

20030879

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

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
(H13-創薬-005)

平成 15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 岩倉 洋一郎

(東京大学医科学研究所・教授)

目次

I. 研究組織 1
II. 総括研究報告	
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 岩倉洋一郎	2
III. 分担研究報告	
エイズ治療薬開発のためのマウスモデルの開発 岩倉洋一郎	9
トランスクリプトーム解析により明らかになった Tat による OGG1 発現誘導と HIV のゲノム保持機構 岡本尚	17
抗原非特異的機序による HIV 複製の抑制 神奈木真理	23
HIV mRNA の核外輸送を標的とした抗エイズ薬の開発研究 志田壽利	28
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表31
V. 研究成果の刊行物・別刷 41

I. 研究組織

研究課題：エイズ治療薬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

主任研究者：岩倉洋一郎 (東京大学医科学研究所ヒト疾患モデル研究センター細胞機能研究分野・教授)

分担研究者：岡本 尚 (名古屋市立大学医学部分子医学研究所分子遺伝部門・教授)

神奈木真理 (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・教授)

志田 壽利 (北海道大学遺伝子病制御研究所病態研究部門感染病態分野・教授)

II. 総括研究報告

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）
総括研究報告書

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

主任研究者 岩倉洋一郎 東京大学医科学研究所 教授

研究要旨

エイズ治療は HAART 治療法の導入により大きく前進したが、潜伏ウイルスの存在や薬剤耐性ウイルスの出現など、いまだ多くの問題を抱えている。本研究では新しい治療法の開発に資するため、HIV の宿主域バリアーを形成する宿主因子をヒト型化することにより新たなエイズモデルの開発を目指すと共に、宿主因子を標的とした抗 HIV 薬の開発を試みた。この中で、HIV トランスジェニック (Δ pol-Tg) マウスをより効率的な感染モデルとするために、ヒト Cyclin T1 とヒト CRM1 のダブル Tg マウスを交配させることによりウイルス産生効率の増強を試みた。また、マウスではインテグラーゼ (IN) の機能が十分に発揮されないため、HIV preintegration complex の核移行が障害されており、これが一つの宿主域バリアーとなることを見いだした。また、Tat 発現に伴う遺伝子発現プロファイルを解析し、DNA (guanine) の修復酵素 OGG1 の遺伝子が誘導されることを見だし、Tat による新たなウイルスゲノム保持機構が存在することを明らかにした。また、HIV-1 抑制活性を持つ CD8 陽性 CTL 株の細胞上清から、責任蛋白の精製及び単離を行い、HIV-1 抑制因子の同定を試みた。さらに Rev の多量体化、Rev と CRM1 との結合及び Rev の核外輸送機能を阻害する薬物をスクリーニングする系を開発し、30万種類の化合物をスクリーニングし、阻害活性を持つ8種類の化合物を見いだした。このようにエイズ動物モデルの作製を進めると同時に、抗 HIV 薬の標的分子の探索や解析を行い、動物モデルを用いた抗 HIV 薬の開発・評価を行うための基盤を作ることができた。

主任研究者：

岩倉洋一郎（東京大学医科学研究所・ヒト疾患モデル研究センター・細胞機能研究分野・教授）

分担研究者：

岡本 尚（名古屋市立大学・医学部・分子医学研究所・分子遺伝部門・教授）

神奈木真理（東京医科歯科大学大学院・歯学総合研究科・免疫治療学分野・教授）

志田 壽利（北海道大学遺伝子病制御研究

所病態研究部門感染病態分野・教授）

A. 研究目的

欧米など先進国では増加がやや頭打ちになっているとは言え、世界的には HIV 感染者はますます増加しており、すでにエイズを発症している患者の治療と共に、未発症の3千万人を越える感染者の発症をいかに防ぐかはきわめて大きな社会問題である。比較的感染者の少ない我が国にも相応の国際貢献が求められている。近年、エイズ治療は HAART 治療法の導入により

大きく前進したが、現在においてもなお、副作用や薬剤耐性ウイルスの出現などの問題から、ウイルスの完全駆逐やウイルス負荷量を減少させる新たな治療法の開発が急がれている。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るが、マウスのような小動物に HIV が感染しないことがこれまで病態解析や治療薬開発上の大きな制約となっていた。本研究では、抗 HIV 薬開発に適した小動物モデルの開発を第 1 の目的とした。このため、HIV 増殖に関与する新たな宿主因子を探索し、種間障壁となるものをヒト型化する事により、HIV 感受性マウスの作製を計ることにした。また、これまでに作製した HIV 遺伝子導入 Tg マウスを利用して、HIV の潜伏感染機構を解析する事により、ウイルスを完全に駆逐する方策を検討した。一方、宿主因子は新たな抗 HIV 薬の標的となりうることから、HIV の転写制御あるいは核外輸送に関与する宿主因子に焦点を絞り、探索を進めると共に、機能阻害薬のスクリーニングを行った。さらに、免疫学的手法により HIV 増殖を抑制する方法の一つとして、CD8 陽性細胞由来の HIV 抑制因子の解析を進めた。

この中で岩倉は、HIV プロウイルス遺伝子導入 Tg マウスの CytT1、CRM1 をヒト型化することにより、感染モデルの効率化を図ると共に、新たに pre-integration complex (PIC) の核移行に関与する宿主因子の同定を試みた。また HIV のコレセプターである CXCR4 の生体内での機能を明らかにするために、T 細胞特異的に CXCR4 遺伝子を欠損させたコンディショナルノックアウトマウスで観察される胸腺内の T 細胞のアポトーシス亢進メカニズムを解析した。さらに骨髓細胞特異的に CXCR4 を欠損させた KO マウス (Mxcre-CXCR4 KO) を作製し、CXCR4 の骨髓における機能を解析した。

一方、岡本は HIV 感染症の進展にガン化促進、免疫抑制、酸化ストレス誘導作用等を有する HIV tat の分子機構を追求するために、tat により発現誘導される遺伝子プロファイルを解

析し、tat 被制御遺伝子を網羅的に探索した。

神奈木はこれまでに非感染者由来の末梢血単核球 (PBMC) から、HIV 複製抑制能を持つ CD8+ T 細胞株を樹立した。これはアロ特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) であり、HIV 抗原特異性は無く自己細胞にも傷害性を示さないが、HIV 感染自己細胞に対してウイルス抑制活性を持つ。この活性は、生物学的な抗 HIV 薬としての可能性を持っている。本年度はこの CD8+ CTL の HIV 抑制メカニズムの解明及び CTL 株の培養上清中に含まれる抑制因子の同定を目的とした。

志田はヒト CRM1 が HIV Rev を核外に運ぶだけではなく、Rev の多量体化に必要であること、またラットの CRM1 は Rev に対してうまく機能しないことを示してきた。また Rev の機能を阻害する化合物を検索するための細胞評価系を構築し、予備スクリーニングを行ってきた。本年度はスクリーニングを拡大して大規模な Rev 阻害剤のスクリーニングを行うとともに、ラット細胞への hCRM1 発現による HIV 感受性の検討、ならびに hCRM1 トランスジェニックラットの作製を行った。

B. 研究方法

1) 岩倉

① hCRM1 及び hCyclin T1 Tg マウスの作製及び Δpol-Tg マウスとの交配

HIV-1 の遺伝子発現が、ヒト CytT やヒト CRM1 の発現により亢進しているかどうか検討するために CD4-hCytT/hCRM1 マウスまたは lck-hCytT/CRM1 と Δpol-Tg を交配させ、その仔マウスの免疫組織 RNA を用い、ノーザンブロッティングを行った。

② マウス細胞に於ける HIV 宿主域バリアー過程の解析

IN または Vpr の核移行機能を検討するために、GFP 発現ベクターを構築した。その GFP 融合発現ベクターをヒト子宮頸癌細胞である HeLa あるいはマウス繊維芽細胞である NIH3T3 にリポフェクション法によりトランス

フェクトし、24 時間後に共焦点顕微鏡により観察した。

③ CXCR4 の生理機能の解析

CXCR4 のコンディショナル KO マウス作製のため、CXCR4 の Exon 2 を LoxP 塩基配列で挟んだベクターを構築し、相同組み換えにより loxP ノックインマウスを得た。このマウスを Lck-Cre Tg と掛け合わせるにより、T 細胞特異的に CXCR4 遺伝子を欠損させたマウス (Lck-Cre-CXCR4 KO) を作製した。このマウスの胸線細胞を採取し、その細胞を SDF-1 あるいは無血清培地処理後、フローサイトメトリー法を用いてアポトーシスを検討した。

一方骨髄細胞特異的に CXCR4 を欠損させたコンディショナル KO マウス (Mxcre-CXCR4 KO) は、ノックインマウスを Mx プロモーター下に Cre 遺伝子を結合した Mx-Cre Tg マウスと交配し、得られた仔を poly IC を処理することによって作製した。大腿骨の切片を作製後、HE 染色を行うと共に、TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase ; 酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ) 染色により破骨細胞を同定した。また、骨量は DXA 法により評価した。

2) 岡本

① Tat 過剰発現により誘導される遺伝子の検索

Tat 被制御遺伝子を解析するにあたり、薬剤により Tat 及び mutant Tat (mTat) の発現を制御できる細胞株を樹立した。樹立した細胞への薬剤刺激後の Tat 及び mTat の発現はウエスタンブロット法で確認にした。本細胞株を用いて Tat 非誘導時、誘導後の遺伝子発現プロファイルを相互に比較した。誘導遺伝子は RT-PCR 及びリアルタイム PCR により遺伝子レベルでの、ウエスタンブロット法により蛋白レベルでの確認を行った。

② Tat 過剰発現で誘導された OGG1 のプロモーター解析

Tat は酸化ストレスを誘導することが知られ

ている。Tat 発現細胞に抗酸化剤、酸化ストレス誘導剤前処理後の OGG1 発現の影響をウエスタンブロット法により調べた。また tat 存在下で OGG1 promoter (luc 含) の種々の変異体を作用させ、ルシフェラーゼ活性を測定することによりプロモーター解析を行った。

③ Tat による AP-4 の DNA 結合能に対する影響の解析

② の結果から、Tat が AP-4 へ結合し OGG1 プロモーター内の AP-4 結合サイトに影響を与えることが推察された。AP-4 は HLH 型転写因子で GC box に結合し、いくつかの遺伝子発現を促進または抑制することが報告されている。そこで、AP-4 の DNA 結合能に対する Tat の作用を、EMSA、IP-WB assay 及び OGG1 プロモーター上の AP-4 結合サイトを用いた ChIp assay プロモーター活性を用いて検討した。

④ Tat 発現による細胞内 8-oxo-dG 産生への影響の検討

酸化ストレスは酸化型 guanine である 8-oxo-dG を誘発し G:C から T:A への transversion を起こすことが知られている。一方 OGG1 は 8-oxo-dG を除去することにより transversion による DNA の変異を阻止していると考えられるため、Tat または mTat 発現による 8-oxo-dG への影響を HPLC-EC 法にて検討した。

3) 神奈木

① 健常人由来アロ抗原特異的 CD8 陽性 CTL 株:

3 人の健常人 PBMC をマイトマイシン C 処理した Raji 細胞で刺激し、特異的に増殖する細胞群から CD4+ 細胞を除去し IL-2 依存性の CD8+ 細胞株を樹立した。この CTL 株は、IL-2 存在下で培養し定期的に Raji 刺激を加え維持した。

② HIV-1 感染 PBMC に対する HIV-1 抑制:

細胞接触を介する抑制活性の検出には、CTL と同ドナー由来の PHA 刺激 PBMC の CD8+ 細胞除去分画に HIV-1 感染後、CTL と混合培

養し、上清中 HIV-1 p24 量を ELISA により測定した。細胞上清中の抑制活性の検出には、PHA 刺激 CD4+PBMC に HIV-1 感染させた後、CTL 上清を加え、4 日後の HIV-1 p24 量を測定した。

③ CTL 培養上清の分画：

CTL 培養上清は、CTL を抗原刺激後 IL-2 存在下で培養し、遠心した上清を 0.25 μ m フィルターで通したものをを用いた。上清の粗分画と濃縮には分子量 50 K および 10 K のセントリコンチューブを用いて行った。ゲル濾過カラムによる分画は HPLC を用いて行い、得られた分画の濃縮はセントリコンチューブを用いて行った。各分画の HIV-1 抑制活性は、上清で感染 PBMC を処理した後、HIV-1 p24 量で判定した

④ CTL 由来蛋白のプロテオーム解析：

HIV-1 抑制活性のある CD8+ CTL と対照細胞の抽出蛋白を二次元電気泳動で展開しクマシーブリリアントブルー染色した後、両者を比較し、量に変化の見られた蛋白スポットをゲルから切り出し、質量分析（トリプシン消化、MALDI-MS）を行った。

4) 志田

① 薬効の評価：

昨年度作製した Rev-Rev 多量体形成、Rev-CRM1 結合、そして RNA 輸送の 3 段階を評価できる細胞系を用いて約 30 万種類の化合物のスクリーニングを行った。樹立した細胞株を 96 穴プレートにまき、翌日化合物を含む培地に交換した。24 時間後にルシフェラーゼ活性を測定し、その減少を阻害活性とした。また、特異性を調べるために CRM1-I κ Ba 結合への影響を調べた。

② 細胞：ヒト細胞として HeLa, CD4-HeLa 細胞を、ラット細胞として ER1 細胞を用いた。HIV の感染価を測定するための indicator cell として TZM-bl 細胞を用いた。

③ プラスミド：

Gag 発現のために pNL κ -r-Luc, CRM1 発現

のために pSRaCRM1, レトロベクター構築のために pMXneo (東大、北村教授より分与) を用いた。感染性 HIV 全長ゲノムを持つプラスミドとして pNL432 を用いた。

C. 研究結果

1) 岩倉

① hCRM1 及び hCyclin T1 Tg マウスの作製及び Δ pol-Tg マウスとの交配

作製した CD4-hCycT1/CRM1 Tg あるいは lck-hCycT1/CRM1 Tg マウスの免疫組織において RNA 発現の高い 2 系統を Δ pol Tg マウスと交配させた。仔マウスの脾臓、胸腺、リンパ節由来の RNA を用いたノーザンブロッティング解析を行った結果、LPS 無刺激では Δ pol Tg マウスでも hCD4-hCycT1/hCRM1/ Δ pol Tg マウスでも HIV 遺伝子発現が低く、HIV RNA のバンドが確認できなかった。LPS 刺激時に HIV 遺伝子発現は上がったが、hCycT1 や hCRM1 による HIV 遺伝子発現上昇への影響は認められなかった。

② マウス細胞に於ける HIV 宿主域バリアー過程の解析

GFP-IN あるいは GFP-Vpr の発現ベクターを HeLa あるいは NIH3T3 に過剰発現させた結果、GFP-Vpr は HeLa, NIH3T3 共に核局在が観察された。しかし、GFP-IN は HeLa では核局在が観察されたが、NIH3T3 では細胞質に局在した

③ CXCR4 の生理機能の解析

T 細胞特異的に CXCR4 遺伝子を欠損させたコンディショナル KO マウス (lckcre-CXCR4 KO) の胸腺細胞培養中 SDF-1、無血清培地処理後フローサイトメトリー法を行い T 細胞アポトーシスに対する解析を行った結果、SDF-1、無血清培地処理共に KO マウスと野生型マウスの間に差を認められなかった。

一方 Mxcre-CXCR4 KO マウスの大腿骨の HE 染色から、この KO では骨量が増加し、大理石骨病様の症状が観察された。さらに破骨細胞に対する TRAP 染色により、骨表面におけ

る破骨細胞数の低下が示された。

2) 岡本

Tat 被制御遺伝子を解析するにあたり、薬剤により Tat および mutant Tat (mTat) の発現を制御できる細胞株を新たに樹立した。樹立した細胞を用いて Tat 非誘導時、誘導時の遺伝子発現プロファイルについて相互に比較を行った結果、酸化ストレスによる DNA 傷害に対する修復酵素である OGG1 が Tat によって強く発現誘導を受けていた。リアルタイム PCR およびウエスタンブロットによって遺伝子レベルと蛋白レベルでの OGG1 の発現誘導が確認できた。

Tat 発現細胞においては細胞内レッドクスバランスが酸化方向にシフトしていた。このとき、抗酸化剤による前処理を行っても Tat による OGG1 誘導作用は認められたことから、Tat は直接 OGG1 の発現を誘導しているものと考えられた。ルシフェレースを含む OGG1 プロモーターを用いたプロモーター解析の結果、Tat は OGG1 プロモーターを活性化した。さらに、種々の変異 OGG1 プロモーターを作製し Tat の作用を検討した結果、5'末端側の AP-4 結合サイトが必須であることがわかった。さらに EMSA を用いて Tat が AP-4 の DNA 結合能を抑制することがわかった。また、IP-WB assay により *in vivo* において Tat と AP-4 が相互作用することが確認され、ChIP 法により Tat の AP-4 との相互作用が AP-4 の OGG1 プロモーターへの結合を抑制していることが示唆された。

酸化ストレスにより 8-oxo-dG ができること G:C から T:A への transversion を起こすことが知られているが、OGG1 は 8-oxo-dG を除去することにより transversion による DNA の変異を阻止している。8-oxo-dG 量を HPLC-EC 法にて測定した結果、Tat の発現とともに 8-oxo-dG 量が有意に低下した。以上の結果から、Tat により誘導された OGG1 が実際に機能し、8-oxo-dG 量が低下しているも

のと考えられた。

3) 神奈木

3 株のアロ特異的 CD8 陽性 CTL は、いずれも HIV-1 感染させた PHA 刺激自己 PBMC と混合培養すると、HIV-1 産生を著明に抑制した。しかし、上清に HIV-1 抑制活性が認められたのは、3 株中 1 株だけであった。また、既知の HIV-1 抑制因子である RANTES, MIP1, SDF、インターフェロン、Defensin などに対する特異抗体を添加しても CTL 上清による抑制は解除できなかった。また今年得られた株も、昨年の報告と同様 Fas ligand 中和抗体では HIV-1 抑制活性の大勢に影響を与えなかった。

次に、この CTL 上清中の抑制因子の分画を試みた。セントリコンで、>50 K、10 K~50 K、<10 K に分けた場合、抑制活性は >50 K 以上の分画に認められた。<10 K の分画にも抑制が認められたが、これは FCS の濃度変化によるものと考えられた。FCS の影響を除くため、無血清培地で CTL を培養したところ HIV-1 抑制活性が残存することが確認されたので、以後、この上清を用いた。ゲル濾過カラムを用いて分画したところ、14 番目の fraction (60 K 前後) に強い HIV-1 抑制活性が認められた。一方、CTL の細胞膜由来の HIV-1 抑制分子を調べるため、CTL 抽出蛋白を 2 次元展開しプロテオーム解析を試みた。その結果、コントロール細胞と異なる泳動パターンを示した幾つかのスポットをピックアップしたが、その多くは未知の蛋白であった。

4) 志田

① 阻害物質のスクリーニング

約 30 万化合物をスクリーニングして、Rev 活性を阻害する 8 種類の化合物を得た。さらに、これらの化合物に Molt4 細胞における HIV-1 の増殖阻害活性があることを認めると共に、この濃度では細胞増殖は阻害しないことを確認した。しかし、有効濃度が高すぎることから、製剤とするにはさらに

低濃度でも効果を発揮するように改良する必要があると考えられる。

② ラット細胞におけるヒト hCRM1 発現の効果

ヒト細胞とほぼ同量の hCRM1 を発現するラット細胞株を作成したところ、細胞増殖には影響がなく、ヒト細胞に近い HIV Gag の発現が可能であることがわかった。このことから、内在性の rCRM1 に優性阻害効果がないことがわかった。

D. 考察

1) 岩倉

今回報告した hCyclin T1 及び hCRM1 ダブル Tg マウスと Δ pol-Tg マウスとの交配では HIV 遺伝子発現は上昇しなかった。これは CD4 プロモーターあるいは Ick プロモーターによって制御される hCRM1 及び hCyclin T1 の発現が十分ではない可能性が考えられる。現在、より強発現する Tg マウスを再度作製中である。一方マウス細胞に於いて GFP-IN は核局在することができなかつた。これらの結果より、マウス細胞においては IN と相互作用する核移行因子が存在しないか、IN の核移行を阻害する因子が存在することが推察された。現在その因子を探索中である。また T 細胞特異的に CXCR4 遺伝子を欠損させたコンディショナル KO マウス (Ickcre-CXCR4 KO) において T 細胞のアポトーシスが亢進する理由は現在のところまだわかっていない。しかし、このマウスにおけるアポトーシスの機構を解明することは、エイズ患者における CD4 陽性細胞減少のメカニズムを一部説明することになるものと考えている。今後種々のアポトーシス関連蛋白の関与を検討する予定である。一方、Mxcre-CXCR4 KO マウスでは骨量が増加し、大理石骨病様の症状を示すとともに、骨表面における破骨細胞数の低下が観察された。これらの結果より CXCR4 が破骨細胞形成に関与する可能性が示唆された。破骨細胞前駆細胞で CXCR4 の発現が認められること、CXCR4 発現細胞は SDF-1

に対し走化生を示すこと、骨表層に存在する骨芽細胞には SDF-1 の高発現が認められることなどから、破骨細胞が骨表面に移動するために、SDF-1/CXCR4 システムを使っていることが考えられる。以上の結果により、HIV 治療における CXCR4 の中和抗体あるいは CXCR4 阻害剤の使用は、患者さんに骨量増加を引き起こす可能性が示唆された。

2) 岡本

Tat は宿主のレドックスバランスを酸化方向にシフトし HIV の転写に対して有利に働く一方で、あらかじめ OGG1 を誘導することによって Transversion による HIV-1 のゲノム変異を未然に防止している (feed-forward) 可能性が示唆された。また、最近 APOBEC3G/CEM15 による HIV ゲノム変異 (G:C から A:T への transition) を Vif が抑制していることが報告されたが、今回の結果から Tat も Vif とともに HIV ゲノムの安定性に関与していることが推察された。

3) 神奈木

CTL 株の一つから得られた液性因子は、HIV-1 持続感染細胞からの HIV-1 産生に対しては抑制が認められないことから、細胞性因子とは異なるメカニズムで HIV-1 複製を抑制していると考えられた。精製分離の後、蛋白の同定と抑制活性の確認を行うことにより、新たな抑制因子が得られる見通しである。細胞側の因子についてもひきつづき責任蛋白の単離・精製を行う予定である。

4) 志田

hCRM1 とヒト型 HIV 受容体を発現させることによって、ラット細胞で HIV を増殖させることができる可能性が示された。既に、hCRM1 を発現するトランスジェニックラットを作成しており、受容体を発現させることによって HIV が感染できるようになることが期待される。また、30 万種類の化合物をスクリーニングし、Rev 阻害効果を持つ 8 種類の化合物

を見いだした。抗 Rev 剤のリード化合物として期待される。

E. 結論

HIV 感染モデルとしてはサルが比較的ヒトに近いが、遺伝的、微生物学的な統御が不十分であることや、取り扱いが難しいこと、供給や動物愛護上の問題を抱えていることなどから、必ずしもモデルとして最も優れているとは言えない。小動物の疾患モデルが望まれる所以である。マウスモデルは最初 Malcolm Martin (1988) らが HIV 遺伝子導入 Tg マウスを作製し、エイズ様症状を示すことを報告したが、その後この系統は途絶え、これに代わるものは報告されていない。また、ヒト CD4 や CXCR4 または CCR5 遺伝子を導入して作製した感受性マウスは、感染効率が低く実用には適さない。

岩倉らは HIV 遺伝子を導入した Tg マウス (Δ pol-Tg) をより感染状態に近いマウスモデルにするため、CD4 プロモーターや Ick プロモーターを用いた CyclinT や CRM1 のダブル Tg を作製し、 Δ pol マウスとの掛け合わせを行った。hCycT-hCRM1 Tg は Δ pol との交配によっては HIV の発現を増加させることができなかつたが、今後 CycT1 及び CRM1 を強発現させ HIV 遺伝子発現が上昇することができれば、エイズ病態解析や治療薬開発のスクリーニング系として有用であると考えられる。また、マウス細胞においては PIC の核移行に重要であると考えられている IN が核に局在できなかったことから、IN と相互作用する因子がマウスにおける種間バリアーとなっている可能性が考えられた。今後この因子を探索し、マウスの遺伝子をヒト型化することにより、HIV 感受性マウスが実現できることが期待される。さらに二種類の CXCR4 コンディショナル KO マウスを用いた解析から、CXCR4 の T 細胞アポトーシスあるいは破骨細胞形成における役割が明らかとなった。

岡本は今回の研究から、Tat が宿主のレドックスバランスを酸化方向にシフトし HIV の転写に対して有利に働く一方で、あらかじめ修復酵素である OGG1 を誘導することによって HIV-1 の変異を未然に防止しているという新たなゲノム保持機構の存在を明らかにした。HIV-1 の複製過程の律速段階である Tat による転写制御機構を解明することにより、転写段階をターゲットとした新たなエイズ治療薬の開発が期待される。

また、神奈木は R5、X4 両 HIV-1 株の複製を抑制する CD8 陽性 CTL を HIV-1 非感染者から樹立した。さらに、細胞接触依存性の HIV-1 抑制を示す株と抑制活性を持つ液性因子 (CAF) を産生する株を得た。液性因子は 60kDa 前後の fraction に存在し精製中である。CD8+ CTL の細胞表面分子とともに、今後、生物学的な抗 HIV-1 薬としての開発可能性を持つと考えられる。

志田はスクリーニングの結果、8種類の抗 Rev 阻害物質を見いだした。Rev-CRM1、Rev-Rev の結合阻害、Rev の核外輸送に焦点を絞った抗 HIV の開発は独自のものであり、新しい作用機序を持つ抗 HIV 薬が開発される可能性がある。また hCRM1 とヒト型受容体を発現させることによってラットにおいて HIV を増殖させることができる可能性を示した。hCRM1Tg ラットを作製できれば、新しい抗 HIV 薬の評価系につながることを期待される。

このようにエイズ動物モデルの作製を進めると同時に、一方で細胞、個体レベルで抗 HIV 薬の標的分子の探索や解析を行い、動物モデルを用いた抗 HIV 薬の開発・評価を行うための基盤を作ることができた。

F. 研究発表

各分担研究報告書に掲載。

III. 分担研究報告

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

エイズ治療薬開発のためのマウスモデルの開発

分担研究者：岩倉洋一郎（東京大学医科学研究所）

研究要旨

エイズ治療は HAART 治療法の導入により大きく前進したが、潜伏ウイルスの存在や薬剤耐性ウイルスの出現などの問題によって、まだ完全に治癒できるまでには至っていない。本研究では新しい治療法の開発に資するため、潜伏ウイルスの活性化機構について検討を加えると共に、新たなエイズモデルの開発を試みた。我々はこれまで HIV 遺伝子導入トランスジェニック (Δ pol-Tg) マウスを HIV の潜伏感染モデルとして用いることにより、HIV の活性化には LTR U3 内の CREB/ATF 結合領域の脱メチル化が必要であり、脱メチル化は細胞周期依存性に起きることを明らかにしてきた。また CD4 プロモーターや lck プロモーターを用いて HIV の転写活性に必要な転写に関与する CyclinT1 や核外輸送に関与する CRM1 のトランスジェニック (Tg) マウスを作製してきた。当該年度では CD4 プロモーターや lck プロモーター-CyclinT1 及び CRM1 のダブル Tg を作製し、 Δ pol-Tg マウスと交配させることによりウイルス産生の効率の上昇を試みた。また、昨年明らかにしたマウスに於ける HIV pre-integration complex の核移行過程における宿主域バリアーはマウス細胞におけるインテグラーゼ (IN) の機能障害に起因することを見いだした。さらに骨髓細胞特異的に CXCR4 を欠損するコンディショナル KO マウスを作製し、CXCR4 が骨形成機能にも関与する可能性を示唆した。

1. 研究目的

抗 HIV 薬の開発に適した小動物エイズモデルを作製するために、HIV 感受性マウスの作製と共に、HIV キャリアーマウスの作製を試みている。また、これらのマウスを用いて、HIV の増殖機構や発症機構を解析すると共に、病態形成に関与する種々の宿主因子について、その生理的、病理的役割を明らかにすることを目指している。

1) hCRM1 及び hCyclin T1 ダブルト

ランスジェニックマウスの作製及び Δ pol-Tg マウスとの交配

最近、CyclinT1 (CycT1) が転写因子として HIV の転写に関与しており、この因子が宿主域バリアーの一因になっていることが示された。また、当研究班の班員の志田らは、CRM1 が HIV mRNA の核外輸送に関与しており、この因子も宿主域バリアーを構成している可能性を示唆した。そこで、本研究ではこれらの因子をヒト型化した Tg マウスを作製し、HIV 遺伝子導入トランスジェニック

(Δ pol-Tg) マウスと掛け合わせるにより、さらに発現効率の良いキャリアーモデルの作製を試みた。

昨年度までに我々は、 β -アクチンプロモーターの制御下にヒト CycT1 遺伝子を導入したマウス Tg マウスを作製した。 β -アクチンプロモーター CycT1 Tg マウスは Δ pol-Tg マウスと掛け合わせると HIV 遺伝子の転写効率が 1000 倍も亢進し、血中のウイルス粒子濃度は 9 ng/ml にも達することを観察している。しかし、HIV 遺伝子の発現が T 細胞に限局せず、筋肉や皮膚などいろいろな臓器でみられ、エイズ感染者の発現状態と異なることが分かった。また、この Tg は生後 8 週齢までに半分以上のマウスが死亡するため、成体での遺伝子発現や免疫機能の解析が困難であった。そこで、実際の感染者により近いモデルを作製するため、昨年度 T 細胞特異的に制御できる CD4 プロモーターや lck プロモーターを用いたヒト CycT1 Tg 及びヒト CRM1 遺伝子を作製した。今年度は作製した CD4 プロモーターまたは lck プロモーター-CycT1 Tg 及びヒト CRM1 遺伝子のダブル Tg マウスを作製し、 Δ pol-Tg マウスと掛け合わせることで、T 細胞特異的に HIV 粒子産生の効率を上げることを試みた。

2) マウス細胞に於ける HIV 宿主域バリアー過程の解析

HIV 感受性マウスを作製するために、マウス細胞に於ける HIV 宿主域バリアー過程の同定を試みた。これまでヒト CD4 遺伝子、ヒト CCR5 遺伝子、ヒト CCR3 遺伝子、ヒト CXCR4 遺伝子、などを導入した Tg マウスを作製した。しかしながら、これらのマウス T 細胞にウイルスは侵入するものの、増殖は認められず、さらにヒト CyclinT1 を導入しても同様であった。従って、これらの事実はレセプター、転写因子以外に宿主域バリアーとなるステップが存在することを示唆する。昨年度我々は、マウス細胞に於ける HIV 宿主域バリアー過程は pre-integration complex (PIC) の核移行過程にあることを明

らかにした。今年度は PIC の核移行に関与すると考えられている HIV 蛋白であるインテグラーゼ IN 及び Vpr の GFP 融合発現ベクターを作製し、それをヒト細胞またはマウス細胞に過剰発現させることにより、IN 及び Vpr のマウス細胞における局在を解析した。

3) CXCR4 の生理機能の解析

T 細胞上に発現している CXCR4 は HIV 感染時のコ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が検討されている。また、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ている。CXCR4 の生体内での機能を明らかにすることは、CXCR4 を標的とした治療薬の副作用の予測を可能にし、最大限の効果にもつながると考えられる。我々は昨年度までに T 細胞特異的に CXCR4 遺伝子を欠損させたコンディショナルノックアウトマウス (lckcre-CXCR4 KO) を作製し、このマウスでは胸腺内の T 細胞のアポトーシスが亢進し、T 細胞の数や割合が減少していることを明らかにした。今年度の研究では CXCR4 シグナルによるアポトーシス抑制のメカニズムを詳細に解析すると共に、新たに骨髓細胞特異的に CXCR4 を欠損させたコンディショナル KO マウス (Mxcre-CXCR4 KO) を作製し、解析した。

2. 研究方法

1) hCRM1 及び hCyclin T1 トランスジェニックマウスの作製及び Δ pol-Tg マウスとの交配

HIV-1 の遺伝子発現が、ヒト CycT1 やヒト CRM1 の発現により亢進しているかどうか検討するために CD4-hCycT/hCRM1 マウスまたは lck-hCycT/CRM1 と Δ pol-Tg を交配させ、仔マウスの脾臓、胸腺及びリンパ節の RNA を抽出後、RT-PCR を行った。

また LPS を腹腔注射 24 時間後の免疫組織についても同様に RNA を抽出し、ノーザンブロット解析を行った。

2) マウス細胞に於ける HIV 宿主域バリアー過程の解析

IN または Vpr の核移行機能を検討するために、GFP 発現ベクターを構築した。その GFP 融合発現ベクターをヒト子宮頸癌細胞である HeLa あるいはマウス繊維芽細胞である NIH3T3 にリポフェクション法によりトランスフェクションさせ、24 時間後に共焦点顕微鏡により観察した。

3) CXCR4 の生理機能の解析

T 細胞特異的に CXCR4 遺伝子を欠損させたマウス (*lckcre-CXCR4 KO*) の胸線細胞を採取し、その細胞を培養中 SDF-1 あるいは無血清培地処理後、フローサイトメトリー法を用いてアポトーシスを検討した。

一方骨髄細胞特異的に CXCR4 を欠損させたコンディショナル KO マウス (*Mxcre-CXCR4 KO*) の作製のため、CXCR4 の Exon 2 を LoxP 塩基配列で挟んだベクターを構築した。このベクターを用いて Tg マウスを作製後、Mx プロモーター下に Cre 遺伝子をノックインした Mx-Cre マウスと交配させた。その仔が 8-10 週齢時に poly IC を処理することによって骨髄特異的 CXCR4 KO マウスを作製した。大腿骨の切片を作製後、HE 染色、破骨細胞を染色する TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase ; 酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ) 染色を行い骨量の評価をした。

(倫理面への配慮)

ヒト由来の試料としてリンパ球の分離のため健康人ならびに臍帯血提供者による採血が必要である。提供者の同意のもとに採血を行い、遺伝子解析等の解析は HIV の感染の有無のみを行い、その利益ならびに人権擁護の取り扱いに十分配慮する。また、この血液を他の

目的には一切使用せず、実験終了後は即時廃棄するものとする。従ってこのことによる患者への不利益は全く考えられない。また実験結果については、将来研究計画全体が終了した時点で、論文や報告書等の形で血液提供者が知ることができるようにする。

(動物実験について)

マウスの飼育・実験はそれぞれの所属機関の動物実験指針に従い行うものとする。各々の施設はよく整備されており、マウスは病原体汚染のない状態で飼育されている。動物実験においては動物愛護の精神に基づき、動物の使用数を最小限にとどめると共に、使用にあたっては苦痛を最小限にとどめるため、ネンブタールなどの麻酔薬を用いるものとする。また最終処分はネンブタールの過剰投与あるいは炭酸ガスにより行う。

4. 結果と考察

1) hCRM1 及び hCyclin T1 トランスジェニックマウスの作製及び Δ pol-Tg マウスとの交配

作製した CD4-hCycT/CRM1 Tg あるいは *lck-hCycT/CRM1 Tg* マウスの脾臓、胸腺、リンパ節を用いた RT-PCR 法により、発現の高い 2 系統を Δ pol-Tg マウスとの交配に用いた。仔マウスの脾臓、胸腺、リンパ節由来の RNA を用いたノーザンブロット解析を行った結果、LPS 無刺激では Δ pol-Tg マウスでも CD4-hCycT/CRM1/ Δ pol-Tg マウスでも HIV 遺伝子発現が低く、HIV RNA のバンドが確認できなかった。LPS 刺激時に HIV 遺伝子発現は上がったが、hCycT1 や hCRM1 による HIV 遺伝子発現上昇への影響は認められなかった。これらの結果から、導入遺伝子 hCycT1 あるいは CRM1 の発現が低く HIV 遺伝子の発現に十分に影響を与えない可能性が考えられる。現在より強発現する Tg マウスを再度作製中である。

2) マウス細胞に於ける HIV 宿主域バリアー過程の解析

GFP-IN あるいは GFP-Vpr の発現ベクター-HeLa あるいは NIH3T3 に過剰発現させた結果、GFP-Vpr は HeLa、NIH3T3 共に核局在が観察された。しかし GFP-IN は HeLa では核局在が観察されたが、NIH3T3 では細胞質に局在した。以上の結果により、マウス細胞においては IN と相互作用する核移行因子が存在しない、あるいは IN の核移行を阻害する因子が存在することが推察された。現在その因子を探索中である。

3) CXCR4 の生理機能の解析

T 細胞特異的に CXCR4 遺伝子を欠損させたコンディショナル KO マウス (Ickcre-CXCR4 KO) での T 細胞減少の原因を明らかにするために胸腺細胞培養中 SDF-1、無血清培地処理後フローサイトメトリー法を行い T 細胞アポトーシスに対する解析を行った。その結果、SDF-1、無血清培地処理共に KO マウスと野生型マウスの間に差を認められなかった。昨年報告した SDF-1/CXCR4 からのシグナルの下流に存在するアポトーシス抑制蛋白 PKB タンパク質のリン酸化にも差が認められなかったという結果も含めて、Ickcre-CXCR4 KO の胸腺 T 細胞アポトーシス亢進には SDF-1 は関与しないということが明らかになった。また無血清培地処理後においても差が認められなかったことから、ストレス誘導性のアポトーシス亢進機構も働いてないことが示唆された。CXCR4 の発現低下によって T 細胞のアポトーシスが亢進する事の原因を解明することが、エイズ患者における CD4 陽性細胞減少の機構解明につながると考えられる。今後、その他のアポトーシス関連タンパクの関与を検討する予定である。

一方 Mxcre-CXCR4 KO マウスの大腿骨の HE 染色から、この KO では骨量が増加し、大理石骨病様の症状が観察された。さらに破骨細胞を染色する TRAP 染色により、骨表面における破骨細胞数の低下が示されたこと

から、CXCR4 が破骨細胞形成に関与する可能性が示唆された。破骨細胞前駆細胞で CXCR4 の発現が認められること、CXCR4 発現細胞は SDF-1 に対し走化生を示すこと、骨表層に存在する骨芽細胞には SDF-1 の高発現が認められることなどから、破骨細胞が骨表面に移動するために、SDF-1/CXCR4 システムを使っていることが考えられる。以上の結果により、HIV 治療における CXCR4 の中和抗体あるいは CXCR4 阻害剤の使用は患者さんに骨量増加を引き起こす可能性が示唆された。

E. 結論

より効率的な感染モデルの樹立を目指して、CD4 プロモーターや Ick プロモーターを用いた CyclinT1 や CRM1 のダブル Tg を作製し、HIV (Δ pol) Tg マウスとの掛け合わせを行った。これらのマウスにおいて、恒常的な HIV 遺伝子発現が認められれば、エイズ病態解析や治療薬開発のスクリーニング系として有用であると考えられる。この他、HIV 感受性マウスの開発のため、宿主間バリアーとなっている PIC の核移行過程を検討し、マウス細胞においては IN の機能に問題があることを見いだした。この結果はマウスにおける新たな宿主バリアー因子の発見への手掛かりを与えるものである。また、CXCR4 欠損マウスを用いて、CXCR4 が T 細胞の生存だけでなく骨形成に重要な役割を果たしていることを明らかにした。これらの結果は CXCR4 を標的とした治療薬を用いる際の注意点のひとつを示すものである。

6. 研究発表

1) 論文発表

Kobari, Y., Misaki, Y., Setoguchi, K., Zhao, W., Komagata, Y., Kawahata, K., Iwakura, Y., and Yamamoto, K. T cells accumulating in the inflamed joints of a spontaneous murine model of rheumatoid arthritis become restricted to common clonotypes during disease progression.

- Int. Immunol., 16, 131-138 (2004).
- Ishida, Y., Kondo, T., Takayasu, T., Iwakura, Y., Mukaida, N. The Essential Involvement of Cross-Talk between IFN- γ and TGF- β in the Skin Wound-Healing Process. *J. Immunol.*, 172, 1848-1855 (2004).
- Ishihara, K., Sawa, S.I., Ikushima, H., Hirota, S., Atsumi, T., Kamimura, D., Park, S.J., Murakami, M., Kitamura, Y., Iwakura, Y., Hirano, T. The point mutation of tyrosine 759 of the IL-6 family cytokine receptor gp130 synergizes with HTLV-1 pX in promoting rheumatoid arthritis-like arthritis. *Int. Immunol.*, 16, 455-465 (2004).
- Ishida, Y., Maegawa, T., Konodo, T., Kimura, A., Iwakura, Y., Nakamura, S., Mukaida, N. Essential Involvement of IFN- γ in *Clostridium difficile* Toxin A-induced Enteritis. *J. Immunol.*, 172, 3018-3025 (2004).
- Nakaya, T.A., Kita, M., Kuriyama, H., Iwakura, Y., Imanishi, J. *Panax ginseng* Induces Production of Proinflammatory Cytokines via Toll-like Receptor. *J. Interferon Cytokine Res.*, 24, 93-100 (2004).
- Li, Y., Ishii, K., Hisaeda, H., Hamano, S., Zhang, M., Nakanishi, K., Yoshimoto, T., Hemmi, H., Takeda, K., Akira, S., Iwakura, Y., Himeno, K. IL-18 gene therapy develops Th1-type immune responses in *Leishmania major*-infected BALB/c mice: is the effect mediated by the CpG signaling TLR9? *Gene Ther.*, in press.
- Sashinami, H., Nakane, A., Iwakura, Y. and Sasaki, M. Effective Induction of Acquired Resistance to *Listeria monocytogenes* by Immunizing Mice with In Vivo-Infected Dendritic Cells. *Infect. Immun.*, 71, 117-125 (2003).
- Nakae, S., Komiyama, Y., Narumi, S., Sudo, K., Horai, R., Tagawa, Y., Sekikawa, K., Matsushima, K., Asano, M., and Iwakura, Y. IL-1-induced TNF α elicits inflammatory cell infiltration in the skin by inducing interferon- γ -inducible protein-10 in the elicitation phase of contact hypersensitivity response. *Int. Immunol.*, 15, 251-260 (2003).
- Tanaka, J., Ishida, T., Choi, B.-I., Watanabe, T., Yasuda, J., and Iwakura, Y. Latent HIV-1 reactivation in transgenic mice requires cell cycle-dependent demethylation of CREB/ATF sites in the LTR. *AIDS*, 24, 167-175 (2003).
- Nakae, S., Komiyama, K., Yokoyama, H., Nambu, A., Umeda, M., Iwase, M., Homma, I., Sudo, K., Horai, R., Asano, M. and Iwakura, Y. Interleukin-1 is required for allergen-specific Th2 cell activation and the development of airway hypersensitivity response. *Int. Immunol.*, 15, 483-490 (2003).
- Voronov, E., Shouval, D. S., Krelin, Y., Cagnano, E., Benharroch, D., Iwakura, Y., Dinarello, C. A., and Apte, R. N. Interleukin 1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 2645-2650 (2003).
- Kirrii, H., Niwa, T., Yamada, Y., Wada, H., Saito, K., Iwakura, Y., Asano, M., Moriwaki, H., and Seshima, M. Lack of

- interleukin-1 β decreases the severity of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 23, 656-660 (2003).
- Kyuwa, S., Kawamura, S., Tagawa, Y., Iwakura, Y., Urano, T., and Yoshikawa, Y. Differences between BALB/c and C57BL/6 mice in mouse hepatitis virus replication in primary hepatocyte culture. *Exp. Anim.*, 52, 81-84 (2003).
- Iwakura, Y. Autoimmune chronic inflammatory arthropathy in mice transgenic for the HTLV-I *tax* gene. In "Two decades of adult T-cell leukemia and HTLV-I research", (eds. K. Sugamura, R. Uchiyama, M. Matsuoka, and M. Kannagi), Gann Monograph on Cancer Research, 50, Japan Scientific Societies Press and Karger, Tokyo, pp.197-218 (2003).
- Nakae, S., Horai, R., Komiyama, Y., Nambu, A., Asano, M., Nakane, A., and Iwakura, Y. The role of IL-1 in the immune system. In "Cytokine Knockouts", (ed. G. Fantuzzi), Humana Press, Totowa, NJ, pp. 95-109 (2003).
- Nakae, S., Saijo, S., Horai, R., Sudo, K., Mori, S., and Iwakura, Y. IL-17 production from activated T cells is required for the spontaneous development of destructive arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 5986-5990 (2003).
- Asano, M., Nakae, S., Kotani, N., Shirafuji, N., Nambu, A., Hashimoto, N., Kawashima, H., Hirose, M., Miyasaka, M., Takasaki, S., and Iwakura, Y. Impaired selectin ligand biosynthesis and reduced inflammatory responses in β -1,4-galactosyltransferase-I-deficient mice. *Blood*, 102, 1678-1685 (2003).
- Isoda, K., Shiigai, M., Ishigami, N., Matsuki, T., Horai, R., Nishikawa, K., Kusuhara, M., Nishida, Y., Iwakura, Y., and Ohsuzu, F. Deficiency of interleukin-1 receptor antagonist promotes neointimal formation after injury. *Circulation*, 108, 516-518 (2003).
- Miyake-Nishijima, R., Iwata, S., Saijo, S., Kobayashi, H., Kobayashi, S., Souta-Kuribara, A., Hosono, O., Kawasaki, H., Tanaka, H., Ikeda, E., Okada, Y., Iwakura, Y., and Morimoto, C. Role of Crk-associated substrate lymphocyte type in the pathophysiology of the rheumatoid arthritis in *tax* transgenic mice and in humans. *Arthritis Rheum.*, 48, 1890-1900 (2003).
- Matsuki, T., Horai, R., Sudo, K., and Iwakura, Y. IL-1 plays an important role in lipid metabolism by regulating insulin levels under physiological conditions. *J. Exp. Med.*, 198, 877-888 (2003).
- Mun, HS., Aosai, F., Chen, M., Piao, LX., Norose, K., Iwakura, Y., Yano, A. Pathogenicity of *Toxoplasma gondii* through B-2 cell-mediated downregulation of host defense responses. *Microbiol Immunol.*, 47, 533-542 (2003).
- Kariyone, A., Tamura, T., Kano, H., Iwakura, Y., Takeda, K., Akira, S., and Takatsu, K. Immunogenicity of Peptide-25 of Ag85B in Th1 development: role of IFN- γ . *Int. Immunol.*, 15, 1183-1194

(2003).

Norose, K., Mun, H.S., Aosai, F., Chen, M., Piao, L.X., Kobayashi, M., Iwakura, Y., and Yano, A. IFN- γ -Regulated *Toxoplasma gondii* Distribution and Load in the Murine Eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 44, 4375-4381 (2003).

Nakae, S., Nambu, A., Sudo, K., and Iwakura, Y. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J. Immunol.*, 171, 6173-6177 (2003).

Enomoto, H., Shiojiri, S., Hoshi, K., Furuichi, T., Fukuyama, R., Yoshida, C.A., Kanatani, N., Nakamura, R., Mizuno, A., Zanma, A., Yano, K., Yasuda, H., Takeda, K., and Komori, T. Induction of osteoclast differentiation by Runx2 through RANKL and OPG regulation and partial rescue of osteoclastogenesis in Runx2^{-/-} mice by RANKL transgene. *J. Biol. Chem.*, 278, 23971-23977 (2003).

2) 学会発表

1. 岩倉洋一郎：発生手法を用いたエイズモデルの開発。第4回熊本エイズセミナー招待講演、平成15年9月、熊本。
2. 鶴谷直美、角木基彦、崔秉日、岩倉洋一郎：マウス細胞へのHIV感染における種間バリアー過程の同定。第51回日本ウイルス学会、平成15年10月、京都。
3. 鶴谷直美、崔秉日、角木基彦、岩倉洋一郎：マウス細胞へのHIV-1感染における種間バリアーは pre-integration complex (PIC)の核移行過程にもある。第26回日本分子生物学会、平成15年12月、神戸。
4. 角木基彦、崔秉日、鶴谷直美、志田壽利、岩倉洋一郎：ヒト Cyclin T1 および CRM1 トランスジェニックマウスにおけ

る HIV-1 複製過程の解析。第26回日本分子生物学会、平成15年12月、神戸。

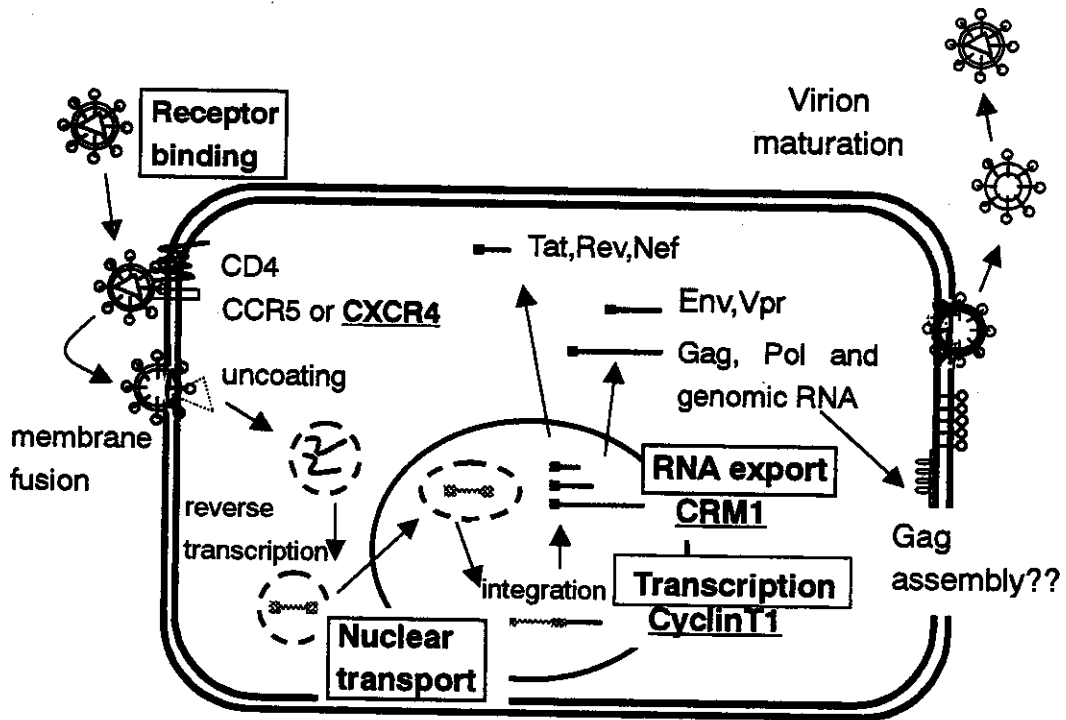


Fig. 1. HIV の生活環とマウスにおける種間バリアー因子。

四角で囲んだ過程は本研究で着目した種間バリアー過程。下線は今年度作製したノックアウトあるいはトランスジェニックマウスの宿主側因子。

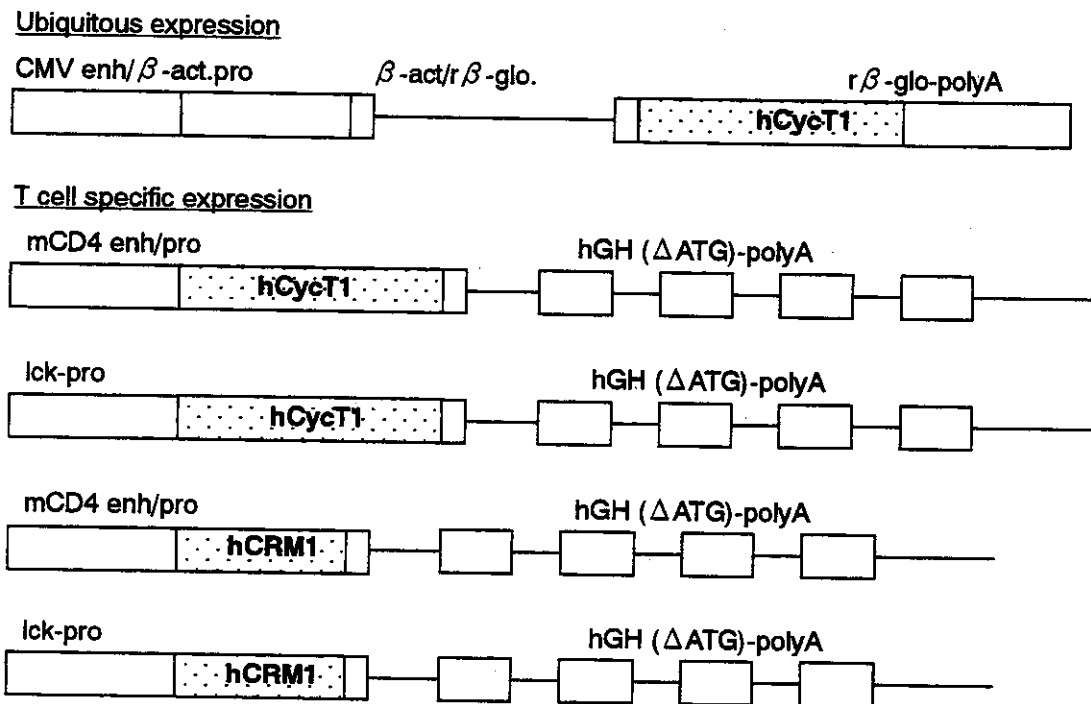


Fig. 2. 作製したトランスジェニックマウスのコンストラクト。

トランスクリプトーム解析により明らかになった Tat による OGG1 発現誘導と HIV のゲノム保持機構

分担研究者：岡本 尚（名古屋市立大学大学院医学研究科細胞分子生物学）

研究要旨

Tat 発現に伴う遺伝子発現プロファイルの変化を追求した。その結果、酸化ストレスに伴う DNA (guanine) 修飾の修復酵素 OGG1 遺伝子の誘導が明らかになった。その分子遺伝学的解析の結果より、Tat は OGG1 転写の抑制因子である AP4 に結合し、AP4 を OGG1 プロモーターから遊離させることによって、OGG1 の転写を誘導することがわかった。一方、Tat の発現に伴って細胞内酸化ストレスは著明に増加していた。それにも関わらず DNA の酸化修飾によって生ずる 8-OH-dG の量は Tat 発現によって低下した。これらのことから、Tat は OGG1 を誘導することによってウイルス複製に伴う酸化ストレスによる遺伝子変異をあらかじめ抑制する作用を持つことが明らかになった。

A. 研究目的

Tat は HIV の増殖に必須の転写活性化因子であるが、がん化促進、免疫抑制、酸化ストレス誘導作用等を有することが報告されており、HIV 感染症の進展に多面的な影響を及ぼしている。その分子機構を追究するために、遺伝子発現プロファイル解析を実施し Tat 被制御遺伝子を包括的に検索した。その結果、OGG1 の発現誘導を認めたので HIV 感染における意義を追求した。

（倫理面への配慮）

本研究には該当せず。

B. 結果

(1) Tat は DNA glycosylase である OGG1 遺伝子発現を誘導する。

Tat 被制御遺伝子を解析するにあたり、Ponasteron A (pon A) で Tat および mutant Tat(mTat) の発現を制御できる細胞株を新たに樹立した。樹立した細胞において pon A 特異的な Tat および mTat の発現が Western blot(WB)法で確認でき、Tat 誘導細胞においては HIV-1 遺伝子の活性化と Cyclin T1 との結合も認められた。本細胞を用いて Tat 非誘導時、誘導後の遺伝子発現プロファイルを相互に比較を行った結果、酸化ストレス

DNA 傷害に対する repair enzyme である OGG1 が Tat によって最も強く発現誘導を受けていた。RT-PCR およびリアルタイム PCR によって遺伝子レベル、WB において蛋白レベルでの OGG1 の発現誘導が確認できた(Fig. 1)。

2) Tat は OGG1 promoter 上の AP-4 結合サイトに作用し OGG1 の発現を直接誘導する。

Tat は酸化ストレスを誘導することが知られており、Tat が酸化ストレスを介して OGG1 の発現を誘導していることが推察された。実際に Tat 発現細胞においては細胞内レッドクスバランスが酸化方向にシフトしていた。しかしながら、抗酸化剤を前処理しても Tat による OGG1 誘導作用は認められた。さらに、酸化ストレスのインデューサーである H₂O₂ や TNF- α 等は OGG1 の発現を誘導しなかったことから、Tat は直接 OGG1 の発現を誘導していることが推察された。実際に、OGG1 promoter を用いて Luciferase assay を行った結果、Tat は OGG1 promoter を活性化した。さらに、OGG1 promoter 上の責任領域を決定するために種々の変異 OGG1 promoter を作製し Tat の作用を検討した。その結果、5 末端側の AP-4 結合サイトを変異させた promoter においては Tat の効果が認められなくなった(Fig. 2)。

さらに興味深いことに本 promoter においては basal level での転写活性が上昇していた (Fig. 2)。以上の結果から、AP-4 は OGG1 の発現において negative に作用しており、Tat は AP-4 による阻害作用を解除している可能性が推察された。実際に OGG1 promoter とともに AP-4 を強発現させると、Tat による活性化作用と basal level での転写活性が抑制された。

(3) Tat は AP-4 と相互作用し AP-4 の OGG1 promoter への結合を抑制する。

AP-4 は HLH 型転写因子で GC box に結合しいくつかの遺伝子発現を促進または抑制することが報告されているが、そのメカニズムや相互作用因子等の解析はなされていない。そこで、AP-4 の DNA 結合能に対する Tat の作用を *in vitro* において EMSA にて検討した。その結果、Tat の発現量に依存して AP-4 の DNA 結合能が低下した。次に Tat と AP-4 が相互作用する可能性を推察し *in vivo* において IP-WB assay を行ったところ、Tat は内在性の AP-4 と結合した。以上の結果は、OGG1 promoter 上の AP-4 結合サイトを用いた ChIP assay においても認められ (Fig. 3)、Tat が AP-4 と相互作用することにより AP-4 の OGG1 promoter への結合を抑制している可能性が示唆された。

(4) Tat は細胞内 8-oxo-dG 産生を抑制する。

酸化ストレスは酸化型 guanine である 8-oxo-dG を誘発し G:C から T:A への transversion を起こすことが知られている。OGG1 は 8-oxo-dG を除去することにより transversion による DNA の変異を阻止している。実際に OGG1 ノックアウトマウスにおいては OGG1 による修復機構が働かないため 8-oxo-dG 量が上昇することが報告されている。Tat が OGG1 の発現を誘導しことから、8-oxo-dG 量を HPLC-EC 法にて測定した。その結果、Tat の発現量とともに 8-oxo-dG 量が非発現細胞の baseline level よりも有意に低下していた (Fig. 4)。他方、トランス活性化能を失った mTat 発現細胞においては、OGG1 遺伝子の発現誘導作用および

上記の抑制作用は見られなかった。以上の結果から、Tat により誘導された OGG1 が作用し 8-oxo-dG 量が低下していることが推察された。

C. 考察

Tat は宿主のレドックスバランスを酸化方向にシフトし HIV の転写に対して有利に働く一方で、あらかじめ OGG1 を誘導することによって Transversion による HIV-1 のゲノム変異を未然に防止している (feed-forward) 可能性が示唆された。また、最近 APOBEC3G/CEM15 による HIV ゲノム変異 (G:C から A:T への transition) を Vif が抑制していることが報告されたが、今回の結果から Tat も Vif とともに HIV ゲノムの安定性に関与していることが推察された。

D. 研究発表

1. 論文発表

Jiang, X., Takahashi, N., Matsui, N., Tetsuka, T., and Okamoto, T.: The NF- κ B activation in the lymphotoxin beta receptor signaling depends on the phosphorylation of p65 at serine 536. *J. Biol. Chem.* 278: 919-926, 2003

Jiang, X., Takahashi, N., Ando, K., Otsuka, T., Tetsuka, T., and Okamoto, T.: NF- κ B p65 transactivation domain is involved in the NF- κ B-inducing kinase (NIK) pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301:583-590, 2003

Matsumura, T., Degawa, T., Takii, T., Hayashi, H., Okamoto, T., Inoue, J., and Onozaki, K.: TRAF6-NF- κ B pathway is essential for IL-1-induced TLR2 expression and its functional response to TLR2 ligand in murine hepatocytes. *Immunology* 109:127-136, 2003

Okano, A., Usuda, N., Furihata, K., Nakayama, K., Tian, Q B., Okamoto, T., and Suzuki, T.: Huntingtin-interacting