

論文の内容の要旨

論文題目

HIV-1 潜伏感染成立及び維持における 宿主エピジェネティック制御因子 PRC2 の機能研究

氏名 松田 有加

〈背景〉 HIV 潜伏感染細胞は抗 HIV 薬療法下でも長期間体内に残存し、抗 HIV 薬服用中断により再発するウイルス血症のウイルス供給源となる。このことから、潜伏感染細胞集団の縮小は HIV 感染症の新たな課題である。ウイルス遺伝子はプロウイルスの 5' 末端側の LTR 配列をプロモーター/エンハンサーとして発現し、さらに宿主のエピジェネティック制御の影響を受けて転写レベルが規定されるが、この潜伏感染細胞では複製可能なプロウイルスが転写レベルで抑制されている。体内の潜伏感染細胞を減少させるためには、その成立メカニズムの理解が重要であるが、これまで十分明らかにされていない。この主な原因としては①潜伏感染細胞には特異的なマーカーがないこと、②潜伏感染の成立の頻度は非常に低いこと、の 2 点が挙げられる。従って、ウイルス遺伝子発現が抑制された集団を特定し、詳細に解析することが急務である。

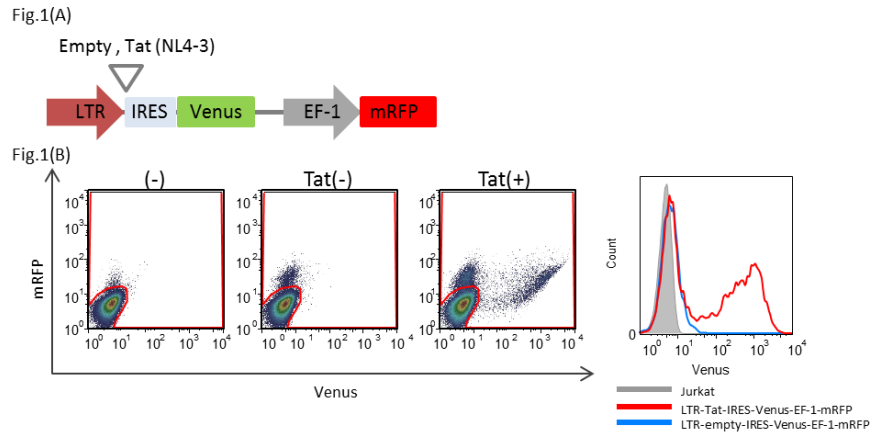
〈目的〉 上記の問題を考慮し、感染から慢性感染成立までの LTR の活性の観察に特化した独自のレポーター導入系 Dual-color-reporter を作製した。本研究はこのレポーターを用いて HIV の潜伏化成立のメカニズムの解明とその過程における宿主エピジェネティック制御の役割を検証することを目的とした。

〈結果〉

1. Dual-color-reporter 導入系の作製及び検証

集団中の感染細胞での LTR の活性を解析するために、Tat を搭載もしくは欠損させた Dual-color-reporter を作製し、レンチウイルスベクターによる導入系の確立を行った (Fig. 1A)。

このレポーターは感染細胞と非感染細胞を mRFP の発現の有無により識別できる。また二次感染を防ぎ、LTR 上のエピジェネティクスの経時的な変化を追跡するために *env* 遺伝子を欠損させた。



上記の Tat 搭載/欠損 dual-color-reporter プラスミドを 293T 細胞に一過的に導入し、Flowcytometry を用いた 2 種類の蛍光タンパク質の発現解析により、LTR が Tat に応答すること、LTR の活性が下流の EF-1 プロモーターの影響を受けないことを確認した。続いて、T 細胞株である Jurkat 細胞に VSV-G タンパク質で pseudotyping したレポーターウイルスを導入し、レポーターの発現を観察した。その結果、Tat を搭載したレポーターを導入した細胞の一部で Venus の発現が見られた (Fig. 1B)。この細胞集団の LTR 活性の経時変化を観察したところ、約 40 日の培養を経て抑制された。再活性化可能なレポーターの存在を検証するために TNF- α 、PMA/Ionomycin、HDAC 阻害剤である VPA 処理を行ったところ、これらの処理により LTR が再活性化された。以上の結果から長期培養したレポーター導入細胞中に再活性化可能なプロウイルスが存在することが示され、Tat 搭載 dual-color-reporter が HIV 潜伏化成立の分子機構の解析に適したモデルであると考えられた。

2. 感染初期の LTR の活性とエピジェネティクスの影響

様々な細胞株に対して Tat 搭載レポーターを導入し、感染初期の LTR 活性を観察した結果、感染後 3 日目において LTR の活性の異なる 2 つの集団が存在することがわかった (Fig. 1B)。さらに、活性化 PBMC に single-color-reporter を導入した場合にも、LTR 活性の強度が異なる集団の存在が観察され、この現象の普遍性が示唆された。

感染初期の LTR 抑制機構を解明するために、レポーター導入後 4 日目に Venus(-)、Venus(+) の集団を分取し、転写制御及びエピジェネティック制御に関連する種々の解析を行った (Fig. 2A)。その結果、Venus(-) 集団はレポーター配列の欠損はなく、エピジェネティック制御依存的な転写抑制が存在することがわかった。特に転写抑制的な H3K27me3 修飾が Venus(-) 集団中の LTR のプロモーター領域で蓄積していることが明らかとなった (Fig. 2B)。そこで H3K27me3 制御因子である PRC2 が Venus(-) 集団での抑制に寄与するか検討するために PRC2 阻害剤 DZNep 処理を行ったところ、LTR が活性化することがわかった。以上より Venus(-) 集団における LTR の抑制に PRC2 が寄与する事が示唆された。

Fig.2(A) LTR-Tat-IRES-Venus-EF-1-mRFP 導入 Jurkat の sorting

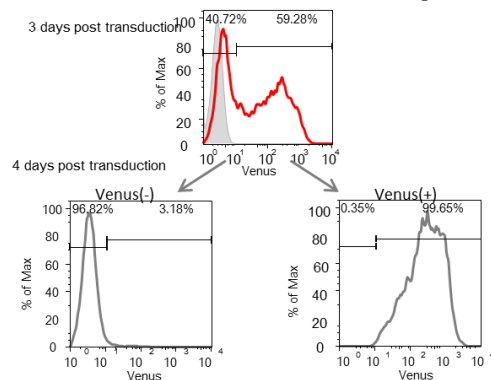
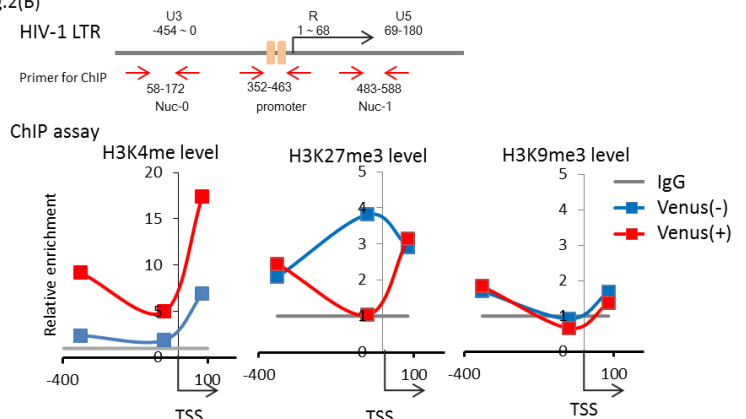


Fig.2(B)



3. PRC2 の感染初期におけるウイルス遺伝子発現への影響

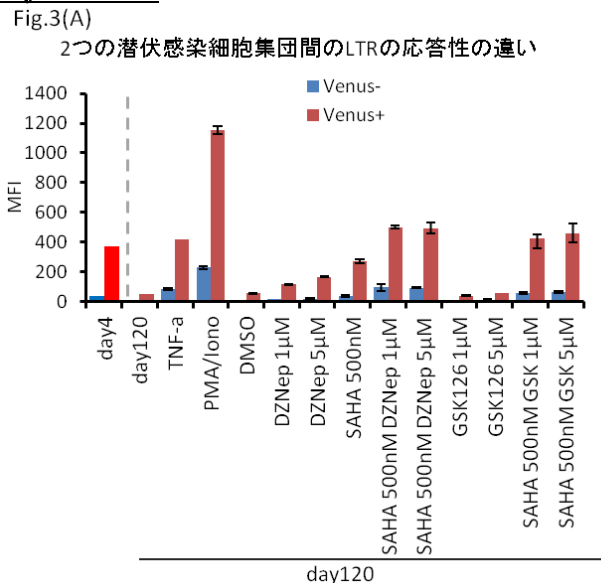
感染初期における LTR 活性の抑制に対する PRC2 の役割を解析するために、PRC2 の主要な構成因子の EZH2 及び SUZ12 のノックダウンを行った。特異的な shRNA 発現細胞株を樹立し、レポーターウイルスを導入した結果、コントロール細胞と比較して感染初期の Venus(+) 集団の割合に増加が認められた。続いて、single-round HIV 感染系を用いて、感染初期のウイルス遺伝子発現抑制に対する PRC2 の影響を解析した。EZH2 または SUZ12 をノックダウンした細胞や、DZNep を前処理した細胞において、感染初期のウイルス遺伝子発現細胞の割合の増加が認められた。以上の結果から細胞内の PRC2 の活性が感染初期のウイルス遺伝子発現を抑制することがわかった。

4. 活性化 LTR の経時的な抑制におけるエピジェネティック制御の役割

次に、Tat 搭載レポーター導入系で分取した Venus(+) 集団を長期培養し、LTR 活性の経時変化を観察したところ、徐々に抑制されることがわかった。この経時的な抑制におけるエピジェネティック制御の役割を解析するために、レポーター導入直後と長期培養後の Venus(+) 集団で、LTR 上の抑制的なヒストン修飾のレベルを比較した。その結果 H3K27me3 及び H3K9me3 レベルの増加が LTR 上に見られた。また Venus(+) 集団を PRC2 阻害剤、HDAC 阻害剤存在下で培養した結果、LTR 活性の抑制が阻害された。以上の結果から活性化 LTR の経時的抑制への転写抑制的な宿主のエピジェネティック制御の関与が示唆された。

5. 潜伏感染細胞集団中に存在する heterogeneity について

長期培養後の Venus(-), Venus(+) 集団の LTR 上のヒストン修飾のレベルの比較した結果、2 つ集団間にはレベルの違いがあることがわかった。2 集団の性質の違いを検証するために、種々の LTR 活性化刺激への応答性を比較したところ、Venus(+) 集団ではこれらの刺激に対する応答性が高いことがわかった (Fig. 3A)。この結果から、潜伏感染細胞集団中には再活性化刺激への応答性に関する heterogeneity が存在することが示唆された。



6. LTR 上における PRC2 の影響

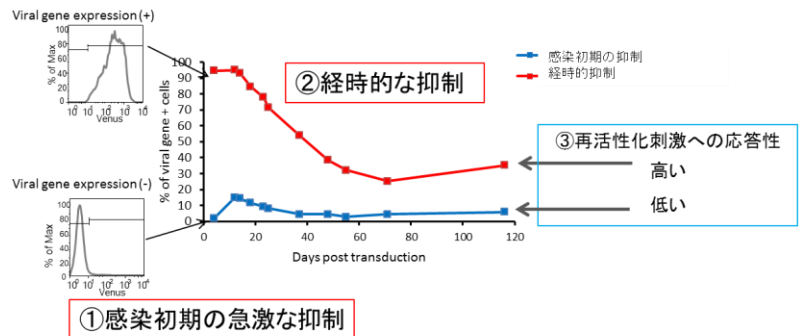
次に 2 つの異なる潜伏化モデルを用いて、LTR 上における PRC2 の影響の検討を行った。まず Hela/LTR-luciferase 細胞を用いて、PRC2 の Tat による LTR 活性化能への影響を解析した。その結果、SUZ12 ノックダウン細胞では Tat に対する LTR の応答性が増加した。逆に SUZ12 過剰発現細胞では Tat に対する応答性が低下した。以上の結果から PRC2 が Tat の LTR 活性化能を阻害することが示唆された。

また HIV 慢性感染細胞株 U1 に対して PRC2 因子をノックダウンし HIV-1 に与える影響を検討した結果、H3K27me3 の低下を経て LTR を活性化することがわかった。一方で PRC2 のノックダウンは LTR 上の他のヒストン修飾のレベルには影響を与えなかった。

〈考察〉

1. 2つの潜伏化成立メカニズムの生物学的意義について

本研究では Tat 搭載 dual-color-reporter Fig.4 潜伏化成立メカニズムと再活性化に関する潜伏感染細胞中のheterogeneityを用いて、①潜伏化成立メカニズムは、感染初期の急激な LTR の抑制、活性化した LTR の経時的な抑制の2通りであること示し、これまで経験的に想定されてきた潜伏化成立の過程を初めて証明することが出来た。さらに②この2つの潜伏化成立メカニズムの一端にエピジェネティック制御が関わることを明らかにした。



また興味深いことに、異なるメカニズムで成立した2つの潜伏感染細胞間には LTR 活性化刺激への応答性の違いがあることが明らかになった。HIV-1 感染者由来の CD4+ T 細胞中にも、in vitro での再活性化刺激に応答性しない intact なプロウイルスを持つ感染細胞が存在することが報告されている(Ya-Chi Ho et al., *Cell*, 2013)。本研究で見出した潜伏感染細胞集団間の性質の違いは in vivo の潜伏感染細胞中にも存在する heterogeneity を反映している可能性があり、このような細胞集団の成立メカニズムを解明する良いモデルとなると期待される。またこのモデルを用いて2つの集団間での宿主因子の発現や integration site の違いを調べることにより、HIV-1 の潜伏化成立の詳細な分子機構が明らかにできると期待される。

2. 潜伏感染細胞集団の縮小の可能性

HAART 療法中の患者への SAHA の投与による、resting CD4+T 細胞中のウイルス RNA レベルの再活性化が報告されたが(Archin et al., *Nature*, 2012)、体内の潜伏感染細胞を減少できるかは不明である。PRC2 阻害剤と HDAC 阻害剤の共処理によってより強力に LTR が再活性化されたことから、これらと HAART の併用により、潜伏化ウイルスの活性化と新規の潜伏感染の阻害による潜伏感染細胞集団の縮小が可能ではないかと期待される。