

平成 21 年 5 月 11 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19390128

研究課題名（和文） ラット抗ヒトレトロウイルス阻害因子と感染モデル

研究課題名（英文） Rat inhibitor to human retroviruses and infection model for these viruses

研究代表者 志田 壽利 Hisatoshi Shida  
北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授  
00144395

## 研究成果の概要：

ラットにおける HTLV-1 と HIV-1 の増殖を抑えている因子を、トランスジェニックラットを用いて *in vivo/ex vivo* で検討した。HTLV-1 の増殖を抑えている 1 因子として CD8 T 細胞を同定した。しかし、他の因子の存在も示唆された。HIV-1 の増殖が悪い 1 因として、ラット CyclinT1 と CRM1 にある事が分かった。ヒト CyclinT1 と CRM1 double Tg ラット由来の T 細胞とマクロファージにおいてヒト細胞の 1/10-1/3 量の感染性 HIV-1 が生産された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年	8,200,000	2,460,000	10,660,000
2008年	6,300,000	1,890,000	8,190,000
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：HIV, HTLV-1, ラットモデル、自然免疫、阻害因子

## 1. 研究開始当初の背景

エイズウイルス (HIV) は累計で 8 千万人 (内 4 千万人が生存) に感染し、昨年には 250 万人が新規感染した。特に中国、インドネシアなど近隣国で感染が急拡大し、このままでは、2010 年までにアジアで数千万人が感染すると予想されている。他方、ヒト T 細胞白血病ウイルス (HTLV-1) は、国内で 100 万人以上が感染しており、白血病 (ATL) をはじめ脊髄症 (HAM)、シェーグレン症候群、膠原病など各種関連疾患を引き起こす。これらのウイルス病に対して根本的な治療法が無く、発症予防・治療法の開発が必要である。

細胞レベルで解明されたウイルス増殖の

分子機構と感染個体での免疫学的知見を統合し、新しい治療と予防法を開発するためには小動物感染モデルが有用である。特に、少し感染を許し、近交系が確立され、発生工学の利用できるラットは両ウイルスの良い感染動物モデルに改良できる可能性を持つ。

特に HTLV-1 に関してはラットを用いて、ウイルス学的、免疫学的研究が行われ、モデルとしての有用性が確立している。しかし、ウイルス粒子の生産が非常に低い点、感染モデルとして不十分である。我々はその原因として、ウイルス粒子構成蛋白である Gag と Env の mRNA を運ぶべきラット rCRM1 が働かないためであることを明らかにした。さ

らに、ヒト対応因子である hCRM1 を発現するトランスジェニック(Tg)ラットを作成する事に成功し、CD4+ T 細胞が ex vivo で non Tg ラット由来の細胞の千倍量の HTLV-1 粒子を生産し、ヒト T 細胞と同等であることを見出した。このことは in vitro では、ラット T 細胞での HTLV-1 の増殖の非効率性が hCRM1 の供給によって解決されることを示している。そこで、Tg ラット成体に HTLV-1 を感染させたところ、胸腺への侵入と感染初期（一ヶ月以内）における体内ウイルス量は、通常ラットよりも多いにもかかわらず、他の点においては大差がなかった。このことは、ラットの自然・獲得免疫系が HTLV-1 の増殖を抑えていることを考えさせる。

HIV-1 の増殖を、Rev のコファクターでもある hCRM1 を恒常的に発現させたラット T 細胞株において、①クロモソームの組み込みまでの過程で阻害が認められ、②転写効率が低く、Tat のコファクターである CyclinT1 を発現させる必用があり、③ウイルス粒子形成段階での非効率はないにもかかわらず、④感染性の無い HIV 粒子が生産される、ことが分かった。ラット T 細胞株にヒト CD4/CCR5/CRM1/CyclinT1 を発現させるとヒト T 細胞株の約 1/3 の HIV 粒子が生産されるにもかかわらず、感染が広がらない。このことは、ラットに HIV が感染できない主要原因が、感染性のない粒子形成か感染前期での阻害にあることを示唆している。

## 2. 研究の目的

上記のように、HTLV-1 と HIV-1 の感染阻害因子がラットに存在する。そこで、これらのウイルスが効率よく感染し、増殖するラットモデルを作成するために、阻害因子を同定しすることが本研究目的である。

## 3. 研究の方法

**HTLV-1 ウイルス量の定量**：血中ウイルス量を p19ELISA と PCR によって測定した。また、各種リンパ系組織を採取して同様の方法で測定した。

**hCyclinT1 Tg ラットの作成**：CyclinT1 ゲノムを持つ BAC クロンを F344 ラット受精卵に microinjection し、子孫ラットの尻尾 DNA を PCR で検索する事により、hCyclinT1 Tg ラットを得た。脾臓、胸腺、マクロファージを刺激有無の状態 で培養し、hCyclinT1 の発現を Western blotting で確認した。

**HIV-1 ゲノムの導入**：ラット T 細胞には electroporation で、マクロファージには Gタンパクでコートした HIV-1 を感染させた。その後、培養上清中と細胞内の p24 量を ELISA で測定する事により HIV-1 の増殖の指標とした。

**HIV-1 の感染性**：培養上清中の p24 測定後、TZM-bl 細胞に添加し、luciferase 活性を測定した。luciferase 活性/p24 量の値で感染価を算出した。

## 4. 研究成果

### HTLV-1 の増殖に対する hCRM1 Tg ラット免疫の阻害効果

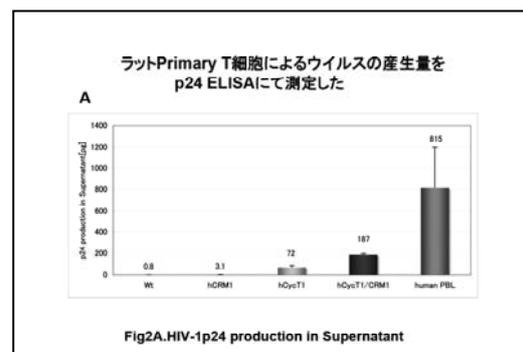
ラットの免疫系を回避して、HTLV-1 を効率よく感染させるために、新生児への感染と経口感染を試みた。両感染経路共に hCRM1 Tg ラットでは感染 4-6 週迄は Wt ラットよりも体内ウイルス量が高かったが、その後差がなくなった。このことは、ラットの免疫系が HTLV-1 の増殖を抑えている事を示唆している。そこで、CD8T 細胞の効果を調べるために、抗 CD8 単クローン抗体をラットに接種する事により CD8T 細胞を枯渇させる事により体内 HTLV-1 の量の変化を調べた。その結果、数倍体内 HTLV-1 量が上昇したが、Tg と Wt ラット間では差がなかった。この結果は CD8 T 細胞が HTLV-1 の増殖を抑えている事を示しているが、又、他の阻害因子が存在する事をも示している。

### HIV-1 の増殖に関する諸因子の検討

ラット T 細胞株で HIV-1 のバリアーとして CyclinT1 を同定したので CyclinT1 Tg ラットを作製し、HIV-1 の増殖を先ず ex vivo で調べた。そして、以下の結果を得た。

1、hCRM1/hCyclinT1 のダブル Tg ラットのマクロファージでは、ヒト細胞の 10-40% の感染性の HIV-1 の増殖が認められた。特に、ヒト CRM1 の発現効果が大きかった。

2、Tg ラットの T 細胞ではヒト細胞の 10-30% の感染性の HIV-1 の増殖が認められた。特に、ヒト CyclinT1 の発現効果が大きかった。



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- (1) Hajime Suzuki, Minoru Kidokoro, Ismael Ben Fofana, Takashi Ohashi, Tomotaka Okamura, Kazuhiro Matsuo, Naoki Yamamoto, Hisatoshi Shida (2009): Immunogenicity of newly

- constructed attenuated vaccinia strain LC16m8Δ that expresses SIV Gag protein. *Vaccine* 27:966-971 (査読あり)
- (2) Takashi Ohashi, Mika Nagai, Hiroyuki Okada, Ryo Takayanagi and Hisatoshi Shida (2008): Activation and Detection of HTLV-I Tax-specific CTLs by Epitope expressing Single-Chain Trimers of MHC Class I in a rat model. *Retrovirology* 5: 90. (査読あり)
  - (3) Fumihiko Yasui, Chieko Kai, Masahiro Kitabatake, Shingo Inoue, Misako Yoneda, Shoji Yokochi, Ryoichi Kase, Satoshi Sekiguchi, Kouichi Morita, Tsunekazu Hishima, Hidenori Suzuki, Katsuo Karamatsu, Yasuhiro Yasutomi, Hisatoshi Shida, Minoru Kidokoro, Kyosuke Mizuno, Kouji Matsushima, Michinori Kohara (2008): Prior immunization with SARS-CoV nucleocapsid protein causes severe pneumonia in mice infected with SARS-CoV. *J. Immunol.* 181:6337-48. (査読あり)
  - (4) Ryo Takayanagi, Takashi Ohashi, Eizaburo Yamashita, Yohei Kurosaki, Kumiko Tanaka, Yoshiyuki Hakata, Yasumasa Komoda, Satoru Ikeda, Yasuko Tsunetsugu-Yokota, Yuetsu Tanaka, Hisatoshi Shida (2007): Enhanced Replication of Human T-cell Leukemia Virus Type 1 in T Cells from Transgenic Rats Expressing Human CRM1 That Is Regulated in a Natural Manner. *J. Virol.* 81: 5908-5918 (査読あり)
  - (5) Masahiro Kitabatake, Shingo Inoue, Fumihiko Yasui, Shoji Yokochi, Masaaki Arai, Kouichi Morita, Hisatoshi Shida, Minoru Kidokoro, Fukashi Murai, Mai, Quynh Le, Kouji Matsushima, and Michinori Kohara (2007): SARS-CoV spike protein-expressing recombinant vaccinia virus efficiently induces neutralizing antibodies in rabbits pre-immunized with vaccinia virus. *Vaccine* 25: 630-637. (査読あり)
- [学会発表] (計 10 件)
1. 高柳亮、大橋貴、田中勇悦、志田壽利：HCRM1Tg ラットモデルを用いた抗 HTLV-1 抗体産生誘導の解析 第 56 回日本ウイルス学会学術総会 平成 20 年 10 月 26 日 岡山コンベンションセンター (岡山県)
  2. 岡田紘幸、大橋貴、志田壽利：ラット細胞での HIV-1 増殖におけるヒト CyclinT1 と CRM1 の効果、第 56 回日本ウイルス学会学術総会 平成 20 年 10 月 26 日 岡山コンベンションセンター (岡山県)
  3. 永井美佳、大橋貴、木村富紀、橋本岩雄、志田壽利：ラット細胞における HIV 複製への RNA 輸送因子 hCRM1 の効果 第 8 回分子生物学会春期シンポジウム 平成 20 年 5 月 27 日、札幌
  4. 鈴木元、松尾和浩、山本直樹、大橋貴、志田壽利：SIV Gag 発現ワクシニア m8Δ 株の免疫原性の検討 第 22 回日本エイズ学会 平成 20 年 11 月 28 日 大阪
  5. 高柳亮、大橋貴、志田壽利：HTLV-1 感染ラット細胞株での Foxp3 発現維持における IL-2 の役割、日本ウイルス学会 平成 19 年 10 月 21 日 札幌
  6. 岡田 紘幸. 大橋 貴. 志田 壽利：ラット primary T 細胞での HIV-1 増殖におけるヒト Cyclin T1 と CRM 1 の相乗効果、日本ウイルス学会 平成 19 年 10 月 21 日 札幌
  7. 近藤真理子、鈴木元、大橋貴、志田壽利：ラット TRIM5a 様タンパクの HIV-1 感染阻害作用、日本ウイルス学会 平成 19 年 10 月 21 日 札幌
  8. 毛利友香、鈴木等、志田壽利、高久洋：HTLV-1 Rex タンパク質による RNaseIII-Dicer の活性阻害、日本ウイルス学会 平成 19 年 10 月 21 日 札幌
  9. 鈴木元、大橋貴、志田壽利：ラット T 細胞における HIV-1 複製の前期過程の解析、日本エイズ学会 平成 19 年 11 月 28 日 広島
  10. 高柳亮、大橋貴、志田壽利：Analysis of immunosuppressive function of Foxp3 expressing HTLV-I-infected cells in a rat model, 13<sup>th</sup> Int'l conference on Human Retrovirology HTLV and related VIRUSES. 2007 May 22th 箱根
6. 研究組織

(1)研究代表者

志田 壽利

北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授

00144395

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

鈴木 元

北海道大学・遺伝子病制御研究所・博士研究

員

50400023

張 陰峰

北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教

40374681