

機関番号：32665

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791575

研究課題名 (和文) 胎盤絨毛細胞の分化と HIV 感受性の解析

研究課題名 (英文) Replication of HIV in immortalized human trophoblasts

研究代表者

泉 泰之 (IZUMI YASUYUKI)

日本大学・医学部・研究員

研究者番号：50459872

研究成果の概要 (和文): 正常妊娠初期絨毛由来の不死化栄養膜細胞 (Trophoblast) 株において、低効率ながらも CD4 非依存的な HIV 感染、複製が認められた。さらに、この HIV 複製が LPS により促進される傾向が認められた。この結果から、妊娠時において、グラム陰性菌感染症が HIV 垂直感染リスクを高める実験的根拠となる可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文): HIV replicates in immortalized human first trimester trophoblast cell line in a CD4 independent manner. The HIV replication was up-regulated by lipopolysaccharide. These results suggested molecular basis of increased risk of maternal fetal infection by local infection by Gram-negative bacteria.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,400,000	420,000	1,820,000

研究分野：生殖免疫学、ウイルス学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：HIV、垂直感染、胎盤絨毛、Trophoblast、LPS

1. 研究開始当初の背景

我が国における HIV 垂直感染は、妊娠中の抗ウイルス薬の投与、選択的帝王切開、断乳 (人工栄養使用) により、1%程度にまで抑制されている。しかしながら、血中のウイルス量が高い場合や、マラリア、絨毛羊膜炎細菌性膣症、妊娠高血圧症候群などの合併症が存在する場合は経胎盤感染を来すことが報告されている。

一方、無治療妊婦においても HIV 垂直感染率は 20-30%程度といわれており、さらに垂直感染を来さない妊婦においても胎盤には HIV 抗原に対する抗体で染色されることから何らかの胎盤関門が存在すると考えられるが、

詳細なメカニズムは不明である。

胎盤絨毛を形成する栄養膜細胞 (Trophoblast) は、通常の HIV 感染においてレセプターとなる CD4 分子をほとんど発現しておらず、HIV 垂直感染においては、一般的な末梢血由来リンパ球とは異なった CD4 非依存性の感染メカニズムが存在すると考えられるがその詳細なメカニズムに関しては不明である。

2. 研究の目的

HIV 垂直感染においては CD4 非依存性の感染メカニズムが存在すると考えられるが、その場合、どのような因子が HIV に対する感受性を規定するかを解明することを目的とする。

我々はこれまで各種の絨毛癌細胞株を用いて HIV 垂直感染について検討してきたが、最近、正常妊娠初期絨毛由来の不死化 Trophoblast 細胞株を供与されたので、これらを用いてより生理的条件に近い実験系で解析をすすめることが可能になった。

これらの細胞株においても HIV 感染に関連する遺伝子、タンパクの発現の有無を確認する。

本研究では、絨毛羊膜炎や細菌性胎症の起因菌となることの多いグラム陰性菌の細胞壁成分 LPS が初期絨毛由来 Trophoblast 細胞株における HIV 感染、ウイルス複製に及ぼす影響とそのメカニズムを *in vitro* で解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞株、ウイルス株の供与

正常妊娠初期絨毛由来の不死化 Trophoblast 細胞株 Swan71 (Sw71) を米国 Yale 大学 Gil Mor 教授より分与を受けたものを使用した。また、HIV-1 LAI 株を国立感染症研究所エイズ研究センター山本直樹センター長 (当時) より分与を受けたものを同様に使用した。

(2) Sw71 における遺伝子発現の解析

通常のリンパ球、マクロファージに対する HIV 感染に関わる CD4, CXCR4, CCR5 等の mRNA あるいはタンパクが絨毛細胞株 Sw71 においても発現しているかを RT-PCR 法またはフローサイトメーターを用いて解析した。また、LPS のレセプターとなる TLR4 の発現についても同様に解析した。

(3) LPS により誘導されるサイトカインの定量

Sw71 を、*E. coli* 由来の LPS 1~10 μ g/mL 添加培地中で培養し、6, 24, 48 時間後の培養上清中のサイトカイン、特に HIV 複製に対して一般的に亢進的に作用すると考えられている TNF- α や IL-1 産生量を ELISA 等によって定量し、コントロール培養群と比較検討した。

(4) Sw71 における HIV の感染性ならびに複製効率の解析

様々な力価の HIV を Sw71 に感染させた。レトロウイルスは感染後、宿主細胞のゲノム遺伝子中に取り込まれるので、細胞中におけるプロウイルス DNA を PCR により検出する

ことにより、感染の有無を検討した。HIV 複製に関しては、培養上清中の HIV のウイルスタンパク p24 を ELISA によって定量することにより検討した。

(5) Sw71 における HIV の感染、複製に LPS が及ぼす影響の解析

Sw71 を LPS 1~10 μ g/mL 添加培地中で培養し、1 日後に HIV LAI 株を感染させた。感染後 4, 5 日後に培養上清中の HIV p24 量を ELISA によって定量し、LPS 非添加群の値と比較検討した。

4. 研究成果

(1) Sw71 における遺伝子及びタンパク発現の解析結果

RT-PCR 法またはフローサイトメーターにより解析した結果、Sw71 における CD4 の発現は検出できなかった (図 1)。一方、ケモカインレセプター CXCR4, CCR5 の発現は非刺激の場合においても認められた。また、同様に TLR4 の発現も認められた。 (図 1)

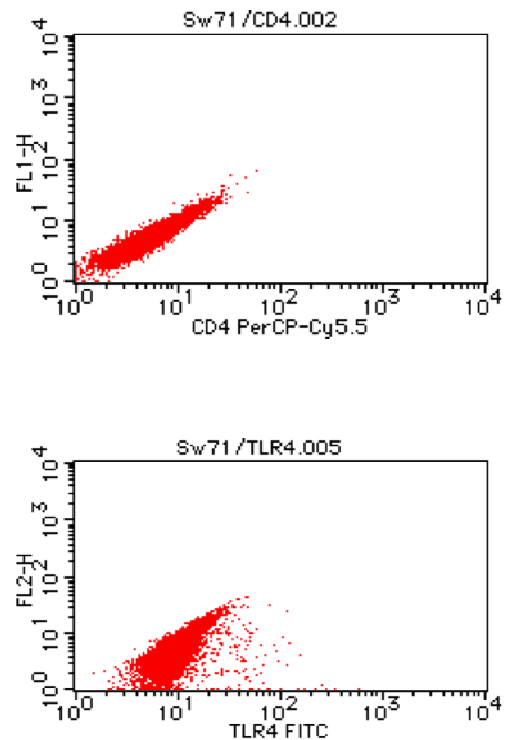


図 1 絨毛細胞 Sw71 における CD4 (上) および TLR4 (下) の発現 (フローサイトメーターによる解析)。

(2) LPS 刺激による Sw71 のサイトカイン産生量の解析結果

LPS 刺激 6, 24, 48 時間後における TNF- α 及び IL-1 β 産生はほとんど認められなかった。TNF- α や IL-1 β は、一般的に HIV 複製に対して亢進的に作用するが、絨毛細胞への LPS 刺激においては、これらのサイトカインを介した HIV 複製への関与は低いと思われる。今後、他のサイトカイン、ケモカインあるいは生殖系のホルモンの産生と HIV 感受性との関係の有無について検討していく予定である。

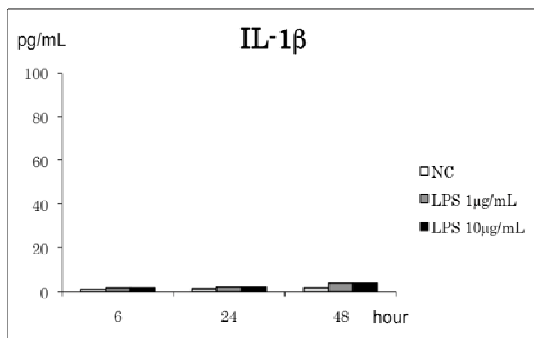
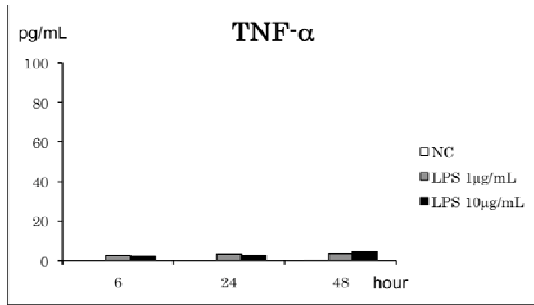


図 2 LPS 刺激による Sw71 からのサイトカイン産生。TNF- α (上) および IL-1 β (下)。

(3) Sw71 における HIV 感染、複製

低力価の HIV では Sw71 に対する感染の成立は認められなかった。高力価の HIV に対しては Sw71 に対する感染は認められた (図 3) もの、その複製効率は、リンパ球系の細胞に対するものと比較して極めて低かった。そのため、今後は、cell-to-cell の HIV 感染系を確立して、同様の解析を行っていくことが望まれる。

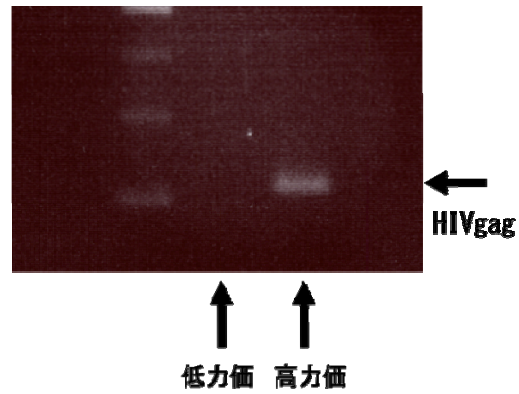


図 3 HIV 感染後の Sw71 細胞におけるプロウイルス DNA の検出。

(4) Sw71 における HIV 感染、複製に LPS が及ぼす影響

10 μ g/mL の LPS で刺激した Sw71 に HIV を感染させると、対照群と比較して培養後の上清中ウイルスタンパク量が増加する傾向が認められた。ただし、その詳細なメカニズムは不明である。

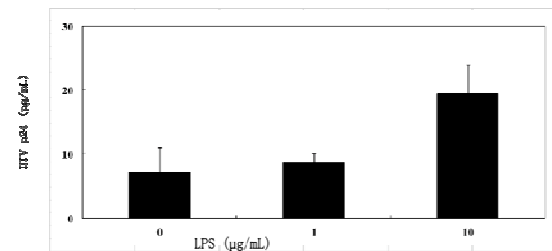


図 4 LPS 処理による HIV 複製の促進。

(5) まとめ

以上の結果より、絨毛細胞において、CD4 非依存的な HIV 感染、複製が認められた。さらに、グラム陰性菌が起因菌となることの多い絨毛羊膜炎や細菌性膣症等が HIV 垂直感染のリスクを高める可能性があることが *in vitro* の面からも示唆された。LPS の作用経路である TLR4 を介したシグナルを阻害することにより母子感染のリスクが軽減できるか解析することが今後の課題である。

また、Sw71 は、LPS 刺激によって TNF- α や IL-1 β をほとんど産生しなかったが、妊娠の際は周囲から多くの刺激を受ける環境下にある。よって、周囲の臨床的環境から、絨毛細胞に、これらサイトカインによる刺激が入ると HIV 感染、複製に影響を及ぼす可能性があり、今後検討していく。

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)

[学会発表] (計 1 件)

- ① 泉泰之、胎盤絨毛細胞における HIV 感染と複製の解析、第 84 回日本感染症学会、平成 22 年 4 月 5 日～6 日、国立京都国際会館

6. 研究組織

(1) 研究代表者

泉 泰之 (IZUMI YASUYUKI)

日本大学・医学部・研究員

研究者番号：50459872

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし