

令和 3 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07143

研究課題名(和文) HIV-1複製を制御する宿主因子のゲノムワイドスクリーンによる包括的解明

研究課題名(英文) Studies on host factors regulating HIV-1 replication

研究代表者

山岡 昇司 (Yamaoka, Shoji)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：90263160

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：細胞因子SPSB1がプロウイルスの遺伝子発現を増強することがわかった。これをきっかけとしてSPSB1さらにヒトT細胞白血病ウイルス由来Taxタンパク質がレンチウイルスベクター産生量を増強することを論文報告した。ヒトT細胞株MT4とcDNA発現遺伝子ライブラリーを用いて、転写調節因子Patz1のアミノ末端側(Patz1dC)をコードするcDNAを得て、Patz1がHIV-1の逆転写過程に必要な細胞因子であることを論文報告した。SIVgsn由来Vpuがウイルス放出を抑制するヒト細胞因子BST-2に膜貫通ドメインを介して結合し、その発現を抑制してHIV-1の放出を促進することを論文報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HIVプロウイルスの発現を促進する細胞因子はホルボールエステル等の転写活性化因子が知られているが、これをレンチウイルスベクターの産生増強に応用した初めての研究成果であり、その発展的展開はCAR-T治療等に用いられるレンチウイルスベクターの産生に多大な貢献をすることが期待される。Patz1の同定はそのウイルス学的意義にとどまらず、演繹的な方法では発見が困難なウイルス複製促進因子の同定における発現クローニングの威力を示すもので、方法論的に意義深い。サル免疫不全ウイルスのVpuがヒトBST-2を発現抑制しうるものの発見は、種を越えて感染進化するウイルスと宿主の相互関係を理解する上で大きな意義がある。

研究成果の概要(英文)：Three papers have been published in international journals describing virus-host interaction. A cellular factor SPSB1 was found to enhance proviral expression. This led to a discovery that SPSB1 and HTLV-I-derived trans-activator Tax potentially enhance lentiviral production. Patz1 was identified as an important cellular factor essentially involved in reverse transcription through an expression cloning with a human T-cell line MT4 and cDNA expression library. The Vpu protein of SIVgsn71 was found to interact with human BST-2 through their membrane-spanning regions and downregulate cell surface expression of human BST-2, which facilitated HIV-1 virion release in the presence of human BST-2.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HIV host factor Vpu BST-2 Lentiviral vector SPSB1 Tax

1. 研究開始当初の背景

HIV-1 は、ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型(HTLV-I)と並んでヒトに感染して病原性を持つレトロウイルスである。サハラ以南のアフリカをはじめとする世界的な HIV-1 の流行が続き、本邦では年間約 1000 人の新規感染者が発生、その制圧は地球規模の課題である。HIV-1 感染症治療では、抗レトロウイルス治療(ART)の進歩によって感染者の予後は格段に向上したが、現行の治療薬が主としてウイルスタンパク質を標的とすることによる薬剤耐性ウイルスの出現とその新規患者への感染、潜伏感染ウイルスを駆逐できず治癒が望めないこと、薬剤の副作用の問題など解決すべき課題が多く残されている。ウイルスがコードする調節タンパク質の作用については世界中で多くの研究がなされ、それをもとに薬剤が開発されてきたが、HIV-1 複製を制御する宿主因子については近年の研究でようやくその一端が知られ始めたに過ぎない。

われわれの研究成果を含めこれまで多くの宿主因子の関与が報告されてきたが、HIV-1 の驚異的な複製過程や潜伏感染現象を解明し、治癒をめざす新規治療法開発の基盤を形成する、という本研究の核心をなす学術的目的を達成するには不十分である。HIV-1 の複製を止め、潜伏感染をも制御するためには、変異の激しいウイルス因子ではなくウイルス動態に本質的に関わる多くの未知宿主因子の同定が不可欠である。これまでのスクリーニングの多くが、HIV-1 本来の宿主である血液系細胞ではなく HeLa、HEK293 などの扱いやすい細胞系でなされてきたことも問題で、価値ある未知の宿主因子を発見するためには、従来の方法に頼らず新しい研究材料とスクリーニング法が必要とされている。

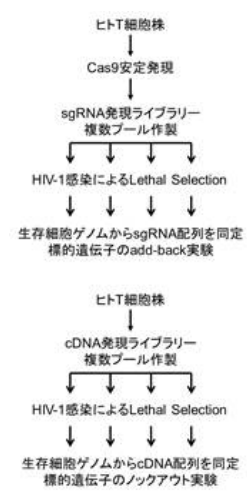
2. 研究の目的

本研究の目的は、(1) HIV-1 複製を制御する新規宿主因子を、ヒト T 細胞と遺伝子ライブラリーを用いたゲノムワイドスクリーンによって見出し、その作用メカニズムの解明から治癒をめざす新規抗ウイルス戦略の開発に必要な基盤的知見を築くこと、(2) ウイルス因子と宿主因子の関係を進化論的に理解する目的で、HIV およびサル免疫不全ウイルス SIV 由来 Vpu タンパク質とヒト BST-2 の攻防をその鍵を握るアミノ酸配列に注目して解析する (3) 細胞因子の発展的活用法を見出すことにある。HIV-1 は宿主因子を利用して複製する一方で、細胞が備えている HIV-1 複製を抑制する機構から逃れこれに打ち勝つ戦略を有している。HIV 複製を促進する宿主因子の作用を抑制し、抗複製作用を有する宿主因子の作用を強化することが、HIV 複製のコントロールにつながるはずである。逆に、ウイルス産生を促進する宿主因子の作用を利用すれば、遺伝子治療に用いられる HIV を元に開発されたレンチウイルスベクターの産生量を増大させることが可能である。

3. 研究の方法

研究目的 (1) では、研究代表者が経験と実績を有する cDNA 発現クローニングに加えて Cas9/sgRNA ノックアウトライブラリーを用いて、HIV-1 複製に必要な宿主因子および複製を抑制できる宿主因子を同定し、その作用機序を解明する。cDNA 発現ライブラリーはヒト CD4 陽性 T 細胞、ヒト T 細胞株を mRNA ソースとして多数構築してあり、ヒト T 細胞株に導入し細胞プールを複数作製する。感染に用いる HIV-1 ベクターとしてヒト T 細胞株で自律複製可能な HIV-1 株 NL4-3、自殺遺伝子である単純ヘルペスウイルス由来 *Thymidine kinase (HSV-TK)* 遺伝子も同時に発現できる NL4-3 TKRC (RC: replication-competent)を採用し、本来のウイル

ス感染伝播に近い条件でスクリーニングを実施する。*env*, *nef* 遺伝子を欠き HSV-TK を発現する Vesicular stomatitis virus glycoprotein で pseudotype した VSVG/NL4-3 TK の単回感染の繰り返しを試みる。cDNA 発現ライブラリーを多種類、CRISPRi ライブラリーを2種類、細胞株多種類、レポーターウイルスを2種類用意し、臨機応変に活用する。感染性が対照細胞群の数%以下に低下した複数の細胞集団からゲノム DNA を抽出し、PCR により増幅した遺伝情報を回収する。遺伝子ライブラリーを用いた発現クローニング法は、求める形質を有する細胞の選別法が確立していれば、タンパク質間の結合など通常の方法では容易に同定できない宿主因子をその機能証明とともに発見することを可能にする。得られた cDNA 等の遺伝子を安定発現あるいはノックアウト、ノックダウンすることで、感染・複製がどの段階で影響を受けるかを検証する。得られた cDNA がタンパク質コード領域全長である場合は新規 restriction factor である可能性があり、同遺伝子のノックアウトが複製を促進するか解析する。cDNA がタンパク質コード領域断片の場合は、複製に必要な内因性タンパク質に対して dominant-negative 変異体として作用している可能性があり、同遺伝子のノックアウトが複製を抑制するか検証する。

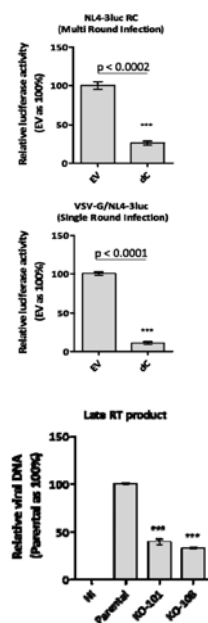


(2) については、Vpu が BST-2 の細胞表面発現を抑制する様子を、FACS を用いて解析する。特に膜貫通ドメインのアミノ酸に変異を導入して重要なアミノ酸を同定する。

(3) については、スクリーニングで HIV 複製の後期過程、すなわちプロウイルスの転写から出芽に至るまでの間でウイルス複製の促進に働く宿主因子が見出された場合は、これをレンチウイルスの産生増大に活用できないか検討する。遺伝子治療への応用を前提に、安全性の観点も重視し、理研から提供される第2世代、第3世代のパッケージングシステムを使用する。HEK293T 細胞への一過性トランスフェクション48時間後に培養上清を回収し、ヒト MT4 細胞株に感染させて、発現するレポーター遺伝子の活性で評価する。

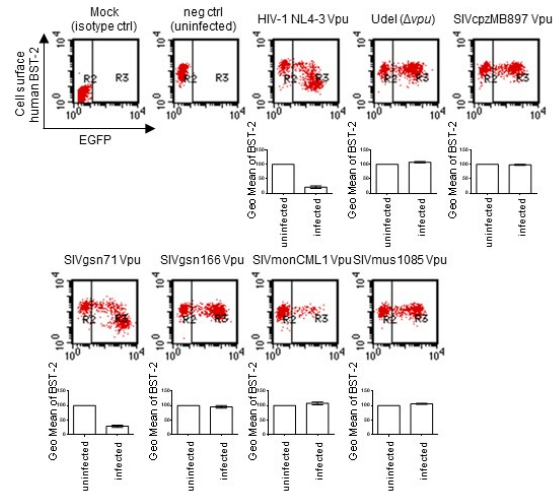
4. 研究成果

(1) HIV-1 感染に必要な細胞因子 Patz1 を見出した。ヒト T 細胞株 MT4 に cDNA 発現遺伝子ライブラリーを導入後、自殺遺伝子 HSV-TK を発現できる HIV-1 ベクター-NL4-3TK を感染させることで得られた HIV-1 感染抵抗性細胞株から、Patz1 という p53 に結合する転写調節因子のアミノ末端側 (Patz1dC) をコードする cDNA を回収した。Patz1dC を単独で MT4 細胞に発現させると HIV-1 感染を強く阻害し、p53 発現を欠くヒト肺癌細胞株 H1299 で Patz1 遺伝子をノックアウトすると HIV-1 ベクターの感染が著しく阻害された。MT4 細胞で Patz1 発現をノックダウンすると、ウイルス侵入後の逆転写過程が阻害された。Patz1 ノックダウン細胞では、LongA、Short 2 種類の isoform を発現させて初めて HIV-1 ベクター感染が回復した。このことは、Patz1 がヘテロダイマーとして機能することを示唆している。以上のことから、Patz1 は HIV-1 の逆転写過程に必要な細胞因子であると結論し、論文報告した。



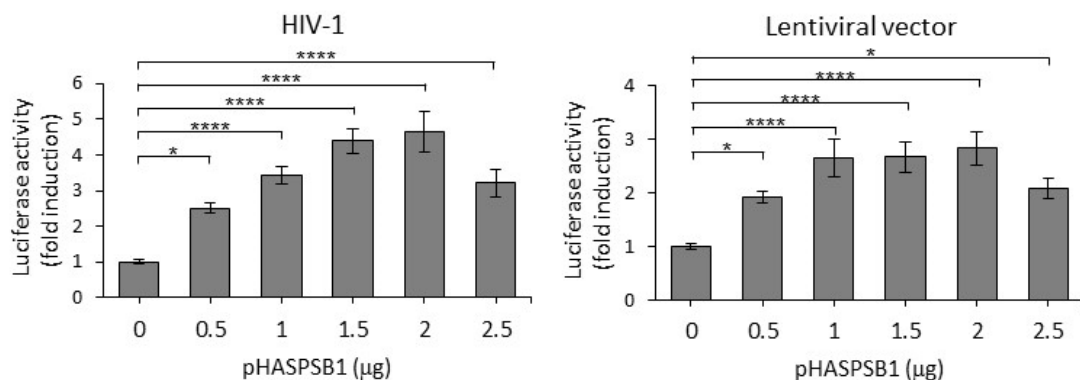
(2) ヒト免疫不全ウイルス(HIV)はサル免疫不全ウイルス(SIV)を起源とし、直系の祖先ウイルスはチンパンジーのウイルス SIVcpz であろうとされている。ウイルスの出芽・放出を抑制する細胞タンパク質 BST-2 に対抗するウイルスタンパク質は、HIV では Vpu であるが SIVcpz では

Nefである。greater spot-nosed monkeys に感染する SIVgsn はこの目的に Vpu を使い、SIVcpz は SIVgsn と別種サル由来 SIVrcm との組み換え体由来と考えられている。すなわち、SIVgsn Vpu は何らかの理由でチンパンジーでは使われず、その代わりに Nef が働いたが、ヒトに感染後は Vpu を再び用いるようになった、ということである。この経緯は、ウイルスと宿主の進化と相互関係を考える上で重要な示唆を与えている。SIVgsn がヒト BST-2 に膜貫通ドメインを介して結合した結果、細胞膜上でのヒト BST-2 発現を抑制することを、FACS を用いて証明した。SIVgsn 由来 Vpu は、ヒト細胞においてヒト BST-2 発現抑制をとおして HIV-1 の放出を促進していた。その効果を、BST-2 遺伝子をノックアウトした HeLa 細胞では SIVgsn の発現によって感染性ウイルス粒子の放出は変わらないが、ヒト BST-2 あるいは BST-2gsn を同細胞に発現させた場合は、SIVgsn 由来 Vpu 存在下でウイルス放出が促進されることを、HIV-1 ベクター感染に伴って luciferase を発現する TZM-bl レポーター細胞を用いて明らかにした。さらに、



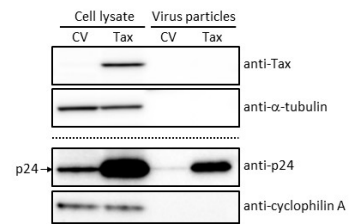
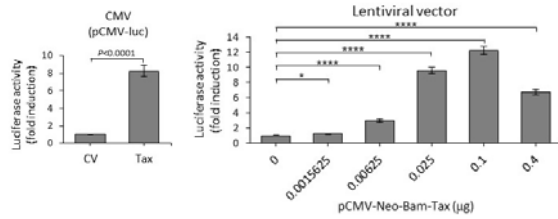
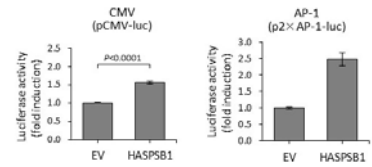
SIVgsn99CM71 株の Vpu がヒト BST-2 を妨害する分子メカニズムは、HIV-1 の Vpu による妨害メカニズムとは異なる可能性も示した。この成果は 2020 年 1 月、専門誌 *Journal of Virology* に発表した。2020 年度は、BST-2 と相互作用すると考えられるモチーフのアミノ酸に変異を導入して更に詳しい抑制メカニズムの解明に挑み、SIVgsn99CM71 株の Vpu がヒト BST-2 を妨害する分子メカニズムは、HIV-1 の Vpu による妨害メカニズムとは異なる証拠を得て、論文投稿した。すなわち、SIVgsn Vpu によるヒト BST-2 抑制では GSN BST-2 抑制に比べて、アミノ末端近傍に存在するアラニン、トリプトファン残基、およびロイシン残基、リジン残基の重要性が高いことを見出した。このことは、ヒト BST-2 がウイルス放出を抑制するためにより高度な機能を獲得進化してきたことを示唆している。また、この経緯は Vpu と BST-2 が、ウイルスと宿主の進化と相互関係を考える上で非常に興味深い研究対象であることを物語る。

(3) ヒト免疫不全ウイルス HIV-1 の複製を制御することが知られている細胞因子 TRIM5a と SOCS1 にそれぞれ存在する SPRY ドメインと SOCS box の両者を有する細胞因子 SPSB1 に着目して、HIV-1 複製への影響を調べたところ、組み込まれたプロウイルスの遺伝子発現を増強することがわかった。これをきっかけとして、SPSB1 には転写因子 AP-1 を介した CMV プロモ



ーターの活性化とレンチウイルスベクター産生量増強効果もあることがわかった。CMV プロモーターは NF- κ B, AP-1, CREB/ATF など多くの転写因子結合配列を有する。これらの転写因子を活性化することが知られているヒト T 細胞白血病ウイルス由来 Tax タンパク質発現によるさらに強力な CMV プロモーターの活性化とレンチウイルスベクター産生量増強効果も判明した。Tax がレンチウイルスベクターの粒子内に認められないことは、ベクター粒子を精製して western blotting で確かめた。

レンチウイルスベクターの画期的増産は製剤コストの低減に直結する。そのことは現時点で一部の疾患の若年患者に限られている CAR-T 療法の適用拡大を可能にし、さらには遺伝子治療で効果を期待できる他の多くの難病治療への応用に道を開くことで、今後の遺伝子治療の普及と発展に大きく貢献することが期待される。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yao W, Yoshida T, Hashimoto S, Takeuchi H, Strebel K, Yamaoka S.	4. 巻 94
2. 論文標題 Vpu of a Simian Immunodeficiency Virus Isolated from Greater Spot-Nosed Monkey Antagonizes Human BST-2 via Two AxxxxxxW Motifs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e01669-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.01669-19	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 -
1. 著者名 Aziati ID, Yoshida T, Hamano A, Maeda K, Takeuchi H, Yamaoka S.	4. 巻 514
2. 論文標題 PATZ1 is required for efficient HIV-1 infection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 538-544
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.04.175	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 -
1. 著者名 Asakawa M, Itoh M, Suganami T, Sakai T, Kanai S, Shirakawa I, Yuan X, Hatayama T, Shimada S, Akiyama Y, Fujiu K, Inagaki Y, Manabe I, Yamaoka S, Yamada T, Tanaka S, Ogawa Y.	4. 巻 9
2. 論文標題 Upregulation of cancer-associated gene expression in activated fibroblasts in a mouse model of non-alcoholic steatohepatitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 19601
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-56039-0	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 -
1. 著者名 Ndzinu Jerry Kwame, Takeuchi Hiroaki, Saito Hideki, Yoshida Takeshi, Yamaoka Shoji	4. 巻 20
2. 論文標題 eIF4A2 is a host factor required for efficient HIV-1 replication	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microbes and Infection	6. 最初と最後の頁 346 ~ 352
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.micinf.2018.05.001	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 Suzuki Naoto, Yoshida Takeshi, Takeuchi Hiroaki, Sakuma Ryuta, Sukegawa Sayaka, Yamaoka Shoji	4. 巻 8
2. 論文標題 Robust Enhancement of Lentivirus Production by Promoter Activation	5. 発行年 2018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/s41598-018-33042-5	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 -

[学会発表] 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Naoto Suzuki, Takeshi Yoshida, Hiroaki Takeuchi, Ryuta Sakuma, Sayaka Sukegawa, Shoji Yamaoka
2. 発表標題 Enhancement of Lentivirus Production by Inducing Promoter Activation
3. 学会等名 日本ウイルス学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Weitong Yao, 芳田剛, 橋本紗希, 武内寛明, 山岡昇司
2. 発表標題 HIV-1は抗ウイルスタンパク質ヒトBST-2に拮抗する機能をどのように獲得したのか
3. 学会等名 日本エイズ学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeshi Yoshida, Weitong Yao, Saki Hashimoto, Hiroaki Takeuchi, Shoji Yamaoka
2. 発表標題 An SIV Vpu can antagonize human BST-2/tetherin
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kenzo Tokunaga, Yanzhao Zhang, Seiya Ozono, Weitong Yao, Minoru Tobiume, Shoji Yamaoka, Satoshi Kishigami, Hideaki Fujita
2. 発表標題 Endogenous activation of BST-2 by CRISPR reduces HIV-1 replication
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeshi Yoshida, Saki Kawamura, Haruka Yamaguchi, Hiroaki Takeuchi, Shoji Yamaoka
2. 発表標題 Identification of a host factor supporting HIV-1 entry
3. 学会等名 第32回日本エイズ学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 武内寛明, 合田仁, 石田尚臣, 佐藤賢文, 岩瀬早織, 山岡昇司
2. 発表標題 HIV 潜伏感染を制御する宿主因子の同定および解析
3. 学会等名 第32回日本エイズ学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 レンチウイルスベクター産生の増強方法	発明者 山岡昇司、芳田剛、 鈴木尚人	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PH-8070-PCT	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 レンチウイルスベクター産生の増強方法	発明者 山岡昇司、鈴木尚 人、芳田剛	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-176230	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 レンチウイルスベクター産生の増強方法	発明者 山岡昇司、鈴木尚 人、芳田剛	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-549114	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

レンチウイルスベクターの産生を飛躍的に増大させる方法を開発
http://www.tmd.ac.jp/archive-tmdu/kouhou/20181011_1.pdf
レンチウイルスベクターの産生を飛躍的に増大させる方法を開発
https://www.amed.go.jp/news/release_20181011-02.html

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------