

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 15 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23300156

研究課題名(和文) HIV - 1 感染症の病態形成におけるマクロファージの意義の解明

研究課題名(英文) Role of macrophages in the pathogenesis of HIV-1 infection

研究代表者

五十嵐 樹彦 (Igarashi, Tatsuhiko)

京都大学・ウイルス研究所・特定教授

研究者番号：90467431

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,800,000円

研究成果の概要(和文)：マクロファージはエイズの病原体であるHIV-1に感染するが、感染したマクロファージは体内でどのくらい生存するか知られていない。我々はSHIVエイズサルモデルに多剤併用療法を適用して感染マクロファージの半減期を求めた所、半減期の異なる、少なくとも3つの集団が存在することを明らかにした。更に強力な治療によっても抑制できないウイルスは組織中のM2型マクロファージに由来する証拠を得た。この細胞を特異的に傷害できれば本疾患の治療に貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Macrophages have been known to be one of the major target cell types for HIV-1, the causative agent of AIDS. However, there are no available data concerning half-life of infected macrophages in infected individuals. Applying combined anti-retroviral regimen to SHIV-rhesus macaque model for AIDS, we revealed that there were at least three populations of infected macrophages with distinct half-lives and that the most durable population was consisted of M2 type macrophages. It is conceivable that specific intervention of these cells would contribute to the cure for the disease.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HIV エイズ マクロファージ 多剤併用療法 半減期 SHIV

1. 研究開始当初の背景

エイズの病原ウイルスHIV-1の感染者は全世界で3300万人、新既感染者は270万人いると言われており、HIV-1感染症の制御は依然として地球規模の公衆衛生上の重要課題である。本感染症の治療に関しては、複数の抗HIV薬を服用する多剤併用療法の開発により大きな進展があった。即ち、本療法により患者の体内ウイルス量が検出限界以下に抑制され、感染により減少したウイルスの標的であるCD4陽性T細胞が増加し、患者の平均余命は非感染者並みに延長すると推定されている。しかし、治療が成功している患者の血中にも超高感度の検出方法によりごく微量のウイルスが検出される。また、これらの患者においてT細胞活性化や炎症マーカーの上昇と、従来エイズ関連疾患と見なされていなかった心血管系、肝および肺疾患、および悪性新生物の発症の増加が見られている。完全に抑制されないウイルス発現がこれらの疾患の引き起こすと考えられている。これらの問題の根幹には、現行の多剤併用療法では感染者からウイルスを駆逐できない事実が存在する。即ち、多剤併用療法下で治療に抵抗するウイルスリザーバーが存在するのである。治療下の感染者の体内では抗ウイルス剤の作用により新規感染は起こらないと考えられるため、リザーバーは治療開始以前に確立されたウイルス持続感染細胞と考えられる。多剤併用療法下のウイルスリザーバーとして休止期のCD4陽性T細胞が確立されている。治療下の感染者から採取され試験管内で高度に精製されたこれら細胞は、刺激を加えると感染性のウイルスを放出し得る事が示されている。その一方で、休止期CD4陽性T細胞以外のリザーバーの存在を示唆する結果が、治療を意図的に中断した感染者由来試料の解析から得られている。その他のウイルスリザーバーとして樹状細胞、CD34陽性細胞と並びマクロファージ(M)が想定さ

れている。M はエイズ流行の初期からリンパ球と共にHIVの標的細胞として同定されている。うえ、試験管内でウイルスを接種したM はリンパ球と比較して容易に細胞死を起こさず、比較的長期間生存し、子孫ウイルス粒子を放出し続ける事からも、生体内でもリザーバーとなり得ると考えられている。しかし、感染M が実際に生体内でどのくらい生存するかは知られていない。HIV-1感染症の病態におけるM の関与を研究する事は容易ではない。理由として以下の2点が挙げられる。

(1) M の調整・培養が技術的に難しい。この問題を回避するため単球系株化細胞及び末梢血単球を試験管内でサイトカインにより分化誘導した「単球由来M (MDM)」が研究に多用されているが、これらの細胞と実際に生体内で生理的に分化したM とのウイルス感染の文脈における異動は不明である。

(2) M に比べてリンパ球はHIV-1 の受容体(CD4)および共受容体(CCR5 及びCXCR4)の発現頻度が高く、個体レベルでは感染リンパ球が感染細胞のうち、圧倒的大多数を占める。そのため、個体レベルにおいて感染M はリンパ球に隠れて顕在化せず、その検索は困難を伴う。

研究代表者は過去19年間にわたりサルエイズモデルを用いHIV-1 病原性の解明に関する基礎研究に携わって来た。その中で、HIV-1 とSIV(サルから分離された同様のウイルス)の遺伝子を組換えたSHIV が、当初アカゲザルに非病原性であったが、個体内で病原性ウイルスに進化した事を報告した。このウイルスを新たに動物に接種すると、数週間で全身のCD4陽性T細胞を枯渇させ、その後、半年以内にエイズ様の病態を呈する事を見いだした。感染サルのCD4陽性T細胞が枯渇してからエイズ様病態を呈するまで、血中ウイルス量は高値を保つが、この間のウイルスはM が産生している事を見いだした。このSHIV感染の後期は、霊長類レンチウイルスの個体レベル感染

において極めて稀な、ほぼ純粋なM 感染である。

2. 研究の目的

高病原性 SHIV/アカゲザル感染モデルにおいて主要感染細胞がマクロファージとなる感染後期を用いて、多剤併用療法下における感染M の意義を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ウイルス

高病原性 SHIV KS661 分子クローンを用いた。

(2) 動物

インド産系アカゲザルを用いた。

(3) 感染実験

1×10^4 、 1×10^5 または 1×10^6 50%組織培養感染価の SHIV KS661 を麻酔下のアカゲザルに静脈内接種した。感染前から麻酔下で継時的に採血、リンパ節摘出及び気管支内視鏡を用いた肺胞洗浄を行った。

リンパ球サブセットの解析

抗凝固血液を蛍光標識した抗リンパ球マーカー抗体と反応させ、蛍光励起細胞分取装置で解析した。

血中ウイルス量の測定

血液から分離した血漿から RNA を精製し、ウイルス gag 遺伝子を増幅するリアルタイム PCR 反応により血中ウイルス量を測定した。

感染マクロファージ数の追跡

肺胞洗浄液からマクロファージを含む細胞を調製、磁気ビーズと抗体を用いて T 細胞を除去後、段階希釈しウイルスに高感受性の MT-4 細胞と共培養した。培養 3 週間後の培養上清中ウイルス特異逆転写酵素活性を測定し、ウイルス分離可能な最小マクロファージ数を決定した。

実験終了時には過剰量のペントバルビタールを静脈内投与して動物を安楽死させた後、組織を摘出した。

(4) 多剤併用療法

抗 HIV-1 薬として認可されている薬剤を用いた。核酸系逆転写酵素阻害薬としてアジドチミジン(AZT)、ラミブジン(3TC)、テノフォビル(TDF)を用いた。プロテアーゼ阻害薬としてロピナビル(LPV)を、そのブースターとしてリトナビル(RTV)をもちいた。薬剤はそれぞれ錠剤を破碎し、同じく破碎した実験動物用飼料、バナナと混合、成型して通常の飼料の代わりに給餌した。朝、夕(10時間後)に給餌した。朝の飼料は AZT 150mg、3TC 75mg、TDF 300mg、LPV 200mg、RTV 50mg を、夕の飼料は AZT 150mg、3TC 75mg、LPV 200mg、RTV 50mg を含有するよう調製した。投

与期間中毎日飼料の残量を追跡したところ、すべての動物が全期間 90%以上摂食した。

慢性期治療

接種 8 週後から投薬した。

急性期治療

接種 9 または 10 日後から投薬した。

(5) 組織化学的検索

麻酔下で外科的に摘出したリンパ節及び実験終了時に採材した組織は定法通り固定・包埋の後、薄切標本を作製し、ジゴキシゲニン標識 RNA プローブ及び抗 T 細胞または抗マクロファージ抗体で多重染色を行い、共焦点蛍光顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

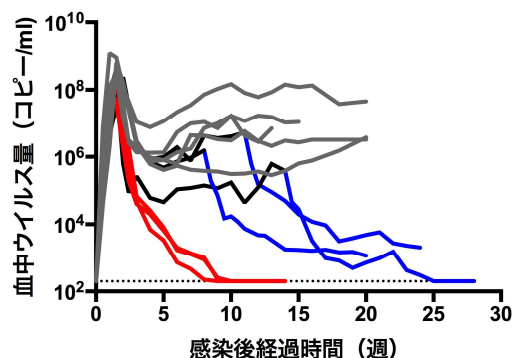


図 1. 感染サル血中のウイルス量推移

(1) マクロファージが主要感染細胞になった SHIV KS661 アカゲザル感染における多剤併用療法

SHIV KS661 は従来報告されている様にアカゲザル体内で急性期に大量に複製し、その後一旦ウイルス複製は衰えるものの再び複製が回復しエイズ様症状を引き起こした(図は感染サルの血中ウイルス量を表す)。図中の灰色の線が非治療群の血中ウイルス動態を表す。慢性期に治療を行った群では治療開始前のウイルス量は非治療群と変わらないが、治療を開始すると3相性に減衰した(図中青色)。特に第3相はその傾きが非常に緩やかであった。

(2) リンパ球が主要感染細胞である SHIV KS661 急性感染期における多剤併用療法

本研究で用いた多剤併用療法は SIV239/アカゲザル実験感染モデルに適用すると血中ウイルス量を2相性に減衰させ検出限界以下に抑制することが知られている。また、本研究で用いた薬剤の標的となるウイルス酵素の遺伝子は SIV239 と SHIV KS661 で同一であり、また、試験管内における両ウイルスの薬剤感受性は同等である。観察されたウイルス抑制は両ウイルスの細胞指向性の違いに帰せられる(SIVはリンパ球、SHIV KS661 感染後期はマクロファージ)と考えられたが、それを検証するため、SHIV KS661 感染においてリンパ球が主な標的となる急性期に同じ

多剤併用療法を適用したところ、血中ウイルス量は SIV 感染サルに適用した時と同様に 2 相性に減衰し、検出限界以下に抑制された (図中赤色)。このことから、SHIV KS661 感染後期に多剤併用療法を適用すると観察される、非常に緩やかに減衰する第 3 相減衰はマクロファージが担っていることが予想された。

(3) 多剤併用療法のウイルス産生肺泡マクロファージ数への影響

我々は当初、SHIV KS661 はリンパ球を完全に枯渇させマクロファージがウイルス標的細胞に代わると予想したが、継時的なリンパ節の組織化学的検索から血中で枯渇しても組織中にはウイルス感染リンパ球が存在し、全感染細胞中の割合はマクロファージが 85%、リンパ球は 15%ほどであった。従って上記の血中ウイルス量の動態には感染リンパ球の減衰が含まれている可能性がある。そこで、感染マクロファージの動態を直接観察するため、継時的に肺泡マクロファージを採集し、感染細胞数の推移を追跡した (図 2)。

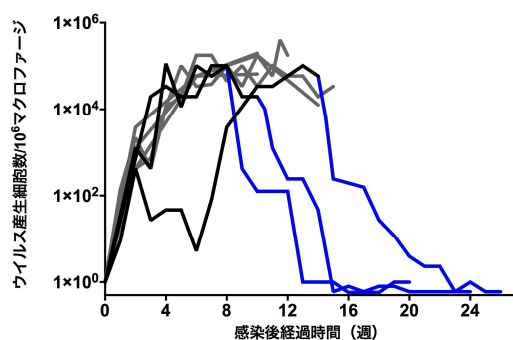


図 2. ウイルス感染肺泡マクロファージ数の推移
非治療群ではウイルス感染直後から感染マクロファージ数は幾何級数的に増加し、感染 8 週後には 10^6 細胞あたり 10^5 の細胞がウイルス産生するレベルで安定化した (図中灰色)。治療群では 2 頭で非治療群と同じ推移を、もう 1 頭でも採集的には同じ水準の感染細胞数に達した。治療群全ての動物で感染細胞数は 2 相性に減少した。各相の傾きは血中ウイルス量減衰で見られたものと同等であった。以上から、感染マクロファージは半減期の異なる複数の集団からなることが示唆された。

(4) 組織化学的検索による第 3 相減衰を担っている細胞の同定

実験終了時まで投薬を継続したが、 10^3 コピー/ml の血中ウイルス量が持続した動物から安楽殺後、組織を採集し、PCR 法で各組織のウイルス RNA 量を検索した所、非リンパ系組織では検出限界以下、肺、消化管といったリンパ球が多く分布する組織では少量、リンパ節、脾臓といったリンパ系組織ではより多量のウイルス RNA が検出された。特に脾臓において多量のウイルス RNA が検出されたことから本組織を組織化学的に検索し、多剤併用療

法下でもウイルス RNA を発現する細胞の同定を試みた (図 3)。

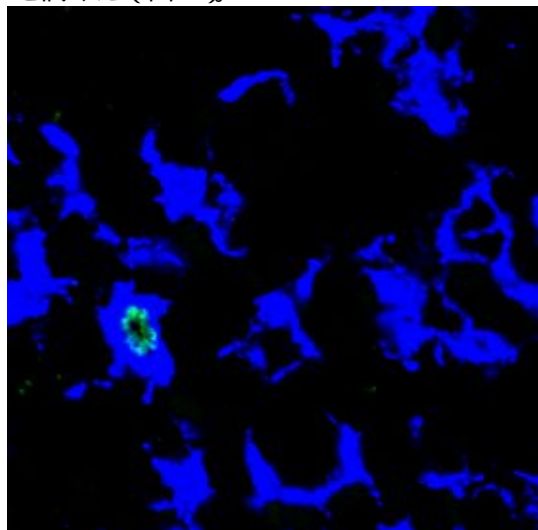


図 3. ウイルス感染細胞の同定

ウイルス RNA 陽性細胞は専ら脾臓の白脾髄動脈周囲リンパ鞘辺縁部に存在し、予想どおりマクロファージ (CD68 陽性) であった。さらに詳しい性格付けを行った所、CD163 陽性の所謂 M2 型マクロファージであることが明らかとなった (図中青色は CD163 分子を、緑色はウイルス RNA-核に局在-を示す)。

近年、HIV-1 感染において感染初期は M1 型マクロファージが増加するが、後期では M2 型マクロファージが優勢になるという報告がある。これら M2 型マクロファージの一部で活発なウイルス RNA 発現が多剤併用療法下でも持続している知見は今回の研究で初めて明らかにされた。頻度は非常に低い可能性があるが、今回見出された現象は治療を受けている HIV-1 感染者でも起こっていると考えられる。

現在、これらの細胞のさらに詳細な性格を組織化学的に追求しているが、そこから得られる知見を用いてこれら細胞を特異的に傷害する方法の確立できれば HIV 感染症の治療に一歩近づけると考えている。

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 1 件)

Oue, M., Sakabe, S., Horiike, M., Yasui, M., Miura, T., and Igarashi, T. No viral evolution in the lymph nodes of SIV-infected rhesus macaques during combined antiretroviral therapy. *J. Virol.* 87:4789-93, 2013.

〔学会発表〕(計 2 件)

渡部 祐司、岩見 真吾、西山 由利子、森 ひろみ、三浦 智行、五十嵐 樹彦：高病原性 SHIV 感染サルにおける感染マクロファ-

ジの半減期の推定、第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012年11月13-15日
渡部 祐司、岩見 真吾、森 ひろみ、松浦 嘉奈子、日紫喜 隆行、三浦 智行、五十嵐樹彦：高病原性SHIV感染サルにおける感染マクロファージは感染リンパ球と同程度の半減期を示す、第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月10-12日

〔図書〕(計 0 件)

〔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

該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

五十嵐 樹彦 (IGARASHI Tatsuhiko)

京都大学・ウイルス研究所・特定教授

研究者番号：90467431

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし