

論文内容の要旨

論文題目： マウスモデルを用いた HIV-1 複製機構の解析

(The mechanism of HIV-1 replication in primary mouse cells of HIV-1 transgenic mice)

氏名 角木 基彦

【序論】

エイズは HIV-1 の感染により引き起こされる、後天性の免疫不全症であり、感染後約 10 年間の潜伏期間を経た後に発症する。HIV-1 は T 細胞およびマクロファージ (M ϕ) に感染後、自身のゲノムを宿主細胞内に組込むことで潜伏状態を維持する。近年、複数の抗 HIV 薬を併用する HAART の導入により、エイズの発症率および死亡率は激減した。しかし、HAART では HIV-1 の潜伏感染細胞を除くことはできないため、感染者は生涯にわたり服薬を続ける必要がある。ゆえに、ワクチンをはじめとした、潜伏感染細胞を標的とした新たな治療法の開発が望まれている。抗 HIV 薬やワクチン開発の前臨床試験のみならず、個体レベルでのエイズ発症機構を解析するための重要なツールとして、有用な動物モデルが求められている。申請者の研究室で作製された HIV-1 ゲノム導入マウス (HIV-Tg) は、細菌成分により潜伏 HIV-1 が再活性化される HIV-1 潜伏感染の動物モデルである。本研究では、HIV-1 潜伏感染の分子機構を明らかにすることで、新規抗 HIV-1 薬の開発に資するべく、HIV-Tg を用いて、M ϕ における潜伏 HIV-1 再活性化機構を明らかにすることを目的とした。また、よりヒトに近い HIV-1 複製効率をマウスにおいて実現すべく、HIV-Tg で観察された HIV-1 mRNA 転写後における障害を克服するようなマウスモデルの作製を試み、HIV-1 複製効率に及ぼす影響を解析した。

1. 細菌感染に伴う潜伏 HIV-1 再活性化機構の解析

【背景と目的】

細菌感染は、エイズ発症の促進因子であり、潜伏期に T 細胞や M ϕ に潜む HIV-1 の再活性化

を誘導する。またエイズ発症後の主な死因は、日和見菌の感染によるものである。従って、エイズの発症予防、治療には、細菌感染に伴う HIV-1 再活性化機構の解明が急務である。申請者の研究室で作製された HIV-Tg は、HIV-1 潜伏感染のモデル動物であり、リンパ球においては、LPS により誘導された TNF や IL-1 依存的に HIV-1 再活性化が起こることが知られていた。しかし、他の細胞の関与およびその分子機構の詳細は不明であった。HIV-1 による細胞傷害を受けず、細胞寿命が長いことから、M ϕ は主要な HIV-1 潜伏感染細胞となっている。そこで本研究では、M ϕ の潜伏感染細胞としての機能に着目し、細菌感染に伴う HIV-1 再活性化における M ϕ の関与を明らかにすべく、HIV-Tg の M ϕ における HIV-1 再活性化機構の解明を試みた。

【実験方法】

HIV-Tg から調製したチオグリコレート誘導腹腔 M ϕ および脾臓細胞を LPS で刺激し、HIV-1 mRNA の発現をリアルタイム PCR により定量した。また、HIV-1 タンパク質を Western blot および ELISA により検出した。HIV-1 再活性化における、TNF 産生の寄与を明らかにすべく、抗 TNF 中和抗体で処理した M ϕ における LPS 刺激時の HIV-1 mRNA 発現をリアルタイム PCR により評価した。TLR4 の下流では、アダプター分子である MyD88 および TRIF を介して MAPK 群および NF- κ B が活性化されることで、炎症性サイトカインなどの種々の遺伝子発現を制御することが知られている。そこで HIV-1 再活性化におけるこれらシグナル分子の関与を明らかにすべく、p38 MAPK, ERK, JNK, NF- κ B それぞれに対する阻害剤、*Myd88* および *Trif* に対する siRNA または MyD88 欠損マウスおよび TRIF 経路特異的阻害剤を用いて、LPS 刺激時の HIV-1 mRNA 発現をリアルタイム PCR で定量した。

【結果と考察】

HIV-Tg 由来 M ϕ では、脾臓細胞と同様に LPS 濃度依存的に HIV-1 再活性化が起こり、また HIV-1 タンパク質への翻訳が見られることを見いだした。しかし、M ϕ では脾臓細胞よりも早期に HIV-1 mRNA の発現がピークに達したことから、脾臓細胞とは発現制御機構が異なることが示唆された。実際、脾臓細胞では TNF 阻害により、LPS による HIV-1 再活性化が有意に抑制されたが、M ϕ では抑制されず、IL-1 の産生は見られなかった。このことから、M ϕ における HIV-1 再活性化は TNF や IL-1 産生に依存せず、TLR4 を介した直接シグナルが重要であることが示唆された。p38 MAPK および NF- κ B 経路の阻害は HIV-1 再活性化を有意に抑制したが、ERK および JNK 経路の阻害は影響を及ぼさなかった。また、MyD88 経路の阻害では HIV-1 再活性化が有意に抑制されたが、TRIF 経路の阻害では影響が見られなかった。これらの結果から、申請者は、M ϕ における LPS 刺激に伴う HIV-1 再活性化は、TRIF 経路よりもむしろ MyD88 経路に依存しており、その下流では p38 MAPK および NF- κ B の活性化が必須であることを明らかにした。以上より、M ϕ における細菌感染時の HIV-1 再活性化メカニズムが明らかとなり、エイズ治療の新たな標的分子が同定された。同時に、HIV-1 再活性化時の HIV-1 タンパク質産生を詳細に解析したところ、M ϕ では HIV-1 Gag タンパク質の産生効率が低いことが明らか

となった。このことから、*in vivo*における効率的なウイルス複製を実現するには、HIV-1 mRNAの転写後においてさらなる改良が必要であることが示唆された。

2. HIV-1 感受性マウス作製の試みと解析

【背景と目的】

マウスは遺伝的背景および環境要因を一致させやすく、発生工学的手法を用いることで遺伝子レベルでの詳細な解析が可能であり、モデル動物として適している。しかし、マウス細胞では、ヒト細胞と比べてウイルス複製の種々の過程で効率が低下している。申請者の研究室で作製された HIV-Tg は HIV-1 ゲノムが宿主ゲノムに組み込まれているため、転写以降の過程の解析が可能である。前章における解析から、HIV-Tg の M ϕ では、HIV-1 mRNA の転写は観察されるが、Gag タンパク質の産生効率が低いことが明らかとなり、HIV-1 mRNA 転写後の過程における種間障壁が示唆された。HIV-1 の mRNA は、一次転写産物から複数のスプライスバリエーションに変換され、それぞれがコードするタンパク質は効率的なウイルス産生に必須である。ヒト CRM1 は一次転写産物がスプライシングを受ける前に unspliced HIV-1 mRNA を核外に輸送し、ウイルス産生を促進する宿主因子である。本研究では、マウス CRM1 による unspliced mRNA の核外輸送能がヒト CRM1 と比較して低いことが、HIV-Tg において Gag 産生効率が低い原因であると仮定し、ヒト CRM1 トランスジェニックマウス (hCRM1 Tg) を作製することで、よりヒトに近い HIV-1 複製効率を示すマウスモデルの作製を試みた。

【実験方法】

LPS 刺激により HIV-1 を再活性化させた HIV-Tg と、HIV-1 を感染させたヒト T 細胞株 MT4 から RNA を精製し、Northern blot により HIV-1 mRNA のスプライスバリエーションの組成を比較した。C3H/HeN 由来のマウス受精卵にヒト CRM1 発現ベクターをマイクロインジェクションし、hCRM1 Tg を作製した。導入遺伝子のゲノムへの挿入は、Southern blot により確認した。導入遺伝子の発現を Northern blot により解析し、発現が高い系統を選び、感染実験に用いた。マウス細胞における HIV-1 侵入障害を回避するため、HIV の外殻を水疱性口内炎ウイルス由来糖タンパク質 (VSV-G) で置き換えたシェードウイルス (VSV/HIV) を作製した。VSV/HIV を野生型マウスおよび hCRM1 Tg のチオグリコレート誘導腹腔 M ϕ に感染させた後、HIV-1 mRNA の発現をリアルタイム PCR により定量した。

【結果と考察】

HIV-1 感染 MT4 と比較して、HIV-Tg では HIV-1 mRNA が過剰にスプライシングを受けていることを見いだした。このことから、実際にマウス CRM1 はヒト CRM1 と比べて unspliced mRNA の核外輸送能が低いことが示唆された。hCRM1 Tg を作製し、複数系統の Tg を得ることに成功した。hCRM1 Tg は野生型マウスと比較して外見上の異常は見られなかったが、M ϕ における VSV/HIV 感染時の unspliced HIV-1 mRNA の spliced HIV-1 mRNA に対する割合が増加して

いた。この結果より、hCRM1 Tg において HIV-1 mRNA のスプライシングを抑制させることに成功した。これは、hCRM1 の導入により unspliced mRNA の核外輸送能が上昇したものと考えられた。以上より、hCRM1 を導入することで、よりヒトに近いモデルマウスを作製することができた。

【結論】

本研究は、細菌感染に伴う、M ϕ における潜伏 HIV-1 再活性化の分子機構を明らかにすることを目的として行われた。HIV-Tg の M ϕ を用いて、LPS による HIV-1 再活性化機構を解析した結果、リンパ球とは異なり M ϕ では、TNF や IL-1 などの産生による二次的刺激ではなく、TLR4 を介した直接シグナルが重要であることが明らかとなった。この時、MyD88 を介した p38 MAPK および NF- κ B の活性化が必須であることを明らかにした。これらのシグナル経路の阻害は、LPS によるサイトカイン産生も同時に抑制することから、リンパ球および M ϕ 両者における HIV-1 再活性化の抑制につながると考えられる。宿主因子を標的とした治療は、薬剤耐性ウイルスの出現頻度が低く、有効な治療法となりうる。HIV-Tg は HIV-1 再活性化を標的とした治療法の探索および評価のための非常に有用なツールとなるものと期待される。また、hCRM1 Tg では、HIV-1 mRNA の過剰なスプライシングが抑制され、よりヒトに近いモデルマウスの作製に成功した。hCRM1 Tg x HIV-Tg を用いることで、HIV-1 複製効率が更に上昇することが考えられる。これらのマウスは、エイズ発症機構を個体レベルで解析可能な有用な動物モデルとなることが期待される。