

学位論文題名

HIV 感染による宿主遺伝子発現の変化:

ヒトおよびラット細胞を用いた解析

学位論文内容の要旨

Human immunodeficiency virus (HIV)-1 は acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) の病原ウイルスであり, CD4 および chemokine receptor を介してヒト T 細胞及び monocyte/macrophages 系細胞に種および細胞特異的に感染する. マウスやラットなどげっ歯類の CD4 や chemokine receptor は HIV-1 と親和性がなく, HIV-1 感染に対して抵抗性であることはよく知られている. 最近, ラット由来の細胞に HIV-1 感染受容体遺伝子であるヒトの CD4 や CXCR4 chemokine receptor の他に Cyclin T1 を導入することにより, 複製レベルは低いものの HIV-1 の感染が成立する可能性が報告された. 一方, MHC Class II transactivator (CIITA) を多種類の細胞に発現させると HIV-1 の複製が促進されることが報告されている. 本研究では HIV-1 感染感受性のある小動物モデル作製に向けて, HIV-1 感染に必要なと考えられるヒト CD4, CXCR4, Cyclin T1 や CIITA を強制発現させたラット線維芽細胞を用い, T-tropic HIV-1 ウイルスをそれらの細胞株および対照としてヒト CD4⁺細胞株 HUT78 に感染させ, HIV-1 感染初期におけるヒト及びラット宿主細胞遺伝子の発現変化を検討した.

各 W31 transfectant 細胞の導入ヒト CD4 および CXCR4 遺伝子の発現は flow cytometry で解析した. どの細胞表面にも, 大差なく十分な導入ヒト CD4 および CXCR4 遺伝子の発現が確認された. 一方, ヒト Cyclin T1 及び CIITA 遺伝子の発現は, それぞれの gene specific primer set を用いた RT-PCR 法によって, それぞれの遺伝子を transfect したすべての細胞で確認された. ヒト CD4, CXCR4, Cyclin T1 や CIITA を発現させた W31 transfectant 細胞に HIV-1 を感染させた. HIV-1 感染 W31 transfectant 細胞における HIV-1 プロウイルス DNA の確認は, HIV-1 env gene specific primer set を用いた PCR 法によって行った. いずれの感染 W31 transfectant 細胞においても, 予定された 321bp のバンドが増幅され, HIV-1 プロウイルスが各細胞のゲノム内に挿入されていると考えられた.

挿入された HIV-1 プロウイルスの発現を検討するため, 感染後経時的に感染細胞溶解液中の p24 Gag 蛋白の発現を ELISA 法で解析した. HIV-1 感染 HUT78 細胞培養上清の約 1000 分の 1 と微量であるものの, p24 蛋白が検出された. しかし, 培養上清では検出できなかった. 一方, 4 種類の感染 W31 transfectant 細胞の内, 感染 hCD4-hCXCR4/W31 細胞のみがほかの細胞に比べ約半分以下であった. したがって, ヒト Cyclin T1 および CIITA はラット線維芽細胞でも弱いながらウイルスの発現に効果的に働く可能性が考えられた. Control に用いた HIV-1 と共培養した W31 細胞では, p24 は全く検出されなかった. 経時的には, どの感染 W31 transfectant 細胞においても感染 2 日後から 6 日後にかけて徐々に p24 レベルは減少し, その後ごく少量ながら 10 日後まで持続した.

HIV-1 感染による HUT78 細胞での宿主遺伝子の発現の変化を cDNA array により検討した. 使用した 621 ヒト免疫関連遺伝子アレイフィルターでは約 250 の遺伝子が測定可能であった. HIV-1 感染 HUT78 細胞では未感染に比べ, 発現亢進より発現低下する遺伝子の方が多かった. 発現亢進する遺伝子には FAS や PIN など apoptosis を誘導する遺伝子を含んでいた. 3 分の 2 以下の発現低下を認めた 56 の遺伝子の中には, Bcl-x や NFκB などの anti-apoptotic

に働く因子のほか、遺伝子発現制御系遺伝子や細胞増殖に関わる遺伝子を多数含んでいた。感染 W31 transfectant 細胞については当教室で作製した独自のラット用アレイフィルターを用いて検討した。このフィルターで用意された 284 種類の遺伝子の内、約半数が評価可能であった。すべての種類の感染 W31 transfectant に共通して発現亢進を確認できる遺伝子は見られなかったが、FAS や ORF1 ほかにいくつかの遺伝子は 2 種類以上の感染細胞で発現が亢進していた。一方、ヒトと同様に HIV-1 感染によって発現が低下する遺伝子の方が亢進する遺伝子より多かった。使用したラット用とヒト用のアレイフィルターで準備されている遺伝子の種類が違い、共通しているものが少ないながら FAS の亢進や RANTES, Bcl-x, NFκB の低下傾向はどちらでも観察された。次に、ヒトの感染細胞でより普遍的な HIV-1 感染により変動する遺伝子を抽出する目的で、M-tropic HIV-1 を感染させたヒト monocyte 系細胞株である U937 での遺伝子変化を cDNA array で検討した。この結果から得られた感染 HUT78 と同様な変動を示した遺伝子のうち、感染 W31 transfectant 細胞にも変化が確認できた 9 種類の遺伝子を抽出して、半定量的リアルタイム RT-PCR で発現動態の確認を行った。すなわち、HIV-1 感染により発現亢進する遺伝子の候補として HSP90β, PPP1CA, PIN, FAS の 4 種類の遺伝子を選び、HUT78, U937 および各 W31 transfectant 細胞への HIV-1 感染による変動を検定した。その結果、HSP90β と FAS はヒト Cyclin T1 遺伝子を持つ W31 transfectant で HUT78 や U937 同様の感染による発現増強を見た。一方、発現の低下する遺伝子として CREB-2, ICAM, NFκB, Bcl-x および RANTES について同様の検討を行った。この 5 種類の遺伝子はいずれの場合も、ヒト Cyclin T1 遺伝子を導入した W31 transfectant 細胞で HUT78 や U937 と同様の発現低下が観察された。CREB-2, ICAM, Bcl-x については、CIITA 導入細胞や Cyclin T1 と CIITA の両方を持つ hCD4-hCXCR4-hCycT1-hCIITA/W31 でも低下が確認されたが、NFκB および RANTES は CIITA 導入細胞ではほとんど変化が無いかあるいは逆に亢進傾向にあり、hCD4-hCXCR4-hCycT1-hCIITA/W31 での発現の変化は無いかあるいは亢進気味にあった。

今回の研究では、cDNA array 法を活用することにより、HIV-1 感染初期に起こる感染宿主の遺伝子発現の変動を明らかにすることができた。また、HIV-1 感染関連ヒト遺伝子導入ラット細胞を使用することによって感染初期の宿主遺伝子の発現変動にはヒト Cyclin T1 が重要な働きをしていることを示した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 木 敬

副 査 教 授 長 嶋 和 郎

副 査 教 授 志 田 壽 利

学 位 論 文 題 名

HIV 感染による宿主遺伝子発現の変化：

ヒトおよびラット細胞を用いた解析

申請者は HIV-1 感染感受性のある小動物モデル作製に向けて、HIV-1 感染に必要と考えられる HIV-1 受容体ヒト CD4 と CXCR4 およびウイルスの発現に関与する Cyclin T1 や CIITA を強制発現させたラット線維芽細胞 (W31 細胞) に T-tropic HIV-1 ウイルスを感染させるとともに、対照としてヒト CD4⁺細胞株 HUT78 にも感染を行い、HIV-1 感染初期におけるヒト及びラット宿主細胞遺伝子の発現変化を検討した。まず、各 W31 transfectant での導入ヒト CD4, CXCR4, Cyclin T1 及び CIITA 遺伝子の発現を確認した。ヒト CD4 と CXCR4、さらに Cyclin T1 や CIITA を発現した W31 に HIV-1 を感染させると、Cyclin T1 や CIITA の有無に関わらず、ヒト CD4 と CXCR4 を発現した W31 細胞ではいずれの細胞にも HIV-1 プロウイルス DNA が認められた。HIV-1 プロウイルスの発現を p24 Gag 蛋白の ELISA 法で解析した。HIV-1 感染 HUT78 細胞培養上清の約 1000 分の 1 と微量であるものの、p24 蛋白を検出した。また、ヒト Cyclin T1 や CIITA も導入した W31 ではヒト CD4 と CXCR4 のみを導入した細胞の約 2 倍の p24 発現があり、ヒト Cyclin T1 や CIITA 遺伝子は弱いながらウイルスの発現に効果的に働く可能性が考えられた。HIV-1 感染による HUT78 細胞での宿主遺伝子の発現の変化を cDNA array により検討した。HIV-1 感染 HUT78 細胞では未感染に比べ、発現亢進より発現低下する遺伝子の方が多かった。発現亢進遺伝子には apoptosis を誘導する遺伝子を含み、発現低下の遺伝子の中には anti-apoptotic に働く因子のほか、遺伝子発現制御系遺伝子や細胞増殖に関わる遺伝子を多数含んでいた。感染 W31 transfectant についても同じ傾向が見られた。感染 W31 transfectant にも変化が確認できた 9 種類の遺伝子について、半定量的リアルタイム RT-PCR で発現動態を確認した。その結果、ヒト Cyclin T1 が導入された細胞では、より HUT78 と同様な発現の変化が確認され、感染初期の宿主遺伝子の発現変動には Cyclin T1 が重要な働きをしていることを示した。発表の後、副査の志田壽利教授と以下のような質疑応答があった。問：HUT78 細胞の中にも p24 蛋白はあるか。答：今回示していないが、細胞の中にも存在し、上清よりも多いと考えている。問：ラット細胞では p24 は細胞内に確認されているが上清ではみられないのはなぜか。上清へ

放出する為には他の遺伝子が必要なのか。答：最近 HIV-1 の感染には Topoisomerase 1 が感染効率を上げることも報告されており、ほかの遺伝子が必要かもしれない。問：HUT78 と W31 細胞の種類は何か。答：HUT78 は T 細胞で W31 はラット線維芽細胞。問：これらの細胞間の違いによって感染の違いはあるか。答：あると思うのでラットの T 細胞でも今後検討したい。問：アレイの実験ではアポトーシス関連の遺伝子が上昇し、ウイルス感染による影響が考えられるが、どのように確認できるか。答：アポトーシスについては免疫染色を行い、FACS で確認できるので今後行いたい。問：一般的にはウイルスを感染すると apoptosis が誘導されるが、その理由として、一つは生体の防御機構がウイルスの増殖を制限するために、もう一つは、ウイルス遺伝子の発現によって宿主細胞死を引き起こすのではないかと考えられている、どちらか推測できるか。答：どちらでも可能性があるが、ウイルスにより起こることが違う可能性もあり、推測が難しい。次に、副査の長嶋和郎教授と以下のような質疑応答があった。問：今回の実験ではヒトの遺伝子を 4 種類導入しているが、HIV-1 の感染に最近必要なことがわかってきた Topoisomerase を加え、5 種の遺伝子を導入し HIV-1 の増殖を調べる事は可能か。答：可能だと思う。問：今回 HIV-1 感染を行った細胞では HIV-1 粒子がつくられるか。答：つくっているかまだ確認できていない。最後に、主査の吉木敬教授と以下のような質疑応答とアドバイスがあった。問：形態学的な変化はどうか。答：細胞が大きくなったり集まったりなどの現象が見られた。問：p24 の発現量はヒトでは 18 日まで検討しているが、ラットでは 10 日までしか検討されていない。ラットでも 18 日くらいまで p24 の発現量を観察できるか。また、ヒトで見られたように上昇する可能性はあるか。答：細胞は生きていますので p24 の発現量を測定することができます。また、上昇していることも考えられる。アドバイス：ラットの T 細胞は弱く 4 種の遺伝子導入実験は難しいので、当教室ではトランスジェニックラットの作製も試みている。HIV-1 感染には 4 種の遺伝子で十分か、あるいはその他に必要な遺伝子があるかについても検討する事が今後必要であろう。以上、質疑に対する応答は概ね妥当であった。

この論文は、HIV-1 感染に必要と考えられる遺伝子を強制発現させたラット線維芽細胞を用い、HIV-1 感染初期におけるヒト及びラット宿主細胞遺伝子の発現変化を cDNA array にて検討した点が高く評価され、今後の HIV-1 感染感受性のある小動物モデル作製の一翼を担うものとして期待される。

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。