

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10235

研究課題名(和文) ヒスタミン受容体のHIV感染への関与

研究課題名(英文) The role of histamine receptor on HIV infection

研究代表者

小川 陽一 (Ogawa, Youichi)

山梨大学・大学院総合研究部・講師

研究者番号：20377542

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：体液中のHIV-1は粘膜・皮膚に暴露後、樹状細胞(DC)という抗原提示細胞に感染する。HIV-1感染DCは所属リンパ節へ遊走し、CD4陽性T細胞にHIV-1を受け渡すことで宿主のHIV-1感染が完成する。肥満細胞にはヒスタミン受容体(HR)が発現し、HR1-4までのサブタイプが存在する。HRはDCにも発現することが知られており、DCに発現するHRのHIV-1感染における役割を検討した。DCにはHR2が発現し、HR2を抑制する薬剤はDCにおけるHIV-1感染を有意に抑制した。このことは、臨床で頻用されるHR2受容体拮抗薬にHIV-1感染予防効果があることを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新規HIV感染数は未だ減少に転じず、新規HIV感染予防策の構築は重要な課題である。本研究において、HR2阻害薬がHIVの初期感染標的細胞であるDCにおいてHIV感染を抑制することが確認された。HR2阻害薬は臨床現場において、胃潰瘍薬として頻用されており、その安全性は担保されている。したがって、HIV感染リスクの高い集団においてHR2阻害薬の内服は、新規HIV感染率を減少させ、医療費の軽減に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Upon exposure of HIV-1 contained in biological fluid to mucosa and skin, HIV-1 infects dendritic cells, a type of antigen presenting cells. Subsequently, these HIV-1-infected DC migrates to draining lymph nodes and then transmits HIV-1 virions, resulting in the completion of HIV-1 infection in the body. Histamine receptor (HR) is predominantly expressed on mast cells, while DC also expresses some HR. We found that DC expressed HR2 and HR2 antagonist significantly suppressed HIV-1 infection in DC. In conclusion, HR2 antagonist that is in widespread clinical use inhibits HIV-1 acquisition in DC.

研究分野：ウイルス感染症

キーワード：HIV ヒスタミン受容体 PAF 樹状細胞 ランゲルハンス細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒスタミン受容体(HR)は現在までに4つのサブセットが同定されている(H1R, H2R, H3R, H4R)。粘膜・皮膚上皮に存在するランゲルハンス細胞(LC)はHIV感染時の初期感染標的細胞である。① LCにどのサブセットのHRが発現しているか、② LC上のHR刺激時あるいはHR阻害時にLCにおけるHIV感染率がどのように変容されるか、③ HR刺激時あるいはHR阻害時のHIV感染LCのHIV特異的CTL誘導能・制御性T細胞(Treg)誘導能の変容、はこれまで検討されていない。感染拡大に歯止めがかからないHIV感染において、臨床で頻用されるH1R・H2R阻害薬がHIV感染にどのような影響を持つのか、また未だ承認薬剤のないH3R・H4R阻害薬がHIV感染において功罪となるか検討することは臨床・創薬の点で大きな意義があると考えた。

### 2. 研究の目的

HIV初期感染標的細胞には、粘膜上皮・皮膚表皮に存在するLCと粘膜固有層・皮膚真皮に存在する樹状細胞(DC)の2種類がある。LC、DCについて以下の項目について検討を行った。

- (1) monocyte-derived LC/DC (mLC/mDC)におけるHRの発現
- (2) mLC/mDCをヒスタミンで刺激した際のHIV感染率の変化
- (3) mLC/mDCを血小板活性化因子(platelet activating factor; PAF)で刺激した際のHIV感染率の変化
- (4) mLC/mDCをHR agonistsあるいはantagonistsで処理した際のHIV感染率の変化
- (5) HIV感染率変容のメカニズム解析
- (6) 皮膚細胞を用いた研究結果の確認
- (7) 臍細胞を用いた研究結果の確認
- (8) 皮膚あるいは臍細胞を用いた、HIV特異的CTL誘導能・制御性T細胞(Treg)誘導能の変容

### 3. 研究の方法

上記2. 研究の目的に則して記載する。

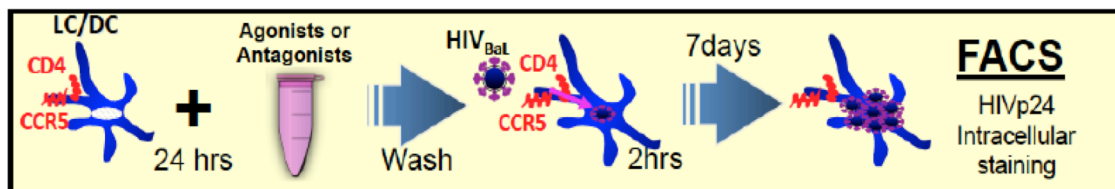
#### (1) monocyte-derived LC/DC (mLC/mDC)におけるHRの発現

PBMCからヒト単球をMACSで単離し、GM-CSF+IL-4 (mDC), GM-CSF+IL-4+TGF- $\beta$  (mLC)で1週間培養する。HRに対する信頼できる抗体は存在しないため、mDC, mLCにおけるmRNA levelでのHR発現をqPCRで検討した。

#### (2) mLC/mDCをヒスタミンで刺激した際のHIV感染率の変化

(3) mLC/mDCを血小板活性化因子(platelet activating factor; PAF)で刺激した際のHIV感染率の変化

#### (4) mLC/mDCをHR agonistsあるいはantagonistsで処理した際のHIV感染率の変化



mLC/mDCを(2)ヒスタミン、(3)PAF、(4)HR agonistsあるいはantagonistsで24時間前処理し、洗浄後にHIV-Balに感染させる。よく洗浄後、1週間培養し、mLC/mDCにおけるHIV感染率をp24 intracellular stainingで検討する。

#### (5) HIV感染率変容のメカニズム解析

mLC・mDCを各種HR agonist/antagonist存在下で24時間培養し、以下の分子の発現変化を検討する

- ① CD83, CD86, CCR7: LC・DCの活性化状態を反映する: flow cytometry
- ② CD4, CCR5: HIV receptor: flow cytometry
- ③ Langerin, DC-SIGN: HIV感染に関与するC-type lectin receptor: flow cytometry
- ④ APOBEC3G, TRIM5a, SAMHD1, Tetherin: 内因性HIV複製制御分子: Western blotting

#### (6) 皮膚細胞を用いた研究結果の確認

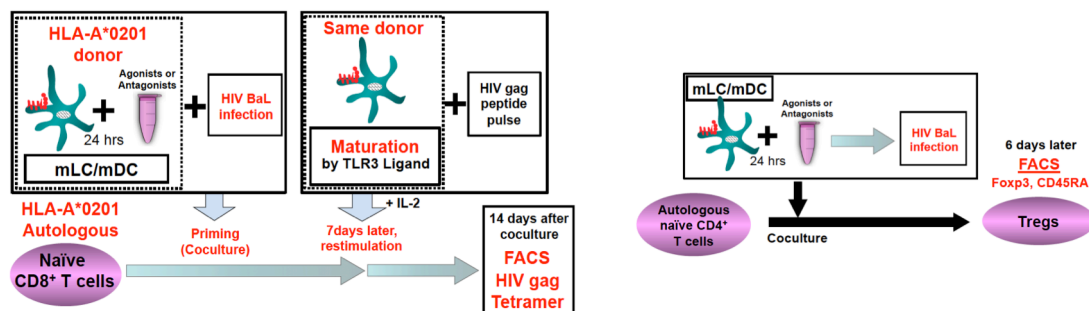
#### (7) 臍細胞を用いた研究結果の確認

上記で得られた結果を実際の皮膚・粘膜LC/DCを用いて確認する。

- ① ヒト皮膚・臍LC・DCの単離
- ② ヒト皮膚・臍組織をDispase IIで培養し、上皮と固有層に分ける。
- ③ 上皮・固有層をさらにLiberase TLで培養しsingle cell suspensionを作成する。
- ④ それぞれのsingle cell suspensionをLymphoprep ficallにかけ純度を上げる。
- ⑤ 最後にanti-CD1a microbeadsを用い、臍上皮single cell suspensionからLCを、粘膜固有層single cell suspensionからDCをpositive selectionする。純度はflow cytometryを用いて確認する。

検討内容は(1)～(5)と同様である。

(8) 皮膚あるいは腫細胞を用いた、HIV 特異的 CTL 誘導能・制御性 T 細胞(Treg)誘導能の変容



<HIV 特異的 CTL 誘導能>

- ① mLC・mDC に各種 agonist/antagonist 存在下で 24 時間培養・洗浄後、HIV BaL に 2 時間感染させ、autologous の naive CD8 陽性細胞と共培養し priming を行う
- ② 7 日後、同一のドナーから作成した mLC・mDC に HIV gaga pepetide をパルスし、培養 CD8 陽性細胞を boosting する
- ③ 14 日後に HIV gag 特異的 CTL 誘導率を HIV gag tetramer を用い flow cytometry にて評価する

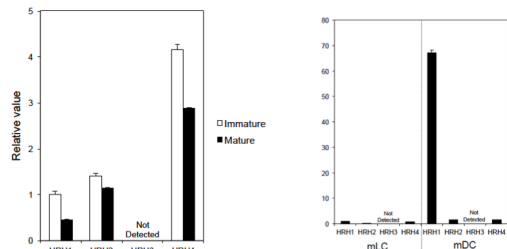
<制御性 T 細胞(Treg)誘導能>

- ① mLC・mDC に各種 agonist/antagonist 存在下で 24 時間培養・洗浄後、HIV BaL に 2 時間感染させ、autologous の naive CD4 陽性細胞と共培養する
- ② 6 日後、Treg 誘導能を CD4, CD45RA, FoxP3 に対する抗体で染色し評価する。

4. 研究成果

上記 2. 研究の目的に則して記載する。

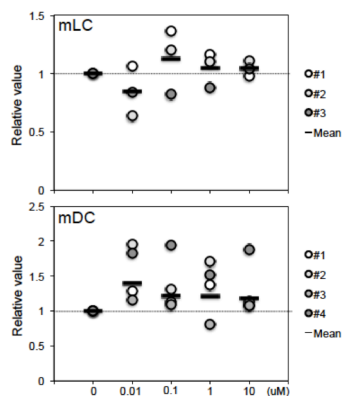
(1) monocyte-derived LC/DC (mLC/mDC)における HR の発現



左図) Immature mLC は mRNA level で HR4 > HR2 > HR1 の順に発現をしている。Mature mLC では発現レベルが低下する傾向にあった。HR3 は immature/mature mLC とともに発現していなかった。  
右図) mDC は強く HR1 を発現していた。mLC と同様に HR3 は発現しない。

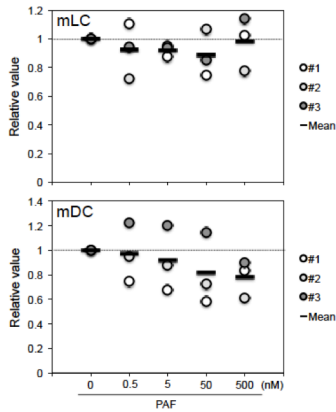
mLC では HR1, HR2 の発現はタンパクレベルで確認できなかった。したがって、mLC: HR4, mDC: HR1, HR2, HR4 を発現していることが明らかとなった。

(2) mLC/mDC をヒスタミンで刺激した際の HIV 感染率の変化



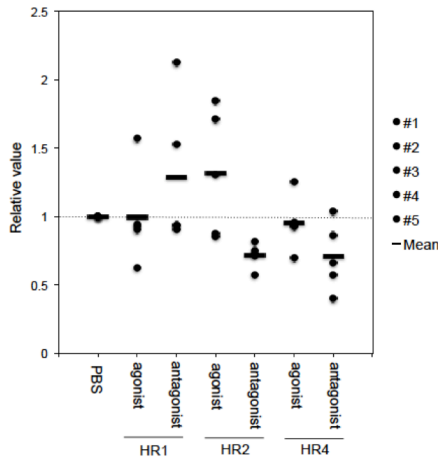
HR を刺激する主要物質はヒスタミンであり、まずヒスタミンの mLC, mDC における HIV 感染率の変容を検討した。mLC においては、ヒスタミンは HIV 感染率に影響しない。mDC においては、ヒスタミンは HIV 感染率を増強する傾向にあり、特に低濃度の 0.01uM では有意に HIV 感染率を増強した。

(3) mLC/mDC を血小板活性化因子 (pletlet activating factor ; PAF)で刺激した際の HIV 感染率の変化



LC/DC は PAF 受容体を発現することも知られており、主に肥満細胞から放出される PAF の mLC/mDC における HIV 感染率の変容を検討した。  
 mLC においては、PAF は HIV 感染率に影響しない。  
 mDC においては、PAF は HIV 感染率を低下する傾向にあり、特に高濃度の 500nM では有意に HIV 感染率を低下した。

(4) mLC/mDC を HR agonists あるいは antagonists で処理した際の HIV 感染率の変化



mDC は HR1, HR2, HR4 を発現しており、それぞれの agonist, antagonist の mDC における HIV 感染率の変化を検討した。5 名の健常人 PBMC から作成した mDC で一定の傾向を示したものは、HR2 antagonist であり、有意に mDC における HIV 感染率を減少した。

一方で、mLC は HR4 を発現しているが、HR4 の agonist, antagonist は mLC における HIV 感染率を変化しなかった。

これらの結果からヒスタミン、PAF、HR2 antagonist などは mDC において HIV 感染を変容することが明らかとなった。よって、以後は mDC について検討を継続した。

(5) HIV 感染率変容のメカニズム解析

- ① LPS による mDC 活性化を FACS にて CD83, CD86 の発現で評価したところ、HR2 antagonist, PAF 存在下では mDC の活性化が抑制された。
  - ② HR2 antagonist は HIV 受容体である CD4 の発現を低下し、PAF は HIV 受容体である CCR5 の発現を低下した。
  - ③ HR2 antagonist, PAF は内因性抗 HIV 因子のひとつである APOBEC3G の発現を増強した。
- これらの結果から、HR2 antagonist, PAF は HIV 受容体の発現低下、また内因性抗 HIV 因子の発現増強を介して mDC における HIV-1 感染を抑制することが明らかとなった。

(6) 皮膚細胞を用いた研究結果の確認

皮膚 DC を単離し、上記で得られた知見を確認した。

(7) 臍細胞を用いた研究結果の確認

世界的には HIV 感染は異性間性行为で感染するリスクが高い。したがって、上記の皮膚 DC のみならず、臍 DC でも同様の知見が得られるか検討する予定である。

(8) 皮膚あるいは臍細胞を用いた、HIV 特異的 CTL 誘導能・制御性 T 細胞(Treg)誘導能の変容  
 mDC, 皮膚 DC, 臍 DC を用いて、HR2 antagonist, および PAF が HIV 特異的 CTL 誘導能・制御性 T 細胞(Treg)誘導能を変容するか検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----