

機能的 T リンパ球反応に関する研究

研究分担者 寺原 和孝 国立感染症研究所 免疫部 主任研究官

研究要旨：

これまでのワクチン接種/SIV 感染アカゲサルモデルでの解析から、ワクチン誘導 SIV 特異的 CD4 陽性 T リンパ球のうち、CD107a 誘導画分は SIV に対して感染抵抗性を示す一方、その他細胞画分（MIP-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , あるいは IL-2 誘導画分）は感染により顕著に減耗することを明らかにした。しかしながら、SIV 暴露に伴う SIV 特異的 CD4 陽性 T リンパ球の機能動態については、SIV 感染による直接的な影響の他、CTL 等による間接的要因が影響している可能性も考えられた。そこで H26 年度は、ウイルス複製抑制に結びつく群（抑制群）とその抑制に至らない群（非抑制群）において共通した反応を見出すことで、SIV 感染による直接的な影響に起因する機能動態の特定を試みた。解析の結果、抑制群・非抑制群に共通する反応として、1) CD107a 誘導画分は他の 4 種類の機能分子（MIP-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2）誘導画分と比較して SIV 感染抵抗性を示すこと、2) 各機能分子（MIP-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2）誘導画分においても CD107a 誘導を共有する亜集団は共有しない亜集団と比較して高い SIV 感染抵抗性を示すこと、が明らかとなった。以上の結果から、CD107a 誘導能を有するウイルス抗原特異的 CD4 陽性 T リンパ球の誘導は、今後のワクチン開発において着目すべき免疫因子の一つとして挙げられよう。

A. 研究目的

細胞傷害活性を有する CD8 陽性 T リンパ球（CTL）は慢性持続感染を成立させる HIV/SIV の体内複製制御において中心的役割を担う。そして、この CTL の誘導・維持には CD4 陽性 T リンパ球によるヘルパー機能が重要であるとされる。一方で、CD4 陽性 T リンパ球はそれ自身が HIV/SIV の感染標的であり、特にウイルス抗原特異的メモリー細胞は他の CD4 陽性 T リンパ球集団よりも優先的に感染を許容することが知られている。つまり、ワクチンによる抗原特異的 CD4 陽性 T リンパ球の誘導がむしろ感染増悪の要因となってしまうリスクも孕んでいる。そのためにも、SIV 感染によるワクチン誘導 SIV 特異的 CD4 陽性 T リンパ球の機能動態を把握することは、効果的なワクチンを設計する上で非常に重要であると考えられる。

これまでの当分担研究におけるワクチン接種/SIV 感染アカゲサルモデルでの解析から、ワクチン誘導 SIV 特異的 CD4 陽性 T リンパ球のうち、CD107a 誘導画分は SIV 感染抵抗性を示す一方、その他細胞画分（MIP-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , あるいは IL-2 誘導画分）は感染により顕著に減耗すること

を明らかにした。しかしながら、これらサル群はウイルス複製抑制に結びつく群（抑制群）とその抑制に至らない群（非抑制群）が混在しており、SIV 感染による直接的な影響の他、CTL 等による間接的要因がその機能動態に影響した可能性も示唆された。そこで H26 年度は抑制群と非抑制群において共通した反応に着目することにより、SIV 感染による直接的な影響に起因する SIV 特異的 CD4 陽性 T リンパ球の機能動態の特定を試みた。

B. 研究方法

Gag 発現センダイウイルス（SeV-Gag）ワクチンを施したビルマ産アカゲサル（17 頭）について、SIVmac239 暴露後 6 ヶ月目の血中ウイルス量が  $<1.6 \times 10^3$  copies/ml のサルを抑制群（n = 10）、 $\geq 1.6 \times 10^3$  copies/ml のサルを非抑制群（n = 7）とし、ワクチンブースト後/ウイルス暴露前、および、ウイルス暴露後 1 週目に採取した末梢血由来単核球を実験に供した。VSV-G シュードタイプ SIV を感染させた同一個体由来の B lymphoblastoid cell line（SIV-BLCL）、あるいは未処理 BLCL と PBMC を in vitro で共培養後、CD4 陽性 T リンパ球における

各機能分子 (CD107a, MIP-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2) の発現をフローサイトメトリーにて解析した。そして、抗原刺激サンプルから未刺激サンプルの頻度数値を差し引いた値をSIV特異的頻度の数値とした。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え生物等を用いる実験については国立感染症研究所の承認あるいは文部科学大臣の確認を得ている。動物実験については国立感染症研究所および医薬基盤研究所の動物実験委員会の承認を得てから開始し、動物実験等の実施に関する基本指針を遵守した。

### C. 研究結果

#### 1) ウイルス暴露前のSIV特異的CD4陽性Tリンパ球画分の比較

ウイルス暴露前における各機能分子 (CD107a, MIP-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2) 誘導画分の頻度について抑制群と非抑制群で比較した結果、いずれの細胞画分においても有意な違いは認められなかった (図1)。

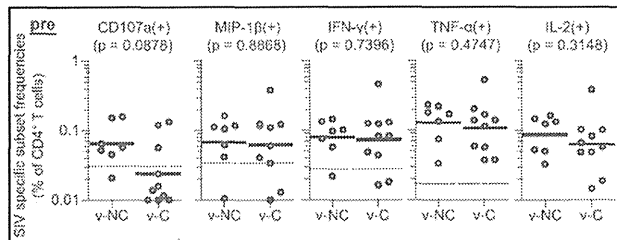


図1. SIV接種前の各機能分子 (CD107a, MIP-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2) 誘導CD4陽性Tリンパ球画分の頻度。v-C: 抑制群、v-NC: 非抑制群。統計解析はMann-Whitney U testにて行った。

#### 2) ウイルス暴露後1週目におけるSIV特異的CD4陽性Tリンパ球画分の頻度

ウイルス暴露後1週目における各機能分子誘導画分の頻度について抑制群と非抑制群で比較した結果、いずれの細胞画分においても抑制群の方が非抑制群よりも高い傾向を示し、TNF- $\alpha$ 誘導画分では有意差が認められた (図2)。

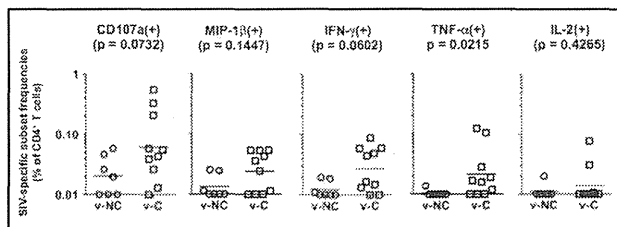


図2. SIV暴露後1週目における各機能分子

(CD107a, MIP-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2) 誘導CD4陽性Tリンパ球画分の頻度。v-C: 抑制群、v-NC: 非抑制群。統計解析はMann-Whitney U testにて行った。

#### 3) ウイルス暴露前後でのSIV特異的CD4陽性Tリンパ球画分の変動

ウイルス暴露によるSIV特異的CD4陽性Tリンパ球の細胞減耗を評価するため、ウイルス暴露前後での各機能分子誘導画分の頻度の変動について解析した (図3)。その結果、抑制群、非抑制群ともにMIP-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2誘導画分で有意な減少が認められた。一方、CD107a誘導画分については抑制群、非抑制群ともに有意な変動を認めず、抑制群においてはむしろ増加傾向を示した。

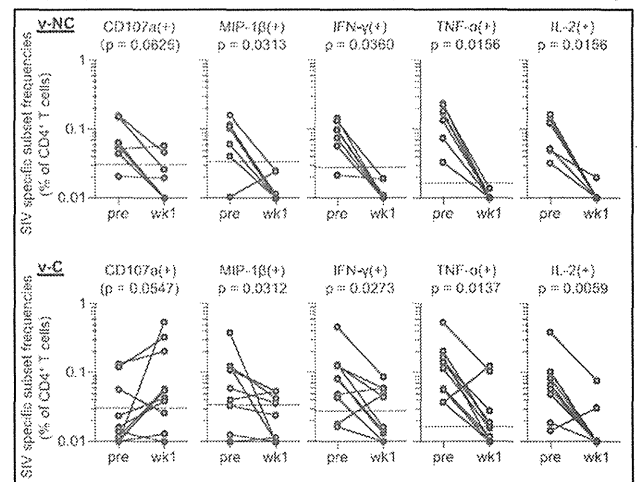


図3. SIVチャレンジ前後での各機能分子 (CD107a, MIP-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2) 誘導CD4陽性Tリンパ球画分の頻度の変動。v-C: 抑制群、v-NC: 非抑制群。統計解析はpaired t-testにて行った。

#### 4) CD107a誘導能の有無によるウイルス感染抵抗性の評価

SIV特異的CD4陽性Tリンパ球集団には、各機能分子 (CD107a, MIP-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2) の誘導を共有する細胞画分が存在する。そこで本解析では、CD107a誘導能とウイルス感染抵抗性との関連性を評価するため、ウイルス暴露に伴う各機能分子 (MIP-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2) 誘導画分中のCD107a誘導亜集団ならびにCD107a非誘導亜集団の頻度の変動を解析した (図4)。なお、研究結果3) において、ウイルス暴露に伴う上記各機能分子誘導画分の頻度の変動は抑制群・非抑制群ともに同様な傾向 (有意な減少) を示したことから、本解析では抑制群と非抑制群の区別は行わなかった。解析の結果、MIP-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ 誘導画分にお

るCD107a誘導亜集団の頻度の変動については有意差を認めなかったが、TNF- $\alpha$ 、IL-2誘導画分では有意に減少した(図4A)。それに対し、CD107a非誘導亜集団はいずれの機能マーカー陽性画分においても有意な減少が認められ、そのレベルはCD107a誘導亜集団よりも顕著であった(図4B)。

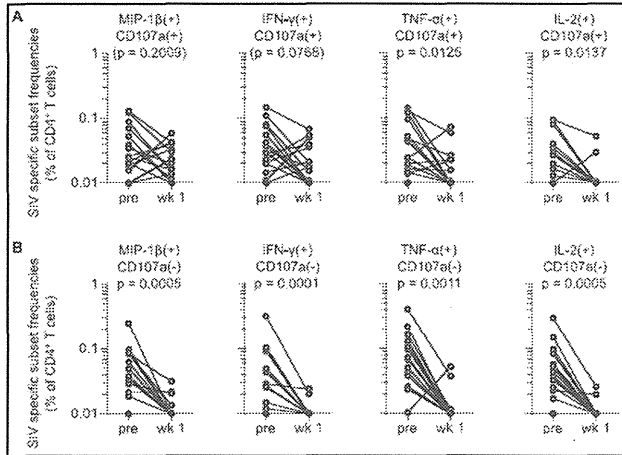


図4. SIV暴露前後での各機能分子(MIP-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2)誘導CD4陽性Tリンパ球画分におけるCD107a誘導亜集団(A)ならびにCD107a非誘導亜集団(B)の頻度の変動。統計解析はWilcoxon signed-rank testにて行った。

#### D. 考察

直接的なウイルス感染抑制に寄与する CTL と異なり、抗ウイルス免疫において間接的に寄与する(いわゆるヘルパー機能を発揮する)CD4陽性T細胞はその機能動態が病態に対して“結果”を示すものか、あるいは“原因”を示すものか、といった判断は非常に困難である。そこで本研究では、ウイルス複製抑制に結びつく群(抑制群)とその抑制に至らない群(非抑制群)において共通した反応を見出すことで、SIV感染による直接的な影響に起因する機能動態の特定を試みた。

SIV暴露前におけるSIV特異的CD4陽性Tリンパ球の機能構成は抑制群と非抑制群で有意な違いは認められず(図1)、このことからSIV暴露後における機能動態への影響としてSIV特異的CD4陽性Tリンパ球の機能構成そのものが原因となる可能性は考えにくい。感染急性期においてもCTLはウイルス複製抑制の中心的役割を担うことから、抑制群と非抑制群間でのSIV特異的CD4陽性Tリンパ球の機能動態の違い(図2)は、ウイルス制御レベルの違いとして生じた“結果”を単に描写している可能性は否めない。しかしながら、抑制群と非抑制群で共通した(または両群を

包括した)反応に着目したところ、SIV感染による直接的な影響について以下のように集約できた。

(1) SIV特異的CD4陽性Tリンパ球のうちCD107a誘導画分の頻度はSIV暴露後も有意な変動を示さず、また、MIP-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2誘導画分においてもCD107aの誘導を共有する亜集団は非共有亜集団よりも減耗のレベルが低いことから、CD107a誘導能を有する細胞画分はウイルス感染に対して高い抵抗性を示すことが推察される。

(2) SIV特異的CD4陽性リンパ球のうち、CD107a非誘導画分はSIV暴露により顕著に減耗した。MIP-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2分子の誘導に特徴付けられる細胞画分はヘルパーTリンパ球であることから、本結果はワクチンによるSIV特異的ヘルパーTリンパ球の誘導が感染増悪のリスクとなる可能性を示唆する。

CD107a誘導能を有するCD4陽性Tリンパ球(CD4 CTL)はMHC-II依存的な細胞傷害活性を有することが知られており、その標的としてウイルス感染樹状細胞・マクロファージといった抗原提示細胞が考えられる。SIV暴露後1週目といった感染伝播の初期過程では、特に樹状細胞-CD4陽性T細胞間のウイルス伝播が全身伝播の効率に深く関わりとされている。つまり、CD4 CTLはウイルス感染樹状細胞を標的とすることで感染急性期のウイルス伝播抑制に寄与している可能性が示唆される。

以上のことから、予防エイズワクチンにおけるウイルス抗原特異的CD4陽性Tリンパ球の誘導の是非について考察した場合、感染増悪に至る可能性があるヘルパーTリンパ球の誘導を押しさえ込みつつ、ウイルス抵抗性の高いCD4 CTLを如何に効率的に誘導出来るかが鍵であると考えられる。

#### E. 結論

SeV-Gagワクチン接種アカゲサルにおける解析から、SIV特異的CD4陽性Tリンパ球のうち、MIP-1 $\beta$ , IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ 誘導細胞集団はSIV感染により顕著に減耗するのに対し、CD107a誘導細胞集団は高いウイルス抵抗性を示した。

#### F. 研究発表

##### 1 論文発表

- (1) [Terahara K.](#), Ishii H., Nomura T., Takahashi N., Takeda A., Shiino T., Tsunetsugu-Yokota Y., [Matano T.](#) Vaccine-induced CD107a<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells are resistant to depletion following AIDS

virus infection. J. Virol. 88: 14232-14240, 2014.

## 2 学会発表

- (1) Ikeno S., Terahara K., Tsunetsugu-Yokota Y. Induction of human cytokines in humanized mice improves myeloid cell development and antigen-specific antibody production. 第43回日本免疫学会総会・学術集会、京都、2014年12月
- (2) 寺原和孝、石毛真行、池野翔太、小林（石原）美栄、岡田誠治、横田（恒次）恭子：R5・X4 HIV-1混在感染ヒト化マウスの感染早期にみられるR5ウイルス優位性とその要因の検討、第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月
- (3) 池野翔太、寺原和孝、駒瀬勝啓、竹田誠、森川裕子、竹山春子、横田（恒次）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（3）、第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月
- (4) 和田倭、小林（石原）美栄、寺原和孝、池野翔太、徳永研三、立川（川名）愛、山岸誠、竹山春子、横田（恒次）恭子：恒常的に培養維持されたCD4陽性T細胞へのHIV-1の感染とその転写制御機構の解明、第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月
- (5) Matano T., Terahara K., Ishii H., Nomura T. Vaccine-induced CD107a<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-cells are resistant to killing following immunodeficiency virus infection. HIV Research for Prevention, Cape Town, South Africa, Oct 28-31, 2014: AIDS Research and Human Retroviruses. October 2014, 30(S1): A247.
- (6) Yamashita Y., Tanaka T., Oe T., Kawakami K., Oka M., Matsumoto S., Terahara K., Tsunetsugu-Yokota Y., Morimoto K., Ariyoshi K. Unique cytokine profiles of CD4<sup>+</sup>T cell to Acr, HBHA and MDP-1 antigens in different clinical stage of *mycobacterium tuberculosis* infection. The ERS International Congress 2014, Munich, Germany, Sep 6-10, 2014.

## G. 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。
- 3 その他  
なし。

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takebe Y, Naito Y, Raghwani J, Fearnhill E, Sano T, Kusagawa S, Mbisa J, Zhang H, <u>Matano T</u> , Brown AL, Pybus O, Dunn D, Kondo M.	Inter-continental dispersal of HIV-1 subtype B associated with transmission among men who have sex with men in Japan.	J Virol	88	9864-9876	2014
Nomura T, Yamamoto H, Takahashi N, Naruse TK, <u>Kimura A</u> , <u>Matano T</u> .	Identification of SIV Nef CD8 <sup>+</sup> T cell epitopes restricted by a MHC class I haplotype associated with lower viral loads in a macaque AIDS model.	Biochem Biophys Res Commun	450	942-947	2014
<u>Terahara K</u> , Ishii H, Nomura T, Takahashi N, Takeda A, Shiino T, Tsunetsugu-Yokota Y, <u>Matano T</u> .	Vaccine-induced CD107a <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T cells are resistant to depletion following AIDS virus infection.	J Virol	88	14232-14240	2014
Watanabe K, Matsubara A, Kawano M, Mizuno S, Okamura T, Tsujimura Y, Inada H, Nosaka T, Matsuo K, <u>Yasutomi Y</u> .	Recombinant Ag85B vaccine by taking advantage of characteristics of human parainfluenza type 2 virus vector showed Mycobacteria-specific immune responses by intranasal immunization.	Vaccine	32	1727-1735	2014
Kobiyama K, Aoshi T, Narita H, Kuroda E, Hayashi M, Tetsutani K, Koyama S, Mochizuki S, Sakurai K, Katakai Y, <u>Yasutomi Y</u> , Saijo S, Iwakura Y, Akira S, Coban C, Ishii KJ.	A non-agonistic Dectin-1 ligand transforms CpG into a multitask nano-particulate TLR9 agonist.	Proc Natl Acad Sci USA	111	3086-3091	2014
Tsujimura Y, Inada H, Yoneda M, Fujita T, Matsuo K, <u>Yasutomi Y</u> .	Effects of Mycobacteria major secretion protein, Ag85B, on allergic inflammation in the lung.	PLoS One	9	e106807	2014

Saito N, Chono H, Shibata H, Ageyama N, <u>Yasutomi Y</u> , Mineo J.	CD4(+) T cells modified by the endoribonuclease MazF are safe and can persist in SHIV-infected rhesus macaques.	Mol Ther Nucleic Acids	3	e168	2014
Machino-Ohtsuka T, Tajiri K, Kimura T, Sakai S, Sato A, Yoshida T, Hiroe M, <u>Yasutomi Y</u> , Aonuma K, Imanaka-Yoshida K.	Tenascin-C aggravates autoimmune myocarditis via dendritic cell activation and Th17 cell differentiation.	J Am Heart Assoc	3	e001052	2014
Okabayashi S, Shimozawa N, <u>Yasutomi Y</u> , Yanagisawa K, Kimura N.	Diabetes mellitus accelerates A $\beta$ pathology in brain accompanied by enhanced GAB $\beta$ generation in nonhuman primates.	PLoS One		in press	
Onishi M, Ozasa K, Kobiyama K, Ohata K, Kitano M, Taniguchi K, Homma T, Kobayashi M, Sato A, Katakai Y, <u>Yasutomi Y</u> , Wijaya E, Igarashi Y, Nakatsu N, Ise W, Inoue T, Yamada H, Vandenbon A, Standley DM, Kurosaki T, Coban C, Aoshi T, Kuroda E, Ishii KJ.	Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin spikes local inflammation that induce Th2 and Tfh responses to the coadministered antigen.	J Immunol		in press	
Tachibana SI, Kawai S, Katakai Y, Takahashi H, Nakade T, <u>Yasutomi Y</u> , Horii T, Tanabe K.	Contrasting infection susceptibility of the Japanese macaques and cynomolgus macaques to closely related malaria parasites, Plasmodium vivax and Plasmodium cynomolgi.	Parasitol Int		in press	
Ohkura T, Momose F, Ichikawa R, Takeuchi K, <u>Morikawa Y</u> .	Influenza A virus hemagglutinin and neuraminidase mutually accelerate their apical targeting through clustering of lipid rafts.	J Virol	88	10039-10055	2014
Matsui M, Shindo K, Izumi T, Io K, Shinohara M, Komano J, Kobayashi M, Kadowaki N, Harris RS, <u>Takaori-Kondo A</u> .	Small molecules that inhibit Vif-induced degradation of APOBEC3G.	Virol J	11	122	2014

Sato K, Takeuchi JS, Misawa N, Izumi T, Kobayashi T, Kimura Y, Iwami S, <u>Takaori-Kondo A</u> , Hu WS, Aihara K, Ito M, An DS, Pathak VK, Koyanagi Y.	APOBEC3D and APOBEC3F potentially promote HIV-1 diversification and evolution in humanized mouse model.	PLoS Pathog	10	e1004453	2014
Otsuki H, Yoneda M, Igarashi T, <u>Miura T</u> .	Generation of a monkey-tropic human immunodeficiency virus type 1 carrying <i>env</i> from a CCR5-tropic subtype C clinical isolate.	Virology	460-461	1-10	2014
Adach A, <u>Miura T</u> .	Animal model studies on viral infections.	Front Microbiol	5	672	2014
<u>Yoshimura K</u> , Harada S, Boonchawalit S, Kawanami Y, Matsushita S.	Impact of maraviroc-resistant and low-CCR5-adapted mutations induced by in vitro passage on sensitivity to anti-envelope neutralizing antibodies.	J Gen Virol	95	1816-1826	2014
Matsushita S, <u>Yoshimura K</u> , Ramirez K-P, Pisupati J, Jenkins J, Murakami T on behalf of the KD-1002 Study Group.	Passive transfer of neutralizing monoclonal antibody KD-247 reduces plasma viral load in patients chronically infected with HIV-1.	AIDS	29	453-462	2015
Ramirez KP, Kuwata T, Maruta Y, Tanaka K, Alam M, <u>Yoshimura K</u> , Matsushita S.	Complementary and synergistic activities of anti-V3, CD4bs and CD4i antibodies derived from a single individual can cover a wide range of HIV-1 strains.	Virology	475	187-203	2015
Kirby KA, Ong YT, Hachiya A, Laughlin TG, Chiang LA, Pan Y, Moran JL, Marchand B, Singh K, Gallazzi F, Quinn TP, <u>Yoshimura K</u> , Murakami T, Matsushita S, Sarafianos SG.	Structural basis of clade-specific HIV-1 neutralization by humanized anti-V3 monoclonal antibody KD-247.	FASEB J	25	70-80	2015



