様式Ｆ－１９

科研費
KAKENHI

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６月５日現在

機関番号：14301
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2011～2012
課題番号：23790500
研究課題名（和文）HIV-1 感染急性期における Vpr と制御性 T 細胞の機能解明

研究課題名（英文）Investigation of the roles of Vpr and regulatory T cells in the acute phase HIV-1 infection

研究代表者
佐藤　佳（KEI SATO）
京都大学・ウイルス研究所・助教
研究者番号：10593684

研究成果の概要（和文）：
生体内 HIV-1 増殖における Vpr の役割を解明することを目的として、Vpr 欠損 HIV-1 と野生型 HIV-1（JR-CSF 株）をそれぞれヒト化マウスに接種した。Vpr 欠損 HIV-1 の増殖効率は、野生型 HIV-1 に比して有意に低かった。また、急性期（感染後 1-3 週齢）の野生型 HIV-1 感染マウスでは、Treg における効率的なウイルス増殖と Treg の枯渇が観察されたのに対し、Vpr 欠損 HIV-1 感染マウスではそれらが観察されなかった。以上の結果から、急性期において、HIV-1 は Treg を効率的な自己増幅の場として利用していること、そして、Vpr によって Treg の枯渇と免疫活性化が惹起されることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：
Regulatory $CD4^+$ T cells (Tregs) are known for playing a pivotal role in the maintenance of immune homeostasis, and actively cycle *in vivo.* It is also known that human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) mainly targets $CD4^+$ T cells and induces immune activation as a hallmark of HIV-1 pathogenesis. Here, by using a humanized mouse model, we demonstrate that viral protein R (Vpr), a pleiotropic protein encoded by HIV-1, promotes viral expansion by exploiting Tregs during the acute phase of infection. Our findings show that Vpr predominantly causes G_2 cell cycle arrest and apoptosis in Tregs, leading to their depletion *in vivo.* Moreover, we demonstrate that the Treg depletion caused by Vpr induces immune activation, which augments HIV-1 propagation *in vivo.* Taken together, this is the first report to directly demonstrate that Vpr plays a bifunctional role in HIV-1 replication *in vivo* by targeting Tregs and suggests that Vpr plays a crucial role in HIV-1 pathogenesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：ウイルス学
キーワード：HIV-1, ヒト化マウス, Vpr, 制御性 T 細胞, 感染急性期

１．研究開始当初の背景
種々の外来病原体の中には、ヒトにのみ特異的に感染し、病原性を発揮する病原体が存在する。ヒト特異的病原体の代表例として、後天性免疫不全症候群（AIDS）の原因ウイルスであるヒト免疫不全ウイルスＩ型（HIV-1）

が挙げられる。

抗 HIV-1 薬多剤併用療法の確立により、AIDS を含む HIV-1 感染症の治療成績は格段に改善した。しかしながら、HIV-1 感染症の根治療法はいまだに確立されておらず、より効果的な新規治療法が求められている。これまで根治療法が確立できなかった一因として、HIV-1 の病原性がヒトに限られており、HIV-1 感染病態を生体内で忠実に再現できる動物モデルが存在しなかったことが挙げられる。そのため、HIV-1 感染病態の研究は、HIV-1 の近縁ウイルスであるサル免疫不全ウイルス（SIV）をアカゲザルなどの霊長類に接種し、HIV-1 のヒトにおける病態を模倣する形で実施されてきた。しかしながら、SIV/霊長類モデルでの病変が HIV-1/ヒトにおける病変と同一である確証はなく、HIV-1 感染病態を真に理解するにあたり、HIV-1 そのものの感染モデルが希求されていた。この問題を解決するために、申請者は、免疫不全マウスである NOG マウスにヒト造血幹細胞を移植することにより、ヒト造血能を 1 年以上維持することのできる“ヒト化マウス”を作製した。作製したヒト化マウスは、HIV-1 増殖を 30 週以上持続することができた。さらに、申請者は、血中 CD4 陽性 T 細胞（HIV-1 の主たる感染標的細胞）の漸進的減少に代表される、HIV-1 感染者で確認される病態を、ヒト化マウスで再現することに成功した（Nie and Sato et al, *Virology,* 2009; Sato et al, *Vaccine,* 2010）。

HIV-1 の感染急性期における感染ダイナミクスは、HIV-1 感染症/AIDS の病態を理解する上で重要なステップである。しかしながら、臨床検体の場合、感染時点を特定・限定することができないため、感染急性期の解析はほぼ不可能である。また、これまで HIV-1 感染病態を適切に再現できる *in vivo* 感染モデルが存在しなかったため、感染急性期における感染病態については未解明な点が多かった。

２．研究の目的

申請者によるこれまでの研究から、ヒト化マウスの HIV-1 感染急性期（感染後 1-3 週）において、FOXP3 陽性の制御性 CD4 陽性 T 細胞（Treg）が顕著かつ有意に減少することを見出した。また、興味深いことに、感染後 1 週における感染マウスの脾臓を採取し、HIV-1 抗原に対する抗体（抗 p24 抗体）を用いた flow cytometry 法により、ナイーブ CD4 陽性 T 細胞（Tn），メモリーCD4 陽性 T 細胞（Tm），および Treg における HIV-1 感染細胞率を解析したところ、Treg における HIV-1 感染率が、Tn, Tm に比べ有意に高いことが確認された。以上の結果は、HIV-1 感染急性期において、Treg が主たる HIV-1 感染標的細胞となっていること、そして、Treg が主たる HIV-1 産生細胞となっていることを示唆している。

HIV-1 は、”アクセサリータンパク質”と呼ばれるさまざまなタンパク質をコードしている。そのひとつである Viral protein R (Vpr) は、細胞周期を G2/M 期で停止させる機能、アポトーシスを誘導する機能を有していることが知られている（Andersen et al, *Exp Mol Pathol,* 2008）。また、過去の報告から、Treg は生体内において比較的活発に細胞分裂を行っていることが明らかとなっている（Miyara et al, *Immunity,* 2009）。以上の知見から、ヒト化マウスの HIV-1 感染急性期における Treg の枯渇に Vpr が関与している可能性を想定し、Vpr 欠損 HIV-1 をヒト化マウスに接種した。その結果、Treg の枯渇は確認されなかった。さらに興味深いことに、Vpr 欠損 HIV-1 感染後 1 週における血漿中ウイルス量が、野生型 HIV-1 に比して有意に低下していることが確認された。以上の結果から、感染急性期において、Treg の枯渇が Vpr 依存的に引き起こされること、そして、Vpr による Treg の枯渇が、感染急性期における感染ダイナミクスに関与していることが強く示唆された。

そこで、本研究は、HIV-1 感染急性期における Vpr と Treg の機能解明を目的とする。具体的には、

(1) 感染急性期において Treg が HIV-1 の amplifier となっている可能性を追求する。
(2) 感染急性期における Treg と Vpr による HIV-1 増殖亢進メカニズムを解明する。

以上２点を解明することを目的とした。

３．研究の方法

(1) 感染急性期において Treg が HIV-1 の amplifier となっている可能性を追求する。

野生型 HIV-1 あるいは Vpr 欠損 HIV-1 をヒト化マウスに接種し、感染後 2,4,7 日目の末梢血を採取する。血漿中のウイルス RNA 量を real-time RT-PCR 法により定量し、末梢血単核球（PBMC）数を血球計算機を用いて計数する。また、PBMC 中の Tn, Tm, Treg の割合、および、HIV-1 感染細胞の割合を、抗 CD4, 抗 CD45RA, 抗 FOXP3, 抗 HIV-1 p24 抗体を用いた flow cytometry 法により算出する。

Treg のマーカーのひとつとして、CD25 分子（IL-2 受容体 a 鎖）が知られている。また、可溶性 IL-2 とにジフテリア毒素の融合タンパク質（denileukin diftitox [DD], 商品名 Ontak®）の投与により、生体内の Treg を消失させることができることが知られている（Morse et al, *Blood,* 2008）。Treg が感染急性期における HIV-1 amplifier となっていることを多角的に検証するために、DD を投与して Treg を消失させたヒト化マウスに HIV-1 を接

種し、感染後 2,4,7 日における血漿中ウイルス量を real-time RT-PCR 法により定量する。コントロールとして、PBS を投与したマウスでも同様の実験を行う。そして、DD を用いた Treg の消失により、同時期における血漿中ウイルス量が低下するか否かを評価し、感染急性期の HIV-1 増殖における Treg の役割を明らかにする。

(2) 感染急性期において Treg が HIV-1 の amplifier となっている可能性を追求する。

これまでの研究から、Vpr には細胞周期を G2/M 期で停止させる機能（G2/M arrest）があること（Andersen et al, *Exp Mol Pathol,* 2008）、また、Vpr による G2/M arrest 下の HIV-1 感染細胞は HIV-1 産生効率が高いこと（Goh et al, *Nat Med,* 1998）が示唆されている。また、Treg は生体内において活発に細胞分裂を行っていることが報告されている（Miyara et al, *Immunity,* 2009）。以上の知見から、Treg が Vpr による G2/M arrest に対する感受性が高い可能性、および、Vpr による G2/M arrest によって Treg における HIV-1 産生効率が増加する可能性を想定し、以下の実験を行う。

感染後 1 週の野生型および Vpr 欠損 HIV-1 感染マウスの脾臓からヒト細胞を回収し、Tn, Tm, Treg 各サブセットを分画する抗体と抗 HIV-1 p24 抗体で染色する。さらに、細胞のゲノム DNA を Hoechst 染色し、細胞の DNA 含有量に基づいて各サブセットの HIV-1 感染細胞，非感染細胞の細胞周期を flow cytometry 法により解析する。そして、HIV-1 感染および非感染 Tn, Tm, Treg の細胞周期の状態を、細胞周期解析ソフトウェア（ModFit）を用いて解析し、野生型 HIV-1 感染細胞での G2/M 期の細胞の割合が、Vpr 欠損 HIV-1 感染細胞のそれよりも高いことを検証する。次に、各サブセットの HIV-1 感染細胞を、G0/G1 期, S 期, G2/M 期にそれぞれ分画し、G2/M 期の野生型 HIV-1 感染 Treg における HIV-1 産生量が最も高いことを、HIV-1 p24 抗原量を flow cytometry 法により解析・定量することにより検討する。

４．研究成果

(1) 感染急性期において Treg が HIV-1 の amplifier となっている可能性を追求する。

血漿中のウイルス RNA 量を real-time RT-PCR 法により定量した結果、感染後 4, 7 日齢における野生型 HIV-1 感染マウスのウイルス RNA 量は、Vpr 欠損 HIV-1 感染マウスのそれに比して有意に大きかった。

DD 投与により効率的にヒト化マウス内の Treg を枯渇させることができ、これは他の免疫細胞（特に Tm）の活性化を惹起した。DD 投与マウスに野生型 HIV-1 または Vpr 欠損 HIV-1 を接種し、感染後 2,4,7 日における血漿中ウイルス量を real-time RT-PCR 法により定量した結果、興味深いことに、野生型 HIV-1、Vpr 欠損 HIV-1 感染マウスともにウイルス量が 10 倍以上増大した。さらに、DD 非投与マウスに比べ、野生型 HIV-1 と Vpr 欠損 HIV-1 感染マウスのウイルス量の差異は大きくなった。この結果は、DD 投与による Treg の枯渇によってヒト化マウス免疫系の異常活性化が惹起され、異常活性化した CD4T 細胞が HIV-1 増殖を促進した可能性が考えられた。

(2) 感染急性期において Treg が HIV-1 の amplifier となっている可能性を追求する。

感染後 1 週の野生型および Vpr 欠損 HIV-1 感染マウスの脾臓からヒト細胞を回収し、Tn, Tm, Treg 各サブセットを分画する抗体と抗 HIV-1 p24 抗体で染色した。その結果、野生型および Vpr 欠損 HIV-1 感染マウスにおいて、Treg における p24 陽性率がもっとも高かった。また、Tn, Tm 分画における p24 陽性細胞の割合は、野生型 HIV-1 感染マウスと Vpr 欠損 HIV-1 感染マウスで同等であったのに対し、Treg 分画の p24 陽性細胞の割合においては、野生型 HIV-1 感染マウスが Vpr 欠損 HIV-1 感染マウスに比して有意に高かった。

次に、細胞のゲノム DNA を Hoechst 染色し、細胞の DNA 含有量に基づいて各サブセットの HIV-1 感染細胞, 非感染細胞の細胞周期を flow cytometry 法により解析した。HIV-1 感染および非感染 Tn, Tm, Treg の細胞周期の状態を、細胞周期解析ソフトウェア（ModFit）を用いて解析した結果、野生型 HIV-1 感染 Treg の G2/M 期の細胞の割合が、Vpr 欠損 HIV-1 感染細胞のそれよりも有意に高かった。

さらに、各サブセットの HIV-1 感染細胞を、G0/G1 期, S 期, G2/M 期にそれぞれ分画し、G2/M 期の野生型 HIV-1 感染 Treg における p24 陽性率を flow cytometry 法により検証した結果、G2/M 期の野生型 HIV-1 感染 Treg における p24 陽性率および抗原量が最大であった。以上の結果から、感染急性期において Treg が HIV-1 の amplifier となっていること、そして、Vpr が Treg で G2 arrest を惹起することにより HIV-1 産生が増大される可能性が強く示唆された。

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９件）

1. Mitsuko Fukuhara*, Shingo Iwami*‡, Kei Sato*‡, Yorihiro Nishimura, Hiroyuki Shimizu, Kazuyuki Aihara, and Yoshio Koyanagi. Quantification of the dynamics of enterovirus 71 infection by experimental-mathematical investigation. *Journal of Virology*, 87(1): 701-705, 2013. (*Equal contribution;‡Correspondence)（査読有）
DOI: 10.1128/JVI.01453-12

2. Shingo Iwami, Kei Sato, Rob J. de Boer, Kazuyuki Aihara, Tomoyuki Miura, and Yoshio Koyanagi. Identifying viral parameters from *in vitro* cell cultures. *Frontiers in Microbiology,* 3:319, 2012.（査読有）
DOI: 10.3389/fmicb.2012.00319

3. Kei Sato, Peter Gee, and Yoshio Koyanagi. Vpu and BST2: still not there yet? *Frontiers in Microbiology,* 3:131, 2012.(‡Correspondence)（査読有）
DOI: 10.3389/fmicb.2012.00131

4. Shingo Iwami, Benjamin P. Holder, Catherine A. A. Beauchemin, Satoru Morita, Tetsuko Tada, Kei Sato, Tatsuhiko Igarashi, and Tomoyuki Miura. Quantification system for the viral dynamics of a highly pathogenic simian/human immunodeficiency virus based on an *in vitro* experiment and a mathematical model. *Retrovirology*, 9(1): 18, 2012.（査読有）
DOI: 10.1186/1742-4690-9-18

5. Kei Sato, Naoko Misawa, Mitsuko Fukuhara, Shingo Iwami, Dong Sung An, Mamoru Ito, and Yoshio Koyanagi. Vpu augments the initial burst phase of HIV-1 propagation and downregulates BST2 and CD4 in humanized mice. *Journal of Virology*, 86(9): 5000-5013, 2012.（査読有）
DOI: 10.1128/JVI.07062-11

6. Tadashi Watanabe, Emiko Urano, Kosuke Miyauchi, Reiko Ichikawa, Makiko Hamatake, Naoko Misawa, Kei Sato, Hirotaka Ebina, Yoshio Koyanagi, and Jun Komano. The hematopoietic cell-specific Rho GTPase inhibitor ARHGDIB/D4GDI limits HIV-1 replication. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 28(8): 913-922, 2012.（査読有）
DOI: 10.1089/aid.2011.0180

7. Kei Sato‡ and Yoshio Koyanagi‡. The mouse is out of the bag: insights and perspectives on HIV-1-infected humanized mouse models. *Experimental Biology and Medicine*, 236: 977-985, 2011. (‡Correspondence)（査読有）
DOI: 10.1258/ebm.2011.010294

8. Kei Sato, Naoko Misawa, Chuanyi Nie, Yorifumi Satou, Dai Iwakiri, Masao Matsuoka, Rei Takahashi, Kiyotaka Kuzushima, Mamoru Ito, Kenzo Takada, and Yoshio Koyanagi. A novel animal model of Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in humanized mice. *Blood*, 117(21): 5663-5673, 2011.（査読有）
DOI: 10.1182/blood-2010-09-305979

9. Tomoko Kobayashi, Hirotaka Ode, Takeshi Yoshida, Kei Sato, Peter Gee, Seiji P Yamamoto, Hirotaka Ebina, Klaus Strebel, Hironori Sato, and Yoshio Koyanagi. Identification of amino acids in the human tetherin transmembrane domain responsible for HIV-1 Vpu interaction and susceptibility. *Journal of Virology*, 85(2): 932-945, 2011.（査読有）
DOI: 10.1128/JVI.01668-10

〔学会発表〕（計１０件）
1. 佐藤佳, 三沢尚子, 福原充子, 岩見真吾, 伊藤守, 小柳義夫. ウイルス性膜タンパク質 Vpu による生体内 HIV-1 増殖促進作用, 日本分子生物学会, 2012 年 12 月 12 日, 福岡.

2. 佐藤佳, 三沢尚子, 福原充子, 岩見真吾, Dong Sung An, 伊藤守, 小柳義夫. 生体内 HIV-1 複製における Vpu の機能解析, 日本エイズ学会学術集会, 2012 年 11 月 24 日, 日吉.

3. 佐藤佳, 三沢尚子, 佐藤賢文, 松岡雅雄, 伊藤守, 小柳義夫. Vpr の制御性 T 細胞特異的な消耗促進作用による生体内 HIV-1 増殖亢進, 日本ウイルス学会学術集会, 2012 年 11 月 14 日, 大阪.

4. 佐藤佳. ヒト化マウスモデルを用いた HIV 複製定量系とその応用, 第 22 回日本数理生物学会大会, 2012 年 9 月 10 日, 岡山.

5. Kei Sato, Naoko Misawa, Mitsuko Fukuhara, Shingo Iwami, Dong Sung An, Mamoru Ito, and Yoshio Koyanagi. Positive contribution of HIV-1 Vpu for viral propagation in vivo, Retroviruses meeting at Cold Spring Harbor laboratory, 2012 年 5 月 24 日, ニューヨーク（米国）.

6. Kei Sato. Dynamics of HIV-1 infeection in humanized mouse model, 1st Samsung Humanized Mice Symposium（招待講演）, 2012 年 4 月 14 日, ソウル（韓国）.

7. 佐藤佳, 三沢尚子, 佐藤賢文, 松岡雅雄, 伊藤守, 小柳義夫. 急性感染期の HIV-1 増殖における制御性 T 細胞と Vpr の寄与, 第 25 回日本エイズ学会学術集会, 2011 年 12 月 2 日,

東京.

8. Kei Sato, Naoko Misawa, Mamoru Ito, and Yoshio Koyanagi. HIV-1 Vpr protein accelerates HIV-1 replication during acute phase in vivo, 3rd International Workshop on Humanized mice, 2011 年 10 月 29 日，ピッツバーグ（米国）.

9. Kei Sato, Naoko Misawa, Mamoru Ito, and Yoshio Koyanagi. HIV-1 Vpr protein accelerates HIV-1 replication during acute phase in vivo, XV International Congress of Virology, 2011 年 9 月 13 日，札幌.

10. Kei Sato, Naoko Misawa N, Yorifumi Satou, Masao Matsuoka, Mamoru Ito, and Yoshio Koyanagi. Efficient HIV-1 infection in regulatory $CD4^+$ lymphocytes during acute phase in humanized mice, Retroviruses Meeting at Cold Spring Harbor laboratory , 2011 年 5 月 26 日，ニューヨーク（米国）.

〔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〕
なし

６．研究組織
(1)研究代表者
佐藤　佳（KEI SATO）
京都大学・ウイルス研究所・助教
研究者番号：10593684

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし