

murine retrovirus. Clin. Immunol. 97:33-42, 2000.

④ Zhang, T., Y. Maekawa, K. Yasutomo, H. Ishikawa, B. Fawzy Nashed, T. Dainichi, H. Hisaeda, T. Sakai, M. Kasai, T. Mizuochi, T. Asano, N. Katunuma, and K. Himeno: Pepstain A-sensitive aspartic proteases in lysosome are involved in degradation of the invariant chain and antigen-processing in antigen presenting cells of mice infected with leishmania major. Biochem. Biophys. Res. Commun. 276, 693-701, 2000.

⑤ Kasai, M., H. Kropshofer, A. B. Vogt, E. Kominami and T. Mizuochi: CLIP-derived self peptides bound to MHC class II molecules of medullary thymic epithelial cells differ from those of cortical thymic epithelial cells in their diversity, length, and C-terminal processing. Eur. J. Immunol. 30, 3542-3551, 2000.

## (2) 学会発表

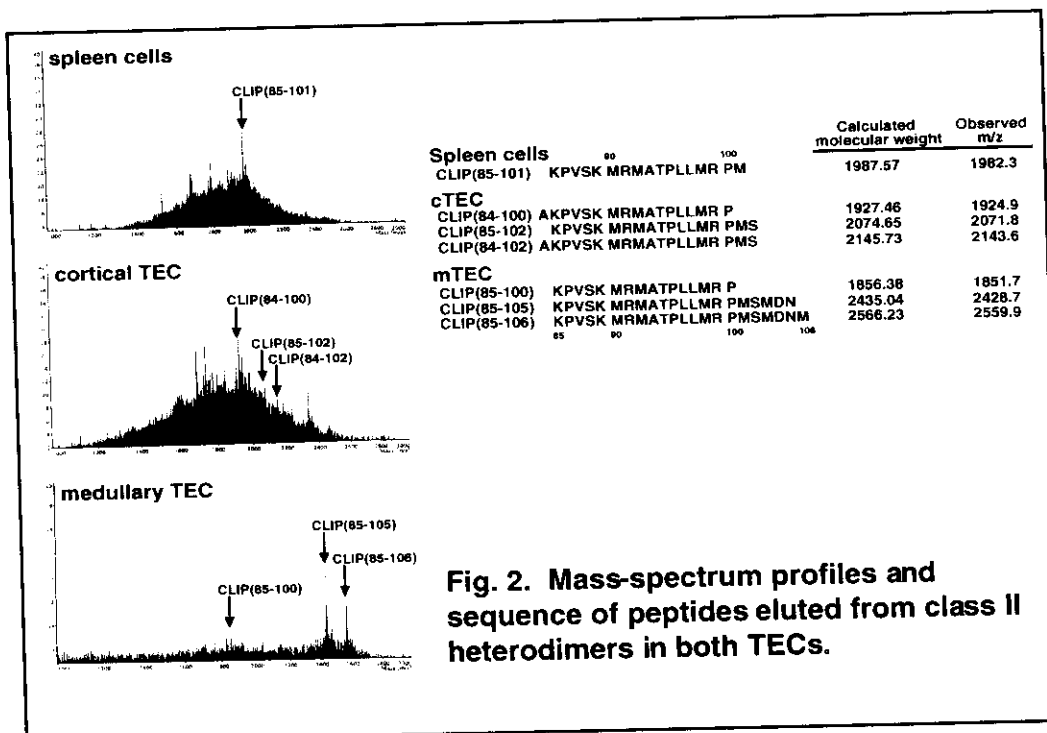
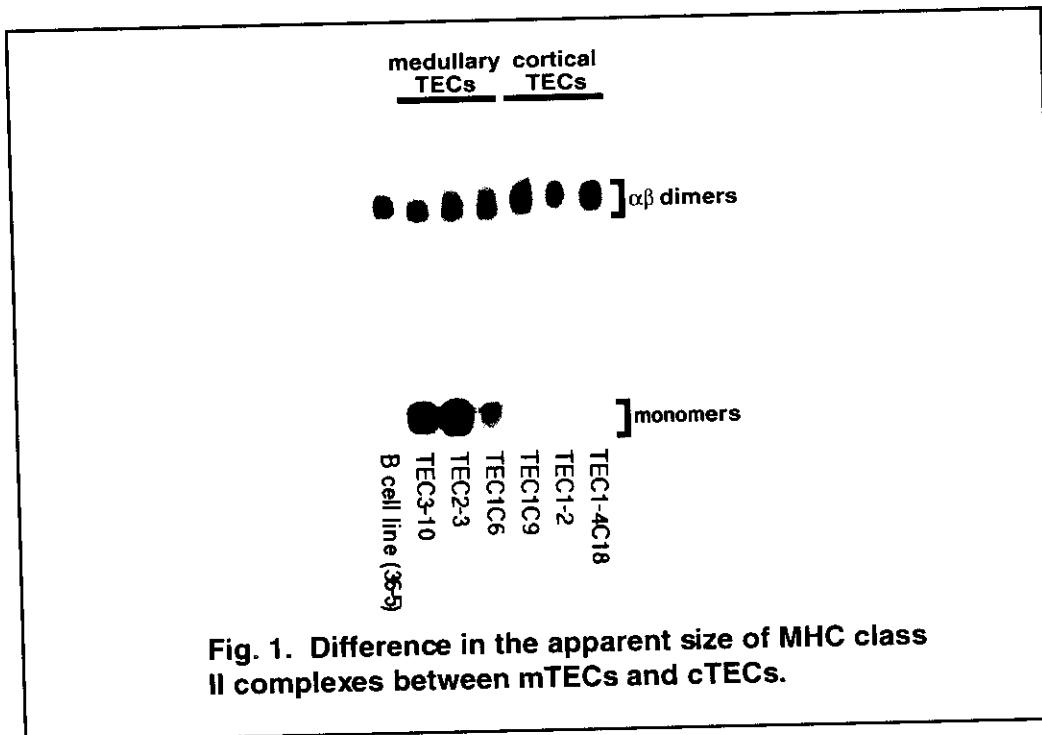
① 笠井道之、水落利明：マウス胸腺上皮細胞の MHC class II 複合体から分離される CLIP のモチーフと MHC class II 拘束性抗原提示における Ii 鎖のプロセッシングについて。The 10th Kyoto T Cell Conference, 2000 年。

② 笠井道之、水落利明：胸腺髄質部上皮細胞と皮質部上皮細胞における MHC クラス II 分子に結合する CLIP(classII-associated invariant chain peptide)の相違。

第 30 回日本免疫学会総会・学術集会、2000 年

## G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし。
2. 実用新案登録  
なし。
3. その他



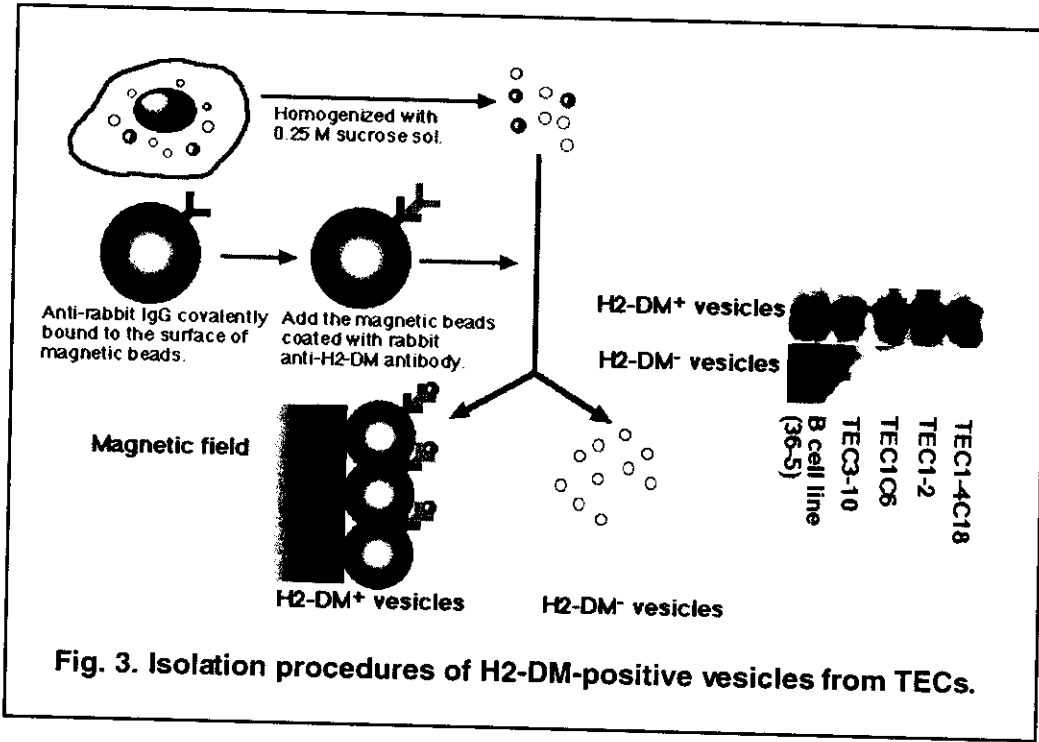


Fig. 3. Isolation procedures of H2-DM-positive vesicles from TECs.

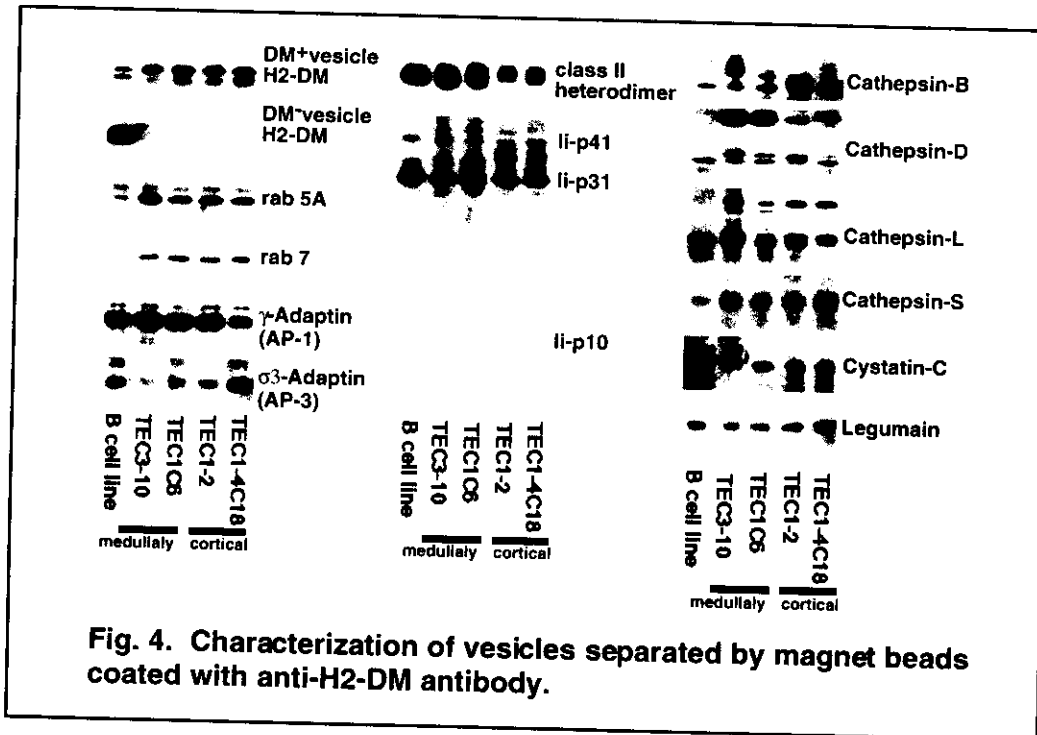


Fig. 4. Characterization of vesicles separated by magnet beads coated with anti-H2-DM antibody.

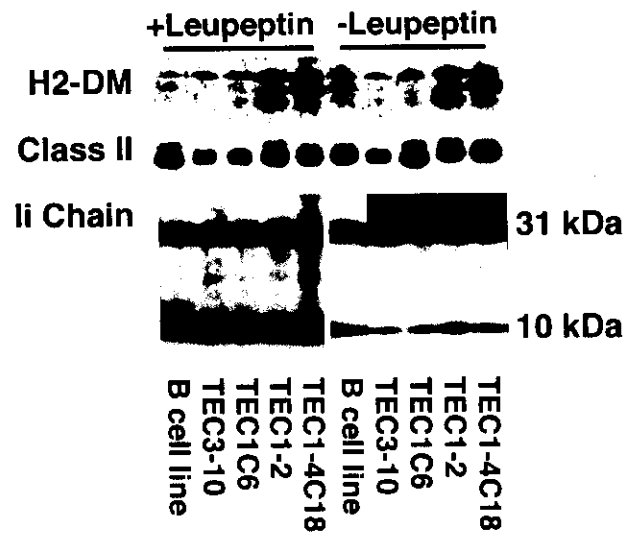


Fig. 5. Degradation profiles of Ii chains in H2-DM<sup>+</sup> vesicles.

HIV 感染実験モデルの作製

分担研究者 吉木 敬 北海道大学教授

**研究要旨** HIV 感染小動物モデルの作製を目的に、HIV 感染受容体であるヒト CD4 および CXCR4 あるいは CCR5 をラット培養細胞株に導入し、HIV 感染を行った。欠損の無いプロウイルスのラットゲノム内への組込みは確認されたが、ウイルス mRNA の発現は見られなかった。しかし、ヒト Cyclin T1 および MHC class II 転写活性化遺伝子を導入すると合胞細胞が形成され、p24 蛋白の発現や再感染性を有したウイルス粒子の発現の可能性が示唆された。

A. 研究目的

HIV 感染やエイズの発症に対して有効な感染予防や発症阻止法を開発研究するためには、安定的に供給されるモデル系が必要となる。しかし、いまだ適切な HIV 感染小動物モデルは作製されていない。本研究計画では HIV 感染受容体であるヒト CD4 および CXCR4 あるいは CCR5 さらに HIV の活性化に重要とされるヒト cyclin T1 や MHC class II 転写活性化遺伝子 (CIITA) などを導入した小動物を作製し、HIV を感染させエイズ発症モデルを樹立し、感染予防や発症阻止法の開発を行うことを目的に、本年度はラット細胞を用いて、in vitro 感染系の樹立を目指した。また、成果をあげている HTLV-I についてもその活性化に関わるヒト crm1 遺伝子導入ラットを作製し、ヒト感染性レトロウイルスの感染や発症阻止を統合的に進める。

B. 研究方法

細胞株としてラット線維芽細胞株 W31（北大遺伝子病制御研究所、細川博士より供与）とコントロールとして HUT78 細胞株を用いた。発現ベクターに組込まれたヒト CD4 遺伝子は鳥山博士（都立総合医学研究所）から供与されたものを使用した。ヒト CXCR4、CCR5、cyclin T1、CIITA 遺伝子はヒト末梢血単核球より RT-PCR 法によりアミノ酸コード領域全長の cDNA を作製し、DNA シークエンスにより変異のないことを確認の上、用いた。発現ベクターとしては pcDNA3.1、pEF6、pEGFP、pEYFP を用いた。トランスフェクションはリポフェクション法にて行った。トランスフェクタントでの導入遺伝子の発現は特異抗体を用いた蛍光抗体法による FACS あるいは蛍光顕微鏡下で、または RT-PCR にて検定した。HIV-1 ウイルスとしては T 細胞好性の SF33（札幌市立病院、立野博士より供与）とマクロファージ好性の JR-FL および JR-CSF（東北大、小柳博士より供与）を用いた。プロウイルスの証明には各種 HIV 遺伝子領域のプライマーを用いた PCR 法およびサザンブロット法で、mRNA の発現は RT-PCR 法で確認した。p24 蛋白発現は ELISA 法で確認した。末梢血単核球との細胞融合はポリエチレングリコールを用いて行った。再感染実験では感染培養細胞の上清を一晩ヒト末梢血単核球

と反応させ、洗浄後単核球を培養し、経時的にその上清中の p24 蛋白を測定した。一方、H-2Kd プロモーター下流にヒト crm1 遺伝子（北大遺伝子病制御研究所、志田博士より供与）を導入した発現コンストラクトをラット受精卵にマイクロインジェクションし、偽妊娠ラット卵管へ移入して産仔を得た。導入遺伝子は PCR 法とサザンブロット法にて検討した。

ヒト末梢血単核球はこの実験をよく理解したボランティアから採取した。動物の使用にあたっては北海道大学医学部「動物実験に関する指針」に遵守し行っているほか、感染実験にあたっては特殊感染実験設備を使用している。

C. 研究結果

W31 細胞へのヒト CD4 および CXCR4 あるいは CCR5 のトランスフェクションの結果、安定的にこれらの遺伝子を発現する CD4-CXCR4 および CD4-CCR5 遺伝子導入細胞株を樹立した。これらの細胞に SF33 あるいは JL-FL、JL-CSF を感染させるとそれぞれのゲノム DNA 内に全長サイズのプロウイルス DNA が確認された。しかし、細胞形態に変化を見ないほか、RT-PCR レベルでウイルス mRNA の発現は確認されなかった。しかし、さらにこれらの細胞へヒト cyclin T1 遺伝子を導入すると形態学的に細胞の凝集した細胞塊を形成した。この凝集細胞におけるウイルス mRNA の発現を検討すると、RT-PCR で LTR、pol、env、nef の発現が確認されたが、gag、vif、tat の発現は検出されなかった。一方、この HIV 感染遺伝子導入細胞株をヒト末梢血単核球と細胞融合させるといずれの細胞株においてもその培養上清中に p24 蛋白を検出し、この細胞融合によって少なくとも gag は発現できると考えられた。しかし、ラット末梢血単核球との細胞融合では p24 発現は確認されず、p24 発現には新たなヒト遺伝子が必要であることが明らかとなった。次に、最近 HIV-1 ウイルス活性化に必要であることが報告されたヒト CIITA の導入を試みた。前出の SF33 感染 CD4-CXCR4 遺伝子導入細胞に cyclin T1 遺伝子と CIITA 遺伝子をコ・トランスフェクションすると cyclin T1 遺伝子単独では細胞の凝集のみであったが、多核の合胞細胞が出現した。この細胞では陽性コントロール SF33 感染ヒト T 細胞株 HUT78

に比較すると低いながら、p24 の蛋白発現が確認された。これら合胞細胞の出現や p24 の発現は CIITA 単独の遺伝子導入では見られなかった。さらに、この合胞細胞の培養上清を用いてヒト末梢血単核球への再感染実験を行うと、低レベルながら時間の経過とともに上清中の p24 濃度が上昇する傾向が見られた。しかし、合胞細胞を形成しない cyclin T1 あるいは CIITA 遺伝子単独導入細胞では p24 の発現や再感染性は確認されなかった。

ヒト *crm1* 遺伝子導入ラットについては、現在一頭の founder が確認された。

#### D. 考察

HIV-1 感染受容体が同定されて以来、多くの研究がなされているにもかかわらず、小動物での一般的な使用に適した HIV-1 感染モデル系は未だ樹立されていない。この理由として、HIV-1 に感染した細胞がウイルス粒子を形成するには、感染受容体以外にもヒト由来の因子が必要であることが示されている。最近、HIV-1 ウイルス遺伝子の発現にはヒト cyclin T1 遺伝子が重要な働きをしていることが明らかとなり、ヒト CD4、CCR5 および cyclin T1 遺伝子を導入したマウス細胞への HIV-1 感染実験が報告された。しかし、ウイルス遺伝子の発現は微量で、十分なウイルス粒子形成を得るには至っていない。このことは、今回の我々のラット細胞を用いた研究でもこれら3つのヒト遺伝子だけでは不十分なウイルス遺伝子の発現しか得られていないことで明らかである。さらに、この HIV-1 感染ヒト遺伝子導入ラット細胞をヒトあるいはラット PBMC と細胞融合すると、ヒト PBMC と融合したときのみ p24 の発現が増強した。このことから、上記3つ以外にもヒト遺伝子が HIV-1 ウイルス粒子の発現に必要であると考えられた。一方、最近ではヒト CIITA 遺伝子が HIV-1 の転写活性を高めウイルス発現を増強するとの報告が注目されており、本研究において、我々のラットの HIV-1 感染細胞系にこの CIITA 遺伝子を導入した。その結果、細胞の合胞化や p24 の発現の増強が確認されるほか、この細胞の培養上清に再感染性のあるウイルス粒子が産生されている可能性が示された。現在、この結果の確認をすすめるとともに、各ヒト遺伝子のトランスジェニックラット作製を準備中である。

ヒト *crm1* 遺伝子導入ラットの樹立とこのラットへの HTLV-1 感染は HTLV-1 ウイルス高発現が期待され、よりヒトに近い HTLV-1 感染症モデルとなる可能性が高い

#### E. 結論

1. ヒト CD4 および CXCR4 遺伝子はラット細胞に HIV-1 ウイルスの細胞内移行やウイルスゲノム全長のプロウイルス化を誘導できる。
2. ヒト cyclin T1 遺伝子は上記感染ラット細胞で一部のウイルス発現と細胞の凝集を誘導する。しかし、ウイルス粒子の発現は確認されない。
3. ヒト CIITA 遺伝子は cyclin T1 遺伝子と共同し

て、合胞細胞形成、p24 蛋白産生を誘導する。さらに再感染性のあるウイルス粒子を産生させる可能性が示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Hanabuchi, S., Ohashi, T., Koya, Y., Kato, H., Takemura, F., Hirokawa, K., Yoshiki, T., Yagita, H., Okumura, K., Kannagi, M.: Development of human T-cell leukemia virus type 1-transformed tumors in rats following suppression of T-cell immunity by CD80 and CD86 blockade. *J. Virol.* 74: 428-435, 2000.

2) Jiang, X., Ikeda, H., Tomaru, U., Morita, K., Tanaka, Y., Yoshiki, T.: A rat model for human T lymphocyte virus type 1-associated myeloneuropathy down-regulation of bcl-2 expression and increase in sensitivity to TNF- $\alpha$  of the spinal oligodendrocytes. *J. Neuroimmunol.* 106: 105-113, 2000.

3) Ohya, O., Ikeda, H., Tomaru, U., Yamashita, I., Kasai, T., Morita, K., Wakisaka, A., Yoshiki, T.: Human T-lymphocyte virus type 1 (HTLV-1)-induced myeloneuropathy in rats: Oligodendrocytes undergo apoptosis in the presence of HTLV-1. *APMIS*, 108: 459-466, 2000.

4) Kannagi, M., Ohashi, T., Hanabuchi, S., Kato, H., Koya, Y., Hasegawa, A., Masuda, T., Yoshiki, T.: Immunological Aspects of Rat Models of HTLV Type 1-infected T Lymphoproliferative Disease. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 16: 1737-1740, 2000.

##### 2. 学会発表

1) Yoshiki, T.: Retrovirus-associated vasculitis models. International Workshop on Systemic Vasculitis 2000, Tokyo.

2) Yoshiki, T.: Pathogenetic Role of Retrovirus in Collagen vascular and Autoimmune Diseases. Symposium 10. XXIII International Congress of the International Academy of Pathology and 14th World Congress of Academic and Environmental Pathology, IAP NAGOYA 2000 Symposia Handout 1: 367, 2000.

#### G. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

## HIV 脳炎の発症病理に関する研究

分担研究者：佐多徹太郎（国立感染研・感染病理）

研究協力者：中島典子、佐藤由子（国立感染研・感染病理）

### 研究要旨

HIV 脳炎の発症機序を明らかにする目的で、in situ hybrAT 法の開発を行い、その条件を検討した。従来の酵素標識法では不可能であったヒト剖検リンパ節や脳組織における HIV を検出することができた。検出できたシグナルから、HIV 増殖部位の詳細な情報が得られるであろう。また microdissection 法による検出も合わせて、HIV 感染動態さらにサイトカイン等の宿主因子の病原性への関与についても検討していきたい。

### A. 研究目的

最近の HAART 導入により血中ウイルス量の低下および CD4 陽性細胞の増加により、多くの日和見感染症や日和見腫瘍の発生頻度が減少し、患者の予後はかなり改善されてきた。一方で、抗 HIV 剤は血液脳関門を通過しにくいため、近い将来 HIV 脳炎の発生が増加する可能性が指摘されている。HIV 脳炎の発症病理はいまだ不明な点が多く、その機序を明らかにすることは将来の HIV 脳炎の治療に結びつく知見が得られる可能性がある。

HIV 脳炎は HIV の脳内感染によって起こるとされ、実際の HIV 感染者の 20-30% が神経症状を来す。HIV 脳炎は、病理組織学的に、Microglial nodule, Gliosis, Myeline paillor 等が脳組織切片にみられるものの、特異的所見は白質内の小血管周囲にみられるマクロファージ由来の単核および多核巨細胞の存在で、これを MGC (multinucleated giant cell) とよんでいる。したがって、神経病理学的特異的所見は MGC の存在とされている。脳内 HIV の検出には、免疫組織化学による HIVP24 抗原の検出が行われてきたが、およそ 30% の MGC 等にしか陽性とはならなかった。電顕で細胞内のウイルス粒子を検出した報告があるが一般的ではない。この細胞内のウイルスゲノムの検討には、通常 in situ hybridization 法が行われが、いままでいろいろ工夫しても検出できなかった。また RI 標識等の高感度検出方法で検討した成績では、HIV が MGC に検出できても、神経細胞等には検出されなかった。したがって、脳内の HIV はおもに MGC で増殖しているものと考えられており、神経症状はなんらかの神経毒性物質の産生による影響と考えられてきた。HIV 脳炎の神経症状発症機序について知るためには、脳組織における HIV 感染の実態をより明らかにする必要がある。

我々は最近、HybrAT 法を開発した。この方法は in situ hybridization 法に応用が可能であれば、検出感度の上昇が期待でき、しかも高感度ゲノム RNA および mRNA 検出系を樹立することができよう。HIV 感染者の HIV 脳炎発症機構を明らかにするために、脳内ウイルスの動態および炎症性サ

イトカインの果たす役割について詳細な病理組織学的研究を行うことを目的として、プローブの作製条件や反応条件を検討し、さらに HIV 感染者の生検および剖検例を用いて検討した。

### B. 研究方法

#### 1. ヒト HIV 感染生検および剖検組織

本邦および外国の共同研究者から HIV および日和見感染症の診断を目的として過去に送られてきたホルマリン固定パラフィン包埋のリンパ節および脳組織材料を対象とした。診断目的である PCR 法による HIV 検出結果はすでに共同研究者に報告されている。生検による日和見感染症の結果については治療に役立てられ、また剖検例については病理診断に役立てられている。今回の組織内 HIV 検索の結果についてはまとまった結果が出次第、新たに共同研究者に報告する予定である。

#### 2. HybrAT 法

これは 5'末端に Biotin を 1 個、3'末端に AT の繰り返し配列(AT)<sub>10</sub> を付加した Oligonucleotide probe の標的 DNA に相補的な部分(40 base)を特異的にハイブリダイズさせ、過剰のプローブを high stringency 条件下で洗い流した後、3'末端の AT 配列を多くのハプテン (Digoxigenin や Biotin) を取り込ませながら特異的に Tth DNA polymerase により伸長させ、このハプテンを Alkaline phosphatase や HRP 等の酵素反応で検出する方法である。条件が良好と考えられた HIV 感染サル組織では特異的なシグナルの検出が確認できた。今回 HIV の gag, nef, tat 等の領域内にそれぞれ 38-41 塩基長のプローブを作製した。

プローブの特異性や有効性を検定する目的で、pNL43-2 を鋳型とした gag 領域から nef 領域 (635-8995) にかけての 8.3kb の long PCR 産物および nef ないし gag 領域の PCR 産物(それぞれ 501b, 645b)を精製後、フィルターにプロットし、アルカリ変性後 UV cross link して固定した。このフィルターを用いて、種々の条件で反応を試み、検討した。

パラフィン切片を前処理後、hybridization、洗浄、そして AT tailing 反応、洗浄後さらに streptavidin-alkaline phosphatase ないし horse radish peroxidase、あるいは catalyzed signal amplification 法による HRP の酵素反応でシグナルを検出した。

### C. 研究結果

#### 1. Probe の選択および反応条件

PCR で増幅した HIV gag から nef 領域までの 8.3Kb の PCR 産物を精製したのち copy 数に換算し、4 倍段階希釈して filter にドットプロットし、アルカリ変性後 UV cross link して固定し以下の実験に用いた。Gag probe は 3 種類用い、hybridization、wash、そして AT tailing をすべて 60°C で行った。酵素反応は streptavidine-HRP を反応させたのち、DAB で呈色反応を行った。それぞれの probe 配列と反応液の組成（塩濃度、ホルムアミド%）から Tm 値を算出できるが、実際の Tm 値はそれぞれの反応段階で用いられる反応液の組成（塩濃度及びホルムアミド%）が異なるごとに変化する。どの probe においても hybridization、wash は Tm 値よりも高い温度、すなわち high stringency 条件下で反応を行った結果、AT tailing を行わない場合、gag1 と gag3 の probe では  $7.5 \times 10^9$  の HIV DNA が検出できたが、gag2 probe では検出できなかった。しかし、AT tailing 反応を 60 分行うだけで、gag1 と gag3 の probe では  $1.2 \times 10^8$  まで検出できることが判明した。単純計算すると、これは 64 倍検出感度が増加することを示している。また gag2 probe でも  $7.5 \times 10^9$  の HIV DNA がかるうじて検出できた。

Tm 値よりも高い温度、すなわち high stringency 条件下で反応を行ったにもかかわらず、gag1 および gag3 probe では反応したが、gag2 probe では AT tailing 後にわずかな反応が得られただけで十分ではなかった。これは、gag2 では probe 配列の GC% が低いという理由以外に、probe の配列にも問題があると考えられた。

HIV の nef および gag 領域の PCR 産物（長さ nef=501b、gag=645b）を精製後、（ $8.5 \times 10^9$  から  $1.3 \times 10^9$  まで）4 倍段階希釈して filter に付着させアルカリ変性させた後 UV cross link して固定した。high stringency および low stringency 条件下でそれぞれの反応を行った。High stringency 条件では、Nef probe では hybridization がほとんど起こらなかった。ほとんど洗い流されてしまった可能性があり、検出感度は低かった。Gag1 probe では  $(T_m+5)^\circ\text{C}$  で hybridization し、 $(T_m+2)^\circ\text{C}$  で wash し、 $(T_m-10)^\circ\text{C}$  で AT tailing を行ったことになるが、gag 特異的な反応による検出が可能であり、4 段階希釈してもなお、検出することができた。Low stringency 条件下では、両者の probe とも  $(T_m-13)^\circ\text{C}$  で hybridization し、 $(T_m+2)^\circ\text{C}$  で wash、 $(T_m-5)^\circ\text{C}$  で

AT tailing した。Gag2 probe は nef とは反応せず特異的に gag と反応し、しかも 4 段階以上の検出感度上昇が得られた。しかし、nef probe は一部 gag とも反応してしまった。

以上のことから、特異的反応には probe の hybridization における Tm 条件次第であることが明らかとなった。つまり一部でも hybridization が起こり、しかもかなり厳しい条件で wash し、一部でも probe が残っていれば、AT tailing 反応により、かなり特異的に検出できることが分かった。

#### 2. HIV 脳炎例のホルマリン固定パラフィン包埋切片での反応

HIV 脳炎例では大脳灰白質直下の白質の小血管周囲に多数のマクローファージの浸潤が認められ、ときに多核巨細胞を形成している。電顕でウイルス粒子が細胞質内に存在していることが明らかとなっている例もある。免疫染色でマクローファージは CD68 が陽性で、HIV P24 のウサギ抗体を用いた免疫染色で、この細胞の細胞膜および細胞質にシグナルが観察できた。しかし、20-30%程度の細胞にのみ陽性であった。これまで、HIV の全長の DNA probe あるいは RNA probe を作製し、HIV DNA や RNA を alkaline phosphatase 酵素反応により検出することを試みてきたが、ことごとく失敗してきた。脳組織の固定条件が不良であることから、多くのウイルス RNA が消失してしまっていると考えられた。しかし、oligonucleotide probe を使い、in situ hybridAT 法により HIV RNA が免疫染色で陽性となるマクローファージの細胞質内に陽性となることが分かった。Sense probe では反応が得られないことにより、特異的シグナルと考えられた。多核巨細胞だけでなく、他の脳細胞にもシグナルが観察できたが、特異性については、より検討が必要である。

実際、streptavidin-HRP では検出できず、今回は CSA 法を用いた。このことから、MGC 内ではかなり少量の RNA が存在していることが考えられる。一方で、その感度は十分とは言えないものの、ヒト剖検例の、必ずしも固定条件がいいとはいえない組織で、in situ PCR 法を用いずに、HIV が検出できたことは、意義があると思われた。

#### 3. AIDS 剖検例および生検例のリンパ節 (in situ hybridAT-CSA 法)

免疫染色では、ときに HIV P24 抗原が残存するリンパ節濾胞領域の濾胞樹状細胞の細胞膜に一致して認められた。必ずしも全ての例には認められないことから、リンパ節の破壊程度や患者の HIV ウイルス量等と関係すると思われる。HIV RNA は in situ HybrAT 法では、濾胞は陰性で、リンパ節の T 細胞領域に散在性に陽性細胞が認められた。Sense probe では陰性であった。このシグナルは nef probe でも、また gag probe でも同じであった。また 4 例の HIV 感染者のリンパ節でも同



じ所見であった。いままでヒト例では検出できなかったことから、検出感度の増加によるものと考えられた。

#### D. 考察

ヒト HIV 脳炎における脳組織内の HIV の感染動態については、その方法論的ハードルの高さから十分な検討ができなかったため、これまで PCR 法によりウイルスの特徴を検討してきた。HIV<sub>env</sub> 領域の nested PCR 法を用いて、凍結脳、肝臓や腎臓、脾臓、そしてリンパ節組織由来の DNA を検体として、HIV の proviral DNA の env 領域を増幅し、その塩基配列をしらべた。HIV 脳炎患者の脳由来の HIV は、他臓器由来の HIV とかなり類似しており、しかも M tropic HIV の性格を持つ。脳炎の無い例の脳以外の臓器組織からは、M および T 指向性ウイルスが検出され、脳組織から HIV が検出される場合、その性格はかなり異なることが明らかとなった。HIV 脳炎由来の脳内には全身に感染している HIV がなんらかの理由により侵入し、神経症状を起こすと考えられた。

HIV 脳炎の脳組織における HIV 発現細胞の研究報告は現在まで多くあるが、いずれも MGC 以外の細胞についての陽性所見は信頼性がやや欠けるものであり、疑問視されていた。Bagastra らは in situ PCR 法を用いて検討したところ、Microglia, Astrocyte, Choroid plexus は全検討例で陽性、しかも神経細胞には 77%、血管内皮細胞では 86%、Oligodendroglia では 59%の症例で陽性となった。しかし陽性細胞の頻度は Choroid plexus で 38%、Microglia では 7.5%であり、神経細胞では 3.5%、Astrocyte では 2.6%と少なかった。DNA 及び RNA の検出細胞数を検討してみると、神経細胞では 100%、内皮細胞では 65%、Astrocyte では 40%であり、Microglia では 30%であった。このことから、神経細胞に HIV は感染しているものの、ウイルスの増殖は限られていると考えられた。そこで、ウイルス増殖の指標として Unspliced RNA の陽性細胞頻度を検討してみると、内皮細胞で 0.17%、Microglia で 0.13%であり、神経細胞では 0.02%であった。それに対し、グリア細胞である Oligodendroglia や Astrocyte では 0.001%ないしそれ以下であり、グリア細胞におけるウイルス増殖が限られていることを明らかにした。このことから、HIV は脳内でマクロファージや Microglia だけでなく脳を構成する細胞のほとんどに感染しており、神経細胞でも HIV は感染しわずかながら増殖していることになる。またウイルスは Microglia で増殖しているが、逆にグリア細胞内ではウイルス増殖になんらかの障害があることを示唆した。したがって、HIV 脳炎では HIV が脳内の固有細胞のほとんどに感染していることから、神経症状の出現は HIV 感染によるなんらかの機

能障害が関係していると報告された。

一方で、HIV の coreceptor が調べられた報告では、Microglia/Macrophage には多くのケモカインレセプターが発現していること、グリア細胞である Astroglia や神経細胞、血管内皮細胞では CXCR4 がおもに発現していることがわかってきた。これらのレセプター発現と、前述した HIV 感染状態とどのような関係があるのかは不明であるが、炎症にともない、これらのケモカインレセプターの発現が誘導されるという報告もある。上記のデータの追加報告はごく少ない。その理由は方法論的にかなりの困難さをともなうからと考えられる。

我々が最近開発した HybriAT 法は Membrane filter 上では高感度に核酸を検出可能である。標的核酸とハイブリダイズする Probe 部分は 40 base 前後であるので、sequence database から簡単に合成できクローン化 DNA を必要としない。そして標的核酸と特異的に結合したあとでこの probe の 3'末端に結合した AT 配列部分でシグナルの増殖反応を特異的に行うという特徴がある。したがって、probe が特異的に結合していれば、そのシグナルは特異的結合部位周辺に観察されるはずである。In situ PCR 法では、DNA repair という非特異的シグナルが現れること、また検出目的の核酸は増殖核酸であり増殖反応中に特異的部位から遊離してしまう可能性が考えられ、非特異的シグナルの原因となる。実際、この非特異的シグナルの存在のため、なかなか一般的に普及していない。組織の固定条件を良好とすることが可能な SIV 感染サルの脳炎組織において、HybriAT 法を試してみた。その結果、反応が特異的であること、また AT 反応時間によって、シグナルが増強することが判明し、in situ hybridization 法に応用が可能であることが分かった。しかしながら、検出感度は期待していたほどではなく、壊死部にも反応が見られることなどから、Probe の作製条件、hybridization 条件、AT tailing 条件等について詳細な検討が必要であることが課題となった。

今回、通常の hybridization 法と酵素反応による検出では困難であったヒト HIV 脳炎組織において、in situ HybriAT 法の種々の条件を検討し、また検出方法についても改善を試みた。作製した HIV 検出用 probe とする Oligonucleotide の長さは 38-41 塩基で、GC%は 55-60%であり、Antisense probe の 3'末端には G か C を配置した。5'末端には Biotin を 1 個付加し、3'末端には AT 配列が 10 回くりかえされるよう 20 塩基を付加した。全長は 60 塩基程度となる。pNL43 ないし JRCSF 等のウイルス配列をもとに、Gag 領域、Nef 領域、LTR 領域、Tat 領域そしてスプライスされた後の Tat-rev 領域の probe を作製した。Probe の塩基配列や反応条件を検討した結果、特異性があること、AT Tailing 反応によりシグナル強度が増強すること、

そしてヒト剖検例の組織でも検出できることがわかった。脳およびリンパ節での所見から、in situ hybrAT-CSA 法で検出できる HIV のシグナルは増殖しつつあるウイルスの mRNA と考えられた。すなわち、P24 抗原が陽性となるリンパ節濾胞領域にはほとんど検出されないこと、切片を heat denature してもしなくてもシグナルの局在には変化がないこと、proviral DNA を検出するほど感度は高くないことがその理由である。

今後、症例を増やし、検出できたシグナルから、HIV 増殖部位の詳細な情報が得られると考えられる。また microdissection 法による検討も組み合わせ、HIV 感染動態さらにサイトカイン等の宿主因子の病原性への関与についても検討していきたい。

#### E. 結論

いままで in situ PCR 法ないし RI を標識した in situ hybridization でしか検出できなかった HIV RNA が HIV 感染者のホルマリン固定パラフィン包埋切片上で、In situ hybrAT-CSA 法により検出することができた。検出には Hybridization の反応温度、probe の塩基配列が重要であり、検出できたシグナルの特異性が高いことがわかった。検出できたシグナルはおもに mRNA と考えられた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Brandful JAM, Apeagyei FA, Ampofo WK, Adu-Sarkodie Y, Ansah JE, Nuvour V, Aido S, Ishikawa K, Sata T, Yamamoto N and Yamazaki S.: Relationship between immunological status and prevalence of viral STDs among HIV-1 seropositive patients in Ghana. *Viral Immunology* 1999, 12: 131-137.
- 2) Nakajima N, Sata T, Hanaki K, Kurata T, Yoshikura H.: Application of the hybridization AT-tailing (HybrAT) method for detection of human or simian immunodeficiency virus RNA in formalin-fixed and paraffin-embedded cells or tissues. *J Virol Method* 1999 ; 81 (1-2) : 169-177
- 3) Otani I, Mori K, Sata T, Terao K, Doi K, Akari H, Yoshikawa Y: Accumulation of MAC387+ macrophages in paracortical areas of lymph nodes in rhesus monkeys acutely infected with simian immunodeficiency virus. *Microbes Infect* 1999, 1: 977-985
- 4) Kashiwase M, Sata T, Yamauchi Y, Minoda H, Usui N, Iwasaki T, Kurata T, Usui M.: Progressive outer retinal necrosis caused by herpes simplex virus type 1 in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Ophthalmology* 2000, 107: 790-794.
- 5) Matano T, Kano M, Odawara T, Nakamura H, Takeda A, Mori K, Sata T, Nagai Y.: A novel DNA vaccine strategy inducing safer restricted replication of attenuated vaccine virus only in the

receptor-transduced cells. *Vaccine* 2000, 18, 3310-3318.

- 6) Kano M, Matano T, Nakamura H, Takeda A, Kato A, Ariyoshi K, Mori K, Sata T, Nagai Y.: Elicitation of protective immunity against simian immunodeficiency virus infection by a recombinant sendai virus expressing the gag protein. *AIDS* 2000, 14 : 1281-1282.
- 7) Tanaka M, Endo K, Suzuki T, Kakita A, Takahashi H, Sata T.: Parkinsonism in HIV encephalopathy. *Mov Disord* 2000, 15: 1032-1033.

#### G. 知的所有権の取得状況 特になし。

## HIV-1 持続感染成立機序と阻止に関する研究

分担研究者 神奈木真理 東京医科歯科大学医歯学総合系研究科教授

**研究要旨** HIV-1 感染では、急性感染から回復した後に活動性の持続感染状態となる。この持続感染状態における活性化した宿主免疫機構の消耗がエイズ発症の機序の一つである。現在、HIV-1 に対するワクチンの達成目標は、急性感染からの回復に必要な宿主免疫を事前に強化しておき、生体内でのウイルスの初期増殖を最小限度に食い止めることである。しかし、一旦持続感染が成立すれば上記の病理は進行する。従って、急性感染を最小限にすることに加え、持続感染の成立阻止の努力も必要である。これは同時に HIV-1 感染症の治療にもつながる。しかし、HIV-1 持続感染機序についてはほとんど分かっていない。臨床研究で持続感染細胞はメモリーT細胞であることが示唆されているが詳細は不明である。我々は、HIV-1 持続感染機序を解明する目的で、試験管内で持続感染状態を作り宿主防御機構への感受性を調べた。その結果、Nef 機能を温存する HIV/NL4-3 株に持続感染した末梢血単核球分画（PBMC）は、MHC-I 発現低下が認められたにもかかわらず無症候 HIV-1 キャリア（AC）由来の CD8 陽性細胞によって HIV-1 産生が抑制されることが分かった。また、MHC-I の全く一致しない持続感染 PBMC に対しても AC-CD8 細胞の HIV-1 抑制は有効であった。これらのことは、持続感染細胞の HIV-1 産生に対し MHC-I 非依存性の抑制機序が働くことを示している。これが細胞傷害を伴わないとすれば、持続感染細胞が維持される一因とも考えられる。

### A. 研究目的

一般に、中和抗体はウイルス量を軽減し、細胞性免疫、特に CTL は感染細胞を除去することにより急性期からの回復に役立つ。HIV 感染では、この後一部のウイルスが活動性の持続感染状態へ移行する。この状態は徐々に進行する HIV 増殖と宿主防御の均衡状態であり、HIV 感染症の病理の本質ともいえる。HIV の感染防御を考える上では、中和抗体や CTL 誘導に加え持続感染の成立阻止も考慮しなければならない。しかし、HIV 持続感染に関しては不明な部分が多い。本研究の目的は、持続感染細胞における HIV-1 潜伏機序および宿主免疫との関係を解明することである。

### B. 研究方法

1) Allo-抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞クローンの樹立。健常人 PBMC を EBV 感染 B 細胞株 Raji 細胞で刺激し、allo-抗原特異的に増殖する T 細胞株を樹立した。この細胞株は IL-2 存在下に定期的な Raji 刺激により株化

維持された。このような T 細胞株に HIV-1 (NL4-3, NFN-SX) を感染させ、HIV-1 感受性と細胞数変化を経時的に調べた。

2) これとは別に、健常人末梢血単核球 (PBMC) から付着細胞を除去し、PHA 刺激後 HIV-1/LAI または HIV-1/NL4-3 を感染させ数日培養し、AZT と IL-2 を添加した培地で培養したものを、持続感染細胞として用いた。これは、MHC-I の発現および、無症候 HIV-1 キャリア (AC) 由来 CD8 陽性 T 細胞の HIV-1 産生抑制効果を調べる際の標的として用いた。

3) HIV-1 持続感染 PBMC の MHC-I 発現。感染 PBMC を先ず抗 MHC-I 抗体を用いて細胞表面染色を行ったのち、細胞膜を透過処理し、蛍光標識 HIV-1 p24 抗体で二重染色し、FACS で解析した。

4) AC 由来 CD8 陽性 T 細胞の HIV-1 産生抑制効果に対する持続感染 PBMC の感受性は、両者を共培養した上清中 HIV-1 p24 量により調べた。HIV-1 p24 の定量は ELISA 法により行った。

(倫理面への配慮) 本研究に用いた末梢血の採取に当たり供血者の理解を得、守秘義務を固守する。

### C. 研究成果

#### 1) 抗原特異的T細胞への HIV-1 持続感染株

i) 持続感染細胞がメモリー T 細胞であることが示唆されているので、この疑似実験系を作る目的で、健常人 PBMC を Raji 細胞で刺激し allo-抗原特異的に増殖する T 細胞株を樹立した。この細胞株は、マイトマイシン処理した Raji 細胞を加えると著明に増殖するが、自己 EBV トランスフォーム B 細胞株には反応しなかった。IL-2 存在化でも抗原刺激を加えないと 1 週間で静止期に入ることが細胞周期の解析で確認された。

ii) これらの T 細胞株に T 細胞親和性 HIV-1 (NL4-3) およびマクロファージ親和性 HIV-1 (NFN-SX) を感染させ、HIV 感受性を調べた。その結果、静止期であってもこれらの T 細胞株は抗原刺激の有無にかかわらず両 HIV-1 株に感受性であった。NFN-SX 感染では HIV-1 産生は一過性に認められ、著しい細胞死を伴った。一方、NL4-3 感染ではウイルスの複製は緩徐であり、抗原不在下でも 6 週間以上生細胞が残り HIV-1 を持続的に産生することが分かった。

#### 2) 持続感染 PBMC の AC 由来 CD8 細胞への感受性

これまで我々は AC 由来 CD8 細胞が HIV-1 産生を抑制することを報告してきた。この実験は上に PBMC の急性感染系を標的として行われてきたが、今回、持続感染 PBMC について調べた。この結果、AC-CD8 細胞は急性感染の場合と同様に持続感染 PBMC の HIV-1 産生も抑制した。この際、PBMC が AC-CD8 細胞と一致する MHC-I 数が多いほど強い抑制が認められたが、全く MHC-I の一致しない PBMC に対しても AC-CD8 細胞は有意な抑制を示した。非感染者由来の CD8 陽性細胞には、このような抑制は認められなかった。

#### 3) 持続感染 PBMC の MHC-I 発現量と AC 由来 CD8 細胞への感受性

i) Nef が細胞表面の MHC-I 発現を抑制することが報告されている。そこで、まず我々の準備した持続感染 PBMC についてこの現象を検証した。その結果、HIV-1/LAI (Nef 欠損) 感染培養中では、HIV-1 p24 陽性細胞と陰性細胞の MHC-I 発現量 (蛍光強度) に差

がないのに比べ、HIV-1/NL4-3 (Nef 保存) 感染細胞では MHC-I 発現量が減弱していた (図 1)。

ii) 次に、このような HIV-1 持続感染細胞の HIV-1 産生が AC 由来 CD8 陽性細胞による抑制をうけるかどうか検討した。AC-CD8 と MHC-I の一致した健常人 PBMC を HIV-1/LAI あるいは HIV-1/NL4-3 に持続感染させ、種々の比で AC-CD8 細胞と共培養し 3 日目の p24 活性を測定した。抑制の強さは、HIV-1 産生を 50% 抑制する AC-CD8 細胞/感染細胞数比 (SI50) で数値化し比較した。この結果、調べたほとんどの AC 例から得た CD8 細胞は結果は HIV-1 株の如何にかかわらず同程度の抑制を示した (図 2)。

### D. 考察

メモリー T 細胞の HIV-1 持続感染を疑似する試験管内実験系として、抗原特異的 T 細胞株に T 細胞親和性およびマクロファージ親和性 HIV-1 を感染させたところ、静止期においても両ウイルス株の感染は成立した。その後も長期にわたり感染細胞が生存しウイルス産生も維持されることが確認されたが、生存細胞数が少ない点を改善する必要がある。

一方、HIV-1 感染後 AZT で再感染を抑制して作成した持続感染状態の PBMC は、AC 由来 CD8 陽性 T 細胞の HIV-1 抑制機能に対して感受性であった。このことは、AC-CD8 細胞が HIV-1 複製の転写以降を抑制していることを示している。さらに、MHC-I の全く一致しない PBMC にもこの抑制が有効であり、Nef による MHC-I 発現低下の影響も少ないことから、AC-CD8 による持続感染細胞の HIV-1 産生抑制には、MHC-I 非依存的な機序が多分に含まれることが示唆された。この抑制が細胞傷害を伴わないとすると、持続感染細胞の維持理由の一つであると考えられる。しかし、一致する MHC-I 数が多い標的に対してより強い活性が認められたことは、MHC-I の一致により何らかの近接効果が生じて抑制効果を高めたか、あるいは MHC-I 依存的な抑制も同時に働いていると考えられる。非感染者には抑制効果が認められなかったことを合わせ考慮すると、効果細胞は CD8 陽性 HIV-1 特異的 T 細胞である可能性が高い。

### E. 結論

i) 静止期の抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞に

- HIV-1 感染が成立し、一部は持続感染状態となることがわかった。
- ii) AC 由来 CD8 陽性細胞の HIV-1 産生抑制能は、急性感染だけでなく持続感染状態の PBMC に対しても有効であることが分かった。
  - iii) AC 由来 CD8 陽性細胞の持続感染 PBMC に対する HIV-1 産生抑制には、MHC-I 依存のおよび非依存の機序が働くことが分かった。
  - iv) HIV-1 持続感染 PBMC では Nef による MHC-I 発現低下が認められたが、AC-CD8 細胞の HIV-1 産生抑制に及ぼす影響は少なかった。
- F. 研究発表
1. 論文発表
    - i) T. Ohashi, M. Kubo, H. Kato, A. Iwamoto, H. Takahashi, M. Fujii, and M. Kannagi. Role of class I major histocompatibility complex-restricted and unrestricted suppression of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication by CD8+ T lymphocytes. *J. Gen. Virol.* 80:209-216, 1999.
    - ii) N. Tsurutani, M. Kubo, Y. Maeda, T. Ohashi, N. Yamamoto, M. Kannagi, T. Masuda. Identification of critical amino acid residues in human immunodeficiency virus type 1 IN required for efficient proviral DNA formation at steps prior to integration in dividing and non-dividing cells. *J. Virol.* 74: 4795-4806, 2000.
    - iii) M. Kannagi, T. Ohashi, S. Hanabuchi, H. Kato, Y. Koya, A. Hasegawa, T. Masuda, and T. Yoshiki. Immunological aspects of rat models of HTLV-type 1-infected T lymphoproliferative disease. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 16: 1737-1740, 2000.
    - iv) T. Ohashi, S. Hanabuchi, H. Kato, H. Tateno, F. Takemura, T. Tsukahara, Y. Koya, A. Hasegawa, T. Masuda, and M. Kannagi. Prevention of adult T cell leukemia-like lymphoproliferative disease in rats by adoptively transferred T cells from a donor immunized with human T cell leukemia virus type 1 Tax-coding DNA vaccine. *J. Virol.* 74: 9610-9616, 2000.
  2. 学会発表
    - i) 劉 慧寧、久保誠、増田貴夫、大橋貴、神奈木真理、非感染者由来アロ特異的 CTL による HIV-1 の増殖抑制. 第 14 回日本エイズ学会、京都、2000、11 月
    - ii) 久保 誠、増田貴夫、大橋貴、岩本愛吉、神奈木真理、無症候 HIV-1 感染者 CD8 陽性細胞の持続感染細胞に対する抑制効果. 第 14 回日本エイズ学会、京都、2000、11 月
    - iii) 増田貴夫、鶴谷直美、久保誠、大橋貴、山本直樹、神奈木真理、HIV-1 インテグラーゼの機能ドメイン解析. 第 14 回日本エイズ学会、京都、2000、11 月
    - iv) 鶴谷直美、久保誠、大橋貴、山本直樹、神奈木真理、増田貴夫、HIV-1 インテグラーゼ蛋白の核移行シグナル領域の検討. 第 48 回ウイルス学会、津、2000、10 月
    - v) 久保誠、増田貴夫、鶴谷直美、大橋貴、岩本愛吉、神奈木真理。HIV キャリア CD8 陽性細胞の HIV-1 抑制効果に対する MHC-I 発現低下の影響。第 48 回ウイルス学会、津、2000、10 月

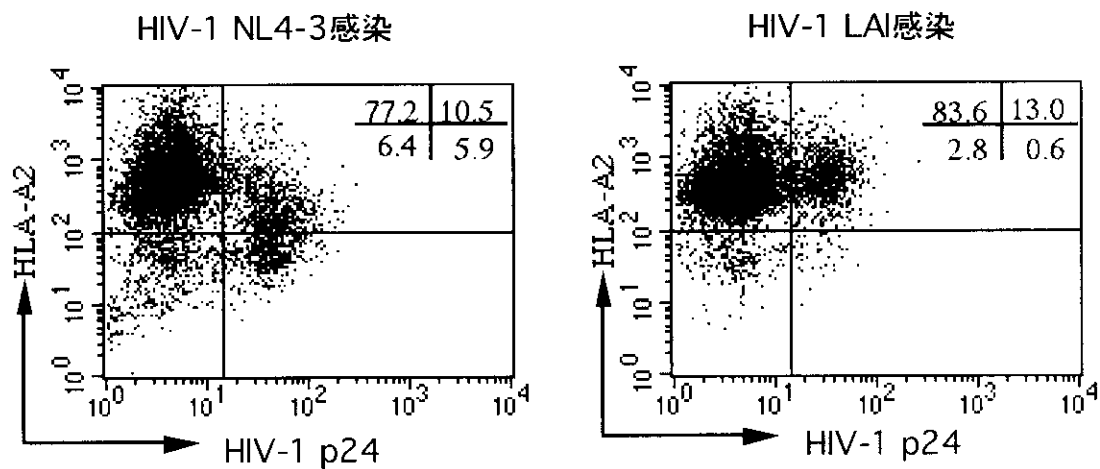


図1 HIV-1持続感染PBMCのMHC-I 発現低下

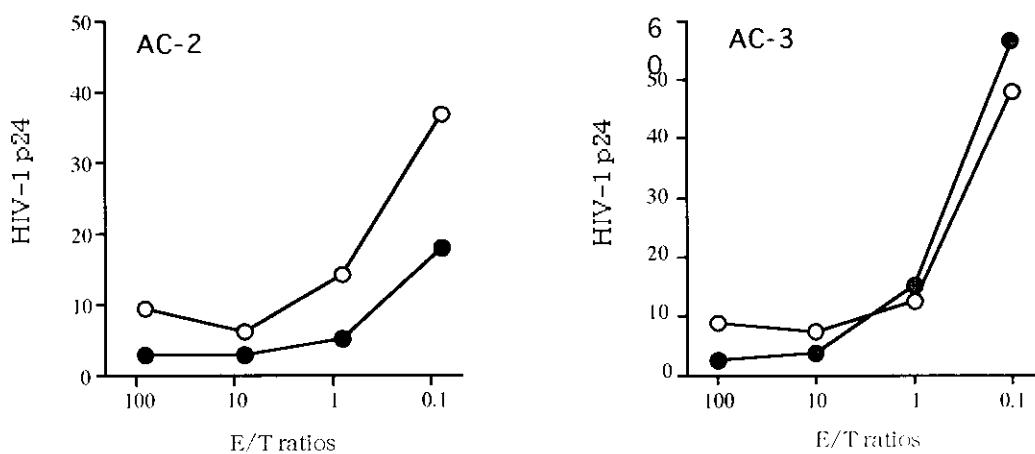


図2 HIV-1 NL4-3 (●) あるいはLAI (○) 持続感染細胞に対する AC-CD8陽性細胞のHIV-1抑制効果

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

エイズ日和見感染発症阻止のための免疫学的・細菌学的研究

分担研究者 牧野 正彦 国立感染症研究所  
ハンセン病研究センター部長

研究要旨. HIV 感染者への結核菌等の抗酸菌の感染は重篤な病変を発症させる。ハンセン病は、抗酸菌であるらい菌の感染によって発症する慢性炎症性疾患である。ハンセン病の発症は、らい菌抗原に対して特異的免疫応答能の低下が密接に関与する。しかし、生体内で最も重要な抗原提示細胞である樹状細胞(DC)とらい菌の相互作用については充分解明されていない。そこで、正常健常者末梢単球より分化誘導した DC のらい菌に対する感受性を検索し、さらに抗原提示能に及ぼす影響を検索した。DC は in vitro でらい菌に対し感受性を示し、感染 DC 細胞内に PGL-1 抗原が検出された。同時に、DC 表面に PGL-1 抗原および患者プール血清に反応する抗原が検出された。そこで、らい菌感染 DC の抗原提示能を検索したところ、対象として用いた *M. bovis* BCG および *M. avium* が、それぞれ MOI 0.2 および 5.0 で強い CD4 および CD8 陽性 T 細胞の増殖応答を DC の活性化因子非存在下で誘導したのに対し、*M. leprae* は MOI 80 で初めて有意の T 細胞増殖をもたらした。感染 DC により刺激された T 細胞が産生する IFN- $\gamma$  を測定したが、増殖応答と同様に対象群で強く、らい菌では MOI 320 を用いた場合に明らかな産生を認めた。感染 DC 表面の抗原提示に関与する抗原を検索したところ、らい菌感染 DC では菌数に比例して CD40、CD86、MHC 抗原の発現が増強し、MOI 320 で CD83 抗原が陽性となった。そこで、らい菌感染 DC を CD40 mAb、LPS、IL-12、IFN- $\gamma$  などを単独で用い DC の活性化を試みた。CD40 mAb で処理した DC は CD83 抗原を発現したが、T 細胞を刺激する能力は増強されなかった。従って、らい菌は生体内で最も有能な DC に対し感受性を示したが、他の抗酸菌(*M. bovis* BCG および *M. avium*)と異なり、自己の T 細胞を容易には抗原特異的に刺激し得なかった。さらに、CD40 リガンドなどの DC 活性化因子にも抵抗性を示した。

A. 研究目的

らい菌は、抗原提示細胞の一種であるマクロファージに親和性を示し細胞内寄生感染を果たす。らい菌感染マクロファージは容易には活性化されず、自己の T 細胞を活発に活性化することもない。その結果、らい菌は生体内でいわゆる免疫学的不応答性を獲

得し、重篤かつ広範な病変を誘導する。HIV 感染者においては、免疫応答能を低下させる病原体は、より早急に体外へ排除する必要がある。しかし、これまでらい菌と生体内で最も有能な抗原提示細胞である樹状細胞(Dendritic cell, DC)とのかかわり合いについては充分解明されていない。

そこで、抗らい菌免疫応答の誘導を目的としてらい菌の DC に対する感受性を検索し、さらに DC の抗原提示能に及ぼす影響を検索した。

## B. 研究方法

**細胞および抗酸菌** 正常健常者より、十分なインフォームドコンセントを行った後、末梢血リンパ球(PBMC)の供与を受けた。プラスティック附着性単球は、PBMC を 60 分間培養した後非附着性細胞を除去して得た。DC の分化誘導には、recombinant (r)GM-CSF 50 ng/ml と rIL-4 10 ng/ml を用いた。マクロファージは、プラスティック附着性単球を 20% FCS 非存在下で培養して得た。

**細胞表面抗原の解析** DC の細胞表面抗原の解析は、市販の抗体(CD1a, CD54, CD86, CD83, HLA-ABC, HLA-DR)を用い FACScalibur にて行った。

**抗酸菌および抗酸菌感染** らい菌はヌードマウスを用い増殖させた Thai 53 株を用いた。対照として *M. bovis* BCG および *M. avium* を用いた。らい菌の DC への感染は、抗 PGL-1 モノクローナル抗体(DZ2C11, ハンセン病研究センター皆川文重博士より供与)を用い、細胞内抗原染色を施した後 FACScalibur にて検索した。らい菌由来の抗原の細胞表面への発現は、抗 PGL-1 抗体およびハンセン病患者血清(皆川博士より分与)を用い検索した。

**樹状細胞の抗原提示能の検索** 非感染および抗酸菌感染 DC の抗原提示能は、自己の CD4 および CD8 T 細胞の増殖応答能にて検索した。CD4 陽性および CD8 陽性 T 細胞の精製は、

ダイナビーズ結合抗体を用いて negative selection で行った。

**倫理面への配慮** 血液ドナーのプライバシーを完全に守るため、研究結果発表に際しては個人が特定されないよう配慮し、研究者はドナーのいかなる個人情報も漏出しないよう細心の注意を払った。また、使用目的と使用方法および医学上の貢献予測を十分に説明し理解(インフォームドコンセント)を得た。さらに、結果について守秘義務に基づいて知る権利と知りたくない権利を守った。

## C. 研究結果

らい菌の DC への感染は、らい菌特異的抗原である PGL-1 抗原を指標として細胞内抗原染色を行った。in vitro で加えたらい菌の量依存性に PGL-1 抗原の量が増大し、その程度はマクロファージとほぼ同程度であり、らい菌は in vitro で容易に DC に感染した。らい菌は、マクロファージ内では菌体のプロセッシングを妨げるため、らい菌由来抗原はマクロファージ細胞表面には発現されない。これに対して、DC 内においてはらい菌はプロセッシングを受け DC 表面に PGL-1 抗原を発現した。さらに、らい菌感染 DC 表面にはハンセン病患者プール血清と反応する抗原が検出された。ついで、抗原提示に関わる分子のらい菌感染 DC への発現を検索すると MHC class I, class II および CD40 抗原陽性であり、らい菌の量依存性に CD86 抗原の発現が増強した。しかし、DC の活性化マーカーである CD83 は陰性で超大量のらい菌(MOI 320)を感染させて初めて陽性となった。そこで、*M. bovis* BCG および *M.*



*avium* を対象としてらい菌感染 DC の抗原提示能を自己(同一人)の CD4 陽性および CD8 陽性 T 細胞を responder として検索したところ、対象抗酸菌を感染させた DC は、DC の活性化因子非存在下において *M. bovis* BCG (MOI 0.6~2.5) および *M. avium* (MOI 0.3~1.3) で非常に強い T 細胞の増殖応答を誘導したが、らい菌感染 DC の抗原提示能は弱く、MOI 80~320 において T 細胞の弱い増殖応答を誘導した。さらに、感染 DC によって刺激された CD4 陽性および CD8 陽性 T 細胞が産生する IFN- $\gamma$  を測定したが、対象抗酸菌を感染させた DC は強い IFN- $\gamma$  産生を誘導するのに対し、らい菌感染 DC では MOI 320 において有意の IFN- $\gamma$  産生をもたらした。しかし、その産生能は対照抗酸菌に比し明らかに低下していた。これらの結果は、らい菌感染 DC は BCG 株あるいは *M. avium* とは異なり菌の感染だけでは T 細胞を十分に刺激し得るまでには活性化されていない可能性を考えさせる。この点を明らかにするためらい菌感染 DC を種々の因子を用い活性化を試みた。DC 上に発現する CD40 抗原を通じてシグナルを施すと DC は有意に活性化することが知られる。そこで、CD40 mAb を用いらい菌感染 DC にシグナルを与えたところ、CD86 抗原の発現が増強し CD83 抗原が陽性(MOI 80)となり、DC の成熟化および活性化が進行した。しかし、らい菌感染 DC の自己 T 細胞刺激能は有意には増強されなかった。CD40 抗原を介したシグナルの他に、LPS, IFN- $\gamma$ , IL12 の DC 活性化因子としての作用を同様に検索したが、らい菌感染 DC の抗原提示能

は増強されなかった。一方、PGL-1 抗原は免疫抑制性に働く可能性が示唆されている。かつ、らい菌感染 DC 表面には PGL-1 抗原が発現しているため、DC 表面の PGL-1 抗原をモノクローナル抗体を用いマスクした後、感染 DC の抗原提示能を検索した。その結果、感染 DC の CD4 陽性および CD8 陽性 T 細胞刺激能は有意に増強した。

#### D. 考察

慢性感染症とりわけ細胞内持続感染症に対し有効な免疫療法を施すには、抗原提示細胞を用いた抗原特異的細胞性免疫応答を誘導することが不可欠である。抗原提示細胞として種々の細胞が知られているが、この中で非感作 T 細胞および感作 T 細胞の両者を強く活性化し得る細胞は樹状細胞(DC)のみである。マクロファージは非感作リンパ球を刺激することはできなく、さらにらい菌感染マクロファージは、非感染マクロファージと比較すると細胞表面上の MHC class I および class II 抗原の発現は低下し、IFN- $\gamma$  等の MHC 抗原増強剤を用いても自己の T 細胞を活性化・増殖させることはできない。従って、抗らい菌特異的 T 細胞増殖応答を誘導するには DC を用いることが最も有効と想定された。しかし、これまでらい菌と DC の相互作用については十分に検討されていないため、本年度はらい菌感染 DC の抗原提示能について検索した。その結果、同じ抗酸菌である *Mycobacterium bovis* BCG および非定型抗酸菌である *M. avium* と異なり、らい菌は DC に感染しても自己の T 細胞を十分に活性化することは

できなかった。その原因として、①らい菌は抗原性の極めて弱い菌であること、②PGL-1 抗原および患者血清と反応する抗原が細胞表面に発現しているにも関わらず、T細胞を刺激するためにエッセンシャルなエピトープが発現していない、③らい菌が樹状細胞内でプロセッシングされるためには長時間を要し、通常の *in vitro* のアッセイシステムでは DC の抗原提示能が正確に評価されていない、④今回は T 細胞と DC の相互作用に重要な CD40 を介したシグナル、LPS、IL-12、IFN- $\gamma$  などを用い DC の活性化を試みたが十分な結果は得られず、今回未検索の因子あるいは未知の因子がらい菌感染 DC の抗原提示に重要な役割を果たしている、⑤らい菌菌体中に免疫抑制性に働く成分が存在し DC の機能を抑制している、などの可能性が考えられる。この中で、今回検索した中では⑤の可能性が強く考えられた。すなわち、DC 表面上に発現する PGL-1 抗原を抑制したところ DC による CD4 陽性および CD8 陽性 T 細胞の増殖応答が有意に増強した。PGL-1 抗原はらい菌特異的であり、BCG 株にも *M. avium* にも発現していない。従って、PGL-1 抗原が DC の抗原提示能を抑制している可能性は強い。ハンセン病はらい菌の感染により誘導されるが、末梢神経障害をもたらし、患者の QOL を著しく低下させる。そのため、HIV-1 との二重感染は大きな社会的問題を惹起する。従って、抗らい菌免疫療法は極めて重要であるが、DC を用いた免疫療法の開発に今回の結果は有用な情報を提供していると考えられる。

## E. 結論

らい菌は生体内で最も有能な DC に対し感受性を示したが、他の抗酸菌 (*M. bovis* BCG および *M. avium*) と異なり、自己の T 細胞を容易には抗原特異的に刺激し得なかった。さらに、CD40 リガンドなどの DC 活性化因子にも抵抗性を示した。しかし、感染 DC 表面の PGL-1 抗原の発現を抑制すると DC の抗原提示能は増強した。このことは、抗らい菌免疫療法の開発に有用な情報と考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 牧野正彦. HTLV-I 感染症 (ATL/HAM). 茂田士郎, 満屋裕明編, ウイルス感染症との戦い, 285-295, 2000.
- 2) 牧野正彦. HTLV-I 関連脊髄症 (HTLV-I-associated myelopathy; HAM) 熱帯性痙性脊髄対麻痺 (tropical spastic paraparesis; TSP). 免疫症候群. 矢田純一編, 日本臨床, 9-12, 2000.
- 3) Makino, M., S. Wakamatsu, S. Shimokubo, N. Arima, and M. Baba. Production of Functionally Deficient Dendritic Cells from HTLV-I-Infected Monocytes: Implication for the Dendritic Cell Defect in Adult T Cell Leukemia., *Virology*, 274:140-148, 2000.

### 2. 学会発表

- 1) 牧野正彦, 宇都宮 與, 下窪 敏, 出雲周二, 馬場昌範. 成人 T 細胞

白血病における免疫不全症発症に及ぼす HTLV-I 感染 CD4 陽性 T 細胞上の CD40 リガンドの発現異常の影響. 第 48 回日本ウイルス学会学術集会総会 2000 年 10 月 津

- 2) Maeda Y., B. V. Hoang, S. Shrisungngam, S. Maeda, P. J. Brennan, Y. Kashiwabara, and M. Makino. Molecular and immunological analysis of a

protein against leprosy. International Symposium on Mycobacterial Diseases: Pathogenesis, Protection and Control, Jan., 2001, Bose Institute, Calcutta, India.

G. 知的所有権の取得状況  
なし

## SHIV の病原性に関する研究

分担研究者 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

エイズ研究のための霊長類実験動物系で用いられている病原性 SIV-HIV キメラウイルス (SHIV) は、非病原性の親ウイルスをサルで継代することにより得られたものである。その病原性獲得機構は未だ解明されていない。我々は、病原性 SHIV-C2/1 株のゲノム構造の比較遺伝子解析により、*env* 遺伝子の特定領域 (C2 及び V3) の病原性発現への関与の可能性を指摘した。本研究では、病原性に関与する SHIV-C2/1 ゲノム上の遺伝子 (領域) の同定のために、SHIV-C2/1 株の分子クローニングを行った。ウイルス感染 M8166 細胞より抽出した DNA を鋳型として、PCR 法により増幅したウイルス DNA 断片を組み合わせ、プロウイルス型のプラスミドクローン (pKS661) を構築した。これを COS7 細胞にトランスフェクトして回収したウイルス SHIV-C2/1 KS661 は、カニクイザル及びアカゲザルに接種すると、感染が成立してウイルス血症を呈し、CD4 陽性 T リンパ球の枯渇、対 CD8 陽性 T リンパ球比率の逆転現象を引き起こした。このように、サルに病原性を示す分子クローンの作製に成功した。

### A. 研究目的

抗 HIV ワクチン或いは抗 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。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る (図1)。作製された組み換えウイルスクローンは、通常、病原性を持たず、サルで継代を繰り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、病原性獲得機構は明らかになっていない。そこで、本研究では、遺伝子工学的手法を駆使して、ウイルスの病原性獲得機構の解明を目指す。病原性獲得機構が明らかになることにより、動物試験用 SHIV の設計が容易になることが期待され、現在必要となっている、Clade B 以外の 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ことも期待している。

我々は、これまで、SHIV-C2/1 と他の病原性 SHIV (SHIV-HXBc2P3.2) との比較遺伝子解析より、Env C2 及び V3 領域に病原性ウイルス間で共通する変

異を見出した。それは、C2 領域のアスパラギン結合糖鎖の消失であり、V3 ループ内の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ことである (図2)。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予想される。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、病原性 SHIV-C2/1 と非病原性親株 SHIV-89.6 間の種々の組み換えウイルスを作製し、それらの病原性を比較検証する必要がある。本年度は、この組み換え実験に必須な SHIV-C2/1 の病原性分子クローンの作製を試みた。

### B. 研究方法

クローニングの手順 (図3) は、まず、SHIV-C2/1 (カニクイザル血漿) を感染させた M8166 細胞 (CD4 陽性ヒト T 細胞株) より抽出した全細胞 DNA を鋳型とし、PCR 法によりプロウイルスゲノムを増幅した。その際、Expand High Fidelity PCR System Kit (Roche Diagnostics) の (*Pwo* + *Taq*) DNA ポリメラーゼ混合酵素を用いて、人工的な塩基変異を導入しないように努めた。PCR プライマーは、プロウイルスゲノムを制限酵素 *Sse8387* I と *Sph* I にて3分割し、5' および3' 末端に人工的に各々 *Not* I と *EcoR* I の制限酵素部位を加えた形になるように