

課題番号 : 29指1003  
研究課題名 : HIV-1潜伏感染病態の理解とバイオマーカーの導出  
主任研究者名 : 石坂幸人  
分担研究者名 : 志村まり

キーワード : HIV-1、潜伏感染、HAND、悪性リンパ腫、ウイルス蛋白質  
研究成果 :

抗エイズ薬 (cART) によって、ヒト1型免疫不全ウイルス (以下 HIV) 感染者の予後は著しく改善したが、cART を中断すると速やかにウイルス産生が再開することから、cART 下でもウイルス産生が継続的に生じている「聖域」の存在が提唱されるようになってきている。また、近年、HIV 感染者は、健常人と比較して、老化が5年ほど進んでいることや (Boulias et al., 2016)、HIV 患者における心血管障害 (Cardiovascular Disease: CVD) も依然、臨床上の課題になっている。即ち、血中ウイルス価が検出限界以下を示す一見、臨床的に良くコントロールされている症例でも、ウイルス産生に伴う炎症やウイルス蛋白質による影響を持続的に受けている可能性が考えられる。以上を背景として、本課題では、潜伏感染状態を把握するための客観的な情報を得ることを目的として、患者血中に存在するサイトカインを網羅的に解析し、潜伏感染病態と関連する分子を把握する。研究代表者は先行研究で、患者血中にアクセサリ蛋白質である Vpr が検出され血中 Vpr 蛋白質が機能性を示すことも明らかにした。そこで、本課題の第二の課題として、Vpr 蛋白質をマウスに投与した際に惹起される生体反応を明らかにし、検出されるサイトカイン産生との関連性の有無を明らかにする。

a. ルミネックス法を用いた抗エイズ薬を服用中の患者血中のサイトカインの把握

ルミネックス (=マルチプレックス) によるサイトカインの網羅的解析を応用し、ACC バイオバンクで保管されている血清検体を用いて行う。ルミネックスは、抗体を使用したサンドイッチ法で、基本的には ELISA と同様な原理であるが、検体 25 $\mu$ L で最大 100 種まで解析可能である点が特徴である (スライド-1 参照)。これまでルミネックスを用いて得た解析データが複数報告されているが、使用したキット間でどの様なバラツキがあるかに関しては、解析されて来なかった。そこで、初期段階の解析として、ルミネックスを扱う 3 社の IL8, IL12p40, Mip1beta を含む検出系について、同血清検体 (HIV 感染者 10 名、健常人 10 名) を用いて得られるデータについて、比較した。その結果、得られた定量値や検量線は、会社により様々に異なることが分かった (スライド-2 参照)。今後、最適な解析キットを用いて、患者血中サイトカインの網羅的解析を行う。

b. 患者血中に検出される Vpr による病態の誘発

血中 Vpr の生体に与える影響を調べるため、マウスに組み換え Vpr 蛋白質 (rVpr) を長期間投与し、各臓器や組織について調べた。組み換え rVpr 蛋白質は、コムギ胚芽無細胞システムで発現した後、Vpr に対する単クローン抗体を用いたアフィニティーカラムで精製した。rVpr を 15 $\mu$ g/kg の用量でマウスに隔日 1 回、計 34 回腹腔内投与し、採取した各臓器・組織を用いて、老化関連マーカーである SMP30 (Senescence Marker Protein-30) mRNA の発現解析を行った。その結果、心臓組織において、発現量が低下することが分かった。また、心臓組織切片への SA- $\beta$ -gal

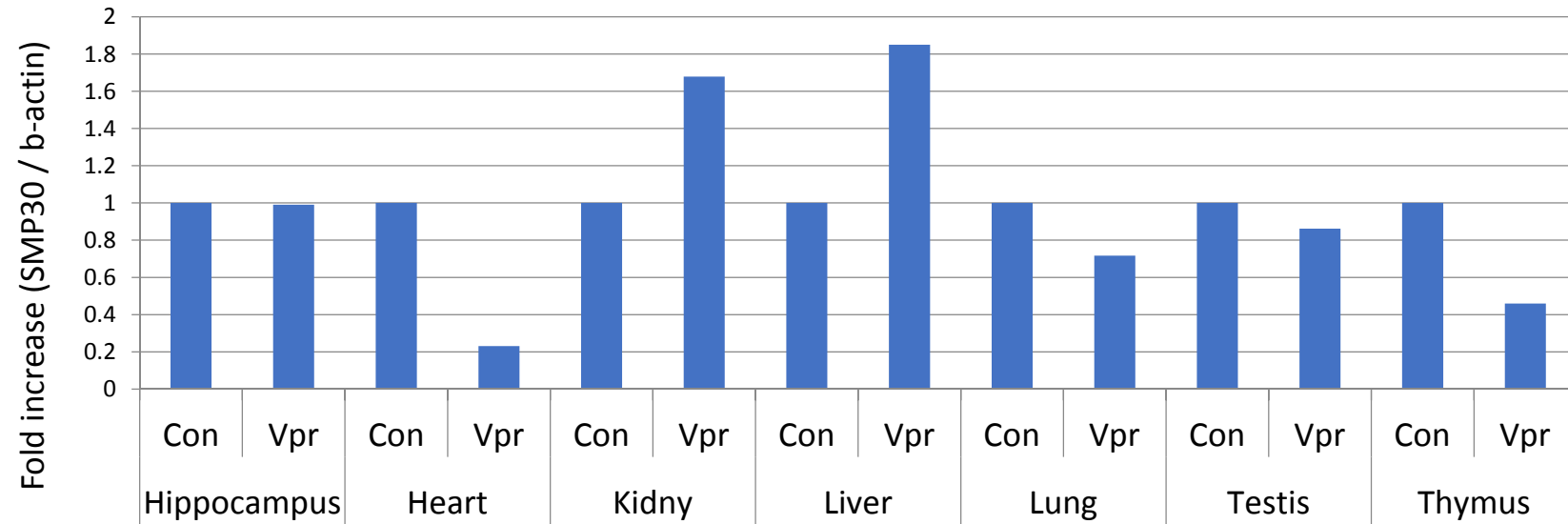
(senescence-associated beta-galactosidase) 染色を行ったところ、rVpr 投与群でシグナルの増加が確認された。以上の結果から、rVpr の長期投与は、マウス心臓での老化を促進させることが示唆される。今後、心血管組織の損傷マーカーである p53 の発現を調べるとともに、その分子機序を明らかにする予定である。

Subject No. : 29A-1003  
Title : Pathological conditions of latent HIV-1 infection and identification of its biomarkers  
Researchers : Yukihiro Ishizaka, Mari Shimura  
Key word : HIV-1, Latent infection, HAND, malignant lymphomas, viral proteins  
Abstract :

Combined antiretroviral therapy (cART) for human immunodeficiency virus-1 (HIV) can suppress the viral replication to a non-detectable level in the HIV-positive patients, and prevent immunodeficiency caused by T-cell depletion. After interruption of the cART regimen, however, viral replication can easily resume from the long lived reservoir cells. *Viral protein R (Vpr)*, an accessory gene of HIV, encodes a virion-associated nuclear protein of 96 amino acids, and is proposed to facilitate viral infection into macrophages. Structural analyses revealed that Vpr contains three  $\alpha$ -helices with a self-dimerization/oligomerization feature and a flexible carboxyl (C)-terminal region that has a basic amino acid stretch with DNA binding activity. Vpr possesses pleiotropic functions for stimulating the viral replication in multiple steps. Notably, lines of evidence indicate that Vpr is found in blood of HIV patients, although serum viral titers in those patients are non-detectable. Moreover, Vpr in patients blood is biologically active for induction of retrotransposition of interspersed nuclear element-1 (L1-RTP). Recently, it was reported that DNA methylation pattern of peripheral blood cells indicate that aging of the patients is 5-year advanced, compared to healthy humans, and HIV patients suffer from cardiovascular diseases (CVD), implying the possibility that blood circulating viral proteins are involved in the pathogenesis of HIV patients especially under latent infection phase. Based on these observations, we started to study the effects of Vpr on tissues, especially on heart tissue.

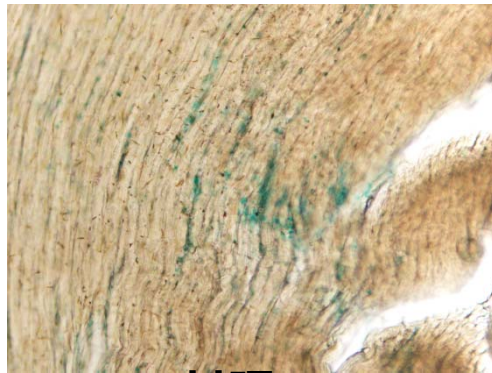
A recombinant protein of Vpr (rVpr) was expressed by wheat germ extracts, and purified by an affinity chromatography of monoclonal antibody to Vpr. After repetitive injections of rVpr three times a week, we examined mRNA expression of *SMP30*, the marker gene of senescence by quantitative reverse transcription followed by PCR (qRT-PCR) analysis. Interestingly, the expression of *SMP30* mRNA was reduced in heart after 6 week of the initial rVpr injection (Figure1). Moreover, senescence associated  $\beta$ -galactosidase expression was increased by rVpr administration. Additionally, copy numbers of L1 were increased after rVpr administration. Because L1-RTP induces expression of inflammatory cytokines, and can induce tissue damage, our current observations suggest that rVpr induces tissue senescence via the induction of L1-RTP. Further studies are ongoing to clarify the involvement of L1-RTP associated inflammation signals are reputed to aging of heart.

**図 1 : Vprの長期間歇投与は、老化関連マーカーである SMP30の心臓での発現を低下させる**

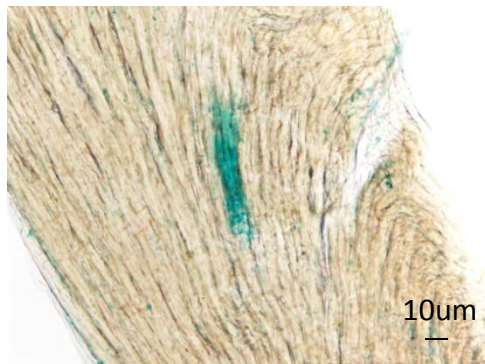


**図 2 : rVprはマウス心の老化を誘導するとともに  
レトロトランスポジションを惹起する**

**SA- $\beta$ -Gal staining**

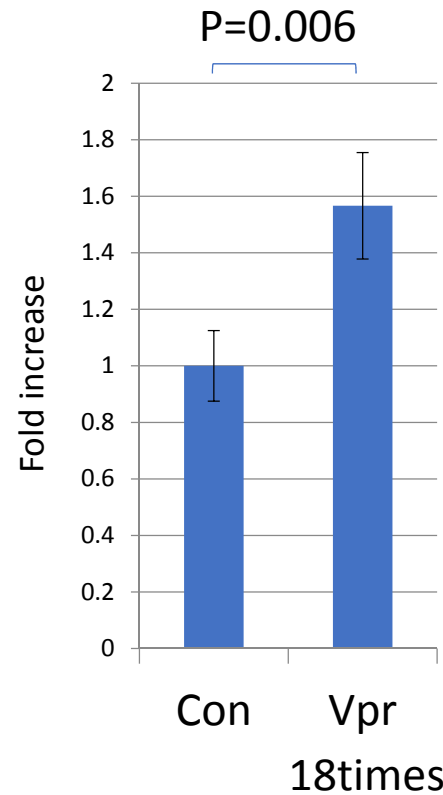


対照



Vpr 18 回投与

**L1 copy numbers**



課題番号 : 29指1003

研究課題名 : Non-AIDS症例を用いた網羅的サイトカインの検出

主任研究者名 : 石坂幸人

分担研究者名 : 志村まり

キーワード : 網羅的サイトカイン, multiplex, HIV, cART

研究成果 :

近年 HIV 感染者の多くが抗エイズ治療 (cART) を施され Non-AIDS 症状を示す中、依然、心血管障害や発癌率が高いなどの報告が多く、感染者の慢性炎症は否定できないと考える。本研究ではサイトカインを網羅的に測定し、cART 治療下の感染者の免疫状態を明らかにすることを目的とする。

測定は、ルミネックス (=マルチプレックス) によるサイトカインの網羅的解析を応用し、ACC バイオバンクで保管されている血清検体を用いて行うこととした。ルミネックスは、抗体を使用したサンドイッチ法であることから、基本的には ELISA と同様な原理であるが、検体 25uL で最大 100 種まで解析可能な点が、希少検体では有用である (スライド参照)。一方、どの程度正確にそれぞれのサイトカインが定量できているのかは、論文報告でも明言されていない。リコンビナントタンパク質を用いた報告は各社より公開されているが、臨床検体では不明である。そこで、3社の IL8, IL12p40, Mip1beta を含むルミネックスについて、同血清検体 (HIV 感染者 10 名、健常人 10 名) を用いて比較検討してみた。供給された定量値や検量線は、会社により様々であった (スライド参照)。そこで、検量線の直線域外で定量値を除外すると、IL8 においては、どの会社のルミネックスも近い値を示していた。ELISA 同様、ルミネックスで得られた値は、検量線直線域からの定量値が肝要と考える。一方、直線域を離れても相対関係は保たれている場合もあり、定量には不向きでも、相対比較には可能なサイトカインも存在した。

以上より、本研究では、検量線の直線域がより広域で、測定値の範囲内にあったサイトカイン、**AAT, A2Macro, B2M, BDMF, C3, Eotaxin-1, Haptoglobin, Factor VII, FRTN, ICAM-1, IL-1ra, IL-8, IL-10, IL-12p40, IL-18, IL-23, CRP, MIP-1beta, MMP3, MCP1, SCF, RANTES, TMP-1, TNFR2, VCAM-1, VEGF, vWF** の 27 種を選択し、HIV 感染者 130 名 (cART 未治療 10 名を含む)、年齢性別が合致している健常コントロール 20 名の血清について測定した。測定値について、多変量解析のうち主成分分析を施行した。健常者のサイトカインのばらつきは小さいが、HIV 感染者のばらつきは、より大きい結果となった。結果は、健常者はホメオスタシスにより、比較的安定な免疫状態にあることを示唆している。今後、感染者のばらつきが何に依存しているのかについて、対応する臨床情報を調べ明らかにし報告する。

研究発表及び特許取得報告について

課題番号： 29A-1003

研究課題名： HIV-1潜伏感染病態の理解とバイオマーカーの導出

主任研究者名： 石坂幸人

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
Identification of a cell-penetrating peptide applicable to a protein-based transcription activator-like effector expression system for cell engineering.	Takashina T, Koyama T, Nohara S, Hasegawa M, Ishiguro A, Iijima K, Jun L, Shimura M, Okamoto T, Sakuma T, Yamamoto T, Ishizaka Y	Biomaterials	173	2018
Structural alterations of DNA induced by viral protein R of HIV-1 trigger the DNA damage response.	Iijima K, Kobayashi J, Ishizaka Y	Retrovirology	15	2018
Thioacetamide-induced hepatic fibrosis in the common marmoset.	Inoue T*, Ishizaka Y*, Sasaki E, Ro G, Mineshige T, Yanase M, Sasaki E, Shimoda M	Exp. Anim.		in press

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
HIVアクセサリータンパクVpr投与によって誘導されるマウス心臓老化とレトロトランスポゾンlong interspersed nuclear element-1	上野 美華子、石黒 亮、石坂幸人	第40回日本分子生物学会年会	神戸	2017年12月
HIV関連リンパ腫発症前にみられる末梢血細胞の早期エピゲノム変化	松永章弘、岡雅子、柳川泰明、梅野富輝、今留健一、瀧永博之、岡慎一、萩原槩太郎、石坂幸人、志村まり	第19回 白馬シンポジウム	仙台	2017年7月
Early epigenetic alterations of peripheral blood lymphocytes of HIV-positive individuals before the lymphomagenesis	松永章弘、石坂幸人、志村まり	第76回 日本癌学会学術総会	横浜	2017年9月
HIV関連リンパ腫の早期診断を目指した発症前DNAメチル化変動の解析	松永章弘、岡雅子、柳川泰明、梅野富輝、今留健一、瀧永博之、岡慎一、萩原槩太郎、石坂幸人、志村まり	第40回 日本分子生物学会年会	横浜	2017年10月

研究発表及び特許取得報告について

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
該当なし				

特許取得状況について ※出願申請中のものは( )記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
転写調節融合ポリペプチド	N1601- PCT(PCT/JP2017 /044266)	NCGM、広島大学、 アステラス製薬	2017年12月11日	日本
細胞膜透過性ポリペプチド	N1703 (特願 2017-236660)	NCGM、広島大学、 アステラス製薬	2017年12月11日	日本
細胞のダイレクトリプログラミング方法	特願2018- 069936	NCGM、広島大学	平成30年3月30 日	日本

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。

※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと。