

慢性的免疫活性化制御因子の機能解析

研究分担者 小柳 義夫 京都大学ウイルス研究所 教授
研究協力者 佐藤 佳 京都大学ウイルス研究所 助教
研究協力者 三沢 尚子 京都大学ウイルス研究所 技術補佐員

研究要旨：HIV 感染者にみられる免疫細胞の活性化は、HIV 感染による病態悪化に関わる主要因となる。しかし、その成立メカニズムは未だ不明な点が多い。本研究は、HIV 感染者における制御性 T 細胞がどのように病態悪化に関与するかを明らかにするために、ヒト化マウスを用いて解析した。制御性 T 細胞は、生体内できわめて高い細胞増殖活性を有し、HIV 補受容体である CCR5 の高発現状態にあった。そして、HIV-1 ならびに制御性 T 細胞を特異的に破壊する抗体薬の投与によって誘導された制御性 T 細胞の枯渇状態では、メモリー T 細胞の異常活性化が生じ、生体内の HIV-1 の複製全体を亢進することがわかった。この制御性 T 細胞への感染には、Vpr というウイルス性因子が関与し、感染細胞を G2M 期へ停止させ、それに続くアポトーシスを生じさせると明らかにした昨年の結果とともに、生体内のウイルス感染においては制御性 T 細胞が重要な役割を担っていることがわかった。

A. 研究目的

HIV の慢性的免疫活性化を制御する宿主細胞因子群についてのその機能を明らかにする。HIV の感染により直接的に影響をうける CD4 陽性細胞が関与する免疫反応は、胸腺組織で産出された CD4 ナイーブ細胞(Tn)、末梢組織で外来抗原に速やかに反応する CD4 メモリー細胞(Tm)そして、それらの反応に抑制的に働く T 細胞である CD4 制御性 T 細胞(Treg)から構成される。いずれの CD4 陽性 T 細胞は HIV 感染により障害をうけるが、その障害の程度ならびに個体内における分布と動態は、適切な機能解析動物モデルが開発されていないために、不明であった。本研究は、HIV 感染時の免疫活性化制御因子について、HIV-1 感染ヒト化マウスという動物モデルを始点にして、ウイルス学的解析まで進展させた。

B. 研究方法

ヒト血液幹細胞移植 NOG マウス（ヒト化マウス）への CCR5 指向性 HIV-1 株（JR-CSF 株）の野生型ならびに Vpr 欠損ウイルスをマウスの腹腔から接種後、感染後経時的（7 日目、14 日目、21 日目）に眼窩静脈から採血を行い、CD3⁺CD4⁺の Tn(CD45R0⁻), Tm(CD45R0⁺), Treg(FOXP3⁺)の

細胞数ならびに、上記採取日に加え 2 日目、4 日目に採血を行い血漿ウイルス RNA 量 (Viral load, VL) を測定した。Treg の枯渇実験として、リシン付加抗 CD25 単クローナル抗体薬である denileukin diftitox (DD) の腹腔内投与をおこなった。さらに、flow cytometry 法により細胞分子の発現量を測定した。ヒト化マウスの作製はこれまで報告者らが独自に開発した方法に準じた (Virology 394:64-72, 2009, J. Virol. 84:9546-9556, 2010, Vaccine, 28S2:B68-B74, 2010, Blood 117:5663-5673, 2011)。
(倫理面への配慮)

ヒト由来の試料として提供者の同意のもとに採取を行い、その利益ならびに人権保護の取り扱いに十分配慮した。京都大学の医の倫理委員会承認済みである。実験動物に対する動物愛護上の配慮を考慮した実験計画は京都大学動物委員会承認済みである。組換え DNA 実験についても、P3 レベルの物理的封じ込めの必要な大臣確認実験も含め承認済みである。

C. 研究結果

ヒト化マウスへの DD 投与の 3 日後の末梢血 (PB) における白血球細胞数 (WBC)、総 CD4⁺ T (total CD4) 細胞数、Tn 数、Tm 数には、DD 非投与群と

比べて、細胞数の大きな差異は見出せなかった。一方、Treg は、DD 投与によってほとんど消失した(図 1A と B の Post)。これらのマウス内のヒト CD8 陽性メモリー細胞の活性化状態を MKi67 抗原陽性率で検討したところ、あきらかに DD 投与によって MKi67 抗原陽性細胞が大幅に増加した(図 1C)。CD4 陽性細胞では、Tn ではその増加がみられなかったがメモリー細胞である Tm では MKi67+細胞の増加がみられた(図 1D)。そして、それら Tn ならびに Tm 細胞表面の CCR5 の陽性率は明らかに増加していた(図 1E)。次に、Treg 枯渇環境における、HIV-1 の感染性を検討した。Treg への感染性が優る野生型の HIV-1 と Treg への感染性が劣る Vpr 欠損 HIV-1 をそれぞれ接種後、継続的に採血し、総 CD4 細胞数、Tn 数、Tm 数、そしてウイルス血症レベルを検討した。DD 投与によっていずれのウイルスでも CD4 数の急激な減少、特に Tm 細胞の減少がみられた(図 1F)。そして、ウイルス複製レベルは、野生型の HIV-1 では急速な高レベルのウイルス血症に達すること、Vpr 欠損 HIV-1 もウイルス血症の上昇が遅れながら高レベルウイルス血症に到ることがわかった(図 1G, H)。Treg 枯渇環境においては、ウイルス血漿レベルは 10 倍以上高いものになった(図 1G, DD+ではいずれも 10^7 copy/ml を上回る)。

D. 考察

Treg が HIV-1 感染者でどのような役割を有するのか、これまで多くの議論があった。これまでの HIV 感染者の末梢血の解析研究では、Treg が減っているという報告と逆に増加しているために免疫不全が起きているという、相反する報告が続いていた。本研究の結果、感染者内の Treg 数は、HIV 感染により影響をうけて減っていると考えられる。一方、定常状態ではきわめて高い細胞分裂能を有する Treg が免疫反応の一部として増加している可能性も高い。免疫細胞の活性化に直接影響を及ぼす Treg を HIV に限らず、特定の分子標的剤(ここでは DD)の処理によって生じさせた枯渇環境では、メモリー T 細胞の異常活性化が生じ、生体内の HIV-1 の複製全体を亢進する結果、HIV-1 血症レベルが急速に上昇することがわかった。この Treg への感染には、Vpr というウイルス性因子が関与し、感染細胞を G2M 期へ停止させ、それに続くアポトーシスを生じさせると明らかにした

これまでの結果とともに、生体内におけるウイルス感染において、Treg が重要な役割を担っていることがわかった。

E. 結論

HIV-1 感染における Treg が重要な役割を担うメカニズムが解明された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) Sato, K., Misawa, N., Iwami, S., Satou, Y., Matsuoka, M., Ishizaka, Y., Ito, M., Aihara, K., An, D.S., Koyanagi, Y.: HIV-1 Vpr accelerates viral replication during acute infection by exploitation of proliferating CD4⁺ T cells in vivo. *PLOS Pathog.* 9:e1003812, 2013.
 - 2) Ogawa, Y., Kawamura, T., Matsuzawa, T., Aoki, R., Gee, P., Yamashita, A., Moriishi, K., Yamasaki, K., Koyanagi, Y., Blauvelt, A., Shimada, S.: Antimicrobial peptide LL-37 produced by HSV-2-infected keratinocytes enhances HIV infection of Langerhans cells. *Cell Host Microbe* 13, 77-86, 2013.
 - 3) Hollenbaugh, J.A., Gee, P., Baker, J., Daly, M.B., Amie, S., Kasai, N., Kanemura, Y., Ward, B.M., Koyanagi, Y., Kim, B.: Host factor SAMHD1 restricts DNA viruses in non-dividing myeloid cells. *PLOS Pathog.* 9, e1003481, 2013.
 - 4) Ebina, H., Misawa, N., Kanemura, Y., Koyanagi, Y.: Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. *Sci. Rep.* 3, 2510, 2013.
2. 学会発表
 - 1) Sato, K., Iwami, S., Koyanagi, Y.: Quantification system of HIV replication dynamics in vivo. 1st Annual q-bio Meeting, Honolulu, USA, February, 2013.
 - 2) Sato, K., Misawa, N., Satou, Y., Matsuoka, M., Ito, M., Koyanagi, Y.: HIV-1 Vpr accelerates viral replication by exploiting regulatory CD4⁺ T cells in humanized mice. 20th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections,

- Atlanta, USA, March, 2013.
- 3) Sato, K., Shibata, J., Izumi, T., Misawa, N., Kobayashi, T., Kimura, Y., Ito, M., Pathak, K.V., Koyanagi, Y.: Differential Impact of HIV-1 G-to-A Hypermutation Induced by APOBEC3G and APOBEC3F in vivo. Retroviruses Meeting Cold Spring Harbor, New York, USA. May, 2013.
 - 4) Sato, K. Dynamics of HIV-1 Infection in Humanized Mouse Model, 熊本大学エイズ学研究センターWYIS セミナー(招待講演), Kumamoto, 2013年7月.
 - 5) 佐藤佳. Distinct impact of HIV-1 G-to-A hypermutation induced by APOBEC3G and APOBEC3F in humanized mice, 第15回白馬シンポジウム, 名古屋, 2013年7月.
 - 6) 竹内(柴田)潤子, Perche, B., Migraine, J., Mercier-Delarue, S., Ponscarne, D., Simon, F., Clavel, F., Labrosse, B. High level of susceptibility to human TRIM5 α conferred by HIV-2 capsid sequences, 第15回白馬シンポジウム, 名古屋, 2013年7月.
 - 7) Koyanagi, Y. Intrinsic cellular defenses against retroviruses and DNA viruses. The 12th Awaji International Forum on Infection and Immunity (AIFII 12), Awaji, Japan. September, 2013.
 - 8) Sato, K., Takeuchi, J.S., Misawa, N., Izumi, T., Kobayashi, T., Kimura, Y., Iwami, S., Takaori-Kondo, A., Hu W.-S., Aihara, K., Ito, M., An, D.S., Pathak, K.V., Koyanagi, Y.: Restriction and diversification of HIV-1 mediated by APOBEC3-induced G-to-A mutation in humanized mouse model. 4th International Workshop on Humanized mice, Seoul, Korea. September 30-October 2, 2013.
 - 9) Kobayashi, T., Sato, K., Misawa, N., Yoshikawa, R., Shibata, J., Kanemura, Y., Fukuhara, M., Okamoto, M., Miyazawa, T., Yasunaga, J., Matsuoka, M., Aihara, K., An, D. S., Ito, M., and Koyanagi, Y.: Assessment of the pathogenic potential of simian retrovirus type 4 in humanized mice model, 4th International Workshop on Humanized Mice, Seoul, Korea, 2013年10月.
 - 10) 蝦名博貴. ゲノム編集技術による潜伏 HIV プロウイルスの制御と除去, 第3回ゲノム編集研究会, 広島. 2013年10月.
 - 11) Koyanagi, Y.: Strategy of disrupting latent form of HIV-1 proviral DNA, 14th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, October, 2013.
 - 12) Takeuchi, J. S., Sato, K., Iwami, S., Misawa, N., Kobayashi, T., Aihara, K., Koyanagi, Y.: Quantification of HIV cell-free and cell-to-cell transmissions based on experimental-mathematical investigations, 14th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, October, 2013.
 - 13) Koyanagi, Y. Misawa N., Sato K., Ebina H.: HIV strategy for acceleration of viral replication in vivo and eradication approach of HIV proviral DNA, Japan-Russia International Workshop, Kyoto, Japan. October, 2013.
 - 14) 小柳義夫, Gee Peter, 金村優香. 核酸代謝酵素 SAMHD1 による HSV-1 複製の抑制, 第60回日本ウイルス学会学術集会, 神戸. 2013年11月.
 - 15) 佐藤佳, 竹内(柴田)潤子, 三沢尚子, 泉泰輔, 小林朋子, 木村雄一, 岩見真吾, 高折晃史, Hu, W.-S., 合原一幸, 伊藤守, An, D. S., Pathak, V. K., 小柳義夫. 生体内 HIV-1 増殖過程における APOBEC3G, APOBEC3F 依存的 G A 変異のウイルス学的意義の解明, 第61回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 2013年11月.
 - 16) 竹内(柴田)潤子, 佐藤佳, 岩見真吾, 三沢尚子, 小林朋子, 合原一幸, 小柳義夫. HIV-1 感染における Cell-free 感染と Cell-to-cell 感染の定量的解析, 第61回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 2013年11月.
 - 17) 金村優香, Gee Peter, 蝦名博貴, Yoo Ji Seung, 藤田尚志, 小柳義夫 I型 IFN 発現制御における SAMHD1 の新規機能の解析 第61回日本ウイルス学会学術集会, 神戸. 2013年11月.
 - 18) Takeuchi, J. S., Sato, K., Iwami, S., Kobayashi, T., Aihara, K., Koyanagi, Y.: Quantification of HIV cell-free and cell-to-cell transmissions based on experimental-mathematical investigations, The 3rd International Symposium on Innovative Mathematical Modelling, Tokyo, 2013年11月.
 - 19) Kobayashi, T., Koizumi, Y., Misawa, N., Takeuchi, J. S., Aihara, K., Koyanagi, Y., Iwami, S., Sato, K.: Quantification of G-to-A Mutation-dependent and -independent Inhibition of HIV-1 Replication Mediated by APOBEC 3G/3F Based on Experimental-Mathematical Investigation, The 3rd International Symposium on Innovative Mathematical Modelling, Tokyo, 2013年11月.
 - 20) Iwami, S., Takeuchi, J. S., Sato, K., Aihara, K.: Quantification of cell-to-cell infection in cell

culture system, The 3rd International Symposium on Innovative Mathematical Modelling, Tokyo, 2013 年 11 月.

- 21) Nishimura, S.-I., Sato, K., Iwami, S., Aihara, K.: A Theoretical Model of CD4 T cell Migration and Cell-to-Cell Transmission of HIV Virus in Lymph Nodes, The 3rd International Symposium on Innovative Mathematical Modelling, Tokyo, 2013年11月.
- 22) Sato, K., Takeuchi, J. S., Izumi, T., Misawa, N., Iwami, S., Kobayashi, T., Kimura, Y., Pathak, V. K., Aihara, K., Koyanagi, Y.: Differential Impact of HIV-1 G-to-A Hypermutation Induced by APOBEC3G and APOBEC3F in vivo, The 3rd International Symposium on Innovative Mathematical Modelling, Tokyo, 2013 年 11 月.
- 23) 竹内(柴田)潤子, 佐藤佳, 三沢尚子, 泉泰輔, 小林朋子, 木村雄一, 岩見真吾, 高折晃史, Hu, W.-S., 合原一幸, 伊藤守, An, D. S., Pathak, V. K., 小柳義夫. HIV-1 感染ヒト化マウスモデルを用いた APOBEC3G/F の機能解析, 第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会, 熊本, 2013 年 11 月.
- 24) 蝦名博貴, 三沢尚子, 金村優香, 小柳義夫. ゲノム編集技術による潜伏 HIV プロウイルスの制御と除去, 第 27 回日本エイズ学会学術集会, 熊本. 2013 年 11 月.

- 25) 佐藤佳. エイズウイルス研究の最前線: これまでの研究とこれからの研究, 京都薬科大学セミナー(招待講演), 京都, 2013 年 11 月.
- 26) 佐藤佳. テトラスパニンタンパク質のウイルス粒子への取り込みによる HIV 感染性の制御, 第 36 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2013 年 12 月.
- 27) Ebina, H., Misawa, N., Kanemura, Y., Koyanagi, Y.: Development of the CRISPR/Cas9 system editing for latent HIV-1 provirus. 第 36 回日本分子生物学会年会, 神戸. 2013 年 12 月.
- 28) 金村優香, Peter Gee, 蝦名博貴, Yoo Ji Seung, 藤田尚志, 小柳義夫. Novel function of SAMHD1 to involve in regulation of type I interferon induction. 第36回日本分子生物学会年会, 神戸. 2013 年 12 月.

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. Treg 枯渇による HIV-1 感染の促進。DD 投与後の A. PB 中の Treg の検出, B. DD 投与後の WBC 数, total CD4 細胞数, Tn 数, Tm 数, Treg 数, C. CD8⁺メモリー細胞内の MKi67 抗原陽性率, D. CD4 陽性 Tn, Tm, Treg 内の MKi67 抗原陽性率, E. Tn, Tm, Treg 表面の CCR5 の陽性率, F と G. Treg 枯渇 (DD+) と Treg 存在 (記入なし) 下における, HIV-1 の感染性。野生型のウイルス (HIV-1) と Vpr 欠損 (HIV-1 vpr) ウイルスをそれぞれ接種後の総 CD4 細胞数, Tn 数, Tm 数 (F), そしてウイルス血症レベルをしめす (G), H 接種後のウイルス血症ピークに達する上昇カーブ (H)。

