HIV 病態における TH 1・TH 2

小 柳 義 夫

Jpn. J. Clin. Immun., 23 (6) : 582~585, 2000.**Efficient Replication of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Cytokine Induced CD 4⁺ T Helper 1 (Th 1)-and Th 2-type Conditions**

Yoshio Koyanagi

*Department of Virology, Tohoku University School of Medicine***【Summary】**

Potent stimuli for CD 4⁺ T cell differentiation are cytokines. Among them, IL-12 or IL-4 induce naive CD 4⁺ T cells to Th 1 or Th 2 cells, respectively. In this study we found that macrophage-tropic (M-tropic) HIV-1 strains more efficiently replicated in interleukin 12 (IL-12) induced T helper 1 (Th 1)-type culture derived from normal CD 4⁺ T cells than T-cell-line-tropic (T-tropic) strains did. In contrast, T-tropic strains preferentially infected IL-4 induced Th 2-type culture derived from same donor CD 4⁺ T cells. Additional studies using chimeric viruses demonstrated that the V 3 region of gp 120 was the principle determinant for this efficient replication. It was also isolated T-tropic viruses from an acutely infected patient who had been evidenced as severe CD 4 depletion during short time course. These results indicate that HIV-1 isolates exhibit differences in the ability to infect CD 4⁺ T cell subset such as Th 1 or Th 2 cells, and that this difference may partly correlate with the viral pathogenesis. The findings suggest that immunological condition is one of the factors responsible for inducing selection of HIV-1 strains.

【概 要】

HIV-1 の主な標的細胞群はヘルパー T (Th) 細胞群であるが、これらの細胞群はその産生するサイトカインのパターンから、Th 1, Th 2 ならびに Th 0 細胞に大別されることが知られている。感染初期に分離されるマクロファージ指向性 (M-tropic) HIV-1 は Th 1 細胞培養系において、また病状の進行とともに分離される T 細胞株指向性 (T-tropic) HIV-1 は Th 2 細胞培養系において、それぞれ増殖性が高いことを明らかにしてきた。ウイルスの増殖性の決定領域は gp 120 の V 3 領域のみにあることがキメラウイルスの解析から明らかになった。

発病前の感染者においては、Th1型の免疫応答細胞が優位にあるが、病状の進行につれてTh2型免疫応答細胞が優位になってくるといふ臨床免疫学的検討からの報告を考慮すると、今回の結果は、体内でのサイトカインまたはTh細胞サブセットの変動が、ウイルスの変異を促進しうる大きな要因であると考えられる。

I. はじめに

Human immunodeficiency virus (HIV) の感染に対して、生体は速やかにサイトカインネットワークを構築し、免疫反応を誘導するが、このネットワークの中心を担うものはヘルパーT細胞(Th)群である。これらTh細胞は、産生するサイトカインのパターンから、Th1、Th2ならびにTh0細胞に大別されることが知られている。これまでHIV-1分離株のなかには、これらThサブセットに対する住み分けが存在することを明らかにしてきた^{1,2)}。その分子メカニズムと臨床的意義を明らかにするために実験をスタートした。

II. 材料と方法

1. IL-12刺激Th1細胞およびIL-4刺激Th2細胞の培養系

健康人 peripheral blood mononuclear cell (PBMC) を回収し、DYNABEADS法を用いてCD4陽性T細胞を分離した。この細胞を、まずOKT3抗体を固相化したプレート上でIL-12を含む培地で8日間培養したものをTh1型細胞、また、この細胞から、さらにCD45RA陽性細胞を分離し、IL-4を含む培地で同様に刺激したものをTh2細胞とし以降の実験に用いた。このそれぞれの培養系におけるIFN- γ (Th1細胞)あるいはIL-4 (Th2細胞)産生細胞率は、細胞内サイトカイン染色法によって確認した。結果は、Th1細胞培養系においてはIFN- γ とIL-4産生細胞は96.2%と4.2%、Th2細胞培養系におけるそれは9.7%と57.7%であった。

2. 急性感染期HIV-1感染者からの臨床分離株の分離

米国 Cedars-Sinai Medical Center に通院している3名の抗体陰性期ならびに抗体陽転後6~9カ月のHIV-1感染者のPBMCを、健康人由来のPBMCとco-cultureし、ウイルスを分離した。さらに各患者からのウイルス溶液から、限界希釈法によって各10分離株を得、以降の実験に用いた。

3. 標的細胞へのウイルス侵入効率の測定

1) Binding/entry assay

p24 gag 抗原量で200 ngに相当するHIV-1_{JR-CSF}とHIV-1_{NL4-3}を、それぞれTh1型細胞とTh2型細胞とともに4°Cで1時間インキュベーション後、PBS(-)で2回洗浄し、細胞表面に吸着したウイルス量を、p24 gag ELISAにて測定した(binding assay)。また、ウイルスと細胞を37°Cで1時間インキュベーション後、細胞表面に吸着したウイルスをトリプシンにより除去し、細胞内から回収できるp24 gag 抗原量をもって、ウイルス侵入量とした(entry assay)。

2) DNA PCR assay

MOI 0.001の各ウイルスを細胞に2時間感染させ、細胞を2回洗浄し、感染24時間後の細胞内HIV-1 DNAをPCR法によって検出した。

3) Single round HIV-1 infection assay

nef遺伝子領域にルシフェラーゼ遺伝子を置き換え、env遺伝子に欠失をくわえ、replication incompetentであるHIV-1ベクター(pJR-luc, pNL-luc)と、JR-FLあるいはIIIBエンベロープを発現するプラスミドDNAをそれぞれCOS細胞にco-transfectionし、2日後の培養上清をウイルス溶液として回収した。次に、p24 gag 抗原量で100 ngに相当するウイルスを、Th1またはTh2型細胞に2時間感染させ、48時間後の細胞抽出液中のルシフェラーゼ活性を測定した。

III. 結果

1. 急性感染期由来の臨床分離株のサイトカイン誘導Th1またはTh2型細胞における増殖性 [実験1]

抗体陰性期ならびに抗体陽転後数カ月のHIV-1感染者(計6名)からそれぞれ10株ずつの分離株を得たが、実際に感染実験に用いたのはそのうちの47分離株であった。これらの分離株はp24 gag 抗原量で1 ngに相当するウイルス液を用いて、Th1細胞培養系およびTh2細胞培養系における増殖性を検討したところ、22分離株でTh1またはTh2型細胞培養系における増殖性が確認された。これらの分離株のうち、

A. Binding/entry assay

B. DNA PCR assay

C. Single round HIV-1 infection

図 1 Th1細胞とTh2細胞へのウイルス侵入効率

1名の感染者 (GAM) からの分離株を除くと, 14分離株中11分離株 (78.6%) はTh1細胞培養系で増殖性を示したのに対し, Th2細胞培養系で増殖性を示したのはわずか3分離株 (21.4%) であった。しかしながら, 抗体陽転後も高いウイルス血症を示した感

染者GAM由来の8分離株については, Th2型細胞において増殖性が高く, さらにそのうち3分離株についてはTh1型細胞においても高い増殖性が確認された。

2. Th 1 あるいは Th 2 型細胞への侵入効率の比較 [図 1]

JR-CSF などの M-tropic HIV-1 は Th 1 細胞において、NL 4-3 といった T-tropic HIV-1 よりも増殖性が高く、さらにその増殖性の違いはウイルス側のエンベロープ領域が決定していること報告してきた^{1,2)}。本実験においては、このウイルスのエンベロープ領域の違いが、ウイルスの life cycle のどの段階においてウイルス増殖の違いに寄与しているのかを明らかにすることを目的とした。その結果、Th 1 細胞への侵入効率を p 24 gag 抗原量、またはウイルス DNA 量として検索したところ、その侵入効率はともに T-tropic HIV-1 の方が高かった (図 1-A および B)。さらに、M-tropic または T-tropic のエンベロープをもつ replication incompetent な HIV-1 を感染させた結果からも、細胞侵入効率は T-tropic エンベロープをコートされたウイルスで高かった (図 1-C)。従って、M-tropic HIV-1 の IL-12 刺激 Th 1 細胞における高い増殖性は、ウイルスの細胞侵入以降の段階で主に決定されている可能性が強く示唆された。

IV. 考 察

HIV-1 感染者においては、感染初期には IFN- γ や IL-2 などのサイトカインを産生する Th 1 型の細胞性免疫応答が優位であるが、病状の進行に伴って IL-4 などを産生する Th 2 型の液性免疫応答が優位になると報告され、いわゆる Th サブセットの極性化と感染個人の病態との相関についてこれまでに数多くの議論がなされている³⁾。免疫担当細胞は、サイトカインを媒体としてその防御機構を発揮することから、Th サブセットの変動に伴う生体内サイトカインの変動が、ウイルスの選択的増殖に大きな影響を及ぼすことは容

易に想像できる。これまでに我々は、HIV-1 分子クローンをを用いた研究から、M-tropic HIV-1 は IL-12 で誘導される Th 1 型 CD 4 陽性 T 細胞培養系において、また T-tropic HIV-1 は IL-4 によって誘導される Th 2 型 CD 4 陽性 T 細胞培養系においてそれぞれ増殖性が高いことを明らかにしてきた^{1,2)}。この以前の我々の結果を、感染初期には M-tropism を示すウイルスが、逆に感染中・後期には T-tropism を示すウイルスがそれぞれ優位に分離されてくるという臨床ウイルス学的な検討結果と総合すると、Th サブセットの極性化がウイルスの M-tropism から T-tropism へのシフトを惹起しうるひとつの要因であると考えることができる。一方、今までの研究結果では、Th 1 細胞における M-tropic HIV-1 と T-tropic HIV-1 の増殖性の違いは、キメラウイルスを用いた実験から、ウイルスエンベロープ領域の V 3 loop が決定していることを明らかにした²⁾。V 3 loop は細胞側の co-receptor と結合することでウイルスの細胞への侵入を促進することが知られている。従って、co-receptor の発現量の違いがウイルスの増殖に影響を及ぼしている可能性が考えられたが、M-tropic HIV-1 の co-receptor である CCR 5 は確かに Th 1 型細胞で高く発現しているものの、T-tropic HIV-1 の co-receptor である CXCR 4 も同様に高い発現が確認されている²⁾。そこで、本研究においては、エンベロープ領域の違いが、細胞侵入段階でウイルスの増殖性の差異に影響を及ぼしているのか否かについても、詳しい解析を行った。その結果、少なくとも Th 1 型細胞への侵入効率は M-tropic よりも T-tropic の方が高いことが明らかとなり、M-tropic HIV-1 の Th 1 型細胞における高い増殖性は、その細胞侵入以降の過程で主に決定されている可能性が強く示唆された (図 1)。

文 献

- 1) Tanaka, Y., Koyanagi, Y., Tanaka, R., Kumazawa, Y., Nishimura, T., Yamamoto, N.: Productive and lytic infection of human CD4⁺ type 1 helper T cells with macrophage-tropic human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.*, 71: 465~470, 1997.
- 2) Suzuki, Y., Koyanagi, Y., Tanaka, Y., Murakami, T., Misawa, N., Maeda, N., Kimura, T., Shida, H., Hoxie, J.A., O'Brien, W.A., and Yamamoto, N.: Determinant in human immunodeficiency virus type 1 for efficient replication under cytokine induced CD4⁺ T helper 1 (Th 1)-and Th 2-type conditions. *J. Virol.*, 73: 316~324, 1999.
- 3) Clerici, M., Shearer, G.M.: The Th 1-Th 2 hypothesis of HIV infection: new insights. *Immunol Today*, 12: 575~581, 1994.