

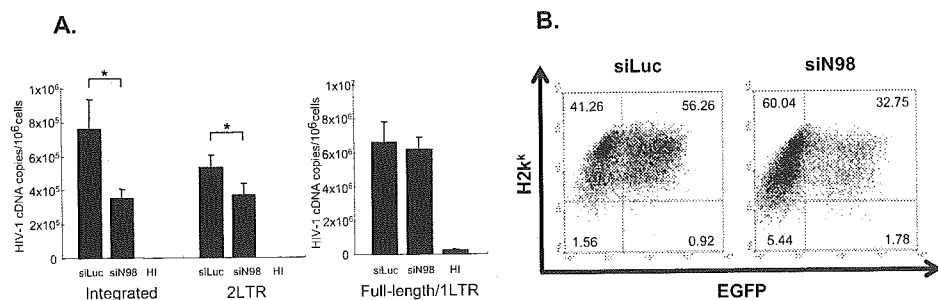


図. 4.

Nup98発現抑制細胞におけるHIV-1 cDNAの核内移行の抑制。

(A) siLuc及び siN98導入後72時間目の293T細胞にEGFP発現 HIV-1ベクターを感染させ、24時間後のHIV-1 cDNAをReal time PCRで定量した。1 × 10⁶あたりのHIV cDNAコピー数を示す。*はウェルチのtテストでp<0.05を示す。
 (B) FACSによるsiRNA導入細胞におけるHIV-1感染性の解析。siLuc及びsiN98発現レンチウイルスベクターをMT-2細胞に感染3日後、EGFP発現し複製可能なHIVであるNL-EGFPを感染させ、3日後にGFP及びH-2K^kの発現効率をFACSにて解析した。
 (C) (B)の蛍光顕微鏡による観察。スケールバーは100 μm。

C.

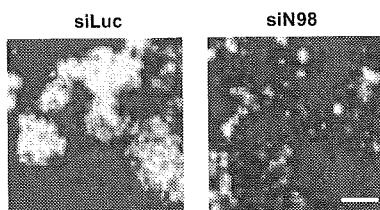


図. 5.

Nup98機能阻害によるHIV-1感染阻害。

(A) VSV-Mおよびその変異体 M(D)発現プラスミドDNAをトランスフェクション後、12時間目の293T細胞にDsRed発現HIV-1ベクターを感染させ、さらに24時間後のDNAを回収し、HIV-1 cDNAをReal time PCRで定量した。*はウェルチのtテストでp<0.05を示す。

(B) (A)の細胞におけるDsRed及びH-2K^kの発現効率をFACSにて解析した。

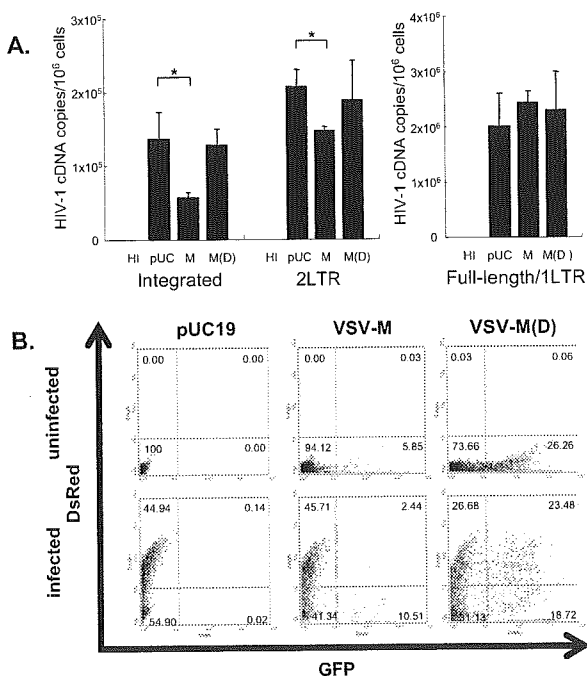


図 6

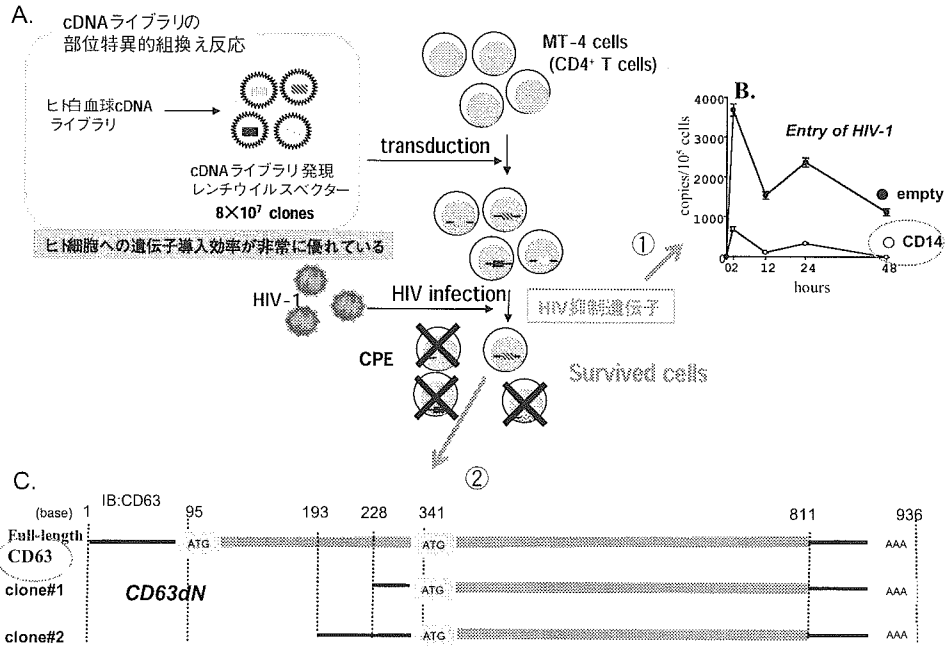
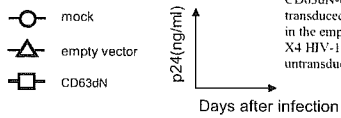
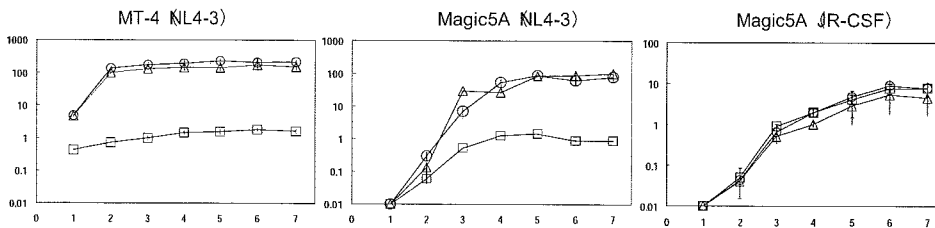


図 7

A. p24 ELISA



The anti-HIV-1 activity in the CD63dN-transduced cells with a wild type X4 HIV-1 (NL4-3) but not a R5 HIV-1 (JR-CSF) was also confirmed. The level of HIV-1 gag p24 in culture supernatant from X4 HIV-1-infected cultures in the CD63dN-transduced cells was approximately 100 fold-lower than that in either untransduced or empty vector-transduced cells (Fig. 3E). Level of X4 HIV-1 DNA in the CD63dN-transduced cells was significantly lower than that in the empty vector-transduced or untransduced cells (Fig. 3F). Cells in the CD63dN-transduced culture infected with X4 HIV-1 grew similar as that in the HIV-1 uninfected culture, whereas that in the empty-vector-transduced or untransduced cultures infected with X4 HIV-1 were severely killed (data not shown).



B.

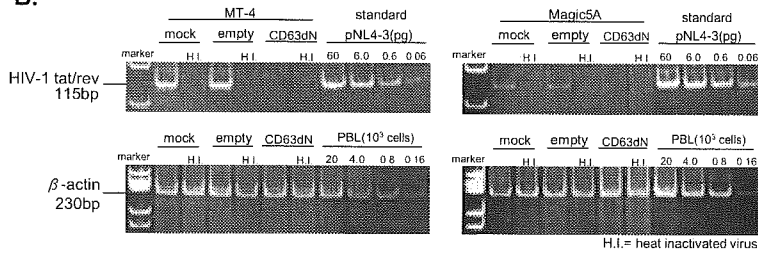


図8.

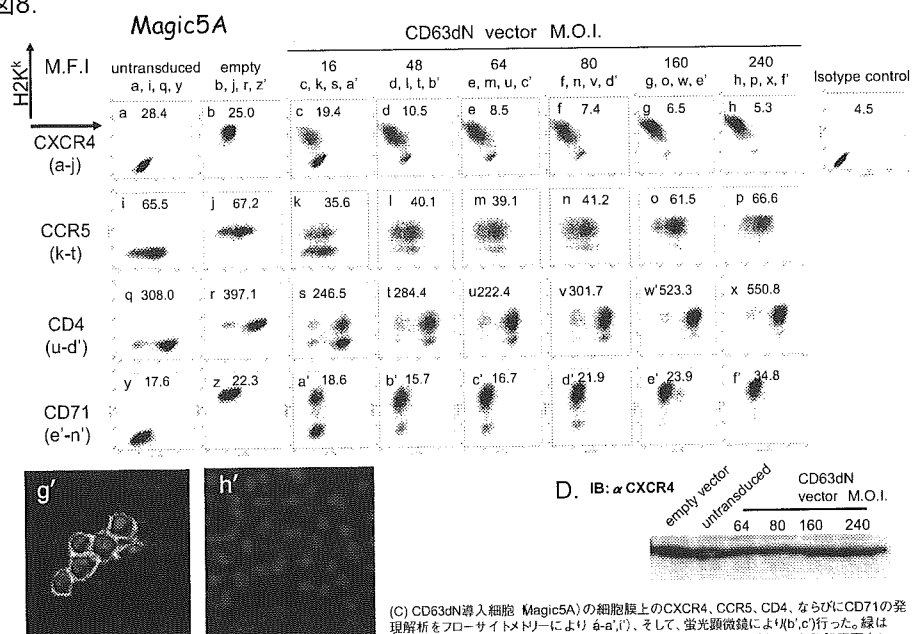


図9. CD63dNの導入によりCXCR4の細胞膜への移行が阻害される

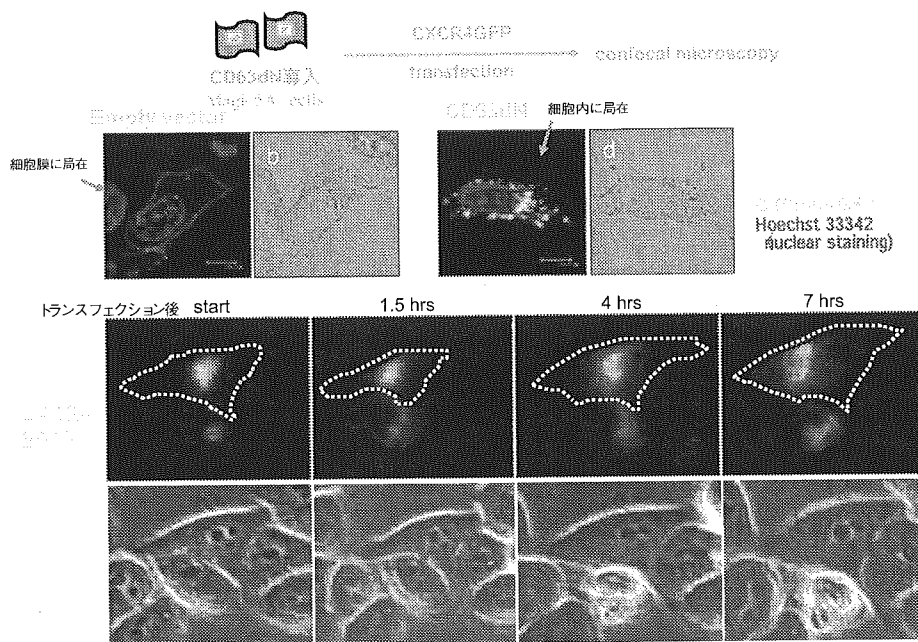


図10. CD63dNによる細胞膜移行抑制に関わるCXCR4ドメインの解析

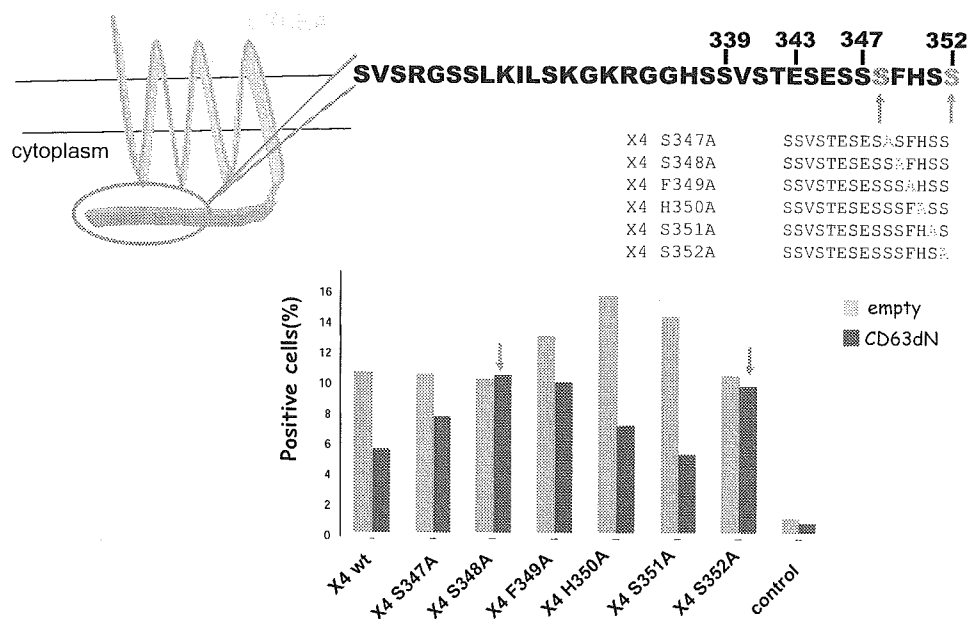


図10B. CD63変異体によるコレセプター分子の抑制はmembrane trafficking異常による

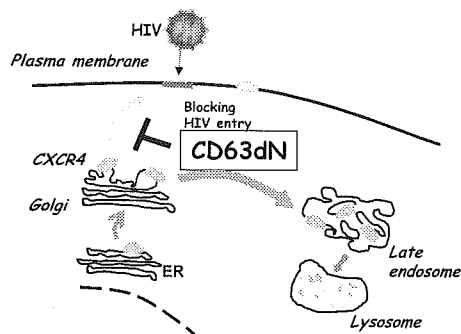


図11. 野生型のCD63強制発現によりウイルス感染性が減弱する

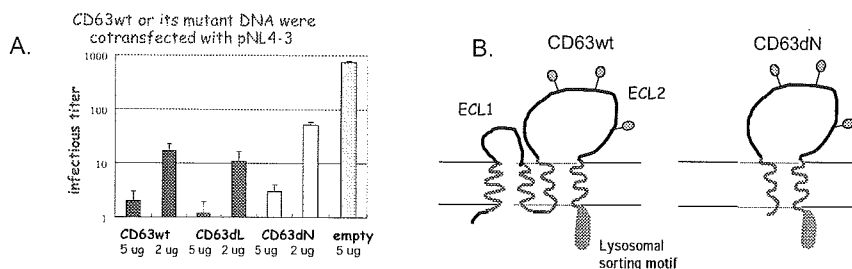


図11C. 野生型CD63の発現によりHIV Env蛋白質のウイルス粒子内へ取り込みが抑制される

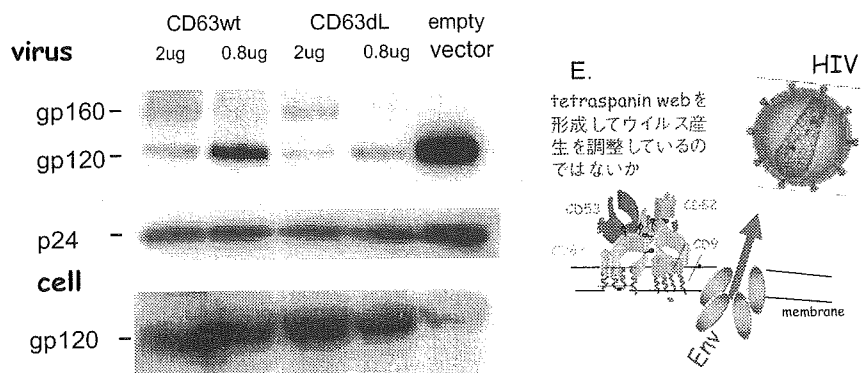
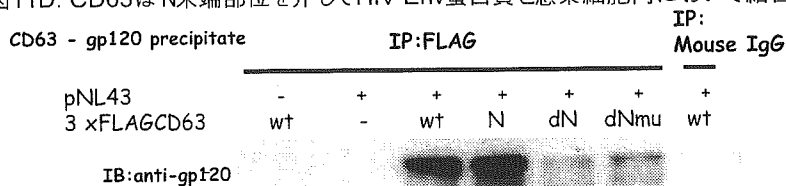


図11D. CD63はN末端部位を介してHIV Env蛋白質と感染細胞内において結合している



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（平成15-17年度）

分担研究者 田中勇悦 琉球大学・医学部・免疫学分野 教授

研究要旨：エイズ発症阻止を目的とした樹状細胞(DC)免疫に注目し、DCの分化培養方法の検討、その機能解析を *in vitro* で行い、実際の HIV-1 感染抑制効果を個体モデルである hu-PBL-SCID マウスを使って検証を試みた。不活化 HIV-1 で感作した単球由来 GM-CSF/IL-4 添加培養 DC で免疫した hu-PBL-SCID マウスでは種々の HIV-1 抗原エピトープを認識するヒト CD4+T 細胞が誘導され、CCR5 指向性 HIV-1 の感染を抑制する CD4 因子を産生した。DC 免疫療法に用いるための免疫誘導活性の高い DC の分化培養方法を開発する試みとして、単球の CCR5 または CXCR4 架橋の効果を検討したところ、抗体処理単球は培地のみではマクロファージに分化し、GM-CSF+IL-4 または IL-4 のみを加えて培養することにより機能的 DC に誘導された。一方、別の視点から HIV-1 がリンパ節等において免疫応答の過剰な活性化を引き起こすことがエイズ発症へとつながるとも考え、過剰な免疫応答を抑制する能力のある DC（免疫抑制性 DC）のエイズ抑制能を検討する目的で、独自の誘導法を開発した。

A. 研究目的

免疫関連分子を介したエイズ発症阻止を目的とする研究において、不活化 HIV-1 感作樹状細胞(DC)で免疫した hu-PBL-SCID マウスが CCR5 指向性(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 免疫療法に用いる免疫賦活活性の高い DC の分化培養方法を研究することを第一目的にして研究を開始した。平成17年度の研究では、過剰な免疫応答を抑制する免疫抑制性 T 細胞(Treg)と呼ばれる細胞群を優勢に誘導できるような DC の分化培養方法を開発することを目的とした。どちら

の DC を用いた免疫がエイズ発症阻止につながるか、つまりエイズウイルスを駆逐する方法がよいのか、逆に過剰免疫応答を抑制することによりエイズウイルスと共存を図る方法がよいのか、あるいは両者を使い分けなければならないのか、今後の研究課題である。

B. 研究方法（倫理面への配慮）

1. DC 培養：単球は PBMC から抗体 negative selection 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、その後試験管内でサイトカイン添加により DC に分化させる方法を用いた。免

疫刺激性 DC の培養には、GM-CSF と IL-4 を用いた。この DC の最終成熟には IFN- β を用いた。新たな試みとして単球の CCR5 および CXCR4 架橋には、プラクチックプレート固相化特異的単クローン抗体を用い、この場合は、IL-4 のみ添加の条件も検討した。さらに、免疫抑制性成熟 DC を得るために、IFN- β と IL-4 を添加し、1 日培養後、外来抗原 (KLH、不活化 HIV-1IIIB) や LPS) で 2 日間刺激培養した。

2. 得られた DC の表現系は、CD80, CD83, CD86, HLA-DR, CD14, CXCR4, CCR5 等に対する単クローン抗体による染色後、Flowcytometry で解析した。

3. DC の機能は、in vitro においてはアロ CD4+T 細胞との混合培養における細胞増殖およびサイトカイン産生能で検討した。In vivo における機能解析には、hu-PBL-SCID (RAG2/c γ 欠損 SCID) マウスを使った。マウスの脾臓に抗原で感作した DC と同じドナー由来の PBMC を同時に移植し、5-7 日後に、同量の抗原感作 DC を腹腔に移植した。それから 5-7 日後、マウス体内からヒト細胞を回収し、種々のアッセイを行なった。

4. サイトカインの定量は市販のキットを用いた。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。

すでにこのような動物実験を含む一連の研究は、琉球大学の動物実験倫理委員会・感染微生物取り扱い安全管理委員会

で審査され、許可されている。

C. 研究結果

1. H15 年度

疫刺激性 DC 免疫法を用いて誘導される抗 HIV-1 免疫応答の詳細について検討した。不活化 HIV-1 感作培養樹状細胞で免疫した hu-PBL-SCID マウスには種々の HIV-1 構成蛋白あるいは調節蛋白のエピトープを認識するヒト CD4+T 細胞が誘導され、その中の一部の細胞が CD4 因子を産生した。

2. H16 年度

DC 免疫療法に用いるための活性の高い DC の分化培養方法を研究する中で、新たな試みとして CCR5 及び CXCR4 分子の架橋の効果を検討した。架橋により GM-CSF+IL-4 または IL-4 のみを加えて培養することにより Th1 免疫刺激に優れる機能的 DC が誘導されることを明らかにした。

3. H17 年度

単球を培養初日から IFN- β と IL-4 を含む培地で培養し、1 日後に外来抗原である KLH や不活化 HIV-1 あるは LPS を培養系に添加し、さらに 2 日間培養することにより DC マーカーである CD83 を強度に発現し、CD80 と CD86 が強く up-modulation された DC を誘導することに成功した。抗原刺激を加えないと CD83 は誘導できなかった。このような DC 培養系の培養上清には、IL-10、IL-12 と TNF α が検出された。コントロールである

GM-CSF/IL-4 分化 DC は、LPS と IFN- γ で刺激しないと IL-12 を産生しなかった。これら 2 種類のタイプの DC の免疫調節作用を naive アロ CD4+T 細胞との混合培養で比較検討すると、GM-CSF/IL-4 で培養し IFN- β で成熟させた DC(cDC) に比べて IFN- β /IL-4/ 抗原で刺激された DC(quick DC) は、CD4+T 細胞の増殖抑制活性、IFN- γ 産生刺激活性とも弱かった。しかし、quick DC のみが、CD4+T 細胞の IL-10 産生を誘導した。ここで誘導された CD4+T 細胞を *in vitro* で anti-CD3, anti-CD28 抗体で刺激すると、より高濃度の IL-10 が産生され、Treg の一種である免疫誘導性 IL-10 産生性 Treg の増殖が促進されることが分かった。*In vivo* においても KLH 感作 DC を使った場合、quick DC の免疫誘導能は無いのか、あるいはとても低いことを示すデータが得られた。

D. 考察

DC は、自然アジュバントとして感染症およびガンの領域で注目されている。本研究では、未だ確立されていないヒトの DC の培養方法とそれを用いた HIV-1 免疫誘導について独創的な研究を行なうことができた。GM-CSF と IL-4 で誘導し、IFN- β で最終段階に分化させた DC は、免疫賦活作用を持つこと、特に HIV-1 感染症の個体シミュレーションを可能とする動物モデルである hu-PBL-SCID マウスでは、不活化 HIV-1 で感作した DC による免疫は *in vivo* において R5 HIV-1 の感染を阻止

する免疫応答を誘導することを証明した。そのエフェクターは免疫 CD4 T 細胞が産生する新たな因子 (CD4 factor) であることを突き止めた。

さらに新たな DC 分化培養法として、単球をケモカイン受容体架橋刺激を加えて培養することにより、IL-4 のみで Th1 誘導性 DC が培養誘導できることを明らかにできた。新たな発見である。この方法を使うと、単球を PBMC から接着法により簡単に分離させることも可能になることも新たな発見である。

一方、単球を IFN- β と IL-4 で培養し、翌日に抗原を加えてさらに 2 日間培養することにより、これまでの免疫賦活性 DC とは機能が正反対の免疫抑制性 DC が誘導された。その機能は、IL-10 産生 Treg の誘導であり、hu-PBL-SCID マウスを使った *in vivo* 免疫試験においても免疫誘導性は陰性であった。

以上の観察は同じ単球でも分化培養の条件によって両極端の DC になることを示しており、今回の Treg 誘導性 DC が実際に HIV-1 の増殖や病原性、さらにエイズ発症阻止にどのような影響力をもつかどうか興味深く今後の研究成果が期待される。

E. 結論

免疫賦活性ヘルパー T 細胞を刺激する活性を持つ機能的 DC と、Treg を誘導する活性をもつ DC の培養方法が確立された。どちらの DC がエイズ発症抑制能をもつ

のか、感染実験で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) Nimura F, Zhang L, Okuma K, Tanaka R, Sunakawa H, Yamamoto N and Tanaka Y.: Cross-linking cell surface chemokine receptors leads to isolation, activation and differentiation of monocytes into potent DC's. Exp. Biol. Med. 2006, in press.
- (2) Yoshida A., Kodama A., Tanaka R., Yamamoto N., Ansari A. A. 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, 2006 in press.
- (3) Nakayama EE, Tanaka Y, Nagai Y, Iwamoto A, Shioda T.: A CCR2-V64I polymorphism affects stability of CCR2A isoform. AIDS 18(5):729-738, 2004.

(4) Murakami T, Ablan S, Freed EO, Tanaka Y.: Regulation of human immunodeficiency virus type 1 Env-mediated membrane fusion by viral protease activity. J Virol. 78(2):1026-1031, 2004.

(5) 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

(5) Yoshida A, Tanaka R, Murakami M, Takahashi T, Koyanagi Y, Nakamura M, Ito M, Yamamoto N, and Tanaka Y. :Induction of protective immune responses against R5 HIV-1 infection in the hu-PBL-SCID mice by intra-splenic immunization with HIV-1-pulsed dendritic cells: possible involvement of a novel factor of human CD4⁺ T cell origin. J.Virol. 77(16):8719-8728, 2003.

2. 学会発表

- (1) Nakayama EE, Tanaka Y, Nagai Y, Iwamoto A, Shioda T. A CCR2-V64I polymorphism 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) 大隈和, 田中勇悦: サルエイズウイルス感染細胞を特異的に攻撃する新規組換え VSV. 第 53 回日本ウイルス学会学術集会, 2005. 11. 20: 横浜.
 - (6) 芳田剛, 河野祐治, 青木淳, 三浦義治, 田中勇悦, 小柳義夫: 抗 HIV 因子の単離: CXCR4 細胞膜移行阻害分子の同定. 第 53 回日本ウイルス学会学術集会, 2005. 11. 20: 横浜
 - (7) 久保嘉直, 吉居廣郎, 田中勇悦, 佐藤裕徳, 山本直樹: HIV-1 の細胞内侵入におけるエズリンの関与. 第 53 回日本ウイルス学会学術集会, 2005. 11. 20: 横浜
 - (8) 山下篤哉, 照沼裕, とう学文, 金浩範, MUNKANTA Muwansa, 葛西宏威, 加藤伊陽子, 田中勇悦, 山本直樹, 伊藤正彦: HIV-1 感染長期未発症者由来 CD8 陽性 T 細胞株の産生する HIV-1 液性因子. 第 53 回日本ウイルス学会学術集会, 2005. 11. 20: 横浜
 - (9) 張 險 峰, 田中勇悦, 間 陽 子: Regulation of HIV-1 viron protein expression by Vpr. 第 19 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2005.12.1: 熊本
 - (10) 大隈和, 吉田篤司, 田中礼子, 田中勇悦: エイズウイルス感染細胞を標的とし攻撃する新規組換えウイルスベクター. 第 19 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2005.12.2: 熊本
 - (11) 吉田篤司, 大隈和, 田中礼子, 山本直樹, 田中勇悦: 不活化 HIV-1 感作樹状細胞免疫と CXCR4 アンタゴニスト投与による R5 および X4 HIV-1 感染防御. 第 19 回日本エイズ学会学術

- 集会・総会, 2005.12.3: 熊本
- (12) 田中勇悦, 吉田篤司, 大隈和, 田中礼子, 山本直樹: HIV-1 感染防御を目的とする単球のマニピュレーション: 単球の CXCR4, CCR5 架橋を介する HIV-1 受容体の発現抑制と HIV-1 免疫誘導樹状細胞の分化培養. 第 19 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2005.12.3: 熊本
- (13) 山下篤哉, 照沼裕, とう学文, 高嶋能文, 花房秀次, 岡慎一, 酒井道生, 白幡聡, 藤井輝久, 石川正明, 高橋義博, 池田柊一, 三浦琢磨, 松田重三, 田中勇悦, 葛西宏威, 加藤伊陽子, 山本直樹, 三間屋純一, 伊藤正彦: T 細胞由来抗 HIV-1 液性因子からみた HIV-1 感染長期末発症者の AIDS 発症遅延要因. 第 19 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2005.12.3: 熊本
- (14) 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 52 回日本ウイルス学会総会 横浜 11/21/2004, 抄録 p217
- (15) 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 34 回日本免疫学会総会・学術集会記録 札幌 12/1/2004, 抄録 p91
- (16) Tanaka Y. Protection of hu-PBL-SCID mice against HIV-1 infection by dendritic cell-based immunization. 第 18 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.
- (17) 中山英美, 田中勇悦, 岩本愛吉, 永井美之, 塩田達雄 CCR2 遺伝子多型とエイズ病態進行遅延効果 第 51 回日本ウイルス学会学術集会・2003.10.27: 京都
- (18) 田中礼子, 山本直樹, 田中勇悦 HIV-1 粒子への免疫共刺激・細胞間接着分子 OX40 OX40L の取り込みと機能 第 51 回日本ウイルス学会学術集会・2003.10.27: 京都
- (19) 村上努, 田中勇悦 HIV-1 Gag 蛋白による env 蛋白膜融合活性の制御 第 51 回日本ウイルス学会学術集会・2003.10.27: 京都
- (20) 田中勇悦, 吉田篤司, 田中礼子, 村上努, 山本直樹 hu-PBL-SCID マウス個体での X4 HIV-1 の viremia 誘導 第 17 回日本エイズ学会学術集会・2003.11.27: 神戸
- (21) 村上努, 広瀬国孝, 谷中幹郎, 山本直樹, 田中勇悦 新規ケモカインレセプター阻害剤 T-1113 を用いた R5/X4 HIV-1 感染 PBMC 刺激培養による CD4 陽性 T 細胞の大量培養 第 17 回日本エイズ学会学術集会・2003.11.27: 神戸
- (22) 中山英美, 田中勇悦, 岩本愛吉, 永井美之, 塩田達雄 CCR2 遺伝子多型のエイズ病態進行遅延効果 第 17 回

日本エイズ学会学術集会・

2003.11.27：神戸

- (23) 吉田篤司、村上努、田中礼子、中村正孝、田中勇悦 hu-PBL-SCID マウスの不活化 HIV-1 感作樹状細胞免疫で誘導される新規 R5-HIV-1 感染防御因子産生ヒト CD4+T 細胞が認識する HIV-1 抗原エピトープの多様性 第 33 回日本免疫学会学術集会・2003.12.8：福岡

- (24) 村上 努、S. Ablan、E. O. Freed、田中勇悦 HIV-1Gag タンパクによるウイルスと標的細胞との膜融合の制御 第 26 回日本分子生物学会年会・2003.12.13：神戸

H. 知的所有権の出願・取得状況

なし

「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

Vpr によってゲノム DNA の二重鎖切断が誘導されること、また、Vpr はマクロファージに対する感染効率を数倍上昇させることを見出した。一方、血中 Vpr を検出するためのシステムを構築し、14 名の HIV-1 感染者の血漿について解析した。その結果、5 ng/ml 前後の濃度で血中に存在する症例が存在し、Vpr の検出が血中ウイルス RNA のコピー数と良く相関することを認めた。精製 Vpr を調整し、血中で検出されるのと同濃度の Vpr をマクロファージに作用させると、DNA 損傷が誘導されることも明らかとなった。本研究結果は Vpr の役割に加えて、エイズ病態を理解する上でも重要な情報を提供するものと考えられる。

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 つの作用を考えている。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 点を研究の対象としてきた。

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. 患者体液中の Vpr 測定法の確立

3. 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

である。本分担研究では、項目-1 及び-2 を中心に解析を行った。項目-1 については、平成 17 年度に改変型レンチウイルスベクターの導入を行い、特にマクロファージへの感染効率に対する Vpr の作用を中心に解析した。また、Vpr 発現によって宿主細胞のゲノム二重鎖切断 (DSB: double strand breaks) が誘導されることを見出した。Vpr の機能として、細胞周期の G2 期で細胞増殖を停止させる作用が知られている。本年度、Vpr により DSB が誘導されることが明確になったことから、この G2 期における増殖異常が DSB によって誘導されていることを一元的に説明することが可能になった。項目-2 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たが、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。患者体液中の Vpr 濃度を把握するための最終手段として、これまで使用してきた単クローン抗体 8D1 に加えて、C-末端ペプチドに対する単クローン抗体 (C217) の作成に成功した。この両者の抗体を用いて、免疫沈降法とウエスタン解析を行うことで、患者血漿中の Vpr 検出が可能になった。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 NL4-3 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 をフォルボールエステルである 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。

R+ウイルスによる DSB Vpr を含むウイルスを培養細胞に感染させ 2 日後に回収し、アガロースゲル中に包埋した。Protenase K 及び SDS を用いて蛋白質を消化し、パルスフィールド電気泳動法による解析に供した。陽性コントロールとして 7.5Gy の放射線照射後の細胞を用いた。電気泳動後、ゲルをピストラグリーンで染色し、DNA の泳動パターンを比較した。。

HIV-1 陽性者血漿中 Vpr の検出 2 種類の単クローン抗体の内、C217 で免疫沈降 (IP) を行い、8D1 でウエスタン解析 (WB) を行った。各検体 200 ul を DNaseI 及び RNase で処理した後、解析に供した。標準サンプルとして、大腸菌で発現・精製した Vpr を用いた。以前作成した Vpr 測定用の ELISA (バージョン-1) により、Vpr 濃度を把握した。標準検体として、5、2.5 及び 1.25 ng 相当の Vpr 精製標品を健康人の血漿に混和し、HIV-1 検体と同様の IP-WB を行い、Vpr を検出した。

Vpr 添加による DNA 損傷 HIV-1 陽性患者血漿中で検出される濃度と同程度の濃度で Vpr を作用させた際の細胞側の反応を観察した。健康人由来マクロファージに対して 5 ng/ml の Vpr を添加し、2 日後に、DNA 損傷のマーカである γ -H2AX の染色性を解析した。

(倫理面への配慮)

HIV-1 陽性者の検体の供与を受けるに当たり、国立国際医療センター倫理委員会及び共同研究の医療機関での承認を得た。健康人から末梢血の供与を受ける場合には、ドナーに実験の内容を十分に説明し、自由意志のもとに献血を依頼した。一回の採血量は 5-50 ml とした。

本研究に関連する実験は大臣確認実験「17 国分科振第 17 号」として承認された。

C. 研究結果

1. p24 の値にして 50 ng 相当の R-及び R+ウイルスをウエスタン解析したところ、R+のみで Vpr が検出された。
2. p24 の値にして 200 ng/ml の濃度の R-及び R+ウイルスを調整し、培養細胞に感染させたところ、ほぼ全ての細胞にルシフェラーゼの発現が検出された。そして感染後 24 時間では細胞周期の G2

期における著明な細胞の集積が認められたのに対して、54 時間後では分裂期の異常が認められた。またこれらの細胞の形態を詳細に解析すると凝縮した染色体が認められるにも拘らず細胞周期関連蛋白質の適切な発現が障害されていた。

3. THP-1/PMA 細胞に R-及び R+ウイルスを感染させ、ルシフェラーゼ活性を指標にして感染効率を比較した。ウイルス量は p24 にして 5 ng/ml 以下で感染させた。その結果、R+ウイルスを感染させた検体では R-を感染させた検体と比較して 3-4 倍高いルシフェラーゼ活性が認められた。
4. X-線照射後の細胞の DNA をパルスフィールド電気泳動法で解析すると、高分子 DNA の下に DNA の“ダマ”が検出された。Vpr を含むウイルスを感染後の細胞中にも同様の“ダマ”が認められた。また、Vpr 発現細胞中に DSB の際に誘導されるリン酸化 ATM、リン酸化 Chk2 及び Rad51 のフォーカス形成が認められた。
5. 14 症例の HIV-1 陽性患者血漿中の Vpr を解析した。その結果、6 名で Vpr が検出された。その濃度は、約 5 ng/ml 程度を示す症例が認められた。HIV-1 陰性健康人 30 例について解析したが、いずれの検体でも約 14 kDa の蛋白質が検出されることはなかった。
6. Vpr の検出と血中 HIV-RNA コピー数との間に正の相関が認められたが、今後さらに症例数を増やして解析することを計画している。興味深い事に、高いウイルス価を示すにもかかわらず、Vpr が検出されない症例が認められた。この症例の vpr 遺伝子を解析したところ、ヌクレオチド 79 の位置に 4 個の塩基が挿入され、3'直下にストップコドンが出現することが明らかになった。
7. 患者血中に存在する Vpr と同程度の濃度の生物活性を検定した。健康人由来マクロファージに 5 ng/ml の Vpr を添加し、2 日後に DNA 損傷のマーカである γ -H2AX の染色を行ったところ、数は少ないもののフォーカス形成が認められた。50 ng/ml の Vpr を作用させるとこのフォーカスは顕著に認められた。

D. 考察

Vpr による細胞分裂期の異常 R+ウイルスによる細胞周期異常が認められたが、R-ウイルスは細胞周期

異常を示さなかった。このことは使用した HIV ウィルスが Vpr 機能を解析するための良いツールであることを意味する。また感染初期には細胞周期の G2 期での異常が検出されるのに対して、感染後 50 時間余りを経ると G 期の異常に加えて、M 期の異常が認められた。この結果は Vpr 発現細胞を用いた我々のこれまでの解析結果とよく合致する。この解析結果については、現在投稿準備中である。

マクロファージ系細胞へのウイルス感染 Vpr によりマクロファージへの感染効率が上昇することが明らかになった。また、培養液中に Vpr を添加することで、R-ウィルスの感染効率が上昇した。

Vpr による DSB Vpr により DSB が誘導された。精製したリコンビナント Vpr 蛋白質を裸核に作用させると再現良く DSB が誘導されたこと、また Vpr の DNA 結合ドメインである C 末端領域を欠失させると DSB の誘導能が減弱すること、さらに Vpr 自身をプラスミド DNA と混和しても DSB やニックの形成は誘導されないことから、Vpr は核内に存在する内在性の因子に依存しながら、Vpr 自身が DNA に結合することで、DSB を誘導することが強く示唆された。以前の解析から Vpr はクロマチンヒストンのアセチル化を高度に誘導する事が明らかとなっている。Vpr がマクロファージに感染する際、クロマチン構造を緩めながら、ゲノム DNA に修飾因子をリクルートし、DSB を誘導する機構を考えている。その機序の詳細は今後の研究課題である。

血中 Vpr の検出と DSB HIV 陽性症例中の血液中に 5 ng/ml (約 3 nM) 程度の Vpr が存在することが明確になった。また Vpr の検出と血中 HIV-RNA コピー数との間に正の相関が認められた。今後、さらに症例を増やして、相関の有無を明確にすることが肝要である。そして、相関が認められた際には、Vpr の血中での検出とウイルス RNA の増加の时期的なずれの有無に着目して解析することが重要と考えている。5ng/ml 程度の Vpr でも、健康人末梢血由来単核球と共培養すると、ある種のサイトカインを産生させ、これが潜伏感染細胞である U1 細胞からのウイルス産生を誘導することを見出している。患者血中の Vpr の増加が、末梢血細胞に作用して、全身の潜伏感染細胞からのウイルス産生誘導を惹起する可能性を念頭において、今後の解析を行う予定である。

Vpr は神経系の細胞の培養液中に添加されると、神経細胞のアポトーシスが誘導することが報告されている。しかしこの実験で使用された Vpr の濃度は 5 μ M であり、今回検出された Vpr の 1000 倍であった。また、Patel ら同様の実験に使用した Vpr 濃度は ng/ml のオーダーであったが、10 ng/ml の Vpr で若干のアポトーシスが誘導されるに過ぎず、50 ng/ml で初めて有意な変化が認められている。今後、脳脊髄液中の Vpr 濃度を把握することが、Vpr による神経細胞のアポトーシス、ひいてはエイズ脳症における Vpr の役割を明らかにする上で、重要と思われる。一方、末梢血単核球細胞に対する作用については、Muthumani らが報告しており、精製 Vpr 50 pg/ml でも単核球細胞が有意にアポトーシスが誘導されることが報告されている。単核球細胞の中で T 細胞が選択的にアポトーシスを示すか否かについては報告が無い。末梢血細胞と神経細胞では Vpr に対する感受性が著しく異なっている可能性が示唆される。

Vpr による DSB R+ウィルスをマクロファージに感染させると DSB が誘導され、精製 Vpr をマクロファージの培養系に添加しても DNA 損傷のマーカーである γ -H2AX の発現が誘導された。その濃度としては 5 ng/ml 程度でも活性を示し、50 ng/ml の Vpr で顕著な DNA 損傷形質が認められた。ウイルス産生が盛んに行われている組織中の Vpr は血中の濃度と比較して高い可能性があるため、ウイルス産生部位に局在する細胞中には高度の DSB が存在する可能性が考えられる。

エイズ症例では高頻度の B 細胞性リンパ腫が認められる。また、一度 HIV に感染すると、原行の ART 療法では、体からウイルスを駆逐することは究めて難しいことが知られている。即ち、一度 HIV に感染すると、体中の細胞が一生 DSB を誘発される環境下に置かれるという可能性が考えられる。Vpr による DSB がエイズ症例で認められる悪性腫瘍発症の分子基盤となっている可能性を考えている。今後、この可能性を検証する一方、HIV 陽性者の体細胞中での DSB の検出を試みる予定である。

Vpr による DSB の機序とウイルス感染における意義については、現在のところ不明である。しかし、裸核にリコンビナント Vpr を作用させることにより DSB が誘導されること、Vpr の DNA 結合ドメインである C

末端領域を欠失させると DSB 誘導能が減弱すること、さらに Vpr 自身には DNA に対するニッキング作用や二重鎖切断を誘導する機能を示さないことから、核内の内在性因子に作用して DSB を誘導するものと考えられる。

マクロファージは DNA 合成を行わないため、これに伴って自然に発生する DSB は存在しない。X-線照射等で DSB を誘導すると、細胞内の組換え修復頻度が増加することを認めており、DSB がウイルスのインテグレーションに対して有利に作用する可能性が考えられる。今後、Vpr による DSB とマクロファージへの感染効率(挿入頻度)の関連性について明確にし、Vpr-DSB の持つ意義を明らかにしたいと考えている。

E. 結論

Vpr は単球/マクロファージ系細胞へのウイルス感染に重要であること、また Vpr が DSB を誘発することを見出した。2 者の関連について、今後解析する。

F. 健康危険情報 特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tachiwana, T., Shimura, M., Nakai-Murakami, C., Tokunaga, K., Takizawa, Y., Sata, T., Kurumizaka H., and Ishizaka, Y. HIV-1 Vpr induces DNA double-strand breaks. *Cancer Res.*, 66, 627-631, 2006.
2. Mizoguchi, I., Ooe, Y., Hoshino, S., Shimura, M., Kasahara, T., Ohta, T., Kano, S., Takaku, F., Nakayama, Y., and Ishizaka, Y. Improved gene expression in resting macrophages using an oligopeptide derived from Vpr of human immunodeficiency virus type-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 338, 1499-1506, 2005.
3. Shimura, M., Tokunaga, K., Konishi, M., Sato, Y., Kobayashi, C., Sata, T., and Ishizaka, Y. Premature sister chromatid separation in HIV-1-infected peripheral blood lymphocytes. *AIDS* 19, 1434-1438, 2005.

4. Taguchi T., Shimura M., Osawa Y., Suzuki Y., Mizoguchi I., Niino K., Takaku F., and Ishizaka Y. Nuclear trafficking of macromolecules by an oligopeptide derived from Vpr of human immunodeficiency virus type-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320, 18-26, 2004.
5. Uchida S, Ohtsubo M, Shimura M, Hirata M, Nakagama H, Matsunaga T, Yoshida M, Ishizaka Y., Yamashita K. Nuclear export signal in CDC25B. *Biochem Biophys Res Commun.* 316, 226-32, 2004.
6. Uchida, S., Kuma, A., Ohtsubo, M., Shimura, M., Hirata, M., Nakagama, H., Matsunaga, T., Ishizaka, Y., Yamashita, K. Binding of 14-3-3b but not 14-3-3s controls the cytoplasmic localization of CDC25B: binding site preferences of 14-3-3 subtypes and the subcellular localization of CDC25B. *J. Cell Sci.*, 117, 3011-3020, 2004.
7. Minemoto, Y., Uchida, S., Ohtsubo, M., Shimura, M., Sasagawa, T., Hirata M., Nakagama, H., Ishizaka, Y., and Yamashita, K. Loss of p53 Induces M-phase retardation following G2 DNA damage checkpoint abrogation. *Arch. Biochem. Biophys.* 412, 13-19, 2003.

2. 学会発表

1. Shimura M, Ishizaka Y. Aberrant sister chromatid separation by HIV-1 VPR coupled with disruption of HPI $\square$ and kinetochore components.第 20 回 Oncogene Meeting, Frderick, Maryland, USA, 6 月, 2004.
2. Taguchi T, Shimura M, Kinomoto M, Tokunaga K, Sata T, Ishizaka Y. Mitotic abnormalities induced by Vpr, an accessory gene product of HIV-1. Salk/EMBL, Oncogene and Growth Control. Salk, Ssan Diego, USA, August, 2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 無
2. 実用新案登録 無
3. その他

研究成果の刊行に関する一覧表

1. 書籍

該当なし

2. 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
Yamada, T., Watanabe, N., Nakamura, T and Iwamoto, A.	Antibody-dependent cellular cytotoxicity via a humoral immune epitope of Nef protein expressed on the cell surface.	J. Immunology.	172	2401-6	2004
Furutsuki T, Hosoya N, Kawana-Tachikawa A, Tomizawa M, Odawara T, Goto M, Kitamura Y, Nakamura T, Kelleher AD, Cooper DA, Iwamoto A.	Frequent transmission of cytotoxic-T-lymphocyte escape mutants of human immunodeficiency virus type 1 in the highly HLA-A24-positive Japanese population.	J Virol	78	8437-45	2004
D Zhu, H Taguchi-Nakamura, M Goto, T Odawara, T Nakamura, H Yamada, H Kotaki, W Sugiura, A Iwamoto & Y Kitamura	Influence of single-nucleotide polymorphisms in the multidrug resistance-1 gene on the cellular export of nelfinavir and its clinical implication for highly active antiretroviral therapy.	Antiviral Therapy	9	929-35	2004
Yokomaku, Y., Miura, H., Tomiyama, H., Kawana-Tachikawa, A., Takiguchi, M., Nagai, Y., Iwamoto, A., Matsuda, Z., and Ariyoshi, K	Impaired epitope processing and presentation as a major escape mechanism from CTL recognition in HIV-1 infection.	J. Virol.	78	1324-32	2004
Nakayama, E.E., Tanaka, Y., Nagai, Y., Iwamoto, A., and Shioda, T.	A CCR2-V64I polymorphism affects stability of CCR2A isoform.	AIDS	18	729-38	2004
Sakurai, A., Jere, A., Yoshida, A., Yamada, T., Iwamoto, A. Adachi, A., and Fujita, M.	Functional analysis of HIV-1 vif genes derived from Japanese long-term non progressors and progressors for AIDS.	Microbes and Infection	6	799-805	2004
Tomonari A, Takahashi S, Shimohakamada Y, Ooi J, Takasugi K, Ohno N, Konuma T, Uchimar K, Tojo A, Odawara T, Nakamura T, Iwamoto A, Asano S.	Unrelated cord blood transplantation for a human immunodeficiency virus-1-seropositive patient with acute lymphoblastic leukemia.	Bone Marrow Transplant	36	261-262	2005
T. Maeda, T. Fujii, T. Matsumura, T. Endo, T. Odawara, D. Itoh, Y Inoue, T. Okubo, A. Iwamoto, T. Nakamura.	AIDS-related cerebral toxoplasmosis with hypertense foci on T1-weighted MR images: A case report.	J. Infect.	in press		

研究成果の刊行に関する一覧表

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

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
Song, H., Nakayama, E. E., and Shioda, T.	Effects of human interleukin 7 on HIV-1 replication in monocyte-derived human macrophages.	AIDS	In press		2006
Nuanjun Wichukchinda, Emi E Nakayama, Archawin Rojanawiwat, Panita Pathipvanich, Wattana Auwanit, Suthon Vongsheree, Koya Ariyoshi, Pathom Sawanpanyalert, and <u>Tatsuo Shioda</u> .	Protective Effects of <i>IL-4 -589T</i> and <i>RANTES</i> <i>-28G</i> on HIV-1 disease progression in infected Thai females.	AIDS	20	189-196	2006
Emi E. Nakayama, Hiroyuki Miyoshi, Yoshiyuki Nagai, and Tatsuo Shioda.	A specific region of 37 amino acid residues in the SPRY (B30.2) domain of African green monkey TRIM5 α determines species-specific restriction of SIVmac infection.	J. Virol.	79	8870-8877	2005

Kazuyasu Mori, Chie Sugimoto, Shinji Ohgimoto, Emi E. Nakayama, <u>Tatsuo Shioda</u>, Shigeru Kusagawa, Yutaka Takebe, Munehide Kano, Tetsuro Matano, Takae Yuasa, Masaaki Miyazawa, Yumiko Takahashi, Michio Yasunami, Akinori Kimura, Naoki Yamamoto, Yasuo Suzuki, and Yoshiyuki Nagai.	Influence of glycosylation on the efficacy of an Env-based vaccine against SIVmac239 in a macaque AIDS model.	J. Virol	79	10386-1039 6	2005
Nakayama, E. E., Tanaka, Y., Nagai, Y., Iwamoto, A. and <u>Shioda, T.</u>	A CCR2-V64I polymorphism affects stability of CCR2A isoform.	AIDS.	18	729-738.	2004
Sakuragi, J., Ueda, S., Iwamoto, A. and <u>Shioda, T.</u>	Relationship between dimerization and packaging of HIV-1 genome RNA; a possible role of dimerization in genome packaging.	J. Virol	77	4060-4069	2003

Matano, T., Kano, M., Takeda, A., Nakamura, H., Nomura, N., Furuta, Y., <u>Shioda, T.</u> and Nagai, Y.	No significant enhancement of protection by Tat-expressing Sendai viral vector-booster in a macaque AIDS model.	AIDS	17	1392-1394	2003
--	---	------	----	-----------	------