

学位論文題名

ヒト CD4, CCR5, MHC class II transactivator を  
発現するトランスジェニックラットの作製と  
末梢血単核球への HIV - 1 の感染

学位論文内容の要旨

Human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) は AIDS の病原ウイルスであり, CD4 と chemokine receptor である CXCR4 または CCR5 を感染受容体として, ヒト T 細胞および単球系細胞に特異的に感染する. 感染の際にはこれらの感染受容体分子と HIV-1 の envelope 蛋白である gp120 との結合が必要である. また, HIV-1 は自己複製の過程においてウイルス蛋白のひとつである Tat を使用する. Tat は, 宿主細胞の Cyclin T1 と Cyclin-dependent kinase 9 (CDK9) の複合体である p-TEFb と結合することによりウイルス遺伝子の転写伸長反応を促進するが, Tat の発現量が十分でない感染初期においては, MHC class II transactivator (CIITA) が, Tat の代わりに p-TEFb と結合することが知られている. げっ歯類の CD4 や CXCR4, CCR5 はいずれも gp120 との親和性がなく, マウスやラットの細胞は HIV-1 感染に対して抵抗性であることが知られている. また, HIV-1 遺伝子を導入したラットの細胞にヒト Cyclin T1 を導入することにより, HIV-1 の複製効率が上昇することや, CIITA を持続的に発現させた Jurkat cell に HIV-1 を感染させると, HIV-1 の複製が増強することが報告されている. これらの事より, CD4, CCR5 (または CXCR4), Cyclin T1, CIITA の 4 つのヒト遺伝子を発現するトランスジェニックラットを作製すれば, HIV-1 感染小動物モデルを作製することが可能であると考え, 本研究を行った.

ヒト CD4, CCR5, Cyclin T1, CIITA 遺伝子をプラスミドに組み込み, 増殖させ, 適切な制限酵素で切断し, マイクロインジェクションに使用する遺伝子断片 CIITA-CD4 と CyclinT1-CCR5 を作製した. この遺伝子断片を混合しラット受精卵にマイクロインジェクションし, トランスジェニックラットを作製した. CCR5, Cyclin T1, CIITA の promoter には, mouse H2-K<sup>d</sup> promoter を, CD4 の promoter には, human CD4 promoter を使用した.

遺伝子の導入が確認されたラット (Founder ラット) は, マイクロインジェクションを行った卵子 537 個, 生存産仔 153 頭のうち 1 頭で, 健康な雄であった. 組み込まれた導入遺伝子について, PCR 法を用いて解析を行ったところ, CIITA, CD4, CCR5 は全長が導入していたものの, Cyclin T1 の 5' 側の導入が確認できなかった. 次に PBMC から total RNA を採取し, RT-PCR により各導入遺伝子の発現を調べ, Cyclin T1 以外の 3 つの遺伝子の発現を確認した. また, フローサイトメトリーにより, PBMC での CD4 と CCR5 分子の

細胞表面への発現を確認した。また、これらの発現は PBMC の分画によらず観察された。リンパ節、脾臓、骨髄から採取した細胞では、CD4、CCR5 の発現は PBMC と同様であったが、胸腺から採取した細胞では、CD4、CCR5 とともに発現が低かった。

Founder ラットを正常の雌ラットと交配し、得られた産仔 (F1) に導入遺伝子が伝達するか否かについて、Founder ラットの場合と同様に PCR とフローサイトメトリーを用いて検討したところ、産仔は、CD4、CCR5、CIITA のいずれも導入されたもの、CD4 と CIITA のみ導入されたもの、いずれも導入されないものが生まれた。遺伝子が導入されたラットは、正常ラットに比べおよそ 20% 程度体重が少ないものの、ほとんどのラットは健康であった。3 つの遺伝子が導入された F1 についてフローサイトメトリーで CD4、CCR5 の発現を検討したところ、個体によりその発現の程度にはばらつきがみられたが、CD4、CCR5 がどちらも陽性になる細胞は、多い個体で PBMC のリンパ球分画中 20% 弱であった。

次に、CD4、CCR5 の発現が高かったトランスジェニックラット PBMC を採取し、ConA で 24-48 時間刺激した後に、HIV-1 を感染させ、培養上清中および細胞溶解液中の p24 濃度を ELISA により測定した。感染 4 日目の培養上清中では、正常ラット (SD)、トランスジェニックラット (TG)、ヒト PBMC (Human) の値はそれぞれ、6.3、13.9、320 pg/ml であり、標準偏差はそれぞれ 0.172、0.138、5.97 であった。SD と TG の差は 2.2 倍、TG と Human の差は 23 倍であった。感染 7 日目の培養上清中では、SD、TG、Human の値はそれぞれ、検出感度以下、0.847、467 pg/ml で、標準偏差は 0、0.0893、45.32 であった。TG と Human の差は 550 倍であった。ヒト PBMC 培養上清中では 4 日目から 7 日目にかけて p24 濃度は 1.46 倍に上昇しているが、TG では 1/16.4 に減少していた。感染後 7 日目に採取した細胞溶解液 ( $1.5 \times 10^6$  個/500 $\mu$ l) 中の p24 濃度は、SD、TG、Human がそれぞれ 1.58、11.0、161 pg/ml であった。SD と TG の差は 7.0 倍、TG と Human の差は 14.6 倍であった。p24 濃度が、TG ラット細胞溶解液中では、比較的高かったものの、細胞培養上清中では低い値を示したことは、p24 が細胞内で産生されているものの、ウイルス粒子の産生がないか、あってもごく微量であり、かつ培養上清中には放出されていない可能性を示している。

感染 7 日目の PBMC の genomic DNA を鋳型とした PCR では、陽性対照のヒト PBMC では、LTR、gag、pol、vif、env、nef のバンドが確認され、TG ラット PBMC においても、LTR、gag、pol、env のバンドが確認できた。陰性対象の SD ラット PBMC では、いずれの HIV-1 特異的なバンドも確認されなかった。感染 7 日目の各細胞より抽出した total RNA から作製した cDNA を鋳型とした RT-PCR では、ヒト PBMC で、gag、pol、vif、env、nef のバンドが確認でき、TG ラットでもヒト PBMC に比べて薄いものの、いずれのバンドも確認することができた。SD ラットではいずれのバンドも確認されなかった。このことは、TG の PBMC に HIV-1 ウイルスゲノムが侵入し、HIV-1 の有する reverse transcriptase により、HIV-1 のゲノム RNA が DNA に転写されたことを示している。vif、nef のバンドは確認できないが、細胞内に侵入したウイルス量が極めてわずかであったために PCR でバンドの検出に至らなかったと考える。RT-PCR では、TG でも、vif と nef のバンドが、ヒト PBMC に比べて薄いながら確認でき、ウイルスの組み込みが起り、プロウイルスの転写が行われている可能性を示している。

今回の検討では、HIV-1 を感染させた TG ラットの PBMC から、十分量のウイルス粒子産生を確認するには至らなかった。転写以降のウイルスの複製のために必要なヒト遺伝子の候補としては、ウイルスの assembly にとって不可欠と思われる HP68 の報告や、budding

の際に利用されている Tsg101 という宿主蛋白質の報告がある。HIV-1 感染小動物モデルの作製のためには、これらのヒト遺伝子を持つトランスジェニックラットとの交配実験も考慮する必要がある。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 笠 原 正 典  
副 査 教 授 小 野 江 和 則  
副 査 教 授 有 川 二 郎

学 位 論 文 題 名

## ヒト CD4, CCR5, MHC class II transactivator を 発現するトランスジェニックラットの作製と 末梢血単核球への HIV - 1 の感染

HIV-1 に対するワクチン開発や、病態の解明の為に、HIV-1 感染可能な小動物モデルの作製が望まれている。HIV-1 は、CD4 と chemokine receptor である CXCR4 または CCR5 を感染受容体として、ヒト T 細胞および単球系細胞に特異的に感染するが、げっ歯類の CD4 や CXCR4, CCR5 はいずれも HIV-1 との親和性がないことが知られている。また、HIV-1 遺伝子を導入したラットの細胞にヒト Cyclin T1 を導入することにより、HIV-1 の複製効率が上昇することや、MHC class II transactivator (CIITA) を持続的に発現させた Jurkat cell に HIV-1 を感染させると、HIV-1 の複製が増強することが報告されている。以上のことから、これらのヒト遺伝子を発現するトランスジェニックラットを作製すれば、HIV-1 感染小動物モデルを作製することが可能であると考え、本研究を行った。

CCR5, Cyclin T1, CIITA の promoter として、mouse H2-K<sup>d</sup> promoter を、CD4 の promoter として、human CD4 promoter を使用して、遺伝子断片 CIITA-CD4 と CyclinT1-CCR5 を作製した。これらの遺伝子断片を混合し、ラット受精卵にマイクロインジェクションし、1 頭の健康な遺伝子導入ラットを得た。解析の結果、CIITA, CD4, CCR5 は全長が導入されていたものの、Cyclin T1 は一部が欠損して導入されていた。末梢血単核球 (PBMC) を用いた RT-PCR で、Cyclin T1 以外の 3 つの遺伝子の発現を確認し、フローサイトメトリーにより、CD4 と CCR5 分子の細胞表面への発現を確認した。遺伝子導入ラットを正常の雌ラットと交配し、得られた産仔 (F1) においても、遺伝子の導入と、発現を確認した。CD4, CCR5 の発現は、個体により程度にばらつきがみられた。

次に、in vitro での HIV-1 感染実験を行った。CD4, CCR5 の発現が高かったトラ

ンスジェニックラットの PBMC を採取・刺激後に、HIV-1 を感染させ、7 日間培養した。感染 7 日目の PCR では、トランスジェニックラット PBMC において、HIV-1 特異的な遺伝子の発現が確認でき、RT-PCR においても、ラット PBMC で、ヒト PBMC に比べて薄いものの、gag, pol, vif, env, nef のバンドが確認できた。このことから、ウイルスの感染と逆転写、プロウイルスの転写が行われていると考えられた。続いて、感染細胞で実際にウイルスタンパクが造られているのを調べるため、HIV-1 gag タンパクの一部である p24 の発現を ELISA で検討した。7 日目の培養上清中の p24 の濃度はごく微量だったものの、細胞溶解液中では、Negative control に比べ高い値を示していた。このことは、ウイルス粒子の産生がないか、あっても微量であるものの、トランスジェニックラット感染細胞内でウイルス mRNA が翻訳され、ウイルスタンパクが産生されている事を示す結果であった。

公開發表において、副査の有川 二郎教授から HIV-1 の複製が十分に行われていないのは、Cyclin T1 を導入できなかつた影響なのか、それとも別に原因があるのか、ウイルス感染細胞を長期間継代培養していくことにより、HIV-1 が、ラット細胞感受性が高いものになっていく可能性はあるか等の質問があった。これらの質問について申請者は、Cyclin T1 を導入できなかつた影響が大きいと思われるとともに、転写以降のウイルスの複製のために必要なヒト遺伝子の候補が他にもいくつかあること、今まであまり考慮していなかつたものの、HIV-1 の変異の可能性はあると考えること等を適切に回答した。ついで、小野江 和則教授より、導入遺伝子のプロモーターをどういう理由で選んだのか、4 つの遺伝子を一度に入れようとした理由は何か等の質問があった。この質問に対して、申請者は、当教室で使用した実績と、遺伝子発現細胞を限定させる目的で使用するプロモーターを選んだこと、4 つの遺伝子を一度に入れることによるメリットが多いと考えたこと等を、適切に説明した。最後に、主査の笠原 正典教授からこのラットをどのように有用に使用できるのかについて考えていく必要があるとの助言をうけた。

この論文は、HIV-1 感染モデル小動物開発という目標に一步近づいた点で高く評価され、今後、他の新たな遺伝子を導入できれば、より理想的な動物モデルが作製できると期待される。

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合わせ申請者が博士（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。