

16. ヘルパーT細胞活性化による HIV ワクチンの開発

保富康宏 (三重大学医学部)

結核菌ワクチンである BCG のヘルパーT細胞(Th)を利用する事による HIV 特異的細胞傷害性Tリンパ球(CTL)の誘導を DNA ワクチン、ペプチドワクチンの2種類の方法を用いて検討した。マウスを BCG 感作、未感作の2群に分けさらに各群で HIVgp160 組み込みプラスミド単独免疫、および BCG の α 抗原組み込みプラスミドと混合免疫の群を作製した。HIV 特異的 CTL は BCG 感作、HIVgp160 組み込みプラスミドと α 抗原組み込みプラスミドとの混合免疫の群でのみ高い活性が得られた。ペプチドワクチンでは HIV の CTL エピトープ P18、P18 と HIV の Th エピトープペプチド PCLUS3 のリンケージペプチド PCLUS3-P18、および BCG α 抗原内の Th エピトープ#25 と P18 のリンケージペプチド#25-P18 を BCG 感作、未感作の2群にそれぞれ免疫し CTL の誘導を試みたところ、BCG 感作で#25-P18 免疫群で最も高い CTL 活性が得られた。以上のことから世界中で広く感作を受けている BCG の Th を利用するワクチンは HIV 特異的 CTL の誘導に有効であると思われた。

A.研究目的

HIV に対する感染防御には液性免疫だけでは不十分であり、細胞性免疫、特に細胞傷害性Tリンパ球(CTL)の働きが必要であると考えられている。本研究では世界中で広く用いられている結核ワクチンである BCG のヘルパーT細胞(Th)を利用する事による HIV 特異的 CTL の誘導可能な HIV ワクチン開発の基礎的検討を行うことを目的とした。

B.研究方法

BALB/cxC3H/HeNF1 (CC3HF1)および BALB/cxC57BL/6F1 (CB6F1)マウスを用い以下のごとく行った。

1) BCG α 抗原 DNA を用いた HIV DNA ワクチンの増強効果

BCG α 抗原 DNA を HIVIII DNA と混合接種し HIV 特異的 CTL を ^{51}Cr 遊離法にて CTL 活性を測定した。

2) BCG α 抗原内 Th エピトープを用いたペプチドワクチン

BCG α 抗原内 Th エピトープペプチドと HIV の CTL エピトープペプチドを結合させマウスに免疫し同様に CTL 活性の測定を行った。

C.研究結果及び考察

HIV DNA ワクチン単独接種では高い CTL 活性は誘導されなかったが BCG α 抗原 DNA 混合接種では高い活

性が得られ、更にマウスを BCG で免疫前に感作しているものではより著明であった。(図3) ペプチドワクチンでは BCG α 抗原内の Th エピトープ結合ペプチドでのみ CTL は誘導され、同様に BCG 感作マウスではより高い活性が得られた。(図4) これらの結果から BCG が世界中で広く用いられていることを考えれば、この BCG α 抗原を利用するワクチンは有効なワクチン効果を得られると考えられた。

D. 考察

CTL の誘導は CTL エピトープ単独では困難で有る場合が多く、そのために Th を活性化することが近年考えられてきたが、多くの場合そのウイルスに対する Th を活性化する方法が主流であった。しかしながら本研究では全く異なる抗原の Th を利用し、更にその Th が強く Th1 タイプの誘導を行うものを用いればより簡便に CTL の誘導が可能であることを示した。

E. 結論

エイズ研究においてはワクチン開発が重要な問題として今現在まで残っている。この様な状況で新たな手法によるワクチンが数多く報告されている。本研究では既存の世界中で広く用いられており、細胞性免疫を強く誘導する BCG の抗原を利用するという全く新しい試みを行い、実現

可能なものであることを示した。

F. 研究発表

1) 論文発表

1. Hiranuma, K., Tamaki, S., Nishimura, Y., Kusuki, S., Isaogawa, M., Kim, G., Kaito, M., Kuribayashi, K., Adachi, Y. and Yasutomi, Y. Helper T cell (Th) determinant peptide contributes to induction of cellular immune responses by peptide vaccine constructs against hepatitis C virus.

J. Gen. Virol. 1999;80:187-193.

2. Nishimura, Y., Kamei, A., Uno-Furuta, S., Tamaki, S., Kim, G., Adachi, Y., Kuribayashi, K., Matsuura, Y., Miyamura, T. and Yasutomi, Y. A single immunization with a plasmid encoding hepatitis C virus (HCV) structural proteins under the elongation factor 1- α promoter elicits HCV-specific cytotoxic T lymphocytes (CTL).

Vaccine 1999; 18:675-680.

3. Seth, A., Yasutomi, Y., Jacoby, H., Callery, J.C., Kaminsky, S.M., Koff, W.C., Nixon, D.F. and Letvin, N.L. Evaluation of a lipopeptide immunogen as a therapeutic in HIV type 1-seropositive individuals. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2000;16:337-343.

4. Matsumoto, J., Kawai, S., Terao, K., Kirinoki, M., Yasutomi, Y., Aikawa, M. and Matsuda, H. Malaria infection induces

rapid elevation of soluble Fas ligand level in serum and subsequent T lymphocytopenia: possible factors responsible for the differences in susceptibility of two species of Macaca monkeys to Plasmodium coatney-infection. *Infect.Immun.* 2000; 68:1183-1186.

5. Imanaka-Yoshida, K., Hiroe, M., Yasutomi, Y., Maki, S., Tsuchiya, T., Noda, N., Toyozaki, T., Nishikawa, T., Ishiyama, S., Sakakura, T. and Yoshida, T. Tenascin-C is a useful marker for myocarditis disease activity. submitted

6. Mori, K., Yasutomi, Y., Sawada, S., Villinger, F., Sugama, K., Rosenwith, B., Ueberla, K., Yamazaki, S., Ansari, A. and Ruebsamen-Weigmann, H. Short-term treatment with a novel RT inhibitor induces an attenuated vaccine effect able to contain a pathogenic SHIV-RT virus. *J. Virol.* in press

7. Kamei, A., Tamaki, S., Taniyama, H., Takamura, S., Nishimura, Y., Kagawa, Y., Uno-Furuta, S., Kaito, M., Kim, G., Toda, M., Matsuura, Y., Miyamura, T., Adachi, Y. and Yasutomi, Y. Induction of hepatitis C virus specific cytotoxic T lymphocytes in mice by an intrahepatic inoculation with an expression plasmid. *Virology* in press

8. Uno-Furuta, S., Tamaki, S., Takebe, Y., Takamura, S., Kamei, A., Kim, G.,

Kuromatsu, I., Toda, M., Kaito, M., Adachi, Y. and Yasutomi, Y. Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes by *in vivo* electric administration of peptides. submitted

2.学会発表

BCG α 抗原を用いた HIV ワクチン：
第13回日本エイズ学会総会（1999年東京）

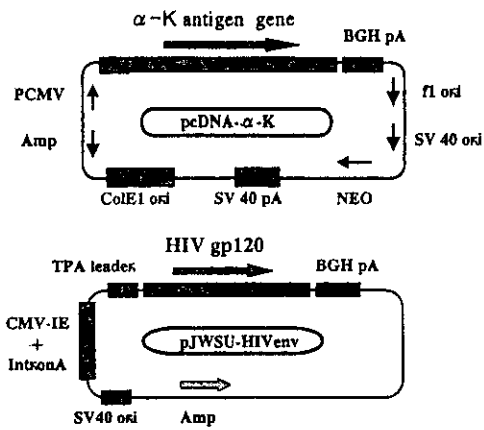


図1 α抗原 DNA および HIVgp120DNA

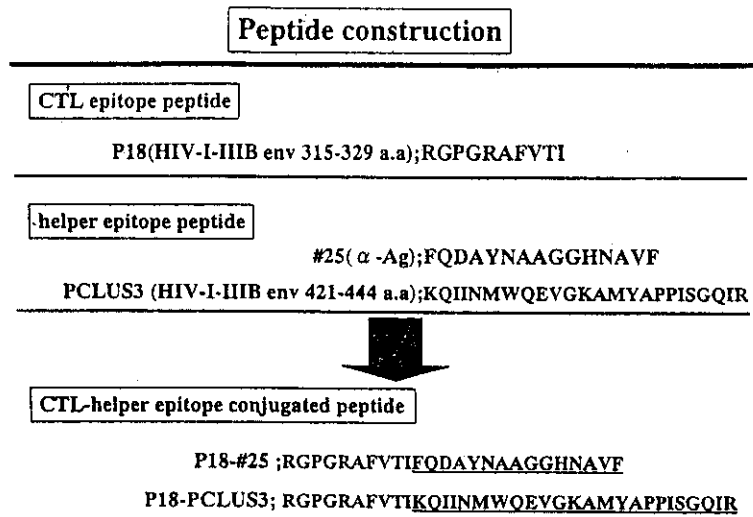


図2 作製したペプチド

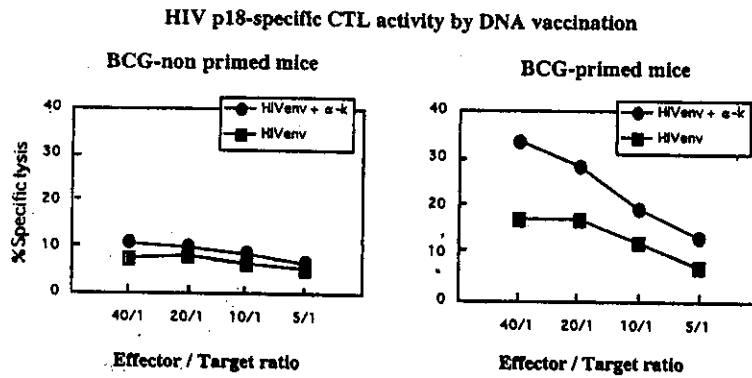


図3 DNA ワクチン接種マウスの HIVenv に対する CTL 活性

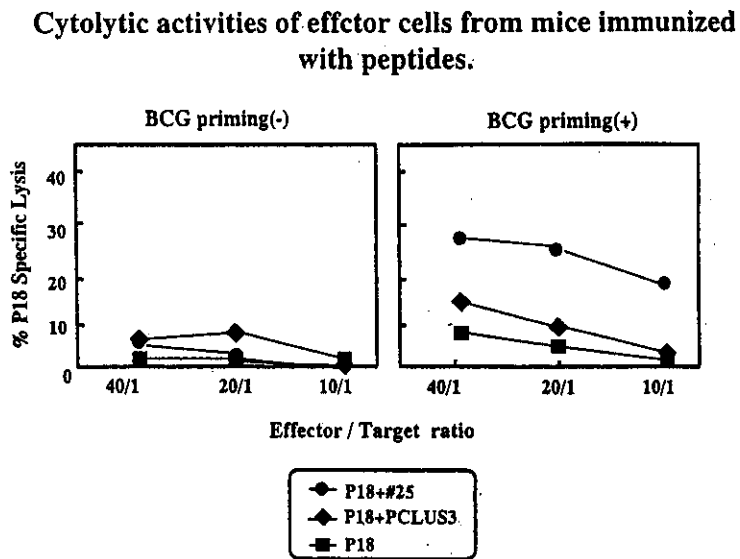


図4 ペプチドワクチン接種マウスの HIVenv に対する CTL 活性

(分担) 研究報告書

17. CXCR4のアンタゴニストおよびその類似物質による R5 HIV-1 感染性の増強作用

分担研究者： 中島 秀喜（鹿児島大学歯学部口腔細菌学）

研究要旨

CXCR4の低分子アンタゴニストであるT134、T140、ALX40-4CやCXCR4のナチュラルリガンドであるSDF-1は、CXCR4をコレセプターとして利用するT-tropic (X4) HIV-1の感染を特異的に抑制する。しかしながら、R5 HIV-1 (JR-CSF) を用いてMAGI-CCR5における影響を検討した結果、SDF-1、ALX40-4Cを添加した際には感染効率の増強が認められた。T-134、T140では高濃度域を加えた場合、R5 HIV-1の感染増強作用が認められたが、SDF-1、ALX40-4Cと比べると、その増強作用ははるかに弱かった。また、AMD3100では、R5 HIV-1の感染増強作用はみられず、vMIP IIではX4および R5 HIV-1ともに感染抑制がみられた。PBMCに試験物質を加えて48時間処理した時のCCR5の発現をFACSで測定したところ、R5 HIV-1の感染増強効果がみられた物質においてCCR5の発現の増強が認められ、転写活性の亢進がみられたが、AMD3100にはCCR5の発現に影響は見られなかった。CXCR4アンタゴニストのHIV感染におよぼす感染阻止と増強効果という二面性を解明することは、エイズ治療薬としてこれらの物質を使用する際の重要な情報となると考えられた。

A. 研究目的

CXCR4のナチュラルリガンドであるSDF-1や、低分子アンタゴニストであるT134、ALX40-4Cは、CXCR4をコレセプターとして利用するT-tropic(X4) HIV-1の感染を特異的に抑制する。しかしながら、これらの化合物をCCR5を利用するM-tropic (R5) HIV-1感染細胞に高濃度で処理した場合には、その感染性が増強する事を発見した。今回、CXCR4アンタゴニストのHIVの感染におよぼす感染抑制と増強という二面性作用に関する検討を行ったので報告する。

B. 研究方法

1) 試験物質：合成ペプチドT22の抗HIV活性の発現に重要と思われる逆 β シート構造を維持したまま低分子量化（14個アミノ酸）し、さらに12位のリジンをシトルリンに変換したペプチド、T134、およびT134の3位のTrpをL-3-(2-naphthyl)alanineに置換したT140を合成した。他にCXCR4のアンタゴニストとして、バイサイクラムAMD3100、9個のD-ArgよりなるALX40-4C、CXCR4のリガンドであるSDF-1、CCR5のリガンドのMIP-1 α およびHHV8がコードしているケモカイン様ペプチドであるvMIP-IIを合成あるいは購入して、抗HIV活性試験を行った（図1）。

2) 抗HIV活性試験：X4 HIV-1 に対する抗HIV活性は、HIV感染MT-4細胞に見られる細胞傷害の試験薬剤による阻止率をMTT法にて評価した。また、HIV-1 LTR/ β -galとヒトCCR5遺伝子を導入したCD4陽性HeLa細胞（MAGI-CCR5細胞）を用いたMAGIアッセイでX4またはR5 HIV-1を感染させたとき、ウイルス

に感染することで β -galactosidaseを発現して青色を呈する細胞数を算定し、各々のHIVに対する抗ウイルス活性を評価した。

3) 抗CXCR4、抗CCR5モノクローナル抗体結合阻止試験：ヒト末梢血リンパ球あるいはMAGI-CCR5細胞を試験物質で処理し、細胞表面に発現しているCXCR4またはCCR5分子に対する各々の抗体の結合阻止を、蛍光抗体法を行いフローサイトメーターで測定した。

4) ゲルシフトアッセイ(Electrophoretic mobility shift assay:EMSA)：MAGI-CCR5細胞(5×10^4 /ml)に、T134、T140、ALX40-4C、AMD3100あるいはSDF-1を100 μ Mになるよう培地に添加し48時間培養した。その後、細胞を剥離し、bufferA (10mM HEPES [pH7.9]、1.5mM MgCl₂、10mM KCl、0.5mM Phenylmethyl-sulfonyl Fluoride(PMSF)、0.5mM dithiothreitol (DTT))-0.1% NP40 を加えて細胞膜を可溶化し、遠心した後に核成分を回収した。得られた核抽出物5 μ gに、³²P-ラベルしたNF- κ Bプロンプを加え室温下1時間反応させ、6%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。EMSAシグナルはBio-imaging Analyzer によって解析した。

5) LTR活性化評価：COS-7細胞 (1×10^4 /ml)に、1 μ gのpLTR-lucをFuGENE™6 Transfection Reagent を用いてトランスフェクションした。4時間培養後にT134、T140、ALX40-4C、AMD3100、SDF-1をそれぞれ20 μ Mのなるよう培地に添加し、さらに48時間培養した。その後細胞を溶解し、細胞内のルシフェラーゼ活性をルミノメーターで測定した。

C. 研究結果

1) 抗HIV活性：X4 HIV-1 株であるHIV-1_{ms}が感染したMT4細胞を用いた抗HIV活性をMTT法で評価した結果を表1に示している。ここで試験した全ての物質はX4 HIV-1の感染阻止作用がみられた。このことは、HIV-1_{NL4-3}を用いたMAGIアッセイでも確認された(表2)。T140またはSDF-1それぞれ1 μ MをPBMCに処理したとき、抗CXCR4抗体の結合は抑制された。T134やAMD3100でも同様な抑制がみられた。しかしながら、これらの物質は、抗CCR5抗体や抗CD4抗体との結合には影響しなかった。これに対して、vMIP IIは抗CXCR4抗体のみならず、抗CCR5抗体との結合も抑制した(図2)。これらの試験物質のR5 HIV-1 (JR-CSF)に対する作用をMAGI-CCR5を用いて評価した結果、20 μ M以上の濃度のSDF-1、ALX40-4Cや、60 μ M以上のT-134、T140を加えた場合、R5 HIV-1の感染増強作用が認められた。これらの濃度は、X4 HIV-1の感染を50%抑制する濃度の数百~数千倍という高濃度であった。また、AMD3100では、R5 HIV-1の感染増強作用はみられず、vMIP IIではX4および R5 HIV-1ともに感染抑制がみられた(表2)。

2) CCR5発現に与える影響：PBMCに試験物質を加えて48時間処理した時のCCR5の発現をFACSで測定したところ、R5 HIV-1の感染増強がみられたSDF-1、ALX40-4C、T134、T140においてCCR5の発現の増強が認められたが、AMD3100では影響は見られなかった(図3)。

3) CXCR4アンタゴニストの転写活性におよぼす影響：pLTR-*luc*をトランスフェクションしたCOS-7細胞に、T134、T140、ALX40-4C、AMD3100、SDF-1をそれぞれ20 μ Mとなるよう培地に添加した時のルシフェラーゼ活性をみた結果を図4に示してある。結果は、薬剤無添加の場合のルシフェラーゼ活性と比較した相対比で示している。また、活性増強があるコントロール物質としてTPA刺激した細胞の活性を同時にみている。R5 HIV-1の感染増強作用がみられたT134、T140、ALX40-4CおよびSDF-1処理では、ルシフェラーゼ活性の増強がみられたが、感染増強作用がみられなかったAMD3100ではルシフェラーゼ活性の増強もみられなかった。

挿入図は、MAGI-CCR5細胞(5 \times 10⁴/6well)に、T134(lane2)、T140(lane3)、ALX40-4C(lane4)、AMD3100(lane5)、SDF-1(lane6)を100 μ M濃度になるよう培地に添加し48時間培養した場合に得られた核抽出物に、³²P-ラベルしたNF- κ Bプローブを加え室温下1時間反応させ、6%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行ったものである。薬剤未処理のコントロールのEMSAシグナル(lane1)と比較して、SDF-1とALX40-4C処理した場合のそれは強く、またT134とT140処理した場合にも経度のEMSAシグナルの増強効果がみられた。これらに反して、AMD3100処理ではそのような増強効果はみられなかった。

D. 考察

我々は、昨年の本報告書でT-tropic HIV-1感染のコレセプターであるCXCR4のアンタゴニストとして作用することで抗ウイルス活性を示す合成ペプチドT134の活性評価を示した。さらに、T134同様にCXCR4に作用するAMD3100と抗CXCR4モノクローナル抗体やSDF-1の細胞膜との結合への影響を検討し、これら2つの物質は同様な阻害作用をもつものの、T134とAMD3100の間には交差耐性はみられないことを報告した。T134とAMD3100に交差耐性がみられなかったことは、例え1つのCXCR4アンタゴニストで治療中にその薬剤に対して耐性を示すHIV株が出現しても、他のCXCR4に作用する薬剤に切り替えて治療を続けられる可能性があることになる。今年度は、T134をさらに修飾したT140を合成し、他のCXCR4アンタゴニストのAMD3100やALX40-4C、CXCR4のリガンドであるSDF-1、HHV8遺伝子がコードするケモカイン様物質であるvMIP IIなどとの抗ウイルス作用を比較検討した。その結果、SDF-1、ALX40-4C、T134、T140は、その強力な抗X4 HIV-1活性に反して、高濃度で使用した場合にはR5 HIV-1の感染増強作用があることが分かった。その作用機序としては、これらが標的細胞の転写活性を増強し、CCR5分子の発現を増強させ、さらにはHIV-1の転写活性をも増強する可能性が予想された。これに対して、AMD3100にはこのようなR5 HIV-1感染の増強作用はみられず、また、vMIP IIではX4 HIV-1のみならずR5 HIV-1の感染両方を強力に抑制した。このような、CXCR4アンタゴニストのウイルス株による作用の二面性は、今後これらをエイズ治療薬として開発していく上での重大な問題になると思われる。

E. 結論

CXCR4のナチュラルリガンドであるSDF-1およびアンタゴニストであるT134、T140、ALX40-4Cは、らの物質を高濃度で処理した場合にはR5 HIV-1の感染性を増強することが分かった。その機序としては、これらの物質が細胞の転写活性を高めて、R5 HIV-1感染のコレセプターであるCCR5の発現を増強すること、さらにはHIV-1の転写活性も増強する可能性が予想された。ただし、他のCXCR4アンタゴニストとして作用するAMD3100には、このようなR5 HIV-1の感染増強作用はみられず、また、vMIP IIはX4 HIV-1のみならずR5 HIV-1の感染両方を阻止し得ることが分かった。今後、これらのCXCR4アンタゴニストをエイズ治療薬として臨床的に使用する場合には、CCR5阻害物質やvMIP IIなどとの併用や既存の作用機所が異なる抗レトロウイルス薬との併用療法などを考えていく必要があると思われる。

図表の説明

1. CXCR4アンタゴニストの化学構造(図1)

2. HIV-1IIIB感染MT-4細胞での抗HIV活性のMTT法による評価(表1)

3. PBMCへの抗CXCR4抗体(12G5)、抗CCR5抗体(2D7)および抗CD4抗体の結合阻害作用(図2)。CXCR4アンタゴニストであるT140およびCXCR4のナチュラルリガンドであるSDF-1は、12G5とCXCR4の結合は阻止するが、2D7とCCR5との結合および抗CD4抗体の結合には影響しない。HHV8遺伝子がコードするvMIP II は、12G5と2D7の両方の抗体との結合を阻止しているが、抗CD4抗体の結合には影響していない。ここで使用したT140、SDF-1、vMIP IIは、いずれも1 μ Mを使用した。

4. CXCR4アンタゴニストおよびSDF-1によるCCR5発現の増強作用(図3)。T134、T140、ALX40-4C、AMD3100およびSDF-1、それぞれ100 μ Mを加えた培養液で2日間培養したPBMCの細胞膜表面に発現したCCR5を、抗CCR5抗体(2D7)を用いて間接蛍光抗体法で検討した。T134、T140、ALX40-4CおよびSDF-1で処理した場合には、CCR5の発現量の増強がみられたが、AMD3100で処理した場合にはCCR5の発現はコントロールと変わらなかった。

5. CXCR4アンタゴニスト、SDF-1およびvMIP IIのMAGIアッセイによる、T-tropic HIV-1およびM-tropic HIV-1感染におよぼす影響(表2)。ここで試験したすべての物質においてT-tropic HIV-1の感染に対する抑制効果がみられる。(数字は50%感染阻止濃度で示している。)これに反して、M-tropic HIV-1の場合、vMIP IIでは感染抑制作用($EC_{50}=19.9$ nM)がみられたが、SDF-1とALX40-4Cは20 μ M以上の濃度で、T134とT140は60 μ M以上の濃度(これらの濃度はT-tropic HIV-1の感染を50%抑制した濃度の数百~数千倍の濃度に相当する)で感染増強効果がみられた。

6. CXCR4アンタゴニストの転写活性に与える影響(図4)。COS7細胞(1×10^4 /ml)に、1 μ gのpLTR-lucをトランスフェクションし、4時間培養後に、T134、T140、ALX40-4C、AMD3100、SDF-1をそれぞれ20 μ Mとなるよう培地に添加し、さらに48時間培養した。その後、細胞を溶解し、細胞内のルシフェラーゼ活性をルミノメータで測定した。転写活性を増強させるコントロールとしてTPA(10 nM)処理した細胞でのルシフェラーゼ活性も同様に測定した。結果は、薬剤無添加の場合のルシフェラーゼ活性と比較して相対比で示している。結果のグラフは5回の異なる試験結果の平均値である。

挿入図は、MAGI-CCR5細胞(5×10^4 /6well)に、T134(lane2)、T140(lane3)、ALX40-4C(lane4)、AMD3100(lane5)、SDF-1(lane6)を100 μ M濃度になるよう培地に添加し48時間培養した場合に得られた核抽出物に、 32 P-ラベルしたNF- κ Bプロンプを加え室温下1時間反応させ、6%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行ったものである。EMSAシグナルはBio-imaging Analyzerによって解析した。薬剤未処理のコントロール(lane1)と比較して、SDF-1とALX40-4C処理した場合に強く、またT134とT140処理した場合に経度のEMSAシグナルの増強効果がみられた。これらに反して、AMD3100処理ではそのような増強効果はみられなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Arakaki, R., Tamamura, H., Premanathan, M., Kanbara, K., Ramanan, S., Mochizuki, K., Baba, M., Fujii, T. and Nakashima, H.: **T134, a small molecule CXCR4 inhibitor, has no cross drug-resistance with the different class of CXCR4 antagonist AMD3100.**, *J. Virol.*, **73**; 1719-1723, 1999.
2. Xu, Y., Tamamura, H., Arakaki, R., Nakashima, H., Zhang, X., Fujii, N., Uchiyama, T. and Hattori, T.: **Marked increase in anti-HIV activity, as well as inhibitory activity against HIV entry mediated by CXCR4, linked to enhancement of the binding ability of tachyplesin analogs to CXCR4.**, *AIDS Res. Human Retroviruses*, **15**(5); 419-427, 1999.
3. Arakaki, N., Kajihara, T., Arakaki, R., Ohnishi, T., Kazi, J. A., Nakashima, H. and Daikuhara, Y.: **Involvement of oxidative stress in tumor cytotoxic activity of hepatocyte growth factor/scatter factor.**, *J. Biol. Chemist.*, **274**(19); 13541-13546, 1999.
4. Yoshida, T., Akasaka, T., Choi, Y., Hattori, K., Yu, B., Mimura, T., Kaneko, Y., Nakashima, H., Arakaki, R., Premanathan, M., Yamamoto, N. and Uryu, T.: **Synthesis of polymethacrylate derivatives having sulfated malthoheptaose side chains with anti-HIV activities.**, *J. Polymer Science*, **37**; 789-800, 1999.
5. Yasukawa, M., Hasegawa, A., Sakai, I., Ohminami, H., Arai, J., Kaneko, S., Yakushijin, Y., Maeyama, K., Nakashima, H., Arakaki, R. and Fujita, S.: **Down-regulation of CXCR4 by human herpesvirus 6 (HHV-6) and HHV-7.**, *J. Immunol.*, **162**; 5417-5422, 1999.
6. Premanathan, M., Kathiresan, K. and Nakashima, H.: **Mangrove Halophytes: a source of antiviral substances.**, *South Pacific Study*, **19**(1-2); 49-57, 1999.

7. Meta, A., Torigoe, N., Ito, Y., Arakaki, R., Nakashima, H. and Sugimura, K.:
Peptide-motif analysis of phage clones selected by anti-CCR5 monoclonal antibody (2D7).,
pp 489-492. Peptide Scienc 1998: (Ed. by M. Kondo), Protein Research, 1999.
8. Satoh, K., Kihara, T., Ida, Y., Sakagami, H., Koyama, N., Premanathan, M., Arakaki, R., Nakashima, H., Komatsu, N., Fujimaki, M., Misawa, Y. and Hata, N.:
Radical modulation activity of pine cone extracts of *Pinus elliottii* var. *Elliottii*.
Anticancer Res., **19(1A)**; 357-364, 1999.
9. Motohashi, N., Kawase, M., Kurihara, T., Shirataki, Y., Kamata, K., Nakashima, H., Premanathan, M., Arakaki, R., Kanbara, K., Satoh, K., Sakagami, H., Saito, S. and Nakamura, T.:
Relationship between radical intensity and biological activity of cacao husk extracts.
Anticancer Res., **19(2A)**; 1125-9, 1999.
10. Katsuraya, K., Nakashima, H., Yamamoto, N. and Uryu, T.:
Synthesis of sulfated oligosaccharide glycosides having high anti-HIV activity and the relationship between activity and chemical structure.
Carbohydrate Res., **315(3-4)**; 234-242, 1999.
11. Premanathan, M., Kathiresan, Yamamoto, N. and Nakashima, H.:
***In vitro* anti-human immunodeficiency virus activity of polysaccharide from *Rizophora mucronata* Poir.**,
Biosci. Biotechnol. Biochem., **63(7)**; 1187-1191, 1999.
12. Borjihan, G., Katsuraya, K., Nakashima, H. and Uryu, T.:
Synthesis and anti-HIV activity of sulfated polysaccharides containing acetamido groups.,
Sen'i Gakkaishi, **55(7)**; 323-330, 1999.
13. Premanathan, M., Arakaki, R., Izumi, H., Kathiresan, K., Nakano, M., Yamamoto, N. and Nakashima, H.:
Antiviral properties of a mangrove plant, *Rizophora apiculata* Blume, against human immunodeficiency virus.,
Antiviral Res., **44**; 113-122, 1999.
14. Gao, Y., Katsuraya, K., Kaneko, Y., Mimura, T., Nakashima, H. and Uryu, T.:
Synthesis, enzymatic hydrolysis, and anti-HIV activity of AZT-spacer-curdlan sulfate.,
Macromolecules, **32**; 8391-8324, 1999.
15. Katsuraya, K., Jeon, K-J, Nakashima, H. and Uryu, T.:
NMR studies on structure and action mechanism of sulfated dodecyl laminaripentaosidewith high anti-human immunodeficiency virus activity.,
Polymer Journal, **31**; 924-928, 1999.
16. Sakagami, H., Satoh, K., Ida, Y., Koyama, N., Premanathan, M., Arakaki, R., Nakashima, H., Hatano, T., Okuda, T. and Yoshida, T.:
Induction of apoptosis and anti-HIV activity by tannin- and lignin-related substances.,
pp 595-611. *Plant Polyphenols 2: Chemistry, Biology, Pharmacology, Ecology*,
(Ed. by Gross et al.), Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 1999.
17. Satoh, K., Sakagami, H., Ida, Y., Komatsu, N., Nakashima, H., Kanbara, K., Gupta, M., Sarma, D.N. and Mitra, K.:
Antimicrobial and radical modulation activity of AV-07, a poly-herbal formula.,
In vivo, in press. 2000.18. Motohashi, N., Kawase, M., Saito, S., Kurihara, T., Satoh, K., Nakashima, H., Premanathan, M., Arakaki, R., Sakagami, H. and Molnar, J.:
Synthesis and biological activity of N-acylphenothiazines.,
Antimicrob. Agents, in press. 2000.
19. Yoshida, Y., Kang, B., Hattori, K., Mimura, T., Kaneko, Y., Nakashima, H., Premanathan, M., Arakaki, R., Yamamoto, N. and Uryu, T.:
Anti-HIV activity of sulfonated arabinofuranan and xylofuranan.,
Carbohydrate polymers, in press. 2000.
20. 新垣理恵子、中島秀喜：抗ウイルス化学療法、ウイルスを知る（山本直樹編）、羊土社 98-106, 1999.
21. 神原賢治、中島秀喜：新規の抗ウイルス薬の開発状況、化学療法の領域、15(8): 1166-1173, 1999.
22. 神原賢治、藤井信孝、中島秀喜：HIV感染のコレセプター、CXCR4、を標的としたエイズ治療薬の開発況、感染症学会誌、74(3): 237-244, 2000.
2. **学会発表**
1. 神原賢治、新垣理恵子、M. Premanathan、中島秀喜；YK-FH312化合物の抗ウイルス活性。第10回抗ウイルス化学療法研究会、平成11年2月19-20日、東京
2. 中島秀喜；HIV感染のコレセプター、CXCR4、を標的としたエイズ治療薬の開発況。第73回日本感染症学会、平成11年3月30-31日、東京
3. 神原賢治、新垣理恵子、後藤和代、金本大成、吉森史、玉村啓和、藤井信孝、中島秀喜；CXCR4のアンタゴニストおよびその類似物質によるM-tropic HIV感染の増強作用。第47回日本ウイルス学会、平成11年11月7-9日、横浜
4. 金本大成、神原賢治、新垣理恵子、吉森史、後藤和代、柏田良樹、中島秀喜；テルペノイド化合物YK-FH312化合物の抗HIV活性。第13回日本エイズ学会、平成11年12月2-4日、東京
5. 神原賢治、新垣理恵子、後藤和代、金本大成、吉森史、玉村啓和、藤井信孝、中島秀喜；CXCR4のアンタゴニストおよびその類似物質によるM-tropic HIV感染の増強作用。第13回日本エイズ学会、平成11年12月2-4日、東京
6. 吉森史、神原賢治、後藤和代、金本大成、中島秀喜；HIV感染のレセプター発現におよぼすグリチルリチンの影響。第13回日本エイズ学会、平成11年12月2-4日、東京

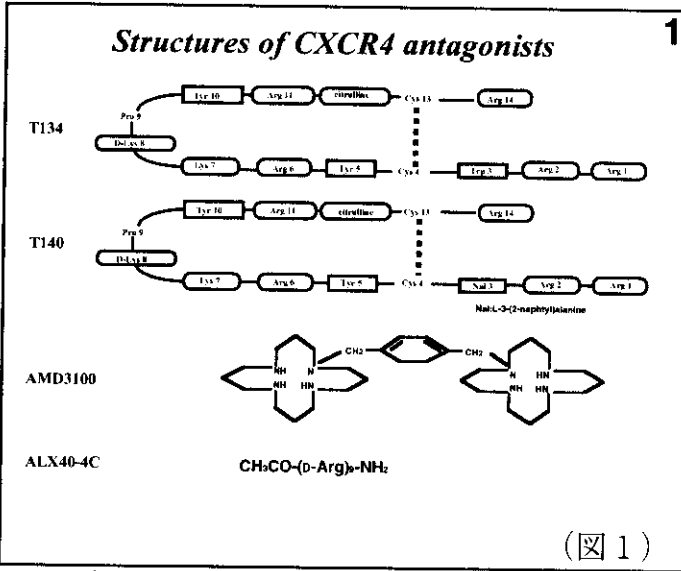


Table 1. Anti-HIV activity of CXCR4 inhibitors in MTT assay

Compound	EC ₅₀ (nM)	CC ₅₀ (μM)	SI (CC ₅₀ /EC ₅₀)
T134	63.5	>100	> 1575
T140	7.8	>100	>12821
ALX40-4C	1300.0	140	108
SDF-1	730.0	> 11	> 15
AMD3100	280.0	>250	> 893
vMIP II	430.5	> 50	> 116
AZT	11.5	139	12087

(表 1)

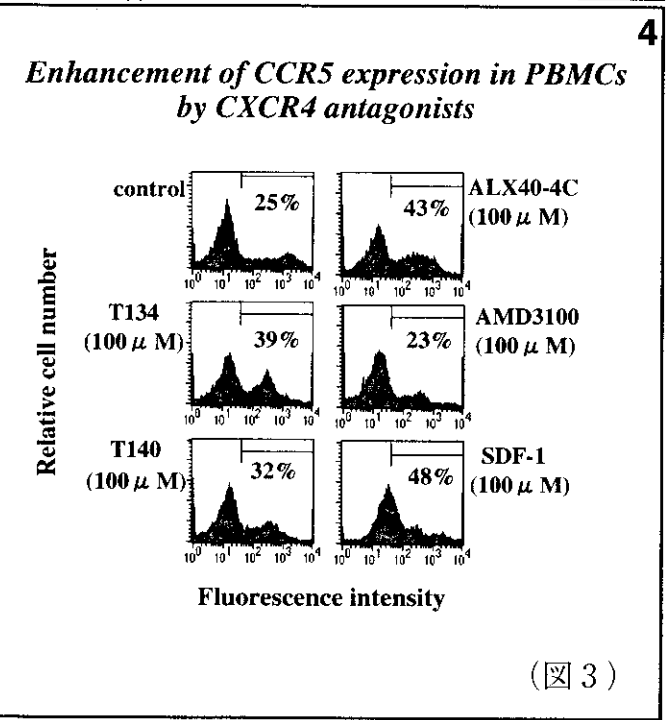
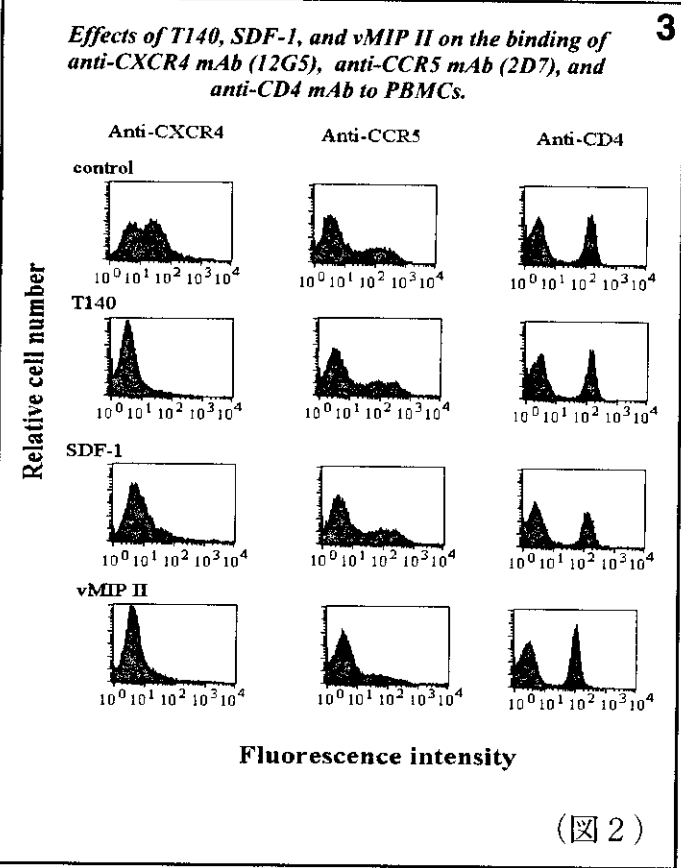
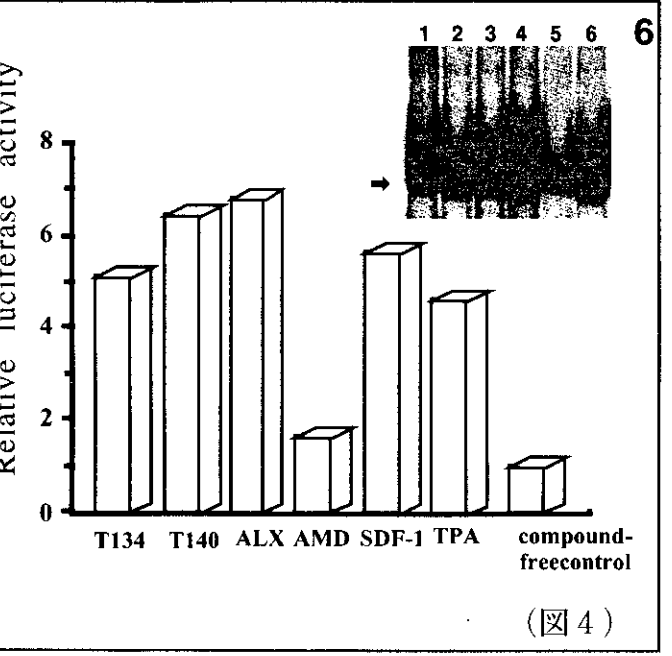


Table 2. Effects on T-tropic and M-tropic HIV-1 in MAGI assay

Compound	M-tropic HIV (HIV-1 _{JR-CSF}) [No. of blue cells in MAGI assay]					T-tropic HIV-1 [HIV-1 _{NL4-3}]
	100 μM	60 μM	20 μM	8 μM	0	EC ₅₀ (nM)
T134	200 (x3.1)	164 (x2.6)	72 (x1.1)	66 (x1.0) ^a	64	18.5
T140	281 (x4.4)	143 (x2.2)	60 (x0.9)	53 (x0.8)		1.3
ALX40-4C	248 (x3.9)	224 (x3.5)	254 (x4.0)	174 (x2.7)		95.2
AMD3100	58 (x0.9)	61 (x1.0)	70 (x1.1)	79 (x1.2)		3.3
Met SDF-1	404 (x6.3)	431 (x6.7)	199 (x3.1)	50 (x0.8)		7.9
SDF-1	311 (x4.9)	249 (x3.9)	213 (x3.3)	60 (x0.9)		40.0
vMIP II	16 (x0.3)	1 (x0)	1 (x0)	0 (x0) ^b		8.1
				19.9 ^b		

^a The number in parenthesis is relative ratio when compared with the number of blue cells in compound-free control.
^b EC₅₀ (nM)

(表 2)



18. カニクイザルに病原性を示すSHIVの解析

協力研究者 阪井弘治 国立感染症研究所エイズ研究センター主任研究官

研究要旨

本研究では、エイズの霊長類実験動物系で用いられているSIV-HIVキメラウイルス (SHIV) の病原性獲得機構解明のため、病原性SHIV-C2/1のウイルスゲノム構造を明らかにし、非病原性親株SHIV-89.6等と比較解析した。

SHIV-C2/1のシーケンスの結果、RNAゲノム長は9860塩基であることが明らかになった。非病原性親株SHIV-89.6と比較すると、31塩基の変異が確認され、そのうち17がenv遺伝子に集中していた。塩基変異に伴うアミノ酸置換変異は、Gagに1個所、Polに3個所、Tatに2個所、Envに16個所、そしてNefに1個所見出された。また、env遺伝子3'末端を含む140 bpが欠失し、その結果、HIV-1 Env gp41 C末端の42アミノ酸が欠失するとともに、SIVmac239由来の同等領域57アミノ酸に置換していることが明らかになった。更に、HIV-1/HXBc2のenv遺伝子を持つ病原性SHIV-HXBc2P3.2との比較分析により、Env C2及びV3領域2個所に類似する変異を見出した。第一は、C2領域のアスパラギン結合糖鎖 (SHIV-HXBc2P3.2では276N、SHIV-C2/1では279N) の消失であり、第二は、V3ループ内の連続する塩基性アミノ酸の一部が全く極性の異なるアミノ酸に変化している (SHIV-HXBc2P3.2では304 R/I、SHIV-C2/1では308 R/E) ことである。これらの部位は各々ウイルスレセプター及びコレセプターとの結合に関与することが知られており、ウイルスの宿主域が変化している可能性が考えられる。以上のように、ウイルスの比較遺伝学的解析により病原性に関与し得るゲノム領域の情報を得ることができた。

A. 研究目的

抗HIVワクチンあるいは抗HIV薬の開発と評価のために、マカク属のサルとSIV-HIVキメラウイルス (SHIV) を組合せたエイズの霊長類実験動物系が、世界中で複数樹立されている。国立感染症研究所に於ても、カニクイザルと病原性SHIV-C2/1を用いたモデル系が樹立、利用されている (論文発表2)。これらのSHIVは、SIVmac239をベースにしてClade B HIV-1のenv遺伝子を挿入したキメラウイルスであり、作製された組換えウイルスクローンは通常病原性を持たず、サルで継代を繰返すことにより病原性を獲得していく。現在のところ何れのマカクザル- SHIV実験系に於てもこの機序は明らかになっていない。SHIVの病原性獲得機構を解明することにより、動物試験用SHIVの設計が容易になることが期待され、現在困難を極めている、日本および東南アジアにて流行しているClade E HIV-1とのキメラSHIVを作製する上でも多大な示唆を得ることができると思われる。更に、ヒトにおけるHIVの病

原性発現を研究する上で何らかの手掛かりが得られる可能性もある。そこで本研究では、SHIVの病原性獲得機構解明の第一歩として、病原性SHIV-C2/1ウイルスゲノムの構造を明らかにし、非病原性親株SHIV-89.6等と比較解析することを計画した。

B. 研究方法

病原性SHIV-C2/1は、非病原性親株SHIV-89.6 (図1及び引用文献2) をアカゲザルで3代継代した後、更にカニクイザルにて2代継代して得られた (図2及び論文発表2)。ウイルスストックはカニクイザルの血漿の形態で存在する。まず、サル血漿よりウイルスRNAを含有する全RNAを抽出し、これを鋳型としてウイルス特異的プライマーを用いてnested RT-PCRを行った。PCRは全ゲノムを11断片に分割して各断片の両端が重複するように設計した。PCR産物はアガロースゲルで精製、dideoxy chain termination法にて蛍光terminatorを用い

て標識し、ABI PRISM 310 Genetic Analyserにて電気泳動して、シーケンスを決定した。

C. 研究結果

シーケンスの結果SHIV-C2/1のRNAゲノム長は9860塩基であった。非病原性親株SHIV-89.6と比較すると、31塩基の変異が確認され、そのうち17変異がenv遺伝子に集中していた(図3)。塩基変異に伴うアミノ酸置換変異は、Gagに1個所(457 M/I)、Polに3個所(66 A/T、413 S/L、771 K/R)、Tatに2個所(39 I/T、およびC末端のQ付加)、Envに16個所(143 P/L、153 K/E、186 I/V、187 E/K、190 N/S、228 M/I、279 N/D、284 A/V、308 R/E、399T/A、562 H/N、565 Q/R、746 L/S、756 D/A、779 I/T、842 L/V)、そしてNefに1個所(109 R/K)見出された。また、env遺伝子3'末端を含む140 bpが欠失し、その結果、HIV-1 Env gp41 C末端の42アミノ酸が欠失するとともに、SIVmac239由来の同等領域57アミノ酸に置換していることが明らかになった。なお、決定したSHIV-C2/1全ゲノムシーケンスは遺伝子データベース(DDBJ/EMBL/GenBank)に登録申請中である。

D. 考察

本研究で解析した病原性SHIV-C2/1の系図を遡れば、非病原性親クローンSHIV-89.6を経て、SHIV-4(SHIV-HXBc2)に至る(図1)。SHIV-4はSIVmac239のtatよりenv遺伝子までをHIV-1/HXBc2クロノンの同等領域で置換したものである(図1及び引用文献1)。SHIV-89.6は、SHIV-4のenv遺伝子の一部(KpnI-BamHI)をHIV-1/89.6に置換して作製された(図1及び引用文献2)。非病原性SHIV-89.6がin vivo継代により病原性SHIV-C2/1に変化したのと同様に、非病原性SHIV-4もアカゲザルにて継代することで病原性のSHIV(SHIV KU-1)へと変化した事例が報告されている(Cayabyabら引用文献3)。Cayabyabらは、SHIV KU-1のenv遺伝子の一部(KpnI-BamHI)をクローニングし、非病原性親クローンSHIV-4の同等領域と取り換えることによりSHIV-HXBc2P3.2を作製、このクローンが病原性を示すことから、env遺伝子のKpnI-BamHI領域(Envアミノ酸No.43-751)が病原性発現に必要であると結論した(引用文献3)。このenv遺伝子KpnI-BamHI領域について、SHIV-4と

SHIV-HXBc2P3.2、及びSHIV-89.6とSHIV-C2/1の2組の非病原・病原性ウイルスに共通点があるかを比較検討した。図4に示すように、各々の非病原性ウイルスが病原性ウイルスに変化した際に同等部位のアミノ酸が変化した例は確認できなかった。しかしながら、類似の変化が2個所に見出された。第一は、C2領域のアスパラギン結合糖鎖(SHIV-HXBc2P3.2では276N、SHIV-C2/1では279N)が消失することである。この部位はウイルスレセプターであるCD4との結合に関与することが示されており、その相互作用に変化をもたらす可能性が考えられる。第二は、V3ループ内の連続する塩基性アミノ酸の一部が全く極性の異なるアミノ酸に変化している(SHIV-HXBc2P3.2では304 R/I、SHIV-C2/1では308 R/E)ことである。V3領域はコレセプターを介した宿主域の決定に大きく関与していることが知られており、極性変化を伴うアミノ酸変異が宿主域に影響を与えている可能性は十分考えられる。

以上、2株の病原性SHIVに共通点に焦点を当てて分析したが、各々のウイルス株が別個の原因で病原性を獲得した可能性も考慮すべきであろう。SHIV-C2/1には31の塩基変異が見出される。それに伴う23のアミノ酸変異のうち17は極性等アミノ酸の性質の変化を伴い、結果としてタンパク質の構造・活性等の変化を引起す可能性が有る。例えば、env遺伝子C末端を含む140塩基の欠失により、SHIV-C2/1のEnvタンパク質C末端は、HIVのgp41 C末端由来の42アミノ酸からSIVの同等部分57アミノ酸へと置換する。この部分はgp41の細胞質内領域で、 α -helix構造を取り細胞膜内面と接触していると推定されている。その機能は不明ではあるが、次の様な推測も可能であろう。Env gp41 C末端はコアタンパク質のGag p17との相互作用に重要な役割を演じ、この相互作用には種特異性が有るのかも知れない。つまり、SHIVにおいては、HIVよりもSIVのEnv gp41 C末端領域の方が、SIV Gag p17との親和性が高いのかもしれない。この事象が、感染性にも影響を与えているかも知れない。また、140塩基の欠失領域はnef遺伝子の直ぐ上流にあるため、同遺伝子の発現のパターンや発現量に影響を与える可能性も考えられる。

上述の分析結果を踏まえたうえで、病原性獲得・発現に必要な遺伝子(または遺伝子領域)を同定

するためには、SHIV-C2/1の分子クローンの作製、次いで親株SHIV-89.6との組換えウイルス作製と病原性の解析が必要である。

E. 結論

カニクイザルに病原性を示すHIV-SIVキメラウイルス株、SHIV-C2/1のRNAゲノム全シーケンスを決定した。全長は9860塩基。非病原性親株SHIV-89.6と比較すると、31塩基の変異が有り、そのうち17がenv遺伝子に集中していた。HIV-1/HXBc2のenv遺伝子を持つ病原性SHIV-HXBc2P3.2との比較分析により、Env C2及びV3領域に類似の変異を見出した。これら2領域を含めて何れの遺伝子(領域)が病原性に関与するかを同定するためには、SHIV-C2/1の分子クローンの作製を始めとする更なる研究が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Sakai, K., Horiuchi, M., Iida, S., Fukumori, T., Akari, H., and Adachi, A. : Mutational analysis of human immunodeficiency virus type 1 *vif* gene. *Virus Genes*, 18(2), 179-181, 1999.

(2) Sinohara, K., Sakai, K., Ando, S., Ami, Y., Yoshino, N., Takahashi, E., Someya, K., Suzaki, Y., Nakasone, T., Sasaki, Y., Kaizu, M., Lu, Y. and Honda, M. : A highly pathogenic simian/human immunodeficiency virus with genetic changes in cynomolgus monkey. *Journal of General Virology*, 80(Pt5), 1231-1240, 1999.

(3) Mochizuki, N., Otsuka, N., Matsuo, K., Shiino, T., Kojima, A., Kurata, T., Sakai, K., Yamamoto, N., Isomura, S., Dhole, T.N., Takebe, Y., Matsuda, M., and Tatsumi, M. : An infectious DNA clone of HIV type 1 subtype C. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 15(14), 1321-1324, 1999.

2. 学会発表

(1) 阪井弘治、篠原克明、高橋栄治、網康至、海津雅彦、吉野直人、佐々木裕子、須崎百合子、仲宗根正、本多三男：カニクイザルに病原性を示すSHIV-C2/1株のシーケンスの解析。第47回日

本ウイルス学会、1999.

(2) 阪井弘治、篠原克明、高橋栄治、網康至、海津雅彦、吉野直人、佐々木裕子、須崎百合子、仲宗根正、本多三男：カニクイザルに病原性のSHIV-C2/1キメラウイルスのゲノム解析。第13回日本エイズ学会、1999.

(3) 佐々木裕子、網康至、阪井弘治、篠原克明、高橋栄治、安藤秀二、染谷健二、須崎百合子、海津雅彦、仲宗根正、本多三男：HIV-1 89.6由来 Env 等シーケンスを挿入した SIV/HIV キメラウイルスの株間による変化—感染サルにおける CD4 陽性細胞減少と CD4 陽性細胞における CD95 発現の解析。第13回日本エイズ学会、1999.

(4) 篠原克明、阪井弘治、高橋栄治、網康至、吉野直人、海津雅彦、佐々木裕子、須崎百合子、仲宗根正、本多三男：カニクイザル病原性 SIV/HIV キメラウイルスの安定性。第13回日本エイズ学会、1999.

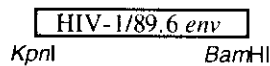
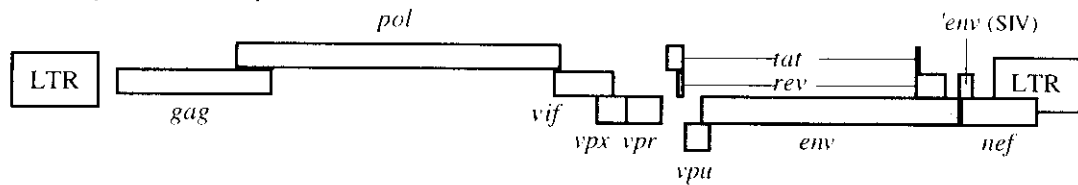
G. 引用文献

(1) Li, J., Lord, C.I., Haseltine, W., Letvin, N.L. and Sodroski, J. : Infection of cynomolgus monkeys with a chimeric HIV-1/SIVmac virus that expresses the HIV-1 envelope glycoproteins. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome*, 5 (7), 639-646, 1992.

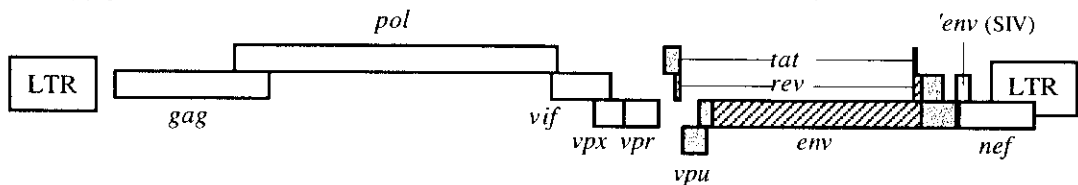
(2) Reimann, K.A., Li, J.T., Voss, G., Lekutis, C., Tenner-Racz, K., Racz, P., Lin, W., Montefiori, D.C., Lee-Parritz, D.E., Lu, Y., Collman, R.G., Sodroski, J., and Letvin, N.L. : An env gene derived from a primary human immunodeficiency virus type 1 isolate confers high in vivo replicative capacity to a chimeric simian/human immunodeficiency virus in rhesus monkeys. *Journal of Virology*, 70(5), 3198-206, 1996.

(3) Cayabyab, M., Karlsson, G.B., Etemad-Moghadam, B.A., Hofmann, W., Steenbeke, T., Halloran, M., Fanton, J.W., Axthelm, M.K., Letvin, N.L., and Sodroski, J.G. : Changes in human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins responsible for the pathogenicity of a multiply passaged simian-human immunodeficiency virus (SHIV-HXBc2). *Journal of Virology*, 73(2), 976-84, 1999.

SHIV-4 (SHIV-HXBc2)



SHIV-89.6



- SIVmac239 (*nef* open)
- HIV-1/HXBc2
- HIV-1/89.6

図1 SHIV-89.6 の系統図

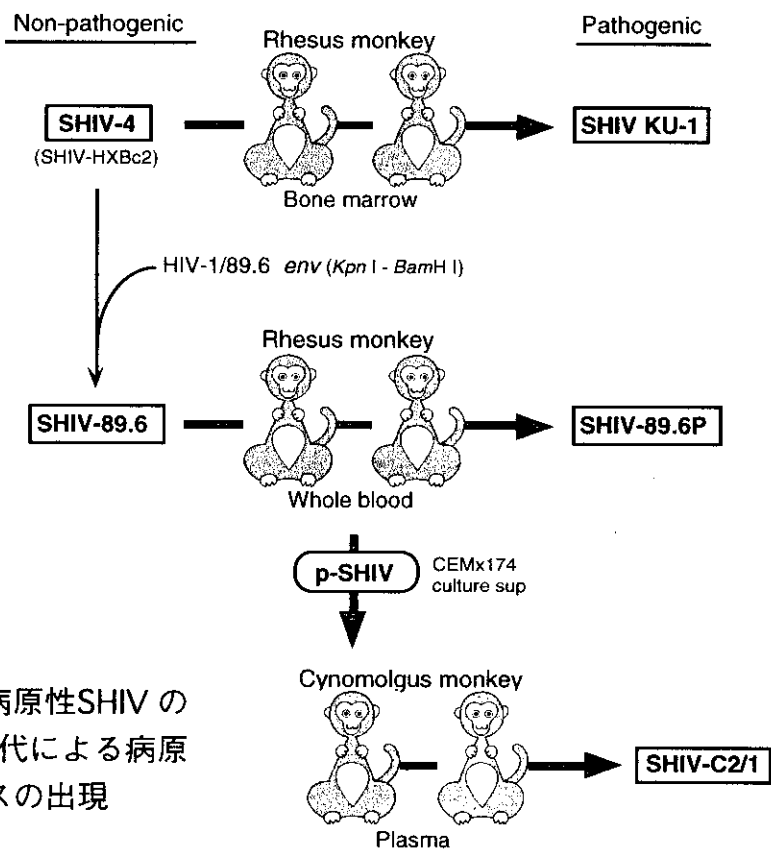


図2 非病原性SHIVの in vivo 継代による病原性ウイルスの出現

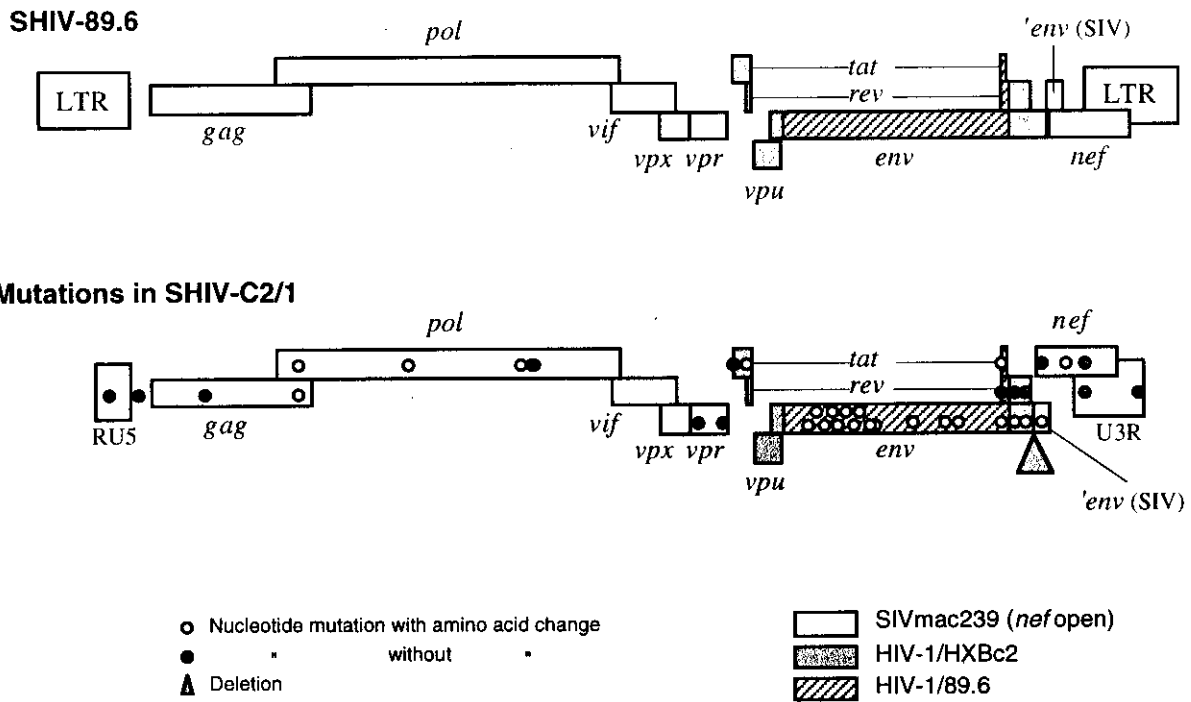


図3 SHIV-89.6 とSHIV-C2/1 の比較

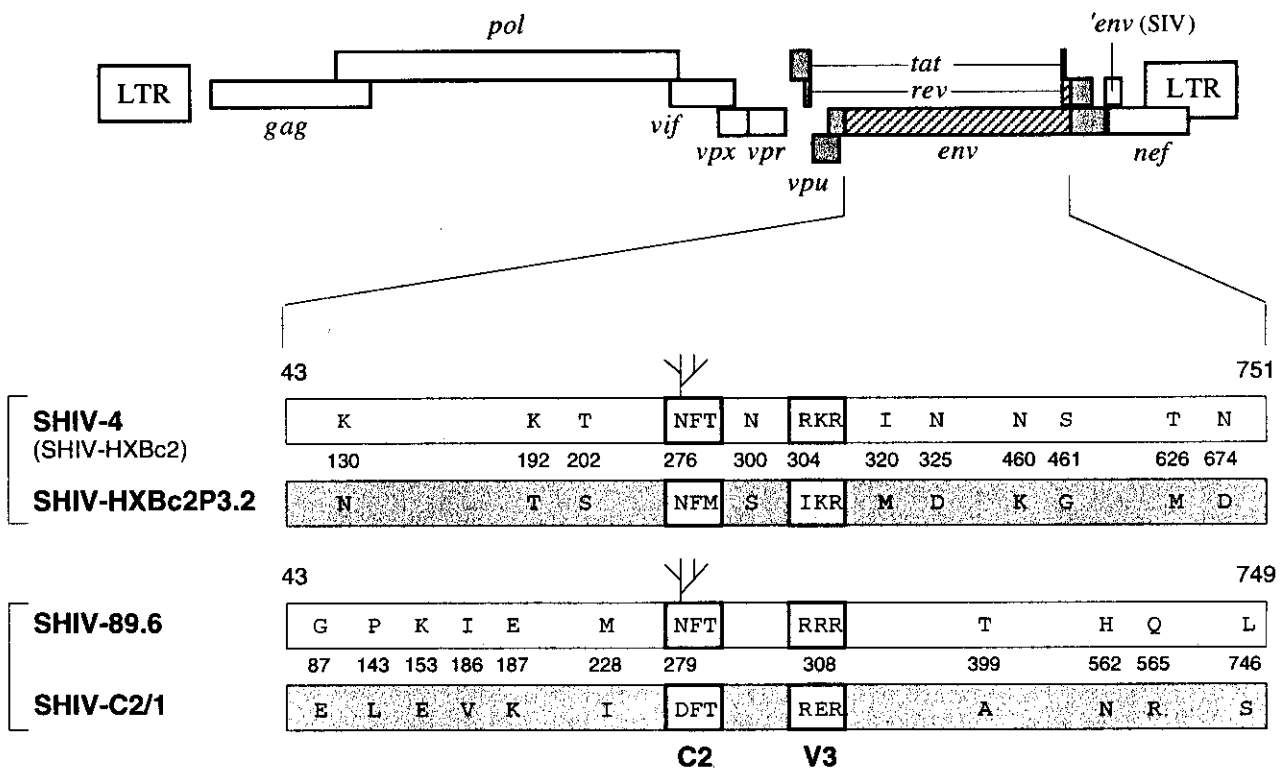


図4 2組の非病原性及び病原性SHIVの比較

19. HIV-1 Tat蛋白によるマクロファージのアポトーシス死細胞貪食処理の抑制

分担研究者 水落利明 国立感染症研究所・細菌血液製剤部 輸血病態室長

研究要旨

アポトーシスをおこした細胞は、マクロファージをはじめとする貪食細胞によって、生体からすみやかに取り除かれて、生体の恒常性が維持されている。

本研究では、HIV感染によるマクロファージのアポトーシス死細胞の貪食処理への影響について検討を加えた。THP-1細胞のアポトーシス死細胞の貪食はHIV-1 Tat処理により、明らかに抑制された。Tat RGD 配列がマクロファージのアポトーシス死細胞の認識を抑制するとともに、Tat蛋白がマクロファージを活性化するため、貪食処理能が低下するのではないかと考えられる。

共同研究者 小高 千加子 国立感染症研究所
細菌血液製剤部

A. 研究目的

アポトーシスをおこした細胞は、マクロファージをはじめとする貪食細胞によって、生体からすみやかに取り除かれて、細胞内からは何ら放出されることなく処理され、その結果炎症を引き起こすことなく死細胞は除去されると考えられている。

本研究では、HIV感染によるマクロファージのアポトーシス死細胞の貪食処理への影響に関して検討を加えた。

B. 研究方法

マクロファージに分化誘導させたヒトTHP-1細胞をHIV-1BH10 Tat1-86合成ペプチドあるいはRGD配列を含むTat61-86ペプチドで処理し、アポトーシス死細胞の貪食能を調べた。また、THP-1細胞からのサイトカイン産生は、ELISAを用いて測定した。さらに、マクロファージを活性化することで知られているLPSやbacterial DNAでTHP-1細胞を処理し、そのアポトーシス死細胞の貪食処理能への影響についても検討を加えた。

C. 研究結果

1. Tat合成ペプチドによるマクロファージのアポトーシス死細胞貪食の抑制：

ヒトJurkat T細胞を抗Fas抗体(CH-11)で処理し16時間経過すると、すべての細胞がアポトーシスにより死滅する。そのアポトーシス死細胞をマクロファージに分化誘導させたヒトTHP-1細胞に貪食させ、1時間経過すると約50%の死細胞が貪食された。Phospho-L-serine (PLS)前処理すると貪食の抑制が見られた。さらに、RGDSペプチド前処理すると著明な死細胞の貪食の抑制が観察された。Tat 1-86ペプチド処理すると死細胞の貪食の抑制され、RGD配列を含むTat61-86ペプチドでも、THP-1細胞の死細胞の貪食の低下が観察された(Fig. 1a)。さらに、THP-1細胞の死細胞の貪食について経時的变化を調べてみると、RGDSペプチドあるいはTat1-86ペプチド前処理すると死細胞の貪食の抑制が観察された(Fig. 1b)。

2.マクロファージの活性化とアポトーシス死細胞の貪食能の低下：

THP-1細胞をTat1-86、Tat61-86、そしてマクロファージを活性化することで知られているLPSやE.coli由来のDNAで処理し、THP-1細胞からのTNF- α 、IL-1 β のサイトカイン産生を経時的に測定した。Tat1-86で処理した場合、LPSやE.coli由来のDNAで処理した場合よりも早期から培養液中にTNF- α 、IL-1 β 産生が見られ、処理後16時間では、Tat1-86で処理したTHP-1細胞からは、LPSやE.coli由来のDNA処理した場合と同程度のTNF- α 、IL-1 β

産生が観察された(Fig.2)。一方、calf thymus 由来のDNAやTat61-86ペプチドで処理したTHP-1細胞の培養液中には殆どTNF- α , IL-1 β は検出されなかった。

次に、これらの16時間処理したTHP-1細胞のアポトーシス死細胞の貪食能を調べてみるとLPS, E.coli由来のDNA,あるいはTat1-86ペプチド処理により活性化されたTHP-1細胞のアポトーシス死細胞の貪食能の明らかな低下が認められた(Fig. 3)。

D. 考察

今回実験に用いたTHP-1細胞のアポトーシス死細胞の認識は、PLS前処理よりもRGDSペプチド前処理した場合に、著明な死細胞の貪食の抑制が観察されたことより、主に、ピトロネクチンレセプターを介して行われると考えられた。Tatはピトロネクチンレセプターに結合することは知られているが、Tat存在下、THP-1細胞のアポトーシス死細胞の貪食は明らかに抑制された。

マクロファージを活性化することで知られているLPSやE.coli由来のDNAをマウスに投与すると抗DNA抗体産生を誘導されることが報告されているが、その機序について未だ明らかでない。LPSやE.coli 由来のDNAあるいはTat1-86でTHP-1細胞を活性化後、アポトーシス死細胞の貪食能を調べてみると明らかな低下が認められたことより、Tat RGD配列がマクロファージのアポトーシス死細胞の認識を抑制するとともに、Tat蛋白がマクロファージを活性化するため、貪食処理能が低下したと考えられた。

HIV感染に伴ない自己免疫疾患で観察される、自己細胞成分、特にDNAや核蛋白を認識する自己抗体が高頻度で検出される。抗DNA抗体産生の機序については未だ不明であるが、ヌクレオソーム蛋白がポリクローナルB細胞の活性化や抗DNA抗体を誘導する主要な抗原であるという報告もされている。最近、自己免疫疾患とアポトーシスとの関連が注目され、SLEをはじめとする全身性自己

免疫疾患患者の末梢血液中にヌクレオソームが検出されることが報告されている。マウスにアポトーシス死細胞を投与すると抗DNA抗体産生が誘導されることが明らかにされている。昨年度、我々はアポトーシスをおこした細胞は、マクロファージによって貪食され、アポトーシス死細胞のヌクレオソーム蛋白が分解されることが報告した。

HIV感染によりマクロファージの貪食処理が抑制され、アポトーシス死細胞のヌクレオソーム蛋白が分解されず、その結果、末梢血液中流出し、それが、炎症や自己抗核抗体の産生の誘因になるのではないかと推察される。

今後、Tat-transgenic mice で自己抗体が検出されるか検討するとともに、ヌクレオソーム蛋白が抗DNA抗体を誘導する機構についても解析を進めたいと考えている。

E. 結論

HIV-1Tatにより、マクロファージによるアポトーシス死細胞の貪食は明らかな抑制が観察された。HIV感染に伴ない自己抗体産生の機序については現在のところ不明であるが、本研究の成果はHIV感染に伴ない自己抗体産生機構を解明する一助になるものと思われる。

F. 研究発表

[論文発表]

A. 原著

1. Odaka, C. and T.Mizuochi: Role of macrophage lysosomal enzymes in the degradation of nucleosomes of apoptotic cells. *J. Immunol.* 163:5346-5352.1999.
2. Odaka, C. and T.Mizuochi: Angiotensin-converting enzyme inhibitor captopril prevents activation-induced apoptosis by interfering with T cell activation signals. (Submitted for publication)
3. Odaka, C. and T.Mizuochi: Proteolysis of thymosin β 4 by caspase-3-like proteases during apoptosis in murine thymocytes. (Submitted for publication)

B: 総説

1. 小高千加子, 水落利明: アポトーシスにおけるDNAの切断とヌクレアーゼ. 臨床免疫. 32:18-26.1999.

[学会発表]

1. 小高千加子, 水落利明: マクロファージによって貪食されたアポトーシス死細胞のヌクレオソームの分解. 第29回日本免疫学会学術集会, 1999年12月.

2. 吉澤いづみ, 早田陽子, 保田幸子, 加藤珠美, 水落次男, 竹森利忠, 水落利明, 横田恭子: HIV-1 gag の経鼻免疫による液性及び細胞性免疫応答の誘導. 第29回日本免疫学会学術集会, 1999年12月.

3. 笠井道之, 水落利明: マウス胸腺上皮細胞のクラスII拘束性抗原提示におけるIi鎖のプロセッシング様式とカテプシンの役割について. 第29回日本免疫学会学術集会, 1999年12月.

HIV-1 Tat inhibits engulfment of apoptotic cells by THP-1 cells

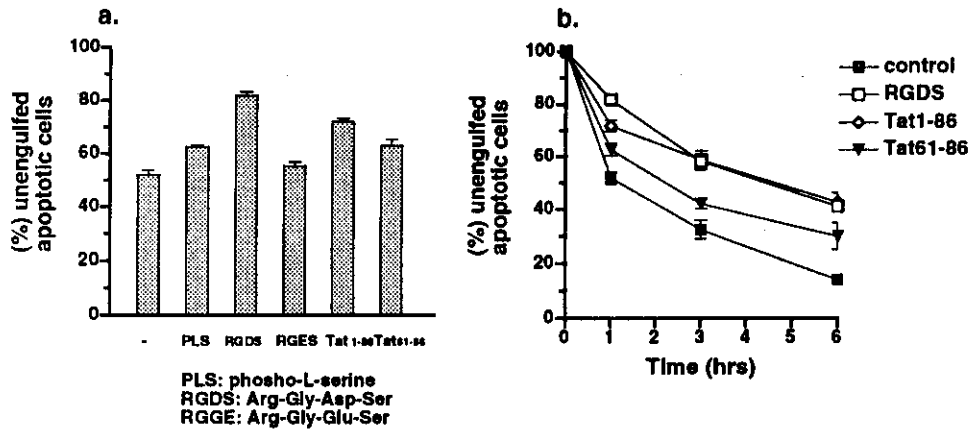


Fig. 1

Exposure to HIV-1 Tat results in cytokine production in THP-1 cells.

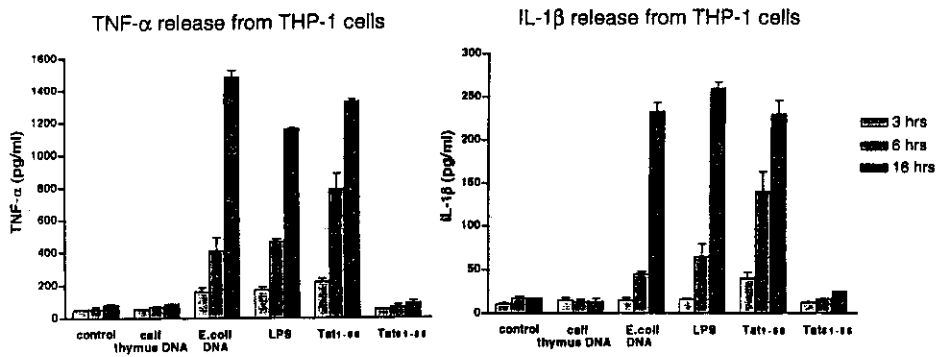


Fig. 2

Engulfment of apoptotic cells by activated THP-1 cells

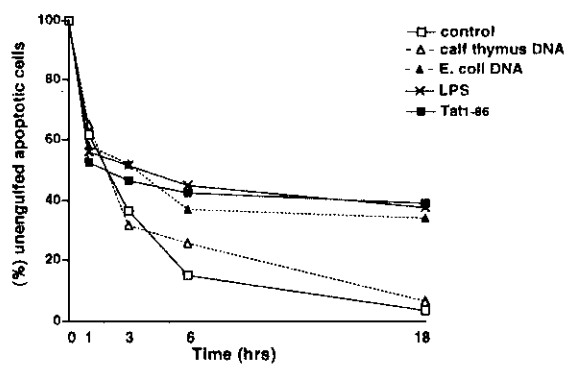


Fig. 3