

厚生労働科学研究費補助金（創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業）
分担研究報告書

ネコエイズモデルを用いた免疫不全症のコントロール

分担研究者 長谷川 篤彦 日本大学生物資源科学部・獣医臨床病理学研究室・教授

研究要旨 HIV 感染におけるモデル動物の検討を行うため、FIV 感染における CD4 陽性 T 細胞のアポトーシス誘導に対する分子機構を解析した。まず、ネコのアポトーシス関連遺伝子である Bax, Bcl-2, Bcl-xL Caspase 3 のクローニングを行った。次にこれら遺伝子の発現について、アポトーシス誘導時の FIV 感染ネコ細胞(kumi-1)における変化をリアルタイム PCR 法で検討した。その結果、アポトーシス誘導遺伝子である Bax および Caspase 3 の発現量の増加は認められなかったが、アポトーシス抑制遺伝子である Bcl-2 の発現が感染 8 日後に非感染細胞の約 2.2 倍以上に増加することが確認された。なおアポトーシス抑制遺伝子である Bcl-xL の変化は認められなかった。株化ヒト細胞を HIV に感染させ、アポトーシス誘導を行った研究でも同様の結果が報告されていることから、FIV 感染ネコは HIV 感染におけるアポトーシス研究においてもモデル動物となることが考えられた。

A. 研究目的

HIV 感染によって引き起こされる免疫不全機構の解析は、HIV 研究の主要な柱である。その免疫不全機構の主因としては、免疫機構の制御に重要な役割を果たしている CD4 陽性 T 細胞の減少であるとされている。この CD4 陽性 T 細胞の減少がアポトーシスによって引き起こされていることが知られている。そのため、HIV 感染によって引き起こされるアポトーシスの制御が可能となれば、HIV 感染患者の免疫不全状態に進行することを抑えることができると考えられる。このことから、多くの遺伝子レベルおよび蛋白レベルにおける CD4 陽性 T 細胞の

アポトーシス抑制法が検討されているが、画期的な治療法の開発には至っていない。特にアポトーシス抑制法の開発には、HIV 感染モデル動物が必要であるが、適切なモデルがないため、なかなか研究が進まないのが現状である。

一方ネコ免疫不全ウイルス (feline immunodeficiency virus: FIV) 感染症は、ネコに様々な免疫異常を起すことから HIV 感染症のモデルとして検討されている。FIV 感染症は HIV 感染症に準じ、5 つの臨床期を臨床症状に基づいて分類されているが、これに対して我々は、客観的な臨床マーカーを用いて検討を行った。その結果、FIV 感染症ネコについてリンパ球サブセットと

血漿中 FIV の RNA 量の推移は、免疫不全が進行するとともに、血液中の CD4 陽性 T 細胞が減少し、それと反比例して、血漿中 FIV の RNA 量が増加することが明らかとなった。このことは、FIV 感染における CD4 陽性 T 細胞のアポトーシスは免疫不全の主因となっていることが示唆され、病態の推移が HIV 感染症と非常に類似していることが明らかとなった。さらに我々は、FIV 感染における CD4 陽性 T 細胞のアポトーシスには HIV のそれと同様 Fas および Fas リガンドが関与していることを報告しているが、その他アポトーシス制御についての詳細な分子機構については、いまだ検討されていない。そこで今回は、HIV 感染における細胞のアポトーシス抑制法の開発を行うにあたって、必要となるモデル動物の検討を行うために FIV 感染における CD4 陽性 T 細胞のアポトーシス誘導の分子機構を解析した。

B. 研究方法

1. ネコのアポトーシス関連遺伝子のクローニング
 - 1) ネコ由来 T 細胞株化細胞 (FT-1) から mRNA を抽出し、それから cDNA を合成する。
 - 2) ヒトおよびマウスで登録されている Bax, Bcl-2, Bcl-xL, Caspase 3 のアポトーシス関連遺伝子情報から相同性領域をもとにプライマーを設計する。
 - 3) 各遺伝子に特異的なプライマーを

もとに cDNA を鋳型として PCR 反応を行い、各遺伝子断片をクローニングし、各遺伝子の塩基配列を解析する。

- 4) 各遺伝子の部分塩基配列から、5' および 3' RACE 法を行い、各遺伝子の完全長 cDNA 塩基配列を決定し、DDBJ (DNA Data Bank of Japan) に登録し、一般公開する。
2. FIV 感染細胞におけるアポトーシス関連遺伝子の発現解析
 - 1) ネコ由来 T 細胞株 (kumi-1) に FIV ウイルスの A 型株 (sendai-1) 株に感染させる。
 - 2) 感染 3、6、8 日後に細胞を回収し、アポトーシスを誘導していることを TUNEL 染色で確認する。
 - 3) 回収した細胞から RNA を抽出し、cDNA を合成する。
 - 4) 各アポトーシス関連遺伝子に特異的なプライマーを設計し、cDNA を鋳型としてリアルタイム PCR 法を行い、各遺伝子の発現量を定量する。
 - 5) 各遺伝子の発現量の変化をアポトーシスの進行とともに記録し、HIV によるアポトーシスにおいて認められている変動と比較する。

(倫理面への配慮)

本研究は、ネコ由来の株化細胞を用いた *in vitro* 研究であるため、倫理面で抵触することは無いと考えてい

る。

C. 研究結果

1. ネコのアポトーシス関連遺伝子のクローニング

今回クローニングしたネコのアポトーシス関連遺伝子の完全長 cDNA の塩基配列情報は、既に DNA Data Bank of Japan (DDBJ) に登録し、一般に公開してある。以下、クローニングした遺伝子名と DDBJ 登録番号を記す。

Bcl-2 (DDBJ Accetion No. AB096611),
Bcl-xL (AB080951), Bax (AB080724),
Caspase 3 (AB090246)

2. FIV 感染細胞におけるアポトーシス関連遺伝子の発現解析

クローニングしたネコのアポトーシス関連遺伝子 (Bcl-2, Bcl-xL, Bax, Caspase 3) について、FIV 感染細胞がアポトーシス誘発時に各遺伝子発現がどのように変化するか、リアルタイム PCR 法を用いて検討した。その結果、感染 3、6、8 日と経過するにつれてアポトーシス細胞数が増加していることが TUNEL 染色で確認されたが、アポトーシス誘導遺伝子である Bax および Caspase 3 の発現量の増加は認められなかった。一方で、アポトーシス抑制遺伝子である Bcl-2 の発現が感染 8 日後に非感染細胞の約 2.2 倍以上に増加することが確認

された。なおアポトーシス抑制遺伝子の Bcl-xL には変化は認められなかった。

D. 考察

FIV 感染細胞においてはアポトーシス誘導時、アポトーシス誘導遺伝子である Bax および Caspase 3 の発現量に変化は認められなかったが、アポトーシス抑制遺伝子である Bcl-2 の発現が増加することが確認された。これは、矛盾するように考えられるが、興味あることに HIV を株化細胞に感染させ、アポトーシスを誘導させた研究においても同様な結果が報告されている。これはウイルス感染によって一時的にアポトーシスが抑制され、その間にウイルス複製が完成するのではないかと考えられているが、確証はいまのところ得られていない。またアポトーシス誘導には、Caspase 3 作用が重要視されているが、HIV における報告および今回の研究結果から、Caspase 3 に無関係なアポトーシスの誘導系の存在も考えられる。

このように FIV 感染細胞のアポトーシス誘導に関する分子機構は、HIV のそれと類似しており、FIV 感染ネコはアポトーシス研究においてもモデル動物とに価値のあることが示唆された。

E. 結論

ネコのアポトーシス関連遺伝子群の Bax, Bcl-2, Bcl-xL Caspase 3 の各遺伝子のク

ローニングを行った。これらクローニングしたアポトーシス関連遺伝子の発現を FIV 感染細胞について検討した。その結果、アポトーシス誘導遺伝子である Bax および Caspase 3 の発現量の増加は認められなかったが、アポトーシス抑制遺伝子である Bcl-2 の発現が感染 8 日後に非感染細胞の約 2.2 倍以上に増加することが確認された。なおアポトーシス抑制遺伝子である Bcl-xL では変化は認められなかった。同様な結果が HIV における研究でも報告されていることから、FIV 感染ネコは HIV におけるアポトーシス研究のモデル動物となることが考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

今回の研究成果は、現在学会発表および学術論文として学術雑誌に発表準備中である。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表
雑誌

発表者氏名	論文タイトル名 発表誌名 巻号 ページ 出版年
<u>Senpuku H</u> , <u>Asano T</u> , <u>Matin K</u> , <u>Salam A</u> , <u>Tsuha Y</u> , <u>Horibata S</u> , <u>Shimazu N</u> , <u>Soeno Y</u> , <u>Aoba T</u> , <u>Sata T</u> , <u>Hanada N</u> , and <u>Honda M</u> .	Effects of human IL-18 and IL-12 treatment on human lymphocyte engraftment in NOD-scid mouse. Immunology 107 : 232-242 (2002)
<u>Nakao R</u> , <u>Hanada N</u> , <u>Asano T</u> , <u>Hara T</u> , <u>Salam Md A</u> , <u>Matin K</u> , <u>Shimazu Y</u> , <u>Nakasone T</u> , <u>Horibata S</u> , <u>Aoba T</u> , <u>Honda M</u> , <u>Amagasa T</u> , <u>Senpuku H</u> .	Assesment of oral transmission using cell-free HIV-1 in mice reconstituted with human peripheral blood leucocytes. Immunology In press (2003)
<u>Ichiyama K</u> , <u>Yokoyama S</u> , <u>Tanaka Y</u> , <u>Tanaka R</u> , <u>Hirose K</u> , <u>Bannai K</u> , <u>Edamatsu T</u> , <u>Yanaka M</u> , <u>Niitani Y</u> , <u>Kurosaki N</u> , <u>Takaku H</u> , <u>Koyanagi Y</u> , and <u>Yamamoto N</u> .	A duodenally absorbable CXC chemokine receptor 4 antagonist, KRH-1636, exhibits a potent and selective anti-HIV-1 activity in vitro and in vivo. Pro. Natl. Acad. Sci. (USA) In press (2003)
<u>Igakura T</u> , <u>Stinchcombe JC</u> , <u>Goon PK</u> , <u>Taylor GP</u> , <u>Weber JN</u> , <u>Griffiths GM</u> , <u>Tanaka Y</u> , <u>Osame M</u> , and <u>Bangham CRM</u> .	Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-Induced polarization of the cytoskeleton. Science In press (2003)
<u>Saito M</u> , <u>Braud VM</u> , <u>Goon P</u> , <u>Hanon E</u> , <u>Taylor GP</u> , <u>Saito A</u> , <u>Eiraku N</u> , <u>Tanaka Y</u> , <u>Usuku K</u> , <u>Weber JN</u> , <u>Osame M</u> , and <u>Bangham CRM</u> .	Low frequency of CD94/NKG2A-positive T lymphocytes in HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients but not in asymptomatic carriers. Blood In press (2003)

Zhang J, Nagasaki M, <u>Tanaka Y</u> , and Morikawa S.	Capsaicin inhibits growth of adult T-cell leukemia cells. <i>Leuk. Res.</i> 27(3):275-283 (2003)
Hiraiwa N, Yabuta T, Yoritomi K, Hiraiwa M, <u>Tanaka Y</u> , Suzuki T, Yoshida M, and Kannagi R.	Transactivation of the fucosyltransferase VII gene by human T-cell leukemia virus type 1 tax through a variant cAMP-responsive element. <i>Blood</i> In press (2003)
Mori N, Yamada Y, Ikeda S, Yamasaki Y, Tsukasaki K, <u>Tanaka Y</u> , Tomonaga M, Yamamoto N, and Fujii M.	Bay 11-7082 inhibits transcription factor NF-kappa B and induces apoptosis of HTLV-I-infected T-cell lines and primary adult T-cell leukemia cells. <i>Blood</i> 100(5):1828-1834 (2002)
Wang X, Miyake H, Okamoto M, Saito M, Fujisawa J, <u>Tanaka Y</u> , Izumo S, and Baba M.	Inhibition of the tax-dependent human T-lymphotropic virus type I replication in persistently infected cells by the fluoroquinolone derivative k-37. <i>Mol. Pharmacol.</i> 61(6):1359-1365 (2002)
Mori N, Fujii M, Hinz M, Nakayama K, Yamada Y, Ikeda S, Yamasaki Y, Kashanchi F, <u>Tanaka Y</u> , Tomonaga M, and Yamamoto N.	Activation of cyclin D1 and D2 promoters by human T-cell leukemia virus type I tax protein is associated with IL-2-independent growth of T cells. <i>Int. J. Cancer</i> 99(3):378-385 (2002)
Satoh M, Toma H, Sugahara K, Etoh K, Shiroma Y, Kiyuna S, Takara M, Matsuoka M, Yamaguchi K, Nakada K, Fujita K, Kojima S, Hori E, <u>Tanaka Y</u> , Kamihira S, Sato Y, and Watanabe T.	Involvement of IL-2/IL-2R system activation by parasite antigen in polyclonal expansion of CD4(+)25(+) HTLV-1-infected T-cells in human carriers of both HTLV-1 and <i>S. stercoralis</i> . <i>Oncogene</i> 21(16):2466-2475 (2002)

<p>Goon PK, Hanon E, Igakura T, <u>Tanaka Y</u>, Weber JN, Taylor GP, and Bangham CRM.</p>	<p>High frequencies of Th1-type CD4(+) T cells specific to HTLV-1 Env and Tax proteins in patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. <i>Blood</i> 99(9):3335-3341 (2002)</p>
<p>Takizawa M, <u>Chiba J</u>, Haga S, <u>Asano T</u>, Yamamoto N and <u>Honda M</u>.</p>	<p>Fractionation of guinea pig leukocyte by flow cytometry using a novel MIL4/SSC parameter. <i>Cytometry Research</i> In press (2003)</p>
<p>Goto, Y., Nishimura, Y., Baba, K., Mizuno, T., Endo, Y., Masuda, K., Ohno, K. and <u>Tsujimoto, H.</u></p>	<p>Association of plasma viral RNA load with prognosis in cats naturally infected with feline immunodeficiency virus. <i>J. Virol.</i> 76:10079-10083 (2002)</p>
<p>Mizuno, T., Goto, Y., Baba, K., Masuda, K., Ohno, K and <u>Tsujimoto, H.</u></p>	<p>Molecular cloning of feline tumor necrosis factor receptor type I (TNFR I) and expression of TNFR I and TNFR II in Lymphoid cells in cats. <i>Eur. J. Immunogenetics</i> 30:107-113 (2003)</p>

20021242

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P.43- P.45の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。