

氏 名	よね ざわ あき ひと 米 澤 昭 仁
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2436 号
学位授与の日付	平 成 14 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻
学位論文題目	Replacement of the V3 region of gp120 with SDF-1 preserves the infectivity of T-cell line-tropic human immunodeficiency virus type 1. (gp120のV3領域をSDF-1に組み換えても、T細胞株指向性HIV-1の感染性は保持される。)
論文調査委員	(主 査) 教 授 淀 井 淳 司 教 授 中 畑 龍 俊 教 授 内 山 卓

論 文 内 容 の 要 旨

HIV-1は、そのエンベロープ(Env)と標的細胞側のCD4およびコレセプターとの相互作用により細胞内へ侵入し感染する。特に、Envとコレセプターとの相互作用はHIV-1の細胞指向性を決定づける上で重要であり、ケモカインレセプターの一つであるCXCR4、CCR5が、それぞれT細胞株指向性、マクロファージ指向性HIV-1の代表的なコレセプターとして知られている。

一方、HIV-1 Envはgp120、gp41からなり、まずCD4と結合することにより、gp120の立体構造が変化しそのV3領域が露出する。そしてV3領域とコレセプターとの相互作用により、gp41が活性化され標的細胞との膜融合、侵入へと進む。このV3領域はループ構造を持ちコレセプターとの結合および細胞指向性の決定に関与することが知られている。しかしV3領域とコレセプターの結合そのものの重要性については現在十分には解明されていない。そこで、V3領域とコレセプターとの結合そのものが、ウィルス固有のアミノ酸配列よりも細胞内侵入・感染に重要である、すなわちレセプターに結合しうるアミノ酸配列をV3領域に組み込むことで感染性が保持されるという仮説を立てた。

この仮説を証明するため、T細胞株指向性HIV-1(NL4-3)EnvのV3領域をコレセプターCXCR4のリガンドであるSDF-1の部分アミノ酸に置換し、このキメラEnvを持ったpseudotype HIV-1がCXCR4発現細胞に対する感染性を保持しているかどうかを検討した。

NL4-3のEnv発現ベクターのV3領域を3種の異なる部位・長さのSDF-1 cDNA、すなわちN末端より別アミノ酸(NL4-3/SDF1-51)、全長の67アミノ酸(NL4-3/SDF1-67)、およびV3領域と相同性を持つ11-53番目の43アミノ酸(NL4-3/SDF1-V3)にそれぞれ置換した。作製したキメラEnv蛋白の発現は免疫沈降法、Western blotting法により確認した。このキメラEnv発現ベクターとpNL4-3.Luc.E-R-ベクターをHEK293T細胞に一過性共発現させ、その上清を回収してLuciferase reporter virusを作製し、感染実験を行った。

結果、これらのキメラEnvのうちの1つであるNL4-3/SDF1-51を持つウィルスがU87.CD4、CXCR4細胞に感染し、U87.CD4、U87.CXCR4およびU87.CD4.CCR5細胞には感染しなかった。そして、この感染は、CXCR4のリガンドであるSDF-1 β 、抗SDF-1抗体、および抗CD4抗体(Leu3a)によりそれぞれ濃度依存性に抑制された。さらにNL4-3/SDF1-51 Env gp120蛋白はアイソトープ標識SDF-1(125 I-SDF-1)とCXCR4との結合を特異的に阻害したことから、キメラEnvのSDF-1に置換されたV3領域とCXCR4とが結合していることが示唆された。

以上の結果から、EnvのV3領域をSDF-1に置換してもCXCR4を介する感染性は保持されることが証明された。すなわち、V3領域とコレセプターとの結合がHIV-1の細胞内侵入に重要であり、V3領域が外来性のアミノ酸で置換されても結合能を有する配列であれば感染性が保持されることが示された。

さらにはT-tropic HIV-1 EnvのV3領域をCCR5のリガンドであるMIP-1 α に置換してもCCR5発現細胞に感染しう

ることが証明された。このことから、HIV ベクターの組織・細胞特異的なターゲッティングに V3 領域を他のリガンド分子に置換する手法が応用できる可能性が考えられる。

論文審査の結果の要旨

HIV-1 のエンベロープ (Env) の V3 領域はコレセプターとの相互作用、細胞侵入および細胞指向性の決定に関与している。しかし V3 領域とコレセプターとの結合そのものが、その後引き続いて起こる膜融合の過程の引き金になっているかどうかは明らかでない。本研究は、Env の V3 領域にウイルス固有のアミノ酸配列がなくても、同領域にコレセプターに結合しうるアミノ酸配列があれば、その Env をもったウイルスが細胞侵入し、感染することができるのかどうかを検討したものである。

T 細胞株指向性 HIV-1 Env の V3 領域をコレセプター CXCR4 のリガンドである SDF-1 の部分アミノ酸に置換したところ、このキメラ Env を持った HIV-1 は CXCR4 発現細胞に感染した。この感染は、SDF-1 β 、抗 SDF-1 抗体、および抗 CD4 抗体により抑制され、さらに、キメラ Env gp120 蛋白は、アイソトープ標識 SDF-1 と CXCR4 との結合を特異的に阻害した。以上の結果から、V3 領域を SDF-1 に置換しても CXCR4 を介する感染性は保持されることが証明された。さらに、同部位の MIP-1 α への置換により CCR5 を介した感染が成立した。以上より、V3 領域がコレセプターに結合することが HIV-1 の細胞侵入に重要なステップであることが示された。

本研究は、HIV-1 の細胞内侵入機構の解明に貢献し、V3 領域とコレセプターとの結合性の意義、さらには HIV ベクターの組織・細胞特異的なターゲッティングへの応用に寄与するところが多い。従って、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位申請者は平成13年11月9日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。