

[課程-2]

審査の結果の要旨

ティラナイポン パイロート

氏名 Teeranaipong Phairote

本研究はヒト免疫不全ウイルス1型（HIV-1）の細胞指向性を解析するために、細胞膜融合と二重分裂タンパク質（Dual Split Protein, DSP）を用いた迅速・簡便なHIV-1表現型細胞指向性試験の新規開発を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. HIV-1表現型細胞指向性試験にはレセプター発現細胞としてNP2細胞、CD4およびCCR5発現NP2細胞（N4R5）、CD4およびCXCR4発現NP2細胞（N4X4）の3種の培養細胞株を使用し、細胞指向性の決定に必須のDSP1タンパク質を細胞に恒常的に発現させるために、レンチウイルスベクターを用いてDSP1遺伝子を導入した。ブラストサイジン存在下による選択と、クローニングを行いDSP1恒常発現細胞株（N4-DSP1, N4R5-DSP1, N4X4-DSP1）を樹立した。
2. 293FT細胞にHIV-1 env遺伝子、DSP2遺伝子および遺伝子導入マーカーとしてmOrange蛍光タンパク質を同時発現可能な新規プラスミド（pRE11）を構築した。
3. 上記HIV-1 Envタンパク質、DSP2タンパク質およびmOrangeタンパク質発現pRE11導入293FT細胞とN4R5-DSP1もしくはN4X4-DSP1の共培養を行い、HIV-1 Envタンパク質とCD4、CCR5/CXCR4タンパク質との相互作用により細胞膜融合を観察することができた。また細胞膜融合細胞にてDSPタンパク質の会合による緑色蛍光およびルシフェラーゼ活性を蛍光顕微鏡およびルミノメーターを用いて検出できることを示した。
4. CXCR4指向性HIV-1実験株（NL4-3, HXB2, LAI）、CCR5指向性HIV-1実験株（BaL）および両指向性HIV-1株（SF2）のenv遺伝子をpRE11にクローニング後、細胞膜融合実験を行った。結果はこれまでに報告されているウイルス粒子を使用した細胞指向性試験と完全に一致した。また、X4指向性Env発現pRE11とR5指向性Env発現pRE11ベクターの混合実験によりX4を0.5%、R5を10%の感度で検出できる事を明らかにした。
5. 20名のHIV-1感染者由来の血漿を用いて細胞指向性試験を行った。HIV-1感染者の血漿からRNAを抽出後、Nested-PCRによりenv遺伝子を増幅しpRE11ベクターへクローニングを行った。Env遺伝子の増幅、クローニングが可能であった19例全例において細胞指向性の決定が可能であることを示した。
6. HIV-1感染者由来envを用いた細胞膜融合を用いた指向性試験の結果とウイルス粒子を用いたIn-house Pseudoviral tropism assayとの比較を行った。13/19例の結果は一致し、6/19例の結果は一致していなかった。結果の不一致は細胞膜融合を用いた指向性試験では両指向性だった検体が、Pseudoviral tropism assayではR5指向性という結果

となった。これら検体についてクローン解析を行った結果、どの検体からも細胞膜融合試験で両指向性クローンを得られた事から、Fusion assayの感受性がPseudoviral tropism assayより高い可能性が示唆された。

以上、本論文は細胞膜融合と二重分割タンパク質 (Dual Split Protein, DSP) を用いた新規 HIV-1 表現型細胞指向性試験を樹立した。本研究はこれまでにウイルス粒子を使用し、数週間を要していた表現型細胞指向性試験に代わる新しい細胞指向性決定系を確立した。今後、臨床分野および基礎分野における HIV-1 の細胞指向性解析に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。