

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 1 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590416

研究課題名（和文）cystatin-C は、どのようにして CD4 非依存性 HIV 感染を促進するのか？

研究課題名（英文）How does cystatin-C enhance CD4-independent HIV infection?

研究代表者

久保 嘉直 (Kubo, Yoshinao)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：30273527

研究成果の概要（和文）：CD4 非依存性 HIV 感染耐性の HeLa 細胞を感染感受性に変換する細胞因子を同定した。カテプシン蛋白質分解酵素の阻害因子 cystatin-C であった。cystatin-C や低分子量カテプシン阻害剤 CA-074Me は、CD4 非依存性 HIV 感染を促進した。CD4 非依存性 HIV 感染は、エンドサイトーシス阻害剤によって低下したので、エンドソームに取り込まれた後、細胞内に侵入すると思われる。エンドソーム内のカテプシン活性が高いと、HIV 粒子が分解され、感染が抑制されるのであろう。マウス白血病ウイルス（MLV）感染もエンドソームを経由することが既に知られている。しかし、MLV 感染は、CA-074Me によって低下したので、CD4 非依存性 HIV と異なり、カテプシンを必要とする。また、XC 細胞における MLV 感染はエンドソーム酸性化阻害剤によって低下しないので、エンドソームを経由しないと古くから考えられてきた。しかし、XC 細胞における MLV 感染もエンドソームを経由し、エンドソーム酸性化なしにカテプシンが活性化されることによってエンドソーム酸性化非依存性の MLV 感染がおこることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：HeLa cells were resistant to CD4-independent HIV infection. We identified cystatin-C (cathepsin protease inhibitor) that conferred HeLa cells susceptible to CD4-independent HIV infection. When target cells were treated with a low molecular weight cathepsin inhibitor, CA-074Me, CD4-independent HIV infection was enhanced. Because CD4-independent HIV infection was attenuated by an endocytosis inhibitor, the infection occurs through endosomes. When cathepsin activity is relatively higher, CD4-independent HIV infectivity may be reduced due to the degradation of HIV particles incorporated into endosomes by cathepsin. Although murine leukemia virus (MLV) infection occurs via endosomes, MLV infection was rather suppressed by CA-074Me. This result indicates that cathepsin is required for MLV infection unlike CD4-independent HIV infection. Because MLV infection in XC cells is not suppressed by endosome acidification inhibitors, it is widely accepted that MLV infection does not occur via endosomes specifically in XC cells. We found that MLV infection in XC cells occurs through endosomes, and cathepsin activated without endosome acidification in XC cells confers MLV infection resistant to endosome acidification inhibitors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：HIV、cystatin-C、カテプシン B、自然免疫

1. 研究開始当初の背景

一般的に HIV は、CD4 と CXCR4 もしくは CCR5 を感染受容体として認識し、標的細胞に感染する。しかし、CD4 を必要とせず感染可能な CD4 非依存性 HIV が、感染患者から効率よく単離される。CD4 非依存性 HIV は、CD4 を発現していない様々な細胞に感染し、AIDS 患者において高率に観察される脳炎、腎炎、肝炎の原因と考えられている。

我々は、様々な培養細胞株の CD4 非依存性 HIV 感染に対する感受性を決定した。その結果、HeLa 細胞は、CD4 非依存性 HIV 感染に対して耐性であることがわかった。感染耐性の HeLa 細胞と感染感受性の 293T 細胞のハイブリドーマ細胞は、CD4 非依存性 HIV 感染に対して感受性であったので、HeLa 細胞は CD4 非依存性 HIV 感染に必須な細胞因子を欠損していることを示している。HeLa 細胞に CD4 を導入すると、CD4 依存性 HIV は容易に感染することから、その細胞因子は CD4 非依存性 HIV 感染特異的な因子である。

2. 研究の目的

CD4 非依存性 HIV 感染に必須な細胞因子を同定することにより、CD4 非依存性 HIV 感染機構を解明する。その結果、明らかとなった感染機構が他のレトロウイルス感染にも関与しているかどうか知ることを目的とした。

3. 研究の方法

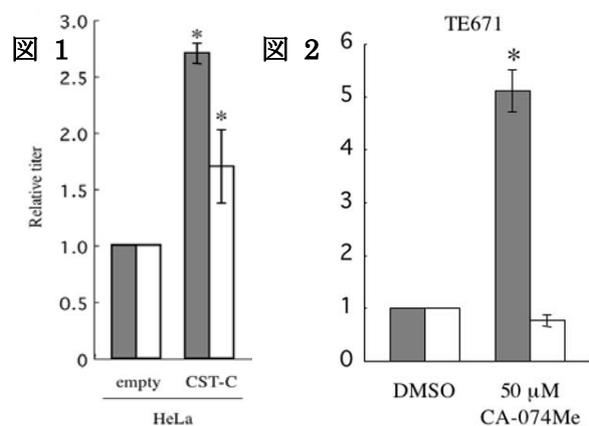
CD4 非依存性 HIV 感染耐性の HeLa 細胞に感染感受性の T 細胞から調製した cDNA 発現ライブラリーを導入した。その細胞に、薬剤耐性遺伝子を持った CD4 非依存性 HIV vector を接種し、薬剤処理した。生き残った細胞から、導入した cDNA 配列を PCR により単離し、CD4 非依存性 HIV 感染に必須な細胞因子を同定した。

4. 研究成果

cDNA 発現ライブラリーを導入し、CD4 非依存性 HIV 感染感受性となった HeLa 細胞から、導入した cDNA を PCR によって増幅した。その塩基配列を決定した結果、cystatin-C であることがわかった。確認のため、HeLa 細胞に cystatin-C 発現プラスミドを導入したところ、CD4 非依存性 HIV 感染が促進された (図 1)。この結果は、CD4 非依存性 HIV 感染には cystatin-C が必須であることを示している。

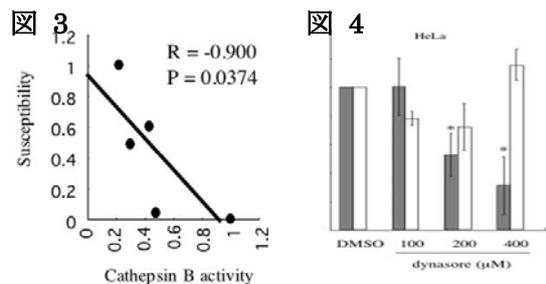
cystatin-C はエンドソーム蛋白質分解酵

素であるカテプシンの阻害因子であることが既に知られている。cystatin-C はカテプシン活性を抑制することによって CD4 非依存性 HIV 感染を促進しているのかどうか知るため、HeLa 細胞を低分子量カテプシン阻害剤 CA-074Me により処理した。その結果、CA-074Me は CD4 非依存性 HIV 感染を促進した (図 2)。これらの結果は、カテプシンが CD4 非依存性 HIV 感染を阻害し、効率よい CD4 非依存性 HIV 感染のためにはカテプシン活性を抑制する必要があることを示している。



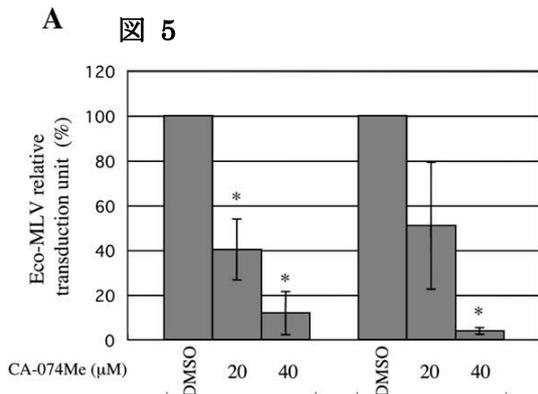
この結果を確認するため、様々な培養細胞株の CD4 非依存性 HIV 感染感受性とカテプシン活性の関係を解析した。カテプシン活性が高いと CD4 非依存性 HIV 感染感受性が低かった (図 3)。すなわち CD4 非依存性 HIV 感染感受性とカテプシン活性は逆相関していることがわかった。

カテプシンはエンドソーム内に存在しているので、これらの結果は、CD4 非依存性 HIV 感染がエンドソームを経由することを示唆している。これを証明するため、CD4 非依存性 HIV 感染におけるエンドサイトーシス阻害剤の影響を解析した。予期したように、エンドサイトーシス阻害剤 (dynasore) は、CD4 非依存性 HIV 感染を抑制した (図 4)。この結果は、CD4 非依存性 HIV 感染がエンドソームを経由することを示している。



これらの結果から、CD4 非依存性 HIV ウィルス粒子は一度エンドサイトーシスによりエンドソームに取り込まれ、その後、細胞内に侵入するが、エンドソーム内のカテプシン活性が高いと、ウィルス粒子は分解され、感染が低下することが明らかとなった。

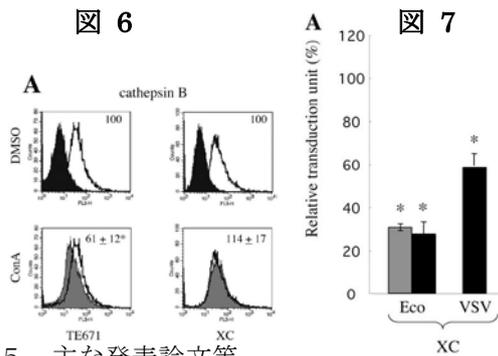
続いて、他のレトロウイルス感染におけるカテプシンの働きを解析した。CD4 非依存性 HIV 感染と同様に、マウス白血病ウイルス (MLV) 感染もエンドソームを経由して起こることが既に知られている。しかし、MLV 感染は、カテプシン阻害剤 (CA-074Me) によって抑制された (図 5)。



この結果は、MLV 感染にはカテプシンが必要であることを示している。

ほとんどの細胞における MLV 感染はエンドソーム酸性化阻害剤によって阻害されるが、XC 細胞における MLV 感染は阻害されない。XC 細胞における MLV 感染は、エンドサイトーシス非依存性であると古くから考えられてきた。カテプシンはエンドソームに存在するので、もしこの仮説が本当なら、XC 細胞における MLV 感染はカテプシンを必要としないはずである。しかし、カテプシン阻害剤は XC 細胞における MLV 感染を阻害した (図 5)。ではなぜエンドソーム酸性化阻害剤は XC 細胞における MLV 感染を抑制しないのだろうか？カテプシンはエンドソーム酸性化によって活性化されるので、エンドソーム酸性化阻害剤は、カテプシン活性化を阻害することによって MLV 感染を抑制すると思われる。そこで、細胞内のカテプシン活性を測定した。興味あることに、多くの細胞のエンドソーム酸性化阻害剤処理はカテプシン活性を低下させたが、XC 細胞のカテプシン活性は低下しなかった (図 6)。この結果は、XC 細胞ではカテプシンはエンドソーム酸性化と関係なく活性化されることを示している。これは、XC 細胞における MLV 感染もエンドソームを経由し、XC 細胞のカテプシン活性はエンドソーム酸性化阻害剤の影響を受けないため、MLV 感染にも影響しないことを示している。XC 細胞における MLV 感染は、エンドサイトーシス阻害

剤によって抑制された (図 7)。この結果は、上記の結論を支持する。



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 9 件)

- ① H. Yoshii, H. Kamiyama, K. Goto, K. Oishi, N. Katsunuma, Y. Tanaka, H. Hayashi, T. Matsuyama, H. Sato, N. Yamamoto, Y. Kubo. CD4-independent human immunodeficiency virus infection involves participation of endocytosis and cathepsin B. PLoS ONE 6, e19352 (2011) 査読あり DOI:10.1371/journal.pone.0019352.
- ② H. Kamiyama, K. Kakoki, H. Yoshii, M. Iwao, T. Igawa, H. Sakai, H. Hayashi, T. Matsuyama, N. Yamamoto, Y. Kubo. Infection of XC cells by MLVs and Ebola virus is endosome-dependent but acidification-independent. PLoS ONE 6, e26180 (2011) 査読あり DOI:10.1371/journal.pone.0026180
- ③ S. Ono, T. Tanaka, M. Ishida, A. Kinoshita, J. Fukuoka, M. Takaki, N. Sakamoto, Y. Ishimatsu, S. Kohno, T. Hayashi, M. Senba, M. Yasunami, Y. Kubo, L. M. Yoshida, H. Kubo, K. Ariyoshi, K. Yoshiura, K. Morimoto. Surfactant protein C G100S mutation causes familial pulmonary fibrosis in Japanese kindred. Eur. J. Respir. 38, 861-869 (2011) 査読あり DOI:10.1183/09031936.00143610.
- ④ H. Kamiyama, Y. Kubo, H. Sato, N. Yamamoto, T. Fukuda, F. Ishibashi, M. Iwao. Synthesis, structure-activity relationships, and mechanism of action of anti-HIV-1 lamellarin a20-sulfate analogues. Bioorg. Med. Chem. 19, 7541-7550 (2011) 査読あり DOI:10.1016/j.bmc.2011.10.030.
- ⑤ H. Shindo, K. Yasui, K. Yamamoto, K. Honma, K. Yui, T. Kohno, Y. Ma, K. J. Chua, Y. Kubo, H. Aihara, T. Ito, T.

- Nagayasu, T. Matsuyama, H. Hayashi. Interferon regulatory factor-4 activates IL-2 and IL-4 promoters in cooperation with c-Rel. *Cytokine* 56, 564-572 (2011) 査読あり DOI:10.1016/j.cyto.2011.08.014.
- ⑥ H. Hayashi, T. Kohno, K. Yasui, H. Murota, T. Kimura, G.S. Duncan, T. Nakashima, K. Yamamoto, I. Katayama, Y. Ma, K.J. Chua, T. Suematsu, I. Shimokawa, S. Akira, Y. Kubo, T.W. Mak, T. Matsuyama. Characterization of dsRNA-induced pancreatitis model reveals the regulatory role of IFN regulatory factor 2 (Irf2) in trypsinogen5 gene transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 18766-18771 (2011) 査読あり DOI:10.1073/pnas.1116273108.
- ⑦ T. Kohno, Y. Kubo, K. Yasui, M. Haraguchi, S. Shigematsu, K. J. Chua, T. Matsuyama, H. Hayashi. Serum starvation activates NF-kB through G protein B2 subunit-mediated signal. *DNA Cell Biol.* 31, 1636-1644 (2012) 査読あり DOI:10.1089/dna.2012.1666.
- ⑧ H. Kamiyama, K. Kakoki, S. Shigematsu, M. Izumida, Y. Yashima, Y. Tanaka, H. Hayashi, T. Matsuyama, H. Sato, N. Yamamoto, T. Sano, Y. Shidoji, Y. Kubo. CXCR4-tropic, but not CCR5-tropic, human immunodeficiency virus infection is inhibited by the lipid raft-associated factors, acyclic retinoid analogs, and cholera toxin B subunit. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 29, 279-288 (2013) 査読あり DOI:10.1089/aid.2012.0174.
- ⑨ Y. Kubo, H. Hayashi, T. Matsuyama, H. Sato, N. Yamamoto. Retrovirus entry by endocytosis and cathepsin proteases. *Adv. Virol.* 2012, 640894 (2012) 依頼された総説 DOI:10.1155/2012/640894.
- [学会発表] (計 12 件)
- ① Y. Kubo. Murine leukemia virus in Japanese prostate cancer patients and its cell entry mechanism. The 8th Japan-China International Conference of Virology, Harbin, China, July 4-7, 2010.
- ② 久保嘉直、神山陽香、山本直樹。XMRV の XC 細胞におけるエンドソーム依存性かつ、その酸性化を必要としない感染機構について。第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、11 月 7-9 日、2010 年
- ③ 久保嘉直、吉居廣朗、神山陽香、田中勇、佐藤裕徳、山本直樹。カテプシン B は CD4 非依存性 HIV 感染感受性の重要な決定因子の 1 つである。第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、11 月 7-9 日、2010 年
- ④ 神山陽香、岩尾正倫、佐藤裕徳、山本直樹、久保嘉直。Tetherin の HIV-1 cell-cell transmission に及ぼす影響。第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、11 月 7-9 日、2010 年
- ⑤ K. Kakoki, H. Kamiyama, T. Igawa, H. Sakai, N. Yamamoto, Y. Kubo. XMRV infection alters cellular gene expressions in human prostate cancer LNCaP cells. XV International Congress of Virology, Sapporo, Japan, Sept. 11-16, 2011.
- ⑥ H. Kamiyama, Y. Kubo, H. Sato, N. Yamamoto, T. Fukuda, M. Iwao. Structure-activity relationship of anti-HIV-1 compound, lamellarin sulfates. XV International Congress of Virology, Sapporo, Japan, Sept. 11-16, 2011.
- ⑦ Y. Kubo, H. Kamiyama, K. Kakoki, T. Igawa, H. Sakai, N. Yamamoto. Unprocessed cathepsin L is active in XC cells in which XMRV infection is pH-independent. XV International Congress of Virology, Sapporo, Japan, Sept. 11-16, 2011.
- ⑧ K. Kakoki, T. Igawa, H. Sakai, H. Hayashi, T. Matsuyama, N. Yamamoto, Y. Kubo. XMRV infection confers androgen-dependent cell growth of a prostate cancer cell line, LNCaP, to androgen-independent. 23th Workshop on Retroviral Pathogenesis. Montpellier, France, Nov. 2-5, 2011.
- ⑨ 久保嘉直、神山陽香、鹿子木桂、田中勇、悦、林日出喜、松山俊文、佐藤裕徳、山本直樹。エンドソームに局在する宿主自然免疫因子による HIV-1 増殖抑制。第 25 回日本エイズ学会学術集会、東京、11 月 30 日-12 月 2 日、2011 年
- ⑩ S. Shigematsu, M. Izumida, H. Hayashi, T. Matsuyama, Y. Kubo. Role of SAM domain of SAMHD1 in its function as an innate immune factor against HIV-1 infection. Frontiers of Immunology in Health & Diseases, Cold Spring Harbor Asia Conference, China, Sept. 3-7, 2012.
- ⑪ 重松小百合、林日出喜、松山俊文、久保嘉直。SAMHD1 の HIV 感染抑制活性における SAM ドメインの機能。第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、11 月 13-15

- 日、2012年
- ⑫ 重松小百合、林日出喜、松山俊文、久保嘉直。SAMHD1のHIV感染抑制活性におけるSAMドメインの機能。第26回日本エイズ学会学術集会、横浜、11月24-26日、2012年

[図書] (計1件)

- ① Y. Kubo. Chapter 3. Retroviral membrane fusions: regulation by proteolytic processing and cellular factors. L.I. Larsson edited "Cell Fusion" Springer Press, 2011. <http://www.springer.com/biomed/book/978-90-481-9771-2>

[産業財産権]

○出願状況 (計3件)

名称：レトロウイルス感染抑制剤
発明者：久保嘉直、神山陽香
出願人：長崎大学、興和株式会社
種類：特許
番号：13/246,066
出願年月日：2011年9月27日
国内外の別：アメリカ

名称：レトロウイルス感染抑制剤
発明者：久保嘉直、神山陽香
出願人：長崎大学、興和株式会社
種類：特許
番号：特願2008-544091
出願年月日：平成19年9月20日
国内外の別：国内

名称：ウイルス感染症の予防又は治療剤
発明者：久保嘉直、神山陽香、鹿子木桂、松山俊文、林日出喜
出願人：長崎大学
種類：特許
番号：PCT/JP2012/078053
出願年月日：平成24年10月30日
国内外の別：国際

○取得状況 (計0件)

該当なし

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/mmi/cs/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保 嘉直 (Kubo, Yoshinao)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：30273527

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし