

学位論文題名

Synergistic effect of human CycT1 and CRM1 on HIV-1 propagation in rat T cells and macrophages

(ラット細胞での HIV-1増殖におけるヒト CyclinT1と CRM 1の相乗効果)

学位論文内容の要旨

【目的】

HIV-1はCD4/CCR5のreceptorを介して宿主の細胞に感染するウイルスである。ヒトとチンパンジー以外に感染しないので、ワクチンや治療法の開発にHIV-1小動物感染モデルが必要である。ラット細胞にヒトCD4/CCR5を発現させても、僅かにしかウイルスが増殖しないが、増殖効率を改善することにより、小動物感染モデルが出来ると考えられる。最初に、転写効率とウイルスmRNAの核外輸送を改善するためにTatのコファクターである転写伸長因子ヒト(h)CyclinT1とRevのコファクターであるRNA輸送因子ヒト(h)CRM1に着目した。更に、我々は、hCyclinT1とhCRM1を発現するTgラット、そのdouble Tgラットを樹立した。本研究では、ラット細胞株と、hCyclinT1/CRM1トランスジェニック(Tg)ラットのprimary T細胞と腹腔マクロファージでのHIV-1増殖における両因子の効果とラット細胞から産生されたvirusの感染性を調べることを目的にした。

【実験方法】

- ①ラットT細胞株FPM1とC58(NT)D、ラットマクロファージ株NR8383に、hCyclinT1及びhCRM1の発現ベクターとHIV-1の発現ベクターであるpΔpol(X4 virus)と一緒にヌクレオフェクターを用いてエレクトロポレーションにより導入し、上清中のウイルス量をp24 ELISAにて測定した。また、R5とX4 virusの発現ベクターを細胞株に導入し、細胞株から産生されたウイルスの感染性をTZM-bl細胞を用いて検討した。
- ②F344由来のWt/Tgラットの脾臓のT細胞又はCD4⁺T細胞を抗CD3/CD28の抗体で(ヒトのPBLはPHAで)2日間刺激後エレクトロポレーションによりHIV-1の発現ベクターであるpCRRE(X4 virus)とpmax-GFP(導入効率を確認するため)を導入し、上清中のウイルス量を測定した。更に、上記と同様にprimary T細胞から産生されたウイルスの感染性を評価した。また、Western blotにより、hCyclinT1とhCRM1を検出した。
- ③F344のWt/Tgラットの腹腔からマクロファージを採取し、その後、VSV-G NL4-3 シュードウイルス(X4 virus)又はNLAD8-EGFP(R5 virus)を感染させ、ウイルス量を測定した。また、産生されたR5/X4ウイルスの感染性を評価した。

【結果】

- ①ラットT細胞株とラットマクロファージ株におけるhCyclinT1とhCRM1の効果を調べるため、pΔpolとhCyclinT1及びhCRM1の発現ベクターを同時にtransfectionした。その結果、FPM1とC58(NT)Dでは、hCyclinT1を導入することにより約50倍、更にhCRM1を同時に導入することにより、数倍上清中へのウイルス量が増加した。しかし、hCRM1のみでは、ウイルス量の増加が殆ど見られなかった。NR8383では、hCRM1を導入することにより約15倍、更にhCyclinT1を同時に導入することにより数倍上清中へのウイルス量

が増加した。しかし、hCyclinT1のみでは、ウイルス量の増加が殆ど見られなかった。また、ラット細胞株から産生されたウイルスは、R5/X4ウイルスは共に感染性があった。②hCyclinT1とhCRM1 Tgとそのdouble Tgラットのcharacterizationを行った。hCyclinT1 Tgの脾臓細胞をPHAで刺激したところ、hCyclinT1が発現しなかったが、抗CD3/CD28抗体で刺激するとhPBL(human peripheral lymphocyte)と同等の発現があった。ラット腹腔マクロファージにおいても、hMDM(human monocyte derived macrophage)と同等の発現が確認された。この結果から、double Tgラットは、HIV-1感受性ラットモデルに有用であることが示唆された。

③ラット primary T細胞でのHIV-1増殖効果におけるhCyclinT1とhCRM1の効果を検討するため、pCRREとpmax-GFPを導入し、ウイルス量を測定した。その結果、hCyclinT1 Tgラットの脾臓のT細胞においてWtと比べて約15倍、double Tgラットにおいては、約40倍までウイルス量が増加した。そして、ヒトPBLの約3分の1の量であった。また、double TgラットのCD4⁺T細胞では、Wtと比べて約170倍までウイルスの産生量が増加した。

④ラット腹腔マクロファージでのHIV-1増殖効果におけるhCyclinT1とhCRM1の効果を検討する為に、腹腔マクロファージにVSV-G NL43 シュードウイルスを感染させ、12日間上清中のウイルスの産生量をモニターした。その結果、Wtと比べてhCRM1 Tg由来のマクロファージでは約3倍ウイルス量の増加が見られた。更にdouble Tgでは約5倍増加し、hMDMの1/2から1/6の産生量であった。次に、ラット腹腔マクロファージから産生されたウイルスの感染性を検討ところ、NL-4-3 virusでは、hMDM由来のウイルスと同等の感染性があり、NLAD8-EGFPではhPBL由来のウイルスの約1/2であった。

【考察】

①ラットT細胞株において、hCyclinT1とhCRM1を同時に導入することにより、ウイルス量が著しく増加したが、hCRM1のみでは増加が見られなかった。また、ラット primary T細胞では、Wtと比べてhCyclinT1/CRM1 double Tgラットにおいて著しくウイルス量の増加が見られ、細胞株と同様の傾向を示した。また、ヒトPBLと比較すると約3分の1にまで増加した。この結果から、ラットT細胞には、hCyclinT1は必要な因子であると考えられる。

②ラットマクロファージ株では、hCyclinT1とhCRM1を同時に導入することにより、ウイルス量の著しい増加が見られたが、hCyclinT1のみでは増加が見られなかった。また、double Tgラット由来の腹腔マクロファージにおいても細胞株と同様の傾向を示した。この結果から、ラットマクロファージには、hCRM1が必要な因子であると考えられる。

③ラット細胞株とprimary細胞から産生されたウイルスは、R5 type、X4 type共に感染性があった。

【結語】

今回の結果から、ラット primary T細胞とマクロファージにおけるHIV-1の増殖には、ヒトCyclinT1とCRM1が必要な因子であり、このhCyclinT1/CRM1 double TgラットにHIV-1のreceptorであるCD4/CCR5を発現させることにより、HIV-1感受性ラットが出現すると期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 有 川 二 郎
副 査 教 授 高 田 賢 藏
副 査 教 授 志 田 壽 利

学 位 論 文 題 名

Synergistic effect of human CycT1 and CRM1 on HIV-1 propagation in rat T cells and macrophages

(ラット細胞での HIV-1増殖におけるヒト CyclinT1と CRM 1 の相乗効果)

ラットは HIV-1 の受容体であるヒト CD4 と CCR5 を発現させるとウイルスが僅かに増殖するので、増殖率を改良することでワクチンや治療法を開発するため良いモデルになる可能性がある。本論文では、ラット細胞での HIV-1 増殖における HIV-1 の転写のコファクターヒト CyclinT1 と mRNA の輸送因子ヒト CRM1 の効果を解析した。

ラット細胞株における両因子の効果を調べるため、hCyclinT1 及び hCRM 1 発現ベクターと HIV-1 発現ベクターをエレクトロポレーションにより導入し、上清中のウイルス量を p24 ELISA にて測定した。その結果、ラット T 細胞株では、hCyclinT1 を導入することにより約 50 倍、hCRM 1 を同時に導入することで、更に数倍ウイルス量が増加した。ラットマクロファージ株では、hCRM 1 を導入することにより約 15 倍、hCyclinT1 を同時に導入することで更に数倍増加した。また、ラット細胞株から産生されたウイルスは、R5/X4 ウイルス共に感染性があつた。

ラット細胞株にヒト CyclinT1 と CRM 1 を同時に導入することにより著しいウイルスの増殖を確認したので、ヒト CyclinT1 と CRM 1 を発現する Tg ラット及び、その double Tg ラットを樹立し、primary T 細胞及び、腹腔マクロファージでの HIV-1 増殖における両因子の効果と、産生されたウイルスの感染性を検討した。

最初に、ラットの脾臓細胞を抗 CD3/CD28 抗体で刺激すると hCyclinT1 と hCRM 1 共に hPBL (human peripheral lymphocyte) と同等の発現があることを認めた。また、胸腺細胞においても両因子の発現があつた。ラット腹腔マクロファージにおいても、hMDM (human monocyte derived macrophage) と同等の発現があつた。次に、ラット primary T 細胞での HIV-1 増殖効果における両因子の効果を検討するため、HIV-1 発現ベクターと GFP を発現するベクターを導入した。その結果、Wt の脾臓の T 細胞と比べて double Tg ラットでは約 40 倍ウイルス量が増加した。ヒト PBL の約 3 分の 1 の量であつた。また、double Tg ラットの CD4⁺T 細胞では約 170 倍増加した。次いで、ラットマ

クロファージにおける効果を調べるために、腹腔マクロファージに VSV-G でコートした HIV-1 ウイルスを感染させた。その結果、Wt と比べて double Tg ラットにおいてウイルス量が約 5 倍増加した。hMDM の約 1/2 から 1/6 量であった。ラット primary 細胞から産生されたウイルスは、R5/X4 ウイルス共に感染性があった。以上の結果から、ラット primary T 細胞とマクロファージにおける HIV-1 の増殖にはヒト CyclinT1 と CRM1 が必要な因子であり、この hCyclinT1/CRM1 double Tg ラットに HIV-1 の receptor である CD4/CCR5 を発現させることにより、HIV-1 感染小動物ラットが作製出来ることが期待された。

発表後、高田賢蔵教授より「ラット CyclinT1 と CRM1 を過剰発現させるとヒト CyclinT1 と CRM1 と同様に HIV-1 の増殖を促すのか?」、有川二郎教授より「ラット細胞に感染するウイルスの単離が出来るのか?」、志田壽利教授より「研究遂行上最も重要な点は何か?」との質問があった。高田賢蔵教授の質問に対して申請者は自身の論文報告などを引用し、有川二郎教授の質問に対してはウイルスの単離が出来る可能性を示唆し、志田壽利教授の質問に対しては本研究で用いた浮遊細胞への安定した transfection の実験系の樹立がポイントであったことを述べ、申請者自身の考察を交えて概ね適切かつ明確に回答した。

この論文は、トランスジェニックラットにおいて HIV-1 の産生量が著しく増加され、今後の HIV-1 感染小動物モデルの樹立に向けての方向性を示唆した点が高く評価できる。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。