

論文内容の要旨

論文題目 サル指向性 HIV-1 に関する研究

氏名 齊藤 暁

1. 序論

ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (human immunodeficiency virus type 1 [HIV-1]) の宿主域は比較的に狭く、ヒトとチンパンジー以外ではほとんど増殖できない。ヒトと同じ霊長類であるアカゲザル、カニクイザルなどのマカク属サル由来細胞でも、その増殖が強く抑制される。したがって現時点では、近縁のサル免疫不全ウイルス (SIV) 感染マカクサルモデルが、ヒト HIV-1 感染症を反映する最適の動物モデルと考えられている。しかし、HIV-1 と SIV の相違点が問題となる場合、例えば HIV-1 蛋白の特異的な構造を標的とする新規薬剤やワクチンなどの評価には、HIV-1 感染動物モデルが有用である。

このいわゆる「種の壁」を規定する機序については、未だ十分には解明されていないものの、近年、いくつかの宿主因子の関与が報告されてきている。また、近年、これらの抗 HIV-1 因子と相互作用するウイルス蛋白の機能領域やその分子機序の解明が進展し、HIV-1 をベースとしたサル指向性 HIV-1 獲得に向けた研究が進められている。

そこで私は、マカクサルが HIV-1 感染に抵抗性である機序の解明に向けて、サル指向性 HIV-1 のサルへの感染性を検討していくこととした。所属研究室の共同研究者 (足立ら) が、カニクイザル T 細胞株に感染性を有するサル指向性 HIV-1 作製を進めていることから、このウイルスを用いて実験を進めることとした。第一世代のウイルス NL-DT5R は、HIV-1 由来遺伝子を約 93% 保持するキメラウイルスであり、さらにいくつかの改良が加わり、カニクイザル T 細胞株における増殖能が向上したとされる第二世代 MN4-5S および第三世代 MN4Rh-3 が作製されている。そこで本研究では、カニクイザル T 細胞株で増殖能が確認されたこれらのサル指向性 HIV-1 の個体レベルでの増殖能を検討することを目的とし、カニクイザルにおける感染実験を行った。さらに、その増殖に影響を与える宿主因子について解析した。

2. 材料、方法

本研究で用いたサル指向性 HIV-1 は、足立らにより作製されたものであり、それらの模式図を図 1 に示す。カニクイザル末梢血単核球 (PBMC) におけるサル指向性 HIV-1 増殖能の解析においては、磁気細胞分離法により CD8 陽性細胞を除去後、活性化させた細胞を標的としてウイルスを感染させ、経時的に上清中の HIV-1 Gag カプシド蛋白 (p24) 量を ELISA を用いて定量した。

カニクイザルの TRIM5 遺伝子型については、細胞から DNA を回収し、PCR 法にて目的とする領域を増幅することにより解析した。カニクイザル個体におけるウイルス増殖能の解析においては、ウイルスを静脈内接種した後、経時的に採血し、各種リンパ球マーカーの免疫染色による測定およびリアルタイム PCR 法による血漿中ウイルス (ゲノム) 量定量を行った。

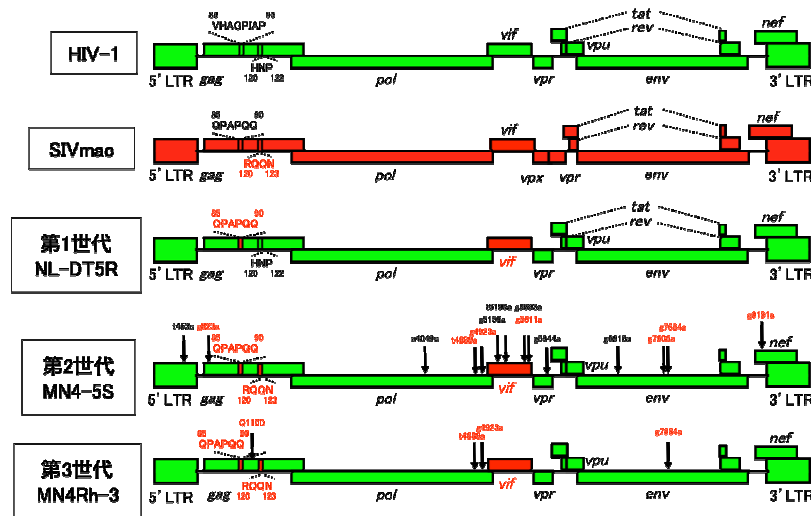


図1 各HIV-1クローンの模式図
 緑色の部分はHIV-1由来の領域を示し、赤色の部分はSIVmac由来の領域を示す。矢印は、塩基置換の位置を示す。また、アミノ酸置換を伴う塩基置換の位置を赤字で示す。

3. 結果

(1) カニクイザル PBMC および個体における第二世代サル指向性 HIV-1 (MN4-5S) の増殖能の解析

これまでのサル指向性 HIV-1 の増殖能の解析は主に T 細胞株を用いて行われてきたので、まず、HSC-F 細胞株での増殖能が確認された第二世代サル指向性 HIV-1 である MN4-5S について、カニクイザル PBMC での増殖動態を解析し、その増殖能を確認した。

次に、サル個体での増殖能を検討するため、3 頭のカニクイザルへの感染実験を行なった。その結果、いずれの個体においても、一過性ではあるがウイルス血症が観察された。血漿中ウイルス量のピーク値は、 $5 \times 10^3 - 2 \times 10^4$ copy/ml であった。

(2) カニクイザル PBMC における第三世代サル指向性 HIV-1 (MN4Rh-3) の増殖能の解析

カニクイザル T 細胞株での増殖能が現時点で最も高い第三世代サル指向性 HIV-1 である MN4Rh-3 を使い、カニクイザル PBMC および個体における増殖能をさらに詳細に検討することとした。まず、数頭のカニクイザル由来 PBMC における MN4Rh-3 の増殖レベルを解析したところ、一部のサル個体由来 PBMC において比較的高レベルの増殖が認められた。その一方で、一部の個体由来 PBMC においては増殖がほとんど認められず、ウイルス感受性が大きく異なる 2 つのカニクイザル個体群が存在することが示唆された。

(3) カニクイザル TRIM5 遺伝子型が第三世代サル指向性 HIV-1 (MN4Rh-3) の増殖に及ぼす影響の解析

上記のサル指向性 HIV-1 感受性に関与する宿主因子として TRIM5 の可能性を検証するため、カニクイザル TRIM5 遺伝子多型の解析を行った。医薬基盤研究所霊長類医科学研究センターのカニクイザル 79 頭の TRIM5 遺伝子多型について検討した結果、CypA 挿入のあるアレル (TRIM-Cyp) と CypA 挿入のない野生型アレル (TRIM5 α) が存在することが明らかとなった。重要なことに、上記のカニクイザル PBMC での第三世代 MN4Rh-3 感染実験において抵抗性であった個体群は TRIM5 α をホモで有しており、その一方で、第三世代 MN4Rh-3 に感受性を示した個体群は TRIM-Cyp をホモで有するか、もしくは TRIM5 α と TRIM-Cyp をヘテロで有していた。

この TRIM5 遺伝子型と第三世代 MN4Rh-3 感受性との相関を検証する目的で、各群の頭数を増やし、各々の PBMC における MN4Rh-3 の増殖レベルを解析した。その結果、図 2 に示すように、TRIM5 α ホモ群 (n = 9) は、MN4Rh-3 感染に対して強い抵抗性を示し、ウイルス増殖のピーク値 (p24 : 平均 3.6×10^0 ng/ml) は、TRIM-Cyp ホモ群 (n = 9) のピーク値 (p24 : 平均 5.8×10^1 ng/ml) と比較して有意に低下していた (p = 0.0010)。一方で、TRIM-Cyp ホモ群と TRIM5 α ・TRIM-Cyp ヘテロ群の間には、MN4Rh-3 感受性に有意な差は認められなかった。以上の結果より、TRIM5 遺伝子型がサル指向性 HIV-1 (MN4Rh-3) の増殖に大きく影響することが示唆された。

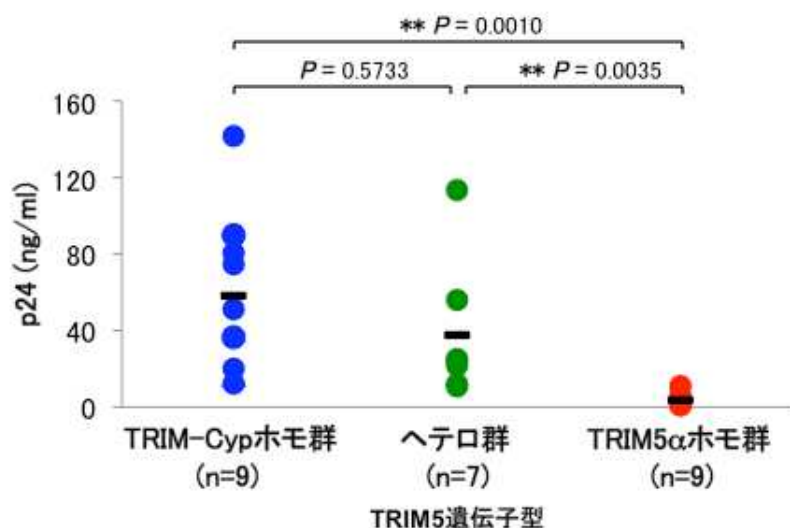


図2 各TRIM5遺伝子型のカニクイザルPBMCにおける第三世代ウイルスMN4Rh-3の増殖

(4) カニクイザル個体における第三世代サル指向性 HIV-1 (MN4Rh-3) の増殖能の解析

上記の TRIM5 遺伝子型のサル指向性 HIV-1 感受性への関与を考慮したうえで、カニクイザル個体レベルでの第三世代 MN4Rh-3 の増殖能を解析することとした。TRIM5 α ホモ個体群 (n = 3) および TRIM-Cyp ホモ個体群 (n = 6) の 2 群を用意し、MN4Rh-3 チャレンジ実験を行った。その結果、TRIM-Cyp ホモ個体群では、一過性ではあるものの全頭にウイルス血症 (ピーク血漿中ウイルス量 : $1 \times 10^4 - 2 \times 10^5$ copy/ml) が認められた。一方、TRIM5 α ホモ個体群では、急性期でも効率よいウイルス増殖は認められず、血漿中ウイルス量はピーク値で 2×10^3 copy/ml 以下であった。このことから、in vivo においても、TRIM5 遺伝子型のサル指向性 HIV-1 感受性への影響が示唆された。

4. 考察

本研究では、カニクイザル T 細胞株での増殖能の確認された第二世代および第三世代サル指向性 HIV-1 (MN4-5S および MN4Rh-3) について、カニクイザル PBMC での増殖能ならびにカニクイザル個体における増殖能を明らかにした。カニクイザル感染実験では、持続感染には至らなかったものの、急性期に比較的高い血漿中ウイルス量を示した。この結果は、このサル指向性 HIV-1 が、サル細胞に対する種の壁を部分的に乗り越える能力を獲得している可能性を示唆している。

また、本研究では、TRIM5 の遺伝子多型解析により、高率に TRIM-Cyp アレルを有するカニクイザル群を世界で初めて見いだした。このサル群は、TRIM5 遺伝子型のウイルス感受性への影響を検証するうえで、極めて貴重なモデルとなりうると考えられる。

さらに、カニクイザル PBMC での第三世代サル指向性 HIV-1 (MN4Rh-3) 感染実験において、TRIM-Cyp ホモ群もしくは TRIM5 α ・TRIM-Cyp ヘテロ群が感受性を示し、TRIM5 α ホモ群は強い抵抗性を示すことを見いだした。この結果は、サル個体レベルでの感染実験でも認められ、TRIM5 遺伝子型がサル指向性 HIV-1 の増殖に大きく影響することが示された。一連の結果は、TRIM5 遺伝子型がサル指向性 HIV-1 感染への感受性を規定する重要な因子であることを示唆するものであり、極めて重要な知見であると考えられる。

本研究の結果は、マカクサルが HIV-1 感染に抵抗性である機序の解明に貢献しうるだけでなく、HIV-1 蛋白の特異的な構造を標的とする新規薬剤やワクチンなどの評価に有用な HIV-1 感染動物モデル開発に結びつくことが期待される。

5. 結語

本研究では、カニクイザル T 細胞株での増殖能の確認された第二世代および第三世代サル指向性 HIV-1 (MN4-5S および MN4Rh-3) について、カニクイザル PBMC での増殖能ならびにカニクイザル個体における増殖能を明らかにした。一方、TRIM5 の遺伝子多型解析により、高率に TRIM-Cyp アレルを有する貴重なカニクイザル群を見いだした。さらに、TRIM5 遺伝子型がサル指向性 HIV-1 の増殖に大きく影響することを示す結果を得た。本研究の結果は、マカクサルが HIV-1 感染に抵抗性である機序の解明に貢献しうるだけでなく、今後、HIV-1 蛋白の特異的な構造を標的とする新規薬剤やワクチンなどの評価に有用な HIV-1 感染動物モデル開発に結びつくことが期待される。