

論文の内容の要旨

論文題名:1 型ヒト免疫不全ウイルスベクター(HXN)の特性の解析に関する研究

指導教官:岩本 愛吉 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 13 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名:佐久間 龍太

1 型ヒト免疫不全ウイルス(human immunodeficiency virus type 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る。HIV-1 は一本鎖のプラス鎖 RNA をゲノムとして持つ。感染後、ゲノム RNA は HIV-1 の逆転写酵素によって二本鎖 cDNA と変換されながら核へ侵入する。この cDNA は HIV-1 のインテグラーゼによって宿主の染色体に組み込まれる。ゲノム cDNA の両端に繰り返し配列 LTR とパッケージングシグナル(Ψ)を持ち、内部にウイルス粒子形成に必須のタンパク質をコードする構造遺伝子(*gag*, *pol*, *env*)などを持つ。この HIV-1 を遺伝子導入用のベクターとして利用したものが HIV-1 ベクターである。

本研究で使用した HIV-1 ベクター(HXN)は、HIV-1 のゲノム cDNA を基に構築されており、両端の LTR と Ψ は持つが、遺伝子のほぼ全てを欠損している。HXN から HIV-1 のタンパク質が発現することはない。HXN はネオマイシン耐性遺伝子と hybrid TK プロモーターを(hTK)持つ。hTK は ミニマム TK プロモーターとポリオーマウイルスのエンハンサーで構成されている。粒子形成に必要なタンパク質はヘルパープラスミドを用いて供給した。ヘルパープラスミドとして、Env 以外の HIV-1 タンパク質の発現プラスミドを用いた。また Env はほかのウイルスのエンベロープタンパク質で置換可能であるので、vesicular stomatitis virus (VSV) G タンパク質発現プラスミドを 2 つめのヘルパープラスミドとして使用した。ベクタープラスミドとヘルパープラスミドを 293FT 細胞へ co-transfection すると、内部に HXN の RNA を持ち、エンベロープに VSV G タンパク質を持つベクター粒子が培養上清中に放出される。

HXN を AIDS の遺伝子治療に利用できないかと考えた。HXN を用いて導入した外来遺伝子発現カセットは宿主の染色体に組み込まれて長期間発現することが期待できる。また、開発されたベクターのエンベロープを HIV-1 Env に戻せば HIV-1 と同じ宿主特異性を持つベクターとなり、これは増殖しない HIV-1 であるのでワクチン効果も期待できる。一方で、HXN の遺伝子導入効率は HIV-1 の感染効率と比較して低い事が欠点としてあげられる。これは、HXN が自己増殖できないように、遺伝子のほぼ全てを削ったことで、効率の良い感染に関与する領域も失ったことが原因だと考えられている。そこで遺伝子導入効率を上げるためには、HIV-1 由来の配列に戻せば良いのではないかと考えた。本研究では HXN に戻す HIV-1 の塩基配列として central polypurine tract and central termination sequence (cPPT/CTS) に注目した。cPPT/CTS に変異を入れた HIV-1 の感染性が低下することが報告され、cPPT/CTS は HIV-1 の効率の良い感染に必要と考えられている。この cPPT/CTS を HXN ベクターに挿入することで遺伝子導入効率が上昇するかを調べた。

HXN のプロモーターの上流に 178 塩基の cPPT/CTS を含む断片 (SCC、図 1) を挿入して HXN-SCC を作製した。ベクターの遺伝子導入効率は、HeLa 細胞を指示細胞とし G418 耐性をマーカーとして調べた。各ベクターの遺伝子導入効率は HXN の遺伝子導入効率を 1 としたときの相対値として計算し、有意差の有無を判断した。その結果、HXN と HXN-SCC の遺伝子導入効率に有意差はなかった。挿入した領域が短すぎたために差が出なかったのかと考え、282 nt の断片 (LCC、図 1) を挿入することとした。LCC は SCC よりも 5' 側に 104 nt 長い領域である。HXN のプロモーターの上流に LCC を挿入して HXN-LCC を作製し、遺伝子導入効率を調べた。その結果、予想に反して HXN-LCC の遺伝子導入効率は HXN と比較して有意に低下した (約 15%)。LCC はベクター感染を阻害する因子の標的になっていることが考えられた。LCC を標的とするベクター感染を阻害する因子が存在するならば、それは HIV-1 の感染も阻害できるのではないかと考えた。LCC は HIV-1 のゲノムの一部だからである。そこで、HXN-LCC の感染がどの段階で阻害されているのかを調べた。

ベクター感染の段階のうち、核へ侵入した cDNA 量、インテグレーションした cDNA 量、内部プロモーターからの遺伝子発現の 3 点を調べた。核へ侵入した cDNA 量を調べるために核内の cDNA 量の指標として広く用いられている 2LTR 環状 DNA 量を特異的な PCR によって検出した。その結果、HXN 感染細胞と HXN-LCC 感染細胞の核内の 2LTR 環状 DNA 量に差がなく、HXN と HXN-LCC のベクター RNA/cDNA の核への侵入は同程度だと考えられる。次にインテグレーションした cDNA 量を Alu-LTR PCR 法を用いて解析した。Alu-LTR PCR 法は LTR とヒト染色体上の繰り返し配列 (Alu 配列) との間の領域を PCR で増幅することで、染色体にインテグレーションしたベクター DNA のみが増幅される PCR である。その結果、HXN-LCC のインテグレーション量は HXN と比較して低下していることが分かった。以上より HXN ベクターに LCC を挿入することで、核へ侵入した後インテグレーションまでのいずれかの段階が阻害されていることが分かった。

インテグレーションした cDNA 量は低下していたが、一部の cDNA はインテグレーションしていた。そこで、内部プロモーターからの遺伝子発現についても調べた。そのために、HXN の構造を模したレポータープラスミドを作製した。この LTR と hTK プロモーターを持ち、レポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を持つ。このプロモーターの上流に LCC を挿入し、LCC がルシフェラーゼ活性に与える影響を調べた。その結果、LCC の挿入によってルシフェラーゼ活性は 20-30% 程度に低下した。このレポータープラスミドから LTR を除いても、hTK プロモーターを TK プロモーターに置換してもルシフェラーゼ活性の低下は認められなかった。TK プロモーターはミニマム TK プロモーター (hTK と共通) とチミジンキナーゼのエンハンサー領域で構成されていることから、ルシフェラーゼ活性の低下には LTR と hTK プロモーターに含まれるポリオーマウイルスのエンハンサーが必要だと推測された。更に、LCC を 5' 側から 13 塩基ずつ削った欠損変異を作製し、ルシフェラーゼアッセイを行ったところ、LCC の 5' 側の 13 塩基 (図 1) が重要であることが示された。遺伝子発現を抑制する塩基配列の多くは何らかのタンパク質の結合によって転写を抑制するので、LCC に対する何らかのタンパク質の結合が推測された。

HXN-LCC の遺伝子導入効率が低下した一方で、HXN-SCC のインテグレーションは HXN と同程度起こっていた。そのため、短い cPPT/CTS (SCC) と長い cPPT/CTS (LCC) の差の領域に原因があることが予想された。そこで LCC と SCC の差の 104 塩基の領域 (dZ、図 1) を HXN ベクターに挿入して HXN-dZ を作製し、遺伝子導入効率が低下するかを調べた。HXN-dZ の遺伝子導入効率が低下すれば、LCC の挿入による遺伝子導入効率の低下の原因は dZ 領域にあることになり、HXN-dZ の遺伝子導入効率が低下しなければ LCC 全長が必要ということになる。HXN-dZ でも培養上清中にベクター粒子は形成された。この粒子から RNA を抽出し RT-PCR を行ったところ、驚いたことにこの粒子内にベクター RNA は含まれていなかった。そこで、ベクター産生細胞の細胞質と核におけるベクター RNA 量を RT-PCR 法にて調べたところ、HXN-dZ の RNA はベクター産生細胞の核内からは検出できたが、細胞質からは検出されなかった。このことから、HXN ベクターに dZ を挿入することで、ベクター RNA が細胞質に輸送されなくなったことが示唆された。HXN-dZ の RNA はベクター産生細胞の細胞質から検出されなかったにも関わらず、dZ をその一部として含む LCC を挿入した HXN-LCC ベクター RNA は細胞質から検出された。このことから、HXN ベクターに dZ を挿入したことによる核から細胞質への輸送の阻害は SCC により打ち消されると推察された。

以上の結果から、HXN-dZ はウイルス増殖の複製の段階で阻害されているベクターとなる。この HXN-dZ がドミナントネガティブとして HIV-1 の増殖を抑制できないかを調べた。そのために、HXN-dZ の DNA をコードしているプラスミドと HIV-1_{LAI} の感染性クローンをコードしているプラスミド (pLAI) を 293T 細胞に co-transfection して培養上清中に放出される粒子量を測定した。粒子形成に必要なタンパク質は pLAI から発現するので、粒子量が少ないということは pLAI からのタンパク

質発現、つまり HIV-1 の複製が阻害されたと言うことを示唆する。その結果、HXN のプラスミドと pLAI を co-transfection した場合でも粒子量の低下が見られたが、HXN-dZ のプラスミドを co-transfection に用いた場合、より大きく粒子量が減少した。よって HXN ベクターでもウイルス複製を抑制する効果があるが、dZ を挿入したことで更に強い抑制が可能になることがわかった。以上より、HXN-dZ を利用することで HIV-1 の増殖を制御できる可能性が示唆された。dZ 領域に関する報告は今のところ無く、本研究では新しい現象を観察したと考えられる。

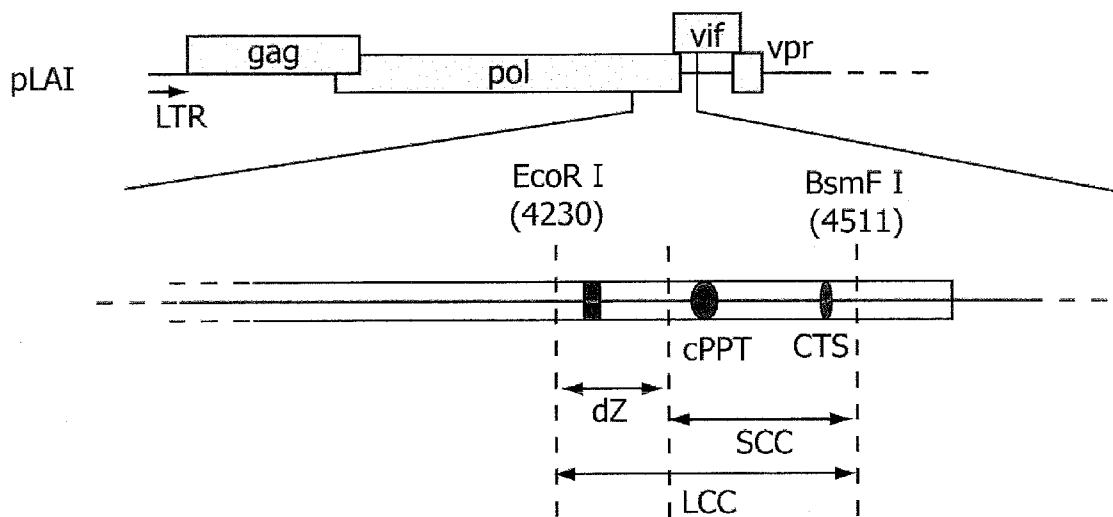


図1 使用した cPPT/CTS、dZ の領域

HIV-1_{LAI} の pol 遺伝子の 3' 端に cPPT (4367-4390) と CTS (4470-4380) が存在する (ともにオレンジの楕円)。LCC として用いた 282nt の領域は 4230-4511 番の塩基を、SCC として用いた 178nt の領域は 4334-4511 番の塩基を SCC と LCC の差となる 104nt の領域を dZ と名付け、PCR にて増幅して使用した。ルシフェラーゼアッセイから導かれた hTK プロモーターからの転写を抑制する責任領域を青四角で示した。図は pLAI 上の HIV-1LAI ゲノム cDNA の一部を示し、番号は 5' LTR 中の R 領域の始点を 1 としたときの塩基番号を表す。