

総括研究報告書

1. 研究開発課題名：H I V-1 治癒法構築戦略
2. 研究開発代表者： 小柳義夫（京都大学ウイルス研究所）
3. 研究開発の成果

HIV-1 リザーバの解剖学的局在とその細胞環境の維持に関わる生物学的特徴を明らかにし、そのマーカー分子の解明、そして、HIV-1 治癒法構築のための分子細胞治療法の開発を行うことが、本研究の目的である。H27 年度は以下のような研究成果が得られた。

リザーバ細胞の解析実験系として既報のヒト化マウスへの抗 HIV-1 剤の併用療法（J. Virol. 86, 630, 2012）の投与法は、マウスに対する毒性があった。そこで抗 HIV-1 剤を減量し、1 日 1 回の 2 週間皮下投与、そして休薬後 3 週目に採血を行うことができた。治療前、治療中、休薬後のマウス血漿中の HIV-1 RNA 量を比較した結果、抗 HIV-1 剤によるウイルス RNA 量の減少はみられた。そして、休薬後 3 週目のウイルス量は急激に上昇していた。次に、HIV-1 感染ならびに非感染のヒト化マウスの脾臓から RNA を抽出し、RNAseq 法によりウイルス感染により特異的に発現誘導される遺伝子の同定を試みた。20,000 個以上の遺伝子の中から統計学的に有意差を示す発現誘導遺伝子として 100 個以上の分子を見出した。リザーバ細胞排除法として、HIV-1 LTR の TAR 領域に対する TALEN (TAR TALEN) を作製し、その HIV-1 プロウイルスの切断効率を検討した。まず、LTR-Tat-IRES-GFP (LTIG) 発現レトロウイルスベクター導入 Jurkat 細胞の GFP 発現細胞の減少率により LTR 切断効率を比較し、2013 年に研究代表者が開発した CRISPR/Cas9 法によるそれと比べて優れた切断効率を TAR TALEN に見出した。次に、導入核酸として、試験管内で合成した mRNA の遺伝子導入を試み、単一のトラスフェクションにより 90%以上のプロウイルスが不活性化された。さらに、プロウイルスの両端に配位する LTR の同時切断によってプロウイルス配列の排除が可能であることが PCR の解析よりわかった。TAR TALEN mRNA を用いた場合、単一のトラスフェクションにより 50%ものプロウイルス配列が排除された。

潜伏リザーバ細胞培養系の確立のために、ウイルス遺伝子内に LTR 依存性発現緑色蛍光遺伝子 (GFP) と細胞性あるいは CMV プロモータ依存性赤色蛍光遺伝子 (*mCherry* あるいは *mKO*) を連結挿入し、ウイルス産生感染（緑色赤色両陽性）と潜伏感染（緑色陰性 赤色陽性）を識別できる HIV-1 (DuoFluo HIV-1) DNA を構築した。

リザーバ細胞検出系確立に向け、高感度かつ高精度に微量 DNA/RNA を検出可能な droplet digital PCR (ddPCR) システムを用いウイルス核酸の検出限界濃度を決定した。また HIV-1 および HIV-2 潜伏感染モデル細胞を樹立し、潜伏化や再活性化後の複製効率について検討した。本モデル細胞を用いた検討の結果、酸素濃度依存的なプロウイルスゲノムの転写調節機構の存在が示唆された。