

考 察

東アフリカのウガンダでは人口の約10%にあたる200万人の人がHIV-1に感染しているとされている。これまで、我々はこの国におけるHIV/AIDS患者の日和見感染症の診断と治療に関する研究を実施してきた。また、アフリカのHIV感染者においてはPBMCのサイトカイン産生が、白人の感染者に比較して過剰に亢進しており、アフリカ人と白人のHIV感染に対する免疫応答の違いが示唆されている²⁾。

T細胞は活性化にともないCD45RO+ナイーブT細胞からCD45RO+メモリーT細胞へ分化する。さらに、このナイーブT細胞はサイトカイン環境によりIL-2, IFN- γ , TNF- α など細胞性免疫に重要なサイトカイン産生を促すTh1細胞と、IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13等のB細胞の免疫グロブリン産生を促すサイトカインを産生するTh2細胞へ分化する。一方、Th1とTh2サイトカインを産生するヘルパーT細胞のTh0も同定されている。これらの経緯から、ClericiらによりHIV感染症におけるTh1からTh2への極性化の仮説が提唱された³⁾。しかし、MaggiらはHIV感染症の進行期にTh0やTh2細胞が優位に分離され、HIVはこれらの細胞で増殖することを報告した⁴⁾。その後のHIV感染におけるサイトカイン産生の極性を検討した研究では、前述の仮説を支持する結果と⁵⁾、相反する結果が認められる⁶⁾。Bonecchiらは臍帯血から分離したリンパ球をTh1およびTh2環境で分化させるとTh1細胞はCXCR3を発現し、Th2細胞はCCR4を発現することを報告し⁷⁾、さらにImaiらはナイーブT細胞をTh2環境下で分化させるとその60%はCCR4を発現し、IL-4, IL-5産生が誘導できることを明らかにしている(未発表成績)。そこで、我々は抗CCR4抗体を用いたフローサイトメトリー法によりHIV感染病期におけるCCR4陽性Th2細胞の動態の解析を試みた。ここで、HIV感染症においては病期の進行に伴いCD4陽性リンパ球実数は減少するためTh1細胞やTh2細胞が増加することは期待できず、これらの比率によりTh1、Th2の優位性が評価可能と考えられる。

今回の検討から、HIV感染者において末梢血CD4陽性リンパ球比率とCD4陽性リンパ球上の

CCR4陽性比率が逆相関を示したことから、HIV病期の進行に伴いCD4陽性リンパ球上のCCR4陽性比率が増加することが明らかとなった。特に、CD4<200/mm³のHIV感染者においてはCD4陽性リンパ球上のCCR4陽性比率はHIV非感染者やCD4>200/mm³以上のHIV感染者のそれより有意に高値を示した。従って、CD4<200/mm³のHIV感染者におけるTh2細胞の相対的増加が示された。しかしながら、このTh2細胞の優位性を確実にするにはTh1細胞を特徴づけると考えられるCD4陽性リンパ球上のCXCR3の発現などの低下を示すことが必要と考えられる。一方、これまでTh1、Th2の極性は末梢血CD4T細胞あるいはPBMCによるTh1、Th2サイトカインの産生性により検討されてきた。今回、我々もPHA刺激後のPBMCによるサイトカイン産生性について検討した。この結果、HIV感染者ではTh1サイトカイン産生の減少傾向とTh2サイトカイン産生の増加傾向が示された。前述のCD4<200/mm³のHIV感染者におけるTh2細胞の相対的増加とこのサイトカイン産生パターンの変化はHIV感染症におけるTh1からTh2への極性化を示唆している。

一方、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が、これまでHIV感染者における動態については報告がなかった。しかしながら、極く最近になってOstrowskiらはCD4陽性T細胞上のCCR5発現はHIV感染病期の進行に伴い亢進し⁸⁾、逆にCD4陽性T細胞上のCXCR4発現は低下することを報告している。彼らは分離されたHIV-1の細胞指向性の検討も行っているが、ウイルスの細胞指向性とCCR5, CXCR4発現の関係については未だ解明できていない。我々のウガンダのHIV感染者における研究においても、その病期進行に伴うCD4陽性リンパ球上のCCR5の発現亢進は確認された。しかしながら、CXCR4においてはOstrowskiらの成績とは異なり、明らかな%CD4との正相関は認められなかった。

結 論

今回の研究から、HIV進行期(CD4 200/mm³以下)においてCCR4陽性Th2細胞の相対的増加が示さ

れ、Th2 優位となる可能性が示唆された。また、CCR4 同様に、HIV 病期の進行に伴う CD4 陽性リンパ球における CCR5 の発現亢進も確認された。

参考文献

- 1) Mayanja-Kizza, H., Oishi, K., Mitarai, S., et al. : Combination therapy with fluconazole and flucytosine for cryptococcal meningitis in patients with AIDS in Uganda. *Clin. Infect. Dis.* 26:1362-66, 1998
- 2) Rizzardini, G., Trabattoni, D., Saresella, M., et al. : Immune activation in HIV-infected African individuals. *AIDS*. 12: 2387-2396, 1998
- 3) Cleric, M., Shearer, GM.: A Th1 to Th2 switch is a critical step in the etiology of HIV-infection. *Immunol Today*. 14: 107-111, 1993.
- 4) Maggi, E., Mazzetti, M., Rivina, A., et al. Ability of HIV to promote a TH1 to TH0 shift and to replicate preferentially in TH2 and TH0 cells. *Science*. 265: 244-248, 1994.
- 5) Klein, SA., Dobmeyer, JM., Dobmeyer, TS., et al. : Demonstration of the Th1 to Th2 cytokine shift during the course of HIV-1 infection using cytoplasmic cytokine detection on single cell level by flow cytometry. *AIDS*. 11: 1111-1118, 1997
- 6) Fakoya, A., Matear, PM, Filley, E. , et al. : HIV infection alters the production of both type 1 and type 2 cytokines but does not induce a polarized type 1 or type 2 state. *AIDS*. 11: 1445-1452, 1997
- 7) Bonocchi, R., Bianchi, G., Bordignon, PP, et al. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med*. 187: 129-134, 1998
- 8) Ostrowski, MA., Justement, SJ, Catanzaro A. et al. : Expression of chemokine receptors CXCR4 and CCR5 in HIV-infected and uninfected individuals. *J. Immunol*. 161: 3195-3201, 1998



CCR5 結合ドメインのペプチドミミック とその機能

杉村 和久¹⁾、伊東 祐二¹⁾、中島 秀喜²⁾、西本憲弘³⁾、吉崎 和幸³⁾、

¹⁾鹿児島大学工学部 生体工学科

²⁾鹿児島大学歯学部 細菌学

¹⁾大阪大学健康体育部

研究要旨

リセプターとリガンドの結合は生体反応の要である。多くの場合、結合部位はペプチド鎖の折り畳まれた結果できる3次構造で規定され、結合に直接関与するアミノ酸は1次構造配列の各所に分散している。私どもはこの結合部分の3次構造を認識するモノクロナール抗体を用いてファージライブラリーを探索し、この抗体に結合するファージクローンを単離すれば、抗体が鋳型として働き、リセプターとリガンドの結合部位の3次構造を直接コピーする可能性を検討してきた。

本研究では、M-tropic HIV-1 の感染で coreceptor として機能する CCR5 の mimetics を試みた。用いた抗体は2D7で、CCR5の細胞外第2ループ領域を認識し、CCR5のリガンドである MIP-1 α 、MIP-1 β 、RANTES の結合、また M-tropic HIV-1 の感染も阻害する。この抗体を鋳型とし Biopanning を行い、2D7が特異的に認識する3つのモチーフを同定した。さらに、そのうちの M23はM-tropic HIV-1 感染を特異的に阻害し、T-tropic HIV-1 感染には影響しないことを明らかにした。また、ELISAにより、M23はMIP-1 α 、MIP-1 β およびRANTESと結合すること、しかしCCR2のリガンドである MCP1 には結合しないことを明らかにした。このことより、私どもの手法により CCR5-binding domain mimic のデザインが可能であることが明らかとなった。

分担研究者：吉崎和幸

研究協力者：杉村和久、伊東祐二、中島秀喜、西本憲弘

Peptide mimic of CCR5-binding domain and its function

Kazuhisa Sugimura¹⁾, Yuji Ito¹⁾, Hideki Nakashima²⁾, Norihiro Nishimoto³⁾, Kazuyuki Yoshizaki³⁾

¹⁾Department of Bioengineering, Faculty of Engineering, Kagoshima University, ²⁾Department of Microbiology and Immunology, Kagoshima University Dental School and ³⁾Department of Medical Science I, School of Health and Sports Science, Osaka University,

目 的

HIV-1の感染はgp120がTリンパ球のCD4分子に結合し、これによるgp120の3次構造の変化が誘導され、Tリンパ球に発現しているCCR5と結合し、感染が成立すると報告されている^{1,2)}。CCR5は7回膜貫通型のケモカインレセプターであり、macrophage (M)-tropic HIV-1株の感染にcoreceptorとして働く。一方、CXCR4はT-tropic HIV-1株の感染に関与する³⁾。macrophage (M)-tropic HIV-1はT-tropic HIV-1株より、初期感染において重要な役割を果たしていることが明らかになっている⁴⁾。

レセプターとリガンドの結合は生体反応の要である。この結合を制御するアンタゴニストやアゴニストの発見は医薬品開発にとって重要である。しかし、この結合部位は多くの場合、ペプチド鎖の折り畳まれた3次構造で規定されている。膨大な数の天然物や既存の合成化合物をHigh-throughput法により、活性のある分子を偶然に当てるとというのがドラッグデザインの現況である。しかし分子生物学は多くの疾病の病因を分子のレベルで解読するため、医薬品開発のための標的分子の決定は、急速に容易となってきた。この成果を受けた現況の戦略的アプローチは、アミノ酸配列の点突然変異法とX線結晶解析の結果を必要とする。

本研究はこの発想とは異なり、戦略的にかつ非常に容易に医薬品開発が展開できる新しい手法の基礎研究である。この方法では、結合ドメインの立体構造を認識する単クローン抗体を鋳型にして、それに結合するモチーフをファージライブラリーからファージクローンとして単離し活性ペプチド化を目指す。即ち、標的の結合ドメインを直接コピーし、ドラッグデザインを達成するというものである。このため、レセプター分子の結合ドメインがイムノグロブリンのV領域や7回膜貫通型分子であっても、結合阻止活性のある抗体が存在すれば、その結合ドメインミミックが可能となる^{5,6)}。この3D分子デザイン法によれば、レセプターが7回膜貫通型の分子であろうとも、レセプターとリガンドの結合を阻害する抗体が作成されれば、そのアンタゴニストの設計は達成可能と考えられた。この観点から、M-tropic HIV-1の感染でcoreceptorと

して機能するCCR5のmimeticsを試みた。

方 法

1. 抗体およびケモカイン

マウス抗ヒトCCR5モノクローナル抗体(2D7)はNIH AIDS Research and Reference Reagent Program (Maryland, Rockville)より恵与された。マウス抗ヒトCD4モノクローナル抗体(Leu-3a; Becton Dickinson, San Jose, CA)、マウスIgG1モノクローナル抗体(MOPC-21; Pharmingen, San Diego, CA)、アルカリフォスファターゼ(AP)標識ウサギ抗マウスIgG抗体(Zymed Lab., San Francisco, CA)、AP標識ストレプトアビジン(Vector Lab., Burlingame, CA)はそれぞれ購入した。

リコンビナントヒトMIP-1 α は化血研(熊本)、リコンビナントヒトMIP-1 β とリコンビナントヒトRANTESは本田(国立感染症研究所)、リコンビナントヒトMCP-1は倉津(鹿大・医・脳神経外科)より恵与された。

2. ファージライブラリー

西(熊大・脳神経外科)らにより構築されたファージディスプレイライブラリーを用いた⁷⁾。このライブラリーを作製したfUSE5ベクターのgene 3 (g3)には、そのアミノ酸配列のN末端から5番目の位置に15残基のランダムなアミノ酸シーケンスが挿入されている。

3. バイオパンニング

Fukumoto, T., et alの方法にしたがって行った^{5,6)}。即ち、抗CCR5抗体(2D7; 10 μ g)をコートした35 mmプラスチックプレート(岩城ガラス、東京)上でファージディスプレイライブラリー(1.2×10^{12} Transforming Unit [TU])を氷上で4時間反応させた。0.5% Tween 20/Tris-buffered saline (TBS/Tween; pH 7.5)でプレートを洗浄した後、2D7に結合したファージは0.1N HCl-glycine (pH 2.2)で溶出した。溶出液は1.0 M Tris-HCl (pH 9.1)で中和し、そのファージは大腸菌K91kanに感染させて増幅した。このサイクルを合計3回行い、2回目は2D7 (5 μ g)と増幅したファージ、3回目は2D7 (1 μ g)と増幅したファージを混合したものを、それぞれ5 μ gの抗

マウス IgG 抗体をコートしたプレート上で1時間反応させた。

4. DNA シークエンス

ファージの gene 3 protein (g3p) に組み込まれた15残基のアミノ酸シークエンスは、プリズム仕様書 (Applied Biosystem) にしたがって行った。即ち、ファージの single-strand DNA に相補的なプライマー(5'-TGAATTTTCTGTATGAGG-3')を用い、ABI DNA Sequencer 373A-36S(アプライドバイオシステムズ)によって塩基配列を決定した⁵⁾。

5. SDS-PAGE

Laemmliの方法にしたがって行った^{5,6)}。詳細には、ファージ(2.5 μ g)、分画により精製したg3p(25 ng)と g8p(1 μ g)をそれぞれ、1.0% ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)の存在下で2-メルカプトエタノールと熱処理を3分間行い、氷上で15分間保温した後、15% ポリアクリルアミドゲルでの電気泳動を行った。電気泳動後のタンパク質の染色は銀染色 II キットワコー(和光、大阪)を用いて行った。なお、分子量マーカーには第一化学薬品(東京)の Prestained Protein Marker Broad Range を用いた。

6. ファージタンパク質の精製

一本鎖DNAのfd ファージは2~5コピーのg3pと約2700コピーのg8p分子を発現している^{8,9)}。これらのファージコートタンパク質(g3pとg8p)の精製は Fukumoto, T., et al の方法にしたがって行った^{5,6)}。即ち、HiLoad superdex 200(26/60 : Pharmacia biotech, Uppsala, Sweden)カラムによるHPLC(High performance liquid chromatography)ゲルろ過法によって精製した。溶出は50 mM Na_2SO_4 /5 mM citric acid/0.1% SDS(pH 3.0)を用い、流速は0.8 ml/minで行った。分取したフラクションはUltrafree-MC 10000(ミリポア)を用い、バッファーをPBSに置き換えながら濃縮した。そのタンパク質はDC Protein Assay(Bio-Rad, Hercules, CA)を用いて定量した。その分子量はSDS-PAGEで確認した。その結果、g3pは44 kDaのシングルバンドであることを確認した(Figure 1)。

7. ELISA^{5,6)}

96穴イムノプレート(Nunc, Roskilde, Denmark)にファージクローン(4×10^9 TU/40 μ l/well)、g3p(100 ng/40 μ l/well)、ケモカイン(200 ng/40 μ l/well)をそれぞれ4°Cで一晩コートし、1.0% BSA/TBSでブロックし

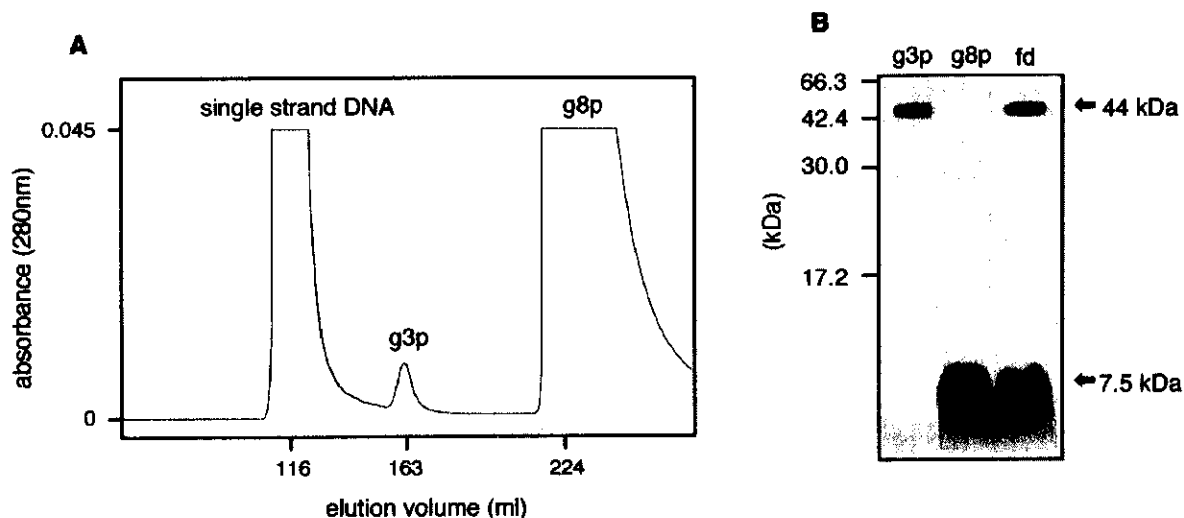


Figure 1. Purification of g3p.

(A) HiLoad Superdex 200 (26/60) chromatography profile. (B) SDS-PAGE analysis. An aliquot of g3p (25 ng), g8p (1 μ g) or fd-phage (2.5 μ g) was applied to lanes.

た。TBS/Tweenで洗浄した後、抗CCR5抗体 (2D7; 100 ng/40 μ l/well)、抗CD4抗体 (Leu-3a; 100 ng/40 μ l/well)、マウスIgG1(MOPC-21; 100 ng/40 μ l/well)、ビオチン標識 g3p をそれぞれ加え、室温で1時間反応させた。これらの結合はAP標識抗マウスIgG抗体 (1:1000) またはAP標識ストレプトアビジン (1:1000) を反応させ、p-ニトロフェニルリン酸を含む基質溶液を加えることで検出した。測定にはマイクロプレートリーダー(日本インターメッド、東京)を用い、405nmでの吸光度を測定した。

8. HIV-1感染実験 (MAGI assay)¹⁰⁾

HIV-1感染の際の標的細胞として、MAGI-CCR5細胞を用いた。この細胞株はヒトCD4、ヒトCCR5、ヒトCXCR4、HIV-LTR- β -galactosidaseを発現しており、HIV-1の感染が起こるとウイルス由来のTatタンパク質により β -galactosidaseが転写される。最後にX-galを加えることで、感染した細胞は青く染まる。実験はまず、このMAGI-CCR5細胞を48穴プレートにまき (2x10⁴/well)、37°Cで一晩培養した。翌日、ファージ(40 μ g/ml)、g3p、2D7(4 μ g/ml)、MIP-1 α (4 μ g/ml) と、M-tropic HIV-1 (SF162株, JR-FL株; 0.2 MOI) または T-tropic HIV-1 (IIIB株; 0.2 MOI) の混合物を4°Cで30分間保温したものをそれぞれ加え、37°Cで培養した。2日後、細胞上清

を取り除き細胞を洗浄した後、Fix液で細胞を固定し、細胞の染色にはX-galを含む基質溶液を用いた。阻害パーセント:[1-(阻害物を含む時の感染細胞数)/(阻害物を含まない時の感染細胞数)]x100

結果

1. バイオパニング

2D7抗体はCCR5の細胞外第2ループ領域を認識しCCR5のリガンドであるMIP-1 α , MIP-1 β 及びRANTESの結合を阻害し、M-tropic HIV-1の感染を阻害する¹¹⁾。この抗体を用いたバイオパニングにより、80クローンのファージを単離した。これらのファージクローンが実際、2D7への結合活性を持っているかどうかを確かめるために、ELISAによるスクリーニングを行った。Figure 2に示すように、80クローン中、9クローンのファージが抗CCR5抗体(2D7)との結合活性を示した。横軸には各ファージクローンを、縦軸には405 nmでの吸光度を示した。

2. 2D7抗体が認識するモチーフ

一次スクリーニングで、抗CCR5抗体(2D7)との結合活性が見られた9クローンについて、g3p分子に含まれる15残基のアミノ酸配列をDNAシーク

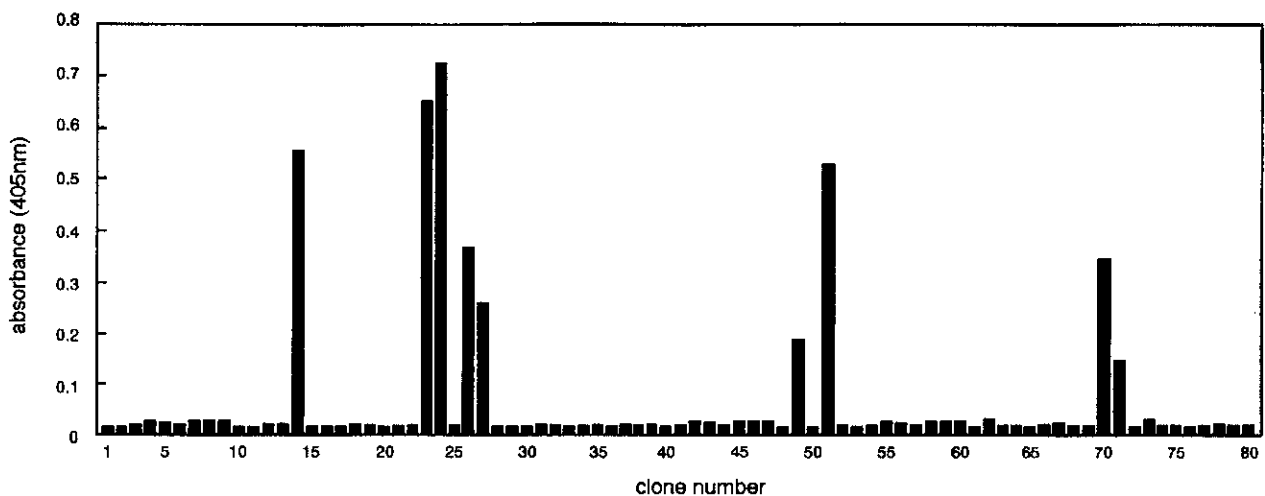


Figure 2. Primary screening of anti-CCR5 mAb (2D7)-binding phage clones.

ELISA was performed as described. Immuno plates were coated with phage clones (4 x 10⁹ TU/40 μ l/well) at 4°C overnight. After blocking with 1.0% BSA/TBS, anti-CCR5 mAb (2D7; 100 ng/40 μ l/well) was added, followed by the detection with AP-conjugated anti-mouse IgG at a dilution of 1:1000.

エンサーにより解析した結果、下のように3種類のモチーフに分類することができた(Figure 3)。それぞれM14、M23、M71と命名し、M23の配列をもったファージは9クローン中7クローンと最も多かった。

得られたモチーフは抗CCR5抗体(2D7)に結合することから、この抗体が認識するCCR5の部位と同じまたは似通った配列を有していることが考えられる。そこで、これらのモチーフとCCR5の一次配列とのホモロジー解析をGene Works (帝人、東京)またはインターネット上の解析ソフトPIMAを用いて行った。しかし、CCR5との有意な相同性は見られず、これらのモチーフ間での相同性も認められなかった。

3. 2D7 特異的結合活性

一次スクリーニングでは、抗CCR5抗体(2D7)だけとの結合活性をみたが、得られた3種類のファージクローンが実際2D7に特異的結合しているかどうかを確認するために、2D7と同じマウスIgG1抗体である抗CD4抗体(Leu-3a)とノーマルマウスIgG抗体(MOPC-21)をコントロールとしたELISAを行った。その結果、M14、M23、M71ファージはLeu-3aとMOPC-21とは結合せず、2D7特異的な結合活性を示した(Figure 4)。この結果より、M14、M23、M71モチーフはCCR5様モチーフとして機能することが示唆された。

clone	motif
M14	RSNSPLXRIGFFGLH
M23	FCALDGDGFWLAPAC
M71	YFTTPATLLPFGV

Figure 3. Amino acid sequence motifs of 2D7-binding phage clones

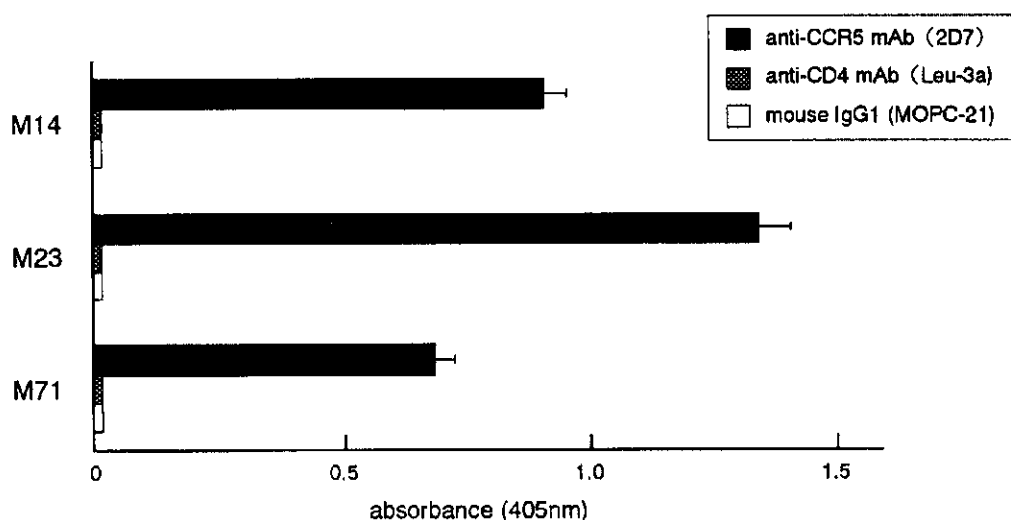


Figure 4. Specific binding of M14-phage, M23-phage or M71-phage to 2D7.

ELISA was performed as described in materials and methods. Immuno plates were coated with phage clones (4×10^9 TU/40 μ l/well) at 4°C overnight. After blocking with 1.0% BSA/TBS, anti-CCR5 mAb (2D7; 100 ng/40 μ l/well), anti-CD4 mAb (Leu-3a; 100 ng/40 μ l/well) or mouse IgG₁ (MOPC-21; 100 ng/40 μ l/well) was added, followed by the detection with AP-conjugated anti-mouse IgG at a dilution of 1:1000.

4. g3pの抗CCR5抗体特異的な結合活性

M14・M23・M71-ファージの提示するモチーフの抗体結合特異性をさらに検討するため、これらのファージからg3pを精製し、抗CCR5抗体(2D7)との結合活性をELISAで調べた(Figure 5)。先ほどのファージの場合と同様に、M14, M23, M71-g3pは抗CCR5抗体(2D7)との特異的結合活性を示した。

5. M23ファージクローンの抗HIV-1活性

M-tropic HIV-1のエンベロープ糖タンパク質gp120はCD4分子に結合することで、CCR5と特異的に相互作用する。2D7がM-tropic HIV-1と

Dual-tropic HIV-1の感染を阻害するのならば、パンニングによって得られた3種類のファージクローンはHIV-1感染におけるCCR5様結合モチーフとして機能し、HIV-1の感染を阻害することが示唆された。そこで、これらのファージの抗HIV-1活性を調べるために、*in vitro*でファージクローンの存在または非存在下で、M-tropic HIV-1(SF162株)の感染阻害実験を行った。Figure 6に示すように、M23は40 μ g/mlで約60%の強い感染阻害活性を示した。一方、M14とM71は約15%と弱い活性を示した。L4はコントロールファージクローンであり、感染を阻害しなかった。

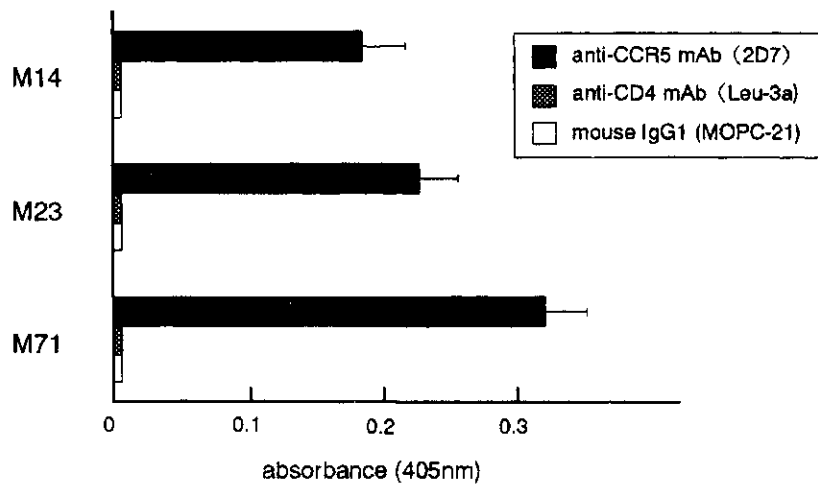


Figure 5. Specific binding of M14-g3p, M23-g3p or M71-g3p to 2D7.

ELISA was performed as described. Immuno plates were coated with M14-g3p, M23-g3p or M71-g3p (100 ng/40 μ l/well) at 4 $^{\circ}$ C overnight. After blocking with 1.0% BSA/TBS, anti-CCR5 mAb (2D7;100 ng/40 μ l/well) was added, followed by the detection with AP-conjugated anti-mouse IgG at a dilution of 1:1000.

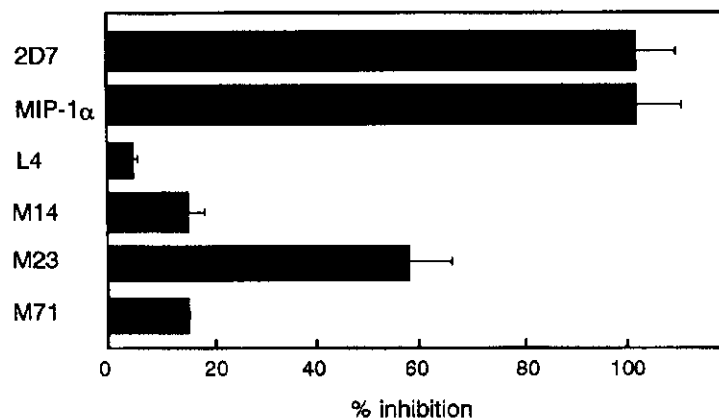


Figure 6. Inhibitory activity of 2D7-binding phage clones on HIV-1 infection.

MAGI-CCR5 cells were infected with M-tropic HIV-1 strain (SF162) in the absence or presence of 2D7 (4 μ g/ml), MIP-1 α (4 μ g/ml) or phage clone (40 μ g/ml). L4 was used as a control phage clone.

6. 精製したM23-g3p分子のM-tropic HIV-1特異的感染阻害活性

M23モチーフの抗HIV-1活性をさらに調べるために、先のファージの時とは別の M-tropic HIV-1 (JR-FL 株)及び T-tropic HIV-1(IIIB 株)を用いて、M23-g3pの抗HIV-1活性を調べた。Figure 7に示すように、M23-g3pの M-tropic HIV-1(JR-FL 株)感染阻害活性は15 μ g/mlで50%の阻害活性を示した。対

称的に、M23-g3pはT-tropic HIV-1(IIIB 株)での阻害活性を示さなかった。L4-g3pはコントロールファージクローンである。

7. M23-g3pのリガンド(ケモカイン)結合活性

M23モチーフはM-tropic HIV-1感染を特異的に阻害することから、M23モチーフはCCR5の結合ドメインを模倣していることが示唆された。その

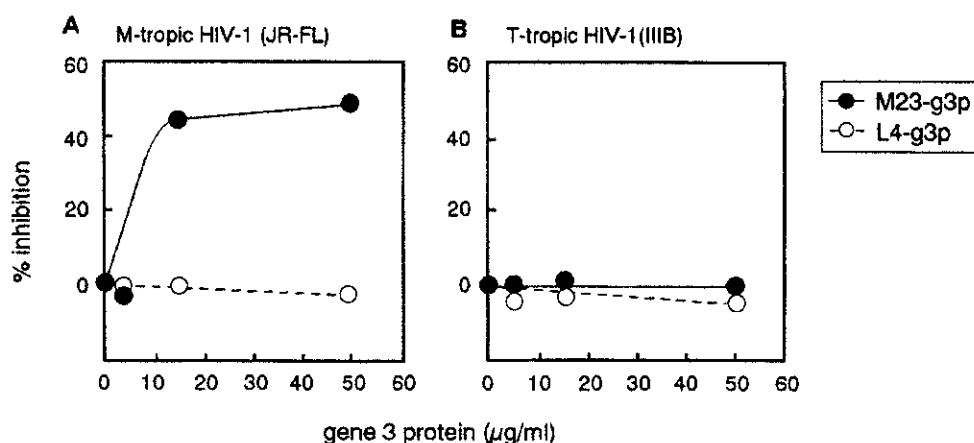


Figure 7. M-tropic HIV-1 specific inhibitory activity of M23-g3p.

MAGI-CCR5 cells were infected with (A) M-tropic HIV-1 strain (JR-FL) or (B) T-tropic HIV-1 strains (IIIB) in the presence of various concentrations of M23-g3p (closed circle) or L4-g3p (open circle). L4-g3p was used as a control.

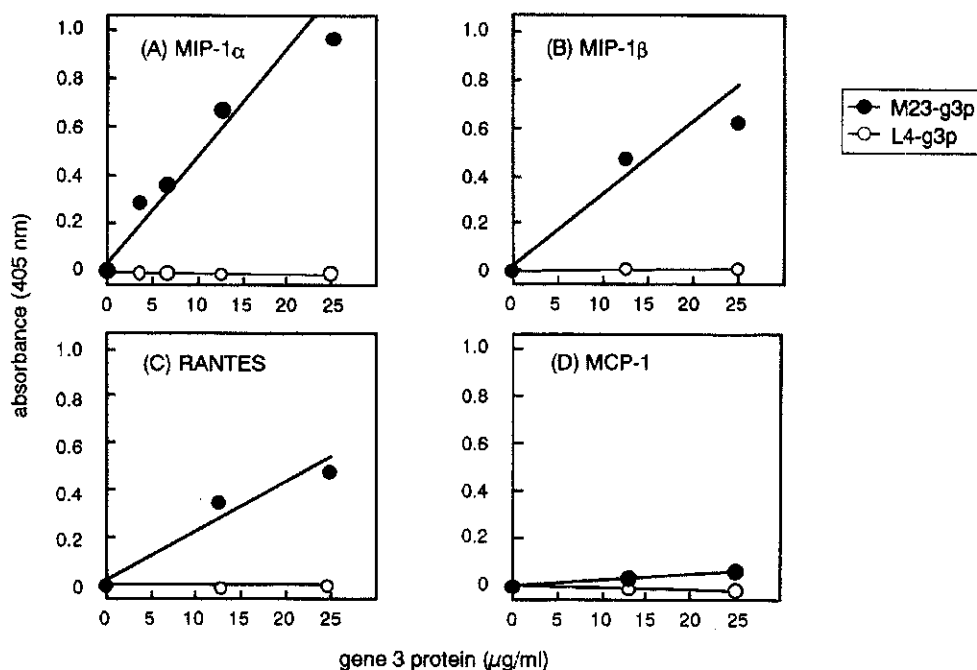


Figure 8. Binding activity of M23-g3p to chemokines.

Immuno plates were coated with 200 ng/40 μ l/well of MIP-1 α (A), MIP-1 β (B), RANTES(C), MCP-1 (D). Forty μ l of biotinylated M23 (closed circle) or L4-g3p (open circle) was added to each well at varying concentrations, followed by the detection with AP-conjugated streptavidin at a dilution of 1:1000.

ことから、M23-g3pはCCR5のリガンドであるβ-ケモカイン(MIP-1α, MIP-1β, RANTES)に結合する可能性がある。そこで、M23-g3pのβ-ケモカイン(MIP-1α, MIP-1β, RANTES)への結合活性をELISAで調べた。実験は、ビオチン標識した様々な濃度のM23-g3pをケモカインコートしたイムノプレートにコートし、その後、AP標識ストレプトアビジンを反応させることを行った。Figure 8に示すように、M23-g3pはCCR5の全てのケモカインリガンド(MIP-1α, MIP-1β, RANTES)に、濃度依存的に結合し、CCR2のケモカインリガンドであるMCP-1には結合しなかった。L4-g3pはコントロールであり、ここで示したケモカイン全てに対して結合活性を示さなかった。

考 察

以前の研究で、私どもはCTLA4の結合ドメインを認識する抗CTLA4抗体を用いたバイオパンニングにより、CTLA4結合ドメインミミックを同定した^{5,6)}。本研究では同様のアプローチで、抗CCR5抗体、2D7を用いてファージディスプレイライブラリーを探索した結果、3つのCCR5様モチーフ(M14, M23, M71)を明らかにした。特にM23モチーフについては、M23-g3pを用いた実験においても著しいHIV-1感染阻害活性を示し、その活性はM-tropic strainに特異的であることが明らかとなった¹²⁾。また、M23-g3pはCCR5のケモカインリガンドであるMIP-1α, MIP-1β及びRANTESと特異的に結合することが明らかとなった。M23モチーフは2つのCys残基を有しており、ジスルフィド結合によるループ形成が活性の発現に重要である可能性が示唆された。

以上の結果はM23はCCR5結合ドメインミミックであることを示唆した。MIP-1α, MIP-1β及びRANTESのいずれもが、M-tropic HIV-1感染を阻害するという結果⁴⁾はこれらのケモカインがCCR5に結合する際に共通して利用するドメイン構造が、M-tropic HIV-1感染に関与していることを示唆している。この事実は、本研究で明らかにした、M-tropic HIV-1感染を阻害する活性を有するM23-g3pが、MIP-1α, MIP-1β及びRANTESのいずれとも結合するという結果とよく一致する。

CTLA4結合ドメインミミックおよび本研究で示したCCR5結合ドメインミミックの成果は、単クローン抗体とファージディスプレイライブラリーを用いた結合ドメインの分子設計の妥当性を明らかにし、レセプターとリガンドの相互作用における阻害モチーフのデザインに有用であることを示している。

CCR5のような複雑な膜受容体は、立体構造を保持したままのリコンビナント分子の作製が不可能であり、そのような場合でも、2D7のような抗体があれば、それを鋳型として結合ドメインをコピーすることができる。このことは分子設計にとってきわめて重要な意味をもっている。モチーフがg3pに組み込まれた状態で結合ドメインミミックとしての活性を見いだすことができれば、このリコンビナント分子の結晶解析は可能であり、従来の分子デザインの手法を利用することができる。単純にモチーフのみの合成ペプチドで、その生理活性を再現できれば最も理想的であるが、そうでない場合でも、このモチーフを基本形としたMutagenesis libraryを新たに作製し、標的分子により強く結合する分子を選別するアフィニティー・マチュレーション法を利用することができる。この成果に基づいてモチーフの小分子化を目指すことができる。このように本研究は経口投与可能な小分子医薬品開発にとって、非常に戦略的かつ新しい分子デザインの道筋となることが期待される。

参考文献

- 1) Kwong, PD., Wyatt, R., Robinson, J., et. al., Structure of an HIVgp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* 393:648-659, 1998.
- 2) Wyatt, R., Kwong, PD., Desjardins, E., et. al., The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature* 393: 705-711, 1998.
- 3) Horuk, R., Chemokine receptors and HIV-1: the fusion of two major research fields. *Immunol. today*, 20: 89-94, 1999
- 4) Fauci, AS., Host factors and pathogenesis of HIV-induced disease. *Nature* 384: 529-534, 1996.
- 5) Fukumoto, T., Torigoe, N., Kawabata, S., et al., Peptide mimics of the CTLA4-binding domain stimu-

- late T-cell proliferation, *Nature biotechnology*, 16: 267-270, 1998.
- 6) Fukumoto, T., Torigoe, N., Ito, Y., T cell proliferation-augmenting activities of the gene 3 protein derived from a phage library clone with CD80-binding activity. *J. Immunol.* 161: 6622-6628, 1998.
 - 7) Nishi, T., Buddle, R.J., McMurray, J.S., et al., Tight-binding inhibitory sequences against pp60c-src identified using a random 15-amino-acid peptide library. *FEBS Lett.* 399: 237-240, 1996.
 - 8) Wuttke, G.G., Keppner, J., and Rasched, I., Pore-forming properties of the adsorption protein of filamentous phage fd. *Biochim. Biophys. Acta* 985: 239-247, 1989.
 - 9) Smith, G.P., Surface presentation of protein epitopes using bacteriophage expression system, *Curr. Opin. Biotech.* 2: 668-673, 1991.
 - 10) Kimpton, J., and Emerman, M., Detection of replication-competent and pseudotyped human immunodeficiency virus with a sensitive cell line on the basis of activation of an integrated β -galactosidase gene. *J. Virol.*, 66: 2232-2239, 1992.
 - 11) Wu, L., LaRosa, G., Kassam, N., et. al., Interaction of chemokine receptor CCR5 with its ligands: Multiple domains for HIV-1 gp120 binding and a single domain for chemokine binding., *J. Exp. Med.* 186: 1373-1381, 1997.
 - 12) Meta, A., Torigoe, N., Ito, Y., et al., Peptide-motif analysis of phage clones recognized by anti-CCR5 monoclonal antibody (2D7), 10th International Congress of Immunology [Eds. by G.P. Tarrar, I. Nath, N.K. Ganguly & K.V.S. Rao) Monduzzi Editor Press, 1475-1479, 1998.



潜伏HIV再活性化におけるCD30/MAPキナーゼ経路の役割

堀江 良一¹⁾、米山 彰子²⁾、木村 哲³⁾、渡邊 俊樹⁴⁾

¹⁾東京大学医学部附属病院 第1内科

²⁾東京大学医学部附属病院 臨床検査医学

³⁾東京大学大学院医学系研究科 感染制御学、感染症内科

⁴⁾東京大学医科学研究所 病理学研究部

研究要旨

HIV感染症はプロテアーゼ阻害剤を含む多剤療法によって、末梢血中のウイルスロードの著明な減少が得られることが明らかになったが、潜伏感染細胞中のウイルスは排除できない事が報告されている。従って根治を目指す治療法を確立するには、潜伏感染ウイルスの再活性化の鍵となる分子群の同定を行ない、この潜伏感染ウイルスを標的とする有効な手段を開発し、ウイルスの再活性化をいかにコントロールするかが重要である。しかし、現時点では、HIVの潜伏感染と再活性化の分子機構に関する知見は非常に限られている。

我々は、NF- κ Bの活性化を介して潜伏HIVを再活性化出来ることで知られるCD30のシグナル伝達経路の役割を、1)再活性化の初期過程=HIVの遺伝子発現抑制機構の解除、2)後期過程:ウイルスの転写制御因子Tatとの協調作用による活性化、の二つの観点から検討している。これまで我々は後期過程: Tatが存在する場合において、CD30/TRAFシグナルはTatの作用をNF- κ B依存性に相乗的に増強することを明らかにしている。本研究において我々は、HIV Tat非存在下、すなわちHIVLTRの転写が抑制されているマクロファージ系細胞の潜伏感染モデルにおいて、CD30からのシグナルが染色体に組み込まれたプロウイルスの再活性化に関与し、C/EBP β (NF-IL6)によるHIVLTRの活性化を増強すること、更にCD30によるC/EBP β (NF-IL6)の活性化にはp38MAPKが関与していることを明らかにした。これらの結果は、潜伏感染HIVの再活性化において、NF- κ Bのみならずp38MAPKを活性化し得るCD30のシグナル伝達系の重要な役割を示唆するものである。

分担研究者：米山彰子、木村 哲

研究協力者：堀江良一、渡邊俊樹

Role of CD30/MAPK pathway in reactivation of latent HIV

Ryouichi Horie¹⁾, Akiko Yoneyama²⁾, Satoshi Kimura³⁾ and Toshiki Watanabe⁴⁾

¹⁾Department of Laboratory Medicine, University of Tokyo, ²⁾Laboratory center, Tokyo University Hospital, ³⁾Department of Infection Control and Prevention, Department of Infectious Diseases, Graduate School of Medicine, University of Tokyo and ⁴⁾Department of Pathology, Institute of Medical Science, University of Tokyo

背景および目的

HIV感染症はプロテアーゼ阻害剤を含む多剤療法によつて末梢血中のウイルスロードの著明な減少が得られ、免疫機能を回復させることが明らかになった。しかし、この療法は末梢血などで増殖するウイルスには有効であるが、潜伏感染細胞中のウイルスに対しては無効である事が報告されている¹⁻³⁾。従って、根治を目指す治療法を確立するには、潜伏感染ウイルスの再活性化の鍵となる分子群の同定を行ない、この潜伏感染ウイルスを標的とする有効な手段を開発し、ウイルスの再活性化をいかにコントロールするかが今後 AIDS の発症予防と治療において重要になると予想される。しかし、現時点では、HIVの潜伏感染と再活性化の分子機構に関する知見は非常に限られている。

TNFR ファミリーのシグナル伝達機構の研究は近年急速に展開し、種々のシグナル伝達分子が同定されると共にそれらの間および既知のシグナル伝達経路との多様なクロストークの存在が明らかになり、その分子機構の解析が進んでいる^{4,6)}。実際、TNFR ファミリーの細胞質内領域に結合するシグナル伝達分子TRAFファミリー蛋白質は、NF- κ B活性化に加えてMAPキナーゼ(JNK)の活性化にも関与する事が報告された⁷⁾。一方、CD30はHIV潜伏感染の活性化に関してTNFと異なり、単独でウイルス発現を誘導できる事が明らかになっている^{8,9)}。

転写抑制の分子機構は、個々の転写因子解析から ternary complex を介したヒストンのアセチル化の制御を基本とする枠組みで捉えられるようになってきた¹⁰⁻¹²⁾。従って、潜伏感染の機構も HIVLTR の転写抑制と言う視点での見直しが求められている。つまり、HIVの潜伏感染と再活性化の機構を理解するには、転写抑制とその解除の分子機構を明かにすると共に、転写開始後における Tat と膜レセプターからのシグナル伝達経路の相互作用の機構を含めて、潜伏感染と再活性化の分子機構の新たな理解が必要であると考えられる。

一方、マクロファージはHIV感染の標的細胞であり、HIVの潜伏感染細胞と考えられている。これらの細胞においてはHIVの遺伝子発現制御にC/EBP β (NF-IL6)が重要な役割を果たしている¹²⁾。

以上のような背景に基づいて我々は、潜伏HIVの再活性化における CD30/TRAF のシグナル伝達経路の役割を、前期課程: HIVLTRの転写抑制機構の解除と後期過程: Tat との相互作用による HIVLTRの活性化という観点から、TRAF蛋白質-NF- κ B 活性化経路と MAP キナーゼ活性化経路に焦点を当てて検討している。これまで我々は後期過程において、CD30/ TRAFシグナルはTatの作用を N- κ B 依存性に相乗的に増強することを明らかにしている。本研究において我々は前期課程、すなわち HIVLTR の転写が抑制されている潜伏感染のモデルにおいて、マクロファージにおける潜伏感染と再活性化のメカニズムを検討した。具体的には、マクロファージ系細胞 U937 を主に用いて CD30/ TRAF による p38 MAPK の活性化とその標的分子としての C/EBP β (NF-IL6) の活性制御と HIV 遺伝子発現誘導を検討した。

材料および方法

培養細胞としてはT細胞株Jurkat, およびマクロファージ系細胞株U937、HIV潜伏感染のモデルであるU1細胞株を用いた。CD30のクロスリンクには抗CD30モノクローナル抗体BerH2と抗マウスIgG抗体を用いた。プロモーターの活性化を検討する reporter gene assay では、HIV LTR-Luc および NF- κ B site に変異を導入した HIVmkBLTR-Luc を reporter とし、CD30, TRAF2, TRAF5, C/EBP β (NF-IL6) の発現ベクターを co-transfect する transient transfection assay を行った。p38MAPK の活性化は p38MAPK Assay kit (NEB) を用いて解析した。In vitro kinase assay には GST-NFIL6 を作製しこれを基質として用いた。HIVの活性化におけるp38MAPK の関与は、HIVp24のELISAおよび特異的 inhibitor である SB-203580 を用いて解析した。

結果

1. CD30による染色体に組み込まれたHIVの再活性化

CD30からのシグナルが染色体に組み込まれたプロウイルスの再活性化に関与しているかを HIV vector (日本医大の島田先生より供与) を用いて

HIVLTRが染色体に組み込まれているU937、U937/HXNLucを作成し検討した。図1に示すようにCD30をトランスフェクションにより過剰発現させてシグナルを入れるとHIVLTRの誘導がかかる。

2. CD30によるHIVLTR活性化へのNF- κ B以外のsignal pathwayの関与

これまでの報告ではCD30からのHIVLTRの活性化にはNF- κ Bが重要であるとの報告がある。そこでCD30からのHIVLTR活性化をJurkatを用いたtransientなreporter gene assayで検討した結果を図2に示す。確かにCD30あるいは直下のシグナル伝達分子であるTRAF2, 5により、HIVLTRが活性化されるが、この活性化はNF- κ B siteにmutationを導入しても認められる。したがってこの結果は、CD30/TRAFによるHIVLTR活性化にはNF- κ B以外のsignal pathwayが関与していることを示唆している。

3. CD30によるC/EBP β (NF-IL6)の活性化

生体内での潜伏感染にはTリンパ球とマクロファージが重要である。これまでの報告ではマク

ロファージにおけるHIVLTRのdriveにNF-IL6が重要との報告が複数ある。そこでCD30/TRAF-HIVLTR pathwayへのC/EBP β (NF-IL6)の関与を見た。U937細胞において、C/EBP β (NF-IL6)はHIVLTRの活性を約2倍活性化したが、これにTRAF2あるいはTRAF5を共導入すると、その活性化のレベルがそれぞれsynergisticに増強される事が明らかになった(図3A)。更に、LTRを5'側から欠失し1コのNF-IL6 siteと2コのNF κ B siteの領域のみを残すHIVLTR-Luc reporterのを用い、NF- κ B siteにmutationを導入しても、CD30, TRAF2, TRAF5はC/EBP β (NF-IL6)を著明に活性化することが示された。(図3B)従って、CD30/TRAF2, 5からのHIVLTRを活性化にはC/EBP β (NF-IL6)の活性化を介したsignal pathwayが存在していることが示された。

4. p38 MAPK活性化刺激によるC/EBP β (NF-IL6)の活性化

これまでC/EBP β (NF-IL6)の活性化がRas-MAPKにより制御されること、また、p38MAPKがC/EBPファミリーの分子であるCHOPをリン酸化し転写活性を制御する事が知られている。我々は、CD30

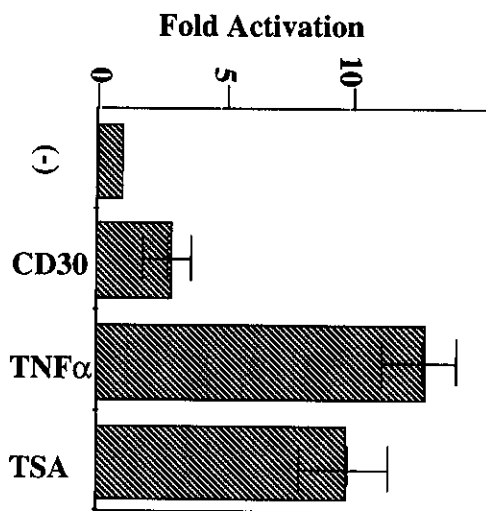


図1 CD30による染色体に組み込まれたHIVの再活性化
CD30からのシグナルが染色体に組み込まれたプロウイルスの再活性化に関与しているかを検討した。HIV vector(日本医大の島田先生より供与)を用いてHIVLTRが染色体に組み込まれているU937、U937/HXNLucを作成した。CD30をトランスフェクションにより過剰発現させてシグナルを入れるとHIVLTRの誘導がかかる。

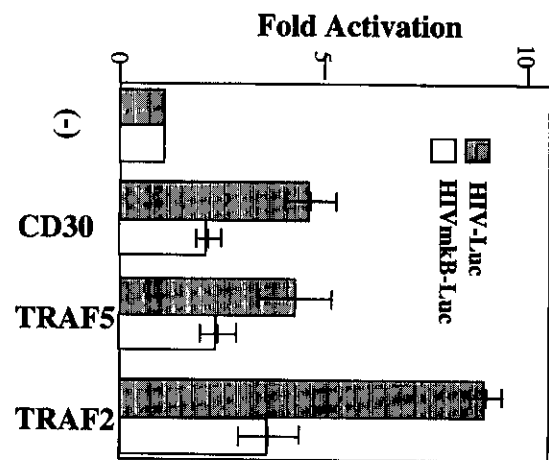


図2 CD30によるHIVLTR活性化へのNF- κ B以外のsignal pathwayの関与

CD30からのHIVLTR活性化をJurkatを用いたtransientなreporter gene assayで検討した結果を示す。CD30あるいは直下のシグナル伝達分子であるTRAF2, 5により、HIVLTRが活性化されるが、この活性化はNF- κ B siteにmutationを導入しても認められる。この結果はCD30によるHIVLTR活性化へのNF- κ B以外のsignal pathwayの関与を示唆する。

を cross-link し *in vitro* kinase assay で p38MAPK の活性化により p38MAPK が活性化されることを明らかにしている。そこで活性化した p38MAPK が NF-IL6 をリン酸化するかを *in vitro* kinase assay で検討した結果を図 4 に示す。

U937 を p38MAPK の活性化剤である anisomycin 処理、あるいは U937 に CD30 の機能ドメインを含むコンストラクト、TRAF2, 5, MAPKK である MKK6 を含む各種発現ベクターをトランスフェクトした時、NF-IL6 がより強くリン酸化することがわかる。

5. C/EBPβ(NF-IL6)の活性化とp38MAPK

我々は CD30、TRAF2 あるいは TRAF5 による C/EBPβ (NF-IL6) の活性化に p38MAPK の活性化が関与していることを、p38MAPK の特異的阻害剤である SB203580 を用いて明らかにしている。CD30 による HIV 活性化についての p38MAPK の関与を別の系、HIV 潜伏感染細胞である U1 cell を用いた p24 の ELISA でみるた結果を図 5 に示す。SB203580 で抑制がかかることがわかる。

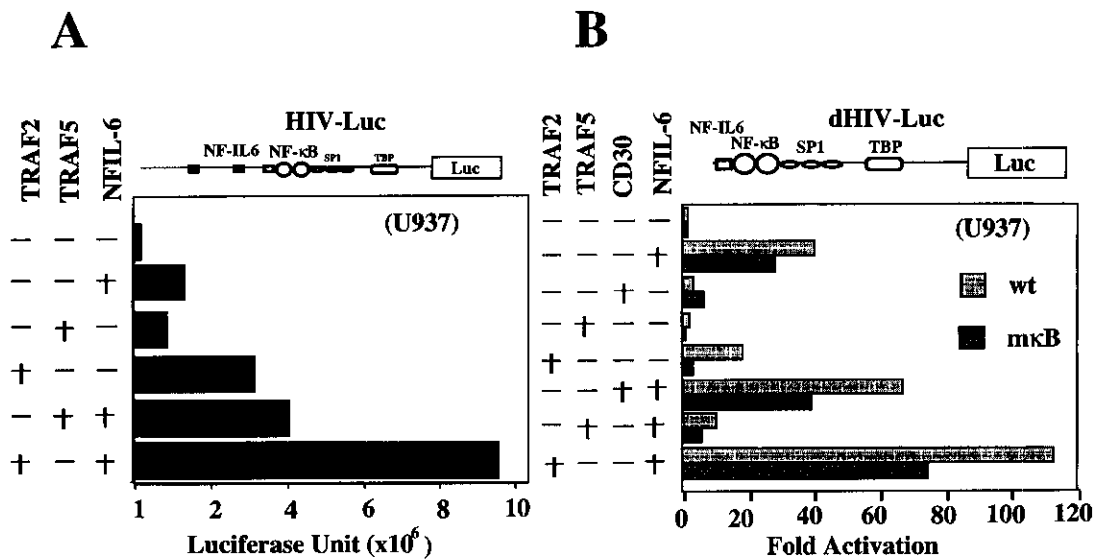


図3 CD30によるC/EBPβ(NF-IL6)の活性化

U937細胞において、C/EBPβ(NF-IL6)はHIVLTRの活性を約2倍活性化したが、これにTRAF2あるいはTRAF5を共導入すると、その活性化のレベルがそれぞれ synergistic に増強される事が明らかになった(図3A)。更に、LTRを5'側から欠失し1コのNF-IL6 siteと2コのNF-κBsiteの領域のみを残すHIVLTR-Luc reporterのを用い、NF-κBsiteにmutationを導入しても、CD30、TRAF2、TRAF5はC/EBPβ(NF-IL6)を著明に活性化することが示された。従って、CD30/TRAF2, 5からのHIVLTRを活性化にはC/EBPβ(NF-IL6)の活性化を介したsignal pathwayが存在していることが示された(図3B)。

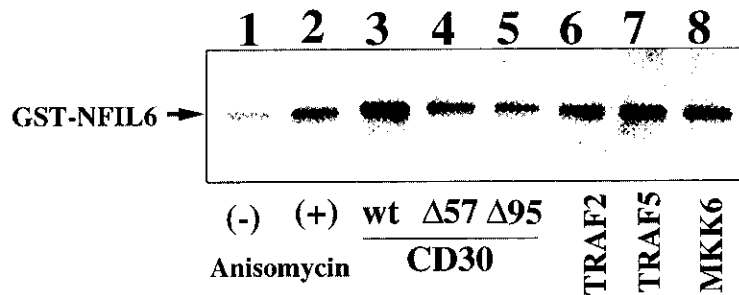


図4 p38 MAPK 活性化刺激による C/EBPβ (NF-IL6) の活性化

活性化した p38MAPK が NF-IL6 をリン酸化するかを *in vitro* kinase assay で検討した結果を示す。U937 を p38MAPK の活性化剤である anisomycin 処理、あるいは U937 に CD30 の機能ドメインを含むコンストラクト、TRAF2, 5, MAPKK である MKK6 を含む各種発現ベクターをトランスフェクトした。

これらの結果は、C/EBP β (NF-IL6)による HIVLTR の活性化に対する CD30 シグナルの作用が、p38MAPK の活性化を介していることを強く示唆するものである。

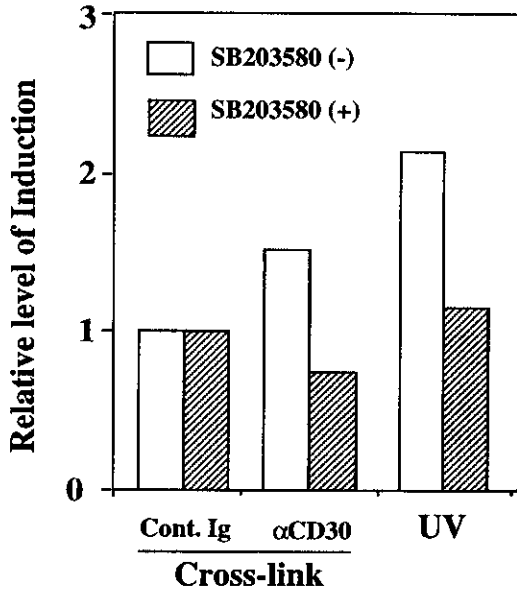


図5 C/EBP β (NF-IL6)の活性化と p38MAPK

CD30による HIV 活性化についての p38MAPK の関与を、HIV 潜伏感染細胞である U1 cell を用いた p24 の ELISA でみた結果を示す。SB203580 で抑制がかかることがわかる。

考察および結論

これまで我々は CD30/TRAF2, 5 のシグナルが HIVLTR の活性化において、HIV Tat と synergistic な協同作用を示すことを明らかにしている。本研究において我々は HIV Tat 非存在下、すなわち HIVLTR の転写が抑制されているマクロファージ系細胞の潜伏感染モデルにおいて、CD30 からのシグナルが:1) 染色体に組み込まれたプロウイルスの再活性化に関与していること。2) C/EBP β (NF-IL6)による HIVLTR の活性化を増強すること、3) p38MAPK の活性化剤である anisomycin 処理、あるいは CD30、TRAF2、5、MKK6 により NFIL6 がリン酸化することを明かにし、更に、4) CD30/TRAF2、5 による C/EBP β (NF-IL6)の活性化には p38MAPK が関与していることを明らかにした。これらの結果は、潜伏感染 HIV の再活性化において、NF- κ B と P38MAPK を活性化し得る CD30/TRAF2、5 のシグナル伝達系の重要な役割を示唆するものである(図6)。この様な CD30 による HIV の遺伝子発現抑制解除と活性化の分子機構の解明は、潜伏感染ウイルス排除の分子標的を同定する上で有用であると考えられる。

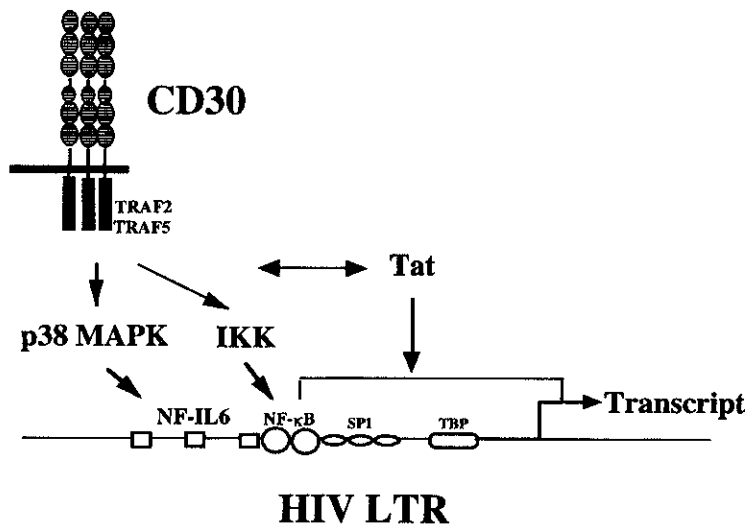


図6 CD30/TRAF から HIVLTR 活性化にいたる dual の pathway

CD30/TRAF から HIVLTR 活性化には IKK-NF- κ B を介した系と P38MAPK-NFIL6 を介した系の dual pathway が存在し、HIV 遺伝子発現に重要な意味を持つ。

参考文献

- 1) Gulick RM, Mellors JW, Havlir D, et al. Treatment with indinavir, zidovudine, and lamivudine in adults with human immunodeficiency virus infection and prior antiretroviral therapy. *N Eng J Med* 337: 734-739, 1997
- 2) Wong JK, Hezareh M, Günthard HF, et al., Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. *Science* 278: 1291-1295, 1997
- 3) Finzi D, Hermankova M, Pierson T, et al., Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiviral therapy. *Science* 278: 1295-1300, 1997
- 4) Smith, C.A., Farrah, T., and Goodwin, R.G. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 76, 959-962, 1994.
- 5) Bazzoni, F. and Beutler, B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *New Eng J Med* 334, 1717-25, 1996.
- 6) Natoli G, Costanzo A, Ianni A, et al., Activation of SAPK/JNK by TNF receptor 1 through a noncytotoxic TRAF2-dependent pathway. *Science* 275: 200-202, 1997.
- 7) Song HY, Régnier CH, Kirschning CJ, et al., Tumor necrosis factor (TNF)-mediated kinase cascades: Bifurcation of nuclear factor- κ B and c-jun N-terminal kinase (JNK/SAPK) pathways at TNF receptor-associated factor 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 9792-9796, 1997.
- 8) Biswas P, Smith CA, Goletti D, et al., Cross-linking of CD30 induces HIV expression in chronically infected T cells. *Immunity* 2, 587-596, 1995.
- 9) Maggi E, Annunziato F, Manetti R, et al., Activation of HIV expression by CD30 triggering in CD4⁺ T cells from HIV-infected individuals. *Immunity* 3, 251-255, 1995.
- 10) Pazin MJ and Kadonaga JT. What's up and down with histone deacetylation and transcription? *Cell* 89: 325-328, 1997.
- 11) Wolffe AP. Sinful repression. *Nature* 387: 16-17, 1997
- 12) Henderson AJ, Connor RI and Calame KL. C/EBP activators are required for HIV replication and proviral induction in monocytic cell lines. *Immunity* 5: 91-101, 1996.



IL-6を介したウイルス間クロストーク —KSHV/HHV-8由来vIL-6による HIV複製の増強—

吉崎 和幸¹⁾、西本 憲弘¹⁾、王鞍 孝子¹⁾、田合ひろみ¹⁾、稲城 玲子²⁾、森 康子²⁾、
山西 弘一²⁾

¹⁾大阪大学健康体育部 健康医学第一部門

(大阪大学大学院医学系研究科 分子病態医学専攻生理病態学)

²⁾大阪大学大学院医学系研究科 分子病態医学専攻微生物学

研究要旨

Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV)は、human herpesvirus-8(HHV-8)とも呼ばれるガンマヘルペス属のウイルスであり、AIDSに合併するカポジ肉腫、悪性リンパ腫、あるいはCastleman病の発症に関与する可能性が示唆されている。HIVの感染細胞はT細胞と単球に限られており、またHHV-8はB細胞と血管内皮細胞に限られ、それぞれ感染細胞は異なるが、これらのウイルスが相互に作用し宿主の病態を悪化させる可能性がある。興味深いことに、HHV-8はその遺伝子配列の中にヒトIL-6(hIL-6)相同部位を有し、その産物(ウイルスIL-6、vIL-6)はhIL-6と同様の生理活性を持つ。一方、HIV感染によるhIL-6の産生増強が知られており、しかもhIL-6はHIVの複製を促すのみならずカポジ肉腫、悪性リンパ腫の増殖を促し、Castleman病の病態形成に関与する。そこで、vIL-6ならびにhIL-6のAIDS病態への関与、特にHIV複製ならびにHHV-8感染細胞増殖に対する影響について検討した。hIL-6はHHV-8感染Bリンパ腫細胞BCBL-1の増殖を濃度依存性に促した。またvIL-6はHIV感染した単球細胞株のU-1細胞におけるHIV複製を促した。しかもHIV複製に対する刺激活性は、ハイブリドーマ細胞増殖刺激作用から換算したhIL-6相当量で示した場合、hIL-6に比べて約1000倍強いものであった。従ってHIV感染によって増加したhIL-6はHHV-8感染B細胞の増殖を促し、HHV-8によって産生されたvIL-6はHIV感染U-1細胞におけるHIV複製を促した。以上の結果よりhIL-6ならびにvIL-6を介したウイルス間相互作用の存在が示唆された。

分担研究者：吉崎和幸

研究協力者：西本憲弘、王鞍孝子、田合ひろみ、稲城玲子、森 康子、山西弘一

Crosstalking between HIV and KSHV/HHV-8 via interleukin 6 in the pathophysiology of AIDS.

Kazuyuki Yoshizaki¹⁾, Norihiro Nishimoto¹⁾, Takako Okura¹⁾, Hiromi Tagoh¹⁾, Reiko Inagi²⁾, Yasuko Mori²⁾, Koichi Yamanishi²⁾

¹⁾Department of Medical Science I, School of Health and Sport Sciences, Osaka University and ²⁾Department of Microbiology, Osaka University Medical School

目 的

HIV感染に伴う臨床症状の出現には、多様な生理活性を有するサイトカインであるインターロイキン6(IL-6)の過剰産生が関与すると考えられる。IL-6はHIV感染T細胞や単球から過剰に産生され、HIV自身のウイルス複製を増やすオートクライン因子の一つと考えられているばかりでなく²⁾、HIV感染者に認められる高ガンマグロブリン血症やCastleman病、あるいはAIDS発症後の悪液質の原因と考えられている。またIL-6はAIDSに合併するカポジ肉腫やB細胞リンパ腫の増殖因子である^{3,4)}。近年AIDS患者のカポジ肉腫病変部位から見出されたKaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV)は、既知のγヘルペスウイルス亜群と相同性を有し、8番目のヒトヘルペスウイルス(human herpesvirus 8, HHV-8)とも呼ばれている⁵⁾。HHV-8の注目すべき点はウイルスゲノムの中にヒトIL-6(hIL-6)遺伝子と相同性を有する配列を持ち^{6,7)}、その遺伝子の産物、ウイルスIL-6(vIL-6)はhIL-6と同様に、マウスハイブリドーマ細胞やミエローマ細胞の増殖を促すことである^{6,7,8)}。さらにHHV-8は、IL-6がその病態に関与することが報告されているCastleman病⁹⁾や悪性リンパ腫¹⁰⁾と疫学的関連を有することが示され、これらの疾患の原因ウイルスとしての可能性が示唆されている。

さて、これらの疾患を有する患者でのHHV-8の検出率は、HIV陽性の患者群で明らかに高値を示しており、HIVとHHV-8の感染病態に何らかの相互作用の存在が考えられる。しかしHIVはT細胞及び単球、HHV-8はB細胞や血管内皮細胞とそれぞれ異なった細胞に感染するため、ウイルス間の直接作用は考えにくい。そこでこれらのウイルスがIL-6を介して相互に作用し、宿主の病態を悪化させるのではないかとの仮説を設け、hIL-6によるHHV-8感染細胞への影響ならびにvIL-6によるHIV感染細胞への影響、特にHIV複製について検討した。

方 法

1. 細胞ならびにサイトカインによる刺激

HIV感染細胞株としてACH-2(T細胞)ならびに

U-1(単球)を用いた。各々の細胞を 5×10^5 個/mlに調整し、種々の濃度のリコンビナントvIL-6ならびにhIL-6の存在下で48well plate (0.5ml/well)を用いて48時間培養し、HIV複製に対する影響を培養上清中のp24抗原量を測定し評価した。

HHV-8感染B細胞はBody cavity-based lymphoma由来BCBL-1細胞株を用いた。BCBL-1細胞におけるHHV-8の感染はウサギ抗HHV-8ポリクローナル抗体による免疫染色、ならびにPCRとSouthern blot hybridizationの組合せにより確認した。BCBL-1細胞はhIL-6の存在あるいは非存在下、 5×10^3 個/200 μ l/wellの濃度で96well plateを用いて48時間培養し*in vitro*増殖試験に用いた。

2. p24抗原の測定

前述のACH-2ならびにU-1細胞の培養上清中のp24抗原量は、遠心にて培養上清を分離した後、HIVp24 ELISA Kit(Abbot社)を用いて測定した。

3. *in vitro*増殖試験

BCBL-1細胞は48時間培養の最後の6時間を18.5kBq/wellの³H-TdRにてラベルし、DNAへの取込にて増殖能を評価した。

hIL-6ならびにvIL-6の活性測定にはIL-6依存性マウスハイブリドーマ細胞株MH60を用いた。hIL-6及びvIL-6の存在下、 1×10^4 個/200 μ l/wellの濃度で96well plateを用いて48時間培養し増殖能を評価した。尚、vIL-6の活性はMH60細胞の増殖において同等の刺激活性を有するhIL-6の量で示した。

4. リコンビナントvIL-6の作成

vIL-6cDNAはDr. Chan and Dr. Mooreより供与された。pME18Sfベクターに順方向ならびに逆方向に挿入したプラスミドを293T細胞(ヒト胎児由来腎細胞にSV40のlargeT抗原を導入して作成した細胞)にリン酸カルシウム共沈法にて遺伝子導入を行った。2日間培養した293T細胞の培養上清をD-MEMメデイウムで透析した後、マウスハイブリドーマ細胞MH60に対する増殖刺激作用を検討し、hIL-6相当量としてvIL-6活性を示した。この方法によりhIL-6換算320pg/mlに相等するvIL-6を得た。またコントロールには逆方向に遺伝子を組

み込んだプラスミド導入株の上清(reverse vIL-6)ならびにSham operationを行った培養上清を用いた。

結果

1. リコンビナントvIL-6によるマウスハイブリドーマ細胞株MH60の増殖刺激

リコンビナントvIL-6とhIL-6の活性を比較するため、MH60細胞の増殖支持能を検討した。図1にその結果を示す。図右のようにhIL-6は0.11Unit/ml(≒22pg/ml)から0.001Unit/ml(≒0.2pg/ml)の範囲で濃度依存性にMH60細胞の増殖を刺激した。一方、vIL-6cDNAを導入したヒト胎児由来腎細胞293T細胞の培養上清も20倍ならびに100倍希釈でMH60の増殖を支持したが、vIL-6cDNAを逆方向に組み込んだプラスミドの導入株(reverse vIL-6)ならびにSham operationを行った培養上清には有意なMH60に対する増殖支持能は認められなかった。MH60の増殖支持能の比較から、vIL-6cDNA導入293T細胞の培養上清中には320pg/mlのhIL-6に相当する活性が認められた。しかもこの培養上清中のhIL-6量をhIL-6特異的の化学発光酵素抗体測定法で測定したところ約1pg/mlであったことから、293T上清中のMH60増殖支持活性はvIL-6によると考え、これをリコンビナントvIL-6として用いた。

2. vIL-6によるHIV複製刺激

リコンビナントvIL-6(293T-F)によるHIV複製刺激能を検討するため、ACH-2ならびにU-1細胞をvIL-6あるいはhIL-6の存在下で培養し、上清中のp24抗原量を測定した。図2にELISAの結果を示す。U-1細胞においてvIL-6は32pg/mlhIL-6等量でp24抗原の産生を有意に増やしたが、それと同等のHIV複製刺激に必要なhIL-6量は約30,000pg/mlであり、vIL-6は約1000倍強い活性を有した。すなわちvIL-6はマウスハイブリドーマ増殖支持能に比べ強いHIV複製刺激活性を有することがわかった。一方、ACH-2細胞に関しては、vIL-6はHIV複製になんら影響しなかった。

3. hIL-6によるBCBL-1の増殖刺激

HHV-8感染B細胞株であるBCBL-1の増殖に対するhIL-6の作用を検討したところ、hIL-6は1-100ng/mlの範囲で濃度依存性にその増殖を促進した(図3)。抗HHV-8抗体による免疫染色にてBCBL-1細胞の約5%がHHV-8陽性で、且つHHV-8陽性細胞ではvIL-6が産生されていた。従って、hIL-6はHHV-8感染悪性リンパ腫細胞の増殖を促進した。結果的にHHV-8、さらにはHHV-8由来vIL-6の産生をも促すのではないかと考えられる。

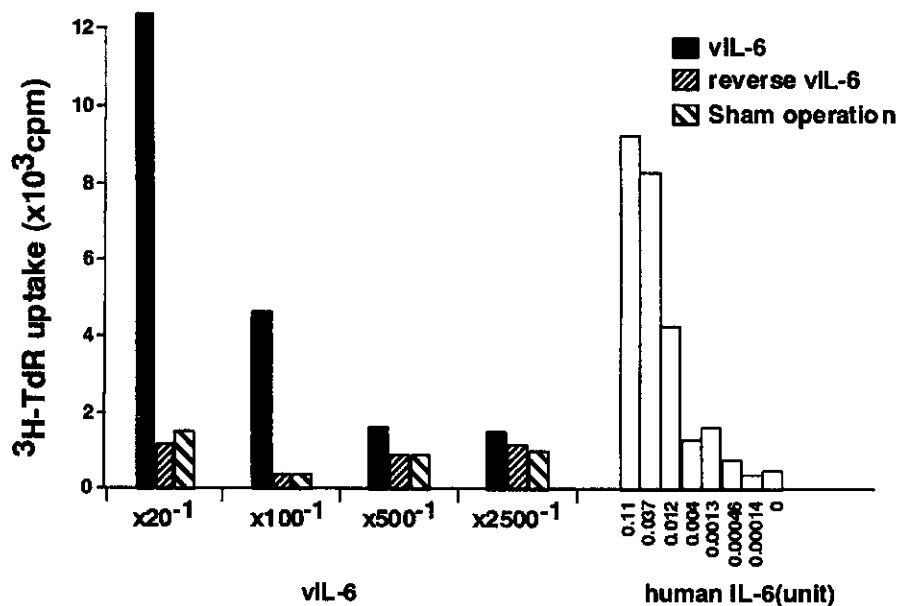


図1 vIL-6ならびにhIL-6によるマウスハイブリドーマ増殖刺激作用