

第6回 ECC 山口メモリアルエイズ研究奨励賞受賞研究

宿主細胞因子を標的にした HIV-1 抑制に関する研究
Cellular Factors as Targets for Anti-HIV-1 Chemotherapy

岡本実佳

Mika OKAMOTO

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科附属難治ウイルス病態制御研究センター
(抗ウイルス化学療法研究分野)Center for Chronic Viral Diseases, Graduate School of Medical and Dental Sciences,
Kagoshima University

日本エイズ学会誌 8 : 92-99, 2006

はじめに

HAART 療法の開発により、HIV 感染症は比較的長期間コントロールすることが可能な疾患となった。我が国においても新規感染者が増加している今、慢性期における対策、特に HIV 脳症発症予防の必要性が高まっている。

HIV 脳症は、感染後期に発症する、HIV-1 が直接関与する亜急性ないし慢性進行性の中枢神経障害である。HAART 療法で HIV 脳症の発症を完全に阻止することが困難である原因として、中枢神経系における慢性感染細胞の存在に加え、HIV 脳症の病態の複雑さが関係している。

HIV 脳症患者の脳内では、脳内マクロファージ/ミクログリア、特に多核巨細胞において、高率に HIV 感染が認められる。しかし、アストロサイトでは *in situ* ハイブリダイゼーションなどで HIV-1 を同定される場合はあるが、ウイルスの増殖性感染については疑問視されている。また、神経細胞における HIV-1 感染はほとんど証明されていない。このようなことから、HIV 脳症は、HIV-1 に感染した脳内マクロファージ/ミクログリアにおいて生産された HIV 粒子、ウイルス性蛋白質、あるいは炎症性サイトカインなどの神経細胞に対する毒性因子により、神経細胞がアポトーシスを起こし、その結果、脳機能障害が引き起こされることにより発症すると考えられている。しかし、HIV 脳症の詳細なメカニズムはまだ解明されていない。そこで、私たちの研究グループは HIV 脳症の発症機序および病態の解明、さらにそれらに則した HIV 脳症治療薬の研究を行ってきた。今回、これらの研究成果により、第6回日本エイズ学会 ECC 山口エイズメモリアル研究奨励賞を受賞させ

著者連絡先：岡本実佳 (〒890-8544 鹿児島市桜ヶ丘 8-35-1 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科附属難治ウイルス病態制御研究センター)

Fax : 099-275-5932

2006年5月2日受付

て頂いた。そこで、本稿ではこれらの研究について概説したいと思う。

HIV 脳症予防薬の開発

HIV-1 遺伝子の発現は、プロウイルスゲノムの long term repeat (LTR) にある宿主の転写因子の結合領域に、それぞれの因子が結合することにより制御されている。中でも nuclear factor (NF)- κ B は、LTR のエンハンサー領域にある κ B 配列を認識して結合することで、HIV-1 遺伝子発現を最も強く誘導する。また、炎症性サイトカインである tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β , IL-6 は HIV 脳症患者の脳脊髄液において上昇しており、HIV 脳症の病態への関与が示唆されているが、NF- κ B はそれらの遺伝子発現も制御している。そのため、リザーバー細胞となった脳内マクロファージ/ミクログリアからの HIV-1 産生や炎症性サイトカイン産生を抑制する可能性を持つ NF- κ B 阻害剤の研究に取り組んできた。その中でも、我々が HIV 脳症発症予防薬としての可能性を見出した cepharanthine の研究について述べる。

Cepharanthine (図1) は *Stephania cepharantha* より抽出された植物性アルカロイドで、*in vivo* において、抗炎症、抗アレルギー作用を示し、日本において炎症性疾患の治療に幅広く用いられている。その主成分である cepharanthine について、単球系由来の U1 細胞およびリンパ球系由来の ACH-2 細胞という2種類の HIV-1 慢性感染細胞を用いて、*in vitro* における抗 HIV-1 効果について検討した。その結果、cepharanthine は、phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) による刺激により U1 細胞から誘導された HIV 産生を 0.1 μ g/ml の濃度で 20% 以下に抑制し、また、1 μ g/ml までの濃度において細胞増殖に影響はなかった。cepharanthine の 50% 有効濃度 (EC₅₀) 値は 16 ng/ml、一方 50% 毒性濃度 (CC₅₀) 値は 2.2 μ g/ml であり、選択係数 (CC₅₀/EC₅₀) は約

137であった(図2)。TNF- α 刺激による HIV-1 産生誘導も同様に抑制した (data not shown)。しかしながら, cepharanthine は ACH-2 細胞における PMA 刺激による HIV-1 産生誘導を全く抑制しないことが分かった (data not shown)。U1 細胞のような潜伏感染細胞からの HIV-1 遺伝子発現は, 先に述べたように LTR のエンハンサー領域における NF- κ B の κ B 配列への結合により制御されている。そのため, LTR を介した遺伝子発現に対する cepharanthine の影響について調査した。その結果, cepharanthine は, PMA あるいは TNF- α 刺激により活性化された, LTR を介した遺伝子発現を 0.1 μ g/ml の濃度で有意に抑制した (data not shown)。さらにゲルシフト法による解析により, cepharanthine は, U1 細胞において, PMA あるいは TNF- α 刺激により誘導された NF- κ B の核内移行を 0.1 μ g/ml の濃度で阻害することが分かった (図3)。また, HIV-1 産生抑制効果と同様に, ACH-2 細胞においては, cepharanthine の NF- κ B 核内移行に対する阻害作用は全く認められなかった (data not shown)。このような結果から, cepharanthine は, NF- κ B 阻害作用を介して HIV-1 遺伝子発現を抑制す

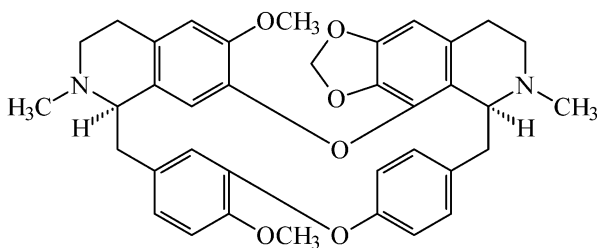


図 1 Cepharanthine の化学構造

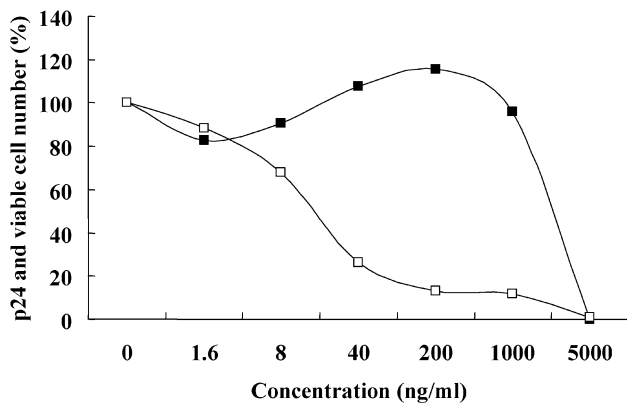


図 2 Cepharanthine の抗 HIV-1 効果

cepharanthine は, PMA 刺激により U1 細胞から誘導された HIV 産生を 0.1 μ g/ml の濃度で 20% 以下に抑制し, また, 1 μ g/ml まで細胞増殖に影響はなかった。(□ : p24 抗原量, ■ : 生細胞数)

ることで, 慢性感染細胞からの HIV-1 産生を抑制することが明らかにされた。

Cepharanthine が NF- κ B 阻害剤であることが分かったため, 初代ヒトマクロファージを用いて, 炎症性サイトカイン産生への cepharanthine の影響を調べた。その結果, cepharanthine は, 1 μ g/ml の濃度において, 初代ヒトマクロファージの形態や生存率へ影響せず, lipopolysaccharide (LPS) 刺激により誘導された TNF- α , IL-1 β , IL-6 および IL-8 の産生を有意に抑制した (図4)。このような結果から, cepharanthine は HIV 脳症の病因との関係が示唆されている各種炎症性サイトカイン産生の阻害剤であることも明らかとなった。

また, TNF- α および HIV-1 のエンベロープ蛋白質である gp120 は, 酸化ストレスを引き起こし, 神経細胞死を誘導することが知られており, HIV 脳症の病態への関与が示唆されている。cepharanthine は抗酸化作用を持つことが知られており, そこで TNF- α および gp120 による神経細胞死誘導に対する cepharanthine の効果を検討した。その結果, cepharanthine は TNF- α および gp120 による神経細胞死を 0.2 μ g/ml の濃度で有意に抑制した (図5)。これらの結果は, cepharanthine が HIV-1 感染脳内マクロファージ/ミクログリアなどから, 神経細胞死を引き起こす原因とな

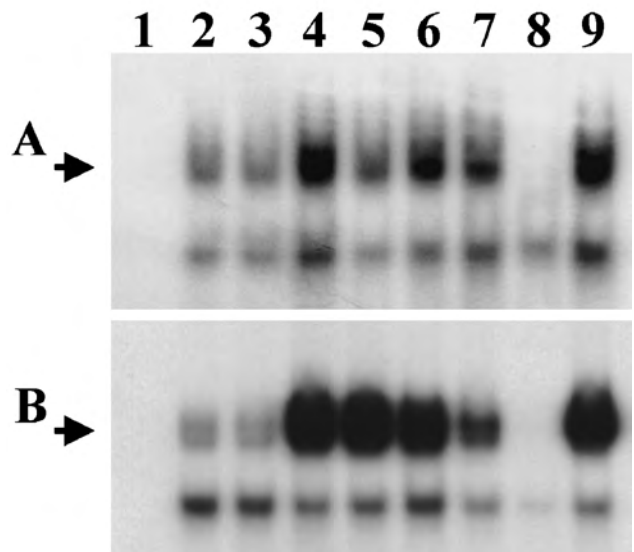


図 3 NF- κ B 活性化に対する cepharanthine の効果

cepharanthine 非存在下 (lane 2, 4, 6) あるいは存在下 (lane 3, 5, 7) において, 10 ng/ml の PMA (A) あるいは 1 ng/ml の TNF- α (B) で 30 分間 (lane 4, 5) あるいは 4 時間 (lane 6, 7) 刺激された U1 細胞の核抽出物をゲルシフト法で解析した結果, cepharanthine は, PMA あるいは TNF- α 刺激により誘導された NF- κ B の核内移行を 0.1 μ g/ml の濃度で阻害した。

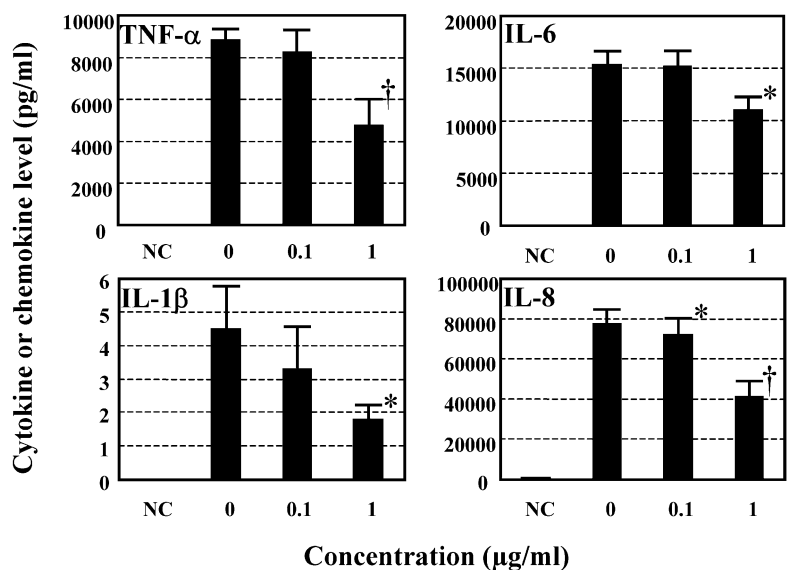


図 4 Cepharanthine のサイトカインおよびケモカイン産生抑制効果
初代培養ヒトマクロファージにおいて、LPS で誘導された TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 および IL-8 産生を cepharanthine (1 μ g/ml) は毒性を示さずに有意に抑制した。(*) $P < 0.05$, (†) $P < 0.01$

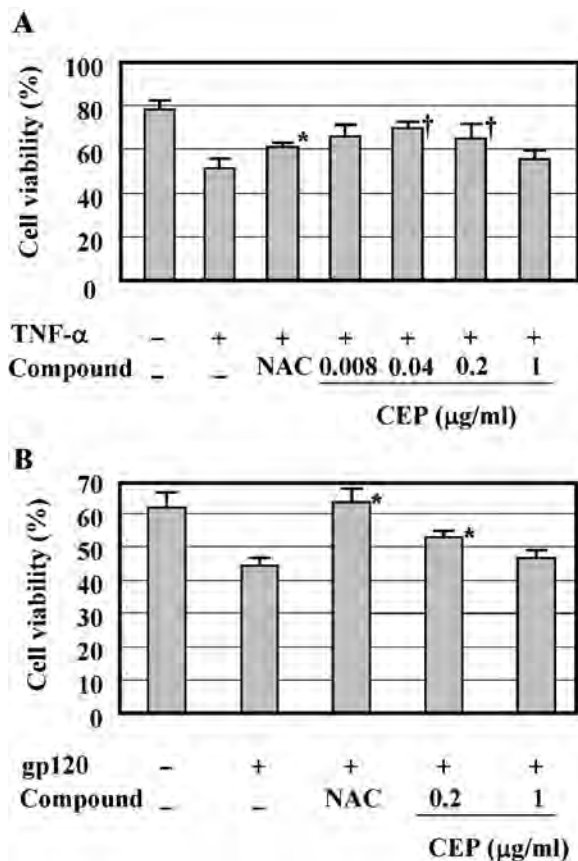
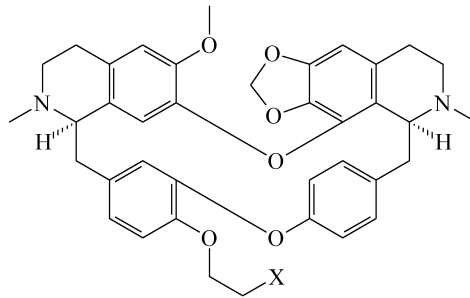


図 5 Cepharanthine の神経細胞死抑制効果
神経型に分化させた神経芽細胞種株 SK-N-MC 細胞の TNF- α (10 ng/ml) (A) あるいはリコンビナント gp120 (1 nM) (B) による神経細胞死を、cepharanthine は 0.2 μ g/ml で有意に抑制した。(NAC : N-acetyl-L-cysteine 500 μ M) (*) $P < 0.05$, (†) $P < 0.01$

表 1 U1 細胞における TNF- α によって誘導された HIV 産生に対する cepharanoline 誘導体の効果



Compound	X	EC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	CC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	SI
57	OCH ₂ Ph	0.0074 \pm 0.0043	0.68 \pm 0.63	92
68	NHOCH ₃	0.010 \pm 0.007	1.3 \pm 0.6	130
78	NHCH ₂ Ph	0.015 \pm 0.006	0.77 \pm 0.58	51
93	piperazinyl	0.0041 \pm 0.0020	1.2 \pm 0.6	293
97	imidazolyl	0.013 \pm 0.003	1.1 \pm 0.8	85
Cepharanthine		0.028 \pm 0.016	1.3 \pm 0.3	46

EC₅₀ 値は p24 抗原量, CC₅₀ 値は MTT 法による生細胞率よりもとめられた。
SI: 選択係数

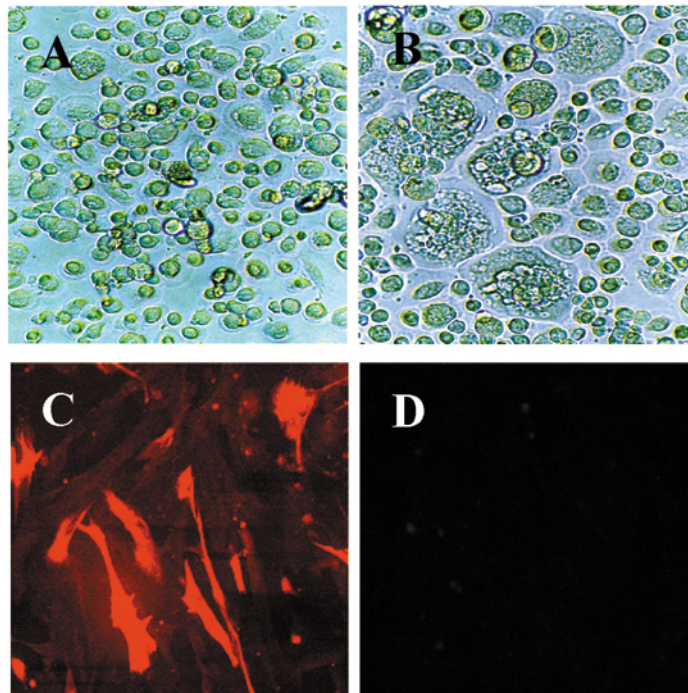


図 6 初代培養ヒトマクロファージ (A, B) :
HIV-1 感染 (B) および非感染 (A) マクロファージは膨張し, さらに HIV-1 感染マクロファージには多数の多核巨細胞が認められた。
初代培養ヒトアストロサイト (C, D) :
免疫組織化学染色法により GFAP (アストロサイトの特異的なマーカー) 陽性であることが確認された (D は陰性コントロール)。

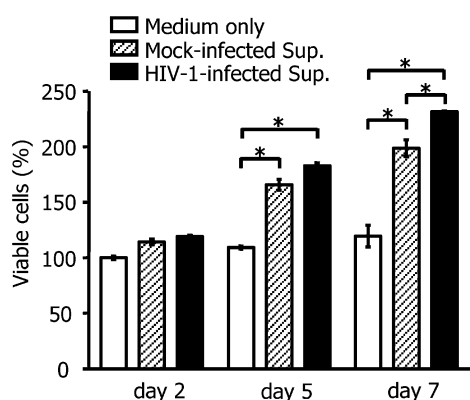


図 7 マクロファージのアストロサイトの増殖に対する影響

マクロファージの培養上清を作用させたアストロサイトにおいて、培養5日目より有意な細胞増殖が認められた。

る、gp120などのHIV-1抗原やTNF- α などの炎症性サイトカインの産生を抑制することにより、神経細胞死を阻害する効果があることを示している。

Cepharanthineは12-O-methyl cepharanolineであるので、これまでに、我々のグループは96種類のcepharanoline誘導体を合成し、それらについてTNF- α 刺激により誘導されるU1細胞におけるHIV-1産生抑制効果を調べた。その結果、cepharanthineより高い抗HIV効果を示す5つの薬剤を得ることができた。中でも12-O-ethylpiperazinyl cepharanolineは最も効果が高く、cepharanthineのEC₅₀値が0.028 μ g/mlであるのに対して、12-O-ethylpiperazinyl cepharanolineのEC₅₀値は0.0041 μ g/mlであった(表1)。

HIV脳症の病態におけるアストロサイトの役割について

—in vitroにおけるHIV脳症のアストログリオシスの発症および病態機構の解明—

先に述べたように、HIV脳症において、脳内マクロファージ/ミクログリアは主要なHIV-1産生細胞と考えられている。しかし、脳内のHIV-1産生細胞数は必ずしもHIV脳症の病状と相関しない。一方、アストロサイトでは、HIV-1感染は制限され、感染性を有するウイルス粒子はほとんど産生されないが、Nef, Rev, TatといったHIV-1蛋白質や炎症性サイトカイン、ケモカインなどを産生することが知られている。それらはいずれもHIV-1産生や免疫機能の調整に関与し、さらに神経毒性を有していることから、アストロサイトはそのような神経毒性因子の産生を介して、HIV脳症の病因において重要な役割を果たすと考えられる。

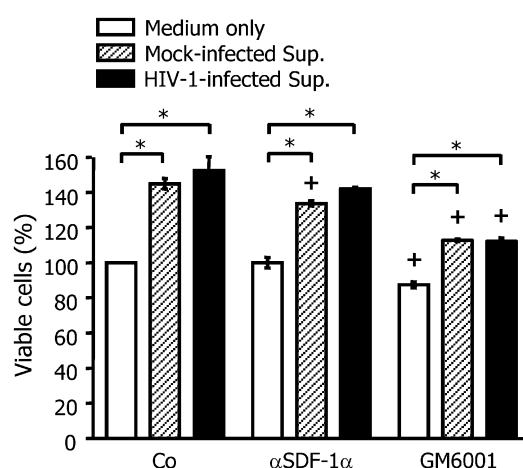


図 8 抗SDF-1 α 中和抗体およびMMP阻害剤GM6001のアストロサイト増殖に対する影響

抗SDF-1 α 中和抗体は、部分的に非感染マクロファージ培養上清による増殖活性化を抑制し、GM6001はHIV-1感染および非感染マクロファージ両方の培養上清による増殖活性化を抑制した。

このように、脳内マクロファージ/ミクログリアとアストロサイトはHIV脳症の深く関与していると考えられているが、HIV脳症における両者の関係はまだ明らかにされていない。そこで私たちの研究グループは、in vitroで培養されたマクロファージ(図6A)が非感染細胞であっても活性化状態にあり、種々のサイトカインなどを分泌していることに着目し、HIV脳症において活性化状態にある脳内マクロファージ/ミクログリアのin vitroモデルとした。そして、HIV-1感染マクロファージ(図6B)を感染脳内マクロファージ/ミクログリアのin vitroモデルとし、それらを用いて、初代培養ヒトアストロサイト(図6C, D)との相互作用について検討した。

HIV脳症における脳内マクロファージ/ミクログリアとアストロサイトの間接的な相互作用を解明するため、HIV-1感染あるいは非感染マクロファージの培養上清を初代培養ヒトアストロサイトに作用させ、それらの生細胞率を測定した(図7A)。その結果、マクロファージの培養上清を作用させたアストロサイトにおいて、培養5日目より有意な細胞増殖が認められ、しかもその作用は、非感染細胞と比較して、HIV-1感染マクロファージの培養上清において、より顕著であった。一方、未処理のヒトアストロサイトは7日間の培養期間において細胞増殖はほとんど認められなかった。これらの結果から、HIV-1感染および非感染マクロファージの培養上清には初代培養ヒトアストロサイトの増殖を活性化させる作用があることがわかった。その作用は0-20%の濃度において濃度依存的であった(data

not shown)。また、その作用は、これまで報告のあったリコンビナント gp120 や stromal cell-derived factor (SDF)-1 α によるアストロサイト増殖促進作用より、さらに顕著であった (data not shown)。これらの結果から、マクロファージの培養上清によるアストロサイトの増殖活性化には、gp120 や SDF-1 α 以外の因子も関与していると考えられた。

SDF-1 α と matrix metalloproteinases (MMPs) はアストロサイトに発現していることが知られており、また、HIV 脳症の病因と密接に関係していると考えられている。そこで抗 SDF-1 α 中和抗体と MMP 阻害剤 GM6001 の、マクロファージ培養上清によるアストロサイト増殖に対する影響を調べた。その結果、抗 SDF-1 α 中和抗体は、部分的に非感染マクロファージ培養上清による増殖活性化を抑制し、GM6001 は HIV-1 感染および非感染マクロファージ両方の培養上清による増殖活性化を抑制した (図 8)。これらの結果から、SDF-1 α と MMPs がマクロファージ上清によるアストロサイトの増殖活性化に関与していることが明らかになった。

アストロサイトは、CD4 は発現していないが、CCR5 および CXCR4 は発現している (data not shown)。また、SDF-1 α は CXCR4 のリガンドであることから、マクロファージ培養上清によるアストロサイトのケモカイン・レセプター発現の変化を調べた結果、CCR5 に対しては影響がなかったが、CXCR4 mRNA の発現の増強が認められた (図 9A)。また、MMPs とその内因性の阻害因子である tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMPs) の中で、アストロサイトに発現し、さらに HIV 脳症との関連が指摘されている MMP-2、MMP-9、TIMP-1 および TIMP-2 について、マクロファージ上清による発現の変化を調査した。その結果、HIV-1 感染および非感染マクロファージ上清により、アストロサイトの MMP-2、TIMP-1 および TIMP-2 mRNA 発現は増強され、さらに HIV-1 感染マクロファージ上清による MMP-9 mRNA の発現の増強も認められた (図 9B)。これらの結果から、アストロサイト自身による MMPs 産生の増強が、マクロファージ上清による増殖活性化に関与していることが示唆された。さらに、アストロサイトにおける SDF-1 α 産生について調査した結果、マクロファージ上清により有意に増加し、さらに、GM6001 はそれらを有意に抑制することがわかった (図 9C)。これらのことから、マクロファージ上清は、アストロサイトに対する増殖活性化能を有する SDF-1 α の産生を促進させる作用を持ち、そこに MMPs の関与が示唆された。

以上の結果から、HIV-1 感染および非感染マクロファージは間接的にアストロサイトに CXCR4、SDF-1 α や MMP の発現増強を促進させ、それらの相互作用によって、アストロサイトに異常な増殖を引き起こすと思われた (図 10)。

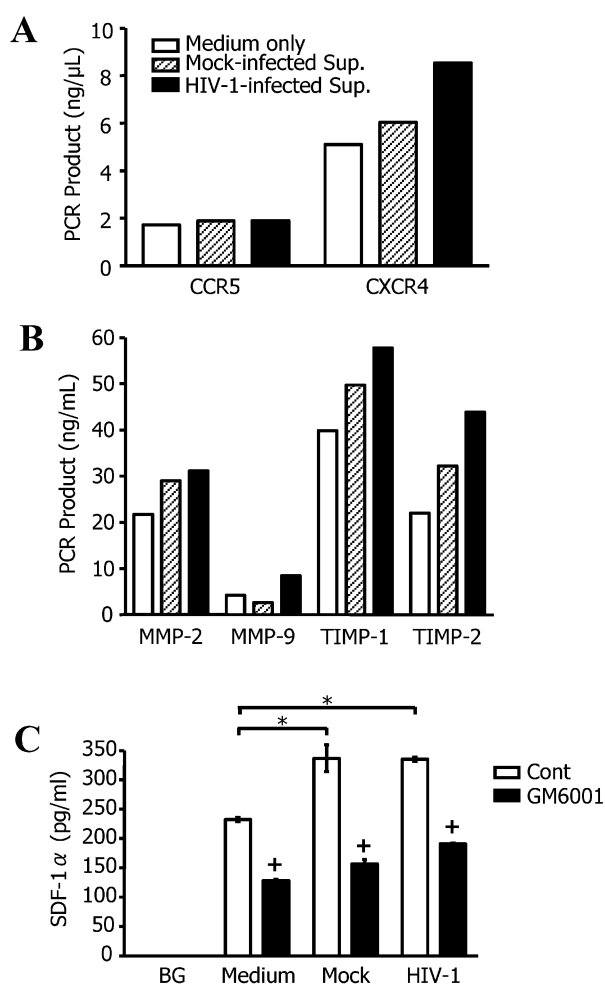


図 9 (A) マクロファージ培養上清によるアストロサイトのケモカイン・レセプター発現の変化: CCR5 に対しては影響がなかったが、CXCR4 mRNA の発現の増強が認められた。(B) アストロサイトにおける MMPs および TIMPs 発現の変化: HIV-1 感染および非感染マクロファージ上清により、MMP-2、TIMP-1 および TIMP-2 mRNA の発現の増強が、さらに HIV-1 感染マクロファージ上清による MMP-9 mRNA の発現の増強も認められた。(C) アストロサイトにおける SDF-1 α 産生への影響: アストロサイトにおける SDF-1 α 産生は、マクロファージ上清により増加し、さらに、GM6001 はそれらを抑制した。(+) GM6001 非存在下 (Cont) のそれぞれのサンプルに対する有意差をあらわす。(*, +) $P < 0.05$

すなわち、このような機構が HIV 脳症におけるアストログリオシスの発症および病態を形成していると推測される。

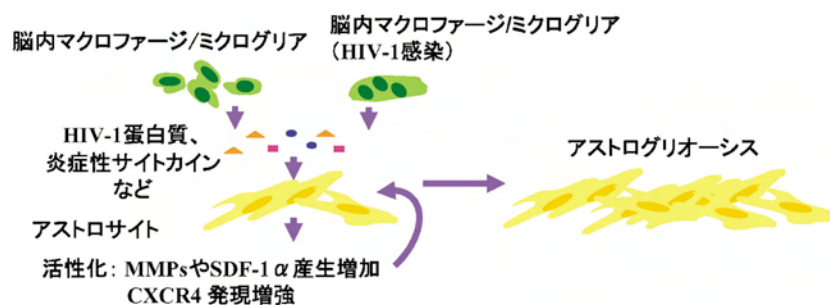


図 10 HIV 脳症におけるアストログリオシス発症機序 (仮説)

HIV 脳症においては、HIV-1 感染および非感染マクロファージ/ミクログリアより産生された因子によりアストロサイトは活性化し、その結果 MMP や SDF-1 α , CXCR4 などの発現が増強される。それらの作用および相互作用を介して、アストロサイトの増殖が促進され、アストログリオシスが誘導される。

終わりに

HAART 療法の導入により、HIV 脳症の発生率は著しく低下した。しかしながら、未だに HIV-1 感染者の約 10% において HIV 脳症している。その結果、HAART 療法による長期生存 HIV-1 感染者の増加により、HIV 脳症の有病率は実際には増加している。

Cepharanthine のような薬剤は HIV-1 の急性感染には無効であり、実際に HIV-1 感染症治療の主体にはなり得ないと思われる。しかし、HAART 療法の成功により、HIV-1 を産生する細胞として、慢性感染細胞の占める割合が増加している状態では、cepharanthine のような薬剤を用いることで、慢性感染細胞からの HIV-1 および炎症性サイトカインの産生を抑制し、神経細胞死を阻止することで、HIV 脳症の発症を抑制することが可能になるのではないかと考えられる。cepharanthine は脳内移行性があり、すでに慢性炎症性疾患の治療薬として臨床で使用されている薬剤であり、HIV 脳症発症予防薬としての応用が期待される。

また、アストロサイトは脳内グリア細胞において最も多い細胞であり、サイトカインを含めた種々の神経栄養因子や神経生存因子の産生、また、多くの神経伝達物質や調節因子の受容体発現を通じて、神経細胞の生存および機能性の維持に深く関与している。さらに、脳障害時には反応性アストロサイトとなり、その病態形成および修復に重要な役割を果たしている。HIV 脳症においてもアストロサイトの増殖 (アストログリオシス) が特異的な病理像の一つであることから、その発症および病態にアストロサイトは深く関与していると考えられる。

今回の研究では、HIV-1 感染あるいは免疫学的に活性化されたマクロファージがアストロサイトを刺激し、刺激されたアストロサイトから産生された SDF-1 α や MMPs によ

り、アストロサイトの増殖が活性化されることが明らかとなったが、アストロサイトから産生された HIV-1 蛋白質や炎症性サイトカインなど神経毒性因子が HIV 脳症発症に関与していることを考えると、アストロサイトの増加がさらに神経細胞死を引き起こすことになると考えられる。また、アストロサイトからの SDF-1 α や MMPs の産生増加は、SDF-1 α による末梢からの HIV-1 感染あるいは活性化マクロファージの中枢神経系への移入や MMPs による脳血液関門の破壊を促進するという点からも、HIV-1 感染による中枢神経障害を進行させると考えられる。従って、HIV 脳症の発症予防には、このような宿主因子を標的とした治療薬の開発を模索する必要がある。

謝辞：このたびは第 6 回 ECC 山口エイズメモリアル研究奨励賞を受賞させて頂き、有り難うございました。本賞の選考委員の先生方、並びにこれまでご指導いただいた馬場昌範先生はじめ諸先生方に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Speth C, Dierich MP, Sopper S : HIV-infection of the central nervous system : the tightrope walk of innate immunity. *Mol Immunol* 42 : 213-228, 2005.
- 2) Wiley CA, Schrier RD, Nelson JA, Lampert PW, Oldstone MB : Cellular localization of human immunodeficiency virus infection within the brains of acquired immune deficiency syndrome patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 83 : 7089-7093, 1986.
- 3) Garden GA : Microglia in human immunodeficiency virus-associated neurodegeneration. *Glia* 40 : 240-251, 2002.
- 4) Baba M : Cellular factors as targets for anti-HIV-1

- chemotherapy (Butera ST ed), HIV Chemotherapy, Caister Academic Press, pp241–260, 2005.
- 5) Gallo P, Frei K, Rordorf C, Lazdins J, Tavolato B, Fontana A : Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection of the central nervous system : an evaluation of cytokines in cerebrospinal fluid. *J Neuroimmunol* 23 : 109–116, 1989.
 - 6) Okamoto M, Ono M, Baba M : Potent inhibition of HIV type 1 replication by an antiinflammatory alkaloid, cepharanthine, in chronically infected monocytic cells. *AIDS Res Hum Retroviruses* 14 : 1239–1245, 1998.
 - 7) Okamoto M, Ono M, Baba M : Suppression of cytokine production and neural cell death by the anti-inflammatory alkaloid cepharanthine : a potential agent against HIV-1 encephalopathy. *Biochem Pharmacol* 62 : 747–753, 2001.
 - 8) Baba M, Okamoto M, Kashiwaba N, Ono M : Anti-HIV-1 activity and structure-activity relationship of cepharanthine derivatives in chronically infected cells. *Antivir Chem Chemother* 12 : 307–312, 2001.
 - 9) Brack-Werner R : Astrocytes : HIV cellular reservoirs and important participants in neuropathogenesis. *AIDS* 13 : 1–22, 1999.
 - 10) Eddleston M, Mucke L : Molecular profile of reactive astrocytes—implications for their role in neurologic disease, *Neuroscience* 54 : 15–36, 1993.
 - 11) Montgomery DL : Astrocytes : form, functions, and roles in disease. *Vet Pathol* 31 : 145–167, 1994.
 - 12) Okamoto M, Wang X, Baba M : HIV-1-infected macrophages induce astrogliosis by SDF-1 α and matrix metalloproteinases. *Biochem Biophys Res Commun* 336 : 1214–1220, 2005.
 - 13) Iskander S, Walsh KA, Hammond RR : Human CNS cultures exposed to HIV-1 gp120 reproduce dendritic injuries of HIV-1-associated dementia. *J Neuroinflammation* 1 : 7–15, 2004.
 - 14) Bajetto A, Barbero S, Bonavia R, Piccioli P, Pirani P, Florio T, Schettini G : Stromal cell-derived factor-1 α induces astrocyte proliferation through the activation of extracellular signal-regulated kinases 1/2 pathway. *J Neurochem* 77 : 1226–1236, 2001.
 - 15) Rostasy K, Egles C, Chauhan A, Kneissl M, Bahrani P, Yiannoutsos C, Hunter DD, Nath A, Hedreen JC, Navia BA : SDF-1 α is expressed in astrocytes and neurons in the AIDS dementia complex : an in vivo and in vitro study. *J Neuropathol Exp Neurol* 62 : 617–626, 2003.
 - 16) Suryadevara R, Holter S, Borgmann K, Persidsky R, Labenz-Zink C, Persidsky Y, Gendelman HE, Wu L, Ghorpade A : Regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by astrocytes : links to HIV-1 dementia. *Glia* 44 : 47–56, 2003.
 - 17) L  v  que T, Le Pavec G, Boutet A, Tardieu M, Dormont D, Gras G : Differential regulation of gelatinase A and B and TIMP-1 and -2 by TNF- α and HIV virions in astrocytes. *Microbes Infect* 6 : 157–163, 2004.