

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

平成 14 年分担研究報告書

エイズ発症阻止に関する研究

免疫共刺激分子 OX40-OX40L と HIV-1 感染

分担研究者 田中勇悦 琉球大学医学部附属沖縄・アジア医学研究センター 教授

研究要旨

活性化 CD4+T 細胞に新たに発現する OX40 は、DC やマクロファージ等の抗原提示細胞上、特殊な場合は、HTLV-I 感染細胞上の OX40L と相互作用し、細胞の活性化、分化成熟、増殖に重要な役割を果たすことが明らかになってきた。この OX40 シグナルは、抗原特異的 CD4+T 細胞の NF-kappa B を活性化およびアポトーシス阻止分子である Bcl-XL や Bcl-2 を発現させる。その結果、CD4+T 細胞には増殖促進、長期メモリー T 細胞としての生存、および免疫抑制解除が観察される。日本において OX40/OX40L の HIV-1 感染に及ぼす影響を研究することは、HTLV-I と HIV-1 の重感染対策においても重要なテーマである。さらに、OX40/OX40L 機能破綻は種々の自己免疫疾患にも関係するので、HIV-1 感染において OX40/OX40L 反応がどのような役割を果たすのかを *in vitro* で検討した。その結果、OX40 からのシグナルは HIV-1 潜伏感染 CD4+細胞を活性化し HIV-1 の産生を促進するが、炎症性サイトカインである TNF との相乗作用によって細胞死を引き起こす場合があることが分かった。細胞死は急速なアポトーシスによるものであり、その結果、HIV-1 潜伏感染細胞からの HIV-1 産生が急激に減少した。この現象は細胞レベルでの新たな抗 HIV-1 生体防御機構の一つと考えられる。

A 研究目的

HIV-1 は、増殖の場として活性化 CD4+細胞を必要とする。CD4+T 細胞が特異的抗原を認識して活性化状態になるには、抗原提示細胞からの共刺激 (costimulation) シグナルが必要である。代表的な共刺激分子とそのリガンドとして CD28/CD80-CD86 および CD40/CD40L の組み

合わせが知られているが、最近 OX40/OX40L が注目されている。活性化 CD4+T 細胞に新たに発現する OX40 と DC やマクロファージ等の抗原提示細胞上の OX40L との相互作用は、お互いの細胞にシグナルを伝達し、細胞の活性化、分化成熟、増殖に重要な役割を果たすことが明らかになってきたからである。OX40 からのシグナルは、抗原特異的 CD4+T 細胞にアポトーシス阻止分子である

Bcl-XL や Bcl-2 を発現させ、その結果、CD4+T 細胞の増殖促進やトランス解除に働く。対照的に HIV-1 感染は CD4+T 細胞を枯渇させるが、OX40/OX40L が HIV-1 感染病態にどのような影響を与えるのか未だ十分には解明されていない。

OX40L は、HTLV-I 感染細胞上に選択的に発現する細胞膜抗原として田中らが見つけた抗原であり、HTLV-I の腫瘍関連抗原 tax により発現が誘導される。また、HTLV-I 感染細胞上には OX40 も発現することから OX40/OX40L の反応は HTLV-I の腫瘍化にも何らかの役割を持つと考えられる。日本における HTLV-I のキャリアは、100 万人以上と推定されており、OX40/OX40L の HIV-1 感染に及ぼす影響を研究することは、HTLV-I と HIV-1 の重感染対策においても重要なテーマである。さらに、OX40/OX40L 機能破綻は種々の自己免疫疾患にも関係していることも示唆されていることから、HIV-I 感染において OX40/OX40L 反応がどのような役割を果たすのかを検討した。

## B 研究方法

遺伝子トランスフェクションにより OX40 と OX40L を定常発現する細胞株を作製した。HIV-1 潜伏感染した T 細胞である ACH-2 細胞および単球系細胞株 U1、HIV-1 産生 T 細胞株である Molt-4/IIIB、にもそれぞれ OX40、OX40L を導入した。これらの細胞を種々の組み合わせと種々の培養条件下で混合培養し、HIV-1 産生を p24-ELISA 定量法で、死細胞をエオシン Y 色素取り込

みで、アポトーシスをアネキシン V/PI 染色法でモニターした。反応の特異性は抗 OX40 および抗 OX40L 特異的単クローン抗体による阻止効果で判定した。また、アゴニスティンクな機能をもつ抗体での刺激も試みた。

実験材料の性格上、倫理の配慮は特に問題ないと考えられる。

## C 研究結果

OX40L 発現細胞、TNF- $\alpha$  または TNF- $\beta$  で刺激すると、OX40 を発現させた HIV-1 潜伏感染 T 細胞株の ACH-2/OX40 細胞、HIV-1 潜伏感染単球系細胞株の U1/OX40 細胞および HIV-1 産生的感染細胞の Molt-4/IIIB/OX40 からの多量のウイルス産生が誘導された。OX40L 発現細胞による反応は、抗 OX40L 抗体で有意に阻止された。HIV-1 産生誘導されたこれらの細胞は徐々に死滅した。

興味あることは、上記の OX40 発現細胞に OX40L による刺激と TNF- $\alpha$  または TNF- $\beta$  による刺激を同時に作用させると、予想に反してウイルス産生は逆に抑制されたことである。顕微鏡下では、この二重刺激によって OX40 発現細胞の急激な死滅が観察された。アネキシン V/PI 染色により、ACH-2/OX40 は TNF または OX40L 単独刺激でも緩慢なアポトーシスを起したが、両刺激では急速に（9 時間以内でほぼ 100%）アポトーシスに陥ることが明らかとなった。つまり、ウイルス産生が始まる前に細胞がアポトーシスを起したのである。このよう

な細胞自殺によるウイルス産生抑制は、X4 HIV-1 NL4-3 株を急性感染させた Molt-4/OX40 細胞でも同様に観察された。

このような細胞死に HIV-1 が関与するかどうかを調べるために、OX40 を導入した HIV-1 非感染細胞株について、OX40L および TNF の同時刺激を与えて細胞死が誘発されるかを検討した。Molt-4, CEM, Jurkat 細胞は、両刺激により 3~6 時間位から細胞死が観察され、24 時間後にはほとんどの細胞が死滅した。緩慢ではあるが、U1 細胞の親株である U937 細胞、別の単球系細胞株 THP-1 でも両刺激により細胞死が誘発された。この条件下における Molt-4 細胞の細胞死は、カスパーズ阻害剤 Z-VAD-FMK により解除された。以上の結果により、OX40L および TNF の同時刺激は、HIV-1 産生非依存性に種々の細胞株をアポトーシスに導くことが分かった。

PBMC を IL-12 または IL-4 存在下で固相化 OKT-3 抗体で活性化すると CD4+T 細胞は OX40 を発現してくるが、IL-12 で刺激した方、つまり Th1 環境の CD4+T 細胞により高い OX40 発現が観察される。この細胞群に OX40L 陽性細胞を添加すると細胞膜表面のアネキシン V 染色度が有意に増加した。しかし、細胞増殖には明らかな影響は見られなかった。

#### D 考察

今回の研究によって、OX40/OX40L 反応が、ある条件下ではアポトーシス誘導に関与するという重要な事実を見いだした。

その結果、HIV-1 潜伏感染細胞は HIV-1 産生が起こる前に死滅した。つまり、OX40 刺激の効果は、細胞を共刺激し HIV-1 感染を促進させる面と、急速な細胞死を導き HIV-1 産生を抑制する面を持つことが初めて明らかにされた。

本研究でのアポトーシスの観察は、細胞株における特殊な環境下での観察なので、実際に活性化 PBMC において OX40 シグナルが細胞死を誘発するのかを、種々の条件下でさらに追及する必要がある。また、ヒト PBMC を移植した hu-PBL-SCID マウス個体ではどうなのかも研究すべきテーマである。さらに、HTLV-I 感染が OX40/OX40L システムをより強力に動かすことか考えられることから、HTLV-I と HIV-1 重感染を解析するモデル動物作製を急ぐべきであると考える。現在のところ、私たちの研究グループは、hu-PBL-SCID マウスに HTLV-I 感染細胞を接種することにより、マウス体内でヒト T 細胞に HTLV-I 感染させる系を作出した。また予備実験ではあるが、この HTLV-I 感染マウスでは R5 HIV-1 の感染が抑制されることを示すデータを得ている。

上記のように OX40 のシグナルは、TNF からのシグナルと相乗的に働き細胞死を促進させたが、他のアポトーシス誘発シグナルである Fas からのシグナルに OX40 がどのように働くのか未だ解明されておらず、今後明らかにする価値がある。また、正常な T 細胞でも刺激を繰り返すことにより OX40L を発現する事実を観察しており(田中ら、論文作成中)、T 細胞間の OX40/OX40L

相互反応、および OX40L 側からのシグナル伝達が HIV-1 感染に与える影響についても解析してゆきたい。

#### E 結論

OX40 からのシグナル伝達は CD4+T 細胞の活性化を促進するが、HIV-1 非依存性に単独、または TNF との相乗作用によって細胞死を引き起こす場合があることが分かった。細胞死は急速なアポトーシスによるものであり、その結果、HIV-1 潜伏感染細胞の細胞死が誘発された。HIV-1 感染において、これらの HIV-1 抑制現象は細胞レベルでのエイズ発症に対する生体防御機構の一つと考えられる。

#### F 健康危険情報 特になし

#### G 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) Mori N, Yamada Y, Ikeda S, Yamasaki Y, Tsukasaki K, Tanaka Y, Tomonaga M, Yamamoto N, and Fujii M Bay 11-7082 inhibits transcription factor NF-kappaB and induces apoptosis of HTLV-I-infected T-cell lines and primary adult T-cell leukemia cells Blood, 100(5) 1828-1834, 2002
- (2) Wang X, Miyake H, Okamoto M, Saito M, Fujisawa J, Tanaka Y, Izumo S, and 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, 61(6) 1359-1365, 2002

- (3) Mori N, Fujii M, Hinz M, Nakayama K, Yamada Y, Ikeda S, Yamasaki Y, Kashanchi F, Tanaka Y, Tomonaga M, and Yamamoto N Activation of cyclin D1 and D2 promoters by human T-cell leukemia virus type I tax protein is associated with IL-2-independent growth of T cells Int J Cancer, 99(3) 378-385, 2002
- (4) Satoh M, Toma H, Sugahara K, Etoh K, Shiroma Y, Kiyuna S, Takara M, Matsuoka M, Yamaguchi K, Nakada K, Fujita K, Kojima S, Horii E, Tanaka Y, Kamihira S, Sato Y, and Watanabe T Involvement of IL-2/IL-2R system activation by parasite antigen in polyclonal expansion of CD4(+)25(+) HTLV-1-infected T-cells in human carriers of both HTLV-1 and S. stercoralis Oncogene, 21(16) 2466-2475, 2002
- (5) Goon PK, Hanon E, Igakura T, Tanaka Y, Weber JN, Taylor GP, and Bangham CRM High frequencies of Th1-type CD4(+) T cells specific to HTLV-1 Env and Tax proteins in patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis Blood, 99(9) 3335-3341, 2002
- (6) de Jong EC, Vieira PL, Schuitemaker JHN, Tanaka Y, Wierenga EA,

Yazdanbakhsh M, and Kapsenberg ML  
Microbial compounds selectively induce  
Th1 cell-promoting or Th2 cell  
promoting dendritic cells in vitro with  
diverse Th cell polarizing signals J  
Immunol 168 1704-1709, 2002  
2 学会発表

- (1) Tanaka Y, Yoshida A, Tanaka R,  
Nakamura M, and Yamamoto N Induction  
of a protective immune response against  
R5-HIV-1 in hu-PBL-SCID mice by  
immunization with autologous mature  
dendritic cells pulsed with  
inactivated HIV-1 第14回 国際エイ  
ズ学会議 2002 7月7日-12日 スペ  
イン バルセロナ
- (2) 田中勇悦, 田中礼子, 中村正孝,  
山本直樹 T細胞補助刺激分子 OX40 を介  
する HIV-1 増殖促進と制御 第50回日  
本ウイルス学会学術集会 2002 10月16-18  
日 札幌
- (3) 栗原清, 増田貴夫, 朝長万左男,  
宇都宮興, 増田昌夫, 田中勇悦, 神奈木  
真理 成人 T細胞白血病細胞の短期培養  
による HTLV-I および costimulatory 分  
子の発現誘導 第50回日本ウイルス学  
会学術集会 2002 10月16-18日 札幌
- (4) 高橋良明, 吉田篤司, 田中礼子,  
山本直樹, 田中勇悦 T細胞補助刺激 TNF  
受容体ファミリー分子 OX40 の HIV-1 感  
染促進と制御 第16回日本エイズ学会  
学術集会 2002 11月28-30日 名古屋
- (5) 高橋良明, 吉田篤司, 田中礼子,

中村正孝, 田中勇悦 T細胞補助刺激分  
子 OX40 を介する T細胞の凝集とアポト  
ーシス誘導 第32回日本免疫学会学術集  
会 2002 12月4-6日 東京

- (6) 馬場英司, 森崎隆, 山本直樹, 菅  
村和夫, 田中勇悦, 片野光男 可溶性  
OX40 分子のリガンド依存性細胞間移動  
の検討 第32回日本免疫学会学術集会  
2002 12月4-6日 東京
- (7) 田中勇悦, 高橋良明, 吉田篤司,  
田中礼子 活性化ヒト T細胞における機  
能的 OX40L 発現 第32日本免疫学会学  
術集会 2002 12月4-6日 東京
- (8) 栗原清, 長谷川温彦, 原嶋奈々江,  
大橋貴, 増田貴夫, 田中勇悦, 神奈木真  
理 成人 T細胞白血病細胞の短期培養に  
よる HTLV-I および costimulatory 分子  
の発現誘導 第32回日本免疫学会学術  
集会 2002 12月4-6日 東京
- (9) 吉田篤司, 高橋良明, 田中礼子,  
田中勇悦 hu-PBL-SCID マウスにおける  
ヒト型抗 HIV-1 免疫応答の誘導 第31  
回日本免疫学会学術集会 2001 12月  
11-13日 大阪

## 厚生科学研究費「エイズ発症阻止に関する研究」班 平成 14 年度報告

分担研究者 小柳津 直樹

所属施設 東京大学医科学研究所 付属病院検査部病理

### 1 研究目的

本年度の研究目的は、HAART 療法後のリンパ節局所における免疫機能病理解析を通してその免疫再構築過程がどのように展開されるかを *in situ* において解析、もって免疫再構築制御機構の実態解明に寄与する知見を得ることにある。

背景 HAART 療法により HIV 増殖が抑制されると末梢血 CD4T 細胞数増加を指標とする免疫再構築が観察される。その構成は比較的早期（開始後 1 - 2 ヶ月以内）に末梢血に出現するメモリー T 細胞分画および 3 ヶ月以降に末梢血で観察されるナイーブ T 細胞分画の増加、の 2 群に大別される。その機序として前者は末梢リンパ装置に（抗原やケモカインの作用により留め置かれた）“trapped cell”の末梢循環への再配分“redistribution”，後者は胸腺よりの T 前駆細胞の末梢への供給増加、の機序が提唱されている。前者についてはその実体についての証左に乏しく、また後者についてはその可能性を示唆する証左はいくつか報告されているが加齢による胸腺機能の生理的低下、また胸腺摘出を受けた患者においてもこの再構築が観察されることから第 3 の供給源の存在が示唆されている。しかしながらこれらの可能性はいずれも末梢血を用いた間接的解析であるため HAART 療法後、実際にリンパ節局所においてどのような変

化が展開されているかについての情報は極めて乏しい。

### 2. 研究方法（倫理面への配慮）

解析対象とした標本は東京大学医科学研究所附属病院感染症内科で HAART 療法開始約 1 ヶ月後にリンパ節局所において採取された 43 歳男性のリンパ節生検標本。この間に血漿ウイルスコピー数は 41 000 copy/ml から 2,400 copy/ml へと減少し、また末梢血 CD4T 細胞数は 24 / $\mu$ l から 119/ $\mu$ l へと増加している。この被検検体に加え癌転移検索用に摘出されたリンパ節をコントロールとして用いた。いずれの標本も診断目的のため患者の同意を得て採取されたものであり倫理面での問題はない。

ホルマリン固定、ハラフィン包埋、薄切標本に対し酵素抗体法による免疫染色を試み解析した。免疫染色内容は各種リンパ球表面マーカーに加え BCG（抗酸菌検出用）、granzyme, K-67（細胞周期関連抗原）染色も実施した。また TUNEL 法によりアポトーシス細胞の検出も試みた。組織標本の TUNEL 染色陽性コントロールとして Fas 抗体処理 Jurkat 細胞を組織ブロックとした標本を用いた。

連続切片を用いて各種染色を施し定量的解析にあたっては同一視野を限定しマイクロ

メーターを装着した顕微鏡下で陽性細胞を計測した。

### 3 研究結果

当該リンパ節の基本所見 標本の約 10%の領域において乾酪壊死が形成され同部のみに BCG 陽性細胞および抗酸菌を検出する。周辺部には類上皮細胞結節が形成されまた密にリンパ球が分布する。リンパ球構成細胞の 75%は CD3 陽性 T 細胞であり CD79 陽性 B 細胞はおよそ 20%で濾胞構造をとり中心部に CD21+濾胞樹状細胞を観察、胚中心は圧排縮小している。辺縁部に形質細胞が分布、リンパ球のおよそ 5%程度を占めている。類上皮細胞部に加えリンパ節全体に CD68+のマクロファージが分布するまた CD57+NK 細胞も有意に増加して存在している。全体として細胞性免疫の作動が強く示唆されるリンパ節である。

CD4 CD8T 細胞の分布について CD4/CD8 の 2 重染色にて解析したその構成比はおよそ 2 3で CD8T 細胞優位な存在を示した。正常リンパ節 T 細胞領域の CD4 CD8T 細胞の構成比は末梢血と同じく 2 1 程度であるが当該リンパ節は 10x17mm と腫大しており CD4T 細胞実数は明らかに増加している。

アポトーシス細胞の存在について BCG 陽性細胞を検出する乾酪壊死巣内においてのみ TUNEL 標識アポトーシス細胞を検出したがその他の領域においては TUNEL 標識細胞は極めて少数であった(陽性コントロールは常に陽性に染色)

細胞増殖解析 細胞増殖周期に共通して発現する Ki-67 抗原を指標として増殖分画にある細胞の同定を試みた。正常リンパ節で Ki-67 標識される細胞は胚中心細胞にはほぼ限局し濾胞間領域で標識される細胞は少数(5%以下)であった。一方、当該リンパ節では全域にわたり極めて多数、およそ 50%の標識率を観察した。連続標本にて解析したところ CD3 陽性細胞の分布と Ki67 標識細胞の分布は一致した CD79 陽性 B 細胞の集簇する領域の Ki-67 標識細胞は殆ど観察せず、増殖分画の主体は T 細胞と考えられた。次にメモリー T 細胞の Ki-67 標識率を検討するため CD45R0 Ki-67 の 2 重染色を試み解析したところ CD45R0 Ki-67 (+/+) 細胞はおよそ 30%、CD45R0 Ki-67(+/-)細胞は 70%でありメモリー T 細胞分画に有意な標識細胞を認めたが Ki-67 標識細胞の主体は CD45R0 陰性のナイーブ T 細胞であった。以上、細胞形態および連続切片での他の表面マーカー解析を総合すれば Ki 67 標識細胞の大多数は T 細胞であり主としてナイーブ T 細胞が増殖分画の主体であることが示唆された。

### 4 考察

当該標本には類上皮細胞肉芽腫が形成されまた抗酸菌の存在が証明され最終的には非定型抗酸菌症と診断された。その前提の上で免疫再構築の観点から局所組織解析を試みた。

まず当該患者の末梢血 CD4T 細胞数は 24 / $\mu$ l と AIDS 期としてもかなり進行した病期にあり、その点を考慮すればリンパ節の荒廃は極めて軽微でありむしろ極めて活発

な細胞性免疫作動を観察した。(副所見であるが granzyme と CD4 あるいは CD8 との二重染色により granzyme 陽性の CD8CTL のみならず多数の CD4/granzyme2 重陽性の細胞を観察し CD4CTL の *in situ* における存在を強く示唆する知見を得ている) 他研究者の報告また我々自身の解析からも未治療のリンパ節では多数のアポトーシス細胞を検出する。当該リンパ節では(乾酪壊死部を除き)アポトーシス細胞は極めて少数であったことから HIV による細胞死誘導が HAART によるウイルス産生阻止により間接的に抑止されたものと思われる。従ってまず指摘できる免疫再構築の一要素はこの細胞死を免れた細胞群の残存 温存であると思われる。これまでの研究により HIV による直接機序 間接機序を含めた細胞死感受性分画はメモリーCD4T 細胞である。次に、有意な CD45RO K<sub>i</sub>-67 ダブル陽性細胞を観察したことからメモリーT 細胞分画の一部に未だ増殖能を保持する分画が存在しこの細胞群が第2の要素を構成している。この両者が HAART 開始後早期に *redistribution* として末梢血に出現するメモリーT細胞分画、つまり *trapped cells* の実体であると思われる。次に CD45RO 陰性の細胞群が K<sub>i</sub>-67 標識細胞の主体であった点は、抗酸菌感染という抗原刺激に呼応して活発に増殖し得る多くのナイーブT細胞がリンパ節局所において存在することを直達的に証明したと考えている。このナイーブT細胞が胸腺より新たに供給された分画か或いはあらかじめ末梢に準備されている末梢性プール分画由来かについては直接的な判定材料を持たない。しかしながら TREC(T-cell receptor excision circles)を指

標とした胸腺“新卒”T細胞解析によれば HAART 後末梢にてその有意な増加を観察し始めるのに3ヶ月を要すると報告されている。従って、今回の材料が HAART 開始後1ヶ月で採取されたことを考慮すればあらかじめ末梢に準備されたナイーブT細胞が活発に増生したものとする。そしてこの分画が後期に末梢血で検出される免疫再構築の主体あるいは第三の要素を構成していると結論した。

## 5 自己評価

- 1) 達成度について 希少な材料をとらえ病理解析の上からはかなりの点まで解析し得たと考えている。
- 2) 研究成果の意義 HIV 感染症の主座は末梢リンパ組織でありたとえ1例といえともその座に直達的解析を加え得たことは非常に意義あることと考えている。特に HAART によりウイルス発現が抑えられればリンパ節局所でのアポトーシスが検出不能なまで低下する点の確認は重要な知見であり、その内容が不明であった“*trapped cells*”の実体がかなり明確となった点、および(多分に概念的な存在でありその実証が困難であった)「末梢ナイーブT細胞プール」の存在を(抗酸菌感染の存在下に)実際のヒト材料で観察し得た点は免疫学の観点からも意義あることである。また AIDS 期においてもこのような分画が温存されている事実は HAART 療法開始時期につ



いても示唆を与えるものである。

- 3) 今後の展望 HAART 開始の前と後に採取された材料が利用可能であればさらに正確な解析が期待出来る。病理免疫組織解析の弱点はその定量性にある。従って今後このような希少な材料を得る際は半割した上でフローサイトメトリーに供すればはるかに定量性にとみかつ立体的な解析が展開できると思われる。

## 6 結論

HAART 開始後 1 ヶ月で採取された非定型抗酸菌感染リンパ節を材料に免疫再構築の観点から詳細な病理組織解析を加えた。その解析結果より HAART 開始後比較的早期に観察される免疫再構築の構成要素は 1) HIV による細胞死を免れた細胞群, および 2) 増殖能力を保持しているメモリー T 細胞分画, の両者であると思われた。一方、比較的後期に末梢で検出するナイーブ T 細胞の供給源はあらかじめ末梢リンパ装置に準備されたナイーブ T 細胞分画であると結論した。

## 7. 知的所有権の出願・取得状況

なし

## 8 研究発表

- 1 Tateyama M *Oyazui et al* CD4 T lymphocytes are primed to express Fas ligand by CD4 cross-linking and to contribute to CD8 T-cell apoptosis via Fas/FasL death signaling pathway *Blood* 96 195-202, 2000
- 2 Tomimori, Y, Ikawa, Y, and *Oyazui, N* Ultraviolet (UV)-irradiated apoptotic lymphocytes produce interleukin 10 (IL-10) by themselves *Immunol Lett* 71 49-54, 2000

- 3 Shimohara, H, Yagita, H, Ikawa, Y, and *Oyazui, N* Fas drives cell cycle progression in glioma cells via extracellular signal regulated kinase (ERK1/2) activation *Cancer Res* 60 1766-1772, 2000
- 4 Shimohara H Kayagaki N Yagita H *Oyazui N* Ohba M Kuroki T and Ikawa Y A protective role of PKCepsilon against TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in glioma cells *Biochemical & Biophysical Research Communications* 284 1162-7, 2001
- 5 *In situ* analysis of immune-reconstitution in the lymph node with *M avium-intracellulare* complex (MAC) infection obtained one month after initiation of HAART (*in preparation*)

## 発症防止ワクチン開発のための基礎研究

分担研究者 志田壽利（北海道大学遺伝子病研究所）

**研究要旨** SIVmac239 感染猿を逆転写酵素阻害剤である PMPA で治療しつつ、rev-env と gag-pol を発現するライブラリーワクチンを接種して、PMPA 投与中止後の体内 SIV 量を追跡した。ワクチンは猿体内の SIV の増殖を抑制することはできなかったが、ウイルスの変異率を変化させていた。このことは体内ウイルスの増殖に影響を与えたことを示唆している。より有効なワクチンに向けてワクシニアベクターのライブラリーワクチン作成法を開発した。

### A. 研究目的

我々は HAART 療法被験者へのワクチン接種によって HAART 中止後もウイルスを抑え続けることができるかどうかを知ることを目的としている。そのために、SIV 感染サルを抗エイズ薬である PMPA で治療してその間にワクチンを接種し、治療中断後のウイルスの rebound を追跡した。ワクチンとしては感染猿（PMPA 療法開始直前の）体内に存在する SIV ゲノム群を PCR によって取り出し、そのまま発現ベクターに連結するオーダーメイド DNA ワクチンを試みた。昨年までの経過で、ワクチンは PMPA 中断後のウイルスの rebound を有意に抑えないとの結果を得た。つまり我々の本試みは失敗であったといえる。しかし、発症予防ワクチンを開発していく上で、今後につなげるために以下の点を検討しておく価値があると思われる。（1）ウイルスの rebound を抑えるには至らなかったが、post-vaccination によって体内ウイルスの増殖様式を modify したか？もし modify できたのなら、より有効なワクチンがウイルス増殖を抑えられる可能性を示唆する。（2）我々のオーダーメイド・ライブラリーワクチンは通常のクローンした単一遺伝子

を基にしたワクチンと異なる抗原性を持つのか？

（3）ワクシニアウイルスベクター上でより免疫原性の強いオーダーメイド・ライブラリーワクチン作成の技術を開発する。今年度は感染猿の観察をさらに続けると共に、上記について結論を出すことを目的とした。

### B. 研究方法

赤毛猿 10 頭に SIV 感染 1 週から 5 週後までと、21 から 27 週までの 2 回 PMPA 療法を行い、その間に 2 回オーダーメイドワクチンを 5 頭に接種した。PMPA 投与開始直前に採血したプラズマから SIV ゲノムを抽出して、PCR 法によって gag-pol 領域と rev-env 領域を増幅した。そして CMV promoter の下流に連結してオーダーメイド・ライブラリーワクチンとした。ウイルスの変異率を調べるために、env の V1 領域を PCR で増幅して塩基配列を決定した。ライブラリーワクチンの免疫原性を調べるために、マウスに筋注して electroporate した。

### C. 研究結果

1 感染猿の観察 SIV 感染猿における PBMC と血

漿中のウイルス量を感染細胞数と Taqman PCR によるコピー数測定で測った。ワクチン群コントロール群共に有意の差が無く、PMPA 中断後にウイルスが rebound した。各群中の 2~3 頭の猿は rebound があまり起こらなかったため、追加 vaccination によってウイルスを抑えつづけることができるかどうか調べた。しかし、感染 6 8 週目からウイルスが認められるようになった。これらの結果から、我々のワクチンは有効ではないと考えられる。

2 ウイルスの変異率 我々のワクチンはウイルスの増殖を抑えられなかったが、体内ウイルスの増殖様式を modify したかどうかを調べるために、Env の V1 領域を sequence した。V1 領域は免疫の主要標的となっており変異率が高いことが知られている。PMPA 中断直後に rebound したウイルスの変異率がワクチン接種群において有意に増加していた。ワクチンによって強化された免疫からの逃避の結果であると解釈される。このことは post-vaccination による体内ウイルスの増殖様式の修飾が起こったことを示唆している。

3 ライブラリーワクチンの免疫原性 ライブラリーワクチンと通常の DNA ワクチンの免疫原性を調べるために、マウスに接種して抗 SIV 抗体を ELISA で調べた。両者は同様の ELISA 値を示した。

4 ワクシニアライブラリーワクチン作成法の開発 低病原性ワクシニアウイルス(VV)LC16m8 株の HA 遺伝子領域に高発現プロモーターである ATI hybrid プロモーターを挿入して、直下に MCS 配列を持つ VV をまず作成した。続いて、MCS を認識する制限酵素で VV genome を 2 つに切断し、SIV の env 領域の PCR 増幅産物と ligation した。canarypox 感染細胞にトランスフェクションして子孫ウイルスを回収した。子孫ウイルスのうち 90% が SIV Env を発現する組み換え VV であった。

D 考察 本 DNA ワクチンは体内ウイルスの増殖を抑制するまでには至らなかった。しかし、増殖様

式を modify したと考えられる。このことはより強力なワクチンを用いることによるウイルス増殖コントロールの可能性を示唆している。今回我々が開発したワクシニアライブラリーワクチン作成法はより免疫原性が高いワクチンの作成に利用できる。

## E 結論

オーダーメイド DNA ワクチンによる post-vaccination は体内ウイルスの増殖を抑えなかったが、修飾した。ワクシニアライブラリーワクチン作成法を開発した。

## F 健康危険情報

なし

## G 研究発表

### 1 論文発表

Hakata, Y, Yamada, M, Mabuchi, N and Shida, H (2002) The Carboxy-terminal Region of the Human Immunodeficiency Virus-1 Protein Rev has Multiple Roles in Mediating CRM1-related Rev Functions *J Virol* 76 8079-8089

Kidokoro, M, Aoki, A, Horuchi, H and Shida, H (2002) Large scale preparation of biologically active measles virus haemagglutinin expressed by attenuated vaccinia virus vectors *Microbes and Infection* 4 1035-1044

Yasuda, J, Hunter, E, Nakao, M, and Shida, H (2002) Functional involvement of a novel Nedd4-like ubiquitin ligase on retrovirus budding *EMBO Rep* 3 636-640

### 2 学会発表

安田二郎、河岡義裕、志田壽利 ユビキチン連結酵素 Nedd4 によるエボラウイルス出芽、日本ウイルス学会 2002, 札幌

木所稔、青木敦子、堀内清、志田壽利 ワクシニア  
ウイルス発現ベクターによる麻疹ウイルス抗原の高  
度発現とヒスチジンタグによる1段階精製法の確立  
(第2報)、日本ウイルス学会2002, 札幌

櫻井陽、安田二郎、志田壽利 HTLV-1 出芽におけ  
る PpxY 配列及び PTAP 配列の機能、日本ウイルス  
学会2002, 札幌

志田壽利、田中勇悦、横田恭子 HIV RNA 輸送因  
子 CRM1 の末梢リンパ球における発現制御、日本エ  
イズ学会2002, 名古屋

安田二郎、河岡義裕、中尾光善、志田壽利 ユビキ  
チン連結酵素 Nedd4 によるエボラウイルス出芽の  
制御、日本分子生物学会2002, 横浜

博多義之、志田壽利 ヒト T 細胞白血病ウイルスの  
Rex 蛋白質に対する宿主因子の作用、日本分子生物

学会2002, 横浜

Xianfeng Zhang, Naoto Mabuchi, Masami  
Yamada, Hisatoshi Shida CRM1 can import into  
the Neucleus in a Temperature and Energy  
Independent Manner 日本分子生物学会2002, 横  
浜

黒崎陽平、山下英三郎、博多義之、志田壽利  
HIV/HTLV-1 宿主 T 細胞における hCRM1 の発現  
制御の解明、日本分子生物学会2002, 横浜

櫻井陽、安田二郎、志田壽利 ユビキチンリガーゼ  
結合配列 PPxY と HTLV-1 の出芽の関与、日本分  
子生物学会2002, 横浜

G 知的所有権の取得状況  
該当無し

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

コレセプターを介した感染阻害の研究

分担研究者 山本 典生 東京医科歯科大学

**研究要旨**

HIV-1主要コレセプターを標的とする抗HIV-1薬剤の探索において、新規低分子化合物T-1113がX4, R5 およびR5X4 HIV-1の増殖を阻害することを見出した。T-1113はCXCR4の第2、第3細胞外領域に対するモノクローナル抗体の結合、およびHIV-1持続感染細胞Molt-4/IIIBとMolt-4細胞との混合培養による巨細胞の形成を顕著に抑制した。しかし、その選択活性はたかだか30倍という程度なので、これをリードコンパウンドとして探索を続ける必要がある。

**A 研究目的**

現行のHAARTで用いられている薬剤と異なり、HIV-1の易変異性がより問題になりにくいと考えられ、ウイルス感染に必須の細胞側因子の一つ、コレセプター、の拮抗薬の開発を行う。

**B 研究方法**

**T-1113と他のコンパウンド**

定法に則り、化学合成で作成された。AMD3100, TAK-779もふくめ呉羽化学工業研究所広瀬氏より提供された。

**細胞とウイルス**

正常末梢リンパ球はRPMI-1640プラス20%FCSで、またMT-4, Molt-4, Molt-4/HIV種々のコレセプターを発現するHOS細胞はRPMI-1640プラス10%FCSで培養した。ウイルスはX4タイプとしてHTLV-III<sub>B</sub>, NL-4-3, YU-6, YU-7を、R5タイプとしてYU-1,5種の臨床分離株を用いた。

**抗ウイルスアッセイ**

正常人末梢血リンパ球(PBMC)Ficoll-Conray法にて分離後、固相anti-CD3/anti-CD28 MoAbにより刺激し、IL-2, RPMI-1640プラス20%FCS存在下で培養した。6日目にHIV-1(NL4-3)をmoi

0.001にて3時間吸着を行った後、遠心にてウイルスを除き、薬剤を加えた。さらに3日間の培養を続け、上清中のp24活性を測定した。

**リガンド結合試験とCa<sup>2+</sup>インフラックス**

HOS細胞に発現させた各種コレセプターに対し、<sup>125</sup>Iラベルリガント(SDF-1 $\alpha$ )を用いることでその結合を検討した。HOS細胞はRPMI-1640プラス10%FCSで培養した。

またCa<sup>2+</sup>インフラックスはFuraPE3-AMをHOS/CXCR4細胞に加えることにより測定した。T-1113によるAnti-chemokine receptor MoAbs結合阻害

Anti-CXCR4として、A145, A120, 12G5, A80をさらにAnti-CCR5としてT312, 2D7, 45531, 45549を用い、FACSにて、細胞への結合阻害を検討した。

**(倫理面への配慮)**

試験管内の実験が主であること、すでに樹立され実験にも頻用されている細胞株を用いることから特に倫理的に問題となるような内容は含まれていないと考えられる。

**C 研究結果**

HIV-1 主要コレセプターを標的とする抗 HIV-1 薬剤の探索において、新規低分子化合物 T-1113 が X4, R5 および R5X4 HIV-1 の増殖を阻害することを見出した。T-1113 は我々が最近報告した CXCR4 アンタゴニスト KRH-1636 と同様に、CXCR4 の第2、第3細胞外領域に対するモノクローナル抗体の結合（それぞれ 12G5、A80）、および HIV-1 持続感染細胞 Molt-4/IIIB と Molt-4 細胞との混合培養による巨細胞の形成を顕著に抑制した。T-1113 は CCR5 発現細胞への MIP-1 $\alpha$  の結合を阻害したが、他の CCR5 阻害剤 TAK-779 と異なり、CCR5 アンタゴニスト活性や第2細胞外領域に対するモノクローナル抗体(2D7、45531)の結合阻害活性は認められなかった。

#### C 考察

T-1113 は X4HIV、R5HIV、Dual-tropic HIV のいずれにも効果を示す点でユニークである。X4、R5HIV 感染を同時に抑制するコレセプター阻害物質の発見は予想外とも言えるものであったが、コンセプトとしても興味深いものであり、その意義は十分であると考えられる。現行の、ウイルスが持つ2種の酵素以外をターゲットにした薬剤の開発は世界的に待望されているものであり、本研究の意義は小さくない。今後の展望については、その安全域の狭さから、これがそのまま薬剤になるとは考えられないが、リード化合物としてユニークな物質を見出したことは、今後の新たな視点を示したという意味で評価される。現在、抗 R5 HIV-1 の作用機序と hu-PBL SCID マウスを用いた in vivo 感染系における有効性を検討中である。

#### E 結論

新規低分子化合物 T-1113 は X4, R5 および R5X4 HIV-1 の増殖を阻害することを見出した。T-1113 は混合培養による X4, R5 巨細胞の形成を顕著に抑制した。

#### F 健康危険情報

特記すべきことなし

#### G 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### H 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

##### 1 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

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

エイズ発症抑制のためのシグナル同定に関する研究

所属施設 東北大学医学系研究科微生物学分野  
分担研究者名 小柳義夫

研究要旨

発症メカニズムがまったく不明の HIV 脳症の病理学的特徴は炎症性変化とともにアポトーシスによる神経細胞死である。HIV はマクロファージとミクログリアに感染するが、神経細胞には感染しない。このことから神経細胞死には間接的な神経障害メカニズムが関与すると考えられる。我々はヒト末梢血単核球細胞 (PBMC) を移植した NOD SCID マウス (hu-PBMC-NOD-SCID マウス) に HIV を感染させ、lipopolysaccharide (LPS)の腹腔内投与を加えると感染細胞が中枢神経組織内の血管周囲に浸潤し神経細胞死を誘導することを見出した。このアポトーシス細胞に近接して TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) を発現する HIV 感染マクロファージの浸潤が見られた。そして、マウスに TRAIL に対する抗体を投与すると、神経細胞死が明らかに抑制されることより、中枢神経組織内における TRAIL の重要性が判明した。さらに、培養神経細胞と TRAIL を発現する HIV に感染したマクロファージ、あるいは、トランスフェクションによる TRAIL 強制発現細胞を混合培養すると神経細胞死が誘導されることかわかった。また、TRAIL 発現細胞が実際のヒトの HIV 脳症患者の脳組織にみつかった。そして、その近辺にシグナル伝達によりはじめて活性化される Caspase-8、さらに、これの下流に位置する Caspase-3 が活性化した神経細胞が見出された。これらの結果は HIV 脳症において、その神経細胞死には TRAIL によるものがかなりありうる可能性が強く示唆された。次に、生体内における HIV 感染を再現するモデル実験系として、ヒト扁桃組織の臓器培養系の確立を試み、HIV 感染が成立することを明らかにした。そして、この扁桃組織内において、HIV は 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)陰性の CD4 陽性 T 細胞、すなわち、ほとんど分裂していない状態でも感染が成立することを見出した。この事実はこれまでの試験管内での HIV 感染実験系では phytohemagglutinin(PHA)などのマイトシエンにより細胞活性化刺激かウイルス増殖に必須であった事実と明らかに異なる。これら神経細胞死にかかわるシグナルの同定、そして、活性化刺激の必要ない実験系の開発は HIV 感染によるエイズ発症阻止に直結する結果である。

A 研究目的

エイズ発症に関与する病原性因子を同定し、その因子抑制技術へ展開させる。本研究の成果をエイズ感染のこれ以上の広がり

を抑える厚生行政の課題克服へのひとつのステップとして貢献させる。

具体的には病原性に直接関連する HIV の生体内における増殖機構を明らかにし、そ

の感染による細胞死のメカニズムを解明する。本年は第一に発症メカニズムがまったく不明の HIV 脳症発症機序を解明するために、脳における HIV 感染の場であるマクロファージへのウイルス感染による中枢神経組織の神経細胞死のシグナル分子の同定、第二に生体内においてもっともウイルス増殖の活発な臓器であるリンパ組織のモデル実験系の確立とこの組織内の非分裂細胞における活発なウイルス増殖の機序を明らかにする。

## B 研究方法

### 1 HIV感染中枢神経組織モデル実験とHIV感染ヒト脳組織の解析

#### ① HIV感染マウスモデルの作製と免疫染色による解析

ヒト末梢血単核球を NOD-SCID マウスの腹腔内へ移植し、5 日目に HIV<sub>IRFL</sub>, HIV<sub>NLCSFV3EGFP</sub>, HIV<sub>NL4-3</sub>, HIV<sub>NLEGFP</sub> を腹腔内に接種し、さらに7日目に LPS (100 $\mu$ g) を腹腔内に接種する。3 日後にマウス脳組織を取り出し、4% periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP)にて固定し、凍結切片を作製する。組織切片を神経細胞特異的マーカーである NeuroTrace blue fluorescent Nissl stain (FNB, Molecular Probes, Inc Eugene, Oregon), 抗 CD68 抗体 (PGM1, DAKO, Kyoto), 抗 HIV gag p24 抗体 (goat polyclonal IgG, ViroStat), 抗 human TRAIL 抗体 (clone RIK-2) と terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) 染色との二重染色を行った。アポトーシス誘導分子に対する中和抗体導入実験では抗ヒト TRAIL 抗体 (RIK-2)・抗ヒト Fas リガント

(FasL) 抗体 (NOK-1)・抗ヒト TNF- $\alpha$  抗体(28401 111)もしくはコントロールマウス IgG を 1mg, LPS と同日に腹腔内投与した。前述したように3日後にマウス脳組織を取り出し凍結切片を FNB 染色と TUNEL の二重染色を行い、スライス当たりの神経細胞にアポトーシスが起きる数を測定した。

(倫理面への配慮)

本動物実験の施行にあたり本学実験施設に設置されている実験動物委員会に動物愛護上の配慮ならびに感染実験の適切な実験施行を行うように指導を受け、すべての実験は承認されている。

#### ② マウス胎児海馬由来の初代神経グリア培養とその培養系における神経細胞死の定量

マウス胎児 (E 18 Balb/c マウス) 脳より海馬を取り出し、トリプシンで消化し、初代神経グリア混合培養系を作製後、B27 (Gibco, Tokyo, Japan) を添加した高濃度グルコース MEM にて維持した。培養開始9日目に HIV<sub>IRFL</sub> あるいは HIV<sub>NLCSFV3EGFP</sub> を感染後7日目のヒト末梢血由来のマクロファージ細胞あるいは TRAIL あるいは FasL 分子を強制発現させたマウス B 細胞腫細胞株 (2PK-3) を添加し、混合培養後5日目に4%PLP にて固定後、凍結切片を作製し、TUNEL 染色と神経細胞特異的な抗体である抗 neurofilament protein (NFP) 単クローン抗体 (clone 2F11, DAKO) を用いて蛍光二重染色を行う。NFP 陽性細胞中の TUNEL 陽性細胞数を測定した。蛍光二重染色の解析には Carl Zeiss および Leica のレーザー顕微鏡と CCD カメラを使用した。

(倫理面への配慮)

臓器摘出は苦痛の軽減のために麻酔下に



行い動物愛護上の配慮を行い、施行前に本学実験動物委員会の承認を受けた。

### ③ エイス脳症患者脳組織の免疫組織学的解析

48歳と25歳の日和見感染と中枢神経内腫瘍のない日本人 HIV 脳症患者解剖脳を10%フォルマリリンにて固定後、パラフィン包埋し、組織切片を抗 HIVgag p24 単クローン抗体 (clone Kal-1, Dako), 抗活性型 caspase-8 単クローン抗体 (clone D384, mouse monoclonal IgG, Cell Signaling Technology, Beverly, MA), 抗 TRAIL 抗体 (ヤキ IgG, Santa Cruz Biotechnology) を用いて免疫染色を行った。

(倫理面への配慮)

これらすべての検体の入手は本学医学部倫理委員会の承認のもと行われた。

## 2 ヒトリンパ臓器モデル実験

### ① ヒト扁桃臓器培養系の確立

本学において扁桃肥大患者より摘出された炎症かない扁桃組織の培養実験を行った。摘出扁桃組織を2-3mmに切断し、スライスを作製し、0.4µmのミリポアフィルター上へのせ、培養プレート内にて維持培養を行った。10µMのBrdUは培養全期間添加した。培養の維持には10%FCS添加RPMI培地を用い、培地の交換は毎日行った。

(倫理面への配慮)

本学において扁桃肥大患者より摘出された炎症かないヒト扁桃組織は本学医学部倫理委員会の承認のもとインフォームトコンセントを得、培養実験を行った。

### ② HIVの感染と感染細胞の同定

培養開始日に HIV<sub>NL4-3</sub> (55,000 ID<sub>50</sub>) あるいは HIV<sub>JRFL</sub> (94,500 ID<sub>50</sub>) を感染させ、感染後4日目に前述の方法で凍結組織切片

を作製し、hematoxylin-eosin (HE)、ならびに、抗 K167 抗体 (clone K1-67, mouse IgG1, DAKO) による免疫染色を行った。さらに、感染後3, 6, 9日目にFACSにより解析をおこなった。phycoerythrin (PE) 標識抗 CD4 抗体 (DAKO)、fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗 BrdU 抗体 (BD) ならびに HIV 陽性細胞を同定するために HIV 感染者ヒト血清と PerCP 標識抗ヒトヤキ IgG を用いて間接蛍光抗体法により染色をおこなった。さらに培養上清中の HIVgag p24 抗原量を ELISA 法にて定量した。

## C 研究結果

### 1 HIV 感染による神経細胞死を再現するモデルマウスの開発

マクロファーン指向性ウイルス (HIV<sub>JRFL</sub> 株) を投与したマウスの脳では少数の CD3 陽性ヒト T 細胞と HIVgag p24 陽性のウイルス感染細胞が血管周囲に検出されたか、CD68 陽性ヒトマクロファーンは検出されなかった。そこで脳実質への細胞浸潤を誘導するために LPS を投与した。この LPS 投与マウスの脳内では、多数の CD3 陽性ヒト T 細胞と HIVgag p24 陽性の HIV 感染細胞の脳実質内への浸潤とともに、血管周囲へ多くの CD68 陽性ヒトマクロファーン細胞浸潤していた (図 1 a)。さらに著明なアストロサイトーシスとミクログリア結節を伴っていた。このマウス脳組織内でのアポトーシスを検出するため、TUNEL 法を施行したところマクロファーン指向性ウイルスと LPS を投与したマウス脳では多数の TUNEL 陽性細胞が検出され、神経細胞の細胞質リソソーム小体を特異的に染色する FNB 染色により、TUNEL 陽性細胞の 10-20%に

神経細胞が含まれることがわかった (図 1b 矢印)。これに対し、非感染の LPS 投与群では少数の TUNEL 陽性細胞が検出され、また LPS 非投与群では TUNEL 陽性細胞はまったく検出されなかった。一方、T 細胞指向性ウイルス (HIV<sub>NL4-3</sub> 株) と LPS を投与したマウス脳組織でも TUNEL 陽性細胞が検出されたが、FNB 陽性の神経細胞のアポトーシスは検出されなかった (結果示さず)。

このウイルス株による神経細胞死誘導能の差異を確認するために、env 領域の V3 配列のみが異なり、細胞指向性の異なる 2 種の GFP 発現キメラウイルスを作製し、LPS を投与し、同様の解析を行った。ここでも、マクロファージ指向性ウイルスである NL-CSFV3-EGFP を感染させたマウスではウイルス感染マクロファージと神経細胞のアポトーシスが検出され、これに対して T 細胞指向性である NL-EGFP を感染させたマウスでは脳実質内にマクロファージの浸潤は見出されるが HIV に感染した CD68 陽性のマクロファージは検出されず、そして FNB 陽性の神経細胞のアポトーシスは検出されなかった。以上の結果より、このモデルマウスにおける神経細胞のアポトーシスにはウイルス感染マクロファージの脳実質内への浸潤が強く関与すると考えられた。

## 2 TRAIL によるマウスモデルにおける神経細胞死

このマクロファージ指向性 GFP キメラウイルスを投与したマウスの脳では、ウイルス感染マクロファージ上に TRAIL が発現していることが確認された。さらに、TUNEL 陽性細胞の近傍には CD68 陽性のヒトマクロファージ (図 1c)、HIVp24 陽性の HIV 感染細胞 (図 1d)、そして、TRAIL 陽性細胞

(図 1e) のいずれもが検出された。次に、この神経細胞死が TRAIL 発現細胞の脳実質内への浸潤により誘導されているかを確認するために、ウイルスと LPS を投与したマウスに対して、アポトーシス誘導分子に対する中和抗体の投与実験を行った。その結果、TRAIL 中和抗体を腹腔内投与すると、神経細胞死は著明に抑制されたのに対し ( $P=0.0005$ , by Welch's *t*-test)、TNF $\alpha$ 、FasL に対する抗体やマウス IgG を投与したマウスでは神経細胞死の抑制は見られなかった (図 1f)。

## 3 TRAIL による培養神経細胞のアポトーシス

上述したマウスモデルにおける神経細胞死を確認するために、マウス胎児海馬由来の初代神経グリア培養に HIV 感染マクロファージあるいは TRAIL 強制発現細胞を添加し、これらの細胞の神経細胞死誘導能を検討した。この培養系では神経細胞とグリア細胞は約 2 ヶ月維持される。非感染マクロファージに比べマクロファージ指向性 HIV (JRFL と NL-CSFV3-EGFP) 感染マクロファージを添加すると非感染マクロファージに比べ明らかに神経細胞死 ( $P < 0.05$  by Student's *t*-test) を有意に誘導できることがわかった (図 1g)。さらに、ヒト TRAIL を強制発現したマウス B 細胞を添加すると、同じように神経細胞のアポトーシスは有意に増加した ( $P < 0.05$  by Student's *t*-test)。これに対し、ヒト FasL を強制発現させた細胞、非導入細胞、および細胞株を添加しない場合には明らかな神経細胞死の増加は見られなかった (図 1h)。

## 4 エイズ脳症患者脳組織における TRAIL 発現細胞

エイズ脳症患者の剖検脳組織において、TUNEL 陽性ならびに活性型 caspase-3 発現神経細胞を検出し (結果示さず)、そして、外来性のアポトーシスシグナルによりはじめて検出される活性型 caspase-8 陽性神経細胞を検出した (図 1i)。そして、その周辺には HIVp24 (図 1j) と TRAIL (図 1k) を発現するマクロファージと思われる細胞を見出した。さらに、この脳組織に TRAIL に対するレセプター分子である DR5 発現神経細胞を検出した (結果示さず)。

#### 5 ヒト扁桃臓器培養の確立と HIV 感染

HIV の主な増殖の場はリンパ臓器である。この微細組織環境をそのまま再現する培養系の確立をめざした。摘出ヒト扁桃組織を細切しフィルターにのせ、サイトカインやマイトジェンなど刺激は加えず維持培養を行った (図 2a)。予備実験の結果、少なくとも 2 週間はその B 細胞が占める濾胞構造とその周辺の T 細胞ゾーンを形成するリンパ組織構築 (図 2b) の維持は可能であることを確認した。そして、この臓器培養開始時に HIV<sub>JRFL</sub> あるいは HIV<sub>NL4-3</sub> を感染させた。感染後 4 日目に分裂増殖細胞を同定するために Ki67 染色をおこない、その陽性細胞は非感染および感染組織いずれにおいても、ほとんど B 細胞ゾーンに局在するが、非常に少ないことがわかった (図 2c 矢印)。そして、この臓器培養における HIV が増殖する細胞を明らかにするために抗 HIV ヒト血清と抗 CD4 抗体を用いて、FACS による解析から CD4 陽性の小リンパ球分画に HIV 陽性細胞を見出した。NL4-3 感染臓器では 6 日目以降 (図 2d)、JRFL 感染臓器では 9 日目以降に HIV 陽性の CD4 陽性細胞を検出した (結果示さず)。さらに、これら HIV 陽

性 CD4 陽性細胞はほとんど、BrdU 陰性であり、分裂していない細胞であることかわかった。また、NL4-3 感染臓器では HIV の感染により CD4 陽性細胞が感染後 12 日目にほとんど死滅していた。

#### D 考察

本研究では HIV 病原性を再現するモデル実験を開発し、その実験系から HIV 感染により生体内で病気を成立させるシグナル分子を明らかにしようとするものである。第一にその発症メカニズムがまったく不明である HIV 脳症の解明のための神経細胞死マウスモデル、培養実験系、そして、実際の HIV 脳症患者の脳組織の解析から HIV 感染によりマクロファージ上に誘導される TRAIL が神経細胞死を誘導していることが強く示唆された。第二に HIV がもつとも活発に増殖するリンパ臓器をそのまま再現するヒト扁桃臓器培養系を確立し、この臓器内では HIV は分裂していない CD4 陽性 T 細胞でも活発にウイルスを産生していることが判明した。いずれも新しい知見である。

神経細胞死モデルマウスでは LPS 投与という操作を加えた。これはヒト細胞の脳内浸潤増強効果を期待したもので、その機序は脳血管内皮細胞における VCAM-1 および E-セレクチンの発現と関与していると考えられる。実際、LPS を腹腔内投与したマウスの脳血管内皮細胞ではこれらの分子の増強を確認している。文献上も HIV 感染者および SIV 感染サル脳では、VCAM-1 の発現が脳内浸潤細胞と近接していること、また、LPS は単球系細胞に加え、血管内皮細胞も活性化することが報告されている。実際、ある程度進行した HIV 感染患者もしく

はエイズ患者でもこのように末梢血中の血管内皮を活性化させる因子により、単球系細胞と血管内皮細胞が活性化され、脳内細胞浸潤が起こると考えられる。我々のモデルマウスならびに神経細胞培養実験系ではマクロファージ指向性ウイルスの感染によりはじめて神経細胞死が誘導され、T細胞指向性ウイルスを用いた場合には神経細胞死は誘導されなかった。この実験結果から、マクロファージ指向性ウイルスが脳症発症への必須因子であるというこれまでの知見と一致する。実際、エイズ脳症患者の脳からはマクロファージ指向性ウイルスしか分離されないこと、また SCID マウスの脳にウイルス感染マクロファージを注入した実験系においても神経細胞死が誘導されることが報告されている。すなわち、神経細胞死にはウイルス感染マクロファージからの因子が重要である可能性が高いと考えられる。我々のモデルマウス脳組織においてウイルス感染マクロファージには、従来報告されている TNF $\alpha$  や IL-1 $\beta$  の発現は HIV 感染により増強されるのではなく LPS などの非特異的刺激により誘導され、TRAIL が HIV 感染により特異的に誘導されることが確認された（結果示さず）。これまで培養系の実験から、HIV 感染や Tat 蛋白質によって、マクロファージに TRAIL が発現しうることが報告されている。さらに脳症モデルマウスにこの中和抗体を投与すると、神経細胞のアポトーシスは抑制され、その関与が示唆された。TRAIL は近年同定された death signal のひとつで、神経細胞のアポトーシスに関与することはこの実験により初めて証明された。

一方、リンパ臓器内において CD4 陽性の

非分裂細胞において活発に HIV は増殖できることは、今まで使われてきた PHA により刺激した末梢血による試験管内の分裂培養系だけでは、生体内における本来の HIV 増殖を再現していない可能性が考えられる。この非分裂細胞における HIV 増殖を維持する隣接細胞はあるのか、そのシグナル分子は何なのかまったく不明である。この HIV 増殖系の解明が期待される。さらにこのようなリンパ臓器における HIV の増殖は抗ウイルス剤に対してどのような感受性があるのか現在検討中である。

## E 結論

*in vivo* ならびに *in vitro* の HIV 感染モデル実験系の開発から、HIV 感染個体内における神経細胞死のシグナル分子の同定、そして、リンパ臓器におけるウイルス増殖系の確立が達成された。学術的意義は TRAIL が CD4 陽性 T 細胞の破壊に関与するという昨年の我々の成果 (J Exp Med 193, 651-659, 2001) に続き、今回の神経細胞破壊にも関与するという知見 (Proc Natl Acad Sci USA, in press) はいずれもエイズの病態に関与するシグナル分子の新たな同定であり、極めて大きい。国際的にも海外の有力雑誌に掲載され認められた。社会的にはこの分子に対する抑制が新たな治療法として発展する可能性が大きく意義はある。

## F 健康危険情報

エイズ発症阻止に向けて学問的進歩が得られた。

## G 研究発表

### 1 発表論文

① Takeuchi H, Suzuki Y, Tatsumi M, Hoshino