

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08800

研究課題名(和文) HIV感染初期ヒト化マウスにおける細胞死誘導と病態形成との関連性について

研究課題名(英文) Association between cell-death induction and pathogenesis in early phase of HIV infection 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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染に伴うCD4陽性T細胞数の減少は感染初期において一過性の細胞数減少がみられるが、誘導される細胞死の特徴や病態形成との関連は未だ明らかではない。そこで本研究では、HIV感染初期ヒト化マウスのCD4陽性T細胞において誘導される細胞死の解析を行った。脾臓CD4陽性T細胞における解析の結果、ウイルス接種後3日目の時点で有意な細胞死誘導が認められた。そして細胞死様式について解析した結果、誘導された細胞死の実態はアポトーシスではなくパイロトーシスやネクロトーシスを含む非アポトーシス性細胞死であった。以上の結果から、非アポトーシス性細胞死と炎症誘導との関連が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在世界的に行われている抗HIV療法は、ウイルス複製を抑え込みながら細胞死を抑制すると同時に、宿主本来の免疫恒常性によってCD4 T細胞数の回復を可能にする。そして、さらなる効果的な治療戦略として、感染早期に誘導される細胞死を防ぐ手段も提案されている。しかしながら、どのような様式の細胞死が誘導されるのかについては明らかになっていない。したがって、本研究で得られた知見は臨床応用に向けた論理基盤を確立する上で意義深いものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Although transient loss of CD4 T cells occurs during early HIV infection, it remains unclear the characteristics of induced cell death and their relevance to immunopathogenesis. In this study, CD4 T-cell death was characterized during the early phase of HIV-infected humanized mice. As a result, CD4 T-cell death was significantly induced at 3 days post-infection in the spleen, and the main body of induced CD4 T-cell death was non-apoptotic cell death including pyroptosis and necroptosis but not apoptosis. These results suggest a relevance between non-apoptotic CD4 T-cell death and immunopathogenesis such as induction of inflammation.

研究分野：感染免疫学

キーワード：HIV T細胞 ヒト化マウス 細胞死 アポトーシス パイロトーシス ネクロトーシス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus: HIV) 感染症ではウイルスの感染標的である CD4 T 細胞の枯渇が免疫不全の最大の要因となる。従来、HIV 感染症における CD4 T 細胞数減少については、「ウイルスによる直接的な細胞傷害効果」、「細胞傷害性 T 細胞や NK 細胞による HIV 感染細胞の排除」、「活性化誘導型細胞死を主としたウイルス非感染細胞における細胞死 (bystander 細胞死)」等が知られ、誘導される細胞死様式の殆どがアポトーシスであると説明されてきた。しかしながら近年、ウイルス産生に至らない HIV 感染 (不稔感染) がプログラム細胞死の一つであるパイロトーシスを誘導することがヒトリンパ組織由来細胞を用いた *ex vivo* の解析で明らかとなり、p24 タンパクあるいはウイルス RNA の発現がみられないことで定義付けられた従来の bystander 細胞死にはこのタイプの細胞死も含まれていた可能性が示唆された。このようなパイロトーシスに陥る細胞は主に休止期のナイーブ細胞であり、HIV の感染補助受容体の一つである CCR5 は殆ど発現していない。もう一つの感染補助受容体である CXCR4 はほぼ全ての CD4 T 細胞に発現していることから、パイロトーシスを誘導し得るのは主に CXCR4 指向性 (X4) ウイルスであると想定される。一方で、CCR5 を発現する CD4 T 細胞の多くは一度抗原刺激を受けたメモリー細胞であり、たとえ休止期であっても速やかに活性化され得るためウイルス産生を伴う増殖性感染に結びつきやすい。つまり、CCR5 指向性 (R5) ウイルスによる感染では不稔感染が回避され、パイロトーシスの誘導は起きにくいと考えられる。事実、ヒトのリンパ組織を用いた *ex vivo* の HIV 感染実験において、いわゆる “bystander 細胞死” は X4 ウイルスで誘導されるものの R5 ウイルスでは認められず、抗 CXCR4 抗体あるいは CXCR4 特異的阻害剤の添加により “bystander 細胞死” が抑制されることが 10 年以上前に報告されている。これら HIV 感染に伴う CD4 T 細胞数減少はエイズ発症期で顕著であるものの、感染初期においても全身レベルで一過性の減少がみられる。しかしながら、感染初期に誘導される細胞死とウイルスの指向性の違いを含めた感染様式との関連は未だ明確ではない。

2. 研究の目的

HIV 感染初期におけるウイルス感染様式の違いが細胞死誘導にどのように影響するか、ひいては病態形成にどのように影響するか、ヒト化マウスモデル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と HIV 感染

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。CD4 T 細胞の分化を確認したヒト化マウスに、CCR5 指向性 (R5) HIV-1 (HIV-1_{NL-AD8}) および DsRed レポーターを有する HIV-1_{NL-AD8-D}、あるいは CXCR4 (X4) HIV-1 (HIV-1_{NL432}) および EGFP レポーターを有する HIV-1_{NL-E} を経尾静脈接種した。

(2) フローサイトメトリー解析

HIV-1 非接種および HIV-1 接種後 3, 7, 14 日目のヒト化マウスから脾臓を摘出し、CD4 T 細胞における死細胞頻度、パイロトーシスのマーカーである活性型カスパーゼ 1 の発現細胞頻度、アポトーシスのマーカーである活性型カスパーゼ 3/7 の発現細胞頻度、Annexin V 結合細胞頻度についてフローサイトメトリー解析を行った。

(3) ウェスタンブロッティング

HIV-1 非接種および HIV-1 接種後 3 日目のヒト化マウスから脾臓を摘出し、CD4 T 細胞をセルソーターにて分取した。分取した CD4 T 細胞について SDS-PAGE を行い、ネクロトーシスのマーカーである phospho-MLKL (pMLKL) の発現についてウェスタンブロッティング解析を行った。

4. 研究成果

(1) 細胞死の誘導

R5 および X4 HIV-1 接種群ともに、非接種群と比較してナイーブ CD4 T 細胞集団では少なくとも 7 日目までに一過性の有意な細胞死誘導が認められた。一方、メモリー細胞集団では R5 および X4 HIV-1 接種群ともに全てのタイムポイントにおいて高いレベルの細胞死誘導が維持されていた。

(2) パイロトーシスおよびアポトーシスの誘導について

活性型カスパーゼ 1 および活性型カスパーゼ 3/7 の発現パターンから、CD4 T 細胞は 3 つの細胞集団に分画された (活性型カスパーゼ 1 単独陽性: 1-SP、活性型カスパーゼ 1・活性型カスパーゼ 3/7 両陽性: DP、活性型カスパーゼ 1・活性型カスパーゼ 3/7 両陰性: DN)。1-SP 画分は大きなサイズの細胞を含んでおり、高い Annexin V 結合性を有していたことからパイロトーシスの特徴を有していた。DP 画分は小さなサイズの細胞で構成され、高い Annexin V 結合性を有していたことからアポトーシスの特徴を有していた。DN 画分は様々なサイズの細胞から構成されていたことからヘテロな細胞集団であることが示唆され、Annexin V 結合性は低かった。そして、HIV-

1 接種ヒト化マウスの脾臓 CD4 T 細胞における各画分の頻度について非接種群と比較した結果、まず 1-SP 画分については、R5・X4 HIV-1 両接種群ともに少なくとも 7 日目までに一過性の誘導が認められたが、14 日目では非接種群と同レベルであった。DN 画分も R5・X4 HIV-1 両接種群ともに誘導され、14 日目まで高いレベルを維持していた。一方、DP 画分は R5・X4 HIV-1 両接種群ともに誘導されなかった。以上の結果から、HIV-1 感染後の早期にパイロトーシスが誘導される一方、アポトーシスは誘導されない（定常状態と同レベル）であることが明らかとなった。

(3) ネクロトーシスの誘導について

上記の解析から、HIV-1 感染により DN 画分も誘導されることを認めた。DN 画分はヘテロな細胞集団であることが示唆されるが、プログラム細胞死の一つであるネクロトーシスのフェノタイプと一致することから、そのマーカーである pMLKL の発現についてウエスタンブロッティングにより解析した。その結果、X4 HIV-1 接種群において pMLKL の発現が誘導されていることを認めた。一方で、R5 HIV-1 接種群では非接種群と同様に pMLKL の発現レベルは低かった。このことから、X4 HIV-1 感染によりネクロトーシスが CD4 T 細胞で誘導されることが明らかとなった。

以上、本研究において、HIV-1 感染初期の CD4 T 細胞にパイロトーシスやネクロトーシスといった非アポトーシス性細胞死が誘導されることが明らかとなり、炎症誘導との関連性が示唆された。

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 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Terahara K, Iwabuchi R, Hosokawa M, Nishikawa Y, Takeyama H, Takahashi Y, Tsunetsugu-Yokota Y	4. 巻 12
2. 論文標題 A CCR5+ memory subset within HIV-1-infected primary resting CD4+ T cells is permissive for replication-competent, latently infected viruses in vitro	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Research Notes	6. 最初と最後の頁 242
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13104-019-4281-5	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 Iwabuchi R, Ikeno S, Kobayashi-Ishihara M, Takeyama H, Ato M, Tsunetsugu-Yokota Y, Terahara K	4. 巻 9
2. 論文標題 Introduction of human Flt3-L and GM-CSF into humanized mice enhances the reconstitution and maturation of myeloid dendritic cells and the development of Foxp3+CD4+ T cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front. Immunol.	6. 最初と最後の頁 1042
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2018.01042	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 Kobayashi-Ishihara M, Terahara K, Martinez JP, Yamagishi M, Iwabuchi R, Brander C, Ato M, Watanabe T, Meyerhans A, Tsunetsugu-Yokota Y	4. 巻 9
2. 論文標題 HIV LTR-driven antisense RNA by itself has regulatory function and may curtail virus reactivation from latency	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front. Microbiol.	6. 最初と最後の頁 1066
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2018.01066	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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Iwabuchi R, Terahara K, Takahashi Y, Tsunetsugu-Yokota Y
2. 発表標題 Characterization of human CD14low DC-like cells in lymphoid tissues using a humanized mouse model
3. 学会等名 第48回日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤雄志、寺原和孝、 岩淵龍太郎、森川裕子、横田恭子
2. 発表標題 ヒト化マウスモデルを用いたHIV-1感染初期に誘導されるCD4陽性T細胞死の性状解析
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Terahara K, Iwabuchi R, Hosokawa M, Takeyama H, Tsunetsugu-Yokota Y
2. 発表標題 Preferential entry of CCR5-tropic HIV-1 over CXCR4-tropic HIV-1 into resting CCR5+CXCR4+ memory CD4+ T cells
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Iwabuchi R., Terahara K., Ishihara-Kobayashi M., Ato M., Tsunetsugu-Yokota Y.
2. 発表標題 Human GM-CSF and Flt3-L induce reconstitution and maturation of human myeloid dendritic cells in humanized mice.
3. 学会等名 第47回日本免疫学会総会・学術集会
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
---------	---------------------------	-----------------------	----