

平成13年度厚生科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

課題番号 H13-エイズ-002

HIV 及びその関連ウイルスの増殖機構及び増殖制御に関する研究

研究報告書

平成14年3月

主任研究者 佐藤 裕徳

(国立感染症研究所・遺伝子解析室・主任研究官)

HIV及びその関連ウイルスの増殖機構及び増殖制御に関する研究班

研究者名	分担	所属	役職
佐藤 裕徳	班長	国立感染症研究所・遺伝子解析室	主任研究官
原田 信志	班員	熊本大学医学部・感染防御学講座	教授
庄司 省三	班員	熊本大学薬学部・生化学	教授
服部 俊夫	班員	東北大学大学院・医学系研究科	教授
小島 朝人	班員	国立感染症研究所・感染病理部	室長
間 陽子	班員	理化学研究所・分子ウイルス学研究ユニット	ユニットリーダー
増田 貴夫	班員	東京医科歯科大学大学院・医歯学総合研究科免疫治療学	助教授
岡本 尚	班員	名古屋市立大学医学部分子医学研究所・分子遺伝	教授
高橋 秀宗	班員	国立感染症研究所・感染病理部	室長
増田 道明	班員	獨協医科大学・医学部	教授
足立 昭夫	班員	徳島大学医学部・ウイルス学教室	教授
仲宗根 正	班員	国立感染症研究所・エイズ研究センター	主任研究官
生田 和良	班員	大阪大学微生物病研究所・ウイルス免疫分野	教授
田代 啓	班員	京都大学・遺伝子実験施設	助教授
巽 正志	班員	国立感染症研究所・獣医科学部	主任研究官
横幕 能行	班員	国立感染症研究所・エイズ研究センター	研究官
松田 善衛	班員	国立感染症研究所・エイズ研究センター	室長
櫻木 淳一	研究協力者	大阪大学微生物病研究所・ウイルス感染分野	助手

目次

I. 総括研究報告書

1. 総括研究報告書（平成13年度） 1
主任研究者：佐藤 裕徳 （国立感染症研究所・遺伝子解析室・主任研究官）

II. 分担研究報告書

柱1 複製の分子素過程の研究

(i) 吸着・侵入

2. V3 中和抗体 0.5b の中和機序の解析 5
分担研究者：原田 信志 （熊本大学医学部・感染防御学講座・教授）
3. V3 ループペプチドによる gp120 の活性化と野生株（SDA1）の V3 ループ配列 11
分担研究者：服部 俊夫 （東北大学大学院・医学系研究科・教授）
4. HIV coreceptor を基礎にした吸着・侵入・増殖制御法の開発 21
分担研究者：庄司 省三 （熊本大学薬学部・生化学・教授）

(ii) 逆転写・核内輸送・組み込み

5. マクロファージにおける HIV の複製効率に関する研究 27
分担研究者：小島 朝人 （国立感染症研究所・感染病理部・室長）
6. HIV-1 Vpr 蛋白核移行の分子機構に関する研究 31
分担研究者：間 陽子（理化学研究所・分子ウイルス学研究ユニット・ユニットリーダー）
7. HIV-1 インテグラーゼの新規機能とその関連因子の探索 41
分担研究者：増田 貴夫 （東京医科歯科大学大学院・歯医学総合研究科免疫治療学・助教授）

(iii) 転写

8. IFN- γ による HIV-1 複製抑制効果と statin 化合物の作用 45
分担研究者：岡本 尚 （名古屋市立大学医学部分子医学研究所・分子遺伝・教授）

(iv) Env 糖タンパク質の成熟

9. SIV Env の成熟と機能発現における糖鎖の役割 53
分担研究者：佐藤 裕徳 （国立感染症研究所・遺伝子解析室・主任研究官）

(v) ウイルス構成成分の集合・出芽・粒子成熟

10. HIV-1 発芽機構に関与するウイルス及び宿主因子 61
分担研究者：高橋 秀宗 （国立感染症研究所・感染病理部・室長）

(vi) 調節遺伝子産物の構造と機能

11. HIV-1 Vpr による宿主細胞周期の攪乱に関与する宿主因子に関する研究 63
分担研究者：増田 道明 （獨協医科大学・医学部・教授）
12. HIV アクセサリー蛋白質の機能解析 65
分担研究者：足立 昭夫 （徳島大学医学部・ウイルス学教室・教授）

柱2 変異研究

13. 日本伝播 HIV-1 集団の遺伝子・分子生物学的解析及び分子力学的構造解析..... 75
分担研究者：仲宗根 正 (国立感染症研究所・エイズ研究センター・主任研究官)

柱3 細胞指向性研究

14. T細胞サブセットと HIV-1 トロピズム..... 81
分担研究者：生田 和良 (大阪大学微生物病研究所・ウイルス免疫分野・教授)
15. HIV-1 感染症における血中 SDF-1 濃度の診断的価値について..... 85
分担研究者：田代 啓 (京都大学・遺伝子実験施設・助教授)

柱4 新規方法論の開発

16. ヒト PBMC で増殖する CRF02_AG 組換え体の感染性分子クローンの分離とその構造..... 89
分担研究者：巽 正志 (国立感染症研究所・獣医科学部・主任研究官)
17. 臨床検体由来 Gag を発現する CTL アッセイ用標的細胞作成..... 95
分担研究者：横幕 能行 (国立感染症研究所・エイズ研究センター・研究官)
18. HIV 増殖に関与する宿主因子のプロテオーム解析..... 101
分担研究者：松田 善衛 (国立感染症研究所・エイズ研究センター・室長)

III. 研究協力者

19. HIV ゲノムの二量体化に関する研究..... 105
協力研究者：櫻木 淳一 (大阪大学微生物病研究所・ウイルス感染分野・助手)

IV. 業績一覧 (2001-2002) 111

I. 総括研究報告書

- 2) 変異研究 (2名): HIV の高変異性は、このウイルスの *in vivo* 増殖様式と生き残り戦略を特徴づける一方、抗 HIV 薬剤治療やワクチンの有効性確保にとって重大な障害となっている。この高変異性発現のしくみと制御の可能性について研究する。
- 3) 細胞指向性研究 (2名): HIV の細胞指向性の変化は感染者の病態進行と密接に関係する。細胞指向性の個体内変化に関与する可能性のある宿主因子を解析する。
- 4) 新規方法論の開発 (3名): 感染者や世界の HIV は多様で、特定の株で確立された増殖様式や制御法は、必ずしも他の株に当てはまらない。多様な *in vivo* HIV 準種を対象とし、その複製様式と宿主免疫応答をより効率的に解析する方法の開発を目指す。

目標: 各項目ごとに以下の目標達成を目指す。

- 1) 複製の分子素過程の研究: ①複製進行に必須の反応および細胞因子を新たに同定する(複数)。②構造解析研究分野との連携を強化する。③複製中間複合体(タンパク質-タンパク質あるいはタンパク質-核酸)の立体構造を決定する(1~2種)。
- 2) 変異研究: 逆転写酵素変異体の生化学的性質と立体構造を決定する。
- 3) 細胞指向性研究: SDF-1 および IL4 がウイルスの細胞指向性変化に果たす役割を明らかにする。
- 4) 新規方法論の開発: プロテオーム解析、新規 CTL assay 法、新規 HIV 分子クローニング法を確立し、複製研究と診断・治療研究に役立てる。

C. 研究結果

1) 複製の分子素過程の研究:

- i) 吸着・侵入: HIV-1 中和抗体 0.5 μ m の作用機序および感染効率の温度依存性を解析し、吸着・侵入の成立には gp120 とレセプターの多価結合と膜の流動性の保持が必要であることを示唆した(原田)。Gp120 および Gp41 の立体構造を認識する種々のモノクローナル抗体および V3 ペプチ

ドを用い、吸着・侵入時における Env 立体構造変化を解析中(服部)。CCR5 の第2細胞外ドメインの立体構造特異的単クローン抗体(KB8C12)を用い、同領域が R5 ウイルスの侵入に関与することを見出した(庄司)。

- ii) 逆転写・核内輸送・組み込み: Env V3 領域のアミノ酸変化を伴わないサイレント変異ウイルスを用い、V3 領域の RNA 塩基配列が逆転写効率を支配する cis 因子として働くことを見出した(小島)。Vpr の2つの α -helical domain が直接・間接に相互作用する分子群を同定し(importin α , β , nucleoporin 構成分子)、さらに核膜吸着と核内移行に果たす役割を明らかにした(間)。インテグラーゼ変異体解析により、同酵素の多機能性(脱殻、逆転写、核内輸送、組み込み)を示唆し、各機能ドメインをマップし、さらに C 末に結合する細胞因子(importin α , β , transportin)を同定した(増田貴)。
- iii) 転写: Tat の転写促進には cyclin T1 が必要であること、IFN による CIITA の発現誘導が Tat 機能を抑制することを見出した(岡本)。
- iv) Env 糖タンパク質の成熟: 一連の SIV Env 糖鎖欠損変異体を用い、糖鎖が Env 成熟と機能発現に果たす役割を解析中(佐藤)。
- v) ウイルス構成成分の集合・出芽・粒子成熟: HIV-1 の発芽粒子には、ゲノム RNA/Gag/nucleolin 複合体が取り込まれること、この複合体形成は、出芽を促進すること、を示唆した(高橋)。一本鎖ゲノムの2量体化反応がパッケージング反応の初期過程として分別可能であることを示唆した(櫻木)。
- vi) 調節遺伝子の構造と機能: 分裂酵母モデル系を用い、Vpr による G2/M arrest 誘導に関与する宿主因子(WEE1)を同定した(増田道)。HIV の5種類の調節遺伝子(Vif, Vpx, Vpr, Vpu, Nef)の網羅的な変異体解析により、各遺伝子産物の機能

子 (Vif, Vpx, Vpr, Vpu, Nef) の網羅的な変異体解析により、各遺伝子産物の機能ドメインをマップ中 (足立)。

2) 変異研究

HIV の変異研究に有用と考えられるユニークな逆転写酵素変異体を見出し、クローン化した (佐藤)。日本の HIV-1 サブタイプ B 感染者集団の V3 多様度を追跡し、10 年間を経ても V3 のヒト集団内多様度はほとんど変化していないことを示唆した (仲宗根)。

3) 細胞指向性研究

CD4⁺CD38⁺T 細胞は T-tropic HIV-1 に感受性が高く、この高感受性は IL-4 による複製昂進 (吸着・侵入以降の過程) が原因となっていることを示唆した (生田)。血中 SDF-1 濃度の変動が HIV 感染者の病態進行、随伴症候群の出現、HIV 細胞指向性変化と相関するか否かを検討中 (田代)。

4) 新規方法論の開発

感染者や世界に流行する多様な HIV 準種の迅速クローニング系の確立を目標とし、本年度は、西・中央アフリカで流行する HIV-1 CRF02_AG の感染性分子クローンを樹立した (巽)。感染者の多様な HIV 準種に対する CTL 活性の特異性の変化を迅速に検出する系の確立を目標とし、新規 CTL 活性評価系を開発中 (横幕)。HIV 複製に関与する多彩な細胞因子群の網羅的解析 (プロテオーム解析) を目標とし、Vif 変異体モデル系で検討中 (松田)。

D. 考察

HIV の増殖機構の理解と増殖制御のためには、複製の分子素過程を解明し、あわせて HIV の高変異性発現のしくみを理解しその制御法を開発することが必須である。これらの研究が推進することにより、抗 HIV 剤やワクチンを理論的にデザインし、またその有効性を確保することが可能となる。

本年度は、当研究班運営の初年度で発足後の実質的研究期間も短いことから、研究目標と戦略の明確化、人材や研究材料の確保、各分担研究課題の実現性の検討、などの研究基盤整備に重点を置いた。その結果、本研究班の目的を遂行するための基盤がおおむね整った。

本研究班の目的達成のために、今後、次ぎの 2

点を重点課題として挙げたい。第一に、各分担研究課題の効率的推進。第二に、その結果見い出されると期待される重要な生体高分子単体・複合体について、その立体構造を速やかに決定するシステムの構築。

第一の点については、基本的には個々の研究者の独創性を尊重し、個別に独自の方法論・工夫を用いて研究を進める。一方で、本研究班の統一性を保ち班員間の共同研究を促進するために、最低年 1 回の班会議を開いて経過を報告し、議論する機会を持つ。

第二の点については、構造解析を専門とする研究者あるいは研究施設との連携体制をつくることが必須である。主任研究者および関心のある分担研究者が中心となり、本研究班班員の同定した生体高分子の立体構造を、速やかに決定するための拠点をつくりたい。拠点施設としては、西播磨科学学園都市 (X 線結晶構造解析のための Spring-8 放射光施設を有する、理化学研究所、大阪大学蛋白質研究所などとの共同研究) を想定している。ただし、構造解析の共同研究者も価値を認める生体高分子の同定が先決であることは論を待たない。

E. 結論

研究目標と戦略の明確化、適切な人材配置により、HIV の複製・変異・細胞指向性研究の基盤がほぼ整った。今後は、各分担研究課題の推進と生体高分子の構造解析研究の基盤強化が必要である。

F. 研究発表

業績一覧参照。

II. 分担研究報告書

2. V3中和抗体0.5βの中和機序の解析

分担研究者 原田信志 (熊本大学医学部感染防御)

研究要旨 HIV-1のV3に対する中和抗体0.5βを使用し、中和反応の経時的測定を行った。片対数グラフでの感染価の直線的減衰から、数学的に、この0.5β抗体は1分子の附着で1ビリオンを中和することがわかった。VSV-Gを介した感染系でも0.5βは中和をしめす事から、この抗体はエンベロープ全体に作用し吸着後に作用すると思われた。また、0.5βは40℃吸着で促進される感染増強を抑制した。HIV-1の感染はエンベロープの流動性によりgp120とレセプターのmultiple-site bindingで感染が成立していること、0.5βはこの流動性を止め吸着後の感染阻止を行っていることが明かとなった。

A. 研究目的

T細胞指向性HIV-1(X4)のレセプターはCD4とCXCR4であり、マクロファージ指向性ウイルス(R5)はレセプターとしてCD4とCCR5を使用する。両指向性HIV-1(R5X4)はCXCR4とCCR5を共に利用し感染を成立させる。HIV-1エンベロープのgp120はこれらレセプターと結合・吸着するが、とくにgp120のV3部位はCXCR4やCCR5との関連が深いことが報告されている。V3をエピトープとする単クローン抗体0.5βは、従って、HIV-1を中和する能力があり、しかも細胞融合をも阻止する。

ウイルスの中和は理論的に；1)ウイルスを凝集させるため；2)ウイルスの細胞レセプターへの吸着を阻害するため；3)レセプター吸着後の何らかのステップを阻止するため、発揮されると考えられている。0.5β抗体はこれまで吸着阻害が主な中和機序と考えられてきたが、この抗体は他の中和抗体と相乗作用があることから、吸着阻止以外の作用があることが示唆されている。

本研究の目的はV3中和抗体である0.5βの作用機序を解明することである。もし吸着後の作用であれば、新たなワクチン戦略の切っ掛けとなる可能性があるし、またウイルスと細胞の新たな吸着後ステップの解明になると思われる。

B. 研究方法

1. 細胞とウイルス：ウイルスはpNL-luc DNAとエンベロープにNL43を(NL43-lucウイルス)、またNL43にVSV-Gを付加したpseudotyped virus (NL43-Gウイルス)を作製し使用した。またIAI株由来のクローンウイルスC-2、C-1-11-9とそれらの0.5β逃避ウイルスを用いた。MAGI細胞に感染さ

せ感染細胞を染めるMAGIアッセイ、GHOST細胞へ感染させルシフェラーゼ活性を測定する方法で、ウイルスの感染価を測定した。

2. ウイルスの定量：HIV-1のコア蛋白であるp24を測定したり、HIV-1DNAやRNAをPCRやRT-PCRで増幅した。

(倫理面への配慮はこの研究では必要ない。)

C. 研究結果

1. 中和抗体0.5βとHIV-1との関連を精査するため中和反応の経時的測定を行った。C-2、C-1-11-9とそれらの0.5β逃避ウイルスを0.5β抗体と37℃で反応させ、分単位でサンプリングし、残存感染性ウイルスをMAGIアッセイで測定した。片対数で V_t/V_0 (V_t はt時間後のウイルス量、 V_0 は反応前のウイルス量)をプロットすると直線となり、これは $V_t = V_0 e^{-Kct}$ つまり $\log_{10} V_t/V_0 = -0.43Kct$ (Kは常数、Cは抗体濃度、tは時間)に従った感染性ウイルスの減衰を示した(図1a,e,g)。また、この反応直線から、各抗体濃度の中和速度を算定すると図1b,f,hに示すように $(\log_{10} V_0/V_t)/t = 0.43Kc$ に従って直線になった。この両直線の成立はウイルスが上記の式に従って中和されていることを示し、1分子の0.5β抗体が1個のHIV-1ビリオンにくっ付き中和が成立することを示している。

0.5β逃避C-2ウイルス(図1c,d)では抗体がまったく作用(附着)していない。他のウイルスは1分子の抗体で中和されるが、図1b,f,hから算定されたK値(それぞれ0.116、0.058、0.012)は、それぞれのウイルスの抗原性の差を反映していた。

2. ウイルス吸着量と感染との関係を調べた。0.5 β でウイルスを処理しMT-4細胞へ吸着させp24量を測定すると、42%の吸着阻止が観察された。この細胞を2日間培養し感染細胞を蛍光抗体法で測定すると99%の抑制が見られた(図2a)。同様に吸着ウイルスはRT-PCRで検出されるが、2日後ウイルスDNAはほとんど検出されなかった(図2b)。0.5 β は、吸着阻止だけでなく吸着後に何らかの感染抑制作用をしていると思われた。

NL43-GウイルスとCD4陰性のN7HeLa細胞との感染系で0.5 β の中和作用を調べた。20 μ g/mlの0.5 β で約50%の中和が認められた。NL43-Gウイルスはphosphatidyl serineをレセプターとして感染が成立するので、この中和現象は吸着阻害以外の作用で起っていると考えられる。

3. ウイルスの吸着を4 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C、40 $^{\circ}$ Cで1時間行くと、温度に比例した感染増強が見られた。MAGIアッセイでは約4倍(図3a)、NL43-lucウイルスとGHOST細胞を用いた系では約8倍(図3b)の感染増強が認められた。また、吸着前1時間40 $^{\circ}$ C処理を行っても感染価に変化はなかったが、37 $^{\circ}$ Cで吸着後洗浄し40 $^{\circ}$ C処理すると、感染促進が認められた(図3)。40 $^{\circ}$ C1時間では細胞傷害が無い事、40 $^{\circ}$ Cで膜の物理的変化が起り感染が増強されたことが示唆された。

4. 約60%の中和を示す1 μ g/mlの0.5 β でウイルスを処理し感染に用いると、37 $^{\circ}$ Cと40 $^{\circ}$ Cの吸着では感染性に差が認められず、温度による感染増強は阻害された。また、ウイルス吸着前に抗 β_2 ミクログロブリン(anti- β_2 M)やanti-HLA-Iで細胞を処理するとやはり40 $^{\circ}$ Cによる感染増強は抑制された(表1)。抗体の結合は、ウイルスエンベロープや細胞膜どちらでも、温度による物理的変化を抑制したと思われた。

D. 考察

37 $^{\circ}$ Cにおける0.5 β による中和反応の経時的測定を行い数学的に解析すると(図1)、V3を標的とする中和抗体では1分子のウイルスへの附着で中和が成立することがわかった。勿論、高濃度の抗体が長時間存在すれば、一部、吸着阻止も起るが(図2a)、ほとんどは1分子の反応で吸着後の感染阻止であると思われる。このことは、V3抗体が他の抗体と相乗的中和反応を起こすことの説明にもなる。また、NL43-GウイルスとN7HeLa細胞の感染系でも0.5 β が、

比較的高濃度であるが、中和を示すことから、この抗体の反応機序は吸着阻害以外にあると思われる。

一部のHIV-1の感染では、レセプターの細胞表面での量が増えると感染性が増強する。また、我々が以前行った研究では、CD4とCXCR4とのcappingとcolocalizationを誘導させるとX4ウイルスの感染が促進される。これらの現象は、1個のウイルスgp120が1つのCD4に結合し感染が成立するという概念では説明困難である。つまり、複数のgp120と複数のレセプター群との結合が感染成立に必要なというmultiple-site bindingの仮説をたてる必要がある。multiple-site bindingの成立には細胞膜とエンベロープの流動性(粘性)が関与している。40 $^{\circ}$ Cでの感染増強(図3)は、高温で膜の粘度が低くなりレセプターやgp120が膜表面で流動し易くなったため、複数のリガンドとレセプターの結合がより多く形成されたためと考えられる。

0.5 β のウイルスへの結合は、エンベロープの粘性へ作用し、その流動性を止めると思われる。そのためmultiple-site bindingが阻止され、感染阻害という中和反応が起ってくると考えられる。同じ理由で、細胞膜への抗体の結合も、温度に依存した膜の流動性を阻害し、40 $^{\circ}$ CでのHIV-1感染増強だけを抑制したものとされた(表1)。

今後、抗体の膜流動性阻止の作用機序、中和抗体はウイルスに特異的であるべきかなど追究していく必要があると思われた。

E. 結論

HIV-1のV3抗体である0.5 β は、1分子のピリオンへの結合でウイルスを中和することができた。その作用機序はウイルス吸着後の感染阻止であり、おそらく抗体の結合により温度依存性であるエンベロープの流動性が阻止されたためと思われた。また、HIV-1はmultiple-site bindingで感染が成立することも示唆された。

F. 研究発表

[論文発表]

1. Tempaku, A., Maeda, Y., Song, W. and Harada, S.: Human T-cell leukemia virus type-I (HTLV-I) Tax is not the only one factor to enhance human immunodeficiency virus ty

- pe-1 (HIV-1) infection in culture-supernatants. *Virus Genes*, 23:77-80, 2001.
2. Habib, E.E., Yokomizo, K., Nagao, K., Harada, S., and Uyeda, M. : Antiviral activity of farnesyl transferase inhibitor FV-8 against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65:683-685, 2001.
 3. Song, W., Yahara, S., Maeda, Y., Yusa, K., Tanaka, Y. and Harada, S. : Enhanced infection of an X4 strain of HIV-1 due to capping and colocalization of CD4 and CXCR4 induced by capsianoside G, a diterpane glycoside. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 283:423-429, 2001.
 4. Foda, M., Harada, S. and Maeda, Y. : Role of V3 independent domains on a dualtropic human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) envelope gp120 in CCR5 coreceptor utilization and viral infectivity. *Microbiol. Immunol.*, 45:521-530, 2001.
 5. Yusa, K., Song, W., Bartelmann, M. and Harada, S. : Construction of HIV-1 library carrying a set of random combination of one to eleven amino acid substitutions in protease associated with protease inhibitor resistance. *J. Virol.*, in press, 2001.

amino acid substitutions in protease associated with drug resistance. 第15回日本エイズ学会総会、2001年11月、東京。

[学会発表]

1. 天白晶、遊佐敬介、原田信志 ; HIV-1の逆転写を抑制する細胞性因子の解析、第49回日本ウイルス学会総会、2001年11月、大阪。
2. 藤岡亜紀、遊佐敬介、前田洋助、原田信志 ; V3に多様な変異をもつ混合HIV-1の作製、第49回日本ウイルス学会総会、2001年11月、大阪。
3. 前田洋助、遊佐敬介、原田信志 ; 2種類のリポーター-HIVを使用したウイルス間相互作用の解析、第49回日本ウイルス学会総会、2001年11月、大阪。
4. Mohamed Foda、前田洋助、原田信志 ; Role of domains on HIV-1 envelope in binding to the DC-SIGN、第15回日本エイズ学会総会、2001年11月、東京。
5. Wei Song、Keisuke Yusa、Shinji Harada ; Construction of HIV-1 library carrying a set of random combination of zero to eleven

図1 中和反応の経時的測定。残存感染性ウイルスの定量はMAGIアッセイで行った。中和単クローン抗体0.5βを37℃で、C-2 (a & b)、0.5β逃避C-2 (c & d)、C-1-11-9 (e & f)、0.5β逃避C-1-11-9 (g & h) ウイルスと反応させた。

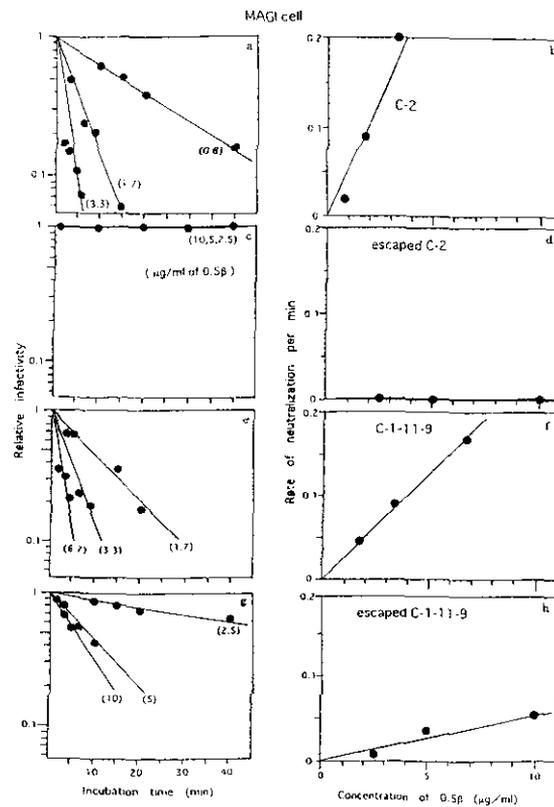


図2 C-2 ウイルスを0.5β抗体と反応させ、MT-4細胞に吸着させた。吸着ウイルス量はp24 (a) とRT-PCR (b) で測定した。2日間培養後、感染細胞数を蛍光抗体法 (a) とPCR (c) で調べた。

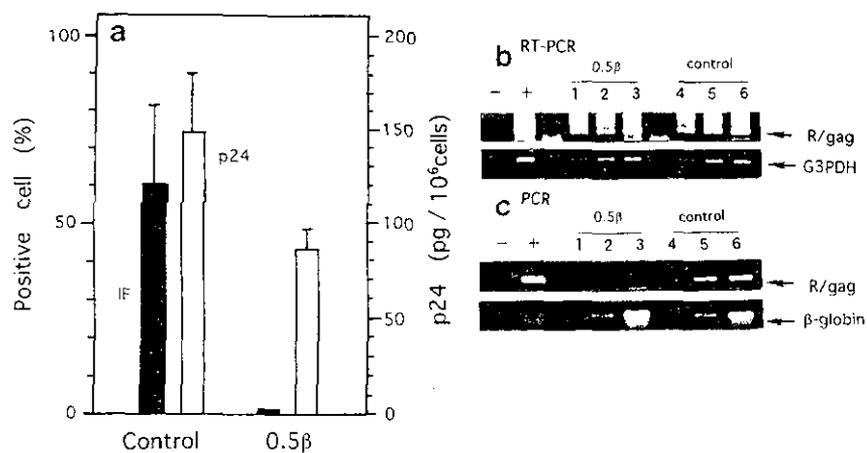
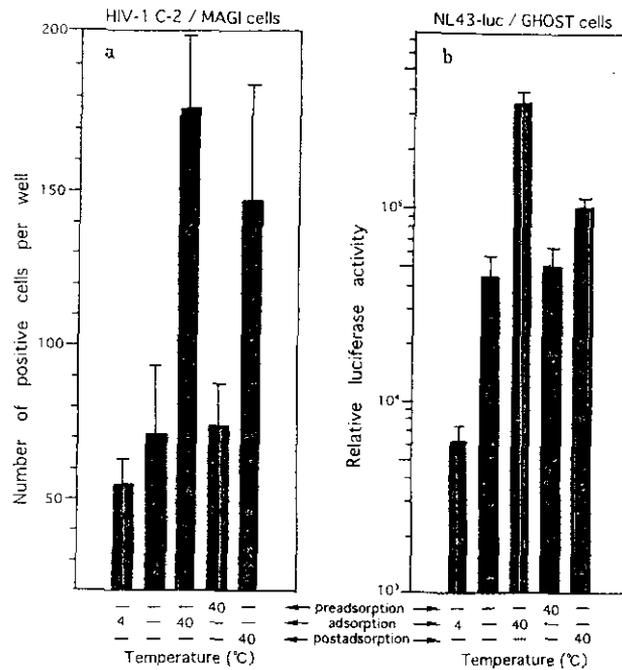


図3 ウイルス吸着時の温度（4℃、37℃、40℃）の感染性への影響。C-2 ウイルスを MAGI 細胞へ感染（a）、NL43-luc ウイルスを GHOST 細胞へ感染（b）させた系を使用した。温度の（—）は37℃である。



Exp.#	Treatment of cells with mAbs ¹	Incubation of virus with 0.5β mAb ¹	Number of HIV-1 positive cells after viral adsorption ¹ at	
			37°C	40°C
Exp. A anti-β₂M mAb				
1	-	-	157.0 ± 23.9	263.3 ± 53.5
2	-	+	56.2 ± 7.0	55.3 ± 10.9
3	+	-	164.2 ± 31.2	137.8 ± 27.3
4	+	+	50.3 ± 7.5	45.8 ± 6.7
Exp. B anti-HLA-I mAb				
1	-	-	154.2 ± 17.0	241.4 ± 18.2
2	-	+	71.5 ± 12.2	61.8 ± 8.7
3	+	-	162.2 ± 11.4	142.2 ± 18.2
4	+	+	71.3 ± 17.8	51.5 ± 12.6

¹MAGI cells (0.5ml per well) were seeded at the concentration of 8×10^4 per ml in 24 flat well plate, and cultured overnight. The cells were treated with 10μg/ml of anti-β₂M (or anti-HLA-I) mAb (+) or MOPC21 (-) for 1hr at 37°C.

²HIV-1 C-2 was incubated with 1μg/ml of 0.5β mAb (+) or MOPC21 (-) for 1hr at 37°C.

³After incubation, 200μl of treated viruses were seeded into each well of the treated cells. Viral adsorption was carried out at 37°C or 40°C for 1hr and the unattached viruses were removed by washing. Then, the cells were cultured for 2 days. HIV-1 positive cells were stained and counted by MAGI assay. All experiments were made in quadruplicate and numbers of positive cells per well are expressed as mean ± standard deviation.

3. V3 ループペプチドによる gp120 の活性化と野生株(SDA1)の V3 ループ配列

分担研究者 東北大学院感染病態学分野 服部俊夫

共同研究者 東北大学院感染病態学分野 凌虹、宇佐美修

研究要旨

V3 ループ由来のペプチドが H9/IIIB 感染細胞膜表面の CD4 inducing epitope に対するモノクローナル抗体(17b)と V2 に対する抗体(830A)の反応性を増強させることより、V3-V1/V2 の均衡の乱れが、ケモカイン受容体の結合領域(17bi)の発現を誘導することが推測された。また V2 を認識するモノクローナル抗体 830A の機能的重要性が示唆された。感染促進作用は感染機構のみではなく、HIV ベクターの開発にも有意義である。仙台在住のエイズ患者由来の野生株がタイプBであることも合わせて明らかにした。

A. 研究目的

HIV の感染機構の解明は感染予防のみならず、HIV ベクターの開発にも有用である。細胞への侵入機構を主にウイルスペプチドを用いて明らかにしてきた。最も強いウイルス感染阻止作用を持つのは gp41 の C 端に存在するペプチドである。このペプチドは、gp41 の構造変化を阻止することが明らかになっている。その構造変化を生ぜしめる機構は未だ不明な点が多いが、gp120 が CD4 分子とケモカイン受容体に結合した後に gp41 の活性化が生ずることと思われる。その Gp120 の活性化様式を解析することにより、HIV 感染機構をさらに明らかにし、抗ウイルス剤を発見することも可能と思われる。我々が報告してきた如く、V3 ループ由来のペプチドが当該ウイルスの感染を促進することができる。X4 ウイルスを用いた解析では、その促進機構として、CD4 やコレセプターの発現は増加させないが、ペプチドがそれ自身の細胞表面への結合を増加させることによる

ことが明らかになっている。しかし R5 では V3 ペプチドも細胞膜表面に結合しないことが同時に明らかになった。それらのことから、我々は今回 V3 ループペプチドの感染細胞膜表面に及ぼす影響を観察した。また臨床研究も開始し、仙台で感染したと思われる、カリニ肺炎を発症したエイズ患者よりウイルスを分離し、その V3 配列も解析した。

B. 研究方法

合成ペプチドの作製

3種類のウイルス (BH10, 89.6, ADA) 由来のループ化ペプチドを作成した。非ループ化ペプチドとしてシステイン残基をアラニンに置換した BH10/CA も用いた。

モノクローナル抗体

ヒトモノクローナル抗 V3 ループ抗体 (447.52 D)、抗 V2 ループ抗体 (830A, 2158, 1357)、抗 CD4 binding site(CD4BS)抗体(IgGb12 と F105)、抗 coreceptor binding site(CD4i)抗体(17b)

を使用した。またコントロールとして抗 CXCR4 抗体 (12G5) を用いた。

中和活性

感染の評価は Luciferase を組み込んだ Pseudotype を CD4 と CoR を発現させた U87 に感染させることにより行った。

Facs 解析

V3 ループペプチドで処理した H9/IIIB 細胞表面の gp120 を CD4BS, CD4i および V2 ループに対する抗体を用いてフローサイトメトリーで解析した。H9/IIIB を 0.1% BSA、0.01% sodium azide、25 mM HEPES を含んだ RPMI (incubation solution; IS) 中で、異なる濃度の V3 ペプチドで一時間 37°C インキュベートした。washing solution (WS, 0.1% BSA, 0.01% sodium azide を含んだ PBS) で二回洗浄したのち、細胞は十分量の抗体を含んだ IS に懸濁され、30 分 4°C でインキュベートした。続いて、WS で細胞を洗浄し、FITC-conjugated Goat F(ab)₂ anti-mouse もしくは anti-human 抗体を用いて 30 分 4°C 染色した。細胞は 1% formaldehyde (fixing solution) で懸濁し、フローサイトメーター (FACScan, Becton Dickinson, San Jose, CA) で解析された。V3 ペプチド無しで抗体を染色に用いたものをコントロールとした。最大量のペプチドの存在下で isotype 抗体を用いた場合をバックグラウンドとした。

野生株の分離

症例：53 才男性 (タクシー運転手) 感染経路：不明 (海外渡航歴なし)

経過：平成 12 年 8 月頃から倦怠感を訴え

近医受診、アレルギー性肺カンジダ症としてステロイド投与される。その後、肺病変の悪化を認め 9 月 18 日当院紹介入院、カリニ肺炎と診断される。HIV RNA 量 $2.2 \times 10^4 / \text{mm}^3$ copies、CD4 数 $1 \text{ cell} / \text{mm}^3$ 。ST 合剤・ペントミジン投与及び HAART を行いウイルス量の著減を認めるが、CD4 数の上昇や血液ガスの改善を認めず、10 月 20 日永眠される。

ウイルス分離：患者由来末梢血リンパ球を正常 PHA-blast と混合培養上清の p24 抗原を測定した。

配列解析法：培養細胞から、BIORAD 社 Insta gene matrix により DNA 抽出を行い、得られた DNA を template とし、nested PCR により得られた PCR 産物を電気泳動で確認後、精製、これを再度 PCR (sequencing PCR) し遺伝子配列を決定した。

C. 研究結果

使用したペプチドは図 1 の通りである。山田班の研究においてこれらの V3 ループペプチドが該当ウイルスの感染を促進することを明らかにしている。

1. 抗 CD4i と抗 CD4BS の中和活性 (図 2) 全ての抗体が HXB2-Luc の U87/CD4/CXCR4 への感染を用量依存的に抑制し、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ で 100% の抑制効果を示した。IgG1b12 (抗 CD4BS) の中和活性は強く、続いて 17b (抗 CD4i), 447.52D (抗 V3), F105 (CD4BS) の順であった。

2. V3 ループペプチドが抗 CD4 BS 抗体

と抗 CD4i 抗体に及ぼす影響

V3 ループペプチドの感染促進作用が、外被糖蛋白の活性化により説明されるか否かを調べるため、抗 CD4 BS 抗体(F105 and IgG1b12)と抗 CD4i 抗体(17b)を使った FACS 解析を行った。F105 と IgG1b12 の gp120 への結合は全く影響されなかったが、V3-BH10 処理によって 17b エピトープの発現は明らかに増加した。逆に、V3-ADA と V3-89.6 処理では同様の結果は得られなかった。(図3)

3. V2 と V3 ループの相互作用

17b エピトープはケモカイン結合部位、即ち CD4 誘導エピトープとしても知られている。この部位は主に V1/V2 と V3 ループなどの変異性の高いループで覆われていると考えられている。覆った V3 ループペプチドと V1/V2 ループはウイルス表面でかなりの直接的な結合は関係していると考えられている。この可能性を調べるため、抗 V2 ループ抗体の 830A と 2158 と 1357 を用いて FACS 解析が行われた。830A の gp120 への結合は、V3-BH10/CA だけでなく V3-BH10 でも明らかに増加した。しかし、他の抗体は増加しなかった。V3-ADA と V3-89.6 は結合に影響しなかった。(図4) 830A と他の抗 V2 モノクロナル抗体において、H9/III B への結合様式を検討すると、830A の結合が他の抗体に比べて高く、エピトープが異なっている可能性が示唆された。(図5)

4. AIDS 患者の HIV 分離株 (SDA 1) 14 日目の培養上清から ELISA 法により p24 を 15ng/ml 検出した。

分離株 V3 配列解析の結果は図6の通りであった。

D. 考察

V3 ループの感染促進機構の解析を進める過程で、V3 ループの添加により、感染細胞膜上の gp120 の立体構造が変化し、CD4i(17b エピトープ)の発現が、用量依存的に誘導されることが明らかになった。一方で CD4 結合部位 (CD4BS, ib12, F105 エピトープ) については変化がみられなかった。非刺激前の gp120 では V3 ループは V1/V2 と何らかの機構で物理的に CD4i の露出を抑制していることが考えられている。V3 ループの添加により CD4i が出現した機構としては、その物理的な会合を解離に導いたためと思われる。そのような状況において、V3 ループペプチドを添加することにより、V2 を認識する異なる 3 種類の抗体のうち 1 種類 (830A) の抗体の発現強度が増した。また 830A の結合は他の抗体に比べて高く、そのエピトープ解析は未だ発表されていないが、以上の実験は 830A は異なるエピトープを認識していることを示唆している。

野生株などでは V1/V2 ループは、gp120 上の CD4 binding site と CD4-induced site の中和エピトープを覆ってしまうと考えられている。(図7) さらに、V1/V2 は V3 と共に中和抵抗性とケモカインレセプターへの作用を決定していると考えられた。これらの結果は V1/V2 が V3 と機能的に相互作用しているか、近接していることを示す。しかしながら、V1/V2 と V3

が直接物理的に相互作用しているかどうかは不明である。というのも、gp120 コアの結晶構造は V region を除いているからである。我々の知見は、V1/V2 と V3 ループの相互作用が均衡を保てなくなることによりコレセプター結合部位が出現し、HIV 感染を促進すること示唆している。この感染促進作用は現在ではなお効率の悪いマクロファージ系の細胞への遺伝子導入の一助になるかもしれない。故にここに用いた株化T細胞での X4 ウイルス(IIIB)を用いた所見を野生株やR 5 ウイルスを用いて一般化する必要がある。そのような特性化のために、当科入院患者からウイルス(SDA1)を分離した。系統樹解析からタイプBに由来するウイルスであることは判明したが、V 3 領域のアミノ酸のチャージは余り高くないが、補受容体の特異性を決定し、多角的な感染機構を解析するための特性化を急ぐと同時に、感染者数の多い中国の野生株の解析も必要と思われる。

E. 論文発表 原著

1. Iwatani Y, Ueno T, Nishimura A, Zhang X, Hattori T, Ishimoto A, Ito M, Sakai H.:
Modification of virus infectivity by cytoplasmic tail of HIV-1 TM protein. *Virus Research* 74:75-87, 2001
2. Shirota H, Sano K, Hirasawa N, Terui T, Ohuchi K, Hattori T, Shirato K, and Tamura G.:
Novel Roles of CpG Oligodeoxynucleotides as a Leader for the Sampling and Presentation of CpG-Tagged Ag by Dendritic Cells. *J*

Immunol 167:66-74, 2001

3. Tamamura H, Omagari A, Hiramatsu K, Gotoh K, Kanamoto T, Xu Y, Kodama E, Matsuoka M, Hattori T, Yamamoto N, Nakashima H, Otaka A, Fujii N.:
Development of specific CXCR4 inhibitors possessing high selectivity indexes as well as complete stability in serum based on an anti-HIV peptide T140. *Bioorg Med Chem Lett* 11:1897-902, 2001

4. Ling H, Zhang X, Lui Y, Hattori T.:
Enhancements of HIV infection by their own V3 loop peptides. *J. Human Virol.* 4:131, 2001

5. 芦野純子、大野勲、岡田信司、西巻雄司、齋藤芳彦、遠藤希之、賀来満夫、笹野公伸、服部俊夫：結核菌培養検査で陽性となるまでに時間を要した全身播種結核患者の一例 結核 印刷中

5. Okada S, Kikuchi M, Hasegawa H, Ishikawa M, Ohno I, Kaku M, and Hattori T Delayed recovery of effector memory CD4+ T cells by highly active antiretroviral therapy in a patient with HIV-1 infection. *Tohoku J Exp Med* in press

総説

1. 服部俊夫、凌虹、劉一
CD4 分子とケモカインレセプターの役割
カレントセラピー Vol.19 No.2:16-18, 2001

2. 岡田信司、服部俊夫、菊池美和子、
賀来満夫、石川正明、長谷川均
HIV 患者における HAART 治療後の
effector memory T cells の変化
エイズ/HIV 感染症臨床カンファランス
23-25,2001

3. 宇佐美修、岡田信司、服部俊夫
HIV と免疫不全 HIV による CD4 陽性
T細胞の障害と回復
Mebio Vol.18 No.11:11-15,2001

4. 芦野純子、吉川健二郎、服部俊夫
サリドマイド
血液・免疫・腫瘍 Vol.6 No.4:93-97,2001

5. 宇佐美修、吉川健二郎、服部俊夫
ウイルス性肺炎：HTLV-1 と HIV を中心
に
日本胸部臨床 60 巻 11 号増刊 S24-
27,2001

6. 西巻雄司、小荒井晃、服部俊夫
感染症内科の問診のポイント 研修医ノー
ト 331-333 永井良三編、診断と治療社、
2001

7. 服部俊夫
HIV の侵入を阻止する膜貫通蛋白由来^α
プ^β (T20 或いは DP178)
エイズ UPDATE ジャパン Vol.3 No.1:17-
18,2001

F. 学会発表
国内学会

1. 劉一、服部俊夫：抗 HIV gp41 モノ
クロナル抗体の X4, R5 ウィルスに対す
る中和活性 第 75 回日本感染症学会
総会、奈良、2001 年 3 月 29-30 日

2. 芦野純子、大野勲、岡田信司、服部俊
夫：消化器癌術後に発症した肺結核患者に
おける抗 TBGL 抗体の検討 第 98 回日
本内科学会総会、横浜、2001 年 4 月 12-
14 日

3. 服部俊夫、石川正明、長谷川均：HIV
感染者のメモリー T 細胞の HAART 治療
後の回復 第 63 回日本血液学会総会、
名古屋、2001 年 4 月 19-21 日

4. 凌虹、宇佐美修、服部俊夫：V3 ルー
プ ペプチドによる当該 envelope 蛋白の
活性化 第 15 回日本エイズ学会総会、
東京、2001 年 11 月 29-12 月 1 日

5. 宇佐美修、凌虹、服部俊夫：gp41 の
細胞外ドメインの C ペプチドは、HIV-1
感染細胞の細胞表面で sCD4 による gp41
の立体構造の変化を阻害する 第 15 回
日本エイズ学会総会、東京、2001 年 11
月 29-12 月 1 日

国際学会

1. Ling H, Liu I, Hattori T.: Enhancements of
HIV infection by V3 loop peptides.
第 13 回日米エイズ部会合同会議、熊本、
2001 年 3 月 21-13 日

2. Liu Y, Ling H, and Hattori T.: Inhibition of sCD4-Induced Conformational Changes of gp41 Ectodomain by C Peptide. AIDS VACCINE 2001, Philadelphia, Sept. 5-8,2001

3. Ling H, Zhang X, Liu Y, and Hattori T.:Enhancements of HIV Infection by Their Own V3 Loop Peptides. International Meeting of the Journal of Human Virology, Baltimore, Sept. 9-13, 2001