

HIV-1 潜伏感染細胞からのウイルス再産生阻止薬の 開発と応用に関する研究

所 属 国立国際医療センター研究所
研究代表者 石坂幸人

研究要旨 本研究では潜伏感染病態において中心的な役割を担う単球/マクロファージ系細胞などの静止細胞へのウイルス感染において重要な役割を担うことが報告されている Vpr の機能解析を行う一方、潜伏感染細胞からのウイルス産生誘導における Vpr の役割を明らかにする。そしてこれら機能を阻害する因子の探索を試みる。また、患者血清中に存在するとされる Vpr 濃度を把握するために ELISA システムを立ち上げる。Vpr が静止細胞へのウイルス感染を正に制御している事、潜伏感染細胞である U1 細胞に対して直接的にウイルス産生を誘導するのではなく、末梢血単核球細胞にある種のサイトカイン産生を誘導することで、ウイルス産生を間接に誘導することを見いだした。そしてサイトカイン産生を阻害する因子を海洋微生物抽出エキスから見いだした。

分担研究者

小柳義夫 京都大学ウイルス研究所 教授
胡桃坂仁志 早稲田大学理工学術院 助教授
山下克美 金沢大学薬学部 助教授
池田和真 岡山大学輸血部 助教授
志村まり 国立国際医療センター 室長
足立恭子 海洋バイオテクノロジー研究所 研究員
前田雅弘 免疫生物研究所 研究員

A. 研究目的

Antiretrovirus therapy (ART)療法が導入され、HIV-1 陽性症例の予後が劇的に改善された。しかし、近年の研究から ART 下でもウイルス産生は持続的に認められ、体内からウイルスを駆逐するためには究めて長期に亘る継続的治療が必要であることが分かってきた。その間、ART 療法の副作用により、治療法からドロップアウトしたり、また薬剤耐性ウイルスの出現により、絶望的な転機をたどる症例もある。即ち、潜伏感染状態の理解とこれを阻止する新しい治療法の開発が急務であると言える。このような潜伏感染状態で重要な役割を担っているのが単球/マクロファージ系細胞であり、これら細胞へのウイルス感染を阻止または感染細胞からのウイルス産生を阻止するシステムの開発を行うこと

により、様々な問題が解決されるものと期待される。

一方、単球/マクロファージ系細胞へのウイルス感染において、必須の役割を担っている遺伝子がアクセサリー遺伝子の一つ Vpr である。Vpr の機能としてアポトーシス、G2 期における細胞周期異常、潜伏感染細胞からのウイルス産生誘導、などが知られている。また患者の血液や脳脊髄液中にも存在することも報告されている。このことは Vpr が全身の潜伏感染細胞から一気にウイルス産生を誘導する機能を持ち得ることを意味する。しかし、潜伏感染細胞への感染における Vpr の意義については、未だ明確な答えが得られていない。Vpr は、preintegration complex を核内に運搬する機能が知られており、この機能が Vpr の単球/マクロファージ系細胞へのウイルス感染を誘導する重要な役割であるということが提唱されている。しかし PIC の核内移行は、マトリクス蛋白質やインテグレースについても報告されていることから、Vpr に特化した機能ではない。即ち、Vpr により誘導される細胞の形質転換の中で、単球/マクロファージ系細胞へのウイルス感染における役割については未知のままである。

近年、Vpr により DNA 損傷と同様のシグナルが誘発されることが報告された。このことから、Vpr がクロマチン構造を変化させている可能性も示唆される。

本研究では4つの柱を設定する。即ち
a. Vpr の単球/マクロファージ系細胞へのウイ

ルス感染における役割の解明、

- b. 潜伏感染細胞からのウイルス産生誘導の解明、
- c. これら機能を阻害する因子の同定、また、
- d. 体液中に存在する Vpr 測定システムの確立である。いずれの項目も国立国際医療センターが中心となりながら項目 a 及び b は分担研究者である小柳教授、胡桃坂助教授、山下助教授が参加し、項目 c は海洋バイオテクノロジー、項目 d は、免疫生物研究所と岡山大学医学部輸血部 池田助教授、との共同研究として行う。

B. 研究方法

a. Vpr の単球/マクロファージ系細胞へのウイルス感染における役割の解明

初年度は、Vpr 発現によるクロマチン構造変化を明らかにしながら、その機序を明らかにする。Vpr 発現細胞としてテトラサイクリン系薬剤であるドキシサイクリン(DOX)の添加によって Vpr の発現がコントロールできる細胞株 MIT-23 を用いる。また、国立感染症研究所 徳永研三博士との共同研究として、ENV 遺伝子(pNL-Luc-ER⁺)と Vpr にフレームシフト変異が挿入されたウイルス(pNL-Luc-ER)発現ベクターを用いた。VSV-G を用いてシュードタイプウイルスを作成し、Magic-5 を用いて感染効率を検定するとともに、p24 を測定して、ウイルス量を標準化した。

ヒト末梢血単核球細胞(PBMC)は分離後、1 μg/ml の PHA を添加し、活性化、あるいは、そのままヒト血清にて培養し非活性状態(静止期細胞)を維持した。細胞へのウイルス感染に先立ち、DNAaseI にてウイルス液中の DNA を除き、gag p24 量として 100ng のウイルスを細胞に 2 時間感染させ、洗浄後、培養した。

リアルタイム PCR : HIV 特異的プライマーペアをデザイン (Virus Genes 27:177-88, 2003) し、R/U5 DNA 量, U5/gag DNA 量, 2LTR DNA 量を ABI PRISM 7700 (PE-Applied Biosystems, Foster City, Calif.)にて定量した。インテグレーション量の定量には Chun らにより報告されたプライマーを用いた (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:13193-13197, 1997.)。インテグレーションされた HIV DNA の定量のためのスタンダードは MT-4 細胞に HIV ベクター(J. Virol. 72:8150-8157, 1998)を導入して作製した細胞 (MT-4 CS/CG) を確立した。

細胞周期 : 細胞内 DNA 量を propidium iodide にて染色し、FACS にて細胞周期を測定した。

b. 潜伏感染細胞からのウイルス産生誘導の解

明

潜伏感染細胞としては U1 細胞を用いた。Vpr 蛋白質はグルタチン S トランスフェラーゼ (GST) 融合蛋白質としてバクテリアで発現させ、グルタチンビーズに結合させた。Triton X-100 入りのバッファーで強力に洗浄した後、プレシジョンで GST と Vpr を切断し、Vpr を溶出した。精製された Vpr は、ELISA キットで濃度を測定した。リンフォプレップで調整した。PBMC に種々の濃度で Vpr を添加し、2 日間培養後の上清を U1 細胞に 10%添加した。上清中の p24 は ELISA キット測定した。

c. a 及び b の Vpr 機能を阻害する因子の同定
海洋バイオテクノロジー研究所との共同研究として進める。同研究所が有する 5 万種類の海洋微生物の抽出エキスをソースとして、Vpr 機能を阻害する化合物を同定する。Vpr のアミノ酸 60-80 をカバーする領域のペプチド (以下 LR-20) は Vpr と結合することを見出している。また、LR-20 は Vpr 機能に対して抑制的に作用することを予備的な知見として見出している。そこで LR-20 と Vpr の結合をモニターするシステムを立ち上げる。即ち、ビオチン化した LR-20 を合成し、精製 Vpr を個相化した後、LR-20 を作用させる。洗浄後、ペルオキシダーゼを結合したストレプトアビジンを作用させ、発色させることにより、結合性を検出した。ここに海洋エキスを添加し、二者の結合を阻害する化合物をスクリーニングした。

d. 体液中に存在する Vpr 測定システムの確立
Vpr に対する単クローン抗体と家兎抗血清を用いて、ELISA を立ち上げるための基礎検討を行ってきた。これまでに作成した ELISA キットを用いることによって、標準サンプルや精製した Vpr の測定は可能であったが、健常人血漿中に交叉抗原が存在するために、患者検体についての測定ができなかった。そこで、今回、C 末端に相当するペプチドに対する単クローン抗体を作成し ELISA システムの再度立ち上げの試みを開始した。

倫理面への配慮 : PBMC の採取にあたり、供血者から実験への同意を得、さらに、検体の個人情報への守秘管理は徹底した。なお、本検体の HIV 以外の遺伝子解析は行っていない。

C. 研究結果

a. Vpr の単球/マクロファージ系細胞へのウイルス感染における役割の解明
静止期 PBMC ではほとんどの細胞が G1 期に

停止していた。まず、R⁺ウイルスを感染させたところ細胞株に比べ侵入効率が 100 倍以上劣るが、PHA で活性化した PBMC においては感染して 48 時間後にはウイルス DNA の 35% はインテグレーションしていた(結果示さず)。一方、静止期 PBMC 内 (PHA 非添加群) における逆転写反応は、Full-length DNA までの合成効率が活性化された細胞に比し劣るが、感染 48 時間後にはウイルス DNA の 21% はインテグレーションしていた (結果示さず)。すなわち、野生株ではインテグレーション効率はさほど阻害されない。このような条件下で R⁺と R⁻ウイルスのインテグレーション効率を比較した。いずれの DNA 量も活性化細胞では両者でその割合に差異はないが、非活性状態を維持した静止期細胞培養系では Vpr 欠失ウイルスのインテグレーション効率が著しく阻害されていた (小柳教授分担分)。

このようなシステムを培養細胞で行うことを試みた。即ちヒト白血病細胞株である THP-1 をフォルボールエステルである PMA で処理すると付着し、マクロファージのマーカーである MAC1 陽性を示すようになる。この際、BrdU の取込みで解析すると、DNA 合成を示す細胞は全体の 1% 以下であった。このような細胞に上記ウイルスを感染させ、ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果 pNL-Luc-E⁺R⁺ と pNL-Luc-E⁻R⁻ の間に著しい活性の差が認められ、pNL-Luc-E⁻R⁻ では pNL-Luc-E⁺R⁺ ウイルスの 5 分の 1 以下の活性であった。現在、インテグレーションされた DNA を測定することを試みている (石坂分)。

b. 潜伏感染細胞からのウイルス産生誘導の解明

精製 Vpr を U1 細胞に添加するとウイルス産生が誘導されるとの報告がある。そこで、精製 Vpr を U1 細胞に様々な濃度で添加し、2 日後の培養上清中の p24 を測定した。その結果、数 ug/ml から数 ng/ml までの Vpr を添加しても全くウイルスの産生は検出されなかった。一方 TNF- α を ng/ml オーダーで添加すると大量のウイルスが産生された。

そこで、健常人の PBMC と U1 の共培養の系に Vpr を添加するとウイルス産生が検出された。さらに PBMC にまず Vpr を作用させた 2 日後の培養上清を U1 細胞に添加するとウイルス産生が誘導されることが分かった (石坂分)。

c. Vpr 機能を阻害する因子の同定

海洋微生物抽出エキス約 6000 種類のスクリー

ニングを行った。そのうち PBMC から Vpr により誘導されるウイルス産生活性因子の産生を抑制する検体が同定された。今後、この検体中の阻害因子を精製し、構造を決定する (足立分担研究者及び石坂分)。

d. 体液中に存在する Vpr 測定システムの確立

Vpr の C 末ペプチドを抗原としてマウス単クローン抗体の作成を試みた。2つのクローンが得られた。それぞれの精製抗体を調整し、反応性を解析した。その結果、クローン 1H4 では Vpr を免疫沈降することは可能であったが、ウエスタン解析に使用することはできなかった。このことは、このクローンがネイティブな Vpr を認識する抗体であることを意味する (前田分担研究者及び石坂分)。

D. 考察

a. Vpr の単球/マクロファージ系細胞へのウイルス感染における役割の解明

ウイルス前期過程、特にインテグレーションの過程において Vpr 蛋白質が静止期の細胞におけるインテグレーションの成立に必要なことが強く示唆された。

また、THP-1/PMA の細胞を用いて、Vpr 依存的に感染効率が誘導された。非分裂細胞と分裂細胞間でのウイルス感染効率の違いがどのような因子によっているか、またこの因子が Vpr により、どのように修飾を受けているかを明らかにすることは静止細胞へのウイルス感染における Vpr の意義と抗 Vpr 因子の探索を行う上ではきわめて重要であると思われる。

ウイルス DNA の核内移行からインテグレーション前までの過程では、細胞周期に左右されないメカニズムがあることがこれまで小柳らの結果から示唆されている (Suzuki unpublished)。今回の小柳教授の解析により、インテグレーションの過程には細胞周期の影響 (おそらく染色体の状態) がきわめて大きいことがわかった。これまでの種々の解析からウイルス増殖のメカニズムについて多くの新しい知見が得られてきたが、いまだ完全ではない。侵入過程はコレセプターの発見から、逆転写の過程はその酵素の結晶構造解析と阻害剤の開発から、分子機構はかなり明らかになってきている。しかし、特に実際のウイルス感染細胞内におけるインテグレーションの過程についての解明は遅れている。これまで特に正常細胞を使った細胞内における定量的把握はほとんどなされていなかった。また、この方法により、実際の感染者、特に ART 療法中のエイズ患者の染色体にインテグレーションしたウイルス DNA 量が把

握できるようになり、予後や治療方法への指標など検討すべきことは多い。

b. 潜伏感染細胞からのウイルス産生誘導の解明

報告されているような U1 細胞からの Vpr によるウイルス産生は認められなかった。代わりに PBMC に Vpr が作用して、何らかの因子が産生され、これが、U1 細胞を刺激してウイルス産生を誘導する機序が考えられた。

b. これら機能を阻害する因子の同定
海洋エキスからの抗 Vpr 因子探索を行った。一年間に 5000 検体ずつのスクリーニングが進む予定である。今回同定された検体を構造決定まで解析を進めたいと考えている。

c. 体液中に存在する Vpr 測定システムの確立本

今回得られた単クローン抗体はネイティブフォームの Vpr を認識することが考えられる。これまで、健常人血液中に交叉する抗原があるために、スクリーニングを行うことができなかったが、今回得られたクローンをを用いたサンドイッチシステムにより、測定可能になるものと期待される。まず、健常人の血液検体についての基礎情報を収集し、ついで患者検体について解析する予定である。

E. 結語

ウイルス DNA の染色体へのインテグレーションの過程に Vpr 蛋白質が関与することがわかった。どのような機序で静止細胞へのインテグレーションを可能にするのかは重要課題であり、現在解析を進めている。

一方、潜伏感染細胞からのウイルス産生誘導に関する Vpr 機能について、これまでの報告とは異なる機序を示唆する結果が得られた。合わせて解析を進める。

健康危険情報

感染実験、ウイルスの保管は各研究機関の定める感染微生物取り扱い安全管理委員会、組換え DNA 委員会の規定に基づき行われている。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Taguchi T., Shimura M., Osawa Y., Suzuki Y., Mizoguchi I., Niino K., Takaku F., and Ishizaka Y. Nuclear trafficking of macromolecules by an oligopeptide derived from Vpr of human immunodeficiency virus type-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320, 18-26, 2004.
2. Uchida, S., Kuma, A., Ohtsubo, M., Shimura, M., Hirata, M., Nakagama, H., Matsunaga, T., Ishizaka, Y., Yamashita, K. Binding of 14-3-3b but not 14-3-3s controls the cytoplasmic localization of CDC25B: binding site preferences of 14-3-3 subtypes and the subcellular localization of CDC25B. *J. Cell Sci.*, 3011-3020, 2004.
3. Shimura, M., et al. Element array after CDDP treatment by scanning x-ray fluorescence microscopy. Submitted.
4. Feng, J., Misu, T., Fujihara, K., Misawa, N., Koyanagi, Y., Shiga, Y., Takeda, A., Sato, S., Takase, S., Kohnosu, T., Saito, H., and Itoyama, Y. Th1/Th2 balance and HTLV-I proviral load in HAM/TSP patients treated with interferon- α . *J. Neuroimmunol.* 51, 189-194 (2004).
5. Ebina, H., Aoki, J., Hatta, S., Yoshida, T., and Koyanagi, Y. Role of Nup98 in nuclear entry of human immunodeficiency virus type 1 cDNA. *Microbes & Infection* 6, 715-724 (2004).
6. Maeda, K., Nakata, H., Koh, Y., Miyakawa, T., Ogata, H., Takaoka, Y., Shibayama, S., Sagawa, K., Fukushima, D., Moravek, J., Koyanagi, Y., and Mitsuya, H. Spirodiketopiperazine-based CCR5 inhibitor which preserves CC-Chemokine/CCR5 interactions and exerts potent activity against R5 human immunodeficiency virus type 1 in vitro. *J. Virol.* 78, 8654-8662 (2004).
7. Kawano, Y., Yoshida, T., Hieda, K., Aoki,

- J., Miyoshi, H., and Koyanagi, Y. A lentiviral cDNA library employing lambda recombination used to clone an inhibitor of human immunodeficiency virus type 1-induced cell death. *J. Virol.* 78, 11352-11359 (2004).
8. Kamada, M., Li, R.Y., Hashimoto, M., Kakuda, M., Okada, H., Koyanagi, Y., Ishizuka, T., and Yawo, H. Intrinsic and spontaneous neurogenesis in the postnatal slice culture of rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 20: 2499-2508 (2004).
9. Nakata, H., Maeda, K., Miyakawa, T., Shibayama, S., Matsuo, M., Takaoka, Y., Ito, M., Koyanagi, Y., and Mitsuya, H. Potent Anti-R5-human immunodeficiency virus type 1 effects of a CCR5 antagonist, AK602/ONO4128/GW873140, in a novel human peripheral blood mononuclear cell nonobese diabetic-SCID, interleukin 2 receptor γ -chain-knocked-out AIDS mouse model. *J. Virol.*, 79, 2087-2096 (2005).
10. Miura, Y., and Koyanagi, Y. Death ligand-mediated apoptosis in HIV infection. *Rev Med Virol*, in press.
11. Matsuura-Sawada, R., Murakami, T., Ozawa, Y., Nabeshima, H., Akahira, J., Sato, Y., Koyanagi, Y., Ito, M., Terada, Y., and Okamura, K. Reproduction of menstrual changes in transplanted human endometrial tissue. *Human Reproduction*, in press.
2. 学会発表
- ① Kawano, Y., Yoshida, T., Hieda, K., Aoki, J., and Koyanagi, Y. A cDNA library-expressing lentivirus vector system to identify inhibitor gene for human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-induced cell death. *Retroviruses Meeting*, Cold Spring Harbor, New York (2004).
- ② Aoki, J., and Koyanagi, Y. Stable inhibition of CXCR4 with siRNA-expressing lentivirus vector. *Retroviruses Meeting*, Cold Spring Harbor, New York (2004).
- ③ 芳田剛、河野祐治、稗田訓子、青木淳、三浦義治、小柳義夫. cDNA ライブラリ発現レンチウイルスベクターによる HIV 抑制因子の単離 第 52 回日本ウイルス学会、横浜 (2004).
- ④ 稗田訓子、芳田剛、青木淳、三浦義治、河野祐治、田中勇悦、小柳義夫. 生細胞における HIV コレセプター分子の解析. 第 52 回日本ウイルス学会、横浜 (2004).
- ⑤ 三浦義治、小柳義夫. エイズ脳症で起こる神経細胞死には TRAIL 分子が関与する. 第 52 回日本ウイルス学会、横浜、2004.
- ⑥ 岡田広司 三浦義治 川口寧 西山幸廣 小柳義夫. 中枢神経組織スライス培養系を用いた単純ヘルペスウイルス 1 型の感染様式の解析. 第 52 回日本ウイルス学会、横浜 (2004).
- ⑦ Koyanagi, Y., Aoki, J., Yoshida, T., and Ebina, H. Role of Nup98 in nuclear entry of human immunodeficiency virus type 1 cDNA. 第 18 回日本エイズ学会、静岡 (2004).
- ⑧ Koyanagi, Y., Kawano, Y., Yoshida, T., and Aoki, J. A cDNA library-expressing lentivirus vector system used to clone an inhibitor for HIV-1-induced cell death. 第 18 回日本エイズ学会、静岡 (2004).
- ⑨ 青木淳, 蝦名博貴, 小柳義夫. HIV 増殖関連細胞因子の siRNA 発現レンチウイルスベクターによる解析. 第 27 回日本分子生物学会、神戸 (2004).
- ⑩ 芳田剛、稗田訓子、河野祐治、青木淳、小柳義夫. ゲートウェイ法による効率的 cDNA ライブラリの組換え反応を利用した発現レ

ンチウイルスベクター： HIV 抵抗性遺伝子の単離. 第 27 回日本分子生物学会、神戸 (2004).	なし
	2. 実用新案登録
	なし
	3. その他
G. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む。)	なし
1. 特許取得状況	