

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04221

研究課題名（和文）HIV-1潜伏感染細胞fibrocytesの意義と特性の解明

研究課題名（英文）Characterization of HIV-1 latently-infected fibrocytes

研究代表者

鈴 伸也（Suzu, Shinya）

熊本大学・ヒトレトロウイルス学共同研究センター・教授

研究者番号：80363513

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではfibrocytesを新たなHIV-1潜伏感染細胞の候補として同定した。まず、未治療感染者の解析を通してfibrocytesがHIV-1に感染していること、そしてそのHIV-1高感受性のメカニズムを明らかにした。HIV-1感染に伴ってfibrocytes数が増多することも見出した。これらの結果はHIV-1近縁のサル指向性ウイルスSIVを感染させたサルでも確認された。そして長期治療したかHIV-1感染者の解析を通して、fibrocytesが静止期CD4+ T細胞に匹敵する、重要な潜伏感染細胞である可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

潜伏感染は薬剤耐性ウイルスと並んで、エイズ研究領域で解決すべき重要な課題でとなっている。これまで代表的な潜伏感染細胞として静止期CD4+ T細胞がよく知られているが、排除する治療法は未だなく、そもそもこれらが潜伏感染全体をカバーするかもまだ明らかではない。従って、全ての潜伏感染細胞を一つずつ同定して、そしてそれらの相対的な貢献度を明確にする必要があり、本研究では私達のオリジナルのfibrocytesについて実践したものである。

研究成果の概要（英文）：In this study, we identified fibrocytes as a candidate for HIV-1 latently infected cells. First, we revealed that fibrocytes are infected with HIV-1 through analyses of treatment-naïve patients, and mechanisms by which HIV-1 efficiently infects fibrocytes. We also found that the number of fibrocytes increases in HIV-1 infection, which persists even after long-term anti-retroviral therapy. Similar results were observed in monkeys infected with HIV-1-related monkey-tropic virus SIV. Finally, we revealed that not only resting CD4+ T cells but also fibrocytes are important HIV-1 latently infected cells through analyses of long-term treated patients whose viral load in plasma is undetectable.

研究分野：感染症

キーワード：エイズ 潜伏感染

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

HIV-1 は薬剤で十分にコントロールされるようになったが、体内から完全に排除されてはいないため、感染者は生涯に渡って服薬を強いられる。主な原因の一つは HIV-1 の潜伏感染である。静止期の CD4⁺T 細胞における潜伏感染が良く知られ、活発に研究されているものの、排除する治療法は未だ確立されていないのが現状である。一方で、治療後の感染者検体を用いたウイルス配列の解析などから、静止期 CD4⁺T 細胞以外にも潜伏感染する事が分かっているが、細胞としての実体はまだ十分に解明されていない。従って、潜伏感染克服には、静止期 CD4⁺T 細胞の排除に向けた取り組みに加え、未解明の部分が多く残る、他の潜伏感染細胞の同定も重要となっている。

私たちは HIV-1 と単球・マクロファージの相互作用について長年、研究しているが (Blood 2005, 2008; Cell Death Differ 2010; J Immunol 2012, 2014, 2016 など) 近年、単球・マクロファージと線維芽細胞の両方の性質を併せ持つ、新たな血液細胞としての fibrocytes (fibroblastic leukocytes 総説: Nat Rev Immunol 2011) の発見に着目し、HIV-1 が fibrocytes に感染するか解析してきた。その結果、まだ治療が始まっていない HIV-1 慢性感染者の末梢血中 fibrocytes に全例で HIV-1 ゲノムを検出してきた。その検出頻度は単球よりも高く、つまり HIV-1 に高感受性であることを初めて明らかにした。そして、これら ex vivo の結果は初代培養ヒト fibrocytes を用いた in vitro 解析でも確認した。つまり、fibrocytes を HIV-1 宿主細胞として初めて同定した (Hashimoto et al, J Immunol 2015)。

一方、fibrocytes は HIV-1 には良く感染するもののウイルス産生自体は弱い、つまり、fibrocytes に HIV-1 が潜伏感染している可能性を見出してきた。例えば、初代培養ヒト fibrocytes では HIV-1 ゲノムコピー数に比べ HIV-1 mRNA 発現量が非常に低く (J Immunol 2015) そして少数の解析例ではあるが、治療後に血中 HIV-1 量が検出限界以下になった慢性感染者の末梢血中 fibrocytes でも HIV-1 ゲノムを検出した。事実、HIV-1 近縁のサル免疫不全ウイルス SIV を感染させたサルの腸間膜リンパ節および末梢血中の fibrocytes は感染しているものの、やはり、ウイルス抗原量は CD4⁺T 細胞よりも明らかに低い事を見出している (未発表)。以上から、fibrocytes が新たな HIV-1 潜伏感染細胞である可能性が高く、今後、静止期 CD4⁺T 細胞等との比較解析を行ない、未だ分かっていない、潜伏感染全体における fibrocytes の貢献度を明確にする研究が必要となってきた。

2. 研究の目的

潜伏感染は薬剤耐性ウイルスと並んで、エイズ研究領域で解決すべき重要な課題となっている。これまで潜伏感染細胞として静止期 CD4⁺T 細胞が良く知られ、最近では 2 次リンパ節組織特有の CD4⁺T 細胞である濾胞性ヘルパー T 細胞 (TFH 細胞) でも可能性が指摘されている (Nat Med 2015) しか、これらを排除する治療法は未だなく、これらが潜伏感染全体をカバーするかも明らかではない。従って、全ての潜伏感染細胞を一つずつ同定して、そしてそれらの相対的な貢献度を明確にする必要があり、本研究ではオリジナルの fibrocytes について実践する。以下の 2 つの観点を軸に研究を進める。

柱 1: 潜伏感染全体に占める fibrocytes の貢献度と特性を明らかにする。

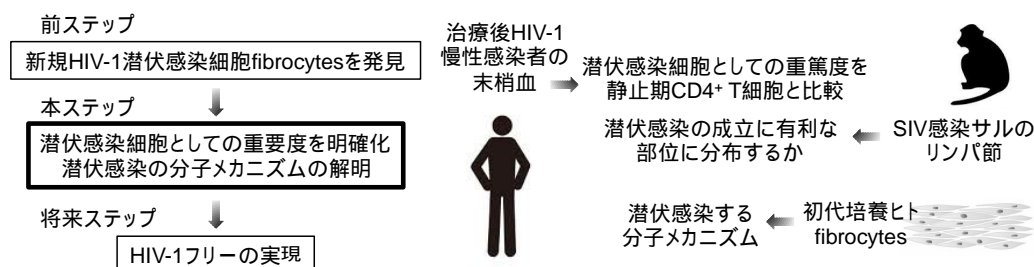
- ・潜伏感染の全体プールに占める fibrocytes の貢献度を明確にする。そのためにまず、治療後の慢性感染者の末梢血中の fibrocytes と静止期 CD4⁺T 細胞などに組み込まれたウイルスゲノムの総数を比較する。ウイルス遺伝子配列も解析して、2 つの細胞群で感染したウイルスに違いがあるかも調べる。

- ・感染性のウイルスを産生し得るかも潜伏感染細胞の重要な特性なので、治療後の慢性感染者の末梢血中 fibrocytes の HIV-1 遺伝子発現を活性化して、その後に感染性ウイルスを放出するか解析する。

- ・潜伏感染の成立には細胞の組織内分布も重要な要因なので、感染サルのリンパ節を中心に、細胞傷害性 T 細胞 CTL、抗体、抗エイズ薬が到達しにくい部位に fibrocytes が分布するか解析する。

柱 2: HIV-1 が fibrocytes に潜伏感染する分子メカニズムを明らかにする。

- ・未だ不明の、fibrocytes における HIV-1 潜伏感染の分子メカニズムを、転写因子群の発現・動態を中心とした観点から解析する。最近見出している、初代培養ヒト fibrocytes の潜伏感染を排除するサイトカインや化合物を応用する。



3. 研究の方法

潜伏感染全体における fibrocytes の貢献度と特性を明らかにするために、以下、3つの主な材料について複数の観点から解析を行う。

- (1) 治療後の感染者末梢血中の fibrocytes および静止期 CD4⁺ T 細胞に組み込まれたウイルスゲノムの総数をソーティング・PCR で定量比較する。
- (2) ソーティング後に培養・活性化して、潜伏感染 fibrocytes が感染性ウイルスを産生するかも定量する。
- (3) 一方で、感染サルリンパ節において、CTL 等がアクセスしにくい部位に感染 fibrocytes が分布するかも免疫染色で解析する。
- (4) さらに、HIV-1 遺伝子転写を活性化する化合物を応用し、初代培養ヒト fibrocytes に潜伏感染する分子メカニズムを転写因子の発現から解析する。

4. 研究成果

(1) 新たな HIV-1 感染細胞としての fibrocytes

未治療 HIV-1 慢性感染者の末梢血細胞を様々な分画に分けて解析し (n=6)、全例において fibrocytes 中に HIV-1 プロウイルスを検出した。一方、同じ解析条件下において、対照とした単球が陽性であった例はわずか3例にとどまった。以上から fibrocytes が新たな HIV-1 感染細胞であり、そして実際に感染者内では単球よりも高頻度に感染している、つまり HIV-1 感受性が高いことも明らかとなった。

(2) 完全長プロウイルス解析

また、上記解析においては、未治療感染者1例において、末梢 fibrocytes にほぼ完全長のプロウイルスを検出し、fibrocytes がこれまで報告されていない、新たな HIV-1 感染細胞である事実がさらに実証された。

(3) 易感染性のメカニズム

次に、fibrocytes が HIV-1 に高感受性を示すメカニズムを解析した。まず、単球と fibrocytes は全体の遺伝子発現プロファイルにおいては大きな違いはないものの、HIV-1 受容体 (CD4) および共受容体 (CCR5 および CXCR4) については、単球よりも fibrocytes が明らかに強く発現することを見出した。一方で、今度は逆に、SAMHD1 や MX2 といった、いわゆる抗 HIV-1 宿主因子 (= HIV-1 の複製や増殖を阻害する細胞側のタンパク質) の発現が弱いことも見出した。SAMHD1 と MX2 はどちらも感染初期過程を阻害する因子であり、HIV-1 受容体の発現が高いという、HIV-1 感染を促進する方に働く2つのユニークな性質により、fibrocytes が HIV-1 に易感染すると考えられた。

(4) 感染に伴う末梢 fibrocytes 数の増多

一方、HIV-1 感染者の末梢 fibrocytes 数が健常人 (HIV-1 非感染者) よりも多いことを見出した。さらには、長期間、治療して、血中ウイルス量が検出限界以下になった感染者においても、依然、高いレベルを示した。この結果は、成人 (日本のコホート) だけでなく、小児 (ジンバブエのコホート) でも確認された。HIV-1 感染者は長期治療後も全身性の慢性炎症が持続することが知られ、血中 IL-6 の高値などが炎症マーカーとして知られているが、fibrocytes 数の増多も新たなマーカーの一つとなる可能性が考えられる。

(5) 感染サルモデルの解析

感染者の解析と並行して、HIV-1 近縁のサル指向性ウイルス SIV を用いた解析も行った。まず、SIV 感染アカゲザルの腸間膜リンパ節中の fibrocytes に SIV タンパク質 Gag が検出された。つまり、fibrocytes における SIV 感染が確認された。さらに、HIV-1 感染者の末梢で認められたように、SIV 感染サルリンパ節においても fibrocytes 数の増多が認められた。一方、前述の fibrocytes 中の Gag 発現量は検出されるものの、マクロファージと比較すると弱いものであった。さらに免疫染色に解析から、fibrocytes は CTL とは必ずしもリンパ節内の局在が一致しないことも明らかとなった。つまり、SIV 感染アカゲザルのリンパ節においては fibrocytes が潜伏感染しやすい性質を有していることが明らかとなった。

(6) 長期治療 HIV-1 感染者の末梢 fibrocytes 解析

最後に、上記1と同様の解析を長期治療感染者でも行った (n=16)。そのプロウイルス頻度の解析の結果、fibrocytes が静止期 CD4⁺ T 細胞に匹敵する重要な潜伏感染細胞であることが明らかとなった。症例によっては (12.5% : 16例中2例) fibrocytes に高頻度に潜伏感染することも見出してきた。一方で近年、大半のプロウイルスには変異や欠失があり、それらからは感染性のあるウイルス粒子が産生されないことが報告されている。本感染者末梢血の解析においては、倫理的な観点から限られた細胞数から出発したため、fibrocytes から感染性ウイルスが産生されると言う証拠は得られなかったが、プロウイルス出現頻度が静止期 CD4⁺ T 細胞と同等であったことを考えると、fibrocytes が主要な HIV-1 潜伏感染細胞の一つであることが予想される。今後の詳細な解析が重要であろう。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Noyori Osamu, Komohara Yoshihiro, Nasser Hesham, Hiyoshi Masateru, Ma Chaoya, Pan Cheng, Carreras Joaquim, Nakamura Naoya, Sato Ai, Ando Kiyoshi, Okuno Yutaka, Nosaka Kisato, Matsuoka Masao, Suzu Shinya	4. 巻 8
2. 論文標題 Expression of IL 34 correlates with macrophage infiltration and prognosis of diffuse large B cell lymphoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical & Translational Immunology	6. 最初と最後の頁 e1074
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cti2.1074	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Maekawa Takaaki, Kato Shoichiro, Kawamura Toshikuni, et al	4. 巻 134
2. 論文標題 Increased SLAMF7high monocytes in myelofibrosis patients harboring JAK2V617F provide a therapeutic target of elotuzumab	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 814 ~ 825
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/blood.2019000051	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Maekawa T, Osawa Y, Izumi T, Nagao S, Takano K, Okada Y, Tachi N, Teramoto M, Kawamura T, Horiuchi T, Saga R, Kato S, Yamamura T, Watanabe J, Kobayashi A, Kobayashi S, Sato K, Hashimoto M, Suzu S, Kimura F	4. 巻 31
2. 論文標題 Myeloproliferative leukemia protein activation directly induces fibrocyte differentiation to cause myelofibrosis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 2709-2716
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/leu.2017.112.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Hesham Nasser, Partho Adhikary, Amira Abdel-Daim, Osamu Noyori, Hitoshi Takizawa, Ryusho Kariya, Seiji Okada, Shinya Suzu
2. 発表標題 Physiological macrophages with un-limited self-renewing capacity
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Osamu Noyori, Hesham Nasser, Omnia Abdel Rahman, Shinya Suzu
2. 発表標題 Virological and hematological analyses of fibrocytes in HIV-1-infected patients
3. 学会等名 第33回日本エイズ学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Noyori O, Nasser H, AbdelRahman O, Suzu S.
2. 発表標題 Virological and hematological analyses of fibrocytes in HIV- infected patients
3. 学会等名 19th Kumamoto AIDS Seminar (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shinya Suzu
2. 発表標題 New cellular reservoirs
3. 学会等名 9th IAS Conference on HIV Science/IAS2017 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Osamu Noyori, Shinya Suzu
2. 発表標題 Role of fibrocytes on latent HIV-1 infection in ART-treated patients
3. 学会等名 第65回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Osamu Noyori, Shinya Suzu
2. 発表標題 Latent HIV-1 infection in fibrocytes in vivo
3. 学会等名 18th Kumamoto AIDS Seminar (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shinya Suzu, Osamu Noyori
2. 発表標題 Fibroblast-like hematopoietic cells, fibrocytes, as novel HIV-1 latently infected cells
3. 学会等名 20th International Conference on Emerging Infectious Diseases (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔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
研究 分担者	野依 修 (Noyori Osamu) (30737151)	熊本大学・エイズ学研究センター・特定事業研究員 (17401)	