

## 第3回 ECC 山口メモリアルエイズ研究奨励賞受賞研究

## HIV-1 の細胞内侵入機構の解析および I 型インターフェロン産生細胞の HIV-1 感染性とその免疫応答

Analysis of Chemokine Receptor-mediated HIV-1 Entry and Immunological Response of Natural Interferon- $\alpha/\beta$ -producing Cells (IPCs) to HIV-1 Infection

米澤 昭 仁

Akihito YONEZAWA

京都大学大学院医学研究科血液病態学

Department of Hematology/Oncology, Graduate School of Medicine, Kyoto University  
(現, Gladstone Institute of Virology and Immunology,  
University of California San Francisco)

日本エイズ学会誌 5 : 188-193, 2003

## はじめに

今回、第3回日本エイズ学会 ECC 山口メモリアルエイズ研究奨励賞受賞の背景となった研究業績について、2つのテーマに分け報告する。なお、以下の研究は京都大学大学院医学研究科血液病態学にて実施したものである。

## 1. ケモカインレセプターを介する HIV-1 の細胞侵入機構の解析

HIV-1 はそのエンベロープ (Env) 蛋白と標的細胞上の受容体 (CD4 およびコレセプター) との相互作用を通じて細胞内に侵入する。コレセプターとは7回膜貫通型 G 蛋白質共役型のケモカインレセプターであり、CXCR4 および CCR5 がそれぞれ T 細胞株指向性、マクロファージ指向性 HIV-1 のコレセプターとして広く知られている<sup>1)</sup>。

HIV-1 の細胞への侵入機構として現在知られているモデルとして、まず HIV-1 の Env 蛋白である gp120 と標的細胞上の CD4 分子が結合し、gp120 の立体構造が変化することによりコレセプター結合領域 (V3 領域) が露出する。そして V3 領域とコレセプターとの相互作用によりさらなる Env の立体構造を引き起こし Env gp41 の活性化、膜融合および侵入過程へと進行する。この V3 領域はループ構

著者連絡先: Akihito Yonezawa, M.D., Ph.D. (Gladstone Institute of Virology and Immunology, University of California San Francisco,  
Mailing Address: P.O. Box 419100, San Francisco, CA 94141-9100)  
Fax: +1-415-826-1514  
E-mail: ayonezawa@gladstone.ucsf.edu

2003年7月2日受付

造を持ちコレセプターとの結合および細胞指向性の決定に関与することが我々の過去の研究および他の多数の論文により証明されている<sup>2-4)</sup>。しかし V3 領域とコレセプターの結合そのものの重要性については現在十分には解明されていない。そこで、V3 領域とコレセプターとの結合そのものが、ウイルス固有のアミノ酸配列に関係なく細胞内侵入・感染に重要である、すなわちレセプターに結合しうるアミノ酸配列を V3 領域に組み込むことで感染性が保持されるという仮説を立て研究した<sup>5)</sup>。

T 細胞株指向性 HIV-1 株 NL4-3 の Env 発現ベクターの V3 領域をそのコレセプターの CXCR4 の本来のリガンドである SDF-1 に組み換えることを試みた。すなわち図1のように、3種の異なる部位・長さの SDF-1 cDNA, N 末端より 51 アミノ酸 (NL4-3/SDF1-51), 全長の 67 アミノ酸 (NL4-3/SDF1-67), および V3 領域と相同性を持つ第 11-53 番目の 43 アミノ酸 (NL4-3/SDF1-V3) をそれぞれ NL4-3Env の V3 領域に置換した。作製したキメラ Env 蛋白の発現, virion への取り込みは免疫沈降法, Western blotting 法により確認した。このキメラ Env 発現ベクターと pNL4-3.Luc.E<sup>-</sup>R<sup>-</sup> ベクターを HEK293T 細胞に一過性共発現させ、その上清を回収して Luciferase reporter virus を作製し感染実験を行った。

その結果、これらのキメラ Env のうちの1つである NL4-3/SDF1-51 を持つウイルスが U87.CD4.CXCR4 細胞に感染し、U87.CD4, U87.CXCR4 および U87.CD4.CCR5 細胞には感染しなかった (図2)。そして、この感染は、CXCR4 のリガンドである SDF-1 $\beta$ , 抗 SDF-1 抗体により特異的に抑制された (図3)。さらにこのキメラ Env ウイル

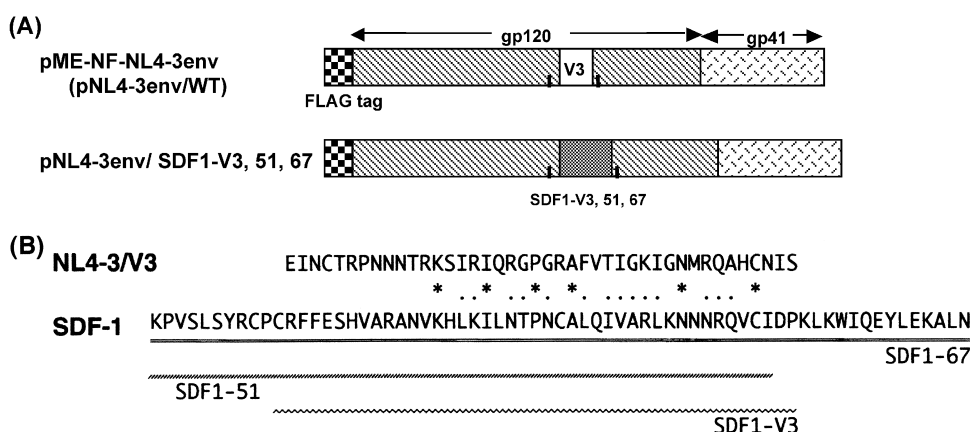


図 1 (A) キメラ Env ベクターの構造。(B) NL4-3Env の V3 領域と SDF-1 のアミノ酸配列およびその相同性。

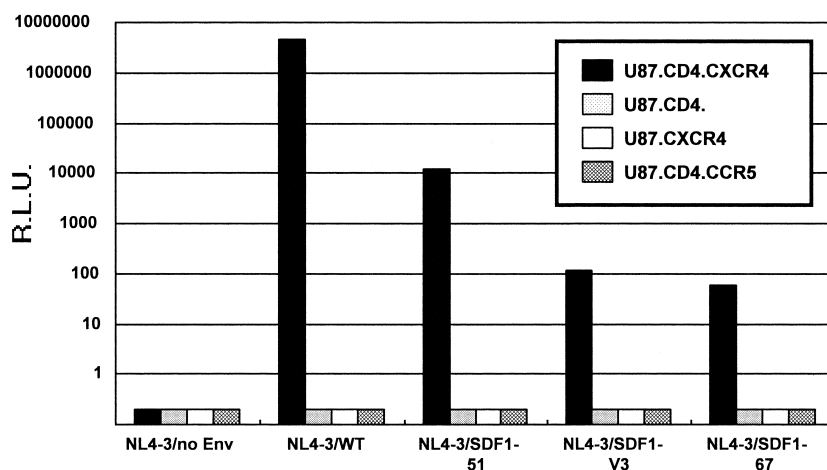


図 2 キメラ Env を持ったウイルスの感染性。R.L.U. ; relative luciferase units

スの感染が CD4 依存性であるかどうかを調べるため、抗 CD4 抗体 (Leu3a) による感染阻止実験を行ったところ、wild type 同様に濃度依存性に抑制された (文献 5) 参照)。以上より NL4-3/SDF1-51 キメラ Env を持つウイルスが CD4 および CXCR4 依存性に感染することが示唆されたが、その感染効率は wild type に比べて非常に低かった。そこで、このキメラ Env と CXCR4 との結合能を調べるためアイソトープ標識 SDF-1 ( $^{125}\text{I}$ -SDF-1) を用いた binding assay を行った。結果、NL4-3/SDF1-51 Env gp120 蛋白は  $^{125}\text{I}$ -SDF-1 と CXCR4 との結合を wild type と同等に特異的に阻害した (図 4) ことから、キメラ Env の SDF-1 に置換された V3 領域と CXCR4 とが結合していることが示唆された。

以上の結果から、Env の V3 領域を SDF-1 に置換しても CXCR4 を介する感染性は保持されることが証明された。すなわち、V3 領域とコレセプターとの結合が HIV-1 の細胞内侵入に重要であり、V3 領域が外来性のアミノ酸で置

換されても結合能を有する配列であれば感染性が保持されることが示された。さらには T 細胞株 HIV-1 Env (NL4-3) の V3 領域をマクロファージ指向性 HIV-1 のコレセプター、CCR5 のリガンドである MIP-1 $\alpha$  に置換すると CCR5 発現細胞に感染しうることが証明された<sup>5)</sup>。このことから、HIV ベクターの組織・細胞特異的なターゲティングに V3 領域を他のリガンド分子に置換する手法が応用できる可能性が考えられる。

## 2. I 型インターフェロン産生細胞の HIV-1 感染性とその免疫応答

樹状細胞 (dendritic cell ; DC) は最も強力な抗原提示細胞としてあらゆる抗原に対して特異的な免疫反応を惹起する免疫系の中心的な細胞である。DC のサブセットにはその起源により骨髄系 DC およびリンパ系 DC に分類され、侵入してきた様々な抗原の排除に適した T 細胞免疫反応 (Th1 または Th2) を誘導する。リンパ系 DC 前駆細胞とし

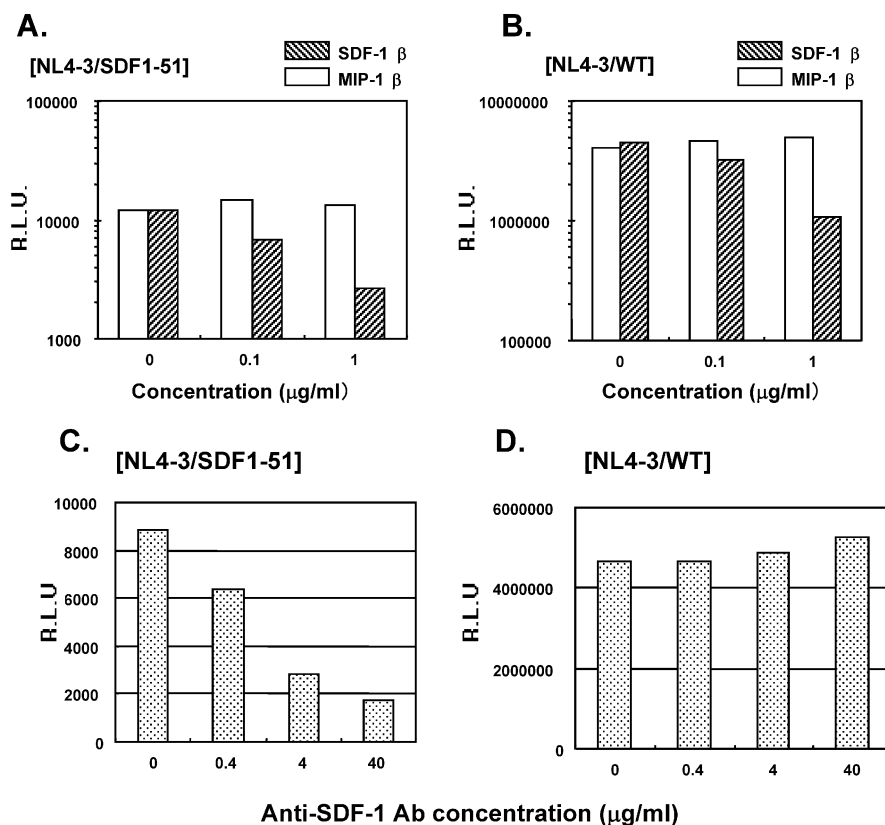


図 3 (A and B) NL4-3/SDF-51 キメラ Env ウイルスの感染性に対する SDF-1β および MIP-1β の影響。  
(C and D) 抗 SDF-1 抗体の NL4-3/SDF-51 キメラ Env ウイルス感染への影響。

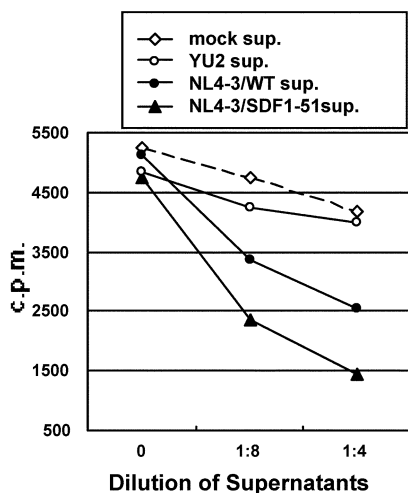


図 4 各種可溶性 Env gp120 蛋白の <sup>125</sup>I-SDF-1 と CXCR4 との結合に対する影響。

で知られる plasmacytoid cell は形質細胞様の形態を呈し、病原体などの刺激により大量の I 型インターフェロン (IFN-α/β) を産生し、抗ウイルス作用、広範な免疫賦活作用を持ち生体防御に重要なインターフェロン産生細胞 (IPC) として注目されている<sup>6-8</sup>)。IPC から分化した DC は

骨髄系の DC とは全く異なる免疫反応を持つことが明らかにされている。

一方、HIV 感染においては、CD4 T 細胞が主たる標的細胞となり感染によるその細胞減少が adoptive immunity の減弱につながる原因となっているが、innate immunity も HIV-1 感染の進行とともに障害されていることが報告されている。innate immunity に重要な役割を果たす IFN-α/β が AIDS の病期の進行とともに低下していることや<sup>9</sup>)、末梢血中の IPC が AIDS 患者において減少していることなど<sup>10</sup>) が報告され、HIV 感染における IPC の役割を研究することが HIV-1 感染の病態を把握するうえで特に重要であると考えられる。そこで、この IPC に着目し、HIV-1 の感染感受性およびその免疫反応について研究を進めた<sup>11</sup>)。

健康人末梢血単核球より magnet beads と各種抗体を用いてリンパ球および単球を除去した後、cell sorter により lineage marker (lin) (-) CD11c (+) CD4low の細胞 (骨髄系 DC) および lin (-) CD11c (-) CD4 (+) の細胞 (リンパ系 DC 前駆細胞, IPC) をそれぞれ分離した。IPC 上に HIV-1 のコレセプターである CXCR4 および CCR5 が発現していることを flowcytometry, RT-PCR で確認した。しかし HIV-1 の吸着および transmission に重要とされ

る DC-SIGN は発現していなかった。さらに IPC に T 細胞株指向性 (NL4-3), マクロファージ指向性 (JR-CSF) HIV-1 株が感染が成立しウイルスが産生されることを, ELISA 法による培養上清中の HIV-p24 抗原量の測定 (図 5), および HIV-1 provirus integration assay (図 6) により見いだした。続いて, HIV-1 に対する IPC の細胞免疫反応を評価するため, IFN 産生能, DC への分化能を検討した。精製した IPC に NL4-3, JR-CSF HIV-1 を添加し 48 時間後, IFN- $\alpha$  の産生量を ELISA 法により測定したところ, 大量の IFN- $\alpha$  が産生されることが判明した (図 7)。さらには産生された IFN- $\alpha$  が IPC での HIV-1 の複製を阻止していることが抗 IFN- $\alpha$  抗体を用いた実験で示唆された (図 8)。すなわち HIV 感染においても IPC が主たる IFN- $\alpha$  の産生細胞であり, 産生した IFN- $\alpha$  が IPC 自身に対しても抗ウイルス効果を発揮することが証明された。さらに IPC が HIV-1 刺激後 DC へ分化することが CD80, CD86 の発現

量の増加, および DC 様への形態変化 (図 9) により観察された。この分化した DC が正常の機能を発揮しうるかどうかは不明であるが, HIV-1 に直接反応し細胞免疫反応を惹起していることが示唆された。これら一連の反応は加熱処理し不活化された HIV を用いても同様に認められたため, IPC の免疫反応に HIV の感染そのものを必要とせずある種の HIV の抗原との相互作用により引き起こされていると考えられた。HIV-1 による IPC の免疫反応のメカニズムに関しては不明であり, 今後検討する予定であるが, 現段階では HIV-1 のレセプターである CD4 分子がこれに関わる可能性が示唆されている<sup>11)</sup>。以上の結果から, IPC は HIV-1 を直接的に認識し, 細胞免疫反応を惹起し, HIV-1 感染の進行阻止に非常に重要であることが示唆された。さらには, IPC を量的・機能的に向上させることが, HIV 感染の 1 つの治療的アプローチとなりうるということが考えられる。

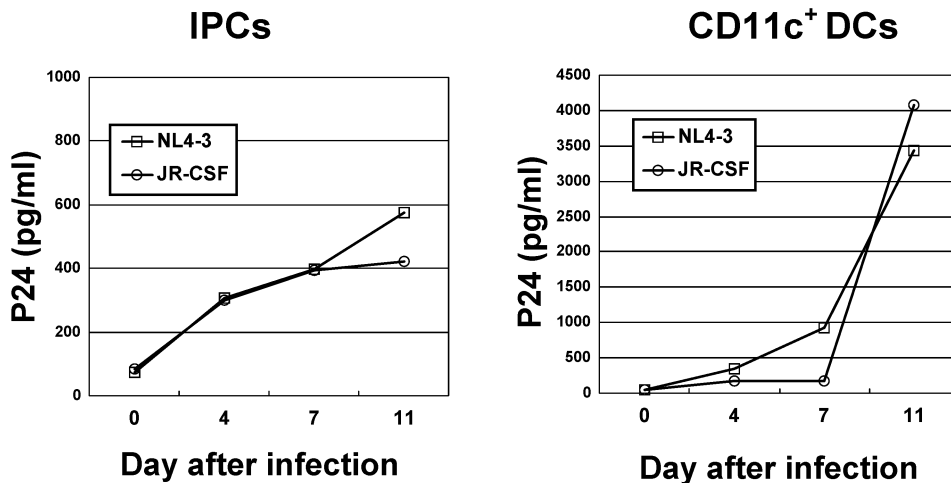


図 5 HIV-1 NL4-3, JR-CSF の IPC および CD11c+DC (骨髄系 DC) への感染。感染後, 培養上清中の p24 抗原量を測定した。

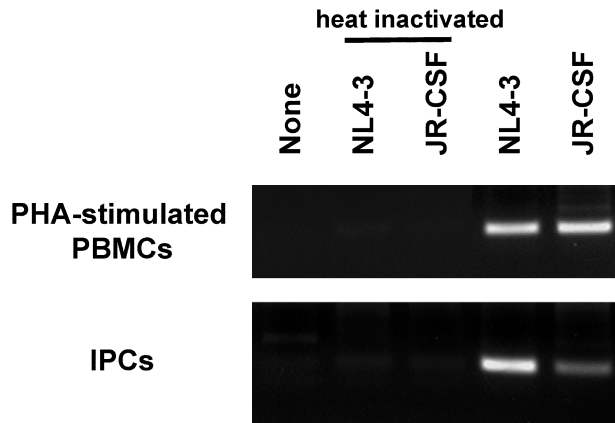


図 6 HIV-1 provirus integration assay。Alu-LTR 間の PCR を利用し, integration された viral DNA を検出した。

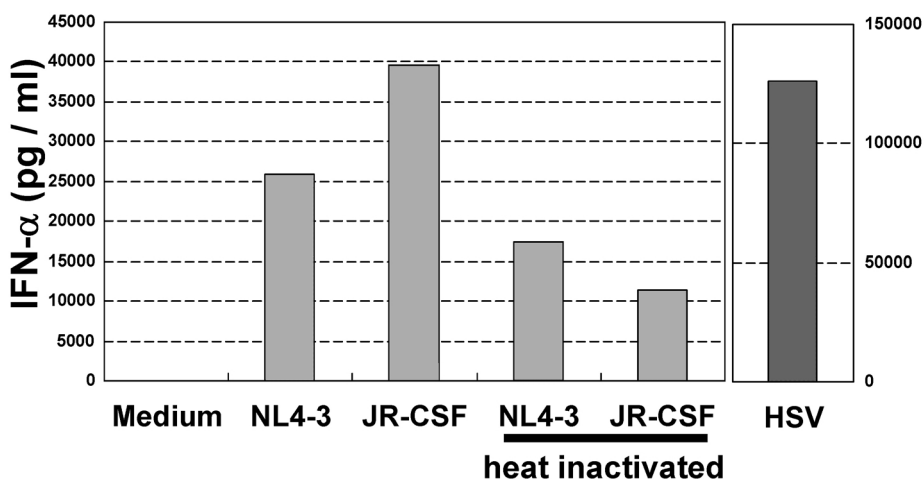


図 7 HIV-1 および Herpes Simplex Virus (HSV) との培養後の IPC の IFN- $\alpha$  産生量。培養 48 時間後の培養上清中の IFN- $\alpha$  を ELISA 法により測定した。

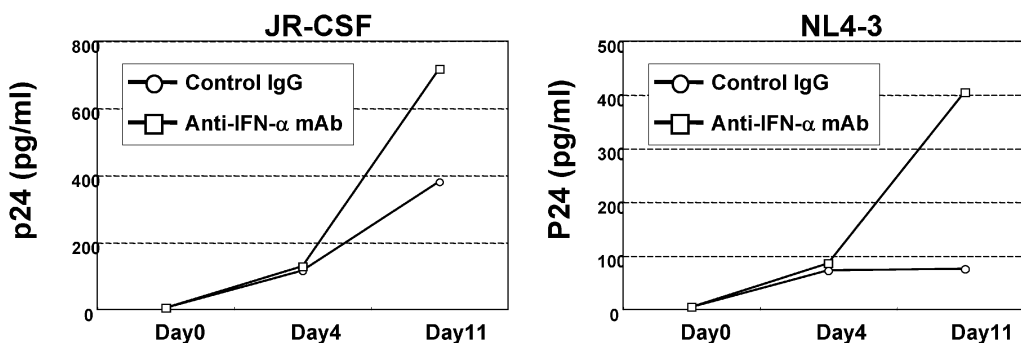


図 8 IPC の HIV-1 (NL4-3, JR-CSF) 感染における抗 IFN- $\alpha$  抗体の影響。

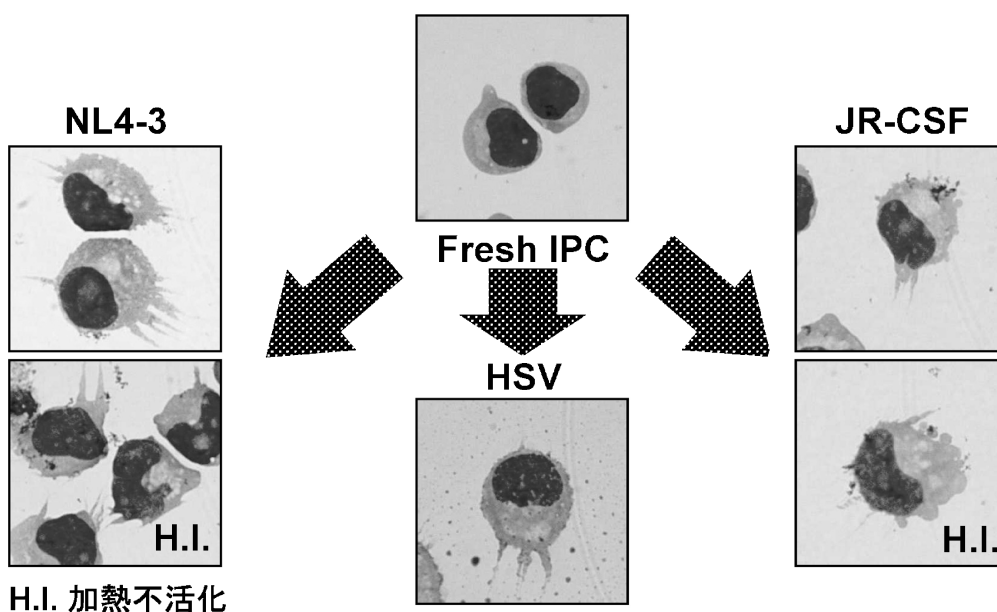


図 9 各種 HIV-1 および HSV 刺激後の IPC の形態学的変化。無刺激の IPC は形質細胞様であるが、刺激 48 時間後には樹状突起を持った DC 様の形態に変化した。

謝辞：本賞の選考にあられた生田和良先生をはじめとする選考委員の諸先生、並びにご推薦を頂いた京都大学大学院医学研究科 内山卓教授に深く感謝いたします。

なお、本研究は平成 10-13 年度文部科学省特定領域研究「エイズ制御のための基礎研究」の一部として実施したものである。

## 文 献

- 1) Berger EA, Murphy PM, Farber JM : Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors : roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol* 17 : 657-700, 1999.
- 2) Sakaida H, Hori T, Yonezawa A, Sato A, Isaka Y, Yoshie O, Hattori T, Uchiyama T : T-tropic human immunodeficiency virus type 1(HIV-1)-derived V3 loop peptides directly bind to CXCR-4 and inhibit T-tropic HIV-1 infection. *J Virol* 72 : 9763-9770, 1998.
- 3) Wu L, Gerard NP, Wyatt R, Choe H, Parolin C, Ruffing N, Borsetti A, Cardoso AA, Desjardin E, Newman W, Gerard C, Sodroski J : CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature* 384 : 179-183, 1996.
- 4) Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Cara A, Gallo RC, Lusso P : The V3 domain of the HIV-1 gp120 envelope glycoprotein is critical for chemokine-mediated blockade of infection. *Nat Med* 2 : 1244-1247, 1996.
- 5) Yonezawa A, Hori T, Takaori-Kondo A, Morita R, Uchiyama T : Replacement of the V3 region of gp120 with SDF-1 preserves the infectivity of T-cell line-tropic human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 75 : 4258-4267, 2001.
- 6) Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Aleardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A, Colonna M : Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 5 : 919-923, 1999.
- 7) Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, Antonenko S, Liu YJ : The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284 : 1835-1837, 1999.
- 8) Kadowaki N, Antonenko S, Lau JY, Liu YJ : Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity. *J Exp Med* 192 : 219-226, 2000.
- 9) Siegal FP, Lopez C, Fitzgerald PA, Shah K, Baron P, Leiderman IZ, Imperato D, Landesman S : Opportunistic infections in acquired immune deficiency syndrome result from synergistic defects of both the natural and adaptive components of cellular immunity. *J Clin Invest* 78 : 115-123, 1986.
- 10) Soumelis V, Scott I, Gheyas F, Bouhour D, Cozon G, Cotte L, Huang L, Levy JA, Liu YJ : Depletion of circulating natural type 1 interferon-producing cells in HIV-infected AIDS patients. *Blood* 98 : 906-912, 2001.
- 11) Yonezawa A, Morita R, Takaori-Kondo A, Kadowaki N, Kitawaki T, Hori T, Uchiyama T : Natural interferon- $\alpha$ -producing cells respond to human immunodeficiency virus-1 with interferon- $\alpha$  production and maturation into dendritic cells. *J Virol* 77 : 3777-3784, 2003.