

エイズ悪性 B 細胞腫誘発機序のウイルス学的解析

研究分担者 徳永 研三 国立感染症研究所感染病理部 主任研究官
研究分協力者 多田 卓哉 国立感染症研究所感染病理部 流動研究員
研究分協力者 張 延昭 国立感染症研究所感染病理部 研究生

研究要旨：エイズ悪性 B 細胞腫は、HIV 感染が誘導する何らかの液性因子が B 細胞に作用することで惹起されるエイズ関連リンパ腫と考えられる。本研究では *in vitro* における T 細胞からの癌化誘発因子について検証する。初代培養細胞実験系を用いて、HIV-1 感染 T 細胞から放出される宿主可溶性因子またはウイルス蛋白が B 細胞に及ぼす影響を T 細胞パイロトーシスという観点から検討することを試みる。本年度は末梢血単核球由来の静止期 T 細胞を用いて実際にパイロトーシスを再現できるか否かについて、異なるトロピズムを持つエンベロープを用いて感染実験を行い、パイロトーシスの指標である細胞内カスパーゼ 1 と培養上清中のインターロイキン 1 β の産生を検討した。

A. 研究目的

エイズ病態進行に伴う CD4 陽性 T 細胞の急激な減少は、静止期 T 細胞への HIV-1 の abortive な感染により休止した逆転写産物が、カスパーゼ 1 を活性化して、それに続く炎症性サイトカインであるインターロイキン 1 β (IL-1 β) が産生することによって起こる、パイロト - シス (炎症性 programmed cell death) が原因であることが、昨年、Nature 誌上で報告された (Nature, 505:509-514, 2014)。その実験はリンパ節・扁桃腺由来のヒトリンパ球凝集培養 (HLAC) 法によるものであったが、末梢血リンパ球を用いた簡易法でパイロト - シスが再現されるか否か、またウイルスのトロピズムが影響するか否かを検討した。

B. 研究方法

1. 初代培養細胞の調製

3 人の健康人由来末梢血リンパ球から CD14 陽性細胞を、CD14 マイクロビーズ (ミリテニー社) を用いた MACS カラムで単離した後、フロースルーの陰性画分から CD4 陽性細胞 (T 細胞) を Dynabeads CD4 Positive Isolation Ki (ライフテクノロジ社) を用いて単離した。得ら

れた CD4 陽性 T 細胞は PHA/IL-2 による刺激は行わずに、10% ヒト AB 型血清 (シグマ社) またはウシ胎児血清 (FBS; シグマ社) 存在下で培養を行った。

2. 各種 HIV-1 変異型ウイルスの調製

一段階増殖 HIV-1 の調製のために、HIV-1 ADA 株由来 CCR5 指向性エンベロープ (R5) 発現ベクターまたは NL4-3 株由来 CXCR4 指向性 (X4) エンベロープ発現ベクターと、*env* 遺伝子欠損型 HIV-1 プロウイルス DNA を 293T 細胞へコトランスフェクションし、ヒト AB 型血清または FBS 存在下で培養を行い、48 時間後に上清中のウイルス量を p24 antigen capture ELISA (ABL 社) により測定した。

3. 感染実験及びウエスタンブロット法

調製したヒト血清培養または FBS 培養の静止期 T リンパ球 (2×10^6 個) に、各ウイルスをそれぞれ 60 ng の p24 量で感染させ、感染後 120 時間目に RIPA バッファーで細胞または上清の溶解を行った。各サンプルを 12% の SDS ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った。泳動後のゲルを PVDF メンブレンに転写後、細胞溶解液には抗カスパーゼ 1 ウサギポリクローナル抗体 (サンタクルズ社) を用いて、上

清溶解液には抗 IL-1 β マウスモノクローナル抗体 (R&D 社) を用いて一次抗体処理、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た。ECL (バイオラッド社) により化学発光を行い、LAS3000 (富士フィルム社) を用いて、細胞内カスパーゼ 1 と上清中 IL-1 β の検出をそれぞれ試みた。

C. 研究結果

ヒト血清培養での静止期 T リンパ球の HIV-1 感染により、X4 ウイルスあるいは R5 ウイルスの違いに依らず、陰性対象では全く認められない約 36 kDa のカスパーゼ 1 前駆体が、全てのドナー由来の細胞溶解液のサンプルで検出された。IL-1 β 前駆体のプロセッシングにより IL-1 β 産生を惹起する 10 kDa の活性化型カスパーゼ 1 は今回の条件では認められなかった。一方で FBS 存在下での HIV-1 感染においては、カスパーゼ 1 前駆体は全く検出されなかった。また、ヒト血清培養あるいは FBS 培養に依らず、X4 ウイルスと R5 ウイルスのどちらの感染においても、上清中の IL-1 β を検出することが出来なかった。

D. 考察

昨年 Nature 論文における HLAC 法は技術的困難さ及び検体入手の困難さが伴うためか、現時点で HIV-1 感染による T 細胞パイロトーシスを再現した報告は一報もない。今回我々はより簡便な健常人末梢血単核球由来の静止期 T 細胞を用いた方法によって、HIV-1 感染特異的かつウイルストロピズム非依的にカスパーゼ 1 前駆体の発現が誘導されることを明らかにした。しかしながら、活性化型カスパーゼ 1 のバンドが細胞溶解液で検出されない事に矛盾せず、上清中への IL-1 β の産生がウエスタンレベルで認められなかった。これについては、もし微量の活性化型カスパーゼ 1 が細胞内に存在する場合、蛋白レベルで検出限界以下の IL-1 β が上清中には存在する可能性が考えられる。そこで今後は、静止期 T 細胞への HIV-1 感染後に細胞からトータル RNA を抽出し、それを用いて IL-1 β を標的とした定量 RT-PCR を試みる。尚、今回の実験において、FBS で培養を行った場合には、カスパーゼ 1 前駆体の発現

すら認められなかったことから、以前から言われている通り、FBS による培養は静止期 T 細胞に何らかの刺激を与えてしまい、T 細胞が実際には静止状態でなくなっている可能性が考えられた。以上、今回の我々の実験条件においては、パイロトーシスの指標となる活性化型カスパーゼ 1 を HIV-1 感染下で検出できなかったが、その前駆体の発現は確認できたことから、実験条件を改善して、活性化型及び IL-1 β の検出を試みる。尚、後者については定量 RT-PCR による検出も行う。来年度は更に、本研究班の主題であるエイズ悪性腫瘍誘発機序に、パイロトーシス関連の現象が関与するか否かについて、感染 T 細胞と B 細胞の混合培養後のメチル化または発現プロファイルを解析していく予定である。

E. 結論

健常人由来末梢血単核球由来の静止期 T 細胞のヒト血清を用いた培養における HIV-1 感染によって、パイロトーシスに関与するカスパーゼ 1 前駆体の発現誘導が認められた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表 論文発表

- 1) Utachee, P., Isarangkura-na-ayuthaya, P., Tokunaga, K., Ikuta, K., Takeda, N., Kameoka, M.: Impact of amino acid substitutions in the V2 and C2 regions of human immunodeficiency virus type 1 CRF01_AE envelope glycoprotein gp120 on viral neutralization susceptibility to broadly neutralizing antibodies specific for the CD4 binding site. *Retrovirology* 11:32, 2014.
- 2) Zhou, D., Wang, Y., Tokunaga, K., Huang, F., Sun B, Yang, R.: The HIV-1 accessory protein Vpr induces the degradation of the anti-HIV-1 agent APOBEC3G through a VprBP-mediated proteasomal pathway. *Virus Res.* 195:25-34, 2015.
- 3) Kikuchi, T., Iwabu, Y., Tada, T., Kawana-Tachikawa, A., Koga, M., Hosoya,

- N., Nomura, S., Brumme, Z.L., Jessen, H., Pereyra, F., Piechocka-Trocha, A., Walker, B.D., Iwamoto, A., Tokunaga, K (co-corresponding author), Miura, T.: Anti-APOBEC3G activity of HIV-1 Vif protein is attenuated in elite controllers. J. Virol. In press.
- 4) 多田卓哉、徳永研三：抗ウイルス宿主因子 BST-2/tetherin とそれに拮抗するウイルス蛋白の分子間対決 Molecular Confrontation between the Host Restriction Factor BST-2/Tetherin and Its Viral Antagonists . 日本エイズ学会誌 The Journal of AIDS Research. 16: 126-136, 2014.
- 7) Tada, T., Zhang, Y., Koyama, T., Yamaoka, S., Fujita, H., and Tokunaga, K (speaker): Novel restriction factor MARCH8 blocks HIV-1 replication. XX International AIDS Conference, Melbourne, Australia, 2014. 7. (Late breaker's oral abstract)

H . 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

- 1 . 特許取得
なし
- 2 . 実用新案登録
なし
- 3 . その他
なし

学会発表

- 1) 多田卓哉、張延昭、小山貴芳、山岡昇司、藤田英明、徳永研三：新規抗ウイルス宿主因子 MARCH8 による HIV-1 感染抑制機構の解明 .第 62 回日本ウイルス学会総会(横浜) 2014. 11.
- 2) 張延昭、多田卓哉、山岡昇司、徳永研三：HIV-1 複製前期の抑制に関わる IFN 誘導性抗ウイルス宿主因子群の解析 . 第 62 回日本ウイルス学会総会 (横浜) 2014. 11.
- 3) 高畑辰郎、徳永研三、長谷川温彦、神奈木真理、増田貴夫： HIV-1 インテグラーゼの非酵素的機能の解析 . 第 62 回日本ウイルス学会総会 (横浜) 2014. 11.
- 4) 和田倭、小林 (石原) 美栄、寺原和孝、池野翔太、徳永研三、川名 (立川) 愛、山岸誠、竹山春子、横田 (恒次) 恭子：恒常的に培養維持された CD4 陽性 T 細胞への HIV-1 の感染とその転写制御機構の解明 . 第 62 回日本ウイルス学会総会(横浜) 2014. 11.
- 5) 高畑辰郎、徳永研三、長谷川温彦、神奈木真理、増田貴夫： HIV-1 インテグラーゼの逆転写過程以前における機能の解析 .第 28 回日本エイズ学会 (大阪) 2014. 12.
- 6) 多田卓哉、張延昭、小山貴芳、山岡昇司、藤田英明、徳永研三：新規宿主因子 MARCH8 は HIV-1 のエントリーを阻害する . 第 28 回日本エイズ学会 (大阪) 2014. 12.