

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19457

研究課題名（和文）細胞膜ナノチューブを標的とする新規HIV抑制法の確立

研究課題名（英文）Establishment of a novel anti-HIV strategy targeting membranous nanotubes

研究代表者

鈴 伸也（Suzu, Shinya）

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：80363513

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：HIV-1とtunneling nanotubes（TNT）と呼ばれる、遠隔の細胞をつなぐ細長い細胞膜突起との密接な関係を明らかにした。TNT形成に重要な宿主タンパク質M-Secに着目し、そのノックダウンでTNT形成だけでなくHIV-1産生量が有意に低下し、特に感染初期に激減した。M-Sec依存性のTNTがHIV-1の細胞間伝播、特に初期伝播に重要であり、HTLV-1についても同様の可能性を見出した。一方、M-Secは感染細胞の運動能にも重要なことも明らかにした。TNTと細胞の移動はどちらもウイルス伝播に有利であり、M-Secはこれら2つの機能を制御し感染を拡大させる因子であることを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エイズウイルスHIV-1は薬剤で抑えられる様になったが、完全には排除されないため、生涯の服薬を必要とし、これに伴う薬剤耐性ウイルスが問題となっている。実際、HIV-1受容体CCR5を標的にHIV-1の細胞への侵入を阻害する薬剤で成功しており、加速するには新たな標的宿主分子の同定が重要である。本研究の成果は、M-Secをその有望な候補として見出したことであり、大きな目標であるHIV-1の根絶につながる点で重要である。同時に、TNTの関与が明らかとなってきた、他の感染症、がん細胞の浸潤など、多くの病態の理解・克服にも有用である。

研究成果の概要（英文）：In this study, we clarified a close relationship between HIV-1 and tunneling nanotubes (TNTs). We focused on M-Sec, a cellular protein involved in TNT formation, and found that its knockdown led to a reduction in not only TNTs but also viral growth, particularly viral growth in an early infection phase. We obtained a similar result for HIV-1-related virus HTLV-1. More importantly, we found that M-Sec is also critical for motility of infected cells. Thus, our current study revealed that M-Sec mediates a rapid and efficient cell-cell transmission of HIV-1 at an early phase of infection by enhancing both TNT formation and cell motility.

研究分野：感染症

キーワード：エイズ ナノチューブ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エイズウイルス HIV-1 は薬剤で抑えられる様になったが、完全には排除されないため、生涯の服薬を必要とし、これに伴う薬剤耐性ウイルスが問題となっている。その軽減に向け、HIV-1 分子ではなく、宿主分子を標的にして HIV-1 を抑える試みが加速している。実際、HIV-1 受容体 CCR5 を標的に HIV-1 の細胞への侵入を阻害する薬剤で成功しており、加速するには新たな標的宿主分子の同定が重要である。一方で近年、HIV-1 とナノチューブと呼ばれる、遠隔の細胞同士を物理的につなぐ、細長い細胞膜突起との密接な関係が明らかとなってきた。例えば、HIV-1 がナノチューブを介して CD4+ T 細胞間を伝播する事 (Sowinski et al, Nat Cell Biol 2008) HIV-1 がマクロファージでナノチューブの形成を促進し、これを通してウイルス蛋白質が B 細胞へ移動し、結果、免疫グロブリンのクラススイッチが障害される事などが報告されてきた (Xu et al, Nat Immunol 2009)。このため、ナノチューブ阻害が HIV-1 感染拡大の抑制に有効と期待され、昨年の国際会議でもトピックであった。しかし、多くの分子の関与が予想されるナノチューブ形成過程には未解明の部分が多く、特異的阻害法も確立されておらず、ナノチューブを介した細胞間伝播が全体のどれ位を担うのかも全く不明であった。

一方、代表者は HIV-1 とマクロファージの相互作用を研究しているが (Blood 2005, 2008: Cell Death Differ 2010: Cell Death Dis 2014: J Immunol 2012, 2014, 2015, 2016 など: 筆頭・責任著者のものから抜粋) その過程で、HIV-1 によるナノチューブ形成促進のメカニズムの一端を解明したと同時に、ナノチューブ阻害が HIV-1 感染拡大の抑制に効果的な事を初めて実証した。理研の大野らは、それまで機能未知であった細胞性蛋白質 M-Sec を初のナノチューブ制御因子として同定した (Hase et al, Nat Cell Biol 2009)。そこで共同研究を進め、その結果、M-Sec が HIV-1 によるナノチューブ形成促進に必要な不可欠な事を発見した。更に、理研の長田博士らと共同して M-Sec に結合する化合物 NPD3064 を同定し、その添加や M-Sec 遺伝子ノックダウンで HIV-1 産生が半分に以下に低下する事も見出した (Hashimoto et al, J Immunol 2016)。一方で最近、M-Sec と RalA (低分子量 GTPase) との間接的な会合が報告されている事から (Kimura et al, Sci Rep 2016)、RalA にも着目し、結果、RalA 阻害化合物 BQU57 が、HIV-1 によるナノチューブ形成を阻害し、そして HIV-1 産生も 1/10 以下に低下する事も見出してきた (投稿準備中)。

更に代表者と分担者は、ナノチューブ阻害が HIV-1 近縁の成人ヒト T 細胞白血病ウイルス HTLV-1 の感染拡大の抑制に有効な事も初めて実証してきた。つまり、HTLV-1 が CD4+ T 細胞においてナノチューブの形成を促進する過程でも M-Sec が不可欠であり、そして、RalA 阻害化合物 BQU57 が、HTLV-1 によるナノチューブ形成も阻害し、そして HTLV-1 産生も大きく低下する事も見出してきた。つまり、HIV-1 と HTLV-1 の細胞間伝播が共通のメカニズムによる可能性を初めて示した。そして、M-Sec をノックダウンした HTLV-1 感染細胞を移植したヒト化マウスでは、コントロールと比較し、ウイルス産生が 1/10 ほどに低下する事、つまりナノチューブを介する細胞間伝播が in vivo でも重要な可能性を示唆する結果も得てきた (投稿中)。

2. 研究の目的

以上から、宿主マシーナリーを標的にしたナノチューブ阻害によって HIV-1 の細胞間伝播を阻止すると言う、これまで例のない制御法の確立に挑戦する。そのために、研究レベルを更に一段、高める。まず、M-Sec-RalA 経路から最適な標的を同定するため、HIV-1 がナノチューブ形成を促進する分子機構の全容を解明する。そして、ナノチューブの in vivo での重要性を明確にするため、HIV-1 感染者や近縁ウイルス SIV 感染サル組織ナノチューブを解析し、HTLV-1 感染ヒト化マウスで RalA 阻害剤等の抗ウイルス効果も評価する。以上で臨床への早期還元を目指す。

このような、宿主マシーナリーを標的にしたナノチューブ形成阻害は、将来的な薬剤耐性 HIV-1 の克服に資すると期待される。既に、HIV-1 感染マクロファージ特異的に M-Sec や RalA と複合体を形成する分子の存在を確認しており、必要な臨床検体は、協力者 3 名から供与されており、ヒト化マウス感染系は分担者が確立しているので、計画はすべて達成できる。議論が多いナノチューブ微細構造についても、HIV-1 や HTLV-1 を例に、連携者と電子顕微鏡での観察を既に進めている。

本研究の成果は、大きな目標である HIV-1 の根絶につながる点で重要であり、他の感染症、がん細胞の浸潤など、多くの病態の理解・克服にも有用である。そして同定するナノチューブ特異的分子は、煩雑なナノチューブ定量を簡便化し、研究全体を加速でき、感染症、がんおよび免疫領域におけるナノチューブの真の役割や重要度を考える上で、有用なツールになる。

3. 研究の方法

大計画 HIV-1 がナノチューブ形成を促進する分子メカニズムの全容解明

ヒト末梢単球を分化させたマクロファージを用いた HIV-1 感染実験系で、以下の解析を行う。ナノチューブの定量は明視野で行うと共に、ファロイジン-アクチン染色後の共焦点レーザー顕微鏡観察でも確認する。HIV-1 の定量は ELISA や FACS などで行う。

(1) 未知の M-Sec・RalA 関連分子の同定

M-Sec と RalA は直接には結合しないので、未知の関連分子がもっと適した標的となる可能性もある。既に M-Sec や RalA と複合体形成する分子を免疫沈降で認めているので、質量分析で同定して、ノックダウンや阻害化合物の添加実験などで validation する。

(2) RalA 以外の低分子量 GTPase の関与の解明

RalA 以外にも低分子量 GTPase は多く存在するので (RalB, Cdc42, Rac1, RhoA など)、それらの関与も、阻害化合物添加やノックダウンなどで解析する。

(3) 他の RalA 阻害化合物の抗ナノチューブ・抗 HIV-1 効果の評価

Ras の下流分子でもある RalA にはがんとの関連から、BQU57 以外にも化合物が次々合成されているので、それらの抗ナノチューブ・抗 HIV-1 効果も評価する。

大計画 分子メカニズムの HTLV-1 との比較

上記計画で解明が期待される分子メカニズムを、HTLV-1 と比較して共通・相違点を明らかにする。HTLV-1 持続感染細胞 MT-2 を主に用いるが、HIV-1 感染マクロファージに比べ、浮遊細胞の MT-2 のナノチューブの明視野観察は定量の正確性に欠けるので、共焦点レーザー顕微鏡で行う。細胞間伝播は、MT-2 細胞と Jurkat 細胞の共培養系でのレポーターアッセイで定量する。

大計画 ナノチューブの *in vivo* における重要性の更なる明確化

組織ナノチューブはファロイジン-アクチン染色で同定する。また、組織での HTLV-1 定量はブロウイルスゲノムの PCR で行う。HTLV-1 キャリアの末梢 CD4+ T 細胞はソーティングで純化する。

(1) HIV-1 感染者のリンパ節におけるナノチューブ解析

治療前の感染者検体をリンパ節について、ナノチューブがどのような細胞同士を、どのような頻度でつなぐかを解析する。細胞種、感染・非感染の有無を区別するため、多重染色する。

(2) SIV 感染アカゲザルの肺・リンパ節におけるナノチューブ解析

HIV-1 近縁の SIV を感染させたサル組織についても同様に解析する。急性期から慢性期にかけて、時系列的に収集した肺・リンパ節を中心にする。

(3) HTLV-1 キャリアの末梢 CD4+ T 細胞におけるナノチューブ解析

純化した HTLV-1 キャリアの末梢 CD4+ T 細胞における M-Sec 異所性発現は既に見出しているのので、次にナノチューブの解析も行う。

(4) HTLV-1 感染ヒト化マウス組織におけるナノチューブ解析

HTLV-1 でも確認するため、分担者が確立してきた、HTLV-1 感染細胞を移植したヒト化マウスの系も用いる。これまでの知見から、主に、骨髄、末梢血、脾臓、肝臓などについて解析する。

(5) HTLV-1 感染ヒト化マウスにおける、RalA 阻害化合物などの抗ウイルス効果の評価

M-Sec をノックダウンした HTLV-1 感染細胞を移植したヒト化マウスで、ウイルス産生が低下する事を見出しているのので、同じ系で、RalA 阻害化合物 BQU57 などの *in vivo* 抗ウイルス効果も評価する。

その他の計画 ナノチューブの微細構造の解析

申請者らの電子顕微鏡解析では、HIV-1 感染マクロファージをつなぐナノチューブに明瞭な境界が認められていない。ナノチューブ上の HIV-1 粒子のスムーズな移動を示唆する点で興味深く、2 つの異なる細胞の一体化も示唆する点で細胞生物学的にも重要なので、HTLV-1 感染細胞やがん細胞も含めて詳細に解析する。

その他の計画 がん細胞・樹状細胞のナノチューブ形成との共通・相違点の解析

HIV-1 や HTLV-1 で解明するナノチューブ制御分子カスケードが普遍的かも明らかにするため、生理的にナノチューブを形成する樹状細胞、そしてナノチューブ形成する事が報告されているがん細胞も含めた解析を行う。樹状細胞はヒト末梢単球から調製する。がん細胞は、M-Sec を異所性発現する U87 (グリオーマ)、NPC-TW、HK1-EBV (鼻咽頭がん)、HCC1937、SW527 (乳がん) などを用いる。

4 . 研究成果

本研究では HIV-1 と tunneling nanotubes (TNT) と呼ばれる、遠隔の細胞同士を物理的に連結する細長い細胞膜突起との密接な関係を明らかにした。まず、TNT 形成に重要な宿主タンパク質 M-Sec に着目し、そのノックダウンによるウイルス増殖の変化を中心に解析を行った。その結果、M-Sec ノックダウンにより、TNT 形成だけでなく、HIV-1 の産生量が有意に低下すること、特に感染初期の段階で激減 (10% 程度にまで) することを見出した。以上から、HIV-1 が TNT を介して効率よく細胞間伝播したと考えられた。一方、HIV-1 近縁のウイルス HTLV-1 (ヒト成人 T 細胞白血病 ATL の原因) についても M-Sec 依存性の TNT が重要な働きをすることを見出した。HIV-1 の時と同様に M-Sec をノックダウンすると、TNT 形成だけでなく、HTLV-1 の産生量も有意に低下することを見出した。さらには、ヒト化マウスを用いた解析から、*in vivo* の HTLV-1 ウイルス伝播にも M-Sec が重要であることも見出した。以上から、M-Sec 依存性の TNT が HIV-1 の細胞間伝播、特に初期の伝播に重要であり、HTLV-1 についても同様の可能性を見出した。一方、M-Sec は TNT 形成だけでなく、感染細胞の運動能にも重要であることも明らかにした。TNT と細胞運動能はどちらもウイルスの伝播に有利であり、M-Sec はこれら 2 つのウイルス伝播にとって重要な機能を制御することでウイルス感染を拡大させる宿主因子であることが明らかとなった。

以上から、M-Sec が HIV-1 および HTLV-1 の増殖に寄与する、新たな機能を持った細胞性タンパク質であることを明らかにした。メカニズムの更なる解明と臨床応用に向けた研究が今後、重要となってきた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Noyori Osamu, Komohara Yoshihiro, Nasser Hesham, Hiyoshi Masateru, Ma Chaoya, Pan Cheng, Carreras Joaquim, Nakamura Naoya, Sato Ai, Ando Kiyoshi, Okuno Yutaka, Nosaka Kisato, Matsuoka Masao, Suzu Shinya	4. 巻 8
2. 論文標題 Expression of IL 34 correlates with macrophage infiltration and prognosis of diffuse large B cell lymphoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical & Translational Immunology	6. 最初と最後の頁 e1074
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cti2.1074	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 Maekawa Takaaki, Kato Shoichiro, Kawamura Toshikuni, et al	4. 巻 134
2. 論文標題 Increased SLAMF7high monocytes in myelofibrosis patients harboring JAK2V617F provide a therapeutic target of elotuzumab	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 814 ~ 825
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2019000051	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7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shinya Suzu, Masateru Hiyoshi
2. 発表標題 Tunneling nanotubes in intercellular transmission of HIV-1 and HTLV-1: similarity and difference
3. 学会等名 20th Kumamoto AIDS Seminar
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hesham Nasser, Partho Adhikary, Amira Abdel-Daim, Osamu Noyori, Hitoshi Takizawa, Ryusho Kariya, Seiji Okada, Shinya Suzu
2. 発表標題 Physiological macrophages with un-limited self-renewing capacity
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hesham Nasser、野依 修、鈴 伸也
2. 発表標題 HIV-1感染者の血中のIL-6高値および炎症性単球増多におけるNefの役割
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 Sameh Lotfi, Osamu Noyori, Hesham Nasser, Shinya Suzu
2. 発表標題 Establishment of a simple culture model for the role of tunneling nanotubes in inter-cellular spread of HIV-1
3. 学会等名 第33回日本エイズ学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hesham Nasser, Osamu Noyori, Shinya Suzu.
2. 発表標題 HIV-1-related disorders progression is driven by sustained Nef-induced high plasma IL-6 and altered monocytes phenotypes in infected patients
3. 学会等名 第33回日本エイズ学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Osamu Noyori, Hesham Nasser, Omnia Abdel Rahman, Shinya Suzu
2. 発表標題 Virological and hematological analyses of fibrocytes in HIV-1-infected patients
3. 学会等名 第33回日本エイズ学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Lotfi S, Noyori O, Nasser H, Suzu S
2. 発表標題 Establishment of a simple culture model for the role of tunneling nanotubes in inter-celular spread of HIV1-
3. 学会等名 19th Kumamoto AIDS Seminar (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究 分 担 者	日吉 真照 (Hlyosi Masateru) (40448519)	国立感染症研究所・血液・安全性研究部・主任研究官 (82603)	