

レトロウイルスによる新規免疫逃避機構の解明

近畿大学 医学部 免疫学教室

高村 史記

1. 背景及び目的

ウイルス感染細胞の排除には CD8 陽性 T 細胞が主要な役割を果たしている。特にメモリーCD8T 細胞は抗原排除後も長期間体内に維持され、同一ウイルスの再侵入に対し速やかに活性化・増殖して感染細胞を排除することで生体防御に重要な役割を果たしている。しかしながら、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) や C 型肝炎ウイルス等の持続感染症では、メモリーCD8T 細胞の大半が機能不全に陥っており、これがウイルス排除能の低下に伴う持続感染成立要因の一つとなっている⁽¹⁾。従って、メモリーCD8T 細胞機能不全機構の解明は持続感染症に対するワクチン開発の最重要課題である。

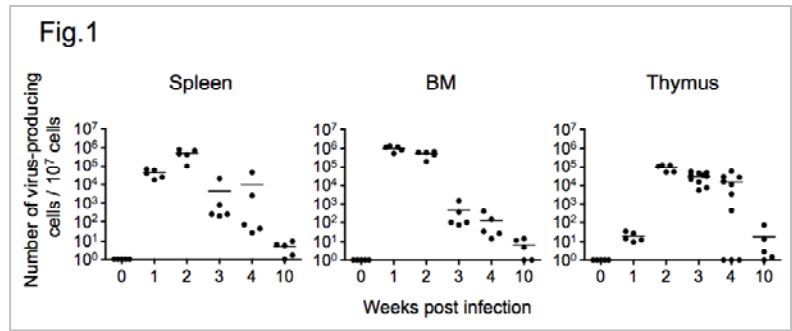
一般に急性感染の場合、メモリーCD8T 細胞数の維持は IL-7 や IL-15 等の恒常性サイトカインに依存するのに対し、持続感染環境下で分化維持されたメモリーCD8T 細胞は IL-7、IL-15 レセプター発現レベルが低く、恒常的増殖能が弱い⁽²⁾。一方で、このような環境下では特異抗原の存在がメモリーCD8T 細胞数の維持に重要な役割を果たしていることが報告されている。その代表的な影響として、持続的な抗原提示が既存の抗原特異的メモリーCD8T 細胞の増殖を継続的に誘導すること⁽³⁾、更には胸腺から新たに供給された抗原特異的ナイーブ CD8T 細胞のメモリーCD8T 細胞への分化誘導が起こることが挙げられる⁽⁴⁾。しかしながら、前者の様に絶えず特異抗原に曝露され続けたメモリーCD8T 細胞は PD-1、IL-10 レセプター等の抑制性因子の発現が増強され、それらのリガンドの作用によりその機能を段階的に失っていくことが知られており (exhaustion)⁽⁵⁻⁶⁾、同様の現象が HIV 感染でも確認されている⁽⁷⁾。

フレンド白血病ウイルス (FV) は成体マウスに免疫抑制に伴う持続的なウイルス血症とそれにより引き続く致死性の赤白血病を誘発するレトロウイルスで、マウス系統間で異なる病原性を示すことから、レトロウイルス感染における宿主免疫応答及びこれを調節している宿主因子 (遺伝子) 解析ツールとして使用されている⁽⁸⁾。申請者は FV 感染後の個体にて、早期にウイルス特異的 CD8T 細胞の機能が失われること、そしてそれはウイルス感染赤芽球の急速な増殖によるウイルス特異的 CD8T 細胞の疲弊 (exhaustion) に起因することを明らかとした⁽⁹⁾。申請者はこの報告を通じ、FV 持続感染個体にて機能的メモリーCD8T 細胞が全く検出されないことに不審を抱き FV 感染病態を再検討したところ、これまで報告されていた骨髄や脾臓のみならず胸腺もまた FV 感染の標的器官の一つであることを突き止めた。通常、持続感染期に胸腺より供給される抗原特異的ナイーブ CD8T 細胞は、末梢で残存抗原により活性化されるものの、感染初期の様な激しい炎症反応が存在しない事、更には抗原量が著しく少ないことから、直接メモリーCD8T 細胞へと分化することが知られている。しかも、この時期に末梢に存在する機能不全に陥ったメモリーCD8T 細胞と異なり、これら残存抗原により誘導されたメモリーCD8T 細胞のほとんどは機能的であることが報告されている。しかしながら、FV の胸腺感染はウイルス抗原に対するネガティブセレクションを誘導し (FV 特異的免疫寛容)、持続感染期におけるウイルス特異的ナイーブ CD8T 細胞の供給 (機能的メモリーCD8T 細胞の源) を遮断することで、機能的メモリーCD8T 細胞枯渇の原因となることが示唆される。従って、本研究では FV が持続感染期においてウイルス特異的免疫寛容を誘導することで宿主免疫応答を回避するという、これまでに報告の無かった新規免疫逃避機構を解明することを目的とする。

2. 方法及び結果

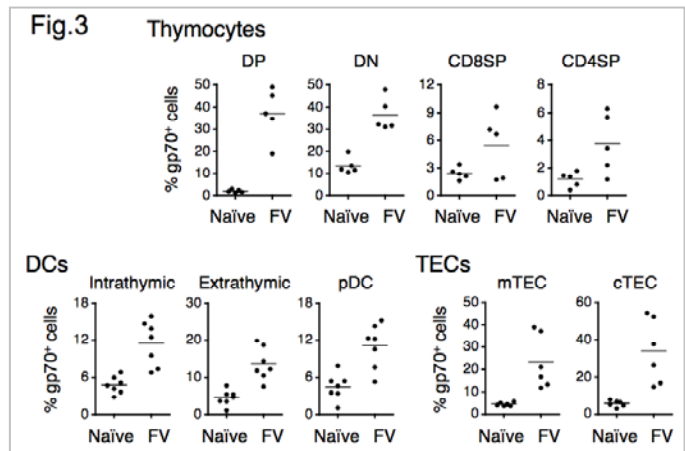
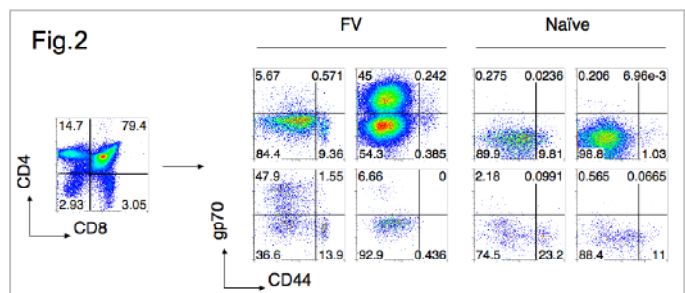
1) 胸腺における FV 持続感染

これまで FV の主要標的臓器は脾臓及び骨髄と考えられていた。ところが、FV 感染マウス胸腺細胞を用いてブランクアッセイにより感染性粒子の産生を検討したところ、脾臓や骨髄に匹敵するほどの感染性粒子の産生が胸腺でも起こっていることを発見した (Fig. 1)。



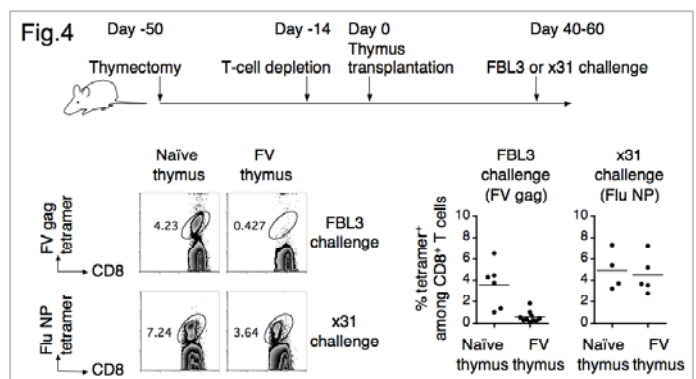
2) 胸腺におけるウイルス感染細胞の同定

FV 感染後 3 週目 (胸腺感染のピーク) に胸腺を採取しウイルスタンパクの発現を確認したところ、ダブルネガティブ胸腺細胞、ダブルポジティブ胸腺細胞における感染が最も顕著であることが明らかとなった (Fig. 2)。また、同様の検討を胸腺樹状細胞、胸腺上皮細胞に対しても行ったところ、全ての分画にウイルスタンパクの発現を確認した (Fig. 3)。この事より、FV が増殖の盛んな胸腺細胞に高率に感染・増殖し、そこから他の細胞分画へと波及していったものと考えられる。



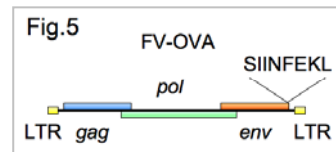
3) FV 特異的胸腺細胞分化障害

胸腺摘出及び末梢 T 細胞除去により T 細胞を欠損したマウスに正常マウスもしくは FV 感染マウスより採取した胸腺を移植し、末梢の T 細胞が再構築された後にウイルス抗原 (FBL3) もしくは全く関連のない抗原 (インフルエンザ x31 株) の攻撃接種を行った。すると、正常マウス胸腺移植群では FBL3、x31 両者に対し強力なウイルス特異的 CD8T 細胞免疫応答が誘導されたのに対し、FV 感染マウス胸腺移植群では x31 に対する反応性はあるものの、FV 抗原には殆ど反応できないことが明らかとなった (Fig. 4)。このことは、FV 感染マウス胸腺からは FV 特異的ナイーブ CD8T 細胞の産生が起こっていないことを意味する。

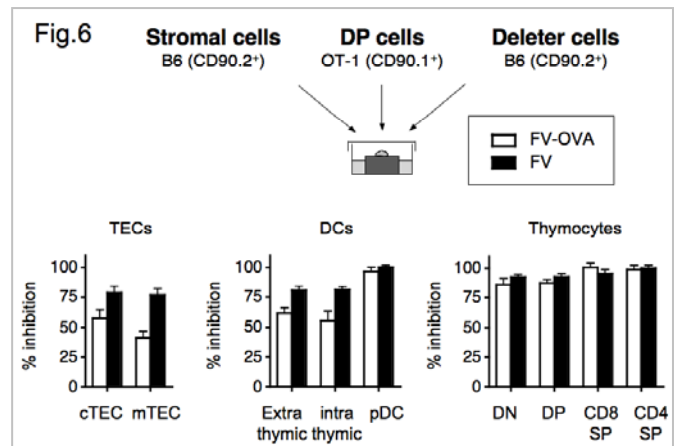


4) 胸腺組織培養によるウイルス抗原特異的ネガティブセレクション誘導細胞の同定

まず、TCR トランスジェニックマウスを用いた解析を行うために、*env* 下流 OVA class I エピトープを挿入した OVA 発現 FV (FV-OVA) を作成した (Fig. 5)。

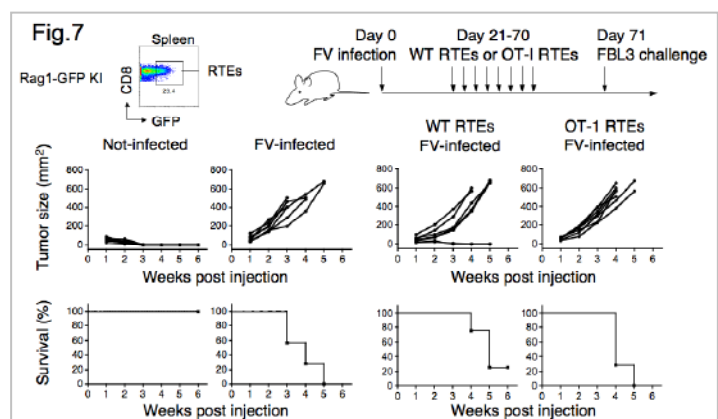


次に、FV 感染マウス胸腺のどのような細胞分画がウイルス特異的ネガティブセレクションを誘導しているのかを確認するため、*in vitro* の胸腺組織培養を行った。即ち、胎児胸腺上皮細胞と OT-1 マウス胸腺由来ダブルポジティブ胸腺細胞を、培養液をしみこませたスポンジの上にて混合培養し、ダブルポジティブ胸腺細胞から CD8 シングルポジティブ細胞への分化が確認できる条件を設定した。ここに、FV-OVA 感染マウス胸腺より胸腺細胞、胸腺樹状細胞、胸腺上皮細胞の核分画を分離し混合培養することで、OT-1 CD8 シングルポジティブ細胞への分化に対する影響を確認した。すると、最もウイルス感染の激しかったダブルネガティブ胸腺細胞、ダブルポジティブ胸腺細胞は軽度の分化阻害を誘導するに留まった。一方、FV-OVA 感染マウスの胸腺樹状細胞、胸腺上皮細胞は効率よく OT-1 CD8 シングルポジティブ細胞への分化を阻害した (Fig. 6)。このことより、ダブルネガティブ胸腺細胞、ダブルポジティブ胸腺細胞にて増殖したウイルスが、胸腺樹状細胞及び胸腺上皮細胞におけるウイルス抗原提示を誘発し（直接感染、もしくはクロスプレゼンテーションによると推測される）、ウイルス抗原特異的ネガティブセレクションを誘導しているものと考えられる。



5) ウイルス特異的免疫寛容が及ぼす白血病発症への影響

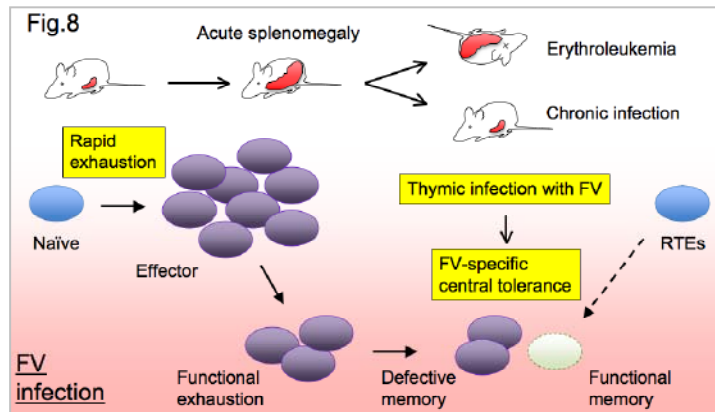
これまでの結果より、通常の FV 感染マウスではウイルス抗原特異的免疫寛容が成立することが明らかとなった。では、もし免疫寛容が成立しなかった場合には白血病発症率の低下が見られるのだろうか？この疑問を解決するために、胸腺から供給されて間もない T 細胞 (Recent Thymic Emigrant; RTE) を識別可能な Rag1-GFP ノックインマウスを応用した。即ち、Rag1-GFP ノックインマウス由来 RTE



を分離し、FV 感染マウスに繰り返し投与（一週毎 8 回）することで白血病発症率への影響を検討した。また、対照には Rag1-GFP OT-1 マウス（ウイルス特異的 RTE を含まない）の RTE を使用した。通常の RTE 投与群、OT-1 RTE 投与群共に白血病発症率の回復は見られなかった。このことより、ウイルス感染後の免疫寛容成立は病態変化にそれほど影響を及ぼしていないことを示している。しかしながら、FV 感染マウスに FV 白血病由来培養細胞を攻撃接種すると全てのマウスが死亡するのに対して、通常の RTE 投与群では攻撃接種に対して耐性を持つ個体が確認された (Fig. 7)。このことは、RTE 投与群ではウイルス抗原に対する免疫応答が若干回復しているというを示す。

3. まとめ

FVは感染後末梢における爆発的な増殖に伴い胸腺へ進入。増殖の盛んなダブルネガティブ胸腺細胞に高率に感染し、ダブルポジティブ胸腺細胞にて盛んに増殖することがこの臓器での持続的な感染性粒子の産生に寄与しているということが示唆された。胸腺細胞にて増殖したウイルスは胸腺樹状細胞、胸腺上皮細胞におけるウイルス抗原提示を誘発、結果ウイルス特異的免疫寛容を引き起こす。この免疫寛容は機能的メモリーCD8T細胞の供給源を断つことでウイルス特異的免疫応答の抑制には重要な役割を果たしている。先の感染初期における末梢CD8T細胞機能不全誘導に加えて、感染後期における中枢での免疫寛容を誘導することで、FVはウイルス特異的CD8T細胞免疫応答を効率よく回避することができる (Fig. 8)。



胸腺感染性を示すウイルスとしては同じレトロウイルス科に属するHIVが知られているが、HIVの胸腺感染による免疫寛容の誘導は全く報告されていない。しかしながら、レトロウイルスは複製過程でウイルスゲノムを宿主ゲノムに組み込むため持続感染の成立が容易であり、胸腺でウイルス抗原の持続発現が起これば、これを自己抗原と誤認識しウイルス抗原特異的免疫寛容が成立することが容易に推測される。従って、本研究はレトロウイルスが胸腺に感染することで免疫寛容誘導し、これが機能不全型メモリーCD8T細胞の蓄積を招き、その結果宿主からの排除を回避するという、これまでに報告の無かった新規免疫逃避機構を世界に先立って証明する物であると共に、このような免疫逃避機構はフレンドウイルスに限らず、HIVを含めた他のレトロウイルスにも共通した機構であることが示唆される。このことはレトロウイルス持続感染症に対するワクチン開発において無視することのできない非常に重要な知見であり、今後はこのような現象が起りうることを考慮し、末梢の機能不全に陥ったウイルス特異的CD8T細胞の機能をいかに効率よく回復させるかという点が重要な治療方針となるであろう。

4. 発表論文、参考文献

1. Wherry EJ. Nat. Immunol. 6: 492-9, 2011
2. Wherry EJ et al. PNAS. 101:16004-9, 2004
3. Shin H et al. JEM. 204:941-9, 2007
4. Vezys V et al. JEM. 203:2263-9, 2006
5. Barber DL et al. Nature 439:682-7, 2006
6. Brooks DG et al. Nat Med. 12:1301-9, 2006

7. Trautmann L et al. *Nat Med.* 12:1198-202, 2006
8. Miyazawa M et al. *Vaccine* 26:2981-96, 2008
9. Takamura S et al. *J. Immunol.* 184: 4696-707, 2010