

200710017A

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

課題番号 H19-政策創薬-一般-005

画期的な霊長類HIV-1モデルによる抗エイズ薬、
エイズワクチン評価基盤技術の開発に関する研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 明里 宏文

平成20（2008）年 3月

目 次

I. 総括研究報告書

- 画期的な霊長類HIV-1モデルによる抗エイズ薬、エイズワクチン
評価基盤技術の開発に関する研究 ----- 1
主任研究者 明里宏文
(独立行政法人医薬基盤研究所霊長類医科学研究センター 室長)

II. 分担研究報告書

1. サル指向性HIV-1のサル類継代馴化、病態解析----- 7
主任研究者 明里宏文
(独立行政法人医薬基盤研究所霊長類医科学研究センター 室長)
2. サル類に感染性・病原性を示すHIV-1クローンの構築----- 13
分担研究者 足立昭夫
(徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 教授)
3. サル指向性HIV-1感染による宿主免疫応答に関する解析----- 17
分担研究者 俣野哲朗
(東京大学医科学研究所 教授)

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 21

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 23

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
総括研究報告書

画期的な霊長類HIV-1モデルによる抗エイズ薬、エイズワクチン評価基盤技術の開発に関する研究

主任研究者 明里宏文 医薬基盤研究所霊長類医科学研究センター室長

研究要旨

抗エイズ薬開発やワクチン開発研究において、その安全性・有効性を評価する上で実験用サル類を用いたトランスレーショナルリサーチは不可欠である。本研究では近年確立された、サル細胞で増殖可能なサル指向性 HIV-1 クローンを用いてこれまで不可能とされてきたモデル動物である実験用サル類/HIV-1 感染・発症システムを確立することを目的とする。今年度は第一世代のサル指向性 HIV-1 クローンである NL-DT5R を用いたマカク属サルへの感受性について、細胞レベルおよび個体レベルにおいて解析を行なうとともに、よりサル細胞での複製・増殖に最適化されたいわゆる第二世代サル指向性 HIV-1 クローンの構築に向けた基盤研究を行なった。その結果、カニクイザルは NL-DT5R に感受性を有し、細胞レベルのみならず個体レベルでも同ウイルスの感染増殖が確認できた。またサル細胞を用いた馴化ウイルスの遺伝子解析結果を基に、NL-DT5R より増殖効率等で格段に優れた MN4/MN5 分子クローンが得られた。以上の結果は今後の HIV-1 サル感染発症システム確立に向け有望な成果であると考えられた。

分担研究者

足立昭夫（徳島大学大学院・ヘルスバイオサイエンス研究部 教授）

俣野哲朗（東京大学・医科学研究所 教授）

A. 研究目的

抗エイズ薬開発やワクチン開発研究において、その安全性・有効性を評価する上で実験用サル類を用いたトランスレーショナルリサーチは不可欠である。HIV-1 は実験用サル類に感染発症しないことから、アカゲザルを用いたサル免疫不全ウイルス（SIV）および SIV の一部を HIV-1 遺伝子に組み換えたキメラウイルス（SHIV）感染・発症モデルは、サロゲートモデルとして汎用されている。これらの霊長類モデルは、CD4 陽性ヘルパー T 細胞減少やエイズ発症のメカニズムのみならず、ヒトでは解析が困難な感染初期過程におけるウ

イルス動態や免疫応答能の解析、さらに予防治療ワクチンの開発研究において重要な役割を担っており、その成果として現在多数の候補ワクチンが開発されつつある。一方、HIV-1 遺伝子産物を標的としたワクチンや新規治療薬の有効性評価には長期に渡る臨床試験を待たなければならず、その経費も莫大なものとなることから、HIV-1 が感染しエイズを発症する実用的な動物モデルの開発が長い間求められてきた。

昨今の宿主因子の研究成果より HIV-1 の宿主域を規定する要因が明らかとされ、これらの知見を基に足立らの研究グループは世界に先駆け、サル細胞で増殖可能なサル指向性 HIV-1 クローンの構築に成功した（PNAS, 2006 年 11 月 7 日号）。そこで本研究ではこのクローンを用いた実験用サル類/HIV-1 感染・発症システムを確立することを目的とする。本研究が成功すれば、これまで困難であった HIV-1 を標的とした新規抗エイズ薬およ

びエイズワクチンに関する前臨床試験を霊長類モデルを用いて評価することが可能となることから、抗エイズ医薬品開発戦略上、画期的なブレークスルーと期待される。

そこで本研究では近年確立された、上記サル指向性 HIV-1 クローンの第一世代である NL-DT5R を用いたマカク属サルへの感受性について細胞レベルおよび個体レベルにおいて解析を行ない、当研究班の最終的目標である HIV-1 サルモデル確立に向けた基盤的情報の蓄積を進めることとした。またこれと平行して、よりサル細胞での複製・増殖に最適化されたいわゆる第二世代サル指向性 HIV-1 クローンの構築のための基礎研究を行った。

B. 研究方法

(1) サル細胞における HIV-1 感染実験

・足立らが構築したサル指向性 HIV-1 クローンである NL-DT5R (X4-tropic) および NL-DT5R5-1 (R5-tropic) を、293T 細胞にトランスフェクションし各ウイルスを得た。サル感染実験用ウイルスは、接種個体由来 CD8(-)PBMC への感染実験により得た。(明里)

・in vitro 感染実験では我々が樹立したカニクイザル T 細胞株である HSC-F およびカニクイザル、アカゲザル由来 PBMC を用いた。CD8 陽性細胞除去は、immunobeads 法を基に抗 CD8 抗体結合ビーズを用いて行なった。本法により 99%以上の CD8 陽性細胞が除去可能であった。ウイルス定量は p24 ELISA 法により行なった。(明里)

(2) カニクイザル個体における HIV-1 感染実験

・カニクイザルは当施設で繁殖している SPF 個体を用いた。アカゲザルは国内繁殖業者より購入した。サルへのウイルス接種及び採血は、ケタミン麻酔下で行なった。(明里)

・得られたサル血液を用いて、定量 PCR 法により plasma viral RNA の検出、定量を行なうと共に、フローサイトメトリー法により末梢血リンパ球数、CD4 陽性 T リンパ球数、CD8 陽性 T リンパ球数の測定を行った。(明里、俣野)

・ HIV-1 特異的 T リンパ球反応を測定するために、チャレンジ実験前に、まず各々のサル由来の B リンパ芽球株 (BLCL) の樹立を行った。この BLCL に、第 1 世代 HIV-1 分子クローン DNA をトランスフェクションし、この細胞とチャレンジ後 4 週目の末梢血単核球 (PBMC) との共培養を行った後、T リンパ球中に特異的に誘導されるインターフェロン γ (IFN- γ) を細胞内染色により測定した。(俣野)

(3) 第二世代サル指向性 HIV-1 クローンの構築のための基礎研究

・NL-DT5R(X4 ウイルス)ゲノムの改変とその R5 ウイルスバージョン NL-DT5R5-1(SF162 の *env* 遺伝子を持つ) の構築は常法に従って行なった。PCR 法を用いた感染細胞からの分子ウイルスクローニングも既報の通りである (PNAS 103: 16959-16964, 2006)。(足立)

・トランスフェクションとウイルス感染実験には、それぞれ 293T 細胞と HSC-F 細胞を用いた。293T 細胞は 10%FCS 加 MEM 培地で、HSC-F 細胞は 10%FCS 加 RPMI1640 培地で維持し、感染実験は IL-2 存在下あるいは非存在下で行なった。(足立)

・ウイルスゲノムのシーケンシスはアプライドバイオシステムのサイクルシーケンスキットを用いて決定した。(足立)

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は、倫理面も含めて、医薬基盤研究所の動物実験委員会の審査をうけ、その承認を得て当センター感染症実験施設 (ABSL3 施設) にて実施した。用いた組換え生物等については、第二種使用等拡散防止措置確認申請承認 (大臣確認) 済みである。

C. 研究結果

(1) サル細胞における HIV-1 感染実験

実験 1 : サル指向性 HIV-1 である NL-DT5R (X4-tropic) および NL-DT5R5-1 (R5-tropic) の 2 クローン由来ウイルスについて確認実験とし

て HSC-F 細胞における感染実験を行なった。その結果、予想通りどちらのウイルス株も優れた増殖を認めたが、NL-DT5R5-1 では NL-DT5R よりやや増殖効率が低かった。

実験 2 : 次に、サル個体への感染実験を前提に、カニクイザル及びアカゲザル由来 PBMC を用いた感染実験を行なった。上記ウイルス株のサル PBMC における感染増殖能が明らかではなかったことから、より感受性を高めるため immunobeads 法により CD8 陽性細胞を除去した PBMC (CD8(-)PBMC) を調整した。これらを PHA 刺激にて活性化した後、100ng p24 相当の NL-DT5R および NL-DT5R5-1 をそれぞれカニクイザル及びアカゲザル (各 2 頭) 由来 PBMC, CD8(-)PBMC に接種し、培養上清中のウイルス量を経時的に測定した (図 1)。その結果、以下のことが明らかとなった: ①NL-DT5R および NL-DT5R5-1 のどちらも、カニクイザル細胞では有為な増殖が見られたが、一方アカゲザル細胞では殆ど増殖が認められなかった。同時に行なった SIVmac239 感染実験では、カニクイザルおよびアカゲザル細胞のどちらでも同程度に増殖が見られたことから、アカゲザル細胞の調整に問題がなかったことが確認された (data not shown)。② HSC-F での結果と同様に、PBMC においても NL-DT5R の方が NL-DT5R5-1 と比較して増殖効率が優れていた。③カニクイザル PBMC において、CD8 陽性細胞除去によりどちらのウイルス株も増殖効率が向上した。

以上の結果より、パイロット試験としてのサル感染実験にはカニクイザルおよび NL-DT5R の組み合わせを用いることとした。

実験 3 : HIV-1 感染実験に用いるカニクイザル候補として、若齢個体 (3 歳齢以下) と妊娠個体を検討した。特に妊娠個体では、一般に免疫応答能が減弱しており、HIV-1 感受性が比較的高い。そこで、若齢個体および妊娠個体由来 CD8(-)PBMC を用いて、実験 2 で得られたウイルス上清 (1ng p24 相当の NL-DT5R) にて感染実験を行なった (図 2)。その結果、妊娠個体 (C97-108, C97-070) 由来細胞の方が若齢個体と比較してウイルス感受性が高いことが示された。これらの結果を踏ま

え、妊娠ザル個体への感染実験を行なった。

(2) カニクイザル個体における HIV-1 感染実験
上述の妊娠カニクイザル由来 CD8(-)PBMC において増殖した NL-DT5R を含む培養上清 (C97-108: 3.8ng/ml, C97-070: 6.1ng/ml p24) を同個体へ接種し、その後の経過を観察した。その結果、どちらの個体共に感染 1-3 週間後において 10^3 コピー/ml 以上の血中ウイルス RNA が検出され、4 週以後は検出限界以下となった。

CD4 陽性 T リンパ球数および CD8 陽性 T リンパ球数ともに大きな変化は認められなかった。これら 2 頭の 4 週目の HIV-1 特異的 T リンパ球反応の解析の結果、CD8 陽性 T リンパ球反応 (IFN- γ 陽性 CD8 陽性細胞) が認められ、HIV-1 特異的 CD8 陽性 T リンパ球反応が誘導されていることが確認できた。

以上の結果から、第一世代サル指向性 HIV-1 である NL-DT5R は、カニクイザルにおいて感染増殖が可能であることが示された。

(3) 第二世代サル指向性 HIV-1 クローンの構築のための基礎研究

遺伝子工学的手法を用いて NL-DT5R ゲノムを様々に改変し、*gag* あるいは *vif* に変異・組換えを持つウイルスクローンをそれぞれ 26 種類および 9 種類作製した。これら全てのクローンにつき、293T 細胞へのトランスフェクションでウイルスサンプルを調製し、HSC-F 細胞での感染・増殖効率を検討した。しかし、全てのクローンが親株 NL-DT5R よりも増殖が遅いかあるいは増殖不能であった。NL-DT5R を親株とする R5 ウイルス NL-DT5R5-1 も CPE 惹起能は高いが増殖効率は非常に悪かった。

上記の結果に基づいて、NL-DT5R および NL-DT5R5-1 を親ウイルスとして用い、HSC-F 細胞でのウイルス馴化を試みた。ウイルス感染細胞の培養上清中に RT が検出されなくなってから、新たに HSC-F 細胞を加え培養を続けた。細胞追加後に産生されてきたウイルスをストックし (感染開始から約二ヶ月後)、HSC-F 細胞での増殖効率を検

討した。二つのウイルスサンプルとも NL-DT5R (オリジナル) より著しく、かつ、同程度に増殖効率が向上しており、細胞馴化が起こっていることが強く示唆された。

“馴化型”ウイルスが存在する感染細胞のゲノムから PCR 法にてウイルスゲノムを分子クローン化した。効率良く生物活性のあるクローンを取得するため、ウイルスゲノムを二つにわけて増幅し、かつ、得られた DNA を元の NL-DT5R に挿入した。ウイルスゲノムの 3 プライム側が X4 ウイルス由来のクローンを MN4 (4 種)、R5 ウイルス由来のクローンを MN5 (10 種) と命名した。各クローンの HSC-F 細胞における増殖速度を比較検討した結果、NL-DT5R より著しく早いクローンがそれぞれ複数得られた。これらは HSC-F 細胞における CPE の出現も早くかつ増強されていた。

最も増殖効率の良いクローンのゲノムシーケンスを決定した。NL-DT5R についての報告 (PNAS 103:16959-16964, 2006) と同様に、親株からの変異は LTR と *gag*(MA)、*pol*、*vif*、*vpr*、*env* および *nef* 遺伝子に少数認められたのみであった。MN4/MN5 クローンに共通して見られる変異の存在する領域 (同一の変異ではない) は LTR、*pol*(IN)、*vif* (アミノ酸置換を伴わない変異) および *env*(SU) であった。

D. 考察

本研究では、サル指向性 HIV-1 についてマカク属サル PBMC での感受性試験を行なったところ、カニクイザルの方がアカゲザルよりも感受性を示した。この結果は、これまでの SIV や SHIV での感染実験結果に基づく予想に反するものであった。本実験に用いた NL-DT5R (X4-tropic) および NL-DT5R5-1 (R5-tropic) の 2 クローン由来ウイルスがカニクイザル T 細胞株である HSC-F による馴化ウイルスであることから、これらのウイルス蛋白がカニクイザル宿主因子に対して機能的指向性を示すことがこの原因の一つとして考えられる。当センターでは家系の明らかな SPF カニクイザル自家繁殖群を有しており、十分なサル個体の入手や遺伝的要因に基づく個体選別が可能

であることから、将来の HIV-1 ワクチン候補の有効性評価研究に有望な結果と考えられる。また既に俣野らは MHC-I, MHC-II のハプロタイプが明らかなアカゲザルコロニーを確保していることから、アカゲザル指向性を獲得した HIV-1 クローン構築についても検討を進めていきたい。

カニクイザル PBMC を用いた感染実験において、CD8 陽性細胞除去により NL-DT5R (X4-tropic) および NL-DT5R5-1 (R5-tropic) の 2 クローン由来ウイルス株も増殖効率が向上した。従って、CD8 陽性細胞 (NK 細胞、T 細胞) がウイルス複製抑制に重要な役割を担っていることが確認された。これらの細胞がどのような機序でウイルス制御に関与しているかは不明であるが、自然免疫応答からの回避能力がエイズウイルスの持続感染能獲得に重要であることが示唆される。このことから、個体レベルで高いウイルス複製能や持続感染効率を有する HIV-1 樹立に際しては、少なくとも CD8 陽性細胞を含む PBMC で増殖可能なクローンを継代・馴化することが不可欠であると考えられた。

今回の *in vitro* 感染実験では、妊娠ザル由来 PBMC が若齢サル由来のものより感受性が高く、また個体レベルでの接種実験でも有為なウイルス増殖を認めることが出来た。最近、用いた妊娠ザル 2 頭とも仔ザルを出産しており、現在これらの仔ザルにおける HIV-1 検出を進めているところである。妊娠 HIV-1 感染者に関する報告では、母親の病態進行度と垂直感染率の相関が認められることから、今回の実験における母子感染は可能性が低いと考えられる。しかしながら、今後の第 2 世代サル指向性 HIV-1 クローンをを用いた感染・馴化実験においては、本プロトコルを用いることでより効率的なウイルス馴化が可能になることが期待される。

五十嵐らもブタオザル NL-DT5R の組み合わせによる感染実験で、我々のカニクイザルを用いた場合とほぼ同等のウイルス増殖を認めている (J Virol, 2007)。しかしながら、最終的な目標である実験用サル類/HIV-1 感染・発症モデル確立には、まだ多くの改善の余地が残されている。この点については、足立らのグループが研究を進めて

いる、よりウイルス複製能を改善した第2世代のサル指向性 HIV-1 クローンを用いて、カニクイザル・アカゲザル PBMC での感染・継代による馴化を行なうことでさらに個体レベルでの複製効率が向上するものと期待される。しかし、長期持続感染や CD4 陽性細胞数の低下といった病原性の獲得には、上記のような実験に加えて、サル間の継代・馴化が不可欠であろう。次年度以降はこうした事項を踏まえ、第2世代のサル指向性 HIV-1 クローン構築、サル PBMC および個体レベルでの感染・継代による馴化、さらにこれらの結果得られる馴化型ウイルスのゲノム・機能解析を進め、長期持続感染や CD4 陽性細胞数の低下といった病原性を獲得した第3世代のサル指向性 HIV-1 クローン構築を目指していきたい。

E. 結論

今年度は第一世代のサル指向性 HIV-1 クローンである NL-DT5R を用いたマカク属サルへの感受性について、細胞レベルおよび個体レベルにおいて解析を行なうとともに、よりサル細胞での複製・増殖に最適化されたいわゆる第二世代サル指向性 HIV-1 クローンの構築に向けた基盤研究を行なった。その結果、カニクイザルは NL-DT5R に感受性を有し、細胞レベルのみならず個体レベルでも同ウイルスの感染増殖が確認できた。またサル細胞を用いた馴化ウイルスの遺伝子解析結果を基に、NL-DT5R より増殖効率等で格段に優れた MN4/MN5 分子クローンが得られた。以上の結果は今後の HIV-1 サル感染発症システム確立に向け有望な成果であると考えられた。

G. 研究発表

(1) Kawada M, Tsukamoto T, Yamamoto H, Takeda A, Igarashi H, Watkins DI, Matano T. Long-term control of simian immunodeficiency virus replication with central memory CD4⁺ T-cell preservation after non-sterile protection by a cytotoxic T lymphocyte-based vaccine. *J Virol* 81:5202-5211, 2007.

(2) Tsukamoto T, Yuasa M, Yamamoto H, Kawada M, Takeda A, Igarashi H, Matano T. Induction of CD8⁺ cells able to suppress CCR5-tropic simian immunodeficiency virus SIVmac239 replication by controlled infection of CXCR4-tropic simian-human immunodeficiency virus in vaccinated rhesus macaques. *J Virol* 81:11640-11649, 2007.

(3) Tsukamoto T, Dohki S, Ueno T, Kawada M, Takeda A, Yasunami M, Naruse T, Kimura A, Takiguchi M, Matano T. Determination of a major histocompatibility complex class I restricting simian immunodeficiency virus Gag241-249 epitope. *AIDS*, in press.

(4) Takeuchi H, Matano T. Host factors involved in resistance to retroviral infection. *Microbiol Immunol.*, in press.

(5) Piroozmand A, Yamamoto Y, Khamisri B, Fujita M, Uchiyama T, Adachi A. Generation and characterization of APOBEC3G-positive 293T cells for HIV-1 Vif study. *Journal of Medical Investigation* 54: 154-158, 2007.

(6) Igarashi T, Iyengar R, Byrum RA, Buckler-White A, Dewar RL, Buckler CE, Lane HC, Kamada K, Adachi A, Martin MA. An HIV-1 derivative with 7% SIV genetic content is able to establish infections in pig-tailed macaques. *Journal of Virology* 81: 11549-11552, 2007.

(7) 足立昭夫、鎌田和弥、八町和樹、山下知輝、内山恒夫、野間口雅子. HIV-1 の病原性とアクセサリー遺伝子. 蛋白質核酸酵素, 52 : 1261-1267, 2007.

(8) Nomaguchi M, Doi N, Kamada K, Adachi A. 2008. Species barrier of HIV-1 and its jumping by virus engineering. *Reviews in Medical Virology* (Invited).

(9) Nomaguchi, M., and Adachi, A. 2008. Role of HIV-1 Vpu protein for virus spread and pathogenesis. *Microbes and Infection* (Invited).

(10) 明里宏文: 医学実験用霊長類を用いた病原体感染実験施設の管理運営におけるコンプライアンスとバイオセーフティ. *JVM (獣医畜産新報)* 60: 641-645, 2007.

(11) Hiyoshi M, Suzu S, Yoshidomi Y, Hassan R, Harada H, Sakashita N, Akari H, Motoyoshi K, Okada S: Interaction between Hck and HIV-1 Nef negatively regulates cell surface expression of M-CSF receptor. *Blood* 111: 243-250, 2008.

2 学会発表

- (1) Tsukamoto T, Yuasa M, Kawada M, Takeda A, Matano T. Effective CD8(+) cell responses against SIV superchallenge in SHIV-controllers. 4th IAS Conference on HIV pathogenesis, Treatment and Prevention, Sydney, Australia, 7/22-25/2007.
- (2) Matano T, Kawada M, Kuwano T, Naruse T, Kimura A. Association of AIDS vaccine efficacy with MHC haplotypes in rhesus macaques. The 25th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, Monterey, CA, USA, 9/10-13/2007.
- (3) 塚本徹雄、俣野哲朗. CD8 陽性細胞集団のエイズウイルス抑制能を評価する. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会、3WSB3、札幌、10/23/2007.
- (4) Matano T. SIV replication under CD8 cell responses. Center for AIDS Research, Kumamoto University, 10th Anniversary Symposium, Kumamoto, Japan, 11/15/2007.
- (5) 川田真幹、俣野哲朗. CTL 誘導エイズワクチン接種サルへのエスケープ変異ウイルス感染実験. 第 21 回日本エイズ学会学術集会、OS07-53、広島、11/28/2007.
- (6) Adachi A, Kamada K, Khamsri B, Hatcho K, Doi N, Yamashita T, Uchiyama T, Nomaguchi M. Generation and characterization of monkey-tropic HIV-1: evasion from antiviral factors. The 7th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2007, Awaji, Japan.
- (7) 山下知輝、八町和樹、鎌田和弥、Boonruang

Khamsri、野間口雅子、足立昭夫. HIV-1 Vif と宿主因子 APOBEC3F との結合機能部位の解析. 第 55 回日本ウイルス学会、2007 年、札幌市.

(8) 八町和樹、鎌田和弥、山下知輝、Boonruang Khamsri、土肥直哉、野間口雅子、足立昭夫. HIV-1 Vif 種特異性決定領域の解析とサル感染性 HIV-1 作製への応用. 第 55 回日本ウイルス学会、2007 年、札幌市.

(9) 足立昭夫、鎌田和弥、八町和樹、土肥直哉、Boonruang Khamsri、山下知輝、野間口雅子. HIV-1 DT クローンの細胞および個体レベルでの増殖能. 第 55 回日本ウイルス学会、2007 年、札幌市.

(10) 野間口雅子、足立昭夫. 粒子放出能に関する Vpu の点変異体解析. 第 21 回日本エイズ学会、2007 年、広島市.

(11) 足立昭夫. HIV-1 の種特異的増殖. 第 21 回日本エイズ学会教育講演、2007 年、広島市.

(12) 明里宏文: サルを用いた病原体感染実験実施におけるコンプライアンスとバイオセーフティ. 第 1 4 3 回日本獣医学会学術集会シンポジウム、2007 年、つくば市.

(13) 飯島沙幸、李永仲、明里宏文: HIV NefN 末端の tryptophan-based motif は AP-1A の mu subunit との相互作用を介して MHC-I 発現を抑制する. 第 5 5 回日本ウイルス学会学術集会、2007 年、札幌市.

(14) 明里宏文、李永仲、飯島沙幸、アブドアルキン: HIV-1 粒子内 Vif 蛋白の生理的機能に関する解析. 第 2 1 回日本エイズ学会学術集会、2007 年、広島市.

H. 知的財産権の出願・登録状況

無し。

II. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

サル指向性 HIV-1 のサル類継代馴化、病態解析

分担研究者 明里宏文 医薬基盤研究所霊長類医科学研究センター室長

研究要旨

抗エイズ薬開発やワクチン開発研究において、その安全性・有効性を評価する上で実験用サル類を用いたトランスレーショナルリサーチは不可欠である。本研究では近年確立された、サル細胞で増殖可能なサル指向性 HIV-1 クローンを用いた実験用サル類/HIV-1 感染・発症システムを確立することを目的とする。今年度はサル指向性 HIV-1 クローンの第一世代である NL-DT5R を用いたマカク属サルへの感受性について細胞レベルおよび個体レベルにおいて解析を行なった。その結果、当初の予想に反しアカゲザルと比較してカニクイザルがより優れた感受性を示し、細胞レベルのみならず個体レベルでもウイルスが増殖することが確認できた。本結果は今後の HIV-1 サル感染発症モデル確立に向け有望な成果であると考えられた。

A. 研究目的

抗エイズ薬開発やワクチン開発研究において、その安全性・有効性を評価する上で実験用サル類を用いたトランスレーショナルリサーチは不可欠である。HIV-1 は実験用サル類に感染発症しないことから、アカゲザルを用いたサル免疫不全ウイルス（SIV）および SIV の一部を HIV-1 遺伝子に組み換えたキメラウイルス（SHIV）感染・発症モデルは、サロゲートモデルとして汎用されている。これらの霊長類モデルは、CD4 陽性ヘルパー T 細胞減少やエイズ発症のメカニズムのみならず、ヒトでは解析が困難な感染初期過程におけるウイルス動態や免疫応答能の解析、さらに予防治療ワクチンの開発研究において重要な役割を担っており、その成果として現在多数の候補ワクチンが開発されつつある。一方、HIV-1 遺伝子産物を標的としたワクチンや新規治療薬の有効性評価には長期に渡る臨床試験を待たなければならず、その経費も莫大なものとなることから、HIV-1 が感染しエイズを発症する実用的な動物モデルの

開発が長い間求められてきた。

昨今の宿主因子の研究成果より HIV-1 の宿主域を規定する要因が明らかとされ、これらの知見を基に足ららの研究グループは世界に先駆け、サル細胞で増殖可能なサル指向性 HIV-1 クローンの構築に成功した（PNAS, 2006 年 11 月 7 日号）。そこで本研究ではこのクローンを用いた実験用サル類/HIV-1 感染・発症システムを確立することを目的とする。本研究が成功すれば、これまで困難であった HIV-1 を標的とした新規抗エイズ薬およびエイズワクチンに関する前臨床試験を霊長類モデルを用いて評価することが可能となることから、抗エイズ医薬品開発戦略上、画期的なブレークスルーと期待される。

そこで本研究では近年確立された、上記サル指向性 HIV-1 クローン的第一世代である NL-DT5R を用いたマカク属サルへの感受性について細胞レベルおよび個体レベルにおいて解析を行ない、当研究班の最終的目標である HIV-1 サルモデル確立に向けた基盤的情報の蓄積を進め

ることとした。

B. 研究方法

・ウイルス：足立らが構築したサル指向性 HIV-1 クローンである NL-DT5R (X4-tropic) および NL-DT5R5-1 (R5-tropic) を、293T 細胞にトランスフェクションし各ウイルスを得た。サル感染実験用ウイルスは、接種個体由来 CD8(-)PBMC への感染実験により得た。

・細胞：in vitro 感染実験では我々が樹立したカニクイザル T 細胞株である HSC-F およびカニクイザル、アカゲザル由来 PBMC を用いた。CD8 陽性細胞除去は、immunobeads 法を基に抗 CD8 抗体結合ビーズを用いて行なった。本法により 99%以上の CD8 陽性細胞が除去可能であった。

・サル実験：カニクイザルは当施設で繁殖している SPF 個体を用いた。アカゲザルは国内繁殖業者より購入した。サルへのウイルス接種及び採血は、ケタミン麻酔下で行なった。

・ウイルス検出：in vitro 実験では主に p24 ELISA 法によりウイルス定量を行なった。In vivo 実験では、plasma viral RNA を定量 PCR 法により測定した。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は、倫理面も含めて、医薬基盤研究所の動物実験委員会の審査をうけ、その承認を得て当センター感染症実験施設 (ABSL3 施設) にて実施した。用いた組換え生物等については、第二種使用等拡散防止措置確認申請承認 (大臣確認) 済みである。

C. 研究結果

(1) サル細胞における HIV-1 感染実験

実験 1：サル指向性 HIV-1 である NL-DT5R (X4-tropic) および NL-DT5R5-1 (R5-tropic) の 2 クローン由来ウイルスについて確認実験として HSC-F 細胞における感染実験を行なった。その

結果、予想通りどちらのウイルス株も優位な増殖を認めたが、NL-DT5R5-1 では NL-DT5R よりやや増殖効率が低かった。

実験 2：次に、サル個体への感染実験を前提に、カニクイザル及びアカゲザル由来 PBMC を用いた感染実験を行なった。上記ウイルス株のサル PBMC における感染増殖能が明らかではなかったことから、より感受性を高めるため immunobeads 法により CD8 陽性細胞を除去した PBMC (CD8(-)PBMC) を調整した。これらを PHA 刺激にて活性化した後、100ng p24 相当の NL-DT5R および NL-DT5R5-1 をそれぞれカニクイザル及びアカゲザル (各 2 頭) 由来 PBMC, CD8(-)PBMC に接種し、培養上清中のウイルス量を経時的に測定した (図 1)。その結果、以下のことが明らかとなった：①NL-DT5R および NL-DT5R5-1 のどちらも、カニクイザル細胞では有為な増殖が見られたが、一方アカゲザル細胞では殆ど増殖が認められなかった。同時に行なった SIVmac239 感染実験では、カニクイザルおよびアカゲザル細胞のどちらでも同程度に増殖が見られたことから、アカゲザル細胞の調整に問題がなかったことが確認された (data not shown)。②HSC-F での結果と同様に、PBMC においても NL-DT5R の方が NL-DT5R5-1 と比較して増殖効率が優れていた。③カニクイザル PBMC において、CD8 陽性細胞除去によりどちらのウイルス株も増殖効率が向上した。

以上の結果より、パイロット試験としてのサル感染実験にはカニクイザルおよび NL-DT5R の組み合わせを用いることとした。

実験 3：HIV-1 感染実験に用いるカニクイザル候補として、若齢個体 (3 歳齢以下) と妊娠個体を検討した。特に妊娠個体では、一般に免疫応答能が減弱しており、HIV-1 感受性が比較的高い。そこで、若齢個体および妊娠個体由来 CD8(-)PBMC を用いて、実験 2 で得られたウイルス上清 (1ng p24 相当の NL-DT5R) にて感染実験を行なった (図 2)。その結果、妊娠個体 (C97-108, C97-070) 由来細胞の方が若齢個体と比較してウイルス感受性が高いことが示された。これらの結果を踏まえ、妊娠ザル個体への感染実験を行なった。

(2) カニクイザルにおける HIV-1 感染実験

上述の妊娠カニクイザル由来 CD8(-)PBMC において増殖した NL-DT5R を含む培養上清 (C97-108: 3.8ng/ml, C97-070: 6.1ng/ml p24) を同個体へ接種し、その後の経過を観察した。その結果、どちらの個体共に感染 1-3 週後において 10^3 コピー/ml 以上の血中ウイルス RNA が検出され、4 週以後は検出限界以下となった (図 3)。以上のことから、第一世代サル指向性 HIV-1 である NL-DT5R は、カニクイザルにおいて感染増殖が可能であることが示された。

D. 考察

本研究では、サル指向性 HIV-1 についてマカク属サル PBMC での感受性試験を行なったところ、カニクイザルの方がアカゲザルよりも感受性を示した。この結果は、これまでの SIV や SHIV での感染実験結果に基づく予想に反するものであった。本実験に用いた NL-DT5R (X4-tropic) および NL-DT5R5-1 (R5-tropic) の 2 クローン由来ウイルスがカニクイザル T 細胞株である HSC-F による馴化ウイルスであることから、これらのウイルス蛋白がカニクイザル宿主因子に対して機能的指向性を示すことがこの原因の一つとして考えられる。当センターでは家系の明らかな SPF カニクイザル自家繁殖群を有しており、十分なサル個体の入手や遺伝的要因に基づく個体選別が可能であることから、将来の HIV-1 ワクチン候補の有効性評価研究に有望な結果と考えられる。また既に俣野らは MHC-I, MHC-II のハプロタイプが明らかなアカゲザルコロニーを確保していることから、アカゲザル指向性を獲得した HIV-1 クローン構築についても検討を進めていきたい。

五十嵐らもブタオザル NL-DT5R の組み合わせによる感染実験で、我々のカニクイザルを用いた場合とほぼ同等のウイルス増殖を認めている (J Virol, 2007)。しかしながら、最終的な目標である実験用サル類/HIV-1 感染・発症モデル確立には、まだ多くの改善の余地が残されている。この

点については、足立らが進めている、よりウイルス複製能を改善した第 2 世代のサル指向性 HIV-1 クローンの構築が必要と考えられる。

カニクイザル PBMC を用いた感染実験において、CD8 陽性細胞除去により NL-DT5R (X4-tropic) および NL-DT5R5-1 (R5-tropic) の 2 クローン由来ウイルス株も増殖効率が向上した。従って、CD8 陽性細胞 (NK 細胞、T 細胞) がウイルス複製抑制に重要な役割を担っていることが確認された。これらの細胞がどのような機序でウイルス制御に関与しているかは不明であるが、自然免疫応答からの回避能力がエイズウイルスの持続感染能獲得に重要であることが示唆される。このことから、個体レベルで高いウイルス複製能や持続感染効率を有する HIV-1 樹立に際しては、少なくとも CD8 陽性細胞を含む PBMC で増殖可能なクローンを継代・馴化することが不可欠であると考えられた。

今回の *in vitro* 感染実験では、妊娠ザル由来 PBMC が若齢サル由来のものより感受性が高く、また個体レベルでの接種実験でも有為なウイルス増殖を認めることが出来た。最近、用いた妊娠ザル 2 頭とも仔ザルを出産しており、現在これらの仔ザルにおける HIV-1 検出を進めているところである。妊娠 HIV-1 感染者に関する報告では、母親の病態進行度と垂直感染率の相関が認められることから、今回の実験における母子感染は可能性が低いと考えられる。しかしながら、今後の第 2 世代サル指向性 HIV-1 クローンをを用いた感染・馴化実験においては、本プロトコルを用いることでより効率的なウイルス馴化が可能になることが期待される。

E. 結論

今年度はサル指向性 HIV-1 クローンの第一世代である NL-DT5R を用いたマカク属サルへの感受性について基礎的解析を行なった。その結果、カニクイザルが感受性を有しており、細胞レベルのみならず個体レベルでもウイルス増殖が確認できた。本結果は今後の HIV-1 サル感染発症モデル確立に向け有望な成果であると考えられた。

G. 研究発表

1 論文発表

明里宏文：医学実験用霊長類を用いた病原体感染実験施設の管理運営におけるコンプライアンスとバイオセーフティ. *JVM (獣医畜産新報)* 60: 641-645, 2007.

Hiyoshi M, Suzu S, Yoshidomi Y, Hassan R, Harada H, Sakashita N, Akari H, Motoyoshi K, Okada S: Interaction between Hck and HIV-1 Nef negatively regulates cell surface expression of M-CSF receptor. *Blood* 111: 243-250, 2008.

2 学会発表

明里宏文：サルを用いた病原体感染実験実施におけるコンプライアンスとバイオセーフティ. 第1

43回日本獣医学会学術集会シンポジウム、2007年、つくば市。

飯島沙幸、李永仲、明里宏文：HIV Nef N末端の tryptophan-based motif は AP-1A の mu subunit との相互作用を介して MHC-I 発現を抑制する. 第55回日本ウイルス学会学術集会、2007年、札幌市。

明里宏文、李永仲、飯島沙幸、アブドアルキン：HIV-1 粒子内 Vif 蛋白の生理的機能に関する解析. 第21回日本エイズ学会学術集会 2007年、広島市。

H. 知的財産権の出願・登録状況
無し。

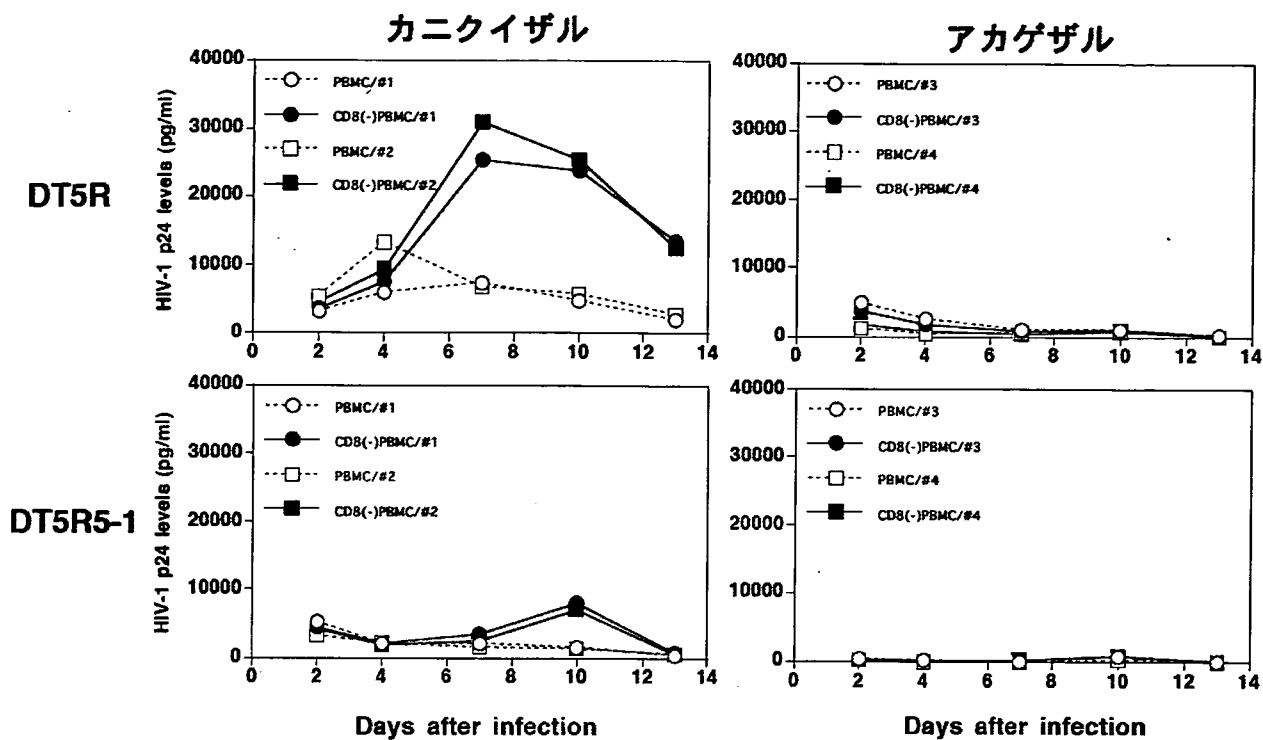


図1：カニクイザル及びアカゲザル PBMC, CD8(-)PBMC における HIV-1 DT5R, DT5R5-1 感染実験

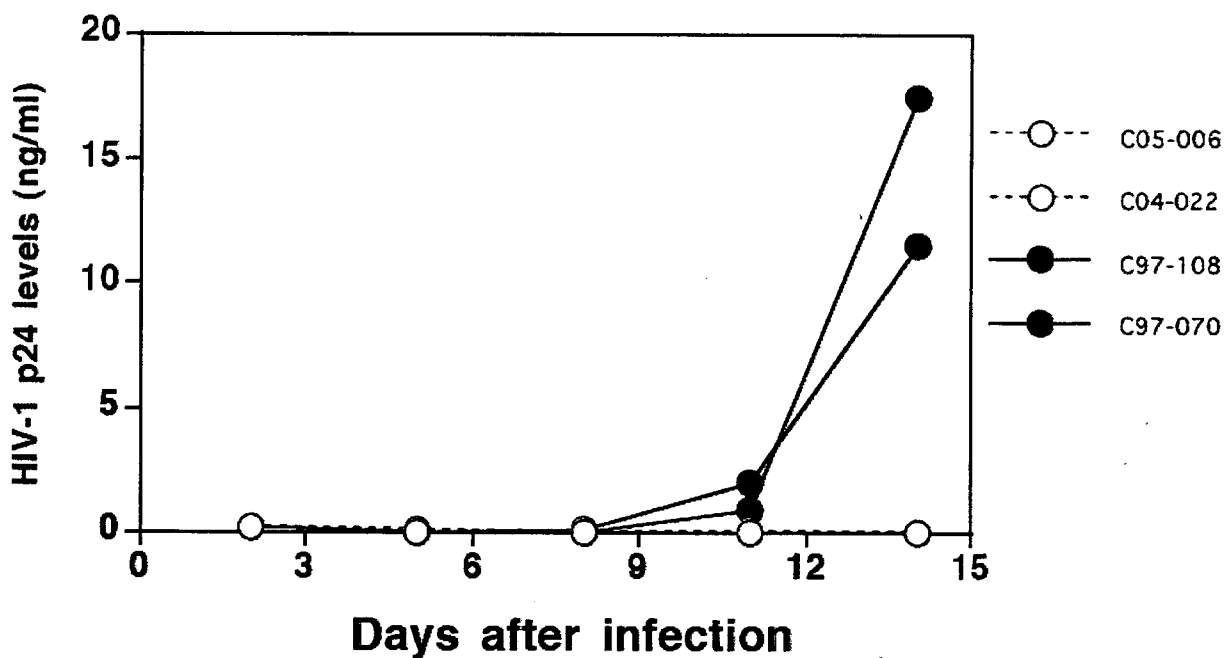


図2：カニクイザル CD8(-)PBMC における HIV-1 DT5R 感染実験

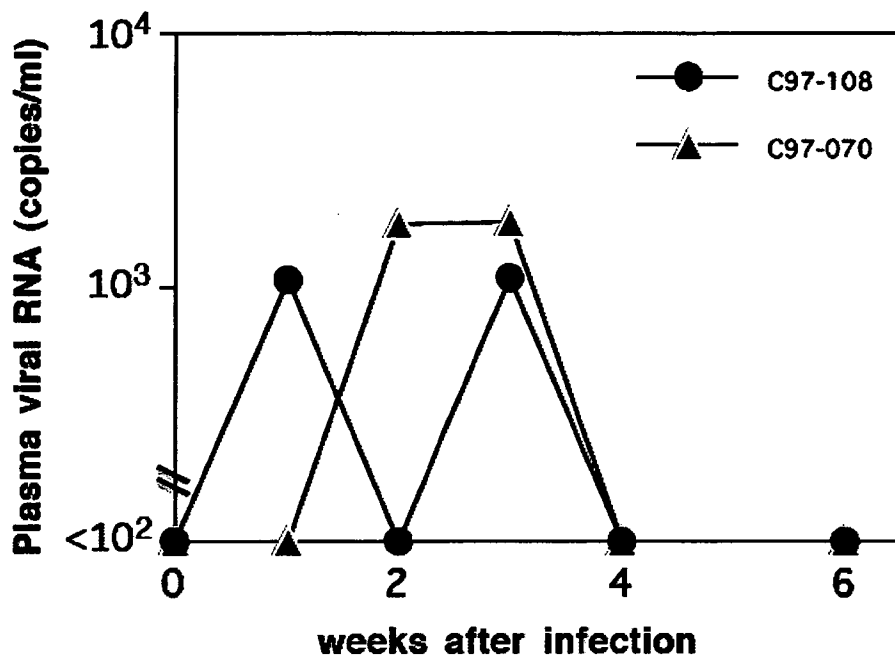


図3：カニクイザル妊娠個体における HIV-1 DT5R 感染実験：血中ウイルス RNA の推移

分担研究報告書

サル類に感染性・病原性を示す HIV-1 クローンの構築

分担研究者 足立昭夫 徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部 教授

研究要旨 HIV-1 のサル感染モデルを確立するため、サル細胞での複製・増殖に最適化したウイルスクローンの分子構築を目指し以下の実験を行なった。プロトタイプサル指向性 HIV-1 クローン NL-DT5R (X4 ウイルス) とその R5 ウイルスバージョン NL-DT5R5-1 とを用い、増殖効率を指標としてサル細胞 HSC-F での馴化を行った。感染細胞の長期培養により増殖効率の著しく向上したウイルスが出現した。これらのウイルスが感染した HSC-F 細胞のプロウイルスゲノムを PCR 法で二つに分けて増幅し、組換え操作により完全長の分子ウイルスクローンを得た。これらの中から HSC-F 細胞において親株である NL-DT5R/NL-DT5R5-1 より増殖効率が優れたものを複数選択し、それぞれ MN4/MN5 クローンと命名した。現在までに MN4 クローンは 4 種、MN5 クローンは 10 種作製した。これらのクローンは増殖効率だけでなく HSC-F 細胞に対する CPE 惹起能も格段に増強されていた。増殖効率が著しく向上したクローンのゲノムシーケンスを決定したところ、親株からの変異は LTR と *gag*(MA)、*pol*、*vif*、*vpr*、*env* および *nef* 遺伝子に少数認められたのみであった。MN4/MN5 クローンに共通して見られる変異の存在する領域は LTR、*pol*(IN)、*vif*(アミノ酸置換を伴わない変異) および *env*(SU) であった。現在、これらの変異がウイルス複製効率の向上にどの程度寄与しているのかを実験的に解析している。

A. 研究目的

我々が世界に先駆けて構築したプロトタイプサル指向性 HIV-1 (NL-DT5R) は SIVmac239 の *vif* 遺伝子全部と *gag* 遺伝子のごく一部とを持つ。NL-DT5R は種々のサル細胞 (カニクイザル由来 HSC-F 細胞、ブタオザル、アカゲザルおよびカニクイザル由来 PBMC) だけでなく、ブタオザル個体にも感染・増殖した (PNAS 103:16959-16964, 2006; J Virol 81:11549-11552, 2007; 未発表データ)。しかし、NL-DT5R はサル病原性標準株である SIVmac239 よりサル細胞での増殖効率が悪く (PNAS 103:16959-16964, 2006)、また、ブタオザル感染個体でのウイルス血症も一過性であった (J Virol 81:11549-11552, 2007)。本年度は、HIV-1/マカクザル感染システムの確立を目指し、NL-DT5R のゲノムを

改変・修正してウイルス学的性状を改善するための基礎研究を行なった。

B. 研究方法

1. NL-DT5R (X4 ウイルス) ゲノムの改変とその R5 ウイルスバージョン NL-DT5R5-1 (SF162 の *env* 遺伝子を持つ) の構築は常法に従って行なった。PCR 法を用いた感染細胞からの分子ウイルスクローニングも既報の通りである (PNAS 103:16959-16964, 2006)。
2. トランスフェクションとウイルス感染実験には、それぞれ 293T 細胞と HSC-F 細胞を用いた。293T 細胞は 10%FCS 加 MEM 培地で、HSC-F 細胞は 10%FCS 加 RPMI1640 培

地で維持し、感染実験は IL-2 存在下あるいは非存在下で行なった。トランスフェクションにはリン酸カルシウム法を用いた。ウイルスは培養上清中の逆転写酵素 (RT) 活性により定量した。

3. ウイルスゲノムのシーケンスはアプライドバイオシステムのサイクルシーケンスキットを用いて決定した。

(倫理面への配慮)

本研究では、ヒトと動物を用いた研究は行なっていない。

C. 研究結果

1. 遺伝子工学的手法を用いて NL-DT5R ゲノムを様々に改変し、*gag* あるいは *vif* に変異・組換えを持つウイルスクローンをそれぞれ 26 種類および 9 種類作製した。これら全てのクローンにつき、293T 細胞へのトランスフェクションでウイルスサンプルを調製し、HSC-F 細胞での感染・増殖効率を検討した。しかし、全てのクローンが親株 NL-DT5R よりも増殖が遅いかあるいは増殖不能であった。NL-DT5R を親株とする R5 ウイルス NL-DT5R5-1 も CPE 惹起能は高いが増殖効率は非常に悪かった。
2. 上記の結果に基づいて、NL-DT5R および NL-DT5R5-1 を親ウイルスとして用い、HSC-F 細胞でのウイルス馴化を試みた。ウイルス感染細胞の培養上清中に RT が検出されなくなつてから、新たに HSC-F 細胞を加え培養を続けた。細胞追加後に産生されてきたウイルスをストックし (感染開始から約二ヶ月後)、HSC-F 細胞での増殖効率を検討した。二つのウイルスサンプルとも NL-DT5R (オリジナル) より著しく、かつ、同程度に増殖効率が向上しており、細胞馴化が起こっていることが強く示唆された。
3. “馴化型” ウイルスが存在する感染細胞のゲノムから PCR 法にてウイルスゲノムを分子クローン化した。効率良く生物活

性のあるクローンを取得するため、ウイルスゲノムを二つにわけて増幅し、かつ、得られた DNA を元の NL-DT5R に挿入した。ウイルスゲノムの 3 プライム側が X4 ウイルス由来のクローンを MN4 (4 種)、R5 ウイルス由来のクローンを MN5 (10 種) と命名した。各クローンの HSC-F 細胞における増殖速度を比較検討した結果、NL-DT5R より著しく早いクローンがそれぞれ複数得られた。これらは HSC-F 細胞における CPE の出現も早くかつ増強されていた。

4. 最も増殖効率の良いクローンのゲノムシーケンスを決定した。NL-DT5R についての報告 (PNAS 103:16959-16964, 2006) と同様に、親株からの変異は LTR と *gag*(MA)、*pol*、*vif*、*vpr*、*env* および *nef* 遺伝子に少数認められたのみであった。MN4/MN5 クローンに共通して見られる変異の存在する領域 (同一の変異ではない) は LTR、*pol*(IN)、*vif* (アミノ酸置換を伴わない変異) および *env*(SU) であった。

D. 考察

HIV-1 の基礎・臨床研究を格段に進展させるためには、SIV や SHIV ではなく HIV-1 そのものを用いたサル感染・発症モデルが必要である。このシステムが確立できれば、長い間不可能であった (1) HIV-1 の病原性発現機構の解析、(2) 分子・細胞レベルでは不明の点の多い HIV-1 アクセサリー蛋白質の個体内機能の解析、(3) HIV-1 感染症の制御に繋がる新薬/ワクチンの評価・開発研究 が実現可能となる。本研究で得られた HIV-1 の分子クローン MN4/MN5 はこの目標の基礎となりえる。

E. 結論

本研究により、プロトタイプサル指向性 HIV-1 (NL-DT5R クローン) より増殖効率等で

格段に優れた MN4/MN5 分子クローンが得られた。サル細胞での増殖効率の上昇にはウイルスゲノムの5プライムおよび3プライム側の領域が共に関わっていると考えられる。クローン間で共通な変異領域としてはLTR、IN、SU および Vif があり、サル細胞での馴化に関連して特に注目される。我々が新しく得た分子クローンに関して、当面、次の事柄が課題となる。

1. MN4/MN5 に認められた変異のうちどの変異がサル細胞での増殖効率に貢献しているか。有意義な変異が多数見つければ、更なるウイルスゲノム改変に有力な情報となる。
2. サル細胞でのみ有意義な変異があるか否か。もしあれば、分子機構を解明するための実験を行なう。
3. ごく近い将来のサル感染実験に備えて、得られたクローンが X4 あるいは R5 ウイルスであることをアンタゴニストを用いて確認・実証する。
4. MN4/MN5 の CA (CypA 結合部位以外の領域) に新たな変異を導入する。NL-DT5R は TRIM5 α によるウイルス複製の抑制を解除しておらず (論文投稿準備中)、また、MN4/MN5 の CA には馴化による変異がなかったためである。
5. MN4/MN5 クローンおよびそれらの改良型 (上記の 4) のサル PBMC (カニクイザルやアカゲザル等) での増殖能を検討する。このデータを基にサル感染実験をデザインする。
6. マーカー遺伝子を挿入し、ウイルスの感染個体内での可視化を試みる。

研究期間内のできるだけ早い時期に上記課題を遂行し、「考察」の項で述べた目標を達成すべく全力で取り組む。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Piroozmand, A., Yamamoto, Y., Khamsri, B., Fujita, M., Uchiyama, T., and Adachi, A. 2007. Generation and characterization of APOBEC3G-positive 293T cells for HIV-1 Vif study. *Journal of Medical Investigation* 54: 154-158.
- 2) Igarashi, T., Iyengar, R., Byrum, R.A., Buckler-White, A., Dewar, R.L., Buckler, C.E., Lane, H.C., Kamada, K., Adachi, A., and Martin, M.A. 2007. An HIV-1 derivative with 7% SIV genetic content is able to establish infections in pig-tailed macaques. *Journal of Virology* 81: 11549-11552.
- 3) 足立昭夫、鎌田和弥、八町和樹、山下知輝、内山恒夫、野間口雅子. 2007. HIV-1 の病原性とアクセサリ-遺伝子. *蛋白質核酸酵素*, 52: 1261-1267.
- 4) Nomaguchi, M., Doi, N., Kamada, K., and Adachi, A. 2008. Species barrier of HIV-1 and its jumping by virus engineering. *Reviews in Medical Virology (Invited)*.
- 5) Nomaguchi, M., and Adachi, A. 2008. Role of HIV-1 Vpu protein for virus spread and pathogenesis. *Microbes and Infection (Invited)*.

2. 学会発表

- 1) Akio Adachi, Kazuya Kamada, Boonruang Khamsri, Kazuki Hatcho, Naoya Doi, Tomoki Yamashita, Tsuneo Uchiyama and Masako Nomaguchi. Generation and characterization of monkey-tropic HIV-1: evasion from antiviral factors. The 7th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2007, Awaji, Japan.
- 2) 山下知輝、八町和樹、鎌田和弥、Boonruang Khamsri、野間口雅子、足立昭夫. HIV-1 Vif と宿主因子 APOBEC3F との結合機能部位の解析. 第 55 回日本ウイルス学会、2007 年、札幌市.
- 3) 八町和樹、鎌田和弥、山下知輝、Boonruang Khamsri、土肥直哉、野間口雅子、足立昭夫. HIV-1 Vif 種特異性決定

領域の解析とサル感染性 HIV-1 作製への応用. 第 55 回日本ウイルス学会、2007 年、札幌市.

- 4) 足立昭夫、鎌田和弥、八町和樹、土肥直哉、Boonruang Khamsri、山下知輝、野間口雅子. HIV-1 DT クローンの細胞および個体レベルでの増殖能. 第 55 回日本ウイルス学会、2007 年、札幌市.
- 5) 野間口雅子、足立昭夫. 粒子放出能に関する Vpu の点変異体解析. 第 21 回日本エイズ学会、2007 年、広島市.
- 6) 足立昭夫. HIV-1 の種特異的増殖. 第 21 回日本エイズ学会教育講演、2007 年、広島市.

H. 知的財産権の出願・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
なし。