

厚生労働科学研究費補助金  
エイズ対策研究事業

# HIV 感染とエイズ発症の阻止および 治療に関する基礎研究

平成18年度 総括・分担研究報告書

平成19年 3 月

主任研究者 佐 多 徹太郎  
(国立感染症研究所)

平成18年度エイズ対策研究事業  
「HIV感染とエイズ発症の阻止および治療に関わる基礎研究」班  
班員名簿

佐多徹太郎	国立感染症研究所・感染病理部	部 長
横田 恭子	国立感染症研究所・免疫部第1室	室 長
田中 勇悦	琉球大学医学部・感染免疫学	教 授
宮澤 正顯	近畿大学医学部・免疫学教室	教 授
神奈木真理	東京医科歯科大学大学院・医歯学総合研究科・免疫治療学研究室	教 授
有吉 紅也	長崎大学熱帯医学研究所・感染症予防治療分野	教 授
塩田 達雄	大阪大学微生物病研究所	教 授
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	部 長
徳永 研三	国立感染症研究所・感染病理部	主任研究官
岩本 愛吉	東京大学医科学研究所・先端医療研究センター	教 授
小柳 義夫	京都大学ウイルス研究所	教 授

# 目 次

## I. HIV 感染とエイズ発症の阻止および治療に関わる基礎研究

総括研究報告書（平成 18 年度） . . . . . 1

主任研究者：佐多 徹太郎（国立感染症研究所・感染病理部）

## II. 分担研究報告書

1. HIV 脳症病態の解析 . . . . . 5

分担研究者：佐多 徹太郎（国立感染症研究所・感染病理部）

2. 抗 HIV 免疫応答を左右する抗原提示機能に関する解析 . . . . . 11

分担研究者：横田 恭子（国立感染症研究所・免疫部第 1 室）

3. 免疫誘導性および免疫寛容性樹状細胞の分化培養と HIV-1 増殖調節への応用 . . . . . 15

分担研究者：田中 勇悦（琉球大学医学部・感染免疫学）

4. HIV 感染抵抗者で働く宿主遺伝子の同定と HIV 感染防御免疫の増強法 . . . . . 19

分担研究者：宮澤 正顕（近畿大学医学部・免疫学教室）

5. 生体分子を介する HIV-1 感染抵抗性 . . . . . 25

分担研究者：神奈木 真理（東京医科歯科大学大学院・医歯学総合研究科・  
免疫治療学研究室）

6. CRF01\_AE 株由来 Gag タンパクにおける細胞障害性 T 細胞 (CTL) エピトープ  
に関する研究 . . . . . 29

分担研究者：有吉 紅也（長崎大学熱帯医学研究所・感染症予防治療分野）

7. HIV-1 感染病態に関わる宿主因子の解析 . . . . . 37

分担研究者：塩田 達雄（大阪大学微生物病研究所）

8. HIV-1 感染に伴うゲノム DNA 二重鎖切断の分子機構と潜伏感染細胞からの ウイルス再産生における自然免疫シグナル伝達の関与 . . . . .	4 1
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）	
9. ヒト宿主因子 APOBEC3G の HIV-1 感染病態制御と HIV-1 Vif による 回避機構の解明 . . . . .	4 5
分担研究者：徳永 研三（国立感染症研究所・感染病理部）	
10. エイズ発症阻止に関わる宿主因子・病態の研究 . . . . .	5 3
分担研究者：岩本 愛吉（東京大学医科学研究所・先端医療研究センター）	
11. HIV 感染による中枢神経組織破壊メカニズムの解明 . . . . .	5 7
分担研究者：小柳 義夫（京都大学ウイルス研究所）	
III. 研究成果に関する刊行一覧表 . . . . .	6 3

# I. 総括研究報告書

## 総括研究報告書

# HIV 感染とエイズ発症の阻止および治療に関わる基礎研究

主任研究者 佐多 徹太郎 国立感染症研究所感染病理部 部長

研究要旨 本研究班では、HIV 感染病態の基礎的な解析に焦点をあて、そこから得られる情報をもとに、感染防御免疫の増強、そして抗 HIV 薬剤やワクチンの開発に役立てることを目的とし、HIV 感染免疫防御機構、HIV 感染に関わる自然免疫等の宿主因子の解析、HIV 感染病態の解明を3本の柱として、HIV 感染やエイズ発症の阻止や治療に繋がる基礎的研究を行う。本年度の研究結果は以下の通りである。HIV 増殖抑制により Gag 特異的 CD4+T細胞増殖応答を回復させた。Treg 誘導性 DC の分化培養方法を確立し、ある環境下では、Treg が HIV-1 の感染増殖を抑制する機能をもつことを明らかにした。HIV 曝露非感染者の持つ第 22 染色体の遺伝的特徴を、特定の遺伝子の発現調節領域多型としてほぼ同定した。HIV-1 Nef は自然免疫応答を抑制し HIV-1 感染を有利にする可能性がある。CRF01\_AE 株の Gag CTL エピトープを新たに 6 箇所発見した。HIV-1 に曝露されながらも感染を免れている人には遺伝子多型が 12 箇所見出された。HIV-1 陽性患者血中に Vpr を見出した。HIV-1 Vif 蛋白の抗 A3G 活性はサブタイプによって異なり、プロテアソーム分解能に相関していることを見出した。HIV 感染者血漿中の IP-10 が血中 HIV 量と相関することを見出した。エイズ患者の神経細胞分化抑制の過程の詳細なメカニズムが明らかになりつつある。神経・グリア細胞にウイルス遺伝子が組み込まれ、ウイルス由来蛋白が発現するとその細胞ないし周囲の細胞がアポトーシスをおこすことが示唆された。

### 分担研究者：

横田 恭子 国立感染症研究所室長  
田中 勇悦 琉球大学医学部教授  
宮澤 正顯 近畿大学医学部教授  
神奈木 真理 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科教授  
有吉 紅也 長崎大学熱帯医学研究所教授  
塩田 達雄 大阪大学微生物病研究所教授  
石坂 幸人 国立国際医療センター研究所部長  
徳永 研三 国立感染症研究所主任研究官  
岩本 愛吉 東京大学医科学研究所教授  
小柳 義夫 京都大学ウイルス研究所教授

感染病態の基礎的な解析に焦点をあて、得られる情報をもとにして、感染防御免疫機構の増強、そして抗 HIV 薬剤やワクチン開発に役立てることが必要である。

1) HIV 感染免疫防御機構：樹状細胞による抗原提示は抗原特異的 T 細胞の活性化と同時に潜伏 HIV を再活性化すると想定されるため、HIV 増殖と活性化 T 細胞の性状を同時に解析して樹状細胞 (DC) による抗原提示機能の増強と HIV 増殖制御を図る (横田)。免疫応答を調整する DC 群の分化培養法を確立し、in vivo の T 細胞免疫応答の調節能および HIV-1 の増殖調節能を比較することにより、新たなエイズ予防および治療法の開発に寄与する (田中)。HIV 曝露非感染者の遺伝的特徴として第 22 染色体の特定の遺伝子が曝露非感染者でのみ強く発現していることを見出したので、その発現

### A. 研究目的

HAART の開発により HIV 感染者の予後は著明に改善されたが、薬剤の長期投与と長期毒性、服薬遵守の不徹底と薬剤耐性ウイルスの出現など深刻な問題が生じている。今一度、HIV

調節機構を解明し免疫治療に役立てる(宮澤)。HIV-1 抑制状態を誘導する細胞分子およびシグナルの検索と HIV-1 抑制機序解析を行い、生体分子を標的とした HIV-1 複製抑制方法を確立し感染防御を達成する(神奈木)。エイズ進行遅延型 HIV 感染者に特異的な CTL エピトープを発見し、その抗原提示効率を評価し、ワクチン開発に役立てる(有吉)。2) HIV 感染に関わる自然免疫等の宿主因子の解析: HIV-1 感染者ならびに非感染者の遺伝的多型を検討し、エイズの病態進行の予測を可能にし、感染防御に関わる未知の宿主因子を明らかにする(塩田)。ゲノム DNA の二重鎖切断(以下 DSB)と IKK 依存的なシグナル伝達機構を明らかにし、マクロファージ感染に対して阻害効果を示す因子の開発に向けた情報を得ることにより、新たな創薬の可能性が期待される(石坂)。APOBEC3G および HIV-1 Vif 蛋白による宿主の防御機構とウイルスの回避機構について検討し、自然免疫増強する薬剤の開発やワクチン、遺伝子治療に資する(徳永)。3) HIV 感染病態の解明: HIV 感染症の自然経過および治療による病態修飾に関連した HIV 特異的 CTL を解析し、エイズ発症阻止や治療法の向上に結実させる(岩本)。HIV が感染した中枢神経組織内における、神経組織の機能維持と神経細胞の分化成熟過程への影響を明らかにし、エイズ脳症の発症機序を解析する(小柳)。HIV 脳症の病態について in vitro 培養系を用いて解析し、発症阻止、予防および治療に重要な知見を見出す(佐多)。

これらの基礎研究で得られる知見から新たな治療等への方策が得られれば、現在の問題が改善され、エイズ対策全般に役立てられる。

## B. 研究方法

1) HIV 感染免疫防御機構: 抗原特異的 T 細胞株を効率よく樹立する方法を確立し、抗原提示機能について解析する(横田)。強力な免疫誘導活性をもつ DC と免疫抑制性 DC の培養方法を開発する(田中)。ヒト第 22 染色体遺伝子エンハンサー領域の多型の機能性を検定する。また遺伝子組み換えマウスでの解析を行う(宮澤)。CD28-B7, TLR ファミリーを含む免疫関連分子群の抗体あるいは可溶性抗原を用いて

CD4 陽性細胞およびマクロファージの HIV-1 複製を抑制する分子を調べて活性を確認する(神奈木)。15 アミノ酸領域まで CTL エピトープ領域を同定する。臨床株 gag 発現ベクターの作成を行う(有吉)。

2) HIV 感染に関わる自然免疫等の宿主因子の解析: タイランパンコホートの HIV-1 感染者の性的パートナーで HIV-1 陰性者の遺伝子多型 1 万箇所について解析し、HIV-1 感染感受性に関わる新たな遺伝子多型を見出す(塩田)。Vpr による DSB 誘導に必須の領域を明らかにする(石坂)。HIV-1 サブタイプ A・B・C・A/E・A/G 由来の Vif の APOBEC3G に対する抑制活性を検討し、その差異とその原因機序を解明する(徳永)。

3) HIV 感染病態の解明: 少量の末梢血から HIV 特異的 CTL の発現・機能解析を行う系を確立し、蛍光マイクロアレイシステムを用いて血中液性因子を検討する(岩本)。神経細胞障害性ならびに神経細胞の分化能の検討を行う(小柳)。エイズ脳症におけるウイルスが神経・グリア細胞に感染することの意義を明らかにする(佐多)。

(倫理面への配慮)

臨床材料の提供を受ける場合は、研究目的やその為に必要な事項、いつでも研究から離脱できること等を文書によって患者に説明し、書面でインフォームドコンセントを得る。各施設の倫理委員会による倫理審査を受け、承認を得る。また患者情報の保管に関しては個人情報保護法に基づき漏洩のないように管理を徹底する。動物実験は各施設の実験動物委員会の承認を受け、動物愛護の精神に則り、動物に与える苦痛の軽減と排除に勤める。

## C. 研究結果

1) HIV 感染免疫防御機構: LTR/Nef 領域 shRNA 発現レンチウイルスを用い、慢性 HIV 感染者の Gag に対する CD4+T 細胞増殖応答はウイルス増殖抑制により回復可能であることを示した(横田)。HIV 曝露非感染者で、HIV 抗原刺激後特異的に発現が上がる第 22 染色体の二つの遺伝子の発現調節機構を解明するため、これらを含むゲノム領域の網羅的塩基配列

決定を行い、一方の遺伝子の調節領域に塩基置換の集積を見出した(宮澤)。Primary マクロファージ、NK 細胞およびNK 感受性細胞を用いて細胞間相互作用の実験系を作成し、HIV-1 感染を抑制する自然免疫応答条件を見出した。Nef が間接的に阻害する可能性を示した(神奈木)。CRF01\_AE 株の Gag CTL エピトープを新たに 6 箇所発見した。北タイ HIV コホート 長期生存者の CTL 認識パターンを経時的に観察した。HLA 情報のある夫婦 114 組 228 名の gag シーケンスを完了した。CRF01\_AE gag 遺伝子発現系の作製を試みた(有吉)。

2) HIV 感染に関わる自然免疫等の宿主因子の解析: タイランパンの HIV 感染者の性的パートナーでありながら HIV 陰性の 32 名と HIV 感染者 36 名について、ゲノムワイドスクランニングを行って遺伝子多型 1 万箇所を検討し、有意差がある多型が 12 箇所見出された(塩田)。HIV-1 陽性 52 症例中 20 例の血漿中に数 ng/ml の Vpr を検出した。Vpr 検出とウイルス価の間には正の相関が認められた。1 nM のリコンビナント Vpr を培養系に添加するとゲノム DNA 二重鎖切断(DSB: double strand breaks)が誘導され、C 末端 12 個のアミノ酸を欠失させると DSB 誘導能は激減した。また潜伏感染細胞である U1 細胞に対してウイルス産生を誘導しなかった(石坂)。HIV-1 サブタイプ間で Vif 蛋白の抗 A3G 活性の違いが認められた。Vif の抗 A3G 活性の強弱は、G→A 変異出現頻度と完全に逆相関することが分かった。抗 A3G 活性の違いは Vif の A3G プロテアソーム分解能の違いに起因することが明らかになった(徳永)。

3) HIV 感染病態の解明: HIV 感染者血漿中の IP-10 が血中 HIV 量と相関することが明らかになった。少数の細胞で遺伝子発現を解析するシステムを考案した(岩本)。HIV 感染マクロファージにより神経組織内の細胞間配位に障害が起こることがわかった。神経細胞分化障害としてラメリポディア形成には異常はないが、樹状突起の成長と軸索突起の極性決定過程が障害された(小柳)。神経・グリア細胞に SIV 遺伝子が組み込まれ、SIV 由来蛋白が発現するとその細胞ないし、周囲の細胞がアポトーシスをおこす可能性が示唆された(佐多)。

## D. 考 察

1) HIV 感染免疫防御機構: HIV 増殖抑制性 shRNA 発現レンチウイルスにより慢性感染者の Gag 特異的 CD4+T 細胞増殖応答が回復したことは、体内(細胞内) HIV の増殖抑制がエイズの治療上重要であることを示唆する(横田)。ヒト単球を IFN-beta と IL-4 で培養すると、IL-10 産生 Treg 誘導性 DC へと分化することは新たな発見であるが、さらに研究が必要である(田中)。遺伝子発現の調節が感染抵抗性に関与すると考えられる(宮澤)。Nef が初感染時の自然免疫応答を抑制することにより HIV-1 複製を有利にしていることを示唆した(神奈木)。

2) HIV 感染に関わる自然免疫等の宿主因子の解析: 1 万箇所の多型を同時に比較しているため、より大規模な集団で検討し直す必要がある(塩田)。Vpr が積極的にエイズ病態に関与していることが示唆された(石坂)。サブタイプによる伝播効率の違いに A3G 活性の違いが関係している可能性が推察された(徳永)。

(3) HIV 感染病態の解明: さらに解明を進めるために少量の血液から遺伝子発現のマикроアレイ解析を大幅に拡張できるシステムに移行する必要がある(岩本)。HIV の Vpr が神経細胞軸索伸長阻害因子となりかつミトコンドリアの機能低下が伴っていることから、この機能を改善することが治療に関わるかもしれない(小柳)。神経・グリア細胞に潜伏感染している SIV は神経・グリア細胞障害に関与することが示唆された(佐多)。

## E. 結 論

HIV 感染免疫防御機構における Gag 特異的 CD4+T 細胞の役割や DC の機能解析、感染抵抗性に関わる遺伝子等が明らかにされた。HIV 感染に関わる自然免疫等の宿主因子の解析では、HIV 感染防御に関わる遺伝子多型、Vpr ないし APOBEC の機能解析から新しい知見が得られた。HIV 感染病態の解明では、種々のサイトカインの発現や、エイズ脳症の発症に関わる病態が明らかにされた。



F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表

各分担研究者の報告書参照。

2. 学会発表

各分担研究者の報告書参照。

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

## II. 分担研究報告書

# 1. HIV 脳症病態の解析

分担研究者 佐多徹太郎 国立感染症研究所感染病理部 部長  
研究協力者 中島典子 国立感染症研究所感染病理部 主任研究官

研究要旨 多剤併用療法 (HARRT) によりヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染症の死亡率は低下したが、HIV 脳症の罹患率は増加し、HIV 患者のおよそ 30% に併発している。脳症による神経障害は無症候期から出現するが、その病態はいまだ明らかではない。ウイルスは感染初期に中枢神経系に侵入し、主に血管周囲マクローファージ・ミクログリアに感染し、神経・グリア細胞での感染は制限されている。そのため HIV 感染による神経障害は主に感染したマクローファージ・ミクログリアが分泌する因子による間接障害であると考えられている。本研究では、SIV が単球由来細胞の非存在下で神経・グリア細胞にどのように作用するかについて神経・グリア細胞のみから構成されるサル胎仔脳由来前駆細胞培養系を用いて解析した。具体的には VSVG でシュードタイピングした SIV  $\Delta$ E/vsvg を感染 (single round infection) させた後、神経・グリア細胞に誘導されるサイトカイン、ケモカイン、シグナル伝達系 (MAP キナーゼ系)、アポトーシス関連蛋白の誘導について解析した。感染 24 時間後より SIV 由来蛋白の発現が確認され、培養上清中の MCP-1 値が IP-10 に先立って増加した。細胞中の TNF $\alpha$ -RNA 値は 48 時間後にコントロールと比較して高値となったが、蛋白レベルでは検出感度以下であった。MAPK シグナル伝達系では活性型 ERK が経時的に増加するのがわかった。SIV  $\Delta$ env/vsvg 感染細胞では、アポトーシス関連蛋白である p53 蛋白の発現と TUNEL 陽性細胞の増加が認められた。

## A. 研究目的

HIV 脳症およびその動物モデルである SIV 脳症では、虚血性脳疾患や脳神経変性疾患と同様に神経及びグリア細胞がアポトーシスをおこすことが知られている。本研究では、神経・グリア細胞のみから構成されるサル胎仔脳由来前駆細胞培養系に SIV  $\Delta$ E/vsvg を感染させることで SIV 由来蛋白を多くの細胞に intracellular に発現させ、どのようなケモカイン・サイトカインの発現が誘導されるか、どのようなシグナル伝達系が関与するか、また神経あるいはグリア細胞がアポトーシスを起こすかについて解析し、SIV の神経・グリア細胞障害について検討した。

## B. 研究方法

1) サル胎仔脳前駆細胞 (BPCs) 由来の培養系

在胎 11 週のカニクイザルの胎児脳を摘出後、細切し、EGF (上皮増殖因子)、FGF (線維芽細胞増殖因子) を含む無血清培地で培養し、BPCs を選択培養した (Neurosphere 法)。増殖継代した BPCs を増殖因子を取り除き、血清を添加した培地中で、poly-O をコートした 6 ウェルプレート (5x10<sup>5</sup> 個/ウェル) に接着することにより分化誘導した。

## 2) SIV17 $\Delta$ E/vsvg の感染

pSIV17  $\Delta$ E と pVsvg、pCAG-HIVgag-pol と pCMV-vsvg-RSV-Rev を 293T 細胞にコトランスフェクションし、48 時間後の培養上清を DNase 処理後、超遠心して接種材料 (SIV  $\Delta$ E/vsvg と vehicle) を作製した。またプラスミド(-) を mock とした。100ng の SIV p27 量相当の SIV17  $\Delta$ E/V を接種量とした。これと同等の vsvg 量含有する vehicle の HIVp24 量をウエスタン

プロットと ELISA 法でもとめ、vehicle の接種量を決定した。分化誘導した BPCs に SIV17 Δ E/V、vehicle、mock を感染させて、3 時間後に細胞を PBS で 3 回洗い、新しい培地を添加し培養した。感染前、感染後 3、24、48、72、96、168 時間ごとに経時的に上清と細胞を回収して -20°C に保存し、後日図 1 に示したような解析を行った。

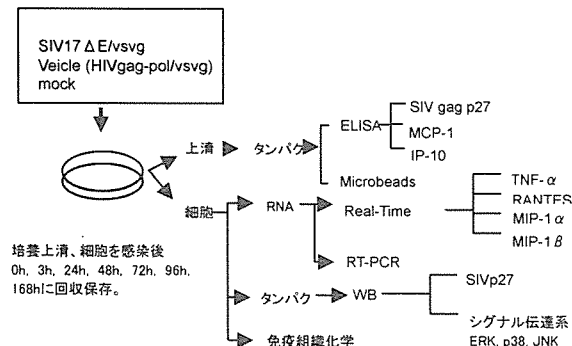


図 1

### 3) SIV Δ E の発現

BPCs 由来の神経・グリア細胞における SIV17 Δ E/vsvg の感染効率を調べるために、SIV Δ E Δ nef-GFP/vsvg を感染させ GFP の発現を蛍光顕微鏡下で観察した。RT-PCR 法で SIV-tat mRNA の発現を、ELISA 法で上清中の SIVgagp27 蛋白を、ウエスタンブロッティング法で細胞中の SIV-nef 蛋白を確認した。

### 4) ケモカイン・サイトカインの測定

**ELISA 法**：回収した培養上清中の SIV p27 gag 蛋白量(coulter)、ケモカイン CCL2/MCP-1(R&D)および CXCL10/IP-10(R&D)を各々 ELISA 法にて測定した。

**蛍光マイクロビーズアッセイ**：培養上清中のケモカイン (CXCL8/IL-8、CCL2/MCP-1、CCL5/RANTES、CCL3/MIP1-α、CCL4/MIP1-) を市販されている MultiPlex kit(BIOSOURCE) および蛍光マイクロビーズアレイシステム (Luminex)にて測定した。

**定量 RT-PCR 法**：TNF-α、MIP1-α、MIP1-β、GAPDH のスタンダード系列を作製し、サンプルと共に ABI PRISM 7900 HT Sequence Detection System で定量した。得られたサンプル

の DNA のコピー数を、GAPDH のコピー数を基準として標準化した。

### 5) シグナル伝達系

MAPK のリン酸化、p53 の発現量についてウエスタンブロットで解析した。抗 p53、抗 ERK1、抗 ERK1/2、抗 pan-JNK、抗 JNK、抗 p38α、抗 p38 抗体(以上すべて BD)、抗 β-actin 抗体 (SIGMA)を一次抗体として使用した。2次抗体 (抗マウス IgG HRP (Amersham))と反応後、ECL 法で発色させ、LAS-3000(FUJIFILM)で検出した。

### 6) 免疫組織化学

細胞を 4%PFA/PBS で固定し、0.1%triton/PBS で処理後、1次抗体 (マウスモノクローナル抗 p53 抗体、抗 Tuj 抗体、抗 SIVgagp27 抗体、ラビットポリクローナル抗 GFAP 抗体)、2次抗体 (Alexa488 抗マウス IgG 抗体、Alexa568 抗ラビット IgG 抗体) と反応させた。核染色は Hoechst33258 で行った。

### 7) アポトーシスの検出

感染 7 日目の細胞を 4%PFA/PBS で固定し TUNEL 法 (Roche) にてアポトーシス陽性細胞を検出した。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、当研究所動物実験委員会の許可のもとに行った。

## C. 研究結果

### 1) SIV Δ E Δ nef-GFP/vsvg 感染効率

SIV Δ E Δ nef-GFP/vsvg 感染後 24~48 時間後から蛍光顕微鏡下で GFP の発現が観察され始めた。SIV Δ E Δ nef-GFP/vsvg 感染 72 時間後の GFP 発現細胞 (図 2 a、e) は 1 視野の全細胞 (図 2 b、f) あたり 58% (図 2a、b)、40% (図 2e、f) であった。ほとんどが GFAP 陽性細胞であり、Tuj 陽性細胞 (神経細胞) で GFP を発現しているものは 1 視野に 0~1 個のみであった。BPC 由来神経・グリア細胞培養系の 40%以上の細胞に VSVG を介して SIV Δ E が導入され、そのほとんどが GFAP 陽性細胞 (アストロサイト) であることがわかった。

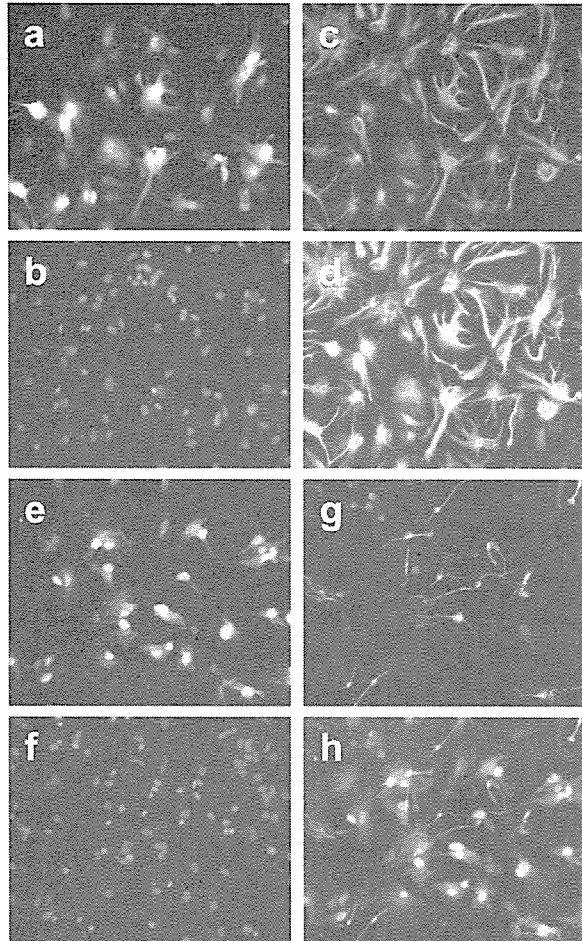


図 2. SIV  $\Delta$ env  $\Delta$ nef-GFP/vsvg 感染 72 時間後の GFP 発現 (a, e)、Hoechst33258 (b, f)、GFAP (c)、Tuj1 (g)

## 2) SIV17 $\Delta$ E/V 感染細胞中の tat 遺伝子、gag 及び nef 蛋白の発現

SIV17  $\Delta$ E/V を感染させた神経・グリア細胞からグアニジン法により RNA を抽出し、RT-PCR 法にて SIV-tat mRNA の発現を調べた。その結果、感染後 24 時間後以降に SIV-tat の mRNA が検出され始めた。また経時的に回収した培養上清の SIV-gag 抗原量の変化を ELISA で定量した結果、感染 72 時間後以降に gag 抗原量が増加し始めた。細胞を感染後 6 日後に固定して、SIV-gag 蛋白の発現を免疫組織化学で確認した結果、GFAP 陽性細胞で SIVgag が発現していることがわかった (図 3)。また経時的に回収した培養細胞中の SIV-nef 蛋白をウェスタンブロッティングで解析した結果、感染後 72 時間後以降に培養上清中の SIV-nef 蛋白が検出された。

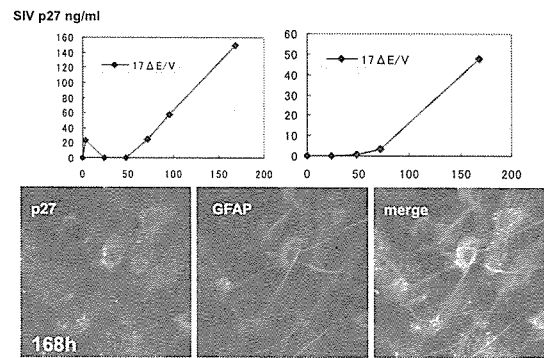
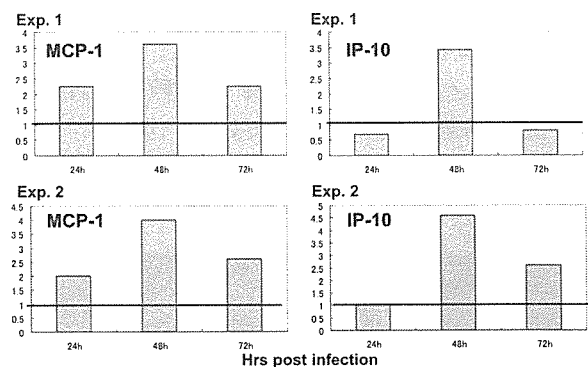


図 3. SIV17  $\Delta$ E/V 感染細胞培養上清中の SIVp27 の経時変化及び感染 6 日目の細胞での発現

## 3) SIV17 $\Delta$ E/V 感染神経・グリア細胞培養上清中のケモカイン量

SIV17  $\Delta$ E/V 感染細胞の培養上清中の MCP-1、IP-10 量は vehicle と比較して感染 48 時間後に高値を示した。MCP-1 は IP-10 よりも早く 24 時間後より上昇した (図 4)。マイクロビーズアレイシステム Luminex を用いて、培養上清中のその他のケモカインである IL-8、MCP-1、RANTES、MIP1- $\alpha$ 、MIP1- $\beta$  を調べたところ、MCP-1 に関しては ELISA と同様の結果を得た。



$$\text{Fold increase} = \frac{\text{SIV } \Delta\text{E/V 感染時のケモカイン量}}{\text{vehicle 感染時のケモカイン量}}$$

図 4. 培養上清中の MCP-1、IP-10 量の変化

## 4) SIV17 $\Delta$ E/V 感染神経・グリア細胞に誘導されるサイトカイン・ケモカイン mRNA の定量

SIV17  $\Delta$ E/V を感染させた神経・グリア細胞中の TNF- $\alpha$ 、MIP1- $\alpha$ 、MIP1- $\beta$  の mRNA の発現量をリアルタイム PCR で定量した。TNF- $\alpha$ 、MIP1- $\alpha$ 、MIP1- $\beta$  とも 48 時間後に vehicle と比べて高値をとった。

## 5) MAPK の活性化および p53 蛋白の経時的な変化

SIV17 $\Delta$ E/V の感染による神経・グリア細胞内のシグナル伝達系の動態を解析するために、代表的な MAPK である ERK1/2、JNK、p38 とそのリン酸化型をウエスタンブロッティングにより解析した。リン酸化 ERK の発現量が vehicle と比較して経時的に増加していった。リン酸化 p38 及びリン酸化 JNK に関しては vehicle と比較して優位な差は見られなかった (図 5)。

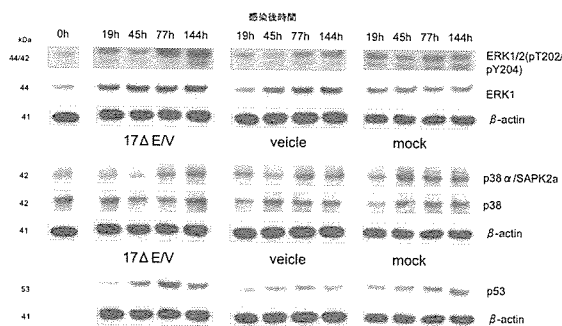


図 5. MAPK、リン酸化 MAPK、p53 蛋白の発現

## 6) SIV17 $\Delta$ E/V 感染によるアポトーシス

ウエスタンブロッティングと免疫組織化学及び TUNEL 法により解析を行った。ウエスタンブロッティングでは vehicle と比較して経時的に p53 の発現量が増加していき (図 4)、免疫組織化学と TUNEL では感染 7 日後に p53 が強発現しているアストロサイトが見られた (図 6)。

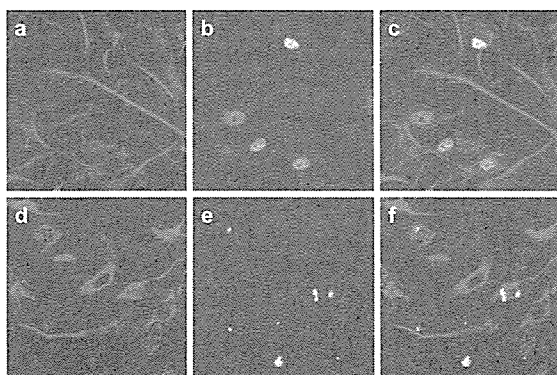


図 6. SIV17 $\Delta$ E/V 感染 7 日後神経・グリア細胞 GFAP 陽性細胞 (a, d)、p53 (b)、TUNEL 陽性 (e)、merge (c, f)

## D. 考察

サル胎仔脳由来前駆細胞を 1%FBS 添加培地で培養すると分化誘導され、GFAP 陽性細胞 (アストロサイトおよび一部の神経細胞) が

80~90%、Tuj 陽性細胞 (神経細胞) が 20~40% の混合培養系を得ることができる。我々はこの神経・グリア細胞培養系を用いて中枢神経系における SIV の感染動態を解析している。現在までの研究で SIV/17E-Fr に感受性のある GFAP 陽性細胞がこの培養系に存在することがわかっているが、その割合が小さいため神経・グリア細胞に誘導されるケモカイン等の詳細な解析や神経・グリア細胞の機能障害等を評価することは困難である。そこで本研究では SIV/17E-Fr を vsvg でシュードタイピングした SIV17 $\Delta$ E/V が神経・グリア細胞に感染後引き起こす変化を解析した。まず SIV17 $\Delta$ E $\Delta$ nef-GFP/V の感染によって、GFP を発現する細胞のほとんどが GFAP 陽性細胞で Tuj 陽性細胞は非常に少ないことがわかった。すなわち、この混合培養系で SIV 由来蛋白を発現しているのは主にグリア細胞であると考えられる。感染 24 時間以内に SIV-tat 遺伝子が転写されはじめ、24~48 時間後より SIV 蛋白が合成されるのが確認された。MCP-1 と IP-10 は SIV 脳炎サルや HIV 脳症患者の脊髄液や脳組織で高値をとるケモカインであるが、*in vitro* でも SIV 感染によりサルミクログリアに誘導されることがわかった (投稿準備中)。神経・グリア細胞でも図 3 に示したように両ケモカインとも vehicle と比較して高値であったが、MCP-1 の方がより早く (24 時間後から) 誘導されることがわかった。培養上清中の MIP1- $\alpha$ 、MIP1- $\beta$  および炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  に関しては、ELISA 法で vehicle と差がなかったが、細胞中の mRNA 量は定量 PCR 法で 48 時間後に vehicle の 4 倍以上であった。シグナル伝達系ではコントロールと比較して SIV17 $\Delta$ E/V 感染により ERK が活性化することがわかった。一方 p38MAPK、JNK のリン酸化に関しては有意差はなかった。ERK は活性化すると転写因子などをリン酸化し、遺伝子発現を調節することで細胞の分化や増殖などを制御していると考えられおり、p38、JNK は細胞周期の停止、アポトーシス、癌化に関係しているといわれているが、ERK が神経細胞死やアポトーシスにも関与しているという報告もある。SIV 感染ブタオザルの脳症モデルにおいて感染早期にはアストロサイトで ERK が有意に活性化し、中期か

ら p38 や JNK の活性型がミクログリアやアストロサイトで検出され始めるという報告がある。また HIV-1tat のリコンビナントナント蛋白が in vitro で血管内皮細胞の ERK のリン酸化を誘導し、内皮細胞の細胞周期を進行させるという報告もある。p53 蛋白が vehicle と比較してより多く発現し、免疫組織化学でも検出された結果については、p53 のリン酸化、アポトーシスとの関連についてなど、より詳細な検討が必要である。HIV 関連神経障害に p53 pathway が関与しているという報告はあるが、これらは HIV-1-env(gp120)が関係している。本研究から得られた結果の相互の関連性については現段階では不明である。しかしながら SIV 蛋白を導入した場合に神経・グリア細胞にもたらす変化をいくつか明らかにすることができた。今後はこれを足掛かりとしてさらに詳細に解析し、脳症を引き起こす因子・メカニズムを解明し脳症発症を予防・阻止する方法を見出したいと考えている。

#### E. 結 論

神経・グリア細胞のみから構成されるサル胎仔脳由来前駆細胞培養系に VSVG でシュードタイピングした SIV  $\Delta$ env/vsvg を感染 (single round infection) させると MCP-1 および IP-10 が分泌され、細胞内の ERK-MAPK が活性化することがわかった。

#### F. 健康危険情報

とくになし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Iwata N, Yoshida H, Tobiume M, Ono F, Shimazaki T, Sata T, Nakajima N: Simian fetal brain progenitor cells for studying viral neuropathogenesis. *J Neurovirol* 13: 9-20, 2007.

##### 2. 学会発表

1) Nakajima N, Sata T: Simian immunodeficiency virus infection in simian fetal brain progenitor cells and microglial cells. 7<sup>th</sup> International Symposium on NeuroVirology (Philadelphia, USA) 2006. 31May-3June

2) 吉田洋明、中島典子、佐多徹太郎：SIV 感染によりミクログリア、神経・グリア細胞に誘導されるサイトカイン・ケモカインの解析。第 54 回日本ウイルス学会学術集会 (名古屋) 2006 年 11 月

#### H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

## 2. 抗 HIV 免疫応答を左右する抗原提示機能に関する解析

分担研究者 横田 恭子 国立感染症研究所免疫部 第一室長

**研究要旨** HIV 増殖抑制効果の強い shRNA 発現組換えレンチウイルスを用い、慢性感染者の Gag 特異的記憶 CD4+T 細胞増殖応答は同時に誘導される HIV 増殖を抑制することにより回復可能であることが明らかとなった。従って、HIV に潜伏感染した抗原提示細胞と HIV 特異的記憶 CD4+ T 細胞の相互作用の場でウイルス増殖を抑制することが最も重要であり、このような組換えレンチウイルスをワクチンとして応用することにより新たな治療法を開発することも可能と思われる。

### A. 研究目的

樹状細胞や記憶 T 細胞には HIV が潜伏感染し、抗原(特に HIV)特異的 T 細胞活性化の際に HIV の再活性化が促進される。本研究では、HIV 感染における抗 HIV 反応を評価する系を開発し宿主感染防御機構の強化をめざすことを目的とする。

### B. 研究方法

#### 1) 細胞とレンチウイルスによる遺伝子導入

末梢血単核細胞(PBMC)より EasySep Neg Human T Cell kit (StemCell Tech.Inc.)を用いて T 細胞を分画し、組換えレンチウイルスに感染させた後、非 T 細胞分画と再混合した。フランスにおける HIV 感染者の IMMUNOCO コホートは当該施設の倫理委員会の承認を受けて保存されているものである。対象検体として 1992-1994 年にかけて集められ、CD4 数が保持されかつ種々の血中ウイルス量を示す 8 症例由来の 1 2 検体を共同研究のために提供を受けた。

#### 2) 抗原

抗原刺激として HIV-1 Gag p24 抗原、CMV 抗原、PPD 抗原を細胞にそれぞれ最終濃度 5, 10, 10 µg/ml、加えて培養した。

#### 3) 培養

増殖反応を解析する場合はレンチウイルスを感染させた PBMC の培養 1 日目に抗原を加え、更に 3 日培養した後、BrdU を加えて 30 分パルスし、細胞表面抗原とともに

FACScalibur で解析した。

#### 4) レンチウイルスベクター

U3-LTR と重複する Nef coding 領域に対する small hairpin RNA 発現レンチウイルスベクターを構築し、HIV gag/pol, VSV-G/rev プラスミドとともに 293T 細胞にトランスフェクトした。培養上清を超遠心してウイルス濃縮液を調整し、p24ELISA で濃度を測定した。導入効率を判断するため、一定量の p24 を CEM 細胞に感染させて GFP 陽性細胞を計測し、MOI を計算した。

#### 5) FACS 解析

細胞表面に対する標識抗体 (CD4, CD3, CD27, CD28, CD45RA) はすべて BD BioScience 社より購入した。BrdU の取り込みも同社の APC 標識 BrdU 測定キットを用いた。

(倫理面への配慮)

本研究では倫理面に配慮する実験を含んでいない。

### C. 研究結果

慢性 HIV 感染者では HIV 特異的な記憶 CD4 陽性 T 細胞の機能 (IL-2 産生と増殖) 異常が認められ、このことが HIV 感染に伴って進行する免疫不全に大きく関わっていると考えられている。更に、HIV 特異的な記憶 CD4 陽性 T 細胞にウイルスが高頻度に潜伏していることが既に明らかにされている。そこで、このような HIV 特異的な記憶 CD4 陽性 T 細胞の機能異常が潜伏感染した HIV の再活性化によるもの



かどうかを明らかにするため、LTR/Nef 領域 shRNA 発現レンチウイルス (Lenti shNef366) を用いて Gag 抗原刺激に伴って誘導されると思われるウイルス増殖を抑制し、その結果 T 細胞の増殖が回復するか否かを調べた。検体は初期にフランスの IMMUNOCO cohort に登録された慢性 HIV 感染者の 12 検体である。これら感染者の T 細胞に Lenti shNef366 あるいは Lenti control を感染させた後 Gag 蛋白で刺激し、BrdU をパルスして Gag 特異的な記憶 CD4 陽性

T 細胞の増殖応答について FACS 解析した。その結果、図 1 に示すように、特に血中ウイルス量が 10,000 以上の高値を示す 8 検体において Lenti shNef366 導入により HIV 特異的な記憶 CD4 陽性 T 細胞の増殖能が有意に回復した。しかも、刺激に反応して増殖性を回復した細胞集団は、HIV 感染者で蓄積していることが知られる分化途中の細胞 (CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>あるいは CD27<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>) であることが明らかとなった (図 2)。

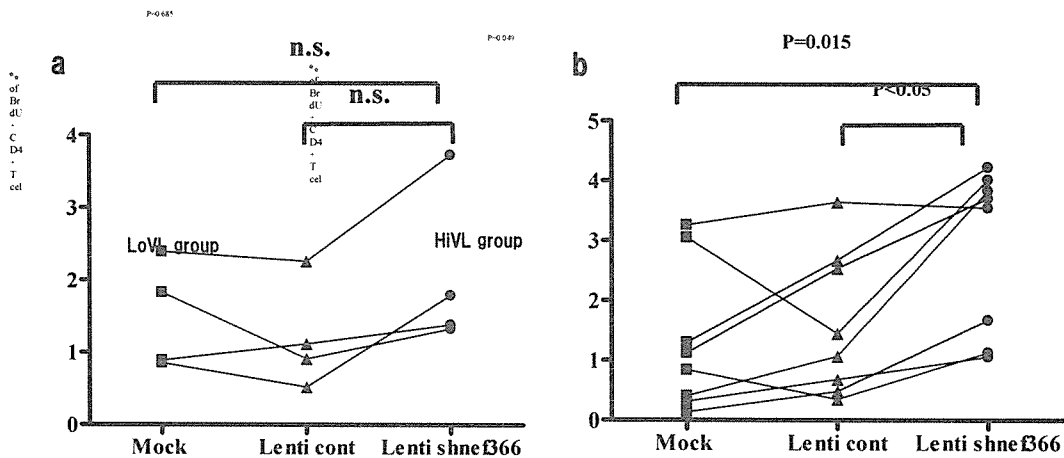


図 1. 慢性 HIV-1 感染者の HIV-1 特異的 CD4 陽性 T 細胞の増殖能欠損はウイルス増殖抑制により回復する。HIV-1 感染者の PBMC をそのまま、あるいは Lenti shNef366 ないし Lenti cont を感染させ、Gag p24 刺激により活性化される CD4 陽性 T 細胞の BrdU 取り込み (増殖能) を解析した。a: 血中ウイルス量が 10,000 copies/ml 以下の感染者 (LoVL)、b: 血中ウイルス量が 10,000 copies/ml を越える感染者 (HiVL) グループに分けて、統計解析すると、HiVL グループでの増殖能は Lenti shNef366 感染群で有意に回復していた。

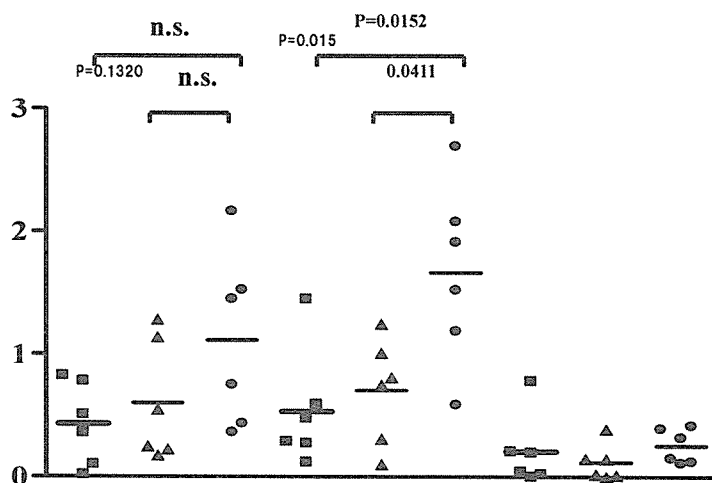


図 2. HIV-1 特異的な CD4 陽性 T 細胞の中で増殖能の回復は分化途中の細胞集団で顕著である。HIV-1 Gag p24 で刺激した CD4<sup>+</sup> T 細胞の CD27 と CD28 の発現パターンをもとに T 細胞の分化度を分類すると、増殖している (CD4+BrdU<sup>+</sup>) のは主に Intermediate phase (CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>あるいは CD27<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>) の細胞集であった。この集団は慢性 HIV-1 感染で蓄積することが知られている分化途上の T 細胞であると考えられている。

#### D. 考 察

樹状細胞等の抗原提示細胞による T 細胞活性化は初期免疫応答の開始だけでなく、記憶 T 細胞の再活性化にも重要である。今回我々の解析から、HIV 増殖抑制効果の強い shRNA 発現レンチウイルスにより慢性感染者の Gag 特異的 CD4+T 細胞増殖応答は回復させることが明らかとなった。しかもこの効果は HIV 特異的 CD4+T 細胞の分化異常も回復させる可能性がある。HIV が HIV 特異的記憶 T 細胞に高頻度に潜伏感染していることを考慮に入れると、エイズの病態進行には、“抗 HIV 応答を担う HIV 特異的記憶 CD4+ T 細胞が潜伏感染して抗原刺激のたびにウイルス増殖が誘導され、その結果記憶 T 細胞が死滅していくと同時に他の細胞にも感染を拡大させる”ということが重要な要因と考えられる。我々の解析結果は今後のエイズ治療の方向性を大きく左右する重要な知見であり、HIV に感染した抗原提示細胞と HIV 特異的記憶 CD4+ T 細胞の相互作用の場でウイルス増殖を抑制するためには、HIV の増殖を抑制する組換えレンチウイルスをワクチンとして活用することで、より有効な治療法を開発していく必要がある。

#### E. 結 論

HIV 増殖抑制性 shRNA 発現レンチウイルスを用い、慢性感染者の Gag 特異的記憶 CD4+T 細胞増殖応答は同時に誘導されるウイルス増殖を抑制することにより回復させることが可能であることが示された。これは今後のエイズ治療の方向性に大きく貢献する重要な知見である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Tsunetsugu-Yokota Y, Ishige M, Murakami M: Attenuated *Salmonella Typhimurimu* expressing codon-optimized HIV-1 Gag potentiated Gag-specific CD8+T cell-response in intestinal mucosa. *Aids Res Hum Retro*, 2007. (in press)
- 2) Yamamoto T, Isogai M, Ohtake K, Tsunetsugu-Yokota Y: High and inducible

expression of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Nef by adenovirus vector does not disturb potent antigen-presentation by monocyte-derived dendritic cells. *Microbes Infect* 8: 2522-2530, 2006.

- 3) Yamamoto T, Miyoshi H, Yamamoto N, Yamamoto N, Inoue J-I, Tsunetsugu-Yokota Y: Lentivirus vectors expressing short hairpin RNAs against the U3-overlapping region of HIV nef inhibit HIV replication and infectivity in primary macrophages. *Blood* 108: 3305-3312, 2006.

##### 2. 学会発表

- 1) 水越文徳、山本拓也、光木裕也、立川(川名)愛、横田(恒次)恭子:抗原の糖鎖による樹状細胞の cross-presentation の影響。第 35 回免疫学会(大阪)平成 18 年 12 月

#### H. 知的所有権の出願・登録状況

特になし。

### 3. 免疫誘導性および免疫寛容樹状細胞の分化培養と HIV-1 増殖調節への応用

分担研究者 田中 勇悦 琉球大学医学部感染免疫学 教授

研究要旨 HIV-1 感染に対する新たな治療法を確立する基礎研究として、過度の免疫応答を抑制する制御性 T 細胞 (Treg) に着目し、Treg を誘導する樹状細胞 (DC) の培養方法の確立を試みた。ヒト単球を IFN-beta と IL-4 で培養すると DC 様の細胞に分化した。この DC とアロナイーブ CD4+T 細胞と混合培養すると免疫抑制サイトカインである IL-10 と Th1 サイトカインである IFN-gamma を産生する T 細胞が誘導された。誘導された T 細胞は、自己の CD4+T 細胞の増殖反応を抑制した。この Treg を *in vitro* で刺激培養した上清は、新鮮 PBMC やマクロファージへの R5 HIV-1 感染を著明に抑制した。以上の結果より、今回の試みで誘導された DC は、Treg を誘導する活性を持つこと、誘導された Treg は R5 HIV-1 感染を抑制する因子を産生することが示唆された。

#### A. 研究目的

HIV-1 の増殖は宿主の T 細胞免疫機構の活性化、特に炎症性反応に依存する。感染初期において HIV-1 は外来ウイルスとして免疫を惹起させ、CD4 陽性の T 細胞やマクロファージの活性化に乗じて感染を広げ、かつ感染細胞を死滅させる。したがって、この時期には、自己の細胞であろうとも HIV-1 が感染した CD4 細胞を破壊することができる強力な免疫応答が生体防御に重要と考えられる。しかしながら、感染が進み、中期～後期に入ると、HIV-1 が HIV-1 非感染 CD4 細胞の過度な活性化を引き起こすために、HIV-1 と無関係に CD4 細胞のアポトーシスが誘導され、それが CD4 細胞の枯渇、ひいては免疫不全の一因となると考えられている。

アフリカのサルにおいては宿主とサルエイズウイルス (SIV) が共存する例が知られるが、このようなサルではバイレミアが起きても免疫応答は抑制されている。この事実から、HIV-1 感染者においても過度な免疫応答を抑制することが HIV-1 の増殖の足場を無くしかつエイズ発症抑制につながる可能性があると考えられる。そこで免疫抑制性 T 細胞 (Treg) と樹状細胞 (DC) に注目した。本研究では、ヒトの系に

において Treg を誘導する DC の分化培養方法を新たに開発し、誘導された IL-10 産生性 Treg 細胞群について表現形と機能および HIV-1 感染増殖阻止能について検討することを目的とした。

#### B. 研究方法

ヒト末梢血単核球 (PBMC) より CD14+単球を negative selection kit (Dyna) で精製し、IFN-beta と IL-4 存在下で 3 日間培養した。培養 1 日目に LPS や不活化 HIV-1 を添加することにより成熟マーカーを有する DC が誘導された (II-DC)。対照 DC は GM-CSF と IL-4 中で 6 日間分化培養し、IFN-beta で成熟させた DC (GI-DC) を用いた。表現系は特異的単クローン抗体を用いたフローサイトメトリ (FCM) で解析した。DC の機能は、IL-12 産生性、アロ naïve CD4+T 細胞の増殖誘導およびサイトカイン産生性で検討した。アロ naïve CD4+T 細胞は、negative selection kit (MACS) で精製した。IL-10 産生 Treg は *in vitro* で CD3/CD28 抗体結合磁石ビーズ (Dyna) で刺激拡大培養し、その培養上清を得た。

HIV-1 感染標的に用いた細胞は、新鮮 PBMC、PHA 活性化 PBMC (d3)、CD14 由来 M-CSF 培

養マクロファージである。感染細胞を 96 well plate に播き、試験する Treg 培養上清を 50% に添加し、R5 HIV-1 JR-CSF または X4 HIV-1 NL4-3 を一晚感染させた。翌日細胞を洗浄後、培地のみ、あるいは 50% Treg 培養上清を添加する条件で培養した。HIV-1 の感染増殖は培養上清中の p24 産生を ELISA でモニターした。なお、供血者には十分な説明をして了解を得た上で協力をいただいた。

(倫理面への配慮)

本研究では倫理面に配慮する実験を含んでいない。

### C. 研究結果

ヒト単球を IFN-beta と IL-4 で培養すると、IL-10 産生 Treg 誘導性 DC へと分化した。この樹状細胞 II-DC は通常の培養方法で誘導される DC (GI-DC) に比べて CD83, CD80 や CD86 抗原発現が高く、IL-12 および TNF-alpha を未熟 GI-DC よりも高く産生した。II-DC はアロ naïve CD4+T と混合培養することにより IL-10 と IFN-gamma の産生を誘導した。誘導された T 細胞は、自己の naïve CD4+T 細胞がアロの GI-DC 刺激に対して示す増殖反応を抑制した。この Treg を in vitro で刺激培養した上清は、新鮮 PBMC やマクロファージへの R5 HIV-1 感染を著明に抑制した。X4 HIV-1 感染への影響は少なかった。

### D. 考察

本年度の研究によりヒト単球を IFN-beta と IL-4 で培養すると、IL-10 産生 Treg 誘導性 DC へと分化することを新たに見いだした。この誘導には HIV-1 や LPS による刺激が必須であり、TLR 等からの第二のシグナル伝達の必要性についてさらなる研究が必要である。混合培養により naïve CD4+T から誘導された T 細胞は、IL-10 と IFN-gamma とを同時に産生する細胞群であり、IL-10 産生 Treg と Th1 が混合した状態であることが示唆された。興味あることは、Treg の培養上清が in vitro において R5 HIV-1 の増殖を著明に抑制したことである。どのような因子が抑制に関与しているのかをより詳細に検討する必要がある。IL-10 はマクロファージにおける R5 HIV-1 の感染増殖を抑制するこ

とがすでに報告されているが、IL-10 に対する抗体をいれても抑制解除は部分的であることから、IL-10 以外の因子も同時に HIV-1 抑制に関与することが示唆された。

### E. 結論

本年度の研究によりヒト単球を IFN-beta と IL-4 で培養すると、IL-10 産生 Treg 誘導性 DC へと分化することを新たに見いだした。誘導 Treg は R5 HIV-1 の感染増殖を抑制した。

### F. 健康危険情報

とくになし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Dewan MZ, Terunuma H, Toi M, Tanaka Y, Katano H, Deng X, Abe H, Nakasone T, Mori N, Sata T, Yamamoto N: Potential role of natural killer cells in controlling growth and infiltration of AIDS-associated primary effusion lymphoma cells. *Cancer Sci* 97(12):1381-1387, 2006.

#### 2. 学会発表

- 1) 大隈 和、田中礼子、山本直樹、田中勇悦：CXCR4 コレセプター使用 HIV-1 株の感染を阻害する新規 CXCR4 アンタゴニスト KRH-3140 の hu-PBL-SCID マウスにおける経口投与効果。第 54 回日本ウイルス学会 学術集会(名古屋)2006 年 11 月
- 2) 佐藤 佳、青木 淳、大黒恵理子、佐野浩一、田中勇悦、小柳義夫：テトラスパニン分子の過剰発現による HIV-1 の感染抑制。第 54 回日本ウイルス学会 (名古屋) 2006 年 11 月
- 3) 村上 努、大隈 和、熊倉 成、田中礼子、谷中幹郎、田中勇悦、山本直樹：新規 CXCR4 アンタゴニスト KRH-3166 は経口投与可能な高活性抗 HIV-1 剤である。第 20 回日本エイズ学会学術集会(東京)2006 年 11 月
- 4) 大隈 和、田中礼子、伊藤 守、田中勇悦：ヒト IL-4 産生 SCID マウスの X4 HIV-1 感染への応用。第 20 回日本エイズ学会学術集会(東京)2006 年 11 月