

存在しない。

これらの知見から、これまでは SIV の細胞指向性は生体における感染細胞と一致しているのではないかと推測されていた。しかし、マクロファージ指向性ウイルスは中和抗体に感受性が高く、本来、T 細胞指向性ウイルスの感染後、エイズを発症し、宿主免疫が破綻した時に出現するウイルスであるので、宿主免疫が正常な状態でも生体内のマクロファージに感染するかという点については明らかにされていない。そこで本研究では細胞指向性が異なるウイルスを用いて、宿主における感染細胞の局在、感染部位での免疫応答、サイトカイン誘導などを解析することにより、細胞指向性というウイルスの性質がその後の病態に与える意義について検討をすることを目的とする。今年度は 4 種の SIV の *in vitro* での細胞指向性に関する性質を解析した。さらにそれらのウイルスをアカゲザルに接種し、初期感染における感染細胞の解析を開始した。

B. 研究方法

1. 実験に用いたウイルスまたは Env

SIVmac239: 病原性 SIV 分子クローン, アカゲザル感染でエイズを発症。

239/316env: エイズを発症した SIVmac239 感染ザルの肺胞マクロファージから分離されたマクロファージ指向性 SIV316 由来の env を SIVmac239 env と組換えた SIV。

MERT: SIV316 Env のマクロファージ指向性に最も重要な 4 アミノ酸変異を持つ。

Δ5G: SIVmac239 Env に存在する 22 個の N-結合型糖鎖のうちの 5 個が欠失。サルへの感染では初期感染は SIVmac239 と同等で

あるが、慢性感染は制御される。

2. 細胞指向性の解析

アカゲザル末梢血から分離した PBMC およびアカゲザル肺洗浄液から分離した肺胞マクロファージにそれぞれのウイルスを感染させ、経時的に採取した培養上清中の p27 Gag 量を ELISA によって測定することにより、ウイルス増殖を調べた。

3. CD4 非依存性の解析

細胞融合アッセイによって CD4 非依存性を調べた。マウス L 細胞を用い、片方の細胞群にそれぞれの Env と T7 ポリメラーゼを発現させ、もう一方の細胞群には T7 ポリメラーゼ依存的に beta-ガラクトシダーゼを発現するプラスミドをトランスフェクションした後、ウイルスレセプターである CD4 と CCR5、または CCR5 のみを発現させた。両方の細胞群を混ぜて培養し、細胞融合に伴う T7 ポリメラーゼ依存的 beta-ガラクトシダーゼ発現を測定した。

4. アカゲザルへの感染実験

アカゲザルにそれぞれ SIVmac239、MERT、Δ5G を 200TCID₅₀ 静脈内接種した。感染後、7-9 日または 12-14 日に安楽殺を行い、各臓器の採取、リンパ節・脾臓・空腸・回腸からのリンパ球分離を行った。

5. 感染細胞の解析

各ウイルス感染ザルから得た各リンパ節、腸管、脾臓のパラフィン包埋標本を用いて、免疫染色を行い、SIV 感染細胞の分布と同定を行った。

C. 研究結果

1. それぞれの SIV の in vitro における細胞指向性

解析に用いたウイルスは SIVmac239 を親株として、Env のみが異なる。サル PBMC での増殖能はすべてのウイルスで同等であった (図 1A)。それに対して、サル肺胞マクロファージでの増殖能は大きく異なり、239/316env と MERT はきわめてよく増殖したが (図 1B)、SIVmac239 はほとんど増殖しなかった (図 1B、C)。Δ5G は明らかにマクロファージで増殖したが、239/316env や MERT と比較すると増殖能ははるかに低かった (図 1B、C)。

2. それぞれの SIV の CD4 非依存性

マクロファージ指向性と関連する性質として CD4 非依存性がある。エイズウイルスは CD4 と CCR5 のふたつのレセプターを使い、多段階の過程を経て細胞に侵入する。T 細胞指向性ウイルスは Env の gp120 が CD4 と結合することにより、隠れていたコレセプター CCR5 との結合部位が露出する。そして gp120 と CCR5 が結合し、gp41 の構造変化が起こりウイルス膜と細胞膜の融合が起こる。しかし、マクロファージ指向性ウイルスは CD4 との結合の必要性が低下している (CD4 非依存性)。マクロファージは CD4 発現が低いので CD4 非依存性を獲得したウイルスが感染できると考えられる。そこで各ウイルスの CD4 非依存性を細胞融合アッセイによって解析した。

図 2 に示すように、SIVmac239 Env は 2 つのレセプターがないと細胞融合は起こら

ない。しかし、マクロファージで増殖した 239/316env や Δ5G の Env は部分的にはあるが CD4 非依存性があることが明らかになった。しかし、MERT の Env は CD4 非依存性を示さなかった。

3. アカゲザルにおける初期感染の解析

ウイルス感染後安楽殺したサルの小腸、腸管膜リンパ節、表層リンパ節について感染細胞の局在を調べるため、抗 SIV 抗体 (抗 Nef または抗 Gag 抗体) と抗 CD3 抗体 (T 細胞マーカー) または抗 CD68 抗体 (マクロファージマーカー) とで免疫蛍光染色を行った。SIVmac239 感染ザルと MERT 感染ザルの小腸では CD3 陽性細胞だけでなく、数多くの CD68 陽性細胞に SIV シグナルが認められた。それに対して、Δ5G 感染ザルの小腸では CD3 陽性細胞が主要な SIV 感染細胞であった。すなわち、小腸では SIVmac239 と MERT は T 細胞だけでなく、マクロファージにも感染していたのに対し、Δ5G の感染は T 細胞が主要な感染細胞であった。各ウイルスの腸管膜リンパ節における感染細胞も小腸と同様な傾向が見られた。しかし、表層リンパ節ではいずれのウイルス感染でも T 細胞が主要な感染細胞であった。

D. 考察

エイズウイルス感染の主要な標的細胞は CD4+T 細胞とマクロファージであり、分離されたウイルスはこの二つの細胞に対する感染性 (細胞指向性) が異なる。これまで細胞指向性は宿主感染における感染細胞と一致しているのではないかと推測されていた。しかしこの性質は培養細胞を用いたウ

ウイルスの増殖性であることから実際の感染宿主での細胞指向性と一致しない可能性も考えられる。T細胞、マクロファージは組織間、あるいは同じ組織においても分化、活性化が異なることが明らかである。

本研究では細胞指向性の異なる4種のSIVの*in vitro*における性質を調べ、そのうちの3種のウイルスについて、アカゲザルにおける初期感染期の感染動態について解析を開始した。その結果、SIVmac239とMERTは*in vivo*でマクロファージにも高率に感染していることが示されたが、 $\Delta 5G$ はほとんどの感染細胞がT細胞であった。

これまでの感染実験における血漿ウイルスロードの測定から、SIVmac239は初期感染でのウイルス増殖が激しく、その後においても高い持続感染が継続し、感染後2年以内に半数以上がエイズを発症する。マクロファージ指向性変異を持つMERTもSIVmac239と同様に初期感染で高いウイルスロードを示すが、その後一時的に検出限界以下となる。しかし再び、ウイルスロードは上昇しSIVmac239と同様な持続感染が見られた。エイズ発症はSIVmac239より遅延した。糖鎖欠失変異を持つ $\Delta 5G$ 感染では、SIVmac239と同等の初期感染後、速やかにウイルスロードは検出限界以下となり、その後も長期間にわたって感染は制御された。このような病態の違いと今回得られた初期感染における標的細胞の違いはリンクしていると考えられる。今後は初期感染におけるマクロファージ感染と免疫不全、エイズ脳症の発症の関連をさらに詳細に解析していくため、標的組織でのCD4+T細胞の活性化や抗ウイルス宿主応答の違いを明らかにしていく必要があると考える。

E. 結論

SIVの*in vitro*と*in vivo*における細胞指向性は必ずしも一致せず、*in vivo*における標的細胞の違い（特にマクロファージへの感染）が病態を左右すると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

1. Villinger F, Miller R, Mori K, Mayne AE, Bostik P, Sundstrom JB, Sugimoto C, Ansari AA. IL-15 is superior to IL-2 in the generation of long-lived antigen specific memory CD4 and CD8 T cells in rhesus macaques. *Vaccines*, 22, 3510-3521, 2004.
2. Matano T, Kobayashi M, Igarashi H, Takeda A, Nakamura H, Kano M, Sugimoto C, Mori K, Iida A, Hirata T, Hasegawa M, Yuasa T, Miyazawa M, Takahashi Y, Yasunami M, Kimura A, O'Connor DH, Watkins DI, Nagai Y. Cytotoxic T Lymphocyte based Control of Simian Immunodeficiency Virus Replication in a Preclinical AIDS Vaccine Trial. *J Exp Med*, 199, 1709-1718, 2004.
3. Lun WH, Takeda A, Nakamura H, Kano M, Mori K, Sata T, Nagai Y, Matano T. Loss

of virus-specific CD4+ T cells with increases in viral loads in the chronic phase after vaccine-based partial control of primary simian immunodeficiency virus replication in macaques. J Gen Virol, 85, 1955-1963, 2004.

4. Ansari AA, Mayne AE, Onlamoon N, Pattanapanyasat K, Mori K, Villinger F. Use of recombinant cytokines for optimized induction of antiviral immunity against SIV in the nonhuman primate model of human AIDS. Immunol Res, 29, 1-18, 2004.

学会発表

1. 糖鎖欠損変異 SIV の弱毒化とウイルス学的性質の変化 杉本智恵、塩田達雄、中山英美、扇本真治、山本直樹、永井美之、鈴木康夫、森 一泰、日本ウイルス学会、2004年、横浜

2. Sugimoto C, Yasutomi Y, Ohgimoto S, Shioda, T, Yamamoto N, Nagai Y, Mori K. Viral properties of deglycosylated SIVmac239 mutants: Implication for Neutralization sensitivity, cell tropism and CD4 independency. 22th annual symposium on nonhuman primate models for AIDS, 2004, San Antonio, USA.

3. Saito N, Sugimoto C, Yamamoto N, Villinger F, Ansari A, Mori K. Magnitude of SIV specific CD4 T cells correlated to

the control of SHIV-RT infection in the animals received post-exposure prophylaxis. 22th annual symposium on nonhuman primate models for AIDS, 2004, San Antonio, USA.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他
特になし

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 脳症におけるアストロサイトの役割について
—HIV 白質脳症のアストログリオシスの発症および病態機構の解明—

分担研究者 馬場昌範 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科教授
研究協力者 岡本実佳 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科講師
王 欣 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科研究員

研究要旨：現在、HIV 脳症におけるアストロサイトの役割を含め、HIV 脳症の詳細な発症機序および病態は未だに不明である。本研究においては、HIV 脳症における脳内マクロファージ/ミクログリアの *in vitro* モデルとして、末梢性単核細胞 (PBMCs) 由来のマクロファージを用い、HIV-1 感染あるいは非感染のマクロファージの上清を、初代培養ヒトアストロサイトに作用させ、その影響について検討した。その結果、感染および非感染マクロファージの培養上清は、ともにヒトアストロサイトの有意な増殖の活性化を引き起こした。また、その作用は非感染と比較して、感染マクロファージの培養上清においてより顕著であった。さらに HIV-1 感染および非感染マクロファージの培養上清によるヒトアストロサイトの増殖活性化は、stromal cell-derived factor-1 α (SDF-1 α) に対する中和抗体および matrix metalloproteinase (MMP) 阻害剤により抑制された。また、感染および非感染マクロファージの培養上清で刺激されたヒトアストロサイトでは、MMP および tissue inhibitors of MMP (TIMP) の mRNA の発現、さらに SDF-1 α 産生の増加が認められ、その SDF-1 α 産生は MMP 阻害剤により抑制された。以上の結果から、HIV-1 感染および非感染マクロファージより分泌された因子はアストロサイトを活性化し、その結果、アストロサイトにおける SDF-1 α や MMP の発現が誘導され、それらの作用によって、アストロサイトの異常な増殖活性化が起きていると思われた。このことは HIV-1 脳症におけるアストログリオシス発症機序に深く関与していると考えられる。

A. 研究目的

HIV 脳症は、HIV-1 が直接関与する亜急性ないし慢性進行性の中枢神経

障害であり、認知障害および行動障害を呈する。HIV 脳症患者の中枢神経系においては、脳内マクロファージ/ミクログリア、およびそれらの融合と考

えられる多核巨細胞を伴う多発性、散在性の亜急性脳炎・脊髄炎（HIV 脳炎・脊髄炎）、また、大脳白質におけるミエリンの減少、アストロサイトの増加を伴うびまん性病変（HIV 白質脳症）が特異的に認められる。

HIV 脳症においては、脳内マクロファージ/ミクログリア、特に多核巨細胞において、高率に HIV-1 感染が認められる。しかし、アストロサイトでは *in situ* ハイブリダイゼーションなどで HIV-1 が同定される場合はあるが、ウイルスの増殖性感染については疑問視されている。また、神経細胞における HIV-1 感染はほとんど証明されていない。このようなことから、HIV 脳症は、HIV-1 に感染した脳内マクロファージ/ミクログリアにおいて生産された HIV-1 粒子、ウイルス由来の蛋白質、あるいは炎症性サイトカインなどの神経細胞に対する毒性因子により、神経細胞がアポトーシスを起こし、その結果、脳機能障害が惹起されることにより発症すると考えられている。しかし、HIV 脳症の詳細な発症機序および病態については未だ明らかにされていない。

特に、アストロサイトは脳内グリア細胞としては最も多い細胞で、サイトカインを含めた種々の神経栄養因子、神経生存因子を産生し、また、多くの神経伝達物質や調節因子の受容体を発現していることから、神経細胞の支持細胞というだけでなく、神経細胞との相互作用を介して、細胞の生存および機能性の維持に深く関与している。アストロサイトは、脳障害時において

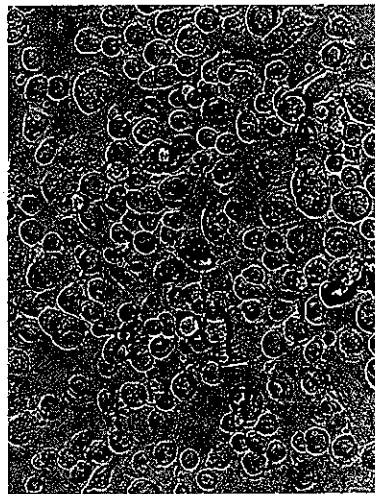
は反応性アストロサイトとなり、その病態形成および修復に重要な役割を果たしていることが知られている。さらに、HIV 脳症において、アストロサイトの増殖（アストログリオシス）が特徴的な病理像の一つであることからみても、その発症および病態にアストロサイトが深く関与していると推測される。しかし、それらの詳細については不明である。

本研究は、*in vitro* で分化した培養マクロファージが未刺激においても活性化状態にあり、種々のサイトカインなどを分泌していることから、HIV 脳症における脳内マクロファージ/ミクログリアのモデルとなる可能性が示唆された。そこで、HIV-1 感染および非感染培養マクロファージのヒトアストロサイトの初代培養に対する影響について詳しく検討し、HIV 脳症における脳内マクロファージ/ミクログリアとアストロサイトの相互作用の解明を試みた。

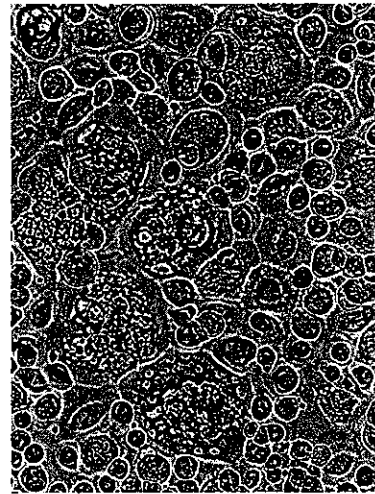
B. 研究方法

1) HIV-1 感染および非感染マクロファージ

健常人の PBMCs から得られた単球を、マクロファージへと分化させた。その後、HIV-1 (Ba-L 株) を用いて感染(あるいは疑似感染)させた(図 1)。感染後、細胞を一度洗浄し、引き続き 10 日間培養した。その後、それぞれの培養上清を採取し、アッセイに用いるまで -80°C で保存した。感染マクロファージ培養上清中の HIV-1 p24 抗原



Uninfected



HIV-1-infected

図1. 非感染 (左) および HIV-1 感染 (右) 初代培養ヒトマクロファージ

を ELISA 法で測定した結果, 平均 60 ng/ml であった (data not shown)。

2) 初代培養ヒトアストロサイト

本研究に用いた初代培養ヒトアストロサイトは Cambrex 社 (米国) より購入した。アストロサイト専用培地 (Cambrex 社) を用いて培養した。

3) ヒトアストロサイト増殖試験

各種薬剤の存在あるいは非存在下において, 初代培養ヒトアストロサイトの培養上清中に 20% の HIV-1 感染あるいは非感染マクロファージの培養上清を添加しアストロサイトを培養した。また, 中和抗体や薬剤と作用させた感染あるいは非感染マクロファージの培養上清をヒトアストロサイトの培養上清中に 20% 添加し培養した。その後, アストロサイトの生細

胞数を色素法にて定量した。

4) DNA および RNA の検出

HIV-1 感染の有無について, アストロサイトから抽出された DNA を用いて, PCR 法によりプロウイルス DNA を検出することにより確認した。また, HIV-1 感染および非感染マクロファージ培養上清を作用させた初代培養ヒトアストロサイトから total RNA を抽出し, CCR5 および CXCR4 の mRNA の発現を RT-PCR 法により解析した。さらに, MMP および TIMP の mRNA 発現についても同様に RT-PCR 法を用いて解析した。

5) ELISA

薬剤の存在および非存在下において, HIV-1 感染あるいは非感染マクロファージ培養上清を作用させた後, ア

ストロサイトの培養上清を採取し、それぞれにおける SDF-1 α の産生量を ELISA 法を用いて測定した。

(倫理面への配慮について)

本研究では、健常人からマクロファージを得るために PBMCs の供給を受

けたが、その際にはその検体に関する遺伝子解析実験を一切行わないことを必ず説明し、提供者からの同意を得た。また、ヒト初代培養アストロサイトについては市販品を用い、個人を特定できるようなドナーからの提供は一切受けていない。



Anti-GFAP monoclonal antibody



Control serum

図 2. 初代培養ヒトアストロサイトの免疫組織染色

C. 研究結果

1) HIV-1 感染および非感染マクロファージ培養上清によるヒトアストロサイトの増殖活性化

用いた初代培養細胞のアストロサイトとしての特性は、glial fibrillary acidic protein (GFAP) に対する抗体を用いた免疫組織化学染色法により確認された (図 2)。また、初代培養ヒトアストロサイトでは、これまでいくつ

かの研究グループにより報告されてきたように、HIV-1 のコレセプターである CXCR4 および CCR5 は発現していたが、レセプターである CD4 の発現については認められなかった (図 3)。

HIV 脳症における、脳内マクロファージ/ミクログリアとアストロサイトの間接的な相互作用を解明するため、HIV-1 感染あるいは非感染マクロファージの培養上清をアストロサイトに作用させ、それらの生細胞率を測

定した。その結果、HIV-1 感染および非感染のマクロファージの培養上清を作用させたアストロサイトの両方において、培養5日目より有意な細胞増殖が認められた(図4)。その作用は、非感染マクロファージと比較して、感染マクロファージの培養上清において、より顕著であった。それに比べ、未処理のヒトアストロサイトは7日間の培養期間において細胞増殖がほとんど認められなかった。これらの結果から、*in vitro* において、HIV-1 感染および非感染マクロファージの培養上清には初代培養ヒトアストロサイトの増殖を活性化させる作用があることがわかった。また、その活性化能力は非感染マクロファージより HIV-1 感染マクロファージの培養上清の方がより強力であることも明らかとなった。

これまで他の研究グループにより、HIV-1 エンベロープ抗原の gp120、炎症性ケモカインの1つである SDF-1 α が、マウスあるいはラットのアストロサイトの増殖を促進すると報告されている。そこで、リコンビナント gp120 および SDF-1 α のヒトアストロサイトに対する影響を調べた。その結果、gp120 および SDF-1 α は両者ともヒトアストロサイトの増殖を有意に促進した(図5)。しかし、HIV-1 感染あるいは非感染マクロファージの培養上清による増殖活性化の方がそれらより顕著であった。これらの結果から、HIV-1 感染あるいは非感染マクロファージの培養上清によるヒトアストロサイトの増殖活性化には、gp120 およ

び SDF-1 α 以外の因子も関与する可能性が示唆された。

mRNA (RT-PCR)

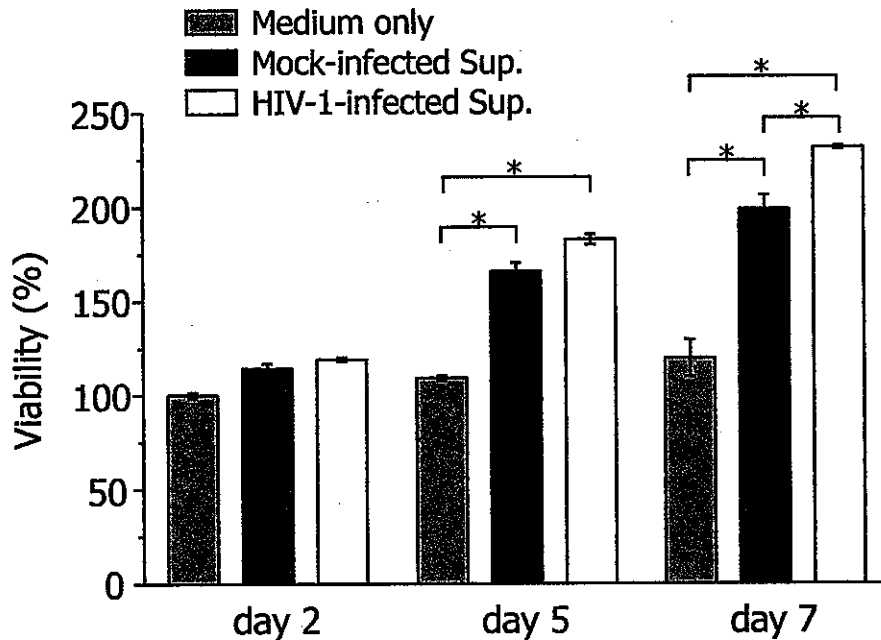
CD4 CCR5 CXCR4

図3. アストロサイトにおける HIV-1 レセプターおよびコレセプター mRNA の発現 (RT-PCR 法)

2) HIV-1 感染および非感染マクロファージ培養上清のヒトアストロサイトの増殖活性化作用に対する各種薬剤および中和抗体の影響

HIV-1 感染および非感染マクロファージの培養上清によるヒトアストロサイトの増殖活性化のメカニズムの解明のため、まず、ヒトアストロサイトにおける HIV-1 感染について調査した。また、マクロファージ培養上清の感染能力を評価するため、PBMCs にも同様に作用させ、ヒトアストロサイトの結果と比較した。その結果、HIV-1 感染マクロファージ培養上清を作用させた PBMCs と比べ少量ではあるが、HIV-1 感染マクロファージ培養上清を作用させたヒトアストロサイトで HIV-1 プロウイルス DNA が検出され、HIV-1 感染が確認された(図6)。

しかし、マクロファージ培養上清を作用させたヒトアストロサイトでは、CCR5 の mRNA 発現はほとんど変化せ



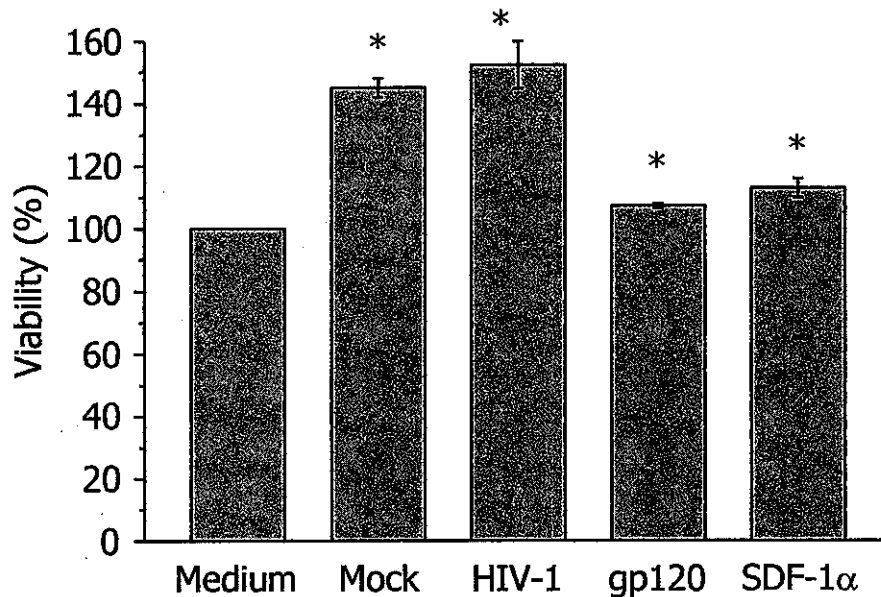
All data represent means \pm SD for three separate experiments. Statistical significance of viabilities between samples was evaluated by Student's *t* test ($p < 0.05$).

図4. HIV-1 感染および非感染マクロファージの培養上清のアストロサイト増殖に与える影響: 初代培養ヒトアストロサイトの培養上清中に, HIV-1 感染 (HIV-1-infected Sup.) あるいは非感染マクロファージの培養上清 (Mock-infected Sup) を 20% 添加し, 培養した。(Medium only: 未処理細胞) その後, アストロサイトの生細胞数を色素法で測定した。すべてのデータは 3 回別々に行われた実験結果の平均値 \pm 標準偏差をあらわす。各サンプル間の有意差は *t* 検定により評価された (*: $p < 0.05$)。

ず, 一方で, CXCR4 の mRNA 発現が増加していた (図 7)。

次に, HIV-1 感染および非感染マクロファージ培養上清によるヒトアストロサイトの増殖活性化に対する各種阻害薬の影響について検討した。アッセイには, HIV-1 逆転写酵素阻害薬である zidovudine (AZT), プロテアーゼ阻害薬である nelfinavir (NFV), 抗 HIV-1 活性を有する CCR5 拮抗薬である TAK-220, さらに, 同じく抗 HIV-1 活性を有する CXCR4 阻害薬である AMD3100 を用いた。まず, 初代培養ヒトアストロサイトにおいて, 各薬剤

のタイトレーションを行った結果, AZT, NFV, TAK-220, および AMD3100 は, 0.1~10 μ M の濃度において, いずれも細胞毒性を示さないことがわかった (図 8)。そこで, 各薬剤とも 1 μ M をアッセイに用いた。その結果, これら全ての抗 HIV-1 薬, また, CXCR4 を介したシグナル伝達など Gi 蛋白質共役レセプター依存性シグナル伝達の阻害剤である百日咳毒素 (pertussis toxin, PTX) は, HIV-1 感染および非感染マクロファージ上清によるヒトアストロサイトの増殖活性化を抑制できなかった (図 9)。



All data represent means \pm SD for three separate experiments.
 Statistical significance of viabilities between samples was evaluated by Student's *t* test ($p < 0.05$).

図5. リコンビナント gp120 および SDF-1α のアストロサイト増殖に与える影響 (マクロファージの培養上清との比較):アストロサイトの培養上清中に, HIV-1 感染 (HIV-1) あるいは非感染マクロファージの培養上清 (Mock) を 20% 添加した。または, アストロサイトの培養上清中に, 1 nM のリコンビナント gp120 (gp120) あるいは 20 nM のリコンビナント SDF-1α (SDF-1α) を添加した (Medium: 未処理細胞)。5 日間培養後, アストロサイトの生細胞数を色素法で測定した。すべてのデータは 3 回別々に行われた実験結果の平均値 \pm 標準偏差をあらわす。各サンプル間の有意差は *t* 検定により評価された (*: $p < 0.05$)。

HIV-1 proviral DNA

1 2 3 4 5



図6. HIV-1 感染マクロファージ培養上清によるアストロサイトの感染: マクロファージ培養上清曝露 24 時間後に各細胞より DNA を抽出し, PCR 法によりプロウイルス DNA を検出した。(1) 非感染マクロファージの培養上清を作用させた PBMCs, (2) HIV-1 感染マクロファージの培養上清を作用させた PBMCs, (3) 未処理のヒトアストロサイト, (4) 非感染マクロファージの培養上清を作用させたヒトアストロサイト, (5) HIV-1 感染マクロファージの培養上清を作用させたヒトアストロサイト。

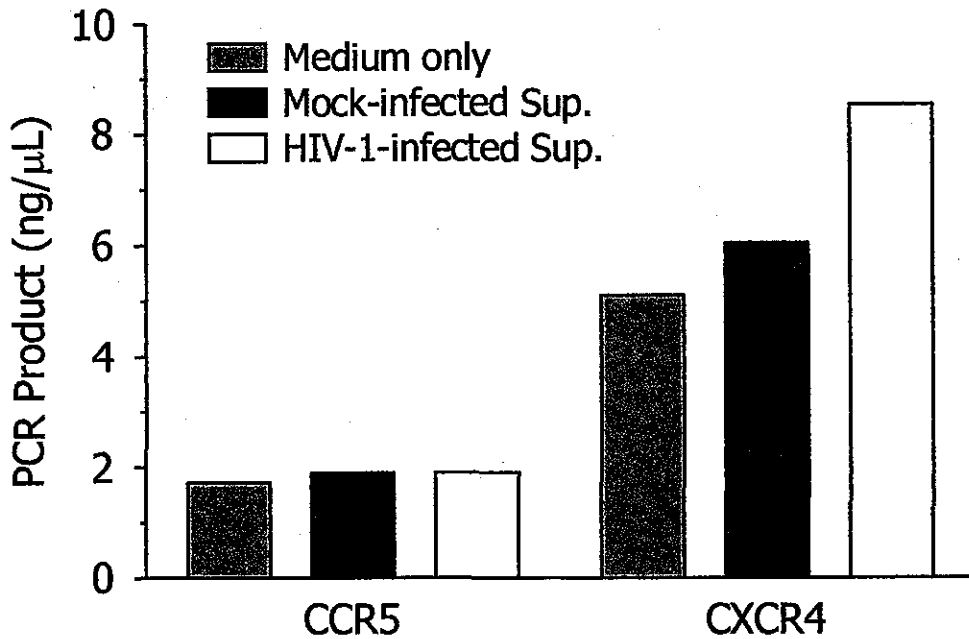
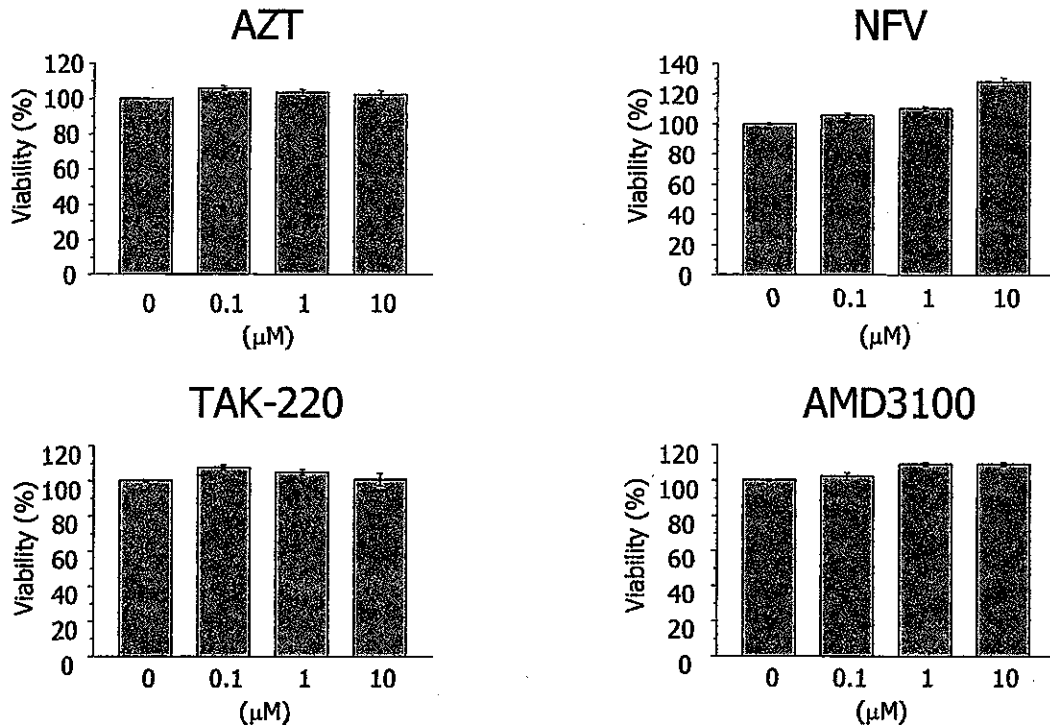


図7. HIV-1 感染および非感染マクロファージの培養上清のアストロサイトにおける CCR5 および CXCR4 mRNA 発現に与える影響：未処理細胞 (Medium only)，および、HIV-1 感染 (HIV-1-infected Sup.) あるいは非感染マクロファージの培養上清 (Mock-infected Sup.) を 24 時間作用させたアストロサイトから total RNA を抽出し、それぞれの mRNA の発現を RT-PCR 法で測定し定量化 (同時に測定したそれぞれの GAPDH の mRNA の発現量で標準化) した。

ところで、MMP は HIV-1 脳症を含めた種々の中枢神経系の炎症性疾患の病態へ関与することが知られている。また、様々な刺激によるアストロサイトの活性化には MAP キナーゼ (mitogen-activated protein kinase) 経路の活性化を介することが知られている。そこで、抗 SDF-1 α 中和抗体、抗 CXCR4 中和抗体、MMP 阻害薬である GM6001、および MEK (MAP kinase-ERK kinase 1) 阻害薬である PD98059 の、マクロファージ上清によるヒトアストロサイトの増殖活性化に対する影響を調査した (図 10)。その結果、

抗 SDF-1 α 中和抗体は非感染マクロファージ培養上清によるヒトアストロサイトの増殖活性化を有意に抑制した。一方、GM6001 は HIV-1 感染および非感染マクロファージ培養上清によるヒトアストロサイトの増殖活性化の両方を有意に抑制した。これらのことから、HIV-1 感染および非感染マクロファージ培養上清によるヒトアストロサイトの増殖活性化には SDF-1 α のみならず、MMP も関与すると思われた。



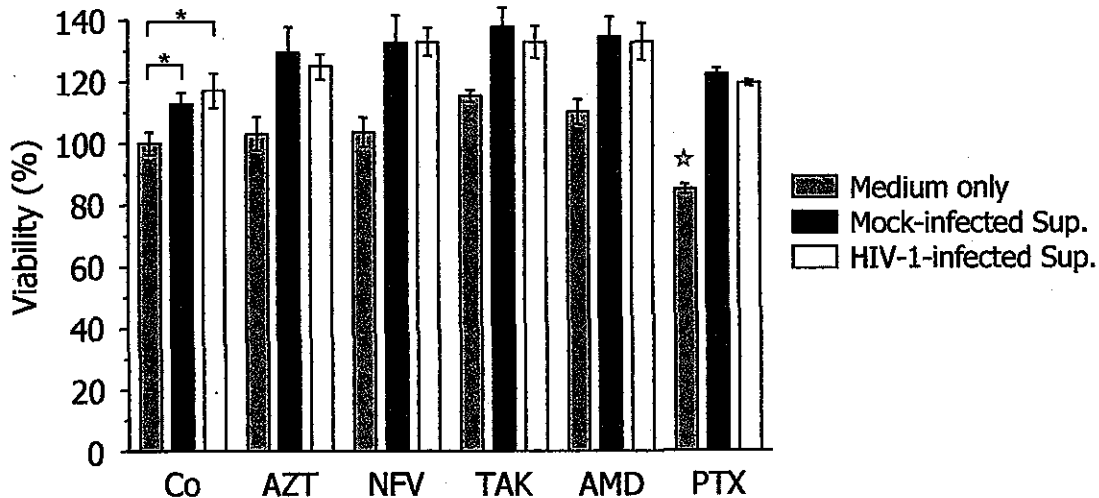
All data represent means \pm SD for three separate experiments.

図8. 各種薬剤のアストロサイトに対する細胞毒性（生細胞率に与える影響）：各濃度の薬剤をそれぞれヒトアストロサイトに作用させ、培養5日目に各生細胞数を色素法で測定した。

3) HIV-1 感染および非感染マクロファージ培養上清によるヒトアストロサイトにおける MMP 発現への影響

マクロファージ培養上清を作用させたヒトアストロサイトにおける MMP およびその内在性の阻害因子である TIMP の発現について、中でも HIV 脳症との関連が指摘されている MMP-1, MMP-2, TIMP-1, および TIMP-2 の mRNA 発現について調べた。その結果、HIV-1 感染および非感染マクロファージ培養上清を作用させたアストロサイトにおいて、MMP-2, TIMP-1, および TIMP-2 の mRNA の発現増強が認められた（図 11）。これらの発

現は、非感染細胞と比較して、HIV-1 感染マクロファージの培養上清を作用させたアストロサイトにおいて、より顕著であった。また、HIV-1 感染マクロファージ培養上清を作用させたヒトアストロサイトにおいては、MMP-9 の発現増強も認められた。これらのことから、HIV-1 感染あるいは非感染マクロファージ培養上清の刺激によって、ヒトアストロサイトでは MMP の発現が増強し、その MMP がヒトアストロサイトの細胞増殖の活性化を引き起こす原因の一つとなっていると考えられた。



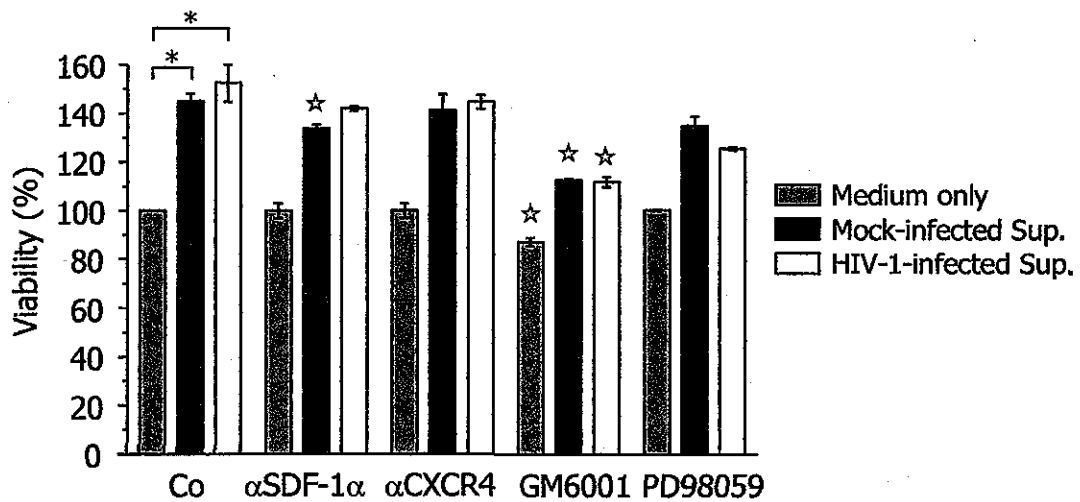
All data represent means \pm SD for three separate experiments.
 Statistical significance of viabilities between samples was evaluated by Student's *t* test ($p < 0.05$).

図9. 各種薬剤のマクロファージの培養上清によるアストロサイト増殖活性化に対する抑制効果：各 HIV-1 およびケモカインレセプター阻害剤 (1 μ M), あるいは PTX (2 nM) をヒトアストロサイトに作用させ, その2時間後に HIV-1 感染および非感染マクロファージ培養上清を20% 添加した。その後5日間培養し, それぞれの生細胞率を MTT 法で測定した。すべてのデータは3回別々に行われた実験結果の平均値 \pm 標準偏差をあらわす。各サンプル間の有意差は *t* 検定により評価された。☆: コントロールのそれぞれのサンプルに対する有意差をあらわす (*, ☆: $p < 0.05$)。

4) HIV-1 感染および非感染マクロファージ培養上清によるヒトアストロサイトにおける SDF-1 α 産生への影響

これまでの結果から, HIV-1 感染および非感染マクロファージ培養上清を作用させたヒトアストロサイトでは, CXCR4 の mRNA 発現が増加していることが明らかとなった (図7)。また, 抗 SDF-1 α 中和抗体は非感染マクロファージ培養上清によるヒトアストロサイトの増殖活性化を有意に抑制することがわかった (図10)。そこで, マクロファージ培養上清によるヒトアストロサイトの増殖活性化に対する SDF-1 α の関与を明らかにするため, HIV-1 感染および非感染マクロフ

ァージ培養上清を作用させたヒトアストロサイトの SDF-1 α 産生量を測定した (図12)。その結果, HIV-1 感染および非感染マクロファージ培養上清を作用させたヒトアストロサイトでは, SDF-1 α の産生が有意に増加していることが明らかとなった。これに対し, GM6001 の存在下においては, ヒトアストロサイトの SDF-1 α 産生が HIV-1 感染および非感染マクロファージ培養上清による増強も有意に抑制された (図12)。これらの結果から, マクロファージ培養上清によるアストロサイトの増殖活性化には, SDF-1 α と MMP が何らかの働きをしていることが示唆された。



All data represent means \pm SD for three separate experiments.
 Statistical significance of viabilities between samples was evaluated by Student's *t* test ($p < 0.05$).

図 10. 抗 SDF-1 α 中和抗体, 抗 CXCR4 中和抗体, MMP 阻害薬 GM6000, および MEK 阻害薬 PD98059 のマクロファージ上清によるアストロサイト増殖活性化に対する抑制効果: 抗 SDF-1 α 中和抗体 (50 μ g/ml), 抗 CXCR4 中和抗体 (100 μ g/ml) あるいは GM6001 (25 μ M) を, それぞれ HIV-1 感染および非感染マクロファージ培養上清と 1 時間反応させた後にヒトアストロサイトの培養上清中に 20% 添加した。または, PD98059 (10 μ M) をヒトアストロサイトに作用させ, その 2 時間後に HIV-1 感染および非感染マクロファージ培養上清を 20% 添加した。その後 5 日間培養し, それぞれの生細胞率を MTT 法で測定した。すべてのデータは 3 回別々に行われた実験結果の平均値 \pm 標準偏差をあらわす。各サンプル間の有意差は *t* 検定により評価された。
 ☆: コントロールのそれぞれのサンプルに対する有意差をあらわす (*, ☆: $p < 0.05$)。

D. 考 察

本研究の結果から, HIV-1 感染および非感染マクロファージの培養上清は, *in vitro* において, 初代培養ヒトアストロサイトに時間依存性の有意な増殖の活性化を引き起こすことが分かった (図 4)。それに対して, 未処理の初代培養ヒトアストロサイトは 7 日間のアッセイ期間中, ほとんど細胞増殖を起こさなかった。また, マクロファージの培養上清によるアストロサイトの増殖活性化作用は, 非感染マク

ロファージと比較して HIV-1 感染マクロファージにおいてより顕著であった (図 4)。これらの結果から, HIV 脳症におけるアストログリオーシスの発症に, 脳内マクロファージ/ミクログリアより分泌される因子が関与する可能性が示唆された。また, HIV-1 由来の因子がアストロサイトの増殖をさらに活性化する可能性があると考えられた。

リコンビナント gp120 および SDF-1 α の両方とも初代培養ヒトアストロサイトの細胞数を有意に増加さ

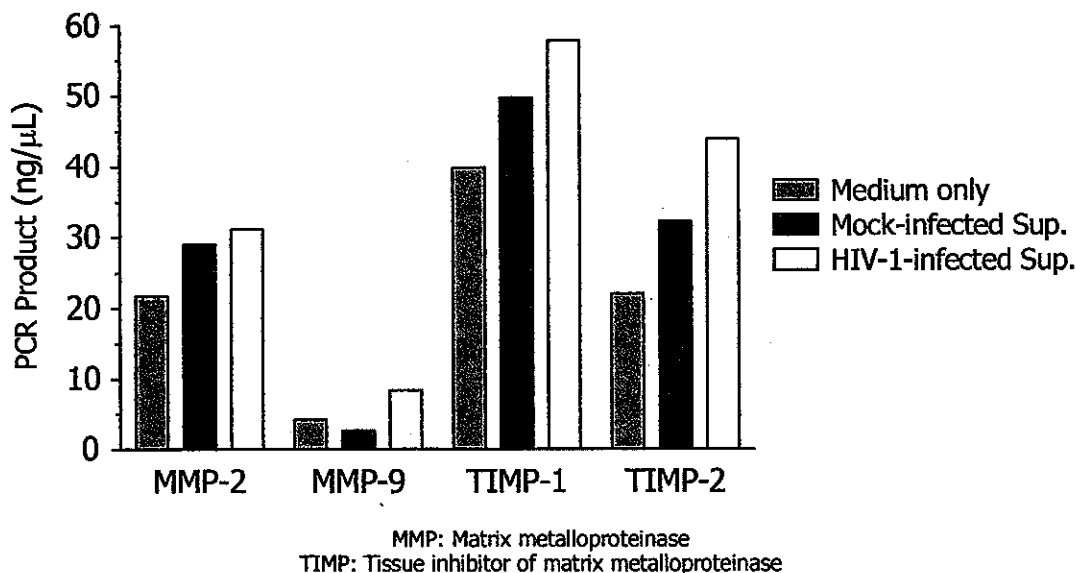
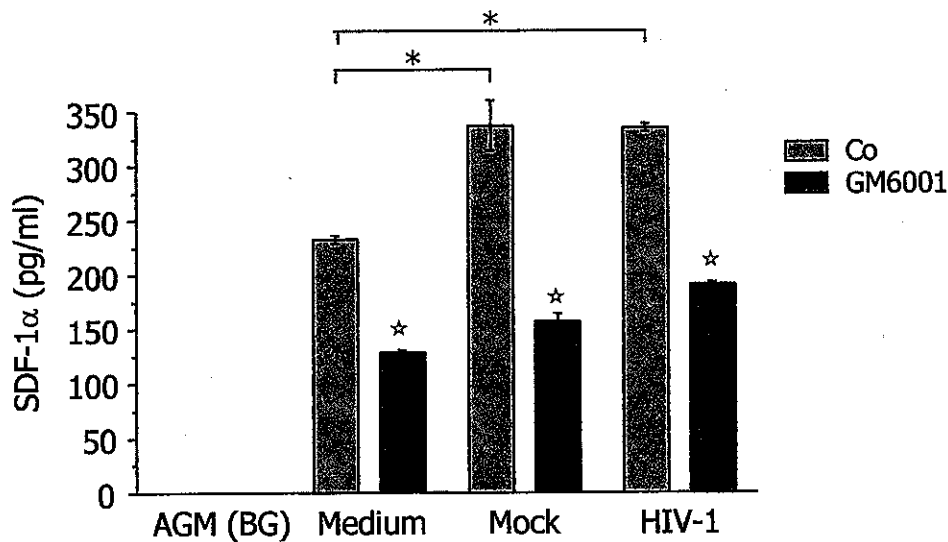


図 11. HIV-1 感染および非感染マクロファージの培養上清のアストロサイトにおける MMP および TIMP mRNA 発現に与える影響: 未処理細胞 (Medium only), および, HIV-1 感染 (HIV-1-infected Sup.) あるいは非感染マクロファージの培養上清 (Mock-infected Sup.) を 24 時間作用させたアストロサイトから total RNA を抽出し, それぞれの mRNA の発現を RT-PCR 法で測定し定量化 (同時に測定したそれぞれの GAPDH の mRNA の発現量で標準化) した。

せた (図 5)。しかし, どちらの作用も HIV-1 感染および非感染マクロファージの培養上清によるヒトアストロサイトの増殖活性化作用を上回るものではなかった (図 5)。これらのことから, HIV-1 感染あるいは非感染マクロファージの培養上清によるヒトアストロサイトの増殖活性化には, GP120 および SDF-1 α 以外の因子も関与する可能性が示唆された。

初代培養アストロサイトでは CCR5 および CXCR4 が発現していた (図 3)。また, 少量ではあるが, HIV-1 感染マクロファージ上清を作用させたヒトアストロサイトにおいて, HIV-1 プロウイルス DNA が検出され, HIV-1 感染が確認された (図 6)。しかし, AZT,

NFV, TAK-220, および AMD-3100 は, いずれも HIV-1 感染および非感染マクロファージの培養上清によるヒトアストロサイトの増殖活性化作用に対して抑制効果は示さなかった (図 9)。それに対して, 抗 SDF-1 α 中和抗体は非感染マクロファージ培養上清によるヒトアストロサイトの増殖活性化を部分的に抑制した。また, MMP 阻害剤である GM6001 は HIV-1 感染および非感染マクロファージ培養上清によるヒトアストロサイトの増殖活性化をどちらも抑制した (図 10)。これらの結果から, HIV-1 感染および非感染マクロファージ培養上清によるヒトアストロサイトの増殖活性化には SDF-1 α のみならず, MMP も関与する



All data represent means \pm SD for three separate experiments. Statistical significance of viabilities between samples was evaluated by Student's *t* test ($p < 0.05$).

図 12. HIV-1 感染および非感染マクロファージの培養上清のアストロサイトにおける SDF-1 α 産生に与える影響：MMP 阻害剤の存在 (GM6001) および非存在下 (Co) で、HIV-1 感染 (HIV-1) あるいは非感染マクロファージ (Mock) の培養上清をヒトアストロサイトに 5 日間作用させた。その後、それぞれの上清中の SDF-1 α 量を ELISA 法で測定した。BG：初代培養ヒトアストロサイト専用培地 (細胞なし)。すべてのデータは 3 回別々に行われた実験結果の平均値 \pm 標準偏差をあらわす。各サンプル間の有意差は *t* 検定により評価された。☆：コントロールのそれぞれのサンプルに対する有意差をあらわす (*, ☆: $p < 0.05$)。

ことが示された。

MMP は細胞外マトリックスを分解する酵素の総称で、創傷治癒過程、癌の増殖・浸潤などにおいて、細胞外基質の分解を介して細胞移動に関与する。MMP 阻害剤により HIV-1 感染マクロファージ培養上清によるヒトアストロサイトの増殖活性化を抑制したことは、他のグループによる SCID マウスを用いた実験結果からも支持される。また、MMP-2 および MMP-9 はアストロサイトにおいて発現し、脳炎および脳障害に深く関与すること

が知られている。HIV 脳症においても、HIV-1 脳症の患者の脳脊髄液および脳組織においては、未発症者に比較し、MMP-2 のレベルの上昇が認められたという報告がある。本研究の結果においても、HIV-1 感染マクロファージ培養上清を作用させたアストロサイトにおいて MMP-2 および MMP-9 の発現増強が認められた。また、非感染マクロファージの培養上清を作用させたヒトアストロサイトでも MMP-2 の発現増強が認められた (図 11)。これらのことから、HIV-1 感染あるいは非

感染マクロファージ培養上清の刺激によって、ヒトアストロサイトでは MMP の発現が増強し、その MMP がヒトアストロサイトの細胞増殖の活性化を引き起こす原因の一つとなっていると考えられた。また、MMP の発現誘導作用は、非感染細胞と比較して、HIV-1 感染マクロファージ培養上清でより強かったことから、HIV-1 粒子、ウイルス性タンパク質、あるいはそれらの刺激によりマクロファージから分泌されたサイトカインなどが、アストロサイトにおける MMP の発現をさらに活性化していると推測された。

TIMP は内在性の MMP 阻害因子である。HIV-1 感染および非感染マクロファージ培養上清を作用させたアストロサイトでは、MMP とともに TIMP-1, および-2 の発現増強も認められた (図 11)。これまでに、他のグループより IL-1 β で刺激されたヒトアストロサイトで、MMP-2 の発現増強と同時に TIMP-1 の発現も増強したという報告がある。本研究の結果において、非感染細胞と比較して、HIV-1 感染マクロファージの培養上清を作用させたヒトアストロサイトにおいて、TIMP-1 および-2 の発現はより顕著であったことから、TIMP 発現増強は MMP の活性化に対する反応性の応答と考えられた。

HIV-1 感染および非感染マクロファージ培養上清を作用させたヒトアストロサイトにおいて、CXCR4 の発現は増加していたが、CCR5 発現はほとんど変化していなかった (図 7)。マク

ロファージ指向性 HIV-1 は CCR5 をコレセプターとして利用することから、ヒトアストロサイトにおける HIV-1 感染とケモカインレセプターの発現誘導には、直接は関連がないと思われた。

この CXCR4 発現の増加は、非感染マクロファージより HIV-1 感染マクロファージ培養上清において顕著であった (図 7)。その傾向は、HIV-1 感染および非感染マクロファージの培養上清のヒトアストロサイト増殖活性化作用と一致する。また、CXCR4 は SDF-1 α のレセプターであることから、マクロファージの培養上清のヒトアストロサイト増殖活性化作用と CXCR4 発現の増加には何らかの関連があると考えられた。

本研究の結果から、抗 SDF-1 α 中和抗体により、非感染マクロファージの培養上清によるアストロサイトの増殖活性化が有意に抑制され、HIV-1 感染マクロファージ培養上清によるアストロサイト増殖促進作用も減弱傾向になることが分かった (図 10)。また、HIV-1 感染および非感染マクロファージの培養上清の作用を受けたアストロサイトでは、SDF-1 α 産生が増加していた (図 12)。このようなことから、SDF-1 α は、HIV-1 感染あるいは非感染マクロファージの培養上清の刺激によりアストロサイトにおいてその産生が増加し、マクロファージの培養上清の作用によって発現が増強されたアストロサイト上の CXCR4 を介して、アストロサイトの増殖を活性化させているのではないかと推測された。

興味深いことに、MMP 阻害剤である GM6001 は HIV-1 感染および非感染マクロファージの培養上清の作用による SDF-1 α 産生誘導をどちらにおいても有意に抑制することが示された (図 12)。これまでいくつかのグループから、破骨細胞、横紋筋肉腫細胞、あるいは骨髄幹細胞において SDF-1 と MMP の相互作用が報告されている。このようなことから、ヒトアストロサイトにおいても、SDF-1 α と MMP が、各々単独の作用ばかりでなく、両者の相互作用を介して、HIV-1 感染および非感染マクロファージ培養上清によるヒトアストロサイトの増殖活性化に関与しているのではないかと推測された。このことは恐らく、本研究結果において、抗 CXCR4 中和抗体、PTX、および PD98059 が、マクロファージの培養上清によるヒトアストロサイトの増殖活性化を抑制できなかったことにも関連すると思われる。

HIV-1 脳症患者の脳内においては、HIV-1 感染あるいは炎症により活性化した脳内マクロファージ/ミクログリアから分泌された因子により、アストロサイトは活性化し、SDF-1 α 、MMP、そして CXCR4 の発現が増強され、それらの作用ならびに相互作用によって、アストロサイトの異常な増殖活性化が起きていると推測される (図 13)。しかしながら、HIV 脳症におけるアストログリオーシスには、その他の細胞性因子および HIV-1 由来因子も関与する可能性がある。それら因子を判明し、さらに HIV 脳症の病態解明および治療法の確立を目指すため、現在、

私たちのグループでは、HIV-1 感染および非感染マクロファージ培養上清を作用させた初代培養ヒトアストロサイトにおける遺伝子発現を、DNA マイクロアレイを用いて解析中である。

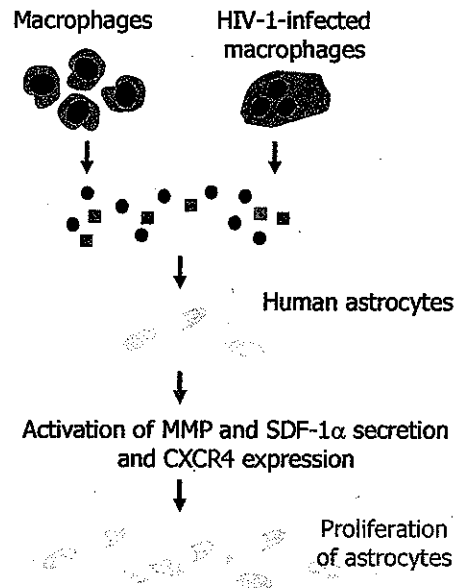


図 13 : HIV 脳症におけるアストロサイトの増殖機序 (仮説) : HIV 脳症においては、HIV-1 感染および非感染マクロファージ/ミクログリアより産生された因子によりアストロサイトは活性化し、その結果 MMP, SDF-1 α , そして CXCR4 などの発現が増強される。それらの作用および相互作用を介して、アストロサイトの増殖が促進され、アストログリオーシスが誘導される。

E. 結論

・ HIV-1 感染・非感染マクロファージ

の培養上清は *in vitro* において、ヒトアストロサイトの有意な増殖の活性化を引き起こし、その作用は HIV-1 感染マクロファージにおいてより顕著であった。

・ HIV-1 感染・非感染マクロファージの培養上清は、ヒトアストロサイトにおいて、SDF-1 α 産生, MMP, TIMP, CXCR4 発現の有意な増加を引き起こした。

・ HIV-1 感染・非感染マクロファージの培養上清によるヒトアストロサイトの増殖活性化は、抗 SDF-1 α 中和抗体および MMP 阻害剤により抑制された。

・ 以上の結果から、HIV-1 感染および非感染マクロファージより分泌された因子は、SDF-1 α , MMP, および CXCR4 発現の活性化を介して、強力にアストロサイトの増殖活性化を引き起こすと考えられ、このことは HIV-1 脳症の発症機序に関与すると思われる

F. 研究発表

1. 論文発表 (欧文のみ)

1. Baba M. Inhibitors of HIV-1 gene expression and transcription. *Curr. Topics Med. Chem.* **4**: 871-883 (2004).
2. Imamura S, Ishihara Y, Hattori T, Kurasawa O, Matsushita Y, Sugihara Y, Kanzaki N, Iizawa Y, Baba M., Hashiguchi S. CCR5 antagonists as anti-HIV-1 agents. 1. Synthesis and biological evaluation of 5-oxopyrrolidine-3-carboxamide derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* **52**: 63-73 (2004).
3. Sawada H, Umedo M, Kawase T, Baba M., Tomita T. Synthesis and properties of fluoroalkyl end-capped sulfobetaine polymers. *J. Appl. Polym. Sci.* **92**: 1144-1153 (2004).
4. Imamura S, Kurasawa O, Nara Y, Ichikawa T, Nishikawa Y, Iida T, Hashiguchi S, Kanzaki N, Iizawa Y, Baba M., Sugihara Y. CCR5 antagonists as anti-HIV-1 agents. Part 2: Synthesis and biological evaluation of N-[3-(4-benzylpiperidin-1-yl)propyl]-N,N(-)di-phenylureas. *Bioorg. Med. Chem.* **12**: 2295-2306 (2004).
5. Dutschman GE, Grill SP, Gullen EA, Haraguchi K, Takeda S, Tanaka H, Baba M., Cheng Y-C. Novel 4'-substituted stavudine analog with improved anti-human immunodeficiency virus activity and decreased cytotoxicity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**: 1640-1646 (2004).
6. Kaneko T, Shimomai S, Miyazaki M, Baba M., Akashi M. IgG responses to intranasal immuni-