

平成 21 年 4 月 13 日現在

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2005～2008
 課題番号：17390135
 研究課題名（和文） HIV-1 タイ型 CRF01-AE の高アポトーシス誘導機序の解明とその制御法の開発
 研究課題名（英文） Studies on the mechanism for HIV-1 Thai CRF01_AE-induced high apoptosis induction and the development of its control
 研究代表者
 生田 和良（IKUTA KAZUYOSHI）
 大阪大学・微生物病研究所・教授
 研究者番号：60127181

研究成果の概要：HIV-1 は遺伝子変異を引き起こしやすく、これが HIV-1 病態の大きな特徴となっており、根本的な治療法やワクチン開発ができない原因となっている。本研究では、HIV-1 の病態機序解明および global epitope 誘導型ワクチン開発を目指して、タイ型（AE 型）と欧米型（B 型）間のウイルス学的な差異、組換え型出現機序、Env gp41 を認識させやすい HIV-1 の構築などにフォーカスした研究を行なった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
17 年度	5,300,000	0	5,300,000
18 年度	2,900,000	0	2,900,000
19 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
20 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
総計	14,000,000	1,740,000	15,740,000

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：HIV、AIDS、CRF01_AE、アポトーシス、重感染、組換え型、ワクチン

1. 研究開始当初の背景

HIV-1 感染病態の特徴は、長い無症候性キャリア期を経て AIDS を発症する点である。この間、HIV-1 は、感染初期から活発なウイルス複製を行い、宿主の免疫担当細胞を破壊し続けている。しかし、宿主側も絶えず免疫担当細胞の補給を行うことにより、ウイルスの負荷を低く抑えている状態と考えられる。

HIV-1 は極めて多様なウイルス集団である。HIV-1 は Group M (Major), O (Outlier) および N (non-M/non-O) の 3 Group に分類されるが、この内 Group M は HIV-1 の主要

なウイルスグループで、世界的規模で流行している。Group M に属するウイルスは、さらに A~K の 9 つのサブタイプに分けられる。また、これらのサブタイプは互いに遺伝子組換えを起こすことによって、新たな組換え型ウイルス (Circulating Recombinant Form; CRF) を多く生み出している。これまでの HIV-1 に関する情報のほとんどは、欧米各国に蔓延している HIV-1 サブタイプ B (B 型) 感染者から得られた情報が蓄積されたものである。たとえば、HIV-1 感染が引き起こす免疫担当細胞破壊による免疫不全機構については、HIV-1 の感染を受けた細胞自

身のアポトーシス機構および感染細胞もしくは感染細胞から遊離した HIV-1 粒子およびウイルス蛋白質の影響を受けた非感染免疫細胞のアポトーシス（活性化依存バースタンダーアポトーシス）などについて報告されている。しかし、世界の感染者のほとんど（95%）が感染している non-B 型についての情報は極めて少ない。したがって、これら non-B 型について、アポトーシス誘導機序、ウイルス複製機序、病態関連宿主因子等に関する情報を蓄積することが、HIV-1 感染者に対する的確な治療法、またその予防法を確立するうえで極めて重要となる。

私たちは、これまでに、タイ王国など東南アジアに蔓延しているのみならず、わが国においても感染者が増加傾向にある CRF01_AE (AE 型) HIV-1 について、B 型と大きく異なる点について報告してきた。特に、AE 型は *vpu* 遺伝子の premature stop codon 変異が、他のサブタイプに比べ、異常に高率であること、この *vpu* 変異は末梢血単核球 (PBMC) のアポトーシスを高率に誘導することを報告してきた。さらに、非感染 T 細胞のバースタンダーアポトーシス誘導は、CD4+ T 細胞のサブセット (CD4+CD38-) が高シンチウム形成可能な HIV-1 粒子の吸着を受けることにより、非感染 T 細胞のバースタンダーアポトーシスを誘導するエフェクター細胞になることを見出し、実際に AE 型 HIV-1 感染者から分画される CD4+CD38- サブセットが同様のエフェクター活性を獲得していることを突き止めている。この CD4+CD38- サブセットは、HIV-1 複製に対しては抵抗性で、インテグレーション後の転写過程が抑制されている。

2. 研究の目的

AE 型のウイルス学的性状について詳細な解析を行い、B 型と比較検討し、その相違点を明らかにする。また、AE 型は、A 型と E 型との組換え体であるが、そのような組換え体が出現する機序について解析する。さらに、多様な HIV-1 の制御法として、global epitope を認識させることが可能なワクチン開発に向けた検討を行う。

3. 研究の方法

タイ型 HIV-1 である AE 型の高アポトーシス誘導機序について、患者からの臨床サンプルを用いた検討も行う計画であったが、タイにおける倫理委員会からの承認が難しく、研究を実施することが困難となってきたことから、AE 型に関する情報を別の角度に広げて

検討することにした。

(1) タイ型 HIV-1 である AE 型の臨床ウイルス株を分離し、この *env* 領域を B 型の分子クローンである pNL4-3 に組み込むことにより、AE 型の Env 蛋白質の性状を解析した。

(2) B 型の実験室株である LAI を持続感染させた MT-4 細胞の細胞クローニングを行うことにより、*pol* protease 領域に one base insertion を、また幾つかの他の遺伝子にも変異が認められる provirus を持っているクローン細胞株 L-2 を分離していた。この L-2 細胞は、大量のウイルス粒子を産生するが、そのウイルス粒子はドーナツ型の未熟ウイルス形態をしており、非感染性である。この L-2 細胞を用いて、HIV-1 の組換え出現機序を明らかにするため、この L-2 への AE 型臨床ウイルス株による重感染実験を行なった。さらに、この重感染した L-2 細胞から細胞クローンを分離し、細胞クローンレベルで重感染に基づく組換え型 HIV-1 出現頻度とその機序について検討した。

(3) 上記 L-2 細胞および L-2 ウイルス粒子は、非感染ヒト CD4+細胞株である MOLT-4 との間で細胞融合に基づくシンチウムを形成し、その形成率は野生型 LAI よりも高率であった。そこで、この L-2 を用いて、HIV-1 Env 蛋白質による細胞融合過程を途中で止める工夫を行い、global neutralization epitope が存在する Env gp41 の構造が免疫細胞に認識されやすい変異 HIV-1 の作製を試みた。そのために、L-2 細胞内の全長を含む分子クローン pL2 を作成し、このクローンへの遺伝子変異導入を行った。

(4) AE 型感染者においても、高アポトーシス誘導に関わっていることが明らかになった CD4+CD38- サブセットについて、ウイルス感染感受性について検討した。AIDS 病態進行とともに、CD38+CD38- T 細胞比が上昇する点に着目し、CD4+の両サブセットが感受性を示す HIV-1 トロピズムについて検討した。また、その感受性の違いに関わる祝因子の同定を行なうため、GeneChip 解析を行った。

4. 研究成果

(1) 現在までに 35 個の CRF01_AE *env* 組換え型ウイルスを構築して、遺伝子解析を行うと共に、抗 Env ヒト単クローン中和抗体や患者血清に対するウイルス中和感受性を解析した。

遺伝子解析により得られた予想アミノ酸配列を用いて、35 個の *env* 遺伝子間のアミノ酸配列の多様性を解析した結果、予想以上に多様性を持つことが明らかになった。樹立した CRF01_AE *env* 組換え型ウイルスは、中和抗体や抗 Env 薬剤に対して多様な中和感受性を示した。具体的には、B 型ウイルス感染患者から樹立された Env gp120 に対するヒト単

クローン抗体では、ほとんどの CRF01_AE *env* 組換え型ウイルスの感染が阻止されなかったのに対して、Env gp41 に対するヒト単クローン抗体により多くの CRF01_AE *env* 組換え型ウイルスの感染が阻止された。

(2) タイの AE 型のような組換え型 (CRF) は、HIV-1 重感染を受けることにより出現したと考えられる。すなわち、既にある型の HIV-1 に感染した感染細胞が別の型の HIV-1 による 2 回目の感染を受け、双方のウイルスゲノム間の組換えを起こす過程を経て出現すると考えられる。実際、感染者の血清学的な、また分子的な解析から、複数の型の HIV-1 に感染している感染者の存在に関する証拠が多く得られている。

L-2 細胞株への AE 型臨床ウイルス株を重感染した結果、一部の細胞が重感染を成立した。重感染の判定は、抗 Gag p17 抗体で p17 の N 末端を認識する V17 が Gag の切断が起こった場合のみ反応する性質を利用した。L-2 細胞内には Gag 前駆体蛋白質のみを発現しており (Gag p24 の中央部を認識する V107 抗体で確認) 重感染後にのみ V17 陽性細胞が現れる。そこで、細胞クローニングにより、重感染が成立した 3 クローン細胞を分離し、そのウイルス遺伝子解析を行ったところ、B 型と AE 型の provirus がそれぞれ 1 コピーずつ存在し、Gag 蛋白質は成熟型になっていた。産生ウイルス粒子の Env および Gag 蛋白質は B 型であったが、感染性を獲得していたことから、AE 型の Pol 蛋白質によって complement された結果、成熟型ウイルス粒子の産生細胞になっていたと考えられた。そこで、これらクローン細胞から産生されるウイルス粒子を MT-4 細胞で継代培養を行ったところ、3 代継代の間にはほとんどのウイルスが、少なくとも L-2 細胞内 provirus 内の *pol* 遺伝子変異領域は AE 型に置き換わった組換え体になっていることが明らかになった。このように、B 型で初めに感染し、その持続感染状態にある細胞に AE 型が重感染することにより、まず complementation、その後に産生されるウイルスが複製する過程で recombination が起こり、組換え体が出現していた。したがって、L-2 のように、持続感染し、たとえ感染性粒子を産生していなくとも、これらの細胞は重感染ウイルスの受け手となり、多様な組換え体を産生する細胞集団となり得ると考えられる。

(3) HIV-1 Env 内 gp41 に存在する heptad repeat (HR)1 と HR2 は、逆平行に相互作用しヘアピン構造をとることで膜融合へと導くことに機能すると考えられている。この過程で最も強力に作用しているアミノ酸を *in silico* 解析により検討したところ、HR2 の N 末端に位置する Env の 628 と 631 番目のトリプトファンであると考えられた。そこで、周

辺の立体構造を大きく変化させないように考慮し、W を構造が類似しているチロシン (Y) に置換した変異体 (W628Y、W631Y、W628Y/W631Y) を作製した。

まず、アミノ酸置換導入によるウイルス蛋白質発現に与える影響を Western Blotting により確認したところ、Env 蛋白質のみを発現させた場合でも、ウイルス粒子を産生させた場合でも、これらのアミノ酸置換導入による Env 蛋白質発現への大きな影響は見られなかった。続いて、Env 蛋白質の機能を、シンシチウム形成法と、細胞融合に伴う Tat 蛋白質の移行によるレポーター遺伝子の転写活性亢進法により評価した。その結果、L-2 と陽性コントロールとして用いた LAI では Env 蛋白質のみを発現させた場合でも、ウイルス粒子を産生させた場合でも、使用したプラスミド量依存的にシンシチウム形成したが増加した。一方、これと同じ条件下でプラスミド量を増加させても、変異体のいずれにおいてもシンシチウム形成は確認できず、陰性コントロールとして用いた empty vector と同様であった。フローサイトメトリーにて、アミノ酸置換を導入したウイルスが標的細胞への結合能を維持していたかどうかを検討した結果、LAI、L-2、変異体の全てにおいて同程度の蛍光強度が確認され、アミノ酸置換を導入しても標的細胞への結合能には変化が無いことが明らかとなった。以上の結果は、今回作製した変異体は、正常にウイルス粒子形成を行い、標的細胞への吸着も正常であるが、その後の融合過程の途中、すなわち、gp120 構造が gp41 から外れ、gp41 が伸びて標的細胞に結合した段階で止まった状態 (すなわち、ヘアピン構造を取る直前の状態) が持続するウイルスと考えられる。これまで、細胞融合の各過程は瞬間的に進むために、免疫細胞が認識する猶予が無く、gp41 内の global epitope を認識した免疫応答誘導が難しいとされてきたが、今回作製した変異体はその点の改良が可能となったと考えられ、今後動物実験等によりその点を確認する必要がある。

(4) CD4⁺CD38⁺ T 細胞サブセットが CXCR4 指向性 HIV-1 に高感受性を示すこと、この違いには IL-4 刺激によって引き起こされるウイルス転写過程にあることを既に見出しているため、IL-4 処理および未処理の CD4⁺CD38⁺ および CD4⁺CD38⁻ T 細胞サブセットについて GeneChip 解析を行ったところ、IL-4 処理 CD38⁺サブセットでのみ認められたものとして 20 遺伝子、IL-4 処理 CD38⁻サブセットでのみ認められたものとして 5 遺伝子を同定することができた。半定量的 RT-PCR 法による解析を進めたところ、これら因子のうち、前者で 8 遺伝子、後者で 3 遺伝子が確認された。そこで、IL-4 処理 CD38⁻で発現の高かった遺

伝子群の1つ、RNF125について詳細な解析を進めた。RNF125に対する siRNA を用いて細胞内の RNF125 蛋白質レベルを減少させた。その後 HIV-1 を感染させたところ、HIV-1 の増殖が上昇した。そこで、HIV-1 proviral DNA と RNF125 を cotransfection することにより、ウイルス蛋白質産生に与える影響を検討したところ、細胞上清中に放出されるウイルス粒子のレベルが RNF125 の用量依存的に抑制された。RNF125 はそのアミノ酸配列から RING domain を持っていることから、蛋白質のユビキチン化を進める E3 ligase であることが推定される。RING domain の最初のシステインもしくは一番目と二番目のシステインをアラニンに置換することで、E3 ligase 活性を欠失した変異体を作製できることが今までに報告されている。そこで、これらの変異体 (C37A および C37/40A) を作製し、HIV-1 proviral DNA と cotransfection を行ったところ、E3 活性を失った変異体は、細胞上清中へのウイルス粒子放出に抑制的には働かなかった。HIV-1 proviral DNA と RNF125 を cotransfection した後、細胞内 HIV-1 RNA 量を調べたところ、RNF125 の用量依存的にウイルス RNA 量が減少していた。C37A では抑制されなかった。HIV-1 LTR からの転写への影響をルシフェラーゼアッセイ法により検討したところ、RNF125 の用量依存的に HIV-1 LTR からの転写が抑制された。E2 ligase である Ubc13 の蛋白質量を siRNA を用いて減少させた細胞、および Ubc13 plasmid を発現させて蛋白質量を増加させた細胞に、RNF125 と HIV-1 proviral DNA を cotransfection したところ、細胞上清中に放出されるウイルス粒子のレベルには変化がなかった。以上、RNF125 は HIV-1 LTR プロモーターに作用する様々な転写因子、もしくは、その転写因子のシグナル経路に関わる宿主因子をユビキチン化することによって、HIV-1 LTR からの転写を間接的に阻害していることが示唆された。さらに、E2 ligase の1つである Ubc13 の細胞内蛋白質量を変化させた場合、RNF125 による HIV-1 複製抑制に影響が見られないことから、RNF125 によりユビキチン化された標的蛋白質が、プロテアソームにより認識され、分解されることが考えられた。

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14件)

Komoto, S., Tsuji, S., Lee, B.J., Iwabu, Y., Kojima, Y., Otake, T., Taniguchi, K., Ikuta, K.: Higher frequency of premature stop codon mutations at *vpu* gene of human immunodeficiency virus type 1 CRF01_AE

compared with those of other subtypes. *Microbes Infect.* 7, 139-147, 2005.

Isarangkura, P.N.A., Li, G.M., Warachit, J., Iwabu, Y., Tsuji, S., Auwanit, W., Yamamoto, D., Goto, T., Hayashi, Y., Kiso, Y., Ikuta, K.: Different susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 to Env gp41-derived synthetic peptides corresponding to the two heptad repeat regions. *Microbes Infect.* 7, 356-364, 2005.

Li, Y.G., Iwabu, Y., Warachit, J., Kinomoto, M., Ibrahim, M.S., Tsuji, S., Mukai, T., Kameoka, M., Tokunaga, K., Sata, T., Ikuta, K.: Interleukin-4 upregulates T-tropic human immunodeficiency virus type 1 transcription in primary CD4⁺ CD38⁺ T-lymphocyte subset. *Microbiol. Immunol.* 49, 155-165, 2005.

Kinomoto, M., Yokoyama, M., Sato, H., Kojima, A., Kurata, T., Ikuta, K., Sata, T., Tokunaga, K.: Amino acid 36 in HIV-1 gp41 ectodomain control fusogenic activity: Implications for the molecular mechanism of viral escape from a fusion inhibitor. *J. Virol.* 79, 5996-6003, 2005.

Iwabu, Y., Goto, T., Tsuji, S., Warachit, J., Li, G.M., Shoji, S., Kameoka, M., Ikuta, K.: Superinfection of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) to cell clone persistently infected with defective virus induces production of highly cytopathogenic HIV-1. *Microbes Infect.* 8, 1773-1782, 2006.

Shoji-Kawata, S., Zhong, Q., Kameoka, M., Iwabu, Y., Sapsutthipas, S., Luftig, R. B., and Ikuta, K. The RING finger ubiquitin ligase RNF125/TRAC-1 down-modulates HIV-1 replication in primary human peripheral blood mononuclear cells. *Virology* 368, 191-204, 2007.

Kitagawa, Y., Kameoka, M., Shoji-Kawata, S., Iwabu, Y., Mizuta, H., Tokunaga, K., Fujino, M., Natori, Y., Yura, Y., and Ikuta, K. Inhibitory function of adapter-related protein complex 2 alpha 1 subunit in the process of nuclear translocation of human immunodeficiency virus type 1 genome. *Virology* 373, 171-180, 2008.

Iwabu, Y., Mizuta, H., Kawase, M., Kameoka, M., Goto, T., and Ikuta, K. Superinfection of defective human immunodeficiency virus type 1 with different subtypes of wild-type virus efficiently produces infectious variants with the initial viral phenotypes by complementation followed by recombination. *Microbes Infect.* 10, 504-513, 2008.

Zhong, Q., Ikuta, K., and Luftig, R. B. An HIV clade B defective particle producing cell line (L-2) shows stability in its HIV mutated

genome over 10 years. Current Topics in Virology 6, 15-24, 2008.

Utachee, P., Jinnopat, P., Isarangkura-Na-Ayuthaya, P., de Silva, U.C., Nakamura, S., Siripanyaphinyo, U., Wichukchinda, N., Tokunaga, K., Yasunaga, T., Sawanpanyalert, P., Ikuta, K., Auwanit, W., and Kameoka, M. Phenotypic studies on recombinant human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) containing CRF01_AE *env* gene derived from HIV-1-infected patient, residing central Thailand. Microbes Infect. 11, 2334-343, 2009.

〔学会発表〕(計6件)

北川友紀子、亀岡正典、水田浩之、小路早苗、生田和良

HIV-1 複製関連宿主因子として同定された AP2 α のウイルス増殖抑制機序の解析
第55回日本ウイルス学会学術集会

2007年10月21日-23日 札幌

水田浩之、川瀬倫子、岩部幸枝、亀岡正典、後藤俊幸、生田和良

HIV-1 持続感染細胞への重感染により出現する組換え HIV-1

第55回日本ウイルス学会学術集会

2007年10月21日-23日 札幌

亀岡正典、北川友紀子、川下理日人、徳永研三、生田和良

タイ国サラブリー県の薬剤未治療 HIV-1 感染者から分離した HIV-1 プロテアーゼの遺伝子型および表現型の解析

第55回日本ウイルス学会学術集会

2007年10月21日-23日 札幌

Arias Juan Fernando、生田和良

Distinctive Biological Features of HIV Type 1 Subtype C Isolates of Indian Origin: Implications for Disease Progression

第55回日本ウイルス学会学術集会

2007年10月21日-23日 札幌

亀岡正典、Piyamat Jinnopat、Panasda Isarangkura-N-A、Piraporn Utachee、北川友紀子、Udayanga Chandimal de Silva、Uamporn Siripanyaphinyo、亀岡陽子、徳永研三、Pathom Sawanpanyalert、Wattana Auwanit、生田和良

CRF01_AE 型 Gag がプロテアーゼ阻害剤に対するウイルスの薬剤感受性を低下させる分子機構について

第56回日本ウイルス学会学術集会

2008年10月26日-28日 岡山

川瀬倫子、水田浩之、川下理日人、鷹岡昭夫、長谷川紀昭、山田直子、生田和良

高細胞融合能を示す非感染性 HIV-1 粒子の Env gp41 へのアミノ酸変異導入の効果
第56回日本ウイルス学会学術集会

2008年10月26日-28日 岡山

〔図書〕(計0件)

医科ウイルス学、南江堂、高田賢蔵編集、
2009：生田和良 レトロウイルス科

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

発明の名称：HIV 転写制御因子

発明者：生田和良、小路早苗

出願番号：2005-83826

6. 研究組織

(1)研究代表者

生田 和良 (IKUTA KAZUYOSHI)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：60127181

(2)研究分担者

作道 章一 (SAKUDO AKIKAZU)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：10397672

亀岡 正典 (KAMEOKA MASANORI)

大阪大学・微生物病研究所・特任准教授

研究者番号：60281838

小路 早苗 (SHOJI SANAE)

大阪大学・微生物病研究所・特任研究員

研究者番号：20397681