

機関番号：82603

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20590481

研究課題名（和文）HIV-1Nef によるマクロファージの自然免疫機能攪乱とエイズ病態形成の機構

研究課題名（英文）HIV-1 Nef dysregulates innate immunity of macrophages and plays a role in AIDS pathogenesis

研究代表者

横田 恭子 (YOKOTA YASUKO)

国立感染症研究所・免疫部・室長

研究者番号：20182701

研究成果の概要（和文）：

HIV-1 Nef のエイズ病態における役割を明らかにするため、Nef 発現で抑制された TLR5 と IL-10 受容体（ベータ鎖）に注目し、これらの分子を介するマクロファージの自然免疫応答について解析した。TLR5 や IL-10 受容体からのシグナルはマクロファージのサイトカイン産生バランスに影響しており、Nef が自然免疫監視機能を障害する可能性が示唆された。一方、ヒト造血幹細胞移入免疫不全マウスは HIV に感染するもののマクロファージの分化発達が不十分であり、病態解析のモデルには適さなかった。

研究成果の概要（英文）：

In order to clarify a role of HIV-1 Nef on the AIDS pathogenesis, we analyzed the innate immune function of macrophages through the stimulation of TLR5 and IL-10 receptor beta, expressions of which were suppressed by Nef. A cytokine production profile of macrophages via these signaling was disturbed by Nef expression. Unfortunately, immunodeficient mice reconstituted with human cord blood stem cells were poor in the macrophage development and, therefore, not a good model to study Nef function in vivo.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	0	1,900,000
2009 年度	1,100,000	0	1,100,000
2010 年度	700,000	0	700,000
総計	3,700,000	0	3,700,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：マクロファージ、自然免疫系シグナル、病原性、HIV-1 Nef、サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

HIV-1 Nef はエイズ病態形成と深く関わるものが示唆されているものの、その詳細は未だに明らかでない。そこで、Nef タンパクを tetracycline 制御下に発現させるアデノウイルスベクターを用い、Nef タンパク発現に伴って変動するヒト初期培養マクロファージの mRNA を網羅的に解析した。その結果、マクロファージの自然免疫機能に深くかか

わると考えられる TLR5 と IL-10Rβ の mRNA 発現が Nef 発現により抑制されることに注目した。また、免疫不全マウスにヒト臍帯血由来造血幹細胞を移入することによりヒトリンパ球や骨髄球が分化増殖する“ヒト化マウス”を HIV-1 感染モデル動物として利用することが可能となった。

2. 研究の目的

HIV-1 感染マクロファージにおいて Nef タンパクがマクロファージ本来の自然免疫機能を障害するかどうか、それによりエイズ病態に Nef がどのように関わっているかを培養細胞系及びヒト化マウスを用いて解析する。

3. 研究の方法

単球由来 U937 や THP-1 細胞株および初期培養単球由来マクロファージ(MDM)に、アデノウイルスベクターで Nef 発現を on/off 制御し、TLR5 の mRNA やタンパクの発現を Real Time PCR あるいはウエスタンブロットで解析した。また、Nef の発現下に TLR5 刺激が誘導する 6 種類のサイトカイン産生を解析した。更に、野生型あるいは Nef 欠損 HIV-1 感染 MDM において IL-10 を加えた時のリン酸化シグナルの変化、25 種類のサイトカイン産生変化について網羅的解析を行った。

4. 研究成果

まず、恒常的に Nef を発現する単球系細胞株 U937 あるいは THP-1 で Nef 発現の量と TLR5 の mRNA、およびタンパク発現低下のパターンを解析し、アレイの結果の再現性を確認した。しかしながら、強力なプロモーター下に発現させた TLR5 は Nef による発現抑制を受けなかったことから、TLR5 の発現低下は Nef による間接的効果と考えられた。次に、調節性に Nef 発現を誘導するアデノウイルスを初期培養 MDM に感染させて TLR5 のリガンドである flagellin で刺激し、6 種類の炎症性サイトカイン産生の Nef による影響について、LPS による TLR4 刺激のそれと比較した。その結果、flagellin 刺激時の IL-6 産生 (縦軸、単位は pg/ml) は Nef 発現 (Adeno-Nef (on)), Tetracycline 非添加群) 依存的に低下することが明らかとなった (図 1)。

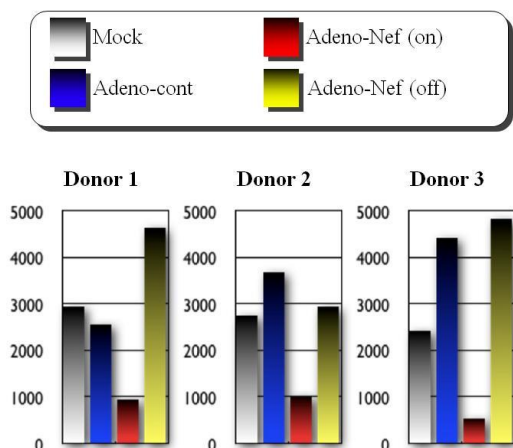


図 1 TLR5 刺激時の IL-6 産生量の Nef による抑制効果

MDM は用いた条件では TLR5 や IL-10Rβ のタ

ンパクレベルでの発現が弱く、フローサイトメーターで Nef 発現によるこれら分子の発現そのものの変化を解析することは困難であった。そこで、MDM を不活化 Salmonella 菌や flagellin、IL-10 等で刺激し、培養上清中のサイトカイン 25 種類を網羅的に測定した。その結果、検出されたサイトカインの中でやはり IL-6 の産生のみが Nef 発現に応じて変化していることが示された。

次に、HIV-1 の感染そのものが MDM の自然免疫機能を障害するかどうかを検討するため、EGFP を発現する野生株 (WT) あるいはその Nef 欠損 (Δ Nef) R5 型 HIV-1 を MDM に感染させ、7 日後の IL-10 刺激による多種サイトカイン量の変化を測定した。その結果、HIV-1 Δ Nef 感染 MDM では WT 感染あるいは非感染 MDM と比較して MCP-1、MIP-1 α および IP-10 の産生量が顕著に増加した。また、WT 感染あるいは非感染 MDM による IL-8 および MIP-1 β の産生は免疫抑制性サイトカインである IL-10 を培地に加えると低下したのに対し、HIV-1 Δ Nef 感染 MDM では IL-10 による抑制効果が認められなかった。そこで、Nef による IL-10 シグナル阻害機序を明らかにするため、その下流に存在するシグナル伝達分子、STAT-3 のリン酸化について検討した。IL-10 によって誘導される STAT-3 のリン酸化のレベルは Nef 発現による影響を受けず、Nef による IL-10 シグナル阻害効果は STAT-3 非依存的であることが示唆された。以上のことから、Nef は MDM において炎症性サイトカインである IL-6、MCP-1、MIP-1 α 、および IP-10 の産生および IL-10 を介するサイトカイン産生抑制性シグナルを阻害して免疫系のバランスを乱すことにより、HIV-1 感染に対する自然免疫監視機構を回避している可能性が in vitro の実験で示された。

一方、ヒト臍帯血 CD34 陽性あるいは CD133 陽性幹細胞を導入した免疫不全マウスでヒト化マウスを作製し、ヒトの T リンパ球の分化増殖過程を詳細に検討した。このマウスでは高率良く HIV-1 感染が成立し、血液および組織中の感染細胞をフローサイトメーターで検出することが可能となった。しかしながら、この系統のマウスでは単球マクロファージ系細胞の分化に障害があると考えられ、マクロファージの HIV 感染による自然免疫機能の変化を解析するモデルとしては何らかの工夫が必要であることが明らかとなった。

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 7 件)

- ① Tsunetsugu-Yokota, Y. and Yamamoto, T.
:Mammalian microRNAs.: post-

transcriptional gene regulation in RNA virus infection and therapeutic applications. *Frontiers in Microbiology* 査読有, 1: 1-9, 2010

- ② Yamamoto, T., Samri, A., Mitsuki, Y-Y., Mizukoshi, F., Kobayashi, K., Inoue, J.-I., Autran, B. and Tsunetsugu-Yokota, Y.: siRNA inhibiting HIV-1 reactivation restores function of HIV-specific CD4+ T cells in chronically HIV-infected individuals. *AIDS* 査読有, 23:2265-2275, 2009
- ③ Yamamoto, T., Iwamoto, N., Yamamoto, H., Tsukamoto, T., Kuwano, T., Takeda, A., Kawada, M., Tsunetsugu-Yokota, Y., Matano, T.: Polyfunctional T-cell induction in neutralizing antibody-triggered simian immunodeficiency virus control. *J. Virol.* 査読有, 83:5514-5524, 2009
- ④ Yamamoto, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Mitsuki, Y-Y, Mizukoshi, F., Terahara, K., Inagaki, Y., Yamamoto, N., Kobayashi, K. and Inoue, J-I.: Selective transmission of R5 HIV-1 over X4 HIV-1 at the dendritic cell-T cell infectious synapse is determined by the T cell activation state. *PLoS Pathogen* 査読有, 5:e1000279, 2009
- ⑤ Mizukoshi, F., Yamamoto, T., Mitsuki, Y-y., Terahara, K., Kawana-Tachikawa, A., Kobayashi, K., Iwamoto, A., Morikawa, Y., and Tsunetsugu-Yokota, Y.: Activation of HIV-1 Gag-specific CD8+ T cells by yeast-derived VLP-pulsed dendritic cells is influenced by the level of mannose on the VLP antigen. *Microbes Infect.* 査読有, 11:191-197, 2009
- ⑥ Komuro, I., Sunazuka, T., Akagawa, S.K., Tsunetsugu-Yokota, Y., Iwamoto, A., and Omura, S.: Erythromycin-derivatives inhibit HIV-1 replication in macrophages through modulation of MAPK activity to induce small isoform of C/EBP β . *PNAS* 査読有, 105: 12509-12514, 2008
- ⑦ Yamamoto, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Mitsuki, Y-Y, Mizukoshi, F., Terahara, K., Inagaki, Y., Yamamoto, N., Kobayashi, K. and Inoue, J-I. : Selective transmission of R5 HIV-1 over X4 HIV-1 at the dendritic cell-T cell infectious synapse is determined by the T cell activation state. *PLoS Pathogen.* 査読有, 5: e1000279, 2009

[学会発表] (計 7 件)

- ① Tsunetsugu-Yokota, Y. and Terahara, K.: Factors crucial for the preferential propagation of R5-tropic HIV-1 in the early phase of HIV-1 infection. The 5th Japanese-German HIV-Symposium. 東京都、2010

年 5 月

- ② Tsunetsugu-Yokota, Y.: The impact of chemokine receptor usage of HIV-1 in the pathogenesis of HIV infection. The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity. 兵庫県、2010 年 9 月
- ③ 石毛真行、寺原和孝、光木裕也、渋谷謙太郎、小林和夫、岡田誠治、横田(恒次)恭子 : HIV-1 感染モデルとしてのヒト化マウスの妥当性と X4 および R5 HIV-1 感染. 第 58 回ウイルス学会、徳島県、2010 年 11 月
- ④ 渋谷謙太郎、光木裕也、寺原和孝、柳雄介、小林和夫、横田(恒次)恭子 : 樹状細胞を標的とした HIV-1 増殖抑制 shRNA 発現レンチウイルスの開発 第 39 回日本免疫学会、大阪、2009 年 12 月
- ⑤ Terahara, K., Mizukoshi, F., Yamamoto, T., Mitsuki, Y-Y, Tsuchiya, T., Kobayashi, K. and Tsunetsugu-Yokota, Y.: HIV-1 Nef dysregulates the innate immune function of macrophages. The 8th Awaji International Forum of Infection and Immunity 兵庫、2008 年 9 月 10 日
- ⑥ 山本拓也、光木裕也、水越文徳、寺原和孝、稲垣好雄、山本直樹、横田(恒次)恭子 : 樹状細胞の抗原提示に伴う感染シナプスを介した R5 型 HIV-1 選択的伝播機構の解析 第 56 回ウイルス学会、岡山、2008 年 10 月 28 日
- ⑦ 水越文徳、山本拓也、光木裕也、寺原和孝、小林和夫、横田(恒次)恭子 : Nef 蛋白質発現に伴うマクロファージの自然免疫機能異常に関する解析 第 22 回日本エイズ学会、大阪、2008 年 11 月 27 日

[図書] (計 2 件)

- ① 横田(恒次)恭子 : レトロウイルス進化における AIDS、病原体の進化による疾病、特集: 生活習慣病 H A 進化病である、成人病と生活習慣病 東京医学社、5 頁 2009 年
- ② Tsunetsugu-Yokota, Y.(Kendow, L.B. ed.): Transmission of HIV from dendritic cells to CD4+ T cells: a promising target for vaccination and therapeutic intervention” in AIDS vaccines, HIV receptors and AIDS research. Nova Biomedical Books Inc. 12 頁, 2008 年

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横田 恭子 (YOKOTA YASUKO)
国立感染症研究所 免疫部
研究者番号：20182701

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：