

200500688A

厚生労働科学研究研究費補助金

エイズ対策研究事業

HIV-1遺伝子を広域に持つ新規SHIVとサルを用いた  
エイズ治療薬開発の研究

平成17年度 **総括研究報告書**

主任研究者 井戸 栄治  
(京都大学ウイルス研究所 特任助教授)

平成18年 (2006年) 3月

## 目 次

I. 総括研究報告		
「HIV-1遺伝子を広域に持つ新規SHIVとサルを用いたエイズ治療薬開発の研究」 -----		1
井戸 栄治		
(資料1)		
II. 分担研究報告		
「polのRTとINT領域及びenvをHIV-1由来にしたSHIV(SHIV-rti/3rn)のサル細胞への 馴化に関わる変異の解析」 -----		9
伊吹 謙太郎		
(資料2)		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	14
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	16

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

総括研究報告書

「HIV-1遺伝子を広域に持つ新規SHIVとサルを用いたエイズ治療薬開発の研究」

主任研究者 井戸 栄治 京都大学ウイルス研究所 特任助教授

## 研究要旨

本研究では、前臨床の基礎研究として、人に近い動物であるサルを用いてエイズ治療法を実験的に開拓する系を確立することを目的とする。人への治療法として提示するためには、薬剤の標的がエイズの病原ウイルス HIV-1 そのものであることが望ましい。ところが HIV-1 は、ヒト以外にはチンパンジーなど一部の例外を除いて、通常の医学実験用のサルには感染しない。そこで我々は、HIV に類似のサルウイルス(SIV)と HIV-1 とのキメラウイルス(SHIV)を作成し、これと比較的入手の容易なアカゲサルを用いてエイズの病態を研究できる系を生みだそうとしたのである。従来サル感染実験に使用される SHIV と言えば、主に env 遺伝子とその周辺付属遺伝子のみが HIV-1 由来で、その他は SIV 由来であるものに限られていた。しかし、これでは人への治療薬の効果判定に適してはいない。なぜなら、市販されているウイルス複製阻害剤の中には、NNRTI のように HIV-1 の pol 遺伝子産物を特異的に標的としているものも多いからである。そこで我々は、pol 遺伝子が HIV-1 由来である一連の新規 SHIV を作成し、そのサル感染実験を行うことにした。本研究計画最終年度では主に、1) HIV-1 の protease (PR) を持つ SHIV(SHIV-pr)のサル感染実験と PR 阻害剤処理前後における遺伝子変異解析、2) HIV-1 の reverse transcriptase (RT)と integrase (INT)を持つSHIV(SHIV-rti)のサル感染実験、3) HIV-1の pol (PR, RT, INT)を持つ SHIV(SHIV-prti)のサル感染実験、4) pol の RT と INT 領域及び env を HIV-1 由来にした SHIV(SHIV-rti/3rn)のサル感染実験の follow up、以上4点の研究を行った(1-3を主任研究者が担当、4を分担研究者伊吹が担当した)。1)では、4週間の PR 阻害剤の投与前後で特に有意の耐性変異は生じなかったことが判った。2)と3)では、PR 遺伝子以外に RT さらには INT 遺伝子領域が HIV-1 由来の新規 SHIV がサルに感染し得ることが明らかとなり、サルを用いて HAART モデルの研究ができる道が開かれた。4)は、env まで含めて HIV-1 の領域を拡大すると、サル細胞への adaptation に際して gp41 を中心としてゲノム全体に複数箇所の変異が必要となることが判った。

分担研究者 伊吹 謙太郎  
京都大学ウイルス研究所  
助手

### A. 研究目的

エイズ治療については、この数年の間に HAART 療法などが開発され、光明が見えたかに思えた。しかし、この療法では確かに延命はできるものの、高価な薬剤を大量に摂取し続けねばならず、副作用の問題や投薬を止めれば新たにウイルスが再増殖し始め、しかも通常の薬剤では抑えることができないという多剤耐性株の出現の問題、さらには治療中の免疫系再構築の間に既存の日和見感染症が悪化するいわゆる免疫再構築症候群などの問題が指摘されている。治療薬自体の開発が押し進められるべきであることは言うまでもないが、

種々の治療薬の最適な組み合わせの探索を始めとして、他の抗ウイルス活性物質あるいは免疫システム自体を活性化する薬剤との併用など、従来試みられていない実験的療法の開拓が強く要望されている。しかしながら、人を対象としてそのような治療効果が保証されない、場合によっては症状増悪のリスクが否定できない実験的治療を安易に試みることは倫理的に許されない。そこで本研究では、先ず、前臨床の基礎研究として、人に近い動物であるサルを用いてエイズ治療法を実験的に開拓する系を確立することを目的とする。次にその系を用いて、種々の薬剤や新たな治療法の効果判定を行い、人のためのより良い治療法を提示することを最終目標とする。3年計画の最終年度としては、特に現在市販されている多くの薬剤の標的となる pol 遺伝子が

HIV-1 の SHIV のサル感染実験に重点を置いた。

## B. 研究方法

pol 遺伝子が HIV-1 由来である一連の新規 SHIV (以下の 1-3) をフルゲノムで作成し、トランスフェクション後得られたウイルスを用いて、それらのサル感染実験を行うことにした。本研究計画最終年度では主に、1) HIV-1 の protease (PR) を持つ SHIV(SHIV-pr) のサル感染実験と PR 阻害剤処理前後における遺伝子変異解析、2) HIV-1 の reverse transcriptase (RT) と integrase (INT) を持つ SHIV(SHIV-rti) のサル感染実験、3) HIV-1 の pol (PR, RT, INT) を持つ SHIV(SHIV-prti) のサル感染実験、を行った。感染の成立は、血中の viral RNA load の測定、ウイルス分離、抗体応答の有無などで判定した。また CD4/8 比も追跡した。

### (倫理面への配慮)

本研究では、治療薬開発にサルを用いている。従って差し当たって人権上の問題は該当しない。実験動物としてサルを使用する点については、動物愛護の配慮を怠ることなく主任研究者の所属する京都大学ウイルス研究所のサルの飼育と使用に関する委員会(通称「霊長類委員会」)に定める規定・指針に則して研究を行っている。

## C. 研究結果

1) HIV-1 の protease (PR) を持つ SHIV(SHIV-pr) のサル感染実験と PR 阻害剤処理前後における遺伝子変異解析

$10^5$  TCID<sub>50</sub> の SHIV-pr をアカゲザルに静脈内接種すると、血中ウイルス量は接種後 2 週目で  $10^5$  copies/ml 程度にまで上がり、その後  $10^3$ ~ $10^4$  copies/ml と低いながら半年以上の長期に渡りウイルスを産生し続けた。さらにこのサルからウイルスを含む血漿を新たなサルに 4 代まで継代したところ、ウイルス量も安定して  $10^5$  copies/ml 程度の持続感染状態になることが判った。次にこれらのサルに PR 阻害薬カレトラ(ロピナビル/リトナビル)の中身を水に懸濁して 4 週間毎日経口投与(1カプセル分/日/頭)したところ、試みた 3 頭いずれも血中ウイルス量が検出限界( $10^3$  copies/ml)あるいはそれ以下に減少した。薬剤投与を停止すると、血中ウイルス量は処理停止後 1 週目から元のレベルに近く戻り、その後高値を持続、またウイルス分離もできた。カレトラ投与直前と停止後 1 週目で血中に再出現したウイルスについて、

RT-PCR で遺伝子解析したところ(測定可能であった 2 頭分のみ)、特に顕著な変異は認められなかった。

2) HIV-1 の reverse transcriptase (RT) と integrase (INT) を持つ SHIV(SHIV-rti) のサル感染実験

$2 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub> の SHIV-rti を 2 頭のアカゲザルに静脈内接種した結果、共にウイルス分離・抗体反応が見られ、感染が成立した。viral RNA load は  $10^{3-4}$  copies/ml と高くはなかったが、一時中断の後、接種 6 ヶ月頃よりウイルス分離が再び見られた。CD4/8 値などに大きな変化はまだ観察されていない。

3) HIV-1 の pol (PR, RT, INT) を持つ SHIV(SHIV-prti) のサル感染実験

SHIV-prti はカニクイザル由来の株化 T 細胞である HSC-F 細胞およびアカゲザルサル細胞で感染増殖能を示すが、ピークの出現が遅く、そのままサル個体へ接種するにはその増殖能では弱いと考えられた。そこで先ず HSC-F 細胞で馴化することにした。10 代ほど passage したところ、ピークが現れるのが早くなり、この増殖能の向上した  $10^{4.5}$  TCID<sub>50</sub> の SHIV-prti(p) を 2 頭のアカゲザルに静脈内接種した。その結果、両頭よりウイルスが分離され、弱い抗体反応も見られ、感染は成立したと考えられる。ただし、接種してまだ 3 ヶ月程度しか経過していないので、今後の経過が注目される。

## D. 考察

SHIV-pr 感染サルのカレトラ投与実験において、ウイルス量が顕著に下がったことは、本研究で作成した一連の SHIV とサルを用いて、PR を初めとする種々の抗ウイルス薬剤の経口投与での in vivo 評価が現実に可能であることを示している。ほぼ 1 ヶ月間のカレトラ投与前後において PR 遺伝子を含めて周辺に顕著な変異が見られなかったことは、耐性変異がこの期間では生じないことを示唆しており、この薬剤が極めて有効であることを確認できたものと考えられる。今後より長期の投与実験など様々な実験計画の可能性が考えられる。

SHIV-rti さらには SHIV-prti がサルに感染することが確かめられたことは、これら SHIV が将来的に PR や RT 阻害剤を組み合わせた HAART 治療の検証に使用できることを示唆しており、利用価値は高いものと考えられた。RT 阻害剤は水溶性も高く、経口投与も PR 阻害剤よりは容易に行なえるものと思われる。ただし、実用化するためには現在のままではウイルスロードの値がやや低いので、継代による安定化、

可能であれば分子クローン化が必要と考えられ、それが今後の課題である。

#### E. 結論

ヒトのエイズ治療薬の多くが標的とする pol 遺伝子を HIV-1 由来とした SHIV を作成し、それがサルに感染する新しい動物モデル系を確立するという研究計画に掲げた第一目標に関しては、かなり達成されたのではないかと自負している。また現在 HIV-1 の領域が最も広い SHIV の分子クローンが得られた意義も大きいと思われる。ウイルスの宿主域という種の壁を超える要因を解明することに寄与するものと考えられるからである。もっともウイルス酵素阻害剤の薬剤評価に関して言えば、SHIV-pr を始めとして SHIV-prti など、pol 領域が HIV-1 由来である SHIV で十分であるので、それらの実用化の目処が立ったことの意義が大変大きいと考えられる。薬剤処理に関しては、PR 阻害剤であるカレトラ剤の効果をサルで実証できたことは大きな成果であるが、その他の開発中の薬剤等の検証にまで発展させることができなかつたことは悔やまれる。しかしながら、限られた人力と予算の中で、以上の点すべてを遂行することは至難であり、全体としての達成度はまずまずだったのではないかと自己評価している。

当初、望むらくは HIV-1 由来の領域がなるだけ広いものをと期待した。が、現時点では env 領域も置換すると感染初期はよいとして、サル個体内で持続感染するのが難しく、今後薬剤評価のためと HIV-1 領域拡大の努力は一応別個の研究と割り切るべきであろう。

幸い pol 領域が HIV-1 由来の SHIV がサルに感染することが確かめられたので、今後はこれらの安定化を図ること、そしてそれを利用した実験的治療法の開拓をより積極的に進める予定である。またサルを使える最大の利点は、ヒトに対しては絶対に不可能な研究ができることである。以上のことを念頭に置いて、可能であれば何らかの新たな研究助成を受けて次の研究を行いたいと考えている。

##### 1) INT 阻害剤など新規薬剤の in vivo 評価

将来 NNRTI のように HIV-1 特異的な新規薬剤が続々と開発作成されるものと思われる。そうした薬剤の HAART レベルの評価には、本研究で開発した SHIV とサルの系はうってつけである。

##### 2) HAART 中断後に再び活発なウイルス産生をする臓器の解明

薬剤処理中にウイルスがどこに潜んでいる

のか、耐性ウイルスが活発に動き出すのはどこの臓器なのか、などの疑問を解明することは本疾病の根治療法を探る上で重要な問題である。新規 SHIV と薬剤の系はこうした研究に利用できる。

#### F. 健康危険情報

該当するものはない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Takahashi, M., Ido, E., Uesaka, H., Fukushima, T., Ibuki, K., Miura, T., Hayami, M., Takahashi, H.: Comparison of susceptibility to SIVmac239 infection in CD4<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup> T cells. Arch. Virol., 150:1517-28, 2005.

2) Horiuchi, R., Akahata, W., Kuwata, T., Enose, Y., Ido, E., Suzuki, H., Miyake, A., Saito, N., Ibuki, K., Goto, T., Miura, T., Hayami, M.: DNA vaccination of macaques by a full-genome SHIV plasmid that has an IL-2 gene and produces non-infectious virus particles. Vaccine, in press.

3) Takemura, T., Ekwalanga, M., Bikandou, B., Ido, E., Yamaguchi-Kabata, Y., Ohkura, S., Harada, H., Takehisa, J., Ichimura, H., Parra, H.J., Nende, M., Mubwo, E., Sepole, M., Hayami, M., Miura, T.: A novel SIV from black mangabey (*Lophocebus aterrimus*) in Democratic Republic of Congo. J. Gen. Virol., 86(7):1967-71, 2005.

4) Saito, N., Takahashi, M., Akahata, W., Ido, E., Hidaka, C., Ibuki, K., Miura, T., Hayami, M., Takahashi, H.: Analysis of evolutionary conservation in CD1d molecules among primates. Tissue Antigens., 66(6):674-82, 2005.

##### 2. 学会発表

Akiyama, H., Ido, E., Miura, T., Hayami, M.: Construction and characterization of a new simian/human immunodeficiency chimeric virus (SHIV) having the reverse transcriptase, integrase and the 3' half of HIV-1 genome

and its monkey-cell-adapted mutants. The XXII Symposium of the International Association for Comparative Research on Leukemia and Related Diseases, July 2-5, 2005, Heidelberg, Germany

Ido, E., Akiyama, H., Suzuki, H., Ibuki, K., Ishimatsu, M., Miura, T., Hayami, M.: Generation of novel SHIVs having HIV-1-derived Pol gene and their potential usefulness in AIDS studies. Seventh International Congress on AIDS in Asia and the Pacific, Kobe, July 1-5, 2005.

Ishimatsu, M., Ido, E., Suzuki, H., Akiyama, H., Miura, T., Hayami, M.: Generation of a novel SHIV that possesses HIV-1-derived protease gene and its infection to macaque monkeys: a useful tool for in vivo efficacy tests towards HIV protease inhibitors. 23rd annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, September 21-24, 2005, Oregon

Saito, N., Takahashi, M., Akahata, W., Ido, E., Hidaka, C., Ibuki, K., Miura, T., Hayami, M., Takahashi, H.: Evolutional conservation of the CD1d molecules among primates. 23rd annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, September 21-24, 2005, Oregon

Horiuchi, R., Ido, E., Akahata, W., Enose, Y., Ibuki, K., Miura, T., Goto, T., Takahashi, H., Hayami, M.: DNA vaccination of macaques by full-sized SHIV plasmids that produce non-infectious virus particles. Seventh International Congress on AIDS in Asia and the Pacific, Kobe, July 1-5, 2005.

Horiuchi, R., Ido, E., Akahata, W., Enose, Y., Ibuki, K., Miura, T., Goto, T., Takahashi, H., Hayami, M.: DNA vaccination of macaques by full-sized SHIV plasmids that produce non-infectious virus particles, Tenth International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim, November 16-17, 2005, Hanoi, Vietnam

石松美沙、井戸栄治、鈴木元、秋山尚志、三浦智行、速水正憲: SIVmac に HIV-1 のプロ

テアーゼ (PR) 遺伝子を組み込んだ SHIV-pr 感染アカゲザルにおける PR 阻害剤投与実験とその遺伝子変異解析、第 53 回日本ウイルス学会、2005 年 11 月 20 日-22 日、横浜

秋山尚志、井戸栄治、三浦智行、速水正憲: HIV-1 の逆転写酵素、インテグラーゼ及び 3' 側遺伝子をもつ SHIV のサル細胞馴化機序の解析、第 53 回日本ウイルス学会、2005 年 11 月 20 日-22 日、横浜

井戸栄治、石松美沙、秋山尚志、三浦智行、速水正憲: 逆転写酵素とインテグラーゼ遺伝子が HIV-1 由来の SHIV-rti のサル感染実験、第 19 回日本エイズ学会、2005 年 12 月 1 日-3 日、熊本

高橋秀実、高橋めぐみ、斉藤尚紀、守屋慶一、上坂浩実、福島達伸、井戸栄治、伊吹謙太郎、三浦智行、速水正憲: サル CD4+T 細胞と CD4+CD8+T 細胞の SIVmac239 に対する感受性の差異、第 19 回日本エイズ学会、2005 年 12 月 1 日-3 日、熊本

H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)  
今のところなし。

# HIV-1の遺伝子領域に特異的に作用する新規SHIVと

## サルモデル系を用いた動物感染実験の研究

京都大学ウイルス研究所  
新興ウイルス感染症研究センター

井戸栄治

### 研究のねらい

- I. 人になるだけ近い動物としてサルを用いて、HIV-1の遺伝子領域を広域に持つ新規SHIVによる動物モデル系を確立する →特に*pro*領域をHIV-1由来にする
- II. その系を用いて、ヒトに対しては倫理的に不可能な実験的治療薬の開発研究を行う

### これまで3年間にやったこと

Part I. 人になるだけ近い動物としてサルを用いてHIV-1の遺伝子領域を広域に持つ新規SHIVによる動物モデル系を確立する

- 1) SHIV-prのサル感染実験
- 2) SHIV-rtiのサル感染実験
- 3) SHIV-rtiのサル感染実験
- 4) SHIV-rt/3m及びSHIV-rti/3mのサル感染実験

Part II. その系を用いてヒトでは倫理的に不可能な実験的治療薬開発研究を行う

- 1) SHIV-pr持続感染サルへのPR阻害剤経口投与実験
- 2) SHIV持続感染サルへのIL-15の治療効果の検討
- 3) SIV感染サルへのインテグラーゼ阻害剤投与実験

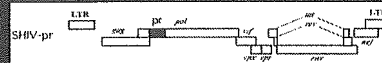
### Amino Acid Sequences near the Cleavage Sites by Viral Protease

MA239 HIV-1 Ser Gln Val Lys Phe Ile Val Gln  
SHVmac Gly Gly Asp Lys Phe Val Gln Gln

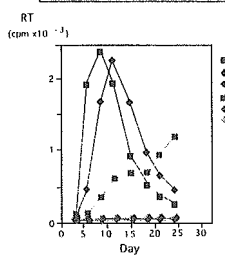
NC1R HIV-1 Ser Phe Ser Phe Phe Gln Ile Thr  
SHVmac Gly Phe Ala Ala Phe Gln Phe Ser

PRRT HIV-1 Thr Gln Val Phe Thr Tyr Ser Pro  
SHVmac Ser Leu Asp Phe Pro Ile Ala Lys

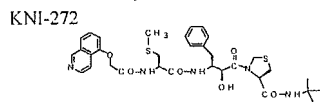
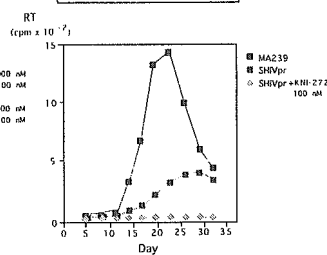
RT1S HIV-1 Arg Lys Val Leu Phe Leu Asp Gly  
SHVmac Arg Gln Val Leu Phe Leu Glu Lys



Inhibition of Viral Growth by KNI-272 in HSC-F Cells



Inhibition of Viral Growth by KNI-272 in Monkey PBMC



### SHIV-prのサル感染実験

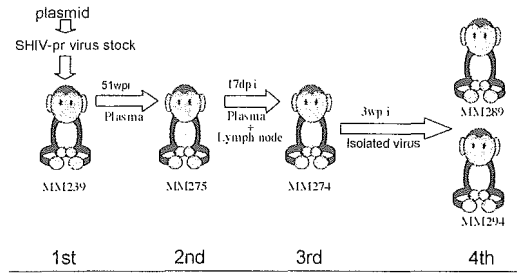
SHIV-pr ( $2 \times 10^5$ TCID<sub>50</sub>) was intravenously injected into two rhesus macaques [MM236(male) and MM239(female)]

- Virus isolation
- Plasma viral RNA load
- PA antibody
- CD4/8

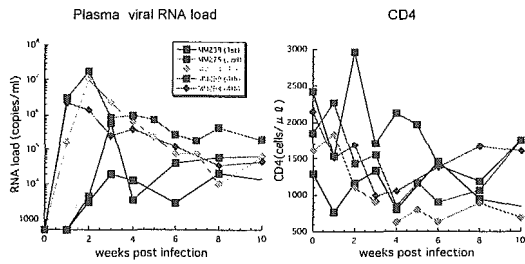
### Virus isolation and PA antibody titers in SHIV-pr infected rhesus monkeys

Week	0	1	2	3	4	6	8	11	15	20	27	31	45	51
<b>Virus isolation</b>														
MM1236	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
MM1239	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
<b>PA antibody (Genedia JHY-1.2)</b>														
MM1236	<32	<32	<32	32	32	32	256	256	256	256	256	256	256	ND
MM1239	<32	<32	<32	<32	<32	<32	256	1024	1024	1024	4096	≥16384	≥16384	≥16384

### SHIV-pr の *in vivo* 継代

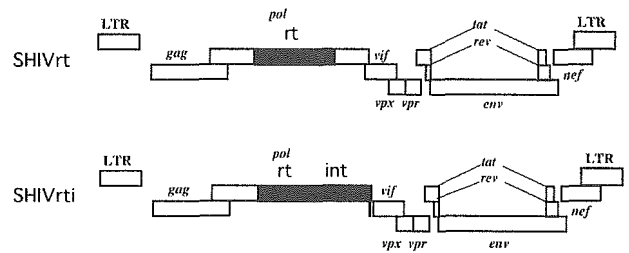


### Results of *in vivo* passage of SHIV-pr



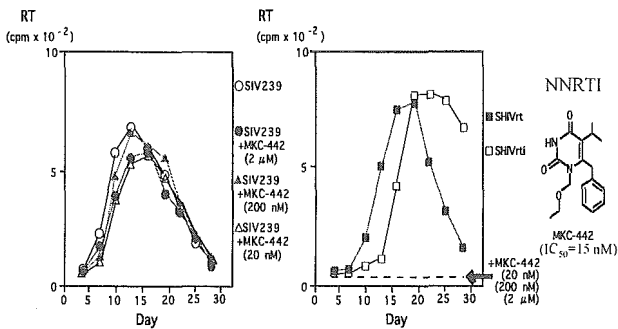
The *in vivo* passage of the virus, however, gradually enhanced its viral productivity and the peak values of viral RNA loads reached  $10^6$ - $10^7$  in the 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> generations with rather high set points ( $\sim 10^5$ ).

### polのPR以外の遺伝子領域をHIV-1のそれと置き換える



### SIVmac239 Infection to Rhesus PBMC

### SHIVrt & SHIVrti Infection to Rhesus PBMC

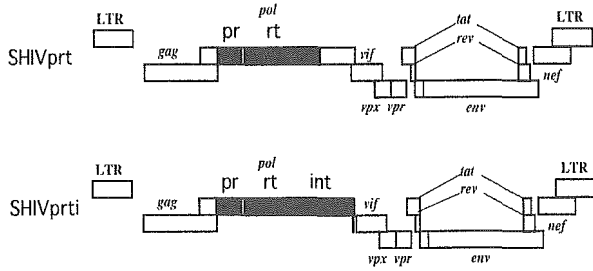


### Virus isolation and PA antibody titers in SHIV-rti infected rhesus monkeys

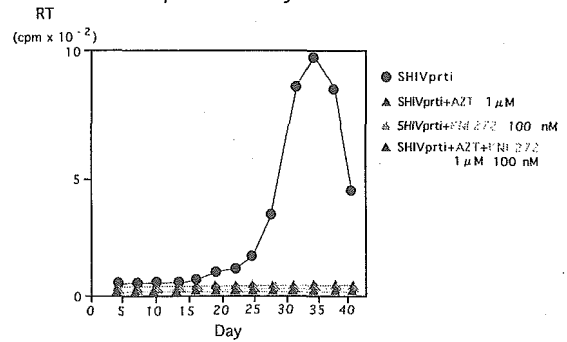
Week	0	1	2	3	4	6	8	10	12	16	21	25
<b>Virus isolation</b>												
MM402	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+
MM403	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
<b>PA antibody (Genedia JHY-1.2)</b>												
MM402	<32	<32	<32	<32	<32	<32	<32	32	256	1024	2048	4096
MM403	<32	<32	<32	<32	<32	<32	<32	<32	32	64	32	32



PRからINTまで *pol* 遺伝子領域ほぼ全体をHIV-1のものに置換する



Effect of KNI-272/AZT on Viral Growth of SHIVprti in Monkey PBMC



Virus isolation and PA antibody titers in SHIV-prti-infected rhesus monkeys

Week 0 1 2 3 4 6 8 10 12

Virus isolation

MM117	-	-	-	-	-	+	+	+
MM133	-	+	-	+	+	+	-	+

PA antibody (Genedra HIV-1.2)

MM117	<32	<32	<32	<32	<32	<32	32	32
MM133	<32	<32	<32	<32	<32	<32	32	32

Part I のまとめ

1. *pol* 遺伝子領域の一部あるいは大部分がHIV-1由来の一連の新規SHIVが作成され、これらはサル由来の細胞株のみならず、アカゲサルPBMCで増殖することが示された。
2. これらのSHIVは *in vitro*細胞培養レベルで、PR阻害剤やRT阻害剤に対し、その増殖が型特異的に阻害されることが明らかとなった。
3. SHIV-pr、SHIV-rti、およびSHIV-prtiは、アカゲサル個体に感染することが分かった。この内SHIV-prは *in vivo*継代によって高いウイルスロードを維持する持続感染状態になることが明らかとなった。
4. Env領域もHIV-1由来にした更に広域がHIV-1のSHIVは、サルに感染するが持続感染には至らないことが分かった。

これまで3年間にやったこと

Part I. 人になるだけ近い動物としてサルを用いてHIV-1の遺伝子領域を広域に持つ新規SHIVによる動物モデル系を確立する

- 1) SHIV-prのサル感染実験
- 2) SHIV-rtiのサル感染実験
- 3) SHIV-prtiのサル感染実験
- 4) SHIV-rt/3m及びSHIV-rti/3mのサル感染実験

Part II. その系を用いてヒトでは倫理的に不可能な実験的治療薬開発研究を行う

- 1) SHIV-pr持続感染サルへのPR阻害剤経口投与実験
- 2) SHIV持続感染サルへのIL-15の治療効果の検討
- 3) SIV感染サルへのインテグラーゼ阻害剤投与実験

プロテアーゼ阻害剤の経口投与実験

Drug :

Kaletra (PR inhibitor: a mixture of lopinavir/ritonavir)

Method :

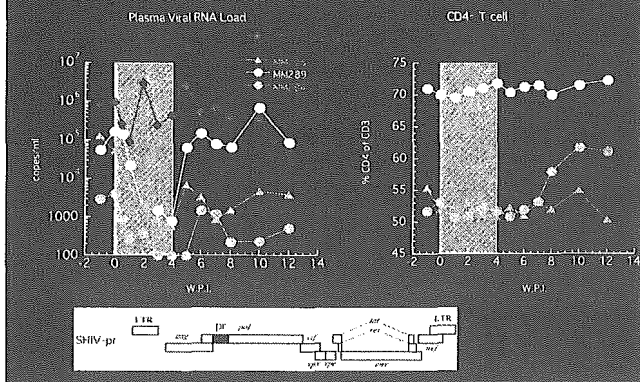
The content of Kaletra capsule (a mixture of lopinavir/ritonavir) was suspended in drinking water and administered by the oral route (12/3 mg/kg/day) to monkeys for 4 weeks.

Animals:

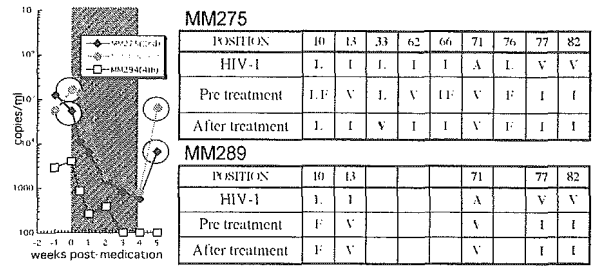
SHIV-pr persistently infected monkeys

MM275(2nd), MM289(4th) and MM294(4th)

HIV-1 プロテアーゼ阻害剤(カレトラ)の経口投与によるサル個体内での効果



Karletra処理によるウイルスの変異(PR領域)



Part II のまとめ

- SHIV-prが持続感染しているサルにPR阻害剤であるKaletraを4週間経口投与すると、血中ウイルスロードは検出限界レベルまで減少し、投薬を中止すると直ちに元のレベルにまでリバウンドすることが分かった。このことは、HIV-1用に開発された阻害剤について、新規SHIVとサルを用いて in vivoレベルで評価できることを意味しており、新しいツールとしての有用性が実証されたものと考えられる。
- IL-15によるエイズ治療の効果がサルで示唆された。しかし頭数が少なく、しかも2頭中1頭でのみの弱い効果であったので、IL-15の投与方法や投与量など、さらに今後の条件検討が必要と考えられた。
- A社のINT阻害剤をSIVが持続感染しているサルに皮下投与したが、一時的にウイルスロードを減少させたものの効果は持続しなかった。またその薬剤に対する耐性変異が生じていた。

今後の展開

- SHIV-rti、SHIV-rti の in vivo 継代により、安定で高いウイルスロードの持続感染サルを確保する
- それらの分子クローンを作成する
- インテグラーゼ阻害剤を始めとして、開発中の薬剤や新規な組み合わせのHAART療法について in vivo評価を行う
- 薬剤処理中および中断後のウイルス潜伏もしくは増殖再開部位を、全身臓器の解析により明らかにする(動物でしかできない)

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

分担研究報告書

「polのRTとINT領域及びenvをHIV-1由来にしたSHIV(SHIV-rti/3rn)のサル細胞への馴化に関わる変異の解析」

分担研究者 伊吹 謙太郎 京都大学ウイルス研究所 助手

## 研究要旨

SHIV-rti/3rn は、SIVmac のゲノムに、HIV-1 の RT と INT 遺伝子および ENV 遺伝子を組み込んだキメラウイルスである。このプロウイルスプラスミドを培養細胞にトランスフェクションすると、感染性のウイルスが産生される。しかしこのウイルスは、ヒト由来の細胞株ではよく増殖するもののサル由来の細胞株 HSC-F では増殖が極めて弱かった。そこで、サル細胞への adaptation をねらって HSC-F で 26 週間継代を続けた結果、HSC-F ならびにアカゲザル PBMC において明らかな増殖能の向上が見られたので、この継代ウイルスを 3 頭のアカゲザルに静脈内接種したところ、いずれのサルにおいても接種後 1 週目に血中ウイルス量が  $10^5$ ~ $10^6$  copies/ml のピークに到達し、2 週目からは抗体応答も認められ、ウイルス分離、PCR の成績からも感染が成立したと考えられた（前年度に報告）。このサル細胞への馴化に際し、どのような変異が生じたかを解析した結果、継代前と後のウイルスではゲノム全体に渡って全部で 11 ヶ所（Gag の MA と CA、Pol の INT、gp120 に 4 ヶ所、gp41 に 3 ヶ所、他に PBS に 1 ヶ所）の変異（PBS を除いてアミノ酸の置換を伴う変異）が認められたが、この内 Gag の CA (p27) 領域と gp41 領域の内の一つ、都合 2 ヶ所の変異が最もサル細胞における増殖能向上に寄与していることが明らかとなった。また、それぞれの変異を持つフルゲノムの分子クローンも作成した。

## A. 研究目的

HIV-1 の遺伝子領域を広域に持つ SHIV があれば、サルを用いた動物モデルとしては最も望ましい。これまでに RT 遺伝子と ENV 遺伝子を HIV-1 にした SHIV がサルに感染することを

示しているのに、これに更に INT 遺伝子を HIV-1 にしたところ、サル細胞での増殖能は急激に弱くなることが分かった。しかしながら、in vitro での継代により弱かった増殖能は工場することが判り、この馴化の間にどのような変異が入ったのかを解析することがサル細胞で増殖する SHIV を作る上で重要な情報が得られるものと考えられた。

## B. 研究方法

pol の RT と INT 領域及び env を HIV-1 由来にした SHIV(SHIV-rti/3rn)のサル感染実験に用いた材料の内、コンストラクト直後のプラスミド DNA、in vitro 継代中の培養上清、接種時のウイルス液、サル個体から再分離されたウイルスを RT-PCR により配列分析した。最終的にはゲノム全体で 11 ヶ所の変異が見つかったので、各変異を持つコンストラクトを作成し、それらの増殖性能を比較することでサル細胞への適応がどの段階で獲得されたかを検討することにした。

## （倫理面への配慮）

本研究では、治療薬開発にサルを用いている。従って差し当たって人権上の問題は該当しない。実験動物としてサルを使用する点については、動物愛護の配慮を怠ることなく主任研究者の所属する京都大学ウイルス研究所のサルの飼育と使用に関する委員会（通称「霊長類委員会」）に定める規定・指針に則して研究を行っている。

## C. 研究結果

サル細胞への馴化に際し、継代前と後のウイルスではゲノム全体に渡って全部で11ヶ所（Gag のMAとCA、PolのINT、gp120に4ヶ所、gp41に3ヶ所、他にPBSに1ヶ所）の変異（PBSを除い

てアミノ酸の置換を伴う変異)が認められた。この内GagのCA (p27) 領域とPBSの変異はトランスフェクト後、直ちに生じる変異であった。ENV領域のgp120領域とgp41領域の変異、それぞれ4ヶ所、3ヶ所はグループとして変異を持ったコンストラクトの比較の結果、どちらもサル細胞(HSF-C)へのadaptationに貢献するものの、gp41のものの方がより貢献度が高いことが判った。

#### D. 考察

サル細胞への adaptation に際して多くの変異が見つけられたが、それぞれの寄与度は異なっており、それらを個別に持つフルゲノムの分子クローンを作成して初めてそのような比較が出来たわけである。実際そうした一連の変異を持つ分子クローンは、現在世界で最も HIV-1 領域が広く、かつサルの PBMC で (サル個体でも) 増殖するウイルスであり、それを手にした意義は極めて大きい。

#### E. 結論

結局、この遺伝子構造に関してはサル細胞での増殖能の獲得は、Env の特に gp41 の変異がかなり重要であることが分かったことになる。もっとも、サル PBMC でのウイルス増殖には INT の変異も大きな影響を及ぼしており、HIV-1 の領域を広げるとたとえ一カ所の変異でありウイルス構造全体への波及効果が現れ、ことは単純ではないということらしい。

#### F. 健康危険情報

該当するものはない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Shimizu, Y., Miyazaki, Y., Ibuki, K., Suzuki, H., Kaneyasu, K., Goto, Y., Hayami, M., Miura, T., Haga, T.: Induction of immune response in macaque monkeys infected with simian-human immunodeficiency virus having the TNF- $\alpha$  gene at an early stage of infection. *Virology*, 343(2):151-61, 2005.

2) Horiuchi, R., Akahata, W., Kuwata, T., Enose,

Y., Ido, E., Suzuki, H., Miyake, A., Saito, N., Ibuki, K., Goto, T., Miura, T., Hayami, M.: DNA vaccination of macaques by a full-genome SHIV plasmid that has an IL-2 gene and produces non-infectious virus particles. *Vaccine*, in press.

3) Saito, N., Takahashi, M., Akahata, W., Ido, E., Hidaka, C., Ibuki, K., Miura, T., Hayami, M., Takahashi, H.: Analysis of evolutionary conservation in CD1d molecules among primates. *Tissue Antigens.*, 66(6):674-82, 2005.

4) Miyake, A., Ibuki, K., Suzuki, H., Horiuchi, R., Saito, N., Motohara, M., Hayami, M., Miura, T.: Early virological events in various tissues of newborn monkeys after intrarectal infection with pathogenic simian human immunodeficiency virus. *J. Med. Primatol.*, 34(5-6):294-302, 2005.

5) Kaneyasu, K., Kita, M., Ohkura, S., Yamamoto, T., Ibuki, K., Enose, Y., Sato, A., Kodama, M., Miura, T., Hayami, M.: Protective efficacy of nonpathogenic nef-deleted SHIV vaccination combined with recombinant IFN- $\gamma$  administration against a pathogenic SHIV challenge in rhesus monkeys. *Microbiol. Immunol.*, 49(12):1083-94, 2005.

6) Suzuki, H., Motohara, M., Miyake, A., Ibuki, K., Fukazawa, Y., Inaba, K., Masuda, K., Minato, N., Kawamoto, H., Hayami, M., Miura, T.: Intrathymic effect of acute pathogenic SHIV infection on T-lineage cells in newborn macaques. *Microbiol. Immunol.*, 49(7):667-79, 2005.

7) Miyake, A., Ibuki, K., Enose, Y., Suzuki, H., Horiuchi, R., Motohara, M., Saito, N., Nakasone, T., Honda, M., Watanabe, T., Miura, T., Hayami, M.: Rapid dissemination of a pathogenic simian/human immunodeficiency virus to systemic organs and active replication in lymphoid tissues following intrarectal infection. *J. Gen. Virol.*, in press.

##### 2) 学会発表

Haga, T., Shimizu, Y., Miyazaki, Y., Ibuki, K.,

Kaneyasu, K., Suzuki, H., Goto, Y., Miura, T., Hyami, M.: Induction of immune response in macaque monkeys infected with simian-human immunodeficiency virus having the TNF-alpha gene early stage of infection. Keystone Symposium, July 23-8, 2005, Sanfrancisco

Motohara, M., Ibuki, K., Miyake, A., Fukazawa, Y., Inaba, K., Suzuki, H., Masuda, K., Minato, N., Kawamoto, H., Nakasone, T., Honda, M., Hayami, M., Miura, T.: Impaired T cell differentiation in the thymus at the early stages of acute pathogenic SHIV infection in monkeys in comparison to low pathogenic SHIV infection. 23rd annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, September 21-24, 2005, Oregon

Ibuki, K., Miyake, A., Horiuchi, R., Saitou, N., Suzuki, H., Motohara, M., Fukazawa, Y., Inaba, K., Miura, T., Hayami, M.: The effects of low-pathogenic SHIV intrarectal infection on immune cell population of the intestinal tract in comparison to acute-pathogenic SHIV infection. 23rd annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, September 21-24, 2005, Oregon

Saito, N., Takahashi, M., Akahata, W., Ido, E., Hidaka, C., Ibuki, K., Miura, T., Hayami, M., Takahashi, H.: Evolutional conservation of the CD1d molecules among primates. 23rd annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, September 21-24, 2005, Oregon

Horiuchi, R., Ido, E., Akahata, W., Enose, Y., Ibuki, K., Miura, T., Goto, T., Takahashi, H., Hayami, M.: DNA vaccination of macaques by full-sized SHIV plasmids that produce non-infectious virus particles, Tenth International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim, November 16-17, 2005, Hanoi, Vietnam

清水祐也、宮崎恭行、伊吹謙太郎、後藤義孝、三浦智行、速水正憲、芳賀猛：TNF- $\alpha$  遺伝子挿入 SHIV 感染アカゲサルにおける効果的な免疫応答、第 23 回九州実験動物研究総会、2005 年 11 月 19 日～20 日、佐賀

稲葉一寿、深澤嘉拍、堀内励生、三宅在子、松田健太、松山めぐみ、姫野愛、伊吹謙太郎、速水正憲、三浦智行：強毒 SHIV の経粘膜・経静脈感染アカゲサルの感染病態および腸病変の比較解析、第 53 回日本ウイルス学会、2005 年 11 月 20 日～22 日、横浜

三宅在子、石田尚志、深澤嘉拍、伊吹謙太郎、三浦智行、速水正憲、渡邊俊樹：SHIV 感染サル検体を用いた感染初期および後期におけるプロウイルス LTR 上のヒストン化学修飾状態の解析、第 53 回日本ウイルス学会、2005 年 11 月 20 日～22 日、横浜

三宅在子、石田尚臣、深澤嘉拍、伊吹謙太郎、三浦智行、速水正憲、渡邊俊樹：SHIV 感染サル検体を用いたプロウイルス LTR 上のヒストン化学修飾状態の解析、第 28 回日本分子生物学会年会、2005 年 12 月 7 日～10 日、福岡

深澤嘉拍、三宅在子、伊吹謙太郎、鈴木元、堀内励生、斉藤尚紀、元原麻貴子、稲葉一寿、姫野愛、渡邊俊樹、三浦智行、速水正憲：強毒、弱毒 SHIV 粘膜感染初期の全身臓器におけるウイルス動態の解析、第 19 回日本エイズ学会、2005 年 12 月 1 日～3 日、熊本

兼安健太郎、伊吹謙太郎、大倉定之、姫野愛、喜多正和、山本俊郎、佐藤彰彦、三浦智行、速水正憲：nef 欠損弱毒 SHIV のワクチン効果に対する rIFN- $\gamma$  投与の増強効果、第 19 回日本エイズ学会、2005 年 12 月 1 日～3 日、熊本

元原麻貴子、伊吹謙太郎、三宅在子、深澤嘉伯、稲葉一寿、鈴木元、増田恭子、河本宏、仲宗根正、本多三男、速水正憲、三浦智行：強毒・弱毒 SHIV の感染初期における胸腺組織及び胸腺内 T 前駆細胞の解析、第 19 回日本エイズ学会、2005 年 12 月 1 日～3 日、熊本

高橋秀実、高橋めぐみ、斉藤尚紀、守屋慶一、上坂浩実、福島達伸、井戸栄治、伊吹謙太郎、三浦智行、速水正憲：サル CD4+T 細胞と CD4+CD8+T 細胞の SIVmac239 に対する感受性の差異、第 19 回日本エイズ学会、2005 年 12 月 1 日～3 日、熊本

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）  
今のところなし。



研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takahashi, M., <u>Ido, E.</u> , Uesaka, H., Fukushima, T., Ibuki, K., Miura, T., Hayami, M., Takahashi, H.	Comparison of susceptibility to SIVmac239 infection in CD4 <sup>+</sup> and CD4 <sup>+</sup> 8 <sup>+</sup> T cells.	Arch. Virol.	150	1517-28	2005
Horiuchi, R., Akahata, W., Kuwata, T., Enose, Y., <u>Ido, E.</u> , Suzuki, H., Miyake, A., Saito, N., Ibuki, K., Goto, T., Miura, T., Hayami, M.	DNA vaccination of macaques by a full-genome SHIV plasmid that has an IL-2 gene and produces non-infectious virus particles.	Vaccine	In press		2006
Takemura, T., Ekwalanga, M., Bikandou, B., <u>Ido, E.</u> , Yamaguchi-Kabata, Y., Ohkura, S., Harada, H., Takehisa, J., Ichimura, H., Parra, H.J., Nende, M., Mubwo, E., Sepole, M., Hayami, M., Miura, T.	A novel SIV from black mangabey ( <i>Lophocebus</i> <i>aterrimus</i> ) in Democratic Republic of Congo.	J. Gen. Virol.	86(7)	1967-71	2005
Saito, N., Takahashi, M., Akahata, W., <u>Ido,</u> <u>E.</u> , Hidaka, C., Ibuki, K., Miura, T., Hayami, M., Takahashi, H.	Analysis of evolutionary conservation in CD1d molecules among primates.	Tissue Antigens	66(6)	674-82	2005
Shimizu, Y., Miyazaki, Y., <u>Ibuki, K.</u> , Suzuki, H., Kaneyasu, K., Goto, Y., Hayami, M., Miura, T., Haga, T.	Induction of immune response in macaque monkeys infected with simian-human immunodeficiency virus having the TNF-alpha gene at an early stage of infection.	Virology	343(2)	151-61	2005
Miyake, A., <u>Ibuki, K.</u> , Suzuki, H., Horiuchi, R., Saito, N., Motohara, M., Hayami, M., Miura, T.	Early virological events in various tissues of newborn monkeys after intrarectal infection with pathogenic simian human immunodeficiency virus.	J. Med. Primatol	34(5-6)	294-302	2005



Kaneyasu, K., Kita, M., Ohkura, S., Yamamoto, T., <u>Ibuki, K.</u> , Enose, Y., Sato, A., Kodama, M., Miura, T., Hayami, M	Protective efficacy of nonpathogenic nef-deleted SHIV vaccination combined with recombinant IFN- gamma administration against a pathogenic SHIV challenge in rhesus monkeys.	Microbiol. Immunol.	49(12)	1083-94	2005
Suzuki, H., Motohara, M., Miyake, A., <u>Ibuki, K.</u> , Fukazawa, Y., Inaba, K., Masuda, K., Minato, N., Kawamoto, H., Hayami, M., Miura, T.	Intrathymic effect of acute pathogenic SHIV infection on T- lineage cells in newborn macaques.	Microbiol. Immunol.	49(7)	667-79	2005
Miyake, A., <u>Ibuki, K.</u> , Enose, Y., Suzuki, H., Horiuchi, R., Motohara, M., Saito, N., Nakasone, T., Honda, M., Watanabe, T., Miura, T., Hayami, M.	Rapid dissemination of a pathogenic simian/human immunodeficiency virus to systemic organs and active replication in lymphoid tissues following intrarectal infection.	J. Gen. Virol.	In press		2006

## Comparison of susceptibility to SIVmac239 infection between CD4<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup> T cells

M. Takahashi<sup>1,2</sup>, E. Ido<sup>3</sup>, H. Uesaka<sup>2,3</sup>, T. Fukushima<sup>1,2</sup>, K. Ibuki<sup>3</sup>,  
T. Miura<sup>3</sup>, M. Hayami<sup>3</sup>, and H. Takahashi<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology and Immunology, Nippon Medical School,  
Tokyo, Japan

<sup>2</sup>Laboratory of Virus Control, Institute for Virus Research,  
Kyoto University, Kyoto, Japan

<sup>3</sup>Laboratory of Viral Pathogenesis, Institute for Virus Research,  
Kyoto University, Kyoto, Japan

Received September 8, 2004; accepted February 17, 2005

Published online April 21, 2005 © Springer-Verlag 2005

**Summary.** CD4-bearing T cells are the primary targets for human immunodeficiency virus type 1(HIV-1)/simian immunodeficiency virus (SIV) infection. However, it is unclear whether the susceptibility of CD4-bearing T cells including CD4 single positive and CD4/8 double positive T cells to HIV/SIV infection is the same or not. In this study, we compared the susceptibility to SIV infection between CD4<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup> T cells, using Herpesvirus saimiri (HVS)-transformed CD4<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup> T cells established from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of rhesus macaques. Although there was little difference between the two CD4-bearing T cell population in the expression level of CD4 molecules and chemokine receptors such as CXCR4 and CCR5, SIV replicated more efficiently in CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup> T cells than in CD4<sup>+</sup> T cells. Moreover, we found that reverse transcription initiated more efficiently in CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup> T cells than in CD4<sup>+</sup> T cells and that the cell lysates from CD4<sup>+</sup> T cells impaired the RT activity more strongly than that from CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup> T cells. These findings suggest that intracellular environment in CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup> T cells is better for reverse transcription and that the infection of those CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup> T cells might play critical and different roles in HIV-1/SIV infection and dissemination.

### Introduction

CD4 molecule is the major receptor used by human immunodeficiency virus type 1(HIV-1)/simian immunodeficiency virus (SIV) for binding and entry into target cells. The HIV-1/SIV have a strong cytopathic action on the CD4<sup>+</sup> T cells, and the significant depletion of those CD4<sup>+</sup> T cells in the blood as well as the peripheral lymphoid organs of infected patients are the hallmarks of progressive immune

impairment leading to AIDS [17, 20]. The chemokine receptors CCR5 and CXCR4 have been identified as co-receptors for HIV-1/SIV [6, 8]. Distribution of these receptors permits the virus to infect not only CD4<sup>+</sup> T cells but also macrophages and dendritic cells (DCs) [7, 12]. After the infection, HIV-1/SIV integrates into the DNA of the host cells. Therefore, the replicating capacity of the integrated viral genome, or provirus, may be greatly influenced by the metabolic and activation state of the host cells [9, 18].

CD4-bearing T cells include both CD4 single positive T cells and CD4/8 double positive T cells. CD4<sup>+</sup> T cells broadly distribute in the body, whereas CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup> T cells are localized in the particular organs such as thymus and small intestine. CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup> thymocytes, which are situated in the relatively immature stage of differentiation, have been shown a marked susceptibility to HIV-1/SIV infection and replication [3, 22]. Severe depletion of CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup> T cells in intraepithelial lymphocytes (IELs) was also observed in SIV-infected rhesus macaques [19, 21]. These observations indicate that CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup> T cells are highly permissive to HIV-1/SIV infection and replication. Thus we speculated that CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup> T cells might be equally or more susceptible to HIV-1/SIV infection with higher replication capacity in comparison with CD4<sup>+</sup> T cells. To address this question, we compared the susceptibility to SIV infection in CD4<sup>+</sup> T and CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup> T cells using Herpesvirus saimiri (HVS)-transformed CD4<sup>+</sup> T and CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup> T cells established from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of rhesus macaques.

Here we show that SIV replicated more efficiently in CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup> T cells than in CD4<sup>+</sup> T cells and such SIV replicating capacity in CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup> T cells was enhanced via progressed reverse transcription.

## Materials and methods

### *Cell culture and virus*

Two CD4<sup>+</sup> T cell clones (133, 135-1-3) and two CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup> T cell clones (135-1, 136-1) were established by HVS-immortalized method [16, 27] from PBMC of three rhesus macaques (*Macaca mulatta*) MM133, MM135 or MM136. Briefly, PBMC were separated from whole blood by Ficoll-Hypaque (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) centrifugation, stimulated for 2 to 3 days with 10 µg/ml of phytohemagglutinin-P (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and then infected in bulk with HVS strain C-488 (kindly provided by Dr. Yasukawa). After 6 to 8 weeks in culture in RPMI 1640-based medium [25] supplemented with 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 0.1 mM nonessential amino acids, a mixture of vitamins, 1 mM HEPES, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 50 µM 2-ME, heat-inactivated 10% FCS, and 100 units/ml of human recombinant IL-2, viable cells were recovered by Ficoll-Hypaque separation and CD4<sup>+</sup> T cells or CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup> T cells were cloned by limiting dilution. A molecular clone of SIV (SIVmac239) was used in the present study and was grown on C8166 cells [4] and titrated with M8166 cells (a subclone of C8166). The titer of virus stock was 10<sup>+</sup> TCID<sub>50</sub>/ml.

### *Infection of CD4<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup> T cells with SIV*

Cells were infected with SIV (moi 0.05-1) in 48 well plates and incubated for 2 h at 37 °C. After washing twice with phosphate buffered saline (PBS) to remove free virus, cells were cultured for 4-7 days.

*Reverse transcriptase (RT) assay and detection of p27*

The RT assay was performed as described previously [26]. The amount of p27 core antigen in the culture supernatant was measured using the SIV Core Antigen ELISA kit (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA).

*Semi-quantitative PCR*

DNA was isolated from cultured cells using QIAamp DNA Blood kits (Qiagen, Valencia, CA, USA). Quantification of DNA was performed by real-time PCR with  $\beta$ -actin primers as internal control. Real-time PCR was carried out in a 20  $\mu$ l containing template DNA, primers for  $\beta$ -actin (forward, 5'-tcaccacactgtgccatctacga-3'; reverse, 5'-cagcgggaaccgctcattgccaatgg-3'), and SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems Foster City, CA, USA). Fluorescence was measured after each cycle using ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems). DNA estimated by real-time PCR was subjected to PCR with the following primers specific for the *nef* gene of SIVmac239 (forward, 5'-ctcactctctgtgagggacagaaa-3'; reverse, 5'-ccccgtaacatccccttggaaagtccc-3') and the R/U5 region of SIVmac239 LTR (forward, 5'-ttctctccagcactagcaggtagagcctgggtgtccctg-3'; reverse, 5'-caggcgccaatctgctgagggatttctgcttc-3'). To demonstrate that equal amounts of DNA were subjected to PCR, we showed the electrophoresis data of  $\beta$ -actin PCR product during the exponential phase of amplification.

RNA was prepared from cultured cells using RNAeasy (Qiagen). One microgram of RNA was incubated for 1 h at 42 °C after adding 20 U of RNase inhibitors (Takara, Otsu, Japan), 0.2 mM deoxynucleoside triphosphates, 2.5 nM random primers, 11 U of Rous associated virus 2 reverse transcriptase (Takara) and reverse transcriptase buffer to a final volume of 20  $\mu$ l. Quantification of cDNA was performed by real-time PCR with  $\beta$ -actin primers as mentioned above. cDNA estimated by real-time PCR was subjected to PCR with the following respective primers specific for CD3 (forward, 5'-tctgtgacctccgcatctt-3'; reverse, 5'-ggagacctggccagcgggag-3'), CD4 (forward, 5'-cctcccactcgcctttaca-3'; reverse, 5'-tcagcaccacaccgccttc-3'), Bob (forward, 5'-aaggacagactgtgcatatgtagtctg-3'; reverse, 5'-tctcagcttttgtgtgctttcctg-3'), and Bonzo (forward, 5'-ggatgacctggggcaaggtcaccagc-3'; reverse, 5'-gtgcttctggaagcctccagcatgaag-3').

*Cell staining*

Cells were pelleted and resuspended at a concentration of  $5 \times 10^5$  cells in 50  $\mu$ l of PBS with 0.1% NaN<sub>3</sub> containing FITC-labeled mouse anti-CD3 mAb (clone SP34; BD PharMingen, San Diego, CA, USA), PE-labeled mouse anti-CD4 mAb (clone L200; BD PharMingen), FITC-labeled mouse anti-CD8 mAb (clone RPA-T8; BD PharMingen), PE-labeled anti-CXCR4 mAb (clone 12G5; BD PharMingen), or PE-labeled anti-CCR5 mAb (clone 3A9; BD PharMingen). After 30 min incubation on ice, cells were washed and resuspended in PBS for analysis by FACScan (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

*Measurement of cell growth*

Single cell suspensions were seeded at a density of  $1 \times 10^5$  cells per well on 96-well microtiter plates. After 7 days of incubation, colorimetric determination of cell growth was performed using XTT Cell Proliferation kit (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA).

*Virus entry assay*

Cells were infected with virus (moi 1) for 2 h at 37 °C. After washing with PBS, cells were treated with 0.05% trypsin containing 0.02% EDTA. After washing extensively, cells were