

## 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 京都大学ウイルス研究所 教授  
研究分担者 三浦 智行 京都大学ウイルス研究所 准教授

### 研究要旨：

SIV/アカゲザル潜伏・再活性化モデルを確立し解析した結果、潜伏感染個体内で CD8 による抑制を解除した場合に、いち早くウイルスが増殖する細胞はリンパ節中の Treg である可能性が示唆された。

### 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ことから、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、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

$1.1 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub> の SIV1A11 ウイルスストックを麻酔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、麻酔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種々の蛍光標識単クローン抗体（抗 CD3, CD4, CD8 および CD20 等）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

ウイルス接種数週間後に感染サルに抗 CD8 抗体（M-T087R1, NIH Nonhuman Primate Reagent Resource より入手）10 mg/kg を麻酔下で皮下投与した。

（倫理面への配慮）

動物実験に当たっては、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」に基づいた「京都大学における動物実験の実施に関する規定」を遵守する。当施設におけるアカゲザルの飼養については、「特定外来生物による生態系等に係わる被害の防止に関する法律」の規定に基づき、環境大臣より許可を受けている。また、「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」の輸入禁止地域等を定める省令に基づき輸入サル飼育施設の指定を受けている。「動物の愛護及び管理に関する法律」も遵守する。

## C. 研究結果

SIV 1A11 接種中国産アカゲザルにおいてウイルス接種後一過性のウイルス血漿が検出されたが、その後検出限界 (200 コピー/ml) 以下に抑制され、潜伏感染となった。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。

潜伏感染サルに抗 CD8 抗体を投与した所、血中ウイルス RNA 量が投与 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、投与前に殆ど検出されなかった 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。再活性化の前後でウイルス抗原陽性 CD4 陽性 T 細胞を比較したところ、再活性化後に FoxP3 陽性細胞が増加する傾向が観察された。しかし、ウイルス抗原陽性の抗原提示細胞を直接検出することはできなかった。

## 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「潜伏感染」となったが、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。すなわち本研究によって SIV / アカゲザル潜伏・再活性化モデルを確立することができた。潜伏感染個体において抗 CD8 抗体を投与することによって CD8 によるウイルス抑制を解除してウイルスの再活性化を誘導した時に、いち早くウイルスが増殖する細胞はリンパ節中の Treg である可能性が示唆された。

## E. 結論

SIV / アカゲザル潜伏・再活性化モデルを確立し解析した結果、潜伏感染個体内で CD8 による抑制を解除した場合に、いち早くウイルスが増殖する細胞はリンパ節中の Treg である可能性が示唆された。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Otsuki, H., Yoneda, M., Igarashi, T., and Miura, T.: Generation of a monkey-tropic human immunodeficiency virus type 1 carrying env from a CCR5-tropic subtype C clinical isolate. *Virology*, 460-461: 1-10, 2014.
- 2) Adach, A. and Miura, T.: Animal model studies on viral infections. *Frontiers in Microbiology*, 5: Article 672, 2014.

### 2. 学会発表

- 1) Saito, A., Matsuoka, K., Ode, H., Otsuki, H., Yoshida, T., Iwatani, Y., Sugiura, W., Matano, T., Miura, T., and Akari, H.: A novel HIV-1mt encoding CCR5-tropic Env established persistent infection in *Cynomolgus* macaques. 2014 Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Boston, March 3-6, 2014.
- 2) 米田舞、大附寛幸、松下修三、日紫喜隆行、五十嵐樹彦、三浦智行: 新規 CCR5 指向性サルヒト免疫不全ウイルスのサルへの順化における env 遺伝子変異と中和抗体抵抗性の解析、日本動物遺伝育種学会第 15 回大会和光、2014 年 10 月 31 日-11 月 1 日
- 3) 三浦智行、米田舞、大附寛幸、松下修三、日紫喜隆行、五十嵐樹彦: 新規 CCR5 指向性 SHIV のサルへの順化と中和抗体抵抗性の解析、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月 10-12 日
- 4) 渡部祐司、岩見真吾、森ひろみ、松浦嘉奈子、石田裕樹、日紫喜隆行、三浦智行、五十嵐樹彦: 高病原性 SHIV 感染サルにおける感染マクロファージは感染リンパ球と同程度の半減期を示す、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月 10-12 日
- 5) 芳田剛、齋藤暁、松岡和弘、大出裕高、岩谷靖雅、杉浦互、保富康宏、俣野哲朗、三浦智行、明里宏文: サル個体におけるサル指向性 HIV-1 の増殖効率を上昇させる要因 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月 10-12 日
- 6) 関紗由里、野村拓志、西澤雅子、横山勝、佐藤裕徳、團塚愛、三浦智行、小柳義夫、俣野哲朗: SIV の持続感染・伝播における変異蓄積に関する研究、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月 10-12

- 7) 中村碧、高原悠佑、松岡佐織、三浦智行、小柳義夫、成瀬妙子、木村彰方、俣野哲朗：抗 HIV 薬投与下の治療ワクチン接種により誘導される CD8 陽性 T 細胞の SIV 複製抑制能の解析、第 28 回日本エイズ学会学術集会、大阪、2014 年 12 月 3-5 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