

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	東京工科大学	医療保健学部	教授
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	小林 美栄	国立感染症研究所	免疫部	流動研究員
研究協力者	和田 倭	国立感染症研究所	免疫部	研究生

研究要旨：

静止期にある CD4 陽性 T 細胞を長期培養維持可能な HSP (HomeoStatic Proliferation) 培養系は、おそらく体内のリンパ組織で恒常維持されている CD4 陽性 T 細胞を模倣した状態でナイーブ T 細胞も含めて培養維持できる。この培養で維持されるナイーブ T 細胞は、in vitro での TCR 刺激や HDAC 阻害剤による HIV-1 mRNA の増加は誘導されなかったことから、静止期ナイーブ T 細胞での LTR 制御は強力な TCR 刺激を受けて静止状態に戻った記憶 CD4 陽性 T 細胞とは異なることが示唆された。

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 (gag/pol、 rev および VSV-G 発現ベクター)、あるいは env 欠損 HIV-1_{NLE} (GFP 発現) proviral DNA と VSV-G 発現ベクター-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 CD4⁺ T cell isolation kit (ミリテニ)を用いて negative selection して CD4⁺ T 細胞を純化した。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 VSV psudotype した HIV-1_{NLE} を spinoculation により感染させた。細胞を洗浄後、IL7 と IL-15 を加えて培養維持し、これを HSP (Homeostatic proliferation) 培養とした。一部は固相化抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体で T 細胞受容体 (TCR)を刺激し、IL-2 存在下に培養した(TCR 刺激培養)。

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 の mRNA 発現を Real Time PCR で定量した。また、感染細胞の DNA を調整し、Alu-primer を用いた integration の解析を行った。

PCR 解析では以下のプライマー・プローブセッ

トを用いた Taqman 法、あるいは Syber Green 法による Real Time PCR で定量した。

GFP: forward, 5'-gaccactaccagcagaacac-3', reverse, 5'-gaactccagcaggaccatg-3', probe, [6-FAM]-agcaccagtcgccctgagca-[BHQ-1], HIV-1 tat は、forward, 5'-catccaggaagtcagcctaaaact-3', reverse, 5'-tcgctgtctcgccttcttc-3'。また、細胞の endogenous control gene expression として RNaseP 遺伝子発現を定量した (forward: 5'-agatttgacctgcgagcg-3', reverse, 5'-gagcggctgtctccacaagt-3', および probe, [6-FAM]-ttctgacctgaaggctctgcgcg-[BHQ-1])。

ゲノムに組み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-1 primer (5'-tccagctactggggaggctgAGG-3' Alu-2 primer (5'-gcctccaaagtgtctgggattacag-3') first-gag-R primer (5'-caatatcatacgccgagagtgctgcgcttcagcaag-3') で 1st PCR を行い、全 DNA を 1×10^5 copies β -globin となるように調整して Alu sites を一定にした。2nd PCR は U5 (5'-ccgtctgtgtgactctgg-3') second-tag-R (5'-caatatcatacgccgagagtg-3') と probe [6-FAM]-cgcttcagcaagccgagctctgc-[BHQ-1]を用いた。

5. その他の薬剤

HDAC 阻害剤 SAHA (virinostat) とメチル化阻害剤 2'-deoxy-5-azacytidine (dAzCyt)は Sigma-Aldrich 社より購入した。

(倫理面への配慮等) ヒト末梢血調整のため、国立感染症研究所の倫理委員会の承認を得、ボランティアから同意を得て採血を行った。

C. 研究結果

静止期にある末梢血由来 CD4 陽性 T 細胞を HIV-1 に感染させ、ナイーブあるいはメモリー T 細胞の恒常性維持に必須といわれる IL-7 と IL-15 を添加して培養することにより、潜伏感染モデルとしての HSP (HomeoStatic Proliferation)培養系を確立した。LTR の制御下に GFP を発現するレンチウイルスを感染させた時、静止期の GFP 陰性 CD4 陽性 T 細胞において低レベルの GFP mRNA の発現を認めた。これが Tat の発現が無いレンチウイルスであるためかどうかを確認するため、野生株 HIV-1_{NL-E} を感染させたところ、図 1 A 左に示すように、4.96%の細胞が GFP を発現しており、特に静止期(非分裂)細胞に GFP 陽性細胞が多かった。ナイーブ T 細胞にゲートをかけると、GFP 陽性細胞は 1.83%存在しており、メモリーよりは少ないもののナイーブ T 細胞にも感染は成立していることが明らかとなった(図 1 B)。野生株では培養中

に感染した細胞が多いことが考えられたため、ナイーブ T 細胞をエンリッチして(85%程度)から同様に VSV pseudotype した HIV-1_{NL-E} を感染させて HSP 培養して 14 日後に解析すると、図 1 B に示すように、GFP 陽性細胞は 0.95%に減少した。このうち GFP 陰性の静止期にあるナイーブ T 細胞にゲートをかけてソートし、再活性化を試みた。TCR 刺激を加えて 1 日目と 6 日目の細胞より RNA を回収し、GFP および tat の mRNA 発現を RT-PCR で定量したところ、図 2 に示すように、HSP 培養を継続して発現している GFP(A)や tat (B)の発現はむしろ低下した。従って、integrate した HIV-1 の再活性化は TCR 刺激では誘導されないことが明らかとなった。そこで同様に感染した細胞を 8 日目にソートし、HSP 培養を継続して 13 日目に TCR 刺激、HDAC 阻害剤である SAHA(0.5 μ M)やメチル化阻害剤 dAzCyt(1.0 μ M)を加えて更に 48 時間後に GFP mRNA の発現を解析したところ、TCR や dAzCyt よりも保たれてはいるものの、SAHA による再活性化誘導はできなかった。一方、ここには示していないが、同じ細胞を感染直後に TCR を刺激して維持した細胞では SAHA により 5 倍程度の GFP mRNA 発現が見られていることから、HSP 培養維持される静止期ナイーブ CD4 陽性 T 細胞はこれまでに知られている再活性化刺激に反応しないことが明らかとなった。

D. 考察

HIV-1 の潜伏過程には T 細胞によって様々な因子が作用していることが指摘されている。培養細胞を用いた in vitro の系では、CD4 陽性 T 細胞株や TCR 刺激後に生存する初期培養 T 細胞が主として使用されてきた。しかしながら、このような T 細胞はすべてメモリー・エフェクターに分化した細胞である。また、感染者の体内 PBMC に潜伏感染した HIV-1 の再活性化をめざす、いわゆる”shock and kill”治療法において、TCR 刺激だけでなく HDAC 阻害剤を含めた様々な薬剤が試されてきたが、その効果は部分的でしかない。HSP 培養維持された静止期にある naïve T 細胞は低レベルの HIV-1 mRNA のみ発現しており、TCR や HDAC 阻害剤にも反応しなかったことから、これらの細胞での潜伏感染は一度 TCR を受けたメモリー・エフェクター細胞とも異なる未知の制御を受けていると推察される。最近同定された Stem cell

memory T 細胞 (Buzon et al., Nat. Med. 20:139, 2014)は、本研究の静止期 naïve T 細胞に類似した低頻度の T 細胞亜集団であるが、メモリー T 細胞と比較して活性化されてウイルスによる細胞傷害を受けにくいためその存在は長期にわたり、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示唆されている (Jaafoura ら、Nat. Comm., 5:5407, 2014)。このようなプロウイルスを持つ細胞が生体内のどのような条件で再活性化しうるのか、あるいはまったく silent なまま経過するのか、今後分子レベルで解析していく必要がある。HSP 培養は今後の潜伏感染成立過程の詳細な解析に有用な in vitro 培養系であると思われる。

E. 結論

静止期にある CD4 陽性 T 細胞を長期培養維持可能な HSP (HomeoStatic Proliferation)培養系は、おそらく体内のリンパ組織で恒常維持されている CD4 陽性 T 細胞を模倣した状態でナイーブ T 細胞も含めて培養維持できる。この培養で維持されるナイーブ T 細胞は、in vitro での TCR 刺激や HDAC 阻害剤による HIV-1 mRNA の増加は誘導されなかったことから、静止期ナイーブ T 細胞での LTR 制御は強力な TCR 刺激を受けて静止状態に戻った記憶 CD4 陽性 T 細胞とは異なることが示唆された。このような静止期の T 細胞への HIV-1 感染と潜伏化の成立過程やその存在意義について更に検討が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Terahara, K., Ishige, M., Ikeno, S., Okada, S., Kobayashi-Ishihara, M., Ato, M., and Tsunetsugu-Yokota, Y.; Humanized mice dually challenged with R5 and X4 HIV-1 show preferential R5 viremia and restricted X4 infection of CCR5⁺CD4⁺ T cells. Microb. Infect. 2015. in press
- 2) Terahara, K., Ishii, H., Nomura, T., Takahashi, N., Takeda, A., Shiino, T., Tsunetsugu-Yokota, Y. and Matano, T.; Vaccine-induced CD107a⁺CD4⁺ T cells are resistant to depletion following AIDS

- virus infection. J. Virol.,88: 14232-40, 2014
- 3) Kobayashi-Ishihara, M., Takahashi, H., Ohnishi, K., Nishimura, K., Terahara, K., Ato, M., Itamura, S., Kageyama, T., Tsunetsugu-Yokota, Y.; Broad Cross-Reactive Epitopes of the H5N1 Influenza Virus Identified by Murine Antibodies Against the A/Vietnam/1194/2004 Hemagglutinin. PLoS One, 9(6):e99201, 2014
 - 4) Tsunetsugu-Yokota, Y., Nishimura, K., Misawa, S., Kobayashi, M., Takahashi, H., Takayama, I., Ohnishi, K., Itamura, S., Nguyen, H. L. K. Le, M. T. Q., Dang, G. T., Nguyen, L. T., Tashiro, M., Kageyama, T.; Development of a sensitive novel diagnostic kit for the highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus. BMC Infect Dis., 14:362, 2014
 - 5) Iwata-Yoshikawa, N., Uda, A., Suzuki, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Sato, Y., Morikawa, S., Tashiro, M., Sata, T., Hasegawa, H. and Nagata, N.; Effects of Toll-like Receptor Stimulation on Eosinophilic Infiltration in Lungs of BALB/c Mice Immunized with UV-inactivated Severe Acute Respiratory Syndrome-related Coronavirus Vaccine. J. Virol., 88:8597-8614, 2014
 - 6) Matsuzakia, Y., Sugawaraa, K., Nakauchi, M., Takahashi, Y., Onodera, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Matsumura, T., Ato, M., Kobayashi, K., Shimotai, Y., Mizuta, K., Hongo, S., Tashiro, M., Nobusawa, E.; Epitope mapping of the hemagglutinin molecule of A/(H1N1)pdm09 virus by using monoclonal antibody escape mutants. J. Virol., 88:12364-73, 2014

2. 学会発表

- 1) 池野翔太、寺原和孝、石毛真行、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10日
- 2) 和田倭、小林(石原)美栄1)、寺原和孝1)、池野翔太1)2)、徳永研三3)、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10日

- 3) 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について」第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月10日
- 4) 萩原恭二、村上知行、石井英樹、竹嶋伸之輔、近藤恭光、本田香織、長田裕之、横田(恒次)恭子、鈴木正昭、間陽子「アクセサリタンパク質Vprの核移行を標的にしたマクロファージに対する新規HIV-1阻害剤の最適化研究」第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月10日
- 5) Yoppy R Candra, Anna L Poetranto, Aldise M Natri, Edith F Puruhito, 横田(恒次)恭子, 西村研吾, 影山努, 高原悠佑, 堀田博, 清水一史「Comparative analysis for the detection of

avian influenza H5N1 virus by using a novel luminescence analyzer (POCube) and real-time RT-PCR」第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月10日

- 6) Shota Ikeno, Kazutaka Terahara, Yasuko Tsunetsugu-Yokota「Induction of human cytokines in humanized mice improves dendritic cell development and antigen-specific antibody production」第43回日本免疫学会学術集会、京都、2014年12月10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
3. その他
なし

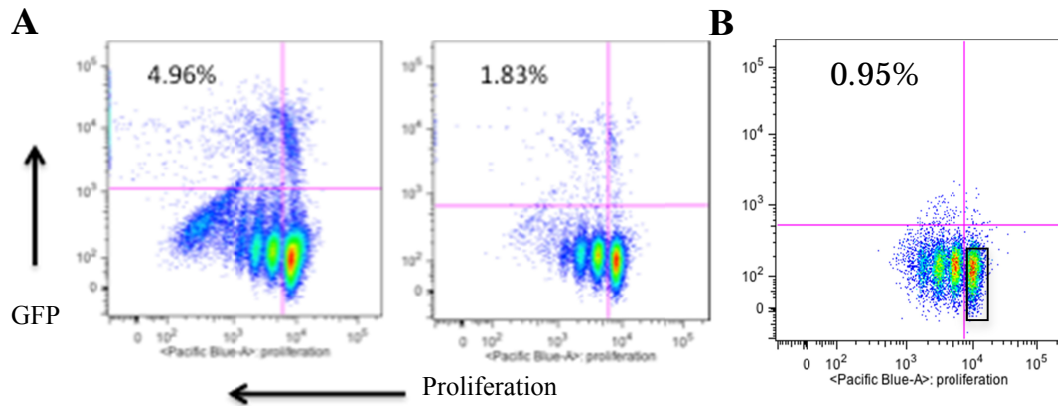


図1 静止期 CD4 陽性 T 細胞における HIV-1 感染とその発現

(A) 末梢血 CD4 陽性細胞に GFP を発現する HIV-1_{NL-E} を感染させた。この細胞を IL-7 と IL-15 添加した HSP 培養し、感染 9 日後にフローサイトメーターで感染細胞 (GFP, 縦軸) と増殖レベル (横軸) を解析した。

(B) 末梢血 CD4 陽性細胞を更に naive 細胞に分け、VSV pseudotype した HIV-1_{NL-E} を感染させて HSP 培養し、感染 14 日後の細胞増殖と GFP 発現をフローサイトメーターで解析した。

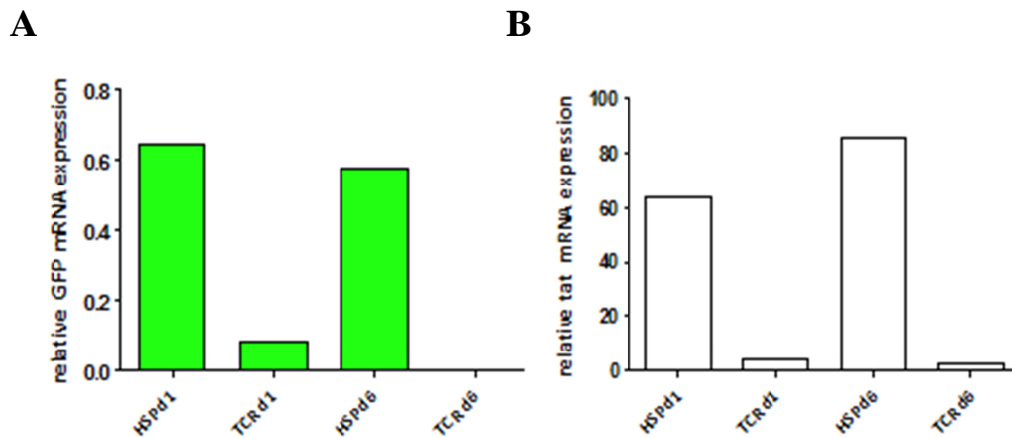


図2 GFP を発現しない静止期 CD4 陽性 naive T 細胞でのウイルス mRNA 発現

VSV pseudotype した HIV-1_{NL-E} を感染させて HSP 培養 14 日後 (図 1 B) の GFP 陰性、細胞非分裂 (静止期) CD4 陽性 T 細胞を FACSaria でソートし、HSP 培養を継続あるいは TCR 刺激を加えて 1 日後および 6 日後に RNA を抽出した。cDNA 合成後、定量 PCR にて GFP (A) および tat (B) の mRNA 発現量を解析した。縦軸は、細胞内 endogenous mRNA コントロールとして RNase P の mRNA に相対的な GFP および tat の発現レベルとして示した。

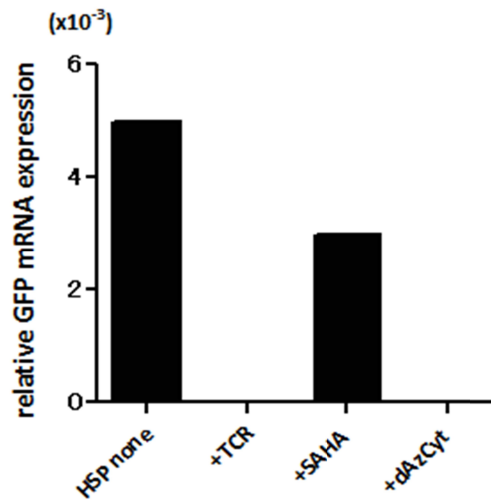


図3 潜伏感染した静止期 CD4 陽性 naïve T 細胞における HIV の再活性化誘導

図2同様に VSV pseudotype した HIV-1_{NL-E} を感染させて HSP 培養 8 日後に GFP 陰性、細胞非分裂（静止期）CD4 陽性 T 細胞を FACSaria でソートし、HSP 培養を更に持続して 15 日後に RNA を抽出した。一部は 13 日目に TCR 刺激、あるいは SAHA, dAzCyt を添加し、同じく 15 日目に RNA を抽出して cDNA を合成して GFP mRNA を PCR 定量した。縦軸は、細胞内 endogenous mRNA コントロールとして RNase P の mRNA に相対的な GFP の発現レベルとして示した。