

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 24 日現在

機関番号：13501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659545

研究課題名（和文）ヒト化マウスを用いた Vitamin D3、HSV-2 の HIV 感染への関与の検討

研究課題名（英文）Examination of the participation in HIV infection of the Vitamin D3 and HSV-2 using the humanized mouse

研究代表者

島田 眞路 (SHIMADA SHINJI)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授

研究者番号：10114505

研究成果の概要（和文）：ヒトヘルペスウイルス 2 型（HSV-2）は HIV 感染リスクを高めることが知られている。性行為 HIV 感染における初期ターゲット細胞であるランゲルハンス細胞（LC）の HIV 感染性に対する HSV-2 の影響を検討した。HSV-2 は上皮細胞からの β ディフェンシンや LL-37 の産生を誘導したが、これら抗菌ペプチドの中で LC の HIV 感染性に影響を与えるのは LL-37 のみであった。実際に siRNA を用いて LL-37 をノックダウンした表皮細胞に HSV-2 を曝露した培養上清は LC の HIV 感染増強効果を失うことが確認された。これらの実験結果より、HSV-2 は上皮細胞からの LL-37 産生を誘導することによって HIV 感染リスクを高めることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Herpes simplex virus (HSV)-2 shedding is associated with increased risk for sexually acquiring HIV. Because Langerhans cells (LCs) are suspected to be one of the initial target cell types infected by HIV following sexual exposure, we examined whether and how HSV-2 affects HIV infection of LCs. HSV-2 stimulated epithelial cell production of antimicrobial peptides (AMPs), including human defensins and LL-37. Culture supernatants of epithelial cells infected with HSV-2 enhanced HIV susceptibility in mLCs, and this effect was abrogated by blocking LL-37 production. These data suggest that HSV-2 enhances sexual transmission of HIV by increasing HIV susceptibility of LCs via epithelial cell production of LL-37.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：HIV、HSV-2、抗菌ペプチド、ランゲルハンス細胞

1. 研究開始当初の背景

性器粘膜上皮はヒト免疫不全ウイルス（HIV）など様々な性行為感染に関与するウイルスの侵入部位である。HIV 患者が世界で初めて報告されてからおよそ 30 年が経つが、いまだ有効なワクチンは存在せず、世界における年間新規 HIV 感染者推計総数は現在でも約 250 万人に上る。本邦では、他の先進国の新規 HIV 感染者数が減少傾向に転じつつ

あるのに対し、依然年間千人を上まわるペースで増加し続けており、2010 年の新たな感染者数は 1503 人、うち新規エイズ発症患者は 453 人と過去最多を更新した。

粘膜や皮膚を介した性行為 HIV 感染初期において性器皮膚・粘膜に曝露されたウイルスは局所から所属リンパ節に運ばれて宿主での永久的な感染を成立させる。近年この分野の研究が飛躍的に進み、HIV の生体内侵入

メカニズムが徐々に明らかとなりつつある。

これまで我々は、性行為 HIV 感染における最も重要な初期ターゲット細胞は性器粘膜・皮膚の上皮内に存在する樹状細胞の一亜群であるランゲルハンス細胞 (LCs) であることを見出してきた。HIV は、細胞侵入時に CD4 および CCR5 を使う R5 HIV と CD4 および CXCR4 を使う X4 HIV に大別されるが、現在までの様々な疫学的調査研究により、性行為感染では主に R5HIV が選択的にパートナーに感染することが明らかとなっている。一方、皮膚および粘膜表皮内に存在する樹状細胞 (DCs) の一亜群である表皮内 LCs は、ウイルスなどの病原体が侵入すると成熟・活性化されるとともに粘膜や皮膚から所属リンパ節に遊走し、リンパ節内 T 細胞を活性化させる。このため HIV 感染症においても、LCs は感染局所から所属リンパ節内 CD4+ T 細胞への HIV 播種に関与していると考えられてきた。興味深いことに、表皮内 LCs は CCR5 を発現しているものの CXCR4 は発現しておらず、実際に *in situ* LC が選択的に R5HIV に感染することや HIV 感染 LC 自身がウイルスを複製できること、さらには HIV 感染 LC が T 細胞へ HIV を伝播して T 細胞からの大量のウイルス産生を誘導することなどが観察されている。さらには CCR5 3' 2' 遺伝子をもつ人の LCs は健常人の LCs に比べて有意に HIV 感染に抵抗性であることもわかり、現在では性行為感染でみられる選択的な R5HIV の生体内侵入は粘膜・皮膚表皮内 LCs の感染トロピズムによると考えられている。また最近、LC に発現される Langerin が結合した HIV をバーベック顆粒まで輸送した後に顆粒内で不活化する機能を持つことが明らかとなり、同分子は HIV の侵入を防ぐ一種のバリアとして働くと考えられている。以上の研究結果から、異性間性行為における HIV の生体内侵入メカニズムとして、精液あるいは膣分泌液中の R5HIV および X4HIV がパートナーの皮膚・粘膜に曝露される際、Langerin との結合を免れた R5HIV が選択的に LCs に感染し、HIV に感染した LCs が所属リンパ節に遊走后に CD4+ T 細胞へウイルスを受け渡す経路が考えられている。

一方、これまでの数多くの疫学的調査結果によって、HIV 以外の STD (性感染症) 保有者の性行為 HIV 感染リスクが数倍~数十倍高くなることが知られている。このため米国では HIV 以外の STD の治療が HIV 感染拡大予防戦略の主軸となってきた。我々は最近、細菌由来リポペプチドやグラム陽性菌ペプチドグリカンが LCs に発現される TLR (Toll-like receptor) 1/TLR2 や TLR6/TLR2 などを通じて LCs の HIV 感染性および HIV の複製を促進することを明らかとしており (Ogawa Y. and Kawamura T et al. Blood, 2009)、

TLR2 ligands を有するグラム陽性菌や梅毒、淋菌、クラミジア、トリコモナスなどの STD 病原体は TLR2 を介して粘膜内 LC の HIV 感染を増加させることにより、宿主の HIV 感染を促進していると考えられている。

一方、これまでの疫学的調査結果より、ヒトヘルペスウイルス 2 型 (HSV-2) 感染者では性行為 HIV 感染リスクが 3~10 倍高くなることが知られているが、そのメカニズムは未だ不明である。

2. 研究の目的

本研究では、これまでに我々が確立した *in vitro* 単球由来 LCs の HIV-1 感染モデルを用いて、HSV-2 による LCs の HIV 感染性への影響について検討した。

3. 研究の方法

(1) HSV-2 による表皮細胞からの抗菌ペプチド誘導能；HSV-2 を正常ヒト表皮角化細胞 (NHEK) に 12 時間暴露後、mRNA を抽出し、上皮から産生されることが報告されている主要な抗菌ペプチド (Cathelicidin、 α Defensin 5-6、 β Defensin1-4) に対する primer を用いて real-time PCR を行う。また、蛋白レベルでの産生確認のため、HSV-2 に 24 時間暴露後の NHEK より蛋白を抽出し上記抗菌ペプチドに対する抗体を用い western-blot を行う。さらに、NHEK 培養液中の抗菌ペプチド蛋白量を ELISA にて検討する (day3, 5, 7)。

(2) 単球由来 LCs の樹立：ヒト皮膚 LCs のキャラクターをもち、広く用いられている単球由来(monocyte-derived LCs; mLCs)を用いて以下の実験を行う。尚、mLC の樹立および *in vitro* での HIV 感染の成立は我々のグループによりすでに確立されているものである (Kawamura T. et al. Eur J Immunol, 2001)。ヒト単球を GM-CSF, IL-4, TGF β 存在下で 1 週間培養し mLC を樹立する。95%以上がヒト LC マーカー CD1a、E-Cadherin 陽性であるが、ヒト LC 特異的分子である Langerin 陽性細胞は約 15%であった。そのため、FACS の際には Langerin 陽性細胞に gate をかけ解析、また必要に応じて Langerin 陽性細胞を sorting し実験を行う。

(3) 抗菌ペプチドによる LCs の HIV 感染への影響：合成抗菌ペプチドの LL-37 (Cathelicidin)、 α Defensin5, 6 および β Defensin1,2,3,4 を mLC に 24 時間暴露し洗浄する。その後、HIV BaL(R5-HIV) に 2 時間感染させ、よく洗浄した後に 7 日間培養する。7 日後、HIV 感染 mLC 数を HIV p24 に対するモノクローナル抗体を用いて intracellular staining および FACS で定量することで、抗菌ペプチドが mLC の HIV 感染にどのように影響を与えるか検討する。

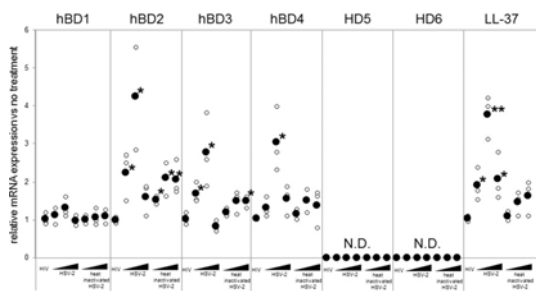
(4) 上記実験にて mLC の HIV 感染に影響

を与える抗菌ペプチドをsiRNAを用いてノックダウンした表皮細胞を作製し、正常表皮細胞とともにHSV-2に24時間曝露し、その培養上清の存在下でのランゲルハンス細胞のHIV感染への影響を上記方法を用いて比較検討する。

4. 研究成果

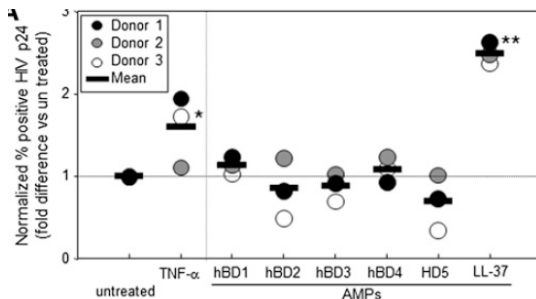
(1) HSV-2は上皮細胞からのβDefensin2,3,4やLL-37の産生を誘導したが、コントロールとして用いたHIVでは上皮細胞からの抗菌ペプチドの産生は認められなかった(図1)。

図1



(2) これら抗菌ペプチド(βDefensin2,3,4, LL-37)の中でLCのHIV感染性に影響を与えるのはLL-37のみであった(図2)。

図2

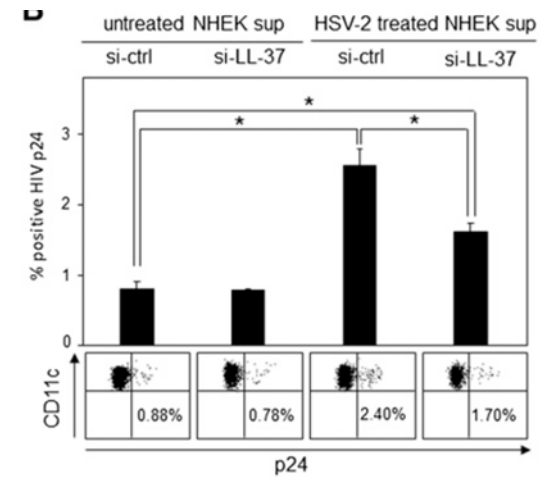


(3) HSV-2を曝露したNHEK培養上清はLCのHIV感染増強効果を示したが、siRNAを用いてLL-37をノックダウンした表皮細胞ではその増強効果を失うことが確認された(図3)。

これらの実験結果より、HSV-2は上皮細胞からのLL-37産生を誘導することによってHIV感染リスクを高めることが示唆された。HSV感染者では無症候性に外陰部性器皮膚・粘膜にHSV-2が放出・存在されていることが知られており(無症候性排泄)、この無症候性に排泄されたHSV-2が表皮細胞からの抗菌ペプチド: LL-37産生を誘導することで表皮内のLCsの易感染性が増し、宿主の性行為HIV感染リスクの増加につながる一因

であると考えられた。また、性行為HIV感染予防の観点から、個々のSTD治療はその治療効果そのものにも限界があることから、今後TLR2阻害剤やLL-37阻害薬の開発などの新たな予防戦略が必要であろう。

図3



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1件)

① [Youichi Ogawa](#), [Tatsuyoshi Kawamura](#), [Takamitsu Matsuzawa](#), [Rui Aoki](#), [Peter Gee](#), [Atsuya Yamashita](#), [Kohji Moriishi](#), [Kenshi Yamasaki](#), [Yoshio Koyanagi](#), [Andrew Blauvelt](#), and [Shinji Shimada](#)

Antimicrobial Peptide LL-37 Produced by HSV-2-Infected Keratinocytes Enhances HIV Infection of Langerhans Cells

Cell Host and Microbe, 13, 77–86, January 16, 2013

査読有

[学会発表] (計 1件)

① [Youichi Ogawa](#), [Tatsuyoshi Kawamura](#), [Takamitsu Matsuzawa](#), [Rui Aoki](#), [Andrew Blauvelt](#), and [Shinji Shimada](#)

Antimicrobial Peptide LL-37 Produced by HSV-2-Infected Keratinocytes Enhances HIV Infection of Langerhans Cells

International Investigative Dermatology, May 9, 2013, Edinburgh, Scotland

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島田眞路 (SHIMADA SHINJI)
山梨大学・医学工学総合研究部・教授
研究者番号：10114505

(2) 研究分担者

川村龍吉 (KAWAMURA TATSUYOSHI)
山梨大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：70262657

小川陽一 (OGAWA YOICHI)
山梨大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：20377542

青木類 (AOKI RUI)
山梨大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：10377541

(3) 連携研究者

なし