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わる基礎研究

平成19年度　総括・分担研究報告書

平成20年3月

主任研究者　佐 多　徹太郎

（国立感染症研究所）

平成19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
高橋　秀宗	国立感染症研究所・感染病理部	室　長
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 19 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　正顯（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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ ２７
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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ ３１
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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ ４３
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・・・・・・・・・・・・・・・ ４７

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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ ５１

分担研究者：徳永　研三（国立感染症研究所・感染病理部）

１０．HIVenv 結合因子を利用したウイルス複製阻害・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ ６３

分担研究者：高橋　秀宗（国立感染症研究所・感染病理部）

１１．エイズ発症阻止に関わる宿主因子･病態の研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ ６９

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）

１２．HIV 感染による中枢神経組織破壊メカニズムの解明・・・・・・・・・・・・・・・・・ ７３

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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ ８１

I. 総括研究報告書

平成１９年度厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
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。(1) HIV 感染免疫防御機構、(2) HIV 感染に関わる自然免疫等の宿主因子の解析、(3) 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、治療に繋がる基礎的研究を行う。本年度の研究成果は以下である。樹状細胞（DC）から CD4 陽性 T 細胞への HIV-1 感染伝播を阻害した。DC の分化培養により CD8+T 細胞を活性化し、OX40/OX40L 発現誘導を通じて HIV-1 増殖を抑制した。HIV 曝露非感染者の持つ遺伝的特徴を、*Gene1* イントロンにおける塩基配列多型の集積として同定した。NK 感受性 K562 細胞、TLR3 あるいは TLR4 の刺激により HIV-1 複製を抑制した。CTL 免疫圧によって生じる Gag アミノ酸変異の中で高 CD4 値、低ウイルス量など臨床経過に良い影響を与える T242 を見出した。ウイルス成熟によりウイルス表面の env、env 認識抗体が減少した。HIV-2 の TRIM5α感受性はヒトとカニクイサルとで共通であった。HIV-1 インテグレーションの過程にゲノム DNA 二重鎖切断が関与していた。サブタイプ C の Vif 蛋白は、最も強い抗 APOBEC3G 活性を有した。血中ウイルス量の高い群で IL-2R, MIP-1α, MIP-1β, RANTES の産生能が有意に低かった。ミトコンドリア透過膜保護薬 ubiquinone-10 は、Vpr による神経細胞障害を改善した。SIV 感染による神経・グリア障害に ERK 活性化によるアポトーシスが関与している可能性があった。

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
高橋秀宗　国立感染症研究所室長
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

A．研究目的

全世界のみならず国内でも HIV 感染者およびエイズ患者は増加している。エイズ克服には感染予防をめざしたワクチン開発が最も重要ではあるが、多くの臨床試験が頓挫しているのが現状である。一方、HAART の開発により HIV 感染者の予後は著明に改善されたが、長期毒性の出現、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。

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

HIV 抗原特異的 T 細胞活性化の検出系を確

立すると共に、樹状細胞（DC）から CD4 陽性 T 細胞への HIV 伝播を阻害する（横田）。DC の分化培養法を検討し OX40/OX40L 発現誘導を通じた HIV 増殖抑制を開発する（田中）。自然感染抵抗性を示す個体群の遺伝要因を明らかにする（宮澤）。自然免疫による HIV-1 防御機構を解明し、その誘導方法を開発する（神奈木）。宿主細胞傷害性 T 細胞（CTL）免疫とウイルスの相関関係を分子レベルで解明する（有吉）。抗体、sCD4 等の HIV env 結合因子を利用して、複製阻害法を導く方法を開発する（高橋）。

2）HIV 感染に関わる自然免疫等の宿主因子の解析

病態進行や HIV 感染感受性の違いを決定する宿主側の因子を明らかにする（塩田）。潜伏感染状態において重要な単球/マクロファージ（Mϕ）系細胞へのウイルス感染と再活性化機序を解明する（石坂）。APOBEC3 の本質的な役割を解析し、Vif の抗 APOBEC3G 活性の強弱に関わる領域を同定する（徳永）。

3）HIV 感染病態の解明

慢性期 HIV 感染者の血中ウイルス量（セットポイント）を規定する因子を探索し、免疫病態、AIDS 発症のメカニズムを明らかにする（岩本）。HIV 感染による中枢神経組織破壊機構を明らかとし、有効な薬剤を開発する（小柳）。HIV 脳症の病態を 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）。

B. 研究方法

1）HIV 感染免疫防御機構

抗原特異的 T 細胞活性化を検出するため FRET を選択し、DC からの HIV 伝播阻害にはレンチウイルスベクターにより siRNA を発現させた（横田）。DC の分化培養法を変え、OX40/OX40L 誘導と HIV-1 増殖への影響を調べた（田中）。HIV 曝露非感染者の持つ遺伝的特徴、及びマウス APOBEC3 のマウスレトロウイルス感染へ及ぼす影響を検定した（宮澤）。NK 感受性 K562 細胞または Toll-like receptor (TLR)の刺激による HIV-1 複製への影響について検討した（神奈木）。北タイで夫婦間伝播が確認できた 65 組において、特定 HLA に関連したウイルスアミノ酸変異の変化を調べた（有吉）。HIV-1 粒子の成熟に伴う Gag の変化、Gag と Env の関係、さらに粒子表面の Env、Env 認識抗体について解析した（高橋）。

2）HIV 感染に関わる自然免疫等の宿主因子の解析

HIV-2 のヒト、カニクイサル TRIM5αに対する感受性、HIV-2 の株間における TRIM5α感受性の違い、及び TRIM5αの一塩基多型 43Y の影響を調べた（塩田）。HIV-1 感染によって誘導されるゲノム DNA 二重鎖切断（DSB: DNA double strand breaks）、及び潜伏感染細胞の再活性化機構を調べた（石坂）。レトロトランスポゾン LINE-1 を用いて抗レトロウイルス宿主因子 APOBEC3 について調べ、さらに HIV-1 サブタイプ間で異なる Vif の抗 APOBEC3G 活性について調べた（徳永）。

3）HIV 感染病態の解明

血中ウイルス量の低い群と高い群、および治療群の感染者 PBMC を用いて、非特異的刺激により誘発されるサイトカインを測定した（岩本）。中枢神経系でウイルスを産生するマクロファージの培養上清中に含まれる神経障害因子の探索を行った（小柳）。サル神経・グリア細胞培養系の SIV 接種による、SIV 抗原量、ケモカイン、サイトカイン、蛋白リン酸化等の変化を測定した（佐多）。

C. 研究結果

1）HIV 感染免疫防御機構

恒常的 IFN-γ産生細胞を FRET により検出可能とした。siRNA の発現により DC から CD4 陽性 T 細胞への HIV 伝播を抑制した（横田）。DC の分化培養により CD8+T 細胞を活性化させ、さらに OX40/OX40L 発現誘導を介して R5 HIV-1 増殖を抑制した（田中）。HIV 曝露非感染者の持つ遺伝的特徴を、*Gene1* イントロンにおける塩基配列多型の集積として同定した。マウス APOBEC3 はマウスレトロウイルスの複製を強く抑制した（宮澤）。K562 細胞による前処理、TLR3、4 リガンドによる感染前後の処理により HIV-1 複製を抑制した。単球系 THP-1

細胞株においても刺激による HIV-1 複製の抑制を再現した（神奈木)。CTL 免疫圧下で生じるウイルス変異率と復帰率は逆相関した。例外的に T242 変異は変異率と復帰率のどちらも高く、高 CD4 値、低ウイルス量であり、さらに生命予後が良い傾向にあることが判明した（有吉)。HIV 粒子の成熟に伴い Gag 多量体は収縮し、Env は Env 認識抗体と共にウイルス表面から排除される可能性を示した（高橋)。

2）HIV 感染に関わる自然免疫等の宿主因子の解析

HIV-2 の TRIM5α感受性はヒトとカニクイザルで共通であること、報告されたヒト TRIM5αの一塩基多型は HIV-1 感染症の病態進行に影響せず、HIV-1 感染阻害効果にも違いが認められないことが判明した（塩田)。ウイルスインテグレーションの過程で DSB と DSB 誘発細胞内シグナルの関与が示唆された。一方、再活性化に関与する IL-6 産生では自然免疫シグナル受容体が重要な役割を担っていた（石坂)。全ての APOBEC3 ファミリー蛋白が抗 LINE-1 レトロ転移活性を有していた。サブタイプ C の Vif が、最も強い抗 APOBEC3G 活性を有し、N 末の 8 番目と 17 番目のアミノ酸によって規定されていた（徳永)。

3）HIV 感染病態の解明

血中ウイルス量が高い群で IL-2R, MIP-1α, MIP-1β, RANTES の産生能が有意に低く、血中ウイルス量と逆相関を示した（岩本)。微量 Vpr がマクロファージより放出され、神経細胞分化を抑制した。ミトコンドリア透過膜保護薬 ubiquinone-10 は細胞分化を改善した（小柳)。サル神経・グリア・ミクログリア培養細胞系で SIV 感染により、ERK が活性化し、リン酸化 P53 が蓄積した（佐多)。

D. 考察

1）HIV 感染免疫防御機構

FRET を用いた臨床検体への応用は感度上、現状では困難である。DC、CD 4 陽性 T 細胞などにおける siRNA の発現は有効である（横田)。DC の分化培養法の検討により、新たな HIV 増殖抑制法が可能となった（田中)。*Gene1* の機能的イントロン多型同定により感染抵抗性の分子メカニズムが解明された。マウス APOBEC3 アイソフォームの構造比較により、HIV 複製抑制能を持ったヒト型 APOBEC3 を設計することが可能となった（宮澤)。マクロファージにおける HIV-1 複製抑制物質のスクリーニングが可能となった（神奈木)。CTL 誘導型ワクチンに組み込まれるべき抗原デザインに有用な情報が得られた（有吉)。HIV-1 粒子の成熟には抗体による認識回避機構が含まれている可能性がある（高橋)。

2）HIV 感染に関わる自然免疫等の宿主因子の解析

HIV-2 の株間におけるヒト TRIM5αに対する感受性の違いは、病態進行速度に影響する。ヒト TRIM5α多型に関する報告の信憑性は疑われる（塩田)。DSB サイトにウイルス DNA が挿入される可能性及び、再活性化において Vpr が Toll-like 受容体を標的としている可能性が示唆された（石坂)。全ての APOBEC3 ファミリーが抗 LIN-1 転移活性を有していたことから、プロトタイプとしての活性を維持している可能性がある。サブタイプ C Vif が高い抗 APOBEC3G 活性を有するのは、プロテオソームへ持ち込む能力が高いことに起因すると推察した（徳永)。

3）HIV 感染病態の解明

MIP-1α, MIP-1β, RANTES は R5-HIV の感染阻害因子であると同時に Th1 の遊走因子であり、セットポイントを規定する要因である可能性がある（岩本)。ubiquinone-10 は広く臨床の場で使用されている薬剤であることから、エイズ脳症患者における神経細胞の再生を促す薬剤としての可能性が高い（小柳)。SIV 感染による神経・グリア障害では ERK 活性化によるアポトーシスが関与している可能性が示唆された（佐多)。

E. 結論

DC を介する HIV-1 感染伝播の阻害法、自然感染抵抗性を示す遺伝要因、自然免疫による HIV-1 防御法、CTL 免疫とウイルスの相関関係、ウイルス成熟と抗体の関係について知見が得

られた。HIV 感染感受性の違いを決定する宿主因子、潜伏感染と再活性化、抗 APOBEC3G 活性の強弱を説明する分子機構について説明がなされた。慢性期 HIV 感染者の血中ウイルス量を規定する因子探索、HIV 感染による中枢神経組織破壊機構の理解が進み、有効な薬剤が見出された。

F. 健康危険情報

各分担者の報告書参照。

G. 研究発表

1．論文発表

各分担者の報告書参照。

2．学会発表

各分担者の報告書参照。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

各分担者の報告書参照。

1．特許取得

2．実用新案登録

3．その他

II. 分担研究報告書

1．HIV 脳症の病態の解析

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　サル胎仔脳より神経・グリア細胞培養系および神経・グリア・ミクログリア培養系を確立した。VSVG でシュードタイピングした SIVΔE/vsvg を感染させた後、神経・グリア細胞に誘導される p53 蛋白は接種量に相関して増加した。また p53 は主に感染細胞の核に発現していることがわかった。SIV/17E-Fr を感染させた神経・グリア細胞培養系および神経・グリア・ミクログリア細胞培養系の培養上清中の SIVp27 抗原量、MCP-1、IP-10、IL-8、IL-6 を経時的に測定し、感染41 日目の細胞中に発現している p53 関連蛋白、ERK シグナル伝達蛋白をウエスタンブロッティン法で検出し、非感染培養系と比較した。神経・グリア細胞培養系ではSIV(+)でリン酸化p53 の発現が高く、Bcl-2/Bax 比が低かった。リン酸化c-Raf、リン酸化 ERK、リン酸化 p90RSK も SIV(-)と比較して高かった。一方培養上清中の SIVp27 抗原量、MCP-1、IP-10、IL-8、IL-6 が高値をとった神経・グリア・ミクログリア培養系では SIV(+)でリン酸化 p53 の発現が高かったが、Bcl-2 /Bax 比の差はなかった。リン酸化 c-Raf、特にリン酸化 ERK は SIV(-)と比較して高かった。またリン酸化 pCREB/CREB が SIV(-)と比較して低かった。

A．研究目的

HIV 脳症および SIV 脳症は、感染マクロファージおよびミクログリアが産生するウイルス蛋白 (gp120、ｔａｔ、ｖｐｒ)、ケモカイン、サイトカインなどの液性因子によって神経・グリア細胞に機能障害やアポトーシスが引き起こされることで発症すると考えられている。昨年度の研究により、サル胎仔脳前駆細胞由来の神経・グリア細胞培養系に SIV/17E-Fr を vsvg でシュードタイピングした SIVΔE/vsvg を感染させると細胞内の p53 蛋白および活性型 Extracellular signal-regulated protein kinases（ERK) がコントロールと比較して増加することがわかった。HIV 関連神経障害に p53 pathway と HIV-1 env (gp120) が関係しているという報告がある。今年度は神経・グリア細胞培養系および神経・グリア・ミクログリア細胞培養系に SIV/17E-Fr を接種し、round infection させたあとの細胞内の p53 関連蛋白と ERK シグナル伝達蛋白の発現について解析した。

B．研究方法

1）培養系

在胎 8-11 週のサル胎仔脳より細胞を回収し、ニューロスフィア法で選択培養し、神経幹細胞を含む脳前駆細胞（BPCs）を得た。これを分化誘導し、神経・グリア細胞のみからなる培養系を昨年度の報告書と同様に作製した(5x10E5 個/well/6well plate)。同一の胎仔脳から回収した細胞の一部は 10%DMEM 培地で培養し、2-3 週間後に上清中に浮遊してくる細胞を回収した。これがマクロファージ/ミクログリア細胞であることを免疫組織化学により確認した(図 1 CD68、Iba1、CD14、CD11b)。神経・グリア細胞培養系にミクログリア細胞を 10E5 個ずつ添加し、神経・グリア・ミクログリア細胞培養系を作製した。

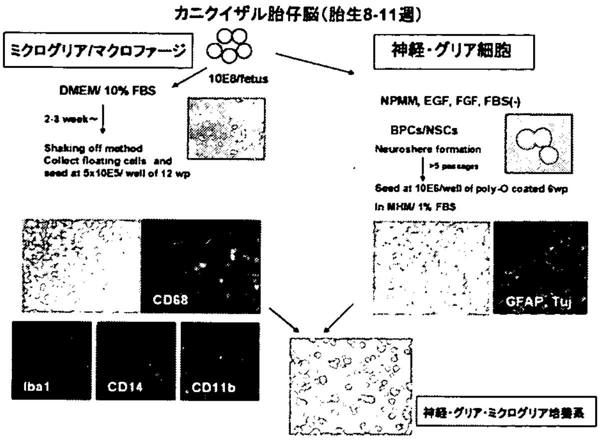

図1.神経・グリア細胞培養系とミクログリア培養系

2）SIV/17E-Fr の感染

pSIV/17E-Fr を 293T 細胞に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、接種材料 SIV/17E-Fr とした。またプラスミド(-)を mock とした。6well プレートに作製した神経・グリア細胞培養系に SIV/17E-Fr、mock を 2well ずつ〔計 1 セット〕SIV p27 量で 100ng 相当の SIV17/17E-Fr を感染（16hr）させた。翌日 PBS で 3 回洗い、新しい培地と交換して培養した。3-4 日ごとに上清を回収して－20℃に保存した。感染 23 日目後に 1 セットに 10E5 個のミクログリア細胞を添加し、神経・グリア・ミクログリア培養系とした。

3）SIVp27 抗原量

回収した培養上清中の SIVgagp27 抗原量は ELISA 法により測定した（SIVp27 antigen capture assay、Advanced BioScience Laboratories, Inc.)。

4）ケモカイン・サイトカインの測定

回収した培養上清中の CCL2/MCP-1、CXCL10/IP-10(R & D)ならびに monkeyIL-6、monkeyIL-8(Bender MedSystems)を ELISA で測定した。

5）ウエスタンブロッテイング

回収した細胞を 1 mM の PMSF を添加した cell lysis buffer(Cell Signaling)で処理し、均一になるまでよく攪拌した。14,000g で 10 分間遠心後上清とペレットにわけて-80 度で保存した。4xNuPage LDS sample buffer、β メルカプトエタノールを添加したサンプルをポリアクリルアミドゲル電気泳動し、蛋白の発現をウエスタンブロッテイング法で解析した。用いた一次抗体は phospho-p53(ser15)抗体、phospho-p53(ser46)抗体、phospho-p53(ser37) 抗体、phospho-p53(ser392) 抗体、p53 抗体、phospho-c-Raf 抗体 phospho-MEK1/2 抗体、MEK1/2 抗体、phospho-ERK1/2 抗体、ERK1/2 抗体、phospho-90RSK 抗体、CREB 抗体、phospho-CREB(ser133)抗体(以上 Cell Signaking)、Bcl-2 抗体、Bax 抗体、Bcl-x 抗体（以上 BD)、抗 β-actin 抗体(SIGMA)。2 次抗体(HRP-抗マウス IgG(Amersham)あるいは HRP-抗ラビット IgG(Pierce))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、マウスモノクローナル抗 p53 抗体（ＢＤ)、２次抗体（Alexa488 抗マウス IgG 抗体、Alexa568 抗マウス IgG 抗体）と反応させた。核染色は Hoechst33258 で行った。

C．研究結果

1）SIVΔE /vsvg 感染による p53 の発現

神経・グリア細胞培養系に SIV17ΔE/V、Veicle、mock を SIV p27 量相当で 12.5、25、50、100 ng 感染させた。SIV17ΔE/V、Veicle、mock の作製法は昨年度の報告書と同様である。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 4 日後に細胞を固定し、免疫組織化学で p53 を検出した。図２に示すように接種量に相関して p53 陽性細胞が増加した。また p53 が SIVΔE /vsvg 感染細胞に誘導されるのか、非感染細胞にも誘導されるのかを確認するために SIVΔEΔnef-GFP/vsvg を感染させた細胞で p53 と GFP の局在を二重免疫組織化学で解析した。図３に示すように GFP 陽性の感染細胞の核に p53 が強く発現していることがわかった（太矢印)。また GFP 陽性細胞でも p53 陽性でないもの（グレー矢印)、p53 陽性でも GFP 陽性でないものも観察された（細白矢印)。

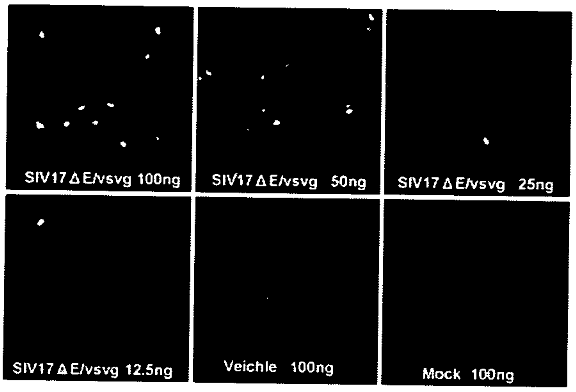

図 2. SIVΔE /vsvg 接種量と p53 陽性細胞数

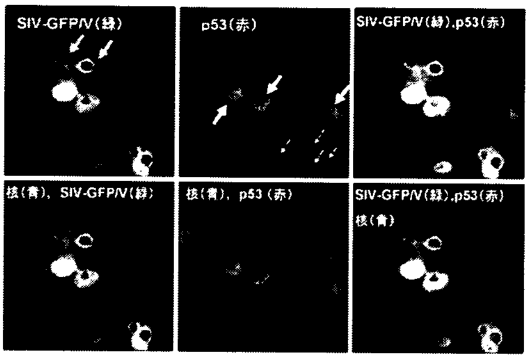

図 3. SIVΔEΔnef-GFP/vsvg 感染細胞における p53 の発現(緑:GFP、赤:p53、青:核)

2) <u>SIV/17E-Fr 感染神経・グリア細胞培養系および神経・グリア・ミクログリア細胞培養系</u>

神経・グリア細胞培養系に SIV/17E-Fr、mock を接種し、その後経時的に培養上清中の SIVp27 抗原量、ケモカイン MCP-1、IP-10、サイトカイン IL-8、IL-6 量を測定した。ミクログリアを添加する前は SIVp27 抗原量も低く(最高で 18 日目の 1638pg/ml)サイトカイン・ケモカイン量は mock と比較して大差なかった。23dpi 以降 SIVp27 量が増加してきたのは培地を 1%FBS-MHM より 10%FBS-DMEM に変更したためと考えられる。一方、23dpi に培地変更とともにミクログリアを添加した SIV 感染培養系では、培養上清中の SIVp27 抗原量が急速に増加するに伴ってケモカイン MCP-1、IP-10、サイトカイン IL-8、IL-6 量も増加した。なお、IL-8 と IL-6 に関してはミクログリアを添加した培養系の上清のみ測定した。

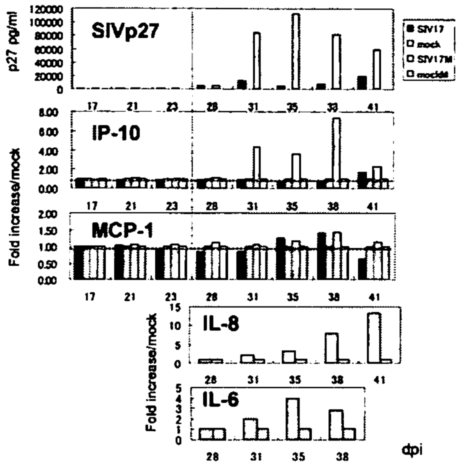

図 4.神経・グリア細胞培養系(SIV17、mock)および神経・グリア・ミクログリア細胞培養系(SIV17M、mockM)の培養上清中の SIVp27 抗原、IP-10、MCP-1、IL-8、IL-6 の経時変化

3) <u>SIV 感染培養系における p53 関連蛋白の発現</u>

SIV/17E-Fr 感染神経・グリア細胞培養系および神経・グリア・ミクログリア細胞培養系において、41dpi(ミクログリア添加より 18dpi)に各培養細胞から RNA と細胞蛋白を抽出し保存した。RNA を用いて RT-PCR 法にて SIV-tatmRNA (spliced form) の発現を調べた。その結果、SIV 感染群では陽性、非感染群では unspliced form ともに陰性となり、前者では SIV が転写されていることを後者ではコンタミしていないことが確認された。SIV/17E-Fr が round infection することでアポトーシス関連蛋白の発現パターンが mock と比較して変化するかをウエスタンブロッティングで解析した。感染群で p53、リン酸化 p53 ともに非感染群(mock)と差がみられた(図 5)。

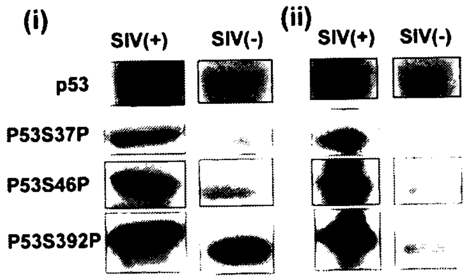

図 5. p53 およびリン酸化 p53 蛋白の発現の相違。(i)神経・グリア細胞培養系(ii)神経・グリア・ミクログリア培養系

p53 が関連するアンチアポトーシス蛋白である Bcl-2、Bcl-x およびプロアポトーシス蛋白である Bax の発現を解析した。また Bcl-2、Bcl-x と Bax、actin との比を数量化したところ、経・グリア細胞培養系では SIV(+)で Bcl-2 の発現が mock と比較して少ないことがわかった(図6)。神経・グリア・ミクログリア培養系では顕著な差はなかった。

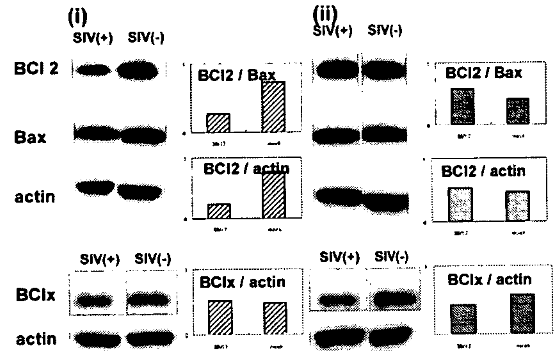

図 6.Bcl-2、Bcl-x、Bax の発現の相違。(i)神経・グリア細胞培養系(ii)神経・グリア・ミクログリア培養系

4）SIV 感染培養系における ERK シグナル伝達系

同様に ERK シグナル伝達系に関連する蛋白の発現を解析した。神経・グリア細胞培養系(図7(i))では pc-Raf、pERK1/2、p90RSK まで SIV(+)培養細胞の方が SIV(-)と比較して多く検出された。一方神経・グリア・ミクログリア細胞培養系（図 7(ii)）では pERK1/2 までは SIV(+)培養細胞の方が多く検出されたが、pCREB に関しては SIV(-)の方が多く検出された。

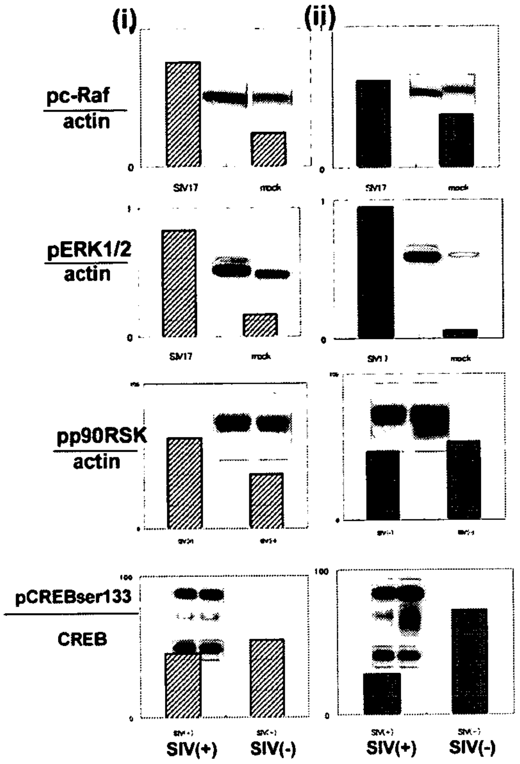

図 7. ERK シグナル伝達系関連蛋白の発現
(i)神経・グリア細胞培養系(ii)神経・グリア・ミクログリア培養系
cAMP response element-binding protein(CREB)
ribosomal S6 kinase (p90RSK)

D. 考察

昨年度の研究で SIV17ΔE/V 感染神経・グリア細胞ではコントロールと比較して p53 蛋白が増加し、ERK が活性化していることがわかった。さらに今年度の追加データである図 2、3 の結果から SIV17ΔE/V 接種量に相関して感染細胞の核内に p53 が発現していることがわかった。リン酸化により p53 が安定化されて核内に蓄積されていることを示している。p53 は DNA 損傷などの種々のストレスを受けた細胞で発現が誘導され、核内で転写活性化因子として機能しその標的遺伝子の発現誘導を介して細胞周期の停止、DNA 修復、アポトーシスの誘導などの細胞機能の調節を行うことが知られている。中枢神経系の様々なアポトーシスに関与し、HIV 関連神経障害においても HIV-1 env (gp120) が p53 を介してアポトーシスを誘導するという報告がある。またエイズ痴呆患者の脳で p53 の発現レベルが高い、p53 欠損マウスのニューロンでは gp120 や tat による細胞死

が抑制されるなどの報告もある。

今年度はSIV envの関与もみるためにsingle round infectionではなくSIV/17E-Frを感染させた細胞を用いてSIV感染とp53関連蛋白、ERKシグナル伝達系について解析した。SIV/17E-Frはアストロサイトで増殖することはすでに報告したが、培養上清中のSIVp27値はミクログリア細胞のおよそ100分の1である。またケモカイン・サイトカインの産生量も少ない。そこでミクログリアを添加した神経・グリア・ミクログリア培養系もあわせて構築した。SIVp27値のピークが過ぎたころに細胞を回収し、細胞中のp53関連蛋白およびERKシグナル伝達系についてウエスタンブロッテイングで発現を解析した。図.5、6に示したようにSIV(+)培養細胞で、リン酸化p53が蓄積されている傾向があることがわかった。神経・グリア細胞培養系ではSIV(+)培養細胞でBcl-2の発現が少ない傾向にあったが、これについてはさらに詳細な解析が必要である。p53は標的遺伝子の1つであるPUMAやBaxなどを介してミトコンドリアからチトクロムCを放出させ、caspase-3を活性化してアポトーシスを誘導する。これに対してアンチアポトーシスの作用をすることが知られているBcl-2とBcl-xはHIV-1感染に対し、神経保護効果があると報告されている。ERKシグナル伝達系は主に生存シグナルに関与していると考えられてきたが、最近活性型ERKが、ある条件下では神経にアポトーシスを誘導することが報告されている。ERK誘導アポトーシスのメカニズムは1つではなく、完全には解明されていない。マウスレトロウイルス *ts 1* を感染させたアストロサイトではERKの活性化を介してp53が蓄積しているという報告があるが、SIVの場合も同様なメカニズムかもしれない。SIV(+)の神経・グリア・ミクログリア細胞培養系ではリン酸化ERK1/2が増加していたが、その下流のリン酸化CREBの発現はSIV(-)と比較して相対的に少なかった。持続的なリン酸化ERKがp90RSKにCREB結合蛋白（CBP）を結合させて、p90RSKおよびCREBのリン酸化〔活性化〕を阻害するという報告がある。CREBは長期記憶やシナプス形成に関与している蛋白質で、脳由来神経栄養因子（BDNF）の転写を調節している。今後はCREBのmRNAレベルの解析が必要である。

今年度の研究では感染41日目（ミクログリア添加後18日目）というただ1点でしか解析していないこと、SIV感染(+)(-)の比較にとどまること、個々の細胞種レベルでの解析ができないことなど問題点はあるが、興味深い結果が得られた。いままでに報告されている知見と本研究との結果から図8のような作用機序（仮説）が考えられた。来年度はこの仮説を証明することを試み、新たな結果がえられれば改良し、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。

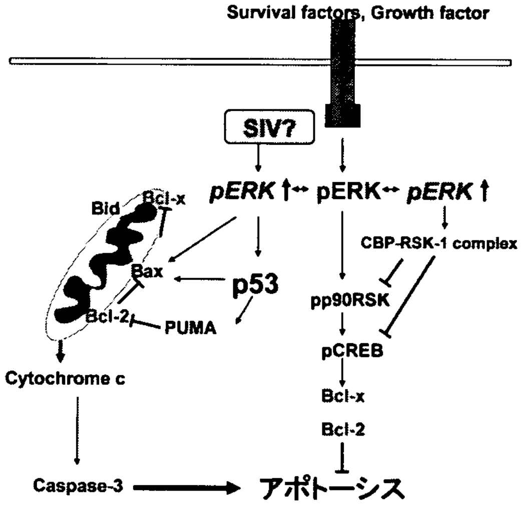

図.8 ERK介在アポトーシス〔仮説〕
持続的SIV感染（*tat?*、*env?*）により持続的にERKが活性化されると（*pERK*）pCREBが抑制され、またp53が活性化し、PUMA、Baxなどプロアポトーシス因子が増強し、Bcl-2、Bcl-xなどのアンチアポトーシス因子が現弱することになる

E. 結論

SIV/17E-Fr感染によって神経・グリア細胞培養系および神経・グリア・ミクログリア細胞培養系の細胞で持続的にERKが活性化し、リン酸化p53が蓄積するのがわかった。SIV感染による神経・グリア障害にERK活性化によるアポトーシスが関与している可能性が示唆された。

（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。

F. 健康危険情報
特になし

G. 研究発表
1．論文発表
1) Hara,M., Kikuchi,T., Sata,T., Nakajima,N., Yasui, A., Sato, Y., Tanaka, K., Narita, T., Ono, F., Akari, H., Terao, K., and Mukai, R. : Detection of SRV/D shedding in body fluids of cynomolgus macaques and comparison of partial gp70 sequences in SRV/D-T isolates Viruses Genes 2007, Oct;35(2):281-8.

2．学会発表
1) 中島典子、佐多徹太郎　：ミクログリア細胞培養系および神経・グリア細胞培養系におけるサル免疫不全ウイルス（SIV）の感染動態。第55回日本ウイルス学会学術集会 2007年10月
2) 飛梅実、長谷川秀樹、片野晴隆、佐藤由子、中島典子、佐多徹太郎：　狂犬病ウイルスのヒト生体内分布。第55回日本ウイルス学会学術集会 2007年10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

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 IFN-γ enhancer をタンデムに接続した minimal promoter 制御下に β-lactamase を発現する Indicator LV は恒常的に IFN-γを産生している細胞を FRET により生きたまま検出したが、抗原特異的に反応する T 細胞検出には不十分であった。一方、Lenti shNef366 の siRNA 効果により DC から CD4 陽性 T 細胞への免疫シナプスを介した効率よい HIV 感染伝播が阻害された。従って両細胞に HIV 感染抵抗性を賦与することにより、HIV 特異的 CD4 陽性 T 細胞の活性化に伴う HIV 増殖を制御しつつ抗 HIV 免疫応答を強化できる可能は高い。

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 反応を評価する系と宿主感染防御機構の強化をめざす技術の開発を目的とする。

B. 材料と方法

1）レンチウイルスベクター

IFN-γ distal あるいは proximal enhancer をタンデムに接続した minimal promoter 制御下に β-lactamase を発現する indicator レンチウイルス（LV）及び U3-LTR と重複する Nef coding 領域に対する small haipin RNA 発現 LV ベクター(Lenti shNef366) 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、p24 エライザで濃度を測定した。

2）T 細胞活性化による FRET の測定

恒常的に IFN-γを産生する初期培養 CD4 陽性細胞株に indicator (IFNp-blazer) LV を spinoculation 法で感染させ、IFN-γの制御下に β-lactamase を発現する細胞株を得た。末梢血単核球(PBMC) は T-cell negative selection kit (StemCell technology）を用いて T 細胞分画と non-T 細胞分画に分け、indicator LV を spinoculation 法で感染させた。これらの細胞を洗浄し、2 日間培養した後、プレートにコートした抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体で T 細胞受容体刺激を加えて更に 2 日間培養した。最後に CCF2-AM 基質(Invitrogen)を取り込ませ細胞表面抗体を加えた後、室温で一晩保存し、FACSaria で $CD3^{+}CD4^{+}$細胞にゲートをかけて Violet lazer における蛍光波長の変化を解析した。

3）HIV 感染と増殖

PBMC より CD14 陽性単球を分画して樹状細胞(DC)に分化させ、CD14 陰性細胞より CD4 陽性 T 細胞を調整した。DC に Lenti shNef366 あるいは control (Lenti PRE)を感染させ(moi=2)、洗浄後一日培養した。CD4 陽性 T 細胞には抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体で T 細胞受容体刺激を加えて培養した。翌日これらの細胞を回収し、10^{6}細胞あたり 400 ng の赤色蛍光色素を発現する HIV-$1_{NL\text{-}D}$ あるいは(X4) HIV-$1_{NLAD8\text{-}D}$ (R5)を DC に感染させた後、0.05%トリプシン処理(RT 5 分)した。細胞を 4 回洗浄した後細胞数を数え、ウエルあたり 2-4x10^{4}個の DC と 10 倍の CD4 陽性 T 細胞を 96U プレートで混合培養した。培養後 2 日おきに培地を交換し、培養上清中の p24 Gag 量をエライザで測定した。感染 6 日後の細胞の一部を回収して APC 標識抗 CD3 抗体で染色し、FACScalibur で感染細胞の頻度を解析した。

4）FACS 解析

標識抗体（抗 CD4、CD3 と IFN-γ）および細胞刺激用抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体はすべて BD あるいは e-BioScience 社より購入した。

C．研究結果

1）HIV 感染における抗 HIV 反応評価系の確立

Indicator LV による T 細胞活性化検出と定法の細胞内 IFN-γ染色(ICS)による検出の感度を比較した。恒常的に IFN-γを産生する初期培養 CD4 陽性細胞株を樹立し、LV による遺伝子導入後数日培養して GFP 陽性の Indicator LV あるいは Lenti PRE 導入細胞をソートして純化した。これら細胞を用いて FLET あるいは IFN-γ ICS を行った結果、この系で遠位エンハンサーを含む minimal promoter が強く作用したことから、その後の実験は全て dist-IFNp-blazer LV を Indicator LV として用いた。図 1 (a)左に示すように FRET で IFN-γ promoter の活性を検出できたのは 7.94%+3.05%で合計約 11%の細胞に活性を認めた。一方 ICS(右)では IFN-γを産生する細胞は 7.82%であったことから、FRET による検出は ICS よりも感度において優れていることが示唆された。更にこのアッセイ系を感染者検体に応用するためには、T 細胞受容体刺激に伴う IFN-γ産生を検出する必要がある。そこで T 細胞への LV による遺伝子導入後遺伝子発現が最大となる 2 日目に抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体による刺激を加え、48 時間後に基質を取り込ませて FACS で解析した。 (b)に二人のドナーにおける T 細胞活性化に伴う FRET 解析の結果を示した。この刺激で活性化される CD4 陽性 T 細胞は少なくとも 30-40%は存在する条件であるが、我々の FRET の系で検出可能な集団は 1-4%程度でしかなかった。

2）宿主感染防御機構の強化

HIV の初期感染および免疫応答刺激にともなうウイルス増殖は DC を代表とする抗原提示細胞が HIV 特異的 T 細胞を活性化する時に誘導され、そのことが病態進行に最も重要な要因であると考えられる。更に、DC は HIV-1 に潜伏感染してもそれ自身のウイルス産生はごくわずかであるため、HAART 療法も効き難い。そこで我々の開発した HIV 増殖抑制性 LV (Lenti shNef366)を用いて DC に HIV 抵抗性を賦与し、CD4 陽性 T 細胞へのウイルス伝播・拡大を阻止することが可能かどうかを検証した。LV(GFP+)導入 DC に蛍光発色 HIV を感染させた後 CD4 陽性 T 細胞と混合培養し、ウイルスの増殖を FACS および p24 エライザで測定した。図 2(a)に示すように、R5 型 HIV-1 (HIV-$1_{NLAD8\text{-}D}$) は X4 型 HIV-1(HIV-$1_{NL\text{-}D}$)よりも感染伝播効率が良くその後の増殖も早かった。そこで R5 型 HIV-1 を DC に感染させ、6 日後の細胞を FACS 解析した。(b)はその代表的な例である。LV を導入していない DC(mock、左)から CD4 陽性 T 細胞に伝播された赤色蛍光 HIV 陽性 T 細胞集団は約 4.71%であり、対照となる LV(Lenti PRE、中央)導入 DC でも 4.44%であったが、siRNA 効果を有する LV (Lenti shNef366、右)は 1.19%に低下していた。また、図には示さないが、培養上清中の p24 量もこれに併行して低下していた。

D. 考察

本研究では HIV 感染における抗 HIV 免疫応答を評価するため、HLA 拘束性を配慮する必要が無く、しかも細胞を生かしたまま高感度に T 細胞活性化を解析する系の確立を目指した。これは、感染者における T 細胞動態解析のための画期的な技術となりうる。しかしながら、この系では FRET を検出する時に同時に LV 導入細胞（GFP+）が検出できないことから LV の導入効率が大きな問題となり、また、記憶 T 細胞の受容体刺激に伴って動員される IFN-γの転写因子活性を minimal promoter で代表できるかどうか等、いくつか問題点が残っている。従って現時点では臨床検体への応用は困難であると考えられ、新たな基質への改良や LV の感染効率の更なる向上が実現した時に再度考慮すべきと判断した。

HIV 感染者の体内に潜伏する HIV は、抗 HIV 免疫応答を担う HIV 特異的記憶 T 細胞に高率に存在することが知られている。これは、HIV に感染あるいはウイルス抗原を取り込んだ抗原提示細胞(DC)による HIV 抗原提示の際に、DC と T 細胞とで形成される免疫シナプスを介して HIV 特異的な記憶 T 細胞への効率よい感染がおこることが重要な要因であると考えられる。このような抗原提示を介したウイルス伝播・増殖を制御可能なレンチウイルスベクターの開発は理にかなっており、更に開発・改良を進めることによって新たな治療法として確立していくことが望ましい。

E. 結論

IFN-γ enhancer をタンデムに接続した minimal promoter 制御下にβ-lactamase を発現する Indicator LV を用い、恒常的に IFN-γを産生している細胞を FRET により生きたまま検出することが可能となった。しかしながら、T 細胞受容体刺激、即ち抗原特異的に反応する T 細胞を効率よく検出するためには感度が不十分であり、現段階では診断に有用な系として確立できなかった。

一方、siRNA 効果を発現する Lenti shNef366 を DC に導入すると、DC から CD4 陽性 T 細胞への免疫シナプスを介した効率よい HIV 感染伝播を抑制できることが明らかとなった。従って、CD4 陽性 T 細胞のみならず DC にも HIV 感染抵抗性を賦与することにより、HIV 特異的 CD4 陽性記憶 T 細胞の活性化に伴う HIV 増殖を制御しつつワクチンによる抗 HIV 免疫応答を強化できる可能性が示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Tsunetsugu-Yokota, Y., Ishige, M., Murakami, M.:Attenuated *Salmonella* Typhimurium expressing codon-opitimized HIV-1 Gag potentiated Gag-specific CD8+ T cell-response in intestinal mucosa. Aids Res. Hum. Retro. 23:278-286, 2007
2) Nitahara-Kasahara, Y., Kamata, M., Zhang, X., Muneta, K., Miyamoto, Y., Yamamoto, T., Iijima, S., Yoneda, Y., Tsunetsugu-Yokota, Y., Aida, Y. A novel nuclear import of Vpr promoted by importin α is crucial for HIV-1 replication in macrophage. J.Virol, 81:5284-5293, 2007
3) Takayanagi, R., Ohashi, T., Yamashita, E., Kurosaki, Y., Tanaka, K., Hakata, Y., Komoda, Y., Ikeda, S., Tsunetsugu-Yokota, Y., Tanaka, Y., H. Shida. Enhanced replication of human T-cell leukemia virus type 1 in T cells from transgenic rats expressing human CRM1 that is regulated in a natural manner. J Virol., 81:5908-5918, 2007
4) Takuya, Y and Tsunetsugu-Yokota, Y. Prospects for the therapeutic application of lentivirus-mediated gene therapy to HIV-1 infection. Curr. Gene Therapy, in press, 2007
5) 寺原和孝 横田（恒次）恭子：粘膜ワクチンの研究開発、ワクチンの展望４、ワクチン感染症のコントロールに向けて、治療学 4: 67-70, 2007

2. 学会発表

1) Tsunetsugu-Yokota, Y. and Yamamoto, T. Immune control of HIV-1 by restoring HIV-specific CD4+ T-cell function: a vaccine strategy against chronic HIV/SIV infection. The 8th Seminar in Kumamoto, Kumamoto, September, 2007
2) 光木裕也、山本拓也、水越文徳、山岡昇司、山本直樹、横田（恒次）恭子: マクロファージにおける Nef 蛋白質発現に伴う自然免疫機構異常に関する解析。第 55 回ウイルス学会、札幌、平成 19 年 10 月。
3) 光木裕也、山本拓也、水越文徳、寺原和孝、稲垣好雄、山岡昇司、山本直樹、横田（恒次）恭子: EGFP と DsRed を発現する X4 型及び R5 型 HIV-1 の作製とその応用。第 55 回ウイルス学会、札幌、平成 19 年 10 月。
4) 石井孝司、横田恭子、長谷川秀樹、永田典代、森川茂、福士秀悦、水谷哲也、鈴木哲郎、田代真人、田口文広: 高度弱毒化ワクチニアウイルス株 DIs の組換え SARS ワクチンとしての検討。第 55 回ウイルス学会、札幌、平成 19 年 10 月。
5) 山本拓也、光木裕也、水越文徳、小林和夫、井上純一郎、横田（恒次）恭子：HIV 特異的な免疫担当細胞に HIV 抵抗性を賦与しうる RNAi 誘導型エイズワクチンの開発。第 55 回ウイルス学会、札幌、平成 19 年 10 月。
6) Yamamoto, T., Tachikawa-Kawana, A., Iwamoto, A., Kobayashi, K., Inoue, J-I, Autran, B., and Yokota-Tsunetsugu, Y.: Development of a nobel IFN-gamma detection system of virus-specific T cell activation by flow cytometry. 第 37 回免疫学会、東京、平成 19 年 11 月。

7) Konno, H., Yamamoto, T., Yamazaki, K., Qin J., Ghoda, J., Akiyama, T., Yokota-Tsunetsugu, Y., Inoue, J-I.:ウイルス感染時のインターフェロン及び炎症性サイトカイン産生に対するTRAF6の役割。第37回免疫学会、東京、平成19年11月。

8) 横田（恒次）恭子、山本拓也、Brigitter Autran: HIV慢性感染期におけるHIV特異的CD4陽性T細胞の機能障害—ワクチン開発に向けての考察。第21回日本エイズ学会、広島、平成19年11月。

9) 水越文徳、山本拓也、立川(川名)愛、岩本愛吉、森川裕子、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21回日本エイズ学会、広島、平成19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

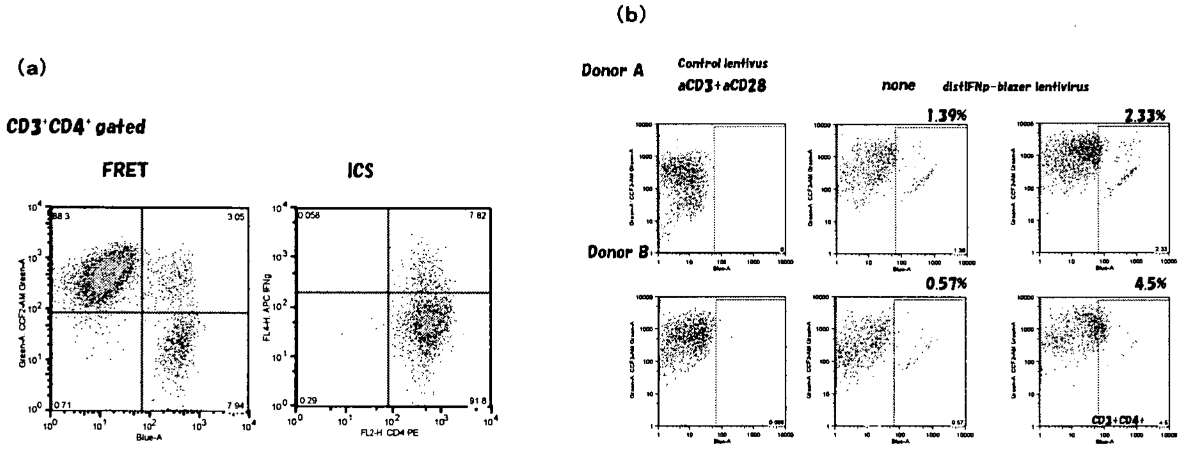

図1 distal IFN-γ minimal promoterの下流にβ-lactamaseを発現するIndicatorレンチウイルス(dist-IFNp-blazer)導入によるFRET

(a)恒常的にIFN-γを産生するCD4陽性T細胞初期培養株にIndicatorレンチウイルス(dist-IFNp-blazer)を感染させた。感染細胞をGFP+としてソートし、遺伝子導入した細胞を数日培養してCCF2-AMを取り込ませ、β-lactamase活性による蛍光波長の変化を測定した(FRET)。また、同時に同じ細胞を細胞内IFN-γ染色し、FACSで解析した(ICS)。

(b)2人のドナーのPBMCのT細胞にcontrol (PRE)あるいはIndicatorレンチウイルスを導入し、non-T細胞分画とともに2日間培養した。その後抗CD3と抗CD28抗体で刺激あるいは未刺激のまま培養し、48時間後にFACSによるFRET解析を行った。

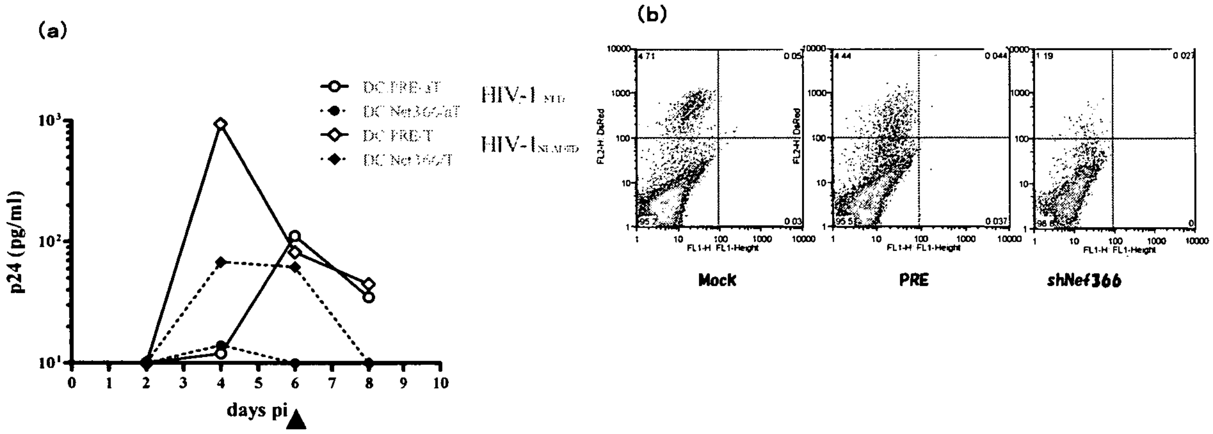

図2. HIV感染DCによるCD4陽性T細胞へのウイルス伝播の制御

(a) siRNAを発現するレンチウイルスをDCに導入し、翌日HIV-1NL-DあるいはHIV-1NLAD8-Dを2時間37度で感染させた。細胞をトリプシン処理して洗浄後、前日に抗CD3 抗体と抗CD28抗体で刺激したCD4陽性T細胞と混合培養し、2日毎に培養上清を採取した。

(b)同上の系でHIV-1NLAD8-D感染後6日目の細胞を回収し、APC-CD3で染色してFACS解析した。CD3陽性の生細胞にゲートをかけてあらわした。横軸はレンチウイルスの発現するGFP、縦軸はHIV-1の発現するDsRedである。