1. 組換えレンチウイルスの作製

細胞ゲノムに挿入されて LTR からの転写を解析するため、P2 レベルのレンチウイルスベクター pCS-CDF-GFP-Nef-LTR を構築した。これをトランスファープラスミドとする組換えレンチウイルス作製用 DNA の一式(gag/pol、rev および VSV-G 発現ベクター)、HIV-1_{NLE} (X4 型) あるいは HIV-1_{NLAD8-D} (R5 型) proviral DNA を 293T 細胞に塩化カルシウム沈殿法でトランスフェクションし、ウイルスを作製した。

2. ヒト CD4 陽性 T 細胞の培養維持とウイルス感染

健康人末梢血単核球(PBMC)より CD14 陽性細胞を分画し、単球由来樹状細胞(MDDC)を分化誘導した。CD14 陰性細胞より、CD4⁺ T cell isolation kit (ミルテニ)を用いて negative selection し、CD4⁺ T 細胞をエンリッチした。この細胞に色素(Violet tracer; Invitrogen)をとりこませた後、GFP 発現組換えレンチウイルス(Lenti GFP-Nef-LTR)あるいは

GFP 発現 HIV-1_{NLE} を spinoculation により感染させた。細胞を洗浄後、スーパー抗原(SEB)でパルスした自己 MDDC と共培養することにより強力に T 細胞受容体を刺激し、IL-2 存在下に培養した(T 細胞受容体刺激培養)。あるいは T 細胞刺激なしに IL7 と IL-15 のみを加えて培養し、これを HSP (Homeostatic proliferation) 培養とした。

3. 細胞の増殖・活性化のフローサイトメーター解析

レンチウイルスあるいは HIV 感染細胞を感染後 5 日あるいは 12 日以降に一部回収し、Aqua live/dead dye (L34957, Invitrogen)と反応させた後、細胞表面を PE-Cy7 標識 CD45RA, PerCP 標識 CD4, PE 標識 HLA-DR, Alexa647 標識 CD11a, Alexa700 標識 CD27(すべて Bio Legend)で染色して FACSanto で解析した。必要に応じ、同様に染色した感染細胞の T 細胞亜集団を FACSaria で分画した。

4. 定量 PCR 解析

分画したレンチウイルス感染細胞より RNA を抽出し、cDNA を合成して GFP や tat, nef の mRNA 発現を Real Time PCR で定量した。また、細胞の HIV-1 制御因子として知られる SAMHD1 および APOBEC3G の発現を比較定量した。

このため、Taqman 法では以下のプライマー・プローブセットを用いた。

GFP: forward, 5'-gaccactaccagcagaacac-3', reverse, 5'-gaactccagcaggaccatg-3', probe, [6-FAM]-agc-accagtcgccctgagca-[BHQ-1], HIV-1 Nef: forward, 5'-tgagacgagctgagccagcag-3', reverse, 5'-ttgtgctctag-

ccaggcac-3', probe, [6-FAM]-tcgagatactgctccaccctatct-[BHQ-1].

また、細胞の endogenous control gene expression として EF-1 α 遺伝子発現を Lux primer 法で定量した (標識 forward primer として 5'-gaa-cagttgggtcgctttgctgttc-3', 未標識 reverse primer として 5'-gacacccaccgcaactgtct-3'). その他の遺伝子に関しては Syber green 法で検出した。HIV-1 Tat: forward, 5'-tagagccctggaagcatccagg-3', reverse, 5'-tcgctgtctccgcttcttctctgc-3'. SAMHD1 と APOBEC3G のプライマーは徳永研三室長(感染研・感染病理)より供与を受けた。

ゲノムに組込まれたプロウイルス DNA の定量は、山本らの方法(Virus Genes 32:105, 2006)に準じ、Alu と U3 領域のプライマーを用いて解析した。

5. ヒト化マウスの確立と HIV 感染

NOJ 免疫不全マウス(NOD/SCID/Jak3^{null})にヒト臍帯血造血幹細胞を移入したマウス(ヒト化マウス)を作製した。ヒト T 細胞が十分分化発達してきたマウスに X4 型(緑)あるいは R5 型(赤) HIV-1 を同時感染させ、特異的なプライマーによる定量的 RT-PCR 法で両ウイルスの血中量を測定すると同時に、感染細胞の特徴と感染頻度についてフローサイトメーターで解析した。

(倫理面への配慮等)ヒト臍帯血や末梢血は、それぞれ東京臍帯血バンクとボランティアから、関係する倫理委員会の承認のもとに譲渡された。動物実験は国立感染症研究所の実験動物委員会の承認を得、動物愛護の精神に則って実験を行った。

C. 研究結果

PBMC 中の静止期 CD4 陽性 T 細胞に GFP を LTR 制御下に発現する組換えレンチウイルス(Lenti GFP-Nef-LTR)を MOI 1.0 で感染させた後、HSP 培養すると、2 週間後に細胞はゆっくり増殖し、一部の細胞は活性化(CD11a 発現増加)されても増殖することなく維持された(図 1A 上段)。一方 DC と SEB 抗原で強力に CD4 陽性 T 細胞を刺激する T 細胞受容体刺激培養では、1 週間後にはほとんど全ての細胞が活性化されて増殖した(図 1A 下段)。このような異なる刺激細胞の GFP の発現を比較すると、後者では 60~70%の細胞が GFP を発現しているのに対し、前者の HSP 培養では GFP 陽性細胞は 1%程度であり、GFP 発現細胞は増殖していない細胞分画にも存在していた(図 1B 上段左)。このことは HIV-1 の感染でも同様で、

増殖を伴わない GFP 発現細胞は一定頻度存在していることが明らかとなった。従って、レンチウイルスに初期感染した細胞は 60~70%以上であるが、その後の細胞の活性化の過程で、GFP 発現頻度は大きく異なる。

そこで、HSP 培養後 2 週間以上たった細胞で GFP を発現してない CD4 陽性 T 細胞にプロウイルスがどの程度 integration しているのかを確認するため、GFP 陰性細胞を確認するため、GFP 陰性細胞を増殖の有無で分画し(図 2) integration したプロウイルス DNA の定量を行った。その結果、活性化して増殖していない fraction 4 では 9590 copies/10⁵ cells、増殖している fraction 3 では 294 copies/10⁵ cells であることが明らかとなった。従って、静止期を維持している CD4 陽性 T 細胞においてもレンチウイルスゲノムの integration は一部の細胞におきており、GFP の転写レベルでの抑制があると考えられた。

同様に、静止期に HIV-1 に感染させた CD4 陽性 T 細胞を HSP 培養し、感染 11 日後に CD4 陽性細胞亜集団をソートしてそのウイルス発現を解析した(図 3A、医科研立川愛准教授との共同研究)。この、T 細胞受容体刺激を受けることなく HSP 培養で維持された GFP 陰性細胞において、低レベルではあるものの tat が有意に発現していた(図 3B)。更に、同じ細胞において HIV-1 制御因子として知られている SAMHD1 や APOBEC3G の発現を定量したところ、両者とも感染によって低下する傾向にあった(図 3C)。なお、これらの細胞では、APOBEC3G の発現量は CEM 細胞株と比較してそれほどかわらないのに対し、SAMHD1 の発現量は、CEM 細胞より 1000 倍程度高いことがわかった(未発表データ)。

以上のことから、HSP 培養では強力な T 細胞受容体刺激をうけることなく体内のリンパ組織で恒常維持されている CD4 陽性 T 細胞を mimic した状態で培養維持することが可能であり、今後、初期培養細胞を用いた HIV-1 感染と潜伏化の成立過程の解析に有用であると考えられる。

一方、我々の開発した異なる蛍光を発現する X4 型と R4 型 HIV-1 を同時に同量感染させたヒト化 NOJ マウスにおける感染細胞の分布や血中ウイルス量の変化をモニターしたところ、両ウイルスともにヒト化マウス体内で増殖はするが、感染後 5-6 週たった時点で X4 型ウイルスは検出され

なくなったマウス個体が多かった。この時、CCR5を発現する CD4 陽性への両ウイルスの感染頻度を比較したところ、X4 型 HIV-1 の感染細胞は単独感染の時と比較して明らかに頻度が低下していた。この様なマウスにおいて、X4 型 HIV-1 に感染した CCR5 陽性 T 細胞が特に死滅しやすい傾向はなく、なぜ CCR5 陽性 T 細胞で X4 型 HIV-1 の感染頻度が低くなるのか、血中から消失した X4 型 HIV-1 に潜伏感染した細胞が体内のどこかに存在するのか、という点は今後検討していく必要がある。

D. 考察

培養細胞を用いた in vitro の系で HIV-1 の潜伏過程を解析する系は最近数多く報告されている。その内、細胞株を使う系は潜伏感染の維持機構の解析に有用であるものの、潜伏成立の過程は T 細胞によって様々であることが指摘されている。一方、初期培養 T 細胞において、T 細胞受容体を介した強力な刺激は T 細胞の急激な増殖と活性化にともなう細胞死を誘導しやすいことから、HIV-1 感染細胞の詳細な解析は困難である。その点、HSP 培養は生体内の恒常性を維持する機構を模倣することにより、静止期にある細胞を培養維持できる点で優れた解析系であると考えられる。本研究において、HIV-1 の初期感染は静止期を維持する細胞においても進行し、ゲノムの integration がおこり、低レベルの転写もおきている細胞集団が長期に持続しうるということが明らかとなった。このようなプロウイルスを持つ細胞の性状やウイルスの転写制御の特徴について、今後分子レベルで解析していく必要がある。最近同定された Stem cell memory T 細胞は naïve T 細胞に近い表面抗原を発現している低頻度の T 細胞亜集団であり、HIV 感染者における潜伏感染に重要な役割を果たすことが報告されている(Buzon et al., Nat. Med. 20:139, 2014)。この様な記憶 T 細胞を含む HSP 培養系は今後の潜伏感染成立過程の詳細な解析に有用であると思われる。

E. 結論

末梢の CD4 陽性 T 細胞を用いて静止期 T 細胞を長期培養維持可能な HSP (HomeoStatic Proliferation) 培養系を確立した。この培養系において、静止期 T 細胞の一部には HIV-1 感染後にプ

ロウイルスが integration し、低レベルのウイルス発現が誘導されていた。HSP 培養系は今後潜伏感染成立過程を解析するための有用なモデルとなりうると思われる。

G. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) Yamashita, Y., Hoshino, Y., Oka, M., Matsumoto, S., Ariga, H., Nagai, H., Makino, M., Ariyoshi, K., Tsunetsugu-Yokota, Y.: Multicolor flow cytometric analyses of CD4⁺ T cell responses to Mycobacterium tuberculosis-related latent antigens. Jp.J.Infect.Dis., 3:207-215, 2013.
 - 2) Tsunetsugu-Yokota, Y and Muhsen, M. Development of human dendritic cells and their role in HIV infection: antiviral immunity versus HIV transmission. Front. Microbiol. 4:1-10, 2013.
 - 3) Ikeno, S., Suzuki, M., Muhsen, M., Ishige, M., Kobayashi-Ishihara, M., Ohno, S., Takeda, M., Nakayama, T., Morikawa, Y., Terahara, K., Okada, S., Takeyama, H., Tsunetsugu-Yokota, Y.: Sensitive detection of measles virus infection in the blood and tissues of humanized mouse by one-step quantitative RT-PCR. Front. Microbiol.4:1-8, 2013.
 - 4) Nomaguchi, M., Miyake, A., Doi, N., Fujiwara, S., Miyazaki, Y., Tsunetsugu-Yokota, Y., Yokoyama, M., Sato, H., Masuda, T., Adachi, A. Natural single-nucleotide polymorphisms in the 3' region of HIV-1 pol gene modulate viral replication ability. J. Virol. in press, 2014.
2. 学会発表
 - 1) Takahashi, H., Ohnishi, K., Nishimura, K., Takayama, I., Nakauchi, M., Nagata, S., Tsunetsugu-Yokota, Y., Tashiro, M., Kageyama, T. Development of monoclonal antibodies specific for H5 HA and their application to rapid detection of influenza A/H5N1 virus. Options for the Control of Influenza VIII, Cape Town, 5-10 September 2013.
 - 2) 西村研吾、曾家義博、服部静夫、影山努、大西和夫、高山郁代、小林美栄、高橋仁、横田恭子「化学発光免疫測定法を用いた高感度 H5HA 検出系の開発とベトナムにおける H5N1 感染試料を用いた検出感度の検討」第27回インフルエンザ研究者交流会シンポジウム、札幌、2013年6月29日。
 - 3) 池野翔太、鈴木基臣、寺原和孝、石毛真行、駒瀬勝啓、竹田誠、森川裕子、中山哲夫、柳雄介、竹山春子、横田恭子「ヒト化マウスの麻疹ウイルスベクター評価系への応用」第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013年11月11日。

- 4) 小林(石原)美栄、高橋仁、西村研吾、高山郁代、大西和夫、板村繁之、影山努、横田(恒次)恭子「H5N1インフルエンザウイルス高感度検出系開発に向けたH5HA特異的抗体のエピトープ解析」第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013年11月11日.
- 5) 高橋仁、田中仁喜、西村研吾、高山郁代、中内美名、永田志保、小林美栄、藤博幸、大西和夫、横田(恒次)恭子、田代真人、影山努「H5 HA特異的なモノクローナル抗体の作製とH5N1インフルエンザ迅速診断法構築の検討」第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013年11月11日.

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

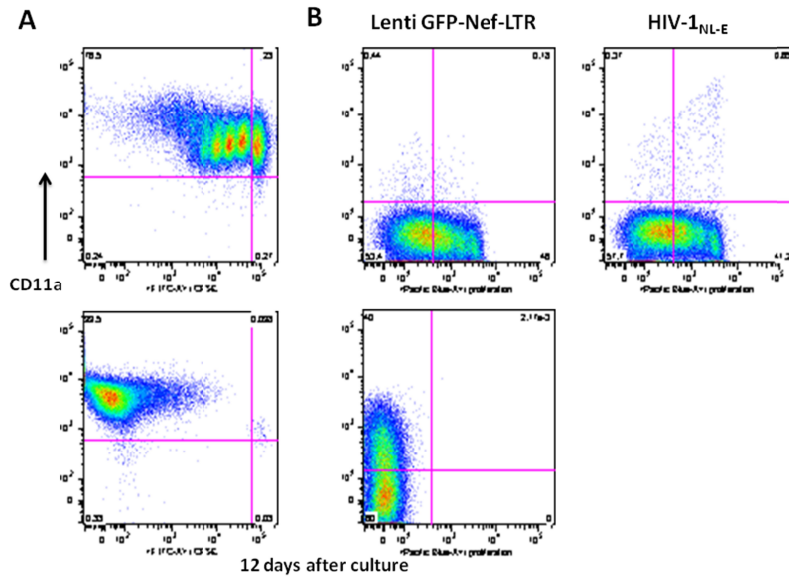


図1 異なる刺激で培養した CD4 陽性 T 細胞におけるレンチウイルスの発現
 末梢血 CD4 陽性細胞に色素を取り込ませた後、LTR 制御下に GFP を発現する組換えレンチウイルス(Lenti GFP-Nef-LTR)あるいは HIV-1_{NL-E} を感染させた。この細胞を IL-7 と IL-15 添加培地(上段、HSP 培養)あるいは自己 DC と SEB で刺激して培養(T 細胞受容体刺激培養刺激培養、下段)し、2 週間後の細胞をフローサイトメーターで解析した。

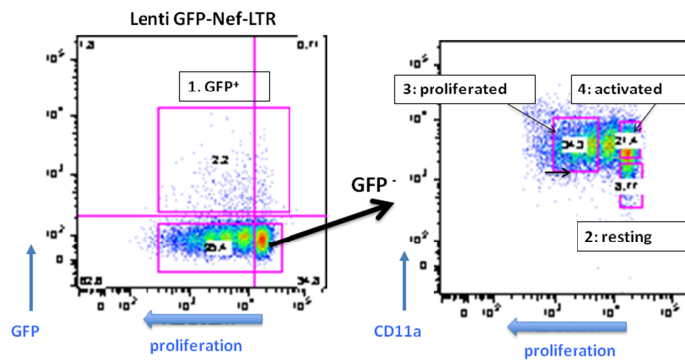


図2 GFP 発現組換えレンチウイルス感染後の CD4 陽性 T 細胞亜集団の分画
 図1と同様に組換えレンチウイルス感染後 HSP 培養した細胞を GFP 陽性(Fraction 1)と陰性細胞に分け、GFP 陰性細胞を増殖細胞(Fraction 3)、非増殖活性化細胞(Fraction 4)および非増殖非活性化細胞(Fraction 2)にゲートをかけて FACSaria でソートした。

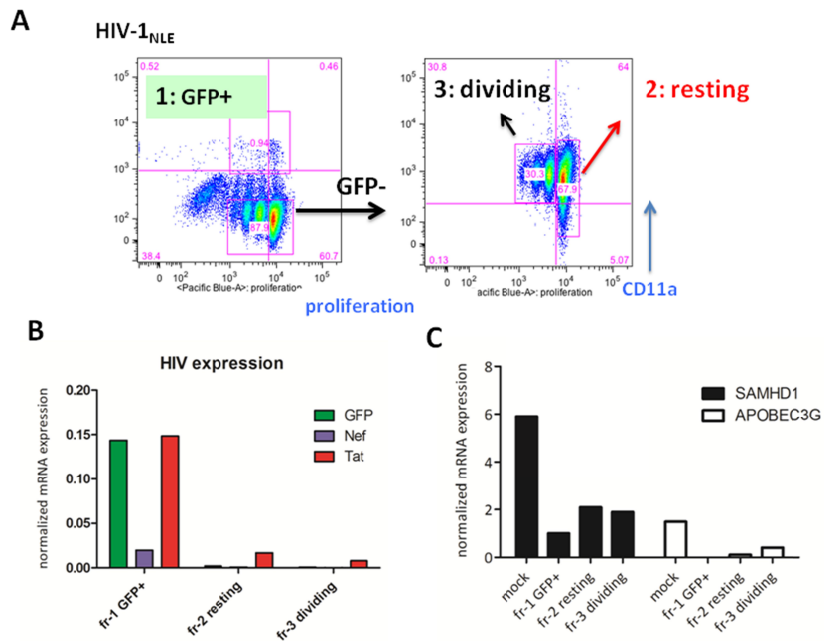


図3 GFP 発現 HIV-1 感染後の CD4 陽性 T 細胞亜集団における HIV および細胞制御因子の発現量の比較

図2同様に、HIV-1_{NL-E}に感染させてHSP培養した細胞をソートし、それぞれの分画細胞よりRNAを抽出して定量PCR法により(B)GFP、nef、tatの発現、(C)SAMHD1、APOBEC3Gの発現レベルを解析した。