

Peptrotech社)存在下で1日おきに培養液を半換えし、7日間培養後DCに分化させたものを実験に用いた(Fig.1)。purityはサイトスピン標本をWright-Giemsa染色し形態学的に、そして同時にフローサイトメトリーを用いてCD1a陽性細胞として算出した。その結果は70-80%と比較的良好であった。

## 6. Mo-DCのサイトカイン産生能の解析

Mo-DC(かける $1 \times 10^5$ /ml)にLPS(1 $\mu$ g/ml)あるいはzymosan(100mg/ml; Sigma社)を加え刺激し、48時間後に培養上清を採取し、-80°Cで保存した。培養上清中のIL-12p40、IL-18、TNF- $\alpha$ をELISAキット(IL-12p40(R&D社、米国)、TNF- $\alpha$ (Endogen社)、IL-18(MBL社、群馬))を用いて測定した。

## 7. 統計学的解析

Statview IIソフトウェアを用いて行った。群間の比較にはMann-Whitney U testを用い、 $p < 0.05$ を有意として判定した。

## 結果

### 1. CD4KOマウス脾細胞由来DCにおけるサイトカイン産生能の解析

CD4KOマウスの脾細胞由来DCは野生型マウスのそれと比べLPS刺激においてもSAC刺激においてもIL-12p40産生能の低下が認められた。

### 2. HIV感染者Mo-DCのサイトカイン産生能の解析

CD4KOマウスの脾細胞由来DCでの解析からHIV感染者におけるDCの機能低下が示唆されたので、HIV感染者Mo-DCのサイトカイン産生能の解析を行った。LPSおよびzymosanで刺激したMo-DCのIL-12p40産生能はHIV感染者群と健常人群間とで有意差を認めなかった(図2)。TNF- $\alpha$ (図3)やIL-18(図4)に関してもMo-DCからの産生能には両群間に差はなかった。

Table.1 Clinical data on HIV-positive patients enrolled in the study

Patient	HIV viral load (copies/ml)	CD4 cell counts (cells/ $\mu$ l)	Antiretroviral therapy
1. 34M	< 500	182	AZT, 3TC, NFV
2. 20M	$1 \times 10^4$	194	d4T, ABC, RTV, SQV
3. 34M	$3.8 \times 10^3$	114	d4T, ddI, NVP,
4. 57M	$1.5 \times 10^3$	87	d4T, 3TC, RTV, SQV
5. 17F	<500	335	d4T, 3TC, RTV, SQV

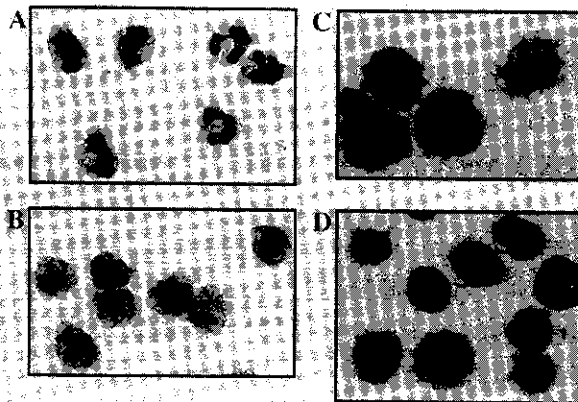


Fig 1 Cytochemical staining of cell preparations. A: monocytes (modified Wright-Giemsa staining, X400), B: monocytes (esterase staining, X400), C, D: dendritic cells (modified Wright-Giemsa staining, X400)

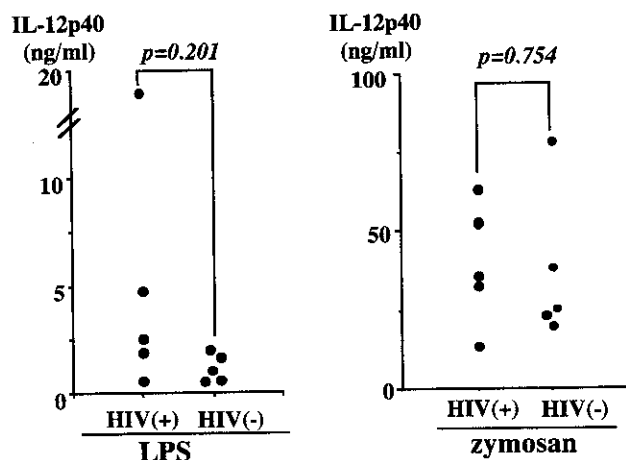


Fig. 2 IL-12p40 production by monocyte-derived dendritic cells stimulated with LPS or zymosan

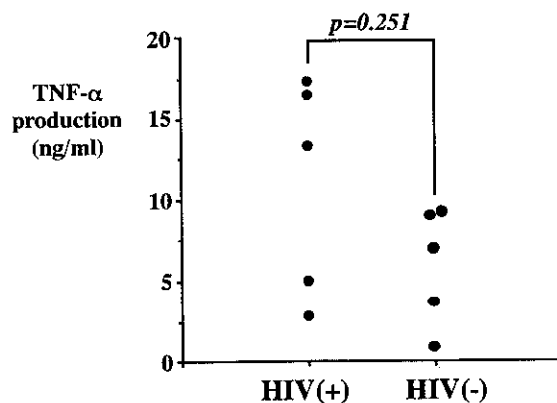


Fig. 3 TNF- $\alpha$  production by monocyte-derived dendritic cells stimulated with zymosan

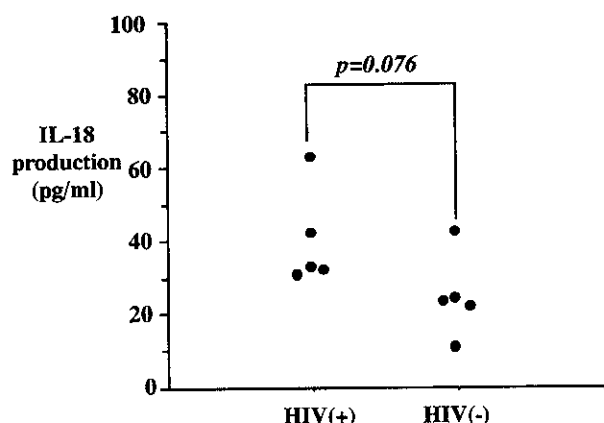


Fig. 4 IL-18 production by monocyte-derived dendritic cells stimulated with zymosan

## 考察と結論

今回我々は CD4KO マウスを用いて、マウス脾細胞由来 DC のサイトカイン産生能が CD4 陽性 T 細胞欠損状態下では低下することを明らかにした。

さらに我々は HIV 感染者群と健常者群間で Mo-DC のサイトカイン産生能を比較検討した。その際、これまでに HIV 感染者の Mo-DC では調べられていなかった、真菌の菌体成分である zymosan も刺激剤として用いた。その結果、マウスの結果とは異なり、IL-12p40、TNF- $\alpha$  や IL-18 産生能において、両群間に有意な差が認められないことを明らかにした。

マウスの DC に関しては、最近 SCID マウスおよび RAG2 欠損マウスにおいて T 細胞の欠損が樹状細胞の質的量的異常を来すことが報告された<sup>6)</sup>。すなわち、ハプテンで感作した皮膚や所属リンパ節内の DC の数が少なく、正常マウスから移入したハプテン感作 T 細胞への抗原提示能が低下していた。さらに正常マウス由来の T 細胞を T 細胞欠損マウスに移入すると DC の機能が回復した。我々の検討からは CD4KO マウスにおいて IL-12p40 産生が低下しており、T 細胞の中でも CD4 陽性 T 細胞が DC の機能的成熟に必要であることが示唆され、今後詳細な検討が必要と考えられる。

このことから、CD4 陽性細胞が減少する HIV 感染の病態においても同様に DC の機能が障害されていることが予想された。ところが予想に反して、我々の検討では HIV 感染者の Mo-DC は健常人に比べ IL-12p40、TNF- $\alpha$  および IL-18 産生は障害されていなかった。その理由として、今回対象とした HIV 感染者は表 1 に示した通り、全症例が HAART を受けており、そのことがなんらかの形で CD4 陽性 T 細胞の機能の改善に参与している可能性があると考えられた。実際、AZT 治療によって HIV 感染者の DC の機能が改善したとする報告があり<sup>7)</sup>、この可能性を支持する。

Chougnnet<sup>8)</sup> は我々と同様の検討を行っているが、同様に IL-12 産生能の低下は認めていない。こ

の場合もHIV感染症例は全例抗HIV療法を受けており、CD4細胞数も200/μl以上の症例が大半であった。これらのことから、今後HAARTを受けていない症例を含めたDCの機能の解析が必要と思われた。

HIV感染者のPBMCについてMullerら<sup>9)</sup>はIL-12産生低下に比してIL-10産生が亢進していることを指摘しており、これがエイズにおける細胞性免疫低下の一因と考えている。Chougnnetらは、先の報告の中でDCのIL-10産生に関しても解析を行っているが、これも両群間に差は認められなかった<sup>8)</sup>。

サイトカイン産生能の他にDCの機能として重要なものに抗原提示能がある。これに関してもランゲルハンス細胞を用いた解析<sup>10)</sup>やHIVに対するメモリーCTLの活性化能を解析した報告がみられる<sup>11)</sup>が、いずれも抗原提示能は比較的保たれていた。

以上のことからHIV感染者におけるDCの機能は比較的保たれており、HIV感染者においてDCワクチンがHIV感染そのものに対する、あるいは合併する日和見感染症に対する新たな治療法として一つの選択肢となりうることが期待できる。

しかしながら、HIV患者に対するDCワクチンを臨床応用するためには、今後の研究で明らかにすべきこと検討課題が山積している。HIVに対する有効なCTLを誘導するためにDCにパルスするHIVの抗原について詳細に検討する必要がある。また、DCの投与経路の検討も必要である。一方、種々の炎症性サイトカインによってHIVそのものの増殖が促進されることもわかっており<sup>12,13)</sup>、この点についても今後さらに慎重に検討していく必要がある。これらの問題点の解決を含めこの領域における今後の研究の発展が期待される。

## 参考文献

- 1) Steinman RM. 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenecity. *Annu. Rev. Immunol.* 9: 271-296
- 2) Banchereau J and Steinman RM. 1998. Dendritic cell and the control of immunity. *Nature.* 392: 245-252
- 3) Salgaller ML, Tjoa BA, Lodge PA, et al.1998. Dendritic cell-based immunotherapy of prostate cancer. *Crit. Rev. Immunol.* 18: 109-119
- 4) Nestle FO, Aljagic S, Gilliet M, et al. 1998. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat. Med.* 4: 328-332
- 5) Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, et al. 1996. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat. Med.* 2: 52-58
- 6) Shreedhar V, Moodycliffe AM, Ullrich SE, et al.1999. Dendritic cells require T cells for functional maturation *in vivo*. *Immunity.* 11: 625-636
- 7) Gompels M, Patterson S, Roberts MS, et al. 1998. Increase in dendritic cell numbers, their function and the proportion uninfected during AZT therapy. *Clin. Exp.Immunol.* 112: 347-353
- 8) Chougnnet C, Cohen SS, Kawamura T, et al. 1999. Normal immune function of monocyte-derived dendritic cells from HIV-infected individuals: implications for immunotherapy. *J. Immunol.* 163: 1666-1673
- 9) Muller F, Aukrust P, Lien E., et al. 1998. Enhanced interleukin-10 production in response to *Mycobacterium avium* products in mononuclear cells from patients with human immunodeficiency virus infection. *J. Infect. Dis.* 177: 586-594
- 10) Blauvelt A, Clerici M, Lucey DR, et al. 1995. Functional studies of epidermal Langerhans cells and blood monocytes in HIV-infected persons. *J.Immunol.* 154: 3506-3515
- 11) Fan Z, Huang XL, Zheng L, et al. 1997. Cultured blood dendritic cells retain HIV-1 antigen-presenting capacity for memory CTL during progressive HIV-1 infection. *J. Immunol.* 159: 4973-4982
- 12) Shapio L, Puren AJ, Barton HA., et al. 1998. Interleukin18 stimulates HIV type1 in monocytic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:12550-12555
- 13) Chun TW, Engel D, Mizel SB., et al. 1998. Induction of HIV-1 replication in latently infected CD4+ T cells using a combination of cytokines. *J. Exp. Med.* 188: 83-91



# HIV-1 TatによるIL-12産生抑制とその作用機序について

伊藤 正彦<sup>1)</sup>、照沼 裕<sup>1)</sup>、何 麗敏<sup>1)</sup>、石田 尚臣<sup>2)</sup>、木村 哲<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> 山梨医科大学 微生物学

<sup>2)</sup> 東京大学医科学研究所

<sup>3)</sup> 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-1感染者はCD4(+) T cell数が減少するのみならず、細胞性免疫を司るInterleukin (IL)-12の産生能も低下する。IL-12はmonocyteやmacrophageが産生するが、HIV感染者でIL-12産生能が低下する理由は不明であった。我々はHIV-1の調節タンパクの一つであるTatがLPSまたはSAC刺激による単球系細胞のIL-12産生を抑制することを見出した。さらにその抑制の分子機構を明らかにするためにLPSを介した情報伝達系に注目した。PKC $\zeta$ のkinase negativeを用いた実験からLPS刺激時のIL-12 p40の産生にはPKC $\zeta$ の活性化が重要であること、PKCの活性阻害剤を用いた実験からPKC活性は、JNKの活性化に寄与すること、JNKの制御キナーゼである、SEK1のkinase negativeを用いた実験からIL-12 p40遺伝子のプロモーター活性化にJNKの活性化が重要であることを示唆するデータを得た。これらの結果から、HIV-1 Tat蛋白質は、PKCを介した情報伝達系を阻害することにより、IL-12産生を抑制していると考えられる。

研究分担者：木村 哲

研究協力者：伊藤正彦

## Inhibition of Interleukin-12 production by HIV-1 Tat protein and its mechanisms

Masahiko Ito<sup>1)</sup>, Hiroshi Terunuma<sup>1)</sup>, Limin He<sup>1)</sup>, Takaomi Ishida<sup>2)</sup> and Satoshi Kimura<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Microbiology, Yamanashi Medical University, <sup>2)</sup> Institute of Molecular and Cellular Biosciences, University of Tokyo, <sup>3)</sup> Department of Infection Control and Prevention, Department of Infectious Diseases, Graduate School of Medicine, University of Tokyo

## 目 的

HIV感染者はCD4(+) T cell数の低下のみならず細胞性免疫反応を司る Interleukin (IL)-12の産生能も低下する。IL-12産生能の低下の原因は不明であった。我々はその原因の一つとしてHIV-1が産生するタンパクがIL-12の産生を抑制する可能性を探るために、種々のHIV-1タンパクを健康人末梢単核細胞(PBMC)に前処理し、IL-12産生能を調べた。また作用機序を調べるためにIL-12を産生する cell line である THP-1でも同様の実験を行った。

## 方 法

健康人のPBMCを10%FCS加RPMI-1640でHIV-1蛋白である Tat, Nef, gp120, vpr と共に3時間培養し、その後 staphylococcus cowan strain I (SAC)を $10^3$  (v/v)加えて24時間後の培養上清を種々の cytokine の assay kit (R&D社)で測定した。ヒト単核細胞株 THP-1はRPMI-1640培地(10%FCS)で培養した。抗ERK1, 2抗体、抗JNK抗体、抗p38抗体は santacruz社、抗PKC $\zeta$ 抗体はGIBCO-BRL社よりそれぞれ購入した。MARK-Kinase, SEK1, MKK3bのkinase-negative cDNAおよび発現ベクターは京都大学大学院理学研究科西田先生より、PKC $\zeta$ のkinase-negative cDNAは横浜市立大学医学部大野先生よりそれぞれ御供与いただいた。 $5 \times 10^6$ 細胞より核抽出液を調整し、 $5 \mu\text{g}$ の蛋白を1アッセイに用いた。アッセイに用いたプローブはMHC class I エンハンサー領域のNF $\kappa$ B認識配列を用いた。THP-1細胞へのトンスフェクションはQuagen社 Effectenを用いた。 $5 \times 10^6$ 細胞をlysisし、それぞれの抗体を用いて免疫沈降した。ERK1, 2にはMBPを、JNKにはGST-c-Junを、p38にはATF2をそれぞれ基質として用いた。PKC $\zeta$ にはMBPを基質として用いた。

## 結 果

Fig. 1に示すとおり、Tatは5~40ng/mlの濃度でIL-12の産生を抑制した。しかしながらIL-10, TNF- $\alpha$ , IL-6の産生は抑制しなかった。一方、

recombinant Nef, gp120は20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ でもIL-12の産生は抑制しなかった。またTatに対する抗体を用いた免疫沈降によりTatを取り除くとIL-12産生抑制効果は認められなかった(data not shown)。また messenger RNAをRT-PCR法によりDNAし、それをPCRで増幅しその後Southern analysis法で測定した結果、TatはIL-12 p40の messenger RNAの産生を抑制した。次にTat作用機序をもとめる実験においてPBMCは細胞の種類が均一でないので macrophage系の細胞であるTHP-1 cell lineを用いて以下の実験を行った。LPS刺激によりPKCが活性化されるとの報告から、我々はまず、LPS刺激によるIL-12 p40の産生誘導にPKCの活性がどのように関わるか活性阻害剤である staurosporineを用いて解析した。その結果、staurosporineを1時間前処理したTHP-1細胞は、LPS刺激によるIL-12 p40の産生が有意に低下した。また、同様の実験系でHIV-1 Tat蛋白を3時間前処理したTHP-1細胞においても、IL-12 p40の産生は有意に低下した(Fig. 2)。このことは、IL-12 p40の産生にPKC活性が重要であることを示唆している。次に、LPS刺激時の転写因子NF $\kappa$ Bの活性化をゲルシフトアッセイを用いて解析した。その結果、staurosporine処理してもNF $\kappa$ Bの活性化には影響が認められず、また同様な実験系で、HIV-1 Tat蛋白処理したTHP-1細胞では、むしろ強い活性化が認められた。以上のことから、PKC活性は転写因子NF $\kappa$ Bの活性化に必須ではないことを示唆している。

次に、我々は、PKCの下流のシグナル伝達系でIL-12 p40の産生に関わる因子として、最もよく解析が進められているMAP-Kinasesに注目した。現在、MAP-Kinaseのファミリーとして、3種のKinaseが知られている。そこで、LPS刺激時に活性化されるMAP-Kinaseを同定する目的で、それぞれ3種のKinaseを、免疫沈降し、*in vitro* kinase assayにより、活性を測定した(Fig. 3)。その結果、THP-1細胞においてLPS刺激時に最も活性化されるのはJNKであることが明らかになった。古典的kinaseであるERK1, 2はLPS刺激時にむしろ抑制され、p38 kinaseはほとんど活性が変化しなかった。そこで、JNKの活性化がstaurosporineおよびHIV-1 Tat蛋白処理によりどのように変化するか、同様に*in vitro* kinase assayにより検討した。その結果、

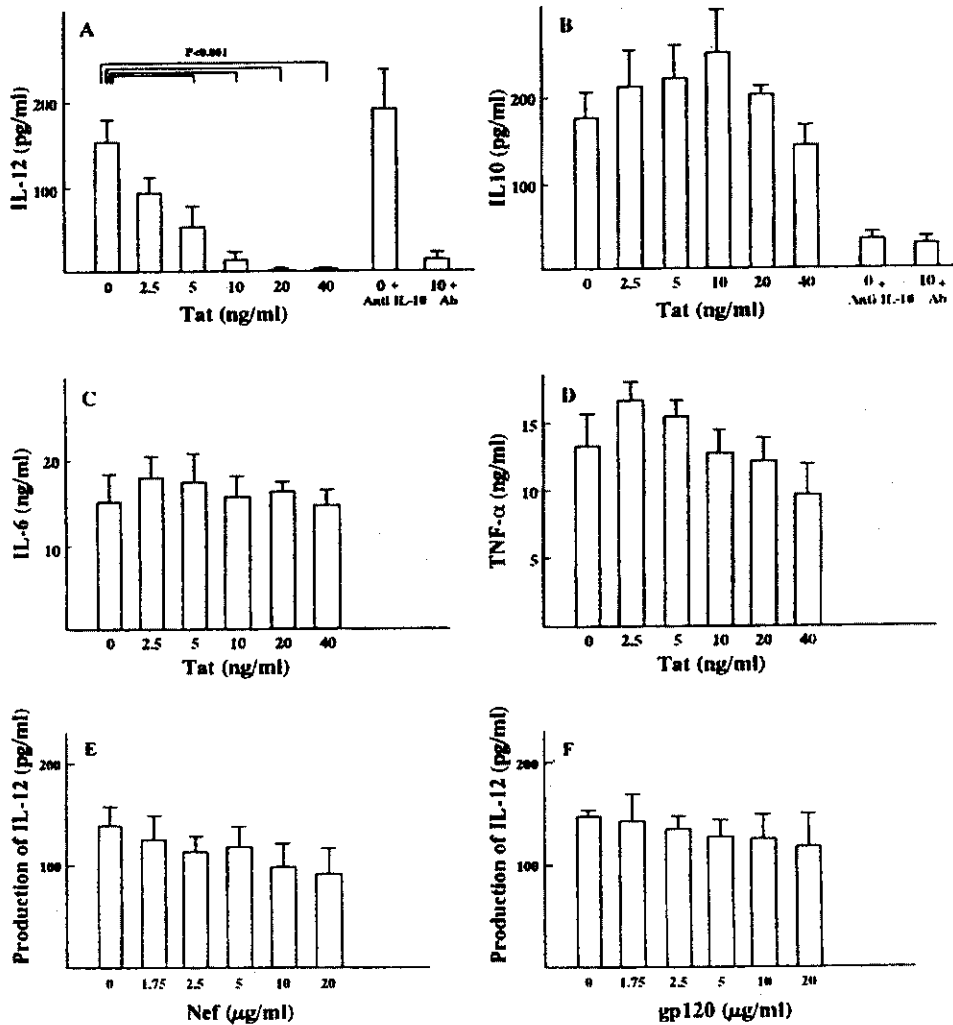


Fig. 1

Effects of Tat, Nef, and gp120 on IL-12, IL-10, IL-6, and TNF- $\alpha$  productions by human PBMCs. Human PBMCs were preincubated with medium alone, Tat (A, B, C, D.), Nef (E), or gp120(F) with or without neutralizing goat anti-IL-10 IgG anti body (10 $\mu$ l/ml) for 3 hr before SAC (1: 10,000, w/v) was added. After 18 hr of incubation with SAC, the supernatants were collected and tested for the presence of IL-12 p70(A,E,F), IL-10 (B), IL-6 (C), and TNF- $\alpha$ (D) by ELISA. Results shown are the mean  $\pm$  SE (n=5). p Values (p<0.001) are indicated.

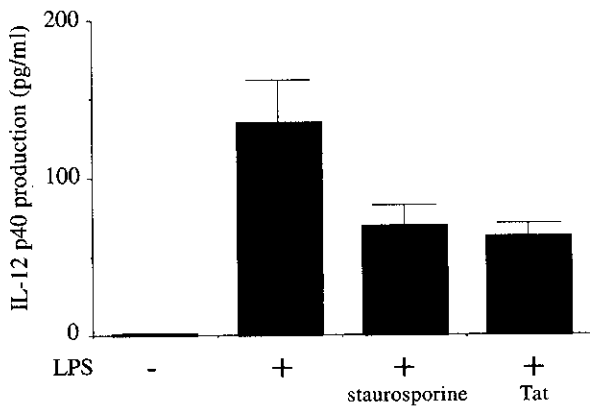


Fig. 2 HIV-1 Tat and staurosporine suppresses the production of IL-12p40

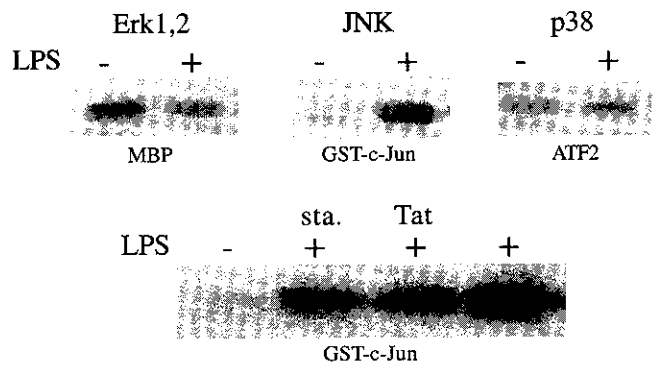


Fig. 3 HIV-1 Tat and staurosporine suppresses the activation of JNK

staurosporine および HIV-1 蛋白処理により JNK の活性化は有意に抑制されることが明らかとなった。加えて、ERK1, 2の活性化を制御するMAPK-kinase, JNKの抑制kinaseであるSEK1, p38Kinaseの制御KinaseであるMKK3bのkinase-negativeコンストラクトをIL-12 p40プロモーターCATレポーターとともにトランスフェクションし、LPS刺激時のプロモーター活性を比較した。その結果、JNKの制御kinaseであるSEK1のkinase-negativeを導入した際に有意にプロモーターの活性化が抑制された。以上のことから、IL-12 p40の産生に関わるPKCを介したシグナル伝達系の一つはJNKを活性化するパスウェイであると考えられる。

PKCには現在13種のアイソザイムが知られて

いる。IL-12 p40の産生に関わるPKCとして、THP-1細胞においてLPS刺激時に活性化されるPKCに注目した。PKC $\zeta$ を免疫沈降し、*in vitro* kinase assayを用いて活性化を解析すると、LPS刺激時にPKC $\zeta$ は約二倍の活性化が誘導された。この実験系にTatを前処理するとこの活性化は有意に抑制された(Fig. 4)。さらにPKCのkinase-negativeの発現ベクターをTHP-1細胞に導入し、恒常発現株を樹立し、LPS刺激時のIL-12 p40の産生量をELISA法により測定すると、産生量は恒常発現株で有意に抑制されていた(Fig. 5)。以上のことから、HIV-1 Tat蛋白はPKC $\zeta$ の活性化を抑制することによりIL-12 p40産生を抑制すると考えられる。

### HIV-1 Tat inhibits the activation of PKC $\zeta$



Fig. 4 HIV-1Tat inhibits the activation of PKC $\zeta$

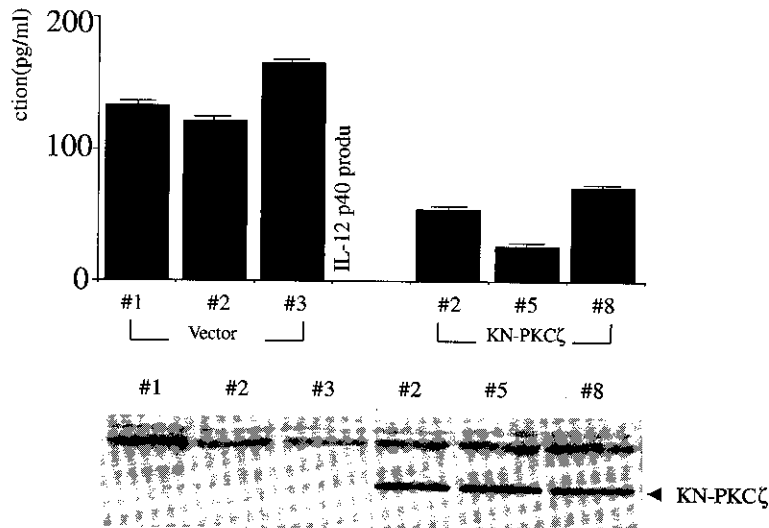


Fig. 5 Kinase negative PKC $\zeta$  suppresses the production of IL-12 p40

## 考察および結論

我々は細胞外に分泌される Tat 蛋白が、IL-12 の産生を抑制することを初めて報告した。この分子機構として Tat 蛋白が PKC $\zeta$  の活性化を抑制することが原因となり、IL-12 p40 の産生が抑制されると考えられる。LPS 刺激時に活性化される細胞内シグナル伝達系として最もよく知られている転写因子 NF $\kappa$ B の活性化は Tat 蛋白により影響を受けず、むしろ強く活性化されることが示された。これとほぼ同様な結果はアストロサイトにおいても認められるとの報告があり、興味深い。IL-12 p40 のプロモーター領域には 2 つの NF $\kappa$ B 認識配列があり、その領域に変異を導入すると LPS 刺激時のプロモーター活性化が認められなくなることから、IL-12 p40 の産生には NF $\kappa$ B の活性化が重要であると考えられている。我々の実験から Tat 処理によりむしろ活性化が認められるのに、p40 の産生が抑制されている理由は不明であるが、p40 プロモーター領域には LPS で反応する領域がもう一つ報告され、転写因子 Ets のファミリーが重要であるとの報告があり、そちらの活性化も p40 産生には必須であることから、Tat を介した抑制機構はこの領域に作用するのかも知れない。事実、PKC のシグナルは JNK の活性化を抑制しているので、JNK に制御される逆転因子がその領域からの転写活性化に寄与しているのかも知れない。

## 参考文献

- 1) M. Ito, T. Ishida, L. He, F. Tanabe, R. Yang, Y. Miyakawa and H. Terunuma. HIV type 1 Tat protein inhibits interleukin 12 production by human peripheral blood mononuclear cells. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 14(10): 845-849, 1998.
- 2) M. R. Zocchi, A. Rubartelli, P. Morgavi and A. Poggi. HIV-1 Tat inhibits human natural killer cell function by blocking L-type calcium channels. *Journal of Immunology*, 161: 2938-2943, 1998.





## CD30シグナルによる潜伏HIV再活性化の分子機構の解析

堀江 良一<sup>1,3)</sup>、米山 彰子<sup>2)</sup>、木村 哲<sup>3)</sup>、渡邊 俊樹<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup>北里大学医学部 血液内科

<sup>2)</sup>東京大学医学部附属病院 検査部

<sup>3)</sup>東京大学大学院医学系研究科 感染制御学、感染症内科

<sup>4)</sup>東京大学医科学研究所 病理学研究部

### 研究要旨

HIVの再活性化におけるCD30シグナルの役割とCpGメチル化によるHIV LTRの機能制御の意義を検討した。stable transformantではHIV LTR-Lucの基礎転写活性が低値であり、*in vitro*でのSssI methylaseによるCpGメチル化HIV LTR-Lucは基礎転写活性およびTNF- $\alpha$ などの活性化刺激に対する反応性が著しく低下したことから、CpGメチル化による活性抑制機構が示唆された。stable transformantでは、5AzaCによるCpGの脱メチル化、CD30やp38MAPKの上流のMKK6のシグナルによりLuc活性が誘導された。Bisulfite modification解析の結果、HIV慢性感染細胞株とHIV transgenic mouse (HIV-Tg)の各臓器において、ウイルス遺伝子発現レベルとLTR U3領域のCpGメチル化の程度が相関した。TNF- $\alpha$ による慢性感染細胞株でのウイルス遺伝子発現誘導に伴い、U3領域のCpG脱メチル化が認められた。LPS処理によるHIV-Tg脾臓細胞でのウイルス遺伝子発現誘導に伴いU3領域の一ヶ所のCpG site (CREB/AP-1 motif内)で特異的に脱メチル化が進行した。

以上の結果は、CD30シグナルがCpGメチル化を介して潜伏しているHIVを再活性化する機構として、TRAF-p38MAPK-CREBの経路と未知のCpG脱メチル化経路の双方を介している可能性を示唆する。

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/p38MAPK pathway in reactivation of latent HIV

Ryouichi Horie<sup>1,2)</sup>, Akiko Yoneyama<sup>3)</sup> and Toshiki Watanabe<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Pathology, Institute of Medical Science, University of Tokyo, <sup>2)</sup> Department of Hematology, Internal medicine, Kitasato University School of Medicine, <sup>3)</sup> Department of Laboratory Medicine, <sup>4)</sup> Department of Infection Control and Prevention, Department of Infectious Diseases Graduate School of Medicine University of Tokyo

## 背景および目的

プロテアーゼ阻害剤を加えた多剤併用療法は AIDS 発症予防には有効だが、潜伏感染 HIV には無効であることが明かにされた<sup>1,4)</sup>。従って、潜伏感染 HIV の排除が根治的治療法の開発における重要課題である。細胞への感染後にウイルス遺伝子の発現が抑制され潜伏するのは HIV に限らず多くのウイルスに見られる基本的なライフサイクルである<sup>5)</sup>。HIV 感染後の転写抑制には、LTR のメチル化が関与していると考えられている<sup>6,7)</sup>。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<sup>8-10)</sup>。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- $\kappa$ 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<sup>11,12)</sup>。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<sup>13,14)</sup>。我々は昨年までの解析で、HIV LTR の転写が抑制されている潜伏感染のモデルにおいて、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 $\beta$  (NF-IL6) による HIV LTR の活性化を増強すること、更に CD30 による C/EBP $\beta$  (NF-IL6) の活性化には p38MAPK が関与していることを示した。この結果は、潜伏感染 HIV の再活性化において、NF- $\kappa$ 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。

現在、転写制御の機構は、DNA 結合蛋白である転写制御因子が p300/CBP や N-CoR 等の histone acetylase/deacetylase を動員し、ヒストンのアセチル化制御を介してクロマチンの構造を制御することが基本であると考えられている<sup>15,16)</sup>。一方、ゲノム DNA の CpG メチル化は、個体発生や細胞分化に伴う、制御された遺伝子発現の構造的基盤となっており、ウイルスの潜伏感染にも関与することが示唆されているが詳細は不明である<sup>17)</sup>。メチ

ル化 CpG は特異的結合蛋白質 MeCP2 の結合を介して遺伝子発現の stable repression をもたすが、この転写抑制複合体が mSin3A/HDAC と言う co-repressor-histone deacetylase から成る事が明らかになった<sup>18,19)</sup>。本研究の目的は、上記のような知見を背景に、HIV の潜伏感染における CpG メチル化の関与を明らかにするとともに、CD30 等のサイトカインシグナルによる再活性化の分子機構を明らかにすることを目的に、細胞外からのシグナルによる再活性化に関与する CpG 部位の同定とメチル化の制御を解析する。

## 材料および方法

プロモーター活性を検討する transient transfection assay の reporter gene としては HIV LTR-Luc を使用した。培養細胞は HIV 持続感染細胞株である U1, ACH2, Molt20-2 細胞株を用いた。染色体に組み込まれた HIV LTR のプロモーター活性を検討する stable transformant は我々が作成した、CEM 細胞株に HIV LTR-Luc プラスミドを Neomycin 耐性遺伝子発現ベクターとともにトランスフェクトして樹立した CEM/HIVLuc 細胞と Luciferase 遺伝子を組み込んだ HIV ベクターを感染して得られた CEM/HXNLuc, U937/HXNLuc 細胞を用いた。さらに岩倉教授らの作成した HIV トランスジェニックマウスの各臓器および脾臓細胞を用いた。CpG メチル化阻害薬として 5-Azacytidine、活性化刺激には TNF- $\alpha$  と LPS を用いた。感染細胞のウイルス遺伝子発現の検出は Northern blot 法を用い、LTR の CpG メチル化の解析には bisulfite modification sequencing 法を用いた。

## 結果

### 1. Transient reporter gene assay と染色体に組み込まれた HIV LTR のプロモーター活性の比較

HIV LTR のプロモーター活性を transient transfection の系と HIV LTR が染色体に組み込まれている stable transformant (CEM/HIVLuc, CEM/HXNLuc, U937/HXNLuc) で比較検討した。図 1 に示すように HIV LTR は CEM, Jurkat, U937 細胞での

transient transfectionでは高いプロモーター活性を示すが、CEMあるいはU937に由来する stable transformantではごく低い活性しか示さなかった。染色体に組み込まれたHIV LTRの活性が何らかの機序で抑制されていることが示された。(図1)

## 2. CpGメチル化とHIV LTRのプロモーター活性

CpGメチル化によるHIV LTRの活性抑制を実験的に検証するために、HIV LTR-Lucプラスミドを *in vitro* で SssI methylase を用いてメチル化してから、Jurkat細胞に導入して、非メチル化プラスミドを用いた場合と比較検討した。非メチル化プラスミドの場合、高い非刺激での基礎活性が認められたが、メチル化後導入した場合はLucの活性が100分の1以下に減少した。さらに、HIV TatあるいはTNF- $\alpha$ による活性化に対してもほとんど反応しないことが明らかになった。これらの結果はLTRのCpGメチル化が、プロモーターの基礎活性ばかりで無く種々の刺激に対する反応性も阻害することを示している。(図2)

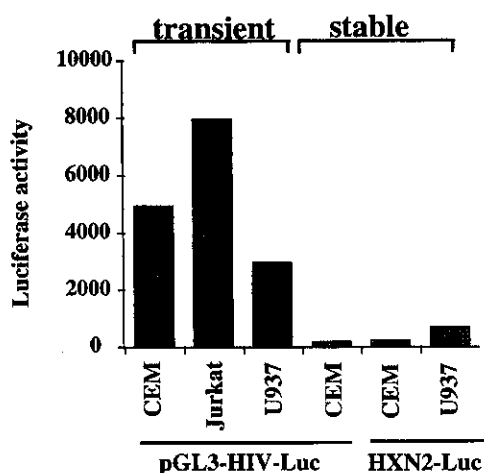


図1 Transient transfectionと染色体に組み込まれたHIV LTRの活性

Transient transfectionで導入されたHIV LTRと染色体に組み込まれているHIV LTRの活性の比較を行うために、pHIV LTR-LucとNeoを導入したCEM細胞、およびHIVベクター-HXNLucを導入したCEMおよびU937細胞を作成し、pHIV LTR-Lucのtransient transfectionによる結果と比較検討した。Transient transfectionではT細胞のCEM, Jurkatおよびマクロファージ系のU937いずれにおいても高い活性が認められた。これに対して、stable transformantでは数分の一から数十分の一の活性しか認められなかった。

## 3. CD30シグナルによる染色体に組み込まれたHIV LTRの活性化

CEM/HIVLuc細胞では基礎転写活性が抑制されているが、このクローンをメチル化阻害剤である5-AzaCで処理するとLuciferase活性が数倍に上昇する。この結果はこのクローンにおいては、LTRのプロモーター活性がCpGメチル化により抑制されていることを示唆する。このクローンにCD30からのシグナルを入れると、TNF- $\alpha$ で刺激した場合と同様に3~4倍の基礎活性の増加が認められた。また、MKK6を過剰発現させてp38MAPKを活性化することにより同様の現象が確認された。これらの結果は、染色体に組み込まれたHIVLTRのプロモーター活性がメチル化によって抑制されていること、TNF- $\alpha$ 及びCD30シグナル、特にp38MAPKがそのプロモーターを再活性化し得ることを示している(図3)。

## 4. 慢性感染細胞におけるウイルス遺伝子発現レベルとHIVLTRのメチル化の相関

ウイルス発現レベルの低い慢性感染細胞において、実際にHIV LTRのメチル化と発現レベルの相

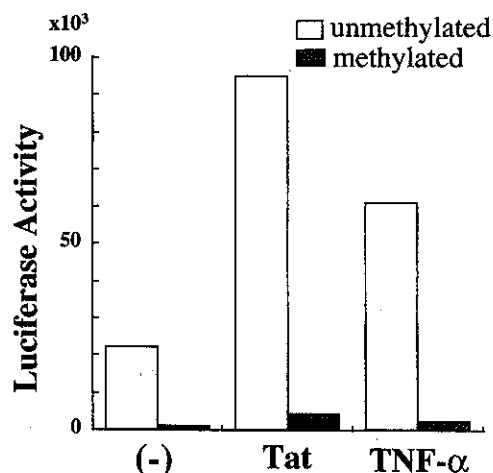


図2 HIV-LTR活性に対する *in vitro* CpGメチル化の影響

LTR活性のCpGメチル化による影響を検討するため、SssI methylaseを用いてpHIV LTR-Lucを *in vitro* でメチル化したのちにJurkat細胞にtransfectionを行い、非メチル化pHIV LTR-Lucを用いた場合と比較した。刺激を加えない基礎活性は、メチル化により約100の1に低下した。さらに、HIV TatあるいはTNF- $\alpha$ に対する反応性もほぼ同様に抑制された。メチル化プラスミドをtransfectionして観察された活性は、メチル化されなかった分子による活性と推測された。

関を検討した。ウイルス遺伝子発現レベルは mRNA を Northern blot で検討し、プロウイルスの LTR メチル化は Bisulfite modification sequence analysis で U3 領域の CpG について解析した。その結果、Northern blot でウイルス mRNA レベルの高い Molt20-2 のプロウイルスでは CpG メチル化レベルは発現レベルの低い ACH-2 細胞のプロウイルスに比べ、全体として明らかにメチル化レベルが低いことが示された(図 4)。

### 5. TNF- $\alpha$ による再活性化と CpG 脱メチル化

Molt20-2 細胞を用いて TNF- $\alpha$  刺激によるウイルス遺伝子の発現誘導と CpG のメチル化の変化を解析した。脱メチル化剤 5-AzaC を 2.5 $\mu$ M の濃度で加えて 3 日間にわたって観察したが、mRNA およびウイルスタンパク質 p24 の発現誘導は見られなかった。しかし、TNF- $\alpha$  の刺激によりウイルス発現が mRNA およびタンパク質レベルで顕著に発現が誘導された。(図 5, A, B) 5-AzaC 処理 3 日後にはほとんどの CpG が脱メチル化されていた。一方、

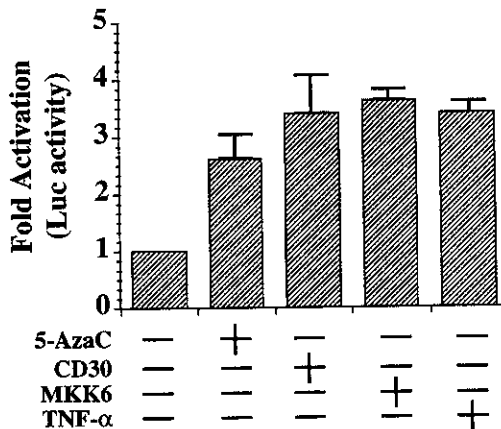


図 3 染色体に組み込まれた pHIV LTR-Luc をもつ CEM の stable transformant (CEM/HIVLuc) におけるプロモーターの活性化

Luciferase 活性はメチル化阻害剤 5-AzaC の処理で数倍に活性化された。CD30 の過剰発現による刺激でも TNF- $\alpha$  による刺激と同程度(3~4 倍)の活性化が認められた。MKK6 の導入による p38MAPK の活性化によってもほぼ同程度の誘導が認められた。染色体に組み込まれた LTR が CpG メチル化によって活性が抑制されていること、CD30 や TNFR を介した TRAF protein からのシグナル特に p38MAPK の活性が、プロモーターの再活性化に関与していることが示唆された。

TNF- $\alpha$  刺激においても 3 日後にはほとんどの CpG site で脱メチル化が認められた(図 5, C)。これらの結果は、TNF- $\alpha$  のシグナルが転写再活性化のみならず、CpG の脱メチル化をもたらすことを示しものと考えられる。

### 6. HIV-Tg マウスの各臓器におけるウイルス遺伝子発現と LTR のメチル化

LTR の CpG メチル化とウイルス遺伝子の発現の相関が、HIV-Tg マウスの固体レベルにおいても認められるかどうかを検討した。マウスの各臓器におけるウイルス遺伝子の発現を Northern blot 法で解析したところ、ウイルス遺伝子は骨格筋と皮膚以外の臓器ではほとんど発現していないことが明らかになった(図 6, A)。LTR の CpG メチル化を解析したところ、発現のない脾臓細胞では解析領域内のすべての CpG がメチル化されていたが、ウイルスの発現している骨格筋及び皮膚では一部の CpG が脱メチル化していることが明らかになった(図 6, B)。従って、LTR の CpG メチル化とウイル

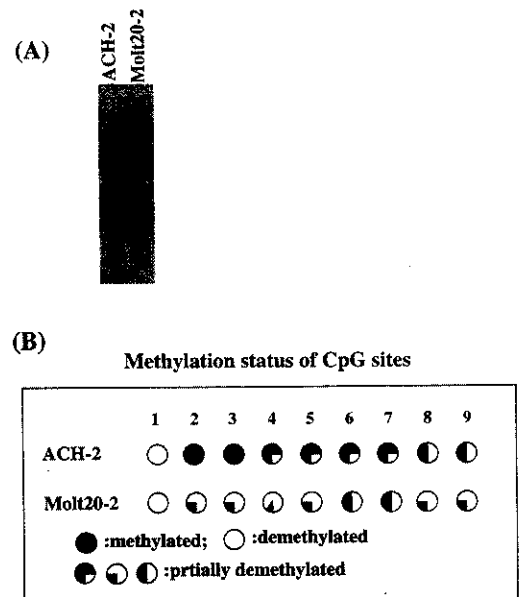


図 4 HIV 慢性感染細胞株におけるウイルス遺伝子発現と HIV LTR の CpG メチル化

HIV の慢性感染細胞 ACH2 および Molt20-2 細胞ではウイルス mRNA が低レベルに発現している(A)。これらの細胞に組み込まれている HIV の LTR の CpG のメチル化を bisulfite modification 法および direct sequence によって解析した。9 つの CpG site のメチル化の程度 (methylation density) は mRNA のレベルと相関した (B)。

ス遺伝子の発現レベルの逆相関が HIV-Tg マウスの臓器においても確認された。

## 7. LPS投与によるHIV-Tgマウス脾臓細胞でのウイルス遺伝子再活性化とCpGメチル化

岩倉らにより、HIV-Tg マウスはLPS投与により72時間後をピークにウイルスの発現が誘導されることが示されている。そこで、LPS投与前と問う予後72時間で脾臓を摘出し、ウイルス遺伝子の発現をNorthern blot法で検討し、同時に HIV LTR のCpGメチル化をdirect sequencingによるbisulfite modification法で解析した。各々2個体を用いて解析したが、いずれもLPS投与により72時間後にウ

イルスmRNAの発現が強く誘導されていることが確認された(図7, A)。LTRのU3領域に存在する8ヶ所のCpGは、未処理の段階では全てメチル化されていたが、LPS処理後はそのうち4ヶ所で一部脱メチル化認められることが明らかになった(図7, B)。これらの結果は、*in vivo*においても、ウイルス遺伝子の発現の抑制とCpGのメチル化が相関すること、さらに遺伝子発現が認められる場合は少なくとも一部のCpGの脱メチル化が認められることを示している。

## 8. LPS処理により脱メチル化が誘導される部位の解析

CpGメチル化による遺伝子発現抑制は、一般にプロモーター領域等のCpGのメチル化のdensity(頻度)に依存するとされている。HIV-Tgにおけるウイルス遺伝子発現の再活性化の系においても同様の議論が適応出来るかどうかを検討するため、我々はHIV LTR U3領域の個々のCpGのメチル化レベルを詳細に検討することにした。この目的のため、direct sequence法ではなく、PCR産物をTAクローニング法でプラスミドにクローニングし、個々のクローンの塩基配列を明らかにした。図8に示すように、LPS未処理検体で15クローン、処理後の検体について25クローンの塩基配列を決定した。その結果、U3のCpGは大部分がメチル化去れたままであるのに対し、特定の一ヶ所のみが40%の頻度で脱メチル化していることが示された。この部位の塩基配列をコンピュータ解析したところ、これまで報告されていないcyclic AMP responsive element (CRE) およびAP-1の結合配列が重複している配列であることが明らかになった。岩倉らがこのマウスにおけるウイルスの再活性化にはp38MAPKが必須であると報告していること、別の系では有るが、先に示したように、我々もp38MAPKを活性化するCD30あるいはMKK6が潜伏ウイルスの再活性化可能を持つこと、CREB/ATFファミリーの転写因子は代表的なp38MAPKの標的分子であること等を考え合わせると、この結果は、潜伏ウイルスの再活性化にp38MAPKが重要な役割を果たしている可能性を示すものと思われる。

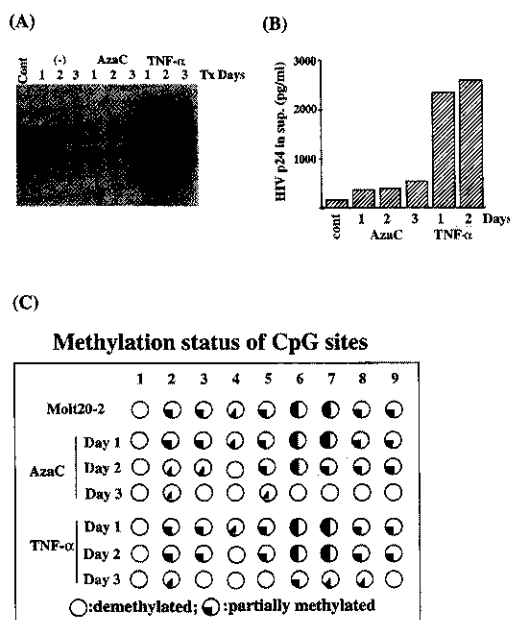


図5 TNF- $\alpha$ による慢性感染細胞のHIV再活性化とCpG脱メチル化

molt20-2細胞を用いてウイルス再活性化とCpGメチル化の制御の関係を検討した。ウイルス遺伝子の発現をNorthern blot法で検討すると、メチル化阻害剤(2.5 $\mu$ M)の単独処理では3日後まで観察しても発現誘導は認められなかったが、TNF- $\alpha$ (10 $\mu$ g/ml)の処理では翌日から強い発現誘導が認められた(A)。培養上清中のウイルスをp24 ELISAキットで測定したところ、mRNAと同様にTNF- $\alpha$ 処理では翌日から2ng/ml以上の強い誘導が認められたが、5-AzaCの単独処理ではほとんどウイルスの誘導が認められなかった(B)。LTRのU3領域のCpGのメチル化レベルをbisulfite modification法およびdirect sequencingで経時的に解析したところ、個々のCpGによりばらつきはあるものの、5-AzaC処理2日目では一部、3日ではほとんどの部位が脱メチル化していた。TNF- $\alpha$ 刺激を加えた場合もほぼ同様に2日目では一部の部位、3日目では全体に著しい脱メチル化が認められた(C)。

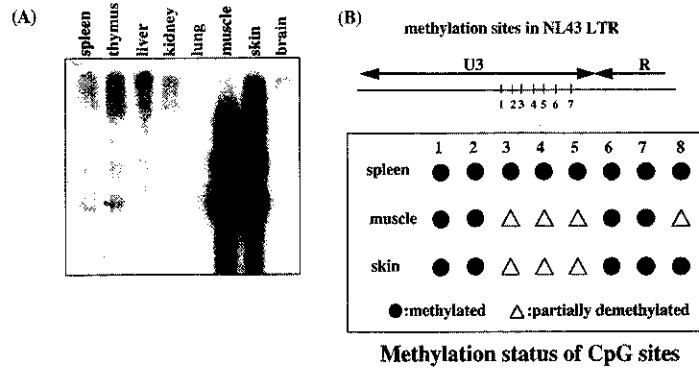
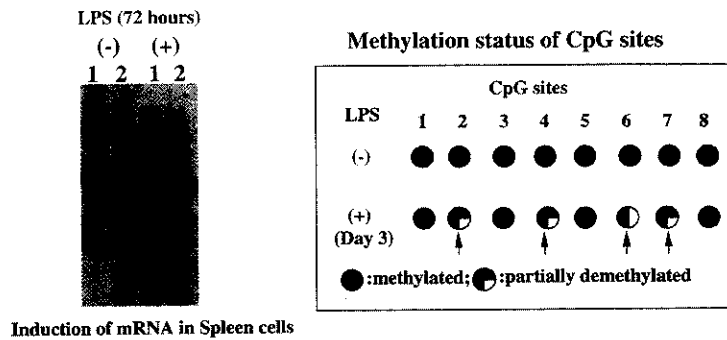


図6 HIV-Tg マウスの各臓器におけるウイルス遺伝子の発現と LTR のメチル化

岩倉らが作成した HIV のトランスジェニック (HIV-Tg) マウスを用いて各臓器のウイルス遺伝子発現を Northern blot 法で解析した結果、骨格筋及び皮膚以外の臓器ではほとんどウイルスの発現が検出されなかった (A)。発現の見られない脾臓と発現している筋肉及び皮膚の LTR の CpG メチル化を bisulfite modification 法および direct sequencing で解析したところ、脾臓では 8 個の CpG site すべてがメチル化されていたのに対して、皮膚及び筋肉では一部の CpG が部分的に脱メチル化していた (B)。



Induction of mRNA in Spleen cells

図7 LPS 投与による HIV-Tg マウス脾臓細胞でのウイルス遺伝子発現誘導と CpG メチル化の変化(1)

非刺激 HIV-Tg マウスと LPS 投与 HIV-Tg マウス各々 2 個体の脾臓におけるウイルス遺伝子の発現を Northern blot 法で解析した。LPS 投与 72 時間後に明らかなウイルス mRNA の発現誘導が認められる (A)。それぞれの脾臓細胞における LTR の CpG メチル化の bisulfite modification 法および direct sequencing による解析結果 (B)。LPS 投与マウスでは一部の CpG site で部分的な脱メチル化が認められる (B)。

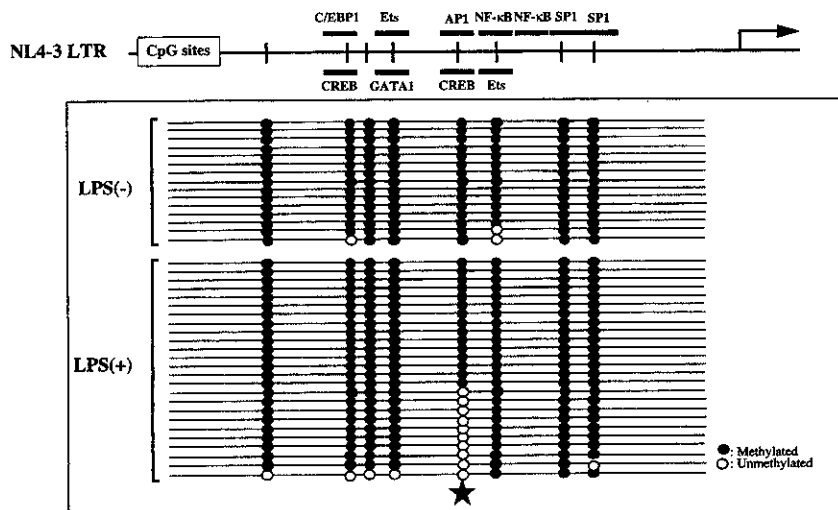


図8 LPS 投与による HIV-Tg マウス脾臓細胞でのウイルス遺伝子発現誘導と CpG メチル化の変化(2)

脱メチル化の部位とその程度を詳細に検討するため、bisulfite modification 後の PCR 産物をプラスミドにクローニングして、個々のクローンの解析を行った。その結果 1 ヶ所の CpG site が特異的に強く脱メチル化が進行することが明らかになった。この CpG site の存在する部位の塩基配列は CREB 結合配列と AP-1 結合配列が重複していることが明らかになった。

## 考察および結論

これまで我々はCD30の潜伏感染HIVの再活性化における役割を検討し、NF- $\kappa$ Bとp38MAPK-NF-IL6を活性化するCD30/TRAF2、5のシグナル伝達系の意義を明らかにして来た。本研究ではさらに、潜伏感染=ウイルス遺伝子発現の抑制におけるCpGメチル化の意義を明らかにした。また、再活性化とCpGメチル化の制御について検討し、細胞外からのTNF- $\alpha$ やLPSと言うウイルスの再活性化能を持つサイトカインあるいは mitogen からのシグナルが、ウイルス遺伝子の発現誘導と同時にCpGの脱メチル化を誘導することを見出した。stable transformantでの再活性化誘導がTNF- $\alpha$ あるいは5-AzaC処理に匹敵することから、CD30のシグナルが同様の機能を持つことが強く示唆された。従って、CD30のシグナルは何らかの機序を介してCpGの脱メチル化を誘導すると同時に、TRF2/5の下流でのp38MAPK-CREB/ATF経路の活性化によりウイルス遺伝子の再活性化をもたらす可能性が明らかになった(図9)。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。

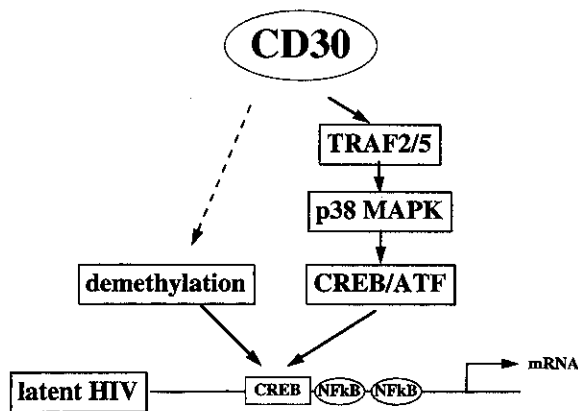


図9 まとめ

本研究により、CD30からのシグナルは染色体に組み込まれたHIVを再活性化し得ることが示された。実験結果から示唆された機構は以下のものである。CD30を含むTNFRファミリーからのシグナルがメチル化CpGの脱メチル化を誘導するとともに、TRAFタンパク質を介したp38MAPK-CREB/ATFファミリー転写因子の活性化経路が作用してLTRを活性化するというものである。

## 参考文献

- 1) Finzi D, Blankson J, Siliciano JD, Margolick JB, Chadwick K, Pierson T, Smith K, Lisziewicz J, Lori F, Flexner C, Quinn TC, Chaisson RE, Rosenberg E, Walker B, Gange S, Gallant J, Siliciano RF. Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat Med*. 5: 512-517, 1999.
- 2) Chun TW, Stuyver L, Mizell SB, Ehler LA, Miccan JA, Baseler M, Lloyd AL, Nowak MA, Fauci AS. Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Nov 25; 94(24): 13193-7.
- 3) Wong JK, Hezareh M, Gunthard HF, Havlir DV, Ignacio CC, Spina CA, Richman DD. Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. *Science* 278: 1291-1295, 1997.
- 4) Finzi D, Hermankova M, Pierson T, Carruth LM, Buck C, Chaisson RE, Quinn TC, Chadwick K, Margolick J, Brookmeyer R, Gallant J, Markowitz M, Ho DD, Richman DD, Siliciano RF. Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science* 278: 1295-1300, 1997.
- 5) Li XD, Moore B, Cloyd MW. Gradual shutdown of virus production resulting in latency is the norm during the chronic phase of human immunodeficiency virus replication and differential rates and mechanisms of shutdown are determined by viral sequences. *Virology* 225: 196-212, 1996.
- 6) Bednarik DP, Mosca JD, Raj NB. Methylation as a modulator of expression of human immunodeficiency virus. *J Virol* 61: 1253-1257, 1987.
- 7) Bednarik DP, Cook JA, Pitha PM. Inactivation of the HIV LTR by DNA CpG methylation: evidence for a role in latency. *EMBO J* 9: 1157-1164, 1990.
- 8) Smith, C.A., Farrar, T., and Goodwin, R.G. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 76, 959-962, 1994.
- 9) Bazzoni, F. and Beutler, B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *New Eng J Med* 334, 1717-25, 1996.
- 10) Horie R, Watanabe T. CD30: Expression and

- function in health and disease. *Sem Immunol*, 10: 457-470, 1998
- 11) 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.
  - 12) Song HY, Régnier CH, Kirschning CJ, et al., Tumor necrosis factor (TNF)-mediated kinase cascades: Bifurcation of nuclear factor- $\kappa$ 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.
  - 13) 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..
  - 14) 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.
  - 15) Pazin MJ and Kadonaga JT. What's up and down with histone deacetylation and transcription? *Cell* 89: 325-328, 1997.
  - 16) Wolffe AP. Sinful repression. *Nature* 387: 16-17, 1997
  - 17) Razin A . CpG methylation, chromatin structure and gene silencing-a three-way connection. *EMBO J* 17: 4905-4908, 1998.
  - 18) Jones, P. L., G. J. Veenstra, P. A. Wade, D. Vermaak, S. U. Kass, N. Landsberger, J. Strouboulis, and A. P. Wolffe. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat. Genet.* 19: 187-191, 1998.
  - 19) Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393: 386-389, 1998.





## HIVRNA定量法の検討 —アンプリコアHIV-1モニターver1.0と ver1.5の比較及び高感度法の検討—

吉原なみ子<sup>1)</sup>、福嶋 浩一<sup>1)</sup>、岡 慎一<sup>2)</sup>

1) 国立感染症研究所エイズ研究センター

2) 国立国際医療センター エイズ治療・研究開発センター

### 研究要旨

サブタイプB以外のサブタイプにも対応できるアンプリコアHIV-1モニターver1.5の検討を行った。既存のアンプリコアHIV-1モニターver1.0と比較したところサブタイプBの検体ではバージョン間での差は見られなかったが、サブタイプEの検体ではver1.5で5～10倍高値となり、アンプリコアHIV-1モニターver1.5の使用によりサブタイプの違いによる測定値の差については解消されるものと思われる。超遠心を用いた高感度法では今回測定した261検体のうち約20%が定量でき標準法で検出限界以下であった検体でも、高感度法を利用することで従来よりも広い範囲でウイルスの動態を追うことが可能であることが示された。一方、400copies/ml以上を示した検体も高感度法の測定値は標準法の値と一致したが、高感度法の検出上限(75000copies/ml)以上では低値または、測定不能となるケースがあった。したがって、高感度法はRNA量の多い時期の測定には不向きと思われる、このことを考慮して標準法と高感度法を使い分ける必要がある。

アンプリコアHIV-1モニターver1.5によるHIVRNAの定量はサブタイプの影響が少なくなり、より正確なウイルス量を知る方法として有効である。更に高感度法を併用することで、広い範囲でウイルスのモニタリングが可能であった。

分担研究者：岡 慎一

研究協力者：吉原なみ子、福嶋浩一

### Comparison between version 1.0 and version 1.5 of Amplicor HIV-1 Monitor test kit and evaluation of ultrasensitive assay

Namiko Yoshihara<sup>1)</sup>, Koichi Fukushima<sup>1)</sup> and Shinichi Oka<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>AIDS Research Center, National Institute of Infectious Disease, <sup>2)</sup>AIDS Clinical Center, International Medical Center of Japan

## 目的

現在HIVRNAの定量に広く使われているアンプリコア HIV-1 モニター ver1.0 は、用いているプライマーの配列からサブタイプB以外のサブタイプでは実際のウイルス RNA よりも少ない値となることが指摘されている。

今回我々は、プライマーペアを変更したアンプリコア HIV-1 モニター ver1.5 を用いて血漿中の HIVRNA を定量し、従来のバージョン (ver1.0) と比較した。

また50copies/ml以上の感度が得られる高感度法についての検討も行った。

## 研究対象と方法

サブタイプBまたはサブタイプEの血漿をアンプリコア HIV-1 モニター ver1.0 と ver1.5 で測定し比較した。また、ver1.5では国立国際医療センターより提供された RNA 量が少ないと思われる HIV-1 感染者血漿 261 検体を高感度法で測定した。

高感度法の操作手順：血漿 500 $\mu$ l (標準法では 200 $\mu$ l) を 1.5ml 遠心チューブに入れ 16400rpm (26461G)、4 $^{\circ}$ C で1時間超遠心後、上清を取り除いた。これに調整済みの Lysis Reagent を 600 $\mu$ l 加え攪拌、室温で10分間反応させた。イソプロピルアルコール 600 $\mu$ l を加え、15000rpm で 15分間遠心、上清を除き 70%エタノール 1ml で洗浄を行った。さらに遠心、上清除去後に得られた沈殿物を Specimen Diluent 100 $\mu$ l (標準法では 400 $\mu$ l) で溶解し、このうち 50 $\mu$ l を PCR に用いた (図1)。

増幅反応は 50 $^{\circ}$ C、2分間反応させた後 60 $^{\circ}$ C、30分間の逆転写反応で標的 RNA から cDNA を合成させた。PCR による逆転写された cDNA の増幅は 95 $^{\circ}$ C、10秒間、52 $^{\circ}$ C、10秒間、72 $^{\circ}$ C、10秒間を 8 サイクル、その後、90 $^{\circ}$ C、10秒間、55 $^{\circ}$ C、10秒間、72 $^{\circ}$ C、10秒間で 23 サイクルで行った。

PCR 反応後、モニター変性試液を加え増幅産物を 1本鎖 DNA にアルカリ変性させた。これを HIV-1 用 DNA プローブまたは定量標準用 DNA プローブの固相化されたマイクロウェルに加えハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後は酵素による発色反応を行い、各ウェルの吸

光度を測定した。

得られた HIV-1RNA と定量標準用 RNA の吸光度から 1ml 当たりの HIV-1RNA 量を求めた。

## 研究結果及び考察

### 1. アンプリコア HIV-1 モニター ver1.0 と ver1.5 の比較

サブタイプ B では回帰係数  $r=0.863$  であり、ver1.0 と ver1.5 の間で測定値の差は見られなかった (図2)。したがってサブタイプ B についてはアンプリコア HIV-1 モニター ver1.5 のプライマー変更による影響は見られないと思われる。一方、サブタイプ E では検体によりばらつきがあり、ver1.0 の誤差範囲と思われる程度の変化しか見られない検体 (検体 ID5290、10426 等) もあったが、大きな変化のある検体 (検体 ID7044、Y1 等) では測定値が 5~10 倍高くなる傾向が見られた (図3)。したがってサブタイプ E の検体についてはアンプリコア HIV-1 モニターのプライマーの変更により正しく測定することが可能となった。

### 2. 高感度法の検討

400 コピーの検出限界以下の検体を  $n=6$  で測定したところ、検体「25」では平均が 289copies/ml (対数変換値 2.34) で SD% が 4.2、検体「45」では平均が 264copies/ml (対数変換値 2.45) で SD% 12.2% であった (表1)。これは標準法と変わらない程度のばらつきであり、高感度法により遠心等の新たな操作が加わっても測定の精度は変わらないことが分かった。

RNA 量が少ないと思われた 261 検体を高感度法で測定した結果を表2に示す。400copies/ml 以上は 17 検体 (7%)、50copies/ml 以上 400copies/ml 未満は 43 検体 (16%)、50copies/ml 未満は 201 検体 (77%) であった。400copies/ml 以上となった検体を標準法でも測定し相関を見たところ相関係数  $r=0.795$

表1 アンプリコア HIV-1 モニターの再現性

検体 ID	n	平均 Log [HIV RNA copies/ml]	SD%
25	6	2.34	4.2
45	6	2.45	12.2

であり標準法と高感度法とで測定値に大きな差は見られなかった。(図4)しかし標準法での測定値が $10^5$ copies/ml以上となった検体が2検体あり、これらは高感度法では1検体は測定限界(75000copies/ml)以上で検出不能となり、残りの1検体は約1/4低い値を示した。以上のことから高感度法は検出感度の上限である75000copies/ml以上では測定値の信頼性に問題があると思われる。

今回測定した検体の約8割は高感度法でも検出限界以下であった。これはサンプリングにかたよりがあったことを考慮しても、多くの患者が治療の効果によって血中のHIV-1RNA量が抑えられていることがうかがえる。なお、これら検出限界以下の症例については50copies/ml以下のウイルス量を測定する必要があるかどうかは今後、臨床経過をふまえて検討すべきであろう。

表2 高感度法による定量結果

	検体数 (%)
400 copies/ml 以上	17 (7%)
50 - 400 copies/ml	43 (16%)
50 copies/ml 未満	201 (77%)
合計	261

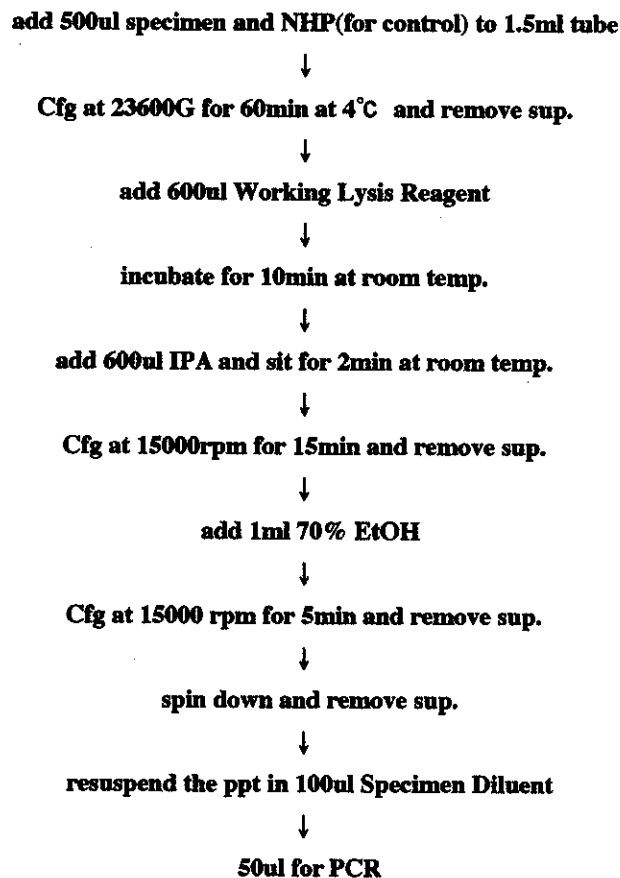


図1 アンプリコアHIV-1 モニター高感度法の抽出操作

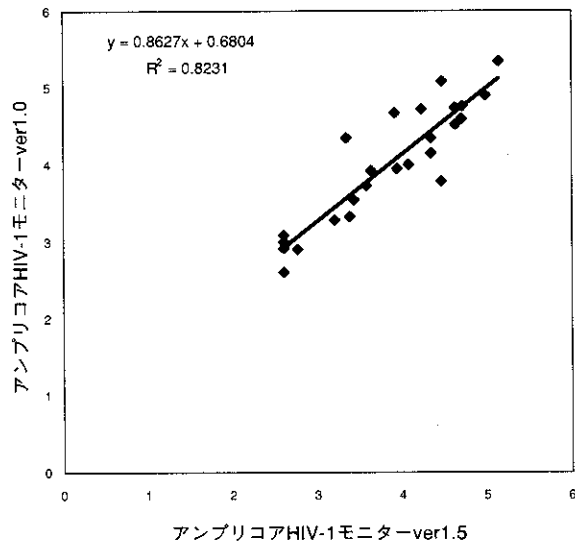


図2 アンプリコア HIV-1 モニターのバージョンによる比較 (サブタイプ B)

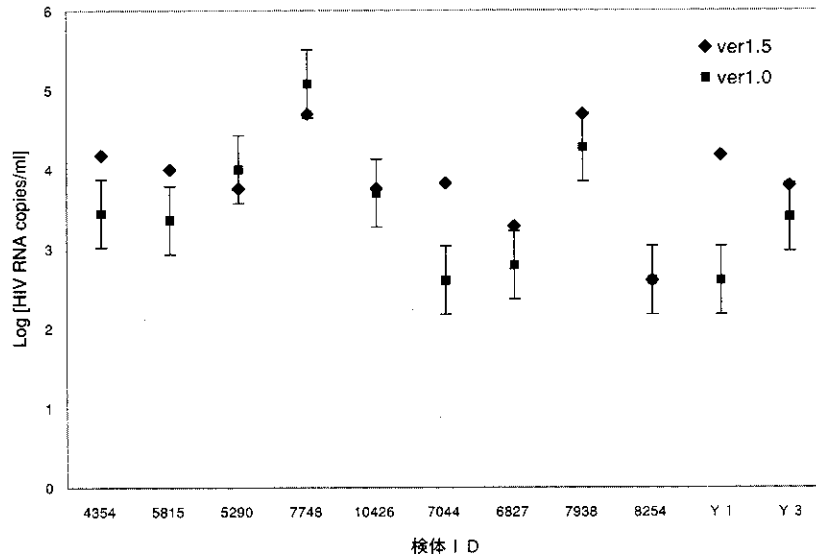


図3 アンプリコア HIV-1 モニターのバージョンによる比較 (サブタイプ E)

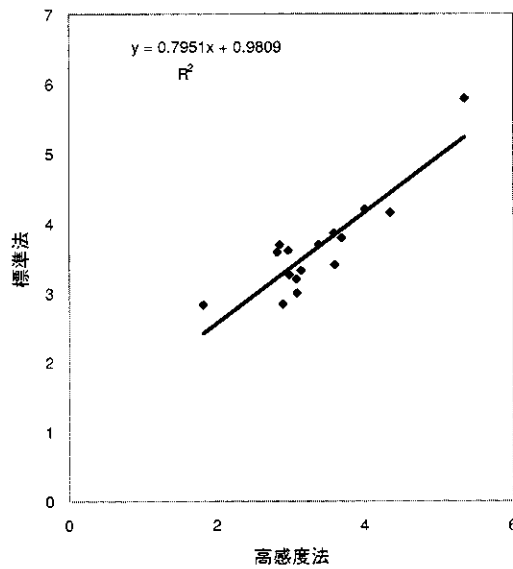


図4 400copies/ml 以上における標準法と高感度法の測定値の関係