

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860875

研究課題名(和文) ヒト免疫不全ウイルス感染ランゲルハンス細胞の免疫学的機能の検討

研究課題名(英文) Immunological function of Langerhans cells in HIV in vitro and ex vivo infection

研究代表者

松澤 高光 (MATSUZAWA, Takamitsu)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：40568028

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトランゲルハンス細胞(LCs)がHIVに感染後、どのようにHIV特異的免疫応答を変調するかは明らかにされていない。

本研究では、in vitroまたはex vivoでHIV感染させたLCsはHIV非感染LCsと比較して、ナイーブCD4陽性T細胞からエフェクター制御性T細胞への誘導能が有意に低下していた。一方で、in vitroまたはex vivoでHIV感染させたLCsは、ナイーブCD8陽性T細胞からIFN- γ 産生能を有するHIV特異的CD8陽性T細胞を誘導した。

以上の結果より、HIV感染LCはHIV特異的免疫応答を誘導し、後天性免疫不全症候群の発症を遅延させている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Little is known on the modulation of HIV-specific immune responses by HIV-infected Langerhans cells (LCs), such as the induction of HIV-specific CD8+ T cells and CD4+ regulatory T (Treg) cells, both of which play important roles in controlling HIV replication in infected individuals.

In this study, in vitro HIV-infected mLCs or ex vivo HIV-infected human epidermal LCs significantly decreased the induction of FoxP3hiCD45RA- effector Treg cells from naive CD4+ T cells than HIV-uninfected mLCs or HIV-uninfected human epidermal LCs. On the other hand, in vitro HIV-infected monocyte-derived LCs (mLCs) or ex vivo HIV-infected human epidermal LCs were able to induce IFN- γ -producing HIV gag-specific CD8+ T cells from naive CD8+ T cells.

Taking these results together, HIV-infected LCs trigger beneficial anti-HIV immune responses in the initial HIV infection phase, thereby contributing to the prolonged incubation period from initial HIV infection to AIDS onset.

研究分野：HIV感染におけるランゲルハンス細胞の免疫学的機能

キーワード：HIV感染 ランゲルハンス細胞 HIV特異的免疫応答

1. 研究開始当初の背景

抗原提示細胞 (APC) の一つである表皮内ランゲルハンス細胞 (LCs) は性行為ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染における最初の感染ターゲット細胞である。

HIV 特異的 CD8 陽性 T 細胞や CD4 陽性制御性 T 細胞 (Treg 細胞) は、HIV 感染患者における免疫応答において重要視されている。

現在まで、HIV 感染における APC の一つである樹状細胞 (DCs) による HIV 特異的 CD8 陽性 T 細胞誘導能に関していくつか報告がある。HIV に曝露された単球由来 DCs や HIV 抗原 (gag、nef、reverse transcriptase epitope) をパルスされた単球由来 DCs が HIV 特異的 CD8 陽性 T 細胞反応を誘導するとする報告である。

一方、現在まで、HIV 感染における DCs による Treg 細胞誘導能に関していくつか報告があるが一定した見解が得られていない。HIV 感染時に DCs が Treg 細胞の誘導を促進する報告として、HIV 感染患者の単球由来 DCs が健康なドナーの単球由来 DCs より Treg 細胞を誘導しやすい、未治療の HIV 感染患者のリンパ節内 DCs により Treg 細胞への変化が誘導される、さらに HIV に曝露された形質細胞様樹状細胞 (pDCs) がナイーブ CD4 陽性 T 細胞からの Treg 細胞への分化を誘導する報告である。一方で、HIV 感染時に単球由来 DCs による Treg 細胞の誘導が低下するとする報告もある。

近年、ヒト Treg 細胞を、ナイーブ Treg 細胞 (CD45RA⁺Foxp3⁺/CD25⁺⁺)、エフェクター Treg 細胞 (CD45RA⁻Foxp3⁺⁺/CD25⁺⁺⁺)、non Treg 細胞 (CD45RA⁻Foxp3⁺/CD25⁺⁺) に再分類する方法が報告されている。

以上の背景より、LCs が HIV に感染後どのように免疫応答を変調するのか現在まで明らかにされていない。

2. 研究の目的

HIV 感染 LCs による Treg 細胞誘導能や HIV

特異的 CD8 陽性 T 細胞誘導能を含め、HIV 感染 LCs の免疫学的機能を調べ、HIV 感染 LCs が HIV 感染患者の免疫機能に与える影響を検討することを目的とし、研究を行った。

3. 研究の方法

本研究において、LC として、採血検体より作製培養したヒト表皮 LCs の特徴を有する ヒト単球由来 LC-like DCs (以下 mLCs) と ヒト表皮 LCs を用いた。

(1) HIV 感染 mLCs の免疫抑制分子の発現

mLCs に HIV_{Bal} を 2 時間曝露し洗い、6 日後に、無刺激、24 時間 TLR2 Ligand である HKLM (5×10^8 /ml)、peptidoglycan (10ug/mL)、TLR3 Ligand である poly(I:C) (25 µg/ml)、TGF (10ng/ml) による刺激を加え、その後フローサイトメトリーによる解析を行った。この際、mLCs の解析においては Langerin 陽性細胞に gate をかけた。Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)、IL-10、TGF- を細胞内染色した。HIVp24 陰性 mLCs と HIVp24 陽性 mLCs における各免疫抑制分子の発現を mean fluorescence intensity で比較した。

(2) HIV 感染 LCs によるナイーブ CD4 陽性 T 細胞からのナイーブまたはエフェクター Treg 細胞の誘導能

mLCs を非刺激群、24 時間 HKLM (TLR2; 5×10^8 /ml) による刺激群に分け、各群をさらに HIV_{Bal} を曝露しない群、2 時間 HIV_{Bal} を曝露する群に細分した。

一方、上記と同一の有償ボランティアの PBMC から Naive CD4⁺ T Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec[®]) を用い、Magnetic-activated cell sorting (MACS) によりナイーブ CD4 陽性 T 細胞を分離回収した。

上記の非刺激ないし刺激、HIV 非感染ないし感染した mLCs と、ナイーブ CD4 陽性 T 細胞を共培養した。共培養 6 日後に共培養された細胞を回収し、フローサイトメトリーによる解析をおこなった。CD3 陽性細胞に gate を

かけて、ナイーブ Treg 細胞 (CD45RA+ Foxp3+)、エフェクターTreg 細胞 (CD45RA- Foxp3++)、non Treg 細胞 (CD45RA- Foxp3+) について解析し、HIV 感染 mLCs による Treg 細胞誘導能について検討した。

有償ボランティアから採取した表皮シートに HIV_{BaL} を曝露しない群、ex vivo で 2 時間 HIV_{BaL} を曝露する群に分け、3 日後に表皮シートから培養液に遊走した LCs を回収した。回収した LCs と同一のボランティアからのナイーブ CD4 陽性 T 細胞を 6 日間共培養し、上記と同様にフローサイトメトリーによる解析をおこなった。HIV 感染表皮 LCs による Treg 細胞誘導能について検討した。

(3) 誘導される Treg 細胞の T 細胞増殖抑制能

mLCs に HIV_{BaL} を曝露しない群、2 時間 HIV_{BaL} を曝露する群に分け、その mLCs をナイーブ CD4 陽性 T 細胞と共培養した。共培養 6 日後に共培養された細胞を回収し、Dynabeads CD25 にて CD25 陽性細胞を分離回収した。

一方、異なるボランティアからの PBMCs を用いて、allo mixed lymphocyte reaction (MLR) を行った。Responder としての PBMCs は CFSE ラベルした。Stimulator としての PBMCs には放射線照射した。

上記分離回収した CD25 陽性細胞を MLR に対して、CD25 陽性細胞 : responder PBMCs の様々な比率 (0:1, 0.5:1, 1:1, 2:1, 4:1, 8:1, 16:1) で添加した。5 日後に細胞を回収し、CFSE 希釈 responder CD3 陽性 T 細胞 (増殖する T 細胞) を解析することで、誘導される Treg 細胞の T 細胞増殖抑制能について検討した。

(4) HIV 感染 LCs によるナイーブ CD8 陽性 T 細胞からの HIV 特異的 CD8 陽性 T 細胞誘導能

HIV 特異的 CD8 陽性 T 細胞誘導に関する実験において、FACS Aria により mLCs の中でランゲリン陽性細胞を分離回収し mLCs として実験に使用した。

コントロールとしてヒト単球由来 DCs (以

下 mDCs) を用いた。

HLA-A*0201 陽性有償ボランティアから作成培養した mLCs/mDCs を、非曝露群、3 時間 HIV gag ペプチド曝露群、2 時間 HIV_{BaL} 曝露群に分けた。一方、同一のボランティアの PBMC から Naive CD8⁺ T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec[®]) を用い、MACS によりナイーブ CD8 陽性 T 細胞を分離回収した。

上記の各 mLCs/mDCs とナイーブ CD8 陽性 T 細胞を共培養した。共培養 7 日後、同一のボランティアからの非曝露、HIV gag ペプチド曝露、HIV_{BaL} 曝露した mLCs/mDCs により 7 日間再刺激した。再刺激中、rhIL-2 (10 U/ml) を添加した。再刺激 7 日後、HLA-A*0201 HIV gag p17₇₇₋₈₅ tetramer を用いて、フローサイトメトリーによる解析をおこない、HIV 感染 mLCs/mDCs による HIV gag 特異的 CD8 陽性 T 細胞誘導能について検討した。

HLA-A*0201 陽性有償ボランティアから採取した表皮シートに非曝露、ex vivo で 3 時間 HIV gag ペプチドを曝露、2 時間 HIV_{BaL} を曝露する群に分けた。3 日後に表皮シートから培養液に遊走した LCs を回収した。各 LCs を同一のボランティアからのナイーブ CD8 陽性 T 細胞と共培養した。共培養 7 日後、同一のボランティアからの非曝露、ex vivo で HIV gag ペプチド曝露、HIV_{BaL} 曝露し回収した LCs により 7 日間再刺激した。再刺激中、rhIL-2 (10 U/ml) を添加した。再刺激 7 日後、HLA-A*0201 HIV gag p17₇₇₋₈₅ tetramer を用いて、フローサイトメトリーによる解析をおこない、HIV 感染表皮 LCs による HIV gag 特異的 CD8 陽性 T 細胞誘導能について検討した。

(5) 誘導される HIV 特異的 CD8 陽性 T 細胞の IFN- 産生能

mLCs と表皮 LCs において、上記のように 7 日間再刺激した。再刺激 7 日後、PMA と Ionomycin 刺激後、IFN- 細胞内染色を行い、フローサイトメトリーにより HIV gag tetramer 陰性細胞と HIV gag tetramer 陽性

細胞における IFN- γ 陽性細胞を比較し、HIV gag 特異的 CD8 陽性 T 細胞の IFN- γ 産生能について検討した。

また mLCs において、再刺激 7 日後、HIV gag ペプチド曝露した mLCs/mDCs による刺激下で IFN- γ ELISPOT assay を行い、HIV gag ペプチド特異的に IFN- γ を産生する CD8 陽性 T 細胞の数を比較検討した。

4. 研究成果

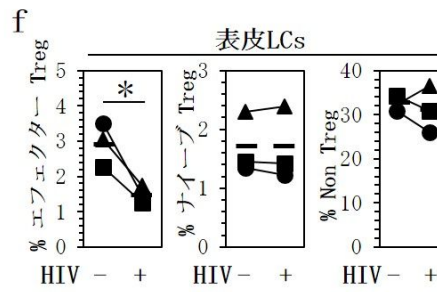
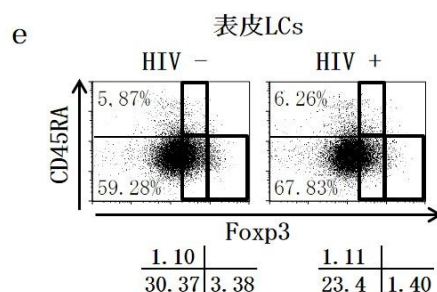
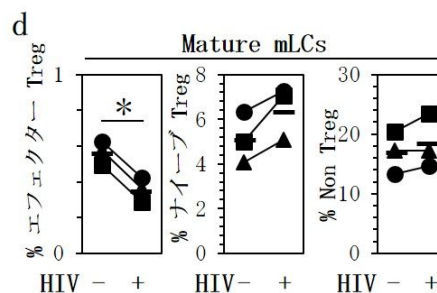
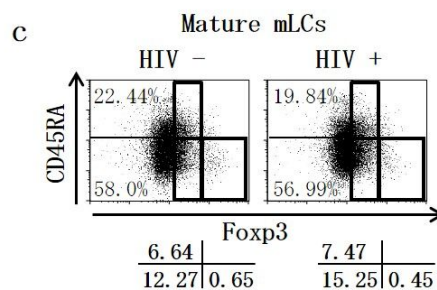
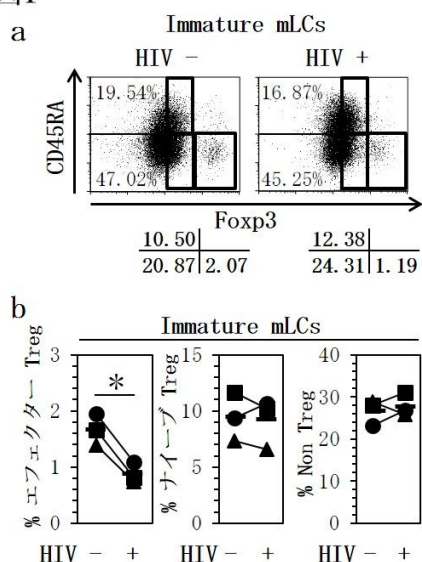
(1) HIV 非感染 mLCs と比較し、HIV 感染 mLCs の IDO、IL-10、TGF- β などの免疫抑制分子の発現は有意差を認めなかった。

(2) HIV 非感染 LCs と比較し、HIV 感染 LCs によるナイーブ CD4 陽性 T 細胞からのエフェクター Treg 細胞誘導能は有意に低下した (図 1a-f)。

図 1a、c、e の下 3 つの数字は各々の図のエフェクター Treg 細胞 (右下)、ナイーブ Treg 細胞 (左上)、non Treg 細胞 (左下) の割合 (%) を示す。

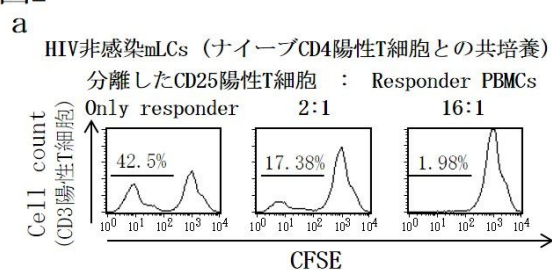
図 1b、d、f は、3 名の異なるボランティアの summary を示す。

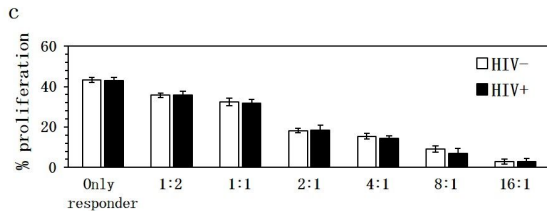
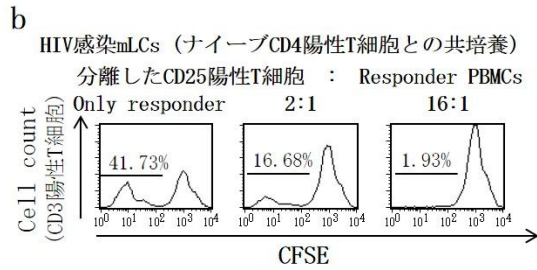
図 1



(3) HIV 感染 mLCs により誘導される Treg 細胞と HIV 非感染 mLCs により誘導される Treg 細胞の T 細胞増殖抑制能は同等であった (図 2a-c)。

図 2

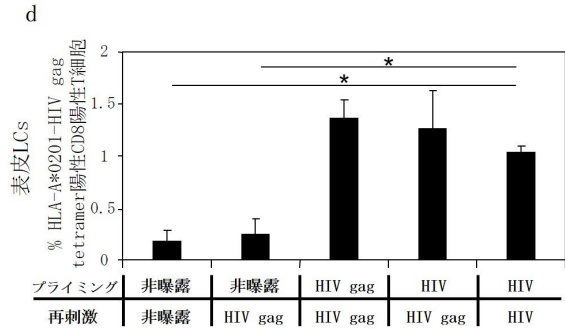
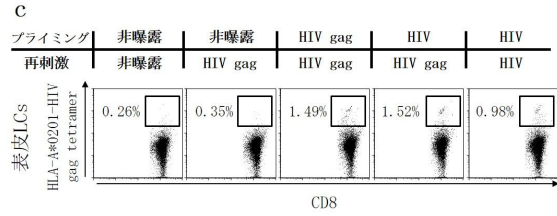
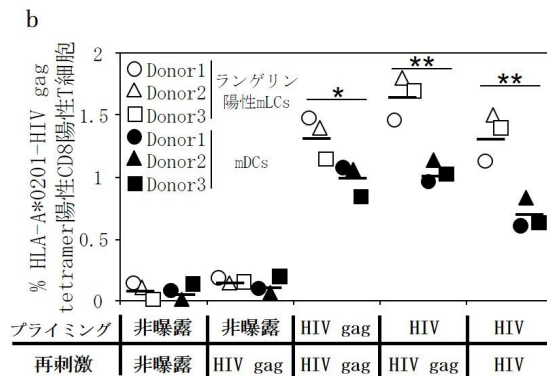
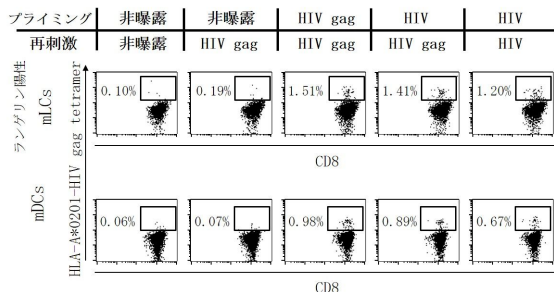




(4) HIV 感染 LCs は、ナイーブ CD8 陽性 T 細胞からの HIV 特異的 CD8 陽性 T 細胞誘導能を有していた。

HLA-A*0201 陽性有償ボランティアからの mLCs ないし表皮 LCs と、ナイーブ CD8 陽性 T 細胞を用いた実験において、HIV 感染 mLCs ないし HIV 感染表皮 LCs は HIV gag 特異的 CD8 陽性 T 細胞を誘導することができた(図3a-d)

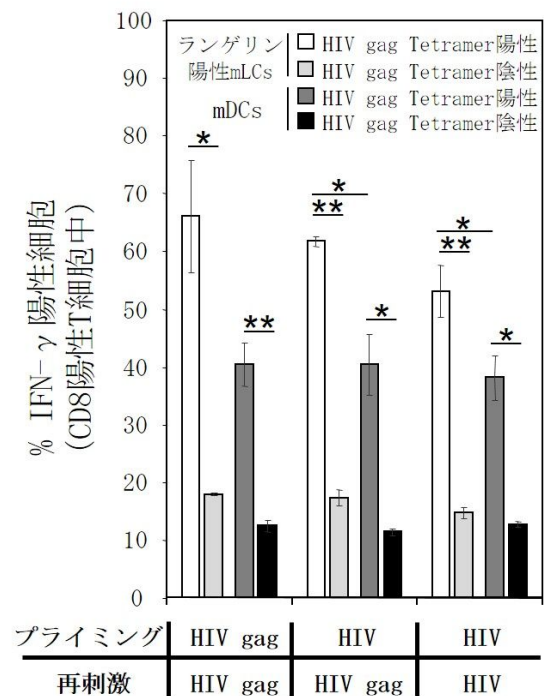
図3 a

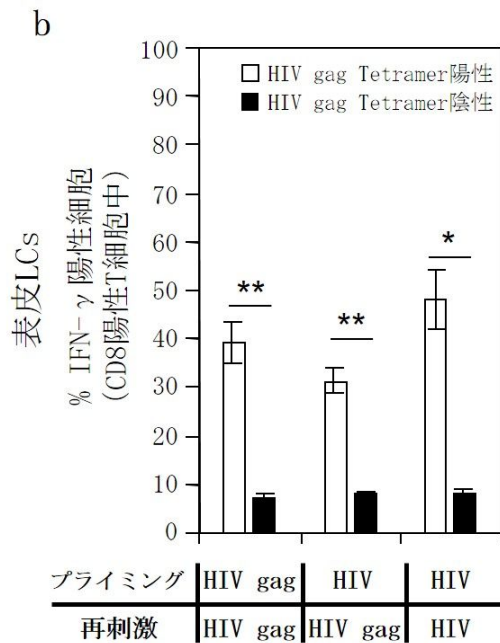


(5) HIV 感染 LCs により誘導される HIV 特異的 CD8 陽性 T 細胞は IFN- γ 産生能を有していた。

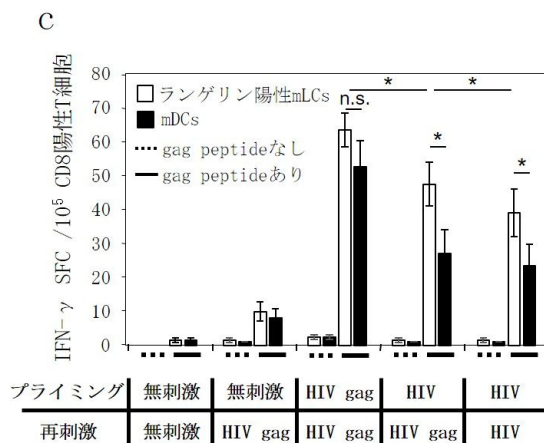
フローサイトメトリーによる検討において、HIV 感染 mLCs ないし HIV 感染表皮 LCs により誘導される HIV gag tetramer 陽性細胞は、HIV gag tetramer 陰性細胞より IFN- γ 陽性細胞の割合が有意に高値であった(図4a, b)。

図4 a





IFN- ELISPOT assay による検討において、HIV 感染 mLCs により誘導される HIV 特異的 CD8 陽性 T 細胞は、HIV gag ペプチド特異的に IFN- を産生した (図 4c)。



以上の結果より、HIV 感染 LCs は T 細胞増殖抑制能を有するエフェクター Treg 細胞誘導能が低下し、一方、IFN- 産生能を有する HIV gag 特異的 CD8 陽性 T 細胞を誘導した。

これらの結果を考慮すると、LCs は初期 HIV 感染細胞の一つとして重要であるばかりでなく、HIV 特異的免疫応答を高めることで後天性免疫不全症候群の発症を遅延させている可能性が示唆された。

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)

[学会発表](計3件)

発表者名: Takamitsu Matsuzawa

発表標題: New insights into immunological function of Langerhans cells in HIV in vitro and ex vivo infection

学会名: The 39th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology

発表年月日: 2014年12月13日

発表場所: ホテル阪急エキスポパーク

(大阪府・吹田市)

発表者名: Takamitsu Matsuzawa

発表標題: Immunological function of Langerhans cells in HIV in vitro and ex vivo infection

学会名: LC2015 14th International Workshop on Langerhans Cells (国際学会)

発表年月日: 2015年11月6日

発表場所: 京都市国際交流会館

(京都府・京都市)

発表者名: Takamitsu Matsuzawa

発表標題: Immunological function of Langerhans cells in HIV in vitro and ex vivo infection

学会名: The 40th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology

発表年月日: 2015年12月12日

発表場所: 岡山コンベンションセンター

(岡山県・岡山市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

松澤 高光 (MATSUZAWA Takamitsu)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号: 40568028