

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860777

研究課題名(和文) エイズ発症者から分離された新規HIV-2が宿主防御機構から逃避する分子機序の解明

研究課題名(英文) Analysis of immune escape mechanism of novel HIV-2 variants isolated from AIDS patients

研究代表者

根本 理子(Nemoto, Michiko)

岡山大学・その他の研究科・助教

研究者番号：30625926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、由来の異なる培養細胞および初代培養細胞におけるHIV-2組換え流行株の増殖動態が初めて明らかにされた。また、HIV-2組換え流行株が細胞侵入の際にケモカイン受容体のCCR5を利用していることが示された。本研究で得られた知見は新規HIV-2組換え流行株の学術的な基盤情報を提供するだけでなく、感染患者の治療の改善に大いに役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In vitro replication kinetics of novel HIV-2 circulating recombinant forms in various cell lines as well as in primary cells have been studied. The chemokine receptor CCR5 is used by novel HIV-2 circulating recombinant forms as a coreceptor to enter cells. The findings from this study not only offer academic knowledge of novel HIV-2 circulating recombinant forms, but also help improve treatment for these novel HIV-2 infected patients.

研究分野：医歯薬学

キーワード：HIV-2 組換え流行株 宿主因子

1. 研究開始当初の背景

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) には、1 型 (HIV-1) と 2 型 (HIV-2) の二種類存在することが知られている。HIV-2 は HIV-1 に比べて病原性が低く、感染者の約 80% はエイズを発症しない長期未発症者になることが知られている。HIV-2 が HIV-1 よりも病原性が低い理由として、ウイルスの増殖能の低さや宿主の免疫機能による制御が考えられている。宿主の免疫機能の中でも内在性 HIV 感染抑制因子に対して HIV-2 は HIV-1 と異なる感受性を示すことが知られている。

HIV-2 は遺伝子学的に 8 つのグループ (A~H) に分類されるが、そのうちグループ A とグループ B が西アフリカを中心に流行している。申請者らのグループは、2010 年にグループ A 株と B 株がゲノム組換えを起こした HIV-2 組換え流行株 (CRF01_AB 株) を世界で初めて報告した。特筆すべきことに、HIV-2 組換え流行株に感染していた 3 症例とも、36 歳以下の若年齢であるにも関わらず、エイズを発症しており、血中ウイルス量が 10^5 コピー/mL 以上の高値を示した。このことから、CRF01_AB 株が宿主免疫応答等の回避により成立した可能性が示唆され、至適治療指針の決定にはウイルス学的特性および宿主体内における感染動態の早急な解明が望まれた。

2. 研究の目的

本研究では、HIV-2 組換え流行株のウイルス学的特性を明らかにし、非組換え型の HIV-2 の特徴と比較解析することにより、病原性との因果関係を明らかにすることを目的とする。本研究は、従来のウイルス学的解析だけでなく、細胞内宿主因子との関連性に着目して研究を遂行することを特徴とする。

3. 研究の方法

本研究で用いる HIV-2 グループ A 株および B 株の感染性分子クローンについては、申請者

らが MTA (Material Transfer Agreement) を取り交わし、クローンを構築した国内外の研究者から入手したものをを用いた。また、HIV-2 組換え流行株の感染性分子クローンは、申請者の前任者である伊部史朗博士が 2010-2011 年に実施した若手研究 (B) において作製済みのものを使用した。HIV-1 の感染性分子クローンは HXB2 株および JR-CSF 株を用いた。

(1) 種々の細胞株における HIV-2 クローンの増殖能の比較

由来の異なる細胞株における増殖能の比較

子宮頸がん由来の MAGIC-5A 細胞、TZM-bl 細胞に各 HIV クローンを感染させウイルス増殖能の違いを比較した。MAGIC-5A 細胞は、プロモーター活性を持つ LTR (Long Terminal Repeat) の下流に β -Galactosidase が組み込まれたプラスミドを有するため、X-gal で染色することによりウイルスの感染価を測定した。また、TZM-bl 細胞は LTR の下流に Luciferase が組み込まれたプラスミドを有するため、Luciferase 活性を測ることでウイルスの感染価を測定した。さらに、ウイルス感染細胞を顕微鏡下で直接観察し、多核巨細胞の形成を確認した。

異なるケモカイン受容体を発現する細胞株を用いた細胞指向性の決定

ケモカイン受容体の CCR5 と CXCR4 のどちらも発現している R5-MaRBLE と CXCR4 のみ発現している X4-MaRBLE を用いて、HIV-2 組換え流行株のケモカイン受容体に対する指向性を解析した。コントロールとして、R5 指向性の HIV-1 JR-CSF 株および X4 指向性の HIV-1 HXB2 株を用いた。ウイルスの感染価は上記同様、Luciferase 活性により測定した。

また、TZM-bl 細胞を用いて CCR5 阻害剤である Maraviroc に対する感受性試験を行った。

(2) 初代培養細胞における HIV-2 クローンの増殖能の比較

ウイルスの動態をより生体内に近い条件で比較するため、健常人全血から分離した初代培養細胞を用いてウイルス増殖能を比較した。ヒト全血から密度勾配遠心法により末梢血単核球を分離後、抗 CD14 抗体で修飾された磁気ビーズを用いて単球由来マクロファージを、また抗 CD4 抗体で修飾された磁気ビーズを用いて CD4+T 細胞を分離した。さらに、抗 CD14 抗体で分離した単球から、樹状細胞特異的に発現している CD1c に対する抗体を用いて樹状細胞を調製した。調整した細胞に対し、それぞれ IFN や PHA で刺激を行った後、ウイルスを感染させた。ウイルスの増殖は、申請者らのグループで確立した定量 RT-PCR 法を用いて、培養上清中のウイルス RNA 量を測定することで評価した。

4. 研究成果

由来の異なる種々の細胞株における HIV-2 組換え流行株と HIV-2 グループ A 株、B 株の増殖能に顕著な違いは見出されなかった。

次に、HIV-2 組換え流行株のケモカイン受容体に対する指向性を解析した。その結果、X4-MaRBLE においては、ほとんど感染が見られなかったことから、組換え流行株は CCR5 指向性であることが示された。さらに、CCR5 阻害剤である Maraviroc に対して感受性を示した。その際の 50%有効濃度 (EC50) は 0.6-7.7 nM、最大阻害率 (MPI) は 99-100%であった。本研究により初めて HIV-2 組換え流行株のケモカインレセプターに対する指向性および Maraviroc に対する薬剤感受性プロファイルを明らかにすることができた。上記知見は、今後 HIV-2 組換え流行株感染患者の治療の選択肢を広げる上での重要な基盤情報となると考えられる。

次に、ヒト全血から調整した初代培養細胞を用いてウイルス増殖能の違いを評価した。末

梢血単核球を用いた場合、HIV-2 組換え流行株と HIV-2 グループ A 株、B 株の増殖速度に顕著な差は見られなかった。一方、単球由来マクロファージを用いた場合、HIV-2 グループ B 株のみ、増殖がまったく見られなかったが、これはマクロファージのもつ HIV 感染抑制因子を分解する作用を持つ vpx に premature stop codon が入っているためと考えられた。HIV-2 組換え流行株と HIV-2 グループ A 株の増殖速度には顕著な差は見られなかった。

上記研究の過程で、HIV-2 ウイルスを産生させる細胞によって、ウイルスの感染細胞に与える影響が異なることを新たに見出した。まず、ヒト胎児腎由来の 293T 細胞で産生させたウイルスを用いて、R5-MaRBLE への感染実験を行った。ウイルス感染後、1, 3, 5, 7 日目に Luciferase の発光強度を測定したところ、HIV-1 ウイルスでは、7 日目にかけて発光強度が増加していくのに対し、HIV-2 ウイルスを感染させた細胞では培養 3 日目に最も高い発光強度を示した後、5 日目以降ほとんど発光が確認できなくなった。また 5 日目以降に HIV-2 ウイルスを感染させた細胞の生存率が極端に低下していることが確認された。ヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞で産生した HIV-2 ウイルスを用いて同様の実験を行ったところ、7 日目においても細胞生存率の低下は確認されなかった。段階希釈したウイルスを用いて同様の実験を行ったが、やはり 293T 細胞に産生させた HIV-2 ウイルスを用いた場合のみ、感染 5 日目以降に細胞の生存率が低下していることが確認された。このことから、293T 細胞に産生させた場合、HIV-2 ウイルス特異的に、細胞内での急激な増殖および細胞死を引き起こすような変異、もしくは翻訳後修飾が起きている可能性が示唆された。293T 細胞に産生させた HIV-2 ウイルスと HeLa 細胞に産生させた HIV-2 ウイルスの違いを明らかにするため、それぞれの細胞が

ら産生させたウイルスのゲノム、タンパク質の解析を継続している。

岡山大学・環境生命科学研究科・特任助教
研究者番号：30625926

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 2 件)

根本理子、「エリート HIV コントローラーの謎」バイオメディア (日本生物工学会誌) 査読無 92(4), 189, (2014)

Nakashima, M., Ode, H., Kawamura, T., Kitamura, S., Naganawa, Y., Awazu, H., Tsuzuki, S., Matsuoka, K., Nemoto, M., Hachiya, A., Sugiura, W., Yokomaku, Y., Watanabe, N. and Iwatani, Y., “ Structural Insights into HIV-1 Vif-APOBEC3F Interaction”, Journal of Virology, 査読有, 90, 1034-47 (2015), DOI: 10.1128/JVI.02369-15

[学会発表](計 2 件)

Michiko Nemoto, “ Exome sequencing identified a novel tyk2 compound heterozygous mutation in 2 siblings with primary immunodeficiency ”, Joint Meeting of the 1st Africa International Biotechnology & Biomedical Conference and the 8th International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis, 2014.9.11, 「NAIROBI (KENYA)」

根本理子, “ A novel TYK2 compound heterozygous mutation in the patients with primary immunodeficiency ”, 日本分子生物学会年会, 2015.12.2, 「神戸国際展示場 (兵庫県・神戸市)」

6. 研究組織

(1)研究代表者

根本理子 (NEMOTO Michiko)