



|              |                                                                                                                                                 |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | CXCR4/fusin Is Not a Species-specific Barrier in Murine Cells for HIV-1 Entry                                                                   |
| Author(s)    | 橘, 和延                                                                                                                                           |
| Citation     | 大阪大学, 1998, 博士論文                                                                                                                                |
| Version Type |                                                                                                                                                 |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/41214">https://hdl.handle.net/11094/41214</a>                                                             |
| rights       |                                                                                                                                                 |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

|               |                                                                                                                                 |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名           | 橘 和 延                                                                                                                           |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 (医 学)                                                                                                                       |
| 学 位 記 番 号     | 第 1 4 1 2 3 号                                                                                                                   |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平 成 10 年 9 月 17 日                                                                                                               |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第 4 条第 2 項該当                                                                                                                |
| 学 位 論 文 名     | CXCR4/fusin Is Not a Species-specific Barrier in Murine Cells for HIV-1 Entry<br>(マウス CXCR4/fusin は HIV-1 感染における種特異的 barrier か) |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 松澤 佑次<br>(副査)<br>教 授 平野 俊夫 教 授 山西 弘一                                                                                |

## 論 文 内 容 の 要 旨

〔目的〕 ケモカインは多くのメンバーが炎症時に白血球の遊走を促進すると考えられている、分子量約10 kD のサイトカインファミリーの総称である。我々はこれまで、B細胞の初期分化を支持する分子としてケモカイン PBSF/SDF-1 (pre-B cell growth stimulating factor/stromal cell-derived factor-1) を同定し (PNAS 91: 2305, 1994), これが他のケモカインと異なり造血や発生に必須であることを発見した (Nature 382: 635, 1996)。さらに, PBSF/SDF-1 の受容体としてマウス CXCR4 を同定した (PNAS 93: 14726, 1996)。一方, 1996年, ケモカイン受容体 CXCR4 は, T細胞株指向性 HIV-1 の宿主細胞への侵入に必須の, CD4 に次ぐ第二の受容体 (coreceptor) として機能することが明らかにされた。しかし, この coreceptor は, 10年来マウスで働かずヒト特異的であると考えられてきた。そこで, マウスおよびヒト CXCR4 を用いて coreceptor の種特異性を検討した。

### 〔方法〕

#### 細胞内カルシウム測定

マウス PBSF/SDF-1 の NIH3T3 細胞およびマウス CXCR4 を transfect した CHO 細胞に対する細胞内カルシウムの測定を fura-PE3 のラベルにより行った。

#### Fusion Assay

HaLaS3 に  $\beta$ -gal の  $\alpha$ -subunit と HIV-1 の env を recombinant vaccinia virus を感染させることにより導入した。一方, NIH3T3 にヒト CD4,  $\beta$ -gal の  $\omega$ -subunit と T7 RNA polymerase を vaccinia virus により, 各ケモカイン受容体を lipofectamine 法により導入した。これらの細胞が融合すれば, 細胞内の  $\beta$ -gal の  $\alpha$ -subunit と  $\omega$ -subunit が相補し,  $\beta$ -gal が活性化される。この  $\beta$ -gal の活性を OD<sub>590</sub> により測定した。

#### Infection Assay

ヒト CD4 と各ケモカイン受容体, HIV-1 の LTR- $\beta$ -Gal を導入したヒト腸上皮由来 SW480, 骨肉腫由来 HOS cell, グリオーマ由来 U87MG cell に T 細胞株指向性 (T-tropic) virus の NL432, IIB, マクロファージ指向性 (M-tropic) virus の SF162, NL432 の env と V3 loop を SF162 の env と V3 loop にそれぞれ置換したキメラウイルス NL432<sub>env-162</sub>, NL432<sub>v3-162</sub> を感染させた。感染が成立すれば, HIV-1 によりコードされた Tat が発現され, *lacZ* の発現が誘導される。

〔成績〕 従来よりヒト CD4 を発現させても HIV-1 が侵入できないと報告されていたマウス NIH3T3 細胞は, 機能的な CXCR4 を発現していないことが明らかとなった。そこで, NIH3T3 細胞を用いた fusion assay により, マウス CXCR4 が HIV-1 の Env を介する膜融合を起こすかどうか検討した。驚いたことに, マウス CXCR4 とヒト CD4 を発現させた NIH3T3 細胞は, T 細胞株指向性 HIV-1 由来の Env を発現させた HeLaS3 細胞と融合した。そして, infection assay においても, マウス CXCR4 とヒト CD4 を発現させたヒト細胞株 SW480, HOS, U87MG は, T 細胞株指向性 HIV-1 に十分な感染性を示し, マウス CXCR4 が HIV-1 ウイルスそのものに対しても coreceptor として機能することが明らかとなった。また, マウス CXCR4 を介した T 細胞株指向性 HIV-1 の宿主細胞への侵入にはヒト CXCR4 と同様 HIV-1 の envelope gp 120 の V3 loop が重要であることも示された。

〔総括〕 以上の結果は, 従来予想されていたヒト, マウス間での coreceptor の種特異性の概念を変更するものである。この結果はマウスの細胞に T 細胞株指向性 HIV-1 を侵入させるためにはヒト CD4 のみを導入すれば十分であることを示し, HIV-1 の感染モデルとしてマウスそのものやマウス細胞を用いる研究に重要な知見であると考えられる。一方, マウス CCR5 は HIV-1 の coreceptor として機能しないことが示され, 2 種の coreceptor の構造, 機能の違いを反映していると考えられ興味深い。

## 論文審査の結果の要旨

ケモカインは多くのメンバーが炎症時に白血球の遊走を促進すると考えられている, 分子量約 10 kD のサイトカインファミリーの総称である。彼等はこれまで, B 細胞の初期分化を支持する分子としてケモカイン PBSF/SDF-1 を同定し, その受容体としてマウス CXCR4 を同定した。そしてこれらの分子が他のケモカインと異なり造血や発生に関与することを報告してきた。一方, 1996 年, ケモカイン受容体 CXCR4 は, CD4 と共同して T 細胞株指向性 HIV-1 の侵入時に第二の受容体 (coreceptor) として機能することが明らかにされた。しかし, この coreceptor は 10 年来, マウスで働かずヒト特異的であると考えられてきた。そこで, マウス, ヒト CXCR4 を用いて coreceptor の種特異性を検討した。

fusion assay と infection assay を用い, マウス CXCR4 が T 細胞株指向性 HIV-1 に対して coreceptor として機能することを見事に示した。また, 従来よりヒト CD4 を発現させても HIV-1 が侵入できないと報告されていたマウス NIH3T3 細胞が, CXCR4 を細胞表面に発現していないことも示した。

以上より, マウス CXCR4 は, T 細胞株指向性 HIV-1 の感染において種特異的 barrier ではないことが明らかとなった。この結果は, マウスの細胞に HIV-1 を侵入させるためにはヒト CD4 のみを導入すれば十分なことを示し, HIV-1 の感染モデルとしてマウスそのものやマウス細胞を用いる研究に大変重要な知見であると考えられ, 学位の授与に値すると思われる。