

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08687

研究課題名(和文) HIV感染における表皮・膣上皮resident memoryT細胞の役割

研究課題名(英文) The role of epidermal and vaginal epithelial resident memory T cells 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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト皮膚表皮および膣上皮には末梢組織に長期定住するresident memory T (TRM)細胞が存在する。CD4+T細胞はHIVの感染標的となるため、CD4+TRMのHIV感染性を検討した。CD103+分画およびCD103-分画共に同程度にHIVに感染した。しかし、CD103+CD4+TRMは感染後アポトーシスに陥るのに対して、CD103-CD4+TRMは生存し続けた。これはHIVはCD103-CD4+TRMに感染後、潜伏感染状態となるためであることが明らかとなった。また、このメカニズムにOX40シグナルが関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膣に暴露されたHIVは膣上皮に存在する抗原提示細胞であるランゲルハンス細胞(LC)に感染し、HIV感染LCが所属リンパ節に遊走しCD4+T細胞にHIVを受け渡すと考えられてきた。しかし、膣上皮にCD4+TRMが存在することが明らかとなり、HIVの初期感染標的となる可能性が考えられた。CD103-分画のCD4+TRMはHIV感染後、HIV潜伏感染細胞となることが明らかとなった。このことはHIV感染予防には、LCおよびCD4+TRMでのHIVの感染を阻害することが重要であることを示唆する。

研究成果の概要(英文)：Resident memory T (TRM) cells are present in peripheral tissue including epidermis and vaginal epithelium. Since CD4+ T cells are the target of HIV infection, HIV infectivity in CD4+ TRM was examined. Both the fraction of CD103+ and CD103- equivalently infected to HIV. However, CD103+ fraction subsequently underwent apoptosis, but not CD103- fraction. This is because HIV-infected CD103-CD4+ T cells became latent. Moreover, OX40 signal may mediate this latent HIV infection.

研究分野：皮膚免疫

キーワード：HIV resident memory T細胞 皮膚 膣 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

背景 1. 我々はこれまでに、HIV-1 は皮膚表皮・粘膜上皮に存在する抗原提示細胞 Langerhans 細胞 (LC) 上に発現する CD4 と CCR5 を介して感染し、所属リンパ節へ遊走し、CD4 陽性 T 細胞に virion を受け渡すことで宿主での HIV-1 感染を完成することを明らかにしている。

背景 2. これまで皮膚表皮は約 95% を占める keratinocytes (KC) と約 5% を占める LC によって構成されると考えられていた。

背景 3. しかし、近年皮膚を含む末梢組織には、組織において長期間定住し循環系へ再循環しない resident memory T 細胞 ( $T_{RM}$ ) と呼ばれる memory T 細胞サブセットが存在することが明らかとなった。

背景 4. 我々はヒト正常表皮にも CD4 陽性  $T_{RM}$  が存在することを明らかにした。

\* 以上のことから、ヒト表皮・粘膜上皮に存在する CD4 陽性  $T_{RM}$  に HIV-1 が暴露された際、a) HIV-1 に感染するのか、b) 遊走・再循環しない CD4 陽性  $T_{RM}$  は HIV-1 感染後どのような挙動を示すのか、また c) LC における HIV-1 感染に対する影響、を明らかにしたいと考えた。

## 2. 研究の目的

- ヒト表皮・粘膜上皮に存在する CD4 陽性  $T_{RM}$  における HIV-1 感染性を検討する。
- $T_{RM}$  は組織から遊走・再循環しないため、宿主における HIV-1 感染を成立させるのはこれまで通り HIV-1 感染 LC と考えるが、この LC における HIV-1 感染への影響を検討することで、ヒト表皮・粘膜上皮 CD4 陽性  $T_{RM}$  が HIV-1 感染において感染を増悪するのか、減弱するのかを明らかにし、今後の HIV-1 予防戦略に結果を還元する。

## 3. 研究の方法

### 1. ヒト表皮・粘膜上皮 CD4 陽性 $T_{RM}$ における HIV-1 受容体・内因性抗 HIV 因子の発現

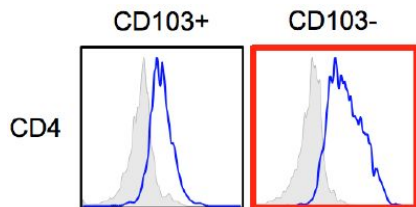
<方法> ヒト皮膚・腔組織を Dispase II にて処理し、表皮・腔粘膜上皮を得る。それぞれを酵素処理し single cell suspension を作成、FACS にて CD4, CCR5, CXCR4, APOBEC3G, TRIM5 $\alpha$ , SAMHD1, Tetherin の発現を、ヒト表皮・粘膜上皮 CD4+CD69+ $T_{RM}$  の 3 分画: I) CD103+, II) CD103-Foxp3-, III) CD103-Foxp3+, において決定する。

### 2. ヒト表皮・粘膜上皮 CD4 陽性 $T_{RM}$ における HIV-1 感染性

<方法> 上記 1. と同様に single cell suspension を作成、CD4 陽性細胞を MACS beads を用いて単離し、HIV-1 に感染させる。HIV-1 は感染に CCR5 を使用する R5 HIV-1, 感染に CXCR4 を使用する X4 HIV-1 の双方を用いる。感染 5 日後、上記 3 分画における HIV-1 感染率を p24 intracellular staining で決定する。

### 3. ヒト表皮・粘膜上皮 CD4 陽性 $T_{RM}$ における HIV-1 感染後の運命

<背景> 一般的に CD4 陽性 T 細胞は HIV-1 感染後、活発にウイルス複製し最後には死滅する群・ウイルス複製を止め潜伏感染状態となる群、の 2 群に分類される。後者の潜伏感染には T 細胞上の OX40 シグナルが重要であることが報告されている (Kuo, et al., Immunity, 2018)。表皮 CD4+CD69+ $T_{RM}$  のうち CD103- 分画が OX40 を強く発現していることを先行研究で明らかにした。このことは CD4+CD69+CD103- $T_{RM}$  は HIV-1 感染後、潜伏感染に入ることを予測させる。



<方法> 上記 2. と同様に表皮・粘膜上皮から CD4 陽性 T<sub>RM</sub> を単離し, R5 HIV-1, X4 HIV-1 に感染させる. 5 日後, ヒト表皮・粘膜上皮 CD4+CD69+T<sub>RM</sub> の 3 分画における apoptosis/necrosis 率を AnnexinV/PI 染色にて FACS で決定する. また, 潜伏感染率を決定するために GK0 HIV-1 (dual fluorescent reporter HIV-1 virus: 京都大学血液腫瘍内科, 白川健太郎先生より供与) を用い, GK0 HIV-1 感染後のヒト表皮・粘膜上皮 CD4+CD69+T<sub>RM</sub> の 3 分画における HIV-1 複製率・潜伏感染率を FACS で同定する.

#### 4. HIV-1 感染ヒト表皮・粘膜上皮 CD4 陽性 T<sub>RM</sub> と LC の相互関係

<方法> ヒト表皮・粘膜上皮をシート状のまま GFP HIV-1 に暴露する. CD4 陽性 T<sub>RM</sub>, LC はともに HIV-1 に感染するが, HIV-1 暴露後の感染の早さ, また HIV-1 感染・非感染 CD4 陽性 T<sub>RM</sub> と HIV-1 感染・非感染 LC との contact を二光子顕微鏡で計測・イメージングする. これにより CD4 陽性 T<sub>RM</sub> と LC における HIV-1 virion の受け渡しなどの相互作用が明らかになると考える.

#### 5. HIV-1 ”潜伏” 感染ヒト表皮・粘膜上皮 CD4 陽性 T<sub>RM</sub>

<背景> HIV-1 潜伏感染状態の CD4 陽性 T 細胞は TLR2 の刺激により, HIV-1 複製細胞へと活性化する (Macedo, et al., JCI Insight, 2018). 我々は性行為感染症のうち TLR2 ligand を保有するものは, LC 上の TLR2 を介することで LC における HIV-1 感染を増強することを報告している (Ogawa, et al., Blood, 2009). このことに HIV-1 ”潜伏” 感染ヒト表皮・粘膜上皮 CD4 陽性 T<sub>RM</sub> が関与するのではないかと予測する.

<方法> 上記 1. と同様に表皮・粘膜上皮の single cell suspension (CD4 陽性 T<sub>RM</sub>, LC を含む) を作成, 3. で用いた GK0 HIV-1 に感染させる. 5 日後, TLR2 ligand を culture に加え, HIV-1 ”潜伏” 感染ヒト表皮・粘膜上皮 CD4 陽性 T<sub>RM</sub> の潜伏感染解除率と LC における HIV-1 感染率の変化を検討.

### 4. 研究成果

#### 1. ヒト表皮・粘膜上皮 CD4 陽性 T<sub>RM</sub> における HIV-1 受容体・内因性抗 HIV 因子の発現

ヒト皮膚表皮、粘膜上皮の single cell suspension を作成, CD4+TRM の CD4, CCR5, CXCR4, APOBEC3G, TRIM5 $\alpha$ , SAMHD1, Tetherin の発現を, flow cytometry で解析を行った. CCR5 は CD103-分画で, CXCR4 は CD103+分画で有意に強い発現が認められた. CD4, APOBEC3G, TRIM5 $\alpha$ , SAMHD1, Tetherin の発現の発現に有意差は認められなかった. 臨床的には HIV-1 感染初期ではエントリーに CD4/CCR5 を使用する M-tropic HIV-1 がメインであるため, CD103-分画の方が HIV-1 に易感染性であることが予測された.

#### 2. ヒト表皮・粘膜上皮 CD4 陽性 T<sub>RM</sub> における HIV-1 感染性

CD4+TRM は HIV-1 に感染するが, 1. の予測に反し, CD103+分画および CD103-分画で R5-HIV, X4-HIV の感染性に傾向はあるものの, 有意な感染指向性は認められなかった. IL-7 および IL-15 は TRM 細胞の生存, また CD4 陽性 T 細胞の HIV-1 感染性を増強することが報告されている. 両分画を HIV-1 暴露後, PBS/IL-7/IL-15 のいずれかで培養し, HIV-1 感染性を検討したが, 両分画における HIV-1 感染性は増強するが, 両分画における感染性の差異は認められなかつ

た.

### 3. ヒト表皮・粘膜上皮 CD4 陽性 T<sub>RM</sub> における HIV-1 感染後の運命

HIV 感染 CD103+分画, CD103-分画を培養し続け, 両分画の HIV 感染細胞の生存率を annexin V staining を用いて flow cytometry で検討したところ, CD103-分画 HIV 感染 CD4 陽性 TRM は CD103+分画 HIV 感染 CD4 陽性 TRM と比較してアポトーシスに陥りにくいことが明らかとなった. これは, 前者分画に感染した HIV は潜伏感染状態に入るためと仮説をたて, HIV の潜伏感染について検討を行った. HIV GK0 (dual colorreporter virus)を両分画に感染させ, productive な HIV 感染細胞と latent な HIV 感染細胞を flow cytometry で同定したところ, 仮説のように CD103-分画 HIV 感染 CD4 陽性 TRM は CD103+分画 HIV 感染 CD4 陽性 TRM と比較して HIV 感染後, 潜伏感染状態に入る細胞が多いことが明らかとなった. また CD103-分画 HIV 感染 CD4 陽性 TRM の HIV 潜伏感染細胞化は CD103-分画に発現する OX40 を抗 OX40 抗体でブロックすることで減弱するため, OX40 シグナルが HIV 潜伏感染細胞化に関与することが示唆された.

### 4. HIV-1 感染ヒト表皮・粘膜上皮 CD4 陽性 T<sub>RM</sub> と LC の相互関係

### 5. HIV-1 " 潜伏 " 感染ヒト表皮・粘膜上皮 CD4 陽性 T<sub>RM</sub>

現在, 検討中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Sato T, Ogawa Y, Yokoi K, Nagasaka Y, Ishikawa A, Shiokawa I, Kinoshita M, Watanabe R, Shimada S, Tanaka A, Momosawa A, Kawamura T.	4. 巻 13
2. 論文標題 Characterization of human epithelial resident memory regulatory T cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front Immunol.	6. 最初と最後の頁 962167
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2022.962167.	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 -

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------