

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780280

研究課題名(和文)新規 HIV-1 Nef トランスジェニックマウスを用いたエイズ脳症発症機構の解析

研究課題名(英文) Mechanisms of development of AIDS encephalopathy using a new transgenic mouse model expressing HIV-1 Nef

研究代表者

富岡 幸子 (TOMIOKA, Yukiko)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教

研究者番号：50374674

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト免疫不全ウイルス1 (Human Immunodeficiency virus 1; HIV-1)のアクセサリー蛋白質Nefを発現するトランスジェニックマウス (Nef Tg) は、運動失調・後肢麻痺・てんかん様発作など重度の神経症状を示した。Nef Tgでは病理組織学的に脳および脊髄におけるアストロサイトの著明な増生、ミクログリアの増加・集簇、白質の空胞化、リンパ球浸潤など多彩な病変が観察された。また、Nef Tgの脳ではIP-10等複数のサイトカイン発現が増強していた。これらの病態はエイズ脳症の病態の一部と類似しており、NefがHIV-1による病理発生に重要な役割を持つことが示された。

研究成果の概要(英文)：Transgenic mice expressing Human Immunodeficiency Virus 1 (HIV-1) accessory protein Nef (Nef Tg) showed the severe neurological symptom including motor ataxia, hindquarter paralysis, and epileptic seizure. Histopathologically, prominent astrocytosis, microgliosis, vacuolation of the white matter, lymphocytic infiltration were observed in the brain and spinal cord of Nef Tg. In addition, expression of some cytokines such as IP-10 was increased in the brain of Nef Tg. These pathological changes were similar to those of AIDS encephalopathy in human, which indicated that Nef protein plays an important role in neuropathogenesis of HIV-1 infection.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：病態 疾患モデル HIV-1 Nef エイズ脳症 トランスジェニックマウス

1. 研究開始当初の背景

HIV-1 感染症では様々な神経障害が認められる。なかでも認知障害・運動障害を主徴とするエイズ脳症はエイズ患者の 20~60% に見られ、患者の社会生活に大きな障害をもたらすことから重要な問題となっている。エイズ脳症が他のウイルス性脳炎と異なる特徴として、症状の重篤さに対して検出されるウイルス量が少なく、感染の程度が軽いことがある。このことから、神経組織の障害はウイルスの感染増殖による直接的な障害だけではなく、ウイルス蛋白に対する生体の反応など間接的な障害が複合した多彩な病態であると提唱されている。Nef, Tat, Env, Vpu といったウイルス蛋白質がエイズ脳症に関与することが示唆されているが、詳細は未だ解明途上にある。有効なエイズ脳症治療法を確立するには、中枢神経系においてこれらのウイルス蛋白の発現が宿主細胞に対してどのような影響を及ぼすのかを詳細に解析し、その解析に基づいた疾患モデル動物を確立することが必要不可欠である。エイズ脳症への関与が疑われているウイルス蛋白質のうち、アクセサリー蛋白質の Nef はエイズ発症にきわめて重要で多くの研究がなされている。その機能は多岐にわたり、CD4 の発現抑制、MHC class I の発現抑制、シグナル伝達分子との相互作用の他、アポトーシスを誘導することも報告されている。また、エイズ脳症患者の脳から分離されるウイルスの Nef に特異的な変異があるという報告も複数あり (J Neurovirol. 17(1):82-91,2011; PLoS One 6(2): e166592011, 2011; AIDS Res Hum Retroviruses. 26(4):495-500, 2010)、Nef はエイズ脳症発症の重要な鍵となると考えられる。

我々は多様な機能を持つ HIV-1 Nef に注目し、ウイルスの感染・増殖という現象を伴わずに Nef が単独で宿主細胞に影響して神経病原性を発揮するかを調べるため、GFAP プロモーター下で脳のアストロサイトで Nef を発現するトランスジェニックマウス(Nef Tg マウス)を作製したところ、進行性の運動失調、後躯麻痺、協調性失調、てんかん様発作など重篤な神経症状が認められた。Nef Tg マウスは中枢神経系における Nef の機能を解析する上で有効で、優れたエイズ脳症モデルになり得ると思われるが、このマウスは重度の神経症状を呈し約 10 週齢で多くは死に

至るため、自然交配が困難であり、卵巣移植・体外受精等の手法を駆使して系統を維持しなければならない。また、母子感染の例を除けば後天的に HIV-1 に感染して脳症を発症することを考慮すると、個体成熟後に Nef を発現する Tg マウスが疾患モデルとして必要不可欠であると思われた。一方で、本邦では報告数が少ないものの、世界的には小児 HIV-1 感染者は約 250 万人にも及び、この大半が出生前または周産期の母子感染によるものであることを鑑みると、既存の Nef Tg マウスを用いて Nef が胎生期一生涯後個体成熟期に発現した場合の生体への影響を検討することも意義深いと思われた。

2. 研究の目的

本研究では、HIV-1 Nef 発現による神経病態を解析し、Nef Tg マウスを新しいエイズ脳症モデルとして確立すること、この Tg における病理発生機序を明らかにすること、Nef をエイズ脳症の治療標的として位置づけることを目的とする。具体的には以下を実施する。

- (1) Nef Tg マウスにおける詳細な病理組織像の解析とエイズ脳症との相違点の検証。
- (2) Nef により発現異常が誘起される宿主遺伝子の同定。
- (3) 薬剤で発現調節できる Nef Tg マウスの作出・解析。

3. 研究の方法

(1) Nef Tg マウスの病理組織学的解析：
Nef Tg マウスから、脳・脊髄を含む全身諸臓器を経時的に採取し、HE 染色および細胞マーカーを用いた免疫染色や特殊染色を適宜実施し、病理組織学的解析を行なう。

(2) Tg マウスで発現異常が認められる宿主遺伝子の探索と発現解析：
Nef Tg マウスの脳を経時的に採取、RNA を抽出し、マルチプレックスサスペンションアレイ解析および real time RT-PCR によって Nef Tg マウスで発現異常が認められる遺伝子について探索する。

(3) 薬剤発現誘導型 Nef Tg マウスの作製：
CAG プロモーターおよび loxP 配列を含む蛋白発現プラスミドに Nef 遺伝子をクローニン

グした後、シーケンスによりその配列を確認する。このプラスミドから切り出した CAG, loxP, Nef からなる遺伝子断片をマイクロインジェクション法により C57BL/6 マウスの受精卵前核に注入し、DNA 組換え酵素 Cre 存在下で Nef を発現する loxP-Nef Tg マウスを作出する。このマウスとタモキシフェン投与によって Cre を発現する CreER マウス (米国ジャクソン社より購入) を交配し、ダブルトランスジェニックマウス loxP-Nef x CreER Tg を作出する。この loxP-Nef x CreER Tg に対して適宜タモキシフェンを投与し、遺伝子発現を誘導して病理組織学的解析および遺伝子発現解析を行う。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

① Nef Tg マウスの病理組織学的解析：

Nef Tg マウスでは、病理組織学的に脳および脊髄の主に大脳白質や小脳の顆粒層において反応性アストロサイトの著明な増殖(図 1 上段)や反応性ミクログリアの増加・集簇 (図 1 下段)が観察された。

また、白質の空胞化 (図 2)、T リンパ球浸潤、神経細胞の変性・細胞死といった多彩な病変が観察された。これらはエイズ脳症の病態の一部と一致するものである。しかしながら、エイズ脳症に特徴的な大脳白質血管周囲の多核巨細胞は全く認められなかった。

また、抗 Nef 抗体を用いた免疫染色では、Nef Tg マウスの肥大したアストロサイトで、Nef 蛋白質の発現が確認された (図 3)。

② Tg マウスで発現異常が認められる宿主遺伝子の探索と発現解析：

マルチプレックスサスペンションアレイ解析および real time RT-PCR によって、Nef Tg マウスでは、IP-10、Eotaxin、MCP-1、IL-17 等複数のサイトカイン・ケモカインの遺伝子発現が増強していることが明らかになった

(各々野生型マウスの約 5 倍、5 倍、3 倍、7 倍)。

③ 薬剤発現誘導型 Nef Tg マウスの作製：

使用予定の Cre-loxP 発現システムで、Cre 非存在下でも発現のリークが認められることが分かったので、Nef を逆向きに挿入した loxP プラスミドの構築を検証した。これにより loxP-Nef Tg マウスの作出に遅れが生じたため、ダブルトランスジェニックマウス作製の CreER マウスについては準備を進めたが、薬剤発現誘導型 Nef Tg マウスの完成には至らなかった。

(2) 得られた成果の意義と今後の展望

Nef Tg マウスの中樞神経系病変はエイズ脳症の病変と一致する部分が多く、本研究成果は Nef がエイズ脳症の神経病理発生に重要な役割を持つことを強く示唆した。しかしながらエイズ脳症に特徴的な多核巨細胞の出現は全く認められなかったことから、これを再現するにはミクログリアなどマクロファージ系の細胞におけるウイルス感染ないし Nef を含む各種ウイルスタンパク質の発現が必要であると考えられた。

また、本研究では、実際のウイルス感染とは異なる Nef の単独発現によって、ウイルス感染と同様に脳でのサイトカインの発現異常もたらされることが明らかになった。

以上より、Nef Tg マウスは非常に有用なエイズ脳症モデルとなることが明らかになった。薬剤発現誘導型 Nef Tg を完成させ、アストロサイト以外の細胞 (特にミクログリア) でも Nef を発現調整できるシステムを確立し、HIV-1 中枢神経病態発現における Nef の役割についてさらに追求することを、今後の課題としたい。

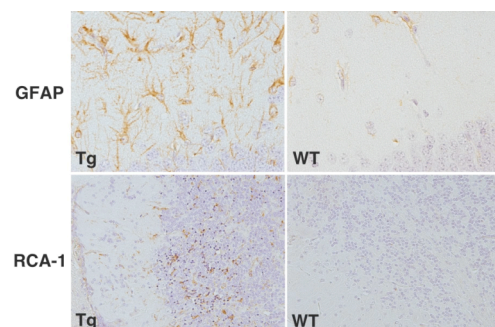


図1 上段：アストロサイトマーカーGFAPによる免疫染色像。大脳、海馬近傍。下段：ミクログリアマーカーRCA-1による免疫染色像。小脳。ミクログリア集簇では神経細胞 (顆粒細胞) の変性も認められる。左：Nef Tg マウス、右：野生型マウス。Bar=50 μm。

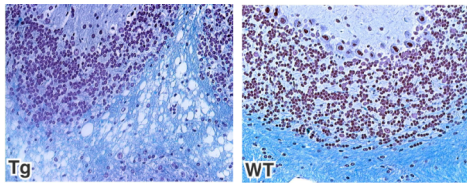


図2 ルクソールファスト青染色、小脳。左：Nef Tg マウス、右：野生型マウス。Bar=50 μm。

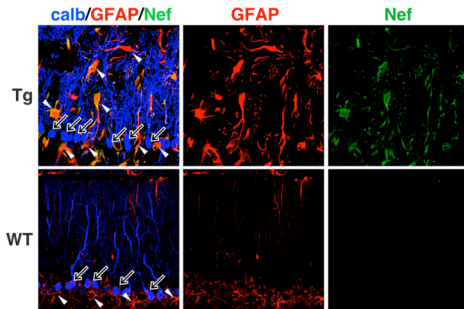


図3 プルキンエ細胞マーカー-calbindin (青)、アストロサイトマーカー-GFAP (赤)、抗HIV-1 Nef 抗体 (緑)を用いた多重蛍光免疫染色。小脳。下段の野生型ではアストロサイトの一種であるバグマンングリアがプルキンエ細胞の近傍に秩序正しく配列しているが、上段の Nef Tg マウスでは肥大した Nef 陽性アストロサイトが無秩序に配列する。矢印：プルキンエ細胞、矢頭：アストロサイト。Bar=50 μm。

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 2 件)

① Tomioka, Y., Morimatsu, M., Taharaguchi, S., Yamamoto, S., Suyama, H., Ozaki, K., Iwamori, N., Ono, E. Abnormal spermatogenesis and reduced fertility in transgenic mice expressing the immediate-early protein IE180 of pseudorabies virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 440:683-688 (2013)、査読有

② Takakuwa, H., Yamashiro, T., Le, M.Q., Phuong, L.S., Ozaki, H., Tsunekuni, R., Usui, T., Ito, H., Morimatsu, M., Tomioka, Y., Yamaguchi, T., Ito, T., Murase, T., Ono, E., Otsuki, K. Molecular epidemiology of avian influenza viruses circulating among healthy poultry flocks in farms in northern Vietnam. *Prev. Vet. Med.* 103:192-200 (2012)、査読有

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

富岡 幸子 (TOMIOKA, Yukiko)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教

研究者番号：50374674

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

小野 悦郎 (ONO, Etsuro)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：00160903

森松 正美 (MORIMATSU, Masami)

北海道大学・獣医学研究科・准教授

研究者番号：70241370