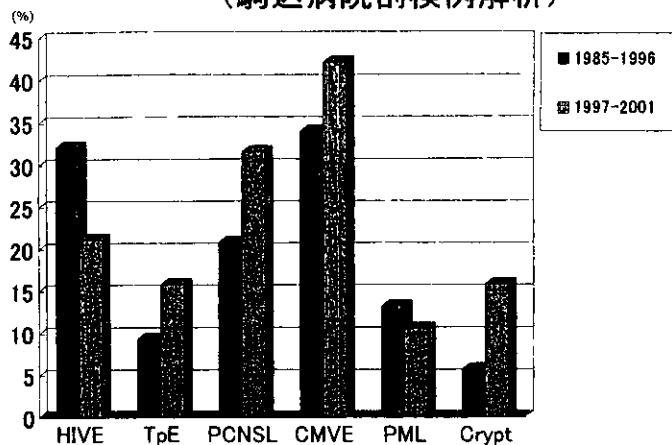


表4 主要神経合併症(剖検例解析)

	HIV 脳症	トキソプラズマ 症	リンパ 腫	サイトメ ガロウ ウイルス 脳炎	PML	クリプ トコッカス 症
1985 ~1996 (n=53)	17例 (32.1%)	5例 (9.4%)	11例 (20.8%)	18例 (34.0%)	7例 (13.2%)	3例 (5.7%)
1997 ~2001 (n=19)	4例 (21.1%)	3例 (15.8%)	6例 (31.6%)	8例 (42.1%)	2例 (10.5%)	3例 (15.8%)
計	21例 (29.2%)	8例 (11.1%)	17例 (23.6%)	26例 (36.1%)	9例 (12.5%)	6例 (8.3%)

図3 主要神経合併症の推移
(駒込病院剖検例解析)



HIV HIV脳症 TpE トキソプラズマ脳炎 PCNSL 脳原発性リンパ腫 CMVE サイトメガロウイルス脳炎 PML 進行性多巣性白質脳症 Crypt クリプトコッカス症 χ^2 検定では各項目両群間に有意差なし

F 参考文献

- 1) d' Armino Monforte A, et al Decreasing incidence of CNS AIDS-defining events associated with antiretroviral therapy *Neurology* 2000,54 1856-1859
- 2) Sacktor N, et al HIV-associated neurologic disease incidence changes Multicenter AIDS cohort study, 1990-1998 *Neurology* 2001,56 257-260
- 3) Maschke M, et al Incidence and prevalence of neurological disorders associated with HIV since the introduction of highly active antiretroviral therapy (HAART) *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000,69 376-380
- 4) 中川正法、納 光弘 わが国における HIV-1 感染による神経障害の疫学 HIV-1 感染による神経障害の診療マニュアル 東京 進興医学出版社, 1997 p 18-26
- 5) Mashah E, et al Changes in pathological findings at autopsy in AIDS cases for the last 15 years *AIDS* 2000,14 69-74
- 6) Jellinger KA, et al Neuropathology and general autopsy findings in AIDS during the last 15 years *Acta Neuropathol* 2000,100 213-220

G 研究発表

1 学会発表

- 1) HIV 感染症者に合併した Elsberg 症候群 4 例の報告 第 7 回日本神経感染症研究会 2002 10
- 2) エイズ脳症の現況 臨床の立場から, Neuro-AIDS に対する HAART 導入の影響 第 16 回日本エイズ学会サテライトシンポジウム 2002 11
- 3) 頭部 MRI 画像と臨床症状の経過にかいりを呈した HIV に PML を合併した 1 症例 第 16 回日本エイズ学会 2002 11

2. 論文発表

- 1) 岸田修二 神経系の感染症 *AIDS 看*

護のための最新医学講座 第 1 巻 脳神経系疾患 2002 p 210-219

- 2) 岸田修二 Neuro-AIDS に対する HAART の意義. *Annual Review* 2003 神経 p 110-125 中外医学社 2003 年

H 健康危険情報

本研究結果は、HIV 感染に気づかず神経障害を発症して初めて HIV 感染と判明する HIV 感染患者が、欧米先進国に比べわが国では増加してきていることを示唆しており、啓蒙活動を通じ、HIV 感染の抑制ならびに治療の重要性を強調すべきである。

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（第3報）

エイズ末期に起こる大脳皮質病変はウイルス感染細胞の局所浸潤を伴わずに生じている

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	Xing Hui Qin	鹿児島大学医学部難治性ウイルス疾患研究センター
	森豊隆志	鹿児島大学医学部第3内科
	早川 仁	鹿児島大学医学部第3内科
	森 一泰	国立感染症研究所筑波医学実験用電長類センター

研究要旨 サルエイズモデルを用いて、エイズ発症動物に生じた大脳皮質の変性病変について免疫組織化学、電顕等を用いて詳細に解析し、ウイルス感染細胞の局在との関連を検討した。T細胞指向性ウイルス Mac239 感染サルでは、明らかな神経細胞の変性脱落像は見られないものの、ニューロピルのクリオーネスとともに CD68 陽性のマクロファーン/ミクログリアが増生し、その活性化が示唆された。また、シナプス終末蛋白シナプトフィニンや樹状突起構成蛋白 MAP 2 の免疫組織化学ではそれらの発現低下は見られない一方で、Calbindin の免疫染色で明らかな染色性の低下が観察され、介在ニューロンの機能異常が生じている可能性が示唆された。病巣局所にウイルス感染細胞は認められず、エイズ末期の高ウイルス血症やサイトカインの異常などを介した間接的な神経障害機構の関与が示唆される。

A 研究目的

エイズの本態であるリンパ組織の崩壊とは独立して起こっている HIV 脳症は HAART 療法によりリンパ節病変の進行が制御される中でどのように変貌するかは不明である。最近の剖検組織に解析では脳神経障害はむしろ増加していると報告されており、今後あらたな問題となることか懸念される。

エイズの脳神経障害については大脳白質の多核巨細胞を伴うグリア結節と深部白質の淡明化が知られ、多核巨細胞、浸潤マクロファーン、ミクログリアにウイルスが感染していることが証明されている。一方、エイズにおける大脳皮質病変についてはニューロンの脱落、萎縮、樹状突起の単純化、MAP II、シナプトフィニン発現の低下、ニューロピルの空胞変性などいろいろな報告があるか必ずしも明らかではなく、その機序は不明

である。

我々は、サルのエイズウイルス SIV の感染実験系を用いて、リンパ系組織や中枢神経組織を病理組織学的に詳細に解析し、ウイルスの感染ターゲットの違いによるリンパ組織病変の進行と脳病変の進展の差異を比較し、エイズの発症過程と脳症の発症過程との関連を検討し、昨年度までにリンパ組織病変と脳病変は SIV 感染症の独立した病変であり、さらに、大脳白質の多核巨細胞を伴うグリア結節病変と皮質ニューロピルの病変はそれぞれ独立した病態として起こっていることを明らかにした。本年度は解析動物数を増やすとともに、大脳皮質病変の詳細を免疫組織化学と電顕により解析した。

B 研究方法

B ウイルス、SRV、SIV、STLV 抗体陰性のアカケ

サル（ミャンマー原産）を用いた。T細胞指向性の SIVmac239 感染サル 3 頭、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 2 頭と、非感染サル 2 頭を対照として検索した（表 1）。それぞれのサルは 4%パラホルムアルデヒドで灌流固定し、リンパ節、脾臓及び脳を採取、パラフィン包埋し、病理組織標本を作製した。炎症細胞のサブセットとして CD3、CD20、CD68、分裂細胞のマーカー Ki 67、グリオースの検索のため GFAP の免疫染色をし、光顕にて観察した。

感染後、エイスを発症し、大脳皮質の局所的なグリオースを認めた SIVmac239 感染アカゲサルと、多核巨細胞を伴う典型的なミクログリア結節病変（SIVE）を白質に生じ、エイスは発症していない SIV 239 *env*MERT 感染アカゲサルの前頭葉皮質、海馬領域についてシナプス小胞を染める抗シナプトフィニン抗体、樹状突起を染色する抗 MAP-2 抗体、さらに GABA 作動性神経細胞のマーカーである Calbindin の免疫染色とを行い、コントロールと比較した。また、グリオースを示す部位とそれぞれの神経細胞関連蛋白の染色性との関連を見るために、GFAP との 2 重染色を行った。また、同部を 1%オスミウム酸にて再固定後、エポキシ包埋し、ニューロピルの微細構造を観察した。ウイルス感染細胞の同定として SIV-Env を認識する抗体 KK41 を用いてウイルス蛋白の検出を行った。

C 研究結果

リンパ組織の破壊像をしめし、典型的なエイスを発症した T細胞指向性ウイルスの SIVmac239 及び RT SHIV 感染サルでは、大脳皮質の明らかな神経細胞変性や脱落の所見は見られなかったか、ニューロピルに局所的なグリオースがみられ（図 1）、ニューロピルに CD68 陽性のマクロファージ/ミクログリアが増加し、一部は神経細胞と密接したサテライト細胞の所見を呈していた（図 2）。しかし、KK41 陽性のウイルス感染細胞はニューロピルにはほとんど認められず、髄膜

に少数存在するリンパ球と思われる単核球の一部のみが陽性であった（図 1 E）。また、電顕により樹状突起内に層状構造物や dense body などの異常構造物が増加し、シナプス形成の少ない樹状突起やアストロサイト突起の膨化、クリア線維束の増加など、ニューロピルの微細な変性像が確認された（図 3）。MAP 2、シナプトフィニンによる免疫組織化学では染色性に斑が見られたか、2 重染色では GFAP 陽性のグリオースの部位とは一致せず（図 4）、MERT 感染サルやコントロールと比較しても有意の低下は確認されなかった。一方、Calbindin の免疫染色では皮質のグリオースを示した Mac239 感染サルで明らかな染色性の低下が観察された（図 5）。

D 考察

これまでの SIV 感染サルを用いた検索により、①マクロファージ指向性ウイルス感染サルでは、多核巨細胞を伴うグリア結節というエイス脳症特有の病変がエイスの進展、すなわち免疫不全の程度とは独立して生じること、②T細胞指向性ウイルスに感染し、エイスを発症したサルにはクリア結節は見られない一方、大脳皮質ニューロピルの微細な変性像が見られ、これはエイスの進展と平行して生じていることを明らかにしてきた。今年度は検索頭数を増やしてこれまでの結果を確認するとともに、エイス末期におこると考えられる Mac239 感染サルの大脳皮質病変を詳細に観察した。明らかな神経細胞の変性脱落像は見られないものの、グリオースとともに CD68 陽性のマクロファージ/ミクログリアが増生し、その活性化が示唆された。また、シナプス終末蛋白シナプトフィニンや樹状突起構成蛋白 MAP 2 の免疫組織化学ではそれらの発現低下は見られない一方で、Calbindin の免疫染色で明らかな染色性の低下が観察され、介在ニューロンの機能異常が生じている可能性が示唆された。局所にウイルス感染細胞は認められず、エイス末期の高ウイルス血症やサイトカインの異常などを介した間接的な神経障害機構の関与が示唆される。

HAARTにより免疫不全の進行が長期コントロールされ、末期エイズ患者の減少とともに、通常は両者が混在している二つの病態のうち、エイズ末期に亜急性に進行する脳症としての HIV 脳症は短期的には減少することか予想され、一方で、免疫不全が進行する以前に、慢性変性疾患を思わせる緩徐進行性の神経疾患としての HIV 脳症が徐々に増加してくるものと思われる。しかし、HIV 感染者は増加の傾向を続けており、長期の薬剤服用は耐性ウイルスの出現や服用の中断により、エイズ末期の脳症も存在し続けることか予想される。HIV 脳症の二つの病態を区別し、それぞれの病態の解明と診断・評価法の開発、病態に則した治療法の開発が必要である。

E 結 論

SIV 感染サルモデルを用いてエイズ病変と脳症の作成に成功し、その解析により、リンパ組織病変と脳病変は SIV 感染症の独立した病変であること、エイズ脳症における大脳白質の多核巨細胞を伴うグリア結節病変と皮質ニューロピルの病変はそれぞれ独立した病態として起こっていること、皮質ニューロピルの病変は感染細胞の局所への浸潤を伴わずに生していることを明らかにした。

F 知的財産権の出願・登録状況

特許出願

蓮井和久、村田長芳、出雲周二。超高感度免疫組織化学的染色法およびその自動化。特願 2003 040286、平成 15 年 2 月 18 日出願

G 研究発表（英文原著のみ記載）

1 Xing HQ, Moritoyo T, Mori K, Tadakuma K, Sugimoto C, Ono F, Hayakawa H, Izumo S. Simian immunodeficiency virus encephalitis in the white matter and degeneration of the cerebral cortex occur independently in simian immunodeficiency virus infected monkey J Neurovirol 2003,

in press

- 2 Sugimoto C, Tadakuma K, Otani I, Moritoyo T, Akari H, Ono F, Yoshikawa Y, Sata T, Izumo S, Mori K. Nef gene is required for robust productive infection of Simian Immunodeficiency Virus in T cell rich paracortex in lymph node 2003, J Virol in press
- 3 Takenouchi N, Yamano Y, Usuku K, Osame M, Izumo S. Long term follow up of HTLV I proviral load in patients with HAM/TSP J Neurovirol, 2003 in press
- 4 Furukawa Y, Saito M, Matsumoto W, Usuku K, Tanaka Y, Izumo S, Osame M. Different cytokine production in Tax expressing cells between HTLV I associated myelopathy/ tropical spastic paraparesis patients and asymptomatic HTLV I carriers J Infect Dis 2003, in press
- 5 Kubota R, Furukawa Y, Izumo S, Usuku K, Osame M. Degenerate specificity of HTLV I specific CD8+ T cells during viral replication in patients with HTLV I associated myelopathy (HAM/TSP) Blood 2003, in press
- 6 Saito M, Higuchi I, Saito A, Izumo S, Usuku K, Bangham CRM, Osame M. Molecular analysis of T cell clonotypes in muscle infiltrating lymphocytes from patients with human T lymphotropic virus type 1 polymyositis J Infect Dis 2002 86(9) 1231-41
- 7 Yamano Y, Nagai M, Brennan M, Mora CA,

- Soldan SS, Tomaru U, Takenouchi N, Izumo S, Osame M, Jacobson S. Correlation of human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV 1) mRNA with proviral DNA load, virus specific CD8(+) T cells, and disease severity in HTLV 1 associated myelopathy (HAM/TSP). *Blood* 2002;99(1):88-94.
- 8 Kiwaki T, Umehara F, Arimura Y, Izumo S, Arimura K, Itoh K, Osame M. The clinical and pathological features of peripheral neuropathy accompanied with HTLV I associated myelopathy. *J Neurol Sci* 2003;206(1):17-21.
- 9 Nagai M, Utsunomiya T, Takenouchi N, Izumo S, Osame M. Failure to detect HTLV type 1 DNA from HTLV type 1 seronegative patients with chronic progressive spastic paraparesis in Kagoshima. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002;18(14):1089-90.
- 10 Marin O, Hasui K, Remondegui C, Sato E, Aye MM, Takenouchi N, Izumo S, Tajima K. Adult T cell leukemia/lymphoma in Jujuy, north west Argentina. *Pathol Int* 2002;52(5-6):348-357.
- 11 Umehara F, Itoh K, Michizono K, Abe M, Izumo S, Osame M. Involvement of Fas/Fas ligand system in the spinal cords of HTLV I associated myelopathy. *Acta Neuropathol (Berl)* 2002;103(4):384-90.
- 12 Vine AM, Witkover AD, Lloyd AL, Jeffery KJ, Siddiqui A, Marshall SE, Bunce M, Eiraku N, Izumo S, Usuku K, Osame M, Bangham CR. Polygenic control of human T lymphotropic virus type I (HTLV I) provirus load and the risk of HTLV I associated myelopathy/ tropical spastic paraparesis. *J Infect Dis* 2002;186(7):932-9.
- 13 Wang X, Miyake H, Okamoto M, Saito M, Fujiwara J, Tanaka Y, Izumo S, Baba M. Inhibition of the Tax dependent human T lymphotropic virus type I replication in persistently infected cells by the fluoroquinolone derivative K-37. *Mol Pharmacol* 2002;61:1359-1365.
- 14 Wang X, Okamoto M, Kawamura M, Izumo S, Baba M. Inhibition of human T-lymphotropic virus type I gene expression by the Streptomyces derived substance EM2487. *Antiviral Chem Chemother* 2002;13:177-183.

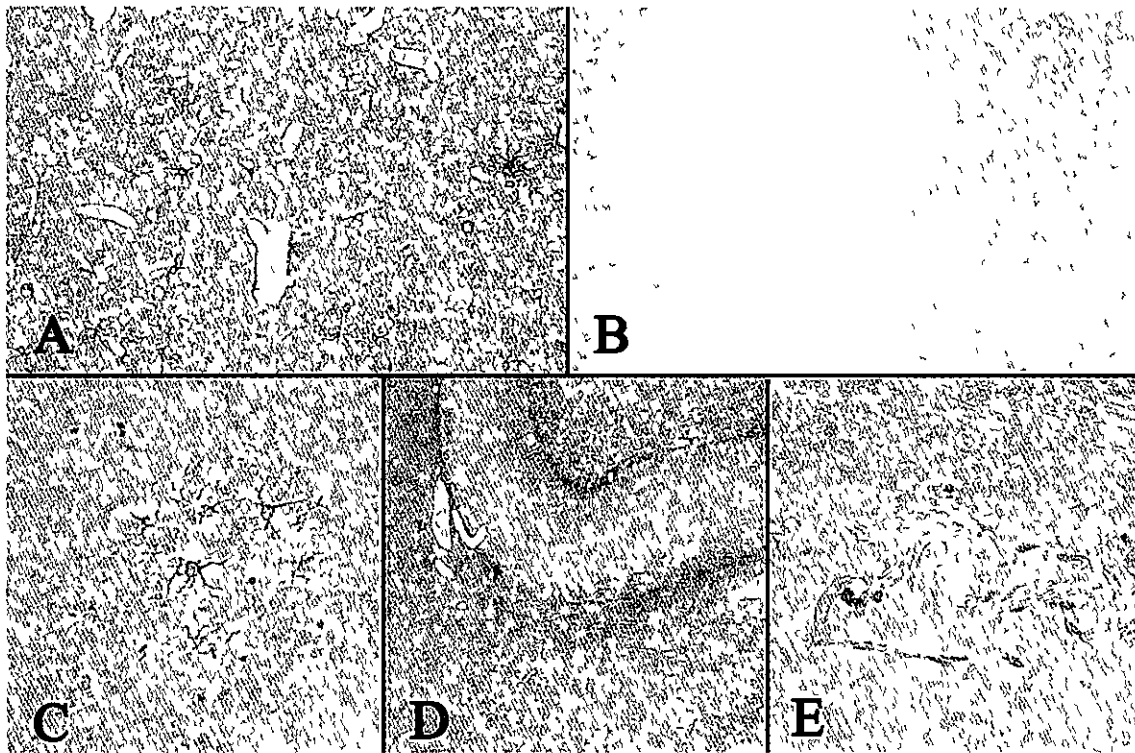


図1 Mac239感染サル前頭葉皮質 (A, C) と海馬 (D) に見られたクリオーシス B, envMERTの前頭葉皮質。 E, ウイルス感染細胞はクモ膜下腔に少数見られるのみ

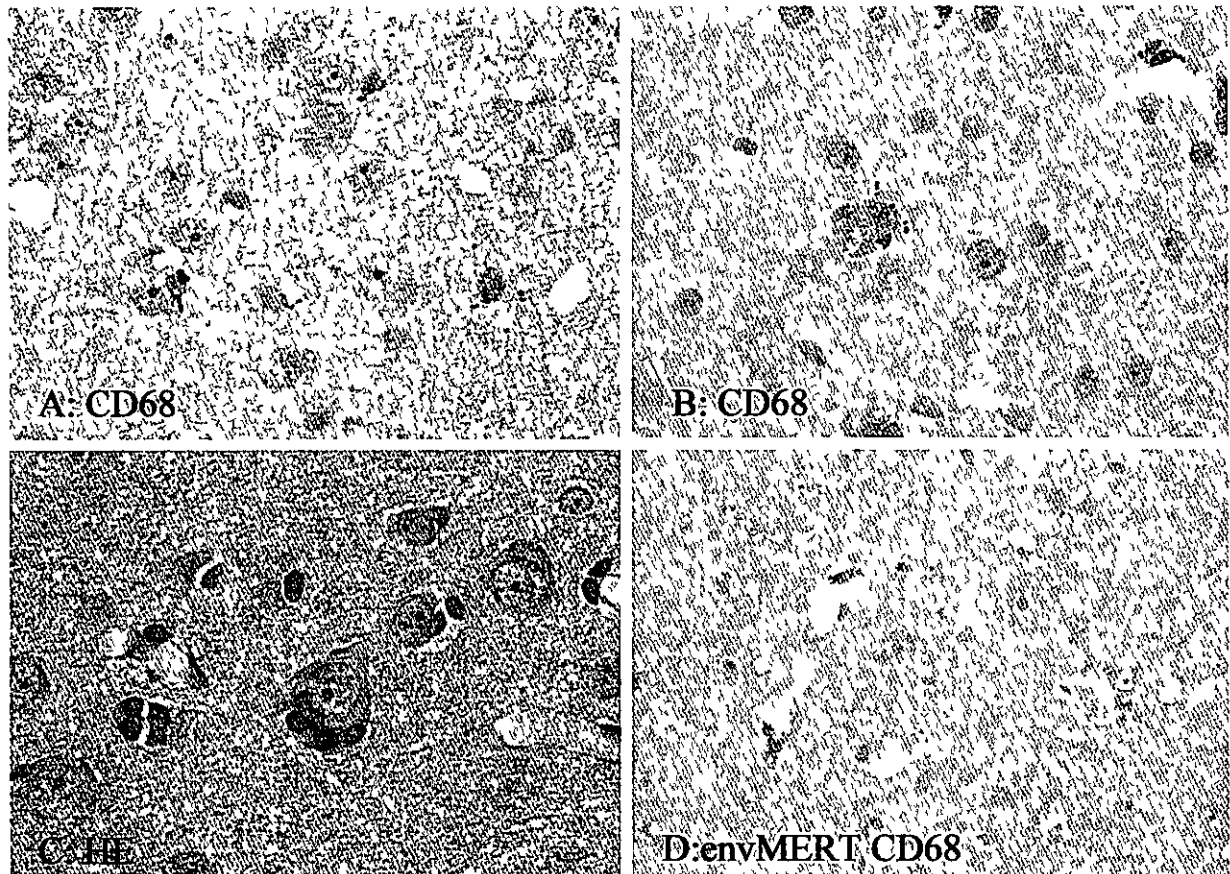


図2 Mac239感染サル前頭葉皮質のCD68+細胞 (A, B)とサテライトーシスを示す神経細胞 (C)。D, envMERT感染サルではCD68+細胞は血管周囲に局限している。

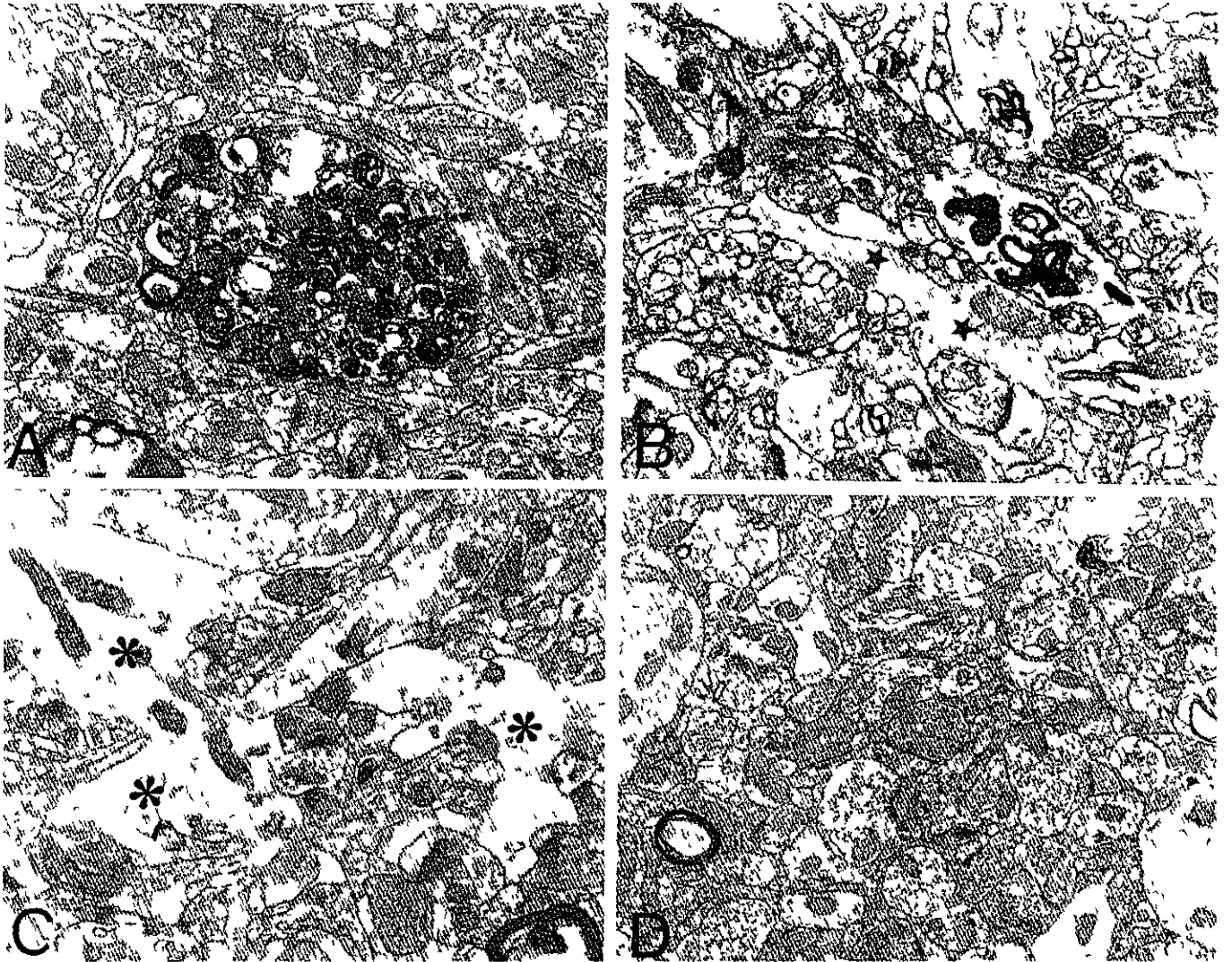


図3 前頭葉皮質ニューロピルの電顕像。A-C, Mac239感染サル D, envMERT感染サル

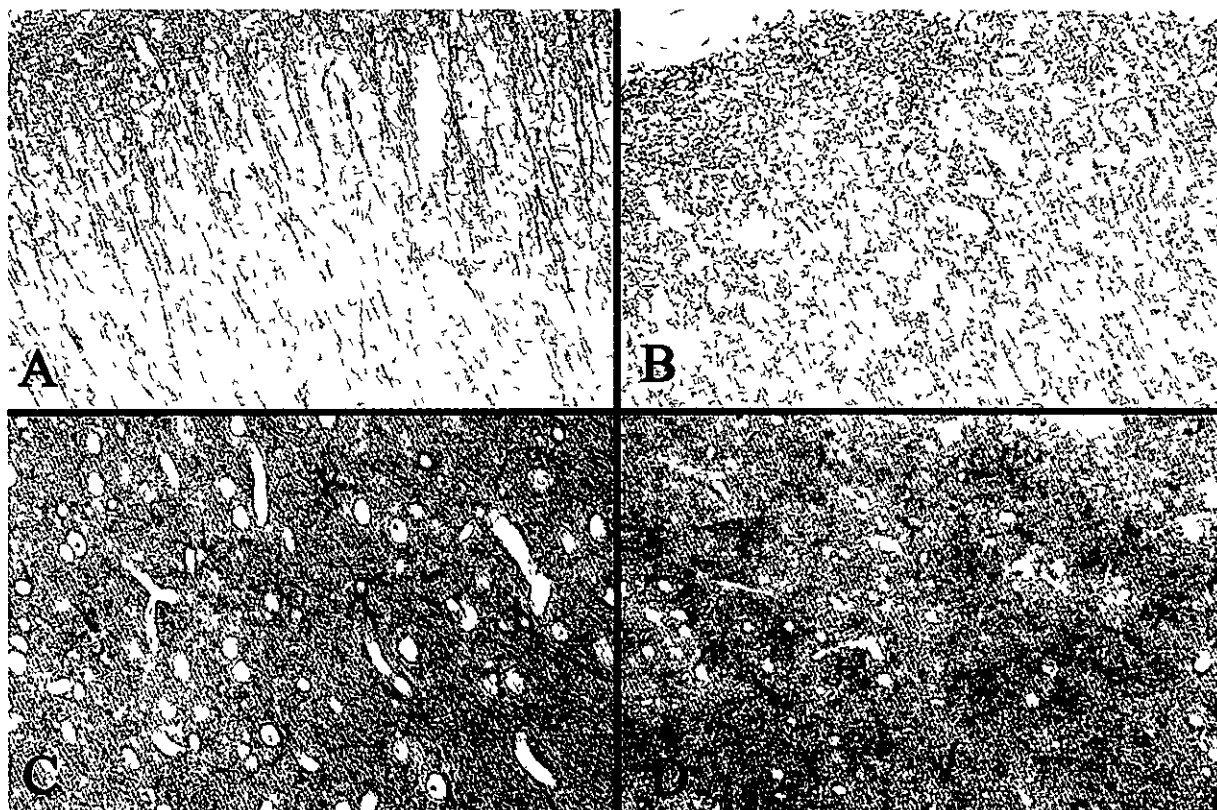


図4 MAP-2 (A, C)とシナプトフィシン (B, D)の免疫染色。GFAPとの2重染色でクリオーシスの見られる部位でもそれぞれの染色性は保たれている (C, D)。

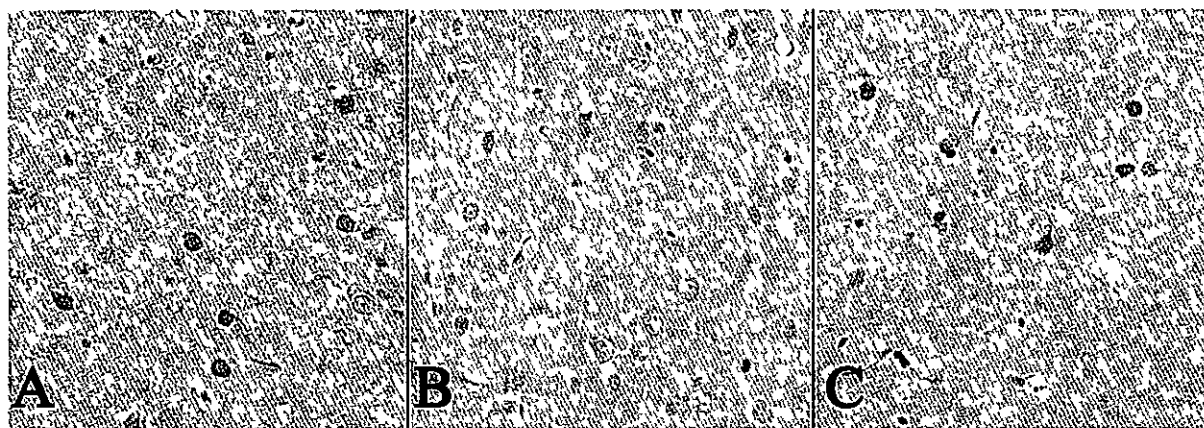


図5 前頭葉皮質のCalbindinの免疫染色。A, Control B, mac239感染サル C, envMERT感染サル

厚生労働科学研究補助金(エイズ対策研究事業)
分担研究報告書

AIDS dementia complex (ADC)発症機構に関する研究
発症因子とTNF- α との関係およびADC簡易疾患マーカーの開発

研究分担者	斉藤 邦明	岐阜大学医学部講師
研究協力者	清島 満	岐阜大学医学部教授
研究協力者	鍋島 俊隆	名古屋大学医学部教授

研究要旨 HIV 等で刺激したヒト血中モノサイト/マクロファーン培養上清を用いたマウス初代神経細胞による毒性試験および LP-BM5 ウイルスを感染させたマウス行動薬理試験の結果、いずれもウイルス感染により活性化された脳内マイクログリアおよび一部の浸潤細胞が産生する INF- α が痴呆の発症に深く関係していることが明らかとなった。したがって、AIDS dementia complex (ADC)治療薬として TNF- α 阻害剤の応用は極めて重要と考えられた。さらに、ADC 簡易神経疾患マーカーとして開発した髄液中キノリン酸定量法は、その感度ならびに特異性に関しても優れており、ADC の指標に加え、種々神経疾患においてモノサイト/マイクログリア活性化の1つのインテックスとして有用であることが明らかとなった。

A. 研究目的

マウス ADC モデルを用いた行動薬理的試験による研究分担者のこれまでの研究結果より、ADC 発症のメカニズムに TNF- α が関与していること、さらに薬剤投与により脳での TNF- α 抑制することにより、マウスの記憶障害が改善する事を明らかとなった。本研究は(1)痴呆の発症に深く関与していることが考えられる TNF- α について、骨髄移植(BMT)により TNF- α 欠損骨髄キメラマウスを用いて病体解析し、その病体における変化について考察する(2)マウスの初代神経および混合クリア培養系、さらには HIV 等で刺激したヒト血中モノサイト/マクロファーン培養上清を用いて、ADC 発症因子について解析する(3)モノサイト/マイクログリアが活性化された際に多量に放出され、また ADC の

程度を反映するとされる髄液キノリン酸の簡易定量の確立することを主な目的とした。

B 研究方法

(1)TNF- α 欠損骨髄キメラマウスを用いた病体解析 INF- α 欠損骨髄キメラマウスに LP-BM5 ウイルスを感染させ、感染 10 週後より行動薬理的指標として Y-maze 等を実施し、さらに行動薬理試験終了後の脳内 TNF 発現量を定量的に解析した。

(2)マウス胎児より採取した神経初代培養細胞に、クリア系の細胞を供培養させる系あるいは HIV 感染させたヒト血中モノサイト/マクロファーン培養上清を用いる系により、ADC 発症因子について TNF- α との関連も含めて解析した。

初代神経細胞の培養

初代神経細胞は、C57BL/6J マウスの胎児より単離した。胎生 15 日のマウスより全脳を取り出し、大脳皮質を HANKS' BALANCED SALTS (Sigma H4891) に回収した。その後、実体顕微鏡下にて脳膜を剥離し、細切後に酵素液 (SUMILON MB-X9901) を 3.35 ml の大脳皮質に対して 2.5 ml 加え、37°C、30 分間反応させた。脳組織を分散後に、900rpm、4°C、5 分間、遠心し、分散液を 2.5 ml 加え、再度、底部の細胞を分散後に下方に除去液を 2.5 ml 加え、900rpm、4°C、5 分間遠心した。回収した細胞は培養液 (SUMILON MB-X9501) に分散後、細胞数をカウントし、 1.25×10^5 cells/well になるようにポリエチレンイミン (Sigma P3143) でコートした 24 ウェルプレートに播き、37°C、5% CO₂ インキュベーター内で培養した。3 日目に、200 μ M AraC (Sigma C1768) を 10 μ M になるように加え、5 日目に培養液 [Neurobasal medium (Gibco 21103-049), B-27 supplement (Gibco 17504-044), 0.5mM L-Glutamine] を全量、交換した。以後、2-3 日に一度、培養液を交換し、細胞を維持した。

Microglia の培養

一次混合培養のクリア細胞は、C57BL/6J マウスの 1-2 日新生仔から常法に従い回収した。全脳を取り出し、実体顕微鏡下で脳膜を剥離後、培養液 [MEM (Gibco 11090-081), 10% FCS, 5.5 μ g/ml Insulin (Sigma I5500), 2.5% Glucose] を加え、細胞をよく分散した。その後、1 brainあたり 1-2 フラスコになるように培養液を加え、37°C、5% CO₂ インキュベーター内で培養した。2、7、10 日後に培養液を交換し、細胞を維持した。培養 14 日後に 37°C、150rpm、2 時間、振

盪し、上清を回収後、ペトリ皿に回収した細胞を捲いた。37°C、15・30 分間、インキュベートした後に付着しなかった細胞を取り除き、シリコンラハーにて付着したマイクログリア細胞を回収した。

(3) ADC の指標として髄液中キノリン酸高感度定量法についてリコンヒナント酵素を用いた簡易系を確立し、HIV 患者の髄液中キノリン酸濃度を定量した。

キノリン酸の簡易定量に必要な 2 種類のキノリン酸代謝関連酵素を大腸菌にて発現させ、常法に従いリコンヒナント酵素を精製し、キノリン酸簡易迅速測定法についてテイスポーサフルカラムを用いて構築した。測定法の最小感度は 5-10nM 程度で、健常人の髄液測定が十分可能であった。また、測定結果をガスクロマトグラフィーマススペクトロメーターにて測定した結果と対比した結果 (相関係数 $r = 0.936$)、測定系の正確性についても何ら問題は見られなかった。

C 研究結果

(1) LP-BM5 感染マウスを用いた行動薬理学的検索

Wild type マウスに LP-BM5 ウイルスを感染させることにより、感染 8-10 週後のマウスはエイズ患者末期に見られ ADC 様の症状を発症する。しかし、TNF- α 欠損マウスならびに TNF- α 合成阻害を用いた実験では、ADC 様症状の改善が見られる。今回の TNF- α 欠損骨髄キメラマウスを用いた実験から、LP-BM5 感染により合成の亢進した脳の TNF- α は、LP-BM5 感染した wild-type マウスに比へ TNF- α

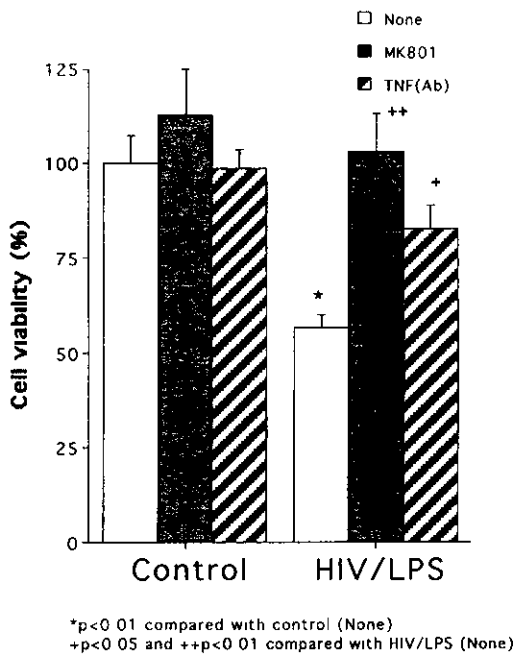


Figure 1 神経初代培養を用いた HIV 感染マクロファージが産生する神経毒の同定

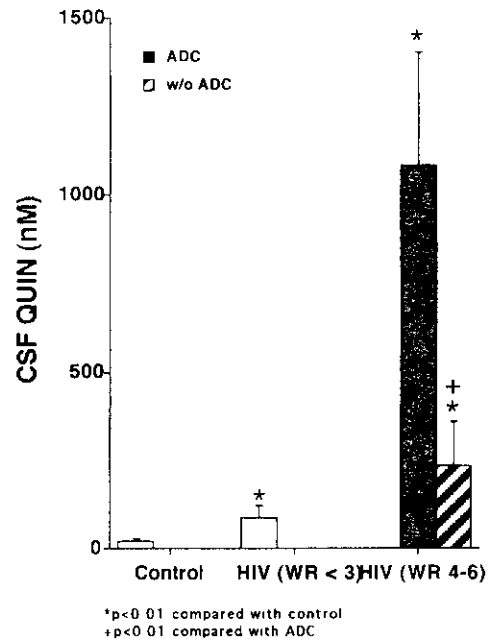


Figure 2 キノリン酸簡易定量法を用いたエイズ患者髄液の測定

欠損骨髄キメラマウスにおいて若干減少したか有意差は得られなかった。行動薬理学試験については Y-maze 試験を実施し、LP - BM5 感染により記憶障害が認められた wild-type マウスと同様に、LP - BM5 感染 TNF- α 欠損骨髄キメラマウスにおいても記憶障害が認められ、記憶障害が改善された LP - BM5 感染 TNF- α 欠損マウスで見られた結果とは対照的であった。

(2) 神経初代培養を用いた HIV 感染マクロファージが産生する神経毒の同定
マウス初代神経培養細胞に、HIV ならびに LPS で刺激したヒト血中モノサイト/マクロファージ培養上清を添加したところ図 1 に示す如く神経細胞生存率の低下が認められた。この生存率の低下は、NMDA レセプターアンタゴニストである MK-801 あるいは TNF- α 抗体の添加で改善された。

(3) キノリン酸簡易定量法を用いたエイズ患者髄液の測定
高感度簡易定量法を用いて測定した健康人の髄液中キノリン酸濃度は、 226 ± 7 nM であった。HIV 患者の髄液中キノリン酸濃度を定量した結果(図 2)、ADC を発症している患者の髄液のキノリン酸濃度は、Walter Reed (WR) Stages の進行と共に上昇しており、WR stages 後期ではコントロールの 100 倍以上の値を示すケースが多く認められた。さらに、ADC を発症している患者の値 (WR stages 4-6 with dementia 1080 ± 320 nM) は、ADC を発症していない患者の値 (WR stages 4-6 without dementia 235 ± 75 nM) に比べて有意に高かった。

Table 1 エイス痴呆発症原因に関する報告

ウイルス由来の物質
gp120 (or fragment)
gp120 + NMDA receptor アコニスト
tat
HIV感染による他の病原体および神経細胞の遺伝子賦活
その他 (種々のペプチド)
感染細胞由来の物質
HIV 感染マクロファージからの神経毒
炎症性サイトカイン(TNF- α など)
トリプトファンの代謝産物 (キノリン酸)
プロスタグランジン
アストロサイトの機能不全による神経障害
その他 NO, PAF, Glutamate etc

D 考察

ADC 発症の原因物質として、表1に示す如く多くの物質が、考えられているか、今回の我々の研究結果は、TNF- α を阻害することにより、ADC 発症を抑制できる事を、*in vivo* 神経培養実験ならびにマウスを用いた行動薬理試験により明らかとした。ADC 発症のメカニズムは、非常に複雑であると考えられるか、アルツハイマー病などの神経変性疾患とは異なり、可逆的な神経障害である。したがって、治療の観点から TNF- α は1つのターゲットとして ADC を含めた種々免疫性神経疾患でさらに今後注目されるものと考えられた。また、診断ならびに治療効果判定に必須である髄液ハイオマーカ-として、簡易キノリン酸測定法を考案した。キノリン酸の合成経路は、マイクログリアやマクロファージ系の細胞で高く、さらにサイトカインなど種々の免疫刺激で誘導される。したがって、キノリン酸簡易測定法は1つの、ADC の指標に加え、MS さらには HTLV-1 などの神経性ウイルス疾患のサンプルを分析し、脳神経疾患について病体解析を含めた幅広い

検討を加えることにより、臨床応用することか充分可能であると考えられた。また、種々神経疾患においてモノサイト/マイクログリア活性化の1つのインデックスとして今後非常に有用であると考えられた。

E 結論

ウイルス感染により活性化された脳内マイクログリアおよび一部の浸潤細胞が産生する TNF- α が痴呆の発症に深く関係していることか明らかとなった。ADC 治療薬の臨床応用を目標として、より安全な TNF- α 阻害剤の応用は極めて重要と考えている。さらに、簡易ウイルス性神経疾患マ-ーカーとして開発した髄液中キノリン酸簡易高感度定量法は、ADC の指標に加え、種々神経疾患においてモノサイト/マイクログリア活性化の1つのインデックスとして今後非常に有用であると考えられた。

F 研究発表

1 論文発表

[原著]

1 Tumor necrosis factor- α from bone marrow-derived cells is not essential for the expression of adhesion molecules in lipopolysaccharide-induced nasal inflammation Iwasaki M, Saito K, Sekikawa K, Yamada Y, Wada H, Mizuta K, Ito Y, Seishima M
Cytokine (In Press)

2 Lack of tumor necrosis factor- α induces impaired proliferation of hepatitis B virus-specific CTL Kasahara S, Ando K, Saito K, Sekikawa K, Ito H, Ishikawa T, Ohnishi H, Seishima M, Kakumu S, Moriwaki H
J Virol (In press)

3 L-Tryptophan-L-kynurenine pathway metabolism accelerated by Toxoplasma gondii infection is abolished in gamma interferon-gene-deficient mice cross-regulation between inducible nitric oxide synthase 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)

4 Improved myocardial ischemia/reperfusion injury in mice lacking tumor necrosis factor- α Maekawa N, Wada H, Kanada T, Niwa T, Yamada Y, Saito K, Fujiwara H, Sekikawa K, Seishima M
J Am Coll Cardiol, 39 1229-1235 (2002)

5 CREB phosphorylation as a molecular marker of memory processing in the

hippocampus for spatial learning
Mizuno M, Yamada K, Maekawa N, Saito K, Seishima M, Nabeshima T
Behav Brain Res, 133 135-141 (2002)

6 Immunohistochemical localization and mRNA expression of apolipoprotein A-I in rat spinal cord
Fuji H, Saito K, Hamakawa H, Maekawa N, Fujigaki S, Wada H, Shimokawa K, Seishima M, Takami T
J Atheroscl Thromb, 9 93-98 (2002)

[総説]

7 生活習慣病と炎症性サイトカイン—TNF- α を中心として—
斎藤邦明, 関川賢二, 竹村正男, 和田久泰, 藤井秀比古, 山田泰弘, 清島 満
健康創造研究, 1 (1) 22-29, (2002)

[著書]

8 感染症の宿主防御機構—理論と実際—腫瘍壊死因子 (TNF- α)
関川賢二, 谷口隆秀, 斎藤邦明
医薬ジャーナル社, 2002

2 学会発表
(シンポジウム)

臨床化学 (先端技術・選抜シンポジウム)
2次元液体クロマトグラフィーを用いた LPS 刺激 Macrophage の proteome 解析
藤井秀比古, 増田潤一, Maynard DM, 斎藤邦明, 清島 満, 西村雅之, Kowalak JA, Markey SP
第 49 回臨床検査医学会総会, 大阪市, 2002 11 22-24

厚生労働科学研究費補助金(エイズ対策研究事業)
分担研究報告書

HIV 感染に伴う中枢神経障害の髄液診断
14-3-3 蛋白質の機能と神経細胞障害の考察

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 矢野仁康、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として、髄液中の 14-3-3 蛋白質の検出の意義と有用性について解析してきた。14-3-3 蛋白質は通常髄液中に検出されることはないが、HIV 感染に伴い神経細胞内で発現が高まり、何らかの機序で髄液中に検出されるようになる。本年度は特に抗アポトーシス機能を示すとされている 14-3-3 蛋白質の機能について、我々が新たに見いたした 14-3-3 蛋白質の分子シャペロン機能を中心に、RNAi による検討を行った。その結果、14-3-3 蛋白質は転写調節領域に heat responsive element を持つ分子シャペロンで、ミトコンドリアから遊離されるアポトーシス誘導物質の cytochrome C と結合するか、ミトコンドリア内で cytochrome C と結合して cytochrome C の aggregation と変性を抑制し、抗アポトーシス機能を示すと示唆された。

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、特に real time marker が望まれているかこれまでに有用な marker は知られていない。これまでに我々は、通常では脳脊髄液に見ることのできない 14-3-3 蛋白質が ADC 患者の脳脊髄液中に特徴的なアイソマーパターンで検出される事を見出して、考察を行ってきた。本年度は、昨年度に続いて 14-3-3 蛋白質の EIA システムの確立をめさすと共に、14-3-3 蛋白質の細胞内での機能の解析を行った。14-3-3 蛋白質はこれま

て細胞内の Bad と結合して抗アポトーシス作用を示す事が報告されていたか、我々は 14-3-3 蛋白質が特に脳の神経細胞に多く発現されて、HIV 脳症において細胞障害の明らかな部位では 14-3-3 が細胞外に遊離してほとんど見られなくなっていること、障害部位の周囲では逆に 14-3-3 の発現増加が見られる事を見いたした。本年度の研究では、我々が新たに見いたした 14-3-3 蛋白質の分子シャペロン機能を中心に、RNAi による検討を行った。

B. 研究方法

①実験材料

drosophila Schneider 2 (S2) cell は Invitrogen より購入。14-3-3ζ, 14-3-3 共通認識抗体は我々と免疫生物学研究所が共同開発したものをを用いた。Hsp90、Actin 抗体は sigma より購入。Cytochrome-c 抗体(モノクローナル)は pharMingen より購入。Actinomycin D は sigma より購入した。ProteinG sepharose は Zymed より購入。One-step RT-PCR kit は Qiagen, MEGAscript transcription kit は Ambion より購入。Trizol は Invitrogen より購入した。

②Cell culture

通常 S2 細胞は drosophila Schneider medium (10% fetal calf serum)で 27°C で培養を行った。37°C で 1 時間培養後、再び 27°C に戻すことで heat stress 処理とした。

③dsRNA の作製

S2 cell より total RNA を抽出後、drosophila 14-3-3ζ, Hsp90, HSF の primer を用いて RT-PCR で各々の鋳型 DNA を増幅後、MEGAscript transcription kit で dsRNA を合成した。[primer design と RT-PCR] NCBI の PSI-BLAST search against whole drosophila genome から drosophila 14-3-3ζ, Hsp90, HSF を確認後各々の鋳型 DNA fragment がほぼ 500bp になるように primer を設定し RT-PCR を行った。各々の primer sequence を示す。14-3-3ζ, GenePeptide accession no AE003831, forward-primer (F-P)

5'-GTCATCGTGGCGTGTTCATCT-3, reverse-primer (R-P) 5'-TCAACAGCTGCATGATGAGTG-3, Hsp90, accession no AE003477, (F-P) 5'-GGCTGATGATGAGAAGAAGGA-3, (R-P) 5'-CTCAATCAGCTCCATGGTCTT-3, HSF, accession no AE003800, (F-P) 5'-GCAACATGTCTGGCGTGAA-3', (R-P) 5'-TGTCGTCGTAGCTTGTGTTTC-3

各々の 5 端に T7 RNA polymerase-binding site (TTAATACGACTCACT-ATAGGGAGA) を付加した primer を用いて、RT-PCR (28 cycle, annealing temp 58°C) を行った。dsRNA 合成は Dixon lab protocol に従って行った。精製鋳型 DNA を各々 1 μg MEGAscript kit にて転写後、アニーリング反応のため 65°C 50 分処理後ゆっくりと室温にもとした。

④RNAi の調整

S2 cell を drosophila serum free medium で final con を 1×10^6 cells/ml になるように調整した。各々 6 well culture dish に 1ml ずつ分注後、各 dsRNA を final con 37nM になるように直接 medium に追加した。27°C で 1 時間培養後、drosophila Schneider medium を 2ml 追加し 72 時間培養を行った。RNAi の効果は各々の特異抗体を用いた western-blotting 並びに、RT-PCR による mRNA の発現量の比較から検定を行った。

⑤ Whole cell lysate の調整、及び Western-blotting

S2 cell を harvest 後細胞は PBS で洗浄

し RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.1 % SDS, 0.5 % deoxycholate, 0.4 mM EDTA and 10 % glycerol)で溶解した。lysate は laemmli sample buffer を加え SDS-PAGE を行い各々の抗体を用いた western-blotting にて解析した。

⑥ ActinomycinD 処理

14-3-3ζ, Hsp90 dsRNA 処理、もしくは非処理 S2 cell を 72 時間培養後に、actinomycinD を final con 200 μg/ml になるように追加し 27°C で 30 分間前処理を行った。続いて 37°C で 1 時間培養後 27°C に戻し、0, 1, 2 and 3 時間培養を行い各々の lysate を調整した。

⑦ S2 cell の soluble or insoluble (aggregation) fraction の調整

control S2 cell 及び各々の RNAi S2 cell を 27°C で 72 時間培養後、37°C で 1 時間熱処理を行った。終了後 27°C に戻し各々 0, 1, 2, 3 時間培養した。非熱処理細胞を含む各細胞は PBS で洗浄後、lysis buffer (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM KCl, 2 mM EDTA and 15 % sucrose) で溶解し sonication (Branson cell disruptor 250, 50 % duty, 3 cycles) を行った。2000g, 15 min の遠心で未破碎細胞を取り除いた後、15000g, 20min 遠心を行い上清を soluble fraction として回収した。沈殿は RIPA buffer で溶解後 (4°C, 30 min) insoluble (aggregation) fraction として回収した。各 soluble or insoluble fraction は電気泳動後、anti-cytochrome-c の抗体を用いて

Western-blotting を行った。

⑧ 免疫沈降

免疫沈降法は standard method に準じて行った。⑥で調整した各々の cell extracts に protein G sepharose を加え非特異的結合を除いた後、上清に、protein G に続いて抗 cytochrome-c 抗体を加え共沈 (4°C, 90 min), 洗浄後 14-3-3ζ, 14-3-3 共通認識抗体を用いて Western-blotting を行った。

C. 研究結果

1) 14-3-3 蛋白質はストレス蛋白質であった。

14-3-3 蛋白質は、細胞内の Bad と結合して抗アポトーシス作用を示すと報告され、ADC における脳内病変の進行状況を適確に把握する real time marker としての意義に注目している。我々は 14-3-3 蛋白質が特に脳の神経細胞に多く発現されて、HIV 脳症において細胞障害の明らかな部位では 14-3-3 が細胞外に遊離してほとんど見られなくなっていること、障害部位の周囲では逆に 14-3-3 の発現増加が見られる事を見いだしてきた。さらに、14-3-3 蛋白質が HSP70 に類似した Nucleoside Diphosphate Kinase 様活性のあることを報告している。そこで、14-3-3 蛋白質がストレス蛋白質であるか否かを検定するために Heat Stress に反応性を持つか否かの検討を行った。

研究方法に示すように、S2 cell を 27°C の培養条件から 37°C に変更すると、図 1 のように処理後 1-3 時間と 14-3-3 蛋白質の発現が高まってくる事が観察された。

なお S2 cell には、14-3-3 isomer の中で 1 isomer の 1 種類しか存在しないことが分かっている。同時に検定した HSP90 も、発現増加の程度は低いものの Heat Stress に反応して増加した。

2) 14-3-3 蛋白質の熱発現誘導は転写レベルで調節されている。

14-3-3 蛋白質が heat stress に反応してその発現の増加する機序を解明するため、Actinomycin D の効果を検討した。図 2A で示すように Actinomycin D, 5 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で、14-3-3, HSP90 蛋白質の発現増加は有意に抑制された。さらに 14-3-3 遺伝子の転写調節領域を検索したところ、heat response element を見つけた。

3) 14-3-3 蛋白質の熱発現誘導は Heat Shock Transcription Factor (HSF) によって誘導されている。

14-3-3 ζ 遺伝子の転写開始領域の上流で見つけた heat response element を介して、HSF が作用しているか否かを RNAi による HSF ノックダウン法にて検定した。図 3A に示すように、HSF にたいする RNAi を 72 時間処理した後、heat stress をかけたところ 14-3-3 ζ も HSP90 も共に発現の増加が認められなくなった。なおこの時の転写因子 HSF mRNA の発現抑制を RT-PCR にて検討したところ、図 3B に示すように、RNAi による著明な転写抑制が認められた。

以上の事から 14-3-3 蛋白質は HSF を介して Heat stress による誘導を受けていることが明らかとなった。

3) 14-3-3 蛋白質は熱ストレス時に、アポトーシスの引き金を引く cytochrome C と結合して熱変性凝集を抑制する。

14-3-3 蛋白質の細胞内でのシャペロン作用を、アポトーシスの引き金を引く cytochrome C の熱変性凝集抑制効果から検討した。図 4 に示すように、14-3-3 蛋白質は 1 時間の熱ストレスによって生じた cytochrome C の凝集を、27°C の条件下で可溶性に変化させた。しかし 14-3-3 RNAi を処理すると、cytochrome C の熱変性凝集抑制効果は著明に抑制され、可溶化された cytochrome c の増加は見られなかった。HSP90 RNAi を処理しても、類似の効果は認められたか、その効果は、14-3-3 に比較して弱いものであった。

4) 14-3-3 蛋白質は熱変性 cytochrome c と結合してシャペロン作用を示す。

14-3-3 蛋白質が基質である熱変性 cytochrome c と実際に結合してシャペロン作用を示すか否かを、免疫沈降法にて検定した。図 5 に示すように、細胞内で熱変性により凝集した cytochrome c のみで 14-3-3 蛋白質が検出され、可溶性分画では cytochrome c に結合した 14-3-3 蛋白質は検出できなかった。

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タプター分子として作用する事、Bad と結合して抗アポトーシス作用を示す事が知られていた。我々は 14-3-3 蛋白質が特

に脳の神経細胞に多く発現していて、HIV 脳症において細胞障害の明らかな部位では 14-3-3 が細胞外に遊離してほとんど見られなくなっているか、障害部位の周囲では逆に 14-3-3 の発現増加が見られる事から、14-3-3 蛋白質の分子シャペロン機能を中心に、RNAi による検討を行った。

その結果、14-3-3 蛋白質は Heat Stress 蛋白質であることを新たに見いたした。14-3-3 蛋白質の熱ストレス応答は、HSF を介して起こっていることを、HSFRNAi により証明した。さらに 14-3-3 蛋白質の熱ストレス応答の一つとして、アポトーシスの引き金を引く cytochrome C と結合して熱変性凝集を抑制して、そのシャペロン作用を示す事が明らかとなった。

E. 結論

HIV encephalitis の発症課程において、脳脊髄液中に出現する 14-3-3 蛋白質は、本来 14-3-3 蛋白質を高濃度に保有する脳の神経細胞からアポトーシスなどの細胞障害時にもれて出て来る事と、14-3-3 蛋白質が抗アポトーシス物質として、HIV encephalitis 時に反応性に発現増加を起こしたことが考えられる。14-3-3

蛋白質の脳脊髄液中での増加の意義は不明であるか、今回の研究から 14-3-3 蛋白質についての以下の性質が明確となった。

- 1) 14-3-3 蛋白質は Stress Protein である Heat Stress に反応してその発現を増加させた。
- 2) 14-3-3 蛋白質は転写因子の HSF を介してその発現を増加させている。
- 3) 14-3-3 蛋白質は cy と cytochrome c と直接結合して、熱変性凝集塊の析出を抑制している。

F. 健康危険情報

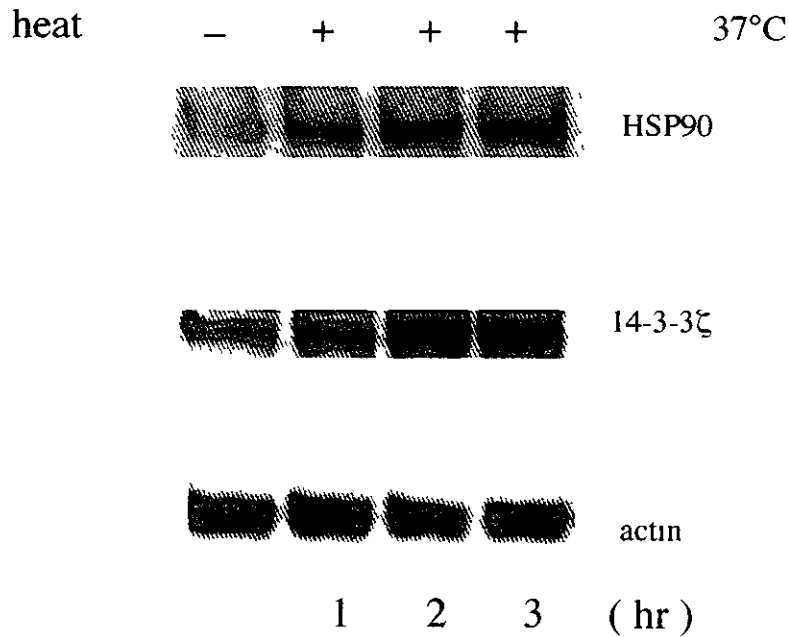
本研究によって得られた成果の中で、健康危険情報に該当する事項は特に含まれていない。

G. 研究発表

論文発表

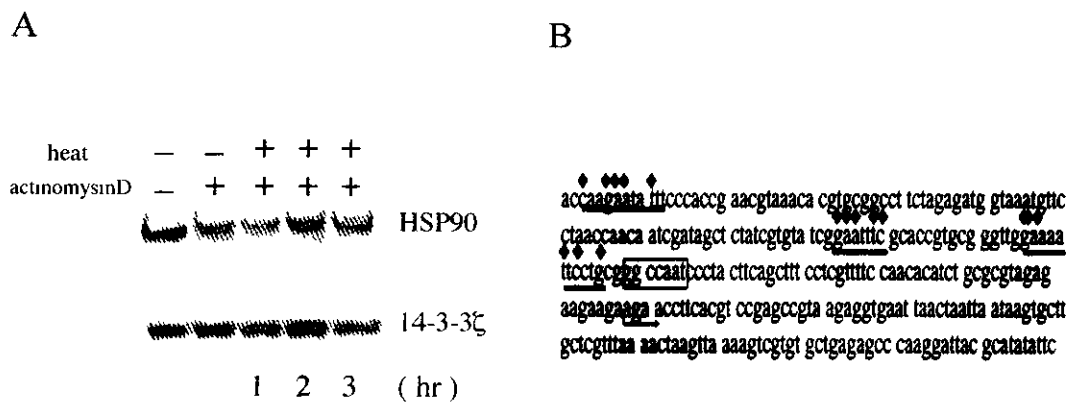
- 1 Yano, M, Kanasaki, Y, Koumoto, Y, Inoue, M, and Kido, H Chaperone activities of the 26S and 20S proteasome Curr Prot Pept Sci 2003, in press

図 1 14-3-3 蛋白は heat shock protein である



Drosophila S2 cell (Schneider cell) を 37°C, 1 時間の熱ショック後、27°C に戻して 1, 2, 3 時間後各々の細胞を集めて cell lysate を調整した。14-3-3 ζ, Hsp 90, actin の発現量を各々の抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。

図 2. 14-3-3 蛋白発現の熱誘導は転写レベルで調節されている。



A, 転写阻害剤アクチノマイシン D は、14-3-3 蛋白発現の熱誘導を阻害する。drosophila S2 cell を、5 μg/ml のアクチノマイシン D で 27°C, 30 分前処理後、37°C, 1 時間の熱ショックを行った。終了後、27°C に戻して 1, 2, 3 時間後各々の細胞