

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07591

研究課題名(和文) HIV-1Vif/HDAC3複合体によるHIV-1潜伏感染転写ネットワークの制御

研究課題名(英文) Transcriptome analysis of HIV-1 latently infected cells

研究代表者

白川 康太郎 (Shirakawa, Kotaro)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：80728270

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：HIVGKOを感染させたJurkat T細胞モデルを用いて潜伏感染細胞の遺伝子発現プロファイルをCAGE法により解析した。非感染細胞と比較し潜伏感染細胞で31種の遺伝子発現が低下したが、遺伝子発現が増加した遺伝子は認めなかった。非感染細胞でSPP1とAPOEの発現が増加しており、shRNAを用いてこれらの遺伝子がHIV感染を抑制することを示した。さらにmTOR経路の活性化が低い細胞で潜伏感染が多いことを発見した。以上より潜伏感染細胞の遺伝子発現は非感染細胞と差がないことが明らかとなり、感染する細胞の遺伝子発現の状態が感染後のウイルス転写に影響を与えることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HIV感染症は抗ウイルス薬によりコントロール可能となったが、治療を中止すると再発してしまう。これはメモリーT細胞などのHIV潜伏感染細胞がウイルス蛋白を発現せず免疫による監視を生き残るためである。本研究ではHIV潜伏感染細胞の転写プロファイルと比較し、HIVゲノムがインテグレーションされた潜伏感染細胞に転写レベルで非感染細胞との差がほとんどないことを示された。本細胞モデルを用いてさらに潜伏感染の分子機構を明らかにできれば潜伏感染細胞を標的とした治療を目指すための新たな治療法につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：HIVGKO enables direct identification of both productively and latently HIV-infected cells. In this study, we deep sequenced CAGE tags in non-infected and latently and productively infected cells and compared their transcriptional profiles. We detected 31 down regulated genes in latently infected cells compared to those of noninfected cells. Among these, SPP1 and APOE were downregulated in latently infected cells. SPP1 or APOE knockdown in Jurkat T cells increased susceptibility to HIVGKO infection, suggesting that they have antiviral properties. Components of the mTOR pathway were significantly up regulated in productively infected cells, suggesting that mTOR pathway activity plays a role in establishing the latent reservoir. These findings indicate that HIV entry and integration do not trigger unique transcriptional responses when infection becomes latent and that T cells cannot recognize the integrated HIV genome when infection remains latent.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HIV潜伏感染 トランスクリプトーム CRISPRスクリーニング mTOR経路

1. 研究開始当初の背景

HIV-1 感染症は多剤併用療法によりコントロール可能となったが、治療を中止するとウイルス血症が再発してしまい治癒は得られない。これは静止期メモリーCD4 陽性 T 細胞などの HIV-1 潜伏感染細胞がウイルス蛋白を発現せず、長期に亘り免疫による監視から生き残るためである。潜伏感染細胞を再活性化させ、ウイルス蛋白の発現によりアポトーシスするか、免疫で排除することにより治癒を目指す「Shock and Kill」が提唱され HDAC 阻害剤などの薬剤の治験が進んでいるが、未だ有効な治療法は確立していない。治癒を目指すにはこの潜伏感染のメカニズムを明らかにし、潜伏感染細胞を直接標的とする治療の開発が必要である。

2. 研究の目的

本研究では潜伏感染の分子メカニズムを明らかにするため、米国グラッドストーン研究所 Eric Verdin 研究室で開発された二重蛍光 HIV モデル (HIV_{GKO}) を用いた遺伝子発現の解析を行った。HIV_{GKO} を Jurkat T 細胞に感染させ、ウイルス産生性感染細胞、潜伏感染細胞、非感染細胞を分離し、その遺伝子発現を CAGE 法により解析した。CAGE 法は理化学研究所で開発され、村川研究室で行われた。

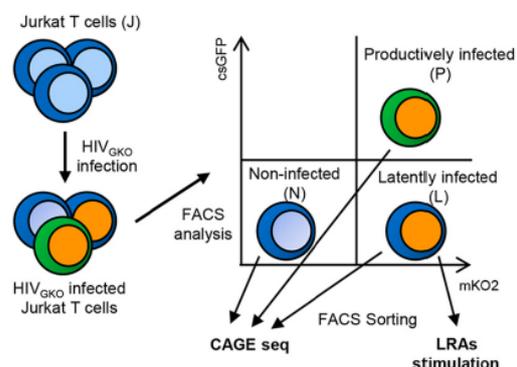
また分離した潜伏感染細胞を用いて CRISPR スクリーニングを行い、潜伏感染を維持するために必要な遺伝子群を同定した。CRISPR スクリーニングは京都大学ウイルス再生医科学研究所の遊佐研究室で行われた。

3. 研究の方法

(1) HIV_{GKO} の感染と潜伏感染細胞の分離と CAGE 解析

HIV_{GKO} を Jurkat T 細胞に感染させ、GFP 陽性となるウイルス産生性感染細胞、mKO2 陽性となる潜伏感染細胞、共に陰性となる非感染細胞に分画しセルソーターを用いて分離する (右図)。

各分画の total RNA を抽出し nAnTi-CAGE プロトコルにより CAGE ライブラリを作成しイルミナ Next Seq 500 でシーケンスし比較した。



(2) 潜伏感染細胞で発現低下が見られた遺伝子の機能解析

CAGE seq の結果よりウイルス産生性感染細胞、潜伏感染細胞および非感染細胞の遺伝子発現を比較した。有意に変動した遺伝子が潜伏感染の成立に関する影響を調べるために、Tet-on shRNA 発現系を用いて標的遺伝子の発現を抑制した際の HIV_{GKO} 感染への影響を Jurkat T 細胞および初代培養 CD4 陽性 T 細胞で検討した。

(3) HIV_{GKO} 感染潜伏感染細胞由来潜伏感染細胞 JGL を用いた CRISPR スクリーニング

HIV_{GKO} を感染させ、mKO2 単独陽性となる潜伏感染細胞 (JGL) をセルソーターで分離する。JGL に Cas9 および CRISPR ライブラリを導入し、再活性化を意味する GFP 陽性細胞分画を再度セルソーターで分離した。ライブラリ導入直後とのガイド RNA のコピー数を次世代シーケンスで比較しノックアウトにより再活性化を誘導する遺伝子の同定を試みた。

4. 研究成果

(1) HIV_{GKO}の感染と潜伏感染細胞の分離と CAGE 解析

各分画より 7500 万 CAGE タグをそれぞれシーケンスし発現を比較した。感染前の細胞に比較しウイルス産生感染細胞ではおよそ 7000、潜伏感染細胞および非感染細胞では 2000 の遺伝子発現に差が見られ、ウイルス産生感染細胞では T 細胞活性化およびアポトーシス関連遺伝子群での発現に差が見られた。一方、潜伏感染細胞と非感染細胞での遺伝子発現には 33 遺伝子でのみ差が見られ、潜伏感染細胞で発現が上昇した遺伝子は見られなかった。

(2) 潜伏感染細胞で発現低下が見られた遺伝子の機能解析

潜伏感染細胞で発現低下みられた遺伝子のうち SPP1 と APOE に注目し、Tet-On shRNA を用いて遺伝子発現を抑制した際の HIV_{GKO} の感染効率を評価した。Jurkat T 細胞と初代培養 CD4 陽性 T 細胞を用いた実験で SPP1 および APOE ノックダウンにより HIV_{GKO} の感染が増加することによりこれらの遺伝子が抗 HIV 効果を持つことが示唆された。さらに 3 群のうち潜伏感染細胞でのみ発現が低下した RPS6 に注目し、RPS6 のノックダウンを行ったところ潜伏感染細胞の割合が減少し、ウイルス産生性感染細胞の割合が増加することがわかり RPS6 ノックダウンによるフィードバックで mTOR 経路の活性化が起こっていることが起因していると考えられた。mTOR 経路のりん酸化酵素阻害剤で潜伏感染細胞分画が増加することが確認された。

(3) HIV_{GKO} 感染潜伏感染細胞由来潜伏感染細胞 JGL を用いた CRISPR スクリーニング

本研究期間中に明らかにできなかったがこの方法を用いて、ノックアウトにより潜伏感染細胞の再活性化を促す可能性のある 4 遺伝子を同定した (未発表データ)。

5. 主な論文発表等 研究代表者に下線

1. Hirabayashi S, Bhagat S, Matsuki Y, Takegami Y, Uehata T, Kanemaru A, Itoh M, Shirakawa K, Takaori-Kondo A, Takeuchi O, Carninci P, Katayama S, Hayashizaki Y, Kere J, Kawaji H, Murakawa Y. NET-CAGE characterizes the dynamics and topology of human transcribed cis-regulatory elements. *Nat Genet.* 51(9): 1369-1379, 2019.
2. Yoshinaga N, Shindo K, Matsui Y, Takiuchi Y, Fukuda H, Nagata K, Shirakawa K, Kobayashi M, Takeda S, Takaori-Kondo A. A screening for DNA damage response molecules that affect HIV-1 infection. *Biochem Biophys Res Commun.* 513(1): 93-98, 2019.
3. Fukuda H, Li S, Sardo L, Smith JL, Yamashita K, Sarca AD, Shirakawa K, Standley DM, Takaori-Kondo A, Izumi T. Structural Determinants of the APOBEC3G N-Terminal Domain for HIV-1 RNA Association. *Front Cell Infect Microbiol.* 9: 129, 2019.
4. Yamazaki H, Shirakawa K, Matsumoto T, Hirabayashi S, Murakawa Y, Kobayashi M, Sarca AD, Kazuma Y, Matsui H, Maruyama W, Fukuda H, Shirakawa R, Shindo K, Ri M, Iida S, Takaori-Kondo A. Endogenous APOBEC3B Overexpression Constitutively Generates DNA Substitutions and Deletions in Myeloma Cells. *Sci Rep.* 9(1): 7122, 2019.
5. Matsumoto T, Shirakawa K, Yokoyama M, Fukuda H, Sarca AD, Koyabu S, Yamazaki H, Kazuma Y, Matsui H, Maruyama W, Nagata K, Tanabe F, Kobayashi M, Shindo K, Morishita R, Sato H, Takaori-Kondo A. Protein kinase A inhibits tumor mutator APOBEC3B through phosphorylation. *Sci Rep.* 9(1): 8307, 2019.
6. Hirabayashi S, Shirakawa K, Horisawa Y, Matsumoto T, Matsui H, Yamazaki H, Sarca AD, Kazuma Y, Nomura R, Konishi Y, Takeuchi S, Stanford E, Kawaji H, Murakawa Y, Takaori-Kondo A. APOBEC3B is preferentially expressed at the G2/M phase of cell cycle. *Biochem Biophys Res Commun.* 2021 Mar 26;546:178-184. doi: 10.1016/j.bbrc.2021.02.008. Epub 2021 Feb 13. PMID: 33592502
7. Yamazaki H, Shirakawa K, Matsumoto T, Kazuma Y, Matsui H, Horisawa Y, Stanford E, Sarca AD, Shirakawa R, Shindo K, Takaori-Kondo A. APOBEC3B reporter myeloma cell

- lines identify DNA damage response pathways leading to APOBEC3B expression. *PLoS One*. 15(1): e0223463, 2020.
8. Nagata K, Shindo K, Matsui Y, Shirakawa K, Takaori-Kondo A. Critical Role of PP2A-B56 Family Protein Degradation in HIV-1 Vif Mediated G2 Cell Cycle Arrest. *Biochem Biophys Res Commun*. 527(1): 257-263, 2020.
 9. Takei H, Fukuda H, Pan G, Yamazaki H, Matsumoto T, Kazuma Y, Fujii M, Nakayama S, Kobayashi IS, Shindo K, Yamashita R, Shirakawa K, Takaori-Kondo A, Kobayashi SS. Alternative Splicing of APOBEC3D Generates Functional Diversity and Its Role as a DNA Mutator. *Int J Hematol*. 2020.
 10. Matsui H, Shirakawa K, Konishi Y, Hirabayashi S, Sarca AD, Fukuda H, Nomura R, Stanford E, Horisawa Y, Kazuma Y, Matsumoto T, Yamazaki H, Murakawa Y, Battivelli E, Verdin E, Koyanagi Y, Takaori-Kondo A. CAGE-seq reveals that HIV-1 latent infection does not trigger unique cellular responses in a Jurkat T cell model. *J Virol*. 95(8): e02394-20, 2021.
 11. Sarca AD, Sardo L, Fukuda H, Matsui H, Shirakawa K, Horikawa K, Takaori-Kondo A, Izumi T. FRET-Based Detection and Quantification of HIV-1 Virion Maturation. *Front Microbiol*. 12: 647452, 2021.
 12. Kazuma Y, Shirakawa K, Tashiro Y, Yamazaki H, Nomura R, Horisawa Y, Takeuchi S, Stanford E, Konishi Y, Matsui H, Matsumoto T, Tanabe F, Morishita R, Ito S, Takaori-Kondo A. ILF2 enhances the DNA cytosine deaminase activity of tumor mutator APOBEC3B in multiple myeloma cells. *Sci Rep*. 2022 Feb 10;12(1):2278. doi: 10.1038/s41598-022-06226-3. PMID: 35145187

[雑誌論文] (計 12 件)

[学会発表] (計 14 件)

[図書] (計 0 件)

[知的財産権]

出願状況

取得状況

ノックアウトにより潜伏感染を再活性化する遺伝子群を特許出願検討中

6. 研究組織

研究代表者

白川康太郎 (京都大学・医学研究科)

研究者番号 : 80728270

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsui Hiroyuki, Shirakawa Kotaro, Konishi Yoshinobu, Hirabayashi Shigeki, Sarca Anamaria Daniela, Fukuda Hirofumi, Nomura Ryosuke, Stanford Emani, Horisawa Yoshihito, Kazuma Yasuhiro, Matsumoto Tadahiko, Yamazaki Hiroyuki, Murakawa Yasuhiro, Battivelli Emilie, Verdin Eric, Koyanagi Yoshio, Takaori-Kondo Akifumi	4. 巻 95
2. 論文標題 CAGE-Seq Reveals that HIV-1 Latent Infection Does Not Trigger Unique Cellular Responses in a Jurkat T Cell Model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e02394-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.02394-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hiroyuki Matsui, Kotaro Shirakawa, Shigeki Hirabayashi, Anamaria D. Sarca, Hirofumi Fukuda, Yasuhiro Murakawa, Emilie Battivelli, Eric Verdin, Akifumi Takaori-Kondo
2. 発表標題 HIV-1 latent infection does not trigger cellular transcriptional responses in T-cells
3. 学会等名 Keystone Symposia 2020 HIV Pathogenesis and Cure X6（国際学会）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Verdin Lab website https://www.buckinstitute.org/lab/verdin-lab/

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	Buck Institute for Research on Aging			