

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

抗エイズ薬開発のための小動物評価系の開発と

新規治療薬の開発研究

(H16-創薬-007)

平成18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)

平成19(2007)年 3月

# 目次

## I. 総括研究報告

抗エイズ薬開発のための小動物評価系の開発と新規治療薬の開発研究-----1-10

岩倉 洋一郎

## II. 分担研究報告

1. 抗エイズ薬開発のためのマウスモデルの開発 ----- 11-16

岩倉 洋一郎

2. HIV ラット感染モデルの開発 ----- 17-21

志田 壽利

3. 造血細胞移植 SCID マウスの HIV モデル動物への応用 ----- 22-29

小柳 義夫

4. 抗エイズ薬開発のためのマウス個体への感染系開発 ----- 30-38

小糸 厚

5. HIV 転写制御機構における分子標的と小動物を用いた治療法の評価に関する研究  
----- 39-43

岡本 尚

6. 生体分子による HIV-1 複製抑制 ----- 44-49

神奈木 真理

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 51-62

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 63-376

## I. 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

抗エイズ薬開発のための小動物評価系の開発と新規治療薬の開発研究

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 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、小動物を用いた新たなエイズモデルの開発を目指すと共に、抗 HIV 薬の候補分子、標的分子の解析を行った。この中で、(1) マウスの宿主障壁の一つに PIC の核移行阻害があることを見いだしていたが、今回ヒト LEDGF の導入によりマウス細胞内での HIV 感染効率の上昇が見られた。(2) ラット T 細胞特異的な cyclophilinA 依存的な HIV 複製阻害因子の存在を見いだした。(3) マウス及びラット APOBEC1, 3 の HIV 抑制活性見いだした。(4) NOG マウスの新生児肝臓内にヒト臍帯血 CD34 陽性細胞を移植すると DC が構築されることから、HIV 感染時における DC の機能評価系として有望であることが示された。(5) 転写因子の AP-4 は TBP の TATA box への結合を阻止し、同時に HDAC をリクルートすることによって HIV プロウイルスからの転写を抑えることを明らかにした。(6) CD8 陽性 CTL 株の培養上清から HIV 増殖抑制蛋白の精製を試み、Mycoplasma 由来の arginine deiminase である事を明らかにした。このように小動物エイズモデルの作製を進めると同時に、抗 HIV 薬の候補分子や標的分子の解析を行い、小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研究を押し進めることができた。

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：

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)

小柳 義夫 (京都大学ウイルス研  
究所所属エイズ研究施設 教授)

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)

小糸 厚 (熊本大学エイズ学研究中心 センター 助教授)

神奈木 真理 (東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 教授)

## A.研究目的

HAART 治療が出現した現在、エイズ治療の次の目標はウイルス負荷を減少させることによって、発症を遅らせると共に新たな耐性ウイルスの出現を抑えることと、最終的には潜伏ウイルスを完全に排除する方法を開発することである。このために必要な動物モデルが、現在霊長類以外に適当な系がないことは治療薬開発上の大きな障害である。本研究では、HIV-1 (HIV) の小動物における増殖の障壁に関与する宿主因子を探索、同定し、これをヒト型化することにより、抗エイズ薬開発に適した小動物モデルを開発する。また、ヒトリンパ球の増殖により適した SCID-*hu* モデルを開発する。宿主障壁となる宿主因子は新たな抗 HIV 薬の標的として重要であり、これを阻害する小分子化合物のスクリーニングを行う。また、小動物モデルを用いることにより、発症機構を解析すると共に、抗エイズ薬を評価し、評価系としての有用性を検証する事を目的としている。

この中で、

1) 岩倉は抗 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ともに、HIV キャリアーマウスの作製を試みる。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開発する共に、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旨とする。

2) 志田は HIV ウイルス mRNA 形成に必要なウイルスの調節因子 Rev/Rex を支持すべきラット因子 rCRM1 が機能しないことが、ラットでの HIV/HTLV-1 の増殖の非効率の 1 原因であることを発見した。さらに、hCRM1 を恒常的に発現させたラット細胞を作成して検討した結果、ヒト細胞に準じる HIV 粒子が生産されることを明らかにした。そこで、受容体と hCRM1 を共発現する Tg ラットを作成すると共に、ラット T 細胞株におけるヒト因子の要求性と抑制因子をさらに検討し、同定された因子を発現する Tg ラットを作成することを目的とした。

3) 小糸は、APOBEC3(APO3)が逆転写の際 first-strand DNA に作用して感染性を抑制するが、HIV Vif はヒト APO3 にもみ対抗し、マウス由来のものには作用せず、HIV の宿主域がきわめて狭いことの一因となっている可能性があることから、この HIV に対する自然防御機構がげっ歯類に広く存在するか否かを明らかにするため、ラット由来 APO3 をクローニ

ングし、その活性を検討した。また、マウス、ラット由来 APOBEC1 の抗 HIV 活性を評価した。

4) 小柳はヒト末梢血を移植した SCID マウス内で再現される活性化 T 細胞における HIV の感染から、その経時的な解析からウイルス産生量や病態の推移、そして候補薬剤の体内における抗ウイルス作用など多くの情報を得る技術を開発する。さらに、ヒト血液・リンパ網内系を忠実に再現しうるヒト化マウス (NOG-hCD34 マウス) を用い、*in vivo* におけるヒト DC の動態と、DC が HIV 病態に果たしている役割を解明することを目的とした。

5) 岡本は bHLH-Zip 型の転写因子である AP-4 に注目した。TGF- $\beta$  や caspase 9, angiotensinogen などの遺伝子プロモーターにその結合配列が存在するが、詳細な制御機構は不明である。HIV LTR の TATA box 近傍にも AP-4 の結合配列が存在し、種々の HIV サブタイプにおいてこの結合部位がよく保存されている。そこで、HIV 発現に対する AP-4 の作用と作用機構を解明することを目的とした。

6) 神奈木は免疫 T 細胞が産生する HIV 抑制因子を新たな抗 HIV 予防治療剤候補と位置づけ、その抑制機序解明と同定を目指している。これまでに、健常者由来の CD8+ アロ特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が、抗原非特異的に細胞接触依存性に HIV-1 複製抑制能を持つことを見出したが、1 株だけは上清も HIV-1 抑制

活性を示した。この因子として

Mycoplasma 由来の arginine deiminase (ADI) を同定し、抗 HIV 活性の本体であるかどうかの確認および細胞毒性の解析を行った。

## B. 研究方法

### 1) 岩倉

LPS 刺激時の HIV 発現におけるサイトカイン、新規タンパク合成、NF- $\kappa$ B の関与を明らかにすべく、TNF- $\alpha$  中和抗体、シクロヘキシミド (CHX)、あるいは PDTC 存在下で LPS 刺激を行い、HIV 発現をリアルタイム PCR 解析により計測した。

さらに、マウス細胞における HIV インテグラーゼの核移行過程を解析するために、hLEDGF 安定発現 NIH3T3 株を樹立し、VSV-G pseudotyped HIV 増殖をルシフェラーゼアッセイにより測定した。

マウス細胞における HIV 増殖時の hCycT, hCRM1 の機能を明らかにすべく、hCycT, hCRM1 トランスジェニックマウスを作製し、マクロファージにおける VSV-G pseudotyped HIV の複製をルシフェラーゼアッセイおよびリアルタイム PCR 解析により定量した。

### 2) 志田

HIV-1 の増殖に必要なヒト遺伝子をレトロ／レンチベクターで transduce し、恒常的に発現する細胞を作成した。一過性

の発現は nucleofector を用いた electroporation によった。HIV の増殖は p24 ELISA によって測定した。GFP/Venus 発現ウイルスを感染させ、発光細胞を FACS で計測する事によって感染効率を算出した。hCyclinT1 ゲノムを含む BAC と、制御領域を全て有する hCD4 plasmid を用いて Tg ラットを作製した。

### 3) 小柳

臍帯血 CD34 陽性細胞を放射線照射新生児免疫不全マウス (NOG マウス) の肝臓へ移植した (NOG-hCD34 マウス)。このマウスに未分化 DC, 成熟 DC を尾静脈より移植した。その際、それぞれの DC を異なる蛍光色素によりラベルした。移植後 2 時間目のマウスの各組織を摘出して細胞を回収し細胞の存在の有無を判定した。

### 4) 小糸

ラット脾臓由来 APOBEC3 の全長, N 端側ドメイン、および C 端側ドメインに HA タグを付加して発現ベクターに組み込み、抗 HIV、抗 MLV 活性を解析した。さらに酵素活性部位の変異体を作製し、抗ウイルス活性を解析した。また逆転写産物の pol 領域を PCR で増幅し、G to A mutation の導入を検討した。Balb/C マウス、SD ラット、NZW うさぎ、フェレットおよびヒト小腸由来 mRNA より APOBEC1 cDNA をクローニングし、抗

HIV 活性を解析した。また、APOBEC3, APOBEC1 の分子進化的解析をおこなった。

### 5) 岡本

AP-4 による TBP の TATA box 結合性の変化を EMSA 法で調べた。AP-4 部位に変異を加えた種々の HIV LTR 変異体を作成し、AP-4 による HIV-1 転写に及ぼす影響をルシフェラーゼアッセイにて定量的に調べ、siRNA によって AP-4 をノックダウンした時の効果を調べた。潜伏感染細胞内での HIV LTR DNA への AP-4, TBP, HDAC, RNA pol II などの結合をクロマチン免疫沈降法 ChIP で調べた。

### 6) 神奈木

以前から HIV-1 感染者の CD8 陽性細胞が HIV-1 複製を抑制する未同定の液性因子 CAF (CD8+ cell antiviral factor) を産生することが報告されている。これとは別に、我々は、HIV-1 と無関係の抗原特異性を持つ CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が細胞接触依存性に HIV-1 複製抑制効果を示すことを報告してきた。この抑制効果は細胞傷害活性とは異なり、上清には抑制活性がないため CAF とも異なる活性と考えてきた。しかし、樹立した CTL 株のうち 1 株 (CTL-3) だけは細胞上清も HIV-1 抑制活性を示した。昨年度、我々はこの CTL 上清から HIV-1 抑制活性のある分画を部分精製し、質量

分析の結果、この分画に特異的な蛋白のバンドが Mycoplasma 由来の arginine deiminase(ADI)であることを同定した。本年度は、ADI がこの CTL 上清中の抗 HIV-1 活性の本体であるかどうかの確認および細胞毒性の解析を行なった。

## C.研究結果

### 1) 岩倉

LPS 刺激時におけるマクロファージからの HIV 発現は TNF- $\alpha$  中和抗体および CHX 存在下でも抑制効果が見られなかったことから、サイトカインの産生による二次的な効果によるものではなく、TLR を介した LPS の直接刺激が強く寄与していることが明らかになった。また、NF- $\kappa$ B 阻害剤 PDTC 存在下で発現が強く抑制されたことから、TLR の下流に位置する NF- $\kappa$ B がマクロファージにおける HIV 発現の中心的役割を担っていることが明らかになった。一方、Hela、NIH3T3 とともに、ヒトあるいはマウス LEDGF を co-transfection することにより GFP-IN は強い核局在を示した。更に、hLEDGF 安定発現 NIH3T3 細胞を樹立し、VSV-G pseudotyped HIV 感染を行い、ウイルス複製をルシフェラーゼアッセイにより評価したところ、親株の NIH3T3 細胞と比較して5倍前後の発現上昇が見られたものの、Hela 細胞と比較すると 1/10 以下であった。

hCycT, hCRM1 Tg のマクロファージに

VSV-G pseudotyped HIV を感染してウイルス複製を検討したところ、ルシフェラーゼアッセイでは hCycT Tg では野生型と比較して約5倍の発現増加が見られた。hCRM1 Tg では野生型と同程度であった。リアルタイム PCR 解析により、ウイルス mRNA の分布を詳細に解析したところ、hCycT Tg では 2kb, 4kb mRNA の発現は顕著に増加していたものの、9kb mRNA の増加は見られなかった。一方 hCRM1 Tg では 2kb mRNA に対する 9kb mRNA の割合が約2倍に増加しており、hCRM1 導入による Rev 活性の上昇が見られた。

### 2) 志田

HIV-1 の侵入過程にはマクロファージ、上皮系細胞に阻害因子はなく、T 細胞には cyclophilinA 依存的な阻害があった。ヒト cyclinT1 と CRM1 の導入により T 細胞で 100 倍以上の Gag の産生増強が見られた。興味深い事に、両因子の増強効率は細胞種によって異なっていた。上皮系細胞では強感染性、T 細胞では弱感染性のウイルスが作られた。hCyclinT1 と hCD4 のトランスジェニックラットを作製した。

### 3) 小柳

NOG マウスへのヒト CD34 陽性細胞の肝臓内移植によりヒト T 細胞が末梢血と脾臓において 5-10%以上存在するようになった。さらに、MDC, PDC が共に存



在していることが確認された。そして MDC の組織移行効率を検討した。脾臓、肝臓、そして胸腺において、移植した未分化 DC と成熟 DC が存在していることが確認され、肝臓に移行した未分化 DC/成熟 DC の細胞数は同等であったのに対し、脾臓と胸腺へ移行した細胞数は、未分化 DC に比して成熟 DC の方が多かった。

#### 4) 小糸

ラット APOBEC3 の C 末端のみで、HIV の感染性は著明に低下した。G to A hypermutation が確認され、その阻害が脱アミノ酵素活性に依存することを明らかにした。ラット APOBEC3 の全長、C 端側分子のいずれも、マウス APOBEC3 と同様に TTC\*配列を好んでターゲットにすることがわかった。MLV に対しては阻害活性を示さなかった。げっ歯類の APOBEC3 は急速にそのアミノ酸配列を変化させてきたことが示唆されたが、その選択圧は現時点では不明である。さらに、ラットのみならず、マウスの APOBEC1 も Vif 非依存性に HIV の感染性を 10 分の 1 程度に抑制することがわかった。

#### 5) 岡本

AP-4 は TBP の TATA box への結合を阻止し、同時に HDAC をリクルートすることによって HIV プロウイルスからの

転写を抑えることを明らかにした。この結果は、siRNA による AP-4 ノックダウンおよび HIV フルサイズ DNA クローンへの AP-4 結合部位欠失変異体の作成によって確認した。潜伏感染細胞株では刺激前では、AP-4 部位に AP-4 と HDAC が結合しているが、活性化により離脱し、TBP, RNA pol II がリクルートされることを証明した。

#### 6) 神奈木

ADI は arginine を枯渇させる酵素であるので、培養中に過剰量の arginine を加えたところ、抗 HIV-1 効果は阻害された。また、同細胞株を抗 Mycoplasma 剤で処理すると、上清中の抗 HIV-1 活性は消失したが細胞接触依存性の抗 HIV-1 効果は残っていた。さらに、arginine を添加しても細胞接触依存性の HIV-1 抑制は影響を受けなかった。Arginine はヒトでは必須アミノ酸ではなく正常細胞は合成できる。ADI を含む上清の添加により PHA 刺激した健常者由来のリンパ球には増殖抑制が認められたが apoptosis の誘導は認められなかった。

### D. 考察

#### 1) 岩倉

HIV-Tg マウスのマクロファージにおいて HIV 遺伝子を効率的に活性化させるためには、おそらく TLR を介した直接シグナルが必須であり、サイトカインなど

を介した2次的な刺激はほぼ必要でないことが示唆された。また、TLRの下流ではNF- $\kappa$ Bが必須であることが示唆された。これらの結果から、マクロファージにおける潜伏感染機構はリンパ球におけるものとは異なっている可能性が示唆された。一方、NIH3T3におけるGFP-INの細胞内局在は、ヒトLEDGFのみならずマウスLEDGFの過剰発現によっても核局在を示したことから、NIH3T3細胞で見られたGFP-INの細胞質局在はLEDGFの発現不足あるいはマウスLEDGFとHIV-INの相互作用が弱いことによる可能性が示唆された。また、ヒトLEDGFを導入したNIH3T3細胞では親株と比べて5倍程度のHIV増殖の増加が見られたものの、Hela細胞と比較すると1/10以下であることから、LEDGF以外の因子もマウス細胞における効率的なHIV増殖には必要である可能性が示唆された。hCycT, hCRM1 TgのマクロファージではTatおよびRev活性の上昇が見られた。これらのTgによりHIV感受性マウスの作製へ向けて進歩が見られた。現在、hLEDGF Tgを作製中であり、hCycT, hCRM1と交配させることにより、更に効率のよいHIV増殖が期待される。

## 2) 志田

本研究から、ラットのある種のT細胞にはTrim5様阻害因子が存在している事が示唆された。しかし、この因子は上皮

系細胞には発現しておらず、サルのTrim5aと似てはいるが、異なる分子だと予想される。さらに、上皮系細胞には存在しない、T細胞の感染性減弱因子も示唆された。これらの阻害因子を同定してノックダウンし、hCRM1とhCyclinT1を発現させる事がラット感染モデルの作成には必用と考えられる。

## 3) 小柳

免疫不全マウスへのヒト細胞移植によるヒトキメラマウスを確立した。その結果、マウス体内にヒトT, B, DC, マクロファージ細胞の新生を再現でき、HIV感染が可能であることそして、NOG-hCD34マウス内にDCが構築されていること、*in vitro*で調整したMDCが組織移行能を有していることが確認された。ヒトDCの機能評価実験系として利用することに成功した。

## 4) 小糸

げっ歯類APOBEC3は、個体内での生理的機能を含めて、解明されるべき興味深い問題が残されている。APOBEC1はげっ歯類では、小腸の他、肝臓、腎臓、脾臓、さらに生殖細胞系でもその発現がみられ、ゲノムを保護する機構に一役かっているのかもしれない。げっ歯類など小動物由来のAPOBEC3、APOBEC1の種々のレトロエレメントに対する活性は、今後、詳細に解析していく必要があると考えられる。また、我々はHIV/MLVシ

ュードタイプをヒト CD4/CXCR4 発現マウスに感染させ、個体レベルでのレトロウイルスの感染系として確立することを現在試みている。

#### 5) 岡本

宿主転写因子 AP-4 は HIV 複製を転写レベルで負に制御し、細胞内に潜伏感染しているプロウイルスからのウイルス複製を抑えることによってその維持に重要な役割を演じている。AP-4 結合配列は LTR 領域内の TATA ボックスのすぐ下流に位置し、AP-4 結合配列は種々の HIV-1 株の中でもよく保存されている。本研究では、AP-4 が TBP の TATA ボックスへの結合を抑制し、さらに AP-4 が転写コレプレッサーである HDAC1 を HIV-1 LTR にリクルートすることによって HIV 転写を抑制していることを初めて明らかにした。

#### 6) 神奈木

CTL-3 株に感染していた *Mycoplasma* 由来の ADI が CTL-3 株の上清の HIV-1 抑制効果の本体であったことが分かった。ADI はすでに抗癌剤として臨床試験の行なわれている薬剤であり、抗 HIV-1 薬としての開発可能性を持つと考えられる。しかし、CTL 株の細胞接触依存性の HIV-1 活性は *Mycoplasma* 感染や ADI とは無関係であり、CTL 表面分子による別の抑制機序によると考えられた。

### E.結論

マウスやラットの HIV 感受性宿主障壁因子を同定、ヒト型化する試みは着実に進んでおり、また一方では種特異的な HIV 複製阻害因子の探索も行われた。更に、NOG-*hu* マウスや MuLV pseudo virus の系も開発されつつあり、種々のアプローチによる小動物 HIV 感染系の構築が進んでいる。また、潜伏感染細胞の制御を目指した研究もマウスモデルを用いて進んでおり、再活性化時における TLR シグナルの重要性、および HIV ウイルスゲノムの転写における AP-4 の役割が明らかにされると共に、CTL 由来 HIV 抑制因子の精製、同定も進んでいる。これらの因子を標的とした新たな治療薬の開発はエイズの完全治癒に向けて非常に重要な意味を持つ。今後、これらの成果を組み合わせ、個体レベルでの抗エイズ薬評価系を構築する予定である。

### F.健康危険情報

なし

### F.研究発表

各分担報告書に掲載。

**F.健康危険情報**

なし

**F.研究発表**

各分担報告書に掲載。

## II. 分担研究報告

## 抗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 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ともに、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マウス (HIV-Tg) をHIVの潜伏感染モデルとして用いることにより、HIVの主要な標的細胞であるT細胞及びマクロファージにおけるHIV遺伝子発現制御機構について解析してきた。本年度は、HIV-TgのマクロファージにおけるLPS刺激時のHIV遺伝子再活性化機構の解析を行い、マクロファージにおけるHIV遺伝子の活性化には、サイトカインあるいは新規タンパク合成を介した2次的影響は必須ではなく、TLRを介した直接シグナルが重要であること、またこの下流で働くNF- $\kappa$ Bが必須であることを明らかにした。昨年度までに我々は、マウス細胞における新たな宿主域バリアとしてHIV pre-integration complex (PIC) の核移行過程が障害されること、LEDGFをヒト型化することでマウス細胞内でもインテグラーゼが正常に核移行することを見いだしたが、本年度はLEDGFを導入したマウス細胞ではHIVの増殖が増加するという結果を得た。さらに、hCycT, hCRM1 Tgを作製し、このTgのマクロファージではTatおよびRev活性の増加が見られることを示した。

### A. 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、HIV 感受性マウスの作製とともに、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開発する共に、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) HIV-Tgのリンパ球、マクロファージにおけるHIV遺伝子発現制御機構の解析

我々はこれまで、HIVキャリアーモデルマウスとしてHIV遺伝子導入トランスジェニックマウス(HIV-Tg)を作製し、このマウスの脾臓ではLPS刺激に伴い HIV遺伝子の発現誘導が起き、これには細胞増殖に依存したLTRU3中のCREB/ATF結合領域のCpG脱メチル化が重要な役割を果たしていることを示してきた。この時、HIV遺伝子の発現細胞を調べたところ、ほとんどはB細胞に起因するもので、T細胞からの寄与はB細胞の1/10程度しかないと明らかにした。一方で、HIV-Tgのマクロファージは種々

のTLRリガンドおよびサイトカイン刺激によりHIV遺伝子発現が誘導され、細胞種ごとに潜伏再活性化の仕組みが異なる可能性が示唆された。本年度はHIV-TgマクロファージのLPS刺激時のHIV遺伝子活性化に重要なシグナル経路を明らかにするためにHIV遺伝子発現制御機構の詳細な解析を行った。

#### 2) マウス細胞における HIV インテグラーゼの核移行過程の解析

これまでの解析から、マウス細胞においてはインテグラーゼが核局在できないことが PIC の非効率的な核移行の原因であることが示唆されたことから、インテグラーゼの核局在に関与することが報告されている LEDGF をマウス細胞に導入することにより、インテグラーゼの細胞内局在に対する影響を検討した。

### B. 研究方法

#### 1) HIV-Tg マクロファージにおける HIV 遺伝子発現制御機構の解析

マクロファージにおける HIV 発現を解析するために、

4% TGC を HIV-Tg の腹腔に投与し 3 から 5 日後にマクロファージを回収し、プレート上で 4 時間接着培養を行った後に非接着細胞を PBS で洗浄することによって除き、接着細胞をマクロファージとして用いた。100 ng/ml の LPS 存在下、刺激後 6 時間後の HIV 遺伝子の発現をリアルタイム PCR 解析により定量した。LPS 刺激時に産生される TNF- $\alpha$  による 2 次的な HIV 発現誘導の影響を見るために、抗 TNF- $\alpha$  抗体存在下で LPS 刺激を行った。サイトカインをはじめとする、LPS 刺激による新規タンパク合成の影響を調べるために、シクロヘキシミド存在下で LPS 刺激を行った。LPS による HIV 発現誘導時の NF- $\kappa$ B の影響を調べるために、NF- $\kappa$ B 阻害剤 PDTC 存在下で LPS 刺激を行った。

### 2) マウス細胞における HIV 感染時の ヒト LEDGF の効果

NIH3T3 細胞に pCAG-hLEDGF (ヒト LEDGF 発現ベクター)、または pCXN2 (コントロールベクター) をトランスフェクションし、ネオマイシンにより薬剤選択を行い、hLEDGF 安定発現株を得た。これらの細胞株に VSV-G pseudotyped HIV (NL-luc) を感染させ、2 日後にウイルス複製をルシフェラーゼアッセイにより評価した。

### 3) hCycT、hCRM1 トランスジェニックマウスの作製と解析

CAG プロモーター制御下に hCycT、hCRM1 を発現する Tg を作製し、このマウスの腹腔マクロファージに VSV-G pseudotyped HIV (NL-luc) を感染させ、ルシフェラーゼアッセイおよびリアルタイム PCR 解析により、HIV 複製後期過程における hCycT、hCRM1 の影響を評価した。hCycT Tg と HIV-Tg を交配させダブル Tg を作製し、マクロファージにおける HIV 遺伝子発現をリアルタイム PCR 解析により評価した。

## C. 研究結果

### 1) HIV-Tg のマクロファージにおける HIV 遺伝子発現制御機構の解析

マクロファージにおける LPS 刺激時の HIV 発現は、抗 TNF- $\alpha$  抗体及びシクロヘキシミドにより阻害されなかったが、NF- $\kappa$ B 阻害剤 PDTC 存在下で強く抑制された。また、全ての TLR リガンド、及び TNF- $\alpha$  刺激で効率的な HIV 遺伝子の発現上昇が見られ、発現量は LPS 刺激を行った B 細胞と同程度かそれ以上であった。

LPS 刺激による HIV 遺伝子の発現は脾細胞および B 細胞においては 24 から 48 時間後にピークに達したのに対し、マ

クロファージでは 6 時間後にピークに達した。

LPS 刺激によるマクロファージからの HIV 発現は 5-AC 処理群と未処理群で同程度の活性化を示した。

### 2) マウス細胞における HIV 感染時の ヒト LEDGF の効果

hLEDGF を導入 NIH3T3 細胞は、コントロールベクターを導入した NIH3T3 細胞および親株と比較して、VSV-G pseudotyped HIV 感染時のルシフェラーゼ活性が 5 倍程度増加していた。

### 3) hCycT、hCRM1 トランスジェニックマウスの作製と解析

hCycT Tg のマクロファージでは、野生型マウスと比較して VSV-G pseudotyped HIV 感染時のルシフェラーゼ活性および 2 kb、4 kb mRNA 発現量が約 5 倍増加していた。9 kb mRNA の発現量に差は見られなかった。hCRM1 Tg ではルシフェラーゼ活性の変化はなかったが、2 kb mRNA に対する 9 kb mRNA の割合が約 2 倍に増加していた。また、HIV-Tg と交配させた hCycT Tg のマクロファージでは HIV-Tg と比較して、未刺激時でも約 10 倍の HIV 遺伝子の発現上昇がみられ、LPS 刺激時も同様の発現増加がみられた。

## D. 考察

### 1) HIV-Tg のマクロファージにおける HIV 遺伝子発現制御機構の解析

抗 TNF- $\alpha$  抗体およびシクロヘキシミドが LPS 刺激時の HIV-Tg のマクロファージにおける HIV 遺伝子発現誘導に影響を及ぼさなかったことから、この発現誘導は、LPS 刺激によって誘導された TNF- $\alpha$  やその他のサイトカインによる 2 次的なものではなく、TLR を介した直接シグナルが最も重要であることが示唆された。また、TLR の下流にある NF- $\kappa$ B が LPS による HIV 遺伝子発現誘導には必須であることも明らかになった。これは、LPS 刺激時の脾細胞でみられた TNF- $\alpha$  や IL-1 などのサイトカイン依存的な発現誘導とは異なる。脾細胞の場合は B 細胞が主な HIV 発現細胞であったが、HIV-Tg の T 細胞は LPS を含めたあらゆる活性化刺激を行っても HIV の発現誘導がみられない。培養細胞を用いた解析から、HIV の潜伏感染に影響を及ぼす因子の一つとして宿主による HIV ゲノム挿入部位の配列依存的抑制機構が示唆されているが、HIV-Tg では全ての細胞で HIV の挿入部位が同一であるので、この Tg でみられた細胞種ごとの発現様式の違いは別のメカニズムによるものと考えられる。考えられるメカ

ニズムとしては、細胞種特異的なエピジェネティックな制御、転写因子の組み合わせ、転写伸長の補助因子であるヒト CyclinT1 (hCycT) の要求性の違いなどが考えられる。これらの可能性について、B 細胞では LTR 領域の CpG DNA のメチル化が重要な役割を果たしていることがわかっているが、今回の我々の結果によれば、T 細胞およびマクロファージで DNA メチル化による制御は見られない。また、hCycT を導入することによりマクロファージでは顕著な HIV 遺伝子発現上昇が見られるが、B 細胞及び T 細胞では見られないといった結果も得られた。これらの結果から、宿主ゲノム中の同じ場所に HIV 遺伝子が挿入されていても、細胞種ごとに全く異なる潜伏感染及び再活性化機構が存在することが示唆された。

#### 2) マウス細胞における HIV 感染時のヒト LEDGF の効果

NIH3T3 において、ヒト LEDGF の過剰発現により GFP-IN が核局在を示したことから、HIV 感染時の PIC の核移行阻害が LEDGF の種間格差によることが示唆された。hLEDGF を過剰発現した NIH3T3 細胞を樹立し、VSV-G pseudotyped HIV を感染させたところ複製効率の上昇が見られたことから、LEDGF は単にインテグラーゼの核移行のみならず HIV 複製においても重要な役割を果たしていることが明らかになった。現在、この複製効率の増加が HIV 複製過程のどこで起こっているのかを詳細に解析中である。また、マウス LEDGF でも GFP-IN の核移行が観察されたことから、NIH3T3 細胞における GFP-IN の細胞質局在は、内在性 LEDGF の発現量の減少、あるいはマウス LEDGF と IN の結合力の減少によるものと考えられる。現在、これらの可能性についても検討を行っている。

#### 3) hCycT、hCRM1 トランスジェニックマウスの作製と解析

細胞株で示唆された結果と同様に hCycT、hCRM1 はトランスジェニックマウスにおいても Tat および Rev 活性を上昇させたが、hCRM1 の効果は細胞株で得られた結果よりも小さなものであった。この原因としてトランスジェニックの発現量が小さいこと、アッセイ系の違い、細胞種の違いなどが考えられるが、現在これらの可能性について検討を行っている。また、志田らの報告によれば、ラット細胞では hCRM1 の効果は mRNA の存在比よりもむしろ HIV のタンパク発現に大きな影響を及ぼすことが示唆されることから、我々は現在 HIV タンパク産生における hCRM1 の影響を解析中である。さらに、リンパ球への

HIV 感染時における hCycT、hCRM1 の影響も解析している。

### E. 結論

#### 1) HIV-Tg マクロファージにおける HIV 遺伝子発現制御機構の解析

HIV-Tg では、宿主ゲノム中の同じ場所に HIV 遺伝子が挿入されているにもかかわらず、リンパ球とマクロファージ、あるいはリンパ球の中でも B 細胞と T 細胞で全く異なる機構による HIV 誘導が見られた。これは、潜伏感染および再活性化のメカニズムを考える上で非常に興味深い。今後、これら細胞種ごとの潜伏・再活性化のメカニズムを詳細に分子レベルで解明することにより、HAART 療法の問題点である潜伏感染細胞や薬剤耐性ウイルスを標的とした新たな抗 HIV 薬開発が期待される。

#### 2) マウス細胞における HIV 感染時のヒト LEDGF の効果

マウス細胞に LEDGF を過剰発現させることにより、マウス細胞における非効率な HIV 感染能が上昇した。これは、LEDGF 過剰発現マウスを作製することにより、よりヒトに近い HIV 感受性マウスが得られるものと期待される。

#### 3) hCycT、hCRM1 トランスジェニックマウスの作製と解析

hCycT、hCRM1 の過剰発現により、マクロファージにおいて Tat、Rev 活性の上昇が見られた。これらのマウスを HIV の受容体および上述したヒト LEDGF 発現トランスジェニックマウスと交配させることで、よりヒトに近い HIV 感受性マウスが得られるものと期待される。

#### (倫理面への配慮)

動物実験においては所属機関の動物実験指針に従った。また、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、ネブタールなどの麻酔薬を用いた。

### F. 研究業績

#### 論文発表

1. Hirota, K., Hashimoto, M., Yoshitomi, H., Tanaka, S., Nomura, T., Yamaguchi, T., Iwakura, Y., Sakaguchi, N., and Sakaguchi, S. T cell self-reactivity forms cytokine milieu for spontaneous development of IL-17<sup>+</sup> helper T cells that cause autoimmune arthritis. *J. Exp. Med.*, in



- press.
2. Sato, K., Suematsu, A., Okamoto, K., Yamaguchi, A., Morishita, Y., Kadono, Y., Tanaka, S., Kodama, T., Shizuo, A., Iwakura, Y., Cua, D. J., and Takayanagi, H.  $T_H17$  functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J. Exp. Med.*, in press.
  3. Nigrovic, P. A., Binstadt, B. A., Monach, P. A., Johnsen, A., Gurish, M., Iwakura, Y., Benoist, C., Mathis, D., and Lee, D. M. Mast cells contribute to initiation of autoantibody-mediated arthritis via IL-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press.
  4. Nakae, S., Iwakura, Y., Suto, H., and Galli, S. J. Phenotypic differences between Th1 and Th17 cells and negative regulation of Th1 cell-differentiation by IL-17. *J. Leu. Biol.*, in press.
  5. Saijo, S., Fujikado, N., Furuta, T., Chung, S., Kotaki, H., Seki, K., Sudo, K., Akira, S., Adachi, Y., Ohno, N., Kinjo, T., Nakamura, K., Kawakami, K., and Iwakura, Y. Dectin-1 plays an important role in host defense against the pathogenic fungus *Pneumocystis carinii*. *Nature Immunol.*, 8, 39-46 (2007).
  6. Tsurutani, N., Yasuda, J., Yamamoto, N., Choi, B., Kadoki, M., and Iwakura, Y. Nuclear import of the pre-integration complex is blocked upon infection by HIV-1 in mouse cells. *J. Virol.*, 81, 677-688 (2007).
  7. Onodera, S., Ohshima, S., Tohyama, H., Yasuda, K., Nishihira, J., Iwakura, Y., Matsuda, I., Minami, A., and Koyama, Y. A novel DNA vaccine targeting macrophage migration inhibitory factor protects joints from inflammation and destruction in murine models of arthritis. *Arthritis Rheum.*, 56, 521-530 (2007).
  8. Umemura, M., Yahagi, A., Hamada, S., Begum, M-D., Watanabe, H., Kawakami, K., Suda, T., Sudo, K., Nakae, S., Iwakura, Y., and Matsuzaki, G. IL-17-mediated regulation of innate and acquired immune response against pulmonary *Mycobacterium bovis bacilli Calmette-Guerin* infection. *J. Immunol.*, 178, 3786-3796 (2007).
  9. Shimizu, M., Shimamura, M., Owaki, T., Asakawa, M., Fujita, K., Kudo, M., Iwakura, Y., Takeda, Y., Mizuguchi, J., and Yoshimoto, T. Antiangiogenic and antitumor activities of IL-27. *J. Immunol.*, 176, 7317-7324 (2006).
  10. Kotani, M., Hirata, K., Ogawa, S., Habiro, K., Araki, M., Ishi, T., Ishida, Y., Tanuma, S., Tanabe, K., Toma, Horai, R., Iwakura, Y., and Abe, R. Presence of CD28-dependent and independent pathways in autoimmune arthritis developed in interleukin-1 receptor antagonist-deficient mice. *Arth. Rheum.*, 54, 473-481 (2006).
  11. Matsuki, T., Nakae, S., Sudo, K., Horai, R., and Iwakura, Y. Abnormal T cell activation caused by the imbalance of the IL-1/IL-1 receptor antagonist system is responsible for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Int. Immunol.*, 18, 399-407 (2006).
  12. Ishigame, H., Nakajima, A., Saijo, S., Komiyama, Y., Mastuki, T., Nakae, S., Horai, R., Kakuta, S., and Iwakura, Y. The role of TNF $\alpha$  and IL-17 in the development of excess IL-1 signaling-induced inflammatory diseases in IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *Ernst Schering Res. Found. Workshop*, 56, 129-153 (2006).
  13. Vonk, A. G., Netea, M. G., van Krieken, J. H., Iwakura, Y., van der Meer, J. W. M., and Kullberg, J. B. Endogenous interleukin-1 $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$  are crucial for host defense against disseminated candidiasis. *J. Infect. Dis.*, 193, 1419-1426 (2006).
  14. Chida, D., Osaka, T., Hashimoto, O., and Iwakura, Y. Combined IL-6 and IL-1 deficiency causes obesity in young mice. *Diabetes*, 55, 971-977 (2006).
  15. Nambu, A., Nakae, S., and Iwakura, Y. IL-1 $\beta$ , but not IL-1 $\alpha$ , is required for antigen-specific T cell activation and the induction of local inflammation in the delayed-type hypersensitivity responses. *Int. Immunol.*, 18, 701-712 (2006).
  16. O'Sullivan, B. J., Thomas, H. E., Pai, S., Santamaria, P., Iwakura, Y., Steptoe, R. J., Kay, T. W. H., and Thomas, R. IL-1 $\beta$  breaks tolerance through expansion of CD25<sup>+</sup> effector T cells. *J. Immunol.*, 176, 7278-7287 (2006).
  17. Iwakura, Y., and Ishigame, H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J. Clin. Invest.*, 116, 1218-1222 (2006).
  18. Ohtaki, H., Nakamachi, T., Dohi, K., Aizawa, Y., Takaki, A., Hodoyama, K., Yofu, S., Hashimoto, H., Shintani, N., Baba, A., Kopf, M., Iwakura, Y., Matsuda, K., Arimura, A., and Shioda, S. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) decreases ischemic neuronal cell death in association with interleukin-6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 7488-7493 (2006).
  19. Komiyama, Y., Nakae, S., Matsuki, T., Nambu, A., Ishigame, H., Kakuta, S., Sudo, K., and Iwakura, Y.

- IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.*, 177, 566-573 (2006).
20. Murakami, M., Iwai, S., Hiratsuka, S., Yamauchi, M., Nakamura, K., Iwakura, Y., and Shibuya, M. Signaling of vascular endothelial growth factor receptor-1 tyrosine kinase promotes rheumatoid arthritis through activation of monocyte/macrophage. *Blood*, 108, 1849-1856 (2006).
  21. Okada, K., Inoue, A., Okada, M., Murata, Y., Kakuta, S., Jigami, T., Shiraishi, H., Eguchi, K., Motomura, M., Akiyama, T., Iwakura, Y., Higuchi, O., and Yamanashi, Y. The muscle protein Dok-7 is essential for neuromuscular synaptogenesis. *Science*, 312, 1802-1805 (2006).
  22. Fujikado, N., Saijo, S., and Iwakura, Y. Identification of arthritis-related gene clusters by microarray analysis of two independent mouse models for rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.*, 8, R100, 1-13 (2006).
  23. Furuta, T., Kikuchi, T., Iwakura, Y., and Watanabe, N. Protective roles of mast cells and mast cell-derived tumor necrosis factor in murine malaria. *J. Immunol.*, 177, 3294-302 (2006).

**G. 知的財産権の出願・登録状況**

該当なし

## HIV ラット感染モデルの開発

分担研究者 志田壽利 北海道大学遺伝子病制御研究所

研究要旨 HIVラット感染モデルを作製するために、ラットのT細胞、マクロファージ、上皮系細胞株を用いて増殖過程を調べた。侵入過程にはマクロファージ、上皮系細胞に阻害因子はなく、T細胞には cyclophilinA 依存的な阻害があった。ヒト cyclinT1 と CRM1 の導入により T細胞で 100 倍以上の Gag の産生増強が見られた。上皮系細胞では強感染性、T細胞では弱感染性のウイルスが作られた。hCyclinT1 と hCD4 のトランスジェニックラットを作製した。

### A 研究目的

エイズウイルス(HIV)は累計で8千万人(内4千万人が生存)に感染し、昨年には450万人が新規感染した。特に中国、インドネシアなど近隣国で感染が急拡大し、このままでは、2010年までにアジアで数千万人が感染すると予想されている。HIV感染の拡大を防ぐためにワクチン開発が望まれているが、遅々として進んでいない。その1つの原因は使いやすいHIV感染モデルが存在しないことである。しかし、ヒトのCD4とケモカイン受容体を発現させてやれば、HIVがわずかに増殖することからラットは良いモデルに改良しうる可能性を秘める。

我々は、HIV-1の増殖の非効率の主原因として、ウイルス mRNA 形成に必要なウイルスの調節因子 Rev を支持すべきラット因子 rCRM1 が機能しないことをラット上皮系細胞株を用いて見いだした。しかし、昨年度ラット T細胞株 FPM1 を調べた結果、Tat のコファクターであるヒト hCyclinT1 の導入によって HIV-1 の増殖が大幅に上昇し、

ヒト hCRM1 の導入効果よりも顕著である事を見いだした。さらに FPM1 においては HIV の侵入の阻害因子が存在することを示唆した。また、マウスやラットの APOBEC3 は HIV-1 の感染性ウイルス粒子の形成を阻害する事が示唆されている。そこで、本年度は、ラットの上皮、T、マクロファージ細胞株における HIV-1 の侵入過程、hcyclinT1, hCRM1 の効果、感染性粒子の形成について比較検討した。又、諸因子の Tg ラットを作成した。

### B 研究方法

細胞：ヒト T細胞として Mo1t4CCR5 細胞を、ラット T細胞として FPM1, C58NTD, Nb2 細胞を用いた。ラットマクロファージ株として NR8383, 上皮細胞株として ER1 と FPM-SV を用いた。

プラズミド：Gag 発現のために pNLΔ pol, CRM1 発現のために pSRaCRM1, h&rCyclinT1 発現のために pCN2h & r cyclinT1, 感染性 HIV 全長ゲノムを持つプラズミドとして pNL432, pNL43AD8GFP と pJR-CSF を用い

た。

遺伝子導入：一過性の発現には nucleofector を用いた electroporation 法によった。FPM1 には program T-03, C58NTD と NR8383 には T-27, Molt4CCR5 には A-30 で行った。遺伝子導入細胞株を作成するために MX レトロベクター、CS レンチベクターを用いた。

感染効率の測定：G タンパク質でコートした NL43AD8GFP 又は HIV ベクター CSII-EF-MCS-IRES2-Venus を感染させて、GFP 又は Venus により発光する細胞の割合を FACS で計測した。

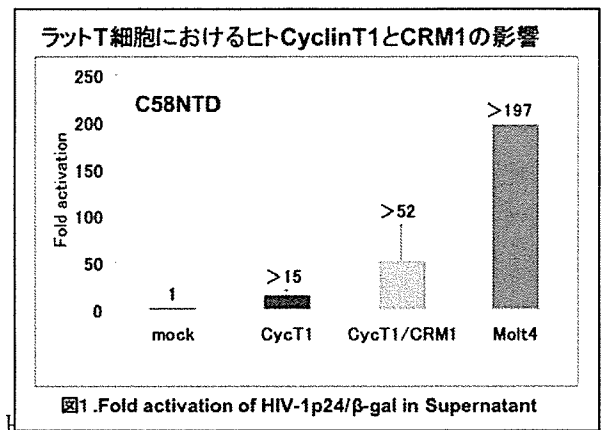
ウイルス粒子の感染性の測定：G タンパク質でコートした NL43 の感染3日後、細胞上清中の p24 量を ELISA で測定し、感染価をレポーター細胞 TZM-bl 細胞 (HIV が感染すると b-ガラクトシダーゼとルシフェラーゼを誘導する) を用いて測定した。

## C 研究成果

### ラット T 細胞、マクロファージにおける hCyclinT1 と hCRM1 の効果

ラット T 細胞株 FPM1 と C58NTD, マクロファージ株 NR8383 に electroporation で pNLA pol, CRM1 又は CyclinT1 発現 plasmid, 導入効率補正用 pCDMβ-gal を導入して Gag (p24) の生産量を ELISA によって測定した。FPM1, C58NTD 共に hCyclinT1 の導入によって p24 は 20~60 倍の生産の上昇が見られた。さらに hCRM1 の導入によって、約 3 倍上昇した。両因子の導入によって 60~200 倍 p24 が生産されるようになり、ヒト T 細胞である Molt4 の 1/5~1/3 の量であった。他方、NR8383 においては hCyclinT1 を導入しなくても、Tat 活性は十分検出され、hCyclinT1 の効果は 2 倍程

度であり、代わりに、hCRM1 導入の効果が大きく 5~10 倍の p24 生産の増強が見られた。(図1参照)



猿細胞において HIV-1 感染の阻害因子 Trim5a が報告されている。Trim5a は cyclophilinA と共同して働くために、その阻害剤 CsA を添加することによって猿細胞に HIV-1 が感染できるようになる。昨年度、FPM1 細胞で、CsA が存在すると 5~10 倍感染効率が上を報告した。他方 Keppler らはラット T 細胞として Nb2 細胞を用いて、侵入過程で阻害因子を持たない事を報告している(2001年)。そこで、今年度 C58NTD と Nb2 を含めた 3 種類のラット T 細胞と ER1 細胞における HIV-1 の感染効率をヒト細胞と比較した。

上皮系細胞においてはラットとヒト細胞 (HeLa 細胞) 間で感染効率に差はなく、効率よく感染した。また、CsA の効果も見られなかった。他方、ラット T 細胞においては、ヒト T 細胞と同様に比較的効率よく感染して、CsA 添加によって効率が下がるともの (Nb2 細胞) と、感染効率が悪く CsA 添加によって効率が上昇するもの (C58NTD, FPM1 細胞) に分かれた (図2参照)。