

令和 2 年 6 月 6 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09016

研究課題名(和文) 高精細HIV-1トランスクリプトームと慢性持続感染病態との関連性解析研究

研究課題名(英文) HIV-1 transcriptome analysis

研究代表者

佐藤 賢文 (SATO, YORIFUMI)

熊本大学・ヒトレトロウイルス学共同研究センター・教授

研究者番号：70402807

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)：本研究課題では、まず細胞培養株を用いて、ウイルス配列濃縮法による高感度HIVトランスクリプトーム解析法を確立した。更にその確立した方法を用いて臨床検体のウイルストランスクリプトーム解析を行ったが、今回の高感度な解析でも十分なウイルス転写物を検出することは出来なかった。以上の結果の解釈として以下の2つが考えられた。治療前の感染者検体においても、末梢血液中に存在するウイルス転写物は極めて微量であるため、高感度な検出系であっても検出されない。検出感度が不十分で有り、改良が必要であること。バイオバンクの活用などを通じ、解析症例数を増やし、感染細胞の多い症例を選定するなどして、今後も研究を継続する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HIV-1感染者において、抗ウイルス療法下で残存するウイルスリザーバの研究のために高感度ウイルス遺伝子発現検出系の開発を行った。従来の方法に比べ検出感度を数千倍高める事に成功した。

しかしながら、臨床検体でウイルスRNAを検出するには、それでも感度が不十分であったため、今後も研究を継続して、解析系の更なる改良を行う。

研究成果の概要(英文)：First, we have established DNA-probe based viral sequence enrichment protocol for HIV-1 transcriptomic analysis by using cell lines. The efficiency was very high. We could enrich viral transcripts with more than 1,000 times. Then, we applied the new protocol for clinical sample. We analyzed PBMCs from HIV-1-infected individuals. We analyzed them before and after cART. We found that even before cART, we could not detect enough number of HIV-1 transcripts even after enrichment. We concluded that even our current is not good enough to detect HIV-1 RNA from clinical samples, especially PBMCs. We need to increase sensitivity or analyze different samples such as lymph nodes. We are going to continue this research h to make further progress.

研究分野：感染症内科学

キーワード：HIV-1

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、世界的におよそ4000万人、我が国でも2万人を超えるHIV感染者が存在する。近年、抗レトロウイルス療法 (combination anti-retroviral therapy: cART) の進歩により、先進国ではHIV感染症がコントロール可能な慢性疾患へと変貌しつつある。しかしながら、cARTによっても感染者体内からウイルスを完全に排除する事は極めて困難であり、感染者は長期にわたり治療を継続する必要がある。血清中のウイルスのコントロール良好な感染群においても、早期痴呆やがんの発症率の上昇などが問題になってきており、持続感染の問題は早急に解決が必要な研究課題の一つである。

治療中の感染者末梢血にも感染細胞は存在し、その細胞ゲノムにHIV-1が組み込まれている。組み込まれたウイルスの大部分は、変異や欠損をもつため(Chon LB et al Cell 2015)、ウイルスリザーバーとして寄与している可能性に関しては否定的な意見が多い。その一方で、変異や欠損したウイルスからでもウイルスRNAを産生する事で、慢性病態に関与している可能性が考えられる。実際に、ウイルス量のコントロール良好な感染者サンプルを用いた解析でも、small non-coding RNAの転写が高頻度に検出されることが報告されている。(Ishizaka A et al, J. Virol 2016)

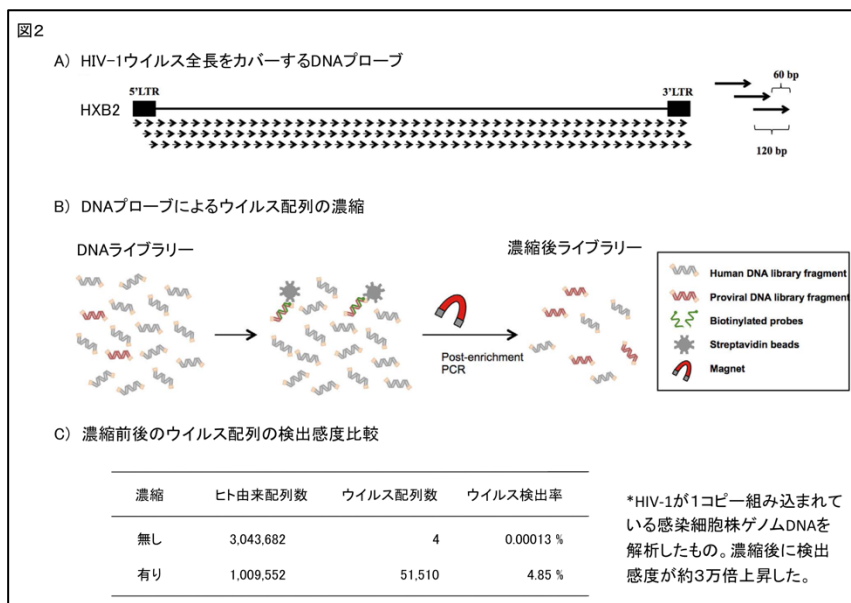
2. 研究の目的

以上のような背景に基づき、本研究では、HIV-1感染者における末梢血でのウイルス遺伝子転写を高感度、高精度かつ網羅的に検出し、ウイルス転写パターンと慢性持続感染病態との関連性について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

感染者検体で、ウイルス遺伝子発現を調べる際に問題となるのが、治療中の感染者末梢血中の感染細胞の割合が極めて低いこと点である。さらに検出を難しくする要因として、ヒトゲノムが約31億塩基対に対して、ウイルスゲノムは約9千塩基対と極めて小さい事が挙げられる。したがって、感染者血液サンプルでRNA-seq解析を行っても、検出されるRNAのほとんどは宿主細胞由来のものであり、ウイルス由来のRNA検出効率が極めて低い。

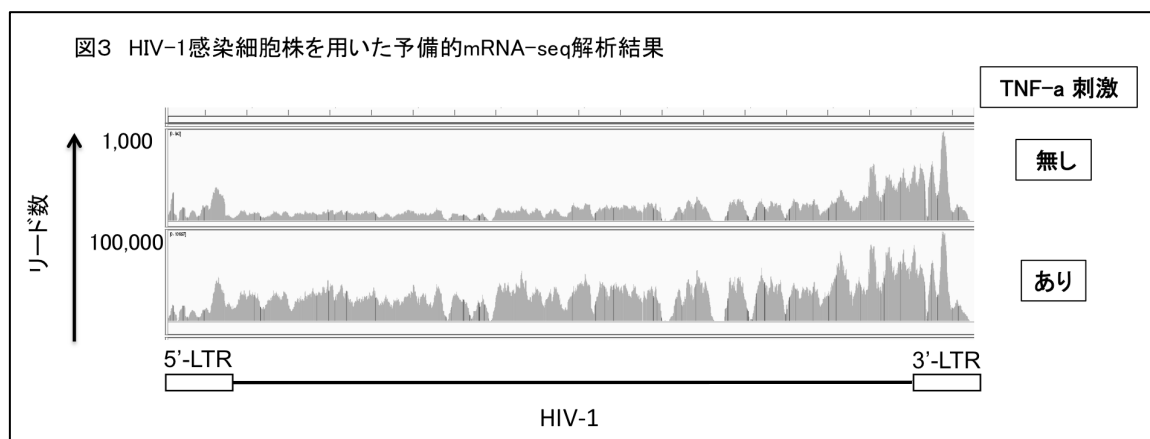
本研究では、その問題を解決するために、申請者らが最近開発したDNA-probeによるウイルス配列濃縮と次世代シーケンス (NGS) を活用した高感度かつ高精度なウイルス配列検出法を、RNA-seqに応用した。DNA-seq解析ではHIV-1配列の検出率を約3万倍高める事に成功している(図2)。感染細胞の割合が低い感染者検体でも、高感度にウイルスRNA



の検出が可能になると考えられる。異なる臨床像をしめす感染者グループごとに結果を比較解析する事で、ウイルストランスクリプトームと慢性感染病態との関連性について明らかにする。

4. 研究成果

高精細 HIV-1 ランスクリプトームと慢性持続感染病態との関連性解析研究を遂行した。まず最初に、細胞株を用いてウイルス配列濃縮法による高感度 HIV トランスクリプトーム解析法を確立した。図3に mRNA-seq の DNA プローブによる濃縮後の予備的解析パターンを示す。HIV-1 潜伏感染モデル細胞株 ACH2 をサイトカイン TNF-a で刺激すると、ウイルス遺伝子発現量が顕著に増加していることが分かる。



次に、臨床検体のウイルストランスクリプトーム解析を行った。抗ウイルス療法無し、あるいは抗ウイルス療法ありの状態の HIV 感染者末梢血検体を 15 検体選定し、予備的解析を行った。HIV 複製は末梢血では極めて低いことが知られており、今回の高感度な解析系をもってしても、十分なウイルス転写物を検出することは出来なかった。

以上の結果の解釈として以下の2つが考えられた。

- ① 治療前の感染者検体においても、末梢血液中に存在するウイルス転写物は極めて微量であるため、高感度な検出系であっても検出されない。
- ② 検出感度が不十分で有り、改良が必要。結果のまとめ:臨床検体での解析まで行う事が出来た。ウイルスの転写物の十分な検出には至っていないものの、末梢血検体におけるウイルス遺伝子発現が極めて低いことが原因である。

本研究課題の結果をふまえた今後の展開 HIV 複製は末梢血では極めて低いことが知られており、今回の高感度な解析でも十分なウイルス転写物を検出することは出来なかった。リンパ節検体などの活用が1つの方向性であるが、検体数など制限がある。十分な臨床検体解析数を確保し、解析に適した症例を選定するためにも、現在バイオバンクへの活用が出来るように倫理審査の再申請を行っており、今後も研究を継続して行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Stanoeva K, König A, Fukuda A, Kawanami Y, Kuwata T, Satou Y, Matsushita S	4. 巻 78
2. 論文標題 Total HIV-1 DNA Dynamics and Influencing Factors in Long-Term ART-Treated Japanese Adults	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes	6. 最初と最後の頁 239 ~ 247
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/QAI.0000000000001662	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Stanoeva KR, König A, Fukuda A, Kawanami Y, Kuwata T, Satou Y, Matsushita S.	4. 巻 -
2. 論文標題 Total HIV-1 DNA dynamics and influencing factors in long-term ART-treated Japanese adults: a retrospective longitudinal analysis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Acquir Immune Defic Syndr	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/QAI.0000000000001662. [Epub ahead of print]	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Satou Yorifumi, Katsuya Hiroo, Fukuda Asami, Misawa Naoko, Ito Jumpei, Uchiyama Yoshikazu, Miyazato Paola, Islam Saiful, Fassati Ariberto, Melamed Anat, Bangham Charles R. M., Koyanagi Yoshio, Sato Kei	4. 巻 7(1)
2. 論文標題 Dynamics and mechanisms of clonal expansion of HIV-1-infected cells in a humanized mouse model	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6913
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-07307-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Miyazato Paola, Matsuo Misaki, Tan Benjy J. Y., Tokunaga Michiyo, Katsuya Hiroo, Islam Saiful, Ito Jumpei, Murakawa Yasuhiro, Satou Yorifumi	4. 巻 16
2. 論文標題 HTLV-1 contains a high CG dinucleotide content and is susceptible to the host antiviral protein ZAP	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Retrovirology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1186/s12977-019-0500-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Katsuya Hiroo, et al	4. 巻 29
2. 論文標題 The Nature of the HTLV-1 Provirus in Naturally Infected Individuals Analyzed by the Viral DNA-Capture-Seq Approach	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 724 ~ 735.e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.celrep.2019.09.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Iwase Saori C., Miyazato Paola, Katsuya Hiroo, Islam Saiful, Yang Benjy Tan Jek, Ito Jumpei, Matsuo Misaki, Takeuchi Hiroaki, Ishida Takaomi, Matsuda Kouki, Maeda Kenji, Satou Yorifumi	4. 巻 9
2. 論文標題 HIV-1 DNA-capture-seq is a useful tool for the comprehensive characterization of HIV-1 provirus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-48681-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Baba Masaya, et al	4. 巻 17
2. 論文標題 TFE3 Xp11.2 Translocation Renal Cell Carcinoma Mouse Model Reveals Novel Therapeutic Targets and Identifies GPNMB as a Diagnostic Marker for Human Disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Research	6. 最初と最後の頁 1613 ~ 1626
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1158/1541-7786.MCR-18-1235	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 佐藤賢文	4. 巻 21
2. 論文標題 「HIV-1ウイルスリザーバの成立・維持の仕組み」	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本エイズ学会誌	6. 最初と最後の頁 167-172
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Saori C. Iwase, Misaki Matsuo, Benjy Tan Jek Yang, Paola Miyazato, Eriko Kudo, Kouki Matsuda, Islam Saiful, Kenji Maeda, Seiji Okada, Yorifumi Satou
2. 発表標題 Identification of an intragenic regulatory region within HIV-1 provirus and its transcriptional regulatory mechanism - HIV-1 プロウイルスのintragenic転写調節領域の探索および機能的解析
3. 学会等名 日本レトロウイルス研究会夏季セミナー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Saiful Islam, Kouki Matsuda, Benjy Tan Jek Yang, Hiroo Katsuya, Paola Miyazato, Kenji Maeda, Yorifumi Sato
2. 発表標題 Clonal selection of HIV-1-infected cells during ART in an in vitro model of persistent infection
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Saori C. Iwase, Misaki Matsuo, Benjy Tan Jek Yang, Paola Miyazato, Eriko Kudo, Kouki Matsuda, Islam Saiful, Kenji Maeda, Seiji Okada, Yorifumi Satou
2. 発表標題 Identification of an intragenic regulatory region within HIV-1 provirus and its transcriptional regulatory mechanism
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yorifumi Satou, Kouki Matsuda, Saiful Islam, Kenji Maeda
2. 発表標題 Selection of HIV-1 proviruses under combined treatment with LRA and anti-retroviral drug in vitro
3. 学会等名 第19回熊本エイズセミナー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Saiful Islam, Kouki Matsuda, Benjy Tan Jek Yang, Hiroo Katsuya, Paola Miyazato, Kenji Maeda, Yorifumi Satou
2. 発表標題 Clonal selection of HIV-1-infected cells during ART in an in vitro model of persistent infection
3. 学会等名 第19回熊本エイズセミナー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Saori C. Iwase, Misaki Matsuo, Benjy Tan Jek Yang, Paola Miyazato, Eriko Kudo, Kouki Matsuda, Islam Saiful, Kenji Maeda, Seiji Okada, Yorifumi Satou
2. 発表標題 Identification of an intragenic regulatory region within HIV-1 provirus and its transcriptional regulatory mechanism
3. 学会等名 第19回熊本エイズセミナー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Saiful Islam, Kouki Matsuda, Benjy Tan Jek Yang, Hiroo Katsuya, Paola Miyazato, Kenji Maeda, Yorifumi Satou
2. 発表標題 Clonal selection of HIV-1-infected cells during ART in an in vitro model of persistent infection
3. 学会等名 第32回日本エイズ学会学術集会・総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Benjy Tan Jek Yang, Iwase Saori, Katsuya Hiroo, Miyazato Paola, Islam Mohammad Saiful, Maeda Kenji, Matsushita Shuzo, Satou Yorifumi
2. 発表標題 An Investigation on the Potential Role of HIV-Host Chimeric Transcripts in Maintaining the Latent Reservoir
3. 学会等名 第32回日本エイズ学会学術集会・総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Saori C. Iwase, Misaki Matsuo, Benjy Tan Jek Yang, Paola Miyazato, Eriko Kudo, Kouki Matsuda, Islam Saiful, Kenji Maeda, Seiji Okada, Yorifumi Satou
2. 発表標題 Identification of an intragenic regulatory region within HIV-1 provirus and its transcriptional regulatory mechanism
3. 学会等名 第32回日本エイズ学会学術集会・総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤賢文
2. 発表標題 治癒を目指したHIV研究
3. 学会等名 第227回HIVカンファランス（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤賢文、勝屋弘雄、福田麻美、三沢尚子、伊東潤平、内山良一、宮里パオラ、Mohammad S Islam、Ariberto Fassati、Charles RM Bangham、小柳義夫、佐藤圭
2. 発表標題 次世代シーケンスによるヒト化マウスHIV-1感染モデルにおけるウイルス感染細胞クローン動態解析
3. 学会等名 第27回抗ウイルス療法学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Benjy Tan Jek Yang, Miyazato Paola, Islam Mohammad Saiful, Iwase Saori, Kudo Eriko, Okada Seiji, Satou Yorifumi
2. 発表標題 Improving the Resolution of HIV-1 Transcriptome Analysis Through Targeted Enrichment
3. 学会等名 第20回日本レトロウイルス研究会 夏期セミナー
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Islam Mohammad Saiful, Yohei Seki, Paola Miyazato, Benjy Tan Jek Yang, Hirofumi Akari and Yorifumi Satou
2. 発表標題 Absolute Quantitation of Integrated HIV-1 DNA In Vivo by using Droplet Digital PC
3. 学会等名 第65回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Benjy Tan Jek Yang, Miyazato Paola, Islam Mohammad Saiful, Iwase Saori, Kudo Eriko, Okada Seiji, Satou Yorifumi
2. 発表標題 Improving the Resolution of HIV-1 Provirus RNA Sequencing through Targeted Enrichment
3. 学会等名 第65回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Saiful Islam, Paola Miyazato, Yohei Seki, Benjy Tan Jek Yan, Saori Iwase, Hirofumi Akri, Yorifumi Satou
2. 発表標題 Quantitative and Qualitative Evaluation of HIV-1 Proviral DNA by Droplet Digital PCR and High-throughput Sequencing
3. 学会等名 第18回熊本エイズ学セミナー
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Benjy Tan Jek Yang, Miyazato Paola, Islam Mohammad Saiful, Iwase Saori, Kudo Eriko, Okada Seiji, Satou Yorifumi
2. 発表標題 High Resolution HIV-1 Provirus Transcriptome Analysis with DNA Probe Enrichment
3. 学会等名 第18回熊本エイズ学セミナー
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Islam Mohammad Saiful, Paola Miyazato, Yohei Seki, Benjy Tan Jek Yang, Saori Iwase, Hirofumi Akari, Yorifumi Satou
2. 発表標題 Quantitative and qualitative evaluation of HIV-1 proviral DNA by digital droplet PCR and high-throughput sequencing
3. 学会等名 第31回日本エイズ学会学術集会・総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Benjy Tan Jek Yang, Miyazato Paola, Islam Mohammad Saiful, Iwase Saori, Kudo Eriko, Okada Seiji, Satou Yorifumi
2. 発表標題 High Resolution HIV-1 Provirus Transcriptome Analysis with DNA Probe Enrichment
3. 学会等名 第31回日本エイズ学会学術集会・総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Islam Mohammad Saiful, Paola Miyazato, Kouki Matsuda, Benjy Tan Jek Yan, Saori Iwase, Yohei Seki, Kazuhisa Yoshimura, Hirofumi Akari, Kenji Maeda, Yorifumi Satou
2. 発表標題 Evaluation of HIV-1 Proviral DNA by Newly Established Approaches
3. 学会等名 JSPS_NUS Symposium
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>熊本大学国際先端医学研究機構 エイズ学研究センター佐藤研究室「RESEARCH」 http://www.caids.kumamoto-u.ac.jp/satou/research.html</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	瀧永 博之 (GATANAGA HIROYUKI) (10466211)	国立研究開発法人国立国際医療研究センター・エイズ ゙治療・研究開発センター・治療開発室長・研究・開 発科長 (82610)	