

ウイルス・免疫応答

マクロライド誘導体のヒト単球由来マクロファージにおけるマクロファージ指向性HIV-1の増殖能に与える影響について

小室 巖¹⁾ 砂塚敏明²⁾ 大村 智²⁾ 赤川清子¹⁾

はじめに

多くのヒト組織マクロファージ (MΦ) はマクロファージ指向性ヒト免疫不全症候群ウイルス (M-tropic HIV-1) にいずれの時期においても感受性を示すが、無症候性キャリアーの患者においてはウイルスの産生は少なく¹⁾、一方でAIDS期の患者や日和見感染症を合併したHIV-1患者においては、ときに多量のウイルス産生を示すことが知られている²⁾。

最近の研究によれば、HIV-1に対する抗ウイルス療法 (HAART) はウイルスの逆転写酵素活性やウイルスDNAの複製の段階で強い活性を示し、増殖活性の強いCD4⁺Tリンパ球におけるウイルスの増殖を強く抑制するが、ある一定のリンパ網内系組織においては抗ウイルス作用が十分でなくウイルスを排除出来ないことから、これらの組織がウイルスの維持増殖の温床になっていることが報告されている^{3,4)}。

そこで今回我々は、エリスロマイシン (EM) とその誘導体がヒト単球 (Mo) よりコロニー刺激因子 (CSF) にて分化誘導したマクロファージにおけるM-tropic HIV-1の増殖能に与える影響について検討したので報告する。

材料および方法

(1) マクロファージの分化誘導

ヒト末梢血単核細胞 (PBMC) よりCD14 MicroBeadsを用いて磁気細胞分離システム (MACS) (MiltenyiBiotec) により分離したMoにM-CSF及びGM-CSFを添加し37℃、5% CO₂にて7日間培養し分化誘導した。

(2) ウイルス増殖能に対する薬剤の影響

MΦにM-tropic HIV-1のHIV-1_{BaL} (100pg/ml) を

2時間接触感染後、EMやその誘導体を添加した。ウイルス産生は培養上清中のp24抗原量を sandwich-ELISA法にて測定し、ウイルスDNAの有無についてはLTR-gagをプライマーとしたnested-PCR法にて検討し、LTRをプライマーとしたPCR法にて半定量を行った。さらにHck蛋白とC/EBPβ蛋白の発現様式をウエスタンブロット法にて検討した。

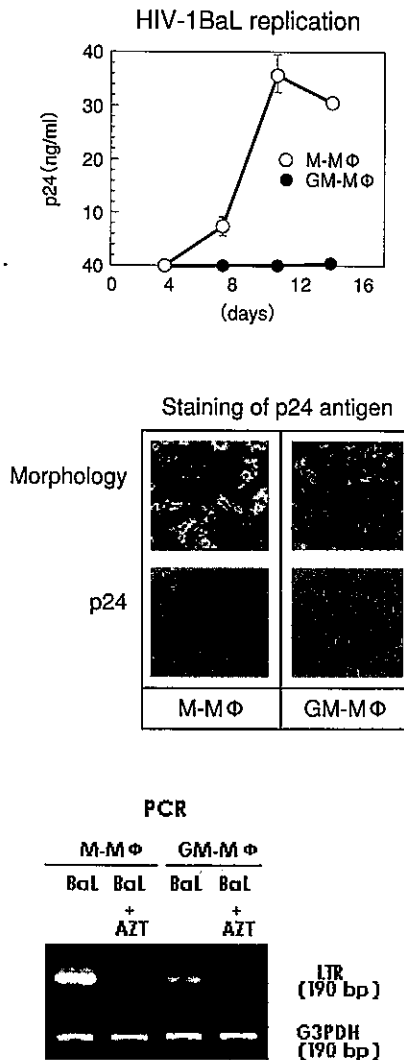
結果

(1) M型MΦとGM型MΦにおけるM-tropic HIV-1の増殖能

形態学的検討、細胞表面マーカーおよび食食能に関する機能面からの検討などから、MoよりM-CSFにて分化誘導したマクロファージ (M型MΦ) は腹腔マクロファージと、GM-CSFにて分化誘導したマクロファージ (GM型MΦ) は肺胞マクロファージ (A-MΦ) と類似の形質を有することが知られていることより⁵⁾、組織MΦにおけるウイルス増殖能をM型MΦとGM型MΦをモデルとして用いて検討した。

HIV-1_{BaL}感染後7日目よりM型MΦで顕著なウイルス産生を認め10日目にピークを迎えたが、GM型MΦでは培養14日目においても殆どウイルスの産生を認めなかった (Fig. 1)。ウイルスの産生を示したM型MΦにおいては、ウイルスの増殖した時期に一致して多核巨細胞の形成が認められたが、ウイルス産生を殆ど認めなかったGM型MΦにおいては、感染前とほぼ同じ形態を示した (Fig. 1)。しかしながらM型MΦのみならずGM型MΦにおいてもウイルスDNAの形成を認めたことから、GM型MΦにおけるウイルス増殖抑制は転写翻訳後レベルで行われていると考えられた (Fig. 1)。

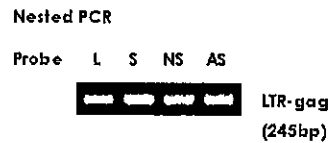
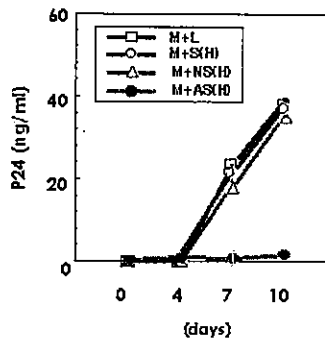
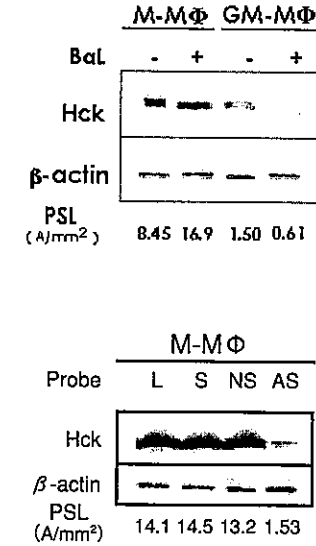
¹⁾ 国立感染症研究所免疫部, ²⁾ 北里研究所

Fig. 1. Different susceptibility of Mo-derived M Φ s to M-tropic HIV-1 infection.

(2) M型M Φ とGM型M Φ におけるHck蛋白およびC/EBP β 蛋白の発現がウイルス増殖能に与える影響

HIV-1のウイルス複製にはnefの活性化および5'-LTR近位の転写活性化を必要とし、これらの活性化に宿主側のHck蛋白およびCCAAT enhancer binding proteinであるC/EBP β 蛋白の発現が関与していることが報告されているため^{6,7)}、M型M Φ とGM型M Φ におけるHck蛋白およびC/EBP β 蛋白の発現をウイルス感染前後で検討した (Fig. 2, 3)。ウイルスに感受性を示したM型M Φ では、Hck蛋白

の発現がGM型M Φ と比較して感染前より高く、感染後にさらに発現が増強したのに対して、ウイルスに抵抗性を示したGM型M Φ ではHck蛋白の発現が低く、感染後にはさらにその発現は抑制された (Fig. 2)。またHckに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド (AS) の添加によるHck蛋白の発現抑制によりM型M Φ でのウイルス産生が抑制されたことから、M-tropic HIV-1の産生にはHck蛋白の発現が必須であることが示された (Fig. 2)。また、AS添加後においてもウイルスDNAの複製を認めたことから (Fig. 2)、Hckの作用点は主に転写

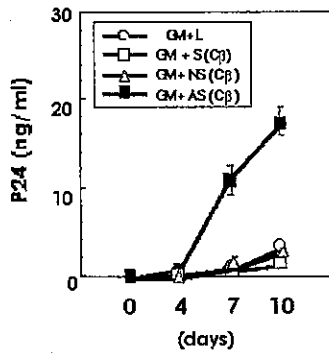
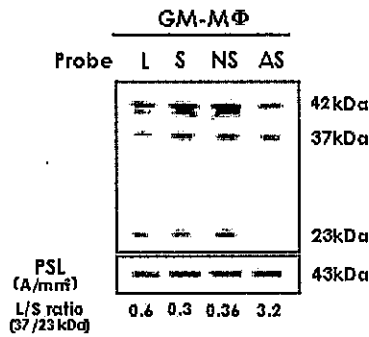
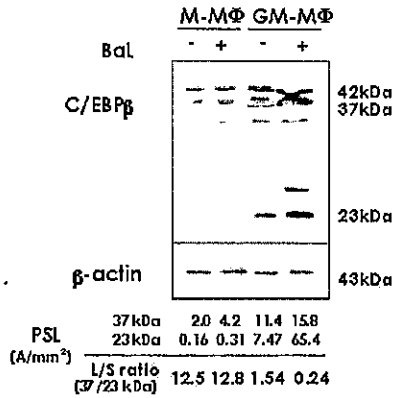
Fig. 2. Effect of AS-Hck on HIV-1_{Bal} replication in M-M Φ .

翻訳レベルにあると考えられた。

Hck蛋白の発現様式とは対称的に、C/EBP β 蛋白の発現は、ウイルスに感受性を示したM型M Φ では、GM型M Φ と比較して感染前後でより低く、ウイルスに抵抗性を示したGM型M Φ ではウイルス感染前でも高く、感染後にはさらにその発現が増強した (Fig. 3)。またM型M Φ では37kDaの高分子型 (L型) の発現が高く23kDaの低分子型 (S型)

が低かったため、L/S比は12以上を示した。しかしながらGM型M Φ ではL型の発現が低くS型が高かったため、L/S比がM型M Φ と比較して極端に低いことが認められた (Fig. 3)。またC/EBP β に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド (AS) の添加によりC/EBP β 蛋白のL/S比が大きくなったGM型M Φ でウイルス産生が認められたことから、M-tropic HIV-1の産生にC/EBP β 蛋白のL/S比の発現

Fig. 3. Effect of AS-C/EBP β on HIV-1_{BaL} replication in GM-M Φ .



Nested PCR

Probe L S NS AS

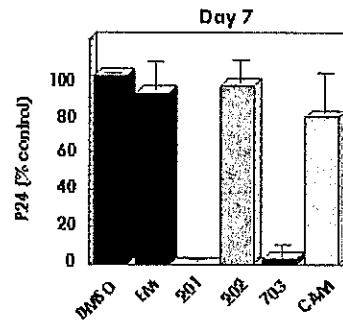
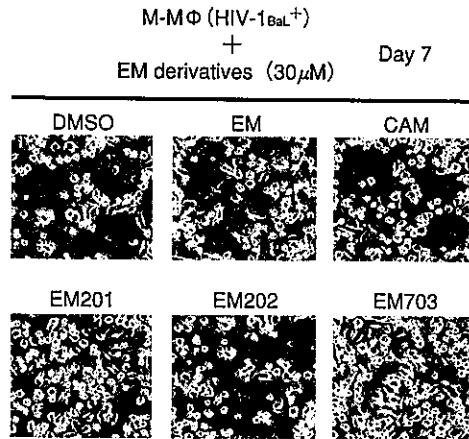


LTR-gag
(245bp)

比率が深く関与することが示された (Fig. 3)。

(3) EMおよびEM誘導体のM型M Φ におけるM-tropic HIV-1の増殖能に与える影響
HIV-1_{BaL}感染後にEMおよびクラリスロマイシ

Fig. 4. Screening of EM derivatives that show an inhibitory effect on HIV-1 replication in M-M Φ judged by inhibition of MGC formation.

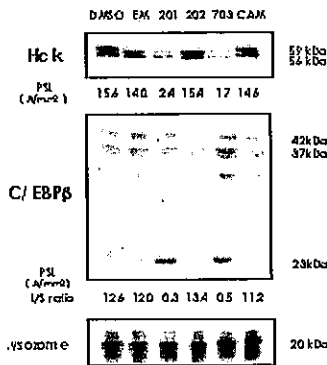
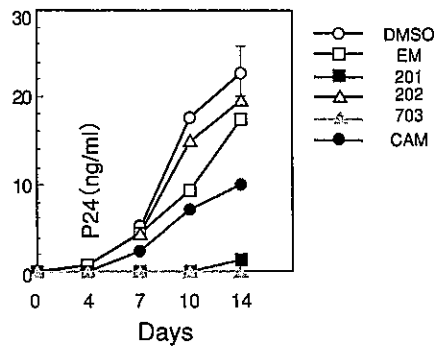


ン (CAM) を添加した群では対照群 (DMSO) とともに培養 7 日目に多核巨細胞の形成を認め、ウイルスの産生を認めたが (Fig. 4), EM の誘導体である EM201⁸⁾, EM703⁹⁾ (Fig. 4), EM732 および EM736 では多核巨細胞の形成を認めず、ウイルス産生も認めなかった。また EM202 (Fig. 4) および EM724 では多核巨細胞の形成とウイルス産生を認めた。しかしながらウイルス産生の抑制を示した EM201 および EM703 においてもウイルス DNA の複製を認めたことから、EM 誘導体による M-tropic HIV-1 の産生抑制は転写翻訳レベルで行われているものと考えられた。さらに EM201 および EM703 を添加後の M 型 M Φ におけるウイルス産生を経時的に検討したところ、培養 14 日目においても十分にウイルス産生の抑制を示したことから、これらの誘導体は長期的な抑制作用を有すると考えられ

た (Fig. 5)。

(4) EM および EM 誘導体の M 型 M Φ における Hck 蛋白と C/EBP β 蛋白の発現に与える影響

EM および EM 誘導体を添加後 48 時間後の M 型 M Φ における Hck 蛋白と C/EBP β 蛋白の発現を検討した。ウイルス産生を抑制した群の EM201 および EM703 を添加された M 型 M Φ では、対照群 (DMSO) と比較して Hck 蛋白の発現が著明に低下し、C/EBP β の S 型の発現が増強し L/S 比の低下を認めた (Fig. 5)。一方で、ウイルス産生の抑制を示さなかった群の EM202 および EM, CAM を添加された M 型 M Φ では、対照群と同様に Hck 蛋白の発現が高く、C/EBP β の S 型の発現は低く L/S 比が高いことが確認された (Fig. 5)。これらの実験結果は EM 誘導体による Hck 蛋白と C/EBP β 蛋白の発現調節が M-tropic HIV-1 のウイルス産生抑制の機構の一

Fig. 5. EM201 and EM703 can induce reciprocal changes of Hck and C/EBP β expression in M-M Φ .

つであることを示唆していた。

考察

今回の実験結果から、EM誘導体の一部にM-tropic HIV-1の産生抑制作用を有するものを見出した。また薬剤の効果判定の際に感染後のM型M Φ における多核巨細胞の形成の有無をみるのが簡単なスクリーニング法として有用であることを示した。

組織マクロファージにおけるM-tropic HIV-1感染後の動態を単球由来マクロファージをモデルとして解析した結果、M-tropic HIV-1の産生抑制作用を有するEM201およびEM703はウイルスに感受性を示すM型M Φ においてHck蛋白の発現抑制とC/EBP β 蛋白の発現調節によるL/S比の低下を誘導し、ウイルス産生を抑制することを明らかにしたが、この結果はウイルスに耐性を示すGM型M Φ でのHck蛋白とC/EBP β 蛋白の発現様式と一致したことから¹⁰⁾、Hck蛋白とC/EBP β 蛋白の発現調節

はウイルス増殖応答に極めて重要な役割を果たしていることを示唆している。

マクロライド誘導体のM-tropic HIV-1のウイルス産生に対する影響を検討した報告は殆どなく、ウイルス産生抑制作用を示したEM201およびEM703の作用機序の解析はHIV感染症の新たな治療薬を開発するうえで、有益なものと考えられた。

参考文献

- 1) LI, S., JUAREZ, J., ALALI, M., *et al.* : Persistent CCR5 utilization and enhanced macrophage tropism by primary blood human immunodeficiency virus type 1 isolates from advanced stages of disease and comparison to tissue-derived isolates. *J. Virol.* 73 : 9741~9755, 1999
- 2) ORENSTEIN, J. M., FOX, C. and WAHL, S. M. : Macrophages as a source of HIV during opportunistic infections. *Science* 276 : 1857~1861, 1997
- 3) ORENSTEIN, J. M., FEINBERG, M., YODER, C., *et al.* : Lymph node architecture preceding and following 6 months of potent antiviral therapy : follicular hyperplasia persists in parallel with p24 antigen resto-

- ration after involution and CD4 cell depletion in an AIDS patient. *Aids* 13 : 2219~2229, 1999
- 4) CROWE, S. M. and SONZA, S. : HIV-1 can be recovered from a variety of cells including peripheral blood monocytes of patients receiving highly active antiretroviral therapy : a further obstacle to eradication. *J. Leukoc. Biol.* 68 : 345~350, 2000
 - 5) AKAGAWA, K. S. : Functional heterogeneity of colony-stimulating factor-induced human monocyte-derived macrophages. *Int. J. Hematol.* 76 : 27~34, 2002
 - 6) SAKSELA, K., CHENG, G. and BALTIMORE, D. : Proline-rich (PxxP) motifs in HIV-1 Nef bind to SH3 domains of a subset of Src kinases and are required for the enhanced growth of Nef+ viruses but not for down-regulation of CD4. *Embo. J.* 14 : 484~491, 1995
 - 7) HENDERSON, A. J. and CALAME, K. L. : CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) sites are required for HIV-1 replication in primary macrophages but not CD4(+) T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 : 8714~8719, 1997
 - 8) 大澤瑞穂, 砂塚敏明, 澤井哲夫, 大村 智, 赤川清子 : エリスロマイシン (EM) 及びその代謝産物 EM201 の IL-2 レセプターシグナル伝達への影響。 *Jpn. J. Antibiotics* 57 suppl. A : 92~94, 2004
 - 9) 砂塚敏明, 大村 智 : 新規マクロライド誘導体 EM703 の創薬。 *Jpn. J. Antibiotics* 57 suppl. A : 114~116, 2004
 - 10) KOMURO, I., YOKOTA, Y., YASUDA, S., *et al.* : CSF-induced and HIV-1-mediated distinct regulation of Hck and C/EBPbeta represent a heterogeneous susceptibility of monocyte-derived macrophages to M-tropic HIV-1 infection. *J. Exp. Med.* 198 : 443~453, 2003