

サイトカインノックアウトマウスを用いた
エイズ痴呆発症因子の解明に関する研究

(研究課題番号 H10-特別-026)

平成10年度厚生科学研究費補助金 (厚生科学特別研究事業)
研究報告書

平成10年 4 月

主任研究者 齊藤 邦明
(岐阜大学医学部附属病院中央検査部・講師)

厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）
総括研究報告書

サイトカインノックアウトマウスを用いたエイズ痴呆発症因子の解明に関する研究

主任研究者 斉藤邦明 岐阜大学医学部臨床検査医学講座

LP-BM5ウイルスに感染したマウスで発症する末梢の免疫不全の程度は、少なくとも感染後10週でTNF- α の産生の有無に影響されず、一般的なウイルス感染におけるTNF- α の生体防御の役割に関する報告と異なることが明らかとなった。また、Y-maze test、Water finding test、Water maze testなどの行動薬理試験の結果は、wildマウスLP-BM5感染群において非感染群に比べ明らかな学習機能の低下が認められた。しかし、これらの学習機能の低下はTNF KOマウスにおいて全く認められず、マウスのLP-BM5ウイルス感染で発症する記憶障害がTNF- α の脳内における宿主細胞からの放出により発症していることが明らかとなった。

A. 研究目的

エイズ患者末期に見られる記憶障害 [AIDS dementia complex, (ADC)]の発生機序は未だ解明されていないのが現状である。しかし、ADC発症のメカニズムの1つとして、脳内でHIV感染した宿主細胞によって放出されるサイトカイン (IL-1, IL-6, TNF- α , IFN- γ , TGF- β)、キノリン酸、グルタミン酸、NO、PAF等の様々な生理活性物質が関与していると考えられている。本研究はTNF- α ノックアウトマウス(TNF KO)を用い、それらのマウスにADC類似の症状を呈するまでに病状が進行することで知られるLP-BM5ウイルスを投与し、正常なマウスとの神経化学および行動学的比較を行った。すでにヒトの死後脳によるTNF- α mRNAの解析では、エイズ患者のうち痴呆を発症した症例は発症しなかった症例に比べ脳内のTNF- α の発現が有意に増加していたことが報告されている。すなわち、TNF- α が何らかの形でADC発症に関与しているとすれば、TNF- α の発現を抑制することにより正常なマウスで観察されるADC類似の症状が改善されることになる。本研究では、遺伝子組み換えによりTNF KOマウスを作成し、TNF- α がエイズの末梢における病状進行、さらにはエイズ痴呆にどのように関与しているかを追求した。

B. 研究方法

a) マウスエイズモデルを用いた病態解析
LP-BM5ウイルスを遺伝的に正常なマウス(C57BL

/6)に感染させることにより、8-10週後にマウスはADCに類似した症状を呈するまでに病状が進行する。Wild typeおよびTNF KOマウスマウスの両方にLP-BM5ウイルスを投与し、体重、脾重量、肝重量の変化、さらにフローサイトメトリーによる膜表面抗原CD4、CD8、IL-2R陽性細胞の変化、脾細胞のConA、LPS刺激試験などをエイズの末梢における病状進行の指標とした。また、脳内におけるマイクログリアおよび神経細胞のマーカーとして³H-PK 11195 binding assayおよびMAP-2 immunoblotsにより評価した。

1. フローサイトメトリーによる膜表面抗原CD4、CD8、IL-2R陽性細胞の変化
マウス脾臓を細切後、脾細胞を抽出しRPMI-1640培地(Gibco)で3回洗浄し、細胞数 1×10^6 個/mlに調整した。フローサイトメトリー専用チューブ (Falcon 2052) でFITC標識 CD4 抗血清 (Pharmin gen), FITC標識 CD8 (Pharmin gen), PE標識 IL-2 R(Serotec) をそれぞれ $5 \mu\text{l}$ と調整した脾細胞を $100 \mu\text{l}$ を混合し 4°C で30分間反応させた。反応後、FACS Lysing solution (Becton Dickison) を 1ml 加え5分間の細胞固定を行った。固定後RPMI-1640培地で3回洗浄し、最終液量 $500 \mu\text{l}$ に調整した。フローサイトメトリー(FACScan:Becton Dickinson)での解析はLYSIS-II ソフトウエアを用い 1×10^4 個の脾細胞についてその細胞膜抗原を測定し百分率 (%) で評価した。

2. 脾細胞の Con A、LPS 刺激試験

マウス脾臓を無菌的に摘出し脾臓の一部から脾細胞を抽出した。さらにFetal bovine serum (Equitech) を10%添加したRPMI-1640培地で3回洗浄後、 0.5×10^6 個/mlに調整し96穴培養用プレート(Falcon 3072)に 200μ l播種した。細胞刺激剤(Con A, LPS)を各穴 10μ g添加し48時間培養した。さらに ^3H 標識チミジンを各穴に $10 \mu\text{Ci}$ 添加後、12時間培養しチミジンを細胞内に取り込ませた。培養終了後、細胞をすべてセルハーベスター(Bio-science)で洗浄し、 γ -カウンター(Beckman-710)で細胞内の ^3H 測定を行い細胞の刺激応答の指標とした。

3. ^3H -PK11195 binding assay

組織を50倍量の30mM Tris-HCl(pH7.1)でホモゲナイズし、 $20,000 \times g$ にて20分遠心した沈殿を再度20倍量の30mM Tris-HCl(pH7.1)で希釈したサンプルを用い常法にて ^3H -PK11195 binding assayを行った。

4. MAP-2 immunoblots

組織を10倍量の0.32M sucrose in 10 mM Tris-HCl(pH7.4) with protease inhibitor cocktailでホモゲナイズし、 $20,000 \times g$ にて30分遠心した上清を4-12% gradient polyacrylamide gelを用いて泳動した後、常法にてMAP-2抗体を用いimmunoblotsを行った。

b) 行動薬理的検索

前述のごとくwild typeのマウスは8-10週後にマウスはADCに類似した症状を呈する。その評価法としてY-maze test, Rotarod test, Water finding test, Water maze test, Passive avoidance test等を実施し、LP-BM5感染による行動薬理学的変化を観察した。これらの手法を用い、TNF KOマウスとwild typeのマウスとの結果を比較することにより、サイトカインのADC発症に対する関与の有無を明らかにする。

Y-maze

自発交替行動の測定は、Sarter (1988)らの方法に準じて以下の手順で行った。マウスをY字迷路のいずれかのarmの先端に置き、8分間にわたって迷路内を自由に探索させ、マウスが移動したarmの位置を選択した順に記録する。マウスが測定時間内に各armに移動した回数をカウントしこれをtotal arm

entriesとする。つぎに、この中で連続して異なる3つのarmを選択した組み合わせを調べ、この数をnumber of alternationとする。Number of alternationをtotal arm entriesから2を引いた数で割り、それに100を掛けて求めた値をpercent alternationとし、これを自発的交替行動の指標とした。

Rotarod test

静止したドラムの上にマウスを3分間乗せる(第1日目の1回目)。次に、一定のスピード(8 rpm)で回転しているドラム上(直径30cm)にマウスをのせ、3分間の落下回数を測定する。この操作を1日5回、3日間繰り返し測定し、落下回数の減少を学習の評価とした。

Water finding test

実験装置内(オープンフィールド)内にマウスを入れ、マウスが探索行動を開始するまでの時間を測定する(start latency)。マウスが探索行動を開始してから3分間自由に装置内を探索させる。この時、小部屋に入るまでの時間、小部屋の給水チューブに触る回数およびオープンフィールド内の移動回数を測定する。3分間以内に最初に給水チューブに触れた時間からさらに3分間まで装置内を探索させる。なお、3分以上経過しても給水チューブに触らなかったマウスは試験から除外する、ここまでの操作を獲得試行とする。獲得試行終了後マウスは絶水し、獲得試行の約24時間後にテスト試行を行う。マウスを再び装置内に入れ、探索行動を開始するまでの時間、給水チューブのある小部屋までの時間、摂水するまでの時間を測定する。これらの指標を獲得試行を経験していないマウスnativeのそれと比較して学習の指標とした。

Water maze

1) Visible target trial

1日3回訓練試行を行う。Platformの位置は固定し、start位置を毎回変化させ、startしてからplatformに到達するまでの時間を測定する。一回の試行は最大60秒までとし、この間に動物がplatformに到達出来ない場合は手でplatformまで誘導する。Platform上には約30秒間滞在させる。この操作を2日間行う。

2) Reference memory

1日3回訓練試行を行う。Platform上の位置は固定し、start位置を毎回変化させる。1回の試行は最大

60秒までとし、この間に動物がplatformに到達出来ない場合は手でplatformまで誘導する。Platform上には約30秒間滞在させる。1日3回の訓練試行終了後にprobe testを行う。この操作を第1週目は連続4日間繰り返し行う（訓練試行12回、probe test4回）。第1週目の最終試行の5日後にretention testを1回行う。Retention test終了後に訓練試行を2回行い、その後probe testを行う。なお、訓練試行の期間については、学習の修練度に応じて変更することがある。

3) Working memory

Reference memory試験終了翌日にplatformの位置を5・5・2・のoriginal platformの隣に移動させる。Start位置は毎回変化させる。1回の試行は最大60秒までとし、この間に動物がplatformに到達出来ない場合は手でplatformまで誘導する。Platform上には約30秒間滞在させる。この操作を一日3試行行う。第2日目のplatformの位置は1日目のplatformの反対側に移動させる。Start位置は毎回変化させる。1回の試行は最大60秒までとし、この間に動物がplatformに到達出来ない場合は手でplatformまで誘導する。Platform上には約30秒間滞在させる。この操作を3試行行う。第3日目のplatform位置はoriginal platformの反対側に移動させる。Start位置は毎回変化させる。1回の試行は最大60秒までとし、この間に動物がplatformに到達出来ない場合は手でplatformまで誘導する。Platform上には約30秒間滞在させる。この操作を3試行行う。

4) Passive avoidance test

不透明のアクリル樹脂製で床がグリッドになっている暗室と明室からなり、両室がギロチンドアで仕切られた装置を用いた。実験中は明室の床から40cmの高さに設置した100Wの電灯を点灯する。始めにギロチンドアを開けたままの状態をマウスを3分間自由に探索させる。その後ギロチンドアを開けた状態でマウスを明室にいれ、マウスの四肢が完全に暗室内に入った時に素早くギロチンドアを閉め、床のグリッドを通してscrambled shocker（株式会社ニューロサイエンス）から0.3mA、1秒間のfootshockを与える。その後マウスを暗室から取り出し、再び明室に入れる。この操作をマウスが120秒間明室にとどまるまで繰り返し行い、その回数を学習評価の指標とする。ここまでの操作を訓練試行とする。訓練試行の24時間後に保持試行を行う。保持試行ではギロチンドアが開いた状態でマウスを明室に入

れ、暗室に移動するまでの時間を測定する。この時間をstep-through latencyとし、受動的回避学習の指標とする。なお、step-through latencyは最大300秒とする。

C. 研究結果

1. LP-BM5ウイルス感染による体重、脾重量、リンパ節重量、肝重量の変化

LP-BM5ウイルス感染により、体重、脾重量、リンパ節重量、肝重量は有意に増加したが、WildとTNF KOマウスでの増加の程度は全く差が認められなかった。

2. LP-BM5ウイルス感染による膜表面抗原B220、CD4、CD8、IL-2R陽性細胞の変化

脾細胞のB220細胞陽性率はLP-BM5ウイルス感染により低下した。しかし、低下の割合は感染10週後においてWildとTNF KOマウスで全く差が認められなかった。CD4・IL-2R細胞陽性率およびCD4/CD8相対比はLP-BM5ウイルス感染により増加した。しかし、増加の割合はWildとTNF KOマウスで有意の差が認められなかった。

3. 脾細胞のConA、LPS刺激試験

脾細胞をConAあるいはLPSで刺激することにより、細胞内へのチミジンの取り込みは無刺激の細胞に比べ著しく増加するが、LP-BM5ウイルス感染によりその増加の割合は極端に抑制された。しかし、その抑制の割合は感染10週後においてWildとTNF KOマウスで全く差が認められなかった。

4. ³H-PK11195 binding assay

Microglial markerとしての線条体における³H-PK11195 binding assayは、wildマウス、TNF KOマウス共にLP-BM5に感染群で非感染群に比較してBmaxの有意な増加が認められた。この際のKd値には何の変化も認められなかった。

5. MAP-2 immunoblots

Neuronal markerとしての線条体におけるMAP-2 immunoreactivityは、wildマウスのシグナルに比較してLP-BM5に感染することにより有意に低下していた。しかし、TNF-KOマウスのLP-BM5感染群と非感染群におけるMAP-2 immunoreactivityの差は全く認められなかった。

6. 行動薬理的検索

Y-maze

Wildマウスの自発交替行動量はLP-BM5に感染することにより有意に低下していた。しかし、TNF-KOマウスのLP-BM5感染群と非感染群における自発交替行動量の差は全く認められなかった。

Rotarod test

Morter learningの指標となるrotarod testでは、LP-BM5に感染させた群およびさせなかった群の両方での有意差は認められなかった。

Water finding test

WildおよびTNF KOマウスについて、獲得試行を行ったマウスの吸水チューブを見つけるまでの時間(finding)、節水するまでの時間(drinking)は、獲得試行を行わなかったマウスの要した時間に比べ有意に短くなり学習効果が認められ、LP-BM5に感染させたwildマウスでは、獲得試行を行ったにもかかわらず、その学習効果は全く認められず、獲得試行を行った群と行わなかった群での有意差は認められなかった。しかし、TNFKOマウスではLP-BM5に感染しているにもかかわらず非感染群と同様に学習効果が認められた。

Water maze

LP-BM5感染群および非感染群のマウスのswimming speedは、両群で差が認められなかったが、escape latencyは、5日目、7日目、9日目のwildマウスでLP-BM5に感染することにより、その時間が有意に延長していた。しかし、TNF-KOマウスのLP-BM5感染群と非感染群におけるescape latencyの差は全く認められなかった。

D. 考察

Murine AIDSの病状進行に伴い、体重、脾重量、リンパ節重量、肝重量の増加、脾細胞のB220, CD4, CD8, IL2R陽性細胞の割合の変化および脾細胞のConA, LPS刺激に対するチミジンの取り込み量の変化などが末梢の病状進行すなわち免疫不全の程度の指標になることが知られている。本研究では、エイズ痴呆の指標として種々行動薬理試験が開始されたLP-BM5感染10週後の末梢におけるそれぞれの病状の進行程度をwildとTNF KOマウスについて比較検討した。いずれの指標もwildマウスで従来報告されていた通りの結果が得られたが、wildとTNF KOマウス両群での有意差は認められなかった。これ

らの結果は、LP-BM5感染により発症する免疫不全の程度は、少なくとも感染後10週の時点ではTNF- α の有無に影響されないことを示唆しており、従来の一般的なウイルス感染におけるTNF- α の役割に関する報告と異なっていた。しかし、本研究の主題であるエイズ痴呆の解析については、wildとTNF KOマウスでの末梢における免疫不全の程度に差がなかったことで、行動薬理的試験のwildとTNF KOマウスでの単純な比較検討が可能であった。行動薬理試験の結果は、先に示したとおり、Y-maze test, Water finding test, Water maze testなどでLP-BM5感染のマウスでは、非感染群のマウスに比べ明らかな学習機能の低下が認められた。しかし、これらの学習機能の低下はTNF KOマウスでは全く認められず、このマウスモデルで認められる痴呆の発症にTNF- α が関与していることが明らかとなった。さらに、LP-BM5感染マウスの脳の³H-PK 11195 binding assayの結果は、wildとTNF KOマウス間での有意差は認められず、マイクログリアの活性化がwildおよびTNF KOマウスの両方で起こっていることが考えられた。一方、神経障害の指標として行ったMAP-2 immunoblotsの結果は学習機能の低下と平行していた。すなわち、脳内のMAP-2 immunoreactivityは、wildマウスのシグナルに比較してLP-BM5に感染することにより有意に低下していた。しかし、TNF-KOマウスのLP-BM5感染群と非感染群におけるMAP-2 immunoreactivityは有意の差を認められなかった。これらの結果を総合すると、LP-BM5感染マウスではTNF- α が脳内の宿主細胞から放出されることにより何らかの形で直接あるいは間接的に神経機能障害を発症させていることが考えられた。

E. 結論

LP-BM5に感染マウスモデルはエイズ痴呆解明のための非常に良いモデルであることが確認された。今回の研究結果よりTNF- α が直接あるいは間接的にエイズ痴呆の発症に関与していることが証明され、今後のエイズ痴呆のメカニズムの解明に新たな道を開いた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Characterization of learning and memory deficits in C57BL/6 mice infected with LP-BM5, a murine model of AIDS.

Iida R, Yamada K, Mamiya T, Saito K, Seishima M,
Nabeshima T.

J. Neuroimmunol. In Press (1999)

2. 学会発表

Characterization of learning and memory deficits in the
mice infected with LP-BM5.

Iida R, Yamada K, Noda Y, Mamiya T, Saito K,
Seishima M, Nabeshima T.

第71回日本薬理学会年会, 京都, 1998.3.23-26

LP-BM5 ウイルス感染の炎症に対する IFN- γ の影響
(IFN- γ knockout mouse を用いての検討)

竹村正男, 斉藤邦明, 前川尚也, 藤垣朱和子, 藤井
秀比古, 和田久泰, 清島 満.

第19回日本炎症学会総会, 東京, 1998.9.3-4

マウスエイズモデルにおける indoleamine 2,3-
dioxygenase (IDO) の誘導機構について—インターフェ
ロン- γ ノックアウトマウスを用いた検討—

藤垣朱和子, 斉藤邦明, 竹村正男, 前川尚也, 藤井
秀比古, 和田久泰, 清島 満.

第38回日本臨床化学学会年会, 富山市, 1998.10.21
-23