

平成 22 年 3 月 23 日現在

研究種目：基盤研究 B

研究期間：2005～2008

課題番号：17390454

研究課題名（和文） HIV 垂直感染における胎盤関門と脱落膜大顆粒リンパ球の役割

研究課題名（英文） Role of local decidual large granular lymphocytes and local immune responses on materno-fetal HIV transmission

研究代表者

早川 智 (HAYAKAWA SATOSHI)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：30238084

研究成果の概要（和文）：エイズウイルス（HIV）感染妊婦における胎児，新生児に対する垂直感染の予防は人類保健上重要な課題の一つである。しかし無治療妊婦でも子宮内感染の頻度は低く，胎盤には関門が存在する。我々は，ヒトの妊娠子宮に形成される脱落膜のリンパ球が，HIV に感染した細胞を破壊すると同時に，それ自体が HIV に感染すること，細菌やウイルスの産物が Toll 様受容体を介してウイルス複製や細胞のサイトカイン産生に影響することを明らかにした。また，本研究により妊娠による HIV への免疫応答への修飾が明らかになった。

研究成果の概要（英文）：The HIV/AIDS epidemic has been rapidly increasing all over the world. The number of HIV infected pregnant women has also been increasing. On the other hand, intra uterine infection rates are less than 20% without any medical interventions. This fact suggests possible placental barrier for HIV in human pregnancy. In the present study we revealed the double edged sword roles of human decidual lymphocytes which harm HIV infected trophoblasts but often infected with HIV and serve as reservoirs. At the same time, we observed differentiation-dependent susceptibility of human trophoblasts for HIV-1 in CD4 independent manners and possible roles of endogenous or exogenous TLR agonists. Our results suggest importance of cytokine milieu in the human utero-placental unit for vertical transmission of HIV.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	4,100,000	0	4,100,000
2006 年度	1,800,000	0	1,800,000
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
総計	10,000,000	1,230,000	11,230,000

研究分野：産婦人科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：HIV，胎盤関門，垂直感染，リザーバー，IL-16，脱落膜リンパ球，

1. 研究開始当初の背景

HIV 感染妊婦における胎児，新生児に対する垂直感染の予防は人類保健上重要な課題の一つである。国連エイズ委員会の推定では

2002 年 1 年間だけでも全世界で 60 万人の小児がエイズに感染し，その大部分は母子感染によるとされている。小児エイズの予後が不良であることから，早急な対策が必要である。

我が国においては、申請者の所属する厚生労働省研究班の調査で、HIV陽性妊婦は妊娠中の抗ウイルス剤の投与と選択的帝王切開により垂直感染率を1%程度まで下げることが可能となっている。しかしながら、南アジアやアフリカにおける無治療妊婦でも垂直感染の程度は20%程度であり、不完全ながら胎盤関門が存在すると考えられている。

2. 研究の目的

ヒト脱落膜にはCD56強陽性、CD16陰性の大顆粒リンパ球CD56 LGLが多数存在し、母児免疫の上で重要な役割を果たしている。NK細胞はHIVに感染した細胞を破壊すると同時に、それ自体がHIVのターゲットとなることが知られている。脱落膜CD56 LGLはNK, NKTなど複数の細胞集団よりなり、また株化が困難である。そこで初代培養細胞あるいはNK, NKT由来樹立細胞株を用いたHIV感染実験でサイトカインやケモカインの細胞に及ぼす影響や転写因子の動態を解析し、脱落膜内でのCD56 LGLのHIV感染における機能ならびにHIV感染妊婦局所免疫の解析により子宮内における予防法の確立を目的とする。

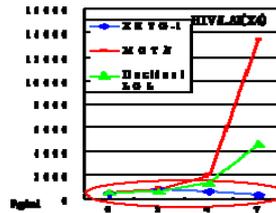
3. 研究の方法

- 1) 脱落膜リンパ球, CD56LGL 白血病細胞株に *in vitro* で CXCR4 指向性 HIV-LAI を感染させて上清中の HIV 量を ELISA で測定した。またこの系に、TLR リガンドを添加し複製効率の変化を検討した。
- 2) 絨毛癌細胞株 BwWo, JEG-3, 不死化絨毛細胞 H8, Sw71 に同一のウイルスを感染させ複製効率を検討するとともに、TLR を介したシグナルの影響を検討した。
- 3) 脱落膜リンパ球, NK, NKT 細胞株に IL-2+IL-12 の存在下, あるいは非存在下に TLR リガンドを添加し, サイトカイン産生の変化を ELISA もしくはサイトカインアレイにより網羅的に解析した。

4. 研究成果

1) 脱落膜リンパ球は PHA で芽球化した末梢血 T 細胞や T 細胞白血病株に比較して低効率であるが、HIV を複製した。脱落膜大顆粒リンパ球のモデルとして NKT 細胞株 MOTN, NK 細胞株 KHYG に *in vitro* で HIV を感染させたところ、前者においては有効な複製が見られ、培養上清中に HIVp24 の出現を認めたのに対し、KHYG は HIV の integration による provirus は見られるものの、virus RNA の発現や上清中への p24 の産生はまったく認められず、リザーバーとなっている可能性が示唆された。

X4ウイルスはCD56陽性大顆粒NKT細胞株では複製を生じるがNK細胞株では複製しない(p24ELISA)



しかし、HIV 感受性を調節する TRIM5 α の発現には差がなく、他の機序が関与すると推定された。HIV を有効に複製する NKT 細胞株 MOTN と、不完全な複製を行う KHYG 細胞の遺伝子ならびにタンパク発現プロファイルを

X4 HIV gag/pol/env 転写には差がない (RT-PCR)



網羅的に解析し、約 40 遺伝子の発現の差を認めた。現在、HIV 複製に関する転写因子発現を解析中であるが、現時点では感受性を決定する特定の遺伝子を同定するには至っていない。

2) 絨毛への感染

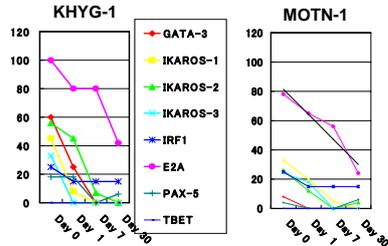
我々は、先に HIV 陽性妊婦の胎盤を病理組織学的に解析し、HIV の血中濃度が高い場合には栄養膜合胞体細胞 syncytial trophoblast に、低い場合には Hofbauer 細胞のみに染色されることを明らかにした。ただ、いずれの場合にも trophoblastic stem cell である cytotrophoblast には染色されず、絨毛細胞の分化段階により感受性が異なる可能性が示唆された。そこで、絨毛癌細胞株 BeWo を Forskolin で分化誘導し、HIV 複製効率を検討した。その結果、未分化な BeWo は HIV 非感受性であるが、分化誘導を受けると HIV に CD4 非依存性に感染し複製すること、分化の過程で CXCR4 発現は変化しないが、TLR-7, 8 からのシグナルで調節されることが明らかになった。さらに、不死化初期絨毛細胞株 H8, Sw71 に HIV を感染させると T 細胞に比較して低効率ながら HIV を複製し、この過程は TLR4 によって増強されることが明らかになった。この事実は、主としてグラム陰性菌による絨毛羊膜炎が HIV 垂直感染に関与する可能性を示唆する所見である。

3) サイトカイン産生への影響

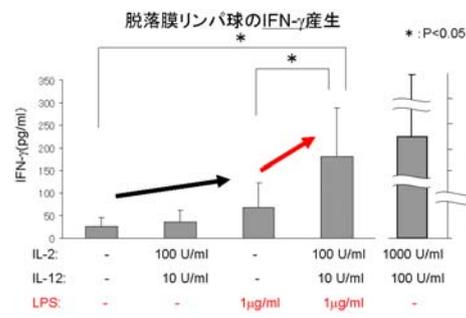
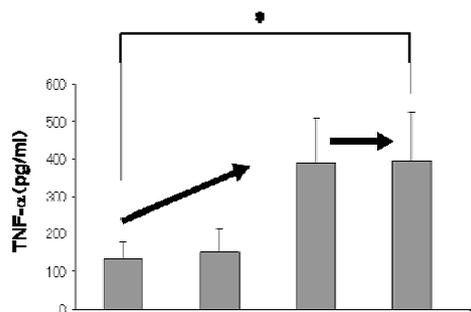
KHYG, MOTN はいずれも IL-12 刺激により、IFN- γ を産生する。これらの細胞に HIV を感染させることにより、IFN 産生は著しく低下した。また、細胞内における SOCS-1, 3 発現

が亢進することから、これを介する可能性が示唆されたが、siRNAによるノックダウン実験ではIFN- γ 産生は回復せず、偶然、同時に起きている現象なのか、病態形成の上で意義のある現象なのかは現時点では不明である。HIV感染に緒より複数のシグナル伝達因子発現が低下していることから、必ずしも単一の経路を経ない可能性がある。

X4 HIV感染はNK,NKT細胞株の転写因子活性を抑制する



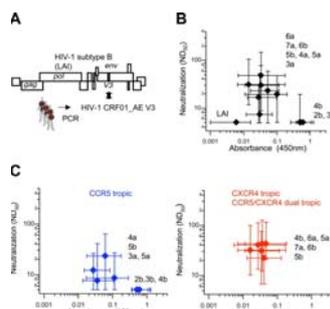
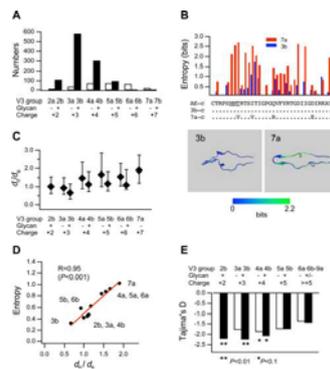
新鮮な脱落膜リンパ球はCD69を発現し、中等度に活性化しているが非刺激時には、IFN- γ 、TNF- α とも産生を認めなかった。この系ではLPS単独刺激により、IFN- γ 、TNF- α ともに産生が誘導された。IL-2+IL-12の存在下ではLPS刺激によるIFN- γ 産生は増強されたが、TNF- α 産生はIL-2+IL-12による増強を受けなかった。粘膜局所におけるHIVの複製制御因子の一つRANTESはTLR3による刺激で、強く誘導されたが、IL-2+IL-12の影響は受けなかった。



4) そのほか関連研究

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) エンベロープ蛋白gp120V3領域はHIV感染におけるコレセプター指向性と宿主の免疫応答を規定する。我々は、1984年から2005年の間に37

カ国から収集した1361例のHIV-1CRF01_AEV3ウイルスにおけるV3遺伝子の多様性を解析した。その結果、V3ペプチドの正電荷の減少が中和抗体活性の低下と強い相関があること。すなわちV3ループの正電荷を低下させる方向に淘汰圧が加わることを明らかにした。特にV3ループの特定の部位の変異がCCR5指向性を決定する上で重要な役割を果たすことから、治療方針の決定やワクチンのデザインに重要な意味を有する可能性がある。



妊娠中は子宮内局所ならびに全身の免疫系がTh2にシフトする。HIV陽性妊婦では妊娠中に抗HIV抗体価が上昇するが、同じエピトープを認識するCTL活性は低下することがある。我々はV3領域に対する抗体が中和活性を有さず、むしろ遮断抗体として作用する可能性がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計16件)

- ① Negishi M, Izumi Y, Aleemuzzaman S, Inaba N, Hayakawa S : Lipo polysaccharide (LPS) induced Interferon (IFN)- γ production by decidual mononuclear cells is Interleukin(IL)-2 and IL-12 dependent. *Am. J. Reprod. Immunol.* (in press) (査読有)
- ② Trinh QD, Pham NT, Lam BQ, Le

- TP, Truong KH, Le TQ, Vo HT, Tang TC, Ha TM, Izumi Y, Mizuguchi M, Hayakawa S, Ushijima H : Subtyping and env C2/V3 sequence analysis of HIV-1 isolated from HIV-infected children hospitalized in Children Hospital 1, Vietnam during 2004-2005. *J Trop Pediatr*. 2009 Dec;55(6):399-401 (査読有)
- ③ 早川智 : 【生殖器の感染防御機構】 女性生殖器における感染防御機構 オーバービュー - HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY(1340-220X)16 巻 4 号 Page295-299(2009.12) (査読有)
- ④ Trinh QD, Izumi Y, Komine-Aizawa S, Shibata T, Shimotai Y, Kuroda K, Mizuguchi M, Ushijima H, Mor G, Hayakawa S : H3N2 influenza A virus replicates in immortalized human first trimester trophoblast cell lines and induces their rapid apoptosis. *Am J Reprod Immunol*. 2009 Sep;62(3):139-46. (査読有)
- ⑤ Honda M, Wang R, Kong WP, Kanekiyo M, Akahata W, Xu L, Matsuo K, Natarajan K, Robinson H, Asher TE, Price DA, Douek DC, Margulies DH, Nabel GJ : Different vaccine vectors delivering the same antigen elicit CD8+ T cell responses with distinct clonotype and epitope specificity. *J Immunol*. 2009 Aug 15;183(4):2425-34. (査読有)
- ⑥ Ohto H, Yonemura Y, Takeda J, Inada E, Hanada R, Hayakawa S, Miyano T, Kai K, Iwashii W, Muto K : Asai F Guidelines for managing conscientious objection to blood transfusion. *Transfus Med Rev*. 2009 Jul;23(3):221-8. (査読有)
- ⑦ 稲葉憲之, 大島教子, 林田志峯, 西川正能, 岡崎隆行, 庄田亜紀子, 稲葉未知世, 根岸正実, 多田和美, 稲葉不知之, 田所望, 深澤一雄, 渡辺博, 高見澤裕吉, 熊曙康, 和田裕一, 喜多恒和, 外川正生, 塚原優己, 早川智, 吉野直人, 戸谷良造 : HBV, HCV, HIVスクリーニング ペリネイタルケア 28 巻 6 号 Page582-586(2009.06) (査読無)
- ⑧ Shibata T, Tanaka T, Shimizu K, Hayakawa S, Kuroda K : Immuno-fluorescence imaging of the influenza virus M1 protein is dependent on the fixation method. *J Virol Methods*. 2009 Mar; 156(1-2):162-5. (査読有)
- ⑨ 稲葉憲之, 大島教子, 西川正能, 岡崎隆行, 庄田亜紀子, 根岸正実, 林田志峯, 稲葉未知世, 和田裕一, 喜多恒和, 外川正生, 塚原優己, 名取道也, 牛島廣治, 戸谷良造, 五味淵秀人, 早川智, 尾崎由和, 吉野直人, 田中憲一, 熊曙康 : 【性感染症up to date】 【性感染症への対応と治療】 周産期における HIV/エイズ, その現状と対策 厚労省研究班の成績をもとに. *臨床婦人科産科* 63 巻 2 号 Page151-155(2009.02) (査読無)
- ⑩ Naganawa S, Yokoyama M, Shiino T, Suzuki T, Ishigatsumo Y, Ueda A, Shirai A, Takeno M, Hayakawa S, Sato S, Tochikubo O, Kiyoura S, Sawada K, Ikegami T, Kanda T, Kitamura K, Sato H : Net positive charge of HIV-1 CRF01_AE V3 sequence regulates viral sensitivity to humoral immunity. *PLoS ONE*. 2008 Sep 12;3(9):e3206. (査読有)
- ⑪ Komine-Aizawa S, Majima H, Yoshida-Noro C, Hayakawa S : Stimuli through Toll-like receptor (TLR) 3 and 9 affect human chorionic gonadotropin (hCG) production in a choriocarcinoma cell line *J Obstet Gynaecol Res*. 2008 Apr;34(2):144-51 (査読有)
- ⑫ 早川智, 真島洋子, 泉泰之, Tيره Duy Quang, Nbandith Viengvansay, 相澤志保子 : 女性生殖器・脱落膜の免疫と母子感染 : 産婦人科の実際 57 巻 5 号 Page773-780(2008.05) (査読無)
- ⑬ 相澤(小峯)志保子, 早川智, 長縄聰, 永石(石井)真木, 本多三男, 砂川恵伸, 根本則道 : HIV垂直感染と胎盤関門, 炎症と免疫, 15 巻 1 号, Page87-93, 2006.12 (査読無)
- ⑭ 早川智, 塚原優己, 吉野直人, 北村勝彦, 稲葉憲之, 喜多恒和, 佐久本薫, 箕浦茂樹, 高野政司, 和田裕一 : 我が国における HIV 感染妊婦の現状と垂直感染のコントロール(平成 16 年度の全国調査成績より) *感染症学雑誌*(0387-5911)80 巻 6 号 Page799-800(2006.11) (査読有)
- ⑮ 長縄聰, 早川智, 相澤志保子, 清水一史, 北村勝彦, 本多三男, 陳旺全 : 鄭瑞棠アロマセラピーに用いられる芳香物質の HIV 感染に及ぼす影響 MAGIC-5 細胞を用いた in vitro での検討, アロマセラピー学雑誌(1346-3748)6 巻 1 号 Page19-25(2006.03) (査読有)

- ⑫ 相澤志保子, 早川智: 産科 母子感染のスクリーニング HIV 産婦人科の実際 55 巻 11 号 Page1706-1711 (2006. 10) (査読無)

[学会発表] (計 1 1 件)

- ① 根岸正実, 泉泰之, 大島教子, 稲葉憲之, 早川智: Th1 サイトカインはヒト脱落膜リンパ球のLPS感受性を亢進する, 第 37 回日本臨床免疫学会, 2009 年 11 月 14 日 東京
- ② 谷口晴記, 塚原優己, 井上孝実, 山田里佳, 大島教子, 林公一, 蓮尾泰之, 佐久本薫, 早川智, 喜多恒和, 稲葉憲之, 和田裕一: HIV 母子感染予防対策マニュアル改訂時の検討項目と今後の課題 第 61 回日本産科婦人科学会 2009 年 4 月 4 日 京都
- ③ 真島洋子, 鈴木美喜, 木根洸猛, 千島史尚, 相澤志保子, 泉泰之, 早川智: TLRを介した刺激はCD56 陽性大顆粒NK, NKT細胞株のIFN- γ 産生を調節する 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会 2008 年 11 月 21 日 東京
- ④ 相澤志保子, 泉泰之, 長縄聡, 本多三男, 北村勝彦, 稲葉憲之, 山本直樹, 早川智: HIVの母子感染 HIV垂直感染における胎盤関門の解析 第 82 回日本感染症学会 2008 年 4 月 18 日 島根
- ⑤ 佐藤裕徳, 横山勝, 神田忠仁, 早川智, 北村勝彦, 長縄聡: HIV-1 CRF01_AE V3 の変異解析 第 21 回日本エイズ学会 2007 年 11 月 28 日 広島
- ⑥ 早川智, 塚原優己, 吉野直人, 北村勝彦, 稲葉憲之, 喜多恒和, 佐久本薫, 箕浦茂樹, 高野政司, 和田裕一: 我が国におけるHIV感染妊婦の現状と垂直感染のコントロール(平成 16 年度の全国調査成績より) 第 20 回日本エイズ学会 2006 年 11 月 30 日 東京
- ⑦ 嶋貴子, 今井光信, 谷口晴記, 早川智, 外川正生, 塚原優己, 稲葉憲之: 妊婦集団におけるHIVスクリーニング検査の偽陽性出現率に関する調査 第 20 回日本エイズ学会 2006 年 11 月 30 日 東京
- ⑧ 谷口晴記, 塚原優己, 外川正生, 早川智, 嶋貴子, 太田順子, 西川正能, 庄田亜紀子, 岡崎隆行, 池田綾子, 大島教子, 稲葉憲之: HIV母子感染成立例の産科的背景について 第 20 回日本エイズ学会 2006 年 11 月 30 日 東京
- ⑨ 長縄聡, 菱山和義, 松崎圭一, 相澤志保子, 真島洋子, 北村勝彦, 北中進, 早川智: 甘遂(カンツイ)由来の新規テルペノイド誘導体の抗HIV活性の検討 第 20 回日本エイズ学会 2006 年 11 月 30 日 東京
- ⑩ 喜多恒和, 松田秀雄, 工藤一弥, 岩田みさ子, 小早川あかり, 箕浦茂樹, 佐久本薫, 早川智, 塚原優己, 和田裕一, 戸谷良造, 稲葉

憲之: 本邦におけるHIV感染妊娠の発生と母子感染予防対策の現状 第 58 回日本産科婦人科学会 2006 年 4 月 横浜

- ⑪ 井上孝実, 戸谷良造, 喜多恒和, 佐久本薫, 和田裕一, 林公一, 蓮尾泰之, 塚原優己, 谷口晴記, 早川智, 稲葉憲之: HIV母子感染防止策の技術継承の問題に関する検討 第 58 回日本産科婦人科学会 2006 年 4 月 横浜

[図書] (計 3 件)

- ① 早川智, 源頼朝の歯周病, 診断と治療社, 2008, (総ページ 277).
- ② 早川智, 相澤志保子, 妊娠と感染症, HIV (鈴木光明 吉村泰典編 産婦人科専門医に聞く最新の臨床), 中外医学社, 2007, (総ページ 441 分担執筆 P38-41).
- ③ 早川智, HIV感染症, AIDS, 不育症臨床エビデンス産科学 第 2 版 (佐藤和雄, 藤本征一郎編 総ページ 595 分担執筆 P468-471 P273-276), メディカルビュー社, 2005.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

早川 智 (HAYAKAWA SATOSHI)
日本大学・医学部・教授
研究者番号: 30238084

(2) 研究分担者

本多 三男 (HONDA MITSUO)
国立感染症研究所・エイズ研究センター・第一研究グループ長
研究者番号: 20117378 (H17~H18)
長縄 聡 (NAGANAWA SATOSHI)
日本大学・医学部・専修研究員
研究者番号: 40445747 (H17~H18)
根本 則道 (NEMOTO NORIMICHI)
日本大学・医学部・教授
研究者番号: 80096875 (H17~H19)
北村 勝彦 (KITAMURA KATSUHIKO)
横浜市立大学・医学部・准教授
研究者番号: 30195287 (H17~H19)
齋藤 滋 (SAITOH SHIGERU)
富山大学・医学部・教授
研究者番号: 30175351 (H17~H20)
山本 直樹 (YAMAMOTO NAOKI)
国立感染症研究所・エイズ研究センター・センター長
研究者番号: 00094053 (H18~H20)
稲葉 憲之 (INABA NORIYUKI)
獨協医科大学・医学部・教授
研究者番号: 70114238 (H19)
相澤 志保子 (AIZAWA SHIHOKO)
日本大学・医学部・助手
研究者番号: 30513853 (H20)
泉 泰之 (IZUMI YASUYUKI)
日本大学・医学部・専修研究員
研究者番号: 50459872 (H20)