

学位論文題名

ヒト免疫不全ウイルス感染初期過程における

ウィルスー宿主細胞の相互作用

ーレセプター CD4 の部分ペプチドを用いた解析ー

学位論文内容の要旨

1981年に Godliebらにより伝染性疾患として報告された後天性免疫不全症候群(AIDS)は、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)の感染が原因となって誘発される、免疫不全症を特徴とする伝染性疾患である。このウイルスに感染した個体は、平均10年近くもの無症候期を経た後、著しい免疫機能の低下と共に、それまで免疫系の監視により抑制されていた病原性微生物、腫瘍細胞の活動が活発化し、やがてこれらに伴う致死的な疾患を発症する。AIDSは、今後発展途上国を中心に爆発的な流行が確実視され、WHOによれば西暦2000年には世界のHIV感染者の総数は3000-4000万人に達するであろうと予測されているにも拘らず、今迄のところ根本的な治療法は確立されていない。

ウィルスの感染には、ウィルス粒子が宿主細胞に結合し侵入するためのレセプターを必要とする。HIVは、細胞表面に存在する糖タンパク質CD4をレセプタータンパク質として利用し、自らの外被糖タンパク質gp120を介して結合する。CD4は、主要な免疫担当細胞であるヘルパーT細胞や、マクロファージ系の細胞に特異的に発現しているため、これらの細胞がHIVの良い標的細胞となる。HIVの感染に伴って、これら免疫担当細胞は死滅、または機能異常をきたすことにより、感染者の免疫機能は著しく低下する。これが、免疫不全症を惹起する直接的な原因と考えられる。また、AIDS発症患者内のHIVは、無症候期のHIVの性状とは異なり、増殖が速く、毒性も高いウイルスに変化していることが明らかにされている。従って、最初に感受性細胞がHIVに感染する初感染機序の他に、無症候期のHIVの動態および無症候期から発症期に向かうウィルスの活性化機序をそれぞれ反映しているモデル培養細胞系において、それらを遮断する方

法を検討することが、予防および治療の方法を確立する上で重要である。

このような独特な感染様式を示すウイルスに対し、その感染を防御したり、既に感染が成立した個体から排除したりする有効な方策を探るべく、レセプター分子CD4の部分ペプチドを用いて、gp120とCD4との結合を主とするウイルスと宿主細胞の相互作用を解析した。その結果、CD4アナログとして用いたCD4の部分ペプチドの内、イムノグロブリンの3番目の相補性決定領域(CDR3)に対応する領域を含むペプチドに、gp120分子の高次構造変化を誘導する作用に基づくと思われる、HIVの初感染を抑える活性を見いだした。そこで、本CD4ペプチドおよび他のCD4関連試薬を用いて、今回樹立した、無症候期および発症への移行期のウイルス状態を反映するin vitroモデル培養系における「ウイルスと宿主細胞の相互作用」を解析し、これらの感染様式を阻害する薬剤を検討した。本論文の要旨は、以下の3項目である。

1. ヒト白血病由来CD4陽性T細胞株へのHIV感染の初期過程を解析するため、レセプターCD4分子上の、HIVの外被糖タンパク質gp120との結合領域の同定を行なった。多数のCD4部分ペプチドを用いたHIV感染阻害試験およびHIV誘導多核巨細胞形成(細胞間感染)阻害試験の結果、CD4中に存在する、イムノグロブリンの3番目の相補性決定領域(CDR3)に対応する領域を含むペプチドにその活性を認めた。活性を示す最小単位のペプチドであった(66-92)中の84Cysへ、ベンジル基を導入することにより感染阻害活性の増強が認められた。また、CD4ペプチド(68-130)の免疫により抗CD4マウス単クローン抗体を産生している11株のハイブリドーマを樹立した。これらは、部分ペプチドを用いたエピトープマッピングの結果から5型(I-V)に型別された。特に、72-84領域を認識しているI型の抗体が最も強い抗HIV-1活性を示し、ペプチド法から得られた結果と一致した。

2. 本CD4ペプチドの、HIV感染阻害機序を検討した。本ペプチドは、gp120との反応においてgp120の分子内に存在するTrp残基の蛍光スペクトルを減少させた。この結果は、ペプチドとの反応により引き起こされたgp120分子の高次構造変化の反映と考えられた。特に、gp120上の、CD4との結合に関与する領域、ウイルス粒子膜貫通タンパク質であるgp41との結合に関与する領域、V3と呼ばれる領域(高変異性領域であるが、中和抗体および細胞傷害性T細胞の主要なエピトープとして機能し、更に第二のレセプター分子との関与が指摘されている領域でもある)への影響が観察された。即ち本ペプチド

は、これらの領域の機能阻害を介して、感染阻害を引き起こすであろうことが示唆された。またこれらの結果から、CD4のCDR3対応領域は、gp120の高次構造変化の誘導を通じて、ウイルスの吸着から侵入への移行過程に関与していると考えられた。

3. HIV感染を受けた生体は、不完全なウイルス（いわゆる弱毒性ウイルス）による長い持続感染期（無症候期）を経た後に、強毒性ウイルスの出現に伴ってAIDSを発症する。そこで、まずこれらの現象を反映している培養細胞系の確立を試みた。その結果、HIVの急性感染後に、持続感染を成立させた一部の細胞が出現し、この持続感染細胞の中から、非感染性HIV粒子を持続的に産生しているクローン細胞株（感染性は認められないが、粒子単独で多核巨細胞形成誘導能を持つ）を分離することができた。また、これを持続感染のモデル細胞として、この細胞への新たなHIVの感染、すなわち重感染を試みたところ、HIVの初感染時に比べ、ゆっくりではあるが重感染の成立が認められ、しかも重感染細胞は強毒性ウイルスを持続的に産生する細胞に変化していた。そこで、CDR3に対応する領域を含む上記ペプチドの阻害活性を、無症候期に存在するウイルス（持続感染ウイルス）の憎悪機能のモデル系と考えられる不完全粒子による多核巨細胞形成誘導能、および無症候期から発症期への移行期に起こるモデル系と考えられる重感染においてそれぞれ検討した結果、同ペプチドに強い阻害活性を認めた。一方、CD4上のgp120との結合に関与することが既に確立されているCDR2に対応する領域は、この重感染時のレセプターとしては関与していないことが示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 東 市 郎  
副 査 教 授 盛 田 フ ミ  
副 査 教 授 杉 本 和 則  
副 査 教 授 生 田 和 良 (医学研究科)

## 学 位 論 文 題 名

ヒト免疫不全ウイルス感染初期過程における

ウィルスー宿主細胞の相互作用

ーレセプター CD4 の部分ペプチドを用いた解析ー

後天性免疫不全症候群(AIDS)は、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)の感染が原因となって誘発される疾患である。HIVに感染した宿主は、平均10年の無症候期を経た後、著しい免疫機能の低下と共に、感染症や癌などの日和見疾患を発症する。このとき、AIDS発症患者内のHIVは、無症候期のものとは異なり、増殖が速く、細胞傷害性も高いことが明らかにされている。従って、無症候期のHIVの動態および無症候期から発症期に向かうウィルスの活性化機序をそれぞれ反映しているモデルを用いて予防および治療の方法を確立することが重要である。

HIVの感染においては、宿主細胞表面に存在するレセプターのCD4タンパク質と、HIVの外被糖タンパク質gp120との結合が、ウィルス粒子の吸着、侵入の第1段階である。従って、両者の結合を阻害することにより、HIVの感染を阻止することが可能となる。

本研究では、レセプター分子CD4の部分ペプチドを用いて、gp120とCD4との結合を主とするウィルスと宿主細胞の相互作用を解析した。その結果、CD4の部分ペプチドの内、イムノグロブリンの3番目の相補性決定領域(CDR3)に対応する領域を含むペプチドに、gp120分子の高次構造変化を誘導する作用に基づくと思われる、HIVの初感染を抑さえる活性を見いだした。そこで、CD4ペプチドを用いて、今回樹立した、無

症候期および発症への移行期のウイルス状態を反映する *in vitro* モデル培養系における「ウイルスと宿主細胞の相互作用」を解析し、これらの感染様式の阻害活性を検討した。本論文の要旨は、以下の3項目である。

1. HIV感染の初期過程を解析するため、レセプターCD4分子上の、HIVの外被糖タンパク質gp120との結合領域の同定を行なった。HIV感染阻害試験およびHIV誘導多核巨細胞形成阻害試験の結果、CD4中に存在する、イムノグロブリンの3番目の相補性決定領域(CDR3)に対応する領域を含むCD4ペプチド(66-92)にその活性を認めた。CD4ペプチド(66-92)中の84Cysへ、ベンジル基を導入することにより感染阻害活性の増強が認められた。また、CD4ペプチド(68-130)の免疫により抗CD4マウス単クローン抗体を産生している11株のハイブリドーマを樹立した。特に72-84領域を認識している抗体が、最も強い抗HIV活性を示し、ペプチド法から得られた結果と一致した。
2. 本CD4ペプチドの、HIV感染阻害機序を検討した。本ペプチドは、gp120との反応においてgp120の分子内に存在するTrp残基の蛍光スペクトルを減少させた。この結果は、ペプチドとの反応により引き起こされたgp120分子の高次構造変化の反映と考えられた。特に、gp120上の、CD4との結合に関与する領域、ウイルス粒子膜貫通タンパク質であるgp41との結合に関与する領域への影響が観察された。即ち本ペプチドは、これらの領域の機能阻害を介して、感染阻害を引き起こすであろうことが示唆された。以上、CD4のCDR3対応領域は、gp120の高次構造変化の誘導を通じて、ウイルスの吸着から侵入への移行過程に関与していると考えられた。
3. HIV感染を受けた生体は、不完全なウイルス(いわゆる弱毒性ウイルス)による長い持続感染期(無症候期)を経た後に、強毒性ウイルスの出現に伴ってAIDSを発症する。そこで、まずこれらの現象を反映している培養細胞系を確立した。CDR3に対応する領域を含む本ペプチドの阻害活性を、無症候期に存在するウイルス(持続感染ウイルス)の憎悪機能のモデル系と考えられる不完全粒子による多核巨細胞形成誘導能、および無症候期から発症期への移行期に起こるモデル系と考えられる重感染においてそれぞれ検討した結果、同ペプチドに強い阻害活性を認めた。一方、CD4上のgp120との結合に関与すると報告されているCDR2に対応する領域は、この重感染時のレセプターとしては関与していないことが示唆された。