

TABLE 2. Drug resistance levels associated with NRTI resistance mutations as determined using X4-MaRBLE cells infected with HIV-1 clones

Agent	IC ₅₀ (nM) ± SD (change, <i>n</i> -fold) ^a for:					
	Wild type	M41L/T215Y	M184V	M41L/M184V/T215Y	D67N/K70R	M41L/D67N/K70R/T215Y
Zidovudine	0.8 ± 0.4	10.6 ± 6.9 ^c (12.5 ± 1.9)	0.4 ± 0.1 (0.5 ± 0.01)	1.9 ± 1.0 ^b (3.5 ± 0.5)	4.6 ± 1.0 ^c (4.6 ± 1.2)	54.0 ± 32.3 ^{c,d,e} (48.1 ± 16.0)
Didanosine	2,097.7 ± 1,101.4	2,899.8 ± 1,627.9 (1.4 ± 0.4)	2,164.6 ± 1,019.8 (1.3 ± 0.2)	2,893.7 ± 1,519.0 (2.1 ± 0.8)	3,754.2 ± 1,468.3 (1.4 ± 0.3)	5,082.9 ± 2,397.5 ^b (1.8 ± 0.5)
Zalcitabine	2.5 ± 1.1	3.8 ± 3.3 (1.5 ± 0.8)	3.4 ± 0.6 (1.3 ± 0.4)	3.9 ± 2.0 (2.2 ± 0.8)	3.0 ± 0.8 (1.2 ± 0.3)	3.5 ± 2.3 (1.2 ± 0.6)
Lamivudine	8.7 ± 4.5	20.9 ± 14.5 ^c (3.8 ± 3.2)	>5,000 ^c (>533.7)	>5,000 ^c (>1,339.3)	17.8 ± 6.9 ^b (2.4 ± 1.3)	44.3 ± 27.7 ^c (6.8 ± 7.4)
Stavudine	14.4 ± 5.2	29.9 ± 14.0 ^b (2.2 ± 0.4)	17.5 ± 7.6 (0.9 ± 0.3)	40.7 ± 23.8 ^c (2.9 ± 1.1)	31.3 ± 24.9 (2.3 ± 1.7)	50.3 ± 24.2 ^c (3.8 ± 1.6)
Abacavir	348.7 ± 122.8	985.5 ± 306.3 ^c (3.2 ± 1.1)	1,497.5 ± 589.4 ^c (3.9 ± 1.2)	3,300.0 ± 1,986.9 ^{c,d} (10.6 ± 3.1)	836.2 ± 522.5 ^b (2.1 ± 0.7)	2,015.1 ± 842.8 ^{c,d} (5.2 ± 0.9)

^a Change (*n*-fold) = (observed IC₅₀ for strain)/(IC₅₀ for wild type).

^b *P*, <0.05 for comparison with wild-type virus.

^c *P*, <0.005 for comparison with wild-type virus.

^d *P*, <0.05 for comparison with M41L/T215Y virus.

^e *P*, <0.05 for comparison with D67N/K70R virus.

vir. The patient in case 2 had been heavily treated with anti-retroviral agents, and isolate 2 had a high accumulation of NRTI and PI resistance mutations but no NNRTI resistance mutation. This isolate had six TAMs and an M184V mutation in the RT region and demonstrated resistance to zidovudine (change, 32.9-fold) and lamivudine (change, >380.7-fold) but not to efavirenz. As for the protease region, 11 mutations were detected, including three major mutations (M46I, V82F, and L90M). Of these 11 mutations, 10 matched known lopinavir resistance mutations (International AIDS Society—USA drug resistance chart) (20). Indeed, high resistance to lopinavir (change, >76.5-fold) was observed.

Isolate 3 had 6 TAMs (M41L, E44D, D67N, V118I, L210W, and T215Y), and a high level of resistance to zidovudine (change, 114.5-fold) was observed. As the virus in this isolate had all four known NRTI resistance mutations responsible for hypersusceptibility to NNRTIs, it was hypersusceptible to efavirenz (change, 0.2-fold). Efavirenz hypersusceptibility was defined as a change in resistance of <0.4-fold compared to that of the wild type by statistical analysis (mean value minus 2 SD) and by data from a previous report (4). Isolate 4 had accumulated five TAMs and demonstrated 191.7-fold-higher resistance to zidovudine. No lamivudine resistance and NNRTI resistance mutations were observed, and the virus was susceptible to lamivudine. Isolate 4 also had M41L, V118I, L210W, and T215Y mutations, and the virus demonstrated hypersusceptibility to efavirenz (change, 0.2-fold). Two major mutations, D30N and L90M, and eight secondary mutations in the protease region were observed. Of these eight secondary mutations, five matched lopinavir resistance mutations, with our assay indicating a 9.4-fold increase in resistance to lopinavir. Isolate 5 had an RT inhibitor resistance pattern similar to that of isolate 2, having accumulated six TAMs and the M184V lamivudine resistance mutation in RT and demonstrating 104.1-fold-higher resistance to zidovudine and >380.7-fold-higher resistance to lamivudine. This virus also had M41L, V118I, L210W, and T215Y mutations. Though this virus appeared to be slightly more susceptible to efavirenz (change, 0.6-fold), this effect was not statistically significant. Isolate 5 had accumulated 11 lopinavir resistance mutations in the protease region and demonstrated 75.5-fold-higher resistance to lopinavir in our assay.

Isolate 6 had accumulated six TAMs in RT and showed 224.0-fold-higher resistance to zidovudine. This isolate had E44D and V118I mutations (low-level-lamivudine-resistance mutations) and showed 6.7-fold-higher resistance to lamivudine. Similar to those in cases 3 to 5, the virus in case 6 had M41L, V118I, L210W, and T215Y mutations and demonstrated slight hypersusceptibility to efavirenz (change, 0.4-fold). As for the protease region, isolate 6 had three major mutations, M46I, I84V, and L90M, and six minor resistance mutations. Of these nine mutations, eight were listed as lopinavir resistance mutations, and intermediate-level resistance to lopinavir (change, 14.6-fold) was observed. Isolate 7R had K103N and showed high-level resistance to efavirenz (change, 66.8-fold). No other drug resistance mutations in the RT region were found, and thus the isolate was susceptible to zidovudine and lamivudine. The protease region did show two minor mutations, L63C and V77I, and the isolate was susceptible to lopinavir.

TABLE 3. Drug resistance levels associated with NNRTI resistance mutations as determined using X4-MaRBLE cells infected with HIV-1 clones

Agent	IC ₅₀ (nM) ± SD (change, <i>n</i> -fold) ^a for:		
	Wild type	K103N	Y181C
Nevirapine	206.3 ± 68.2	16,110.7 ± 6,445.7 ^b (78.6 ± 19.7)	9,586.3 ± 6,396.4 ^c (47.5 ± 23.8)
Efavirenz	1.4 ± 0.4	79.3 ± 33.3 ^b (54.7 ± 15.6)	2.3 ± 0.6 ^c (1.5 ± 0.1)

^a Change (*n*-fold) = (observed IC₅₀ for strain)/(IC₅₀ for wild type).

^b *P*, <0.005 for comparison with wild-type virus.

^c *P*, <0.05 for comparison with wild-type virus.

Thus, the increases observed in levels of resistance to zidovudine and lopinavir were associated with the accumulation of known resistance mutations associated with those drugs. Similarly, hypersusceptibility to efavirenz was associated with the accumulation of M41L, V118I, L210W, and T215Y mutations in four out of six clinical isolates (30). Taken together, these results confirm the reliability of using X4- and R5-MaRBLE cells in drug resistance phenotyping.

DISCUSSION

The development of reliable methodologies to evaluate drug susceptibility *in vitro* has been a major thrust of drug resistance research. Although several phenotypic assays are commercially available for clinical usage, they are expensive and may not be readily available either in developing or developed countries. As for use in research laboratories, these commercial assays target only the protease and reverse transcriptase gene regions of the HIV-1 genome, limiting their flexibility as a tool for basic research. Thus, there is still a need for easy-to-use assay systems with high reproducibility, for both clinical and research usage. To fill this gap, we drew a blueprint for a new type of reporter cell line by considering the advantages and drawbacks of several previously reported cell lines (12, 15, 17, 21, 24, 26, 31, 36). Based on this blueprint, we chose the T-cell-based cell line HPB-Ma (16, 29, 40) as the parent cell line to introduce reporter genes and to establish new reporter cell lines. HPB-Ma is a murine leukemia virus-transformed human T-cell line demonstrating high susceptibility to HIV-1, which can replicate efficiently in these host cells. As HPB-Ma cells naturally express CD4 and CXCR4, but not CCR5, we introduced the CCR5 expression gene to widen the susceptibility spectrum of the cell line to include R5-tropic viruses. The reporter protein chosen to measure HIV infectivity was FL, as it has a wider dynamic range than other known reporter candidates.

Another type of luciferase, RL, was introduced as a marker of cell number and viability.

Finally, two types of new reporter cell lines were established, X4-MaRBLE and R5-MaRBLE. As expected, these new cell lines had several advantages over previously described cell lines. First, viruses efficiently propagated in these cell lines, making multiple-round replication assays possible. In addition, viruses could be isolated from patient plasma and PBMC by using the cell lines. Since other reporter cells may not allow replication-competent viruses to be efficiently produced, their use is largely limited to single-cycle replication assays. These assays are currently accepted as the major method for measuring viral infectivity due to their rapid readout of results. However, single-cycle replication assays cannot evaluate the postintegration late phase of the viral life cycle. To evaluate late-phase inhibitors, such as PIs, by using single-cycle replication assays, an additional step is required prior to the assay to produce viruses under test drug pressure. On the other hand, multiple-round replication assays allow late-phase inhibitors to be directly evaluated, just as early-phase inhibitors, without additional culture. Furthermore, multiple-round replication assays allow for a clearer readout of drug susceptibility, as the differences in drug susceptibilities between the reference and test viruses may be amplified by each round of replication.

Second, the cell lines were successfully transfected with RL to broaden their application. The constitutive expression of this second luciferase in the cell line has made it possible to easily and accurately evaluate cell number and the cytotoxicities of test compounds. As we planned to conduct multiple rounds of assays, the cells were cultured for at least a week, long enough for them to propagate and increase the background level of FL. The extent of this increase depended on the amount of viral inocula or the level of inhibition by antiretroviral agents. By monitoring RL activity,

TABLE 4. Drug resistance levels of PI-resistant mutants analyzed using HIV-1-infected X4-MaRBLE cells

Agent	IC ₅₀ (nM) ± SD (change, <i>n</i> -fold) ^a for:			
	Wild type	M46I	V82T	L90M
Indinavir	11.3 ± 4.3	19.5 ± 17.0 (2.2 ± 2.7)	38.0 ± 6.8 ^b (3.8 ± 1.6)	11.5 ± 1.5 (1.1 ± 0.3)
Saquinavir	7.4 ± 3.4	5.0 ± 2.4 (0.7 ± 0.3)	6.5 ± 1.3 (1.0 ± 0.4)	6.9 ± 1.1 (1.0 ± 0.4)
Nelfinavir	4.9 ± 2.3	7.4 ± 5.3 (1.9 ± 1.5)	20.0 ± 5.5 ^b (5.4 ± 3.7)	11.5 ± 0.7 ^d (3.3 ± 2.2)
Amprenavir	6.7 ± 3.1	9.7 ± 5.4 (2.0 ± 2.0)	17.2 ± 5.2 ^c (2.9 ± 1.0)	10.7 ± 2.1 (2.0 ± 1.3)
Lopinavir	6.6 ± 3.8	6.3 ± 2.9 (1.1 ± 0.7)	29.1 ± 9.0 ^c (5.0 ± 1.8)	5.6 ± 0.9 (1.1 ± 0.7)

^a Change (*n*-fold) = (observed IC₅₀ for strain)/(IC₅₀ for wild type).

^b *P*, <0.005 for comparison with wild-type virus.

^c *P*, <0.05 for comparison with wild-type virus.

^d *P*, <0.01 for comparison with wild-type virus.

TABLE 5. Susceptibilities of seven patient-derived viral isolates to representative drugs assayed using R5-MaRBLE cells

Strain or isolate (subtype)	Tropism ^b	RT mutation(s)	Protease mutation(s)	IC ₅₀ (nM) ± SD (change, <i>n</i> -fold) of:			
				Zidovudine	Lamivudine	Efavirenz	Lopinavir
JRCSF (B)	R5	None	L63P	1.4 ± 0.6 (1)	13.6 ± 4.6 (1)	0.9 ± 0.1 (1)	19.3 ± 8.4 (1)
1 (B)	R5	None	L63P/T, A71A/V, V77I	1.2 (0.7)	4.2 (0.3)	1.5 (1.8)	6.8 (0.5)
2 (B)	X4, R5	M41L, D67N, K70R, K101Q, M184V, L210L/W, T215F, K219Q	L10I, L33F, M46I, F53L, I54V, L63P, A71V, G73S/T, V77I, V82F, L90M	56.1 (32.9)	>5,000 (>380.7)	1.1 (1.3)	>1,000 (>76.5)
3 (F)	X4, R5	M41L, E44E/D, D67N, K101K/E, V118I, L210W, T215Y	K20T, D30N, M36I, M46M/L, L63P, A71V, N88D	195.1 (114.5)	34.5 (2.6)	0.1 (0.2)	ND ^c (ND)
4 (B)	X4, R5	M41L, E44A, D67N, V118I, L210W, T215Y	L10V, K20T, D30N, M36I, I54V, L63T, A71V, V77V/I, N88D, L90M	326.5 (191.7)	13.5 (1.0)	0.2 (0.2)	123.4 (9.4)
5 (B)	X4, R5	M41L, E44D, D67N, V118I, M184V, L210W, T215Y	L10V, K20R, V32I, M36I, M46L, F53F/L, I54V, L63P, A71V, V82A, L90M	177.4 (104.1)	>5,000 (>380.7)	0.5 (0.6)	986.8 (75.5)
6 (F)	R5	M41L, E44D, D67N, V118I, L210W, T215Y	L10I, K20T, M36I, M46I, F53L, L63L/I/T/P, A71V, I84V, L90M	381.7 (224.0)	88.0 (6.7)	0.3 (0.4)	190.6 (14.6)
7R ^a (B)	X4	K103N	L63C, V77I	2.1 (1.5)	22.3 (1.6)	60.2 (66.8)	7.6 (0.4)

^a Recombinant HXB2 with patient-derived protease and RT sequences.

^b The tropism of each virus was determined by using X4-GHOST and R5-GHOST cells.

^c ND, not determined.

we could easily evaluate culture conditions and their effects on assay results.

These two characteristics confer a great advantage to using the MaRBLE cell lines for screening new antiretroviral agents. They allow both early- and late-phase inhibitor candidates to be evaluated under the same protocol, as the assay permits multiple viral replications. Moreover, monitoring of RL activity allows false-positive results (inhibition by test drugs due to cytotoxicity) to be detected and eliminated. Finally, the use of RL activity greatly improved the efficacy of screening.

The MaRBLE cell lines stably expressed the transfected genes, as confirmed by the stable expression of CD4, CXCR4, and CCR5 on the surfaces of cells maintained in culture for up to 6 months with continuous passage. We also confirmed that the two reporter genes were stably expressed and that IC₅₀s were identical for both newly plated and 6-month-old cultures (data not shown).

In conclusion, we successfully established two unique cell lines, X4-MaRBLE and R5-MaRBLE, which are useful for assaying viral drug resistance and for screening new antiretroviral compounds. Although the cost of phenotypic assays using our cell lines may be less than that of commercial systems, the assays require a biosafety level 3 laboratory, general culture equipment, and a luminometer for readout. Since these are all expensive items, the assay price should be reduced and the assay protocol should be simplified for wider usage of the assay.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Hiroshi Yoshikura, Mari Takizawa, and Mitsuo Honda for their help and discussions. We also thank Claire Baldwin for her help in preparing the manuscript.

This study was supported by a grant from the Human Sciences Foundation and the Program for Promotion of Fundamental Studies

in Health Sciences of the National Institute of Biomedical Innovation (NIBIO).

REFERENCES

- Ait-Khaled, M., A. Rakik, P. Griffin, A. Cutrell, M. A. Fischl, N. Clumeck, S. B. Greenberg, R. Rubio, B. S. Peters, F. Pulido, J. Gould, G. Pearce, W. Spreen, M. Tisdale, and S. Lafon. 2002. Mutations in HIV-1 reverse transcriptase during therapy with abacavir, lamivudine and zidovudine in HIV-1-infected adults with no prior antiretroviral therapy. *Antivir. Ther.* 7:43–51.
- Baxter, J. D., D. L. Mayers, D. N. Wentworth, J. D. Neaton, M. L. Hoover, M. A. Winters, S. B. Mannheimer, M. A. Thompson, D. I. Abrams, B. J. Brizz, J. P. Ioannidis, T. C. Merigan, et al. 2000. A randomized study of antiretroviral management based on plasma genotypic antiretroviral resistance testing in patients failing therapy. *AIDS* 14:F83–93.
- Bento, F. M., D. Takeshita, C. B. Sacramento, T. R. Machado, M. B. Mathor, A. K. Carmona, and S. W. Han. 2004. Over expression of the selectable marker blasticidin S deaminase gene is toxic to human keratinocytes and murine BALB/MK cells. *BMC Biotechnol.* 4:29.
- Bosch, R. J., G. F. Downey, D. A. Katzenstein, N. Hellmann, L. Bachelier, and M. A. Albrecht. 2003. Evaluation of cutpoints for phenotypic hypersusceptibility to efavirenz. *AIDS* 17:2395–2396.
- Cingolani, A., A. Antinori, M. G. Rizzo, R. Murri, A. Ammassari, F. Baldini, S. Di Giambenedetto, R. Cauda, and A. De Luca. 2002. Usefulness of monitoring HIV drug resistance and adherence in individuals failing highly active antiretroviral therapy: a randomized study (ARGENTA). *AIDS* 16:369–379.
- Clevenbergh, P., J. Durant, P. Halfon, P. del Giudice, V. Mondain, N. Montagne, J. M. Schapiro, C. A. Boucher, and P. Dellamonica. 2000. Persisting long-term benefit of genotype-guided treatment for HIV-infected patients failing HAART. The Viradap Study: week 48 follow-up. *Antivir. Ther.* 5:65–70.
- Cohen, C. J., S. Hunt, M. Sension, C. Farthing, M. Conant, S. Jacobson, J. Nadler, W. Verbiest, K. Hertogs, M. Ames, A. R. Rinehart, and N. M. Graham. 2002. A randomized trial assessing the impact of phenotypic resistance testing on antiretroviral therapy. *AIDS* 16:579–588.
- Condra, J. H., W. A. Schleif, O. M. Blahy, L. J. Gabrylski, D. J. Graham, J. C. Quintero, A. Rhodes, H. L. Robbins, E. Roth, M. Shivaprakash, D. Titus, T. Yang, H. Tepler, K. E. Squires, P. J. Deutsch, and E. A. Emini. 1995. In vivo emergence of HIV-1 variants resistant to multiple protease inhibitors. *Nature* 374:569–571.
- Durant, J., P. Clevenbergh, P. Halfon, P. Delgiudice, S. Porsin, P. Simonet, N. Montagne, C. A. Boucher, J. M. Schapiro, and P. Dellamonica. 1999. Drug-resistance genotyping in HIV-1 therapy: the VIRADAPT randomised controlled trial. *Lancet* 353:2195–2199.
- Eshleman, S. H., G. Crutcher, O. Petrauskene, K. Kunstman, S. P. Cunningham, C. Trevino, C. Davis, J. Kennedy, J. Fairman, B. Foley, and J. Kop. 2005. Sensitivity and specificity of the ViroSeq human immunodeficiency

- ciency virus type 1 (HIV-1) genotyping system for detection of HIV-1 drug resistance mutations by use of an ABI PRISM 3100 genetic analyzer. *J. Clin. Microbiol.* 43:813–817.
11. Fumero, E., and D. Podzamczar. 2003. New patterns of HIV-1 resistance during HAART. *Clin. Microbiol. Infect.* 9:1077–1084.
 12. Gervaix, A., D. West, L. M. Leoni, D. D. Richman, F. Wong-Staal, and J. Corbeil. 1997. A new reporter cell line to monitor HIV infection and drug susceptibility in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4653–4658.
 13. Grant, R. M., D. R. Kuritzkes, V. A. Johnson, J. W. Mellors, J. L. Sullivan, R. Swanstrom, R. T. D'Aquila, M. Van Gorder, M. Holodniy, R. M. Lloyd Jr., C. Reid, G. F. Morgan, and D. L. Winslow. 2003. Accuracy of the TRUGENE HIV-1 genotyping kit. *J. Clin. Microbiol.* 41:1586–1593.
 14. Gu, Z., Q. Gao, X. Li, M. A. Parniak, and M. A. Wainberg. 1992. Novel mutation in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase gene that encodes cross-resistance to 2',3'-dideoxyinosine and 2',3'-dideoxycytidine. *J. Virol.* 66:7128–7135.
 15. Hachiya, A., S. Aizawa-Matsuoka, M. Tanaka, Y. Takahashi, S. Ida, H. Gatanaga, Y. Hirabayashi, A. Kojima, M. Tsumi, and S. Oka. 2001. Rapid and simple phenotypic assay for drug susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 using CCR5-expressing HeLa/CD4(+) cell clone 1–10 (MAGIC-5). *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:495–501.
 16. Hartley, J. W., and W. P. Rowe. 1976. Naturally occurring murine leukemia viruses in wild mice: characterization of a new "amphotropic" class. *J. Virol.* 19:19–25.
 17. Hertogs, K., M. P. de Bethune, V. Miller, T. Ivens, P. Schel, A. Van Cauwenberge, C. Van Den Eynde, V. Van Gerwen, H. Azijn, M. Van Houtte, F. Peeters, S. Staszewski, M. Conant, S. Bloor, S. Kemp, B. Larder, and R. Pauwels. 1998. A rapid method for simultaneous detection of phenotypic resistance to inhibitors of protease and reverse transcriptase in recombinant human immunodeficiency virus type 1 isolates from patients treated with antiretroviral drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:269–276.
 18. Hollinger, F. B., J. W. Bremer, L. E. Myers, J. W. Gold, L. McQuay, and the NIH/NIAD/DAIDS/ACTG Virology Laboratories. 1992. Standardization of sensitive human immunodeficiency virus coculture procedures and establishment of a multicenter quality assurance program for the AIDS Clinical Trials Group. *J. Clin. Microbiol.* 30:1787–1794.
 19. Imamichi, T. 2004. Action of anti-HIV drugs and resistance: reverse transcriptase inhibitors and protease inhibitors. *Curr. Pharm. Des.* 10:4039–4053.
 20. Johnson, V. A., F. Brun-Vezinet, B. Clotet, B. Conway, D. R. Kuritzkes, D. Pillay, J. M. Schapiro, A. Telenti, and D. D. Richman. 2005. Update of the drug resistance mutations in HIV-1: fall 2005. *Top. HIV Med.* 13:125–131.
 21. Kimpton, J., and M. Emerman. 1992. Detection of replication-competent and pseudotyped human immunodeficiency virus with a sensitive cell line on the basis of activation of an integrated beta-galactosidase gene. *J. Virol.* 66:2232–2239.
 22. Larder, B. A., S. D. Kemp, and P. R. Harrigan. 1995. Potential mechanism for sustained antiretroviral efficacy of AZT-3TC combination therapy. *Science* 269:696–699.
 23. Larder, B. A., A. Kohli, P. Kellam, S. D. Kemp, M. Kronick, and R. D. Henfrey. 1993. Quantitative detection of HIV-1 drug resistance mutations by automated DNA sequencing. *Nature* 365:671–673.
 24. Miyake, H., Y. Iizawa, and M. Baba. 2003. Novel reporter T-cell line highly susceptible to both CCR5- and CXCR4-using human immunodeficiency virus type 1 and its application to drug susceptibility tests. *J. Clin. Microbiol.* 41:2515–2521.
 25. Myint, L., M. Matsuda, Z. Matsuda, Y. Yokomaku, T. Chiba, A. Okano, K. Yamada, and W. Sugiura. 2004. Gag non-cleavage site mutations contribute to full recovery of viral fitness in protease inhibitor-resistant human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:444–452.
 26. Petropoulos, C. J., N. T. Parkin, K. L. Limoli, Y. S. Lie, T. Wrin, W. Huang, H. Tian, D. Smith, G. A. Winslow, D. J. Capon, and J. M. Whitcomb. 2000. A novel phenotypic drug susceptibility assay for human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:920–928.
 27. Reed, L., and H. Muench. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoint. *Am. J. Hyg.* 27:493–497.
 28. Sarkar, G., and S. S. Sommer. 1990. The "megaprimer" method of site-directed mutagenesis. *BioTechniques* 8:404–407.
 29. Shimizu, Y. K., R. H. Purcell, and H. Yoshikura. 1993. Correlation between the infectivity of hepatitis C virus in vivo and its infectivity in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6037–6041.
 30. Shulman, N. S., R. J. Bosch, J. W. Mellors, M. A. Albrecht, and D. A. Katzenstein. 2004. Genetic correlates of efavirenz hypersusceptibility. *AIDS* 18:1781–1785.
 31. Spenlehauser, C., C. A. Gordon, A. Trkola, and J. P. Moore. 2001. A luciferase-reporter gene-expressing T-cell line facilitates neutralization and drug-sensitivity assays that use either R5 or X4 strains of human immunodeficiency virus type 1. *Virology* 280:292–300.
 32. Sugden, B., K. Marsh, and J. Yates. 1985. A vector that replicates as a plasmid and can be efficiently selected in B-lymphoblasts transformed by Epstein-Barr virus. *Mol. Cell. Biol.* 5:410–413.
 33. Tisdale, M., S. D. Kemp, N. R. Parry, and B. A. Larder. 1993. Rapid in vitro selection of human immunodeficiency virus type 1 resistant to 3'-thiacytidine inhibitors due to a mutation in the YMDD region of reverse transcriptase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5653–5656.
 34. Tural, C., L. Ruiz, C. Holtzer, J. Schapiro, P. Viciano, J. Gonzalez, P. Domingo, C. Boucher, C. Rey-Joly, and B. Clotet. 2002. Clinical utility of HIV-1 genotyping and expert advice: the Havana trial. *AIDS* 16:209–218.
 35. Vandamme, A. M., F. Houyez, D. Banhegyi, B. Clotet, G. De Schrijver, K. A. De Smet, W. W. Hall, R. Harrigan, N. Hellmann, K. Hertogs, C. Holtzer, B. Larder, D. Pillay, E. Race, J. C. Schmit, R. Schuurman, E. Schulse, A. Sonnerborg, and V. Miller. 2001. Laboratory guidelines for the practical use of HIV drug resistance tests in patient follow-up. *Antivir. Ther.* 6:21–39.
 36. Vodros, D., C. Tscherning-Casper, L. Navea, D. Schols, E. De Clercq, and E. M. Fenyo. 2001. Quantitative evaluation of HIV-1 coreceptor use in the GHOST3 cell assay. *Virology* 291:1–11.
 37. Willey, R. L., R. Shibata, E. O. Freed, M. W. Cho, and M. A. Martin. 1996. Differential glycosylation, virion incorporation, and sensitivity to neutralizing antibodies of human immunodeficiency virus type 1 envelope produced from infected primary T-lymphocyte and macrophage cultures. *J. Virol.* 70:6431–6436.
 38. Wilson, J. W. 2003. Update on antiretroviral drug resistance testing: combining laboratory technology with patient care. *AIDS Read.* 13:25–30, 35–38.
 39. Winters, M. A., R. J. Bosch, M. A. Albrecht, and D. A. Katzenstein. 2003. Clinical impact of the M184V mutation on switching to didanosine or maintaining lamivudine treatment in nucleoside reverse-transcriptase inhibitor-experienced patients. *J. Infect. Dis.* 188:537–540.
 40. Yoshikura, H. 1989. Thermostability of human immunodeficiency virus (HIV-1) in a liquid matrix is far higher than that of an ecotropic murine leukemia virus. *Jpn. J. Cancer Res.* 80:1–5.

ウイルス感染制御における ncRNA の役割

西澤雅子, 柴田潤子, 杉浦 互

近年になり動物細胞においてウイルス感染の防御機構として宿主細胞の RNAi が作用することが明らかになった。興味深いことに、ウイルスはこの対抗手段として宿主細胞の RNAi を阻害するタンパク質を保有したり、miRNA をつくりだすことが明らかになった。さらにウイルスは宿主細胞由来の miRNA を利用して複製効率を上昇させるなど自身の複製を制御することも明らかになった。これらの知見はウイルスと宿主がどのように干渉しあいながら進化してきたかを考えるうえで興味深い。

キーワード ● ncRNA, miRNA, siRNA, 感染防御, 複製制御

はじめに

1998年にFireらによって報告されたRNA干渉(RNAi)は¹⁾、植物から動物にかけて広い生物種で保存されたmRNA転写後の遺伝子発現制御機構として知られている。RNAiは細胞内での20塩基前後の小さなnon-coding RNA(ncRNA)によって誘導され、植物や昆虫ではこれがウイルス感染に対する防御の一環として機能することが以前から報告されている²⁾³⁾。しかし哺乳類では外来性のRNAによってインターフェロン経路を介した非特異的なRNA分解が誘発されるため、感染防御としてのRNAiは機能しないと考えられていた⁴⁾。ところが2001年にTuschlらによって哺乳類細胞でもRNAiが誘導できることが示され⁵⁾、広く動物一般においてncRNAによるRNAiの本来の生理的意義が注目を集めるようになった。本稿ではncRNAとウイルス感染防御の関連についてウイルス側と宿主側の因子それぞれについて最新の知見を解説する。

1 ncRNAによる宿主細胞内でのウイルスの感染防御

細胞がウイルス感染防御のツールとしてncRNAを利用する証拠がいくつかのウイルスにおいて報告された。以下にウイルス由来ncRNAと宿主細胞由来ncRNAを利用したウイルス感染防御メカニズムについてそれぞれ紹介する。

① 水泡性口内炎ウイルス

(vesicular stomatitis virus : VSV)

WilkinsらのグループとSchottらのグループにおいてVSVの複製がRNAiによって抑制されることが明らかにされた⁶⁾⁷⁾。線虫ではRNAiにかかわる遺伝子群(*rde-1*, *rde-4*)がすでに同定されており⁸⁾⁹⁾、これらのRNAi関与因子を欠損した線虫細胞を利用して解析を行った結果、欠損細胞では野生型の細胞に比べてVSVの複製が増強した。これは線虫細胞内でRde-1, Rde-4およびDicerの働きによりVSVのRNAが切断されてsiRNAとなり、これが線虫細胞のRNAiを誘導してVSVの感染・複製を抑制したことを示唆する結

Involvements of ncRNA in viral replication controls

Masako Nishizawa/Junko Shibata/Wataru Sugiura : National Institute of Infectious Diseases (NIID), AIDS Research Center (ARC) (国立感染症研究所エイズ研究センター)

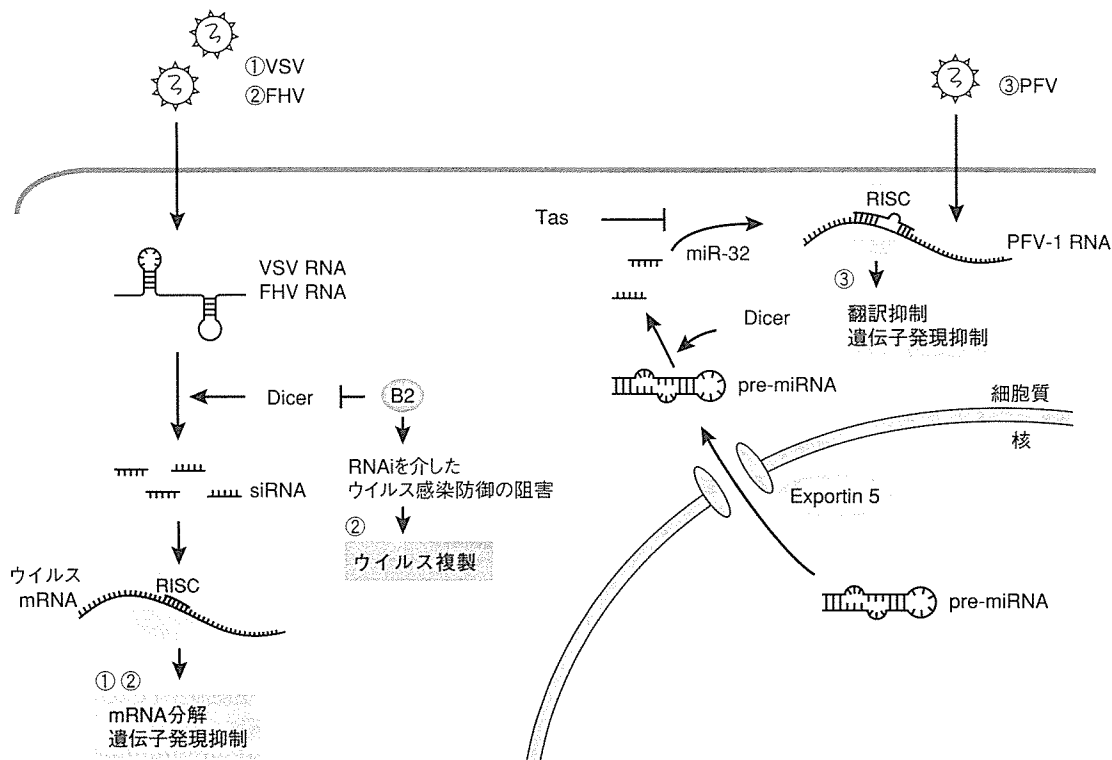


図1 ncRNAによる細胞内でのウイルス感染防御機構

①, ②: Dicerによって切断されたVSVあるいはFHVのRNAがsiRNAとして宿主細胞内のRNAiを誘導し, ウイルス感染が防御される. FHVのもつB2タンパク質は宿主細胞内のRNAiを阻害し細胞内でのウイルス複製を可能にする. ③: 宿主細胞がもつmiRNAの1つであるmiR-32がPFV-1のRNAに結合し, RNAiを介してウイルス複製を抑制する. PFV-1のもつTasタンパク質はmiRNAによるRNAiを阻害し細胞内でのウイルス複製を可能にする

果である. 実際, このVSV由来のsiRNAが線虫の野生型細胞内で蓄積していることが示された(図1①).

② 猫鼻気管炎ウイルス

(flock house virus : FHV)

Luらは線虫細胞におけるFHV感染でもVSVと同様にRNAiによる感染防御機構が働くことを示した¹⁰⁾. この報告ではFHVの感染によって線虫細胞のRNAiが働きFHVの複製が抑制されることが示された. 一方, siRNA特異的なRNAiの誘導に必須であるrde-1を欠損した細胞においてはFHVの複製が抑制されなかった. また, rde-1上流でsiRNA前駆体をターゲットとすることでRNAi阻害活性をもつB2タンパク質を欠損したFHVは野生型細胞での複製が抑制された. これらの結果から, 線虫細胞で観察されたFHVに対

する感染防御はsiRNAを介したRNAiによることが示唆された(図1②).

③ 霊長類泡沫状ウイルス

(primate foamy virus type 1 : PFV-1)

Lecellierらは293TやHeLaといった哺乳類細胞株がもつmiRNA(miR-32)がPFVの複製を抑制することを示した¹¹⁾. この結果は哺乳類細胞がウイルス感染に対する防御機構としてmiRNAを利用することを示唆している. またPFVはTasというウイルス由来タンパク質をもつことが知られているが, このTasがRNAiを介したウイルス複製抑制を阻害することが明らかになった. この報告は哺乳類細胞がもつmiRNAが感染防御機構として機能することを始めて示した重要な知見といえよう(図1③).

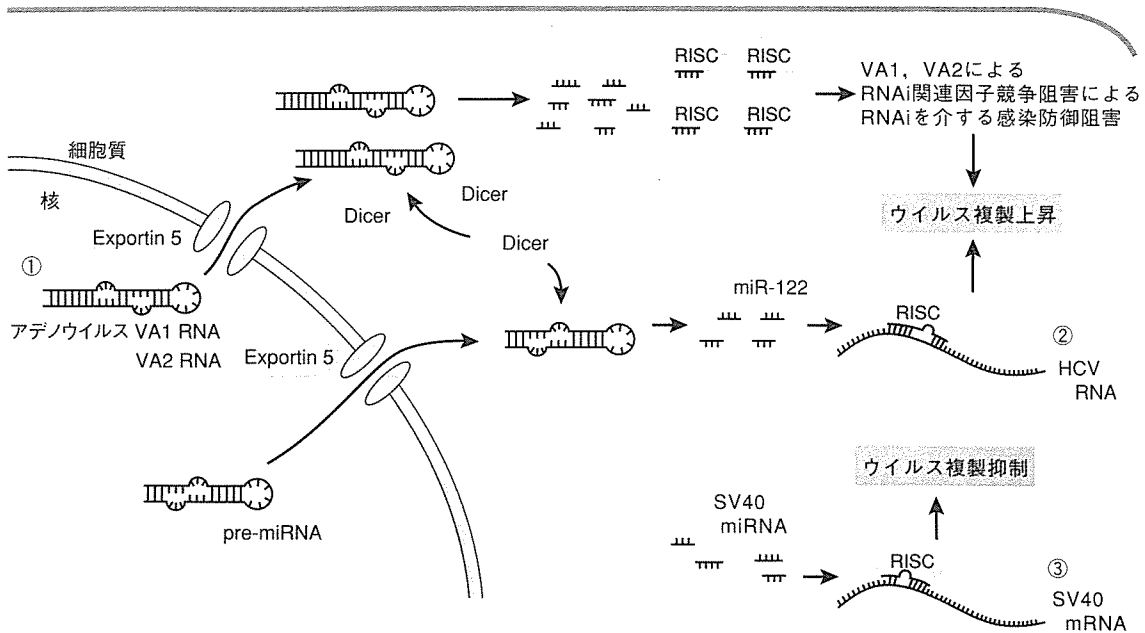


図2 ncRNAによる細胞内でのウイルス複製増強・制御

①アデノウイルスがもつ ncRNA である VA1 RNA と VA2 RNA が宿主細胞内の RNAi 関連因子を競合的に阻害しウイルスの複製を可能にする。②宿主細胞がもつ miRNA の miR-122 が HCV の非翻訳領域 (NCR) に結合しウイルス複製効率を上昇させる。③ SV40 の後期過程において転写される miRNA が前期過程で転写される mRNA に相補的な配列をもち、この mRNA からの翻訳を阻害してウイルス複製を制御している。RISC : RNA-induced silencing complex

2 ncRNA による宿主細胞内でのウイルス複製制御

宿主細胞の感染防御機構として、ウイルス由来の ncRNA が RNAi を誘導するといった機序のほかに宿主細胞がもつ ncRNA やウイルスが自らもつ ncRNA がウイルス複製を直接制御する事実が最近報告された。以下に最近の知見を紹介する。

① アデノウイルス (adenovirus)

アデノウイルス感染では ncRNA が感染細胞内に大量に蓄積することが以前から知られていた (viral associated RNA : VA RNA)。VA RNA は Exportin-5 に結合することで pre-miRNA の核外への輸送を、また Dicer に結合することで siRNA や miRNA のプロセッシングを競合的に抑制することが示された。また VA RNA 自身が Dicer によりプロセッシングされることで生じた VA RNA 特異的な siRNA が RISC と複合体を形

成することも知られている^{12) 13)}。ただし、VA RNA はイントロン配列中にあるため、形成された VA RNA に特異的な RISC 複合体が細胞内の mRNA を抑制することはないものと思われる。むしろ、VA RNA 由来の siRNA が RISC に競合的に結合することで RNAi 機構を抑制している可能性が示唆された (図 2 ①)。これらの知見をまとめると、アデノウイルスは自身ももつ ncRNA である VA RNA の働きで宿主側の感染防御機構である RNAi 機構を阻害しウイルス複製を可能にしていると考えられる。

② エプスタイン-バーウイルス (Epstein-Barr virus : EBV)

Pfeffer らは EBV が持続感染したパーキットリンパ腫由来の細胞の ncRNA を解析し、ウイルス自身が miRNA をもち、自らの複製を制御している可能性を示した¹⁴⁾。またコンピュータ解析により EBV miRNA の標的となる宿主側およびウイルス自身の配列を探索

表 本稿で紹介したウイルス感染防御・複製制御に関連する miRNA 一覧

ウイルス名	miRNA の名前	機序	RNAi に対するウイルス由来阻害物質	文献
PFV	miR-32	ウイルス複製抑制	Tas	11
ADV		ウイルス複製増強	VA1, VA2 (ADV 由来 RNA)	12, 13
EBV	ebv-miR-BART1	不明		14
	ebv-miR-BHRF1-1	不明		
	ebv-miR-BHRF1-2	不明		
	ebv-miR-BHRF1-3	不明		
	ebv-miR-BART2	不明		
SV40	SVmiRNA	ウイルス複製制御		15
HCV	miR-122	ウイルス複製増強		16
HIV	miR-N367	ウイルス複製抑制	Nef	17, 18

した結果、宿主因子としてはアポトーシスや癌化に関与する因子などが候補としてあげられている。しかしこれらが本来の EBV の miRNA の標的かどうかについてはまだ明らかではない。

③ SV40 ウイルス (simian virus 40)

Sullivan らはウイルスがもつ miRNA がウイルスの複製を制御していることをはじめて実験的に明示した¹⁵⁾。SV40 の後期過程において転写される miRNA が前期過程で転写される mRNA に相補的な配列をもち、この mRNA からの翻訳を阻害した。これによってウイルスの T 抗原の発現は低下したが SV40 の miRNA を欠損した変異型ウイルスと野生型ウイルスでは感染力をもつウイルス粒子の産生に差はなかった。変異型ウイルスでは野生型ウイルスに比べて CTL^{※1} に対する感受性が上昇していた。これは SV40 の miRNA が CTL による宿主からの SV40 感染細胞の除去を防ぎ自らのより効率的な複製に寄与しているものと思われる (図 2③)。

④ C 型肝炎ウイルス

(hepatitis C virus : HCV)

Jopling らは HCV が増殖可能な細胞において miR-122 という miRNA が細胞内に大量に存在していることを明らかにした¹⁶⁾。miR-122 に対して完全に相補的

※1 CTL

cytotoxic T lymphocyte (細胞障害性 T リンパ球)。細胞障害性 T リンパ球は腫瘍細胞・移植された非自己細胞・ウイルス感染細胞などの細胞を特異的に認識して傷害し破壊・除去する作用をもつリンパ球のことを称する。別名キラー T 細胞ともよばれる。

な配列をもつアンチセンスオリゴ RNA を細胞に導入すると HCV の複製は抑制された。miR-122 は HCV ゲノムの 5' 末端の非翻訳領域^{※2}(non-coding region : NCR) に結合して HCV RNA の発現を増強することが明らかになった。この NCR に変異を導入すると HCV RNA の発現は減少した (図 2②)。

⑤ ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (human immunodeficiency virus type 1 : HIV-1)

HIV-1 がコードする miRNA やその宿主側の標的についても解析が進められている。そのなかで nef 遺伝子^{※2}のなかに存在する miR-N367 が nef の発現を抑制し、HIV-1 の複製に影響を及ぼすことが示された¹⁷⁾¹⁸⁾。また、HIV-1 由来の Tat タンパク質^{※3}が RNAi の阻害活性を有し、宿主およびウイルス由来の ncRNA を制御していることが示唆された¹⁹⁾。HIV-1 の感染によって宿主細胞の miRNA の発現が減少したという報告もある²⁰⁾。HIV-1 によって引き起こされる病態と ncRNA の関連性について今後の解析が期待される。

※2 nef 遺伝子

negative factor の略でウイルス複製に必須ではない遺伝子と考えられていたが、ウイルス複製増強や細胞表面の MHC 分子の発現抑制による CTL の回避や、他にも CD4 分子の細胞表面発現抑制による重感染の抑制など、多彩な機能をもつことが最近になって明らかになってきた。

※3 Tat タンパク質

HIV の調節遺伝子がコードするタンパク質の 1 つで、HIV RNA 末端に存在する LTR (long terminal repeat) 配列のなかにある TAR (trans-acting responsive element) に結合しウイルス遺伝子発現を制御するなど、HIV の複製に深く関与する因子である。

■ おわりに

2005年になって動物細胞におけるウイルス感染と ncRNA との関連についての研究は急激に進み、ncRNA がウイルス感染制御に大きな役割を果たしていることが明らかになりつつある。本稿で紹介した知見は ncRNA が宿主細胞とウイルスの感染防御・複製制御に相互的にかかわっていることを示している。表に今回紹介したウイルス感染防御・複製制御に関与するとされている miRNA を示した。今後ウイルスの感染防御・複製制御に関与する miRNA の解析が進むにつれて RNA を応用した新たな治療法の展開が期待される。

感染防御機構における ncRNA の役割を理解するうえで '06年1月に Virology 誌に掲載された Schutz らの総説²¹⁾ が現時点で参考となる最新の論文である。また宿主・ウイルスのもつ miRNA に関しては Yeung らの総説^{21) 22)} に詳細がまとめられている。ご興味のある方はご一読をお勧めする。

文献

- 1) Fire, A. et al. : Nature, 391 : 806-811, 1998
- 2) Hamilton, A. J. & Baulcombe, D. C. : Science, 286 : 950-952, 1999
- 3) Li, H. et al. : Science, 296 : 1319-1321, 2002

- 4) Stark, G. R. et al. : Annu. Rev. Biochem., 67 : 227-264, 1998
- 5) Elbashir, S. M. et al. : Nature, 411 : 494-498, 2001
- 6) Wilkins, C. et al. : Nature, 436 : 1044-1047, 2005
- 7) Schott, D. H. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102 : 18420-18424, 2005
- 8) Tabara, H. et al. : Cell, 99 : 123-132, 1999
- 9) Tabara, H. et al. : Cell, 109 : 861-871, 2002
- 10) Lu, R. et al. : Nature, 436 : 1040-1043, 2005
- 11) Lecellier, C. H. et al. : Science, 308 : 557-560, 2005
- 12) Lu, S. & Cullen, B. R. : J. Virol., 78 : 12868-12876, 2004
- 13) Andersson, M. G. et al. : J. Virol., 79 : 9556-9565, 2005
- 14) Pfeffer, S. et al. : Science, 304 : 734-736, 2004
- 15) Sullivan, C. S. et al. : Nature, 435 : 682-685, 2005
- 16) Jopling, C. L. et al. : Science, 309 : 1577-1581, 2005
- 17) Omoto, S. & Fujii, Y. R. : J. Gen. Virol., 86 : 751-755, 2005
- 18) Omoto, S. et al. : Retrovirology, 1 : 44, 2004
- 19) Bennasser, Y. et al. : Immunity, 22 : 607-619, 2005
- 20) Yeung, M. L. et al. : Retrovirology, 2 : 81, 2005
- 21) Schutz, S. & Sarnow, P. : Virology, 344 : 151-157, 2006
- 22) Yeung, M. L. et al. : Cell Research, 15 : 935-946, 2005

Profile

筆頭著者プロフィール

西澤雅子：2000年東北大学大学院農学研究科修了。'00年～'03年エイズ予防財団リサーチレジデント、神奈川県衛生研究所勤務。'03年より国立感染症研究所エイズ研究センター研究官。現在の研究テーマは薬剤耐性 HIV-1。特に薬剤耐性 HIV-1 を克服するための新薬・ワクチン開発を SCID マウスを用いて行っている。HIV-1 の複製制御の解明にも興味をもっている。

平成 18 年度 厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業
「HIV 感染症の医療体制の整備に関する研究」班
総括・分担研究報告書

発行日 2007 年 3 月 31 日

発行者 主任研究者 岡 慎一

発行所 研究班事務局
国立国際医療センター病院
エイズ治療・研究開発センター
〒 162-8655 東京都新宿区戸山 1-21-1
