

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月5日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05198

研究課題名(和文) HIVの細胞間伝播による感染性獲得メカニズム解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanism of HIV cell-to-cell transmission

研究代表者

梁 明秀 (Ryo, Akihide)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：20363814

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、エイズウイルス(HIV)の細胞-細胞間感染を生体外で再構築し、ウイルス構成因子の細胞内輸送やVirological Synapse(VS)への局在化をモニタリングできる実験系の構築を行った。この実験系を用いて、ウイルス伝播に関与する宿主因子としてがん抑制遺伝子産物であるAPCを同定した。その後の解析により、APCがHIV GagおよびウイルスゲノムRNA(vRNA)をVSに局在化させることで、HIVの細胞-細胞間感染を正に制御することを明らかにした。また、上記手法を活用し、HIV細胞-細胞間感染を阻止する新たな宿主因子を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞間接触により感染細胞から非感染細胞に直接エイズウイルスを受け渡すcell-to-cell感染は通常の感染系の数十倍～数千倍という高効率なウイルス伝播が可能であり、新たな創薬ターゲットであると考えられる。本研究で見いだしたAPCはウイルス構成因子を細胞の特定の場所に集積させることで、HIVのcell-to-cell伝播を制御する宿主因子である。APCの本来の機能を阻害させないで、APCとGagの相互作用を阻止できれば、HIVの効率的な細胞-細胞間伝播が阻止できる可能性がある。ウイルス-宿主間相互作用を抑制する新しいタイプの治療薬開発へ展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：It is widely believed that cell-to-cell viral transfer is a major mode of HIV-1 infection in lymphoid tissues and much more efficient for spreading viral particles than cell-free infection. In our present study, we created a HIV-1 molecular clone carrying 24 repeats of the MS2-binding sites in order to monitor the intracellular dynamics of Gag and vRNA in cells. Using this system, we show that the tumor suppressor adenomatous polyposis coli protein (APC) directs the localization and assembly of HIV-1 Gag polyprotein at distinct membrane components to enable the efficient production and spread of infectious viral particles. Furthermore, we newly identified anti-viral host factors that selectively suppress the cell-to-cell transmission of HIV-1.

研究分野：医歯学

キーワード：HIV 宿主因子 細胞-細胞間感染 プロテオミクス 分子イメージング

1. 研究開始当初の背景

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) は、細胞外に分離放出されたウイルス粒子による cell-free 感染系とは別に、細胞間接触により感染細胞から非感染細胞に直接ウイルスを受け渡す cell-to-cell 感染系がある。一般的に cell-to-cell 感染系は、cell-free 感染系の数十倍～数千倍という高効率なウイルス伝播が可能であるため、中和抗体や抗ウイルス薬による抑制効果が不十分になる。また、ウイルス潜伏化や長期の感染維持に重要な役割を果たす。cell-to-cell 感染系は、特に CD4 陽性 T リンパ球が高密度に存在する腸管関連リンパ組織などの 2 次リンパ組織では、主要な感染伝播様式であり、また、HIV 潜伏化の成立に関わることで HIV の長期感染維持に重要な役割を果たすことが報告され、近年注目を集めている。しかしながら、HIV の cell-to-cell 感染の分子機構については不明な点が多い。ウイルス伝播に関与する宿主因子やその作用機序が明らかになれば、新たな抗ウイルス療法の開発につながる可能性がある。

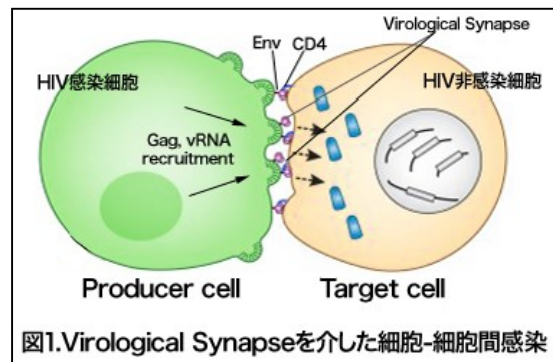


図1.Virological Synapseを介した細胞-細胞間感染

2. 研究の目的

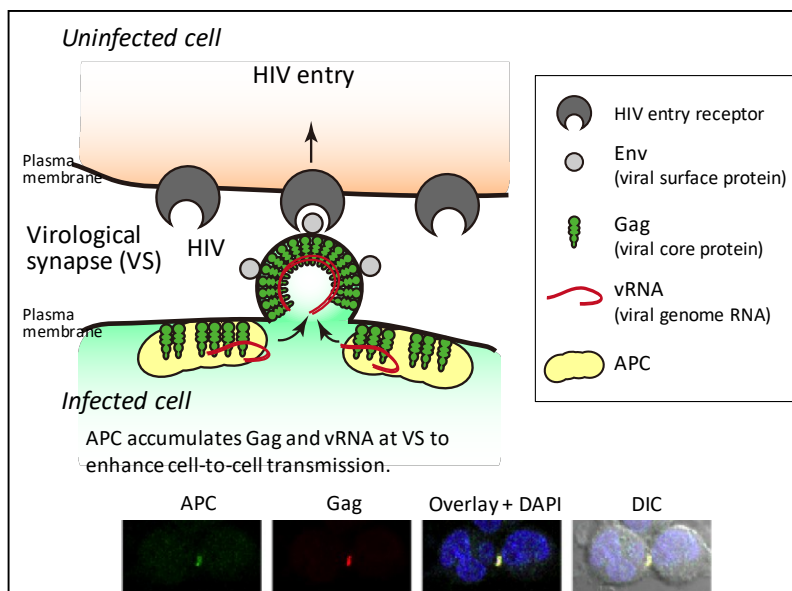
本研究課題では、エイズウイルス (HIV) の細胞-細胞間感染を生体外で再構築し、ウイルス構成因子の細胞内輸送や Virological Synapse (VS) への局在化をモニタリングできる実験系の構築を行う。次に、この実験系を用いて、ウイルス伝播に関与する宿主因子を同定し、それらの HIV 細胞-細胞間伝播における役割やその分子機序について明らかにする。また、上記手法を活用し、HIV 細胞-細胞間感染を阻止する新たな宿主因子を探索する。

3. 研究の方法

HIV の細胞-細胞間伝播におけるウイルス受け渡しの場である Virological synapse (VS) 様構造を、トランスウェル 3 次元培養系を用いて立体的に再構築させた。また、バクテリオファージ MS2 結合配列を挿入した HIV 分子クローンを用いて、感染細胞内における vRNA の動態を可視化した。また、当教室で独自に構築した、ISG (Interferon-stimulated genes) 遺伝子ライブラリーを活用し、発現スクリーニングを実施した。これらの実験系を用いて HIV の細胞-細胞間伝播を促進または阻止する宿主因子を複数同定し、その作用分子機構について解析を行った。TAP (Tandem Affinity Purification) を用いたプロテオミクス解析を実施し、新たな Gag 前駆体蛋白質結合因子を探索する。コムギ無細胞タンパク質合成系を用いて、ビオチン付加宿主タンパク質を合成し、HIV タンパク質との相互作用をハイスループットに検出できるアッセイ系を、化学増幅型ルミネッセンスプロキシミティホモジニアスアッセイ AlphaScreen を用いて構築し、ウイルス-宿主タンパク質相互作用検出・定量した。

4. 研究成果

HIV の細胞-細胞間伝播におけるウイルス受け渡しの場である Virological synapse (VS) 様構造を、トランスウェル 3 次元培養系を用いて立体的に再構築させることに成功した。また、バクテリオファージ MS2 結合配列を挿入した HIV 分子クローンを用いて、感染細胞内における vRNA の動態を可視化することにも成功している。これらのモデル系および研究ツールを活用し、HIV の細胞-細胞間伝播を促進または阻止する宿主因子を複数同定し、その作用分子機構について解析を行った。



同定された因子のうち、まずはがん抑制遺伝子産物である APC (adenomatous polyposis coli) に着目して研究を行った。解析の結果、HIV 産生細胞において APC は Gag、vRNA 両方の輸送、安定化の制御に関与する可能性が示唆された。また、上記の細胞培養系を用いて、APC による HIV の cell-to-cell 感染への役割を解析したところ、APC を阻害すると、Gag および vRNA の VS への局在化が低下し、cell-to-cell 感染効率が顕著に低下することが認められた。これらの結果は、APC がウイルス構成因子を VS にリクルートすることで、HIV の cell-to-cell 感染を制御していることを示唆する結果である。

また、当教室で独自に構築した ISG (Interferon-stimulated genes) 遺伝子ライブラリー (約 500 種類) を活用し、発現スクリーニングを実施した。具体的には、293T 細胞を用いて ISG 遺伝子を導入後、HIV カプシドタンパク質である Gag の局在と安定性について考察した。NanoBRET 技術を用いたスクリーニングにより、未知の宿主因子が Gag の膜局在化と安定性を阻害することで、HIV 産生を顕著に阻害した。現在、3 次元トランスウェル培養系において cell-to-cell ウイルス伝播への役割や機能について解析中である。

本研究では、エイズウイルスの細胞-細胞間接触により生ずる cell-to-cell 感染系に関わる宿主因子を同定し、その作用機序について分子レベルで解明をおこなった。cell-to-cell 感染は通常の感染系の数十倍~数千倍という高効率なウイルス伝播が可能であり、新たな創薬ターゲットであると考えられる。本研究で見いだした宿主因子、特に APC は、ウイルス構成因子を細胞の特定の場所に集積させることで、HIV の cell-to-cell 伝播を制御する宿主因子である。APC の本来の機能を阻害させないで、APC と Gag の相互作用を阻止できれば、HIV の効率的な細胞-細胞間伝播が阻止できる可能性がある。ウイルス-宿主間相互作用を抑制する新しいタイプの治療薬開発へ展開が期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Miyakawa K, Matsunaga S, Yokoyama M, Nomaguchi M, Kimura Y, Nishi M, Kimura H, Sato H, Hirano H, Tamura T, Akari H, Miura T, Adachi A, Sawasaki T, Yamamoto N, Ryo A. PIM kinases facilitate lentiviral evasion from SAMHD1 restriction via Vpx phosphorylation. *Nat Commun.* 2019 Apr 23;10(1):1844. 査読有. doi: 10.1038/s41467-019-09867-7. オープンアクセス有.
2. Khatun H, Yamaoka Y, Matsushima Y, Matsunaga S, Kimura H, Ho J, Shuda M, Ryo A. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for major capsid VP1 protein of trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus. *Microbiol Immunol.* 2018 Dec;62(12):763-773. 査読有. doi: 10.1111/1348-0421.12662.

3. Yamamoto T, Honda A, Sato T, Ryo A. Editorial: Perspectives for the Next Generation of Virus Research: Spearheading the Use of Innovative Technologies and Methodologies. *Front Microbiol.* 2017 May 11;8:758. 査読有. doi: 10.3389/fmicb.2017.00758. eCollection 2017. オープンアクセス有.
4. Kushiro K, Yaginuma T, Ryo A, Takai M. Differences in Three-Dimensional Geometric Recognition by Non-Cancerous and Cancerous Epithelial Cells on Microgroove-Based Topography. *Sci Rep.* 2017 Jun 26;7(1):4244. 査読有. doi: 10.1038/s41598-017-03779-6. オープンアクセス有.
5. Imagawa E, Higashimoto K, Sakai Y, Numakura C, Okamoto N, Matsunaga S, Ryo A, Sato Y, Sanefuji M, Ihara K, Takada Y, Nishimura G, Saitsu H, Mizuguchi T, Miyatake S, Nakashima M, Miyake N, Soejima H, Matsumoto N. Mutations in genes encoding polycomb repressive complex 2 subunits cause Weaver syndrome. *Hum Mutat.* 2017 Jun;38(6):637-648. 査読有. doi: 10.1002/humu.23200. オープンアクセス有.
6. Mai TT, Hamaï A, Hienzsch A, Cañeque T, Müller S, Wicinski J, Cabaud O, Leroy C, David A, Acevedo V, Ryo A, Ginestier C, Birnbaum D, Charafe-Jauffret E, Codogno P, Mehrpour M, Rodriguez R. Salinomycin kills cancer stem cells by sequestering iron in lysosomes. *Nat Chem.* 2017 Oct;9(10):1025-1033. 査読有. doi: 10.1038/nchem.2778. オープンアクセス有.
7. Miyakawa K, Nishi M, Matsunaga S, Okayama A, Anraku M, Kudoh A, Hirano H, Kimura H, Morikawa Y, Yamamoto N, Ono A, Ryo A. The tumour suppressor APC promotes HIV-1 assembly via interaction with Gag precursor protein. *Nat Commun.* 2017 Jan 30;8:14259. 査読有. doi: 10.1038/ncomms14259. オープンアクセス有.
8. Kudoh A, Miyakawa K, Matsunaga S, Matsushima Y, Kosugi I, Kimura H, Hayakawa S, Sawasaki T, Ryo A. H11/HSPB8 Restricts HIV-2 Vpx to Restore the Anti-Viral Activity of SAMHD1. *Front Microbiol.* 2016 Jun 13;7:883. 査読有. doi: 10.3389/fmicb.2016.00883. eCollection 2016. オープンアクセス有.

〔学会発表〕（計 8 件）

1. 駒 貴明, 小谷 治, 土肥直哉, 宮川 敬, 梁 明秀, 横山 勝, 佐藤裕徳, 足立昭夫, 野間口雅子. Role for the Gag-CA linker domain in the late HIV-1 replication phase. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会. 2018 年 10 月 30 日. 京都
2. 松永智子, 菱澤方勝, 高折晃史, 梁明秀. 疾患特異的マーカーとしての抗 HTLV-1 抗体の血清学的エピトープの検討. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会. 2018 年. 京都.
3. 松永智子, 松島勇紀, 森下了, 木村博一, 梁明秀. Protein Active Array を用いたヒト血清中に含まれる抗ウイルス抗体の網羅的検出. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会. 2017 年.
4. 駒 貴明, 土肥直哉, 宮川 敬, 梁 明秀, 足立昭夫, 野間口雅子. HIV-1 複製後期過程における Gag-CA リンカー領域内アミノ酸残基 S149 及び I150 の役割. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会. 2017 年.
5. 宮川 敬, 梁 明秀. 宿主因子 APC による HIV 細胞-細胞間伝播制御機構の解明. 第 31 回日本エイズ学会学術集会. 2017 年.
6. 梁 明秀. Overcoming viral evasion from host restriction factors: Targeting HIV accessory proteins. 第 30 回日本エイズ学会学術集会（招待講演）. 2016 年 11 月 24 日～2016 年 11 月 26 日. かごしま県民交流センター（鹿児島）.

7. 宮川 敬, 松山慎一郎, 村上 努, 梁 明秀. NanoBRET 法を用いた生細胞内 HIV-1 Gag の多量体化解析および結合宿主因子探索. 第 30 回日本エイズ学会学術集会. 2016 年 11 月 24 日～2016 年 11 月 26 日. かごしま県民交流センター (鹿児島).
8. 岩瀬早織, 宮川 敬, 工藤あゆみ, 梁 明秀. ケミカルバイオロジーを用いた HIV 再活性化のメカニズム解析. 第 30 回日本エイズ学会学術集会. 2016 年 11 月 24 日～2016 年 11 月 26 日. かごしま県民交流センター (鹿児島).

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年 :
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 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

https://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~saikin/?page_id=54

https://www.amed.go.jp/news/release_20190423.html

6. 研究組織

(1) 研究分担者 該当なし

研究分担者氏名 :

ローマ字氏名 :

所属研究機関名 :

部局名 :

職名 :

研究者番号 (8 桁) :

(2) 研究協力者 該当なし

研究協力者氏名 :

ローマ字氏名 :

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。