

64. 感染シナプスによる HIV 伝播：免疫シナプスの略奪利用

森川 裕子

北里大学 北里生命科学研究所 ウイルス感染制御学研究室 2

Key words : HIV, 免疫シナプス, 細胞間伝播

緒 言

HIV (human immunodeficiency virus) やその他のレトロウイルスは細胞間接着により極めて効率良く標的細胞に感染する。この細胞間伝播の様式として「感染シナプス」と呼ばれる免疫シナプス様構造が知られている¹⁻³⁾。感染シナプスは明らかな極性をもち、HIV は感染細胞の接着部位だけから放出される。一方、標的細胞の接着面には HIV 受容体や細胞接着分子が集積することが報告されている^{4,5)}。すなわち、感染細胞においては HIV 粒子形成と放出の場が、標的細胞においては HIV 受容体等が、細胞接着面に極性化し、効率の良い HIV の細胞間伝播が成立するよう両細胞がリモデリングされる可能性が示唆される。HIV は免疫細胞に感染するため、免疫シナプス機構を感染シナプスとして略奪利用するとともに (例えば、SMAC (supramolecular activation complex) 構造)、免疫シナプス機能を攪乱する可能性も示唆されている⁶⁾。本研究では、HIV 感染シナプスと免疫シナプスの類似点と相違点に着目しつつ、感染シナプスにおいて利用される免疫シナプス機構と排除される機構、感染シナプス独特の分子機構等を解析することとした。

方法および結果

HIV 感染 Jurkat 細胞 (ヒト T 細胞株) を非感染 Jurkat 細胞と 1 時間共培養し、感染シナプスを形成させた。関与する分子群を免疫染色およびイメージングで解析した。

1. 感染シナプスの接着面における集積分子群

免疫シナプスでは中心部に T 細胞受容体複合体 (TcR-CD3-ZAP70, CD4-Lck, CD28) からなる cSMAC が、その外側に接着分子群 (インテグリン LFA1-ICAM1) からなる pSMAC が形成される。HIV 感染シナプスを形成させた後これら分子群を免疫染色し共焦点顕微鏡で解析したところ、感染シナプスの接着面には HIV タンパク質 (gp120, Gag) と受容体 CD4 の集積とともに、Lck、CD28 の集積が観察された (図 1)。接着分子インテグリン (LFA1-ICAM1) も認められた。

Coculture : Inf JKT + Uninf JKT

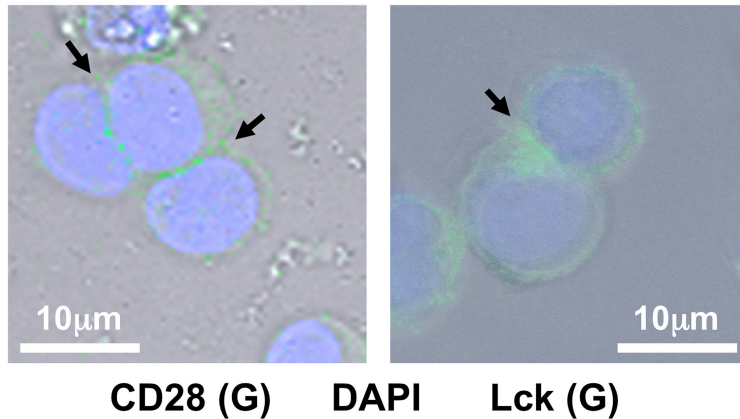


図1. 感染シナプスにおける SMAC

HIV 感染 Jurkat 細胞と非感染 Jurkat 細胞を共培養した。抗 CD28 抗体と抗 Lck 抗体で免疫染色、核は DAPI で検出した。DIC 画像へ RGB 画像を overlay したもの。矢印は細胞接着部位における集積を示す。

2. 感染シナプス形成による細胞内小器官の極性化

HIV は細胞膜からだけでなく、エンドソーム内にも放出されることが知られている。HIV 感染シナプスを形成させ、細胞内小器官のマーカータンパク質を免疫染色してその局在を調べたところ、エンドソーム (CD63 分子で検出) とミトコンドリア (Cox2 分子で検出) が接着部位側の細胞質 (特に感染細胞側の細胞質) に局在することが判明した (図2)。CD63 は接着部位にも認められた。

Coculture : Inf JKT + Uninf JKT (CMTMR)

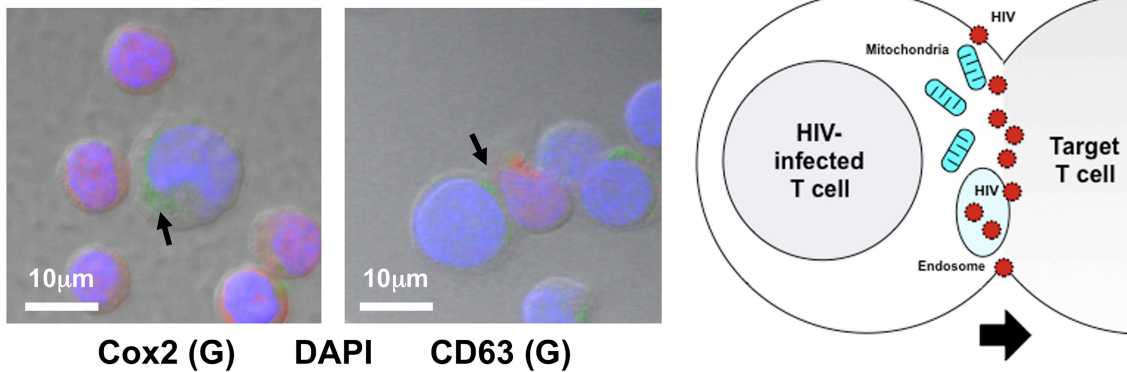
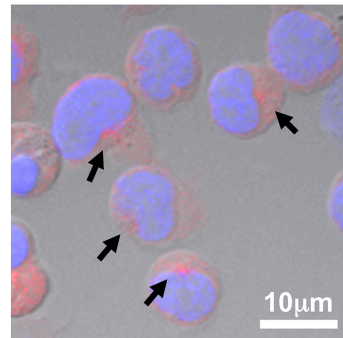


図2. 感染シナプスにおける細胞内小器官の局在

HIV 感染 Jurkat 細胞と CMTMR で標識した非感染 Jurkat 細胞を共培養した。抗 Cox2 抗体と抗 CD63 抗体で免疫染色し、核は DAPI で検出した。DIC 画像に RGB 画像を overlay したもの。矢印は細胞接着部位側への局在を示す。

HIV タンパク質の細胞内輸送に微小管系が利用されることが知られている。微小管を蛍光標識して Jurkat 細胞に発現させたが、感染シナプス部位への微小管中心の偏り (極性) は観察できなかった (図3)。nocodazole で微小管重合を阻害しても感染シナプスは形成されたが、接着部位における HIV タンパク質の局在は減少した。

Coculture : Inf JKT + Uninf JKT



mStrawberry-Tubulin

DAPI

図 3. 感染シナプスと微小管中心

mStrawberry-Tubulin 恒常発現 Jurkat 細胞に HIV を感染させ、非感染の mStrawberry-Tubulin 恒常発現 Jurkat 細胞を共培養した。DIC 画像に RGB 画像を overlay したもの。矢印は微小管中心を示す。

3. エンドソームによるエクソサイトーシス

分子イメージングを用いた予備実験により、HIV タンパク質はエンドソームの輸送制御分子 (Rab7 や Rab9) と共局在し細胞内輸送されることを観察している (未発表)。shRNA でこれら Rab 分子をノックダウンした Jurkat 細胞を樹立した。HIV p24 抗原 capture ELISA で測定したところ、これらのノックダウン細胞では HIV 放出の低下が認められた。また、HIV 感染シナプスを形成させたところ、細胞接着部位における HIV タンパク質の局在は減少した (図 4)。

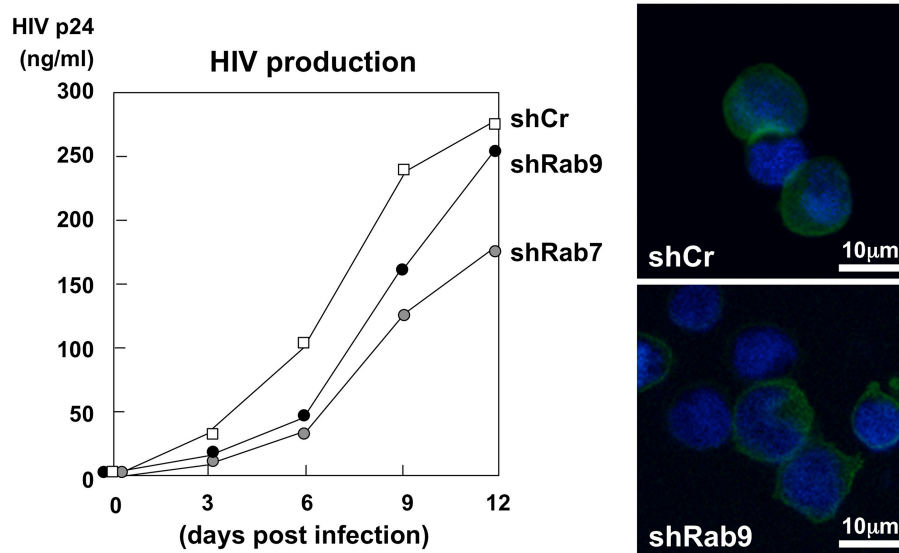


図 4. エンドソーム分子と HIV 産生

shRNA で Rab7 と Rab9 をノックダウンした Jurkat 細胞を樹立した。HIV を感染させ、培養液に放出される HIV を p24 抗原 capture ELISA で定量した。shRab9 恒常発現 Jurkat 細胞に HIV を感染させ、非感染のものと同様に共培養した。抗 HIV p24 抗体で免疫染色、核は DAPI で検出した。

考 察

免疫シナプスでは、中心部に cSMAC (TcR-CD3-ZAP70, CD4-Lck, CD28) その外側に pSMAC (LFA1-ICAM1) が集積・形成される。本研究では HIV 感染シナプスにおける集積 SMAC 分子群を解析した。HIV 感染シナプスでは中心部に gp120-CD4 が集積するため TcR が排除されると予想したが、Lck, CD28 の集積が認められた (図 1)。また ZAP70 の集積は報告されている。さらに、既報と同様に LFA1 の局在も認められた。これらの結果から、HIV 感染シナプスは免疫シナプスと構成成分が酷似する可能性が考えられた。

HIV 感染シナプス形成は細胞接着だけでなく細胞極性化を伴うか、細胞内小器官の局在を調べたところ、免疫シナプスと同様に接着部位側の細胞質にミトコンドリアの偏在が認められた。免疫シナプスではシグナル伝達やサイトカイン放出の ATP 供給源であるが、HIV 感染シナプスの場合は、HIV 出芽・放出のためのエネルギー源として利用されていると思われる。また、接着部位側の細胞質や接着部位にエンドソーム (分子) の集積を認めた。エンドソーム分子だけが接着部位に局在化する可能性もあるが、エンドソーム自体がリクルートされ、エクソサイトーシスによりエンドソーム内の HIV が放出されるモデルも考えられた (図 2)。電子顕微鏡による確認が必要である。サイトカインや分泌顆粒は免疫シナプスでは微小管系を介して小胞輸送される。HIV タンパク質は微小管系を介して輸送されることから、感染シナプスにおける微小管中心の局在を調べたが、微小管中心の偏り (極性) は見いだせなかった (図 3)。ただし、微小管系の極性形成が短時間である可能性が考えられる。生細胞イメージングによる観察が必要である。

文 献

- 1) Igakura T, Stinchcombe JC, Goon PK, Taylor GP, Weber JN, Griffiths GM, Tanaka Y, Osame M, Bangham CR. Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. *Science*. 2003 Mar 14;299(5613):1713-6. PMID:12589003
- 2) Jolly C, Sattentau QJ. Retroviral spread by induction of virological synapses. *Traffic*. 2004 Sep;5(9):643-50. PMID:15296489
- 3) Jin J, Sherer NM, Heidecker G, Derse D, Mothes W. Assembly of the murine leukemia virus is directed towards sites of cell-cell contact. *PLoS Biol*. 2009 Jul;7(7):e1000163. doi: 10.1371/journal.pbio.1000163. PMID: 19636361
- 4) McDonald D, Wu L, Bohks SM, KewalRamani VN, Unutmaz D, Hope TJ. Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions. *Science*. 2003 May 23;300(5623):1295-7. PMID:12730499
- 5) Jolly C, Kashefi K, Hollinshead M, Sattentau QJ. HIV-1 cell to cell transfer across an Env-induced, actin-dependent synapse. *J Exp Med*. 2004 Jan 19;199(2):283-93. PMID:14734528
- 6) Fackler OT, Alcover A, Schwartz O. Modulation of the immunological synapse: a key to HIV-1 pathogenesis? *Nat Rev Immunol*. 2007 Apr;7(4):310-7. PMID:17380160