

学位論文題名

Extracellular Nef protein regulates productive HIV-1 infection from latency

(遊離型HIV-1 Nef蛋白質による細胞内潜伏HIV-1の活性化)

学位論文内容の要旨

ヒト免疫不全ウイルス1型(HIV-1)は、後天性免疫不全症候群(AIDS)の原因ウイルスである。HIV-1感染からAIDS発症へと向かう病態進行は、HIV-1の主な宿主細胞であるCD4陽性細胞の減少と密接な関わりを持つことが明らかにされている。HIV-1感染個体は、一過性の急性感染期を経た後、約10年にも及ぶ長い無症候(AC)期に入る。AC期におけるHIV-1感染細胞の割合は比較的高い値を示す一方、血中より分離されるウイルス力価はAIDS期のそれと比較して低い値を示す。このことからAC期におけるHIV-1の感染様式はウイルス抗原レベルの低い、いわゆる潜伏感染状態であることが予想される。HIV-1潜伏感染細胞では、ウイルス抗原は主に転写レベルで抑制されており、サイトカインや他のウイルス感染などの刺激により活性化されることが様々な実験により証明されている。

HIV-1は、構造遺伝子(*gag*, *pol*, *env*)、調節遺伝子(*tat*, *rev*)、およびアクセサリー遺伝子(*vif*, *vpr*, *vpu*, *nef*)によって構成されている。ウイルス複製のためには、ウイルス粒子を構成する構造遺伝子とウイルス遺伝子発現を制御する調節遺伝子が必須であるが、アクセサリー遺伝子は必ずしも必要ではない。一方、*vpr*と*nef*の機能として、サル免疫不全ウイルス(SIV)を用いた実験よりAIDS発症に必要であることが示されている。このような背景から、これらアクセサリー遺伝子、特に*vpr*および*nef*のAIDS発症に及ぼす機能解明が急がれている。現在までに明らかにされた機能として、*Vpr*が細胞周期のG2アレストを誘導すること、*Nef*のN末端がHIV-1のレセプターであるCD4分子のdown-regulationを誘導すること、および*Nef*のN末端と中央部のPXXPドメインと呼ばれる領域が末梢血におけるウイルス複製を正に制御していることなどが挙げられる。さらに、細胞外からの遊離型*vpr*蛋白質による刺激によって、細胞内潜伏HIV-1が活性化されることが明らかにされた。一方我々は、現在までに、*Nef*蛋白質がHIV-1感染細胞表面に発現されること、および*Nef*蛋白質が非感染細胞表面に結合することにより、HIV-1の細胞間伝播を促進することを報告してきた。そこで今回我々は、*Nef*蛋白質を細胞外からHIV-1潜伏感染細胞に加えることにより、潜伏ウイルスの活性化が起こるかどうかについての検討を行った。

潜伏感染モデル細胞として、世界的に広く用いられているACH2細胞とU1細胞(それぞ

れCEM細胞とU937細胞にHIV-1 LAI株が持続感染したクローン細胞)、および今回新たに分離したMOLT-20-2細胞(MOLT-4細胞にHIV-1 NL43株が持続感染したクローン細胞)を用いた。これらの細胞は、未刺激状態では全体の5%以下の細胞がHIV-1抗原を発現しているにすぎないが、細胞をフォルボルエステル(PMA)、カルシウムイオノフォア(A23187)または腫瘍壊死因子 α (TNF- α)で刺激することにより、ほとんど全ての細胞にHIV-1抗原を発現する。そこで、これらの細胞上清中に大腸菌で発現させたHIV-1 Nef蛋白質(GSTとの融合蛋白質として発現させたものをプロテアーゼ処理してGST部分とNef部分に切断した後、精製したもの)を最終濃度50 μ g/mlで加え、4日後におけるHIV-1抗原発現を抗Gag p24モノクローナル抗体(V107)を用いた間接抗体染色(IF)法により観察した。上記の3種の潜伏感染細胞のうち、U1およびMOLT-20-2細胞においてHIV-1抗原発現細胞数の上昇(共にほぼ100%の細胞がHIV-1抗原を発現)が観察された。このような活性はGSTとの融合蛋白質の状態(GST-Nef)では低く、コントロールとして用いたGST蛋白質では見られなかった。MOLT-20-2細胞におけるウイルス抗原陽性細胞数の上昇は加えるNef蛋白濃度に依存しており、NefのC末端部分を認識する抗体によって阻害された。次に、Nef蛋白質内の活性部位を検索するために、Nefのアミノ酸配列に従って14種類のペプチドを合成し、MOLT-20-2細胞に添加した。その結果、Nefの132-147アミノ酸に対応するペプチドを加えたときにおいて、HIV-1抗原発現の上昇が観察された。

以上のようなNef蛋白質によるHIV-1活性化が感染者においても起こりうるかどうかを検討するために、2名のHIV-1感染者(いずれもAC期で、うち1名が血友病由来)から末梢血単核球(PBMC)を分離し、その培養上清中にNef蛋白質を添加した。その結果、いずれの検体においても、加えたNef蛋白質の濃度に依存してHIV-1の活性化(培養上清中のHIV-1ウイルス量の増加)が観察された。

以上の結果より細胞外からHIV-1 Nef蛋白質を加えることにより、細胞に何らかのHIV-1 活性化シグナルが誘起されることが示唆された。このような活性は、細胞種依存的であったが、HIV-1感染者由来PBMCにおいても観察されたことから、HIV-1感染者体内でも起こっている可能性が示唆された。今回明らかになった、潜伏ウイルスの活性化に関わるNef蛋白質の機能は、本研究により初めて明らかになったものであり、野生型SIV接種サルが*nef* 欠損型SIV接種サルに比べて高いウイルス負荷を維持し、AIDS発症へ進行するというKestlerらの実験結果(Kestler, H. W., III et al. *Cell*, 65, 651-662, 1991)を理解する上で重要であると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 長 嶋 和 郎

副 査 教 授 高 田 賢 藏

副 査 教 授 生 田 和 良

学 位 論 文 題 名

Extracellular Nef protein regulates productive HIV-1 infection from latency

(遊離型HIV-1 Nef蛋白質による細胞内潜伏HIV-1の活性化)

ヒト免疫不全ウイルス1型(HIV-1)は、後天性免疫不全症候群(AIDS)の原因ウイルスである。HIV-1感染からAIDS発症へと向かう病態進行は、HIV-1の主な宿主細胞であるCD4陽性細胞の減少と密接な関わりを持つことが明らかにされている。HIV-1感染個体は、一過性の急性感染期を経た後、約10年にも及ぶ長い無症候(AC)期に入る。AC期におけるHIV-1感染細胞の割合は比較的高い値を示す一方、血中より分離されるウイルスカ価はAIDS期と比較して低い値を示す。このことからAC期におけるHIV-1の感染様式はウイルス抗原の発現レベルが低い、いわゆる潜伏感染状態であることが予想される。HIV-1潜伏感染細胞では、ウイルス抗原は主に転写レベルで抑制されており、サイトカインや他のウイルス感染などの刺激により活性化されることが様々な実験から証明されている。HIV-1がコードする9つの遺伝子(*gag*, *pol*, *env*, *tat*, *rev*, *vif*, *vpr*, *vpu*, *nef*)のうち、*vpr*と*nef*の機能として、サル免疫不全ウイルス(SIV)を用いた実験よりAIDS発症に必要であることが示されている。このような背景から、これらアクセサリ遺伝子、特に*vpr*および*nef*の、AIDS発症に及ぼす詳細な機能解明が急がれている。現在までに報告された機能のうちウイルス活性化に関係するものとして、細胞外からの遊離型Vpr蛋白質による刺激によって、細胞内潜伏HIV-1が活性化されることが明らかにされている。一方我々は、現在までに、Nef蛋白質がHIV-1感染細胞表面に発現されること、およびNef蛋白質が非感染細胞表面に結合することにより、HIV-1の細胞間伝播を促進することを報告してきた。そこで今回申請者は、Nef蛋白質を細胞外からHIV-1潜伏感染細胞に加えることにより、潜伏ウイルスの活性化が起こるかどうかについての検討を行った。潜伏感染モデル細胞として、世界的に広く用いられているACH2細胞とU1細胞、および今回新たに分離したMOLT-20-2細胞(MOLT-4細胞にHIV-1 NL43株が潜伏感染したクローン細胞)を用いた。これらの細胞は、未刺激状態では全体の5%以下の細胞がHIV-1抗原を発現しているにすぎないが、細胞をフォルボールエステル(PMA)、カルシウムイオノフォア(A23187)または腫瘍壊死因子 α (TNF- α)で刺激することにより、ほとんど全ての細胞にHIV-1抗原の発現を誘導できる。そこで、これらの細胞上清中に大腸菌で発現させたHIV-1 Nef蛋白質

を最終濃度50 μ g/mlで加え、4日後のHIV-1抗原発現を抗Gag p24モノクローナル抗体(V107)を用いた間接蛍光抗体染色法により観察した。上記の3種の潜伏感染細胞のうち、U1およびMOLT-20-2細胞においてHIV-1抗原発現細胞数の上昇が観察された。MOLT-20-2細胞におけるウイルス抗原陽性細胞数の上昇は、加えるNef蛋白濃度に依存しており、NefのC末端部分を認識する抗体によって阻害された。このようなNef蛋白質によるHIV-1活性化が感染者においても起こりうるかどうかを検討するために、2名のHIV-1感染者(いずれもAC期で、うち1名が血友病患者由来)から末梢血単核球を分離し、その培養上清中にNef蛋白質を添加した。その結果、いずれの検体においても、加えたNef蛋白質の濃度に依存してHIV-1の活性化(培養上清中のHIV-1ウイルス量の増加)が観察された。

以上の結果より細胞外からHIV-1 Nef蛋白質を加えることにより、細胞に何らかのHIV-1活性化シグナルが誘起されることが示唆された。このような活性は本研究により初めて明らかになったものであり、野生型SIV接種サルが*nef*欠損型SIV接種サルに比べて高いウイルス負荷を維持し、AIDS発症へ進行するというKestlerらの実験結果(1991)を理解する上で重要であると考えられる。

公開發表にあたり、免疫科学研究所細菌感染部門の岸助教授より、Nefによる刺激に関わると考えられるウイルス側、細胞側のファクターの細胞株間の違いについて、柿沼教授よりGST-Nefを用いた場合の結果の解釈について、副査の高田教授より潜伏感染を成立させる要因について、活性化状態の蛍光抗体の強度に違いがみられた理由、Nefレセプターとして同定した分子とCD4分子との関連性について、大腸菌発現Nef蛋白とNef関連合成ペプチドの活性の違いについて、AIDS発症におけるNefの潜伏ウイルス活性化能の役割について、ウイルスキャリアにおける*nef*遺伝子変異の報告例について、主査の長嶋教授より患者の中でフリーのNefが存在する可能性、TNF- α とNefの刺激機序の違いについて、*src*関連蛋白の検索について、Grb 2に注目した理由、また副査の生田教授から一般的に了解されているAIDS発症と関連するマーカーについて、などの質問がなされたが、発表者はおおむね妥当な回答を行った。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。