

平成13年度

エイズ医薬品等開発研究

重点研究報告書

第3分野

抗エイズ薬開発のための基盤技術の開発等に関する研究

エイズ治療薬開発のためのマウスモデルの作製とモデルを用いた抗HIV薬の開発研究

所 属 東京大学医科学研究所ヒト疾患モデル研究センター

研究者 岩倉洋一郎

分担研究者

- (1) 名古屋市立大学医学部分子医学研究所分子遺伝 岡本尚
- (2) 東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 免疫治療学分野 神奈木真理
- (3) 北海道大学遺伝子制御研究所 病態研究部門 感染病態分野 志田壽利

要旨

HIV 感染モデルの作製を目的に NOD/SCID マウスを改良した。また、抗エイズ薬の開発を目的に、IL-16、CXCR4 の機能、IFN- γ による Tat 阻害作用、CD8 陽性 CTL 由来のウイルス抑制因子の作用機構、核外輸送因子 CRM1 の機能について解析した。

1. 研究目的

エイズ治療は HAAT 治療法の開発により大きく前進したものの、潜伏ウイルスや薬剤耐性ウイルスなどの問題などを抱えており、新しい治療法の開発は社会的急務である。このためには感染過程を再現できる動物モデルが必須であり、本研究は実用性に優れたマウス実験系を開発し、抗 HIV 薬の評価系として樹立することを第一の目的とする。またこれらのモデルを用い、これまで開発が遅れている HIV 増殖に関わる宿主因子を標的とした抗 HIV 薬の評価を行い、モデルの有用性を検証すると共に、新規抗 HIV 薬開発に資すことを目指す。

SCID-hu マウスは HIV の感染初期を含め、増殖過程を再現できることから有効な感染モデルであるが、移植されたヒト T 細胞が胸線で定着できず、T 細胞の増殖が認められないなどの問題がある。移植されたヒト T 細胞を正しくホーミングさせることを目的として幹細胞のホーミングに作用することが分かっている SDF-1 を胸線で発現する SCID-hu マウスの作製を試みた。また、AIDS 治療薬の開発に必要な基礎研究として、HIV の増殖や遺伝子発現に関与する宿主因子である CCR5、CRM1 及び HIV の増殖抑制機能を持つ CD8 陽性 T 細胞の機能解析を行った。

1) 岩倉

マウスにおける HIV 感染系の確立を目指し、SCID-hu マウスの改良を試みるとともに、HIV 増殖に関与する宿主因子であるヒト CRM1 遺伝子導入トランスジェニックマウスの作製を試みた。SCID-hu マウスは生体内で全増殖過程を再現できることから有効な感染モデルであるが、ヒト臍帯血幹細胞を移植した場

合、T細胞が分化してこないことが問題である。ヒトT細胞前駆体をマウス胸腺環境下においてやると正常なT細胞が分化してくることがわかっているため、SCID-huで効率が悪いのはヒトT細胞前駆細胞がマウスの胸腺にホーミングしないことが原因であると考えられる。そこでヒトT細胞前駆細胞にはCXCR4が発現していることが分かっているため、ヒトSDF-1を胸腺特異的に発現するNOD/SCIDマウスを作製し、移植したヒトT細胞前駆細胞を胸腺にホーミングさせることを試みた。これにより、効率よくヒトT細胞の増殖が見られる感染系の確立を目指す。

同じく、マウスにおけるHIV感染系の確立を目指し、宿主域バリアーの原因となる種々の分子をヒト型化する試みを行っている。これまでに、CD4、CXCR4、CXCR3、CCR5、cyclin Tをヒト型化したトランスジェニックマウスを作製した。しかし、これまでのところこれらの分子をヒト型化するだけではHIVに感受性を示さないことが分かっている。そこで、本研究ではmRNAの核外輸送に参与するCRM1をヒト型化することにした。CRM1はgagやenv mRNAの核外輸送に参与しており、マウスCRM1はうまく機能しないことが志田らにより示されている。そこで、志田らとの共同でヒトCRM1遺伝子を導入したマウスを作製し、HIV感染に対する効果を検討することにした。

第3の研究としてIL-16ノックアウトマウスの作製とその解析を試みた。CD4やCXCR4はHIVのレセプターであり、これらのレセプターの機能を阻害する薬剤、あるいはペプチドはエイズ治療の大きなターゲットとなりうる。しかし、CD4に対する抗体によりHIVの結合を阻害することはHIVの感染を阻害すると同時にリンパ球のアポトーシスを誘導し、また、すでに感染している細胞には効果が低いことから治療としてはあまり有効ではないことがわかっている。IL-16はCD8⁺T細胞によって分泌される121アミノ酸残基のペプチドで、80kDaの前駆体であるpro-IL-16がcaspase-3により切断されてできる。このサイトカインはHIVと同じくCD4に結合することが知られており、HIVのentryを拮抗的に阻害して感染を抑制する。また、IL-16-CD4のシグナルはHIV感染細胞においてHIV遺伝子の複製抑制を示すことが分かっている。IL-16のCD4への結合がT細胞にアポトーシスを誘導することは報告されていない。本年度はIL-16のHIV増殖に対する影響を検討する系を構築するために、IL-16ノックアウトマウスの作製を試みた。

第4の研究としてCXCR4の機能解析を試みた。T細胞上に発現しているCXCR4はHIV感染時のコリレセプターとして機能しており、CXCR4に対する中和抗体及び拮抗的ペプチドを用いたエイズ治療への検討が報告されている。CXCR4のリガンドであるSDF-1からのシグナルがリンパ球細胞の分化、増殖に必須であることが明らかになり、そのシグナルがHIVの増殖に何らかの影響を及ぼす可能性が考えられる。また、CXCR4の生体内での機能を明らかにすることはCXCR4をターゲットとする治療の時に副作用を防ぎ、最大限の効果を得るためにも重要である。そこで本研究では、CXCR4欠損マウスを作製し、その機能を解析した。CXCR4のホモ欠損マウスは出産前後に死亡するため、コンディショナルノックアウトマウスを作製し、解析に用いた。

2) 岡本

HIVがコードする転写活性化因子Tatは、ウイルスの爆発的な複製を可能にしている。Tatの転写伸長促進作用にはcyclin T1とCDK9を含む複合体からなるP-TEFbが必須である。他方、AIDSとならんで重症免

疫不全を起こす疾患として *bare lymphocyte syndrome* (BLS) と呼ばれる先天性免疫不全症候群があるが、BLS は MHC クラス II (MHC II) 遺伝子の転写制御因子である *class II transactivator* (CIITA) の遺伝子レベルの変異で起こる遺伝性疾患である。BLS では MHC II 遺伝子転写の活性化に必要な不可欠な転写活性化因子 CIITA に遺伝子変異が起こっており MHC II の発現誘導ができず、そのため抗原提示細胞 APC 機能が障害され重症型の免疫不全症候群を呈する。さらに、IFN- γ による MHC II の発現誘導には CIITA によることが示されている。AIDS においては HIV の APC への感染が Tat による CIITA の機能障害を引き起こし、その結果 BLS と同様に APC による抗原認識レベルでも免疫不全を引き起こしていることを昨年度報告した (*Immunity* 12:61-70, 2000)。また逆に、CIITA の発現が Tat の機能を抑え HIV の増殖を抑えることも報告した (*BBRC* 279:494-499, 2000)。以上より、IFN- γ などによる CIITA の誘導が AIDS の病態進行を抑える可能性が示唆されたのでそれに対する実験を行なった。

3) 神奈木

頻回 HIV 感染の危険に曝された非感染者の中に HIV 特異的 T 細胞応答を示す者があることが知られている。これは、明らかに HIV-1 の感染があったにも拘らず、これらの個体では検出可能なレベルの持続感染に移行しなかったことを示している。遺伝的な HIV 感染レセプター異常で説明されるのは、このような現象の一部であり、多くの場合は機序不明である。これらの個体では、HIV-1 特異的免疫応答はウイルスの曝露後におこったと考えるのが妥当である。従って、それ以前に HIV 感染播種を制限した何か別のメカニズムが既存したことになる。このことは、自然感染の中にワクチン効果を誘導できる感染条件があるか、あるいは感染局所で HIV 非特異的な防御システムが働いたかのいずれかを意味する。我々はこれまで、CD8 陽性細胞が MHC-I 非拘束的にウイルス産生を抑制することを報告してきた。このような細胞は、上記の HIV 非特異的防御システムの一つと考えられる。

本研究の目的は、類似の HIV 抑制性活性を持つ CD8 陽性免疫細胞の誘導である。生体でこのような細胞が誘導できれば、HIV-1 初期感染の拡大が制限され、これにより持続感染への移行を阻止できる可能性がある。

4) 志田

HIV はスプライシングを制御することにより、数多くの遺伝子を小さなゲノムにコードしている。スプライシングを制御する因子として Rev を自身がコードしている。Rev はイントロンを含む gag や env mRNA の細胞質への発現に必要である。また、HTLV-I は同様の機能を持つ Rex をコードしている。Rev/Rex は細胞質で合成後核内に移入し、ウイルス RNA と結合して核外に輸送する。Rev と Rex はその機能を果たすために核内移入シグナル(NLS)と核外移行シグナル(NES)を有している。Rev/Rex が RNA を搬出するためには、Rev/Rex の単一分子では不十分であり、RNA 上で多量体化することが必要である。Rev/Rex の NES に結合する主要コファクターとして hCRM1 が同定された。我々は hCRM1 が Rev/Rex を核外に運ぶだけでなく、Rex の多量体化に必要であることを報告してきた。

しかし、Rev の多量体化に関しては相矛盾する報告がされている。まず、Rev の NES 変異体が低い多量

体化能を持つことが報告されている。このことは CRM1 が多量体化に関与することを示唆している。他方、野生型 Rev と NES 変異 Rev を共発現すると野生型 Rev の局在が変化する。このことは両者が CRM1 なしにヘテロオリゴマーを形成しうることを示唆している。さらに、in vitro で精製した Rev 蛋白が RNA 上で多量体化することが報告されている。そこで我々は今年度 CRM1 の Rev 多量体化への関与を in vivo と in vitro の系で詳細に検討した。

ラットは以前より HTLV-1 の感染モデル動物として使用されてきた。しかし、体内でのウイルス増殖が悪く不完全なモデルであった。最近、HTLV-1 の感染したラット細胞内では、tax/rex の mRNA は十分合成されているにもかかわらず、gag と env の mRNA 量が非常に少ないことが報告された。このことは Rex の働きが悪いことを示唆している。そこでラット rcrm1 cDNA をクローニングして、Rex と Rev のコファクターとしての活性を hCRM1 と比較検討した。

2. 研究方法

1) 岩倉

- a. ヒト SDF-1 遺伝子をクローン化し、マウス CD4 エンハンサー・プロモーターの制御下で SDF-1 を発現するコストラクトを作製した。マイクロインジェクション法により、(NOD/shi+/+ x NOD/LiSz scid/scid) F1 マウスの受精卵に導入し、トランスジェニックマウスを作製した。トランスジーンである SDF-1 の発現はノザン解析で確認した。また、ヒト Cordblood から造血幹細胞(CD34+)を精製し、トランスジェニックマウスに移植し、その定着、及び各種の血液細胞への分化増殖を検討した。
- b. IL-16 ノックアウトマウスの作製はまず、E14. 1 ES 細胞を用い、相同遺伝子組み替えによりエクソン 5、6 を欠損させ、代わりに Red Fluorescence Protein 遺伝子を挿入した。その後、ES 細胞凝集法によりキメラマウスを作製し、キメラマウスを野生型マウスと交配させ、ヘテロノックアウトマウスを得た。
- c. CXCR4 のエクソン 2 を lox P で挿んだコンストラクトを作製し、ノックインマウスを作製した。Cre 遺伝子を lck プロモーター制御下で発現するマウスと Mx プロモーター制御下で発現するマウスを入手し、掛け合わせるにより、組織特異的に CXCR4 遺伝子を欠損させたマウスを作製した。

2) 岡本

- a. 薬および抗体：組換えヒト IFN γ と TNF α は市販のものを用いた。Simvastatin は和光純薬、抗 STAT1 と抗 Cyclin T1 抗体およびリン酸化型 STAT1 に対する抗体はそれぞれ Santa Cruz 社および Cell Signaling Technology 社より購入した。
- b. 細胞株およびウイルス：HIV-1 潜伏感染細胞株である OM10.1 以外に HL60、Jurkat、THP1 および Tat を構成的に産生する THP1/Tat 細胞株(Merin et al. FEBS Lett. 394:9-13,1996)を用いた。HIV-1 full-length proviral DNA を含むプラスミッドとしては pNLA-3 を用いた。細胞からのウイルス産生量は、培養細胞上清中のウイルス p24 抗原量を p24 antigen capture ELISA assay (RetroTek 社)により定量した。
- c. 細胞表面 MHC II 抗原の測定：細胞表面での MHC II (HLA-DR, HLA-DP)の発現は FACS によって

解析した。

- d. luciferase 検定：種々の luciferase (luc) 遺伝子発現プラスミッドとエフェクタープラスミッドの細胞への導入には lipofectamine を用いた。24 時間後、細胞から蛋白を抽出し、luc 活性を測定した。
- e. ウェスタンブロット法：細胞抽出液の作成およびウェスタンブロット法は既に報告した方法(Oncogene 18:5177-5186; J. Biol. Chem. 275:4383-4390,2000)に拠った。

3) 神奈木

- a. 我々のこれまでの研究で、無症候 HIV-1 キャリアの CD8 陽性細胞が PBMC 感染標として HIV-1 抑制効果をあらわすことが分かっている。しかし、感染者の CD8 陽性細胞中には HIV-1 特異的 CTL が多数含まれるため、HIV-1 抑制効果が HIV-1 特異的細胞傷害性の結果であることを否定できない。そこで、HIV-1 に特異性を持たず、HIV-1 抑制能を有する CD8 陽性細胞の誘導を試みる。誘導刺激の候補として、種々のマイトゲン、既感作抗原、スーパー抗原等を考慮したが、まず、HIV-1 とは無関係の抗原に対する CD8 陽性 CTL の誘導を試験内で行った。抗原としてはアロ細胞を選択した。
- b. 誘導した CTL の抗原特異性を調べるため、種々の細胞と 72 時間混合培養を行い、最後の 16 時間の Thymidine 取り込みをベータカウンターで測定した。この際、混合培養前に、刺激細胞マイトマイシン C あるいはホルマリンで処理し、CTL の DNA 合成のみを検出できるようにした。CTL の細胞傷害活性は ⁵¹Cr 遊離法で行った。このため、標的細胞を ⁵¹Cr で標識し 6 時間種々の比率で CTL と混合培養した後上清中の ⁵¹Cr を測定した。
- c. HIV-1 抑制能の検定のため、アロ特異的 CTL と HIV-1 に感染させた自己 PBMC とを混合培養し、上清中に産生された HIV-1 量を HIV-1 p24 ELISA 法により経時的に測定した。HIV-1 株としては T 細胞親和性の NL4-3 株 (CXCR 4 使用) とマクロファージ親和性 NFN-SX (CCR5 使用) を用いた。NL4-3 株と NFN-SX は HIV-1 gp120 V3 領域のみを異にする。両株とも東北大学小柳義夫博士より供与された。
- d. 感染方法として急性感染系と持続感染系の両者を用いた。急性感染系では PHA 刺激 PBMC を試験管内で HIV-1 と 37°C 2 時間感染させた後 PBS で洗い、96 ウェルマイクロプレートに 10⁵/well で撻き、種々の数の CTL と混合培養した。持続感染系では、PHA 刺激 PBMC に HIV-1 を感染させた後 1 週間 IL-2 存在下で培養し、アッセイ前日から AZT を 10μg/ml 添加した。翌日これを PBS で洗った後種々の数の CTL と混合培養した。この培養中にも AZT を添加した。いずれの場合も CTL との混合培養中には IL-2 を加えた。

4) 志田

- a. プラズミド：Rev, Rex, hCRM1 などの発現に pSRα296 を用いた。
- b. レポーター：Rev 活性測定のための pDM128 (HIV ゲノムの tat-env 領域のイントロンに CAT 遺伝子を挿入したもの)、HTLV-I の Rex 活性測定用 pDM128RXRE (pDM128 に HTLV-I の LTR を挿入したもの) を用いた。
- c. mRNA の発現の測定：レポーターと Rev/Rex 発現プラスミッドをヒト HeLa とラット Ref52 細胞にコ

トランスフェクションした。上記レポーターからのイントロン部分を持つ mRNA のみが CAT をコードしている。従って、CAT 蛋白を ELISA 法によって定量することにより mRNA 量の定量に換えた。トランスフェクション効率を補正するために、pCDMβ-gal をいつもコトランスフェクションした。

- d. Two hybrid assay による蛋白質間相互作用の測定：Gal4 の DNA 結合領域と目的蛋白の融合蛋白を発現するプラズミドと、他方 VP16 の活性化領域と目的蛋白質の融合蛋白発現プラズミドを構築した。これらのプラズミドとレポーターである pGB5CAT (または pG5Luc) を細胞にコトランスフェクトして、CAT(またはルシフェラーゼ)の生産量を測定することにより蛋白質間相互作用の指標とした。
- e. コファクター活性の測定：優性阻害変異体である TAgRexM64 やは細胞のコファクターを奪うことによって Rev/Rex の活性を阻害する。leptomycin B (LMB)は特異的な CRM1 の阻害剤である。そこで、まず、TAgRexM64 や LMB によって Rev/Rex の活性を抑えてから、CRM1 を過剰発現させてやることによって活性が回復するかどうかでコファクター活性を測定した。
- f. リコンビナント蛋白の調製:pET-CRM1 と pET-RanQ69L を大腸菌 BL21 に導入した。両蛋白とも FPLC を用い、数種のカロムクロマトグラフィーによって精製した。RanQ69L には GTP を負荷した。

3. 研究成果、及び考察

1) 岩倉

a. HIV 感受性マウスの作製のために、ヒト SDF-1 を CD4 プロモーターの制御下に発現させるコンストラクトを作製した。この DNA を NOD-Scid/+マウスの受精卵に導入し、トランスジェニックマウスを作製した。このマウスは予想通り、胸線で強く SDF-1 を発現していた。掛け合わせにより、NOD-Scid/Scid トランスジェニックマウスを作製し、ヒト Cordblood 造血幹細胞を移植し、マウス骨髄及び末梢血での T 細胞の増殖を検討した。個体によって異なる結果を示しているが、ヒト SDF-1 の強制発現により移植されたヒト幹細胞由来のリンパ球の増殖が確認できた。

b. IL-16 染色体遺伝子をクローン化し、エクソン 5、6 を欠損させ、代わりに Red Fluorescence Protein 遺伝子を発現するコンストラクト作製した。このコンストラクトを ES 細胞に導入し、相同組み換え体を単離した。その ES 細胞を用いてキメラマウスを作製し、キメラマウスと野生型マウスとの掛け合わせでヘテロ欠損マウスが得られた。現在、ヘテロ欠損マウスを用いた兄妹交配でホモ欠損マウスを作製中である。ホモ欠損マウスが得られたら、免疫担当細胞の機能異常及び HIV の遺伝子発現に対する影響を検討する予定である。

c. CXCR4 のコンディショナルノックアウトマウスを作製することに成功した。このマウスと Mx-cre マウスとの掛け合わせで得られた子孫マウスに polyI:C を投与したところ、骨髄細胞での CXCR4 遺伝子の欠損が確認できた。また、lck-cre マウスと掛け合わせたところ、T 細胞特異的に CXCR4 が欠損されることが確認できた。CXCR4 遺伝子の欠損による T 細胞の分化増殖への影響を検討したところ、ノックアウトマウスでは胸線、脾臓及びリンパ節での T 細胞の数が野生株マウスの 2/3 程度に減少していることがわかった。その原因として考えられるアポトーシスの増加を確認するため、TUNEL 法を用いて胸線を染色したところ、アポトーシス細胞の割合が約 2 倍増加していることがわかった。また、BrdU を用いて生体内での T 細胞の代謝速度を調べたところ、2 倍程度亢進していた。この結果から CXCR4 からのシグナルが T 細

胞の生存に重要な役割を果たしていることがわかった。HIV 感染者においては T 細胞表面上の CXCR4 の発現が減少することが報告されており、感染者では CXCR4 シグナルが入りにくいため、T細胞がアポトーシスを起こす可能性が考えられる。逆に、HIV が CXCR4 に結合することにより、アポトーシス阻害シグナルが入る場合は、ウイルスの増殖に有利に働いている可能性も考えられる。今後これらの点を明らかにしたい。

2) 岡本

a. まず IFN γ による HIV-1 潜伏感染細胞 OM10.1 からのウイルス産生に対する効果を検定した。OM10.1 細胞に TNF α 刺激を加えることにより著しいウイルス産生の誘導が起こった。しかしながら、種々の濃度の IFN γ であらかじめ細胞を処理することにより TNF α によるウイルス産生が濃度依存性に低下した。

また、STAT1 およびその活性化型であるリン酸化された STAT1 をウエスタンブロット法により見たところ、IFN γ 刺激5分後より STAT1 の活性化が認められ、しかも IFN γ の濃度に依存していた。他方、cyclin T1 の量には変化が見られなかった。

さらに、IFN γ による CIITA 誘導は CIITA に対する良い抗体がないため MHC II の発現をモニターした。ヒト単球系細胞株 THP-1 に IFN γ を作用させたところ MHC II の発現は約 15 倍に増加したことから CIITA 活性の誘導が確認された。

次に、これらの IFN γ の効果が Tat 作用を抑制するために起こっているかを見るために HIV-1 LTR をプロモーターに持つ luciferase reporter プラスミッドからの遺伝子発現の Tat によるトランス活性化に対する IFN γ の効果を検定した。HL60 および Jurkat いずれの細胞株においても、IFN γ による Tat のトランス活性化に対する著明な抑制作用が確認された。

Kwakら(Swiss Med. Wkly 131:41-46,2001)およびSadeghiら(Transplantation 71: 1262- 1268, 2001)により少なくとも血管内皮細胞では HMG CoA reductase 阻害剤である statin 系化合物が CIITA の誘導を障害することを報告している。そこで、まず IFN γ 処理に伴う STAT1 活性化と MHC II 誘導に対する simvastatin の効果を検定したが、種々の濃度の simvastatin による効果は認められなかった。同様に OM10.1 において simvastatin の効果を検定した。上記の実験と同様 IFN γ 投与による TNF α 刺激に伴うウイルス産生誘導の抑制に対して、simvastatin は最大 5 μ M 投与しても作用を認めなかった。

今回の一連の実験から、IFN γ による HIV 複製抑制作用が Tat のウイルス遺伝子発現トランス活性化作用の抑制によることが明らかになった。このことは IFN γ もしくはその inducer が HIV-1 感染者に対して発症予防の作用をするであろうことを強く示唆した。

ウイルス増殖と免疫不全の病態進行には Tat が重要な作用をしているとともに、CIITA の過剰発現もしくは活性誘導によりこれらの病態の逆行が可能であることが示された。実際に、HIV-1 感染者の血清中の IFN γ の濃度とウイルス負荷量が逆相関し、長期未発症例では γ IFN 濃度の高い患者が多い(Bailer et al., J. Immunol. 162: 7534-7542, 1999)ことからこれらの可能性が裏付けられる。

3) 神奈木

CD8 陽性 PBMC を試験管内でアロ細胞で繰り返し刺激することにより IL-2 存在下に長期生存する細胞

株を得た。3H-Thymidine 取り込み法では、この細胞は刺激に用いたアロ細胞にのみ反応して DNA 合成を行うが自己 EBV トランスフォーム B 細胞株や自己 PHA 刺激 PBMC には反応しなかった。また、アロ刺激後数日は IL-2 存在下で増殖するが、その後は次回同刺激を行うまで増殖は停止し、典型的な抗原特異的 T 細胞株の増殖パターンを示した。細胞傷害アッセイでは、刺激に用いたアロ細胞に対して強い細胞傷害性を示すが自己 EBV トランスフォーム B 細胞株や自己 PHA 刺激 PBMC には反応せず、NK 細胞の標的である K562 細胞株に対しても傷害性を示さなかった。従って、誘導された IL-2 依存性細胞株はアロ細胞に特異的な CD8 陽性 CTL であることが分かった。

この CD8 陽性 CTL が自己 PBMC に対して反応性を持たないことから、抗原非特異的な HIV-1 抑制効果を調べる標的細胞として PHA 刺激自己 PBMC を用いた。まず、HIV-1 の急性感染系では、感染 PBMC の HIV-1 産生量がはじめの 1 週間で等比級数的に増大することを確認した。しかし、CTL が培養中に存在するとこの HIV-1 産生は CTL 数依存的に抑制された。アロ特異的 CTL による抑制は CCR5 使用 HIV-1 株を用いた場合も CXCR4 使用 HIV-1 株を用いた場合も同様に認められた。

持続感染系では、4 日間の培養中に感染 AZT 存在下に PBMC は安定した HIV-1 産生を行った。CTL との混合培養ではやはり CTL 数依存的に HIV-1 産生抑制が認められた。持続感染における CTL の HIV-1 抑制効果は、急性感染系ほど顕著ではないが、PHA 刺激 CD8 陽性 PBMC に比べると強い抑制が認められた。このアロ特異的な CD8 陽性 CTL による HIV-1 抑制は急性感染系で顕著に認められ持続感染系では弱い。従って、急性感染の抑制機序と持続感染系で認められる抑制機序が一致するかどうかについては疑問が残る。PHA 刺激 CD8 陽性 PBMC ではこのような抑制は再現できないので、少なくとも混合培養による非特異的な抑制ではないと考えられる。抑制機序の解明にはさらに解析が必要である。

4) 志田

Rev と Rex の多量体化に CRM1 が関与していることを *in vivo* で示すために、two hybrid assay 時に LMB を添加して影響を調べたところ、CRM1 が Rev/Rex の多量体化を促進していることを示唆する結果が得られた。ラット細胞中で Rex の活性を測定したところ、活性がほとんど検出できなかった。ラット細胞中での Rex の機能不全の原因を追求するために、ラットの *rcrm1* cDNA を RT-PCR 法によってクローニングした。hCRM1 または rCRM1 の Rex に対するコファクターとしての活性を検討した。その結果、rCRM1 は Rex に対して働かないことが分かった。次に、ラット細胞に hCRM1 をトランスフェクトすると Rex が働くようになった。この結果より、ラット細胞で Rex が効率よく働けない原因が rCRM1 にあることが分かった。次に、rCRM1 がコファクターとして働けない機構を検討した。Rex の多量体化促進能を *in vivo* と *in vitro* で調べたところほとんどないことが分かった。このことは、rCRM1 がコファクターとして働けないのは Rex の多量体化支持能欠如に原因がある事を示している。hCRM1 と rCRM1 キメラ分子を作製して性質を調べることにした。679 番目のアミノ酸を境に N 末端が hCRM1 で C 末端側が rCRM1 の配列を持つ hrCRM1 と逆の rhCRM1 を作製した。hrCRM1 は Rex に対して rhCRM1 よりも弱い結合能を持つにもかかわらず、hCRM1 とほぼ同等の多量体化促進能を持ち、従って、Rex の活性を支持した。この結果は、Rex の多量体化を支持する能力は効率的な結合とは独立した機能であることを示している。我々は hCRM1 が単に Rev と Rex を核外に輸送するだけでなく、多量体化にも関与していることを *in vivo* と *in vitro* で証明

した。実験結果を総合して、我々は「Rev が自身の持つ能力で弱く 2 量体を形成しはじめる、続いて hCRM1 が Ran-GTP と共に Rev の NES に結合することによって Rev-Rev 相互作用を強めて安定な多量体形成を促す」というモデルを提唱する。Rex の場合はそれ自身の 2 量体形成能が弱いために、上記の CRM1 依存的なステップがよりクローズアップされると考えられる。

4. 結論

- 1) 胸腺特異的にヒト SDF-1 を発現する NOD/SCID マウスの作製に成功した。このマウスではヒト造血幹細胞からのリンパ球の増殖が良く、ウイルス感染モデルとして有用である可能性が示唆された。
- 2) IL-16 遺伝子のノックアウトマウスが得られ、エイズ発症における役割を検討することが可能になった。
- 3) CXCR4 のコンディショナルノックアウトマウスを作製することに成功した。CXCR4 からのシグナルが T 細胞の生存に重要な役割を果たしていることがわかり、エイズ発症への関与が示唆された。
- 4) IFN γ による HIV 複製抑制作用が Tat のウイルス遺伝子発現トランス活性化作用の抑制によることが明らかになった。このことは IFN γ もしくはその inducer が HIV-1 感染者に対して発症予防の作用をするであろうことを強く示唆した。
- 5) HIV-1 に特異性を持たない活性化 CTL も、PBMC に対して HIV-1 抑制能を持つことが分かった。このような HIV-1 非特異的な CTL による HIV-1 抑制が存在することは、今後、HIV-1 感染防御方法開発の可能性を広げるものである。
- 6) Rev の多量体化形成プロセスとして、最初 2 量体を形成した後、CRM1 が Ran-GTP と共に Rev の NES に結合することによって Rev-Rev 相互作用を強めて安定な多量体形成を促すことが示唆された。
- 7) Rex の NES との結合と多量体化促進能は CRM1 内の別のドメインが担うことが明らかになった。

5. 研究発表

原著論文

1. Takeda, K., Hayakawa, Y., Smyth, M. J., Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Kakuta, S., Iwakura, Y., Yagita, H., and Okumura, K. Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. *Nature Medicine*, **7**, 94-100 (2001).
2. Seino, K., Fukao, K., Muramoto, K., Yanagisawa, K., Takada, Y., Kakuta, S., Iwakura, Y., Van Kaer, L., Takeda, K., Nakayama, T., Taniguchi, M., Bashuda, H., Yagita, H., and Okumura, K. Requirement for NKT cells in the induction of allograft tolerance. *Proc. Natl. Acad. U. S. A.*, **98**, 2577-2581 (2001).
3. Norose, K., Mun, H. S., Aosai, F., Chen, M., Hata, H., Tagawa, Y., Iwakura, Y., Yano, A. Organ infectivity of *Toxoplasma gondii* in interferon-g knockout mice. *J. Parasitol.*, **87**, 447-52 (2001).
4. Yoneto, T., Waki, S., Takai, T., Tagawa, Y., Iwakura, Y., Mizuguchi, J., Nariuchi, H., and Yoshimoto, T. A critical role of Fc receptor-mediated antibody-dependent phagocytosis in the host resistance to blood-stage *Plasmodium berghei* XAT infection. *J. Immunol.* **166**, 6236-6241 (2001).

5. Hayakawa, Y., Takeda, K., Yagita, H., Kakuta, S., Iwakura, Y., Van Kaer, L., Saiki, I., and Okumura, K. Critical contribution of IFN-gamma and NK cells, but not perforin-mediated cytotoxicity, to anti-metastatic effect of alpha-galactosylceramide. *Eur J Immunol.* **31**, 1720-1727 (2001).
6. Shibata, S., Kakuta, S., Hamada, K., Sokawa, Y., and Iwakura, Y. Cloning of a novel 2', 5'-oligoadenylate synthetase-like molecule, Oasl5 in mice. *Gene*, **271**, 261-271 (2001).
7. Nakae, S., Asano, M., Horai, R., Sakaguchi, N., and Iwakura, Y. IL-1 enhances T cell- dependent antibody production through induction of CD40L and OX40 on T cells. *J. Immunol.*, **167**, 90-97 (2001).
8. Yasuda, J., Miyao, T., Kamata, M., Aida, Y., and Iwakura, Y. T cell apoptosis causes peripheral T cell depletion in mice transgenic for the HIV-1 *vpr*. *Virology*, **285**, 181-192 (2001).
9. Kotani, N., Asano, M., Iwakura, Y., and Takasaki, S. Knockout of mouse b1,4-galactosyltransferase-I gene results in a dramatic shift of outer chain moieties of N-glycans from type 2 to type 1 chains in hepatic membrane and plasma glycoproteins. *Biochem J.*, **357**, 827-834 (2001).
10. Sato, M., Chamoto, K., Tsuji, T., Iwakura, Y., Togashi, Y., Koda, T., and Nishimura, T. Th1 cytokine-conditioned bone marrow-derived dendritic cells can bypass the requirement for Th functions during the generation of CD8(+) CTL. *J. Immunol.*, **167**, 3687-3691 (2001).
11. Dal, J. H., Iwatani, Y., Ishida, T., Terunuma, H., Kasai, H., Iwakura, Y., Fujiwara, H., and Ito, M. Glycyrrhizin enhances interleukin-12 production in peritoneal macrophage. *Immunology*, **103**, 235-243 (2001).
12. Miura, T., Kudo, T., Matsuki, A., Sekikawa, K., Tagawa, Y., Iwakura, Y., Nakane, A. Effect of 6-Hydroxydopamine on host resistance against *Listeria monocytogenes* infection. *Infect. Immun.*, **69**, 7234-7241 (2001).
13. Nakae, S., Naruse-Nakajima, C., Sudo, K., Horai, R., Asano, M., and Iwakura, Y. IL-1a, but not IL-1b, is required for contact-allergen-specific T cell activation during the sensitization phase in contact hypersensitivity. *Int. Immunol.*, **13**, 1471-1478 (2001).
14. Kyuwa, S., Kawamura, S., Shibata, S. Machii, K., Tagawa, Y., Iwakura, Y., and Urano, T. The severity of hepatic lesion after intraperitoneal JHMV infection in IFN-gamma deficient mice is parallel to viral replication in hepatocytes *in vitro*. *Adv Exp Med Biol.*, **494**, 95-99 (2001).
15. Moshkin, M. P., Tamagawa, A., Kolosova, I. E., Gerlinskaya, L. A., Iwakura, Y., and Endo, Y. Social behavior in male mice deficient in genes for interleukin-1. *Med. Immunol.*, **3**, 449-457 (2001). (In Russian)
16. Yokoyama, H., Yasuda, J., Okamoto, H., and Iwakura, Y. Pathological changes of renal epithelial cells in mice transgenic for the TT virus ORF1 gene. *J. Gen. Virol.*, **83**, 141-150 (2002).
17. Saijo, S., Asano, M., Horai, R., Yamamoto, H., and Iwakura, Y. Suppression of autoimmune arthritis in IL-1-deficient mice in which T cell activation is impaired due to low levels of CD40L and OX40 expression on T cells. *Arth. Rheum.*, **46**, 533-544 (2002).
18. Kakuta, S., Tagawa, Y., Shibata, S., Nanno, M., and Iwakura, Y. Inhibition of B16 melanoma experimental metastasis by interferon-g through direct inhibition of cell proliferation and activation of anti-tumor host mechanisms. *Immunology*. **105**, 92-100 (2002).
19. Nagai, Y., Shimazu, R., Ogata, H., Akashi, S., Sudo, K., Yamasaki, H., Hayashi, S., Iwakura, Y., Kimoto, M., and

- Miyake, K. Requirement for MD-1 in cell surface expression of RP105/CD180 and B-cell responsiveness to lipopolysaccharide. *Blood*. **99**,1699-1705 (2002).
20. Kyuwa, S., Shibata, S., Tagawa, Y., Iwakura, Y., Machii, K., and Urano, T. Acute hepatic failure in IFN- γ -deficient BALB/c mice after murine coronavirus infection. *Virus Research*, **83**, 169-177 (2002).
 21. Shinozawa, Y., Matsumoto, T., Uchida, K., Tsujimoto, S., Iwakura, Y., and Yamaguchi, K. Role of interferon- γ in inflammatory responses in murine respiratory infection with *Legionella pneumophila*. *J. Med. Microbiol.*, **51**, 225-230 (2002).
 22. Asahi, Y., Yoshikawa, T., Watanabe, I., Iwasaki, T., Hasegawa, H., Sato, Y., Shimada, S., Nanno, M., Matsuoka, Y., Ohwaki, M., Iwakura, Y., Suzuki, Y., Aizawa, C., Sata, T., Kurata, T. and Tamura, S. Protection against influenza virus infection in polymeric Ig receptor knockout mice immunized intranasally with adjuvant-combined vaccines. *J. Immunol.*, **168**, 2930-2938 (2002).
 23. Oguro, T., Takahashi, Y., Ashino, T., Takaki, A., Shioda, S., Horai, R., Asano, M., Sekikawa, K., Iwakura, Y., and Yoshida, T. Involvement of tumor necrosis factor α , rather than interleukin-1 or nitric oxides in the HEME Oxygenase-1 gene expression by lipopolysaccharide in the mouse liver. *FEBS Letters*, in press.
 24. Uranishi, H., Tetsuka, T., Yamashita, M., Asamitsu, K., Shimizu, M., Itoh, M. and Okamoto, T. : Involvement of the pro-oncoprotein TLS (Translocated in liposarcoma) in nuclear factor- κ B p65-mediated transcription as a coactivator. *J. Biol. Chem.* 276: 13395-13401, 2001.
 25. Senoo, M., Tsuchiya, I., Matsumura, Y., Mori, T., Saito, Y., Kato, H., Okamoto, T. and Habu, S. : Transcriptional dysregulation of the p73L / p63 / p51 / p40 / KET gene in human squamous cell carcinomas: expression of Δ Np73L, a novel dominant-negative isoform, and loss of expression of the potential tumour suppressor p51. *Br. J. Cancer* 84:1235-1241, 2001.
 26. Ando, T., Kawabe, T., Ohara, H., Ducommun, B., Itoh, M. and Okamoto, T.: Involvement of interaction between p21 and PCNA for the maintenance of G2/M arrest after DNA damage. *J. Biol. Chem.* 276:42971-42977, 2001.
 27. Matsumoto, S., Imaeda, Y., Umemoto, S., Kobayashi, K., and Okamoto, T.: Cimetidine increases survival of colorectal cancer patients with high levels of sialyl Lewis-X and sialyl Lewis-A epitope expression on tumor cells. *Br. J. Cancer*, 2002 (in press).
 28. Kawabe, T., Suganuma, M., Ando, T., Kimura, M., Hori, H. and Okamoto, T.: Cdc25C interacts with PCNA at G2/M transition. *Oncogene* (in press) 2002
 29. Maki, M., Matsukawa, N., Yuasa, H., Otsuka, Y., Yamamoto, T., Akatsu, H., Okamoto, T., Ueda, R., Ojika, K.: Decreased expression of hippocampal cholinergic neurostimulating peptide precursor protein mRNA in the hippocampus in alzheimer's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2002 (in press)
 30. Sarol, L.C., Imai, K., Asamitsu, K., Tetsuka, T., Barzaga, N.G. and Okamoto, T.: Inhibitory effects of IFN- γ on HIV-1 replication in latently infected cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002 (in press)
 31. Hanabuchi, S., Ohashi, T., Koya, Y., Kato, H., Hasegawa, A., Takemura, F., Masuda, T., and Kannagi, M. Regression of Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I)-lymphomas in a rat model: Peptide-induced T-cell immunity. *J. Natl. Cancer Inst.* **93**: 1775-1783, 2001

32. Kannagi, M., Hanabuchi, S., Ohashi, T., Hasegawa, A., and Masuda, T.: Host defense Mechanisms against HTLV-1-induced T cell lymphomas in a rat model. *AIDS Research and Human Retroviruses* 17 (Suppl. 1): S14, 2001
33. 神奈木真理. HIV-1 感染の制御因子. *エイズ学会誌* 3 : 167-174, 2001
34. 神奈木真理. ヒト T 細胞白血病ウイルス感染に対する抗腫瘍ワクチン. *がん治療のあゆみ*, 20 : 21-28, 2001
35. Hakata, Y., Yamada, M., and Shida, H. Rat CRM1 is Responsible for the Poor Activity of Human T-Cell Leukemia Virus Type-1 Rex Protein in Rat Cells. *J. Virol.* 75: 11515-11525 (2001)
36. Hakata, Y., Yamada, M., Mabuchi, N. and Shida Th The Carboxy-terminal Region of the Human Immunodeficiency Virus-1 Protein Rev has Multiple Roles in Mediating CRM1-related Rev Functions. *J. Virol.* Submitted. (2002)
37. Shida, H. and Hakata, Y. Multiple roles of cellular export machinery in HTLV-1 Rex functioning. *Gann monograph* In press. (2002)

学会発表

1. Huining Liu, Makoto Kubo, Takashi Ohashi, Takao Masuda, Mari Kannagi Allo-specific CTL from a seronegative donor suppress the replication of R5 and X4 HIV-1. 第 49 回日本ウイルス学会、大阪、2001、11 月
2. 川温彦、大橋貴、花淵志野、加藤大智、増田貴夫、神奈木真理. HTLV-1 経口感染および腹腔内感染ラットにおける持続感染ウイルス量と免疫応答の比較. 第 49 回ウイルス学会、大阪、2001、11 月
3. 大橋貴、花淵志野、増田貴夫、神奈木真理. Tax 発現 DNA ワクチン接種ラットにより誘導した CTL 細胞株の HTLV-1 感染 T 細胞に対する作用の解析. 第 49 回ウイルス学会、大阪、2001、11 月
4. 花淵志野、大橋貴、小屋美博、加藤大智、長谷川温彦、増田貴夫、神奈木真理. ラット HTLV-1 腫瘍モデルにおける HTLV-1 特異的 CTL エピトープの同定とペプチドワクチンの抗腫瘍効果. 第 49 回ウイルス学会、大阪、2001、11 月
5. 鶴谷直美、庭野雪路、周 Xin、池田たま子、大橋貴、花淵志野、山本直樹、神奈木真理、増田貴夫. HIV-1 インテグラーゼ蛋白の核局在シグナルと細胞性因子の検討. 第 49 回日本ウイルス学会、大阪、2001、11 月
6. 池田たま子、周 Xin、長谷川温彦、大橋貴、奈良信夫、神奈木真理、増田貴夫. HIV-1 インテグラーゼ PYPN 配列の役割. 第 49 回ウイルス学会、大阪、2001、11 月

7. 知的所有権の取得状況

なし

平成13年度

エイズ医薬品等開発研究
重点研究報告書

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社