

## HIV 感染者における慢性的な免疫活性化と T 細胞疲弊の要因

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 准教授  
研究協力者 細谷 香 東京大学医科学研究所

### 研究要旨：

HIV 感染慢性期において病態進行の早い高 HIV 量の感染者では CD4<sup>+</sup>T 細胞における IL2 遺伝子が高度にメチル化されており、非特異刺激に対する IL2 低発現と関連していることを見いだした。CD4<sup>+</sup>T 細胞における IL2 遺伝子の DNA メチル化状態はサブセット間で大きく異なっており、最終分化段階にあり細胞老化のマーカーである CD57 を発現する CD4<sup>+</sup>T 細胞は他のメモリー CD4<sup>+</sup>T 細胞に比して高度にメチル化されていること、高 HIV 量の感染者では CD57 陽性 CD4<sup>+</sup>T 細胞が高頻度に存在することから、HIV 感染では CD4<sup>+</sup>T 細胞の老化に伴うエピジェネティックな制御による IL2 遺伝子発現抑制が T 細胞機能不全の一因であることが示唆された。

### A. 研究目的

HIV 感染症において、エイズ発症のメカニズムは未だ明らかとなっていない。HIV に感染してからエイズ発症までの期間は感染者によって大きく異なり、未治療の感染者において感染後 1 年でエイズ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 年以上エイズ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エイズ発症のメカニズムを明らかにするために重要な研究テーマである。

近年の研究により、HIV 慢性感染期では T 細胞が持続的な活性化により疲弊することで機能が低下していることが明らかとなってきた。T 細胞の疲弊は HIV 特異的 T 細胞に限らず T 細胞全体に起きているため、抗原特異的な刺激による活性化のみならず免疫システム全体の持続的活性化に起因するものと考えられる。しかしながら慢性感染症の中でも HIV 感染症に特有に見られる T 細胞疲弊の背景にある分子メカニズムは明らかになっていない。

血中 HIV 量はエイズ発症までの期間と関連の見られる臨床指標の一つであり、HIV 感染症の免疫病態を考える上で最も重要な指標である。エイズ発症のメカニズムを明らかにするためには、血

中 HIV 量の異なる感染者における T 細胞について、詳細な解析を行うことが有効であると考えられる。昨年度は血中 HIV 量の高い感染者（高 HIV 群）と低い感染者（低 HIV 群）における免疫細胞の機能的な違いの評価を行った。その結果、高 HIV 群では低 HIV 群に比べ刺激後短時間での PBMC による IL2 遺伝子発現が低下しており、CD4<sup>+</sup>T 細胞の IL2 遺伝子プロモーター/エンハンサー領域の転写開始部位直近の CpG 部位 (CpG1) が高度にメチル化されていることを明らかにした。これら IL-2 発現量と CpG1 のメチル化状態は負の相関が見られたことから、IL-2 の遺伝子発現制御には CpG1 メチル化が重要であること、高 HIV 群では DNA メチル化により IL2 発現が抑制されていることを明らかにした。

PBMC 中の CD4<sup>+</sup>T 細胞は多様なサブセットからなる。IL2 遺伝子は Naïve T 細胞では高度にメチル化されていることが知られており、試験管内での TCR 刺激により脱メチル化されることが知られているが、末梢血中の CD4<sup>+</sup>T 細胞における状態は解析されていない。本年度は、末梢血中 CD4<sup>+</sup>T 細胞の IL2 遺伝子プロモーター領域の CpG 部位のメチル化について詳細に解析を行い、高 HIV 群における IL-2 遺伝子の高度メチル化に関連する要因を明らかにすることを目的とした。

## B. 研究方法

### 研究対象

東京大学医科学研究所附属病院を受診する HIV 感染者を対象とした。未治療の慢性感染者で血中 HIV 量が高い感染者 (>25,000 copies/ml) 低い感染者 (<1,400 copies/ml) の末梢血単核球 (PBMC) を用いた。一部の解析には健常人の PBMC を解析に用いた。

### 定量 RT-PCR による mRNA 発現量の解析

PBMC を PHA にて刺激し、2.5 時間培養後に PBMC から RNA を抽出し逆転写反応を行い、IL-2 をコードする遺伝子の mRNA 量を real-time PCR により定量した。

### CD4<sup>+</sup>T 細胞中のサブセットの分取

CD4<sup>+</sup>T 細胞中の各分化段階での DNA のメチル化を解析するため、健常人の PBMC を用いて、抗 CD3, CD4, CD8 抗体と同時に分化段階のマーカーである CD45RA, CCR7, CD27, CD28、あるいは CD57 に対する抗体で多重染色を行い分画し、セルソーターを用いて各細胞集団を分取した。

### ゲノム DNA のメチル化解析

分画した細胞から DNA を抽出し、バイサルファイト処理した後、解析対象とした IL-2 の遺伝子のプロモーター/エンハンサー領域を PCR にて増幅後、シーケンス解析を行った。

### フローサイトメトリーによる CD4<sup>+</sup>T 細胞の性状、機能解析

PBMC を用いて、抗 CD3, CD4, CD8, CD45RA, CCR7, CD57 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。また PMA/ionomycin にて非特異刺激を加えた後、IL-2 産生を細胞内サイトカイン染色にて解析した。

(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。研究対象者への負担は、臨床上必要な採血に加えての少量の血液採取のみであり、倫理面への問題は無いと判断される。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

各 CD4<sup>+</sup>T サブセットにおける IL2 遺伝子のメチル化状態を明らかにするため、CD45RA, CCR7, CD27, CD28 の発現パターンにより分画し、CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> (Naïv)、CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> (central memory (CM))、CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> (early effector memory (E-EM))、CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>CD28<sup>+</sup> (intermediate effector memory (I-EM))、CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup> (late-effector memory (L-EM)) の各分画について、IL2 遺伝子のメチル化解析を行った。Naïve 細胞における CpG1 は高頻度にメチル化されているのに対して、CM, E-EM, I-EM 細胞における CpG1 は殆ど脱メチル化されていた。一方で、最終分化細胞である L-EM 細胞では再メチル化されており、CM, E-EM, I-EM 細胞に比べて有意にメチル化 DNA の頻度が高かった。

また、細胞老化のマーカーである CD57 の発現は IL-2 発現低下との関連が報告されていることから、CD57 の発現と IL-2 遺伝子メチル化の関連性についても解析を行った。Naïve, CM, E-EM では CD57 の発現が認められなかったのに対し、分化が進むほど CD57 の発現が上昇し、L-EM 細胞で最大の発現が見られた。CD4<sup>+</sup>T 細胞中のメモリー (CD45RA<sup>-</sup>) 分画における CD57<sup>-</sup>細胞、CD57<sup>+</sup>細胞での IL2 遺伝子のメチル化解析を行ったところ、CD57<sup>-</sup>細胞に比べて CD57<sup>+</sup>細胞で有意に高いメチル化状態を示した。CD57<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞は PMA/イオノマイシンを用いた強い T 細胞刺激を行っても IL-2 の産生は認められなかったことから、CD4<sup>+</sup>T 細胞において、最終分化した L-EM 分画の CD57<sup>+</sup>細胞では IL2 遺伝子が再メチル化されることで IL-2 の発現が抑制されている可能性が示唆された。

CD4<sup>+</sup>T 細胞における CD57 の発現を HIV 感染者群間で比較したところ、CD57 の発現は低 HIV 群に比べて高 HIV 群で有意に高く、IL2 遺伝子の CpG1 メチル化との間には正の相関が見られた。さらに、非特異刺激後の IL-2 産生量とは負の相関を示した。これらの結果から、高 HIV 群では IL2 遺伝子が高度にメチル化された CD57<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞が蓄積することで IL-2 産生が抑制されていることが示唆された。

## D. 考察

naïve CD4<sup>+</sup>T 細胞では IL2 遺伝子プロモータ

一領域はほぼ完全にメチル化されており、メモリーへ分化すると脱メチル化されるが、最終分化段階であり CD28-の L-EM 細胞で再メチル化されていた。T 細胞の活性化には CD28 からの補助刺激が必須であることが知られており、本研究結果は CD28 からの補助刺激が IL2 遺伝子メチル化の制御に関連している可能性を示唆している。さらに、L-EM で高頻度に発現が見られる CD57 を発現する細胞でも同様に高度メチル化が観察された。CD57<sup>+</sup>メモリーT 細胞では IL-2 産生が著しく低下していたことから、HIV 慢性感染では、エピジェネティックな制御により IL-2 産生能が低下した老化 CD4<sup>+</sup>T 細胞が蓄積していることが明らかとなった。IL-2 は T 細胞の増殖因子であるだけでなく、CD4<sup>+</sup>T 細胞におけるサイトカイン産生、また CD8<sup>+</sup>T 細胞の機能にも影響を及ぼすため、本研究で見られた CD4<sup>+</sup>T 細胞における IL-2 遺伝子の高度メチル化が、高 HIV 群における T 細胞の様々な機能不全の一因であることが示唆された。

## E. 結論

病態進行の早い高 HIV 量の感染者で CD4<sup>+</sup>T 細胞において IL2 遺伝子が高度にメチル化されていた。IL2 遺伝子は細胞老化に伴い再メチル化されており、HIV 感染慢性期では老化した CD4<sup>+</sup>T 細胞の蓄積により IL-2 発現が低下していると考えられる。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Shimizu A, Kawana-Tachikawa A, Yamagata A, Han C, Zhu D, Sato Y, Nakamura H, Koibuchi T, Carlson J, Martin E, Brumme CJ, Shi Y, Gao GF, Brumme ZL, Fukai S, Iwamoto A. Structure of TCR and antigen complexes at an immunodominant CTL epitope in HIV-1 infection. *Sci Rep.* 3:3097, 2013
- 2) Teeranaipong P, Hosoya N, Kawana-Tachikawa A, Fujii T, Koibuchi T, Nakamura H, Koga M, Kondo N, Gao GF, Hoshino H, Matsuda Z, Iwamoto A. Development of a rapid cell-fusion-based phenotypic HIV-1 tropism assay. *J Int AIDS Soc.* 16:18723, 2013.
- 3) Nishimura T, Kaneko S, Kawana-Tachikawa A, Tajima Y, Gotoh H, Zhu D, Nakayama K,

Iriguchi S, Uemura Y, Shimizu T, Takayama N, Yamada D, Nishimura K, Ohtaka M, Watanabe N, Takahashi S, Iwamoto A, Koseki H, Nakanishi M, Eto K, Nakauchi H. Generation of rejuvenated antigen-specific T cells by pluripotency reprogramming and redifferentiation. *Cell Stem Cell.* 12:114-26, 2013.

### 2. 学会発表

- 1) Kaori Nakayama-Hosoya, Takaomi Ishida, Noriaki Hosoya, Hitomi Nakamura, Michiko Koga, Tomohiko Koibuchi, Aikichi Iwamoto, Ai Kawana-Tachikawa. Low IL-2 expression by epigenetic modification is associated with immunosenescence in HIV non-controllers. Keystone symposia, HIV Pathogenesis – Virus vs Host. Banff, Alberta, Canada, Mar 2014.
- 2) Meribe SC, Hasan Z, Gatanaga H, Miura T, Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A, Oka S, Ueno T. Linkage between disease status and a naturally-arising mutation in functional region of HIV-1 Nef. 21th conference on retroviruses and opportunistic infections. Boston, USA. Mar 2014.
- 3) Kawana-Tachikawa A. The 9<sup>th</sup> China-Japan Laboratory Workshop: Pathogenesis, Gene regulation, and signal transduction. “Interaction between virus and host immune response during chronic HIV-1 infection.”, Beijing, China, Nov 2013.
- 4) Kaori Nakayama-Hosoya, Takaomi Ishida, Noriaki Hosoya, Hitomi Nakamura, Michiko Koga, Tomohiko Koibuchi, Aikichi Iwamoto, Ai Kawana-Tachikawa. The essential role of epigenetic regulation for CD4<sup>+</sup> T cell dysfunction during chronic HIV-1 infection. AIDS Vaccine 2013 Conference. Barcelona, Spain, Oct 2013.
- 5) Meribe SC, Kawana-Tachikawa A, Takamasa Ueno T. Naturally arising amino-acid polymorphisms within functional regions of HIV-1 Nef influence viral persistence in vivo. 第42回日本免疫学会学術集会, 千葉, 2013年12月.
- 6) 石坂彩, 立川(川名)愛, 中村仁美, 古賀道子, 細谷紀彰, 鯉淵智彦, 野本明男, 岩本愛吉, 水谷荘利. HIV-1陽性者末梢血からのHIV-1短鎖RNAの検出および定量法の確立. 第27回日本エイズ学会学術集会, 熊本, 2013年11月.

- 7) 立川(川名)愛、韓忠勇、清水晃尚、細谷紀彰、中村仁美、古賀道子、鯉淵智彦、いわ本愛吉．重複するCTLエピトープ部位に生じた1アミノ酸変異によるエピトープの消滅と出現．第61回日本ウイルス学会学術集会，神戸，2013年11月．

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1．特許取得

特になし

### 2．実用新案登録

特になし