

- Miura, T. Quantification system for the viral dynamics of a highly pathogenic simian/human immunodeficiency virus based on an in vitro experiment and a mathematical model. *Retrovirology* 9:18, 2012.
- 2) Morita, D., Yamamoto, Y., Suzuki, J., Mori, N., Igarashi, T., and Sugita, M. Molecular requirements for T cell recognition of N-myristoylated peptides derived from the simian immunodeficiency virus Nef protein. *J. Virol.* 87:482-8, 2013.
 - 3) Fujita, Y., Otsuki, H., Watanabe, Y., Yasui, M., Kobayashi, T., Miura, T., and Igarashi, T. Generation of a replication-competent chimeric simian-human immunodeficiency virus carrying *env* from subtype C clinical isolate through intracellular homologous recombination. *Virology* 436:100-111, 2013.
 - 4) Takahashi, N., Nomura, T., Takahara, Y., Yamamoto, H., Shiino, T., Takeda, A., Inoue, M., Iida, A., Hara, H., Shu, T., Hasegawa, M., Sakawaki, H., Miura, T., Igarashi, T., Koyanagi, Y., Naruse, T.K., Kimura, A., and Matano, T. A novel protective MHC-I haplotype not associated with dominant Gag-specific CD8⁺ T-cell responses in SIVmac239 infection of Burmese rhesus macaques. *PLoS ONE* 8:e54300, 2013.
2. 学会発表
- 1) Hiroyuki Otsuki, Takeshi Kobayashi, Tatsuhiko Igarashi, Tomoyuki Miura: Generation of monkey-tropic human immunodeficiency virus strains carrying a variety of CCR5-utilizing *env* genes from HIV-1 subtype C clinical isolates through intracellular homologous recombination 19th East Asia Joint Symposium on Biomedical Research, Seoul, Korea, 2012.8.22-25
 - 2) 三浦智行、大附寛幸、米田舞、一瀬裕太郎、小林剛、五十嵐樹彦：霊長類エイズモデル感染病態に関わるウイルスゲノム基盤に関する研究 第154回日本獣医学会、岩手、2012年9月14-16日
 - 3) 岩見真吾、de Boer Rob、五十嵐樹彦、三浦智行：培養細胞実験と数理モデルによるウイルス感染動態の定量化ーウイルス病原性の解明への応用ー 第60回日本ウイルス学会、大阪、2012年11月13-15日
 - 4) 大附寛幸、一瀬裕太郎、小林剛、原田恵嘉、吉村和久、鳴海哲夫、玉村啓和、松下修三、五十嵐樹彦、三浦智行：中和感受性を増強する薬剤による抗 HIV-1 治療戦略に向けた新規 SHIV/アカゲザル評価モデルの開発 第60回日本ウイルス学会、大阪、2012年11月13-15日
 - 5) 米田舞、一瀬裕太郎、大附寛幸、松田健太、松下修三、五十嵐樹彦、三浦智行：サルに順化した CCR5 指向性 SHIV-MK38 の中和抗体に対する抵抗性 第60回日本ウイルス学会、大阪、2012年11月13-15日
 - 6) 渡部 祐司、岩見 真吾、西山 由利子、森 ひろみ、三浦 智行、五十嵐 樹彦：高病原性 SHIV 感染サルにおける感染マクロファージの半減期の推定 第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012年11月13日-15日
 - 7) 岩見真吾、Rob de Boer、三浦智行、西村佳哲、五十嵐樹彦：SHIV 感染アカゲザルにおいて病原性を決定づけるウイルス感染動態の探索ー数理モデルによるデータ解析の視点からー 第26回日本エイズ学会、神奈川、2012年11月24-26日
 - 8) 大附寛幸、一瀬裕太郎、小林剛、五十嵐樹彦、三浦智行：細胞内相同組換えを利用した CCR5 指向性サブタイプC HIV-1 由来 *env* を持つサル指向性 HIV-1 の作出 第26回日本エイズ学会、神奈川、2012年11月24-26日
 - 9) 中村碧、高原悠佑、松岡佐織、阪脇廣美、三浦智行、五十嵐樹彦、小柳義夫、成瀬妙子、木村彰方、俣野哲朗：サルエイズモデルにおける抗HIV薬投与下のCTL誘導治療ワクチン接種効果の解析 第26回日本エイズ学会、神奈川、2012年11月24-26日
 - 10) 廣田雄樹、鳴海哲夫、橋本知恵、吉村和久、原田恵嘉、大附寛幸、三浦智行、五十嵐樹彦、相川春夫、野村渉、松下修三、玉村啓和：HIV 外被タンパク質 gp120 を標的とするインドール型低分子 CD4 ミミックの創製研究 第26回日本エイズ学会、神奈川、2012年11月24-26日
- 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

潜伏感染細胞の同定とその成立機構

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	主任研究官
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	渋谷謙太郎	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：

細胞ゲノムに挿入されて最小レベルの転写を解析する Lenti EGFP-Nef-LTR を作製し、Tat の非存在下では LTR からの転写は低レベルであることを確認した。一方、ヒト化マウスの X4 型と R5 型 HIV-1 の重複感染において、X4 型 HIV-1 の感染のみが一過性に終わり、潜伏感染が成立している細胞集団が存在する可能性が示唆された。従って、試験管内と生体内の系において潜伏感染の成立と転写制御の過程を解析することが可能となった。

A. 研究目的

静止期で維持される試験管内潜伏感染モデルシステムを確立し、ゲノムに挿入された proviral DNA の発現制御、及びヒト化マウスにおける HIV 潜伏間細胞集団の同定とその性状を解析することにより、潜伏化の成立に関与する細胞因子を明らかにする。

B. 研究方法

1. 組換えレンチウイルスベクターの作製

細胞ゲノムに挿入されて最小レベルの転写を解析するための P2 レベルのレンチウイルスベクターを作製した(図 1 上)。この DNA を transfer vector として 293T 細胞のカルシウム法でトランスフェクションし、組換えレンチウイルス Lenti EGFP-Nef-LTR を作製した。

2. LTR からの遺伝子発現解析

Tat 遺伝子を強制的に発現する Jurkat/tat と Jurkat/- に Lenti EGFP-Nef-LTR を MOI=0.5 で感染させ、感染後 2, 4, 7 日後の GFP 発現細胞の変化をフローサイトメーターで解析した。

3. ヒト化マウスの確立と HIV 感染

NOJ 免疫不全マウス(NOD/SCID/Jak3^{null})にヒト臍帯血造血幹細胞を移入したマウス(ヒト化マウス)を作製した。ヒト T 細胞が十分分化発達してきたマウスに X4 型(緑)あるいは R5 型(赤)蛍光 HIV-1

を感染させ、特異的なプライマーによる定量的 RT-PCR 法で両ウイルスの血中量を測定すると同時に、感染細胞の分画とその動態についてフローサイトメーターで解析した。

(倫理面への配慮等)ヒト臍帯血や末梢血は、それぞれ東京臍帯血バンクと日本赤十字社から、関係する倫理委員会の承認のもとに譲渡された。動物実験は国立感染症研究所の実験動物委員会の承認を得、動物愛護の精神に則って実験を行った。

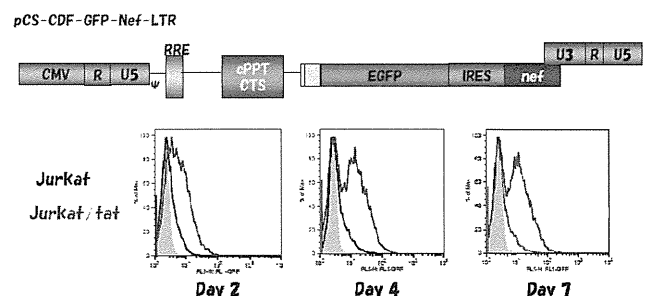


図 1. HIV の潜伏感染を模倣する LTR の発現制御解析ツール

Jurkat 細胞への組換えレンチウイルスの感染とその後の発現をフローサイトメーターで解析した。

C. 研究結果

静止期の記憶 T 細胞への潜伏感染では、一度活性化されてエフェクター T 細胞になる過程で HIV に

感染した細胞の一部が記憶 T 細胞となって長期に存在すると考えられているが、そのような記憶 T 細胞がどのようにして生じるのかはまだわかっていない。従って、HIV が潜伏する過程そのものも不明である。通常の HIV 感染では、感染後ウイルス増殖による細胞死が誘導されるため、試験管内での潜伏感染細胞の解析は容易ではない。そこで、HIV の潜伏と最低限(nef)のウイルス mRNA の発現をモニターするための組換えレンチウイルスベクター Lenti EGFP-Nef-LTR を作製した。このウイルスを Tat の発現あり無しの Jurkat 細胞に感染させ、GFP の発現を解析したところ、予想通り Tat 発現下では GFP の発現が時間経過につれて高まったのに対し、Tat 発現の無い細胞ではごく低レベルの遺伝子発現が維持されることが観察された。従って、この Lenti EGFP-Nef-LTR ウイルスは初期培養細胞の感染と潜伏化の過程を解析するツールとして有用である。

一方、生体内における潜伏感染細胞同定のため、我々の確立した NOJ ヒト化マウスで発達してくる T 細胞の分化活性化度や HIV 感染の特徴について詳細に解析した結果、レシピエントを最初に放射線照射するかしないかで、発達に時間的差はあるものの、分化してくる T 細胞の性状には大きな違いはないことが明らかとなった。そこでこれらのヒト化マウスに我々の開発した異なる蛍光を発現する X4 型と R4 型 HIV-1 を同時に同量感染させ、感染細胞の分布や血中ウイルス量の変化をモニターしたところ、多くの場合両ウイルスともにヒト化マウス体内で増殖はするが、感染後 5-6 週たった時点で X4 型ウイルスは検出されなくなる傾向にあった。通常ヒト化マウスへの HIV 感染では、ウイルス増殖は長期に一定レベルで持続することが知られている。しかしながら、我々の同時感染系では、R5 型 HIV-1 の存在下で X4 型ウイルス感染が抑制されることをこれまで観察しており、X4 型 HIV-1 が特定の細胞集団に潜伏感染細胞として存在するか否か、存在するとすればその細胞がどういう特徴を持っているのかを今後明らかにしていく必要がある。

D. 考察

記憶 T 細胞での潜伏感染の成立の機構を明らかにするためには、記憶 T 細胞そのものの成立機構を明らかにする必要があると思われる。我々の作製

した minimum HIV ベクターは、記憶 T 細胞になりうる集団を特定するために有用であると期待している。一方、試験管内の培養細胞のみを用いた解析には限界があることも十分考えられる。ヒト化マウスの HIV 重複感染モデルは、これまでの試験管内実験では明らかにできない生体内(組織)での造血系細胞同士の相互作用も含めた環境下で HIV の感染と潜伏化の過程を解析することを可能とするであろう。更に、樹状細胞等、HIV に感染して極低レベルのウイルスを産生する抗原提示細胞の存在も、生体内の潜伏感染成立と再活性化に関わる重要な細胞であることを念頭に置いて今後の解析を進めていく。

E. 結論

細胞にゲノム挿入後の最低レベルの LTR からの発現を解析するツールとして組換えレンチウイルスベクター(Lenti EGFP-Nef-LTR)を作製した。一方、ヒト化マウスの X4 型と R5 型 HIV-1 の重複感染では X4 型 HIV-1 の感染のみが一過性に終わり、潜伏感染が成立している可能性が示唆された。従って、試験管内と生体内の系において潜伏感染の成立と転写制御の過程を解析することが可能となった。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Terahara, K., Ishige, M., Ikeno, S., Mitsuki, Y-y, Okada, S., Kobayashi, K. and Tsunetsugu-Yokota, Y.: Expansion of activated memory CD4⁺ T cells affects infectivity of CCR5-tropic HIV-1 in humanized NOD/SCID/JAK3^{null} mice. PLoS One, 8:e53495, 2013.
- 2) Tsunetsugu-Yokota, Y. and Terahara, K.: Receptor usage and the pathogenesis in acute and chronic virus infections. Front. Microbiol.3:289, 2012.
- 3) Sugimoto, C., Nakamura, S., Hagen, S.I., Tsunetsugu-Yokota, Y., Villinger, F., Ansari, A.A., Suzuki, Y., Yamamoto, N., Nagai, Y., Picker, L.J., Mori, K.: Glycosylation of SIV influences immune-tissue targeting during primary infection that leads to immunodeficiency or viral control J. Virol. 86:9323-9336, 2012.

- 4) Nomura, T., Yamamoto, H., Shiino, T., Takahashi, N., Nakane, T., Iwamoto, N., Ishii, H., Tstukamoto, T., Kawada, M., Matsuoka, S., Takeda, A., Terahara, K., Tsunetsugu-Yokota, Y., Iwata-Yoshikawa, N., Hasegawa, H., Sata, T., Naruse, T.K., Kimura, A., Matano, T. Association of major histocompatibility complex class I haplotypes with disease progression after simian immunodeficiency virus challenge in Burmese rhesus macaques. *J. Virol.* 86:6481-6490, 2012.
- 5) Mitsuki, Y-Y., Terahara, K., Shibusawa, K., Yamamoto, T., Tsuchiya, T., Ishige, M., Kobayashi, K., Morikawa, Y., Nakayama, T., Takeda, M., Yanagi, Y., and Tsunetsugu-Yokota, Y. HIV-1 infection accelerates measles virus infection by upregulating signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) in CD4⁺ T cells. *J. Virol.* 86:7227-7234, 2012.
- 6) Takeuchi, K., Nagata, N., Kato, S., Ami, Y., Suzaki, Y., Suzuki, T., Sato, Y., Tsunetsugu-Yokota, Y., Mori, K., Nguyen, V. N., Kimura, H., and Nagata, K. (2012). Wild-type measles virus with the hemagglutinin protein of the Edmonston vaccine strain retains wild-type tropism in macaques. *J. Virol* 86:3027-3037, 2012.

2. 学会発表

- 1) Ikeno, S., Terahara, K., Ishige, M., Suzuki, M., Mitsuki, Y-y, Morikawa, Y., Nakayama, T., Tsunetsugu-Yokota, Y.: Application of humanized mice for the evaluation of measles virus vector. The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Hyogo, September 11-14, 2012.
- 2) Tsunetsugu-Yokota, Y., Ishige, M. Ikeno, S., and Terahara, K.: Humanized mice as an animal model for human-tropic virus infection, in Immunological Mechanisms of Vaccination, Keystone Symposium, Ottawa, Canada, December 13-18, 2012.
- 3) 池野翔太、寺原和孝、石毛真行、鈴木基臣、光木裕也、森川裕子、中山哲夫、横田恭子。ヒト化マウスの麻疹ウイルスベクター評価系への応用。

第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、平成24年11月。

- 4) 岩田奈緒子、永田典代、鈴木忠樹、佐藤由子、横田恭子、西條政幸、森川茂、長谷川秀樹。SARS-CoV感染動物モデルを用いたUV不活化SARS-CoVの副反応発生機序について。第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、平成24年11月。

II. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

HIV 潜伏・再活性化に関与する ウイルス蛋白と宿主因子の分子機構

研究分担者 徳永 研三 国立感染症研究所 感染病理部 主任研究官
研究協力者 小山 貴芳 国立感染症研究所 感染病理部 協力研究員

研究要旨： 先頃発見された SAMHD1 はマクロファージや樹状細胞で高発現している抗ウイルス宿主因子であるが、これ以外の未知の抗ウイルス蛋白が存在する可能性が示唆されている。今回我々はそのような宿主因子の探索およびそれを標的とする HIV-2 アクセサリー蛋白 Vpx についての機能解析により以下の結果を得た。(1) 昨年度のプロテオーム解析により同定された 8 種類の候補蛋白の過剰発現または SAMHD1 との共発現実験を行った結果、いずれも HIV-1 の感染性に影響を与えることはなかった。(2) 免疫沈降実験により候補蛋白 8 種類のうち 7 種類が Vpx と相互作用を示し、更にそのうち 3 種類が強力に Vpx と結合していることが明らかになった。(3) 遺伝子サイレンシング実験により、Vpx との強い結合性を示す 3 種類の候補蛋白のうちの 1 つが Vpx の補助因子である可能性が示唆された。(4) HIV/AIDS 患者の末梢血リンパ球またはマクロファージにおける SAMHD1 の発現レベルを解析した結果、CD4 を指標とした病態進行との間に相関性は認められなかった。

A. 研究目的

HIV の潜伏感染及び再活性化で主要な役割を果たすマクロファージ及び樹状細胞で発現している宿主蛋白の中で、HIV-2 アクセサリー蛋白 Vpx に抑制される新規抗ウイルス宿主因子 SAMHD1、またはそれ以外の抗ウイルス宿主因子の存在に近年注目が集まっている。本研究課題においては、SAMHD1 以外の抗ウイルス宿主因子候補の探索を行い、それを抑制する抗宿主因子としての Vpx の機能解析を分子レベルで行うことを目的とした。また HIV-1 感染者由来の未刺激または刺激後の末梢血リンパ球、あるいはマクロファージより抽出した RNA を用いて real-time RT-PCR を行い、SAMHD1 の mRNA 発現レベルと病態進行の相関性の有無を検討した。本研究で解析するこれらウイルス蛋白および宿主因子は、将来的に治療の標的となり得ることが充分に考えられることから、抗ウイルス宿主因子を賦活化する低分子化合物、薬剤およびワクチン

の開発や、遺伝子治療への応用に資する研究を行う。

B. 研究方法

1. 発現プラスミド DNA の構築

Vpx 発現ベクターとして HIV-2 GH1-2 プロウイルス DNA を鋳型に PCR を行い、増幅断片をまず pFC15K HaloTag CMVd1 vector (Promega) の SgfI/XhoI site に挿入して作製した。次に、レンチウイルスベクター版の作成のために、上記発現ベクターを鋳型として Vpx-HaloTag 領域を PCR 増幅した後、レンチウイルストランスファーベクター pWPI の PmeI site に挿入して作製した。また昨年、樹状細胞を用いて行ったプロテオーム解析において候補に挙げた 8 種類の蛋白について、各々の shRNA レンチベクターベース発現ベクターを構築した。感染実験用に CD4 と CCR5 を同時に発現できる哺乳類細胞発現ベクターを、pCAGGS をベースとして、PCR 増幅した CD4、IRES

(internal ribosome entry site)、および CCR5 の順に上流から挿入して作製した。作製した各発現ベクターの遺伝子配列は ABI3130 シークエンサー (ABI) により確認した。

2. 免疫沈降実験

HA タグ付加候補蛋白発現ベクターまたは SAMHD1 (ヒト、サル、マウス由来) 発現ベクターと、FLAG タグ付加または上記 HaloTag 付加 Vpx 発現ベクターを 293T 細胞にコトランスフェクションして 36 時間培養した。細胞溶解液を加えて遠心した上清を用いて、抗 Flag 抗体ビーズ (Sigma) または HaloTag ビーズ (Promega) による免疫沈降反応を行った。抗 HA タグ・モノクローナル抗体を用いた沈降物のウェスタンブロット (IP-Western) 法により、Vpx と候補蛋白または SAMHD1 との相互作用を検討した。

3. 感染実験

昨年作製した 8 種類の候補蛋白及び SAMHD1 の哺乳類細胞発現ベクターを (各々、あるいは SAMHD1 と) CD4/IRES/CCR5 発現ベクターと共にヒト胎児腎細胞 293T へコトランスフェクションした。同時にウイルスの preparation のために、昨年作製した Vpr-RRE 発現ベクター + 空レンチトランスファーベクターまたは Vpr/Vpx 融合型発現ベクター + Luciferase レンチトランスファーベクター (これも昨年作製) をパッケージングベクター及び CCR5 指向性 (R5) HIV-1 ADA 株由来 Env 発現ベクターと共に 293T 細胞へコトランスフェクションし、48 時間後に上清中のウイルス量を p24 ELISA Kit により定量した。上記候補蛋白と CD4/CCR5 発現細胞を 96 well plate に撒き直した後、10 ng p24 量の R5Env-pseudotyped レンチベクターウイルスを感染させた。48 時間後に 100 μ l のライシスバッファー (Promega) を加えて細胞を溶解した。そのうちの 25 μ l を用いて、ルシフェラーゼ活性を Centro LB 960 (Berthold) を用いて測定することにより、感染性を定量化した。

4. 遺伝子サイレンシング実験

各 shRNA 発現レンチベクター、パッケージングベクター及び水疱性口炎ウイルス G 蛋白 (VSV-G) 発現ベクターを 293T 細胞へコトランスフェクションし、48 時間後に上清中のウ

イルス量を p24 ELISA Kit により定量した。単球系細胞株 THP-1 に各 shRNA レンチベクターを MOI 50 で transduce して 96 時間培養した。その間、コントロール用の Vpr-RRE 発現ベクターまたは Vpr/Vpx 融合型発現ベクターと、Luciferase レンチトランスファーベクター、パッケージングベクター及び VSV-G 発現ベクターと共に 293T 細胞へコトランスフェクションし、48 時間後に上清中のウイルス量を p24 ELISA Kit により定量した。前述の shRNA レンチベクターで transduce した各 THP-1 細胞に PMA (30 ng/ml; Sigma) を添加して 18 時間培養した後、Luciferase レンチベクターウイルスを 50 ng 感染させた。48 時間後に 100 μ l のライシスバッファーを加えて細胞を溶解、そのうちの 25 μ l を用い、ルシフェラーゼ活性を測定して感染性を定量化した。

5. Real-time RT-PCR 実験

東大医科研の岩本愛吉先生と立川愛先生の御協力により、また豪州王立パース病院の Simon Mallal 所長及び David Nolan 博士の御協力により HIV/AIDS 患者検体を得た。そのうち東大科研サンプルより 32 人と王立パース病院サンプルより 24 人の未刺激末梢血リンパ球より、または東大医科研サンプル 14 人の刺激末梢血リンパ球あるいはそれらをマクロファージに分化させてそれぞれインターフェロン α (IFN α) 処理/未処理したものから、RNAqueous Kit (Ambion) を用いてトータル RNA を単離した。段階希釈したコントロール (GAPDH) 及び標的遺伝子 (SAMHD1) のスタンダードプラスミドとそれぞれのプライマー及び Taq-man プローブ 2 色 (GAPDH, Cy5; SAMHD1, FAM)、QuantiTect Multiplex RT-PCR (Qiagen) を用いて Mx3005P (Stratagene) による real-time RT-PCR を行い、標準曲線の linearity を確認した。患者検体における各遺伝子の発現レベルを multiplex real-time RT-PCR により定量した。

[倫理面への配慮] 遺伝子組換え実験は、国立感染症研究所・組換え DNA 実験安全委員会において平成 20 年 4 月 30 日付け承認番号・機 20-16 により、また大臣確認 (平成 20 年 10 月 21 日、国文科振第 31 号、感染研承認番号 大 20-10) により承認を得たプロトコールに従っ

て行われた。また患者検体と用いた実験は、国立感染症研究所・ヒトを対象とする医学研究倫理審査において、平成24年3月15日付け承認番号347 また平成24年7月2日付け承認番号348により承認を得たプロトコールに従って行われた。

C. 研究結果

1. 候補蛋白発現による HIV-1 感染抑制の有無.

昨年度作製した8種類のVpx標的宿主因子候補蛋白の発現ベクターを用いて、これら候補蛋白がHIV-1感染を抑制するか否か、また感染に用いるウイルスに取り込ませたVpxにより抑制が解除されるか否かについて検討した。293T細胞でのトランジェントな発現実験系において感染実験を行うために、トランスフェクションが成立していない細胞への感染を避けるため、感染に用いるウイルスに対してはVSV-G-pseudotypingを行わず、R5Envによるpseudotypingを行い、標的細胞(候補蛋白発現細胞)でCD4/CCR5を共発現させる方法を取った。感染実験の結果、いずれの細胞においてもVpxの有無によらずHIV-1感染抑制効果は特に認められなかった。また候補蛋白とSAMHD1の共発現においても同様に抑制効果は観察されなかった。

2. Vpxと宿主候補蛋白の相互作用の検討.

FLAGタグ付加Vpx発現ベクターとのコトランスフェクション後の抗Flag抗体ビーズを用いたIP-Western法により、昨年度のプロテオーム解析により得られた8種類のVpx標的宿主因子候補蛋白のうちの7つのバンドが検出された。これらの中には強度intensityが低いバンドも含まれていたため、抗体フリーの方法として、HaloTag付加Vpx発現ベクターとのコトランスフェクション後のHaloTagビーズを用いたIP-Western法を行った。その結果、3種類の候補蛋白において非常に特異的なバンドが検出された。引き続き行う遺伝子サイレンシング実験において、この3つの候補宿主蛋白に焦点を絞ることにした。

3. 候補蛋白の遺伝子サイレンシングによる HIV-1 感染性への影響の有無.

明らかにVpxと相互作用を示した上記3種類

の候補蛋白のshRNA発現レンチベクターを作製、293T細胞へのトランスフェクションにより産生させたベクターウイルスを用いてTHP-1細胞でtransduceさせた。48時間後に一部の細胞を回収して溶解し、ウェスタンブロット法により、3種類の遺伝子全てにおいて比較的効率よくサイレンシング出来ていることが判った。PMA処理によりそれらの細胞を分化させた後に、Vpx(+/-)HIV-1を感染させた。2種類の候補蛋白ノックダウン細胞においては、Vpxの有無によらずHIV-1感染効率に全く変化は認められなかったが、残り1種類の候補蛋白のノックダウンでは、Vpxによる感染増強能が低下していた。このことから、この候補蛋白はVpxの補助因子として機能している可能性が示唆された。

4. HIV/AIDS患者におけるSAMHD1の遺伝子発現レベルと病態進行の相関性.

HIV-1感染者においてSAMHD1のmRNA発現レベルが高いほど、CD4陽性細胞数が多い、つまり病態進行が遅いか否かについて検討した。日本及び豪州のHIV/AIDS患者それぞれ32名・24名の末刺激末梢血リンパ球、または日本の14名の患者の刺激リンパ球とマクロファージ(それぞれIFN α +/-)よりトータルRNAを抽出し、コントロールのhouse-keeping geneとしてGAPDHを、抗ウイルス宿主因子としてSAMHD1を標的にreal-time RT-PCRを行った。末梢血リンパ球とマクロファージの両方においてIFN α 処理の有無はSAMHD1の発現に殆ど影響を与えないが、末梢血リンパ球とマクロファージの比較においてはマクロファージでのSAMHD1の発現が10倍近く高いことが明らかになった。しかしながらSAMHD1の発現レベルとCD4カウントの間には殆ど相関性が認められなかったことから、生体内においてSAMHD1はHIV-1の病態制御に寄与していない可能性が示唆された。

D. 考察

昨年度プロテオーム解析により同定された8つの候補蛋白の過剰発現によるHIV-1感染抑制効果を最初に調べたところ、どの蛋白の過剰発現においてもHIV-1の感染効率に影響を与えることはなかった。これら候補蛋白が

SAMHD1 の補助因子である可能性を検討するため、各蛋白と SAMHD1 の共発現実験を行ったが、いずれにおいても HIV-1 の感染性に変化はなかった。先頃、仏国のグループにより、SAMHD1 が HIV-1 の逆転写に必要な細胞内 dNTP を加水分解して枯渇させることにより HIV-1 の感染を抑制することが報告された

(Lahouassa et al. *Nat. Immunol.* 12;13:223-8, 2012) が、更に SAMHD1 のそうした機能が効果的に発揮されるのは、樹状細胞、マクロファージ、そして静止期 T リンパ球 (Baldauf et al. *Nat Med.* 18:1682-7, 2012) のように低 dNTP pool 状態の細胞のみであり、逆に一般的な細胞株では高い dNTP pool レベルが維持されているため、SAMHD1 発現下においても HIV-1 は充分量の dNTP を利用できることが明らかになってきた。それゆえ今回用いた 293T 細胞のように dNTP 量が豊富であると予想される細胞株では、共発現実験において SAMHD1 およびその補助因子の効果は殆ど認められない可能性が考えられる。従って、それらを過剰発現実験で検証するためには少なくとも、低 dNTP 量であることが既知の細胞を用いる必要がある。SAMHD1 の機能解析によく用いられる単球系細胞株 THP-1 は上記の点から低 dNTP pool 状態であると考えられるが、我々はこの細胞株を用いて Vpx と相互作用を示す 3 種類の蛋白の遺伝子サイレンシング実験を行った。その結果、1 種類の候補蛋白において逆に Vpx の機能低下が認められたことから、この候補蛋白は抗ウイルス宿主因子ではなく、むしろ Vpx の補助因子である可能性が考えられた。しかしながら、本実験では、THP-1 細胞における Vpx の有無による HIV-1 感染増強能の差が、わずか 3 倍程度しかなく、ノックダウン効果もやや部分的であったため、今後更なる追試実験が必要である。HIV/AIDS 患者検体を用いた SAMHD1 の mRNA 発現解析においては、SAMHD1 の発現レベルは CD4 カウントを指標とした病態進行とは殆ど相関しないことが考えられた。一方で、我々はこの一連の実験において大変興味深い知見を得た。それは SAMHD1 の発現レベルは、IFN α 処理の有無では差がなく、マクロファージへの分化が発現上昇に重要であるということである。更に重

要なことに、SAMHD1 の発現レベルがリンパ球に比べて非常に高いマクロファージにおいても、HIV-1 は効率よく感染するが、SAMHD1 発現レベルに変化のない IFN α 処理マクロファージにおいて、HIV-1 感染が完全にブロックされるという結果を、我々は得ている。このことは SAMHD1 の HIV-1 に対する抗ウイルス宿主因子としての活性は非常に弱く、未知の IFN 誘導型宿主因子が強力に抗ウイルス活性を有している可能性を示唆するものである。我々はその様な宿主因子の探索も視野に入れて今後研究を展開していく予定である。

E. 結論

- 1) プロテオーム解析により Vpx の標的宿主因子候補として昨年度に同定された 8 種類の蛋白の過剰発現または SAMHD1 との共発現実験において、いずれも HIV-1 の感染性への影響は認められなかった。
- 2) 候補蛋白 8 種類のうち 3 つが Vpx と相互作用を示しことが明らかになった。
- 3) 遺伝子サイレンシング実験により 1 種類が Vpx の補助因子である可能性が示唆された。
- 4) HIV-1 感染者の末梢血リンパ球およびマクロファージにおける SAMHD1 の遺伝子発現レベルは病態進行との相関性を示さなかった。

G. 研究発表

論文発表

- 1) Tokunaga, K. HIV-1 Vpu and BST-2/tetherin: Enemies at the Gates. *Current HIV Res.*, 10: 275-276. 2012.
- 2) Arias, J.A., Iwabu, Y., and Tokunaga, K. Sites of action of HIV-1 Vpu in BST-2/tetherin downregulation. *Current HIV Res.*, 10: 283-291. 2012.
- 3) Fujita, H., Fujimoto, K., Tokunaga, K., and Tanaka, Y. Intracellular Logistics of BST-2/Tetherin. *Current HIV Res.*, 10: 321-326. 2012.
- 4) Arias, J.A., Koyama, T., Kinomoto, M., and Tokunaga, K. Retroelements versus APOBEC3 family proteins: No great escape from the magnificent seven. *Front Microbiol.*,

3, 275, 2012.

- 5) Zheng, Y.-H., Jeang, K.-T., and Tokunaga, K. Host Restriction Factors in Retroviral Infection: Promises in Virus-Host Interaction. *Retrovirology* 9:112 2012.
- 6) Chutiwitoonchai, N., Hiyoshi, M., Hiyoshi-Yoshidomi, Y., Hashimoto, M., Tokunaga, K., and Suzu, S. Characteristics of IFITM, the newly identified IFN-inducible anti-HIV-1 family proteins. *Microbes Infect. In press.*
- 7) Koyama, T., Sun, B., Tokunaga, K., Tatsumi, M., and Ishizaka, Y. DNA damage aids HIV-1 infection of macrophages by overcoming integrase inhibition. *Retrovirology In press.*

学会発表

- 1) T. Kikuchi, Y. Iwabu, A. Kawana-Tachikawa, M. Koga, N. Hosoya, S. Nomura¹, Z.L. Brumme, H. Jessen, A. Kelleher, M. Markowitz, F. Pereyra, A. Trocha, B.D. Walker, A. Iwamoto, K. Tokunaga, and T. Miura: Anti-APOBEC3G activity of HIV-1 Vif protein from elite controllers is attenuated compared to those from untreated chronic progressors or those from individuals with acute infection. XIX International AIDS Conference, Washington D.C., USA, 2012. 7.
- 2) 張延昭、岩部幸枝、立川(川名)愛、中村仁美、David Nolan、Simon Mallal、長谷川秀樹、山岡昇司、岩本愛吉、徳永研三 : HIV-1 感染者における抗ウイルス宿主因子の発現レベルと病態進行との相関性の有無. 第 59 回日本ウイルス学会総会(大阪) 2012. 11.
- 3) 小山貴芳、Juan F. Arias、岩部幸枝、徳永研三 : HIV-2 Vpx に不活化される抗ウイルス宿主因子の探索. 第 59 回日本ウイルス学会総会(大阪) 2012. 11.
- 4) Juan F Arias、小山貴芳、岩部幸枝、横山勝、佐藤裕徳、長谷川秀樹、徳永研三 : APOBEC3G による Alu 転移抑制の分子生物学的および構造学的解析. 第 59 回日本ウイルス学会総会(大阪) 2012. 11.
- 5) 菊地正、岩部幸枝、立川(川名)愛、古賀

道子、野村滋、細谷紀彰、Zabrina L. Brumme、Heiko Jessen、Anthony D. Kelleher、Martin Markowitz、Florencia Pereyra、Alicja Trocha、Bruce D. Walker、岩本愛吉、徳永研三、三浦聡之 : HIV-1 elite controller における HIV-1 Vif の抗 APOBEC3G 活性の低下. 第 59 回日本ウイルス学会総会(大阪) 2012. 11.

- 6) 小山貴芳、Juan F Arias、横山勝、佐藤裕徳、徳永研三 : APOBEC3G の抗 Alu レトロ転移活性に寄与するアミノ酸の同定. 第 35 回日本分子生物学会(福岡) 2012. 12.

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

HIV ゲノムの潜伏化・再活性化に関わる エピジェネティック調節機構とその制御

研究分担者 渡邊 俊樹 東京大学大学院新領域創成科学研究科・教授
研究協力者 山岸 誠 東京大学大学院新領域科学研究科
メディカルゲノム専攻病態医療科学分野
小林 美栄 国立感染症研究所 免疫部
松田 有加 東京大学大学院新領域科学研究科
メディカルゲノム専攻病態医療科学分野

研究要旨：

HIV の潜伏化及び再活性化は、LTR 上で起こるエピジェネティックな変化によって転写レベルで制御される。本研究では宿主因子である Polycomb ファミリーによる HIV 制御の分子メカニズムの解析と制御可能性について検討を行う。

今年度は潜伏感染細胞株に対してノックダウン及び過剰発現実験を行うことにより、Polycomb ファミリーが LTR 上の H3K27 のトリメチル化を誘導し、LTR の活性レベルを低下させることを明らかにした。さらに single-round HIV-1 を用いた実験では Polycomb の阻害剤である DZNep が HIV-1 の再活性化に有効であることも見いだした。

続いて HIV-1 の宿主である CD4⁺T 細胞における潜伏感染細胞集団を解析するために、LTR から蛍光タンパク質を発現する新たなレポーターウイルスを作成した。このウイルスに感染した細胞は、別のプロモーターから別色の蛍光タンパク質を恒常的に発現するため、感染細胞に限定して LTR を解析することが可能である。実際にこの新しいレポーターウイルスを用いて感染実験を行ったところ、感染細胞の一部で LTR の不活性化が誘導されることが分かった。これは実際の感染者個体内で観察される状況と一致しており、この系を用いて HIV-1 の潜伏の新たな知見を得ることができると考えられた。

A. 研究目的

HIV-1 は体内で CD4⁺T 細胞に感染し、感染細胞を破壊することで、感染者に重篤な免疫不全を引き起こす。2009 年の報告では世界中に約 3400 万人の HIV-1 感染者がいると推定されており、社会に大きな影響を与えている感染症のひとつである。現在 HIV-1 感染者に対しては複数の抗 HIV 薬を併用する多剤併用療法(HAART)が行われており、AIDS の発症を効果的に防ぐことが可能である。しかし体内の様々な組織に HIV-1 latent reservoir と呼ばれる感染細胞が残存しているため、HAART によって体内から完全に HIV-1 を排除することは不可能である。Latent reservoir からのウイルスの再活性化を防ぐため

に、患者は長期に渡り抗 HIV 薬を服用しなければならず、薬剤耐性ウイルスの出現、重篤な副作用、医療費などの問題が生じており、潜伏感染ウイルスの排除が新たな課題となっている。HIV-1 latent reservoir の中でもウイルス血症の主な原因となっているのは潜伏感染 CD4⁺T cell である。この細胞ではプロウイルスの状態では HIV-1 遺伝子の発現が抑制されており、従って抗 HIV 薬の標的とならない。

このような潜伏感染細胞集団の解析と LTR の不活性化の分子メカニズムの解明が世界中で進められているが、どのような細胞において潜伏感染が成立しているのかは未だ明らかにされておらず、潜伏化成立段階に関わる分子群の

特定も不十分である。これまでに HIV の転写抑制に関わる因子は複数報告されているが、ある潜伏化モデルに特化した研究が多く、実際の宿主である CD4⁺T 細胞における分子メカニズムは不明のままである。一方で実際の HIV-1 感染者の解析から、HIV-1 のインテグレーションは転写の活性レベルが比較的变化しやすい条件的ヘテロクロマチン領域に多いことが報告されている。そこで本研究では、同領域に蓄積し、転写のダイナミズムを決定する H3K27 のトリメチル化修飾(H3K27me3)と、そのレベルを制御する Polycomb repressive complex 2 (PRC2)に注目し、PRC2 の HIV-1 遺伝子発現抑制への関与とその分子機構を検証することを目的とした。

B. 研究方法

1. 使用した細胞

HIV-1 潜伏感染細胞株 OM10.1、AHC2、U1 細胞はいずれも 10%FBS を含む RPMI1640 培地で培養した。先行研究で作成した LTR-luciferase 遺伝子が導入された HeLa 細胞は 10%FBS を含む DMEM 培地で培養した。

健常者末梢血単核球(PBMC)は、提供者の同意を得て使用した。末梢血からフィコールを用いて PBMC を分離し、PHA 存在下で活性化させた後、IL-2 を含む培地で培養を行った。T 細胞の濃縮は磁気ビーズを用いて行った。

2. 使用したウイルス

HIV-1 の潜伏化モデルには、細胞株に慢性的に感染している IIIB 株の他に、NL4-3 株及び *nef* 領域に EGFP を搭載した single-round HIV-1 (Fukumori *et al.* Microbes and Infection 2000)を使用した。また、潜伏化を検出する新たな single-round レポーターウイルスは理化学研究所バイオリソースセンター三好浩之教授が開発したレンチウイルスベクターを骨格にして作成した。

3. ウイルス遺伝子発現解析及びエピジェネティック解析

ウイルス遺伝子発現は RT-PCR で評価した。また LTR 上のメチル化ヒストンの解析は ChIP アッセイによって評価した。遺伝子のノックダウンは特異的な shRNA を設計し、レトロウイル

スベクターを用いて T 細胞株に導入した。

LTR から発現する GFP および Venus は FACS Calibur で検出し、FlowJo を用いて解析を行った。

C. 研究結果

1. 潜伏感染細胞株を用いた HIV-1 の潜伏化分子メカニズムの解析

まずエピジェネティックな抑制を解析するモデルを選出するために、HIV-1 潜伏感染細胞株として知られる OM10.1、U1、及び ACH2 について HIV-1 の転写レベルとヒストンメチル化の比較を行った。その結果、比較的 HIV-1 の転写活性が高い OM10.1 では LTR 上における H3K27me3 のレベルが低く、逆に HIV-1 の転写が抑制されている ACH2 及び U1 細胞では LTR 上の H3K27me3 の値が高いことが分かった。ChIP アッセイにおいて DNA 領域ごとに比較したところ、LTR の転写開始点上流で特に H3K27me3 が蓄積していることが分かった。このことから H3K27me3 が HIV-1 の転写抑制に関与していると考えられた。

2. HIV-1 潜伏化における Polycomb ファミリーの寄与

H3K27me3 を誘導する酵素群は Polycomb ファミリーと呼ばれ、複合体を形成して標的遺伝子上のヒストンにメチル化を導入し、クロマチン構造の凝集を誘導する。そこで HIV-1 の転写抑制に Polycomb ファミリーが関わっているかを検証するために、U1 細胞に対して Polycomb 複合体の必須因子である SUZ12 のノックダウンを行った。その結果、SUZ12 をノックダウンした U1 細胞では LTR 上の H3K27me3 レベルが低下し、HIV-1 の転写レベルの活性化が誘導された。さらに HIV-1/LTR-luciferase 細胞による潜伏化モデルでも同様の結果が得られた。さらに発現ベクターを用いて SUZ12 を過剰発現した結果、HIV-1 の転写が抑制されることがわかった。このことより Polycomb によるエピジェネティックな変化が HIV-1 の転写抑制と潜伏化に関わっていることが示された。また SUZ12 をノックダウンした細胞では Tat による HIV-1 の転写活性化の効率が大きく亢進することもわかった。

3. single-round HIV-1 を用いた潜伏化の解析

次に HIV-1 の感染から潜伏化成立までのダイナミズムを検討する為に、single-round HIV-1 を用いて解析を行った。このウイルスは LTR の下流で GFP を発現するため、LTR の活性レベルを GFP の強度で検出することが可能である。このウイルスを Molt4 細胞に感染させ、継時的に GFP 強度を検出したところ、LTR からの転写は感染後 4 日でピークを迎え、その後抑制されることが分かった。しかしながら Nef 以外の HIV-1 遺伝子を発現するため、多くの感染細胞は死滅し、潜伏化したプロウイルスを持つ細胞は一部であった。

この潜伏化モデルに対して TNF- α を用いて NF- κ B シグナルを活性化させると、GFP の発現が著しく誘導されたことから、生き残った潜伏感染細胞では HIV-1 が転写レベルで抑制されていることが分かった。そこで Polycomb による転写抑制の有無を検討するために、PRC2 の活性中心である EZH2 の阻害剤 DZNep を処理したところ、TNF- α と同様に強烈に LTR の活性化を誘導することが分かった。さらに HDAC 阻害剤である VPA を同時に処理することにより再活性化効率が増加したことから、ヒストンメチル化の導入とアセチル化レベルの低下が LTR の不活性化に重要であることが分かった。

興味深いことに、EZH2 または SUZ12 をノックダウンした Molt4 細胞を樹立し、その後 HIV-1 を感染させると、感染初期の LTR の活性レベルが増加することが分かった。このことから、Polycomb による HIV-1 の転写抑制は、感染初期から起こっていることが示された。

4. PBMC を用いた HIV-1 潜伏化モデル構築の試み

続いて、HIV-1 の宿主である CD4⁺T 細胞において同様の分子メカニズムが存在するかを検討するために、健康者 PBMC に上記の single-round HIV-1 を感染させ、GFP の検出を継時的に行った。通常の NL4-3 株などを用いた場合、新規感染が持続的に起こりウイルス増殖のピークは感染後 2 週間程で、その後転写が抑制されるまで 1 ヶ月以上かかるのに対し、本研究で用いた single-round HIV-1 は感染から継続的に転写抑制がかかるため、2 週間で完全に潜伏化した集

団が現れることがわかった。この集団に対して DZNep を処理すると GFP の強度が増加することから、正常 T 細胞においても Polycomb が LTR の抑制に関わっていることが示唆された。しかし、上記の Molt4 の場合と同様に、ウイルス遺伝子の発現により多くの感染細胞が死滅してしまい、潜伏感染細胞の取得の効率が悪いことがわかった。

5. 潜伏感染をモニターする新たなレポーターウイルスの作成

これまでの多くの研究から、潜伏化の誘導はインテグレートした LTR が不活性化されることが原因であると考えられる。そこで感染細胞の細胞死を誘導するウイルス遺伝子を排除し、LTR の下流に Venus を搭載したレポーターレンチウイルスベクターを新たに構築した。このとき、これらの下流に EF1 プロモーターから mRFP を発現する構造を付け加えたことにより、恒常的に発現する mRFP によって感染細胞に限定した解析が可能になった。また潜伏化の誘導に対する Tat の関わりを明らかにするために、LTR の下流に Tat を持つウイルスと持たないウイルスの両者を作成した。これらのウイルスベクターを VSV-G でパッケージングを行い、293T 細胞、及び Molt4 細胞に感染を行った。感染細胞を継時的に採取し、FACS を用いて mRFP 発現により感染細胞を限定したのち、Venus の強度で LTR の活性化レベルを検討した。その結果、感染細胞集団における LTR の活性レベルは多様性があることが分かった。また Tat が無いウイルスは LTR の活性レベルが非常に低く、多くは潜伏化に向かうことが分かった。

6. T 細胞における EZH2 の発現と表現型の解析

HIV-1 に対して抑制的に働く EZH2 は、宿主 T 細胞に対しても非常に重要な役割をもち、その異常は細胞に対して大きく影響する。我々はこれまでに EZH2 の過剰発現が T 細胞の NF- κ B シグナルの活性化に寄与することを報告している(Yamagishi et al., Cancer Cell, 2012)。しかし T 細胞において EZH2 の発現がどのように制御されるか明らかになっていない。そこで T 細胞に対して CD3/CD28 抗体を用いて活性化を誘導したところ、著しく EZH2 の発現が誘導されるこ

とが分かった。さらに PBMC から休止期 T 細胞を採取し、FACS を用いて CD25 の発現と EZH2 の発現を検討したところ、EZH2 の発現はヘテロであり、EZH2 の発現が高い集団では CD25 の発現も高く、活性化状態であることが分かった。

D. 考察

本研究では様々なモデルを用いて HIV-1 の不活性化を誘導するエピジェネティック因子の同定とその分子メカニズムの解析を目的として研究を進めている。今年度の成果は以下のよう
にまとめられる。①潜伏感染モデルを用いて、HIV-1 の潜伏化の維持に Polycomb ファミリーが関与していることが分かった。②Tat による転写活性化には LTR 上のクロマチン構造が影響し、Polycomb による H3K27me3 の誘導が重要であることが示唆された。③感染初期においても Polycomb による抑制が関わっており、潜伏化の誘導は感染後の早期に誘導されている可能性が示された。④潜伏感染細胞を蛍光タンパク質で検出できる新たなレポーターウイルスを構築し、感染実験に成功した。⑤HIV-1 の抑制に関わる EZH2 の発現は T 細胞の活性化状態に影響されることが分かった。

実際の LTR 上の凝集したクロマチンでは H3K27me3 を始めとする様々なエピジェネティック制御が存在すると考えられる。特に DZNep と VPA の処理によりウイルスの再活性化が強力に誘導されたことから、ヒストンのメチル化とアセチル化が協調して制御に関わっていると考えられる。Polycomb ファミリーは元々 HDAC と相互作用することが報告されており、エピジェネティックな制御系がどのように LTR 上に誘導されるかを明らかにすることが今後の課題である。

今回作成した新たなレポーターウイルスは、感染細胞集団の一部に含まれる潜伏化集団をリアルタイムで検出、解析できる系であり、非常に有用である。今回の検討の結果、ウイルスに感染している細胞集団の LTR の活性レベルはヘテロであり、一部の集団が潜伏する実際の HIV-1 感染と一致する良いモデルであると考えられる。今後は Flow cytometer を用いてこれらの細胞を分取し、それぞれの細胞の特徴や、LTR

上のエピジェネティックな制御の違い、またはインテグレーションサイトにも注目して研究を進めていく予定である。

E. 結論

HIV-1 の潜伏化の導入と維持には polycomb ファミリーが関わっており、これらの因子は T 細胞において非常に動的に制御されている。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamagishi M, Watanabe T. New Paradigm of T cell Signaling: Learning from Malignancies (Review Article). **J Clin Cell Immunol**. S12:007, 15pp, 2012.
- 2) Yamagishi M, Watanabe T. Molecular Hallmarks of Adult T Cell Leukemia (Review Article). **Front Microbiol**. 3: 334. Sep. 2012.
- 3) Iwanaga M, Watanabe T, Yamaguchi K. Adult T-cell leukemia: a review of epidemiological evidence. **Front Microbiol** 3: 322. Sep. 2012.
- 4) Nakano K, Watanabe T. HTLV-1 Rex: the courier of viral messages, making use of the host vehicle. **Front Microbiol** 3:330. Sep. 2012.
- 5) Kobayashi-Ishihara M, Yamagishi M, Hara T, Matsuda Y, Takahashi R, Miyake A, Nakano K, Yamochi T, Ishida T, Watanabe T. HIV-1-encoded antisense RNA suppresses viral replication for a prolonged period. **Retrovirology**, 9:38, 17pp. May. 2012.
- 6) Ando T, Imamura H, Suzuki R, Hideki Aizaki H, Watanabe T, Wakita T, Suzuki T. Visualization and Measurement of ATP Levels in Living Cells Replicating Hepatitis C Virus Genome RNA. **PLoS Pathogens**, 8(3):e1002561, 2012.

2. 学会発表

- 1) Watanabe T, “Polycomb—miRNA—NF- κ B linkage in ATL cells”, The 5th Annual Meeting & Symposium of The Association for HTLV and Related Diseases, IMSUT, Tokyo, 8.25-8.26, 2012.
- 2) Watanabe T, “The role of microRNAs in Adult T-Cell Leukemia”, Viruses, Genes and Cancer workshop, Venice, Italy, Oct. 25-27, 2012.
- 3) 松田有加、山岸誠、小林美栄、原 拓馬、石田尚臣、渡邊俊樹、「HIV-1潜伏化の成立と維持における Polycomb group の機能解析」、

第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪国際会議場、2012年11月.

- 4) 小林美栄、山岸誠、松田有加、中野和民、矢持忠徳、石田尚臣、渡邊俊樹、「HIV-1由来antisense RNAによるウイルス複製抑制メカニズムの解析」、第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪国際会議場、2012年11月.
- 5) 小林(石原)美栄、山岸誠、松田有加、中野和民、矢持忠徳、石田尚臣、渡邊俊樹、「HIV-1由来新規antisense RNA,ASP-Lはウイルスを制御する機能性RNAである」、第35回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場、2012年12月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

HIV 感染者における慢性的な免疫活性化と T 細胞疲弊の要因

研究分担者 立川 愛 東京大学医科学研究所
先端医療研究センター感染症分野 准教授

研究要旨：

HIV 感染慢性期では病態進行の早い血中 HIV 量が高い感染者では T 細胞が持続的な活性化状態にあり、多様なサイトカイン・ケモカインの産生能が低下していることが明らかとなっている。本研究では、CD4 陽性 T 細胞における IL-2 遺伝子のプロモーター／エンハンサー領域の DNA メチル化解析を行い、血中 HIV 量の高い感染者では特定の CpG サイト (CpG 1) が高度にメチル化されていることを明らかにした。高 HIV 量の感染者では T 細胞刺激後の IL-2 mRNA 量が低 HIV 量の感染者と比して有意に低いこと、また CpG1 におけるメチル化状態と IL2 遺伝子発現量の間に相関が見られたことから、CpG1 のメチル化は IL-2 遺伝子発現制御に重要であり、血中 HIV 量が高い HIV 感染者において IL-2 遺伝子の高度な DNA メチル化により IL-2 発現量が低下していることが示唆された。

A. 研究目的

HIV 感染症において、エイズ発症のメカニズムは未だ明らかとなっていない。HIV に感染してからエイズ発症までの期間は感染者によって大きく異なっており、未治療の感染者でも感染後 1 年でエイズを発症する場合もあれば、長期未発症者と呼ばれる感染者では 20 年以上エイズを発症しない場合もある。このような感染者間では宿主側あるいはウイルス側になんらかの相違があると考えられ、その相違を明らかにすることはエイズ発症のメカニズムを明らかにすることとなる。

近年の研究により、HIV 慢性感染期では T 細胞が疲弊しておりその機能も低下していることが明らかとなってきた。その原因として持続的な活性化が考えられるが、T 細胞の疲弊は HIV 特異的 T 細胞に限らず T 細胞全体に起きているため、抗原特異的な刺激による活性化のみならず免疫システム全体の持続的活性化に起因するものと考えられる。しかしながら慢性感染症の中でも HIV 感染症に特有に見られる T 細胞疲弊の背景にある分子メカニズムは明らかになっていない。

血中 HIV 量はエイズ発症までの期間と相関が見られる臨床指標の一つであり、HIV 感染症の免疫病態を考える上で最も重要な指標である。エイズ発症のメカニズムを明らかにするためには、血中

HIV 量の異なる感染者における T 細胞について、詳細な解析を行うことが有効であると考えられる。これまでの研究で、血中 HIV 量の高い感染者 (高 HIV 群) と低い感染者 (低 HIV 群) における免疫細胞の機能的な違いの評価を行ってきた。その結果、高 HIV 群では低 HIV 群に比べ刺激後短時間での IL-2 遺伝子の mRNA 発現が有意に低く、長期間培養後には MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES を含む Th 1 型、Th17 型サイトカインの産生能も有意に低いことを明らかにした。さらにその産生能と T 細胞の活性化・疲弊状態の間に相関が見られることを明らかにした。

本研究では、高 HIV 群における刺激後初期段階での IL-2 遺伝子発現の低下に着目し、その分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。遺伝子発現制御は複数の要因が関与するが、エピジェネティックな制御はその一つである。ゲノム DNA のメチル化は遺伝子への転写因子の結合を阻害したり、クロマチン構造の形成に関与することで遺伝子発現を制御する。本研究では血中 HIV 量の異なる感染者の T 細胞における IL-2 遺伝子プロモーター／エンハンサー領域のメチル化状態を解析した。

B. 研究方法

＜研究対象＞

東京大学医科学研究所附属病院を受診する HIV

慢性感染者を対象とした。未治療で VL が高い感染者（高 HIV 群、10 名）、VL が低い感染者（低 HIV 群、10 名）、また 2 年以上 HAART 行いウイルス量が検出限界以下の感染者（治療群、8 名）の末梢血単核球(PBMC)を用いた。対照として健常人群(9 名)についても解析を行った。

<ゲノム DNA のメチル化解析>

PBMC から CD4⁺T 細胞、CD8⁺T 細胞を分画し、抽出した DNA をバイサルファイト処理した後、解析対象とした IL-2, IFN- γ のプロモーター/エンハンサー領域を PCR にて増幅後、シーケンス解析を行った。

<定量 RT-PCR による mRNA 発現量の解析>

PBMC を PHA にて刺激し、2.5 時間培養後に PBMC から RNA を抽出し逆転写反応を行い、IL-2, IFN- γ をコードする遺伝子の mRNA 量を real-time PCR により定量した。

<サイトカイン産生能の解析>

PBMC を PHA にて刺激し 5, 18 時間後に培養上清を回収した。培養上清中のサイトカインの測定には Biosource 社の Human Cytokine 25-plex Kit を用いた。

(倫理面への配慮)

臨床材料の提供を受ける場合には研究目的や必要事項を文書を用いて説明し、書面でインフォームドコンセントを得た。研究対象者への負担は、临床上必要な採血に加えての少量の血液採取のみであり、倫理面への問題はないと判断される。本研究内容は東京大学医科学研究所倫理審査委員会により承認されている。

C. 研究結果

IL-2, IFN- γ のプロモーター/エンハンサー領域に存在する CpG サイトはそれぞれ 6 カ所、4 カ所であった。PBMC 中の CD4⁺T 細胞及び CD8⁺T 細胞を分画し、バイサルファイト法による CpG サイトの DNA メチル化解析を行った。IFN- γ においては、CD4⁺T 細胞、CD8⁺T 細胞ともに、高 HIV 群、低 HIV 群、健常人群間でいずれの CpG サイトにおいてもメチル化状態に違いは見られなかった。それに対して、IL-2 では CD4⁺T 細胞で最も上流（転写開始地点に近い）に位置する CpG サイト (CpG1) が、高 HIV 群で有意に高度にメチル化されていることが

明らかとなった。低 HIV 群のメチル化状態は健常人群と同様であった。一方、CD8⁺T 細胞ではいずれの CpG サイトにおいても群間で有意な差は認められなかった。

同時に、短時間刺激後 (2.5 時間) の IL-2, IFN- γ の mRNA 量を比較したところ、IFN- γ では群間で差が見られなかったが、IL-2 では高 HIV 群における mRNA レベルは低 HIV 群の約 50% 程度であった。さらに、各感染者における IL2 遺伝子の CpG1 のメチル化と、IL-2 の mRNA 発現量の間には負の相関が見られた。これらの結果から、IL-2 の遺伝子発現には DNA メチル化による制御が重要であり、特に CpG1 サイトにおけるメチル化が発現制御に重要であることが示唆された。

さらに高 HIV 群で見られた IL-2 発現の低下が他のサイトカイン産生に与える影響を明らかにするために、刺激後 5 時間における IL-2 産生量と、刺激後 18 時間における各種サイトカイン、ケモカインの産生量の関連を調べたところ、IFN- γ , IL-12, MIP-1 α , IL-17, TNF- α 等のサイトカイン産生量と正の相関が見られた。

HAART によりウイルスをコントロールしている治療群において、IL-2 遺伝子の DNA メチル化解析を行ったところ、全ての CpG サイトで低 HIV 群、健常人群と同程度のメチル化状態であった。そのうち、治療開始前後の解析が可能であった 4 名について治療前後でのメチル化状態を比較したところ、いずれも治療後に CpG1 のメチル化頻度が減少していた。

D. 考察

高 HIV 群において、IL-2 遺伝子のプロモーター/エンハンサー領域の CpG1 サイトの高度なメチル化が見られ、メチル化の頻度と IL-2 発現量は逆相関があったことから、CpG1 サイトのメチル化は IL-2 遺伝子発現制御に重要な役割を担っていることが示唆された。CpG1 は antigen-receptor-response element 2 (ARRE2)内に位置しており、その近傍には NFAT、Oct1 といった IL-2 発現に不可欠な転写因子の結合部位が存在する。CpG1 がメチル化されることにより、これらの転写因子の結合が阻害され IL-2 の発現が低下している可能性が示唆された。

CD4⁺T 細胞における IL-2 遺伝子の DNA メチル化はサブセット間で異なることが知られており、naïve T 細胞では高度にメチル化されている。以前の研究で高 HIV 群と低 HIV 群におけ

る CD4⁺T 細胞のサブセットには違いがないことを明らかにしており、本研究で見られた高 HIV 群における CpG1 における高度なメチル化はサブセットの違いによるものではないと考えられる。IL-2 遺伝子の DNA メチル化に関連する要因について、CD4⁺T 細胞の活性化／疲弊状態等の CD4⁺T 細胞の質との関連について、今後さらに検討が必要である。

刺激後短時間での IL-2 発現量と 18 時間後の特定のサイトカイン、ケモカインの産生量に相関が見られたことから、IL-2 は逐次的に起こる T 細胞のサイトカイン産生の制御に関連していることが示唆された。しかしながら、IL-2 遺伝子のメチル化以外にもサイトカイン産生に関わる転写因子の様態についても高 HIV 群と低 HIV 群間で異なる可能性があるので、さらなる解析が必要である。

これまでの研究で高 HIV 群の感染者においても HAART を行うとサイトカイン・ケモカインの産生は回復することを明らかにしたが、本研究では IL-2 遺伝子のメチル化も治療後には通常のレベルに戻ることが示された。末梢血レベルでは T 細胞におけるサイトカイン産生は可逆的であることが示唆された。

E. 結論

HIV 感染慢性期において、病態進行の早い高 HIV 量の感染者では CD4⁺T 細胞における IL-2 遺伝子が低 HIV 群、健常人群と比して、特定の CpG サイトが高度にメチル化されていることを明らかにした。さらにその CpG サイトのメチル化状態と IL-2 遺伝子発現の間に強い逆相関の関係が見られたことから、高 HIV 群では何らかの原因で CD4⁺T 細胞の IL-2 遺伝子が高度にメチル化されていることで IL-2 発現が抑制されていることが示唆された。IL-2 は T 細胞の増殖因子であるだけでなく、CD4⁺T 細胞におけるサイトカイン産生、また間接的に CD8⁺T 細胞における機能にも影響を及ぼすため、本研究で見られた CD4⁺T 細胞における IL-2 遺伝子の高度なメチル化が、高 HIV 群における T 細胞の様々な機能不全の一因であることが示唆された。

今後、本研究で観察された IL-2 遺伝子のメチル化に関連する要因を明らかにすることで、T 細胞の機能回復を目指した治療法の開発につなげたい。

G. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) Nomura S, Hosoya N, Brumme ZL, Brockman MA, Kikuchi T, Koga M, Nakamura H, Koibuchi T, Fujii T, Carlson JM, Heckerman D, Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A, Miura T. Significant Reductions in Gag-protease Mediated HIV-1 Replication Capacity Over the Course of the Epidemic in Japan. J Virol. 2013 87:1465-76.
 - 2) Kikuchi T, Iwatsuki-Horimoto K, Adachi E, Koga M, Nakamura H, Hosoya N, Kawana-Tachikawa A, Koibuchi T, Miura T, Fujii T, Kawaoka Y, Iwamoto A. Improved neutralizing antibody response in the second season after a single dose of pandemic (H1N1) 2009 influenza vaccine in HIV-1-positive adults. Vaccine. 30:3819-23. 2012
2. 学会発表
 - 1) Kikuchi T, Iwabu Y, Kawana-Tachikawa A, Koga M, Nomura S, Hosoya N, Brumme ZL, Heiko J, Kelleher AD, Markowitz M, Pereyra F, Trocha A, Walker BD, Iwamoto A, Tokunaga K, Miura T. Anti-APOBEC3G activity of HIV-1 Vif protein from elite controllers is attenuated compared to those from untreated chronic progressors of those from individuals with acute infection. XIX International AIDS Conference, July 2012, Washington DC, USA.
 - 2) Han C, Shimizu A, Zhu D, Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A. Impact of an amino acid change within overlapping CTL epitopes in HIV-1 infection. Keystone symposia; HIV Vaccines, Feb, 2013. Keystone, CO, USA.
 - 3) 菊地正、岩部幸枝、立川(川名)愛、古賀道子、野村滋、細谷紀彰、Brumme ZL, Heiko J, Kelleher AD, Markowitz M, Pereyra F, Trocha A, Walker BD, 岩本愛吉、徳永研三、三浦聡之. HIV-1 elite controller における HIV-1 Vif の抗 APOBEC3G 活性の低下. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月、大阪.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし

HIV感染者に伴う制御性・抑制性リガンドの発現とT細胞疲弊化について

研究分担者 上野 貴将 熊本大学エイズ学研究センター 准教授

研究要旨：

本研究では、HIVの慢性的免疫活性化によるT細胞の疲弊化を左右する免疫学的要因の解析を進めた。初年度にあたって、T細胞への抗原提示と免疫制御および免疫活性化にかかわるMHC class II-associated invariant chain (CD74)の発現変化に着目し、抗原提示細胞にHIVが感染したときのレセプター発現変化の解析を行った。特に、46名のHIV感染者から分離したNefクローンによるCD74発現昂進作用について、詳細に解析した。その結果、Nefはアミノ酸配列ではクローン間で著しく多型であったが、NefによるCD74発現昂進作用はよく保存されており、生体内で重要な機能を持つものと示唆された。ウイルス量などとの相関は認められなかった。今後他のレセプターや細胞を用いた研究を展開して、ウイルス因子による免疫活性化とT細胞疲弊化の解析を進めていきたい。

A. 研究目的

本研究では、研究班の主要な柱の一つである「HIVの潜伏感染と慢性的免疫活性化によるT細胞の疲弊化を左右する免疫学的要因の解明」に取り組む。今年度は、T細胞への抗原提示と免疫制御および免疫活性化にかかわるMHC class II-associated invariant chain (CD74)の発現変化に着目した。具体的には、多くの慢性感染者からクローニングしたNefを用いて、抗原提示細胞にHIV-1が感染したときのレセプター発現変化について検討した。また、この活性に影響するアミノ酸変異の同定や、臨床データとの相関を検討した。

B. 研究方法

46名の慢性感染期のHIV感染者の血漿から、ウイルスRNAを抽出し、nef遺伝子を増幅、クローニングした。pNL43のnef領域と入れ替えて、組換えウイルスを作成した。ヒトB細胞株にCD4を導入して、HIV-1が感染するように改変した。この細胞に、さまざまなnefを有するウイルスを感染させて、HIV感染細胞におけるCD74分子の発現量変化をフローサイトメトリーで解析した。

（倫理面への配慮）

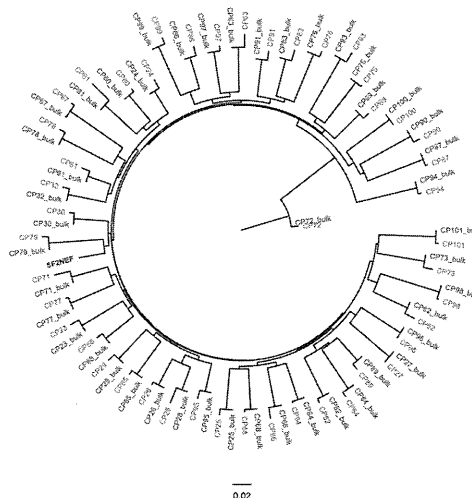
HIV感染者のリクルートと、検体の採取は、米国マサチューセッツ総合病院で実施した。

すべての感染者から同意文書に承諾を得ている。感染者の個人情報入手していない。また、研究の実施に当たっては、熊本大学の倫理審査会の審議を受け、承認を得ている。承認を受けた研究計画に厳密にしたがって遂行した。

C. 研究結果

（1）HIV感染者検体とnef遺伝子

HIV-1サブタイプBに慢性的に感染した未治療の患者の検体を集め、nef遺伝子のクローニングを行った。ウイルス量は、中央値[IQR] 90,850 copies/ml [28840-231000]で、CD4+ T cell count は 297.5 cells/mm³ [72-455]であった。nef遺伝子の系統樹解析



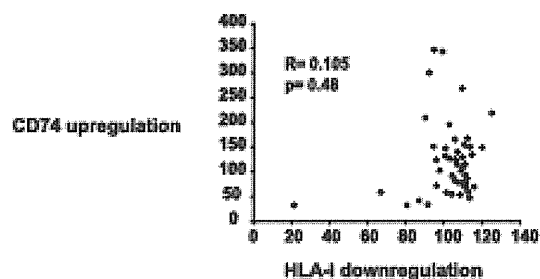
を行ったところ、クラスター等の形成は認められなかった（図1）。また、各コドンについて、アミノ酸の多型率（変異率）を調べたところ、Los Alamos databaseに登録されているものとよく相関していた（Spearman $R=0.92$, $p<0.0001$ ）。このことから、この研究で用いた Nef は、サブタイプ B の多型性を反映しているものと示唆された。

（2）MHC-II invariant chain (CD74)の発現変化

クローニングした nef 遺伝子をさらに pNL43 の nef 領域と入れ替えて、組換えウイルスを作成した。ヒト B 細胞株で、HLA クラス I を欠損した 721.221 細胞株に、HLA-A24 とヒト CD4 遺伝子をあらかじめ導入した細胞を用いた。これに臨床分離したさまざまな nef 遺伝子を持つウイルスを感染させて、CD74 の発現変化をフローサイトメトリーで測定した。Nef は HLA-I の発現を低下させる機能を持つので、HLA-I の発現変化もコントロールとして同時に測定した。典型的な実験結果の例を図2に示す。実験室株である SF2 Nef の活性と比較したところ、臨床分離株 Nef の CD74 発現昂進活性は、112% [69-151]であった。また、HLA-I 発現抑制活性は、106% [98-102]であった。どちらの活性もクローン間で非常によく保存されていた。しかし、HLA-I 発現抑制活性はクローン間で 10%以内と変動幅が非常に小さかったが、CD74 発現昂進作用は、クローン間で2倍以上の開きがあった。

（3）CD74 発現昂進活性と、病態および他の機能との相関

Nef による CD74 発現昂進活性と、感染者の CD4 陽性 T 細胞カウントやウイルス量との相関を解析したが、有意な関連性は得られな



かった。また、Nef による HLA-I 発現低下作用との相関を解析したが（図3）、有意な相関は得られなかった。これは、HLA-I 発現抑制活性の変動率が低いために、相関を得られにくいためと考えられた。あるいは、CD74 発現昂進活性は、生体内でのウイルスの複製にとって、すべての感染者に必須な機能なのではなく、個々の感染者に応じて適応・馴化した結果を見ているのかもしれない。一方、Nef によるウイルス感染性増強作用は、感染者の CD4 陽性 T 細胞カウントと相関していた（データ未掲載）。HIV-1 gp-41 と CD74 が結合して、シグナルを伝達することによってウイルス複製を促すことが報告されており、CD74 を介した Nef によるウイルス感染増強経路があるのかもしれない。

（4）CD74 発現昂進活性に影響する Nef アミノ酸多型の解析

CD74 発現昂進活性に有意に影響するアミノ酸多型性、コドンの同定を試みた。5つのコドンが CD74 発現昂進活性と相関していた（表1）。94番目のコドンは、よく保存されたアミノ酸であるが、HLA-B8 拘束性 CTL からの逃避変異として知られている。このことから、CTL 逃避変異は、CD74 発現昂進活性に何らかの影響を与えているかもしれない。一方、HLA-I 発現抑制活性に影響するコドンについては、十分に有意なレベルで同定するに至らなかった。これらのこ

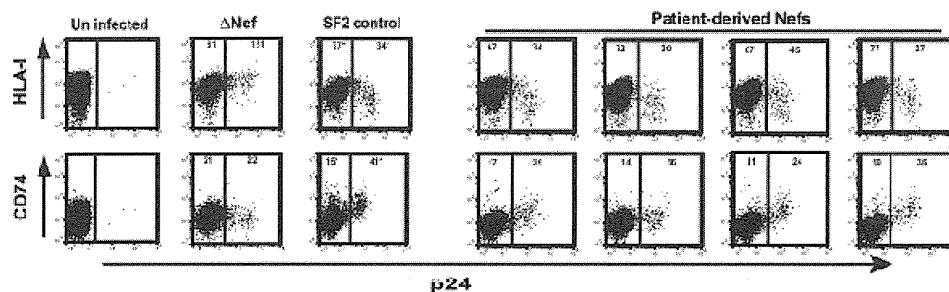


Table 1. Analysis of Nef residues associated with functions

Nef Activity	Codon ^a	AA ^b	No. of subjects ^c		Relative Nef activity		p-value	q-value
			AA+	AA-	AA+	AA-		
CD74 up-regulation	12	E	5	41	195.1	102.9	0.01	0.2
	21	Q	6	40	180.9	98.1	0.01	0.2
	94	K	40	6	124.4	52.9	0.004	0.1
	205	D	21	25	150.5	82.1	0.001	0.02
	205	N	25	21	82.1	150.5	0.001	0.02

^a HXB2 numbering

^b AA, amino acid

^c Gaps in the alignment are considered missing data; as such, amino acid totals do not always add up to 46.

とから、CTL 逃避にかかわる HLA-I 発現抑制と、免疫活性化にかかわる CD74 発現昂進作用は、Nef の異なった領域がその機能を担っており、かつ、生体内では独立に制御される機能であると考えられた。

D. 考察

CD74 の発現量は HIV-1 感染者で免疫活性化と関連することが報告されている。Nef の CD74 発現昂進作用に着目し、46 名の HIV-1 感染者検体を用いて、解析を行った。しかしながら、CD74 発現昂進作用は、ウイルス量や CD4 陽性 T 細胞カウントなどとの相関は見られなかった。一方、アミノ酸配列は大きく異なっているにも関わらず、すべての Nef で CD74 発現昂進作用が顕著に認められたことは、この機能が生体内のウイルス複製や慢性化に重要であることを示唆している。今後、他のレセプター等を含め、免疫活性化と T 細胞機能への影響について、解析を進めて行きたい。

E. 結論

本研究では、46 名の未治療の慢性感染者から、Nef 遺伝子をクローニングして、その機能的多型性と、臨床マーカーなどとの相関、およびそれらの機能に大きく影響するアミノ酸の同定を試みた。その結果、感染者由来の Nef では、CD74 発現昂進作用、HLA-I 発現抑制は、Nef の異なった領域で機能が担われているが、どちらもその活性は非常によく保存されていた。これらのことから、HIV-1 Nef は、感染細胞の CD74 発現昂進を促すことにより、免疫活性化に何らかの寄与をするものと示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Zafrul Hasan, Jonathan M Carlson, Hiroyuki Gatanaga, Anh Q. Le, Chanson J Brumme, Shinichi Oka, Zabrina L Brumme, Takamasa Ueno (2012) Minor contribution of HLA class I-associated selective pressure to the variability of HIV-1 accessory protein Vpu. Biochem. Biophys. Res. Comm. 421, 291-295
- (2) Philip Mwimanzi, Tristan J. Markle, Takamasa Ueno, Mark A. Brockman (2012) HLA class I down-regulation by HIV-1 Nef: What might we learn from natural sequence variants? Viruses 4, 1844-
- (3) Philip Mwimanzi, Tristan J Markle, Eric Martin, Yoko Ogata, Xiaomei T Kuang, Michiyo Tokunaga, Macdonald Mahiti, Florencia Pereyra, Toshiyuki Miura, Bruce D Walker, Zabrina L Brumme, Mark A Brockman and Takamasa Ueno (2013) Attenuation of multiple Nef functions in HIV-1 elite controllers. Retrovirology 10: 1

2. 学会発表

- (1) Zafrul Hasan, J. Carlson, H. Gatanaga, A. Le, S. Oka, Z. Brumme, Takamasa Ueno. Impact of HLA class I-driven genetic variability in HIV-1 accessory gene vpu. COLD SPRING HARBOR ASIA CONFERENCES: Frontiers of Immunology in Health and Disease. Suzhou Dushu Lake Conference Center, China. September