

## 第二次審査（論文公開審査）結果の要旨

### Suppression of R5-type of HIV-1 in CD4+ NKT cells by V $\delta$ 1+ T cells activated by flavonoid glycosides, hesperidin and linarin

フラボノイド配糖体—ヘスペリジンおよびリナリン—で活性化した V $\delta$ 1 陽性 T 細胞による CD4 陽性 NKT 細胞内における R5 型 HIV-1 の制御

日本医科大学大学院医学研究科 微生物学・免疫学分野  
大学院生 米川 倫之  
Scientific Reports (2019 年) 掲載予定

近年、抗ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 薬、特にインテグラーゼ阻害薬の発展により、HIV 感染者の循環血中においてウイルスを制御することが可能になった。しかし、抗ウイルス療法 (ART) の中断後、多くの症例で HIV (特に CCR5 陽性 CD4 陽性 T 細胞に感染する R5 型 HIV) の再燃が認められる。これまで申請者らのグループは、ART 中の HIV 感染者において、末梢血中からウイルスが検出されない場合でも回腸に存在する CD4 陽性ナチュラルキラー T (NKT) 細胞からウイルスが検出されることを報告し、この細胞が ART 中の HIV 感染者におけるウイルス reservoir となっている可能性を指摘した。また、ヒト末梢血単核細胞 (PBMC) 由来の CD4 陽性 NKT 細胞に R5 型 HIV 株である NL (AD8) を感染させる実験モデルにおいて、V $\delta$ 1 TCR 陽性  $\gamma\delta$  型 T 細胞 (V $\delta$ 1 細胞) が MIP-1 $\alpha$  や MIP-1 $\beta$  および RANTES といったケモカインの分泌を介して NKT 細胞内での HIV 複製を抑制することを見出した。しかし、この研究で用いた V $\delta$ 1 細胞は新鮮 PBMC から単離されたものであり、その分離過程において V $\delta$ 1 細胞の一部が活性化されていたため HIV 複製抑制効果は不均一であった。そこで、本研究では V $\delta$ 1 細胞を単離後一定期間培養して resting 状態とした後、V $\delta$ 1 細胞を活性化させ HIV 複製抑制効果を観察することにした。

ヒト  $\gamma\delta$ T 細胞は V $\delta$ 1 型 T 細胞と V $\delta$ 2 型 T 細胞の 2 種類のサブセットに大別されている。これまで V $\delta$ 2 型 T 細胞の認識抗原として、Isopentenyl pyrophosphate (IPP) などの アルキルピロリン酸系抗原やリセドロン酸のようなアミノビスホスホネート製剤、アルキルアミン類などの物質が知られているが、V $\delta$ 1 細胞の認識抗原については明らかにされていない。本研究は、V $\delta$ 1 細胞が腸管に多く存在することをふまえて、日常的に摂取される食物や漢方薬に含まれる成分、特に、抗酸化効果、抗炎症効果、抗凝固効果、抗動脈硬化効果など、ヒトに有益な効果が多く知られているフラボノイド類の中に V $\delta$ 1 細胞の認識抗原を見出し、認識抗原により活性化した V $\delta$ 1 細胞の CD4 陽性 NKT 細胞における HIV-1 複製抑制効果を明らかにすることを目的とした。

本研究では、初めに V $\delta$ 1 細胞に対して特異的な抗原のスクリーニングを行うために TCR

を欠損した Jurkat T 細胞に PBMC 由来の V $\delta$ 1 TCR または V $\delta$ 2 TCR を導入発現させた 2 種類のトランスフェクタント細胞株 (1C116 と 2C21) を樹立した。これらの細胞株は移入した TCR に対する抗原の存在下で IL-2 を分泌する特徴を有しているため、培養上清中の IL-2 を定量することで刺激抗原のスクリーニングが可能であった。スクリーニングの結果、2 種類のフラボノイド配糖体 (ヘスペリジンおよびリナリン) が V $\delta$ 1 TCR を強く刺激・活性化することを明らかにした。次に、これらフラボノイド配糖体が実際にヒト V $\delta$ 1 細胞を刺激・活性化するかを PBMC にフラボノイド配糖体を添加して検討した。その結果、ヘスペリジンおよびリナリンは PBMC 中の V $\delta$ 1 細胞を特異的に増殖させ、活性化することを明らかにした。さらに、PBMC から誘導し resting 状態にした V $\delta$ 1 細胞に、フラボノイド配糖体を添加・刺激した際のサイトカインとケモカインの分泌動態を検討した。その結果、resting 状態の V $\delta$ 1 細胞をヘスペリジンおよびリナリンで刺激すると、IL-5 や IL-13 の Th2 型のサイトカインの分泌とともに、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$  や RANTES のケモカインの分泌が認められ、フラボノイド配糖体が V $\delta$ 1 細胞を resting 状態から活性化状態に誘導することが示された。以上の結果をふまえ、R5 型 HIV-1 である NL(AD8)株が感染した CD4 陽性 NKT 細胞内における HIV 複製に対するヘスペリジンまたはリナリンで活性化した V $\delta$ 1 細胞の影響を解析した。ヘスペリジンまたはリナリンを単独で用いた場合、ならびに resting 状態の V $\delta$ 1 細胞のみを用いた場合では、NKT 細胞内の HIV 複製を抑制することはできなかったが、ヘスペリジンおよびリナリンで活性化した V $\delta$ 1 細胞は NKT 細胞内の HIV 複製を著明に抑制した。

以上、本研究はヘスペリジンやリナリンといった漢方薬中にも含有されるフラボノイド配糖体が、V $\delta$ 1 TCR を介してヒト V $\delta$ 1 細胞を選択的に活性化することを世界で初めて示し、この活性化した V $\delta$ 1 細胞が CD4 陽性 NKT 細胞における HIV-1 複製を著明に抑制することを明らかにした。

第二次審査においては、本研究の論理性が高く評価されるとともに、活性化 V $\delta$ 1 細胞が CD4 陽性 NKT 細胞内の HIV 複製を抑制する機序、NKT 細胞以外の CD4 陽性細胞種での HIV 複製制御への応用、Th2 サイトカイン分泌と HIV 複製抑制の関係、HIV 制御以外の臨床的な  $\gamma\delta$ T 細胞の意義 (産婦人科領域における  $\gamma\delta$ T 細胞の役割)、フラボノイドの類縁化合物のイソフラボンによる V $\delta$ 1 細胞活性化の可能性、フラボノイドの構造活性相関、本実験系のフラボノイド用量と日常的な摂取量との比較、V $\delta$ 1 細胞の認識抗原のスクリーニングの規模、スクリーニング標的化合物の選定理由、漢方薬の HIV 感染症への臨床応用例の有無などについて、様々な質疑が行われたが、いずれにおいても的確な回答がなされた。

以上より、本論文は学位論文として価値あるものと認定した。