

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：19K23860

研究課題名（和文）革新的なHIV治癒戦略をめざした新規HIV-1感染制御宿主因子の探索同定

研究課題名（英文）Screening of HIV-1 regulatory factors toward HIV-1 cure

研究代表者

助川 明香（Sukegawa, Sayaka）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：40844379

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、HIV-1感染増殖伝播を制御する新たな宿主側要因を探索同定し、それらの機能解析をおこなうことで、これまでにない新たなHIV治癒法開発に貢献することを目的とした。まず、HIV-1感染感受性の異なる3種類のTリンパ球細胞の感染感受性差異および各宿主遺伝子の細胞内発現レベル差異の解析結果を基に、29種類の宿主因子をHIV-1感染抑制候補因子として選定した。次に、これら宿主候補因子を特異的かつ安定的発現制御（ノックダウン）細胞を樹立し、HIV-1感染効率の変化の有無を評価した。結果、細胞内発現量の低下に伴い、HIV-1感染効率の上昇が認められるHIV-1抑制候補因子AおよびBを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、国内外を問わずHIV-1感染増殖伝播を制御する宿主因子の探索同定が多数おこなわれ

ており、HIV-1感染制御機構の理解は深まりつつある。しかしながら、未だ不明な点が多く残されており、HIV治癒戦略において大きな障壁となっている。

本研究の様に、HIV-1感染標的Tリンパ球細胞の感染感受性差異に着目した細胞内因子動態の解析では、HIV-1感染必須および感染抑制の両側面から多面的にHIV-1制御因子を同定することが可能であると考えられる。本研究において同定された新規宿主因子は、HIV-1感染制御機構の理解を深めるだけでなく、新たなHIV-1治癒戦略への貢献につながるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this research is to identify new HIV-1 regulatory host factor (s) toward HIV-1 cure.

To achieve this purpose, we performed microarray analysis to compare the gene expression level of three different CD4+ T lymphocytes, which show the different HIV-1 sensitivity. Based on the result of both microarray and HIV-1 infectivity in those three different T lymphocytes, we focused on 29 genes. Next, we established knock down cells using 2-3 different targeting shRNA for each target gene and evaluated HIV-1 infectivity. As a result, we found the correlation of endogenous mRNA levels and HIV-1 infectivity in knock down cells targeting host factors A and B. Furthermore, to verify the effect of A and B on HIV-1 restriction, we are attempting reconstitution analysis.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HIV-1 宿主因子 感染制御 エイズ

1. 研究開始当初の背景

近年、抗 HIV-1 療法の飛躍的な進歩により、HIV 感染症は治療可能な慢性疾患として認知されつつある。しかしながら、既存の抗 HIV-1 薬がウイルス生活環そのものを標的としていることから、薬剤耐性変異ウイルスの出現やすい。更に、潜伏感染細胞の存在により、感染者体内からのウイルス完全排除は難しく未だ根治には至っていない。

【研究計画概要】

◆ 現時点のエイズ治療薬における問題点

- ・ HIV生活環を標的としているため、薬剤耐性ウイルスが出現しやすい。
- ・ HIV生活環に関わる宿主因子の役割に対する理解が不十分である。

◆ 研究目的

- ・ HIV-1生活環全体を捉えた、新規HIV感染制御宿主因子の同定および機能解析

◆ 最終目標

- ・ HIV-1感染伝播機構における宿主因子の更なる理解を深める

近年、RNA 干渉法 (RNAi) 等を用いたゲノムワイドスクリーニングにより、HIV-1 感染増殖伝播に関わる細胞内因子の網羅的解析が可能となったものの、真の感染制御宿主因子同定に至ったものはごく僅かであり、HIV-1 感染増殖伝播機構は未だ不明な点が多く残っている。このことから、HIV 生活環に関わる宿主因子の役割をより深く理解し、宿主側因子を標的とした新たなエイズ治療戦略が必要不可欠であると考えられる。

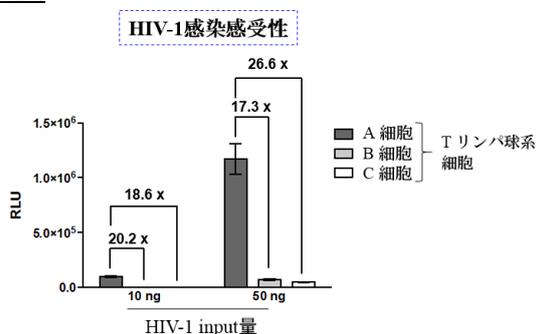
2. 研究の目的

HIV-1 感染感受性の異なる、感染標的 T リンパ球細胞における細胞内因子の mRNA 発現動態差異に着目し、HIV-1 感染環境全体を捉えた、新規 HIV-1 感染制御因子の網羅的な探索同定および、その機序の解析をおこなうことで、HIV-1 感染伝播機構の更なる理解を深めることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) HIV-1 感染感受性に影響を及ぼす候補因子の抽出

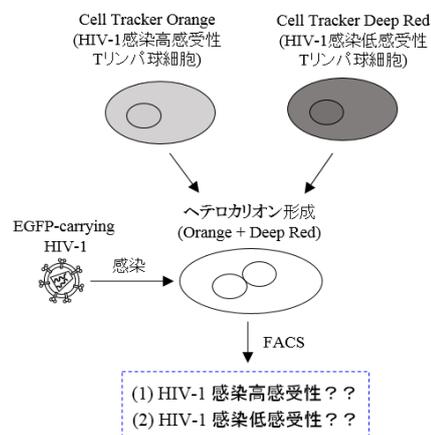
所属研究室では、HIV-1 感染標的細胞である 3 種の T リンパ球細胞における HIV-1 感染感受性の違いを見出している (図 1)。まず、マイクロアレイ解析により、HIV-1 感染感受性の異なる T リンパ球細胞における、細胞内因子の mRNA 発現動態差異の解析をおこなう。更に、HIV-1 感染感受性の異なる T リンパ球細胞の性状解析を目的としたヘテロカリオンを用いた HIV-1 感染実験 (図 2) の結果を基に、HIV-1 感染抑制因子、あるいは、HIV-1 感染をサポートする宿主因子の 2 つに分類し、mRNA 発現動態差異レベルを基準に細胞内因子の解析優先順位を決定する。



(図1) Tリンパ球細胞におけるHIV-1感染感受性の差異

(2) HIV-1 感染制御因子の同定および機能解析

上記(1)において、29種類の宿主候補因子を HIV-1 感染抑制に関わる宿主候補因子として選定し、以下の手順に従い、HIV-1 感染抑制効果の評価をおこなった。①選定した宿主候補因子の特異的かつ安定的発現制御 (ノックダウン) 細胞を、各宿主候補因子に対して、2-3種類の異なる領域を標的とした shRNA を用いて樹立した。②ルシフェラーゼ遺伝子が挿入された VSVG シュードタイプの HIV-1 を感染させ、親株と比較して 2.5 倍以上のルシフェラーゼ発現上昇を認めた 6 種類の宿主因子を選定した。③これら宿主因子に対して、mRNA 量の定量を目的として、one-step RT-PCR の条件検討をおこなった。



(図2) ヘテロカリオンによるHIV-1感染制御因子の探索

条件が決定した 3 種の宿主因子については、感染低感受性細胞 (図 1、B 細胞) において機能遺伝子ノックダウン細胞を樹立し、④VSVG シュード

タイプの HIV-1 を用いた HIV-1 感染制御能の評価、⑤細胞表面レセプターである CD4、およびケモカインレセプターである CXCR4、CCR5 の発現量を確認し、自己増幅可能な HIV-1 を用いて、HIV-1 感染制御能の評価をおこなった。

4. 研究成果

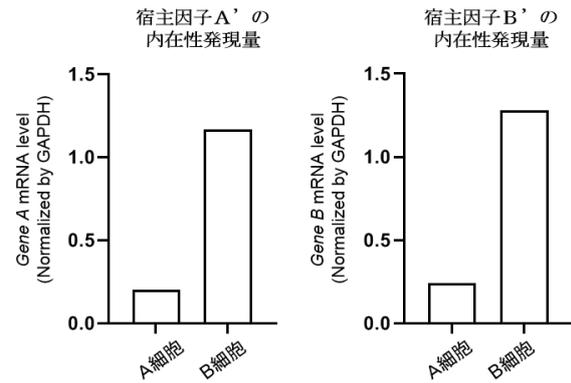
上記方法により、宿主候補因子 A' (免疫応答に関わる宿主因子)、および B' (タンパク質修飾に関わる宿主因子) を HIV-1 感染抑制に関わる候補因子として抽出した。これら二つの宿主因子の内在性 mRNA 量は、マイクロアレイの結果と相関性が認められ、宿主因子 A' および B' は、(図 1) の実験において、感染高感受性を示したリンパ球系細胞 A と比較して、感染低感受性を示したリンパ球系細胞 B において、高い発現量が認められた (図 3)。

HIV-1 感染低感受性細胞 (B 細胞) において、宿主候補因子 A' および B' の機能遺伝子ノックダウン細胞を樹立し、HIV-1 感染に重要な細胞表面レセプターの発現量をフローサイトメトリにより解析した結果、CD4 およびケモカインレセプターである CXCR4 共に、親株の細胞と同等レベルの発現量を維持していることを確認した。

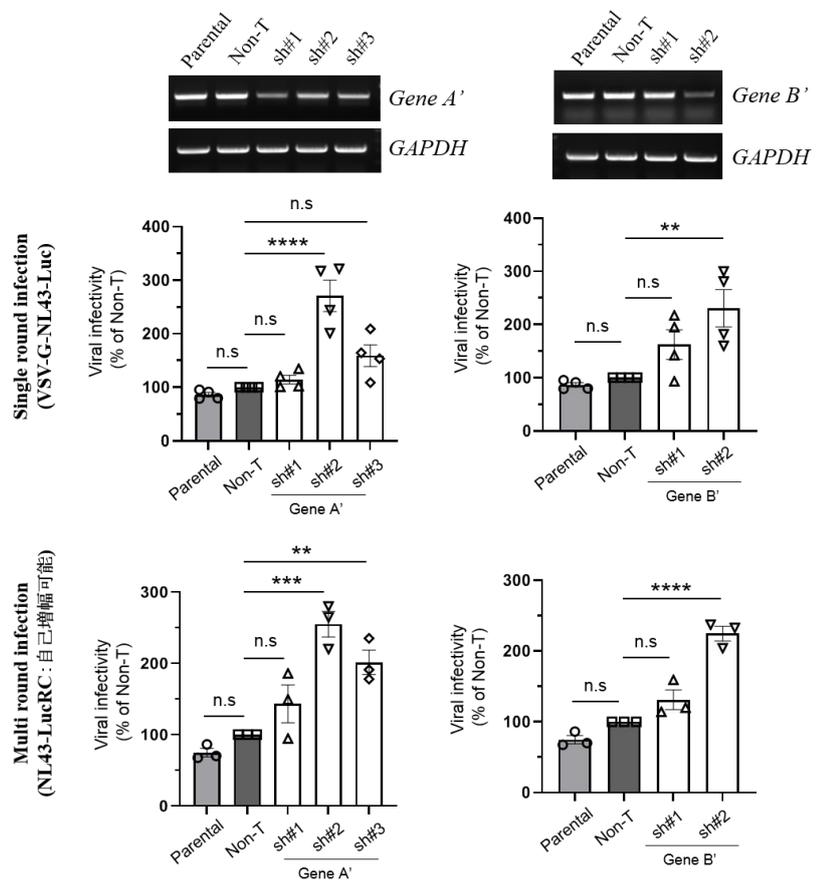
そこで、宿主候補因子 A' および B' の HIV-1 感染増殖過程における影響を調べる為に、VSVG シュードタイプの HIV-1 (シングルラウンド感染) および、自己増幅可能な HIV-1 を用いた感染実験をおこなった。双方のウイルス共に、ルシフェラーゼ遺伝子が組み込まれているため、感染により発現するルシフェラーゼ遺伝子の発現量を指標に感染効率を評価可能である。その結果、宿主因子 B' は、mRNA 量の低下に伴い、VSVG シュードタイプおよびウイルスエンベロープを介して感染が成立する HIV-1 共に、感染

宿主因子 A' については、shRNA の標的領域によっては、宿主因子 A' ノックダウン細胞において HIV-1 感染効率の回復が認められなかった。本研究により HIV-1 感染抑制

能を有する新たな宿主因子の候補として、宿主因子 A' および B' を選定した。今後は、機能遺伝子のノックダウンにより得られた上記の結果が、機能遺伝子特異的であるか否かについて、再構築細胞を樹立し、HIV-1 感染感受性復帰の有無について検討し、選定した二つの宿主因子が真に HIV-1 感染増殖抑制に寄与しているのか評価する必要がある。



(図3) 宿主因子A'およびB'のTリンパ球細胞における発現量(mRNA量)



効率の上昇が認められた。

(図4) 宿主因子A'およびB'のHIV-1感染増殖に対する影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 助川明香, 松田幸樹, 北村春樹, 月谷知也, 芳野広起, 小早川拓也, 玉村啓和, 山岡昇司, 前田賢次, 武内寛明
2. 発表標題 HIV-1転写動態制御に関わる新規低分子化合物の探索
3. 学会等名 第68回 日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 助川明香, 松田幸樹, 北村春樹, 月谷知也, 芳野広起, 小早川拓也, 玉村啓和, 山岡昇司, 前田賢次, 武内寛明
2. 発表標題 HIV-1潜伏感染細胞を再活性化する新規低分子化合物の探索
3. 学会等名 第35回 日本エイズ学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------