

ため、直腸組織生検材料から細胞浮遊液を調製し、代表的抗原提示細胞である樹状細胞を精製する目的で抗 CD1b 抗体及び磁気ビーズを用いて細胞を精製した。精製した細胞の多くは形態的に単核で細胞質が豊富で空胞を含み、マクロファージ様であった。この細胞に関して CD11c、CD123 および HLA-DR 抗原の発現をフローサイトメトリーにより解析した所、HLA-DR 陽性でかつ CD11c 陽性（骨髄系樹状細胞）または HLA-DR 陽性でかつ CD123 陽性（形質細胞様樹状細胞）の細胞がそれぞれ検出された。2mm×2mm×2mm の生検組織 10 片から $1-6 \times 10^5$ 細胞が、磁気ビーズ精製後は総計 10^4 台の細胞が調製されたが、収率は低かった。

• SIV 1A11 の中国産アカゲザルにおける複製

ウイルス曝露後接種 10 週間まで 10^3-10^4 コピー/ml の血中ウイルス RNA が断続的に検出されたが、その後検出限界以下 (200 コピー/ml) に抑制された。接種 15-25 週後の血漿に関して、遠心沈渣から RNA 抽出する事で 1 反応あたりの実効試料投入量を増やし検出感度を上げると、1 頭のサルで接種 26 週後に 17 コピー/ml のウイルス RNA が検出された。

CD4 陽性および CD8 陽性リンパ球サブセットはウイルス感染によって変動しなかった。感染サルは観察期間中臨床的に霊長類レンチウイルス関連疾患を示さなかった。

• 抗 CD8 抗体処理

接種 32 週後に 1 頭の感染サルに抗体を投与した所、血中ウイルス RNA が投与 3 日以内に検出限界以下から 10^4 コピー/ml まで一過性に上昇した。

抗体投与直前及び投与 2 日後に生検したリンパ節細胞の解析の結果、投与前に検出されなかった gag ウイルス抗原陽性細胞 (0.03%) が、2 日後に 0.12% 検出された (寺原和孝博士による解析)。

D. 考察

SIV 1A11 は当初予想した通り、一過性のウイルス血症の後制御され「潜伏」したが、抗 CD8 抗体処理による「抑制解除」により少なくとも末梢血及びリンパ節において「再活性化」した事から、恐らく全身性にウイルスの再活性化は起こっていると考えられる。現在、同様に抗体投与前及び 2 日後に生検した直腸組織におけるウイルス遺伝子発現を *in situ* hybridization により解析中であるが、こちらでもウイルスシグナルが検出される事が期待される。

直腸生検試料からの樹状細胞の精製は当初予想していたよりも困難である事が明らかとなった。採取出来る組織の量に限りがあるため、取りこぼしが無い様調製する必要がある。従来のキレート剤及び蛋白分解酵素 (主にコラゲナーゼ) 処理では組織片を完全に可溶化する事が出来ないため、細胞を取りこぼしていると考えられる。そこで、酵素処理に加え緩徐な器械的破碎を加える事を検討している。

同時に直腸組織の組織化学的検索に向けて非感染サル直腸組織を用いて条件を検討しているが、明らかになった事として、アカゲザル下部消化管の粘膜固有層では、リンパ球は上部と比較して少なく、CD68 陽性のマクロファージは豊富に存在する事である。現在まで数種の単クローン抗体を用いて樹状細胞の検出を試みているが検出されない事から、本組織における樹状細胞の分布は CD68 陽性マクロファージと比較して少ない事が予想される。そこで来年度は抗原提示細胞としてマクロファージに焦点を当てて検索を進める (生検試料からの細胞調製及び組織化学的検索) 事が現実的であろう。

E. 結論

非病原性 SIV 1A11 および中国産アカゲザルを用いてエイズウイルス潜伏・再活性化モデルを確立した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Oue, M., Sakabe, S., Horiike, M., Yasui, M., Miura, T., and Igarashi, T. No viral evolution in the lymph nodes of SIV-infected rhesus macaques during combined antiretroviral therapy. *J. Virol.* 87:4789-93, 2013.
- 2) Nomaguchi, M., Yokoyama, M., Kono, K., Nakayama, E.E., Shioda, T., Doi, N., Fujiwara, S., Saito, A., Akari, H., Miyakawa, K., Ryo, A., Ode, H., Iwatani, Y., Miura, T., Igarashi, T., Sato, H., and Adachi, A. Generation of rhesus macaque-tropic HIV-1 clones that are resistant to major anti-HIV-1 restriction factors. *J. Virol.* 87:11447-61, 2013.
- 3) Otsuki, H., Hishiki, T., Miura, T., Hashimoto, C., Narumi, T., Tamamura, H., Yoshimura, K., Matsushita, S., and Igarashi, T. Generation of a replication-competent simian-human immunodeficiency virus, the neutralisation sensitivity of which can be enhanced in the

presence of a small molecule CD4 mimic. J Gen Virol. 94:2710-6, 2013.

- 4) Hashimoto, C., Narumi, T., Otsuki, H., Hirota, Y., Arai, H., Yoshimura, K., Harada, S., Ohashi, N., Nomura, W., Miura, T., Igarashi, T., Matsushita, S., and Tamamura, H. A CD4 mimic as an HIV entry inhibitor: Pharmacokinetics. Bioorg. Med. Chem. 21:7884-9, 2013.

2. 学会発表

- 1) 米田舞、大附寛幸、一瀬裕太郎、松田健太、松下修三、五十嵐樹彦、三浦智行：新規 CCR5 指向性 SHIV のサルへの順化と中和抵抗性の解析 第 155 回日本獣医学会、東京、2013 年 3 月 28-30 日
- 2) 加藤文博、小林剛、三浦智行、五十嵐樹彦、日紫喜隆行：分泌型ルシフェラーゼ遺伝子を有するデングウイルス 1 型レプリコンの構築 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013 年 11 月 10-12 日
- 3) 日紫喜隆行、Han Qi' En、下遠野邦忠、五十嵐樹彦、鈴木陽一、山本直樹：ISGylation (ISG15-conjugation) によるデングウイルスの複製制御機構 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013 年 11 月 10-12 日
- 4) 石田裕樹、加藤文博、川岸崇裕、小林剛、日紫喜隆行、三浦智行、五十嵐樹彦：フィリピンカイザルにおけるデングウイルス自然感染、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013 年 11 月 10-12 日
- 5) 大附寛幸、五十嵐樹彦、三浦智行：CCR5 指向性サブタイプ C エンベローを持つサル指向性 HIV-1 のブタオザルにおける複製 第 61 回日本ウイルス学会学術交流会、神戸、2013 年 11 月 10 日-12 日
- 6) 大附寛幸、丸田泰広、橋本知恵、鳴海哲夫、廣田雄樹、原田恵嘉、三浦智行、吉村和久、玉村啓和、松下修三、五十嵐樹彦：抗 V3 抗体および低分子 CD4 ミミック曝露後投与によるアカゲザルでの SHIV 複製抑制 第 27 回日本エイズ学会学術集会、熊本、2013 年 11 月 20 日-22 日
- 7) 米田舞、大附寛幸、松下修三、五十嵐樹彦、三浦智行：新規 CCR5 指向性かつ中和抵抗性 SHIV 分子クローンの作製及び解析 第 27 回日本エイズ学会学術集会、熊本、2013 年 11 月 20-22 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	池野 翔太	国立感染症研究所	免疫部	研究生

研究要旨：

末梢の CD4 陽性 T 細胞を用いて静止期 T 細胞を長期培養維持可能な HSP (HomeoStatic Proliferation)培養系を確立した。この培養系において静止期細胞の一部には HIV-1 感染後プロウイルスが integration して低レベルのウイルス発現が誘導されていた。HSP 培養系は今後潜伏感染成立過程を解析するための有用な試験管内モデルとなりうると思われる。

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の作製

細胞ゲノムに挿入されて LTR からの転写を解析するため、P2 レベルのレンチウイルスベクター pCS-CDF-GFP-Nef-LTR を構築した。これをトランスファープラスミドとする組換えレンチウイルス作製用 DNA の一式(gag/pol、rev および VSV-G 発現ベクター)、HIV-1_{NL-E} (X4 型) あるいは HIV-1_{NLAD8-D} (R5 型) proviral DNA を 293T 細胞に塩化カルシウム沈殿法でトランスフェクションし、ウイルスを作製した。

2. ヒト CD4 陽性 T 細胞の培養維持とウイルス感染

健康人末梢血単核球(PBMC)より CD14 陽性細胞を分画し、単球由来樹状細胞(MDDC)を分化誘導した。CD14 陰性細胞より、CD4⁺ T cell isolation kit (ミルテニー)を用いて negative selction し、CD4⁺ T 細胞をエンリッチした。この細胞に色素(Violet tracer; Invitrogen)をとりこませた後、GFP 発現組換えレンチウイルス(Lenti GFP-Nef-LTR)あるいは

GFP 発現 HIV-1_{NL-E} を spinoculation により感染させた。細胞を洗浄後、スーパー抗原(SEB)でパルスした自己 MDDC と共培養することにより強力に T 細胞受容体を刺激し、IL-2 存在下に培養した(T 細胞受容体刺激培養)。あるいは T 細胞刺激なしに IL7 と IL-15 のみを加えて培養し、これを HSP (Homeostatic proliferation) 培養とした。

3. 細胞の増殖・活性化のフローサイトメーター解析

レンチウイルスあるいは HIV 感染細胞を感染後 5 日あるいは 12 日以降に一部回収し、Aqua live/dead dye (L34957, Invitrogen)と反応させた後、細胞表面を PE-Cy7 標識 CD45RA, PerCP 標識 CD4, PE 標識 HLA-DR, Alexa647 標識 CD11a, Alexa700 標識 CD27(すべて Bio Legend)で染色して FACScanto で解析した。必要に応じ、同様に染色した感染細胞の T 細胞亜集団を FACSaria で分画した。

4. 定量 PCR 解析

分画したレンチウイルス感染細胞より RNA を抽出し、cDNA を合成して GFP や tat, nef の mRNA 発現を Real Time PCR で定量した。また、細胞の HIV-1 制御因子として知られる SAMHD1 および APOBEC3G の発現を比較定量した。

このため、Taqman 法では以下のプライマー・プローブセットを用いた。

GFP: forward, 5'-gaccactaccagcagaacac-3', reverse, 5'-gaactccagcaggaccatg-3', probe, [6-FAM]-agc-accagctcgccctgagca-[BHQ-1], HIV-1 Nef: forward, 5'-tgagacgagctgagccagcag-3', reverse, 5'-ttgtgctctag-

ccaggcac-3', probe, [6-FAM]- tcgagatactgctccacccttct-[BHQ-1]。

また、細胞の endogenous control gene expression として EF-1 α 遺伝子発現を Lux primer 法で定量した (標識 forward primer として 5'-gaa-cagttgggtcgcctttgctgttc-3', 未標識 reverse primer として 5'-gacacccaccgcaactgtct-3')。その他の遺伝子に関しては Syber green 法で検出した。HIV-1 Tat: forward, 5'-tagagccctggaagcaccagg-3', reverse, 5'-tcgctgtctccgctttctctgc-3'。SAMHD1 と APOBEC3G のプライマーは徳永研三室長(感染研・感染病理)より供与を受けた。

ゲノムに組込まれたプロウイルス DNA の定量は、山本らの方法(Virus Genes 32:105, 2006)に準じ、Alu と U3 領域のプライマーを用いて解析した。

5. 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) HIV-1 を同時感染させ、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、感染細胞の特徴と感染頻度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ボランティアから、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。

C. 研究結果

PBMC 中の静止期 CD4 陽性 T 細胞に GFP を LTR 制御下に発現する組換えレンチウイルス(Lenti GFP-Nef-LTR)を MOI 1.0 で感染させた後、HSP 培養すると、2週間後に細胞はゆっくり増殖し、一部の細胞は活性化(CD11a 発現増加)されても増殖することなく維持された(図 1A 上段)。一方 DC と SEB 抗原で強力に CD4 陽性 T 細胞を刺激する T 細胞受容体刺激培養では、1週間後にはほとんど全ての細胞が活性化されて増殖した(図 1A 下段)。このような異なる刺激細胞の GFP の発現を比較すると、後者では 60~70%の細胞が GFP を発現しているのに対し、前者の HSP 培養では GFP 陽性細胞は 1%程度であり、GFP 発現細胞は増殖していない細胞分画にも存在していた(図 1B 上段左)。このことは HIV-1 の感染でも同様で、

増殖を伴わない GFP 発現細胞は一定頻度存在していることが明らかとなった。従って、レンチウイルスに初期感染した細胞は 60~70%以上であるが、その後の細胞の活性化の過程で、GFP 発現頻度は大きく異なる。

そこで、HSP 培養後 2 週間以上たった細胞で GFP を発現していない CD4 陽性 T 細胞にプロウイルスがどの程度 integration しているのかを確認するため、GFP 陰性細胞を確認するため、GFP 陰性細胞を増殖の有無で分画し(図 2)、integration したプロウイルス DNA の定量を行った。その結果、活性化して増殖していない fraction 4 では 9590 copies/10⁵ cells、増殖している fraction 3 では 294 copies/10⁵ cells であることが明らかとなった。従って、静止期を維持している CD4 陽性 T 細胞においてもレンチウイルスゲノムの integration は一部の細胞におきており、GFP の転写レベルでの抑制があると考えられた。

同様に、静止期に HIV-1 に感染させた CD4 陽性 T 細胞を HSP 培養し、感染 11 日後に CD4 陽性細胞亜集団をソートしてそのウイルス発現を解析した(図 3A、医科研立川愛准教授との共同研究)。この、T 細胞受容体刺激を受けることなく HSP 培養で維持された GFP 陰性細胞において、低レベルではあるものの tat が有意に発現していた(図 3B)。更に、同じ細胞において HIV-1 制御因子として知られている SAMHD1 や APOBEC3G の発現を定量したところ、両者とも感染によって低下する傾向にあった(図 3C)。なお、これらの細胞では、APOBEC3G の発現量は CEM 細胞株と比較してそれほどかわらないのに対し、SAMHD1 の発現量は、CEM 細胞より 1000 倍程度高いことがわかった(未発表データ)。

以上のことから、HSP 培養では強力な T 細胞受容体刺激をうけることなく体内のリンパ組織で恒常維持されている CD4 陽性 T 細胞を mimic した状態で培養維持することが可能であり、今後、初期培養細胞を用いた HIV-1 感染と潜伏化の成立過程の解析に有用であると考えられる。

一方、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たヒト化 NOJ マウスにおける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、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

なくなったマウス個体が多かった。この時、CCR5を発現する CD4 陽性への両ウイルスの感染頻度を比較したところ、X4 型 HIV-1 の感染細胞は単独感染の時と比較して明らかに頻度が低下していた。この様なマウスにおいて、X4 型 HIV-1 に感染した CCR5 陽性 T 細胞が特に死滅しやすい傾向はなく、なぜ CCR5 陽性 T 細胞で X4 型 HIV-1 の感染頻度が低くなるのか、血中から消失した X4 型 HIV-1 に潜伏感染した細胞が体内のどこかに存在するのか、という点は今後検討していく必要がある。

D. 考察

培養細胞を用いた *in vitro* の系で HIV-1 の潜伏過程を解析する系は最近数多く報告されている。その内、細胞株を使う系は潜伏感染の維持機構の解析に有用であるものの、潜伏成立の過程は T 細胞によって様々であることが指摘されている。一方、初期培養 T 細胞において、T 細胞受容体を介した強力な刺激は T 細胞の急激な増殖と活性化にともなう細胞死を誘導しやすいことから、HIV-1 感染細胞の詳細な解析は困難である。その点、HSP 培養は生体内の恒常性を維持する機構を模倣することにより、静止期にある細胞を培養維持できる点で優れた解析系であると考えられる。本研究において、HIV-1 の初期感染は静止期を維持する細胞においても進行し、ゲノムの integration がおこり、低レベルの転写もおきている細胞集団が長期に存続しうるということが明らかとなった。このようなプロウイルスを持つ細胞の性状やウイルスの転写制御の特徴について、今後分子レベルで解析していく必要がある。最近同定された Stem cell memory T 細胞は naïve T 細胞に近い表面抗原を発現している低頻度の T 細胞亜集団であり、HIV 感染者における潜伏感染に重要な役割を果たすことが報告されている (Buzon et al., Nat. Med. 20:139, 2014)。この様な記憶 T 細胞を含む HSP 培養系は今後の潜伏感染成立過程の詳細な解析に有用であると思われる。

E. 結論

末梢の CD4 陽性 T 細胞を用いて静止期 T 細胞を長期培養維持可能な HSP (HomeoStatic Proliferation) 培養系を確立した。この培養系において、静止期 T 細胞の一部には HIV-1 感染後に

ロウイルスが integration し、低レベルのウイルス発現が誘導されていた。HSP 培養系は今後潜伏感染成立過程を解析するための有用なモデルとなりうると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamashita, Y., Hoshino, Y., Oka, M., Matsumoto, S., Ariga, H., Nagai, H., Makino, M., Ariyoshi, K., Tsunetsugu-Yokota, Y.: Multicolor flow cytometric analyses of CD4⁺ T cell responses to Mycobacterium tuberculosis-related latent antigens. *Jp.J.Infect.Dis.*, 3:207-215, 2013.
- 2) Tsunetsugu-Yokota, Y and Muhsen, M. Development of human dendritic cells and their role in HIV infection: antiviral immunity versus HIV transmission. *Front. Microbiol.* 4:1-10, 2013.
- 3) Ikeno, S., Suzuki, M., Muhsen, M., Ishige, M., Kobayashi-Ishihara, M., Ohno, S., Takeda, M., Nakayama, T., Morikawa, Y., Terahara, K., Okada, S., Takeyama, H., Tsunetsugu-Yokota, Y.; Sensitive detection of measles virus infection in the blood and tissues of humanized mouse by one-step quantitative RT-PCR. *Front. Microbiol.* 4:1-8, 2013.
- 4) Nomaguchi, M., Miyake, A., Doi, N., Fujiwara, S., Miyazaki, Y., Tsunetsugu-Yokota, Y., Yokoyama, M., Sato, H., Masuda, T., Adachi, A. Natural single-nucleotide polymorphisms in the 3' region of HIV-1 pol gene modulate viral replication ability. *J.Virol.* in press, 2014.

2. 学会発表

- 1) Takahashi, H., Ohnishi, K., Nishimura, K., Takayama, I., Nakauchi, M., Nagata, S., Tsunetsugu-Yokota, Y., Tashiro, M., Kageyama, T. Development of monoclonal antibodies specific for H5 HA and their application to rapid detection of influenza A/H5N1 virus. Options for the Control of Influenza VIII, Cape Town, 5-10 September 2013.
- 2) 西村研吾、曾家義博、服部静夫、影山努、大西和夫、高山郁代、小林美栄、高橋仁、横田恭子「化学発光免疫測定法を用いた高感度 H5HA 検出系の開発とベトナムにおける H5N1 感染試料を用いた検出感度の検討」第27回インフルエンザ研究者交流会シンポジウム、札幌、2013年6月29日。
- 3) 池野翔太、鈴木基臣、寺原和孝、石毛真行、駒瀬勝啓、竹田誠、森川裕子、中山哲夫、柳雄介、竹山春子、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61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013年11月11日。

- 4) 小林(石原)美栄、高橋仁、西村研吾、高山郁代、大西和夫、板村繁之、影山努、横田(恒次) 恭子「H5N1インフルエンザウイルス高感度検出系開発に向けたH5HA特異的抗体のエピトープ解析」第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013年11月11日.
- 5) 高橋仁、田中仁喜、西村研吾、高山郁代、中内美名、永田志保、小林美栄、藤博幸、大西和夫、横田(恒次) 恭子、田代真人、影山努「H5 HA特異的なモノクローナル抗体の作製とH5N1インフルエンザ迅速診断法構築の検討」第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013年11月11日.

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

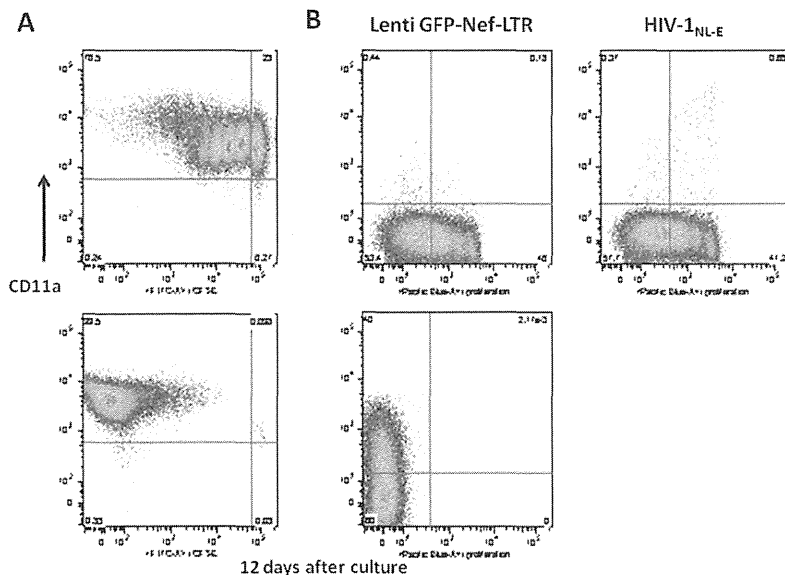


図1 異なる刺激で培養した CD4 陽性 T 細胞におけるレンチウイルスの発現
末梢血 CD4 陽性細胞に色素を取り込ませた後、LTR 制御下に GFP を発現する組換え
レンチウイルス(Lenti GFP-Nef-LTR)あるいは HIV-1_{NL-E} を感染させた。この細胞を IL-7
と IL-15 添加培地(上段、HSP 培養)あるいは自己 DC と SEB で刺激して培養(T 細胞受
容体刺激培養刺激培養、下段)し、2 週間後の細胞をフローサイトメーターで解析した。

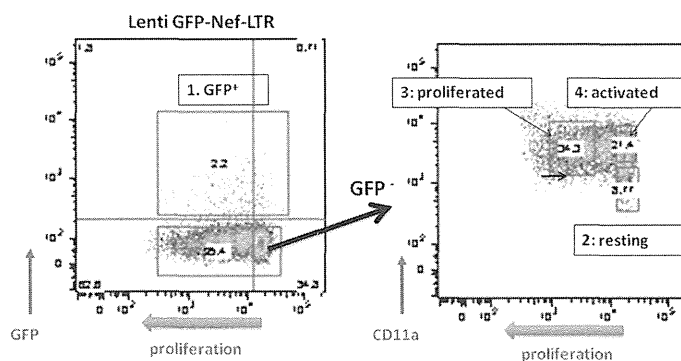


図2 GFP 発現組換えレンチウイルス感染後の CD4 陽性 T 細胞亜集
団の分画

図1と同様に組換えレンチウイルス感染後 HSP 培養した細胞を GFP
陽性(Fraction 1)と陰性細胞に分け、GFP 陰性細胞を増殖細胞(Fraction
3)、非増殖活性化細胞(Fraction 4)および非増殖非活性化細胞(Fraction 2)
にゲートをかけて FACSaria でソートした。

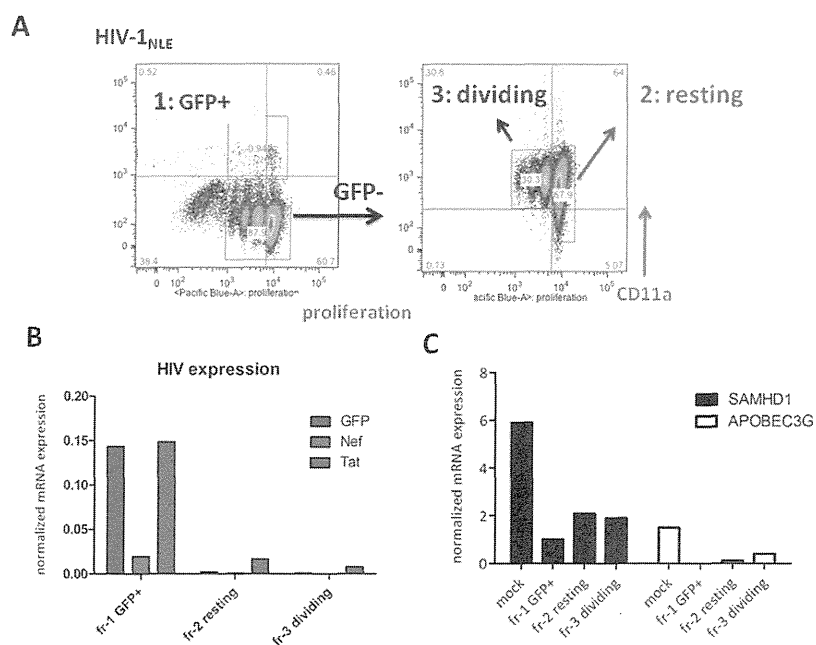


図3 GFP 発現 HIV-1 感染後の CD4 陽性 T 細胞亜集団における HIV および細胞制御因子の発現量の比較

図2同様に、HIV-1_{NL-E}に感染させて HSP 培養した細胞をソートし、それぞれの分画細胞より RNA を抽出して定量 PCR 法により(B) GFP、nef、tat の発現、(C) SAMHD1、APOBEC3G の発現レベルを解析した。

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
メディカルゲノム専攻病態医療科学分野

研究要旨：

HIV 潜伏化の分子メカニズムを知るためには、感染細胞集団全体を正確に可視化した上で LTR の活性レベルをモニターする必要がある。本研究では新たな dual-color reporter を作成し、感染初期及び後期における感染細胞集団の特定と分子レベルでの潜伏化メカニズムの検証を行った。その結果、感染細胞の一部において感染後非常に早期に LTR が不活性化する集団が存在することが明らかになった。感染初期に LTR の活性レベルが異なる集団を分取し、分子レベルでの検討を重ねた結果、潜伏化集団では LTR の転写レベルで不活性化されており、主にヒストン修飾によるエピジェネティックな変化が原因であることがわかった。また残る集団については時間依存的な LTR が抑制が観察された。このエピジェネティック変化を制御する PRC2 に対する阻害剤は潜伏化集団に対して再活性化能をもつことが分かったが、一方で感染初期に成立した一部の集団は応答性が乏しく、非常に強固に抑制されていることがわかった。

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 感染者がおりと推定されており、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。

本年度は、感染細胞集団を特定し、さらに LTR 活性を動的にモニターできる新規レポーターウイルスを作成し、感染細胞中の LTR の制御メカニズムの解析を行った。

B. 研究方法

1. dual-color reporter ウイルスの作成

dual-color reporter 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、LTR の下流に Tat-IRES-Venus を挿入した。さらに下流に EF1 プロモーターとその直下に mRFP 遺伝子を挿入した。このベクターと VSV-G を用いて single-round ウイルス液を調製し、遠心によって濃縮した後、各種細胞に感染させた。

2. 感染細胞集団の分取と分子生物学的解析

dual-color reporter 感染細胞における Venus 及び mRFP の検出、定量は FACSCalibur (BD)を用いた。感染細胞の分取は FACS AriaII (BD)で行い、分取後は通常の条件下で培養を行った。ウイルスゲノムの検出は PCR 法を用いた。ウイルス mRNA 量は qRT-PCR で定量した。メチル化 DNA の検出はバイサルファイト法を用いた。LTR 上の修飾ヒストンの定量は、ChIP assay によって検討した。LTR 上 3 箇所 PCR プライマーを設計し、転写開始点からの距離と修飾の蓄積の関係を検討した。

PRC2 のノックダウンについては、各種因子に対する特異的な shRNA を設計、検証し、効率よくノックダウンできるレトロウイルスベクターを作成した。このレトロウイルスを細胞に感染させてノックダウン細胞を樹立したのち、dual-reporter ウイルスを感染させることで PRC2 による潜伏化への影響を検討した。

3. Single-Round HIV-1 を用いた実験

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。これらのモデルにおける分子細胞学的に手法については上記と同様に行った。

4. エピジェネティック薬を用いた潜伏化ウイルスの再活性化

HDAC の阻害には TSA、SAHA、及び VPA を至適濃度で使用した。また PRC2 の阻害には EZH2 の特異的阻害剤である DZNep 及び GSK126 を至適濃度で使用した。LTR の活性化には TNF- α 及び PMA/Ionomycin を用いた。

C. 研究結果

1. 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と感染実験

これまでの多くの研究成果から、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た。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

レトロ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、様々な T 細胞株に対して感染実験を行った。感染成立後初期において FACS を用いて mRFP の発現から感染細胞を特定し、その集団における LTR の活性レベルを Venus の発現で検討したところ、感染細胞集団における LTR の活性レベルが不均一であり、主に LTR の活性が非常に強い集団と、Tat を持つウイルスにも関わらず LTR の活性が非常に弱い集団が存在することが分かった。この現象は検討した多くの T 細胞株で共通して観察されたことから、普遍的な現象であると考えられた。

また、この感染モデルを長期に培養すると、LTR の活性レベルが徐々に低下し、感染後 1 ヶ月程でほとんどすべての集団の LTR が不活性化した。

2. 感染初期における潜伏化の分子メカニズム

感染初期における LTR の活性制御の分子メカニズムを明らかにするために、上記で得られた LTR の活性レベルが異なる 2 集団について、Venus の発現レベルに基づき FACS を用いて感染細胞の分取を行った。この 2 集団について、まず感染細胞ゲノムの存在するウイルス DNA の検出を用いて行った。その結果、LTR の活性が低い集団においても全長ウイルスゲノムが確認された。次にこれらの集団間の Venus の発現の差異について、qRT-PCR を用いて転写レベルを検討した結果、Venus の発現が低い集団では Venus mRNA の存在量が著しく低下していることがわかった。この事から Venus の発現低下は LTR からの転写の不活性化によることが示された。

これまでの多くの研究報告と我々の研究成果から、LTR の制御がエピジェネティック依存的であることが強く疑われた。そこでまず両者の LTR 上の DNA メチル化を検証するために、バ

イサルファイト法を用いてメチル化 DNA の検出を行った。しかしながら、LTR の活性レベルの強弱に関わらず、感染初期には LTR 上のメチル化 DNA は検出されなかった。

次に両細胞集団に対して ChIP assay を行い、LTR 上のヒストン修飾の比較検討を行った。その結果、感染初期において LTR の活性が弱い集団において遺伝子発現の抑制に関わる H3K27me3 の蓄積が認められた。一方 LTR の活性が強い集団では H3K27me3 の蓄積はなく、逆に遺伝子発現の活性化に関わるヒストンのアセチル化の導入が検出された。そこでこれらのヒストン修飾と LTR からの転写レベルの関係を明らかにするために、両細胞集団に対して各種エピジェネティック薬を投与し、その後の応答を検証した結果、LTR の活性が弱い集団で若干の反応が見られた。さらに、潜伏化集団の成立における PRC2 の機能を検討するために、PRC2 に対する特異的 shRNA を用いてノックダウンを行った結果、感染初期に形成される潜伏化集団の割合の低下が見られた。以上のことから、感染初期における LTR の抑制にはこれらのヒストン修飾が関わっていることが示された。

3. Single-Round HIV-1 を用いた検証

上記について別の実験系で検証するために、single-round HIV-1 を用いて潜伏化モデルを作成した。single-round HIV-1 を T 細胞株に感染させ、その直後もしくは感染前に各種エピジェネティック薬を投与することで、感染初期におけるエピジェネティック変化の影響を検討した。その結果、single-round HIV-1 においても、感染初期に感染細胞の一部の集団がエピジェネティック依存的に抑制されていることが示された。

4. 時間依存的な LTR の不活化の分子メカニズムについて

上記の dual-color reporter を感染後、Venus の発現が高い集団を分取し、その後通常条件で培養すると、LTR の活性レベルが時間依存的に徐々に抑制されていくことがわかった。そこでこの集団の感染後初期と後期においてサンプリングを行い、ChIP assay によってヒストン修飾の変化を検討した結果、感染後後期において

H3K27me3 及び H3K9me3 の蓄積が認められた。また感染初期に LTR が不活化していた集団についても同様の検討をした結果、同様に H3K27me3 の更なる蓄積と H3K9me3 の導入が認められた。

5. エピジェネティック薬を用いた潜伏化ウイルスの再活性化

以上の結果より、潜伏感染細胞における LTR の不活性化様式は不均一であり、感染初期における急速な抑制と、感染後後期における時間依存的な抑制が存在することがわかった。そこでこれらの集団によって形成される潜伏後期過程における刺激応答性の違いを検討した。それぞれの集団を感染初期に分取し、その後感染後半年間培養し、異なる潜伏感染細胞集団を得た。これらの集団に対して各種再活性化シグナル及びエピジェネティック薬を処理してその後の応答性を検証した結果、感染初期に活性が強く時間依存的に抑制された集団は再活性化刺激に対して過敏に応答し、LTR が容易に活性化した。一方で感染初期に急激に抑制された集団は、様々な再活性化刺激に対する応答性が鈍く、集団中の LTR のほとんどが不活性化したままであった。

D. 考察

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、潜伏感染の分子メカニズムを知る非常に有用である。驚くべき事に、感染後非常に早期に LTR の活性レベルが低い、もしくは検出できないレベルの集団が形成されることがわかった。潜伏感染細胞集団の形成が感染後早期であろうことはこれまでの研究から推察されてきたことであつたが、実験的に証明したのは本研究が初めてである。また興味深い事に、これまで多くの研究で扱ってきた長期培養によって得られる潜伏感染細胞集団が、実は異なる経路で形成されたヘテロな集団であることがわかった。さらに感染初期に形成された集団は再活性化刺激に対してほとんど応答せず、非常に強力に抑制された集団であることが考えられた。

本研究では、このモデルを用いて潜伏化の分子

メカニズムについても検討を行った。これまでに様々なモデルで潜伏化メカニズムが提唱されているが、我々の結果から LTR を取り巻くヒストン修飾、とくに PRC2 によって導入される H3K27me3 の蓄積が重要であることが強く示唆された。またこれまでに潜伏化に重要であると報告されている H3K9me3 については感染後期にその蓄積が検出されており、感染後の LTR のダイナミックな制御の一端が明らかとなった。PRC2 に対する阻害剤もしくはノックダウンが潜伏化の導入及び維持に対して影響したことは、現在使用されている HDAC 阻害剤に加えて PRC2 阻害剤が有効であることが強く示唆している。しかしながら HDAC と同様 PRC2 は宿主ゲノム制御においても重要な因子であり、LTR 特異的な制御を目指す上で、LTR におけるエピジェネティック変化の更なる分子メカニズムの検証が必要である。

E. 結論

HIV の潜伏化には複数のエピジェネティックメカニズムが存在し、ヘテロな集団の形成を担っている。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Asanuma S, Yamagishi M, Kawanami K, Nakano K, Sato-Otsubo A, Muto S, Sanada M, Yamochi T, Kobayashi S, Utsunomiya A, Iwanaga M, Yamaguchi K, Uchimaru K, Ogawa S, Watanabe T. Adult T-cell leukemia cells are characterized by abnormalities of Helios expression that promotes T-cell growth. *Cancer Sci* 104(8):1097-1106, Aug. 2013 (doi: 10.1111/cas.12181)
- 2) Tsukasaki K, Imaizumi Y, Tokura Y, Ohshima K, Kawai K, Utsunomiya A, Amano M, Watanabe T, Nakamura S, Iwatsuki K, Kamihira S, Yamaguchi K, Shimoyama M. Meeting report on the possible proposal of an extra-nodal primary cutaneous variant in the lymphoma type of adult T-cell leukemia-lymphoma. *J Dermatol* in press
- 3) Togano T, Nakashima M, Watanabe M, Umezawa K, Watanabe T, Higashihara M, Horie R. Synergistic Effect of 5-Azacytidine and

NF- κ B Inhibitor DHMEQ on Apoptosis Induction in Myeloid Leukemia Cells. *Oncol Res* 20(12):571-577, 2013 (doi: 10.3727/096504013X13775486749371)

- 4) Ly BT, Chi HT, Yamagishi M, Kano Y, Hara Y, Nakano K, Sato Y, Watanabe T. Inhibition of FLT3 expression by green tea catechins in FLT3 mutated-AML cells. *PLoS One* 8(6):e66378, Jun. 2013 (doi: 10.1371/journal.pone.0066378)
- 5) Mahieux R, Watanabe T. Forefront studies on HTLV-1 oncogenesis. *Front Microbiol* 4:156, Jun. 2013 (doi: 10.3389/fmicb.2013.00156)
- 6) Nakano K, Ando T, Yamagishi M, Yokoyama K, Ishida T, Ohsugi T, Tanaka Y, Brighty D-W, Watanabe T. Viral interference with host mRNA surveillance, the nonsense-mediated mRNA decay (NMD) pathway, through a new function of HTLV-1 Rex: implications for retroviral replication. *Microbes Infect* 15(6-7):491-505, Jun. 2013 (doi: 10.1016/j.micinf.2013.03.006)
- 7) Yuki H, Ueno S, Tatetsu H, Niuro H, Iino T, Endo S, Kawano Y, Komohara Y, Takeya M, Hata H, Okada S, Watanabe T, Akashi K, Mitsuya H, Okuno Y. PU.1 is a potent tumor suppressor in classical Hodgkin lymphoma cells. *Blood* 121(6):962-970, Feb. 2013 (doi: 10.1182/blood-2012-05-431429)

(総説)

- 1) 山岸誠、渡邊俊樹、特集/血液疾患におけるエピゲノム異常と治療「ATL発症におけるエピゲノム解析の進歩 (The State of the Art in Epigenomics of Adult T Cell Leukemia)」、*血液内科*、66(2)、2013年2月1.
- 2) 渡邊俊樹、特集：リンパ系腫瘍—最新の病態解析と治療—「成人T細胞白血病/リンパ腫の分子病態解析と治療の進歩」、*最新医学*、68(10)：40-47、2013年10月1.
- 3) 渡邊俊樹 (分担執筆)、「IV.リンパ球系 3. 成人T細胞白血病/リンパ腫におけるNF- κ B経路の活性化」、*Annual Review 2014 血液*、147-152、総239ページ程度、中外医学社、2014年1月

2. 学会発表

(国際学会)

- 1) Yamagishi M, Watanabe T, “EPIGENETIC Deregulation of MIRNA in Malignant Lymphomas”, 18th Congress of EHA, Stockholm, Sweden, June 16 (June 12-June 16), 2013 (Oral)

- 2) Nagata Y, Sato-Otsubo A, Okuno Y, Shiraiishi Y, Chiba K, Tanaka H, Kon A, Yoshida K, Sanada M, Ishiyama K, Miyawaki S, Kitanaka A, Shimoda K, Miyano S, Watanabe T, Ogawa S, “Whole exome analysis reveals mutations of TET2 in adult T-cell leukemia/lymphoma”, 18th Congress of EHA, Stockholm, Sweden, June 14(June 12-June 16), 2013 (Poster)
- 3) Takemoto S, Uzawa K, Morita K, Pornkunal R, Haga Y, Iwanaga M, Sagara Y, Kawano F, Watanabe T, “Adult T-cell leukemia/lymphoma following elevation of serum levels of soluble cytokine receptors, sCD25 and Scd30”, 16th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses, Montreal, Canada, June 26-30, 2013(Poster)
- 4) Watanabe T, “Hematological neoplasms and viral Infections”, XXVI Symposium IACRLRD, Lingotto Conference Center, Torino, Italy, Sept. 14(Sept. 11- Sept. 14), 2013(Invited)
- 5) Yamagishi M, Fujikawa D, Kurokawa N, Soejima A, Takahashi R, Sakai N, Nakagawa S, Nakano K, Kobayashi S, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Uchimaru K, Ogawa S, Watanabe T, “Molecular hallmarks of adult T cell leukemia: miRNA, epigenetics, and emerging signaling abnormalities”, 16th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses, Montreal, Canada, June 29(June 26-30), 2013(Oral) HTLV 2013 Young Investigator Travel Award
- 6) Nakano K, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Uchimaru K, Watanabe T, “Disorders of the cMyb proto-oncogene expression and its significance in the course of ATL development”, 16th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses, Montreal, Canada, June 26-30, 2013(Poster)
- 7) Fujikawa D, Yamagishi M, Kurokawa N, Soejima A, Ishida T, Tanaka Y, Nakano K, Watanabe T, “HTLV-1 Tax disrupts the host epigenome by interacting with a Polycomb group protein EZH2”, 16th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses, Montreal, Canada, June 29(June 26-June 30), 2013(Poster) Top10 posters
- 8) Ly BTK, Chi HT, Yamagishi M, Kano Y, Hara Y, Nakano K, Sato Y, Watanabe T, “Inhibition of FLT3 expression by EGCG in FLT3 mutated-AML cells”, The 5th International Conference on O-CHA (Tea) Culture and Science(第5回国際 O-CHA 学術会議), Shizuoka Convention & Arts Center, Shizuoka, November. 8(November 6- November 8), 2013 (Poster) Outstanding Poster Award
- (国内学会)
- 1) Ly BTK, Chi HT, Yamagishi M, Kano Y, Hara Y, Nakano K, Sato Y, Watanabe T, “Inhibition of FLT3 Expression by EGCG in FLT3 mutated-AML Cells”, 平成25年度東京大学医科学研究所研究成果発表会, 東京大学医科学研究所、2013年5月30日-31日 (ポスター発表)
- 2) Fujikawa D, Yamagishi M, Kurokawa N, Soejima A, Ishida T, Tanaka Y, Nakano K, Watanabe T, “HTLV-1 Tax disrupts the host epigenome by interacting with a Polycomb group protein EZH2”, 平成25年度東京大学医科学研究所研究成果発表会, 東京大学医科学研究所、2013年5月30日-31日 (ポスター発表) **ポスター賞**
- 3) 中野和民、安東友美、山岸誠、横山弘一、唐澤伸明、橋爪大明、高橋隆太郎、高橋碧、石田尚臣、大杉剛生、田中勇悦、David W. Brighty、渡邊俊樹、「ウイルス複製を有利にするHTLV-1 Rexの新たな機能の可能性と宿主細胞への影響」、第2回ATLシンポジウム、第6回HTLV-1研究会・シンポジウム、東京大学医科学研究所、2013年8月24日(2012年8月23日-8月25日) (シンポジウム発表)
- 4) 渡邊俊樹、「我が国におけるHTLV-1/ATL研究の現状」、大河内メモリアルシンポジウム1:HTLV-1の現状、第61回日本輸血・細胞治療学会総会、パシフィコ横浜、横浜、2013年5月16日(2013年5月16日—5月18日) (招待講演)
- 5) 堀江良一、渡邊真理子、伊藤金次、梶野富輝, Marshall E. Kadin, 渡邊俊樹、東原正明、「Hodgkinリンパ腫と未分化大細胞型リンパ腫におけるCD30過剰発現機構の解析」、第53回日本リンパ網内系学会総会、国立京都国際会館、京都、2013年5月18日(2013年5月16日-5月18日) (ポスター発表)
- 6) 若林翼、矢持忠徳、矢持淑子、佐々木陽介、Sanaz Firouzi、瀧本雅文、渡邊俊樹、「成人T細胞白血病/リンパ腫(ATLL)における、がん幹細胞微小環境の組織病理学的同定の試み」、第102回日本病理学会総会、ロイトン札幌、札幌、2013年6月6日-6月8日 (ポスター発表)

- 一発表)
- 7) 渡邊俊樹、「ATLの分子病態を基盤とした新規治療法の可能性」、腫瘍別シンポジウム、第72回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜、横浜、2013年10月3日（2013年10月3日—10月5日）（口演発表）
 - 8) 矢持忠徳、守田陽平、矢持淑子、Sanaz Firoouzi、佐々木陽介、若林翼、渡辺信和、内丸薫、宇都宮與、渡邊俊樹、「Putative ATL tumor initiating cells の解析」、第72回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜、横浜、2013年10月3日（2013年10月3日—10月5日）（ポスター発表）
 - 9) 堀江良一、渡邊真理子、伊藤金次、梅野富輝、カディン マーシャル、梅澤一夫、渡邊俊樹、東原正明、「Hodgkinリンパ腫と未分化大細胞性リンパ腫におけるCD30過剰発現機構の解析」、第72回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜、横浜、2013年10月3日（2013年10月3日—10月5日）（ポスター発表）
 - 10) 福田裕章、日野原邦彦、島村徹平、渡邊俊樹、宮野悟、後藤典子、「ヒト乳がん細胞において Amphiregulin/EGFR 経路は mammosphere形成に寄与する」、第72回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜、横浜、2013年10月3日（2013年10月3日—10月5日）（ポスター発表）
 - 11) 山本悠貴、大野麻美子、松田浩一、渡邊俊樹、太田力、「DNA修復因子NBS1の塩基多型によるDSBR機能低下と発がんリスクの増大」、第72回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜、横浜、2013年10月4日（2013年10月3日—10月5日）（口演発表）
 - 12) Yamakawa N, Yokoyama K, Lu J, Imadome K, Watanabe T, Horie R, Hozumi K, Yahara T, Ando K, Nakamura N, Kotani A, “The regulation of “Inflammatory niche” with tumor derived small RNAs”, 第75回日本血液学会学術集会、ロイトン札幌、札幌、2013年10月11日（2013年10月11日—10月13日）（口演発表）
 - 13) Horie R, Watanabe M, Nakano K, Togano T, Kadin ME, Watanabe T, Higashibara M, “CD30 repression triggers global gene responses and anti-proliferative effects in Hodgkin lymphoma”, 第75回日本血液学会学術集会、ロイトン札幌、札幌、2013年10月12日（2013年10月11日—10月13日）（口演発表）
 - 14) 佐藤均、Sanaz Firouzi、渡邊俊樹、矢持忠徳、「免疫不全マウスに連続継代移植されたヒト腫瘍細胞の継代5代目における染色体解析」、染色体学会第64回年会、富山大学五福キャンパス、富山、2013年11月8日—11月10日（ポスター発表）
 - 15) 渡邊俊樹、「ウイルス複製を有利にする HTLV-1 Rexの新たな機能と宿主細胞への影響」、シンポジウム1 発癌ウイルス、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場、神戸、2013年11月10日（2013年11月10日—11月12日）（招待講演）
 - 16) 合田史、片貝栄樹、伊藤郁朗、五十嵐恒雄、渡邊俊樹、佐藤正通、「第2子妊娠中にHIVに感染し、EFV内服中に第3子を妊娠した一症例」、第27回日本エイズ学会学術集会・総会、市民会館崇城大学ホール、熊本、2013年11月20日—11月22日（ポスター発表）
 - 17) 唐澤伸明、中野和民、安東友美、橋爪大明、横山弘一、渡邊俊樹、「宿主mRNA品質管理機構(NMD)抑制を司るHTLV-1 Rexの機能ドメインの解析」、第36回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド、2013年12月5日（2013年12月3日—12月6日）（ポスター発表）
 - 18) 渡邊俊樹、「ATL発症と病態の分子基盤解明の試み」、第11回東海リンパ腫フォーラム学術講演会、ホテルキャッスルプラザ、名古屋、2013年4月20日(招待講演)
 - 19) 渡邊俊樹、「ATL多段階発癌の分子機構解明へのアプローチ」、第1回ATL疾患検討会、東京コンファレンスセンター・有明、東京、2013年7月13日(招待講演)
 - 20) 渡邊俊樹、「診断と治療法開発につながるATLの分子病態解明の試み」、長崎県産婦人科学会地方会、島原、長崎、2013年8月11日(招待講演)
 - 21) 渡邊俊樹、「HTLV-1総合対策3年目の現状」、長崎県ATLウイルス母子感染防止に関する講習会、長崎県医師会館、長崎、2013年12月18日(招待講演)
 - 22) 小林誠一郎、渡辺恵理、石垣知寛、中野和民、矢持忠徳、山岸誠、浅沼里実、大野伸広、湯地晃一郎、渡辺信和、東條有伸、渡邊俊樹、内丸薫、「HAS-Flow法を用いたHTLV-1キャリア／くすぶり型ATL境界の

- 検討」、第6回HTLV-1研究会・シンポジウム、東京大学医科学研究所、2013年8月25日(2012年8月23日-8月25日)(口演発表)
- 23) 中川翔太、山岸誠、藤川大、中野和民、宇都宮與、内丸薫、渡邊俊樹、「成人T細胞白血病細胞におけるポリコムタンパク質の過剰発現機構の解析」、第6回HTLV-1研究会・シンポジウム、東京大学医科学研究所、2012年8月24日-8月25日(ポスター発表)
- 24) 酒井直規、山岸誠、藤川大、中野和民、宇都宮與、内丸薫、渡邊俊樹、「ATL細胞におけるp38シグナル伝達系の異常とNF- κ B経路への影響」、第6回HTLV-1研究会・シンポジウム、東京大学医科学研究所、2012年8月24日-8月25日(ポスター発表)
- 25) 中川翔太、山岸誠、藤川大、中野和民、宇都宮與、内丸薫、渡邊俊樹、「ATLにおけるEZH2過剰発現の分子メカニズム」、第72回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜、横浜、2013年10月3日(2013年10月3日-10月5日)(ポスター発表)
- 26) 山岸誠、片野晴隆、中川翔太、中野和民、太田泰徳、比島恒和、岡田誠治、渡邊俊樹、「リンパ腫におけるエピジェネティック依存的なmiRNAの発現異常とシグナル伝達系の活性化」、腫瘍別シンポジウム、第72回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜、横浜、2013年10月4日(2013年10月3日-10月5日)(口演発表)
- 27) 藤川大、山岸誠、黒川直也、副島あい、石田尚臣、田中勇悦、中野和民、渡邊俊樹、「HTLV-1タンパク質Taxはポリコムタンパク質EZH2との相互作用を介してエピゲノムを攪乱する」第72回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜、横浜、2013年10月4日(2013年10月3日-10月5日)(ポスター発表)
- 28) 中野和民、宇都宮與、山口一成、内丸薫、渡邊俊樹、「スプライシングとmRNA品質管理機構の二重不全によるATL細胞でのPTC含有異常転写産物の高発現とその影響」第72回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜、横浜、2013年10月5日(2013年10月3日-10月5日)(ポスター発表)
- 29) Yamagishi M, Katano H, Nakano K, Ota Y, Hishima T, Okada S, Watanabe T, “Coordinated epigenetic regulation of mRNAs activates simultaneous signaling in malignant lymphoma”, 第75回日本血液学会学術集会、ロイトン札幌、札幌、2013年10月11日(2013年10月11日-10月13日)(口演発表)
- 30) Kobayashi S, Watanabe E, Ishigaki T, Ohno N, Yuji K, Nakano K, Yamochi T, Watanabe T, Watanabe N, Tojo A, Uchimaru K, “The CD7 vs CADM1 plot in FACS is useful for selection of advanced HTLV-1 carriers”, 第75回日本血液学会学術集会、ロイトン札幌、札幌、2013年10月11日(2013年10月11日-10月13日)(ポスター発表)
- 31) Ly BTK, Chi HT, Yamagishi M, Kano Y, Hara Y, Nakano K, Sato Y, Watanabe T, “Inhibition of FLT3 expression by green tea catechins in FLT3 mutated-AML cells”, 第75回日本血液学会学術集会、ロイトン札幌、札幌、2013年10月12日(2013年10月11日-10月13日)(ポスター発表)
- 32) Yamagishi M, Fujikawa D, Kurokawa N, Soejima A, Nakagawa S, Nakano K, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Uchimaru K, Watanabe T, “Diverse ways of modulating Polycomb group function and host epigenome in adult T cell leukemia”, 第75回日本血液学会学術集会、ロイトン札幌、札幌、2013年10月13日(2013年10月11日-10月13日)(口演発表)
- 33) 藤川大、山岸誠、中川翔太、黒川直也、副島あい、中野和民、宇都宮與、内丸薫、石田尚臣、田中勇悦、渡邊俊樹、「HTLV-1タンパク質TaxとPolycombタンパク質EZH2との相互作用を介して宿主細胞のエピゲノムを攪乱し、腫瘍化の進行に寄与する」、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場、神戸、2013年11月12日(2013年11月10日-11月12日)(一般口演)
- 34) 中川翔太、山岸誠、藤川大、中野和民、宇都宮與、内丸薫、渡邊俊樹、「成人T細胞白血病におけるポリコムファミリーの過剰発現機構の解析」、第36回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド、2013年12月5日(2013年12月3日-12月6日)(ポスター発表)
- 35) 酒井直規、山岸誠、藤川大、中野和民、宇都宮與、内丸薫、渡邊俊樹、「成人T細胞白血病におけるp38シグナル伝達系の異常とその意義」、第36回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド、2013年12月4日(2013年12月3日-12月6日)(ポスター発表)

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 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 張 延昭 国立感染症研究所感染病理部 研究生

研究要旨： 2011年に発見された抗ウイルス宿主因子 SAMHD1 はマクロファージや樹状細胞において機能し、HIV-2/SIV Vpx 蛋白により不活化される。今回我々は、それらの細胞において I 型インターフェロン (IFN) 処理後に認められる強力な抗 HIV-1 活性が Vpx によって解除できない事を見出した。つまり SAMHD1 非依存的な感染抑制を担う I 型 IFN 誘導性遺伝子 (ISG) の関与が示唆されたことから、これを探索することを目的とした。健常人の血液から調製した活性化 T リンパ球、マクロファージ及び樹上細胞を IFN α 存在下/非存在下で培養した後に抽出した RNA を用いて、リアルタイム RT-PCR による遺伝子発現解析を行った。その結果、6 種類の ISG が IFN α 処理により特に著しい発現上昇を示した。これらの発現ベクターを構築して過剰発現細胞を作製し、HIV-1 感染実験を行ったところ、これら ISG は異なるレベルで HIV-1 感染を抑制することが明らかになった。以上のことから、先頃報告された新規抗ウイルス宿主因子 MX2 のみならず、これら複数の ISG が同時に HIV-1 感染を負に制御している可能性が示唆された。

A. 研究目的

マクロファージ及び樹状細胞は HIV の潜伏感染及び再活性化において鍵となる標的細胞である。そうした細胞における抗ウイルス宿主因子として、2011年に SAMHD1 が同定され、この蛋白が細胞内 dNTP プールを枯渇することで、HIV-1 の逆転写が阻害されることが明らかになった。この阻害活性は HIV-2/SIV アクセサリー蛋白 Vpx によって抑制されるが、我々は本年度の研究において、マクロファージ及び樹状細胞の I 型インターフェロン (IFN) 処理による著しい HIV-1 感染抑制は Vpx 存在下でも解除されない事を見出した。つまり、SAMHD1 非依存的な HIV-1 感染抑制効果が考えられたことから、I 型 IFN 誘導性遺伝子 (ISG) の同定を試みることを目的とした。

B. 研究方法

1. 発現プラスミド DNA の構築

後述のリアルタイム RT-PCR 実験による発現

解析において候補に挙げた 6 種類の蛋白について HeLa 細胞から抽出したトータル RNA より作製した cDNA をもとに PCR を行い、各フラグメントを C 末 HA タグ付加 pCAGGS に組込んで各発現ベクターを構築した。

2. 初代培養細胞の調製

健常人 4 人の血液から Ficoll 遠心法により末梢血リンパ球を分離した後、抗 CD14 抗体磁気ビーズを用いた MACS カラム法により CD14 陽性細胞を分離した。その半分を MCSF 存在下で 1 週間培養することによりマクロファージに、残り半分を GM-CSF と IL-4 存在下で 1 週間培養することにより樹状細胞にそれぞれ分化させた。CD14 陰性細胞については抗 CD4 単クローン抗体を用いて CD4 陽性細胞を分離して、PHA/IL-2 存在下で 3 日間、刺激培養して活性化 T リンパ球を調製した。マクロファージ、樹状細胞、及び活性化 T リンパ球をそれぞれ IFN α 存在下/非存在下で 24 時間培養した後、以下の感染実験、あるいはリアル

タイム RT-PCR 実験にそれぞれ用いた。

3. 感染実験

上記で調製した初代培養細胞を用いる感染実験では、まず Vpr/Vpx 融合型発現ベクター(または空ベクター)と Vpr/Env 変異型ルシフェラーゼレポーター HIV-1 プロウイルス DNA および水疱性口炎ウイルス G 蛋白 (VSV-G) 発現ベクターをヒト胎児腎細胞 293T 細胞へコトランスフェクションした。48 時間後に上清中の p24 量を測定して感染を行い、更に 48 時間後に細胞溶解液を調製した。それを用いてルシフェラーゼ活性を測定して感染性を定量化した。また候補蛋白を強制発現させる感染実験では、標的細胞用に 6 種類の候補蛋白の哺乳類細胞発現ベクターを CD4/IRES/CCR5 発現ベクターと共に 293T へコトランスフェクションした。同時にウイルスの調製のために、HIV-1 ADA 株由来 R5-Env 発現ベクター及び Env 変異型ルシフェラーゼレポーター HIV-1 プロウイルス DNA 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 p24 量を測定した。候補蛋白と CD4/CCR5 発現細胞を撒き直した後、R5-Env シュードウイルスを感染、ルシフェラーゼ活性を測定した。

4. リアルタイム RT-PCR 実験

前述の健常人 4 人の活性化 T リンパ球、マクロファージ、樹状細胞、または 293T 細胞、単球細胞株 THP-1 をそれぞれ IFN α 処理/未処理したものからトータル RNA を単離した。段階希釈したコントロール (GAPDH) 及び標的遺伝子のスタンダードプラスミドとそれぞれのプライマーを用いてリアルタイム RT-PCR を行い、標準曲線の直線性を確認した後、各検体における各遺伝子の発現レベルを定量化した。

[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 25 年 9 月 13 日付け承認番号・機 25-53 により、また大臣確認 (平成 25 年 9 月 20 日、大臣確認通知番号 25 受文科振第 1849 号) 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. IFN α 処理による HIV-1 感染抑制は SAMHD1

非依存的である

今回まず我々は、分化させた単球細胞株 THP-1 および単核球由来マクロファージにおいて IFN α 処理後に HIV-1 感染が強く抑えられることを確認した。その際の SAMHD1 発現レベルを測定した結果、マクロファージにおいては IFN α 処理による有意な発現上昇が見られなかった。更に重要なことに、IFN α 処理による THP-1 細胞、樹状細胞、マクロファージでの著しい HIV-1 感染抑制は Vpx 存在下でも解除されなかった。このことから、SAMHD1 非依存的な抑制効果が考えられ、未知の抗ウイルス宿主因子の関与が示唆された。

2. IFN α は幾つかの ISG 発現を強力に誘導する IFN 誘導性の新たな抗ウイルス宿主因子を探索する為にまず、活性化 T リンパ球、マクロファージ、及び樹状細胞における、各主要抗ウイルス宿主因子、または過去に報告されている数種類の IFN 誘導性因子の mRNA 発現を解析した。まず APOBEC3G と BST-2/tetherin については、活性化 T リンパ球では IFN 誘導による顕著な上昇が認められなかったが、樹状細胞とマクロファージでは、3 倍以上の発現上昇が見られた。TRIM5 α は全ての細胞において弱い発現上昇が確認された。これに対し、SAMHD1 の場合樹状細胞とマクロファージにおいて僅か 2 倍程度の上昇しか認められなかった。近年新たな抗ウイルス宿主因子として報告された MOV10 と、APOBEC3A は IFN 刺激による発現上昇が確認された。特に、APOBEC3A は 50-1,000 倍の発現上昇が認められた。更に過去に報告がある既知の 15 種類の ISG の発現変化を調べた。逆転写を阻害する RTF1、CTR9、PAF1 ; インテグレーションを阻害する CDKN1A、SETB1 ; そして RNA export を阻害する SLFN11 では、顕著な発現上昇が見られなかった。アセンブリを阻害する CNP 及び HERC5 では発現上昇が確認された。転写を阻害する TRIM19 と機能不明の TRIM11 の場合も、弱い発現上昇が見られた。ウイルス放出を阻害する TRIM22、RSAD2 と ISG15、更にウイルス蛋白発現およびエントリーの両ステップを阻害することが報告されている IFITM ファミリー蛋白 (1、2、及び 3) は、いずれもマクロファージにおいて IFN 誘導によ

り、25倍から1000倍までの激しい発現上昇が確認された。

3. ISGの過剰発現はHIV-1感染を抑制する

上記の結果より、IFN誘導後に激しい発現上昇が確認されたISG 6種類の発現ベクターを構築し、CD4/CCR5発現ベクターと共に293T細胞にコトランスフェクションして標的細胞を作製した。R5エンベロープを持つLucウイルスを293T細胞から作製し、ターゲット細胞に感染させ、各ISGの過剰発現によるHIV-1の感染抑制効果を検証した。まずウエスタンブロットにより各ISGが正常に発現している事を確認した。これらを過剰発現させた細胞に対してHIV-1感染実験を行った結果、APOBEC3A、IFITMファミリー、RSAD2は異なるレベルでHIV-1感染を抑制することが明らかになった。

D. 考察

IFN α 処理をしたマクロファージ及び樹状細胞ではSAMHD1の発現上昇は認められず、またVpxの有無に依らずHIV-1感染が成立しないことから、SAMHD1以外の未知の宿主因子がHIV-1感染前期段階を強力にブロックしている可能性が示唆された。その責任因子として、昨年末に、新規宿主因子MX2がIFN誘導性のHIV-1感染抑制因子であることがNatureに2報連続で報告された(Nature 502:559-62, 2013, Nature 502:563-6, 2013)。しかしながら、その論文におけるMX2のノックダウン実験では感染回復率は僅か20%に過ぎなかった。したがって今回、我々の実験において、IFN処理による大幅な発現上昇が認められ、強いHIV-1感染抑制効果を示したAPOBEC3A、IFITMファミリー及びRSAD2蛋白も、この感染制御に関与している可能性が考えられる。我々は現在、更なる未知の宿主因子がIFN誘導性のHIV-1感染抑制に関わる可能性を考慮して、cDNAライブラリー発現レンチベクターを作製して、抗HIV-1活性を持つISGの同定を試みている。

E. 結論

(1) IFN α によるマクロファージ及び樹状細胞での強力な抗HIV-1活性は、SAMHD1の発

現上昇のためではなく、Vpxによる解除もできないことから、SAMHD1非依存的な感染抑制を担う宿主因子の関与が示唆された。

(2) IFN α 処理による既知のISG群のmRNAの発現変動をリアルタイムRT-PCRにより検討したところ、6種類の遺伝子において顕著な発現上昇が確認された。

(3) 上記ISGを過剰発現させた細胞に対する感染実験を行った結果、APOBEC3A、IFITMファミリー及びRSAD2蛋白がHIV-1感染抑制効果を示した。

(4) マクロファージ及び樹状細胞においては、先頃報告された新規宿主因子MX2に加えて、SAMHD1非依存的なHIV-1感染抑制を担うISGが複数存在する可能性が考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

- 1) Koyama, T., Sun, B., Tokunaga, K., Tatsumi, M., and Ishizaka, Y.: DNA damage aids HIV-1 infection of macrophages by overcoming integrase inhibition. *Retrovirology* 10:21, 2013.
- 2) 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.* 15:280-290, 2013.
- 3) Fujita, H., Iwabu, Y., Tokunaga, K. (co-corresponding author), and Tanaka, Y.: Membrane-associated RING-CH (MARCH) 8 mediates the ubiquitination and lysosomal degradation of the transferrin receptor. *J. Cell Sci.* 126:2798-2809, 2013.
- 4) Tada T., Kadoki, M., Liu, Y., Tokunaga, K. (co-corresponding author), and Iwakura, Y.: Transgenic expression of the human LEDGF/p75 gene relieves the species barrier against HIV-1 infection in mouse cells. *Front. Microbiol.* 4:377, 2013.
- 5) Koyama, T., Arias, J.F., Iwabu, Y., Yokoyama,

M., Fujita, H., Sato, H., and Tokunaga, K. (corresponding author): APOBEC3G oligomerization is associated with the inhibition of both Alu and LINE-1 retrotransposition. PLoS ONE 8:e84228, 2013.

学会発表

- 1) Fujita, H., Iwabu, Y., Tokunaga, K., Tanaka, Y.: MARCH8 mediates the ubiquitination and lysosomal degradation of the transferrin receptor. The 35th Naito Conference: “The Ubiquitin-Proteasome System: From Basic Mechanisms to Pathophysiological Roles”, Sapporo, Japan, 2013.7.
- 2) Koyama, T., Tada, T., Fujita, H., Tokunaga, K.: Membrane-associated RING-CH (MARCH) 8 protein inhibits HIV-1 infection. Frontiers of Retrovirology Conference 2013, Cambridge, UK, 2013. 9.
- 3) 小山貴芳、多田卓哉、藤田英明、徳永研三：新規宿主因子 MARCH8 は HIV-1 感染を抑制する。第 61 回日本ウイルス学会総会（神戸）2013. 11.
- 4) 張延昭、小山貴芳、多田卓哉、山岡昇司、徳永研三：SAMHD1 非依存的な HIV-1 複製阻害に関与する IFN 誘導性抗ウイルス宿主因子の探索。第 61 回日本ウイルス学会総会（神戸）2013. 11.
- 5) Juan F Arias、小山貴芳、岩部幸枝、横山勝、佐藤裕徳、徳永研三：APOBEC3G の二量体化は LINE-1 転移抑制に重要である。第 61 回日本ウイルス学会総会（神戸）2013. 11.
- 6) 亀岡正典、Piraporn Utachee、Panasda Isarangkura-na-ayuthaya、徳永研三、生田和良、武田直和：HIV-1 CRF01_AE 株が gp120 CD4 結合部位を認識する単クローン抗体に対して中和抵抗性を示す分子機構。第 61 回日本ウイルス学会総会（神戸）2013. 11.
- 7) 大久保麻佳、檜崎彩香、萩森政頼、山口泰史、藤井佑樹、藤原俊幸、徳永研三、藤田英明：亜鉛輸送体 ZIP14 の細胞内輸送および機能発現制御に関する基礎的解析。第 30 回日本薬学会九州支部大会（長崎）2013. 12.
- 8) 小山貴芳、多田卓哉、藤田英明、徳永研三：膜貫通蛋白 MARCH8 による HIV-1 感染阻害。第 36 回日本分子生物学会（神戸）2013. 12.
- 9) Koyama, T, Arias, J.F., Iwabu, Y., Yokoyama, M., Fujita, H., Sato, H., Tokunaga, K. APOBEC3G oligomerization is associated with the inhibition of Alu and LINE-1 retrotransposition. Keystone Symposia “Mobile Genetic Elements and Genome Evolution”, Santa Fe, USA, 2014. 3.

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