

平成22年 6月 7日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790350
 研究課題名 (和文)
 サルエイズウイルスのヒトへの感染伝播を規定する宿主制御因子の網羅的解析
 研究課題名 (英文)
 Extensive analysis of human cellular factors that target simian immunodeficiency virus replication
 研究代表者
 武内 寛明 (TAKEUCHI HIROAKI)
 東京大学医科学研究所・特任助教
 研究者番号：20451867

研究成果の概要 (和文)：

サルエイズウイルス (SIV) が宿主域を乗り越えて、ヒトに感染伝播してきた機構を明らかにすることが目的で研究を行った結果、Cyclophilin A (CypA) および Cyclophilin B (CypB) 分子は、抗 SIV 細胞内因子であるが、ヒトエイズウイルス (HIV) に対しては、CypA は増殖必須因子であり、CypB は影響を及ぼさない因子であることが分かった。これらの結果は、人畜共通感染症および新興感染症において有益な情報である。

研究成果の概要 (英文)：

An understanding of host cell factors that affect viral replication contributes to elucidation of the mechanism for determination of viral tropism. SIV infection was not significantly affected by knock-down of CypA, an essential factor for HIV-1 replication, but enhanced by knock-down of CypB, another PPIase, in human target cells. These results imply different effects of CypA/CypB on HIV-1 and SIV replication.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：感染防御・ワクチン

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究に関連する国内・国外の研究動向および位置づけ

世界的に流行しているエイズの原因であるエイズウイルス (HIV) は、サルエイズ

ウイルス (SIV) がヒトに感染伝播することによって出現したことは、既に知られている。近年、HIV の宿主域に対して、国内外を問わず、多くの研究者によって解析が進められているが、エイズウイルスの感染ルートであっ

た、SIV がヒトに感染伝播することに対する研究は、殆ど行われていない。特に、SIV がヒト細胞内に侵入し、細胞側からのウイルス排除機構から逃れて子孫ウイルスを増やしていく機構は、世界的にも解析が進んでおらず、エイズウイルスの異種間感染伝播メカニズム解明における本研究の重要性は極めて高いと思われる。

(2) 応募者のこれまでの研究成果をふまえて着想に至った経緯

応募者は、SIV がヒトに感染するメカニズムを解明するために、細胞レベルでのウイルスと宿主との相互作用を解析してきた。その結果、これまでに2つの重要な知見を得ている。まず、SIV にコードされている Virion Infectivity Factor (Vif) 蛋白が、細胞内に存在するエイズウイルス増殖阻害因子で、RNA-editing enzyme の一種である APOBEC family の抗ウイルス効果を制御していることを明らかにした (J Biol Chem. 280, 375-382, 2005)。更には、HIV 感染増殖に必要な宿主因子である、細胞性シャペロン的一种である Cyclophilin A (CypA) も、ヒトにおける SIV 感染増殖を制御する細胞性因子であり (図1)、SIV の Vif 蛋白がこの効果を抑制することを明らかにした (J Virol. 81, 8080-8090, 2007)。このメカニズムは、HIV がヒトに感染する際には全く効果を示さないことから、サルからヒトへ感染する際に効力が発揮される宿主特異的なメカニズムである。本報告は、SIV の Vif 蛋白が、SIV のヒトへの初期感染段階において重要な役割を担っていることを、初めて報告したものである。さらに詳細な解析を進めた結果、APOBEC や CypA だけではなく、SIV 感染増殖に影響を与える、更なるヒト細胞内抵抗性因子の存在が示唆されたので、この因子を検索し、詳細な機能解析を行うことにした。

2. 研究の目的

本研究は、サルエイズウイルス (SIV) が宿主域を乗り越えて、ヒトに感染伝播してきた機構を明らかにすることであり、新興感染症に対するヒト宿主防御機構に対する理解を深めることが目的である。具体的には、SIV 感染におけるヒト細胞性抑制因子を同定し、この因子が持つ機能を抑制して増殖伝播するウイルス機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ウイルス複製過程における宿主因子の影響

SIV がヒト細胞株に感染した後のウイルス

複製過程を、DNA-PCR 法にて解析する。具体的には、ウイルス複製過程で生じる様々なウイルス DNA の形状を判別出来るプライマーを用いて解析する。この解析に用いる細胞は、ウイルス粒子の感染性を判定するために、ウイルス蛋白依存的に luciferase 蛋白を発現するカセットを組み込んだヒト T 細胞株を用いて、DNA-PCR 法と共に luciferase 蛋白の発現量を解析することによって、宿主因子によるウイルス複製過程への影響をより詳細に解析する。

(2) サルおよびヒト宿主制御因子の網羅的解析

ヒト宿主制御因子の生理活性と SIV 感染との相互関係を詳細に解析する。具体的には、同定した各宿主因子の生理活性阻害剤や、small interference RNA (siRNA) を用いた宿主因子機能抑制実験で、SIV 感染増殖におけるこれらの宿主因子の役割を解析する。更には、それらに関連する宿主因子を、ウイルス蛋白に対する免疫沈降法を行うことや、siRNA を用いた感染実験系において、SIV の様々な遺伝子欠損株を用いる事で、SIV と宿主因子との相互作用を規定する責任領域を同定し、そのメカニズムを詳細に解析する。

また、同定した遺伝子を発現出来るプラスミドベクターを構築し、細胞内でこれらを過剰発現させることにより、SIV 感染増殖に与える影響を詳細に解析する。

4. 研究成果

(1) 免疫抑制剤: Cyclosporine A のウイルス感染増殖におよぼす効果:
研究代表者の先行研究により、SIV がヒトへ感染伝播する際に、chaperon family に属する Cyclophilin A (CypA) が SIV 増殖抑制因子として作用しており、SIV Vif 蛋白がその機能を抑制していることが明らかとなっている。そこで、CypA の更なる機能解析を行うために、Cyclophilin family の酵素活性阻害剤である Cyclosporine A (CsA) を用いて SIV 感染増殖に対する影響を解析した。具体的には、HIV-1 である NL4-3 株と SIV である SIVagm および SIVmac239 株とを、CsA 非存在下および存在下にて、ヒト T 細胞株である CEM-SS 細胞に感染させた。その結果、CsA は HIV 感染に対して増殖抑制効果を示し、SIV 感染に対しては増殖促進効果を示す結果が得られた (図1)。このことは、CypA を含む Chaperon family が HIV/SIV 感染に対して異なる作用機序を持つことが示唆された。

ヒト CEM-SS 細胞

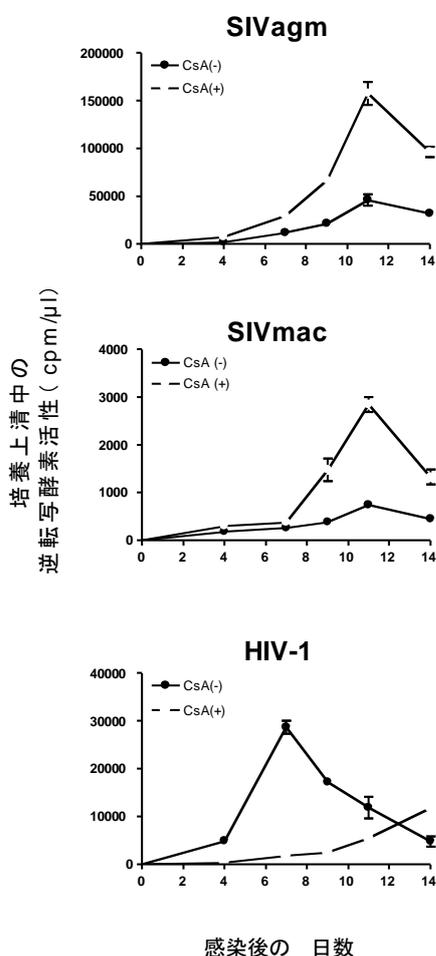


図 1. ヒトおよびサル T 細胞株におけるウイルス増殖に対する CsA の影響: ヒト T 細胞株において CsA 存在および非存在下におけるウイルス感染実験を行い、2 日毎の培養上清中の逆転写酵素活性 SIV 粒子内に取り込まれたものを測定した。上段は SIVagm を、中段は SIVmac239 を、下段は HIV-1 を感染させたものであり、CsA (+) は CsA 存在下、CsA (-) は CsA 非存在下を示している。

(2) ウイルス感染ヒト T 細胞内におけるウイルス DNA 合成効率の解析:

ウイルス感染における CsA の効果を詳細に解析するために、CEM-SS 細胞から産生された NL4-3、SIVagm および SIVmac239 株を、新たな CEM-SS 細胞に感染させ、24 時間後に感染細胞からゲノムを含む Total DNA を抽出し、

感染細胞内における逆転写反応から得られたウイルス DNA 合成量を定量した。その結果を図 2 に示す。ウイルス感染標的となる CEM-SS 細胞に対する CsA の影響を解析するために、通常の CEM-SS 細胞と、ウイルス感染前に CsA (2.5 μM) を処理した細胞とを用いた。その後、SIV 粒子と感染標的細胞との組み合わせによって、ウイルス感染に対する CsA の影響を、感染細胞内のウイルス DNA 合成量を比較することによって行った。その結果、HIV 感染における CsA の効果は、ウイルス DNA 合成効率を低下させる、すなわち HIV 増殖抑制側に作用する結果が得られ、この効果は感染標的細胞に対する CsA 処理の影響によるものであった (図 2 の HIV-1)。ところが、SIV 感染については、感染標的細胞に対する CsA 処理が、SIV 感染後のウイルス DNA 合成効率を低下させるよりもむしろ上昇させる結果が得られた (図 2 の SIVagm および SIVmac)。

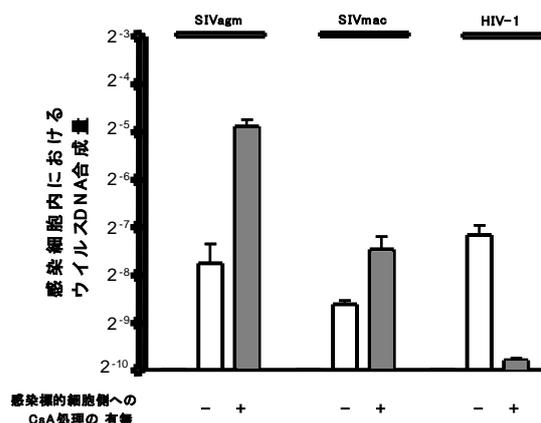


図 2. ウイルス感染標的ヒト細胞 (CEM-SS) 内におけるウイルス DNA 合成量の比較: CEM-SS 細胞から産生された SIVagm (左側)、SIVmac239 (中央) および HIV-1 (右側) を CEM-SS 細胞に感染させ、24 時間後の感染細胞内にて合成されたウイルス DNA をリアルタイム PCR 法にて測定した結果を示す。ウイルス標的細胞側への CsA 処理は、ウイルス感染標的 CEM-SS 細胞に対し、ウイルス感染前に CsA (2.5 μM) を前処理していることを示している。

(3) CypA 遺伝子ノックダウンヒト T 細胞株を用いたウイルス感染増殖能の解析: 以前の報告より、CsA は、CypA と結合してその機能を抑制することが知られている。そこで、ウイルス感染における CsA の効果と CypA の機能とが関連しているか否かを解析するため

に、CypA 遺伝子を small interference RNA (siRNA) を用いて発現抑制させたヒト CEM-SS 細胞株 (CypA-KD CEM-SS) を作製し、ウイルス感染実験を行った。その結果、HIV-1 感染増殖能については、大きく低下することが認められ、さらに CypA-KD CEM-SS 細胞での CsA 存在下における HIV-1 感染増殖能は、CsA 非存在下と比較して差異は殆ど認められなかった。これに対し、CypA-KD CEM-SS 細胞での SIV 感染増殖能を検討したところ、CEM-SS 細胞のそれと比較しても大きな差異は認められなかった。ところが、CsA 存在下における CypA-KD CEM-SS 細胞における SIV 感染増殖効率は増大し、その効果は CsA 存在下の CEM-SS 細胞におけるそれと同様であった (図 3)。

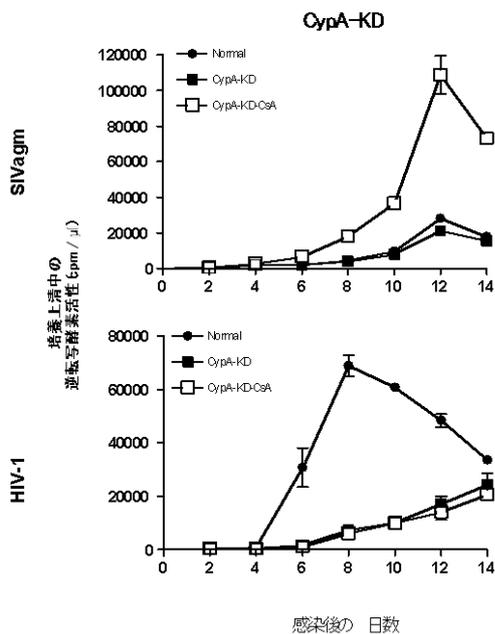


図 3. CypA 遺伝子ノックダウン (CypA-KD) ヒト T 細胞株を用いたウイルス感染増殖能の解析: CypA-KD 細胞において CsA 存在および非存在下におけるウイルス感染実験を行い、2 日毎の培養上清中の逆転写酵素活性を測定した。上段は SIVagm を、下段は HIV-1 の感染増殖能を示したものである。Normal は CEM-SS 細胞、CypA-KD は CypA 遺伝子ノックダウン細胞、CypA-KD-CsA は、CypA-KD 細胞の CsA 存在下におけるウイルス感染実験結果を示している。

(4) CypB-KD CEM-SS 細胞を用いたウイルス感染増殖能の解析: ウイルス感染に対する CypB 分子機能の影響を解析するために、CypB-KD CEM-SS 細胞を用いたウイルス感染実験を行った。その結果、HIV-1 感染増殖能に

ついては、CEM-SS 細胞のそれと比較して大きな差異は認められず、CsA 存在下における CypB-KD CEM-SS 細胞での HIV 感染増殖効率は著しく低下した (図 4)。これに対し、CypB-KD CEM-SS 細胞での SIV 感染増殖能を検討したところ、SIV 感染増殖効率は増大し、CsA 存在下での CEM-SS 細胞での SIV 感染増殖効率と同等の結果が得られた (図 4)。

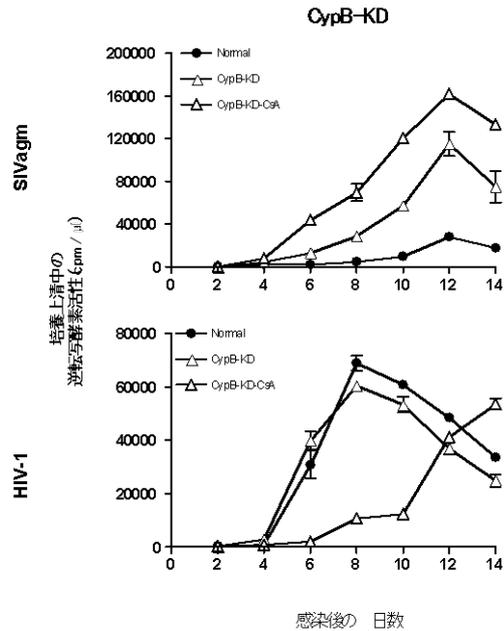


図 4. CypB 遺伝子発現抑制 (CypB-KD) ヒト T 細胞株を用いたウイルス感染増殖能の解析: CypB-KD 細胞において CsA 存在および非存在下におけるウイルス感染実験を行い、2 日毎の培養上清中の逆転写酵素活性を測定した。上段は SIVagm を、下段は HIV-1 の感染増殖能を示したものであり、縦軸は培養上清中の逆転写酵素活性量を示し、横軸は感染後の日数を示している。Normal は CEM-SS 細胞、CypB-KD は CypB 遺伝子ノックダウン細胞、CypB-KD-CsA は、CypB-KD 細胞の CsA 存在下におけるウイルス感染実験結果を示している。

(5) 結論

本研究では、ヒト細胞において CypA および CypB 分子が SIV 感染抑制因子であることを明らかにした。この研究成果は、エイズウイルスの異種間感染伝播において、Cyp が重要な役割を担っていることを示唆しており、エイズのみならず、新興および再興感染症、更には人畜共通感染症に対するヒト宿主防

御機構に対する理解を深めるものとする。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

1. Takeuchi H. 2010. Contribution of Cyclophilin A to determination of simian immunodeficiency virus tropism: A progress update. Vaccine. 28 Suppl 2:B51-4. (査読有り)
2. 武内 寛明. 2009. エイズウイルスの異種間感染メカニズム. The Journal of AIDS Research (日本エイズ学会誌) 11(2): 104-105. (査読無し)
3. Takeuchi H and Matano T. 2008. Host factors involved in resistance to retroviral infection. Microbiol Immunol. 52(6):318-25. (査読有り)
4. Kawada M, Tsukamoto T, Yamamoto H, Iwamoto N, Kurihara K, Takeda A, Moriya C, Takeuchi H, Akari H & Matano T. 2008. Gag-specific cytotoxic T-lymphocyte-based control of primary simian immunodeficiency virus replication in a vaccine trial. J Virol. 82(20):10199-206. (査読有り)

[学会発表] (計9件)

国際学会

(1) H. Takeuchi, N. Inagaki, H. Ishii, T. Kuwano, H. Akari and T. Matano. Cyclophilin A affects SIV replication positively in monkey but negatively in human cells. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Reroviruses, New York, USA, 2008. 5. 20. (口頭発表)

(2) H. Takeuchi, H. Ishii, T. Kuwano, N. Inagaki, H. Akari and T. Matano. Contribution of cyclophilin A to determination of simian immunodeficiency virus tropism. The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji Island, Japan, 2008. 9. 10. (シンポジウム招待講演)

(3) Takeuchi H, Ishii H and Matano T. 2009. Cyclophilin B has an inhibitory effect on

SIV but not HIV-1 replication in human cells. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Reroviruses, New York, USA, 2009. 5. 19. (口頭発表)

(4) Takeuchi H, Ishii H and Matano T. 2009. Species-specific effect of cyclosporine A on simian immunodeficiency virus replication: possible contribution of cyclophilins to the determination of viral tropism. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji Island, Japan, 2009. 9. 10. (ポスター発表)

(5) Takeuchi H. 2009. Species-specific Effect of Cyclosporine A on Simian Immunodeficiency Virus Replication: Possible Contribution of Cyclophilins to the Determination of Viral Tropism. China-Japan Research Collaboration on Emerging and Reemerging Infections, Beijing, China, 2009. 10. 22. (口頭発表)

国内学会

(6) 口頭発表

Cyclophilin A はサルエイズウイルスの宿主域を規定する細胞内因子である。武内 寛明、石井 洋、桑野 哲矢、稲垣奈都子、明里 宏文、俣野哲朗 (第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月27日、岡山コンベンションセンター)

(7) シンポジウム講演

エイズウイルスの異種間感染メカニズムー新興・再興感染症に対する新規治療および予防法の確立に向けてー。武内 寛明 (第22回日本エイズ学会学術集会・総会、2008年11月27日、大阪国際交流センター)

(8) 口頭発表

エイズウイルストロピズムにおける Cyclophilins の役割。武内 寛明、石井 洋、俣野 哲朗 (第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月26日、都市センターホテル、東京)

(9) 口頭発表

Cyclophilins はエイズウイルストロピズムを規定する細胞内因子である。武内 寛明、石井 洋、俣野 哲朗 (第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月28日、名古屋国際会議場)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武内 寛明 (TAKEUCHI HIROAKI)
東京大学医科学研究所・特任助教
研究者番号：20451867

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：