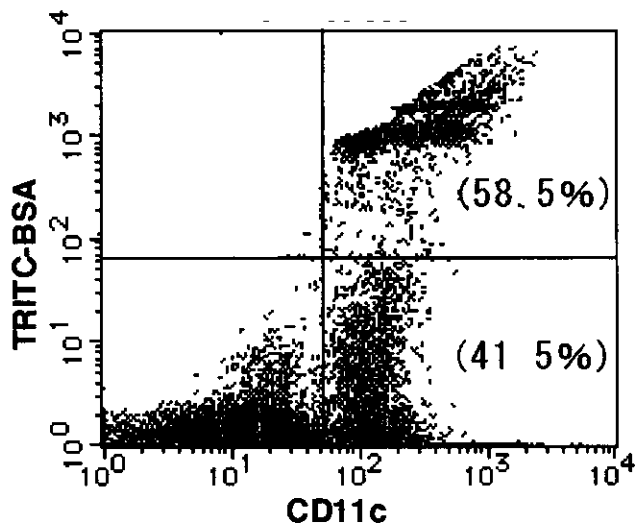


図5 骨髄細胞由来樹状細胞への M5-DPPE 被覆リポソームの取り込み

磁性鉄粒子を封入した M5-DPPE 被覆リポソーム (M5-ML)および未被覆リポソーム (ML) を骨髄細胞由来樹状細胞に加え、一定時間ごとに細胞内に取り込まれた鉄粒子を定量した。

M5-Liposome



Liposome

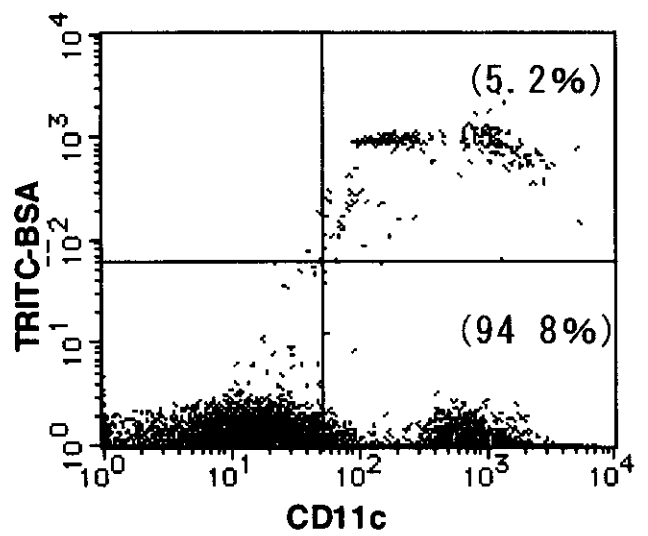


図6 腹腔細胞へのM5-DPPEリポソームの取り込み
蛍光標識 BSA (縦軸) を封入したリポソームをマウス腹腔に投与し、30 分後に腹腔細胞を回収し、CD11c 抗体 (横軸) で染色した。

HIV 脳炎発症病理に関する研究

分担研究者 佐多徹太郎 (国立感染症研 感染病理)

研究協力者 中島典子 岩田奈織子、佐藤由子 (国立感染症研 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、動物モデルである SIV 感染サル の剖検リンパ節および脳組織における SIV-DNA すなわち SIV プロウイルスの局在を laser-microdissection 法、PCR 法、免疫染色法を用いて検討した。また HIV 脳炎モデル となる *in vitro* 培養系をサル胎児由来の神経幹細胞を使用して開発することを試みた。

A 研究目的

AIDS 患者の 20% に合併する HIV 脳炎及び AIDS 痴呆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により将来の 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 脳炎て は、病理組織学的に Microglial nodule, Gliosis, Neuronal loss, Myelin pallor 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 られる多核巨細胞の存在で、これを MGC (multinucleated giant cell) とよんでいる。この MGC の存在が神経病理学的特異的所見といえる。

我々は高感度で特異性の高い新しい *in situ* hybridization 法である *in situ* Hybridization AT tailing-CSA (ISH-AT-CSA) 法を開発し ルーマニア小児 エイズ剖検脳及びリンパ節標本において免疫染色と ISH-AT-CSA 法との二重染色により感染細胞を同定し HIV のリザーバーの候補であるリンパ節標本に おいて臨床末期に HIV かどうかのような動態を示すか を考察した (昨年度までの報告)。

今年度は動物実験モデルである SIV 感染サル の剖検リンパ節において濾胞樹状細胞と SIV との関係 を microdissection 法を用いて検討した。また SHIV 感染 サルの剖検脳組織標本において ISH-AT-CSA 法で mRNA が検出されなかった非病変領域から SHIV-DNA が検出されるか解析した。さらに HIV 脳 炎モデルとなる *in vitro* 培養系をサル胎児由来の神 経幹細胞を使用して開発することを試みた。

B 研究方法

1 レーザーマイクロタイセクション (LMD laser-microdissection) 法

LMD 法は組織切片から特定の部位を単離回収て きる簡便な方法である。簡単に述べると、顕微鏡下 で細胞傷害性の少ない 337nm の UV レーザーにより 標的細胞群を切り取り、細胞 1000 個分を回収する。 一般にこの手法は癌病変の解析に用いられており 感染症の病理学的解析に使用している報告は少ない。

HIV 感染リンパ節の濾胞樹状細胞 (FDC) の関与 についてはいまだ一致した見解がえられていない。 そこで SIVsmE543 感染カニクイザルの PFA 固定パ ラフィン包埋リンパ節における SIV-DNA の局在を 調べた。すなわち FDC が存在する胚中心 (GC) 部

分とその周囲部分をそれぞれ LMD 法で回収し nested-PCR 法を用いて SIV-DNA (SIVsmE543 特異 的 nef primer 使用 122 bp) を検出した。

次に SHIV896 による脳炎アケザルのホルマリ ン固定パラフィン包埋脳組織標本においても同様な 解析をした。すなわち、MGC 部分 (病変部) と非病 変部 (神経細胞およびグリア細胞を含む) を LMD 法で切り取り nested-PCR 法を用いて SHIV-DNA (79 bp) を検出した。

2 サル胎児脳からの神経幹細胞の分離と培養

臨床検体やサルなど比較的大型の動物を用いた実 験系では標本の状態などいろいろと制約がある。そ こでサルの神経幹細胞を用いた新しい *in vitro* の脳 炎モデルがてきないか検討した。

在胎 6-8 週のカニクイザルの胎児を帝王切開し、 胎児脳を摘出した。線条体、海馬、中脳、脳室周囲 部分をミンチにして Neurosphere 法で神経幹細胞を 分離培養した。Neurosphere 法は EGF (上皮増殖因子)、 FGF-2 (線維芽細胞増殖因子)、LIF (白血球遊走阻 止因子) を含む無血清培地で培養すると他の primary cell は無血清のため死滅していくが、幹細胞は 1 週 間ほど球形の sphere を形成してくることを利用し た分離培養法である。神経幹細胞はこの状態で増殖 をすることかてきる。また増殖因子を取り除き、血 清を添加するとたたちに分化誘導される特徴を持つ。 サルの神経幹細胞についての報告はほとんどないの でまずその特徴を調べた。

- (1) 神経幹細胞に選択性の高いマーカーである 抗 Musashi1 抗体で胎児脳標本、幹細胞標本 を染色した。
- (2) 分化誘導後の細胞標本を神経細胞、アストロ サイト、オリゴデントロサイトのマーカーで 染色し、その割合を調べた。
- (3) 神経細胞への分化誘導がマウスの神経幹細胞 同様 BDNF、NT-3 添加により促進される か調べた。
- (4) GFP 遺伝子が nef の代わりに導入され VSVG で被われたニューロウイルスが感染 するか調べた。

C 研究結果

1 SIV 感染サルホルマリン固定パラフィン包埋リンパ節における SIV-DNA の局在

リンパ節の免疫染色および SIV-DNA 検出の結果

	胚中心	胚中心周囲
B 細胞(CD20)	+	+
T 細胞(CD3)	+	+
濾胞樹状細胞(CD35)	+	-
Macrophage(Mac387)	+	+
SIV-p27 抗原	++	+/-
SIV-nef-DNA (PCR)	-	+
SIV-gag-DNA (PCR)	+/-	+

上表にまとめたように SIVp27 抗原は胚中心部で優位に陽性であり、二重染色の結果、p27 陽性細胞は CD35 陽性細胞にほぼ一致していた。しかしながら SIV-DNA は胚中心よりもむしろ胚中心周囲から優位に検出された (図 2)。

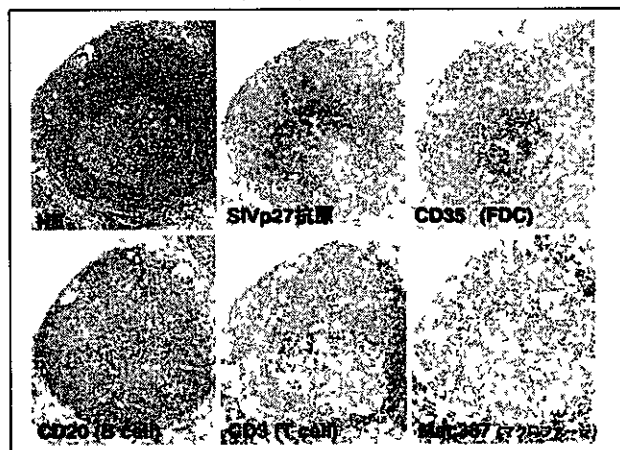


図 1 SIV 感染サルリンパ節の免疫染色

2 SHIV 脳炎サルホルマリン固定パラフィン包埋脳組織標本における SHIV-DNA の局在

前年度までに行った免疫染色および *in situ* hybridization の結果では、マクロファージに一致してシグナルが認められ、神経細胞やアストロサイト等、脳固有細胞には明らかなシグナルは検出されなかった。これらのシグナルは mRNA を意味し、SHIV-DNA を検出するにはさらに高感度の検出法を要する。今回マクロファージ、MGC 以外の神経細胞やアストロサイトが存在する非病変部分を *microdissection* 法により切り取り、proviral DNA を nested-PCR 法により検出したところ、病変部と同様に検出された。この結果は神経細胞やアストロサイトにも SHIV が感染するという報告と一致した。

3 サル胎児脳からの神経幹細胞の分離と培養 (HIV 脳症の *in vitro* 感染モデルの開発)

在胎 8 週のカニクイザル胎児脳の PFA 固定パラフィン包埋切片を神経細胞に選択性の高いマーカーの 1 つである抗 Musashi1 抗体で染色したところ、脳室

周囲の上皮細胞、脳室下層に存在する細胞が染まった。これはヒト、マウスの報告と同様であった。分離したサル神経幹細胞の細胞塊をハラフィン包埋した切片も抗 Musashi1 抗体で染まった。

サル神経幹細胞の増殖速度は分離後 3-4 週後に安定してきた (doubling time が 5-7 日) が 8-10 週あたりから増殖率が悪くなった。分離後 3-4 週経過した神経幹細胞を分化誘導し、5 日目に神経細胞 (Map2, Tuj1)、アストロサイト (GFAP)、オリゴデンドロサイト (O4) の割合をそれぞれの細胞マーカー (括弧内) で染色して調べた。蛍光顕微鏡下で、80% がアストロサイト、10-20% が神経細胞であった。分化時に BDNF 及び NT3 を添加すると神経細胞の割合が 30% に上昇した。

GFP 遺伝子が nef の代わりに導入され VSVG で被われたニュートウイルスを single round infection させるとほとんど全ての神経幹細胞が感染後 48 時間で GFP を発現した。FACS での解析結果では 90% の細胞で発現していた (図 2)。神経幹細胞を single cell にし、分化誘導と同時に GFP ウイルスを感染させた場合と分化後 5 日経過してから感染させた場合とは相違なかった。発現率の定量的な相違についてはまだ調べていない。一般に使用されている市販のレンチウイルスベクターを使用したときと比較すると発現効率は格段に優れていた。



図 2 GFAP (赤) 陽性細胞が GFP (緑) を発現している (黄色)。神経幹細胞に HIV-GFP を感染させ 5 日目。

D 考察

昨年度の研究で、AIDS 剖検リンパ節の濾胞内の CD21 陽性濾胞樹状細胞に一致して p24 抗原が検出されたものの、ISH-AT-CSA 法により HIV-mRNA は濾胞内には検出されなかったことを報告した。ISH-AT-CSA 法は proviral DNA を検出するほど感度は高くないのでこの CD21 陽性濾胞樹状細胞が HIV-DNA 陽性か否かについては検討できなかった。今年度、SIV 感染サルリンパ節を用いて、SIVp27 抗原陽性の濾胞樹状細胞 (サルでは CD35 陽性細胞) を含む胚中心部分を切り抜き SIV-DNA の検出をこ

ころみたところ、p27 抗原量に反して DNA はほとんど検出されなかった。これは濾胞樹状細胞が p27 陽性であるのは SIV 粒子を trap しているだけで、SIV を複製しているのではないことを示唆する。

ヒト HIV 脳炎の病態については、いまだ明らかな点が多い。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、疑問視されている。今回 MGC 以外の神経細胞やアストロサイトが存在する非病変部分からも proviral DNA が nested-PCR 法により検出された。神経細胞やアストロサイトが *in vitro* で restricted infection することと一致する。今後標本数をふやす、異なる primer で施行する、定量 PCR を行うなどさらに検討を要すると考えている。これらの脳固有細胞の HIV 感染に対する感受性についてはまだ明らかなてない。すべての脳固有細胞が同時に感染するのか、何らかの順番（前後関係）があるのかも不明である。剖検標本からは感染後おこったことの‘結果’のみしか解析できない。HIV 感染後の各細胞での HIV の動態や各細胞の分泌する多様な因子との関係を解析するには HIV 感染モデルとなる *in vitro* の培養系が必須である。

一般の primary cell culture と比較して神経幹細胞の特徴は、培養条件で増殖させることができること、3 種類の脳固有細胞からなる培養系に分化誘導できることである。また分化誘導時に添加する増殖因子によりこれらの細胞の割合を調節することが可能である。神経幹細胞は分離時期により性質が異なるが、我々は胎生 6-8 週のスル胎児脳を使用することにした。スルの神経幹細胞はマウスやヒトの神経幹細胞と同様の培養条件で培養可能であった。GFP 遺伝子が *nef* の代わりに導入され、VSVG で被われたシールドウイルスは 90% の効率で神経幹細胞に感染した。分化誘導前に感染させた細胞も分化誘導されかつ GFP の発現は持続していた。VSVG のかわりに種々の SIV, HIV の *env* を使用したときの GFP の発現をしらべるとともに CXCR4, CCR5 の発現を調べる予定である。

E 結論

LMD 法と nested-PCR および免疫染色法によりホルマリン固定パラフィン包埋切片中の SIV-DNA、HIV-DNA の局在を明らかにした。またスル神経幹細胞分離培養し、これに HIV ヘクターを用いて GFP を導入した。この神経幹細胞を用いた脳炎モデルを作製することを試行中である。

F 研究倫理

動物実験に関しては、当研究所動物実験委員会の許可のもとに行った。

G 研究発表

論文発表

- 1 Harada T, Tsunetsugu-Yokota Y, Koyanagi Y, Sata T, Kurata T, Kojima A Role of nucleotide

sequences in the V3 region for efficient replication of CCD5-utilizing human immunodeficiency virus type 1 in macrophages *Virology*, 2002, 299,192

- 2 Limon A, Nakajima N, Lu R, Ghory HZ and Engelman A Wild-type levels of nuclear localization and human immunodeficiency virus type 1 replication in the absence of the central DNA flap *J Virol* 2002, 76 (23),12078-86
- 3 Nakajima N, Ionescu P, Sato Y, Hashimoto M, Kuroita T, Takahashi H, Yoshikura and Sata T In situ hybridization AT-tailing with catalyzed signal amplification for sensitive and specific in situ detection of human immunodeficiency virus -1 mRNA in formalin-fixed and paraffin-embedded tissues *Am J Pathol* 2003, 162 (2) in press

G 知的所有権の取得状況

特になし。

サルエイズ脳炎発症モデルに関する研究

分担研究者	向井 鏡三郎	国立感染研・筑波霊長類センター	（室長）
研究協力者	佐多 徹太郎	国立感染研・感染病理部	（部長）
	菊池 俊彦	国立感染研・筑波霊長類センター	（協力研究員）
	石川 智美	国立感染研・筑波霊長類センター	（実習生）

研究要旨 世界的なエイズの蔓延とともに発症の予防 治療法の開発が待たれている。HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy) 療法を行っても、エイズ脳炎の発症を見る場合があり、患者のQOLの観点からもその発症機構の解明は必須である。

T 細胞指向性 SIVmac239 接種によってエイズ脳炎を発症したカニクイザル脳組織から、モノサイト系 SIV 産生細胞株 2 株 (BM1、BM5) を樹立した。この BM 細胞株の諸特性と BM 細胞が由来したサル脳炎組織の病理組織学的解析結果とを合わせて考察することにより、SIV を産生する BM 様細胞の集簇巣が脳血管周囲に形成されることがエイズ脳炎発症病因の一つであるという可能性を示唆してきた。BM 細胞 2 株が産生する SIV (SIVbm1, SIVbm5) の全塩基配列の解析の結果、SIVbm5 が Mφ・神経細胞指向性の変異の一部を獲得していたのに反し、SIVbm1 にはいずれの変異も認められなかった。SIVbm1 と SIVbm5 はサル Mφ や神経細胞(アストロイト)に指向性があり、2 ウイルス株とも野生型 (SIVmac239) に無い共通の表現形を持つ。そこで、Mφ 中枢神経指向性に関連している DNA 配列部位を特定するため、SIVbm 2 株と野生型 SIVmac239 のキメラウイルスを作成し、その指向性について細胞レベルで解析を行った。その結果、SIVbm1 と SIVbm5 の Mφ・神経細胞指向性は共に env 領域の *SphI* と *NheI* 断片 (~2.2Kb) により担われていることが明らかになった。

A 研究目的

世界的なエイズの蔓延とともに最近ではアジア、アフリカ大陸にもその流行がみられ、HIV の感染予防とともにエイズ発症の予防・治療法の開発が待たれている。

最近、開発された新しいプロテアーゼ阻害薬等が HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy) 療法に加えられ、患者の延命を期待できるようになったが、リポジストロフィー

など薬物の副作用が問題となっている。また、投薬により、中枢神経系、脳脊髄液中のウイルス量を低下させる薬剤は AZT と我々の報告した 6-Cl-ddG を含めてもまだ少ない (1-5)。エイズ脳炎・痴呆症は HIV 感染者のうち約 30%に見られ HIV 感染に特徴的である。従って、サルエイズ脳炎発症モデルの開発とその発症機構の解明は、HIV 感染とその予防にとって重要な意義をもつ。

T細胞指向性 SIVmac239 接種によってエイズ脳炎を発症した2頭のカニクイザル脳組織から、モノサイト系 SIV 産生細胞株2株 (BM1、BM5) を樹立した。このBM細胞2株はいずれもMφ様細胞表面抗原及びMφ、モノサイト系エステラーゼを持ち、CD4 陰性で SIV を産生する無限増殖性細胞である (図1)。このBM細胞の諸特性とBM細胞が由来したサル脳炎組織の病理組織学的解析結果とを合わせて考察することにより、SIVを産生し且つ増殖マーカーであるPCNA抗原やKi67抗原をもつBM様細胞の集簇が脳血管周囲に形成されることがエイズ脳炎発症病因の一つであるという作業仮説を立てている。

一方、BM細胞2株が産生するSIV(SIVbm1、SIVbm5)の全塩基配列の解析の結果、SIVbm5がMφ・神経細胞指向性の変異の一部を獲得していたのに反し、SIVbm1にはいずれの変異も認められなかった (図2)。SIVbm1とSIVbm5はサルMφや神経細胞(アストロサイト)に指向性があり、2ウイルス株とも野生型(SIVmac239)に無い共通の表現型を持つ。

本年度は、Mφ 中枢神経指向性に関連しているDNA配列部位を特定するため、SIVbm2株と野生型SIVmac239のキメラウイルスを作成し、その指向性について細胞レベルで解析を行うことを目的とした。

B 研究方法

SIVmac239との組換え感染性SIVの作成

BM細胞2株からゲノムDNAを調製し、*EcoRI*で完全消化した後、Lambda EMBL4ベクターの*EcoRI*サイトに挿入したものをLambda Packaging Extractを用いて組換えファージを調製した。目的のSIVbm全長遺伝子を含むファージはAmersham/PharmaciaのECL検出系を使用したSIVmac239由来*env*、*gag*プロンプを用いてブランクハイブリダイゼーション法によりスクリーニングした。組換えファージの確認は、LambdaファージのDNA

を調製後、制限酵素地図作製により行い、最終的には全塩基配列決定により目的クローンの確認を行った。一方、得られたλSIVbm1とλSIVbm5クローン及びSIVmac239の*env*領域には保存された*SphI*、*SpeI*、*Clal*、*NheI*、*NdeI*等の制限酵素サイトがあるので (図3)、λSIVbm1やλSIVbm5の*env*領域の*SphI*サイトを起点に長いもの (*SphI*から*NdeI*まで) から短いもの (*SphI*から*SpeI*まで) をSIVmac239の相当するサイトに挿入したキメラウイルスを作成した。これらのDNAは293T細胞にトランスフェクトし、培養上清中のウイルスをそのままPhenotype試験に用いた。

組織培養及びPhenotype試験

脳組織由来細胞株BM1細胞株、BM5細胞株の培養には通常のRPMI培地と6穴平底プレートを用い、培地は3日毎に交換した。また、BM細胞により産生されたSIVは培地交換後35日目に培養上清を回収しウイルス(SIVbm1、SIVbm5)として使用した。

SIVmac239株の増殖およびウイルスのTCID₅₀は常法に従ってCEMx174細胞株を用いて求めた。その他のウイルス(SIVbmやキメラウイルス)は他の宿主細胞を用いることなくRT(逆転写酵素)活性をSIVmac239に合わせて、細胞に感染させた。また、ウイルス感染は、SIVmac239とCEMx174細胞株の組み合わせで、moi 0.3で感染させ、3日毎に培養上清を回収した後、よく懸濁後2/3量の培地を細胞と共に廃棄し交換した。

サル肺胞MφはFoamyウイルス、CMVの感染のないアカゲザルの肺の洗浄により得た細胞を、10%ヒトAB血清、5%FCSを含むRPMI1640培地と48穴プレートを用い、48日間培養した。アストロサイトの分画は正常カニクイザルの解剖時の大脳皮質の一部をGillesら(J Neurovirol 6 173-186, 2000)の方法を用いて調製した。アストロサイトへのウイルス感染は27日間継続観察した。各種ウイ

ルスの各種細胞における増殖は、培養上清中 S I V の逆転写酵素活性を測定し、市販のリコンビナント H I V 逆転写酵素を用いて標準化して定量した。また、産生ウイルスのピーク付近や、産生ウイルスの初期の立ち上がりの時期の確認には p27ELISA (p27 core antigen capture assay kit, Coulter) を用いた。

S I V ゲノム遺伝子塩基配列は、独自にデザインしたプライマーによる P C R 産物を T A クローニングし、1回の P C R 反応あたり、3~5 クローンの塩基配列を確認して決定した。塩基配列決定に用いた機種は Li-COR Sequencer である。

(倫理面への配慮)

本研究は、国立感染症研究所動物実験委員会による審査の結果承認を受けた。また、研究の実施にあたっては、筑波医学実験用霊長類センター諸内規、作業方式に従って繁殖育成サルを用い、動物に与える苦痛の軽減と排除に勤めた。

C 研究結果

λSIVbm1 および λSIVbm5 の作成

BM 細胞2株からゲノム DNA を調製し、*EcoRI* で完全消化した後、Lambda EMBL4 ベクターの *EcoRI* サイトに挿入した DNA を Lambda Packaging Extract と混合して組換えファージを調製した。目的の SIVbm 全長遺伝子を含むファージは λ SIVbm1 の場合約 550,000 プラークをスクリーニングして1個のクローンが得られたが、λ SIVbm5 の場合には約 12,000 プラークの中に1個検出できた。

塩基配列解析により、得られた λ SIVbm1 と λ SIVbm5 全長感染性クローンの配列は昨年度報告のものの一部異なるが、λ SIVbm1 には *env* 領域の V1 に 9 個、V4 領域に 18 個の連続した in frame 欠失が、また λ SIVbm5 には V4 領域に 21 塩基の連続した in frame 欠失が認められた。これら DNA はそのまま、もし

くは *EcoRI* で Lambda EMBL4 ベクターから切りはずして 293T 細胞にトランスフェクトし、培養上清中に入 SIVbm1 と λ SIVbm5 ウイルスを回収した。ウイルスの回収率を DNA のモル数を合わせて比較したところ、EMBL4 ベクターがない DNA の方が 10 倍程度多いウイルスが回収できた。このモノクローンウイルスの Phenotype に関し、BM 細胞が産生する SIVbm1、SIVbm5 と質的に同様であった。

SIVmac239 とのキメラ感染性 SIV の作成による神経細胞指向性領域の特定

得られた λ SIVbm1 と λ SIVbm5 クローン及び野生株 SIVmac239 の *env* 領域には保存された *SphI*, *SpeI*, *Clal*, *NheI*, *NdeI* 等の制限酵素サイトがある (図 3)。組換えウイルス作成のため、λ SIVbm1 と λ SIVbm5 の *SphI* サイトから *NdeI* サイトまでの 3.5Kb 断片をそれぞれ切り出し、pBR322 プラスミドよりも Low copy Number プラスミドである pMW118 に挿入し、サブクローン DNA を得た。その後、*SphI* と *SpeI* 断片、*SphI* と *Clal* 断片、*SphI* と *NheI* 断片という風に *SphI* サイトを起点にして 0.6Kb から 3.5Kb までの λ SIVbm1 と λ SIVbm5 の *env* 領域の断片 8 種を調製し、pBR322 上の SIVmac239 の該当する *env* 領域への組換え SIV を作成した。それぞれ

SIVbm1 SS, SIVbm1 SC, SIVbm1 SN, SIVbm1 SNd, SIVbm5 SS, SIVbm5 SC, SIVbm5 SN SIVbm5 SNd とした。作成した組換え SIV を調製し、サル肺胞 Mφ とアストロサイトに感染させ、継時的に培養上清を採取しウイルス産生量を定量した。その結果、2 株のウイルス共に 2.2Kb の *env* 領域が野生型 SIVmac239 に挿入されたときに初めてサル肺胞 Mφ とアストロサイトで増殖可能となった (図 4)。従って、既知の変異が存在しない SIV bm1 の Mφ・Neuro-tropism はこの 2.2Kb 領域に起因することが明らかになった。SIVbm SN より長い 3.5Kb の SIVbm 由

来 *env* 断片が挿入された SIVbm SNd にも Mφ と神経細胞指向性がみられた。

D 考察

λSIVbm1 および λSIVbm5 の作成

BM 細胞のゲノム DNA を鋳型に、Long PCR 法を用いて得られた DNA 断片をプラスミドに導入する試みを幾度も行ったが、組換えプラスミドを大腸菌で増殖させる時に、プラスミド内に欠失が生じるという失敗を何度か経験した。プラスミドを pBR322 プラスミドよりも Low copy Number プラスミドである pMW118 に交換しても、SIVbmDNA への欠失は発生した。野生株である SIVmac239 の場合は、問題なく Midium copy Number プラスミドである pBR322 に挿入出来るし、プラスミドを増殖させる宿主大腸菌を吟味しなくても 37°C の培養条件で、欠失も変異も認められなかった。今回完全長の SIVbm1 と SIVbm5 遺伝子の Cloning に成功したのは入ファージベクターを採用したことによるものと思われる。実際野生株 SIVmac239 の *env* 領域の場合は遺伝子配列決定のための組換え体作成は容易であるが、我々の SIVbm 2 株の *env* 領域の場合は非常に困難であった。米国のグループが SIV を含む数種のレンチウイルスにおいて、*env* 領域の 5' 上流に大腸菌体内で Promoter となりうる塩基配列があり、mRNA を介して *env* 領域が蛋白を合成してしまうという報告をしている (Gene 124, 93, 1993)。従って、SIVbm の *env* 領域が大腸菌にとって毒性の蛋白を合成してしまうことは可能である。一方、入ファージベクターに組換えられた SIVbm 株の *env* 領域は入ファージにとっては不要な領域にあり、約 15 分間の間に数千個の progeny ファージを生産する大腸菌体内では SIVbm 株の *env* 領域は発現しても少量であり、毒作用があったとしても十分に作用する前に宿主大腸菌が溶菌してしまうので、組換え DNA が安定に生産される

のかも知れない。いずれにしても、待望の全長遺伝子 SIVbm 感染性クローンが作成できた。

また、SIVbm1 と SIVbm5 とを特徴づける *env* 領域の連続した in frame 欠失が認められたことは、BM 細胞が産生する SIVbm の代表的なウイルスのうちの 1 クローンを得たものと考えられる。現在、このクローン SIV の病原性を検討するため、サルでの感染実験を行っている。

SIVmac239 とのキメラ感染性 SIV の作成による神経細胞指向性領域の特定

λSIVbm1 と λSIVbm5DNA が BM 細胞が産生する SIVbm の genotype と Phenotype を保有することと、その DNA が欠失や変異なく安定して調製可能になったため、野生型 SIVmac239 との種々の組換えキメラウイルスを作成することが可能になった。

野生型にない Phenotype の原因遺伝子領域の特定を目的として、8 種類のキメラウイルスを作成した。サル肺胞 Mφ とアストロサイトを用いた感染実験からは、*SphI* と *NheI* 断片の 2.2Kb の領域が Mφ・Neurotropism にとって必須であることが明らかになった。このことはこれら Phenotype には点突然変異のみではなく、点突然変異を含むかなり広い領域が立体構造として必要であることを示唆している。現在数カ所に点突然変異を導入してその効果を検討している (図 3)。

また、BM 細胞の成因を考える上で、重要となるのは CD4 分子が BM 細胞に認められないことである。SIVbm が感染した後に、CD4 が Down Regulate された可能性と、2nd Receptor のみで SIVbm が感染し得た可能性が考えられる。SIVbm の 2nd Receptor の使用に関しては、現在調査中である。

E 結論

λSIVbm1 および λSIVbm5 の作成

入ファージベクターを採用したところ、2株のBM細胞のゲノムDNAより完全長のSIVbm1とSIVbm5遺伝子のCloningに成功した。λSIVbm1とλSIVbm5遺伝子の293T細胞へのトランスフェクションにより回収したSIVbm1とSIVbm5のウイルスはBM1とBM5細胞が産生するSIVbmと同様の指向性(Mφとアストロサイトに感染・増殖)を持っていた。

SIVmac239 とのキメラ感染性 SIV の作成による神経細胞指向性領域の特定

λSIVbm1とλSIVbm5クローン及び野生株SIVmac239のenv領域に保存された制限酵素サイトを用い、肺胞Mφとアストロサイトに感染・増殖できないSIVmac239にSIVbmの遺伝子を挿入した組換え体をMφとアストロサイトに感染させることにより、SIVbmのenv領域内のSphI, NheI間の2.2Kb遺伝子断片がMφ・Neuro-Tropismを担うことが明らかになった。

F 研究発表

1 論文発表

1)Fuji,Y, Mukai,R, Murayama, Y, Akari,H, Machida, M, Mori, K, Takasaka,M, Murakami,K, and Yoshikawa,Y Efficacy of 6-chloro-2',3'-dideoxyguanosine(6-Cl-ddG) on an ARC/AIDS rhesus macaque (*Macaca mulatta*) infected with simian immunodeficiency virus

Exp Anim 46 83-87, 1997

2) Otani I, Fuji,Y, Akari, H, Mukai,R, Mori K, Ono,F, Kojima,E, Machida,M, Murakami,K, Doi,K, Yoshikawa,Y Effectsof 6-chloro-2',3'-dideoxy guanosine (6-Cl-ddG) in surface lymph nodes of rhesus mon-keys (*Macaca mulatta*) chronically infectedwith simian immunodeficiency virus (SIVmac239)

J Veternary Med Sci 59 891-896, 1997

3) Otani I, Fuji,Y, Akari, H, Mukai,R, Mori K, Ono,F,Kojima,E, Machida,M, Murakami,K,Doi, K,Yoshikawa,Y Effectsof 6-chloro-2',3'-dideoxy guanosine (6-Cl-ddG) in surface lymph nodes of rhesus mon-keys (*Macaca mulatta*) chronically infectedwith simian immunodeficiency virus (SIVmac239)

J Veternary Med Sci 59 891-896, 1997

4) Fuji,Y,Mukai,R, Murayama, Y, Akari,H, Machida,M, Mori,K, Takasaka,M, Murakami,K, and Yoshikawa,Y Efficacy of 6-chloro-2',3'-dideoxyguanosine(6-Cl-ddG) onrhesus macaque chronically infected with simian immunodeficiency virus (SIVmac239)

J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retro-virol 16 313-317, 1997

5) Fuji,Y, Mukai,R, Akari,H,Machida,M, Mori,K, Takasaka, M, Kojima, E Murakami, K, and Yoshikawa, Y Antiviral effectsof 6-chloro-2',3'-dideoxy guanosine (6-Cl-ddG) in rhesus monkeys acutely infected with SIV

Antiviral Chem & Chemother 9 85-92,1998

2 学会発表

1)菊池俊彦、石川智美、宮崎 均、佐多徹太郎、向井鏖三郎 Cloning and Analysis of Neurotropic SIV。

第25回日本分子生物学会(横浜)2002年

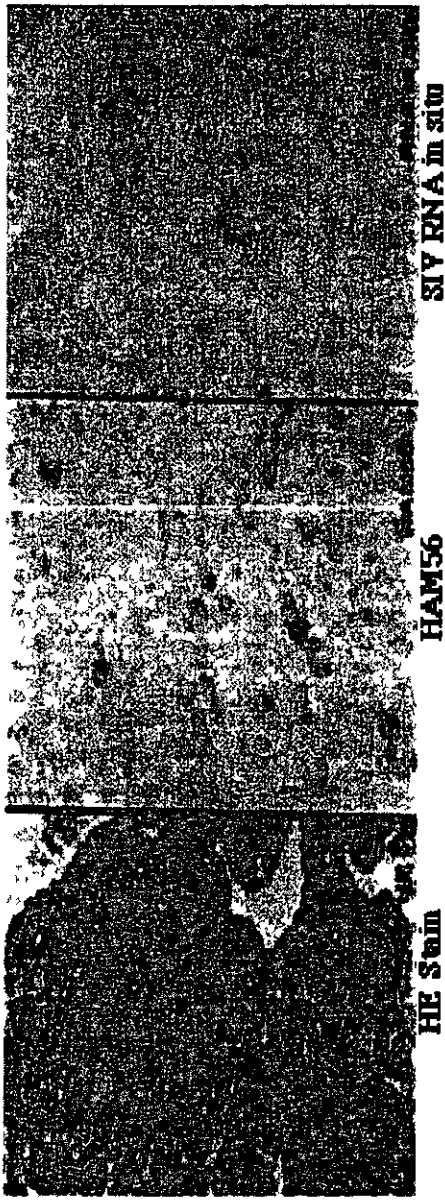
2)中山大介、向井鏖三郎、石川智美、橋 罔臣、梅田 衛、本田徹朗、高宗暢暁、三隅将吾、庄司省三 Chemokine receptor CCR5-CXCR chimera 抗原に基づいた conformation specific 単クローン抗体の免疫学的諸性質の検討 16回日本エイズ学会(名古屋)2002

G 知的所有権の所有状況

- | | |
|-----------|-------|
| 1. 特許取得 | 申請準備中 |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

☒ 1

Simian AIDS with Encephalopathy (Macrophage nodules in Brain Cortex) and BM Cell lines



【Brain tissue Pathology with Encephalitis】

- SIV producing cells in the Nodule around Blood vessel
- M φ Marker + , Proliferating Ag (PCNA +, Ki67 +)

【 BM cells (Brain monocyte like cells) 】

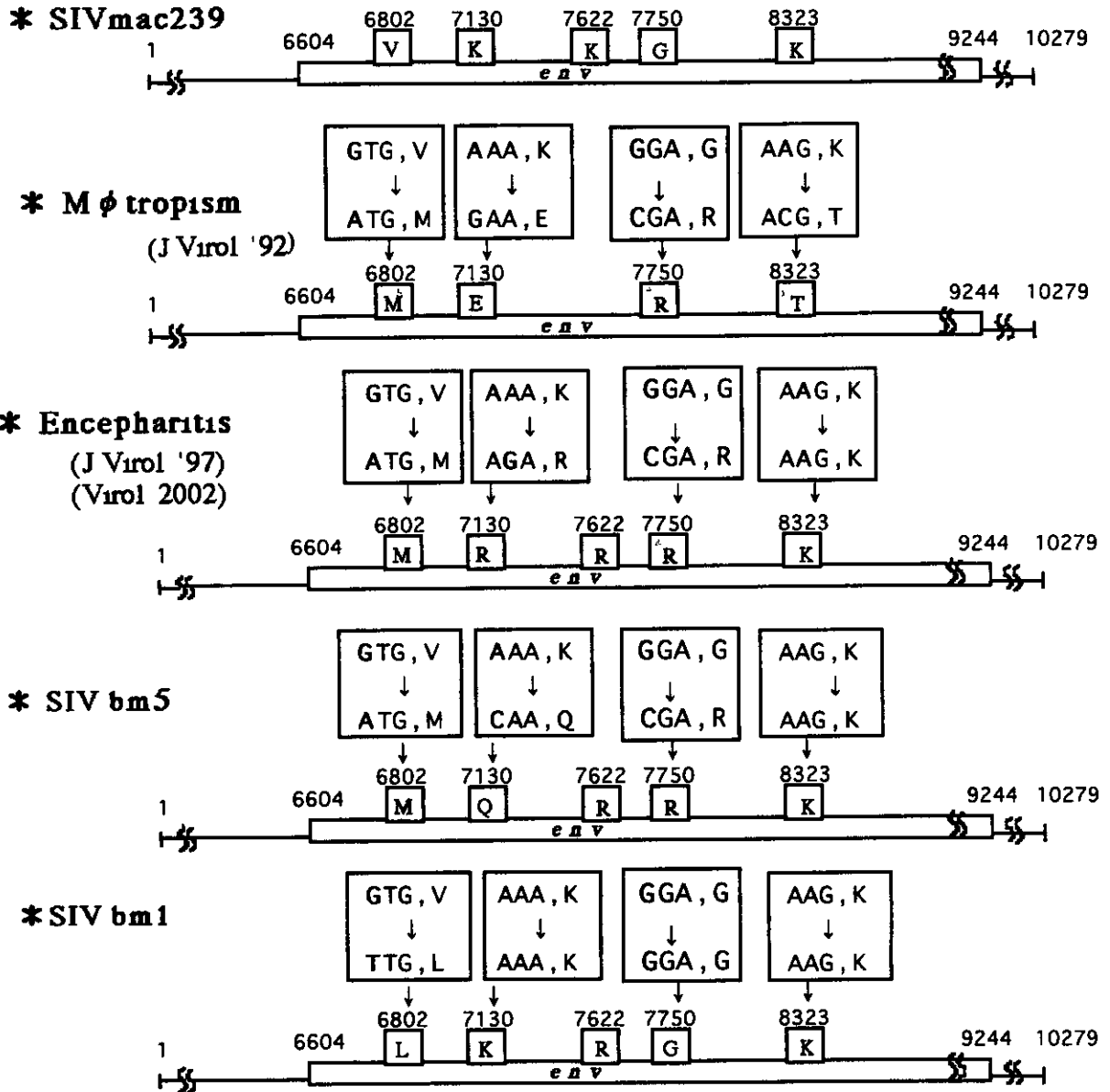
- Immortalized
- Monocytic Surface antigen + and Esterases +
- CD4 - , infectious SIV production



BM1 cell line (x 100) BM5 cell line



Amino acid changes in env region of SIV for M ϕ tropism and Neuro-tropism



J Virol 66, 2067 '92
 J Virol 71, 5790 '97
 Virol 297, 57, 2002
 SIV bm5
 SIV bm1

Specific mutations for macrophage-tropis
 Neurovirulent molecular clone of SIV17E-Fr
 Single Encephalitis cell RT-PCR (SIVmac239)
 Mutations in SIV bm5
 Mutations in SIV bm1

3 Chimera Constructs from Wild type and Mutant Neuro-Tropic SIV

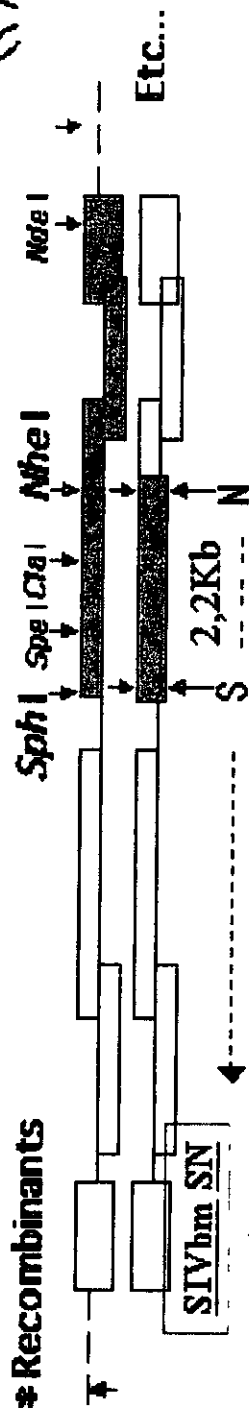
* Wild type SIV_{mac239} : Non- M ϕ / Non- Neuro Tropic



* Mutant SIV_{bm1} & bm5 : M ϕ / Neuro Tropic



* Recombinants



• Transformation on 293T cells to get the viruses.

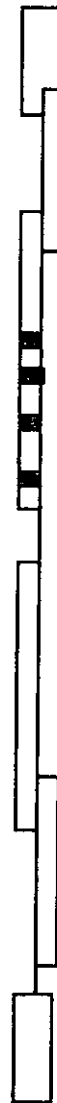
In vitro
assay

• Infect monkey Alveolar M ϕ and Astrocytes.

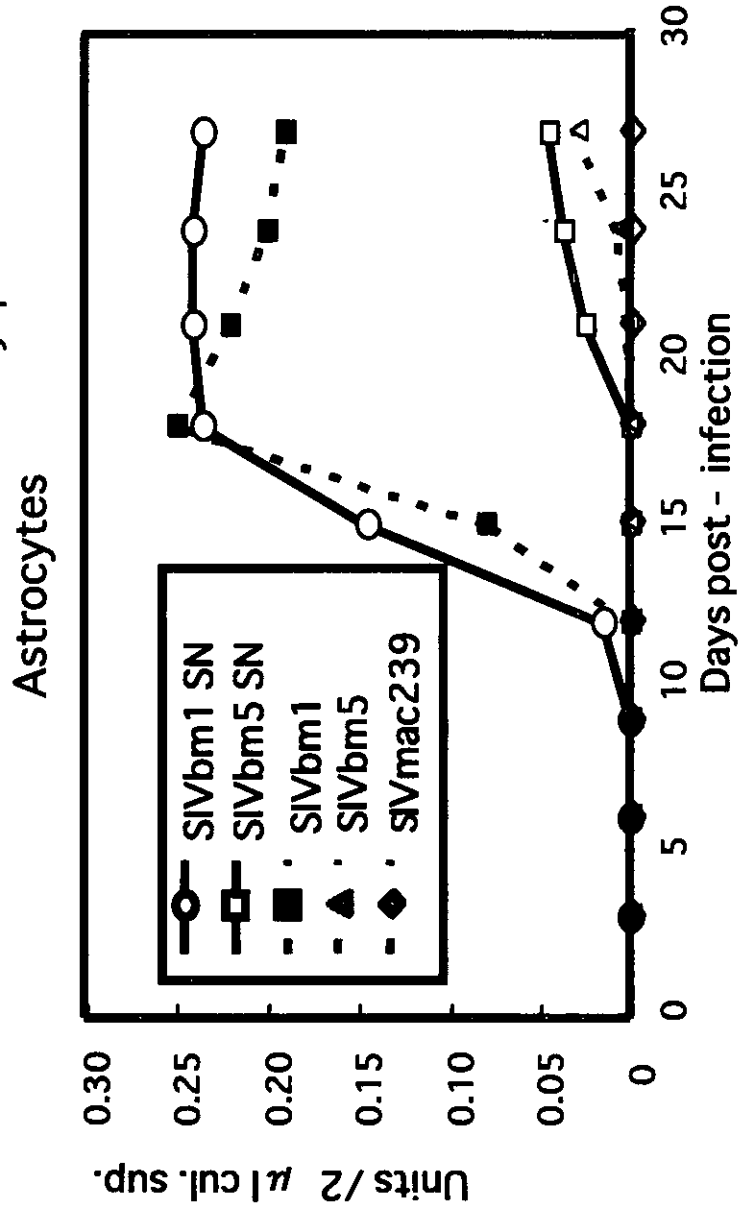
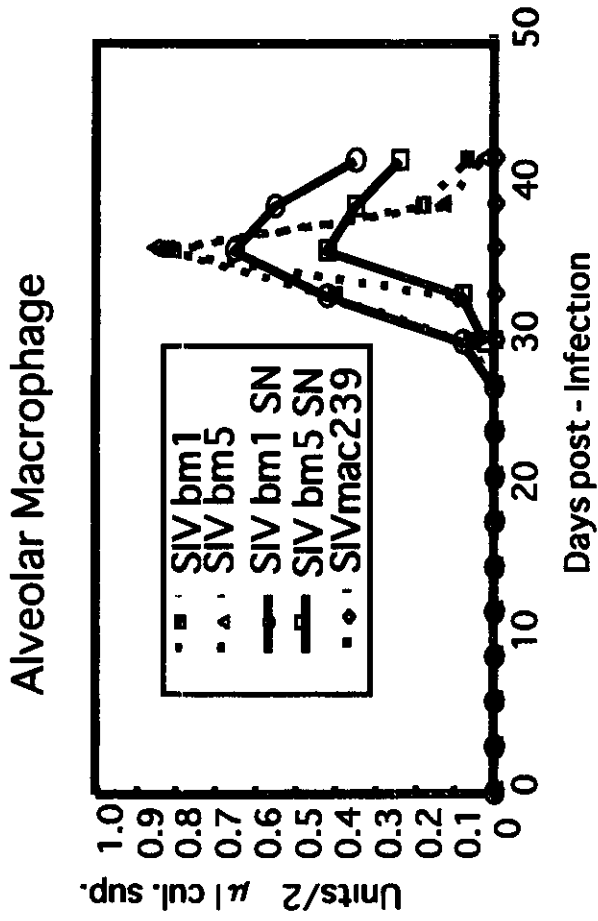
• Check Cul.sup RT- activities for the phenotypes.

* Point mutations

M D S R



4



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 医歯学総合研究科 教授）

研究要旨 一般に、急性ウイルス感染からの回復には細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を中心とする T 細胞性免疫が重要な役割を果たす。これは CTL が感染細胞を特異的に殺すことによりウイルス産生が絶たれるためである。急性 HIV-1 感染においてもウイルス血症は HIV-1 特異的 CTL の出現とともに鎮静化される。しかし、そのウイルス抑制機序が果たして細胞傷害であるかどうかには疑問がある。我々は、無症候 HIV-1 感染者 (AC) の CD8+T 細胞が MHC-I 拘束性および非拘束性の HIV-1 抑制効果を持つことを報告してきた。昨年までの研究で、AC 由来 CD8+細胞の HIV-1 感染末梢血単核細胞 (PBMC) に対する細胞傷害性は HIV-1 Nef による MHC-I 発現抑制のため減弱するにもかかわらず、HIV-1 抑制能は Nef の有無により影響されないことが分かった。従って、CD8+細胞による HIV-1 抑制は主に MHC-I 非依存性の機能によると考えられる。本年度は、HIV-1 特異的細胞傷害機能の非存在下でも CTL が HIV-1 抑制能を示し得るかどうかを調べるため、非感染健常者から HIV-1 とは無関係のアロ特異的 CD8+CTL を樹立し、HIV-1 感染自己 PBMC のウイルス産生に対する影響を見た。その結果、この CTL は R5 あるいは X4 HIV-1 株の急性感染に引き続くウイルス産生を著明に抑制した。さらに、CTL と HIV-1 感染自己 CD4+PBMC を混合培養した後 CD8+細胞を除き刺激を加えると HIV-1 の産生が回復した。このことは、CTL が HIV-1 特異性とは無関係に HIV-1 抑制能を持ち、しかも抑制を受けた感染細胞は培養中で生存しており、その HIV-1 複製は CTL 除去により可逆であることを示している。これは、無症候 HIV-1 感染者由来 CD8+細胞の HIV-1 抑制現象に酷似している。これらの観察から、我々は、感染者の HIV-1 特異的 CD8+CTL はウイルス産生を抑制できるが、その機序は主に CTL の抗原非特異的な HIV-1 抑制機序によるものであると考察する。これは、HIV-1 に対する宿主防御機構の本質が他のウイルスと根本的に異なることを示しており HIV-1 持続感染機序の一つを説明するとともに、メモリー CTL を誘導するだけのワクチンでは HIV-1 からの防御に不十分であることを示唆する。

A 研究目的

HIV-1 急性感染からの回復期にはウイルス量は減少し、その後、持続感染状態へ移行する。無症候 HIV-1 感染者 (AC) 由来 CD8+細胞 (AC-CD8+) は試験管内で HIV-1 産生を抑制するため、急性感染からの回復および無症候期の維持を担う宿主防御機構と考えられている。本研究の目的はこの CD8+細胞による抑制活性の本質を突き止め、HIV-1 感染症における役割を明らかにするとともに感染防御や治療ワクチンへの応用可能性を追求するものである。

昨年度は、AC-CD8+細胞の HIV-1 抑制が MHC-I 非拘束性であり、Nef による MHC-I 発現低下の影響も少ないことから、MHC-I 非依存性な機序が多分に関与することを示した。CTL の抗原特異的細胞傷害は MHC-I 依存性である。従って CD8+細胞による MHC-I 非依存性の HIV-1 抑制には HIV-1 抗原認識

は必須でないことが示唆された。そこで本年度は、HIV-1 特異的細胞傷害活性の影響なしに MHC-I 非拘束性の HIV-1 抑制活性を見るため、健常人由来のアロ特異的 CTL を作成し、HIV-1 感染自己末梢血単核球 (PBMC) に対するウイルス抑制への影響を調べた。

B 研究方法

1) 健常人由来抗原特異的 CD8 陽性 CTL 株の樹立

健常人 PBMC をマイトマイシン C 処理した Raji 細胞で刺激しアロ特異的に増殖する細胞群から CD4+細胞を除去し IL-2 依存性の CD8+細胞株を樹立した。この細胞株の表面抗原は FACS で、抗原特異性は 51Cr 遊離法による細胞傷害活性と 3H-thymidine 取り込みによる細胞増殖能で検定した。CTL 株の維持には IL-2 存在下で定期的に Raji 刺激を加えた。

2) PBMC への HIV-1 感染

CTL 誘導に用いたのと同ドナー由来の PBMC から付着細胞を除去し PHA 刺激後 1 週間 IL-2 存在下で培養し、実験前に抗ヒト CD8 抗体結合イムノビーズを用いて CD4+ 細胞分画を得た。これらの細胞に X4 HIV-1/NL4-3 あるいは R5 HIV-1/NFN-SX 株を 2 時間感染させ、洗浄後様々な数の CTL とともに IL-2 添加培地で培養した。

3) HIV-1 産生抑制の検定

上記 CD8+CTL と HIV-1 感染自己 CD4+PBMC との混合培養の上清を 4 日後にハーベストし、その中に含まれる HIV-1 p24 量を ELISA により調べた。

4) 長期混合培養からの CTL の除去

CD8+CTL により抑制された感染 PBMC の HIV-1 複製が可逆であるかどうかを調べるため、CTL と HIV-1 感染自己 PBMC を 7 日間混合培養した後、イムノビーズにより CD8+細胞を除去し、その後培養を 3 分割し、何も添加しないか、ブドウ球菌毒素 SEB あるいは新たに準備した PHA 刺激 CD4+PBMC を添加した。IL-2 存在下でさらに 1 週間培養し上清中の HIV-1 p24 量をモニターした。

C 研究成果

1) CD8+CTL の特異性

マイトマイシン処理 Raji 細胞で繰り返し刺激し IL-2 存在下で培養した非感染者由来の CD8 陽性細胞株は Raji 細胞を加えると著明に増殖し thymidine 取り込みも亢進した。また、これらの CD8 陽性細胞株は 51Cr 標識した Raji 細胞に対して著明な細胞傷害性を示すが、自己由来の EBV トランスフォーム B 細胞株には反応しなかった。従って、樹立された細胞株はアロ特異的な細胞傷害性 T 細胞 (CTL) であり、自己細胞に対しては傷害性を持たないことが分かった。

2) アロ特異的 CD8+CTL による自己 PBMC に対する HIV-1 産生抑制

次に、この CTL 株と同ドナー由来の自己 CD4+PBMC に HIV-1 を感染させたものを、CTL と混合培養した (図 1)。その結果、X4 株 NL4-3 感染の場合も R5 株 NFN-SX 感染の場合も HIV-1 産生が抑制された (図 2)。PHA 刺激した同じドナー由来の CD8+PBMC を加えた場合にはこのような顕著な HIV-1 抑制は認められなかった。また、自己 CD4+PBMC を HIV-1 感染後数日間培養した後 CTL と混合培養しても、HIV-1 産生の抑制が認められた。従って、アロ特異的 CTL は HIV-1 感染自己 PBMC に対してウイルス抑制活性を示し、その抑制には X4 株あるいは R5 株 HIV-1 の違いに影響されず、ま

た急性感染系でも持続感染系でも有効であった。

3) CTL による HIV-1 感染細胞傷害の関与

アロ特異的 CTL は自己細胞に対して抗原特異的な傷害性を示さないはずであるが、HIV-1 感染によって PBMC が CTL 感受性となる可能性を考慮し、感染 PBMC に対する細胞傷害性を次のようにして検討した。HIV-1 感染自己 CD4+PBMC を CTL の存在下あるいは非存在下に 6-12 時間培養し上清中に遊離した p24 量を ELISA 法で測定した。培養全体を融解したサンプルの p24 量を 100% とし、CTL を含まないサンプル上清中の自発 p24 量を 0% とした。この結果、6 時間のアッセイでは有意な細胞傷害性は認められなかったが、12 時間のアッセイでは弱い傷害性が認められた。この傷害性は Fas ligand 中和抗体を加えると消失したため Fas ligand による非特異性 killing によるものと考えられた。しかし、CTL と HIV-1 感染自己 PBMC を数日間混合培養した際に認められる HIV-1 産生抑制は Fas L 中和抗体の存在の有無に影響されなかった。従って、Fas L 依存性の bystander killing も一部に存在するものの、CTL の HIV-1 抑制機序の本質では無いと考えられた。

4) CTL による HIV-1 抑制の可逆性

CTL の感染 PBMC に対する HIV-1 抑制が細胞傷害性に因らないのであれば、抑制は可逆である可能性がある。これを試験管内で検証するため、アロ特異的 CTL と HIV-1 感染自己 CD4+PBMC を 7 日間混合培養した後 CD8+細胞を除去した。この後、CD8+除去細胞培養中の HIV-1 p24 量の増加は SEB の添加時に顕著となった (図 3)。また、新たに準備した PHA 刺激自己 CD4+PBMC を加えた場合にも HIV-1 産生は著明に増加した。しかし、CD8+細胞除去直後に CTL を加え戻した場合には、SEB 添加あるいは CD4+PBMC 添加を行っても HIV-1 増殖は抑制されたままであった。

D 考察

本年度は、HIV-1 特異的 CTL 活性の影響無しに、MHC-I 非拘束性の HIV-1 抑制活性を調べるため、HIV-1 とは無関係の特異性を持つ CTL を用いた。その結果、CTL は HIV-1 感染細胞に対して抗原非特異的に HIV-1 抑制効果を示すことが分かった。これは、AC-CD8+細胞に認められる MHC-I 非依存性 HIV-1 抑制に相当することが示唆される。しかし、PHA 刺激 CD8+細胞には HIV-1 抑制活性が乏しいことから、抗原特異的 CTL に特有の活性と考えられる (data not shown)。

AC末梢血中のCD8陽性CTLの多くはHIV-1特異的CTLであることから、これらが効果細胞である可能性が高い。つまり、HIV-1特異的CTLはHIV-1産生を抑制することによって宿主防御に貢献するが、その抑制機序はHIV-1特異的細胞傷害とは異なると考えられる。

1986年に米国のLevy博士らが、HIV-1キャリアの末梢血PBMCからCD8+細胞を除去すると、HIV-1複製が試験管内で再開することを示し、この現象がCTLによる細胞傷害とは異なると報告した。今回の我々の実験では、HIV-1と無関係のCTLによりLevyらの観察と類似の現象が再現された。従って、HIV-1キャリアのPBMC培養に認められるCD8+細胞によるHIV-1抑制は、CTLのHIV-1非特異的なHIV-1抑制で説明できる。

この現象はまた、CTLが複製可能なウイルスを保持した感染細胞を温存することをも意味する。これは、HIV-1NefのMHC-I発現抑制のため、感染PBMCがCTLの攻撃を免れるという報告と一致する。生体内でどの時期のどの細胞がこのようなCTL半抵抗性の状況にあるかは推察の域を出ないが、HIV-1持続感染の機序の一つであると考えられる。

急性感染からの回復期には、他のウイルス感染症と同様HIV-1量は減少する。しかし、この機序にもCTLの非特異的HIV-1抑制が関与しているとすれば、他のウイルスに対する防御機構とは大きく異なることになる。一般に宿主防御としてのワクチンの主目的はメモリーCTLを誘導することである。しかし、HIV-1に対するCTLの機能が感染細胞の傷害でないのであればHIV-1に対するワクチンの焦点を考え直す必要がある。今後、有効なワクチン開発のためには、メモリーCTLの誘導だけでなく恒常的なCTL活性化(弱毒化生ワクチンである程度達成されているような)を図る必要がある。また、CTLによるHIV-1抑制の責任分子の同定は今後の感染防御対策に応用可能であり重要な課題である。

E 結論

CD8+CTLが抗原特異性と無関係にPBMCのHIV-1抑制を持つことが分かった。Fas Lによる非特異的細胞傷害も一部に認められた

が、HIV-1抑制の機序の大部分はnon-cytolyticであり、PBMCのHIV-1複製はCTL除去後可逆であった。以上の観察は、無症候HIV-1キャリアのCD8+細胞の持つHIV-1抑制能に類似の機序によっておこることを示唆する。

F 研究発表

1 論文発表

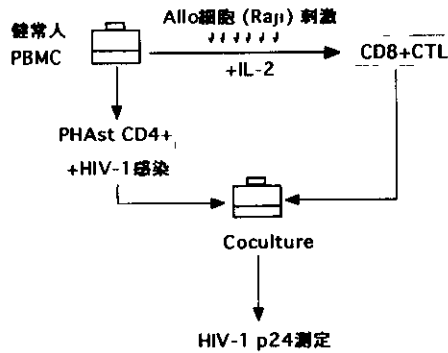
- i) Huining Liu, Takashi Ohashi, Takao Masuda, Xin Zhou, Makoto Kubo, Mari Kannagi Suppression of HIV-1-replication by HIV-1-irrelevant CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes through Fas ligand-mediated cytolysis and noncytolytic mechanisms resulting in preservation of persistently HIV-1-infected cells in vitro Paper submitted 2002
- ii) A Hasegawa, T Ohashi, S Hanabuchi, H Kato, F Takemura, T Masuda, and M Kannagi Expansion of human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) reservoir in orally infected rats Inverse correlation with HTLV-I-specific cellular immune response J Virol, in press 2003

2 学会発表

- i) CD8陽性CTLのHIV-1感染における役割 神奈木真理 第16回エイズ学会シンポジウム、H14年11月、名古屋
- ii) Allo-specific CTL suppress replication of R5 and X4 HIV-1 in autologous PBMC Huining Liu, Takashi Ohashi, Xin Zhou, Takao Masuda, Makoto Kubo, Mari Kannagi 第50回ウイルス学会、H14年10月、札幌
- iii) CTL-mediated suppression of HIV-1 replication irrelevant of antigen-specificity 劉慧寧、大橋貴、Zhou Xin, 久保誠、増田貴夫、神奈木真理 第16回エイズ学会、H14年11月、名古屋
- iv) 健常人由来末梢血細胞を用いたZ-100の抗HIV作用機序の検討。江森豊、栗本忠、Zhou Xin, 大橋貴、増田貴夫、神奈木真理 第32回免疫学会H14年12月、東京

図 1

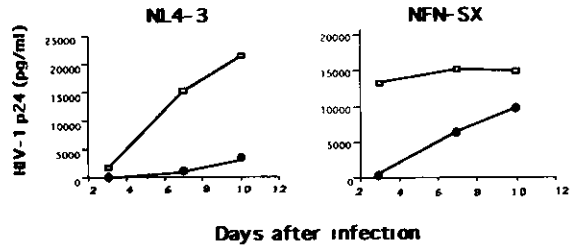
Allo特異的CD8+ CTL によるHIV-1抑制実験系



健康人由来 PBMC を Raji 細胞で刺激しアロ特異的 CD8+CTL 株を誘導した。同一ドナーの PHA 刺激 CD4+PBMC に HIV-1 を感染させ、CTL と混合培養した後、上清中の HIV-1p24 量を測定した。

図 2

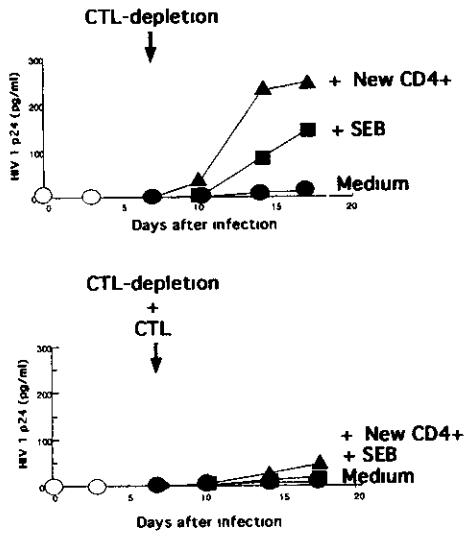
アロ特異的CTLによるHIV-1抑制
(HIV-1感染自己CD4+ PHA-blastに対して)



健康人由来アロ特異的 CD8+CTL 存在下 (●) あるいは非存在下 (□) で、HIV-1 感染自己 CD4+PBMC を CD8/CD4 比=9 で培養し、上清中の HIV-1p24 量を経時的に測定した。

図 3

Reversible HIV-1 replication following
CD8+ CTL-depletion from coculture
with HIV-1-infected CD4+ PBMC



健康人由来アロ特異的 CD8+CTL 存在下 (○) で、HIV-1 感染自己 CD4+PBMC を 7 日間培養した後、CD8+細胞を除去し SEB 又は新しく調整した PHA 刺激自己 CD4+PBMC を添加し更に培養し HIV-1p24 産生量を測定した (上図)。下図は、CD8+細胞除去直後に CTL を加え戻した場合。

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 部長

研究要旨 らい菌は代表的病原性抗酸菌であるか、ヒトに感染後宿主の液性免疫応答能は保持したまま、細胞性免疫応答を低下させる特徴を有する。しかし、これまでにその詳細な機序は明らかにされていない。本研究では、らい菌由来免疫抑制性分子の同定を目的とし、HIV-1 感染者における細胞性免疫が関与した日和見感染機構の解析を目指した。らい菌菌膜由来 α -crystallin (ACR) は、DC からの II-12p70 の産生および DC の成熟化を抑制し、T 細胞の抗原特異的免疫応答能を減弱させた。しかし、T 細胞のマイトゲンやアロ抗原に対する反応性に対しては影響を与えず、さらに免疫調整性サイトカイン IL-10 の産生あるいは DC のアポトーシスなどは誘導しなかった。抗酸菌由来分子として、抗原提示細胞に直接的に働き、免疫抑制効果を発揮する分子はこれまでに報告されていないため、HIV-1 感染者の日和見感染を制御する上で重要な知見が得られた。

A 研究目的

HIV-1 感染者の日和見感染症として抗酸菌感染症は重要な位置を占める。特に、らい菌は宿主の液性免疫応答能を保持したまま、病原体に対する細胞性免疫応答を減弱させる作用を有している。従って、免疫学的に日和見感染症としての抗酸菌感染症を解明する上で重要な位置をしめる。しかし、これまでに抗酸菌をコートする分子として、PGL-1 抗原が報告されているか、PGL-1 は主に T 細胞に作用すると考えられていて、抗原提示細胞の機能を直接的に抑制する分子はこれまでに同定されていない。そこで、らい菌がコートする免疫抑制分子を同定し、HIV-1 感染者の日和見抗酸菌感染機構ひいてはワクチン開発を考察するための知見を得ることを目的とした。

B 研究方法

正常健常者末梢単球を得て、リコンヒナント GM-CSF および IL-4 を用いて樹状細胞(DC)を分化誘導した。らい菌(Tha1 53株)はヌートマウスを用いて増殖させヒースヒーダーと超遠心機を用いて、細胞壁・細胞膜・細胞質分画に分離精製した。これら、らい菌分画の中で最も抗原性に富んでいる菌膜に着目し、らい菌感染者血清を用いてウエスタンブロッティングを行ない数本のハントを得た。これらのハントを抽出

した後、N 末端-アミノ酸シーケンスを行ない、既報のらい菌ゲノムシーケンスと照合して α -crystallin (ACR) を同定した。抗原パルス DC の細胞表面の解析は FACS caliber を用いて行なった。抗原パルス DC の細胞性免疫誘導能(抗原提示能)は、自己 T 細胞の増殖応答およびサイトカイン産生能で解析した。サイトカインの定量には ELISA 法を用いた。

倫理面への配慮 国立感染症研究所倫理委員会の審査を受け、以下の通り行った。血液トナーのプライハノ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、研究者はト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、さらに拒否し得ることを説明した上で理解(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

精製した ACR の抗原性、すなわち細胞性免疫誘導能を検索するため、ACR を DC にパルスしたのち T 細胞を刺激したところ、T 細胞の増殖応答およびサイトカイン産生は全く誘導されなかった。そこで、らい菌由来抗原性タンパク(らい菌菌膜)および

抗酸菌非関連抗原(OVA)の T 細胞活性化に対する影響を調べるため、DC に ACR およびこれらの抗原をパルスし、その抗原提示能を検索した。ACR 非パルス、抗原パルス DC は自己の CD4 陽性および CD8 陽性 T 細胞を刺激し、IL-2 および IFN- γ の産生を誘導した。しかし、ACR を同時に DC にパルスすると上記抗原によって誘導されるサイトカイン産生は 90%以上抑制された。ACR は細胞性免疫応答を抑制する働きを有していることが判明した。ついてその機序を解明するため ACR の T 細胞、DC および DC-T 細胞相互作用に及ぼす影響を検討した。PMA プラス ionomycin は、抗原提示細胞非存在下に T 細胞を活性化することか知られる。そこで ACR の T 細胞への作用を検討したか、T 細胞のマイトゲン反応性は抑制されなかった。次いで、DC と T 細胞の相互作用を検討した。DC は allogenic T 細胞および抗原特異的 T 細胞の活性化を誘導する。DC とこれら T 細胞を細胞外 ACR 存在下で混合培養したか、T 細胞の活性化は抑制されなかった。最後に DC に及ぼす ACR の影響を検討したところ ACR は抗原刺激および CD40 リガンド刺激で誘導される DC の IL-12 産生能を著しく低下させた。また ACR は DC の成熟化に伴い細胞表面での発現を増強する MHC クラス I の発現を著しく抑制し、また CD86・CD80 CD54・CD58・CD40 抗原の発現を減弱させた。しかし、らい菌菌膜を DC にパルスした後、DC 表面に発現するらい菌由来分子の発現は ACR によって阻害されなかった。今後、ACR が誘導する DC の機能低下に関わる分子機構の解析が必要であるか、ACR は DC の抗原提示能を低下させる可能性が示唆された。

D 考察

らい菌は宿主の細胞性免疫応答能を抑制する特徴を有する代表的な病原性抗酸菌であり、エイズの日和見感染症を考える上で極めて有用なモデルである。本研究事業の中で、我々はこれまでにらい菌の菌壁に存在するらい菌特異抗原 PGL-I は DC の細胞表面に発現し、T 細胞と DC の相互作用を抑制することで T 細胞の活性化を抑制することを明らかにしてきた (Infect

Immun 70 5167-5176, 2002)。本年度の研究では細胞性免疫を抑制する第二の分子として α -crystallin (ACR) が重要な役割を果たす可能性を明らかにした。ACR は、PGL-I 抗原とは異なり DC 内で作用し、T 細胞の活性化に重要な働きをする DC 上の分子の発現あるいは産生を抑制すると想定された。従来、抗酸菌は、抗原提示細胞に感染しファゴソームを形成しライノソームとの融合 (P-L fusion) を抑制することで生体防御反応を抑制することか知られているか、ACR は抗酸菌由来タンパクあるいは第三者 (非抗酸菌由来) 抗原の抗原提示細胞への取り込みおよびプロセッシングを抑制するものではなく、従来報告されている機序と異なった機構により DC の機能を抑制すると考えられた。その代表的な作用でこれまでに明らかになっている点は、DC からの IL-12p70 (bioactive form) の産生抑制と DC 表面への MHC クラス I 抗原の発現抑制である。IL-12p70 は T 細胞のタイプ 1 T 細胞への分化および活性化を誘導する上で極めて有用なサイトカインであるため、IL-12p70 の産生が抑制された点は、細胞性免疫を賦活する上で重要な知見と考えられた。MHC クラス I は CD8 陽性 T 細胞を活性化し、抗ウイルス細胞性免疫応答を賦活する上で重要である。ACR が DC の MHC クラス I 抗原の発現を抑制した点は、HIV-1 の感染者における日和見感染を考察する上で重要であると思われる。

E 結論

抗酸菌菌膜に存在する α -crystallin (ACR) は生体内で最も有能な抗原提示細胞である樹状細胞の T 細胞活性化能を抑制する分子として同定された。抗酸菌の有する細胞性免疫抑制機構を担う分子と想定された。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

1 論文発表

- 1) Kawamura, M, T Naito, M Ueno, T Akagi, K Hiraishi, I Takai, M Makino, T