

前単球系細胞株であるU937に由来するサブクローンにおける

HIV-1感染とアポトーシス誘導の感受性に関する研究

学位論文内容の要旨

ヒト免疫不全ウイルス1型(HIV-1)は、後天性免疫不全症候群(AIDS)の原因ウイルスであり、HIV-1感染からAIDS発症へと向かう病態進行は、HIV-1の主な宿主細胞であるCD4陽性細胞の減少と密接な関わりを持つことが明らかにされている。HIV-1感染個体は、一過性の急性感染期を経た後、平均9.8年にも及ぶ長い無症候(AC)期に入る。このAC期末梢血より分離されるウイルスは、主に単球-マクロファージ系細胞に感染する単球指向性ウイルスである。このことは、単球-マクロファージ系細胞へのHIV-1感染が、AC期中に徐々に進行する免疫不全の誘導に深く関わっていることを示唆している。

そこで、HIV-1感染宿主細胞としての重要性が示唆される単球-マクロファージ系細胞へのHIV-1感染様式を明らかにすることを目的として、前単球系細胞株U937より樹立した分化ステージが異なるサブクローンを用いたHIV-1感染実験を行った。

前単球系細胞株U937より限界希釈法により樹立したサブクローン46株は、そのHIV-1感受性を指標として、2株のHIV-1高感受性型(high-type)、2株の低感受性型(low-type)、及び42株の中間型(middle-type)に型別された。非感染状態のサブクローン代表6株(各型2株ずつ)の細胞表面抗原の発現を調べたところ、細胞表面のCD4分子の発現量には各型間で大きな差は認められなかったが、LFA-1の発現量はhigh-typeサブクローンで最も低く、low-typeサブクローンで最も高かった。HIV-1感染後に現れる細胞の変化として、活性酸素の産生がhigh-typeサブクローンでは感染後、初期から一貫して永続的に認められるのに対して、low-type及びmiddle-typeサブクローンでは一過性にウイルス抗原発現量が高い時期にのみ認められた。また、HIV-1感染に伴う分化誘導の結果と考えられる付着細胞がhigh-typeサブクローンにのみ出現した。これらの結果は、各サブクローンのHIV-1感染感受性の違いは、細胞の分化程度の違いに依っていると考えられた。HIV-1感受性に違いが認められた原因を明らかにするため、ウイルスの吸着量、ウイルスDNA合成量、ウイルス転写効率についての解析を行った。その結果、今回high-typeサブクローンで認められた高感受性は、ウイルス吸着率や染色体への組み込み型のHIV-1DNA量には依存しておらず、非組み込み型のHIV-1 DNA量に依存していることが判明した。

一方、HIV-1感染生体内においてCD4陽性細胞の減少にはアポトーシスが関与するという報告が多数ある。このHIV-1感染に伴うアポトーシス誘導の大きな特徴としては、

アポトーシスが主にHIV-1ゲノム陰性の細胞に起こっていることが挙げられる。この知見はHIV-1感染に伴い、ウイルスの間接的な影響によりアポトーシスが誘導されることを示しているが、AIDS病態進行とHIV-1の転写量には正の相関関係が認められること、即ちCD4陽性細胞数の減少はHIV-1の複製という直接的な影響の結果であるとも考えられ、矛盾点を含んでいる。そこで、HIV-1感染実験に併せて、上記U937由来サブクローンのアポトーシス誘導についての解析も行った。今回、我々は感染者生体内でもその存在が確認されていながらも、そのAIDS病態への関わりが全く解明されていない不完全HIV-1粒子の細胞への吸着が細胞に及ぼす影響に着目して、そのアポトーシス誘導能についての解析を同様のサブクローンを用いて行った。不完全HIV-1粒子としては、以前に樹立されていた非感染性HIV-1粒子(L-2粒子)を用いた。その結果、HIV-1に対する感受性の低い2株のlow-typeサブクローンは、2株のhigh-typeサブクローンに比べ、TNF- α や抗Fas抗体と同様に、非感染性の不完全HIV-1粒子(L-2粒子)の吸着により誘導されるアポトーシスに高い感受性を示すことが判明した。また、この不完全HIV-1粒子により誘導されるアポトーシスはU937のみでなく、健常成人より分離した末梢血Tリンパ球にも、細胞活性化依存的に認められることもわかった。

これらの結果より、今回樹立したU937由来サブクローンにおけるHIV-1感染の感受性とアポトーシス誘導の感受性は逆相関の関係にあった。

HIV-1感染生体内におけるアポトーシス誘導について、HIV-1が感染し活発なウイルス複製が起こっている細胞にはアポトーシスが認められず、アポトーシスはむしろ非感染細胞で起こっているとの報告がなされている。即ち、生体内にはHIV-1が感染し活発なウイルス複製を行う細胞種とHIV-1によるアポトーシス誘導を受ける細胞種は別々に存在すると考えられる。今回のU937由来のサブクローンを用いた、HIV-1感染感受性とアポトーシス感受性が逆相関の関係にあるという結果より、これらサブクローンを用いた解析がHIV-1感染生体内で起こっている現象を解明する上で重要なモデル系となり得るものと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 生 田 和 良

副 査 教 授 吉 木 敬

副 査 教 授 上 出 利 光

学 位 論 文 題 名

前単球系細胞株であるU937に由来するサブクローンにおける HIV-1 感染とアポトーシス誘導の感受性に関する研究

ヒト免疫不全ウイルス1型(HIV-1)は、後天性免疫不全症候群(AIDS)の原因ウイルスであり、HIV-1感染からAIDS発症へと向かう病態進行は、HIV-1の主な宿主細胞であるCD4陽性細胞の減少と密接な関連性のあることが示されている。HIV-1感染個体は、一過性の急性感染期を経た後、平均9.8年にも及ぶ長い無症候(AC)期に入るが、このAC期末梢血より分離されるウイルスは、主に単球-マクロファージ系細胞に感染する単球指向性ウイルスである。このことは、単球-マクロファージ系細胞へのHIV-1感染が、AC期中に徐々に進行する免疫不全の誘導に深く関わっていることを示唆している。

そこで、前単球系細胞株であるU937より樹立した各種サブクローンを用いたHIV-1感染実験を行った。樹立したサブクローン46株は、そのHIV-1感受性を指標として、2株のHIV-1高感受性型(high-type)、2株の低感受性型(low-type)、及び42株の中間型(middle-type)に型別された。非感染状態のサブクローン代表6株(各型2株ずつ)の細胞表面抗原の発現を調べたところ、細胞表面のCD4分子の発現量には各型間で大きな差は認められなかったが、LFA-1の発現量はhigh-typeサブクローンで最も低く、low-typeサブクローンで最も高かった。HIV-1感受性に違いが認められた原因を明らかにするため、ウイルスの吸着量、ウイルスDNA合成量、ウイルス転写効率についての解析を行った。その結果、今回high-typeサブクローンで認められた高感受性は、ウイルス吸着率や染色体への組み込み型のHIV-1DNA量には依存しておらず、非組み込み型のHIV-1 DNA量に依存していることが判明した。

一方、HIV-1感染生体内においてCD4陽性細胞の減少にはアポトーシスが関与するという報告が多数ある。このHIV-1感染に伴うアポトーシス誘導の大きな特徴としては、アポトーシスが主にHIV-1ゲノム陰性の細胞に起こっていることが挙げられる。この知見はHIV-1感染に伴い、ウイルスの間接的な影響によりアポトーシスが誘導されることを示しているが、AIDS病態進行とHIV-1の転写量には正の相関関係が認められること、即ちCD4陽性細胞数の減少はHIV-1の複製という直接的な影響の結果であるとも考えられ、矛盾点を含んでいる。そこで、HIV-1感染実験に併せて、上記U937由来サブクローンのアポトーシス誘導についての解析も行った。今回、感染者生体内でもその存在が確認されていながらも、そのAIDS病態への関わりが全く解明されていない不完全HIV-1粒子のアポトーシス誘導能についての解析を同様のサブクローンを用いて行った。不完全

HIV-1粒子としては、非感染性HIV-1粒子(L-2粒子)を用いた。その結果、HIV-1に対する感受性の低い2株のlow-typeサブクローンは、2株のhigh-typeサブクローンに比べ、TNF- α や抗Fas抗体と同様に、非感染性の不完全HIV-1粒子(L-2粒子)の吸着により誘導されるアポトーシスに高い感受性を示すことが判明した。また、この不完全HIV-1粒子により誘導されるアポトーシスはU937のみでなく、健常人より分離した末梢血Tリンパ球にも、PHA、Con A、Ionomycinによる細胞活性化依存的に認められることも明らかになった。これらの結果より、今回樹立したU937由来サブクローンにおけるHIV-1感染の感受性とアポトーシス誘導の感受性は逆相関の関係にあった。

HIV-1感染生体内におけるアポトーシス誘導について、HIV-1が感染し活発なウイルス複製が起こっている細胞にはアポトーシスが認められず、アポトーシスはむしろ非感染細胞で起こっているとの報告がなされている。即ち、生体内にはHIV-1が感染し活発なウイルス複製を行う細胞種とHIV-1によるアポトーシス誘導を受ける細胞種は別々に存在すると考えられる。今回のU937由来のサブクローンを用いた、HIV-1感染感受性とアポトーシス感受性が逆相関の関係にあるという結果より、これらサブクローンを用いた解析がHIV-1感染生体内で起こっている現象を解明する上で重要なモデル系となり得るものと考えられる。

本研究は、AIDS病態進行に係わる中心的と現象と考えられるアポトーシス誘導に関して、感染性の認められないドーナツ様粒子の関与の可能性を初めて示したものであり、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。