

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03498

研究課題名（和文）感染微小環境の統合的理解に基づいたHIV再活性化と細胞間伝播機構の解明

研究課題名（英文）Understanding of the impact of infection microenvironment in HIV reactivation and cell-to-cell transmission

研究代表者

梁 明秀 (RYO, Akihide)

横浜市立大学・医学研究科・客員教授

研究者番号：20363814

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、生体環境に近い構造をもつ3次元微小環境培養モデルを活用し、I型インターフェロン（IFN）によるウイルス伝播抑制に関わる宿主因子（MAL）を同定、HIV-1アクセサリタンパク質NefがMALの抗ウイルス機能を部分的に阻害することを明らかにした。HIVの自然免疫に対する回避機構についても、HIV-1プロテアーゼ（PR）が重要な役割を果たすことを示した。低酸素応答分子メカニズムを標的とした研究も行い、数理モデルを用いてその妥当性の検証も行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HIV感染症は死亡率が劇的に改善したが、体内に残存するHIV潜伏感染細胞がしばしば再活性化するため根治療法は未だ存在しない。3次元微小環境培養モデルを用いて、ウイルスの再活性化及び細胞間伝播を可視化・定量化し数理モデルを構築、また、ウイルスの挙動変化を規定する責任因子をマルチオミクス解析により包括的に明らかにすることで、HIV伝播を制御する新たな分子機構の解明とHIV感染症の根治を目指した新規治療法を創出することが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this research project, we found that treatment of three-dimensional infected cell models with type I interferon markedly reduced the amount of viral cell-to-cell spread from infected to uninfected cells. A protein-protein interaction analysis revealed that the transmembrane protein MAL accumulated HIV-1 Gag protein in the host endosomal compartment, leading to its degradation in lysosomes. We searched for host factors that are cleaved by HIV-encoded proteases. We found that PR specifically cleaved the TBK1 and markedly reduced the kinase activity of TBK1. In fact, in HIV PR-expressing cells, nuclear translocation of IRF3 and production of type I IFN were reduced upon innate immune signals. We analyzed the molecular mechanism of HIV-2 latency under hypoxia and found that the hypoxia-inducible factor HIF-1 induces multiple long non-coding RNAs bound to the transcriptional regulatory region of HIV-2 and suppressed HIV-2 gene expression through an epigenetic regulatory mechanism.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HIV エイズ 感染症 微小環境 宿主因子

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) HIV 感染症は多剤併用療法 (ART) により死亡率が劇的に改善し、今や慢性疾患として位置づけられつつある。しかしながら感染者の血中ウイルス量が検出限界以下になっても、体内に残存する HIV 潜伏感染細胞 (リザーバー) がしばしば再活性化するため根治には至っていない。近年、ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬などの LRA (latency reversing agent) によってウイルス遺伝子を再活性化させ、ART と併用して HIV を排除する「shock and kill 療法」が試みられているが顕著な成果は出ていない。これは、LRA により細胞から放出された数百～数千個のウイルス粒子が一気に隣接細胞へ細胞間伝播してしまうことで、局所的な薬剤濃度や宿主免疫の効力が相対的に低下してしまうことが原因と考えられる。

(2) 従来の HIV 研究では、生体内の微小環境を考慮した多細胞種によるウイルス感染の時空間動態研究はほとんど行われてこなかった。また、感染微小環境の変遷がウイルス-宿主相互作用にどのように影響するかについて考察している研究も数少ない。これは、ウイルス側は遺伝子変異による多様性を獲得するのに対し、細胞側は常に一定なものとして研究が進められてきたことが原因であると考えられる。

2. 研究の目的

(1) HIV 感染症の根治のためには、ウイルスの再活性化や細胞間ウイルス伝播を含めたウイルス増殖機構を解明し、それらを阻止する新たな戦略が必要となる。本研究課題では、複数の細胞種が積層させた生体環境に近い細胞培養モデルを用いて、感染微小環境の数量的及び質的变化に対するウイルス動態変化を考察し、それらを規定する外的因子 (微小環境) や宿主側の責任因子をマルチオミクス解析により明らかにすること、また、これらの実験データを基に数理モデルを構築し、生体環境を模した不均一な細胞集団下での感染伝播や薬効予測法を開発することにより、根治を目指した新規治療法の創出を目指す。

(2) 感染微小環境の要因として、サイトカイン刺激や各種細胞外ストレスにともない誘導・活性化される細胞内シグナルや因子群を探索し、それらのウイルスとの相互作用を見出すことで新たな感染制御機構を明らかにする。さらには、これらの結果の時空間的解析を行うことで、より高精度な制御機構の解明に繋げる。

3. 研究の方法

(1) 本研究課題では、複数の細胞種が積層された生体環境に近い構造を持つ 3 次元感染細胞培養モデルを用いて、潜伏感染細胞からのウイルスの再活性化及び細胞間伝播に関わる宿主因子の探索、ウイルスの細胞-細胞間伝播を可視化・定量化することで、ストレス刺激に対するウイルスの挙動をリアルタイムに解析した。その結果、3 次元感染細胞モデルに Ⅱ 型インターフェロン (IFN) を投与すると、感染細胞から非感染細胞へのウイルス細胞-細胞間伝播量が著しく減少すること、ライブセルイメージングにより細胞膜近傍に集積するはずの HIV-1 Gag タンパク質が、細胞質内のアグリソーム内に隔離されることが判明した。

(2) 隔離によりウイルスの細胞間伝播が阻止されている可能性があることから、生細胞におけるタンパク質-タンパク質間相互作用解析ツールである NanoBRET を用いて更に探索した結果、膜貫通タンパク質 MAL が HIV-1Gag タンパク質を宿主のエンドソームコンパートメントに集積しリソソームで分解に導いていることを明らかにした。また、MAL の抗ウイルス活性がウイルスのアクセサリータンパク質である Nef によって阻害されていたため、HIV がコードするプロテアーゼ (PR) により切断される宿主因子を探索したところ、TBK1 の C 末端部分を特異的に切断し、TBK1 のキナーゼ活性を顕著に低下させていることを明らかにした。

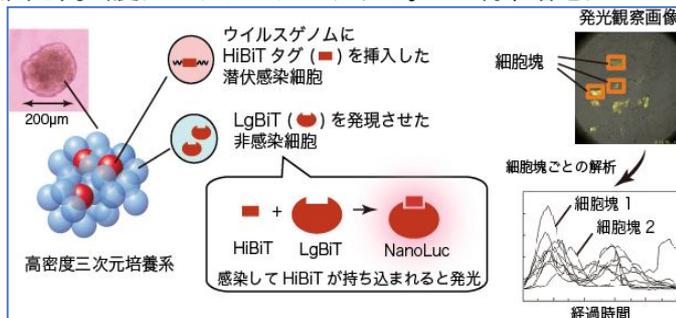
(3) HIV PR 発現細胞では、二本鎖 RNA 刺激による自然免疫シグナルにおいて、転写因子 IRF3 の核内移行と I 型 IFN の産生が減少する一方、HIV 再活性化における自然免疫応答はプロテアーゼ阻害剤 (PI) 処理により顕著に回復し、PI に対する薬剤耐性変異を有する PR は、Gag 前駆タンパク質の切断能を保持していたが、TBK1 に対する切断活性は著しく低下した。以上の結果より、HIV による自然免疫回避に PR が重要な役割を果たすことを明らかにした。

(4) 低酸素下における HIV-2 の潜伏化の分子機構について解析を行なった結果、低酸素誘導因子 HIF-1 により複数の長鎖ノンコーディング RNA (lncRNA) が誘導され、この一部が HIV-2 の転写制御領域に結合し、エピジェネティックな調節機構により HIV-2 の遺伝子発現を抑制することを明らかにした。

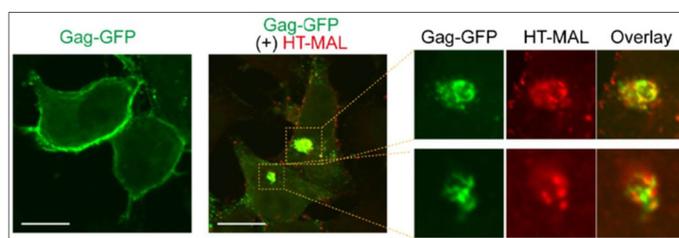
(5) これらの結果について、数理モデルを用いてその妥当性を検証した。

4. 研究成果

(1) 多層性 HIV 感染モデル系を樹立するため、レポーター遺伝子(HiBit-LgBiT システム)を応用した3次元培養モデルを構築した。ヒトリンパ節由来線維芽細胞様細胞にヒトテロメア逆転写酵素(hTERT)を用いて不死化し、HIV 感染および非感染 T 細胞と混和した人工ミニリンパ組織を構築した。レポーター遺伝子(HiBit 発光タグ)をコードした HIV 分子クローンを定常的に発現させた T 細胞系細胞を構築、HIV プロウイルスの定常発現が極めて低いリザーバー細胞モデルを樹立する。次に、上記の HIV 潜伏感染細胞と NanoLuc ルシフェラーゼ断片 LgBiT を発現させた非感染 T 細胞株、さらにリンパ節由来線維芽細胞様細胞(Fibroblast-like reticular cell; FRC); 7 インテグリン陽性周皮細胞(AIPs)を様々な比率で混合し、3D ハイドロゲル培養システムを用いて細胞集団を高密度にパッケージングする。この際、培地に LRA を添加すると、リザーバー細胞内において HiBit 発光タグを有したウイルスが産生される。また、細胞間感染が誘導されると、標的細胞内で HiBit と LgBiT が結合し、強力に発光する(右図)。このシグナルをルミノメーターや発光顕微鏡を用いて検出することで、リアルタイムにウイルスの伝播を定量・可視化することに成功した。

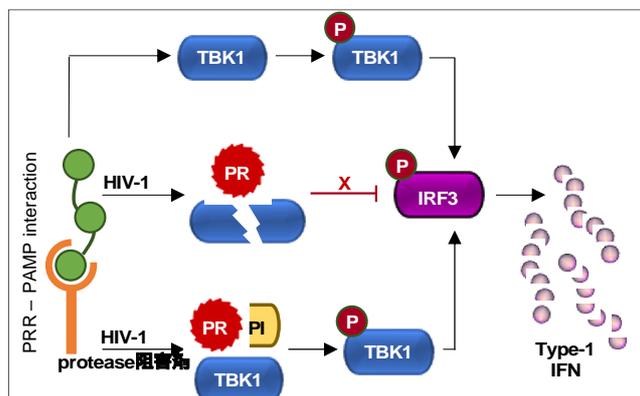


(2) 3次元感染細胞モデルに、LRAとともに型インターフェロン(IFN)を投与すると、ウイルス遺伝子発現は上昇する一方、感染細胞から非感染細胞へのウイルス伝播量が著しく減少することを予備実験により見いだした。また、ライブセルイメージングにより細胞膜近傍に集積するはずの HIV 骨格タンパク質 Gag



が、細胞質内のアグリソーム内に隔離されていたため、本現象に関わるインターフェロン誘導遺伝子(ISG)の同定を試みる。具体的には、約800種類のISGライブラリーの中からGagと直接相互作用するISG蛋白質を、生細胞におけるタンパク質-タンパク質間相互作用解析ツールであるNanoBRETを用いて探索した。結果、Gagと相互作用するISG産物として膜貫通タンパク質MALを同定した。MALの強制発現はHIV-1粒子の生産を大幅に阻害し、宿主のエンドソームコンパートメントにおけるGagの転位、蓄積、リソソームにおける分解につながった。また、MALの抗ウイルス活性は、ウイルスのアクセサリータンパク質であるNefによって阻害されることも判明した。本研究は、これまで明らかにされていなかったMALの抗ウイルス機能とそのウイルスへの対抗策を明らかにするとともに、宿主細胞が本来有する細胞内免疫機構を解明した。(文献)

(3) HIVが再活性化された際に、宿主の自然免疫応答を回避する機構の解明を行なった。HIVがコードするプロテアーゼ(PR)は、種々の宿主細胞タンパク質を切断することが知られていたため、PRが自然免疫シグナル関連因子を切断すると仮定。詳細な解析の結果、PRはTBK1のC末端部分を持特的に切断し、TBK1のキナーゼ活性を顕著に低下させた。HIV PR発現細胞では、二本鎖RNA刺激による自然免疫シグナルにおいて転写因子IRF3の核内移行とI型IFNの産生が減少した。一方、HIV再活性化における自然免疫応答は、プロテアーゼ阻害剤(PI)処理により顕著に回復した。さらに、PIに対する薬剤耐性変異を有するPRは、Gag前駆タンパク質の切断能は保持していたが、TBK1に対する切断活性が著しく低下していた。以上の結果より、HIVによる自然免疫回避にPRが重要な役割を果たすことを示した。(文献)



(4) HIVの潜伏化に関与する細胞外要因として、低酸素応答分子メカニズムを標的とした研究を実施した。まずは、HIV-2アクセサリータンパク質Vpxがフォン・ヒッペル・リンドウ腫瘍抑

制タンパク質 (von Hippel-Lindau tumor suppressor protein; VHL) との相互作用により、ユビキチン化され、プロテアソームにより分解されることを見出した。また、Vpx 強制発現細胞では、正常酸素分圧下において VHL による HIF-1 の分解が阻害され低酸素応答が誘導されていた。一方、Vpx を欠如した HIV-2 では野生株と比較して潜伏化が起こりにくかったが、低酸素環境下においては潜伏化が促進されたことから、低酸素応答シグナル及び関連因子が HIV-2 の潜伏化に寄与することが示唆された。網羅的な遺伝子発現解析及びその後の機能解析により、低酸素誘導因子 HIF-1 により複数の長鎖ノンコーディング RNA (lncRNA) が誘導され、そのうちの一部が、HIV-2 の転写制御領域に結合し、エピジェネティックな調節機構により HIV-2 の遺伝子発現を抑制することが明らかにした。これらの結果について数理モデルを用いてその妥当性を検証した。

< 引用文献 >

Miyakawa K, Jeremiah SS, Nishi M, Morikawa Y, Ryo A. MAL Inhibits the Production of HIV-1 Particles by Sequestering Gag to Intracellular Endosomal Compartments. *Front. Virol.*, 23 March 2022 doi: 10.3389/fviro.2022.836125.

Jeremiah SS, Miyakawa K, Matsunaga S, Nishi M, Kudoh A, Takaoka A, Sawasaki T, Ryo A. Cleavage of TANK-Binding Kinase 1 by HIV-1 Protease Triggers Viral Innate Immune Evasion. *Front Microbiol.* 2021 Apr 27;12:643407. doi:10.3389/fmicb.2021.643407. PMID: 33986734; PMCID: PMC8110901.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Miyakawa Kei, Nishi Mayuko, Jeremiah Sundararaj Stanleyraj, Morikawa Yuko, Ryo Akihide	4. 巻 2
2. 論文標題 MAL Inhibits the Production of HIV-1 Particles by Sequestering Gag to Intracellular Endosomal Compartments	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Virology	6. 最初と最後の頁 836125
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fviro.2022.836125	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 Jeremiah Sundararaj Stanleyraj, Miyakawa Kei, Matsunaga Satoko, Nishi Mayuko, Kudoh Ayumi, Takaoka Akinori, Sawasaki Tatsuya, Ryo Akihide	4. 巻 12
2. 論文標題 Cleavage of TANK-Binding Kinase 1 by HIV-1 Protease Triggers Viral Innate Immune Evasion	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 643407
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2021.643407	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 Ino Yoko, Kinoshita Eiji, Kinoshita Kikuta Emiko, Akiyama Tomoko, Nakai Yusuke, Nishino Kohei, Osada Makoto, Ryo Akihide, Hirano Hisashi, Koike Tohru, Kimura Yayoi	4. 巻 22
2. 論文標題 Evaluation of four phosphopeptide enrichment strategies for mass spectrometry based proteomic analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PROTEOMICS	6. 最初と最後の頁 2100216
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/pmic.202100216	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 Mitsunaga Makoto, Ito Kimihiro, Nishimura Takashi, Miyata Hironori, Miyakawa Kei, Morita Takeshi, Ryo Akihide, Kobayashi Hisataka, Mizunoe Yoshimitsu, Iwase Tadayuki	4. 巻 5
2. 論文標題 Antimicrobial strategy for targeted elimination of different microbes, including bacterial, fungal and viral pathogens	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 647
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-022-03586-4	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 -

1. 著者名 Hatayama Yasuyoshi, Yamaoka Yutaro, Morita Takeshi, Jeremiah Sundararaj Stanleyraj, Miyakawa Kei, Nishi Mayuko, Kimura Yayoi, Mitsunaga Makoto, Iwase Tadayuki, Kimura Hirokazu, Yamamoto Naoki, Takaori-Kondo Akifumi, Hasegawa Hideki, Ryo Akihide	4. 巻 14
2. 論文標題 Development of a Monoclonal Antibody Targeting HTLV-1 Envelope gp46 Glycoprotein and Its Application to Near-Infrared Photoimmuno-Antimicrobial Strategy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 2153 ~ 2153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v14102153	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 Ino Yoko, Yamaoka Yutaro, Tanaka Kiho, Miyakawa Kei, Nishi Mayuko, Hatayama Yasuyoshi, Kimura Hirokazu, Kimura Yayoi, Ryo Akihide	4. 巻 23
2. 論文標題 Integrated tandem affinity protein purification using the polyhistidine plus extra 4 amino acids (HiP4) tag system	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PROTEOMICS	6. 最初と最後の頁 2200334
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pmic.202200334	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4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 船橋 利佳子, 鈴木 智津, 山岡 悠太郎, 宮川 敬, 木村 弥生, 梁 明秀
2. 発表標題 アルファスクリーンを用いた血清中の抗HTLV-1抗体測定法の開発
3. 学会等名 第72回日本電気泳動学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 梁 明秀
2. 発表標題 新型コロナウイルス感染症に対する新たな検査法の開発と実用化
3. 学会等名 第35回日本エイズ学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tanaka K, Miyakawa K, Ino Y, Shin J, Kimura Y, Ryo A
2. 発表標題 E3 Ubiquitin Ligase VHL negatively regulates HIV-2 Vpx.
3. 学会等名 The 34th Annual Meeting of the Japanese Society for AIDS Research
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西 真由子, 立石健祐, 中居佑介, 巳鼻悠作, 木村弥生, 山本哲哉, 梁 明秀
2. 発表標題 血管周皮細胞と共培養された原発性CNSリンパ腫(PCNSL)の細胞生存と増殖におけるプロリルイソメラーゼPin1の役割
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

https://ryolab.wixsite.com/ycu-microbiology

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	中林 潤 (Nakabayashi Jun) (80322733)	東京医科歯科大学・統合教育機構・教授 (12602)	

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