

大阪大学微生物病研究所, 免疫・生体防御研究部門, ウイルス感染制御分野

塩田達雄

(e-mail shioda@biken.osaka-u.ac.jp)

大阪大学微生物病研究所は、吹田市の大阪大学吹田キャンパスの西の端に位置する。筆者らの研究室は、その微生物病研究所の中でもさらに西の端にある北館の3階にある。

この研究室はかつての感染病理部門の流れをくむ。感染病理部門は昭和29年2月に釜洞醇太郎先生（教授在任昭和27—39年）により創設され、その後、加藤四郎先生（同昭和39—平成元年）、栗村敬先生（同平成2—9年）を経て、2000年2月に筆者が分野長・教授に着任した。現在のスタッフは、教授の他、助手の櫻木淳一、中山英美、櫻木小百合に、技術補佐員の坂東セツ子、秘書の寺本典子が加わる。

以下に述べるように本研究室の研究テーマのほとんどを human immunodeficiency virus (HIV) そのもの、あるいは HIV 感染症 (acquired immune deficiency syndrome; AIDS) に関する研究が占める。

### 1. HIV 感染症の病態進行に関わる因子

AIDS の病態ならびに進行速度は感染者ごとに大きく異なり、感染後、急激に CD4 陽性 T 細胞数の減少をみる感染者から10年以上発症しない感染者まで様々である。また、HIV 感染の機会が多く、明らかに暴露を繰り返しながらも感染を免れている人々が少数ながら存在する。これら AIDS 病態や HIV 感染感受性の多様性がウイルス側および宿主側のどのような因子によって規定されているかを明らかにすることは、AIDS 制御の戦略を策定する上で重要である。筆者は、これら AIDS 病態の多様性に関わる因子の解析を1989年のサンフランシスコ留学 (Dr. Jay A. Levy) を機会に開始し、現在もこのテーマを主要な研究テーマとしている。留学当初や帰国後の東京大学医科学研究所ウイルス感染研究部在籍中 (教授: 永井美之先生) は、主にエンベロップ蛋白質の多型解析を中心とした HIV-1 側因子を解析していたが、1997年に医科学研究所感染症研究部 (教授: 岩本愛吉先生) に移ってから、ヒトゲノムの多型解析を中心とした宿主側因子の解析にも手を広げるようになり、現在に至っている。

#### (a) ケモカインレセプターの遺伝子多型

HIV のレセプター CD4 とともに HIV の細胞侵入に必須な コレセプターが CCR5, CXCR4, CCR2 などのケモカインレセプターである。取り分け重要な CCR5 遺伝子には、欧米人に特異的な32塩基欠失のホモ接合と HIV-1 感染抵抗性、ヘテロ接合と AIDS 病態進行遅延との関連が1996年に報告されていた。しかし、日本人を含むアジア人にはこの32塩基欠失は存在しないとされていた。

筆者らが改めて日本人の CCR5 遺伝子の解析を行ったところ、32塩基欠失は確かに見出されなかったが、そのかわり CCR

5 の893番目の塩基の欠失 (CCR5-893(-)) が低い頻度ながら見つかった。ただ、CCR5 の893番目の塩基が欠失しても CCR5 の細胞外領域は変化しないため、当初、この CCR5-893(-) は HIV 感染に特に影響しないだろうと予想された。しかし、それでも念のため、センダイウイルスベクターを用いてこの多型を持つ CCR5 を発現させ、そのコレセプター活性を測定してみることにした。そして、たまたまその時短期間だけ研究室に配属されていた医学部学生とともに CCR5-893(-) 発現細胞と CCR5 をコレセプターとして使用する HIV-1 SF162株のエンベロップ蛋白質発現細胞との細胞融合能を測定した。その結果、普通の CCR5 は SF162株のエンベロップ蛋白質と反応して激しい細胞融合を引きこすのに、CCR5-893(-) による細胞融合は普通の CCR5 の10分の1程度という意外な数字が出た。筆者は、慣れない医学部学生が間違えたか、自分が医学部学生への説明に気を取られて何か間違えたもの、と思い込み、翌日、一人で追試を行ったがやはり細胞融合能が低い。RNA ウイルスであるセンダイウイルスベクターに変異が入ってしまい発現量が低下したか、と考え、DNA ウイルスのワクシニアウイルスベクターを用いて発現させてもやはり細胞融合能が低い。どうも1塩基の欠失で CCR5 のコレセプター活性が低下しているようだ、と気付くまでしばらく時間を要した。その後のレーザー顕微鏡等を用いた解析で、CCR5-893(-) は粗面小胞体から細胞表面への CCR5 分子の輸送が効率良く進行しないため、その発現細胞では CCR5 をコレセプターとして使用する HIV-1 の感染感受性が低下していることが明らかになった (J. Virol. 75, 3462-3468, 2001)。

#### (b) サイトカインの遺伝子多型

IL4 は言うまでもなく Th2 型の代表的なサイトカインであり、IgE の産生、液性免疫を司る2型ヘルパー T 細胞の分化、IgG の isotype switching に働く。HIV-1 感染との関わりでは、このサイトカインは CCR5 の発現を抑制し、CXCR4 の発現を促進する。また、1型と2型では同じヘルパー T 細胞でありながら、HIV-1 感染感受性が異なることが知られている。1型と2型はあくまでもヘルパー T 細胞の分類だが、人間も1型と2型に大雑把に分類できるかもしれない、と考えたのが助手の中山である。

IL4 の5'側 non-coding 領域内の翻訳開始部位から上流に数えて589番目に C あるいは T の多型が存在し、ここが T であると IL4 プロモーターの活性が上昇すると報告されている。中山は、日本人感染者の末梢血からウイルス分離を行い、そのウイルスが R5-tropic HIV-1 か X4-tropic HIV-1 かを判定するとともに、感染者の IL4 の5'側 non-coding 領域の多型解析を行った。その結果、IL4-589T 多型の頻度は HIV-1 非感染者よりも異性間性的接触によって感染した者の集団で有意に低く、HIV-1 の異性間性交渉による伝播の際にこの遺伝子多型がある程度感染抵抗性を付与する可能性が示唆された。また、IL4-589T のホモ接合体の感染者からは、他の遺伝

子型の感染者よりも X4-tropic HIV-1 が有意に高い割合で分離され、IL4-589T のホモ接合体の感染者では X4-tropic HIV-1 への変化が起きやすいことが示唆された。前者は IL4 による CCR5 の発現低下、後者は IL4 による CXCR4 発現増強の効果によるものと考えられる (J. Virol. 74, 5452-5459, 2000)。

日本人の解析が一段落した後、AIDS 病態全体に対する IL4-589T の影響を検討するためにフランスの SEROCO cohort study group との共同研究を申し込んだ。その結果、感染時期が特定されている 427 人のフランス人感染者の遺伝子解析を行うことを許された。しかし、遺伝子解析研究の常として、検体は収集した場所から動かすことができない。そこで、フランスに筆者と中山で行って遺伝子解析を行うことにした。日本での仕事もあるので期間は 5 日間しかとれない。この限られた時間で 427 検体の PCR-restriction fragment length polymorphism assay ができるだろうか、不安がよぎる。想定できる全ての失敗を考慮して、Taq polymerase や制限酵素はもちろん、実験に使用する全てのアガロースゲルをあらかじめ作成して電気泳動槽と変圧器とともにスーツケースに詰めて渡した。フランスでは共同研究相手の P. Debre 教授と I. Theodorou 博士の親切な対応もあって無事 427 検体の解析を終了することができた。最終日の夕刻、「パリに来てパリの町を見ないで帰るのはあまりにひどい。」との Theodorou 博士の「強硬な抗議」を受け入れて彼の車で凱旋門やエッフェル塔を見せてもらったが、時差と疲労で筆者は半分以上寝てしまい、申し訳ないことをしたと思っている。

日本に帰国後、statistician の Mayer 博士が商売道具の腕を骨折したりしてデータ解析は半年以上を要したが、AIDS 発症までの期間の Kaplan-Meier 解析を行ったところ、IL4-589T を持つ感染者は、持たない感染者よりも AIDS 発症が遅延することが明らかになった。この発症遅延効果は、白色人種特有の CCR5 の 32 塩基の欠失の影響を補正しても有意であった。また、IL4-589T を持つ感染者は感染初期の血中ウイルス RNA 量が低く、それを補正すると、発症遅延効果は見られなくなった。おそらく、IL4-589T を持つ感染者は IL4 の量が若干だが多いために、CCR5 発現が低下していて、個体感染の成立ならびに初期のウイルス量の中心となる R5 ウイルスの増殖が悪く、AIDS 発症が遅延するものと考えられる (J. Infectious Dis. 185, 1183-1186, 2002)。

### (c) 新たな宿主因子を求めて

以上のように当研究室では宿主因子として主に HIV-1 の細胞侵入に関わる因子をこれまで解析してきたが、現在は、細胞侵入の後に必要とされる宿主因子の探索を行っている。また、後述の HIV の粒子形成に関わる宿主因子の探索も行っている。

## 2. HIV のウイルス粒子形成機構

筆者は、留学前に、故・洪田博士のもとで HIV-1 の Gag

蛋白質に対するマウスの免疫反応の解析を行っていた。その際、全くの偶然から、HIV-1 の Gag 蛋白質だけを発現させても HIV-1 様の粒子が形成されることを見出し、筆者の医学博士論文として提出することができた。実はこの仕事は筆者が最も強い知的興奮を感じた仕事である。しかし、たまたま serendipity の甘美な蜜の味を知ってしまった代償は大きく、現在も助手や学生の出してくる「変な」データや失敗した実験データに突拍子もない解釈をつけては実験を行った本人に呆れられる毎日である。現在、当研究室では HIV-1 の粒子形成機構の解析は助手の櫻木淳一が行っている。

HIV-1 粒子にはそのゲノム RNA が 2 本パッケージングされている。櫻木は「なぜ 2 本なのか」という素朴な疑問に答えを見出そうとした。従来のレトロウイルスのゲノム 2 量体化の研究がほとんど試験管内での RNA の 2 量体化を調べているのに対し、ウイルス粒子そのものを使う方法にこだわって解析を進めた結果、ウイルスがゲノムを粒子に取り込む際にゲノムが二量体化していることが重要であるという結論に行き着いた (J. Virol. 76, 959-967, 2002, J. Virol. 77, 4060-4069, 2003)。また、最近、HIV-1 の起原が、チンパンジー体内で生じた 2 種の Simian immunodeficiency virus の組み換えによる可能性が報告されているが、この解析法を応用することでウイルスの組み換え体生成のメカニズム解明にも寄与できるものと考えている。

最後に大学の重要な使命である人材育成について触れておきたい。ウイルス学の人材不足が指摘されて久しく、筆者自身が教授に昇進できたのも人材不足のせいと考えている。しかし、最近の SARS は言うにおよばず、ウエストナイル、ニパ、新型インフルエンザなどエマージングウイルス感染症が跋扈する世情では、ウイルス学に通じた人材育成は国の存亡に関わる重要課題である。比較的単純な病原体であるウイルスが人体という複雑なシステム中の様々な因子と相互作用をおこない、そのシステムを攪乱させた結果生じるのがウイルス感染症である。従ってウイルス側、宿主側双方についてバランス良く知識を身に付け、かつ深い洞察力を備えた人材を養成するのが理想ではあるが…書いている筆者自身が理想とほど遠いため、この使命達成への道りは簡単ではないが、筆者なりに力を尽くしたい。なお、当研究室は大阪大学医学系研究科博士課程ならびに医科学修士課程が正規の窓口だが、他大学在籍者を受け入れた実績もあり、本稿を読まれて当研究室に興味を感じた若い方は連絡を頂ければ幸いである。また、当研究室のホームページは <http://www.biken.osaka-u.ac.jp/kenkyu/meneki/DVI/index.html> に掲載されている。

本稿を執筆する機会を頂いた、東京大学医科学研究所岩本愛吉先生ならびにウイルス誌の編集委員の方々に御礼申し上げます。