

Matsumoto, Keiichi I Nakayama, and Yoshitaka Tanaka. The endosomal vesicles carrying ubiquitylated cargos selectively localizes to the cleavage furrow during cytokinesis. 第 33 回日本分子生物学会、2010 年 12 月、神戸.

- 13) Takayoshi Koyama, Kenzo Tokunaga, Tetsutaro Sata, Yukihiro Ishizaka. Site-Specific Integration of a Lentiviral Vector in the Human Genome via DNA Double-Strand Breaks:第 33 回日本分子生物学会、2010 年 12 月、神戸.

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

マクロファージ感染に関与する宿主側因子の同定

研究分担者 石坂 幸人 国立国際医療研究センター 難治性疾患研究部 部長

研究要旨：本分担研究課題では、潜伏感染状態の温床となっているマクロファージへのウイルス感染機序とこれに関与する宿主因子を明らかにする。今年度の解析で、ゲノム DNA 損傷部位 (DSB) にウイルス DNA が挿入されること、この現象がインテグラーゼ (IN) 阻害剤で抑制できない事を明らかにした。また、DSB を誘導する Vpr の作用によって、静止マクロファージへの IN 活性非依存的なインテグレーション頻度が 100 倍程度上昇することを見いだした。Vpr による DSB 誘導は Vpr のクロマチンリクルートメントと DNA 損傷誘導の 2 つのステップで制御されており、各ステップに関与する宿主因子を同定するとともに、その機能解析を進めた。

A. 研究目的

本分担研究では潜伏感染状態の温床となっているマクロファージへのウイルス感染機序と関与する宿主因子を明らかにする。マクロファージにおけるウイルス感染及び産生は、ウイルス感染初期と潜伏感染状態からのウイルス再産生機序の 2 つのステップで理解することが重要であると考えられる。潜伏感染状態からのウイルス再産生機序については、厚生労働科学研究「エイズ対策研究事業」(平成 18-20 年 研究代表者 佐多徹太郎博士)以来解析を継続し、今年度その研究成果を論文として発表した。即ち、アクセサリ遺伝子である Vpr 産物は、マクロファージを介して活性の酸素を誘導し、膜上に存在するフォスファチジルコリンの酸化 ---Toll-like receptor 4---MyD88---p38(MAPK)---C/EBP- β のシグナル活性化を介して、最終的に IL-6 産生を誘導することで潜伏感染細胞からウイルス産生を誘導することを明らかにした(業績-5)。

そこで、本年度は静止マクロファージへのウイルス初期感染機序に照準を絞り、

- a. DNA 二重鎖切断(以下 DSB:DNA double-strand break)のウイルス感染における意義
 - b. Vpr によって誘導される DSB 誘発の分子機序の解析
- の 2 つの柱を設定して解析した。

B. 研究方法

- a. DSB のウイルス感染における意義

i) DSB サイトへウイルス DNA の挿入:ヒト単球性白血病細胞株 (THP-1)はフォルボールエステル(PMA)の作用によりマクロファージ様細胞に分化誘導することが知られている。そこで、静止マクロファージへのウイルス感染機序を明らかにするための検出系として、THP-1/TPA 細胞を調整し、実験に供した。さらに、ウイルス感染における DSB の役割を理解するために、人工的な DSB 誘導系として rare-cutting restriction enzyme である I-SceI 認識サイトを導入した THP-1 を樹立した。I-SceI サイトは 18 塩基認識する制限酵素サイトであり、ヒトゲノムには存在しない。HIV-1 感染の際、I-SceI アデノウイルスを感染させ、人工的に作成した DSB サイトへのウイルス DNA の挿入頻度を定量 PCR にて検定した。また、ウイルス DNA と I-SceI サイトの境界部 (breakpoint) を挟む形で PCR 増幅を行い、ウイルス挿入部位をシークエンス解析にて決定した。

I-SceI システムに加えて、内在性の rare-cutting restriction enzyme である I-PpoI サイトとその制限酵素を用いたシステムも稼働させた。I-PpoI は 15 塩基を認識する制限酵素で、ヒト細胞に同酵素をコードする遺伝子は存在しないが、認識配列はリボゾーマル DNA 中に 200-300 コピー存在する。そこで、同制限酵素を発現するアデノウイルスを調整し、感染させる事で同部位に DSB を挿入した。

ii) インテグラーゼ非依存的な DSB サイトへのウイルス DNA 挿入とプロウイルス DNA コピー数の評価: 従来からインテグラーゼ (IN: integrase) の catalytic

activity(CA)活性の無い変異ウイルスにも、低い頻度ではあるが感染性が認められていた (J Virol, 72(6), 4678-4685, 1998)。しかし、そのメカニズムは全く不明であった。昨年度までの DSB サイトへ挿入されたウイルス DNA とゲノム DNA の Breakpoint の塩基配列の解析から、DSB サイトへのウイルス DNA の挿入は IN-CA 非依存的に誘導される可能性が考えられた。そこで、IN-CA 変異体である IN の 64 番アミノ酸のアスパラギン酸(D)をアラニン(A)に変異させた D64A ウイルス(NL4-3 由来ウイルス)あるいはバリン(V)に変異させた D64V ウイルス(レンチウイルスベクター)を用いてウイルス感染実験を行った。

そして定量的 PCR 法を用いて、ゲノム全体のインテグレーション頻度に占める DSB サイトへの挿入頻度の算出を試みた。実験には IN-WT あるいは D64V レンチウイルスと *I-PpoI* アデノウイルスを併用した感染実験を行い、感染細胞中の DNA について PCR 解析を行った。*I-PpoI* アデノウイルス(MOI=30)をレンチウイルス感染 24 時間前に作用し、同部位を切断した。レンチウイルス感染の 2 週間後に細胞を回収し、インテグレーション頻度を qPCR によって定量した。

iii) IN 阻害剤存在下での DSB のウイルス感染効率における役割と関与する宿主因子の解析: IN-CA に対する阻害剤であるラルテグラビル(RAL)存在下でウイルス感染実験を行い、qPCR 法によって *I-SceI* 特異的に挿入されたウイルス DNA の頻度を定量した。

RAL 存在下あるいは IN-CA 変異ウイルスのインテグレーション頻度は WT ウイルスの約 1/100 であり、Alu-PCR を用いた定量的なウイルス感染効率の把握は困難であった。そこで、Neo 耐性遺伝子を持つ NL4-3 由来ウイルスを作製し、Neo 耐性のコロニー形成数を指標にインテグレーション頻度を求めた。さらに DSB サイトのウイルス DNA の挿入における役割をより明確な形で明らかにするため、*I-SceI* サイトを人工的に切断した HT1080 細胞に Neo 耐性ウイルスを感染させた後、G418 選択を行い、薬剤耐性コロニー数を算定した。

また、ルシフェラーゼ(Luc)遺伝子を持つ NL4-3 由来ウイルスも併用した。Luc 活性を指標とした感染効率がゲノムへのプロウイルス DNA の挿入効率とほぼ同等の傾向を示しながら変化することを確認した後、IN 阻害剤(RAL 及び他の阻害剤である EVG)、DSB 誘導剤(Etoposide、Bleomycin)あるいは DSB 修復因子阻害剤(ATM 阻害剤: 10 μ M KU55933、

DNA-PKcs 阻害剤: 10 μ M NU7026、Mre11 阻害剤: 100 μ M Mirin)存在下(ウイルス感染2時間前に添加)に感染実験を行い、関与する宿主因子の同定を試みた。細胞は TPA 処理 THP-1 及び、健康人から調整した monocyte-derived macrophage (MDM)を用いた。

vi) LAM-PCR 法によるプロウイルス/ゲノム境界部の塩基配列情報の収集: DSB 部位へ挿入されたプロウイルスの末端配列を調べたところ、挿入や欠失が高頻度にみられた。そこで、RAL 存在下に挿入されたプロウイルスにも挿入や欠失がみられる可能性を検証するために linear-amplification-mediated PCR (LAM-PCR) 法によってプロウイルス/ゲノム境界部の塩基配列を増幅し、シーケンスを決定した。

b. Vpr によって誘導される DSB 誘発の分子機序の解析。

Vpr による DSB 誘導には、i) クロマチン上での宿主側因子機能の誘導による DNA 損傷 と ii) Vpr のクロマチンリクルートメント の2つのステップが必要であると考えている。そこで、この2つのそれぞれ関与する分子機序を明らかにすることを試みた。

i) Vpr による DSB 誘発に関与する宿主因子の同定: 野生型 Vpr に Flag タグを付与した蛋白質を HEK293T 細胞に強制発現させ、細胞抽出液から抗 Flag 抗体を用いて免疫沈降法(IP: immunoprecipitation)で Vpr 自身と Vpr 結合タンパクを回収した。この沈降物中に存在する DNA に対する作用を調べるため、スーパーコイル型プラスミド DNA と二価イオン共存下に 30 分間インキュベートした後、アガロース電気泳動法で解析した。また、トポイソメラーゼ I (TopoI) 特異的阻害剤であるカンプトテシン(CPT)を添加し、DNA の泳動度の変化の有無を観察した。

ii) Vpr クロマチンリクルートメントに関与する因子の同定: 精製 Vpr 組み換え蛋白質を bait としてランダムペプチドディスプレイライブラリーを稼働させ、Vpr に親和性を示すペプチドを同定した。そして、VAP-1 (Vpr-associating peptide)と命名した同ペプチドを抗原としてウサギ抗体を作成し、同抗体を用いて IP-SDS-PAGE 解析によって VAP-1 蛋白質の同定を試みた。VAP-1 ペプチドで結合阻害を受ける蛋白質に相当するバンド切り出し、TOF-MS 解析に供した。同定された遺伝子産物(SNF2h)に HA タグを付与した状態で発現するコンストラクトを作成し、Vpr 発現ベ

クターとともに HEK293T 細胞に導入した。Vpr に対する抗体を用いた IP 後のウエスタン解析、またはその逆を行うことで、SNF2h と Vpr の細胞内における複合体形成の有無を評価した。

iii) SNF2h 遺伝子発現抑制状態での Vpr 機能解析: SNF2h siRNA を用いて内在性発現を抑制し、その状態での Vpr のクロマチンへのロード量を評価した。また、SNF2h siRNA 導入下での組み換え Vpr 蛋白質 (rVpr) 添加による DSB 誘導能の有無を解析した。

(倫理面への配慮)

本課題は主として細胞株を用いる研究であり、ヒト検体を対象とした内容ではない。組み換え生物を用いた実験であり拡散防止措置は大臣確認実験として行う。そのための研究計画書は文科省に申請し、平成 18 年 5 月 31 日付け、17 国文部科学振興第 68 号で確認済みである。平成 22 年度、再度 大臣確認実験申請を行い、22 受文科振第 66 号として承認され(平成 22 年 5 月 18 日付)、平成 25 年 3 月 31 日まで継続可能である。

C. 研究結果

a. DSB のウイルス感染における意義と機序

i) DSB のウイルス感染における意義: H21 年度までの研究成果として、PMA 処理 THP-1 に対して DSB 誘導後にウイルス感染を行うと、I-SceI サイトへのウイルス挿入効率が增加すること、さらにプロウイルス DNA とゲノム DNA との境界部位の塩基配列の解析から、DSB サイトへのウイルス挿入が IN-CA 非依存的に誘導される傾向が認められていた。そこでまず、CA を失った IN 変異体(IN^{D64A})を用いて同様の実験を行った。その結果、野生型 IN を有するウイルスと同様に、IN^{D64A} ウイルスも DSB サイトへ挿入されることが分かった。

また、ヒトゲノムに存在する I-PpoI サイトを用いて同様の解析を行った。I-SceI と同様に、アデノウイルスを用いて I-PpoI 制限酵素を一過的に発現させると、同部位へウイルス DNA が挿入された。さらに IN 非依存的なインテグレーションに占める DSB サイトへの挿入頻度を調べるために、感染細胞のみを薬剤によって選択し、プロウイルス DNA 全体のコピー数と I-PpoI 部位特異的なインテグレーション頻度を qPCR 法によって調べた。その結果、IN 活性非依存的インテグレーションの過半数が DSB サイト(I-PpoI サイト)へ挿入されることを認めた。

ii) インテグラーゼ非依存的な DSB サイトへのウイルス DNA 挿入: 次に、近年臨床で使用されている IN 阻害剤(RAL)存在下で、DSB サイト(I-SceI サイト)への挿入に対する影響を調べた。その結果、DSB サイトへのウイルス DNA の挿入は RAL 及び EVG で阻害されないことが分かった。

既述の通り、IN-CA 変異ウイルスのインテグレーション頻度が極めて低いため、Alu-PCR 法でプロウイルス DNA の全体のコピー数を把握しながら、IN-CA 非依存的に挿入されるウイルス DNA コピー数を評価することは困難であった。そこで、Neo 耐性 NL4-3 ウイルスと G418 選択を用いて、Neo 耐性細胞コロニーを形成させ、コロニー数を算定することでインテグレーション頻度を比較した。その結果、HT1080 細胞株を用いた場合には、IN^{WT} ウイルス全体の約 0.5%が IN 活性非依存的に挿入されることが明らかとなった。

さらに、アデノウイルスを用いて I-SceI サイトを人工的に切断した前後での感染効率を比較した。その結果、IN 依存的な挿入頻度(IN-WT ウイルス)は I-SceI 切断によって高々 2 倍程度上昇したのに対して、IN 非依存的な挿入頻度は約 100 倍上昇した。

iii) DSB へのウイルス DNA 挿入に関する宿主因子の解析: 次に、IN-CA 非依存的なインテグレーションに関わる宿主因子の探索を試みた。IN 非依存的なインテグレーションは DSB 部位に挿入されることから、DSB 修復因子に着目した。IN 非依存的なウイルス感染効率は低く、プロウイルス DNA のコピー数で評価することは困難であった。そこで、Luc 遺伝子を持つ NL4-3-Luc ウイルスを用いた感染実験を稼働させた。まず、このウイルスを用いた場合でも DSB に対して同様の傾向を示すことを確認した。即ち、NL4-3-Luc ウイルスを PMA 処理 THP-1 細胞あるいは MDM に感染させ、IN 阻害剤の影響を調べた結果、THP-1/PMA 細胞及び MDM ともに、プロウイルス DNA の約 1%は RAL 抵抗性挿入プロセスによって形成されることが分かった。この結果は G418 抵抗性を指標にコロニー数で評価した実験結果とほぼ同等の頻度であった。

次に、TopoII 阻害剤である Etoposide と DNA に直接作用し切断する Bleomycin の作用を検証した。これらの薬剤存在下に D64A ウイルスを感染させるとその効率は Etoposide あるいは Bleomycin 添加によって約 10 倍上昇した。

次に DSB 依存的に挿入されるプロセスに関する宿主因子の解析を行った。即ち、ATM、DNA-PKcs

あるいは Mre11 に対する阻害剤 (KU55933、NU7026 あるいは Mirin) を用いて NL4-3-Luc ウイルスの感染阻害効果を調べたところ、ATM 阻害剤のみ IN^{WT}、IN^{D64A} ともに感染抑制効果がみられた。一方、DNA-PKcs と Mre11 阻害剤では感染抑制がみられた濃度で、同時に薬剤による細胞毒性がみられたため、ウイルス感染効率に対する作用について結論することは難かった。

また qPCR 解析によって、KU55933 が I-SceI サイトへのウイルス DNA 挿入を抑制することも認めた。

iv) LAM-PCR 法によるプロウイルス/ゲノム境界部の塩基配列情報の収集: DSB 部位へ挿入されたプロウイルスの末端配列を調べたところ、挿入や欠失が高頻度に見られた。そこで、RAL 存在下に挿入されたプロウイルスにも挿入や欠失がみられるかを調べるために LAM-PCR 法によってプロウイルス/ゲノム境界部の塩基配列を増幅、解読した。その結果、RAL 存在下で感染させた場合には、17 個のクローン中 15 個で Breakpoint 近傍に塩基の欠失や挿入が認められたのに対して、RAL の溶媒として使用した dimethylsulfoxide (DMSO) 添加群では、解析した 20 クローン中、同様の塩基変異は 1 クローンでのみであった。

b. Vpr によって誘導される DSB 誘発の分子機序の解析

i) Vpr による DSB 誘発に関与する宿主因子の同定: Flag 付 Vpr を HEK293T 細胞に発現させ、Flag 抗体で Vpr と複合体を形成する蛋白質を回収し、プラスミド DNA と作用させた。その後 DNA をフェノールクロロフォルムで抽出し、電気泳動するとスーパーコイル DNA とは異なる泳動パターンを示すことが分かった (フォーム B)。スーパーコイル DNA が示す泳動パターン (フォーム A) と比較するとフォーム B の泳動速度は遅く、DNA に Nick または DSB が誘導されている可能性または、DNA のトポロジカルな変化が誘導されている可能性の 2通りが考えられた。

そこでまず、フォーム B に標識ヌクレオチド存在下に TDT (Terminal deoxynucleotidyl transferase) を作用させ、切断が誘導されているか否かを検証したところ、標識ヌクレオチドが DNA に標識されることが無かったことから、プラスミド DNA には、切断断端が存在していない事が示唆された。(図 B)

以上の結果から、上記 2つの可能性の内、プラスミド DNA の弛緩 (トポロジー変化) が誘導されている可

能性が示唆された。スーパーコイル DNA が弛む構造変化にトポイソメラーゼ I (TopoI) が関与している可能性を考え、Vpr 複合体をプラスミド DNA に作用させる際に TopoI 阻害剤である CPT を添加し、その作用の有無を解析した。その結果、CPT の作用によって、Vpr 沈降物による DNA 構造変化誘導が阻害された。以上の結果から、Vpr によるプラスミド DNA 弛緩誘導には TopoI の関与が強く示唆された。

次に、細胞内での Vpr と TopoI との機能的な関連性を証明するため、IP 後のウエスタン解析 (WB) を行った。その結果、Vpr と TopoI は細胞内で複合体を形成していること、さらに TopoI が Vpr による DSB 誘導に関与するか否かを調べるため、TopoI を siRNA によりノックダウンした状態で Vpr 機能を評価したところ、TopoI siRNA の導入下では、Vpr による DSB の誘導が軽減されることが示された。

ii) Vpr のクロマチンリクルートメントに関与する因子の同定: まず、Vpr 結合ペプチドとして同定した VAP-1 に対する抗体を用いた IP 解析により、Vpr 結合蛋白質としてクロマチンリモデリング因子である SNF2h を同定した。

組み換え蛋白質を用いた解析から SNF2h と Vpr は直接的に結合すること、その際、Vpr のアミノ酸 71-75 に相当する HFRIG (アミノ酸一文字表記) を必要とすることが分かった。一方、SNF2h 側の Vpr 結合領域は N 末端アミノ酸 1-320 に相当する領域であることが示唆された。

c. SNF2h 遺伝子発現抑制状態での Vpr 機能解析: SNF2h siRNA 導入下での内在性蛋白質の発現はコントロールの 70% 程度減少し、その条件化での Vpr のクロマチンロード量はコントロールの 30% 程度にまで減少した。そこで Vpr による DSB 誘導能をテトラサイクリンで Vpr 発現が制御できる細胞株を用いて解析した。その結果、興味深いことに SNF2h siRNA 導入下でも Vpr による DSB は同程度に誘導される事が判明した。またヒト線維芽細胞である TIG-3 細胞に SNF2h siRNA を導入し、培養系に添加された rVpr による DNA 損傷の変化も平行して調べたところ、この場合にも DNA 損傷は同程度に誘導されることが分かった。

現在、siRNA をさらに作用させることによって内在性 SNF2h 蛋白質の発現を極限まで抑制した条件下での Vpr 作用を検証中である。

D. 考察

a. DSB のウイルス感染における意義

DSB サイトへのウイルス挿入が IN^{D64A} ウイルスでも認められること、また RAL 存在下でも DSB サイトへのウイルス DNA の挿入が認められたことは、ゲノムへのウイルス DNA の挿入の一部が宿主細胞側の反応として誘導されていることを意味する。また RAL は、DSB で増強するウイルス感染効率は阻害しない可能性も示唆された。臨床的に抗エイズ薬でウイルス DNA が体内から駆逐できないことが大きな問題となっている。今回の解析結果は、RAL がウイルス DNA のゲノム挿入へのステップを完全には阻害しきれない事を意味し、IN-CA 以外を標的とする IN 阻害剤の開発の必要性を示唆する。

この IN 活性非依存的なインテグレーションは MDM の場合、全体の約 1% の頻度で生じ、さらに DNA 損傷がウイルス DNA のゲノム挿入において重要な役割を果たしていることが分かった。また、DNA 修復に関わる宿主因子である ATM が DSB サイトへのインテグレーションに重要であることも明らかとなった。従来から IN 活性非依存的なインテグレーションの存在は分かっていたが、そのメカニズムは不明であった。今回、IN 活性非依存的なインテグレーションには DSB が重要な役割を担っていることが示唆された。

ウイルス/ゲノム DNA の Breakpoint を含む塩基配列の解析によって、RAL 存在下で感染したイベントの場合には、遺伝子欠損や挿入が高頻度に観察された。この事は、IN 阻害剤を服用中の症例を対象に末梢血細胞中のプロウイルス DNA/ゲノム境界部位の塩基配列を解析すれば、実際のウイルス感染においてどの程度 IN-CA 非依存的にウイルス感染が成立しているかについて類推できるものと思われる。

最終年度では、IN 阻害剤存在下におけるウイルス感染実験を行い、IN 活性非依存的にインテグレーションされたプロウイルスから二次ウイルスが産生される可能性を検証する。その際、IN 阻害剤存在下で感染させた細胞をサイトカインなどで刺激し、ウイルス再産生が促されるかを調べることで、今回明らかにした現象の潜伏感染状態での意義が明らかになると思われる。

b. Vpr による DSB 誘発に関与する宿主因子の同定

今回、新規 Vpr 結合蛋白質として TopoI と SNF2h を同定した。現在、Vpr が TopoI の作用を介して DNA 損傷を誘導する機構を明らかにすべく、実験を進め

ており、解明の糸口となる実験データも得られつつ有る。一方、今回同定した SNF2h は Vpr のクロマチンリクルートメントに大きく関与している可能性も示唆される。即ち、siRNA を用いて内在性 SNF2h を 70% ノックダウンすると、Vpr のクロマチンロード量が 30% にまで減少した実験事実は、Vpr 機能において SNF2h が大きな役割を担っている可能性を示唆する。しかし、この状態でも Vpr で誘導される DSB が検出されたことから、通常の 30% 程度の Vpr 量でも十分に DSB 機能が発揮できる可能性が考えられる。今後は、SNF2h の Vpr 結合領域の過剰発現系と siRNA を組み合わせることによって、Vpr 誘発 DSB 誘発において、SNF2h が主要な役割を担っていることを証明する予定である。

以上の様に、Vpr は複数の宿主側因子の機能に依存しながら DSB を誘発していることが分かってきた。中でも Vpr のクロマチンリクルートメントには SNF2h 以外の因子も関与している可能性が考えられ、さらに新規 Vpr 結合因子の同定も必要となる可能性も考えられる。

c. Vpr のウイルス感染における作用

Vpr が DSB を誘発することから、特に静止細胞へのウイルス感染効率に対して「正」の制御因子として作用することが強く考えられる。Vpr による感染効率の変化を MDM 及び D64A ウイルスを用いて評価したところ、野生型 Vpr 遺伝子を有するウイルスの感染効率は Vpr 変異ウイルスと比較して約 100 倍優れていることが分かった。すでに報告されているように、Vpr による Preintegration complex の核内移行に対する作用を吟味することは肝要である。しかし、ウイルス DNA の核内移行と DSB サイトへのウイルス DNA 挿入は独立した現象として捉えることができる。Vpr が D64A ウイルスの感染効率を上昇させる事実は、IN-CA 変異体が障害されている機能即ち、ゲノム DNA へのウイルス DNA の挿入ステップで Vpr が作用していることを示唆する。この点は今後明らかにする予定である。

E. 結論

- DSB は静止マクロファージのウイルス感染の際のプラットフォームとして機能する。
- IN 阻害剤は、DSB サイトへのウイルス挿入を阻害できない。
- DSB サイトへのウイルス DNA 挿入には DNA 修復

に関わる宿主因子の ATM が重要な役割を果たしている。

・ Vpr による DSB 誘導は、Vpr のクロマチンリクルートメントとクロマチン上での DNA 損傷誘導因子の少なくとも 2 つの種類の宿主因子作用によって生じることが考えられる。

・ Vpr による DNA 損傷作用は TopoI 作用を介して誘導されている可能性が示唆された。

・ MDM では Vpr によって IN 活性非依存的なインテグレーション頻度が 100 倍程度上昇する。

・ IN 非依存的 (IN 阻害剤存在下) に感染したプロウイルス DNA から二次ウイルス産生が誘導されることを示すことで、潜伏感染病態における DSB の意義を明確にできるものと思われる。この検討は引き続き行う予定である。

F. 健康危険情報：特記すべき事無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kono, K., Nakashima, S., Kokuryo, D., Aoki, I., Shimomoto, H., Aoshima, S., Maruyama, K., Yuba, E., Kojima, C., Harada, A., Ishizaka, Y. Multifunctional liposomes having temperature-triggered release and magnetic resonance imaging for tumor-specific chemotherapy *Biomaterials*, accepted.
- 2) Okudaira, N., Iijima, K., Koyama, T., Minemoto, Y., Kano, S., Mimori, A., Ishizaka, Y. Induction of LINE-1 retrotransposition by FICZ, a candidate endogenous ligand of the aryl hydrocarbon receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107(43):18487-92, 2010.
- 3) Kono, K., Ozawa, T., Yoshida, T., Ozaki, F., Ishizaka, Y., Maruyama, K., Kojima, C., Harada, A., Aoshima, S. Highly temperature-sensitive liposomes based on a thermosensitive block copolymer for tumor-specific chemotherapy. *Biomaterials*, 31(27):7096-105, 2010.
- 4) Takahashi, Y., Haga, S., Ishizaka Y., Mimori, A. Autoantibodies to angiotensin converting enzyme 2 in patients with connective tissue diseases. *Art. Res. & Ther.* 12(3):R8, 2010. (4.5)
- 5) Hoshino, S., Konishi, M., Mori, M., Shimura, M., Nishitani, C., Kuroki, Y., Koyanagi, Y., Kano, S., Itabe, H., Ishizaka, Y. HIV-1 Vpr induces TLR4/MyD88-mediated IL-6 production and reactivates viral production from latency. *J Leukoc Biol.* 87(6) 1133-1143, 2010.

- 6) Haga, S., Nagata, N., Okamura, T., Yamamoto, N., Sata, T., Yamamoto, N., Sasazuki, T., Ishizaka, Y. TACE antagonists blocking ACE2 shedding caused by the spike protein of SARS-CoV are candidate antiviral compounds. *Antiviral Res.* 2010 Mar;85(3):551-5. Epub 2009 Dec 6. (3.6)
- 7) Iwabu, Y., Fujita, H., Kinomoto, M., Kaneko, K., Ishizaka, Y., Tanaka, Y., Sata, T., Tokunaga, K. HIV-1 accessory protein Vpu internalizes cell-surface BST-2/tetherin through transmembrane interactions leading to lysosomes. *J Biol Chem.* 2009 Dec 11;284(50):35060-72. Epub 2009 Oct 16. (5.5)
- 8) Uchida, S., Yoshioka, K., Kizu, R., Nakagama, H., Matsunaga, T., Ishizaka, Y., Poon, R. Y., Yamashita, K. Stress-activated mitogen-activated protein kinases c-Jun NH2-terminal kinase and p38 target Cdc25B for degradation. *Cancer Res.* 2009 Aug 15;69(16):6438-44. Epub 2009 Jul 28.

2. 学会発表

- 1) Takayoshi Koyama, Binlian Sun, Yuzuru Minemoto, Kenzo Tokunaga, Tetsutaro Sata, Yukihito Ishizaka : HIV-1-induced DNA double-strand breaks enhance the infectivity into resting macrophage. The 10th Kumamoto AIDS Seminar, 2009 年 9 月、熊本
- 2) 小山貴芳、孫賓蓮、峯本謙、徳永研三、佐多徹太郎、石坂幸人 : HIV-1 が誘導する宿主 DNA 二重鎖切断はマクロファージへの感染効率を上昇させる。第 57 回 日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月、東京
- 3) Takayoshi Koyama, Kenzo Tokunaga, Tetsutaro Sata, Yukihito Ishizaka : Development of a novel system to integrate the lentiviral vector into human genome in a site-specific, designated SPIED (site-specific integration of exogenous DNA) system 第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月、横浜
- 4) 飯島健太、奥平准之、石坂幸人 . DNA 二重鎖切断による LINE-1 のレトロトランスポジション誘導機構 (口頭) 日本放射線影響学会 第 53 回大会 (京都テルサ) 2010,10/21
- 5) 飯島健太、奥平准之、石坂幸人 . DNA 二重鎖切断は LINE-1 のレトロトランスポジションを誘導

する

第 33 回日本分子生物学会年会 (神戸ポート
アイランド) 2010,12/9

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 該当無し

2. 実用新案登録 該当無し

3. その他

各国への移行手続き(日・米・欧)完了

発 明 人;石坂幸人、長谷川正勝、野原 聡

発明の名称;「新規核移行ペプチド」

PCT/JP2008/054563

出願人;国立国際医療研究センター総長

移行手続き完了;2009/9/8

欧州への特許出願に伴う Office action

2011年1月18日、答申書提出

宿主因子による HIV 抑制法の開発研究

研究分担者 小柳 義夫 京都大学ウイルス研究所 教授
研究協力者 佐藤 佳 京都大学ウイルス研究所 助教
研究協力者 高折 晃史 京都大学医学研究科 教授
研究協力者 泉 泰輔 エイズ予防財団リサーチレジデント

研究要旨: ヒト造血幹細胞の免疫不全マウスへの移植により CD4 細胞を持続的に産生するマウスに、Vif を有する野生型クローン HIV-1 を接種し、ウイルス増殖・複製後のウイルス遺伝子の変異効率を検討した。その結果、きわめて高頻度の G→A 変異がウイルス DNA に確認された。そして、この G→A 変異部位の下流の 1 塩基の塩基配列指向性から、この DNA の G→A 変異の大部分は、内在性の APOBEC3 分子群により引き起こされたことが強く示唆され、そして、特にストップ・コドンの発生を誘発されたことがわかった。さらに、同一の内在性 APOBEC3 に起因する高頻度 G→A 変異を有する HIV-1 DNA も複数クローン確認された。一方、血漿ウイルス RNA には特徴的変異は検出されなかった。以上の結果から、個体内での HIV-1 複製においては、少数の内在性の APOBEC3 分子群によって複数の遺伝子変異が導入され、HIV-1 複製が負に制御されることがわかった。これらの結果は、Vif を有する野生型 HIV-1 の感染においても APOBEC3 分子群は抑制的に働くことを示すものである。

A. 研究目的

HIV の増殖を制御する宿主因子が近年次々と見つかかり、その意義の解明、そしてそれを基盤とする新たな治療法の開発は、現在の Highly active antiretrovirus therapy (HAART) 療法に加えたエイズ制御法につながる。特に、宿主細胞内に内在的に発現する分子による制御法は、これまでのウイルスがコードする逆転写酵素やプロテアーゼなどの酵素に対する阻害薬剤による治療法と異なり、生体内の宿主因子を利用しようとする戦略であり、全く新しい治療技術となる。具体的には、HIV 抑制宿主因子である APOBEC3 や他の分子群の作用機序を明らかにし、感染時にこれらの抑制因子がどのような環境で抗 HIV 作用を発揮するかを明らかにし、宿主因子を利用したウイルス増殖制御と有効な抗 HIV 免疫応答誘導による感染拡大・潜伏化の阻止をめざす。

APOBEC3 分子群と Vif の相互拮抗能については、培養細胞を用いた実験からその詳細が明らかとなってきた。ところが、HIV-1 の感染とその病理変化を他の動物で再現することができないため、生体内での HIV-1 複製における内在性 APOBEC3 分子群の寄与についてはこれまで不明であった。われわれは、ヒト造血幹細胞を重度免疫不全マウスである NOG マウスに移植することにより、ヒト造血能を有する“ヒト化マウス”を作製し、HIV-1 を in vivo 環境で増殖・複製させるこ

とが可能な実験系を開発した (Virology 394:64-72, 2009)。HIV-1 感染ヒト化マウスは、HIV-1 感染者で見られるような、漸進的な CD4 陽性 T 細胞の減少を示し、また、HIV-1 複製を 1 年以上にわたり維持することができ、個体内における HIV-1 複製過程における細胞性因子の影響について解析が可能である。この実験系を用いて、APOBEC3 分子群の影響を検討した。

B. 研究方法（倫理面への配慮）

1) ヒトマウスの作製

臍帯血より CD34 陽性細胞を分離し、免疫不全 NOG 新生児マウスへの移植によりヒト化マウスを作製した。移植後、12-14 週目に採血し、flow cytometry により、CD45、CD3、CD19、CD4、CD8 発現細胞の割合を測定した

2) HIV-1 感染実験

野生型と Vif 欠損 HIV-1 (JR-CSF 株) を感染させ、経時的に採血しウイルス RNA を測定し、15 週目に解剖した。脾臓より DNA を分離し proviral DNA を、血漿よりウイルス RNA をそれぞれ PCR 後 (2620-3621 塩基、1,002bp)、クローン化した amplicon DNA の遺伝子配列の決定を行った。

3) 感染マウスの flow cytometry 解析

感染後 15 週目に解剖し、脾臓、リンパ節などの各臓器を採取し CD4、CD8、CD45RO、CD45RA、CD45RO のそれぞれに対する単クローン抗体によ

り染色後、HIVp24 特異的単クローン抗体 (2C2; 琉球大学田中勇悦博士より分与) を用いてその陽性率を同様に測定した。

4) 統計処理

2群の比較にはウェルチの *t* 検定を行なった。P 値が 0.005 以下のものは統計学的に有意な差があるものとした。

(倫理面への配慮)

動物実験の施行にあたり本学実験動物委員会から動物愛護上の配慮ならびに感染実験の適切な施行を行うように指導を受けた。すべての実験は本委員会より承認されている。また、臍帯血採取にあたり供血妊婦より同意 (インフォームド・コンセント) を得るとともに本学倫理委員会より承認を得ている。

C. 研究結果

1) ヒト化マウス内のヒト細胞の APOBEC3 遺伝子の発現レベル

まず、ヒト化マウス脾臓中の CD4 陽性 T 細胞とヒト末梢血中 CD4 陽性 T 細胞における内在性 APOBEC3 遺伝子の発現レベルを比較した。その結果、ヒト化マウスで分化・成熟したヒト CD4 陽性 T 細胞は、ヒト末梢血中 CD4 陽性 T 細胞と同程度の APOBEC3 遺伝子を発現していることがわかった (図 1a)。この結果より、HIV-1 感染ヒト化マウスにおける内在性 APOBEC3 分子群の HIV-1 複製への影響は、HIV-1 感染者におけるそれと同程度であることが示唆された。次に、野生型 HIV-1 と Vif 欠損 HIV-1 をヒト化マウスに接種し、それぞれの生体内における複製効率を経時的に解析した。その結果、野生型 HIV-1 はヒト化マウスで効率良くかつ持続的に増幅するのに対し、Vif 欠損 HIV-1 はまったく増幅しなかった (図 1b)。

2) ヒト化マウス内での HIV-1 変異効率

図 1b の結果より、内在性 APOBEC3 分子群によって Vif 欠損 HIV-1 の複製が著しく阻害されることが強く示唆されたことから、野生型 HIV-1 の増殖・複製過程における内在性 APOBEC3 分子群の影響を評価すべく、以下の実験を行った。Vif を有する野生型 HIV-1 を接種後 15 週のヒト化マウス脾臓から DNA を抽出し、HIV-1 DNA (逆転写酵素をコードする領域) の変異効率を検討した。その結果、興味深いことに、図 1c に示すようなきわめて高頻度の G→A 変異が確認された。それぞれの APOBEC3 分子による G→A 変異挿入部位には指向性があることが知られている。たとえば、APOBEC3G は GG→AG を優先的に挿入し、APOBEC3B、F は GA→AA を優先的に挿入することが、培養細胞を用いた実験から明らかとなっている (図 1d)。そこで筆者らは、観察された G→A 変異部位の前後 5 塩基について検討を行った。その結果、G→A 変異部位の後ろ 1 塩基にのみ非ランダムな指向

性が確認され ($P = 0.0000012$)、また、この箇所には G または A が顕著に確認された。この傾向は APOBEC3 (特に B, F, G) の指向性 (図 1e) と一致することから、野生型 HIV-1 感染ヒト化マウスで確認された G→A 変異の大部分は、内在性の APOBEC3 分子群により引き起こされたことが強く示唆された。さらに、図 1f に示したような、内在性 APOBEC3 分子群に起因すると思われる高頻度な G→A 変異を有する HIV-1 DNA も複数クローン確認された。以上の結果から、生体内での野生型 HIV-1 複製においても、内在性の APOBEC3 分子群によって HIV-1 複製が負に制御されることが強く示唆された。

3) 血漿ウイルス RNA の変異効率

野生型 HIV-1 感染マウス血漿から高レベルの HIV-1 RNA (10^5 コピー以上) が 3, 6, 9, 12, 15 週目にそれぞれに検出されたが、Vif 欠損ウイルス接種マウスからは検出できなかった。APOBEC3 によると考えられる変異の傾向は、HIV-1 RNA ではほとんど観察されなかった。

D. 考察

本研究は、クローン HIV-1 がヒト化マウスという実験動物モデル内においてその遺伝子は変異し、その過程に内在性の APOBEC3 分子群が関与することをはじめて明らかにしたものである。

それぞれの APOBEC3 分子による G→A 変異挿入部位には指向性がある。たとえば、APOBEC3G は GG→AG を、APOBEC3B と F は GA→AA を優先的に挿入することが明らかとなっている。今回の HIV-1 感染ヒト化マウス感染の proviral DNA に検出された変異の傾向は APOBEC3 (特に B, F, G) の指向性と一致することから、この G→A 変異の大部分は、内在性の APOBEC3 分子群により引き起こされたことがわかった。すなわち、Vif を有する野生型 HIV-1 も APOBEC3 の標的となっていることがわかった。

個体内での HIV-1 複製過程で APOBEC3G (特に APOBEC3G と F) を破壊する Vif が存在する状況においても少数の内在性の APOBEC3 分子群によって複数の遺伝子変異が導入され、HIV-1 複製が負に制御されることがわかった。すなわち、今後、内在性 APOBEC3 の発現と機能を誘導する薬剤が開発できれば新たな治療法になりうるということがわかった。

E. 結論

生体内において APOBEC3 分子群は HIV-1 感染を明らかに負に制御していることが証明された。

F. 健康危険情報

HIV-1 の感染実験、ウイルスの保管は全て京都大学ウイルス研究所で定める感染微生物取り扱い

安全管理委員会、動物委員会、組換え DNA 委員会の規定に基づき、すべて P3 実験施設で行われた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sato K, Nie C, Misawa N, Tanaka Y, Ito M, Koyanagi Y. Dynamics of memory and naive CD8⁺ T lymphocytes in humanized NOD/SCID/IL-2R^ynull mice infected with CCR5-tropic HIV-1. *Vaccine*, 28S2:B32-37, 2010.
- 2) Inaba K, Fukazawa Y, Matsuda K, Himeno A, Matsuyama M, Ibuki K, Miura Y, Koyanagi Y, Nakajima A, Blumberg RS, Takahashi H, Hayami M, Igarashi T, Miura T. Small intestine CD4⁺ cell reduction and enteropathy in simian/human immunodeficiency virus KS661-infected rhesus macaques in the presence of low viral load. *J Gen Virol*. 91:773-781, 2010.
- 3) Urano E, Ichikawa R, Morikawa Y, Yoshida T, Koyanagi Y, Komano J. T cell-based functional cDNA library screening identified SEC14-like 1a carboxy-terminal domain as a negative regulator of human immunodeficiency virus replication. *Vaccine*, 28S2:B68-74, 2010.
- 4) Hoshino S, Konishi M, Mori M, Shimura M, Nishitani C, Kuroki Y, Koyanagi Y, Kano S, Itabe H, Ishizaka Y. HIV-1 Vpr induces TLR4/MyD88-mediated IL-6 production and reactivates viral production from latency. *J. Leukoc. Biol*. 87:1133-1143, 2010.
- 5) Sato K, Izumi T, Misawa N, Kobayashi T, Yamashita Y, Ohmichi M, Ito M, Takaori-Kondo A, Koyanagi Y. Remarkable lethal G-to-A mutations in vif-proficient HIV-1 provirus by individual APOBEC3 proteins in humanized mice. *J. Virol*. 84:9546-9556, 2010.
- 6) Izumi T, Io K, Matsui M, Shirakawa K, Shinohara M, Nagai Y, Kawahara M, Kobayashi M, Kondoh H, Misawa N, Koyanagi Y, Uchiyama T, Takaori-Kondo A. HIV-1 Vif interacts with TP53 to induce G2 cell cycle arrest and positively regulate viral replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 107, 20798-20803, 2010.
- 7) Kobayashi T, Ode H, Yoshida T, Sato K, Gee P, Yamamoto SP, Ebina H, Strebel K, Sato, Koyanagi Y. Identification of amino acids in the human tetherin transmembrane domain responsible for HIV-1 Vpu interaction and susceptibility. *J. Virol*. 85: 932-945, 2011.
2. 学会発表
- 1) Sato K, and Koyanagi Y. A novel HIV-1 infection model using humanized mice, 1st international young investigator symposium, Kumamoto, Japan, 2010.
- 2) Sato K, Izumi T, Misawa N, Ito M, Takaori-Kondo A, Koyanagi Y. Evidence for HIV-1 G-to-A hepermutation in vivo by Apobec3 proteins. *Retroviruses Meeting*, Cold Spring Harbor, New York, 2010.
- 3) Yamamoto SP, Okawa K, Masuda T, Morikawa Y, Koyanagi Y, Suzuki Y. Modulation of HIV-1 infection at late phase by an integrase-interactor, Huw1. *Retroviruses Meeting*, Cold Spring Harbor, New York, 2010.
- 4) Kobayashi T, Yoshida T, Sato K, Peter Gee, Ebina H and Koyanagi Y. Characterization of species-specific interaction between Bst-2 transmembrane domain and HIV-1 Vpu in lipid bilayers of living cells. *Retroviruses Meeting*, Cold Spring Harbor, New York, 2010.
- 5) Sato K. A novel animal model for active EBV infection in humanized mice, The 16th East Asia Joint Conference on Biomedical Research, Taipei, Taiwan, 2010.
- 6) Sato K, Misawa N, Nie C, Satou Y, Matsuoka M, Ito M, Koyanagi Y. Investigation of HIV-1 pathogenesis in humanized mice. 14th International Congress of Immunology, Kobe, 2010.
- 7) Iwami S, Sato K, Misawa N, Kobayashi T, Rob J. de Boer, and Koyanagi Y. DNA labeling system by peripheral blood of humanized mouse, the 2nd synthetic immunology workshop, Kyoto, Japan, 2010.
- 8) Kobayashi T, Yoshida T, Sato K, Peter Gee, Ebina H and Koyanagi Y. Live cell-based mutagenesis studies reveals the structural insights for human tetherin recognition by HIV-1 Vpu. 11th Kumamoto AIDS Seminar Global COE Joint International Symposium, Kumamoto, Japan, 2010.
- 9) Sato K, Izumi T, Misawa N, Kobayashi T, Ito M, Takaori-Kondo A, and Koyanagi Y. G-to-A mutations in HIV-1 provirus by APOBEC3 proteins contribute to abrogation of virus replication in humanized mice, 第10回あわじしま感染症・免疫フォーラム, 淡路島, 2010.
- 10) 佐藤佳, 岩見真吾, 三沢尚子, 伊藤守, 小柳義夫. ヒト化マウス末梢血による DNA ラベリング系の確立 -動物実験-, 第20回日本数理生物学会大会, 札幌, 2010.
- 11) 岩見真吾, 佐藤佳, Rob J. de Boer, 小柳義夫. ヒト化マウス末梢血による DNA ラベリング系の確立 -数理モデル-, 第20回日本数理生物学会大会, 札幌, 2010.
- 12) 佐藤佳, 三沢尚子, Chuanyi Nie, 佐藤賢文, 松岡雅雄, 高橋玲, 伊藤守, 高田賢蔵, 小柳義夫.

- ヒト化マウスを用いたEBV関連血球貪食性リンパ組織球症モデルマウスの確立, 第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010.
- 13) 小柳義夫、小林朋子 HIV のアクセサリー蛋白質 Vpu とその阻害蛋白テザリン、第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010.
- 14) 小林朋子、芳田剛、佐藤佳、Peter Gee、山元誠司、蝦名博貴、小柳義夫 HIV-1 Vpu 相互作用に必須な tetherin/Bst-2 膜貫通領域アミノ酸の同定, 第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010.
- 15) 蝦名博貴、鈴木康嗣、金村優香、津村斐子、小柳義夫 HIV cDNA のインテグラーゼ非依存性組込みとウイルス複製 第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010.
- 16) 小林朋子、大出裕高、佐藤佳、Gee Peter、山元誠司、蝦名博貴、佐藤裕徳、小柳義夫 Human tetherin transmembrane domain is responsible for HIV-1 Vpu interaction and susceptibility. 第24回日本エイズ学会学術集会、東京、2010.
- 17) Sato K, Koyanagi Y. Remarkable and lethal G-to-A mutations in wild-type HIV-1 provirus by individual APOBEC3 proteins in infected humanized mice model. 第24回日本エイズ学会学術集会、東京、2010.
- 18) Kobayashi T, Yoshida T, Sato K, Gee Yamamoto S, Ebina H, Koyanagi Y. Identification of amino acids in the human tetherin transmembrane domain responsible for HIV-1 Vpu interaction and susceptibility. 第33回日本分子生物学会年会、神戸、2010.
- 19) 蝦名博貴、鈴木康嗣、金村優香、津村斐子、小柳義夫 細胞内 DNA 修復システムによるレトロウイルス cDNA 組込み機能の代償 第33回日本分子生物学会年会、神戸、2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

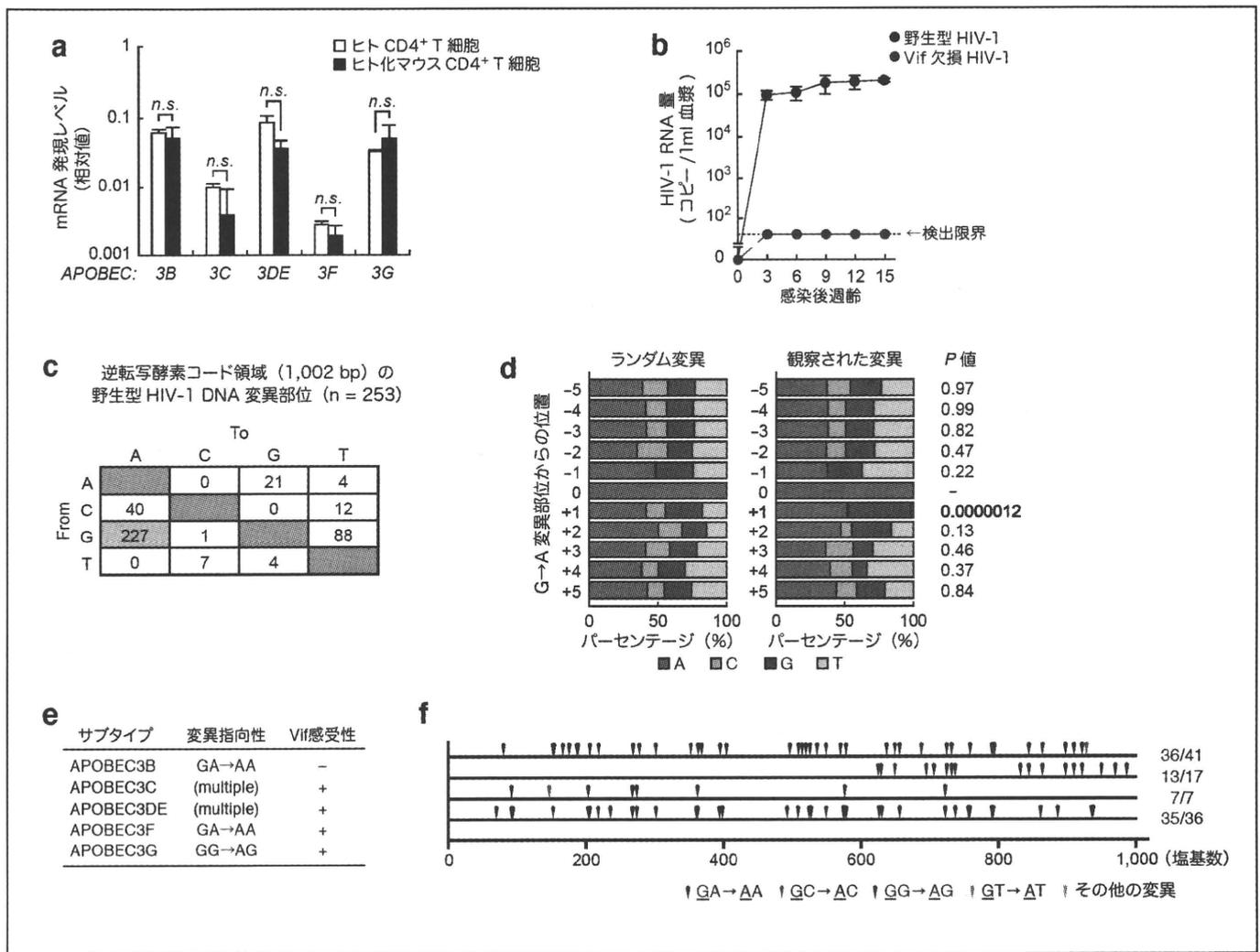


図 1 Vif と APOBEC3 分子群の相互関係

- a) APOBEC3 遺伝子の発現レベル。ヒト末梢血およびヒト化マウス脾臓より分離したヒト CD4 陽性 T 細胞から RNA を回収し、内在性 APOBEC3 遺伝子 (APOBEC3B, C, DE, F, G) の発現を real-time RT-PCR により解析した。n. s., 統計的有意差なし。
- b) ヒト化マウスでの HIV-1 複製。ヒト化マウスに野生型 HIV-1 または Vif 欠損 HIV-1 を接種し、接種後 3-15 週のマウス血漿中のウイルス RNA 量を定量した。破線は検出限界を示す。
- c) 野生型 HIV-1 の塩基配列解析。野生型 HIV-1 感染ヒト化マウス (感染後 15 週) の脾臓より DNA を回収し、HIV-1 DNA に蓄積した変異を sequencing により解析した (n = 253)。なお、塩基配列解析は、逆転写酵素をコードする 1,002 bp の領域を対象とした。
- d) G→A 変異部位の指向性。野生型 HIV-1 感染ヒト化マウス (感染後 15 週) で検出された 227 か所の G→A 変異 (図 1E) の前後 5 塩基の配列について、観察された変異部位の結果 (右, “観察された変異”) と、すべての G→A 変異がランダムに起きたと仮定した結果 (左, “ランダム変異”) を比較した。それぞれの塩基部位 (-5~+5, G→A 変異部位を 0 とした場合) における “ランダム変異” と “観察された変異” の独立性について、chi-square 検定により算出した P 値を示した。
- e) APOBEC3 分子群の指向性。APOBEC3B, C, DE, F, G の変異指向性と、Vif への感受性についてまとめた。
- f) 高頻度な G→A 変異が蓄積したクローンの例。塩基配列解析の結果、G→A が高頻度に検出された 4 クローンの結果を示した。塩基配列解析した 1,002 bp 中に検出された G→A 変異の数を各配列の最右に黒字で示した。また、上 2 クローンについては、GA→AA の数を赤字で、下 2 クローンについては、GG→AG の数を黒字で示した。

HIV-1感染および AIDS 発症抵抗性遺伝子 *Rac2* の発現調節と作用機序

研究分担者 宮澤 正顯（近畿大学医学部 教授）

研究要旨：特定の HIV-1 感染者と継続的に非防御的な性的接触を繰り返しているが、血中に HIV-1 ゲノムも抗 HIV-1 IgG 抗体も検出されない HIV-1 曝露非感染者がある。我々は、レトロウイルス中和抗体産生を制御する宿主遺伝子 *Rfv3* をマウス第 15 染色体上にマッピングする過程で、これと類似のヒト遺伝子が HIV-1 曝露非感染者における抵抗性要因となっている可能性を見出し、その分子実態を追求してきた。今年度は、1) ヒト細胞で *Rac2* 遺伝子高発現が HIV-1 感染抵抗性に結びつくしくみを分子レベルで解析するとともに、2) *Rfv3* の分子実態であると考えられる *APOBEC3* 遺伝子多型がウイルス中和抗体産生を制御するしくみを細胞レベルで解析した。

A. 研究目的

有効なウイルス感染防御法および治療法を開発するには、自然抵抗性を示す個体群の遺伝要因を明らかにするのが早道である。HIV-1 感染の成立後に初期のウイルス複製を制御する因子として宿主 MHC 遺伝子多型の重要性が明らかにされる一方で、HIV-1 感染の成立に対し抵抗性を付与すると考えられる宿主遺伝子として、ケモカイン受容体およびそのリガンドの多型や、マクロファージ・抗原提示細胞系の機能に関与するマンノース結合レクチン、DC-SIGN などの遺伝子多型が報告されている。しかし、ケモカイン受容体発現欠損の頻度は低く、イタリア・タイ・アフリカなどで把握されてきた HIV-1 曝露非感染者 (HIV-1-exposed seronegative individuals: ESN) の多くは、既知の遺伝子多型ではその感染抵抗性を説明できない。

我々はマウスレトロウイルス感染時に中和抗体産生を制御する宿主遺伝子 *Rfv3* を第15染色体にマップし、そのオーソログが存在すると考えられるヒト第22染色体上に、ESN の原因遺伝子が存在する可能性を指摘した (Kanari, Y., *et al. AIDS* 19:1015-1024, 2005)。本研究では、曝露非感染者が持つと考えられる抵抗性宿主遺伝子の分子実態を解明し、その機能を HIV-1 感染防御およびエイズ発症予防に結びつけることを最終目的とした。

B. 研究方法

1) *Rac2* 遺伝子下流エフェクター機構の解析

Rac2 遺伝子高発現が HIV-1 複製に与える効果と、*Rac2* 分子の下流エフェクター機構解析の

ため、*Rac2* 転写産物内に3ヶ所の標的配列を設定し、siRNA により遺伝子発現を抑制した。それぞれ独立の siRNA 発現ベクター、または既知のいかなる遺伝子とも相互作用しない対照配列を発現するベクターを、高発現型の *Rac2* イントロンハプロタイプを持つ THP-1 細胞に導入し、*Rac2* の発現が強く抑制された細胞株を樹立した。これらの siRNA 発現細胞株に CCR5 指向性の HIV-1 BaL 株を感染させ、上清中の p24 を定量した。また、IFN- α または LPS 刺激後の *Rac2*, *CCR5*, *CXCR4*, *CCL3*, *CCL4*, *CCL5* 各遺伝子産物の発現変動を、real-time PCR 法、Western blot 法、及び上清中タンパク質の ELISA 法により定量した。

2) ヒト末梢血単核球による表現型解析

上記の1)で見出した *Rac2* 遺伝子発現抑制による表現型の変化が、*Rac2* イントロン遺伝子型の異なるヒト個体の細胞でも見られるかどうかを確認するため、未感染健康人ボランティアから得た末梢血単核球について、その *Rac2* イントロンハプロタイプを特徴的 SNPs のタイピングにより決定し、蛍光セルソータで CCR5 及び CXCR4 の発現を調べた。また、これら細胞に試験管内で HIV-1 分子クローン BaL を感染させ、上清中の CCL5 産生を ELISA により定量した。

3) *APOBEC3* ノックアウトマウスにおけるレトロウイルス感染実験

C57BL/6 背景の *APOBEC3* 遺伝子ノックアウトマウスについては既に報告している (Takeda E. *et al. J. Virol.* 82:10998-11008, 2008)。野生型及び *APOBEC3* ノックアウトマウスにフレンド白血病レトロウイルス (F-MuLV) の感染性分子クローンを接種後、経時的に血清と脾細胞を採取した。細胞表

面マーカーとウイルス *env* 遺伝子産物 SU タンパク質発現をモノクローナル抗体を用いた蛍光セルソータ法により、ウイルス産生細胞数の定量を infectious center 法により、またウイルス中和抗体価を *Mus dunni* 細胞を標的とするフォーカス法により、それぞれ解析した。

【倫理面への配慮】

未感染健康人からの採血は、書面による研究目的の説明と署名による同意を得た上で行った。連結不能匿名化試料を用いたヒトゲノム遺伝子解析の実施については、近畿大学医学部ゲノム倫理委員会より許可を得た(「新型チップ等を用いた第 22 染色体新規 SNPs 多型の網羅的解析による HIV 感染防御ワクチン及び抗 HIV 治療薬の効果判定改善と新しい免疫治療法の開発」、平成20年5月30日承認、19-61)。

C. 研究結果

1) *Rac2* 遺伝子発現抑制による下流効果機構の解析

Rac2 高発現が HIV-1 感染抵抗性に結び付く機構を解明するため、*Rac2* 遺伝子第5イントロンに高発現型のハプロタイプを持つヒト単球系細胞株 THP-1 に *Rac2* の siRNA を導入し、*Rac2* 発現が低下したクローンを複数得た。*Rac2* 発現の低下した THP-1 細胞では、対照の siRNA を発現する細胞に比べ、HIV-1 BaL 株の複製が有意に促

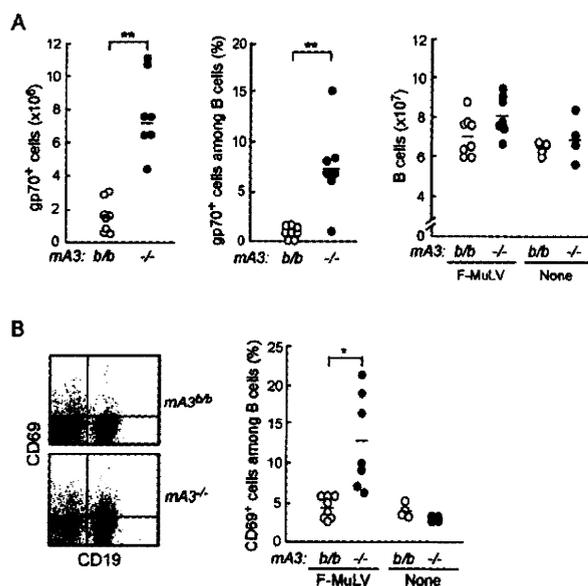


図 1. APOBEC3 ノックアウトマウスにおけるレトロウイルス感染病態。A, 脾細胞中のウイルス抗原陽性細胞数、B リンパ球中のウイルス感染細胞の割合、及び総 B リンパ球数。B, 感染 B リンパ球における活性化マーカーの発現。

進した。

そこで、これら *Rac2* siRNA 発現細胞株における遺伝子発現を対象細胞と比較したところ、IFN- α 刺激後の *CCR5* 遺伝子発現が *Rac2* 発現低下に伴って上昇していたが、*CXCR4* 遺伝子発現には大きな変化はなかった。また、*Rac2* siRNA 発現細胞では、LPS 刺激後の *CCL5* 遺伝子発現誘導が低く、対照の THP-1 細胞では刺激前から発現している *CCL5* が、siRNA による *Rac2* 発現抑制により検出されなくなっていた。

そこでタンパク質レベルの解析を行ったところ、*Rac2* siRNA 発現細胞株では *CCR5* 分子の発現が増加しており、LPS 刺激による上清中への *CCL5* 分泌は有意に減少していることが明らかとなった。なお、THP-1 細胞では元々構成的に *CCR5* の産生が見られるが、*Rac2* siRNA 発現細胞株ではそれが完全に停止していた。

2) *Rac2* 遺伝子型の異なるヒト末梢血単核球での解析

未感染健康者より得た末梢血単核球について、*Rac2* イントロンハプロタイプの決定に必要な rs2284037, rs739042, rs739041 のタイピングを PCR 法により行った。これにより高発現型及び低発現型のハプロタイプをそれぞれホモ接合で持つ個体を同定し、蛍光セルソータを用いて CD4 陽性 T 細胞及び CD14 陽性単球の *CCR5* 発現を調べた。その結果、*CCR5* の平均蛍光強度は CD4 陽性 T 細胞でも CD14 陽性単球でも高発現型ハプロタイプを持つ個体で有意に低かった。

更に、これら末梢血単核球に HIV-1 BaL を感染させ、3日後の上清中に存在する *CCR5* リガンド分子の濃度を測定した。その結果、*CCL3* も *CCL5* も、高発現型の *Rac2* イントロンハプロタイプを持つ細胞からより高濃度に検出され、特に *CCL5* の産生量は *Rac2* 高発現個体由来の細胞で有意に高かった。

3) *APOBEC3* 遺伝子多型がレトロウイルス中和抗体産生を制御する機構

高機能型の *APOBEC3* を高発現する C57BL/6 (B6) マウス (*mA3^{b/b}*)、または *APOBEC3* 遺伝子をノックアウトした B6 マウス (*mA3^{-/-}*) にフレンド白血病レトロウイルスを感染させ、脾細胞中のウイルス抗原陽性細胞数を定量したところ、以前に報告したとおり、*APOBEC3* 欠損によりレトロウイルス感染が著しく促進された(図 1)。この際、*APOBEC3* 欠損マウスにおける感染細胞の大半は B リンパ球であり、*APOBEC3* 欠損の有無やレトロウイルス感染の有無は B リンパ球の総数には有意な影響を及ぼさなかったが(図 1A)、*APOBEC3* 欠損マウスにレ

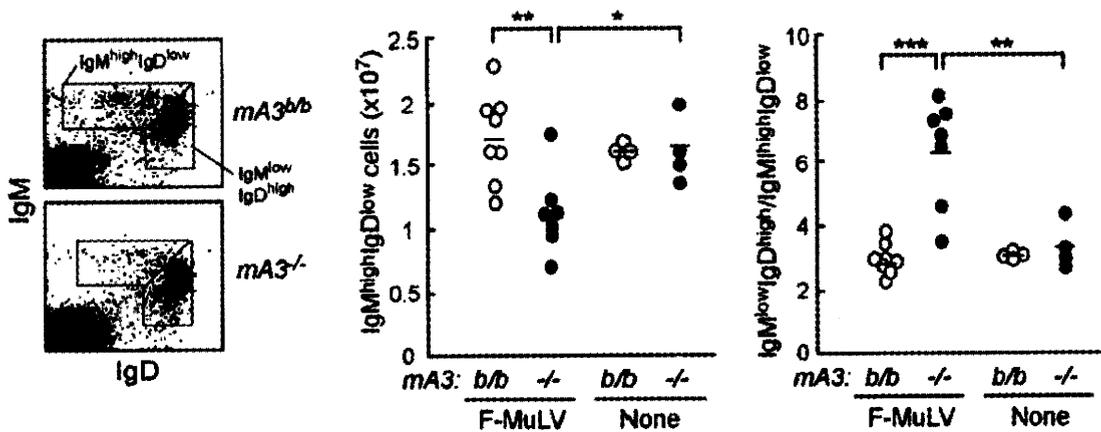


図2. マウスレトロウイルス感染は APOBEC3 欠損マウスで移行型 B リンパ球の減少を引き起こす

トロウイルスを感染させた場合にのみ、有意に多くの B リンパ球が活性化した(図 1B)。

レトロウイルス感染マウスの脾臓中における B リンパ球サブpopulationを詳細に解析したところ、骨髄から二次リンパ組織に流入した直後で、濾胞に到達する前の移行型 B リンパ球(IgM^{high}, IgD^{low})の絶対数は、ウイルス感染の有無に関わらず野生型マウスでは変動がなかったが、APOBEC3 欠損マウスにレトロウイルスを感染させた場合のみこのpopulationが有意に減少し、それに伴って移行型 B リンパ球に対する成熟 B リンパ球(IgM^{low}IgD^{high})の割合が有意に増加した(図 2)。このことから、APOBEC3 欠損下でマウスレトロウイルスは、骨髄から流入した直後の移行型 B リンパ球の傷害及び B リンパ球のポリクローナルな活性化を介して中和抗体産生を阻害しているものと考えられた。

D. 考察

これまで、*Rac2* 遺伝子第5イントロンに高発現型のハプロタイプを持つヒト個体では、その末梢血単核球が CCR5 指向性 HIV-1 の複製に対して抵抗性を示すことを観察・報告してきた。しかしながら、*Rac2* 高発現が CCR5 指向性 HIV-1 の複製制御に繋がる分子機構は明らかでなかった。

Rac2 遺伝子第5イントロンに高発現型ハプロタイプを持つヒト単球系細胞株 THP-1 を用い、siRNA を用いて *Rac2* の発現を抑制したところ、予想通り CCR5 指向性 HIV-1 の複製促進に繋がった。*Rac2* siRNA 発現細胞では CXCR4 の発現には著しい変化がないものの、IFN- α 刺激後の CCR5 発現が mRNA レベルでもタンパク質レベルでも上昇し、LPS 刺激後の CCL5 発現は、mRNA レベルでも上清中のタンパク質レベルでも有意に低下していた。特に、LPS 刺激前の構成的 CCL5 産生が、*Rac2* siRNA 発現により認めら

れなくなった。これらの結果は、*Rac2* 高発現が HIV-1 共受容体である CCR5 の発現低下と CCR5 リガンドである CCL5 の発現上昇を介して、CCR5 指向性 HIV-1 の標的細胞への吸着侵入を機能的に阻害している可能性を示唆する。

今回未感染健康人の末梢血単核球を用いた解析を行ったところ、*Rac2* 第5イントロンに高発現型ハプロタイプを持つ個体では、同じ部位の遺伝子型が低発現型ハプロタイプのホモ接合である者に比較して、末梢血 CD4 陽性 T 細胞でも CD14 陽性単球でも細胞表面の CCR5 発現が有意に低いことがわかった。さらに、これらの細胞に HIV-1 を感染させ上清中の CCL5 を測定したところ、高発現型の *Rac2* ハプロタイプを持つ個体では CCL5 産生が有意に高かった。

これら細胞株と末梢血単核球を用いた解析の結果から、*Rac2* 高発現が HIV-1 感染抵抗性に結びつくくみの少なくとも一部は、*Rac2* の下流標的分子として CCR5 の発現低下と CCL5 の発現上昇が起こることにあると考えられた。

一方、第 22 染色体上の ESN の原因遺伝子同定のきっかけとなったマウスの *Rfv3* 遺伝子については、その分子実態が APOBEC3 の遺伝子多型であるという考えが大方の支持を得ているが、細胞内レトロウイルス複製制限因子であるシチジンデアミナーゼ APOBEC3 の機能性多型が、いかにしてウイルス中和抗体産生を制御しうるのかは疑問のままであった。

今年度我々は、マウス APOBEC3 が B リンパ球により選択的に発現すること、APOBEC3 欠損状態ではレトロウイルスが B リンパ球に感染してポリクローナルな活性化を引き起こすこと、APOBEC3 欠損下でレトロウイルス感染が起こった場合、骨髄から二次リンパ組織に移動した直後の移行型 B リンパ球が選択的に減少することを明らかにした。同様の B リンパ球機能障害と抗体産生の遅延は

HIV-1 感染初期についても報告されており、免疫抑制性のレトロウイルスが初期感染確立のために共通に利用する経路である可能性がある。

我々の実験結果は感染初期のウイルス複製制御に中和抗体の果たす重要な役割を示すとともに、APOBEC3 がその生理機能として B リンパ球をレトロウイルス感染から護っていることを示す。今後、APOBEC3 欠損状態で移行型 B リンパ球が減少するしくみを解明することで、感染初期の中和抗体産生を保護・促進することにより HIV-1 感染に対する抵抗性を増強する方策にも繋がるものと考えられる。

E. 結論

Rac2 遺伝子高発現は CCR5 発現抑制と CCL5 発現増強を介して機能的に CCR5 指向性 HIV-1 の吸着侵入過程を阻害し、これにより HIV-1 暴露非感染者の感染抵抗性に寄与している可能性が示された。

APOBEC3 の生理機能の一つは B リンパ球をレトロウイルス感染から護ることであり、APOBEC3 機能欠損下でレトロウイルスは B リンパ球に感染してポリクローナルな活性化と移行型 B リンパ球の減少を引き起こし、これが中和抗体産生の抑制に繋がると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takamura, S., S. Tsuji-Kawahara, H. Yagita, H. Akiba, M. Sakamoto, T. Chikaishi, M. Kato, and M. Miyazawa. Premature terminal exhaustion of Friend virus-specific effector CD8⁺ T cells by rapid induction of multiple inhibitory receptors. *J. Immunol.* **184**:4696-4707, 2010.
- 2) Tsuji-Kawahara, S., T. Chikaishi, E. Takeda, M. Kato, S. Kinoshita, E. Kajiwara, S. Takamura, and M. Miyazawa. Persistence of viremia and production of neutralizing antibodies differentially regulated by polymorphic *APOBEC3* and *BAFF-R* loci in Friend virus-infected mice. *J. Virol.* **84**: 6082-6095, 2010.
- 3) Takamura, S. and M. Miyazawa. Response to comment on "Premature terminal exhaustion of Friend virus-specific effector CD8⁺ T cells by rapid induction of multiple inhibitory receptors." *J. Immunol.* **185**: 1349-1350,

2010.

- 4) Naruse, T. K., Z. Chen, R. Yanagida, T. Yamashita, Y. Saito, K. Mori, H. Akari, Y. Yasutomi, M. Miyazawa, T. Matano, and A. Kimura. Diversity of MHC class I genes in Burmese-origin rhesus macaques. *Immunogenetics* **62**: 601-611, 2010.
- 5) Sugimoto C., S. Watanabe, T. Naruse, E. Kajiwara, T. Shiino, N. Umano, K. Ueda, H. Sato, S. Ohgimoto, V. Hirsch, F. Villinger, A. A. Ansari, A. Kimura, M. Miyazawa, Y. Suzuki, N. Yamamoto, Y. Nagai, and K. Mori. Protection of macaques with diverse MHC genotypes against a heterologous SIV by vaccination with a deglycosylated live-attenuated SIV. *PLoS One* **5**: e11678, 2010.

2. 学会発表

- 1) 宮澤 正顯. レトロウイルス遺伝子発現と糸球体病変: 拡大するヒトレトロウイルスの世界 (特別講演). 第 45 回日本小児腎臓病学会学術集会、2010 年 7 月、大阪.
- 2) Kanari, Y., Hakata, Y., Wichukchinda, N., Irie, S., Biasin, M., Sakamoto, M., Tsuji-Kawahara, S., Takeda, E., Trabattoni, D., Piacentini, L., Fasano, F. R., Naddeo, V., Lo Caputo, S., Mazzotta, F., Rojanawiwat, A., Pathipvanich, P., Auwanit, W., Kohara, S., Sawanpanyalert, P., Ariyoshi, K., Clerici, M. and Miyazawa, M. High-level *Rac2* expression associated with novel intron polymorphisms restricts HIV-1 replication in exposed seronegative individuals. **NEKKEN Research Conference "Ten years' achievements of the Lampang HIV cohort in Northern Thailand."** October 27, 2010, Nagasaki, Japan.
- 3) 宮澤 正顯. 性感染症の最近の動向: HIV と性器クラミジアを中心に (教育講演). 第 19 回日本口腔感染症学会総会・学術大会. 2010 年 11 月. 大阪.
- 4) 宮澤 正顯、博多 義之、金成 安慶、河原 佐智代. HIV 感染移行性の分子機構: *Rac2* と *APOBEC3* (シンポジウム). 第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2010 年 11 月. 東京.

H. 知的財産権の出願・取得状況

該当するもの無し

ウイルスベクターワクチン抗原に対する免疫応答と HIV 感染制御

研究分担者	横田 恭子	国立感染症研究所免疫部	第一室長
研究協力者	寺原 和孝	国立感染症研究所免疫部	研究員
研究協力者	石毛 真行	国立感染症研究所免疫部	協力研究員
研究協力者	洪沢謙太郎	国立感染症研究所免疫部	流動研究員
研究協力者	光木 裕也	国立感染症研究所免疫部	流動研究員

研究要旨: CCR5 陽性 CD4⁺T 細胞は CCR5 陰性細胞と同程度に CXCR4 を発現し、*in vitro* で X4 型と R5 型 HIV-1 を別々に感染させた場合、侵入から integration までの過程で大きな差は認められなかったが、同時感染においては R5 型 HIV-1 の逆転写は X4 型よりも早く進行することが示唆された。また、ヒト化マウスを用いた *in vivo* の HIV-1 同時感染においても CCR5 陽性 CD4⁺T 細胞への R5 型優位の感染が示唆され、マウス個体の CD4⁺T 細胞の分化・活性化状態によって X4 型と R5 型ウイルス感染細胞の分布は特徴的であった。ヒト化マウスは初期感染時の様々な病態を反映する HIV-1 感染モデルとして有望である。

A. 研究目的

抗原提示細胞である樹状細胞(DC)や記憶 T 細胞への潜伏感染およびウイルス再活性化を制御することはエイズ病態進行阻止に重要である。本研究では、記憶 T 細胞に選択的に感染する R5 型 HIV-1 が感染者体内で初期に優位となる分子機構、エイズワクチン候補である Gag 発現麻疹ウイルスや改良型 HIV 抑制性レンチウイルスベクターが DC 等の抗原提示細胞により活性化されて発揮する T 細胞の抗 HIV 応答について、ヒト化マウスモデルを利用した *in vivo/ex vivo* および *in vitro* の系で解析することを目的とする。

B. 研究方法

1) 蛍光マーカー発現 HIV-1 および組換えレンチウイルスの作製

NL432 をベースに X4(Lai)あるいは R5(AD8)型で異なる蛍光を発する組換え HIV-1 provirus (HIV-1_{NL-E} あるいは HIV-1_{NLAD8-D})を 293T 細胞に transfect してウイルスを調整した。

EGFP を発現する組換えレンチウイルスベクター、Gag/PoL 発現プラスミド、VSV-G/Rev あるいは野生型麻疹ウイルスの envelope として N

末の一部を欠く Fusion (F)タンパクと Hemagglutinin (H)タンパク発現（九州大学・柳教授より供与）及び Rev 発現プラスミドを 293T 細胞に cotransfect してウイルスを調整した。

2) 細胞の調製

健常人より PBMC を調整し、CD4 陽性 T 細胞を negative selection kit を用いて調整した (StemCell Tech.)。分画した CD4 陽性 T 細胞を HIV-1 感染を阻害しない抗 CCR5 抗体(琉球大学医学部・田中勇悦教授より供与)で染色し、FACSaria を用いて CCR5 陽性細胞を得た。一部の T 細胞は抗 CD3 抗体(5 µg/ml)をプレートにコートし、培養液に 抗 CD28 抗体(2 µg/ml)を添加して活性化させた。

3) HIV-1 および組換えレンチウイルス感染

HIV-1 感染は 10⁶ 個の細胞に対して p24 Gag の量にして 200 ng 加え(MOI=0.2 相当)、室温で 2 時間 spinoculation した後 3 回洗浄して培養した。組換えレンチウイルスの感染は MOI=1~2 で同様に行った。

4) 逆転写産物の定量

HIV-1 感染後 40 時間あるいは 24 時間後の細胞を回収し、10⁵ 個の細胞あたり 5 µl の細胞溶解

液に調整した。これらの溶解液をテンプレートとして LTR の R と U5 あるいは U5 と Gag 領域のプライマーで proviral DNA を増幅し、TaqMan による Real-time PCR を行った。細胞あたりの HIV-1 のコピー数は β -globin 遺伝子で normalize した。

ヒト化マウスの確立と感染実験

免疫不全(NOD/SCID Jak3KO: NOJ、熊本エイズ学研究センター・岡田誠治教授より供与)マウスを繁殖させ、ヒト臍帯血由来造血幹細胞(CD133+)を新生マウスの肝臓に移植してヒト化マウスを作製した。移植 20 週前後で CD4 陽性 T 細胞が分化増殖してきたマウスに R5 型と X4 型 HIV-1 (200 ng の p24 量) を同時に経静脈的に感染させた。血中の CD4 細胞数、ウイルス量を隔週でモニターし、CD4 細胞数が顕著に減少した 3 匹を殺処分し、血液、脾臓及び骨髄細胞を採取した。T 細胞分化、活性化マーカー、ケモカイン受容体(CR)に対する抗体セットで染色し、FACScalibur で解析した。

健康人 PBMC の利用に関しては感染研医学研究倫理委員会で承認され、献血者のインフォームドコンセントを得た。また、免疫不全マウスにヒト臍帯血幹細胞を移入して HIV-1 感染モデルを確立する研究に関しては、東京臍帯血バンクと感染医学研究倫理委員会および実験動物委員会の承認を得た。動物愛護の精神に則り、動物に与える苦痛の軽減と排除に努める。

C. 研究結果

末梢血の CCR5 陽性細胞は静止期にある記憶 T 細胞の一部をなしており、同時に CXCR4 も高度に発現している。前年度 CD4⁺CCR5⁺ で活性化マーカーの一つである HLA-DR 陰性の T 細胞を純化し、entry assay を行った結果、X4 型と R5 型 HIV-1 の膜融合は CR の発現に依存するが、CCR5 陽性細胞では R5 型 HIV-1 の方が X4 型 HIV-1 よりも膜融合の進行が早いことが示唆された。少なくとも T 細胞の活性化初期(24~48 時間)には CR の発現や膜融効率に変化はなかった。更に、今年度は CCR5 陽性細胞の活性化段階の違いにより侵入後の X4 あるいは R5 型 HIV-1 の逆転写の過程が異なるのかどうかを検討した。図 1a に示すように、X4 あるいは

R5 型 HIV-1 感染後未刺激(resting)あるいは最後に TcR を刺激した(activated)細胞、あるいは 1 日前に TcR を刺激した(preactivated)後に X4 あるいは R5 型 HIV-1 に感染させ、これらの細胞を感染後 40 時間培養して逆転写産物を Real Time PCR で定量した。Preactivation により後期逆転写産物(U5/gag 右側パネル)の量は増加したが、X4 と R5 で R/U5 (前期課程、左側)および U5/gag の量的な差は認められなかった(図 1b)。従って、CCR5 陽性細胞に侵入した X4 と R5 型 HIV-1 の逆転写の進行に大きな差はないことが明らかとなった。また、核移行を示す 2LTR form や integration の過程も大きな差を認めなかった。しかしながら、X4 と R5 型 HIV-1 を同時感染させた CCR5 陽性細胞では activated 群で感染 24 時間後の DsRed の逆転写産物が EGFP のそれよりも高かったことから、両ウイルスが CCR5 陽性細胞に感染した時の逆転写の進行は R5 型 HIV-1 の方が早く進む可能性が示唆された。

生体での R5 型優位の感染機構を明らかにするため、ヒト化マウスに X4 型と R5 型 HIV-1 を同時感染させ、両ウイルスの挙動を解析した。最もウイルス感染が進行していると考えられる血中 CD4 の枯渇が顕著になった時点でのマウス 3 匹の末梢血、脾臓、および骨髄を採取して T 細胞の分化・活性化状態と感染細胞分布を FACS で解析した。これらのマウス脾臓は X4 型と R5 型 HIV-1 感染細胞の両者 (Mixed type)、R5 感染細胞のみ (R5 type)、X4 感染細胞のみ(X4 type)が存在するものに分かれた(図 2a)。どのマウスにおいても感染前に存在していた effector memory 細胞集団(CD5RA⁺CCR7⁻) が共通して消失していた(図 2b)。

一方、感染細胞における CR 発現を見ると、X4 type では CCR5 陽性細胞にも陰性細胞にも均等に広く感染していた(図 3c)のに対し、Mixed type では CCR5 陽性細胞分画での X4 感染は少なかった(図 3a 右のパネル)。R5 type では CCR5 陽性細胞が優位(31.7%の CXCR4⁺と 44.9%の CXCR4⁻)に感染していたが、Mixed type では CCR5 陽性細胞そのものの頻度が低下しており(図 3a 左のパネル)、CCR5 陰性細胞分画で R5 型感染細胞の割合が多かった(35.5%の CXCR4⁺と 38.3%の CXCR4⁻)。従って

X4 と R5 が同時に感染増殖しうる個体では、R5 感染細胞で CCR5 の強い downmodulation がおきていることが推測された。なお、R5 type のマウスでは naïve 細胞の頻度がわずかであったことから、naïve T 細胞の存在は X4 型 HIV-1 感染の持続に重要であり、血中 CD4 が消失後にもリンパ組織に存在していると考えられる。

これらのマウスの感染細胞における HLA-DR と CD4 の発現をみると、どのマウスでも R5 感染細胞の方が X4 感染細胞よりも CD4 downmodulation が強くおこっており、R5 に感染した細胞はウイルスを大量に産生していることが示唆された(図 4)。

以上のことから、R5 型と X4 型 HIV-1 の感染は個体の T 細胞の分化・活性化状態に強く左右され、ヒトにおける HIV-1 感染初期の様々な病態を反映するモデルとして有用であることが明らかとなった。

更に、HIV-1 抑制分子を発現する組換えレンチウイルスをエイズ治療あるいはワクチンとして応用することを考え、野生型麻疹ウイルスの H と F タンパクを envelope として SLAM 陽性の活性化 T 細胞および樹状細胞(DC)を標的とする MV レンチウイルスベクターを作製した。VSV-G タンパクを envelope とする従来のレンチウイルスと比較して感染価は低いものの、SLAM 発現細胞への選択的感染が示された。そこで単球由来 DC を LPS で活性化させて SLAM 発現を誘導し、HIV-1 抑制 shRNA を発現する MV レンチウイルスを導入後に HIV-1 を感染させると、アロ CD4⁺T 細胞へのウイルス伝播が抑制された。SLAM 発現はヒト化マウスの CD4⁺T 細胞の、特に central memory や early memory 細胞に多く存在していた。今後、この組換え MV レンチウイルスをヒト化マウスの HIV-1 初期感染モデルに応用してその抗 HIV 効果を評価していく。

D. 考察

細胞レベルの解析では、CCR5 陽性記憶 CD4⁺T 細胞に X4 型と R5 型 HIV-1 が同時に感染した場合、膜融合速度や逆転写速度は R5 型の方が早い傾向があった。CCR5 を発現している細胞は末梢血を占める naïve 細胞とは異なり CCR5

からのシグナルを受け取る準備ができている細胞であり、R5 型 HIV-1 に感染した際の CCR5 からのシグナル伝達系のタンパクとの相互作用がウイルスの感染を促進している可能性が考えられる。ヒト化マウスの同時感染で両方のウイルスが異なった細胞集団として検出されたマウスにおいて、CCR5 陽性細胞への X4 型 HIV-1 の感染頻度が X4 型感染細胞のみが検出されたマウスのそれと比較して少ないことは、R5 と X4 の同時感染時には CCR5 陽性細胞では R5 優位に進行するという点で、in vitro の結果と一致している。

ヒト化マウスに HIV-1 が感染すると、体内で活性化されて特に cell cycle が回っている effector memory 細胞でまず大量のウイルス産生がおこり、これらの細胞は末梢の CD4 が枯渇するころまでには死滅してしまうであろう。我々が FACS 解析したのは感染してもウイルス発現がまだ低いままの状態にある細胞集団で、このような細胞の一部はウイルス発現が低下し、潜伏感染細胞として長期に体内に持続する可能性がある。更に、ヒト化マウスでヒトと同じ抗 HIV 応答が起こるかどうかは今後検討が必要であるが、頻度は多くないものの骨髄系の単球や DC/macrophage も分化してきており、何らかの免疫応答が誘導されることは想像に難くない。

ヒト化マウスは HIV-1 感染モデルとしていくつかの側面からエイズ病態を解析するために有用であり、今後も開発・応用が必要である。我々が開発した、異なる蛍光を発する X4 型と R5 型 HIV-1 は、生体での感染細胞の分布や T 細胞の性状を解析するための重要なツールとなるであろう。

E. 結論

CCR5 陽性記憶 CD4⁺T 細胞を純化して in vitro で異なる蛍光を発する X4 型と R5 型 HIV-1 を別々に感染させた場合、侵入から integration までの過程で大きな差は認められなかったが、同時感染においては R5 型 HIV-1 の逆転写過程は X4 型よりも早く進行することが示唆された。一方、ヒト化マウスを用いた in vivo HIV-1 同時感染では、X4 型と R5 型ウイルス感染細胞が脾臓で同時に存在するものや片方だけ存在す