

「HIV 感染末梢血細胞の形質転換能の検討」に関する研究

分担研究者 徳永 研三 国立感染症研究所感染病理部 主任研究官

研究要旨：エイズ悪性 B 細胞腫は、HIV 感染が誘導する何らかの液性因子が B 細胞に作用することで惹起されるエイズ関連リンパ腫と考えられる。そこで本年度の研究ではまず *in vitro* における T 細胞からの癌化誘発因子について検証すべく、初代培養細胞実験系を用いて、HIV-1 感染 T 細胞から放出される宿主可溶性因子またはウイルス蛋白が B 細胞に及ぼす影響について DNA メチル化レベルで検証することを試みた

A. 研究目的

エイズ関連悪性リンパ腫は非エイズ悪性リンパ腫とは異なる疾病として考慮する必要性があり、エイズ悪性 B 細胞腫においては HIV 感染に直結した外的因子が B 細胞に作用することによって癌化が惹起される可能性が考えられる。そこで本研究においては、T 細胞からの癌化誘発因子について臨床検体、培養細胞、ならびに動物実験で明らかにする。更に同定された液性因子作用を遮断する中和抗体を作成し、臨床応用の可能性も明らかにする。本年度は、*in vitro* で、末梢血リンパ球由来 T 細胞に HIV-1 を感染させ、そこから放出される可溶性の宿主因子またはウイルス蛋白が、共培養の B 細胞に与える影響について検討した。

B. 研究方法

1. 初代培養細胞の調製

健常人由来末梢血リンパ球から分離した CD43 陽性細胞（T 細胞、マクロファージ他）を PHA/IL-2 存在下で 72 時間、刺激培養して活性化 T リンパ球を調製した。CD43 陰性細胞（B 細胞）は無刺激で培養した。

2. 各種 HIV-1 変異型ウイルスの調製

一段階増殖 HIV-1 の調製のために、HIV-1 ADA 株由来 R5-Env 発現ベクターと、野生型またはアクセサリー遺伝子 (*nef*, *vif*,

vpr, または *vpu*) 変異型で且つ *env* 遺伝子欠損型 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 時間後に上清中のウイルス量を p24 ELISA により測定した。調製した各ウイルスを等しい p24 量で、LTR-β-gal 遺伝子が組み込まれている CD4/CCR5 発現 HeLa 細胞 (MAGIC5 細胞) に感染させ、48 時間後に X-gal 染色 (MAGI アッセイ) を行うことによりウイルスの感染力価を定量した。

3. 感染実験

調製した活性化 T リンパ球に、各ウイルスを MOI (multiplicity of infection) 1 で感染させ、メンブレンチャンバーを介して CD43 陰性細胞（未熟 B 細胞）と共培養を行った。48 時間後に培地交換を行い、更に 48 時間培養した後にゲノム DNA を抽出した。

C. 研究結果

感染に用いる野生型及びアクセサリー遺伝子変異型ウイルスの量を感染力価で合わせるために、各ウイルスの感染性を MAGI アッセイにより定量した。その結果、Nef 変異型ウイルス以外は全て野生型と同じ感染性を示したが、Nef 変異型のみ 8.5 倍低い感染性を示したため、他のウイルスの 8.5 倍量の p24 量のウイルスを用いた。一段階増殖ウイルスを用い

たため、感染後の T リンパ球の生存率または形態への影響は認められなかった。

D. 考察

Nef 変異ウイルスのみが他より多いウイルス量で感染に使用されている事の影響を検証する必要がある。IL-2 が B 細胞にメチル化レベルでの影響を与えるとの報告があることから、HIV-1 感染 T 細胞と B 細胞を共培養する際に IL-2 を除いたが、それによる T 細胞の増殖低下が HIV-1 の蛋白発現に与える可能性がある。また今回の感染条件下で実際にどの程度の T 細胞で感染が成立しているかは現時点で不明である。エイズ関連 B 細胞腫における HIV-1 感染の直接的または間接的な影響を DNA メチル化レベルで検討した報告はいまだかつてなく、HIV-1 感染者における B 細胞のメチル化パターンと病態進行の関係を明らかにすることは臨床意義が大きいと考えられる。今後は、感染力価のみならず p24 量で標準化する感染実験も試みる。感染 T 細胞と B 細胞の混合時の IL-2 の有無の影響について検証する。また本実験条件における HIV-1 の感染効率について調べるために p24 間接蛍光抗体法を行う。更に先頃 Nature (505:509-514, 2014) で報告された、静止期 T 細胞への HIV-1 の abortive な感染による pyroptosis 炎症性 programmed cell death でカスパーゼ 1 の活性化により IL-1 β 産生が認められる について、それが B 細胞に与える影響を検証するため、未刺激の静止期 T 細胞への感染実験も試みる。

E. 結論

HIV-1 野生型またはアクセサリー変異型ウイルスを、健康人末梢血リンパ球由来の活性化 T 細胞に等力価で感染させて、未熟 B 細胞と混合培養した。

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 複製阻害に關与する 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關する基礎的解析．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