

学 位 論 文 題 名

HTLV- I 持続感染ラット T細胞へのヒト CRM1 遺伝子
導入による HTLV- I ウイルス発現の検討

学位論文内容の要旨

ヒト T細胞白血病ウイルス I 型 (human T-cell leukemia virus type I ; HTLV-I) が成人 T細胞白血病 (adult T-cell leukemia ; ATL) の原因ウイルスであることが判明してから 20 余年が経過した。この間に HTLV-I 遺伝子による細胞腫瘍化のメカニズムについて多くの研究が行われてきたが、HTLV-I 感染から ATL 発症に至る分子機構は未だ完全には明らかにされていない。その理由のひとつとして、HTLV-I に感染し T細胞白血病を発症する動物モデルが確立されていないことがあげられる。一般に実験動物として用いられるマウスなど齧歯類の HTLV-I に対する感染感受性は極めて低いことが知られているが、ラットでは複数の HTLV-I 持続感染 T細胞株が樹立されている。当教室では、近交系ラットを用いた HTLV-I 持続感染モデルを作製し、解析してきた。このうち WKAH/Hkm ラットを宿主とした持続感染系では、ヒト HTLV-I 感染者の一部に認められる痙性脊髄麻痺に類似した疾患の発症が確認されている。しかしながら、HTLV-I の持続感染が成立したどの系統のラットにも T細胞白血病の発症は観察されなかった。最近、HTLV-I がヒト以外の動物細胞で効率良く増殖できないのは、ウイルス粒子の形成に必須な HTLV-I Rex の働きを支持する宿主細胞性因子 CRM1 (Exportin 1) のうち、ヒト型のみ HTLV-I に有効に作用するためである可能性が報告された。CRM1 は nuclear export signal (NES) をもつ蛋白質と結合し、これを核から細胞質へ輸送する。HTLV-I が宿主細胞内で複製するためには RNA genome を核から細胞質へ輸送する過程が必要であり、このとき HTLV-I genomic RNA は自己の産物である Rex と結合する。Rex は分子内に NES を有しており、genomic RNA と Rex の複合体がさらに CRM1 と結合することによって、HTLV-I genome が核から細胞質へ輸送される。HTLV-I に感染したラット T細胞においても、ラット CRM1 の Rex に対する支持活性が低いため、十分なウイルス発現が誘導されず、個体レベルでは T細胞白血病の発症に至らない可能性が考えられる。本研究では、当教室で維持されている HTLV-I 持続感染ラット T細胞株にヒト CRM1 遺伝子を導入し、実際にウイルス発現が増加するかどうかを検討した。

はじめに、通常の培養状態でヒト CRM1 遺伝子を導入し、ウイルス発現の変化を検討した。HTLV-I ウイルスの genomic RNA およびその産物を検索対象とするため、スプライシングを受けない gag 遺伝子由来の p19 蛋白質の発現を検討した。しかしながら、ヒト CRM1 遺伝子導入後の HTLV-I 持続感染ラット T細胞株の培養上清中に ELISA

の検出感度以上の p19 は認められず、同細胞を溶解して検索しても同様であった。用いた細胞株における HTLV-I 発現の基礎値が低い可能性が考えられ、次に、BrdUrd で刺激した細胞株を用いて実験を行った。BrdUrd で短期間刺激することにより、HTLV-I 持続感染ラット T 細胞株におけるウイルス遺伝子の発現が増加することが知られている。今回の検討でも 50 μ g/ml の BrdUrd で 3 日間刺激することにより、LEWIS-S1 細胞において gag 遺伝子の発現が約 4 倍に増加した。一方、ヒト CRM1 の発現は BrdUrd 刺激による HTLV-I 遺伝子発現の増加になんら影響を及ぼさないことも確認された。現在までに CRM1 の遺伝子転写因子としての機能は知られておらず、今回の実験結果もそれに矛盾しない。

BrdUrd で刺激した TARS-1 の細胞溶解液中において 39.1pg/ml の p19 が検出された。同細胞にヒト CRM1 遺伝子を導入した場合には細胞溶解液中の p19 の濃度は 60.2pg/ml とさらに高値を示した。今回の検討ではラット CRM1 遺伝子導入のコントロールをおいていないため、ヒト CRM1 がラット CRM1 より HTLV-I p19 の発現に対して supportive に働くかどうかは明らかではない。しかし、CRM1 が gag 遺伝子の発現には影響を及ぼさないことを考慮すると、ラット細胞内に導入されたヒト CRM1 により HTLV-I の genomic RNA が核から細胞質に輸送され、その結果 p19 への翻訳が増加した可能性が示唆された。今後、p19 以外のウイルス蛋白の発現について追試し、ヒト CRM1 の効果をさらに確認する必要がある。TARS-1 以外の細胞株では、BrdUrd 刺激とヒト CRM1 遺伝子導入を組み合わせても ELISA の検出感度以上の p19 発現は観察されなかった。ヒト CRM1 遺伝子を導入しなかった BrdUrd 刺激後の細胞株で ELISA の感度以上の p19 が検出された株は TARS-1 のみであり、TARS-1 が他の細胞株に比し HTLV-I ウイルスを発現しやすい株である可能性がある。BrdUrd で刺激した TARS-1 のように、ある程度以上の HTLV-I 遺伝子の発現があるラット細胞にヒト CRM1 を強制発現させることにより、HTLV-I ウイルス発現の誘導を期待できることが示唆された。

HTLV-I genome の核から細胞質への輸送に関わるもうひとつの分子として eukaryotic initiation factor 5A (eIF-5A) が知られている。eIF-5A は Rex が CRM1 と結合するより先に Rex と結合するか、もしくは CRM1 と複合体を形成して Rex に結合する可能性が示唆されている。ヒト CRM1 とラット eIF-5A が機能的に十分な結合をするかどうかは検討していないため不明である。仮に eIF-5A と CRM1 が複合体を形成することが Rex との結合に必要であるなら、ラット細胞に HTLV-I に対する高感受性を誘導するためにはヒト CRM1 と同時にヒト eIF-5A も強制発現させる必要があるかもしれない。今回の検討では、細胞溶解液中に p19 の発現が認められたときの培養上清中に p19 は検出されなかった。培養液量による希釈の影響は無視できないが、ほかのヒト因子が HTLV-I ウイルス発芽の最終段階に関わっているとの報告もあり、ヒト CRM1 の強制発現だけではラットに HTLV-I に対する高感受性を誘導できない可能性も考えられる。

今後さらに、この *in vitro* での遺伝子導入系を用いて HTLV-I の複製に不可欠なヒト因子を解明することにより、それらの因子の役割を明らかにしていける。また、それらの遺伝子を導入することにより ATL 発症モデル作製に必要と考えられる HTLV-I 高感受性宿主となるラットの作製が可能になると期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 木 敬

副 査 教 授 小 林 邦 彦

副 査 教 授 長 嶋 和 郎

学 位 論 文 題 名

HTLV- I 持続感染ラット T細胞へのヒト CRM1 遺伝子 導入による HTLV- I ウイルス発現の検討

HTLV- I に持続感染した WKAH/Hkm ラットではヒト HTLV- I 感染者の一部に認められる HAM/TSP に類似した脊髄症を発症するものの、HTLV- I の持続感染が成立したどの系統のラットにも ATL 類似の T細胞白血病の発症は観察されていない。その理由の一つとして、ウイルス粒子の形成に必須な HTLV- I Rex の働きを支持する宿主細胞性因子 CRM1 が、ラット型ではヒト型に比べて HTLV- I に対する支持活性が低いためである可能性が報告された。CRM1 は Importin Beta ファミリーに属する輸送蛋白質で、核内で Leu に富む NES 配列と結合し、核一細胞質間輸送にかかわっている。RNA 結合蛋白質である HTLV- I の Rex は NES 配列を持ち、宿主の CRM1 を利用して全長のウイルス RNA を核から細胞質へ輸送していると考えられている。

本研究では HTLV- I 持続感染ラット T細胞株にヒト CRM1 遺伝子を導入し、実際にウイルス発現が増加するかどうか検討した。ウイルスの発現は HTLV- I プロウイルスから転写される mRNA のうちスプライシングを受けない全長のウイルス mRNA のみから蛋白に翻訳される gag 遺伝子由来の p19 蛋白の発現にて検討した。しかしながら、ヒト CRM1 遺伝子を導入しても HTLV- I 持続感染ラット T細胞株の培養上清中に ELISA の検出感度以上の p19 は認められず、また同細胞の溶解液中でも検出できなかった。用いた細胞株における HTLV- I 発現の基礎値が低い可能性が考えられたため、次に BrdUrd で刺激した細胞を用いて実験を行った。BrdUrd 処理を行うと、LEWIS-S1 細胞では gag 遺伝子の mRNA 発現が約 4 倍に増加した。一方、ヒト CRM1 の発現は BrdUrd 刺激による HTLV- I 遺伝子 mRNA 発現の増加になんら影響を及ぼさないことも確認された。CRM1 には遺伝子転写に影響を与える機能は知られておらず、今回の結果もそれに矛盾しなかった。そこで、過去の結果より最もウイルス発現量が多いと想定される TARS-1 細胞にヒト CRM1 遺伝子を導入し、BrdUrd で刺激した細胞溶解液中で検討すると、ヒト CRM1 遺伝子を導入した場合は導入していないコントロールに比較して細胞溶解液中の p19 発現が増加した。したがって、少なくともラット細胞内に導入したヒト CRM1 は HTLV- I の全長型 mRNA の核から細胞質への輸送を促進し、その結果 p19 への翻訳が増加した可能性が示唆された。しかし、細胞溶解液中に p19 の発現が認められても培養

上清中に p19 は検出されず、期待したレベルより低い発現にとどまった。培養液量による希釈の影響は無視できないが、未知のヒト因子が HTLV-I ウイルス発芽の最終段階に関わっているとの報告もあり、ヒト CRM1 の強制発現以外にも HTLV-I の高発現にはさらに別のヒト因子が必要となる可能性も考えられた。

公開発表において、副査の小林教授より CRM1 遺伝子導入後の転写レベルと p19 蛋白量との間のギャップについて、TARS-I のみに発現が見られた理由について何か情報あるかどうか、ラットの CRM1 が阻害している可能性があるかどうかについて質問があった。次いで、副査の長嶋教授より導入効率の細胞間差の有無についての質問があった。申請者はこれらの質問に対して自身の実験結果や文献的考察を含めて、少なくとも TARS-I では発現しており転写以降に何らかの因子が関わっているかもしれないこと、TARS-I は感染効率が良いと考えられるもののその理由は今後検討する必要があること、ラット CRM1 がヒト CRM1 の働きを阻害している可能性は否定できないこと、どの細胞でも導入効率に大差なかったことなど概ね妥当な回答した。さらに、長嶋教授より今後 CRM1 の一部を mutation させて CRM1 の働きを観察ことや細胞学的方法などを用いて核内と細胞質での発現の比較や動きを調べるようにとのアドバイスがあった。最後に主査の吉木教授より遺伝子の導入効率や発現を高める工夫が必要なこと、遺伝子導入ラットの作製にはラット CRM1 をノックアウトする必要があるかもしれないことなどのアドバイスがあった。

この論文は、HTLV-I に対する感染感受性を規定する CRM1 を含めさらにヒト因子の探索を継続するものとして高く評価され、今後新たな HTLV-I の高発現、複製に不可欠なヒト因子を明らかにし、CRM1 とともに遺伝子導入したラットの作製によって、HTLV-I 感染による ATL 発症の動物モデルの樹立に向けた研究が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（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。