

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09938

研究課題名(和文) CXCR4利用性HIV-1の維持・淘汰に関わる宿主側・ウイルス側因子の多面的解析

研究課題名(英文) Analyses of viral and host factors involved in the maintenance of CXCR-using HIV-1

研究代表者

前田 洋助 (Maeda, Yosuke)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・准教授

研究者番号：30284764

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：AIDSの原因ウイルスであるHIV-1にはCCR5を使用して感染するR5ウイルスとCXCR4を使用して感染するX4ウイルスが存在するが、一般に感染初期から中期にかけてはR5が主要なウイルスで、感染後期のAIDS発症とともにX4へとウイルスがスイッチすることが知られている。本研究ではこのようなスイッチがなぜおこるかについて研究を行い、ウイルスがスイッチするのではなく、R5とX4の両者が同一の感染者の中で維持されていて、感染の後期まではR5ウイルスがメジャーであったものが、AIDSの発症期にはR5ウイルスを凌駕してX4ウイルスが増殖してくる可能性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HIV-1にはR5とX4と呼ばれる2種類のウイルスが存在しており、R5ウイルスは人から人への伝搬に関与し、X4ウイルスはAIDS発症に関連するウイルスであると考えられている。本研究はこのようなウイルスの変異がなぜ感染末期におこるのかを明らかにした。このことはこれら2種類のウイルスの性質の違いがAIDS発症に関わっていることを示しており、AIDS発症予防の戦略に対する基礎的な情報となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：HIV-1 has two phenotypes which are using CCR5 called R5, or CXCR4 called X4 for its entry, respectively. It is well known that R5 virus is dominant throughout of the infection, while X4 virus emerges at late stage of infection, and associated with disease progression. This study suggested that HIV-1 is not switched from R5 to X4 virus, but both viruses are maintained in the same individuals. Although X4 virus replication is restricted in early stage of infection, X4 virus would be emerged by overcoming the replication of R5 virus at late stage of infection.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HIV-1 コレセプター CCR5 CXCR4 AIDS

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

HIV-1はコレセプターとしてCCR5を使用して細胞内に侵入するR5ウイルス、CXCR4を使用するX4、両者を使用するR5X4に分類され、HIV-1の感染はR5ウイルスによって媒介され、その後R5ウイルスが主要なウイルスとして持続感染を起こしていることが知られている。しかしながら病態の悪化とともに約半数の症例でCXCR4を使用するR5X4からX4ウイルスにスイッチしていくことが知られている。しかしながらこれらは欧米で流行しているサブタイプBでの研究の成果であり、東南アジアで流行しているCRF01_AE(サブタイプAE)で同じような現象が観察されるかどうかについてはあまり多くの研究がなされていないのが実情であった。また、どのような機序でこのようなスイッチがおこるかについては不明であった。

2. 研究の目的

本研究では東南アジアで流行しているCRF01_AEのコレセプター利用性に焦点をあて、そのコレセプター利用性のウイルス学的特徴について解析を行うとともに、CCR5を標的とした治療法であるマラビロクの使用がこれらの地域で可能かどうかを検証することを目的とした。

また欧米では主要なウイルスとして知られているサブタイプBウイルスで観察される、コレセプターのCCR5からCXCR4へのスイッチがCRF01_AEでも同様におこるのかどうかについて確認するとともに、CXCR4へのコレセプター利用性のスイッチの機序についても明らかにする。本研究では特にCRF01_AEの頻度が特に高いハノイを中心とした地域のHIV-1感染者に流布しているHIV-1のコレセプター利用性の特徴を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

ハノイのNHTD(ベトナム国立熱帯病病院)に来院した未治療のHIV-1感染者の血漿からウイルスRNAを抽出し、コレセプター利用性を決定しているHIV-1 gp120のV3領域をPCRで増幅して、そのアミノ酸配列を決定し、これらのV3アミノ酸を有する組換えウイルスを作製して、それぞれの感染者に存在しているHIV-1のコレセプター利用性を決定する。一方で血漿のウイルスRNAからクローニングしたHIV-1が欠損ウイルスである可能性も考慮して、同一患者の血漿から感染性ウイルスを分離し、組換えウイルスで解析したウイルスが感染性ウイルス由来かどうかについても確認する。

4. 研究成果

解析できたHIV-1感染者30人の血漿からクローニングされたV3のアミノ酸配列を確認したところ、VI-340の血漿ではV3領域のアミノ酸が異なる2種類のウイルスが混在していることが判明し、結果として31種類のV3領域のアミノ酸配列を確認できた。これらのアミノ酸配列から予測されるCXCR4利用性のウイルスの頻度はサブタイプBと比較して約45%と高頻度である可能性が示唆された。しかしながら実際に組換えウイルスを作製してそのコレセプター利用性を確認したところ、31例の中で実際にCXCR4利用性を有するウイルスは5例(約16%)と頻度的には高くはなかった(表1)。しかしながら、CXCR4利用性ウイルスはサブタイプBではCCR5とCXCR4の両者を利用するR5X4ウイルスの頻度が圧倒的に高いのに比較して、この地域ではX4ウイルスが5例中3例とX4ウイルスのほうがやや高頻度であった。

表1 血漿のウイルスRNAからクローニングしたコレセプター利用性の解析

	genotype		phenotype	
	No.	%	No.	%
R5	17	55	26	84
R5X4	14	45	2	6.4
X4			3	9.6

このような血漿ウイルスRNAから解析された結果が、実際に感染性ウイルスの特性を見ているかどうかを確認するために、これらの感染者症例の血漿から感染性ウイルスの分離を試みた。最終的に30症例のなかで分離に成功したのは6症例で、そのコレセプター利用性を確認したところ、4症例がCCR5のみを利用するR5ウイルス、2症例がCXCR4のみを利用するX4ウイルスであり、両者を使用するR5X4ウイルスは分離されなかった(表2)。

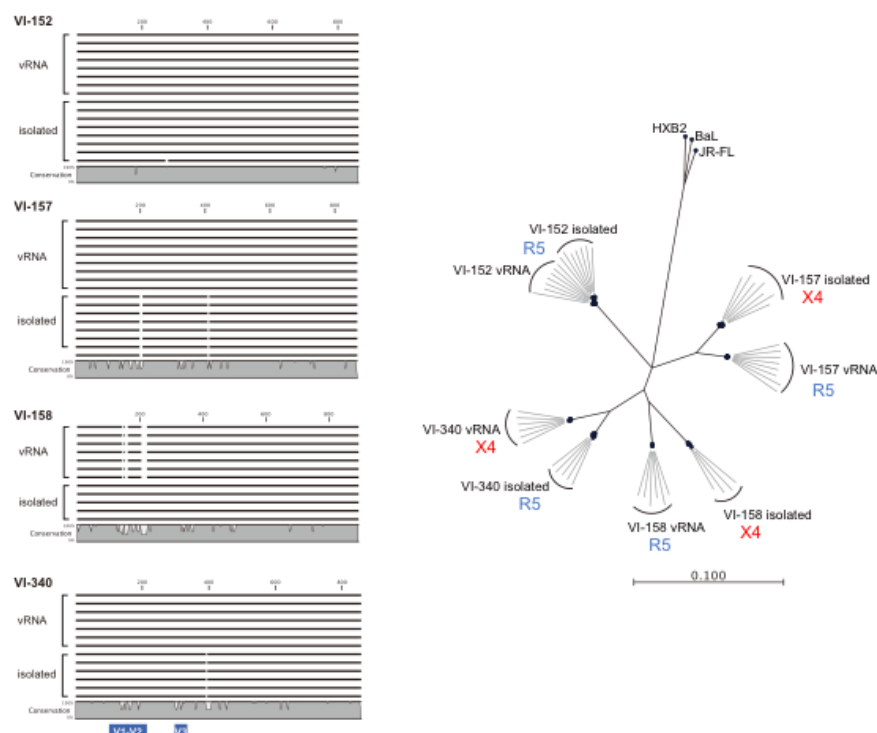
表2 分離されたウイルスのコレセプター利用性の特徴

分離された症例のID	分離ウイルスのコレセプター利用性	血漿からクローニングされたコレセプター利用性
VI-065	CCR5 (R5)	CCR5 (R5)
VI-072	CCR5 (R5)	CCR5 (R5)
VI-152	CCR5 (R5)	CCR5 (R5)
VI-157	CXCR4 (X4)	CCR5 (R5)
VI-158	CXCR4 (X4)	CCR5 (R5)
VI-340	CCR5 (R5)	R5とX4の混合

しかしながら、分離

された X4 ウイルスの血漿 RNA からクローニングされた V3 のコレセプター利用性はどちらも R5 ウイルスであり、血漿でメジャーに存在しているウイルスではない、またコレセプター利用性の異なるウイルスが分離されていたことが判明した (表 2)。

図 1 血漿ウイルス RNA と分離されたウイルス全長 env の解析



この中で血漿からと分離ウイルスからの両者から全長の envelope 遺伝子がそれぞれ複数クローニングできた 4 症例 (VI-152, VI-157, VI-158, VI-340) についてそれぞれのウイルス学的性質の違いについて解析を行った (図 1)。結果, VI-152 では同一症例の血漿からクローニングされた Env と分離された Env はほぼ同一のアミノ酸配列を有していた (図 1 A)。したがって VI-152 では血漿からクローニングされた Env は分離されたウイルス由来であることが確認できた。一方 VI-157, VI-158, VI-340 の症例では, V1/2 領域, V3 領域のアミノ酸配列が, かなり異なっているが, それ以外では血漿からクローニングされた Env は分離されたウイルスの Env と類似しており (図 1 A), 系統樹解析からは, 両者は同じ起源ではあるものの異なるクラスターを形成していた (図 1 B)。

以上の結果から, VI-157 と VI-158 の症例で分離されたウイルスは, 血漿中でメジャーなウイルス集団として存在している R5 以外に, マイナーな集団として存在している X4 ウイルスである可能性が示唆された。一方 VI-340 症例では, 血漿からクローニングされたウイルス RNA の解析から R5 と X4 の混合感染として両者が共存していることが確認された。

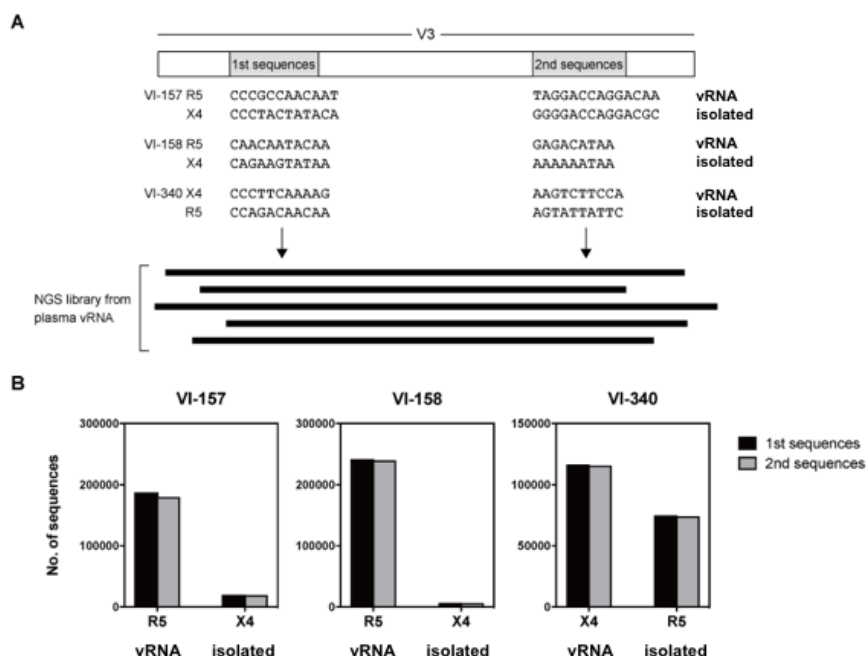
そこで実際に VI-157 と VI-158 症例において, 血漿中でメジャーなウイルスである R5 以外に X4 ウイルスが存在しているかどうかを確認する目的で, 血漿ウイルス RNA の次世代シーケンサー解析 (Next-generation sequencing, NGS) を行った。解析方法としては同一感染者の血漿中 HIV-1 の V3 領域の R5 と X4 ウイルスの塩基配列の違いから R5 の配列以外に X4 由来の配列が存在しているかを探索した (図 2 A)。その結果, VI-157 と VI-158 症例において, それぞれ頻度は異なるものの, 血漿中に X4 ウイルス由来の塩基配列が存在していることが確認できた (図 2 B)。一方 VI-340 症例では予想通り X4 と R5 ウイルスが混在していることが確認できた (図 2 B)。

以上から R5 ウイルスがメジャーな集団として感染者血漿中に存在している症例の一部では, マイナー集団として X4 ウイルスが感染性を維持して存在しているケースがあることを証明できた。したがって, このような症例では CCR5 阻害剤であるマラビロクの使用は禁忌と考えられ, この地域でのマラビロクの使用は控えることが推奨される。

また一般に HIV-1 のターゲットである CD4 陽性リンパ球では, CCR5 はメモリー細胞に強く発現しており, このサブセットが R5 ウイルスを維持しており, 一方 CXCR4 はナイーブ細胞に強く発現しており, このサブセットが X4 ウイルスの維持に関与していると考えられている。したがって標的細胞のこのような棲み分けにより, 2 種類のウイルスが同一感染個

体内で維持されていると考えられる。またこのような複製可能な X4 ウイルス集団の存在は、感染後期において R5 ウイルスの細胞の維持に関与していたメモリー細胞の枯渇などの環境の変化により、長期的にナイーブ細胞内で維持されてきたマイナー集団の X4 ウイルスが R5 ウイルスの複製を凌駕して増殖してくる可能性を示唆しており、感染後期における CXCR4 へのコレセプタースイッチの機序の一部を説明しているものと考えられた。

図2 次世代シーケンサーによるマイナーウイルスの存在



(発表論文)

1. [Maeda Y](#), Takemura T, Chikata T, Kuwata T, Terasawa H, Fujimoto R, Kuse N, Akahoshi A, Murakoshi H, Trang GV, Zhang Y, Pham CH, Pham AHQ, Monde K, Sawa T, Matsushita S, Nguyen TV, Nguyen VK, Hasebe F, Yamashiro T, Takiguchi M: Existence of replication-competent minor variants with different coreceptor usage in plasma from HIV-1-infected individuals. *J Virol* 2020, 94, e00193-20
2. [Thida W](#), Kuwata T, [Maeda, Y](#), Yamashiro T, Tran GV, Nguyen KV, Takiguchi M, Gatanaga H, Tanaka K, Matsushita, S: The role of conventional antibodies targeting the CD4 binding site and CD4-induced epitopes in the control of HIV-1 CRF01_AE viruses. *Biochem Biophys Res Commun* 2019, 508, 46-51

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 1.Maeda Y, Takemura T, Chikata T, Kuwata T, Terasawa H, Fujimoto R, Kuse N, Akahoshi A, Murakoshi H, Trang GV, Zhang Y, Pham CH, Pham AHQ, Monde K, Sawa T, Matsushita S, Nguyen TV, Nguyen VK, Hasebe F, Yamashiro T, Takiguchi M	4. 巻 94
2. 論文標題 Existence of replication-competent minor variants with different coreceptor usage in plasma from HIV-1-infected individuals.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e00193-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.00193-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Thida W, Kuwata T, Maeda Y, Yamashiro T, Tran GV, Nguyen KV, Takiguchi M, Gatanaga H, Tanaka K, Matsushita S	4. 巻 508
2. 論文標題 The role of conventional antibodies targeting the CD4 binding site and CD4-induced epitopes in the control of HIV-1 CRF01_AE viruses.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 46-51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.11.063.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Hamada K, Maeda Y, Mizutani A, Okada S	4. 巻 42
2. 論文標題 The Phosphatidylinositol 3-Kinase p110 /PTEN Signaling Pathway Is Crucial for HIV-1 Entry.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biol Pharm Bull	6. 最初と最後の頁 130-138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b18-00801.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Monde K, Terasawa H, Nakano Y, Soheilian F, Nagashima K, Maeda Y, Ono A	4. 巻 14
2. 論文標題 Molecular mechanisms by which HERV-K Gag interferes with HIV-1 Gag assembly and particle infectivity.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Retrovirology	6. 最初と最後の頁 27
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12977-017-0351-8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Hikichi Y, Yokoyama M, Takemura T, Fujino M, Kumakura S, Maeda Y, Yamamoto N, Sato H, Matano T, Murakami T	4. 巻 97
2. 論文標題 Increased HIV-1 sensitivity to neutralizing antibodies by mutations in the Env V3-coding region for resistance to CXCR4 antagonists	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 J Gen Virol	6. 最初と最後の頁 2427
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/jgv.0.000536	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Monde K, Terasawa H, Nakano Y, Soheilian F, Nagashima K, Maeda Y, Ono A.	4. 巻 14
2. 論文標題 Molecular mechanisms by which HERV-K Gag interferes with HIV-1 Gag assembly and particle infectivity	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Retrovirology	6. 最初と最後の頁 27
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12977-017-0351-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Maeda Y, Takemura T, Terasawa H, Kuwata T, Fujimoto Riito, Akahoshi T, Chikata T, Murakoshi H, Tran GV, Monde K, Nguen KV, Yamashiro T, Hasebe F, Matsushita S, Sawa T, Takiguchi M
2. 発表標題 Existence of infectious minor HIV-1 variants with different coreceptor usage in the plasma of HIV-1-infected individuals
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前田洋助, 桑田岳夫, 寺沢広美, 藤本りいと, 赤星智寛, 近田貴敬, 村越勇人, TranGiang Van, 門出和精, 本田佳記, 竹村太地郎, 澤智裕, 松下修三, 山城哲, Kinh Van, Nguyen, 滝口雅文
2. 発表標題 ベトナムで分離したCRF01_AE HIV-1のコレセプター解析
3. 学会等名 第31回日本エイズ学会学術集会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Maeda Y, Mode K, Terasawa H, Honda Y, Tanaka Y, Yusa K, Sawa T
2. 発表標題 Interaction of PTAP domain of retroviral Gag with TSG101 determined the incorporation of HTLV-1 Env into the virion
3. 学会等名 第65回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 前田洋助, 寺沢広美, 赤星智寛, 近田貴敬, 村越勇人, Giang Van Tran, 門出和精, 山城哲, 澤智裕, 滝口雅文
2. 発表標題 北ベトナムに流布している HIV-1のコレセプター利用性の解析
3. 学会等名 第53回日本ウイルス学会九州支部総会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 新居志郎, 倉田毅, 林英夫, 本田武史, 小田紘, 松本明編集	4. 発行年 2017年
2. 出版社 北海道大学出版会	5. 総ページ数 916
3. 書名 病原細菌・ウイルス図鑑	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----