

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 4月 9日現在

機関番号：17401
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659232
 研究課題名（和文） 慢性感染ウイルスとヒト免疫のバイオインフォマティクス解析
 研究課題名（英文） A bioinformatics approach toward understanding interplay between chronic virus infections and human antiviral immune responses
 研究代表者
 上野 貴将 (UENO TAKAMASA)
 熊本大学・エイズ学研究センター・ 准教授
 研究者番号：10322314

研究成果の概要（和文）：ヒト感染免疫学では、感染個体で見られた現象が、ウイルスに起因するか、ヒトに起因するか明確にすることが困難なケースが多い。本研究では、HIV-1 Nef の遺伝子多型性、機能的多型性と、感染者の病態について、北米のコホートを用いた包括的な解析を試みた。慢性感染者（46検体）の血漿から nef 遺伝子を増幅し、プロウイルスベクターに組み込み、感染性ウイルスを調製した。Nef 依存的なウイルス感染性やウイルス複製能の昂進、CD4 や MHC クラス I の発現低下、CD74 分子の発現昂進などの機能を測定した。同時に、感染者のウイルス量、CD4 カウント、HLA クラス I アリルとの相関について解析を行った。その結果、慢性感染者の Nef は、遺伝的に変異性が著しく、機能変化が大きかった。中でも、ウイルス感染性、複製能、CD74 発現昂進は特に変化が大きく、ウイルス感染性は感染者の病態マーカーと相関していた。

研究成果の概要（英文）：HIV-1 Nef is required for efficient viral replication and pathogenesis. However, the extent to which Nef's functions are maintained in natural sequences during chronic infection, and their clinical relevance, remains incompletely characterized. Relative to a control Nef from HIV-1 strain SF2, HLA class I and CD4 down-regulation activities of 46 plasma RNA Nef sequences derived from unique chronic infected individuals were generally high and displayed narrow dynamic ranges, whereas Nef-mediated virion infectivity, PBMC replication and CD74 up-regulation exhibited broader dynamic ranges. 80% of patient-derived Nefs were active for at least three functions examined. Functional co-dependencies were identified, including positive correlations between CD4 down-regulation and virion infectivity, replication, and CD74 up-regulation, and between CD74 up-regulation and PBMC replication. Nef-mediated virion infectivity inversely correlated with patient CD4+ T-cell count. Strong functional co-dependencies and the polyfunctional nature of patient-derived Nef sequences suggest a phenotypic requirement to maintain multiple Nef functions during chronic infection.

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	3,100,000	930,000	4,030,000

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：感染防御・ワクチン

1. 研究開始当初の背景

ヒト感染免疫学の研究では、環境や遺伝的背

景を実験的に制御できないため、細胞やマウスを用いた分子生物学研究の進歩に取り残

されて来た。HIV 感染症に対する、ヒトの病態およびヒト免疫システムを俯瞰的に解析するアプローチが求められている。

HIV-1 Nef は、その病原性因子として、HIV 感染症の病態発現に重要と考えられているが、その一方で、遺伝子多型性が著しい分子である。このため、感染者の体内で、さまざまな Nef の機能がどのように病態と関連するのか、良くわかっていない。

2. 研究の目的

大規模コホートをベースにして、多くの慢性感染者から集めた Nef 遺伝子を遺伝子レベル、機能レベルで解析することにより、Nef の遺伝的・機能的多型性の性質を明らかにするとともに、それが病態に与える影響を解析する。

3. 研究の方法

(1) HIV 感染者の検体

ボストン地区で集めた HIV 感染者の検体のうち、未治療、慢性期、サブタイプ B に感染した 46 検体をランダムに選び、以後の研究に用いた。感染者の臨床検査値は、ウイルス量 median [IQR]: 90, 850 [28, 840-231, 000] copies/ml で、CD4 陽性 T 細胞カウント: 297.5 [72-455] cells/mm³ であった。(倫理面への配慮) 検体は、米国マサチューセッツ総合病院で、文書による同意を得た感染者から採取した。感染者の個人情報入手していない。

(2) 組換えウイルスの調製

血漿ウイルス RNA から、nef 領域に特異的なプライマーを用いて nef 遺伝子を増幅し、プラスミドベクターにクローニング後、シーケンス解析を行った。さらに、感染者あたり 1 クローンを選び、制限酵素サイトを導入して、プロウイルスクローン pNL43 にサブクローニングした。これらを 293T 細胞にトランスフェクションして、感染性ウイルス粒子を調製した。

(3) Nef 機能の解析

Nef の 5 つの異なる機能について解析した。ウイルス感染性については、TZM 細胞に組換えウイルスを感染させて、個々のウイルスクロンの感染性を化学発光法により測定した。ウイルス複製は、健常人の PBMC を用いて行った。具体的には、 2×10^5 個/well の PBMC にウイルスを感染させ、3 日後に PHA を加えて細胞を活性化させた。その後、3 日おきに、半量の培養液上清を回収して、ウイルス生産量を p24Gag-ELISA で定量した。HLA クラス I (HLA-I) 発現低下と CD74 発現昂進については、721.221 細胞に HLA-A24 と CD4 を安定発現するトランスフェクタントを用いた。この細胞にウイルスを感染させてから、48 時間後に細胞を回収して、表面抗原の発現量を交

代で染色することにより検出し、フローサイトメトリーで定量化した。CD4 発現低下に関しては、Nef の他に Vpu や Env に同様の現象が知られているため、ウイルスではなく、Nef のみを発現させるプラスミドをトランスフェクションにより導入する方法を用いた。

4. 研究成果

(1) Nef 遺伝子配列の解析

複製機能を有するウイルスが多いと考えられることから、本研究では、血漿ウイルス RNA から Nef 遺伝子を増幅した。遺伝子配列の変異性は、Los Alamos データベースのサブタイプ B の変異率とほぼ同等であった。さらに、ウイルス生産細胞を回収して、ウェスタンブロット法によって、Nef 蛋白質の発現量、安定性について解析した。その結果、すべてのクローンであるレベル以上の Nef 蛋白質が安定して発現されていることが分かった (図 A, B)。

(2) Nef の機能的多型性

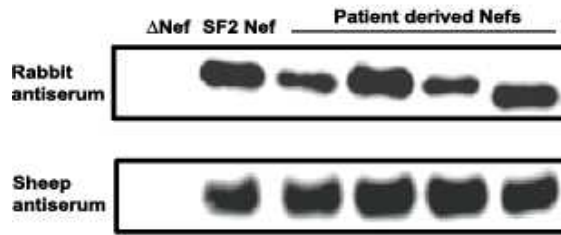
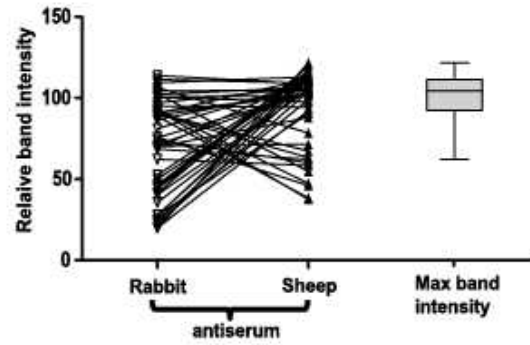
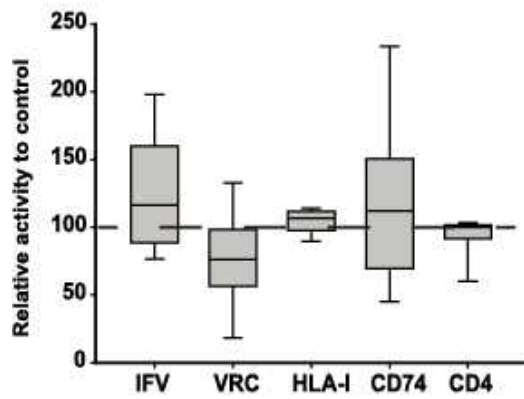
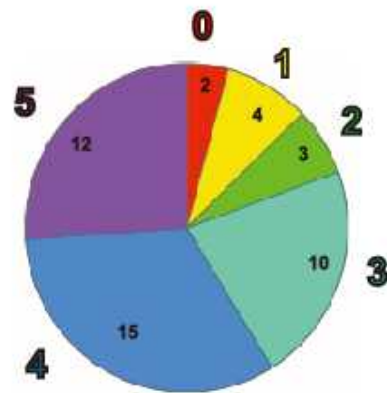
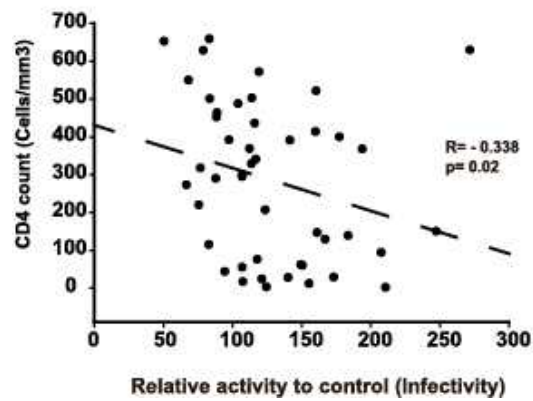
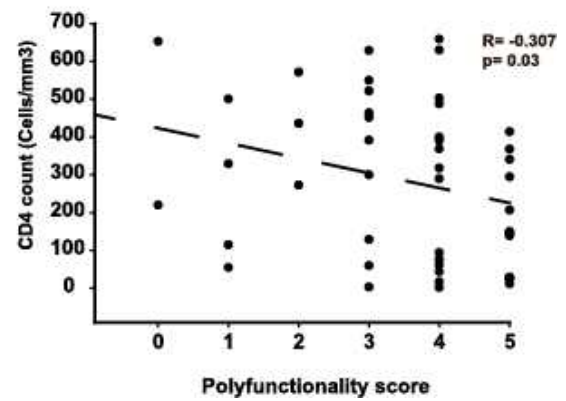
慢性感染者から分離した 46 個の Nef クローンと、実験室株 (SF2) および Nef 欠損株を用いて、Nef の 5 つの機能について解析を行った。その結果、HLA-I と CD4 発現抑制機能は、クローン間のばらつきが小さく、2 つの機能は非常に良く保存されていることが分かった (図 C)。その一方、ウイルス感染性、ウイルス複製、CD74 発現に対する機能は、クローン間で大きく異なっていた。

(3) Nef と病態の相関

Nef 機能解析の結果からは、Nef は複数の機能を維持することが重要であるように思えた。なぜなら、5 つの機能のうち、75% 以上のクローンが、3 つ以上の機能を維持していた (図 D)。一方、CD4 カウントと血漿ウイルス量について、各機能との相関を解析した。その結果、Nef 依存的な感染性増強作用が、CD4 カウントと統計学的に有意な相関を示した (図 E, F)。

(4) Nef 機能の相互関連性

各機能の相互依存性について、解析した。その結果、興味深いことに、HLA-I 発現低下を除く 4 つの機能はクローン間で、相互に関連していた。HLA-I 発現低下作用のみ、他の機能とは相関を示さないことから、この機能は、Nef 蛋白質の異なる領域が機能発現に重要か、あるいは、病態にとって重要ということが示唆された。しかしながら、この研究では、Nef 機能とヒト免疫応答との関連を見出すには至らなかった。おそらく、ヒトのゲノム多型性の問題が大きいため、統計学的な有意さを得るためには検体数が足りなかったためと示唆された。

A**B****C****D****E****F**

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4件)

- ① Philip Mwimanzi, Tristan J Markle, Yoko Ogata, Eric Martin, Michiyo Tokunaga, Macdonald Mahiti, Xiaomei T Kuang, Bruce D Walker, Zabrina L Brumme, Mark A Brockman and *Takamasa Ueno (2013) Dynamic range of Nef functions in chronic HIV-1 infection. *Virology*, [査読有] 439, 74-80 DOI: 10.1016/j.virol.2013.02.005
- ② Philip Mwimanzi, Tristan J Markle, Eric Martin, Yoko Ogata, Xiaomei T Kuang, Michiyo Tokunaga, Macdonald Mahiti, Florencia Pereyra, Toshiyuki Miura, Bruce D Walker, Zabrina L Brumme, Mark A Brockman and *Takamasa Ueno (2013) Attenuation of multiple Nef functions in HIV-1 elite controllers. *Retrovirology* [査読有] 10: 1 DOI: 10.1186/1742-4690-10-1
- ③ Philip Mwimanzi, Tristan J. Markle, Takamasa Ueno, Mark A. Brockman (2012) HLA class I down-regulation by HIV-1 Nef: What might we learn from natural sequence variants? *Viruses* 4, 1711-1730 doi:10.3390/v4091711 [査読有]
- ④ Philip Mwimanzi, Zafrul Hasan, Ranya Hassan, Shinya Suzu, Masafumi Takiguchi and *Takamasa Ueno (2011) Effects of naturally-arising HIV Nef mutations on cytotoxic T lymphocyte recognition and Nef's functionality in primary macrophages. *Retrovirology* 8:50 doi:10.1186/1742-4690-8-50 [査読有]

[学会発表] (計7件)

- ① 緒方陽子、Philip Mwimanzi、李小光、徳永美知代、Tristan Markle、三浦聡之、Bruce Walker、Zabrina Brumme、Mark Brockman、上野貴将: Nef のウイルスレセプター発現低下機能と病態、第26回日本エイズ学会学術集会・総会、慶應義塾大学日吉キャンパス(神奈川)、2012年11月24日-11月26日
- ② M. Mahiti, P. Mwimanzi, Y. Ogata, M. Tokunaga, B. Walker, Z. Brumme, M. Brockman, T. Ueno. Modulation of HIV-1 Nef-mediated HLA class I down-regulation activity during disease progression. 13th Kumamoto

AIDS seminar Aso Resort Grandvrio Hotel, Kumamoto, Japan 24th -26th October, 2012.

- ③ 上野貴将: HIV-1 Nef の遺伝子多型性と機能的可塑性、第14回白馬シンポジウム in 京都、京都市国際交流会館、2012年6月7日-6月8日
- ④ 緒方陽子、大津家裕仁、Philip Mwimanzi、徳永美知代、Tristan Markle、三浦聡之、Bruce Walker、Zabrina Brumme、Mark Brockman、上野貴将: Nef のウイルスレセプター発現低下機能と病態、一般演題「アクセサリ-遺伝子-2」第25回日本エイズ学会学術集会・総会、ハイアットリージェンシー東京、2011年11月30日-12月2日
- ⑤ Zafrul Hasan, J. Carlson, H. Gatanaga, A. Le, C. Brumme, S. Oka, Z. Brumme, T. Ueno. Impact of HLA class I-driven genetic variability in HIV-1 accessory genes. 2011 The Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. Chiba, Makuhari Messe, Japan; November 27-30, 2011
- ⑥ Zafrul Hasan, J. Carlson, H. Gatanaga, A. Le, C. Brumme, S. Oka, Z. Brumme, T. Ueno. Subtle effect of HLA class I-driven selective forces on the variability of HIV-1 accessory genes. 12th Kumamoto AIDS Seminar and GCOE Joint International Symposium. Hotel Nikko Kumamoto and Aso Resort Grandvrio Hotel, Kumamoto, Japan; October 19-21, 2011.
- ⑦ Zafrul Hasan, J. Carlson, H. Gatanaga, A. Le, C. Brumme, S. Oka, Z. Brumme, T. Ueno. Effect of HLA class I-mediated selective pressure on HIV-1 accessory genes. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress: Virus and host response, Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan; September 11-16, 2011.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 貴将 (UENO TAKAMASA)
熊本大学・エイズ学研究センター・准教授
研究者番号: 10322314

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし