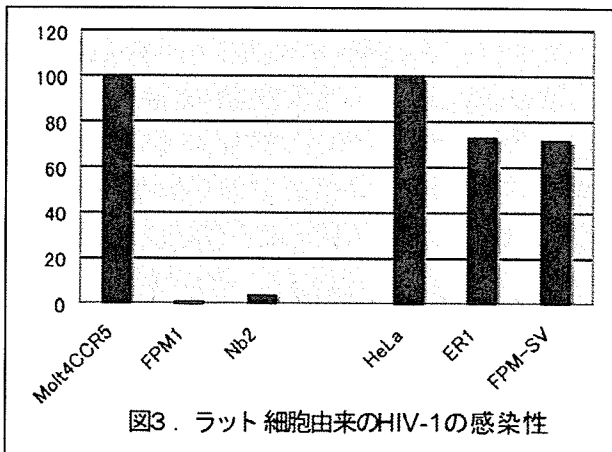


感染性ウイルス粒子の形成

ラット細胞で生産された HIV-1 の感染性を測る為に、細胞の上清中の p24 量と感染価を測定し、感染価/p24 を計算した. 図3に示されているように、ラット上皮系細胞由来の HIV はヒト細胞と同様の感染性を有していたが、ラット T 細胞由来のウイルスは低い感染性しか持っていなかった.



FPM1 細胞由来の HIV-1 粒子を Western blotting で分析すると、Gag のプロセッシングは正常だった. 又、ウイルス RNA もヒト T 細胞由来ウイルスとほぼ同量存在した. これらの事は感染性減弱因子の存在を示唆している.

最も有名な感染性減弱因子はヒト APOBEC3G である. 又、ラット APOBEC3 が HIV-1 の感染性をなくする事が示唆されている. そこで、APOBEC3 siRNA を発現するレンチベクター (PRIME ベクター) 用いて、APOBEC3 mRNA 量が 1/10 に落ちた FPM1 細胞を作製して HIV-1 の感染性を調べた. しかし、感染性は回復しなかった.

トランスジェニックラット (Tg) の作成

上記のように hCyclinT1 が HIV-1 の T 細胞での増殖を助ける事が分かったので、この full ゲノムを持つ BAC クローンを入手して Tg ラットを作製した. 現在 3 種類のフ

アウンダーを得ている。又、この数年来作製できなかった、CD4 の発現 lineage に即して発現が調節される hCD4 Tg ラットの作成に成功した。

D 考察

今年度はラット上皮系細胞、T 細胞株、マクロファージ細胞株を用いて、HIV-1 の増殖に関与する因子の同定と比較検討を行った。

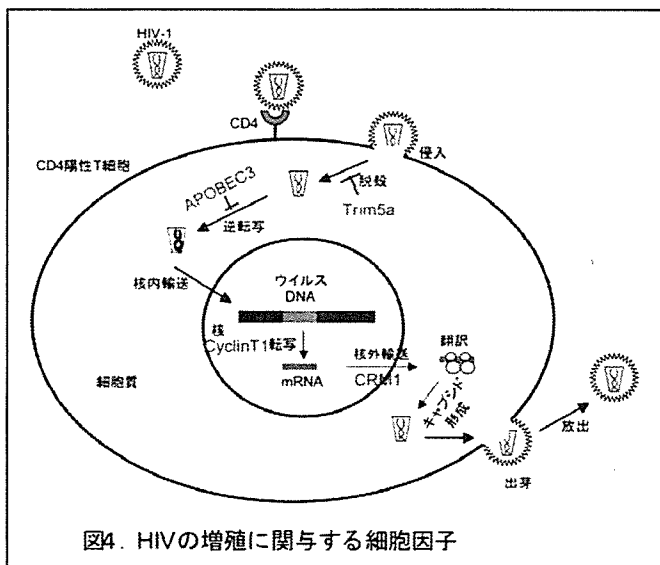


図4に示されているように、ウイルスの侵入過程で働く阻害因子として Trim5a と APOBEC3 が知られている。本研究から、ラットのある種の T 細胞には Trim5 様因子が存在している事が示唆された、しかし、この因子は上皮系細胞には発現しておらず、サルの Trim5a とは発現パターンが異なっている。従って、似てはいるが、異なる分子だと予想される。又、CyclophilinA とは無関係に働く弱い阻害因子の存在も示唆された。さらに、上皮系細胞には存在しないが、T 細胞の感染性減弱因子も示唆された。しかし、この因子は APOBEC3 とは異なる因子である事が示唆された。これらの阻害因子を同定してノックダウンする事がラ

ット感染モデルの作成には必用と考えられる。今後同定していきたい。

他方、hCRM1 と hCyclinT1 を発現させることによってヒト細胞に準じる HIV 粒子が生産されるようになる事が示された。興味深い事に、両因子の増幅効率は細胞種によって異なっていた。

E 結論

HIV-1 感受性のラットを作成するためには、hCRM1 と hCyclinT1 を発現し、Trim5a 様、APOBEC 様の阻害因子をノックダウンした Tg ラットを作成する必用がある。

F 研究発表

1. 論文発表

- (1) Masahiro Kitabatake, Shingo Inoue, Fumihiko Yasui, Shoji Yokochi, Masaaki, Arai, Kouichi Morita, Hisatoshi Shida, Minoru Kidokoro, Fukashi Murai, Mai, Quynh Le, Kouji Matsushima, and Michinori Kohara (2007): SARS-CoV spike protein-expressing recombinant vaccinia virus efficiently induces neutralizing antibodies in rabbits pre-immunized with vaccinia virus. *Vaccine* 25: 630-637.
- (2) Zhang, X, Hakata, Y, Tanaka, Y, and Shida H. (2006): CRM1, an RNA transporter, is a major species-specific restriction factor of human T cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) in rat cells. *Microbes and Infection*. 8: 851-859

2. 学会発表

高柳亮、大橋貴、志田壽利：Foxp3 発現 HTLV-1 感染ラット細胞株における免疫抑

制機能の解析、日本ウイルス学会2006、名古屋

岡田 紘幸、大橋 貴、志田 壽利：ラット T 細胞での HIV-1 増殖におけるヒト CyclinT1 と CRM1 の相乗効果、日本ウイルス学会2006、名古屋

鈴木元、藤澤文絵、大橋貴、志田壽利：ラット細胞における HIV-1 複製の前期過程を阻害する宿主因子の解析、日本エイズ学会2006、東京

永井美佳、大橋貴、志田壽利：ラット細胞における HIV 複製への RNA 輸送因子 hCRM1 の効果、日本分子生物学フォーラム2006、名古屋

木所 稔、西條政幸、網 康至、須崎百合子、永田典代、岩田奈織子、長谷川秀樹、緒方もも子、福士秀悦、水谷哲也、志田壽

利、田代真人、佐多徹太郎、倉根一郎、倉田 毅、森川 茂：改良型痘そうワクチン株 m8Δ のカニクイザルにおけるサル痘発症予防効果、日本ウイルス学会2006、名古屋

高柳亮、大橋貴、志田壽利：Analysis of immunosuppressive function of Foxp3 expressing HTLV-I-infected cells in a rat model, The 2006 International Workshop on Retroviral Pathogenesis. カリフォルニア

大橋貴、高柳亮、志田壽利：Dissemination of HTLV-I in human CRM1 transgenic rats, The 2006 International Workshop on Retroviral Pathogenesis. カリフォルニア

G 知的所有権の取得状況
無し

厚生労働省科学研究費補助金（創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業）
「抗エイズ薬開発のための小動物評価系の開発と新規治療薬の開発研究」
分担研究報告書

研究項目：造血細胞移植 SICD マウスの HIV モデル動物への応用

分担研究者 小柳 義夫 京都大学ウイルス研究所 教授

共同研究者 佐藤 佳 京都大学ウイルス研究所 大学院生

共同研究者 三沢 尚子 京都大学ウイルス研究所 研究補助員

研究要旨

HIV 感染によるヒト免疫組織の破壊を再現する動物モデルを開発し、抗エイズ薬開発のために供する研究をおこなった。免疫不全マウス (NOG マウス) に造血細胞である CD34 陽性細胞を移植し、ヒト T 細胞、B 細胞、樹状細胞 (DC) が、末梢血、そして脾臓などに数ヶ月にわたり維持循環するヒト化マウス (NOG-hCD34 マウス) を確立した。そして、この NOG-hCD34 マウスを用いて、DC の生体内における機能を解析する実験系として進化させた。その結果、未分化 DC (immature DC) は成熟 DC (mature DC) に比して脾臓、ならびに胸腺に移行効率が優れていることがわかった。これらの結果は、このヒト化マウスを用いて、HIV 感染個体内における免疫学的ならびにウイルス学的役割が不明である DC 機能を明らかにできることが判明した。

A. 研究目的

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) は、その宿主域がヒトあるいはチンパンジーに限られるため、マウスなどの小動物は感染モデルとしてはそのままでは利用できない。そこで、ヒト細胞を免疫不全マウスに移植し、ヒト血液系細胞を構築し、そこに HIV を感染させるヒト化マウスの実験系がこれまで、行われてきた。そのなかで、造血細胞の移植により、ほとんどすべての種類の血液細胞を構築できる実験系の開発とそれを利用した抗ウイルス剤ならびにワクチン開発が望まれている。樹状細胞 (dendritic cell; DC) は、免疫監視細胞として生体の免疫系を司る細胞であり、ナイーブ T 細胞に抗原提示をすることのできるきわめてユニークな細胞群である。DC は、皮膚や粘膜などの末梢組織にて抗原を取り込み、その後その細胞の成熟後にその抗原を T 細胞に提示する myeloid DC (MDC) と、主に血中に存在し type I interferon を産生する plasmacytoid DC (PDC) に大別される。HIV が感染した個体内における DC の役割については、粘膜組織に存在する

immature MDC が HIV を捕捉し、所属リンパ節において HIV を CD4 陽性 T 細胞に伝播するという経路 (*trans* infection) が知られており、性感染経路の一因となっていることが *in vitro* における実験結果により示唆されている。しかし、慢性持続性感染期、後天性免疫不全症候群 (acquired immunodeficiency syndrome; AIDS) 発症期において、DC が HIV 病態に果たしている役割についてはほとんど明らかとなっていない。その一因として、DC の、とりわけヒト DC の *in vivo* における動態を解析するツールがないことが挙げられる。上述したように、DC は免疫系の中核を成す細胞群であり、そして、HIV は、CD4 陽性 T 細胞を枯渇させ、免疫不全を引き起こすウイルスである。したがって、AIDS 発症までの過程において、免疫系を司る DC が、その病態進行に関与している可能性が疑われる。そこで、本研究では、ヒト血液・リンパ網内系を忠実に再現し得る NOG-hCD34 マウスを用い、*in vivo* におけるヒト DC の動態と、DC が HIV 病態に果たしている役割を解明することを目的とし、以下の解析を行った。

B. 研究方法

1) 新生児免疫不全マウスへの臍帯血移植
臍帯血より miniMACS 磁気細胞分離キットにより分画した CD34 陽性細胞(陽性率 98% 以上)を選択し、放射線照射 (0.1 Gy) 新生児免疫不全マウス (NOD-SCID とコモン gamma 鎖ノックアウトマウス: NOG) の肝臓へ $1-2 \times 10^5$ 個の CD34 陽性細胞を移植した。移植後、8 週目に採血し、血液中の CD45 陽性細胞率によりヒト細胞移植効率を flow cytometry により判定した。ヒト B 細胞ならびに、ヒト T 細胞の同定には抗 CD19 ならびに抗 CD3 単クローン抗体を用いた。また、T 細胞の分化過程を解析するために、CD45RA, CD4, CD8 に対する単クローン抗体、そして、DC マーカーである CD11c, BDCA2 分子に対する単クローン抗体を用いて、染色し、flow cytometry にて解析した。

2) *In vitro* における MDC 分化培養
ヒト臍帯血より単離した CD34 陽性細胞を、Fms-like tyrosine kinase 3 ligand (Flt3L), thrombopoietin (TPO), stem cell factor (SCF) 存在下で培養し、CD34 陰性 CD14 陰性の DC 前駆細胞 (progenitor cells) を得た。その後、progenitor cells を granulocyte/monocyte-colony stimulating factor (GM-CSF), Flt3L 添加培地で 2 日間培養し、磁気細胞分離法 (MACS) にて CD14 陽性細胞を単離した。この CD14 陽性細胞を GM-CSF, interleukin-4 (IL-4) 添加培地にて 5 日間分化培養することにより、CD11c 陽性 HLA-DR 陽性 DC-SIGN 陽性の immature MDC (imDC) を得た。また、GM-CSF, IL-4 による分化培養時に lipopolysaccharide (LPS) を添加することにより、CD83 陽性 HLA-DR 強陽性 DC-SIGN 陰性の mature MDC (mDC) を得た。さらに、蛍光標識 dextran (dextran-Alexa Fluor®647) と 4°C あるいは 37°C で 1 時間インキュベートすることにより、その取り込み能を flow cytometry で解析し、その貪食機能を評価した。

3) NOG-hCD34 マウスにおける MDC homing assay

上記のように準備した imDC, mDC の *in vivo* における動態を解析するために、それ

ぞれの細胞を autologous NOG-hCD34 (すなわち、*in vitro* で調整した MDC と同一のヒト臍帯血をドナーとして構築した NOG-hCD34 マウス) に尾静脈より移植した。その際、それぞれの細胞を識別するために、imDC を CFDA-SE、mDC を DDAO-SE で蛍光ラベルした。移植後 2 時間目にマウスの各組織 (末梢血、脾臓、肝臓、胸腺) を摘出して細胞を回収し、flow cytometry により移植した細胞の存在の有無を判定した。

C. 研究結果

1) NOG マウスにおけるヒト細胞構築

NOG 新生児マウスへ臍帯血由来の CD34 陽性細胞を肝臓内へ移植した。その結果、移植後 8 週目以降には末梢血においてヒト CD45 陽性の白血球細胞群が出現した。移植後、12 週目以降においては、ヒト T 細胞は末梢血と脾臓において、5-10% 以上存在し、胸腺においては数%の CD4 ならびに CD8 single positive (SP) 細胞、そして、80% 以上は CD4 ならびに CD8 double positive (SP) 細胞が産生されていること、さらに、骨髄においては CD34 陽性の未分化造血細胞が定着していることがわかった (結果示さず)。また、これら末梢血と脾臓の CD4 陽性ならびに CD8 陽性 T 細胞は、多くは CD45RA 分子の発現するナイーブ細胞であることがわかった (結果示さず)。一方、HIV-1 の補助受容体である CCR5 は発現していた (結果示さず)。

2) NOG-hCD34 マウスにおける DC の存在

NOG-hCD34 マウスの各組織より回収した細胞を flow cytometry にて解析した結果、末梢血、脾臓、骨髄、肝臓、胸腺において、HLA-DR 強陽性 CD11c 強陽性の MDC, HLA-DR 強陽性 BDCA2 陽性の PDC が共に存在していることが確認された。また、これらの細胞の末梢血における存在比率は、健常人のそれと同等であった (図 1)。

3) *In vitro* における MDC 分化培養系の確立

In vitro において分化培養した MDC を、表面抗原マーカーを用いて flow cytometry により評価した結果、imDC は、CD80 弱陽性 CD86 弱陽性 CD83 陰性 CD11c 陽性 DC-SIGN 陽性 HLA-DR 陽性であり、一方、mDC は、CD80

陽性 CD86 陽性 CD83 陽性 DC-SIGN 陰性 HLA-DR 強陽性であった。また、蛍光標識 dextran の取り込みによる機能評価の結果、imDC は 37°C においてきわめて高い貪食能を示し、mDC ではその機能が明らかに低下していた。以上の結果より、これまでのヒト末梢血由来の DC 細胞群と一致する表現型を示したことから、この分化培養系が成立していることが確認された(結果示さず)。

4) *In vivo*における MDC の組織移行

上記のように調整した imDC を CFDA-SE、mDC を DDAO-SE で蛍光ラベルし、 10^6 個ずつ同時に、NOG-hCD34 マウス尾静脈より移植した(図 2a)。そして、移植後 2 時間目における NOG-hCD34 マウスの各組織を摘出し、回収した細胞を flow cytometry にて解析した結果、脾臓、肝臓、そして胸腺において、移植した imDC と mDC が存在していることが確認された。なお、末梢血中にもその一部が残存していることが確認された。興味深いことに、組織移行したそれぞれの細胞数を比較したところ、肝臓に移行した imDC/mDC の細胞数は同等であったのに対し、脾臓と胸腺へ移行した細胞数は、mDC に比して imDC の方が多い傾向が確認された(図 2b)。

D. 考察

本研究は小型動物を用いたエイズ薬の治療効果評価系開発のなかで、免疫組織破壊を再現するモデル実験系を確立し、HIV 感染による免疫不全のメカニズム解明とそれに有効な治療薬やワクチンの開発に寄与する研究の推進である。

免疫不全マウスのひとつである NOG マウスへのヒト細胞移植によるヒトキメラマウス(NOG-hCD34 マウス)を確立した。その結果、マウス体内にヒト T, B, DC, マクロファージ細胞の新生を再現でき、HIV 感染が可能であることが判明した。そして、今回の実験結果より、(1) NOG-hCD34 マウス内に DC が構築されていること、(2) *in vitro* で調整した MDC が組織移行能を有していることが確認された。今回我々が確立した実験系は、ヒトの血液・リンパ網内系を忠実に再現する動物モデル実験系である。特筆

すべきは、autologous な MDC を *in vitro* で調整し、その機能を *in vivo* で解析することができる点である。また、今回確立した *in vitro* における MDC 分化培養系は、その細胞を増殖させることが可能であることから、今後さまざまな解析に用いることができる有用なツールとなると考えている。

DC は、HIV の主要なターゲット細胞である CD4 陽性 T 細胞に強いアフィニティーを有している。また、上述のように、MDC は HIV を捕捉し、CD4 陽性 T 細胞に伝播する能力を有していることが知られている。さらに、我々の実験結果より、MDC は、脾臓と胸腺という 2 次リンパ組織に血液を介して移行することができることが明らかとなった。今回の注目すべき点は、HIV を捕捉し得る imDC がより効率良く上記の組織へと移行したことである。以上のことから、血中で HIV を捕捉、あるいは HIV に感染した MDC が、2 次リンパ組織に移行し、CD4 陽性 T 細胞に効率良く HIV を伝播している可能性が考えられる。

HIV が CD4 陽性 T 細胞の枯渇を引き起こし、最終的に免疫不全に至らしめることは知られているが、その直接の要因についてはいまだ明らかではない。今後、この実験系を用い、MDC が CD4 陽性 T 細胞への HIV の伝播と CD4 陽性 T 細胞の枯渇に参与している可能性、そして、それに起因して HIV 病態進行に参与している可能性について解析を進める予定である。また、HIV の病態において PDC が *in vivo* で果たしている役割についても併せて解析を行う予定である。

E. 結論

マウスに HIV-1 に感受性を付与し、さらに、このマウスを使ってヒト DC の機能評価実験系として利用することに成功した。有意義な成果が得られた。

(倫理面への配慮)

本動物実験の施行にあたり本学実験施設に設置されている実験動物委員会に動物愛護上の配慮ならびに感染実験の適切な実験施行を行うように指導を受け、すべての実験

は承認されている。また本学において血液の分与に際し本学医学研究科倫理委員会の承認のもとインフォームドコンセントを得、採血を行い、感染実験に使用した。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Eda Y, Murakami T, Ami Y, Nakasone T, Takizawa M, Someya K, Kaizu M, Izumi Y, Yoshino N, Matsushita S, Higuchi H, Matsui H, Shinohara K, Takeuchi H, Koyanagi Y, Yamamoto N, Honda M. Anti-V3 humanized antibody KD-247 effectively suppresses ex vivo generation of human immunodeficiency virus type 1 and affords sterile protection of monkeys against a heterologous simian/human immunodeficiency virus infection. *J. Virol.* 80:5563-5570, 2006.
2. Hoshino S, Sun B, Konishi M, Shimura M, Segawa T, Hagiwara Y, Koyanagi Y, Iwamoto A, Mimaya JI, Terunuma H, Kano S, Ishizaka Y. Vpr in plasma of HIV-1-positive patients is correlated with the HIV-1 RNA titers. *AIDS Research and Human Retroviruses*, in press.
3. Futahashi, Y, Komano J, Urano E, Aoki T, Hamatake M, Miyauchi K, Yoshida T, Koyanagi Y, Matsuda Z, Yamamoto N. Separate elements are required for ligand-dependent and -independent internalization of metastatic potentiator CXCR4. *Cancer Science*, in press.
4. Koyanagi Y, Tanaka Y, Ito M, Yamamoto N. Humanized mice for human retrovirus infection. *Curr Top Microbiol Immunol*, in press.
5. Miyazato P, Yasunaga J, Taniguchi Y, Koyanagi Y, Mitsuya H, Matsuoka M. De novo HTLV-I Infection of Human Lymphocytes in Nonobese Diabetic-SCID, Common γ -Chain Knocked-Out Mice. *J. Virol.*

80:10683-10691, 2006.

6. Miura Y, Koyanagi Y. HIV encephalopathy. *Japan Medical Association Journal*, 49, 212-218, 2006.

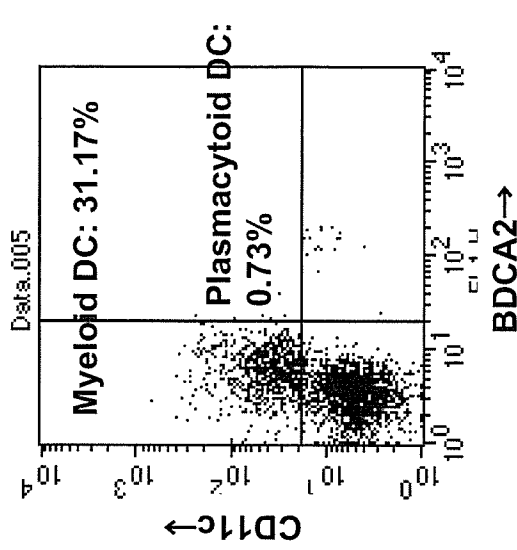
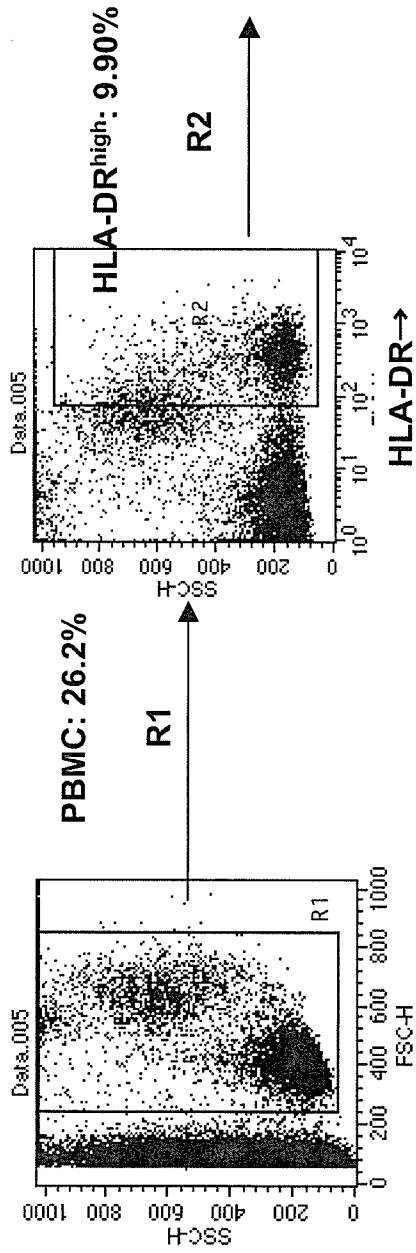
2. 学会発表

1. Aoki J, Sato K, Miura Y, Koyanagi Y. Incorporation of HIV-1 Env into virions is regulated by a tetraspanin. *Retroviruses Meeting*, Cold Spring Harbor, New York, 2006.
2. Yoshida T, Kawano Y, Aoki J, Sato K, Komano J, Miura Y, Tanaka Y, Koyanagi Y. A specific modification of the CXCR4 trafficking: Blocking HIV entry. *Retroviruses Meeting*, Cold Spring Harbor, New York, 2006.
3. 佐藤佳、青木淳、大黒恵理子、佐野浩一、田中勇悦、小柳義夫. 宿主因子の過剰発現による HIV-1 Env タンパク質のビリオンへの取り込み抑制. 近畿エイズ研究会、大阪、2006.
4. 北山裕子、三浦義治、安藤良徳、星野重樹、石坂幸人、小柳義夫. エイズ脳症における神経細胞の軸索伸張障害メカニズムの解析近畿エイズ研究会、大阪、2006.
5. Kitayama H, Miura Y, Ando Y, Hoshino S, Ishizaka Y, Koyanagi Y. The axon outgrowth of neuron was inhibited by HIV-1 infected macrophage. *East Asia symposium*, Soul, 2006.
6. Sato K, Aoki J, Daikoku E, Sano K, Tanaka Y, Koyanagi Y. Reduced infectivity of HIV-1 released from CD63-overexpressed cells. *Kumamoto AIDS seminar*, Aso, 2006.
7. Hoshino S, Sun B, Konishi M, Koyanagi Y, Ishizaka Y. Detection of serum Vpr in HIV-1-positive patients and the mode of viral reactivation from latently infected cells. *Kumamoto AIDS seminar*, Aso, 2006.
8. Koyanagi. Activation of T cells in HIV-1-infected humanized mice, 1st

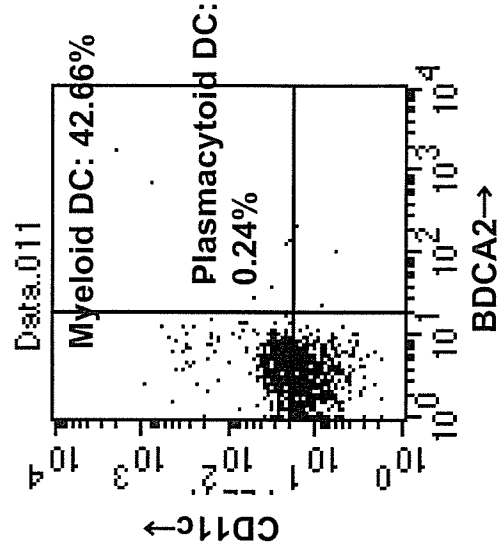
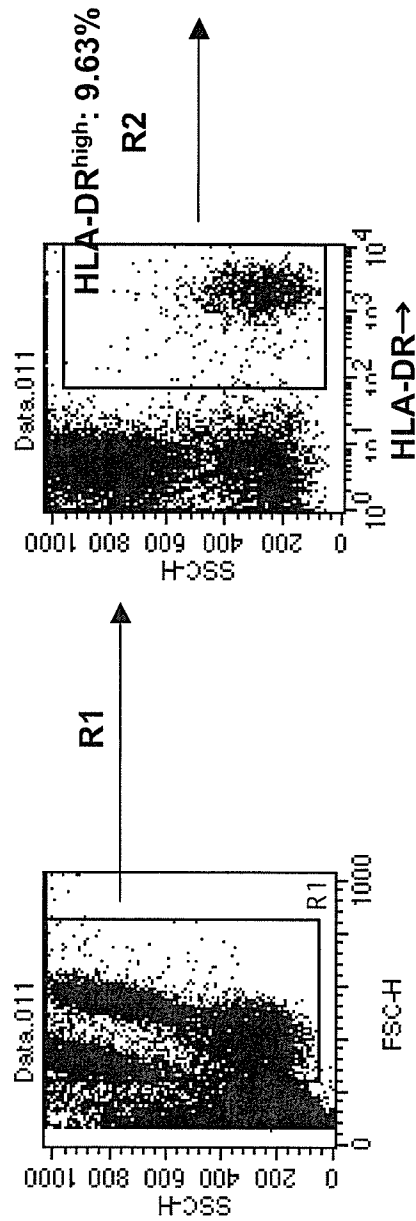
- International workshop on humanized mice, Tokyo, 2006.
9. 星野重樹, 孫賓蓮, 古西満, 小柳義夫, 石坂幸人. HIV-1 Vpr のウイルス再活性における役割. 第 54 回日本ウイルス学会、名古屋、2006.
 10. 篠田康彦、田中勇悦、三浦義治、鈴木陽一、小柳義夫. CCR5 指向性 HIV-1 感染防御因子 (CD4 因子) 産生細胞株に特異的な発現遺伝子の探索第 54 回日本ウイルス学会、名古屋、2006.
 11. 北山裕子、三浦義治、安藤良徳、星野重樹、石坂幸人、小柳義夫. HIV-1 感染マクロファージによる神経細胞の軸索伸張障害メカニズムの解析. 第 54 回日本ウイルス学会、名古屋、2006.
 12. 安藤良徳、三浦義治、北山裕子、岡田広司、川口寧、小柳義夫. HSV-1 に感染したラット脳海馬スライス培養系における神経系細胞の解析. 第 54 回日本ウイルス学会、名古屋、2006.
 13. 小柳義夫、三沢尚子、佐藤佳、伊藤守. HIV 感染モデル動物としてのヒト造血細胞移植 SCID マウスの開発. 第 54 回日本ウイルス学会、名古屋、2006.
 14. 佐藤佳、青木淳、大黒恵理子、佐野浩一、田中勇悦、小柳義夫. テトラスパニン分子の過剰発現による HIV-1 の感染価抑制. 第 54 回日本ウイルス学会、名古屋、2006.
 15. Koyanagi Y. Roles of tetraspanin in HIV-1 infection. Japan-German joint AIDS coferece, Bohem, 2006.
 16. 小柳義夫、三沢尚子、佐藤佳、伊藤守. 新規 HIV 感染小動物モデルの開発: ヒト造血細胞移植 SCID マウス. 第 20 回日本エイズ学会、東京、2006.
 17. 佐藤佳、青木淳、大黒恵理子、佐野浩一、田中勇悦、小柳義夫. 第 20 回日本エイズ学会、東京、2006.
 18. 芳田 剛、河野 祐治、佐藤 佳、安藤 良徳、三浦 義治、田中勇悦、小柳 義夫. CXCR4 の細胞質膜移行を制御する分子. 分子生物学フォーラム. 名古屋. 2006.
 19. 山元誠司, 小川加那子, 小柳義夫, 鈴木陽一. Tandem affinity purification 法によるレトロウイルスキャプシド結合性因子の探索. 分子生物学フォーラム. 名古屋. 2006.
 20. Yoshida T, Koyanagi Y. CD63 and its mutants disrupt CXCR4 trafficking to the plasma membrane and inhibit T-cell tropic HIV-1 entry. Japan-US joint meeting, Kagoshima, 2006.
 21. Miura Y. Efficient HSV-1 infection in neural stem cells in vitro. 第 2 回研究所ネットワーク国際シンポジウム、京都.
 22. 三浦義治、北山裕子、安藤良徳、小柳義夫. HIV 脳症における中枢神経系内宿主因子群の解析. 第 47 回日本神経学会総会、東京.
 23. Miura Y, Andou Y, Kitayama H, Koyanagi Y. Stem cell neurovirology: comparative analyses of neural stem cells in HIV-1 and HSV-1 infection. 第 29 回日本神経科学大会、京都.
 24. 三浦義治 安藤良徳 北山裕子 佐野浩一 川口寧 小柳義夫. 単純ヘルペスウイルス 1 型に感染した neurosphere 形成培養系の解析. 第 21 回ヘルペス研究会 (白川郷) .
 25. Miura Y. HIV encephalopathy and neural stem cell virology. The 7th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, 2006.
- H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む。)
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他

図1. NOG-hCD34マウスにおけるヒトDCの構築

Human peripheral blood



NOG-huCD34 peripheral blood



File: Data.011
 Gated Events: 13095
 X Parameter: FL3-H (Log)
 Y Param

CD45⁺: 21.81%
 (not shown)

Region	Events	% Gated	% Total	X Ge
R1	13095	100.00	32.01	
R2	1261	9.63	3.08	

図2a. NOG-hCD34マウスへのDC移行実験

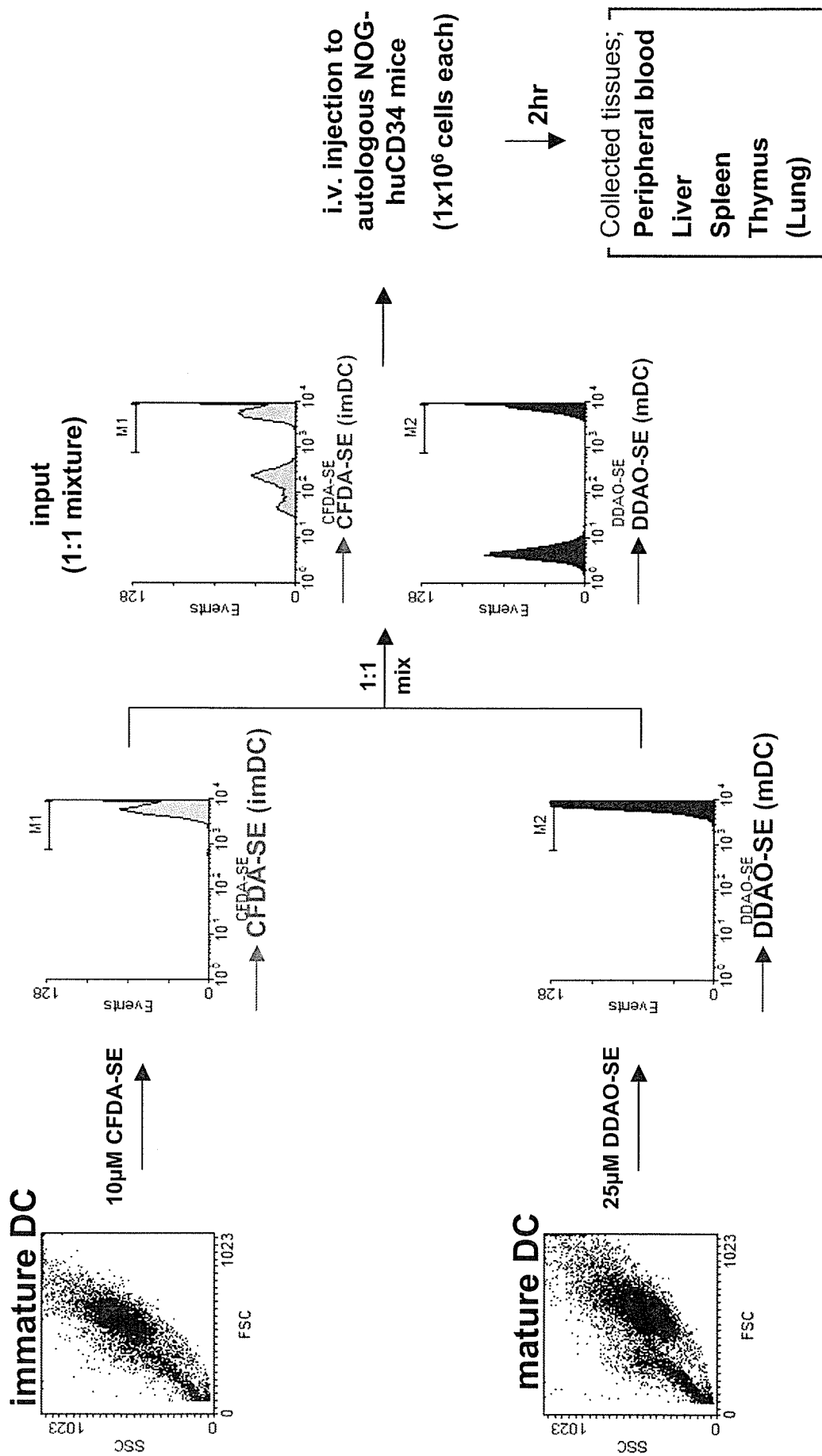
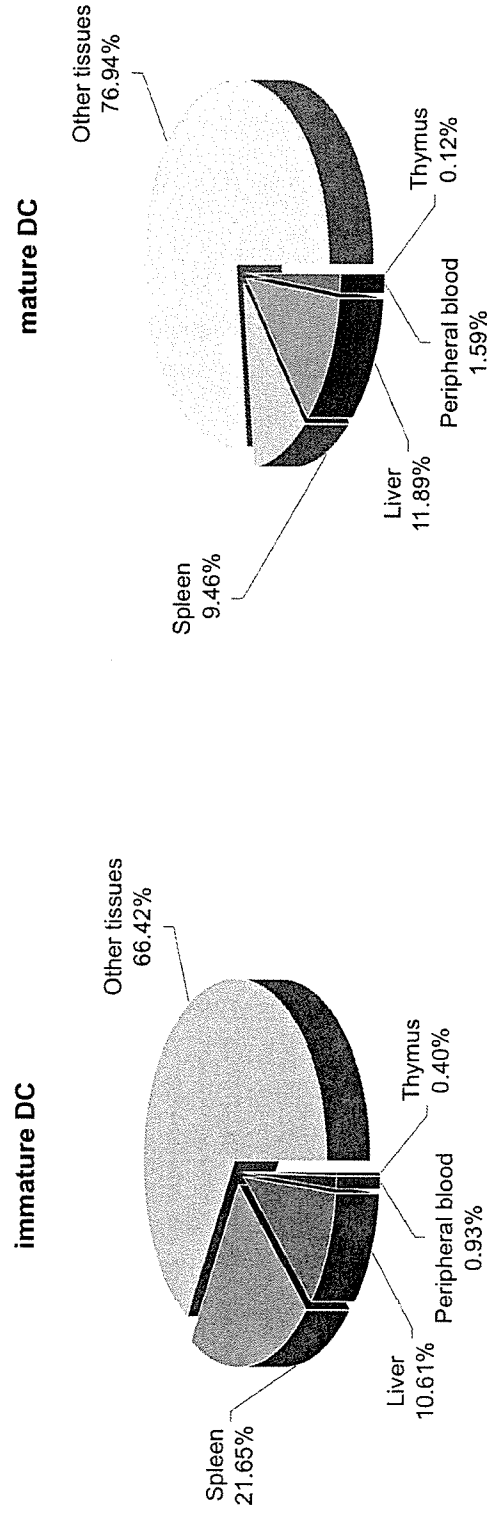
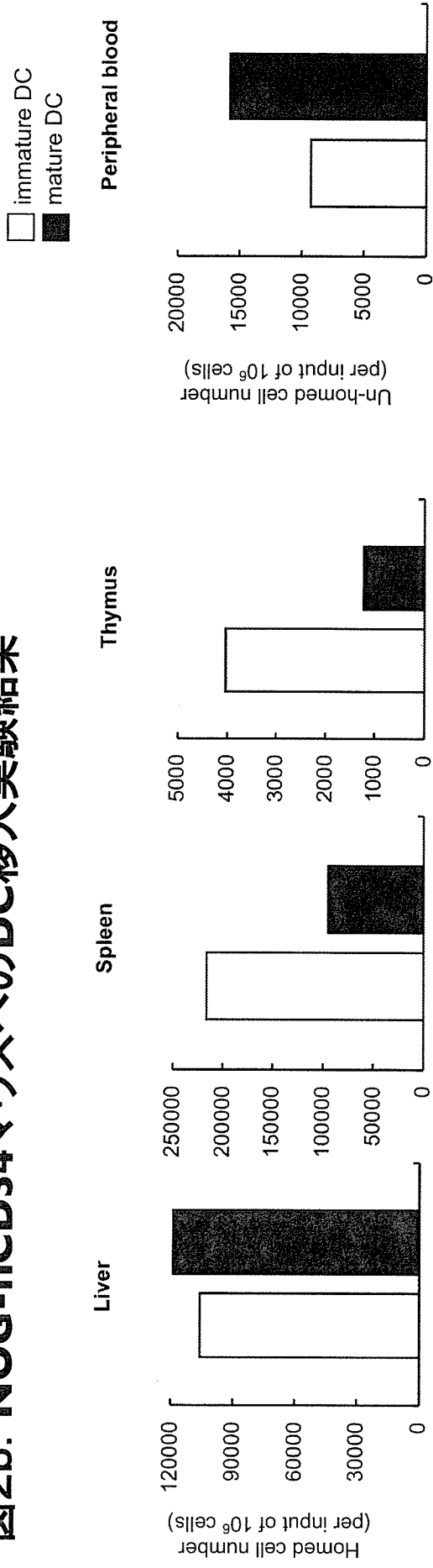


図2b. NOG-hCD34マウスへのDC移行実験結果



厚生労働科学研究費補助金（創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業）
分担研究報告書

抗エイズ薬開発のためのマウス個体への感染系開発

分担研究者 小糸 厚 熊本大学エイズ学研究センター病態制御分野 助教授

研究要旨

本年度はまず、ラット APOBEC3 (APO3) の抗 HIV 活性のより詳細な検討をおこなった。げっ歯類の APO3 の C 端側ドメインは霊長類 APO3H と高い相同性を有し、これらの脱アミノ酵素が共通の遺伝子から分かれて、独自の進化を遂げてきたことを伺わせる。我々は、F344 ラット由来 APO3 の C 端のみで HIV 粒子の感染性を著明に抑制しうることを明らかにした。APO3 全長に比べて、その阻害活性は数分の一に低下したが、感染後のウイルス DNA には G to A hypermutation の導入が確認され、その阻害が脱アミノ酵素活性に依存することを明らかにした (Koito, Ikeda, Shibata, & Ohsugi.: 論文投稿中)。さらに今回、アポリポプロテイン B の RNA editing 酵素として知られる APOBEC1 (APO1) のマウス、ラット homologue が、その作用機構はまだ不明ながら HIV 感染を効率よく阻害することを確認した。これら deaminase 活性部位が 1 ケのみの分子による HIV 阻害機構は、今後の小動物モデル開発にむけて、より詳細に検討していく必要があると考えられる。

A. 研究目的

HIV 粒子に取り込まれたシチジン脱アミノ酵素 APO3 が、逆転写の際、ウイルス DNA に作用し、その感染性を負に制御することが明らかにされた。この HIV 複製に対する自然防御機構が霊長類以外の小動物に広く存在するか否かを明確にすることは、今後の小動物モデル開発に重要であると考えられる。我々は、これまでにラット個体からクローニングした APO3 が強力な抗 HIV 活性を示すことを明らかにしてきたが、本年度は、その作用機構の詳細な解析をおこなった。また、APOBEC ファミリーのプロトタイプである APOBEC1 (APO1) に関しては、ラット由来 APO1 が抗 HIV 活性を示し、RNA をターゲットとしている可能性が示唆されている (Bishop, & Malim.: Science 305:645, 2004)。その抗ウイルス活性の実態をより明らかにするため、げっ歯類をはじめ

めとした種々の小動物由来の APO1 分子をクローニングし、その解析をおこなった。

B. 研究方法

F344 ラット APO3 の全長、N 端側ドメイン、および C 端側ドメインに HA タグを付加して発現ベクター (pCAGGS-pcDNA3.1) に組み込み、抗 HIV、抗 MLV 活性を解析した。さらに酵素活性部位の変異体を作製し、抗ウイルス活性を解析した。pNL-Luc および pNL-LucDvif をラット由来 APO3、VSV-G 発現ベクターとともに 293T 細胞にトランスフェクトし、pseudotype virus を得た。293T 細胞に VSV-G/HIV-1 pseudotype を感染させ、ルシフェラーゼ活性により感染性を定量した。また逆転写産物の pol 領域を PCR で増幅し、塩基配列を決定、G to A mutation の導入を検討した。Balb/C マウス、SD ラット、NZW うさぎ、フ

エレットおよびヒト小腸由来 mRNA より APO1 cDNA 全長を PCR で増幅し、塩基配列を決定した。C 端に HA タグを付加して発現ベクターに組み込み、抗 HIV 活性を解析した。

(倫理面への配慮)

該当事項なし

C. 結果

F344 ラット脾臓由来 APO3 の C 末端分子 (185 残基) の存在下で、HIV 粒子の感染性は著明 (50 分の 1 以下) に低下した (Fig. 3)。APO3 全長 (385 残基) に比較すると、その阻害活性は数分の一に低下したが、感染後のウイルス DNA には G to A hypermutation の導入が確認された。また、作製したいずれの酵素活性部位変異体においても HIV 感染阻害能力はほぼ完全に失われ、その阻害が脱アミノ酵素活性に依存することを明らかにした。ヒト APO3 は逆転写の first(minus)-strand DNA の CCC* を主なターゲットとするのに対し、ラット APO3 の全長、C 端側分子のいずれも、マウス APO3 と同様に TTC* 配列を好んでいることがわかった。ラット APO3 の全長、C 端側分子のいずれも MLV に対して阻害活性を示さなかった。分子系統樹作製の結果、1600 万年前、マウスとラットの分岐後、げっ歯類の APO3 のアミノ酸配列は急速に変化してきたこと示唆されたが、その選択圧は現時点では不明である。

これまでにクローニングした哺乳類由来 APO1 は、5 種類とも cytidine deaminase に保存されたモチーフを 1 コピー有し、アミノ酸配列の同一性はマウス～ラット間で 90% と、げっ歯類間では比較的高い同一性を有していることがわかった (マウス/ヒト間の同一性は 70% 程度である)。ラットのみならず、マウスの APO1 も HIV 粒子の感染性を 10 分の 1 程度に抑制することがわかった。また Vif による阻害をうけないことが

確認された (Fig. 5)。これまでに、うさぎ、フェレット、ハムスター由来 APO1 のクローニングをおこない、その抗 HIV 活性、HIV 粒子への取り込みやウイルス RNA への塩基置換は、現在解析中である。

D. 考察

APO3 遺伝子は、ヒトでは 3A~3H の 7 ケが 22 番染色体の 150kb 内に重複して存在するが、マウスは 15 番、ラットは 7 番染色体上に単一遺伝子として存在する。霊長類の APO3 分子の DNA およびアミノ酸配列比較から進化系統解析をおこなうと、ほぼ全部の領域を通じて、非同義置換 (non-synonymous substitution) が同義置換 (synonymous substitution) より優位であることより、レンチウイルスなどの retroelement が選択圧となり、positive selection が起こっていることが示唆されている (Zhang, & Webb. : Hum. Mol. Gen. 13:1785, 2004)。一方、マウス、ラット APO3 分子の遺伝子系統解析をおこなうと、一部の領域をのぞいて、同義置換が非同義置換より優位であった (Fig. 4)。げっ歯類 APO3 の個体内での生理的機能を含めて、解明されるべき興味深い問題が残されている。

ヒトなど霊長類において、APO1 は小腸でのみ発現し、アポリポプロテイン B の RNA editing 酵素として機能しているが、げっ歯類では、小腸の他、肝臓、腎臓、脾臓などでもその発現がみられる。さらに生殖細胞系でもその発現がみられ、retrotransposition による影響を次世代に遺伝しないよう、ゲノムを保護する機構に一役かっているのかもしれない。いずれにせよ、種々の retroelement へのげっ歯類など小動物由来の APO1 の活性は、APO3 の活性と同様、今後、詳細に解析していく必要があると考えられる。具体的には、IAP や MusD などマウスの内在性レトロウイルス、あるいはヒト Alu ファミリー、マウス

B1 配列など 7SL RNA 由来の SINE の retrotransposition への影響を詳細に検討していく必要があると考えている。

E. 結論

マウス、ラット由来 APO3 のみならず APO1 にも Vif で阻害されない抗 HIV 活性が存在することが明かとなり、げっ歯類を HIV の感染モデルとするための重要な情報が得られた。deaminase 活性部位が 1 ケのみの分子による HIV 感染抑制は、ウイルス学的にはもちろん系統発生的見地にも興味深い材料を提供すると考えられた。

F. 研究発表

1) 論文発表

1. Kazuhisa Yoshimura, Junji Shibata, Tetsuya Kimura, Akiko Honda, Yosuke Maeda, Atsushi Koito, Toshio Murakami, Hiroaki Mitsuya, and Shuzo Matsushita. : Resistance profile of a neutralizing anti-HIV monoclonal antibody, KD-247, that shows favorable synergism with anti-CCR5 inhibitors in vitro. *AIDS* 20: 2065-2073 (2006).
2. Takeo Ohsugi, and Atsushi Koito. : Human T cell leukemia virus type I is resistance to the antiviral effects of APOBEC3. *J. Virol. Methods* 139: 93-96 (2007).
3. Terumoto Ikeda, Junji Shibata, Kazuhisa Yoshimura, Atsushi Koito, and Shuzo Matsushita. : Recurrent HIV-1 integration at the *BACH2* locus in resting CD4⁺ T cell populations during effective highly active antiretroviral therapy. *J. Infect. Des.* 195: 716-725 (2007).

4. Junji Shibata, Kazuhisa Yoshimura, Akiko Honda, Atsushi Koito, Toshio Murakami, and Shuzo Matsushita. : Impact of V2 mutations for escape from a potent neutralizing anti-V3 monoclonal antibody during in vitro selection of a primary HIV-1 isolate. *J. Virol.* (in press).

2) 学会発表

1. 渡辺信元、掛谷秀昭、西原佳史、山口智之、小糸 厚、三好浩之、長田浩之 : フマギリンは HIV-1 の Vpr タンパク質活性を阻害することでマクロファージへのウイルス感染を抑制する。第 1 回日本ケミカルバイオロジー研究会、東京、平成 18 年 5 月 8 日〜9 日。
2. Koito A. : Properties of APOBEC3s from rats (*Rattus norvegicus*) to restrict retrovirus infection. 7th AIDS seminar in Kumamoto. Kumamoto, Japan. Sep. 21-22, 2006.
3. Shibata J, Yoshimura K, Honda A, Koito A, Murakami T, Matsushita S. : Impact of V2 mutations for escape from a potent neutralizing anti-V3 monoclonal antibody during in vitro selection of a primary HIV-1 isolate. 7th AIDS seminar in Kumamoto. Kumamoto, Japan. Sep. 21-22, 2006.
4. Yoshimura K, Shibata J, Honda A, Koito A, Matsushita S. : A novel potent neutralizing anti-V3 monoclonal antibody, KD-247, that shows favorable synergism with anti-CCR5 inhibitors in vitro. 7th AIDS seminar in Kumamoto. Kumamoto, Japan. Sep. 21-22, 2006.

5. Ikeda T, Shibata J, Yoshimura K, Koito A, Matsushita S.: Recurrent HIV-1 integration at the *BACH2* locus in resting CD4⁺ T cell populations during effective HAART. 7th AIDS seminar in Kumamoto. Kumamoto, Japan. Sep. 21-22, 2006.
 6. 小糸 厚、柴田潤二、池田輝政、大杉剛生：ラット APOBEC3 のレトロウイルス感染阻害効果、第 54 回日本ウイルス学会総会、名古屋、平成 18 年 11 月 19 日～21 日。
 7. 柴田潤二、吉村和久、小糸 厚、松下修三：抗 HIV-1gp120-V3 抗体より逃避した V2 領域変異ウイルスの中和抵抗性メカニズムの解析、第 54 回日本ウイルス学会総会、名古屋、平成 18 年 11 月 19 日～21 日。
 8. 池田輝政、柴田潤二、吉村和久、小糸 厚、松下修三：長期間 HAART 有効症例における残存 HIV と組込み部位の関連性、第 54 回日本ウイルス学会、名古屋、平成 18 年 11 月 19 日～21 日。
 9. 小糸 厚、柴田潤二、池田輝政、大杉剛生：ラット APOBEC3 分子による HIV 複製の抑制、第 20 回日本エイズ学会、東京、平成 18 年 11 月 30 日～12 月 2 日。
 10. 吉村和久、柴田潤二、小糸 厚、松下修三：In vitro における抗 HIV-1 中和単クローン抗体とその他の薬剤との相互作用の研究、第 20 回日本エイズ学会、東京、平成 18 年 11 月 30 日～12 月 2 日。
 11. 渡辺信元、山西 淳、掛谷秀昭、西原佳史、山口智之、小糸 厚、三好浩之、長田浩之：エイズウイルス Vpr タンパク質阻害剤としてのフマギリンの発見と作用機作の解析。日本分子生物学 2006 フォーラム、名古屋、平成 18 年 12 月 6 日～8 日。
 12. Koito A.: Properties of APOBEC3s from rats (*Rattus norvegicus*) to restrict retrovirus infection. US-Japan Cooperative Medical Science Program 19nd Joint Meeting of the AIDS Panels. Kagoshima, Japan. Dec. 6-7, 2006.
- G. 知的所有権の取得状況
無し

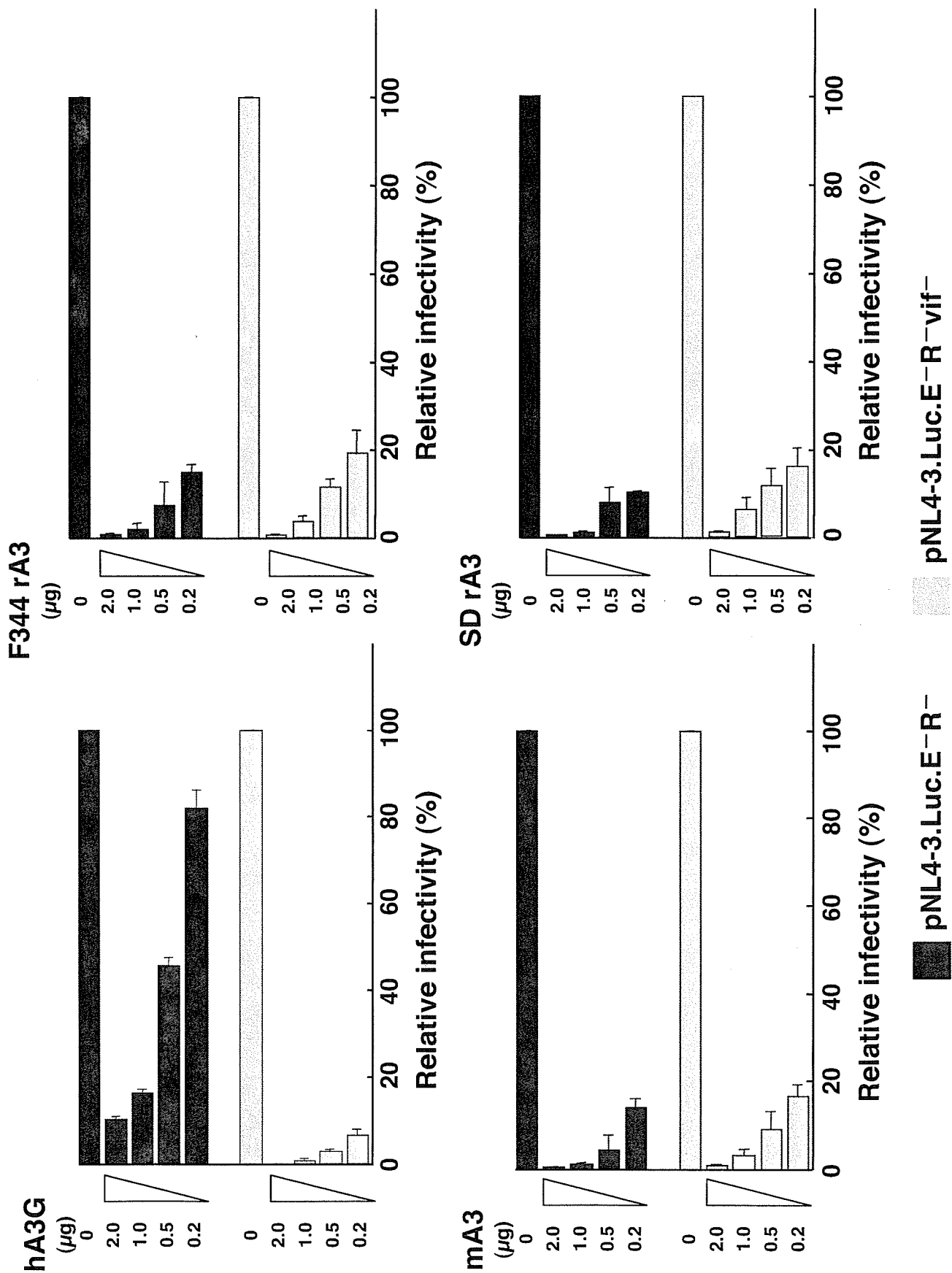


Fig. 1 F344, SD, Wistarラットの脾臓からクローニングしたAPOBEC3は、マウスAPOBEC3と同様、vif非依存性にHIV感染を強力に抑制した。

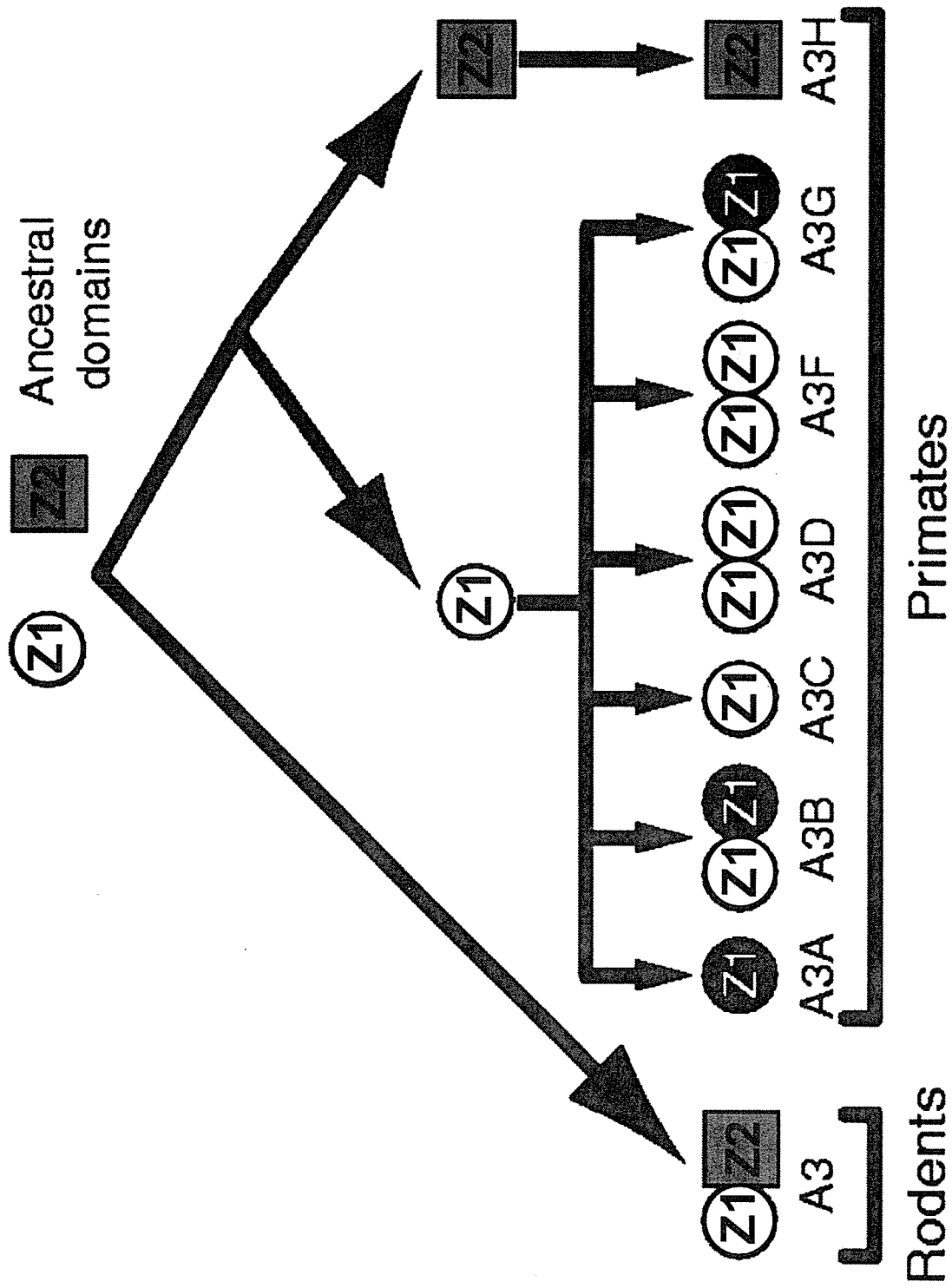
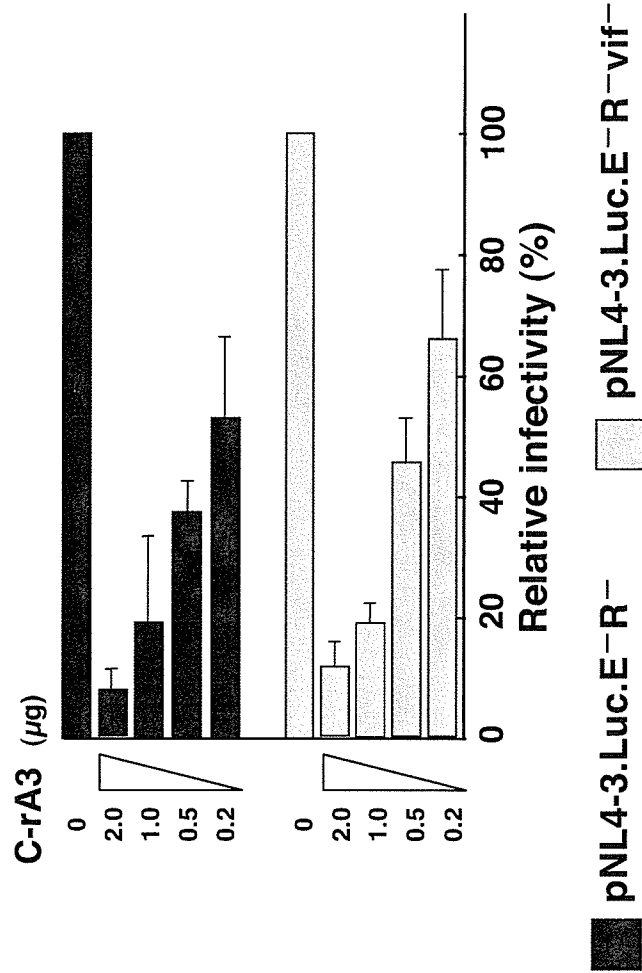
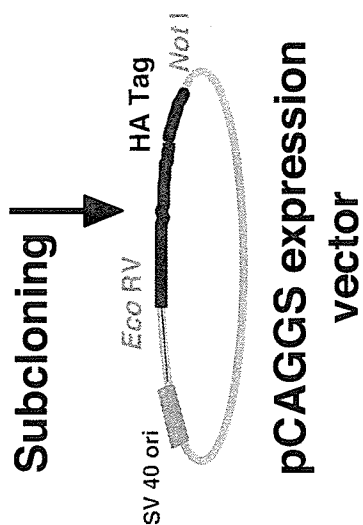
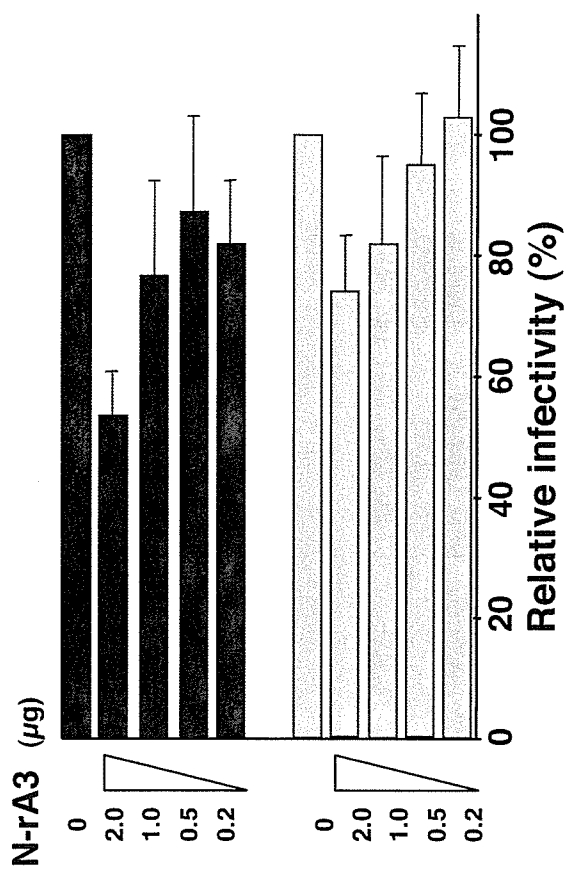
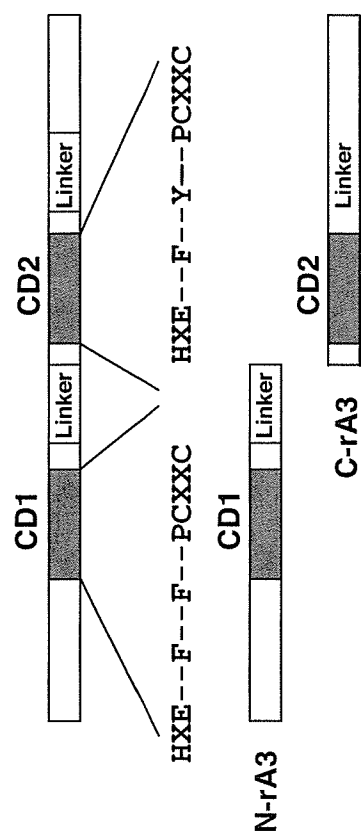


Fig. 2 分子系統樹解析からAPOBEC3ファミリーは、Z1, Z2に、Z1はさらにZ1a, Z1bに分類される。ヒトでは22番染色体の150kb内に7ヶの遺伝子が重複しているが、マウスでは15番、ラットでは7番染色体にZ1a, Z2の融合蛋白として、単一遺伝子にコードされている (Conticello, & Neuberger. Mol.Biol.Evol. 2004)。



■ pNL4-3.Luc.E-R- □ pNL4-3.Luc.E-R-vif-

Fig. 3 ラットAPOBEC3のC末端のみで、HIVの感染性はvif非依存性に著明に低下した。G to A hypermutationが確認され、その阻害が脱アミノ酵素活性性に依存することが明らかとなった。

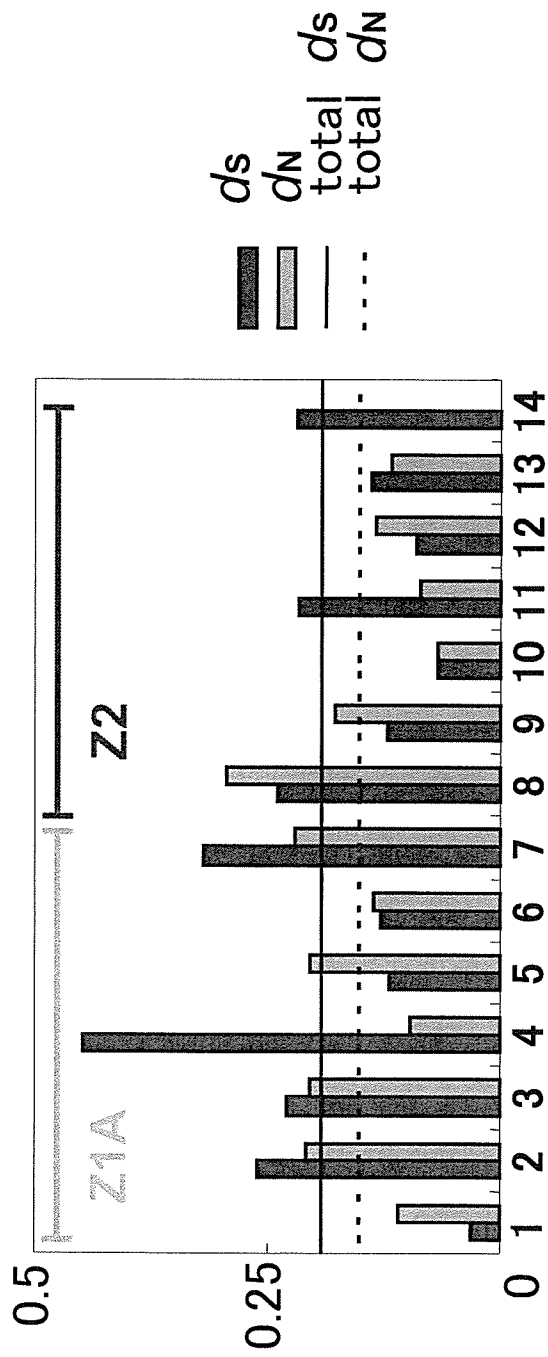


Fig. 4 マウス、ラットAPOBEC3のDNAおよびアミノ酸配列のsliding-window解析。30コドンずつで解析すると1, 5, 8, 9, 12番目のwindowでは非同義置換 (non-synonymous substitution) 優位 がみられた。

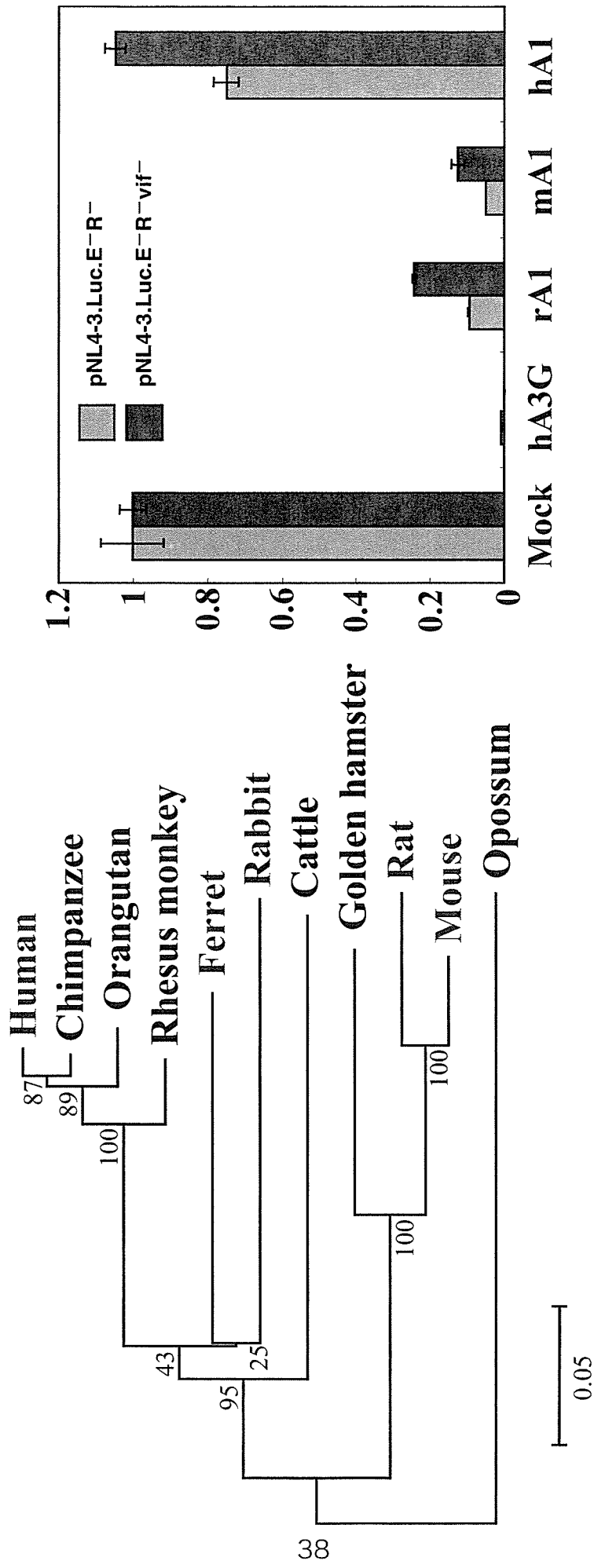


Fig. 5 マウス、ラット、ウサギ、フェレット、ヒト小腸よりAPOBEC1をクローニングした。マウス、ラットのAPOBEC1はvif非依存性にHIV感染を10分の1程度に抑制した。