

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08853

研究課題名(和文) HIV-1潜伏感染メカニズムの多面的解析

研究課題名(英文) Multi-faced analysis of HIV-1 latency

研究代表者

武内 寛明 (Takeuchi, Hiroaki)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：20451867

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、(1) MELKのHIVプロウイルス転写制御(抑制)メカニズムについて詳細な解析を行うこと、(2) 独自に樹立したHIV-1潜伏感染単球系モデル細胞株を用いて機能遺伝子発現抑制細胞ライブラリーを樹立し、プロウイルス再活性化細胞を分離同定すること、の2項目に焦点を当てて研究をおこなった。その結果、(1)については、HIV-1持続感染環境下においてMELKが転写抑制メカニズムに寄与していることを明らかにし、MELK機能阻害剤のプロウイルス活性可能も見出すことが出来、(2)においては、MAPK-RPKが新規潜伏感染制御宿主因子であることを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HIV-1治癒にはリザーバー細胞の効果的な排除が必須である。現時点において個体内におけるリザーバー細胞集団の排除に有効な方法を示せていないことから、新規LRAsの開発および新たなリザーバー細胞排除法の基盤確立が早急に求められている。本研究で同定された宿主因子：MAPK-RPKは、(1) 宿主由来の転写因子による転写活性制御に影響を及ぼしていないこと、(2) 様々な潜伏感染モデル細胞に共通して転写抑制活性を有すること、(3) HIV-1 Tatタンパク質によるHIV-1転写促進メカニズムの特異的制御活性を有すること、を明らかにしたことから、本研究はHIV治癒戦略の大きな進展に寄与することが考えられる。

研究成果の概要(英文)：Currently, the establishment of HIV-1 persistent infection is still a major barrier to complete viral eradication, which has remained elusive because latently infected reservoirs can evade host antiviral immune responses as well as combination antiretroviral therapy. There is therefore still an unmet need to develop new anti-HIV compounds which efficiently reactivate latent HIV-1 provirus. In this study, we found that host cell kinase MELK represses HIV-1 transcription in persistent-infected cells. Furthermore, we employed a genome-wide RNAi screen in newly established latently infected model monocyte-lineage cell clone, THP-1 NanoLuc, capable of expressing NanoLuc (Nluc) protein in the nef region of HIV-1 provirus and found that Nluc activity in MAP kinase-related protein kinase (MAPK-RPK)-depleted clone was markedly enhanced, suggesting that MAPK-RPK is required for maintaining HIV-1 latency.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HIV潜伏感染 エイズ プロウイルス 転写制御 HIV Tat

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在までに確立された HIV-1 生活環を標的とした薬剤併用化学療法によって、効果的な HIV-1 複製制御が可能であることが示されてきたが、この方法は HIV-1 感染増殖伝播環境下においてのみ有効であり、体内から HIV-1 潜伏感染細胞集団(リザーバー細胞集団)を排除する方法としては必ずしも効果的ではないことが明らかとなっている。そのため持続感染ウイルス複製抑制状態を維持するためには、既存の抗 HIV 剤の長期服用に頼らざるを得ないのが現状であり、HIV-1 感染症の根治にはリザーバー細胞の効果的な排除が必須であると考えられる。

現在までに幾つかの HIV 再活性化誘導剤 (Latency-Reversing Agents: LRAs) の臨床試験が行われてきたが、HIV プロウイルスからの転写活性を促進するだけでは個体レベルにおけるリザーバー細胞集団の効果的な排除には至らなかった。このことから、再活性化したリザーバー細胞集団を排除する新たなアプローチが早急に求められているが、HIV 感染細胞がリザーバー細胞へと変貌を遂げる際に必要な HIV 潜伏感染制御メカニズムについては未だ理解が進んでいないことから、新規 LRAs の開発および新たなリザーバー細胞排除法の基盤確立が早急に求められている。

2. 研究の目的

本研究は、ヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) の潜伏感染メカニズムの理解を深め、そのリザーバー細胞の新規排除方法の基盤確立に寄与するために、

(1) MELK の HIV プロウイルス転写制御 (抑制) メカニズムについて詳細な解析を行うこと、

(2) 独自に樹立した HIV-1 潜伏感染単球系モデル細胞株を用いて機能遺伝子発現抑制細胞ライブラリーを樹立し、プロウイルス再活性化細胞を単離し、その細胞内において発現抑制されている機能遺伝子 (群) を HIV-1 再活性化抑制候補因子としてその機能評価を行うこと、

の 2 項目に焦点を当てて研究遂行することが目的である。

3. 研究の方法

(1) HIV-1 持続感染モデル細胞株: NLnEGFP-HEK293 細胞の樹立

シュードタイプレポーター-HIV-1 ベクター: VSV-G/NLnGFP を用いて持続感染モデル細胞 NLnGFP-HEK293 を樹立した。具体的には、HEK293 細胞を 10-cm dish に 1.0×10^6 細胞ずつ用意し、p24 量で 10 ng 相当の VSV-G/NLnGFP を感染させ、これを NLnGFP-HEK293 細胞集団とした。GFP 発現を確認した後に、細胞集団を用いて限界希釈をおこない、GFP 持続発現クローンもしくはセミクローン細胞株を得た。

(2) shRNA 安定発現細胞株の樹立

NLnGFP-HEK293 細胞に、タンパク質合成阻害剤であるピューロマイシンに対する耐性遺伝子を発現する shRNA 発現プラスミドを、レンチウイルスベクターを用いて導入した。導入 48 時間後、4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のピューロマイシン添加培地で 2 日間培養することにより、ピューロマイシン耐性細胞すなわち shRNA 安定発現細胞株を樹立した。

(3) HIV-1 潜伏感染単球系モデル細胞を用いた機能遺伝子発現抑制細胞ライブラリーの作製および HIV-1 潜伏感染制御因子(群)の網羅的探索およびその機能解析

HIV-1 感染症におけるリザーバー細胞の一種である単球/マクロファージ系細胞下部である THP-1 細胞にハイエンドルシフェラーゼ (NIuc) 発現プロウイルスを組み込んだ細胞クローン: THP-1 NIuc 細胞に、15,000 種以上のヒト機能遺伝子を標的とした short hairpin RNA (shRNA) を組み込むことで、機能遺伝子発現抑制 THP-1 NIuc 細胞ライブラリーを樹立した。その後 NIuc レポーター活性が上昇した細胞をクローン化し、その細胞内で発現抑制されている機能遺伝子を HIV-1 プロウイルス再活性化制御(抑制)候補因子とした。

4. 研究成果

(1) NLnGFP-HEK293 細胞における MELK の HIV-1 感染後期過程に対する影響

NLnGFP-HEK293 細胞を用いて、HIV-1 感染後期過程に MELK が及ぼす影響を解析した。具体的には、RNA 干渉を利用して内在性 MELK 遺伝子発現を抑制するために、NLnGFP-HEK293 細胞に MELK 遺伝子を標的とした short hairpin RNA (MELK shRNA) と、細胞内機能遺伝子を標的としない shRNA (Non-target shRNA) とを用いて、MELK 遺伝子発現抑制 NLnGFP-HEK293 細胞 (MELK-KD) と Non-Target 細胞 (Non-T) を各々樹立した。はじめに、それらの細胞内における HIV-1 mRNA 発現量について、加水分解プローブを用いたリアルタイム RT-PCR (RT-qPCR) 法にて解析をおこなった。HIV-1 mRNA は、3 種のスプライシング形態によって発現することから、それらの発現定量については、3 つのスプライシング形態を各々特異的に検出するプライマー/プローブセットを使用した。また、HIV-1 転写に必要な宿主転写因子 NF- κ B、AP-1、および SP-1 に依存しない転写機構を有する 18S rRNA を、内在性コントロールとして

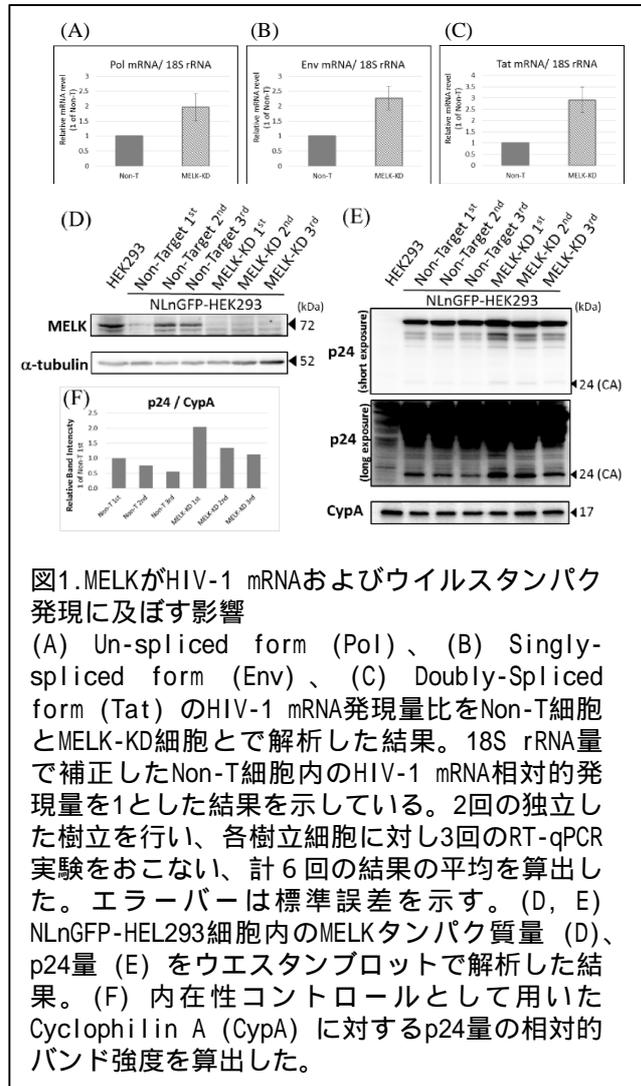


図1. MELKがHIV-1 mRNAおよびウイルスタンパク発現に及ぼす影響

(A) Un-spliced form (Pol)、(B) Singly-spliced form (Env)、(C) Doubly-Spliced form (Tat) のHIV-1 mRNA発現量比をNon-T細胞とMELK-KD細胞とで解析した結果。18S rRNA量で補正したNon-T細胞内のHIV-1 mRNA相対的発現量を1とした結果を示している。2回の独立した樹立を行い、各樹立細胞に対し3回のRT-qPCR実験をおこない、計6回の結果の平均を算出した。エラーバーは標準誤差を示す。(D, E) NLnGFP-HEK293細胞内のMELKタンパク質量 (D)、p24量 (E) をウエスタンブロットで解析した結果。(F) 内在性コントロールとして用いた Cyclophilin A (CypA) に対するp24量の相対的バンド強度を算出した。

して用いた。RT-qPCR 実験の結果を元に、Non-T 細胞に対する MELK-KD 細胞内の HIV-1 mRNA 発現量比を解析した結果、MELK-KD 細胞では Non-T 細胞に比べ HIV-1 mRNA の発現量がスプライシング形態非依存的に有意に増加した(図 1A-C)。また MELK-KD 細胞において HIV-1 キャプシドタンパク質 (p24) 発現量も明らかに増加することが認められた(図 1D-F)。この結果より、MELK は HIV-1 転写メカニズムを負に制御する機構に関与する可能性が示唆された。

(2) HIV-1 潜伏感染制御因子: MAPK-RPK の同定

機能遺伝子発現抑制リザーバーモデル THP-1 Nluc 細胞ライブラリーから Nluc レポーター活性が上昇していた細胞をクローン化し、その細胞内に組み込まれた shRNA 発現カセットの遺伝子配列解析を行った結果、MAP キナーゼファミリーの一つである MAPK-related protein kinase (MAPK-RPK) を標的とした shRNA であることがわかった。そこで MAPK-RPK が THP-1 Nluc 細胞内において、プロウイルスの転写活性化に寄与するかについて解析をおこなった。具体的には、内在性の *MAPK-RPK* 配列を標的とした3種類の shRNA と細胞内機能遺伝子を標的としない shRNA (Non-targeting shRNA: Non-T)とを用いて、shRNA 安定発現 THP-1 Nluc 細胞 (shRNA #1-#3) を樹立し、各細胞内の MAPK-RPK タンパク質発現量についてウエスタンブロット法にて解析を行った。その結果、MAPK-RPK タンパ

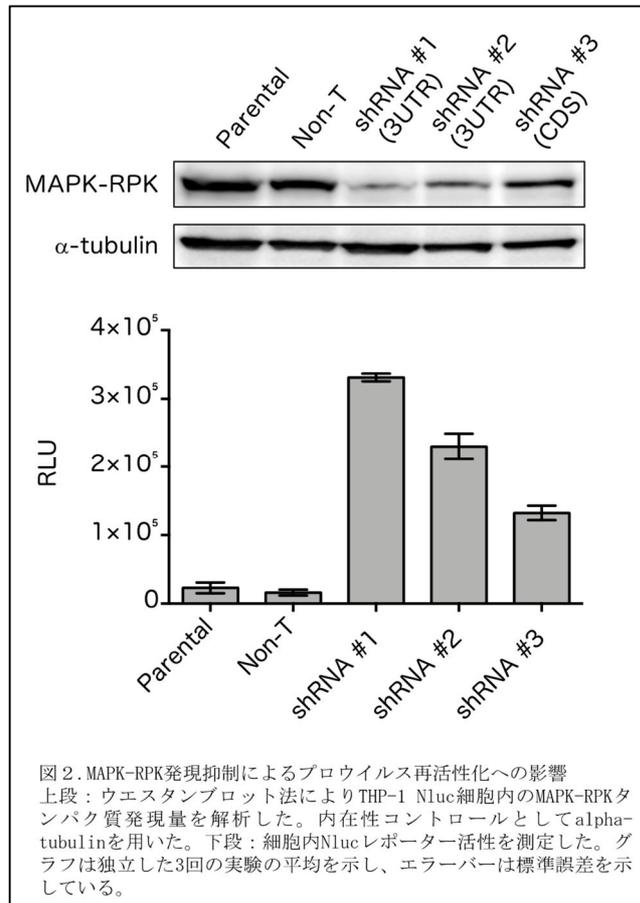


図2. MAPK-RPK発現抑制によるプロウイルス再活性化への影響
 上段：ウエスタンブロット法によりTHP-1 Nluc細胞内のMAPK-RPKタンパク質発現量を解析した。内在性コントロールとしてalpha-tubulinを用いた。下段：細胞内Nlucレポーター活性を測定した。グラフは独立した3回の実験の平均を示し、エラーバーは標準誤差を示している。

ク質発現量が異なる細胞が樹立出来た(図1、上段、shRNA #1-#3までの比較)。また同時に各細胞におけるプロウイルス活性化指標となる Nluc レポーター活性を解析した結果、MAPK-RPK タンパク質発現量の低下に伴う形で Nluc レポーター活性が増加することがわかった(図1、下段、shRNA #1-#3までの比較)。これらの結果から、MAPK-RPK がプロウイルスの転写活性を負に制御しているすなわち潜伏感染を維持する宿主側要因であることが示唆された。更なる解析の結果、MAPK-RPK は、HIV-1 Tat タンパク質が有するプロウイルスの転写促進メカニズムに寄与することが明らかとなり、MAPK-RPK 機能阻害剤がプロウイルス特異的再活性化誘導剤として機能することが分かった。本研究結果より、MAPK-RPK は、HIV リザーバー細胞の効果的な排除方法の基盤確立に大きく寄与する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 12件）

1. 著者名 Ndzinu Jerry Kwame, Takeuchi Hiroaki, Saito Hideki, Yoshida Takeshi, Yamaoka Shoji	4. 巻 20
2. 論文標題 eIF4A2 is a host factor required for efficient HIV-1 replication	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microbes and Infection	6. 最初と最後の頁 346 ~ 352
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.micinf.2018.05.001	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 -
1. 著者名 Suzuki Naoto, Yoshida Takeshi, Takeuchi Hiroaki, Sakuma Ryuta, Sukegawa Sayaka, Yamaoka Shoji	4. 巻 8
2. 論文標題 Robust Enhancement of Lentivirus Production by Promoter Activation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-33042-5	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 -
1. 著者名 Horiguchi Yukichi, Goda Tatsuro, Matsumoto Akira, Takeuchi Hiroaki, Yamaoka Shoji, Miyahara Yuji	4. 巻 35
2. 論文標題 Gold Nanoparticles with Ligand/Zwitterion Hybrid Layer for Individual Counting of Influenza A H1N1 Subtype Using Resistive Pulse Sensing	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 1798 ~ 1806
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.langmuir.8b01586	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 -
1. 著者名 Gohda Jin, Suzuki Kazuo, Liu Kai, Xie Xialin, Takeuchi Hiroaki, Inoue Jun-ichiro, Kawaguchi Yasushi, Ishida Takaomi	4. 巻 8
2. 論文標題 BI-2536 and BI-6727, dual Polo-like kinase/bromodomain inhibitors, effectively reactivate latent HIV-1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-21942-5	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 -

1. 著者名 Takeuchi Hiroaki, Saito Hideki, Noda Takeshi, Miyamoto Tadashi, Yoshinaga Tomokazu, Terahara Kazutaka, Ishii Hiroshi, Tsunetsugu-Yokota Yasuko, Yamaoka Shoji	4. 巻 13
2. 論文標題 Phosphorylation of the HIV-1 capsid by MELK triggers uncoating to promote viral cDNA synthesis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLOS Pathogens	6. 最初と最後の頁 e1006441
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.ppat.1006441	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 -

1. 著者名 Saito Hideki, Takeuchi Hiroaki, Masuda Takao, Noda Takeshi, Yamaoka Shoji	4. 巻 12
2. 論文標題 N-terminally truncated POM121C inhibits HIV-1 replication	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0182434
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0182434	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 -

1. 著者名 Yoshida Takeshi, Hamano Akiko, Ueda Asuka, Takeuchi Hiroaki, Yamaoka Shoji	4. 巻 493
2. 論文標題 Human SMOOTHENED inhibits human immunodeficiency virus type 1 infection	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 132 ~ 138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.09.063	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 -

1. 著者名 Osako Miho, Itsumi Momoe, Yamaguchi Haruka, Takeuchi Hiroaki, Yamaoka Shoji	4. 巻 119
2. 論文標題 A20 restores phorbol ester-induced differentiation of THP-1 cells in the absence of nuclear factor- κ B activation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1475 ~ 1487
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcb.26308	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 -

1. 著者名 Aziati Ishmael Dzigbordi, Yoshida Takeshi, Hamano Akiko, Maeda Kenjiro, Takeuchi Hiroaki, Yamaoka Shoji	4. 巻 514
2. 論文標題 PATZ1 is required for efficient HIV-1 infection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 538 ~ 544
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.04.175	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 -

1. 著者名 Iwase Saori C., Miyazato Paola, Katsuya Hiroo, Islam Saiful, Yang Benjy Tan Jek, Ito Jumpei, Matsuo Misaki, Takeuchi Hiroaki, Ishida Takaomi, Matsuda Kouki, Maeda Kenji, Satou Yorifumi	4. 巻 9
2. 論文標題 HIV-1 DNA-capture-seq is a useful tool for the comprehensive characterization of HIV-1 provirus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 e12326
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-48681-5	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 -

1. 著者名 Maeda Kenji, Das Debananda, Kobayakawa Takuya, Tamamura Hirokazu, Takeuchi Hiroaki	4. 巻 19
2. 論文標題 Discovery and Development of Anti-HIV Therapeutic Agents: Progress Towards Improved HIV Medication	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Topics in Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 1621 ~ 1649
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/1568026619666190712204603	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 -

1. 著者名 Yao Weitong, Yoshida Takeshi, Hashimoto Saki, Takeuchi Hiroaki, Strebel Klaus, Yamaoka Shoji	4. 巻 94
2. 論文標題 Vpu of a Simian Immunodeficiency Virus Isolated from Greater Spot-Nosed Monkey Antagonizes Human BST-2 via Two AxxxxxxW Motifs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e01669
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.01669-19	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Hiroaki Takeuchi
2. 発表標題 Dynamics and Regulation of HIV-1 Uncoating and Nuclear Movements of HIV-1 Complexes: Our Recent Advances and Future Perspectives.
3. 学会等名 CAIDS/ACC/ARC Joint Symposium (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 武内 寛明
2. 発表標題 HIV-1感染細胞内動態に関わる宿主タンパク質の同定および機能解析
3. 学会等名 第20回白馬シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 武内 寛明
2. 発表標題 HIV潜伏感染を制御する宿主因子の同定および解析
3. 学会等名 第32回日本エイズ学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroaki Takeuchi
2. 発表標題 Multiple approach to HIV cure: Towards a better understanding of the precise cellular regulation of HIV-1 infection.
3. 学会等名 France-Japan Symposium on HIV and hepatitis basic research (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroaki Takeuchi
2. 発表標題 Genome-wide RNAi screen identifies MAPK-RPK required for HIV-1 proviral silencing in non-T cell reservoir cell-line model.
3. 学会等名 The 9th international workshop on HIV persistence during therapy (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武内 寛明
2. 発表標題 HIV-1コア・サイエンス ~HIV-1コア(キャプシドコア)崩壊プロセスおよびHIV-1複合体コア(核)移行プロセスのさらなる展望~
3. 学会等名 第31回日本エイズ学会学術集会(招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 武内 寛明	4. 発行年 2018年
2. 出版社 日本エイズ学会	5. 総ページ数 165
3. 書名 日本エイズ学会誌	

〔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