

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21084

研究課題名(和文) エイズウイルスの経路依存的な新規細胞侵入機構と薬剤耐性との関連性

研究課題名(英文) Relationship between HIV entry pathway and drug resistance

研究代表者

志村 和也 (SHIMURA, KAZUYA)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・助教

研究者番号：90613836

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、临床上問題となっている潜伏感染細胞に着目し、再活性化潜伏感染細胞からの感染伝播における抗HIV薬の活性評価を行った。潜伏感染モデル細胞は、複製可能な蛍光HIVの感染性クローンJurkat細胞を導入して樹立した。BRD4阻害剤であるJQ-1によりT細胞活性化を伴わない再活性化が認められ、同時に感染性HIVの産生が認められた。再活性化潜伏感染モデル細胞をドナーとした細胞間感染では、核酸系逆転写酵素阻害薬の活性低下が顕著であった。しかしながら、プロテアーゼ阻害薬や非核酸系逆転写酵素阻害薬は、再活性化潜伏感染細胞からの感染拡大に対して有効性を示した。

研究成果の概要(英文)：HIV-1 infects target cells more efficiently via the cell-to-cell route, compared to the cell-free route. We have developed an assay system, which enabled the precise evaluation of virus infection. Using this system, we revealed that several anti-HIV drugs showed a decreased level of activity in the cell-to-cell pathway. In order to gain deeper insight into their importance on latently-infected cells, we established latent HIV-1-infected cells, which can produce replication-competent viruses upon reactivation. Among several agents, we tested JQ-1, a BRD4 inhibitor, which efficiently reactivated and induced HIV-1 production from the cells. Moreover, we observed that HIV-1 transmission from reactivated cells to uninfected target cells was less susceptible to antiviral drugs such as the ones targeting reverse transcription. These observations indicate that the infection pathway is one of the important factors controlling the expansion of infection from latent infected cells.

研究分野：ウイルス感染症

キーワード：HIV

1. 研究開始当初の背景

ヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus: HIV) が主標的細胞である CD4 陽性 T リンパ球へ感染する様式は、細胞外環境中の遊離ウイルス粒子が関与するセルフリー感染系と、ウイルスシナプス形成を特徴とする細胞-細胞間でのウイルス伝搬による細胞間感染系に大別される。HIV-1 の感染効率は両経路間で異なり、細胞間感染系ではより多くのウイルス粒子が標的細胞に伝搬される。近年、細胞間感染系においては、抗 HIV 薬存在下でのウイルス複製が報告され、これが間欠的なウイルス産生の主体である可能性が示唆されている。

一方で、HIV 感染者におけるウイルス複製の持続的コントロールが高活性抗 HIV 薬により可能となったが、潜伏感染細胞が体内に生存し続ける限り、終生にわたる服薬が必要である。この潜伏感染細胞を体内から排除するために、潜伏感染細胞を種々の薬剤で再活性化し、細胞変性効果あるいは CTL による排除を介してリザーバーサイズを減少させる目的で、近年様々な手段が検討されているが、未だに効果的な方法は未確立である。しかしながら、再活性化に伴う感染性ウイルスの産生も当然起こりうることから、再活性化潜伏感染細胞からの感染伝播についても留意する必要がある。

2. 研究の目的

本研究課題では、HIV の感染経路の違いが薬剤感受性やウイルス感染動態に与える影響を主眼に解析を行い、得られた成果からレトロウイルスの感染・複製機構の詳細な解明を図る。

また、潜伏感染細胞の効率的な再活性化刺激とそのメカニズム、また、再活性化時における感染伝播に対してウイルス感染経路の役割を明らかにするとともに、それに対して有効な薬剤を明らかにする。

3. 研究の方法

ウイルス感染経路別の HIV 感染率の評価はこれまでに確立した手法に従って行った。すなわち、セルフリー感染では、ウイルス粒子を

標的細胞である MT-4 細胞に感染させ、48 時間後にフローサイトメーターによりマーカータンパク質 (blue fluorescent protein: BFP) の発現率を定量した。細胞間感染では、T 細胞株である Jurkat 細胞に感染性クローンを導入し、MT-4 細胞と共培養し、30 時間後に標的細胞中の BFP 発現率を定量した。

HIV 潜伏感染モデル細胞は、BFP 遺伝子を有する複製可能な HIV-1 感染性クローンを Jurkat 細胞に導入し、限外希釈法により樹立した。

プロウイルスの解析については、インバース PCR およびシーケンスにより組込み部位の同定を行った。リアルタイム Alu-PCR によりコピー数の定量を行った。

潜伏感染細胞を用いた細胞間感染系の評価は、再活性化時および MT-4 細胞との共培養時に抗 HIV 薬を加え、標的細胞における BFP 発現率をもって、感染伝播能とした。

潜伏感染細胞の再活性化は、各種薬剤を所定の濃度で 24 時間あるいは 48 時間反応させた後、フローサイトメトリーによるマーカータンパク質の発現、ウイルス抗原に対する ELISA、あるいはレポーター細胞による感染性ウイルス粒子の産生能をそれぞれ定量し、再活性化の程度を評価した。

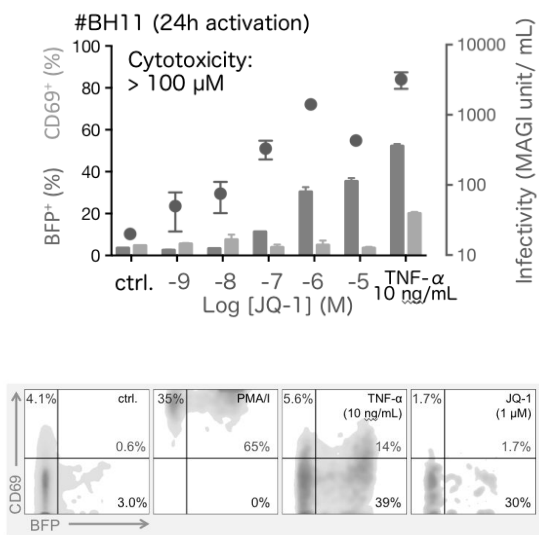
4. 研究成果

我々は、セルフリー感染と細胞間感染を区別して HIV-1 の感染率を定量可能な系をすでに樹立している。この評価系を用いて解析した結果、吸着、融合、逆転写、ならびにインテグレーションの各複製ステップを標的とする抗 HIV 薬は、セルフリー感染と比べて、急性感染の細胞間感染において低活性を示しており、特に、核酸系逆転写酵素阻害薬においてこの現象は顕著であった。この結果から、HIV-1 の感染経路は、薬剤耐性変異と同様に、抗 HIV 薬の感受性に影響を及ぼす因子の一つであることを明らかにした。

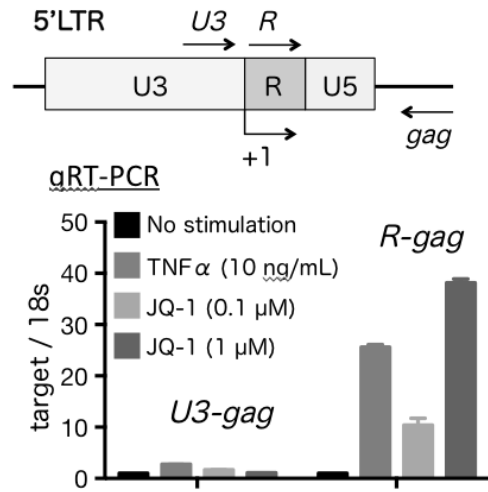
そこで、感染経路の違いにおける感染動態をより詳細に解析するために、エンベロップ遺伝子欠損感染性クローンとエンベロップ発現ベクターを様々な割合で導入した細胞をドナーとし、ターゲット細胞への感染伝達

能を比較した。その結果、セルフリー感染系ならびに細胞間感染系において、エンベロープ発現ベクターの増量に伴い感染伝達能は一過的に亢進し、さらに増量させていくと逆に感染伝達能は減弱した。また、両感染経路の感染効率における最適エンベロープ量を比較すると、細胞間感染系では、より少ないエンベロープ量で十分な感染を引き起こした。

つづいて、これらの現象を現在臨床上問題となっている潜伏感染細胞で評価するため、潜伏感染モデル細胞を樹立した。多数の得られたクローンの中には、TNF- 刺激により、マーカータンパク質である BFP を発現するが感染性ウイルスの産生を伴わないものや、BFP 発現と共にウイルスを産生するものがあった。また BFP 発現の強度はクローン間で多様であった。これはおそらくウイルス遺伝子の組み込み部位の違いや、逆転写反応時における HIV 遺伝子の欠損などが原因と考えられる。従って、今回樹立した HIV-1 潜伏感染モデル細胞のクローンの中から、定常状態では低 BFP 発現強度（潜伏状態）でありながら、TNF- の刺激によりその発現が強く誘導され、かつ感染性ウイルス粒子の産生を引き起こす（再活性化状態）クローンを選抜して評価系を構築した。解析に用いた潜伏感染モデル細胞クローン BH11 は、インバース PCR 法および定量 PCR 法により、1 コピーのプロウイルスを有していた。



続いて、HIV-1 潜伏感染モデル細胞を用い



て、種々の再活性化試薬の効果を検討した。PMA/イオノマイシン処理では、約7割の細胞でBFPの発現が誘導されたが、同時にT細胞活性化の指標であるCD69分子の発現もすべての細胞において認められた。一方で、プロモドメインタンパク質BRD4阻害剤であるJQ-1では、T細胞活性化を伴わない効果的なBFP発現誘導が約3割の細胞で認められた。また、JQ-1の濃度依存的に、BFP発現細胞の割合とウイルス産生能が増加した。さらには、リアルタイムRT-PCR法により、JQ-1がHIV-1 5' LTRのR領域からの転写を数十倍選択的に誘導することを明らかにした。

また、JQ-1は、BRD4以外にもBRD2やBRD3も阻害することが報告されているため、BRD4が再活性化に直接関与しているかどうかを解析した。BRD4に対するshRNAを導入したBH11細胞では、コントロールshRNAを導入したBH11細胞よりもJQ-1処理により高いBFP発現誘導が認められた。さらには、BRD4 shRNA導入細胞では、Annexin-V陽性細胞が増加していた。以上のことから、JQ-1による再活性化においては、BRD4の阻害が中心的なメカニズムであると考えられた。

一方で、BRD4以外のプロモドメインタンパク質も再活性化の標的分子となりうるかどうかを明らかにするために、各種のプロモドメインタンパク質阻害化合物の再活性化誘導能を評価した。その結果、いくつかのプロモドメインタンパク質では、HIV-1の潜伏化あるいは再活性化との関係性を示唆する結果を得ており、JQ-1との間に相乗効果が認められた。これらの結果は、潜伏感染細胞にお

ける再活性化機構のより詳細な機序の解明とともに、効率的な再活性化誘導法の確立につながると期待される。

また、JQ-1 で処理した潜伏感染モデル細胞からの細胞間感染を介した感染拡大の評価を行った。これまでに急性感染モデルで得られた結果と同様に、核酸系逆転写酵素阻害薬の抗 HIV 活性は低下していた。一方で、プロテアーゼ阻害薬は、再活性化潜伏感染モデル細胞からの細胞間感染を、セルフリー感染と同程度抑制した。さらに詳細な解析の結果、潜伏感染モデル細胞の再活性化時のみのプロテアーゼ阻害薬処理により、感染性の低減が認められた。

さらに解析を進めた結果、高活性非核酸系逆転写酵素阻害薬であるエファビレンツ (efavirenz: EFV) やエトラピリン (etravirine: ETV) は、JQ-1 で処理した再活性化潜伏感染細胞からの細胞間感染において、感染伝達能の低減を引き起こした。抗 HIV 活性が比較的弱い非核酸系逆転写酵素阻害薬であるネビラピン (nevirapine: NVP) では、感染伝達能の抑制効果は認められなかったことから、この現象は非核酸系逆転写酵素阻害薬の抗 HIV 活性に依存していると考えられた。これらの結果から、高活性非核酸系逆転写酵素阻害薬は、再活性化潜伏感染細胞に直接作用して感染伝播を阻害していると考えられる。再活性化潜伏感染細胞における蛍光マーカータンパク質の発現には影響を与えなかったことから、潜伏感染細胞内で gag-pol ポリタンパク質の異常なプロセッシングを誘導することにより、感染性ウイルス粒子の産生を阻害している機序が推測された。

以上の結果は、活性化により潜伏感染細胞から多数のウイルスが細胞間感染で伝達されたと考えられ、潜伏感染細胞からの感染拡大における感染伝達様式の重要性が明らかとなった。この再活性化潜伏感染細胞からの感染伝播に対して特に効果を示す治療法の確立が重要であると思われる。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計4件)

1. Alam M, Kuwata T, Shimura K, Yokoyama M, Ramirez Valdez KP, Tanaka K, Maruta Y, Oishi S, Fujii N, Sato H, Matsuoka M, Matsushita S. Enhanced antibody-mediated neutralization of HIV-1 variants that are resistant to fusion inhibitors. *Retrovirology*. 査読あり, 13(1):70, 2016
doi: 10.1186/s12977-016-0304-7
2. Shimura K, Miyazato P, Oishi S, Fujii N, Matsuoka M. Impact of HIV-1 infection pathways on susceptibility to antiviral drugs and on virus spread. *Virology*. 査読あり, 484:364-76, 2015
doi: 10.1016/j.virol.2015.06.029.
3. Okazaki S, Oishi S, Mizuhara T, Shimura K, Murayama H, Ohno H, Matsuoka M, Fujii N. Investigations of possible prodrug structures for 2-(2-mercaptophenyl)tetrahydropyrimidines: reductive conversion from anti-HIV agents with pyrimidobenzothiazine and isothiazolopyrimidine scaffolds. *Org Biomol Chem*. 査読あり, 13(16):4706-13, 2015
doi: 10.1039/c5ob00301f.
4. Okazaki S, Mizuhara T, Shimura K, Murayama H, Ohno H, Oishi S, Matsuoka M, Fujii N. Identification of anti-HIV agents with a novel benzo[4,5]isothiazolo[2,3-a]pyrimidine scaffold. *Bioorg Med Chem*. 査読あり, 23(7):1447-52, 2015
doi: 10.1016/j.bmc.2015.02.015.

〔学会発表〕(計2件)

1. 志村和也、松岡雅雄、HIV-1 潜伏感染モデル細胞を用いた再活性化誘導の機序解析、第31回日本エイズ学会学術集会、2017年11月24日-26日、東京
2. 志村和也、松岡雅雄、蛍光 HIV 潜伏感染モデル細胞を用いた活性化誘導と抗 HIV 薬活性の評価、第30回日本エイズ学会学術集会、2016年11月24日-26日、鹿児島

〔その他〕

ホームページ等

研究室ホームページ:

http://www.infront.kyoto-u.ac.jp/ex_ivr/Lab/VirusControl/

6 . 研究組織

(1)研究代表者

志村 和也 (SHIMURA Kazuya)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・助教

研究者番号： 9 0 6 1 3 8 3 6