

エイズを発症したサルでは大脳皮質の変性病態が認められているが、SIV 感染細胞は存在しない。

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、T 細胞指向性ウイルスが感染後、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、細胞指向性がその後の病態に与える意義について検討をする。

今年度は昨年に引き続きアカゲザルでの初期感染実験を行い、3 種の細胞指向性のことなる SIV について各 2 頭ずつ計 6 頭の初期感染実験を追加した。そして、さらに詳細な感染細胞の局在の解析ならびに初期感染で急激な減少が起こることが報告されている CD4+CCR5+ T 細胞の動態の解析を行った。

## B. 研究方法

### 1. 実験に用いたウイルス (図 1)

SIV239: 病原性 SIV 分子クローン, アカゲザル感染でエイズを発症。T 細胞指向性ウイルス。

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。マクロファージ指向性ウイルス。

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。部分的ではあるがマクロファージ指向性を獲得。

### 2. アカゲザルへの感染実験

アカゲザルにそれぞれ SIV239、MERT、Δ5G を 200TCID<sub>50</sub> 静脈内接種した。感染後、7-14 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。非感染のアカゲザル 2 頭についても同様に各臓器の採取、リンパ球分離を行った。

### 3. 血漿中ウイルス RNA 量の測定

感染ザル血漿から RNA を抽出した。gag 領域にプライマーとプローブを設定し、定量 RT-PCR によって、血漿中 SIV RNA 量を測定した。

### 4. 免疫組織学的解析

各ウイルス感染ザルから得た組織の免疫組織染色により、SIV 感染細胞の検出 (抗 gag 抗体、抗 Nef 抗体)、細胞の同定 (抗 CD3 抗体、抗 CD4 抗体、抗 CD68 抗体)、アポトーシスの検出 (抗 ssDNA 抗体、抗活性化カスパーゼ-3 抗体)、細胞傷害性細胞の検出 (抗グランザイム-B 抗体) を行った。

### 5. プロウイルス DNA 量の測定

感染ザル組織から分離したリンパ球から細胞 DNA を抽出した。env 領域にプライマーを設定し、限界希釈した DNA の nested-PCR によりプロウイルス DNA 量を測定した。

## 6. 血漿中ウイルス RNA 量の測定

感染ザル血漿から RNA を抽出した。gag 領域にプライマーとプローブを設定し、定量 RT-PCR によって、血漿中 SIV RNA 量を測定した。

## 7. リンパ球の FACS 解析

SIV 感染標的組織における CD4+/CCR5+/CD95+ T 細胞サブセットの動態をフローサイトメトリーによって解析した。

## C. 研究結果

### 1. それぞれの SIV 感染における初期感染血漿中 SIV RNA 量

3 種の細胞指向性が異なるウイルス SIV239 (T 細胞指向性), MERT (高マクロファージ指向性), Δ5G (低マクロファージ指向性) をそれぞれ 3~4 頭のアカゲザルに静脈内接種し、7~15 日目に安楽殺を行った。安楽殺時とウイルス感染後経時的に採取した血液から血漿を分離し、血漿中のウイルス RNA 量を定量 RT-PCR によって測定した。図 2 に示すように、MERT 感染は他のウイルス感染より若干低い傾向にあったが、ウイルス増殖の kinetics はいずれのウイルス感染においてもほぼ同等であった。また安楽殺時の血漿ウイルス RNA 量はすべてのサルにおいて  $10^6$  コピー/ml 以上であった。

### 2. 免疫組織染色による感染細胞の局在と同定

抗 SIV Gag ウサギポリクローナル抗体を用いた免疫蛍光染色により、感染ザルの表層リンパ節、腸間膜リンパ節、空腸、回腸、

結腸における感染細胞の局在を調べた (表 1)。

SIV239 感染では感染後 7 日目に腸間膜リンパ節、腸管組織に感染細胞が認められ、感染後 9 日目には調べたいずれの組織でも非常に多くの感染細胞が認められた。そして感染後 12 日目においてもその高い感染率は維持されていた。それに対して、MERT 感染では感染後 9 日目にわずかな感染細胞がリンパ節において認められ、感染後 14 日目に腸管で多くの感染細胞が認められた。Δ5G 感染では感染後 9 日目に腸管と腸間膜リンパ節の T 細胞に著明な感染が認められたが、12 日目には感染細胞は著しく減少した。また解析を行ったいずれの時点でも、表層リンパ節における感染細胞はほとんどなかった。

これらの感染細胞は T 細胞であるか、またはマクロファージであるかの同定を行うため、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) との免疫蛍光二重染色を行った。その結果、いずれのウイルス感染でも主要な感染細胞は T 細胞であることが明らかになった。しかし、SIV239 感染ザルだけは感染後 12~14 日目の腸間膜リンパ節あるいは結腸においてマクロファージが感染していることが示された。

### 3. nested-PCR による各組織の CD4 T 細胞中のプロウイルス DNA 量

上述の免疫組織染色による感染細胞の局在の結果を確認するため、各組織から得られたリンパ球中のプロウイルス DNA 量を nested PCR によって測定し (図 3)。

腸管粘膜下リンパ球ではすべてのウイルス感染ザルにおいて CD4+ T 細胞 100 万個あたり  $10^3$ – $10^4$  コピーのウイルス DNA が検出された。しかし末梢血リンパ球、リンパ節、脾臓では SIV239 感染では  $10^3$ – $10^5$  コピーと最も高かったのに対し、MERT では感染後 9 日目では  $10^2$  コピーと少なかったが 14 日目には  $10^3$  コピー以上に上昇した。Δ5G 感染ではこれらの組織では  $10^2$ – $10^3$  コピー程度に抑えられていた。

#### 4. CD4+CCR5+ T 細胞の動態

最近、エイズウイルス感染では感染の非常に早い時期に消化管粘膜組織の CD4+CCR5+ (メモリー) T 細胞が急激に減少することがサルエイズ発症モデルを用いた研究で明らかになった。(Mattapalli JJ et al. Nature. 2005、LI. Q et al. Nature. 2005.) これらの研究で用いられたウイルスは SIV239 と同様の強病原性 SIV であったので、MERT 感染や Δ5G 感染でも同様なことが起こっているのかを明らかにするため、リンパ球における CD4+CCR5+CD95+サブセットの FACS 解析を行った (図 4)。

SIV239 感染では回腸、腸間膜リンパ節脾臓において顕著な CD4+CCR5+CD95+T 細胞の減少が認められたが、MERT および Δ5G 感染では大きな現象は見られず、MERT 感染ザルでは非感染ザルより CD4+CCR5+CD95+T 細胞が高い組織もあった。

#### 5. 腸管上皮におけるアポトーシス誘導

SIV239 感染初期における CD4 T 細胞の減少の原因はウイルス増殖による直接的作用以外にあるのかを調べるため、腸管組織におけるアポトーシス誘導と細胞傷害性細胞

の浸潤を調べた。

アポトーシス誘導の検出には抗 ssDNA 抗体と抗活性化カスパーゼ-3 抗体による免疫染色により行った。その結果、ssDNA 染色ではいずれのウイルス感染腸管組織においても染色性に大きな違いはなかった。しかし、抗活性化カスパーゼ-3 抗体染色において、SIV239 感染組織では上皮細胞に多数の陽性細胞が認められた (図 5)。

細胞傷害性細胞の浸潤は抗グランザイム-B 抗体染色で検出した。グランザイム-B 陽性細胞が最も多く見られたのが MERT 感染で、次いで Δ5G 感染、SIV239 感染は非感染コントロールと大差なかった。

#### 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。SIV239 は T 細胞指向性ウイルス、MERT はマクロファージ指向性ウイルス、Δ5G は MERT ほど強くはないが、マクロファージ指向性を示す。本研究の目的のひとつは、このような細胞指向性の異なる 3 種のウイルスをアカゲザルに感染させ、サル体内での細胞指向性を調べることである。最近相次いで報告されているように、エイズウイルスの最初の標的組織は腸管であることが本研究からも示唆された。そして細胞指向性と宿主での感染細胞については、in vitro での細胞指向性とは関係なく、すべてのウイルスは T 細胞に感染していたという結果になった。しかし、感染後の CD4+CCR5+ T 細胞の減少の

程度や細胞傷害はSIV239感染が他のウイルス感染と比較して高かったことから、細胞指向性の違いは、標的細胞となるT細胞の活性化やCCR5発現の異なる細胞への感染性に影響した可能性が考えられる。

今回用いた3種のウイルスはアカゲザル初期感染について見ると、いずれのウイルス感染も同じように高いウイルス増殖を示す。しかし、その後感染が低く制御されるのがMERTと $\Delta 5G$ であり、SIV239は高い状態が維持される。MERTは一旦制御されたのち、ウイルス増殖が再上昇する。このようなウイルス感染病態を反映するように、感染後14日目までに採取した各組織の感染細胞の局在を見ると、SIV239は様々なリンパ系組織において多くの感染細胞を認めるにもかかわらず、MERTと $\Delta 5G$ は感染細胞がSIV239より少なかった。MERT感染と $\Delta 5G$ 感染では感染細胞数が少ないことと関連して、CD4+CCR5+細胞の減少も抑えられ、アポトーシス誘導細胞も少なく、グランザイム-B陽性細胞が多かった。これらの結果はMERTと $\Delta 5G$ は初期感染が制御されることを説明できるかもしれない。しかしMERT感染はウイルス増殖が再び上昇し、結局はエイズを発症する点が $\Delta 5G$ とは大きく異なる点である。MERTの細胞指向性は宿主応答により容易に変化する可能性が示唆される。このことから考えて、MERT感染の病原性と脳症発症のメカニズムを解析するには、ウイルス増殖が再上昇した時点での解析を行う必要があるかもしれない。

## E. 結論

MERTはマクロファージ指向性ウイルスで、MERT感染後エイズを発症したサルの大脳白

質ではSIV陽性マクログリア/マクロファージが存在するが、リンパ系組織における初期感染細胞はT細胞であった。MERT感染初期は弱毒株( $\Delta 5G$ )感染と同様に感染組織・細胞への傷害も少なかった。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Mori K, Sugimoto C, Ohgimoto S, Nakayama EE, Shioda T, Kusagawa S, Takebe Y, Kano M, Matano T, Yuasa T, Kitaguchi D, Miyazawa M, Takahashi Y, Yasunami M, Kimura A, Yamamoto N, Suzuki Y, Nagai Y. Influence of glycosylation on the efficacy of an Env-based vaccine against simian immunodeficiency virus SIVmac239 in a macaque AIDS model. *J Virol.* Aug;79(16):10386-96, 2005

### 2. 学会発表

1. C. Sugimoto, S. Izumo, Y. Suzuki, Y. Nagai, and K. Mori. Influence of deglycosylated SIVmac239 on primary infection in lymphatic tissues.. 23<sup>rd</sup> annual symposium on nonhuman primate models for AIDS, September, 2005, Portland, USA.

2. K. Mori, C. Sugimoto, E. Nakayama, T. Shioda, F. Villinger, A.A. Ansari and N. Yamamoto. Development of Sendai virus vector system for eliciting epitope specific CD4 T cells. 23<sup>rd</sup> annual

symposium on nonhuman primate models for  
AIDS, September, 2005, Portland, USA.

3. 糖鎖欠損サル免疫不全ウイルスの細胞指向性と初期感染細胞の解析：低病原性との関連について 杉本智恵、鈴木康夫、山本直樹、永井美之、森 一泰、日本ウイルス学会、2005年、横浜

4. 糖鎖欠損 SIV の弱毒化のメカニズムの解析 杉本智恵、中山英美、塩田達雄、山本直樹、永井美之、森 一泰、日本エイズ学会、2005年、熊本

5. ウイルス特異的 CD4+T 細胞免疫誘導のための Sendai virus vector を用いた CD4+T 細胞エピトープ発現系の開発 森 一泰、杉本智恵、中山英美、塩田達雄、保富康宏、山本直樹、永井美之、日本エイズ学会、2005年、熊本

#### 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

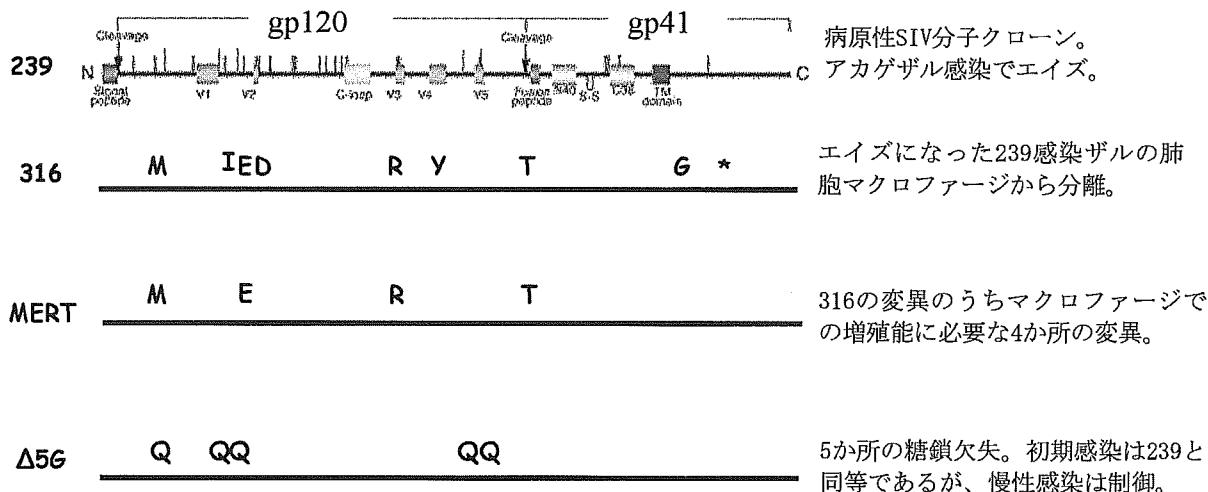


図1. 本研究で使用した SIV

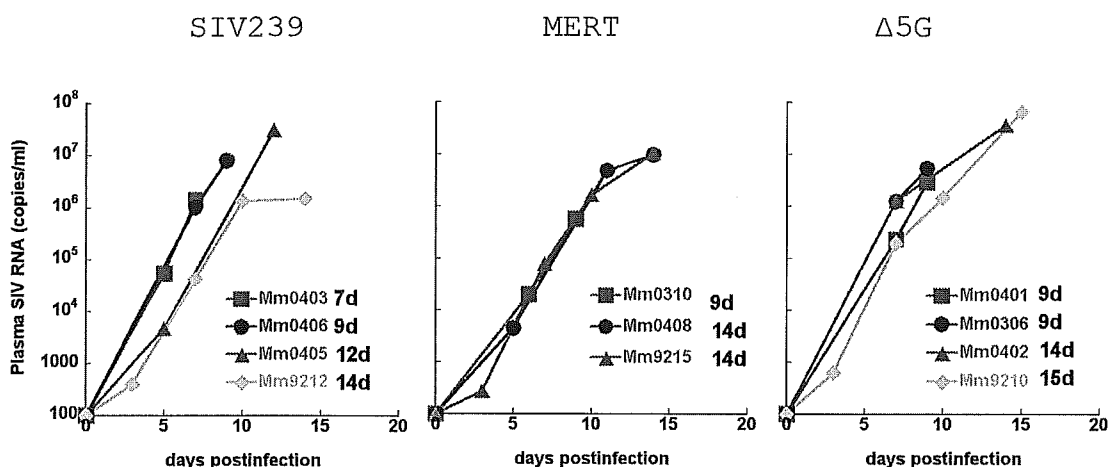


図2. 血漿中 SIV RNA 量

表1. 各ウイルス感染における感染細胞の局在

viruses	Animal no.	Days p. i	Inguinal LN	Mesenteric LN	Jejunum	Ileum	Colon
SIV239	Mm0403	7	±	++	±	++	++
	Mm0406	9	++	++++	++++	++++	+++++
	Mm0405	12	+++	++++	++++	±	+++++
MERT	Mm0310	9	+	+	±	±	±
	Mm0408	14	±	+	+++	±	±
Δ5G	Mm0401	9	+	+	+	++++	+
	Mm0306	9	+	+++	+++	++++	±
	Mm0402	14	±	±	±	±	+++

1-mm<sup>2</sup>あたりのSIV Gag陽性細胞数。±; <5, +; 5-10, ++; 11-50, +++; 51-100, ++++; 101-200, +++++; 201<

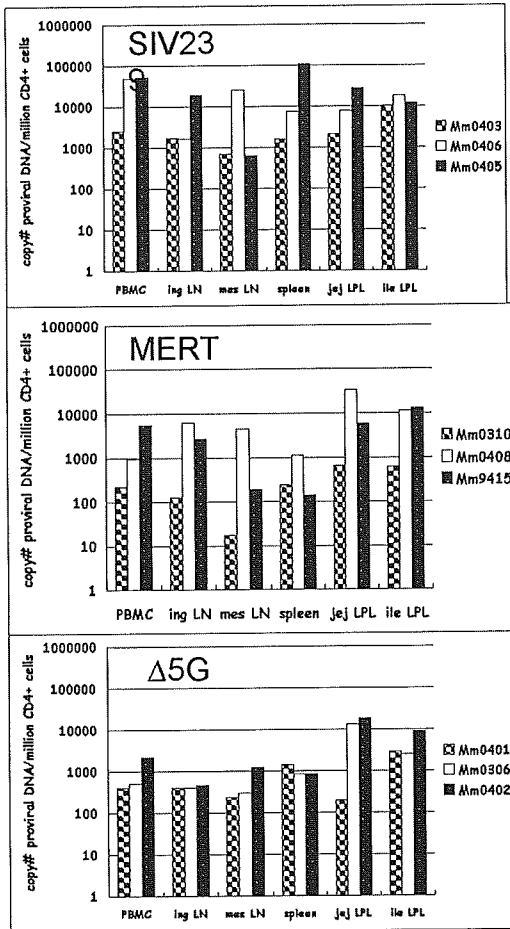


図 3. 各組織リンパ球におけるプロウイルス DNA 量

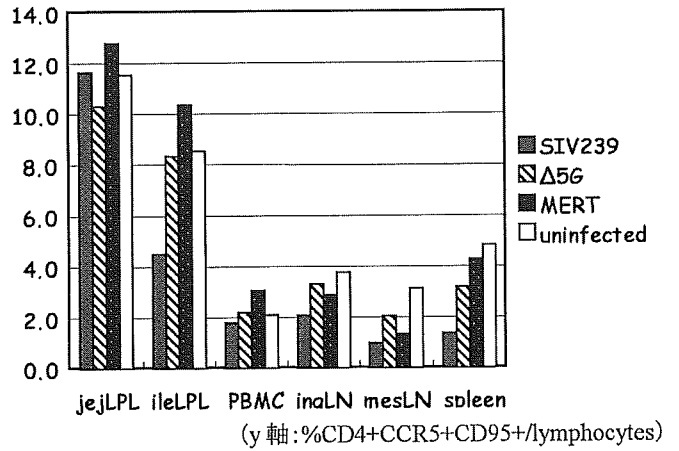


図 4. 各ウイルス感染における CD4+CCR5+T 細胞の割合

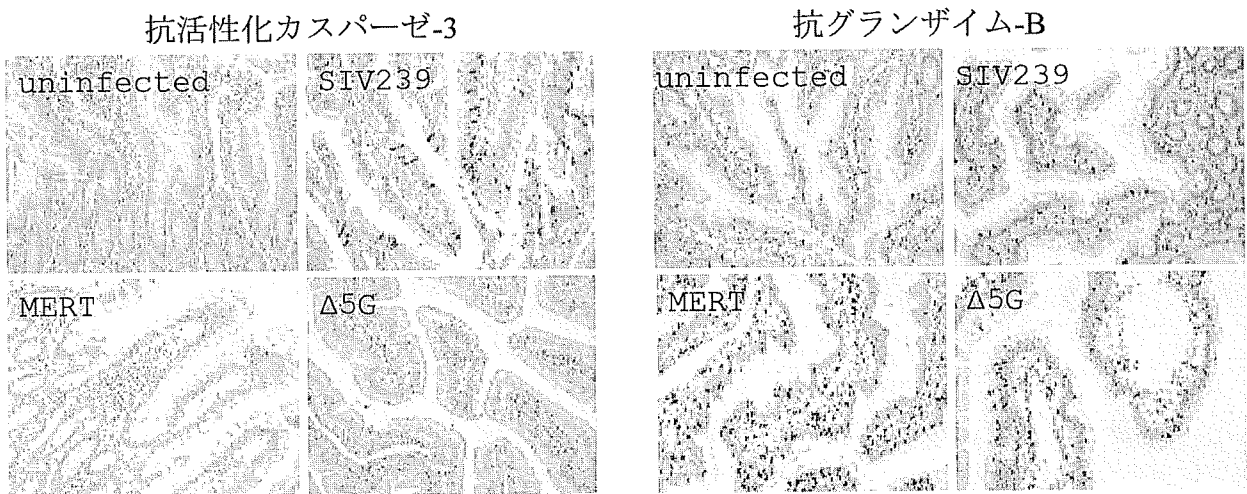


図 5. 腸管組織におけるアポトーシスと細胞傷害性細胞の検出

マイクロアレイを用いたヒトアストロサイト遺伝子発現の解析  
—マクロファージ培養上清が与える影響について—

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：昨年度の本研究において、活性化マクロファージの培養上清がアストロサイトの増殖に影響を与えることを明らかにした。そこで、本年度はその作用をさらに詳細に検討する目的で、DNA マイクロアレイを用いてアストロサイトの遺伝子発現について包括的な検討を行った。HIV-1 非感染および感染マクロファージの培養上清を含む培養液を、培養ヒトアストロサイトに添加し、一定時間インキュベーションした後、アストロサイトより total RNA 抽出した。上清を含まない培養液のみでインキュベーションしたアストロサイトから得られた RNA をコントロールとし、DNA マイクロアレイ法により既知の約 2 万遺伝子について、発現の増強および減少について解析した。解析が可能であった約 1 万 7 千遺伝子のうち、非感染および感染マクロファージ上清により発現量が 1.5 倍以上に上昇したものは、それぞれ 10 および 3 遺伝子であった。一方、2/3 以下に減少したものは、それぞれ 6 および 5 遺伝子であった。どちらの場合においても、5 倍以上発現が増強した遺伝子がそれぞれ 2 つずつ認められ、それらはいずれも angioprotein-like 4 (ANGLRT4) 遺伝子であった。ANGLPT4 は細胞のアポトーシス抑制に働くことが知られており、エイズ脳症におけるアストログリオーシスへの関連性が示唆された。

#### A. 研究目的

エイズ脳症は、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、患者の脳内における多核巨細胞を伴う多発性、散在性の亜急性脳炎（HIV 脳炎）や、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）が特徴である。エイズ脳症は、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、エイズ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。

一方、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と考えられている。エイズ脳症において、アストロサイトの増殖（アストログリオーシス）が特徴的な病理像の一つであることから、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ことは間違いない。しかし、それらの詳細については不明である。

昨年度の本研究において、われわれは 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、エイズ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。その結果、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を明らかにした。さらにそのメカニズムについて検討したところ、(1) HIV-1 感染および非感

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、stromal cell-derived factor-1 $\alpha$  (SDF-1 $\alpha$ ) 産生、matrix metalloproteinase (MMP), tissue inhibitor of MMP (TIMP), CXCR4 発現の有意な増加を引き起こすこと、

(2) 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 $\alpha$  中和抗体および MMP 阻害剤により抑制されることを明らかにし、このことから 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 $\alpha$ , 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思われた。

そこで、本年度の研究においては、マクロファージのアストロサイト増殖に与える影響をさらに詳細に検討する目的で、DNA マイクロアレイを用いてアストロサイトの遺伝子発現について包括的な検討を行った。

## B. 研究方法

### 1) HIV-1 感染および非感染マクロファージ

健常人の末梢単核球 (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。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 抗原を ELISA 法 (ZeptoMetrix 社)

で測定した結果, 平均 48 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。アストロサイトは専用培地 (Cambrex 社) を用いて培養したものを, 以下の実験に用いた。

## 3) マクロファージ培養上清の添加

新鮮なアストロサイト専用培地に 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, 37°C にてアストロサイトを培養した。また, 対照としてマクロファージ培養上清を加えていない培養液で, アストロサイトを同様に培養した。培養 6 および 24 時間後にアストロサイトをリン酸緩衝液 (PBS) で洗浄し, すぐに細胞から RNA を抽出した (図 1)。

## 4) RNA の検出

アストロサイトからの total RNA 抽出は市販の RNA 抽出カラム (RNeasy Mini Kit, Quiagen) を用いた。抽出した RNA はマイクロアレイ実験を行うまで, ただちに -80°C にて保存した。

## 5) DNA マイクロアレイ

アストロサイトにおける遺伝子発現の検討は, Agilent 社の in situ オリゴ DNA マイクロアレイキットを用い, 2 色アレイ法にて行った。また, この実験に先立ち, 抽出した total RNA サンプルの品質のチェックを Agilent 2100 バイオアナライザーで解析し, RNA

の分解がないことを確かめた。

抽出した各々の RNA サンプルを RNase-free 水に溶解し, 濃度を 100 ng/ml に調製した。200 ng の RNA から cDNA をキットの手順に従って合成し, 次に cyanine 3-CTP および cyanine 5-CTP にてラベルした。1 つのサンプル (対照を含む) は dye-swap を行うため, 全て上記 2 種類の色素を用いてラベルした。ラベル化されたサンプルは精製の後, Agilent 社の Human 1A オリゴマイクロアレイ (ヒト遺伝子数 17,086) を用いてハイブリダイゼーションを行った。このマイクロアレイは Incyte 社の Human Foundation 完全長 cDNA クローンセットをもとに, 保存性の高いエクソン領域から, 60 mer オリゴプローブを設計し, 実験により最適化されたものである。ハイブリダイゼーションは, Agilent 社のプロトコルに従い, 専用のチャンバーにて 60°C で 17 時間行った。ハイブリダイゼーション終了後は, マイクロアレイを洗浄, 乾燥後, Agilent 社のマイクロスキナーを用いて, マイクロアレイ上の蛍光スポットを読み取り, TIFF 形式イメージによる画像化を行った。

## 6) 結果の解析

画像化されたマイクロアレイのデータは Future Extraction ソフトウェア (Agilent 社) を用いて, イメージからスポットのシグナル強度やバックグラウンドのシグナル強度などを算出し, それをもとにして, バックグラウンドの引き算, 色素補正を行い, 最終的な 2 サンプル (当該サンプルと対照

サンプル)の発現比や統計処理を行った。スポット解析により数値化されたデータは、遺伝子解析ソフトウェア GeneSpring Version 7 (Silicon Genetics 社)を用いて、遺伝子発現について解析した。

#### (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たため、個人の特長は全く不可能であり、また個人の特長ができるようなドナーからのアストロサイトの提供は全く受けていない。

### C. 研究結果

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している (data not shown)。非感染マクロファージ培養上清および HIV-1 感染マクロファージ培養上清を作用させたときに起こる遺伝子発現の動きを図 2 に示す。ここでは、各種のフィルターを通し、実験上生じる各種のアーティファクトを既に除いてある。非感染および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のどちらも、遺伝子発現の動きはそれ

ほど顕著なものではなかった。しかしながら、何れの条件においても、6 時間および 24 時間を問わず、2 つの遺伝子の顕著な発現増強が認められた。この中で、非感染マクロファージ上清作用後 6 時間におけるアストロサイトの遺伝子発現を図 3 に拡大して示す。

次に主な遺伝子の発現について、6 時間と 24 時間後での時間的変動を検討した。図 4 には非感染 (左) および感染 (右) マクロファージ上清を作用させたときの主な遺伝子の動きと、その名称を示す。このグラフからも明らかのように、HIV-1 感染および非感染に関わらず、上清を作用させたアストロサイトにおいて、angiopoietin-like 4 protein (ANGLPT4) 遺伝子発現の明らかな上昇 (5-6 倍) が認められた。また、ANGLPT4 遺伝子以外には、baculoviral IAP (inhibitor of apoptosis) repeat-containing 3 (BIRC3) 遺伝子の有意な上昇 (1.7-1.9 倍) が認められた。また、これらの遺伝子発現は培養後 6 時間でも 24 時間でもそれほど大きな変動を示さなかった。種々の条件下でのアストロサイトに発現している ANGLPT4 および BIRC3 遺伝子の発現量を、それぞれ図 5 および図 6 に示す。

### D. 考察

ANGLPT4 は新規な fibrinogen/angiopoietin 関連物質の 1 つとして同定され、細胞中には同じタンパクをコードする 2 つの異なる転写産物が認められる。本研究においても 2 種類の mRNA (NM\_016109 と AF202636) の発現増強が同定されている。

ANGLRT4 は肝臓、脂肪組織、そして胎盤などに存在し、脂質代謝や飢餓に対する順応、そして脂肪組織の分化に関係していると言われている。また、細胞の apoptosis に対して抑制的に働くとともに、低酸素血症などに反応して、血管新生に対し促進的に働くことが分かっている。また、ANGLRT4 mRNA は腎細胞癌で非常に多く発現しており、それ以外の腎臓癌や健常組織では認められない。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ことや、エイズ脳症におけるアストログリオー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 ANGLRT4 が関与している可能性が示唆される。一方、BIRC3 遺伝子に関しても、ANGLRT4 遺伝子ほどではないにしろ、何れの条件においても発現の有意な上昇が認められた。

一方、BIRC3 は tumor necrosis associated factor (TRAF) と結合し、interleukin-1 $\beta$  converting enzyme (ICE) 類似のプロテアーゼ活性を阻害することにより、細胞の apoptosis を抑制すると考えられているタンパクである。BIRC3 は血清除去によって誘導される細胞の apoptosis を抑制するが、free radical の誘導薬によって引き起こされる apoptosis は阻害しないと報告されている。ラットにおいて IAP-1 および IAP-3 が transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) により down-regulation され、その結果、ミクログリアの

apoptosis が誘導されるとの報告があるが、ヒトの中樞神経系、特にアストロサイトに対する BIRC3 の影響について検討した報告はない。従って、今後はこれらの物質について、アストロサイトの増殖や機能に与える影響を検討し、エイズ脳症の病態との関連について解明を進める予定である。

## E. 結 論

DNA マイクロアレイによる解析の結果、非感染および 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では、ANGLPT4 および BIRC3 遺伝子の発現増強が認められた。これらの遺伝子産物は細胞死 (apoptosis) に対し、negative regulator として働くことが明らかにされており、本結果はエイズ脳症におけるアストログリオーシスの発生機序と関連する可能性がある。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表 (欧文のみ)

1. Baba M. Cellular factors as targets for anti-HIV-1 chemotherapy. In: Butera ST (Ed), *HIV Chemotherapy: A Critical Review*, pp.241-260. Horizon Scientific Press/Caister Academic Press, Norfolk, UK (2005).
2. Wang X, Baba M. A role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in the cellular resistance to

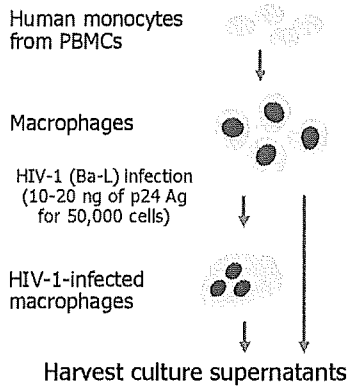
- HIV-1 nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Antiviral Chem. Chemother.* **16**: 213-216 (2005).
3. Tanaka H, Haraguchi K, Kumamoto H, Baba M, Cheng Y-C. 4'-Ethynylstavudine (4'-Ed4T) has potent anti-HIV-1 activity with reduced toxicity and shows a unique activity profile against drug-resistant mutants. *Antiviral Chem. Chemother.* **16**: 217-221 (2005).
  4. Nitanda T, Wang X, Kumamoto H, Haraguchi K, Tanaka H, Cheng Y-C, Baba M. Anti-human immunodeficiency virus type 1 activity and resistance profile of 2',3'-didehydro-3'-deoxy-4'-ethynylthymidine in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 3355-3360 (2005).
  5. Takashima K, Miyake H, Kanzaki N, Tagawa Y, Wang X, Sugihara Y, Iizawa Y, Baba M. Highly potent inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by TAK-220, an orally bioavailable small molecule CCR5 antagonist. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 3474-3482 (2005).
  6. Okamoto M, Wang X, Baba M. HIV-1-infected macrophages induce astrogliosis by SDF-1 $\alpha$  and matrix metalloproteinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **336**: 1214-1220 (2005).
  7. Baba M, Takashima K, Miyake H, Kanzaki N, Teshima K, Wang X, Shiraishi M, Iizawa Y. TAK-652 inhibits CCR5-mediated HIV-1 infection in vitro and has favorable pharmacokinetics in human. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 4584-4591 (2005).
  8. Baba M. Recent status of HIV-1 gene expression inhibitors. *Antiviral Res.* in press.
2. 学会発表 (招待講演・シンポジウムのみ)
    1. Baba M. Viral entry and transcription as targets for inhibition of HIV-1. *1st Japan-Germany HIV/AIDS Symposium*. November 2005, Nagoya, Japan.
    2. 馬場昌範. ウイルス感染症治療の歴史とその進歩—エイズ治療薬を中心に—. 第46回日本臨床ウイルス学会シンポジウム「ウイルス感染症の治療」, 2005年6月, 福岡市.
    3. 馬場昌範. 山田兼雄先生 Memorial Lecture, HIV 侵入阻害薬研究の過去と現在: グリチルリチンから CCR5 拮抗薬まで. 第8回白馬シ

ンポジウム「エイズ研究最前線」,  
2005年11月, 鹿児島.

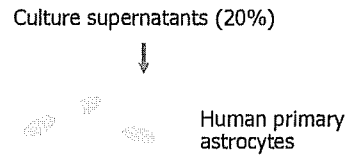
#### H. 知的財産権の出願・登録状況

今年度, 本研究に関するものでは,  
出願および取得特許はない。

1. HIV-1 感染および非感染  
ヒトマクロファージからの  
培養上清の採取



2. ヒトアストロサイト初代培養に  
対するマクロファージ培養上  
清の添加



3. アッセイ

- Extraction of total RNA from astrocytes after 6 and 24 h of supernatant treatment
- DNA microarray analysis

図1. 実験方法の概要. 新鮮なアストロサイト専用培地に 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, 37°C にてアストロサイトを培養した. また, 対照としてマクロファージ培養上清を加えていない培養液で, アストロサイトを同様に培養した. 培養 6 および 24 時間後にアストロサイトを PBS で洗浄し, 細胞から RNA を抽出した.

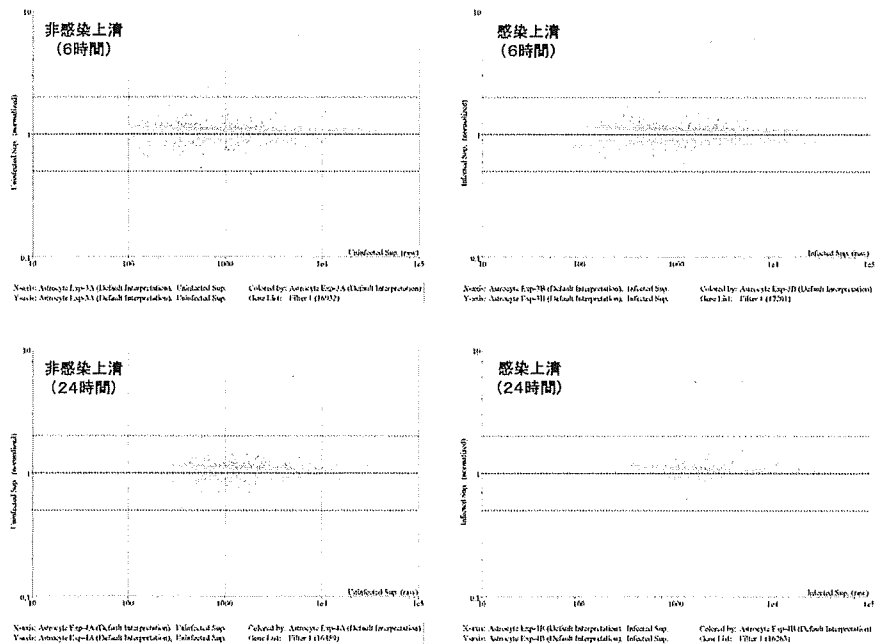


図2. 非感染マクロファージ培養上清および HIV-1 感染マクロファージ培養上清を作用させたときに起こる遺伝子発現の動き. 各グラフの横軸は対照アストロサイトにおける各遺伝子の発現強度を, 縦軸は上清を作用させたアストロサイトの遺伝子発現が, 対照遺伝子の発現強度と比較して, どの程度 (何倍) 増加あるいは減少しているかを示す.

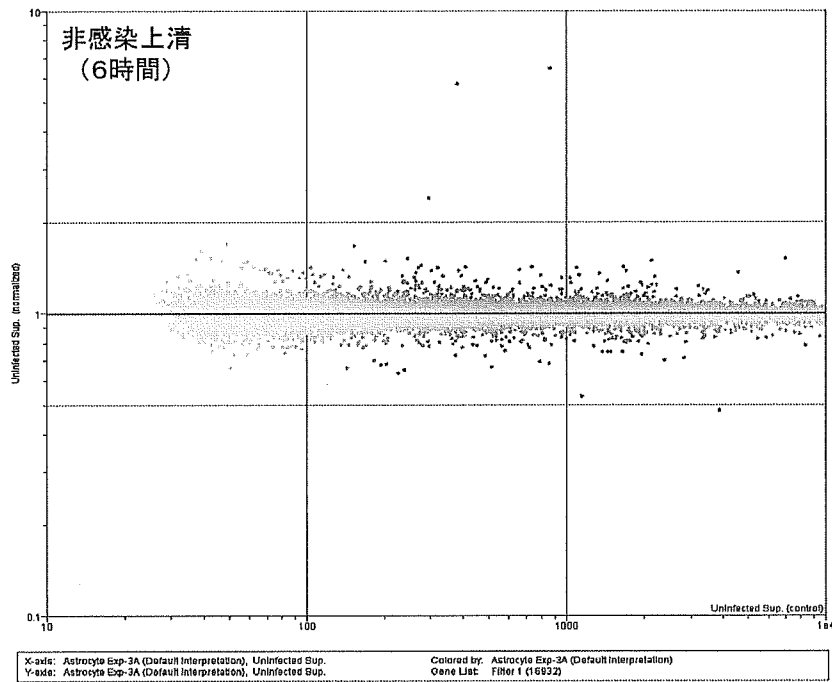


図3. 非感染マクロファージ上清作用後6時間におけるアストロサイトの遺伝子発現. グラフの横軸と縦軸のパラメーターは図2と同じ.

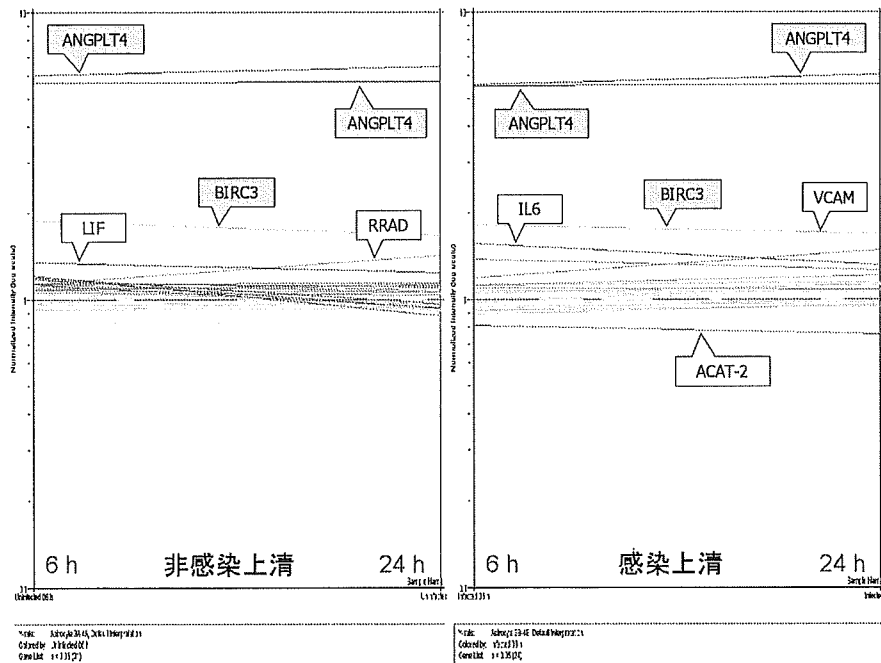


図4. 主な遺伝子の発現の時間的変動. 非感染(左)および感染(右)マクロファージ上清を作用させたときの主な遺伝子の動きと、その名称を示す. 横軸は上清作用後の時間を、縦軸は上清を作用させたアストロサイトの遺伝子発現が、対照遺伝子の発現強度と比較して、どの程度(何倍)増加あるいは減少しているかを示す.



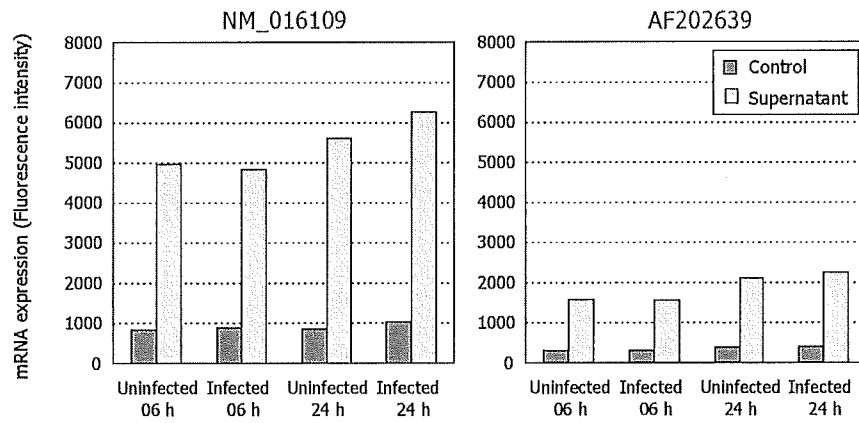


図5. 各種条件下でのアストロサイトにおける angiotensin-like 4 protein (ANGPT4) 遺伝子の発現量.

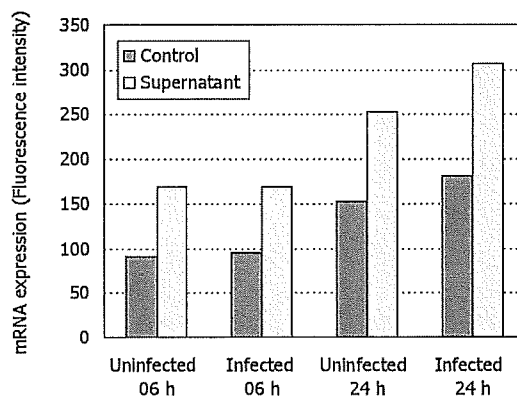


図6. 各種条件下でのアストロサイトにおける baculoviral IAP (inhibitor of apoptosis) repeat-containing 3 (BIRC3) 遺伝子の発現量

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

エイズ脳症の発症病態と治療法に関する研究

—*N*-Myristoyltransferase-1 阻害による HIV-1 複製制御とエイズ脳症—

分担研究者 三隅将吾 熊本大学大学院医学薬学研究部・薬学生化学分野 助教授

研究要旨:近年、human *N*-myristoyltransferase (hNMT)には2つの遺伝子(*hNMT1* および *hNMT2*)が存在し、細胞内で複数の isozyme で存在することが明らかとなった。そこで本研究では、hNMT isozyme 特異的な機能抑制によって、HIV-1 複製を阻害できるかを検討した。hNMT isozyme 特異的な siRNA を用いた結果、hNMT1 の抑制によって得られたウイルスの感染性が低下していた。前駆体タンパク質 Pr55 の non-raft 画分への移行により、ウイルスの粒子形成が阻害されたためであると考えられる。また各 hNMT1 シングルノックダウンによる細胞増殖抑制効果は、両 isozyme ダブルノックダウンによるそれよりも低い結果となった。以上の結果から、hNMT isozyme 特異的な機能抑制は低毒性の HIV-1 複製阻害が達成できると期待され、hNMT1 isozyme 特異的な阻害剤の開発が重要であると考えられる。

#### A. 研究目的

はじめに:HIV-1 の複製を強力に抑制する多剤併用療法(HAART)の導入により、HIV-1 感染症/エイズに対する薬物治療の効果が著しく向上し、それに伴い HIV 脳症発症率の低下が認められるようになった。しかしながら、生涯続けなければならないと考えられている現行の HAART によって、今後、長期的にみて、この HIV 脳症発症率低下が持続されるかは全く不明である。近年、痴呆を伴わない minor cognitive motor disorder(MCMD)と称される中枢神経症状が HAART 導入患者に認められることが報告されはじめている(*J. Neurovirol.* 9.

205-221, 2003)。

髄液中の HIV-1 RNA 量と痴呆や神経生理学的障害が関連していることから(*Neurology* 60. 1388-1390, 2003)、脳組織における HIV-1 の複製を抑制することは重要である。しかしながら、リンパ組織で複製するウイルス集団から隔離された、脳内で独自複製を続ける遺伝的に異なったウイルス集団の存在が知られている(*J. Virol.* 79. 1772-1788, 2005)。このことは、現行の HAART がリンパ組織における HIV-1 複製阻害と同様に、脳内におけるそれを必ずしも効果的にコントロールできていないことを示唆する。このようなことから、HIV-1 の感染に伴

う中枢神経障害を予防することを指向した、脳内 HIV-1 複製を阻害し、薬剤耐性株が出現しにくい抗 HIV 薬開発、および脳内 HIV-1 複製によって引き起こされる神経障害を抑制する薬開発が重要になると考えられる。

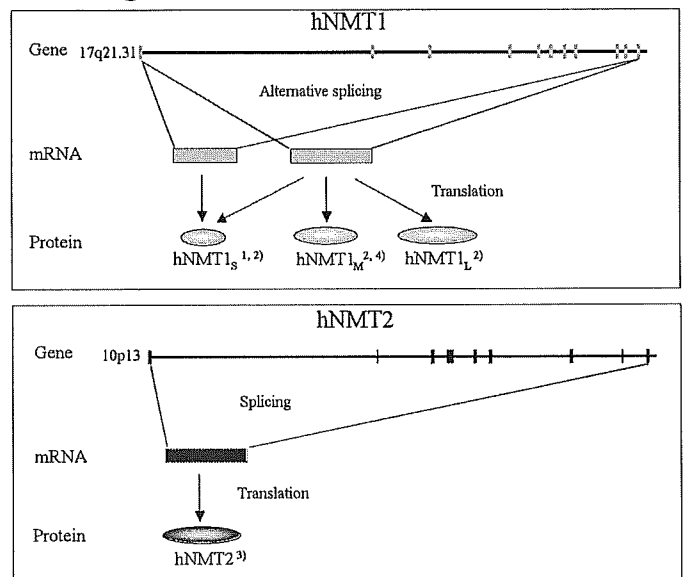
N-myristoylationとHIV-1: 本研究では、HIV 脳症発症制御を目指すにあたり、N-myristoyltransferase (NMT)に着目した。HIV-1においては構造タンパク質であるPr55<sup>gag</sup>がN-ミリスチル化を受けることが知られ、HIV-1の感染性獲得に必須の修飾であることは周知の事実である(HIV-1の調節タンパク質であるp27<sup>orf</sup>もまたN-ミリスチル化を受けることが知られている)。N-ミリスチル化を受けないPr55<sup>gag</sup>からなるウイルスが複製能力を獲得するには、換言すればNMT非依存性の変異ウイルスが出現するには、通常薬剤耐性出現に伴う変異よりも遥かに多くの変異の蓄積が必要になると予想され、N-ミリスチル阻害剤に対する耐性株出現は極めて困難であることが予想される。このことからPr55<sup>gag</sup>の特異的N-ミリスチル化阻害は抗HIV戦略の一つとして考えられる。

N-myristoylationとアポトーシス: HIV脳症の原因の一つに神経細胞のアポトーシスが考えられている。ミトコンドリアを経由するアポトーシスシグナルの中で、BIDのミトコンドリア移行には、N-ミリスチル化が必要とされることが報告されている(*Science* 290,1761-1765, 2000)。HIV脳症における神経細胞のアポトーシスにはTNFやTRAILなどの関与が示唆されていることから(PNAS. 100, 2777-2782, 2003)、BID

のN-ミリスチル化阻害はHIV脳症発症制御のための戦略の一つとなりうると考えられる。

新しい N-myristoylation 阻害戦略の提案: これまでにヒトの NMT を標的とした N-ミリスチル化阻害戦略は必ずしも発展していない。その理由として、阻害剤の特異性の低さと、それに伴う副作用に問題があった。ところが、近年になり、ヒト NMT (hNMT)には、2つの遺伝子 (*hNMT1* および *hNMT2*)が存在し、細胞内で複数の isozymes で存在することが明らかとなった (PNAS 89, 4129-4133, 1992; Biochem. J. 333, 491-495, 1998; JBC. 273, 6595-6598, 1998; JBC. 272, 28680-28689, 19979) (Fig. 1)。

Fig. 1 hNMTの遺伝子およびその産物



現在までにこれら isozyme 間の細胞内における役割の違いの存在について知られていない。そこで我々は、細胞内において各 hNMT isozyme は固有の基質特異性を持ち役割分担をしながら機能していると仮定した。HIV-1 複製やアポトーシス誘導と密接に関連する NMT

isozyme を同定できれば、その isozyme 特異阻害により副作用の軽減が期待できる。

本年度の研究では、HIV-1 複製中で Pr55<sup>gag</sup> の N-ミリスチル化の過程を含む late stage に対して、hNMT1 と hNMT2 のいずれの isozyme が深く関与しているかを siRNA を利用して検討した。

## B. 研究方法

### 細胞

HEK293 cell line は5%FCS DMEM 培地で 37 °C, 5%CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。HeLa-CD4-LTR-CCR5/β-gal (MAGIC-5) cell line (国立感染研、巽先生より分与) は 2.5% FCS DMEM 培地で 37 °C, 5%CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。ヒト神経芽細胞種 SK-N-SH 細胞は 5%FCS DMEM 培地で 37 °C, 5%CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。また 10 μM の all trans retinoic acid を5日間処理し、神経様細胞に分化させた後に実験に供した。

### siRNA

hNMT1 および hNMT2 の遺伝子の exon 領域の DNA 配列の中で、各遺伝子特異的な配列を含む領域から siRNA の標的部位を選定した。化学合成 double strand RNA および hairpin 型の siRNA を発現するベクターを構築し実験に用いた。コントロールとしてランダム化した RNA を用いた。

### トランスフェクション

2.5 x 10<sup>5</sup> cells の HEK293 細胞を 6 well plate に播種し一夜培養後、HIV-1 発現ベクター-pNL4-3 を Lipofectamine2000 (Invitrogen,

Carlsbad,CA) を用いてマニュアルに従いトランスフェクションした。さらに 12 時間または 48 時間後、hNMT1 または hNMT2 を標的とした siRNA 発現ベクターまたは siRNA を Lipofectamine 2000 を用いて同様にトランスフェクションした。さらに 48 時間培養後、培養上清と細胞を回収した。培養上清に含まれるウイルスの感染性を MAGIC-5 assay により評価した。

### Western blot 分析

常法に従い SDS-PAGE を行い PVDF 膜に電氣的にタンパク質を転写後、1%スキムミルクでマスキングした。1次抗体として抗 NMT1 抗体、抗 NMT2 抗体、抗アクチン抗体、HIV-1 positive plasma および anti-Nef 抗体を用い、2次抗体として POD 標識抗マウス IgG 抗体、POD 標識抗ヒト IgG 抗体を用いた。Chemiluminescence detection reagent plus (NEN Life Science Products, Boston, MA, USA) を用いて目的タンパク質の検出を行った。

### Triton X-100 Flotation experiment

siRNA をトランスフェクションされた、Hek293 細胞を可溶化し、30-35%の Optiprep グラジエントを作製し、分画を行った。

(倫理面への配慮)

本研究においては、動物実験を行わず、株化培養細胞を使用していることから、倫理面の問題はないと考えられる。