

氏名(本籍)	た はら さと こ 田原聡子(茨城県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第2668号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	Differential level in co-down-modulation of CD4 and CXCR 4 primed by HIV-1 gp120 in response to phorbol ester, PMA, among HIV-1 isolates (HIV-1 gp120とPMAが誘導するCD4細胞内領域非依存性down-modulationにおけるHIV-1ウイルス株間における相違)
主査	筑波大学教授 医学博士 林 英 生
副査	筑波大学助教授 医学博士 須磨崎 亮
副査	筑波大学助教授 医学博士 松 井 良 樹

## 論文の内容の要旨

### (目的)

ヒト免疫不全ウイルス、HIV-1、はエンベロープ蛋白(gp120)が標的細胞膜上のCD4及びケモカインレセプターに結合することにより感染が成立する。この時、T細胞に指向性をもつHIV-1はCD4及び主としてケモカインレセプターであるCXCR4に結合する。HIV-1のgp120には複製毎に高頻度に変異が導入されるために、産生されたウイルスは細胞傷害性を含めて異なる性状のものとなる。

本研究では、細胞傷害性の異なるHIV-1ウイルス株のgp120のCXCR4への親和性を比較検討し、このウイルスのgp120蛋白と細胞傷害性の関係を明らかにすることを目的とした。

### (方法)

Goldingらは、gp120とphorbol myristate acetate (PMA)による細胞内領域欠損型CD4 down-modulationの実験系を確立し、gp120/CD4複合体と標的細胞膜分子の結合を間接的に証明している(Science, 274, 602-605, 1996)。PMAはCD4の細胞内領域にあるセリンをリン酸化し、CD4のdown-modulationを誘導するため、細胞内領域を欠損した変異CD4はPMAによるdown-modulationは誘導されない。しかし、細胞内領域欠損型CD4にgp120を結合させておくとPMAによるdown-modulationが誘導されるようになる。これはgp120がCD4に結合した後にPMAによりdown-modulationが誘導される分子(この場合CXCR4)と3量体を形成するために見られる現象である。我々は、細胞傷害性の異なるT細胞指向性HIV-1であるⅢB, SF2, そしてSF33の3種類のウイルス由来リコンビナントgp120 (rgp120)を、本実験系に用いた。また、CXCR4陽性であるHeLa細胞、CXCR4陰性であるHOS細胞及びCXCR4を強制発現したHOS細胞に細胞内領域欠損型CD4 (dc35)を導入した細胞株を樹立し、各rgp120と細胞膜分子との結合性を検討した。各細胞株は、rgp120 (10 µg/ml)で37°C30分間処理した後、PMA (100ng/ml)により37°C2時間処理した。PMA及びrgp120処理前後のdc35の発現の変化は、抗CD4抗体により染色し、フローサイトメトリー法により解析した。

## (結果)

CXCR4 陽性の HeLa 細胞において、Ⅲ B 及び SF33rgp120 は dc35 の down-modulation を 40% 以上と強く誘導したのに対し、SF2 rgp120 が誘導する dc35 の down-modulation は 10% 未満と弱いものであった。一方、CXCR4 陰性の HOS 細胞においては、Ⅲ B rgp120 は dc35 の down-modulation を 40% 以上と強く誘導したのに対し、SF33 及び SF2 rgp120 が誘導する dc35 の down-modulation は 10% 未満と弱いものであった。

CXCR4 を強制発現した HOS 細胞を用いたところ、SF33rgp120 はⅢ B rgp120 と同等の強い down-modulation を誘導するようになった。HOS 細胞において RT-PCR 解析でのみ検出される低発現の CXCR4 の関与を検討するため、CXCR4 の発現が低い HeLa 細胞をフローサイトメトリー法によりソーティングし、得られた細胞 (1G8) を用いて同様の実験を行った。その結果、この 1G8 細胞において、Ⅲ B rgp120 は dc35 の down-modulation を全く誘導しなかった。

## (考察)

本研究では、細胞傷害性の異なる 3 種類のウイルス由来 rgp120 及び HIV レセプターである CXCR4 の発現量が異なる 3 種類の細胞株を組み合わせ、rgp120 と CXCR4 の結合性を比較検討した。

HIV-1 感染は、病態の進行に相関して細胞傷害性の強いウイルス株が優位に感染者から分離されてくる。SF2 は弱毒株であるのに対し、Ⅲ B 及び SF33 は強毒株であることが知られている。細胞傷害性の強いⅢ B 及び SF33 rgp120 は、CXCR4 と高親和性であることが示唆された。一方、細胞傷害性の弱い SF2 rgp120 は、CXCR4 に対し低親和性であることを示唆され、ウイルスの細胞傷害性と rgp120 の CXCR4 への親和性に相関が見られることが示された。一方、HOS 細胞における dc35 の down-modulation には CXCR4 以外の分子が関与している可能性が示された。その根拠として、第 1 に HOS 細胞に発現している CXCR4 の発現が極めて低いということが挙げられる。HOS 細胞はヒト骨肉腫由来であり、CXCR4 の発現は mRNA レベルで微かに検出されるものの、抗 CXCR4 抗体による染色及びリガンド刺激によるカルシウムイオンの流入を指標に解析したところ蛋白レベルでの CXCR4 の発現は全く検出されなかった。第 2 に、HeLa 細胞において低発現の CXCR4 では、dc35 の down-modulation が誘導されないことから、HOS 細胞において誘導される dc35 の down-modulation には、CXCR4 以外の何らかの高発現分子が関与していることが考えられる。第 3 に、Ⅲ B rgp120 と SF33 rgp120 は CXCR4 に対して同レベルの親和性が示されているのに対し、Ⅲ B rgp120 と SF33 rgp120 では誘導する dc35 の down-modulation のレベルに違いが見られた。この結果から、HOS 細胞における dc35 の down-modulation には、CXCR4 以外の分子が関与していることが考えられる。

以上の 3 つの根拠から、HOS 細胞にはⅢ B rgp120 と高親和性で SF33 rgp120 とは低親和性の CXCR4 以外の分子が高発現しており、この分子が dc35 の down-modulation に深く関与していることが示唆された。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究はヒト免疫不全ウイルス、HIV、のエンベロープ蛋白 (gp120) と宿主細胞受容体との結合性が細胞傷害性と関連すると推察し、細胞傷害性の異なる 3 種類のウイルス由来の gp120 と、HeLa 細胞および HOS 細胞で CXCR4 (ケモカインレセプター) を強制発現させた系を作成し、その結合性と細胞傷害性を解析している。その結果、CXCR4 への親和性の強さが細胞傷害性の強さと相関していることを示すとともに、HOS 細胞には、CXCR4 以外に gp120 が結合する分子が発現されており、その分子が HIV レセプターとして機能している可能性を示唆している。エンベロープ蛋白が HIV の感染に果たす役割の解明に新しい視点を示した有意義な論文である。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。