

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 29 年度

受付番号 712

氏 名

小林 美栄

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地(派遣先国名) 用務地: バルセロナ (国名: スペイン)

2. 研究課題名(和文) ※研究課題名は申請時のものと違わないように記載すること。

HIV 由来アンチセンス鎖 RNA を標的とした新たな HIV 感染症治療基盤の開発

3. 派遣期間: 平成 29 年 8 月 2 日 ~ 令和 元年 8 月 1 日

4. 受入機関名及び部局名

ボンペウ・ファブラ大学、Experimental and Health Sciences 学部

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 書式任意(A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入也可)

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

1. 研究開始当初の背景

今日では抗 HIV 薬の多剤併用療法(cART)によりヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染者のエイズの発症を防ぐことが可能となったが、潜伏感染細胞は排除されないため根治できない。そこで近年、潜伏感染細胞内のウイルス発現を薬剤で再活性化させ、それらを cART や細胞傷害性 T 細胞(CTL)の働きにより排除する、“**Shock and kill**”という根治戦略が掲げられた。それに伴い、再活性化を誘導する薬剤(Latency Reversing Agents, LRAs)の探索ならびに再活性化メカニズムの解明をめざす研究が全世界で精力的に行われている。しかしながら、現状では潜伏感染細胞の再活性化を完全に誘導するには至っていない。これには、「潜伏感染制御」に関与する宿主・ウイルス因子の情報が断片的であり、その全貌が未だ明らかとなっていないことが一因している。

ここ数年で HIV の潜伏感染成立・維持における因子の新たな候補として HIV のアンチセンス鎖側から転写されてくる RNA(AS RNA)が注目されるようになってきている(図 1)。 gag や env, tat など、既知の HIV 因子は全て HIV ゲノム(プロウイルス)のセンス鎖側から 5'LTR の転写活性によって発現する。一方、本 AS RNA は 3'LTR の転写活性で発現する。派遣者らはこれまでに、HIV 由来 AS RNA の全長配列を明らかにし、AS RNA がセンス鎖 RNA の発現を抑制することを世界に先駆けて明らかにした(Kobayashi-Ishihara et al. Retrovirology, 2012)。また Scripps 研究所の Morris 教授のグループが派遣者らの提供した材料を用いて、AS RNA が HIV の転写をエピジェネティックに抑制する因子であると報告した。AS RNA からは HIV 株間で高度に保存された、Anti-Sense Protein (ASP)が翻訳されることが知られている。受入先研究者らのグループによって、約 34%の感染者で ASP に対する CTL や抗体が検出されることから、感染者で実際に ASP が発現していることが裏付けられている

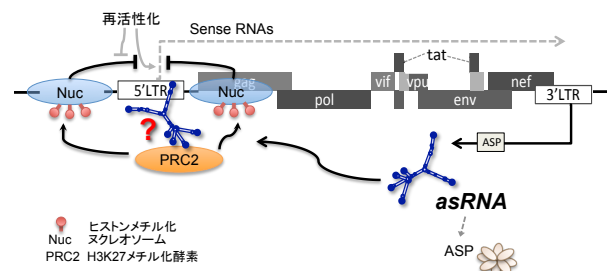


図1 HIVプロウイルスとasRNAによる潜伏感染の概念

(Berger, Meyerhans et al. J.Virol, 2015)。ASP の機能は未だ不明であるが、AS RNA のウイルス抑制能は RNA 自体の機能によるものであり、ASP はウイルス抑制には関与しないと考えている。

先行研究の結果から HIV 感染 T 細胞株集団において、AS RNA の発現レベルはセンス鎖 RNA の約 1/100～1/2500 であると思われ、その発現レベルの低さから、AS RNA 及び ASP の生理学的機能評価が難航している。特に従来の AS RNA 研究では感染細胞集団全体の AS RNA 発現量とセンス鎖 RNA 発現量を比較することで AS RNA の機能を探求してきた。しかしながら、たとえ細胞株に対する感染でも、個々の細胞によってセンス鎖 RNA の発現レベルは顕著に異なるため、AS RNA においても一部の感染細胞で限定的に発現しているのかもしれない。つまり、今後の研究進展のためには潜伏感染成立・維持過程におけるセンス鎖 RNA 発現と AS RNA 発現の関係を個々の細胞レベルで捉えることが必須であると申請者は考えた。

上記の背景から、AS RNA の HIV 潜伏化における役割とそのメカニズムを明らかにし、新たな HIV 感染症治療戦略につながる基礎的知見を得る。

2. 研究・調査実施状況

(1) 組み換えレポーターウイルス(rfl-HIV)を利用した AS RNA の発現動態と機能解析

派遣者は以前から受入先研究者との共同研究で潜伏感染成立・維持過程におけるセンス鎖 RNA 発現と AS RNA 発現の関係を探索してきた。当プロジェクトではセンス鎖及びアンチセンス鎖 RNA の転写レベルを異なる蛍光レポーターでモニターできる、組み換え HIV (rfl-HIV) を作出した。本ウイルスは野生型 HIV と類似した発現動態と AS RNA の機能を保持していた。T 細胞株に対する rfl-HIV 感染実験の結果、HIV 潜伏感染細胞には AS RNA を発現するものと発現しない細胞群の 2 つに分類できることが分かった。更にそれら 2 種の潜伏感染細胞を薬剤で刺激すると、AS RNA 発現潜伏感染細胞の再活性化レベルは著しく低かった。従って、AS RNA は一度プロウイルスから転写がされるとセンス鎖 RNA の転写が抑制され、再活性化をブロックする機能があると示唆された。本結果をまとめ、Frontier Microbiology 誌に発表した(項目 6, 業績 1)。

(2) AS RNA の転写制御系の解析

プロジェクト(1)の結果、AS RNA は潜伏感染維持に貢献していることが明らかとなった。さらに AS RNA が HIV 感染症治療ターゲットとなることが示唆された。例えば、AS RNA の転写を薬剤等で抑制することで”shock and kill”の効率を高めることができるかもしれない。あるいは、薬剤等で逆に AS RNA の転写を誘導し、潜伏感染細胞の再活性化を永久的に“封じ込める”ことができれば、現在の cART にとってかわる治療となるかもしれない。後者の治療戦略は”block and lock”療法としてごく近年

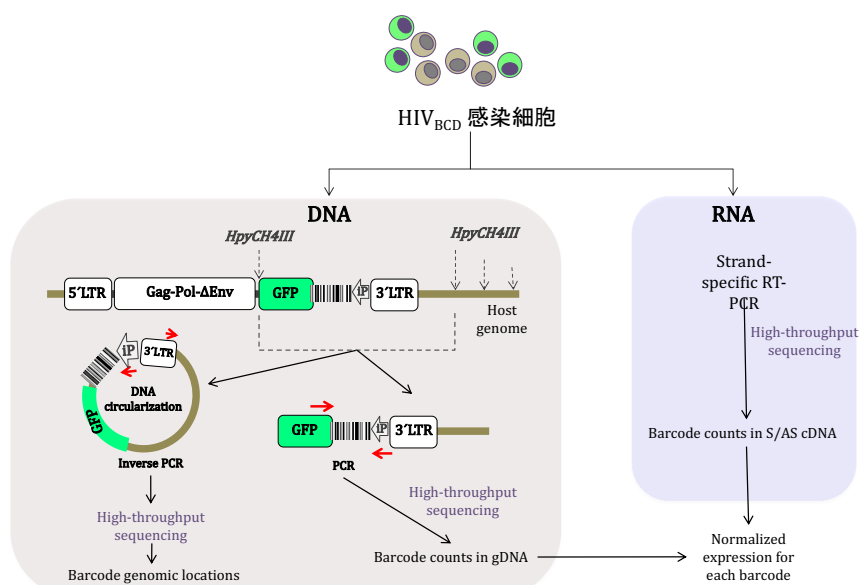


図2. B-HIVE解析の概要

掲げられ、有効な薬剤の探索が始まっている。概して、派遣者は AS RNA の転写制御の解明に重要性を感じ、本プロジェクトを始動した。

これまでの派遣者の研究結果、HIV LTR プロモーターの AS RNA 転写活性はセンス鎖 RNA の転写活性の 1/3 程度であり、また双方とも NF- κ B 活性に依存的であることが分かっている (Kobayashi-Ishihara et al. Retrovirology, 2012)。PMA や TNF- α 、HDAC 阻害薬である SAHA といった HIV 再活性化薬によって AS RNA の転写活性も促進されることも明らかである。しかしながら一部の潜伏感染細胞しか AS RNA を発現しない(項目 6, 業績 1)。一つの可能性として、HIV プロウイルスの組み込み部位(インテグレーションサイト)の違いが影響していると考えられる。

近年、受入先の研究グループでは B-HIVE という新たな解析法を開発することで、インテグレーションサイトによって潜伏感染維持の仕組みが異なることを明らかにした (Chen, Meyherhans et al. Nat. Struct. Mol. Biol. 2017)。そこで派遣者は本解析法を応用して、AS RNA の転写がインテグレーションサイト依存的か否かを検討する。B-HIVE では、ウイルスゲノムに

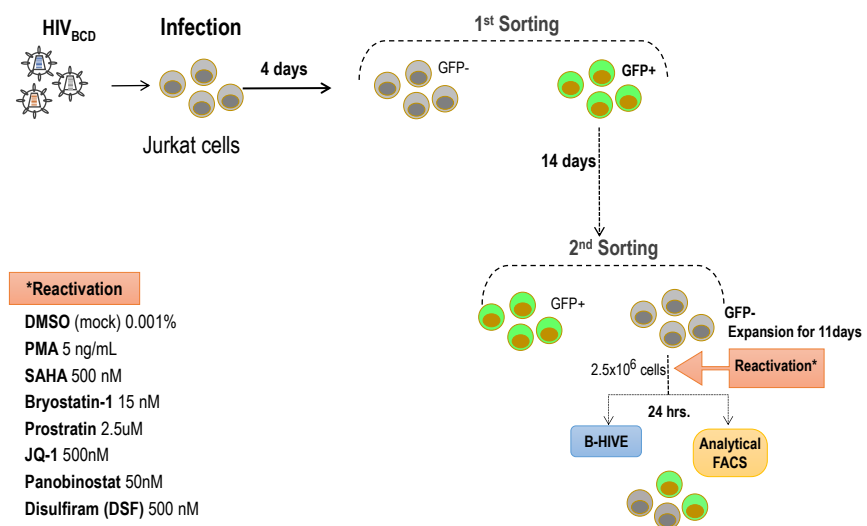


図3. HIV_{BCD}潜伏感染細胞の確立法

20 bp のランダムな配列(バーコード配列)を持った組み換え HIV(HIV_{BCD})を利用することが鍵である。HIV_{BCD}を細胞に感染させた後、本バーコード配列をシークエンスすることにより、感染細胞集団中の個々のウイルスを追跡することができる(図2)。本研究では、Jurkat T細胞に HIV_{BCD}を感染させ、本ウイルスに搭載された GFP 発現レベルをもとに潜伏感染細胞群(GFP 陰性細胞群)を cell sorter で分画した(図3)。得られた細胞群を様々な再活性化薬剤で処置した後、ゲノム DNA と RNA を抽出した。当 DNA と RNA をそれぞれ包括的にシークエンスすることにより、プロウイルスのインテグレーションサイト、およびそのプロウイルスの AS RNA の転写活性解析を試みた。しかしながら、AS RNA をシークエンスすることができなかった。理由として、GFP 陰性細胞群の感染細胞率が高々数パーセントであり、AS RNA 発現レベルが極めて低いことにあった。本改善点として、(1)のプロジェクトで利用した rfl-HIV にバーコード配列を挿入し、AS RNA 発現細胞群を濃縮する方法が挙げられる。しかしながら、本派遣期間内に達成することができなかった。

(3)新規 HIV restriction factor の同定及び機能解析

感染者体内の主要な潜伏感染の場となっているのは休止期 CD4⁺T 細胞である。本細胞の維持・増殖には IL-7 や IL-15 により促される、Homeostatic Proliferation (HSP) が重要な役割を果たしていることから、本増殖系が HIV 潜伏感染に及ぼす影響を調べた。派遣者らは、HIV 感染休止期 CD4⁺T 細胞を HSP 条件下、あるいは抗原刺激条件下(T細胞刺激+IL-2)で培養した。その結果、HSP 培養した休止期 CD4⁺T 細胞では HIV が再活性化しにくいこと、さらに HIV の転写後抑制に関わる機構が強く働いていることが示唆された(Tsunetsugu-Yokota et al., 2016)。この研究成果を受けて、当プロジェクトではどのような宿主因子が HIV の転写後抑制に貢献しているの

5. 所期の目的の遂行状況及び成果・つづき)

かを調べることを目的とした。そこで、1. RNA-seq による HIV 制御因子の候補遺伝子の特定、及び 2. 候補遺伝子 Schlafen12 (SLFN12)による HIV 転写後抑制メカニズムの解明を行った。

目的 1 のため、HSP 培養した休止期 CD4+T 細胞のトランスクリプトーム解析を行った。抗原刺激培養した場合のトランスクリプトームに対し、648 遺伝子が優位に発現上昇していることが分かった。そのうち、HIV 制御因子の候補として SLFN12 に着目した。本遺伝子は SLFN 遺伝子群に属し、この遺伝子群に属する他の遺伝子には抗ウイルス活性を持つものも同定されていたためである。

次に目的 2 のため、SLFN12 を過剰発現あるいはノックダウンした HIV 感染細胞株を用いて、HIV 制御メカニズムを調べた。本研究結果、SLFN12 は特定の tRNA を分解することによって HIV タンパク質の合成を特異的に抑制していることがわかった。現在、論文投稿の準備を進めている。

3. 成果の発表状況

前述の通り、プロジェクト(1)の結果をまとめ、Frontier Microbiology 誌に発表した(項目 6, 業績 1)。さらに本論文の結果を多くの人に知ってもらうため、ポンペウ・ファブラ大学のホームページに論文解説を英語・スペイン語・カタルーニャ語にて発表した(項目 9 参照)。

プロジェクト(3)の研究成果を国際学会にて口頭発表した (11th International meeting of Global Virus Network)。