

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19142

研究課題名(和文) HIV潜伏化と再活性化に係わる lncRNA の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification of lncRNA responsible for HIV dormancy or reactivation

研究代表者

工藤 あゆみ (KUDOH, Ayumi)

横浜市立大学・医学研究科・客員准教授

研究者番号：30616404

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Human Immunodeficiency virus (HIV)感染症の治療における問題点は、現行されている抗レトロウイルス剤の併用療法がHIV潜伏感染状態にある細胞に効かず、体内からHIV感染細胞を完全に排除することができない点にある。本研究課題では、CRISPRシステムを応用したenChIP法を用いることにより、潜伏感染している細胞のHIVゲノム領域上に集積しているlong-non-coding RNA (lncRNA) に着目し、HIV再活性化に作用するRNA分子の新たな同定を試みた。

研究成果の概要(英文)：The trying to identification of lncRNA responsible for HIV dormancy or reactivation as a new therapeutic targets. It is an important step to reach HIV cure. In this study, we used enChIP method to identify lncRNA directly interact with HIV genome which lie in host genome.

研究分野：感染症

キーワード：HIV 潜伏感染

### 1. 研究開始当初の背景

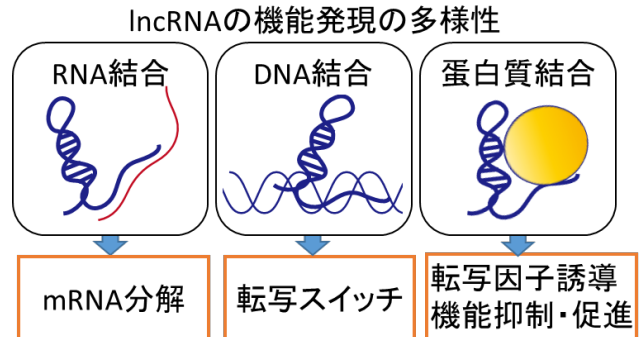
ヒト免疫不全ウイルス (HIV) は AIDS の原因ウイルスであり 2014 年の統計では世界の HIV 陽性数は 3690 万人、新規感染者数は 200 万人、AIDS による死亡者数は年間 120 万人とされ、未だ深刻な感染症とされている。1996 年から開始された多剤併用療法 cART (combination antiretroviral therapy) は、それまで死の病であった HIV 感染症を慢性感症と認識させるまでに AIDS 発症を抑制する効果をもたらした。しかしながら、cART は薬剤の投与を中断すると、体内の HIV コピー数が戻ってしまうことが知られている。つまり、現行の cART では体内の HIV を完全に駆逐することができないのである。この原因となっているのが、HIV リザーバー細胞 (HIV 潜伏感染細胞) の存在である。

HIV 感染患者の CD4+T 細胞の中には 100 万个に 3 個ほどのごく限られた数の HIV リザーバーが存在し、長期間生存が可能なメモリー T 細胞に HIV は潜伏していると報告されている。また cART を 2 年以上続けた患者の T 細胞には、CTL からの攻撃を回避する変異を獲得したプロウイルスが検出されている。このように、HIV は巧妙に感染患者体内において潜伏しゲノムを保持しているが、いまだにどのようなメカニズムで HIV ゲノムの転写が抑制されているのか不明な点が多く残されている。

近年リザーバーを排除する目的で、HDAC 阻害剤 (ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤) や PKC 活性化剤を使用した細胞内転写誘導を併用した Kick and Kill という治療戦略が構想されている。これはリザーバーでの転写を誘導し、HIV 感染を潜伏感染から再活性化し抗レトロウイルス剤を使うことで、リザーバー細胞を体内から除去しようとする考え方である。この治療戦略には期待が集まる一方で、非常に広範囲に転写を誘導する薬剤を使用するため、他の臓器への強い副作用や細胞の腫瘍化を誘導する可能性など、様々な問題点も残されている。それは、潜伏化している HIV ゲノムを再活性化させる “スイッチ” が何であるのか、その分子基盤を理解し標的を明確にすることができれば、大きな改善が得られるはずである。

ヒトゲノムの 98% を占める Junk 領域から発現する蛋白質の遺伝情報を持たない RNA を non-coding RNA と呼び、様々な刺激やシグナルに応答した遺伝子発現の時間空間的な緻密な制御をこうした lncRNA が担っていることが指摘されている。なかでも長鎖ノンコーディング RNA (lncRNA: long-non-coding RNA) は複雑な立体構造を有し、蛋白質やゲノム DNA、RNA と直接結合し遺伝子発現を正や負に細かく調節する作用をもつ。

たとえば、HIV 転写調節にも機能する NFkB は NKILA (lncRNA) と結合することにより、機能が抑えられることが報告されている (Liu et al., 2015, Cancer Cell)。現在、15000 あまりの lncRNA が同定されているが、実はその機能動態についてほとんど解明されていない。



また、HIV-1 ゲノムには long non coding RNA が逆向きにコードされており、HIV-lncRNA が LTR からの転写を負に制御する可能性が指摘されている。しかしながら、LTR 領域における HIV-lncRNA の詳細な働きについては、まったくわかっていない。

染色体上における遺伝子発現制御機構を解明する目的で、Chromatin-Immunoprecipitation (ChIP) が一般的に行われる。しかしながら ChIP 解析は抗体の力価や特異性により結果が大きくばらつくことが問題である。こうした問題点を克服し、潜伏化している HIV ゲノムを狙った解析を行うために、本研究課題では大阪大学の藤井穂高教授らが開発した CRISPR/Cas9 を応用した enChIP 法を用いる。enChIP 法は DNA 切断能力のない Cas9 変異体 (dCas9) を使用し、ゲノム上の随意の部位に dCas9 を結合させ、特定の遺伝子領域に結合している転写因子や RNA を dCas9 分子ごと回収して行うことができる技術である。この方法を用いることにより、潜伏感染前後の HIV ゲノム領域に集積してくる相互作用因子を回収して行うことが可能となる。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、HIV 潜伏感染や再活性化の過程において HIV ゲノム転写がどのように制御されているのか、HIV ゲノム上に集積してくる宿主由来 lncRNA と HIV-lncRNA に焦点を当てて機能解明を目指すものである。

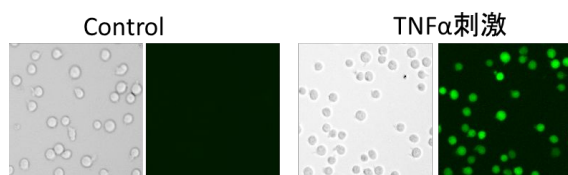
### 3. 研究の方法

HIV 潜伏感染細胞を用い、潜伏感染状態、再活性化状態における細胞内 HIV ゲノム領域を enChIP 法により回収し、LTR 領域に集積してくる lncRNA の同定を試みた。LTR-GFP を導入した潜伏感染モデル細胞を用い、LTR 領域での相互作用解析と、感染様式を蛍光により識別可能な潜伏感染モデル細胞の樹立を行う。

半数体モデル細胞を用い、HIV が挿入された位置から発現する lncRNA が潜伏化効率に与える影響を検証する。候補 lncRNA の感染細胞内での動態をノックダウンや直接的な RNA プルダウンにより解析する。また、ヒト化マウスを用いた HIV 潜伏感染モデル T 細胞における lncRNA の発現プロファイルの解析を行う。

#### 4. 研究成果

LTR 領域が挿入されたゲノム領域とたんぱく質、RNA を含む複合体の enChIP 解析を行うため、まずは HIV 潜伏感染モデル細胞として、二つの LTR 領域で GFR 遺伝子領域を挟んだ LTR-GFP をゲノムに挿入した T 細胞を用いた。HIV 潜伏感染モデル T 細胞は TNF- $\alpha$  を添加することにより、HIV 再活性化誘導を行った。再活性化は新たに発現した GFP たんぱく質の蛍光によりモニターした。enChIP 法を行うため、LTR 領域内の異なる 3 点を特異的に認識するガイド RNA の発現ベクターと FLAG タグを付与した dCas9 発現ベクターをそれぞれ細胞にエレクトロポレーション法により遺伝子導入し、FLAG ピーズを用いて DNA 領域の免疫沈降を行った。解析には LTR 全長に対し、異なる 3 点にガイド RNA (1 - 3) を設計した。enChIP 法は Active Motif 社から発売されている enChIP キット内のプロトコールに従って行った。



回収された DNA を鋳型に定量 PCR を行い LTR 領域の回収程度を確認した。しかし、潜伏感染状態からの DNA 回収率が非常に低く限られていた。

そこで、HIV 潜伏感染状態の細胞を新たに用意し、潜伏感染と再活性化にかかわる因子の解析を試みた。Jurkat 細胞に HIV-1 NL3-4 Env-Luc reporter ベクターを偽ウイルスを用いて感染させ、潜伏感染細胞を作製した。作成した潜伏感染細胞は限界希釈法により 20 種類のクローン株の単離を行い成功した。作成した潜伏感染細胞は、定常状態での活性化の程度を 10000 個の細胞のルシフェラーゼ活性により測定し、比較した。HIV 再活性化の程度は 10ng/ml の PMA 刺激により再活性化を行い、ルシフェラーゼ活性により確認した。得られたクローンのうち、PMA 刺激により 500 倍以上の再活性化効率を示した 2 クローン (#16 : 737 倍、#19 : 694.4 倍) を新たな潜伏感染モデル細胞とした。この二つのクローンは、定常状態でもルシフェラーゼ活性がバックグラウンドの 10 倍以上の数値で確認され(バックグラウンド平均 35RLU/sev, #16:

586 RLU/sec, #19: 681 RLU/sec) 挿入された遺伝子領域が通常も発現していると考えられた。またコントロールとして、Parent Jurkat 細胞株も解析を行った。5x10<sup>6</sup> 個の細胞に、gRNA 発現ベクター、FLAG-dCas9 ベクターをそれぞれエレクトロポレーションにより導入し、24 時間後に細胞を Formaldehyde ベースの固定液により固定後、enChIP を行った。

いずれの実験系においても、LTR 領域の沈降を PCR により確認した。再活性化状態での回収率と比較し、潜伏感染状態ではいずれも LTR 領域を確認できなかった。この解析手法では転写や複製などにより DNA がゆるみ一本鎖 DNA が露出しなければガイド RNA が結合できないため、転写が制御されている(と予想される)潜伏感染状態のゲノムからガイド RNA を介した enChIP を行うことは困難であることが推察された。この状況を踏まえ、LTR 領域を結合している RNA 分子やたんぱく質とともに共沈させてくるためには、ガイド RNA によらない手法が必要となった。

HIV ゲノム挿入部位と再活性化機構について解析を行うため、ゲノム半数体細胞株である HAP-1 (Haploid 細胞株 Horizon Genomics 社)を用い HIV 潜伏感染モデル細胞株の樹立を試みた。HAP-1 細胞へは LTR 領域に挟まれたルシフェラーゼ遺伝子を VSV g 偽ウイルス粒子を用いて感染させ、潜伏化を確認した。コントロールとして同様の手法で T 細胞株、マクロファージ様株、単球においても同様の感染実験を試みた。HAP-1 細胞株、T 細胞株において、感染 1 か月後に誘引剤によるルシフェラーゼ活性を確認した。次にこの細胞群から単一クローンの分離を試みた。限界希釈法を用いてそれぞれ 20 種のクローンを単離することに成功した。

本研究課題では enChIP による HIV 潜伏感染と関連する因子の探索を目的とした。LTR 領域を 3 つの領域に分けてガイド RNA を設計し、LTR 前、中、後のそれぞれの領域から相互作用因子を回収するよう設計していた。しかしながら、転写が制御された潜伏感染状態からガイド RNA を結合させて特定の DNA 領域を回収することが困難であった。

再活性化状態の LTR 領域から回収したたんぱく質は、電気泳動を行ったところ無数のたんぱく質バンドを認めたことから、今後はそれらのたんぱく質を質量分析により同定を試みる。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計1件)

岩瀬早織、宮川敬、工藤あゆみ、梁明秀、  
ケミカルバイオロジーを用いた HIV 再活  
性化のメカニズム解析, 第 30 回日本エ  
イズ学会学術集会・総会, 鹿児島県民交流  
センター(鹿児島), 2016/11/24

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

工藤 あゆみ (KUDOH Ayumi)

横浜市立大学・医学研究科・客員准教授

研究者番号: 30616404