

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 4月11日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390089

研究課題名（和文） HIV アクセサリー蛋白質に対する免疫淘汰圧と機能維持

研究課題名（英文） Functional adaptation of HIV accessory proteins toward immune-mediated selective pressure

研究代表者：

上野 貴将 (UENO TAKAMASA)

熊本大学・エイズ学研究センター・准教授

研究者番号：10322314

研究成果の概要（和文）：Nef などのアクセサリー蛋白質はレンチウイルスに固有の因子で、HIV 感染と病原性発現に必須な因子と考えられている。しかし、CTL 淘汰圧がアクセサリー蛋白質の機能に及ぼす影響、およびアクセサリー蛋白質の機能が生体内のウイルス制御・感染病態に与える影響は十分に解析されて来なかった。本研究では、HIV-1 elite controller（ウイルス量が自発的に検出限界以下に抑えられている感染者）を基に、Nef 蛋白質の変異と機能が生体内のウイルス複製制御に与える影響とヒト免疫応答が持つ役割を解析した。その結果、controller では、慢性感染者に比較して、Nef の機能が減弱化していること、その減弱化の程度は、ある特定の HLA クラス I アリルと関連することを見いだした。

研究成果の概要（英文）：Impaired HIV-1 Gag, Pol, and Env function has been described in elite controllers (EC) who spontaneously suppress plasma viremia to < 50 RNA copies/mL; however, activity of the accessory protein Nef remains incompletely characterized. We examined the ability of 91 Nef sequences, isolated from plasma of 45 EC and 46 chronic progressors (CP), to down-regulate HLA class I and CD4, up-regulate HLA class II invariant chain (CD74), enhance viral infectivity, and stimulate viral replication in PBMC. In general, EC Nef sequences were functional; however, all five activities were significantly lower in EC compared to CP. Nef from HLA-B*57-expressing EC exhibited poorer CD4 down-regulation function compared to non-B*57 EC, and the number of EC-specific B*57-associated Nef polymorphisms correlated inversely with 4 of 5 Nef functions in these individuals. Results indicate that decreased viral protein function, due in part to host immune selection pressures, may be a hallmark of the EC phenotype.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2011年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2012年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス

キーワード：感染防御・ワクチン

1. 研究開始当初の背景

HLA クラス I 拘束性のヒト細胞傷害性 T 細胞 (CTL) は、ウイルス変異を選択させる強い淘汰圧として働くことが分かってきた。一方、アクセサリー蛋白質と呼ばれる Nef などの蛋白質は HIV 感染と病原性発現に必須な因子と考えられている。しかしながら、アクセサリー蛋白質に対するヒト CTL の応答、CTL 淘汰圧がアクセサリー蛋白質の機能に及ぼす影響、およびアクセサリー蛋白質の機能が生体内のウイルス制御・感染病態に与える影響は見過ごされ、十分に解析されて来なかった。

2. 研究の目的

本研究では、Nef 蛋白質に焦点を絞り、ヒト CTL 応答が、Nef 蛋白質の変異と機能に与える影響を明らかにする。同時に、HIV-1 elite controller(エリートコントローラーまたは EC と略す。ウイルス量が自発的に検出限界以下に抑えられている感染者)を基に、Nef 蛋白質の変異と機能が生体内のウイルス複製制御に与える影響を解析する。

3. 研究の方法

(1) HIV 感染者の検体

ボストン地区で集めた HIV 感染者の検体のうち、エリートコントローラー (自発的にウイルス量が 50 コピー/ml に抑えられている極めて稀な感染者) の 4 5 検体をランダムに選び、以後の研究に用いた。その他に、比較対象群として、未治療の慢性感染者 4 6 名から採取した検体を用いた。(倫理面への配慮) 検体は、米国マサチューセッツ総合病院で、文書による同意を得た感染者から採取した。感染者の個人情報入手していない。

(2) 組換えウイルスの調製

血漿ウイルス RNA から、nef 領域に特異的なプライマーを用いて nef 遺伝子を増幅し、プラスミドベクターにクローニング後、シークエンス解析を行った。さらに、感染者あたり 1 クローンを選び、制限酵素サイトを導入して、プロウイルスクローン pNL43 にサブクローニングした。これらを 293T 細胞にトランスフェクションして、感染性ウイルス粒子を調製した。

(3) Nef 機能の解析

Nef の 5 つの異なる機能について解析した。ウイルス感染性については、TZM 細胞に組換えウイルスを感染させて、個々のウイルスクローンの感染性を化学発光法により測定した。ウイルス複製は、健康人の PBMC を用いて行った。具体的には、 2×10^5 個/well の PBMC にウイルスを感染させ、3 日後に PHA を加え

て細胞を活性化させた。その後、3 日おきに、半量の培養液上清を回収して、ウイルス生産量を p24Gag-ELISA で定量した。HLA クラス I (HLA-I) 発現低下と CD74 発現昂進については、721.221 細胞に HLA-A24 と CD4 を安定発現するトランスフェクタントを用いた。この細胞にウイルスを感染させてから、48 時間後に細胞を回収して、表面抗原の発現量を交代で染色することにより検出し、フローサイトメトリーで定量化した。CD4 発現低下に関しては、Nef の他に Vpu や Env に同様の現象が知られているため、ウイルスではなく、Nef のみを発現させるプラスミドをトランスフェクションにより導入する方法を用いた。

4. 研究成果

(1) エリートコントローラー Nef の遺伝子配列と蛋白質発現量の解析

4 5 名のエリートコントローラーの血漿ウイルス RNA から nef 遺伝子を増幅して、遺伝子配列を解析した。系統樹解析をしたが、慢性感染者との間で明確な系統の違いはなく、またコントローラーに特異的なクラスターや共通の祖先を示唆するデータは得られなかった。また、Nef 蛋白質の発現量やウイルス粒子の生産量にも、コントローラーと慢性感染者で違いは認められなかった。

(2) エリートコントローラー Nef の機能解析

遺伝子配列では、コントローラーを特徴づける配列は認められなかったが、アミノ酸配列で調べてみると、いくつかのアミノ酸はコントローラーに有意に多い頻度で見られた。こうしたアミノ酸配列の違いが、Nef の機能の違いに反映するのではないかと考えた。Nef に依存する機能として、ウイルス感染性、ウイルス複製能、HLA-I 発現低下、CD74 発現昂進、CD4 発現低下の 5 つの機能を解析した。その結果、全体として、ほぼすべての Nef は機能的であった。しかし、コントローラーと慢性感染者の Nef 機能のそれぞれの中央値を比較してみると、有意にコントローラー由来の Nef は、機能が減弱化していることが明らかとなった。

(3) 感染者の HLA クラス I アリルの影響

これまでのさまざまな研究で、エリートコントローラーには HLA-B57 アリルを持っている人が有意に多いことが知られている。そこで、コントローラーの検体で、HLA-B57 に関連するアミノ酸変異を解析したところ、9 つの変異が有意に HLA-B57 を持つ感染者に多いことが分かった。興味深いことに、この変異の数と、Nef 機能の関連を調べてみたところ、変異数が多いほど機能が減弱化していること

が分かった。このことから、HLA-B57 拘束性の CTL 応答が Nef 機能の減弱化に影響していると示唆された。

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 10 件)

- ① Philip Mwimanzi, Tristan J Markle, Yoko Ogata, Eric Martin, Michiyo Tokunaga, Macdonald Mahiti, Xiaomei T Kuang, Bruce D Walker, Zabrina L Brumme, Mark A Brockman and *Takamasa Ueno (2013) Dynamic range of Nef functions in chronic HIV-1 infection. *Virology*, [査読有] 439, 74-80 DOI: 10.1016/j.virol.2013.02.005
- ② Philip Mwimanzi, Tristan J Markle, Eric Martin, Yoko Ogata, Xiaomei T Kuang, Michiyo Tokunaga, Macdonald Mahiti, Florencia Pereyra, Toshiyuki Miura, Bruce D Walker, Zabrina L Brumme, Mark A Brockman and *Takamasa Ueno (2013) Attenuation of multiple Nef functions in HIV-1 elite controllers. *Retrovirology* [査読有] 10: 1 DOI: 10.1186/1742-4690-10-1
- ③ Philip Mwimanzi, Tristan J. Markle, Takamasa Ueno, Mark A. Brockman (2012) HLA class I down-regulation by HIV-1 Nef: What might we learn from natural sequence variants? *Viruses* 4, 1711-1730 doi:10.3390/v4091711 [査読有]
- ④ Zafrul Hasan, Jonathan M Carlson, Hiroyuki Gatanaga, Anh Q. Le, Chanson J Brumme, Shinichi Oka, Zabrina L Brumme, *Takamasa Ueno (2012) Minor contribution of HLA class I-associated selective pressure to the variability of HIV-1 accessory protein Vpu. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* [査読有] 421, 291-295 DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.04.002
- ⑤ Nopporn Chutiwitoonchai, Masateru Hiyoshi, Philip Mwimanzi, Takamasa Ueno, Akio Adachi, Hirotaka Ode, Hironori Sato, Oliver T. Fackler, Seiji Okada, Shinya Suzu (2011) The identification of a small molecule compound that reduces HIV-1 Nef-mediated viral infectivity enhancement. *PLoS ONE* [査読有] 6(11): e27696
- ⑥ Philip Mwimanzi, Zafrul Hasan, Ranya Hassan, Shinya Suzu, Masafumi

Takiguchi and *Takamasa Ueno (2011) Effects of naturally-arising HIV Nef mutations on cytotoxic T lymphocyte recognition and Nef's functionality in primary macrophages. *Retrovirology* 8:50 doi:10.1186/1742-4690-8-50 [査読有]

- ⑦ Philip Mwimanzi, Zafrul Hasan, Michiyo Tokunaga, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka, *Takamasa Ueno (2010) Naturally arising HIV-1 Nef variants conferring escape from cytotoxic T lymphocytes influence viral entry co-receptor expression and susceptibility to superinfection. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* [査読有] 403, 422-427
- ⑧ Yoshinori Sato, Hiroshi Takata, Naoki Kobayashi, Sayaka Nagata, Naomi Nakagata, Takamasa Ueno, Masafumi Takiguchi (2010) Failure of effector function of human CD8+ T cells in NOD/SCID/JAK3-/- immunodeficient mice transplanted with human CD34+ hematopoietic stem cells. *PLoS ONE* [査読有] 5(10): e13109 doi:10.1371/journal.pone.0013109
- ⑨ Chihiro Motozono, Philip Mwimanzi, *Takamasa Ueno (2010) Dynamic interplay between viral adaptation and immune recognition during HIV-1 infection. *Protein & Cell* [査読有] 1, 514-519
- ⑩ Koizumi H, Hashimoto M, Fujiwara M, Murakoshi H, Chikata T, Borghan MA, Hachiya A, Kawashima Y, Takata H, Ueno T, Oka S, Takiguchi M. (2010) Different in vivo effects of HIV-1 immunodominant epitope-specific CTLs on selection of escape mutant viruses. *Journal of Virology* [査読有] 84, 5508-5519

[学会発表] (計 23 件)

- ① X. Kuang, A Le, P Mwimanzi, T Markle, R Danroth, T Ueno, T Miura, B Walker, Z Brumme, M Brockman, and the Acute HIV and International HIV Controllers study group. Reduced HIV-1 Nef Function in Acute/Early Individuals who become Viremic Controllers. 20th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI), Georgia World Congress Center, Atlanta, USA. March 3-6, 2013
- ② Chihiro Motozono, John S. Bridgeman, Masaaki Miyazawa, Andrew K. Sewell and Takamasa Ueno. The impact of a single

- amino acid difference in CDR3・ on TCR・・・ cross-reactivity、ワークショップ 32 ヒト免疫、第 41 回日本免疫学会総会・学術集会、神戸国際会議場、兵庫、2012 年 12 月 5~7 日
- ③ 上野貴将、Mwimanzi Philip、Markle Tristan、緒方陽子、徳永美知代、Mahiti Macdonald、三浦聡之、Pereyra Florencia、Walker Bruce、Brumme Zabrina、Brockman Mark: Genetic and functional analyses of HIV-1 Nef in elite controllers. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、グランキューブ大阪 (大阪国際会議場)、2012 年 11 月 13 日 - 11 月 15 日
- ④ Zafrul Hasan, J. Carlson, H. Gatanaga, A. Le, C. Brumme, S. Oka, Z. Brumme, Takamasa Ueno. HLA class I-mediated sequence polymorphism in HIV-1 accessory protein Vpu. The 13th KUMAMOTO AIDS Seminar and GCOE Joint International Symposium, Hotel Nikko Kumamoto and Aso Resort Grandvrio Hotel, Kumamoto, Japan. October 24-26, 2012.
- ⑤ Chihiro Motozono, John J. Miles, Zafrul Hasan, Hiroyuki Gatanaga, Meribe Stanley, Shinichi Oka, Masaaki Miyazawa, Andrew K. Sewell, Takamasa Ueno. HIV-1 immune escape and cross-reactivity profiles of virus-specific cytotoxic T lymphocytes, YIS-A Session II, 13th Kumamoto AIDS Seminar Global COE Joint International Symposium, Aso Resort GRANDVRIO, Kumamoto, Japan, October 24-26, 2012
- ⑥ T. Ueno. Functional impairment of HIV-1 Nef in elite controllers and its correlation with immune-mediated selective pressure. 13th Kumamoto AIDS Seminar Global COE Joint International Symposium, Aso Resort Grandvrio Hotel, Kumamoto, Japan. October 24th - October 26th, 2012.
- ⑦ M. Mahiti, P. Mwimanzi, Y. Ogata, M. Tokunaga, B. Walker, Z. Brumme, M. Brockman, T. Ueno. Modulation of HIV-1 Nef-mediated HLA class I down-regulation activity during disease progression. 13th Kumamoto AIDS seminar Aso Resort Grandiovrio Hotel, Kumamoto, Japan 24th -26th October, 2012.
- ⑧ 本園千尋、John J. Miles、宮澤正顯、上野貴将、Andrew K. Sewell: HLA-B35 拘束性 HIV 特異的 TCR は野生型抗原に高い特異性を有する、学術賞ならびに学術奨励賞候補口演、第 21 回組織適合性学会大会、明治大学、東京、2012 年 9 月 15~17 日
- ⑨ Zafrul Hasan, J. Carlson, H. Gatanaga, A. Le, S. Oka, Z. Brumme, Takamasa Ueno. Impact of HLA class I-driven genetic variability in HIV-1 accessory gene vpu. COLD SPRING HARBOR ASIA CONFERENCES: Frontiers of Immunology in Health and Disease. Suzhou Dushu Lake Conference Center, China. September 3 - 7, 2012.
- ⑩ Philip Mwimanzi, Tristan Markle, Michiyo Tokunaga, Toshiyuki Miura, Eric Martin, Florencia Pereyra, Bruce Walker, Zabrina Brumme, Mark Brockman, Takamasa Ueno. Impaired viral infectivity and viral replication capacity by nef alleles from HIV elite controllers. 25th Annual Meeting of Japanese Society for AIDS Research, Tokyo Hyatt Regency, Tokyo, Japan. November 30th - 2nd December, 2011.
- ⑪ Zafrul Hasan, J. Carlson, H. Gatanaga, A. Le, C. Brumme, S. Oka, Z. Brumme, T. Ueno. Impact of HLA class I-driven genetic variability in HIV-1 accessory genes. 2011 The Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. Chiba, Makuhari Messe, Japan; November 27-30, 2011
- ⑫ Zafrul Hasan, J. Carlson, H. Gatanaga, A. Le, C. Brumme, S. Oka, Z. Brumme, T. Ueno. Subtle effect of HLA class I-driven selective forces on the variability of HIV-1 accessory genes. 12th Kumamoto AIDS Seminar and GCOE Joint International Symposium. Hotel Nikko Kumamoto and Aso Resort Grandvrio Hotel, Kumamoto, Japan; October 19-21, 2011.
- ⑬ Philip Mwimanzi, Tristan Markle, Michiyo Tokunaga, Toshiyuki Miura, Eric Martin, Florencia Pereyra, Bruce Walker, Zabrina Brumme, Mark Brockman, Takamasa Ueno. Population analysis of viral replication capacity by nef alleles of HIV elite controllers. 12th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 19-21 October 2011.
- ⑭ Chihiro Motozono, John J. Miles, Linda Wooldridge, David A. Price, Takamasa Ueno, Andrew K. Sewell. The cross-reactivity footprints of HIV-specific CTLs. 12th Kumamoto AIDS Seminar and GCOE Joint International Symposium. Hotel Nikko Kumamoto and

- Aso Resort Grandvrio Hotel, Kumamoto, Japan; October 19-21, 2011.
- ⑮ Philip Mwimanzi, Tristan Markle, Michiyo Tokunaga, Toshiyuki Miura, Eric Martin, Florencia Pereyra, Bruce Walker, Zabrina Brumme, Mark Brockman, Takamasa Ueno. Impairment of viral replication capacity by nef alleles from HIV elite controllers. Frontiers of Retrovirology, Complex retroviruses, retroelements and their hosts, Amsterdam, Netherlands, 3-5 October 2011.
- ⑯ Philip Mwimanzi, Tristan Markle, Michiyo Tokunaga, Toshiyuki Miura, Eric Martin, Florencia Pereyra, Bruce Walker, Zabrina Brumme, Mark Brockman, Takamasa Ueno. Impairment of virion infectivity by nef alleles from HIV elite controllers. Nef activity in enhancement of virion infectivity is impaired in HIV elite controllers. XV, International Congress of Virology, Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan, 11-16 September 2011.
- ⑰ Zafrul Hasan, J. Carlson, H. Gatanaga, A. Le, C. Brumme, S. Oka, Z. Brumme, T. Ueno. Effect of HLA class I-mediated selective pressure on HIV-1 accessory genes. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress: Virus and host response, Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan; September 11-16, 2011.
- ⑱ Philip Mwimanzi, Tristan Markle, Michiyo Tokunaga, Toshiyuki Miura, Eric Martin, Florencia Pereyra, Bruce Walker, Zabrina Brumme, Mark Brockman, Takamasa Ueno. Impairment of virion infectivity by nef alleles from HIV elite controllers. Keystone Symposia HIV Evolution, Genomics and Pathogenesis, Canada, March 20-25, 2011.
- ⑲ Zafrul Hasan, J. Carlson, H. Gatanaga, A. Le, C. Brumme, S. Oka, Z. Brumme, T. Ueno. Impact of HLA class I-driven genetic variability in HIV-1 accessory genes in Japanese sequences. Keystone Symposia HIV Evolution. Genomics and Pathogenesis: Whistler, Canada; March 20 - 25, 2011.
- ⑳ Mwimanzi, P., Oniangue-Ndza, C., Allen T. M., and Ueno, T. Nef activity in down regulation of viral receptors and protection of HIV superinfection is modulated by Nef mutations that confer CTL escape during acute infection. 11th KUMAMOTO AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, Hotel Nikko Kumamoto and Aso Grand Vrio Hotel, Kumamoto, Japan, October 6-8, 2010.
- 21 Zafrul Hasan, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka, and Takamasa Ueno. Implication of the effects of host immune responses on the HIV-1 vpu gene evolution. 24th Annual Meeting of the Japanese Society for AIDS Research. Grand Prince Hotel Takanawa, Prince Sakura Tower, Takanawa, Tokyo; November 24-26, 2010.
- 22 Zafrul Hasan, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka, and Takamasa Ueno. Implication of the effects of host immune responses on the HIV-1 vpu gene evolution. The 11th KUMAMOTO AIDS Seminar and GCOE Joint International Symposium. Hotel Nikko Kumamoto and Aso Resort Grandvrio Hotel, Kumamoto, Japan; October 6-8, 2010.
- 23 Mwimanzi P., Ueno T. CTL-escape Nef variants influence CCR5 down regulation and HIV superinfection susceptibility. The 14th International Conference of Immunology (ICI), Kobe International Exhibition and Portopia Hotel, Kobe, Japan, August 23-27, 2010.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 貴将 (UENO TAKAMASA)
 熊本大学・エイズ学研究センター・准教授
 研究者番号：10322314

(2) 研究分担者

三浦 聡之 (MIURA TOSHIYUKI)
 長崎大学・熱帯医学研究所・客員教授
 研究者番号：00296576

(3) 連携研究者

潟永 博之 (GATANAGA HIROYUKI)
 国立国際医療研究センター
 エイズ治療・研究開発センター
 治療開発室長
 研究者番号：10466211