

厚生労働科学研究費補助金
エイズ対策研究事業

HIV の潜伏・再活性化および慢性的
免疫活性化を左右する細胞因子・
免疫応答の解明とその制御

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

平成 26 年 3 月

研究代表者 横田 恭子
(国立感染症研究所)

目 次

I . 総括研究報告書

- HIVの潜伏・再活性化および慢性的免疫活性化を左右する
細胞因子・免疫応答の解明とその制御 1
研究代表者： 横田 恭子

II . 分担研究報告書

1. SIV感染におけるウイルス潜伏化機構とCTL応答 11
研究分担者： 山本 浩之
2. 粘膜・リンパ組織の抗原提示細胞への感染様式の解明 17
研究分担者： 五十嵐樹彦
3. 潜伏感染細胞の同定とその成立機構 21
研究分担者： 横田 恭子
4. 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 27
研究分担者： 渡邊 俊樹
5. 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 35
研究分担者： 徳永 研三
6. 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 39
研究分担者： 立川 愛
7. HIV複製を自発的に制御する感染者群でのウイルス蛋白Nefの
機能と免疫活性化における役割 43
研究分担者： 上野 貴将
8. 慢性的免疫活性化制御因子の機能解析 47
研究分担者： 小柳 義夫
9. T細胞の活性化刺激とHIV感染制御 51
研究分担者： 田中 勇悦

III . 研究成果の刊行に関する一覧表 55

HIVの潜伏・再活性化および慢性的免疫活性化を 左右する細胞因子・免疫応答の解明とその制御

研究代表者 横田 恭子 国立感染症研究所 免疫部 第一室長

研究要旨：サルモデルにおいて、SIV 初期制御群の病態進行は感染後 1-2 年時点のプロウイルスの Gag 特異的 CTL エスケープ変異の蓄積の有無で 2 分され、それら個体の特異的 CTL 応答とウイルス制御の関係が示唆された。また、新規に非病原性 SIV_{1A11} 潜伏持続感染モデルが確立された。ヒト化マウスモデルでは、Vpr が Treg への感染性促進因子であること、R5 型 HIV-1 存在下で X4 型 HIV-1 が潜伏する可能性が示された。更に、潜伏感染成立機構解析のための初期 T 細胞培養系が確立され、レポーターウイルスに潜伏感染した細胞が異なるメカニズムを経た不均一な集団で、宿主エピジェネティック因子群が潜伏感染制御に関わることが明らかにされた。一方、慢性 HIV 感染者における T 細胞機能不全の要因の一つとして CD4 陽性 T 細胞の老化と IL-2 遺伝子の DNA メチル化というエピジェネティックな変化があることや免疫活性化に関連するウイルス蛋白質 Nef の機能と病態との関係、マクロファージにおいて 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示唆され、また、HTLV-I 不死化細胞株の OX40L 発現が R5 HIV-1 感染を効率良く抑制し、CXCR4 に対する抗体が T 細胞活性化を抑制することも含め、新たな治療法開発の基盤となる知見が蓄積された。

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）
渡邊俊樹（東京大学大学院新領域創成科学研究科・教授）
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）
田中勇悦（琉球大学大学院医学研究科・教授）
小柳義夫（京都大学ウイルス研究所・教授）
山本浩之（国立感染症研究所エイズ研究センター・研究員）
五十嵐樹彦（京都大学ウイルス研究所・教授）
上野貴将（熊本大学エイズ学研究センター・准教授）

A. 研究目的

HIV の潜伏感染とウイルス再活性化および慢性的免疫活性化による T 細胞の疲弊化を左右する細胞内因子および免疫学的要因を明らかにすることにより、エイズ病態を制御する新規治療戦略のための基盤を確立する。本研究では、latent reservoir

（潜伏感染）と active reservoir（再活性化、持続感染）に関し、主として動物モデルを用いた解析を行う。

B. 研究方法

サルモデル

1) MHC クラス I ハプロタイプ 90-120-Ia 共有 SIV_{mac239} 初期制御群 ($n = 11$) の潜伏プロウイルスの SIV gag と nef 領域の塩基配列解析を行い、感染各期の Gag 特異的 CTL 応答のパターンをフローサイトメーターで評価した。また、SIV 持続制御を示した 1 頭の CD8 を枯渇させ、その後の SIV 特異的 CTL 応答、及び血中ウイルス RNA の gag 領域配列解析を行った。（山本）

2) 非病原性 SIV_{1A11} を 1.1×10^7 TCID₅₀ 中国産アカゲザルに経直腸感染させ、接種前後に経時的に血中ウイルス量と血中およびリンパ節中のリンパ球サブセットの解析を行った。また、腸管生検組織から抗体磁気ビーズを用いて抗原提示細胞を精製した。1 頭の感染サルに抗 CD8 抗体 10 mg/kg を麻酔下で皮下投与した。（五十嵐）

ヒト化マウスモデル

1) 異なる蛍光を発現する X4 型と R5 型 HIV-1 を同時にヒト化 NOJ マウスに感染させた時のウイルス感染細胞の分布を FACS で、血中ウイルス量の変動を qRT-PCR で解析した。(横田)

2) HIV-1 vpr 変異株と野生株をヒト化 NOG マウスに感染させ、Treg 細胞や活性化メモリー T 細胞の動態を FACS で解析した。(小柳)

培養系モデル

1) 健常人末梢血から CD4 陽性 T 細胞を調製し、LTR 制御下に GFP-Nef のみ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} を感染させた後、DC と SEB による T 細胞受容体刺激し、あるいは IL-7 と IL-15 を添加して 2 週間以上細胞を培養維持 (Homeostatic proliferation: HSP) した。これらの T 細胞の増殖、表面抗原や感染細胞頻度を FACS で解析し、一部の亜集団をソートして HIV や細胞 mRNA 発現、プロウイルスの integration を PCR で定量した。(横田)

2) LTR の下流に Tat-IRES-Venus と EF1 プロモーター下に mRFP 遺伝子を挿入して single-round 感染の dual-color reporter ウイルスを作製し、Jurkat T 細胞に感染させた。メチル化 DNA の検出はバイサルファイト法を用い、LTR 上の修飾ヒストンを ChIP assay によって解析した。DAC の障害に TSA、SAHA、及び VPA、また PRC2 の障害には EZH2 の特異的阻害剤である DZNep 及び GSK126 を使用した。(渡辺)

3) 健常人末梢血からマクロファージ、樹状細胞、及び活性化 T リンパ球を調製して IFN α 存在下/非存在下で 24 時間培養し、各遺伝子の発現レベルを定量した。また、I 型インターフェロン (IFN) により強く誘導される 6 種類の蛋白発現ベクターを作成し、シュード HIV ウイルスの感染・増殖に及ぼす影響を検証した。(徳永)

4) 慢性期 HIV 感染者末梢血単核球 (PBMC) を CD4⁺ と CD8⁺T 細胞に分画して IL-2 発現およびプロモーター領域の DNA メチル化解析と細胞表面抗原の FACS 解析を行った。(立川)

5) 慢性 HIV 感染者とエリートコントローラー (EC) の検体から nef 遺伝子を増幅してその配列の遺伝子系統樹解析を行い、その機能との関係について医学統計学的に解析した。(上野)

6) HTLV-1 で不死化した自家 T 細胞株の OX40L 発現とそれによる HIV-1 抑制作用、抗 CXCR4 単クローン抗体 (A120) の T 細胞活性化に対する影響を検討した。(田中)

(倫理面への配慮)

臨床材料や血液の提供を受ける場合には、各施設の医学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した。動物実験は各施設の実験動物委員会の承認を得、実施の際は動物愛護の精神に則って動物に与える苦痛の軽減・排除に努めた。

C. 研究結果

サルモデル

1) SIV 初期制御個体群は gag 領域に CTL エスケープ変異が蓄積する群 (B 群 5 頭) と蓄積しない群 (A 群 6 頭) に分かれた。感染後 2 カ月では両群とも野生株 Gag が主体で、感染後 1 年では CTL エスケープ蓄積群の 1 頭に単独の CTL エスケープが検出された以外は全頭で野生株であった。また、nef 領域には高度の G-to-A 変異が認められる場合があった。CTL エスケープの蓄積は感染後 2 年を過ぎての血中ウイルスの存在と関連し、Gag エピトープ特異的 CTL は B 群において消退傾向であるのに対し、A 群においては比較的維持された。A 群の 1 頭の CD8 陽性細胞を枯渇させると血中ウイルスが再出現し、同時に SIV 特異的 CTL 応答が広汎化した。また、再出現した血中ウイルスは、それまで野生株であった配列がエスケープ変異体 (Gag L216S, D244E, V375M) の配列に置き換わっていた。(山本)

2) 経直腸 SIV_{1A11} 感染後の中国産アカゲザルにおいて低レベルの一過性複製を確認したが、リンパ球サブセットに変動はなかった。抗 CD8 抗体処理により、血中ウイルス量の一過性上昇を認め、リンパ節で Gag ウイルス抗原陽性細胞を検出した。一方、腸管生検組織から精製した細胞の多くはマクロファージ様形態を示し、CD11c 陽性 (骨髄系樹状細胞) や HLA-DR 陽性でかつ CD123 陽性 (形質細胞様樹状細胞) の細胞が存在したが、10 片の生検組織から、わずかに総計 10⁴ 個程度しか得られなかった。(五十嵐)

ヒト化マウスモデル

1) 同時感染 X4 型と R5 型 HIV-1 に感染したヒト化 NOJ マウスでは、それぞれの単独感染と異なり、特に、X4 型の CCR5 陽性記憶 T 細胞への感染頻度が R5 型 HIV-1 の存在によって有意に低下し、血中からも早期に消失する傾向にあった。(横田)

2) ヒト化 NOG マウスを用い、Treg が HIV-1 の標的になりやすく、アクセサリー蛋白質である Vpr による細胞周期の G2 期停止とアポトーシスの効

率的誘導機能を介して選択的に枯渇され、これにより記憶 T 細胞の高度活性化とウイルス増殖促進がおきることを明らかにした。(小柳)

培養系モデル

レポーターウイルスや HIV-1 感染実験において、1) HSP 培養で維持される初期 CD4 陽性 T 細胞は緩慢に増殖し、T 細胞受容体を刺激した場合と異なって HIV-1 感染 2 週間後も非増殖細胞が多く存在した。この亜集団にもプロウイルス DNA の integration と低レベルのウイルス mRNA 発現を認めたことから、細胞内への entry は同じ integration まで感染が進行しても、転写レベルで強い抑制を受けていることが示唆された。(横田)

2) 培養細胞株でも感染初期に LTR が急激に不活化する T 細胞集団と、時間依存的に潜伏化していく 2 つの亜集団が存在し、両者は LTR 上のヒストン修飾や再活性化シグナルに対する感受性が異なることを明らかにした。(渡辺)

その他、HIV-1 制御分子の探索に関して、

3) マクロファージにおいて、I 型インターフェロン (IFN) 添加後の SAMHD1 発現変化は小さかったが、IFN により誘導される既知 ISG 遺伝子の中にははるかに高発現になる遺伝子が 6 種類存在した。これらの遺伝子を過剰発現させるとウイルスの感染・増殖を強く抑制することを確認した。(徳永)

4) 高い血中 HIV-1 を維持する病態進行の早い感染者の CD4 様態 T 細胞では IL-2 遺伝子が高度にメチル化され、その頻度は IL-2 発現量と逆相関し、老化マーカー CD57 の発現とは正の相関を示した。(立川)

5) HIV 感染を完全にコントロールしている EC では、免疫活性化に関連する HIV-1 Nef の機能は減弱していたが、両群の遺伝子配列に顕著な差は認められなかった。(上野)

6) OX40L と OX40 を同時発現する HTLV-1 不死化細胞株では、OX40L のみがβケモカインの産生促進を介して R5 型 HIV-1 感染を効率良く抑制した。一方、A120 存在下では抗 CD3 抗体刺激による T 細胞活性化が抑制された。(田中)

D. 考察

SIV 初期制御後の病態進行が末梢血 CTL 応答群の推移で予測可能である。制御持続群の reservoir 内では、野生型ウイルスは不活化されて Gag 変異ウイルスの増殖が CD8⁺細胞により制御されている

と考えられ、即ち、変異体の蓄積スピードと病態制御の持続とが関連する可能性が示唆された。非病原性 SIV は比較的短期間に潜伏と再活性化が誘導可能なサルモデルとして今後の解析に有用であろう。ヒト化マウスでは高度に活性化された CCR5 発現細胞が多いため、R5 型 HIV-1 の増殖が良い。一方、X4 型 HIV-1 の感染標的は主として naïve T 細胞であることを考えると、この細胞に感染した HIV が生体内でどのくらい長く存続するのか明らかにする必要がある。また、HIV 感染初期に Vpr 蛋白質が Treg への感染促進作用を有することは、ヒト化マウスで初めて明らかになった現象であるが、病状が進行した慢性期においても同様なのか検討を要する。今後、IFN 処理マクロファージや樹状細胞の HIV-1 感染前期段階抑制因子としての新規 ISG が発見され、我々独自の in vitro 潜伏感染・再活性化モデルにおいて新規のエピジェネティック調節因子が明らかになれば、OX40 や A120 抗体と共に今後のエイズ治療開発のために有用である。

E. 結論

サルモデルにおいて、SIV 初期制御群の病態進行は感染後 1-2 年時点のプロウイルスの Gag 特異的 CTL エスケープ変異の蓄積の有無で 2 分され、それら個体の特異的 CTL 応答とウイルス制御の関係が示唆された。また、新規に非病原性 SIV1A11 潜伏持続感染モデルが確立された。ヒト化マウスモデルでは、Vpr が Treg への感染性促進因子であること、R5 型 HIV-1 存在下で X4 型 HIV-1 が潜伏する可能性が示された。更に、潜伏感染成立機構解析のための初期 T 細胞培養系が確立され、レポーターウイルスに潜伏感染した細胞が異なるメカニズムを経た不均一な集団で、宿主エピジェネティック因子群が潜伏感染制御に関わることが明らかにされた。一方、慢性 HIV 感染者における T 細胞機能不全の要因の一つとして CD4 陽性 T 細胞の老化と IL-2 遺伝子の DNA メチル化というエピジェネティックな変化があることや免疫活性化に関連するウイルス蛋白質 Nef の機能と病態との関係、マクロファージにおいて 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示唆され、また、HTLV-1 不死化細胞株の OX40L 発現が R5 HIV-1 感染を効率良く抑制し、CXCR4 に対する抗体が T 細胞活性化を抑制することも含め、新たな治療法開発の基盤となる知見

が蓄積された。

F. 健康危険情報

特になし。

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.
- 5) 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.
- 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.* 15:280-290, 2013.
- 7) Fujita, H., Iwabu, Y., Tokunaga, K., 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.
- 8) Tada T., Kadoki, M., Liu, Y., Tokunaga, K., 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.
- 9) Koyama, T., Arias, J.F., Iwabu, Y., Yokoyama, M., Fujita, H., Sato, H., and Tokunaga, K.: APOBEC3G oligomerization is associated with the inhibition of both Alu and LINE-1 retrotransposition. *PLoS ONE* 8:e84228, 2013.
- 10) 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, Uchimaruru 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).
- 11) 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).
- 12) Mahieux R, Watanabe T. Forefront studies on HTLV-1 oncogenesis. *Front Microbiol* 4:156, Jun. 2013 (doi: 10.3389/fmicb.2013.00156).
- 13) 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).
- 14) Shimizu A, Kawana-Tachikawa A., Yamagata A, Han C, Zhu D, Sato Y, Nakamura H, Koibuchi T, Carlson J, Martin E, Brumme CJ, Shi Y, Gao GF, Brumme ZL, Fukai S, Iwamoto A. Structure of TCR and antigen complexes at an immunodominant CTL epitope in HIV-1 infection. *Sci Rep.* 3:3097, 2013.
- 15) Teeranaipong P, Hosoya N, Kawana-Tachikawa A., Fujii T, Koibuchi T, Nakamura H, Koga M, Kondo N, Gao GF, Hoshino H, Matsuda Z,

- Iwamoto A. Development of a rapid cell-fusion-based phenotypic HIV-1 tropism assay. *J Int AIDS Soc.* 16:18723, 2013.
- 16) Kasahara D, Takara A, Takahashi Y, Kodama A, Tanaka R, Ansari AA, Tanaka Y. Natural OX40L expressed on human T cell leukemia virus type-I-immortalized T cell lines interferes with infection of activated peripheral blood mononuclear cells by CCR5-utilizing human immunodeficiency virus. *Virology* 10:338, 2013.
 - 17) Sato, K., Misawa, N., Iwami, S., Satou, Y., Matsuoka, M., Ishizaka, Y., Ito, M., Aihara, K., An, D.S., Koyanagi, Y.: HIV-1 Vpr accelerates viral replication during acute infection by exploitation of proliferating CD4⁺ T cells in vivo. *PLOS Pathog.* 9:e1003812, 2013.
 - 18) Ogawa, Y., Kawamura, T., Matsuzawa, T., Aoki, R., Gee, P., Yamashita, A., Moriishi, K., Yamasaki, K., Koyanagi, Y., Blauvelt, A., Shimada, S.: Antimicrobial peptide LL-37 produced by HSV-2-infected keratinocytes enhances HIV infection of Langerhans cells. *Cell Host Microbe* 13, 77-86, 2013.
 - 19) Hollenbaugh, J.A., Gee, P., Baker, J., Daly, M.B., Amie, S., Kasai, N., Kanemura, Y., Ward, B.M., Koyanagi, Y., Kim, B.: Host factor SAMHD1 restricts DNA viruses in non-dividing myeloid cells. *PLOS Pathog.* 9, e1003481, 2013.
 - 20) Ebina, H., Misawa, N., Kanemura, Y., Koyanagi, Y.: Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. *Sci. Rep.* 3, 2510, 2013.
 - 21) Shi S, Seki S, Matano T, Yamamoto H. IL-21-producer CD4⁺ T cell kinetics during primary simian immunodeficiency virus infection. *Microbes Infect.* 15:697-707, 2013.
 - 22) Nakane T, Nomura T, Shi S, Nakamura M, Naruse TK, Kimura A, Matano T, Yamamoto H. Limited impact of passive non-neutralizing antibody immunization in acute SIV infection on viremia control in rhesus macaques. *PLoS ONE* 8:e73453, 2013.
 - 23) Iwamoto N, Takahashi N, Seki Sm Nomura T, Yamamoto H. Inoue M, Shu T, Naruse TK, Kimura A, Matano T. Control of simian immunodeficiency virus replication by vaccine-induced Gag- and Vif-specific CD8⁺ T cells. *J Virol.* 88:425-433, 2014.
 - 24) 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.
 - 25) 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.
 - 26) 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.
 - 27) Mwimanzu P, Markle TJ, Ogata Y, Martin E, Tokunaga M, Mahiti M, Kuang XT, Walker BD, Brockman MA, Brumme ZL, Ueno T. Dynamic range of Nef functions in chronic HIV-1 infection. *Virology* 439:74-80, 2013.
 - 28) Motozono C, Miles JJ, Hasan Z, Gatanaga H, Meribe SC, Price DA, Oka S, Sewell AK, Ueno T. CD8⁺ T cell cross-reactivity profiles and HIV-1 immune escape towards an HLA-B35-restricted immunodominant Nef epitope. *PLoS ONE* 8: e66152, 2013.
 - 29) Motozono C, Yokoyama M, Sato H, Ueno T. Cross-reactivity analysis of T cell receptors specific for overlapping HIV-1 Nef epitopes of different lengths. *Microbes Infect* 2014 in press.
- ## 2. 学会発表
- 1) 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。
- 2) 池野翔太、鈴木基臣、寺原和孝、石毛真行、駒瀨勝啓、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。
 - 3) 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。
 - 4) 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.
 - 5) 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.
 - 6) 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.
 - 7) 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.
 - 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.
 - 10) 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) .
 - 11) Watanabe T., "Hematological neoplasms and viral Infections", XXVI Symposium IACRLRD, Lingotto Conference Center, Torino, Italy, Sept. 14(Sept. 11- Sept. 14), 2013(Invited).
 - 12) Yamagishi M, Fujikawa D, Kurokawa N, Soejima A, Takahashi R, Sakai N, Nakagawa S, Nakano K, Kobayashi S, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Uchimaruru 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).
 - 13) 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)
 - 14) 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)
 - 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(招待講演)
 - 16) 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(口演発表)
 - 17) Kaori Nakayama-Hosoya, Takaomi Ishida, Noriaki Hosoya, Hitomi Nakamura, Michiko Koga, Tomohiko Koibuchi, Aikichi Iwamoto, Ai Kawana-Tachikawa. Low IL-2 expression by epigenetic modification is associated with immunosenescence in HIV non-controllers. *Keystone symposia, HIV Pathogenesis – Virus vs Host.* Banff, Alberta, Canada, Mar 2014.
 - 18) Meribe SC, Hasan Z, Gatanaga H, Miura T, Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A, Oka S, Ueno

- T. Linkage between disease status and a naturally-arising mutation in functional region of HIV-1 Nef. 21th conference on retroviruses and opportunistic infections. Boston, USA. Mar 2014.
- 19) Kawana-Tachikawa A. The 9th China-Japan Laboratory Workshop: Pathogenesis, Gene regulation, and signal transduction. "Interaction between virus and host immune response during chronic HIV-1 infection.", Beijing, China, Nov 2013.
 - 20) Kaori Nakayama-Hosoya, Takaomi Ishida, Noriaki Hosoya, Hitomi Nakamura, Michiko Koga, Tomohiko Koibuchi, Aikichi Iwamoto, Ai Kawana-Tachikawa. The essential role of epigenetic regulation for CD4⁺ T cell dysfunction during chronic HIV-1 infection. AIDS Vaccine 2013 Conference. Barcelona, Spain, Oct 2013.
 - 21) 立川(川名)愛、韓忠勇、清水晃尚、細谷紀彰、中村仁美、古賀道子、鯉淵智彦、岩本愛吉. 重複する CTL エピトープ部位に生じた 1 アミノ酸変異によるエピトープの消滅と出現. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 2013 年 11 月 .
 - 22) 田中 勇悦, 田中 礼子 : CXCR4 架橋による HIV-1 感染と T 細胞活性化の抑制 第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会 熊本 (2013.11.20) .
 - 23) Sato, K., Iwami, S., Koyanagi, Y.: Quantification system of HIV replication dynamics in vivo. 1st Annual q-bio Meeting, Honolulu, USA, February, 2013.
 - 24) Sato, K., Misawa, N., Satou, Y., Matsuoka, M., Ito, M., Koyanagi, Y.: HIV-1 Vpr accelerates viral replication by exploiting regulatory CD4⁺ T cells in humanized mice. 20th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Atlanta, USA, March, 2013.
 - 25) Sato, K., Shibata, J., Izumi, T., Misawa, N., Kobayashi, T., Kimura, Y., Ito, M., Pathak, K.V., Koyanagi, Y.: Differential Impact of HIV-1 G-to-A Hypermutation Induced by APOBEC3G and APOBEC3F in vivo. Retroviruses Meeting Cold Spring Harbor, New York, USA. May, 2013.
 - 26) Koyanagi, Y. Intrinsic cellular defenses against retroviruses and DNA viruses. The 12th Awaji International Forum on Infection and Immunity (AIFII 12), Awaji, Japan. September, 2013.
 - 27) Sato, K., Takeuchi, J.S., Misawa, N., Izumi, T., Kobayashi, T., Kimura, Y., Iwami, S., Takaori-Kondo, A., Hu W.-S., Aihara, K., Ito, M., An, D.S., Pathak, K.V., Koyanagi, Y.: Restriction and diversification of HIV-1 mediated by APOBEC3-induced G-to-A mutation in humanized mouse model. 4th International Workshop on Humanized mice, Seoul, Korea. September 30-October 2, 2013.
 - 28) Kobayashi, T., Sato, K., Misawa, N., Yoshikawa, R., Shibata, J., Kanemura, Y., Fukuhara, M., Okamoto, M., Miyazawa, T., Yasunaga, J., Matsuoka, M., Aihara, K., An, D. S., Ito, M., and Koyanagi, Y.: Assessment of the pathogenic potential of simian retrovirus type 4 in humanized mice model, 4th International Workshop on Humanized Mice, Seoul, Korea, 2013 年 10 月.
 - 29) Koyanagi, Y.: Strategy of disrupting latent form of HIV-1 proviral DNA, 14th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, October, 2013.
 - 30) Takeuchi, J. S., Sato, K., Iwami, S., Misawa, N., Kobayashi, T., Aihara, K., Koyanagi, Y.: Quantification of HIV cell-free and cell-to-cell transmissions based on experimental-mathematical investigations, 14th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, October, 2013.
 - 31) Koyanagi, Y. Misawa N., Sato K., Ebina H.: HIV strategy for acceleration of viral replication in vivo and eradication approach of HIV proviral DNA, Japan-Russia International Workshop, Kyoto, Japan. October, 2013.
 - 32) 小柳義夫, Gee Peter, 金村優香. 核酸代謝酵素 SAMHD1 による HSV-1 複製の抑制、第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸. 2013 年 11 月.
 - 33) 佐藤佳, 竹内(柴田)潤子, 三沢尚子, 泉泰輔, 小林朋子, 木村雄一, 岩見真吾, 高折晃史, Hu, W.-S., 合原一幸, 伊藤守, An, D. S., Pathak, V. K., 小柳義夫. 生体内 HIV-1 増殖過程における APOBEC3G, APOBEC3F 依存的 G→A 変異のウイルス学的意義の解明, 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 2013 年

- 11 月.
- 34) 竹内(柴田)潤子, 佐藤佳, 岩見真吾, 三沢尚子, 小林朋子, 合原一幸, 小柳義夫. HIV-1 感染における Cell-free 感染と Cell-to-cell 感染の定量的解析, 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 2013 年 11 月.
- 35) Takeuchi, J. S., Sato, K., Iwami, S., Kobayashi, T., Aihara, K., Koyanagi, Y.: Quantification of HIV cell-free and cell-to-cell transmissions based on experimental-mathematical investigations, The 3rd International Symposium on Innovative Mathematical Modelling, Tokyo, 2013 年 11 月.
- 36) Sato, K., Takeuchi, J. S., Izumi, T., Misawa, N., Iwami, S., Kobayashi, T., Kimura, Y., Pathak, V. K., Aihara, K., Koyanagi, Y.: Differential Impact of HIV-1 G-to-A Hypermutation Induced by APOBEC3G and APOBEC3F in vivo, The 3rd International Symposium on Innovative Mathematical Modelling, Tokyo, 2013 年 11 月.
- 37) 蝦名博貴, 三沢尚子, 金村優香, 小柳義夫. ゲノム編集技術による潜伏 HIV プロウイルスの制御と除去, 第 27 回日本エイズ学会学術集会, 熊本. 2013 年 11 月.
- 38) Ebina, H., Misawa, N., Kanemura, Y., Koyanagi, Y.: Development of the CRISPR/Cas9 system editing for latent HIV-1 provirus. 第 36 回日本分子生物学会年会, 神戸. 2013 年 12 月.
- 39) 金村優香, Peter Gee, 蝦名博貴, Yoo Ji Seung, 藤田尚志, 小柳義夫. Novel function of SAMHD1 to involve in regulation of type I interferon induction. 第 36 回日本分子生物学会年会, 神戸. 2013 年 12 月.
- 40) Yamamoto H. Selection of a survival signal-modulating CTL escape mutant precedes SIV neutralizing antibody induction. 12th Awaji International Forum of Infection and Immunity (AIFI12), Hyogo, Japan, September 2013.
- 41) Yamamoto H. & Matano, T. Selection of a survival signal-modulating CTL escape precedes neutralizing antibody induction against highly resistant SIV. Cold Spring Harbor Meeting Harnessing Immunity to Prevent and Treat Disease, New York, USA, November 2013.
- 42) 山本浩之, 俣野哲朗. センダイウイルスベクターを用いたエイズワクチン. 第 17 回日本ワクチン学会学術集会 (シンポジウム 1: ウイルスベクターとワクチン), 津, 2013 年 11 月.
- 43) Yamamoto H. Neutralizing antibodies against highly antibody-resistant SIV: protective activity and induction correlates. Weekly Young Investigator's Seminar (WYIS), Univ. Kumamoto, Kumamoto, Japan, February 2014.
- 44) 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: フィリピンカニク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.
- 45) 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.
- 46) Stanley M, Kawana-Tachikawa A, Ueno T. Naturally arising amino-acid polymorphisms within functional regions of HIV-1 nef influence viral persistence in vivo. Annual meeting of the Japanese Society for Immunology, Dec 11-13, 2013.
- 47) Stanley M, Hasan Z, Gatanaga H, Miura T, Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A, Oka S, Ueno T. Effects of naturally occurring polymorphisms in functional domains of HIV-1 nef on in vivo disease progression. The 27th Annual meeting of Japanese Society for AIDS Research, Nov 20-22, 2013.
- 48) Mahiti M, Mwimanzu P, Ogata Y, Tokunaga M, Walker BD, Brumme ZL, Brockman MA, Ueno T. Differential modulation of Nef-mediated downregulation activity of HLA-A and B in HIV-1 chronic infection. The 27th Annual meeting of Japanese Society for AIDS Research, Nov 20-22, 2013.
- 49) 豊田真子, Mwimanzu P, Markle TJ, 緒方陽子, Mahiti M, Brumme ZL, Brockman MA, 上野貴将: HIV-1 感染者由来の Nef を用いた機能ドメインの解析, 第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会-熊本, 2013 年 11 月 20 日-11 月 22 日
- 50) Mahiti M, Mwimanzu P, Ogata Y, Tokunaga M,

Walker BD, Brumme ZL, Brockman MA, Ueno T. Impact of naturally-occurring HIV-1 polymorphisms on differential modulation of Nef-mediated down-regulation between HLA class I loci. 61st Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Kobe International Conference Center, Kobe, Japan. November 10th-12th, 2013.

- 51) Stanley M, Hasan Z, Gatanaga H, Miura T, Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A, Oka S, Ueno T. Acceleration of disease Progression by a single naturally-arising polymorphism, within functional region of HIV-1 nef. 14th Kumamoto AIDS Seminar, Oct 29-31, 2013.
- 52) Mahiti M, Mwimanzi P, Ogata Y, Tokunaga M, Walker BD, Brumme ZL, Brockman MA, Ueno T. Differential modulation of Nef-mediated downregulation activity of HLA class I alleles in HIV-1 chronic infection. 14th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan. October 29-31, 2013.
- 53) Kamori D, Hasan Z, Gatanaga H, Oka S, Miura T, Iwamoto A, Kawana-Tachikawa A, Ueno T. HLA-A*02 allelic variants differently influence amino acid polymorphisms in an immunodominant epitope of HIV-1 Vpr. 14th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan. October 29-31, 2013.
- 54) Toyoda M, Mwimanzi P, Mahiti M, Walker BD, Brumme ZL, Brockman MA, Ueno T. Analysis of naturally-occurring polymorphisms of HIV-1 Nef that impair CD4 down-regulation activity. 14th Kumamoto AIDS Seminar, Oct 29-31, 2013.
- 55) Mahiti M, Mwimanzi P, Ogata Y, Tokunaga M, Walker BD, Brumme ZL, Brockman MA, Ueno T. Differential Nef-mediated down-regulation of

HLA-A and B in chronic HIV-1 infection. Immune Activation in HIV Infection: Basic Mechanisms and Clinical Implications (D2), [Breckenridge, Colorado USA] April 3-8, 2013.

- 56) Mahiti M, Mwimanzi P, Ogata Y, Tokunaga M, Walker BD, Brumme ZL, Brockman MA, Ueno T. Naturally-arising amino acid polymorphisms of HIV-1 Nef that differentially modulate downregulation of HLA-A and HLA-B molecules. Frontiers of Retrovirology conference, at Churchill College, Cambridge, UK. September 16th -18th 2013.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1 . 特許取得

無し

2 . 実用新案登録

無し

3 . その他

無し

SIV 感染におけるウイルス潜伏化機構と CTL 応答

研究分担者 山本 浩之 国立感染症研究所 エイズ研究センター 研究員

研究要旨：

SIV 感染サルエイズモデルの先行解析により、CTL を主体とした安定な初期 SIV 制御に至る MHC クラス I ハプロタイプ共有アカゲサル群が同定された。本群における潜伏 SIV の長期制御に結びつく宿主免疫応答の実態は不明である。本研究では SIV 潜伏感染状態の評価を目的に、SIV 初期制御後の潜伏プロウイルスの安定的な検出を確立し、感染慢性期の配列を解析することで CTL エスケープの様式と病態の関連の評価を試みた。前年度では、末梢血 CD4 陽性 T 細胞中の SIV 長期制御中のプロウイルス配列は、感染後 2 年の時点でコードする Gag 蛋白に CTL エスケープ変異が蓄積しない群 (A 群) と蓄積する群 (B 群) に二分されることを見出した。本年度は当該群の時系列的な解析を行った結果、A 群と B 群のプロウイルス配列の差は感染後 1 年以降に主に生じることが見出された。CTL エスケープの有無は、感染後 2 年以降の血中ウイルス再出現例の有無と対応した。また制御持続の質を評価する目的で、A 群の 1 頭につき CD8 陽性細胞枯渇実験を行ったところ血中に再出現したウイルスは Gag 特異的 CTL エスケープを蓄積した変異株であり、持続制御中に SIV プロウイルスが存在する分画には変異体を選択されてゆく active reservoir と野生株が主に残存する abortive reservoir の 2 種以上が存在する事が示唆された。今後は上記結果を踏まえ当該群における IL-7+IL-15 の個体レベルの投与試験を行い、SIV を初期制御・潜伏後に再増殖に至らない形に至らせる手法の探索を行うことを検討する。

A. 研究目的

HIV の潜伏感染・再活性化を左右する細胞内因子および免疫学的要因を明らかにすることを目的に、本研究では個体レベルの初期エイズウイルス制御に至った SIV (サル免疫不全ウイルス) 感染サルエイズモデルを用い、持続的なウイルス制御下におけるウイルス潜伏化・CTL 応答の探索を行う。CTL 主体に初期 SIV 複製制御に至ったアカゲサル群に関し、持続制御期における CTL 応答と潜伏ウイルス中のエスケープ変異の蓄積状況を時系列的に遡って明らかにする。さらに各種の個体レベルでの病態介入実験を行うことで、持続制御の関連因子を明らかにしてゆくことを目標とする。

B. 研究方法

前年度に着手した、MHC クラス I ハプロタイプ 90-120-Ia 共有 SIV_{mac239} 初期制御群 ($n = 11$) の潜伏プロウイルスの解析の更なる検討を行

った。当該群の感染後 2 カ月、及び 1 年時 [血中ウイルスが制御直前、および検出下限 (400 RNA copies/ml plasma) 以下の時期] に遡り、末梢血単核球 (PBMC) より CD4 陽性 T 細胞を磁気分離した。分離には non-human primate CD4⁺ T cell isolation kit を用いた。非培養の細胞、あるいは IL-7 (10 ng/ml) + IL-15 (10 ng/ml) 存在下で 8 日間刺激培養を行う手法で 1.0×10^6 個の細胞につき DNeasy extraction kit を用い total DNA を抽出し、KOD FX neo を用いた nested PCR 法により SIV gag 領域の塩基配列解析を行った。一部個体については、nef 領域の解析も行った。

各頭の血中ウイルス量に関しては、感染後 2 年以降までの長期フォローアップを行った。

感染各期の Gag 特異的 CTL 応答のパターンを評価した。手法としては樹立済み自家 B 細胞芽球に当該の Gag エピトープ領域ペプチドを一

定濃度で載せ、評価対象の PBMC とゴルジ体阻害剤 (monensin) 存在下で 6 時間共培養し、抗原特異的な IFN- γ 産生に関し、細胞内サイトカイン染色と CD3/CD4/CD8 表面染色を組み合わせ、処理しフローサイトメーターで評価した。

初年度の評価で SIV 持続制御を示した A 群の 1 個体 (個体番号 Mq3) につき個体レベルでの CD8 枯渇実験を行った。抗 CD8 cM-T807 抗体を、皮下注/静注 2 回/2 週 計 4 回、初回 10mg/kg、2 回目以降 5mg/kg で投与した。その後の SIV 特異的 CTL 応答、及び血中ウイルス RNA の gag 領域配列解析を行った。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え生物等を用いる実験には、所属機関承認・文部科学大臣承認を取得済みであり、医用霊長類の利用時は、所属機関、医薬基盤研究所の動物実験委員会の審査・承認を得て動物愛護の精神に則って取扱いを行った。

C. 研究結果

1. SIV 初期制御個体群における CD4 陽性 T 細胞中プロウイルス検出を行った。前年度では、感染後 2 年の時点で gag 領域に CTL エスケープ変異が蓄積する群 (B 群 5 頭) と蓄積しない群 (A 群 6 頭) に二分されたが、時系列的に遡った結果、感染後 2 カ月では両群とも野生株 Gag が主体であり、感染後 1 年では CTL エスケープ蓄積群の 1 頭に単独の CTL エスケープが検出された以外は全頭で野生株であった (図 1)。また、nef 領域配列を A 群 2 頭の感染 2 年時検体につき解析した結果、当該領域には高度の G-to-A 変異が認められる場合があることが判明した。

2. CTL エスケープの蓄積の有無は、感染後 2 年を過ぎての血中ウイルスの再検出例の有無と対応した (図 2)。

3. 当該の期間中において Gag エピトープ特異的 CTL は B 群において消退傾向を示し、A 群においては比較的維持された。

4. 持続制御が生じていると目された A 群の 1 頭につき、抗 CD8 抗体を用いた CD8 陽性細胞

枯渇実験を施行した。施行後、予定通りに末梢血中より CD8 陽性細胞集団の消失を認めた。それに伴って速やかに血中ウイルスの再出現を認め、同時に SIV 特異的 CTL 応答の広汎化が生じていた。再出現した血中ウイルスの gag 領域塩基配列を解析した結果、それまで野生株であった配列が主要な Gag 特異的 CTL 全てからエスケープを呈した変異体 (Gag L216S, D244E, V375M) の配列に置き換わっていた (図 3)。

D. 考察

SIV 初期制御群は、感染後 2 年時点の末梢血 CD4 陽性 T 細胞中プロウイルスにおける CTL エスケープの有無で層別化されることが昨年度までに明らかになった。本年度はその差異が出現する時期をまず調べた結果、感染後 1 年までは B 群において同様のエスケープの兆候は明らかではなく、それ以降の変化であることが見出された。また、CTL エスケープの有無は以後の病態進行と直接的な連関がある可能性が見出され、それは制御経過中の Gag エピトープ特異的 CTL レベルの推移とよく対応した。

本年度の特徴的な成果として、CD8 枯渇実験時の再出現血中ウイルスの性状が挙げられる。即ち、再出現ウイルスは、感染 2 年次までの制御経過中の野生株プロウイルスと異なり、CTL エスケープ蓄積を来したものであった。

他方、nef 領域に G-to-A 変異を蓄積した A 群個体の持続制御期プロウイルスが、PBMC 刺激培養上清中に RNA 検出を認めなかった例と対応することを併せて考慮すると、

プロウイルスとして PBMC 中に検出される野生株ウイルスは、(active reservoir ではない) 一種の abortive reservoir に由来する。即ち抗原としての Gag は産生され続けているものの極低レベルである、もしくは特異的 CTL に認識されにくい局所に存在するため、当該の野生株の形で末梢血中を循環している。

末梢血にリアルタイムにウイルス表現型が反映されない active reservoir 中では、持続感染中に Gag 特異的 CTL エスケープ変異体がすでに優位となっているが、Gag 以外の SIV 特異的 CTL 群によって複製が高度に抑制されている。

以上の 2 要素の組み合わせから成る個体レベルの

SIV 持続制御の図式が考えられた。

E. 結論

SIV 初期制御アカゲサル群にて、長期制御期の末梢血 CD4 陽性 T 細胞中プロウイルス Gag 配列を時系列的に解析した結果、CTL エスケープの蓄積の存否は感染後 1 年以降に生じ、また変異蓄積が生じない A 群でも末梢血に反映されにくい分画で変異蓄積が既に生じている可能性が明らかとなった。本研究は、潜伏後に再増殖に至らないエイズウイルスの性状解明への重要な基礎的知見を与えるものである。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shi S, Seki S, Matano T, Yamamoto H. IL-21-producer CD4⁺ T cell kinetics during primary simian immunodeficiency virus infection. *Microbes Infect.* 15:697-707, 2013.
- 2) Nakane T, Nomura T, Shi S, Nakamura M, Naruse TK, Kimura A, Matano T, Yamamoto H. Limited impact of passive non-neutralizing antibody immunization in acute SIV infection on viremia control in rhesus macaques. *PLoS ONE* 8:e73453, 2013.
- 3) Iwamoto N, Takahashi N, Seki S, Nomura T, Yamamoto H, Inoue M, Shu T, Naruse TK, Kimura A, Matano T. Control of simian immunodeficiency virus replication by vaccine-induced Gag- and Vif-specific CD8⁺ T cells. *J Virol.* 88:425-433, 2014.

2. 学会発表

- 1) Yamamoto H. Selection of a survival signal-modulating CTL escape mutant precedes SIV neutralizing antibody induction. 12th Awaji International Forum of Infection and Immunity (AIFI12), Hyogo, Japan, September 2013.
- 2) Yamamoto H. & Matano, T. Selection of a survival signal-modulating CTL escape mutant precedes neutralizing antibody induction against highly resistant SIV. Cold Spring Harbor Meeting Harnessing Immunity to Prevent and Treat Disease, New York, USA, November 2013.

- 3) 山本浩之, 俣野哲朗. センダイウイルスベクターを用いたエイズワクチン. 第 17 回日本ワクチン学会学術集会 (シンポジウム 1: ウイルスベクターとワクチン), 津, 2013 年 11 月.
- 4) Yamamoto H. Neutralizing antibodies against highly antibody-resistant SIV: protective activity and induction correlates. Weekly Young Investigator's Seminar (WYIS), Univ. Kumamoto, Kumamoto, Japan, February 2014.

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。

ID/provirus	2mo p.c.	1Y p.c.	2Y p.c.		
Group A	WT	WT	WT		
Mq1	WT	WT	WT		
Mq2	WT	WT	WT		
Mq3	WT	WT	WT		
Mq4	WT	WT	WT		
Mq5	WT	WT	WT		
Mq6	WT	WT	WT		
Group B					
Mq7	WT	WT	L216S	D244E	A373T
Mq8	WT	WT	L216S	V243A	D244E
Mq9	WT	WT	L216S	V243A	D244E
Mq10	WT	WT	D205E	L216S	D244E I247L
Mq11	WT	L216S	L216S	V243A	L372F

図 1. SIV 持続制御群における末梢血 CD4 陽性 T 細胞中プロウイルスの *gag* 領域配列解析.

SIV 感染後 2 カ月、1 年、2 年の各ウイルス複製制御期における、対応する Gag 蛋白中に生じた非同義置換を示す。D205E, L216S は $Gag_{206-216}$ 特異的 CTL エスケープ、V243A, D244E, I247L は $Gag_{241-249}$ 特異的 CTL エスケープ、L372F, A373T は $Gag_{373-380}$ 特異的 CTL エスケープをそれぞれ示す。

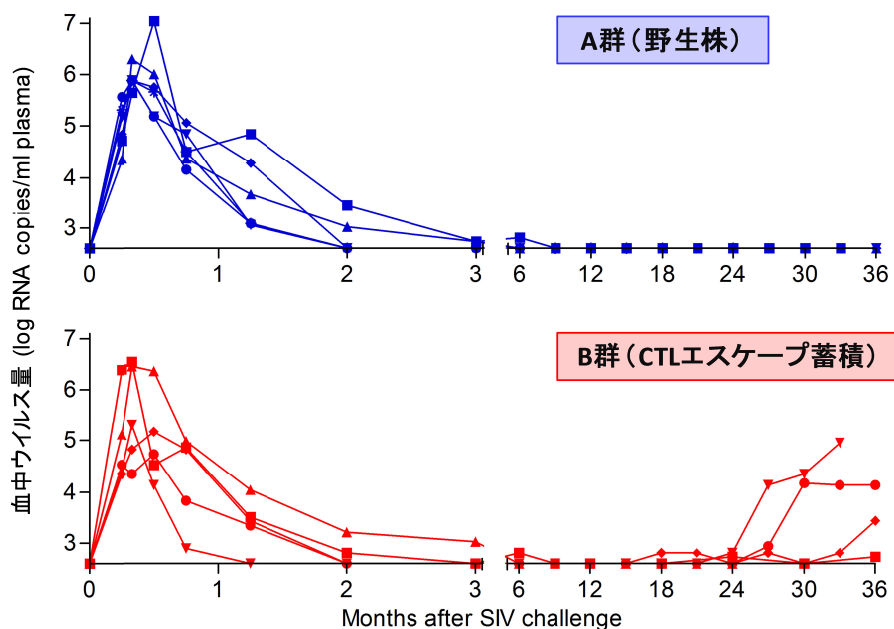
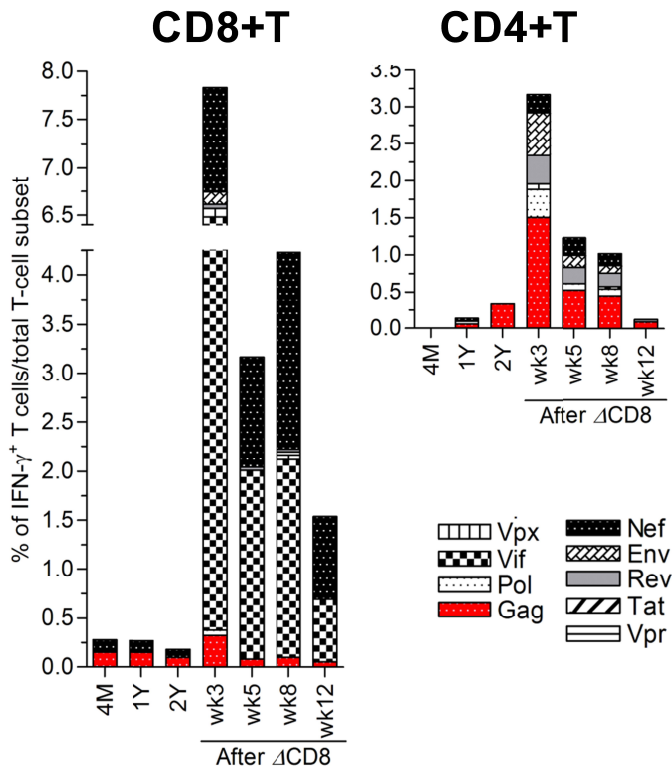


図 2. SIV 持続制御群における血中ウイルス量の解析.

SIV 感染後の血中ウイルス量 (*gag* RNA コピー数/ml 血漿) の経時変化を示す。

A



B

ID/viral RNA	2 wks post-CD8 depletion		
Group A			
Mq3	L216S	D244E	V375M

図 3. SIV 持続制御・A 群(末梢血プロウイルス Gag 配列:野生株)個体 Mq3 における CD8 陽性細胞枯渇試験の解析.

A: CD8 陽性細胞枯渇試験前後の各 SIV 蛋白抗原特異的 CTL レベル(全 CD3 陽性 T 細胞に対する存在比率)を示す。B: CD8 枯渇試験の開始 2 週後に血中に再検出されたウイルス RNA 中の gag 領域変異に対応する Gag 非同義置換の内、代表的なエピトープ特異的 CTL に対するエスケープ変異を示す。

粘膜・リンパ組織の抗原提示細胞への感染様式の解明

研究分担者 五十嵐 樹彦 国立大学法人京都大学ウイルス研究所
附属感染症モデル研究センター 霊長類モデル研究領域 教授

研究要旨：

HIV 潜伏・再活性化サルモデルを構築する目的で、非病原性分子クローン SIV 1A11 を低感受性である事が知られている中国産アカゲザルに昨年度接種した。SIV1A11 は接種後数週間ウイルス血症を誘導したがその後制御された。接種 32 週後に抗 CD8 抗体を投与した所、一過性のウイルス血症及びリンパ節におけるウイルス抗原陽性細胞の出現が観察された。正常サル粘膜組織生検試料から抗原提示細胞の精製を試行したが、収率が低く更に検討を要する。

A. 研究目的

慢性的なウイルス抗原刺激による T 細胞の活性化及び疲弊は HIV 感染症の病原性として特徴付けられる。T 細胞活性化は、樹状細胞に代表される抗原提示細胞との相互作用により誘導される事から、ウイルス感染により抗原提示細胞の質または量が変化し、慢性的な T 細胞活性化を引き起こしている可能性が考えられる。先行研究では、感染により血中の樹状細胞数の推移が主に報告されているが、樹状細胞の感染状況に関する報告は多くない。更に、個体におけるウイルス複製の主要な場であるリンパ節及び消化管に代表される粘膜における樹状細胞感染に関しては、SIV サルエイズモデルを用いて極めて限られた研究が行われているにすぎず (Choi *et al.*, J.Pathol.201:616-28, 2003.) 理解が進んでいるとは言えない。

本分担研究の目的は、個体レベルにおける主要なウイルス複製の場であるリンパ節及び粘膜における抗原提示細胞の感染様態を明らかにする事である。

B. 研究方法

非病原性 SIV 1A11/中国産アカゲザルモデル系を構築し、ウイルスの潜伏・再活性化時に組織で起きる事象を検索する。

・サル感染実験

1.1 × 10⁷TCID₅₀ の SIV1A11 ウイルスストックを麻酔下のアカゲザル直腸にシリコンチューブを用いて非観血的に導入し、30 分間静置した。ウイルス接種前より採血を行い、血漿の保存及び末梢血リンパ球サブセットの測定を行った。接種 1 週間前に、麻酔下で直腸組織を生

検し、RNA 抽出、組織学的検索のために固定、保存した。

・ウイルス RNA の定量

経時的に採取した末梢血より血漿を調製、RNA を抽出し、逆転写/リアルタイム PCR により SIV gag 領域を増幅、定量した。

・リンパ球サブセット測定

経時的に採取した末梢血を蛍光標識単クローン抗体 (抗 CD3, CD4, CD8 および CD20) と反応させ、フローサイトメトリーにより解析した。また、生検したリンパ節から細胞浮遊液を調製し、蛍光標識抗体を用いて同様に解析した。

・抗 CD8 抗体処理

ウイルス接種 32 週後に 1 頭の感染サルに抗 CD8 抗体 (M-T087R1, NIH Nonhuman Primate Reagent Resource より入手) 10 mg/kg を麻酔下で皮下投与した。

・腸管組織からの抗原提示細胞の調製

非感染アカゲザルの直腸組織を麻酔下で生検鉗子を用いて採取、キレート剤及び蛋白質分解酵素処理により細胞浮遊液を調製した。更に、抗 CD1b 抗体 (京都大学ウイルス研究所杉田昌彦博士より分与を受けた) 及び磁気ビーズを用いて細胞を精製、フローサイトメトリーにより発現抗原を検索した。

C. 研究結果

・腸管組織からの抗原提示細胞の調製

抗原提示細胞に感染するウイルスの量、ウイルスの存在様式 (持続的複製があるか、プロウイルスとして潜伏しているか) を明らかにする

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 週後まで 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 Dengue 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 Dengue 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：フィリピンカニクイザルにおける Dengue 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 潜伏感染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_{NLE} (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)を用いて negative selection 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_{NLE} 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 FACSanto 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-accagtcgccctgagca-[BHQ-1], HIV-1 Nef: forward, 5'-tgagacgagctgagccagcag-3', reverse, 5'-ttgtgctctag-

ccaggcac-3', probe, [6-FAM]-tcgagatactgctccaccctatct-[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-cagttgggtcgctttgctgttc-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'-tagagccctggaagcatccagg-3', reverse, 5'-tcgctgtctccgcttcttctctgc-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持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 感染後にプ

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思われる。

G. 研究発表

- 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.
- 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

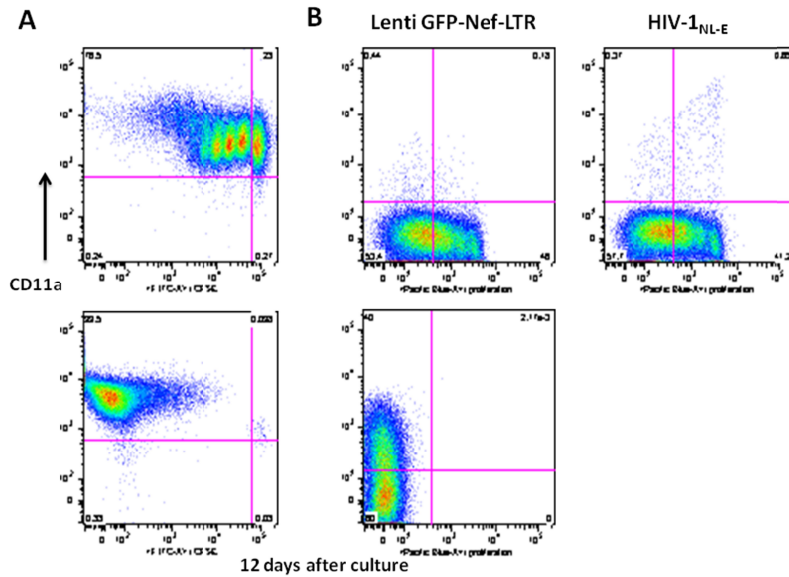


図1 異なる刺激で培養した CD4 陽性 T 細胞におけるレンチウイルスの発現
 末梢血 CD4 陽性細胞に色素を取り込ませた後、LTR 制御下に GFP を発現する組換えレンチウイルス(Lenti GFP-Nef-LTR)あるいは HIV-1_{NL-E} を感染させた。この細胞を IL-7 と IL-15 添加培地(上段、HSP 培養)あるいは自己 DC と SEB で刺激して培養(T 細胞受容体刺激培養刺激培養、下段)し、2 週間後の細胞をフローサイトメーターで解析した。

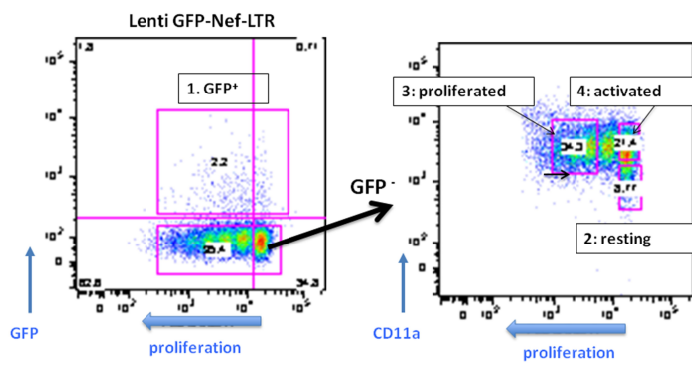


図2 GFP 発現組換えレンチウイルス感染後の CD4 陽性 T 細胞亜集団の分画
 図1と同様に組換えレンチウイルス感染後 HSP 培養した細胞を GFP 陽性(Fraction 1)と陰性細胞に分け、GFP 陰性細胞を増殖細胞(Fraction 3)、非増殖活性化細胞(Fraction 4)および非増殖非活性化細胞(Fraction 2)にゲートをかけて FACSaria でソートした。

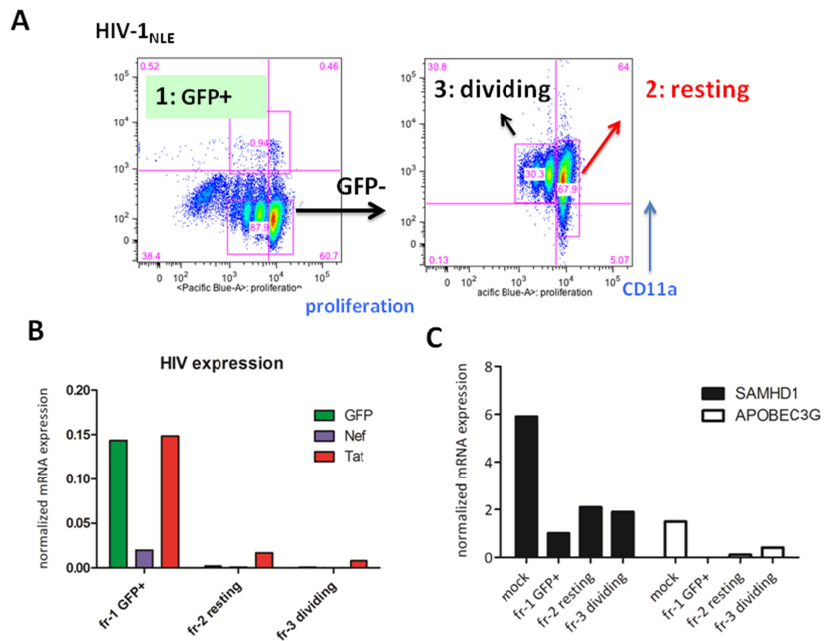


図3 GFP 発現 HIV-1 感染後の CD4 陽性 T 細胞亜集団における HIV および細胞制御因子の発現量の比較

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。

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 箇所に 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。このことから 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 の不活性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 が不活性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ることはこれまでの研究から推察されてきたことであったが、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, Shiraishi 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, Pornkuna1 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、「ウィ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、梅野富輝, 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、梶野富輝、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キャリアノくすぶり型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られた 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、榎崎彩香、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

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
研究協力者 細谷 香 東京大学医科学研究所

研究要旨：

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 IL2 遺伝子が高度にメチル化されており、非特異刺激に対する IL2 低発現と関連していることを見いだした。CD4⁺T 細胞における IL2 遺伝子の DNA メチル化状態はサブセット間で大きく異なっており、最終分化段階にあり細胞老化のマーカーである CD57 を発現する CD4⁺T 細胞は他のメモリー CD4⁺T 細胞に比して高度にメチル化されていること、高 HIV 量の感染者では CD57 陽性 CD4⁺T 細胞が高頻度に存在することから、HIV 感染では CD4⁺T 細胞の老化に伴うエピジェネティックな制御による IL2 遺伝子発現抑制が T 細胞機能不全の一因であ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り、未治療の感染者において感染後 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ために重要な研究テーマである。

近年の研究により、HIV 慢性感染期では T 細胞が持続的な活性化により疲弊することで機能が低下していることが明らかとなってきた。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関連の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。昨年度は血中 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た。その結果、高 HIV 群では低 HIV 群に比べ刺激後短時間での PBMC による IL2 遺伝子発現が低下しており、CD4⁺T 細胞の IL2 遺伝子プロモーター/エンハンサー領域の転写開始部位直近の CpG 部位 (CpG1) が高度にメチル化されていることを明らかにした。これら IL-2 発現量と CpG1 のメチル化状態は負の相関が見られたことから、IL-2 の遺伝子発現制御には CpG1 メチル化が重要であること、高 HIV 群では DNA メチル化により IL2 発現が抑制されていることを明らかにした。

PBMC 中の CD4⁺T 細胞は多様なサブセットからなる。IL2 遺伝子は Naïve T 細胞では高度にメチル化されていることが知られており、試験管内での TCR 刺激により脱メチル化されることが知られているが、末梢血中の CD4⁺T 細胞における状態は解析されていない。本年度は、末梢血中 CD4⁺T 細胞の IL2 遺伝子プロモーター領域の CpG 部位のメチル化について詳細に解析を行い、高 HIV 群における IL-2 遺伝子の高度メチル化に関連する要因を明らかにすることを目的とした。

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 感染者を対象とした。未治療の慢性感染者で血中 HIV 量が高い感染者 ($>25,000$ copies/ml) 低い感染者 ($<1,400$ copies/ml) の末梢血単核球 (PBMC) を用いた。一部の解析には健常人の PBMC を解析に用いた。

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 をコードする遺伝子の mRNA 量を real-time PCR により定量した。

CD4⁺T 細胞中のサブセットの分取

CD4⁺T 細胞中の各分化段階での DNA のメチル化を解析するため、健常人の PBMC を用いて、抗 CD3, CD4, CD8 抗体と同時に分化段階のマーカーである CD45RA, CCR7, CD27, CD28、あるいは CD57 に対する抗体で多重染色を行い分画し、セルソーターを用いて各細胞集団を分取した。

ゲノム DNA のメチル化解析

分画した細胞から DNA を抽出し、バイサルファイト処理した後、解析対象とした IL-2 の遺伝子のプロモーター/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。

フローサイトメトリーによる CD4⁺T 細胞の性状、機能解析

PBMC を用いて、抗 CD3, CD4, CD8, CD45RA, CCR7, CD57 に対する抗体で多重染色を行い、発現パターンの解析をフローサイトメトリーにより行った。また PMA/ionomycin にて非特異刺激を加えた後、IL-2 産生を細胞内サイトカイン染色にて解析した。

(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、倫理面への問題は無いと判断される。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

各 CD4⁺T サブセットにおける IL2 遺伝子のメチル化状態を明らかにするため、CD45RA, CCR7, CD27, CD28 の発現パターンにより分画し、CD45RA⁺CCR7⁺CD27⁺CD28⁺ (Naïv)、CD45RA⁻CCR7⁺CD27⁺CD28⁺ (central memory (CM))、CD45RA⁻CCR7⁻CD27⁺CD28⁺ (early effector memory (E-EM))、CD45RA⁻CCR7⁻CD27⁻CD28⁺ (intermediate effector memory (I-EM))、CD45RA⁻CCR7⁻CD27⁻CD28⁻ (late-effector memory (L-EM)) の各分画について、IL2 遺伝子のメチル化解析を行った。Naïve 細胞における CpG1 は高頻度にメチル化されているのに対して、CM, E-EM, I-EM 細胞における CpG1 は殆ど脱メチル化されていた。一方で、最終分化細胞である L-EM 細胞では再メチル化されており、CM, E-EM, I-EM 細胞に比べて有意にメチル化 DNA の頻度が高かった。

また、細胞老化のマーカーである CD57 の発現は IL-2 発現低下との関連が報告されていることから、CD57 の発現と IL-2 遺伝子メチル化の関連性についても解析を行った。Naïve, CM, E-EM では CD57 の発現が認められなかったのに対し、分化が進むほど CD57 の発現が上昇し、L-EM 細胞で最大の発現が見られた。CD4⁺T 細胞中のメモリー (CD45RA⁻) 分画における CD57⁻細胞、CD57⁺細胞での IL2 遺伝子のメチル化解析を行ったところ、CD57⁺細胞に比べて CD57⁻細胞で有意に高いメチル化状態を示した。CD57⁺CD4⁺T 細胞は PMA/イオノマイシンを用いた強い T 細胞刺激を行っても IL-2 の産生は認められなかったことから、CD4⁺T 細胞において、最終分化した L-EM 分画の CD57⁺細胞では IL2 遺伝子が再メチル化されることで IL-2 の発現が抑制されている可能性が示唆された。

CD4⁺T 細胞における CD57 の発現を HIV 感染者群間で比較したところ、CD57 の発現は低 HIV 群に比べて高 HIV 群で有意に高く、IL2 遺伝子の CpG1 メチル化との間には正の相関が見られた。さらに、非特異刺激後の IL-2 産生量とは負の相関を示した。これらの結果から、高 HIV 群では IL2 遺伝子が高度にメチル化された CD57⁺CD4⁺T 細胞が蓄積することで IL-2 産生が抑制されていることが示唆された。

D. 考察

naïve CD4⁺T 細胞では IL2 遺伝子プロモータ

一領域はほぼ完全にメチル化されており、メモリーへ分化すると脱メチル化されるが、最終分化段階であり CD28-の L-EM 細胞で再メチル化されていた。T 細胞の活性化には CD28 からの補助刺激が必須であることが知られており、本研究結果は CD28 からの補助刺激が IL2 遺伝子メチル化の制御に関連している可能性を示唆している。さらに、L-EM で高頻度に発現が見られる CD57 を発現する細胞でも同様に高度メチル化が観察された。CD57⁺メモリーT 細胞では IL-2 産生が著しく低下していたことから、HIV 慢性感染では、エピジェネティックな制御により IL-2 産生能が低下した老化 CD4⁺T 細胞が蓄積していることが明らかとなった。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 CD8⁺T 細胞の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。

E. 結論

病態進行の早い高 HIV 量の感染者で CD4⁺T 細胞において IL2 遺伝子が高度にメチル化されていた。IL2 遺伝子は細胞老化に伴い再メチル化されており、HIV 感染慢性期では老化した CD4⁺T 細胞の蓄積により IL-2 発現が低下していると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shimizu A, Kawana-Tachikawa A, Yamagata A, Han C, Zhu D, Sato Y, Nakamura H, Koibuchi T, Carlson J, Martin E, Brumme CJ, Shi Y, Gao GF, Brumme ZL, Fukai S, Iwamoto A. Structure of TCR and antigen complexes at an immunodominant CTL epitope in HIV-1 infection. *Sci Rep.* 3:3097, 2013
- 2) Teeranaipong P, Hosoya N, Kawana-Tachikawa A, Fujii T, Koibuchi T, Nakamura H, Koga M, Kondo N, Gao GF, Hoshino H, Matsuda Z, Iwamoto A. Development of a rapid cell-fusion-based phenotypic HIV-1 tropism assay. *J Int AIDS Soc.* 16:18723, 2013.
- 3) Nishimura T, Kaneko S, Kawana-Tachikawa A, Tajima Y, Gotoh H, Zhu D, Nakayama K,

Iriguchi S, Uemura Y, Shimizu T, Takayama N, Yamada D, Nishimura K, Ohtaka M, Watanabe N, Takahashi S, Iwamoto A, Koseki H, Nakanishi M, Eto K, Nakauchi H. Generation of rejuvenated antigen-specific T cells by pluripotency reprogramming and redifferentiation. *Cell Stem Cell.* 12:114-26, 2013.

2. 学会発表

- 1) Kaori Nakayama-Hosoya, Takaomi Ishida, Noriaki Hosoya, Hitomi Nakamura, Michiko Koga, Tomohiko Koibuchi, Aikichi Iwamoto, Ai Kawana-Tachikawa. Low IL-2 expression by epigenetic modification is associated with immunosenescence in HIV non-controllers. Keystone symposia, HIV Pathogenesis – Virus vs Host. Banff, Alberta, Canada, Mar 2014.
- 2) Meribe SC, Hasan Z, Gatanaga H, Miura T, Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A, Oka S, Ueno T. Linkage between disease status and a naturally-arising mutation in functional region of HIV-1 Nef. 21th conference on retroviruses and opportunistic infections. Boston, USA. Mar 2014.
- 3) Kawana-Tachikawa A. The 9th China-Japan Laboratory Workshop: Pathogenesis, Gene regulation, and signal transduction. “Interaction between virus and host immune response during chronic HIV-1 infection.”, Beijing, China, Nov 2013.
- 4) Kaori Nakayama-Hosoya, Takaomi Ishida, Noriaki Hosoya, Hitomi Nakamura, Michiko Koga, Tomohiko Koibuchi, Aikichi Iwamoto, Ai Kawana-Tachikawa. The essential role of epigenetic regulation for CD4⁺ T cell dysfunction during chronic HIV-1 infection. AIDS Vaccine 2013 Conference. Barcelona, Spain, Oct 2013.
- 5) Meribe SC, Kawana-Tachikawa A, Takamasa Ueno T. Naturally arising amino-acid polymorphisms within functional regions of HIV-1 Nef influence viral persistence in vivo. 第42回日本免疫学会学術集会, 千葉, 2013年12月.
- 6) 石坂彩, 立川(川名)愛, 中村仁美, 古賀道子, 細谷紀彰, 鯉淵智彦, 野本明男, 岩本愛吉, 水谷荘利. HIV-1陽性者末梢血からのHIV-1短鎖RNAの検出および定量法の確立. 第27回日本エイズ学会学術集会, 熊本, 2013年11月.

- 7) 立川(川名)愛、韓忠勇、清水晃尚、細谷紀彰、中村仁美、古賀道子、鯉渕智彦、いわ本愛吉．重複するCTLエピトープ部位に生じた1アミノ酸変異によるエピトープの消滅と出現．第61回日本ウイルス学会学術集会，神戸，2013年11月．

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 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：非常に稀ではあるが（全感染者の1%以下）、自身の免疫系で HIV-1 を制御する感染者が知られておりエリートコントローラー（EC）と呼ばれている。EC では、慢性的な免疫活性化は多くの場合認められないため、ウイルス制御や HIV 感染に伴う免疫活性化を研究する上で良いモデルとなりうる。本研究では、免疫活性化に直接的に関わると考えられているウイルス蛋白質である Nef に着目し、EC 由来 Nef の遺伝的、機能的、構造的な特徴を解析した。その結果、EC 由来の Nef では多くの機能が減弱化されており、機能減弱化に関連するアミノ酸変異の多くが HLA アリルと相関していた。こうしたことから、EC で見られる HLA 拘束性免疫応答が、選択圧を通じて、Nef 蛋白質の機能の減弱化に関与していると考えられた。

A. 研究目的

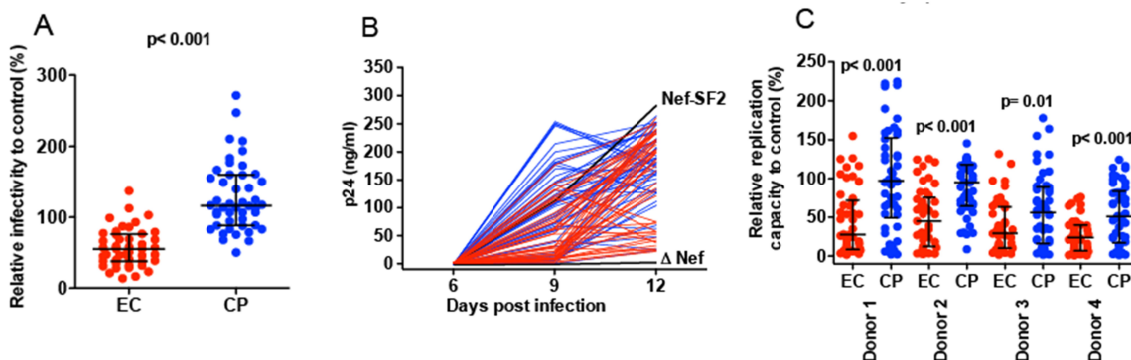
HIV 感染の慢性期には、免疫系は全身的に活性化され、細胞性免疫系による抗原特異的な抗ウイルス機能は疲弊する。一方、非常に稀ではあるが（全感染者の1%以下）、自身の免疫系で HIV-1 を制御する感染者が知られておりエリートコントローラー（EC）と呼ばれている。こうした感染者では、慢性的な免疫活性化は多くの場合認められないため、ウイルス制御や HIV 感染に伴う免疫活性化を研究する上で良いモデルとなりうる。本研究では、免疫活性化に直接的に関わると考えられているウイルス蛋白質である Nef に着目する。EC 由来の Nef について、慢性感染者由来の Nef を比較対照群として、その機能的、遺伝学的特徴を解析した。

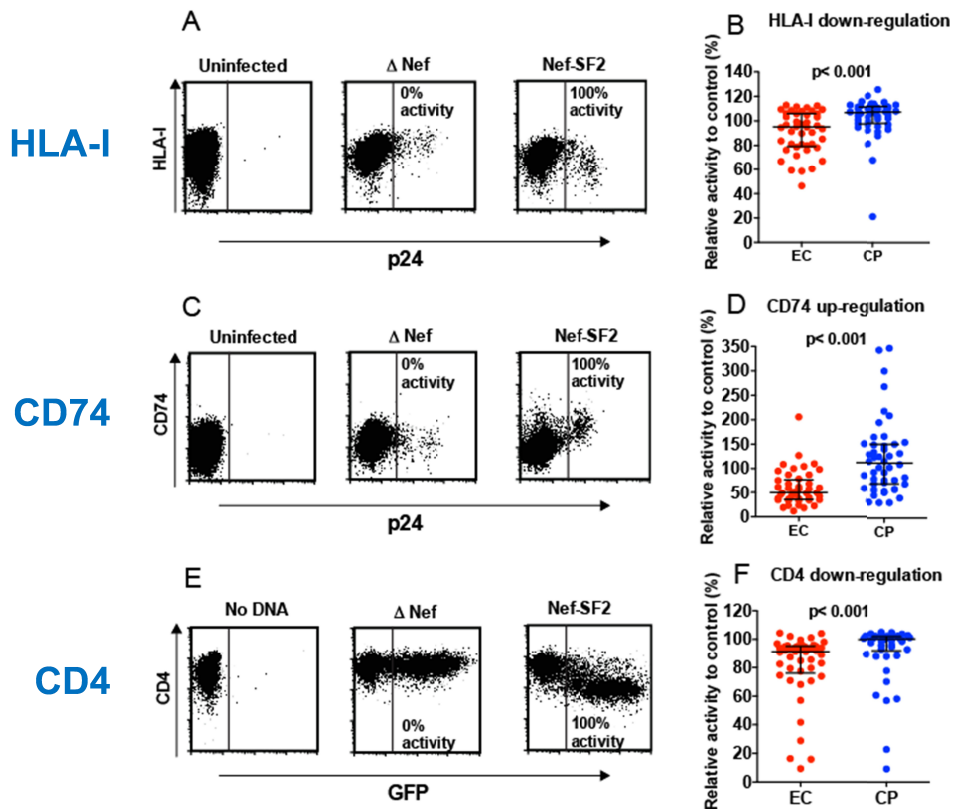
B. 研究方法

ボストン地区で集められた45名の EC および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。これを用いて、Nef のさまざまな機能解析を行った。

（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。感染者の個人情報は入手していない。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。



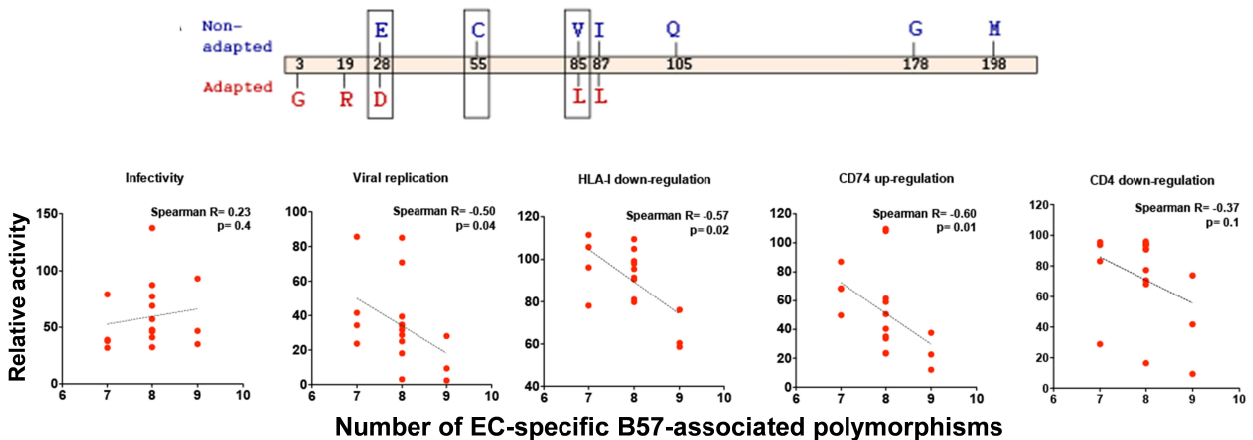


C. 研究結果

(1) ウイルス感染および複製への影響。
 HIV-1 Nef は、ウイルス粒子の感染性を増強するとともに、未刺激の PBMC を用いたウイルス複製を昂進させることが知られている。EC と CP 由来の Nef を持つ組換えウイルスを用いて、両方の機能を測定したところ、それぞれのグループの中央値で比較すると、EC 由来の Nef では統計的に有意に CP 由来 Nef に比較して機能が減弱化していた (図 1A, 1B)。また、PBMC ドナーによって、ウイルス複製は異なるため、4 人の健常人由来の PBMC を用いた。どのドナーに

おいても、EC 由来 Nef の方が低い活性を示した (図 1C)。

(2) 細胞表面抗原発現への影響。
 Nef は、HLA クラス I (HLA-I) や CD4 分子の細胞表面での発現を低下させる。一方、Nef は CD74 分子の発現を昂進させる。これらの活性を測定したところ、同じく中央値で比較すると、EC 由来 Nef の方が CP 由来 Nef に比べて有意に減弱化していた (図 2A, 2B, 2C)。



(3) EC で特徴的に見られるアミノ酸多型と Nef 機能との関連。

nef 遺伝子配列を調べたところでは、EC および CP 間に系統樹上の顕著な違いや、クラスターなどは認められなかった(データ未掲載)。一方、EC と CP 間の Nef 機能の差から、EC 由来 Nef にある何か共通のアミノ酸多型あるいは変異が、Nef 機能の差として現れて来るものと考えた。そこで、EC と CP 由来の Nef のアミノ酸配列で、どちらかに有意に頻度高く認められるコドンを検索した。その結果、11個のアミノ酸多型が EC 由来 Nef に有意に多く認められた。一方、HLA-B57 を持つ感染者は EC に有意に多く認められる。EC 由来の Nef で、HLA-B57 を有する検体に多く認められる Nef 多型を調べたところ、先ほどの11個のうち、9個が相当することが分かった(図3)。9か所のうち、3か所のアミノ酸多型は、Nef クローンによって配列がことなっていた。そこで、これらの変異の有無と、各 Nef 機能との相関を調べたところ、非常に興味深いことに、変異の総数と機能に逆相関が認められた。解析した5つの機能のうち、4つで同様の傾向が認められた(図3)。

D. 考察

EC では、自身の免疫系で HIV-1 複製が制御されていると考えられている。病原性との関連が強い Nef の機能が、こうした感染者で減弱化されており、機能に関連するアミノ酸変異の多くが HLA アリルと相関していた。こうしたことから、EC で見られる HLA 拘束性免疫応答が、選択圧を通じて、Nef 蛋白質の機能の減弱化に関与していると考えられた。

E. 結論

薬剤治療なしに HIV-1 複製が制御されている検体では、Nef の機能が有意に減弱化されていることが明らかとなった。また、こうした減弱化には、ヒト宿主の免疫系が関与していると示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mwimanzani P, Markle TJ, Ogata Y, Martin E, Tokunaga M, Mahiti M, Kuang XT, Walker BD, Brockman MA, Brumme ZL, Ueno T. Dynamic range of Nef functions in chronic HIV-1 infection. *Virology* 439:74-80, 2013
- 2) Motozono C, Miles JJ, Hasan Z, Gatanaga H, Meribe SC, Price DA, Oka S, Sewell AK, Ueno T. CD8⁺ T cell cross-reactivity profiles and HIV-1 immune escape towards an HLA-B35-restricted immunodominant Nef epitope. *PLoS ONE* 8: e66152, 2013
- 3) Motozono C, Yokoyama M, Sato H, Ueno T. Cross-reactivity analysis of T cell receptors specific for overlapping HIV-1 Nef epitopes of different lengths. *Microbes Infect* 2014 in press

2. 学会発表

- 1) Stanley M, Kawana-Tachikawa A, Ueno T. Naturally arising amino-acid polymorphisms within functional regions of HIV-1 nef influence viral persistence in vivo. Annual meeting of the Japanese Society for Immunology, Dec 11-13, 2013
- 2) Stanley M, Hasan Z, Gatanaga H, Miura T, Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A, Oka S, Ueno T. Effects of naturally occurring polymorphisms in functional domains of HIV-1 nef on in vivo disease progression. The 27th Annual meeting of Japanese Society for AIDS Research, Nov 20-22, 2013
- 3) Mahiti M, Mwimanzani P, Ogata Y, Tokunaga M, Walker BD, Brumme ZL, Brockman MA, Ueno T. Differential modulation of Nef-mediated downregulation activity of HLA-A and B in HIV-1 chronic infection. The 27th Annual meeting of Japanese Society for AIDS Research, Nov 20-22, 2013
- 4) 豊田真子, Mwimanzani P, Markle TJ, 緒方陽子, Mahiti M, Brumme ZL, Brockman MA, 上野貴将: HIV-1 感染者由来の Nef を用いた機能ドメインの解析、第 27 回日本エイズ学会 学術集会・総会-熊本、2013 年 11 月 20 日 11 月 22 日
- 5) Mahiti M, Mwimanzani P, Ogata Y, Tokunaga M, Walker BD, Brumme ZL, Brockman MA, Ueno T. Impact of naturally-occurring HIV-1 polymorphisms on differential modulation of Nef-mediated down-regulation between HLA class I loci. 61st Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Kobe International Conference Center, Kobe, Japan.

November 10th-12th, 2013

- 6) Stanley M, Hasan Z, Gatanaga H, Miura T, Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A, Oka S, Ueno T. Acceleration of disease Progression by a single naturally-arising polymorphism, within functional region of HIV-1 nef. 14th Kumamoto AIDS Seminar, Oct 29-31, 2013
- 7) Mahiti M, Mwimanzi P, Ogata Y, Tokunaga M, Walker BD, Brumme ZL, Brockman MA, Ueno T. Differential modulation of Nef-mediated downregulation activity of HLA class I alleles in HIV-1 chronic infection. 14th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan. October 29-31, 2013
- 8) Kamori D, Hasan Z, Gatanaga H, Oka S, Miura T, Iwamoto A, Kawana-Tachikawa A, Ueno T. HLA-A*02 allelic variants differently influence amino acid polymorphisms in an immunodominant epitope of HIV-1 Vpr. 14th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan. October 29-31, 2013
- 9) Toyoda M, Mwimanzi P, Mahiti M, Walker BD, Brumme ZL, Brockman MA, Ueno T. Analysis of naturally-occurring polymorphisms of HIV-1 Nef that impair CD4 down-regulation activity. 14th Kumamoto AIDS Seminar, Oct

29-31, 2013

- 10) Mahiti M, Mwimanzi P, Ogata Y, Tokunaga M, Walker BD, Brumme ZL, Brockman MA, Ueno T. Differential Nef-mediated down-regulation of HLA-A and B in chronic HIV-1 infection. Immune Activation in HIV Infection: Basic Mechanisms and Clinical Implications (D2), [Breckenridge, Colorado USA] April 3-8, 2013
- 11) Mahiti M, Mwimanzi P, Ogata Y, Tokunaga M, Walker BD, Brumme ZL, Brockman MA, Ueno T. Naturally-arising amino acid polymorphisms of HIV-1 Nef that differentially modulate downregulation of HLA-A and HLA-B molecules. Frontiers of Retrovirology conference, at Churchill College, Cambridge, UK. September 16th -18th 2013

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。

慢性的免疫活性化制御因子の機能解析

研究分担者 小柳 義夫 京都大学ウイルス研究所 教授
研究協力者 佐藤 佳 京都大学ウイルス研究所 助教
研究協力者 三沢 尚子 京都大学ウイルス研究所 技術補佐員

研究要旨： HIV 感染者にみられる免疫細胞の活性化は、HIV 感染による病態悪化に関わる主要因となる。しかし、その成立メカニズムは未だ不明な点が多い。本研究は、HIV 感染者における制御性 T 細胞がどのように病態悪化に関与するかを明らかにするために、ヒト化マウスを用いて解析した。制御性 T 細胞は、生体内できわめて高い細胞増殖活性を有し、HIV 補受容体である CCR5 の高発現状態にあった。そして、HIV-1 ならびに制御性 T 細胞を特異的に破壊する抗体薬の投与によって誘導された制御性 T 細胞の枯渇状態では、メモリー T 細胞の異常活性化が生じ、生体内の HIV-1 の複製全体を亢進することがわかった。この制御性 T 細胞への感染には、Vpr というウイルス性因子が関与し、感染細胞を G2M 期へ停止させ、それに続くアポトーシスを生じさせると明らかにした昨年の結果とともに、生体内のウイルス感染においては制御性 T 細胞が重要な役割を担っていることがわかった。

A. 研究目的

HIV の慢性的免疫活性化を制御する宿主細胞因子群についてのその機能を明らかにする。HIV の感染により直接的に影響をうける CD4 陽性細胞が関与する免疫反応は、胸腺組織で産出された CD4 ナイーブ細胞(Tn)、末梢組織で外来抗原に速やかに反応する CD4 メモリー細胞(Tm)そして、それらの反応に抑制的に働く T 細胞である CD4 制御性 T 細胞(Treg)から構成される。いずれの CD4 陽性 T 細胞は HIV 感染により障害をうけるが、その障害の程度ならびに個体内における分布と動態は、適切な機能解析動物モデルが開発されていないために、不明であった。本研究は、HIV 感染時の免疫活性化制御因子について、HIV-1 感染ヒト化マウスという動物モデルを始点にして、ウイルス学的解析まで進展させた。

B. 研究方法

ヒト血液幹細胞移植 NOG マウス（ヒト化マウス）への CCR5 指向性 HIV-1 株（JR-CSF 株）の野生型ならびに Vpr 欠損ウイルスをマウスの腹腔から接種後、感染後経時的（7 日目、14 日目、21 日目）に眼窩静脈から採血を行い、CD3⁺CD4⁺の Tn(CD45RO⁻)、Tm(CD45RO⁺)、Treg(FOXP3⁺)の

細胞数ならびに、上記採取日に加え 2 日目、4 日目に採血を行い血漿ウイルス RNA 量 (Viral load, VL) を測定した。Treg の枯渇実験として、リシン付加抗 CD25 単クローナル抗体薬である denileukin diftitox (DD) の腹腔内投与をおこなった。さらに、flow cytometry 法により細胞分子の発現量を測定した。ヒト化マウスの作製はこれまで報告者らが独自に開発した方法に準じた (Virology 394:64-72, 2009, J. Virol. 84:9546-9556, 2010, Vaccine, 28S2:B68-B74, 2010, Blood 117:5663-5673, 2011)。
(倫理面への配慮)

ヒト由来の試料として提供者の同意のもとに採取を行い、その利益ならびに人権保護の取り扱いに十分配慮した。京都大学の医の倫理委員会承認済みである。実験動物に対する動物愛護上の配慮を考慮した実験計画は京都大学動物委員会承認済みである。組換え DNA 実験についても、P3 レベルの物理的封じ込めの必要な大臣確認実験も含め承認済みである。

C. 研究結果

ヒト化マウスへの DD 投与の 3 日後の末梢血 (PB) における白血球細胞数 (WBC)、総 CD4⁺ T (total CD4) 細胞数、Tn 数、Tm 数には、DD 非投与群と

比べて、細胞数の大きな差異は見出せなかった。一方、Treg は、DD 投与によってほとんど消失した(図 1A と B の Post)。これらのマウス内のヒト CD8 陽性メモリー細胞の活性化状態を MKi67 抗原陽性率で検討したところ、あきらかに DD 投与によって MKi67 抗原陽性細胞が大幅に増加した(図 1C)。CD4 陽性細胞では、Tn ではその増加がみられなかったがメモリー細胞である Tm では MKi67+細胞の増加がみられた(図 1D)。そして、それら Tn ならびに Tm 細胞表面の CCR5 の陽性率は明らかに増加していた(図 1E)。次に、Treg 枯渇環境における、HIV-1 の感染性を検討した。Treg への感染性が優る野生型の HIV-1 と Treg への感染性が劣る Vpr 欠損 HIV-1 をそれぞれ接種後、継時的に採血し、総 CD4 細胞数、Tn 数、Tm 数、そしてウイルス血症レベルを検討した。DD 投与によっていずれのウイルスでも CD4 数の急激な減少、特に Tm 細胞の減少がみられた(図 1F)。そして、ウイルス複製レベルは、野生型の HIV-1 では急速な高レベルのウイルス血症に達すること、Vpr 欠損 HIV-1 もウイルス血症の上昇が遅れながら高レベルウイルス血症に到ることがわかった(図 1G, H)。Treg 枯渇環境においては、ウイルス血漿レベルは 10 倍以上高いものになった(図 1G, DD+ではいずれも 10^7 copy/ml を上回る)。

D. 考察

Treg が HIV-1 感染者でどのような役割を有するのか、これまで多くの議論があった。これまでの HIV 感染者の末梢血の解析研究では、Treg が減っているという報告と逆に増加しているために免疫不全が起きているという、相反する報告が続いていた。本研究の結果、感染者内の Treg 数は、HIV 感染により影響をうけて減っていると考えられる。一方、定常状態ではきわめて高い細胞分裂能を有する Treg が免疫反応の一部として増加している可能性も高い。免疫細胞の活性化に直接影響を及ぼす Treg を HIV に限らず、特定の分子標的剤(ここでは DD)の処理によって生じさせた枯渇環境では、メモリー T 細胞の異常活性化が生じ、生体内の HIV-1 の複製全体を亢進する結果、HIV-1 血症レベルが急速に上昇することがわかった。この Treg への感染には、Vpr というウイルス性因子が関与し、感染細胞を G2M 期へ停止させ、それに続くアポトーシスを生じさせると明らかにした

これまでの結果とともに、生体内におけるウイルス感染において、Treg が重要な役割を担っていることがわかった。

E. 結論

HIV-1 感染における Treg が重要な役割を担うメカニズムが解明された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) Sato, K., Misawa, N., Iwami, S., Satou, Y., Matsuoka, M., Ishizaka, Y., Ito, M., Aihara, K., An, D.S., Koyanagi, Y.: HIV-1 Vpr accelerates viral replication during acute infection by exploitation of proliferating CD4⁺ T cells in vivo. *PLOS Pathog.* 9:e1003812, 2013.
 - 2) Ogawa, Y., Kawamura, T., Matsuzawa, T., Aoki, R., Gee, P., Yamashita, A., Moriishi, K., Yamasaki, K., Koyanagi, Y., Blauvelt, A., Shimada, S.: Antimicrobial peptide LL-37 produced by HSV-2-infected keratinocytes enhances HIV infection of Langerhans cells. *Cell Host Microbe* 13, 77-86, 2013.
 - 3) Hollenbaugh, J.A., Gee, P., Baker, J., Daly, M.B., Amie, S., Kasai, N., Kanemura, Y., Ward, B.M., Koyanagi, Y., Kim, B.: Host factor SAMHD1 restricts DNA viruses in non-dividing myeloid cells. *PLOS Pathog.* 9, e1003481, 2013.
 - 4) Ebina, H., Misawa, N., Kanemura, Y., Koyanagi, Y.: Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. *Sci. Rep.* 3, 2510, 2013.
2. 学会発表
 - 1) Sato, K., Iwami, S., Koyanagi, Y.: Quantification system of HIV replication dynamics in vivo. 1st Annual q-bio Meeting, Honolulu, USA, February, 2013.
 - 2) Sato, K., Misawa, N., Satou, Y., Matsuoka, M., Ito, M., Koyanagi, Y.: HIV-1 Vpr accelerates viral replication by exploiting regulatory CD4⁺ T cells in humanized mice. 20th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections,

- Atlanta, USA, March, 2013.
- 3) Sato, K., Shibata, J., Izumi, T., Misawa, N., Kobayashi, T., Kimura, Y., Ito, M., Pathak, K.V., Koyanagi, Y.: Differential Impact of HIV-1 G-to-A Hypermutation Induced by APOBEC3G and APOBEC3F in vivo. Retroviruses Meeting Cold Spring Harbor, New York, USA. May, 2013.
 - 4) Sato, K. Dynamics of HIV-1 Infection in Humanized Mouse Model, 熊本大学エイズ学研究センターWYIS セミナー(招待講演), Kumamoto, 2013年7月.
 - 5) 佐藤佳. Distinct impact of HIV-1 G-to-A hypermutation induced by APOBEC3G and APOBEC3F in humanized mice, 第15回白馬シンポジウム, 名古屋, 2013年7月.
 - 6) 竹内(柴田)潤子, Perche, B., Migraine, J., Mercier-Delarue, S., Ponscarne, D., Simon, F., Clavel, F., Labrosse, B. High level of susceptibility to human TRIM5 α conferred by HIV-2 capsid sequences, 第15回白馬シンポジウム, 名古屋, 2013年7月.
 - 7) Koyanagi, Y. Intrinsic cellular defenses against retroviruses and DNA viruses. The 12th Awaji International Forum on Infection and Immunity (AIFII 12), Awaji, Japan. September, 2013.
 - 8) Sato, K., Takeuchi, J.S., Misawa, N., Izumi, T., Kobayashi, T., Kimura, Y., Iwami, S., Takaori-Kondo, A., Hu W.-S., Aihara, K., Ito, M., An, D.S., Pathak, K.V., Koyanagi, Y.: Restriction and diversification of HIV-1 mediated by APOBEC3-induced G-to-A mutation in humanized mouse model. 4th International Workshop on Humanized mice, Seoul, Korea. September 30-October 2, 2013.
 - 9) Kobayashi, T., Sato, K., Misawa, N., Yoshikawa, R., Shibata, J., Kanemura, Y., Fukuhara, M., Okamoto, M., Miyazawa, T., Yasunaga, J., Matsuoka, M., Aihara, K., An, D. S., Ito, M., and Koyanagi, Y.: Assessment of the pathogenic potential of simian retrovirus type 4 in humanized mice model, 4th International Workshop on Humanized Mice, Seoul, Korea, 2013年10月.
 - 10) 蝦名博貴. ゲノム編集技術による潜伏 HIV プロウイルスの制御と除去, 第3回ゲノム編集研究会, 広島. 2013年10月.
 - 11) Koyanagi, Y.: Strategy of disrupting latent form of HIV-1 proviral DNA, 14th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, October, 2013.
 - 12) Takeuchi, J. S., Sato, K., Iwami, S., Misawa, N., Kobayashi, T., Aihara, K., Koyanagi, Y.: Quantification of HIV cell-free and cell-to-cell transmissions based on experimental-mathematical investigations, 14th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, October, 2013.
 - 13) Koyanagi, Y. Misawa N., Sato K., Ebina H.: HIV strategy for acceleration of viral replication in vivo and eradication approach of HIV proviral DNA, Japan-Russia International Workshop, Kyoto, Japan. October, 2013.
 - 14) 小柳義夫, Gee Peter, 金村優香. 核酸代謝酵素 SAMHD1 による HSV-1 複製の抑制, 第60回日本ウイルス学会学術集会, 神戸. 2013年11月.
 - 15) 佐藤佳, 竹内(柴田)潤子, 三沢尚子, 泉泰輔, 小林朋子, 木村雄一, 岩見真吾, 高折晃史, Hu, W.-S., 合原一幸, 伊藤守, An, D. S., Pathak, V. K., 小柳義夫. 生体内 HIV-1 増殖過程における APOBEC3G, APOBEC3F 依存的 G A 変異のウイルス学的意義の解明, 第61回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 2013年11月.
 - 16) 竹内(柴田)潤子, 佐藤佳, 岩見真吾, 三沢尚子, 小林朋子, 合原一幸, 小柳義夫. HIV-1 感染における Cell-free 感染と Cell-to-cell 感染の定量的解析, 第61回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 2013年11月.
 - 17) 金村優香, Gee Peter, 蝦名博貴, Yoo Ji Seung, 藤田尚志, 小柳義夫 I型IFN発現制御における SAMHD1 の新規機能の解析 第61回日本ウイルス学会学術集会, 神戸. 2013年11月.
 - 18) Takeuchi, J. S., Sato, K., Iwami, S., Kobayashi, T., Aihara, K., Koyanagi, Y.: Quantification of HIV cell-free and cell-to-cell transmissions based on experimental-mathematical investigations, The 3rd International Symposium on Innovative Mathematical Modelling, Tokyo, 2013年11月.
 - 19) Kobayashi, T., Koizumi, Y., Misawa, N., Takeuchi, J. S., Aihara, K., Koyanagi, Y., Iwami, S., Sato, K.: Quantification of G-to-A Mutation-dependent and -independent Inhibition of HIV-1 Replication Mediated by APOBEC 3G/3F Based on Experimental-Mathematical Investigation, The 3rd International Symposium on Innovative Mathematical Modelling, Tokyo, 2013年11月.
 - 20) Iwami, S., Takeuchi, J. S., Sato, K., Aihara, K.: Quantification of cell-to-cell infection in cell

culture system, The 3rd International Symposium on Innovative Mathematical Modelling, Tokyo, 2013 年 11 月.

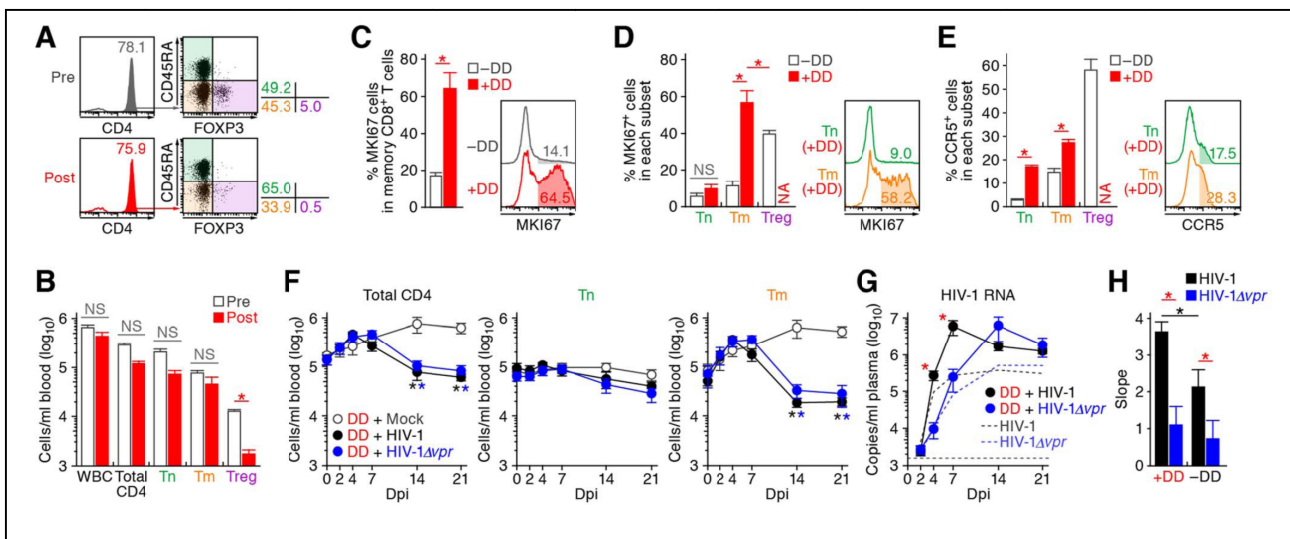
- 21) Nishimura, S.-I., Sato, K., Iwami, S., Aihara, K.: A Theoretical Model of CD4 T cell Migration and Cell-to-Cell Transmission of HIV Virus in Lymph Nodes, The 3rd International Symposium on Innovative Mathematical Modelling, Tokyo, 2013年11月.
- 22) Sato, K., Takeuchi, J. S., Izumi, T., Misawa, N., Iwami, S., Kobayashi, T., Kimura, Y., Pathak, V. K., Aihara, K., Koyanagi, Y.: Differential Impact of HIV-1 G-to-A Hypermutation Induced by APOBEC3G and APOBEC3F in vivo, The 3rd International Symposium on Innovative Mathematical Modelling, Tokyo, 2013 年 11 月.
- 23) 竹内(柴田)潤子, 佐藤佳, 三沢尚子, 泉泰輔, 小林朋子, 木村雄一, 岩見真吾, 高折晃史, Hu, W.-S., 合原一幸, 伊藤守, An, D. S., Pathak, V. K., 小柳義夫. HIV-1 感染ヒト化マウスモデルを用いた APOBEC3G/F の機能解析, 第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会, 熊本, 2013 年 11 月.
- 24) 蝦名博貴, 三沢尚子, 金村優香, 小柳義夫. ゲノム編集技術による潜伏 HIV プロウイルスの制御と除去, 第 27 回日本エイズ学会学術集会, 熊本. 2013 年 11 月.

- 25) 佐藤佳. エイズウイルス研究の最前線: これまでの研究とこれからの研究, 京都薬科大学セミナー(招待講演), 京都, 2013 年 11 月.
- 26) 佐藤佳. テトラスパニンタンパク質のウイルス粒子への取り込みによる HIV 感染性の制御, 第 36 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2013 年 12 月.
- 27) Ebina, H., Misawa, N., Kanemura, Y., Koyanagi, Y.: Development of the CRISPR/Cas9 system editing for latent HIV-1 provirus. 第 36 回日本分子生物学会年会, 神戸. 2013 年 12 月.
- 28) 金村優香, Peter Gee, 蝦名博貴, Yoo Ji Seung, 藤田尚志, 小柳義夫. Novel function of SAMHD1 to involve in regulation of type I interferon induction. 第36回日本分子生物学会年会, 神戸. 2013 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

図 1. Treg 枯渇による HIV-1 感染の促進。DD 投与後の A. PB 中の Treg の検出、B. DD 投与後の WBC 数、total CD4 細胞数、Tn 数、Tm 数、Treg 数、C. CD8⁺メモリー細胞内の MKi67 抗原陽性率、D. CD4 陽性 Tn, Tm, Treg 内の MKi67 抗原陽性率、E. Tn, Tm, Treg 表面の CCR5 の陽性率、F と G. Treg 枯渇 (DD+) と Treg 存在 (記入なし) 下における、HIV-1 の感染性。野生型のウイルス (HIV-1) と Vpr 欠損 (HIV-1 *vpr*) ウイルスをそれぞれ接種後の総 CD4 細胞数、Tn 数、Tm 数 (F)、そしてウイルス血症レベルをしめす (G)、H 接種後のウイルス血症ピークに達する上昇カーブ (H)。



T 細胞の活性化刺激と HIV 感染制御

研究分担者 田中勇悦 琉球大学大学院医学研究科 免疫学講座 教授

研究要旨：免疫応答における T 細胞の活性化は抗原による TCR の直接刺激の他に、種々の補助刺激分子の影響を受ける。HIV-1 の増殖も同じである。補助刺激分子として我々が注目している OX40 は、T 細胞上に活性化により発現が誘導され、そのリガンドである OX40L と反応することにより、T 細胞のサイトカイン産生を促進し、また T 細胞の寿命を延ばす役割がある。我々はこれまで、活性化した末梢血単核球 (PBMC) を組換え OX40L で刺激すると CCR5 結合性 ケモカインの産生が促進され、その結果 R5 HIV-1 の感染が抑制されることを明らかにした。このように OX40/OX40L を介する T 細胞の活性化は、将来、臨床の場でもその応用が期待される。そこで我々は、HTLV-I でトランスフォーム (HTLV-I⁺) した T 細胞株が OX40L を構成的に発現することに注目し、HTLV-I⁺ T 細胞株が活性化した自家 PBMC における R5 HIV-1 感染を OX40L 依存的に抑制することをここに検証した。種々のドナーにおいて自家 HTLV-I⁺ T 細胞株は容易に樹立し培養できることから、HTLV-I⁺ T 細胞株が自家 OX40L 源として利用できる可能性が示唆された。一方、新鮮 T 細胞の活性化を抑制する方法として今回新たに抗体による CXCR4 の架橋を見いだした。

A. 研究目的

腫瘍壊死因子 (TNF) 受容体ファミリーである OX40 は活性化 T 細胞に誘導され、その特異的リガンドである OX40L と反応することにより、免疫 T 細胞を補助刺激 (co-stimulation) する。その結果、T 細胞ではサイトカイン産生促進や T 細胞の延命が促される。我々は、活性化した末梢血単核球 (PBMC) を組換え OX40L で刺激することにより、CCR5 結合性 ケモカインである MIP-1、MIP-1 および RANTES の産生が促進され、CCR5 指向性 (R5) HIV-1 感染を制御することを報告した。今回、我々は、HTLV-I⁺ T 細胞株が OX40L を大量に発現し、R5 HIV-1 の感染を抑制することを検証した。一方、HIV-1 の増殖は慢性的な T 細胞の活性化に依存することから、今回、CXCR4 を標的とした T 細胞の活性化抑制法について検討した。

B. 研究方法

HTLV-I⁺ T 細胞株として、既存の MT-2 細胞、HTLV-I 感染ドナーから樹立した IL-2 依存性 T 細胞株 (ILT)-M1 および健常人 PBMC と HTLV-I⁺ T 細胞株との混合培養で新たに樹立した T 細胞株を用いた。OX40L または OX40 を安定に発現する遺伝子導入 CEM 細胞をコントロールとして用

いた。ビオチン化組換え OX40L および OX40 は市販品を購入し、PE-streptavidin と合わせて FCM 解析に用いた。HIV-1 感染では、OKT-3 抗体で 1 日活性化した PBMC に R5 または X4 HIV-1 を感染させ、OX40L を発現する自家 HTLV-I 不死化細胞 (予め 4% PFA で固定したもの) と混合培養し p24 産生を定量する p24 ELISA や p24 陽性細胞を染色する FCM でモニターした。CXCR4 に対する抗体は自家製の抗体を用い、新鮮 PBMC の活性化培養に添加してその効果を判定した。(倫理面への配慮)

健常人の PBMC 使用実験は倫理委員会で承認され、また、遺伝子組換え生物等使用実験と動物実験も琉大で承認されている。

C. 研究結果

(1) HTLV-I 感染 T 細胞株は、調べた全てのドナーの株において機能的な OX40L を発現した。同時に発現する OX40 は、内在性の OX40L で飽和されて機能的ではないことが示唆された。

(2) HTLV-I⁺ T 細胞株は、組換え OX40L と同様に、活性化自家 PBMC の R5 HIV-1 の感染を ケモカイン依存性に強く抑制した。しかし、X4 HIV-1 感染は全く阻害しなかった。

(3) 4 種類の抗 CXCR4 抗体の内、CXCR4 使用

HIV-1 の感染を阻止する一種類の抗体は新鮮 PBMC の OKT-3 抗体による T 細胞の活性化を有意に阻害した。

D. 考察

種々の細胞における OX40L の発現は限定的であり、また、OX40L だけを発現する組換え OX40L が未だ作製されていないことから、前年度より HTLV-I⁺T 細胞株が OX40L を大量に発現することに着目し、自家 HTLV-I⁺T 細胞株が OX40L のソースとして使えないかを検討し、本年度にその有用性を証明した。in vitro の系であるが、パラフォルムアルデヒド (PFA) で不活化した自家 HTLV-I⁺T 細胞株が OX40L を介する刺激を活性化 T 細胞に入れることにより、T 細胞からのケモカインの産生を誘導し、R5 HIV-1 を選択的に抑制することを明らかにした。OX40L の OX40 刺激活性は、OX40 モノマーよりも OX40 オリゴマーの方が優れることが報告されているが、HTLV-I⁺T 細胞株表面に発現された OX40L はより密度が高く配置されることが推測され、単量体や多量体の OX40L に勝ると期待できる。

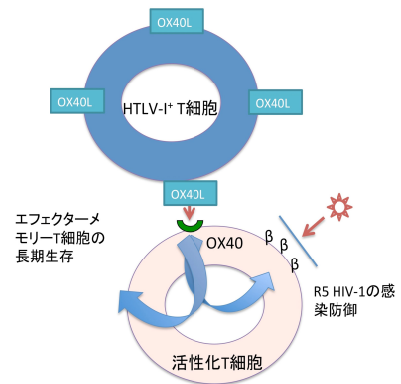
さらに、OX40L はワクチンによる T 細胞免疫を促進する活性もあるので、今後のエイズ予防ワクチン戦略への候補としてさらに研究を進めたい。

これと対照的に T 細胞の活性化は CXCR4 のエピトープ依存性架橋により抑制できることを見いだした。そのメカニズムと応用について明らかにするのは次年度の課題である。

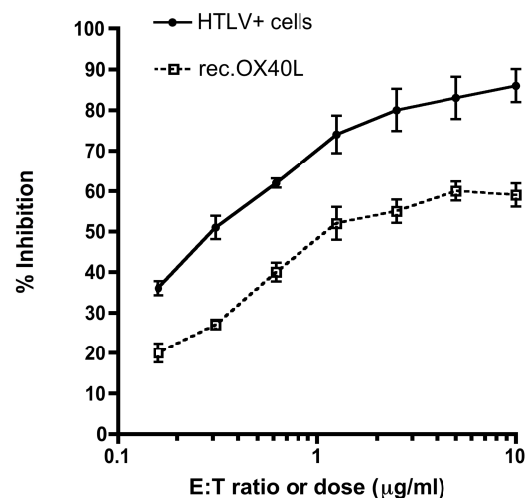
E. 結論

HTLV-I で不死化した自家 T 細胞株は細胞表面に大量の機能的 OX40L を発現し、その OX40L による活性化 T 細胞への刺激は、ケモカイン産生を促進させ R5 HIV-1 感染を抑制する (図 1 & 2)。また、CXCR4 は新たな免疫抑制法の標的となる可能性がある。

HTLV-I 感染自家 T 細胞の OX40L を介する免疫促進と R5 HIV-1 感染制御



(図 1) OX40 を介する HIV-1 制御



(図 2) HTLV-I⁺T 細胞株による R5 HIV-1 抑制

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) Kasahara D, Takara A, Takahashi Y, Kodama A, Tanaka R, Ansari AA, Tanaka Y. Natural OX40L expressed on human T cell leukemia virus type-I-immortalized T cell lines interferes with infection of activated peripheral blood mononuclear cells by CCR5-utilizing human immunodeficiency virus. *Virology*. 2013 10:338.
2. 学会発表
 - 1) 田中 勇悦, 田中 礼子: CXCR4 架橋による

HIV-1感染とT細胞活性化の抑制 第27回
日本エイズ学会学術集会・総会 熊本
(2013.11.20)

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

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
無し							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yamashita, Y., Hoshino, Y., Oka, M., Matsumoto, S., Ariga, H., Nagai, H., Makino, M., Ariyoshi, K., <u>Tsunetsugu-Yokota, Y.</u>	Multicolor flow cytometric analyses of CD4 ⁺ T cell responses to Mycobacterium tuberculosis-related latent antigens.	Jpn.J.Infect.Dis.	3	207-215	2013
<u>Tsunetsugu-Yokota, Y</u> 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
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., <u>Tsunetsugu-Yokota, Y.</u>	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
Nomaguchi, M., Miyake,A., Doi, N., Fujiwara, S., Miyazaki, Y., <u>Tsunetsugu-Yokota, Y.</u> , 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

Koyama, T., Sun, B., <u>Tokunaga, K.</u> , Tatsumi, M., and Ishizaka, Y.	DNA damage aids HIV-1 infection of macrophages by overcoming integrase inhibition.	Retrovirology	10	21	2013
Chutiwitoonchai, N., Hiyoshi, M., Hiyoshi-Yoshidomi, Y., Hashimoto, M., <u>Tokunaga, K.</u> , and Suzu, S.	Characteristics of IFITM, the newly identified IFN-inducible anti-HIV-1 family proteins.	Microbes Infect.	15	280-90	2013
Fujita, H., Iwabu, Y., <u>Tokunaga, K.</u> (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	2798-809	2013
Tada, T., Kadoki, M., Liu, Y., <u>Tokunaga, K.</u> (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
Koyama, T., Arias, J.F., Iwabu, Y., Yokoyama, M., Fujita, H., Sato, H., and <u>Tokunaga, K</u> (corresponding author).	APOBEC3G oligomerization is associated with the inhibition of both Alu and LINE-1 retrotransposition.	PLOS ONE	8	e84228	2013
Kasahara D, Takara A, Takahashi Y, Kodama A, Tanaka R, Ansari AA, <u>Tanaka Y.</u>	Natural OX40L expressed on human T cell leukemia virus type-I-immortalized T cell lines interferes with infection of activated peripheral blood mononuclear cells by CCR5-utilizing human immunodeficiency virus.	Virol. J.	10	338	2013

Sato, K., Misawa, N., Iwami, S., Satou, Y., Matsuoka, M., Ishizaka, Y., Ito, M., Aihara, K., An, D.S., and <u>Koyanagi, Y.</u>	HIV-1 Vpr accelerates viral replication during acute infection by exploitation of proliferating CD4 ⁺ T cells in vivo.	PLOS Pathogens	9	e1003812	2013
Ogawa, Y., Kawamura, T., Matsuzawa, T., Aoki, R., Gee, P., Yamashita, A., Moriishi, K., Yamasaki, K., <u>Koyanagi, Y.</u> , Blauvelt, A., and Shimada, S.	Antimicrobial peptide LL-37 produced by HSV-2-infected keratinocytes enhances HIV infection of Langerhans cells.	Cell Host Microbe.	13	77-86	2013
Hollenbaugh, J.A., Gee, P., Baker, J., Daly, M.B., Amie, S., Kasai, N., Kanemura, Y., Ward, B.M., <u>Koyanagi, Y.</u> , and Kim, B.	Host factor SAMHD1 restricts DNA viruses in non-dividing myeloid cells.	PLOS Pathogens	9	e1003481	2013
Ebina, H., Misawa, N., Kanemura, Y., and <u>Koyanagi, Y.</u>	Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus.	Scientific Reports	3	2510	2013
Shi S, Seki S, Matano T, <u>Yamamoto H.</u>	IL-21-producer CD4 ⁺ T cell kinetics during primary simian immunodeficiency virus infection	Microbes Infect.	15	697-707	2013
Nakane T, Nomura T, Shi S, Nakamura M, Naruse TK, Kimura A, Matano T, <u>Yamamoto H.</u>	Limited impact of passive non-neutralizing antibody immunization in acute SIV infection on viremia control in rhesus macaques	PLOS ONE	8	e73453	2013
Iwamoto N, Takahashi N, Seki Sm Nomura T, <u>Yamamoto H.</u> , Inoue M, Shu T, Naruse TK, Kimura A, Matano T.	Control of simian immunodeficiency virus replication by vaccine-induced Gag- and Vif-specific CD8 ⁺ T cells.	J. Virol.	88	425-433	2014

Oue, M., Sakabe, S., Horiike, M., Yasui, M., Miura, T., and <u>Igarashi, T.</u>	No viral evolution in the lymph nodes of SIV-infected rhesus macaques during combined antiretroviral therapy.	J. Virol.	87	4789-4793	2013
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., <u>Igarashi, T.</u> , 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	11447-11461	2013
Otsuki, H., Hishiki, T., Miura, T., Hashimoto, C., Narumi, T., Tamamura, H., Yoshimura, K., Matsushita, S., and <u>Igarashi, T.</u>	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	2710-2716	2013
Hashimoto, C., Narumi, T., Otsuki, H., Hirota, Y., Arai, H., Yoshimura, K., Harada, S., Ohashi, N., Nomura, W., Miura, T., <u>Igarashi, T.</u> , Matsushita, S., and Tamamura, H.	A CD4 mimic as an HIV entry inhibitor: Pharmacokinetics.	Bioorg. Med. Chem.	21	7884-7889	2013
Mwimanzi P, Markle TJ, Ogata Y, Martin E, Tokunaga M, Mahiti M, Kuang XT, Walker BD, Brockman MA, Brumme ZL, <u>Ueno T.</u>	Dynamic range of Nef functions in chronic HIV-1 infection.	Virology	439	74-80	2013

Motozono C, Miles JJ, Hasan Z, Gatanaga H, Meribe SC, Price DA, Oka S, Sewell AK, <u>Ueno T.</u>	CD8+ T cell cross-reactivity profiles and HIV-1 immune escape towards an HLA-B35-restricted immunodominant Nef epitope.	PLOS ONE	8	e66152	2013
Motozono C, Yokoyama M, Sato H, <u>Ueno T.</u>	Cross-reactivity analysis of T cell receptors specific for overlapping HIV-1 Nef epitopes of different lengths	Microbes Infect.	in press		2014