

トランスジェニックラット 感染モデルを用いたエイズ ワクチン開発

志田 壽利 [北海道大学遺伝子病制御研究所/教授]

原島 秀吉 [北海道大学大学院薬学研究科/教授]

背景・目的

HIVの治療と予防法開発の障害の1つは使いやすい高感受性感染動物モデルがないことである。しかし、ヒトの受容体を発現させてやれば、HIVがわずかに増殖することからラットは良いモデルに改良しうる可能性を秘める。我々は、ウイルス粒子形成を支持すべきラット因子rCRM1が機能しないことが、HIVの増殖の非効率の原因であることを発見した。そこで、ヒトhCRM1を発現させるとラット細胞でHIVが増殖できるようになることを確認し、更に、hCRM1を発現するトランスジェニック(Tg)ラットの作成とエイズワクチン作成の基礎研究を目的とする。

内容・方法

(1) hcrm1遺伝子を発現するラット細胞の構築とHIVの増殖性

hcrm1 cDNAをレトロベクターであるpMXsneoに組み込んで、ラットER1細胞にtransduceして、G418耐性の細胞を選択することによってhCRM1安定発現細胞株(ER1hCRM1)を作成した。ついでHIVの構造タンパク質の発現効率を調べるために、pNL43e-r-Lucをトランスフェクションして培地中に放出されるGag量を $p24ELISA$ によって測定した感染性HIV cloneをトランスフェクションして子孫ウイルスの感染価をTZM-bl細胞を用いて測定した。

(2) hcrm1を発現するTgラットの作成

Tgラットを作成するために、hcrm1ゲノム領域を含むBAC クローンをラット受精卵に打ち込んだ。子孫ラット内のhcrm1ゲノムの存在をPCRによって、hCRM1蛋白の発現をWestern blotによって確認した。

(3) DNAワクチン高発現担体MENDの作成

MENDの調製方法は、①DNAの凝縮化と②脂質膜水和法による凝縮化DNAの脂質コーティングからなる(結果の項参照)

結果・成果

(1) hcrm1遺伝子を発現するラット細胞の構築とHIVの増殖性

レトロベクターによってhCRM1を発現させたER1hCRM1細胞はヒト細胞とほぼ同量のhCRM1を有していた。この細胞にpNL43e-r-LucをトランスフェクションするとER1細胞の

10-20倍量、ヒトHeLa細胞の30-70%のGag蛋白が生産された。感染性clone pNL43をトランスフェクションするとER1細胞の10-20倍量、HeLa細胞の約70%の子孫ウイルスが生産された。また、このラット細胞ではTat活性、ウイルス粒子形成効率はヒト細胞と同等である事がわかった。これらのことは、hCRM1を発現させ、さらにCD4/CCR5/CXCR4などの受容体を発現させることによってラット細胞がHIV感受性になることを示唆している。

(2) hcrm1を発現するTgラットの作成

hcrm1 BACを450個のラット受精卵にマイクロインジェクションする事によってトランスジェニックラットを作成した。2匹の子孫ラットF0が完全長のhcrm1 ゲノムを有していた。内1匹がF1へのhcrm1遺伝子を遺伝した。このTgラットの脾臓、胸腺、肺をWestern blottingで調べると胸腺で大量のhCRM1蛋白の発現が見られた。この発現パターンは内在性のrCRM1と同様であった。

(3) 高発現DNAワクチン担体MENDの作成

HIVは多様な抗原性を持つ混合物として体内に存在しており、どの型のHIVが感染するのか予言できない。従って、ワクチン開発の最大の課題は抗原多様性にいかに対応するかにある。対応法の一つとして、感染者体内に存在する混合物のままのHIV遺伝子群を取り出し、ライブラリーとして発現ベクターに組み込むDNAワクチンを我々は提唱している。しかし、個々の抗原量が少ないために効率よい免疫誘起法の開発が必要である。DNAワクチン高発現担体MENDを作成するために、まずDNAをポリカチオンによって凝縮し、ついで試験管に貼り付けたマイナス荷電を有する乾燥脂質薄膜(マイナスに荷電)に添加した。超音波処理によって脂質によってコートされたDNA凝集体(MEND)を作成した。更に、機能性素子として、ステアリル化アルギニン8重合体(STR-R8)でMEND表面を修飾した。細胞での遺伝子発現効率は裸のDNAワクチンより10-100万倍増加した。

今後の展望

上述のようにhCRM1発現Tgラットの作成に成功した。そこで、このTgラットに受容体を発現させることによってHIV感受性ラットを完成させる計画である。他方、遺伝子高発現MENDの作成に成功したので、HIVの抗原を発現するMEND DNAワクチンを構築して、HIV感受性ラットを測定系として、抗HIV活性を調べる計画である。