

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430084

研究課題名(和文) ヒト遺伝子導入/ノックダウンラットHIV-1感染モデルの作成

研究課題名(英文) human gene transgenic and knock-down rat model for HIV-1 infection

研究代表者

志田 壽利 (shida, Hisatoshi)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・客員教授

研究者番号：00144395

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：エイズワクチンや治療法の開発を加速するために、HIV-1感受性のラット動物モデルは有用である。我々は既にヒトCD4/CCR5/CyclinT1/CRM1遺伝子を導入したラットのマクロファージにHIV-1が効率よく感染できる事を示している。本研究では、さらにCyclophilinAとApobec3をノックアウトする事によってHIV-1がラットT細胞で増殖できるようになる事を見いだした。

研究成果の概要(英文)：To accelerate development of anti HIV-1 vaccine and therapeutics, a rat HIV-1 infection model is useful. We have already found macrophages of rats that express human CD4, CCR5, CyclinT1 and CRM1 genes are efficiently infected with HIV-1. Here we show that the rat T cells whose CyclophilinA and Apobec3 genes are knocked out allow HIV-1 propagation.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HIV-1 感染 ラットモデル

1. 研究開始当初の背景

エイズウイルス(HIV-1)の感染の拡大は続いており、2011年の世界での新規感染者は250万人に及ぶ。東南アジア・インド・中国で感染が急拡大しており、日本へのHIV-1の侵入へとつながっている。感染の拡大阻止の最良の方法はワクチンであるが、決定的なものは未だ開発されていない。他の感染阻止法として抗エイズ薬(HART)の感染前使用(PrEP)が提唱されているが、完全でない(阻止率44-73%)。また、HARTで感染者体内のウイルス量を減少させることにより、感染防止が可能であることが示されたが、感染に気付いていないHIV-1感染者が主要感染源であることを忘れてはならない。

ワクチン開発が遅々としている理由の一つとして、HIV-1の宿主域がヒトとチンパンジーに限られているために、ワクチンの有効性を検証すべき動物感染モデルがないことが挙げられる。そこで、猿エイズウイルス(SIV)用ワクチンの感染防御能を赤毛猿で検証し、そのHIV版で臨床試験に臨むやり方が行われている。しかし、赤毛猿は世界的に不足しており入手が難しく、かつ1頭当たり100-200万円が必要である。さらに、感染猿をP2/P3レベルで飼育できる施設に限りがある。そこで、感染小動物モデルの開発が期待されている。実際、ヒトの臍帯血由来血液幹細胞を移植した免疫不全マウスが感染モデルとして使用されている。しかし、この系ではHIV-1が増殖できるにも関わらず、免疫がほとんど誘導されないためにワクチンの検定系とはなり得ない。また、ヒト胎児の肝臓と胸腺、血液幹細胞を移植するBLTマウスが作成されているが、抗体誘導能が完全でなく、かつ、倫理上の観点から日本では承認されていない。

我々は、ラットを改良する事によって感染モデルとする事を試みている。少しHIV-1の感染を許し、近交系が確立され、発生工学の利用できるラットは良い感染動物モデルに改良できる可能性を持つからである。既に、ラットでHIV-1の増殖を促す因子としてTat(HIV-1の転写因子)のコファクターのヒトCyclinT1と、Rev(HIV-1のRNA輸送因子)のコファクターCRM1を同定し、それらを発現するhCycT1/CRM1発現トランスジェニック(Tg)ラットを作成した。このTgラット由来のprimaryマクロファージにVSVG蛋白質でコートしたHIV-1は効率よく感染し、かつ、ヒトマクロファージの約1/10-1/3量の感染性の子孫ウイルスを生産した。TgラットCD4+ T細胞にHIV-1ゲノムをエレクトロポレーション法で導入すると、野生型ラットT細胞の100-1000倍量の感染性子孫ウイルスが生産された。ヒトCD4+ T細胞の約1/10量であった。ついで、受容体であるヒトCD4/CCR5/CXCR4発現Tgラットと掛け合わせる事により、5重Tgラットを作成し、primaryマクロファージにHIV-1は

効率よく感染することを確認した。しかし、primary T細胞経への感染効率が低いことが分った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ラットCD4+ T細胞への感染効率と子孫ウイルスの生産量をさらに上昇させる方法を開発し、HIV-1感染ラットモデルを作製することである。

3. 研究の方法

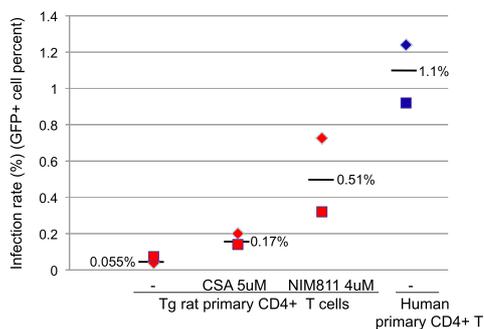
- (1) 細胞の調整：ラット primary CD4+ T細胞はヒト CD4/CCR5/CXCR4/CycT1/CRM1発現Tgラットの脾臓細胞からガラスウールとマグネティックビーズを用いて分離した。抗CD3/CD28抗体によってT細胞を活性化し、RPMI, 20% FCS, 0.1% ME, 1/100 NaPyruvate, 1/100 非必須アミノ酸培地で培養した。ラットT細胞株FPM1, Nb2, C58NTDと皮下細胞株FPMsvをRPMI, 10% FCS, 0.1% ME下で培養した。レトロベクターを用いてヒトCD4/CCR5/CycT1/CCR5を発現させ、各種選択抗生物質存在下で培養した。ヒト primary CD4+ T細胞はPBMCからマグネティックビーズを用いて分離し、PHAで活性化後、IL-2を含むRPMI, 10% FCS中で培養した。ヒトCD4+ T細胞株Molt4CCR5はRPMI, 10% FCS、100ug/ml G418中で培養した。
- (2) ラット cyclophilinA(CypA)のノックダウン(KD)：CypA KD用shRNA配列搭載レンチベクター(pPRIME)を構築して、ラットT細胞株に transduce した。
- (3) ラット Bst2, Apobec3, インターフェロンA受容体(IFNAR), インターフェロンL受容体(IFNLR)のノックアウト(KO)：レンチベクター(Lenti-CRISPR)又は pX330 A/Sの系を用いた。
- (4) HIV-1の調整：AD8-E(GFP遺伝子をゲノム3'領域に有しており、感染するとGFPを発現する。国立感染研横田恭子博士より分与)などのHIV-1は全て全長クローンを293T細胞にトランスフェクションする事により調整した。サイクロスポリンA(CSA)結合領域の変異株G89VとV89P/H87Q/I91N/M96I(4点変異株)をAD8-Eをベースに通常のin vitro mutagenesis法によって作製した。ラットIRF7優勢阻害遺伝子含有AD8はAD8-EのGFP遺伝子をIRF7優勢阻害遺伝子に置き換える事によって構築した。
- (5) HIV-1の感染効率の測定：0.5~1 x 10⁵細胞に1~2.5 x 10⁴ TCID₅₀ HIV-1を加えて37℃一晩保温し、翌日HIV-1の特異的感染阻害物質5uM maravirocを加えて2次感染を阻害し、さらに翌日FACSscaliburを用いてGFP+細胞の割合を計測した。
- (6) HIV-1の増殖効率の測定：上記と同様に感染後、3回培地で細胞を洗浄し、3日培

養した。培養上清を回収し p24 ELISA kit によってウイルスの生産量を、TZM-bl 細胞を用いて感染価を測定した。

4. 研究成果

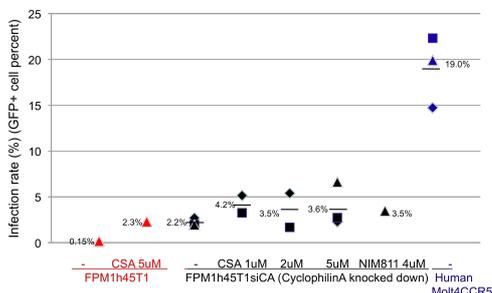
(1) HIV-1 感染効率への CypA 阻害の効果：
Tg ラット由来の primary CD4+ T 細胞に、CypA 阻害剤である CSA 又は免疫抑制効果のない NIM811 存在下で AD8-E を感染させて、感染効率への効果を調べたところ、CSA では3倍、NIM811 では9倍効率の上昇が見られ、ヒト CD4+ T 細胞の約半分の効率まで上昇した(下図参照)。

Effect of cyclosporin A (CSA) on HIV-1 infection to primary CD4+ T cells



さらに詳細に解析するために、primary T 細胞と同様の挙動を示すラット T 細胞株を探した。Nb2, C58NTD, FPM1 の中で、FPM1 が CSA と NIM811 存在下で HIV-1 の感染を上昇させた。ヒト CD4+T 細胞株 Molt4CCR5 と比較したところ、薬剤非存在下では 1/200 の感染効率しかなかったが、CSA 存在下では 1/8 まで上昇した。そこで、CSA の標的である CypA をノックダウンしたところ同様に Molt4CCR5 の 1/8 の効率で HIV-1 を感染させた(下図参照)。

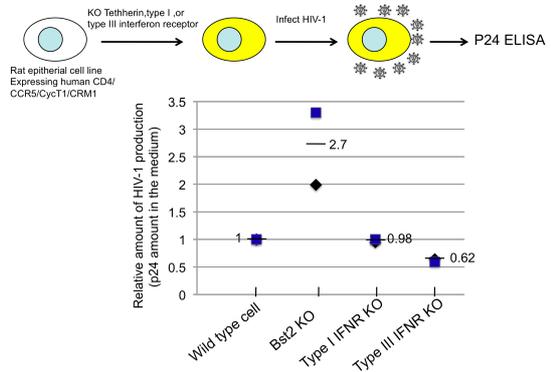
Effect of cyclophilinA knock-down on HIV-1 infection to rat CD4 T cell line



次いで、CypA 結合部位の変異 HIV-1 を 2 種類(G89V, 4 点変異株)作製して感染させたが、効率の上昇は見られなかった。

(2) ラット細胞における HIV-1 の増殖の増強：CSA 存在下で感染させても FPM1 由来の HIV-1 の産生量は Molt4CCR5 由来の HIV-1 の数百分の 1 であり、かつ感染性がなかった。そこで、増殖効率を高めるために、I と III 型インターフェロンの受容体である IFNAR と IFNLR 遺伝子を CRISPR/Cas9 の系を用いてノックアウトした。まずは実験のし易い皮下細胞である FPMsv を用いて行った。しかし、これらの遺伝子 KO による増強効果はなかった。さらに、インターフェロンの誘導を阻害するために、転写因子 IRF7 の優勢阻害因子を組み込んだ HIV-1 を作製したが、ウイルス生産は増強しなかった。ついで、子孫 HIV-1 の細胞からの遊離の阻害因子としていられている Bst2 遺伝子を KO したところ 2~3 倍の上昇が見られた(下図参照)。

Effect of knock-out of putative inhibitors on HIV-1 propagation



次いで、CD4/CCR5/CyT1/CRM1 発現ラット T 細胞 (FPM1h45T1) の Bst2 と Apobec3 遺伝子を KO して、CSA 存在下で AD8-E を感染させたところ、Bst2 と Apobec3 の二重 KO 細胞で数倍ウイルスの増殖が見られ、かつ感染性であった。さらに、子孫ウイルスが FPM1 に再感染していると考えられた。他方 Bst2 単独 KO 細胞での増殖の増強は明確ではなかった。

(3) 結論：FPM1h45T1 の CyclophilinA, Apobec3 遺伝子を KO すれば HIV-1 が一定程度増える事が示めされた。Bst2 遺伝子に関してはさらに検討を要する。今後、この KO 細胞で HIV-1 を継代して馴化することによってラット指向性の HIV-1 を選択し、上記遺伝子 KO ラットを作製することによって HIV-1 感染ラットモデルが作製できると考えられる。なお、上記遺伝子 KO マウスは生存できる事が既に報告されている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

1. Minoru Kidokoro and Hisatoshi Shida (2014): Vaccinia Virus LC16m8Δ as a Vaccine Vector for Clinical Applications. Vaccines 2:755-771; doi:10.3390/vaccines2040755 (査読あり)
2. Takashi Ohashi, Takafumi Nakamura, Minoru Kidokoro, Xianfeng Zhang and Hisatoshi Shida (2014): Combined Cytolytic Effects of a Vaccinia Virus Encoding a Single Chain Trimer of MHC-I with a Tax-Epitope and Tax-specific CTLs on HTLV-I-Infected Cells in a Rat Model. BioMed Research International vol. 2014, Article ID 902478, 13 pages, doi:10.1155/2014/902478 (査読あり)
3. Mao Isshiki, Xianfeng Zhang, Hirotaka Sato, Takashi Ohashi, Makoto Inoue, Hisatoshi Shida (2014): Effects of different promoters on the virulence and immunogenicity of a HIV-1 Env-expressing recombinant vaccinia vaccine. Vaccine 32:839-845 doi: 10.1016/j.vaccine.2013.12.022. (査読あり)
4. Hirotaka Sato, Chen Jing, Mao Isshiki, Kazuhiro Matsuo, Minoru Kidokoro, Shiki Takamura, Xianfeng Zhang, Takashi Ohashi, Hisatoshi Shida (2013): Immunogenicity and safety of the vaccinia virus LC16m8Δ vector expressing SIV Gag under a strong or moderate promoter in a recombinant BCG prime-recombinant vaccinia virus boost protocol. Vaccine 31:3549-57 doi: 10.1016/j.vaccine.2013.05.071. (査読あり)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.igm.hokudai.ac.jp/molvir>

6. 研究組織

(1)研究代表者

志田 壽利 (Shida Hisatoshi)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・客員教授

研究者番号：00144395

(2)研究分担者

張 險峰 (Zhang Xianfeng)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教

研究者番号：40374681

(3)連携研究者

無し