

CCR2 V64Iの両方の多型の組み合わせがHIV-1感染抵抗性に寄与している可能性が示された。

2) HIV-2の株間でTRIM5 α に対する感受性が大きく異なること、HIV-2のカプシド蛋白の120番目のアミノ酸の置換により、HIV-2のTRIM5 α への感受性が大きく変化することが明らかになった。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Wichukchinda N, Nakayama EE, Rojanawiwat A, Pathipvanich P, Auwanit W, Vongsheree S, Ariyoshi K, Sawanpanyalert P, Shioda T: Protective Effects of *IL-4 -589T* and *RANTES -28G* on HIV-1 disease progression in infected Thai females. *AIDS* 20: 189-196, 2006.
- 2) Song H, Nakayama EE, Shioda T: Effects of human interleukin 7 on HIV-1 replication in monocyte-derived human macrophages. *AIDS* 20: 937-939, 2006.
- 3) Nakayama EE, Maegawa H, Shioda T: A dominant-negative effect of cynomolgus monkey tripartite motif protein TRIM5 α on anti-simian immunodeficiency virus SIVmac activity of an African green monkey orthologue. *Virology* 350: 158-163, 2006.
- 4) Sakuragi S, Sakuragi J, Morikawa Y, Shioda T: Development of a rapid and convenient method for the quantification of HIV-1 budding. *Microbes Infect* 8: 1875-1881, 2006.
- 5) Shioda T, Nakayama EE: Human genetic polymorphisms affecting HIV-1 diseases. *Int J Hematol* 84:12-17, 2006.
- 6) Song H, Nakayama EE, Likansakul S, Wasi C, Iwamoto A, Shioda T: A three-base-deletion polymorphism in the upstream non-coding region of human interleukin 7 (IL-7) gene could enhance levels of IL-7 expression. *International Journal of Immunogenetics*. (in

press)

- 7) Wichukchinda N, Rojanawiwat A, Kitamura Y, Nakayama EE, Pathipvanich P, Auwanit W, Sawanpanyalert P, Iwamoto A, Shioda T, Ariyoshi K: The polymorphisms in *DC-SIGNR* affect the susceptibility to HIV-1 infection. *AIDS Res Hum Retrovir*. (in press)
 - 8) Lwembe R, Ochieng W, Panikulam A, Mongoina CO, Owens M, Koizumi Y, Kageyama S, Yamamoto N, Shioda T, Musoke R, D'Agostino A, Songok EM, Ichimura H: Anti-retroviral drug resistance-associated mutations among non-subtype B HIV-1-infected Kenyan children with treatment failure. *J Med Virol*. (in press)
 - 9) Ohishi M, Shioda T, Sakuragi J: Retro-transduction by virus pseudotyped with glycoprotein of vesicular stomatitis virus. *Virology*. (in press)
 - 10) Koizumi Y, Kageyama S, Fujiyama Y, Miyashita M, Lwembe R, Ogino K, Shioda T, Ichimura H: RANTES -28G delays and DC-SIGN -139C enhances AIDS progression in HIV-1-infected Japanese hemophiliacs. *AIDS Res Hum Retrovir*. (in press)
- ##### 2. 学会発表
- 1) Huanliang Liu, Emi E. Nakayama, Ioannis Theodorou, Yoshiyuki Nagai, Sirirat Likansakul, Chantapong Wasi, Patrice Debre, Aikichi Iwamoto and Tatsuo Shioda: Polymorphisms in CCR5 chemokine receptor gene in Japan. The 6th Awaji International Forum on Infection and Immunity, September 2006, Awaji, Japan.
 - 2) 中山英美、塩田達雄：アフリカミドリザル由来 TRIM5 α の SIVmac 感染阻害能に対するカニクイザル由来 TRIM5 α のドミナントネガティブ効果。第 54 回日本ウイルス学会学術集会（名古屋）2006 年 11 月
 - 3) Song H, Nakayama EE, Likansakul S, Wasi C, Iwamoto A, Shioda T: A three-base-deletion polymorphism in the upstream non-coding region of human interleukin 7 (IL-7) gene

- could enhance levels of IL-7 expression. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会（名古屋）2006 年 11 月
- 4) 櫻木淳一、塩田達雄：HIV-1 サブタイプ間組換え体生成機構の解析。第 54 回日本ウイルス学会学術集会（名古屋）2006 年 11 月
- 5) Huanliang Liu, Emi E. Nakayama, Ioannis Theodorou, Yoshiyuki Nagai, Sirirat Likanonsakul, Chantapong Wasi, Patrice Debre, Aikichi Iwamoto and Tatsuo Shioda: Polymorphisms in CCR5 chemokine receptor gene in Japan. 第 20 回日本エイズ学会学術集会（東京）2006 年 11 月
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）
1. 特許取得
該当なし。
 2. 実用新案登録
該当なし。

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

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 部長

研究要旨 HIV-1 感染に伴って誘導されるゲノム DNA 二重鎖切断 (DSB: DNA double strand breaks) の主たる要因として Vpr を同定し、52 例の HIV-1 陽性患者血液検体中の 20 例に同蛋白質を検出した。Vpr の検出はウイルス RNA コピー数と正の相関を示し、最も高い濃度として約 10ng/ml の Vpr を検出した。リコンビナント Vpr を 2-10 ng/ml の濃度で培養細胞に添加すると DSB が誘導される一方、健康人末梢血単核球細胞と潜伏感染細胞である U1 細胞の共培養系に添加するとウイルスが産生された。次年度では、Vpr による DSB とウイルス再産生との関連性及び DSB の機序と意義について解析する。

A. 研究目的

Antiretroviral therapy (ART) が導入され、HIV-1 陽性症例の予後が劇的に改善された。しかし、近年の研究から ART 下でもウイルス感染は持続し、体内からウイルスを駆逐することは困難であることが明らかとなった。即ち、患者は ART 療法を一生続けなくてはならず、薬剤の副作用や薬剤耐性ウイルスの出現により、ART の中断を余儀なくされることで予後不良となる可能性が依然として残っている。即ち、潜伏感染状態の理解とこれを阻止する新しい治療法の開発が必要である。このような潜伏感染状態で重要な役割を担っているのが単球/マクロファージ系細胞で、これら細胞へのウイルス感染機序を理解することにより新しい抗エイズ療法開発の可能性が明らかになるものと期待される。

近年、ウイルス感染の際にゲノム DNA 二重鎖切断 (以下 DSB) が誘導されること、また DSB によって惹起される細胞側のシグナルを遮断することで、ウイルス感染が阻害されることが報告された。分担研究者もウイルス感染の際に DSB が惹起されることを見出すとともに、DSB がアクセサリ遺伝子産物 Vpr によって強く誘導されることを見出した。ウイルス感染における DSB の役割は現在のところ不明

であるが、これまでの解析で明らかにされている情報として、

- i) Vpr はマクロファージへのウイルス感染に重要であること、
- ii) 増殖中の細胞内では DNA 複製の過程で DSB が自然に生成されること、一方、
- iii) マクロファージは静止状態にあり、DNA 合成を示さないこと、

から、Vpr による DSB は静止マクロファージへのウイルス感染の成立に重要な役割を担っているものと想像される。本研究ではこの点を明らかにするとともに、ウイルス感染における DSB そのものの意義についても明らかにする。Vpr の機能解析については、種々の変異体を作成し、DSB 誘導能とウイルス感染誘導効果との関連を明らかにする。平成 18 年度は、DSB の意義を解析するためのシステムの確立を行う一方、Vpr のエイズ病態への影響を把握するための臨床データを得た。即ち、患者血中の Vpr を把握し、ほぼ同じ程度の濃度のリコンビナント Vpr (rVpr) により惹起される細胞側の反応を詳細に解析した。

B. 研究方法

1) 体液中に存在する Vpr 検出システムの確立と血中濃度の把握

患者血液や脳脊髄液中に Vpr が存在するとの報告がある。しかし、その濃度についての報告は皆無である。まず、この点を明らかにするため、分担研究者はこれまで、Vpr 測定用 ELISA システム立ち上げ、患者血中 Vpr の検出を試みて来た。しかし、血漿中に交叉抗原が存在するため患者検体についての測定ができなかった。そこで今回、C 末端ペプチドを用いて新たに単クローン抗体を作成した(2C7)。そして、これまで使用して来た N 末側を認識する単クローン抗体(8D1)と 2C7 を組み合わせた免疫沈降-ウエスタン(IP-WB)解析により血中 Vpr (約 14 kDa) の検出を行った。患者検体は、奈良県立医科大学感染症センター、古西満博士、日本バイオセラピー研究所、照沼裕博士から供与を受けた。これまでに開発した ELISA システムでは、培養液中の Vpr や精製 Vpr の測定を行うことが可能であることから、このシステムを用いてまず精製した rVpr の濃度を正確に測定した。そして、これを種々の濃度で健常人血漿に混和した後、患者検体と同様の手技で IP-WB 解析を行い、血中 Vpr 量を推定するための標準検体とした。Vpr の分子量である 14 kDa の位置に検出される蛋白質の検出を以て「Vpr プラス」と判定した。また、解析対象とした症例を Vpr 検出の有無で 2 群に分け、検体収集時の血中ウイルス RNA 価について、これら 2 群間での有意差検定を行った。

2) DSB の静止マクロファージへのウイルス感染における意義

レンチウイルスベクター(インビトロジェン社製)システムと VSV-G 発現プラスミド DNA をを用いてシュードタイプウイルスを作成した。このウイルスを健常人由来マクロファージへ感染させる際、2.5Gy の X 線照射を行い、48 時間後に、ゲノム DNA に組み込まれたウイルス DNA のコピー数を測定した。リアルタイム PCR 法を用いて挿入ウイルス DNA のコピー数を測定した。まず、繰り返し配列である Alu 配列と HIV-LTR 特異的プライマーを用いて一回目の PCR を行い、その後、LTR 内に設定したプライマーで 2 回目の PCR を行いながら Taqman プローブを用いて定量した。

3) 潜伏感染細胞からのウイルス産生誘導の解明

潜伏感染細胞としては U1 細胞を用いた。Vpr 蛋白質はグルタチン S トランスフェラーゼ(GST)融合蛋白質としてバクテリアで発現し、グルタチンビーズに結合させた。Triton X-100 入りのバッファーで強力に洗浄することで大腸菌に由来するエンドトキシンを排除し、その後プロテアーゼを作用させることで GST と Vpr とを切断し、rVpr を得た。精製した rVpr は、ELISA キットで濃度を測定した。ヒト末梢血単核球細胞(PBMC)は、リンフォプレップで調整した。PBMC に種々の濃度で rVpr を添加し、2 日間培養後の上清を U1 細胞に 10%添加した。上清中の p24 は ELISA キット測定した。

4) Vpr による DSB 誘導

rVpr を種々の濃度で培養細胞の培養系に添加し、2 日後に DSB のマーカーである・H2AX 及びリン酸化型 ATM のフォーカス形成の有無を免疫組織化学的方法で解析した。

(倫理面への配慮) 感染実験、ウイルスの保管は各研究機関の定める感染微生物取り扱い安全管理委員会、組換え DNA 委員会の規定に基づいて行った。感染検体も倫理委員会の承認を得た上で解析した。

C. 研究結果

1. HIV-1 陽性 52 症例中 20 例の血漿中に Vpr を検出した。その最大濃度は約 10 ng/ml (約 0.7 nM) (Vpr の分子量は約 14 kDa) であった。
2. Vpr 検出とウイルス価の間には正の相関が認められた ($p < 0.05$)。
3. X 線照射によりウイルス DNA の挿入頻度が数十倍増加した。感染細胞中のウイルス DNA 量には大きな差が認められなかったことから、X 線照射はウイルス DNA がゲノム DNA へ挿入される過程に関与していることが強く示唆された。
4. 0.12-0.7 nM の rVpr を培養系に添加すると DSB が誘導され、C 末端 12 個のアミノ酸を欠失させた rVpr では DSB 誘導は激減した。

5. 1 nM の rVpr を潜伏感染細胞である U1 細胞に添加しても、ウイルス再産生を誘導しなかった。さらに高濃度の rVpr (670 nM、約 1 ug/ml) で作用させてもウイルス再産生を認めなかった。また、同濃度で 10 日培養を継続しても、ウイルス再産生は認められなかった。一方、TNF- α を添加するとウイルス産生が誘導された。
6. このように rVpr には直接的な作用としてのウイルス再産生誘導能は検出されなかったが、健康人由来 PBMC と U1 細胞の共培養系に 0.7 nM の rVpr を添加するとウイルス産生が誘導された。
7. また、PBMC+rVpr の培養上清を U1 細胞に添加するとウイルス産生が誘導され、この培養上清中には自然免疫で重要な役割を示すことが知られているサイトカインが存在することを認めた。

D. 考 察

1) 患者体液中 Vpr の濃度の把握と DSB

今回、患者血液中の Vpr を検出し、その濃度が約 10 ng/ml (0.7 nM) であることを明らかにした。同濃度の rVpr は DSB を誘発し、Vpr 陽性の症例では、体中の全ての細胞で DSB が惹起される可能性が示唆された。脳脊髄液中にも Vpr が存在することが示唆されており、同様に神経細胞に DSB を誘発するのであれば、神経伝達システムを大きく攪乱する可能性が考えられる。エイズ脳症における Vpr の関与が強く疑われる。

2) DSB によるウイルス DNA のゲノム DNA への挿入頻度の上昇

X 線照射により、ウイルス DNA の挿入頻度が飛躍的に上昇した事は、DSB がウイルス感染において、大きな意味を持っている事を示唆する。今回の解析は、健康人由来マクロファージを用いて行った。マクロファージは非分裂細胞であり、細胞分裂に伴って生じる核膜の崩壊や DNA 合成時に自然に生じる DSB が無い。ゲノム DNA の切断により、クロマチン構造が大きく変化することが想像され、この変化がウイルス感染過程の特にインテグレーションのステップで重要な役割を担っていることが想

像される。次年度ではこの点を明らかにする予定である。その解析を可能にする細胞株を樹立することに成功している。また、DSB とウイルス DNA の挿入の密接な関連性の存在を示唆する予備的なデータも得られている。現在、欧米の幾つかの研究グループが DSB とウイルスのゲノム DNA の挿入の関連性に着目している。次年度、これらの研究グループに先駆けて、研究成果を発表する。

3) ウイルス再産生におけるサイトカインの関与

エンドトキンを含まない高度に精製した rVpr には潜伏感染細胞である U1 細胞からのウイルス再産生誘導能を認めなかった。代わりに PBMC と U1 細胞の共培養系に rVpr を添加するとウイルス産生が顕著に認められた。さらに、rVpr が作用して PBMC からサイトカインの産生を誘導する予備的なデータが得られている。本現象については次年度の前半で論文発表する予定である。

E. 結 論

患者血中に存在する Vpr は、DSB を誘発することでウイルス感染効率を上昇させる一方で、PBMC から産生されるある種のサイトカインを介して、ウイルス産生に関与していることが示唆された。

F. 健康危険情報

とくになし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hoshino S, Sun B, Konishi M, Shimura M, Segawa T, Hagiwara Y, Koyanagi Y, Iwamoto A, Mimaya J, Terunuma H, Kano S, Ishizaka Y: Vpr in plasma of HIV-1-positive patients is correlated with the HIV-1 RNA titers. *AIDS Res Hum Retrovir.* (in press)
- 2) Nakai-Murakami C, Shimura M, Kinomoto K, Takizawa Y, Tokunaga K, Taguchi T, Hoshino S, Miyagawa K, Sata T, Kurumizaka H, Yuo A, Ishizaka Y: HIV-1 Vpr induces ATM-dependent cellular signal with enhanced homologous

recombination. *Oncogene* 26: 477-486, 2007.

- 3) Tachiwana H, Shimura M, Nakai-Murakami C, Tokunaga K, Takizawa Y, Sata T, Kurumizaka H, Ishizaka Y. HIV-1 Vpr induces DNA double-strand breaks. *Cancer Res* 66: 627-631, 2006.
- 4) Uchida S, Kubo A, Kizu R, Nakagama H, Matsunaga T, Ishizaka Y, Yamashita K: Amino acids C-terminal to the 14-3-3 binding motif in CDC25B affect the efficiency of 14-3-3 binding. *J Biochem* 139: 761-769, 2006.

2. 学会発表

- 1) Tachiwana H, Shimura M, Nakai C, Tokunaga K, Takizawa Y, Sata T, Kurumizaka H, Ishizaka Y: HIV-1 Vpr induces DNA double-strand breaks. Retrovirus Meeting, Cold spring Harbor Laboratory, May 2006, New York.
- 2) Hoshino S, Sun B, Konishi M, Koyanagai Y, Ishizaka Y: Detection of serum Vpr in HIV-1-positive patients and the mode of viral reactivation from latently infected cells. 第7回熊本エイズセミナー(熊本) 2006年9月
- 3) 峯本 譲、森 昌子、中井智嘉子、孫賓蓮、石坂幸人: HIV-1 アクセサリー遺伝子産物 Vpr のクロマチンリクルートメントの意義と機序. 第24回 染色体ワークショップ(唐津) 2007年2月

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

出願番号 特 2006-48576

発明人: 石坂幸人、長谷川正勝、野原 聡
発明の名称: 「機能性分子が導入された有機磁性ナノ複合体」

出願人: 国立国際医セ、名糖産業株式会社

出願日: 2006/2/24

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

分担研究者 徳永 研三 国立感染症研究所感染病理部 主任研究官

研究協力者 木ノ本正信 (国立感染症研究所感染病理部エイズ予防財団 RR)

研究要旨 ヒト抗レトロウイルス宿主蛋白 APOBEC3G は、ウイルス感染における逆転写の際、ウイルス DNA に G→A 変異を与えて感染性を失活するが、HIV-1 は自身のウイルス蛋白 Vif によりその機能を相殺する。その Vif はサブタイプにより遺伝子多様性があることから、今回我々はその生物学的活性の違いの有無を検討した。HIV-1 サブタイプの A、B、C、G、A/E、及び A/G 由来 vif 遺伝子 37 種類の cDNA より発現ベクターを作製して in vitro Vif 蛋白機能テストを行った結果、サブタイプ B 由来 Vif に比べて C 由来 Vif が非常に高いウイルス感染性増強能を、逆に A/E 由来 Vif が非常に低い感染増強能を示した。この結果が、各 Vif 蛋白の APOBEC3G プロテオソーム分解能及び G→A 変異抑制能と矛盾しなかったことから、Vif の抗 APOBEC3G 活性にはサブタイプ依存性があることが示唆された。今後の実験でこれが確認できれば、本実験結果は、サブタイプにより HIV-1 の伝播性に強弱がある可能性を内包することとなる。

A. 研究目的

ヒト宿主因子 APOBEC3G は強力な自然免疫能を有する抗レトロウイルス蛋白で、レトロウイルス感染時にはウイルス逆転写産物に激しく G→A 変異を与えることによってウイルスの感染性を失活させる役割を担っている。一方、HIV-1 は自身の抗 APOBEC3G 蛋白である Virion infectivity factor (Vif) により、APOBEC3G をプロテオソーム分解あるいは翻訳阻害することにより、逆転写中のウイルスゲノムを守る機能を持っている。現在までの世界レベルでの Vif/APOBEC3G 研究は、殆ど全てがサブタイプ B 由来 Vif 及び細胞株由来 APOBEC3G 蛋白のみを用いて行われてきた。この点を重視して本研究では、遺伝子レベルで多様性の高いサブタイプ別臨床分離株由来 Vif が、異なる抗 APOBEC3G 活性を示すか否を解析するとともに、APOBEC3G の遺伝子多型性とそれによる生物学的活性の違い、また患者個体内での APOBEC3G 発現推移と病態進行との相関性を検討することにより、HIV-1 サブタイ

プ別・宿主因子ゲノタイプ別発症阻止の戦略的基盤とする。

B. 研究方法

1) DNA クローニング

i) APOBEC3G の cDNA クローニング : APOBEC3G を高発現しているヒト CD4 陽性 T リンパ球細胞株 H9 より、RNAqueous Kit (アンビオン社) を用いてトータル RNA を単離した。Titan One Tube RT-PCR Kit (ロシュ社) を用いて、H9 RNA を鋳型に APOBEC3G 遺伝子の cDNA 合成及び PCR 増幅を行った。更にその PCR 産物を Expand High Fidelity DNA Polymerase (ロシュ社) によって再増幅した後、*KpnI/XhoI* で制限酵素処理を行い、あらかじめ 3 回反復ヘマグルチニン・タグを付加した pCAGGS に挿入した。作製した APOBEC3G 発現ベクター、pCA-hA3G-HA の遺伝子配列は ABI3130 シークエンサー (ABI 社) により確認した。

ii) HIV-1 サブタイプ別 Vif 発現ベクターの作

製及びVifの塩基配列決定・系統樹解析: HIV-1 サブタイプの中で特に感染人口の多い A・B・C・G・A/E・A/G を選び、それらの全長 cDNA クローン (感染研エイズ研究センター・巽博士より分与) を用いて、vif 遺伝子領域を Ultra Pfu DNA ポリメラーゼ (ストラタジーン社) により PCR 増幅、KpnI/XhoI で制限酵素処理を行い、発現ベクター pCAGGS のマルチクローニングサイトに挿入した。作製した各 Vif 発現ベクター (pCA-xx vif) の遺伝子配列の決定及び確認は ABI3130 シークエンサー (ABI 社) により行った。各 Vif 遺伝子の比較を CLUSTAL W プログラムにより行い、neighbor-joining 法により系統樹を構築した。また遺伝子間距離は Kimura two-parameter 法により算定した。

2) HIV-1 サブタイプ別 Vif 蛋白機能テスト

i) DNA トランスフェクション: ルシフェラーゼをレポーター遺伝子として有する Env・Vif 欠損型 HIV-1 cDNA クローン pNL-Luc-F(-)E(-) を 1 µg、の水疱性口炎ウイルス G 蛋白 (VSV-G) 発現ベクター pHIT/G を 100 ng、pCA-hA3G-HA を 50 ng、各サブタイプ別 Vif 発現ベクターを 25ng、空ベクター pCAGGS を 825 ng、FuGENE6 (ロシュ社) を用いて 3.5×10^5 個の 293T 細胞にトランスフェクションした。16 時間後、細胞を PBS で洗浄してフレッシュな培養液を加え、その 32 時間後に余剰の DNA を除去する為に培養上清中に DNase 75 U/ml 及び MgCl₂ 10 mM を添加して、30 分インキュベート、培養上清を感染実験用に回収した。培養上清を一部分注して、p24 ELISA Kit (レトロテック社) によりウイルスの定量を行った。上清回収後、細胞を PBS で洗浄、ライシスバッファー (プロメガ社) を 150 µl 加えたものをウエスタンブロッティング用サンプルとした。

ii) インフェクション+ルシフェラーゼアッセイ: 培養上清中の p24 量を計測後、1 ng p24 量のウイルスを、 1.75×10^4 個/ウェルで 96 ウェルプレートに蒔いた 293T 細胞に感染させた。48 時間後に 200 µl のライシスバッファー (プロメガ社) を加えて細胞を溶解した。そのうちの 20 µl を用いて、ルシフェラーゼ活性を Centro LB 960 (ベルトールド社) により測定することにより、感染性を定量化した。

iii) ウエスタンブロッティング・アッセイ:

トランスフェクション後の細胞溶解液は遠心後、上清に等量の 2 x SDS サンプルバッファーを加えて、98°C で 5 分間ボイルしたものを 10 µl、12.5% の SDS ポリアクリルアミドゲルにアプライして電気泳動を行った。泳動後のゲルをニトロセルロース膜に転写後、膜を上下半分に分断して、下段は抗 Vif ウサギ抗体 (NIH AIDS Reagent を介して Dr. Dana Gabuzda より分与) で、上段は抗 HA モノクローナル抗体 (シグマ社) で一次抗体処理、次にペルオキシダーゼ結合抗ウサギまたは抗マウス抗体で二次抗体処理して、ECL (GE ヘルスケア社) により化学発光を行い、LAS3000 (富士フィルム社) で、Vif 蛋白及び APOBEC3G 蛋白をそれぞれ検出した。上段のニトロセルロース膜は、Restore Western Blot Stripping Buffer (ピアース社) で一次及び二次抗体を除去した後、抗β-アクチン・モノクローナル抗体 (シグマ社)、更に抗マウス二次抗体で処理して、β-アクチン蛋白を検出し、それを内部コントロールとした。

iv) G→A 変異アッセイ: 20 ng p24 量のウイルスを、 3.5×10^5 個/ウェルで 6 ウェルプレートに蒔いた 293T 細胞に感染させ、24 時間後に DNeasy DNA 抽出キット (キアゲン社) を用いてトータル DNA を抽出、env フラグメント (nt 8151-8756) を Expand High Fidelity DNA Polymerase (ロシュ社) により PCR 増幅、TOPO TA-Cloning Vector pCR4 (インビトロジェン社) に挿入して、ABI3130 シークエンサー (ABI 社) により遺伝子配列を決定した。

C. 研究結果

1) HIV-1 vif 遺伝子の遺伝子多様性

我々はまず HIV-1 サブタイプ A・B・C・G・A/E・A/G の vif 遺伝子を 37 種類クローニング (発現ベクター pCAGGS に挿入) して塩基配列を決定した。アミノ酸配列によるアラインメント (データ非表示) の結果、完全に保存されたアミノ酸は全 192 残基中わずか 78 アミノ酸 (40.6%) に過ぎず、過去に報告されてきた通り、実際に vif 遺伝子は非常に遺伝子多様性が高いことを確認した。一方、同一サブタイプ間では、サブタイプ A ($n=5$) で 144 アミノ酸 (75.0%)、サブタイプ B ($n=5$) で 154 アミノ酸 (80.2%) サブタイプ C ($n=9$) で 152 アミノ

酸 (79.2%)、サブタイプ A/E ($n=5$) で 177 アミノ酸 (92.2%)、サブタイプ A/G ($n=12$) で 114 アミノ酸 (60.0%) と、全サブタイプ間に比べ比較的相関性が高いことから、vif の遺伝子多

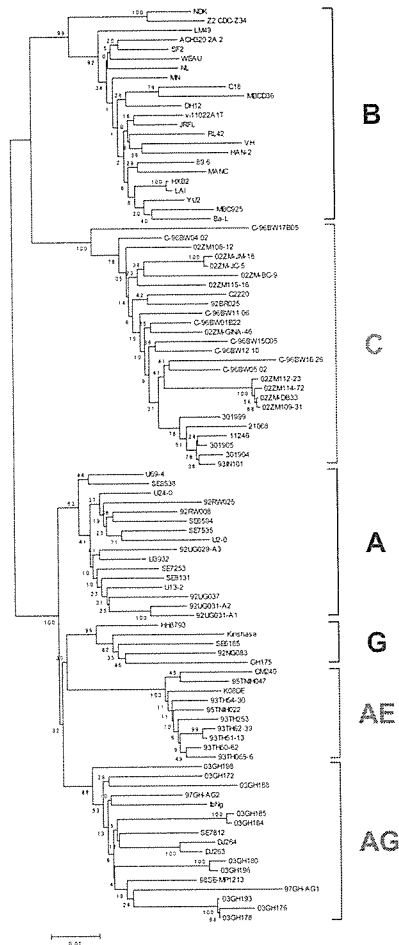


図1. HIV-1 vif 遺伝子の多様性

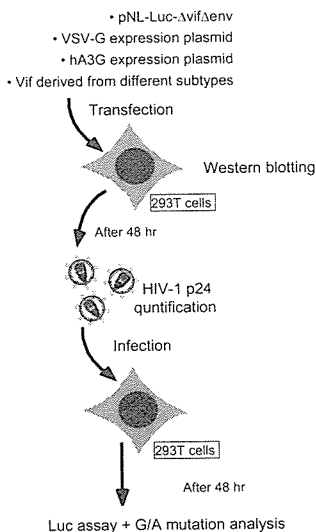


図2. in vitro Vif 蛋白機能テスト

様性は、サブタイプ内ではなくサブタイプ間の多様性によることが明らかになった。既知の vif 遺伝子も含む遺伝子系統樹を作製した結果、図1の様に、実際、サブタイプごとに高いブートストラップ値を示すクラスターを形成した。こうしたサブタイプ間での Vif のアミノ酸レベルでの多様性が、Vif 蛋白の機能の違い、即ち、このウイルス蛋白の本来の標的蛋白である抗レトロウイルス宿主因子 APOBEC3G に対する抗活性の違いとして現れる可能性が考えられた。

2) APOBEC3G 存在下でのサブタイプ別 HIV-1 Vif 蛋白の感染性増強能

サブタイプによる Vif 蛋白の in vitro での抗 APOBEC3G 活性の違いを検討するために、図2に示すような in vitro Vif 蛋白機能テストを行った。Env・Vif 欠損型ルシフェラーゼ・レポーター HIV-1 クローンと VSV-G 発現ベクター、APOBEC3G 発現ベクター、及び各サブタイプ別 Vif 発現ベクターを 293T 細胞にトランスフェクションして 2 日後に培養上清を回収して p24 を定量、同一 p24 量のウイルスを、それぞれ 293T 細胞に感染させた。48 時間後に細胞を溶解して、ルシフェラーゼ活性を測定することにより感染性を定量化し、サブタイプ別 HIV-1 Vif 蛋白の感染性増強能を比較検討した。この実験を行うにあたり、発現ベクターによって in trans に発現させる Vif 蛋白が、実際のウイルス複製における Vif 蛋白の発現量を反映する様に、トランスフェクトする NL 株 (サブタイプ B) 由来 Vif 発現ベクターの量を段階希釈して発現させ、NL 株全長野生型ウイルス DNA から cis に発現してくる Vif 蛋白の量と比較した。その結果、図3上に見られる様に、50 ng の Vif 発現ベクターをトランスフェクトした時に発現する Vif 蛋白のレベルが、野生型 DNA のトランスフェクトによる Vif の発現レベルに最も近いことが分かった。実際、一定量の APOBEC3G 存在下で Vif を限界希釈により発現させた時に得られたウイルスの感染性カーブ (図3下) においても、野生型ウイルスの感染性は、図3上と同量の Vif 発現ベクターを共発現させて得られたウイルスの感染性とほぼ一致していたことから、この条件を用いてまず 3 種のサブタイプ (B・C・A/E) から代表として 1 クローン

ずつ選び、*in vitro* Vif 蛋白機能テストを行った。その結果 (図 4)、サブタイプ B 代表 NL 株由来 Vif 蛋白に比べて、サブタイプ C (02ZM-DB33) Vif は 3 倍近い活性を、逆にサブタイプ A/E (93TH51-13) Vif は 10 倍以上低い値を示した。この違いは、Vif によるプロテオソーム分解が原因と思われる APOBEC3G の蛋白発現の違いと完全に逆相関していた。このサブタイプ間で異なる Vif の感染性増強能の普遍性を検討するために、作製した全 Vif 発現ベクターを用いて同実験を行ったところ、図 5 に示す様に、明らかにサブタイプ依存的に Vif 蛋白の感染性増強能の違いが認められた。その活性の強度は C > (A/G) > B > A > A/E の順であることが明らかになった。また図 4 と同様に、Vif の感染性増強能と APOBEC3G の蛋白発現が全てのサブタイプにおいて完全に逆相関していた。この結果が実際に Vif によるプロテオソーム分解が原因であるか否かを検討する為に、Vif 及び APOBEC3G 発現ベクターのトランスフェクション後に、プロテオソーム阻害剤 MG132 を添加したところ、全てのサブタイプ由来 Vif 蛋白の共発現において、APOBEC3G の発現が回復することが明らかになった (図 6)。つまり Vif 蛋白によるサブタイプ依存的な感染性増強能の違いが、即ち Vif 蛋白による APOBEC3G のプロテオソーム分解能の違いであることが確認できた。

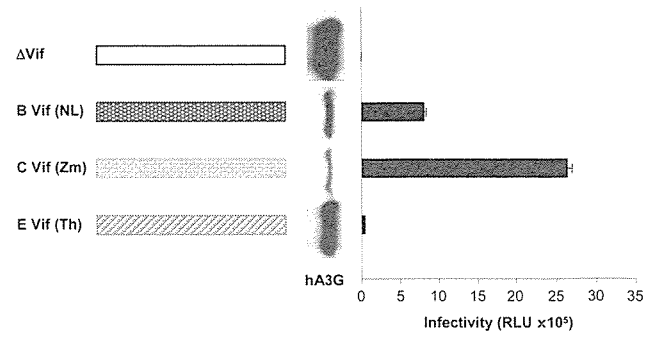


図 4. 3 種のサブタイプ由来 Vif の感染性増強能と APOBEC3G 分解能

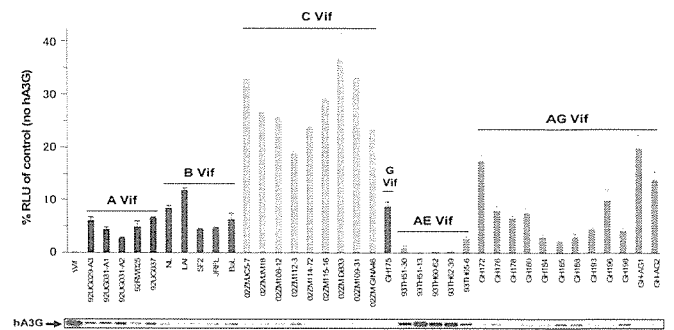


図 5. HIV-1 Vif 蛋白のサブタイプ依存的感染性増強能

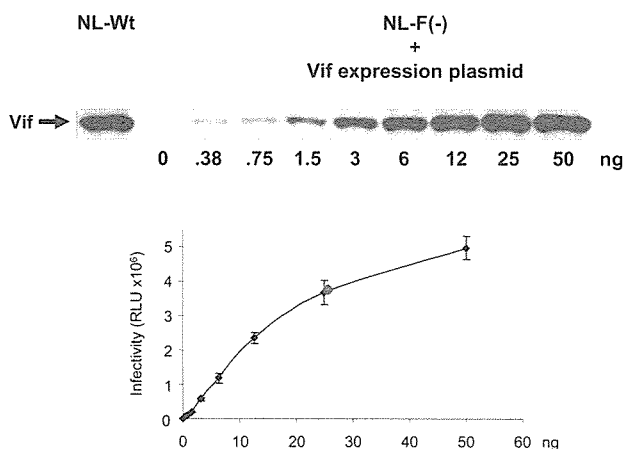


図 3. Vif 蛋白の *cis* 発現レベルの検討 (曲線中の赤丸が野生型の感染性に相当)

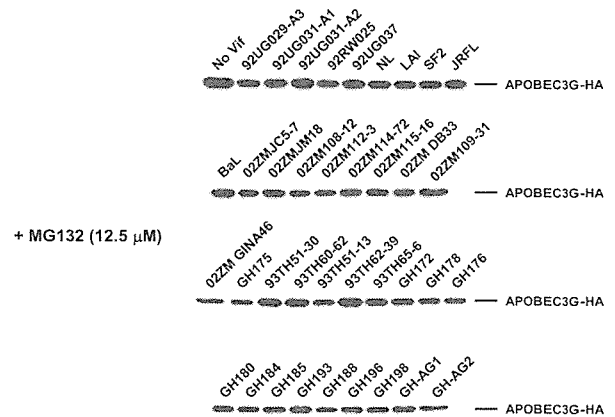


図 6. プロテオソーム阻害剤存在下における Vif による APOBEC3G 分解の抑制

3) サブタイプ別 HIV-1 Vif 蛋白の G→A 変異抑制

抗レトロウイルス宿主因子である APOBEC3G は、HIV-1 の逆転写の際、マイナス鎖 DNA の CCU 配列を好んで標的とし中央の C を U に変える、つまりプラス鎖では TGG を TAG に変えることで (フレームが一致すれば) ストップコドンを頻発させることにより、ウイルスの感染性を失わせる機能を有してい

るが、サブタイプ別 Vif 蛋白による感染性増強能の違いが APOBEC3G プロテオソーム分解能によるものであれば、APOBEC3G によるウイルスの逆転写産物の G→A 変異を抑えているはずである。実際に Vif による G→A 変異抑制活性とパラレルか否かを検討するため、異なるサブタイプ由来 Vif 蛋白の共発現で得られたウイルスが感染したそれぞれの細胞からトータル DNA を抽出して、G→A 変異のホットスポットといわれる env 遺伝子の 3'側領域を PCR 増幅して DNA クローニング、各 10 クローン、約 600 塩基ずつの塩基配列決定を行った。図 7 で見られる様に、Vif 変異 (Δ Vif) ウイルスの場合には、確かに全 TGG 配列 (赤字部分) でことごとく TAG 変異が起きており、APOBEC3G の配列特異的な G→A 変異活性を示していた。一方、サブタイプ別 Vif 蛋白の共発現によるウイルスの場合は、感染性増強能及びプロテオソーム分解能の違いと完全に一致した G→A 変異抑制活性が認められた。以上のことから我々はサブタイプ依存的 Vif 蛋白の生物学的活性の違いは、抗 APOBEC3G 活性の違いと結論付けることができた。

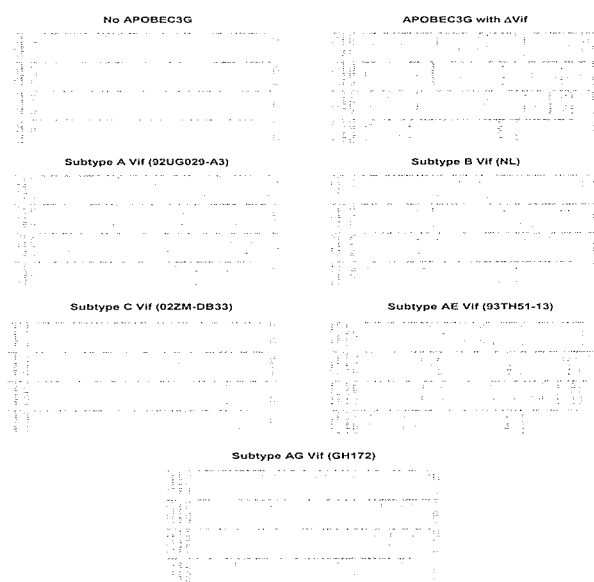


図 7. Vif 蛋白のサブタイプ依存的 G→A 変異抑制活性

4) 抗サブタイプ B-Vif 抗体の他のサブタイプ由来 Vif 蛋白に対する低反応性

上記の結論を導くにあたっては、本研究で作製した全ての Vif 発現ベクターから同レベルの Vif 蛋白の発現があることを示すことが不可欠

である。我々はサブタイプ B 由来精製 Vif 蛋白に対するウサギ血清 (NIH AIDS Reagent より分与) を用いて各 Vif 蛋白の発現をイムノ・ブロッキングにて確認した。その結果、抗 Vif 血清はサブタイプ B 由来 Vif 蛋白には特異的に反応するものの、他のサブタイプの Vif 蛋白には非常に弱く反応、あるいは全く反応しなかった。これは抗原であるサブタイプ B 由来 Vif の抗原性の高い部分が B 特異的であるために他のサブタイプの Vif への反応性が悪い可能性が考えられる。実際、サブタイプ C の Vif は非常に強く APOBEC3G の活性を強く抑えているので、Vif は確実に発現していると言えるが、その一方で、サブタイプ A/E 由来 Vif では抗 APOBEC3G 活性が大変低いことから、発現ベクターでの Vif 蛋白の発現自体が悪い可能性は否定できない (図 8)。したがって図 4、5 及び 7 で認められた Vif 蛋白のサブタイプ依存的抗 APOBEC3G 活性を裏付けるには、全サブタイプ由来の Vif 蛋白の発現を必ず確認する必要がある。この問題を克服すべく現在、数種類の Tag 付けを試みており、また同時に Vif の保存された領域をもとにペプチドを合成して、複数のサブタイプ由来 Vif 蛋白に反応し得る抗 Vif ペプチド抗体を作製しているところである。

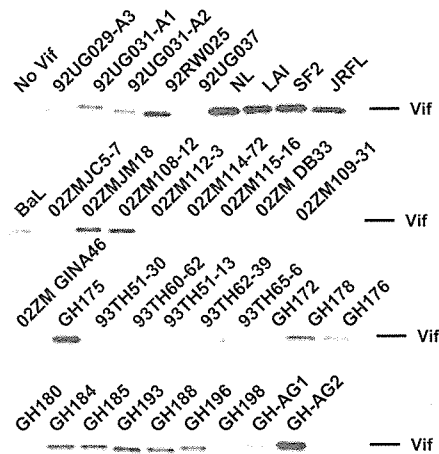


図 8. 抗サブタイプ B-Vif ウサギ血清の他のサブタイプ由来 Vif 蛋白に対する低反応性

D. 考 察

本研究課題「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」において、今年度はまず、Vif 蛋白のサブタイプ間での遺伝子多様性に着目して、

臨床分離株由来 Vif 蛋白の生物学的活性の違いの有無を検討した。

Vif 蛋白は、HIV-1 基礎研究において長期間に渡りその機能が不明であったが故に、アクセサリ蛋白と呼ばれてきた。が、このウイルス蛋白の発見から 15 年を経て、ついに細胞内宿主因子 APOBEC3G をターゲットとして、この抗レトロウイルス蛋白からウイルス核酸を保護する重要な働きを担っていることが明らかになり、Tat 及び Rev 蛋白に続いて第三の HIV-1 制御遺伝子といわれるまでになった。が、過去 5 年に渡る世界の Vif/APOBEC3G 研究は、サブタイプ B の Vif、また CD4⁺T 細胞株 H9 由来の APOBEC3G をベースに進められてきたために、他のサブタイプ由来 Vif 蛋白ではその生物活性はどうか、また APOBEC3G の遺伝子多型性 (polymorphism) による抗ウイルス活性の多様性はあるのかという点については、等閑にされてきた感がある。

本研究課題では特にその点を重視し、今年度は、HIV-1 サブタイプ別の Vif 蛋白の生物学的活性の違いをまず調べた。その結果、確かに由来するサブタイプが異なると、Vif 蛋白のウイルス感染増強能、それを説明する APOBEC3G プロテオソーム分解能及び G→A 変異抑制能において、即ち抗 APOBEC3G 活性において、大きな違いがあることが明らかになった。特にサブタイプ C 由来 Vif 蛋白で最もその活性が顕著であったことから、今回の実験結果は、現在、世界の新規 HIV 感染の 50%以上を占め猛烈な勢いで蔓延しているサブタイプ C ウイルスの感染力を説明する重要なデータとなるかもしれない。と同時にサブタイプ A/E 由来 Vif 蛋白で認められた低レベルの抗 APOBEC3G 活性は、サブタイプ A/E ウイルスの伝播が性交渉等による濃厚曝露によって大量のウイルスコピーが侵入する時のみしか成立し得ない可能性を示唆するものかもしれない。但し、前述した如くこの Vif 蛋白によるサブタイプ依存的抗 APOBEC3G 活性を立証するには、この *in vitro* 実験系が問題なく稼働している、つまりここでは全サブタイプ Vif 蛋白が全て発現していることを示すデータが必要であり、現在それに向けて複数のアプローチを試みているところである。

同時に来年度以降は、こうした Vif 蛋白の抗 APOBEC3G 活性を規定する領域の同定を行うために、vif 遺伝子のサブタイプ間での組換えを行い、更にアミノ酸レベルまで絞込んで解析する。また抗 APOBEC3G 活性の違いが、サブタイプ別の各 Vif 蛋白の APOBEC3G への結合能の違いによるものか、あるいは APOBEC3G プロテオソーム分解を行うユビキチン複合体内の Cullin5 または ElonginC との結合能の違いによるものかを調べる。それと共に前述した様に APOBEC3G 側でも研究を進める為、まず APOBEC3G の polymorphism を検索、その抗 HIV-1 活性の多様性の有無、またサブタイプ別 Vif に対する感受性・抵抗性を解析しながら、更に HIV-1 感染者の個体内における末梢血リンパ球での APOBEC3G 発現レベルの推移と病態進行の相関性について検討していく予定である。

E. 結論

臨床分離株由来の Vif 蛋白は、確かにサブタイプの違いにより差異ある感染増強性・G→A 抑制活性を示したことから、レベルの異なる抗 A3G 活性を有することが示唆された。この結果が、更なる実験で確認できれば、それはサブタイプにより HIV-1 の伝播性に強弱がある可能性を内包することとなる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tachiwana, H., 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) Maeda, M., Sawa, H., Tobiume, M., Tokunaga, K., Hasegawa, H., Ichinohe, T., Sata, T., Moriyama, M., Hall, W.W., Kurata, T., and Takahashi, H. Tristetraprolin inhibits HIV-1 production by binding to genomic RNA. *Microbes Infect.* 8:2647-2656, 2006.
- 3) Nakai-Murakami, C., Shimura, M., Kinomoto, M., Takizawa, Y., Tokunaga, K., Taguchi, T.,

Hoshino, S., Miyagawa, K., Sata, T., Kurumizaka, H., Yuo, A., and Ishizaka, Y. HIV-1 Vpr induces ATM-dependent cellular signal with enhanced homologous recombination. *Oncogene*. 26:477-486, 2007.

2. 学会発表

- 1) 田口 崇、Gruss OJ、木ノ本正信、志村まり、徳永研三、佐多徹太郎、石坂幸人：HIV-1 アクセサリー遺伝子 vpr による M 期染色体の異常と Ran の機能解析。第 23 回染色体ワークショップ、(広島) 2006.1.
- 2) 徳永研三：HIV セミナー。神戸理化学研究所・発生再生科学総合研究センター・セミナー (神戸) 2006.3.
- 3) Tachiwana H, Nakai-Murakami C, Hoshino S, Shimura M, Taguchi T, Kurumizaka H, Tokunaga K, Sata T, Ishizaka Y: HIV-1 Vpr induces DA double-strand breaks. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting, May 2006, NY, USA.
- 4) Shimura, M., Toyoda, Y., Kinomoto, M., Tachiwana, H., Tokunaga, K., Kurumizaka, H., Yoda, K., Yanagida, M., Sata, T., and Ishizaka, Y.: HIV-1 Vpr Causes Aberrant Sister Chromatid Separation. 第 20 回国際生化学・分子生物学会議 (京都) 2006.6.
- 5) 徳永研三、木ノ本正信、坂本優子、巽正志、志村まり、石坂幸人、倉田 毅、佐多徹太郎：宿主因子 APOBEC3G に対する HIV-1 Vif の抑制活性の多様性。第 54 回日本ウイルス学会総会 (名古屋) 2006. 11.
- 6) 徳永研三、木ノ本正信、志村まり、石坂幸人、佐多徹太郎：APOBEC3 ファミリーによる LINE-1 レトロトランスポゾン抑制効果。第 54 回日本ウイルス学会総会 (名古屋) 2006. 11.
- 7) 木ノ本正信、岸上哲士、佐多徹太郎、徳永研三：マウス細胞を利用した HIV-1 複製に関与する宿主因子の検索。第 54 回日本ウイルス学会総会 (名古屋) 2006. 11.
- 8) 木ノ本正信、阿部賢治、鈴木哲朗、倉田 毅、佐多徹太郎、徳永研三：G 型肝炎ウイルス (GBV-C/HGV) 産生系の樹立。第 54 回日本ウイルス学会総会 (名古屋) 2006. 11.
- 9) 木ノ本正信、岸上哲士、佐多徹太郎、片野晴隆、徳永研三：KSHV と HIV-1 の重感染における分子機構についての研究。第 54 回日本ウイルス学会総会 (名古屋) 2006. 11.
- 10) 志村まり、豊田雄介、木ノ本正信、徳永研三、依田欣哉、柳田充弘、佐多徹太郎、石坂幸人：HIV-1 Vpr による姉妹染色分体の早期分離異常。第 29 回日本分子生物学会 (名古屋) 2006. 12.
- 11) 木ノ本正信、志村まり、石坂幸人、佐多徹太郎、徳永研三：ヒトレトロトランスポゾン LINE-1 に対する DNA 編集酵素 APOBEC3 の抑制効果。第 29 回日本分子生物学会 (名古屋) 2006. 12.
- 12) Kinomoto M, Shimura M, Ishizaka Y, Sata T, and Tokunaga K: Differential inhibitory activities of APOBEC3 family proteins on retroviruses and LINE-1 retrotransposon. 3rd Dominique Dormont International Conference on "Host pathogen interactions in chronic infections", December 2006, Bordeaux, France.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
なし

10. エイズ発症阻止に関わる宿主因子・病態の研究

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 教授

研究要旨 慢性期の HIV 感染者の血中ウイルス量（セットポイント）を決定する因子を探索するために蛍光マイクロビーズアレイを用いて、セットポイントの低い患者群（5,000 コピー/ml 未満）と高い患者群（30,000 コピー/ml 以上）および健常者で血漿中のサイトカインを測定、比較した。その結果、IL-8（全例で検出限界以下）、IL-1beta、IL-2、IL-13、RANTES、Eotaxin では HIV 感染者と健常者の間に差が見られなかったが、測定したその他のサイトカインにおいては HIV 感染者において血中濃度が有意に上昇していた。また、HIV 感染者群の比較では、IP-10 が高セットポイント群で有意に血中濃度が高いことがわかった。

A. 研究目的

HIV 感染症では感染直後に一過性の高ウイルス血症を示すが、その後特異的免疫応答の出現と共に血中ウイルス量は減少し、慢性期に移行する。慢性期には比較的安定した血中ウイルス量（セットポイント）が維持されが、セットポイントは感染個体によって大きく異なり、HIV 感染症の予後と相関する指標として臨床的にも重要とされている。急性期および慢性期の血中ウイルスコントロールには細胞傷害性 T 細胞（CTL）が重要な役割をすることが示唆されているが、セットポイントを規定する宿主因子の詳細は不明である。そこで本研究ではセットポイントを規定する因子を探索し、HIV 感染症における免疫病態、AIDS 発症のメカニズムを明らかにすることを目的とする。

セットポイントは感染個体の重要なパラメーターであり、可能な限り臨床材料を用いた研究が必要と考えられる。また、免疫システムは複雑なネットワークの上に成り立っており、単一の因子について解析を行っても複雑な HIV の感染病態を明らかにすることは困難である。本研究では、患者負担の少ない少量の末梢血を基に、ハードウェアとしては蛍光マイクロアレイと蛍光マイクロビーズアレイを用いた可能な限り網羅的な解析法の開発とその応用研究を目指す。

本年度はまず HIV 感染が個体内の免疫学的環境にどのような影響を及ぼすのかを明らか

にするため、HIV 感染者と健常人の血漿を用いて、血中の各種免疫関連の液性因子の測定を行うことを試みた。さらにセットポイントの HIV 量が低い“低 HIV 群”とセットポイントの HIV 量が高い“高 HIV 群”との間での比較解析を行い、セットポイントに影響を与える因子の同定を試みた。

B. 研究方法

HIV 感染者 30 名、健常人 11 名、計 41 名の血漿を用いた。HIV 感染者のうち血中 HIV 量が 5,000 コピー/ml 未満の 17 名を低 HIV 群（CD4 数 509 ± 114 、血中 HIV 量 $\log_{10} 3.03 \pm 0.588$ ）、30,000 コピー/ml 以上の 13 名を高 HIV 群（CD4 数 441 ± 89 、血中 HIV 量 $\log_{10} 4.79 \pm 0.393$ ）と 2 群に分け、解析を行った。

サイトカインの測定には Biosource 社の Human Cytokine 25-lex Kit を用いた。測定対象としたサイトカインは以下の 25 種類である：IL-1beta、IL-1Ra、IL-2、IL-2R、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-17、GM-CSF、TNF-alpha、IFN-gamma、IFN-alpha、IL-8、IP-10、MIG、MIP-1alpha、MIP-1beta、MCP-1、RANTES、Eotaxin。（検出限界は 3 pg/ml～30 pg/ml）。末梢血単核球（PBMC）を得られた一部の HIV 感染者 14 人については HIV の Gag, Pol, Env, Nef タンパク質全体を網羅するオーバーラップペプチドを抗原として ELISPOT アッセイを行い、HIV 特異的 CTL の頻度を測定した。

(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

まず、HIV 感染者と健常人を比較することで HIV 感染が免疫系に与える影響を解析した。その結果、IL-8(全例で検出限界以下)、IL-1beta、IL-2、IL-13、RANTES、Eotaxin では差が見られなかったが、その他のサイトカインにおいては

HIV 感染者において血中濃度が有意に上昇していることが明らかとなった。個体間で測定した各種サイトカインの産生パターンを比較したところ、血中濃度が全体として低い感染者と高い感染者(図1)のパターンに分かれていた。HIV 特異的 CTL の測定を行うことのできた HIV 感染者の中で、特に CTL 頻度の低かった4人はいずれも全体的にサイトカイン濃度が低かった。

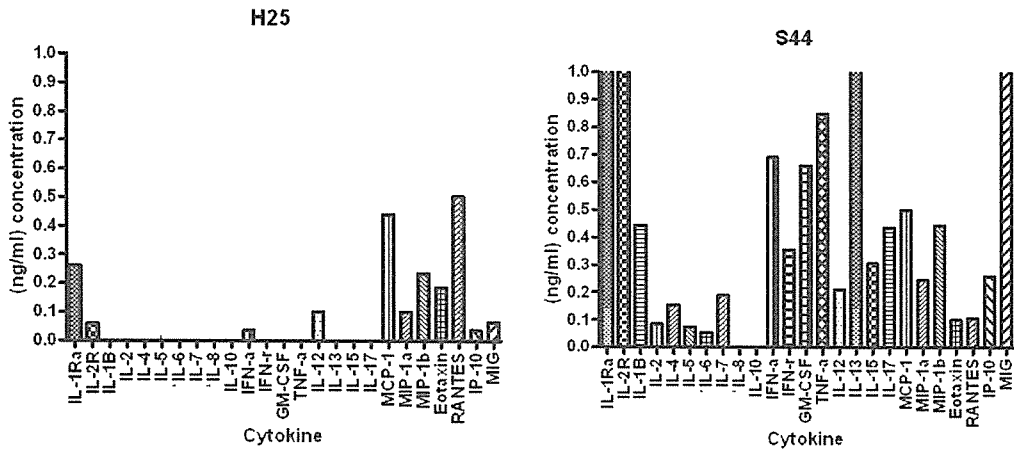


図1. HIV 感染者におけるサイトカイン産生パターン

続いて高 HIV 群、低 HIV 群間での比較を行ったところ IP-10 が低 HIV 群と比べて高 HIV 群で有意に血中濃度が高いことがわかった(図2)。さらに血中 IP-10 濃度と血中 HIV 量、CD4 数との相関関係を調べたところ、血中 IP-10 濃度と血中 HIV 量で正の相関関係を示した(図3a)。また CD4 数が高いほど IP-10 濃度が低い傾向があった(図3b)。その他のサイトカインではセッポイントの異なる群で有意な差は見られなかった。

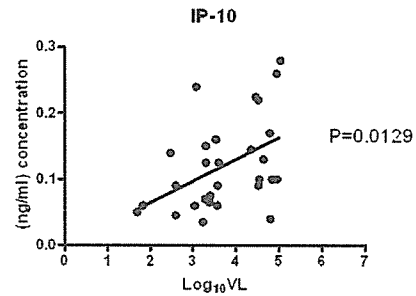


図3a. 血中 IP-10 濃度と HIV 量

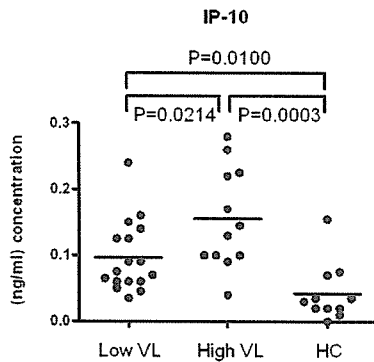


図2. 各群における血中 IP-10 濃度

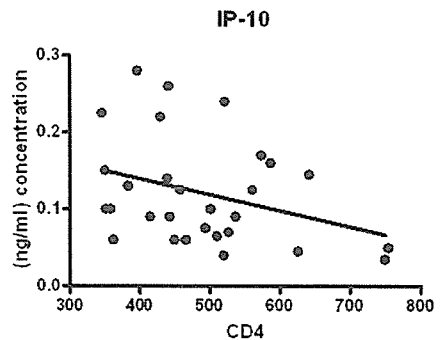


図3b. 血中 IP-10 濃度と CD4 数

D. 考 察

本研究では HIV 感染により今回測定した 25 種類のサイトカインのうち、19 種類のサイトカインにおいて血中濃度の上昇が見られた。またセットポイントの異なる HIV 感染者間では IP-10 の血中濃度が有意に異なっており、血中 HIV 量と相関することが明らかとなった。

多くのウイルス感染症ではインターフェロンなどのサイトカインによって感染防御を行っているが、HIV 感染症においても今回測定対象としたサイトカインの大部分が有意に上昇していた。IL-1、IL-6、TNF-alpha などの炎症性サイトカインも全て上昇しており、HIV 感染下では個体レベルで免疫学的に“活性化された”状態にあることが明らかとなった。また個体間での産生パターンを比較したところ、全体的に血中濃度が高い感染者と低い感染者がいることが明らかとなり、前者は特に免疫系全体が活性化されている状態にあると考えられるが、高サイトカイン群と低サイトカイン群間で血中 HIV 量、CD4 数に違いは認められなかった。しかしながら CTL 応答が特に低い感染個体では血中サイトカイン濃度も全体的に低く、免疫学的に静的な状態に近いことが示唆された。CTL 応答が特に低かった 4 名のうち、3 名は低 HIV 群の中でも HIV 量が低く CD4 数が高い感染者であり、このような感染者において HIV 量が低く抑えられているメカニズムをさらに詳細に検討することが重要と考えられる。

一方、セットポイントの異なる群で相違が見られたのは IP-10 のみであった。IP-10 (interferon inducible protein 10/CXCL10) はインターフェロン γ により誘導され、Th1 タイプの活性化 T 細胞の遊走に関与するケモカインであり、ウイルス・細菌感染症、自己免疫疾患などの Th1 優位の疾患において重要な役割を果たしていることが知られている。IP-10 に関しては PBMC において HIV 複製を高めるという報告や HIV-gp120 が IP-10 の発現を誘導するという報告がある。また HAART 後には血中 IP-10 濃度が低下するという報告もあり、本研究結果を合わせると個体内で IP-10 濃度と HIV 量は相乗的に上昇していると考えられる。

E. 結 論

HIV 感染においてセットポイントを規定する因子を明らかにするため、蛍光マイクロビーズアレイシステムを用いた網羅的な免疫関連因子の

測定を行い、HIV 感染では慢性的な免疫学的活性化状態にあること、Th1 タイプの免疫応答に重要である IP-10 の血中濃度が高 HIV 群で有意に上昇していることを明らかにした。本年度は個体レベルでの免疫学的状態を把握するため、血中サイトカイン量の測定を行った。次年度以降は同じ HIV 感染者について免疫担当細胞の機能的な相違を明らかにするため、PBMC、あるいは分画した T 細胞、単球などを HIV 特異的、あるいは非特異的な刺激下で培養した時に産生されるサイトカインに関して同様の検討を行う。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Maeda, T., Fujii, T., Matsumura, T., Endo, T., Odawara, T., Itoh, D., Inoue, Y., Ohkubo, T., Iwamoto, A., and Nakamura, T. AIDS-related cerebral toxoplasmosis with hyperintense foci on T1-weighted MR images: A case report. *J Infect* 53:e167-e170, 2006.
- 2) Shinoe, T., Wanaka, A., Nikaido, T., Kakuta, Y., Masunaga, A., Shimizu, J., Duyckaerts, C., Imaizumi, K., Iwamoto, A., and Kanazawa, I. The pro-apoptotic human BH3-only peptide harakiri is expressed in cryptococcus-infected perivascular macrophages in HIV-1 encephalitis patients. *Neurosci Lett* 393: 102-107, 2006.
- 3) Hoshino, S., Sun, B., Konishi, M., Shimura, M., Segawa, T., Hagiwara, Y., Koyanagi, Y., Iwamoto, A., Mimaya, J., Terunuma, H., Kano, S., and Ishizaka, Y. Vpr in plasma of HIV-1-positive patients is correlated with the HIV-1 RNA titers. *AIDS Res Hum Retrovir.* (in press)
- 4) Wichukchinda, N., Kitamura, Y., Rojanawiwat, A., Nakayama, EE., Song, H., Pathipvanich, P., Auwanit, W., Sawanpanyalert, P., Iwamoto, A., Shioda, T., and Ariyoshi, K. The polymorphisms in DC-SIGNR affect susceptibility to HIV-1 infection. *AIDS Res Hum Retrovir.* (in press)
- 5) Fujii, T, Nakamura T, Iwamoto A. Pneumocystis pneumonia in patients with HIV infection - Clinical manifestations, laboratory findings and

radiological features -. J Infect Chemother. (in press)

- 6) Maeda, T., Oyaizu, N., Endo, T., Odawara, T., Nakamura, T., Iwamoto, A., Fujii, T. Pneumocystis jiroveci pneumonia in an AIDS patient: Unusual manifestation of multiple nodules with multiloculated cavities. Eur J Radiol. (in press)

2. 学会発表

- 1) 渡邊紗也香、立川（川名）愛、小田原 隆、中村哲也、岩本愛吉：HIV 伝播が確認された感染者間における HIV の遺伝子解析。第 20 回日本エイズ学会（東京）2006 年 11 月

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

1 1. HIV 感染による中枢神経組織破壊メカニズムの解明

分担研究者 小柳 義夫 京都大学ウイルス研究所 教授

研究協力者 三浦義治 (京都大学ウイルス研究所 助手)

北山裕子 (京都大学ウイルス研究所 大学院生)

安藤良徳 (京都大学ウイルス研究所 大学院生)

研究要旨 エイズウイルス感染による脳組織破壊を詳細に解析する実験系として、まずラット脳海馬スライス培養系を用い、HIV 感染マクロファージと共培養実験を行った。その結果、海馬歯状回の神経細胞層を中心に細胞障害ならび神経細胞間配位に障害が起き、さらに神経細胞の axon 形成阻害が誘導されることが判明した。そこで、マウス胎児脳分離細胞から神経細胞軸索突起伸張および neurite 形成を誘導する培養実験系を用いて、その axon 形成能に対する HIV 感染マクロファージの影響を検討した。その結果、HIV 感染マクロファージの培養上清中には神経細胞軸索突起伸張抑制活性があり、そのひとつとしてウイルス蛋白質である Vpr 蛋白質が包含されることがわかった。また、マウス胎児脳由来 neurosphere とヒト末梢血単球由来マクロファージの混合培養により、CD68 陽性のマウスミクログリア細胞の比率が著増し、ミクログリオーシスを再現できることが判明した。

A. 研究目的

本研究の目的は、エイズ病態のなかで大きな問題となる脳症のメカニズム解明と有効な治療法の開発である。現存の逆転写阻害剤およびプロテアーゼ阻害剤などの治療薬は中枢神経系への薬剤移行効率が低く、脳症に対して有効な治療薬とはなり得ない。さらにこの脳症の病態メカニズムは未だ解明されていない部分が多い。それは、エイズ脳症患者の脳内ではエイズウイルスが神経細胞へはほとんど感染しないのにも関わらず、神経細胞の破壊がなぜ持続的に進行するのか、さらに、脳内に浸潤したマクロファージがアストロサイトおよびミクログリアなどの中枢神経系細胞をどのようにして持続的に活性化させ増殖させるのか(アストロサイトーシスおよびミクログリオーシス)という未解明の課題がある。

B. 研究方法

1) 神経細胞軸索障害性の検討

エイズ脳症患者より分離した HIV-1_{JRFL} をヒトマクロファージに MOI1 にて感染させ、

Wister Hannover GALAS 哺乳ラットより脳海馬スライス培養系を作製し、培養開始後 2 週間後のフィルター上のスライス片と共培養を行った。そして、細胞の形態と細胞種の空間的配位の変化を経時的に顕微鏡下に観察し、立体画像解析、さらに組織固定後、免疫染色法を行い、共焦点顕微鏡により観察を行った。また、ICR マウス胎児脳分離細胞に高グルコース培地と HIV-1_{JRFL} 感染マクロファージ培養上清を添加し、神経細胞の軸索突起伸張過程および neurite 形成を time-lapse 顕微鏡を用いてリアルタイムに解析を行った。

2) マウス neurosphere とヒト末梢血単球由来マクロファージとの混合培養系

健康人ヒト末梢血単球より分離培養したマクロファージを ICR マウス胎児由来 neurosphere と混合培養を 12 日間行い、フローサイトメトリー法による解析を行った。

(倫理面への配慮)

本動物実験の施行にあたり本学実験施設に設置されている実験動物委員会に動物愛護上の配慮ならびに感染実験の適切な実験施行を行

うように指導を受け、すべての実験は承認されている。また本学において血液の分与に際し本学医学研究科倫理委員会の承認のもとインフォームドコンセントを得、採血を行い、感染実験に使用した。

C. 研究結果

1) ラット脳海馬スライス培養系において beta-3-tubulin, neurofilament protein, MAP2 の免疫染色法を施行した結果、HIV 感染マクロファージ共培養により、コントロールのそれに比してスライス内の axon 数が著明に減少していた (図 1)。次に、マウス脳分離細胞を血清添加メディウム下にて貼付培養を行い、axon 伸張および neurite 形成を誘導する実験系に HIV 感染マクロファージの培養上清を添加すると、神経前駆細胞からの神経細胞への分化過程における、その細胞からの neurite 数の減少、および、その axon 長の伸張不全を認めた (図 2A, B)。そして、この HIV 感染マクロファージ培養上清添加した神経細胞分化誘導実験に抗 Vpr 抗体を添加すると axon 長の伸張回復を認めた (図 2C)。次に、この培養系に精製 Vpr 蛋白質を添加するとマウス脳分離細胞の axon 伸張が抑制された。HIV 感染マクロファージ培養上清添加時は、neurite 数の減少とその axon 長の伸張不全が見られたが、精製 Vpr 蛋白質を添加時には、axon 長の伸張不全のみであり、すなわち、軸索決定機構に対する阻害作用があることが判明した (図 3)。さらに、ラット脳海馬スライス培養系に精製 Vpr 蛋白質を添加するとスライス内の axon 数は著明に減少した (図 4A, B)。さらに HIV 感染マクロファージメディウム添加および Vpr 添加時には、この分化培養系における神経細胞のミトコンドリア膜電位が減少し (図 5A)、さらに細胞内 ATP 濃度が減少も低下していた (図 5B)。これらの結果より、ミトコンドリア機能低下を伴う axon 伸張障害が存在することが示唆された。

2) マウス neurosphere とヒトマクロファージの混合培養系から細胞を回収してフローサイトメトリー法で解析した。その結果、非共培養系におけるマウス CD68 陽性のミクログリアは

5.79%であったのに対し、マクロファージ共培養系では 15.57% と著明に増加していた。またこの抗マウス CD68 抗体はヒト CD68 分子に対して反応しないことを確認した。

D. 考察

1) これまで HIV Vpr 蛋白質はアポトーシス誘導因子として知られているが、今回の研究により神経細胞軸索伸張阻害因子としての働きもあることが判明した。このメカニズムにはミトコンドリア機能低下を伴っていることから KIF など motor 蛋白質の関与が考えられた。

2) 高密度 neurosphere 内にはミクログリアが混在することが知られている。この浮遊培養系を用いてミクログリアの増殖および分化の可能性を検討した。これまでの報告から NG2 陽性のグリア前駆細胞は生体内においてミクログリアへと分化する可能性が指摘されているが、実証されていない。本研究ではミクログリアの増加にはミクログリアの活性化に伴う増加に加えて、NG2 陽性のグリア前駆細胞からの分化が促進されている可能性も考えられた。

E. 結論

小型動物を用いたエイズ脳症の治療効果評価系の確立に向けて一定の学問的進歩が得られた。そして、特に HIV 感染マクロファージならびに Vpr 蛋白質のミトコンドリア障害による作用に拮抗する薬剤の開発をめざす。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miura Y, Kitayama H, Andou Y, Koyanagi Y: HIV encephalopathy and neural stem cell virology. *Brain and Nerve* 58: 553-559, 2006.
- 2) Miura Y, Koyanagi Y: HIV encephalopathy. *Jpn Med Assoc J* 49: 212-218 2006.
- 3) Eda Y, Murakami T, Ami Y, Nakasone T, Takizawa M, Someya K, Kaizu M, Izumi Y, Yoshino N, Matsushita S, Higuchi H, Matsui H, Shinohara K, Takeuchi H, Koyanagi Y,

- Yamamoto N, Honda M: Anti-V3 humanized antibody KD-247 effectively suppresses ex vivo generation of human immunodeficiency virus type 1 and affords sterile protection of monkeys against a heterologous simian/human immunodeficiency virus infection. *J Virol* 80: 5563-5570, 2006.
- 4) Futahashi Y, Komano J, Urano E, Aoki T, Hamatake M, Miyauchi K, Yoshida T, Koyanagi Y, Matsuda Z, Yamamoto N: Separate elements are required for ligand-dependent and -independent internalization of metastatic potentiator CXCR4. *Cancer Sci.* (in press)
- 5) Koyanagi Y, Tanaka Y, Ito M, Yamamoto N: Humanized mice for human retrovirus infection. *Curt Top Microbiol Immunol.* (in press)
2. 学会発表
- 1) Aoki J, Sato K, Miura Y, Koyanagi Y: Incorporation of HIV-1 Env into virions is regulated by a tetraspanin. *Retroviruses Meeting*, May 2006, Cold Spring Harbor (NY), USA.
- 2) Yoshida T, Kawano Y, Aoki J, Sato K, Komano J, Miura Y, Tanaka Y, Koyanagi Y. A specific modification of the CXCR4 trafficking: Blocking HIV entry. *Retroviruses Meeting*, May 2006, Cold Spring Harbor (NY), USA.
- 3) 佐藤 佳、青木 淳、大黒恵理子、佐野浩一、田中勇悦、小柳義夫：宿主因子の過剰発現による HIV-1 Env タンパク質のビリオンへの取り込み抑制。近畿エイズ研究会（大阪）2006年5月
- 4) 北山裕子、三浦義治、安藤良徳、星野重樹、石坂幸人、小柳義夫：エイズ脳症における神経細胞の軸索伸張障害メカニズムの解析。近畿エイズ研究会（大阪）2006年5月
- 5) Kitayama H, Miura Y, Ando Y, Hoshino S, Ishizaka Y, Koyanagi Y: The axon outgrowth of neuron was inhibited by HIV-1 infected macrophage. *The 13th East Asia Joint Symposium on Biomedical Research*, July 2006, Seoul, Korea.
- 6) Sato K, Aoki J, Daikoku E, Sano K, Tanaka Y, Koyanagi Y: Reduced infectivity of HIV-1 released from CD63-overexpressed cells. *Kumamoto AIDS seminar*, September 2006, Aso, Kumamoto.
- 7) Hoshino S, Sun B, Konishi M, Koyanagi Y, Ishizaka Y: Detection of serum Vpr in HIV-1-positive patients and the mode of viral reactivation from latently infected cells. *Kumamoto AIDS seminar*, September 2006, Aso, Kumamoto.
- 8) 星野重樹、孫賓蓮、古西 満、小柳義夫、石坂幸人：HIV-1 Vpr のウイルス再活性における役割。第 54 回日本ウイルス学会（名古屋）2006年11月
- 9) 篠田康彦、田中勇悦、三浦義治、鈴木陽一、小柳義夫：CCR5 指向性 HIV-1 感染防御因子（CD4 因子）産生細胞株に特異的な発現遺伝子の探索第 54 回日本ウイルス学会（名古屋）2006年11月
- 10) 北山裕子、三浦義治、安藤良徳、星野重樹、石坂幸人、小柳義夫：HIV-1 感染マクロファージによる神経細胞の軸索伸張障害メカニズムの解析。第 54 回日本ウイルス学会（名古屋）2006年11月
- 11) 小柳義夫、三沢尚子、佐藤 佳、伊藤 守：HIV 感染モデル動物としてのヒト造血細胞移植 SCID マウスの開発。第 54 回日本ウイルス学会（名古屋）2006年11月
- 12) 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 の感染価抑制。第 54 回日本ウイルス学会（名古屋）2006年11月
- 13) Koyanagi Y: Roles of tetraspanin in HIV-1 infection. *Japan-German joint AIDS conference*, Bohem, 2006.
- 14) 小柳義夫、三沢尚子、佐藤 佳、伊藤 守：新規 HIV 感染小動物モデルの開発：ヒト造血細胞移植 SCID マウス。第 20 回日本エイズ学会（東京）2006年11月
- 15) 芳田 剛、河野祐治、佐藤 佳、安藤良徳、三浦義治、田中勇悦、小柳義夫：CXCR4