

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790430

研究課題名（和文） HIV 潜伏感染モデル動物の構築と潜伏化メカニズムの解明

研究課題名（英文） Analysis for the mechanism promoting HIV latent infection.

研究代表者

蝦名 博貴（EBINA HIROTAKA）

京都大学・ウイルス研究所・助教

研究者番号：60541951

研究成果の概要（和文）： Human immunodeficiency virus (HIV)を感染者体内から完全除去する事は、現在の薬剤療法では不可能である。HIV の潜伏感染がその原因であると考えられているが、その潜伏化機構はいまだに明らかになっていない。そこで本研究では、HIV 潜伏感染決定メカニズムの解明を目的として、以下の研究を行った。

H22 年度は生体内における HIV の潜伏感染実験モデル動物の構築を目的として、ヒト化マウスに非増殖型 HIV ベクター（single round-HIV, SR-HIV）を感染させ、抹消血に含まれる潜伏感染細胞の解析を行った。H23 年度は HIV の潜伏化を誘導しやすい組込み経路を *in vitro* の実験により明らかにした。具体的には、IN を介さずに組込まれた HIV プロウイルスはウイルス発現量が弱い事、そして、そのウイルス発現量の違いは、HIV の組込み位置によって決定されていることを明らかにした（*Virology*, 2012 25;427(1):44-50）

研究成果の概要（英文）： Although combination antiretroviral therapy (cART) has reduced the pathogenesis of AIDS-related malignancies, it is still impossible to eliminate HIV from infected individual. The HIV latent infection is proposed to be a reason for the incurable phenomenon. However, the mechanism prompting latent infection in HIV infection is still unclear. To clarify the mechanism promoting HIV latency *in vivo* and *in vitro*, we performed several experiments.

In 2010, humanized mouse was infected with single round-HIV (LTR-Tat-IRES-GFP vector) and latently infected lymphocytes were analyzed. In 2011, we found specific integration pathway that has a potential to induce latently infection. We found HIV cDNA can be inserted into the host chromosome even in the presence of integrase (IN) inhibitor. Moreover, we found that the HIV integration pattern is modified under IN-deficient conditions and it may cause reduced promoter activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：潜伏感染、HIV、インテグレーション、ヒト化マウス、エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

これまでの臨床サンプルを使った研究から、HIVはHLA-DR陰性の休止期にある長期生存可能なCD4陽性メモリーT細胞に潜伏感染していることは良く知られている。これら潜伏感染細胞は、HIV感染者体内ではその総数は 10^6 個と非常に少ない細胞集団であると推測されている。そして潜伏感染細胞は、休止期にあることよりウイルスを産生しない状態で極めて長期間生存しうる能力を有すると考えられることから、現在のウイルス複製過程を抑制する薬剤の併用療法であるHAART療法は、その細胞を体内から完全に除去する根治治療になりえないことは自明である。HAARTが導入された直後から、血漿中のウイルスRNAは検出限界以下に低下しても、ウイルスDNAは検出できることより、HIVは潜伏感染しうるということが良く知られることになった。しかし、その具体的な潜伏化のメカニズムについてはほとんど解明されていない。その理由はHIVには適切な長期感染動物モデル実験系がなく、臨床検体の解析に限られているからである。少なくともその解析から、HIVに感染したCD4陽性メモリーT細胞の一部が潜伏感染状態にあることは間違いない。しかし、非活性化状態の細胞に感染し、その状態を維持しているのか、活性化状態の細胞に感染後、その細胞が非活性化状態へ移行するのかまったく不明である。そのほか、生体内には単球/マクロファージ、ならびに樹状細胞というT細胞以外のHIVの標的となる細胞群があり、これらの細胞が生体内におけるウイルス増殖と潜伏化にどのように関わりうるのかも、まったく明らかになっていない (Coleman Retrovirology 2009, Pierson Annu. Rev. Immunol. 2000)。

2. 研究の目的

本研究はHIV潜伏感染決定メカニズムの解明を目的に、ヒト白血球造血能を有するヒト化マウス体内でHIV潜伏感染様式を再現し、潜伏感染成立を決定する分子機序を明らかにする研究である。具体的にはHIV感染マウスから分離した潜伏感染細胞のプロウウイルスの組込み位置とそのプロウウイルスからのウイルス発現量を解析する事により、ウイルス潜伏化を誘導する細胞性ならびにウイルス性因子の実体を明らかにする。

3. 研究の方法

HIV潜伏感染動物モデルの構築には、LTR

プロモーター制御によりGFPを発現SR-HIVをヒト化マウスに接種した。2週間後のヒト化マウスの抹消Tリンパ球をFlow cytometry解析により、GFP発現細胞を検出した。また、ヒト化マウスの抹消Tリンパ球をCD3とIL-2の増殖刺激環境下で培養したものをflow cytometry解析する事で潜伏感染細胞を検出した。

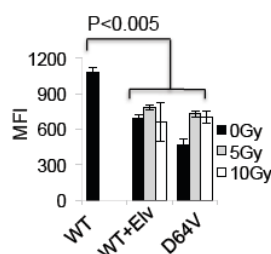
ウイルス産生能力とウイルス組込み位置の解析には、GFP発現SR-HIVを用い、Jurkat細胞に感染させた。これまでの我々の研究から、インテグラーゼ(IN)を介さずに組込まれたプロウイルスからのウイルス発現量は、通常のものに比べて低い事が明らかになっている。そのため、IN阻害剤raltegravir、elvitegravir存在下、もしくはIN機能欠損変異体のSR-HIVを感染させ、ウイルス産生能力の低いプロウイルスを作製した。プロウイルスの組込み位置の解析にはリンカーPCR法を用いた。

4. 研究成果

H22年度は、生体内におけるHIVの潜伏感染を再現するために、LTRプロモーターよりウイルスの転写調節因子TatとGFPの発現のみを行う非増殖型HIVベクター(single round-HIV, SR-HIV)を用いて、ヒト血液幹細胞移植マウス(ヒト化マウス)で感染実験を行った。SR-HIV感染2週間後のヒト化マウスの抹消Tリンパ球において、恒常的GFP陽性細胞と、CD3とIL-2の増殖刺激環境下でGFP発現が誘導される細胞が検出された。しかしながら、分離解析できるほどの感染細胞数は得られなかった。さらなる解析のためにはSR-HIVのヒト血液幹細胞への導入効率を増加させる手法を用いる必要がある。

H23年度はHIVプロウイルスの組込み位置とHIVの潜伏化の相関を解析することを目的として、linker PCR法を用いたHIVの組込み位置解析方法を確立した。これまでの我々の研究で、インテグラーゼ(IN)非依存的に組込まれたHIVプロウイルスからのウイルス発現量は、IN依存的に組込まれたものに比して低い事が明らかになっていた(図1)。

図1: IN非依存的な組みとウイルス発現量



H23 年度はこの方法を用いて、ウイルス組込み経路の違いにより誘導されるウイルス発現量の違いが、HIV の組込み位置によって決定されていることを明らかにした(Virology. 2012 25;427(1):44-50)。図2に HIV の組込み位置を示す。

図2：HIV の組込み位置解析

Pathway	Total Events	In RefSeq ¹	(%) ²	In repeat Seq	(%) ³	Deletion or Insertion	(%) ⁴
IN-dependent ¹	49	40	84.4	1	2.2	3	6.1
IN-independent ²	79	54	69.4	15	19.0	21	26.6
			P=0.098		P=0.0048		P=0.0039

¹ This result summarizes 40 sites derived from LTIG vector infected and 9 sites derived from CS-CDF-EG-Pre infected cells.
² This result summarizes 9 sites derived from LTIG vector infected and 75 sites derived from CS-CDF-EG-Pre infected cells. Of these sites, 6 are the results from WT+Elv and 76 six are from D64V. Then, 13 out of 79 results were derived from pre-irradiated culture.
³ Integration events counted as insertion into reference sequence (=gene coding region).
⁴ A frequency of integration into RefSeq. Random integration into RefSeq is expected to be 33% of total integration sites.
⁵ A frequency of integration into repeat sequence.
⁶ A frequency of integration with deletion in LTR sequence or with up to 50 bp insertion in LTR-host genome junction.

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4件)

Ebina H., Kanemura Y., Suzuki Y., Urata K., Misawa N., Koyanagi Y., Integrase-independent HIV-1 infection is augmented under conditions of DNA damage and produces a viral reservoir. Virology. 査読有、2012 427(1):44-50. 10.1016/j.virol.2012.02.004

Watanabe T., Urano E., Miyauchi K., Ichikawa R., Hamatake M., Misawa N., Sato K., Ebina H., Koyanagi Y. and Komano J. The hematopoietic cell-specific Rho GTPase inhibitor ARHGDI/D4GDI limits HIV-1 replication. AIDS Res. Hum. Retroviruses, 2011. 10.1089/aid.2011.0180

Gee P., Ando Y., Kitayama H., Yamamoto S.P., Kanemura Y., Ebina H., Kawaguchi Y. and Koyanagi Y. APOBEC1-mediated editing and attenuation of herpes simplex virus 1 DNA indicate that neurons have an antiviral role during herpes simplex encephalitis. J. Virol., 査読有、2011 85:9726-9736. 10.1128/JVI.05288-11

Kobayashi T., Ode H., Yoshida T., Sato K., Gee P., Yamamoto S.P., Ebina H., Strebel K., Sato H. and Koyanagi Y. Identification of amino acids in the human tetherin transmembrane domain responsible for HIV-1 Vpu interaction and susceptibility. J. Virol., 査読有、2011、85:932-945. 10.1128/JVI.01668-10.

[学会発表] (計6件)

Ebina H., Urata K., Kanemura Y. and

Koyanagi Y. Construction of labeling method for nucleosome-formed viral DNA. 第34回日本分子生物学会年会、2011年12月13日、横浜

Ebina H., Kanemura Y., Suzuki Y., Urata K. and Koyanagi Y. HIV-1 cDNA integration and persistent infection by DNA repair system. XV International Congress of Virology, 2011年9月15日、札幌

Ebina H., Kanemura Y., Suzuki Y., Urata K. and Koyanagi Y. Integrase independent retroviral cDNA integration, which is indefensible with integrase inhibitor. 第6回研究所ネットワーク国際シンポジウム、2011年6月9日、東京

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/Lab/KoyanagiHP/saito/TOP.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

蝦名 博貴 (EBINA HIROTAKA)

京都大学・ウイルス研究所・助教

研究者番号：60541951

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：