

連載特集：HIV 制御のための宿主防御因子研究の展開 (7)

HIV-1 アクセサリー蛋白質および宿主防御因子の
ヒト化マウスモデルによる評価Investigation of the Roles of HIV-1 Accessory Proteins and
Host Restriction Factors in Humanized Mouse Model

佐藤 佳

Kei SATO

京都大学ウイルス研究所ウイルス病態研究領域

Laboratory of Viral Pathogenesis, Institute for Virus Research, Kyoto University

抗 HIV-1 宿主防御因子

わずか9つの遺伝子しかコードしていない HIV-1 は、その複製過程においてさまざまな細胞性蛋白質を利用する¹⁾。一方、ヒトゲノムは、HIV-1 複製を強力に阻害する複数の蛋白質「宿主防御因子 (restriction factor)」(あるいは「内因性免疫 (intrinsic immunity)」と呼ばれる) をコードしていることが明らかになってきている²⁾。その代表例として、HIV-1 ゲノム中のグアニン塩基をアデニン塩基に置換し (“G→A 変異”), ウイルスの感染性を失効させる APOBEC3 ファミリー蛋白質^{3,4)}、新規ウイルス粒子を細胞表面上に繫留してその放出を抑制する tetherin^{5,6)} が知られている。また、HIV-1 の逆転写反応の基質として用いられるヌクレオシド 3 リン酸 (deoxynucleoside triphosphate ; dNTP) を枯渇させてウイルスの逆転写反応を抑制する SAMHD1⁷⁾、I 型インターフェロンによってその発現が惹起され、HIV-1 複製の前期過程を抑制する MX2^{8~10)} が、新たな宿主防御因子として最近同定された。これら宿主防御因子の分子メカニズムの詳細については、前号までの本誌連載特集「HIV 制御のための宿主防御因子研究の展開」を参照されたい。

アクセサリー蛋白質：宿主防御因子のアンタゴニストとして

9つの HIV-1 遺伝子のうち、5つは構造・機能・調節蛋白質 (Gag, Pol, Env, Tat, Rev) をコードしており、これらはすべてウイルス複製に必須である。それらに加え、HIV-1 は、Vif, Vpu, Vpr, Nef という4つのアクセサリー蛋白質をコードしている。これまでの研究から、Vif は E3 ubiquitin ligase 複合体を動員し、APOBEC3 を proteasome 依存的経

路によって分解し、APOBEC3 による抗 HIV-1 活性を相殺すること¹¹⁾、また、Vpu は細胞表面上に発現する tetherin を down regulation することにより、tetherin の抗 HIV-1 活性を相殺すること、がそれぞれ明らかとなっている⁵⁾。すなわち、Vif は APOBEC3 の、Vpu は tetherin のアンタゴニストとしてそれぞれ機能している (宿主防御因子のアンタゴニストとしての Vif, Vpu の役割についても、前号までの本誌連載特集を参照されたい)。

ヒト化マウス

抗 HIV 薬の開発と多剤併用療法の導入により、HIV-1 感染症に対する治療成績は格段に改善した。しかしながら、HIV-1 を生体から排除 (eradication) するための根治療法はいまだに確立されていない。その一因として、HIV-1 の宿主域がヒトに限られており、HIV-1 の感染病態を再現できる動物モデルが存在しなかったことがあげられる。

HIV-1 感染病態を再現できる新たな動物モデルを作製するために、筆者らは、重度複合免疫不全マウスである NOD/SCID/Il2rg^{-/-}マウス (NOG マウス; 実験動物中央研究所が作製¹²⁾) にヒト CD34 陽性造血幹細胞を移植し、ヒト造血能を1年以上維持できる「ヒト化マウス」を作出した (図1)。ヒト化マウスでは、HIV-1 の増殖が30週以上維持され、血中の CD4 陽性 T 細胞の漸進的減少に代表される HIV-1 感染病態が忠実に再現される^{13,14)}。

上述のように、培養細胞を用いた詳細な解析から、HIV-1 感染症、すなわち「ウイルスとヒトの相克」を、「HIV-1 アクセサリー蛋白質と宿主防御因子の相克」として解釈することが可能となってきた。一方、臨床検体を用いた詳細な研究により、HIV-1 の病態発現原理についての知見も増えつつある。しかしながら、HIV-1 感染を持続的に再現できる適切な動物モデルがなかったため、培養細胞を用いたミクロな知見と、臨床のフィールドから得られたマクロな

著者連絡先：佐藤 佳 (〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町
53 京都大学ウイルス研究所ウイルス病態研究領域)

2015年1月22日受付

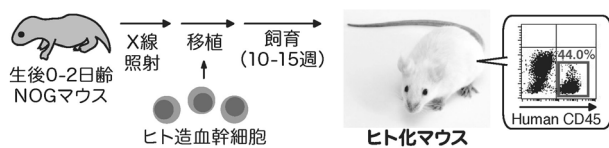


図 1 ヒト化マウス

CD34 陽性ヒト造血幹細胞の移植により、CD4 陽性 T 細胞をはじめとしたヒト白血球 (CD45 陽性細胞) が 1 年以上にわたりレシピエントマウス (NOG マウス) 体内に維持される。

知見を繋ぐこと、すなわち、HIV-1 アクセサリー蛋白質と宿主防御因子の生体内における機能については不明であった。筆者らは、リバーシジェネティクス法を駆使して作製したさまざまなアクセサリー遺伝子欠損・変異体ウイルスとヒト化マウスモデルを用い、HIV-1 感染病態におけるアクセサリー蛋白質と宿主防御因子の役割を明らかにしてきた。以下、これまでに得られている筆者らの知見の中で、特に APOBEC3 蛋白質と Vif の相克について得られた最近の知見を紹介する。

Vif 欠損 HIV-1 感染ヒト化マウス¹⁵⁾

生体内 HIV-1 感染ダイナミクスにおける Vif と APOBEC3 ファミリー蛋白質の機能を明らかにすることを目的として、筆者らはまず、Vif 欠損 HIV-1 と野生型 HIV-1 をそれぞれヒト化マウスに接種した。野生型 HIV-1 は効率良く増殖したのに対し、Vif 欠損 HIV-1 はヒト化マウス内でまったく増殖しなかった (図 2A)。また、HIV-1 のプロウイルス DNA に、APOBEC3 によるものと思われる高頻度の G→A 変異が確認された (図 2B)。以上の結果から、生体内の HIV-1 増殖において Vif は必須のウイルス因子であること、また、APOBEC3 は生体内においても強力な抗ウイルス能を発揮する宿主防御因子であることが明らかとなった。

Vif 変異 HIV-1 感染ヒト化マウス¹⁶⁾

APOBEC3 ファミリー蛋白質は、7つのタンパク質 (APOBEC3A, B, C, D, F, G, H) から構成される。そのなかでも特に、APOBEC3G と APOBEC3F が強力な抗 HIV-1 活性を有すること、そしてこれらのタンパク質の活性は Vif によって相殺されることが知られている。上述の筆者らの研究¹⁵⁾ により、APOBEC3 ファミリー蛋白質が生体内 HIV-1 増殖を強力に抑制することが明らかとなったが、どのファミリー蛋白質、特に APOBEC3G と APOBEC3F のいずれが特にウイルス増殖抑制に寄与しているかは不明であった。これを明らかにするために、筆者らは、APOBEC3G のみを分解できない変異体 Vif をコードする HIV-1 (4A 変

異体) と APOBEC3F のみを分解できない変異体 Vif をコードする HIV-1 (5A 変異体) をリバーシジェネティクス法によってそれぞれ作製し、これらのウイルスをヒト化マウスに接種した。その結果、4A 変異体および 5A 変異体のヒト化マウスにおける増殖効率は、野生型 HIV-1 に比して有意に低く、また、5A 変異体の増殖効率は、4A 変異体のそれに比して有意に低かった (図 3A)。また、APOBEC3G は特に GG→AG 変異を、APOBEC3F は GA→AA 変異をそれぞれ指向することが知られている。そこで、感染後 6 週の脾臓におけるプロウイルス配列を解析した結果、4A 変異体 HIV-1 感染マウスでは GA→AA 変異が顕著に観察されたのに対し、5A 変異体 HIV-1 感染マウスでは GG→AG 変異が顕著に観察された (図 3B)。以上の結果から、生体内 HIV-1 感染動態において、CD4T 細胞に内在的に発現する APOBEC3F, APOBEC3G が共に抗ウイルス活性を示すこと、また、APOBEC3G の抗ウイルス活性は APOBEC3F のそれよりも強力であることが示唆された。さらに興味深いことに、血漿中のウイルス RNA (すなわち、ヒト化マウスで増殖しているウイルス粒子中の RNA) の配列は、脾臓の細胞内のプロウイルス DNA で観察された変異パターンと異なっており、特に 4A 変異体 HIV-1 感染マウスで増殖するウイルスの多様性が有意に上昇していた (図 3C)。これは、APOBEC3G によって惹起される GG→AG 変異は終止変異を誘導しやすい (たとえば、TGG はトリプトファンをコードするコドンであるが、ここに GG→AG 変異が挿入されると TAG [終止コドン] へと置換される) のに対し、APOBEC3F によって惹起される GA→AA 変異は終止変異を誘導しにくく、非同義置換が蓄積するためと考えられる。これらの結果から、APOBEC3F は強力な抗 HIV-1 宿主因子であると同時に、HIV-1 の多様化を促進する機能も有することが明らかとなった。この事実は、APOBEC3F による変異によって、薬剤耐性株や免疫逃避株の出現など、HIV-1 にとって有益な進化が誘導される可能性を示唆している。実際、筆者らの研究により、感染共受容体を CCR5 から CXCR4 に変化したウイルスが 4A HIV-1 感染マウス特異的に出現すること、そして、その機能変異が APOBEC3F によって惹起されたものであることが明らかとなっている¹⁶⁾。さらに最近、同様の結果が臨床検体においても確認されることが報告されている¹⁷⁾。現在、Vif-APOBEC3 相互作用を標的とし、APOBEC3 の抗ウイルス活性を発揮させることを想定した創薬研究が進められている。しかしながら、筆者らの結果は、APOBEC3F の活性はむしろ、ウイルスに有益に働いてしまう可能性、すなわち、宿主にとってもウイルスにとっても諸刃の剣として働いている可能性を示唆している。

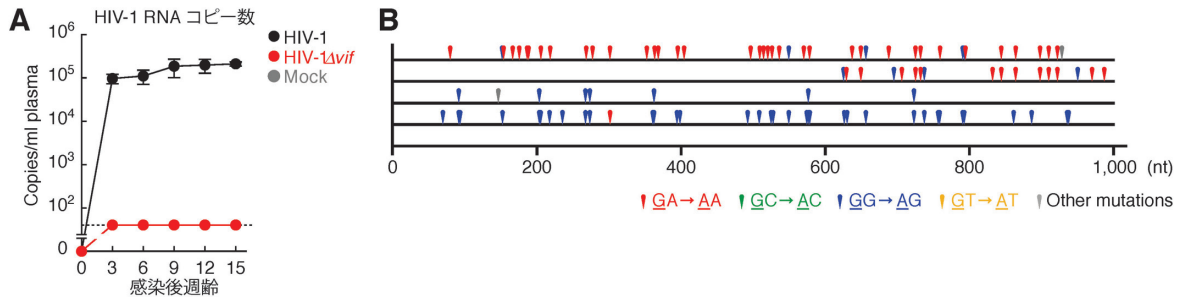


図 2 Vif 欠損 HIV-1 感染ヒト化マウスを用いた解析
 (A) 血漿中の HIV-1 RNA コピー数。検出限界を点線で示す。(B) HIV-1 プロウイルス DNA 配列解析。感染後 15 週齢の野生型 HIV-1 感染ヒト化マウス脾臓より DNA を回収し、*pol* 領域 (1,002 bp) の塩基配列解析を行った。その代表的な結果を示す。

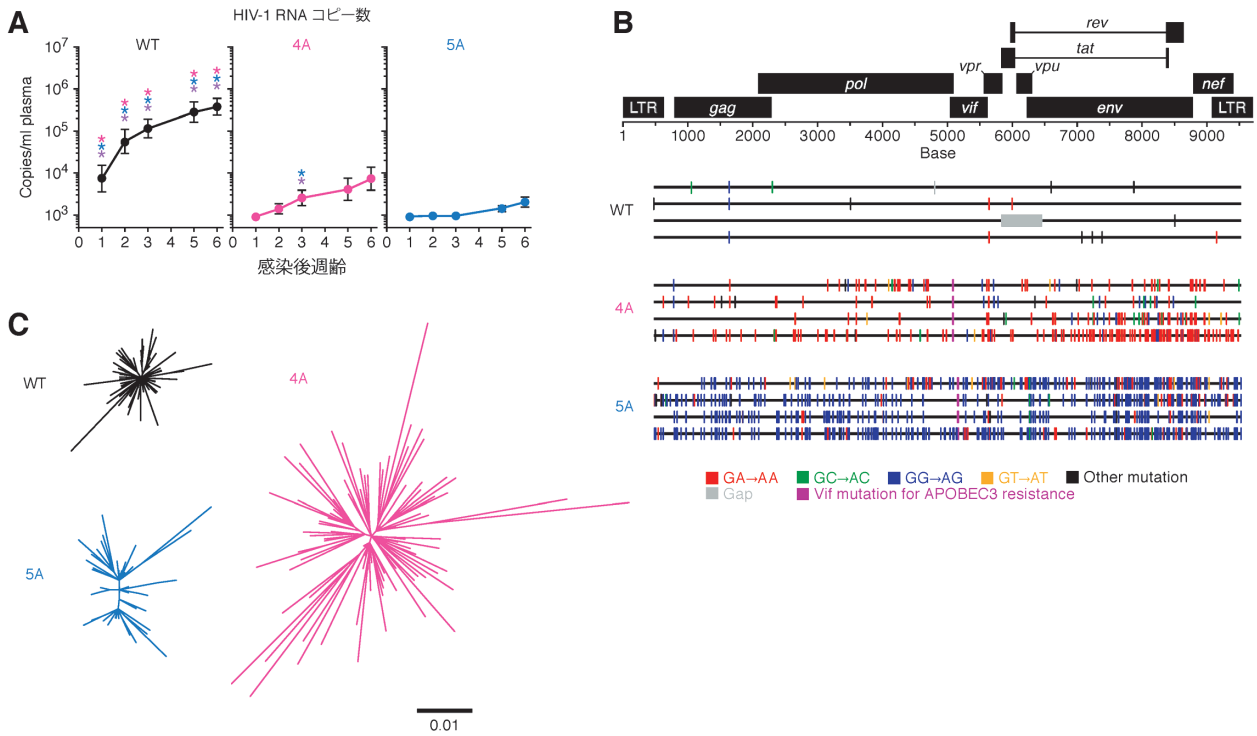


図 3 Vif 変異 HIV-1 感染ヒト化マウスを用いた解析
 (A) 血漿中の HIV-1 RNA コピー数。* $p < 0.05$ (by Student's *t* test)。(B) HIV-1 プロウイルス DNA 配列解析。感染後 6 週齢のヒト化マウス脾臓より DNA を回収し、プロウイルス全長の塩基配列解析を行った。その代表的な結果を示す。(C) HIV-1 ウイルス RNA 配列解析。感染後 6 週齢のヒト化マウス血漿より RNA を回収し、ウイルス RNA (すなわち、ヒト化マウスで増殖しているウイルス) *env* 遺伝子の塩基配列を single genome sequence 法によって解析した。得られた塩基配列を基に作成した系統樹を示す。

おわりに：今後の展望

本稿では、HIV-1 感染病態におけるアクセサリ蛋白質と宿主防御因子の役割について、特に Vif と APOBEC3 ファミリー蛋白質に焦点を当てて概説した。HIV-1 は、ウ

イルス学の範疇においてもっとも解析手法が発達し、ミクロ/マクロ両面においてもっとも理解の進んだウイルスのひとつである。感染症を理解し、ウイルス学を進展させるために、この分野の最先端のひとつである HIV-1 研究は重責を担っていると云える。ミクロな側面においては、新た

な宿主防御因子の同定や、アクセサリ-蛋白質・宿主防御因子の機能の詳細が、研究手法の発展に伴って明らかになっていくものと思われる。一方、マクロな側面においては、HIV-1感染症の新たな治療法・制御法の画策や病態発現原理の解明など、解決すべき課題が山積している。重要なのは、これら2つの視点が mutually exclusive ではないということである。意義のある研究を展開するためには、培養細胞実験（ミクロ）あるいは臨床検体解析（マクロ）に偏執することなく、多角的な視野を持って研究に取り組むこと、すなわち、「凡ウイルス学」として HIV-1 感染症を理解することであると考える。本稿で紹介したヒト化マウスモデルは、培養細胞を用いてもたらされた知見をマクロな条件へと敷衍させること、あるいは、臨床フィールドで得られた知見をミクロな環境で検証することをそれぞれ可能とするプラットフォームである。ヒト化マウスモデルを用いた今後の研究により、ミクロな知見とマクロな知見を直結・融合し、「凡ウイルス学」として HIV-1 感染症を理解することを可能にしていくことが期待される。

文 献

- 1) Brass AL, *et al* : Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science* 319 : 921-926, 2008.
- 2) Malim MH, *et al* : HIV restriction factors and mechanisms of evasion. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2 : a006940, 2012.
- 3) Harris RS, *et al* : DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell* 113 : 803-809, 2003.
- 4) Zhang H, *et al* : The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature* 424 : 94-98, 2003.
- 5) Van Damme N, *et al* : The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein. *Cell Host Microbe* 3 : 245-252, 2008.
- 6) Neil SJ, *et al* : Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* 451 : 425-430, 2008.
- 7) Laguette N, *et al* : SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature* 474 : 654-657, 2011.
- 8) Goujon C, *et al* : Human MX2 is an interferon-induced post-entry inhibitor of HIV-1 infection. *Nature* 502 : 559-562, 2013.
- 9) Liu Z, *et al* : The interferon-inducible MxB protein inhibits HIV-1 infection. *Cell Host Microbe* 14 : 398-410, 2013.
- 10) Kane M, *et al* : MX2 is an interferon-induced inhibitor of HIV-1 infection. *Nature* 502 : 563-566, 2013.
- 11) Sheehy AM, *et al* : The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nat Med* 9 : 1404-1407, 2003.
- 12) Ito M, *et al* : NOD/SCID γ (c)(null) mouse : an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood* 100 : 3175-3182, 2002.
- 13) Nie C, *et al* : Selective infection of CD4+ effector memory T lymphocytes leads to preferential depletion of memory T lymphocytes in R5 HIV-1-infected humanized NOD/SCID/IL-2R γ null mice. *Virology* 394 : 64-72, 2009.
- 14) Sato K, *et al* : The mouse is out of the bag : insights and perspectives on HIV-1-infected humanized mouse models. *Exp Biol Med (Maywood)* 236 : 977-985, 2011.
- 15) Sato K, *et al* : Remarkable lethal G-to-A mutations in vif-proficient HIV-1 provirus by individual APOBEC3 proteins in humanized mice. *J Virol* 84 : 9546-9556, 2010.
- 16) Sato K, *et al* : APOBEC3D and APOBEC3F potently promote HIV-1 diversification and evolution in humanized mouse model. *PLoS Pathog* 10 : e1004453, 2014.
- 17) Kim EY, *et al* : Human APOBEC3 induced mutation of human immunodeficiency virus type-1 contributes to adaptation and evolution in natural infection. *PLoS Pathog* 10 : e1004281, 2014.