

11. エイズ発症阻止に関わる宿主因子・病態の研究

研究分担者 立川 愛 東京大学医科学研究所 先端医療研究センター 助教

研究要旨 本研究により慢性期の HIV 感染者の血中ウイルス量（セットポイント HIV 量）に関連する宿主要因として明らかになった MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES について、抗 HIV 療法開始により HIV 量が低下した HIV 感染者の PBMC を用い経時的な変化を解析した。高 HIV 群で見られた MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES 産生低下は治療開始後すぐに回復することが明らかとなった。また、網羅的遺伝子発現解析により高 HIV 群と低 HIV 群では免疫応答に関与する多様な遺伝子でその発現量が異なっていた。セットポイント HIV 量の異なる HIV 感染者では MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES のみでなく、免疫機能が質的に大きく異なっていることが示唆された。

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 HIV 量）が維持されるが、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。しかしながらセットポイント HIV 量に関連する宿主要因は未だ明らかとなっていない。セットポイント HIV 量に関連する宿主要因を明らかにし、セットポイント HIV 量を低下させる治療法が開発できれば AIDS 発症を阻止あるいは遅延させることができる。そこで、本研究ではセットポイント HIV 量に注目し、HIV 感染者の臨床材料を用いて「セットポイント HIV 量に関連する宿主要因」、中でも免疫関連宿主要因について明らかにすることを目的とした。セットポイント HIV 量が高い HIV 感染者（高 HIV 群）と低い HIV 感染者（低 HIV 群）の末梢血単核球（PBMC）を用いて、その機能的な相違を明らかにし、分子レベルでのメカニズムを明らかにする。HIV 感染病態の決定には宿主免疫応答が深く関わっていることは自明であるが、複雑なネットワークの上に成り立っている免疫システムでの現象を漏らさず捉えるために、なるべく多くの要因を同時に解析することが重要である。網羅的な解析を行うため、非特異的に多様な分子機序で PBMC 中の多くの細胞に作用

する PHA を刺激源とし、タンパク質レベルでの解析には多因子を同時に測定可能な蛍光マイクロビーズアレイシステムを、RNA レベルでの発現解析にはマイクロアレイ法を用いた。臨床材料を用いたこのような網羅的解析を行うことで、これまで明らかにされていないセットポイント HIV 量と関連する未知の要因を明らかにできると考えられる。

昨年度、高 HIV 群と低 HIV 群の PBMC を用いて、PHA 刺激に対して産生された 25 種類のサイトカイン、ケモカイン量を蛍光マイクロビーズアレイシステムで測定し、MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, IL2R の産生量が高 HIV 群で有意に低く、MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES に関しては HIV 量と逆相関することを明らかにした。また、抗 HIV 療法により 3 年以上 HIV 量が検出限界以下の治療群では低 HIV 群と同程度の産生が見られたことから、高 HIV 群でのこれらの分子の低産生は「高 HIV 量」であることの結果であることが示唆された。本年度は抗 HIV 療法開始により HIV 量が変化（低下）しつつある時期に経時的にサンプリングされた PBMC を用いて「HIV 量」と「MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES 産生能」との因果関係についてより詳細に解析することとした。

また、高 HIV 群での MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES 産生量低下のメカニズムとして、産生細胞数の減少、あるいは各産生細胞の産生量の低下、が考えられる。そこで産生細胞数の相違について明らかにするために、PBMC の主な細胞分画の頻度を解析した。

さらに、MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES 産生と関

連する分子、またさらなる未知の因子について知見を得るため、高 HIV 群と低 HIV 群の PBMC を用いマイクロアレイ法で網羅的遺伝子発現解析を行った。

B. 研究方法

1) PBMC の刺激とサイトカイン・ケモカインの測定

PBMC を PHA にて刺激し 48 時間後に培養上清を回収した。培養上清中のサイトカインの測定には Biosource 社の Human Cytokine 25-plex 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- α , IFN- γ , IFN- α , IL-8, IP-10, MIG, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, RANTES, Eotaxin.

2) 網羅的遺伝子発現解析

PBMC を PHA で刺激し、あるいは未刺激で 18 時間培養した後、total RNA を抽出し逆転写を行い cDNA を作製した。さらに T7 RNA ポリメラーゼを用いて RNA 増幅を行い、PHA で刺激したサンプルを Cy5 で、未刺激のサンプルを Cy3 でラベルした後、マイクロアレイ法(二色法)を用いて免疫・代謝に関連する 9000 遺伝子の発現量解析を行った。

3) 細胞分画の解析

PBMC を抗 CD3, CD4, CD8, CD19, CD16, CD56, CD14 抗体と Propidium Iodide (PI) で染色しフローサイトメーターにて解析を行い、CD4+あるいは CD8+T, B, NK 細胞, monocyte の頻度を測定した。さらに分化段階の異なる T 細胞の頻度を測定するため、抗 CD3, CD4, CD8, CD45RA, CCR7 抗体での染色を行った。

C. 研究結果

<治療開始後の MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES 産生の経時的変化>

抗 HIV 療法が施行された 6 名の HIV 感染者について、HIV 量が減少しつつある状態の治療開始直後(1-2ヶ月)(HIV 量 63~1100 コピー/ml)と HIV 量が検出限界以下まで低下した状態(半年~1年)の PBMC を用いて PHA 刺

激に対して産生される 25 種類のサイトカイン・ケモカイン量を測定し、高 HIV 群、治療群(治療開始後 3 年以上経過している状態)と比較した。その結果、MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES では治療開始後 1-2ヶ月ですでに低 HIV 群や治療群(3年以上 HIV 量検出限界以下)と同程度の産生が見られ、MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES 産生能が完全に回復していることが明らかとなった(図 1)。

<PHA 刺激に対する遺伝子発現変化の解析>

高 HIV 群、低 HIV 群、治療群各 5 名の PBMC を用いて PHA 刺激に対して生じた遺伝子発現量変化を比較した。その結果、解析対象とした 9000 遺伝子のうち、高 HIV 群と低 HIV 群で遺伝子発現量に有意差の見られた遺伝子は 93 遺伝子であった。また高 HIV 群と低 HIV 群で有意差が見られたのは 100 遺伝子であった。それに対して、低 HIV 群と治療群ではわずか 14 遺伝子のみでしか遺伝子発現量に有意差が見られなかった。

<PBMC 中の細胞分画の解析>

高 HIV 群での MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES 産生量低下が産生細胞数の低下によるものか否かを明らかにするために、PBMC 中に含まれる各細胞分画の頻度を測定した。

高 HIV 群、低 HIV 群 PBMC 中の CD4+, CD8+T 細胞, B 細胞, NK 細胞, monocyte の頻度を測定したところ、各分画で大きな差は見られなかった(図 2)。

T 細胞, NK 細胞ではそのサブセットによって様々なサイトカイン、ケモカインの産生能が大きく異なることが知られている。そこで、CD4, CD8+T 細胞についてはナイーブ、メモリー、エフェクター細胞を CD45RA, CCR7 の発現の有無によって、NK 細胞については CD56, CD16 の発現量によって分画した。その結果、いずれの細胞分画においても高 HIV 群、低 HIV 群間で頻度に相違が見られなかった。

D. 考察

本研究で高 HIV 群と低 HIV 群で産生量に有意差の見られた MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES は R5-HIV の拮抗因子であるとともに細胞性免疫応答の誘導に重要な分子であるため、HIV 感染

病態に関与する重要な要因であると考えられる。

抗 HIV 療法により HIV 量を低下させた場合に治療開始後 1~2 ヶ月で MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES 産生が回復していた。この時期は HIV 量が激減している (数万コピー/ml が数百コピー/ml へ) 状態であり、治療前は持続的に高抗原量に曝され疲弊状態に陥っていた免疫系にとっては「抗原量」が激減した状態である。高 HIV 群で見られた MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES 産生低下は HIV 自身が原因となり産生細胞になんらかの影響を及ぼしている可能性と、HIV による抗原刺激に曝され続けている免疫系で何らかの機能障害が生じた可能性が考えられる。実際にマイクロアレイを用いた発現解析では高 HIV 群と低 HIV 群では多くの免疫関連遺伝子で有意に発現量の差が見られた。どちらも HIV 量が少ない低 HIV 群と治療群では有意差の見られた遺伝子は僅かであったことから、高 HIV 群の免疫状態というのは低 HIV 群とは大きくことなっていることが明らかである。「HIV 自身」と「免疫応答」のどちらが主たる原因であるかを明らかにすることは重要な課題であるが、生体内で HIV 感染と免疫応答は常に相互に影響を及ぼし合っているため因果関係を明らかにすることは困難である。今後、他の慢性感染症での解析などを行うことで明らかにしていきたい。

また、高 HIV 群での MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES 産生低下のメカニズムを明らかにするため細胞分画の解析を行ったが、群間で有意な差は見られなかった。MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES は単球、マクロファージ、T 細胞など多様な細胞が発現することが知られている。PHA は T 細胞の増殖因子として知られているが、他の細胞にも様々に作用する。本実験条件で見られた MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES の産生細胞を特定すること、またマイクロアレイによる遺伝子発現解析の結果を用いて、その遺伝子発現機序と発現低下のメカニズムを明らかにしていくことが重要である。

E. 結論

セットポイント HIV 量の高い HIV 感染者で見られた MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES 特異的な産

生低下について、抗 HIV 療法開始後の経時的な解析を行い、HIV 量が低下するとその産生は回復することを明らかにした。また、高 HIV 群と低 HIV 群では PBMC 中の各細胞分画の頻度に有意差はなかったことから、MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES 産生細胞の質的異常によるものであることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miyazaki E, Kawana-Tachikawa A, Tomizawa M, Nunoya J, Odawara T, Fujii T, Shi Y, Gao FG, Iwamoto A. Highly restricted TCR repertoire in the CD8+ T-cell response against an HIV-1 epitope with a stereotypic amino acid substitution. AIDS. In press.
- 2) Hosoya N, Miura T, Kawana-Tachikawa A, Koibuchi T, Shioda T, Odawara T, Nakamura T, Kano M, Kato A, Hasegawa M, Nagai Y, Iwamoto A. Comparison between Sendai virus and adenovirus vectors to transduce HIV-a genes into human dendritic cells. J Med Virol. 80:373-82, 2008.
- 3) Mizukoshi F, Yamamoto T, Mitsuki YY, Terahara K, Kawana-Tachikawa A, Kobayashi K, Iwamoto A, Morikawa Y, Tsunetsugu-Yokota Y. Activation of HIV-1 Gag-specific CD8+ T cells by yeast-derived VLP-pulsed dendritic cells is influenced by the level of mannose on the VLP antigen. Microbes Infect. Nov 24 (Epub ahead of print) 2008.

2. 学会発表

- 1) Kawana-Tachikawa A, Nakayama K, Koga M, Odawara T, Fujii T, Iwamoto A. Contribution of Gag-specific CD8+ T cells to HIV control in a population lacking HLA-B57/27. Keystone Symposia: HIV Immunobiology. Infection to immune control. Keystone. Mar 2009.

- 2) 中山香、立川(川名)愛、小田原隆、藤井毅、岩本愛吉. HIV セットポイントを規定する免疫関連因子と HIV 特異的細胞生免疫応答の解析. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会, 岡山 H20.10.
- 3) 古賀道子、立川(川名)愛、小田原隆、岩本愛吉. 日本人集団において HLA 多型性が慢性感染期血中 HIV-1 ウイルス量に与える影響の解析. 第 22 回に本エイズ学会学術集会, 大阪 H20.12.

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

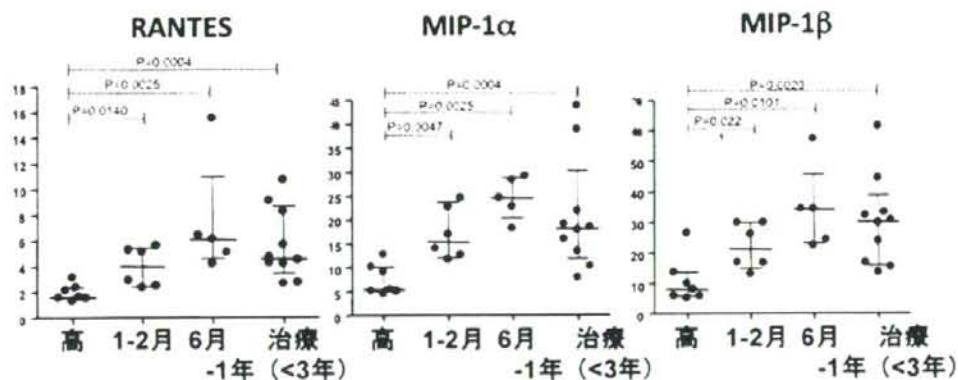


図1 治療開始後の経時的変化

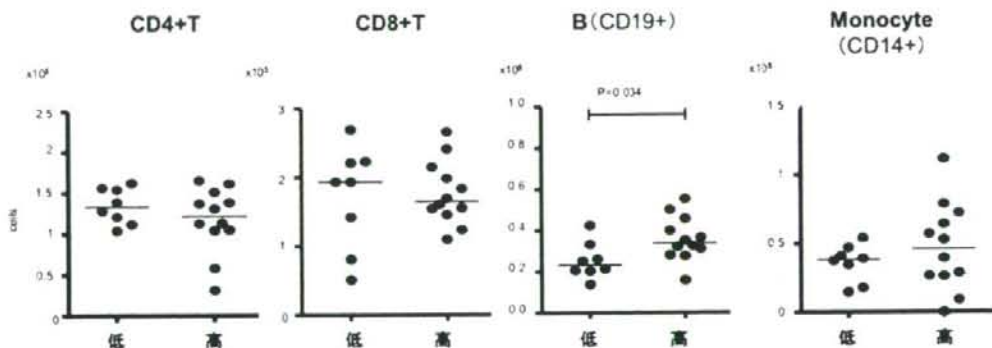


図2 各細胞分画の頻度

12. HIV 感染による中枢神経組織破壊メカニズムの解明

研究分担者 小柳 義夫 京都大学ウイルス研究所 教授

研究協力者 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 中枢神経組織において、ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) は主にマクロファージやミクログリアに感染し、ウイルスを産生する。この HIV-1 感染細胞は神経障害因子を遊離し、これらは特に、大脳基底核、及び、海馬組織において重度な神経細胞障害を引き起こすと考えられている。本研究では、ラット脳海馬スライス培養系を用いて、HIV-1 感染マクロファージが誘導する領域特異的神経細胞障害過程を検討した。HIV-1 を感染させた末梢血単球由来マクロファージ (MDM) と共培養した海馬スライス内では、アポトーシスによる歯状回顆粒細胞の優先的な死滅、及び、CA3 領域に投射する苔状線維の重度障害が見出された。これらの結果は、HIV-1 が感染した海馬組織においては、歯状回は最も脆弱な領域であることを示している。さらに、EGFP 発現マウスレトロウイルスベクター接種により歯状回に分布する神経前駆細胞を標識し、成熟神経細胞への分化能を解析したところ、HIV-1 感染 MDM との共培養により強度の細胞分化障害が引き起こされていた。正常海馬組織において、新生神経細胞は神経細胞層に取り込まれるが、HIV-1 感染 MDM との共培養下では新生神経細胞は神経細胞層に取り込まれなかった。この結果は、HIV-1 感染マクロファージから放出される神経細胞障害は脳組織の組織修復機構を阻害することを示唆している。歯状回は神経新生が活発な領域であり、これが HIV-1 感染による歯状回の選択的脆弱性を規定していることが考えられる。

A. 研究目的

本研究の目的はエイズ病態の中でいまだに臨床的に問題となる中枢神経組織障害のメカニズム解明とそれに有効な治療薬の開発である。逆転写酵素阻害剤ならびにプロテアーゼ阻害剤の併用療法 (HAART) の進歩により、HIV 感染者の免疫不全状態は格段に改善され、その死亡率は激減した。さらに、重篤な HIV 脳症の発病率は HAART により著明に減少したものの、HIV 脳症の軽症型と考えられる軽度の認知および運動障害 (milder cognitive and motor disorder: MCMD) の出現が新たな問題となってきた。この症状は、記憶障害はほとんどなく、計算障害や他の高次皮質機能障害が特徴的である。そしてその病態は HIV 感染細胞の脳内への浸潤と炎症性の病理学的変化を伴っており、この段

階からさらに進行して神経組織の破壊へ至ると考えられている。中枢神経組織において HIV 感染細胞は脳内に浸潤したマクロファージならびに脳に局在するマクロファージ系細胞であるミクログリアである。しかし、HIV そのものが神経細胞に感染することは見出されていないながら、感染者においては明らかに神経細胞の脱落変性が観察される。これまでに多くの HIV 脳症解明研究がおこなわれてきたにも関わらず、HIV 感染に伴う脳神経障害の分子メカニズムについてはいまだ不明な点が多い。それは、現在、抗エイズ薬長期服用者が激増している現状からも、どのようなメカニズムにより、HIV が中枢神経組織を破壊するのかを明らかにし、有効な薬剤を開発する必要がある。

本研究では、HIV 感染マクロファージがど

のように、そして、脳組織のどのような細胞をまず障害するのかを解明するために、脳海馬スライス培養をその標的組織として HIV 感染マクロファージとの共培養実験をおこなった。その結果、脳海馬組織のなかの歯状回顆粒神経細胞の破壊と分化不全が観察された。この神経細胞分化再生の抑制は他の神経細胞層では見いだされなかった。これらの結果は、HIV 感染による中枢神経組織破壊過程では、神経細胞の死滅とその後の再生不全の両者が作用していることを示唆するものである。

B. 研究方法

1) 脳組織スライス培養実験と組織学的解析

哺乳 7-8 日目のハノーバットあるいは ICR マウスを断頭し、脳を摘出し海馬を露出させ、McIlwain ティッシュチョッパーにて海馬溝に垂直に厚さ 350 μ m にスライスした。これをあらかじめ準備しておいた 6 ウェル培養プレート内の培養プレートインサート (Millicell-CM:PICM03050, Millipore) 上に 1 ウェルあたり、4-5 枚の密度で 34°C で培養した。障害細胞群を同定するには SYTO Green dye (Invitrogen) を添加後、30 分培養し、CCD カメラにより、染色細胞を検出した。さらに別のスライス片を 4% periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP) で固定後、凍結切片を作製し、抗 glial fibrillary acidic protein (GFAP) ウサギ抗体 (DAKO)、あるいは、anti-NeuN ラット単クローン抗体 (Chemicon) を用いて蛍光免疫染色を行った。他に抗 nestin 抗体 (Chemicon)、抗 O4 抗体 (Chemicon)、抗 neurofilament protein (NFP) 抗体 (Dako)、抗ラット CD68 抗体である ED1 (Dako)、抗 EGFP 抗体 (Nakarai)、ビオチン標識抗マウス IgM ヤギ抗体 (Chemicon)、Alexa Fluor 488, 594 標識抗マウス IgG ヤギ抗体と Alexa Fluor 594 標識抗ストレプトアビジン (Invitrogen)、FITC 標識抗ラット IgG ヤギ抗体 (Jackson Immuno Research Lab.) を用いた。これら蛍光染色の解析には Leica のレーザー顕微鏡と CCD カメラを使用した。また、ヒト末梢血よりマクロファージ (Monocyte-derived macrophage, MDM) を分離培養し、HIV-1_{JRFL} を感染させ、

このスライス培養とトランスウエルを用いて共培養実験を行った。培養上清中のウイルス量測定は p24ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay, RETROtek, ZeptoMetrix) 法によった。

2) レトロウイルスベクター導入

GFP 発現 MLV 由来ベクターである SR α -EGFP を用いた。スライスにマイクロインジェクション法により錐体細胞層上部に接種した。接種後、培養を 14 日間継続し、組織学的解析に供した。

3) TUNNEL 染色

スライス片を 4% paraformaldehyde で固定後、プロテアーゼ K にて処理し、再び paraformaldehyde で固定した。TritonX-100 処理後、terminal transferase recombinant (TdT) 溶液 (0.02 μ g/ μ l ビオチン標識 dUTP, 0.012 U/ μ l TdT; Roche) と反応させ、二次抗体を添加後反応させた。

4) 統計学的処理

統計学的解析は、one-way ANOVA により行った。多重比較は Student's *t* test を用いて行った。

(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から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た。すべての実験は本委員会より承認されている。また、ヒト末梢血の供与は供血者の同意のもと、倫理委員会よりの承諾のもと施行された。

C. 研究結果

1) HIV 誘導神経組織障害領域の同定

まず、脳組織内の組織構築とウイルス感染による影響をリアルタイムに把握できる実験系として、3 次元構築された脳海馬組織そのものを維持できる海馬スライス培養系を HIV 誘導神経組織障害の評価系として利用可能か検討した。哺乳 7-8 日目のラットあるいはマウスから海馬を取り出し、そのまま、薄切し、ミリポア膜上にて培養を行った。培養直後は生体内の層構造がいったん破壊されるが、培養 2 週目には中央に CA1 や CA3、そして、歯状回などの神経細胞層と周辺のグ

リア層が再構築された(結果示さず)。そして、免疫染色の結果、これらの神経細胞層(NeuN 陽性細胞)とアストロサイト層(GFAP)の分布は確認された(結果示さず)。培養開始後2週目の海馬スライスとHIV感染MDMとの共培養実験を行った。共培養後14日目にはスライス内の神経細胞層に脱落が観察された(図1Aa)。ところが、MDMは培養上清中に持続的にHIVを産生しながら細胞は維持されていた(図1Ab, B)。

HIV感染MDMと共培養したスライス内の障害を受けている細胞群を同定するために、膜不透過性蛍光色素であるSYTO Green dyeを使って染色し、障害部位の同定を試みた。CA3領域ならびに歯状回の神経細胞層に特に際立った脱落が観察された(図2A)。これらの障害細胞が、神経細胞であることが、anti-NeuN抗体による免疫染色で確認された(図2B, C)。さらに障害神経細胞層領域ではアポトーシスが誘導されているかを検討するために、TUNNEL染色をおこなった。TUNNEL陽性細胞、すなわちアポトーシス細胞は脳海馬内では歯状回に特に限局して有意に多く検出された(図2D, E)。さらに、これら歯状回領域における神経線維の障害の程度を明らかにするためにneurofilament蛋白質(NFP)発現細胞の有無を検討したところ、明らかに歯状回からCA3領域へ投射する苔状線維の脱落が観察された(図2F, G)。

一方、神経細胞の脱落とは対照的にアストロ細胞(GFAP)ならびにマイクログリア細胞(ED1, ラットCD68分子)の形態変化からこれらの細胞はHIV感染MDMとの共培養により活性化することが推測された(図3)。

2) HIV誘導神経組織再生不全

最近の研究から、神経組織は器官形成期に限らず成人になっても部位によっては新たに神経細胞の新生が起きていることがわかってきた。神経細胞の新生は神経組織における新たなシナプス形成に寄与し、記憶の形成などの神経機能獲得などに関与すると考えられている。そして、神経細胞新生が生じている場として、脳海馬と嗅球が知られている。脳海馬は新規記憶の形成に関与する領域であり、そのなかでの歯状回は神経幹細胞

が豊富に分布し、活発な神経造成が起きている。興味あることに、今回の結果は、脳海馬歯状回の神経細胞がHIV感染MDMの存在により脱落することがわかった。この脱落はアポトーシスによる破壊とともに、神経細胞の再生不全による可能性が考えられる。そこでまず、未分化神経細胞へのHIV感染MDMとの共存による影響を明らかにするために、神経幹細胞あるいは前駆体細胞に発現するnestin発現細胞の有無を検討した。その結果、HIV感染MDMと非感染MDMとの共培養のいずれのスライスにおいても同程度のnestin陽性細胞が検出された(図4A)。次に、EGFP発現マウスレトロウイルスベクターを錐体細胞層上部に接種し、歯状回に分布する神経幹あるいは前駆細胞を標識し、培養を14日間継続した。マウスレトロウイルスは分裂細胞にのみ感染するので、この組織内における分裂細胞がGFPを発現する。この方法により成熟神経細胞への分化能を解析した。その結果、HIV-1感染MDMとの共培養により強度の神経細胞分化障害が引き起こされていた(図4B)。正常海馬組織において、新生神経細胞は神経細胞層に取り込まれる(図4B a, C)が、HIV-1感染MDMとの共培養下では新生神経細胞は顆粒神経細胞層に取り込まれなかった(図4B b, C)。この結果は、HIV-1感染マクロファージから遊離される神経障害因子は脳組織の組織修復機構も阻害することを示唆している。

D. 考察

3次元に構築された中枢神経組織を顕微鏡下にリアルタイムに観察する方法として脳組織スライス培養系を利用した。本方法は脳海馬組織を350 μ m程度にスライスし、その組織そのまま培養しようとするものであり、培養のための組織切断によりその構築が破壊された海馬組織がふたたび構築され神経細胞層やグリア層が顕微鏡下にて観察されるものである。このスライス培養系に、HIV感染ヒト初代マクロファージと共培養を行うと、海馬スライス再構築後に神経細胞に対する障害活性(図1)が誘導されることを見出した。この神経組織破壊はHIV感染T細胞

胞との共培養系では見られず、HIV 感染マクロファージが遊離するなんらかの神経阻害因子の存在を疑っている。さらに、この HIV 感染マクロファージとの共培養により見出された組織所見として、神経細胞の脱落とグリア細胞の活性化はエイズ脳症患者組織において見出されている典型的病理組織所見であり、この培養系が HIV 誘導神経系障害の評価系として応用可能であることを強く示唆するものである。脳内に HIV 感染細胞を浸潤させてマウスにおいて神経細胞にアポトーシスが以前から誘導できること、そして、その関与分子として TRAIL を見出している (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100: 2777-2782, 2003)。この破壊過程にもこのようなアポトーシス誘導リガンド分子が関与していると考えている。

神経系の細胞分化に対する抑制活性を評価する実験系として、この海馬スライス培養系に神経幹細胞ならびに神経前駆細胞を標識し、神経系細胞分化に対する HIV 感染の影響を検討した (図 4)。その結果、神経幹細胞から神経細胞への分化は HIV 感染マクロファージの存在下においては明らかに阻害されるが、同じ細胞からアストロサイトへの分化はほとんど阻害されないことが明らかになった。本研究で得られた結果をもとに脳海馬における組織破壊のメカニズムを考えてみる。図 5 に示すように、脳海馬において、顆粒細胞の苔状線維は CA3 領域の錐体細胞に投射する。前駆細胞から分化した新生神経細胞は取り込まれ、神経回路を構成する。対照的に、HIV-1 感染マクロファージが共存する脳海馬においては、神経細胞はアポトーシスを起こし、顆粒細胞の苔状線維は CA3 領域の錐体細胞に投射できない。さらに、障害された神経細胞に置き換わるはずの前駆細胞は神経細胞への分化能が極端に減少しており、顆粒細胞層、錐体細胞層に取り込まれない。それゆえ、障害された神経細胞や減少した神経接続は海馬組織の歯状回に蓄積すると考えられる。これら神経破壊と再生不全の蓄積の結果、HIV 感染による中枢神経障害が誘発されていると考えられる。

E. 結論

エイズ脳症発症メカニズムの解明に向けて一定の基礎医学的進歩が得られた。今後、臨床的意義を明らかにする。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sato K, Aoki J, Misawa N, Daikoku E, Sano K, Tanaka Y, Koyanagi Y. Modulation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity through incorporation of tetraspanin proteins. *J. Virol.* 82: 1021-1033, 2008.
- 2) Kitayama H, Miura Y, Ando Y, Koyanagi Y. Human immunodeficiency virus type-1 vulnerates nascent neuronal cells. *Microbiol. Immunol.* 52: 78-88, 2008.
- 3) Koyanagi Y, Tanaka Y, Ito M, and Yamamoto N, Humanized mice for human retrovirus infection. "Humanized Mice", *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 324:133-148, 2008. Nomura, Tatsuji; Watanabe, Takeshi; Habu, Sonoko (Eds.).
- 4) Yoshida T, Kawano Y, Sato K, Ando Y, Aoki J, Miura Y, Komano J, Tanaka Y, Koyanagi Y. A CD63 mutant inhibits T-cell tropic HIV-1 entry by disrupting CXCR4 trafficking to the plasma membrane. *Traffic* 9: 540-558, 2008.
- 5) Kitayama H, Miura Y, Ando Y, Hoshino S, Ishizaka Y, Koyanagi Y. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr inhibits axonal outgrowth through induction of mitochondrial dysfunction. *J. Virol.* 82: 2528-2542, 2008.
- 6) Kawamura T, Koyanagi Y, Nakamura Y, Ogawa Y, Yamashita A, Iwamoto T, Ito M, Blauvelt A, Shimada S. Significant virus replication in Langerhans cells following application of HIV to abraded skin: Relevance to occupational transmission of HIV. *J. Immunol.* 180: 3297-3304, 2008.

- 7) Yamaguchi K, Sugiyama T, Kato S, Kondo Y, Ageyama N, Kanekiyo M, Iwata M, Koyanagi Y, Yamamoto N, Honda M. A novel CD4-conjugated ultraviolet light-activated photocatalyst inactivates HIV-1 and SIV efficiently. *J. Med. Virol.* 80:1322-1331, 2008.
- 8) Urano E, Kariya Y, Futahashi Y, Ichikawa R, Hamatake M, Fukazawa H, Morikawa Y, Yoshida T, Koyanagi Y, Yamamoto N, and Komano J. Identification of the P-TEFb complex-interacting domain of Brd4 as an inhibitor of HIV-1 replication by functional cDNA library screening in MT-4 cells. *FEBS Let.* 582:4053-4058, 2008.
- 9) Ando Y, Kitayama H, Kawaguchi Y, Koyanagi Y. Primary target cells of herpes simplex virus type 1 in the hippocampus. *Microbes Infect.* 10:1514-1523, 2008.
- 10) 佐藤佳, 小柳義夫. Sputnik Sweetheart - ウイルスに感染するウイルス. ウイルス (日本ウイルス学会誌), 58 巻, 第 2 号, pp. 219-220, 2008.
2. 学会発表
- 1) Kitayama H, Miura Y, Ando Y, Hoshino S, Ishizaka Y, Koyanagi Y. HIV-1 VPR in mitochondria impairs neuronal progenitor cell differentiation. *Retroviruses Meeting*, Cold Spring Harbor, New York, 2008.
- 2) Urano E, Kariya Y, Futahashi Y, Hamatake M, Morikawa Y, Yoshida T, Koyanagi Y, Yamamoto N, Komano J. Identification of the carboxy-terminal domain of bromodomain containing 4 as a specific silencer of HIV-1 replication. *Retroviruses Meeting*, Cold Spring Harbor, New York, 2008.
- 3) Yoshida T, Kawano Y, Ando Y, Sato K, Komano J, Tanaka Y, Koyanagi Y. A CD63 mutant inhibits CXCR4 trafficking to the plasma membrane and block X4 HIV-1 entry. *Retroviruses Meeting*, Cold Spring Harbor, New York, 2008.
- 4) Shinoda Y, Suzuki Y, Tanaka Y, Koyanagi Y. Interferon- ω 1 is a powerful inhibitor for HIV-1 infection. *Retroviruses Meeting*, Cold Spring Harbor, New York, 2008.
- 5) Sato K, Aoki J, Misawa N, Daikoku E, Sano K, Tanaka Y, Koyanagi Y. Tetraspanin on HIV-1 virions modulates its infectivity. *Retroviruses Meeting*, Cold Spring Harbor, New York, 2008.
- 6) Yamamoto S, Okawa K, Masuda T, Koyanagi Y, Suzuki Y. Identification of cellular interactors to MoMLV integrase using tandem affinity purification-mass spectrometry analysis. *Retroviruses Meeting*, Cold Spring Harbor, New York, 2008.
- 7) Urano E, Kariya Y, Futahashi Y, Hamatake M, Morikawa Y, Yoshida T, Koyanagi Y, Yamamoto N, and Komano J. Identification of the carboxy-terminal domain of bromodomain containing 4 as a specific silencer of HIV-1 replication. *Retroviruses Meeting*, Cold Spring Harbor, New York, 2008.
- 8) Ando Y, Kitayama H, Kawaguchi Y, Koyanagi Y. Primary target cells of herpes simplex virus type 1 in the hippocampus. *The 15th East Asia Joint Conference on Biomedical Research*, Seoul, 2008.
- 9) Kitayama H, Ando Y, Hoshino S, Ishizaka Y, Koyanagi Y. HIV-1 Vpr in Mitochondria impairs neuronal cell repair. *XIV. International Congress of Virology*, Istanbul, 2008.
- 10) Yoshida T, Kawano Y, Ando Y, Sato K, Komano J, Tanaka Y, Koyanagi Y. CD63 and its mutants inhibit fusion of CXCR4-containing vesicles to the plasma membrane and block X4 HIV-1 entry. *XIII IUMS International Congress of Virology*, Istanbul, 2008.
- 11) Suzuki Y, Ogawa K, Koyanagi Y, Suzuki Y. VRK induces dysfunction of the MoMLV PIC through phosphorylation of BAF. *3rd International Conference on Retroviral Integrase*, Woods hole, Massachusetts,

- 2008.
- 12) Koyanagi, Y.: HIV and AIDS 日中数理生物学コロキウムシンポジウム、岡山、2008.
 - 13) Koyanagi, Y.: HIV-1 pathogenesis: productive infection in CD4+ effector memory T lymphocytes and CD4+ depletion in humanized mice, 第11回京都大学国際シンポジウム、上海、2008.
 - 14) Sato K, Nie C, Misawa N, Tanaka Y, Ito M, Koyanagi Y. Characterization of HIV-1 pathogenesis and the infected cells in humanized mice. 16th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, D-179, Montreal, 2009.
 - 15) Sato K, Aoki J, Misawa N, Daikoku E, Sano K, Tanaka Y, Koyanagi Y. Modulation of HIV-1 infectivity through incorporation of tetraspanin proteins. The Kinki AIDS Seminar, Nara, 2008.
 - 16) Sato K, Nie C, Misawa N, Tanaka Y, Ito M, Koyanagi Y. Characterization of pathogenesis and productive infection of HIV-1 in humanized mice. The 8th Awaji Symposium, Awaji, 2008.
 - 17) Yamamoto S, Okawa K, Masuda T, Koyanagi Y, Suzuki Y. Functional association of HIV-1 and MoMLV integrase with HECT-domain ubiquitin ligase Huwe1. The 9th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, 2008.
 - 18) 渡部匡史, 鈴木陽一, 宮澤正顕, 小柳義夫. Small GTPase Rac2によるHIV-1増殖制御. 第56回日本ウイルス学会, 岡山, 2008.
 - 19) 鈴木康嗣, 小川加那子, 小柳義夫, 鈴木陽一. 細胞性キナーゼVRK1によるレトロウイルスインテグレーション機能の阻害とその分子メカニズム. 第56回日本ウイルス学会, 岡山, 2008.
 - 20) 篠田康彦, 鈴木陽一, 田中勇悦, 小柳義夫. インターフェロンオメガ1によるHIV-1感染抑制機構の解析. 第22回日本エイズ学会, 大阪, 2008.
 - 21) 安藤良徳, 北山裕子, 小柳義夫. ウイルスに対する海馬組織の脆弱性に関する研究. 第22回日本エイズ学会, 大阪, 2008.
 - 22) 小林 朋子, 芳田 剛, 駒野 淳, 小柳 義夫. レンチウイルスベクターを用いた抗HIV因子のスクリーニングとその解析. 第22回日本エイズ学会, 大阪, 2008.
 - 23) 佐藤佳, Chuanyi Nie, 三沢尚子, 田中勇悦, 伊藤守, 小柳義夫. ヒト化マウスにおけるHIV-1感染指向性と持続感染細胞の同定. 第22回日本エイズ学会, 大阪, 2008.
 - 24) 渡部匡史, 鈴木陽一, 宮澤正顕, 小柳義夫. HIV-1複製制御におけるSmall GTPase Rac2の機能解析. 第22回日本エイズ学会, 大阪, 2008.
 - 25) 山元誠司, 大川克也, 小川加那子, 増田貴夫, 森川裕子, 小柳義夫, 鈴木陽一. TAP-MS法によるインテグラーゼ結合因子Huwe1の同定とその解析. 第22回日本エイズ学会, 大阪, 2008.
 - 26) 佐藤佳, 三沢尚子, Chuanyi Nie, 高橋玲, 伊藤守, 小柳義夫. EBV感染モデルマウスの確立と活性化CD8+T細胞の誘導. 第38回日本免疫学会総会, 京都, 2008.
 - 27) 渡部匡史, 鈴木陽一, 宮澤正顕, 小柳義夫. Small GTPase Rac2によるHIV-1増殖制御. 第7回感染症沖縄フォーラム, 沖縄, 2009.
- H. 知的所有権の出願・登録状況
1. 特許取得
該当なし
 2. 実用新案登録
該当なし

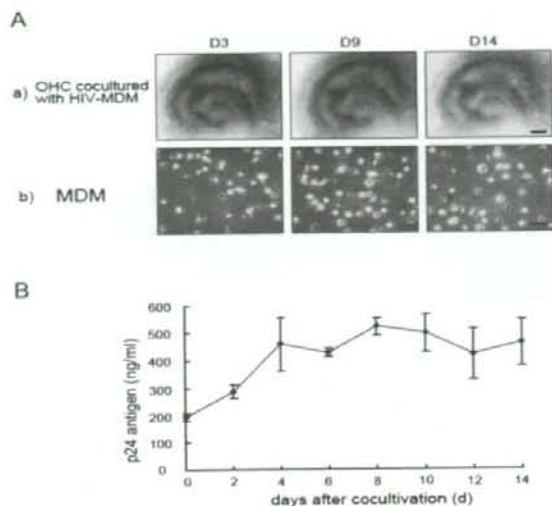


図1 HIV-1 感染 MDM と共培養した海馬スライスの経時的変化

(A) HIV-1 感染 MDM と海馬スライスを 2 週間共培養した。共培養開始後 3, 9, 14 日目の海馬スライスの顕微鏡観察を行った。海馬スライスは次第に薄くなり、細胞脱落が認められた (a) が、HIV-1 感染による MDM の形態変化は観察されなかった (b)。スケールバー: 500 μ m (a)、100 μ m (b)。(B) 共培養の間、HIV-1 感染 MDM から大量の HIV-1 が産生されていた。X 軸は共培養後の日数、Y 軸は ELISA 法により測定した培養上清中の p24 濃度を示している。

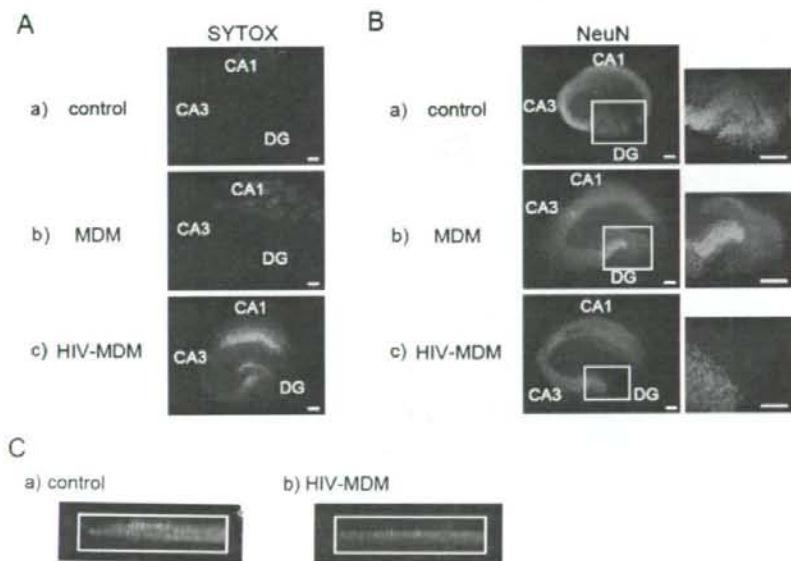


図2 HIV-1 感染 MDM と共培養した海馬スライスにおける神経細胞障害性

(A) CA1 領域、及び、歯状回の神経細胞は HIV-1 感染 MDM との共培養開始後早期に障害された。非共培養海馬スライス (a: control)、または、非感染 MDM (b: MDM)、HIV-1 感染 MDM (c: HIV-MDM) それぞれと海馬スライスを 2 日間共培養し、SYTOX 染色を行った。CA1: CA1 領域、CA3: CA3 領域、DG: 歯状回。スケールバー: 100 μ m。(B) HIV-1 感染 MDM と共培養した海馬スライスにおいて、歯状回の顆粒細胞は重度に脱落していた。非共培養海馬スライス (a: control)、または、非感染 MDM (b: MDM)、HIV-1 感染 MDM (c: HIV-MDM) それぞれと海馬スライスを 14 日間共培養し、抗 NeuN 抗体を用いて免疫染色を行った。矩形領域を拡大した。CA1: CA1 領域、CA3: CA3 領域、DG: 歯状回。スケールバー: 100 μ m。(C) HIV-1 感染 MDM と共培養した海馬スライスの三次元解析により、海馬スライスの菲薄化、及び、神経細胞脱落が認められた。

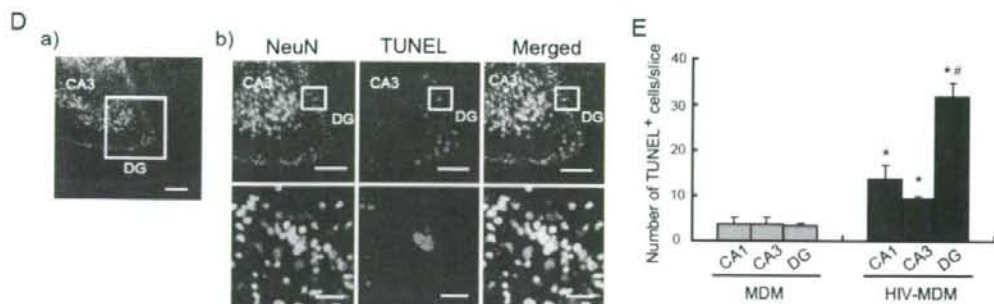


図2 HIV-1 感染 MDM と共培養した海馬スライスにおける神経細胞障害性

(D) HIV-1 感染 MDM により神経細胞のアポトーシスが誘導された。HIV-1 感染 MDM と共培養した海馬スライスを TUNEL (赤)、抗 NeuN 抗体 (緑) を用いて染色し、細胞核を Hoechst33342 (青) を用いて染色した。弱拡大写真は左図 (a)、強拡大写真は右図 (b)。矩形領域を拡大した。CA3: CA3 領域、DG: 歯状回。スケールバー: 150 μ m (a)、100 μ m (b、上図)、25 μ m (c、下図)。(E) 神経細胞のアポトーシスは特に歯状回の顆粒細胞層において誘導された。非感染 MDM (MDM)、HIV-1 感染 MDM (HIV-MDM) と共培養した海馬スライスの 3 領域 (CA1 領域、CA3 領域、歯状回) における TUNEL 陽性神経細胞数をカウントした。Y 軸は海馬スライス中の TUNEL 陽性神経細胞数を示している。*: $p < 0.01$ 対 MDM における各領域。#: $p < 0.01$ 対 HIV-MDM における CA1 領域、及び、CA3 領域。

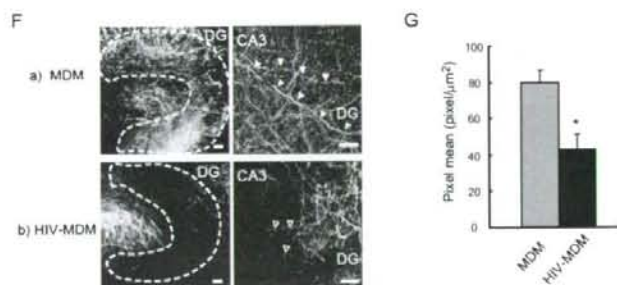


図2 HIV-1 感染 MDM と共培養した海馬スライスにおける神経細胞障害性

(F) HIV-1 感染 MDM によって顆粒細胞のシナプス減少が誘導された。非感染 (a: MDM)、HIV-1 感染 MDM (b: HIV-MDM) それぞれと共培養した海馬スライスを抗 NFP 抗体を用いて免疫染色し、神経軸索を可視化した。弱拡大写真は左図 (a)、強拡大写真は右図 (b)。矩形領域を拡大した。破線により囲まれた領域は歯状回を示す。非感染 MDM と共培養した海馬スライスの歯状回顆粒細胞では長い軸索が形成されており (filled arrowhead) (a)、それらは CA3 領域に投射していた。対照的に、HIV-1 感染 MDM と共培養した海馬スライスの歯状回顆粒細胞では軸索は重度に障害されていた (opened arrowhead) (b)。スケールバー: 50 μ m。(G) HIV-1 感染 MDM (HIV-MDM) と共培養した海馬スライスにおいて、NFP の蛍光輝度は著しく減少していた。*: $p < 0.01$ 対非感染 MDM (MDM)。

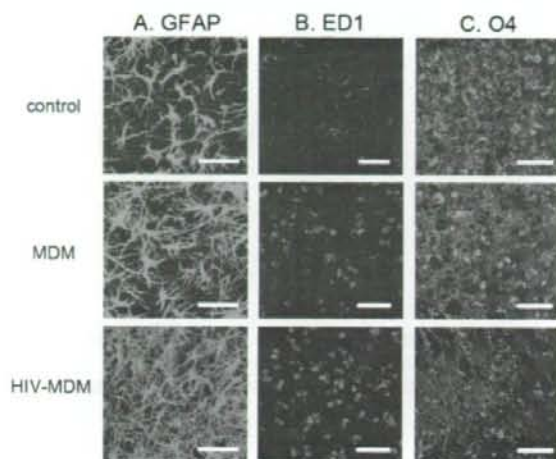


図3 アストロサイト、ミクログリア、オリゴデンドロサイトの異常
非共培養海馬スライス (a: control)、または、非感染 MDM (b: MDM)、HIV-1 感染 MDM (c: HIV-MDM) それぞれと海馬スライスを 14 日間共培養し、抗 GFAP 抗体 (A)、抗 ED1 抗体 (B)、抗オリゴデンドロサイト O4 抗体 (C) を用いて免疫染色を行った。HIV-1 感染 MDM 存在下のアストロサイト数は増大していた (A)。HIV-1 感染 MDM との共培養により、ミクログリアはその数が増大し、形態変化も観察された (B)。対照的に、オリゴデンドロサイトは HIV-1 感染 MDM により障害されていた (C)。スケールバー: 50 μ m。

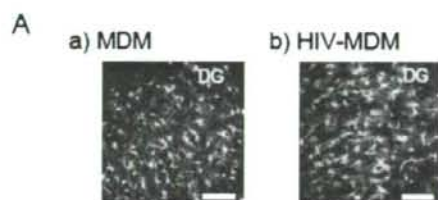


図4 前駆細胞の分化能異常
(A) 前駆細胞数は HIV-1 感染 MDM に影響されなかった。内性前駆細胞を可視化するために、非感染 MDM (a: MDM)、HIV-1 感染 MDM (b: HIV-MDM) それぞれと海馬スライスを 14 日間共培養し、抗 nestin 抗体を用いて免疫染色を行った。CA3: CA3 領域、DG: 歯状回。スケールバー: 50 μ m。

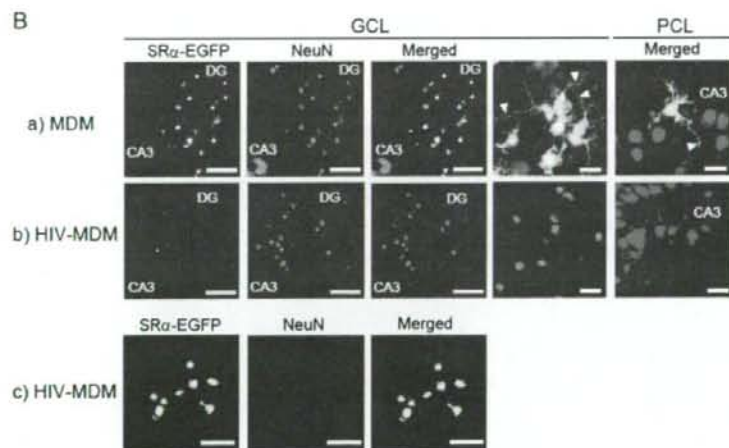


図4 前駆細胞の分化能異常
(B) HIV-1 感染 MDM 存在下において、前駆細胞の神経細胞への成熟過程は強力に抑制された。EGFP 発現 MLV ベクターを用いて前駆細胞をラベルした海馬スライスを非感染 (a: MDM)、HIV-1 感染 MDM (b, c: HIV-MDM) と共培養した。海馬スライスを抗 EGFP 抗体 (緑)、及び、抗 NeuN 抗体 (赤) を用いて免疫染色した。非感染 MDM と共培養した海馬スライスでは EGFP 陽性細胞は NeuN を発現しており、軸索様突起 (filled arrowhead) を持っていた (a, 顆粒細胞層と錐体細胞層)。対照的に、HIV-1 感染 MDM と共培養した海馬スライスでは EGFP 陽性細胞は NeuN を発現しておらず、顆粒細胞層、及び、錐体細胞層に取り込まれた EGFP 陽性細胞数は明らかに減少していた (b, c)。GCL: 顆粒細胞層、PCL: 錐体細胞層、CA3: CA3 領域、DG: 歯状回。スケールバー: 100 μ m、50 μ m (GCL の右図、及び、PCL 図)。

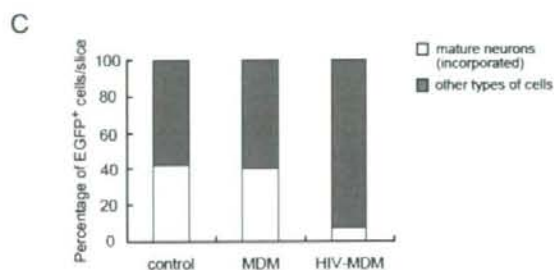


図4 前駆細胞の分化能異常

(C) HIV-1 感染 MDM は神経細胞の分化異常を誘導する。B で述べたように共培養した海馬スライスを抗 EGFP 抗体、及び、抗 NeuN 抗体を用いて免疫染色した。全 EGFP 陽性細胞、及び、顆粒細胞層、錐体細胞層に取り込まれた NeuN 陽性細胞をカウントし、成熟神経細胞（神経回路に取り込まれたもの）と成熟神経細胞以外の細胞に分類した。Y 軸は海馬スライス内の EGFP 陽性細胞のパーセンテージを示す。

Fig. 5

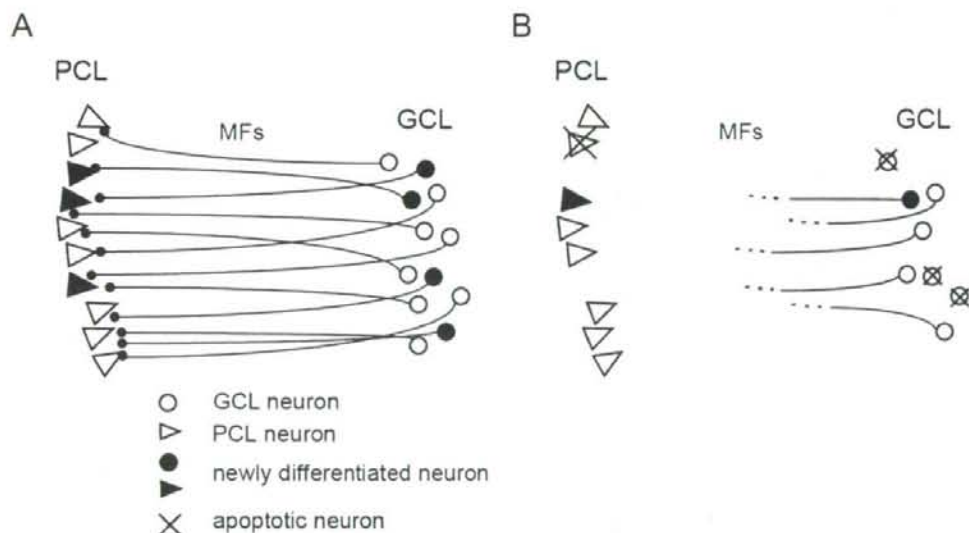


図5 HIV-1 感染マクロファージが誘導する DG 領域の神経細胞障害の提案モデル

(A) 正常海馬スライスにおいて、顆粒細胞の舌状線維 (opened dots) は CA3 領域の錐体細胞 (opened triangles) に投射する。前駆細胞から分化した新生神経細胞は取り込まれ、神経回路を構成する (filled dots and triangles)。(B) 対照的に、HIV-1 感染マクロファージと共培養した海馬スライスにおいて、神経細胞はアポトーシスを起こし (crossed dots and triangles)、顆粒細胞の舌状線維 (opened dots) は CA3 領域の錐体細胞 (opened triangles) に投射できない。しかし、障害された神経細胞に置き換わることができる前駆細胞は神経細胞への分化能が減少しており、顆粒細胞層、錐体細胞層に取り込まれない。それゆえ、障害された神経細胞や減少した神経接続は海馬組織の歯状回に蓄積するだろう。

1 3. HIV 脳症の病態の解析

研究分担者 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 HIV 脳症の動物モデルである SIV 脳症を *in vitro* 培養系で解析するためにサル胎仔脳より神経・グリア細胞培養系、ミクログリア培養系および混合培養系を確立した。それぞれの培養系で SIV/17E-Fr、SIVmac239/316E の感染性を解析した結果、神経・グリア培養系では SIV/17E-Fr の増殖効率が高く、この要因はエントリー以降にあることがわかった。グリア細胞のウイルス生産量は制限されているが、核に組み込まれて持続感染し、ミクログリア細胞へのウイルス供給源となることがわかった。培養上清中のケモカイン、サイトカイン量はミクログリアを含まない神経・グリア細胞培養系では対照と差がみられなかったが、ミクログリアが混在する系では SIVp27 抗原量に関連して上昇するが、分泌量は必ずしも相関せず、SIVmac239/316E と比較して SIV/17E-Fr を感染させた場合の方が多かった。SIV 感染により誘導される細胞の変化として、免疫組織化学で p53 蛋白が感染細胞の核に検出されること、リン酸化 ERK の発現量が感染細胞中で多いことがウエスタンブロッティング法で確認された。これらの機序は不明であるが、リン酸化 ERK が介在するアポトーシス、プレアポトーシス蛋白としての p53 蛋白が SIV の脳神経障害の病態に関連していることが示唆された。

A. 研究目的

HIV 脳症および SIV 脳症において、ウイルスは主にマクロファージおよびミクログリアに感染し、増殖する。アストロサイトなどのグリア細胞での感染は制限されており、その感染様式や意義は明らかでない。また神経細胞への感染はいまだ証明されていない。神経・グリア細胞は感染マクロファージ・ミクログリアが産生するウイルス蛋白、ケモカイン、サイトカインなどの液性因子によって機能障害やアポトーシスを引き起こすと考えられている。今年度はミクログリア、アストロサイト、神経細胞における SIV の感染動態をさらに詳細に解析し、総括する。また昨年度に報告した SIV17 Δ E/vsvg 感染 (神経・グリア細胞培養系) あるいは SIV 感染 (混合培養系) によって p53 とリン酸化 ERK の発現が誘導されることを再確認する。

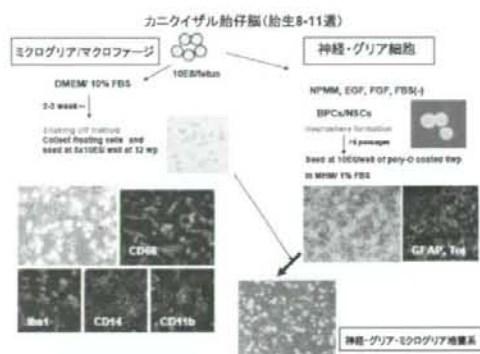


図1. 神経・グリア細胞培養系とミクログリア培養系

B. 研究方法

1) 培養系

図1に示すように在胎 8-11 週のサル胎仔脳より細胞を回収し、神経・グリア細胞のみからなる培養系とミクログリア細胞培養系を確立した。ミクログリアは shaking off 法により回収し、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 10^5 個ずつ添加し、神経・グリア・ミクログリア細胞混合培養系を作製した。

2) SIVの感染

SIV/17E-Fr, SIVmac239/316E を p27 抗原量で 100ng-300ng 相当各培養系に感染 (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°C に保存した。ミクログリア添加実験では感染 11 日目後に 10^5 個のミクログリア細胞を添加し、培地を 1%MHM から 10%DMEM に変更した。AZT 添加の際は感染前日より 100 μM の AZT で培養し、AZT 存在下で感染実験をした。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.)。

3) 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、TNF α (Bender MedSystems) を ELISA で測定した。

4) エントリー効率

SIV/17E-Fr, SIVmac239/316E を感染 1.5 時間前より AZT 処理しておいた神経・グリア細胞培養系に 37°C と 4°C で 2 時間感染させた。PBS で 3 回洗浄したあと 0.0625%の trypsin-EDTA (+/-)、 37°C 、5 分処理した。細胞を洗浄後 lysis buffer で懸濁し、細胞中の p27 抗原量を ELISA で測定した。

5) Alu-PCR

各培養系の細胞の Genomic DNA (Gentra systems) から integrated SIV-DNA を増幅した。特異性を増すために 1st primer は SIV の U3 部分の配列にスファージ特異的配列を付けたものと Alu 配列の primer を使用し、2nd primer として LambdaT-primer と U3 primer を使用した。

6) ウェスタンブロッティング

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 分間遠心後上清を -80°C 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、蛋白の発現をウェスタンブロッティング法で解析した。用いた一次抗体は p53 抗体(DAKO)、phospho-ERK1/2 抗体(Cell Signaling)、抗 β -actin 抗体(SIGMA)。2 次抗体として 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。

7) 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 CD68(DAKO)、CD14(BD)、CD11b(BD)、p53 抗体(DAKO)、ラビットポリクローナル抗 Iba1 抗体(WAKO)と反応させた (4°C 、O/N)。洗浄後 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) SIV 感染

すでに報告した結果と重複するが、SIV/17E-Fr はグリア細胞で SIVmac239/316E はミクログリアで増殖効率が高かった。(図 2) また神経・グリア細胞でのウイルス生産量はミクログリアの 1/100 以下であった。神経グリア細胞培養系において培養上清中の p27 値は感染後 4 日目 (dpi) と 11-14dpi に高値をとり、初期のピークは SIV 株によらず、接種量に related。一方後半のピークは SIV/17E-Fr のみにみられた。これらが逆転写酵素阻害剤 (AZT) 存在化で変化するか調べたところ AZT により 4dpi のピークは変化なかったが、後半のピークは消失した。

2) 神経・グリア細胞へのエントリー効率

図 3 において各 SIV 株感染で 4°C と 37°C におけるトリプシン処理の有無による細胞内 p27 量の差はそれぞれ細胞表面への付着量と細胞への吸着侵入の量を反映していると考えられる。さらにこれらの差が両株間での細胞内へのエントリーの差を表していると考えられ

る。SIV/17E-Fr と SIVmac239/316E の神経・グリア細胞へのエンタリーに相違がないことがわかった。

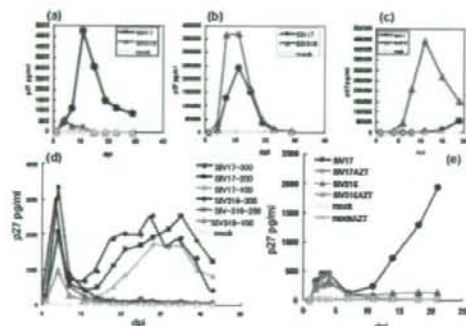


図2. 各培養細胞系におけるSIVの増殖

(a) 神経・グリア細胞培養系 (b) 混合培養系 (c) ミクログリア培養系 (d) 神経グリア細胞培養系に接種したSIV株(SIV17, SIV316) および接種量との関係 (e) AZTによる変化

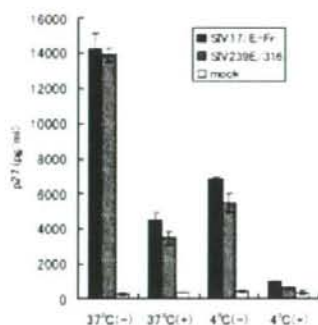


図3. 神経・グリア細胞へのSIVエンタリー
(+) トリプシン処理あり、(-) なし

3) SIVの持続感染様式とミクログリアへのウイルス伝播

SIVの細胞内での存在様式として核内に組み込まれて持続感染する様式の他に、一過性にエンドゾーム内に取り込まれて複製過程を経ずに放出される様式が考えられる。まずAZT +/- で神経グリア細胞培養系にSIV/17E-FrとSIVmac239/316Eを感染させた。26dpiの細胞からDNAを抽出しALu-PCRで染色体内SIV-DNAを検出したところ、図4に示すようにSIV/17E-Fr感染で陽性、SIVmac239/316E感

染で +/- であり、AZT添加したものでは陰性であった。その後ミクログリア細胞を添加しAZT(-)の培地に変更したところAZT(+)の培地で培養していた場合はミクログリア添加によりウイルスは増幅生産されなかった。よってこの実験系においてはミクログリアに伝播されたウイルスはプロウイルスから複製されたものであると考えられた(図4)。

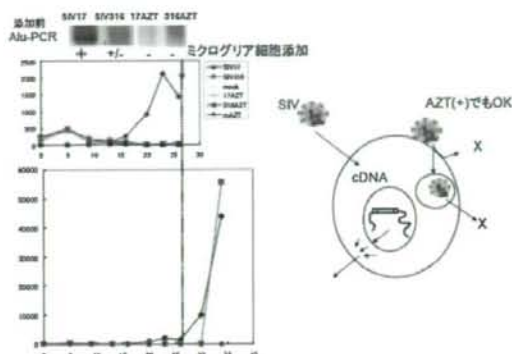


図4. SIV感染神経・グリア細胞培養系への非感染ミクログリア細胞添加による変化

4) ケモカイン・サイトカインの誘導

ミクログリア培養系、混合培養系、神経・グリア細胞培養系にSIV/17E-Fr, SIVmac239/316E, mockを接種し、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, TNF- α 量を測定した。ケモカイン・サイトカインの値は対照とのfold increaseで示した。神経・グリア細胞にSIV/17E-Frを感染させてもケモカイン・サイトカインは対照と有意差が無かったが、SIV Δ E/vsvgを感染(single round infection)させた場合は神経・グリア細胞培養系においても一過性に上昇した。図5に示したようにケモカインはp27量に関連して誘導されるが、その量は必ずしも相関せず、SIV/17E-FrもSIVmac239/316Eと同様あるいはより多くのケモカインを誘導する傾向がみられた。

5) SIV感染培養系におけるp53蛋白の発現

神経・グリア細胞にSIV Δ E/vsvg(SIV17V)を感染させると感染7日目にはアストロサイトの繊維が太くなる変化がみられた。またアポトーシスを誘導するp53蛋白が核に発現するこ

とが今年度も確認された。感染 14 日目の細胞蛋白をウェスタンブロッティングで解析した。感染群で p53、リン酸化 ERK ともに対照 (V, mock) と差がみられた (図 6)。

	IP-10	MCP-1	IL-8	TNF- α	IL-6
ミクログリア	+	+	+	+	NT
混合培養	+	+	+	NT	+
神経・グリア	<	<	<	<	<
● 神経・グリア (SIV Δ E/V)	+	+	+	+	NT

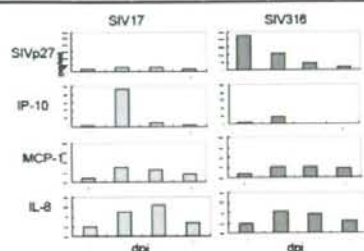


図 5. SIV 感染によって誘導分泌されるケモカイン、サイトカイン。グラフは SIV17/E-Fr、SIVmac239/316E 感染した混合培養系上清中の経時的変化

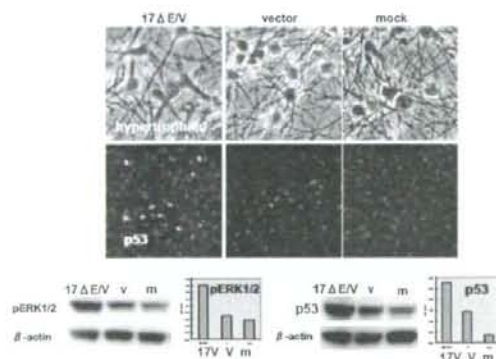


図 6. p53 およびリン酸化 ERK の発現の相違

D. 考察

中枢神経系を構成するアストロサイト、神経細胞、ミクログリアにおいて SIV の感染動態を解析した。ミクログリア・マクローファージは SIV に感受性が高いため、従来の胎仔脳初代培養系での解析では神経・グリア細胞での SIV の感染動態がマスクされてしまうため、ニューロスフィア法を用いてミクログリア・マクローファージを含まない神経・グリア培養系を確立して感染実験に用いている。これまでの解析で SIV

はアストロサイトに感染し、核に組み込まれて持続感染することがわかった。神経・グリア細胞培養系において SIV17E-Fr は SIVmac239/316E と比較してより多くの子孫ウイルスを産生するが、ミクログリア細胞での増殖の 1/100 以下に制限されている。神経・グリア細胞培養系のアストロサイトはポリクローナルに分化した集団と考えられるので、感染可能なアストロサイトの割合が少ないせいかもしれない。またミクログリアの場合と異なり感染後は細胞変性をおこさず核に組み込まれて持続感染する。図 2(d)の感染初期に p27 値がピークをとる原因として、細胞表面に付着したものが外れたという以外にいったん細胞に取り込まれるがまもなく放出されるという経路が考えられる。in vivo では細胞は常にウイルスにさらされるため、グリア細胞がウイルスを trap しては release している可能性もある。in vitro 培養系の実験結果によると trap されたウイルスが長期間細胞内で感染性を失わずに存在する可能性は小さい。細胞に侵入したウイルスが逆転写過程を経て核に組み込まれ、長期間感染細胞に潜伏した場合、その感染グリア細胞はリザーバーとして機能することがわかった(図 4)。神経・グリア細胞培養系にシールドウイルスである SIV17 Δ E/V を感染させるとほとんどすべての細胞に感染し、ウイルス蛋白、ケモカイン、サイトカインを分泌する(前年度までの報告)。Single round に SIV17 Δ E/V が感染した結果 tat などのウイルス蛋白が産生され、これがケモカイン、サイトカインを誘導するという機序が考えられる。混合培養系に SIV を感染させると、ミクログリア細胞で SIV が増殖し、この子孫ウイルスは接種ウイルスとともに神経グリア細胞に感染する。感染ミクログリア細胞の一部はやがて変性し、死滅するが、感染グリア細胞はウイルスを非感染ミクログリア細胞に供給することができる。このようにしてウイルス蛋白、ケモカイン、サイトカインそして神経グリア障害の原因となる未知の因子にさらされる状況は持続し、脳神経障害が発症していくのではないかと考えられる。障害の指標として初年度から着目してきたのは細胞内 p53 蛋白とリン酸化 ERK である。今年度の実験でも感染神経・グリア細胞ではコントロールと比較して

p53 蛋白とリン酸化 ERK が増加していることがわかった。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、エイズ痴呆患者の脳で p53 の発現レベルが高いという報告がある。我々もヒトおよびサルエイズ剖検脳組織で p53 が発現していることを免疫組織化学で確認した (data not shown)。SIV17 Δ E/V 接種量により感染細胞の核内に p53 が発現していることはリン酸化により 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。また近年、リン酸化 ERK が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 介在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。ERK の活性化を介して p53 が蓄積しているという報告もあり (Laboratory investigation, 2002)、現在我々の系でこれを立証することを試みている。

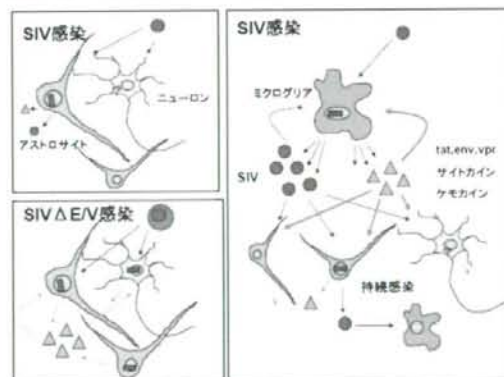


図7. アストロサイト、神経細胞、マイクログリアにおける SIV の感染動態

E. 結論

in vitro の SIV 感染実験によって、脳症における各細胞の相互関係と病態への関わり方を明らかにした。昨年度に引き続き SIV 感染によって神経・グリア細胞培養系および神経・グリア・マイ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どのよ

うに関与しているか明らかにしたい。

(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. 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

III. 研究成果に関する刊行一覧表