

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460500

研究課題名(和文) ヒト化マウスにおける樹状細胞を介したHIV感染伝播動態のin vivo解析

研究課題名(英文) In vivo analysis of HIV transmission via dendritic cells in humanized mice

研究代表者

寺原 和孝 (Terahara, Kazutaka)

国立感染症研究所・免疫部・主任研究官

研究者番号：50469954

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はHIV-1感染伝播における樹状細胞の役割についてヒト化マウスモデルで明らかにすることを目的とした。ヒト化マウスは樹状細胞等の骨髄系細胞の分化が乏しいため、まず、ヒト由来サイトカインであるGM-CSFおよびFlt3-Lの導入による樹状細胞の分化誘導について検討したところ、骨髄系樹状細胞亜集団であるBDCA-1+ MDC1およびBDCA-3+ MDC2の顕著な分化誘導が可能となった。そして、これらヒト化マウスにHIV-1を感染させた結果、感染前の単球数と感染後1週目の血中ウイルス量が有意に相関した。つまり、HIV-1初期感染において樹状細胞がその伝播効率に関与することが推察された。

研究成果の概要(英文)：This study was aimed at elucidating the role of dendritic cells (DCs) on HIV-1 transmission in vivo using humanized mice. Because the development of myeloid-lineage immune cells including DCs is poor in conventional humanized mice, introduction of human GM-CSF and Flt3-L into humanized mice was tested to induce DCs. As a result, two myeloid DC subsets, BDCA-1+ MDC1 and BDCA-3+ MDC2, were significantly induced by treatment with these cytokines. When these DC-induced humanized mice and control humanized mice were infected with HIV-1, a significant correlation between the absolute cell number of blood monocytes pre-infection and the plasma viral load at 1 week post-infection was observed. This result suggests that DCs are involved in the efficacy of HIV-1 transmission in vivo at the early phase of infection.

研究分野：感染免疫学

キーワード：ヒト化マウス 樹状細胞 HIV T細胞 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

ヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus: HIV) の感染経路は性的接触による経粘膜感染が大半を占める。粘膜や皮下組織には樹状細胞サブセットが広く分布しており、このような樹状細胞群は侵入した病原体に対する免疫監視的な役割を果たす一方、HIV に対してはその感染受容体を有することから最初の感染標的ともなり得る。抗原を補足した樹状細胞は、同様に粘膜固有層などの末梢組織に散在するエフェクターメモリーCD4陽性T細胞や所属リンパ節内の静止期 CD4 陽性 T 細胞に対して抗原提示を行うが、樹状細胞が HIV 感染を許容した場合にはその際に形成される免疫シナプスを介して CD4 陽性 T 細胞へのウイルス伝播が効率的に進み、結果として全身系へのウイルス伝播が拡大することが in vitro での解析から想定されている。しかしながら、このような細胞-細胞間を介したウイルス感染・伝播が実際に個体レベルでの感染進行にどの程度関わっているのかは不明である。

ヒト化マウスは重度免疫不全マウスにヒト造血幹細胞を移植することでヒト免疫系を構築させたものであり、HIV 感染動物モデルとしても広く使用されている。しかしながら、HIV 感染ヒト化マウスモデルによる樹状細胞の病態生理学的解析は行われておらず、その理由として T 細胞と比較して樹状細胞の分化が乏しいためであると考えられる。

2. 研究の目的

ヒト化マウス内の樹状細胞を分化誘導させる目的として、ヒトサイトカインの導入を検討した。そして、樹状細胞の分化が誘導されたヒト化マウスによる HIV-1 感染モデルでの解析により、樹状細胞を介した HIV 感染伝播の病態生理学的意義について in vivo で明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト化マウスの構築ならびにヒト GM-CSF および Flt3-L の導入

生後 2 日以内の NOD/SCID/Jak3 KO マウス肝臓に、ヒト臍帯血由来造血幹細胞を移植した。移植後 15-17 週のヒト化マウスにヒト GM-CSF および Flt3-L をコードする発現プラスミドを静脈接種し、hydrodynamic 法による in vivo トランスフェクション (IVT) を行った。IVT 後 10 日目まで経時的に採血し、血漿中の各サイトカインについて CBA 法による定性・定量解析を行った。

(2) サイトカイン導入ヒト化マウスにおける骨髓系細胞分化の解析

IVT 後 10 日目までの末梢血 CD14⁺単球頻度の経時変化、および IVT 後 10 日目の脾臓における樹状細胞頻度および性状についてフローサイトメトリー解析を行った。

(3) ヒト化マウスへの HIV-1 感染

サイトカイン誘導および非誘導ヒト化マ

ウスに対し、DsRed が組み込まれた CCR5 指向性 HIV-1 (HIV-1_{AD8-D}) を経静脈接種した。ウイルス接種後、経時的に採血して得られた血漿サンプルを用い、定量的 real-time RT-PCR 法によりウイルスのコピー数を同定した。

4. 研究成果

(1) IVT による GM-CSF および Flt3-L の発現誘導

通常状態 (IVT 前) のヒト化マウスではヒト GM-CSF、Flt3-L の産生は認められないものの、発現プラスミドによる IVT の結果、両サイトカインともに少なくとも 10 日目まで発現誘導が認められた (図 1)。

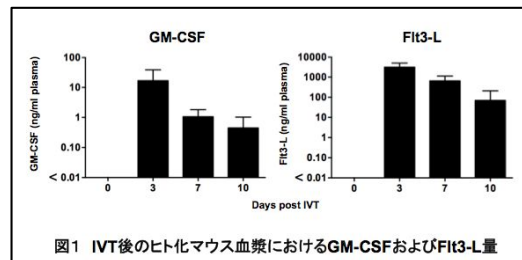


図1 IVT後のヒト化マウス血漿におけるGM-CSFおよびFlt3-L量

(2) IVT 後の末梢血 CD14⁺単球の分化誘導

末梢血における CD14⁺単球頻度について解析した結果、コントロール群では一定の頻度で維持されているのに対し、サイトカイン導入群では有意な上昇が IVT 後 7 日目以降で認められた (図 2)。

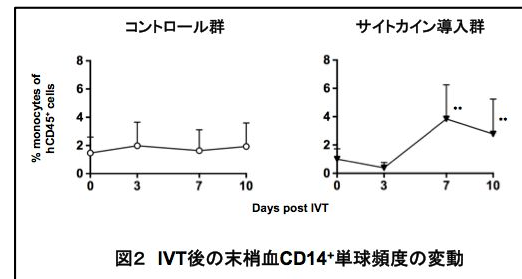


図2 IVT後の末梢血CD14⁺単球頻度の変動

(3) IVT 後の樹状細胞の分化誘導

IVT 後 10 日目の脾臓における樹状細胞亜集団 (BDCA-1⁺ MDC1、BDCA-3⁺ MDC2、CD123⁺ pDC) の頻度について解析した結果、サイトカイン導入群の MDC1 および MDC2 はコントロール群と比較して顕著に上昇した。一方、pDC はサイトカイン導入群の方が有意に低下したが、その差は僅かであった (図 3)。

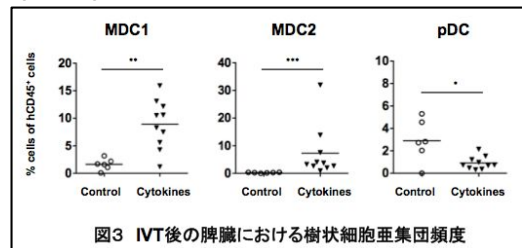


図3 IVT後の脾臓における樹状細胞亜集団頻度

(4) IVT 後の樹状細胞の性状変化

上記 (3) の各樹状細胞亜集団における成

熟度関連マーカー群の発現について解析した。その結果、成熟に伴い発現が上昇するとされる CD40、CD80、CD86、CXCR4 については、サイトカイン導入群ではいずれの細胞集団においてもコントロール群と比較して同等かそれ以上の発現レベルを示した。また、成熟に伴い発現が低下するとされる CCR5 は、サイトカイン導入群の MDC2 でその発現が低下していた(図4)。以上の結果から、サイトカイン導入により全ての樹状細胞亜集団で成熟度が進行していることが推察された。

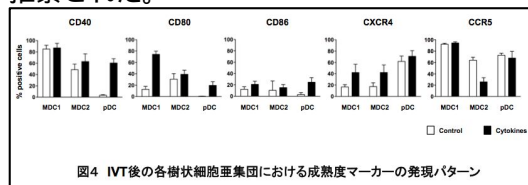


図4 IVT後の各樹状細胞亜集団における成熟度マーカーの発現パターン

(5) IVT後のT細胞の性状変化

上記(3)および(4)と同様に IVT 後 10 日目の脾臓における T 細胞の性状解析を行った。その結果、サイトカイン導入群では CD4⁺T 細胞集団中の FoxP3⁺細胞頻度が顕著に上昇していた(図5A)。さらに分化度を解析した結果(図5B)、サイトカイン導入群の CD4⁺ ヘルパーT 細胞においてナイーブ細胞頻度が低下し、セントラルメモリー細胞の頻度が上昇しており、サイトカイン導入による分化の進行が認められた。一方、CD8⁺ T 細胞の分化度についてはサイトカイン導入による有意な変化を認めなかった。なお、FoxP3⁺細胞はコントロール群・サイトカイン導入群ともにその殆どがセントラルメモリー細胞で占められていた。

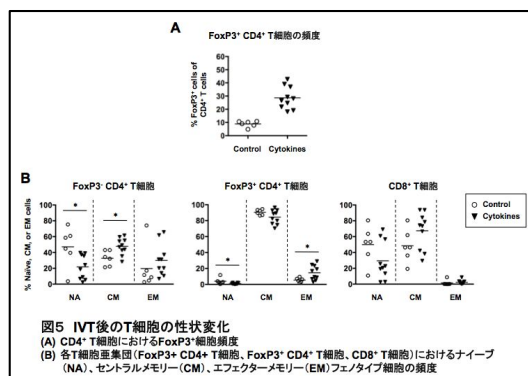


図5 IVT後のT細胞の性状変化
(A) CD4⁺T細胞におけるFoxP3⁺細胞頻度
(B) 各T細胞亜集団(FoxP3⁺CD4⁺T細胞、FoxP3⁺CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞)におけるナイーブ(NA)、セントラルメモリー(CM)、エフェクターメモリー(EM)フェノタイプ細胞の頻度

(6) サイトカイン導入ヒト化マウスへの HIV-1 感染

サイトカイン非導入および導入ヒト化マウスに HIV-1 を感染させ、末梢血単球と産生ウイルス量との関係について解析を行った。その結果、感染前の単球数と感染後 1 週目の血中ウイルス量との間に有意な相関を認められた(図6)。これまで、感染早期(感染後 1 週目)のウイルス量と CD4⁺ T 細胞数は関連しないことが示されており(Terahara et al., 2013) CD4⁺ T 細胞以外の HIV-1 感染性を有する樹状細胞やマクロファージといった

細胞が in vivo における HIV-1 初期伝播に關与することが推察された。どのような細胞集団が実際に in vivo における HIV-1 伝播に關与するのか、また、どのようなメカニズムによるのかが今後の解明すべき点である。

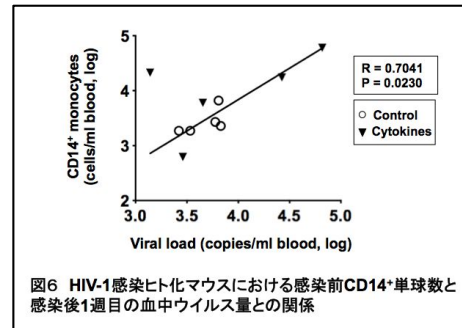


図6 HIV-1感染ヒト化マウスにおける感染前CD14⁺単球数と感染後1週目の血中ウイルス量との関係

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6件)

Wada Y, Nithichanon A, Nobusawa E, Moise L, Martin W, Yamamoto N, Terahara K, Hagiwara H, Odagiri T, Tashiro M, Lertmemongkolchai G, Takeyama H, Groot AD, Ato M, Takahashi Y. A humanized mouse model identifies key amino acids for low immunogenicity of H7N9 vaccines. *Sci Rep.* 2017, 7(1), 1283. doi: 10.1038/s41598-017-01372-5.

Tsunetsugu-Yokota Y, Kobayashi-Ishihara M, Wada Y, Terahara K, Takeyama H, Kawana-Tachikawa A, Tokunaga K, Yamagishi M, Martinez J.P, Meyerhans A. Homeostatically maintained resting naive CD4⁺ T cells resist latent HIV reactivation. *Front Microbiol.* 2016, 7, 1944. doi: 10.3389/fmicb.2016.01944.

Mitsuki Y-y, Yamamoto T, Mizukoshi F, Momota M, Terahara K, Yoshimura K, Harada S, Tsunetsugu-Yokota Y. A novel dual luciferase assay for the simultaneous monitoring of HIV infection and cell viability. *J Virol Methods.* 2016, 231, 25-33. doi: 10.1016/j.jviromet.2016.02.006.

Terahara K, Ishige M, Ikeno S, Okada S, Kobayashi-Ishihara M, Ato M, Tsunetsugu-Yokota Y. Humanized mice dually challenged with R5 and X4 HIV-1 show preferential R5 viremia and restricted X4 infection of CCR5⁺CD4⁺ T cells. *Microbes Infect.* 2015, 17, 378-386. doi: 10.1016/j.jmicin.2015.02.002.

Terahara K, Ishii H, Nomura T, Takahashi N, Takeda A, Shiino T, Tsunetsugu-Yokota Y, Matano T. Vaccine-induced CD107a⁺ CD4⁺ T cells

are resistant to depletion following AIDS virus infection. *J Virol.* 2014, 88(24), 14232-14240. doi: 10.1128/JVI.02032-14.
Kobayashi-Ishihara M, Takahashi H, Ohnishi K, Nishimura K, Terahara K, Ato M, Itamura S, Kageyama T, Tsunetsugu-Yokota Y. Broad cross-reactive epitopes of the H5N1 influenza virus identified by murine antibodies against the A/Vietnam/1194/2004 hemagglutinin. *PLoS ONE.* 2014, 9(6), e99201. doi: 10.1371/journal.pone.0099201.

〔学会発表〕(計 12 件)

Kobayashi-Ishihara M, Martinez JP, Terahara K, Meyerhans A, Tsunetsugu-Yokota Y. Exploring a mechanism of HIV latency in homeostatically maintained CD4+ T cells. 第 46 回日本免疫学会総会・学術集会、沖縄、2016 年 12 月
Nomura T, Yamamoto H, Terahara K, Seki S, Matano T. Analysis of proviral genome sequences in lymph nodes in SIV-infected rhesus macaques. 2nd Kumamoto IRCMS International Symposium and 17th Kumamoto AIDS Seminar、熊本、2016 年 10-11 月
Nomura T, Yamamoto H, Terahara K, Seki S, Matano T. Proviral genome sequences in lymph nodes and bone marrows in SIV-infected rhesus macaques. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2016 年 10 月
Kobayashi-Ishihara M, Terahara K, Ato M, Tsunetsugu-Yokota Y. Maintenance of HIV latency by HIV-1 encoded antisense RNAs. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2016 年 10 月
Nomura T, Yamamoto H, Terahara K, Seki S, Matano T. Analysis of proviral genome sequences in multiple cell subsets in SIV-infected rhesus macaques. 34th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, New Orleans, October 11-14, 2016.
寺原和孝、岩淵龍太郎、小林-石原美栄、横田-恒次恭子：HIV-1 感染初期における CD4 陽性 T 細胞の細胞死誘導と caspase 分子群の関連について：ヒト化マウスモデルでの解析、第 89 回日本生化学会大会、仙台、2016 年 9 月
小林-石原美栄、寺原和孝、池野翔太、阿戸学、横田-恒次恭子：アンチセンス鎖を介した HIV-1 潜伏化制御について、第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会 合同大会、神戸、2015 年 12 月

Ikeno S, Terahara K, Tsunetsugu-Yokota Y. Induction of human cytokines in humanized mice improves myeloid cell development and antigen-specific antibody production. 第 43 回日本免疫学会総会・学術集会、京都、2014 年 12 月
和田倭、小林(石原)美栄、寺原和孝、池野翔太、徳永研三、立川(川名)愛、山岸誠、竹山春子、横田(恒次)恭子：恒常的に培養維持された CD4 陽性 T 細胞への HIV-1 の感染とその転写制御機構の解明、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
池野翔太、寺原和孝、駒瀬勝啓、竹田誠、森川裕子、竹山春子、横田(恒次)恭子：ヒト化マウスの麻疹ウイルスベクター評価系への応用(3)、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
寺原和孝、石毛真行、池野翔太、小林(石原)美栄、岡田誠治、横田(恒次)恭子：R5・X4 HIV-1 混在感染ヒト化マウスの感染早期にみられる R5 ウイルス優位性とその要因の検討、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)
取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺原 和孝 (TERAHARA, Kazutaka)
国立感染症研究所・免疫部・主任研究官
研究者番号：50469954

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

横田 恭子 (YOKOTA, Yasuko)
東京工科大学・医療保健学部・教授
研究者番号：20182701

(4) 研究協力者

岩淵 龍太郎 (IWABUCHI, Ryutaro)