

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08438

研究課題名(和文) アポリポタンパク質Eの抗ウイルスメカニズムと感染病態機構の解明

研究課題名(英文) Role of apolipoprotein E on anti-viral activity and pathogenesis of viral infection

研究代表者

有海 康雄 (ARIUMI, YASUO)

熊本大学・ヒトレトロウイルス学共同研究センター・特任准教授

研究者番号：60303913

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：アポリポタンパク質E (ApoE)は、肝臓やマクロファージ、脳で発現し、脂質代謝、特にコレステロールの運搬に關与する。ApoEには3つのアイソフォームApoE2、ApoE3、ApoE4が存在する。本研究により、ヒト免疫不全ウイルス(HIV-1)感染に伴い、ApoEがマクロファージ特異的に発現誘導されること、ApoEがHIV-1エンベロープをタンパク質分解の場であるライソソームにハイジャックし、分解することにより、ApoEがHIV-1感染を抑制することを見出した。一方、ApoEはHIVのみならず、B型肝炎ウイルス(HBV)のHBxを分解することにより、HBV複製を抑制することも見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アポリポタンパク質E (ApoE)は、コレステロール運搬など脂質代謝に關与することがこれまで知られているが、本研究により、脂質代謝に關与するApoEがタンパク質分解の場であるライソソームにHIVエンベロープをハイジャックし、分解することにより、HIVの感染制御に關与していることが明らかとなり、新たなHIVの感染機構が解明された。この結果、ApoEを分子標的とした治療戦略が期待される。さらにApoEの脂質以外の関与も本研究により明らかにされたので、これまでApoEが關与することが知られている動脈硬化やアルツハイマー病の病態解明や治療法の確立に役立つ可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Apolipoprotein E (ApoE), which expresses in liver, macrophage, and brain, is involved in lipid metabolism, especially transport of cholesterol. ApoE has three isoforms, ApoE2, ApoE3, and ApoE4. In this study, we have found that HIV-1 infection induced ApoE expression in macrophages and ApoE inhibited the HIV-1 infection through a degradation of HIV-1 envelope (Env). Indeed, ApoE hijacked HIV Env in lysosome, where is the protein degradation site. On the other hand, we also have found that ApoE inhibited HBV replication through a degradation of HBx.

研究分野：ウイルス学

キーワード：アポリポタンパク質E HIV HBV マクロファージ 脂質代謝 エンベロープ ライソソーム エンドソーム

## 1. 研究開始当初の背景

アポリポタンパク質 E (APOE)は、3つのアイソフォーム APOE2、APOE3、APOE4が存在し、アイソフォームと病態との関連が明らかになりつつある。ヒトの場合、78%が APOE3 のみを保持するが病原性との関連は報告がない。一方、APOE2 は脂質結合能が乏しく、動脈硬化や高脂血症のリスクが高い。APOE4 を保持する患者はアルツハイマー病の発症リスクが高い。一方、ウイルス感染と APOE アイソフォームとの相関関係はエイズ脳症やヘルペス脳症との関連の報告があるものの、あまり良く理解されていない。最近、APOE は C 型肝炎ウイルス(HCV)の NS5A と結合し、HCV の感染増殖に必要な宿主因子であることが報告された。さらに APOE4 をもつ AIDS 患者はエイズ脳症発症リスクが高いことも示唆されつつある。しかしながら、APOE の HIV-1 の感染増殖における役割は不明な点が多い。HBV に至っては、APOE との直接的な関係については不明である。

## 2. 研究の目的

ヒトに慢性持続感染を引き起こし、AIDS の原因ウイルスであるヒト免疫不全ウイルス(HIV-1)、肝炎、肝硬変、そして肝がんの原因ウイルスである B 型肝炎ウイルス (HBV) 及び C 型肝炎ウイルス (HCV)は共にエンベロープウイルスに分類され、ウイルス粒子は脂質膜からなる原形質膜より出芽により細胞外に放出される。ウイルス粒子はエンベロープ糖タンパク質と宿主細胞膜由来の脂質膜により保護されている。さらに、標的細胞に感染する際に、標的細胞表面の脂質がウイルスの侵入に重要なことも知られている。特に HBV や HCV は脂質代謝の中核となる肝細胞でウイルスの複製増殖がおこる。実際、脂質タンパク質であるアポリポタンパク質 E (APOE)は、肝臓、脳、マクロファージにおいて産生され、細胞内の脂質のトランスポーターとして機能していることが知られているが、最近、HCV NS5A と相互作用し、HCV の感染増殖に必要な宿主因子であることが判明している。このように脂質代謝系のウイルス感染や病態における重要性が示唆されつつある。しかしながら、HIV-1 や HBV における脂質タンパク質の関与については不明な点が多い。

そこで、本研究において、特に APOE を中心に脂質タンパク質の HIV-1 及び HBV の感染増殖に対する役割について研究を進め、脂質タンパク質を分子標的とした新規治療法の開発や慢性ウイルス感染症の病態制御機構の解明につなげたい。一方、APOE には3つのアイソフォーム APOE2、APOE3、APOE4 が存在する。APOE3 は正常型で病態との関連の報告はないが、APOE2 は高脂血症や動脈硬化などの脂質代謝異常、APOE4 はアルツハイマー病発症に関与することが知られている。ウイルス感染症の病態と APOE アイソフォームとの相関も示唆されつつある。実際、APOE4 を持つ患者はエイズ脳症やヘルペス脳症の高リスクグループである。本研究において、患者の APOE アイソフォームがウイルス感染や病態に与える影響についても問いかけてみたい。

本研究において、APOE アイソフォームと HIV-1 及び HBV の感染増殖複製能との相関性や患者の APOE アイソフォームとエイズ及び肝炎、肝硬変、肝硬変などの病態進展との相関性が明らかとなれば、慢性ウイルス感染症の発症機構の解明はもとより、新たな治療や予防戦略の構築につながることを期待される。

### 3. 研究の方法

先ず、マクロファージにおいて、HIV 感染が脂質タンパク質の発現レベルに及ぼす影響について、マイクロアレイ法を用いて検討を行う。HIV-1 には Nef、Vpr、Vif、Vpu などのウイルス増殖や病態に関与する 4 つのアクセサリタンパク質がコードされているので、各々の変異体ウイルスを作成し、マクロファージに感染させ、どのウイルスタンパク質が APOE の発現誘導に必要か同定する。また、APOE プロモーター領域をルシフェラーゼレポーター遺伝子にクローニングし、ルシフェラーゼアッセイにより転写レベルでの発現誘導についても解析を行う。さらに何故、マクロファージ特異的に APOE が発現誘導されるのか細胞特異性についても検討を行う。

次に ApoE に対する siRNA を用いて、ApoE ノックダウン primary MDM を樹立し、ApoE の HIV 感染複製に与える影響について、real-time RT-PCR を用いて定量解析を行う。さらに APOE の抗 HIV-1 効果の作用機序について明らかにするために、HIV-1 の各ウイルスタンパク質が変異したウイルスと ApoE を共発現させ、ApoE の標的ウイルスタンパク質を同定する。ApoE は分泌タンパク質なので、ウイルスが標的細胞に感染侵入する際に必要な HIV-1 ウイルス粒子表面のエンベロープ(Env)が ApoE の標的である可能性もある。特に APOE と Env との相互作用についても解析し、中和抗体のように ApoE がウイルス粒子表面を被覆することにより、抗ウイルス作用を提示しているのか検討を行う。

ApoE の抗 HBV メカニズムについては、先ず、ApoE に対する siRNA を用いて、ApoE ノックダウン肝細胞を樹立し、ApoE の HBV 複製に与える影響について、real-time PCR を用いて定量解析を行う。次に HBV がコードする 4 つのタンパク質 HBc、HBpol、HBx、そして HBs のどの HBV ウイルスタンパク質と相互作用するのか解析を行う。HIV-1 あるいは HBV 感染により、APOE あるいは標的 HIV-1 ウイルスタンパク質の細胞内局在が変動するのか共焦点レーザー顕微鏡を用いて詳細に観察する。APOE 分子は、N 末のシグナル分泌ドメイン、中央の LDLR 結合ドメイン、そして C 末の脂質結合ドメインなど機能的にいくつかのドメイン構造を保持している。そこで、APOE のどの機能ドメインが抗ウイルス作用に関与するのか、各々のドメインの欠失変異体を作成して同定を試みる。また、ApoE の HBV プロモーターに及ぼす影響についても、ルシフェラーゼアッセイにより解析を行う。さらに APOE 及びコレステロール脂質関連因子に対する阻害剤や活性化剤を用いて、HIV-1 及び HBV の感染複製能に与える影響について調べ、脂質代謝系を分子標的とした新規抗ウイルス剤開発の分子候補としたい。

### 4. 研究成果

#### (1) アポリポタンパク質 E (ApoE) による HIV-1 感染の抑制機構

脂質タンパク質とウイルス感染との関係を解析するために、アポリポタンパク質の HIV-1 感染に伴う動態をモニターした。HIV-1 感染マクロファージ (primary monocyte-derived macrophage, MDM) と非感染マクロファージの RNA を単離し、マイクロアレイ解析で両者の発現パターンを比較した結果、驚くべきことに HIV-1 感染に伴い、アポリポタンパク質 E (APOE) のみが特異的に誘導されていることを見出した。しかしながら、HIV-1 感染した CD4<sup>+</sup>T 細胞では、ApoE の発現は検出されなかった。こ

の結果、HIV-1 感染によりマクロファージ特異的に ApoE の発現が強く誘導されることを見出した。次に HIV-1 がどのようなメカニズムにより、ApoE を誘導するのか研究を進めた。HIV-1 には4つのアクセサリタンパク質 Nef、Vif、Vpr、Vpu がコードされているが、各々のアクセサリタンパク質が欠損した HIV 変異体を用いて、マクロファージにおける ApoE の発現誘導をウエスタンブロット法により検証した。その結果、少なくとも4つの HIV アクセサリタンパク質は、ApoE 発現誘導には関与しないことが判明した。また、ApoE はマクロファージのみならず、単球系細胞株 THP-1 においても HIV 感染により、ApoE が発現誘導されることを見出した。そこで、HIV 感染が ApoE の転写制御に関与しているのか検討するため、ApoE プロモーター領域をルシフェラーゼ遺伝子に挿入したレポーターを THP-1 細胞にトランスフェクション後、HIV 感染させ、ルシフェラーゼアッセイを行った。予想通り、HIV 感染に伴い、ApoE プロモーター活性が増強された。以上の結果より、HIV は ApoE プロモーターを活性化することにより、ApoE の発現誘導することが示唆された。

次に ApoE の HIV-1 感染増殖における役割を調べるために、siRNA を用いて ApoE をノックダウンしたマクロファージにおける HIV-1 の感染増殖を ELISA で解析すると、コントロールに比べ、培養上清中に産生されるウイルス量の増加がみられた。一方、ApoE が発現していない 293T 細胞に HIV-1 分子クローンと ApoE を共発現させると、HIV-1 のウイルス産生と感染性の著しい低下がみられた。この結果、ApoE は新規 HIV-1 感染抑制因子であることが判明した。しかしながら、少なくとも強制発現の系においては、3つの異なる ApoE アイソフォーム間に抑制活性の違いは認められなかった。

この ApoE による HIV-1 感染増殖抑制機構に関する研究も進め、ApoE の標的がウイルス感染に必要な糖タンパク質 HIV-1 エンベロープ (Env) であることを明らかにした。ApoE は HIV-1 Env を特異的に分解するが、VSV-G など他のウイルスの Env には影響を及ぼさなかった。ウイルス粒子の細胞外への放出が細胞膜でおこるため、HIV-1 Env は細胞膜周辺に集積するが、興味深いことに ApoE と HIV-1 Env を共発現させると、ApoE は HIV-1 Env を細胞膜周辺から細胞内のエンドソームや蛋白分解の場であるライソゾームにハイジャックすることを見出した。そこで、細胞をライソゾーム阻害剤で処理すると、ApoE による HIV-1 Env の分解がキャンセルされた。以上の結果より、ApoE は、HIV-1 Env をライソゾームで分解することにより、マクロファージ内の HIV-1 量を制御していることが示唆された。さらに ApoE の Env に対する特異性について検証した。ApoE は HIV-1 のみならず、HIV-2 Env も分解し、HIV-2 の感染複製を抑制することを見出した。一方、ApoE は水疱性口炎ウイルス (VSV)をはじめ、B 型肝炎ウイルスや C 型肝炎ウイルスの Env は分解しないことを確認したことにより、ApoE の HIV に対する特異性を実証することが出来た。マクロファージは CD4<sup>+</sup>T 細胞と比較すると長期間 HIV-1 の持続感染が成立している。この持続感染に ApoE が関与している可能性も考えられる。興味深いことにドナー間における ApoE 発現レベルは異なるので、エイズ患者間における ApoE のアイソフォームや発現量の違いと HIV-1 ウイルス量やエイズ病態との関連性についても検討したい。今後、脂質代謝系を分子標的とした新規 HIV 治療戦略が期待される。

## (2) アポリポタンパク質 E による B 型肝炎ウイルス(HBV)複製の抑制機構

アポリポタンパク質 E の B 型肝炎ウイルス(HBV)複製に与える影響について解析をおこなった。まず、HBV 複製ヒト肝細胞株 HepG2.2.15.7 細胞を ApoE siRNA を用いて、ApoE をノックダウンさせ、細胞内の HBV コア結合 HBV DNA レベルを real-time PCR で定量解析した結果、ApoE ノックダウン細胞では、コントロール細胞に比べ、細胞内の HBV コア結合 HBV DNA レベルが顕著に亢進した。一方、3 つの異なった ApoE アイソフォームを HBV 分子クローンと共に強制発現させると、全ての ApoE アイソフォームが細胞内の HBV コア結合 HBV DNA レベルを著しく抑制した。さらに ApoE の欠損変異体を用いた解析では、ApoE の C 末ドメインに HBV 複製を抑制する活性を同定することが出来た。興味深いことに ApoE3 は HBx タンパク質の発現を抑制することも観察されたが、HBV プロモーターのルシフェラーゼアッセイにより、ApoE3 は HBV プロモーター活性には影響を及ぼさないことが判明した。以上の結果より、ApoE は HBx を分解することにより、HBV 複製を抑制することが示唆された。

今後、ApoE アイソフォームと HBV の感染増殖複製能との相関性や患者の ApoE アイソフォームと肝炎、肝硬変、肝硬変などの病態進展との相関性が明らかとなれば、慢性ウイルス感染症の発症機構の解明はもとより、新たな治療や予防戦略の構築につながることを期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 有海康雄	4. 巻 271
2. 論文標題 マクロファージで誘導される新規HIV-1感染抑制因子ApoE	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 週間 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 1308-1309
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 無
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 Siddiqui Rokeya, Suzu Shinya, Ueno Mikinori, Nasser Hesham, Koba Ryota, Bhuyan Farzana, Noyori Osamu, Hamidi Sofiane, Sheng Guojun, Yasuda-Inoue Mariko, Hishiki Takayuki, Sukegawa Sayaka, Miyagi Eri, Strebel Klaus, Matsushita Shuzo, Shimotohno Kunitada, Ariumi Yasuo	4. 巻 14
2. 論文標題 Apolipoprotein E is an HIV-1-inducible inhibitor of viral production and infectivity in macrophages	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS Pathogens	6. 最初と最後の頁 e1007372
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.ppat.1007372	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 Ueno Mikinori, Nogawa Masato, Siddiqui Rokeya, Watashi Koichi, Wakita Takaji, Kato Nobuyuki, Ikeda Masanori, Okimura Takasi, Isaka Shogo, Oda Tatsuya, Ariumi Yasuo	4. 巻 124
2. 論文標題 Acidic polysaccharides isolated from marine algae inhibit the early step of viral infection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Biological Macromolecules	6. 最初と最後の頁 282 ~ 290
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijbiomac.2018.11.152	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 Ariumi Yasuo, Kawano Koudai, Yasuda-Inoue Mariko, Kuroki Misao, Fukuda Hiroyuki, Siddiqui Rokeya, Turelli Priscilla, Tateishi Satoshi	4. 巻 8
2. 論文標題 DNA repair protein Rad18 restricts LINE-1 mobility	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15894
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-34288-9	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 Kawano Koudai, Doucet Aur?lien J, Ueno Mikinori, Kariya Ryusho, An Wenfeng, Marzetta Flavia, Kuroki Misao, Turelli Priscilla, Sukegawa Sayaka, Okada Seiji, Strebel Klaus, Trono Didier, Ariumi Yasuo	4. 巻 46
2. 論文標題 HIV-1 Vpr and p21 restrict LINE-1 mobility	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 8454 ~ 8470
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gky688	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 Yamamoto Naoki, Ariumi Yasuo, Nishida Nao, Yamamoto Rain, Bauer Georg, Gojobori Takashi, Shimotohno Kunitada, Mizokami Masashi	4. 巻 758
2. 論文標題 SARS-CoV-2 infections and COVID-19 mortalities strongly correlate with ACE1 I/D genotype	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gene	6. 最初と最後の頁 144944 ~ 144944
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gene.2020.144944	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 該当する

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 8件)

1. 発表者名 Ariumi Y
2. 発表標題 Apolipoprotein E is an inducible inhibitor of viral production and infectivity in macrophages.
3. 学会等名 French-Japanese Symposium on HIV and hepatitis research in Paris (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ariumi Y, Zou C, Tateishi S, Ikeda M, Wakita T, Kato N
2. 発表標題 DNA-PK and Rad18 are required for HCV replication.
3. 学会等名 26th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ariumi Y
2. 発表標題 Host and viral factors restricts LINE-1 retrotransposition.
3. 学会等名 The 3rd Korea-Japan International Symposium for Transposable Elements (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ariumi Y, Doucet AJ, Kawano K, An W, Turelli P, Strebel K, Trono D
2. 発表標題 HIV-1 Vpr and p21 restrict LINE-1 mobility.
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Retroviruses Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 有海康雄, Zou Chengcheng, 立石智, 池田正徳, 脇田隆字, 加藤宣之
2. 発表標題 DNA-PKとRad18はHCV複製に必要な宿主因子である
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ariumi Yasuo
2. 発表標題 Apolipoprotein E is an HIV-1-inducible inhibitor of viral production in macrophages
3. 学会等名 2018 Cold Spring Harbor Meeting: Retroviruses (国際学会)
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 Ariumi Yasuo
2. 発表標題 Apolipoprotein E is an HIV-1-inducible inhibitor of viral production in macrophages
3. 学会等名 Frontiers in Retrovirology Conference 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ariumi Yasuo
2. 発表標題 RNA granule components regulate HBV replication
3. 学会等名 2018 International HBV Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ariumi Yasuo
2. 発表標題 Apolipoprotein E is an HIV-1-inducible inhibitor of viral production in macrophages
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 Ariumi Yasuo
2. 発表標題 Apolipoprotein E is an HIV-1-inducible inhibitor of viral production in macrophages
3. 学会等名 19th Kumamoto AIDS Seminar (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

熊本大学ヒトレトロウイルス学共同研究センター レトロエレメント学分野 有海プロジェクト研究室  
<https://sites.google.com/site/youhaipurojekutoyanjiushi/home>  
熊本大学エイズ学共同研究センター有海プロジェクト研究室  
<https://sites.google.com/site/youhaipurojekutoyanjiushi/home>

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			
スイス	EPFL			
米国	NIAID, NIH			