

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 10 日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07080

研究課題名(和文) HIV-1潜伏感染成立におけるCOMMD1の機能解明

研究課題名(英文) Elucidation of COMMD1 effect in HIV-1 latent infection establishment

研究代表者

工藤 恵理子 (Kudo, Eriko)

熊本大学・エイズ学研究センター・特定事業研究員

研究者番号：00779176

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：HIV-1宿主因子における機能は、全て初回感染における検討であり、潜伏感染成立における機能は未だ不明である。ドキシサイクリン誘導性COMMD1細胞株において、初回感染におけるHIV-1の複製抑制、さらに宿主ゲノム内のHIV-1ゲノム量が減少していた。しかし、長期培養および再活性化において潜伏感染成立における影響は認められなかった。また、MyeloidおよびLymphoidにおけるプロモーター活性は転写開始位置から上流1 kbpまでは同程度であった。従って、COMMD1における潜伏感染の成立への関与は認められず、Myeloidにおける発現誘導はさらに上流における制御であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The effect of HIV-1 host factors has identified in primary infection. However, the effect in latent infection establishment is unknown. COMMD1 inducible cell line suppressed HIV-1 replication and decreased integrated HIV-1 genome. HIV-1 latently infection establishment and reactivation effect were similar between COMMD1 high and low expressed cells. Moreover, -1kbp COMMD1 promoter construct has highest activity in both myeloid and lymphoid cells. Therefore, this study indicates that COMMD1 doesn't have effect for HIV-1 latent infection establishment and transcriptional regulation in myeloid cells was regulated in a further upstream.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HIV-1 HIV-1宿主因子 潜伏感染 COMMD1 転写制御

1. 研究開始当初の背景

HIV-1 は、主に CD4 陽性 T 細胞に感染することで免疫不全を引き起こし、日和見感染症等の発症により死に至る最も重篤な感染症の一つである。有効な治療法 cART (combination antiretroviral therapy) が確立され、生命予後の優れた改善は得られたものの、今日においても根治には至っていない。その要因として HIV-1 の有する高度な変異性に加え、潜伏感染が挙げられる。cART に用いられる薬剤は、薬剤耐性ウイルスおよび潜伏感染細胞には全く奏効しない。これまで潜伏感染成立機構として、ウイルス遺伝子の変異獲得やエピジェネティクスな遺伝子抑制が報告されている (*J Virol*, 1998; *EMBO J*, 2006)。

しかし、潜伏感染細胞と未感染細胞(親株)における比較検討はなされておらず、HIV-1 潜伏感染細胞選択的治療法の確立のためには、これらの細胞での詳細な比較検討が必要である。特に NF- κ B は、HIV-1 初回感染および潜伏感染からの再活性時において HIV-1 の転写誘導を担う重要な宿主転写因子である。しかし、潜伏感染において HIV-1 LTR(Long terminal repeat)上の NF- κ B 結合部位への変異誘導および NF- κ B タンパク質へのヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)の結合による HIV-1 遺伝子の転写抑制が報告されている。これまでに我々は潜伏感染細胞と親株での比較検討において Myeloid の HIV-1 潜伏感染細胞(U1, OM10.1)において I κ B- α タンパク質の発現および安定性が親株と比較して増加していた。その分子機構として HIV-1 宿主因子 COMMD1 による I κ B- α タンパク質のプロテアソームを介した分解抑制であることが明らかになった。さらに、COMMD1 の発現増加は HIV-1 潜伏感染の維持を増強することを明らかにした。これまで、HIV-1 宿主因子として初回感染において抗 HIV-1 機能を有する一方で、潜伏感染におい

ては維持を増強させていることが明らかになった。しかし、未だ潜伏感染細胞における発現誘導機構および初回感染から潜伏感染成立に至る過程における役割など不明な点が多い。

2. 研究の目的

HIV-1 宿主因子の研究は、初回感染における機能・効果を検討したものであり、潜伏感染および潜伏感染成立における機能・効果は全く明らかにされていない。本研究では、HIV-1 潜伏感染成立に至るまでの過程における COMMD1 の機能を明らかにする。また、Myeloid の潜伏感染細胞において COMMD1 発現誘導を解明するために、COMMD1 の転写発現制御機構の解明を行う。

3. 研究の方法

(1) Tet システムを用いた COMMD1 発現細胞株の樹立および性質の検討

未だ生理的な COMMD1 の発現誘導は明らかにされていないため、U937 細胞に Tet-on システムを導入したクローン細胞を樹立する。さらに、ドキシサイクリン(Dox) 応答性や細胞増殖能、HIV-1 感染受容体(CD4, CXCR4, CCR5)の発現量を検討する。

(2) HIV-1 感染における COMMD1 の潜伏感染成立への影響を検討

樹立したクローン細胞を用いて、HIV-1 を感染させ、感染 1 日後に Dox により COMMD1 の発現誘導を行う。また、1 週間から 1 ヶ月の継時的な観察により感染効率の検討、さらに、TNF- α や PMA を用いた再活性化の検討を行う。宿主ゲノムに組み込まれた HIV-1 ゲノム量を検討する。

(3) Myeloid 細胞における COMMD1 の発現誘導の検討

これまでにクローニングにより作製した COMMD1 プロモーターコンストラクトを U937, Jurkat, U1, J1.1 細胞に遺伝子導入

し、Myeloid 系および Lymphoid 系細胞におけるプロモーター活性を検討する。また *in silico* 解析により細胞種特異的な転写因子結合部位の解析を行う。

4. 研究成果

(1) COMMD1 cDNA を挿入した Tet-on システムを U937 細胞に遺伝子導入し、limiting dilution 法を用いて Dox 誘導性 COMMD1 発現 U937 細胞株を 4 つ樹立した (COMMD1-U937)。それぞれのクローン細胞の Dox に対する応答を検討した結果、100ng/ml および 48 時間処理で最も高い発現誘導が得られた。Dox による発現誘導は 96 時間まで維持できていた。COMMD1-U937 細胞および親株と比較して、細胞増殖率および HIV-1 感染受容体の発現量に顕著な相違は認められず、クローン細胞樹立における影響なかった。以上より、長期感染実験では、3 日毎に 100ng/ml の Dox が適切であると示唆された。

(2) 全ての COMMD1-U937 細胞は HIV-1 に対して高い感染効率を示したが、親株 U937 細胞に比べて低い傾向にあった。初回感染において COMMD1 発現細胞において HIV-1 の転写および複製を抑制しており、この結果は以前の報告 (*Nature*, 2003) と同様の結果であった。HIV-1 潜伏感染成立における COMMD1 の役割を検討するために、HIV-1 を感染させ感染率および潜伏感染細胞の検出を行なった。COMMD1 発現誘導させた細胞において HIV-1 の複製を抑制していたが、長期培養によりその効果は認められなくなった。宿主ゲノムに組み込まれた HIV-1 ゲノム量は、COMMD1 発現細胞においてわずかに減少していた。さらに、感染後 1 週間および 1 ヶ月後に TNF- α または PMA により再活性化を誘導したが、Dox 未処理および処理群において同程度であった。従って、本実験より COMMD1 発現は、HIV-1 初回感染を抑制

し、組み込まれた HIV-1 ゲノム量を減少させたが、潜伏感染を誘導しなかった。

(3) U937, U1, Jurkat, J1.1 に COMMD1 プロモーターコンストラクトを遺伝子導入し、プロモーター活性を検討した。転写開始位置から上流 1kbp におけるプロモーター活性は、-1kbp のコンストラクトにおいて最も高い活性となったが、細胞種特異的および HIV-1 感染細胞特異的なプロモーター活性の相違は認められなかった。

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 3 件)

Goto H, Kariya R, Kudo E, Okuno Y, Ueda K, Katano H, Okada S. "Restoring PU.1 induces apoptosis and modulates viral transactivation via interferon-stimulated genes in primary effusion lymphoma." *Oncogene*, 36(37):pp5252-5262. 2017. [査読有]

Masud Alam M, Kariya R, Kawaguchi A, Matsuda K, Kudo E, Okada S. "Inhibition of autophagy by chloroquine induces apoptosis in primary effusion lymphoma in vitro and in vivo through induction of endoplasmic reticulum stress." *Apoptosis*, 21(10):pp1191-1201. 2016. [査読有]

Vaeteewoottacharn K, Kariya R, Dana P, Fujikawa S, Matsuda K, Ohkuma K, Kudo E, Kraiklang R, Wongkham C, Wongkham S, Okada S. "Inhibition of carbonic anhydrase potentiates bevacizumab treatment in cholangiocarcinoma." *Tumour Biol.*, 37(7):pp9023-9035. 2016. [査読有]

〔学会発表〕(計 1件)

Kudo E, Taura M, Okada S. “The transcriptional regulation of COMMD1, HIV-1 latency maintaining factor, by Sp1” 第 64 回日本ウイルス学会学術集会 (札幌, 10/23-25, 2016) [査読有]

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

工藤 恵理子 (KUDO, Eriko)

熊本大学・エイズ学研究センター・特定事業

研究員

研究者番号: 00779176

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

()

研究者番号 :

(4)研究協力者

()