

- 7) 中村碧、高原悠佑、松岡佐織、三浦智行、小柳義夫、成瀬妙子、木村彰方、俣野哲朗：抗 HIV 薬投与下の治療ワクチン接種により誘導される CD8 陽性 T 細胞の SIV 複製抑制能の解析、第 28 回日本エイズ学会学術集会、大阪、2014 年 12 月 3-5 日

#### Ⅱ. 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	東京工科大学	医療保健学部	教授
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	小林 美栄	国立感染症研究所	免疫部	流動研究員
研究協力者	和田 倭	国立感染症研究所	免疫部	研究生

### 研究要旨：

静止期にある CD4 陽性 T 細胞を長期培養維持可能な HSP (HomeoStatic Proliferation) 培養系は、おそらく体内のリンパ組織で恒常維持されている CD4 陽性 T 細胞を模倣した状態でナイーブ T 細胞も含めて培養維持できる。この培養で維持されるナイーブ T 細胞は、in vitro での TCR 刺激や HDAC 阻害剤による HIV-1 mRNA の増加は誘導されなかったことから、静止期ナイーブ T 細胞での LTR 制御は強力な TCR 刺激をうけて静止状態に戻った記憶 CD4 陽性 T 細胞とは異なることが示唆された。

### 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 (gag/pol、rev および VSV-G 発現ベクター)、あるいは env 欠損 HIV-1<sub>NLE</sub> (GFP 発現) proviral DNA と VSV-G 発現ベクター-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

健常人末梢血単核球(PBMC)より CD4<sup>+</sup> T cell isolation kit (ミリテニー)を用いて negative selection して CD4<sup>+</sup> T 細胞を純化した。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 VSV psudotype した HIV-1<sub>NLE</sub> を spinoculation により感染させた。細胞を洗浄後、IL7 と IL-15 を加えて培養維持し、これを HSP (Homeostatic proliferation) 培養とした。一部は固相化抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体で T 細胞受容体 (TCR)を刺激し、IL-2 存在下に培養した(TCR 刺激培養)。

#### 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 の mRNA 発現を Real Time PCR で定量した。また、感染細胞の DNA を調整し、Alu-primer を用いた integration の解析を行った。

PCR 解析では以下のプライマー・プローブセッ

トを用いた Taqman 法、あるいは Syber Green 法による Real Time PCR で定量した。

GFP: forward, 5'-gaccactaccagcagaacac-3', reverse, 5'-gaactccagcaggaccatg-3', probe, [6-FAM]-agc-accagctccgccctgagca-[BHQ-1], HIV-1 tat は、forward, 5'-catccaggaagtgcgctaaaact-3', reverse, 5'-tcgctgtctccgcttcttc-3'。また、細胞の endogenous control gene expression として RNaseP 遺伝子発現を定量した (forward: 5'-agatttgacctgcgagcg-3', reverse, 5'-gagcggtgtctccacaagt-3', および probe, [6-FAM]-ttctgacctgaaggctctgcgcg-[BHQ-1])。

ゲノムに組み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-1 primer (5'-tcccagctactggggaggctgAGG-3' Alu-2 primer (5'-gcctcccaaagtgtctgggattacag-3') first-gag-R primer (5'-caatatcatagccgagagtgccgcttcagcaag-3') で 1st PCR を行い、全 DNA を  $1 \times 10^5$  copies  $\beta$ -globin となるように調整して Alu sites を一定にした。2nd PCR は U5 (5'-ccgtctgtgtgtgactctgg-3') second-tag-R (5'-caatatcatagccgagagtg-3') と probe [6-FAM]-cgcttcagcaagccgagtcctgc-[BHQ-1] を用いた。

#### 5. その他の薬剤

HDAC 阻害剤 SAHA (vorinostat) とメチル化阻害剤 2'-deoxy-5-azacytidine (dAzCyt) は Sigma-Aldrich 社より購入した。

(倫理面への配慮等) ヒト末梢血調整のため、国立感染症研究所の倫理委員会の承認を得、ボランティアから同意を得て採血を行った。

### C. 研究結果

静止期にある末梢血由来 CD4 陽性 T 細胞を HIV-1 に感染させ、ナイーブあるいはメモリー T 細胞の恒常性維持に必須といわれる IL-7 と IL-15 を添加して培養することにより、潜伏感染モデルとしての HSP (HomeoStatic Proliferation) 培養系を確立した。LTR の制御下に GFP を発現するレンチウイルスを感染させた時、静止期の GFP 陰性 CD4 陽性 T 細胞において低レベルの GFP mRNA の発現を認めた。これが Tat の発現が無いレンチウイルスであるためかどうかを確認するため、野生株 HIV-1<sub>NL-E</sub> を感染させたところ、図 1 A 左に示すように、4.96% の細胞が GFP を発現しており、特に静止期 (非分裂) 細胞に GFP 陽性細胞が多かった。ナイーブ T 細胞にゲートをかけると、GFP 陽性細胞は 1.83% 存在しており、メモリーよりは少ないもののナイーブ T 細胞にも感染は成立していることが明らかとなった (図 1 B)。野生株では培養中

に感染した細胞が多いことが考えられたため、ナイーブ T 細胞をエンリッチして (85% 程度) から同様に VSV pseudotype した HIV-1<sub>NL-E</sub> を感染させて HSP 培養して 14 日後に解析すると、図 1 B に示すように、GFP 陽性細胞は 0.95% に減少した。このうち GFP 陰性の静止期にあるナイーブ T 細胞にゲートをかけてソートし、再活性化を試みた。TCR 刺激を加えて 1 日目と 6 日目の細胞より RNA を回収し、GFP および tat の mRNA 発現を RT-PCR で定量したところ、図 2 に示すように、HSP 培養を持続して発現している GFP(A) や tat (B) の発現はむしろ低下した。従って、integrate した HIV-1 の再活性化は TCR 刺激では誘導されないことが明らかとなった。そこで同様に感染した細胞を 8 日目にソートし、HSP 培養を継続して 13 日目に TCR 刺激、HDAC 阻害剤である SAHA (0.5  $\mu$ M) やメチル化阻害剤 dAzCyt (1.0  $\mu$ M) を加えて更に 48 時間後に GFP mRNA の発現を解析したところ、TCR や dAzCyt よりも保たれてはいるものの、SAHA による再活性化誘導はできなかった。一方、ここには示していないが、同じ細胞を感染直後に TCR を刺激して維持した細胞では SAHA により 5 倍程度の GFP mRNA 発現が見られていることから、HSP 培養維持される静止期ナイーブ CD4 陽性 T 細胞はこれまでに知られている再活性化刺激に反応しないことが明らかとなった。

### D. 考察

HIV-1 の潜伏過程には T 細胞によって様々な因子が作用していることが指摘されている。培養細胞を用いた *in vitro* の系では、CD4 陽性 T 細胞株や TCR 刺激後に生存する初期培養 T 細胞が主として使用されてきた。しかしながら、このような T 細胞はすべてメモリー・エフェクターに分化した細胞である。また、感染者の体内 PBMC に潜伏感染した HIV-1 の再活性化をめざす、いわゆる "shock and kill" 治療法において、TCR 刺激だけでなく HDAC 阻害剤を含めた様々な薬剤が試されてきたが、その効果は部分的でしかない。HSP 培養維持された静止期にある naïve T 細胞は低レベルの HIV-1 mRNA のみ発現しており、TCR や HDAC 阻害剤にも反応しなかったことから、これらの細胞での潜伏感染は一度 TCR を受けたメモリー・エフェクター細胞とも異なる未知の制御を受けていると推察される。最近同定された Stem

cell memory T 細胞 (Buzon et al., Nat. Med. 20:139, 2014)は、本研究の静止期 naïve T 細胞に類似した低頻度の T 細胞亜集団であるが、メモリー T 細胞と比較して活性化されてウイルスによる細胞傷害を受けにくいいためその存在は長期にわたり、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示唆されている (Jaafoura ら、Nat. Comm., 5:5407, 2014)。このようなプロウイルスを持つ細胞が生体内のどのような条件で再活性化しうるのか、あるいはまったく silent なまま経過するのか、今後分子レベルで解析していく必要がある。HSP 培養は今後の潜伏感染成立過程の詳細な解析に有用な in vitro 培養系であると思われる。

### E. 結論

静止期にある CD4 陽性 T 細胞を長期培養維持可能な HSP (HomeoStatic Proliferation)培養系は、おそらく体内のリンパ組織で恒常維持されている CD4 陽性 T 細胞を模倣した状態でナイーブ T 細胞も含めて培養維持できる。この培養で維持されるナイーブ T 細胞は、in vitro での TCR 刺激や HDAC 阻害剤による HIV-1 mRNA の増加は誘導されなかったことから、静止期ナイーブ T 細胞での LTR 制御は強力な TCR 刺激をうけて静止状態に戻った記憶 CD4 陽性 T 細胞とは異なることが示唆された。このような静止期の T 細胞への HIV-1 感染と潜伏化の成立過程やその存在意義について更に検討が必要である。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Terahara, K., Ishige, M., Ikeno, S., Okada, S., Kobayashi-Ishihara, M., Ato, M., and Tsunetsugu-Yokota, Y.; Humanized mice dually challenged with R5 and X4 HIV-1 show preferential R5 viremia and restricted X4 infection of CCR5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells. Microb. Infect. 2015. in press
- 2) Terahara, K., Ishii, H., Nomura, T., Takahashi, N., Takeda, A., Shiino, T., Tsunetsugu-Yokota, Y. and Matano, T.; Vaccine-induced CD107a<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells are resistant to depletion following AIDS

virus infection. J. Virol.,88: 14232-40, 2014

- 3) Kobayashi-Ishihara, M., Takahashi, H., Ohnishi, K., Nishimura, K., Terahara, K., Ato, M., Itamura, S., Kageyama, T., Tsunetsugu-Yokota, Y.; Broad Cross-Reactive Epitopes of the H5N1 Influenza Virus Identified by Murine Antibodies Against the A/Vietnam/1194/2004 Hemagglutinin. PLoS One, 9(6):e99201, 2014
- 4) Tsunetsugu-Yokota, Y., Nishimura, K., Misawa, S., Kobayashi, M., Takahashi, H., Takayama, I., Ohnishi, K., Itamura, S., Nguyen, H. L. K. Le, M. T. Q., Dang, G. T., Nguyen, L. T., Tashiro, M., Kageyama, T.; Development of a sensitive novel diagnostic kit for the highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus. BMC Infect Dis., 14:362, 2014
- 5) Iwata-Yoshikawa, N., Uda, A., Suzuki, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Sato, Y., Morikawa, S., Tashiro, M., Sata, T., Hasegawa, H. and Nagata, N.; Effects of Toll-like Receptor Stimulation on Eosinophilic Infiltration in Lungs of BALB/c Mice Immunized with UV-inactivated Severe Acute Respiratory Syndrome-related Coronavirus Vaccine. J. Virol., 88:8597-8614, 2014
- 6) Matsuzaki, Y., Sugawara, K., Nakauchi, M., Takahashi, Y., Onodera, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Matsumura, T., Ato, M., Kobayashi, K., Shimotai, Y., Mizuta, K., Hongo, S., Tashiro, M., Nobusawa, E.; Epitope mapping of the hemagglutinin molecule of A/(H1N1)pdm09 virus by using monoclonal antibody escape mutants. J. Virol., 88:12364-73, 2014

#### 2. 学会発表

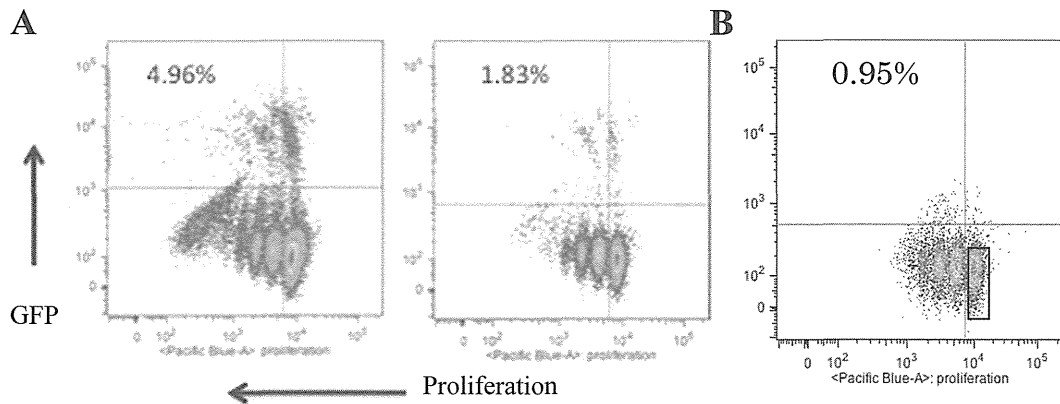
- 1) 池野翔太、寺原和孝、石毛真行、駒瀬勝啓、竹田誠、森川裕子、竹山春子、横田(恒次)恭子「ヒト化マウスの麻疹ウイルスベクター評価系への応用(3)」第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月10日
- 2) 和田倭、小林(石原)美栄1)、寺原和孝1)、池野翔太1)2)、徳永研三3)、立川(川名)愛、山岸誠、竹山春子、横田(恒次)恭子「恒常的に培養維持されたCD4陽性T細胞へのHIV-1の感染とその転写制御機構の解明」第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11

月10日

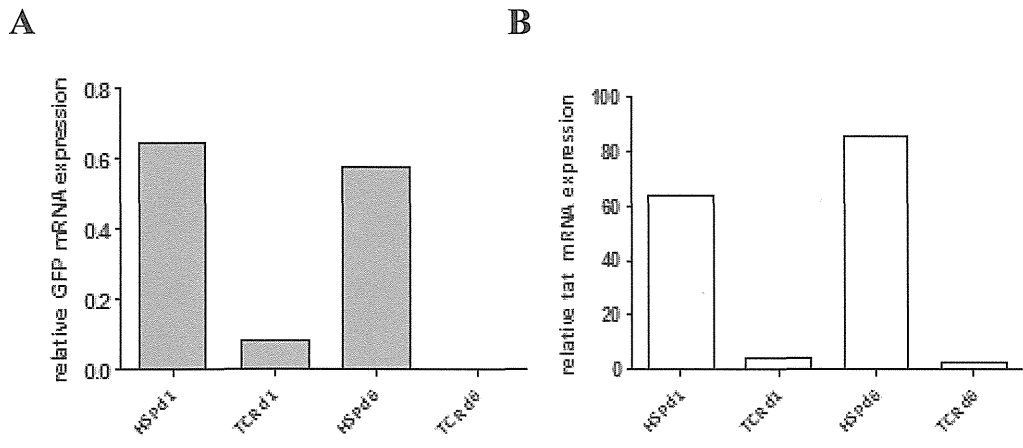
- 3) 寺原和孝、石毛真行、池野翔太、小林(石原)美栄、岡田誠治、横田(恒次) 恭子「R5・X4 HIV-1混在感染ヒト化マウスの感染早期にみられるR5ウイルス優位性とその要因について」第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月10日
- 4) 萩原恭二、村上知行、石井英樹、竹嶋伸之輔、近藤恭光、本田香織、長田裕之、横田(恒次) 恭子、鈴木正昭、間陽子「アクセサリタンパク質Vprの核移行を標的にしたマクロファージに対する新規HIV-1阻害剤の最適化研究」第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月10日
- 5) Yoppy R Candra, Anna L Poetranto, Aldise M Natri, Edith F Puruhito, 横田(恒次) 恭子, 西村研吾, 影山努, 高原悠佑, 堀田博, 清水一史「Comparative analysis for the detection of avian influenza H5N1 virus by using a novel luminescence analyzer (POCube) and real-time RT-PCR」第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月10日
- 6) Shota Ikeno, Kazutaka Terahara, Yasuko Tsunetsugu-Yokota 「Induction of human cytokines in humanized mice improves dendritic cell development and antigen-specific antibody production」第43回日本免疫学会学術集会、京都、2014年12月10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
3. その他  
なし



**図1 静止期 CD4 陽性 T 細胞における HIV-1 感染とその発現**  
 (A) 末梢血 CD4 陽性細胞に GFP を発現する HIV-1<sub>NL-E</sub> を感染させた。この細胞を IL-7 と IL-15 添加した HSP 培養し、感染 9 日後にフローサイトメーターで感染細胞 (GFP, 縦軸) と増殖レベル (横軸) を解析した。  
 (B) 末梢血 CD4 陽性細胞を更に naive 細胞に分け、VSV pseudotype した HIV-1<sub>NL-E</sub> を感染させて HSP 培養し、感染 14 日後の細胞増殖と GFP 発現をフローサイトメーターで解析した。



**図2 GFP を発現しない静止期 CD4 陽性 naive T 細胞でのウイルス mRNA 発現**  
 VSV pseudotype した HIV-1<sub>NL-E</sub> を感染させて HSP 培養 14 日後 (図 1 B) の GFP 陰性、細胞非分裂 (静止期) CD4 陽性 T 細胞を FACSaria でソートし、HSP 培養を継続あるいは TCR 刺激を加えて 1 日後および 6 日後に RNA を抽出した。cDNA 合成後、定量 PCR にて GFP (A) および tat (B) の mRNA 発現量を解析した。縦軸は、細胞内 endogenous mRNA コントロールとして RNase P の mRNA に相対的な GFP および tat の発現レベルとして示した。

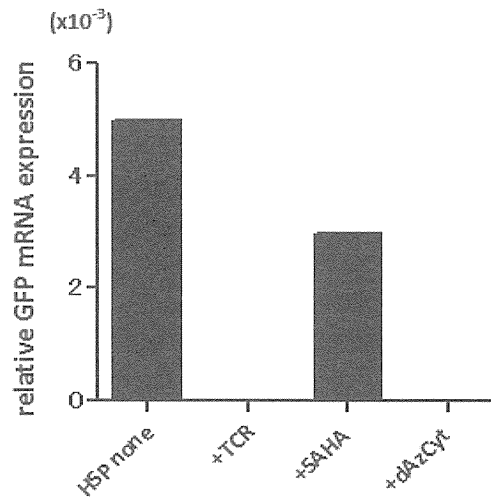


図3 潜伏感染した静止期 CD4 陽性 naïve T 細胞における HIV の再活性化誘導  
 図2同様に VSV pseudotype した HIV-1<sub>NL-E</sub> を感染させて HSP 培養 8 日後に GFP 陰性、細胞非分裂（静止期）CD4 陽性 T 細胞を FACSaria でソートし、HSP 培養を更に持続して 15 日後に RNA を抽出した。一部は 13 日目に TCR 刺激、あるいは SAHA, dAzCyt を添加し、同じく 15 日目に RNA を抽出して cDNA を合成して GFP mRNA を PCR 定量した。縦軸は、細胞内 endogenous mRNA コントロールとして RNase P の mRNA に相対的な GFP の発現レベルとして示した。

## 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創成科学研究科 特任研究員

### 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。本年度は、作成した新規レポーターウイルスを正常 T 細胞に導入し、潜伏化成立の実態を明らかにした (Matsuda *et al.*, Scientific Reports, 2015)。また大規模化合物スクリーニングにより、潜伏化 LTR を効果的に再活性化できる化合物取得の検討を開始した。

### A. 研究目的

HIV-1 は体内で CD4<sup>+</sup>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ない。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<sup>+</sup>T cell である。この細胞ではプロウイルスの状態 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。

最終年度は、作成した新規レポーターウイルスを正常 T 細胞に導入し、潜伏化成立のダイナミクスとその制御の可能性を検討した。また大規模化合物スクリーニングにより、潜伏化 LTR を効果的に再活性化できる化合物の取得を目的とした。

### B. 研究方法

#### 1. 正常 CD4<sup>+</sup>T 細胞を用いた感染実験

末梢血由来正常 CD4<sup>+</sup>T 細胞は健常人 PBMC から磁気ビーズを用いて濃縮を行った。昨年度までに作成した dual-color レポーター DNA を 293FT 細胞に導入し、高濃度ウイルス液を作成したのち、spinoculation によって正常細胞に導入した。その後、CD3/CD28 抗体によって T 細胞を刺激し、その前後の LTR の活性レベルをフローサイトメトリーで解析を行った。

#### 2. 潜伏化 LTR を再活性化する化合物の大規模スクリーニング

Jurkat 細胞に dual-color ウイルスを感染させ、感



染初期に成立した潜伏化細胞を分取したのち、21万種類の低分子化合物を処理する。LTRの活性レベルはHigh Content Analysisによって検出、定量し、化合物の同定を試みている。

## C. 研究結果

### 1. 正常 CD4<sup>+</sup>T 細胞における LTR の潜伏化成立の検出

健康人由来 CD4<sup>+</sup>T 細胞に高濃度 dual-color レポーターを感染させ、その後の LTR の活性レベルを検討した。またこれらの集団に対して CD3/CD28 抗体を用いて抗原刺激を行い、細胞の活性化レベルと潜伏化の検討を行った。さらに前年度までに明らかにした EZH2 の阻害剤と HDAC の阻害剤を処理し、潜伏化の成立に与える影響を検証した。

その結果、正常 T 細胞においても細胞株を用いた場合と同様に、感染直後に LTR が抑制された集団が成立することがわかった。この集団は抗原刺激による細胞の活性化によって縮小されたが、潜伏化集団が依然として残存することがわかった。また EZH2 と HDAC の阻害剤によっても感染初期の潜伏化集団サイズを縮小できることがわかった。しかしながら、潜伏化集団を完全には除去できず、これらの集団を除去する新たな戦略の必要性を浮き彫りにした。

研究成果として昨年度までの細胞株のデータと正常細胞を用いた HIV-1 の潜伏化成立の新たな分子メカニズムについて論文で発表した (Matsuda *et al.*, Scientific Reports, 2015)。

### 2. 潜伏化 LTR を再活性化する化合物の大規模スクリーニング

Jurkat 細胞に dual-color ウイルスを感染させ、感染初期に成立した潜伏化細胞を分取したのち、低分子化合物を処理した。またポジティブコントロールとして PMA+Ionomycin を処理し、検出系の最適化と定量性の確認を行った。LTR の活性レベルは High Content Analysis によって検出、定量し、化合物の同定を試みた。

現在までに実験系の最適化を終了し、現在 21 万種類の化合物スクリーニングを開始している。

## D. 考察

本研究で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。今回得られた正常細胞における潜伏化の成立は、HIV-1 感染症の cure を目指すストラテジーを組み立てる上で非常に重要な発見であった。従来は潜伏化したメモリー T 細胞の活性化と HDAC の阻害が有効であるとされてきたが、我々の系で潜伏化集団の可視化を行うことで、非常に多くの残存が明らかになった。本研究結果で示した polycomb 依存的な LTR の抑制は新たな標的の一つとなると考えられるが、現在使用できる阻害剤では完全な除去には至らなかった。今後これらの分子メカニズムを基盤とした新たな戦略が必要であると考えられた。

本研究では、新たな化合物と分子標的を創出すべく、化合物の大規模スクリーニングを開始した。これまでも潜伏化 HIV を標的とした化合物スクリーニングが報告されているが、我々は感染初期に成立集団に注目して検討を始めている。この結果を得て新たな分子メカニズムの検討と HIV-1 潜伏化の制御を試みる。

## E. 結論

正常 T 細胞において、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) Matsuda Y, Kobayashi-Ishihara M, Fujikawa D, Ishida T, Watanabe T, Yamagishi M. Epigenetic Heterogeneity in HIV-1 Latency Establishment. *Sci. Rep.* 5:7701, Jan. 2015 (doi: 10.1038/srep07701)

### 2. 学会発表

1) 山岸誠、松田有加、小林(石原)美栄、藤川大、石田尚臣、渡邊俊樹、「HIV-1 潜伏化の不均一性とその分子メカニズムの解析」、第 62 回日本ウイルス学会学術総会、パシフィコ横

浜、横浜、2014年11月12日（2014年11月10日～12日）（一般口演）

- 2) 和田倭、小林(石原)美栄、寺原和孝、池野翔太、徳永研三、川名(立川)愛、山岸誠、竹山春子、横田(恒次)恭子、「恒常的に培養維持されたCD4陽性T細胞へのHIV-1の感染とその転写制御機構の解明」第62回日本ウイルス学会学術総会、パシフィコ横浜、横浜、

2014年11月12日（2014年11月10日～12日）（一般口演）

#### Ⅲ. 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：本年度、まず我々は、HIV-1 感染抑制活性がインターフェロン（IFN）の II 型、III 型には殆どなく I 型特異的であることを確認した。そこで I 型 IFN の誘導により発現が著しく惹起される 6 種類の候補蛋白（APOBEC3A、IFITM1、IFITM2、IFITM3、ISG15、及び RSAD2）と新規蛋白 MX2 の安定発現細胞、更に CRISPR/CAS9 システムによるそれら遺伝子のノックアウト細胞を用いて、HIV-1 ルシフェラーゼレポーターウイルスによる感染実験を行った。その結果、前者の実験で、特に IFITM ファミリー蛋白が MX2 レベルの感染抑制活性を示すことを見出した。一方、後者の実験では、個々の遺伝子のジーンサイレンシングでは I 型 IFN による強力な感染抑制からの回復は不十分であった。以上のことから、未知の遺伝子を含む複数の遺伝子が感染抑制に寄与している可能性が示唆された。

### A. 研究目的

我々はこれまでの研究において、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 感染前期抑制は Vpx 存在下でも解除されないこと、つまり、SAMHD1 非依存的な HIV-1 感染抑制効果を見出した。本研究においては、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。昨年度までに、IFN- $\alpha$  によって強力に誘導されることが明らかになった 6 種類の候補遺伝子、APOBEC3A、IFITM1、IFITM2、IFITM3、ISG15、及び RSAD2 を 3 種類の異なる方法により発現させ、HIV-1 ルシフェラーゼレポーターウイルスを用いた感染実験を行うことにより、候補遺伝子産物による感染抑制効果を検討した。また CRISPR/CAS9 システムを用いた候補遺伝子のノックアウトにより、IFN 存在下において、HIV-1 感染効率の回復が認められるか否かを調べた。

### B. 研究方法

まず、HIV-1 感染抑制効果が I 型 IFN 特異的か否かを検証した。次に昨年、候補遺伝子として

同定した IFITM1、IFITM2、IFITM3、ISG15 及び RSAD2 と新規蛋白 MX2 の安定発現細胞株を、DNA 導入後の薬剤選択またはレンチウイルスによるトランスダクションの二種類、計三種類の方法で樹立した。それらの細胞に HIV-1 ルシフェラーゼレポーターウイルスを感染させてルシフェラーゼアッセイにより感染性の定量を行った。詳細は以下の通り。

#### 1. IFN I 型・II 型・III 型の処理による単球細胞株の調製

単球細胞株 THP-1 を phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; Sigma) 30 ng/ml で一晩処理した後、I 型 IFN ( $\alpha$ ,  $\beta$ , 及び  $\omega$ )、II 型 IFN ( $\gamma$ ) または III 型 IFN ( $\lambda$ ) をそれぞれ 500 U/ml を加えて培養した。

#### 2. ネオマイシン耐性候補遺伝子発現プラスミドの構築

pCXN2（京大ウイルス研・朝長先生より分与）から切り出した TK プロモーター/ネオマイシン耐性遺伝子を pCAGGS に挿入した後、そのマルチクローニングサイトに C 末 HA タグを挿入して、PCR 増幅した各候補遺伝子を挿入して作製した。

### 3. T細胞株 M8166 へのトランスフェクションによる安定発現細胞株の樹立

2 で作製したネオマイシン耐性候補遺伝子発現プラスミドをそれぞれ、T細胞株 M8166 に 4D-Nucleofector システム (Lonza) を用いてトランスフェクションし、48 時間後に 1 mg/ml の G418 (Wako) を添加、1 週間培養して安定発現細胞を樹立した。

### 4. 候補遺伝子発現レンチウイルスベクターの構築

前述の pCAGGS バックボーンに HA タグ付き候補遺伝子発現ベクターのインサート部分をタグごと PCR 増幅した後、レンチシャトルベクターに挿入して作製した。

### 5. レンチウイルスベクターによる候補遺伝子の 293T 細胞へのトランスダクション

4 で作製した候補遺伝子発現レンチウイルスベクター、パッケージングベクター、Rev、Tat、及び水疱性口炎ウイルス G 蛋白 (VSV-G) 発現ベクターを 293T 細胞にコトランスフェクションして、48 時間後に上清中のウイルス量を p24 antigen capture ELISA (ABL) により測定した。得られたレンチウイルスベクターを MOI 5 で 293T 細胞にトランスダクションした。

### 6. ネオマイシン耐性遺伝子付き候補遺伝子発現レンチウイルスベクターの構築

上記の候補遺伝子発現レンチウイルスベクターの GFP 遺伝子部分をそれぞれネオマイシン耐性遺伝子と取り換えることにより作製した。

### 7. ネオマイシン耐性遺伝子付加レンチウイルスベクターによる安定発現 HeLa 細胞の樹立

6 で作製したネオマイシン耐性遺伝子付き候補遺伝子発現レンチウイルスベクターを用いて、5 と同様にコトランスフェクションして、p24 量を測定した。得られたレンチウイルスベクターを MOI 5 で HeLa 細胞にトランスダクションした。48 時間後に 500 µg/ml の G418 を添加、4 日間培養して安定発現細胞を樹立した。

### 8. 候補遺伝子ノックアウト用 CRISPR/Cas9 発現レンチウイルスベクターの構築

3'側に PAM 配列を有する 20 塩基の標的配列を候補遺伝子ごとにデザインして、各オリゴリナーを CRISPR/Cas9 発現レンチウイルスベクターに挿入することにより作製、候補遺伝子発現ベクターとのコトランスフェクションによ

り、ノックアウト効率を確認した。コントロールとして SAMHD1 ノックアウトベクターも作製した。

### 9. CRISPR/Cas9 レンチウイルスベクターによる候補遺伝子ノックアウト THP-1 細胞の樹立

8 で作製した CRISPR/Cas9 レンチウイルスベクターを用いて、5 と同様にコトランスフェクションして、p24 量を測定した。得られたレンチウイルスベクターを MOI 3 で THP-1 細胞にトランスダクションした。48 時間後に 0.5 µg/ml の puromycin を添加、4 日間培養して安定発現細胞を樹立した。

### 10. SIV Vpx 取込み用の SIV gag p6 付加 HIV-1 ルシフェラーゼレポータープロウイルス DNA の構築

HIV-1 ルシフェラーゼレポータープロウイルス DNA の gag p6 領域に、SIV の Vpx 結合モチーフである DPAVDLL 配列を挿入して作製した。また RRE 配列を付加した SIVmac 由来 Vpx 発現ベクターを各 PCR 断片の pCAGGS への挿入により構築した。

**11. 感染実験** 上記の 1 で調整した IFN 処理細胞は IFN 添加後の翌日、3、7 及び 9 で調整した安定発現細胞は樹立後すぐに、また 5 で調整した細胞はトランスダクションの 48 時間後に感染実験に用いた。1 の IFN 処理細胞または 3、5、及び 7 の候補遺伝子発現細胞を用いる感染実験では、まず 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 及び 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た。48 時間後に上清中の p24 量を測定して、各細胞に感染を行い、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。9 の候補遺伝子ノックアウト細胞を用いる感染実験では、ウイルスの調製のために、10 で作製した SIV gag p6 付加 HIV-1 ルシフェラーゼレポータープロウイルス DNA と SIVmac Vpx 発現ベクター及び VSV-G 発現ベクターを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、予め PMA 処理により分化させ、IFN- $\alpha$  存在下または非存在下で培養したノックアウト THP-1 細胞に感染、ルシフェラーゼ活性を測定した。また各細胞における候補遺伝子の発現は全てウエスタンブロッ

ト法により確認した。

[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 及び平成 27 年 1 月 15 日付け承認番号・機 26-85 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 の HIV-1 感染前期抑制能は I 型特異的である

分化させた THP-1 細胞における IFN の HIV-1 感染前期抑制は III 型 ( $\lambda$ ) では認められず、II 型 ( $\gamma$ ) では部分的に観察された。I 型 ( $\alpha$ 、 $\beta$ 、及び  $\omega$ ) においては非常に強い抗ウイルス活性が認められ、特に IFN- $\beta$  で最も顕著であった。この結果より、我々はウイルス複製サイクル前期の HIV-1 に対する IFN の抗ウイルス活性は I 型特異的であると結論づけた。

### 2. IFITM ファミリー蛋白は強い抗ウイルス活性を有する

プラスミドベースの安定発現細胞の実験では、いずれの細胞においても感染抑制効果は比較的小さかったものの IFITM ファミリー蛋白発現細胞では感染を 30~40%抑制する効果が認められた。実験系をレンチウイルスベクターの系に変更して行った結果、ISG15 または RSAD2 で 50%程度の抑制効果が、また IFITM ファミリー蛋白では平均で 75%程度の抑制効果が認められた。後者は MX2 発現細胞とほぼ同程度であった。レンチウイルスベクターの系で認められた結果を再現的に観察するために、全てのレンチウイルスベクターにネオマイシン耐性遺伝子を挿入して、作製したウイルスを用いたトランスダクションを行った後、G418 による薬剤選択をして安定発現細胞株を樹立した。これらの細胞において、IFITM ファミリー蛋白発現細胞における HIV-1 感染阻害はより顕著となり、MX2 発現細胞とともに 90%以上の抑制効果を示した。

### 3. I 型 IFN による HIV-1 感染前期抑制は MX2 や IFITM ファミリーのみではない

今回、CRISPR/Cas9 システムを導入して効率よ

いジーンサイレンシングを試みた。各候補遺伝子に対してそれぞれ作製した CRISPR/Cas9 レンチウイルス発現ベクターの高いノックアウト効率を確認した後に、安定ノックアウト THP-1 細胞を作製した。なお、分化した THP-1 細胞において SAMHD1 が高発現しており、実際 SAMHD1 による感染阻害は無視できないことから、HIV-1 ルシフェラーゼレポータープロウイルス DNA に SIV gag p6 配列を付加して Vpx を効率よく取り込めるプロウイルス DNA を作製した。新たに構築した SIVmac Vpx 発現ベクターとのコトランスフェクションによって得られたウイルスを用いて、分化させたノックアウト THP-1 細胞 (IFN- $\alpha$  処理または未処理) に対する感染実験を行った。その結果、IFN- $\alpha$  処理後の細胞においては、MX2 ノックアウトの場合に感染回復率は 15%程度認められ、APOBEC3A や IFITM ファミリー蛋白ノックアウトではそれぞれ 5%弱の回復が観察された。以上より、一部の ISG のみならず、MX2 をはじめ未知の遺伝子も含めた複数の因子が協調して、ウイルス複製サイクルの様々なステップを抑制的に制御している可能性が示唆された。

## D. 考察

今年度の研究において、まず HIV-1 に対する IFN の抗ウイルス活性が I 型に非常に特異的であることが明らかになった。候補遺伝子発現プラスミドのトランスフェクションによる安定発現細胞の実験においては、APOBEC3A 発現細胞が恐らくその毒性により、極めて低い細胞増殖率を示したため、これ以降からの蛋白発現実験からは除外することとした。それ以外の安定発現細胞においても、プラスミドベースの実験では増殖率にばらつきがあり、感染時に細胞数を揃えてもアッセイの時点で細胞数が異なったことから、レンチウイルスベクターの系へと変更した。しかしながら、当初はウイルスベクター DNA に薬剤耐性遺伝子が含まれていなかったため、トランスダクション後に薬剤選択が出来ず、MOI を上げることで、理論上 100%の細胞に目的遺伝子が導入されているものとして実験を行った。その実験系では、実験をリピートする毎に感染実験の測定値が大きくなったため、最終的にレンチウイルスベクター

DNA にネオマイシン耐性遺伝子を入れることによって、薬剤選択による安定発現細胞の樹立が可能となった。その結果、MX2 と三種類の IFITM ファミリー蛋白が HIV-1 に対して最も強い抑制活性を示すことが明らかとなった。その一方で、各遺伝子のジーンサイレンシングにおいては、IFN- $\alpha$  処理による感染抑制からの回復はどれも不十分で、決して一つや二つの主要細胞因子が抑制に寄与しているわけではないことが判明した。

## E. 結論

(1) IFN の HIV-1 感染前期抑制は I 型 ( $\alpha$ 、 $\beta$ 、及び  $\omega$ ) に特異的な機能であった。

(2) 候補遺伝子の単独安定発現系において、三種類の IFITM ファミリー蛋白が MX2 と比べても遜色ない抑制活性を示すことが分かった。

(3) 候補遺伝子のノックアウト細胞の樹立により、それぞれの遺伝子のサイレンシングによる感染回復効果は弱く、未知の遺伝子を含む複数の遺伝子が感染抑制に寄与している可能性が示唆された。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

論文発表

- 1) Utachee, P., Isarangkura-na-ayuthaya, P., Tokunaga, K., Ikuta, K., Takeda, N., Kameoka, M.: Impact of amino acid substitutions in the V2 and C2 regions of human immunodeficiency virus type 1 CRF01\_AE envelope glycoprotein gp120 on viral neutralization susceptibility to broadly neutralizing antibodies specific for the CD4 binding site. *Retrovirology* 11:32, 2014.
- 2) Zhou, D., Wang, Y., Tokunaga, K., Huang, F., Sun B, Yang, R.: The HIV-1 accessory protein Vpr induces the degradation of the anti-HIV-1 agent APOBEC3G through a VprBP-mediated proteasomal pathway. *Virus Res.* 195:25-34, 2015.
- 3) Kikuchi, T., Iwabu, Y., Tada, T., Kawana-Tachikawa, A., Koga, M., Hosoya,

N., Nomura, S., Brumme, Z.L., Jessen, H., Pereyra, F., Piechocka-Trocha, A., Walker, B.D., Iwamoto, A., Tokunaga, K. (co-corresponding author), Miura, T.: Anti-APOBEC3G activity of HIV-1 Vif protein is attenuated in elite controllers. *J. Virol.* In press.

- 4) 多田卓哉、徳永研三：抗ウイルス宿主因子 BST-2/tetherin とそれに拮抗するウイルス蛋白の分子間対決 Molecular Confrontation between the Host Restriction Factor BST-2/Tetherin and Its Viral Antagonists. *日本エイズ学会誌* 16: 126-136, 2014.

学会発表

- 1) 多田卓哉、張延昭、小山貴芳、山岡昇司、藤田英明、徳永研三：新規抗ウイルス宿主因子 MARCH8 による HIV-1 感染抑制機構の解明. 第 62 回日本ウイルス学会総会(横浜) 2014. 11.
- 2) 張延昭、多田卓哉、山岡昇司、徳永研三：HIV-1 複製前期の抑制に関わる IFN 誘導性抗ウイルス宿主因子群の解析. 第 62 回日本ウイルス学会総会(横浜) 2014. 11.
- 3) 高畑辰郎、徳永研三、長谷川温彦、神奈木真理、増田貴夫：HIV-1 インテグラーゼの非酵素的機能の解析. 第 62 回日本ウイルス学会総会(横浜) 2014. 11.
- 4) 和田倭、小林(石原)美栄、寺原和孝、池野翔太、徳永研三、川名(立川)愛、山岸誠、竹山春子、横田(恒次)恭子：恒常的に培養維持された CD4 陽性 T 細胞への HIV-1 の感染とその転写制御機構の解明. 第 62 回日本ウイルス学会総会(横浜)2014. 11.
- 5) 高畑辰郎、徳永研三、長谷川温彦、神奈木真理、増田貴夫：HIV-1 インテグラーゼの逆転写過程以前における機能の解析. 第 28 回日本エイズ学会(大阪) 2014. 12.
- 6) 多田卓哉、張延昭、小山貴芳、山岡昇司、藤田英明、徳永研三：新規宿主因子 MARCH8 は HIV-1 のエントリーを阻害する. 第 28 回日本エイズ学会(大阪) 2014. 12.
- 7) Tada, T., Zhang, Y., Koyama, T., Yamaoka, S.,

Fujita, H., and Tokunaga, K (speaker).: Novel restriction factor MARCH8 blocks HIV-1 replication. XX International AIDS Conference, Melbourne, Australia, 2014. 7. (Late breaker's oral abstract)

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 感染細胞の潜伏・再活性化における宿主免疫への抗原提示の解析

研究分担者 立川 愛 国立感染症研究所エイズ研究センター 室長  
(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：**再活性化した HIV 潜伏感染細胞における HIV 特異的 CTL への抗原提示の様態を明らかにするため、HIV 潜伏感染モデル細胞株を用いて抗原提示解析系の構築を行った。再活性化した特定の HLA を発現する HIV 潜伏感染細胞と HIV 特異的 CTL クローンとを共培養することによって、再活性化により発現された Nef タンパク質由来の CTL エピトープは、速やかに HIV 感染細胞表面で提示されていることが示された。本システムは新たな治療戦略としての潜伏感染細胞再活性化の実用化に向けて、再活性化後の速やかな HIV 感染細胞除去に有用な CTL の探索に有用である。

### A. 研究目的

抗 HIV 薬の進歩により、HIV 感染症は先進国では致死性の疾患ではなくなったが、現状の抗 HIV 療法(cART)では治癒の可能性はない。若年層での感染が主である HIV 感染において、長期 cART による薬物毒性、副作用、医療経済上の問題は深刻であり、治癒を目指す治療法の確立が急務である。

HIV 感染症において治癒を妨げているのは長期生存可能な潜伏感染細胞である。ウイルスタンパク質の発現を伴わない HIV 潜伏感染細胞は宿主の免疫監視機構から完全に逃れることができる。近年潜伏感染細胞を再活性化し、宿主免疫応答により感染細胞除去を目指す治療戦略が提唱されている。HIV 特異的細胞傷害性 T 細胞(CTL)は、再活性化後の HIV 感染細胞排除の重要なエフェクターとして位置づけられる。しかしながら、どのような CTL が再活性化後の HIV 潜伏感染細胞排除に効果的に作用するか、明らかでない。

HIV 特異的 CTL は、個々でその抗 HIV 効果が異なる。それぞれの CTL が認識するエピトープの、細胞表面での抗原提示量、すなわち個々のエピトープを提示する HLA 分子の数や、その抗原提示のタイミングが大きく影響すると考えられる。そこで、本研究では、再活性化後の HIV 感染細胞における抗原提示の動態を明らか

にするために、抗原提示解析系の構築を試みた。

### B. 研究方法

**HLA-A\*24:02 発現 HIV 潜伏感染細胞株の樹立**  
HIV 潜伏感染モデル細胞として、CD4 陽性 T 細胞株の ACH-2 を用いた。ACH-2 にウイルスベクターを用いて HLA-A\*24:02 遺伝子を導入後、薬剤選択、クローニングを行い、HLA-A24 恒常発現 ACH-2 細胞株(A24-ACH2)を樹立した。複数のクローンについて、定常状態（未刺激）と TNF- $\alpha$  で活性化後の HIV 産生について明らかにするため、培養上清中の RT 活性試験を行った。**HLA-A24 恒常発現 HIV 潜伏感染細胞株での抗原提示の解析**

A24-ACH2 を TNF- $\alpha$  で再活性化後、継時的に HLA-A\*24:02 陽性 HIV 感染者末梢血から樹立した HLA-A\*24:02 拘束性 CTL エピトープ特異的 CTL クローンと共培養を開始した。4 時間の培養後、IFN- $\gamma$  ELISpot assay により、IFN- $\gamma$  産生細胞数を定量した。

(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

ウイルスベクターを用いて ACH-2 細胞に HLA-A\*2402 遺伝子を導入し、薬剤選択後クローニングを行い、複数の A24-ACH2 クローンを得た。TNF- $\alpha$ にて再活性化後 RT 活性を測定したところ、再活性化後の活性化レベルと定常状態でのバックグラウンドレベル（未刺激での RT 活性）は、クローンによって大きく異なっていた。バックグラウンドが低く、再活性化後の活性化レベルが高いクローンを選び、実験に用いた。A24-ACH2 を TNF- $\alpha$ にて再活性化後、継時的に Nef 由来の HLA-A\*24:02 拘束性 CTL エピトープ特異的 CTL クローンとの共培養を行い、IFN- $\gamma$  ELISpot assay を行うことで、Nef 特異的 CTL クローンへの抗原提示を解析した。その結果、TNF- $\alpha$ による刺激をしなかった場合、また A24 を発現しない ACH-2 ではほとんど IFN- $\gamma$ 産生細胞が見られなかったのに対して、TNF- $\alpha$ 刺激 6 時間以内で IFN- $\gamma$ 産生細胞が出現し、24 時間後まで徐々に増加していた。

### D. 考察

A24-ACH2 を用いた潜伏感染モデル細胞を用いて、抗原提示動態の解析系を構築し、Nef 特異的 CTL を用いて解析を行った。再活性化による HIV タンパク発現開始後、早期タンパク質である Nef に由来するエピトープは、速やかに抗原提示されていることが示された。定常状態（未刺激）での HIV 産生がほとんどない A24-ACH2 細胞株を用いた本システムは、抗原提示動態の解析に有用であることが明らかとなった。今後、タンパク質発現のタイミングが異なる Gag や Pol 由来のエピトープに対しても同様の検討を行い、由来するウイルスタンパク質の発現動態と抗原提示の関連性を明らかにする。さらに、切り出し効率やペプチドの安定性等も抗原提示に影響を与えるため、同じウイルスタンパク質由来の複数のエピトープ特異的 CTL を用いて同様の検討をすることも重要である。

### E. 結論

再活性化 HIV 潜伏感染細胞における抗原提示

動態の解析系を構築した。

### F. 健康危険情報

特になし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Nakayama-Hosoya K, Ishida T, Youngblood B, Nakamura H, Hosoya N, Koga M, Koibuchi T, Iwamoto A, Kawana-Tachikawa A. Epigenetic repression of interleukin-2 expression in senescent CD4<sup>+</sup> T cells during chronic human immunodeficiency virus type-1 infection. *J Infect Dis*. 211:28-39, 2015.
- 2) Gu L, Kawana-Tachikawa A, Shiino T, Nakamura H, Koga M, Kikuchi T, Adachi E, Koibuchi T, Ishida T, Gao GF, Matsushita M, Sugiura W, Iwamoto A, Hosoya N. Development and Customization of a Color-Coded Microbeads-Based Assay for Drug Resistance in HIV-1 Reverse Transcriptase. *PLoS One*. 9:e109823, 2014.
- 3) Han C, Kawana-Tachikawa A, Shimizu A, Zhu D, Nakamura H, Adachi E, Kikuchi T, Koga M, Koibuchi T, Gao GF, Sato Y, Yamagata A, Martin E, Fukai S, Brumme ZL, Iwamoto A. Switching and emergence of CTL epitopes in HIV-1 infection. *Retrovirology*. 11:38, 2014.

#### 2. 学会発表

- 1) Kawana-Tachikawa A. Disruption of T cell immunity during chronic HIV-1 infection. The 21<sup>st</sup> East Asia Joint Symposium on Biomedical Research. Seoul, Korea. Jul 2014.
- 2) Hirao M, Suzuki K, Kawana-Tachikawa A, Nakauchi H, Cooper DA, Kelleher AD, Kaneko S. Proposal of new immune cell source for HIV-1 infection study based on iPSCs and evaluation of impact of viral replication in iPSCs-derived macrophage expressing shRNAs targeting HIV-1 promoter. 20<sup>th</sup> International AIDS Conference, Melbourne, Australia, Jul 2014
- 3) Kamori D, 村上知行, Hasan Z, Meribe S, Carlson J, Siarot L, 三浦聡之, 立川(川名)愛, 岩本愛吉, 瀧永博之, 岡慎一, 間陽子, 上野貴将: Effects of natural variability of an immunodominant Vpr region on immunological footprints, clinical outcome and protein functions. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 4) 細谷(中山)香、石田尚臣、中村仁美、細谷紀

彰、古賀道子、鯉渕智彦、岩本愛吉、立川(川名)愛: HIV-1 感染における CD4 陽性 T 細胞の IL2 遺伝子発現低下分子メカニズムの解明. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月

- 5) Gu L, Han Y, Guan S, Yang F, Zhu T, 合田仁、Cao Y, 立川(川名)愛、細谷紀彰、Gao FG, 岩本愛吉、Li T, 石田尚臣: 中国 HIV-1 感染者の未治療検体における副受容体指向性の検査. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 6) 佐藤秀憲、細谷(中山)香、菊地正、安達英輔、古賀道子、中村仁美、鯉渕智彦、岩本愛吉、立川(川名)愛: HIV 感染者の CD8 陽性 T 細胞における補助刺激分子 OX40 の検討. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 7) 石坂彩、佐藤秀憲、立川(川名)愛、中村仁美、古賀道子、細谷紀彰、鯉渕智彦、野本明男、岩本愛吉、水谷壮利: HIV-1 残存感染細胞の活性と免疫活性化の相関. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 8) 和田倭、小林(石原)美栄、寺原和孝、池野翔太、徳永研三、立川(川名)愛、山岸誠、竹山春子、横田(恒次)恭子. 恒常的に培養維持された CD4 陽性 T 細胞への HIV-1 の感染とその転写制御機構の解明. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月

ス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月

- 9) 藤田由利子、小野敏明、落合央、立川愛、Leen AM, Heslop HE, 森尾友宏、高橋聡: 実臨床応用に向けたウイルス特異的 T 細胞療法の開発. 第 6 回血液疾患免疫療法研究会学術集会、京都、2014 年 9 月
- 10) 小野敏明、藤田由利子、立川(川名)愛、高橋聡、森尾友宏: 臨床応用に向けた多ウイルス特異的 T 細胞培養法の確立とその特性解析. 第 42 回日本臨床免疫学会総会、東京、2014 年 9 月

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

##### 1. 特許取得

国内特許出願 (申請中)

出願人: 公益財団法人微生物化学研究会、発明者: 水谷壮利、石坂彩、立川愛

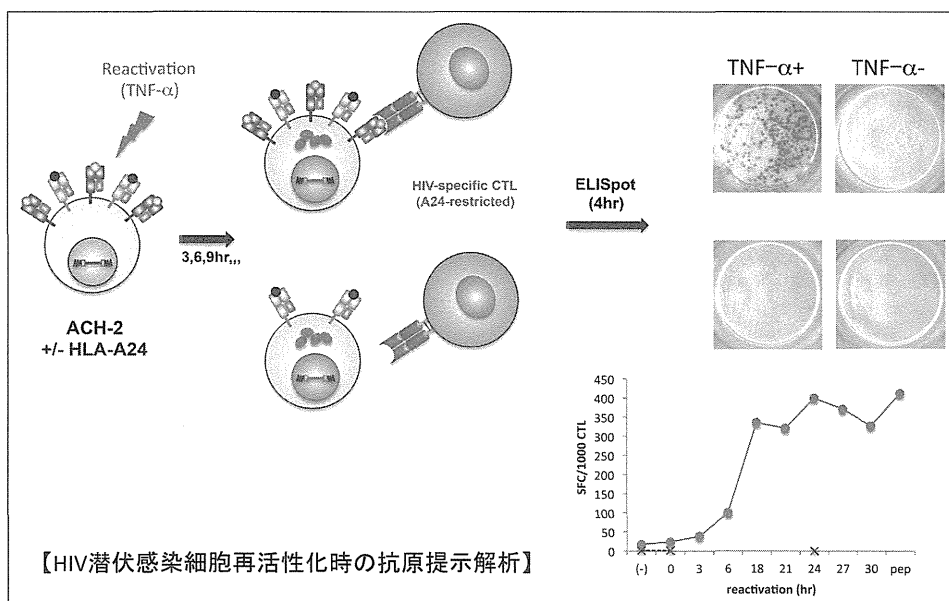
「免疫状態の判定方法、CD4<sup>+</sup>T細胞数の増加予測方法、及び CD4<sup>+</sup>T細胞数の減少予測方法、並びにそれらのためのキット」特願 2014-128028、出願日: 2014 年 6 月 23 日

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし



## HIV 複製を自発的に制御する感染者群でのウイルス蛋白質 Nef の機能と免疫活性化における役割

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:** HIV 慢性感染に伴う免疫活性化と免疫制御の関連を明らかにする目的で、HIV を自発的に制御している極めて稀な感染者であるコントローラーの検体を用いて、ウイルス病原性に関わる Nef の遺伝学的特徴と機能解析を行なう。本年度は、後にコントローラーとなる感染者の急性感染期の検体を集め、Nef 機能の解析を行った。病態が進行する感染者グループの急性感染期の検体を対照群とした。その結果、コントローラーでは Nef 機能が減弱化しており、感染者の HLA 型に相関する変異が機能の減弱化に関係することが分かった。これらのことから、感染急性期に免疫逃避によって選択される変異が Nef の機能の減弱化および病態制御に影響することが明らかとなった。治療なしに HIV 感染制御ができていない検体を用いたユニークなアプローチをとることで、生体内で実際に起きている免疫活性化と免疫応答の複雑な関係の一端を明らかにできた。

### A. 研究目的

HIV 慢性感染に伴う免疫活性化と免疫制御の関連を明らかにする目的で、HIV を自発的に制御している極めて稀な感染者であるコントローラーの検体を用いて、ウイルス病原性に関わる Nef の遺伝学的特徴と機能解析を行なう。

### B. 研究方法

ボストンなどでリクルートしたコントローラーと急性感染者の検体から nef 遺伝子を増幅して、配列解析をするとともに、プロウイルスベクターにクローニングして、Nef の機能を解析した。遺伝子系統樹解析や医学統計学的手法で、対照群間での差を解析した。経時的にサンプリングした検体を用いて、個体内での変化を解析した。

（倫理面への配慮）

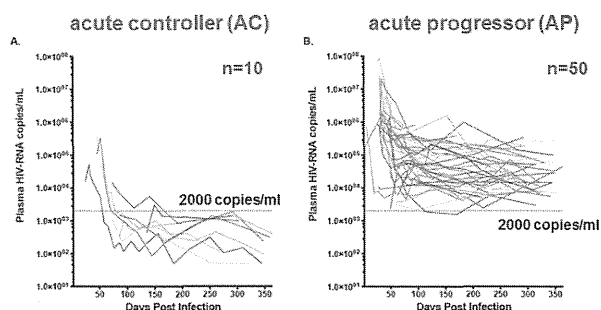
米国マサチューセッツ総合病院より、臨床材料の提供を受けた。研究倫理委員会の承認を得、書面による同意確認と提供者の個人情報の保管管理を徹底しつつ実施する。また、研究の実施に当たっては、熊本大学の倫理審査会の審議を受け、承認を得ている。承認を受けた研究計画に厳密にしたがって遂行した。

### C. 研究結果

ウイルス複製を自発的に制御しているコントローラーでは、慢性的な免疫活性化が非常に低い頻度でしか観察されないことが知られている。そこで、免疫活性化と関連するウイルス蛋白質である Nef の機能について、さまざまな病態にある感染者の検体を用いて解析した。

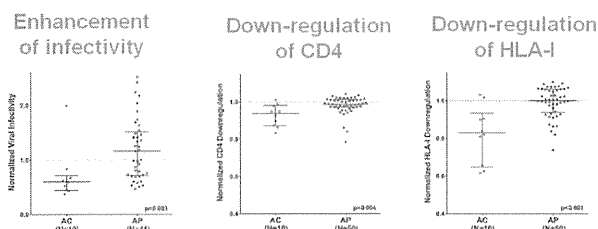
#### （1）感染急性期の検体

急性感染期からフォローアップしている検体で、後にコントローラー（1年後に 2000 RNA copy/ml 未満）となる 10 名を用いた。対照群として、同じ地域の急性期の感染者で、病態が制御されない 50 名の検体を用いた。両群のウイルス RNA から、HIV-1 Nef 遺伝子を増幅した。急性コントローラーを AC、急性病態進行者を AP と記す。



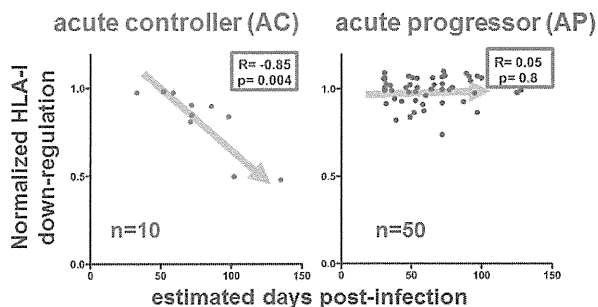
## (2) Nef の機能解析

遺伝子配列の系統樹解析からは、特に両群に特徴的なクラスター等は認められなかった。また、Nef 蛋白質の発現量や、組換えウイルスの生産量などには、両群由来の Nef に差は認めなかった。次に、Nef の 3 つの特徴的な機能として、ウイルス感染性の増強作用、HLA クラス I (HLA-I) および CD4 の発現抑制作用について解析した。その結果、3 つの機能とも急性コントローラ群由来の Nef では、顕著に減弱化していた。



(3) HLA-I 発現抑制機能は、経時的に減弱化している

3 つの機能について、経時的な変化を調べたところ、AC において、HLA-I 発現抑制機能が経時的に減弱化していることが分かった。他の機能にそうした特徴は見られなかった。



AC01: A\*01:01/A\*31:01, B\*37:01/B\*51:09, C\*01:02/C\*06:02

(No typical protective allele in AC01)

	HXB2	MGOKWSEKSV	IGWPTVREEM	RAEPAADRV	QASRDLEKH	GAITSSNTAA	THADCANLEA	QEEVEVGFV	TPQVPLRPHI
Day 33	AC01b_A	MGOKWSEKSL	AGWPTFRERM	QKAEPFAAGV	GAASRDLKKH	GAITSSNTFA	THADCANLEA	QEEVEVGFV	RPQVPLRPHI
	AC01b_D	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	AC01b_F	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	AC01b_G	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Day 383	AC01b_H	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	AC01E_A	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	AC01E_P	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	AC01E_P	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	HXB2	YKAAVDLSHF	LMEKGLLEGL	IHSQRQDIL	DLMIYHTQGY	FPD*QNYTFG	FGVRYPLTFG	MCYKLVVPEP	DKIEEANKGE
	AC01b_A	YKQALDLSHF	LMEKGLLEGL	VTSQRQDIL	DLMIYHTQGY	FPDQNYTFG	FGIRYPLTFG	MCYKLVVPEP	DKVEEANKGE
	AC01b_D	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	AC01b_F	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	AC01b_G	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	AC01b_H	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	AC01E_A	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	AC01E_P	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	HXB2	NTSLLEHVSFL	HGMDDPEREV	LEHRFDSRLA	PHRVARELHP	EYFKNC*	-----	-----	-----
	AC01b_A	NNSLLRHPSL	HGMDDPEREV	LEHMKFDSLA	PHRVARELHP	DYVKN*	-----	-----	-----
	AC01b_D	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	AC01b_F	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	AC01b_G	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	AC01b_H	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	AC01E_A	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	AC01E_P	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

(4) HLA 相関変異 (CTL 逃避変異) が、Nef 機能の減弱化に関係する

1 年後のウイルス量が著しく低くなっていた AC01 という検体について、Nef の変異と機能との関連を解析した。まず、2 つのサンプリングポイントで Nef のアミノ酸配列を比較したところ、4 つの変異を見出した。この感染者の HLA アリルを見たところ、4 つの変異とも感染者の持つ HLA アリルに相関する変異であった。このことは、感染者の細胞性免疫応答による淘汰圧が働いたと推察される。

次に、4 つの変異をさまざまに組み合わせて導入して機能に与える影響を調べたところ、4 つの変異が組み合わさったときのみ、顕著な機能低下を認めた。また、このとき、蛋白質質量も著しく低下していた。

## D. 考察

ウイルスに対する細胞性免疫応答がウイルス感染制御に関わるとともに、逃避変異の選択を通じて (免疫学的な選択圧) Nef 蛋白質の機能と免疫活性化に影響することが明らかとなった。

## E. 結論

極めて特徴的な臨床検体を用いて、ウイルス学的、免疫学的な包括的解析を行うことによって、免疫活性化と抗ウイルス免疫応答の関連性の一端を明らかにすることができた。

## F. 健康危険情報

該当なし。