

- immunizing mice with *in vivo*-infected dendritic cells. *Infect. Immun.*, **71**, 117-125 (2003).
39. Ohtaki, H., Funahashi, H., Dohi, K., Oguro, T., Horai, R., Asano, M., Iwakura, Y., Yin, L., Matsunaga, M., Goto, N., and Shioda, S. Suppression of oxidative neuronal damage after transient middle cerebral artery occlusion in mice lacking interleukin-1. *Neuroscience Res.*, **45**, 313-324 (2003).
  40. Nakae, S., Komiyama, K., Yokoyama, H., Nambu, A., Umeda, M., Iwase, M., Homma, I., Sudo, K., Horai, R., Asano, M. and Iwakura, Y. Interleukin-1 is required for allergen-specific Th2 cell activation and the development of airway hypersensitivity response. *Int. Immunol.*, in press.
  41. Voronov, E., Shouval, D. S., Krelan, Y., Cagnano, E., Benharroch, D., Iwakura, Y., Dinarello, C. A., and Apte, R. N. Interleukin 1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 2645-2650 (2003).
  42. Kyuwa, S., Kawamura, S., Tagawa, Y., Iwakura, Y., Urano, T., and Yoshikawa, Y. Differences between BALB/c and C57BL/6 mice in mouse hepatitis virus replication in primary hepatocyte culture. *Exp. Anim.*, **52**, 81-84 (2003).
  43. Kirii, H., Niwa, T., Yamada, Y., Wada, H., Saito, K., Iwakura, Y., Asano, M., Moriwaki, H., and Seshima, M. Lack of interleukin-1b decreases the severity of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, in press.
  44. Nakae, S., Saijo, S., Horai, R., Sudo, K., Mori, S., and Iwakura, Y. IL-17 production from activated T cells is required for the spontaneous development of destructive arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press.

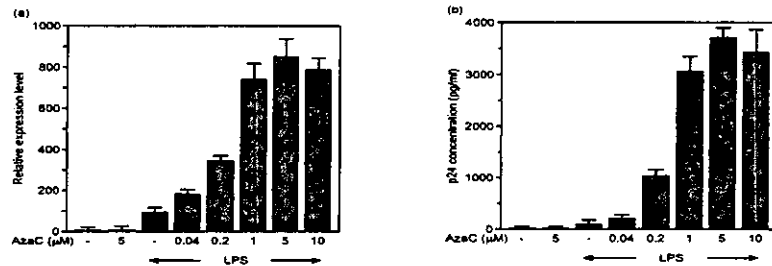


Figure 1. 5-AzaC dose-dependent induction of HIV-1 mRNA expression and p24 Gag protein in HIV-Tg lymphocytes stimulated with LPS. Cultured HIV-Tg lymphocytes were stimulated with or without LPS ( $4 \mu\text{g/ml}$ ) for 48h. Then HIV-1-specific mRNA was measured by Northern blot hybridization (a), and p24 Gag protein concentration was measured by ELISA (b). (a) Total RNA was extracted from the lymphocytes and the relative levels of the 4.0-kb HIV-1 mRNA are shown. The same blot was reprobbed with a  $\beta$ -actin probe to examine the relative amount of the RNA in the lane. Data are expressed as relative values to the activation level in splenocytes stimulated with LPS in the absence of 5-AzaC. (b) The levels of p24 Gag protein in the culture supernatant were measured by ELISA. Results were reproducible in three independent experiment, and the average and standard deviation (SD) of a representative experiment are shown.

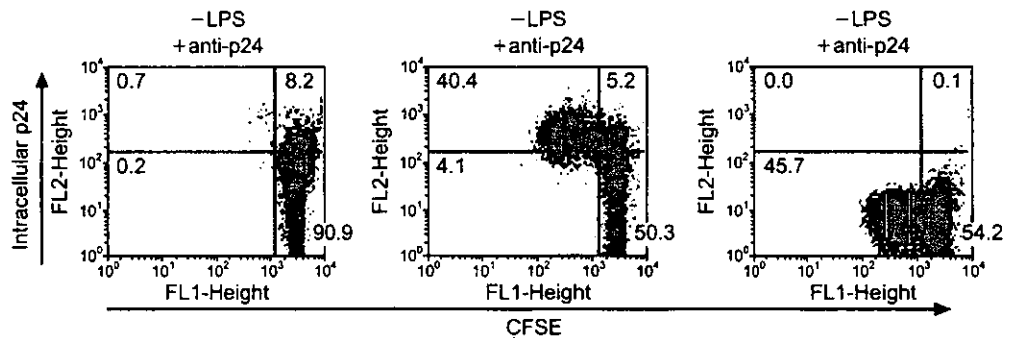
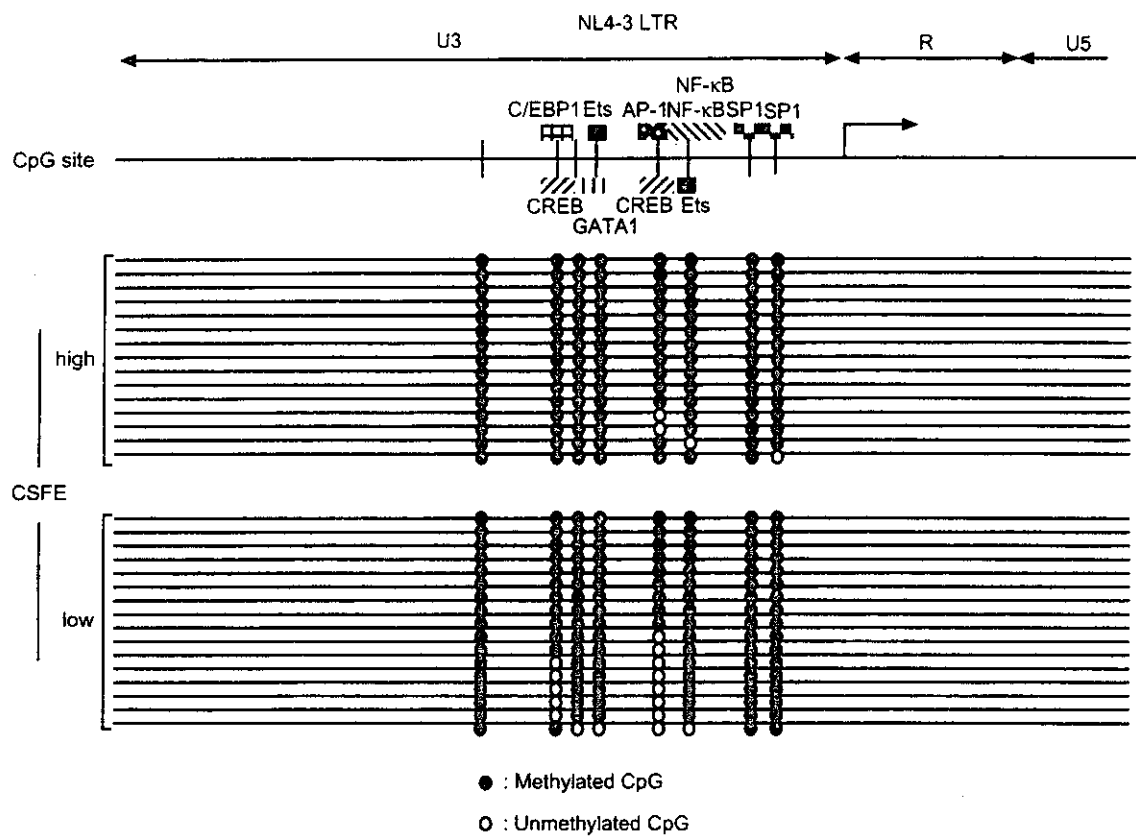


Figure 2. Cell cycle-dependent induction of HIV-1 p24 expression. Induction of HIV-1 p24 expression only in cells that had undergone cell division. CFSE-labelled HIV-Tg lymphocytes were cultivated with LPS or without stimulant for 48 h. After fixation and permeabilization of the cells, intracellular p24 was stained with rabbit anti-p24 polyclonal Ab, and then with PE-conjugated anti-rabbit IgG. The staining pattern was analyzed by flow cytometry. The x-axis represents the intensity of the green fluorescence, CFSE. The intensity decreased with the progression of cell division due to dilution of the intracellular fluorescein. The y-axis represents the intensity of the red fluorescence of PE-conjugated anti-p24 antibody. Left panel: cultivated without LPS, detected with anti-p24 Ab. Middle panel: stimulated with LPS, detected with anti-p24 Ab. Right panel: stimulated with LPS detected without anti-p24 Ab. Results are representative in four independent experiments.



**Fig 3. Demethylation of specific CpG sites after cell cycle progression.** CFSE-labelled HIV-Tg lymphocytes were stimulated with LPS for 48 h, and sorted according to the intensity of CFSE fluorescence, high and low. PCR amplified fragments were cloned into plasmids and the methylation status of each CpG site in a single allele was analyzed. CFSE 'high' shows the result from cell populations that had not divided yet, and CFSE 'low' shows that from cell populations that had undergone cell division. Upper panel: locations of CpG sites in NL4-3 LTR U3 region are shown in relation to the binding motifs for transcriptional factors which were analyzed by TSEARCH program. Lower panel: methylation status of the CpG sites analyzed by bisulfite genomic sequencing methods.

## 潜伏感染 HIV 活性化のメカニズム：リンフォトキシンβ レセプター・シグナルによる NF-κB 活性化機構

分担研究者：岡本 尚（名古屋市立大学大学院医学研究科細胞分子生物学）

### 研究要旨

LTβR シグナリングにおける NF-κB 活性化は IKKβによらず IKKαに依存する系であり、p65 の核移行に依存しないことなどを明らかにした。

### A. 研究目的

HIV 感染者ではウイルスは樹状突起細胞やマクロファージ、および静止期 CD4 陽性 T 細胞などに潜伏感染している。最近、Izmailova ら(Nat. Med. 9:191-197, 2003)は、樹状突起細胞に感染している HIV から作られる Tat が IRF7 などの転写因子を誘導し、MCP1-3 などのケモカインを産生し、非感染 T 細胞を呼び寄せることによって感染を拡大していることを明らかにした。HIV 感染樹状突起細胞でのウイルス遺伝子発現は NF-κB に依存しているが、そのシグナル伝達はリンフォトキシンβレセプター(LTβR)に依存する。なお、LTβR からのシグナルは 2 次リンパ装置の再生など免疫再構築においても重要な働きをしている。LTβR からのシグナルによる NF-κB 活性化のメカニズムについてはまだ明らかにはなっていないが、NF-κB inducing kinase (NIK)および IκB kinase α (IKKα)を介することがノックアウトマウス等の実験から強く示唆される。そこで、本研究では LTβR シグナリングでの NF-κB 活性化機構における NIK と IKKαの役割について検討した。

### B. 研究方法

(1) 発現プラスミッドの作成：発現プラスミッド pM-p65、pM-p65(1-286)、pM-

p65(286-551)、pM-p65(286-551:Δ443-476)、pM-p65(286-520)、pM-p65(431-551)、pM-p65(521-551)、pM-p65(521-551:S529A)、pM-p65(521-551:S536A)、pcDNA3.1(-)-FLAG-p65、pcDNA3-NIK、pcDNA3-NIK(KM)、pcDNA3-IκBΔN、pcDNA3-IκB(S32A/S36A)、pCR-2FL-IKKα、pCR-2FL-IKKα(KM)、pCR-2FL-IKKβおよびpCR-2FL-IKKβ(KM)の作成は既に報告した方法(Jiang et al, J. Biol. Chem. 278:919-926, 2003)に拠った。

(2) 細胞株およびトランスフェクション：293細胞と LTβR を発現する HT29 細胞を用いた。プラスミッドを細胞への導入には FuGENE6 transfection reagent (Roche Molecular Biochemicals) および LipofectAMINE(Invitrogen)を用いた。

(3) Luciferase 検定：Luciferase(Luc)遺伝子発現プラスミッドとエフェクタープラスミッドを細胞へ導入し、48 時間後、細胞から蛋白を抽出、Luc 活性を測定した。

(4) 免疫組織化学染色法：p65 の核移行を解析するため、HT29 細胞を 10ng/ml 濃度の TNF で 15 分にまた 2ug/ml 濃度の LTβR agonistic 抗体で 40 分に刺激し、細胞を固定し、p65 に対する抗体 (Santa Cruz Biotechnology) で染色した。

(5) ウェスタンブロット法：細胞抽出液の作成およびウェスタンブロット法は既に報告した方法 (Jiang et al, J. Biol. Chem. 278:919-926, 2003) に拠った。

(6) 共免疫沈降法：p65 の LT $\beta$ R シグナリングにより誘導したリン酸化を確認するため、HT29 細胞に FLAG 標識した p65 (FLAG-p65) を発現した後、FLAG に対する抗体 (anti-FLAG M2 affinity gel (Kodak)) で共免疫沈降し、沈降された蛋白を p65 の 536 番セリンのリン酸化に認識する特別抗体 (anti-phospho-p65 NF- $\kappa$ B (ser536) antibody (Cell Signaling)) 用いてウェスタンブロット法で解析した。

### C. 研究結果

(1) LT $\beta$ R シグナリングでの NF- $\kappa$ B 活性化は I $\kappa$ B リン酸化および p65 の核移行に依存しない (図 1)：293 と HT29 細胞に様々の NF- $\kappa$ B 活性化因子 (TNF、LT $\beta$ R、NIK、IKK $\alpha$ 、IKK $\beta$  など) を導入し、これらの因子により誘導された  $\kappa$ B 転写活性をみたところ、TNF、LT $\beta$ R および NIK は  $\kappa$ B 転写活性を誘導したが、IKK $\alpha$  また IKK $\beta$  単独では  $\kappa$ B 転写活性を誘導することができないことがわかった。さらに、TNF、LT $\beta$ R シグナリングにおいて I $\kappa$ B のリン酸化をウェスタンブロット法で調べたところ、TNF は I $\kappa$ B のリン酸化を誘導したが、LT $\beta$ R シグナリングでは I $\kappa$ B リン酸化を誘導しないことがわかった。この結果を確認するため、細胞免疫組織化学染色法で p65 の核移行を解析した。その結果、LT $\beta$ R シグナリングにおける NF- $\kappa$ B 活性化においては p65 の核移行を伴わないで NF- $\kappa$ B 依存性転写を活性化することがわかった。

(2) NF- $\kappa$ B 活性化に関わる因子の相互作用：293 と HT29 細胞に様々の NF- $\kappa$ B 活性化因子とそれらの dominant negative 変異体を導入し、Luciferase assay でその作用を解析した。TNF により誘導された NF- $\kappa$ B 活性は NIK、IKK $\alpha$  また IKK $\beta$  の dominant negative 変異体によって抑制された。しがし、LT $\beta$ R シグナリ

ングにより誘導された NF- $\kappa$ B 活性では NIK と IKK $\alpha$  の変異体によって抑えられたが、IKK $\beta$  変異体では抑えられなかった。次いで、これらの因子の共同作用をみたところ、TNF は NIK、IKK $\beta$  との間で共同作用がみられたが、IKK $\alpha$  とではみられなかった。一方、LT $\beta$ R シグナリングは IKK $\beta$  ではなく、IKK $\alpha$  および NIK との間で共同作用がみられた。以上の結果から、TNF シグナリングは主に IKK $\beta$ 、すなわち I $\kappa$ B リン酸化 cascade を使うが、LT $\beta$ R シグナリングは主に NIK、IKK $\alpha$  cascade を使っていることがわかった。さらに、NIK で誘導した NF- $\kappa$ B 活性における IKK $\alpha$ 、IKK $\beta$  とその変異体の作用を確認した。NIK は IKK $\alpha$ 、IKK $\beta$  両方とも共同作用がみられた。他方、NIK で誘導した NF- $\kappa$ B 活性は IKK $\alpha$  変異体によって抑制されたが、IKK $\beta$  によっては抑制されなかった。これらの結果から NIK の作用は IKK $\beta$  でなく主に IKK $\alpha$  と連携していることが示された。

(3) NIK-IKK $\alpha$  の作用部位の同定：NIK-IKK $\alpha$  の作用機構をさらに確認するため、p65 wild-type と様々の変異体の Gal4 融合蛋白の発現プラスミドを作成した。これらプラスミドを細胞に導入し、Luciferase assay でこれら Gal4 融合蛋白の NIK により誘導される転写活性を比較した。その結果、p65 の TA1 領域だけが含まれた Gal4-TA1 融合蛋白は NIK に対して一番高い反応性を示した (図 2)。さらに TA1 領域の 529 番また 536 番セリンをアラニンに変換した変異体を細胞に導入し、NIK により誘導される転写活性を比較したところ、TA1 の転写活性は 536 番セリンの変異によって明らかに抑制された (図 3)。これらの結果から p65 の C-末端 TA1 領域、特にセリン 536 が NIK と IKK $\alpha$  の標的であることが示唆された。

(4) LT $\beta$ R シグナリングにおける p65 の 536 番セリンのリン酸化：細胞に FLAG 標識した p65 (FLAG-p65) を発現し、LT $\beta$ R シグナリングで誘導した p65 セリン 536 のリン酸化を共免疫沈降法で p65 を沈降しウェスタンブロット法で p65 セリン 536 リン酸化抗体を用い

て確認した(図4)。このリン酸化はNIK、IKK $\alpha$  変異体また I $\kappa$ B の発現によって抑制された。以上より、LT $\beta$ R シグナリングにおける NF- $\kappa$ B 活性化は p65 セリン 536 の NIK および IKK $\alpha$  を介したリン酸化に依存していることが明らかになった。

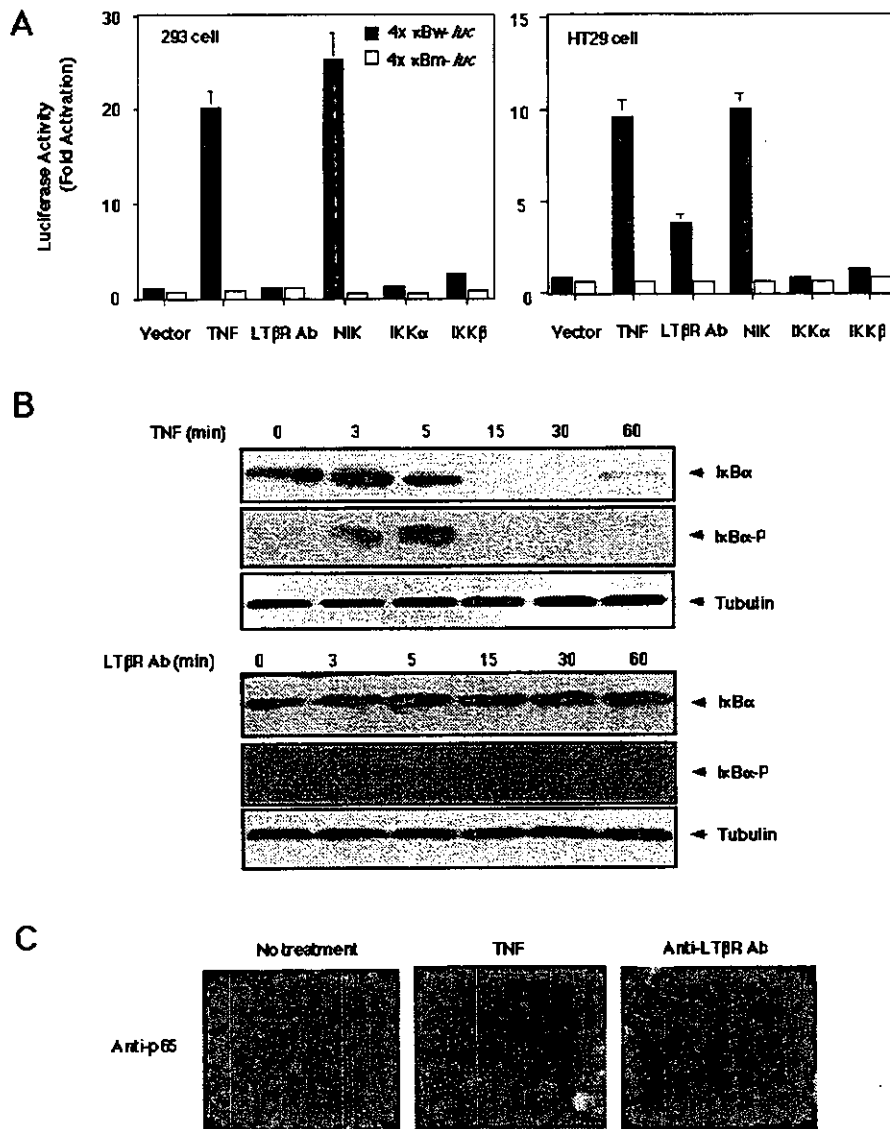
#### D. 考察

今回の研究から、LT $\beta$ R シグナリングにおける NF- $\kappa$ B 活性化は p65 セリン 536 の NIK および IKK $\alpha$  を介したリン酸化に依存していることが確認された。リンフォトキシンからのシグナルは HIV 感染樹状突起細胞でのウイルス遺伝子発現のみならず、リンパ節の形成など HIV によって荒廃されたリンパ組織の再構築にも深く関与している。このシグナルがむしろ活性型 T 細胞を呼び寄せ、HIV 感染の播種に関わっている可能性があるため、LT $\beta$ R シグナルの選択的抑制は AIDS の進展阻止のためにも重要な標的となる。なお、最近の報告から、LT $\beta$ R シグナリングは我々が今回研究対象とした NIK-IKK $\alpha$  を介した p65 のリン酸化 cascade 以外に、もうひとつの cascade、すなわち NIK-IKK $\alpha$  を介した p100-p52 processing、を誘導することが明らかになった。この一連の研究から、潜伏感染 HIV の増殖制御と AIDS 病態の進展における NIK-IKK $\alpha$  cascade の重要性が改めて注目される。

#### E. 研究発表

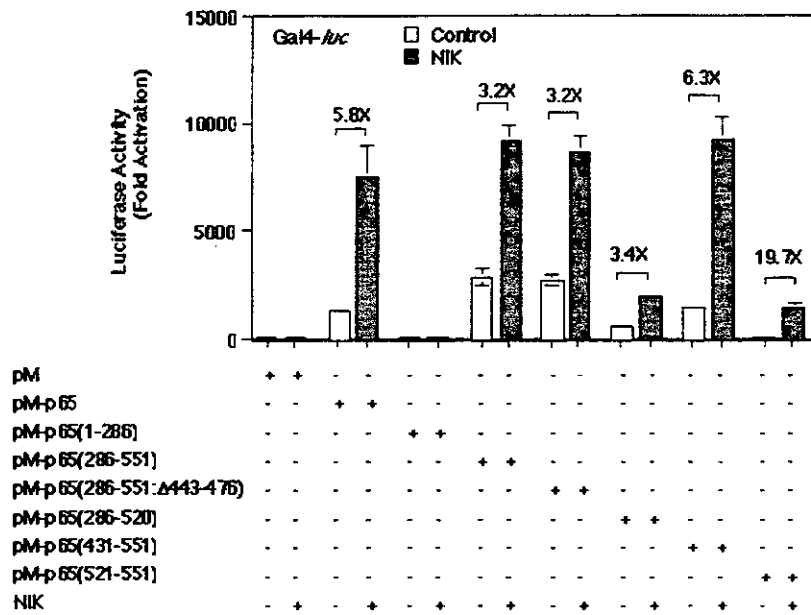
1. Matsumoto S, Imaeda Y, Umemoto S, Kobayashi K and Okamoto T: Cimetidine increases survival of colorectal cancer patients with high levels of sialyl Lewis-X and sialyl Lewis-A epitope expression on tumor cells. *Br J Cancer* 86:161-167, 2002.
2. Kawabe T, Suganuma M, Ando T, Kimura M, Hori H and Okamoto T: Cdc25C interacts with PCNA at G2/M transition. *Oncogene* 21: 1717-1726, 2002.
3. Maki M, Matsukawa N, Yuasa H, Otsuka Y, Yamamoto T, Akatsu H, Okamoto T, Ueda R, Ojika K: Decreased expression of hippocampal cholinergic neurostimulating peptide precursor protein mRNA in the hippocampus in alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 61: 176-185, 2002.
4. Sarol L C, Imai K, Asamitsu K, Tetsuka T, Barzaga N G and Okamoto T: Inhibitory effects of IFN- $\gamma$  on HIV-1 replication in latently infected cells. *Biochem Biophys Res Commun* 291: 890-896, 2002.
5. Tozawa K, Okamoto T, Hayashi Y, Sasaki S, Kawai N, Kohri K: N-acetyl-L-cysteine enhances chemotherapeutic effect on prostate cancer cells. *Urol Res* 30:53-58, 2002.
6. Takada N, Sanda T, Okamoto H, Yang J-P, Asamitsu K, Sarol L C, Kimura G, Uranishi, H, Tetsuka T, Okamoto T: RelA-associated inhibitor blocks transcription of HIV-1 by inhibiting NF- $\kappa$ B and Sp1 actions. *J Virol* 76: 8019-8030, 2002.
7. Watanabe N, Ando K, Yoshida S, Inuzuka S, Kobayashi M, Matsui N, Okamoto T: Gene expression profile analysis of rheumatoid synovial fibroblast cultures revealing the overexpression of genes responsible for tumor-like growth of rheumatoid synovium. *Biochem Biophys Res Commun* 294: 1121-1129, 2002.
8. Takahashi N, Tetsuka T, Uranishi H, Okamoto T: Inhibition of NF- $\kappa$ -B Transcriptional Activity by Protein Kinase A. *Eur J Biochem* 269 : 4559-

- 4565, 2002.
9. Jiang X, Takahashi N, Matsui N, Tetsuka T, Okamoto T: The NF-kappaB activation in the lymphotoxin beta receptor signaling depends on the phosphorylation of p65 at serine 536. *J Biol Chem* 278: 919-926,2003.
  10. Jiang X, Takahashi N, Ando K, Otsuka T, Tetsuka T, Okamoto T: NF-kappaB p65 transactivation domain is involved in the NF-kappaB-inducing kinase (NIK) pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 301:583-590,2003.
  11. Okano A, Usuda N, Furihata K, Nakayama K, Tian Q B, Okamoto T, Suzuki T : Huntingtin-interacting protein-1-related protein of rat (rHIP1R) is localized in the postsynaptic regions. *Brain Res* 2003 (in press).



1. The distinct NF- $\kappa$ B activation cascades by TNF and LT $\beta$ R signaling. (A) The effects of TNF, agonistic anti-LT $\beta$ R mAb, NIK, IKK $\alpha$ , and IKK $\beta$  on the NF- $\kappa$ B-dependent luciferase (*luc*) gene expression. (B) Phosphorylation and degradation of I $\kappa$ B $\alpha$  induced by TNF but not by agonistic anti-LT $\beta$ R mAb. (C) Nuclear localization of p65 in HT29 cells induced by TNF but not by anti-LT $\beta$ R mAb.





2. The determination of the target region within p65 in the NF- $\kappa$ B activation mediated by NIK- $\text{IKK}\alpha$ . The effect of NIK on the Gal4-dependent gene expression driven by various p65 fusion proteins with the Gal4 DNA-binding domain. 293 cells were transfected with 5x Gal4-TATA-*luc* reporter plasmid (*Gal4-luc*) in the presence (closed bar) or absence (open bar) of pcDNA3-NIK together with various pM-p65 constructs. The data are presented as the fold increase in luciferase activities (mean  $\pm$  S.D.) relative to control transfection of three independent experiments.

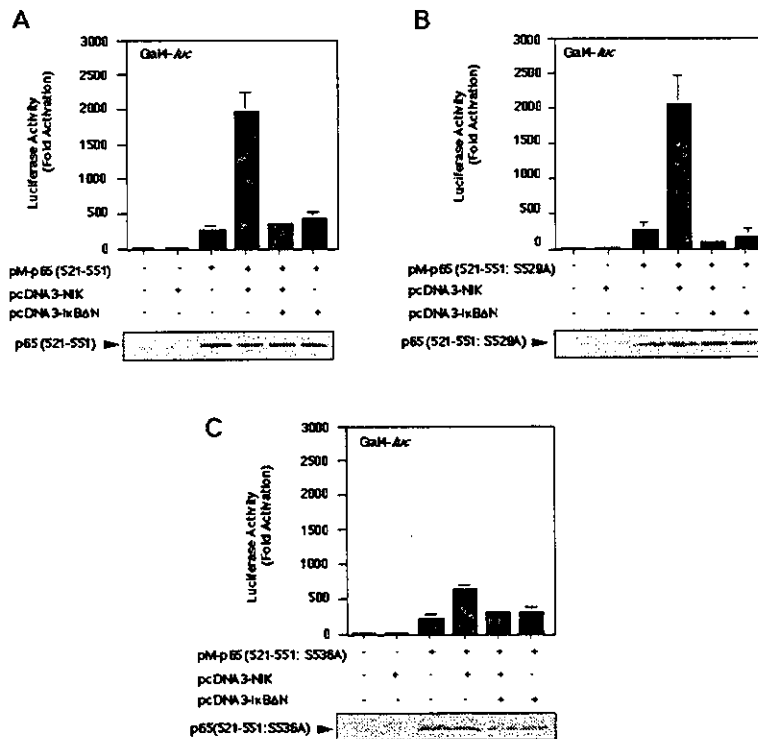
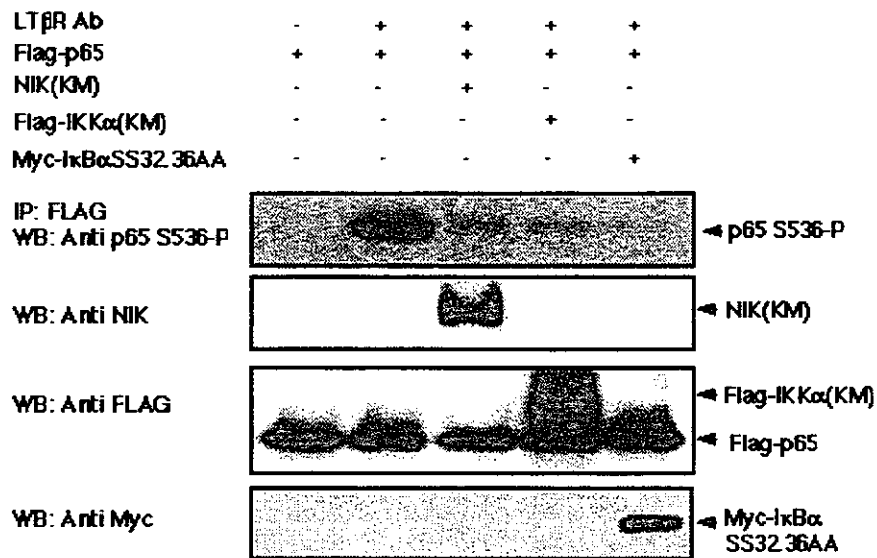


Figure 3. Involvement of Ser536 located in p65 TA1 in the NIK-mediated transcriptional activation. Effects of mutations of Ser529 and Ser536 in TA1 domain of p65 were examined on the NIK-mediated induction of the transcriptional activity of Gal4-p65 TA1 fusion protein. 293 cells were transfected with Gal4-*luc*, pcDNA3-NIK, and various pM-p65 TA1 constructs including pM-p65(521-551) (A), pM-p65(521-551: S529A) (B), and pM-p65(521-551: S536A) (C). Effects of IκBΔN were also examined. Lower panels show the results of Western blotting using anti-Gal4 antibody indicating that equivalent amounts of pM-p65 TA1 and its mutants were expressed in each transfection irrespective of the cotransfection with pcDNA3-NIK or pcDNA3-IκBΔN.



⊠ 4. Phosphorylation of p65 at Ser 536 during the LT $\beta$ R signaling. Phosphorylation of p65 at Ser536 by the LT $\beta$ R signaling. HT29 cells were co-transfected with various combinations of plasmids expressing Flag-tagged p65 (Flag-p65), NIK(KM), Flag-tagged IKK $\alpha$ (KM) and Myc-tagged I $\kappa$ B $\alpha$ (SS32.36AA)(I $\kappa$ B $\alpha$  mutant in which phosphorylation target Ser residues were substituted by Ala). After stimulation with agonistic anti-LT $\beta$ R mAb for 40 min, cell extracts were prepared and immunoprecipitated with anti-Flag M2 affinity gel. The immunoprecipitates were fractionated by SDS-PAGE and immunoblotted with anti-phospho-p65 NF- $\kappa$ B (Ser536) antibody (upper panel). Lower panels show the immunoblotting detection of NIK(KM), p65, IKK $\alpha$ (KM), and I $\kappa$ B $\alpha$ (SS32.36AA) proteins by respective antibodies. Results of p65 detection indicate that equivalent amounts of Flag-p65 were expressed in each transfection. Note the detection of the phosphorylation of p65 at Ser536 upon LT $\beta$ R signaling and its abrogation by overexpression of NIK(KM) or IKK $\alpha$ (KM), kinase-deficient mutants of the corresponding effector kinases, or phosphorylation-defective I $\kappa$ B $\alpha$  (I $\kappa$ B $\alpha$ SS32.36AA).

## 抗原非特異的機序による HIV 複製の抑制

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）

### 研究要旨

昨年度、我々は非感染者由来の末梢血単核球（PBMC）から、抗原非特異的に HIV-1 複製を抑制する CD8+アロ特異的細胞傷害性 T 細胞（CTL）を誘導した。この CTL は細胞にも傷害性を示さないが、R5、X4 両 HIV-1 株感染自己細胞に対してウイルス抑制活性を持つ。本年度は、この抗原非特異的 HIV-1 抑制機序の解析を行った。健常人由来アロ抗原特異的 CD8 陽性 CTL 株と同一ドナー PBMC 由来の CD4+ T 細胞クロンを作成し、1 サイクル HIV-1 複製しか起こさない Pseudotype virus 用いて HIV-1 複製抑制ステップを解析した。また、HIV-1 感染 PBMC に対する CTL の細胞傷害性は、短時間共培養中の上清に遊離される HIV-1 p24 量を測定し細胞傷害性（%）を算出した。この結果、CD4+T 細胞クロンに対する pseudotype virus 感染系では、感染 24 時間後に CTL を添加しても luciferase 活性は有意に抑制されていた。従って、CTL は少なくとも HIV-1 複製サイクルの後半に一つの抑制ステップを有すると考えられた。また、CTL は HIV-1 感染細胞に対して Fas ligand 依存性の bystander killing により低レベルの細胞傷害性を示すが、CTL と HIV-1 感染自己 PBMC を数日間混合培養し HIV-1 産生量を測定する系では、CTL による HIV-1 産生抑制は Fas ligand 中和抗体に影響されなかった。従って、Fas ligand 依存性の bystander killing は CTL の HIV-1 抑制機序の本質ではないと考えられた。

CD8 陽性 CTL は、抗原非特異的に HIV-1 感染 PBMC のウイルス産生を抑制したが、その機序には少なくとも細胞傷害性と非傷害性の両者が含まれることが分かった。このうち、細胞傷害性は主に Fas ligand 依存性の bystander killing によるものであったが、CTL による HIV-1 抑制の全体に対する貢献は少なかった。Pseudotype virus を用いた解析から、CTL による細胞非傷害性の抑制は HIV-1 の組み込み以降のステップ（おそらく転写段階）に有効であることが推察される。細胞非傷害性の HIV-1 抑制活性は、T 細胞性レセプター以外の CD8+CTL の細胞表面分子を介すると考えられ、今後、生物学的な抗 HIV-1 薬としての開発可能性を持つ。

### A. 研究目的

昨年度、我々は非感染者由来の末梢血単核球（PBMC）から、HIV-1 複製に抑制能を持つ CD8+ T 細胞株を誘導した。これはアロ特異的細胞傷害性 T 細胞（CTL）であり、HIV-1 抗原特異性は無く自己細胞にも傷害性を示さないが、HIV-1 感染自己細胞に対してウイルス抑制活性を持つ。HIV-1 初感染時にこのような機能を持つ細胞集団が生体内に存在すれば、HIV-1 初感染巣の拡大が制限され持続感染への移行を阻止できる可能性がある。本年度は、この抗原非特異的 HIV-1 抑制機序の解析を行った。

### B. 方法

1) 健常人由来アロ抗原特異的 CD8 陽性 CTL 株：

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。この細胞株は Raji 細胞を認識して殺すが自己細胞とは反応しないアロ特異的 CTL であることを確認している。この CTL 株は IL-2 存在下で培養維持し定期的に Raji 刺激を加えた。

2) HIV-1 感染 PBMC に対する HIV-1 抑制：

CTL 誘導に用いたのと同ドナー由来の PBMC を PHA 刺激後 1 週間 IL-2 存在下で培養し、CD8+細胞をイムノビーズを用いて除去し 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、上記 CD8+CTL と HIV-1 感染自己 CD4+PBMC と混合、4 日培養後に上清をハーベストしその中に含まれる HIV-1 p24 量を ELISA により測定した。

3) Pseudotype virus 用いた HIV-1 複製抑

制ステップの解析：

野生型 HIV-1 を用いた場合、培養期間中に複数のウイルスサイクルが進行するため、CTL による HIV-1 複製の抑制ステップを特定することは難しい。そこで、envelope 欠損 HIV-1 を含む luciferase 発現ベクターと Amphotropic murine leukemia virus envelope の発現ベクターを COS 細胞に co-transfection して得られた pseudotype virus を用いた (図 1)。Amphotropic murine leukemia virus envelope は PBMC 中の CD4+ 以外の細胞にも感染し得るので、この実験の感染標的としては CTL と同じドナー由来のアロ特異的 CD4+T 細胞クローンを用いた。CD4+T 細胞クローンに pseudotype virus を感染させ 24 時間後の培養に抗原刺激および CTL を加え、さらに感染 4 日後まで培養し、細胞中に発現する luciferase 活性をルミノメーターにより測定した。

4) HIV-1 感染 PBMC に対する CTL の抗原非特異的細胞傷害の有無：

試験管内で HIV-1 感染させた PBMC 培養のうち、実際に HIV-1 感染の成立している細胞は一部である。従来 Cr 遊離法では、感染細胞と非感染細胞の両者とも標識されてしまうため、感染細胞特異的な細胞傷害性を反映できない。そこで、HIV-1 感染 PBMC 培養内の新たな感染を AZT 存在下で阻止した状態で、短時間 (6-12 時間) 培養中に上清中に遊離される HIV-1p24 量を CTL の存在下あるいは非存在下で測定した。細胞傷害性 (%) は以下の計算式により求めた。細胞傷害性 (%) = (CTL 添加 well の上清中 p24 - 対照 well の上清中 p24) / (培養全体の lysate 中の p24 - 対照 well の上清中 p24) × 100。

### C. 結果

アロ特異的 CD8 陽性 CTL は、試験管内で HIV-1 感染させた PHA 刺激自己 PBMC と混合培養すると、HIV-1 産生を CTL 数依存的に抑制した。この抑制効果は、感染直後に CTL を加えた場合に顕著に認められるが、AZT を添加し新たな感染を阻止した慢性感染系に CTL を加えた場合にも弱いながら認められた。また、この抑制は CCR5 使用 HIV-1 株、CXCR4 使用 HIV-1 株の両者に対して有効であった。CTL の代わりに CTL の上清を培養に加えても HIV-1 抑制効果は再現されず、CD4 細胞と CTL の細胞接触が必要であることが確認された。また、既知の RANTES, MIP1- $\alpha$ ,  $\beta$ , SDF 等のケモカインに対する中和抗体をいれても CTL による抑制は解除でき

なかった。

CD4+T 細胞クローンに対する pseudotype virus 感染系では、他の樹立細胞株を感染標的に用いた場合とは異なり luciferase 活性は非常に低かった。このため、感染 24 時間後に再度抗原刺激を行い CD4+T 細胞クローンを活性化したところ 4 日後測定に耐える量の luciferase 活性が得られた。この実験系に感染 24 時間後に CTL を添加し、luciferase 活性を CTL 非存在下の培養と比べた。その結果、CTL 添加した場合の luciferase 活性は有意に抑制されていた (図 2)。従って、CTL は少なくとも HIV-1 複製サイクルの後半に一つの抑制ステップを有すると考えられた。しかし、このような結果は CTL が感染細胞に対して傷害性を示す場合にも得られる可能性があるため、次に、CTL が HIV-1 感染細胞に対して抗原非特異的な細胞傷害を示さないかどうか調べた。

HIV-1 感染 PBMC を AZT 添加培地中で CTL と短時間培養した際の上清中の p24 量増加を測定した。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。さらに、この実験系に Fas ligand 中和抗体を加えると細胞傷害性は消失した。従って、CTL は HIV-1 感染細胞に対して Fas ligand 依存性の bystander killing により低レベルの細胞傷害性を持つことが分かった。

次に、この Fas ligand 依存性の感染細胞死が、CTL による HIV-1 抑制にどれくらい貢献しているかを調べた。このため、CTL と HIV-1 感染自己 PBMC を数日間混合培養し HIV-1 産生量を測定する系に Fas ligand 中和抗体を添加した。この結果、CTL による HIV-1 産生抑制は Fas ligand 中和抗体に影響されなかった。従って、Fas ligand 依存性の bystander killing は CTL の HIV-1 抑制機序の本質ではないと考えられた。同様の結果は pseudotype virus を用いた 1 サイクルのウイルス複製でも確認された。すなわち、pseudotype virus 感染後培養中に Fas L 中和抗体を添加しても、CTL による luciferase 活性の抑制には影響がなかった (図 2)。

### D. 考察

アロ特異的な CD8 陽性 CTL は、抗原非特異的に HIV-1 感染 PBMC のウイルス産生を抑制したが、その機序には少なくとも細胞傷害性と非傷害性の両者が含まれることが分かった。このうち、細胞傷害性は主に Fas ligand 依存性の bystander killing によるものであったが、CTL による HIV-1 抑制の全体に対する貢献は少なかった。従って、Fas

ligand 感受性の HIV-1 感染細胞が、感染細胞全体に占める割合は非常に小さいことが考えられる。Pseudotype virus を用いた解析から、CTL による細胞非傷害性の抑制は HIV-1 の組み込み以降のステップ（おそらく転写段階）に有効であることが推察される。感染 24 時間後には HIV-1 integration が完了していると考えられ、その時点で CTL を加えても抑制が認められたからである。しかし詳細な機序解明にはさらなる解析が必要である。野生型 HIV-1 を用いた場合には、持続感染よりも急性感染系で顕著に抑制が認められたが、これは、上記の転写レベルの抑制がサイクルを繰り返すことによって増幅されているだけなのか、あるいは新たな抑制ステップが存在するのかが不明である。複製サイクル前半にも CTL による抑制ステップが存在する可能性も否定できない。

本研究で示された HIV-1 抑制活性は、非感染者から誘導可能な機能細胞が持つものであり、R5、X4 両 HIV-1 株に有効であるため、抑制機序の解明および抑制機能分子の同定は、今後抗 HIV-1 効果を有する新たな生物学的治療薬としての意義を持っている。また、このような活性の生体レベルでの誘導は、HIV 初感染時にウイルスの生体内播種増殖を制限する HIV-1 非特異的防御システムの役割を果たす可能性があると考えられる。

#### E. 結論

HIV-1 非感染者から CD8 陽性 CTL は、抗原非特異的に HIV-1 感染 PBMC のウイルス産生を抑制し、その機序には Fas ligand 依存性の bystander killing によるものとウイルス複製後期段階の非傷害性抑制の両者が含まれていた。このうち、前者の貢献は minor であった。本活性は、T 細胞性レセプター以外の CD8+CTL の細胞表面分子を介すると考えられ、今後、生物学的な抗 HIV-1 薬としての開発可能性を持つ。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- i) H. Liu, T. Ohashi, T. Masuda, X. Zhou, M. Kubo, M. Kannagi. Suppression of HIV-1-replication by HIV-1-irrelevant CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes through Fas ligand-mediated cytolysis and noncytolytic mechanisms resulting in preservation of persistently HIV-1-infected cells in vitro. Paper submitted.
- 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., 77: 2956-2963, 2003.

- iii) T. Ohashi, S. Hanabuchi, R. Suzuki, H. Kato, H. Tateno, T. Masuda, and M. Kannagi. Correlation of major histocompatibility complex class I downregulation with resistance of human T cell leukemia virus type I-infected T cells to cytotoxic T-lymphocyte killing in a rat model. J. Virol. 76: 7010-7019, 2002.

##### 2. 学会発表

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

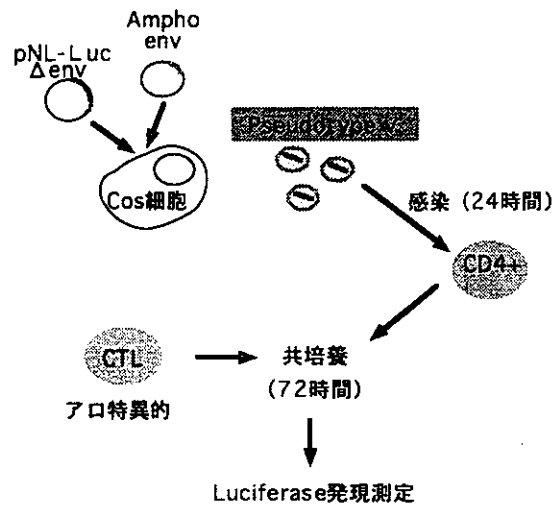


図1 Pseudotype virus 用いた HIV-1 複製抑制ステップの解析：

Luciferase 発現 envelope 欠損 HIV-1 ベクター(pNL-Luc Δenv)と Amphotropic murine leukemia virus envelope の発現ベクター(pJD1)を COS 細胞に co-transfection して得られた pseudotype virus を CD4+T 細胞クローンに感染させ、24 時間後の培養に抗原刺激および CTL を加え、さらに感染 4 日後まで培養し、細胞中に発現する luciferase 活性をルミノメーターにより測定した。

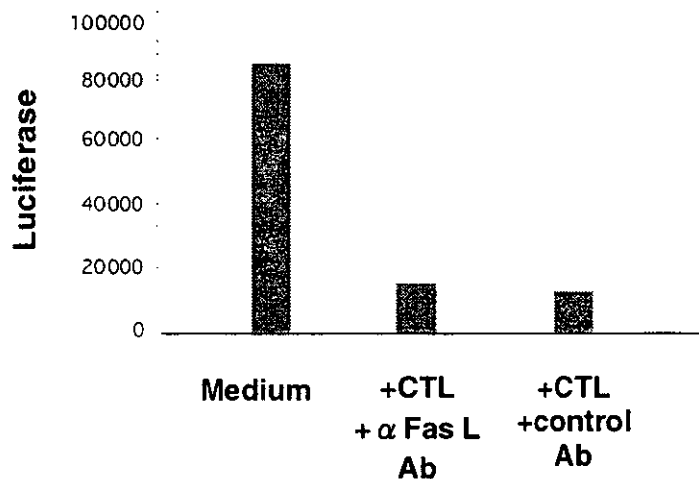


図2 CTLによる HIV-1 複製サイクルの後半ステップの抑制

CD4+ T 細胞に Pseudotype virus を感染させ、24 時間後 CTL と同時に抗 Fas L 中和抗体あるいは対照抗体を添加した。CTL 存在下で luciferase 活性は有意に抑制され、この抑制は Fas L 抗体により阻害をされなかった。

## HIV mRNA の核外輸送を標的とした抗エイズ薬の開発研究

分担研究者：志田壽利（北海道大学遺伝子病制御研究所）

### 研究要旨

Rev の阻害剤を検索するための細胞評価系を構築した。そして予備的に約 3000 化合物を検索した結果 14 物質が Rev の活性を阻害した。

#### A. 研究目的

HIV はスプライシングを制御することにより、数多くの遺伝子を小さなゲノムにコードしている。スプライシングを制御する因子として Rev を自身がコードしている。Rev はイントロンを含む gag や env mRNA の細胞質への発現に必要であるために、ウイルスの増殖に必須である。Rev は細胞質で合成後核内に移入し、ウイルス RNA と結合して核外に輸送する。Rev はその機能を果たすために核内移入シグナル(NLS)と核外移行シグナル(NES)を有している。Rev が RNA を搬出するためには、Rev の単一分子では不十分であり、RNA 上で多量体化することが必要である。Rev の NLS に結合する因子として importin  $\beta$  が、NES に結合する主要コファクターとして hCRM1 が同定された。我々は hCRM1 が Rev を核外に運ぶだけでなく、Rev の多量体化に必要であることを報告してきた。

これまでの我々の基礎研究の成果の上に立って、今年度は、Rev の機能を阻害する化合物を検索するための細胞評価系を構築し、スクリーニングを行うことを目的とした。評価系として Two hybrid system による① Rev-CRM1 の結合阻害と、② Rev-Rev 多量体化阻害、③ Rev 依存性発現レポーターアッセイ系を構築した。

#### B. 研究方法

##### プラスミドの構築

Two hybrid system: Rev をアッセイ時のみ発現させるために Tet-off gene expression system を用いた。始めに薬剤選抜を行うためにハイグロマイシン耐性遺伝子を pBI に挿入した(pBI-Hyg)。次に pBI-Hyg の MCSI に Rev-VP16 遺伝子を挿入して pBI-RevVP を構築した。さらに、pBI-RevVP の MCSII に Gal-Rev を挿入して pBIRR を構築した。また、Gal-hCRM1 を pBI-RevVP の MCSII に挿入して pBIRC を構築した。GAL4 応答プロモーター支配下にルシフェラーゼを組み込んだプラスミド pG5luc に SV40 promoter を含むピューロマイシン耐性遺伝子を挿入して、pG5luc-Pur を作成した。

Rev 依存性発現レポーターアッセイ系：Rev を Tet 制御下に発現する pTRERev を先ず作成し、それに HSV TK promoter を含む hygromycin 耐性遺伝子を挿入して pTRE Rev-Hyg を構築した。Rev 活性測定のために PDM128(HIV ゲノムの tat-env 領域のイントロンに CAT 遺伝子を挿入したもの)の CAT 遺伝子を Luciferase 遺伝子に置き換えた pPDM128Luc を構築した。

##### 安定発現細胞の樹立



HeLa Tet-off に pBIRR と pG5luc-Pur, pBIRC と pG5luc-Pur, pTRE Rev-Hyg と pDM128Luc を導入し、G418, hygromycin, puromycin, Doxycyclin 存在下で培養した。薬剤耐性株のルシフェラーゼ活性の高いクローンを選抜した。その中でも Doxycyclin に対する反応の良いクローンを評価に用いた。

薬効の評価: 上で樹立した細胞株を 96 well plate まき、翌日化合物を含む培地 (Rev を誘導するために Dexycyclin を含まない) に交換した。24 時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。MTT 法による細胞増殖抑制作用、乳酸脱水素酵素を指標にした殺作用 (cytotoxicity) を検討した。

#### C. 研究成果

##### 樹立した評価系細胞の性質

Rev の阻害剤の作用部位として、Rev-Rev 多量体形成、Rev-CRM1 結合、そして RNA 輸送の 3 段階を評価できる細胞系を作成した。Rev-Rev 多量体形成化を測定するために、Rev-VP16, Gal-Rev, pG5luc を組み込んだ細胞を、Rev と CRM1 の結合を測定するために Rev-VP16, Gal-CRM1, pG5luc を組み込んだ細胞を、RNA 輸送を測定するために Rev と pDM128Luc を導入した細胞を樹立した。Doxycyclin を除いて Rev を発現させることによって、高いルシフェラーゼ活性が誘導されることが示された (図 1)。

##### 阻害物質のスクリーニング

上記 3 段階での Rev 活性の評価系を用いて、予備的なスクリーニングを開始した。約 3000 化合物を 1 $\mu$ M, 24 時間処理してルシフェラーゼ活性の低下で効果を判定した。RNA 輸送をほぼ 100%, Rev-CRM1 の阻害が 30% 以下のものが 14 種類見つかった。種々の濃度でのそれらの効果を細胞増殖抑制と殺作用と共に調べたところ、いずれも細胞

殺作用は 50 $\mu$ M でも見られなかったが、細胞増殖抑制作用が見られた。代表的な化合物の結果を図 2 に示す。

#### D. 考察

今年度、我々は Z 社と協力して、Rev の阻害剤を検索するための細胞評価系を構築した。そして予備的に約 3000 化合物を検索した結果 14 物質が Rev の活性を阻害した。しかし、細胞毒性への検討、作用点の同定が必要である。今後 30 万種類の化合物をスクリーニングする予定である。

#### E. 結論

Rev の阻害剤を検索するための細胞評価系を構築した。そして予備的に約 3000 化合物を検索した結果 14 物質が Rev の活性を阻害した。

#### F. 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., Horiuchi, 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

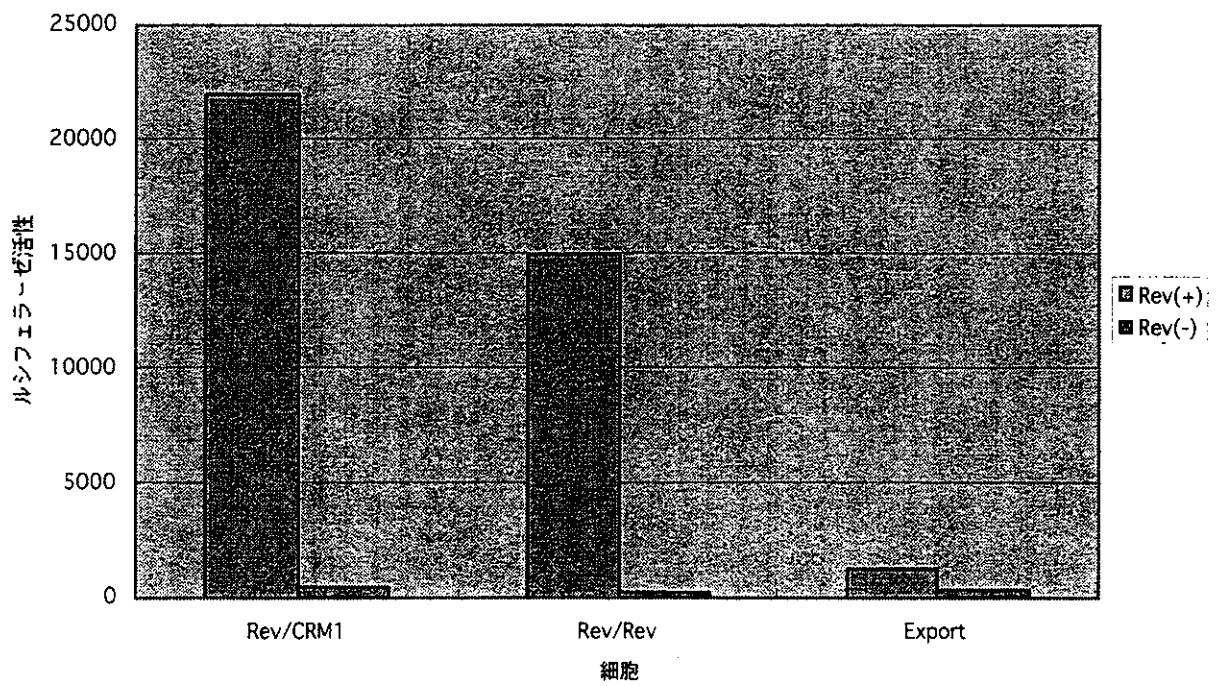
の発現制御の解明、日本分子生物学会 2002, 横浜

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

図1 安定発現細胞のルシフェラーゼ活性



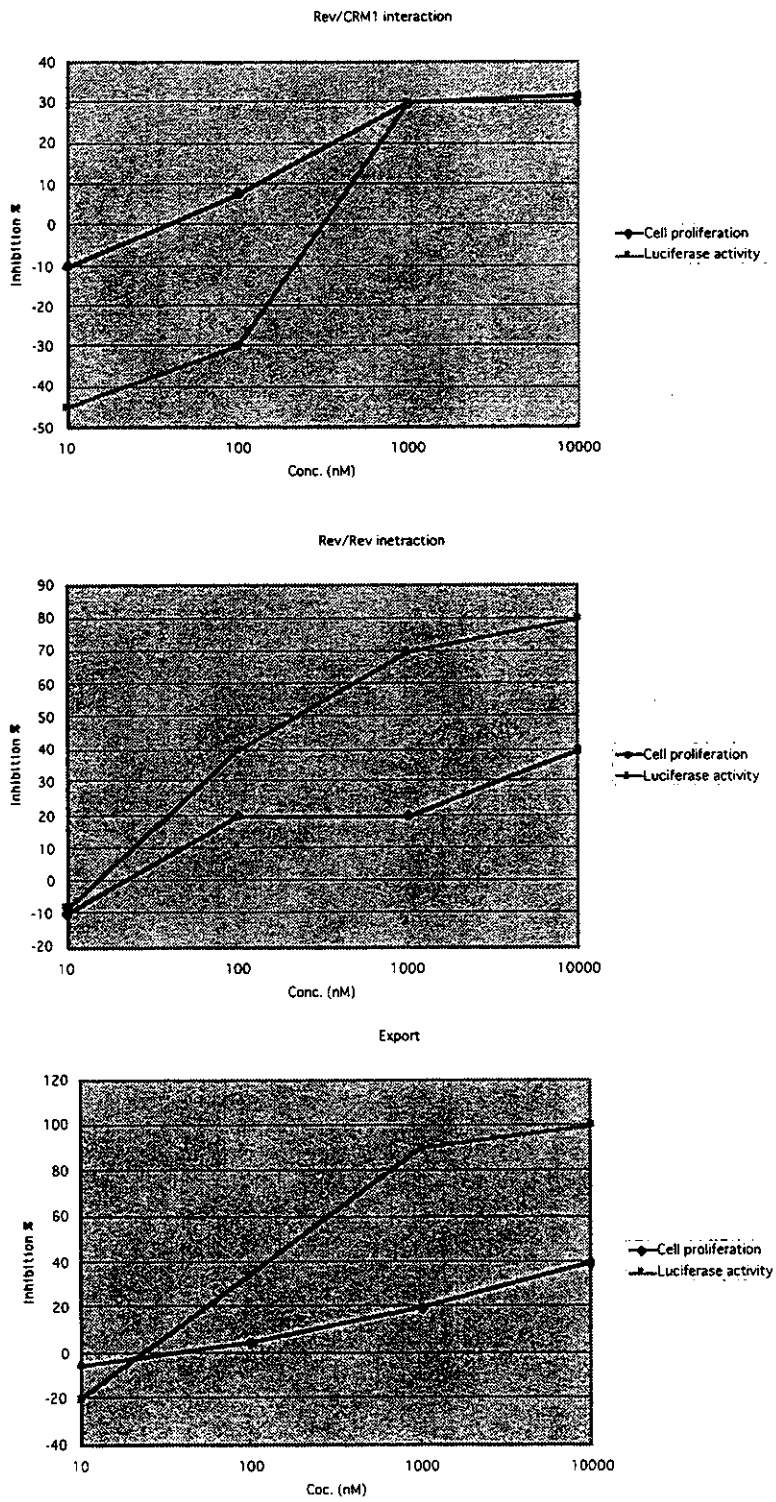


図2 化合物AのRev活性への阻害効果