

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).

3. 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

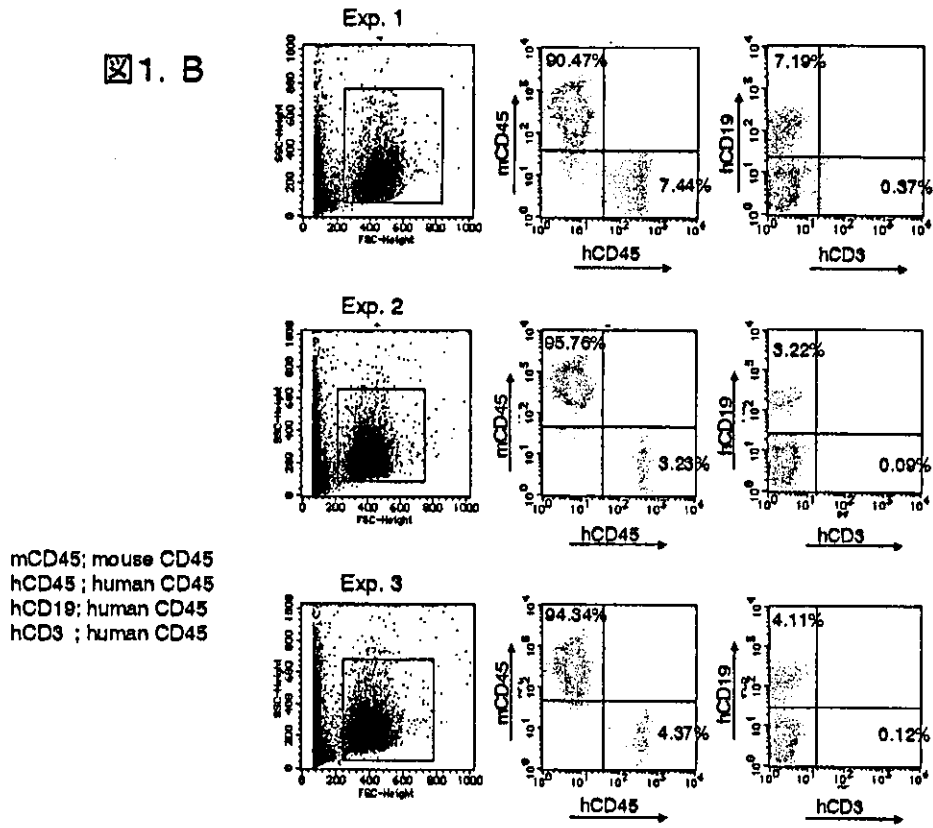
図1. A

新生児 *Balb/c Rag2^{-/-}gC^{-/-}* マウスにおけるヒト細胞の構築効率

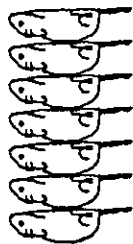
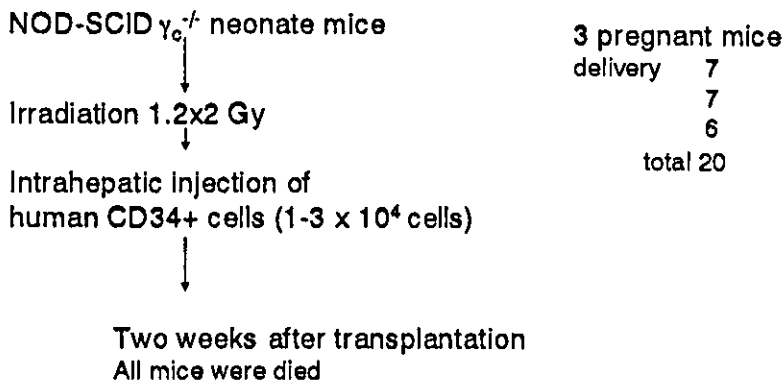
3 pregnant mice delivery	%hCD45 (6 weeks after transplantation)			
	(n)neonate		%hCD45	reconstitution
Exp. 1	3	♂	<0.1	-
		♀	0.8	+
		♀	7.44	++
Exp. 2	4(7)	♀	1.0	+
		♀	3.23	++
		♀	0.4	±
		♀	0.04	-
Exp. 3	4	♀	4.37	++
		♀	0.27	-
		♀	0.15	-
		♀	0.95	+
total 11 mice				

Exp.2 においては移植マウス7匹中4匹のみが6週まで生存し、解析が可能であった。

1. B



2



厚生労働科学研究費補助金（創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業）
（分担）研究報告書

Tat による OGG1 発現誘導と HIV のゲノム保持機構

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：遺伝子発現プロファイル解析をおこない、Tat 被制御遺伝子として酸化ストレスに伴う DNA (guanine) 修飾の修復酵素 OGG1 遺伝子を同定した。ヒト抹消血リンパ球を用いた HIV-1 感染実験においても、OGG1 の誘導が認められた。分子遺伝学的解析の結果より、Tat は OGG1 転写の抑制因子である AP4 を OGG1 プロモーターから遊離させることによって、OGG1 の転写を誘導することがわかった。一方、Tat の発現に伴って細胞内酸化ストレスは著明に増加していた。それにも関わらず DNA の酸化修飾によって生ずる 8-OH-dG の量は Tat 発現によって低下し、OGG1 の siRNA を用いた実験から Tat が OGG1 発現を介して 8-oxo-dG 量の蓄積を抑えることが確認できた。これらのことから、Tat は OGG1 を誘導することによってウイルス複製に伴う酸化ストレスによる遺伝子変異をあらかじめ抑制する作用を持つことが明らかになった。

A. 研究目的

Tat は HIV の増殖に必須の転写活性化因子であるが、がん化促進、免疫抑制、酸化ストレス誘導作用等を有することが報告されており、HIV 感染症の進展に多面的な影響を及ぼしている。その分子機構を追究するために、遺伝子発現プロファイル解析を実施し Tat 被制御遺伝子を包括的に検索した。その結果、OGG1 の発現誘導を認めたので HIV 感染における意義を追求した。

（倫理面への配慮）
本研究には該当せず。

B. 方法と結果

(1) Tat は DNA glycosylase である OGG1 遺伝子発現を誘導する。

Tat 被制御遺伝子を解析するにあたり、Ponasteron A (pon A) で Tat の発現を制御できる細胞株を新たに樹立した。樹立した細胞において pon A 特異的な Tat の発現が Western blot (WB) 法で確認でき、HIV-1 遺伝子の活性化と Cyclin T1 との結合も認められた。本細胞を用いて Tat 非誘導時、誘導後の遺伝子発現プロファイルを相互に比較を行った結果、酸化ストレス DNA 傷害に対する repair enzyme

である OGG1 が Tat によって最も強く発現誘導を受けていた。ヒトリンパ球と Jurkat 細胞を用いた HIV-1 の感染実験においても、p24 産生の上昇とともに、OGG1 の発現誘導が認められた。(Fig. 1)。
2) Tat は OGG1 promoter 上の AP-4 結合サイトに作用し OGG1 の発現を直接誘導する。

Tat が酸化ストレスを介して OGG1 の発現を誘導していることが推察されたが、抗酸化剤を前処理しても Tat による OGG1 誘導作用は阻害されなかった。また、OGG1 の mRNA の安定性にも変化がなかったことから、Tat は直接 OGG1 の発現を誘導していることが推察された。実際に、OGG1 promoter を用いて Luciferase assay を行った結果、Tat は OGG1 promoter を活性化した。さらに、promoter 上の責任領域を決定するために種々の変異 OGG1 promoter を作製した。その結果、5'末端側の AP-4 結合サイトを変異させた promoter においては Tat の効果が認められなくなった (Fig. 2)。興味深いことに本 promoter においては basal level での転写活性が上昇していた。以上の結果から、AP-4 は OGG1 の発現において negative に作用しており、Tat

は AP-4 による阻害作用を解除している可能性が推察された。実際に OGG1 promoter とともに AP-4 を強発現させると、Tat による活性化作用と basal level での転写活性が抑制された。

(3) Tat は AP-4 と相互作用し AP-4 の OGG1 promoter への結合を抑制する。

AP-4 は HLH 型転写因子で GC box に結合しいくつかの遺伝子発現を促進または抑制することが報告されているが、そのメカニズムや相互作用因子等の解析はなされていない。そこで、Tat と AP-4 が相互作用する可能性を推察し *in vivo* において IP-WB assay を行ったところ、Tat は内在性の AP-4 と結合した(Fig. 3 右図)。次に AP-4 の DNA 結合能に対する Tat の作用を *in vitro* において EMSA にて検討した。その結果、Tat の発現量に依存して AP-4 の DNA 結合能が低下した(Fig. 3 左図)。以上の結果は、OGG1 promoter 上の AP-4 結合サイトを用いた ChIP assay においても認められ、Tat が AP-4 と相互作用することにより AP-4 の OGG1 promoter への結合を抑制している可能性が示唆された。

(4) Tat は細胞内 8-oxo-dG 産生を抑制する。

酸化ストレスは酸化型 guanine である 8-oxo-dG を誘発し G:C から T:A への transversion を起こすことが知られている。OGG1 は 8-oxo-dG を除去することにより transversion による DNA の変異を阻止している。実際に OGG1 ノックアウトマウスにおいては OGG1 による修復機構が働かないため 8-oxo-dG 量が増加することが報告されている。Tat が OGG1 の発現を誘導しことから、8-oxo-dG 量を HPLC-EC 法にて測定した。その結果、Tat の発現量とともに 8-oxo-dG 量が非発現細胞の baseline level よりも有意に低下していた(Fig. 4 左図)。さらに、siRNA により OGG1 遺伝子をノックダウンすることにより Tat によって 8-oxo-dG 量が増えることから、Tat が OGG1 発現を介して 8-oxo-dG 量の蓄積を抑えることが確認できた(Fig. 4 右図)。

C. 考察

Tat は宿主のレドックスバランスを酸化方向にシフトし HIV の転写に対して有利に働く一方で、あらかじめ OGG1 を誘導することによって Transversion による HIV-1 のゲノム変異を未然に防止している(feed-forward)可能性が示唆された。また、最近 APOBEC3G/CEM15 による HIV ゲノム変異(G:C から A:T への transition)を Vif が抑制していることが報告されたが、今回の結果から Tat も Vif とともに HIV ゲノムの安定性に関与していることが推察された。

D. 結論

Tat の新たな機能として、OGG1 の発現を介して HIV ゲノムの安定性に関与していることが示された。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takahashi, N., Kobayashi, S., Jiang, X., Kitagori, K., Imai, K., Hibi, Y., and Okamoto, T. : Expression of 53BP2 and ASPP2 proteins from TP53BP2 gene by alternative splicing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315:434-438, 2004.
- 2) Tetsuka, T., Uranishi, H., Sanda, T., Asamitsu, K., Yang, J-P., Wong-Staal, F. and Okamoto, T. : RNA helicase A interacts with nuclear factor-[[kappa]]B p65 and functions as a transcriptional coactivator. *Eur. J. Biochem.* 271: 3741-3751, 2004.
- 3) Tozawa, K., Okamoto, T., Kawai, N., Hashimoto, Y., Nagata, D., Hayashi, Y. and Kohri, K. : Positive correlation between sialyl Lewis X expression and pathological findings in renal cell carcinoma. *Kidney Int.* 2005. (in press)
- 4) Sanda, T., Iida, S., Ogura, H., Asamitsu, K., Murata, T., Bacon, K.B. Ueda R. and Okamoto, T.: Growth inhibition of multiple myeloma cells by a novel IκB

kinase inhibitor. Clin. Can. Res. 2005 (in press)

5) Kobayashi, S., Kajino S., Takahashi, N., Kanazawa, S., Imai, K., Hibi, Y., Ohara, H., Itoh M. and Okamoto, T. : 53BP2 induces apoptosis through the mitochondrial death pathway. Genes Cells 2005 (in press)

6) Okamoto, T. : The epigenetic alteration of synovial cell gene expression in rheumatoid arthritis and the roles of NF- κ B and Notch signaling pathways. Modern Rheum. 2005 (in press)

2. 学会発表

1) Okamoto T, Shuhei U, Asamitsu K, Kondo T : Bioinformatic determination of the Tat/TAR/Cyclin T1 multimolecular transactivation complex. 6th EMBL Transcription Meeting 2004年8月28日~9月1日、Germany

2) Asamitsu, K., Ishida, H., Ueno, S., Kondo, T., Okamoto, T.: Prediction of 3D structure of Tat/TAR/Cyclin T1 complex using molecular docking simulation. 第27回日本分子生物学会 2004年12月8日~11日、神戸

3) Hibi, Y., Hamano, T., Matsuo, K.,

Takahashi, N., Mabuchi, Y., Soji, T., Hara, T., Yamamoto, N., Honda, M., Okamoto, T.: A single nucleotide synonymous mutation in gag gene in seronegative cases of HIV-1 infection. 第27回日本分子生物学会 2004年12月8日~11日、神戸

4) Victoriano, B. A. F. Asamitsu, K., Hibi, Y., Murata, T., Bacon, K. B. Okamoto, T.: Inhibition of HIV-1 replication in HIV-1 latently infected cells by a novel IKK inhibitor 第18回日本エイズ学会 2004年12月9日~11日、静岡

5) Okamoto, T.: Computational analysis of the 3D structure of Tat/TAR/P-TEFb complex as a molecular target of novel anti-HIV therapy. 第18回日本エイズ学会 2004年12月9日~11日、静岡

6) Okamoto, T.: Bioinformatics resolution of TAT/TAR/CYCLIN T1 complex that determines HIV replication. The 31st Annual Convection of The Philippine Society for Biochemistry and Molecular Biology 2004年12月3日~4日、Philippine

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得(出願中)

岡本 尚、田中清隆、長谷川順一: NF- κ B活性化抑制剤(特願2004-3727)(特願2004-3728)

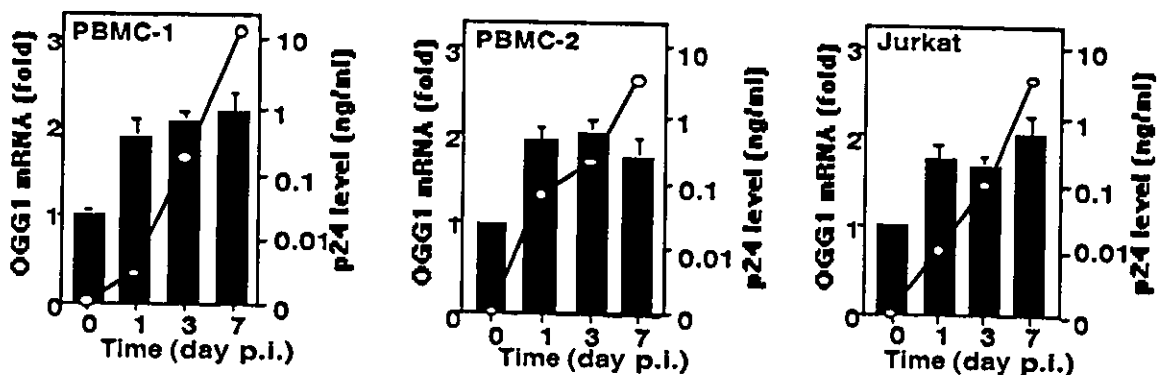


Fig. 1 HIV-1 感染実験。P24 産生とともに OGG1 遺伝子の発現上昇が認められた。

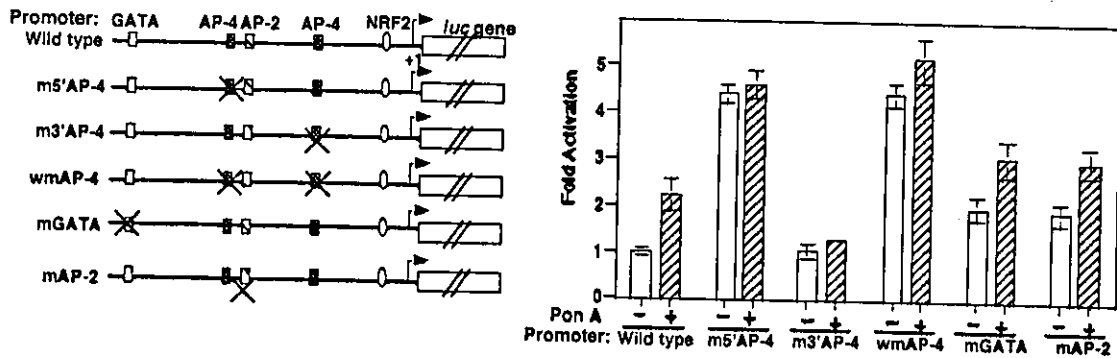


Fig. 2 OGG1 promoter 解析。5 末端側 AP-4 結合部位(m5'AP-4)を変異させると Tat の活性化作用が認められなくなり、basal level での OGG1 遺伝子の活性が上昇した。

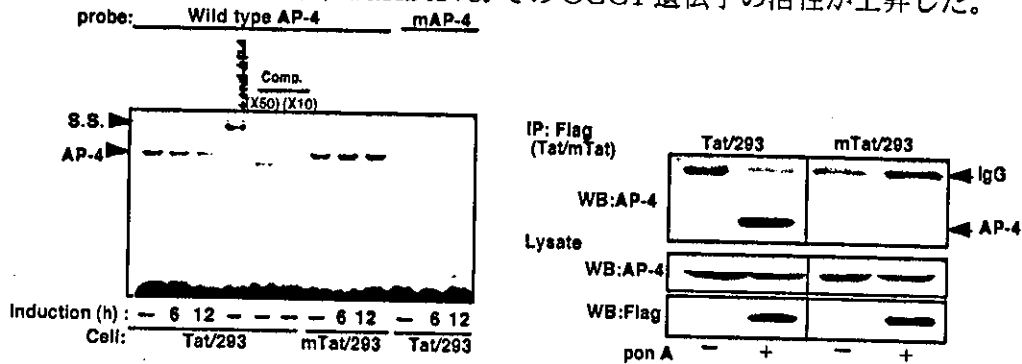


Fig. 3 EMSA 解析、免疫沈降実験の結果から、Tat は AP-4 と結合し(右図)、OGG1 promoter への AP-4 の結合を阻害していることがわかった (左図)。

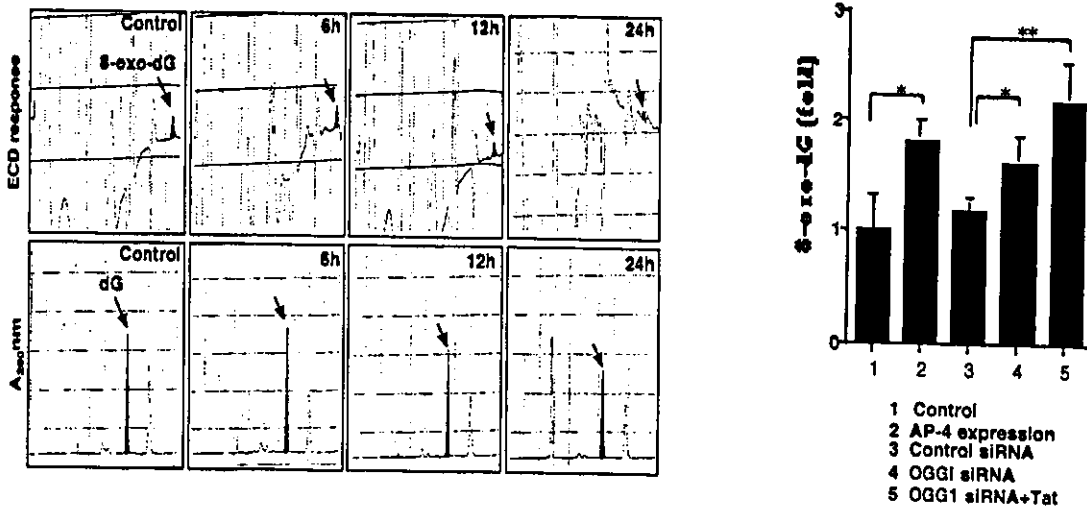


Fig. 4 HPLC 解析の結果、Tat 発現にともない 8-oxo-dG が低下した (左図)。OGG1 siRNA 解析から Tat は OGG1 発現を介して 8-oxo-dG 量の蓄積を抑えていた (右図)。

分担研究者 小糸 厚 熊本大学エイズ学研究センター病態制御分野 講師

研究要旨

マウス個体内での HIV エンベロープ(Env)を介したレトロウイルス感染評価系を確立することを目的とする。HIV Env を改変することにより MuLV 粒子に取り込ませ、この HIV/MuLV シュードタイプを HIV レセプター発現マウス細胞に感染させるための基礎研究をおこなった。またミンクなど食肉目(Carnivora)に属する小動物の HIV 感染モデルとしての可能性を検討し、実験動物としての歴史もあるフェレットでも宿主域障壁が少ないことを明らかにした。さらに今後の小動物モデル開発にむけて、最近その存在が明らかにされた HIV 複製に対する自然防御機構が霊長類以外の小動物に広く存在するか否かの解析をおこなった。

研究目的

HIV 感染症の小動物モデルとして HIV 感受性マウスあるいはラットの作製が試みられてきたが、これまで HIV 感染のレセプターあるいは転写活性化に関与する CyclinT1 を発現させたげっ歯類動物で十分な HIV の複製に成功したとの報告はなく、またそれを規定している宿主因子群がすべてあきらかになっているわけではない。本研究では、HIV Env を遺伝子工学的手法を用いて改変することにより MuLV 粒子に取り込ませ、この HIV/MuLV シュードタイプを HIV レセプター発現マウスに感染させ、マウス個体内での HIV Env を介したレトロウイルス感染評価系として確立することを目的とする。HIV Env に対する抗体やケモカインレセプターに対するアンタゴニストなど種々の治療ストラテジーの効

果を個体レベルで検証しうる実用的な小動物モデルとすることをめざす。また我々は、食肉目(Carnivora)に属するミンクの細胞ではげっ歯類と比較して宿主域障壁が少ないことを報告してきたが、そのメカニズムを明らかにするとともに、この種の小動物の HIV 感染モデルとしての可能性を探る。さらに最近、HIV 粒子に取り込まれたシチジン脱アミノ酵素 APOBEC3 が、逆転写の際 first(minus)-strand DNA に作用し、その感染性を負に制御しうることが明らかにされた。HIV Vif はヒト由来の APOBEC3 に対してのみ対抗し、マウス由来のものには機能せず、HIV 複製の宿主域がきわめて狭いことの一因となっている可能性がある。この HIV 複製に対する自然防御機構が霊長類以外の小動物に広く存在するか否かを明らかにす

ることは、今後の小動物モデル開発にむけて重要であると考え、その解析を行っている。

研究方法

Env gp41 細胞質内領域を欠損させることにより MuLV 粒子に HIV-1 Env が取り込まれ、HIV 感染のレセプターを発現した細胞に MuLV ゲノムを導入しようとの報告 (Schnierle et al., *PNAS* 94:8640,1997) をもとに HIV-1 gp41 変異体を作製した。チキンの β -アクチンのプロモーター、SV40 の複製起点を有する発現ベクター pCAGGS-SF33-Env, pCAGGS-SF33A2-Env のアミノ酸残基 711 番目に終止コドンを導入し、細胞質内欠損変異体を作製した。この HIV-1 Env 変異体の発現ベクターを MuLV ゲノムおよび pRev とともに MuLV 由来の Gag および Pol 蛋白を発現した GP-293 細胞にトランスフェクトすると、MuLV コア蛋白質でパッケージされた MuLV 粒子が HIV-1 Env に包まれた状態で産生されることが考えられる。

アメリカミンクの近縁で、食肉目 (Carnivora)、いたち科 (Mustelidae) に属し、実験動物としての歴史もあるフェレット (*Mustera putorius furo*) の HIV 感受性を検討するため、トリプル F ファーム (米国) よりフェレットを入荷し、熊本大学生命資源研究支援センターの大杉剛生助教授との共同研究で、

飼育管理をおこなった。腎臓と脾臓を摘出し、これらの培養細胞における HIV 複製効率を検討した。また細胞より total RNA を抽出、CyclinT1 および APOBEC3 の塩基配列の解析をおこなった。

(倫理面への配慮)

該当事項なし

研究結果

HIV/MuLV 組換えレトロウイルス作製の方は、まず HIV-1 gp41 細胞質内領域に終止コドンを導入し、細胞質内欠損体 SF33 Δ c711, SF33A2 Δ c711 を作製した。この変異 HIV-1 Env をもつ MuLV 粒子を GP293 パッケージング細胞で産生させると、ヒト CD4/CXCR4 発現マウスリンパ球 (EL4) への MuLV ゲノムの導入が確認された。ヒト CD4/CXCR4 トランスジェニックマウスは昨年度までに熊本大学生命資源研究支援センターの中潟研究室 (動物資源開発研究施設) との共同研究で、体外受精法によりその個体数を増やし、それらのマウスから精子および体外受精で得られた胚を凍結保存した。いつでも同センター内で個体数を増やせる状況をとった。

一方、フェレットの HIV 感受性の検討では、まずフェレット腎臓由来繊維芽細胞が、HIV-1 LTR からの転写活性化をヒト細胞と同等に支持することを確認した。またヒト CyclinT1 の導入によ

りさらに2~3倍の増加が観察されたが、これは261番目のアミノ酸がマウス型の tyrosine であることと矛盾しない。フェレット CyclinT1 は261番目以外の部分で Tat と相互作用しうる、あるいは CyclinT1 に依存しない転写伸長反応の存在を示唆するものである。さらにこの種の細胞では HIV-1 の遺伝子発現、粒子形成および放出が、効率良くおこることが明かとなった(Koito A., et al; 論文投稿中)。このことは、侵入段階の問題さえクリアできれば、これらの小動物個体内でウイルス HIV-1 が増殖できる可能性を示している。さらにこれらの小動物細胞に HIV 複製に対する自然防御機構が存在するか否かを検討した。霊長類とげっ歯類で保存された遺伝子配列より degenerate プライマーを作製し、APOBEC3 cDNA を PCR で増幅、塩基配列を解析したところ、これら異種の生物間で全体の相同性は低いものの酵素活性部位はよく保存されていた。

考察

HIV を含むレンチウイルスベクターの感染は P2 レベル以上での拡散防止措置がとられるが、このシステムは、自己複製能をもたない MuLV ベクターの接種ということになり、通常のマウス施設内で迅速、簡便かつ安全に行うことが可能であり、HIV 感染症に対する系統だった基礎研究の推進に貢献できる

ものと期待される。今後、個体レベルでの感染実験に向けてウイルス力価を上昇させる必要がある。これまでフェレットはインフルエンザウイルスなどの感染症に対する有用な実験用動物として一部の研究施設で用いられてきたが、最近、新型肺炎(SARS)ウイルスにも感染することが報告され注目されている。今後、この動物種での免疫学的検索に必要な種々の研究素材の availability の問題も改善されることが期待される。フェレットの飼育管理をおこない、今後の個体レベルでの研究発展のための有意義なあしがりを得ることができた。

研究発表

1) 論文発表

Shimizu, T., Arai, S., Imai, H., Oishi, T., Hirama, M., Koito, A., Kida, Y., & Kuwano, K.: Glycoglycerolipid from the membranes of *Acholeplasma laidlawii* binds to human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) and accelerates its entry into cells. *Current Microbiol.* **48**, 182-188 (2004).

Koito, A., Kameyama, Y., Shibata, J., Urano, T., Matsushita, S & Ohsugi, T.: Ferret (*Mustela putorius furo*)-derived cells are susceptible to HIV-1 infection. (Submitted).

2) 学会発表

1. 松永欣也、古島志伸、小糸 厚、大杉剛生、浦野 徹：フェレットの飼育管理経験. 第 38 回日本実験動物技術者協会総会. 2004.5.20-22.長崎.
2. 小糸 厚、柴田潤二、大杉剛生、松下修三、亀山祐一：小動物由来 APOBEC3G の抗 HIV-1 活性の解析. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会. 2004.11.21-23.横浜.
3. 祁内 梓、木村哲也、吉村和久、小糸 厚、松下修三：HIV Tat-Nef 融合タンパクを用いた細胞性・液性免疫の誘導. 第 34 回日本免疫学会総会・学術集会. 2004.12.1-3. 札幌.
4. 濱本理恵子、祁内 梓、吉村和久、小糸 厚、松下修三：HIV 感染患者におけるヘルパーT 細胞活性に対する制御性 T 細胞の影響.第 34 回日本免疫学会総会・学術集会. 2004.12.1-3. 札幌.
5. 柴田潤二、木村哲也、岩田隆一、吉村和久、小糸 厚、松下修三：gp120 の C3 領域変異による抗 V3 中和抗体に対する中和抵抗性の獲得自己由来の HIV に対して中和活性をもつ血清中和抗体の交差中和性の研究. 第 18 回日本エイズ学会学術集会. 2004.12.9-11. 静岡.
6. 岩田隆一、柴田潤二、木村哲也、吉村和久、小糸 厚、松下修三：自己由来の HIV に対して中和活性をもつ血清中和抗体の交差中和性の研究. 第 18 回日本エイズ学会学術集会. 2004.12.9-11. 静岡.
7. Kenai, A., Kimura, T., Yoshimura, K., Koito, A., Matsushita, S.: Efficient induction of both cellular and humoral immune responses by immunization with Tat-Nef fusion protein (tNEF) without adjuvants. XV International AIDS Conference, 2004.7.11-16, Bangkok, Thailand.
8. Matsushita, S., Kimura, T., Shirai, N., Koito, A., Yoshimura, K. New approach for optimization of HAART; Evaluation of residual viral replication by monitoring proviral DNA level and T cell turnover rate. [TuPeA4356], XV International AIDS Conference, 2004.7.11-16, Bangkok, Thailand.
9. Koito, A.: Restriction factors against HIV-1 replication in small animal cells. 5th AIDS seminar in Kumamoto 2004.9.9-10. Kumamoto.
10. Shibata, J., Wang, F.X., Kimura, T., Iwata, R., Yoshimura, K., Koito, A., Matsushita, S.: Involvement of C3 mutation in neutralization sensitivity for anti-V3 antibodies. 5th AIDS seminar in Kumamoto 2004.9.9-10. Kumamoto.
11. Iwata, R., Shibata, J., Kimura, T., Yoshimura, K., Koito, A., Matsushita, S.: Cross neutralizing activity of serum antibodies with neutralizing activity against autologous HIV. 5th AIDS seminar in Kumamoto 2004.9.9-10. Kumamoto.

H16. 分担研究報告書

研究費の名称：厚生科学研究費補助金

研究事業名：創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業

課題番号：

研究課題名：抗エイズ薬開発のための小動物評価系の開発と新規治療薬の開発研究

研究代表者：岩倉洋一郎（東京大学医科学研究所）

分担研究者：神奈木真理（東京医科歯科大学）

生体分子による HIV 複製抑制

所属： 東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 免疫治療学分野

研究者氏名： 神奈木真理

研究要旨

我々は、HIV-1 抑制効果を示す CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞(CTL)株を樹立した。この CTL 株は HIV-1 と無関係の 抗原特異性を持ち、HIV-1 抑制は細胞傷害活性とは異なる。樹立した HIV-1 抑制性 CD8 陽性 CTL 株は複数あり、抑制活性に細胞接触を要するものと、液性因子を介するものがある。この液性因子は、以前から存在が指摘されながら未同定の因子 CAF (CD8+ cell antiviral factor) と同等のものであると考えられる。本年度は、HIV-1 抑制活性のある CTL 上清について、クロマトグラフィー分画精製を行った。この結果、ゲルろ過クロマトグラフィーにより 60 kDa 前後に抑制活性のピークが得られた。さらにイオン交換クロマトグラフィーを行い、HIV-1 抑制活性のある分画を部分精製した。この部分精製分画の回収量は微量であるが、HIV-1 抑制の再現性は確認できた。現在、この分画に含まれる複数の蛋白スポットについて、マトリックス支援レーザー励起イオン化飛行時間型質量分析計(MALDI-TOF MS)を用いた解析に移行している。本因子は、今後生物学的な抗 HIV-1 薬としての開発可能性を持つ。

1. 研究目的

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。これらの CTL 株の中には上清中に抑制活性を示すものがあり、この液性因子は無症候 HIV-1 感染者の CD8 陽性細胞から産生される HIV-1 抑制因子 CAF (CD8+ cell antiviral factor)と同等の因子である可能性がある。この因子は、生物学的な抗 HIV-1 薬としての可能性を持っている。

本研究の目的は、この CD8+CTL の HIV-1 抑制メカニズムの解明と抑制因子の同定である。

2. 方法

1) 健康人由来アロ抗原特異的 CD8 陽性 CTL 株:

3 人の健康人 PBMC をマイトマイシン C 処理した Raji 細胞で刺激し、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 存在下で培養し定期的に Raji 刺激を加え維持した。

2) HIV-1 感染 PBMC に対する HIV-1 抑制活性:

細胞接触を介する抑制活性の検出には、CTL と同ドナー由来の PHA 刺激 PBMC の CD8+細胞除去分画に 2 時間 HIV-1 感染後、CTL と 4 日間混合培養し上清中 HIV-1 p24 量を ELISA により測定した。細胞上清中の抑制活性の検出には、PHA 刺激 CD4+PBMC に 2 時間 HIV-1 感染させた後、同体積の CTL 上清を加え 4 日後の HIV-1 p24 量を測定した。

3) Pseudotype virus を用いた HIV-1 抑制活性: HIV-1 複製の初期過程と後期課程に対する CTL 上清中の抑制因子の活性を調べるため、

pseudotype virus を用いた。Envelope 欠損 HIV-1 を含む luciferase 発現ベクターと Vesicular stomatitis virus (VSV)-G, Amphotropic murine leukemia virus (MuLV), あるいは HIV-1 NL4-3 envelope の発現ベクターを COS 細胞に co-transfection して pseudotype virus を得た (図 1)。PHA 刺激 CD4+T 細胞に pseudotype virus を 3 時間感染させ、CTL 上清あるいは精製分画を加え培養し、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) CTL 培養上清の分画:

CTL 培養上清は、CTL を抗原刺激後 IL-2 存在下に 48 時間培養し、遠心した上清を 0.25 μ m フィルターを通したものをを用いた。上清をイオン交換クロマトグラフィーあるいはゲル濾過カラムにより分画し、それぞれの分画を感染 PBMC 培養へ添加し 4 日間に産生された HIV-1 p24 量を測定した。イオン交換とゲル濾過により精製された HIV-1 抑制分画をさらに電気泳動で展開した。

5) CTL 由来蛋白のプロテオーム解析:

CTL 上清中の HIV-1 抑制分画を、SDS-PAGE あるいは二次元電気泳動で展開し銀染色した後、蛋白スポットをゲルから切り出し、質量分析 (トリプシン消化、MALDI-MS) を行った。HIV-1 抑制活性のある CD8+ CTL からの抽出蛋白についても二次元展開し同様の解析を行った。この際、蛋白スポットは対

照細胞と比較し量に変化の見られたのを選んだ。

3. 結果

CD8 陽性 CTL の上清は野生型 R5-, X4 HIV-1 株の複製を著明に抑制した。また、VSV-G, MuLV, あるいは HIV-1 いずれのエンベロープを持つ pseudotype HIV-1 を 3 時間感染させ後に CTL 上清を加えた場合にも中等度の抑制が認められた。CTL の HIV-1 抑制活性が、種々の既知の HIV-1 抑制因子である RANTES, MIP1- α , β , SDF、インターフェロン α , β , Defensin に対する特異抗体により解除されないことは以前に確かめた。また、この活性は熱処理、あるいは酸処理により失われた。

CTL 上清をゲル濾過カラムクロマトグラフィーで分画したところ、14 番目を中心とする fraction (60K 前後) に HIV-1 抑制活性が認められた。しかし、この部位はアルブミンのピークと重なるため、培地から牛血清を除いた条件で培養上清を調整し直した。この条件でも CTL 上清中の HIV-1 活性は失われず、ゲル濾過で同様の分画に HIV-1 抑制活性が認められた。また、イオン交換クロマトグラフィーによる分画では 26 番目付近の分画に HIV-1 抑制活性が認められた。次いで、イオン交換とゲル濾過によりこれらの分画を部分精製した。精製後の分画は、元の CTL 上清と同等の強い HIV-1 抑制活性を示した。HIV-1 抑制実験に用いる際には部分精製分画は透析を行い、総体積が元の上清とほぼ同じ

になるよう濃縮した。

この部分精製分画を SDS-PAGE で展開し、質量分析 (トリプシン消化、MALDI-MS) を行ったところ、60kDa 付近の大きなバンドは牛アルブミンであった。少し上に離れたバンドは Alpha 2 Heremans-Schmid glycoprotein (AHSG, Fetuin) であった。AHSG は肝で産生され血清中に存在し石灰化の阻害因子であり、炎症時に AHSG の血清レベルが低下することが知られている。しかし、アミノ酸配列から、同定された AHSG は牛由来であることが分かった。従って、これらの蛋白は、培地中に微量に存在する FCS 由来のものと考えられた。しかし、CTL を含まない培養上清から同様に精製した分画には、HIV-1 抑制活性は認められないため、FCS 由来の蛋白以外に、抑制物質が含まれると考えられる。培地に添加している IL-2 には少量の FCS が含まれるので、さらに FCS の影響を除くため IL-2 の FCS を除去した条件で CTL 上清を調整し、現在 HIV-1 抑制活性が残存することが確認されている。

4. 考察

HIV-1 抑制活性を観察するために、以前は無症候 HIV-1 キャリアの CD8 細胞の上清を用いていたため、個人差が激しく安定供給は難しかった。しかし、我々のこの数年の研究により、正常の CD8 陽性 CTL が細胞接触により HIV-1 抑制活性を示すことが分かり、さらに、その培養上清中に安定して CAF と類似の HIV-1 抑制因子を得られる系が確立

した。

CD8 陽性 CTL の細胞接触による HIV-1 抑制は、pseudotype virus を用いた解析から、主に 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た。これは、感染 24 時間後に CTL を加えても抑制が観察されたためである。今回、CTL 上清を用いて同様の手法を用いて解析をおこなったが、感染 24 時間後に CTL 上清を加えた場合には抑制効果は安定しなかった。しかし、VSV-G, MuLV, あるいは HIV-1 いずれのエンベロープを持つ pseudotype HIV-1 を感染させた場合でも 3 時間後に CTL 上清を加えた場合には中等度の抑制が認められた。また、野生型 R5-, X4 HIV-1 株の複製も同様に抑制することから、CTL 上清は少なくとも HIV-1 侵入過程には影響しないと考えられた。

イオン交換とゲル濾過クロマトグラフィーにより、CTL 上清中の HIV-1 抑制因子は部分精製が可能であった。しかし、活性分画には FCS 由来の主にアルブミンが含まれるため、それ以上の解析に支障が出ることが分かった。今後、FCS を極力除去した条件で CTL 上清を調整し、蛋白解析を進める計画である。

5. 結論

健康人由来 CD8 陽性 CTL から CAF 様の HIV-1 抑制活性を持つ液性因子を安定し

て供給できる実験系を確立した。イオン交換とゲル濾過クロマトグラフィーにより、CTL 上清中の HIV-1 抑制因子は部分精製が可能であった。上清中の FCS を除去する必要があることがわかったので、今後、CTL 上清の調整条件を改良し蛋白解析を進める計画である。

6. 研究発表

1. 論文発表

- i) X. Zhou, M. Kubo, H. Nishitsuji, K. Kurihara, T. Ikeda, T. Ohashi, M. Azuma, T. Masuda, and M. Kannagi. Inducible co-stimulator (ICOS)-mediated suppression of human immunodeficiency virus type 1-replication in CD4+ T lymphocytes. *Virology* 325: 252-263, 2004.
- ii) Y. Emori, T. Ikeda, T. Ohashi, T. Masuda, T. Kurimoto, M. Takei, and M. Kannagi. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by Z-100, an immunomodulator extracted from human type tubercle bacilli, in macrophages. *J. Gen. Virol.* 85: 2603-2613, 2004.
- iii) M. Kubo, H. Nishitsuji, H. Liu, K. Kurihara, T. Masuda, and M. Kannagi. Suppression of HIV-1 replication by HIV-1-irrelevant CD8+ cytotoxic T lymphocytes and their culture supernatants. XV International AIDS Conference, Medimond S.r.l., E710F1425: 15-19, 2004.
- iv) H. Nishitsuji, T. Ikeda, H. Miyoshi, T. Ohashi, M. Kannagi, and T. Masuda. Expression of small hairpin RNA by lentiviral-based vector confers efficient and stable gene-suppression of HIV-1 on human cells including primary non-dividing cells. *Microbes and Infection*. 6: 76-85, 2004
- v) T. Ikeda, H. Nishitsuji, X. Zhou, N. Nara, T. Ohashi, M. Kannagi, and T. Masuda. Evaluation of the functional involvement of Human immunodeficiency virus type 1 Integrase in nuclear import of viral cDNA during acute infection. *J. Virol.*

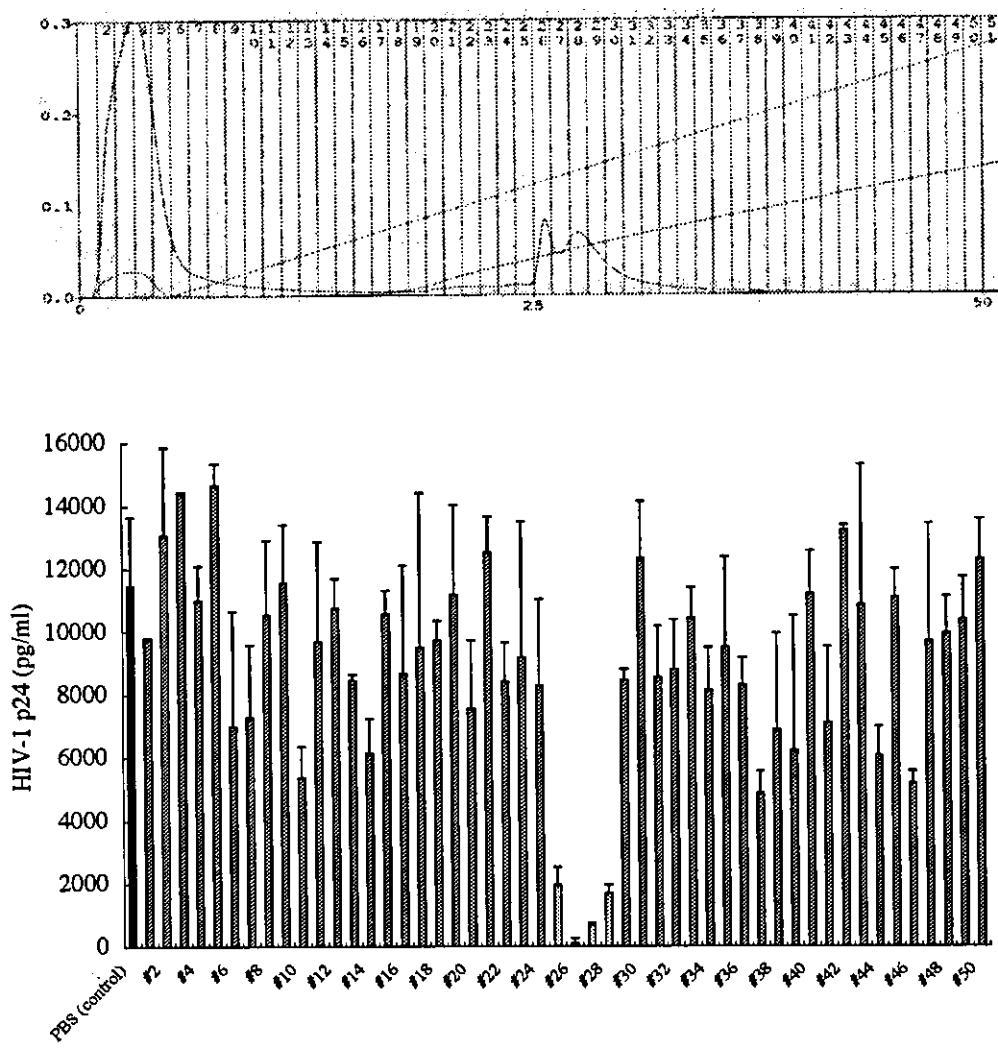
78: 11563-11573, 2004.

学会発表 (2004 年)

- i) M. Kubo, H. Nishitsuji, H. Liu, K. Kurihara, T. Masuda, and M. Kannagi. Suppression of HIV-1 replication by HIV-1-irrelevant CD8+ cytotoxic T lymphocytes and their culture supernatants. XV International AIDS Conference, June 2004, Bangkok.
- ii) 久保 誠、西辻裕紀、栗原 清、増田貴夫、神奈木真理。HIV-1 抗原と無関係な特異性を持つ CTL 株とその培養上清による HIV-1 複製抑制効果。第 52 回日本ウイルス学会。H16 年 11 月、横浜
- iii) 周シン、久保 誠、西辻裕紀、栗原 清、池田たま子、大橋 貴、東みゆき、増田貴夫、神奈木真理。ICOS リガンドによる HIV-1 複製抑制。第 52 回日本ウイルス学会。H16 年 11 月、横浜
- iv) 濱本誠二、西辻裕紀、天笠光雄、神奈木真理、増田貴夫。HIV-1 インテグラーゼと相互作用する宿主細胞内因子の同定。第 52 回日本ウイルス学会。H16 年 11 月、横浜
- v) 西辻裕紀、神奈木真理、増田貴夫。インテグラーゼおよび Tat を標的とした shRNA 発現レンチテリスベクターによる HIV-1 複製抑制と逃避変異出現の解析。第 52 回日本ウイルス学会。H16 年 11 月、横浜
- vi) 久保 誠、西辻裕紀、栗原 清、増田貴夫、神奈木真理。HIV-1 抑制因子を産生する健常人由来 CTL 株の樹立。第 18 回日本エイズ学会。H16 年 12 月、静岡
- vii) 周シン、久保 誠、西辻裕紀、栗原 清、池田たま子、大橋 貴、東みゆき、増田貴夫、神奈木真理。ICOS と CD28 を介する HIV-1 複製調節。第 18 回日本エイズ学会。H16 年 12 月、静岡

図1 イオン交換クロマトグラフィーによる CD8+CTL 上清中の HIV-1 抑制活性分画

CD8+CTL の培養上清をイオン交換クロマトグラフィーにより分画した(上図)。各分画を HIV-1 感染させた CD4+ T 細胞とともに培養した。4 日後、上清中の HIV-1 p24 量を ELISA で測定した結果、26-29 番目の分画に、強い HIV-1 抑制活性が認められた(下図)



研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ishihara, K., Sawa, S. I., Ikushima, H., Hirota, S., Atsumi, T., Kamimura, D., Park, S. J., Murakami, M., Kitamura, Y., Iwakura, Y., and Hirano, T.	The point mutation of tyrosine 759 of the IL-6 family cytokine receptor gp130 synergizes with HTLV-1 pX in promoting rheumatoid arthritis-like arthritis.	<i>Int. Immunol.</i>	16	455-465	2004
Asahi-Ozaki, Y., Yoshikawa, T., Iwakura, Y., Suzuki, Y., Tamura, S., Kurata, T., and Saita, T.	Secretory IgA antibodies provide cross-protection against infection with different strains of influenza B virus.	<i>J. Med. Virol.</i>	74	328-335	2004
Horai, R., Nakajima, A., Habiro, K., Kotani, M., Nakae, S., Matsuki, T., Nambu, A., Saijo, S., Kotaki, H., Sudo, K., Okahara, A., Tanioka, H., Ikuse, T., Ishii, N., Schwartzberg, P. L., Abe, R., and Iwakura, Y.	TNF α is crucial for the development of autoimmune arthritis in IL-1 receptor antagonist-deficient mice.	<i>J. Clin. Invest.</i>	14	1603-1611	2004
Ishigame, H., Nakajima, A., Saijo, S., Komiyama, Y., Mastuki, T., Nakae, S., Horai, R., Kakuta, S., and Iwakura, Y.	The role of TNF α and IL-17 in the development of excess IL-1 signaling-induced inflammatory diseases in IL-1 receptor antagonist-deficient mice.	<i>Cytokines as Potential Therapeutic Targets for Inflammatory Skin Diseases</i> (eds, R. Nunez, C. A. Dinarello, and K. Asadullah), <i>Ernst Schering Research Foundation Workshop</i>			2004, in press.

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kidokoro, M, Tashiro, M, and Shida H.:	Genetically stable and fully effective smallpox vaccine strain constructed from highly attenuated vaccinia LC16m8.	Proc. Natl. Acad. Sci	In press		2005
Sakurai, A, Yasuda, J, Tanaka, Y, Hatakeyama, M, and Shida H.	Regulation of human T-cell leukemia virus type-1 (HTLV-1) budding by ubiquitin ligase Nedd4.	Microbes and Infection	6	150-156	2004

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	Journal of Neuroimmunology	51	189-194	2004
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
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	Journal of Virology	78	:8654-8662	2004

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト（参考）

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	Journal of Virology	78	11352-11359	2004
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	European Journal of Neuroscience	20	2499-2508	2004
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	Journal of Virology	79	2087-2096	2005