

## 論文の内容の要旨

論文題目 HIV-1 感染者の病態進行に關与する免疫学的特性の解析  
指導教員 岩本愛吉 教授

東京大学大学院医学系研究科  
平成 20 年 4 月入学  
医学博士課程  
国際保健学専攻  
中山 香

### [背景]

慢性期ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV) 感染における安定した血中 HIV 量はセットポイントと呼ばれ、大きな個体差がある。セットポイントは HIV 感染症の予後と關連する臨床上重要なパラメーターとされており、高いセットポイントほど病態進行が早いと言われている。一方で、慢性 HIV 感染で見られる免疫活性化は病態進行と關与していることが明らかとなっている。しかしながら、慢性期の血中 HIV 量がどのように免疫系の破綻に影響し、病態進行に關与しているのかは明らかとなっていない。本研究では、慢性期 HIV 感染者の血中 HIV 量と免疫細胞の機能的特性の關係を明らかにするために、未治療のセットポイントが異なる慢性期 HIV 感染者の末梢血単核球 (PBMC) のサイトカイン産生能の網羅的な解析を行った。本研究では PBMC 刺激後に誘導される反応に加え、さらに二次的に起こる免疫反応を包括的に調べるため PBMC を PHA にて刺激後 48 時間でのサイトカイン産生能の評価を行った。血中 HIV 量の異なる感染者間で産生能に相違が見られたサイトカインに関して、さらに詳細な解析を行うため、細胞内サイトカイン染色を用いた個々の細胞レベルでの解析、及びより高感度な定量的 PCR にて遺伝子発現動態の解析を行った。

### [材料と方法]

東京大学医科学研究所附属病院を受診し、インフォームドコンセントの得られた慢性期 HIV 感染者 50 名、健常人 10 名の計 60 名の末梢血単核球 (PBMC) を用いた。対象として、未治療の慢性期 HIV 感染者で血中 HIV 量が 5000 コピー/ml 未満、あるいは 25000 コピー/ml 以上を選別した。血中 HIV 量が 5000 コピー/ml 未満を低 HIV 群 (中央値: 1200 コピー/ml、範囲: 50 - 3600)、25000 コピー/ml 以上を高 HIV 群 (中央値: 62000 コピー/ml、範囲: 25000 - 500000) とした。本研究内容は東京大学医科学研究所倫理審査委員会により承認を得ている (承認番号: 20-47-210521)。

血液より PBMC を単離し、非特異的に T 細胞を刺激する因子であるフィトヘマグルチニン (PHA) で 48 時間刺激後、培養上清中に産生されたサイトカイン量の比較を行った。サイトカイン測定には同時に 25 種類のサイトカインを測定できる Human cytokine twenty-five-plex antibody kit を使用し Luminex<sup>100</sup> system にて測定した。PBMC 中の T 細胞の頻度は、抗 CD3、抗 CD4、抗 CD8 抗体を用いて細胞表面染色を行いフローサイトメトリーにて解析した。T 細胞の分化段階を調べるため表面分子である CD45RA、CCR7 を使用し細胞表面染色を行った。T 細胞の性状を調べるため活性化の指標として CD38、疲弊状態を表す指標として免疫抑制受容体である PD-1 の発現解析を行った。ICS によるサイトカインの発現は T 細胞の刺激として、ホルボールミリスチートアセテート (PMA) とイオノマイシンを使用し PBMC 刺激後 5 時間でのサイトカインの発現を調べた。遺伝子発現の解析は PBMC を PHA 刺激後 18 時間で定量的 PCR による mRNA の発現解析を行った。

### [結果]

低 HIV 群と高 HIV 群での PBMC における非特異的な刺激に対する 25 種類のサイトカイン産生能を比較した。高 HIV 群では低 HIV 群と比べ MIP-1<sub>β</sub>、MIP-1<sub>α</sub>、RANTES、IL-17、sIL-2R、IL-7 の産生能が有意に低下しており (P=0.0077、P=0.0034、P=0.0014、P=0.0256、P=0.0136、P=0.0029)、サイトカイン産生量と血中 HIV 量、CD4 数との相関を調べたところ、血中 HIV 量と MIP-1<sub>β</sub>、MIP-1<sub>α</sub>、RANTES、IL-17、sIL-2R、IL-7、IFN- $\gamma$  産生量は逆相関を示した (P=0.0011、

P=0.0047、P<0.0001、P=0.0051、P=0.0013、P=0.0151) 低 HIV 群と高 HIV 群間で産生量に差の見  
本研究で 1 に

究を行った。産生量に差の見られたサイトカインに関して、IFN- $\gamma$  は主に細胞性免疫応答に関与する。MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTES も生体内で感染部位に CCR5 発現 Th1 リンパ球を遊走することで細胞性免疫応答の誘導に関与する。これら細胞性免疫応答に関与するサイトカイン間の関係や Th17 型サイトカインである IL-17 との関係性を明らかにするために、それぞれの相関を調べたところ、これらのサイトカイン産生量はお互いに強く相関することが明らかとなった。

PHA は T 細胞の活性化因子であることから、PBMC 刺激後 48 時間でのサイトカイン産生量の差は T 細胞に起因していると考えられる。低 HIV 群と高 HIV 群間で見られた MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTES、IL-17、IFN- $\gamma$  の産生量の差は「産生細胞の数の違い」、あるいは「産生細胞の機能・性状の違い」に起因している可能性が考えられる。そこで、まず産生量の差が T 細胞の絶対数、および分化・成熟段階に起因するか調べた。T 細胞のサイトカイン産生能は分化・成熟段階により異なり、サイトカイン産生能を有するのはセントラルメモリー (CM)、エフェクターメモリー (EM)、エフェクター (E) 分画である。しかしながら、低 HIV 群と高 HIV 群間でこれらの T 細胞分画に量的な違いは見られなかった。

PBMC を刺激後 5 時間での IFN- $\gamma$ 、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTES、IL-17 産生細胞の頻度の解析、および個々の細胞の発現量を蛍光強度の中央値 (MFI) を用いて解析した。その結果、CD4+、CD8+T 細胞において、いずれのサイトカインも低 HIV 群と高 HIV 群間で産生細胞の頻度に有意な相違は見られなかった。一方、個々の発現量の比較では、IFN- $\gamma$  産生 CD8+T 細胞での個々の発現量のみ高 HIV 群で有意に低下していた。これまでに、疲弊したメモリー CD8+T 細胞は抗原刺激に対してサイトカイン産生能が低下することが報告されている。このことから T 細胞の活性化・疲弊状態の違いが MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTES、IFN- $\gamma$ 、IL-17 産生能に影響している可能性が考えられる。そこで、PBMC 刺激後 48 時間で見られた高 HIV 群でのサイトカイン産生量の低下や、PBMC 刺激後 5 時間で見られた高 HIV 群での CD8+T 細胞の個々の細胞の IFN- $\gamma$  発現量の低下とメモリー (CM、EM) エフェクター T 細胞の活性化 (CD38+)、疲弊 (PD-1+) 状態との関連について解析を行った。メモリー (CM、EM) 分画における CD38+、PD-1+ 細胞の頻度と PBMC 刺激後 48 時間での MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTES、IFN- $\gamma$ 、IL-17 産生量は有意に逆相関をしめした。さらに、PHA 刺激後 5 時間で見られた IFN- $\gamma$  産生 CD8+T 細胞での個々の発現量と CD38+ 細胞の頻度も有意に逆相関を示した。これらの結果から、高 HIV 群での Th1 型関連サイトカイン (IFN- $\gamma$ 、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTES)、IL-17 の産生能の低下はメモリー (CM、EM) T 細胞の慢性的な活性化や疲弊状態と直接関連している可能性が示唆された。また、T 細胞の過剰な活性化は直接個々の細胞の IFN- $\gamma$  発現量の低下に影響していることが明らかとなった。

PBMC 刺激後 48 時間では低 HIV 群に比べて高 HIV 群で有意に IFN- $\gamma$ 、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTES、IL-17 産生量が低下していた。さらに、IFN- $\gamma$  産生量は、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTES、IL-17 産生量と強い相関を示した。これらの結果から、48 時間での高 HIV 群での IFN- $\gamma$ 、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTES、IL-17 産生量の低下は、PBMC 活性化後初期の段階での IFN- $\gamma$  発現量の低下に起因している可能性がある。そこで、PHA 刺激後 18 時間での遺伝子発現動態の解析を行った。PBMC 刺激後 18 時間での mRNA の発現量を高 HIV 群と低 HIV 群で比較したところ、IFN- $\gamma$  遺伝子の mRNA 発現量のみ高 HIV 群で有意に低下していた。これらの結果から、48 時間での高 HIV 群での MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTES、IL-17 産生量の低下は IFN- $\gamma$  遺伝子発現量の低下に起因しており、IFN- $\gamma$  誘導性に産生されることが示唆された。

#### [考察]

測定を行った 25 種類のサイトカインのうち、高 HIV 群で産生能の低下が見られたのは Th1 型 (MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTES、IFN- $\gamma$ )、Th17 型 (IL-17) のサイトカインのみであり、Th2 型のサイトカインや制御性 T 細胞 (Treg) により産生されるサイトカインには有意差が見られなかった。この結果から高 HIV 群では Th1 型、Th17 型の免疫応答で特異的に機能低下が起きていることが示唆された。これらのサイトカイン産生量とメモリー T 細胞の活性化 / 疲弊状態とは逆相関の関係にあったことから、高 HIV 群では Th1 型、Th17 型の免疫応答に関与するメモリー T 細胞が慢性的な活性化による疲弊により機能不全に陥っていることが示唆された。さらに、高 HIV 群での Th1 型、Th17 型の免疫応答の低下は T 細胞の過剰な活性化による IFN- $\gamma$  発現量の低下に起因していること

が示唆された。高 HIV 群で産生量が低下していた MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTES、IFN- $\gamma$ 、IL-17 は  
宿主  
下を意味し、さらなる悪循環に陥ると考えられる。本研究で見られたメモリーT細胞の機能不全の  
分子メカニズムを明らかにすることで、その分子をターゲットとした治療薬・ワクチンとして利用  
できる可能性がある。