

学 位 論 文 題 名

Exposure of normal monocyte-derived dendritic cell
to human immunodeficiency virus type 1
particles leads to induction of apoptosis
in co-cultured CD4⁺ as well as CD8⁺ T cells.

(HIV - 1 粒子吸着単球由来樹状細胞により誘導される CD 4
並びに CD 8 陽性 T 細胞のアポトーシス)

学位論文内容の要旨

ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) は、後天性免疫不全症候群 (AIDS) の原因ウイルスである。AIDS 病態進行は、HIV-1 の主要な感染標的である CD4 陽性 T 細胞の減少による免疫力の低下で特徴付けられる。しかし、この細胞減少は CD4 陽性 T 細胞のみならず、CD8 陽性 T 細胞や B 細胞といった、免疫担当細胞全体に及ぶことが明かとなっている。この細胞減少の機構については不明な点が多いが、感染者生体内で認められる現象として、リンパ節内ではウイルスに感染していない細胞にアポトーシスが誘導されており、試験管内においては、感染者由来末梢血リンパ球は活性化刺激を加える事により、健常者に比し高率にアポトーシスを起こす事が知られている。HIV-1 感染者の T 細胞における HIV-1 ゲノム陽性率は 0.1%以下であるとする報告、さらに産生ウイルスの大多数は非感染性粒子であるとの報告も併せて考慮すると、感染者生体内における免疫細胞の減少は、HIV-1 感染・増殖による直接的な細胞傷害というよりはむしろ、細胞傷害性因子 (細胞) の誘導に伴う間接的な効果により引き起こされる可能性が強く示唆される。

そこで本研究では、T 細胞との接触により HIV-1 粒子を T 細胞へ受け渡す役割を担っている事が示唆されており、生体内でのウイルス伝播に重要な役割を果たしている樹状細胞に着目し、非感染細胞のアポトーシス誘導への関与を検討した。また HIV-1 感染者において産生されるウイルス粒子の大多数を占めており、病態への関与が示唆されながらも、ほとんどその解析が進んでいない非感染性の HIV-1 粒子がアポトーシスを誘導する可能性について検討を行った。

樹状細胞は健康人由来末梢血単球をインターロイキン 4 (IL-4)、顆粒球・マクロファージ刺激因子 (GM-CSF) 存在下で分化させ、HIV-1 の代表的実験室株 LAI 由来で、細胞への吸着能は有するものの逆転写酵素を有さない為に、細胞内にてウイルス複製を行えない非感染性の L-2 粒子の吸着を行った。その後、健康者由来末梢血 T 細胞との共培養を行い、アポトーシス誘導の可能性について検討を行った。その結果、少なくとも共培養 3 日目より初期アポトーシス細胞の指標であるアネキシン V との反応性が陽性の T 細胞が、L-2 粒子非吸着樹状細胞との共培養を行った場合に比し、高率に出現する事が明かとなった。この傾向は共培養 7 日目においても認められ、前者が約 18%なのに対し、後者は約 34%と 2 倍程度高い割合であり、この傾向は数人の異なる宿主由来の樹状細胞を用いた場合も再現性が確認された。さらに断片化 DNA を有する T 細胞の割合も上記の如く 2 倍程度の増強を示した。このことから HIV-1 粒子吸着をうけた樹状細胞は T 細胞にアポトーシスを誘導し得る事が明かとなった。さらにこのアポトーシスは CD4 陽性 T 細胞のみならず CD8 陽性 T 細胞にも誘導されていた。このアポトーシスに HIV-1 関連のアポトーシスにおいてその重要性が示唆されている Fas システムが関与する可能性について、Fas 抗原のアンタゴニストを添加してアポトーシスの抑制効果を検討したが、非添加時が 60.6%なのに対し、添加時では 51.1%とその効果は非常に弱いものであり、異なるアポトーシスの経路も関与している可能性が示唆された。続いて、樹状細胞は強力な抗原提示細胞として T 細胞との接触により T 細胞の活性化を促す事が知られているため、L-2 粒子吸着後の樹状細胞の T 細胞活性化能に変化が認められるか否かについて検討を行った。その結果、ウイルス粒子吸着後の樹状細胞と非吸着樹状細胞との T 細胞活性化能はほぼ同等であった。次に、L-2 粒子吸着樹状細胞と共培養を行った T 細胞の細胞周期において非吸着樹状細胞との共培養を行った T 細胞に比し、G0/G1 ピークの減少が認められたため、さらに詳細に解析を行ったところ、Ki-67 抗原陰性の G0 期の細胞数の割合は両 T 細胞群において変化は無かったのに対し、L-2 粒子吸着樹状細胞と共培養を行った T 細胞において、Ki-67 抗原陽性 G1 期細胞の割合が約半数に減少していた。このことから、L-2 粒子吸着樹状細胞と共培養を行った T 細胞は樹状細胞により活性化を受け、細胞周期をまわす過程の G0 期から G1 期に至る前にアポトーシスを起こす事が示唆された。

本研究では樹状細胞が HIV-1 粒子の吸着を受けることで、T 細胞にアポトーシスを誘導する事を種々の実験において提示した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 長 嶋 和 郎

副 査 教 授 皆 川 知 紀

副 査 教 授 志 田 壽 利

学 位 論 文 題 名

Exposure of normal monocyte-derived dendritic cell
to human immunodeficiency virus type 1
particles leads to induction of apoptosis
in co-cultured CD4⁺ as well as CD8⁺ T cells.

(HIV - 1 粒子吸着単球由来樹状細胞により誘導される CD 4
並びに CD 8 陽性 T 細胞のアポトーシス)

HIV-1 感染により誘導される T 細胞減少は AIDS 病態の主な機序である。そこで本研究では、T 細胞との接触により HIV-1 粒子を T 細胞へ受け渡す役割を担っている事が示唆されており、生体内でのウイルス伝播に重要な役割を果たしている樹状細胞に着目し、非感染細胞のアポトーシス誘導への関与を検討した。また HIV-1 感染者において産生されるウイルス粒子の大多数を占めており、病態への関与が示唆されながらも、ほとんどその解析が進んでいない非感染性の HIV-1 粒子がアポトーシスを誘導する可能性について検討を行った。

DC は、単球を GM-CSF と IL-4 処理することにより得た。この DC を健常者由来末梢血 T 細胞と 1:20 の割合で共培養した。その後の死細胞率、プロピディウムイオダイド染色、annexin V との反応性から、共培養した CD4⁺および CD8⁺ T 細胞にアポトーシスが誘導されることが明かになった。さらに、このアポトーシスはマイトジェン処理なしでも、恐らく DC のマイトジェン効果により標的 T 細胞が G0 から G1 に移行した時点で引き起こされていた。

このように、HIV-1 粒子吸着を受けた DC は周辺の T 細胞のアポトーシス誘導に関与していることが明かとなった。

副査の志田教授からの HIV-1 感染におけるアポトーシスと病態との関連性に関する質問に対し、感染者のリンパ節において健常者に比し高率にアポトーシスが誘導されている報告や感染者のリンパ球が試験管内において容易にアポトーシスを起こす報告例をあげ、AIDS 病態の本質である免疫細胞の減少はアポトーシスによる可能性を論じた。また CD8 陽性 T 細胞にもアポトーシスが誘導される機序についての質問には、HIV-1 感染により誘導される

サイトカインネットワークが細胞をアポトーシス感受性にし得る環境をつくりあげている可能性を他者の論文を引用しつつ説明した。免疫学的研究と治療法の開発とに関して、本研究の今後の AIDS 治療における応用の可能性についての質問に対し、本研究のような基礎研究の積み重ねが様々な AIDS 病態の本質を明らかにし、ひいては治療法の開発のつながる可能性を述べた。続いて副査の皆川教授より本研究で認められる樹状細胞によるアポトーシスは HIV-1 感染におけるどのステージで起こっている可能性が考えられるのかという質問に対し、CD4 陽性 T 細胞数が維持されているように見えるステージにおいても樹状細胞が T 細胞の異常な活性化を誘導しこれが後にアポトーシスにつながる可能性が考えられ、急激の細胞減少が認められる時期に限らず、感染の全ステージに渡って、樹状細胞はアポトーシス誘導に関与している可能性が考えられる事を述べた。また実際の感染者における非感染性粒子をどのように検出するのかという質問に対し、現在までのところ感染者内で産生されることが予想されている非感染性 HIV-1 粒子は Gag や半定量的 RT-PCR 等で粒子数としては検出できるが、非感染性と感染性粒子として区別して分離する事は困難であると述べた。最後に主査の長嶋教授よりアポトーシス誘導に必要な HIV の最小コンポーネントに関する質問に対し、gp120 である可能性が高い事を述べ、また他者の報告を引用し、gp120 によるアポトーシスは gp120 と抗 gp120 に対する抗体を用い、CD4 の架橋をおこす事で誘導される事を述べた。

本論文は未だ明確にされていない HIV-1 誘導性の非感染細胞のアポトーシス誘導の機序と非感染性 HIV-1 粒子の関与を明かにした点で評価され、今後、AIDS 病態を解明していく上で有用な情報を提供すると考えられる。

審査員一同はこれらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども合わせ、申請者が博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと判定した。