

Figure 2. 行動薬理的にADC様症状を示したマウスに対するペントキシフィリン投与の効果
*p<0.05, vs Control #p<0.01, vs D.W.

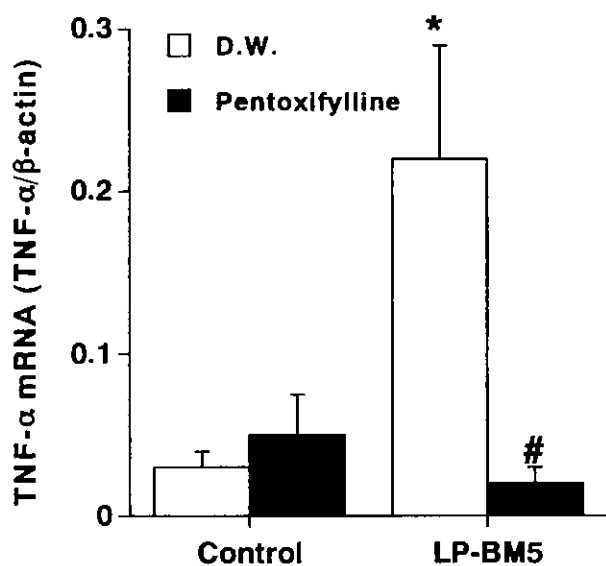


Figure 1. 脳内TNF-α mRNA発現量に対する薬剤投与の効果について
*p<0.05, vs Control #p<0.01, vs D.W.

次に、ADCメカニズムの解析に有用と考えられるTNF-α欠損骨髄キメラマウスを作成した。その結果、図3に示すとおり骨髄移植によりPCRレベルでほとんどの骨髄細胞が置換されていた。また、末梢血の赤血球数、白血球数、血小板数にはBMTしたドナー細胞による差は全く認められなかった。

さらにLPSをi.p.投与した後にWTマウスにWTの骨髄を移植したマウス(wild/wild)で見られるマウス血中TNF-αのピークはWTマウスにTNF-α欠損骨髄を移植したマウス(wild/TNF)において完全に消失していた。しかし、血中インターフェロンγなどTNF-α以外の他のサイトカイン産生プロファイルを調べた結果、wild/TNFマウスと wild/wildマウスで差は認められなかった。

D. 考察

LP-BM5ウイルス感染10週後より連続1週間プロペントフィリンあるいはペントキシフィリン投与によって、末梢のTNF-α産生の阻害が認められたが、進行した末梢における免疫不全のレベルには影響が見られなかった。さらに、脳においてTNF-αの産生の阻害が認められたペントキシフィリン投与群ではLP-BM5ウイルス感染により発

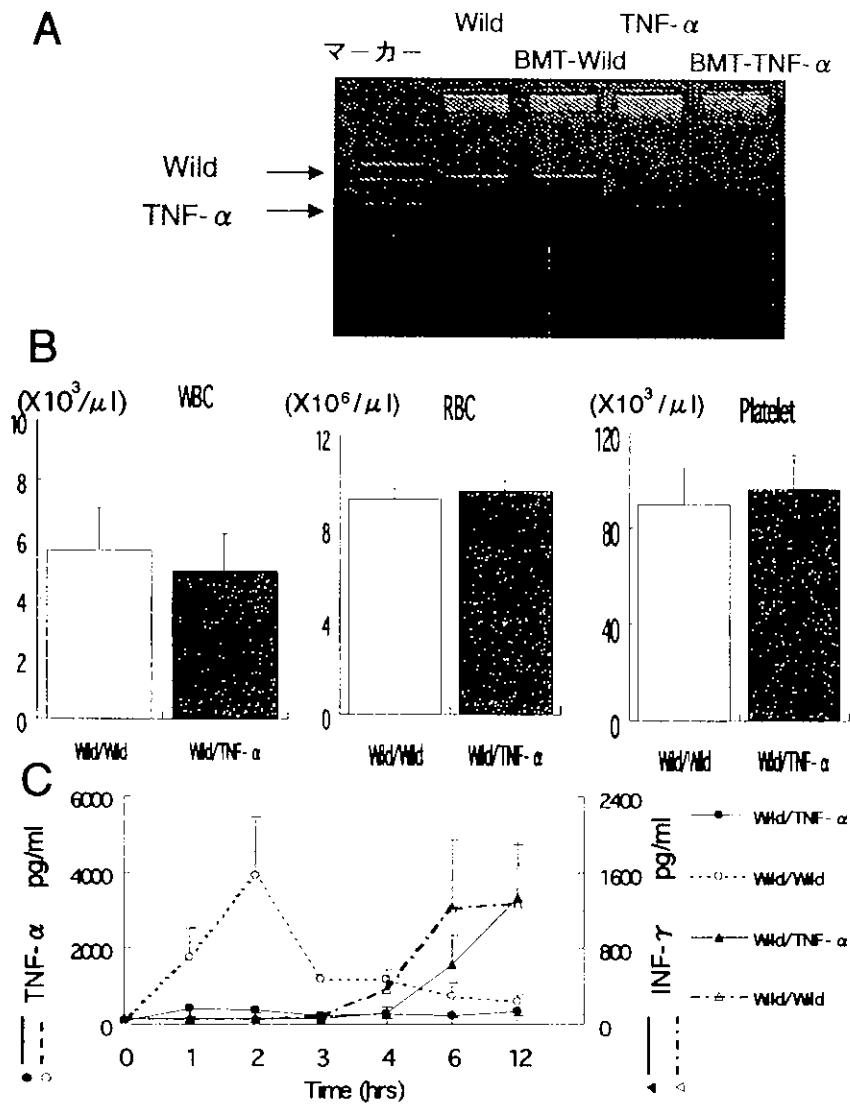


Figure 3. TNF- α 欠損骨髄キメラマウスの作成に関する基礎データ
 (A) BMT後のPCRによる骨髄細胞の置換に関する検討
 (B) BMT後のドナー細胞の差による抹消血の変化
 (C) LPS投与後のサイトカインの変動に関するプロファイル

症する学習機能の低下の改善が認められた。これらの結果は、LP-BM5感染により発症する免疫不全の程度が、少なくとも感染後10週の時点ではTNF- α の有無に影響されなかった分担研究者らのノックアウトマウスを用いた結果と一致していた。今後薬剤により脳のTNF- α をより安全に阻害する方法を確立することによりADCの発症は充分抑制できることが示唆された。さらに、痴呆の発症に深く関与していることが考えられるTNF- α のウイルス感染後の脳内における由来について明らかにするため、TNF- α

欠損骨髄キメラマウスを作成した。その結果図3に示すとおり、骨髄由来のTNF- α のみを特異的に欠損させた動物が作成できた。この動物を使用することにより、ウイルス感染により活性化された脳内グリア系細胞とモノサイトをはじめとした骨髄由来浸潤細胞のいずれが産生するTNF- α が痴呆の発症に深く関係しているかを今後明らかにできるものと期待される。この手法はADC発症のメカニズムを解明ばかりか、その他の多くの脳神経系疾患に応用できると考えている。

E. 結論

ADC治療薬として検討した2種類のTNF- α を阻害する薬剤のうち、特に脳のTNF- α を阻害したペントキシフィリンは、行動薬理学的検索でもADC改善作用が認められた。今回の結果と研究分担者らが先に行ったTNF- α 遺伝子欠損マウスによる研究を総合的に解釈すると、薬剤によって脳のTNF- α を抑制することによりADCの発症を抑制できる可能性を示唆していた。また、ADC発症のメカニズムを解析するために作成したTNF- α 欠損骨髄キメラマウスは、今後ウイルス感染により活性化された脳内グリア系細胞とモノサイトをはじめとした骨髄由来浸潤細胞のいずれの細胞が産生するTNF- α が痴呆の発症に深く関係しているかを明らかにするための有用な実験動物であることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) plays a protective role in acute viral myocarditis in mice: A study using mice lacking TNF- α

Wada H, Saito K, Kanda T, Kobayashi I, Fujii H, Fujigaki S, Maekawa N, Takatsu H, Fujiwara H, Sekikawa K, Seishima M. *Circulation*, 103 (5):626-629, 2001

2. 3-Hydroxyanthranilic acid, an L-tryptophan metabolite, induces apoptosis in monocyte-derived cell stimulated by interferon- γ

Morita T, Saito K, Takemura M, Maekawa N, Fujigaki S, Fujii H, Wada H, Takeuchi S, Noma A, Seishima M. *Annals of Clinical Biochemistry*, 38 : 242-251, 2001.

3. Lipopolysaccharide induction of indoleamine 2,3-dioxygenase is mediated dominantly by an IFN- γ -independent mechanism

Fujigaki S, Saito K, Sekikawa K, Tone S, Takikawa O, Fujii H, Wada H, Noma A, Seishima M.

Eur J Immunol, 31: 2313-2318, 2001

4. L-Tryptophan-kynurenine Pathway Metabolism Accelerated by Toxoplasma gondii Infection Is Abolished in Interferon- γ Gene-Deficient Mice: Crossregulation between iNOS and indoleamine-2, 3-dioxygenase

Fujigaki S, Saito K, Takemura M, Maekawa N, Yamada Y, Wada H, Seishima M.

Infect. Immun. 70: 779-786, 2002

5. Immunohistochemical localization and mRNA expression of apolipoprotein A-I in rat spinal cord.

Fujii H, Saito K, Takami T, Hamakawa H, Maekawa N, Fujigaki S, Wada H, Noma A, Seishima M.

J. Arterioscler Thromb (in press)

6. Improved myocardial ischemia/reperfusion injury in mice lacking tumor necrosis factor- α

Maekawa N, Wada H, Kanda T, Niwa T, Yamada Y, Saito K, Fujiwara H, Sekikawa K, Seishima M

J Am Coll Cardiol. (In Press)

2. 学会発表

1. 炎症性サイトカインとトリプトファン代謝：生体防御と破壊の観点から（学術賞受賞講演）

斎藤邦明

第41回日本臨床化学学会総会，横浜，2001. 8. 26

2. Proinflammatory cytokines and AIDS dementia complex

Saito K

日本学術振興会日韓共同研究事業講演会，Kangwon National University, 韓国，2001. 12. 19

3. タンパク質・アミノ酸栄養の新しい展開（シンポジウム）L-Tryptophan-kynurenine代謝産物の生理作用

斎藤邦明

アミノ酸シンポジウム，長浜，2001. 8. 7

4. Role of neurotrophins and cytokines in regulation of brain function: AIDS dementia complex and proinflammatory cytokines（シンポジウム）

Saito K

Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacologicum (CINP),

Hiroshima, 2001. 10. 5

5. TNF- α ノックアウトマウス (TNF- α KO) における心筋虚血再灌流傷害減少のメカニズム

前川尚也, 和田久泰, 丹羽民和, 斎藤邦明, 清島 満, 鷹津久登, 藤原久義.

第65回日本循環器学会総会，京都市，2001. 3. 25

6. 慢性関節リウマチ患者膝関節液におけるTNF α とsolubleTNF receptor (p55,p75)の検討
佐藤正夫, 竹村正男, 齊藤邦明, 小石浩久, 四戸隆基, 清島 満.
第45回日本リウマチ総会, 東京, 2001. 5. 14-16
7. TNF- α の粥状硬化形成に与える影響について
桐井宏和, 藤井秀比古, 丹羽民和, 和田久泰, 齊藤邦明, 清島 満.
第33回日本動脈硬化学会総会, 東京, 2001. 6. 7-8
8. 心筋虚血におけるTNF- α の関与
前川尚也, 和田久泰, 岩本直樹, 丹羽民和, 太田浩敏, 田代俊文, 山田泰弘, 齊藤邦明, 清島 満.
第66回日本インターフェロン・サイトカイン学会, 神戸市, 2001. 7. 14
9. キノリン酸高感度簡易定量法の開発
藤垣朱和子, 齊藤邦明, 児玉 章, 竹村正男, 前田悟司, 山田泰弘, 和田久泰, 清島 満.
第48回日本臨床検査医学会総会・第41回日本臨床化学会年会連合大会, 横浜市, 2001. 8. 26-28
10. 骨髄移植によるTNF α 遺伝子欠損キメラマウスの作製
大橋葉津希, 齊藤邦明, 前川尚也, 丹羽民和, 竹村正男, 和田久泰, 山田泰弘, 清島 満.
第48回日本臨床検査医学会総会・第41回日本臨床化学会年会連合大会, 横浜市, 2001. 8. 26-28
11. IL-18の分泌におけるTNF α の関与について
-TNF α , IFN γ 遺伝子欠損マウスを用いての検討-
竹村正男, 齊藤邦明, 浜川英嗣, 藤垣朱和子, 前川尚也, 秋山眞澄, 関川賢二, 清島 満.
第48回日本臨床検査医学会総会・第41回日本臨床化学会年会連合大会, 横浜市, 2001. 8. 26-28
12. AIDS痴呆におけるTNF α の役割-マウスモデルによる行動薬理的解析-
秋山眞澄, 齊藤邦明, 飯田竜一, 藤垣朱和子, 前川尚也, 竹村正男, 山田泰弘, 和田久泰, 山田清文, 鍋島俊隆, 清島 満.
第48回日本臨床検査医学会総会・第41回日本臨床化学会年会連合大会, 横浜市, 2001. 8. 26-28
13. メタンフェタミン神経毒性における腫瘍壊死因子の役割
中島 晶, 山田清文, トランマンハン, 齊藤邦明, 清島 満, 鍋島俊隆.
第31回日本神経精神薬理学会, 広島, 2001. 10. 4
14. Toxoplasma gondii 感染時における生体防御メカニズムについて
藤垣朱和子, 齊藤邦明, 竹村正男, 前川尚也, 浜川英嗣, 和田久泰, 山田泰弘, 清島 満.
日本トリプトファン研究会第24回学術集会, 千葉, 2001. 12. 7-8
15. キノリン酸高感度簡易定量法の開発
浜川英嗣, 齊藤邦明, 藤垣朱和子, 高橋香奈子, 竹村正男, 前田悟司, 山田泰弘, 和田久泰, 清島 満.
日本トリプトファン研究会第24回学術集会, 千葉, 2001. 12. 7-8
16. Essential role of TNF- α in the induction of HBV specific CTL
Kasahara S, Ando K, Saito K, Sekikawa K, Seishima M, Moriwaki H.
第31回日本免疫学会総会, 大阪, 2001. 12. 11

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 脳症の神経障害の臨床・病態に関する研究：

「HIV 脳症の臨床・免疫病理学的検討」

分担研究者 岸田修二 東京都立駒込病院神経内科医長

研究要旨

HIV 脳症は HIV-1 の中枢神経感染が基となり、マクロファージ/ミクログリアの活性化から放出されるサイトカインや、その他神経毒などの作用により神経細胞およびアストロサイトの機能障害が生じるためと考えられている。抗ウイルス療法の進歩は一見 HIV 脳症の発生を制御できるかのようにみえているが、脳内で潜伏感染にある HIV を根本的に排除できないことや感染早期から脳症病変が進行しているという病理学的観察などから、現在の HIV 療法の効果の持続に関して疑問視されている。この研究では臨床的 HIV 脳症の重症度で中枢神経内のウイルスの負荷量がどの程度関わっているかを臨床・免疫組織学的に再検討した。その結果、臨床的 HIV 脳症の重症度に応じて HIV 感染細胞数は増加し、基底核>髄質>皮質へと感染分布が拡大していた。活性化マクロファージ/ミクログリア細胞は HIV 感染細胞数以上に極めて多く広範に発現していた。すなわち臨床的 HIV 脳症の基礎は HIV 脳炎であるが、マクロファージ/ミクログリアの活性化が関与した病態が大きく関わっていることをあらためて示唆する一方、病巣の拡大と脳症の臨床症状が関連あることを示した。

A. 研究目的

全身的ウイルス複製の制御の改善により臨床的 HIV (Human immunodeficiency virus) 脳症の発症頻度が減少してきたとの報告が多いにもかかわらず、この効果が長期間続くのかどうか、あるいは単に発症が遅くなってきたのかは明らかではない。なぜなら CD4 陽性リンパ球数の減少を伴わずに HIV 脳症を発症する症例や軽症例の頻度が増加しているとの報告や、病理学的には増加の傾向すら示されている。HIV は感染後まもなく中枢神経系に感染する事実や、多くの抗 HIV 薬が血液脳関門の透過性が悪く、さらに薬剤耐性ウイルスが中枢神経内でも独自に生じる可能性があるため、中枢神経内の HIV を抑制できない可能性がある。従って HIV 感染患者が長期

間生存すると HIV 脳症患者が増加する懸念が残存するため、HIV 脳症の病態解明と治療方針を模索することは重要なことである。

HIV 脳症はマクロファージ/ミクログリア細胞への感染と複製が基となり、マクロファージ/ミクログリアの活性化とそれに続く神経毒の放出が主なメカニズムと考えられている。臨床的 HIV 脳症の重症度と髄液内の HIV (human immunodeficiency virus) ウイルス負荷量が相関するとの報告があるが、中枢神経内のウイルスの負荷量との関係はまだ十分解明されていない。今回 HIV 脳症の臨床的指標と免疫病理学的所見とからこの相関を明らかにすることを目的とした。

B.方法・材料

HIV 脳症と臨床的に診断された8例とサイトメガロウイルス脳炎と診断された2例につき臨床的指標（痴呆重症度、髄液中ウイルス量ないし p24 抗原、髄液 β 2 ミクログロブリン）と免疫病理組織学的所見（組織学的 HIV 感染細胞数、活性化ミクログリア/マクロファージ細胞数量）を対比した。痴呆重症度は Sidtis らの HIV 痴呆の重症度分類を用い、組織学的 HIV 感染細胞、および活性化ミクログリア/マクロファージ細胞検査として、p24 抗体（Kal-1、DAKO）、抗 HLA-DR 抗体（TAL.1B5, DAKO）を用い、前頭葉、基底核の2カ所を免疫病理学的に検討した。染色細胞の多寡は100倍の検鏡で、各視野に時々陽性細胞がある場合を+、各視野で見られる場合を2+、目立って見られる場合を3+、かなり多数の場合を4+と独断的に評価した。

C.結果

HIV 脳症の重症度、髄液中のウイルス量ないし p24 抗原の出現、 β 2 ミクログロブリン量、ならびに神経病理学的診断と免疫組織学的な HIV 陽性細胞密度、活性化マクロファージ/ミクログリア細胞密度とその分布を表1、2および代表的免疫組織像を図1に示した。

1. 高度な HIV 脳症の基礎病変は HIV 脳炎であった。

2. HIV 脳炎の存在は、髄液中に HIV-p24 抗原が出現、あるいは HIV 負荷量が多くみられる傾向があった。臨床的に HIV 脳症と診断しても組織的に HIV 感染の認められない症例では髄液中の HIV 負荷量は極めて少ないものであった。逆にサイトメガロウイルス脳炎と診断したものでも組織的 HIV 脳炎を合併している症例では髄液 HIV 負荷量が優位に多くみられた。

3. HIV 脳症の臨床的重症度に比例して、

基底核>前頭葉髄質>前頭葉皮質に HIV 感染細胞数が多くみられる傾向があったが、stage 1 の軽症例では HIV が必ずしも検出されなかった。

4. HIV 脳症では全例活性化ミクログリア/マクロファージが基底核で多く発現し、重症度に応じて基底核のみならず皮質・髄質全体に多く発現していた。

5. 髄液 β 2 MG の値と中枢神経内活性化ミクログリア/マクロファージの染色細胞数とは相関する傾向がみられた。

D.考察

臨床的に HIV 脳症と診断した8例をサイトメガロウイルス脳炎と診断した2例を対象に臨床的検査所見と病理所見ならびに免疫組織学的手法による HIV 感染細胞密度と活性化マクロファージ/ミクログリア細胞密度を検討した。

臨床的に高度な痴呆例はいずれも組織学的にミクログリア結節、リンパ球、マクロファージの浸潤、特徴的な多核巨細胞の出現と活性化マクロファージ/ミクログリアが増加した HIV 脳炎の所見を呈しており、臨床的 HIV 脳症が HIV 感染に端を発した脳炎であることに同意するものである。

次いで髄液中のウイルス負荷量と HIV 脳症との関係であるが、AIDS 患者で認知機能障害を有する患者に髄液中のウイルス負荷量が多いことが指摘され、また剖検脳を用いた半定量あるいは定量的ウイルス負荷量の検討でも髄液中の高いウイルス負荷量は組織中のウイルス負荷量が多いことが示されたにも関わらず、HIV 脳症の発症病態は HIV の間接効果であるといわれている。McClemon らによると脳組織の HIV-RNA 負荷量は非痴呆患者から軽度、中等度/高度痴呆患者へと優位に増加傾向が認められ、HIV 脳症の病態に脳内での HIV の増殖が関わり、重症度に HIV-RNA

の絶対量との相関を認めている。しかし痴呆患者でも極めて HIV 負荷量が少ない例や、逆に非痴呆患者で脳内 HIV 負荷量が多く認められる例が存在し、神経機能障害には HIV の負荷量よりもマクロファージの活性化のような脳組織の炎症程度の方がより関わりがあると指摘している。ここに示した検討では、対象患者に非痴呆患者でなくサイトメガロウイルス患者を選んだこと、免疫組織化学的手法という初歩的方法で検討したという点に難点があるが、それでも HIV 関連痴呆の中等度ないし高度な例では組織内の HIV 染色密度が高く、組織的 HIV 脳炎の無い例では髄液ウイルス量が極めて低く、HIV 脳炎の存在例では優位に髄液中に HIV 負荷がみられたことは、これまでの指摘のごとく、HIV 脳症の存在とその程度に脳組織内での HIV 増殖が関わっていることに矛盾せず、また HIV 負荷量以上のマクロファージ/ミクログリア細胞の活性化のおびただしさは、HIV 感染に伴ったこれら細胞の活発な活動を反映していることを示唆するものである。

ところで、HIV 脳症は精神運動活動の全般的な緩慢化が特徴で、皮質下痴呆であることいわれ、HIV はしばしば皮質下組織に優位に多く存在することが認められている。今回の検討でもいずれも HIV 感染細胞、活性化マクロファージ/ミクログリア細胞は基底核に最も多く認められたが、本研究で明らかとなったことは、これまでの研究では痴呆と HIV 負荷量あるいは活性化マクロファージ/ミクログリア細胞、その産物との関係を求めたものが主であり、それらの脳内での拡大との関係を論じたものは見あたらない。HIV 脳症が精神運動活動の緩慢化から高度な全般的痴呆へと進展していく過程を考えると、基底核と前頭葉の2カ所からの推定という難点があるが、その病的過程にここに示したような基底核

を中心とし、脳内皮質下白質、皮質へと広がる拡大過程も HIV 脳症の病態を考える上で重要ではないだろうか。

HIV 脳症の発症機構、中枢神経感染細胞が潜伏感染場所となる可能性、現状の HIV 薬での耐性の出現あるいは長期服用の困難さ等を考慮すると、HIV 脳症は今後最も重要な HIV 合併症となる可能性がある。

E. 結論

臨床的 HIV 脳症の重症度に比べると中枢神経内 HIV 感染細胞数は少ないが、重症度に応じて感染細胞数は増加し、基底核>髄質>皮質へと感染分布の拡大がみられる。活性化ミクログリア/マクロファージは HIV 感染細胞数以上に極めて多く発現し、HIV 脳症の重症度に HIV 脳炎以上に相関している。すなわち臨床的 HIV 脳症の基礎は HIV 脳炎であるが、ミクログリア/マクロファージの活性化が関与した病態が大きく関わっていることをあらためて示唆する。

基底核に病変が強く発現することは、HIV 脳症が思考/運動の緩慢化を初期症状とすることと矛盾しない。HIV 脳症が高度化するにつれ、病変が基底核から髄質、皮質へと拡大を示すものと考えられる。

髄液中の HIV 負荷量、 β 2MG は中枢神経実質内の出来事を反映し、組織的 HIV 脳炎の存在例は髄液中の HIV 負荷量が多く、活性化ミクログリア/マクロファージの反応の強いほど β 2MG の増加がみられ、髄液中のウイルス量や、 β 2MG の測定は HIV 脳炎や炎症の活動の推移を判断するのに有用であることを示唆する。

F. 参考文献

1) Sidtis JJ, et al: Early HIV-1 infection and the AIDS dementia complex: Neurology 1990;40:323-326.

2) Glass JD, et al: Immunocytochemical quantitation of human immunodeficiency virus in the brain: correlations with dementia. *Ann Neurol* 1995;38:755-762.

3) McArthur JC, et al: Relationship between human immunodeficiency virus-associated dementia and viral load in cerebrospinal fluid and brain. *Ann Neurol* 1997;42:689-698.

4) Di Stefano M, et al: In vivo evidence of HIV-1 productive infection in cerebrospinal fluid of patients with HIV-1 encephalitis. *AIDS* 1997;11:133-135.

5) Wiley CA, et al: Distribution of brain HIV load in AIDS. *Brain Pathol* 1998;8:277-284.

6) McClellon DR, et al: HIV in the brain. RNA levels and patterns of zidovudine resistance. *Neurology* 2001;57:1396-1401.

5) AIDSに伴う PML (多巣性白質脳症) とその画像所見.

第 25 回日本脳神経 CI 学会総会
2002.02.

2. 論文発表 なし

G. 研究発表

1. 学会発表

1) AIDS 関連トキソプラズマ脳症と脳原発悪性リンパ腫の鑑別 (自験例を中心に)

第 6 回日本神経感染症研究会
2001.07

Neuro・Infection 6(1):82-84,2001

2) AIDS 関連進行性多巣性白質脳症の 1 剖検例. 特に病態進行と JC ウイルス DNA の動態について.

第 6 回日本神経感染症研究会
2001.07

Neuro・Infection 6(1):85-87,2001

3) 脳出血で発症したトキソプラズマ脳症合併 AIDS の 1 例

第 158 回日本神経学会関東地方会
2001.09

4) 都立病院での HIV/AIDS 症例とその診療に関する研究

第 15 回日本エイズ学会 2001.11

表 1

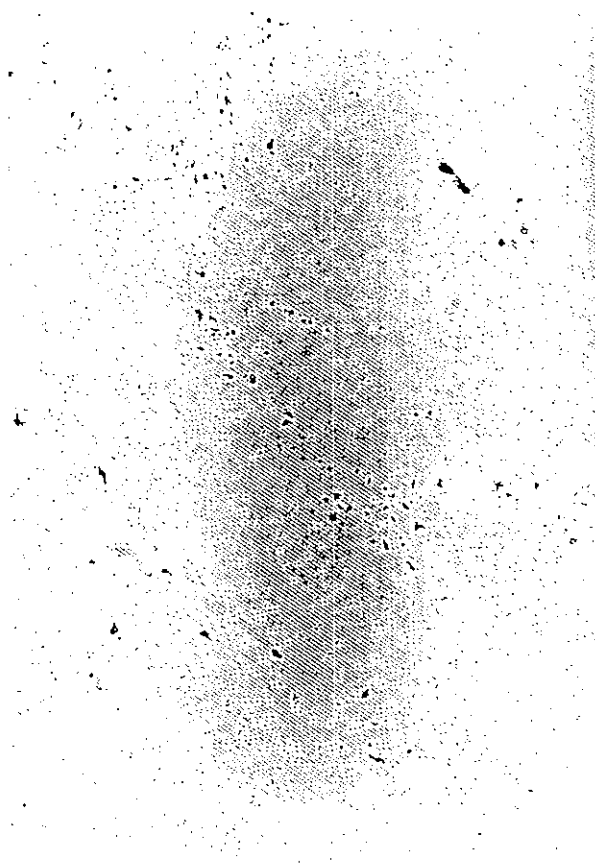
	Neuropathology	Clinical neurology	P24/HIV copies in CSF	β 2MG in CSF mg/dl	HIV p24	Activated microglia /macrophage
TS 38M	HIVE	HIVE Stage IV			前頭葉 皮+ 髓3+ 基底核4+	前頭葉 皮4+ 髓4+ 基底核4+
NO 33M	HIVE	HIVE Stage IV	P24: 22.7	13.7	前頭葉 皮+ 髓3+ 基底核4+	前頭葉 皮4+ 髓4+ 基底核4+
OZ 43M	HIVE Wernicke	HIVE Stage III	P24: 0.30	18.3	前頭葉 皮- 髓+ 基底核2+	前頭葉 皮+ 髓2+ 基底核3+
NM 29M	HIVE	HIVE Stage II	5.6×10^4	6.2	前頭葉 皮+ 髓+ 基底核2+	前頭葉 皮3+ 髓3+ 基底核4+
NT 61M	HIVE	HIVE Stage III		6.9	前頭葉 皮+ 髓+ 基底核2+	前頭葉 皮4+ 髓4+ 基底核4+

表 2

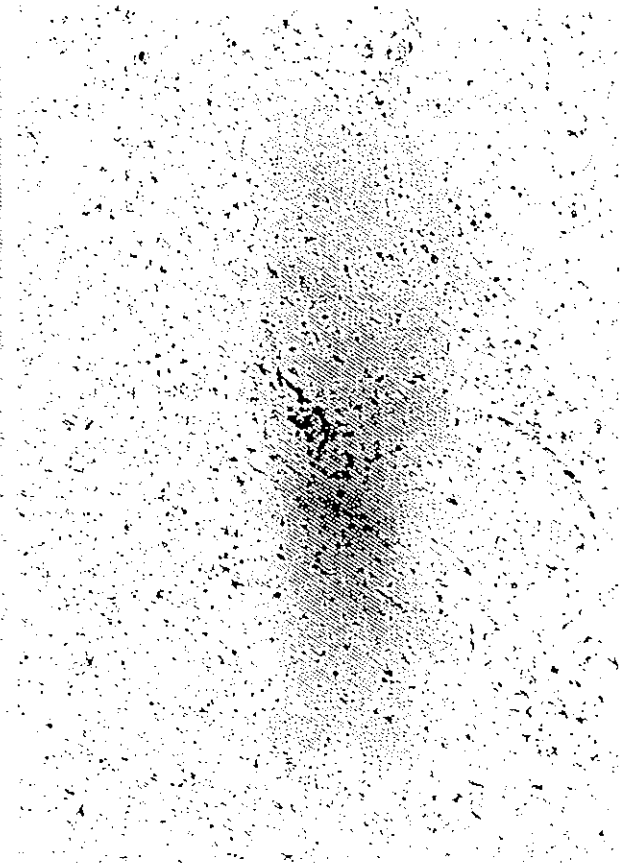
	Neuropathology	Clinical neurology	P24/HIV copies in CSF	β 2MG in CSF mg/dl	HIV p24	Activated Microglia /macrophage
YS 40M	SAH	HIVE Stage I SAH		5.6	前頭葉 皮- 髓- 基底核-	前頭葉 皮+ 髓+ 基底核2+
SY 29M	NP	HIVE stage I	5×10^1	10.7	前頭葉 皮- 髓- 基底核-	前頭葉 皮+ 髓+ 基底核2+
OH 42F	CMVE HIVE	CMVE	P24: 1.76	14.4	前頭葉 皮+ 髓2+ 基底核2+	前頭葉 皮4+ 髓4+ 基底核4+
TY 36M	CMVE HIVE	CMVE	4.3×10^3	20.9	前頭葉 皮- 髓- 基底核+	前頭葉 皮2+ 髓3+ 基底核3+
SB 48M	CMVE HSVE	HIVE Stage IV	7.8×10^2		基底核-	基底核4+

SAH : subarachnoid hemorrhage, Clinical neurology HIVE : HIV encephalopathy , Neuropathology HIVE : HIV encephalitis, CMVE : cytomegalovirus encephalitis, HSVE : herpes simplex virus encephalitis, Wernicke : Wernicke encephalopathy, NP : nothing particular

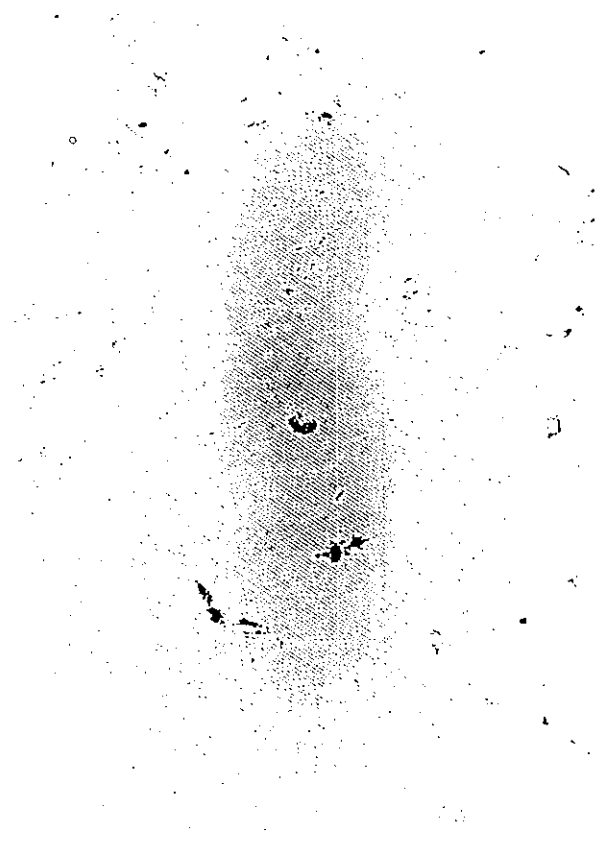
图 1. T. S. HIV 脑症 Stage IV



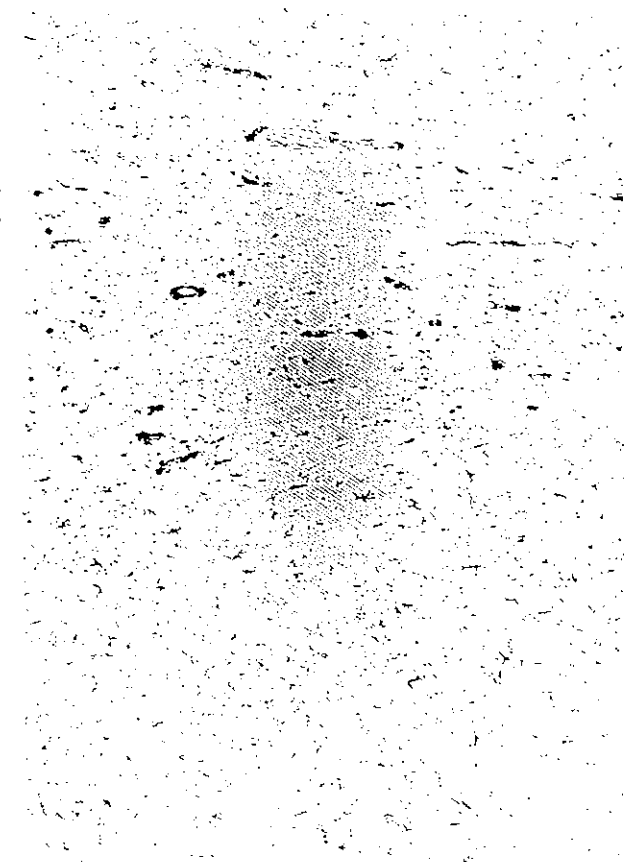
基底核 p 24 抗原染色 × 160



基底核 HLA-DR 染色 × 160



前頭葉 p 24 抗原染色 × 160



前頭葉 HLA-DR 染色 × 160

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：
HIV 感染に伴う中枢神経障害の髄液診断：14-3-3 蛋白質の EIA 測定法の確立と
14-3-3 蛋白質機能の考察

分担研究者 木戸 博 徳島大学分子酵素学研究センター
研究協力者 呂元明、奥村裕司、Saimoon Sharmin

研究要旨: HIV-1 感染による中枢神経障害の進行状況、治療効果の判定を Real time に、しかも迅速に判定する方法の確立が望まれている。本研究では HIV 感染に伴う中枢神経障害の Real time の髄液診断として、14-3-3 蛋白質の重要性を追求してきたが、本年度は 14-3-3 蛋白質の EIA 測定法の確立の試みと 14-3-3 蛋白質機能の考察を行った。解析の結果、髄液中の 14-3-3 蛋白質は Lentil lectin 反応性糖蛋白質と結合しているため、これまでに開発した抗体を用いた通常のサンドイッチ EIA 法では測定できないことが判明した。高感度の EIA を実現するため、前処理として Lentil lectin 反応性糖蛋白質の除去の必要性が明らかとなった。また 14-3-3 蛋白質機能の新機能として、細胞内のアミノ酸センサーの mTOR の自己リン酸化に依存した結合性が明らかとなった。

A. 研究目的

AIDS Dementia Complex (ADC) における脳内病変の進行状況を適確に把握する検査方法の確立を目的として研究が行われた。現在広く行われている脳の画像診断は、脳内病変を real-time に反影しているとは言えず、迅速な鑑別診断、薬物治療効果の判定、病変の進行状況把握と予後の判定に、十分な検査方法とは言えない。

これまでに我々は、ADC 患者の脳脊髄液中に神経細胞に由来する 14-3-3 蛋白質が特徴的なアイソマーパターンで検出される事を見出し、HIV 感染に伴う中枢神経細胞障害の進行程度を示すマーカーとして考察を行ってきた。本年度は、国際的な開発競争が行われているにもかかわらず、いまだにどのグループも成功していない 14-3-3 蛋白質の EIA システムの

確立をめざした。さらに、14-3-3 蛋白質の細胞内での役割と HIV 感染との関係を合わせて検討した。

B. 研究方法

脳の神経細胞（ヒト）の 14-3-3 蛋白質には、類似性の高い 6 種類（ τ , γ , ϵ , β , ζ , η ）の isomer が報告されている。それぞれの isoform 間のわずかな 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)の中から、それぞれの isomer を適格に識別する特異抗体と、いずれの isomer にも共通して反応する抗体を見い出して、これらの組み合わせによる EIA の確立をめざした。PBJ5-FLAG epitope-tagged wild-type FRAP (FKBP12-rapamycin-associated protein, 別名 mTOR: mammalian target of rapamycin), mutant D2357E FRAP, mutant S2035T FRAP plasmid は Dr. S.L. Schreiber (Harvard University) より供与された。FRAP と 14-3-3 τ の細胞内相互作用の検定は、免疫沈降法による沈澱を Western Immunoblotting 法で解析することによって行った。

（倫理面への配慮）

今回の研究で用いた患者脳脊髄液は、国立国際医療センターで予め患者の同意を得た後に採取を施行した

検体である。また今回の研究では動物実験はおこなっていない。

C. 研究結果

1) 14-3-3 蛋白質 EIA システムの開発

いずれの 14-3-3 isomer にも反応する抗体同士の組み合わせから、全てのタイプの 14-3-3 isomer 量を同時に測定する EIA システムの開発と、この共通認識抗体とそれぞれの isomer に対する特異抗体の組み合わせから、14-3-3 isomer を識別して測定する EIA システムの開発を行った。Western Immunoblotting システムに比べて EIA では、抗原の検出感度が予想外に悪く、これまでに作成した EIA の中で最も高感度なシステムでも検出範囲は 0.3-22 ng/well (図 1: recombinant 14-3-3 γ 蛋白質を標準蛋白質とし、全ての isomer を共通認識する抗体での測定系) で、特異的 isomer 認識抗体を用いた測定システムの検出範囲は、1-300 ng/well であった。従って臨床検体の測定には、いずれのシステムもさらに約 5-10 倍の高感度化が必要と判定された。さらにこれらの EIA システムを用いた臨床検体の測定では、脳脊髄液中の何らかの抗原抗体反応阻害物質によって EIA が阻害されていることが明らかとなった。あらかじめ脳脊髄液を Lentil lectin-

Sepharose beads で処理すると、EIA システムにおける抗体の反応性がかなり回復することから、脳脊髄液中の Lentil lectin 反応性糖蛋白質を除去する必要性が示唆された。

2) 14-3-3 蛋白質の細胞内での役割と、HIV 感染における役割の解析
リン酸化蛋白質を認識するアダプター分子としての 14-3-3 蛋白質は、神経細胞に特に多く含まれ、抗アポトーシス作用を始めとした様々な生理作用がこれまでに報告されている。我々は、細胞内のアミノ酸センサーとして蛋白質の翻訳調節をしている FRAP (別名 mTOR) が、その自己リン酸化に依存して 14-3-3 蛋白質と結合することを、Jurkat 培養細胞系と COS-7 細胞の over expression 系 (図 2) で明らかにした。HIV 感染による神経細胞の破壊機序と、14-3-3 蛋白質とリン酸化 FRAP との結合が、どのように関連しているか現在不明であり、今後追求してゆく。

D. 考察

従来より 14-3-3 蛋白質は神経細胞に特に多く含まれ、リン酸化蛋白質のアダプター分子として知られていた。今年度の研究で、脳脊髄液中の 14-3-3 蛋白質は Western Immunoblotting では isoform に特異的に反応するが、EIA ではほとんど反

応しないことが明らかとなった。さらに脳脊髄液をあらかじめ Lentil lectin-Sepharose CL4B で処理することにより、EIA での反応性の回復が認められたことから、神経細胞から脳脊髄液中に遊出した 14-3-3 蛋白質は、Lentil lectin 反応性の糖蛋白質と結合しているために、抗体との反応性が低下していると推定された。今後 14-3-3 蛋白質と結合している蛋白質の同定と、その除去方法を見出すことで、EIA 法の確立と 14-3-3 蛋白質の病態との関係が解明されると期待される。一方、14-3-3 蛋白質の新たな機能の一つとして、細胞内のアミノ酸センサーの mTOR の自己リン酸化に依存した結合性が明らかとなった。mTOR は、細胞内の蛋白質の翻訳調節因子として注目されている分子である。今後 HIV-1 感染に伴って始まる神経細胞の Apoptosis に、神経細胞内の 14-3-3 蛋白質と mTOR がどのようにかかわっているかを明確にする必要がある。

E. 結論

A) 昨年我々が確立した 6 種の 14-3-3 isoform (β 、 τ 、 η 、 ζ 、 ϵ 、 γ) 特異抗体と、今年度確立した全 isoform 共通認識抗体を組み合わせることで、脳脊髄液中の全ての 14-3-3 量を測定する EIA 系と、それぞれの isoform 量

を特異的に測定する EIA 系の確立を試みた。我々の当初の予想に反して、現在用いている抗体は、Western Immunoblotting システムに比べ EIA で抗体の反応性が悪く、臨床検体の測定にはさらに約 5-10 倍の高感度化が必要と判定された。さらに脳脊髄液中には、Lentil lectin 反応性の糖蛋白質が EIA の抗原抗体反応を阻害していることを見出した。今後、抗原抗体反応阻害物質除去法の確立と、反応性の高い抗 14-3-3 抗体の作成により、患者脳脊髄液中の 14-3-3 蛋白質の高感度測定を実現する。さらに CJD、HIV 患者 (ADC, CMVE)、Herpes 脳炎において、それぞれに特徴的な脳脊髄液中の 14-3-3 isomer が出現することから、これらの疾患についても EIA による迅速鑑別診断、薬物治療効果の判定、病変の進行状況把握と予後の判定、等を合わせて検討したい。

B) HIV encephalitis の発症課程において、アポトーシス誘導物質として知られている phosphorylated BAD, forkhead transcription factor FKHRL1, p38 mitogen-activated protein kinase に対する 14-3-3 蛋白質の抑制作用が注目されている。これらの事実に加えて、我々は 14-3-3 蛋白質が細胞内のアミノ酸センサーとして蛋白質の翻訳調節を行っている FRAP (別名

mTOR) と 14-3-3 蛋白質が mTOR のリン酸化に依存して結合することを見出した。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 蛋白質がどのようにかかわっているかを解析する。

F. 健康危険情報

本研究によって得られた成果の中で、健康危険情報に該当する事項は特に含まれていない。

G. 研究発表

論文発表

- 1) Mori, H., Inoue, M., Yano, M., Wakabayashi, H., and Kido, H.: 14-3-3 τ associates with a translational control factor FKBP12-rapamycin-associated protein in T cells after stimulation by pervanadate. *FEBS Lett.* 467(1), 61-64, 2000.
- 2) Wakabayashi, H., Yano, M., Tachikawa, M., Oka, S., Maeda, M., and Kido, H.: Increased levels of 14-3-3 ϵ , γ and ζ isoforms in cerebrospinal fluid of AIDS patients with neuronal destruction. *Clinica chimica Acta* 312, 97-105, 2001

H. 知的所有権の取得状況

特許取得

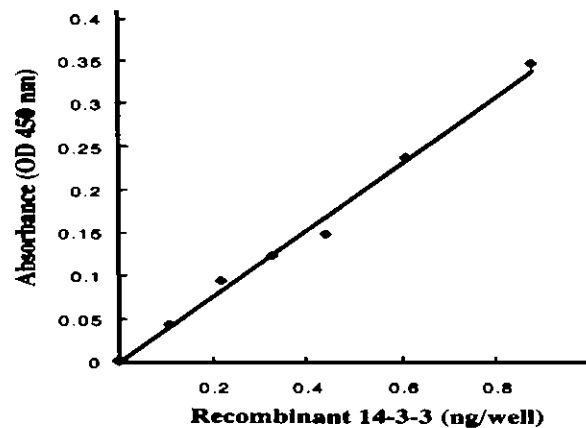
1. 木戸 博、清藤 勉、前田 雅弘
若林 英樹。エイズ関連脳疾患の

診断方法および診断用キット。出願

人:免疫生物研究所、特願 2000-262098.

平成 12 年 8 月 31 日出願。

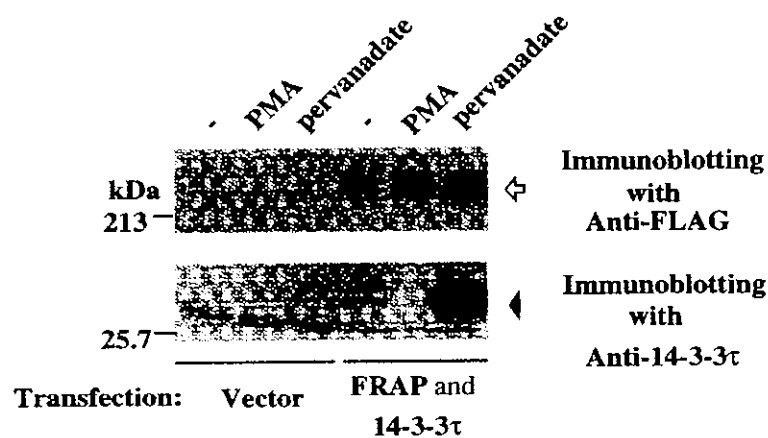
図 1. Recombinant 14-3-3 γ 蛋白質を標準物質としたときの、14-3-3 isoform 共通認識抗体による EIA システム



recombinant 14-3-3 γ isomer を標準蛋白質として、全 isoform 共通認識抗体による EIA システムの感度検定を行った。

図 2. 14-3-3 蛋白質と FRAP の自己リン酸化依存的結合

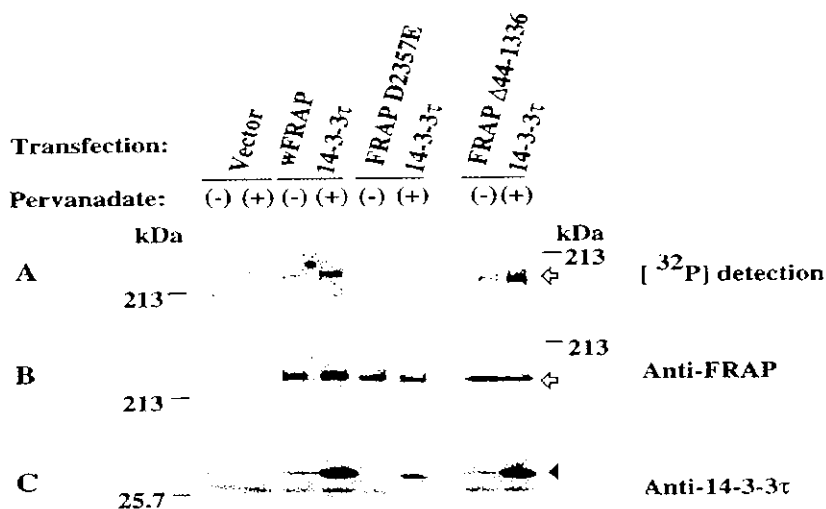
(A)



(A) pervanadate 処理に依存した COS-7 細胞中の FRAP と 14-3-3 τ との相互作用。

COS-7 細胞に wild-type FRAP (wFRAP) と 14-3-3 τ DNA、あるいは vector のみをトランスフェクションし、細胞を pervanadate (100 μ M), PMA (500 ng/ml) で 48 時間刺激した。その後細胞質分画を、抗 FRAP あるいは抗 14-3-3 抗体で免疫沈降して、それぞれの蛋白質に結合している分子の検索を行った。

(B)



(B) 自己リン酸化した FRAP に 14-3-3 τ は結合するが、protein kinase の活性中心を変異させた FRAP では 14-3-3 τ との結合性は、著明に減少した。COS-7 細胞に FLAG-tagged wFRAP, あるいは protein kinase の活性中心を変異させた FLAG-tagged FRAP D2357E, FLAG-tagged deletion mutant FRAP Δ 44-1336 と 14-3-3 τ , vector のみをトランスフェクションし、細胞を pervanadate で処理した後 48 時間目の細胞質を検体とした。A: 抗 FRAP 抗体で免疫沈降処理し、 32 P による自己リン酸化 FRAP を検定。B: 抗 FRAP 抗体で免疫沈降させた検体を、抗 FRAP 抗体で Western immunoblotting して、免疫沈降された FRAP の量に変化の無いことを証明した。C: 抗 FRAP 抗体で免疫沈降させた FRAP 複合体中の 14-3-3 τ を、Western immunoblotting で検出した。

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：
HIV-1感染による中枢神経障害に対する治療薬の開発研究

分担研究者 馬場昌範 鹿児島大学医学部教授

研究要旨：HIV-1感染による中枢神経障害の発症機序を解明し、有効な予防・治療薬の開発研究を行うために、HIV-1感染個体 (*in vivo*) での神経細胞死の誘導機序に基づいた *in vitro* における評価システムを構築した。このシステムを用いて、抗HIV-1薬の神経細胞死に対する抑制効果を検討したところ、HIV-1のコレセプターCXCR4拮抗薬であるAMD3100とHIV-1転写阻害薬のK-37にHIV-1感染による神経細胞死を抑制する効果を認めた。

A. 研究目的

われわれは昨年度の本研究において、ヒト神経芽種由来の細胞を薬剤処理し、神経細胞に分化させた後、tumor necrosis factor (TNF)- α や HIV-1 gp120 を作用させて、これらの物質が確かに神経細胞死を誘導することを確認した。さらに抗炎症アルカロイドである cepharanthine はこれらの物質による神経細胞死を抑制すること、また活性化されたマクロファージにおいて、各種サイトカインの産生を抑制することなどを見出し、本薬剤が HIV-1 感染における中枢神経障害に対する予防・治療薬の候補者になる可能性があることを報告した。一方、そこで用いられた評価系では、神経細胞とその細胞死を誘導する原因と考えられている HIV-1 感染マクロファージを個別に取り扱っており、実際に生体内 (*in vivo*) で起こっている現象を良く再現しているとは言い難い。そこで今年度の研究においては、*in vivo* における神経細胞死の誘導機序に近い *in vitro* の評価

系を構築し、それを用いて HIV-1 感染による中枢神経障害の発症機序の解明と、予防・治療薬の開発を行うことを目的とした。

B. 研究方法

今回樹立した評価系は、神経細胞と HIV-1 感染マクロファージの共培養により、神経細胞の生存に対する影響とそれに対する各種薬剤の作用を調べるものである。ヒトの脳細胞の初代培養を実験に用いることは倫理的に困難であるので、それに代わるものとして、ヒト神経芽種由来で、分化誘導処理によって神経細胞様に分化する SK-N-SH 細胞を用いた。SK-N-SH 細胞は昨年の本研究で用いた SK-N-MC 細胞よりも、分化後は各種サイトカインや HIV-1 由来の抗原に対する感受性が高い。この細胞を 5 μ M のレチノイン酸（全トランス型）で 4 日間処理して神経細胞に分化させた。また、マクロファージについては、骨髓芽球由来の細胞株で、薬剤によってマクロファージに分化する HL-60 細胞とその

HIV-1 感染クローンである OM-10.1 細胞を用いた。これらの細胞を 10 ng/ml のホルボールエステル (PMA) で 2 日間培養すると、HL-60 および OM-10.1 細胞はそれぞれ非感染および HIV-1 感染マクロファージへと分化した。

図 1 に評価系の概要を示す。分化した神経細胞 (10^6 cells/well) に対し、マクロファージ (10^5 cells/well) を直接的に、あるいは $3 \mu\text{m}$ の孔径を有するセルカルチャーインサートを介して間接的に添加し、1% 牛胎児血清の存在下の培養液で共培養した。培養後

3 から 5 日目に培養上清を採取するとともに、細胞の生存率を tertazolium 染色法にて測定した。また上清に放出されるサイトカインやケモカイン、あるいは HIV-1 p24 抗原量については、ELISA 法を用いて定量した。

(倫理面への配慮について)

今回の研究では、倫理的に問題となるような生体からの材料は一切用いていない。また動物実験も行っていない。

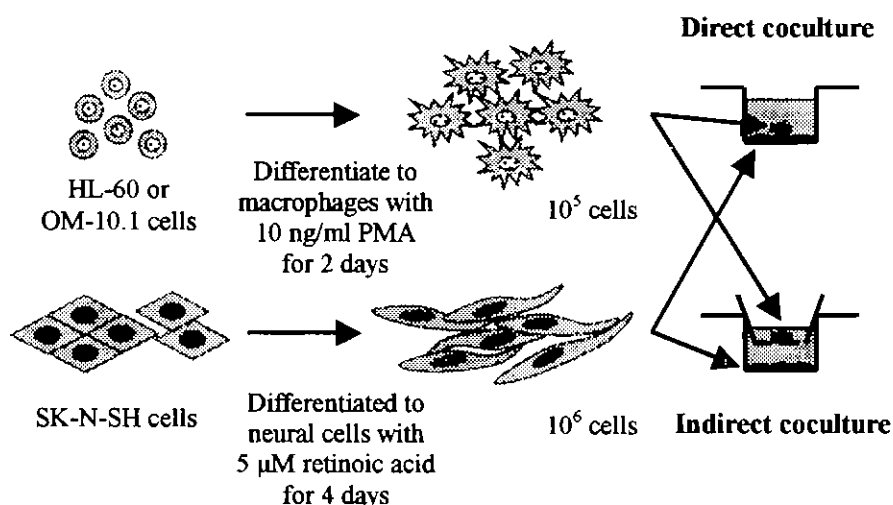


Fig. 1. Schematic presentation of assay procedures for neural cell death. SK-N-SH cells were cultured and differentiated to neural cells in a 24-well culture plate. After differentiation, culture medium containing retinoic acid was completely removed from the culture plate and replaced with maintenance medium. HL-60 or OM-10.1 cells were differentiated to macrophages in the presence of PMA. After 2 days, the cells were washed to remove PMA, trypsinized, and resuspended in maintenance medium. Then, SK-N-SH cells (1×10^6 cells/well) were cocultured with macrophages (1×10^5 cells). For direct coculture, macrophage suspension was added onto neural cells. For indirect coculture, macrophage suspension was added onto a membrane (pore size: $3 \mu\text{m}$). After a 3 and 5-day cocultivation, the culture supernatants were collected, and the number of viable cells was determined.

C. 研究結果

SK-N-SH 細胞はレチノイン酸処理により、細胞の形態が神経細胞様に変化し、また神経マーカーの1つであるニューロン特異的エノラーゼの発現が認められる (data not shown)。この細胞とマクロファージへと分化させた HL-60 もしくは OM-10.1 細胞と共培養を行うと、培養3日目では生細胞数はむしろ増加傾向にあるが、培養5日目ではマクロファージと共培養した神経細胞に生存率の有意な低下が認められた (図2)。また HIV-1 感染マクロファージと共培養した神経細胞の方が、非感染マクロファージと共培養した神経細胞よりも、生存率の低下が顕著であった。さらに、直接共培養のみならず、間接共培養においても神経細胞死の誘導が認められ、むしろこの現象は間接共培養において強いように思われた。

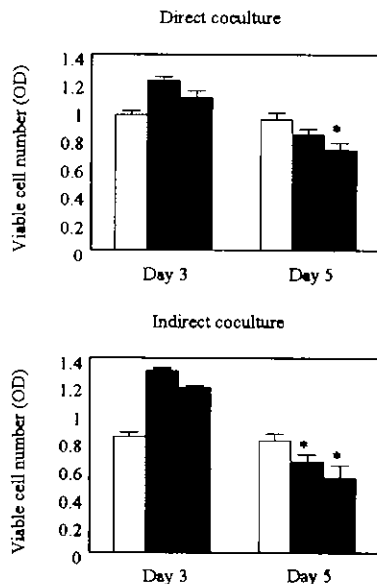


Fig. 2. Neural cell death induced by direct and indirect coculture with macrophages. Neural (differentiated

SK-N-SH) cells were cultured alone (open columns), or cocultured with either uninfected macrophages (differentiated HL-60 cells) (hatched columns) or HIV-1-infected macrophages (differentiated OM-10.1 cells) (closed columns). Experiments were repeated three times, and results are the mean \pm the standard deviation of triplicate determinations in a representative experiment; the statistical significance of viable cell number between the control (open columns) and neural cells cocultured with macrophages (hatched or closed columns) was evaluated by Student's *t* test. *, $P < 0.01$. OD, optical density.

神経細胞死をさらに詳細に検討するために、間接共培養2日目にアポトーシス細胞を検出する目的で、神経細胞の TUNEL 染色を行ったところ、マクロファージと間接共培養を行ったものでは、すでにこの時点で多数の神経細胞がアポトーシスに陥っている像が観察された (図3)。さらに4日目では染色なしでも、形態学的にも明らかな神経細胞死が観察された。

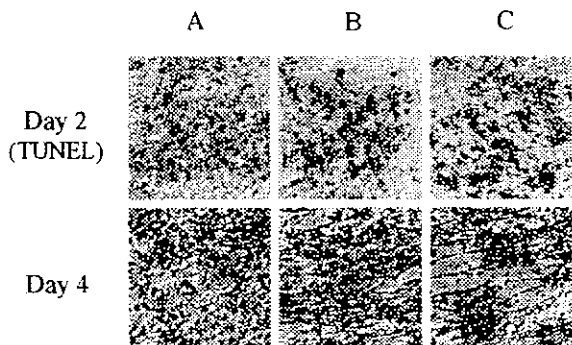


Fig. 3. TUNEL staining and microscopic observation for neural cells cocultured with macrophages. Neural cells were cultured alone (A), or indirectly cocultured with either uninfected

macrophages (B) or HIV-1-infected macrophages (C). After a 2-day incubation, neural cells were subjected to TUNEL staining, and apoptotic cells (stained as dark spots) were detected microscopically (magnification: $\times 100$) (upper panels). The morphology of neural cells was also observed microscopically on day 4 without staining (lower panels).

マクロファージとの間接共培養により、神経細胞に細胞死が誘導されることから、共培養によって培養上清中に産生される何らかの物質に神経細胞死誘導効果があると考え、間接共培養3日目培養上清を種々に希釈して、それらが神経細胞死を誘導できるかどうかを検討した。その結果、培養上清は濃度依存的に神経細胞の細胞死を誘導することが分かった (図4)。

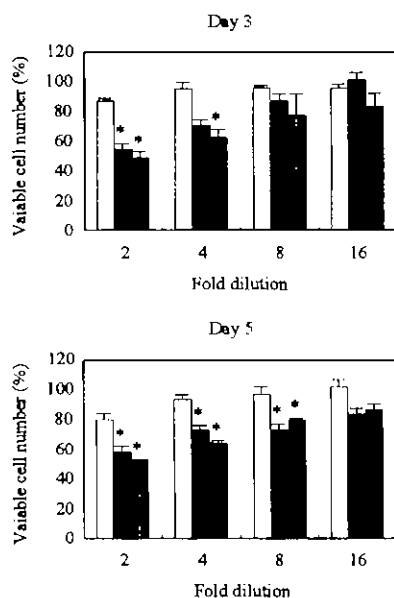


Fig. 4. Neural cell death induced by coculture supernatants. Neural cells were incubated in various (2 to 16-fold) dilutions of the culture supernatants of neural cells alone (open columns), or the

indirect coculture supernatants with either uninfected macrophages (hatched columns) or HIV-1-infected macrophages (closed columns). After a 3 and 5-day incubation, the number of viable cells was determined and expressed as the percent of the control (the number of viable cells cultured in maintenance medium only). Experiments were repeated twice, and results are the mean \pm the standard deviation of triplicate determinations in a representative experiment; the statistical significance of viable cell number between the control and the neural cells exposed to culture supernatants (open, hatched, or closed columns) was evaluated by Student's *t* test. *, $P < 0.01$.

次に神経細胞死を誘導する物質を同定する目的で、共培養の上清中に産生される種々のサイトカインやケモカインを定量した。表1にその結果を示す。神経細胞の単独培養では、調べた6種類のサイトカインとケモカインの産生は認められなかった。一方、マクロファージの単独培養では、非感染および HIV-1 感染に関わらず、IL-1 β を除き、これらのマクロファージからサイトカインやケモカインが産生されていることが分かった。さらに感染マクロファージと非感染マクロファージを比較すると、前者からの産生量が多いように思われた。また神経細胞との共培養により、感染マクロファージからの IL-6, IL-8 および MCP-1 の産生が特に亢進していた。

これらのサイトカインやケモカインが神経細胞死に果たす役割をさらに詳しく解析するために、これらに対する中和抗体を加え、培養上清によって誘導される神経細胞死に対して、抗体が抑制的に作用するかどうかを検討した。その結果、抗 TNF- α , 抗 IL-6,