

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790437

研究課題名(和文)迅速かつ高感度な細胞膜融合検出系を用いたHIV細胞指向性の解析

研究課題名(英文)Development of a rapid and sensitive cell-fusion-based phenotypic HIV-1 tropism assay

研究代表者

細谷 紀彰(HOSOYA, Noriaki)

東京大学・医科学研究所・特任助教

研究者番号：30568928

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：細胞融合を用いたHIVの細胞指向性決定系(DSP-Pheno)の樹立に成功した。細胞融合の検出には緑色蛍光タンパク質(GFP)とルシフェラーゼ(RL)を基にした2重分割タンパク質(Dual split protein: DSP)を用い、蛍光顕微鏡によるGFPおよびルミノメーターによるRLの2種類で判定可能である。DSP-Phenoは迅速で簡便で、細胞培養は必要だが、感染性ウイルスを使用することなく細胞指向性を決定可能である。今後、これまでに使用されている細胞指向性試験との比較などのさらなる解析が必要であるが、DSP-PhenoはHIVの細胞指向性の決定に今後非常に有用な実験手技となる。

研究成果の概要(英文)：We developed a novel HIV-1 phenotypic tropism assay (DSP-Pheno) based on the cell fusion. We employed dual split protein (DSP) composed of split green fluorescent protein (GFP) and split renilla luciferase (RL) as a marker for cell fusion. Equipped with two-way reporter system, RL and GFP, DSP-Pheno is a sensitive test with short turnaround time. Although maintenance of cell lines and laboratory equipment is necessary, it provides a safe assay system without infectious viruses. With further validation against other conventional analyses, DSP-Pheno may prove to be a useful laboratory tool.

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：HIV 細胞指向性 Envタンパク質 2重分割タンパク質 感染症 ウイルス

## 1. 研究開始当初の背景

(1) ヒト免疫不全ウイルス (Human Immunodeficiency virus type I: HIV) はウイルス表面の糖タンパク質である Env と、標的細胞上の CD4 およびケモカインレセプター (CCR5 または CXCR4) が結合することで膜融合が起こり細胞へ感染する。感染に CD4 と CCR5 を使うウイルスを R5 ウイルス、CD4 と CXCR4 を使うウイルスを X4 ウイルスと呼ぶ。このケモカインレセプターの使い分けを HIV の細胞指向性 (トロピズム) と呼ぶ。HIV の感染初期は 95% 以上の感染者で R5 ウイルスだけが増殖し絶対優勢な増殖を示すのだが、X4 ウイルスが増殖すると免疫状態の指標である CD4 細胞数が急激に減少し免疫不全が加速されることが知られている。HIV の細胞指向性は HIV 感染者の病体進行と関連するがその詳細な機序は明らかにされていない。また HIV の治療薬として CCR5 に結合し R5 ウイルスの増殖を阻害する CCR5 阻害薬 (Maraviroc) が製造認証を受けて実際の治療に使用可能である。Maraviroc は X4 ウイルスに効果を示さないため、服薬に際しては事前の細胞指向性測定が義務づけられている。このように細胞指向性の解析は HIV 感染症を理解する上でも、臨床的にも重要なテーマである。

(2) これまでの細胞指向性決定系のゴールドスタンダードは一段感染による組換え HIV を作製し、ルシフェラーゼの活性により細胞指向性を決定する方法 (Trofile) で、米国のモノグラム社が独占的に商業的試験をおこなって来た。日本からも米国まで検体を送る必要があり、結果を得るのに 1-2 ヶ月の期間が必要というのは大きな障壁であった。現在はシークエンスで解析した核酸配列をアミノ酸に変換し、アルゴリズムを用いて細胞指向性を推測するという方法 (Geno2Pheno) も使用されている。Geno2Pheno は全 env 遺伝子 2570 塩基中細胞指向性の決定に重要な 105 塩基 (V3 領域) を用いてアルゴリズムにより細胞指向性を推測するが、V3 領域以外にも細胞指向性に関与するアミノ酸が多数報告されており、そのため推測感度は約 60% と低くトロピズムを正確に判断する事は困難である。従って、上記問題を解決する為にも迅速で簡便な細胞指向性の決定系の確立が必要である。

## 2. 研究の目的

申請者らは独自に開発した 2 重分割タンパク質 (DSP) と細胞融合を用いた HIV の細胞指向性試験 (DSP-Pheno) を用いて、以下の点を明らかにすることを目的とする。

(1) 特異性の検討: HIV の実験株 (R5 ウイルスとして BaL、X4 ウイルスとして NL4-3、Dual ウイルスとして SF2) を用いて DSP-Pheno の結果をこれまでの細胞指向性の結果と比較する。

(2) 薬剤による阻害実験: CCR5 阻害薬

(Maraviroc)、CXCR4 阻害薬 (AMD3100) を用いて特異的に阻害が見られるのかを調べる。

(3) 感度の検討: 微少集団がどの程度の割合混在していれば、シグナルが検出可能かを調べる。

(4) 臨床検体 (HIV 感染者の血漿) から分離したウイルス RNA を用いて、env 遺伝子の増幅が可能か、またその env 遺伝子を発現ベクターへクローニングし、細胞指向性が決定可能かを調べる。

(5) これまで米国のゴールドスタンダードとなっている組換え HIV を用いた細胞指向性決定系と同様のシュードウイルスアッセイおよび、臨床現場でも利用が開始された塩基配列を用いた Geno2Pheno の結果と比較を行い、新規細胞指向性決定系で得られた結果の妥当性を証明する。

(6) HIV 感染者由来の増幅した Env 遺伝子のクローニングを行ない、(4) で得られた結果を詳細に解析する。

## 3. 研究の方法

申請者らは、DSP を用いた迅速で簡便な細胞指向性決定系の構築を行った。この測定系は緑色蛍光タンパク質 (GFP) およびルシフェラーゼの構造学的特性を考慮して 7 対 3 に分割した分割蛍光タンパク質 (DSP<sub>1-7</sub> および DSP<sub>8-11</sub>) を用いた。どちらも一方のみで存在する場合には GFP の蛍光およびルシフェラーゼの活性を示さないが、両者を共発現させることで DSP<sub>1-7</sub> および DSP<sub>8-11</sub> は自己会合し GFP およびルシフェラーゼの活性が復活する。この特性を利用し、レセプター発現細胞として CD4 および CCR5 発現 NP2 細胞 (N4R5) 又は CD4 および CXCR4 発現 NP2 細胞 (N4X4) にそれぞれに DSP<sub>1-7</sub> をレンチウイルスベクターにより導入を行ない、薬剤選択下で恒常的に DSP<sub>1-7</sub> を高発現した細胞株 N4R5-DSP<sub>1-7</sub>、N4X4-DSP<sub>1-7</sub> を樹立した。一方、Env 発現細胞として 293 細胞に DSP<sub>8-11</sub> および HIV-1 Env タンパク質を発現させるベクター (pRE11-env) を構築した。実際の実験では 24 穴プレートに培養してある 293 細胞に pRE11-env を transfection し、48 時間後に PBS にて細胞を懸濁し、96 穴プレートで培養している N4R5-DSP<sub>1-7</sub>、N4X4-DSP<sub>1-7</sub> と共培養を行ない、6 時間後に蛍光顕微鏡にて GFP をルミノメーターにてルシフェラーゼのシグナルを検出した。

(1) 特異性の検討: 特異性を確認する為に実験室株である BaL (R5)、NL4-3 (X4 株)、SF2 (Dual) をそれぞれ Env 発現ベクターである pRE11 にクローニングを行ない、pRE11-BaL、pRE11-NL4-3、pRE11-SF2 を作製した。

(2) 薬剤による阻害実験: Maraviroc、AMD3100 は最終濃度 2 μM となるように N4R5-DSP<sub>1-7</sub>、N4X4-DSP<sub>1-7</sub> へ添加し、90 分後に 293 細胞と共培養を行なった。薬剤なしと比較し 50% 以上のシグナルの減少があっ

た場合に阻害ありと判定した。

(3) 感度の検討: R5 ウイルスの Env を発現する pRE11-BaL と X4 ウイルスの Env を発現する pRE11-NL4-3 を 100%-0%、99%-1%、...、1%-99%、0%-100% という様に段階的に混合し、それらを用いてそれぞれの集団が 0% の時と比べ統計的に優位にシグナルが検出できるかを検討した。

(4) (6) 臨床検体: 東京大学医科学研究所感染免疫内科を受診し、同意が得られた患者 142 例の血漿から HIV RNA を抽出し逆転写反応により cDNA を作製した。cDNA を Nested-PCR により env 遺伝子を増幅し、制限酵素処理、ゲルからの抽出後、pRE11 ベクターへ Ligation を行なった。その後、大腸菌へ導入し、コロニーを集め plasmid 抽出したものを Bulk (集団) 1 個のコロニーから plasmid 抽出したものをクローンとして解析を行なった。

(5) 組換え HIV の作製: pRE11-env と env 遺伝子を欠損ルシフェラーゼを導入した HIV ベクターを 293 細胞に co-transfection を行い 48 時間後に細胞上清を N4R5-DSP<sub>1-7</sub>、N4X4-DSP<sub>1-7</sub> へ加え、感染後 48 時間でルシフェラーゼの活性を測定した。

Geno2Pheno: V3 遺伝子の配列をシーケンスにより解析し、<http://coreceptor.bioinf.mpi-inf.mpg.de> により細胞指向性を予測した。Cut-off (FPR) は 10% として解析を行なった。

#### 4. 研究成果

(1) 特異性の検討: HIV 実験室株である BaL (R5)、NL4-3 (X4)、SF2 (Dual) を用いて特異性を調べたところ、これまでに複数のグループから発表されている細胞指向性の結果と完全に一致した細胞から GFP およびルシフェラーゼのシグナルが観察され、結果は完全に一致した。また特異的でない細胞からのシグナル (バックグラウンド) は非常に弱く非特異的細胞融合がないことが明らかとなった。

(2) 薬剤による阻害実験: ルシフェラーゼの活性において Maraviroc を用いた場合には BaL で 83% の阻害、AMD3100 を用いた場合には NL4-3 で 81% の阻害が見られた。顕微鏡で GFP を観察した場合にも同様の蛍光が見られ、得られたシグナルは CCR5 もしくは CXCR4 特異的に細胞融合がおこっていることが確認された。また、DSP-Pheno assay は細胞膜融合阻害薬のスクリーニングなどにも使用可能である事が示唆された。

(3) 感度の検討: X4 (NL4-3) と R5 (BaL) を混合して検出感度を測定した。ルシフェラーゼにおいて R5 では 5%、X4 では 0.3% の微小集団が混合されていた場合にバックグラウンドと比べて統計的にシグナルを検出可能であった。また顕微鏡で GFP を確認する場合にはそれ以下のものでも検出できる可能性が示唆された。

(4) 臨床検体: HIV 感染者 126 例の血漿からウイルス RNA を分離し、Env 遺伝子の増幅を行ない、発現ベクターへのクローニングを行なった。全ての検体において細胞指向性の決定が可能であった。日本で流行しているサブタイプ B (126 例) に加えて、サブタイプ B 以外 (16 例: サブタイプ A、サブタイプ C、CRF-01AE) についても解析可能である事が明らかとなった。サブタイプ B の 126 例は Bulk の解析において R5 指向性: 68 例、X4 指向性: 0 例、Dual 指向性: 58 例であった。サブタイプ B 以外の症例では R5 指向性: 14 例、X4 指向性: 0 例、Dual 指向性: 2 例であった。どちらも X4 指向性のみで感染している症例は見られなかった。

(5) DSP-Pheno assay で判定した R5 と X4 を Geno2Pheno で比較を行なうと、R5 に比べ X4 と判定された Env は FPR 値が低くなり、2 つのアッセイの結果の傾向は一致した。シュードウイルスを用いた結果では R5 細胞の結果は DSP-Pheno assay と完全に一致した。しかし、X4 細胞においては DSP-Pheno assay で X4 細胞陽性となっても、ウイルスを用いたアッセイでは X4 細胞が陰性になる検体があった。この原因を調べる為にクローニングを行ない解析を行なった。

(6) クローンをを用いた場合でも、DSP-Pheno assay で X4 細胞陽性となっても、ウイルスを用いたアッセイでは X4 細胞が陰性になる Env が存在する事が明らかになった。またこの Env は AMD3100 で特異的に阻害することが可能な事から CXCR4 特異的細胞融合によるシグナルである事が確認された。

今後、今回見られた細胞融合および、ウイルスによる膜融合の結果の違いが、何に起因するものなのかを調べる為に、さらなる詳細な解析が必要である。

#### 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 3 件)

Teeranaipong P\*, Hosoya N\*, Kawana-Tachikawa A, Fujii T, Koibuchi T, Nakamura H, Koga M, Kondo N, Gao GF, Hoshino H, Matsuda Z, Iwamoto A., Development of a rapid cell-fusion-based phenotypic HIV-1 tropism assay, T.P., N.H., contributed equally to this work, Journal of the International AIDS Society, 査読あり, 18 巻, 2013, 18723-18732, doi: 10.7448/IAS.16.1.18723.

Nomura S, Hosoya N, Brumme ZL, Brockman MA, Kikuchi T, Koga M, Nakamura H, Koibuchi T, Fujii T, Carlson JM, Heckerman D, Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A, Miura T., Significant

reductions in Gag-protease-mediated HIV-1 replication capacity during the course of the epidemic in Japan, *Journal of Virology*, 査読あり, 87 巻, 2013, 1465-1476, doi: 10.1128/JVI.02122-12.

Kikuchi T, Iwatsuki-Horimoto K, Adachi E, Koga M, Nakamura H, Hosoya N, Kawana-Tachikawa A, Koibuchi T, Miura T, Fujii T, Kawaoka Y, Iwamoto A., Improved neutralizing antibody response in the second season after a single dose of pandemic (H1N1) 2009 influenza vaccine in HIV-1-positive adults, *Vaccine*, 査読あり, 30 巻, 2012, 3819-3823, doi: 10.1016/j.vaccine.2012.03.083.

[学会発表](計 5 件)

Noriaki Hosoya, Phairote Teeranaipong, Ai Kawana-Tachikawa, Naoyuki Kondo, Hiroo Hoshino, Zene Matsuda, Aikichi Iwamoto, Development of a HIV-1 Phenotypic Tropism Assay Using Dual Split Protein (DSP)-Mediated Membrane Fusion Detection System, 1st Asian Conference on Hepatitis B and C, HIV and Influenza, 2012 年 05 月 18 日~19 日, 中国北京市

Noriaki Hosoya, Phairote Teeranaipong, Ai Kawana-Tachikawa, Naoyuki Kondo, Hiroo Hoshino, Zene Matsuda, Aikichi Iwamoto, A novel phenotypic HIV-1 tropism assay, The 17th Chinese Biopharmaceutical Association Annual Conference, 2012 年 07 月 02 日~03 日, 中国青島市

Noriaki Hosoya, Phairote Teeranaipong, Stucki Heinz, Yoshimi Kashi, Ai Kawana-Tachikawa, Naoyuki Kondo, Hiroo Hoshino, Zene Matsuda, Aikichi Iwamoto, Phenotypic determination of HIV-1 envelope tropism using Dual Split Protein (DSP) mediated cell fusion assay system, Asian Research Forum on Emerging and Reemerging Infections - 2013, 2013 年 01 月 23 日~24 日, 東京都文京区

Noriaki Hosoya, Phairote Teeranaipong, Stucki Heinz, Yoshimi Kashi, Ai Kawana-Tachikawa, Naoyuki Kondo, Hiroo Hoshino, Zene Matsuda, Aikichi Iwamoto, Phenotypic determination of HIV-1 envelope tropism using Dual Split Protein (DSP) mediated cell fusion assay system, 7th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention, 2013 年 06 月 30 日~07 月 03 日, マレーシア、クアラルンプール

細谷 紀彰, Phairote Teeranaipong、立川(川名)愛、鯉淵 智彦、古賀 道子、中村 仁美、近藤 直幸、星野 洪郎、松田 前衛、岩本 愛吉, 細胞膜融合と二重分割タンパク質 (Dual Split Protein: DSP) を用いた HIV-1 細胞指向性試験の開発, 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月 10 日~12 日, 兵庫県神戸市

[その他]  
ホームページ等  
<http://www.idimsut.jp>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

細谷 紀彰 (HOSOYA, Noriaki)  
東京大学医科学研究所・感染症国際研究センター・特任助教

研究者番号 : 3 0 5 6 8 9 2 8