

令和元年6月7日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08814

研究課題名(和文) 微小環境の変化によるHIV潜伏化機構の解明

研究課題名(英文) HIV latency by the change of microenvironment

研究代表者

宮川 敬 (MIYAKAWA, Kei)

横浜市立大学・医学部・講師

研究者番号：20580046

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：HIV感染に伴うエイズ発症は適切な投薬によりほぼ抑制可能になったものの、これらの治療薬では潜伏感染細胞の排除ができないため、投薬中断によるウイルスの再活性化が問題となっている。しかし、HIV再活性化や潜伏化の詳細なメカニズムは依然不明である。本研究では、HIV転写活性を定量可能なモデル細胞を樹立し、HIV再活性化および潜伏化に関わる分子機構の解明を目指した。その結果、中枢神経系受容体シグナル系がHIV再活性化に関与する可能性を見いだした。またHIV潜伏化に関わる少なくとも2種類の宿主因子を同定した。今後、HIV潜伏・再活性化そのものを標的とした治療法開発が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HIV潜伏化や再活性化メカニズムが解明されることで、エイズ発症を防止する従来の治療から、エイズ克服にむけた治療法の開発に貢献できる可能性がある。本研究ではHIV潜伏化に関与する宿主因子を複数同定したことから、今後これらの因子に対する標的薬開発を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：The availability of highly effective anti-retroviral drugs has nearly suppressed the progression of HIV infection to AIDS. However, the reactivation of the virus upon discontinuation of medication is a major problem, as these therapeutic agents can not eliminate latently infected cells. The detailed mechanisms involved in HIV latency and reactivation still remain unknown. In this study, we established model cells capable of quantifying the transcriptional activity of HIV and aimed to elucidate the molecular mechanisms involved in HIV reactivation and latency. In this study, we found the involvement of central nervous signaling in HIV reactivation. We also identified two host factors involved in HIV latency. The scope of this study could be extended to develop novel therapeutic agents against HIV latency in the future.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HIV潜伏化 HIV再活性化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染に伴うエイズ発症は適切な服薬によりほぼ抑制可能になったものの、投薬中断した患者では高頻度でウイルスの再活性化が起こる。その一つの要因は、既存の薬剤が、ウイルス粒子生成が行われている細胞には絶大な効果を示す一方、ウイルス蛋白質がほとんど発現しない、いわゆる潜伏感染細胞には効果を発揮しないためである。

感染細胞内では HIV は自身のゲノムを宿主染色体に組み込むことで子孫ウイルスを安定的に産生する。しかし一定の割合で、組み込まれたウイルスゲノムの転写が起こらない、いわゆる潜伏化状態となった感染細胞が存在する。これらの細胞はウイルス蛋白質がほとんど発現しないため、宿主免疫系から回避するだけでなく、既存の薬剤では排除できない。潜伏感染細胞ではウイルスゲノムが長期にわたって維持されるが、細胞内外の何らかの環境変化によってウイルスゲノムの転写が開始され、いわゆるウイルス再活性化が起こる。そのため、ウイルスの潜伏化や再活性化そのものを標的とする根治療法の開発が行われている。これまでの研究から、感染細胞を取り巻く微小環境の変化やサイトカインなどの外的刺激が HIV 再活性化や潜伏化に関わると推測されているが、詳細なメカニズムは依然不明である。

2. 研究の目的

潜伏感染細胞を再活性化させることで宿主免疫系による排除を目指す「Shock & Kill 療法」や、潜伏状態を維持してウイルス再活性化を未然に防ぐ「Block & Lock 療法」など、近年 HIV 潜伏・再活性化を標的とした根治療法の開発が世界的に行われている。しかし今のところ著名な効果は出ていない。そのため HIV 潜伏・再活性化のさらなるメカニズム解明と薬剤標的の提案が喫緊の課題である。これまでの研究から、感染細胞を取り巻く微小環境の変化やサイトカインなどの外的刺激が HIV 潜伏・再活性化に関わると推測されている。そこで本研究では、HIV 転写活性を定量可能なモデル細胞を樹立し、ケミカルバイオロジーやバイオインフォマティクスを駆使したアプローチにより、HIV 再活性化および潜伏化に関わる分子機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) HIV 潜伏・再活性化モデル細胞の構築

ウイルスゲノム内にレポーター遺伝子を有する HIV を CD4 陽性 T 細胞株や単球細胞株に高 MOI あるいは低 MOI で感染させ、ウイルスゲノムを様々なコピー数で安定発現させた細胞クローンを多数樹立した。組み込まれたウイルスゲノムコピー数は、デジタル PCR 法を用いて算出した。コピー数の増加に伴って、ルシフェラーゼ活性および HIV 遺伝子の転写・翻訳が増加することを確認した。定常状態におけるルシフェラーゼ活性やクロマチン修飾状況を指標に、潜伏・再活性化を観察するためのモデル細胞を選定した。

(2) ケミカルバイオロジーによる HIV 再活性化機序の解析

樹立したモデル細胞に作用点既知の低分子化合物 1,120 種を添加してルシフェラーゼ活性を測定した。ルシフェラーゼ活性を顕著に高めた化合物の作用点が HIV 再活性化に関わる可能性について、クロマチン免疫沈降法などの手法を用いて検討した。

(3) HIV 潜伏化機序の解析

樹立したモデル細胞を様々な培養条件下で数日間培養し、ルシフェラーゼ活性を測定することで HIV 潜伏化の効率を判定した。この際、細胞内 ATP 量を測定し、細胞内代謝への影響を同時に調べた。細胞内 ATP 量が低下せず、ルシフェラーゼ活性のみが低下した場合は潜伏化が起きたと考え、HIV ゲノムの転写抑制を定量 PCR 法やクロマチン免疫沈降法にて確認した。潜伏化前後の細胞のマイクロアレイ解析を行い発現変動のある宿主因子を抽出した。抽出した宿主因子をノックダウンした細胞を作成し、HIV 潜伏化に関与するかを実証した。

4. 研究成果

(1) HIV 再活性化・潜伏化を定量可能なモデル細胞の樹立

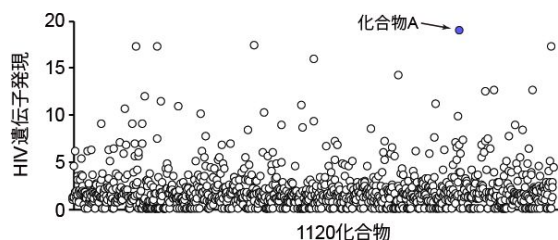
HIV 潜伏・再活性化を迅速に定量するため、レポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を有する HIV を CD4 陽性 T 細胞株や単球細胞株へ感染させ、ウイルスゲノムを様々なコピー数で安定発現する細胞クローンを多数樹立した。PMA 刺激によってルシフェラーゼ活性が増加するクローンのうち、定常状態ではほとんどルシフェラーゼ活性を示さないクローンを、ウイルスゲノムの再活性化を観察するためのモデル細胞とした。これらの細胞では HIV 潜伏化を示すヒストンマークがウイルスプロモーター領域で見られたことから、エピジェネティックな制御により HIV の潜伏化が起こっていると考えられた。一方、定常状態においても検出可能なルシフェラーゼ活性を示したクローンは、ウイルスゲノムの潜伏化を観察するためのモデル細胞とした。デジタル PCR 解析の結果、これらのすべてのモデル細胞は平均 1~2 コピーのウイルスゲノムが挿入されていた。また、すべてのモデル細胞において、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤などの既知の転写活性化刺激に伴って、ルシフェラーゼ活性および HIV 遺伝子の転写・翻訳が増加することを確認した。

(2) HIV 再活性化に関わる新規受容体シグナル系の同定

HIV 再活性化の分子メカニズムを解明するため、作用点既知の低分子化合物 1,120 種を潜伏感染モデル細胞にそれぞれ添加し、HIV 遺伝子発現を正に制御する低分子化合物を探索した。その結果、中枢神経系受容体に作用する化合物 A が HIV 遺伝子発現を顕著に高めることが分かった(右図)。

化合物 A は生体内でこの受容体活性を制御することが知られており、潜伏感染細胞においてこの受容体を介した細胞内シグナル系が HIV 再活性化に関与する可能性が示唆された。クロマチン免疫沈降法の結果、化合物 A は HIV プロモーター領域に特徴的なヒストン修飾を誘導すること

がわかった。また、化合物 A は毒性が極めて低いことから、「Shock & Kill 療法」においてウイルス再活性化を誘導する薬剤としての有用性についても検討中である。



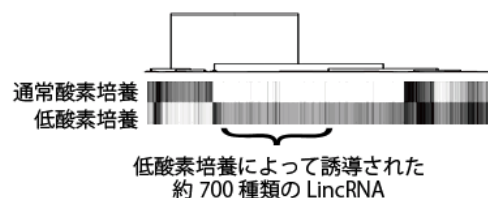
(3) HIV 潜伏化機序に関わる宿主因子の探索と同定

HIV 潜伏化の分子メカニズムを解明するため、構築したモデル細胞を様々な環境下で培養し、ウイルスゲノムの発現変化を調べた。その結果、低酸素環境下では HIV ゲノム発現が顕著に低下し、通常酸素濃度に戻すことにより、再び HIV ゲノムの転写が起こった。このことから、酸素濃度が HIV 潜伏化を制御する可能性が示唆された。クロマチン免疫沈降法の結果、ウイルスゲノムプロモーター領域にヒストンメチル化修飾が多数検出されたことから、感染細胞における低酸素刺激は、エピジェネティックな制御により HIV 潜伏化を促進させる可能性が示唆された。このメカニズムを解明するため、低酸素刺激に伴って発現が 2 倍以上変動する宿主因子について RNA-Seq 法にて探索したところ、エピゲノム制御因子が多数含まれていた。しかし、

これらのうち機能的に HIV 潜伏化に寄与するものは見いだせなかった。そこで次に、遺伝子の転写を配列特異的に制御することが知られる long non-coding RNA (LincRNA) に着目して再解析した結果、低酸素刺激に伴って発現が変動する約 700 種の LincRNA を抽出した(右図)。この中から、バイオインフォマティクスを用いて、HIV 遺伝子配列と高い相同配列を有する 10 種類の LincRNA を同定した。これらの LincRNA が HIV 潜伏化に関わるかを検討するため、それぞれの因子をノックダウンした感染細胞を作成し、低酸素培養下での HIV 潜伏化効

率を測定した。その結果、少なくとも 2 種類の LincRNA が低酸素刺激に伴う HIV 潜伏化機序に関わることを見出した。これらの LincRNA がウイルスゲノムプロモーター領域にヒストンメチル化修飾を誘導する機構については現在解析中である。

HIV 潜伏感染モデルの遺伝子発現解析



5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 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 *Nature Communications*. 10, 1844, 2019. 査読有
DOI: 10.1038/s41467-019-09867-7
- 2) Miyakawa K, Matsunaga S, Yamaoka Y, Dairaku M, Fukano K, Kimura H, Chimuro T, Nishitsuji H, Watashi K, Shimotohno K, Wakita T, Ryo A: Development of a cell-based assay to identify hepatitis B virus entry inhibitors targeting the sodium taurocholate cotransporting polypeptide. *Oncotarget*. 9(34), 23681-94, 2018. 査読有
DOI: 10.18632/oncotarget.25348
- 3) 宮川 敬, 梁 明秀: がん抑制遺伝子産物 APC は HIV 細胞-細胞間感染を促進する. *感染・炎症・免疫*. 4, 302-30, 2017. 査読無
- 4) 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 tumor suppressor APC promotes HIV-1 assembly via interaction with Gag precursor protein. *Nature Communications*. 8, 14259, 2017. 査読有
DOI: 10.1038/ncomms14259
- 5) 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. *Frontiers in Microbiology*. 7, 883, 2016. 査読有
DOI: 10.3389/fmicb.2016.00883

〔学会発表〕(計6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: HIV-1複製後期過程におけるGag-CAリンカードメインの役割. 第66回日本ウイルス学会学術集会, 2018年10月
- 2) Miyakawa K, Ryo A: The tumor suppressor APC promotes HIV-1 assembly via interaction with Gag protein, U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program (USJCMSP) 20th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific, 2018年1月
- 3) 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11月24日
- 4) Miyakawa K, Matsunaga S, Kudoh A, Ryo A: Identification of a host factor that restores the antiviral activity of APOBEC3G by disrupting HIV-1 Vif-mediated counteraction, 26th ECCMID, 2016年4月
- 5) 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
- 6) 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

〔その他〕

新聞報道等

- 1) 「次世代の先導者 エイズ根治へ基礎研究」日経産業新聞 2018年11月22日
- 2) 「慢性的な HIV 感染 基礎研究者、根治に挑む」日経産業新聞 2018年11月9日
- 3) 「HIV 慢性感染を防げ、基礎研究者が挑む」日本経済新聞 電子版 2018年10月29日
- 4) 「HIV の体内感染広げる分子機構」科学新聞 2017年2月17日
- 5) 「HIV 感染拡大機構を解明 関与たんぱく質発見」日刊工業新聞 2017年1月31日

ホームページ等

<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~saikin/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮川 敬 (MIYAKAWA, Kei)

横浜市立大学・医学部・講師 研究者番号: 20580046

(2) 研究分担者・研究協力者

なし

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。