

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：32624

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591486

研究課題名(和文) HIV-1 潜伏感染の新たな治療戦略の開発

研究課題名(英文) Development of new treatment strategies for HIV -1 infection

研究代表者

濱田 浩一 (HAMADA, Koichi)

昭和薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：00343070

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：エイズの治療を困難としている大きな理由にHIV-1の潜伏感染がある。現行の抗レトロウイルス多剤併用療法(cART)はエイズの発症を遅延させることができるが、潜伏感染しているHIV-1には無効であるため体内からウイルスを完全に除去することができない。PI3K/PTEN/GSK3 経路は様々な成長因子・増殖因子により活性化される。本研究では、PI3K/PTEN/GSK3 経路がHIV-1感染時に活性化されており、PI3K/PTEN-Akt/GSK3 経路の制御がHIVの感染および潜伏感染の再活性化に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The presence of latent viral infection has prevented the eradication of human immunodeficiency virus (HIV) from infected patients successfully treated with anti-retroviral therapy. Combination antiretroviral therapy (cART) can effectively suppress HIV-1 replication, but the latent viral reservoir is impervious to cART and represents a major barrier to curing HIV-1 infection. PI3K/PTEN/GSK-3 pathway is a critical role for cell proliferation and survival. In this study, we identified that PI3K/PTEN/GSK-3 pathway is necessary to HIV infection and reactivation.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HIV-1 潜伏感染 PI3K/PTEN

## 1. 研究開始当初の背景

エイズの治療を困難としている大きな理由に HIV-1 の潜伏感染がある。現行の抗レトロウイルス多剤併用療法 (cART) はエイズの発症を遅延させることができるが、潜伏感染している HIV-1 には無効であるため体内からウイルスを完全に除去することができない。従って潜伏感染期の HIV-1 複製の誘導もしくは抑制の分子メカニズムを解明することはエイズ撲滅のための最も重要な課題の一つであり、抗レトロウイルス多剤併用療法と組み合わせることにより新たな治療法に繋がる可能性がある (Trono D et al., Science, 2010)。

PI3K は様々な成長因子・増殖因子により活性化される。活性化された PI3K は、細胞膜構成成分であるホスファチジルイノシトール-4,5-二リン酸 (以下 PI(4,5)P<sub>2</sub>) のイノシトール環 3 位 (水酸基) をリン酸化し、ホスファチジルイノシトール-3,4,5-三リン酸 (以下 PI(3,4,5)P<sub>3</sub>) を産生する。PI(3,4,5)P<sub>3</sub> はセカンドメッセンジャーとして、Akt、GSK3 をはじめとする様々な下流の細胞内シグナル伝達分子を活性化することで細胞増殖、アポトーシス、代謝など多彩な細胞機能を制御する (Bunney TD et al., Nat.Rev.Cancer, 2010) (図 1)。一方、PTEN は、PI(3,4,5)P<sub>3</sub> を基質とする脂質ホスファターゼで、PI3K 経路を負に制御する癌抑制遺伝子である。PTEN は多くの悪性腫瘍で高頻度に遺伝子変異や欠損を認め、PTEN 蛋白発現低下～消失を含めると、PTEN の異常は全悪性腫瘍の約半数を占めることから、現在では p53 と並ぶ癌抑制遺伝子の代表格に位置づけられている。さらに近年 PI3K/PTEN-GSK3 シグナル分子が解糖系 (グルコース代謝) や ATP 産生を制御していること (Cairns RA et al., Nat Rev Can, 2011)、このシグナル経路の異常による解糖系の破綻は、癌の進展に非常に重要であることが報告されている (Christofk HR et al., Nature, 2008、Levine, AJ et al., Science, 2010)。

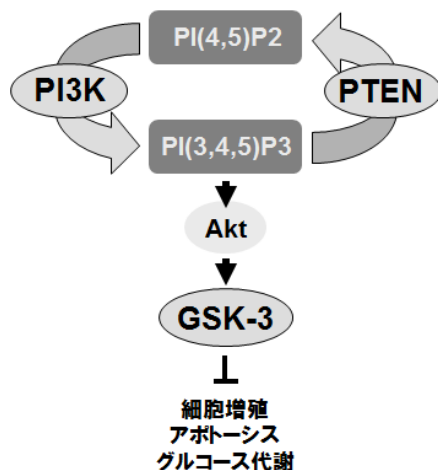


図1 PI3K/PTEN-GSK3シグナル経路

## 2. 研究の目的

抗レトロウイルス多剤併用療法により、AIDS 発症は劇的に低下したが、HIV-1 潜伏感染細胞を駆除できないことが大きな問題として残っている。

近年 HIV-1 潜伏感染細胞では、PI3K シグナルが恒常的に活性化していること (Tachado SD et al., JBC 2008)、PI3K のターゲット分子である Akt 阻害剤は HIV-1 のウイルス複製を抑制できること (Dunn EF et al., J Virol 2009) が報告されている。しかし、現在までに PI3K/PTEN-GSK3 シグナル経路による HIV-1 治療法に関する報告はまだない。そこで本研究では、PI3K/PTEN-Akt/GSK3 経路が HIV-1 の HIV の感染および潜伏感染の再活性化における役割を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) HIV-1 感染による PI3K/GSK3 経路の活性化: HIV-1 感染による PI3K/GSK3 経路の関与を調べるために、HIV-1 易感染性細胞 TZM-bl 細胞に HIV-1 を感染させ、その後経時的に蛋白質を回収し、ウエスタンブロットを行い Akt と GSK3 のリン酸化の変化を検討した。

(2) HIV-1 感染による PTEN 安定性の変化: TZM-bl 細胞に HIV-1 (JR-FL) を感染させ、その後経時的に蛋白質を回収し、ウエスタンブロットを行い PTEN タンパク質を検出することで安定性の検討を行った。

(3) HIV-1 潜伏感染細胞における PTEN の役割: 潜伏感染における PTEN の役割を検討するために、HIV-1 潜伏感染細胞 U1 細胞にレトロウイルスを用いて野生型 PTEN を感染させ、安定細胞株を樹立した。その後 HIV-1 を再活性化させるために TNF で刺激し、再活性化を定量するために HIV-1 特異的な細胞内 p24 タンパク質の免疫染色を行い、フローサイトメトリーにより蛍光強度を指標に解析を行った。

(4) HIV-1 潜伏感染細胞における GSK3 の役割: HIV-1 潜伏感染細胞における GSK3 の役割を検討するために、HIV-1 潜伏感染細胞 ACH2 細胞を GSK3 の阻害剤である CHIR99021 にて処理を行い、再活性化を定量するために HIV-1 特異的な細胞内 p24 タンパク質の免疫染色を行い、フローサイトメトリーにより解析を行った。

(5) HIV-1 再活性化におけるグルコース取り込みの変化: HIV-1 再活性化における代謝の変化を検討するために HIV-1 潜伏感染細胞 ACH2 細胞を TNF により刺激し、その後グルコースのアナログである 2-NBDG を細胞に取り込ませ、蛍光強度をフローサイトメトリーにより測定した。

## 4. 研究成果

(1) HIV-1 感染による PI3K/GSK3 経路

の活性化: HIV-1 易感染性細胞 T2M-bl 細胞に HIV-1 を感染させたところ、時間に依存して PI3K の下流分子である Akt および GSK3 のリン酸化が見られた (図 2)。

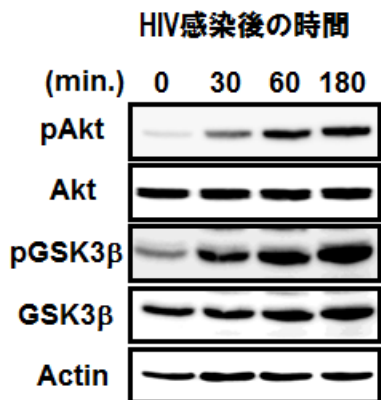


図2 HIV-1感染によるPI3K/GSK3βの活性化

(2) HIV-1 感染による PTEN 安定性の変化 : HIV-1 易感染性細胞 T2M-bl 細胞に HIV-1 を感染させたところ、時間に依存して PTEN 蛋白質量の低下が観察された (図 3)。

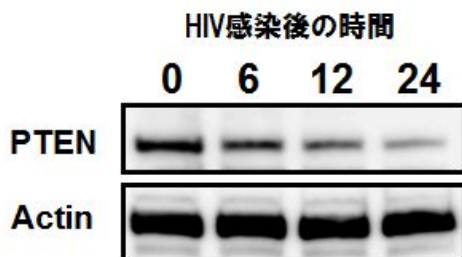


図3 HIV-1感染によるPTEN蛋白質の不安定化

(3) HIV-1 潜伏感染細胞における PTEN の役割 : レトロウイルスにより PTEN を発現させた HIV-1 潜伏感染細胞 U1 細胞では、TNF による HIV-1 の再活性化が抑制されていた (図 4)。

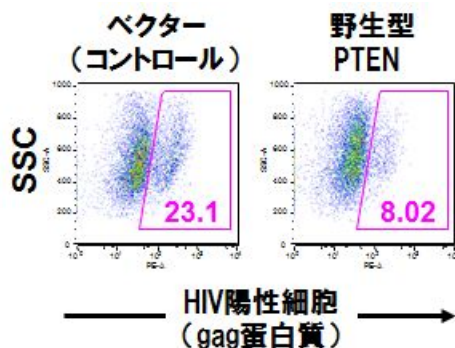


図4 外来性PTENによるHIV-1の活性化抑制

(4) HIV-1 潜伏感染細胞における GSK3 の役割 : GSK3 は PI3K の下流に位置し、HIV-1 再活性化に必要な転写因子 NF-κB を負に制御する分子である。そこで GSK3 の阻害剤である CHIR99021 で HIV-1 潜伏感染細胞 ACH2 細胞を処理したところ、HIV-1 再活性化が誘導できた (図 5)。

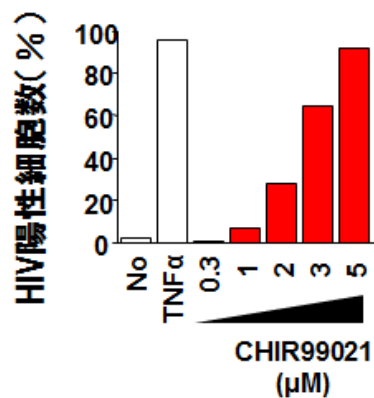


図5 GSK3阻害剤(CHIR99021)によるHIV-1再活性化の誘導

(5) HIV-1 再活性化におけるグルコース取り込みの変化 : TNF で ACH2 細胞の HIV-1 再活性化を誘導した後、グルコースのアナログである 2-NBDG を細胞に取り込ませ、蛍光強度をフローサイトメトリーにより測定したところ、再活性化後でグルコースの取り込みが亢進していた。(図 6)。

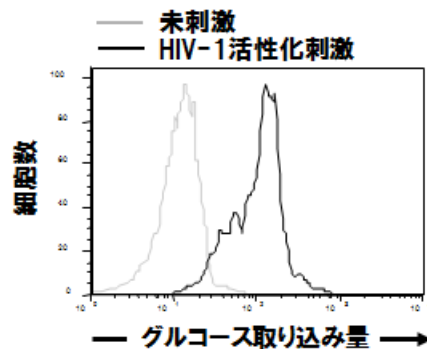


図6 HIV-1再活性化におけるグルコース取り込みの変化

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] 特になし

[学会発表] (計1件)

HIV 潜伏感染における PI3K/PTEN/GSK-3 シグナルの役割

濱田浩一、岡田誠治

第 85 回 日本生化学学会大会 平成 24 年 12  
月 16 日  
福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡県、  
福岡市)

〔図書〕特になし

〔産業財産権〕特になし

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱田 浩一 (HAMADA, Koichi)

昭和薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：00343070

(2) 研究分担者

なし

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし