

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月25日現在

機関番号：17701  
 研究種目：挑戦的萌芽研究  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23659233  
 研究課題名（和文）HIV 潜伏感染細胞の活性化を標的としたエイズの病態制御に関する研究  
 研究課題名（英文）Investigation of the molecular targets for regulation of HIV-1 expression in latently infected cells  
 研究代表者  
 馬場 昌範（BABA MASANORI）  
 鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授  
 研究者番号：70181039

研究成果の概要（和文）：マイクロアレイ解析により潜伏感染細胞における HIV-1 発現に関する宿主因子の網羅的検索を行った結果、Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  刺激による HIV-1 産生誘導に伴い、15 個の宿主因子の遺伝子発現が有意に増加した。さらに、その遺伝子産物のうちの一つである Galectin-3 が HIV-1 潜伏感染細胞における NF- $\kappa$ B 活性化を介した HIV-1 発現増強に関与することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Microarray analysis revealed that 15 cellular factor genes were significantly upregulated along with HIV-1 expression in latently infected cells stimulated with TNF- $\alpha$ . Among the factors, Galectin-3 was found to promote HIV-1 expression through NF- $\kappa$ B activation in the cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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, 潜伏感染, 遺伝子発現, 宿主因子, 活性化

### 1. 研究開始当初の背景

現在の抗レトロウイルス療法 (antiretroviral therapy, ART) は、血漿 HIV-1 量を長期間抑制するが、潜伏感染細胞 (HIV-1 リザーバー細胞) には無効であるため、感染者体内から HIV-1 を完全に排除することはできない。潜伏感染細胞では、通常はインテグレートされた HIV-1 プロウイルス DNA の転写が抑制されている状態にあるが、TNF- $\alpha$  などのサイトカイン、熱ショック、紫外線などの刺激により HIV-1 転写が活性化される。潜伏感染細胞は主にメモリーTリンパ球であり、それらは寿命の長い細胞である。そのため、ART により血漿 HIV-1 量が検出限界以下となっても、ART を中断すると潜伏感染細胞から HIV-1 産生が開始され、再び血漿 HIV-1 量が増加する。従って、HIV-1 感染者は ART を生涯継続しなければならず、服薬率が悪ければ薬剤耐性 HIV-1 の発生、服薬率が良くとも長期使用による薬剤毒性の発現など様々な問題を抱えることとなる。現在、ART により HIV-1 感染者の長期生存が可能となったことから、

HIV-1 潜伏感染細胞に対する対策の必要性が増加している。

最近、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤を用いた、HIV-1 潜伏感染細胞を直接攻撃し一掃する新規戦略、いわゆる「shock and kill」の臨床応用の可能性も検討されてきている。その戦略においては、ART と違い、転写に関与する宿主因子をターゲットとしている。しかし、HIV-1 潜伏感染細胞における HIV-1 発現機構は、NF- $\kappa$ B を含めた様々な宿主因子が関与することが知られているが、未だ完全に解明されていない。

### 2. 研究の目的

HIV-1 潜伏感染細胞をターゲットとした治療法を確立するには、HIV-1 潜伏感染細胞における HIV-1 発現機構を完全に解明する必要がある。そこで本研究では、マイクロアレイ解析を用いて、潜伏感染細胞における HIV-1 発現に関与する宿主因子の網羅的検索を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞

本研究においては、骨髄球系細胞株である HL-60 細胞, HL-60 細胞を親株とする HIV-1 潜伏感染細胞株である OM-10.1 細胞, T 細胞株である CEM 細胞, および CEM 細胞を親株とする HIV-1 潜伏感染細胞株である ACH-2 細胞をアッセイに用いた。

#### (2) マイクロアレイ解析

OM-10.1 細胞に、各濃度の TNF- $\alpha$  を所定の時間作用させた。それらサンプルより抽出した RNA を用いて、アジレント社のマイクロアレイスキャナおよび Gene Spring 解析ソフトウェアを使用して解析を行った。

#### (3) HIV-1 および Galectin-3 発現の測定

各細胞に、種々の濃度の TNF- $\alpha$  を所定の時間作用させた。その後、各サンプルの生細胞率を色素法で判定した。また、各サンプルの培養上清を用いて enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法により HIV-1 p24 抗原量を測定することにより、各サンプルにおける HIV-1 産生量を測定した。さらに、各サンプルから抽出された RNA を用いて、リアルタイム RT-PCR 法により、HIV-1, Galectin-3, および glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) RNA の定量を行った。また、各サンプルから抽出された lysate および各抗体を用いて、Western Blot 法により、Galectin-3 および  $\beta$ -tubulin の発現について解析した。

#### (4) Galectin-3 ノックダウンおよびその効果の判定

エレクトロポレーション法により、各細胞にコントロールあるいは Galectin-3 small interfering RNA (siRNA) を導入した。その後、それらの細胞に図に示したとおり、各濃度の TNF- $\alpha$  を各時間作用させた。Galectin-3 ノックダウンの効率判定のため、各サンプルから抽出された RNA および lysate を用いて、上述のとおり、Galectin-3, GAPDH RNA の定量、および、Galectin-3,  $\beta$ -tubulin それぞれの蛋白発現について解析を行った。また、各サンプルの生細胞率および HIV-1 産生量を、上述のとおり測定した。さらに、各サンプルから核蛋白質を抽出し、Western Blot 法により、NF- $\kappa$ B および SP1 の発現について解析した。

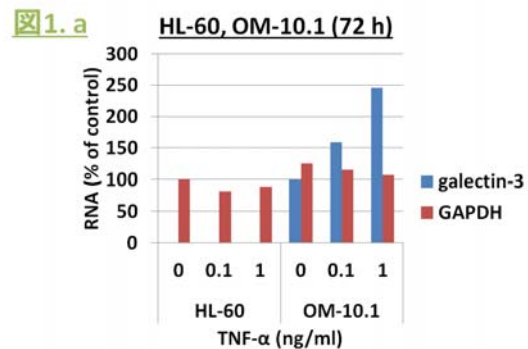
### 4. 研究成果

#### (1) 潜伏感染細胞における HIV-1 発現に関する宿主因子の網羅的検索

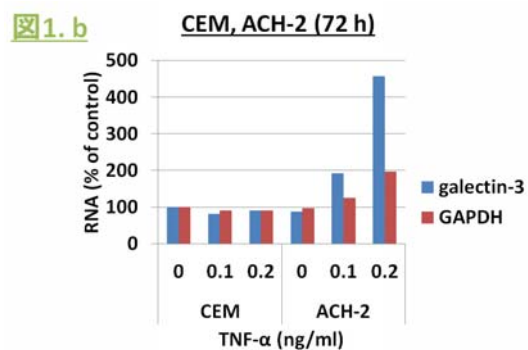
未処理の細胞と比較して TNF- $\alpha$  処理された OM-10.1 細胞では 15 個の宿主因子の遺伝子発現が有意に増加していた。それらの中には、時間依存性に発現が増強するものや周期的に発現が変動するものも含まれていた。

#### (2) HIV-1 潜伏感染細胞における Galectin-3 の発現

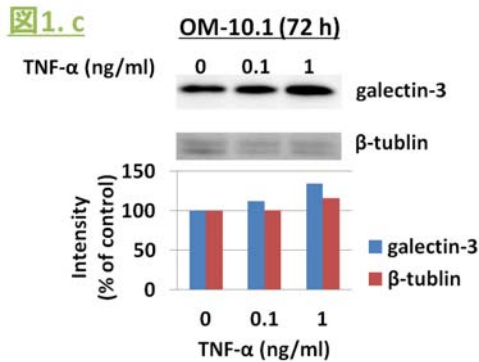
マイクロアレイ解析の結果、これまで HIV-1 潜伏感染との関連について報告がなかった Galectin-3 の遺伝子発現が、OM-10.1 細胞において TNF- $\alpha$  刺激により時間依存性に増強することを見いだした。Galectin-3 は  $\beta$ -galactoside に特異的に結合する lectin ファミリーの一つで、マクロファージや活性化 T 細胞を含む様々な細胞に発現し、細胞増殖、分化、アポトーシス、前炎症状態制御において重要な役割を果たし、癌、炎症、心疾患、脳卒中の病態に関与する。リアルタイム RT-PCR 法により OM-10.1 細胞およびその非感染細胞である HL-60 細胞における Galectin-3 RNA の定量を行った結果、OM-10.1 細胞では TNF- $\alpha$  の濃度依存性に Galectin-3 の RNA 発現が増強したが、HL-60 細胞では TNF- $\alpha$  刺激後も Galectin-3 RNA はほとんど発現していなかった (図 1. a)。



T 細胞系の潜伏感染細胞である ACH-2 細胞およびその非感染細胞である CEM 細胞を用いて同様の実験を行ったところ、ACH-2 細胞では OM-10.1 細胞以上に TNF- $\alpha$  の濃度依存性に Galectin-3 RNA の発現が著しく増強したが、CEM 細胞では Galectin-3 RNA の発現は低く TNF- $\alpha$  刺激の影響も認められなかった (図 1. b)。



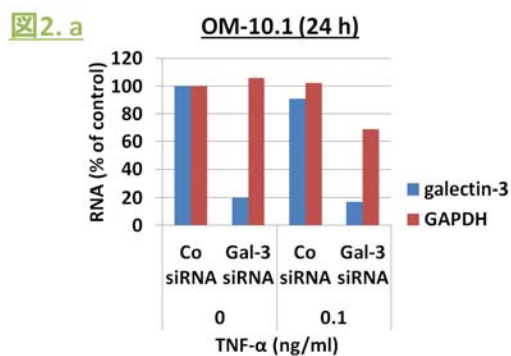
OM-10.1 細胞における Galectin-3 蛋白の発現について Western Blot 法で解析した結果、RNA 発現と同様に、TNF- $\alpha$  の濃度依存性に Galectin-3 蛋白発現の増強が認められた (図 1. c)。



これらの結果から、TNF- $\alpha$  刺激により HIV-1 潜伏感染細胞においては Galectin-3 発現が誘導されるが、非感染細胞では誘導されないことが明らかになった。

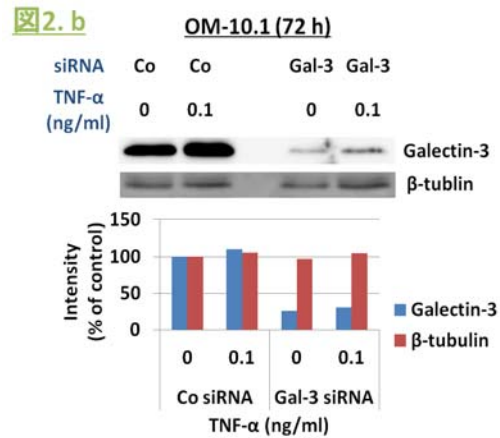
### (3) Galectin-3 ノックダウン

HIV-1 潜伏感染細胞では TNF- $\alpha$  刺激により HIV-1 産生が誘導される。そこで、潜伏感染細胞における TNF- $\alpha$  刺激により誘導された Galectin-3 発現の HIV-1 産生への影響を調べるため、OM-10.1 細胞において siRNA 法による Galectin-3 ノックダウンを行った。そのノックダウンの効率を調べるため、コントロールあるいは Galectin siRNA を導入された細胞において、Galectin-3 RNA および蛋白の発現を、リアルタイム RT-PCR 法および Western Blot 法により解析した。その結果、Galectin siRNA を導入した細胞ではコントロール siRNA を導入した細胞と比較して、RNA、蛋白のどちらにおいても、Galectin-3 発現が約 80% 抑制されており、非常に効率良く Galectin-3 発現がノックダウンされていることがわかった (図 2. a, b)。

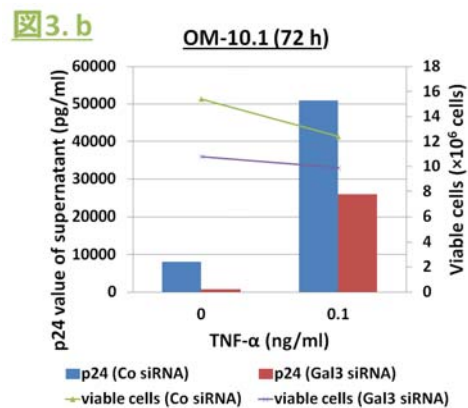
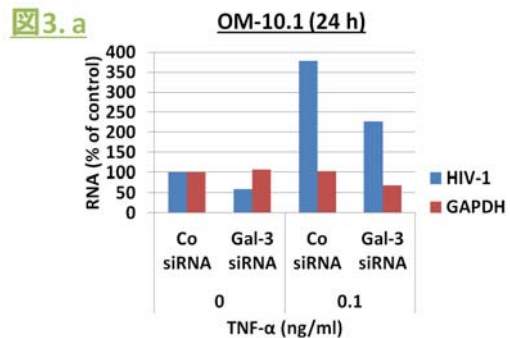


### (4) 潜伏感染細胞における HIV-1 発現に対する Galectin-3 ノックダウンの影響

siRNA 導入により Galectin-3 発現がノックダウンされている OM-10.1 細胞を用いて、HIV-1 発現に対する Galectin-3 ノックダウンの影響について解析を行った。その結果、Galectin siRNA を導入した細胞ではコントロ



ール siRNA を導入した細胞と比較して、TNF- $\alpha$  処理、未処理のいずれにおいても、HIV-1 RNA 発現、HIV-1 産生量のどちらも、Galectin-3 ノックダウンにより著しく減少することが明らかとなった (図 3. a, b)。



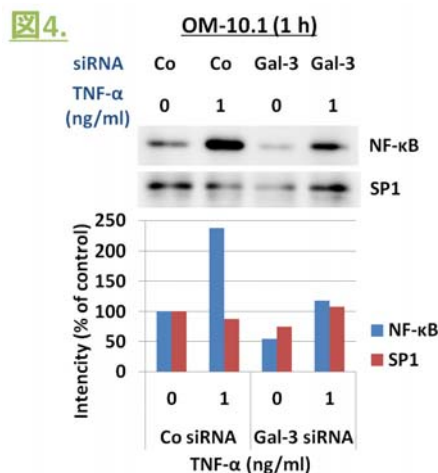
これらの結果から、Galectin-3 は HIV-1 潜伏感染細胞における HIV-1 発現に関与していると考えられた。

### (5) HIV-1 潜伏感染細胞における NF- $\kappa$ B 活性化に対する Galectin-3 ノックダウンの影響

HIV-1 潜伏感染細胞において、NF- $\kappa$ B は HIV-1 遺伝子の強力な転写活性化因子であることが知られている。NF- $\kappa$ B は通常、細胞質において I $\kappa$ B $\alpha$  と結合して存在しているが、TNF- $\alpha$  などの刺激により I $\kappa$ B $\alpha$  が変性すると



核内に移行し、HIV-1 遺伝子のプロモーター領域に結合して HIV-1 遺伝子の転写を活性化させる。Galectin-3 ノックダウンによって OM-10.1 細胞の HIV-1 発現が著しく減少したことから、NF-κB 活性化に対する Galectin-3 ノックダウンの影響について解析を行った。siRNA 導入により Galectin-3 発現がノックダウンされた OM-10.1 細胞から核蛋白質を抽出して、Western Blot 法により各サンプルの核蛋白質における NF-κB について解析した。その結果、OM-10.1 細胞において TNF-α 刺激により誘導された NF-κB の核内移行は Galectin-3 ノックダウンにより著しく阻害されることが明らかとなった (図 4)。



以上の結果から、Galectin-3 は HIV-1 潜伏感染細胞において、NF-κB 活性化を介して HIV-1 発現を促進していると考えられた。

#### 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 6 件)

1. Okamoto M, Chono H, Kawano Y, Saito N, Tsuda H, Inoue K, Kato I, Mineno J, Baba M. Sustained inhibition of HIV-1 replication by conditional expression of the *E. coli*-derived endoribonuclease MazF in CD4<sup>+</sup> T cells. *Hum. Gene. Ther. Methods* **24**: 94-103 (2013) doi: 10.1089/hgtb.2012.131, 査読有.
2. Hamasaki T, Okamoto M, Baba M. Identification of novel inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 replication by *in silico* screening targeting cyclin T1/Tat interaction. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**: 1323-1331 (2013) doi: 10.1128/AAC.01711-12, 査読有.
3. Ordonez P, Hamasaki T, Isono Y, Sakakibara N, Ikejiri M, Maruyama T, Baba M. Anti-human immunodeficiency virus type 1 activ-

ity of novel 6-substituted 1-benzyl-3-(3,5-dimethylbenzyl)uracil derivatives. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**: 2582-2589 (2012) doi: 10.1128/AAC.06307-11, 査読有.

[学会発表] (計 9 件)

1. 濱崎隆之, 岡本実佳, 馬場昌範. Tat 依存性の HIV-1 産生を抑制する新規低分子化合物の同定. 第 26 回日本エイズ学会学術集会, 2012 年 11 月 25 日, 横浜.
2. 馬場昌範. 核酸系逆転写酵素阻害薬フェスティナビル. 第 25 回日本エイズ学会学術集会シンポジウム「次世代の新薬の最新情報」, 2011 年 12 月 2 日, 東京.
3. Ordonez-Suarez P, Hamasaki T, Baba M, Okamoto M. Differential expression of host cellular factors upon HIV-1 reactivation. *24th International Conference on Antiviral Research*, May 9, 2011, Sofia, Bulgaria.
4. Okamoto M, Chono H, Tsuda H, Inoue K, Mineno J, Baba M. Long-term inhibition of HIV-1 replication in CD4<sup>+</sup> T cells transduced with a retroviral vector conditionally expressing the *Escherichia coli* endoribonuclease MazF. *24th International Conference on Antiviral Research*, May 9, 2011, Sofia, Bulgaria.
5. Hamasaki T, Okamoto M, Baba M. *In silico* screening of compounds targeting human cyclin T1 and *in vitro* evaluation of their anti-HIV-1 activity. *24th International Conference on Antiviral Research*, May 9, 2011, Sofia, Bulgaria.

[図書] (計 3 件)

1. 馬場昌範. 抗ウイルス薬の開発. 柳 雄介, 堤 裕幸 (編集)「新編 ウイルスの今日的意味」pp117-126, 医薬ジャーナル社 (2012).
2. 馬場昌範 (分担). ウイルス病の治療. 平松啓一 (監修), 中込 治, 神谷 茂 (編集) 標準微生物学 (第 11 版) pp.413-420, 医学書院 (2012).
3. 馬場昌範 (分担). ウイルス感染症の治療. 東 臣伸, 小熊恵二, 堀田 博 (編集) シンプル微生物学 (第 5 版) pp.262-268, 南江堂 (2011).

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 抗 HCV 薬  
 発明者: 馬場昌範, モハメド タハ アームド サリモ, 下茂徹朗, 武次祐樹  
 権利者: 国立大学法人鹿児島大学  
 種類: 特許  
 番号: 特開 2012-232955 号  
 出願年月日: 平成 23 年 5 月 9 日

国内外の別：国内

○取得状況（計 1 件）

名称：抗ウイルスヌクレオシド類似体および  
ウイルス感染特に HIV 感染の処置方法

発明者：田中博道，馬場昌範，チェン ユン  
ーチ

権利者：エール ユニヴァーシティ，田中博  
道，馬場昌範

種類：特許

番号：第 4980059 号

取得年月日：平成 24 年 7 月 18 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~ccvd/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

馬場 昌範 (BABA MASANORI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・  
教授

研究者番号：70181039

### (2) 研究分担者

岡本 実佳 (OKAMOTO MIKA)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・  
講師

研究者番号：90336347