

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：72801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19117

研究課題名(和文) 残存HIVの転写活性化を規定する宿主内環境因子の同定

研究課題名(英文) Identification of host factors associated with persistent transactivation of HIV

研究代表者

石坂 彩 (ISHIZAKA, Aya)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・博士研究員

研究者番号：70746859

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：HIV感染者の末梢血中の感染細胞では伸長が中途停止したHIV由来の60-70塩基の短鎖RNA(ST)が高頻度に産生される。我々はSTを指標に感染細胞の転写活性を評価する独自の系を考案し、治療により血漿ウイルス量が良好に制御されていても、STが高レベルで検出される患者ではCD8+ T細胞が慢性的に活性化されており、免疫力の指標であるCD4+細胞数の回復が鈍いことを見出した。この知見は血漿に反映されないウイルスの持続的な転写活性化が抗HIV療法下の患者においても惹起されている確固たる証拠であると同時に、低レベルなウイルス複製と慢性炎症が互いに刺激しあう悪循環に陥っている可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we identified prematurely terminated short HIV-1 transcripts (STs) in peripheral blood mononuclear cells as an efficient intracellular biomarker to monitor viral activation and immune status in patients with cART-mediated full viral suppression in plasma. The levels of STs strongly reflected chronic immune activation. These observations represent evidence for a relationship between viral persistence and host immune activation, which in turn results in the suboptimal increase in CD4+ cells despite suppressive antiretroviral therapy. This cell-based measurement of viral persistence contributes to an improved understanding of the dynamics of viral persistence in patients.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HIV 残存感染細胞

1. 研究開始当初の背景

抗 HIV 療法は、血中の HIV 粒子を検出限界未満にまで抑えることが可能である。しかし患者の体内には依然として感染細胞が残存しているため、HIV 感染症が根治したわけではない。残存する感染細胞の存在は免疫システムに慢性的なストレスを与え続けると考えられており、HIV 患者はがんや循環器疾患などの疾患発症のリスクを抱え続けている。この現状から、残存する感染細胞の効果的な制御方法の開発がこれからの HIV 治療に必要な課題のひとつであると言える。そのためには、残存している感染細胞を高感度に検出し、その挙動を把握する方法論が必要となる。

我々はこれまでに末梢血中の感染細胞では伸長が中途停止した HIV 由来の 60-70 塩基の短鎖 RNA (short transcript, ST) が高頻度に産生されるという報告 (Lassen *et al.*, *J. Virol.*, 2004) に着目し、ST を指標に感染細胞の転写活性を評価する独自の系を考案した (特願 2012-013087、PCT/JP2013/051389)。この評価系を用いて残存感染細胞の挙動と病態の関係を調べたところ、抗 HIV 療法の開始後に血漿中の HIV RNA 量が検出限界未満となり治療経過が順調と思われる患者でも ST の発現量が高い患者ほど免疫力の指標である CD4+細胞数の回復が鈍いことが観察された (図 1)。

これは、血漿に反映されないウイルスの持続的な転写活性化が抗 HIV 療法下の患者においても惹起されている確固たる証拠であると同時に、鎮静しきれない残存感染細胞が免疫力の回復に禍根を残すことを意味している。この事象の作用機序の解明は、残存ウ

イルスの活性化機構の理解につながり、これからの抗 HIV 療法が目指す残存感染細胞の制御、制圧の分子基盤づくりに不可欠なものとなる。

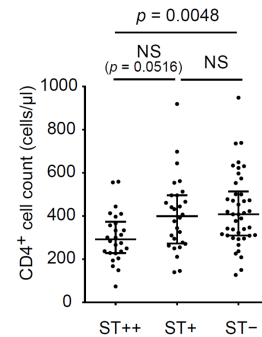


図 1: 治療開始後、血漿 HIV RNA が <50 copies/ml となった患者の PBMC から ST を検出した。ST++ の患者は、低 CD4+ 値を示す傾向があった。

2. 研究の目的

本研究では、抗 HIV 療法下において残存 HIV LTR の転写を活性化する細胞内環境要因を明らかにすることを試みた。これまでの知見から、ST が強陽性である患者の体内では低レベルでありながらも持続的な免疫活性化が起きている可能性が高い。そこで本研究では作業仮説として慢性的な炎症による残存ウイルスの転写活性化を仮定し、それに関わる細胞性因子の解析を進めた。

3. 研究の方法

治療後も ST が検出される患者の体内環境を明らかにするために、PBMC 中の ST の発現量と炎症に関連する細胞因子の両方を HIV 患者の同一血液から解析し、両者の相関について解析した。ST の判定には、遠心分離法によって分画した PBMC から 200 塩基以下の RNA 画分を精製後、qRT-PCR にて

ST 陽性群および陰性群に分類した。細胞因子は、CD4⁺ および CD8⁺ T細胞のそれぞれについて、細胞の活性化および疲弊・老化に関する細胞表面マーカーの解析をフローサイトメトリーを使用して行った。活性化マーカーは HLA-DR および CD38、疲弊・老化マーカーは PD-1 および CD57 について調べた。血液検体は、以下の患者から採集した。

(1) 抗 HIV 薬の投与後に血漿中の HIV RNA 量が検出限界未満となった患者 54 名より、採取した。

(2) 治療開始後に血漿 HIV RNA 量が検出限界未満となった 37 名の患者について、未治療時の血液サンプルの解析を行った。

4. 研究成果

(1) ST の発現量は CD8⁺ T細胞の活性化レベル (HLA-DR, CD38 の発現) と強く関連していた (図 2)。一方、PD-1 や CD57 の発現および CD4⁺ T細胞の活性化レベルと ST の発現量の間には優位な相関は見られなかった。この結果から血漿ウイルス量の制御と免疫反応の鎮静化は同義ではないことが明らかとなった。

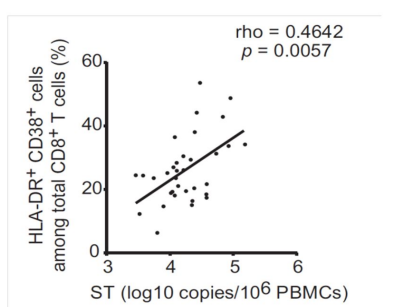


図 2: ST の発現量は CD8⁺ T細胞の活性化と強く相関していた。

(2) 37 名の患者のうち未治療時において ST が高レベルで検出された患者は 21 名であり、

そのうちの 9 名では治療により血漿 HIV RNA 量が検出限界未満となった後も ST が高レベルで検出され続けた。この 9 名は未治療時に非常に強く CD8 T細胞の活性化が起きており、治療後も高活性化状態が維持されていた (図 3)。この事実から、治療後も高レベルで ST の発現が続く背景には、未治療時の過度な免疫の活性化により免疫系が受けた不可逆的なダメージがあると推察できる。

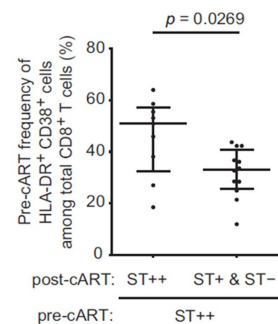


図 3: 治療開始前に非常に強く CD8 T細胞の活性化が起きていた患者は、治療後も ST の高発現が続く傾向があった。

現在の抗 HIV 療法では病態制御により発病を遅らせる治療戦略が現実的な考え方であり、患者体内における免疫反応の沈静化に向けた取り組みは HIV 感染症の制御につながるひとつの有効策である。すなわち治療後も残存する感染細胞の正確な同定、および残存感染細胞による慢性炎症といった病態発症の理解が重要な情報となる。申請者の考案した評価系は残存感染細胞の転写活性を鋭敏に検出することに成功し、その検出技術の向上に大きく貢献した。本研究では、この独自の評価系を用いることにより、これまで詳細な解析が困難であった HIV の持続感染および慢性炎症が成立する分子基盤の理解に貢献する。本成果は残存感染細胞の制御、制圧の分子基盤づくりの達成だけでなく、新た

な血液診断技術の実用化とその対策につながる萌芽性も有する。

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3件)

Ishizaka A, Sato H, Nakamura H, Koga M, Kikuchi T, Hosoya N, Koibuchi T, Nomoto A, Kawana-Tachikawa A and Mizutani T. "Short intracellular HIV-1 transcripts as biomarkers of residual immune activation in patients on antiretroviral therapy." J Virol. 90, 5665-76. (2016) doi: 10.1128/JVI.03158-15. 査読あり

Mizutani T, Ishizaka A, Nihei C. "Transferrin Receptor 1 Facilitates Poliovirus Permeation of Mouse Brain Capillary Endothelial Cells." J Biol Chem. 291, 2829-36 (2016) doi: 10.1074/jbc.M115.690941. 査読あり

Mizutani T, Ishizaka A, Furuichi Y. "The Werner Protein Acts as a Coactivator of Nuclear Factor κ B (NF- κ B) on HIV-1 and Interleukin-8 (IL-8) Promoters." J Biol Chem. 290, 18391-9 (2015) doi: 10.1074/jbc.M115.657155. 査読あり

[学会発表](計2件)

石坂彩、佐藤秀憲、中村仁美、古賀道子、鯉淵智彦、立川(川名)愛、水谷壮利「Cell associated HIV RNA (Short Transcripts)とT細胞活性化との関連」第30回日本エイズ学会学術集会、2016年11月25日、かごしま県民交流センター(鹿児島県鹿児島市)

Aya Ishizaka, Hidenori Sato, Hitomi Nakamura, Michiko Koga, Tomohiko Koibuchi, Ai Kawana-Tachikawa and Taketoshi Mizutani. "Short intracellular HIV-1 transcripts serve as biomarkers of residual immune activation in patients on antiretroviral therapy" 2016年10月31日、2nd Kumamoto IRCMS International Symposium and 17th Kumamoto AIDS Seminar、くまもと県民交流館パレア(熊本県熊本市)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計1件)

名称: 免疫状態の判定方法、CD4+T細胞数の増加予測方法、及びCD4+T細胞数の減少予測方法、並びにそれらのためのキット

発明者: 水谷壮利、石坂彩、立川愛
権利者: 公益財団法人 微生物化学研究会
種類: 特許
番号: PCT/JP2015/078488
出願年月日: 2015年10月7日
国内外の別: 国外

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
<http://www.bikaken.or.jp/research/publications/index.php>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石坂 彩 (ISHIZAKA, Aya)
微生物化学研究会・微生物化学研究所・博士研究員
研究者番号: 70746859