

DA
2004
2002
H9

細胞内サイトカイン測定法を用いた
HIV-1 感染者の病態と病態に関連した
免疫応答に関する解析

2 0 0 2

筑波大学大学院博士課程医学研究科

田 中 真 理

寄贈
田中真理氏

03006680

論文概要

○ 主論文題

細胞内サイトカイン測定法を用いた
HIV-1感染者の病態と病態に関連した
免疫応答に関する解析

(所属) 筑波大学大学院博士課程医学研究科

(氏名) 田中真理

論文概要

緒言

ヒト免疫不全ウイルス1型 (human immunodeficiency virus type 1: HIV-1) は、全世界におよそ4,000万人の生存感染者が存在し、アジア・アフリカ地域を中心に、新規感染者数も断続的な上昇を認める深刻な感染症である。その HIV-1 病期の進行は、ヘルパー T (CD4+) 細胞の数的な減少と体内のウイルスの増殖、そしてそれらに付随して発生する免疫機能低下により象徴される。病態と関連した免疫機能を評価する判断基準として近年注目されている方法に、細胞内サイトカイン測定法がある。細胞内サイトカイン測定法は、細胞をマイトジェンや抗原とともに培養することで、活性化されサイトカインを産生する細胞を検出する測定系である。この測定法の最大の特徴は、サイトカインと表面抗原を二重染色することで、フローサイトメトリーを用いてリンパ球サブセット毎のサイトカイン産生細胞の割合を個別に解析することが可能な点である。また、細胞内サイトカイン測定法は単一細胞における反応ですら検出が可能であることから、反応性の低い抗原による免疫応答を検出する場合にも適している。

目的

マイトジェンもしくは特異抗原により誘導されるサイトカイン産生 T 細胞の割合と HIV-1 および関連疾患の病態との関連を調べ、この因子が免疫機能や治療効果を確認する為の有効な指標となりうるかを主たる目的として、以下の3項目の検討を実施した。

1. HIV-1 病期の進行と TH1 タイプから TH2 タイプへのサイトカインシフトとの関連
2. HIV-1 感染により低下したインターロイキン 2 (interleukin-2: IL-2) 産生 CD4+T 細胞の割合のリコンビナント IL-2(rIL-2)投与による回復の可能性
3. サイトメガロウイルス (CMV) 網膜炎の発症・再発症制御と CMV 特異的 CD4+T 細胞数の関連

対象

各項目の研究課題に従い、以下の様に対象者を選出した。

1. CD4+T 細胞数により3群に分類した HIV-1 感染者 (n=48)
2. IL-2 投与 HIV-1 感染者 (IL-2 group: n=5)とその対照者(control group: n=4)
3. CMV 網膜炎の既往歴があり維持療法中断後も経過が安定している者(n=5)と CMV 網膜炎発症中の者(n=4)

方法

上記 1、2 の対象者の末梢血単核球にはマイトジェンの phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)と Ionomycin を添加し、3 の末梢血単核球には CMV 特異抗原を添加して、それぞれを培養後、細胞内サイトカイン測定法によるサイトカイン産生細胞の割合を解析した。

結果

1. 潜在するサイトカイン生成能力を強力に引き出すPMA+Ionomycinによる非特異刺激により、サイトカイン産生T細胞の免疫動態と、HIV-1感染者の病期との関連を検討することより本研究を開始した。その結果、免疫不全が進行したHIV-1感染者においてはIL-2産生細胞の有意な減少が認められた。
2. 次に、HIV-1感染者のIL-2産生細胞の割合が回復することを期待して、HIV-1感染者にrIL-2を投与した。その経過を縦断的に解析した結果、CD4+T細胞数は増加するものの、IL-2産生CD4+T細胞は有意な増加を認めず、CD4+T細胞数の上昇には、IL-2レセプター α (CD25)を中心とした別の因子が関与している可能性が示唆された。
3. また、CMV 抗原により誘導される TNF- α 産生 CD4+T 細胞(=CMV 特異的 CD4+T 細胞)数を検討した結果、CMV 網膜炎発症中の AIDS 患者は、CMV 網膜炎の既往があり現在は抗 CMV 維

持療法を中断し抗 HIV-1 治療のみで経過している者よりも、CMV 特異的 CD4+T 細胞数が断続的に有意な低値を示した。CMV 網膜炎発症中の対象者は、48 週フォローアップ中に CD4+T 細胞数が回復しても、CMV 特異的 CD4+T 細胞数は一貫して低値をシフトし続けた。即ち、CMV 網膜炎発症(もしくは再発症)の制御には、CMV 特異的 CD4+T 細胞数の回復の必要性が示唆された。

結論

以上のように細胞内サイトカインの測定は、HIV-1 感染者の免疫機能を認識する上でも有用な指標となり、この手法を用いて対象者の免疫応答を縦断的に追跡することの重要性が認められた。今後も HIV 抗原により誘導される特異的免疫応答の解析を始め、CMV 以外の日和見感染症や HIV-1 併発感染症に関しても、細胞内サイトカインの解析が臨床上有効な指標となりうるかを順次検討していく予定である。

筑波大学

博士（医学）学位論文

目次		
第I章	HIV-1 概説	1
第II章	文献的考察	
II-1	サイトカインにより分類される T 細胞サブセットと HIV-1 の病期の進行との関連	3
II-2	HIV-1 の治療としての新しい免疫学的療法の役割	4
II-2-1	HIV-1 感染症における IL-2 治療の役割	4
II-3	CMV に対する免疫反応	5
第III章	病期が進行した HIV-1 感染者では、IL-2 産生 CD4 ⁺ T 細胞割合は低下するが、TH1 タイプ から TH2 タイプ へのサイトカインのシフトは認められない。	
III-1	はじめに	7
III-2	対象と方法	7
III-2-1	研究対象	7
III-2-2	使用蛍光抗体	8
III-2-3	細胞刺激および蛍光抗体染色	8
III-2-4	フローサイトメトリーアッセイ	8
III-2-5	サイトカイン測定	9
III-2-6	統計学的手技	9
III-3	結果	9
III-3-1	PMA+Ionomycin 刺激後の CD4 発現	9
III-3-2	CD4 ⁺ CD8 ⁻ T 細胞内のサイトカイン産生細胞	10
III-3-3	血漿中ウイリス量とサイトカイン産生細胞の関係	10
III-3-4	その他の細胞集団におけるサイトカイン産生細胞	10
III-4	考察	11
第IV章	第三相 IL2 無作為割付国際臨床試験(ESPRIT)参加者を対象とした T 細胞免疫反応の経時的な変動	
IV-1	概要	14
IV-2	目的	14
IV-3	対象と方法	14
IV-3-1	Study design	14
IV-3-2	対象	15
IV-3-3	方法	15
IV-3-3a	採血方法と採血間隔	15
IV-3-3b	使用抗体	15
IV-3-3c	リンパ球表面抗原の解析	16
IV-3-3d	IL-2 産生 T 細胞の変動	16
IV-3-3e	T 細胞増殖試験	16

IV-3-3f	血漿 HIV-RNA 量(VL)	16
IV-3-3g	統計学的処理	16
IV-4	結果	17
IV-4-1	CD4+T 細胞の変化	17
IV-4-2	IL-2 産生 T 細胞の割合	18
IV-4-3	TH1・TH2 型 ^o サイトカイン産生細胞	18
IV-4-4	上記 2 項目の(V-4-2,-3)のまとめ	19
IV-4-5	T 細胞増殖試験	19
IV-4-6	IL-2 レセプター(IL2 receptor: IL-2R)の発現	19
IV-4-7	メモリー ^o T 細胞	20
IV-4-8	NK 細胞の変動	21
IV-4	考察	21
第V章	CMV 網膜炎維持療法を中断した HAART 施行中の AIDS 患者における サイトカイン(CMV)特異的 CD4+T 細胞反応の安定性	
V-1	はじめに	25
V-2	対象と方法	25
V-2-1	対象	25
V-2-2	使用蛍光抗体	26
V-2-3	細胞内サイトカインの検出	26
V-2-4	CMV アンチゲノムの定量	27
V-2-5	統計学的処理	27
V-3	結果	27
V-3-1	CMV 抗原に対する TNF- α 産生 CD4+T 細胞	27
V-3-2	CMV 網膜炎の臨床症状と CMV-特異的 CD4+T 細胞の関連	27
V-3-3	CMV 特異的 CD4+T 細胞の 48 週フォローアップ ^o	28
V-3-4	体内での CMV の再活性化とともに発生した CMV 特異的 CD4+T 細胞 の急激な変動	28
V-4	考察	29
	結語	32
	引用文献	34
	略語一覧	47
	謝辞	