

Table 2 Comparison of PCR with smear and culture for detection of *M. tuberculosis*

Culture	Positive n (%)	Negative n
PCR*		
Positive	18 (82) [†]	3
Negative	4	77
Smear		
Positive	9 (41) [†]	4
Negative	13	76

* PCR using the FTA® card system.

† (%) sensitivity.

PCR = polymerase chain reaction.

PCR ($P < 0.05$), but there was no observed difference in specificity (Figure 2).

We repeated the PCR procedure for all culture- and smear-positive samples. The second experiment showed the same results as the first.

Sensitivity of PCR by smear result

The sensitivity of PCR for smear-positive, culture-positive samples was 9/9 (100%), whereas that for smear-negative, culture-positive samples was 9/13 (69%). These results show that, even in the paucibacillary form of TB resulting from treatment, this PCR system could provide rapid and sensitive detection of *M. tuberculosis* DNA impregnated on the FTA® card.

Stability and control procedures

All of the 102 samples were analysed by PCR at two time points—at the time of sample collection and after 6 months of storage—obtaining positive amplifications in both cases, clearly showing that storage for 6 months did not affect the amplification. PCR products were not detected in negative controls or control punch cards, confirming the absence of contamination during the procedure (Figure 1C). The total assay time was 9 h.

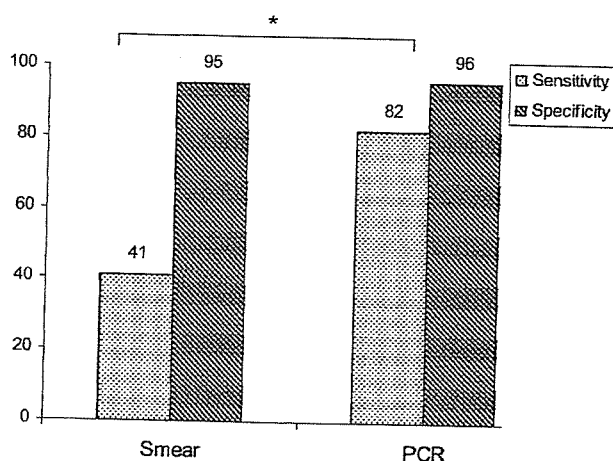


Figure 2 Accuracy of the methods. Sputum smear examination (smear) and PCR assay using the FTA® card system (PCR) among the 22 positive culture samples. * $P < 0.05$. PCR = polymerase chain reaction.

DISCUSSION

The present study demonstrated that the DNA of *M. tuberculosis* can be amplified using sputum spotted on an FTA® card. We found that the *M. tuberculosis* DNA stability with this card at room temperature was up to 6 months. However, care must be taken to avoid cross-contamination between specimens during sampling and handling. The present findings are relevant to patient care and clinical trials and suggest that sputum stored on FTA® cards could provide a simple, economical method for the collection, storage and transport of suspected TB specimens for later testing.

In addition, samples can easily be obtained from geographically isolated populations where access to and/or availability of TB diagnostic testing may be limited. Samples collected may be shipped by mail to a central laboratory for molecular diagnosis without the triple packing system otherwise required for transport.¹³

Depending on the gold standard and other methodological factors, studies have shown PCR sensitivities ranging from 77% to >95% and PCR specificities of >95% in TB patients before treatment.^{4,5} Regarding patients under treatment, Kennedy et al. found 76% agreement between culture and PCR.¹⁴ In our study, three culture-negative samples (one smear-positive and two smear-negative) were detected by our method, which may be explained by the limited quantity of TB DNA.¹⁵ While the sensitivity of smear is dependent on the type and quality of the specimen, our method could be employed with accuracy even 6 months after obtaining the sample. However, as we recommend taking the purulent part of the sputum, it will be necessary to help patients understand that secretions from deep in the lung are required.

More sensitive methods exist, including the use of automated culture systems, but the best tests are not always available for the people who most need them.¹⁶

In summary, the present system appears to be a promising method for transporting and storing sputum samples. Other advantages are the simplicity of the sample preparation and the use of the small disc as a template during the PCR process, using specific targets, without the need for extensive nucleic acid purification.

Acknowledgements

The authors thank Drs J C Agapito and M Rabie for excellent technical assistance and B Bell for reading the manuscript. They also appreciate Dr P Escalante's thoughtful review of and comments on the manuscript.

This study was financially supported by scientific research expenses funding from the Japanese Ministry of Health and Welfare.

References

- Perkins M D. New diagnostic tools for tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; 4 (Suppl): 182–188.
- Pio A, Chaulet P. Tuberculosis handbook. 2nd ed. WHO/CDS/

- TB 2003.320. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2003.
- 3 American Thoracic Society. Rapid diagnostic test for tuberculosis. What is the appropriate use? *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 1804-1814.
 - 4 Sarmiento O, Weigle K, Alexander J, et al. Assessment by meta-analysis of PCR for diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3233-3240.
 - 5 Eichbaum Q, Rubin E. Tuberculosis: advances in laboratory diagnosis and drug susceptibility testing. *Am J Clin Pathol* 2002; 118 (Suppl 1): 3-17.
 - 6 Barnes P, Cave M. Molecular epidemiology of tuberculosis. *N Engl J Med* 2003; 349: 1149-1156.
 - 7 Daar A, Thorsteinsdottir D, Martin A, et al. Top ten biotechnologies for improving health in developing countries. *Nature Genetics* 2002; 32: 229-232.
 - 8 Paramasivan C, Narayana A, Prabhakar R. Effect of storage of sputum specimens at room temperature on smear and culture results. *Tubercle* 1983; 64: 119-124.
 - 9 American Thoracic Society. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 61: 1376-1395.
 - 10 Miller D L, Jones R. The bacterial flora of the upper respiratory tract and sputum of working men. *J Pathol Bacteriol* 1964; 87: 182-186.
 - 11 Popper H H, Winter E, Hofer G, et al. DNA of *Mycobacterium tuberculosis* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue in tuberculosis and sarcoidosis detected by polymerase chain reaction. *Am J Clin Pathol* 1994; 101: 738-741.
 - 12 Eisenach K, Cave D, Bates J, et al. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 1990; 161: 977-981.
 - 13 World Health Organization. Guidelines for the safe transport of infectious substances and diagnostic specimens. WHO/EMC/97.3. Geneva, Switzerland: WHO, 1997. http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_EMC_97_3/en/index.html Accessed May 2006.
 - 14 Kennedy N, Gillespie S H, Saruni A O S, et al. Polymerase chain reaction for assessing treatment response in patients with pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis* 1994; 170: 713-716.
 - 15 Kent PT, Kubica G P. Isolation procedures. In: Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. Atlanta, GA, USA: Centers for Disease Control and Prevention, 1985.
 - 16 Mabey D, Peeling R, Ustianowski A, et al. Diagnostics for the developing world. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2: 231-240.

RÉSUMÉ

CADRE : La réaction polymérase en chaîne (PCR) est sensible pour la détection de *Mycobacterium tuberculosis*, et est disponible dans la plupart des pays, mais dans une moindre mesure dans les zones rurales.

OBJECTIFS : Amplifier les séquences d'ADN de *M. tuberculosis* des crachats repérés sur les cartes FTA et les comparer avec les résultats des examens microscopiques dans les échantillons de cultures positives.

MÉTHODES : Au total, 102 échantillons de crachats de patients tuberculeux ont été marqués sur les cartes FTA et stockés à l'air ambiant. La spécificité et la sensibilité de deux amorces de PCR qui amplifient la région IS6110 de *M. tuberculosis* ont été évaluées et comparées à celles de cultures (milieu liquide 7H9), et de l'examen microscopique d'échantillons frais de crachats.

RÉSULTATS : Il a été possible de détecter 10 fg/μl de DNA mycobactérienne même après 6 mois de stockage. L'analyse PCR des deux paires d'amorces révèle une sensibilité et une spécificité respectivement de 82% et 96%, alors que celles de l'examen microscopique sont respectivement de 41% et de 95%.

CONCLUSION : Le système de carte FTA permettant le stockage de l'ADN bactérien issu d'un échantillon de crachats devrait être envisagé pour le diagnostic moléculaire de la tuberculose. Les échantillons de crachats peuvent être facilement obtenus dans des populations géographiquement isolées, stockés et adressés par courrier afin d'établir à distance un diagnostic moléculaire précis.

RESUMEN

CONTEXTO : La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método sensible para la detección de *Mycobacterium tuberculosis* y se encuentra al alcance en la mayoría de los países, aunque en menor medida en zonas rurales.

OBJETIVO : Amplificar secuencias del ADN de *M. tuberculosis* a partir de manchas de esputo en papel de filtro (FTA cards®) y comparar estos resultados con los resultados de la baciloscopia, en muestras con cultivo positivo para micobacterias.

MÉTODOS : Se recogió un total de 102 muestras de esputo de pacientes con tuberculosis en curso de tratamiento, las cuales se almacenaron como manchas en papel de filtro a temperatura ambiente hasta el momento del análisis. Con la PCR se amplificó un fragmento de 123 pares de bases de la secuencia de inserción IS6110 de *M. tuberculosis*. Se evaluó la eficacia de la PCR en la detección de *M. tuberculosis* y los resultados se com-

pararon con los resultados de los cultivos en medio líquido 7H9 (método de referencia) y de la baciloscopia, de muestras frescas de esputo.

RESULTADOS : El método permitió detectar hasta 10 fg/μl de ADN micobacteriano en muestras almacenadas durante más de 6 meses. La PCR a partir de las manchas de esputo en tarjetas FTA® mostró una sensibilidad del 82% y una especificidad del 96%, comparada con una sensibilidad del 41% y una especificidad del 95% de la baciloscopia.

CONCLUSIÓN : El sistema con tarjetas FTA® debería tenerse en cuenta como método de conservación del ADN micobacteriano presente en las muestras de esputo, para el diagnóstico molecular de la tuberculosis. Así, en poblaciones geográficamente aisladas, de manera sencilla podrían obtenerse las muestras de esputo, almacenarlas y expedirlas por correo con el fin de establecer un diagnóstico molecular exacto.

増え続けるHIV感染症

Key Words

HIV の感染と 増殖のメカニズム

HIV
AIDS
CD4
CCR5
CXCR4

.....
*1 東北大学大学院医学系研究科感染症・呼吸器病態学分野
*2 大阪府赤十字血液センター研究部
.....

服部 俊夫*1 芦野 有悟*1
宇佐美 修*1 吉田 里佳*2

はじめに

後天性免疫不全症候群 (AIDS) は、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) に感染したことによって発症する。このウイルスに感染すると、宿主は、いったんウイルスの増殖を許し急性期 HIV 症候群を示す。初期には抗 HIV 抗体は陰性であるが、徐々に、宿主側の免疫反応によりウイルスの増殖を抑え始め 2~3 週間後から、抗体は陽性となる。しかし、ウイルスを排除しきれずウイルスと免疫が均衡を保った状態が 10 年程度続く。この時期は無症候性キャリア (AC) 期とよばれ、HIV はゆっくり増え、産生量も少ない状態を示す。宿主細胞へ侵入するコレセプターとしては CCR5 を使用する。やがて免疫とウイルス増殖との均衡がくずれ、生態の免疫の負ける時期を迎え AIDS の発症となる。このときの HIV は、早く増殖し生産量も多くコレセプターとしては CXCR4 を使うようになる。しかし病態は一定しておらず、CCR5 のままで感染後 AIDS を発症するや、すぐに AIDS 期になる者から 15 年以上も AC 期が長く続く長期未発症者の存在もあり増殖メカニズムがすべて解明され

ているわけではない。

本稿では、現在まで解明された HIV の細胞内への侵入とウイルスの複製の一般に述べられているメカニズムについて記述する。

ウイルスの遺伝子

まず、複製には欠かせない遺伝子やその蛋白であるが、HIV には 9 個の遺伝子が存在するが、このうち 5 個 (*gag*, *pol*, *env*, *tat*, *rev*) はウイルス複製に必須であり、ほかの 4 つはアクセサリ遺伝子 (*vif*, *vpr*, *vpu*, *nef*) とよばれ必ずしも必要とされないとされてきた。このような遺伝子やあるいは遺伝子からつくられる蛋白質 (大文字で表す) の働きによって、ウイルス産生量、スピード、宿主細胞の破壊のそれぞれの程度が決定され、HIV の増殖に深く関わっている。

HIV の増殖はウイルスの受容体への結合に始まり、*integration*, *maturation* を経て、発芽に至る。その機構に基づいた増殖阻止薬を多数使用することにより HAART 治療が可能になり、死亡者数が激減している。本稿では感染初期の機構を中心に概説し、まだ薬剤としてあまり開発されていない、*entry inhibitor*

についても触れる。

感染における分子機構

1. gp120 の構造と機能

HIV 表面には gp120 と gp41 という糖鎖に富むエンベロープ蛋白が存在し、CD4 陽性 T 細胞と HIV が結合する際にはこれらエンベロープ蛋白が中心的な役割を果たす。エンベロープ蛋白は HIV に抗体が結合するうえで標的となる分子でもあり、ワクチン開発の主要な標的ともなっている。HIV-1 表面のエンベロープ蛋白は、gp120 と gp41 がそれぞれ三量体を形成しているとされる。gp120 が受容体に結合し、gp41 がその後の fusion を生ずる。gp120 が結合する標的細胞表面のレセプター分子は、CD4 とケモカイン受容体 (CCR5, CXCR4) である。CXCR4 と結合する HIV 株は T-tropic とよばれ、おもに活性化 T 細胞に感染する。また、CCR5 と結合する HIV 株は M-tropic とよばれ、おもに静止期 T 細胞やマクロファージに感染する。また、CXCR4, CCR5 どちらのコレセプターも利用することのできる株もあり、Dual-tropic とよばれている。また、CXCR4, CCR5 以外のコレセプ

ターを使用する株も同定されている。まず gp120 が CD4 分子と結合し、構造変化を生じ、R5 ウイルスではおもに V3 ループを介して CCR5 と結合することができると思われる。

CD4 分子と結合した gp120 の構造解析では、観察すると予想どおり V3 ループが gp120 コアから 30 オングストローム外側に飛び出していることが明らかにされた¹⁾。一方で電子顕微鏡を用いた解析では、確かに gp41 の 3 本の柱によって gp120 の三量体が形成されていることが直接可視化された。また、一つのウイルス粒子当たりの三量体エンベロープ粒子は、14 個以下と予想外に少ないことも明らかになっている²⁾。これらの感染に重要な分子を標的にした感染阻止薬が考案されているが、臨床の場を用いるとあまり有効な効果が上がらない (図 1)。おそらく gp120 が変異し、その機能を変えることができるためであり、これは後述するように gp120 の抗体が病態の進行と関連がないようにみえることとメカニズムは似ていると思われる。

2. gp41 の構造と機能

gp120 の経時的なレセプター分子への結合

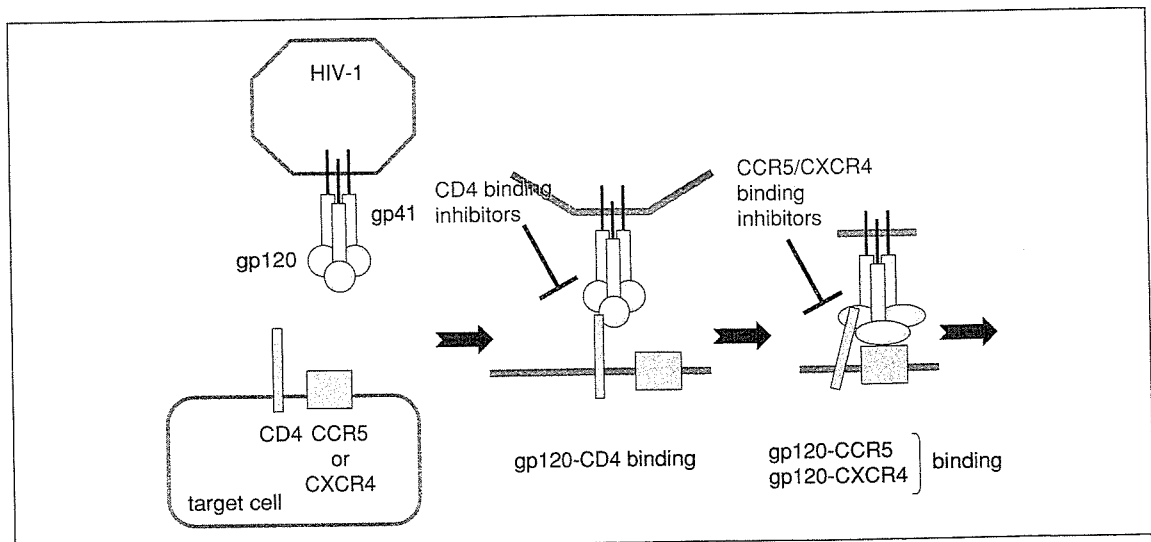


図 1 gp120 と受容体

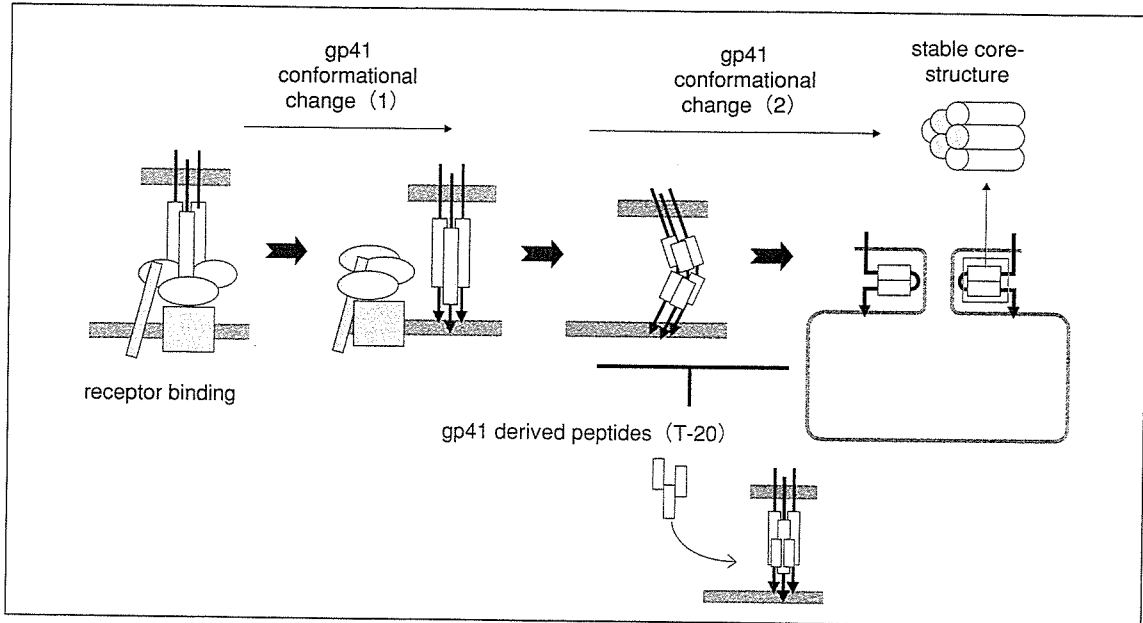


図2 gp41 とその立体構造

により、gp41の活性化が生ずる。gp41三量体は先端に疎水性アミノ酸配列を有し、これが融合ペプチドとして標的細胞膜と融合する。gp41は立体構造変化を起こし、中間体を経てfusion coreをもつpost-fusogenic gp41となる。この際に放出される熱エネルギーが膜融合に使用されるとされている。十分な数のgp41が(必要な数はわかっていない)膜融合を果たすと、HIVと標的細胞の間にporeが生じ、これによってHIVの感染が成立する。gp41が立体構造変化を起こしていく過程が近年明らかとなってきた。fusion coreを生ずる立体構造は2つのアルファヘリックス領域(DP107, DP178というペプチド名称をもつ)によるコイル-コイル構造である。しかし、DP178(T20)を培養液中に添加するとそのコイル-コイル構造をとることができなくなり、感染が阻止される。すでにこのペプチドは臨床の場においても使用されているが、gp41の立体構造変化を阻止することが唯一の機構か否かは不明である(図2)。

抗エンベロープ抗体の意義

これらの現状を踏まえ、受容体に結合するgp120を標的とした、entry inhibitorと抗体の実用化が目指されているが、その道りは平坦ではない(表1)。感染個体はこれらのエンベロープ蛋白に対して抗体を産生する。抗体に関していえば、たとえば無治療でCD4数の低下しない群と、HAART治療によりCD4細胞数が上昇している群では、自己由来のウイルスに対する中和抗体価は、ほとんど差が認められない。これらのことは病態の安定化に高い中和抗体価は不要であることを示している³⁾。また、一方で高い中和抗体価はウイルスの不要な変異を促進する可能性もある。gp120のV3ループに対する抗体は強い中和活性をもつことが知られているが、HIVは中和抗体から逃れるための巧妙な仕組みをもっている。近年、中和抗体に耐性ウイルスをもつ遺伝子配列を解析した結果、中和エピトープ以外の部位にも耐性を獲得できる変異があることがわかってきた。これはglycan shield

表1 HIV entry inhibitors

inhibitory target	inhibitors	available drugs
receptor binding	anti-gp120 antibodies	<i>on developing</i>
	receptor antagonists	<i>on developing</i>
fusion	anti-gp41 antibodies	<i>on developing</i>
	gp41 derived peptides	Enfuvirtide (T-20)

長所：細胞膜表面が作用点 → 細胞を非感染状態に保つ
→ 薬剤デリバリーがしやすい

短所：Env は変異しやすい. 受容体は生理的に重要

とよばれ、中和エピトープから離れた部位の変異によって、gp120 を覆っている糖鎖の配置が変化するために中和抗体が結合できなくなるという。一方で予想されていることは、gp120 が立体構造変化を起こすことにより重要な抗原性を隠すことにより、抗体が効きにくいということも考えられる。

CD4 非依存性 HIV の存在

これらのウイルスの究極の形として、CD4 非依存性に標的細胞に感染しうる HIV 株が発見されている。筆者らも CD4 数の著明に減少したニューモシスチス患者より HIV を単離した (SDA-1)⁴⁾。SDA-1 は CD4 が陽性細胞の細胞に感染する場合には多様な補受容体 (CXCR4, CCR5, CCR3, CCR8) を使用するが、CD4 抗原非存在下では CXCR4 のみを用いて感染するという特性をもつ。

このように CD4 細胞数が著減した患者において、CD4 非依存性の HIV が存在することなどは、gp120 が受容体 inhibitor の存在下ではその受容体を使用しない方向への変異が進むことも示唆され、治療の困難さを予想させる。

感染後の HIV の増殖メカニズム¹⁾²⁾

1. プロウイルスの誕生

脱核後ウイルスによって持ち込まれた tRNA をプライマーとしてウイルス逆転写酵

素 (RT) により RNA は逆転写 (revers transcription) され、2 本鎖 DNA が作られる。その後、まずアクチンと結合し、逆転写された 2 本鎖 DNA は、インテグラーゼ (IN: 宿主の染色体に己の DNA を組み込ませる)、マトリックス蛋白 (MA: Gag 蛋白の一部でエンベロープ内側に存在する)、Vpr 蛋白質 (細胞を G2/M 期に停止させ病原性にかかわる) などと複合体 (preintegration complex: PIC) を形成し、細胞内の微細管に沿って核膜を越えて核内に移動 (integration import) する。そしてこの IN の働きにより核内で宿主染色体 DNA 鎖に転位結合する (integration)。このようにして染色体上にできたウイルス DNA をプロウイルスという⁵⁾。

2. ウイルス RNA の合成と蛋白合成

染色体上にウイルス DNA を組み込むことにより、ウイルス遺伝情報は極めて安定となる。プロウイルスから合成されるウイルス RNA は、細胞染色体 DNA にコードされる mRNA と全く同じように合成され、これが己の子孫の設計図となる。ウイルス RNA へは NF- κ B などの細胞転写因子を使って変換される (transcription) が、1 分子のプロウイルスが、数千分子のウイルス RNA へ変換合成される。転写により合成されたウイルス RNA は、分子量の違いにより 2.0kb, 4.0kb, 9.2kb の分子がある。2.0kb は、低分子量であるので核膜孔を受動的に通過し、細胞質のリボゾームに達し、Tat 蛋白と Rev 蛋白質にそれ

ぞれ翻訳される。高分子 RNA である 4.0kb, 9.2kb の RNA は単独では核膜孔を通過できず、核外移行因子と RanGTPase と先に核外翻訳された Rev 蛋白の作用により能動的に核膜孔を通過でき (RNA export), ウイルス構造蛋白の翻訳 (translation) が実行される。

合成された蛋白のうち、ウイルス粒子を形作る Gag 蛋白と次の感染過程に必要な酵素群 (RT, IN) のそれぞれの前駆体 (GagPol) は、細胞質において多量体を形成し、さらに粒子内に package されるウイルス RNA と結合して (RNA encapsidation) 細胞質膜に移行する。そして、それを取り囲むエンベロープ蛋白質は ER, そしてゴルジ体を経て糖鎖修飾され、T 細胞では細胞質膜の脂質ラフトにおいて、マクロファージでは細胞内の late

endosome に輸送され encapsidation された RNA と会合し最終的にウイルス粒子として組み立てられる (assembly)。

3. 新たなウイルスの誕生

ゲノムが内包されたウイルス粒子が細胞内より細胞外に出芽 (budding) し遊離され、新たなウイルスが誕生する。この過程は、培養細胞で Gag を単独発現させるだけでウイルス様粒子が培養上清に産生させることがわかっており、出芽に必要な十分なエレメントは Gag に存在することが示唆されていた。HIV の機能領域は Gag 蛋白の C 末端の p6 領域がそれである。

また、これと相互作用する宿主因子としてリソゾームにおいて蛋白分解の過程に関わる ESCRT (endosomal sorting complex required

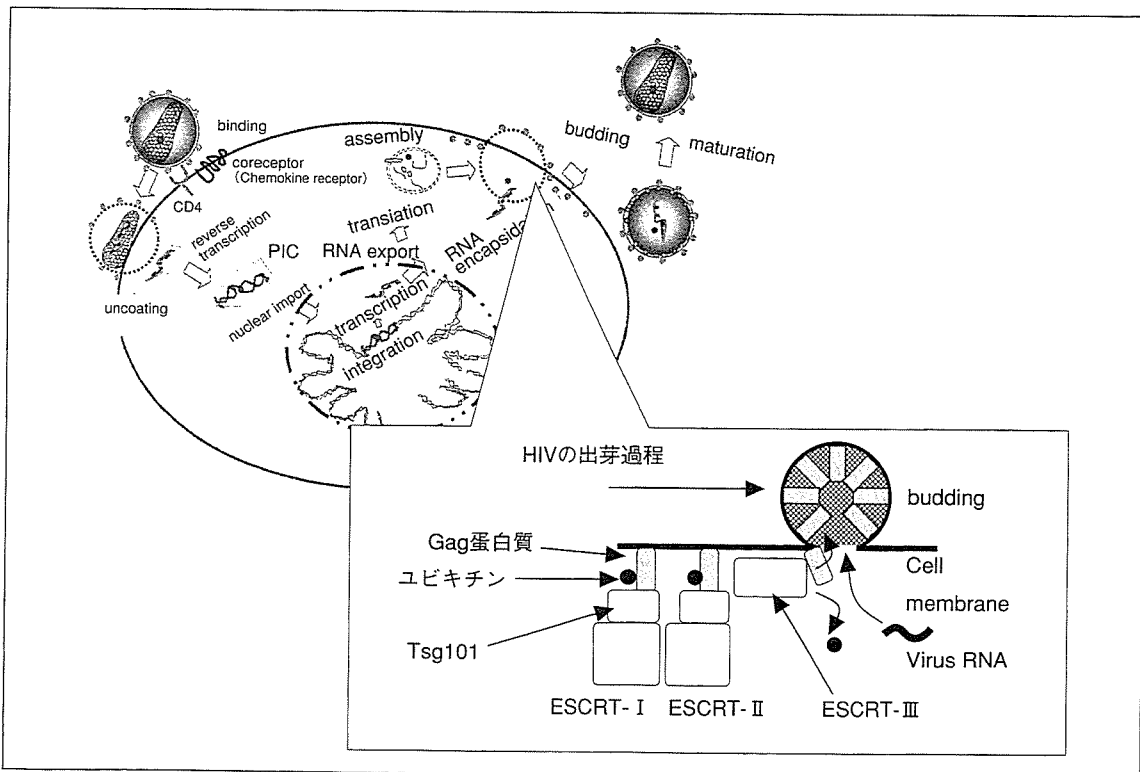


図3 HIVの増殖メカニズム

HIV の宿主細胞への結合 (binding) →脱核 (uncoating) →逆転写 (reverse transcription) →ウイルス DNA の核への移行 (nuclear import) →宿主 DNA への組み込み (integration) →プロウイルスからの転写 (transcription) →ウイルス RNA の核外移行 (RNA export) →翻訳 (translocation) →細胞膜での蛋白の集合 (assembly) →ウイルス RNA の取り込み (RNA encapsidation) →ウイルスの発芽 (budding) →成熟 (maturation) →再感染

for transport) -I の構成成分である Tsg101 (tumor susceptibility gene 101) が同定されている。Tsg101 の生理機能としては、細胞内分子輸送、転写制御、細胞周期調節がある。そして endosomal における Multivesicular body (MVB : エンドゾーム膜の内空側陥入によって形成される小胞) sorting に関わっている。MVB sorting とは、ある種のユビキチン化蛋白質を積み荷として認識しエンドゾーム膜に輸送した後 MVB に積み荷を封入するという細胞内輸送系である。普段は、われわれはこの過程を細胞表面のレセプター脱感作や、ある種の酵素のプロセッシングに使っている。ウイルスはこの小胞化形成を利用し発芽すると思われる。まず、ESCRT-I 構成因子の一つである Tsg101 は、MVB sorting の初期過程で働き直接ユビキチン化された Gag 蛋白 P6 蛋白質と結合し Gag と ESCRT-I の複合体を作り、ESCRT-II, ESCRT-III と連続に作用したのち AAA (ATPases associated with diverse cellular activities)-ATPase (蛋白分解, 膜融合, オルガレラの維持に関わる) である Vps4 により複合体が解体され小胞化形成される。この機構を HIV は細胞質膜で行い、小胞化形成すなわちウイルスの出芽となる (図 3)^{6,7)}。

4. ウイルスの成熟 (maturation)

細胞外に遊離後、ウイルス粒子内のプロテアーゼが活性化し、Gag 蛋白質、ならびに、Pol 蛋白質が切断され、それぞれ成熟ウイルス粒子を形成し、そして感染性ウイルスが次の標的細胞へ感染する。

おわりに

本稿では、前半でウイルス entry を中心に、また後半では侵入後の発芽機構を述べた。現在の治療薬と今後出現する薬剤の作用点の理解の一助となればと思う。

引用文献

- 1) Huang CC et al.: Structure of a V3-containing HIV-1 gp120 core. *Science* 310:1025-1028, 2005
- 2) Zhu P et al.: Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes. *Nature* 441: 847-852, 2006
- 3) Bailey JR et al.: Neutralizing antibodies do not mediate suppression of human immunodeficiency virus type 1 in elite suppressors or selection of plasma virus variants in patients on highly active antiretroviral therapy. *J Virol* 80:4758-4770, 2006
- 4) Xiao P et al.: Characterization of a CD4-independent primary HIV-I (投稿中)
- 5) Sherman MP et al.: Slipping through the door: HIV entry into the nucleus. *Microbes Infect* 4:67-73, 2002
- 6) 安田二郎: HIV 発芽と Tsg101. *ウイルス* 55: 281-286, 2005
- 7) Pornillos O et al.: Structure and functional interactions of Tsg101 UVE domain. *EMBO J* 21:2397-2406, 2002

著者連絡先

(〒980-8575)
宮城県仙台市青葉区青陵町 2-1
東北大学大学院医学系研究科感染症・呼吸器病態学分野
服部俊夫
[E-mail: hattori.t@rid.med.tohoku.ac.jp]

V. 総合研究報告書

主任研究者 菅村和夫 東北大学大学院医学系研究科 教授

分担研究者 石坂幸人 国立国際医療センター研究所 難治性疾患研究部

服部俊夫 東北大学感染症・呼吸器病態学分野 教授

A. 目的

2002 年の SARS のアウトブレイクは、各地でパニックに近い混乱を引き起こした。幸い現在のところ流行は終息しているが、800 人近い死者を出した。われわれは平成 16 年度より SARS ウイルス感染阻止化合物の探索を目的とした研究を開始し、SARS ウイルスの標的細胞の細胞内輸送体に関する研究、SARS ウイルス S 蛋白質の役割に関する研究、SARS ウイルス感染阻止化合物のスクリーニングを推進し、SARS ウイルスの感染機序の解明とその過程を阻害する有効な化合物の探索を行ってきた。

B. 方法

(1) SARS ウイルスの標的細胞の細胞内輸送体に関する研究

ウイルスの細胞内への取り込みの過程の解明を行う。そのためにエンドサイトーシス関連蛋白および小胞輸送関連蛋白の役割に着目した。小胞輸送関連蛋白の発現を阻害したノックアウト細胞あるいはノックダウンを樹立し、感染実験を行いこれらの蛋白質の役割の解明を試みた。

(2) SARS ウイルス S 蛋白質の役割に関する研究

精製した S 蛋白質を ELISA プレートに結合させたのちに部分精製した ACE-2 を作用させた。これを蛍光標識した抗 ACE-2 抗体を作用させ、蛍光プレートリーダーを用いて結合性をモニターした。さらに S または ACE-2 蛋白質をセンサ

ーチップに結合させ、ビアコア (Biacore J) を用いて候補化合物エキス中の結合性を解析する系を構築した。

(3) SARS ウイルス感染阻止化合物のスクリーニング

上記ビアコア、偽ウイルスおよび SARS ウイルス野生株 PUMC01 F5 を用いて、SARS ウイルス感染阻止化合物のスクリーニングを実施した。海洋微生物エキスと漢方薬エキスの感染抑制効果を検討し、漢方薬エキスに関しては、精製画分の感染抑制効果の検討も行った。

C. 結果

(1) SARS ウイルスの標的細胞の細胞内輸送体に関する研究

・clathrin 依存的 endocytosis を特異的に阻害する Chlorpromazine は SARS-CoV 偽ウイルスの侵入を濃度依存的に阻害した。また clathrin heavy chain (CHC) に対する siRNA 処理は偽ウイルスの侵入を約 40% 阻害し、SARS ウイルスの侵入がクラスリン依存性であることを示した。(菅村)

・SARS-Cov/HIV(SHP)偽ウイルス系により HepG2 が最も SARS-Cov の感染実験系に適した細胞株であることを見だし、また、本細胞株には caveolin がいないことも明らかにした。(服部)

(2) SARS ウイルス S 蛋白質の役割に関する研究

・S 蛋白質の作用により、標的細胞 ACE2 の細

胞外ドメインが培養液中に遊離(シェディング)することそれには宿主因子である TNF- α 変換酵素(TACE:TNF- α converting enzyme)が必要である事を明らかにした。この反応はTNFの産生を増強し、炎症を惹起すると思われる。(石坂)

(3) SARS ウイルス感染阻止化合物のスクリーニング

・約 4000 種類の海洋生物抽出エキスで、S 蛋白質と ACE-2 の結合検出を抑制し、偽ウイルス感染系も阻害する 2 種類を特定した。(石坂)

・桂皮エキスとそのエタノール分画及び丁子が SHPと感染性 SARS ウイルス(PUM01F5)を用いた感染系を抑制した。しかしこれらはVSV 感染も阻止した。(服部)

・桂皮エキスとそのエタノール分画は TfR の発現を増し、共焦点顕微鏡により TfR の取り込みを阻害することも示した。しかし丁子にはこのような作用は認められなかった。これらのことは、桂皮が、クラスリン依存性の経路を阻害する可能性を示唆した。(服部)

・桂皮エキスは、ウイルス感染阻害効果だけでなく、TNF- α 分泌誘導に対しても抑制的に作用する。(石坂)

D. 考察

(1) SARS ウイルスの細胞内での増殖機構の解明。

SARS ウイルスの細胞内侵入には ACE2 の発現のほか、クラスリン重鎖(CHC)の発現が相関する事が明らかになった。小胞輸送関連分子がウイルス増殖に影響していることがわかった。これは、小胞依存性のウイルス分解が抑制されるためであると考えられる。

(2) SARS ウイルスの細胞への吸着・侵入機構の解明。

S 蛋白質と ACE2 との結合において、桂皮エキスが ACE2 の遊離を促進することから、ACE2 が桂皮エキスのターゲットである可能性が示さ

れた。

(3) SARS ウイルス感染阻止化合物のスクリーニング

桂皮エキスと丁子エキスが HIV/SARS 偽ウイルスのみでなく、SARS ウイルス野生株の感染も抑制した。これらの漢方薬は実際に患者に投与されて効果のあったとされる薬であることから、これらの漢方薬が SARS ウイルス感染阻止化合物を含み、治療効果もあることが示された。

これらの成果をふまえて、今後以下のような研究が必要である。

(1)SARS-CoV 偽ウイルスが主に clathrin 依存的に細胞に侵入することを明らかにしたが、この侵入機構を病原性 SARS-CoV も利用していることを確認する。また、Hrs や STAMs などの小胞輸送関連分子欠損細胞を用いて、SARS-CoV 含む種々のウイルスの増殖制御を調べる。これらの結果を基に小胞輸送経路を標的とする抗ウイルス剤の開発を目指す。

(2) ACE-2 のシェディングは、SARS ウイルスの感染と呼吸器系症状の重症化が TACE を起点として、共通の分子基盤により誘導されていることを示唆する。現在、S 作用後の TNF- α 分泌の有無と TACE 活性化に関わる ACE2 の細胞内ドメインの責任領域を同定中である。

(3) 桂皮と丁子の精製と同定、精製された成分の評価を行う。精製は桂皮エキス500グラムから開始する。各種溶媒で抽出した後に、TLC、HPLCで精製する。

(4)各種分画の SARS-Cov 偽ウイルスの感染抑制、トランスフェリン発現上昇作用、TACE の抑制作用など多面的な生理活性物質を同定する。

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

平成18年度

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
(菅村和夫分)					
Kyuuma, M, Kikuchi, K, Kojima, K, Sugawara, Y, Sato, M, Mano, N, Goto, J, Takeshita, T, Yamamoto, A, <u>Sugamura, K</u> and Tanaka, N.	AMSH, an ESCRT-III Associated Enzyme, Deubiquitinates Cargo on MVB/Late Endosomes.	Cell Struct Funct	31	159-172	2006
Chen, S., Ishii, N., Ine, S., Ikeda, S., Fujimura, T., Ndhlovu, L. C., Soroosh, P., Tada, K., Harigae, H., Kameoka, J., Kasai, N., Sasaki, T. and <u>Sugamura, K</u>	Regulatory T cell-like activity of Foxp3 ⁺ adult T cell leukemia cells	Int. Immunol.	18	269-277	2006
Ishikawa, Y., Tanaka, N., Murakami, K., Uchiyama, T., Kumaki, S., Tsuchiya, S., Kugoh, H., Oshimura, M., Calos, M. P. and <u>Sugamura, K</u>	Phage fC31 integrase-mediated genomic integration of the common cytokine receptor gamma chain in human T-cell lines	J. Gene Medicine	8	646-53	2006
Satoh, K., Kagaya, Y., Nakano, M., Ito, Y., Ohta, J., Tada, H., Karibe, A., Minegishi, N., Suzuki, N., Yamamoto, M., Ono, M., Watanabe, J., Shirato, K., Ishii, N., <u>Sugamura, K.</u> and Shimokawa, H	Important role of endogenous erythropoietin system to recruit endothelial progenitor cells in hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice	Circulation	113	1442-1450	2006

Soroosh, P., Ine, S., <u>Sugamura, K.</u> and Ishii, N	OX40-OX40 ligand interaction through T cell-T cell contact contributes to CD4 T cell longevity	<i>J. Immunol</i>	176	5975-5987	2006
Uchiyama, T., Kumaki, S., Ishikawa, T., Onodera, M., Sato, M., Du, W., Sasahara, Y., Tanaka, N., <u>Sugamura, K.</u> and Tsuchiya, S	Application of HSVtk suicide gene to X-SCID gene therapy: Ganciclovir offsets gene corrected X-SCID B cells. <i>Biochem</i>	<i>Biophys. Res. Commun.</i>	341	391-8	2006
Nakashima, A., Tanaka, N., Tamai, K., Kyuuma, M., Ishikawa, Y., Sato, H., Yoshimori, T., Saito, S. and <u>Sugamura, K.</u>	Survival of parvovirus B19 infected cells by cellular autophagy	<i>Virology</i>	349	254-263	2006
Watanabe, R., Harada, Y., Takeda, K., Takahashi, J., Ohnuki, K., Ogawa, S., Kaibara, N., Koiwai, O., Tanabe, K., Toma, H., <u>Sugamura, K.</u> and Abe, R	Grb2 and Gads exhibit different interactions with CD28 and play distinct roles in CD28-mediated costimulation	<i>J. Immunol</i>	177	1085-1091	2006
Satoh, T., Moroi, R., Aritake, K., Urabe, Y., Kanai, Y., Sumi, K., Yokozeki, H., Hirai, H., Nagata, K., Hara, T., Utsumi, M., Hirokawa, K., <u>Sugamura, K.</u> , Nishio, K., Nakamura, M	Prostaglandin D2 plays an essential role in chronic allergic inflammation of the skin via CRTH2 receptor	<i>J. Immunol.</i> , in press			
(石坂幸人分)					

Hoshino S, Sun B, Konishi M, Shimura M, Segawa T, Hagiwara Y, Koyanagi Y, Iwamoto A, Mimaya J, Terunuma H, Kano S and <u>Ishizaka Y</u>	Vpr in plasma of HIV-1-positive patients is correlated with the HIV-1 RNA titers	<i>AIDS Res. Hum. Retrovir.</i> In press.			
Nakai-Murakami C, Shimura M, Kinomoto K, Takizawa Y, Tokunaga K, Taguchi T, Hoshino S, Miyagawa K, Sata T, Kurumizaka H, Yuo A and <u>Ishizaka Y</u>	HIV-1 Vpr induces ATM-dependent cellular signal with enhanced homologous recombination	<i>Oncogene</i>	26	477-486	2007
Tachiwana H, Shimura M, Nakai-Murakami C, Tokunaga K, Takizawa Y, Sata T, Kurumizaka H, <u>Ishizaka Y</u>	HIV-1 Vpr induces DNA double-strand breaks	<i>Cancer Res</i>	66	627-631	2006
(服部俊夫分)					
Zhang J and <u>Hattori T</u>	Small RNA molecules as therapeutic genes for viral infectious diseases.	<i>In Journal of Pharmacology and Toxicology</i>			in press
Osamu Usami, Yugo Ashino, Yuichi Komaki, Masafumi Tomaki, Toshiya Irokawa, Tsutomu Tamada, Tsunefusa Hayashida, Katsuji Teruya and <u>Toshio Hattori.</u>	Efavirenz induced neurological symptoms in rare homozygote CYP2B6 *2/*2 (C64T).	<i>International Journal of STD & AIDS</i>			accepted
服部俊夫、巽浩一郎、岩垣博己、佐久間光江	ウイルス感染とバイオデフェンス	Mebio 別冊	24	16-21	2007

Tamada T, Nara M, Tomaki M, Ashino Y, <u>Hattori T.</u>	Secondary bronchiolitis obliterans organising pneumonia in a patient with carbamazepine-induced hypogammaglobulinemia.	Throat	Jan;62(1)	100	2007
Nara M, Sano K, Ogawa H, Tamada T, Nagaoka M, Okada K, Watanabe M, Moriya T, Miki H, Nakata K, Ichinose M, <u>Hattori T</u>	Serum Antibody Against Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor and KL-6 in Idiopathic Pulmonary Alveolar Proteinosis	Tohoku J Exp Med	208(4)	349-54	2006
Usami, O., Xiao, P., Hong Ling, H. <u>Hattori, T</u>	Competitive Study of Monoclonal Antibodies Against the HIV-1 Gp41 Core Structure	Microbiology and Immunology	50	131-134	2006
Di Li, Hong-Xi Gu, Shu-Yun Zhang, Zhao-Hua Zhong, Min Zhuang, <u>Toshio Hattori</u>	YMDD mutations and genotypes of HBV in Northern China	J J Infectious Diseases	59	42-45	2006
Guio, H. Okayama, H. Ashino, Y. Saitoh, H. Xiao, P. Miki, M. Yoshijara, N. Nakanowata, S. <u>Hattori, T</u>	Method for efficient storing and transport of sputum specimens for molecular testing of tuberculosis	The Int J Tuberc Lung Dis	10 (8)	906-10	2006
服部俊夫、芦野有悟、宇佐美修、古田里佳	HIVの感染と増殖のメカニズム	診断と治療	94	2208-2212	2006
Ashino J, Ashino Y, Guio H, Saitoh M, Mizusawa M, <u>Hattori T</u>	Low antibody responses against TBGL in elderly gastrectomized tuberculosis patients	The Int J Tuberc Lung Dis	9	1052-1053	2005
服部俊夫	SARSを含む新興感染症	日本内科学会雑誌	94(9)	1915-1920,	2005