

図 5.

図 6. 各調節領域の検出率(%)

|        | 頂頭葉   | 側頭葉 | 後頭葉   |
|--------|-------|-----|-------|
| A      | 78.79 | 60  | 7.41  |
| B      | 15.15 | 0   | 0     |
| C      | 0     | 20  | 0     |
| D      | 0     | 20  | 0     |
| E      | 0     | 0   | 40.74 |
| F      | 0     | 0   | 51.85 |
| Others | 6..06 | 0   | 0     |

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

「HIV 等のレトロウイルスによる痴呆や神経障害の病態と治療に関する研究」研究班  
(分担) 研究報告書

HIV 感染に伴う中枢神経障害の程度と脳脊髄液中の 14-3-3 蛋白質についての考察  
木戸 博、奥村 裕司、若林 英樹、楊 兵、塩田 麻由美  
徳島大学分子酵素学研究センター・酵素分子化学部門

研究要旨

AIDS Dementia Complex (ADC) は HIV 感染者の約半数に認められるが、画像診断以外に病像を適格に把握する方法は今のところない。また程度の進んだ ADC では、神経細胞の急速な破壊を伴い重篤な症状を示すことも稀ではない。このような患者の病状を Biopsy などによらず生前診断する方法は、MRI などによる画像診断に頼っているのが現状である。しかし画像診断は脳内の病変を real-time に反影するとは言えず、迅速な治療効果の判定や予後の判定に必ずしも有用ではない。本研究では、脳の神経細胞に多く局在して抗アポトーシス作用、シグナル伝達のアダプター因子、カテコールアミン産生促進因子、細胞周期調節因子として知られている 14-3-3 蛋白質が、ADC の進行と共に脳脊髄液中に現れてくる事を始めて見出した。さらに脳の神経細胞中の主要な 14-3-3 蛋白質を構成しているの各 isomer に対する特異抗体の作成に成功して、エイズ患者での特徴的な isoform pattern を同定した。この isoform pattern は、従来 Creutzfeldt-Jakob 病で報告されていた isoform pattern と異なり、鑑別診断にも重要な情報を提供する事が明らかとなった。なお本研究では、これらの抗体を用いた脳脊髄液中の 14-3-3 蛋白質の半定量法を確立している。脳脊髄液中に 14-3-3 を検出した HIV 患者は、いずれも脳の実質障害が強く疑われた ADC と cytomegalovirus encephalitis の患者で、髄膜炎や脳の実質障害を伴わない患者では、脳脊髄液中の 14-3-3 はほとんどの場合検出されなかった。このように 14-3-3 蛋白質は、エイズ脳症における脳の神経細胞の破壊の程度を real-time に知ることのできるマーカーとして、有用である。また脳脊髄液は 1 日に 3.7 回入れ代わる事が知られておることから、髄液中の 14-3-3 は脳の実質障害を反影する real-time marker で脳の病変の進行のみならず、治療の程度、治療の有効性の判定にも有用と推定された。

## A. 研究目的

AIDS Dementia Complex (ADC) は HIV 感染者の約半数に認められるが、画像診断以外に病像を適格に把握する方法は今のところない。しかし画像診断は脳内の病変を real-time に反影するとは言えず、従って迅速な治療効果の判定や予後の判定に必ずしも有用ではない。本研究では、ADC や cytomegarovirus encephalitis (CMVE) を伴う HIV 感染者の脳脊髄液中に、神経細胞に局在する 14-3-3 蛋白質が検出される事を見出し、HIV 感染に伴う中枢神経細胞の障害の程度を示すマーカーとしての考察を行った。なお 14-3-3 蛋白質はこれまでに、Creutzfeldt-Jakob disease (CJD)患者の脳脊髄液中の特異的早期診断マーカーとして注目されてきた蛋白質である。HIV 患者において見い出された 14-3-3 の特徴的 isoform pattern から、CJD などの神経細胞の障害を伴う疾患との鑑別診断にも有用かどうか、合わせて検討した。

## B. 研究方法

ヒトの脳の神経細胞の 14-3-3 蛋白質には、少なくとも 6 種類 ( $\tau$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ,  $\beta$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ ) の isoform が報告されているが、それぞれの isomer 間には約 82-86% の identity があり isomer を適格に識別する市販の特異抗体は今のところ無い。そこで、わずかな 1 次構造の違いに着目した 10 種類の抗ペプチド抗体とそれぞれの recombinant 14-3-3 isomer に対する 11 種の monoclonal antibody (MAb) を作成した。検索した患者は国立国際医療センターで取り扱った

20 症例の HIV 患者 [4 例の ADC, 6 例の CMVE, 6 例の cryptococcal meningitis (CCM), 4 例の中枢神経症状の無い (CNSC-) 患者群]、及び同じく国立国際医療センターと徳島大学で取り扱った 8 症例の HIV 以外の患者 [4 例の無菌性髄膜炎、1 例の amyotrophic lateral sclerosis, 1 例の myasthenia gravis, 1 例の perkinson's disease 患者群] を対象として検索した。(倫理面への配慮)脳脊髄液を採取した HIV 患者と HIV 以外の患者では、十分なインフォームドコンセントを行った上、承諾を得て検体を採取した。

## C. 研究結果

作成した 10 種類の抗ペプチドポリクローナル抗体の中で 14-3-3 $\eta$  に対する特異抗体が得られた。また、 $\zeta$  に対する僅かな交差性を認めるもののほぼ  $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  に特異的な抗体も得られた。また 11 種類の MAb の中では、 $\tau$  に対する 1 種類の特異抗体の作成を見た。市販の抗体の中では、 $\zeta$  に対する抗体 (Santa Cruz, SC-1019) が特異的と判定された (図 1)。これらの特異抗体を用いて患者の脳脊髄液 (20 $\mu$ l) を Western Immunoblotting し、各 isomer の量を densitometer を用いて半定量的に測定した。中枢神経症状を伴う HIV 患者の中で、特に ADC と CMVE 患者の脳脊髄液で明確な 14-3-3 $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\zeta$  の検出を見た。しかし HIV 患者の中でも、cryptococcal meningitis (CCM) を伴う患者や中枢神経症状を伴わない (CNSC-) 患者では、14-3-3 蛋白質の出現頻度と出現量が有意に低い事が判明した。調べた限

りの CJD 以外の HIV に感染していない患者では、いずれの患者も 14-3-3 蛋白質は検出できなかった。図 2 にそれぞれの患者群の典型的な髄液の 14-3-3 isomer pattern を示す。また全ての患者の脳脊髄液中の 14-3-3 isomer pattern を、各群間で統計処理した結果を図 3 に示す。ADC と CMVE 患者では 14-3-3 $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\zeta$  が有意に検出された。しかし、CCM を伴う HIV 患者では時に 14-3-3 $\epsilon$ ,  $\gamma$  が、ADC で 14-3-3 $\beta$  が検出されるが、統計的には有意で無いと判定された。また HIV で認められた 14-3-3 の isomer pattern は、これまでに CJD で報告されていた isoform pattern と明らかに異なり、鑑別診断に役立つ可能性が強く示唆された。

#### D. 考察

14-3-3 蛋白質は、海馬や大脳皮質の錐体細胞、小脳のプルキンエ細胞に多く局在して抗アポトーシス作用、シグナル伝達のアダプター因子、カテコールアミン産生促進因子、細胞周期調節因子、として働いている事がこれまでに明らかにされてきた。特にエイズ患者においては、HIV encephalitis の発症課程において、TNF- $\alpha$  などによって発現量の著明に増加するアポトーシス誘導物質としての phosphorylated BAD, forkhead transcription factor FKHRL1, p38 mitogen-activated protein kinase に対する細胞内の抑制作用物質として、14-3-3 蛋白質が注目されている。このことから、脳脊髄液中に現れた 14-3-3 蛋白質はただ単に神経細胞の破壊の結果遊離してきただけでなく、抗ア

ポトーシス物質として細胞が反応性に誘導してきた結果である可能性も高い。これらの事実に加えて、我々は最近、14-3-3 が細胞内のアミノ酸センサーとして作用する mTOR (FRAP) と結合してその作用を増強させる事を明らかにした。このように、14-3-3 はある種のストレス蛋白質として、細胞の危機に反応している事が考えられる。さらに Hsp70 などの他のストレス蛋白質と共通した酵素活性として、シャペロン型 nucleoside diphosphate kinase 作用のある事が明らかとなった。以上の背景を基に、HIV 感染に伴う神経細胞死の発症機序に 14-3-3 がどのようにかかわっているかを今後解析する。

今回の研究において、CJD 以外に HIV 患者 (ADC, CMVE) においても脳脊髄液中の 14-3-3 が出現し、脳実質細胞の破壊のマーカーとして有用である事、および鑑別診断への isoform pattern 解析の有用性が示唆された。しかしこれまでに、isoform specific 14-3-3 ELISA system の作成に成功した例が無い。そこで、今回作成した抗体を基に isoform specific 14-3-3 ELISA system の作成を今後試みるつもりである。

#### E. 結論

- 1) 脳の神経細胞に多く局在して抗アポトーシス作用、シグナル伝達のアダプター因子、カテコールアミン産生促進因子、細胞周期調節因子として知られている 14-3-3 蛋白質の各 isomer に対する特異抗体の作成を試みた。その結果、14-3-3 $\eta$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\tau$  に対して

- ほぼ特異的な抗体の作成に成功し、市販の抗体の中では、 $\zeta$  に対する抗体(Santa Cruz, SC-1019)が特異的と判定された。さらにこれら 6 種類の抗体を使用した Western immunoblotting 法により、HIV 患者の脳脊髄液中に出現する 14-3-3 蛋白質の半定量法を確立した。なおこれらの抗体を用いることによって、HIV 患者のみならず CJD の早期診断やその isomer pattern の解析が可能と推定された。
- 2) HIV 患者の中で、特に ADC と CMVE 患者の脳脊髄液で 14-3-3 $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\zeta$  の検出を見た。しかし HIV 患者の中でも、CCM を伴う患者や中枢神経症状を伴わない患者では 14-3-3 の出現頻度は低くさらに出現量も低い事が判明した。なお HIV 患者で認められた 14-3-3 isomer pattern は、これまでに報告されている CJD における isoform pattern と異なることが判明した。
  - 3) 脳脊髄液中に 14-3-3 を検出した HIV 患者は、いずれも脳の実質障害が強く疑われた ADC と CMVE の患者で、CCM などの髄膜炎や脳の実質障害を伴わない患者では、脳脊髄液中の 14-3-3 はほとんどの場合検出されなかった。
  - 4) 脳脊髄液は 1 日に 3.7 回入れ代わる事が知られておることから、髄液中の 14-3-3 は脳の実質障害を反影する real-time marker として有用と考えられた。

## F. 研究発表

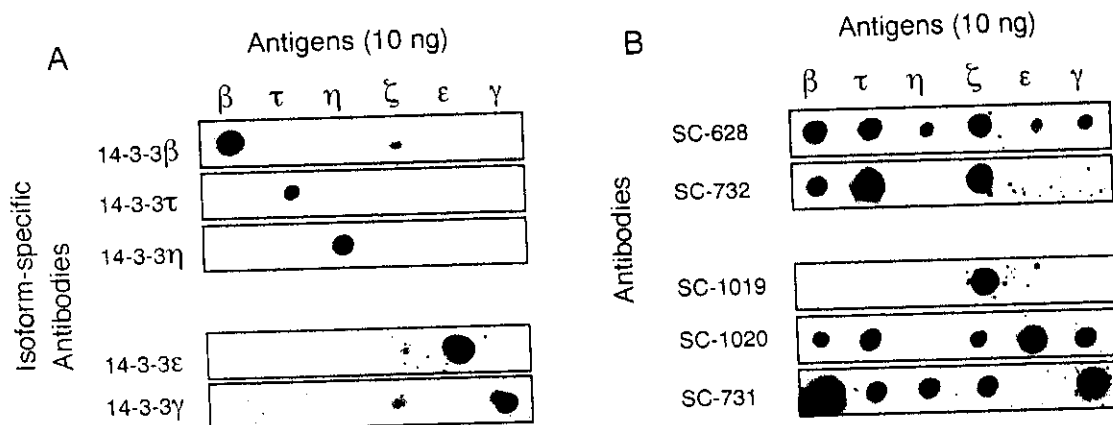
### 1. 論文発表

- 1) Mori, H., Inoue, M., Yano, M., Wakabayashi, H., and Kido, H.: 14-3-3  $\tau$  associates with a translational control factor FKBP12- rapamycin - associated protein in T cells after stimulation by pervanadate. FEBS Lett. 467(1), 61-64, 2000.
- 2) Wakabayashi, H., Yano, M., Tachikawa, M., Oka, S., Maeda, M., and Kido, H. : Increased levels of 14-3-3 $\epsilon$ ,  $\gamma$  and  $\zeta$  isoforms in cerebrospinal fluid of AIDS patients with neuronal destruction. Clinica chimica Acta in press, 2001.

### 2. 学会発表

- 1) エイズによる中枢神経障害と関連する脳脊髄液中の 14-3-3 タンパク質の検討、若林英樹、萩原良明、立川夏夫、岡慎一、サイモン シャルミン、楊兵、矢野仁康、木戸博  
第 73 回日本生化学会大会
- 2) エイズによる中枢神経障害と関連する脳脊髄液中の 14-3-3 タンパク質  
若林英樹、立川夏夫、岡慎一、木戸博、第 14 回日本エイズ学会学術集会、総会

図 1. 得られた 14-3-3 isoform 特異的抗体 (A) と市販の 14-3-3 isoform 抗体 (B) の比較



各 recombinant 14-3-3 isomer (10 μg) に対して得られた 14-3-3 isoform 特異的抗体 (2 μg/ml) と市販の抗体(Santa Cruz) (0.2 μg/ml) の反応特異性を dot-blotting で検討した。

図 2. HIV 感染者 [ADC, CMVE, CCM, 中枢神経症状の無い患者 (CNSC-)] と HIV 以外の患者の脳脊髄液中の 14-3-3 isoform-pattern を示す。

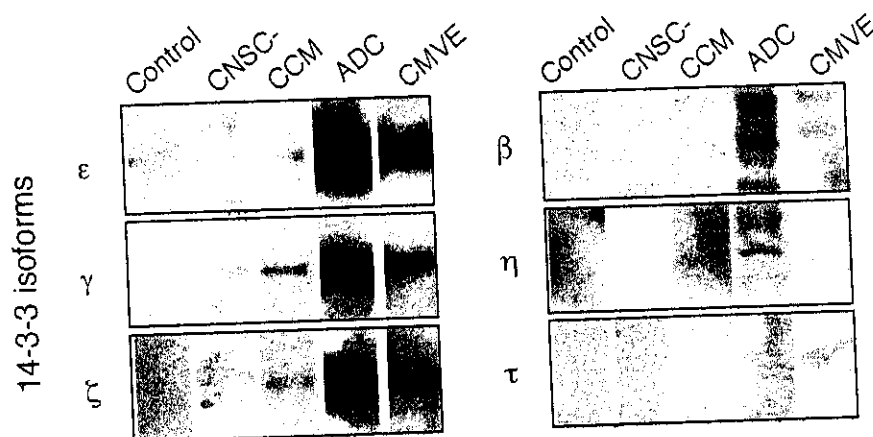
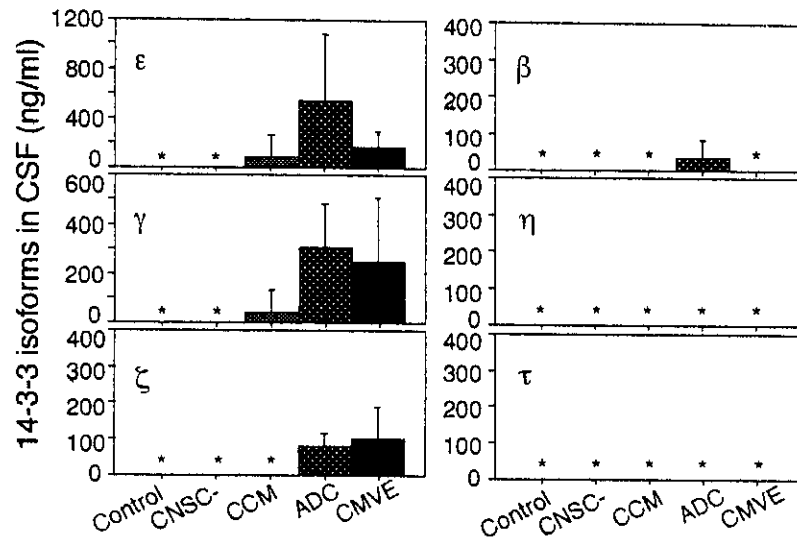


図 1 で示された各 isoform に対する特異抗体を用いて、典型的な各患者の脳脊髄液 (20 μl) 中の 14-3-3 isoform pattern を示す。

図 3. HIV 感染者と HIV 以外の患者の脳脊髄液中の 14-3-3 isoform-pattern と出現頻度の有意差検定



\*は検出限界の 30 ng/ml 以下を示す。

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）  
分担研究報告書

サルエイズモデルを用いたエイズ脳症の病態機序の解析

|       |               |                         |
|-------|---------------|-------------------------|
| 主任研究者 | 出雲周二          | 鹿児島大学医学部難治性ウイルス疾患研究センター |
| 研究協力者 | 森豊隆志          | 鹿児島大学医学部第1生理学           |
|       | Xing Hui Quin | 鹿児島大学医学部難治性ウイルス疾患研究センター |
|       | 森 一泰          | 国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センター  |
|       | 多田隈 圭         | 国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センター  |

**研究要旨：** エイズにおける脳症の病態機序を解明することを目的とし、サルの SIV 感染実験系における感染サルの脳標本を用いた神経病理学的解析ならびにウイルスの感染様式の詳細な解析を行った。エイズ発症前にも神経病理学的異常を認め、ウイルスも検出もされた。一方、エイズ発症サルでは脳症の病理像を欠いており、リンパ組織病変と脳病変は独立した病態として起こっていることが示唆された。また、この検索システムは今後エイズ脳症の解析に有用と思われた。

A. 研究目的

我々は、サルの SIV 感染実験系におけるリンパ系組織標本を用いて、病理学および分子病理学的手法による解析を加え、組織病変やウイルス動態を明らかにし、エイズウイルス感染初期からエイズ発症へ至る *in vivo* でのウイルス感染様式、宿主側の免疫反応を検討してきた。今回、リンパ組織病変の解析がなされているこれら感染サルの脳標本を用いて神経病理学的解析ならびにウイルスの感染様式を詳細に解析し、リンパ組織病変の進行と比較することにより、エイズの発症過程と脳症の発症過程との関連を明らかにし、エイズ脳症の病態機序を解明することを目的とした。

B. 研究方法

B ウイルス、SRV、SIV、STLV 抗体陰性のアカゲザル（ミャンマー原産）を用いた。

SIVmac239、マクロファージ指向性に変異した SIV 239 *env*/MERT、HIV-1 の逆転写酵素遺伝子を持つ SIV キメラウイルスの RT-SHIV の各々を感染させたアカゲザルを作製し、非感染サルを対照とした。感染後、2年以上経過しエイズを発症した SIVmac239 感染アカゲザルと、同時に感染させたがエイズを発症していない SIV 239 *env*/MERT 感染アカゲザルの autopsy により得られた組織は採取後直ちに4%パラホルムアルデヒドで固定した後、パラフィン包埋した。標本は通常の Hematoxylin-Eosin 染色、Klüber-Barrera 染色および抗 CD3 抗体、抗 CD 20 抗体、抗 CD 68 抗体、抗 GFAP 抗体による免疫染色とを行い神経病理学的に検索した。またウイルス感染動態の解析は、SIV *gag*, *pol*, *nef* 領域を鋳型とし、Fluorescein で標識した RNA probe を mix して用い、通常の *in situ* Hybridization により行った。 *in situ*



Hybridization の方法としてはパラフィン包埋された組織は脱パラシ、前処理した後、プローブと一晩ハイブリダイゼーションした。洗浄後、結合したプローブの検出にはアルカリフォスファターゼ標識した抗 Fluorescein 抗体を用い、アルカリフォスファターゼの検出はその基質として NBT/BCIP を用いて発色した。検出バッファー液には 10% のポリビニル・アルコールを含み、これによりバックグラウンドの上昇なしに発色のインキュベーションの時間を延長した。

### C. 研究結果

SIVmac239 と SIV 239 *env*/MERT の autopsy 標本について神経病理学的検索を行った結果では、臨床的に明らかなエイズの所見を示し、リンパ節、脾臓等のリンパ組織にエイズ特有の崩壊病変を示した SIVmac239 の脳組織では、大脳深部白質に瀰漫性のグリア増生がみられたが、炎症細胞の浸潤はほとんど認められず、エイズ脳症の病理所見として特有の多核巨細胞やグリア結節はみられなかった。一方、大脳皮質や中心灰白質では神経細胞脱落はみられなかったが、散在性にニューロピルのアストロサイトの胞体や突起が GFAP 陽性となっており (Fig 1. A, B)、また、海馬歯状回のグリオシスが目立っていた (Fig 1. C, D)。

SIV 239 *env*/MERT 接種サルでは、リンパ組織病変はリンパ濾胞の過形成がみられるものの明らかな濾胞崩壊の所見はなく、病理組織学的にエイズの発症には至っていないと考えられた。一方大脳では明らかな白質淡明化はみられないものの、HIV 脳症の病理像として典型的な多核巨細胞を伴ったミクログリア・マクローファージ系細胞の集簇が白質血管周囲に認められ (Fig2. A)、周囲にアストロサイトの軽度増生が認められた

(Fig 2. B)。ここでは、*gag*、*pol*、*nef* 領域の probe を mix して用いた RNA *in situ* Hybridization にて antisense probe では多核巨細胞およびミクログリアに陽性所見が認められ、sense probe では signal は認められなかった。エイズ発症の前に脳においてはウイルス感染細胞の浸潤に伴う脳症病変が生じていると考えられた (Fig2. C)、また、グリア結節を形成していない一見異常の見られない深部白質血管およびその周囲に RNA *in situ* Hybridization にて散在性に陽性 signal を呈するものも認められた (Fig 2. D)。

### D. 考 察

我々は、HTLV-I 関連脊髄症において神経病理学的検索と HTLV-I proviral DNA の *in situ* PCR 法による検出、mRNA の高感度 *in situ* Hybridization 法による検出、viral protein の Tyramide Signal Amplification 法を用いた高感度検出システムを確立しており、それらをエイズウイルスの検出にも今後応用していくことが有用と思われる。今回の検索により、SIV 感染サルの一部に明らかなエイズ脳症特有の病理組織所見がみられることが明らかとなり、この感染ザルを用いて、生体内、特に中枢神経組織におけるウイルスの浸潤を含めた詳細な動態と組織の反応の解析が可能であることがわかった。さらに、脳症の進展と、リンパ節病変、すなわちエイズとしての免疫不全の進行とは必ずしも平行していないことが示された。また、脳症の病理組織像として大脳白質の多核巨細胞を伴うグリア結節が強調されているが、それに加え、大脳皮質のニューロピルにみられる局所的なグリオシスも脳症の病理組織学的指標となることが示唆された。今後、臨床的なエイズ脳症としての症状・徴候と、病理組織学的所見との対

比により、この両者の病理所見がエイズ脳症のどの病態に関連しているのかについて明らかにしていく必要がある。

本研究ではエイズ脳症に対する治療薬の開発も重要であるが、今後治療薬の効果を判定する上でも、この動物モデルを用いた検索システムは有用と思われた。

#### E. 結 論

1. SIV 感染サルの一部に明らかなエイズ脳症病変がみられる。
2. 脳症の進展とリンパ節病変の進行とは必ずしも平行していない。
3. 脳症の病理組織像として大脳白質の多核巨細胞を伴うグリア結節に加え、皮質のニューロピルの局所的なグリオシスも脳症の指標となる。

#### F. 参考文献

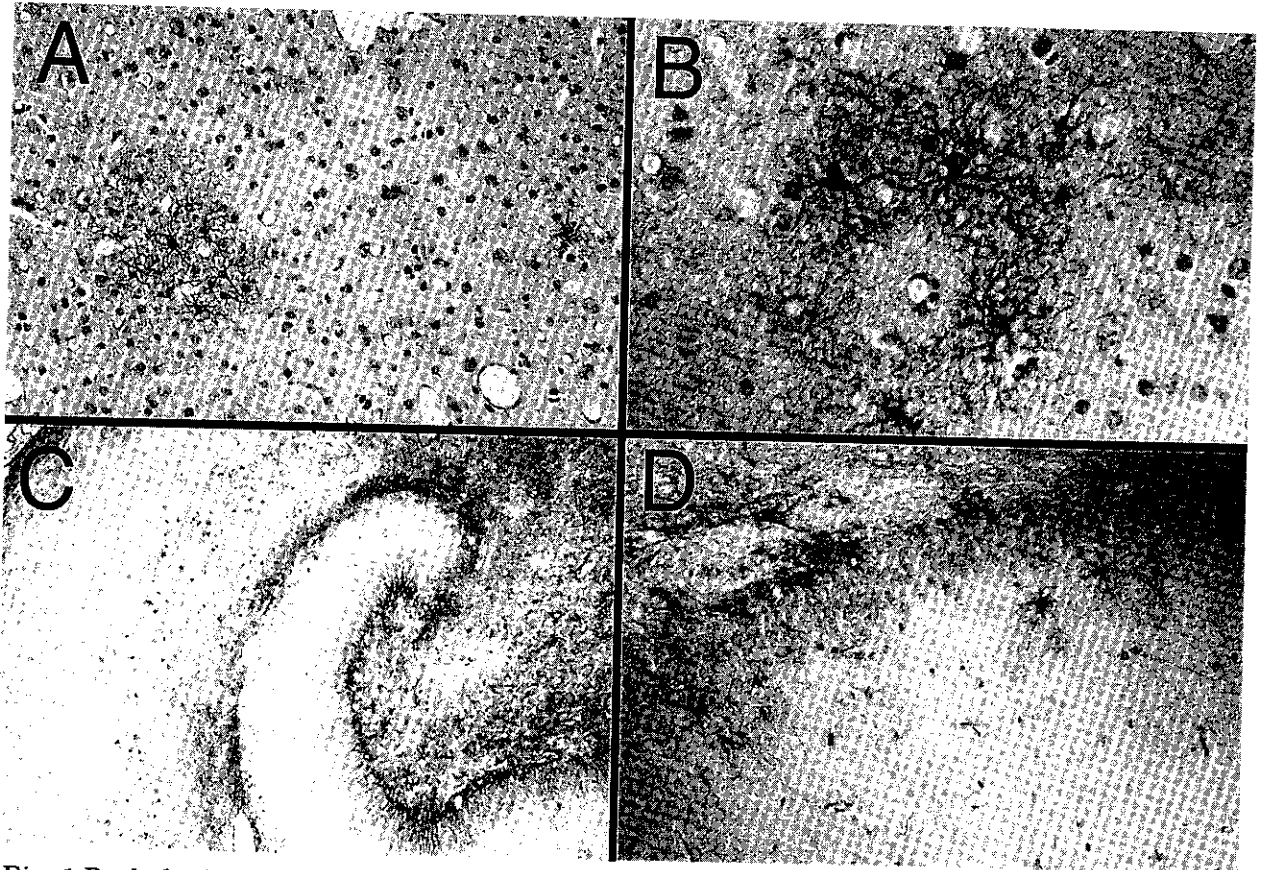
1. Moritoyo T, Izumo S, Moritoyo H, Tanaka Y, Kiyomatsu Y, Nagai M, Usuku K, Sorimachi M, Osame M. Detection of human T-lymphotropic virus type I p40tax protein in cerebrospinal fluid cells from patients with human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Neurovirol.* 5: 241-248, 1999.
2. Matsuoka E, Takenouchi N, Hashimoto K, Kashio N, Moritoyo T, Higuchi I, Isashiki Y, Sato E, Osame M, Izumo S. Perivascular T cells are infected with HTLV-I in the spinal cord lesions with HTLV-I-associated myelopathy/tropical

spastic paraparesis: double staining of immunohistochemistry and polymerase chain reaction in situ hybridization. *Acta Neuropathol (Berl).* 96:340-346, 1998.

3. Moritoyo T, Reinhart TA, Moritoyo H, Sato E, Izumo S, Osame M, Haase AT. Human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy and tax gene expression in CD4+ T lymphocytes. *Ann Neurol.* 40:84-90, 1996.

#### G. 特許取得 (平成 12 年度)

納 光弘. 化学発光 in situ ハイブリダイゼーションと免疫組織化学的染色とを組み合わせた二重標識検出法. 特許第 3 1 2 7 2 4 4 号, 平成 1 2 年 1 1 月 1 0 日.



**Fig. 1** Pathological findings seen in the cerebral cortex of the monkey infected with SIV mac239. Immunohistochemistry using anti-GFAP antibody.

(A, B; focal increase of GFAP staining in the neuropil of the frontal cortex. C, D; diffuse gliosis in the Ammon's horn.)

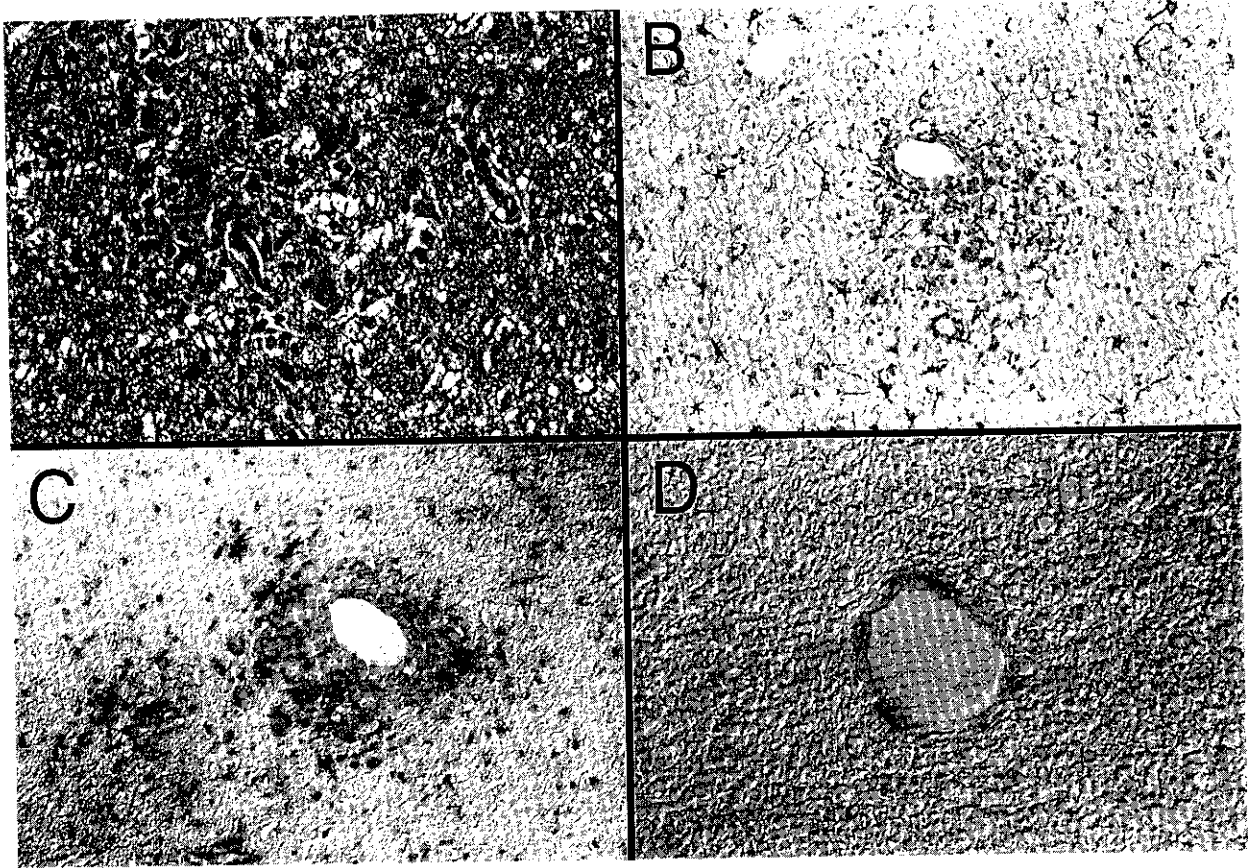


Fig. 2 Neuropathological findings seen in the cerebral white mater of the monkey infected with SIV 239env/MERT.

(A: Hematoxylin-Eosin, B: anti-GFAP antibody, C, D: SIV RNA *in situ* hybridization)

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）  
分担研究報告書

ウィルスの持続感染と神経障害に関する研究

分担研究者 田平 武 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第6部部長  
共同研究者 中垣慶子 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第6部  
Tirtha Raj Koirala //

研究要旨

ネコ免疫不全ウイルス（FIV）は CXCR4 を介して、in vitro でアストロサイトに感染しうることを明らかにした。CXCR4 は主にニューロンに発現し、FIV 感染ネコではその発現が著しく低下していた。直接又は間接的に引き起こされると考えられるこのニューロンの CXCR4 の発現低下は、FIV 脳症の病態を反映していると考えられる。

A. 研究目的

Feline immunodeficiency virus (FIV) はネコに感染し、免疫不全及び FIV 脳症を引き起こし、ヒト AIDS 研究のよい動物モデルとされる。これまでに、FIV は HIV 同様 CD4 及び CXCR4 を受容体として T 細胞に感染することが明らかにされた。しかし、中枢神経系での感染細胞、感染様式、FIV 脳症の発現機序は不明である。本研究は中枢神経系での CXCR4 の発現細胞を明らかにし感染細胞を同定し、FIV 感染ネコにおける中枢神経系の変化について明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

FIV は CrFK 細胞に順化した Petalma 株を用いた。アストロサイト、ミクログリアの分離培養は生後 1～2 日ネコ脳より混合培養を行い、振とう法によりミクログリアを分離した。それぞれの純度は 95% 以上であることを特異マーカーで確認した。こ

の培養細胞に FIV をかけ、感染の有無を p24 の ELISA で調べた。CXCR4 発現の有無は RTPCR 法により、感染受容体としての意義はそのナチュラルリガンドである SDF-1 及び、人工的リガンドである AMD3100 (Bicyclam) による感染抑制で調べた。実験的 FIV 感染ネコ及びコントロールネコの脳は日本獣医畜産大学の石田卓夫先生より供与された。

FIV 感染ネコは行動異常を示し、感染後 7ヶ月～12ヶ月で剖検された。ホルマリン固定、パラフィン包埋切片を免疫組織化学的に解析した。用いた抗体は抗 CXCR4 抗体 (12G5) (R&D System)、抗 MAP-2 抗体 (Boehringer-Mannheim)、抗 GAD 抗体 (Chemicon International)、抗ニューロフィラメント抗体 (SMI-32) (Sternberger Monoclonals)、抗 FIV-p24 抗体 (Biodesign International) 等である。

倫理面への配慮

本研究は当研究所動物実験倫理問題検討

委員会の承認を得て行われた。

### C. 研究結果

分離培養したネコミクログリア及びアストロサイトはいずれも RTPCR により CXCR4 の mRNA 発現が認められた。そこで、これらの細胞にウイルスをかけ感染の有無を p24 の産生で調べた所、いずれも感染が成立することが明らかとなった（図 1 左）。CXCR4 に対するリガンドを作用させると FIV 感染は用量依存性に抑制された（図 1 右）。以上により、アストロサイトも *in vitro* では FIV の標的感染細胞となることが分かった。

FIV 感染ネコ脳を免疫組織化学的に調べると、CXCR4 は主としてニューロンに発現していた（図 2 a）。一部のミクログリア、アストロサイト、血管壁細胞にも陽性所見が見られたが、多くはなかった。FIV 感染ネコ脳では CXCR4 の発現が著明に downregulate していた（図 2 b）。ニューロンの MAP-2 及び GAD の発現も同様に低下していた。その程度は感染後 7 ヶ月の脳より 1 2 ヶ月の脳でより著明であった。しかし、IMR32 の染色はむしろ増強しており、アストロサイトのマーカーである GFAP も増強していた。P24 は血管周囲のミクログリア、マクローファージ様細胞に陽性で、アストロサイト、ニューロンは陰性であった。

### D. 考察

FIV は HIV 同様レンチウイルスに属し、HIV と同様ネコに免疫不全を引き起こし、日和見感染、脳症を引き起こす。脳には白質の髄鞘淡明化、皮質の空胞性変化、グリア結節などが観察され、ヒト HIV 脳症解明の為のよい動物モデルとされている。最近、FIV においても T 細胞に対する感染受

容体は CD4 と CXCR4 であることが明らかにされた。また、ある種の条件では CXCR4 単独でも感染が成立することも示された。しかし、中枢神経系での感染細胞及び脳症のメカニズムは明かでなかった。本研究によりアストロサイトも CXCR4 が少なくとも RTPCR 法で陽性であり、*in vitro* では感染が成立することが分かった。しかし、*in vivo* では CXCR4 は主にニューロンに発現しており、アストロサイト、ニューロンに p24 は証明できなかった。微量の virion の影響は否定できないが、アストロサイトやニューロンに直接ウイルスが感染して病態を引き起こしているとは考え難い。今回明らかになった重要な点は、ニューロンの CXCR4、MAP-2、GAD などの発現が FIV 感染ネコで有意に低下していたことである。CXCR4 の発現低下はウイルス感染によって起こったというより、ウィスル蛋白あるいは SDF-1 等のナチュラルリガンドにより起こったと考える方が妥当であろう。CXCR4 の低下は何らかのシグナル異常を引き起こしていると考えられ、FIV 脳症の病態を一部反映していると考えられる。今後、ヒト脳での検症を行いその意義を明らかにする必要がある。

### E. 結論

- 1) FIV は CXCR4 を介してアストロサイトに感染しうる。
- 2) FIV 感染ネコの脳ではニューロンの CXCR4 発現が低下しており、FIV 脳症の病態を反映していると考えられる。

### F. 研究発表

1. Nakagaki K et al. CXCR4 is the primary receptor for feline immunodeficiency virus in astrocytes. (submitted)

2. Koirala TR et al. Downregulation of CXCR4 expression in the brain of feline immunodeficiency virus-infected cats. (submitted)

3. Koirala TR et al. Decreased expression of MAP-2 and GAD in the brain of cats infected with feline immunodeficiency virus. (submitted)

G. 知的所有権の取得状況  
なし

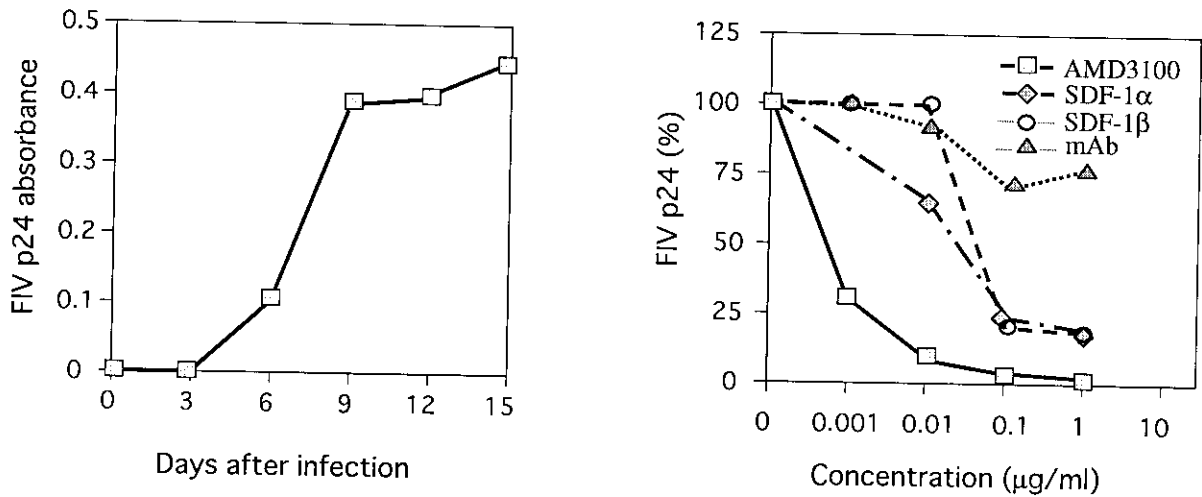


図1. 培養アストロサイトにおけるFIVの感染成立 (左) とリガンドによるブロッキング (右)

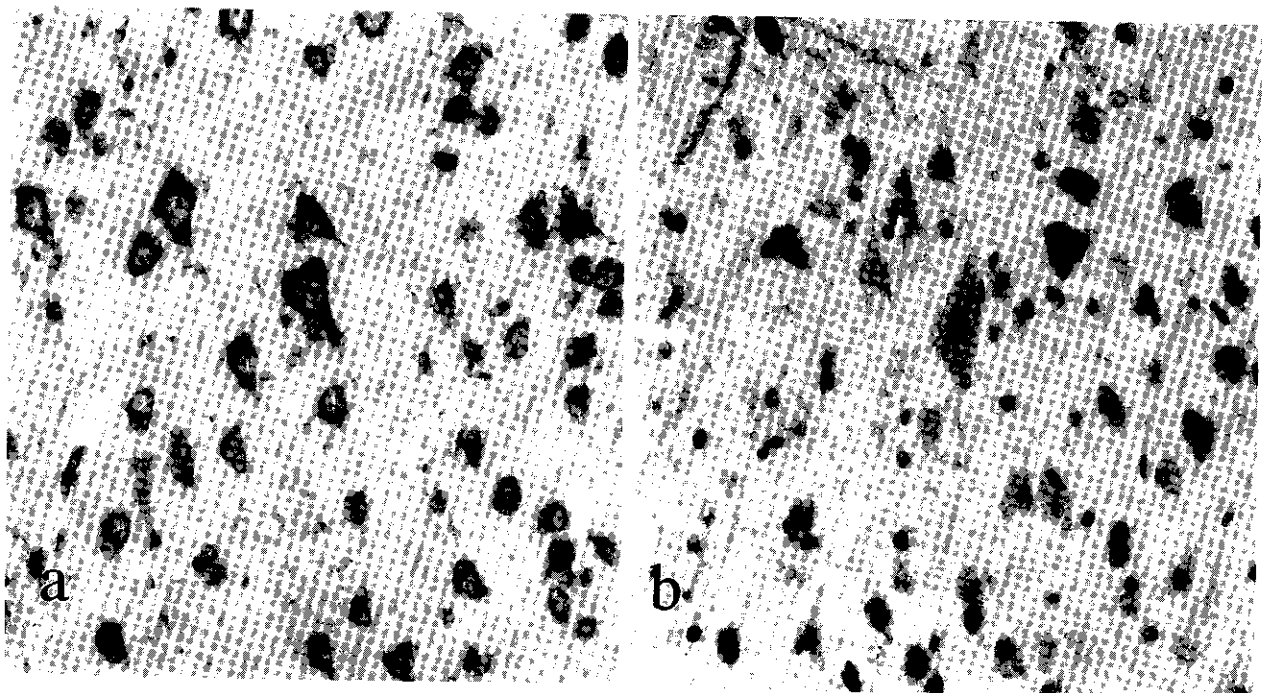


図2. ニューロンにおけるCXCR4の発現。

正常コントロール (a) に比し、FIV感染ネコ (b) では発現低下が見られる。

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）  
分担研究報告書

HIV等のレトロウイルスによる痴呆や神経障害の病態と治療に関する研究

分担研究者 齊藤邦明 岐阜大学医学部講師

A. 研究目的

AIDS dementia complex, (ADC)発症のメカニズムは複雑で、脳内でHIV感染した宿主細胞によって放出されるサイトカイン（IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ ）、キノリン酸、グルタミン酸、NO、PAF等の様々な生理活性物質が重要であると考えられている。また最近のTNF- $\alpha$ ノックアウトマウス(TNF KO)を用いた研究結果より、TNF- $\alpha$ の産生を抑制することにより痴呆の発症が抑制されることが示唆されている。本研究は、ADC治療薬の臨床応用を目標としており、すでにADC発症メカニズムを追求するのに有用な実験動物として申請者らの研究室で確立しているマウスADCモデルに、サリドマイド、Propentofyllin (Type III phosphodiesterase inhibitor)をはじめとした種々TNF- $\alpha$ 産生阻害剤を投与し、Y-maze test, Water finding test, Water maze test等の行動薬理学的試験により、その薬効を評価する。さらに、薬剤投与後の脳を摘出し、TNF- $\alpha$ mRNA発現量の定量を含めた種々脳内生理活性物質の変動、病的検索、ウイルス量の定量などを行い、それらと記憶障害の程度との間に何らかの関係が認められないか検討する。

B. 研究方法

a) マウスエイズモデルを用いた病態解析  
マウスにLP-BM5ウイルスを投与し、体重、

脾重量、肝重量の変化、さらにフローサイトメトリーによる膜表面抗原CD4、CD8、IL-2R陽性細胞の変化、脾細胞のConA、LPS刺激試験などをエイズの末梢における病状進行の指標とした。また、脳内におけるマイクログリアおよび神経細胞のマーカーとして<sup>3</sup>H-PK11195binding assayおよびMAP-2 immunoblotsにより評価した。また、肝、脾、脳におけるTNF- $\alpha$ mRNAレベルの定量は、既報の報告に従って行った。

1. フローサイトメトリーによる膜表面抗原CD4、CD8、IL-2R陽性細胞の変化  
マウス脾臓を細切後、脾細胞を抽出しRPMI-1640培地(Gibco)で3回洗浄し、細胞数 $1 \times 10^6$ 個/mlに調整した。フローサイトメトリー専用チューブ (Falcon 2052) でFITC標識 CD4 抗血清 (Pharmingen), FITC標識 CD8 (Pharmingen), PE標識 IL-2R (Serotec) をそれぞれ  $5 \mu\text{l}$  と調整した脾細胞を  $100 \mu\text{l}$  を混合し  $4^\circ\text{C}$  で30分間反応させた。反応後、FACS Lysing solution (Becton Dickinson) を  $1\text{ml}$  加え5分間の細胞固定を行った。固定後RPMI-1640培地で3回洗浄し、最終液量  $500 \mu\text{l}$  に調整した。フローサイトメトリー(FACScan:Becton Dickinson)での解析はLYSIS-II ソフトウエアを用い  $1 \times 10^4$  個の脾細胞についてその細胞膜抗原を測定し百分率 (%) で評価した。



## 2. 脾細胞の Con A、LPS 刺激試験

マウス脾臓を無菌的に摘出し脾臓の一部から脾細胞を抽出した。さらにFetal bovine serum (Equitech) を10%添加したRPMI-1640培地で3回洗浄後、 $0.5 \times 10^6$ 個/mlに調整し96穴培養用プレート(Falcon 3072)に200  $\mu$ l播種した。細胞刺激剤(Con A, LPS)を各穴10  $\mu$ g添加し48時間培養した。さらに<sup>3</sup>H標識チミジンを各穴に10  $\mu$ Ci添加後、12時間培養しチミジンを細胞内に取り込ませた。培養終了後、細胞をすべてセルハーベスター(Bio-science)で洗浄し、 $\gamma$ -カウンター(Beckman-710)で細胞内の<sup>3</sup>H測定を行い細胞の刺激応答の指標とした。

## 3. 肝、脾、脳におけるTNF- $\alpha$ mRNAレベルの定量

肝、脾、脳を液体窒素で急速に冷凍後、-80°Cで保存した。RNAはISOGENを用いて精製し、PCRは既存の方法にて行った。泳動されたバンドの濃淡を $\beta$ -actinを対照にしてイメージアナライザーにて解析した。

### b) 行動薬理的検索

前述のごとくwild typeのマウスは8-10週後にマウスはADCに類似した症状を呈する。その評価法としてY-maze test, Water finding test, Water maze test等を実施し、LP-BM5感染による行動薬理学的変化を観察した。これらの手法を用い、TNF KOマウスとwild typeのマウスとの結果を比較することにより、サイトカインのADC発症に対する関与の有無を明らかにする。

### Y-maze

自発交替行動の測定は、Sarter (1988)らの方法に準じて以下の手順で行った。マウスをY字迷路のいずれかのarmの先端に置き、8分間にわたって迷路内を自由に探索

させ、マウスが移動したarmの位置を選択した順に記録する。マウスが測定時間内に各armに移動した回数をカウントしこれをtotal arm entriesとする。つぎに、この中で連続して異なる3つのarmを選択した組み合わせを調べ、この数をnumber of alternationとする。Number of alternationをtotal arm entriesから2を引いた数で割り、それに100を掛けて求めた値をpercent alternationとし、これを自発的交替行動の指標とした。

### Water maze

#### 1) Visible target trial

1日3回訓練試行を行う。platformの位置は固定し、start位置を毎回変化させる。startしてからplatformに到達するまでの時間を測定する。一回の試行は最大60秒までとし、この間に動物がplatformに到達出来ない場合は手でplatformまで誘導する。platform上には約30秒間滞在させる。この操作を2日間行う。

#### 2) Reference memory

1日3回訓練試行を行う。platform上の位置は固定し、start位置を毎回変化させる。1回の試行は最大60秒までとし、この間に動物がplatformに到達出来ない場合は手でplatformまで誘導する。platform上には約30秒間滞在させる。1日3回の訓練試行終了後にprobe testを行う。この操作を第1週目は連続4日間繰り返し行う(訓練試行12回、probe test4回)。第1週目の最終試行の5日後にretention testを1回行う。Retention test終了後に訓練試行を2回行い、その後probe testを行う。なお、訓練試行の期間については、学習の修練度に応じて変更することがある。

### 3) Working memory

Reference memory試験終了翌日にplatformの位置を5・5・2・のoriginal platformの隣に移動させる。Start位置は毎回変化させる。1回の試行は最大60秒までとし、この間に動物がplatformに到達出来ない場合は手でplatformまで誘導する。platform上には約30秒間滞在させる。この操作を一日3試行行う。第2日目のplatformの位置は1日目のplatformの反対側に移動させる。Start位置は毎回変化させる。1回の試行は最大60秒までとし、この間に動物がplatformに到達出来ない場合は手でplatformまで誘導する。platform上には約30秒間滞在させる。この操作を3試行行う。第3日目のplatform位置はoriginal platformの反対側に移動させる。Start位置は毎回変化させる。1回の試行は最大60秒までとし、この間に動物がplatformに到達出来ない場合は手でplatformまで誘導する。Platform上には約30秒間滞在させる。この操作を3試行行う。

## C. 研究結果

### 1. LP-BM5ウイルス感染による体重、脾重量、リンパ節重量、肝重量の変化

LP-BM5ウイルス感染により、体重、脾重量、リンパ節重量、肝重量は有意に増加したが、WildとTNF KOマウスあるいはPropentofylline投与群での増加の程度は全く差が認められなかった。

### 2. LP-BM5ウイルス感染による膜表面抗原B220、CD4、CD8、IL-2R陽性細胞の変化

脾細胞のB220細胞陽性率はLP-BM5ウイルス感染により低下した。しかし、低下の

割合は感染10週後においてWildとTNF KOあるいはPropentofylline投与群のマウスで全く差が認められなかった。

CD4・IL-2R細胞陽性率およびCD4/CD8相対比はLP-BM5ウイルス感染により増加した。しかし、増加の割合はWildとTNF KOあるいはPropentofylline投与群のマウスで有意の差が認められなかった。

### 3. 脾細胞のConA、LPS刺激試験

脾細胞をConAあるいはLPSで刺激することにより、細胞内へのチミジンの取り込みは無刺激の細胞に比べ著しく増加するが、LP-BM5ウイルス感染によりその増加の割合は極端に抑制された。しかし、その抑制の割合は感染10週後においてWildとTNF KOあるいはPropentofylline投与群のマウスで全く差が認められなかった。

### 4. <sup>3</sup>H-PK11195 binding assay

Microglial markerとしての線条体における<sup>3</sup>H-PK11195 binding assayは、wildマウス、TNFKOマウス共にLP-BM5に感染群で非感染群に比較してBmaxの有意な増加が認められた。この際のKd値には何の変化も認められなかった。

### 5. MAP-2 immunoblots

Neuronal markerとしての線条体におけるMAP-2 immunoreactivityは、wildマウスのシグナルに比較してLP-BM5に感染することにより有意に低下していた。しかし、TNF-KOマウスのLP-BM5感染群と非感染群におけるMAP-2 immunoreactivityの差は全く認められなかった。

### 6. 肝、脾、脳におけるTNF- $\alpha$ mRNAレベルの定量

本研究の目的の1つである薬剤によりTNF

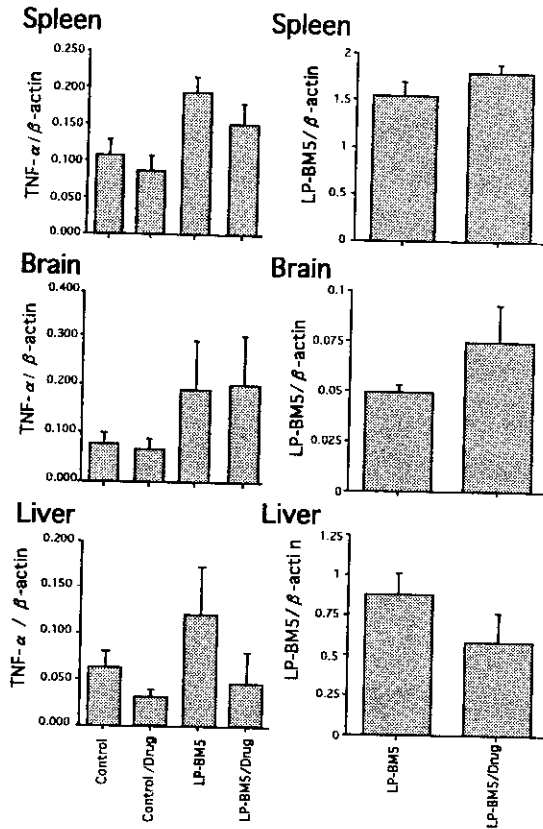


図1 LP-BM5感染マウスでのpropentofylline連続投与によるTNFおよびLP-BM5量の変化

をより安全な形で阻害するためPropentofyllineをLP-BM5感染後9週目より1日2回1週間連続投与しTNF合成に及ぼす薬剤の影響について検討した。その結果、図1に示す通り今回用いた薬剤濃度および方法では、肝臓、脾臓で有意にTNFの合成を抑制していたが、脳では抑制が認められなかった。

## 7. 行動薬理的検索

### Y-maze

WildおよびPropentofylline投与群マウスの自発交替行動量はLP-BM5に感染することにより有意に低下していた。しかし、TNF-KOマウスのLP-BM5感染群と非感染群における自発交替行動量の差は全く認められなかった。

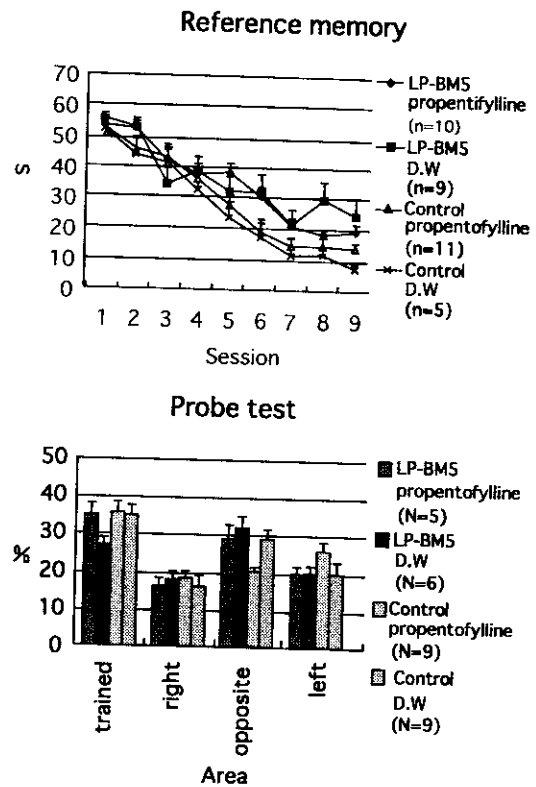


図2 LP-BM5感染マウスでのpropentofylline連続投与による行動薬理学的変化

### Water maze

LP-BM5感染群および非感染群のマウスのswimming speedは、両群で差が認められなかったが、escape latencyは、5日目、7日目、9日目のwildマウスでLP-BM5に感染することにより、その時間が有意に延長していた。しかし、TNF-KOマウスのLP-BM5感染群と非感染群におけるescape latencyの差は全く認められなかった。Propentofylline投与群では図2に示すとおりTNF KOマウスで認められたような著明なADCの改善効果は認められなかった。

## D. 考察

Murine AIDSにおける病状の進行に伴い、体重、脾重量、リンパ節重量、肝重量の増加、脾細胞のB220、CD4、CD8、IL2R陽

性細胞の割合の変化および脾細胞のConA、LPS刺激に対するチミジンの取り込み量の変化などが認められる。しかし、TNF KOマウスを用いた実験からも明らかなように、末梢における病状の進行の指標は、TNFの抑制により何ら影響を受けなかった。行動薬理学試験の結果、Y-maze test、Water finding test、Water maze testなどで、wild typeのマウスのLP-BM5感染マウスでは、非感染群のマウスに比べ明らかな学習機能の低下が認められた。しかし、これらの学習機能の低下はTNF KOマウスでは全く認められなかった。また、LP-BM5感染マウスの脳における3H-PK11195 binding assayの結果は、wildとTNF KOマウス間での有意差は認められず、マイクログリアの活性化はwildおよびTNF KOマウスの両方で起こっていることが考えられた。一方、神経障害の指標として行ったMAP-2 immunoblotsの結果は学習機能の低下と平行していた。これらの結果を総合すると、LP-BM5感染マウスではTNF- $\alpha$ が脳内の宿主細胞から放出されることにより何らかの形で直接あるいは間接的に神経機能障害を発症させていることが考えられた。さらに、本研究の目的の1つである薬剤によりTNFをより安全な形で阻害するためPropentofyllineをLP-BM5感染後9週目より1日2回1週間連続投与しTNF合成に及ぼす薬剤の影響について検討した。その結果、研究に用いた薬剤濃度および方法では、肝臓、脾臓で有意にTNFの合成を抑制していたが、脳では抑制が認められなかった。行動薬理学試験についてもWater maze testを実施したが、TNF KOマウスで認められたようなADCの改善効果は認められなかった。これらの結果を総合すると、LP-BM5感染マウスエイズモデルはエイズ痴呆解明のための良いin vivoモデルであることが確認さ

れた。さらに、TNF- $\alpha$ が直接あるいは間接的にエイズ痴呆に関与していることが証明された。また、TNFを抑制するために用いたPropentofyllineの実験結果より、脳内のTNFを抑制するために、薬剤の投与方法などの検討が必須であることが判明し、さらには脳のTNFをより選択的に阻害する方法の検討、ならびに新しいTNF阻害剤の検討が必要であることが判明した。

## E. 結論

LP-BM5感染マウスエイズモデルはエイズ痴呆解明のための良いin vivoモデルであることが確認された。さらに、TNF- $\alpha$ が直接あるいは間接的にエイズ痴呆に関与していることが証明された。また、TNFを抑制するために用いたPropentofyllineの実験結果より、脳内のTNFを抑制するために、薬剤の投与方法などの検討が必須であることが判明し、さらには脳のTNFをより選択的に阻害する方法の検討、ならびに新しいTNF阻害剤の検討が必要であることが判明した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Suppression of neurocognitive damage in LP-BM5 infected mice with a targeted deletion of the TNF- $\alpha$  gene.

Iida R, Saito K, Yamada K, Basile A S, Sekikawa K, Takemura M, Fujii H, Wada H, Seishima M, Nabeshima T.

FASEB J, 14 (7) : 1023-1031, 2000-5

2. Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) plays a protective role in acute viral myocarditis in mice

Wada H, Saito K, Kanda T, Kobayashi I, Fujii H, Fujigaki S, Maekawa N, Takatsu H, Fujiwara H, Sek