

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

(H19-エイズ-若手-004)

HIV-1感染のヒト-ラット種間バリアーの解明

平成20年度 総括研究報告書

研究代表者 張 險峰

平成21(2009)年 4月

HIV-1感染のヒト-ラット種間バリアーの解明

研究代表者：張 隆峰（北海道大学 遺伝子病制御研究所 助教）

研究要旨

HIVの治療と予防法を開発するためには小動物感染モデルが非常に有用である。ラットにヒトCD4とCCR5を発現させるとHIVがわずかに増殖することから、ラットがHIV感染モデルとなる可能性がある。HIV感染モデルとして改良するためにはラットにおけるHIV増殖非効率の原因を解明することが重要である。19年度ラットT細胞株を用いた研究において、ラットT細胞で作られるHIV-1粒子の感染性低下はENV蛋白に原因があることを見出したが、20年度は、ラットは感染性ウイルス粒子の生産において阻害因子を持たないことを明らかにした。また、ラットマクロファージにはHIV-1感染の阻害因子がないことを明らかにした。さらに、HIVの侵入過程で働く阻害因子の同定に向け、候補遺伝子をしばることができた。

A. 研究目的

エイズの根本的な予防と治療法を開発するために、HIV感染小動物モデルはきわめて有用である。ラットはHIV-1感染の種間バリアーがマウスほど厳密ではないために、良いモデルとなりうる。特に、ラットT細胞株にヒトの受容体およびCRM1、CyclinT1を発現させると、ヒトT細胞株に準じるなHIV粒子が生産される。このことは粒子生産については、これらの因子を発現させることによりほぼ解決できることを示している。しかし、感染が広がらないことが分かった。そこで、本研究の目的はウイルス粒子の感染性と侵入過程に関与しているウイルス性、細胞性因子を同定し、ラット感染モデルの作製に資するを目的にした。昨年、ラットT細胞由来のHIV-1粒子のEnvの機能が低い、もしくは取り込まれたEnvの蛋白質量が少いことを見出した。本年度は、①ラットT細胞におけるHIV-1 Envの発現及び粒子内に取り込まれたEnvの性質の解析、②ラットT細胞株、マクロファージ及びprimary T細胞における各種のHIV-1株粒子の感染性の調査、③侵入過程で働くラット因子のクローニングを試みた。

B. 研究方法

1). HIV-1粒子を分析するため、培養上清を20% sucrose層にのせ、超遠心によって濃縮したウイルス粒子をWestern blottingによってEnvとGag蛋白質を検出した。

2). HIVの感染価を測定するために、回収したウイルスをindicator細胞(T2M-bl)に感染させ、感染に応じて生産されるルシフェラーゼ又はβ-ガラクトシダーゼ活性を測定した。

3). 蛋白質の安定性を測定するため、HIV-1ゲノムを導入した細胞を蛋白質合成阻害剤である cycloheximideで処理し、細

胞を経時的に回収した。Cell lysateをWestern blotting によって分析する事によって、ウイルス及び細胞蛋白質を定量した。

4). ラットprimary細胞へHIV-1を導入するため、hCRM1とCycT1を発現するTgラットからprimary T細胞とマクロファージを精製した。まず、primary T細胞を調製するため、ナイロンウールカラムでラット脾臓細胞からT細胞を精製した。そして、抗ラットCD3抗体とCD28抗体で活性化し、HIV-1分子クローンをnucleofectionで導入した。マクロファージに分化させるため、ラット腹水に含まれるmonocyteを抗ラットCD11b抗体と反応させ、anti-IgA MicroBeadsで分離し、GM-CSFの刺激で、接着培養することによって、マクロファージにさせた。そして、VSV-G coated HIV-1を感染させた。

5). 侵入過程で働くラット因子をクローニングするために、昨年作製した、ラット遺伝子を発現するHeLa細胞に、Venusを発現するHIVシュードウイルスを感染させた。Venus⁺細胞をFACS Vantageで集め、ベクター部分に設計したプライマーを用いてラットcDNAをRT-PCRで増幅して、塩基配列を決定した。

6). ラットT細胞発現 profile microarray 侵入効率に関して両極をなすラットT細胞からTotal RNAを精製し、Agilent社 Whole Rat Genome 4x44K (2色法)のマイクロアレイとGeneSpringGXおよびGenMAPPのソフトウェアで解析した。

(論理面への配慮)

遺伝子組み換え実験は北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規程に沿って、許可を得た上、倫理規則を厳守した。

HIV-1感染実験はP3実験室で行い、安全の面に十分配慮した。

C. 研究結果

1) ラットT細胞株におけるHIV-1 NL4-3 株粒子の感染性減弱機構の解明。

昨年本研究の結果から、ラットT細胞由来のHIV-1粒子のEnvの機能が低い、もしくは取り込まれたEnvの蛋白質量が少いことが考えられた。そこで、HIV-1 NL4-3株を導入したラットT細胞の培養上清から精製したウイルス粒子をWestern blottingで分析したところ、粒子内に取り込まれたEnv蛋白質の量がラット上皮細胞またはヒト細胞由来のHIV-1粒子より少ないことが分かった(図1)。さらにcycloheximideを用いてラットT細胞内に発現したEnv蛋白質の安定性を調べた結果、Env蛋白質は不安定で、速やかに分解されることが分かった。他方、ラットT細胞で作られたGag蛋白質は他の細胞のGagと同様な安定性を持つことが分かった(図2)。

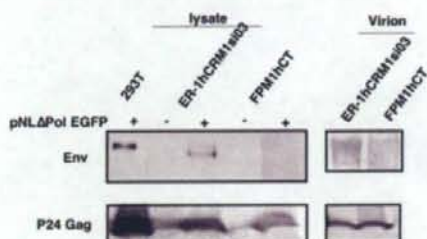


図1. ラットT細胞では、HIV-1 Env の発現及び粒子内に取り込まれたEnv蛋白質量が少い。

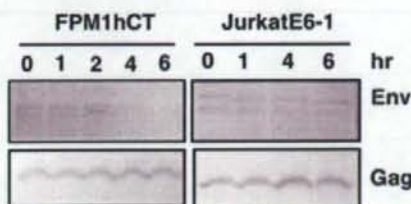


図2. ラットT細胞では HIV-1 Env 蛋白質の安定性が低い。

2) ラットT細胞株由来の種々のHIV-1粒子の感染性

上でHIV-1 NL4-3の感染性が低い事を述べた。そこで、さらに種々のHIV株(AD8, JR-CSF, YU-2, 89.6, Lai2等)の感染性を調べた。その結果、ラットT細胞株で作られたAD8, JR-CSF, YU-2等のマクロファージ指向性HIV-1は、ヒトT細胞由来のウイルス粒子と同等の感染性を持つことが分

かった。一方、ラットT細胞株由来のNL4-3, Lai2などのT細胞指向性HIV-1と両指向性の89.6株は感染性が低いことが確認された(図3)。

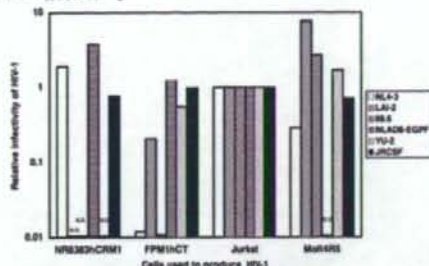


図3. ラットT細胞由来の感染性低いHIV-1はX4及びDual tropicである。

次いで、ラットprimary T細胞にAD8, JR-CSF, NL4-3の分子クローンを導入して子孫ウイルスの感染性を調べたところ、いずれのウイルス粒子もヒトPMBCで生産されたウイルス粒子と同様な感染性があった。

3) ラットマクロファージ由来の種々のHIV-1粒子の感染性

当研究室で作成されたhCRM1とhCycT1を発現するTgラットからマクロファージを調製してGコートNL4-3とAD8を感染させる事により、子孫ウイルスの感染性を調べた。その結果、高感染性のHIV-1がヒト細胞に準じる量生産されることが分かった。さらに、マクロファージにおいては侵入過程、粒子放出過程においても効率が高く、阻害因子が存在しないことが示唆された。

4) HIVの侵入過程で働く阻害因子の同定

レトロベクターを用いてラットcDNAを導入したHIV-1 抵抗性のヒト細胞をスクリーニングしたところ、数個のクローンを得た。しかしラット 遺伝子を同定できなかった。

ラットT細胞株にはHIV-1の侵入効率の高いものと低いものがある。サイクロフィリンA(CypA)の阻害剤サイクロスポリンA(CsA)を作用させると侵入効率の低いT細胞株への感染効率はヒトT細胞とほぼ同等にまで上がった。侵入効率の高いラットT細胞株では、ヒトT細胞と同様に感染効率がやや下がった。このことは、ラットT細胞は侵入を支持する因子を欠くのではなく、Trim様阻害因子を持つ事を再確認している。

また、各細胞株の遺伝子発現プロファイルを手し、分析した結果、侵入効率の低い細

胞株の遺伝子で侵入効率の高い細胞より発現が10倍以上高いものが60個で、その反対に侵入効率の高い細胞株で低い細胞より発現が10倍以上高い遺伝子が125個同定された。現在、その遺伝子のノックダウンの影響を調べているところである。

D. 考察

本年度、ラットT細胞株由来のNL4-3粒子の感染性の低い原因が、細胞内でEnv蛋白質が不安定で、粒子内に取り込まれる量が少ない事にある事を明らかにした。しかし、このことは、T細胞指向性または両指向性HIV-1株に限られ、マクロファージ指向性HIV-1株はヒト細胞で作られたHIV-1株と同等の感染性を持っていた。さらに、ラット primary T細胞とマクロファージではいずれのHIV-1株も感染性を有することから、ラットでは、HIV-1感染の後期過程において種間バリアーが存在しないと考えられる。また、ラットマクロファージにおいては侵入過程においても効率がよく、阻害因子が存在しないことが示唆された。

HIVの侵入過程で働く阻害因子をクローニングするために、Functional cloning法の実験系をさらに改善することを計画している。(昨年用いられたラットprimary T細胞は、複数細胞サブセットであり、感染にバリアーのないマクロファージ、またはCD8T細胞が混在してあった。より厳密に実験材料を取扱うため、HIV-1侵入効率の低いラットT細胞株から抽出したmRNAを基にレトロベクター-cDNAライブラリーを作成して、ヒト細胞をトランスデュースする。)また、侵入効率に関して両極をなすラットT細胞の発現プロファイルをマイクロアレイにより比較し、候補遺伝子をしばったので、ノックダウンすることにより感染効率への影響の分析を進めている。

E. 結論

結局、ラット細胞、マクロファージ共に感染性ウイルス粒子を生産するとの結論に行き着いた。また、ラットマクロファージにはHIV-1感染の阻害因子がないことが分かった。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

学会発表

張陝峰 志田壽利 ラットT細胞由来
HIV-1粒子の感染性 56回日本ウイルス
学会

論文発表

Hiroyuki Okada, Xianfeng Zhang,
Ismael Ben Fofana, Mika Nagai, Hajime
Suzuki, Takashi Ohashi, and Hisatoshi
Shida.

*Synergistic effect of human-CycTI and
-CRM1 on HIV-1 propagation in rat T
cells and macrophages*

Retrovirology (in revise)

H. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

該当なし