

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⁺ 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。

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⁺T 細胞を用いた感染実験

末梢血由来正常 CD4⁺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⁺T 細胞における LTR の潜伏化成立の検出

健康人由来 CD4⁺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)

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