

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：82603

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06877

研究課題名(和文) HIV由来アンチセンス鎖RNAのウイルス潜伏化における役割とそのメカニズムの解明

研究課題名(英文) Investigation for roles and mechanisms of HIV-encoded antisense RNA on the viral latency

研究代表者

小林 美栄 (Kobayashi, Mie)

国立感染症研究所・免疫部・研究員

研究者番号：00748337

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではヒト後天性免疫不全ウイルス(HIV)由来アンチセンス鎖(AS)RNAのHIV潜伏化における役割とそのメカニズムを明らかにすることを目的とした。本目的のため、モデルHIVをT細胞株に感染させて、ウイルス由来のセンス鎖及びAS RNAの発現動態をモニターした。本結果から、AS RNAは潜伏化感染細胞の一部で発現していることがわかった。そこでAS RNA発現潜伏化細胞とAS RNA非発現潜伏化細胞を分取し、薬剤による再活性化実験を行った。その結果、AS RNA発現潜伏化細胞はセンス鎖の再活性化応答レベルが著しく低かった。本研究ではAS RNAが潜伏化維持に貢献している可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：The goal of the present study is to elucidate roles and mechanisms of HIV-encoded antisense(AS) RNA on the viral latency. For this purpose, a model HIV was established and infected to T cells for studying expression dynamics of the viral sense and AS RNA at single cell levels by expressions of respective fluorescent proteins. As a result, AS RNAs were shown to be expressed in a portion of the latently infected cells. Then, to investigate differences in the latency between AS RNA-expressing or -nonexpressing latent cells, the two cells were fractionated and treated with latency reversing agents. As results, the AS RNA-expressing latent cells were shown to have low reactivity with latency reversal. These results suggest that AS RNA contributes to maintenance of latency. Moreover, to elucidate the AS RNA expression in wild type HIV infected cells, monoclonal antibodies against Anti-Sense Protein (ASP) translated from AS RNA were established in the present study.

研究分野：ウイルス学

キーワード：アンチセンス鎖RNA HIV 潜伏化 ASP

1. 研究開始当初の背景

今日では、抗 HIV 薬の多剤併用療法(cART)によりエイズの発症を防ぐことが可能となったが、HIV の発現のない潜伏化細胞を排除できないため、根治は不可能である。近年では潜伏化細胞内のウイルス発現を薬剤等で再活性化させ、それらを cART により排除する、“Shock and kill”という根治戦略が試みられ、再活性化を誘導する薬剤(再活性化薬)の探索ならびに再活性化メカニズムの解明が全世界で精力的に行われるようになった。しかしながら、現状では潜伏化細胞の再活性化を完全に誘導するには未だ至っていない。これは、「潜伏化状態」に關与する宿主・ウイルス因子の情報が断片的であり、その全貌が未だ明らかとなっていないことに一因している。

これまで申請者らと Morris 教授のグループによって、HIV プロウイルスの 3'LTR からアンチセンス方向に転写される RNA(AS RNA)が、5'LTR 領域のヒストン H3 の 27 番目のリシン残基(H3K27)のメチル化を促進し、HIV の転写レベルを抑制することが示唆された。それ以降、HIV の潜伏化成立・維持における因子の候補として AS RNA が注目されるようになった。しかしながら感染細胞集団における AS RNA の発現レベルはセンス鎖のそれと比べ 1/100~1/1000 と低く、AS RNA の生理学的機能が与えるインパクトがどの程度なのか疑問が残っていた。そこで申請者は、潜伏化状態と AS RNA 発現の関連性を個々の細胞レベルで捉える必要性を感じ、センス鎖およびアンチセンス鎖 RNA の転写レベルについて、異なる蛍光レポーターでモニターできるモデル HIV(moHIV)を作出した(図 1)。moHIV の感染実験から、感染 T 細胞集団では、主に①センス鎖のみを発現する細胞②アンチセンス鎖のみを発現する細胞③両者とも発現しない細胞の 3 集団が混在していた。つまり、多くの AS RNA 発現細胞では HIV が潜伏化していることが示された。また、予備実験にて②の細胞集団は PMA による再活性化刺激を与えてもセンス鎖の転写が亢進しない傾向が見られた。従って、現在主流となっている Shock and kill が未だ成功に至らない状況を鑑みた場合、AS RNA による HIV 潜伏化維持能が再活性化の妨げとなっている可能性が強く予想された。

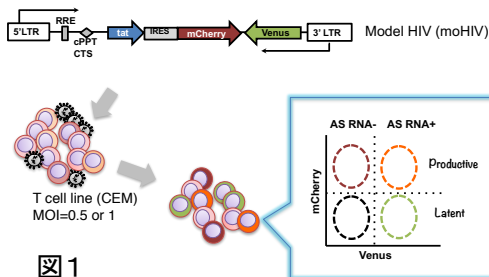


図 1

2. 研究の目的

AS RNA の HIV 潜伏化における役割とその

メカニズムを明らかにし、HIV 根治戦略につながる基礎的知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) moHIV 由来 AS RNA の発現動態及び機能解析

野生型 HIV 感染細胞を用いた解析のための基礎情報を得るため、moHIV における AS RNA の発現挙動及びその機能を明らかにすることを旨とした。

①AS RNA 発現細胞の分取及びクローニング

moHIV 感染細胞における AS RNA およびセンス RNA の発現レベルを Venus および mCherry 蛍光タンパク質の発現レベル(Mean Fluorescent Intensity (MFI))でそれぞれモニターした。これら蛍光タンパク質の発現レベルの測定および各蛍光タンパク質発現細胞の分取には FACS Aria を使用した。全長 moHIV プロウイルスを保持した感染細胞のクローニングには限界希釈法を用いた。

②AS RNA ノックダウン実験

AS RNA に対する Locked Nucleic Acid (LNA) を設計し、LNA を Neon transfection system にて moHIV 感染細胞に electroporation した。LNA 導入後 48 もしくは 72 時間目に細胞の蛍光タンパク質の発現レベルを FACS Aria にて測定した。

③プロウイルスゲノムのシーケンス解析

5'LTR の U5 領域に対するプライマーと 3'LTR の直下の配列に対するプライマーを用いてプロウイルスゲノムの PCR を行なった。PCR 産物を精製し、ダイレクトシーケンシングをすることによりプロウイルスゲノムの変異を調べた。

④再活性化応答性解析

再活性化薬として PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate, 20ng/mL)及び Ionomycin (500nM), SAHA (5μM)を使用した。薬剤処置後 24 時間目の細胞の各蛍光タンパク質の発現レベルを FACS Aria にて測定した。

⑤クロマチン免疫沈降

楽チップキット(MBL 社)を用いて、各クロソンのヒストン H3K27 トリメチル化修飾状態を調べた。

(2)野生株 HIV 感染細胞における実証

moHIV は野生株 HIV の 5'及び 3'LTR 配列を持つものの、それ以外の遺伝子構造及び配列はかなりかけ離れている。(1)で得られた結果が野生株 HIV 感染細胞においても観察できるか否かを検証するため、2つの実験を行なった。

① HIV 潜伏化細胞における AS RNA の発現評価

野生型 HIV の env 以外の遺伝子に加え、センス鎖から緑色蛍光タンパク質の EGFP を発

現する HIV NL-E Δenv 株(文献 1)を CEM 細胞に MOI=1 で感染させた。感染細胞集団から潜伏化細胞を含む EGFP 陰性の細胞集団を分画した。分画効率は全て 99.9%以上であった。大元の感染細胞集団及び EGFP 陰性細胞集団からそれぞれ total RNA を抽出した。RNA200ng 分から strand-specific RT-PCR 法(文献 2)にて、センス鎖及び AS RNA の半定量的解析を行なった。

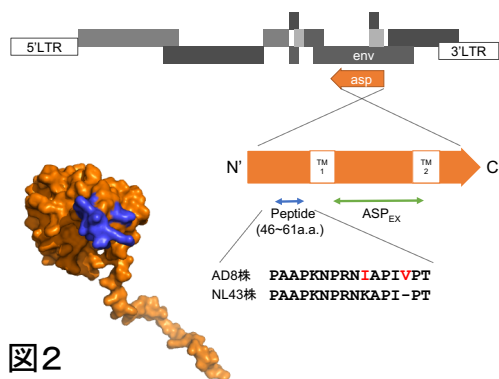


図2

②抗 ASP 抗体の作製と選定

HIV 感染細胞における AS RNA の発現動態を一細胞レベルでモニターするため、本研究では AS RNA から翻訳されるタンパク質である ASP に対する抗体の作製を試みた。免疫抗原として ASP の細胞外ドメインと予測される領域 (ASP_{EX}; 74 a.a.~146 a.a.) を細胞外発現系で大量に合成した。また、抗原性の高いと予測された領域のアミノ酸配列を基に 4 種のペプチドを作製しそれぞれマウスに免疫した(図 2)。

免疫染色可能な抗体の選定のため、GFP を N 末端に融合させた ASP 発現ベクターを作製した。過去の報告に基づき、ASP の DNA 配列はヒト型のコドンに最適化したものを用いた。抗体の HIV 株間の交差反応性を調べるため、HIV AD8 株由来 ASP と HIV NL43 株由来 ASP 発現ベクターをそれぞれ作製した。本発現ベクターを 293T 細胞に一過性過剰発現させ、固定した後、ハイブリドーマ上清と反応させた。次に Alexa647 標識抗マウス IgG 抗体と反応させ、FACS CantoII で解析した。

初期オートファジー阻害剤である 3-メチルアデニン(3-MA)による処置した場合は 5mM の 3-MA を含む培地で 16 時間培養した。(倫理面への配慮)

動物への ASP 抗原免疫実験においてはあらかじめ委託機関と協議し、国立感染症研究所動物実験委員会の承認を得た。動物愛護の精神に則って実験を行なった。

4. 研究成果

(1) moHIV 由来 AS RNA の発現動態及び機能解析

moHIV が本来の AS RNA の機能を保持しているのかを調べた。moHIV に MOI=0.5 で CEM に感染させた。感染 3 日後の細胞に AS RNA に対する LNA を導入し、AS RNA のノックダウンを行なった。導入後 3 日後の mCherry 陽性細胞の頻度を測定した結果、陰性コントロールに比べ AS RNA ノックダウン細胞ではセンス鎖発現細胞の割合が有意に増加していた。申請者らによる従来の研究でも野生型 HIV 感染細胞の AS RNA をノックダウンするとセンス鎖 RNA の発現が促進されることから(文献 2)、本研究で用いる moHIV は本来の AS RNA のウイルス発現抑制機能を有することが示唆された。

moHIV 由来 AS RNA の潜伏化維持における機能を解析するため、moHIV 感染細胞集団からセンス鎖のみを発現する細胞(S+)及びアンチセンス鎖のみを発現する細胞(AS+)、両者とも発現しない細胞(DN)を分取し、それぞれ PMA+Ionomycin で再活性化処置を行った結果、DN では 70%の感染細胞が再活性化したにもかかわらず、AS+では 2%程度が再活性化しただけであった(図 3A)。そこで AS+が保持している moHIV プロウイルスのゲノム配列に異常が無いかを調べた。本解析の結果、AS+のプロウイルスのほとんどは Tat-IRES-mCherry 遺伝子が欠損したものであった。したがって、AS+集団が再活性化しないのは、センス鎖 RNA の発現指標となっていた mCherry 遺伝子の欠損のせいであると結論できた(図 3B)。

本実験系では AS RNA 発現細胞の再活性化

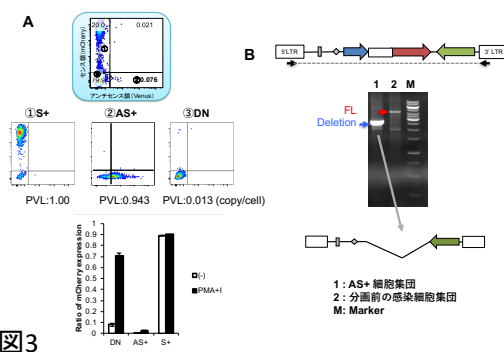


図3

化に対する挙動を正しく評価できないため、moHIV の全長遺伝子を保持した感染細胞をクローン化し、それらのクローンの moHIV の発現挙動を調べることにした。全長遺伝子を持つクローンをそれぞれ 3 クローンずつ選択した(図 4)。S+由来のクローンは安定的に mCherry を高発現しており、アンチセンス鎖の発現はほとんど見られなかった。AS+由来のクローンでは 0.1~1%程の頻度でセンス鎖を低発現している場合があったが、アンチセンス鎖の発現レベルは培養期間を通して安定的であった。全ての DN 由来クローンは一部再活性化してセンス鎖を低発現していた。しかしながらアンチセンス鎖の発現は見られな

かった。AS+及び DN クローン間の mCherry 発現レベルは両群で有意な差は認められなかった。

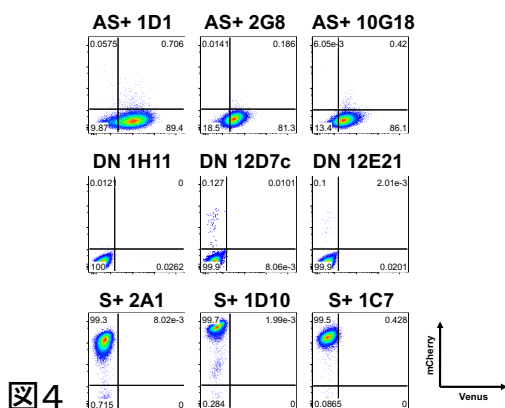


図4

DN 及び AS+クローンを PMA+Ionomycin で処理し、再活性化に対する moHIV 発現の挙動を観察した(図 5)。この結果、DN クローンは約 7~95%の細胞が再活性化してセンス鎖を発現するようになった。これに伴い DN では mCherry の MFI が 10 倍以上上昇した。一方、AS+のクローンにおいては一部 mCherry を低発現するようになった細胞があるものの、mCherry の MFI 上昇は全てのクローンで 1.5 倍程度にとどまった。また、PMA+Ionomycin 処置以外に SAHA で処置した場合においても AS+クローンのセンス鎖発現上昇は見られなかった。MFI に基づいて再活性化レベルを算出し、AS+クローン群と DN クローン群間で比べると、PMA+Ionomycin、SAHA 共に AS+クローン群の再活性化レベルが有意に低かった($p \leq 0.0003$)。一方、AS RNA の発現指標である Venus の発現に関して、全ての AS+クローンで 9 倍近くの MFI の上昇が見られた。しかしながら DN クローンでは再活性化状態でも AS RNA を発現する細胞はほとんど出現しなかった。本 AS RNA の発現応答の相違は AS+クローン群と DN クローン群間で有意($p \leq 0.0009$)であった。これら FACS による観察事項は RNA においても同様であった。概して、再活性化処置により、DN クローンではセンス鎖の発現が亢進する一方、AS+クローンではアンチセンス鎖の発現亢進が起こり、センス鎖の再活性化レベルは著しく低いことが示された。本結果は、AS RNA 発現潜伏化細胞が

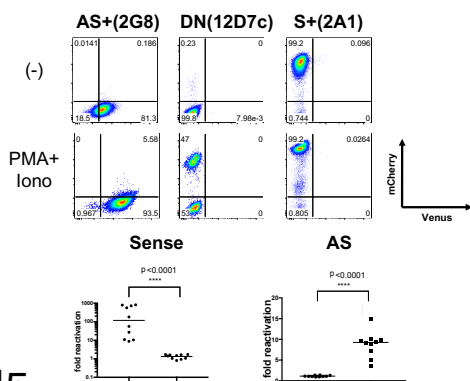


図5

AS RNA の発現をさらに上昇させることにより、薬剤によるセンス鎖の再活性化を免れているようにも捕らえられた。

AS RNA 発現潜伏化細胞ではなぜセンス鎖の再活性化レベルが低いのかを探るため、センス RNA のプロモーター領域である 5' LTR のゲノム配列を各クローンで調べた。しかしながら AS+クローンに特有の変異は認められず、AS+クローンでセンス鎖の転写活性が遺伝変異によって失われている可能性は低いと考えられた。そこで AS RNA 自体が潜伏化維持に機能している可能性を探るため、AS RNA を 2 種の LNA でそれぞれノックダウンし、再活性化薬に対する反応を調べた。その結果、AS+クローンのセンス鎖の再活性化レベルは AS RNA をノックダウンした場合と変化しなかった(図 6)。PMA+Ionomycin による AS RNA の発現上昇はノックダウン細胞でも同程度認められ、AS RNA 発現の指向性がすでに運命付けられているようでもあった。本結果から、プロウイルスのインテグレーションサイト近傍の宿主エレメントによる効果やプロウイルスに対するエピジェネティックな転写抑制効果など、AS RNA を一時的にノックダウンしても影響がない機構が働いている可能性が考えられた。予備的に、クロマチン免疫沈降法で AS+クローン 2G8 と DN クローン 12D7c の 5'LTR 領域における H3K27me3 レベルを測定した結果、AS+クローンの方が DN クローンよりも H3K27me3 レベルが高いことが示唆され、さらなる解析が必要である。今後は moHIV の AS RNA に野生型 HIV の AS RNA の機能が保持されているか否かも、先行研究に倣って確認し、AS RNA の機能と潜伏化維持の因果関係を明らかにすることが重要である。

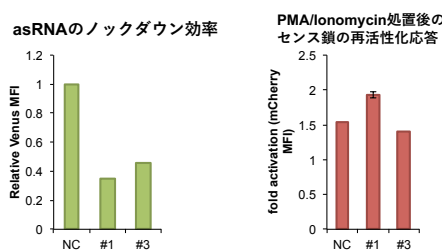


図6

NC : Negative control LNA
#1 & #3 : asRNA に対する LNA

(2) 野生株 HIV 感染細胞における実証

① HIV 潜伏化細胞における AS RNA の発現評価

HIV NL-E Δenv 株感染 CEM の潜伏化細胞集団を分画し、その RNA から strand-specific RT-PCR を行なった結果、潜伏化細胞集団でも AS RNA の発現を認めることができた(図 7)。従って実際の HIV でも潜伏化細胞で AS RNA が発現している可能性が大いに示唆された。

②抗 ASP 抗体 の 作製 と 選定

これまで、他の研究グループによって抗 ASP ポリクローナル抗体の作製実績はあるものの、免疫染色可能な抗体の作出はなされていない。この理由として ASP 自体が疎水性タンパク質であること、抗原性が全体的に低いタンパク質であることが考えられる。さらに以前の研究では、哺乳類細胞に ASP を過剰発現させてもその発現頻度は高々15%程度であること、また、オートファジー阻害薬を使用すると発現効率が改善されることを示している(文献3)。

本研究では、ASP_{EX} をマウスに免疫しモノクローナル抗体の作出を試みたが、ASP 特異的な抗体は得られなかった。4 種のペプチドをマウスに免疫した結果、1 つのペプチド(46a.a.~61a.a.; PAAPKNPRNIPIVPTC)で免疫染色に使用可能な抗体を 10 クローン得ることができた。これらの抗体は抗原ペプチドと同じ配列を持つ HIV AD8 株由来の ASP を認識することはできたが、抗原と異なる配列を持つ HIV NL43 株由来の ASP を認識することはできなかった(図 8A)。また、ウエスタンブロットで ASP を検出することもできないため、ASP の立体構造を認識する抗体であると考えられた。このことから、本抗体の認識は ASP アミノ酸配列の 55 番目のイソロイシン(I)や 59 番目のバリン (V)に影響されている可能性が考えられた。

さらにオートファジー阻害薬 (3-MA) で処置した ASP 発現細胞を免疫染色した結果、オートファジー阻害薬で ASP の発現が促進されることを確認した(図 8B)。

今後は 3-MA 処置も視野に入れ、HIV 感染細胞で免疫染色解析を行う予定である。

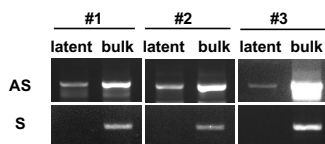


図 7

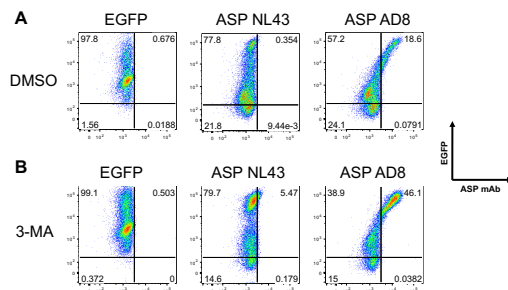


図 8 最も染色性の良かった#58B5の結果を示す

(3)まとめ

本研究結果より、大部分の AS RNA は潜伏化細胞の一部に発現していることが明らかとなり、潜伏化細胞で機能している可能性が示された。さらに、AS RNA 発現潜伏化細胞は、PMA+Ionomycin などの強い再活性化誘導にも

応答しにくい性質をもつことが世界に先駆けてわかった。当結果から本細胞が Shock and kill による HIV 根治の妨げになると示唆され、AS RNA の発現が Shock and kill の予後を左右する因子の一つになるかもしれない。この可能性を証明していくためにも、今後は、本研究で作出した抗 ASP 抗体を用いて HIV 感染細胞における AS RNA 検出系を確立し、AS RNA の潜伏化維持機能及び AS RNA を利用した HIV 根治戦略の可能性を検討してゆく。

<引用文献>

①Mie Kobayashi-Ishihara et al. HIV-1 encoded-antisense RNA suppresses viral replication for a prolonged period. *Retrovirology*. 9:38. 2012

②Kazutaka Terahara et al. Fluorescent Reporter Signals, EGFP, and DsRed, Encoded in HIV-1 Facilitate the Detection of Productively Infected Cells and Cell-Associated Viral Replication Levels. *Front Microbiol*. 2:280. 2011

③Cynthia Torresilla et al. Detection of the HIV-1 Minus-Strand-Encoded Antisense Protein and Its Association with Autophagy. *J.Virol*. 87(9):5089. 2013

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 1 件)

①Yasuko Tsunetsugu-Yokota, Mie Kobayashi-Ishihara, Yamato Wada, Kazutaka Terahara, Haruko Takeyama, Ai Kawana-Tachikawa, Kenzo Tokunaga, Makoto Yamagishi, Javier P Martinez, Andreas Meyerhans. Homeostatically maintained resting naive CD4+ T cells resist latent HIV reactivation. *Front Microbiol*. 査読有, 7:1944 (2016)
DOI:10.3389/fmicb.2016.01944

[学会発表] (計 4 件)

①②Mie Kobayashi-Ishihara, Kazutaka Terahara, Manabu Ato, Yasuko Tsunetsugu-Yokota, Maintenance of HIV latency by HIV-1 encoded antisense RNAs, The 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, 23/10/2016, Sapporo, W1-1-14

①③Mie Kobayashi-Ishihara, Javier P Martinez, Kazutaka Terahara, Andreas Meyerhans, Yasuko Tsunetsugu-Yokota, Exploring a mechanism of HIV latency in homeostatically maintained CD4+ T cells, The 45th Annual Meeting of Japanese Society for Immunology, Ginowan, Okinawa, 5/12/2016, 1-E-W10-12-P (2016A-0435)

③④寺原和孝、岩渕龍太郎、小林(石原)美

栄、横田(恒次)恭子「HIV-1感染初期におけるCD4陽性T細胞の細胞死誘導とcaspase分子群の関連について:ヒト化マウスモデルでの解析」第89回日本生化学会大会、2016年9月25日、仙台

- ④ ◎小林(石原)美栄、寺原 和孝、池野 翔太、阿戸 学、横田(恒次) 恭子「アンチセンス鎖を介したHIV-1潜伏化制御について (Latency regulation of Human Immunodeficiency Virus-1 by the Antisense strand)」第38回日本分子生物学会、2015年12月2日、2LBA069、神戸

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

なし

○出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

小林 美栄 (KOBAYASHI, Mie)

国立感染症研究所・免疫部・研究員

研究者番号: 00748337