

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

エイズ発症阻止に関する研究

分担研究者 竹森 利忠 国立感染症研究所免疫部部長

研究協力者 藤猪 英樹 国立感染症研究所免疫部研究員

研究要旨

成熟 T 細胞により構築される生体の免疫系に与える HIV nef の影響を解析することを目的に、nef 組込みアデノウイルスを作製した。OVA 特異的 T 細胞レセプターを発現し、コクサッキー・アデノウイルス受容体を発現した double Tg マウスより CD4⁺ T 細胞を精製し、ウイルス感染後その機能と性状を報告した。この結果、Nef 発現により T 細胞の抗原刺激に対する反応が低下し、さらに生体内における抗原刺激への応答性とダイナミクスの異常が誘導される可能性を明らかにした。一方 CD4 抑制機能を失った nef を発現すると抑制効果は減弱することから、nef 発現による T 細胞機能異常の一部は CD4 発現抑制に影響されることが示唆された。更に、nef 発現により CD4⁺ T 細胞には抑制 T 細胞への機能変換が誘導される可能性が推察され、上述した T 細胞異常が抑制 T 細胞の効果を反映する可能性が推察された。

A. 研究目的

HIVnef はウイルス感染後の病態発症の主要要因の一つとして考えられている。HIVnef 発現により CD4 と MHC class I 分子の発現抑制、およびウイルス産生増強が報告され、HIVnef は感染細胞の免疫系からの逃避とウイルス産生増加に関わることが予想される。しかし nef の AIDS 発症における病原性誘導の機序は明らかでない。Nef トランスジェニック(Tg)の免疫学的解析により、ウイルス粒子産生なしに CD4⁺ T 細胞減少をはじめとする AIDS 様症状が誘導されて死亡する可能性が示唆され、nef 分子自身が in vivo で病原性発症に関与することが示唆された。しかしこの系では nef の発現が幼若 T 細胞より誘

導されており、通常の HIV 感染による nef 発現の状態とは大きく異なる。我々は成熟 T 細胞により構築される生体の免疫系に与える nef の影響を in vivo で検討することを目的に、nef 組込みアデノウイルスを用いて nef 発現成熟 CD4⁺ T 細胞の機能変化を検討するモデルシステムを構築し、HIV 感染において成熟 T 細胞で発現する HIVnef が生体での免疫不全発症にどのように関与するかを明らかにし、免疫不全発症抑制の対策を考慮する。

B. 研究方法

Nef 遺伝子組み込みアデノウイルスベクター作成の手段には Tong-Chen らの提供する A

Symplified System for generation of Recombinant Adenoviruses を用いた。アデノウイルス作成過程では、E1E3 遺伝子を持つ野生株の出現が問題になるが、E1E3 非発現 HeLa 細胞を用いて野生株の出現がないことを確認した。

CD4⁺ T細胞の調製: CD4⁺ T細胞は DO11.10 TCR transgenic(Tg) マウスと、Coxsackie/Adenovirus Receptor(CAR)Tg マウスをかけ合わせた double Tg マウスの脾臓、リンパ節より、磁気ビーズを用いたカラム分離法によりネガティブに調製した。

ウイルス感染と nef 発現細胞の分離: 精製した CD4⁺ T細胞を 24 穴プレートにまき、IL-7 存在下にて nef 組込みアデノウイルス、CD4 発現抑制機能を欠いた nef 発現アデノウイルス、およびコントロールアデノウイルスを MOI 10 にて感染させた。その後 2 日間培養し、EGFP と CD4 の発現量を指標に FACS を用いて感染細胞 (nef 発現細胞と nef 非発現細胞) とに分離した。

細胞増殖試験: 新たに調整した正常マウスの γ 線照射脾臓細胞に OVA₃₂₃₋₃₃₉ ペプチドをパルスし、分離した nef 発現、nef 非発現細胞と共培養を行い、経日的に [³H] Thymidine の取込みをシンチレーションカウンターにて測定した。

抗原提示部への移動測定: 分離した nef 発現、nef 非発現細胞を同系マウスの BALB/c に 2x10⁶ 個尾静脈より移入し、移入翌日に OVA を完全フロイントアジュバントと共に背部皮下に免疫した。免疫後 5 日目に所属リンパ節に集積した移入細胞数を FACS にて測定した。

Foxp3 遺伝子発現の検出: 分離した nef 発現、nef 非発現細胞と OVA₃₂₃₋₃₃₉ ペプチドをパルスした正常マウスの γ 線照射脾臓細胞と共培養を行

い、3 日後の CD25 陽性細胞から TRIzol を用いて mRNA を抽出し、SuperScript First-Strand Synthesis System を持いて RT 反応を行い、 β -actin 遺伝子量を対照として foxp3 遺伝子発現量を半定量性 PCR にて測定を行った。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は国立感染症研究所動物実験施設の SPF 区で維持飼育を行ない、倫理面も含めて、国立感染症研究所動物実験委員会の審査を受け、その承認を得てから開始した。

C. 研究結果

精製 CD4⁺ T細胞に nef 組込みアデノウイルス (Ad-nef)、CD4 発現抑制機能を欠いた nef 発現アデノウイルス (Ad-LLAA 及び Ad-WLAA、いずれも徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部足立昭夫教授より供与)、およびコントロールアデノウイルスを MOI 10 の条件下で IL-7 存在下において感染させた。感染 2 日後、EGFP と CD4 の発現量を指標に FACS を用いて感染細胞 (nef 発現細胞と nef 非発現細胞) に分離した (図 1)。

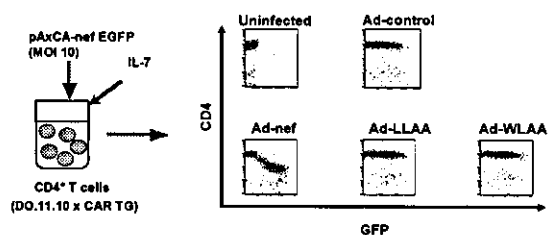


図1. Nef発現細胞とmutant Nef発現細胞の分離

Nef 発現 T細胞の抗原刺激による免疫反応を検討する目的で、新たに調整した正常マウスの γ

線照射脾臓細胞に OVA₃₂₃₋₃₃₉ ペプチドを 0.1 μ M の濃度でパルスし、親株 nef 及び CD4 発現抑制機能を欠いた nef 変異体発現細胞と共培養を行った。刺激後の細胞増殖を [³H] Thymidine の取込みを指標に測定すると、いずれも経日的な増殖が見られたが、nef 発現細胞は nef 非発現細胞に比べてその増殖が有意に遅延することが明らかとなった (図 2)。一方 CD4 抑制機能を失った nef を発現すると抑制効果は減弱することから、nef 発現による T 細胞機能異常の一部は CD4 発現抑制に影響されることが示唆された (図 2)。

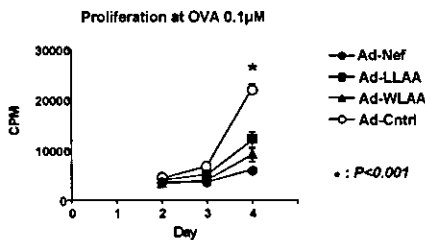


図2. Nef発現による抗原特異的T細胞反応に及ぼす影響

Nef 発現 T 細胞の生体内での機能を確認する目的で、同系マウスに nef 発現細胞あるいは nef 非発現細胞を移入し、OVA/CFA で免疫後の所属リンパ節への移入細胞数の集積を測定した。この結果、nef 発現細胞は nef 非発現細胞に比べて所属リンパ節への集積が著しく減弱することが明らかとなった (図 3)。一方 CD4 抑制機能を失った変異体を発現する T 細胞においては抑制効果が減弱することから、nef 発現による T 細胞ホーミング異常の一部は CD4 発現抑制に影響されることが示唆された (図 3)。

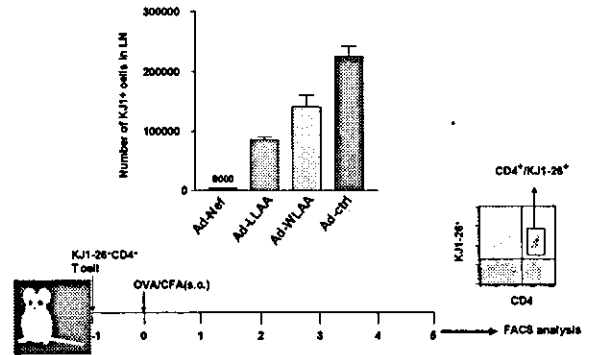


図3. Nef発現による抗原提示部位への集積に及ぼす影響

更に nef 発現 T 細胞の機能を明らかにするために分離した nef 発現、nef 非発現細胞を OVA₃₂₃₋₃₃₉ ペプチドをパルスした正常マウスの γ 線照射脾臓細胞と共培養を行い、3 日後の CD25 陽性細胞の foxp3 遺伝子発現量を β -actin 遺伝子量を対照として半定量性 PCR にて測定を行った。この結果、驚いたことに、活性化した nef 発現 CD4⁺ CD25⁺ T 細胞に foxp3 遺伝子発現の増強が認められた (図 4)。この結果は CD4 陽性 T 細胞は nef 発現により抑制性 T 細胞の表現型を示す可能性が示唆された。

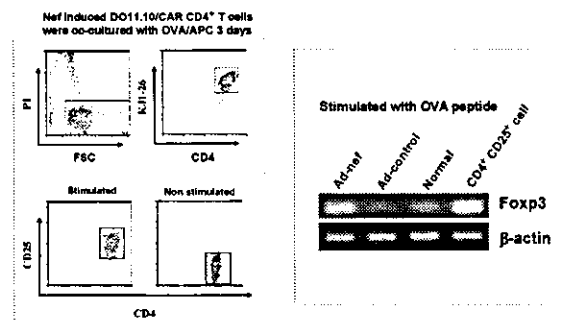


図4. Nef発現による活性化CD25⁺CD4⁺ T細胞のFoxp3遺伝子発現誘導

以上の結果より、成熟 T 細胞での nef 発現は、T 細胞株、生体内での細胞動態と免疫反応に大きく影響を及ぼす可能性が示唆された。

D. 考察

HIV ウィルス感染初期に誘導される免疫異常や

免疫不全に nef の発現が重要な役割を果すことはこれまでに多くの試験管内の実験から推測されている。Nef の発現により CD4 抗原、MHC class I の発現低下をはじめ、細胞内シグナル分子との結合によりアポトーシス阻害の誘導等が報告されているが、しかし nef が個体レベルでどのような機序で免疫不全に関わるか不明であった。一方 nef トランスジェニックマウスにおいて、AIDS 様病態の発症に伴う免疫反応異常が認められるという報告があるが、nef の発現が胸腺内分化における T 細胞から発現しているため、これらの結果が、胸腺内 T 細胞分化異常を反映するかあるいは免疫反応時における T 細胞機能異常を反映するか明かでない。

本研究ではこれらの問題を理解する上で重要な情報が提供されつつある。すなわち、我々が確立した nef 組込みアデノウイルスの感染モデル系を用いて、nef 発現 T 細胞の抗原刺激に対する反応の減弱、SDF-1、MIP-1 への遊走能の低下 (昨年度報告)、さらに生体内における抗原刺激への応答性とダイナミクス異常が誘導される可能性を示した。更に驚いたことに、nef 発現により T 細胞機能が抑制され、この抑制が nef 発現による抑制 T 細胞への変換を反映する可能性が推察された。最近、HIV 感染者において抑制性 T 細胞の表現型を示す T 細胞が増加することが報告され、この増加が HIVnef 発現に依存するか否か今後の解析が必要である。これらの研究を更に発展させ、nef 発現によって機能異常をきたした T 細胞を排除する方策を検討することは重要な課題である。

E. 結論

マウスモデルシステムを用い、成熟 T 細胞への nef 発現により T 細胞機能発現が低下することが明らかとなった。すなわち抗原提示細胞を介した抗原刺激に依存する試験管内での細胞増殖の減弱、さらに in vivo で抗原刺激後に所属リンパ節に集積する活性 T 細胞数は nef 発現により減少することが観察された。これらの結果は、nef 発現が CD4⁺ T 細胞の生体内組織におけるダイナミクスや抗原特異的免疫応答に影響を及ぼす可能性が強く推察された。これらの機能異常は CD4 抑制機能を失った nef を発現すると抑制効果は減弱することから、nef 発現による T 細胞機能異常の一部は CD4 発現抑制に影響されることが示唆された。また、上記の T 細胞機能異常は nef 発現が成熟 T 細胞機能を抑制性 T 細胞へ変換することに起因する可能性が推察された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- (1) 藤猪英樹、竹森利忠「HIVnef 発現により誘導される成熟 T 細胞の機能異常」第 52 回日本ウイルス学会総会、2004 年 11 月
- (2) 藤猪英樹、中山俊憲、谷口克、竹森利忠「HIVnef 発現により誘導される成熟 T 細胞の機能異常」第 34 回日本免疫学会総会、2004

年 12 月

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

「HIV の感染過程や病原性に関わる宿主因子の解析とその抑制に関する研究」

小柳義夫

京都大学ウイルス研究所
エイズ研究施設感染病態研究領域

研究要旨

ヒト白血球由来 cDNA ライブラリ発現レンチウイルスベクターを作製し、human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) に高感受性細胞の CD4 陽性 T 細胞に遺伝子導入した。その後、CXCR4 指向性 HIV-1 (X4 ウイルス) に暴露し、HIV-1 感染による細胞変性効果に対して抵抗性を賦与する遺伝子を単離・同定した。その結果、クローン化された cDNA はリソソーム膜局在蛋白質である CD63 分子の N 末端細胞外ドメインを欠損する変異体蛋白質 (CD63dN) をコードすることがわかった。そこで、あらたに CD63 遺伝子を単離し、全長 CD63 蛋白質 (CD63wt) ならびに CD63dN 蛋白質をコードする遺伝子をレンチウイルスベクターにて導入した細胞株を樹立した。この細胞においては、末端細胞外ドメイン欠損変異体 CD63 分子の発現によりケモカインレセプターであり、かつ HIV のコレセプター分子でもある CXCR4 蛋白質が細胞膜上から消失した。そして、その結果、HIV の感染を強力に抑制していることが判明した。一方、この遺伝子導入細胞の細胞膜表面上のトランスフェリンレセプター (CD71)、 β ケモカインレセプターのひとつであり、さらに R5 ウイルスのコレセプターともなる CCR5、そして、HIV-1 の第一のレセプターである CD4 分子の発現量にはほとんど変化がみられなかったことより、この CXCR4 に対する CD63 分子のダウンレギュレーション活性は特異的な活性であると考えられた。一方、CD63 分子そのものとさらに C 末端の lysosomal sorting motif を欠損する変異体 (CD63dL) は、HIV のウイルス粒子放出を強力に抑制することが判明した。この CD63dL は遺伝子導入によりその局在がリソソーム膜に移行せず細胞質膜にとどまること、そしてこの細胞質膜に Gag 蛋白質が集積していることより、Gag 蛋白質の機能阻害効果があることが示唆された。すなわち、本研究において新たに判明した CD63 分子、特にその二つの変異体は、ひとつ (CD63dN) は CXCR4 のダウンレギュレーション、そして、もうひとつの変異体 (CD63dL) はウイルス粒子放出を抑制し、HIV 感染を強力に阻害することが判明し新たなエイズ発症阻止の治療法開発への手がかりとなることが期待される。

A. 研究目的

HIV 感染増殖はウイルス性因子だけではなく、種々の細胞性因子が関与している。そして、たとえばインターフェロンのように、それらウイルス感染関連因子として抑制的に働くものがあることはよく知られている。そこで細胞性因子として新たにウイルス感染を抑制する因子群の単離を試みた。その結果 cDNA ライブラリ発現レンチウイルスベクターを用いて HIV 感染抵抗性遺伝子探索を遂行した結果得られた CD63 遺伝子はその遺伝子導入により HIV 感染が強力に抑制されることが判明し、その感染防御機構の解明を目的とした。

B. 研究方法

細胞培養

ヒト胎児腎臓由来の 293T 細胞と HeLa 細胞にレンチウイルスベクターにより CD4 と CCR5 蛋白質が強制発現されている Magic5A 細胞は、10% ウシ胎仔血清 (FCS) を含有する D-MEM にて、CD4 陽性 CXCR4 陽性のヒト T 細胞である MT-4 細胞は 10% FCS を含有する RPMI1640 にて培養を行った。

ラムダファージ部位特異的組換え法に対応するレンチウイルスならびにマウスレトロウイルスベクターの作製

CS II -EF-MCS-IRES-H2K⁺ の *EcoR* I 部位に GATEWAY *attR* Reading Frame Cassette (Invitrogen, Carlsbad, California) を挿入したレンチウイルスベクター-pEF-H2K⁺-GATEWAY を作製した。さらに、マウスレトロウイルスベクター-DNA である pSR α -LEGFP を *Bam*HI と *Not*I により切断し、*EGFP* 遺伝子に代わり、GATEWAY *attR* Reading Frame Cassette を挿入したマウスレトロウイルスベクター-DNA pSR α -GATEWAY を作製した。

CD63 蛋白質全長および各欠損変異体発現プラスミド DNA とレンチウイルスベクター-DNA の構築

ヒト白血球の cDNA ライブラリ (Invitrogen) より、以下に記すプライマーから完全長のヒト CD63cDNA をクローニングし、CMV プロモーター発現プラスミドである pCMV-SPORT6 (Invitrogen) の *EcoR* I と *Xba* I 部位に挿入し、CD63 発現プラスミド DNA (pCD63) を作製した。この DNA を *EcoR* I と *Xba* I により処理し、Litmus28 (NEB, Beverly,

MA)の *EcoRI* と *XbaI* 部位に挿入した。この DNA を *Eco0109I* と *XbaI* により処理し、N 末端細胞外ドメインを欠損する CD63 遺伝子 (CD63dN) を pCMV-SPORT6 の *EcoRI* と *XbaI* 部位に挿入した発現プラスミド pCD63dN を作製した。pCD63 を *PstI* と *XbaI* により処理し、オリゴヌクレオチド (5' → 3'

ctagactatctgatactcttcacgaggcagcaggcaagacaattcccaaa
acctcgacaaaagcaattccaagggtgctgca,

3' → 5'

gcagcccttgggaattgcttttgcgaggttttgggaattgctttgctgc
tgctctgtaagagtatcagatagt)

を挿入することにより、CD63 全長中の LSM を削除した変異体 (CD63dL) 発現プラスミド (pCD63dL) を作製した。pCD63・pCD63dN・pCD63dL 中の CD63cDNA 全長および変異体 cDNA 部分を、GATEWAY BP clonase 酵素ミックス (Invitrogen) を用いて BP 反応を行い、エントリーベクターである pDONR221 (Invitrogen) に組換えた。そして、GATEWAY LR clonase 酵素ミックス (Invitrogen) を用いて LR 反応を行い、デスティネーションベクターである pEF-H2K^k-GATEWAY に組換え、それぞれの発現レンチウイルスベクター DNA を作製した。

レンチウイルスベクターの調製

ウシ水疱性口内炎ウイルス G 糖蛋白質 (vesicular stomatitis virus G protein, VSV-G) を pseudotype envelope として持つ replication incompetent ウイルスベクターを作製した。ベクター DNA、VSV-G 蛋白質発現プラスミド (pVSV-G)、HIV-Gag-Pol 発現プラスミド (pMDLg/pRRE)、HIV-Rev 発現プラスミド (pRSV-Rev) とともに 293T 細胞に、リン酸カルシウム法を用い遺伝子導入し、3 日目の培養上清をフィルターでろ過、その後高速遠心 (6000rpm, 4°C, 16 時間) により濃縮し、作製した。コントロールとしては H2K^k のみを発現する CSII-EF-MCS-IRES-H2K^k ウイルスベクターの調製を行った。ウイルス力価は、MT-4 細胞に感染させ H2K^k を発現した感染細胞を phycoerythrin (PE) 標識抗 H2K^k 抗体 (CEDARLANE, Hornby, Ontario) を用いたフローサイトメトリー (Beckton & Deckinson, San Jose, CA) により測定し、決定した。

レンチウイルスベクターによる遺伝子持続発現細胞株の樹立

Magic5A 細胞に multiplicity of infection (M. O. I.) にて CD63 あるいはその変異体発現レンチウイルスベクター、そして、コントロールとして H2K^k 単独発現ウイルスベクターを感染させ、導入遺伝子持続発現細胞株を樹立した。

発現プラスミドの作製とトランスフェクション

CMV プロモーターにより全長 CD63 蛋白質 (CD63wt; Met¹-Met²³⁸)、および、N 末端領域欠損 CD63 変異体蛋白質 (CD63dN; Met⁶³-Met²³⁸)、および、リソソーム局在化モチーフ (Ser²³³-Met²³⁸) 欠

損 CD63C 末端欠損変異体 (CD63dL; Met¹-Arg²³²) を一過性に発現するプラスミド、pCD63wt, pCD63dN, pCD63dL を作製した。そして、CD63wt と CD63dN 蛋白質の N 末端に Cys4 タグ (Cys-Cys-Pro-Gly-Cys-Cys) をコードする合成オリゴヌクレオチド (agaattcacgatggctgggtggctgttgcctggctgttgccggtggcggcgc) を挿入した pCys4CD63wt, pCys4CD63dN を作製した。また CD63wt, CD63dN, そして CD63dL 各蛋白質の N 末端に Flag タグを挿入した pFlagCD63wt, pFlagCD63dN, pFlagCD63dL を作製した。HIV gag-gfp 発現プラスミドは (ハイデルベルグ大学 Krausslich 博士より分与された) Magic5A に対しては Lipofectamin2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) を 293T 細胞にはリン酸カルシウム法を用いて、トランスフェクションした。

フローサイトメトリー解析

細胞膜表面上の CXCR4 分子の検出は、一次抗体に抗 CXCR4 ラットモノクローナル抗体 (mAb) (A-80、琉球大学田中博士より分与された)、二次抗体として Fluorescent isothiocyanate (FITC) 標識の抗ラット IgG ヤギ抗体 (American Qualex Antibodies, San Clemente, CA) を用いた。CD4 の検出には PE 標識のマウス抗 CD4mAb (DAKO, Glostrup, Denmark)、CCR5 は PE 標識のマウス抗 CCR5mAb (Pharmingen, San Jose, CA)、CD71 は FITC 標識の抗 CD71 マウス mAb (Immunotech, Marseille, France) を用い、フローサイトメトリーにて測定した。H2K^k と二重染色を行う場合は、CXCR4、CD71、CD25 は FITC 標識抗体により染色し、H2K^k 抗原は PE 標識抗 H2K^k 抗体 (CEDARLANE) を用いて、一方、CCR5 と CD4 は PE 標識抗体により染色し、FITC 標識抗 H2K^k 抗体 (CEDARLANE) を用いて検出した。

ウェスタンブロッティング

細胞を lysis buffer (1% Brij97 [Sigma, St. Louis, MO], 20mM Tris-HCl pH8.2, 0.15M NaCl, 5mM iodoacetamide, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride) により融解した。煮沸後、可溶性蛋白質に SDS-PAGE Sample buffer を加え、SDS-PAGE にて泳動した。泳動後、PVDFメンブラン (Milipore, Bedford, MA) に蛋白質をトランスファーした。一次抗体として抗 CXCR4 ラット mAb (A-145) を、二次抗体として Biotin 標識の抗ラット IgG ロバ抗体 (Rockland, Gilbertsville, PA) を、そして Streptavidin-Horse radish peroxidase (Zymed) を反応させ、CXCR4 を検出した。

ReAsH-EDT₂ ラベル法

Magic5A 細胞に Cys4 タグ蛋白質発現プラスミドをトランスフェクション後、24 時間後に 2.5 μM ReAsH (Invitrogen) を添加し室温にて 30 分間染色した。20 μM DisperseBlue 3 (Invitrogen) を含む Opti-MEM を加え、さらに 37°C で培養した。生細胞の核染色には Hoechst33342 (Molecular

Probes, Leiden, The Netherlands) を用いた。レーザー顕微鏡 (TCS-SP2, Leica Microsystems, Exton, Pa) を用いて ReAsH 染色から 1 時間後に Cys4 タグ発現細胞の染色画像を得た。

蛍光抗体法

細胞膜表面上の CXCR4 分子を検出するために、遺伝子導入された生細胞に抗 CXCR4 ラット mAb (A-145) を 4°C にて反応させ、4% PFA にて固定した。二次抗体として FITC 標識抗ラットヤギ IgG 抗体 (Zymed, South San Francisco, CA) を用い、共焦点顕微鏡 (Leica DMIRE) にて観察を行った。Magic5A 細胞に pFlagCD63wt および pFlagCD63dN を上述した方法にてトランスフェクションした。24 時間後に 4% paraformaldehyde を用いて 4°C にて 20 分間固定した。3% bovine serum albumin (BSA) にて室温で 30 分間ブロッキング後、FITC 標識抗 Flag マウスモノクローナル抗体 (FITC-M2; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) を一昼夜反応させた。洗浄後、Hoechst33342 を用いて核染色した。レーザー顕微鏡を用いて染色画像を得た。また、CD63 分子の検出ため抗 CD63 マウス単クローン抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Calif.) を反応後、PE 標識の抗マウス IgG ヤギ抗体 (American Qualex Antibodies) を用いて検出した。

ウイルスの調整

293T 細胞に HIV 発現プラスミド pNL4-3 をリン酸カルシウム法にて遺伝子導入した 3 日目の培養上清をフィルターでろ過したものをウイルス溶液として -80°C に保存した。培養上清中のウイルス量は、p24^{gag} 抗原量を酵素免疫測定法にて測定し (ZetoMetrix Corp.)、10% ウシ胎児血清を含む RPMI-1640 で培養したヒト MT-4 あるいは Magic5A 細胞に対して感染を行った。

(倫理面への配慮)

本研究においてはすべて樹立培養細胞を用いており、その使用にあたり細胞樹立者により倫理的配慮はなされている。実験動物は使用していない。

C. 研究結果

1. CD63 蛋白質とその変異体の細胞内局在の解析

我々はヒト白血球由来 cDNA ライブラリ発現レンチウイルスベクターによる HIV 抵抗遺伝子の単離法 (図 1) を用いて HIV 感染後、このウイルスの感染に抵抗性を示した細胞から新たに単離し、同定された DNA 遺伝子は CD63 蛋白質をコードするものであったが、N 末端領域を欠損する蛋白質をコードするものであった。そこでまず、CD63 全長 cDNA 遺伝子を PCR 法により単離し、さらに上述した N 末端領域を欠損する蛋白質をコードする CD63dN、ならびに、リソソーム局在化モチーフを欠損する蛋白質をコードする CD63dL 発現プラスミドを作製した (図 2A)。そして、まず蛍光抗体法により、これらの蛋白質の細胞内局在を解析した。CD63wt 蛋白質はこれまでの報告のように核

膜周囲に帯状に局在したが、CD63dN 蛋白質は核膜周囲ではありながら、明らかな凝集塊を作り細胞質内に局在した。また、CD63dL はリソソーム局在化モチーフを欠損しているので予想されたように多くは細胞質膜表面に存在した。この結果は N 末端細胞外領域を欠損することにより、この蛋白質が凝集する特質を獲得したことが示唆された。これら蛍光抗体法により確認された CD63wt と CD63dN の細胞内局在は、生細胞に対する ReAsH 染色によってもほとんど同じように CD63wt は核膜全周を取り囲む帯状の層として、そして CD63dN は核膜周囲の凝集塊として、細胞内局在が証明される (図 2B)。

2. HIV 感染侵入抑制

CD63dN 遺伝子導入により HIV の感染性は本当に抑制されるか確認するために感染実験を行った。HIV 標的細胞として、ヒト CD4 陽性 MT-4 あるいは HeLa 細胞由来で CD4 と CCR5 蛋白質が強制発現されている Magic5A 細胞を用いた。いずれの細胞においても CD63dN 遺伝子導入により、非導入 (untransduced) あるいはコントロールベクター (empty vector) に比べ、その培養上清中の HIV 抗原量 (gag^{p24}) は約 100 分の 1 ほどに抑えられていたことより HIV の増殖性は強力に抑制されていることがわかった (図 3A, B)。この HIV 感染抑制は X4 ウイルスの場合のみであり、R5 ウイルスである JRCSF の感染性はほとんど影響を受けなかった (結果示さず)。そこで、X4 ウイルス特異的な分子の発現あるいは機能が、この CD63dN 遺伝子導入により影響を受けている可能性があることが想像された。実際、このレンチウイルスにより遺伝子が導入された細胞は遺伝子導入効果依存的に、X4 ウイルスが特異的にコレセプターとして使う CXCR4 の発現を抑制することが分かった (図 3C)。一方、他の分子は R5 ウイルスがコレセプターとして使う CCR5 分子、HIV の第一のレセプターである CD4、そして、細胞膜からエンドサイトーシスされ、主に再利用されて細胞膜に発現するトランスフェリンレセプター (CD71) の発現はほとんど影響を受けなかった (図 3C)。この発現抑制は遺伝子発現レベルの抑制か、あるいは、CXCR4 分子の細胞表面からのダウンレギュレーションなのか明らかにするために、細胞内蛋白質発現量を western blotting により測定してみた。その結果、CD63dN の導入細胞もほとんどに同じレベルの蛋白質を保持していることがわかった (図 3D)。実際、CD63dN 遺伝子を導入した細胞においては、蛍光抗体法により CXCR4 分子は細胞質内に多く集積していたこともわかっている (結果示さず)。

3. HIV 粒子産生抑制

一方、この CD63 分子の遺伝子導入実験の過程において、まず明らかにレンチウイルスベクターなどの遺伝子導入ベクターの作出の際に、明らかに CD63 分子そのものと、さらに C 末端の lysosomal sorting motif を欠損する変異体 (CD63dL) 発現べ

クターは高タイターのベクターの作出が非常に困難であることに気づいた。そこで、これら CD63 あるいは CD63dL 発現ベクターを 293T 細胞に一過性に導入し、同時に感染性 HIV 粒子を放出させることができるプラスミド (pNL4-3) を同時にトランスフェクションし、その効果を判定した (図 4 A, B)。その結果、培養上清中の HIV-1 gag 蛋白質量が 10 から 100 分の 1 に強力に抑制されるばかりでなく、培養上清中の感染性 HIV-1 量が明らかに低下させられることがわかり、CD63 そのもの (CD63wt) とさらに CD63dL は、HIV のウイルス粒子放出を強力に抑制することが判明した。一方、CXCR4 発現を抑制した CD63dN にはウイルス粒子放出過程にはなんら影響を及ぼさないことがわかった。CD63wt と CD63dL は遺伝子導入によりその局在がリソソーム膜に移行せず細胞質膜にとどまること、そしてこの細胞質膜に Gag 蛋白質が集積していること (図 4C) より、Gag 蛋白質の機能阻害効果があることが示唆された。

D. 考察

本研究では CD63 分子、特にその N 末端細胞外領域を欠損した蛋白質が細胞膜表面に局在する CXCR4 を細胞内に移行させること、そして、C 末端の lysosomal sorting motif を欠損する変異体は gag 蛋白質と細胞膜上においてなんらかの分子的関連性を獲得して、その結果 HIV のウイルス感染を抑制することが判明した。

α ケモカインである SDF-1 の受容体 CXCR4 については、そのリガンドにより刺激した際の動態についての報告は数多く存在する。SDF-1 のような外因性刺激を介したレセプターのダウンレギュレーション機構とは異なり、CD63 分子、ならびに、その変異体分子のような内因性蛋白質の発現によるケモカインレセプターの発現減少機構についての知見はほとんどない。

CXCR4 のリガンド刺激後のインターナリゼーションには、デグラデーションモチーフと呼ばれる C 末端の SSLKILSKGK アミノ酸が関与している。このアミノ酸配列中の 3 つのリシンがユビキチン化され、その結果リソソームへの移行が促され、その分子の破壊が誘導されると知られている。そして、Nedd4 ファミリーのユビキチンリガーゼ AIP4 が、細胞膜上の CXCR4 をユビキチン化し、その後、エンドソーム膜に局在するユビキチン結合蛋白質である Hrs と結合し、そして、Hrs のユビキチン化を誘導し、その結果 CXCR4 と Hrs そして AIP4 が複合体を形成して共局在することが報告されている¹⁾。しかし、AIP4 による CXCR4 のユビキチン化は細胞膜上でおこなわれているが、CD63dN 導入細胞における CXCR4 は細胞膜に到達していないことが示唆されており (結果示さず)、CD63dN 蛋白質によるダウンレギュレーション活性は細胞膜上の CXCR4 分子をユビキチン化しリソソームにおいて分解させる経路とは異なる経路

ではないかと考えられる。むしろリボソームで生産された新規の CXCR4 蛋白質が細胞膜に到達せず細胞内に蓄積しているものと考えられる。

CD63 自体が N 末端を欠損することにより、本来の CD63 蛋白質が局在する部位まで到達できない可能性も考えられる。そして、CD63dN 分子と CXCR4 分子が共局在していること (結果示さず) を考え合わせると、新たに合成された CD63dN 蛋白質が新たにリボソームにて翻訳された CXCR4 蛋白質を小胞体、もしくは、トランスゴルジ体において結合して蓄積させているのではないかと考えられる。

ところで、この生体内において CD63dN のような欠損変異体が発現し、これまで述べてきたような役割を担っている可能性について検討すべきである。The European Bioinformatics Institute (EBI) の Alternative Splicing Database (ASD) Project では、いくつかの CD63 の選択的スプライシング産物が報告されており、CD63dN 遺伝子よりさらに N 末端側 11 アミノ酸と C 末端から 22 アミノ酸を欠失した mRNA がヒト細胞内において発現していることが報告されている (<http://www.ebi.ac.uk/asd/>)。今後、骨髄のような、分化の過程において CXCR4 を細胞膜表面上に強発現し一過性に消失する細胞に注目し、CD63dN 遺伝子、もしくは、それに近い CD63 の変異体が生体内に存在するかを検討する必要がある。

CD63dN 分子のきわめて強力な CXCR4 ダウンレギュレーション活性について述べたと同時に、全長 CD63 分子自身に HIV 放出抑制活性があることを示した (図 3A, B)。CD63 分子は後期エンドソーム、および、リソソームに局在することは知られているが、その機能の詳細は不明である。これまでにメラノーマ細胞へ CD63 分子の遺伝子導入を行うとその細胞の転移能を抑制しようということが知られている。また、多くの癌細胞において CD63 蛋白質の発現が低下、ないし、減少しており、CD63 を発現していないヒトメラノーマ細胞に CD63 遺伝子を強制発現させると、癌細胞の移動と運動性が低下することや、導入した CD63 を安定的に発現するメラノーマ細胞をヌードマウスに接種すると、導入していない細胞を注射した場合よりも腹腔内転移が減少したことも知られている。

CD63 について細胞内においてウイルス蛋白質ならびにレセプター分子の機能阻害活性があり、さらに、その分化過程に CD63 分子がウイルス関連分子の発現調節に関わる可能性についても、さらに研究を進める必要がある。

E. 結論

CD63 分子の発現により HIV の侵入、そして、粒子放出過程を強力に抑制しうることが判明した。これら遺伝子導入により、将来の遺伝子治療への

応用の可能性だけでなく、分子機序の解明から新たなメカニズムに基づく治療薬の開発への端緒となることが考えられる。

F. 健康危険情報

エイズ発症阻止に向けて新たな学問的進歩が得られた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Feng J, Misu T, Fujihara K, Misawa N, Koyanagi Y, Shiga Y, Takeda A, Sato S, Takase S, Kohnosu T, Saito H, Itoyama Y. Th1/Th2 balance and HTLV-I proviral load in HAM/TSP patients treated with interferon- α . *J. Neuroimmunol.* 51:189-194, 2004.
- ② Ebina H, Aoki J, Hatta S, Yoshida T, Koyanagi Y. Role of Nup98 in nuclear entry of human immunodeficiency virus type 1 cDNA. *Microbes & Infection* 6, 715-724, 2004.
- ③ Maeda K, Nakata H, Koh Y, Miyakawa T, Ogata H, Takaoka Y, Shibayama S, Sagawa K, Fukushima D, Moravek J, Koyanagi Y, Mitsuya H. Spirodiketopiperazine-based CCR5 inhibitor which preserves CC-Chemokine/CCR5 interactions and exerts potent activity against R5 human immunodeficiency virus type 1 in vitro. *J. Virol.* 78:8654-8662, 2004.
- ④ Kawano Y, Yoshida T, Hieda K, Aoki J, Miyoshi H, Koyanagi Y. A lentiviral cDNA library employing lambda recombination used to clone an inhibitor of human immunodeficiency virus type 1-induced cell death. *J. Virol.*78:11352-11359, 2004.
- ⑤ Kamada M, Li RY, Hashimoto M, Kakuda M, Okada H, Koyanagi Y, Ishizuka T, Yawo H. Intrinsic and spontaneous neurogenesis in the postnatal slice culture of rat hippocampus. *Eur J. Neurosci.* 20, 2499-2508, 2004.
- ⑥ Nakata H, Maeda K, Miyakawa T, Shibayama S, Matsuo M, Takaoka Y, Ito M, Koyanagi Y, Mitsuya H. Potent Anti-R5-human immunodeficiency virus type 1 effects of a CCR5 antagonist, AK602/ONO4128/GW873140, in a novel human peripheral blood mononuclear cell nonobese diabetic-SCID, interleukin 2 receptor γ -chain-knocked-out AIDS mouse model. *J. Virol.*, in press.
- ⑦ Miura Y, Koyanagi Y. Death ligand-mediated apoptosis in HIV infection. *Rev Med Virol.* in press.
- ⑧ Matsuura-Sawada R, Murakami T, Ozawa Y, Nabeshima H, Akahira J, Sato Y, Koyanagi Y, Ito M, Terada Y, Okamura K. Reproduction of menstrual changes in transplanted human endometrial tissue. *Human Reproduction*, in press.

2. 学会発表

- ① Kawano Y, Yoshida T, Hieda K, Aoki J, Koyanagi Y. A cDNA library-expressing lentivirus vector system to identify inhibitor gene for human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-induced cell death. *Retroviruses Meeting, Cold Spring Harbor, New York, 2004.*
- ② Aoki J, Koyanagi Y. Stable inhibition of CXCR4 with siRNA-expressing lentivirus vector. *Retroviruses Meeting, Cold Spring Harbor, New York, 2004.*
- ③ 芳田剛、河野祐治、稗田訓子、青木淳、三浦義治、小柳義夫. cDNAライブラリ発現レンチウイルスベクターによるHIV抑制因子の単離. 第52回日本ウイルス学会、横浜、2004.
- ④ 稗田訓子、芳田剛、青木淳、三浦義治、河野祐治、田中勇悦、小柳義夫. 生細胞におけるHIVコレセプター分子の解析. 第52回日本ウイルス学会、横浜、2004.
- ⑤ 三浦義治、小柳義夫. エイズ脳症で起こる神経細胞死にはTRAIL分子が関与する. 第52回日本ウイルス学会、横浜、2004.
- ⑥ 岡田広司 三浦義治 川口寧 西山幸廣 小柳義夫. 中枢神経組織スライス培養系を用いた単純ヘルペスウイルス1型の感染様式の解析. 第52回日本ウイルス学会、横浜、2004.
- ⑦ Koyanagi Y, Aoki J, Yoshida T, Ebina H. Role of Nup98 in nuclear entry of human immunodeficiency virus type 1 cDNA. 第18回日本エイズ学会、静岡、2004.
- ⑧ Koyanagi Y, Kawano Y, Yoshida T, Jun Aoki. A cDNA library-expressing lentivirus vector system used to clone an inhibitor for HIV-1-induced cell death. 第18回日本エイズ学会、静岡、2004.
- ⑨ 青木淳、蝦名博貴、小柳義夫. HIV増殖関連細胞因子のsiRNA発現レンチウイルスベクターによる解析. 第27回日本分子生物学会、神戸、2004.
- ⑩ 芳田剛、稗田訓子、河野祐治、青木淳、小柳義夫. ゲートウェイ法による効率的cDNAライブラリの組換え反応を利用した発現レンチウイルスベクター: HIV抵抗性遺伝子の単離. 第27回日本分子生物学会、神戸、2004.

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得状況
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

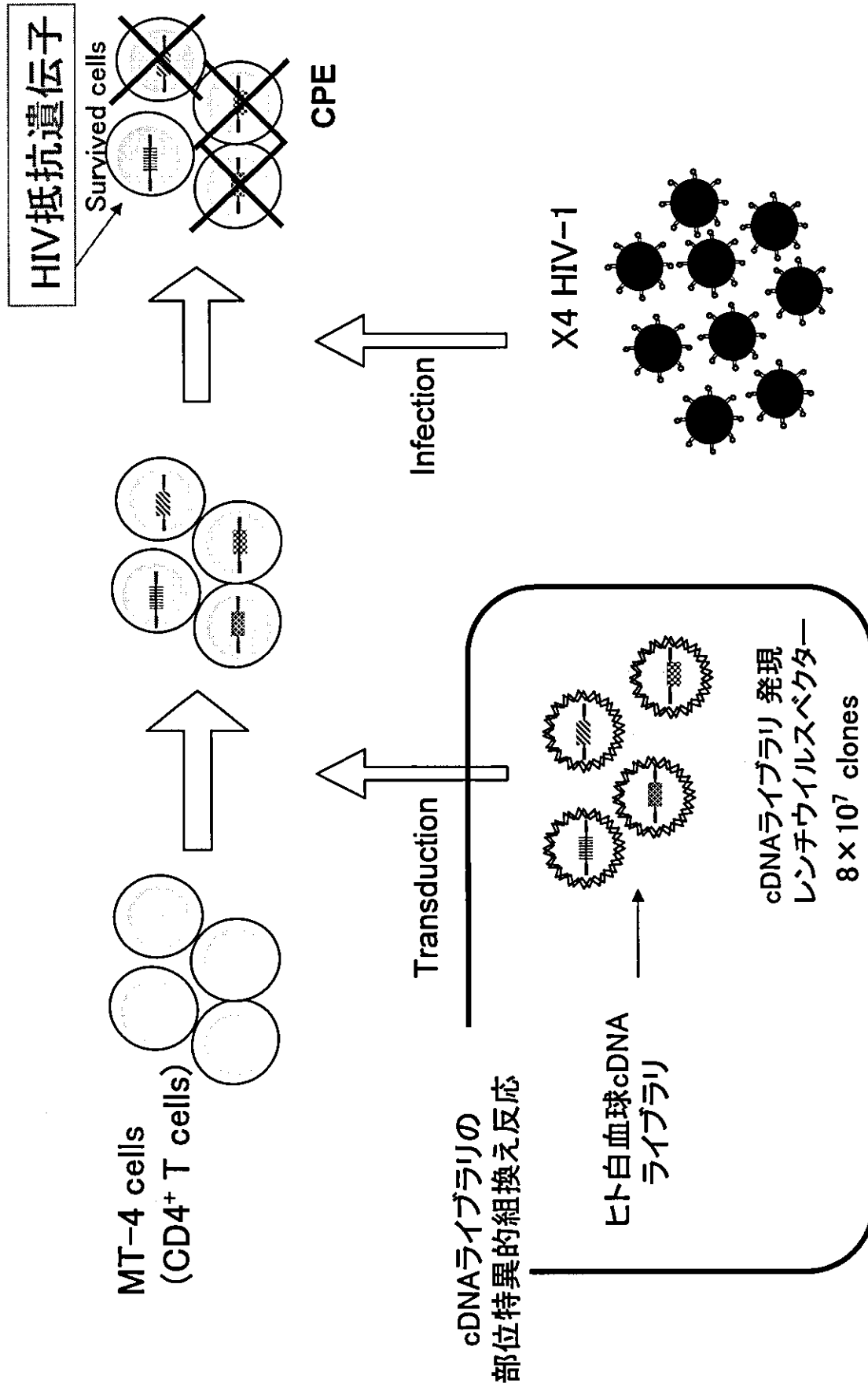


図1. HIV感染抵抗遺伝子の単離法
 ファージ由来の部位特異的組換え反応を利用し、ヒト白血球cDNAライブラリをレンチウイルスベクターDNAに組み換えた。そしてMT-4細胞にこのライブラリ発現ウイルスベクターをトランスフェクションすることによりウイルスベクターを産生させ、cDNAライブラリを遺伝子導入後、CXCR4をコレセプターとするHIV-1NL4-3を感染させた。HIV-1NL4-3はMT-4細胞を細胞変性効果により完全に破壊させることはよく知られているが、もしHIV感染に対して抑制的に働く遺伝子が導入されている細胞が存在すると、その細胞はHIV-1存在下に関わらず残存できる。

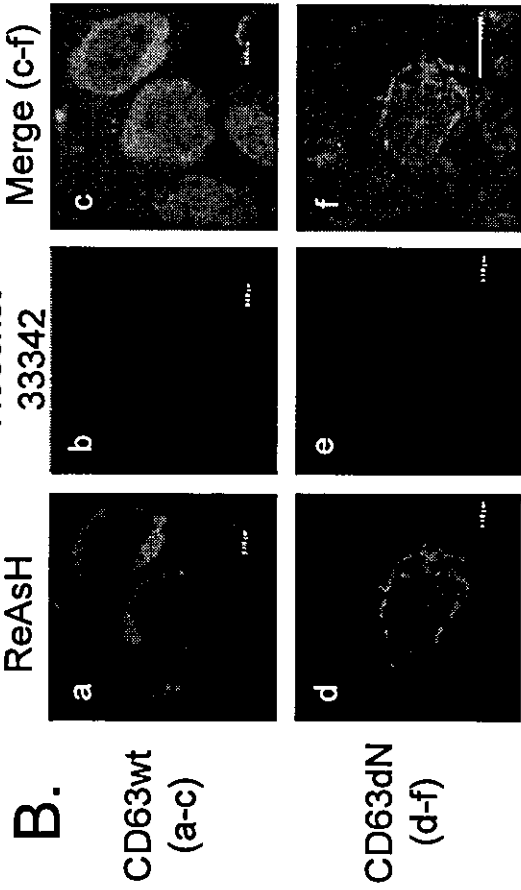
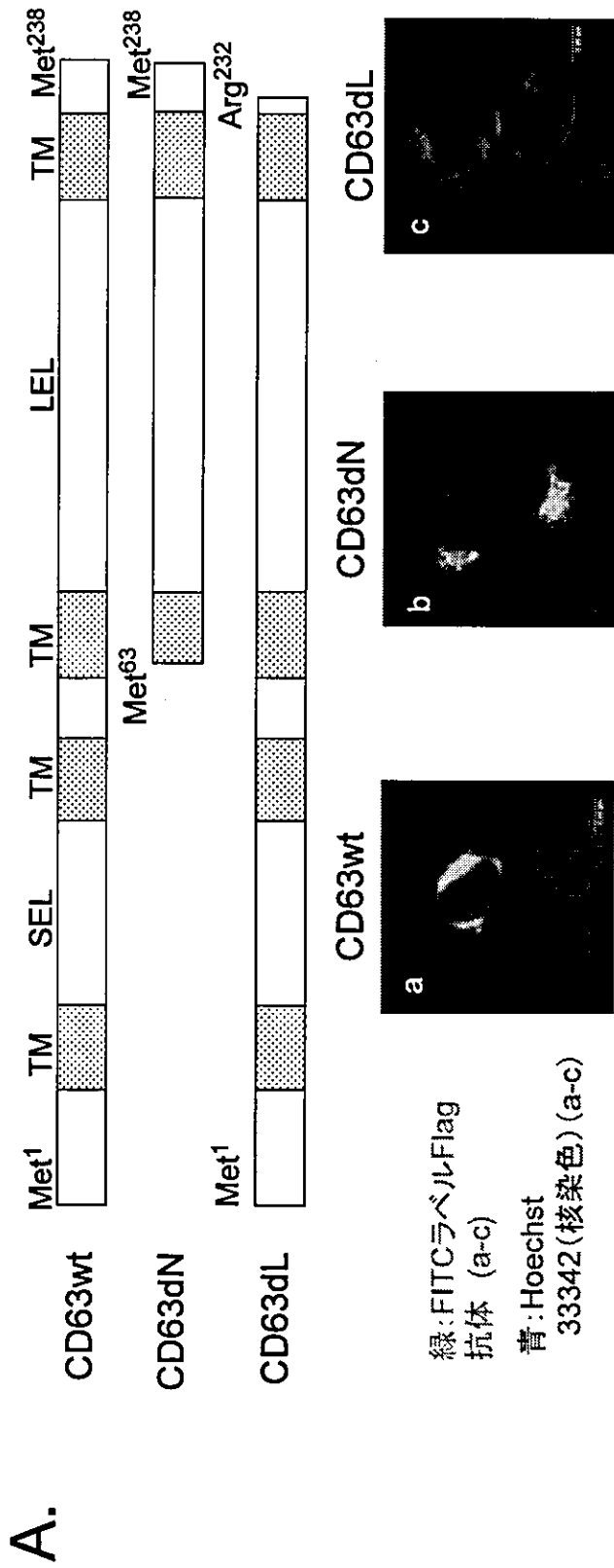


図2. CD63wt蛋白質とそれら変異体の細胞内局在
(A) Magic5A細胞にFlagタグCD63wt (a), FlagタグCD63dL (b), FlagタグCD63dL (c) 発現プラスミド (図2A上段パネル) を一過性に発現させ, FITC標識抗Flag抗体による直接蛍光抗体法により局在を示した (図2A下段パネル, d, e, f)。同時にHoechst33342により, 核染色を行った。膜貫通領域 (TM), N末端細胞外ドメイン (SEL), C末端細胞外ドメイン (LEL) を示す。スケールバーは8 μ m。
(B) Cys4タグCD63wt (a-c) またはCys4タグCD63dN (d-f) 発現プラスミドをMagic5A細胞にトランスフェクションし, 24時間後にHoechst33342を用いて核染色した後, ReAsH染色検出 (a, d) とHoechst33342染色検出 (b, e) をReAsH染色直後に行った。スケールバーは8 μ m。

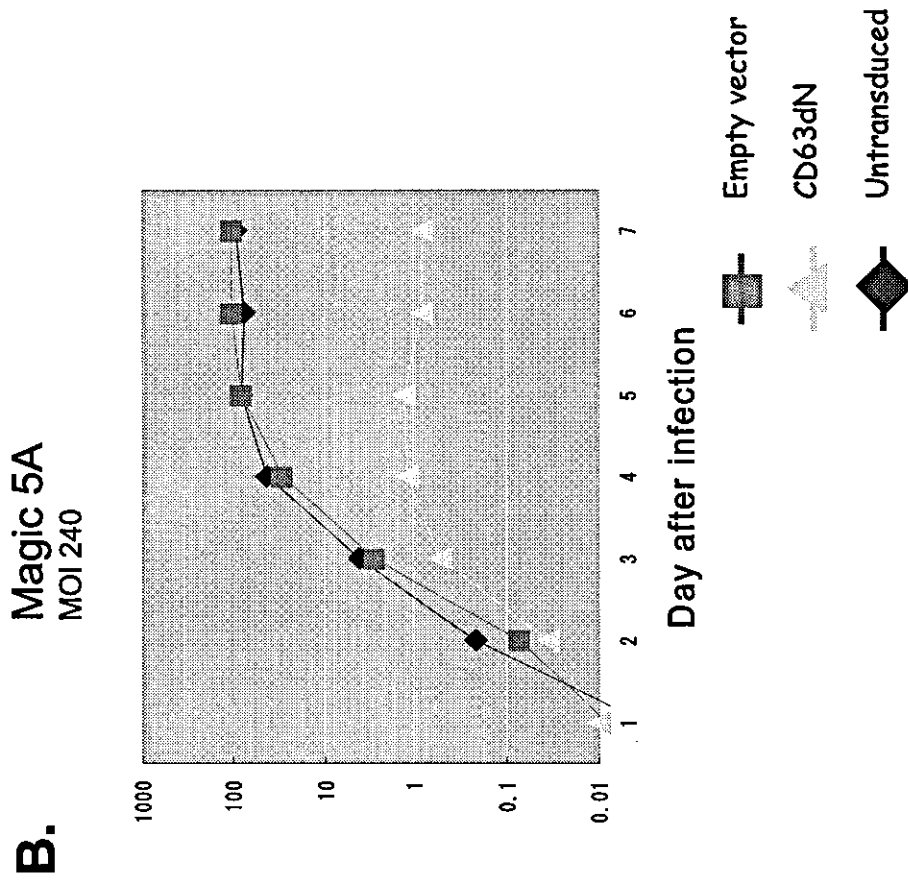
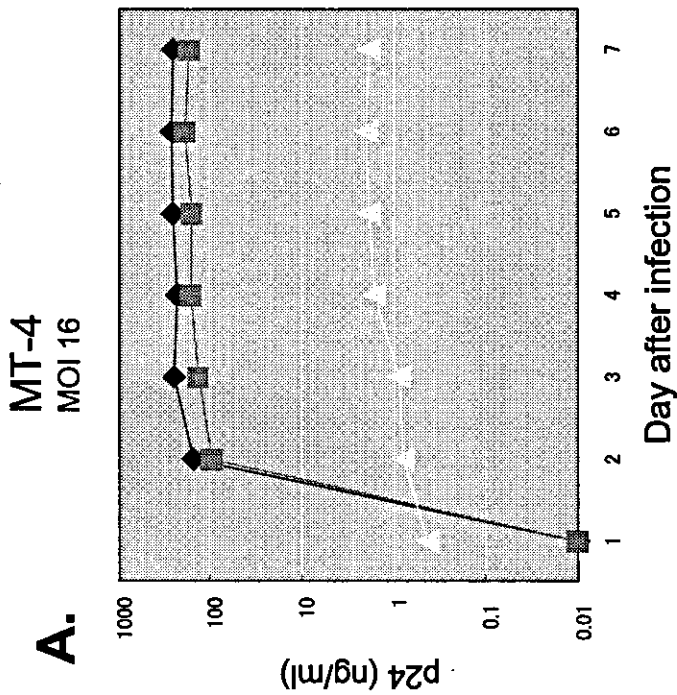
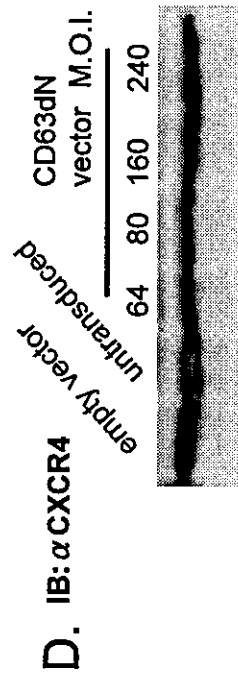
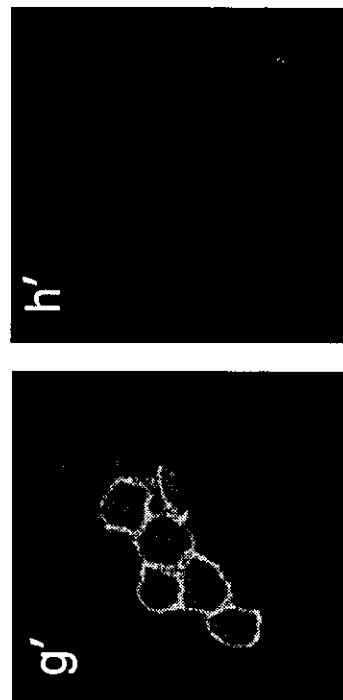
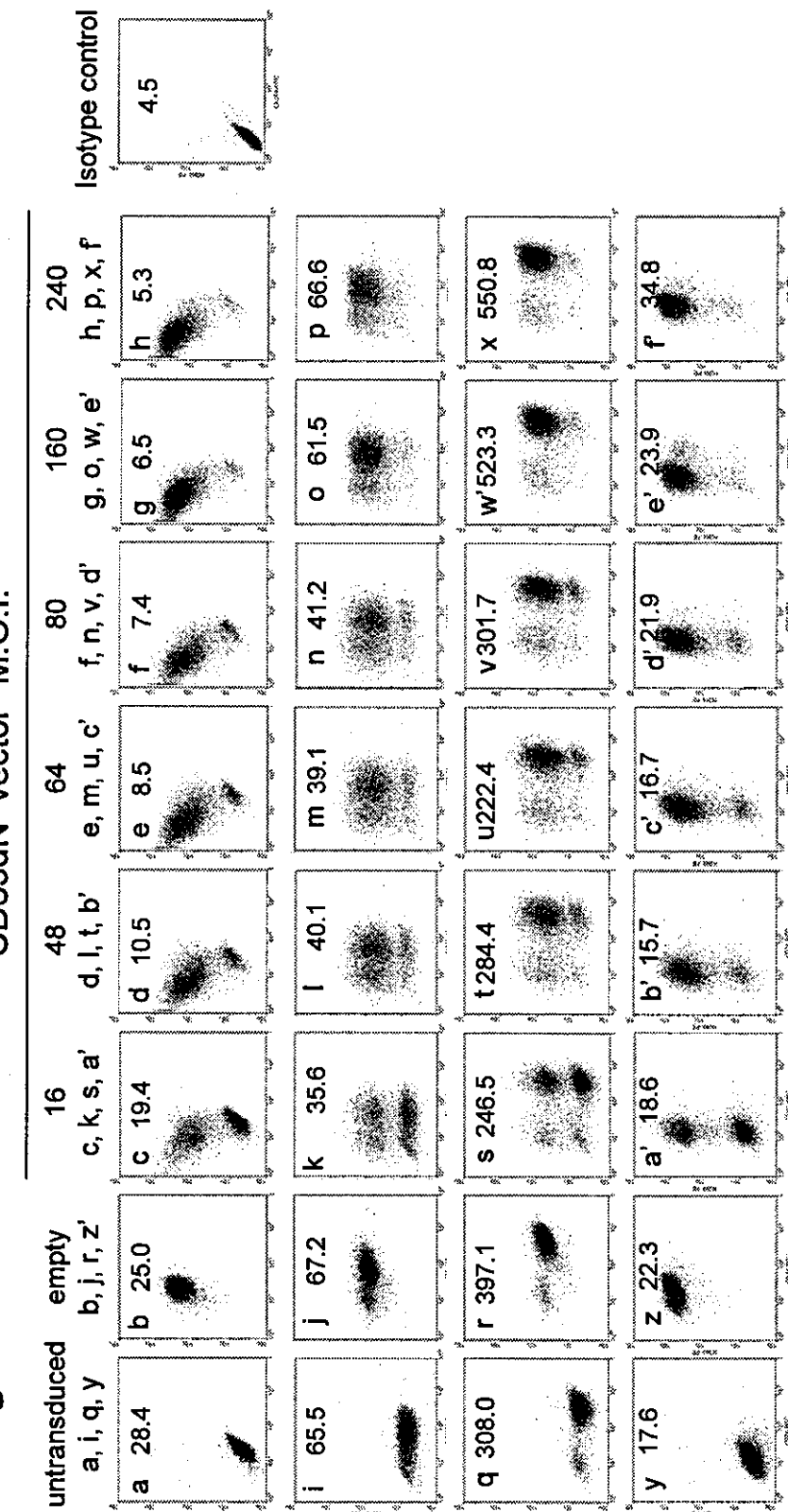


図3. CD63dN遺伝子導入細胞のHIV感受性とCXCR4分子のダウンレギュレーション
(A) MT-4細胞、(B) Magic5AにHIV-1NL4-3をMOI0.01にて感染させ、感染後の培養上清中のgagp24量をELISAにて測定した。

図3C.

Magic5A

CD63dN vector M.O.I.



(C) CD63dN導入細胞 (Magic5A) の細胞膜上のCXCR4、CCR5、CD4、ならびにCD71の発現解析をフローサイトメトリーにより(a-a'j)、そして、蛍光顕微鏡により(b',c')行った。緑はCXCR4分子、青はHoechst33342で核染色を示す。非導入細胞(b')では細胞膜表面上にCXCR4が検出されるが、CD63dN導入細胞(c')では検出されない。(D) CD63dN遺伝子導入細胞内のCXCR4蛋白質発現量をウエスタンブロッティングにより測定した。

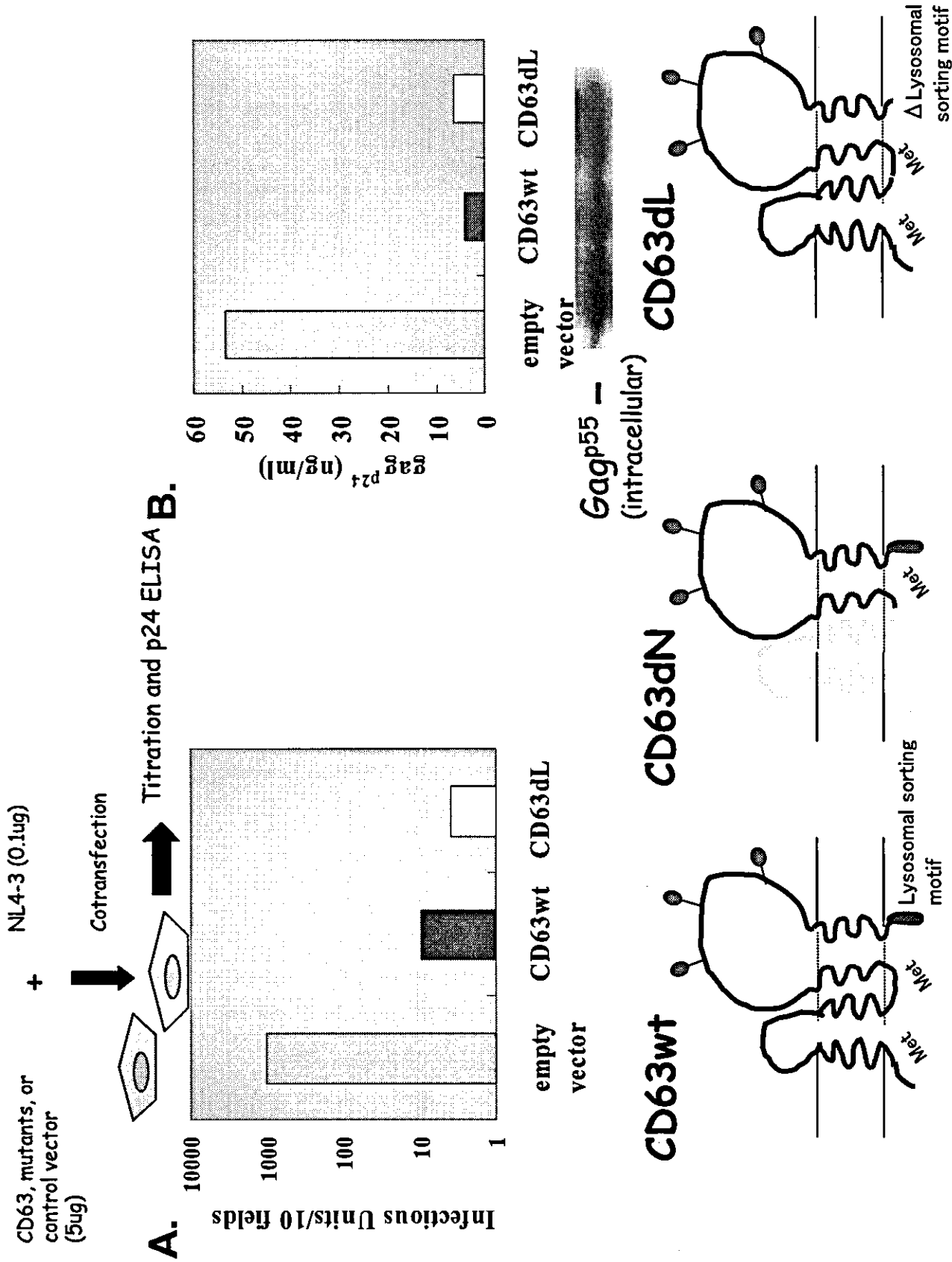
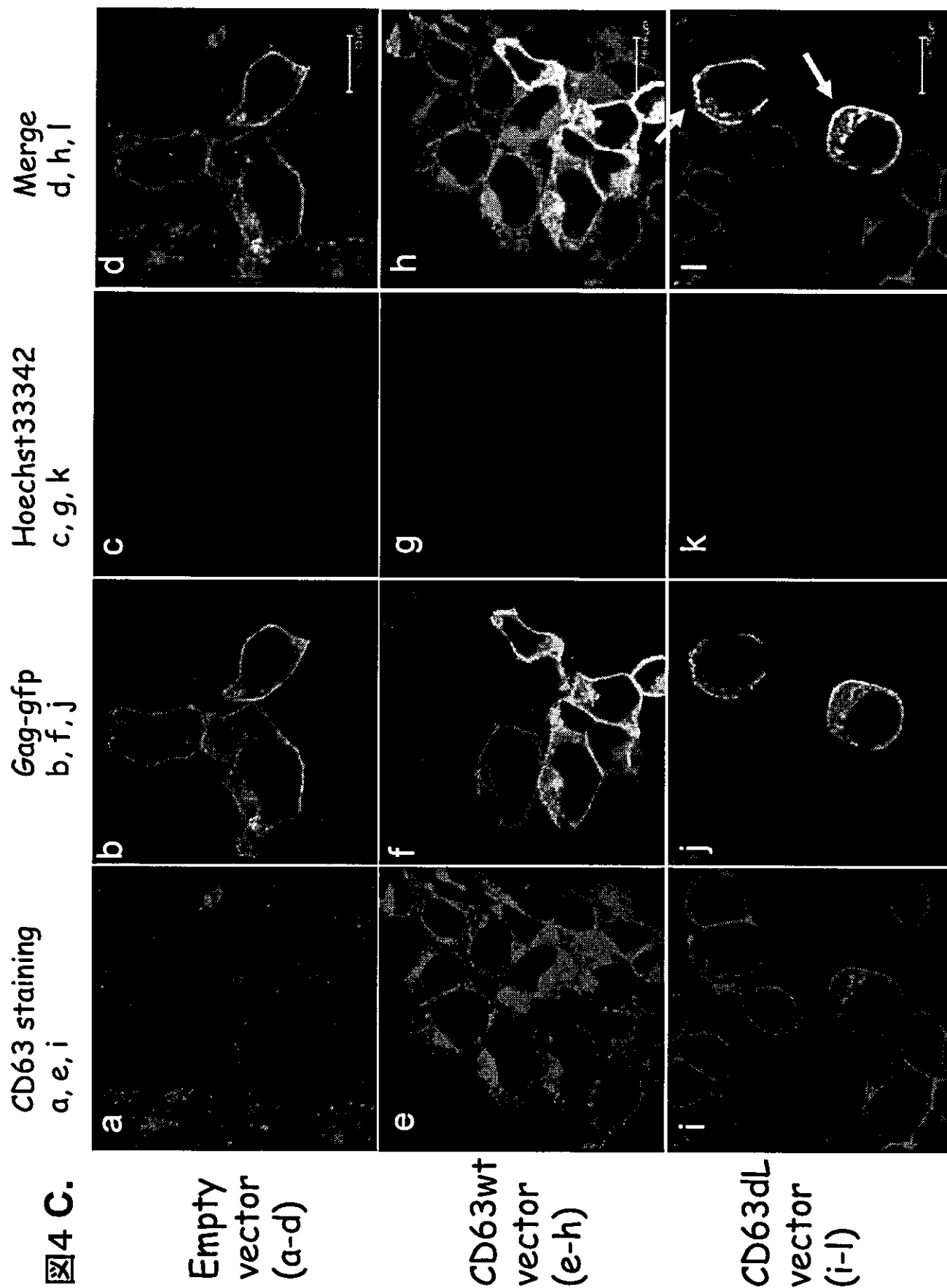


図4. CD63wtならびにCD63dL導入細胞におけるHIV放出の抑制
 CD63、あるいはその変異体遺伝子発現プラスミド(5mg)とpNL4-3プラスミド(0.1mg)を293T細胞にコトランスフェクションし、3日目の培養上清中の感染性HIV-1量をMAGIアッセイ(A)にてgagp24量(B)を測定した。下のパネルはこれらの分子の模式図である。



293T細胞にgag-gfp発現プラスミド(1mg)とCD63遺伝子発現プラスミド(5mg)をコトランスフェクションし2日目に細胞を固定してCD63の発現を蛍光抗体法に検討するとともに、gag-gfp蛋白質の局在を共焦点顕微鏡にて解析した(C)。矢印は共局在部位を示す。

厚生労働省科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

エイズ発症阻止に関する研究班 分担研究報告書

分担研究者 田中勇悦 琉球大学大学院医学研究科免疫学分野 教授

研究要旨：最近、不活化 HIV-1 粒子で感作した自家樹状細胞(DC)を HIV-1 感染者に接種することにより、患者の HIV-1 に対する免疫応答が高められ、体内の HIV-1 量が激減することが報告された。私たちはこれまでに、R5 HIV-1 に対する抑制因子を産生するヒトの CD4+T 細胞がこのような HIV-1 感作自家 DC (DC-HIV-1)免疫で新たに誘導できることを hu-PBL-SCID マウスを用いた実験系で観察し、DC 免疫の有用性を強調してきた。本年度は、免疫効果の高い DC の培養法における新たな試みとして HIV-1 の coreceptor を架橋する方法を独自に考案した。

A. 研究目的

免疫関連分子を介したエイズ発症阻止の研究において、HIV-1 感作樹状細胞(DC)で免疫した hu-PBL-SCID マウスが CCR5 使用(R5)HIV-1 感染に対して完全に耐性になることに注目し、このような DC 免疫療法に用いる活性の高い DC の分化培養方法を研究することを目的に、新たな試みとして抗 CCR5 及び抗 CXCR4 抗体による特異的分子の架橋の効果を観察した。

B. 研究方法（倫理面への配慮）

一般に DC の培養には、単球を抗体で negative あるいは positive 法で分離するか、あるいはプラスチック付着性をもとに分離し、その後試験管内で GM-CSF+IL-4 により DC に分化させる方法が用いられている。今回、単球の分離培養の方法として特異的抗体による単球の CCR5 および CXCR4 の架橋を検討した。得られる DC の R5 HIV-1 抑制因子誘導性は hu-PBL-SCID マウスを用いる感染実験において比較研究した。また、架橋による単球の刺

激が HIV-1 感染にどのように影響するのかを *in vitro* で試した。すでにこのような動物実験は、琉球大学の動物実験倫理委員会で審査され、許可されている。

C. 研究結果

田中らが樹立したラット抗ヒト CCR5 N-terminus 抗体 (T-312)、または抗ヒト CXCR4 ECL1&2 抗体 (A120) を固相化したプレートで 2 時間から一晚培養することにより PBMC 中の殆どの単球がプレートに強く吸着した。これら単球はマクロファージに分化した。興味あることに T312 や A120 で刺激した単球やマクロファージでは R5 HIV-1 の感染・増殖が非刺激細胞より低かった。T312 または A120 刺激単球を GM-CSF+IL-4 または IL-4 のみを加えて培養することにより DC 様細胞が誘導された。このように抗体で架橋した DC を不活化 HIV-1 で感作して hu-PBL-SCID マウスを免疫することによって、R5 HIV-1 抑制因子が誘導された。一方、単球から DC を分化培養する系に培養初日から不活化 HIV-1 を p24

量換算で 50 ng/ml 以上を添加すると DC の分化誘導がアポトーシスにより極端に阻害されるが、架橋した系ではそのような現象は見られなかった。

D. 考察

単球上のケモカイン受容体であり、また HIV-1 の coreceptor である CCR5 または CXCR4 を特異的抗体で架橋するだけで単球のプラスチックへの接着性が高まり、末梢血液単核球分画より単球の分離が簡単になること、その単球はファクターを加えることなしにマクロファージに分化すること、およびこの系に IL-4 単独または GM-CSF と IL-4 を添加すると DC に分化することが明らかになった。これらの観察は単球の分化メカニズムの解明と、今後の DC を用いた HIV-1 免疫誘導の研究に寄与すると考えられる。また、架橋された単球の DC への分化が共存する HIV-1 で阻害されなかったことは、今後、この方法が HIV-1 感染者からの DC の分化培養に応用できることを示唆している。

今後さらに、DC の培養方法について今回の CCR5、CXCR4 の他にも costimulation 分子 (OX40L や CD40L) の影響を探ることが必要であろう。

E. 結論

未だ健常人でも HIV-1 感染者でも末梢血液からの DC の分化誘導は簡単ではない。ヘルパー T 細胞をより強くかつ長期に刺激する活性を持つ機能的 DC の培養方法の確立が急がれる。また DC-HIV-1 免疫方法とケモ

カインアンタゴニストなど他の薬剤との併用は HIV-1 の完全抑制に向けて今後とも検討する意義があると考えられる。

F. 健康危険情報

HIV-1 の感染実験、ウイルスの保管は全て琉球大学医学部で定める感染微生物取り扱い安全管理委員会の規定に基づき、P3 実験施設で行われている。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Yoshida A, Kodama A, Tanaka R, Yamamoto N, Ansari AA and Tanaka Y. Identification of HIV-1 epitopes that induce the synthesis of a R5 HIV-1 suppressor factor by human CD4+T cells isolated from HIV-1 immunized hu-PBL SCID mice. *Clinical and Developmental Immunology*, 2005. in press.
- (2) Nakayama E, Tanaka Y, Nagai Y, Iwamoto A, and Shioda T. A CCR2-V64I polymorphism affects stability of CCR2A isoform. *AIDS* 18(5): 729-738, 2004.
- (3) Zingoni A, Sornasse T, Cocks BG, Tanaka Y, Santoni A, and Lanier LL. Cross-talk between activated human NK cells and CD4+ T cells via OX40-OX40 ligand interactions. *J Immunol.* 173(6): 3716-3724, 2004.

2. 学会発表

- (1) Nakayama EE, Tanaka Y, Nagai Y, Iwamoto

- A, Shioda T. A CCR2-V641 polymorphizm affects stability of CCR2A isoform. XV international AIDS conference, Bangkok 11-16 July 2004, abstract vol. 2, p 9.
- (2) Tanaka Y, Yoshida A, Tanaka R, Murakami T, Yamamoto N. Heterogeneity of HIV-1 epitopes recognized by a novel HIV-1 suppression factor-producing human CD4+ T cells derived from hu-PBL-SCID mice immunized with HIV-1-loaded autologous DC. XV international AIDS conference, Bangkok 11-16 July 2004, abstract vol 2, p 319.
- (3) Murakami T, Yoshida A, Kumakura S, Tanaka R, Mitsuhashi S, Hirose K, Yanaka M, Yamamoto N, Tanaka Y. KRH-2731-5HCl: A new potent and orally bioavailable X4 HIV-1-inhibiting CXCR4 antagonist in vivo. XV international AIDS conference, Bangkok 11-16 July 2004, Program supplement p 30.
- (4) Tanaka Y. Identification of HIV-1 epitopes that induce the synthesis of R5 HIV-1 suppression factor by human CD4+ T cells isolated from HIV-1 immunized hu-PBL-SCID mice and immortalization of the factor-producing CD4+ T cells. Fortieth Anniversary United States-Japan cooperative medical science program, Kyoto 7-10 December 2004, Abstract p375.
- (5) 村上努、田中礼子、山本直樹、田中勇悦
KRH-2731 5Hcl : 新規 CXCR4 アンタゴニストは経口利用可能な HIV-1 侵入阻害剤である。第 5 2 回日本ウイルス学会総会 横浜 11/21/2004, 抄録 p217
- (6) 吉田篤司、村上努、田中礼子、田中勇悦
CCR5 指向性 HIV-1 感染防御因子(CD4 因子)を産生するヒト CD4+細胞株の樹立と解析。第 3 4 回日本免疫学会総会・学術集会記録 札幌 12/1/2004, 抄録 p91
- (7) Tanaka Y. Protection of hu-PBL-SCID mice against HIV-1 infection by dendritic cell-based immunization. 第 1 8 回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集 vol.6 No.4 2004, シンポジウム p 329.

H. 知的所有権の出願・取得状況
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

「Vpr を標的としたエイズ発症阻止」に関する研究
分担研究者 石坂幸人 国立国際医療センター研究所

エイズ発症に直結する Vpr の役割として 2 つの機能が考えられる。即ち、単球/マクロファージ系細胞への初期感染における Vpr 機能と潜伏感染細胞からのウイルス再産生誘導能である。本分担研究ではこれら 2 つの分子機序を明らかにしながら、抗 Vpr 因子の同定を目指す。平成 16 年度では Vpr 欠損ウイルスと野生型ウイルスを調整し、マクロファージ系細胞への感染システムを稼働させ、Vpr が非分裂細胞に対する感染効率を上昇することを認めた。また、Vpr のリコンビナント蛋白質を高度に精製し、エンドトキシンフリーの精製蛋白質を調整した (LPS: <1 pg/ng Vpr)。この標品を培養液中に添加することにより HIV のマクロファージ系細胞への感染効率が増強されること、また潜伏感染した細胞からのウイルス産生は末梢血単核球細胞の機能を介して間接的に誘導されることを見出した。一方、海洋微生物抽出エキストラライブラリーから抗 Vpr 因子の探索も進んでおり、次年度で抗 Vpr 因子化合物の構造を明らかにする。

A. 研究目的

エイズ発症に直結する Vpr の機能として大きく 2 つの可能性を考えることができる。一つは単球/マクロファージ系細胞へのウイルス初期感染における役割であり、他方は潜伏感染細胞からのウイルス産生誘導である。Vpr は、患者血清や脳脊髄液中に存在することが報告されているが、生体内での Vpr 濃度や、実際のウイルス産生における関与の有無については不明である。以上の観点から以下の 3 点について研究を進めている。

1. 単球/マクロファージ系細胞への感染における Vpr 機能の解明
2. Vpr による潜伏感染細胞からのウイルス産生機序の解析と阻害因子の同定
3. 患者体液中の Vpr 測定法の確立

である。項目-3 については、平成 16 年度までにサンドウィッチ法による ELISA システムの作成を試みているが、患者検体をスクリーニングするのに足る精度は得られなかった (D 考察 参照)。平成 16 年度では ELISA システムを改良するため、C-末端ペプチドに対する単クローン抗体を作成した。平成 17 年度では、N-末側を認識する単クローン抗体と併用してより精度の高い測定系を作成する。以下には項目-1 及び-2 に付いて記載する。

B. 研究方法

ウイルス DNA 感染実験に使用する DNA は NL-43 株由来遺伝子で、組み換え型 DNA として ENV 領域を欠失し、NEF 領域にルシフェラーゼ遺伝子が挿入されている。この遺伝子は国立感染症研究所、感染病理部の徳永研三博士から供与を受けた。これを基本型 (R+) とし、VPR 領域にストップコドンが挿入された変異体 (以下 R-) の 2 つのウイルスを用いた。VSV-G 発現プラスミド DNA と共に 293T 細胞に導入し、シールドタイプウイルスを作成した。得られたウイルス量は上清中の p24 を ELISA にて測定した。

単球/マクロファージ系細胞 培養細胞としてヒト単球性白血病細胞株である THP-1 を用いた。THP-1 をフォルボルエステルである phorbol myristate acetate (以下 PMA) で 2 日間処理すると細胞はマクロファージ系細胞の表面マーカーである MAC-1 陽性となり、付着した状態で増殖を停止する。このような細胞に種々の量のウイルスを感染させ、2 日後の細胞中のルシフェラーゼ活性を測定した。

潜伏感染細胞からのウイルス産生誘導 Vpr の発現と精製はバクテリアシステムを用いた。GST 融合蛋白質として発現させ、プロテアーゼで GST と Vpr を切断した後溶出した。エンドトキシン (LPS) はリム