

令和元年6月10日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11160

研究課題名(和文) 膣内常在菌の粘膜免疫応答とHIV感染に及ぼす影響

研究課題名(英文) Influence of the mucosal immune response to the vaginal bacterial flora on HIV infection

研究代表者

TRINH DUYQUANG (TRINH, DuyQuang)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：90647190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では膣上皮細胞が免疫学的機能を持つことに着目し、細菌性膣症の原因となる細菌の菌体成分や代謝物質等が膣上皮細胞に与える影響について調べることを目的とした。膣上皮細胞株と菌体成分とともに培養し、グラム陽性菌と陰性菌では膣上皮細胞が産生するサイトカインや抗微生物ペプチドが異なることが示唆された。上記の膣粘膜細菌共培養上清をNK細胞株NK-92MIに添加し、サイトカイン産生パターンを認めた。DNA結合タンパク質HMGB1がT細胞におけるHIV複製を増強することが示唆された。また膣細菌叢優位菌種の一つである*Lactobacillus crispatus*が膣の再上皮化を加速することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この成果によって、膣内細菌叢優位菌種である*L. crispatus*が膣上皮細胞の膣粘膜の恒常性と堅牢性の維持重要であることが示唆され、膣上皮粘膜を通じてのHIV感染に対する膣内常在菌の感染防御的役割の理解が深まった。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to investigate on the influence of the mucosal immune response to the vaginal bacterial flora on HIV infection. By co-culturing of vaginal epithelial cells with heat-inactivated *Escherichia coli*, *Streptococcus aureus* or their components (LPS, peptidoglycan), a different pattern in immune responses against Gram-positive and -negative bacteria of vaginal epithelial cells was found. With using supernatants of the above co-culture for culturing HIV-infected MOLT-4 cells, a human T-cell leukemia cell line, no influence on HIV replication was noted. HMGB1, a DNA-binding protein, was able to enhance HIV replication in newly infected primary T cells. Interestingly, the important role of *Lactobacillus crispatus*, a predominant anaerobe of normal vaginal bacterial flora, in enhancement of re-epithelialization of vaginal epithelial cells was elucidated.

研究分野：感染症内科学

キーワード：膣上皮細胞 再上皮化 サイトカイン 抗微生物ペプチド HIV複製 T細胞 HMGB1 *Lactobacillus crispatus*

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

腔内には常在細菌叢が存在し、恒常性を保っているが、常在菌叢の乱れ (disbiosis) は細菌性陰症の原因となり、他の性感染症の感染リスクが上昇することが知られている。細菌性陰症や陰炎が女性における HIV 感染のリスクファクターとなるという疫学的報告は少なくないが、その機序は不明である。また腔粘膜の恒常性と堅牢性の維持には腔に常在する乳酸菌が重要な役割を担うとされるがその機序は未知の点が多い。

### 2. 研究の目的

本研究では腔上皮細胞が免疫学的機能を持つことに着目し、細菌性陰症の原因となる細菌の菌体成分や代謝物質等が腔上皮細胞に与える影響について調べることを目的とする。不活化腔上皮細胞と腔内常在菌、病原細菌を共培養し、粘膜下リンパ球における HIV 複製への影響を検討することを目的とする。また腔上皮細胞の再上皮化に対し、腔細菌叢優位菌種の一つである *Lactobacillus crispatus* がどのような影響を及ぼすかを検討する。

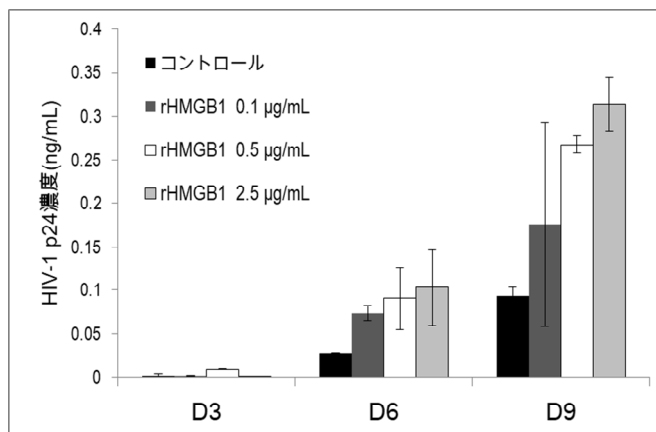
### 3. 研究の方法

- (1) 不活化腔上皮細胞と不活化細菌菌体、菌体成分の共培養：腔上皮細胞 (VK2/E6E7 または MS74) と不活化した *Escherichia coli*, *Streptococcus aureus*, *Lactobacillus crispatus* (Döderlein 桿菌) の細菌菌体あるいは、LPS, ペプチドグリカンなどの菌体成分を共培養し、上記培養系の上清を保存し、NK 細胞株 NK-92MI または HIV を感染させた T 細胞に添加
- (2) ELISA によるサイトカインや抗微生物ペプチド、ウイルスタンパク質等の測定
- (3) スクラッチアッセイによる再上皮化の評価
- (4) 蛍光抗体法による血管内皮増殖因子 (VEGF) とその受容体の発現の解析

### 4. 研究成果

- (1) 腔上皮細胞が産生するサイトカインや抗微生物ペプチド  
大腸菌由来 LPS を腔上皮細胞株 (VK2/E6E7) に添加すると、beta-defensin-2 の産生が誘導されたが、IL-8, elafin や beta-defensin-4 の産生は誘導されなかった。一方、ペプチドグリカンを添加すると IL-8 と elafin の産生が誘導された。この結果から、グラム陽性菌と陰性菌では腔上皮細胞が産生するサイトカインや抗微生物ペプチドが異なることが示唆された。さらに、これらの培養上清を HIV 感染 MOLT-4 細胞に添加し、HIV の複製に与える影響を検討したが、HIV の複製には影響を与えなかった。

- (2) 炎症誘導蛋白 High Mobility Group Box 1 はヒト初代 T 細胞で HIV の複製の促進  
High Mobility Group Box 1 (HMGB1) は主に核内に存在し DNA 結合タンパク質として機能するが、LPS などの刺激によって核内から細胞外に放出され、TLR などの自然免疫系受容体によって認識されて様々な免疫応答に関与することが多数報告されている。そこで、本研究では HMGB1 が HIV の複製に与える影響についても検討した。HIV を感染させたヒト初代 T 細胞に HMGB1 を添加すると HIV 複製が増加し、また抗 HMGB1 抗体を添加すると HIV 複製を抑制することが明らかとなった。従って、HMGB1 が HIV 複製を増強することが示唆された。



リコンビナント HMGB1 の存在下で T 細胞培養上清中の HIV-1 p24 濃度 (図 1)

- (3) NK 細胞活性化に及ぼす影響

HIV 感染の初期防御には粘膜型 NK 細胞が重要な役割を果たしていると考えられている。不活化腔上皮細胞 (MS74) と不活化細菌菌体 (*Escherichia coli*, *Streptococcus aureus*) または菌体成分 (LPS, ペプチドグリカン) とともに培養し、その上清を回収した。上記の腔粘膜細菌共培養上清を NK 細胞株 NK-92MI に添加すると、IFN- $\gamma$  の産生が誘導されたが、IL-4, IL-17 や IL-22 の産生は誘導されなかった。

- (4) *Lactobacillus crispatus*は腔上皮細胞の再上皮化の促進  
腔粘膜の恒常性と堅牢性の維持には腔に常在する乳酸菌が重要な役割を担うとされるがその機序は未知の点が多い。そこで、本研究では腔上皮細胞の再上皮化に対し、腔細菌叢優位菌種の一つである *Lactobacillus crispatus* がどのような影響を及ぼすかを検討した。ヒト不死化腔上皮細胞 MS74 を用いて *L. crispatus* の細胞増殖に対する影響を評価した。さらに *L. crispatus* の共培養、死菌または培養上清を添加しスクラッチアッセイによる再上皮化を評価した。その結果、*L. crispatus* は生菌、培養上清ともに再上皮化を促進した。*L. crispatus* 生菌と培養上清は 24 時間後の培養上清中の VEGF 濃度有意に上昇させた。また MS74 細胞における VEGFR1, 2 の発現が認められ、リコンビナント VEGF 添加により再上皮化を促進した。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Takada K, Komine-Aizawa S, Kuramochi T, Ito S, Trinh QD, Pham NTK, Sasano M, Hayakawa S. *Lactobacillus crispatus* accelerates re-epithelialization in vaginal epithelial cell line MS74. Am J Reprod Immunol. 2018 Sep;80:e13027. doi: 10.1111/aji.13027. (査読有)
- ② Pham NTK, Thongprachum A, Trinh QD, Okitsu S, Komine-Aizawa S, Shimizu H, Hayakawa S, Ushijima H. Detection and genetic characterization of enterovirus strains circulating among children with acute gastroenteritis in Japan during 2014-2016. Pham NTK, Thongprachum A, Trinh QD, Okitsu S, Komine-Aizawa S, Shimizu H, Hayakawa S, Ushijima H. Infect Genet Evol. 2018 Jul;61:16-19. doi: 10.1016/j.meegid.2018.03.009. (査読有)
- ③ Trinh QD, Pham NTK, Takada K, Komine-Aizawa S, Hayakawa S. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-independent rubella infection of keratinocytes and resistance of first-trimester trophoblast cells to rubella virus in vitro. Viruses. 2018 Jan 4;10. pii: E23. doi: 10.3390/v10010023. (査読有)
- ④ Takada K, Komine-Aizawa S, Hirohata N, Trinh QD, Nishina A, Kimura H, Hayakawa S. Poly I:C induces collective migration of HaCaT keratinocytes via IL-8. BMC Immunol. 2017 Apr 24;18:19. doi: 10.1186/s12865-017-0202-3. (査読有)
- ⑤ Pham NTK, Thongprachum A, Baba T, Okitsu S, Trinh QD, Komine-Aizawa S, Shimizu H, Hayakawa S, Ushijima H. A 3-month-old child with acute gastroenteritis with enterovirus D68 detected from stool specimen. Clin Lab. 2017 Jul 1;63:1269-1272. doi: 10.7754/Clin.Lab.2017.170219. (査読有)
- ⑥ Pham NT, Ushijima H, Thongprachum A, Trinh QD, Khamrin P, Arakawa C, Ishii W, Okitsu S, Komine-Aizawa S, Hayakawa S. Multiplex PCR for the detection of 10 viruses causing encephalitis/encephalopathy and its application to clinical samples collected from Japanese children with suspected viral encephalitis. Clin Lab. 2017 Jan 1;63:91-100. doi: 10.7754/Clin.Lab.2016.160630. (査読有)
- ⑦ Trinh QD, Pham NT, Fuwa K, Takada K, Komine-Aizawa S, Honda M, Ushijima H, Hayakawa S. High mobility group box 1 protein enhances HIV replication in newly infected primary T cells. Clin Lab. 2016 Dec 1;62:2305-2311. doi: 10.7754/Clin.Lab.2016.150928. (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 高田 和秀、相澤 志保子、トリン ズイ クアン、早川 智. *Lactobacillus crispatus* は腔上皮細胞の再上皮化の促進する。第 35 回日本産婦人科感染症学会学術集会. 2018 年
- ② トリン ズイ クアン、高田 和秀、相澤 志保子、早川 智. 炎症誘導蛋白 High Mobility Group Box 1 はヒト初代 T 細胞で HIV の複製を促進する。第 32 回日本生殖免疫学会総会・学術集会. 2017 年
- ③ 高田 和秀、相澤 志保子、トリン ズイ クアン、早川 智. デーデルライン桿菌は腔上皮細胞の re-epithelialization を促進する。第 32 回日本生殖免疫学会総会・学術集会. 2017 年
- ④ トリン ズイ クアン、相澤 志保子、早川 智. High mobility group box 1 protein enhances HIV replication in newly infected primary T cells. 第 91 回日本感染症学会総会・学術講演会. 東京都新宿区西新宿 2-2-1 (京王プラザホテル). 2017 年 4 月 6 日

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：相澤 志保子

ローマ字氏名：AIZAWA, Shihoko

所属研究機関名：日本大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：30513858

研究分担者氏名：早川 智

ローマ字氏名：HAYAKAWA, Satoshi

所属研究機関名：日本大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：30238084

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。