

Fig3 血清中 HAV RNA の検出
 ○● : sampling point
 ● : HAV RNA 陽性
 ○ : HAV RNA 陰性
 0 日 : 急性肝炎症状発症日

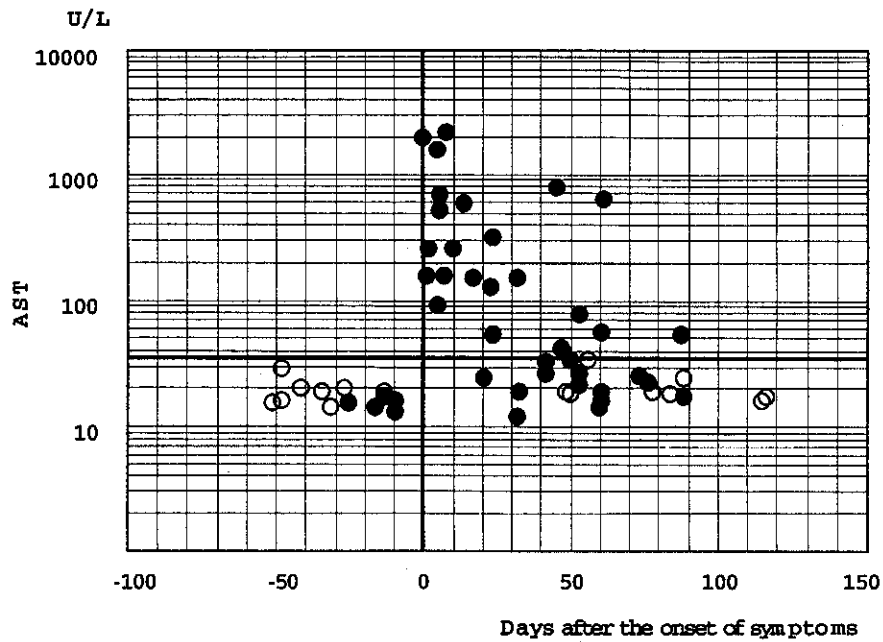


Fig4 AST 値と HAV RNA の有無の相関
 ● : HAV RNA 陽性
 ○ : HAV RNA 陰性
 0 日 : 急性肝炎症状発症日

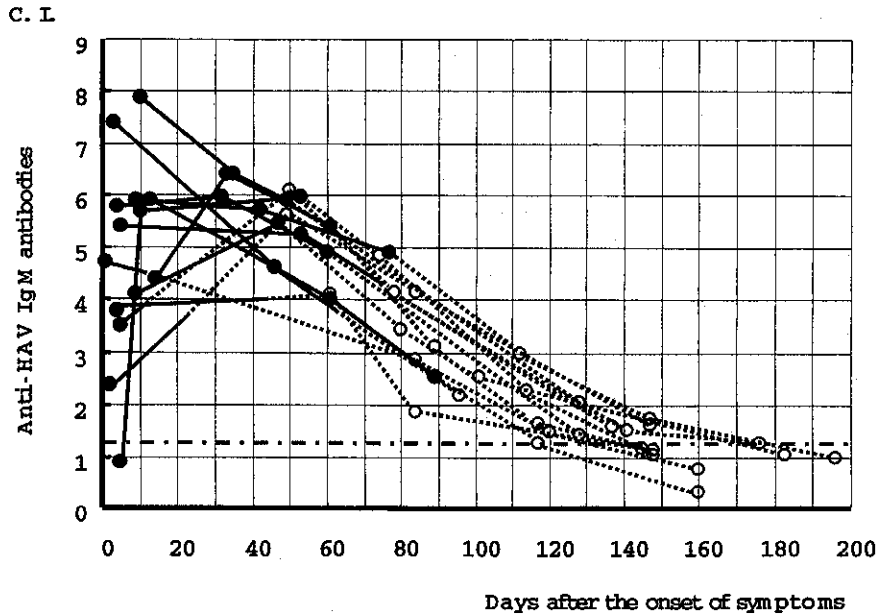


Fig5 血中抗HAV IgM抗体推移とHAV RNAの有無
 — : HAV RNA 陽性期間
 - - - : HAV RNA 陰性期間
 0日 : 急性肝炎症状発症日

考 察

HAVの排泄、viremiaのピークは発症前後であり¹⁸⁾、自然感染した免疫不全のない大人では高感度のNested PCR法を用いても短期間の間にウイルスが血中から証明されなくなる事が報告されている。自然感染者に於けるviremiaの期間は藤原らによれば¹⁰⁾18日と報告され、四柳らの報告では発症後20日前後には患者10例のうち9例からはHAV RNAが検出されてなくなっている¹¹⁾。しかし経口感染ではなくintravenous drug abuser²⁶⁾、血液製剤によるhemophilia患者での報告では藤原等の報告よりもviremiaの期間は長い。今回我々の検討ではホモセクシャルのHIV感染者でA型肝炎の発症者でもっとも長い患者では89日以上にわたってHAV RNAが血清中に検出された。血清中のRNA陽性期間は平均41.6日と計算され、ホモセクシャルのHIV感染者においては、今までの非HIV感染者の経口自然感染者よりも長期間に渡って血中にRNAが検出された。糞便中には血液中の10~1000

倍のHAVが存在し¹⁶⁾、血液中よりも長期間にわたってHAV RNAが検出される事からHIV感染者の糞便中には長期間に渡りHAV RNAが排泄されている可能性を含んでいる¹⁹⁾。このために長期間にわたってHAVのoutbreakが持続しているのかもしれない。発症後60日目⁹⁾、114日目¹⁰⁾にA型肝炎が再燃したHIV非感染者の報告もあるが、HIV感染者ではHAV RNAが長期間にわたって検出されたが肝機能異常の再燃が認められた患者は22名中1名のみであった。A型肝炎の発症機序はHAVの直接的な肝傷害ではなく主としてCTLによる免疫反応が関与する肝細胞傷害であると言われて^{22,23)}が、免疫不全がHAV RNAの存続期間へ与える影響については報告がない。HAVワクチンは有効であるが^{20,21)}、HIV感染者においてはHAVワクチンに対する反応性がCD4数依存性に弱い事が報告され^{15,24)}、HIV感染者ではHCV肝炎、HBV肝炎は慢性化しやすいという報告がある。HIV感染者において長期間にわたって血中にHAVが検出されるのは、免疫機能異常が関与している可能性

がある。HIV感染によってHAVが排除されにくくなっているのかもしれない。

B型、C型肝炎ウイルスの感染や薬物障害のないHIV感染HAV患者でAST値に異常が認められる全ての血中からHAV RNAが検出されたことは新しい知見である。

急性期を過ぎAST、ALT値が正常化した後もHAV RNAが検出された。肝機能異常はHAV RNA陰性化のマーカーとならないと考えられた。抗HAV IgMの陰性化はHAV RNA陰性化のマーカーとなりうることが示唆された。

若年者層にHAV同一株によるA型肝炎が蔓延し、短期間の間に新たな感染者が高率に認められたが、このような個人的な密度の高い接触がHIVの伝播拡大の素地となることが考えられた。日本のような高度に衛生環境が整い若年層における抗体保有率の低い国においては²⁷⁾、ハイリスクグループへの積極的なA型肝炎ワクチンの投与が推奨されると考えられた。

結 論

ホモセクシャルのHIV感染者にA型肝炎のoutbreakを引き起こしたウイルスは系統樹上で同一のクラスターを形成し、1A型のHAVであった。HIV感染者では血中にウイルスが検出される期間は平均41.7日で非HIV感染者において報告されている18日より長く検出された。AST値が異常な全ての検体からはHAV RNAが検出され、AST値が正常化した後にも22検体のうち14検体から検出された。HAV RNAが検出されなくなってからanti HAV IgM抗体は陰性化した。

参考文献

- 1) Niu MT, Polish LB, Robertson BH, et al.: Multi-state outbreak of hepatitis A associated with frozen strawberries. *J Infect Dis* 1992, 166: 518-524.
- 2) Hutin YJ, Pool V, Cramer EH, et al.: A multi-state, food-borne outbreak of hepatitis A. *N Engl J Med* 1999, 340: 595-602.
- 3) Corey L, Holmes KK: Sexual transmission of hepatitis A in homosexual men. Incidence and mechanism. *N Engl J Med* 1980, 320: 435-438.
- 4) Kani J, Nandwani R, Gilson RJC, et al.: Hepatitis A virus infection among homosexual men. *Br Med J* 1991, 302: 1399.
- 5) Anonymous: Hepatitis A vaccination of men who have sex with men-Atlanta, Georgia, 1996-1997. *Morbidity and Mortality Weekly Rep* 1998, 47: 708-711.
- 6) Rosenblum LS, Villarino ME, Nainan OV, et al.: Hepatitis A outbreak in a neonatal intensive care unit: risk factors for transmission and evidence of prolonged viral excretion among pre-term infants. *J Infect Dis* 1991, 164: 476-482.
- 7) Mannucci PM, Gdovin S, Gringeri A, et al.: Transmission of hepatitis A to patients with hemophilia by factor VIII concentrates treated with organic solvent and detergent to inactivate viruses. *Ann Intern Med* 1994, 120: 1-7.
- 8) Chudy M, Budek I, Keller-Stanislawski B, et al.: A new cluster of hepatitis A infection in hemophiliacs traced to a contaminated plasma pool. *J Med Virol* 1999, 57: 91-99.
- 9) Yotsuyanagi H, Koike K, Yasuda K, et al.: Prolonged fecal excretion of hepatitis A virus in adult patients with hepatitis A as determined by polymerase chain reaction. *Hepatology* 1996, 24: 10-13.
- 10) Fujiwara K, Yokosuka O, Ehata T, et al.: Frequent detection of hepatitis A viral RNA in serum during the early convalescent phase of acute hepatitis A. *Hepatology* 1997, 26: 1634-1639.
- 11) Yotsuyanagi H, Iino S, Koike K, Yasuda K, Hino K, Kurokawa K: Duration of viremia in human hepatitis A viral infection as determined by PCR. *J Clin Microbiol* 1997, 35: 35-38.
- 12) Polish LB, Robertson BH, Khanna B, et al.: Excretion of hepatitis A virus (HAV) in adults: Comparison of immunologic and molecular detection methods and relationship between HAV positivity and infectivity in Tamarins. *J Clin Microbiol* 1999, 37: 3615-3617.
- 13) Kojima T., Tachikawa N., Yoshizawa S., et al.: Hepatitis A virus outbreak; a possible indicator of high risk sexual behavior among HIV-1 infected homosexual men. *Jap J Infect Dis* 1999, 52: 173-174.
- 14) Robertson BH, Jansen RW, Khanna B. et al.: Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographic regions. *J Gen Virol* 1992, 73: 1365-1377.
- 15) Stapleton JT: Host immune response to hepatitis A virus. *J Infect Dis* 1995, 171 (Suppl 1): S9-14.
- 16) Robinson W: Hepatitis A. In: *Infectious Diseases*. Edited by Hoeprieh PD. Philadelphia: Harp-

- er & Row; 1983: 705-713.
- 17) Zukerman JN, Zuckerman A: Hepatitis A. In: Infectious Diseases. Edited by Armstrong D, Cohen J. London: Harcourt Publishers; 1999: 8.4.1-8.4.4.
 - 18) Krugman S, Eard R, Giles JP: The natural history of infectious hepatitis. *Am J Med* 1962, 32: 717-728.
 - 19) Grinde B, Stene-Johansen K, Sharma B, Hoel T, Jensenius M, Skaug K: Characterisation of an epidemic of hepatitis A virus involving intravenous drug abusers; infection by needle sharing? *J Med Virol* 1997, 53: 69-75.
 - 20) Bruce L, Snitbhan R, Kunasol P, et al.: Protection against hepatitis A by an inactivated vaccine. *JAMA* 1994, 271: 1328-1334.
 - 21) Iwarson S: New target groups for vaccination against hepatitis A: homosexual men, injecting drug users and patient with chronic hepatitis. *Scand J Infect Dis* 1998, 30: 316-318.
 - 22) Vallbracht A, Gabriel P, Maier K, Hartmann F, Fleming B: A cell mediated cytotoxicity in hepatitis A virus infection. *Hepatology* 1986, 6: 1308-1314.
 - 23) Vallbracht A, Maier K, Stierhof YD, Wiedmann KH, Flehming B, Fleischer B: Liver-derived cytotoxic T cells in hepatitis A virus infection. *J Infect Dis* 1989, 160: 209-217.
 - 24) Neilsen GA, Bodsworth NJ, Watts N: Response to hepatitis A vaccination in human immunodeficiency virus-infected and uninfected homosexual men. *J Infect Dis* 1997, 176: 1064-1067.
 - 25) Kao HW, Ashcavai M, Redeker AG: The persistence of hepatitis A IgM antibody after acute clinical hepatitis A. *Hepatology* 1984, 4: 933-936.
 - 26) LOUIS B. Polish, et al: Excretion of Hepatitis A Virus in Adults: Comparison of Immunologic and Molecular Methods and Relationship between HAV Positivity and Infectivity in Tamarins. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999, 37: 3615-3617
 - 27) Kiyohara T. et al: The latest seroepidemiological pattern of hepatitis A in Japan. *JJMSB* 1997, 50: 123-131

謝 辞

患者血清を分与いただいた矢野右人博士、大黒学博士に感謝いたします。

分担研究報告書

D. 日和見合併症の病態とそのモニタリング



カポジ肉腫、キャッスルマン病合併AIDS患者におけるKSHV/HHV-8感染の病態解析

吉崎 和幸¹⁾、西本 憲弘¹⁾、宋 健¹⁾、松本 智成¹⁾、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)とも呼ばれる腫瘍原性を有するガンマヘルペス属のウイルスであり、AIDS患者におけるカポジ肉腫、Multicentric Castleman's Disease (MCD)あるいはbody cavity-based lymphoma (BCBL)と疫学的な関連が報告されている。HHV-8ウイルスに特徴的なことはウイルスゲノムにはヒトIL-6 (hIL-6)と相同性の高い遺伝子が含まれており、そのコードするタンパク(vIL-6)はhIL-6と同様の作用を有する。

そこで、我々は、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、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すことを示した。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複製およびhIL-6の分泌を促進することを示した。以上のことがHHV-8感染HIV患者において、これらHIVおよびHHV-8ウイルスがhIL-6およびvIL-6を介して相互作用するという仮説をたてた。さらにこの仮説を実証するため、本年度はhIL-6によるHHV-8ウイルスの複製能ならびにvIL-6産生能を検討した。HHV-8ウイルスの複製は、ウイルス複製初期に発現する蛋白質K5のモノクローナル抗体を用いて免疫組織染色ならびにWestern blottingにて評価した。また、我々は抗vIL-6モノクローナル抗体を作成し、hIL-6によるHHV-8感染細胞株であるBCBL-1細胞のvIL-6産生能を免疫組織化学染色ならびにWestern blottingによる蛋白質定量解析をおこなった。その結果hIL-6によるHHV-8複製増加作用ならびにvIL-6産生増加作用は認められなかった。今後はvIL-6抗体を用いて血清中のvIL-6をELISA, CLEIAによる測定系を組み、AIDS患者におけるカポジ肉腫発症の予知因子ならびに腫瘍マーカーとしての可能性を検討する。

分担研究者：吉崎和幸

研究協力者：西本憲弘、宋 健、松本智成、山西弘一

Pathogenic significance of KSHV/HHV8 infection in patients with AIDS

Kazuyuki Yoshizaki¹⁾, Norihiro Nishimoto¹⁾, Ken Song¹⁾, Tomoshige Matsumoto¹⁾ and Koichi Yamanishi²⁾

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

目 的

AIDS に合併するカポジ肉腫病変部位から representational difference analysis (RDA) 法にて見出された Kaposi's sarcoma-associated herpes virus (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。その後の研究からHHV-8はカポジ肉腫のみならず、非ホジキンリンパ腫である body cavity-based lymphoma 細胞や Castleman 病の腫大リンパ節からも検出され、特に AIDS に合併したこれらの疾患病態との疫学的関連が示された^{2,3,4)}。HHV-8の興味深い点はそのウイルスゲノムの中にヒト interleukin 6 (hIL-6) 遺伝子と相同性を有する配列を持ち^{5,6)}、実際にその遺伝子がコードする蛋白 viral IL-6 (vIL-6) は hIL-6 同様にマウスハイブリドーマ細胞^{5,6)}やミエローマ細胞⁷⁾の増殖を促した。しかもカポジ肉腫や非ホジキンリンパ腫の増殖はhIL-6に依存し^{8,9)}、Castleman 病はhIL-6の過剰産生で生じる¹⁰⁾ことが知られていることからHHV-8が病因として注目された。しかし、生体内においてはHHV-8は極少数の細胞に感染が認められているのみでvIL-6産生量も少ない。Castleman病の患者の腫大リンパ節においてvIL-6陽性細胞はリンパ濾胞のマントルゾーンに存在する少数のリンパ球であり、しかもわずかに散見されるのみである¹¹⁾。

そこで、我々は、vIL-6ならびにhIL-6のカポジ肉腫およびMCD合併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、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すことを示した。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複製およびhIL-6の分泌を促進すること、およびこのvIL-6によるU-1細胞に対する分泌および複製刺激作用は、抗ヒトIL-6受容体(hIL-6R)抗体(rhPM-1)では完全には阻害できないが、抗gp130抗体にて完全に阻害できたことから、vIL-6は一部IL-6Rを介して、主にそのシグナル伝達分子であるgp130に直接、あるいはhIL-6Rとは別のvIL-6R(仮定)を介して結合することを示唆した。

本年度は、HHV-8感染細胞に対して、hIL-6のHHV-8ウイルスの複製に与える影響、およびvIL-6産生に与える影響を検討する。

方 法

1. 抗vIL-6モノクローナル抗体の作成

報告されているvIL-6のアミノ酸配列からヒトIL-6受容体結合部位の前後の2種類のペプチドを化学合成し(Fig. 1)、そのペプチドをマウスに免疫しモノクローナル抗体を作成した。

vIL6	MCWFKLWSSL	LV----	GSSL	VSGTRGKLPD	AP-EFEKDL-	--LIQRLNWM
huIL6	MNSFSTSAFG	PVAFSLGLLL	VLPAAFPAPV	APGEDSKDVA	APHRQPLTSS	
vIL6	LWV-----I	DECFRDL---	-CYRTGICKG	ILEPAAIFHL	KLPAINDTDH	
huIL6	ERIDKQIRYI	LDGISALRKE	TCNKSNMCES	SKEALAENNL	KLPKMAEKDG	
vIL6	CGLIGFNETS	CLKKLADGFF	EFEVLFKFLT	TEFGKSVINV	DVMELLTKTL	
huIL6	CFQSGFNEET	CLVKIITGLL	EFEVYLEYLQ	NRFESSEEQA	RAVQMSTKVL	
vIL6	GWDIQEELNK	ITKTHYSPPK	FDR	GLLGLRLQ	GLKYWVRHFA	SFYVLSAMEK
huIL6	IQFLQKKAKN	LDAITTPDPT	TNASLLTKLQ	AQNQWLQDMT	THLILRSFKE	
vIL6	FAGQAVRVLD	SIPDVTDPVH	DK			
huIL6	FLQSSLRAL-	-----R	QM			

* :No. 1 peptide 146-155aa

** :No. 2 peptide 195-204aa

Fig.1 抗vIL-6抗体の抗原認識部位

2. hIL-6刺激によるHHV-8複製およびvIL-6産生能の検討

10⁸ 個の BCBL-1 細胞株に 100 ng/ml のヒト IL-6 で24時間刺激した。細胞を回収し、そのwhole cell lysate を HHV-8 複製の検討ではウイルス複製初期に発現する蛋白質である K5 に対するモノクローナル抗体を用いて、vIL-6 産生に対しては抗vIL-6抗体を用いて Western Blotting を行った。Positive controlとして20 ng/mlのTPA処理を同時に行なったBCBL-1細胞の whole cell lysate を用いた。また免疫組織化学染色による検討としては、上記条件のもと、スライドグラスに細胞を回収後、風乾し、固定液(50%アセトン、50%メタノール)にて5分間固定後、一次抗体として抗K5抗体ならびに抗vIL-6抗体、二次抗体としてFITC-抗マウス抗体にて免疫組織染色を行った。

結果

1. 抗vIL-6モノクローナル抗体の作成

vIL-6に対する2種類の抗原認識部位をもつモノクローナル抗体を複数個得た。TPA刺激を行ったBCBL-1細胞にこの抗体を用いて免疫組織染色を行った。100%アセトン固定にてもBCBL-1細胞中のvIL-6を認識した。この抗体はIgG₁に属し、ヒトIL-6に対する交叉反応は認められなかった。非特異的染色はほとんどなく、vIL-6のみを特異的に染色出来た。

2. ヒトIL-6刺激下のHHV-8複製

hIL-6によるHHV-8ウイルス複製の亢進の有無を見るためHHV-8誘導蛋白K5の発現にて検討した。このためにK5に対するモノクローナル抗体を

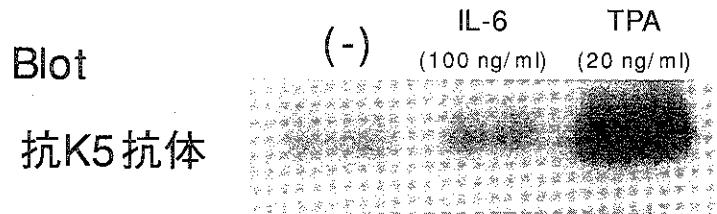


Fig. 2a hIL-6 刺激 BCBL-1 細胞の K5 蛋白の発現 (抗 K5 抗体による Western Blotting)

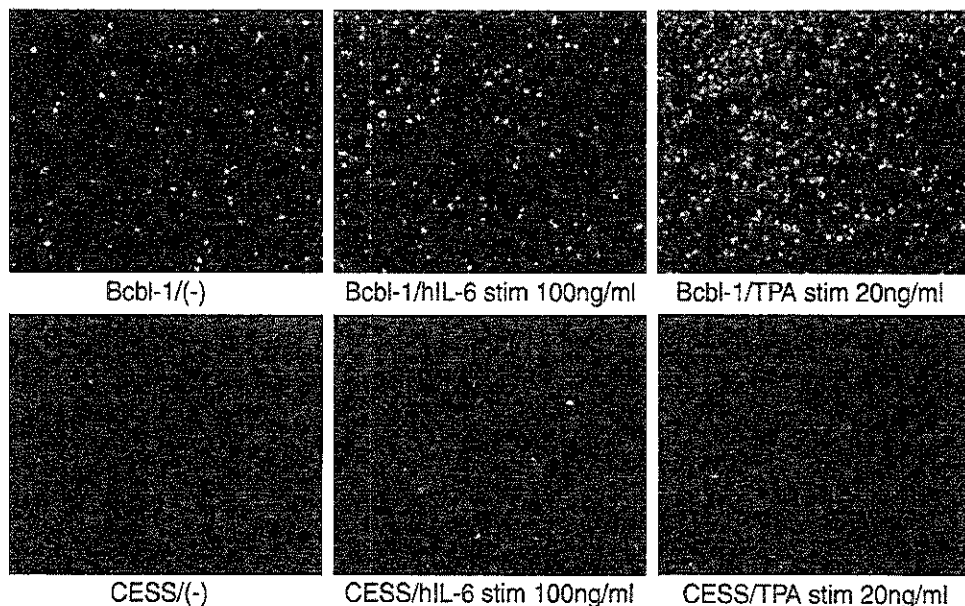


Fig. 2b hIL-6 刺激 Bcbl-1 細胞の K5 蛋白の発現 (抗 K5 抗体による免疫組織染色)

用いてWestern blottingならびに免疫組織化学染色を行った。TPA 刺激によってK5 蛋白は誘導されたが、hIL-6刺激によってK5蛋白はほとんど誘導されなかった(Fig. 2a, 2b)。

3. ヒトIL-6刺激下のvIL-6産生

hIL-6 による HHV-8 ウィルス複製を評価するためvIL-6 に対するモノクローナル抗体を用いてWestern blotting ならびに免疫組織化学染色にて評価した。TPA刺激によってvIL-6が誘導されるのに対して、hIL-6によってvIL-6はほとんど誘導されなかった(Fig. 3a, 3b)。

考 察

HHV-8はカポジ肉腫や、Castleman病、悪性リンパ腫の原因ウイルスとして注目されているが、その発症メカニズムは未だ明らかではなく病態意義に疑問が残っている。その最も大きな理由はHHV-8の感染細胞は生体内において非常にわずかであること、HHV-8の産生するvIL-6は、これらの疾患の増悪因子になる可能性があるが、実際には *in vivo*での発現が非常に少ないからである。

我々はHIV感染症において、1)HHV-8が存在することにより、HHV-8由来のvIL-6がHIV ウィルスの複製ならびにhIL-6産生を誘導する。2)hIL-6

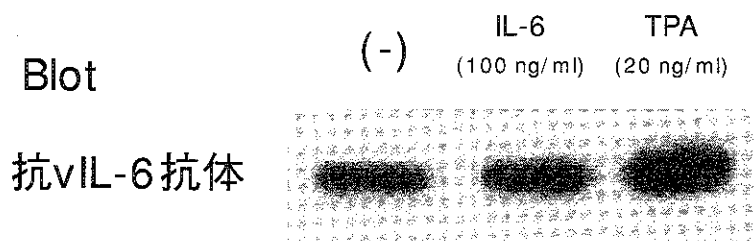


Fig. 3a hIL-6刺激BCBL-1細胞のvIL-6蛋白の誘導 (抗vIL-6抗体によるWestern Blotting)

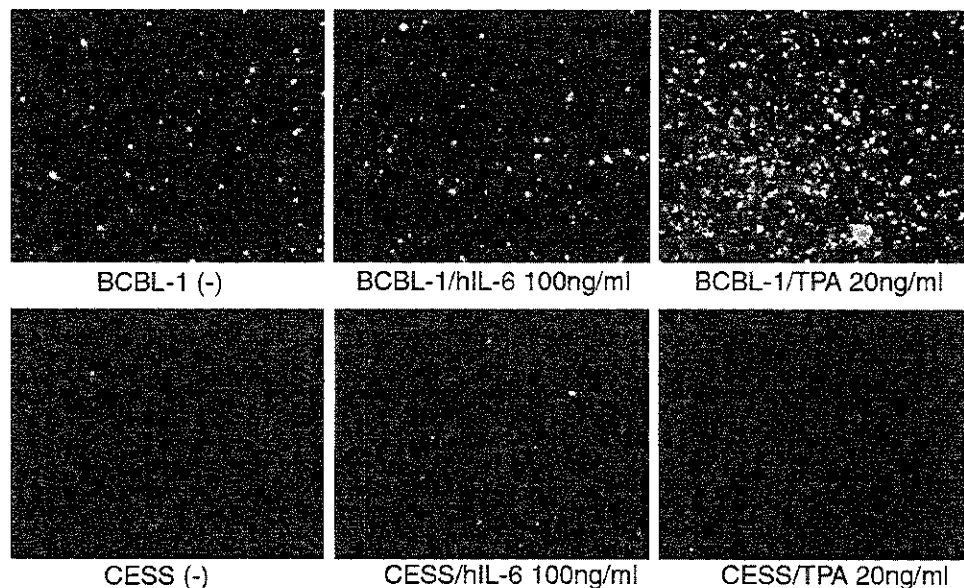


Fig. 3b hIL-6刺激BCBL-1細胞のvIL-6蛋白の発現 (抗vIL-6抗体による免疫組織染色)

によりHHV-8感染細胞増殖が誘導される。3)産生されたhIL-6がHHV-8感染細胞に作用し、HHV-8複製ならびにvIL-6産生を誘導する。4)hIL-6とvIL-6の相互作用がHHV-8陽性HIV患者の病態を形成するという仮説をたてた。

1)と2)については、昨年度の研究にて確認できた。今回我々は3)のhIL-6によってHHV-8の複製増加ならびにvIL-6の産生亢進がおこるかをみるために、それぞれに対するモノクローナル抗体を用いて、Western Blotting および免疫組織染色を行った。予想に反してhIL-6によってHHV-8の複製およびvIL-6の産生亢進は認められなかった。しかしながら前回我々は、HHV-8感染細胞であるBCBL-1細胞株がhIL-6によって濃度依存的に増殖することを示しており、個々の細胞においてはHHV-8の複製は亢進しないが、HHV-8感染細胞がhIL-6により増殖することにより、個体内でHHV-8ウイルス量ならびに、vIL-6量がhIL-6によって増加すると考えている。これらのことよりvIL-6は、HIV複製をも促すことからvIL-6、ならびにhIL-6を介し、HIV、HHV-8という2種類のウイルスがクロストークを行いAIDS病態を形成していると思われる。

また、今回我々は、vIL-6に対するモノクローナル抗体を2種類作成した。この抗体は、比較的緩やかな細胞固定条件でvIL-6を染色することが出来た。この事より、これらの細胞を用いてELISA、CLEIAによる血清vIL-6蛋白の測定が可能になると思われる。我々の実験結果から少なくともhIL-6とvIL-6を介してHIV感染細胞とHHV-8感染細胞が相互に影響を与えていることが判ったことより、HHV-8陽性HIV患者の血清中vIL-6を測定することは病態を評価する上で意義のあるものになると思われる。また、血清vIL-6は、HIV患者におけるカポジ肉腫やMCDの発症予知因子や、腫瘍マーカーとして臨床応用できるかもしれない。今後我々は、血清中vIL-6測定系を確立し臨床応用を検討していく予定である。

結 論

今までの我々の研究にてHHV-8は、自身の遺伝子がコードするvIL-6の分泌を介し、パラクライ

ンメカニズムによりhIL-6産生を誘導し、カポジ肉腫ならびにMCDの病態を悪化させられると思われる。同時にvIL-6とhIL-6はともにHIV複製をも促すことからAIDS病態をも悪化させられると考えられる。したがってvIL-6あるいはhIL-6のシグナルを阻害する治療がAIDSの新しい治療戦略となりうると思われる。また今回我々が作成したvIL-6抗体は、免疫組織染色ならびにWestern Blottingに使用でき、かつ定量性も得られた。今後、この抗体にてELISAの系を作成することにより、AIDS患者発症カポジ肉腫やMCDにvIL-6の病態関与が解析でき、また抗vIL-6抗体の臨床応用も可能になると思われる。

参考文献

- 1) Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowles DM, and Moore PS: Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma, *Sciences*, 266, 1865-1869, 1994
- 2) Huang YQ, Kaplan JJ, Li MH, Poiesz B, Katabira E, Zhang WC, Feiner D and Friedman-Kien AE: Human herpesvirus-like nucleic acid in various forms of Kaposi's sarcoma. *Lancet*, 345, 759-761, 1995
- 3) Cesarman E, Chang Y, Moore PS, Said JW, and Knowles DM: Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based lymphomas. *N. Engl. J. Med.*, 332, 1186-1191, 1995
- 4) Gessain A, Sudaka A, Briere J, Fouchard N, Rio B, Arborio M, Troussard X, Audouin J, and The G: Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like virus (human herpesvirus type 8) DNA sequences in multicentric Castleman's disease: Is there any relevant association in non-human immunodeficiency virus-infected patients? *Blood*, 87, 414-416, 1996
- 5) Moore PS, Boshoff C, Weiss RA, and Chang Y: Molecular mimicry of human cytokine and cytokine response pathway genes by KSHV. *Science*, 274, 1739-1744, 1996
- 6) Nicholas J, Ruvolo VR, Burns WH, Sandford G, Wan X, Ciuffo D, Hendrickson SB, Guo HG, Hayward GS, and Reitz MS: Kaposi's sarcoma-associated human herpesvirus-8 encodes homologues of macrophage inflammatory protein-1 and interleukin-6. *Nature Med.*, 3, 287-292, 1997

- 7) Burger R, Neipel F, Fleckenstein B, Savino R, Ciliberto G, Kalden JR, and Gramatzki M: Human herpesvirus type 8 interleukin-6 homologue is functionally active on human myeloma cells. *Blood*, 91, 1858-1863, 1998
- 8) Miles SA, Rezai AR, Salazar-Gonzales JF, Meyden MV, Stevens RH, Logan DM, Mitusya RT, Taga T, Hirano T, Kishimoto T, and Martinez-Maza O: AIDS Kaposi sarcoma-derived cells produce and respond to interleukin 6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 4068-4072, 1990
- 9) Yee C, Biondi A, Wang XH, Iscove NN, deSouza J, Aarden LA, Wong GG, Clark SC, Messner HA, and Hinden MD: A possible autocrine role for interleukin-6 in two lymphoma cell lines. *Blood*, 74, 798-804, 1989
- 10) Yoshizaki K, Taeho L, Aozasa K, Nakahata T, Wawai H, Tagoh H, Komori T, Kishimoto S, Hirano T, and Kishimoto T: Pathogenic Significance of interleukin-6 (IL-6/ BSF-2) in Castleman's disease. *Blood*, 74, 1360-1367, 1989
- 11) Parravicini C, Corbellino M, Paulli M, Magrini U, Lazzarino M, Moore PS, and Chang Y: Expression of a virus-derived cytokine, KSHV vIL-6, in HIV-seronegative Castleman's disease. *Am. J. Pathol.*, 151, 1517-1522, 1997
- 12) Nishizono I, Iida Suzuki N, Kawada H, Murakami H, Ashihara Y, and Okada M: Rapid and sensitive chemiluminescent enzyme immunoassay for measuring tumor markers. *Clin. Chem.* 37, 1639-1644, 1991
- 13) Sato K, Tsuchiya M, Saldanha J, Koishihara Y, Ohsugi Y, Kishimoto T, and Bendig MM: Reshaping a human antibody to inhibit the interleukin-6-dependent tumor cell growth. *Cancer Res.*, 53, 851-856, 1993
- 14) Nishimoto N, Kishimoto T, and Yoshizaki K: Anticytokine therapy in autoimmune diseases. *Internal Med.*, (in press), 1999



エイズ脳症に伴う14-3-3蛋白質の動態に関する研究(神経細胞障害の進行度測定のマーカー蛋白質としての検討)

木戸 博¹⁾、若林 英樹¹⁾、楊 兵¹⁾、塩田麻由美¹⁾、立川 夏夫²⁾、湯永 博之²⁾、岡 慎一²⁾

¹⁾ 徳島大学分子酵素学研究センター 酵素分子化学部門

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

エイズ脳症に伴う神経細胞の急速な破壊を、早期に的確に診断する生化学的方法は確立されていない。我々は脳の神経細胞の破壊に伴って、脳脊髄液中に14-3-3蛋白質が著明に増加することを見出した。従来14-3-3蛋白質は、Creutzfeldt-Jakob病(CJD)患者の脳脊髄液に著明に増加する蛋白質として注目されていた。本研究において我々は、(1) CJD患者だけでなく、中枢神経症状を伴うHIV患者の約60%の脳脊髄液に14-3-3蛋白質が検出され、正常人では全く検出されないことを明らかにした。(2) 14-3-3蛋白質は6種のisomerが皮膚以外の臓器で見出されるが、HIV患者の脳脊髄液中には、 γ 、 ϵ 、 ζ の3種が検出され、3種のisomerの量比は $\gamma = \epsilon \gg \zeta$ の関係にあり、CJD患者ではほとんど γ しか認められない事実に比較すると、異なるisomer特異性が認められた。(3) AIDS Dementia Complex StageがStage 1から4に進行するに伴って、脳脊髄液中の14-3-3各isomerの量が増加しており、両者の間に明らかな相関が認められた($P=0.0001 \sim 0.0004$)。(4) 脳脊髄液中の14-3-3蛋白質の出現は、末梢血リンパ球のCD4値が20 cells/ μ l以下になった場合にはっきりと認められ、CD4値が20以上の患者ではほとんど認められなかった。(5) HIV患者の中で、脳脊髄液中の14-3-3蛋白質が増加している患者は、日和見感染としてサイトメガロウイルス脳炎を伴うか、エイズ脳症と診断される患者がほとんどで、Cryptococcal meningitisやその他のウイルス性髄膜炎では14-3-3蛋白質の著明な増加は認められなかった。以上の解析から、HIV患者の脳脊髄液中の14-3-3蛋白質(γ 、 ϵ 、 ζ isomer)の検出は、エイズ脳症やサイトメガロウイルス脳炎による神経細胞障害を強く示唆する重要なマーカー蛋白質であることが示された。今後14-3-3蛋白質の脳脊髄液中での増加機序の解析と神経細胞に多く発現している14-3-3蛋白質の生理機能の解析を試みる。

研究分担者：岡 慎一

研究協力者：木戸 博、若林英樹、楊 兵、塩田麻由美、立川夏夫、湯永博之

The 14-3-3 proteins in cerebrospinal fluid as a possible diagnostic marker for the progression of AIDS dementia complex

Hiroshi Kido¹⁾, Hideki Wakabayashi¹⁾, Yang Bing¹⁾, Mayumi Shiota¹⁾, Natsuo Tachikawa²⁾, Hiroyuki Gatanaga²⁾ and Shinichi Oka²⁾

¹⁾ Division of Enzyme Chemistry, Institute for Enzyme Research, The University of Tokushima, ²⁾ AIDS Clinical Center, International Medical Center of Japa

目的

HIV-1は、リンパ球以外に直接神経組織を標的にするため、感染初期からさまざまな神経症状を発症することが知られているが、高度な神経障害はほとんどの場合、感染宿主の免疫系の荒廃に伴って生ずる日和見感染や悪性腫瘍の併発によって認められる。このような神経障害の病因となる基質疾患を的確に把握して治療を行う必要があり、CTやMRIによる画像診断以外に非侵襲的で治療効果や予後の判定に有用な検査法の確立が待ち望まれている。

我々はCJD患者の生前の早期診断に脳脊髄液中の14-3-3蛋白質が有用であることに注目して、HIV患者の脳脊髄液中の14-3-3を測定した。その結果、CJD患者と同様HIV患者の脳脊髄液中に14-3-3蛋白質の著明な増加が認められた。以上の背景を基盤として本年度は次の研究を行った。

- (1) 14-3-3蛋白質は、これまでに7種のisomerが報告されているが、そのうち皮膚にのみ発現しているとされるsを除く6種のisomerが、ヒトの脳で発現していると推定される。そこでsを除く6種類の14-3-3蛋白質を認識する特異抗体を作成し、脳脊髄液におけるそれぞれのisomer特異抗体の作成を、前年に引き続いて作成するとともに、酵素免疫測定法²⁾の確立を試みた。
- (2) HIV患者の脳脊髄液中に出現する14-3-3蛋白質は、HIVの進行度のマーカーとしてのCD4とどのような相関を示すか。さらに脳の神経細胞破壊に伴って中枢神経症状が表れてくるが、AIDS Dementia ComplexのStageと14-3-3蛋白質の出現には、相関があるか否か、脳脊髄液中のHIVウイルスRNAタイターと、髄液中の14-3-3蛋白質の増加は相関するか?
- (3) HIV患者では免疫不全の進行に伴って、種々のウイルスによる日和見感染が脳でも発生する。これらのウイルスの日和見感染と、脳脊髄液中の14-3-3は、何らかの関係があるか否か。

以上を本年度の研究目的として研究を行った。

材質と方法

1. 材質

クローニングによって得られた6種類のヒト14-3-3 isomer ($\gamma, \epsilon, \eta, \tau, \beta, \zeta$) 遺伝子を hexahistidine tag で、あるいは GST 融合蛋白質として大腸菌に発現させ³⁾、各々を精製した後、抗原として用いた。各 isomer に対するリコンビナント蛋白質を抗原として、ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体の作成を行った。今回対象とした患者は、国立国際医療センターで取り扱った HIV 感染患者 21 症例から採取した血液と脳脊髄液各 25 検体を母集団とした。なお、解析した 21 症例は、エイズ脳症と診断された 4 例の他、HIV 日和見感染としてサイトメガロ脳炎と診断された 6 例、クリプトコッカス髄膜炎と診断された 6 例、その他のウイルス性髄膜炎と診断された 2 例と、中枢神経症状を伴わない HIV 感染者 7 例からなる。

2. ウェスタンブロット法

血液の混入のない脳脊髄液 20 μ l を 15000xg 10 分間遠心した上澄みを Laemmli⁴⁾ の方法で電気泳動した後に、PVDF 膜に electroblotting した。次に PVDF 膜を我々が作成した各々のヒト 14-3-3 isomer に対する特異抗体 (ウサギ抗ヒト 14-3-3 $\gamma, \epsilon, \eta, \tau, \beta, \zeta$) と、各 isomer に共通して反応するウサギ抗 14-3-3 Universal 抗体 (Santa Cruz, SC-629) を一次抗体として 4°C で一晩処理した後、Peroxidase (PDP) 標識抗ウサギ IgG 二次抗体と室温で 1 時間反応させ、ECL 化学発光検出システム (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて、検出した⁵⁾。なおウェスタンブロット法での脳脊髄液中の 14-3-3 isomer 蛋白質の定量には、検体と同時に各リコンビナント 14-3-3 isomer (1 ~ 10 μ g) を同様にウェスタンブロットした後、POD の産物を Image Master で測定して定量した。

3. 脳脊髄液中の HIV RNA の定量

脳脊髄液中の HIV RNA の定量は Amplicor HIV-1 Monitor Test Ver.1.0 (Roche Diagnostics) を使い、添付された方法により測定した。

4. データの統計学的解析

全てのデータの統計学的解析は、Stat View-4.1

を用いて行った。

結果

1. HIV感染患者の脳脊髄液中の14-3-3蛋白質 isomerの特異性の検討

14-3-3蛋白質は、それぞれ高い類似性を示す6種の isomer(γ , ϵ , η , τ , β , ζ)と皮膚のみに局在する σ がこれまでに発見されているが、その高い類似性のためにそれぞれの isomer を識別できる抗体が、報告されていなかった。我々は各 isomer に特異的な配列に焦点を合せた数多くのペプチド抗体を作成し、皮膚以外のほとんどの臓器に局在する6種の isomer を比較的特異的に識別する抗体の作成に

成功した。図1にその抗体の特異性を示す。図から明らかなように、これまで市販されて広く使われていた抗体に比して高い特異性を示す抗体が得られたことがわかる。図2には14-3-3蛋白質の各 isomer に特異的な抗体を用いた HIV 感染者の脳脊髄液中の14-3-3蛋白質 isomer の特異性を示す。図2から明確なように、HIV 感染者の脳脊髄液中には、 γ と ϵ タイプが多量に出現し、さらに微量ではあるが ζ タイプも出現する。なお調べた限りの正常人あるいはCJDとHIV感染者以外の患者で、特に髄膜炎を伴う患者の脳脊髄液では、14-3-3蛋白質はほとんど検出できなかった。図3に4例のCJDの脳脊髄液中の14-3-3蛋白質を検出した結果を示す。CJD患者では γ タイプの isomer が優位に出現

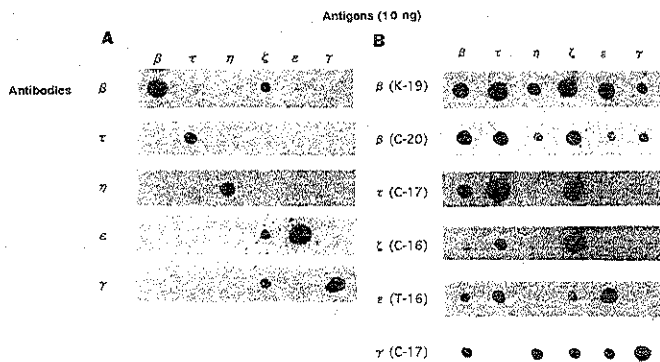


図1 各14-3-3蛋白質 isomer を認識する特異抗体。6種の14-3-3蛋白質 isomer(抗原10ng)に対して我々が作成した特異抗体(A)と市販されているSantaCruzの特異抗体(B)の特異性を示す。SantaCruzの抗体に比して、著しく特異性の増した抗体が得られている

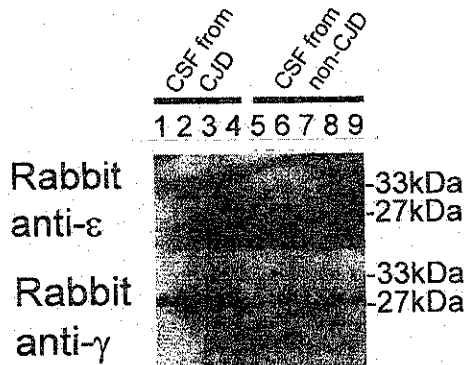


図3 CJD患者(lane 1-4)とCJDとHIV以外でDementiaを示す患者の脳脊髄液(lane 5-9)中の14-3-3蛋白質 isomer パターン。脳脊髄液(10 μ l)をWestern Immunoblottingし、14-3-3蛋白質 isomer を検出した

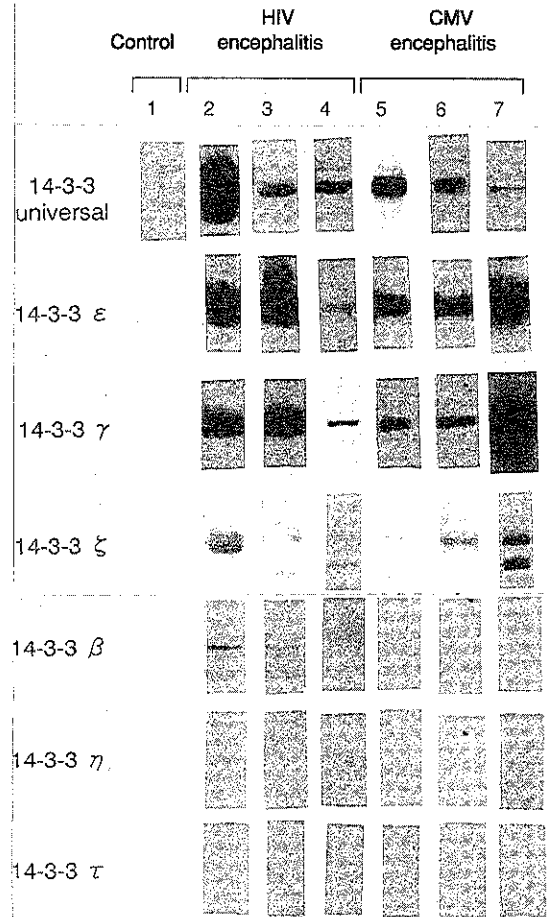


図2 HIV感染者の中で、HIV脳症とサイトメガロウイルス脳炎患者の脳脊髄液の14-3-3蛋白質 isomer パターン。正常人の脳脊髄液では、14-3-3蛋白質は全く検出されないが、HIV脳症とサイトメガロウイルス脳炎患者では、 γ , ϵ , ζ タイプの14-3-3蛋白質が検出された。しかし β , τ , η タイプの14-3-3蛋白質はほとんど検出されなかった

しており、ごくわずかにεタイプが認められる。このようにHIVとCJD患者の脳脊髄液に出現する14-3-3 isomerのパターンに違いのあることが判明した。

2. 脳脊髄液中の14-3-3 isomer値と、AIDS Dementia Complex (ADC) Stageとの相関関係の重回帰分析

表1に今回対象としたHIV感染者を、中枢神経症状を伴う群と、中枢神経症状を伴わない2群に分け、中枢神経症を伴う群ではさらに、HIV encephalitisと診断された群と、日和見感染としてサイトメガロウイルス(CMV)脳炎、Cryptococcal meningitisおよびその他のviral meningitisを伴うと診断された4群に分け、合計5群に分類した時の脳脊髄液中の14-3-3各isomerの定量値と、HIV-RNAタイター、ADC stageおよび患者末梢血中のCD4値を示す。これ等のデータを基に、まずADC stageと脳脊髄液中に増加の認められた14-3-3 γ, ε, ζ isomerとの相関関係を検討した。なお、脳脊髄液中の14-3-3 isomerパターンの解析は、全てのisomerを検出することのできるUnivasal抗体による検定が陽性の検体のみをさらに各々の特異抗体で検定している。従ってUnivasal抗体が陰性の検体では、いずれのisomerの出現も認められてない。図4に示すようにγ, ε, ζ isomerはいずれもADC

stageが上昇するにつれて、脳脊髄液中の値が増加しており、相関関係の指標となるp値は、それぞれγタイプで0.0002、εタイプで0.0004、ζタイプで0.0001以下を示し、明らかな相関関係のあるこ

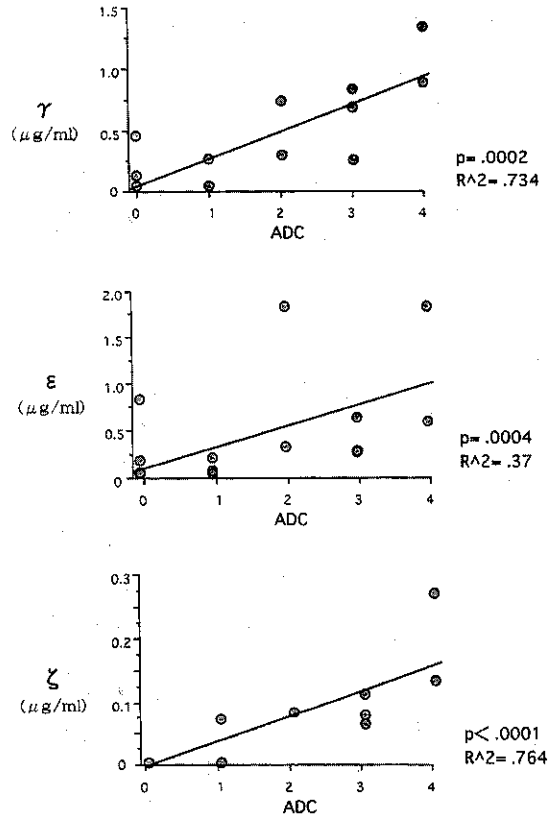


図4 HIV患者の脳脊髄液中の14-3-3蛋白質 isomerとADC stageとの相関関係の重回帰分析

表1 本研究で対象とした21症例の患者の脳脊髄液中の14-3-3蛋白質isomerの定量と、HIV-RNA, CMV- DNAの定量値、末梢血CD4値とADC stage

Code No.	age	sex	Date	U	β	ε	γ	η	τ	ζ	HIV-RNA (copies/ml)	ADC	CD4 (//μl)	CNS complications
HIV encephalitis														
NH14	49	m	960131	160	0.05	1.8	0.85	0	0	0.13	1500000	4	0	lymphoma, cpt, Mngtis
NH1	46	m	940112	88	0.02	1.8	0.7	0	0	0.08	64	2	13	occult lymphoma
NH12	23	m	961031	24	0	0.23	0.65	0	0	0.06	120000	3	3	
NHB13	19	m	951031	20	0	0.035	0	0	0	0	2200	1	2	sev HIV cephalis with dementia
CMV encephalitis														
NH23	53	m	941109	84	0	0.29	0.26	0	0	0.08	50000	2	15	
NHB25	28	m	970109	68	0	0.24	0.21	0	0	0.075	240	3	3	
NHR24	42	m	960712	64	0	0.17	0.22	0	0	0.07	1300	1	3	
NH2	34	m	960402	60	0	0.6	0.8	0	0	0.11	150	3	0.5	
NH8	45	m	961209	38	0	0.55	1.3	0.35	0	0.27	7700	4	8	
NH7	48	m	940715	0	*	*	*	*	*	*	4800	1	28	after 1st trmt of CMV cephalis
cryptococcal meningitis														
NH15	48	m	950219	18	0	0.15	0.41	0	0	0	37000	0	9	cpt mngtis under ctrl
NH20	47	m	941117	14	0	0	0	0	0	0	470000	0	54	CSF titer=1024
NHB30	41	m	970409	13.2	0	0.8	0.09	0	0	0	5000	0	6	
NH18	47	m	950119	2.4	0	0	0	0	0	0	53000	0	9	cpt mngtis under ctrl
NH5	20	m	940801	0	*	*	*	*	*	*	0	0	10	cpt mngtis under ctrl, CMV retinitis
NHB21	36	m	960326	0	*	*	*	*	*	*	58	1	17	
viral meningitis														
NHB4	45	m	960624	2	0	0	0	0	0	0	0	0	492	
NHB16	22	m	941201	2	0	0.023	0	0	0	0	0	0	259	
none in CNS														
NH19	30	m	950515	1.6	0	0	0	0	0	0	860	0	12	convulsion, mania/depression
NH3	34	f	960518	0	0	*	*	*	*	*	89000	0	151	headache
NH6	30	m	960401	0	0	*	*	*	*	*	380	0	411	syphilis, bur neurosyphilis (-)
NH9	26	m	960618	0	0	*	*	*	*	*	0	0	1	sinusoidal fungal infection
NHB2	26	m	950607	0	0	*	*	*	*	*	1400	0	55	CMV retinitis
NHB14	47	m	951005	0	0	*	*	*	*	*	1900	0	19	CMV polyneuritis
NHB19	36	m	970109	0	0	*	*	*	*	*	960	0	116	CMV retinitis/optic neuritis

とが判明した。なお脳脊髄液では γ と ε タイプの出現量が最も多く、高感度に検出できる isomer である事と、 ζ タイプは γ や ε に比して1/10程度しか出現しないが、ADC stage と最も良く相関することが判明した。

3. 脳脊髄液中の14-3-3 isomer値と末梢血CD4値との相関関係の重回帰分析

末梢血CD4値はHIVの進行度とともに減少するが、図5から明らかなように14-3-3 γ , ε , ζ isomerは、それぞれCD4値が20 cells/ μ l以下の重症の時に高頻度に出現するが、CD4値が50 cells/ μ l以上の値

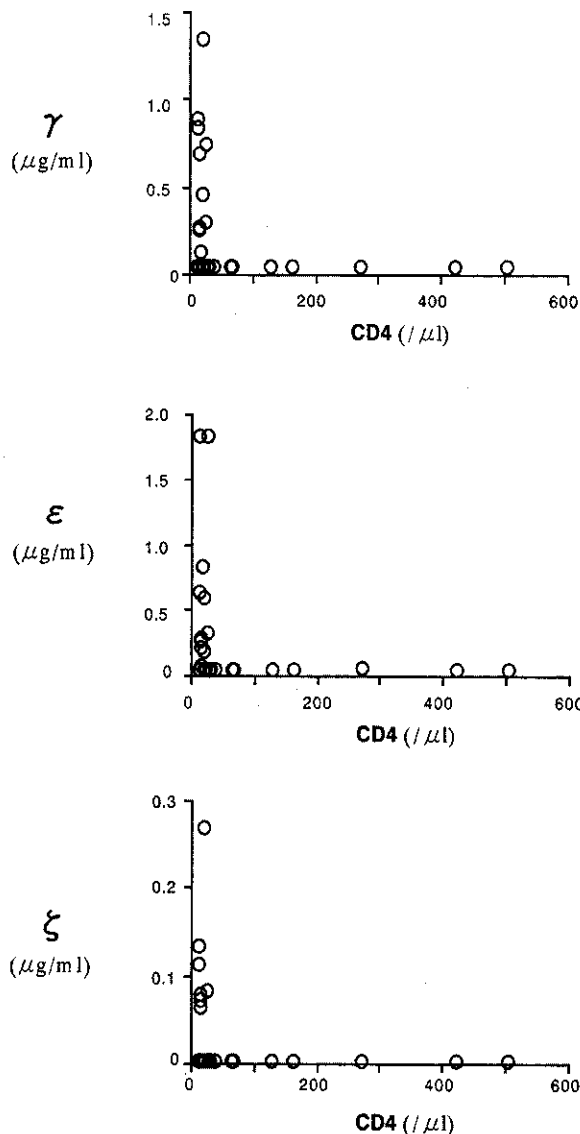


図5 HIV患者の脳脊髄液中の14-3-3蛋白質 isomer と末梢血CD4値との相関関係の重回帰分析

には、脳脊髄液中の14-3-3蛋白質の上昇は全く認められていない。また脳脊髄液中の14-3-3蛋白質と末梢血CD4値との相関関係は認められなかった。なおヒトの脳内の14-3-3蛋白質は、特に神経細胞に多量に発現している。以上の事実は、HIV脳症およびCMV脳炎により脳の神経細胞が障害された時に、脳脊髄液中に放出される14-3-3蛋白質量が増加したためか、神経細胞の障害時にアポトーシス制御因子として反応性に発現が増加し、放出が生じたためと推定される。いずれにしても、CD4値が高度に減少して、免疫不全が進展するとともに脳脊髄液中の14-3-3蛋白質が出現し、その量は中枢神経症状の強さに相関していることが明かとなった。

4. 脳脊髄液中の14-3-3 isomer値と、脳脊髄液中のHIV-RNA値

表1に示すように脳脊髄液中のHIV-RNA値と14-3-3蛋白質の間には、明らかな相関関係は認められなかった。またHIV-RNA値と中枢神経症状の程度を示すADC stageとの間、およびHIV-RNA値と末梢血CD4値との間にも明らかな相関関係は認められなかった。

以上のことより、脳脊髄液中のHIV-RNA量は、神経細胞の破壊の程度を必ずしも反映していないことが示唆された。

考察

14-3-3蛋白質は、脳では神経細胞、特に小脳のプルキンエ細胞、海馬や大脳皮質の錐体細胞に、脊髄では脊髄前角細胞に多く存在することが知られている。従来14-3-3蛋白質はCJD患者の脳脊髄液に特異的にかつ高頻度に出現する蛋白質とされていたが¹⁾、我々はHIV感染者において、CD4値が20 cells/ μ l以下で中枢神経症状を伴う患者の脳脊髄液中に、AIDS Dementia Complex stageに相関して14-3-3蛋白質の γ , ε , ζ タイプが出現することを見出した。14-3-3蛋白質は、正常人の脳脊髄液中や、CD4値の減少が軽微なHIV患者の脳脊髄液ではほとんど認められなかった。このことは、中枢神経系におけるHIVの広がりや神経細胞の障害の程度に相関して、脳脊髄液中の14-3-3蛋白質

が出現することが考えられる。今後CTやMRIによる診断と合せて考えることで、病巣の広がりやReal timeに測定できる脳脊髄液の検査として重要な情報を与えると考えている。

一方14-3-3蛋白質の生理的機能と、HIV感染者での脳脊髄液への14-3-3蛋白質の放出機構はほとんど解明されていないといっても過言ではない。従来14-3-3蛋白質は細胞内でのセリン残基のリン酸化を伴うシグナル伝達の中で、Phospho-Serineを特異的に認識してリン酸化基質と結合するアダプター蛋白と考えられてきた⁶⁾。14-3-3蛋白質と結合するシグナル伝達物質には、Raf-1, Bcr, Bcr-Abl, PI-3 kinase, Protein Kinase C, Bad, EXOS, Cdc25 Phosphatase, FK506-Rapamycin-Associated Protein⁷⁾, Glycoprotein Ib-IXなどが知られている。特に神経細胞の障害とそれに伴う細胞死に関して、14-3-3蛋白質がストレス蛋白(分子シャペロン蛋白質⁸⁾)として作用することが明かとなった。具体的には、アポトーシスによる細胞死の引き金となる一連の機序の中で、ミトコンドリアからのチトクロームCの遊離を促進するBax, Bcl-XL, Bad系に作用する。この系において、14-3-3蛋白質はBad⁸⁾と結合してBadを細胞質に留めることで、Badのミトコンドリアへの輸送を阻害し、アポトーシスを抑制すると考えられている。このことから、HIVやCMVにより脳の神経細胞が障害されると、生体はストレス蛋白質の一つである14-3-3蛋白質の発現を増加させ、細胞死を防ぐ起点が働くと思われる。さらに細胞障害が進行すると、細胞は破壊され細胞質の14-3-3蛋白質は細胞外に漏れ出るとも考えられる。しかしHIV患者の脳脊髄液中になぜ γ , ϵ , ζ タイプの14-3-3蛋白質が出現し、 τ , β , η タイプの14-3-3蛋白質が出現しないのか、どのような機序で14-3-3蛋白質が脊髄液に遊離するか、14-3-3蛋白質の生理的意義とHIVの病態との関係についてはいまだ不明であり、今後の研究課題である。

結 論

HIV-1感染による神経障害の診断を適確に行い、治療の効果や予后进行を判定する方法の確立が望まれている。近年CTやMRIなどの画像診断技術が進

歩してきたが、HIV脳症の重症度と画像所見が必ずしも一致しない点や、初期の脳障害を適確に診断することができない点などから、重症度を示す高感度でReal time Markerが望まれている。我々は、そのようなMarkerの一つとして、本研究でHIV患者の脳脊髄液中の14-3-3蛋白質の検出を提案した。14-3-3蛋白質は、細胞内のシグナル伝達にかかわる重要な因子で、特に細胞周期の制御因子としてアポトーシスを抑制するBad結合蛋白質として、その生理的機能や病態との関係が注目されている。

HIV患者の脳脊髄液中には、末梢血CD4が減少して免疫不全が増悪するに伴って、14-3-3蛋白質のisomerの中で γ , ϵ , ζ タイプのみが増加するが、これらの14-3-3蛋白質の増加の程度は、ADC stageときれいな相関を示し、ADC stageが上がるにつれて脳脊髄液中の14-3-3蛋白質の増加が認められ、重症度を判定するReal time markerとして有用であることが示唆された。従来CJD患者の脳脊髄液中でも14-3-3蛋白質の増加が報告され、特に14-3-3蛋白質の γ タイプが優位に増加し、わずかに ϵ タイプの増加が報告されている⁹⁾。これに対して、HIV脳症の患者では、 γ と ϵ タイプが優位に増加する他、 ζ タイプの増加も認められ、いずれのisomerもADC stageと良く相関して増加し、重症度を反映した($p < 0.0002 \sim 0.0004$)。なお調べた限りの正常人や各種髄膜炎患者の脳脊髄液では、14-3-3蛋白質は認められなかった。

14-3-3蛋白質は、脳の神経細胞の中でも特に小脳のプルキシム細胞、海馬や大脳皮質の錐体細胞に多く含まれるストレス蛋白質の一つである。HIV感染に伴って生ずる神経細胞障害や、CMVによる日和見感染の結果、これらの神経細胞が障害された時に、ストレス蛋白質として反応性に発現が増加する他、脳脊髄液への分泌や神経細胞の破壊に伴う遊出が考えられる。しかし神経細胞からの14-3-3蛋白質の遊出に関する詳細な機序はいまだ不明である。今後これらの機序の解明と、HIV感染の進行に伴う脳脊髄液中の14-3-3蛋白質量の経過の推移を詳細に検討し、HIV脳症のReal time markerとしての病理的意義の解明を進める。

参考文献

- 1) Hsich, G., Kenney, K., Gibbs, C. J., Lee, K. H. and Harrington, M. G. : The 14-3-3 brain protein in cerebrospinal fluid as a marker for transmissible spongiform encephalopathies., *N. Engl. J. Med.*, 335 : 9254-930, 1996.
- 2) Okishima, N., Hagiwara, Y., Seito, T., Yano, M. and Kido, H. : Specific sandwich-type enzyme immunoassays for smooth muscle constricting novel 31-amino acid endothelins., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 256(1) : 1-5, 1999
- 3) Yano, M., Mori, S., Seiki, M. and Kido, H. : Intrinsic Nucleoside Diphosphate Kinase-like Activity as a Novel Function of 14-3-3 Proteins., *FEBS Letters*, 419 : 244-248. 1997
- 4) Laemmli, U.K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4., *Nature*, 227 : 688-685, 1970
- 5) Kido, H., Fukutomi, A., and Katunuma, N. : A novel membrane-bound serine esterase in human T4+ lymphocytes immunologically reactive with antibody inhibiting syncytia induced by HIV-1 : Purification and characterization., *J. Biol. Chem.*, 265 : 21979-21985, 1990
- 6) Muslin, A. J., Tanner, J. W., Allen, P. M., and Shaw, A. S. : Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine., *Cell*, 84 : 889-897, 1996
- 7) Mori, H., Inoue, M., Yano, M., Wakabayashi, H. and Kido, H. : 14-3-3 τ -Associates with a translational control factor FKBP12- rapamycin associated protein in T cells after stimulation by pervanadate., *FEBS Lett.*, 467(1) : 61-64, 2000
- 8) Zha, J., Harada, H., Yang E., Jockerl, J. and Korsmeyer, S. J. : Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X., *Cell*, 87: 617-628, 1996
- 9) Takahashi, H., Iwata, T., Kitagawa, Y., Takahashi, R. H., Sato, Y., Wakabayashi, H., Takashima, M., Kido, H., Nagashima, K., Kenney, K., Gibbs, C. J., and Kurata, T. : ϵ and γ Isoform-specific increase of 14-3-3 proteins in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jacob disease., *Clin. & Diagno. Lab. Immunol.*, 6 : 983-985, 1999



PMLのDNA診断と追跡調査

余郷 嘉明¹⁾、杉本 智恵¹⁾、小川 淳²⁾、隅谷 護人³⁾

¹⁾東京大学医科学研究所 ウイルス感染研究部

²⁾新潟県立がんセンター新潟病院 小児科

³⁾国立国際医療センター 膠原病科

研究要旨

各PML患者の脳病変部に存在するJCV DNAは、原型から作られたユニークな再編成型の調節領域を持つ。したがって、検体から検出された調節領域が、今までに検出されることがないユニークな再編成型調節領域であることを確認することによって、確実な診断を行うことができる。我々は、調節領域をターゲットとしたnested PCR法を用いて、CSFからJCV DNAを検出するサービスを行っている。平成11年度には、35症例、50検体からJCV DNAの検出を試みた。その結果、6症例からユニークな再編成型調節領域を検出した。JCV陽性の患者の基礎疾患は、エイズ (n=2)、SLE (n=2)、その他 (n=2)であった。2症例(症例2と27)については追跡調査が行われた。症例2では5ヶ月間、JCV DNAが検出され続けたが、その後検出されなくなった。発症後1年以上経過するが、病態は安定している。症例27においては、神経症状が出現してから約1ヶ月に採取されたCSFからJCV DNAは検出されなかったが、2ヶ月に採取されたCSFからは検出された。このように、正確な診断には初回の検体が陰性の場合でも、追跡調査する必要があることがわかった。

分担研究者：余郷嘉明

研究協力者：杉本智恵、小川 淳、隅谷護人

DNA diagnosis of PML and follow-up studies

Yoshiaki Yogo¹⁾, Chie Sugimoto¹⁾, Atsushi Ogawa²⁾ and Morito Sumiya³⁾

¹⁾Department of Viral Infection, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, ²⁾Department of Pediatrics, Niigata Cancer Center Hospital, ³⁾Division of Rheumatology, International Medical Center of Japan

目 的

進行性多巣性白質脳症(PML)は、患者の基礎疾患、神経症状の進行、CTやMRIによる画像から示唆されるが、脳病変部を直接検査しない限り、確実な診断を下せなかった。最近、脳脊髄液(以下CSFと記す)からのJCV DNAの検出がPMLの診断に有効であるという報告が相次いでなされた。しかし、CSFからのJCV DNAの検出には高感度のPCR(nested PCR)を用いるので、陽性結果を得ても、コンタミによる偽陽性の可能性がつきまとう。我々は、JCVの調節領域を増幅する新しいnested PCR法を確立した。この方法を用いれば、PCRにありがちな偽陽性を除外することができる(平成9年度本研究班報告書)。

本研究の目的は、「HIV感染症に関する臨床研究班」の分担課題の一つとしてPMLの診断サービスを全国の病院、医療施設に対して行うことである。また、診断を実際に行いながら、診断法の改善も図る。

方 法

1. CSFからのDNA抽出

スマイテストEX-R&D(住友金属)を用いて抽出した。

2. 調節領域の増幅

nested PCRにより行った。outer primerとしてA1とA3を、inner primerとしてB1とB3を用いた。A3(5' CATTACTTACCTATGTAGCTTTTG GTTCAGGC 3')は従来のA2に代わって用いた(下線部はA2の配列)。A3以外のprimerの配列とゲノム上の位置、nested PCRの反応条件は平成9年度の当班の報告書と文献(Sugimoto et al., 1998)に述べた。

3. 増幅断片のクローニング

増幅断片をHindIIIとPstIで消化し、調節領域を切り出した。切り出された調節領域をpBluescript II SK(+)を用いてクローニングした。

4. 制限酵素解析

増幅断片を含むクローンをHindIII, PstI, SstIにより消化した。消化液を3%のNuSieveアガロース・ゲルで電気泳動した。得られた切断パターンからクローンをグループに分けた。

5. 塩基配列の決定

各グループの代表クローン数個を精製し、蛍光式自動シーケンサーを用いてシーケンシングした。

結 果

1. CSFを用いたPMLのDNA診断

平成11年には合計35症例、50検体のCSFを検査し、その内6症例からJCV DNAが検出された(表1にはJCV DNAが検出された症例のみを示した)。なお、この表に加えていないが、平成12年になって4症例を調べ、その内2症例からJCV DNAを検出した(塩基配列の解析は未だ行っていない)。

JCV DNAが検出された患者6名の基礎疾患の内訳はエイズが2、全身性エリテマトーダス(SLE)が2、急性リンパ性白血病(ALL)が1、骨髄繊維症が1で、従来から言われているPMLのリスク群とほぼ一致した。

2. 検出された調節領域の構造

6症例から検出されたJCV調節領域の構造を図1に示した。全てユニークな再編成型調節領域であった。

図1に示した調節領域の構造には以下の特徴が認められた。

- (1) 検出された調節領域の一部(J7、J14a～J14d、J15)が典型的なPML型調節領域(domain Aの重複とdomain Bの欠失を持つ調節領域)であった。
- (2) J7、J13、J14a、J14bは3回反復配列を持っていた。
- (3) J16とJ17aは欠失だけを持っていた。

以上の傾向は平成9年度、10年度にも観察された。