

### 第 III 章. 病期が進行した HIV-1 感染者では、IL-2 産生 CD4+T 細胞の割合は低下するが、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

CD4+T 細胞は、分泌するサイトカインにより主に 2 つのサブタイプに分類される。即ち IL-2 や IFN- $\gamma$  などを分泌する TH1 型 (TH1) および IL-4, IL-5 そして IL-13 などを分泌する TH2 型 (TH2) である[7-11]。1993 年 Clerici らは、リコール抗原およびアロ抗原を刺激に用いた免疫反応試験において、HIV-1 感染者の病期の進行により、TH1 から TH2 ドミナントへサブタイプが推移することを報告した [15,16]。しかし、この仮説は現在においても議論的である。Graziosi らは、同一 HIV-1 感染者において病期の進行とサイトカイン発現の関係を調査し、TH1 から TH2 へのシフトは発生しないと結論している[32]。Westby らも、細胞内サイトカインの解析を行った結果、HIV-1 病期の進行に伴うサブセットのシフトは起こらないと報告している[33]。Westby らの確立した方法は、細胞を単離することなく同じ表面抗原を持つ細胞のサイトカインを解析する方法であるが、phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) と Ionomycin を刺激に用いるために発生する CD4 のダウンモジュレーションが問題であった。そこで、Westby らは、CD3+CD8-T リンパ球を CD4+細胞とみなして、その CD3+CD8-T リンパ球中の細胞内サイトカインの割合を解析している。しかしこの手法によると、CD4-CD8-細胞を目的細胞集団中に含めてしまう可能性があり、正確に CD4+T 細胞におけるサイトカイン産生細胞の割合を投影しているとはいえない。本研究では、3 カラーフローサイトメリー解析を用いて、CD4+T 細胞集団内のサイトカイン産生細胞を直接解析する方法により、HIV-1 において CD4+T 細胞の TH1 から TH2 へのシフトが発生するかを検討した。

### III-2: 対象と方法

#### III-2-1: 対象

国立国際医療センターのエイズ治療 研究開発センターに通院中の 48 名の HIV-1 感染者(HIV+)からのヘパリン採血をサンプルとした。対象者は全て日本人で、平均年齢は、34.8 歳 (19~56 歳)であった。これらの対象者を CD4+T 細胞数により <200/ $\mu$ l: 13 名, 200- 500/ $\mu$ l: 24 名、そして >500/ $\mu$ l: 11 名に分類した。採血時にこれら対象者には、急性感染症ならびにアレルギー反応を認めなかった。また、16 名の年齢をマッチさせた HIV-1 非感染者(HIV-) を対照群とした (平均年齢:34.1 歳, 22~54 歳)。全対象者には研究に対する十分な説明を行い、インフォームドコンセントを得た上で、検体供与の了承を得ている。

#### III-2-2: 使用抗体

以下の蛍光標識抗ヒトモノクローナル抗体 (mAbs) は、Becton Dickinson (BDIS, CA, USA) より購入した。即ち、CD4-PerCP, CD8-FITC, CD69-FITC, IL-2-PE, IFN- $\gamma$ -PE, IL-4-PE, IgG1-FITC, IgG1-PE (clone:X40), IgG2-PE, IgG1-PerCP である。また Pharmingen (CA, USA) より IL-5-PE および IL-5 の アイソタイプコントロールとしての IgG1-PE (clone:R3-34) を購入した。すべてモノクローナル抗体は、製造販売元が推奨している感作濃度に従い使用した。

#### III-2-3: 細胞刺激および抗体染色

細胞の刺激および免疫染色は Westby らの方法に若干修正を加えて実施した[8]。簡潔

に手順を示すと、0.5 ml の全血を 2mM エーグルタミン酸、100 U/ml ペニシリン、および 100 µg/ml ストレプトマイシンを含む RPMI1640 で等量希釈し、さらに細胞の刺激のため 25 ng/ml の PMA (Sigma Aldrich, MO, USA) および 1 µg/ml のイオノマイシン (Ionomycin: Sigma Aldrich, MO, USA) を、そしてサイトカインが細胞外へ分泌するのを防ぐため 10 µg/ml brefeldin A (Sigma Aldrich) をそれぞれ添加した。この希釈血液を 37°C の 5% CO<sub>2</sub> インキュベーターにおいて 4 時間インキュベーションを行った。

インキュベーション後、各サンプルの表面抗原を抗体染色 (室温 15 分間) し、FACS ライジングソリューション (BDIS) により赤血球の溶血ならびに細胞の固定を行い、0.5% ウシ血清アルブミン添加 Phosphate-Buffered-Saline (PBS-BSA) にて洗浄した。次に FACS パーマイアビライジングソリューション (BDIS) により細胞透過処理をし、さらに PBS-BSA により 2 回洗浄を行った後、細胞内サイトカイン染色を行い (室温 30 分間、遮光インキュベーション)、更に PBS-BSA で洗浄後、1% パラホルムアルデヒドにより細胞を固定し、フローサイトメリー測定まで遮光 4°C にて保存した。各処理を期待通りに反応させるため、溶血・細胞透過処理前には、10 秒間の強力なヴォルテックス (vortex) を間歇的に 3 回繰り返した。このステップは、緩やかな混和という従来法に改良を加えた点であり、細胞固定以降に強力な攪拌を実施しても、最終的な細胞の回収率が、極端に低下することはなかった。

#### III-2-4: フローサイトメリーアッセイ

フローサイトメリー解析は、EPICS XL (Coulter, FL, USA) と System II™ ソフトウェアにより実施した。使用蛍光色素に対するセッティングフィルターは、それぞれ FL1 (FITC), FL2 (PE) および FL4 (PerCP) が設定されている。ゲーティング方法は、まず、フォワード・スキャッター (forward-scatter) とサイド・スキャッター (side-scatter) によりドットプロットで分布した主なリンパ細胞集団 (R1) を決定した。次に PMA + Ionomycin の刺激によりダウンモジュレーションした CD4 を検出するため、FL4 の感度 (voltage) を FL1, FL2

のおよそ 2 倍に調整した。その上で、FL4 ヒストグラム上に抗体コントロール (IgG-PerCP) によるカットオフポイントを設定し、R1 中で、カットオフポイントより陽性領域 (positive zone) に位置する細胞群を CD4+リンパ球 (R2) とした。次に R2 中の CD8+T 細胞群 (R3) のコンタミネーションを除く領域 (R2 without R3) を設定して、最終的に R2 without R3 内の細胞を CD4+CD8+T 細胞として、この細胞集団の細胞内サイトカインを測定した (Fig. III-1)。また、刺激による T 細胞活性化の指標として、CD69 細胞の割合も各サンプル毎に測定した(データ表示せず)。

#### III-2-5: サイトカイン測定

各サンプルの培養上清中のサイトカインを測定するために、PBMCs:  $4 \times 10^5$  /well に同様の刺激を加え、37°C の 5% CO<sub>2</sub> インキュベーターにおいて 24 時間インキュベーションを行った。インキュベーション後の培養上清を分取し、測定時まで -30°C にて保存した。サイトカインの測定は市販されている enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) キット (ENDOGEN, MA, USA) を使用した。

#### III-2-6: 血漿 HIV-RNA 量 (VL) 測定

血漿中 HIV-RNA 量 (HIV-viral load: VL) は、EDTA 添加血漿をサンプルとして、PCR 法による核酸増幅と核酸ハイブリダイゼーション法を応用した Amplicor HIV-1 monitor 1.5 (Roche Diagnostic Systems, NJ, USA) にて定量した。同法は、検体中の HIV-RNA を、既知濃度の定量標準 RNA とともに逆転写反応により cDNA へ合成し、PCR により両 DNA を増幅した後、HIV-RNA に特異的な DNA プロブと定量標準 RNA に特異的な DNA プロブにより、それぞれの増幅 DNA を捕捉し、定量標準増幅値と比較することで、HIV-RNA 量の実測を可能にした系である (測定感度: >50 copies/ml)。

### III-2-7: 統計学的手技

群間の比較は、対応のないT検定またはone-way ANOVAにより検定した。血漿中のRNA量はlog換算してから、サイトカイン産生細胞の割合との相関をPearsonの相関係数により調べた。全ての解析は、 $p < 0.05$  の場合に有意差があると判定した。

### III-3: 結果

#### III-3-1: PMA+Ionomycin 刺激後の CD4 発現

PMA + Ionomycin 刺激後の CD4 の発現は、未刺激の場合と比較して明らかなダウンモジュレーションが認められた。CD4 のダウンモジュレーション後の、フローサイトメリーでの検出を容易にする目的で、本研究では、強力なホルックス操作を実施した。この操作により、CD4+リンパ球のピークは、明瞭に分離されたが、CD4+リンパ球のヒストグラムと CD4- (non CD4)リンパ球のヒストグラムの交差を、完全なシングルピークとして単離することは困難であった。それ故に、CD4+リンパ球領域 (R2) への CD8+T 細胞の洩れ込みが、1.3~14.0% 確認された。そのため CD4+CD8-T 細胞 (R2 without R3) を設定し、その中のサイトカインを解析することとした (Fig III-1)。

T 細胞の活性化マーカーである CD69 発現細胞の割合は、HIV+では 78.2~99.5% (mean: 93.3%) で、HIV-では 83.5~98.8% (mean: 92.5%) であり、これは、いずれのグループにおいても大半の細胞が、PMA+Ionomycin により活性化されたことを示すものであった。

#### III-3-2: CD4+CD8-T 細胞における TH1 タイプサイトカイン産生細胞

CD4+CD8-T 細胞におけるサイトカイン産生細胞の割合は、Table III-1 に示す通りである。

HIV+における IL-2 産生細胞の割合は、HIV-に比べると有意に低い値を示した ( $p<0.01$ )。一方、同じ細胞集団における IFN- $\gamma$ 産生細胞の割合は、HIV+と HIV-の間に有意な差を認めなかった。

HIV+を CD4+T 細胞数により  $<200/\mu\text{l}$ ,  $200\text{--}500/\mu\text{l}$ , および  $>500/\mu\text{l}$  の 3 群に分類して IL-2 産生細胞の減少を調べた結果、CD4+T 細胞数の減少に従い、IL-2 産生細胞の割合も減少し、3 群間の比較において有意な差を認めた ( $p<0.05$ )。他のサイトカインにおいては、これら 3 群間に有意な差を認めなかった (Table III-1)。

更に細胞外に分泌されたサイトカインについて調べた結果、培養上清中の IL-2 [mean  $\pm$  S.E (range), HIV+ vs. HIV-] は、それぞれ  $1.2 \pm 1.1$  ng/ml (0.1~5.9 ng/ml) vs.  $2.7 \pm 0.8$  ng/ml (0.1~5.3 ng/ml) であり、IFN- $\gamma$  はそれぞれ  $9.9 \pm 2.1$  ng/ml (0.4~21.4 ng/ml) vs.  $8.9 \pm 1.3$  ng/ml (0.9~17.2 ng/ml) であった。HIV+ の IL-2 の分泌は、HIV- に比べて有意に低い値を示した ( $p<0.05$ ) が、IFN- $\gamma$  の分泌には有意な差を認めなかった。

### III-3-3: 血漿中ウイルス量とサイトカイン産生細胞の関係

CD4+CD8-T 細胞における IL-2 産生細胞の割合と血漿中ウイルス RNA コピー数との間には逆相関関係を認めた ( $r=0.466$ ,  $p<0.05$ ) (Fig. III-2)。同じ細胞集団において IFN- $\gamma$ , IL-4 および IL-5 産生細胞の割合と血漿中 RNA 量との間に関連は認められなかった。

### III-3-4: TH1 タイプサイトカイン産生 CD8+CD4-T 細胞および TH2 タイプサイトカイン産生 CD4+CD8-T 細胞

同じ細胞内サイトカイン測定系により CD8+CD4-T 細胞におけるサイトカイン産生細胞の割合を検討した結果、TH1 タイプのサイトカイン産生細胞の割合は、HIV+と HIV-の間に有意な差を認めたが (IFN- $\gamma$ ;  $p<0.05$ , IL-2;  $p<0.01$ )、CD4+T 細胞数で分類した 3 群間には、有意な差は認められなかった

(Table III-2)。一方、HIV+ を CD8+T 細胞数により 3 群 (<500, 501-1000, >1000 / $\mu$ )に分類し、IL-2 および IFN- $\gamma$  産生細胞の割合を比較したが、こちらは有意な差を認めなかった(データ表示せず)。

全てのサンプルにおいて、CD4+CD8-T細胞のTH2タイプのサイトカイン産生細胞の割合はTH1タイプに比べ低い値を示した。IL-4とIL-5産生細胞の割合はHIV+と HIV- の間に有意な差を認めなかった(mean $\pm$ S.E, HIV+ vs. HIV- ; IL-4: 1.7 $\pm$ 0.4 vs. 2.3 $\pm$ 0.9, IL-5: 3.8 $\pm$ 2.0 vs. 4.4 $\pm$ 0.7)。更に細胞外に分泌されたTH2サイトカインについて調べた結果、HIV+ とHIV-の培養上清中のIL-4は、それぞれ0.6~398.7 pg/ml (mean: 85.4 pg/ml) と 1.8~169.4 pg/ml (mean: 75.3 pg/ml) であり、IL-5は それぞれ2.4~1,609.0 pg/ml (mean: 176.3 pg/ml) と 4.8~732.0 pg/ml (mean: 156.8 pg/ml) であった。従って、TH2タイプのサイトカインの分泌は、HIV+ とHIV- の間に有意な差を認めなかった。

#### III-4; 考察

本章における主たる知見は以下の通りである。1). HIV+ においては、CD4+CD8-T細胞のIL-2産生が低下している (Table III-1)。2). HIV+ の病期が進行すると、CD4+CD8-T細胞のIL-2産生が更に低下する (Table III-1)。3). HIV+ の病期は、CD4+CD8-T細胞中のIL-2以外のサイトカイン産生には影響がない。4). CD4+CD8-T細胞中のIL-2産生細胞の割合と血漿中のウイルスRNAコピー数は、逆相関関係にある (Fig. III-2)。5) TH1からTH2へのシフトと病期の進行には関連が認められなかった (Table III-1, III-2)。

T細胞を活性化し、各種サイトカインの産生を強力に促す PMA+Ionomycin は、T細胞の免疫応答を調べる際に広汎に用いられる刺激である。しかし、CD4 がこの刺激によりダウンモジュレーションすることが知られており[34]、これを回避するため、いくつかの報告においては、CD3+CD8-T リンパ球を

CD4+T 細胞とみなして解析している[33,35,36]。しかしながら、これらの測定系においては、CD3+CD8-T リンパ球集団の中からダブルネガティブ (CD3+CD4-CD8-) 細胞を排除することができない。Norris らは、健康者において 2~10%の CD3+CD4-CD8-細胞が末梢血中に存在すると報告しており[37]、さらに Bonnet らは、非定型好酸菌菌血症やトキソプラズマ感染症またはカボシ肉腫のような AIDS 関連疾患を発症している感染者の CD3+CD4-CD8-細胞数は、増加傾向にあると報告している[38]。即ち、病期の進行した HIV-1 感染者において、このダブルネガティブ細胞の割合が増加している可能性があり、このような代替的な手法では CD4+T 細胞の状況を正確に把握し難いことが予測された。従って本研究においては、CD4+T 細胞の集団を直接解析する方法を採用した。

本研究で実施した間歇的で強力なホルックス操作により、PMA+Ionomycin でダウンモジュレートした CD4+T 細胞集団のピークを、従来法よりも明瞭に認識できた (Fig.III-1f, -1g)。しかし、完全なシングルピークとして単離することはできず、如何に調節を施しても CD4+領域と CD8+領域のヒストグラム上における裾野の交差を分離することができなかつた。このため、CD4+リンパ球として設定した領域 (R2) には、少数 (1.3~14.0%) の CD8+T 細胞のコンタミネーションが認められた。Table III-2 に示す通り、コンタミネートした CD8+T 細胞の産生する IFN- $\gamma$  と IL-2 は、CD4+T 細胞中の IL-2 や IFN- $\gamma$  産生細胞の割合に影響を及ぼす可能性が考えられた。そこで、R2 領域の中から CD8+T 細胞 (R3) を除くような領域 (R2 without R3) を設定して、CD4+CD8-T 細胞におけるサイトカイン産生細胞の状況を測定した。

TH1タイプサイトカインは、HIV-1感染に対する宿主側の免疫能に重要な役割をはたしているが、TH2タイプサイトカインは病状を促進させる作用があるとされている[15,16,35]。本研究において、CD4+CD8-T細胞中のIL2産生細胞は、CD4+T細胞数の低下に伴い選択的に減少する。同様の結果は、CD3+CD8-Tリンパ球中のサイトカイン産生細胞の割合を測定した先行研究においても得られている[33]。また、CD8+T細胞中のIFN- $\gamma$  産生細胞の割合は、HIV-1感染者においてHIV-1非感染者と



比較して、有意な上昇を認めた。特筆すべきは、IL-2とIFN- $\gamma$ は、TH1タイプのサイトカインであるが、両者はCD4+T細胞並びにCD8+T細胞において異なる産生パターンを示した点である。CD4+T細胞におけるIL-2産生細胞の減少は、HIV-1感染にともなうCD4+T細胞の機能不全に関連している可能性が推測されている。また、CD8+T細胞中のIFN- $\gamma$ 産生細胞の割合の増加は、HIV-1感染宿主体内で、HIV-1はじめ各種細菌、ウイルス、原虫由来の抗原刺激に対する細胞傷害活性が強化されていると予測される。

過去のいくつかの報告においては、HIV-1の病期の進行は、TH1タイプサイトカインの減少および、TH2タイプサイトカインの増加と関連しているとされている[15,16,35]。本研究においては、すべての病期においてTH2タイプのサイトカイン産生の有意な変化を確認することができなかった。別の報告においても、各種手法を用いた解析の結果、本研究と同様の結論が導かれている[32,33,39-44]。本研究により、TH1からTH2へのサイトカインのシフトは、CD4+CD8-T細胞により産生されるIL-2（TH1タイプサイトカイン）の減少にのみ起因している可能性が示唆された。

また今回の研究において、IL-2産生細胞と血漿中ウイルスコピー数（VL）は逆相関関係にあった。これは、恐らくCD4+T細胞数の減少とVLの逆相関関係と密接に関連しているとおもわれる。更にそれに加え、HIV タンパクを構成する特定の配列には、宿主の免疫を抑制する作用があり、その中にはサイトカイン産生に直接的な阻害作用を及ぼすものも存在する [45-48]。よってVLの上昇により、IL-2産生能が細胞レベルで直接的に抑制された可能性も併せて考えられる [47,48]。しかしながら、このHIV-1によりIL-2の特異的な減少を引き起こすメカニズムは未だに確定されていない。

今回の横断検討により、HIV-1感染者が病期が悪化するとCD4+CD8-T細胞中のIL-2産生細胞は減少するが、他のサイトカインには影響しないという結論を得た。しかしながら、この結論は、同時に感染者毎のサイトカイン生成パターンの多様性を示すものでもあった。同一感染者を対象とした縦断

研究ならびに今回以上の大規模な集団による検討の実施により、更に本研究を追試する必要性がある。いずれにしても、HIV-1病期の進行にIL-2の存在が、重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

Table III-1. Percentage of cytokine-producing cells in CD4+ CD8- T cell population\*

	n	Th 1 type cytokines (%)		Th 2 type cytokines (%)	
		IL-2	IFN-g	IL-4	IL-5
HIV+	48	23.6±1.8 †	13.7±1.0	1.3±0.1	1.2±0.1
sub group #					
1-200	13	18.0±3.7 ‡	12.8±2.5	1.5±0.2	1.2±0.2
201-499	24	23.5±2.2	15.3±1.4	1.1±0.1	1.3±0.1
>500	11	30.6±3.5	11.3±1.1	1.2±0.1	1.2±0.1
HIV-	16	34.9±3.1	13.2±1.6	1.0±0.1	0.9±0.1

\* Values represent the mean±SEM

† P<0.01, compare with HIV-

‡ P<0.05, comparison of the whole HIV+ group

#: Sub groups were divided by CD4 counts (/μl)

Table III-2. Percentage of cytokine-producing cells in CD8+ CD4- T cell population\*

	n	IL-2 (%)	IFN-g
HIV+	48	8.5 ± 1.0 \$	61.3 ± 2.2 \$\$
sub group #			
1-200	13	10.3 ± 1.8	65.2 ± 4.1
201-499	24	6.7 ± 1.0	61.6 ± 3.2
>500	11	10.6 ± 3.2	56.6 ± 4.1
HIV-	16	14.9 ± 1.7	48.7 ± 5.2

\*: Values represent the mean ± SEM

\$: p < 0.05, compare with HIV-, \$\$: p < 0.01, compare with HIV-

#: Sub groups were divided by CD4 counts (/μl)

### Figure Legends (第 III 章)

#### Fig. III-1. Flow cytometric analysis of intracellular cytokine-producing CD4+CD8- T cells

本研究におけるCD4+CD8-T細胞ゲートリング方法を示した。(A) 主要リンパ球集団を2次元ドットプロットによりゲートリングし、これをリンパ球領域(R1)とした。(B) FL4ヒストグラム上に、アイソタイプコントロール (IgG-PerCP)によるカットオフポイントを設定し、R1中で、カットオフポイントより陽性領域(positive zone)に位置する細胞群をCD4+リンパ球(R2)とした。(C) R2内に漏れ込んだCD8+細胞群(R3)を除くため、CD8-細胞領域(R2 without R3)を設定した。(D) フローサイトメトリーによりR2 without R3、即ち、CD4+CD8-T細胞を最低 5,000 イベント取込み、細胞内サイトカインをFL2により検出し解析を行った。(E-G) HIV-1感染者(CD4数: 307 / $\mu$ l)におけるCD4+T細胞の発現状況 (E; 無刺激のサンプル, F; PMA+ionomycin刺激後、間歇的で強力なホルテックス処理をしたサンプル, G; PMA+ionomycin刺激後、従来の手法で処理したサンプル)。

#### Fig. III-2. The correlation between IL-2producing CD4+CD8- T cells and plasma viral load

CD4+CD8-T 細胞内の IL-2 産生細胞の割合と血漿ウイルス RNA 量の関係を示した。両者間の相関は Pearson の相関係数により検定した。

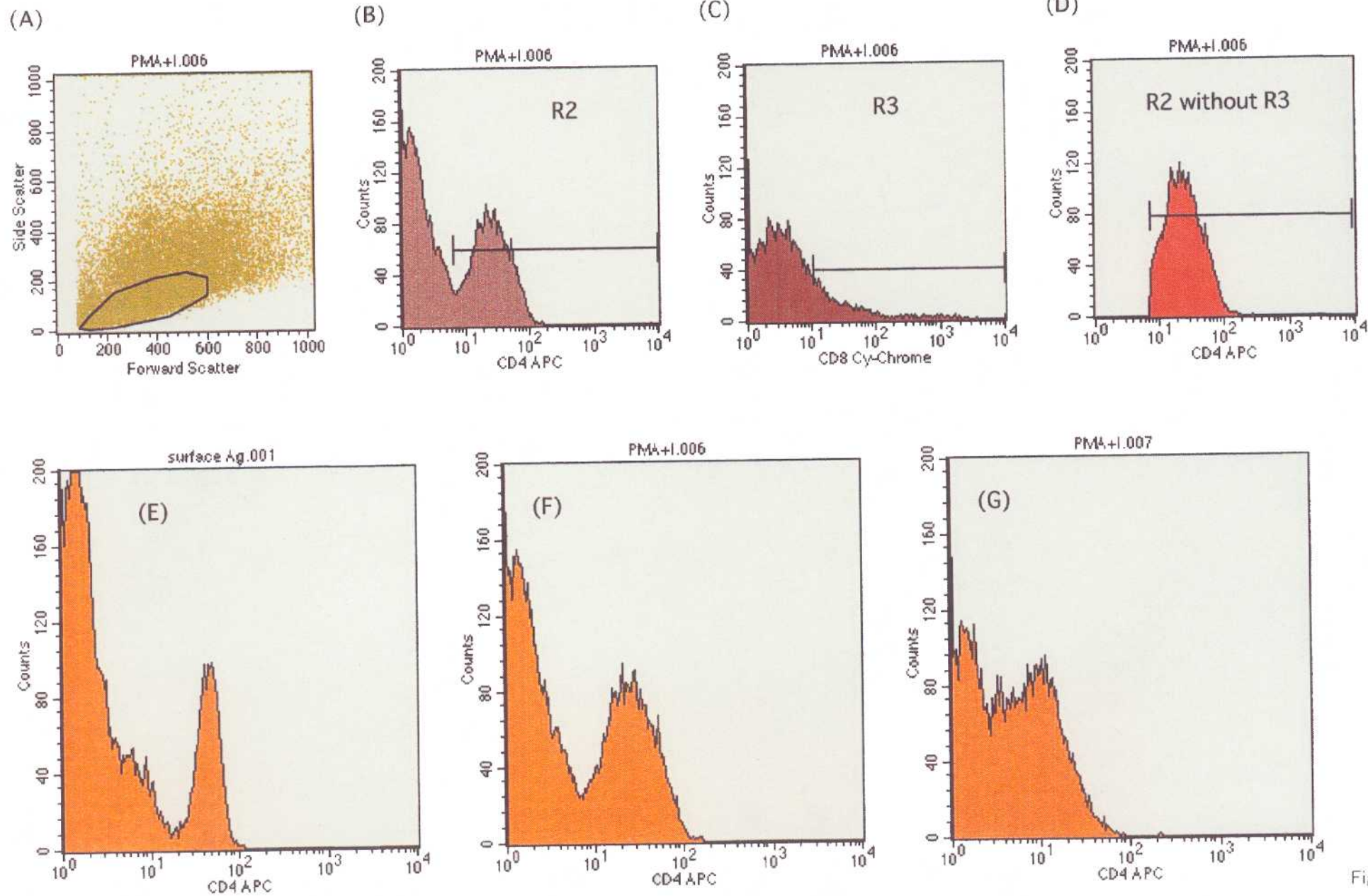


Fig. III-1

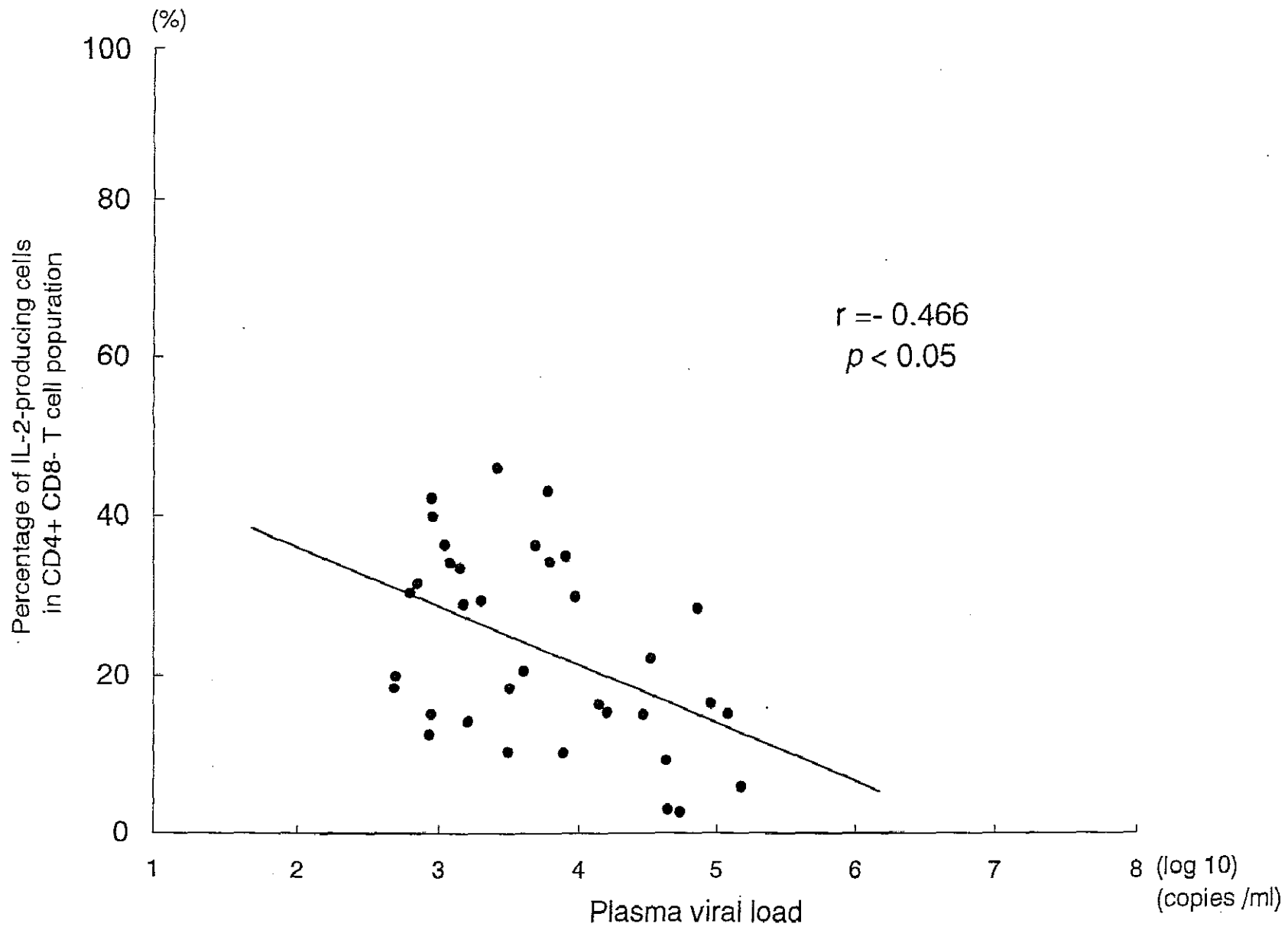


Fig 2-2