

examined but not in sera from secondary PAP (S-PAP) patients or normal subjects. In this case, there were no underlying causes for the S-PAP, such as malignancies, hematopoietic disorders, immunodeficiency disorders, or inhalational syndromes. We measured the serum antibody as described (Seymour et al. 2003). The anti-GM-CSF antibody was detected, and the concentration of the antibody was 27.66 $\mu\text{g/ml}$. Therefore, the diagnosis of I-PAP was confirmed. The shadow on chest radiograph and CT disappeared spontaneously 3 years after the diagnosis (Fig. 3). D_{LCO} also improved (D_{LCO} 13.92 ml/min/mmHg, a prediction of D_{LCO} 70.5% on August 5, 2002 and D_{LCO} 20.10 ml/min/mmHg, a prediction of D_{LCO} 112.3% on July 14, 2005) (Table 1). During this period, the level of KL-6 dramatically decreased (from 1,493 U/ml to 156 U/ml), although the level of GM-CSF antibody had not declined (from 27.66 $\mu\text{g/ml}$ to 26.84 $\mu\text{g/ml}$) (Fig. 4, Table 1).

DISCUSSION

PAP is a rare lung disorder characterized by the accumulation of proteinous material in the alveoli (Seymour and Presneill 2002; Trapnell et al. 2003). The common presenting symptoms are dyspnea on exertion and cough (Wang et al. 1997; Goldstein et al. 1998). Chest radiographs in patients with PAP usually show bilateral and patchy consolidation, although there are no specific features suggesting PAP (Goldstein et al. 1998; Shah et al. 2000). In this disease, the serum levels of lactate dehydrogenase, tumor markers and KL-6 have been reported to increase (Shah et al. 2000), and the predominant abnormality in pulmonary function tests is a restrictive ventilatory defect with a reduction in diffusing capacity (Goldstein et al. 1998; Shah et al. 2000). Our patient had no symptoms during the 5 years of observation. Her chest radiograph showed a unilateral patchy shadow at the time of visiting her family doctor. Her laboratory data were unremarkable except for an increase in KL-6 and a slight reduction in the diffusing capacity. These atypical clinical features made it difficult to reach a diagnosis.

The anti-GM-CSF antibody was detected in

the present case. I-PAP has been reported as an autoimmune disease with neutralizing antibody of GM-CSF (Kitamura et al. 1999). Neutralization of GM-CSF bioactivity by the antibody causes a dysfunction of alveolar macrophages, which results in reduced surfactant clearance (Kitamura et al. 1999). In addition, recently, administration of aerosolized GM-CSF has reported to improve respiratory function of patients with I-PAP (Arai et al. 2004; Tazawa et al. 2005). Interestingly, Kitamura et al. (1999) reported that the antibody was found in sera from all I-PAP patients but not in sera from S-PAP patients or normal subjects. In our case, the concentration of the antibody did not change, although the shadow on chest radiograph disappeared and D_{LCO} improved. Arai et al. (2004) reported a case with PAP successfully treated with inhaled GM-CSF. In their case as well the concentration of anti-GM-CSF antibody was not correlated with the disease severity. They described that the binding capacity of the antibody with GM-CSF was different in each case, although the neutralizing capacity of GM-CSF showed a correlation with the disease activity (Arai et al. 2004). It therefore appears that the absolute quantity of the antibody does not determine the disease severity. In our case, the binding capacity of the antibody may have become weaker during the 3 years since the diagnosis, although the quantity of the antibody has not changed. KL-6 is a mucin-like high molecular weight glycoprotein and a novel serum marker for the activity of diffuse interstitial lung disease (Kohno et al. 1989). However, there are reports that the serum KL-6 level was also high in patients with PAP and that this correlated well with the clinical activity (Nakajima et al. 1998; Takahashi et al. 1998). Takahashi et al. (1998) described that the serum KL-6 levels in patients with PAP were significantly higher than those in patients with other diffuse interstitial lung diseases. In the present case as well the KL-6 level was high, although other laboratory data were unremarkable. In addition, the serum level of KL-6 dramatically decreased with the remission by the chest radiograph appearance and D_{LCO} , suggesting that KL-6 is a useful marker for the clinical course of I-PAP.

In conclusion, our case suggests that there are distinct two markers for I-PAP. The serum level of the antibody represents a useful marker for the diagnosis but not for follow-up of the clinical course, but KL-6 is an excellent for the assessment of the clinical course of I-PAP.

Acknowledgments

We acknowledge Mr. Brent Bell for reading the manuscript.

References

- Arai, T., Hamano, E., Inoue, Y., Tazawa, R., Nukiwa, T., Sakatani, M. & Nakata, K. (2004) Serum neutralizing capacity of GM-CSF reflects disease severity in a patient with pulmonary alveolar proteinosis successfully treated with inhaled GM-CSF. *Respir. Med.*, **98**, 1227-1230.
- Goldstein, L.S., Kavuru, M.S., Curtis-McCarthy, P., Christie, H.A., Farver, C. & Stoller, J.K. (1998) Pulmonary alveolar proteinosis: clinical features and outcomes. *Chest*, **114**, 1357-1362.
- Kitamura, T., Tanaka, N., Watanabe, J., Uchida, K., Kanegasaki, S., Yamada, Y. & Nakata, K. (1999) Idiopathic pulmonary alveolar proteinosis as an autoimmune disease with neutralizing antibody against granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.*, **190**, 875-880.
- Kohno, N., Kyoizumi, S., Awaya, Y., Fukuhara, H., Yamakido, M. & Akiyama, M. (1989) New serum indicator of interstitial pneumonitis activity- sialyated carbohydrate antigen KL-6. *Chest*, **96**, 63-73.
- Nakajima, M., Manabe, T., Niki, Y. & Matsushima, T. (1998) Serum KL-6 level as a monitoring marker in a patients with pulmonary alveolar proteinosis. *Thorax*, **53**, 809-811.
- Seymour, J.F. & Presneill, J.J. (2002) Pulmonary alveolar proteinosis: progress in the first 44 years. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **166**, 215-235.
- Seymour, J.F., Doyle, I.R., Nakata, K., Presneill, J.J., Schoch, O.D., Hamano, E., Uchida, K., Fisher, R. & Dunn, A.R. (2003) Relationship of anti-GM-CSF antibody concentration, surfactant protein A and B levels, and serum LDH to pulmonary parameters and response to GM-CSF therapy in patients with idiopathic alveolar proteinosis. *Thorax*, **58**, 252-257.
- Shah, P.L., Hansell, D., Lawson, P.R., Reid, K.B.M. & Morgan, C. (2000) Pulmonary alveolar proteinosis: clinical aspects and current concepts on pathogenesis. *Thorax*, **55**, 67-77.
- Takahashi, T., Munakata, M., Suzuki, I. & Kawakami, Y. (1998) Serum and bronchoalveolar fluid KL-6 levels in patients with pulmonary alveolar proteinosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **158**, 1294-1298.
- Tazawa, R., Hamano, E., Arai, T., Ohta, H., Ishimoto, O., Uchida, K., Watanabe, M., Saito, J., Takeshita, M., Hirabayashi, Y., Ishige, I., Eishi, Y., Hagiwara, K., Ebina, M., Inoue, Y., Nakata, K. & Nukiwa, T. (2005) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and lung immunity in pulmonary alveolar proteinosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **171**, 1142-1149.
- Trapnell, B.C., Whitsett, J.A. & Nakata, K. (2003) Mechanisms of diseases: Pulmonary alveolar proteinosis. *N. Engl. J. Med.*, **349**, 2527-2539.
- Wang, B.M., Stern, E.J., Schmidt, R.A. & Pierson, D.J. (1997) Diagnosing pulmonary alveolar proteinosis: a review and an update. *Chest*, **111**, 460-466.

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 菅野 有信*1
宇佐 美穂*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言われてきた。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、臨床の場に行う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

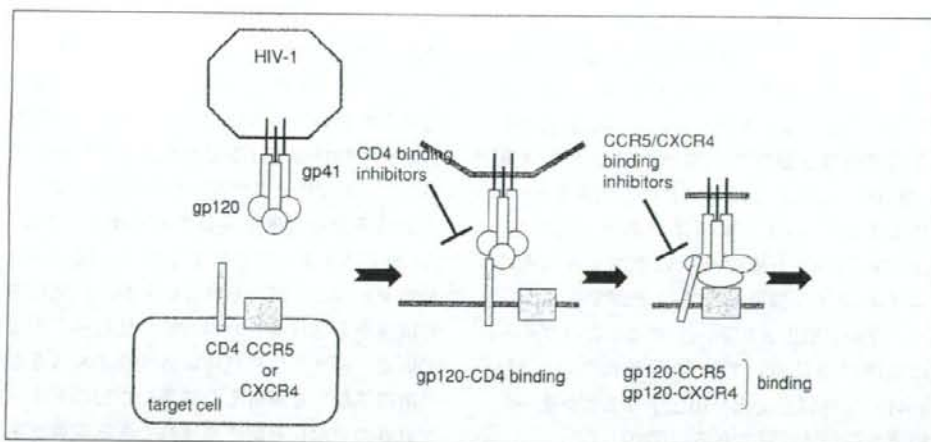


図 1 gp120 と受容体

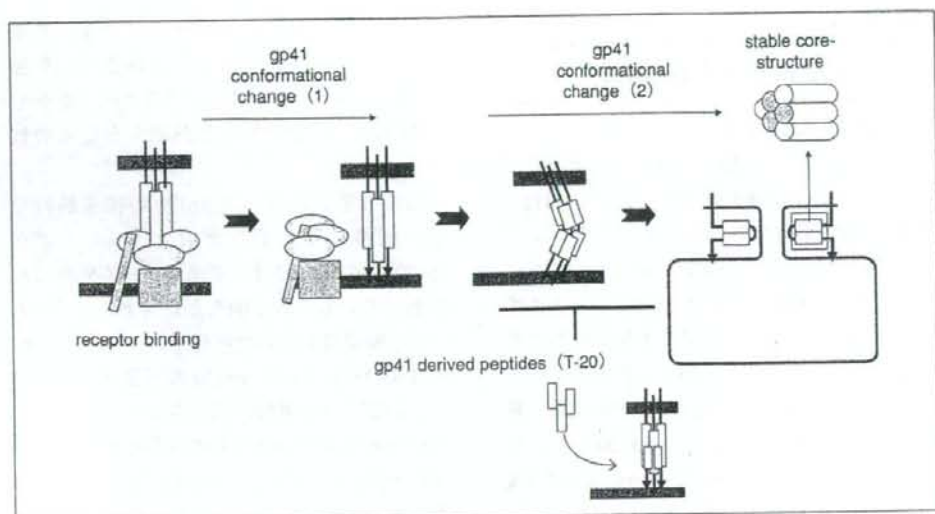


図2 gp41 とその立体構造

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、その道のりは平坦ではない(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²⁾。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	on developing
	receptor antagonists	on developing
fusion	anti-gp41 antibodies	on developing
	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
→ 薬剤アリアリーがしやすい

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пит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テス患者より HIV を単離した (SDA-1)⁹⁾。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、インテグレース (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 蛋白の一部でエンペローブ内側に存在する)、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⁹⁾。

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

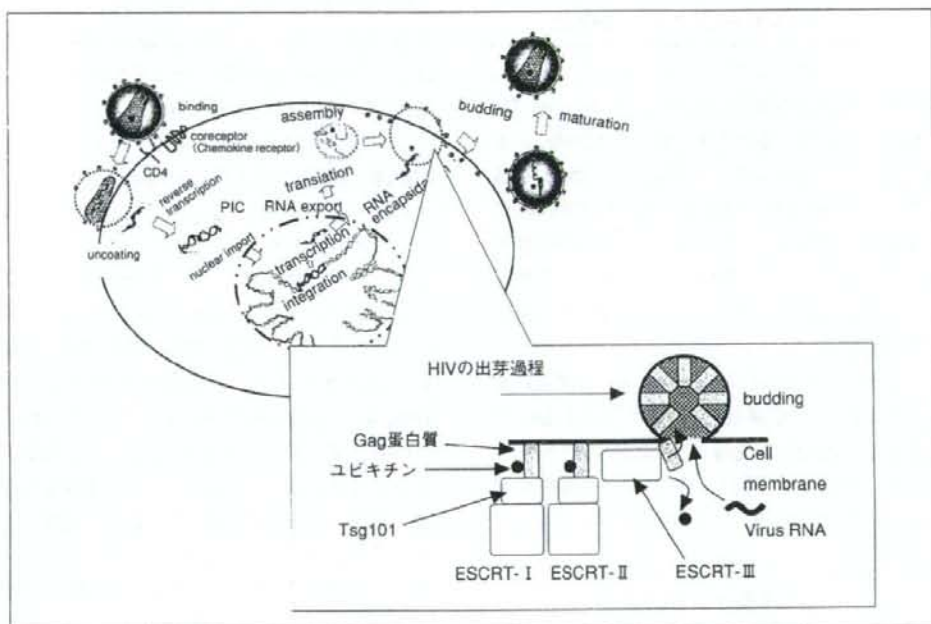


図3 HIVの増殖メカニズム

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 (translation) → 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)⁴⁾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-1 (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]