

19. Polazzi E, Levi G, Minghetti L. Human immunodeficiency virus type 1 Tat oxide synthase expression and nitric oxide production in microglial cultures. J Neuropathol Exp Neurol 1999;58:825-831.

protein stimulates inducible nitric

G. 研究発表

学会発表

AIDS にみられる感染症の病理. 2005年6月18日第16回日本臨床寄生虫学会(東京) 船田信顕

表1 各群における iNOS 免疫染色強度

染色強度	0	1+	2+	3+
対照 8 例	2	4	2(AD1 例)	
HIV 非脳症 7 例 (AIDS4 例)		2(1)	3(2)	2(1)
HIV 脳症 6 例			1	5

AD : Alzheimer 型痴呆

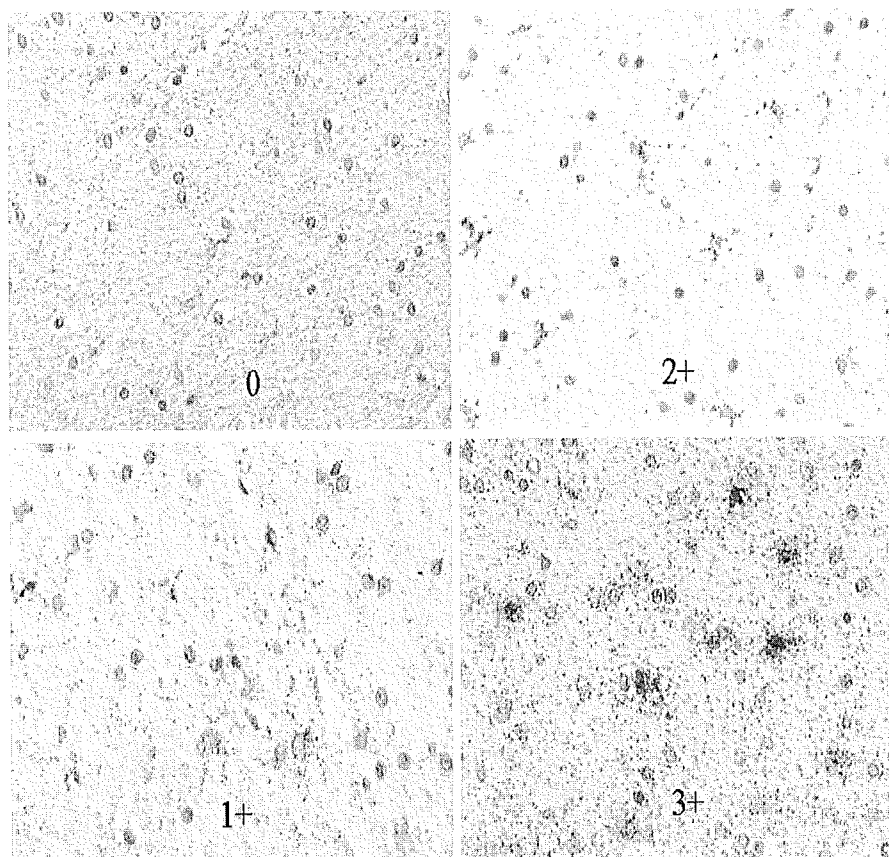


図1 前頭葉白質における iNOS 免疫染色強度

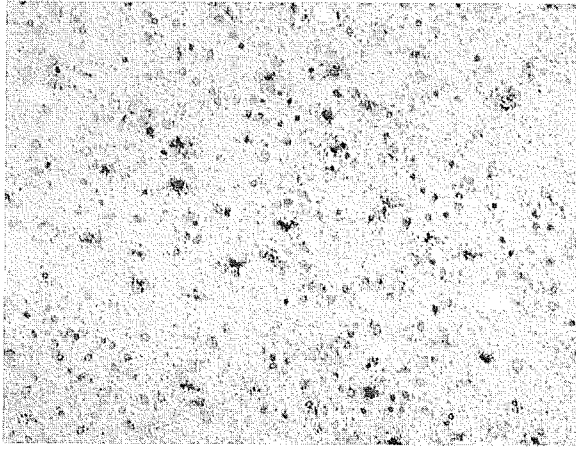


図2 脳症例の前頭葉白質iNOS陽性細胞

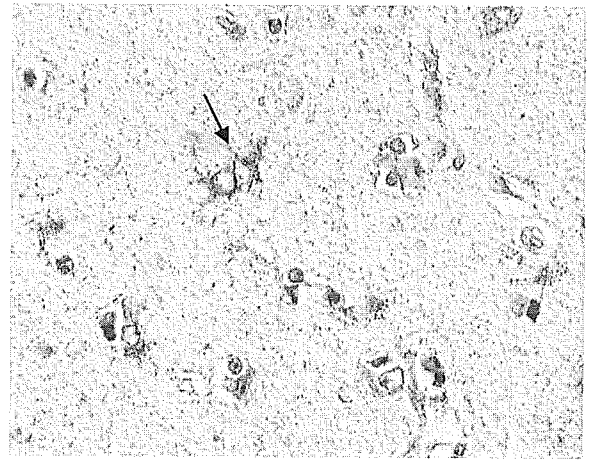


図3 脳症例の前頭葉皮質iNOS陽性細胞 (矢印)

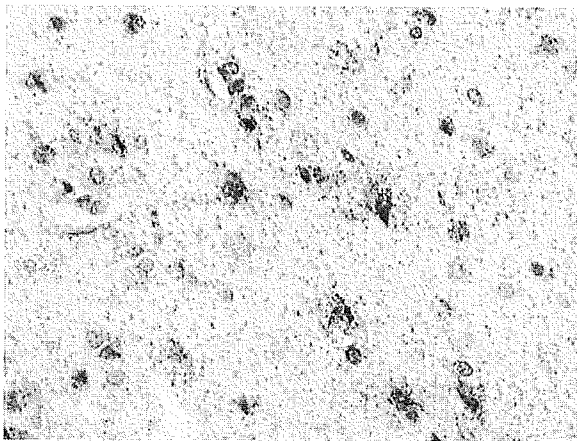


図4 脳症例の前頭葉白質iNOS陽性細胞
主にastrocyteに陽性

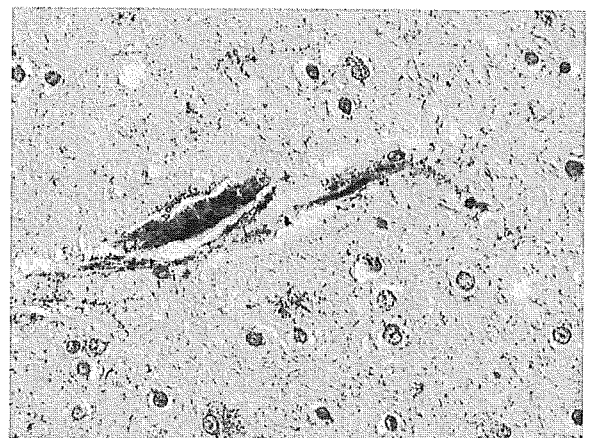


図5 脳症例の前頭葉白質iNOS陽性細胞
血管周囲の単核や多核macrophageに陽性

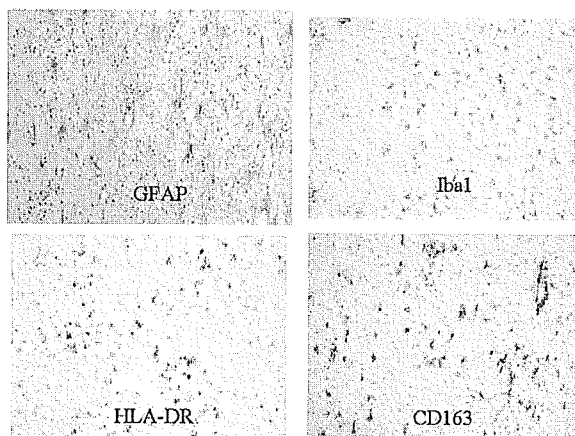


図6 脳症例の前頭葉白質におけるastrocyte
およびmicroglia/macrophageの増生

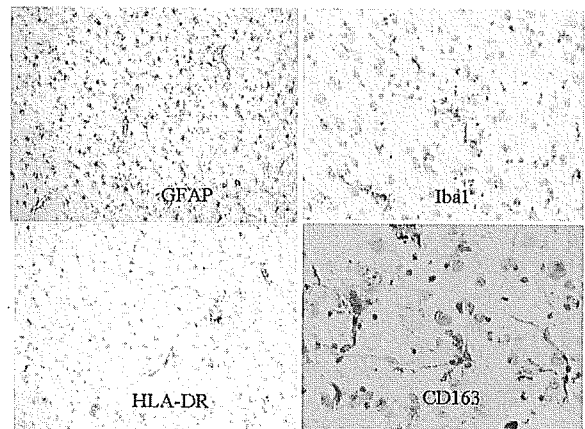


図7 脳症例の前頭葉皮質におけるastrocyte
およびmicroglia/macrophageの増生

厚生科学研究補助金 (エイズ対策研究事業)
分担研究報告書

- (1) エイズ脳症のバイオマーカーについて
(2) Indoleamine-2,3-dioxygenase(IDO)の炎症性サイトカインによる酵素誘導とエイズ脳症

研究分担者	清島 満	岐阜大学大学院医学研究科教授
研究協力者	斉藤 邦明	岐阜大学大学院医学研究科助教授
研究協力者	藤垣 英嗣	岐阜大学大学院医学研究科
研究協力者	岸田 修二	都立駒込病院神経内科部長

研究要旨：

(1) エイズ脳症を発症した患者で HAART ほかの治療前後での髄液中キノリン酸を測定した結果、脳症発症患者では髄液中キノリン酸濃度の著明な増加が見られた。さらに HAART 他の治療経過とともに患者髄液中キノリン酸濃度は治療前に比較して著明に減少した。したがって、エイズ患者の髄液キノリン酸濃度の測定は、診療上有用である事が判明した。

(2) マウス脳症モデルである LP-BM5 ウイルス感染マウスでは、IDO 活性および脳内キノリン酸濃度は著明に増加したが、IDO の主な誘導因子であるインターフェロンガンマの上昇はほとんど見られなかった。そこで、インターフェロンガンマ非依存性 IDO 誘導を検討するため、TNF- α などの炎症性サイトカインとの関係について THP-1 細胞を用いて検討した。その結果、TNF- α 、IL-6、IL-1 β は THP-1 細胞において相乗的に IDO を誘導しており、NF- κ B や p38MAPK との関係が明らかとなった。

A. 研究目的

- (1) エイズ脳症のバイオマーカーについて：キノリン酸測定

キノリン酸は神経の NMDA レセプターのアゴニストとして作用することが知られており、エイズ痴呆コンプレックスの1つの原因物質としても知られている。また、髄液キノリン酸濃度は、エイズ痴呆のレベルと良く相関し、種々脳神経疾患で有用である。したがって、髄液ならび

に血液中のキノリン酸定量の診断および治療効果判定のマーカーとしての有用性は極めて高い。今回の研究では、エイズ脳症を発症した患者で HAART ほかの治療前後での髄液中キノリン酸を測定解析した。

- (2)

Indoleamine-2,3-dioxygenase(IDO)の炎症性サイトカインによる酵素誘導とエイズ脳症
TNF- α などの種々サイトカインによ

って誘導され、エイズ脳症発症の重要な原因物質の1つと考えられているキノリン酸について、生成の律速酵素である indoleamine-2,3-dioxygenase(IDO) とエイズ脳症について検討した。エイズの脳症マウスモデルとして確立した LPBM5 ウイルス感染モデルを用いて、脳内 IDO 活性の経時的変動とウイルス感染によって発症するマウス記憶障害との関係について明らかにする。さらに、IDO はこれまで主にインターフェロンガンマによって STAT1 α 、IRF-1 などの転写因子を介して酵素誘導されることが明らかになっている。しかし、IDO 誘導において、分担研究者らはインターフェロンガンマ非依存性の誘導メカニズムの存在を明らかとしている。そこで、本研究では、インターフェロンガンマ以外の炎症性サイトカインによる IDO の酵素誘導メカニズムについて検討した。

B. 研究方法

(1) エイズ脳症のバイオマーカーについて (キノリン酸定量)：リコンビナント酵素を用いた蛍光標識による HPLC 検出法により定量した。キノリン酸は Quinolinic acid phosphoribosyl-transferase (QPRT) と phosphoribosylpyrophosphate (PRPP) によって nicotinic acid mononucleotide(NAMN)に合成される。さらに、その NAMN を基質として nicotinic acid mononucleotide adenytransferase(NMAT) により desamido-nicotinamide adenine dinucleotide (d-NAD)に合成される。

この際、NMAT によるアデニル化の過程で蛍光ラベルした ATP を使用することにより、蛍光ラベル d-NAD が生成される。両方の酵素反応において副産物として pyrophosphate が生成されるが、これは inorganic pyrophosphatase(IPP)を添加することにより完全に分解されるため、反応中の NAMN や蛍光ラベルされた NAD は十分な生成が得られる。

すなわちこの反応において蛍光 NAD の量は基質である濃度を反映していた。この蛍光標識された NAD を HPLC で測定することにより、キノリン酸濃度を算出する。使用したリコンビナント QPRT (rQPRT) および NMAT (rNMAT) は QIAGEN 社の QIAexpress タンパク精製 System により精製した。

(2)

Indoleamine-2,3-dioxygenase(IDO)の炎症性サイトカインによる酵素誘導とエイズ脳症

：エイズ脳症マウスを用いた病体解析

マウスに LP-BM5 ウイルスを感染させ、感染後脳内 IDO 活性の経時的変動について検討した。酵素活性は常法に従い、HPLC にて IDO 代謝産物であるキヌレニン(KYN)を測定して酵素活性を算出した。

インターフェロンガンマ非依存性の炎症性サイトカインによる IDO の酵素誘導メカニズムの解明

ヒト末梢血単球細胞(PBMC)ならびに THP-1 (human acute monocyte

leukemia cell line)細胞株を用いて、インターフェロンガンマ非依存性のIDO誘導の検討には、1 µg/mlのLPSで24時間処理した各細胞を用いた。各種サイトカインによるIDO誘導の検討にはそれぞれ100 U/mlのリコンビナントインターフェロンガンマ、TNF-α、IL-6、IL-1βで24時間処理した細胞を用いた。IDO酵素活性の測定は、IDOはトリプトファン(TRP)を代謝してKYNを生成させるため、培養上清中のKYNをHPLC法で測定しIDO酵素活性の指標とした。核内転写因子(STAT-1α、IRF-1)の検討はゲルシフトアッセイにより行った。NF-κB inhibitor (SN50)、p38MAPK inhibitor (SB202190)を用いた実験では、それぞれ40 µM、12 µMの濃度で細胞を処理した。

C. 研究結果

(1) エイズ脳症のバイオマーカーについて (キノリン酸定量) :

分担研究者らは、高感度簡易定量法を用いてHIV患者の髄液中キノリン酸濃度が著明に増加していることを報告している。今年度は、エイズ脳症を発症した患者でHAARTほかの治療前後での髄液中キノリン酸を測定した結果は図1に示すとおり、治療経過とともに患者髄液中キノリン酸濃度が減少することを明らかにした。

(2)

Indoleamine-2,3-dioxygenase(IDO)の炎症性サイトカインによる酵素誘導

とエイズ脳症

: エイズ脳症マウスを用いた病体解析

マウスがLP-BM5感染することにより、脳内のIDO活性は経時的に上昇し、行動薬理的に異常を呈する感染後10週ではコントロールに比べ約4倍の酵素活性の上昇が見られた(図2)。

(2) インターフェロンガンマ非依存性の炎症性サイトカインによるIDOの酵素誘導メカニズムの解明

IDOはインターフェロンガンマによって酵素誘導されるが、分担研究者らはインターフェロンガンマ以外の炎症性サイトカイン(TNF-α、IL-6、IL-1β)によりIDOが誘導されるかどうか検討した(図3)。肺の細胞株であるMRC9、神経系の細胞株であるH4では全てのサイトカイン、あるいはそれらの組み合わせでもKYNの生成は増加していなかった。モノサイト系であるTHP-1細胞ではTNF-α、IL-6、IL-1β単独ではKYNの増加はあまり見られないが、これらのサイトカインを同時に加えることでKYNの生成が増加しており、TNF-α、IL-6、IL-1βはTHP-1細胞において相乗的にIDOを誘導していることが明らかとなった。

さらに、THP-1細胞では、LPS刺激によりTNF-α、IL-6、IL-1βなどのサイトカインが放出され、IDOの酵素誘導も見られる。分担研究者らは、IDOの誘導が従来知られているSTAT1αとIRF-1転写因子が関与しているかどうかをLPSによってIDO誘導させたTHP-1細胞を用いて検討した。その結果、図4に示す通り、インター

フェロンガンマで刺激した際には STAT1 α 、IRF-1 とともに抗体によってスーパーシフトしたバンドが検出され STAT1 α と IRF-1 の活性化が確認できた。一方、LPS で刺激した際には、STAT1 α 、IRF-1 とともにバンドが検出されず、LPS による IDO 誘導には STAT1 α と IRF-1 は関与しておらず、インターフェロンガンマによる転写活性化経路とは別の経路を介していることが明らかとなった。

THP-1 細胞を LPS 刺激することにより NF- κ B や p38MAPK 経路が活性化することが知られている。そこで、LPS による IDO の誘導にこれらの転写活性化経路が関与しているかどうかを検討した(図 5)。NF- κ B inhibitor (SN50), p38MAPK inhibitor (SB202190)は共に THP-1 細胞における LPS による KYN 生成を抑制しており、LPS による IDO 誘導は NF- κ B と p38MAPK 経路の活性化を介していることが明らかとなった。また、インターフェロンガンマによる IDO 誘導は NF- κ B inhibitor と p38MAPK inhibitor では抑制されておらず、NF- κ B と p38MAPK の活性化を介した IDO 誘導は LPS に特異的であることが示唆された。

D. 考察

(1) HIV 脳症患者の HART 療法前後の髄液キノリン酸濃度を測定した結果、治療によって脳症が軽快したケースの全例において、脳症に伴って上昇の見られた髄液キノリン酸濃度は、治療後に減少していた。したがって、髄液キノリン酸濃度の測定は、エイズ脳症のバイオマーカーとして極めて有用であると思われる。

(2) IDO の酵素活性はマウス脳症モデルで、有意の増加が見られた。近年、IDO 誘導によるトリプトファン代謝の促進が、免疫抑制作用(免疫寛容)と密接に関与していることが明らかとなっている。この免疫抑制作用は、モノサイト系の細胞であるマクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞中で IDO が誘導されトリプトファンが代謝されると、微小環境でのトリプトファン濃度が減少し、これらの抗原提示細胞から抗原提示を受けるリンパ球の増殖が抑制されることにより起こると考えられている。分担研究者らは、モノサイト系の細胞株である THP-1 細胞を用いた実験から、インターフェロンガンマ非依存性の TNF- α 、IL-6、IL-1 β などの炎症性サイトカインによる IDO の誘導機構を見いだした。さらに、インターフェロンガンマによる IDO の酵素誘導に不可欠な STAT1 α と IRF-1 は LPS/HIV による IDO 誘導には関与しておらず、p38MAPK 経路と NF- κ B の活性化を介していることを明らかにした。IDO 誘導による免疫抑制作用は HIV 感染のみならず自己免疫疾患(クローン病、多発性硬化症など)などでも見出されており、これらの疾患などでは前述の炎症性サイトカインが産生されていることが容易に示唆される。すなわち、分担研究者が明らかにしたインターフェロンガンマ以外の炎症性サイトカインによる IDO 誘導がこれらの疾患時における免疫調節に関与していることが示唆される。さらに、モノサイト系の細胞におけるトリプトファン代謝の亢進がこれらの疾患で重要な役割をしていることから、免疫調節における IDO 誘導によるトリプトファン

代謝の亢進はインターフェロンガンマ依存性および非依存性のメカニズムが複雑に関与していることが示唆された。

E. 結論

エイズ脳症を発症した患者で HAART ほかの治療前後での髄液中キノリン酸を測定した結果より、エイズ患者のキノリン酸測定は、診療上有用である事が判明した。今後、開発された簡易高感度キノリン酸定量を用いた大規模での研究が望まれる。また、今回の研究結果よりキノリン酸の生成にインターフェロンガンマ非依存性の TNF- α などの炎症性サイトカインによる IDO 誘導が深く関係しており、NF- κ B や p38MAPK の重要性が明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

[原著]

Fujigaki H, Saito K, Fujigaki S, Takemura M, Sudo K, Ishiguro H, Seishima M. The signal transducer and activator of transcription 1 α and interferon regulatory factor 1 are not essential for induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by lipopolysaccharide: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor κ B pathways, and synergistic effect of several proinflammatory cytokines. *J Biochem.* (In Press)

Fujigaki H, Saito K, Lin F, Fujigaki S, Takahashi k, Martin BM, Chen CY,

Masuda J, Kowalak J, Takikawa O, Seishima M, Markey SP. Nitration and inactivation of indoleamine 2,3-dioxygenase by peroxynitrite. *J. Immunol.* 176: 372-379 (2006)

Zhu Y, Saito K, Murakami Y, Asano M, Iwakura Y, Seishima M. Early increase in mRNA levels of pro-inflammatory cytokines and their interaction in the mouse hippocampus after transient global ischemia. *Neurosci Lett.* 393(2-3):122-126 (2006)

Murakami Y, Saito K, Hara A, Zhu Y, Sudo K, Niwa M, Fujii H, Wada H, Ishiguro H, Mori H, Seishima M. Increases in TNF- α following transient global cerebral ischemia do not contribute to neuron death in mouse hippocampus. *J. Neurochem.* 93(6):1616-1622 (2005)

Sudo K, Ymada Y, Moriwaki H, Saito K, Seishima M. Lack of tumor necrosis factor receptor type 1 inhibits liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in mice. *Cytokine*, 29: 236-244, (2005)

Miyoshi M, Nadai M, Nitta A, Ueyama J, Shimizu A, Takagi K, Nabeshima T, Takagi K, Saito K, Hasegawa T. Role of tumor necrosis factor-alpha in down-regulation of hepatic cytochrome P450 and P-glycoprotein by endotoxin.

Eur J Pharmacol. 507:229-37, 2005

(TNBS)-Induced Colitis in Mice.

Dig Dis Sci. 2005 Sep;50(9):1669-76.

(2005)

Nakai M, Sudo K, Yamada Y, Kojima Y, Kato T, Saito K, Moriwaki H, Seishima M. The Role of the Tumor Necrosis Factor Receptor in 2,4,6-Trinitrobenzene Sulfonic Acid

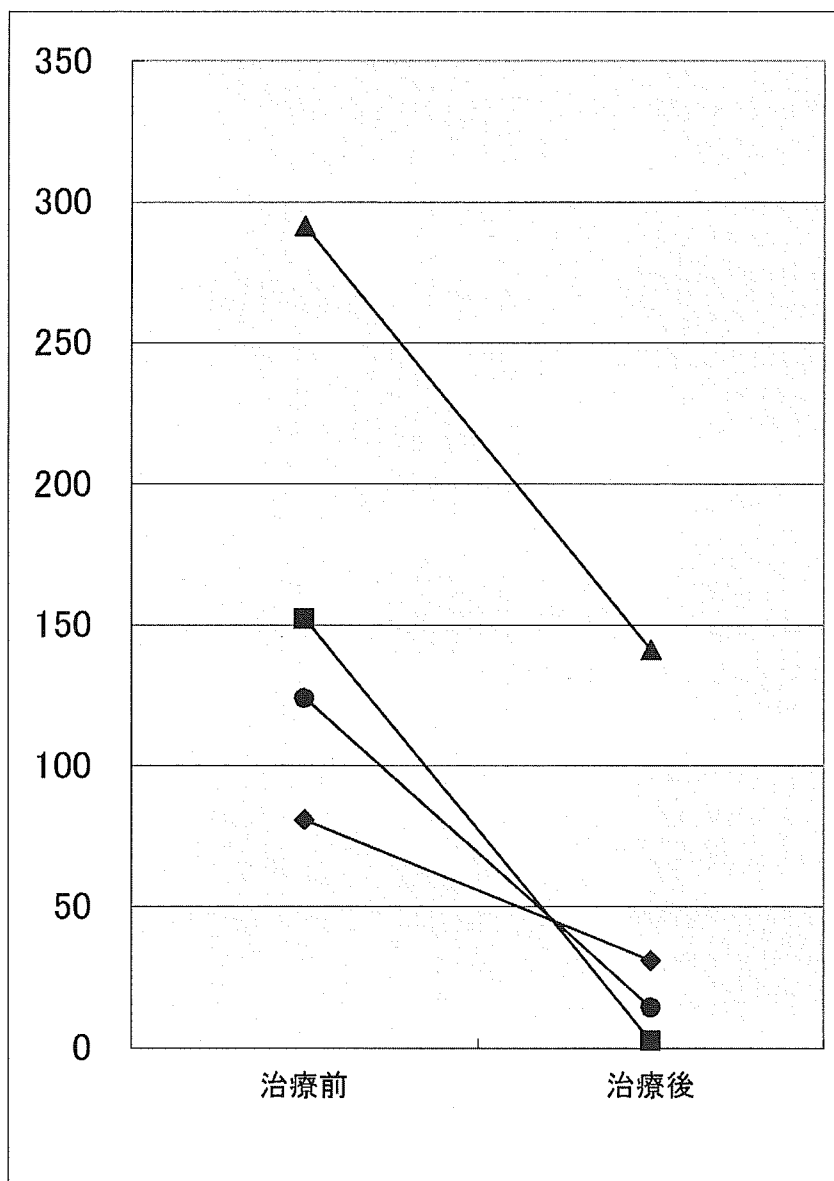


図 1. HART 療法により脳症が軽快した HIV 患者髄液中キノリン酸濃度の変動

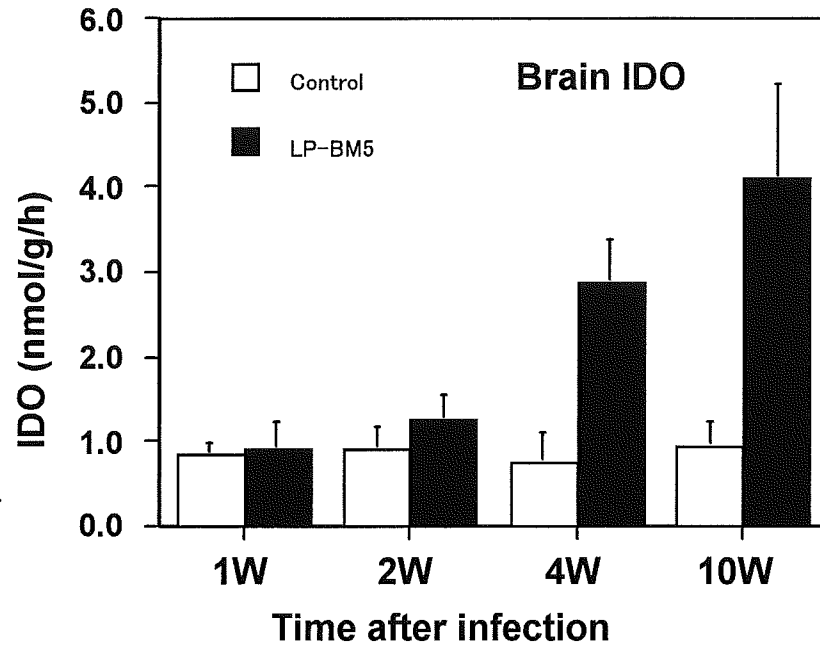


図 2. マウスエイズ脳症モデルにおける脳内 IDO 活性の経時的変化

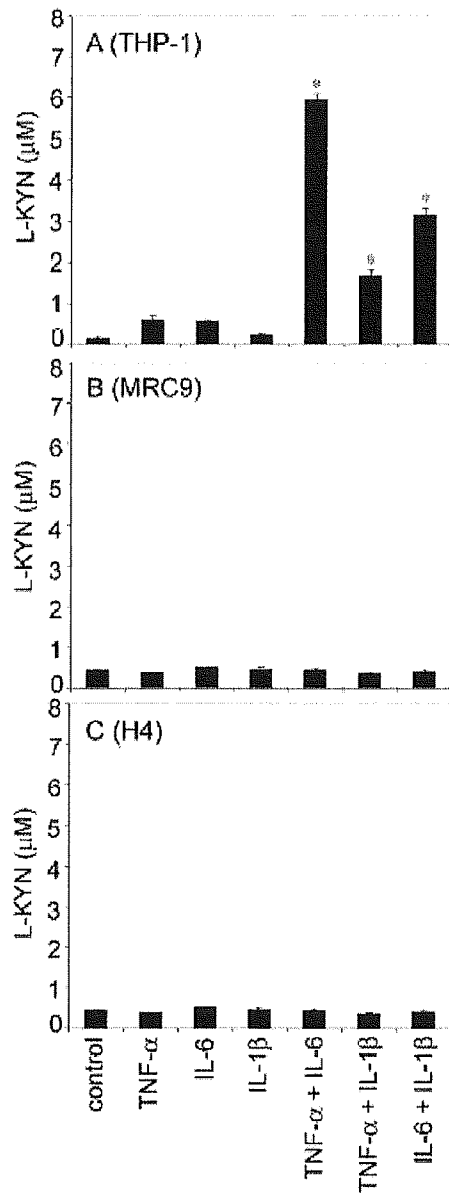


図3. 各種炎症性サイトカインによるIDO誘導

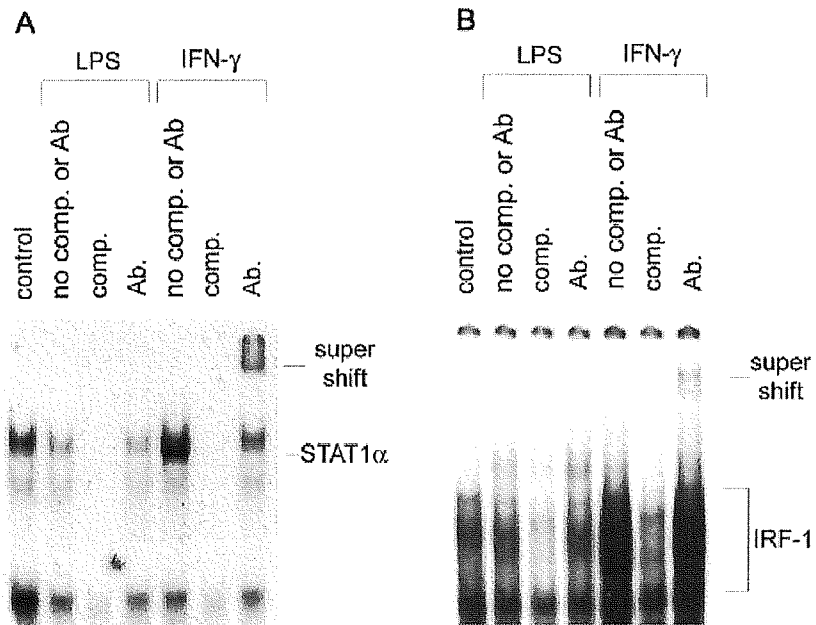


図4. LPSによるIDO誘導におけるSTAT1 α とIRF-1の関与

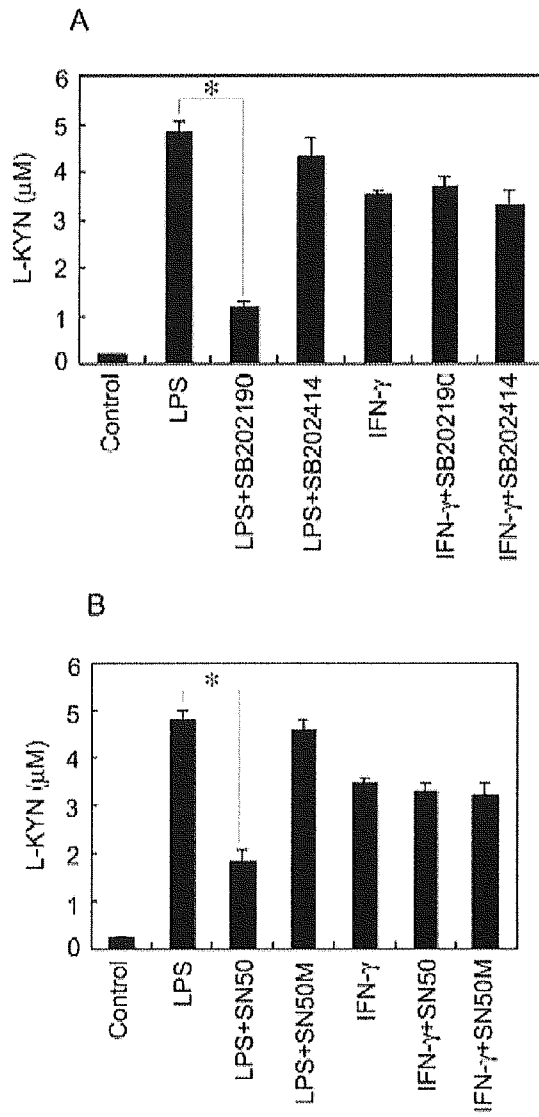


図5. LPSによるIDO誘導におけるNF- κ B inhibitorと p38MAPK inhibitorの影響

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

分担研究報告書

HIV 感染に伴う中枢神経障害：14-3-3 蛋白質の機能と神経細胞障害の考察

分担研究者 木戸 博 徳島大学分子酵素学研究センター

研究協力者 矢野仁康、Mohammad Wadud Bhuiya、中牟田 信一

研究要旨：HIV 脳症は、脳内に侵入したウイルス感染マクロファージ等の炎症性細胞から遊離されるウイルス蛋白やサイトカインによって引き起こされる神経細胞死がその主な原因と考えられる。これまでに我々は、細胞内の足場蛋白 14-3-3 が 1) HIV 脳症の進行に伴い神経細胞が破壊されると脳脊髄液中に漏出して来る事 2) HIV-1 gp120 による CXCR4 を介した細胞死誘導プロセスにおいて、14-3-3 蛋白質は、Bad の gp120 による脱リン酸化を防ぐ事でそのミトコンドリア移行を制御し、gp120 による細胞死に抑制的に働いている事等から、神経細胞死における 14-3-3 蛋白質の重要性について報告してきた。今年度は、HIV 脳症発症において神経細胞死と並んで重要とされる、HIV-1 の血液脳関門(Blood-Brain Barrier: BBB)を介した脳内進入過程での 14-3-3 蛋白質の役割に着目して解析を行った。このため先ず gp120 による BBB の破綻を想定し、ヒト脳血管内皮細胞を用いそのタイトジャンクション構築における 14-3-3 蛋白質の役割を解析した。その結果、gp120 は細胞極性因子 Par-PKC 複合体から 14-3-3 蛋白質の遊離を促進する事で ZO-1 等タイトジャンクション構成分子のプロテアソームによる分解消失を促進し、これにより、細胞接着構造にひずみをきたし BBB の破綻に繋がる事が予想された。これらの結果は、14-3-3 蛋白質が gp120 依存的な神経細胞死において、より包括的にその制御を担っている事を示唆すると共に、HIV 脳症発症の機所解明の新たな手掛りを与えるものになると考えられた。

A. 研究目的

我々はこれまでに、14-3-3 蛋白質が AIDS Dementia Complex (ADC) 患者の脳脊髄液中にアイソマー特異的に検出されてくることから、ADC 患者における脳内病変の進行状況を的確に把握できるマーカーとして提唱してきた。この際、14-3-3 蛋白質は、中枢神経障害の初期において障害部位周辺の神経細胞で特にその発現増強が認められる

が、神経細胞の破壊の進行と共に細胞外に遊離され、最終的に髄液中に漏出されてくると推定し、神経細胞障害の過程に係る重要なファクターと考えてきた。実際、*in vitro* モデルを用いた解析により CXCR4 を介した gp120 による細胞死誘導プロセスで、14-3-3 蛋白質がその重要な制御因子として働いている事を報告してきた。一方、HIV 感染による中枢神経障害では、ウイルス自身かウイルスに感染した monocyte や

macrophage 等の炎症細胞が、BBB を介して脳内に侵入する事がその発症に不可欠と考えられている。BBB は主に脳血管内皮細胞と神経膠細胞から構成されているが、最近、HIV-1 の gp120 や Tat が、直接この TJ を障害し BBB の破綻を引き起こしている可能性が示された。一方、14-3-3 蛋白質は上皮細胞において、TJ 蛋白質の安定化を担う極性因子複合体の重要な制御分子であることが知られている。そこで今回、ヒト脳血管内皮細胞を用いて gp120 による TJ 障害における 14-3-3 蛋白質の役割について検討を行った。

B. 研究方法

1) 実験材料

HBMEC (ヒト脳微小血管内皮細胞) は Applied Cell Biology Research、gp120(IIIB, MN) と gp160 は Immuno Diagnostics 社から購入。14-3-3 蛋白質抗体は、我々と免疫生物学研究所が共同開発したものをを用いた。ZO-1, ZO-2, Occludin, Claudin1 抗体は Zymed から購入した。PAR-3 抗体は Up-state より購入した。Lactacystin は sigma より購入した。

2) Cell culture

HBMEC は CS-C complete medium (Applied Cell Biology Research) で 37°C で培養。gp120 (10 nM) を追加後 24 時間培養を行った。

3) siRNA の作製

siRNA は SilencerTM siRNA Construction Kit を用いて in vitro transcription 法にて合成。各々の特異的 siRNA design (センス鎖) を

の中でも血管内皮細胞間で形成されるタイトジャンクション(TJ)は、BBB のバリアー機能に極めて重要である。最

示す。14-3-3 τ :

5'-AAGTTGCAGCTGATTAAGGAC-3'

14-3-3 ζ :

5'-AACATTGGATAATTCAGCTCC-3' 各々の 3' 端に T7 promoter 相補配列

(CCTGTCTC) を付加したオリゴヌクレオチド template を作製して siRNA 合成を行った。

4) RNAi の調整

Human RNAi は、各々の siRNA (20nM) を HiPer Fect を用いてトランスフェクションを行い 72 時間処理を行った。

5) 細胞検体の調整

Whole cell lysate は各々の細胞を RIPA buffer で溶解して調整、lysate は SDS-PAGE を行い western-blotting にて解析した。

6) 免疫沈降法

免疫沈降は standard method に準じた。各々の cell extracts に protein G sepharose を加え非特異的結合を除いた後、上清に、protein G に続いて抗 Par3 抗体を加え共沈 (4°C、90 min) 、洗浄後各々の抗体を用いて Western-blotting を行った。

7) 免疫蛍光染色

HBMEC に 10 nM の gp120 を加え 24 時間培養後、2%パラホルムアルデヒドで 37 度 15 分固定後、0.5% Triton-X100 で細胞を処理、10%子牛血清で固定。14-3-3、ZO-1, に対する特異抗体で共染色を行った。

C. 研究結果

HIV-1 gp120 による脳血管内皮細胞のタイトジャンクション構築障害における 14-3-3 蛋白質の役割

1) gp120 は、HBMEC の TJ 蛋白質の発現を抑制している。

先ず、HIV-1 gp120 が HBMEC の TJ 構成蛋白質にどの様に影響を与えているか検討した。図 1 はウエスタンブロッティングによって各々の蛋白質の発現を検討したものであるが、gp120 は TJ 蛋白質の中で Zonula Occludent 1(ZO-1)の発現を抑制していた。図 2 はこれらの結果を免疫蛍光染色で確認したものである。gp120 で HBMEC を処理すると、著しい ZO-1 の発現低下が認められ、内皮接着構造の発達が阻害され、スポット状の染色パターンとなった。

2) gp120 は、14-3-3 蛋白質と TJP 安定化分子 PAR-3 との結合を阻害する。

TJP 安定化分子複合体と 14-3-3 蛋白質との結合を見るため、PAR3 の特異抗体で免疫沈降後各々の 14-3-3 に対する特異抗体でウエスタンブロッティングを行った。図 3 に示すごとく、HBMEC では PAR-3 と 14-3-3 τ 及び ζ の結合が認められた。この結合は gp120 で明らかに減弱した。

3) 14-3-3 蛋白質は、gp120 による TJ 蛋白質の発現低下を抑制している。

RNAi 法を用いて、14-3-3 τ もしくは、 ζ の発現量を抑制後、gp120 で処理を行い各々

の TJP 発現に与える影響をウエスタンブロッティングを用いて検討した。図 4 に示すごとく 14-3-3 τ 、 ζ RNAi 細胞で ZO-1, ZO-2, occludin の gp120 による発現低下が著しく増強した。

4) 14-3-3 蛋白質は、gp120 による TJ 蛋白質のプロテアソームによる分解を抑制している。

RNAi 法を用いて、14-3-3 τ もしくは、 ζ の発現量を抑制後、10nM gp120 と 100 μ M lactacytin で 24 時間処理を行い各々の TJP 発現に与える影響をウエスタンブロッティングを用いて検討した。図 5 に示すごとく、14-3-3 τ 、 ζ RNAi 細胞での ZO-1, ZO-2, occludin の gp120 による発現低下が抑制された。

D. 考察

今回の我々の解析から、神経細胞死と並んで HIV 脳症発症機序に重要と考えられている感染細胞を含むウイルスの脳内進入過程にも 14-3-3 蛋白質が関与していることが判明した。14-3-3 蛋白質は、gp120 による TJ 構成蛋白質のプロテアソームによる分解を抑制し、結果的に BBB の破綻に防御的に機能していると推定された。この機能も神経細胞死の場合と同様に、14-3-3 蛋白質の明確なアイソフォーム特異性(τ/ζ)が認められた。これは、生体内で様々な生物学的機能を有する 14-3-3 蛋白質の多様性を反映していると考えられた。今後、TJ 構成蛋白質が gp120 によって、実際にどのように膜から細胞質にリクルートされ分解されていくのかその詳細なメカニズム解析と、in

vivo 実験での検証が必要と考えられる。

E. 結論

今回得られた gp120 による血液脳関門崩壊における 14-3-3 蛋白質の役割を図 6 に示す。通常 TJ 構成蛋白質は PAR-PKC 極性因子複合体によってその発現が制御されている。最近の報告から 14-3-3 蛋白質はこの PAR-PKC 因子複合体の安定化因子として機能していることが明らかとなった。gp120 は、脳血管内皮細胞の細胞間接着構造を障害するが、これは gp120 によって TJ 構成蛋白質がプロテアソームによって分解される事がその主なメカニズムと考えられた。このプロセスで、gp120 は PAR-PKC 複合体から 14-3-3 蛋白質を遊離させる事でその安定化を抑え TJ 構成蛋白質のプロテアソームでの分解を誘導する事が考えられた。これらの結果は、14-3-3 蛋白質が gp120 による TJ の破綻に抑制的に働く分子である事を示している。

F. 健康危険情報

本研究によって得られた成果の中で、健康危険情報に該当する事項は特に含まれていない。

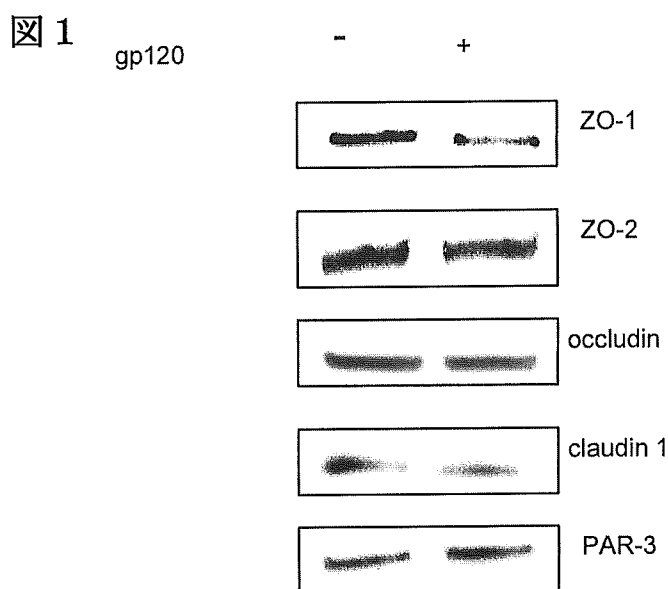
G. 研究発表

1. 論文発表

1. Shiga Y, Wakabayashi H, Miyazawa K, Kido H and Itoyama Y. 14-3-3 Protein levels and isoform patterns in the cerebrospinal fluid of Creutzfeldt-Jakob disease patients in the progressive and terminal stages. *J. Clin. Neurosci.* In press (2006)
2. Yao D, Kuwajima M, Chen Y, Shiota M, Okumura Y, Yamada H and Kido H. Impaired long-chain fatty acid metabolism in mitochondria causes brain vascular invasion by a non-neurotropic epidemic influenza A virus in the newborn/suckling period: implications for influenza-associated encephalopathy. *Mol. Cell Biochem.* In press (2006)
3. Chen Y, Mizuguchi D, Yao D, Ide M, Kuroda Y, Shigematsu Y, Yamaguchi S, Yamaguchi M, Kinoshita M and Kido H. Thermolabile phenotype of carnitine palmitoyltransferase II variations as a predisposing factor for influenza-associated encephalopathy. *FEBS Lett.* 579, 2040-2044 (2005)

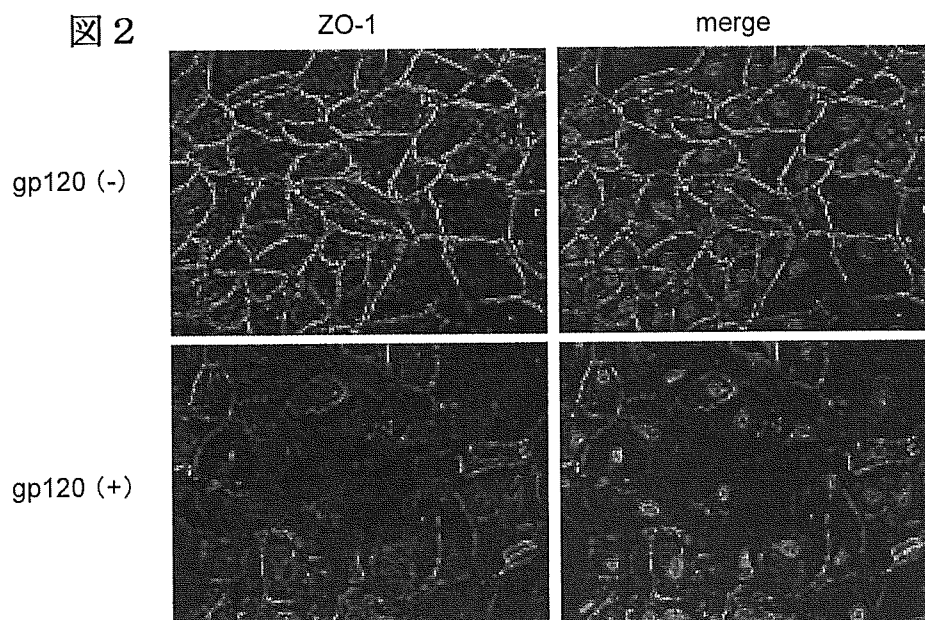
H. 知的財産権の出願 登録状況

今年度、本研究に関するものでは、出願および取得特許は無い。



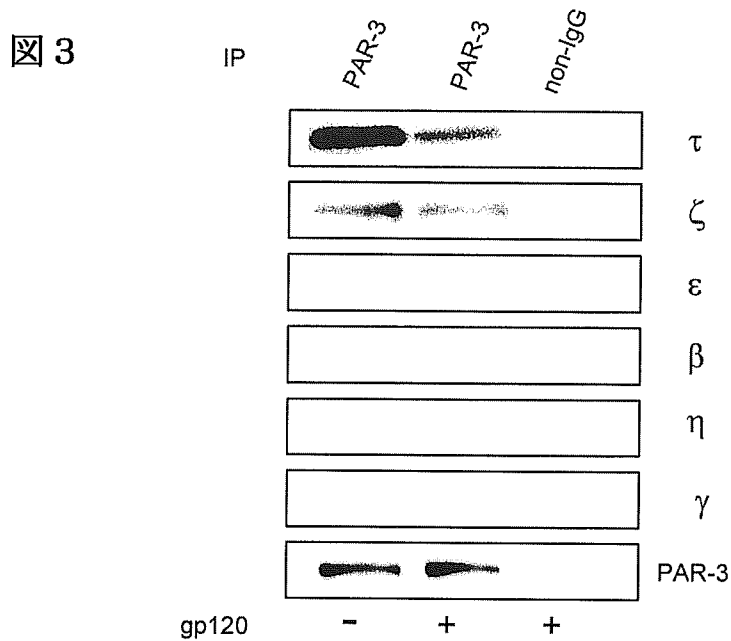
HIV-1 gp120 は、HBMEC の TJ 蛋白質の発現を抑制する

HBMEC を 10 nM gp120 で 24 時間処理後、lysate を SDS-PAGE にかき、
各々の TJP に対する特異抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。

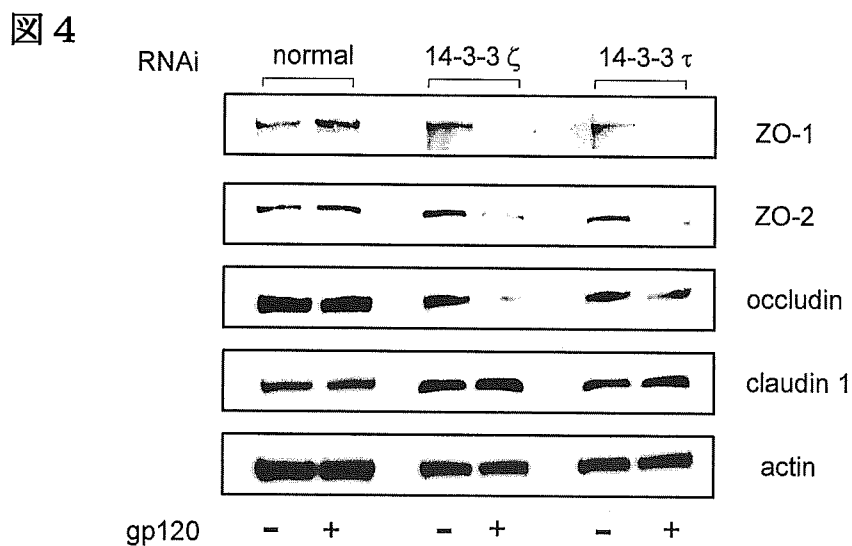


HIV-1 gp120 は、HBMEC の ZO-1 の発現を抑制し細胞間接着構造を障害する

HBMEC を 10 nM gp120 で 24 時間処理後、ZO-1 認識抗体を用いて免疫蛍光染色
を行った。核は Hoechst33342 で染色した。

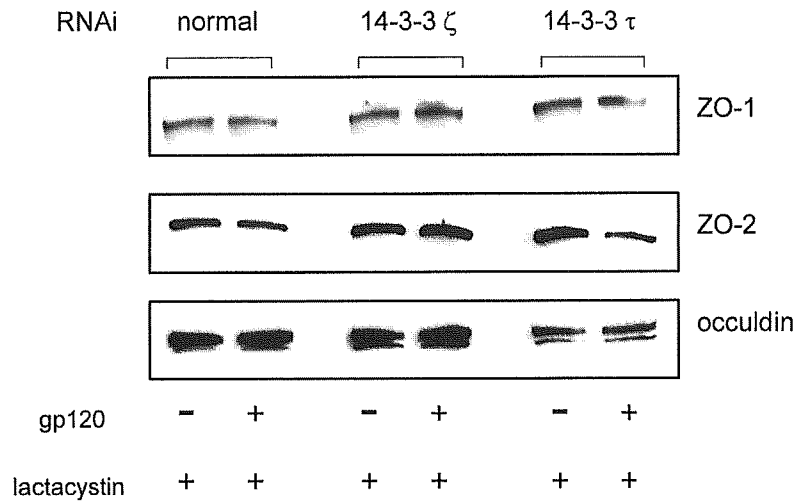


細胞極性因子 PAR-3 は 14-3-3 τ 及び ζ と結合しており、gp120 はこの結合を阻害する
 HBMEC を 10nM gp120 で 24 時間処理後、PAR-3 に対する特異抗体で免疫沈降を行った。終了後各々の 14-3-3 及び PAR-3 に対する特異抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。



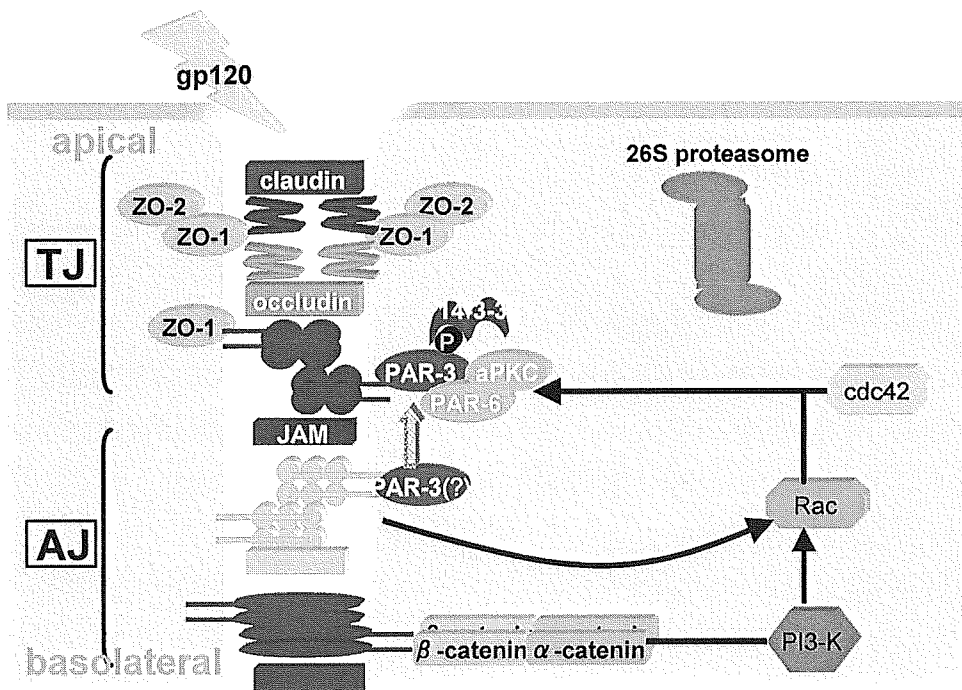
14-3-3 は、gp120 による TJ 蛋白質の発現低下を抑制する
 HBMEC に 14-3-3τ もしくは、ζ に対する特異的 siRNA をトランスフェクション後、72 時間培養した。gp120 を加え 24 時間後、lysate を SDS-PAGE にかき、各々の TJP に対する特異抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。

図 5



14-3-3 は、gp120 による TJ 蛋白質のプロテアソームによる分解を抑制する HBMEC に 14-3-3 τ もしくは、 ζ に対する特異的 siRNA をトランスフェクション後、72 時間培養した。gp120 と lactacystin (10 μ M) を加え 24 時間後、lysate を SDS-PAGE にかき、各々の TJP に対する特異抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。

図 6



gp120 による血液脳関門崩壊における 14-3-3 蛋白質の役割

SIV のマクロファージ指向性と宿主における感染

分担研究者： 森 一泰 国立感染症研究所 エイズ研究センター

研究協力者： 杉本智恵 国立感染症研究所 エイズ研究センター

研究要旨：エイズウイルスの細胞指向性がエイズ発症、脳症や脳炎の発症などの感染後の病態に与える意義を検討することを目的に細胞指向性の異なる SIV（T 細胞指向性の SIV239、強マクロファージ指向性の MERT、弱マクロファージ指向性のΔ5G）のサルでの初期感染における各リンパ系組織での感染細胞の分布、リンパ球サブセットの動態を解析した。3種のウイルスは *in vitro* の細胞指向性は違うにもかかわらず、リンパ系組織における初期感染の標的組織は腸管であり、感染細胞は T 細胞であることが明らかになった。SIV239 感染サルでは様々なリンパ系組織での感染が持続し感染細胞数が多く、CD4+CCR5+細胞の減少も顕著であったが、MERT と Δ5G 感染サルでは感染細胞数が SIV239 感染より少なく、組織における CD4+CCR5+細胞も維持されていた。これらの結果は初期感染の制御と関連していると考えられた。

A. 研究目的

サル/SIV 感染モデルはヒトにおける HIV の感染病態と多くの共通点があるので、エイズの予防法や治療法を開発する上での評価系として、またエイズ病態を解明する動物モデル系として有用である。

SIV239 はサルにエイズを発症させる分子クローンである。SIV239 は培養細胞系では T 細胞でよく増殖するが、マクロファージでほとんど増殖しない。しかし、SIVmac239 感染後エイズを発症したサルでは高頻度に脳炎や巨細胞性肺炎のようなマクロファージ感染と関連する傷害が認められた。この

ような感染マクロファージから分離された SIV は培養細胞系でもマクロファージで非常に良く増殖することが明らかになり、ウイルスの分子生物学的解析の結果、マクロファージでの増殖性の獲得には、*env* のアミノ酸変異が重要であることが明らかになった。

これまでに山田らが報告しているように、マクロファージ指向性と最も強く関連する 4 つのアミノ酸変異を *env* に持つ MERT 感染後エイズを発症したサルでは大脳白質において炎症性病態が見られ、SIV 感染マクログリア/マクロファージが存在することが明らかになった。また SIVmac239 感染後