


2001年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

— 中国人研究者・医療技術者招聘助成 —

2002年 3月 14日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

招聘責任者氏名 吉木 敬 
所属機関名 北海道大学
職 名 教授
所 在 地 〒060-8638 札幌市北区北15条西7丁目
電話 011-706-5050 内線 _____

1. 招聘研究者氏名 温 旺 荣
所属機関 福建医科大学臨床微生物学講座 職名 副教授

2. 研究テーマ ヒトレコウイルス感染症のウイルス・宿主相互作用の解析

3. 日本滞在日程

平成13年 8月22日	来日。
8月23日	同日より北海道大学大学院医学研究科外国人客員研究員として、病態制御学専攻病態解析学講座分子病理学分野に所属。
8月27日	同日より約2ヶ月間、基本的分子生物学的実験手技の習得と研究テーマに関する最近の研究についての調査。
10月22日	研究テーマに関する実験を開始。
平成14年 3月29日	当該分野でのすべての本招聘助成事業に関する研究を終了予定。
3月31日	北海道大学大学院医学研究科外国人客員研究員を終了し、帰国予定。

4. 研究報告書

別紙報告書作成要領により、添付の用紙で研究報告書を作成して下さい。

研究発表中または研究中の本人のスナップ写真を添付して下さい。

※研究成果を発表する場合は、発表原稿・抄録集等も添付して下さい。

※発表に当っては、日中医学協会助成金による旨を明記して下さい。

ヒトレトロウイルス感染症のウイルス・宿主相互作用の解析

研究者氏名	温 旺榮
中国所属機関	福建医科大学臨床微生物学講座 副教授
日本研究機関	北海道大学大学院医学研究科分子病理
指導責任者	教授 吉木 敬
共同研究者	池田 仁, 趙 旭東, 山本友希代, 陳 晶, 鈴木 昭, 辻 隆裕, 立野正敏

要旨

エイズの原因ウイルスであるヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染におけるウイルスと宿主の相互作用を理解するため、ヒト T 細胞株へ HIV を感染させ、感染後早期での宿主遺伝子の発現の変化について約 600 種類の免疫関連遺伝子を中心に DNA アレイによって検討した。その結果、熱ショック蛋白や CD3、FAS など 24 種類の遺伝子は感染後 2 から 3 日で有意に発現の増加を示した。一方、IL-16 は抑制気味であったが、その他に発現が有意に抑制されていた宿主遺伝子は確認されなかった。各遺伝子発現の変化の意義は現在のところ必ずしも明らかではないものの、HIV は感染早期から宿主遺伝子の発現に大きく影響を及ぼしているものと考えられた。また、HIV 感染ラットモデルの作製に向けた HIV 関連ヒト遺伝子導入ラット用の発現コンストラクトの作製も行なった。

Key Words エイズ, ヒト免疫不全ウイルス, 遺伝子発現, cDNA array, トランスジェニック

緒言

HIV 感染によるエイズやヒト T 細胞白血病ウイルス (HTLV) 感染による成人 T 細胞白血病 (ATL) および脊髄症 (HAM/TSP) は代表的なヒトレトロウイルス感染症であり、重篤な疾患としてよく知られている。特に HIV の感染者は依然として増加を続けており、東南アジア・アフリカ諸国では垂直感染のため既に次世代にまで感染拡大がおこっている。HIV もレトロウイルスの特徴として宿主ゲノム内に組み込まれることから、感染後発症まで比較的潜伏期間が長く、発症に至るまでにはさまざまなウイルス・宿主間の相互作用が関与していることが知られている。したがって、ウイルス感染から疾患の発症機構を理解するためには、単に感染細胞と宿主免疫系の解析にとどまらず、感染細胞におけるウイルス遺伝子と宿主遺伝子間の相互作用の解析も必要である。一方、疾患の発症過程での解析には動物モデルを用いた *in vivo* での解析も重要である。しかし、HIV の感染には種特異性があり、その受容体からウイルス活性化に至るまでいくつかのヒト遺伝子が必要なため、現在のところ適切で汎用型の小動物モデルは樹立されていない。

このような状況を踏まえ、最近その有用性が注目されている一度に多数の遺伝子の発現を検索できる cDNA array を用いた HIV 感染による感染細胞での宿主遺伝子の変化を解析した。また、HIV 感染モデルの樹立を目標に、HIV 感染から感染性ウイルスの複製に必要な HIV 関連ヒト遺伝子のトランスジェニック用発現コンストラクトを作製した。

材料と方法

1) 細胞株

ヒト T 細胞株 HUT78 を用いた。培養には 10% 牛胎児血清添加 RPMI1640 培養液を用い、37°C 5% CO₂ インキュベーター内で細胞培養した。

2) HIV 感染

3X10⁷ の HUT78 細胞を 2 µg/ml の polybrene を含む 2 ml RPMI1640 を加え 37°C5%CO₂ インキュベーター内で前処理し、リン酸緩衝生理食塩水で洗浄後、1 ml の T 細胞好性 HIV である SF33 [1] (TCID50 : 100) 液を加え、37°C で 2 時間感染させた。感染後はリン酸緩衝生理食塩水で 3 回洗浄後、10% 牛胎児血清添加 RPMI1640 培養液にて培養した。コントロールとしては前処理した HUT78 を用いた。感染実験は HIV 専用の感染実験室のバイオハザード内で行った。

3) RNA 抽出と標識 cDNA の作製

感染後 2 日と 3 日目の感染 HUT78 細胞およびコントロール HUT78 細胞それぞれから MagExtractor[®] -mRNA- 抽出キット (TOYOBO) を用いて mRNA を抽出した。抽出した mRNA 各 2 µg から Gene Navigator[™] cDNA Amplification System -Biotin- (TOYOBO) を用いて biotin 標識 cDNA を作製した。

4) ハイブリダイゼーションとその検出:

10 ml の PerfectHyb[™] によって Gene Navigator[™] cDNA Array Filter -human immunology- (TOYOBO) を 68°C20 分間プレハイブリダイゼーション後、100°C5 分間で変性させた 100 µl 標識 cDNA を加えた 10 ml の PerfectHyb[™] 内で 68°C12 時間反応させた。反応後 0.1% SDS 添加 2XSSC (0.3M NaCl, 30mM クエン酸ナトリウム, pH7.0) で 68°C5 分間 3 回洗浄、さらに 0.1% SDS 添加 0.1XSSC で 3 回洗浄した。洗浄後のフィルターの反応した biotin 標識 cDNA を Imaging high -Chemilumi- Gene Navigator[™] ver (TOYOBO) によって発光後、CCD カメラ搭載イメージアナライザー (Fluo-S[™] MultiImager, BIO-RAD) で検出し、Quantity One[®] (BIO-RAD) ソフトウェアによって定量化、解析した。

5) 遺伝子導入用発現コンストラクトの作製

ヒト末梢血単核球から CD4、CXCR4、CCR5、cyclin T1、CIITA 遺伝子の cDNA および CD4 プロモーターをポリメラーゼ鎖反応 (PCR) にてクローニングした。クローニングしたそれぞれの遺伝子は DNA シークエンスでその塩基配列を確認した後、CXCR4、CCR5、cyclin T1、CIITA 遺伝子はそれぞれマウス H-2Kd プロモーターを持つ発現コンストラクト [2] に導入した。一方、CD4 プロモーターをマウス H-2Kd プロモーターと置換したベクターに CD4 遺伝子を導入した。出来上がった計 5 種類の発現コンストラクトからそれぞれプロモーターから poly A シグナルまでを含む発現ユニットを制限酵素で切り出し、pUC119 に CXCR4 あるいは CCR5 と cyclin T1、CIITA と CD4 のそれぞれ 2 種類の発現ユニットを持つコンストラクトを作製した。作製した発現コンストラクトは、ラット線維芽細胞株 W31 にトランスフェクションし、逆転写酵素 (RT) -PCR によってそれぞれの発現を確認した。

結果

1) cDNA array を用いた HIV 感染による宿主遺伝子の発現の変化

HIV 感染 2 日後 (図 1B) および 3 日後 (図 1C) での感染 HUT78 細胞における宿主遺伝子の発現の変化を非感染 HUT78 細胞 (図 1A) と cDNA array によって比較した。

図 1

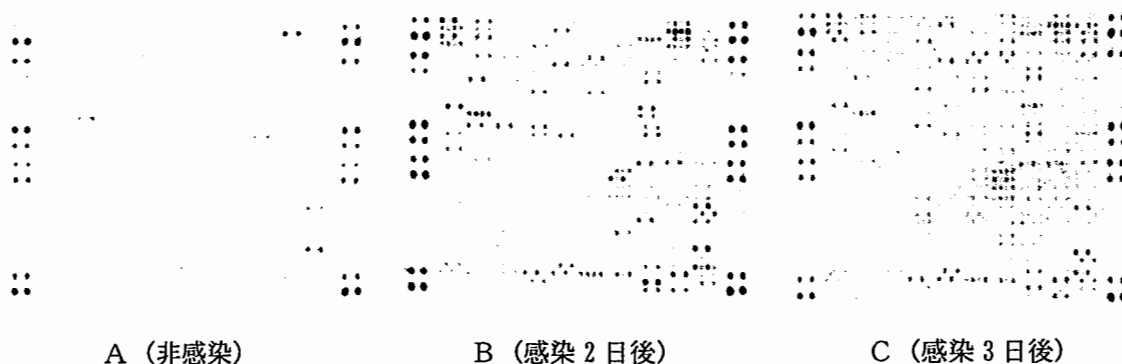
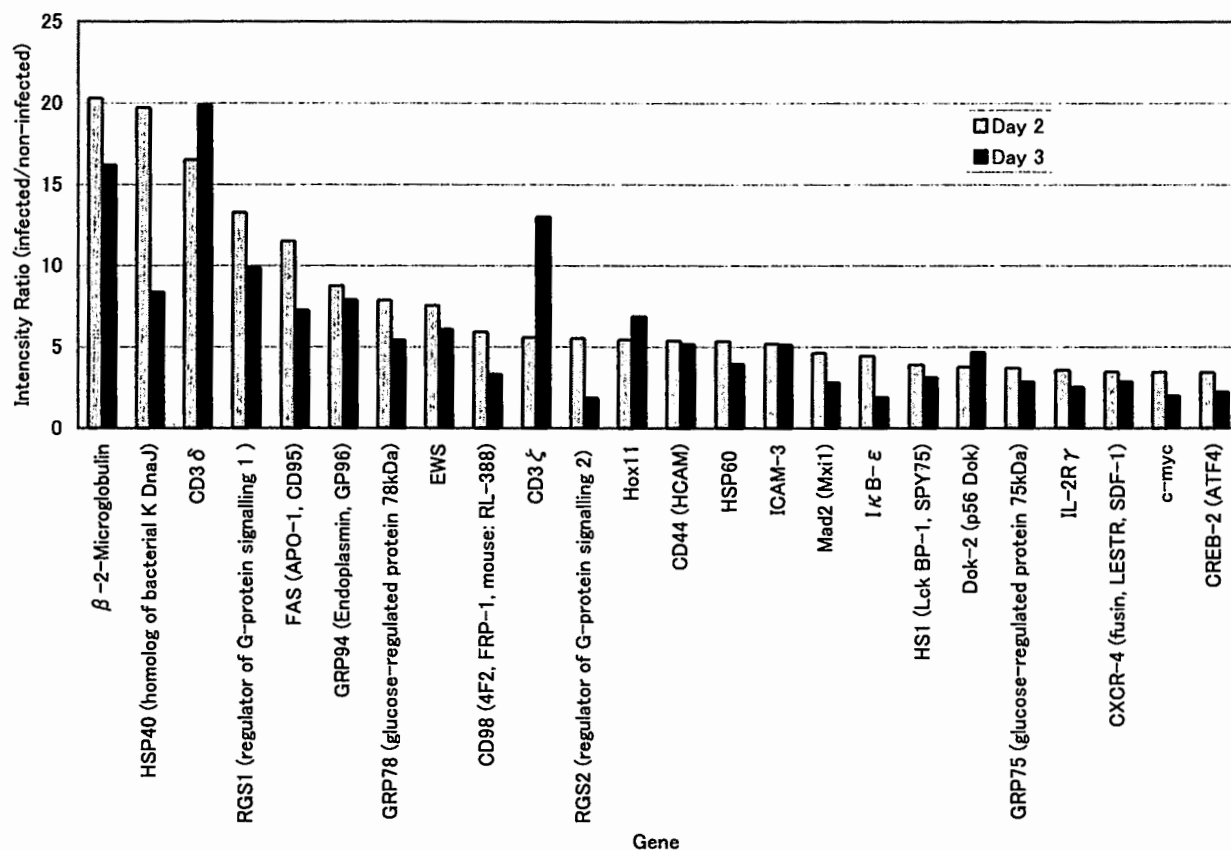


図1の結果をイメージアナライザーで定量化し、非感染時の結果と比較してその発現量が感染2日後および3日後の両方で2倍以上であったもの、あるいは1/2以下であったものを有意とし、判定した。なお、ネガティブコントロールとした luciferase の値 (intensity : 8) を最低値として、それ以下は判定から省いた。その結果、図2に示す24種類の遺伝子において感染後有意に発現が増強していた。一方、有意に発現の抑制のある遺伝子は確認されなかったものの、IL-16の発現は抑制傾向にあった。

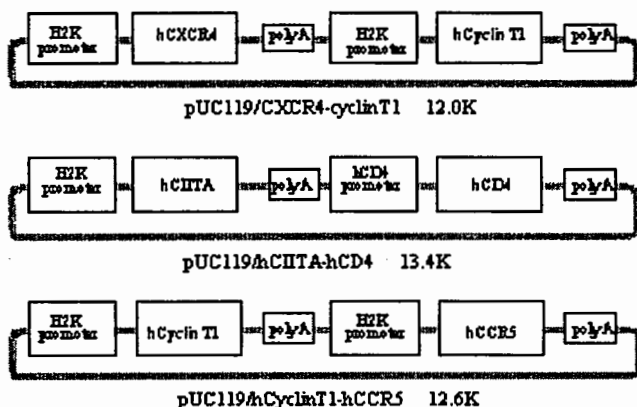
図2



2) 遺伝子導入用発現コンストラクトの作製

いままでの *in vitro* の結果から、ラット細胞に HIV を感染させ、感染性あるウイルスを産生させるためには少なくとも4種類のヒト遺伝子が必要であった。T細胞好性 HIV に対しては CD4、CXCR4、cyclin T1、CIITA、マクロファージ好性 HIV では CD4、CCR5、cyclin T1、CIITA である。したがって、これらそれぞれ4種類のヒト遺伝子を同時に発現するトランスジェニック動物作製のコンストラクトが必要となる。この条件を満足させるため、それぞれ2種類の遺伝子発現ユニットを持つコンストラクト pUC119/CXCR4-CyclinT1、pUC119/CIITA-CD4、pUC119/CyclinT1-CCR5 を作製した(図3)。まず、CD4以外のそれぞれの遺伝子についてはマウス H-2Kd プロモーターを持つ発現ベクターに組み込んだ。CD4 遺伝子については、あらかじめマウス H-2Kd プロモーターを新たにクローニングしたヒト CD4 プロモーターに置換した発現ベクターに組み込んだ。次にそれぞれから発現ユニット(プロモーターから poly A シグナルまで)を適当な制限酵素で切り出し、pUC119 ベクターに図3のような組み合わせで組み込んだ。できあがった各発現コンストラクトをラット細胞に遺伝子導入した結果、各遺伝子の mRNA 発現が RT-PCR によって確認された。

図 3



考察

HIV 感染細胞について、ウイルスとそれに関連する個別の宿主遺伝子との相互作用についての報告は多数あるものの、cDNA array を用いたような多数の宿主遺伝子について、HIV 感染に伴う発現の定量的変化を検討した報告は少ない。Geiss らはヒト T 細胞株 CEM を用いて、HIV 感染を行い無作為に抽出された約 1500 種類の遺伝子についての cDNA microarray を行った[3]。T 細胞受容体 α 鎖 (TCR α) や receptor-interacting protein 140 (RIP140)、CD8- α precursor など 9 種類の遺伝子の発現増加と prothymosin- α や type IV protein tyrosine phosphatase (PTP) など 10 種類の遺伝子の発現抑制を示したが、1.5 倍以上あるいは 2/3 以下を有意としている点や感染 2 日後あるいは 3 日後のどちらか一方でもその値を越えていれば有意としている点が今回の我々の基準と異なる。我々の結果で有意と判定できたのは 24 遺伝子の発現増強で、有意に抑制された遺伝子は確認されなかった。また我々で有意と判定した遺伝子内に Geiss らの報告と一致した遺伝子は見られなかったが、TCR α や CD8- α では感染 3 日後でそれぞれ 2 倍、3.5 倍と増加しており、使用したウイルス株や細胞さらに方法は異なるものの彼らと同様な結果となった。したがって、cDNA array 法はある一定の基準でおこなえば、かなり再現性の高い方法であると考えられた。その他の遺伝子については同一の遺伝子の結果が無く、比較できなかった。今回の我々の研究ではプロットしてある遺伝子数は 600 種類と Geiss らの使用した array の約 1/3 と少なく、且つ我々の判定基準の方が厳しかったにも関わらず、有意な発現増強を示した遺伝子数は約 2.5 倍と多く、HIV 感染では感染細胞の免疫関連遺伝子がより多くまた強い影響を受けている可能性が示唆された。それぞれの遺伝子発現の変化の意義は現在のところ必ずしも明らかではないものの、HIV は感染早期から宿主免疫関連遺伝子の発現に大きく影響を及ぼしており、今後の詳細な解析が必要である。

HIV に感染感受性のあるラットを作製するためには、少なくとも 4 種類の HIV 感染関連ヒト遺伝子を同時に発現するトランスジェニックラットを樹立しなければならない。したがって、その作製にはそれぞれの発現コンストラクトをそれぞれ別個に導入したトランスジェニックラットを樹立し、各トランスジェニックラットを掛け合わせて作製する方法と一つのコンストラクト中に 4 種類の発現ユニットを入れ、遺伝子導入する方法が考えられる。しかし、前者ではメンデルの遺伝の法則から考えて安定的に供給できるラットを樹立するのは困難で、後者の方法では技術的に克服しなければならない点が多い。そこで我々はそれぞれ 2 種類の発現ユニットを持つ 2 つの発現コンストラクトを作製し、その両方を同時にマイクロインジェクションすることとした。作製した発現コンストラクト pUC/CXCR4/CyclinT1、pUC/CIITA/CD4、pUC/CyclinT1/CCR5 はいずれもラット細胞へのトランスフェクションでそれぞれ 2 種類の遺伝子発現が確認され、同時にマイクロインジェクションすることにより 4 種類のヒト遺伝子を発現するトランスジェニックラットの作製が可能と考えられた。

参考文献

1. Tateno M, and Levy JA: MT-4 plaque formation can distinguish cytopathic subtypes for the human immunodeficiency virus (HIV). *Virology* 1988, 167:299-301.
2. Yamada S, Ikeda H, Yamazaki H, Shikishima H, Kikuchi K, Wakisaka A, Kasai N, Shimotohno K, and Yoshiki T: Cytokine-producing mammary carcinomas in transgenic rats carrying the pX gene of human T-lymphotrophic virus type I. *Cancer Res* 1995, 55:2524-2527.
3. Geiss GK, Bumgarner RE, An MC, Agy MB, van't Wout AB, Hammersmark E, Carter V, Upchurch D, Millins JI, and Katze MG: Large-scale monitoring of host cell gene expression during HIV-1 infection using cDNA microarray. *Virology* 2000, 266:8-16.