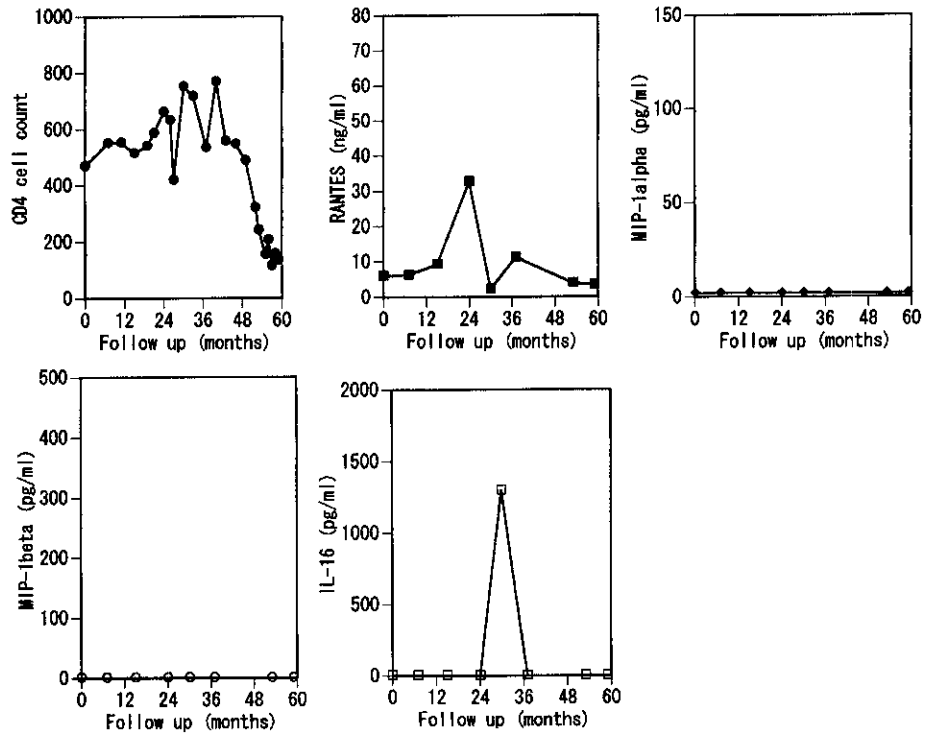
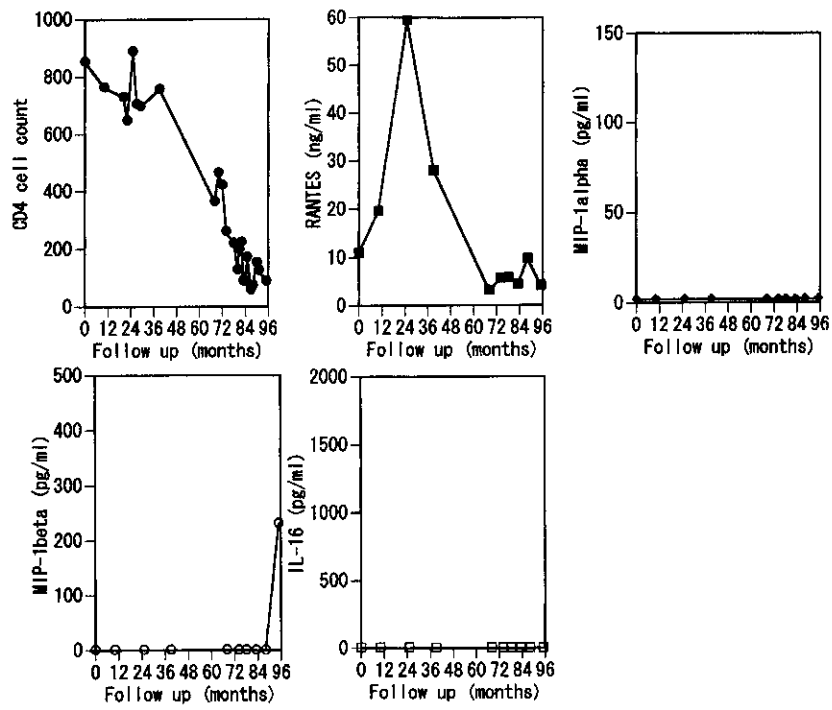


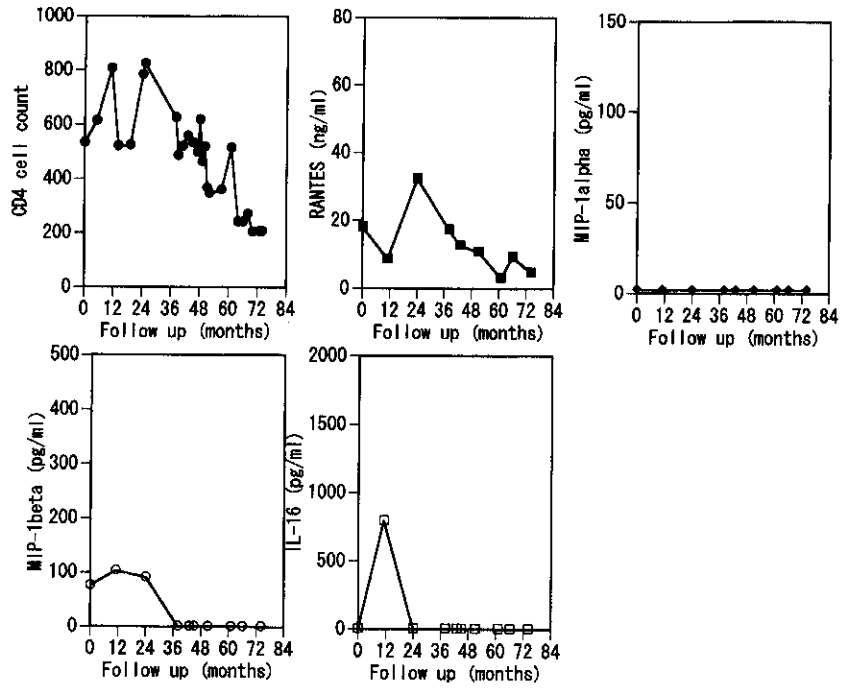
(A)



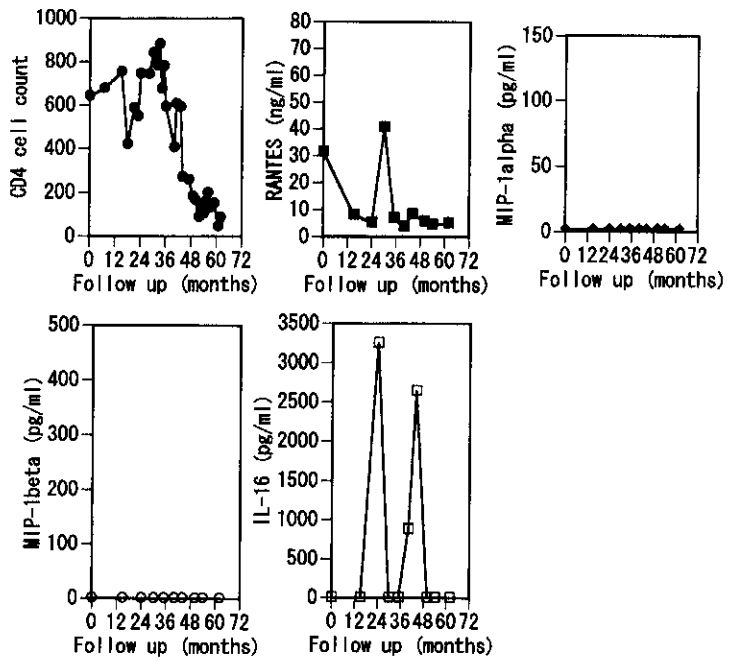
(B)



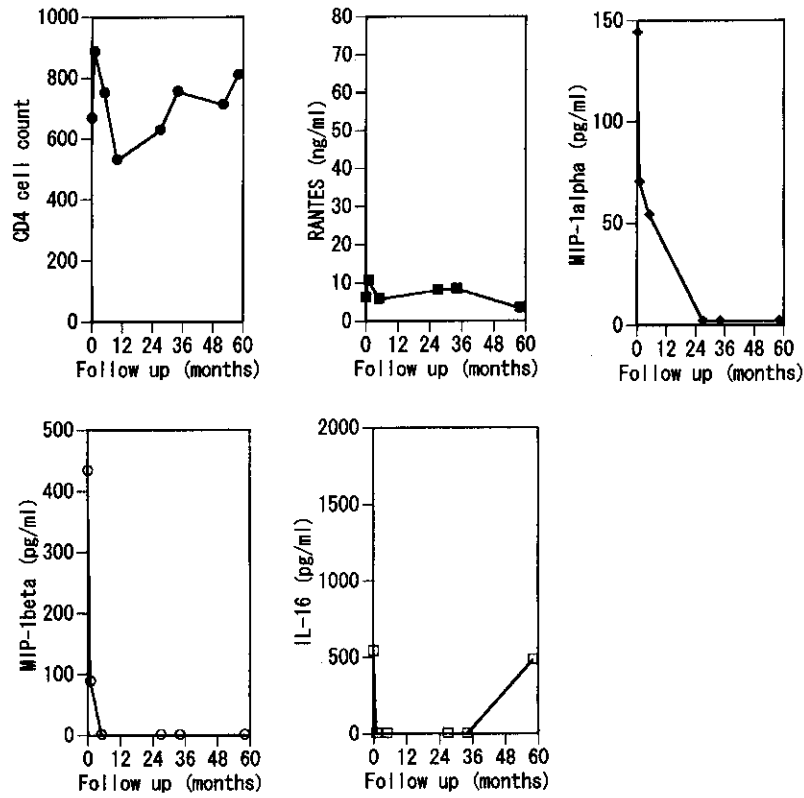
(C)



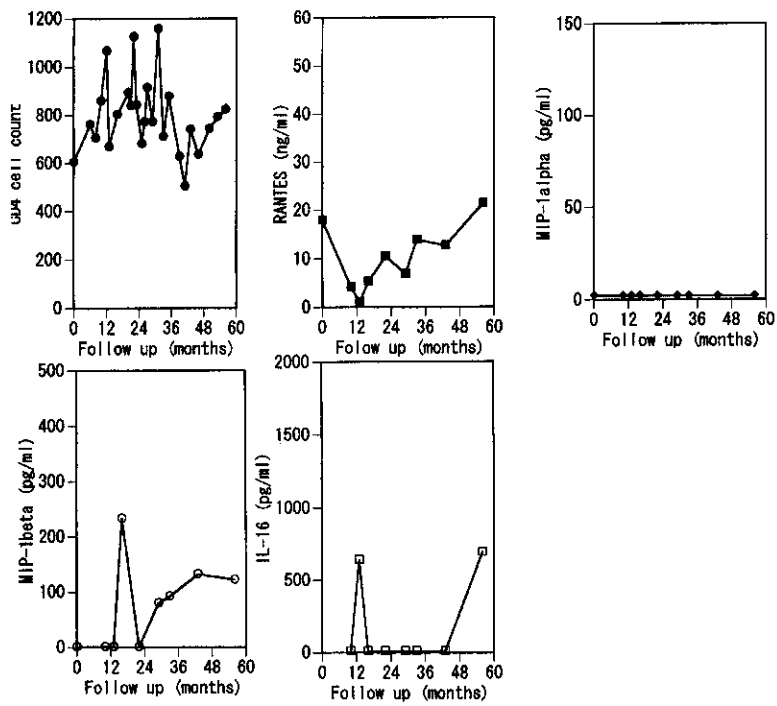
(D)



(E)



(F)



(G)

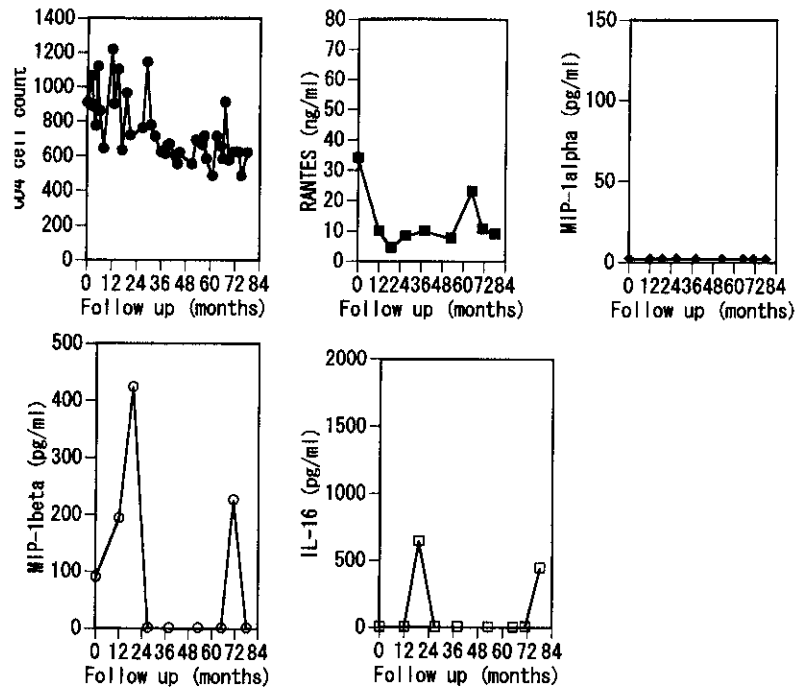


図3 HIV感染者の病期進行とプラズマ中のCCケモカインIL-16のレベル(A-G)

考 察

昨年度の報告書において、CCケモカイン(RANTES、MIP-1 α 、MIP-1 β)以外の可溶性HIV-1複製抑制因子(SHIF: soluble HIV inhibitory factor)がエイズ長期未発症者のCD8陽性T細胞から産生されていることを報告した。本年度の研究では、SHIFがHIV-1持続感染T細胞からのHIV産生を抑制し、また、SEAPレポーターアッセイにおいてもHIV-LTRの転写を抑制することことを明らかにし、SHIFによるHIV-1複製抑制のメカニズムがHIV-LTRの転写抑制であることが強く示唆された。CD8陽性T細胞から産生される抗HIV-1活性を示す可溶性因子としては、CCケモカイン(RANTES、MIP-1 α 、MIP-1 β)、interleukin 16(IL-16)、CD8⁺ T cell antiviral factor (CAF)、soluble HIV inhibitory factor (SHIF)、macrophage-derived chemokine (MDC)が報告されているが、これらのうちHIV-LTRの転写を抑制することが報告されているのは、IL-16、CAF、SHIF、MDCである。SHIF

を高レベルに産生するCD8陽性T細胞をHTLV-Iで不死化して得られたクローンのSHIF活性とCCケモカイン(RANTES、MIP-1 α 、MIP-1 β)、IL-16のレベルを比較検討した結果、両者には相関がみられず、SHIFはCCケモカイン(RANTES、MIP-1 α 、MIP-1 β)およびIL-16とは異なると考えられた。また、昨年度に報告したように、熱安定性の結果の相違よりSHIFはCAFとは異なることが示唆されている。現在、2種の逆転写酵素阻害薬と1種のプロテアーゼ阻害薬の併用投与により、HIV-1感染者体内のウイルス負荷を激減させ病態改善をもたらすことが報告されている。しかし、将来的には、これらの患者においても、薬剤耐性株の出現が危惧され、既存の抗HIV-1薬とは異なる作用メカニズムをもつ薬剤の開発が待ち望まれている。このような観点から、我々はSHIFの遺伝子クローニングを急いでいる。

また、3人のエイズ長期未発症者と4人の発症者から経時的に得られたプラズマ中のCCケモカイン(RANTES、MIP-1 α 、MIP-1 β)、IL-16のレベル

を測定し、CD4 細胞数の推移との関連を検討した結果、エイズ長期未発症者において持続的に高レベルであるサイトカインはなく、また、CD4 細胞数の減少につれて低レベルとなっていくようなサイトカインも明らかではなかった。他のグループからの報告でも、病期の異なる HIV-1 感染者間で血清中の CC ケモカイン (RANTES、MIP-1 α 、MIP-1 β) のレベルに差がみられないことが報告されている^{1,2)}。また、今回の我々の研究では、ヘパリン採血された血液を使用したためにウイルス負荷との関連を検討できなかったが、ウイルス負荷とプラズマ中の RANTES および MIP-1 α のレベルの間には差がみられないことが報告されている³⁾。しかし、重症な免疫不全状態にある HIV-1 感染者に対してプロテアーゼ阻害薬を投与すると、プラズマ中の CC ケモカイン (RANTES、MIP-1 α 、MIP-1 β) および IL-16 のレベルが増加したとの報告がある⁴⁾。さらに、最近では、8 年以上にわたって追跡された HIV-1 感染者において、無症候期からエイズ発症にいたるときにプラズマ中の IL-16 のレベルが低下し、プラズマ中の IL-16 のレベルをモニターすることによりエイズ発症を予測できるとの報告があり⁵⁾、我々の研究結果とは異なる。今後は、日和見感染症の出現などの臨床経過との関連もあわせて検討したい。

結 論

本研究では、CD8 陽性 T 細胞から産生される可溶性 HIV-1 複製抑制因子の解析を行なった。SHIF は HIV-1 持続感染細胞からの HIV-1 産生を抑制し、また、SEAP レポーターアッセイにより SEAP 発現を抑制した。この結果より、SHIF は HIV-1-LTR の転写を抑制することにより HIV-1 の複製を抑制すると考えられた。また、SHIF は CC ケモカイン、IL-16 とは異なると考えられた。HIV-1 感染日本人血友病患者から経時的に得られたプラズマ中の CC ケモカイン (RANTES、MIP-1 α 、MIP-1 β)、IL-16 のレベルを測定した結果、病期の進行との関連はみられず、エイズ発症の予測のマーカーにはなり得ないと考えられた。

参考文献

- 1) McKenzie SW, Dallalio G, North M, et al. Serum chemokine levels in patients with non-progressing HIV infection. *AIDS* 10:F29-F33, 1996.
- 2) Zanussi S, D' Andrea M, Simonelli C, et al. Serum levels of RANTES and MIP-1 α in HIV-positive long-term survivors and progressor patients. *AIDS* 10:1431-1450, 1996.
- 3) Weiss L, Si-Mohamed A, Giral P, et al. Plasma levels of monocyte chemoattractant protein-1 but not those of macrophage inhibitory protein-1 α and RANTES correlate with virus load in human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 176:1621-1624, 1997.
- 4) Bisset LR, Rothen M, Joller-Jemelka HI, et al. Change in circulating levels of the chemokines macrophage inflammatory proteins 1 α and 1 β , RANTES, monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-16 following treatment of severely immunodeficient HIV-infected individuals with indinavir. *AIDS* 11: 485-491, 1997.
- 5) Amiel C, Darcissac E, Truong M-J, et al. Interleukin-16 (IL-16) inhibits human immunodeficiency virus replication in cells from infected subjects, and serum IL-16 levels drop with disease progression. *J. Infect. Dis.* 179:83-91, 1999.



HIV感染血友病患者は HIV感染非血友病患者とは異なり IL-18およびIL-1 β の産生が低下する

伊藤 正彦¹⁾、木村 哲²⁾

¹⁾山梨医科大学 微生物学講座

²⁾東京大学大学院医学系研究科 感染制御学、感染症内科

研究要旨

HIV感染血友病患者群、HIV感染非血友病患者群、HIV非感染血友病患者群および健常人群の末梢血単核細胞(以下PBMC)の各種サイトカインの産生能を *Staphylococcus aureus* Cowan 1株(SAC)で刺激し、18時間後にその培養上清をELISAで測定したところ、HIV感染血友病患者群およびHIV感染非血友病患者群でIL-12産生能は低下していた。IL-18およびIL- β 産生能はHIV感染血友病患者群でのみ有意に低下した。TNF- α 、IL-10、IL-6産生能は4群で差はなかった。Plasma中のTGF- β 1はHIV感染血友病患者群で最も高かった。Natural TGF- β 1は健常人のPBMCのIL-12、IL-18、IL-1 β 産生能を低下させ、caspase-1のmessenger RNA量も低下させた。従って、HIV感染血友病患者群でのIL-18およびIL-1 β 産生能低下はPlasma中のTGF- β 1による持続的な感作による可能性が考えられた。

分担研究者：木村 哲

研究協力者：伊藤正彦

IL-18 and IL-1 β productions are decreased in HIV-seropositive haemophiliacs but not in HIV-seropositive non-haemophiliacs

Masahiko Ito¹⁾ and Satoshi Kimura²⁾

¹⁾Department of Microbiology, Yamanashi Medical University and ²⁾Department of Infection Control and Prevention, Department of Infectious Diseases, Graduate School of Medicine, University of Tokyo

目 的

エイズの原因として HIV が発見されて以来、HIV 感染と発症のメカニズムに関する研究が盛んに行われてきた。HIV は、主に CD4 を介して CD4+T 細胞および macrophage 系細胞に感染し、その細胞を破壊し、さまざまな免疫異常状態を起こす。そのメデイエ-タとしてサイトカインの動態の解析は、長い潜伏期から発症へのメカニズムの解析および長期末発症者の解析にとって重要である。HIV 感染者は細胞性免疫を司る IL-12 の産生が低下していることが報告されている。しかしながら、IL-12 と共調して Th0 細胞を Th1 細胞に誘導する IL-18 に関しては明らかではない。また、日本において、HIV 感染者の多くは血液製剤により感染した血友病患者であるが、HIV 感染血友病患者のサイトカイン産生に関する研究は少ない。本研究では、HIV 感染血友病患者の末梢血単核細胞(以下 PBMC)の産生するサイトカイン、特に IL-12, IL-18 産生能と HIV 感染非血友病患者のサイトカイン産生能とに差があるかどうかを中心に調べた。

方 法

検討の対象は荻窪病院および東京大学医科学研究所付属病院に通院中の人で研究に協力することを同意してくれた HIV 非感染血友病患者 25 人、HIV 感染血友病患者 31 人、HIV 感染非血友病患者 31 人および健常人 30 人とした。末梢血単核球はヘパリン処理した血液から分離し、*Staphylococcus aureus* Cowan 1 株(SAC)を加えて 18 時間培養し、その上清中の IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, TNF- α を ELISA にて定量した。血漿は EDTA 加真空管で採血し、30 分以内に 4 $^{\circ}$ C、1000 x g で 30 分間遠心し、その血漿を分注し、ただちに -80 $^{\circ}$ C に保存した。その血漿を用いて TGF- β 1, IL-4, IL-10, TNF- α を ELISA にて定量した。Natural TGF- β 1 存在下で健常人の PBMC を 18 時間培養し、その後 SAC で 18 時間培養し、その上清を -80 $^{\circ}$ C で保存した。また、TGF- β 1 (10ng/ml) 前処理した場合と処理しない場合での健常人の PBMC に SAC で 3 時間、8 時間刺激したのち、RT-PCR を行った。また、患者からの

PBMC を SAC で 8 時間刺激した後、caspase-1 の mRNA を検出するために RT-PCR を行った。検定は scheffe' F で行い P < 0.05 をもって有意差ありとした。

結 果

SAC で刺激した各群の PBMC の IL-12 産生能は HIV 感染血友病患者群と HIV 感染非血友病患者群の両群で HIV 非感染血友病患者群と健常人群に比べて有意に低下していた。IL-18 および IL-1 β 産生能については HIV 感染血友病患者でのみ有意に低下を認めた。IL-10, IL-6, TNF- α 産生能は 4 群間で差はなかった(図 1)。一方、plasma 中の TGF- β 1 は HIV 感染血友病群で他の 3 群よりも高かった(図 2)。plasma 中の IL-10, IL-4, TNF- α は 4 群間で差はなかった。健常人の PBMC では TGF- β 1 (10 ng/ml) 処理により未処理の場合比べて IL-12, IL-18, IL-1 β の産生能はそれぞれ 39.4%, 32.6%, 36% の低下を認めた(表 1)。しかしながら、IL-10, IL-6, TNF- α 産生能に変化はみられなかった。TGF- β 1 で処理した場合に処理しなかった場合に比べて、SAC で 3 時間、8 時間のいずれの間刺激でも健常人の PBMC の caspase-1 の mRNA 量は低下していた(図 3)。その上清中の IL-1 β , IL-18 の産生量は TGF- β 1 処理により低下した。また、HIV 感染血友病患者の PBMC では SAC 刺激 8 時間後の caspase-1 の mRNA 量は他の 3 群の患者のそれより低くなっており、その上清中の IL-1 β 産生量も低くなった。

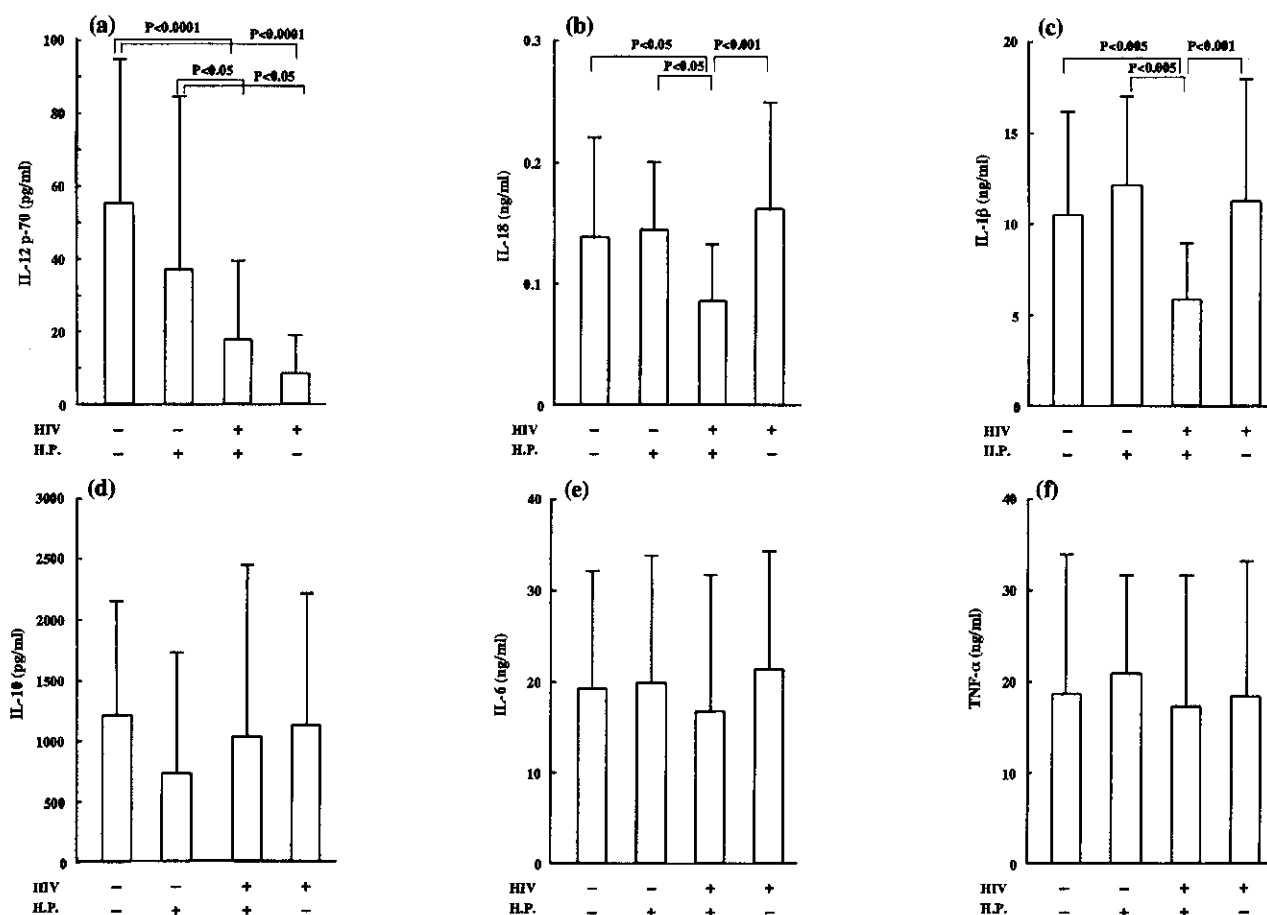


図1 Production of cytokine by SAC-stimulated PBMC from HIV-1 seronegative and seropositive haemophiliacs (H.P.) or non-haemophiliacs. Levels of IL-12 (a), IL-18 (b), IL-1β (c), IL-10 (d), IL-6 (e) and TNF-α (f) were measured by ELISA in the cell-free supernatant of PBMC from healthy HIV-1-seronegative individuals, HIV-1-seronegative haemophiliacs and HIV-1-seropositive haemophiliacs or non-haemophiliacs stimulated with SAC (10⁻³ vol/vol). Results are mean ± SD.

表1 Effect of TGF-β 1 on cytokine productions by SAC-stimulated normal PBMC

TGF-β ₁	IL-12(pg/ml)	IL-18(pg/ml)	IL-1 β (ng/ml)	IL-10(pg/ml)	IL-6(ng/ml)	TNF-α (ng/ml)
-	322 ± 262	49 ± 26	6.6 ± 2.9	527 ± 612	11 ± 4.2	22.9 ± 8.3
+	195 ± 169	33 ± 18	4.2 ± 1.9	530 ± 510	12 ± 4.4	20.2 ± 4.0
% decrease	39.4	32.6	36	-9.1	-0.5	11

Data expressed as mean ± SD in 9 samples.

* Statistically Significant (P<0.05).

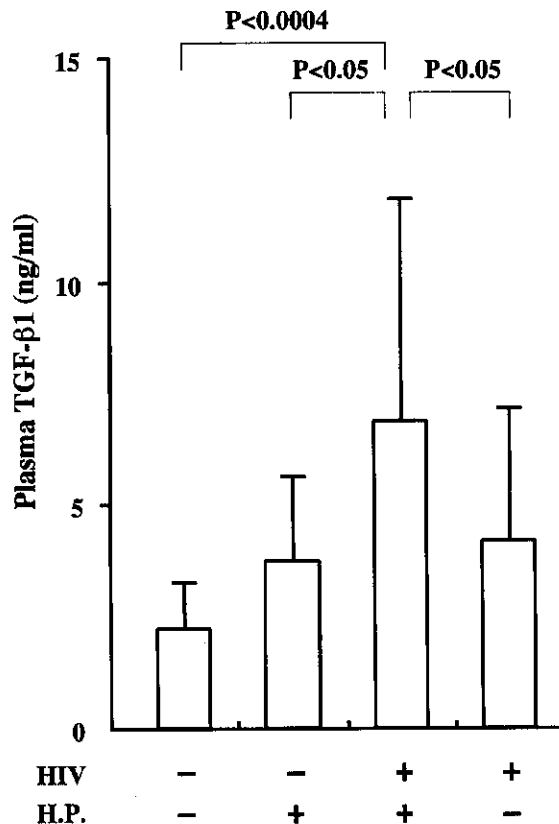


図2 Comparison of plasma TGF-β1 levels in HIV-1-seropositive haemophiliacs (H.P.) or non-haemophiliacs, and HIV-1-seronegative haemophiliacs and healthy HIV-1-seronegative individuals. Plasma TGF-β1 was determined by ELISA. Data are expressed as mean ± SD.

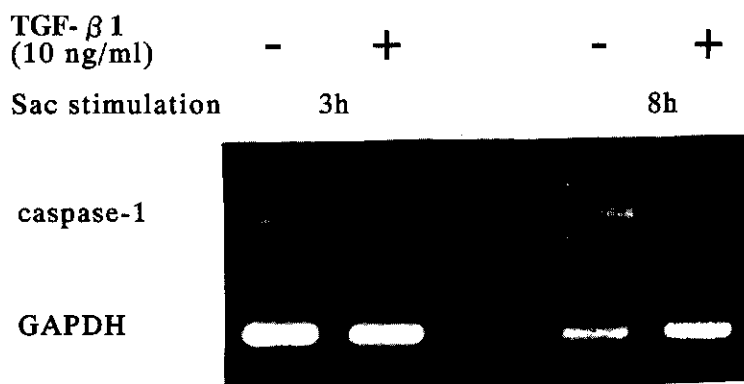


図3 Effect of TGF-β1 on expression of caspase-1 mRNA in normal PBMC stimulated with SAC. PBMC treated with or without 10ng/ml of TGF-β1 for 18 hours were stimulated with SAC for 3 and 8 hr and RNA was extracted and amplified by RT-PCR for caspase-1 mRNA. GAPDH served as the internal control. RT-PCR products were electrophoresed on a 2% agarose gel stained with ethidium bromide. The degree of expression of RT-PCR product for caspase-1 mRNA was reduced after addition of TGF-β1 and SAC stimulation at 3 hr and 8 hr. The level of IL-1β and IL-18 in these culture supernatants was also measured. The production of IL-1β showed a decrease with the addition of TGF-β1 from 0.36 to 0.15 ng/ml and from 4.2 to 2.0 ng/ml at 3 hr and 8 hr stimulation with SAC respectively. The IL-18 production after treating PBMC with TGF-β1 were also decreased from 0.04 to 0.018 ng/ml at 8 hr stimulation with SAC.

考 察

今回、我々は HIV 感染血友病患者において IL-12, IL-18, IL-1 β 産生能が低下していることを見いだした。一方、plasma 中の TGF- β 1 は HIV 感染血友病群で高値を示した。Natural TGF- β 1 で正常人 PBMC を処理し、その後 SAC で刺激したところ IL-18, IL-1 β , IL-12 が低下することが見いだされたことから、plasma 中の TGF- β 1 が高いことで PBMC での IL-12, IL-18, IL-1 β の産生低下が引き起こされている可能性が示唆された。IL-18 も IL-1 β も caspase-1 により部分的に切断され活性型となり細胞外に放出されることが知られているが、今回の実験では TGF- β 1 処理で caspase-1 の mRNA の量が減少することがわかり、血中の高 TGF- β 1 が PBMC の caspase-1 の messenger RNA 産生の低下に関与し、さらに IL-18, IL-1 β の産生を低下させた可能性が考えられた。しかし、このことについては今後さらに詳しい検討が必要である。また、HIV 感染血友病患者の plasma 中の TGF- β 1 が高かった理由については、HIV と HCV が同時に感染することにより plasma 中の TGF- β 1 がもっとも高くなった可能性が考えられた。一方、IL-12 産生は HIV 感染血友病群のみでなく、HIV 感染非血友病群でも低下していたが、IL-12 の産生は TGF- β 1 のみならず IL-10 や HIV のアクセサリ-蛋白である Tat や Vpr でも低下することが知られているので、IL-12 産生は plasma 中の TGF- β 1 が高いことに加えて IL-10 や Tat や Vpr が高くなることにより HIV 感染非血友病群でも低下が引き起こされる可能性が考えられた。

結 論

HIV 感染血友病患者群および HIV 感染非血友病患者群において HIV 非感染血友病患者群と健常人群に比べて PBMC の IL-12 産生能は低下していた。IL-18 および IL-1 β 産生能は HIV 感染血友病患者群でのみ有意に低下した。TNF- α , IL-10, IL-6 産生能は 4 群で差はなかった。Plasma 中の TGF- β 1 は HIV 感染血友病患者群で最も高かった。Natural TGF- β 1 は 健常人の PBMC の IL-12, IL-18, IL-1 β 産生能を低下させ、caspase-1 の messenger RNA 量も低下させた。従って、HIV 感染血友病患者群での IL-18 およ

び IL-1 β 産生能低下は Plasma 中の TGF- β 1 による持続的な感作による可能性が考えられた。

参考文献

- 1) Trinchieri, G.: A cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cell type 1 and cytotoxic lymphocytes., *Blood* 84:4008-4027, 1994
- 2) Okamura, H., Tsutsui, H., Komatsu, T., et al.: Cloning of a new cytokine that induces IFN- γ production by T cells., *Nature* 378:88-91, 1995
- 3) Ito, M., Ishida, T., He, L., et al.: HIV-1 type 1 Tat protein inhibits interleukin12 production by human peripheral blood mononuclear cells. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 14:845-849, 1998

この研究は何麗敏、照沼裕、田辺文憲、花房秀次、岩本愛吉、岡慎一、千葉直彦、栗本雅司、池田雅夫、岡村春樹との共同研究である。



IL-15によるHIV感染者末梢血リンパ球細胞のアポトーシス抑制効果

河野 茂¹⁾、小林 信之²⁾

¹⁾長崎大学医学部 第二内科

²⁾長崎大学薬学部 医療薬剤学講座

研究要旨

IL-15のHIV感染末梢血リンパ球細胞のアポトーシス抑制効果を *in vitro* で検討した。その結果IL-15は濃度依存的にHIV感染末梢血リンパ球細胞のアポトーシスを抑制、その機構がFas/Fas-Lシステムの制御によることが示唆される結果が得られた。さらにIL-15存在下にHIV感染末梢血リンパ球細胞を長期培養するとCD8陽性細胞がより維持されることが明かとなった。本研究よりIL-15をHIV感染者へ投与したばあいにCD4陽性T細胞の特異的な減少を阻止できるだけでなくCTL細胞の維持に有用な可能性が示唆された。

分担研究者：河野 茂

研究協力者：小林信之

Inhibitory Effect of IL-15 on the Apoptosis of Peripheral Blood Leukocytes from HIV - Infected Individuals

Shigeru Kohno¹⁾ and Nobuyuki Kobayashi²⁾

¹⁾The Second Department of Internal Medicine, Nagasaki University and ²⁾Department of Clinical Pharmaceutics, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki University

目 的

HIV感染者末梢血リンパ球細胞は*in vitro*において自発的にアポトーシスにより死滅し、かつそのアポトーシスに Fas/Fas-L システムが関与することが既に明かとなっている。AIDS は CD4 陽性 T 細胞の特異的な減少による免疫不全の誘発がその病態の本体であるため、この CD4 陽性 T 細胞の特異的減少の阻止が AIDS 発症阻止につながるものと期待されている。このような観点からアポトーシス制御薬の HIV 感染者への投与が期待されるが、アポトーシスそのものは生体の基本的な恒常性維持に密接に関与しており、現段階では AIDS を含めて具体的な疾患へのアポトーシス制御薬の投与はリュウマチ患者への Fas/Fas-L システムの制御が治療法として検討されているケースを除いて行なわれていない。この背景にはいまだアポトーシスの制御薬の開発が十分に進んでいない背景もあるが、本研究ではアポトーシス制御薬とりわけ Fas/Fas-L システムの制御薬の検索と AIDS における CD4 陽性 T 細胞の減少防止への応用の可能性を基礎的に研究することを目的としている。本年の研究では一昨年 Fas/Fas-L システムを介したアポトーシスの制御活性があると報告された IL-15 による HIV 感染者末梢血リンパ球細胞の自発的アポトーシスの抑制効果を検討した。

方 法

1. HIV感染者末梢血よりのリンパ球細胞の分離と培養

HIV 感染者末梢血(ヘパリン加採血)は国立国際医療センター岡慎一部長より提供していただき、Ficoll-Paque(Pharmacia)にて単球細胞を分離し、 $1 \times 10^6/\text{ml}$ の濃度で培養した。培養液は RPMI1640, 10% FCSにて行なった。死細胞の測定はトリパンブルー色素排除法により行ない、Hoechst33342 染色による染色体の凝集を蛍光顕微鏡にて観察することによりアポトーシスであるか否かを検定した。用いた検体の CD4, CD8 細胞数は表1にまとめた。

2. IL-15の処理

ヒト組み替え型 IL-15 (Genzyme, Cambridge, MA) および抗 Fas 抗体 CH11 (MBL, Nagoya, Japan), 抗 Fas-L 抗体 NOK-1 (Pharmingen, San Diego, CA) は各図に示した濃度で使用した。

3. フローサイトメトリー

リンパ球細胞の表面マーカーの解析は FITC 結合抗ヒト CD4 抗体 (Pharmingen, San Diego, CA) 及び PE 結合抗ヒト CD8 抗体 (Pharmingen, San Diego, CA) を用い、EPICS XL (Coulter) にて行なった。

表1 実験に用いた検体の CD4, CD8 値

Sample No.	Sex	CD4	CD8
1	M	159	496
2	M	108	497
3	M	379	914
4	M	143	629
5	M	146	1026
6	M	247	1461
7	M	328	625
8	F	334	477
9	M	136	1669
10	M	268	3091
11	M	195	1266
12	F	254	370
13	M	177	327
14	M	208	420
15	M	205	1187
16	M	180	778

結果

1. IL-15によるHIV感染者由来末梢血リンパ球細胞の自発的アポトーシスの阻害

分離したリンパ球細胞は 1×10^6 /mlの細胞数に調整し、RPMI1640 メディウム、10% FCS で種々の濃度の IL-15 在下に培養し経時的に死細胞数をトリパンブルー色素排除法により測定した。図1は検体5～8での結果を示している。図1は培養3日

目のものであり、図から明らかにそれぞれの検体は自発的な細胞死が観察され、その割合は22%から54%にわたっている。これらの細胞死はIL15存在下に効果的に阻害されている。他の検体でも基本的に同様な結果が得られている。図2に今回用いた16検体のIL15による細胞死抑制率の平均値を示した。この図はIL15非処理の細胞死の割合を1とした時の種々の濃度のIL15での抑制率を示したものである。

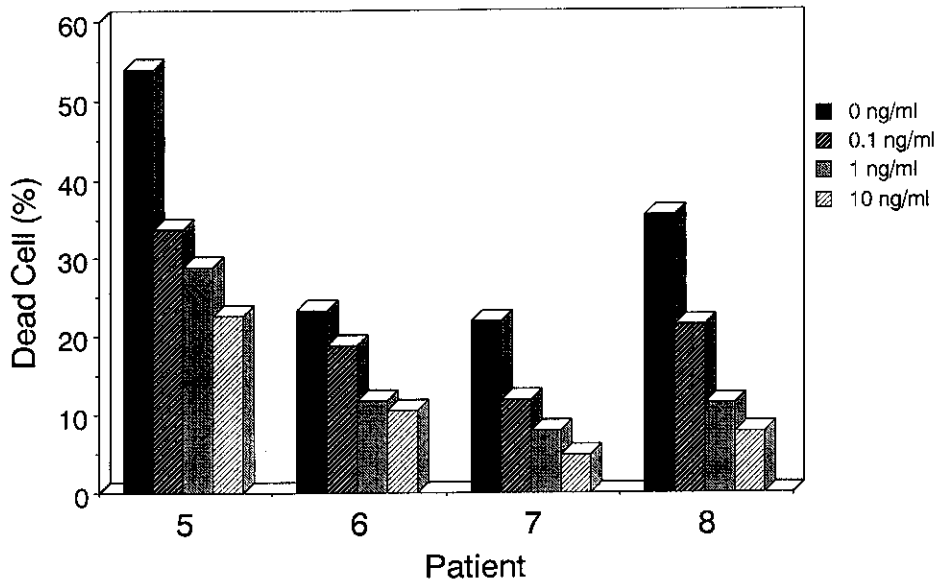


図1 IL15のHIV感染者末梢血リンパ球細胞死の抑制効果

HIV感染者(検体5-8)末梢血リンパ球細胞をFicoll-Paqueで分離後、 1×10^6 /mlの細胞数で3日間RPMI1640培地10%FCSで培養してトリパンブルー色素排除法で死細胞(%)を計測した。IL-15は図で示した濃度で培地に加えた。

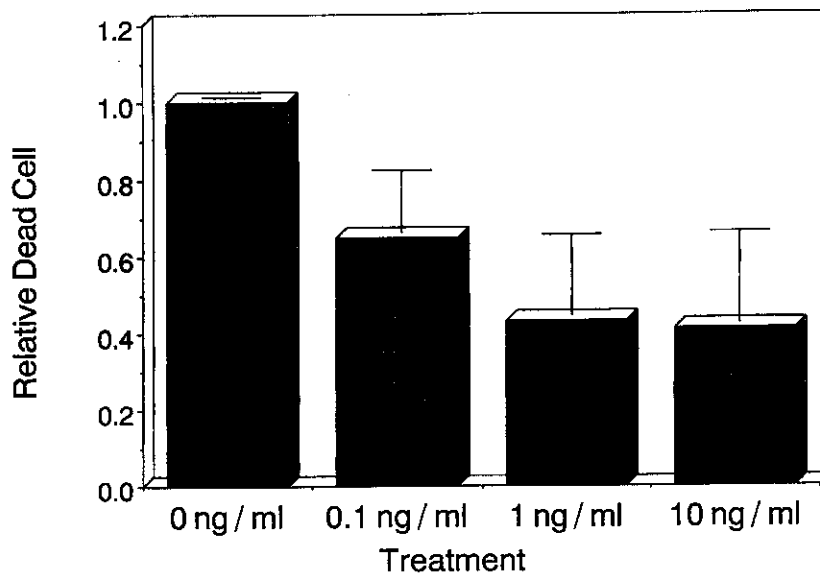


図2 IL15のHIV感染者末梢血リンパ球細胞死の抑制効果の平均値
図1同様の実験をHIV感染者検体16例で行なった平均。

次に死細胞数をフローサイトメトリーにより検定した結果を図3に示す。この図は HIV 感染者 PBMC の前方散乱(FS)および側方散乱(SS)を測定したものである。分離直後の細胞は4%の細胞が死細胞として観察されるが、3日間の培養で死細胞が30.4%に上昇していることがわかる。この死細胞数の増加はIL15 10ng/ml 存在下では16.4%の

上昇に留まり、10日間の培養では3.6%しか死細胞が観察されないことが判る。図4に検体1及び14のIL-15 10ng/ml存在及び非存在下でのそれぞれ4週及び10日間培養した後の形態を示した。IL-15非存在下ではいずれの検体も細胞死が顕著に引き起こされるが、IL15存在下にはほとんどの細胞が生存していることがわかる。

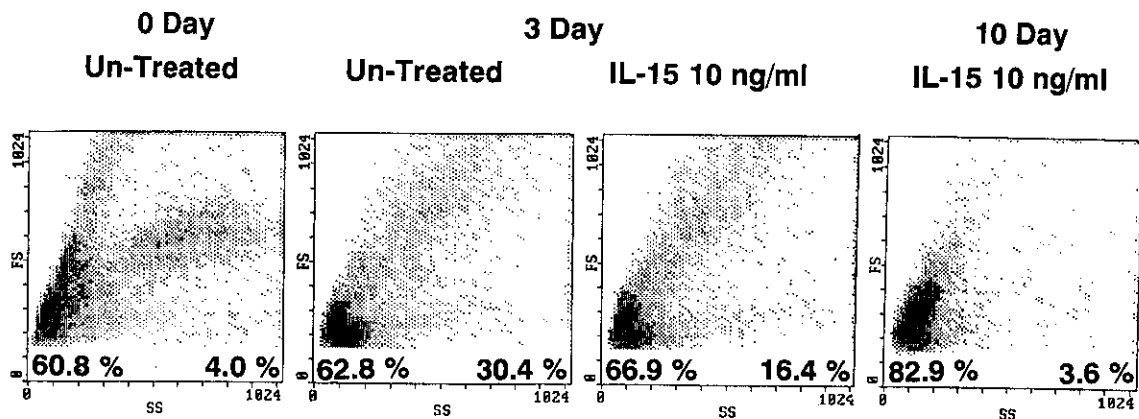


図3 IL15のHIV感染者末梢血リンパ球細胞死の抑制のフローサイトメトリーによる解析

図1同様の実験を行ないフローサイトメーターにて死細胞の測定を行なった。培養はIL15 10ng/ml存在下または非存在下3日目および10日目のもので、各図の横軸は側方散乱(SS)、縦軸は前方散乱(FS)で各図中の左下の数字はリンパ球分画の細胞%、右下の数字は死細胞の%を示している。

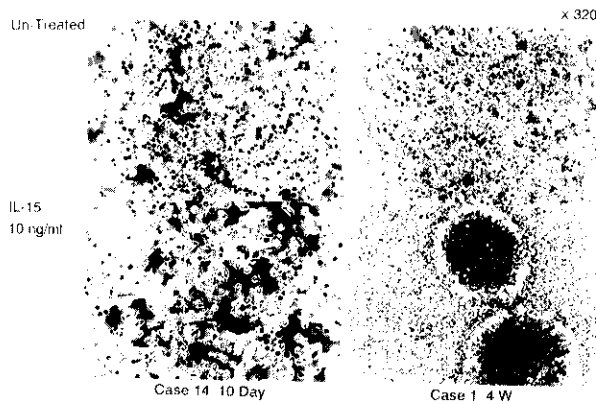


図4 IL15処理したHIV感染者末梢血リンパ球細胞の形態
HIV感染者(検体1および14)末梢血リンパ球細胞を図1のごとくIL15存在、非存在下に培養したそれぞれ4週および10日目の写真。

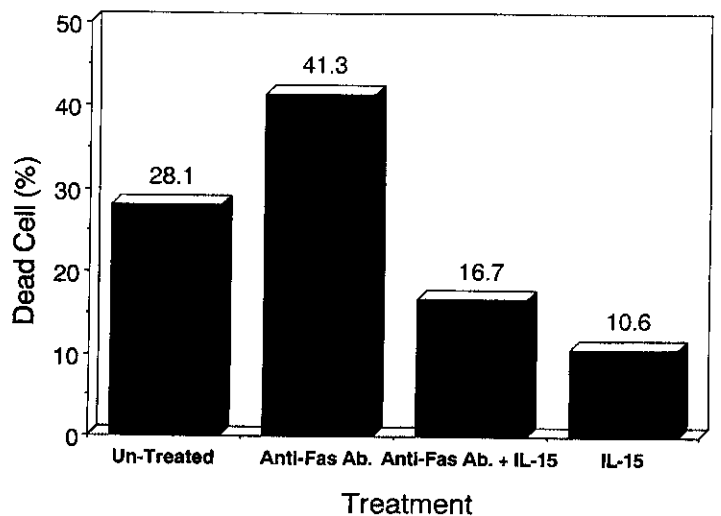


図5 IL15によるFas媒介アポトーシスの抑制

検体16から得られたリンパ球細胞を、無処理、CH11(100 ng/ml)存在下、CH11(100ng/ml)+IL15 10 ng/ml 存在下およびIL15 10ng/ml 存在下に3日間培養し、トリパンブルー色素排除法にて死細胞(%)を算定した。

2. IL-15によるFas依存的アポトーシスの抑制

次にIL15が抗Fas抗体(CH11)により誘導されるリンパ球細胞のアポトーシスを阻害するか検討した。図5に示すように検体16から得られたリンパ球細胞を3日間培養すると28%の細胞死が観察された。この細胞死は抗Fas抗体1mg/mlの存在下に41.3%に増加するがIL-15共存下には16.7%に抑えられた。

3. IL-15処理後のHIV感染者末梢血リンパ球細胞の細胞表面マーカーの解析

IL15はこれまでの報告で未刺激人リンパ球の増殖は引き起こさないことが知られている。またIL-15によりNK細胞の増殖が選択的に引き起こされることも示されている。そこで本研究では単離したHIV感染者リンパ球細胞のIL15処理により生き残った細胞の表面マーカーの解析をCD4及びCD8に関してフローサイトメーターにより行なった。その結果を表2に示す。表から明らかなように10日間の培養でCD4細胞数の割合は若干の減少が見られるが、CD8細胞の割合は委連れの場合も顕著に増加していることが示された。

表2 IL15処理細胞のCD4,CD8陽性率

IL15 10 ng/ml 存在、非存在下に培養した HIV 感染者リンパ球細胞の CD4,CD8 細胞率を抗 CD4 及び抗 CD8 モノクローナル抗体で反応後フローサイトメーターで測定した。

Case	CD4 Cell(%)		CD8 Cell(%)	
	0 Day	10 Day	0 Day	10 Day
5	25.3	16.0	45.6	71.8
6	14.8	13.8	37.6	57.1
7	46.8	32.8	34.0	58.8
8	41.8	43.6	20.7	38.8

PBMC from HIV-infected patients (1×10^6 / ml) were cultured in the presence of 10 ng/ml of IL-15. Percentage of CD4 and CD8 positive cells were determined by flowcytometer.

考 察

IL15は線維芽細胞、単球/マクロファージで主として産生されその受容体は活性化T細胞を含む種々の細胞や組織に見いだされ、IL12と協調的にTh1細胞の増殖を促進するなど細胞増殖の観点から注目されているが、最近になり、Bufone-Paus (Nature Med. 3;1124:1997)らによりFasを介したアポトーシスの抑制活性が見いだされ、またHIV感染者の免疫増強に利用できる可能性が示唆されている(Chehmi et al. J. Immunol. 158;5978:1997)。本研究においてIL15がHIV感染者末梢血リンパ球細胞のFas介在アポトーシス阻害活性を有することがあきらかとなった。現段階ではIL15のFas媒介アポトーシス阻害活性の分子レベルでの機構は明らかにされておらず今後その詳細な検討が必要である。本研究の成果は現在投稿準備中である。

結 論

本研究よりIL-15がHIV感染者末梢血リンパ球細胞の*in vitro*における自発的アポトーシス抑制活性を有することが明かとなった。またIL-15はHIV感染者末梢血リンパ球細胞中のCD8陽性細胞増加作用があることも示された。

成果の発表

- 1) S.Nogae., T.Koji., M.Miyazaki., N.Kobayashi., T.Saito., K.Abe., H.Saito., P.K.Nakane and Y.Nakanishi. : Induction of apoptosis in ischemic reperfusion model of mouse kidney; possible involvement of Fas. J. American Society of Nephrology 9, 620-631. 1998
- 2) K.Kubo., Y.Matsuzaki., M.Okazaki., A.Kato., N.Kobayashi and K.Okita. : The Fas system is not significantly involved in apoptosis in human hepatocellular carcinoma. Liver 18,117-123.1998
- 3) S.Ishiyama., M.Hiroe., T.Nishikawa., T.Shimojo., S.Abe., H.Fujisaki., H.Ito., K.Yamakawa., N.Kobayashi., T.Kasajima and F.Marumo.: The Fas/fas Ligand system is involved in the pathogenesis of autoimmune myocarditis in rats. J.Immunol 161, 4695 - 4701.1998
- 4) Y. Horita., M. Miyazaki., T. Koji., N. Kobayashi., M. Shibuya., M. S. Razzaque., M. Cheng., Y. Ozo-

no., S. Kohno and T. Taguchi. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in rats with protein-overload nephrosis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 13, 2519 - 2528, 1998



ウガンダにおけるHIV感染者の末梢血 CD4陽性リンパ球上のケモカインリセプ ターの発現に関する臨床研究

永武 毅¹⁾、大石 和徳¹⁾、吉嶺 裕之¹⁾、早野 真史²⁾、松島 綱治²⁾

¹⁾長崎大学熱帯医学研究所 感染症予防治療研究分野

²⁾東京大学医学部 衛生学教室

研究要旨

ウガンダにおいて、39名の明らかな日和見感染症を伴わないHIV感染者と27名のHIV非感染者において、末梢血CD4陽性リンパ球のケモカインリセプター(CCR5, CXCR4, CCR4)の発現を検討し、血漿中のHIV-1ウイルス量と末梢血単核球細胞(PBMC)のTh1サイトカイン(IFN- γ)とTh2サイトカイン(IL-10)産生を測定した。HIV感染の進行に伴い、CD4陽性リンパ球比率とCD4陽性リンパ球上のCCR5およびCCR4の発現率は有意に減少した。PBMCのIFN γ 産生はHIV感染者で減少し、IL-10は増加する傾向を示したが、有意な変化ではなかった。血漿中ウイルス量は%CD4と有意な逆相関を示したが、CCR5, CCR4とは有意な相関はなかった。これらの成績より、HIV感染症におけるサイトカイン産生パターンによる明らかなTh1からTh2へ極性化は確認できないが、HIV進行期(CD4 200/mm³以下)におけるCCR4陽性のTh2細胞の相対的増加が示された。また、HIV感染病期の進行に伴いCD4陽性リンパ球上のCCR5発現が亢進することも確認された。

分担研究者：永武 毅

研究協力者：大石和徳、吉嶺裕之、早野真史、松島綱治

Clinical evaluation of the expression of chemokine receptors on human CD4+ lymphocytes of peripheral blood from HIV-infected persons in Uganda

Tsuyoshi Nagatake¹⁾, Kazunori Oishi¹⁾, Hiroyuki Yoshimine¹⁾, Masashi Hayano²⁾, and Kouji Matsushima²⁾

¹⁾Department of Internal Medicine, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University, ²⁾Department of Molecular Preventive Medicine, School of Medicine, The University of Tokyo

目的

最近、Th2細胞が主にCCR4を発現することが報告され、さらにはCCR4陽性Tリンパ球はIL-4、IL-5のTh2サイトカインを産生することが知られている。一方、これまでにCCR5はM-指向性HIV、CXCR4はT-指向性HIVのco-receptorとして知られている。そこで、今回はHIV感染の臨床病期の進行に伴う1) Th1からTh2への極性化が観察されるか否か、2) co-receptor発現の推移を明らかにする目的で以下の検討を行った。

方法

1)1998年7月から10月にかけてウガンダのJoint Clinical Research Center (JCRC)において、インフォームドコンセントの得られたHIV感染者39名と非HIV感染者27名を登録した。HIV感染者は明らかな日和見感染症のない症例を選別した。とくに、HIV感染者は $CD4 < 200/mm^3$ の群10名、 $200 < CD4 < 500/mm^3$ の群14名、 $CD4 > 500/mm^3$ の群15名に分類した。2)被験者から採取したEDTA血と以下の標識抗体を用いてThree color解析法によるフローサイトメトリーを実施した。標識抗体はPE標識抗CCR5抗体、PE標識抗CXCR4抗体、FITC標識抗CCR4抗体、FITC標識およびCy chrome標識抗CD4抗体、PE標識抗CD8抗体、FITC標識、PE

標識、Cy chrome標識コントロールIgG抗体を使用した。全血と抗体処理後に、溶血操作を加え、細胞を1%パラフォルムアルデヒドにより固定した。フローサイトメトリーは細胞固定後速やかに実施した。3)ヘパリン血20mlより比重遠心法により末梢血単核球細胞(PBMC)を分離し、細胞数を2%FCS加RPMI-1640で 2×10^6 cell/mlに調整し37℃で24時間培養した。また、培養はphytohemagglutinin (PHA: 1 μ g/ml)添加で行い、24時間後に培養上清を採取し、-80℃で保存した。培養上清のIFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-10についてELISA法(バイオソース社)で測定した。4)血漿中HIV-1ウイルス量はアンプリコアHIV-1モニターテストキットを用いて行った。5)多群間の比較はKruskal-Wallis testとBonferroni/Dunn's testを用いて行った。

結果

1)HIV感染者の末梢血CD4陽性リンパ球比率(%CD4)とCD4陽性リンパ球におけるCCR5発現率の相関をみたところ、両者は統計学的に有意な逆相関を示した(Fig. 1)。また、HIV非感染者においても両者は逆相関の傾向を示した。一方、%CD4とCD4陽性リンパ球におけるCXCR4の発現率については、HIV感染者および非感染者いずれにおいても明らかな相関は認められなかった。また、%CD4とCD4陽性リンパ球におけるCCR4の発現

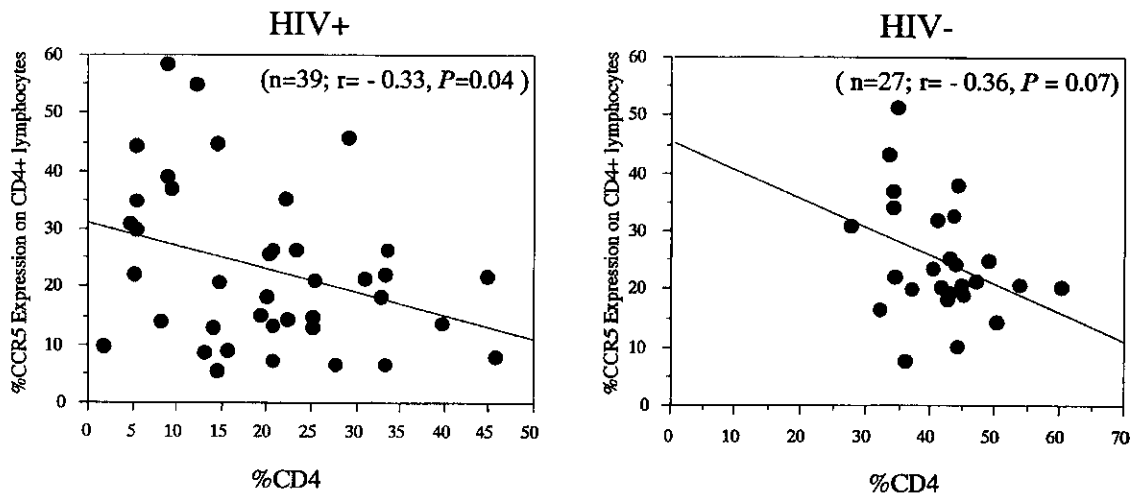


Fig.1 Correlation between %CD4 and CCR5 Expression on CD4+ lymphocytes in HIV-1 infected and uninfected individuals

率については、HIV感染者において有意な逆相関が認められたが、HIV非感染者においては明らかな相関はなかった(Fig. 2)。これらの成績をHIV感染者のCD4 実数によるグループ別で評価した場合、CCR5 も CCR4 も HIV感染者のCD4 < 200/mm³ のグループにおいてのみ他群と比較して有意に高値を示した(Fig. 3, Fig. 4)。

2)PBMCの培養上清のIL-2とIL-4についてはほとんどの検体で測定感度以下であった。IFN- γ 産生については非感染者、CD4>500/mm³以上のHIV感染者で検出されたが、CD4 < 500/mm³以下ではほ

とんど検出されなかった(Fig. 5)。一方、IL-10については非感染者に比較し、CD4> 200/mm³ のHIV感染者では高値をとる傾向を示した。しかしながら、IFN- γ , IL-10いずれにおいても各群間に統計学的有意差は認めなかった。

3)HIV感染者における血漿中のHIV-1ウイルス量は末梢血CD4陽性リンパ球比率(CD4%)と統計学的に有意な逆相関を示した(Fig. 6)。しかしながら、血漿中のHIV-1ウイルス量と末梢血CD4陽性リンパ球のCCR5発現率およびCCR4発現率とは有意な相関は認められなかった。

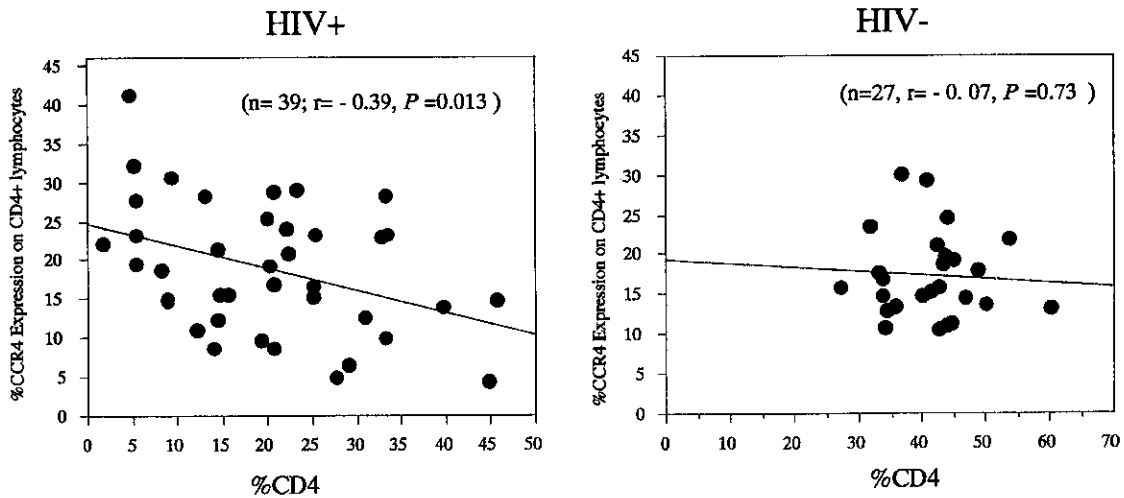


Fig.2 Correlation between %CD4 and %CCR4 Expression on CD4+ lymphocytes in HIV-1 infected and uninfected individuals

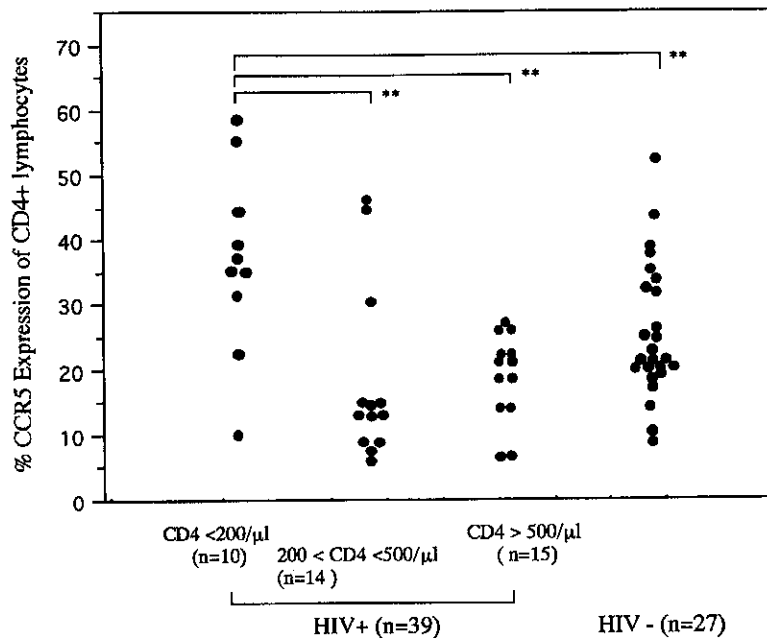


Fig.3 Comparison of %CCR5 Expression on CD4+ lymphocytes in HIV-infected and HIV-uninfected individuals

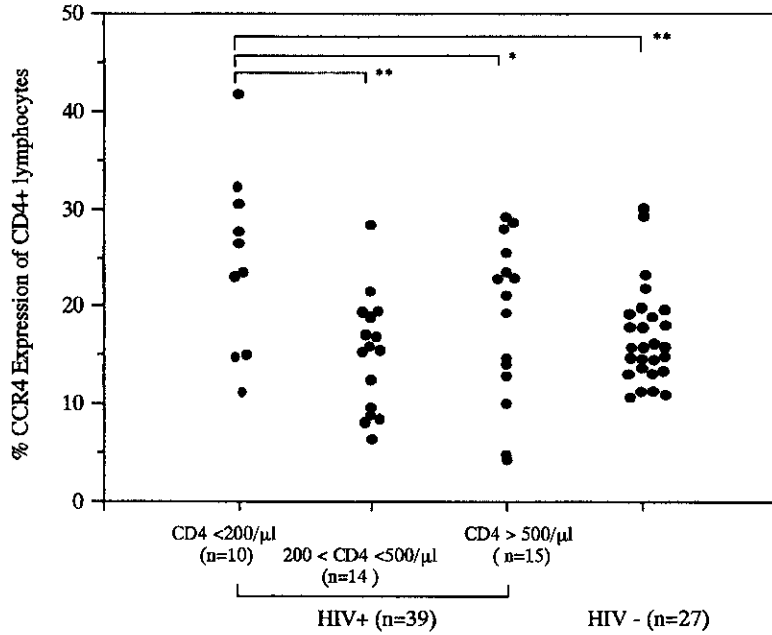


Fig.4 Comparison of %CCR4 Expression on CD4+ lymphocytes in HIV-infected and HIV-uninfected individuals

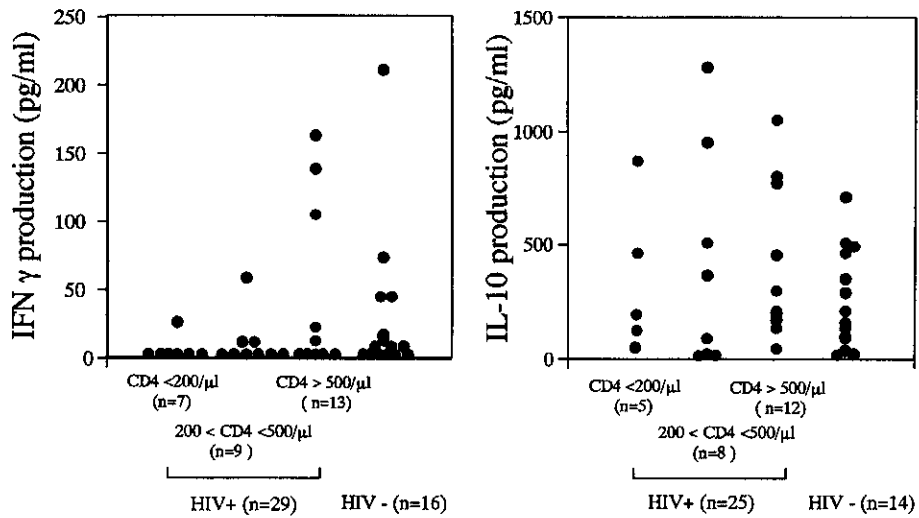


Fig.5 Comparison of IFN- γ and IL-10 production by PHA-stimulated PBMC from HIV-infected and HIV-uninfected individuals

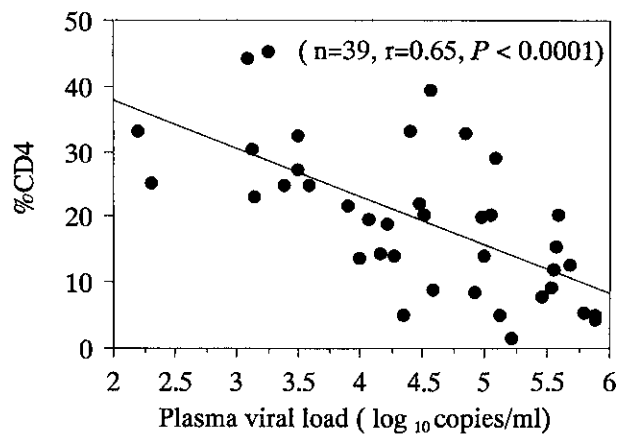


Fig.6 Correlation between %CD4 and plasma viral load in HIV-1 infected individuals