

## 北海道大学遺伝子病制御研究所

病態部門感染病態分野

志田壽利

〒060-0815 札幌市北区北15条西7丁目

電話/FAX : 011-706-7543

E-mail: hshida@igm.hokudai.ac.jp

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

### はじめに

北海道大学は札幌駅から徒歩10分の便利な街中に位置しています。しかし広大な敷地を持つおかげで、夏には小鳥のさえずる自然と文化の程よく調和した憩いの場となっています。冬の雪景色は又、趣が有り、1年中目を楽しませてくれる美しい大学です。当研究室は、敷地の中程に位置する医学部研究棟の5階に有ります。築数十年の伝統ある(?)建物ですが、ようやく改修される事になり、現在引越しの準備中です。

私は7年前に生田和良教授(現:大阪大学)の後任として京都大学ウイルス研究所から赴任してきました。一般実験用と動物感染用のP3室が共に完備している恵まれた環境で研究を始める事が出来ました。現在、私以外に、大橋貴准教授、張陰峰助教、ポストドク3人、大学院生4人(博士課程3人、修士過程1人)、技術補佐員2人が在籍しています。また、国立感染症研究所の木所稔氏と緊密な共同研究を行っています。

### 主な研究テーマ

当研究室では、分子レベルの解析を基に感染モデルラットを作る事を通して、HIVとHTLV-1感染の個体レベルでの解析と治療・予防法の開発を目指しています。

#### 1. HTLV-1のラット感染モデル

扱い易く、近交系が確立され、遺伝子操作の出来るラットやマウスがHTLV-1の良い感染モデルになれば、予防と治療法の開発に大いに役立つでしょう。実際、大橋准教授は東京医科歯科大(神奈木研)時代から、近交系ラットを使ってHTLV-1の免疫療法の研究を行ってきました。私自身がこのテーマに関与するようになったのは偶然の出来事がきっかけです。

元々私はHTLV-1とHIVのRNAの輸送機構に興味を持ち、ウイルス因子であるRexとRev、細胞因子であるCRM1の研究をしていました。その一環として、エイズ脳症の発症機構の解明の為に、HIVの潜伏感染の場所と考えられていたアストロサイトでのRev機能を調べようとしていました。1997年私はヒトアストロサイトーマを譲り受け、Rev/Rexの機能を調べ始めました。Revの働きも弱かったのですが、特に、Rexが機能しませんでした。当時、大学



院生であった博多(現:NYU school of Medicine)はアストロサイトーマCRM1 cDNAのPCRでの増幅条件が他のヒト細胞の場合と異なることに気がつきました。このことは「アストロサイトでは核外輸送装置の構成が他の組織と異なる。」可能性を示唆しています。我々は非常に興味を持ってアストロサイトーマCRM1 cDNAのクローニングを進めました。ところが、部分シーケンスをしたところで、博多が奇妙なことを言い出しました。データベース上に記載されているラットCRM1の配列と一致するというのです。最初は部分的な一致だと思っていたのですが、シーケンスが完了すると完全に一致することが分かりました。アクチン遺伝子を調べることによって我々の使っていた細胞がラット由来であることが判明しました。そういえば、別の学生が、「最近アストロサイトーマが元気で、transfection効率も上がりました。」と言うので、私は上機嫌で、「君も腕が上がったなあ。」と答えていたことを思い出しました。私のラボではラット細胞を取り扱ったことがなかったので、もらった時からラット細胞が少し混ざっており、増殖率の違いからヒトアストロサイトーマと置き換わったものと思われました。大きな衝撃でした。

ふとその時、田中勇悦氏(現:琉球大)と行っていたラットでのHTLV-1の感染実験の記憶がよみがえって来ました。田中氏の努力によって多くの免疫学的な結果を得たのですが、HTLV-1の増殖が悪いために、最終目的まで行き着けなかったものです。ラットでHTLV-1の増殖が悪いのはラットCRM1がRexの良いコファクターとして働かない

ためだったのです。ならば、ヒト CRM1 を発現するトランスジェニック (Tg) ラットを作成すれば良い感染モデルになるはずですが、新たな希望が生まれました。博多と研究を続けて、「ラット CRM1 は Rex タンパク自身を効率よく核外に運搬するが、Rex の多量体化を誘導できないために HTLV-1 RNA を運ばない。」事を証明しました。

北大に移ってから、ヒト CRM1 を発現する Tg ラットの作成に着手しました。これが又難物でした。CRM1 は酵母からヒトまで保存されている、細胞の生存に必須の因子のために、過剰発現すると発生過程に異常が生じるようでした。CRM1 の発現制御様式を調べたところ、静止期のリンパ球では発現が弱く、細胞の活性化に伴って発現が転写後及び転写レベルで誘導される事が分かりました。そこで、natural な発現をさせる為に、ヒト CRM1 ゲノムの全制御領域を有していると思われる BAC クローンを入手して Tg ラットを作成しました。大橋准教授の指導のもとで大学院生の高柳が解析したところ、Tg ラット由来の T 細胞はヒト T 細胞に匹敵する HTLV-1 を生産する事が分かりました。しかし、ラット成体内での HTLV-1 の効率的な増殖にはさらに、別の要因が絡んでいるようです。感染ルート、免疫系の関与、また、未知の阻害因子が考えられます。現在、これらを解明するのが主要テーマの1つになっています。

## 2. HIV のラット感染モデル

CRM1 は Rev のコファクターでもあるので、ヒト CRM1 を発現するラットは HIV の感染モデルとしても有用と思われれます。さらに、受容体であるヒト CD4 と CCR5 を発現させると HIV-1 がわずかに感染できる事が報告されているので、ラットは良い感染モデルに改良できる可能性を秘めています。これらの事から、HIV のラット感染モデルの作成にも力を入れています。

HIV-1 の場合ラットの細胞種によって必要なヒト因子が異なるようです。上皮系細胞株では、ヒト CRM1 を発現させてやればヒト細胞に準じる量の感染性の HIV-1 粒子が生産されるようになります。しかし、大学院生の岡田の結果では、T 細胞では Tat のコファクターであるヒト CyclinT1 の方が重要であるようです。他方、マクロファージ株ではヒト CRM1 の効果が大きいとの結果を得ています。

一方、ラット T 細胞は HIV-1 感染の阻害因子を持っているようです。阻害因子を同定する事は重要です。RNAi によるノックダウンラットを作成出来るからです。ポストドクの鈴木によりますとサイクロスポリン A 依存性と非依存性の阻害因子が有りそうです。又、ポストドクの陳はラット T 細胞から調製した cDNA を導入する事によって、HIV 耐性のヒト細胞を多数樹立しています。耐性遺伝子のクローニングを期待しています。張助教はラット T 細胞由来の HIV 粒子の感染性を調べています。

## 3. ラット細胞における HIV RNA の発現機構

ラット感染モデル作成の原点となったウイルス RNA 輸送機構も調べていくと奥が深い事が分かってきました。数年前に Rev/Rex はウイルス RNA と細胞の輸送因子 CRM1 を仲介する事によって、RNA を核から細胞質に運ぶことが確立されました。しかし、元技術補佐員の大藤と大学院生の永井の結果では、ラット上皮細胞では Rev は細胞質に RNA を運ぶにもかかわらずウイルス蛋白はあまり作られません。ヒト CRM1 の導入で RNA の輸送効率はあまり変わらないのに、ウイルス蛋白質量は増えます。蛋白自身は安定であることが分かったので、翻訳効率が上昇したことが考えられます。Rev/CRM1/RNA 複合体は細胞質に到達するとすぐに乖離する事になっているので、これは不思議な事です。RNA 輸送と翻訳を結ぶ機構が存在すると考えなければ説明できません。この未知の機構が解明される事を期待しています。

## 4. 組み換えワクシニアを用いた抗 HIV ワクチン開発

HIV ワクチンのためのベクターとしてワクシニアウイルスは最も古くから使われてきました。にもかかわらず、ヒトに対する安全性と有効性をかねそろえた適切なワクシニア株は未だ報告されていません。しかし、橋爪先生が開発され、千葉血清研究所が 1970 年代に種痘として使ったワクシニア LC16m8 株が知られています。この株は副作用が無く、有効な抗天然痘抗体を誘導する事が報告されています。従って、この株は良いベクターの候補です。ところが、木所稔氏は LC16m8 株が強毒リバータントを生む事に気がつきました。我々は共同研究を開始し、その責任遺伝子を同定し、削除する事によってリバータントを生じない m8Δ 株を作製しました。さらに、容易に組み換えウイルスを作成出来る *in vitro* ligation 法を開発しました。そこで、私が以前に開発した強力プロモーターと組み合わせる事によって SIV gag を発現する組み換えワクシニアを作製しました。コートジボアールから来たポストドクの Ben Fofana 氏が免疫原性を検討しています。安全で有効なエイズワクチン開発の一助となる事を期待しています。

## おわりに

HIV/HTLV-1 の慢性感染症は、体内でウイルス一宿主の相克が複雑に絡み合っています。この感染症を理解し、根治療法を開発する為に、近交系が使い、遺伝子解析の可能なラットモデルは必ず役立つと信じています。上記のように、当研究室では基礎研究を臨床に役立てる事を目指して日夜努力しています。興味を持たれた方は、遠慮なくご連絡ください。