

## 学位論文題名

## HIV-1 の複製に必要な宿主因子の解析

- HIV-1 感染ラット細胞とヒト細胞の融合実験による検討 -

## 学位論文内容の要旨

ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (human immunodeficiency virus-1 : HIV-1) は後天性免疫不全症候群 (acquired immunodeficiency syndrome : AIDS) の原因ウイルスであり, CD4 および chemokine receptor である CXCR4 または CCR5 を感染受容体として, これらの分子をもつヒト T 細胞および単球/マクロファージ系細胞に感染する. げっ歯類の CD4 や chemokine receptor は HIV-1 と親和性がなく, マウスやラットは HIV-1 感染に対して抵抗性であることが知られている. 最近, ヒト CD4 と CXCR4 または CCR5 を導入したラット細胞では HIV-1 感染が成立し, さらにヒト cyclin T1 を遺伝子導入することにより, 同細胞内で HIV-1 が複製される可能性が報告された. しかしながら, その複製レベルはヒト細胞に比べて極めて低く, ラット細胞内で HIV-1 が大量に増殖するには細胞表面の感染受容体と cyclin T1 以外のヒト因子も必要と考えられた. HIV-1 複製の過程には cyclin T1, CDK9, CRM1, ICAM-3, NF $\kappa$ B, HP68, CIITA など多数の宿主因子が関与していると考えられているが, これまで, それらの因子がどのような細胞に分布しているか, あるいは, それらのうちのどの因子がより重要な役割を果たしているかについては明らかではなかった. 本研究ではヒト CD4 および CXCR4 を強制発現させたラット線維芽細胞 (W31/D4R4) を用い, HIV-1 をその細胞に感染させた. HIV-1 に感染した W31/D4R4 細胞と種々のヒト細胞株を融合し, 各融合細胞の培養上清ならびに細胞溶解液中の HIV-1 蛋白の発現について, p24 Gag 濃度を測定した. さらに, ヒト細胞株およびラット-ヒト融合細胞におけるヒト cyclin T1, CDK9, CRM1, ICAM-3, NF $\kappa$ B, HP68, CIITA の遺伝子発現変化を RT-PCR 法で検討した. これらの検討により, HIV-1 の複製に必要なヒト因子について解析を行った. 樹立されたラット W31/D4R4 細胞に HIV-1 を感染させ, 3 ヶ月間継代培養した細胞から DNA と RNA を抽出して, プロウイルスの組み込みならびにウイルス遺伝子の発現を PCR および RT-PCR 法で検索した. HIV-1 感染受容体遺伝子を導入したラット細胞に HIV-1 を感染させることにより, 宿主ゲノム内へのプロウイルスの組み込みが確認された. RT-PCR でも HIV-1 の LTR, gag, pol, vif, tat, env の各遺伝子発現が検出された. W31/D4R4 細胞に HIV-1 を感染後, 経時的に培養上清と細胞溶解液を採取し, p24 Gag 蛋白の発現を ELISA 法で解析した. 細胞上清中の p24 濃度は感染後 2 日目および 4 日目は 1,000 pg/ml 前後検出されたが, 時間が経過するとともに急速に減少し, 28 日後にはほとんど検出されなくなった. 細胞溶解液中の p24 は感染後 2 日目および 4 日目は 10 ng/ml 以上の値を検出したが, その後, 経時的に徐々に減少し, 28 日後の検出濃度は 84 pg/ml であった. 感染後 3 ヶ月経過した時点において, RT-PCR 法によりウイルス遺伝子の発現が観察されたが, このとき, p24 Gag 蛋白の発現は細胞の培養上清には検出されず, また, 細胞溶解液中においても 12 pg/ml と微量であった. 以上のことから, HIV-1 に感染したラット線維芽細胞内においてはウイルス遺伝子発現があっても微量か, もしくはウイルスの構成や細胞外への放出機構になんらかの障害がある可能性が考えられた. 融合実験には HIV-1 感染後 3 ヶ月間継代維持した W31/D4R4 細胞を用いた. この W31/D4R4 細胞とヒト T 細

胞腫瘍株 HUT78, マクロファージ系腫瘍株 U937, GI などの B 細胞腫瘍株, 癌細胞株 PCI-6 および Huh-7 の融合細胞における細胞溶解液中の p24 の濃度は 4-10 倍に増加した。しかし, ヒト T 細胞腫瘍株 Jurkat と融合したときには p24 の有意な増加は確認されなかった, また, ヒト卵巣癌株 HTOA との融合細胞においてもその増加はごく軽度であった。なお, 今回の検討ではほとんどの融合細胞の上清中に明らかな p24 の増加は確認されなかったが, ヒト B 細胞腫瘍株 WT46 との融合細胞の培養上清中においては 10 pg/ml のごく少量の p24 が検出された。Jurkat や HTOA を蛍光標識し, W31/D4R4 細胞と融合したときの蛍光発現率に, 他の細胞との有意差はなかったので, 単に細胞融合の成否が結果に影響している訳ではないと考えられる。Jurkat および HTOA の各細胞と W31/D4R4 細胞の融合細胞で p24 発現の誘導がおこらなかった原因を追究するために, 実験に用いた各種ヒト細胞株および W31/D4R4 細胞との融合細胞を用いて, これまでに HIV-1 複製に係わることが示唆されている cyclin T1, CDK9, CRM1, ICAM-3, NF $\kappa$ B, HP68, CIITA の 7 つのヒト遺伝子について RT-PCR 法でその発現を検討した。ヒト T 細胞腫瘍株 HUT78 と Jurkat に HIV-1 を感染させ, 28 日間継代培養したときの細胞溶解液中の p24 Gag 蛋白の濃度はいずれも 100 ng/ml 以上である (著者, 未発表データ)。これに対し, HIV-1 感染 W31/D4R4 細胞と HUT78 を融合したときの濃度は 1/1,000 以下の値となっている。このことは, cyclin T1, CDK9, CRM1, ICAM-3, NF $\kappa$ B, HP68 など HIV-1 の複製に重要な役割を果たすヒト遺伝子の発現が融合細胞中では欠落していることと関連している可能性が高い。一方, これらの遺伝子がすべて検出されなかった HUT78 融合細胞および Swei 融合細胞においても細胞溶解液中に非融合ラット細胞より有意に高い p24 が検出されたことから, 今回検索した遺伝子以外にも HIV-1 複製に有利に働くヒト因子が存在する可能性がある。HUT78 では融合前に発現していた CIITA 遺伝子が, 融合後は検出されなかった。これに対し, Jurkat では, 融合前には検出されなかった CIITA 遺伝子がラット細胞との融合により発現誘導されていた。Jurkat 融合細胞において有意の p24 増加が観察されなかった原因として, 融合操作により CIITA 遺伝子の発現が誘導されたこととの関連が推測される。CIITA は感染初期において Tat の働きを代替することにより, HIV-1 の複製に対して有利に働くと報告されたが, その後, 過剰な CIITA は Tat と競合的に働くとの実験結果も示されている。今回検討した 10 種類のヒト細胞株のうち, Jurkat 同様 p24 の増加が得られなかった HTOA においても, 融合前は検出されなかった CIITA が融合後に発現誘導されており, 本結果からも CIITA は HIV-1 複製に対して抑制的に働くと考えられる。そのほか, 細胞融合前後で CIITA が発現誘導された細胞として PCI-6 と Huh-7 があるが, PCI-6 においては cyclin T1 と CDK9 の発現が細胞融合後も維持されており, また, Huh-7 においては ICAM-3 の発現が融合後に発現誘導されており, CIITA による抑制作用が相殺された可能性が考えられる。今回の検討ではほとんどの融合細胞の上清中に明らかな p24 の増加は確認されなかったが, ヒト B 細胞腫瘍株 WT46 との融合細胞の培養上清中においてはごく少量の p24 が検出された。WT46 融合細胞では, 他の融合細胞で検出されなかった HP68 が検出されている。HP68 は HIV-1 キャプシドが形成される際, 宿主細胞の細胞膜に沿って HIV-1 Gag (p55) ポリペプチドが集合するときに使用される宿主因子である。酵母やマウスでは HIV-1 キャプシドの形成が認められないことが知られており, ヒト以外の動物細胞に感染性の HIV ウイルスを産生放出させるためには, ヒト HP68 遺伝子導入が不可欠である可能性も考えられる。本研究ではヒト CD4 と CXCR4 を発現するラット線維芽細胞 W31/D4R4 を用いて, この細胞に HIV-1 を感染させ, さらに各種ヒト細胞株と融合することにより HIV-1 の複製に係わるヒト因子を解析した。以上の結果から, 今回検討した cyclin T1, CDK9, CRM1, ICAM-3, NF $\kappa$ B, HP68, CIITA 以外にも HIV-1 複製に有利に働くヒト因子は存在すると考えられた。ヒト T 細胞腫瘍株 Jurkat と卵巣癌株 HTOA との融合では p24 の増加は誘導されなかった。これらの融合細胞では, 融合操作により発現誘導された CIITA が HIV-1 複製に対して抑制的に働いた可能性が示唆された。HIV-1 複製には, それに対して有利に働く宿主因子と不利に働く宿主因子が複合的に関与していると考えられた。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 笠 原 正 典  
副 査 教 授 長 嶋 和 郎  
副 査 教 授 守 内 哲 也

学 位 論 文 題 名

## HIV-1 の複製に必要な宿主因子の解析

－ HIV-1 感染ラット細胞とヒト細胞の融合実験による検討－

HIV-1 は AIDS の原因ウイルスであり、HIV-1 複製には多数の宿主因子が関与していると考えられている。ヒト CD4/CXCR4 を発現するラット線維芽細胞 W31/D4R4 は HIV-1 に感染し、プロウイルス DNA が細胞ゲノムへ組み込まれることが、趙により報告されている。しかしながら、継代を重ねるにしたがい、HIV-1 感染 W31/D4R4 細胞の培養上清中に HIV-1 p24 蛋白は検出されなくなり、細胞溶解液中においてもその濃度は微量となった。このことから、ラット線維芽細胞内では HIV-1 の複製が十分におこらず、細胞外に HIV-1 はほとんど放出されないと考えられた。そこで、本研究では、HIV-1 感染 W31/D4R4 細胞と各種ヒト細胞を融合し、HIV-1 の複製に必要なヒト因子について解析を行った。その結果、ヒト T 細胞腫瘍株 Hut78、マクローファージ系腫瘍株 U937、Raji などの B 細胞腫瘍株、PCI-6 などの癌細胞株等多くのヒト細胞と融合したとき、融合細胞溶解液中の HIV-1 p24 濃度は融合前の 4-10 倍に増加した。したがって、HIV-1 の複製に有利に働くヒト因子は、これらの細胞種によらず発現していると考えられた。一方、T 細胞腫瘍株 Jurkat または卵巣癌株 HTOA を融合した場合は p24 の有意な増加は確認されなかった。融合前後の細胞を用いて、HIV-1 の複製に関与するとの報告があるヒト cyclin T1, CDK9, CRM1, ICAM-3, NF $\kappa$ B, HP68, CIITA の遺伝子発現を調べたところ、Jurkat と HTOA との融合細胞では融合後に誘導された CIITA が HIV-1 複製に対して抑制的に働いた可能性が示唆された。また、唯一培養上清中に p24 が検出された WT46 融合細胞では HP68 の遺伝子発現が確認され、HIV-1 の細胞外放出にヒト HP68 が重要な役割を果たしているという報告に矛盾しない結果であった。

発表の後、まず、副査守内哲也教授より感染実験を行った場所について質問があった。申請者は、HIV-1 感染実験は P3 実験室で行う必要があること、そのため中棟 1 階の感染対策剖検室を P3 実験室として申請し、病原性微生物等安全委員会の承認を受けたことを回答した。また、守内教授より、本論文では融合細胞のヒト遺伝子変化のみ検討しており、HIV-1 複製におけるラット遺伝子の作用について

不明であるとの指摘があった。申請者は、今回の検討では融合細胞のラット遺伝子の発現変化は検討しておらず、HIV-1 複製に対するラット遺伝子の作用については今後の重要な検討課題であることを回答した。次に、副査長嶋和郎教授より、HIV-1 感染ヒト細胞の p24 産生量について質問があった。申請者は HIV-1 に感染したヒト T 細胞株およびマクロファージ株の培養上清と細胞溶解液中の p24 濃度は、1 ng/ml 以上と高かったことを自らの実験結果に基づき回答した。これに対し、長嶋教授より、ヒト細胞とラット細胞を融合したときの値はそれに比べて極めて低い、なぜかという質問があった。これに対し、申請者は、融合操作により、多くの HIV-1 複製に関与しているヒト遺伝子が消失したことがその原因と考えられると回答した。さらに、長嶋教授より、融合細胞においてヒト遺伝子が欠落する現象は一般的なことかについて質問があった。これに対して、申請者は、一般にラットとヒト細胞を融合する場合にはヒト染色体が消失し、ラットとマウス細胞を融合する場合にはラット染色体が消失することが文献的に知られていると回答した。最後に主査笠原正典教授より融合実験の再現性についての質問があった。申請者は、融合操作は複数回行い、特に Jurkat については繰り返し実験を行って結果が再現されることを確認したと回答した。いずれの質問に対しても申請者は現在までの HIV-1 感染、複製と融合細胞に対する知見や関連する論文報告などを引用し、申請者自身の考察を交えて概ね妥当に応答した。この論文は高く評価され、HIV 等の増殖の分子機構の解明並びに新たなウイルス治療法の開発にも役立つものであると期待される。

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。