

レンチウイルスベクターを用いた感染症におけるマクロファージの機能改善

(課題番号 11557072)

平成 11 年度～平成 13 年度科学研究費補助金

(基盤研究 (B) (2))

研究成果報告書

平成 14 年 3 月

東北大学図書



00031004893

附属図書館

研究代表者 服部俊夫

(東北大学大学院医学系研究科・感染病態学分野 教授)

はしがき

ヒトを含む動物と病原体の営みは分離不可能であり、均衡を保ちながら常に変遷している。微生物により免疫系は進化し、動物は淘汰されてきたともいえる。そして個体レベルでの微生物との均衡の破綻が疾病を持たらす。世界では毎日約16,000人の新しいHIV-1感染者が発生し、毎秒1人の結核菌感染者が誕生し、結核患者が10秒に1人の割合で死亡している。それらの患者は我が国では比較的少ないが、相対的な重要性は増加しつつある。さらに我が国で発見されたHTLV-Iによる成人T細胞白血病患者数は減少傾向を示さない。これらの感染症はいずれも極めて難治性であり、その病態形成にマクロファージの活性化が関与している。故にマクロファージに遺伝子を導入し、その機能を改変する試みは極めて重要である。我々はレンチウイルスベクターを様々な細胞に導入した。ウイルス膜タンパクとしてVSVを使用した際には、これらのベクターは平滑筋細胞や、脳のグリア細胞由来細胞(U87)には極めて容易に感染するが、マクロファージへの感染効率は悪い。HIVの第一の細胞側受容体はCD4分子で第二の受容体はケモカイン受容体である。第二の受容体がCCR5である時にマクロファージあるいは樹状細胞へ選択的に感染が生じるので、それを用いたベクターにはHIVのCCR5好性Envelopeを応用するのが効率的である。感染を促進させるためには、関与するウイルス蛋白の三次元構造の解明が重要な位置を占める。その様な事実を踏まえここではgp120が受容体に結合した後に生ずるウイルスと細胞膜の融合の最終段階にかかわり立体構造変化するgp41に対する液性免疫応答を検討した。更にgp41の活性化をもたらす、gp120の活性化機構についても述べる。

研究組織

研究代表者：服部俊夫（東北大学大学院医学系研究科 感染病態学分野）

研究協力者：大野勲、谷口裕子、張曉燕、徐又農、凌虹、劉一

研究経費

平成11年度	4,400	千円
平成12年度	4,400	千円
平成13年度	4,400	千円
計	13,200	千円

研究発表

ア；学会雑誌.

1. Zhang X, Xu Y, Ling H, and Hattori T.: Inhibition of infection of incoming HIV-1 virus by RNA cleaving DNA enzyme. FEBS Letters 458:151-156, 1999
2. Tahara-Hanaoka S, Ushijima Y, Tarui H, Wada M, Hara T, Imanishi S, Yamaguchi T, Hattori T., Nakauchi H, Koito A.: Differential level in co-down modulation of CD4 and CXCR4 primed by HIV-1 gp120 in response to phorbol ester, PMA, among HIV-1 isolates. Microbiol. Immunol. 44:489-498, 2000
3. Taniguchi Y, Zolla-Pazner S, Xu Y, Zhang X, Takeda S, Hattori T.: A Human Monoclonal Antibody (98-6) Reacts with the Fusogenic Form of gp41. Virology 273:333-340, 2000
4. Li S-L, Zhang X, Ling H, Ikeda J, Shirato K, Hattori T.: A VSV-G pseudotyped HIV vector mediates efficient transduction of human pulmonary artery smooth muscle cells. Microbiology and Immunology 44:1019-1025, 2000

5. Xu Y, Zhang X, Matsuoka M, Hattori T.: The possible involvement of CXCR4 in the inhibition of HIV-1 infection mediated by DP178/gp41 FEBS Letters 487:185-188, 2000
6. Iwatani Y, Ueno T, Nishimura A, Zhang X, Hattori T., Ishimoto A, Ito M, Sakai H.: Modification of virus infectivity by cytoplasmic tail of HIV-1 TM protein. Virus Research 74:75-87, 2001
7. Shirota H, Sano K, Hirasawa N, Terui T, Ohuchi K, Hattori T., Shirato K, and Tamura G.: Novel Roles of CpG Oligodeoxynucleotides as a Leader for the Sampling and Presentation of CpG-Tagged Ag by Dendritic Cells. J Immunol Jul 1;167(1):66-74, 2001
8. Tamamura H, Omagari A, Hiramatsu K, Gotoh K, Kanamoto T, Xu Y, Kodama E, Matsuoka M, Hattori T., Yamamoto N, Nakashima H, Otaka A, Fujii N.: Development of specific CXCR4 inhibitors possessing high selectivity indexes as well as complete stability in serum based on an anti-HIV peptide T140. Bioorg Med Chem Lett 11(14):1897-902, 2001

イ ; 口頭発表.

1. Hattori T., Taniguchi Y, Xu Y, Takeda S, Zhang X, Ohno I and Zolla-Pazner S.: A human monoclonal antibody (98.6) against a fusion active core. Microbial Pathogenesis and host resp. CSHL Sept 23-26, 1999
2. Hattori T., Zolla-Pazner S.: A human monoclonal antibody (98.6) against a fusion active core. 5 th Conference of Pacific rim against infectious disease. Chennai, India Jan 7-11, 2000
3. Ling H, Hattori T.: V3 loop derived peptides enhance HIV-1 entry into the corresponding target cells. The Japanese Society for Immunology, 2000
4. Hattori T., Xu Y, Zhang X and Matsuoka M.: The possible involvement of CXCR4 in the inhibition of HIV-1 infection mediated by DP178/gp41. Japan-US AIDS

Conference SantaFe, March 21-25, 2000

5. Hattori T., Xu Y, Zhang X, Matsuoka M.: The possible involvement of CXCR4 in the inhibition of HIV-1 infection mediated by DP178/gp41. U.S.-Japan cooperative Medical Science Program, Santa Fe, March22-24, 2000
6. Hattori T., Ashino J, Ohno I.: Operations of Neoplasm of Gastrointestinal Tract Predisposes Pulmonary Tuberculosis Possibly Due to Humoral Antibody Deficiencies. ASM CONFERENCE ON TUBERCULOSIS, New York, June20-24, 2000
7. Liu Y, Ling H, and Hattori T.: Inhibition of sCD4-Induced Conformational Changes of gp41 Ectodomain by C Peptide. AIDS VACCINE 2001, Philadelphia, Sept. 5-8,2001
8. Ling H, Zhang X, Liu Y, and Hattori T.:Enhancements of HIV Infection by Their Own V3 Loop Peptides. International Meeting of the Journal of Human Virology, Baltimore, Sept. 9-13, 2001

レンチウイルスベクターを用いた感染症における マクロファージの機能改善

東北大学大学院医学系研究科 感染病態学分野

服部俊夫

研究目的

様々な治療困難な感染症において、病巣に存在するマクロファージは、病態を構成する、陰の主角ともいえる。HIV 感染症、HTLV-I 感染症の代表的疾患である ATL、結核の遷延化におけるマクロファージの果たす役割は大きい。ここではそれらの病態の根本的な改善を目的としてマクロファージにとまた疾患を構成する種々の細胞にレトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入効率を比較検討してその機能の変換への基礎的データとした。HIV 感染者に肺高血圧症が生ずるが、ここでは肺血管平滑筋細胞由来細胞株 PSMC と CD4-CD8-の HTLV-1 感染 T 細胞株、43Ti と末梢血から分離した単球を GM-CSF を含む MEDIUM で 5 日間培養して得たマクロファージへの遺伝子導入を行った。まず、Luciferase 遺伝子導入レポーター遺伝子を使用し、X4, R5 などの様々な指向性を有した偽ウイルスを用い感染実験を行った。HIV の X4, R5 遺伝子発現偽ウイルスは通常使用している CD4・補受容体発現 U87 細胞には感染するが、PSMC には感染しなかった。そこで、VSV-G を用いたレンチウイルスベクターによる感染性を検討した。Luciferase をマーカーとした VSV-Gluc による感染系では、HPASMIC にも補受容体発現 U87 細胞にも同様に効率よい感染がみられた。しかし 43Ti には感染効率は低くまたマクロファージでのルシフェラーゼ活性も非常に低かった。これらの事実を GFP を使用したレポーター遺伝子でも確認すると、PSMC にはウイルス量に依存して、蛍光陽性細胞が増加することが、FACS 解析及び倒立蛍光顕微鏡を用いても明らかにされた。43Ti 細胞においては、培養 18 日目に 10% 程

度の陽性細胞の出現をみた。しかしマクロファージの蛍光陽性細胞は低く本細胞への遺伝子導入には特別の工夫が必要であることが明らかになった。

HIV の感染機構は図1に如く、かなりの部分が明らかにされてきた。さらなる解明は感染予防のみならず、HIV ベクターの開発にも有用である。細胞への侵入機構を主にウイルスペプチドを用いて明らかにしてきた。最も強いウイルス感染阻止作用を持つのは gp41 のC端に存在するペプチドである。このペプチドは、gp41 の構造変化を阻止することが明らかになっている。その構造変化を生ぜしめる機構は未だ不明な点が多いが、gp120 がCD4 分子とケモカイン受容体に結合した後に gp41 の活性化が生ずることと思われる。その Gp120 の活性化様式を解析することにより、HIV 感染機構をさらに明らかにし、抗ウイルス剤を発見することも可能と思われる。我々はこれらの gp 4 1 由来ペプチドが X4 ウイルスにより少量で作用するが、R5 ウイルスはより抵抗性であることを報告し、その理由を解明した。また V3 ループ由来のペプチドがウイルス株特異的な感染促進作用を有することを明らかにした。X4 ウイルスを用いた解析では、その促進機構として、CD4 やコレセプターの発現は増加させないが、ペプチドがそれ自身の細胞表面への結合を増加させることによることが明らかになっている。しかし R5 では V3 ペプチドも細胞膜表面に結合しないことが同時に明らかになった。さらに当該ペプチドが H9/IIIB 感染細胞膜表面の CD4 inducing epitope に対するモノクローナル抗体(17b)と V2 に対する抗体(830A)の反応性を増強させることより、V3-V1/V2 の均衡の乱れが、ケモカイン受容体の結合領域(17bi)の発現を誘導することが推測された。よく感染できるベクターを開発するために、この感染促進作用は HIV ベクターの開発のみではなく感染機構の開発にも有意義である。

材料と方法

合成ペプチドの作製

gp41 由来のペプチドと3種類のウイルス (BH10, 89.6, ADA) 由来の V 3 ループ化ペプチドを作成した。V 3 領域の非ループ化ペプチドとしてシステイン残基をアラニ

ンに置換した BH10/CA も用いた。(表 1、2)

感染系

感染の評価は Luciferase を組み込んだ Pseudotype を CD4 と CoR を発現させた U87 に感染させることにより行った。

モノクロナル抗体

ヒトモノクローナル抗 V3 ループ抗体 (447.52 D)、抗 V2 ループ抗体 (830A,2158,1357)、抗 CD4 binding site(CD4BS)抗体(IgGb12 と F105)、抗 coreceptor binding site(CD4i)抗体(17b)を使用した。またコントロールとして抗 CXCR4 抗体 (12G5) を用いた。

F a c s 解析

V3 ループペプチドで処理した H9/III B 細胞表面の gp120 を CD4BS,CD4i および V2 ループに対する抗体を用いてフローサイトメトリーで解析した。H9/III B を 0.1% BSA、0.01% sodium azide、25 mM HEPES を含んだ RPMI(incubation solution; IS)中で、異なる濃度の V3 ペプチドで一時間 37°C インキュベートした。washing solution (WS、0.1% BSA、0.01% sodium azide を含んだ PBS)で二回洗浄したのち、細胞は十分量の抗体を含んだ IS に懸濁され、30 分 4°C でインキュベートした。続いて、WS で細胞を洗浄し、FITC-conjugated Goat F(ab')₂ anti-mouse もしくは anti-human 抗体を用いて 30 分 4°C 染色した。細胞は 1% formaldehyde (fixing solution)で懸濁し、フローサイトメーター(FACScan, Becton Dickinson, San Jose, CA)で解析された。V3 ペプチド無しで抗体を染色に用いたものをコントロールとした。最大量のペプチドの存在下で isotype 抗体を用いた場合をバックグラウンドとした。

結果

使用した gp41 および gp120 由来ペプチドは表の通りである。X4(HXB2)と R5 (ADA) 由来 Envelop を用いて Pseudotype ウイルスを作成し、標的細胞である U87/CD4/CXCR4 あるいは/CCR5 に感染させる高感度測定系を用いペプチドの融

合阻止能を検討した。

Gp 4 1 由来のペプチドは抑制活性を認めた。その IC50 は N ペプチド (DP178, N36) よりも C ペプチド (DP178, C34) がより低値で、抑制効果が強いことが明らかになった。(図 2) さらにその抑制に対しては R5 ウイルスよりも X4 ウイルスがより抵抗性であった。その理由として gp 4 1 ペプチドと補受容体との相互作用の可能性について検討した。CXCR4 高発現 T 細胞株の CXCR4 を抗体(12G5)により検出する系に、種々のペプチドを作用させた。CXCR4 inhibitor である T2 2 はその結合を低濃度で抑制する。(図 3) C ペプチドで T2 0 として臨床治験が行われている DP 1 7 8 は 1 2 G 5 の結合を抑制したが、同じく C ペプチドでより強い抗 HIV 活性をもつ C 3 4 には抑制活性がなかった。これらのことは T2 0 には CXCR4 と相互作用することができるが、R5 の抵抗性はそれによつてのみでは説明できないことも明らかになった。

Gp 1 2 0 由来ペプチドの作用

同じ感染系に V 3 ループペプチドを加え感染に及ぼす影響を観察した。すると一部の例外を除きウイルス特異的な感染促進作用が観察された。(図 4) その機構を解析するために、V3 ループペプチドが抗 CD4 BS 抗体(F105 and IgG1b12)と抗 CD4i 抗体(17b)の H9/IIIB 細胞膜表面への結合に及ぼす影響を FACS を用いて解析した。F105 と IgG1b12 の gp120 への結合は全く影響されなかったが、V3-BH10 処理によつて 17b エピトープの発現は明らかに増加した。逆に、V3-ADA と V3-89.6 処理では同様の結果は得られなかった。(図 5)

考察

我々は様々な細胞に VSV-G envelope を用いたレンチウイルスベクターを用いて遺伝子を導入する過程でマクロファージへの遺伝子導入効率が平滑筋細胞への導入にくらべて低いことが明らかになった。R 5 ウイルスの Envelope を使用すると特異的にマクロファージへの遺伝子導入が可能となる可能性がある。そこで HIV の感染機構をさらに検索すると、R 5 ウイルスは gp41 の C ペプチドにより抵抗性であることが

明らかになった。さらにV3ループペプチドにはウイルス株特異的な感染促進作用があることが明らかになった。その機構の解析を進める過程で、V3ループの添加により、感染細胞膜上のgp120の立体構造が変化し、CD4i(17b エピトープ)の発現が、用量依存的に誘導されることが明らかになった。一方でCD4結合部位(CD4BS, ib12, F105 エピトープ)については変化がみられなかった。野生株などではV3ループはV1/V2ループとともに、gp120上のCD4 binding siteとCD4-induced siteの中和エピトープを覆ってしまうと考えられている。(図6)さらに、V1/V2はV3と共に中和抵抗性とケモカインレセプターへの作用を決定していると考えられた。これらの結果はV1/V2がV3と機能的に相互作用しているか、近接していることを示す。

我々の知見は、V1/V2とV3ループの相互作用が均衡を保てなくなることによりコレセプター結合部位が出現し、HIV感染を促進すること示唆している。この感染促進作用は現在ではなお効率の悪いマクロファージ系の細胞への遺伝子導入の一助になると思われる。



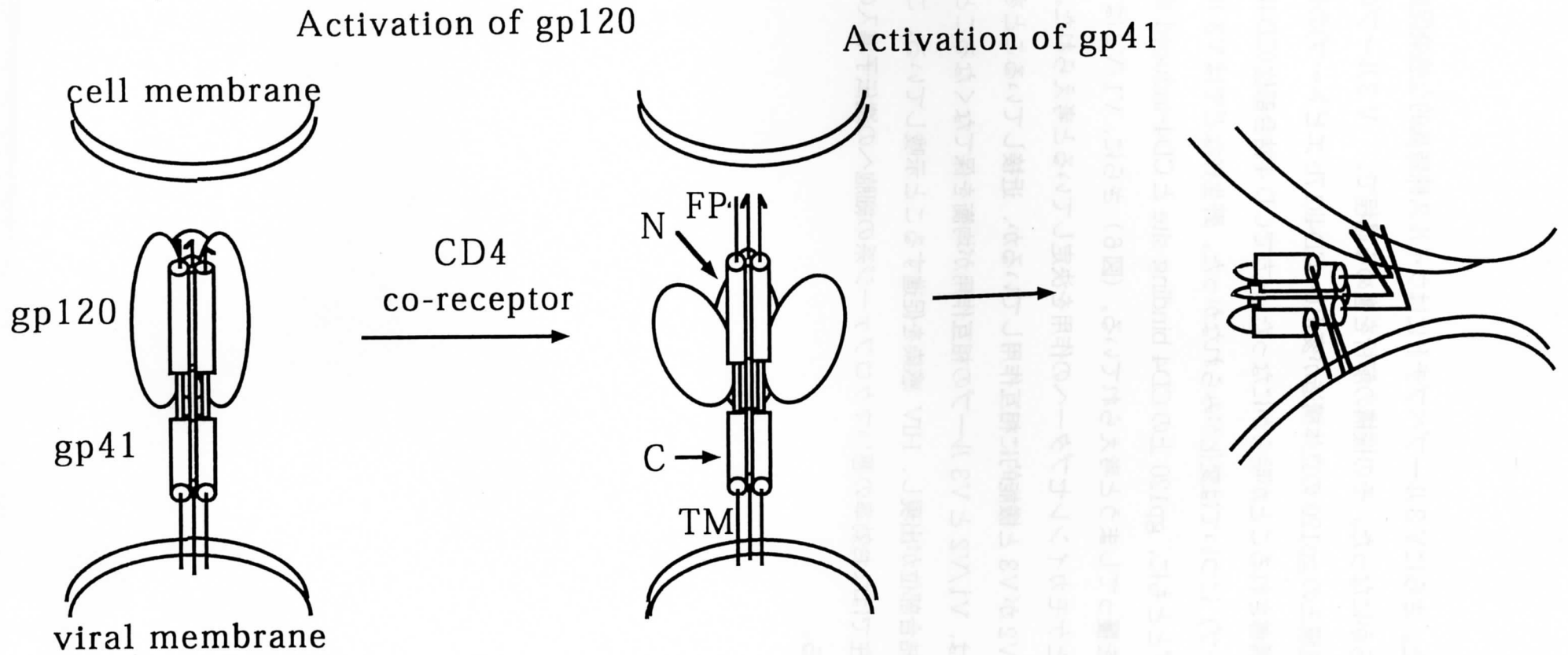


図1 gp120とgp41の活性化と融合の成立

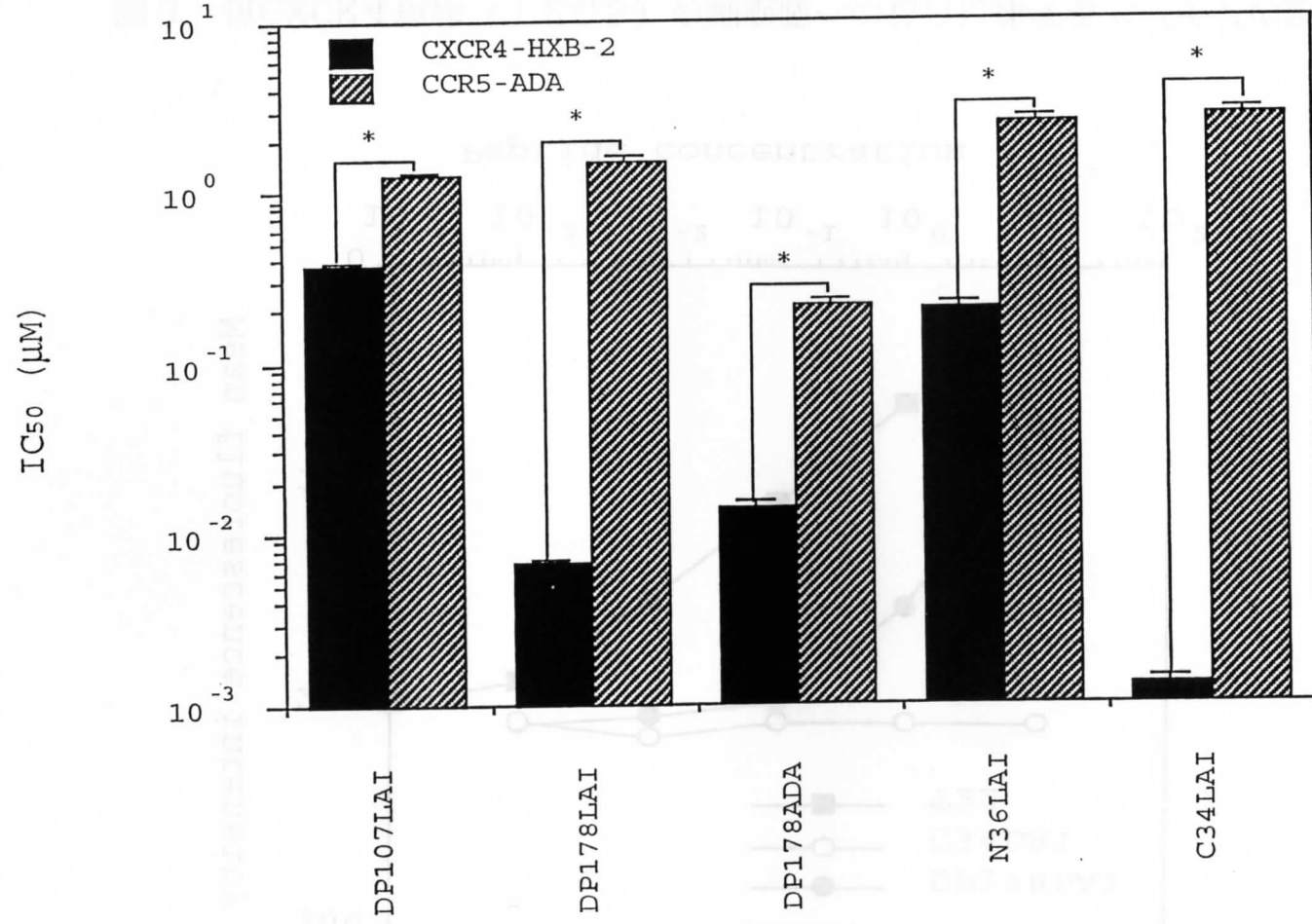


図2 gp41由来NあるいはCペプチドの感染抑制作用

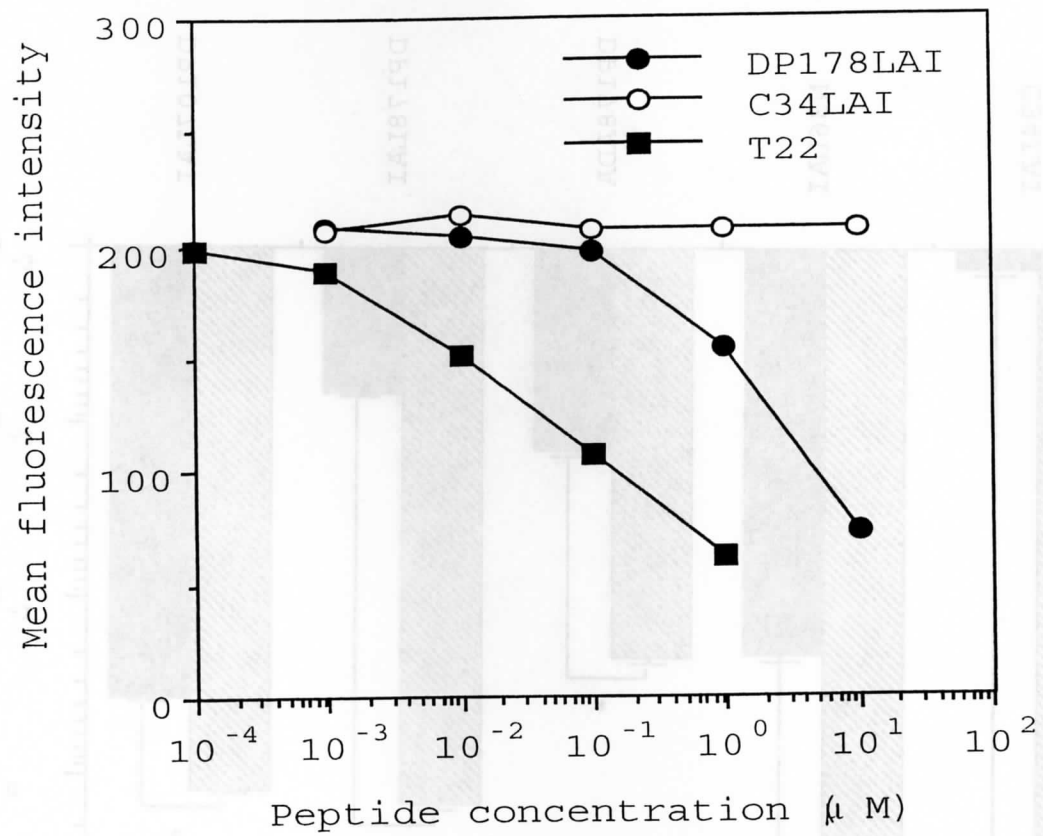


図3 抗CXCR4抗体(12G5)の細胞膜への結合に与えるペプチドの影響

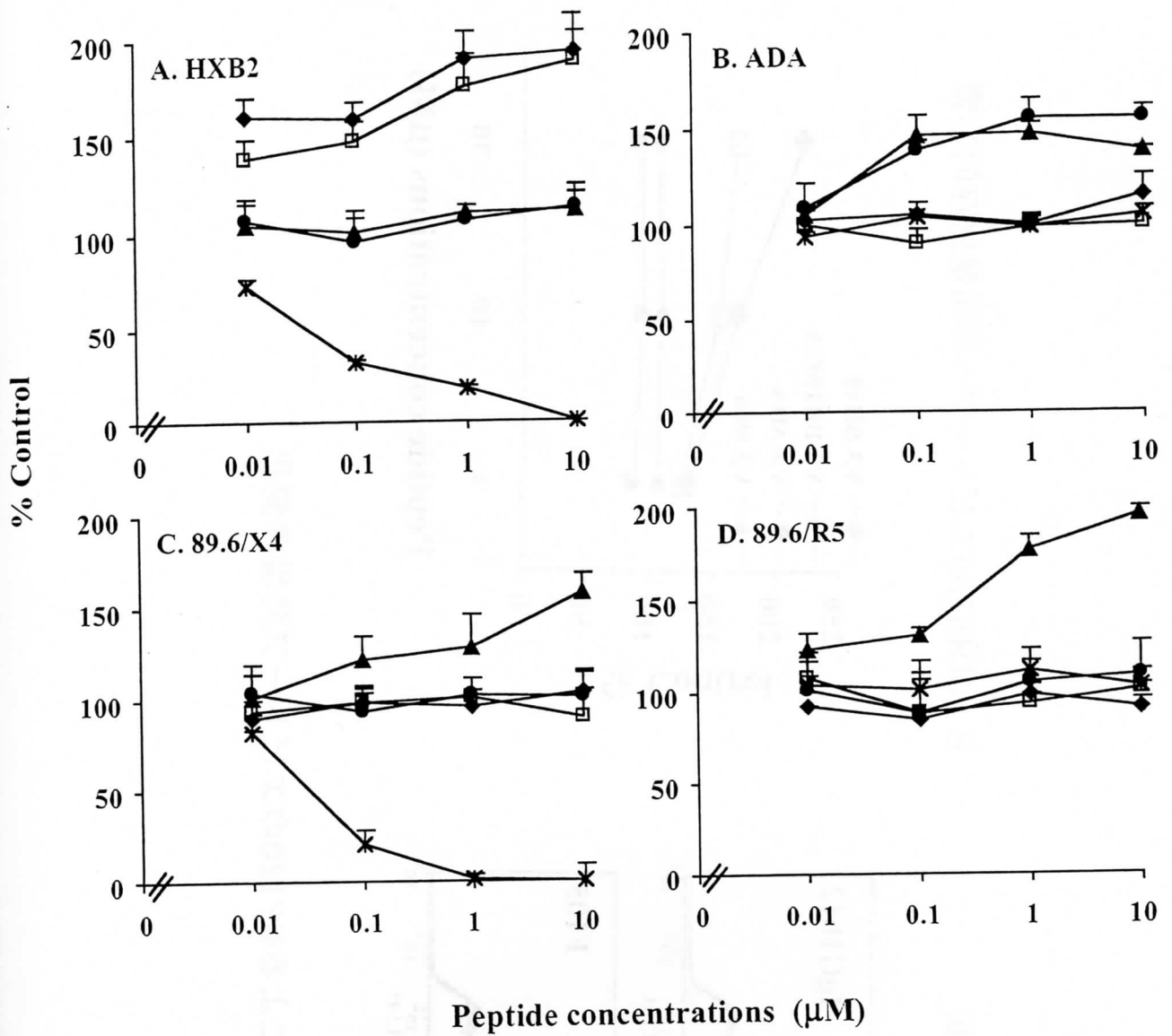
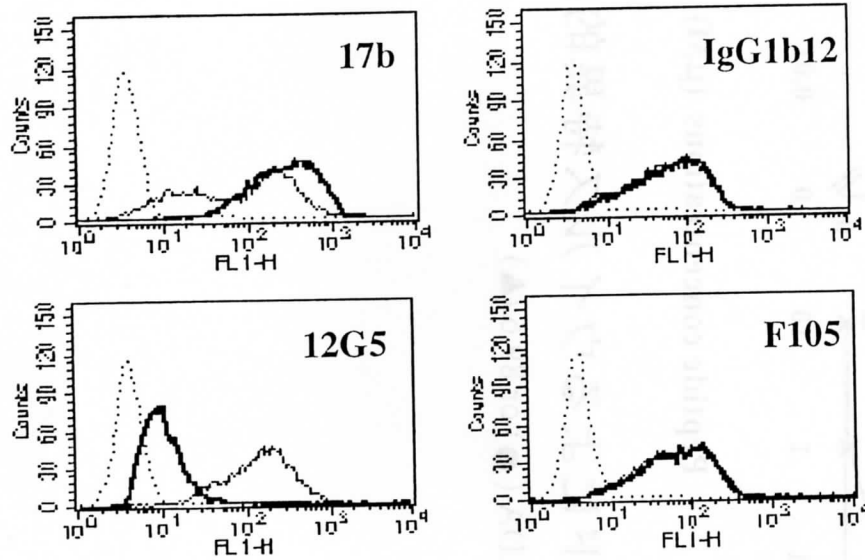


図4 V3 ペプチドによるウイルス特異的感染促進作用。
 BH10 (◆), CA (□), ADA (●) or 89.6 (▲)

A: 4種類の抗体を用いたFacs解析



B: CD4i(17b)エпитープへの用量依存的影響

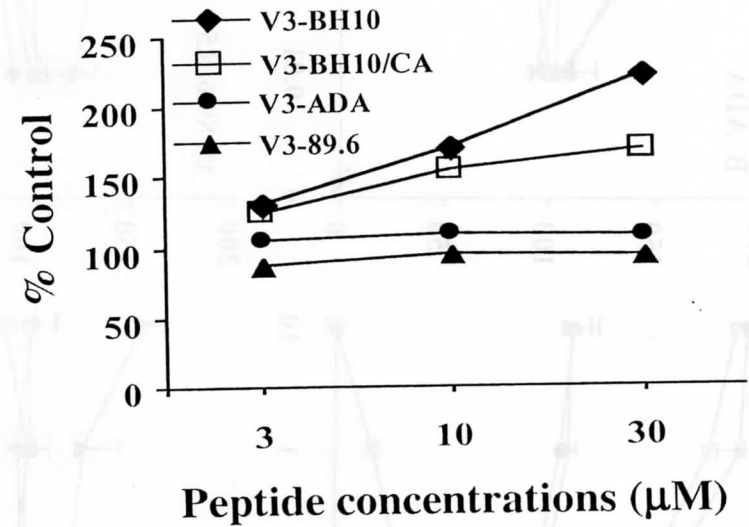


図5 V3ペプチドによるGP120のエピトープ発現の変化

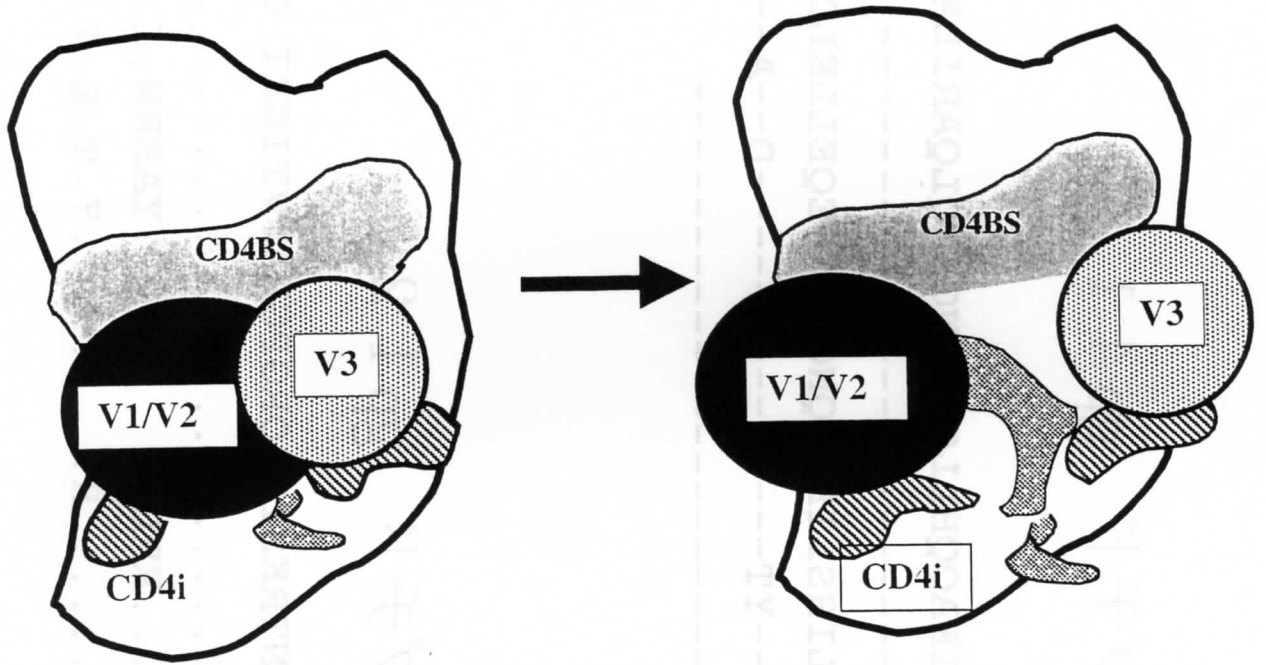


図 6. V1/V2 と V3の相互作用

表1 合成ペプチド gp4 1

DP107 LAI	NNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILAVERYLKDQ
N36 LAI	SGIVQQQ-----
DP178 LAI	YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF
DP178 ADA	--G--YT-----D--A-----
C34 LAI	WMEWDREINN-----

表2 合成ペプチド gp1 2 0

V3-BH10	EINCTRPNNNTRKSIRIQRGPGRAFVTIGKI GNMRQAHCNIS
V3-BH10/CA	...A.....A...
V3-89.6	ESVV.....RRLS.....YARRN.I.DI.....
V3-ADAH.....Y.T.E.I.DI.....

本報告書収録の学術雑誌等発表論文は本ファイルに登録していません。なお、このうち東北大学在籍の研究者の論文で、かつ、出版社等から著作権の許諾が得られた論文は、個別に **TOUR** に登録しております。