

200808014A

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20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 明 里 宏 文

平成21(2009)年3月

## 研究組織

研究者指名		所属	職名
明里 宏文	主任研究者	独立行政法人医薬基盤研究所	室長
足立 昭夫	研究分担者	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	研究分担者	東京大学医科学研究所	教授
櫻木 淳一	研究分担者	大阪大学微生物病研究所	助教授

# 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	9
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	15
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	19
分担研究者 俣野哲朗 (東京大学医科学研究所 教授)	
4. サル指向性HIV-1及びその馴化ウイルスの成熟粒子形成能に 関する解析	23
分担研究者 櫻木淳一 (大阪大学微生物病研究所 助教授)	

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表 27

## IV. 研究成果の刊行物・別刷 29

# 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

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。今年度は昨年度用いた第 1 世代サル指向性 HIV-1 クローンである NL-DT5R よりサル細胞株での増殖能が向上した第 2 世代 HIV-1 クローン MN4-5S および MN5-10S（それぞれ CXCR4 および CCR5 指向性）を構築した。これらはカニクイザル PBMC および個体ともに NL-DT5R と比べ格段に効率良い増殖効率を有することが明らかとなった。次に、DT5R を接種したカニクイザルの感染慢性期に SIV スーパーチャレンジを行ったところ、SIV 感染は成立したものの、その持続感染は抑制された。したがって、HIV-1 感染により誘導される宿主免疫反応は、HIV-1 だけでなく SIV の複製に対しても抑制効果を有する可能性が示唆された。さらに今後、より優れたサル HIV-1 病態モデルを目指し、既に解析用リソースが充実しているアカゲザルに指向性を有する新規 HIV-1 クローンを構築したとともに、今後順次得られるサル適応型 HIV-1 の複製増殖素過程を解析するため必要となるゲノム解析基盤を整備した。これらの成果は、HIV-1 サル感染発症モデル確立に向けて非常に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）

桜木淳一（大阪大学微生物病研究所 助教）

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

**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

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事から、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。

昨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い、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が感染増殖することが確認できた。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第 2 世代クローンである MN4-5S (X4-tropic)/MN5-10S (R5-tropic) が得られた。

この結果を受け、今年度は昨年度用いた第 1 世代サル指向性 HIV-1 クローンである NL-DT5R よりサル細胞株での増殖能が向上した第 2 世代 HIV-1 クローン MN4-5S および MN5-10S (それぞれ CXCR4 および CCR5 指向性) を構築し、これらのサル細胞及び個体レベルでの感染実験を行ない、その感染増殖能及び免疫応答について解析した。また DT5R を接種したカニクイザルの感染慢性期に SIV スーパーチャレンジを行い HIV-1 に対する免疫反応が heterologous virus の増殖を抑制するか否かを解析した。さらに今後、より優れたサル HIV-1 病態モデルを目指し、既に解析用リソースが充実しているアカゲザルに指向性を有する新規 HIV-1 クローン構築を進めたとともに、今後順次得られるサル適応型 HIV-1 の複製増殖過程を解析す

るため必要となるゲノム解析基盤整備を行なった。

## B. 研究方法

(1) サル細胞での感染増殖に向けてさらに最適化されたサル指向性 HIV-1 クローン構築のための基礎研究

・足立らが構築したサル指向性 HIV-1 クローンである NL-DT5R, MN4-5S, MN4Rh (X4-tropic) および MN5-10S, MN5Rh (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 (足立、明里)。

・in vitro 感染実験ではヒト細胞株 M8166, 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。ウイルス定量は培養上清中の逆転写酵素 (RT) 活性定量法または p24 ELISA 法により行なった (足立、明里)。

・上記ウイルスを感染させた細胞から PCR 法により分子ウイルスクローンを構築した。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。Env の構造解析は国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センターの佐藤裕徳博士および横山勝博士により行なわれた。

(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。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、侯野)。

・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、もしくは HIV-1 Gag overlapping peptides mixture 添加により T リンパ球中に特異的に誘導されるインターフェロン g (IFN- $\gamma$ ) を細胞内染色により測定した (俣野)。

・カニクイザル superchallenge 実験: 昨年度の研究において NL-DT5R を接種したカニクイザル2頭を用いた。NL-DT5R 感染4週後以降、plasma から HIV-1 の RNA は検出されていない。この2頭のカニクイザルに SIVmac239 を 100 TCID<sub>50</sub> 静脈内接種した。コントロールとして、ナイーブカニクイザル2頭に同様に SIVmac239 を接種し、経時的に plasma viral RNA の定量を行うとともに、FACSにて細胞集団(特に CD4 陽性 T 細胞)の変動を追跡した (明里、俣野)。

(3) レトロウイルスゲノム二量体化・ゲノム組換え・ゲノムパッケージング解析のための実験系の構築

HIV-1 プロウイルス型プラスミド pNL43 を母体としてすべての変異体を作成した。HIV-1 各サブタイプの感染性 DNA クローンもしくは分離株の分与を受け、クローン DNA やウイルス感染細胞 DNA より PCR にて各サブタイプの E/DLS をクローニングし、pNL43 とのキメラを作成した。異なる DLS 間の二量体化効率を測定することを目的として、同一ゲノム上に2つの DLS を保持する変異体も多数作成した。

マウスの表面抗原遺伝子 (mCDs) および緑色蛍光蛋白 (GFP) を pNL43 の非必須遺伝子領域に組み込んだ組換えウイルスを作成した。これとサブタイプキメラクローンを組み換えてマーカー付きキメラウイルスクローンを多数作成した。GFP は N 末あるいは C 末に変異を導入したものをを用いて、この二変異体間で組換えが起こった場合のみ蛍光励起される GFP が発現するようにした。別途開発した1ベクターによる組換え効率検出システムでは、遺伝子フレーム内に組換えマーカーとして一部配列を重複させた GFP (GFPF) と、感染マーカーとして mCD をベクターに挿入し、GFP の重複間の組換えによって起きる GFP の再構成を検

出した。これらのベクターを 293T 細胞に VSV-G 発現ベクターとコトランスフェクトし、産生ウイルスの感染により発現する mCDs および GFP の発現率を FACS 解析した。mCDs の発現率から組換えの理論的発現率を算出し、実際の GFP 発現率との比較により組換え効率を測定した。様々なレトロウイルスの翻訳不能変異体を作成し、野生株とのコトランスフェクションにより産生するウイルス粒子中のゲノムの割合を算出した。ウイルスの精製・感染・ノザンハイブリダイゼーション・RNase プロテクション・定量 PCR は定法に従って行った。

(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) サル指向性 HIV-1 クローン構築のための基礎研究

1. HSC-F 細胞での馴化・適応により増殖効率が向上した HIV-1 クローン MN4 (X4 ウイルス) および MN5 (R5 ウイルス) に存在したゲノム変異を一個づつ親ウイルスクローンである NL-DT5R および NL-DT5R5-1 に導入し、トランスフェクション・感染実験を行い、有意義のものを検索した。その結果、それぞれ、Pol- $\text{IN}$  と Env-gp120 の一アミノ酸変異の二ヶ所のみが重要であった。MN4 の V234I 変異 (Pol- $\text{IN}$ ) と E427K 変異 (Env-gp120 C4 領域)、および、MN5 の N222K 変異 (Pol- $\text{IN}$ ) と S304G 変異 (Env-gp120 V3 領域) である。

2. 構造解析の結果では、MN4 の Env E427K 変異はヒト CD4 との親和性に影響なくカニクイザル CD4 との親和性を増大させると予想される。実際、ヒト M8166 細胞での感染実験においては、この変異はウイルス学的効果を示さなかった。

3. 構造解析の結果では、MN5 の Env S304G 変異

はCCR5との親和性を増大させると予測される。これに合致して、MN5のHSC-F細胞へのエントリー効率は著しく増加し、コレセプターアンタゴニストTAK-779に対する感受性が顕著に減少していた。

4. 我々が構築したプロトタイプサル指向性HIV-1であるNL-DT5RはカニクイザルTRIM5 $\alpha$ による増殖抑制を解除できていないため (Microbes Infect, in press, 2009)、これに関わると予想されるGag-CA helix 6/7 loop構造 (S配列)をSIVmac239の対応領域に置換したMN4SとMN5Sを作製した (大阪大学微生物病研究所 塩田達雄教授らとの共同研究)。親クローンであるMN4/MN5と比較すると、カニクイザルHSC-F細胞ではそれほど顕著な差が認められなかったが、アカゲザルHSR5.4細胞では、S配列を持つと感染が持続し、長期間ウイルスが産生されるようになった。

5. 上記4の結果に基づき、MN4SとMN5SをHSR5.4細胞に感染させ、長期培養によるウイルス馴化を試みた。長期培養後に得られたウイルスを分子クローンし、トランスフェクション・感染実験により調べたところ、親クローンより格段に増殖能が向上したウイルスクローンが取得できた (MN5Rh)。このクローンにはGag-CA領域に三個、Pol-IN領域に一個の変異が存在するのみであった。MN5RhよりMN4Rhを構築した。

#### (2) カニクイザルPBMCにおけるHIV-1感染実験

サル個体への感染実験を前提に、カニクイザル由来PBMCにおける感染実験を行った。昨年度の第1世代サル指向性HIV-1クローン (NL-DT5R)を用いた実験同様、よりウイルスへの感受性を高めた条件下で実験を行うため、immunobeads法によりPBMCからCD8陽性細胞を除去した。この細胞をPHA刺激にて活性化した後、100 ng p24相当の各ウイルスを感染させ、培養上清中のウイルス量を経時的に測定した。その結果、次のことが明らかとなった。①X4クローンにおいては、NL-DT5Rと比較してMN4-5は高い増殖能を示した。さらに、塩田らにより報告された配列を導入したMN4-5Sは格段に高い増殖を示すことが明らかとなった。

②R5クローンにおいても、MN5-10Sは有意な増殖を示した。以上の結果より、サル個体感染実験にはMN4-5SおよびMN5-10Sを用いることとした。

#### (3) カニクイザルにおける第2世代HIV-1感染実験

カニクイザルCD8(-) PBMCにおいて増殖したMN4-5SもしくはMN5-10Sを含む培養上清 (10 ng)を各ウイルス3頭ずつのカニクイザルに静脈接種し、その後の経過を観察した。その結果、感染2週間において、MN4-5Sはすべての個体で、MN5-10Sでは3頭中1頭でウイルス増殖が確認された。特にMN4-5Sを接種した個体2頭およびMN5-10S接種個体1頭において感染14日時点で $10^4$  copies/ml以上のウイルスRNAが検出された。HIV-1感染急性期の宿主免疫反応の解析では、HIV-1 Gag特異的CTL反応誘導が確認できた。現在感染ザルにおけるリンパ球サブポピュレーションのおよびウイルス量の経過を引き続き観察中である。

昨年度のNL-DT5Rを用いた感染実験ではその増殖のピークが $10^3$  copies/ml程度であったことから、今回用いた第2世代サル指向性HIV-1クローンはカニクイザル個体における増殖能が少なくとも10倍以上向上していることが示された。

#### (4) NL-DT5R感染ザルへのSIV superchallenge

SIV感染後のplasma viral RNAを測定したところ、急性期においては両群に大きな差はなかった (俣野らの報告書参照)。しかし、FACS解析の結果から、central memory CD4陽性T細胞数の変動に相異点が認められた。すなわちNaïve群では大きな減少が認められたが、NL-DT5R接種群ではほとんど変動がみられなかった。一般に、SIVmac239接種後にはcentral memory CD4陽性T細胞の減少が認められることから、NL-DT5R接種により賦与された免疫がSIVmac239によるcentral memory CD4陽性T細胞減少を抑制した可能性が示唆された。極めて重要なことに、SIV感染7週後の時点でのplasma viral RNA定量の結果、naïve群では2頭中2頭で持続的なviremiaが観察されたが、NL-DT5R接種群では2頭中2頭で検出限界以下のレベルであった。これらの結果から、NL-DT5R感染によりSIV増殖を抑制するワクチン様効果をカ



ニクイザルに付与した可能性が示唆された。

(5) レトロウイルスゲノム二量体化・ゲノム組換え・ゲノムパッケージング解析のための実験系の構築

1. ゲノム二量体化をパッケージングから切り離して解析する、ノイズの低い極めてユニークな実験系を構築した。これをリファインすることで簡便に実験用ベクターを作成することも可能とした。様々な HIV-1 サブタイプ内・サブタイプ間のヘテロゲノム二量体化効率を測定した結果、サブタイプの組合せによって二量体形成の効率に差があることが示唆された。変異導入実験の結果二量体化開始部位 (DIS) が効率決定に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

2. 二種の mCDs と GFP 変異体を用いることで、ヘテロゲノム間組換えを迅速簡便に定量する系を構築し、この系による値がこれまでの文献による値と一致していることを示した。ゲノム二量体化効率と平行してヘテロゲノム間組換え効率を測定した結果、この二つの効率にほぼ完全な順相関が確認された。

3. HIV ゲノム組換えの必要条件検索において、相同配列長による組換えへの影響を検討した。GFP の重複長を 30 から 250 塩基まで段階的に変えた一連の変異体の感染実験において、単位長さあたりの組換え効率は重複長に従い上昇し 60 塩基でプラトーに達した。重複部分の相同性を変化させると、わずか 10% の相同性低下によって劇的な組換え効率の低下が観察された。また、重複配列間に挿入する RNA スペーサーを複数種用いることで自由エネルギーを変化させても、組換え効率は大きく増減した。

4. ウイルスのゲノムパッケージングとゲノム翻訳の関係性を探索する目的で、翻訳・非翻訳ゲノムを同時に細胞内で発現させ、産生ウイルス粒子あたりの両種のパッケージング効率を算出した。HIV-1 においては効率は翻訳の有無に影響されなかったが、HIV-2 においてはやや翻訳されるゲノムの方がパッケージされやすい傾向があった。しかしそのバイアスは文献で見られたものに比べかなり低いものであった。

## 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 (MN4Rh および MN5Rh) はこれらの目標に向け極めて有望である。サル細胞におけるウイルス増殖効率の向上に貢献する変異の同定とその機序の詳細な解析は、基礎研究としての意義だけでなく今後のウイルスゲノムの改良に繋がる重要な情報をもたらす可能性がある。Env 変異はもちろんであるが、この意味で、別個のウイルスクローンに共通して認められた IN C 末端領域の変異 (N222K および V234I) は大変興味深い。

本研究では、よりカニクイザル T 細胞株に馴化した第 2 世代サル指向性 HIV-1 クローンをを用いて、細胞レベルおよび個体レベルにてその増殖能を解析した。CD8(-) PBMC における感染実験の結果より、X4 クローンである MN4-5S は NL-DT5R よりも高い増殖を示すことが示された。その増殖亢進効果は、R5 クローン (MN5-10S) においても確認された。この *in vitro* 実験結果を受け、カニクイザル個体に MN4-5S もしくは MN5-10S を静脈接種した。その結果、MN4-5S 接種個体のすべてと、MN5-10S 接種個体 1 頭でウイルス増殖が検出され、そのレベルは NL-DT5R と比較して少なくとも 10 倍以上高かった。このことから、*in vitro* での増殖能の向上が *in vivo* での増殖能の向上にもつながることが示唆された。今後さらに経過を観察していくが、次の課題としては慢性化に繋がるかどうかポイントとなる。これまでの SHIV 感染における報告で、HIV-1 特異的 CD8 陽性 T 細胞がウイルス制御に寄与しており、特異抗体投与による CD8 陽性 T 細胞の除去によってウイルス抑制が解除されることによりウイルス再活性化が生じる

こと、さらにこの結果ウイルスの変異誘導、適応変異が起こることが知られている。そこで、上記感染サルについて CD8 陽性 T 細胞の除去処理を行ない果たして HIV-1 再活性化や慢性化が生じるかについて検討する予定である。

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、充分な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、すでに俣野らは MHC-I、MHC-II 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、足立らが構築を進めているアカゲザル指向性を獲得した HIV-1 クローンについてもサルレベルでの感受性について、さらに検討を進めていきたい。

NL-DT5R 感染カニクイザルへの SIV スーパーチャレンジ実験では、興味深いことに naïve 群と比較して NL-DT5R 接種群ではセットポイント期以降の SIV 増殖が抑制されているといった予備的知見が得られ、HIV-1 感染により誘導される宿主免疫反応が、HIV-1 だけでなく SIV の複製に対しても抑制効果を有する可能性が示唆された。今後、引き続き詳細なウイルス学的、免疫学的解析を行いたい。本予備的知見が正しいならば、そのウイルス増殖制御を規定する新たな抗ウイルス防御機序を解明する重要なモデルとなるとともに、SIV をベースとした抗 HIV-1 生ワクチン開発への応用が期待される。

HIV を含むレトロウイルスのポジティブ一本鎖 RNA ゲノムはウイルス粒子内で非共有的に結合して二量体を形成している。これは遺伝子組換えによって子孫に遺伝的多様性をもたらし、また片方のゲノムが傷ついていた時の補償をすることで、生き残りに有利な状況を作り出していると解釈されている。HIV ゲノム二量体化及びゲノムパッケージング・組換えの機序の解明は、遺伝的多様性を主要な生き残り戦略としている HIV の制圧の端緒となり、ワクチン開発を実施する科学的基盤を提供することが期待されている。次年度よりさらに本格化することが予想されるサル指向性 HIV-1 in vivo 感染実験においても、ウイルス増

殖素過程の基礎的知見の解析は重要な情報となると考えられ、実験系の構築と検証は不可欠である。これらの実験系を用いて、今後感染実験の過程で分離されるサル指向性 HIV-1 の変異株の解析を行っていくことを第一義とするが、さらに様々なウイルス種や細胞種を用いた実験も平行して行うことでそれぞれのウイルスの一般則や宿主特異性についても追求し、感染モデル実験へとフィードバックさせることが可能となると考えられる。

## E. 結論

今年度は昨年度用いた第 1 世代サル指向性 HIV-1 クローンである NL-DT5R よりサル細胞株での増殖能が向上した第 2 世代 HIV-1 クローン MN4-5S および MN5-10S (それぞれ CXCR4 および CCR5 指向性) を構築した。これらはカニクイザル PBMC および個体ともに NL-DT5R と比べ格段に効率良い増殖効率を有することが明らかとなった。次に、DT5R を接種したカニクイザルの感染慢性期に SIV スーパーチャレンジを行ったところ、SIV 感染は成立したものの、その持続感染は抑制された。したがって、HIV-1 感染により誘導される宿主免疫反応は、HIV-1 だけでなく SIV の複製に対しても抑制効果を有する可能性が示唆された。さらに今後、より優れたサル HIV-1 病態モデルを目指し、既に解析用リソースが充実しているアカゲザルに指向性を有する新規 HIV-1 クローンを構築したとともに、今後順次得られるサル適応型 HIV-1 の複製増殖素過程を解析するため必要となるゲノム解析基盤を整備した。これらの成果は、HIV-1 サル感染発症モデル確立に向けて非常に有望な成果であると考えられた。

## F. 研究発表

- 1) 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* 18: 261-275.
- 2) Fujita, M., Otsuka, M., Miyoshi, M., Khamsri, B., Nomaguchi, M., and Adachi, A. 2008. Vpx is critical for reverse transcription of the human immunodeficiency virus type 2 genome in

- macrophages. *Journal of Virology* 82: 7752-7756.
- 3) Yamashita, T., Doi, N., Adachi, A., and Nomaguchi, M. 2008. Growth ability in simian cells of monkey cell-tropic HIV-1 is greatly affected by downstream region of the *vif* gene. *Journal of Medical Investigation* 55: 236-240.
  - 4) Nomaguchi, M., Fujita, M., and Adachi, A. 2008. Role of HIV-1 Vpu protein for virus spread and pathogenesis. *Microbes and Infection* 10: 960-967.
  - 5) Yamashita, T., Kamada, K., Hacho, K., Adachi, A., and Nomaguchi, M. 2008. Identification of amino acid residues in HIV-1 Vif critical for binding and exclusion of APOBEC3G/F. *Microbes and Infection* 10: 1142-1149.
  - 6) Hacho, K., Kamada, K., Yamashita, T., Adachi, A., and Nomaguchi, M. 2008. Replication potentials of *vif* variant viruses generated from monkey cell-tropic HIV-1 derivative clones NL-DT5/NL-DT5R. *Microbes and Infection* 10: 1218-1222.
  - 7) Fujita, M., Otsuka, M., Nomaguchi, M., and Adachi, A. 2008. Functional region mapping of HIV-2 Vpx protein. *Microbes and Infection* 10: 1387-1392.
  - 8) Morita, D., Katoh, K., Harada, T., Nakagawa, Y., Matsunaga, I., Miura, T., Adachi, A., Igarashi, T., and Sugita, M. 2008. Trans-species activation of human T cells by rhesus macaque CD1b molecules. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 377: 889-893.
  - 9) Kamada, K., Yamashita, T., Hacho, K., Adachi, A., and Nomaguchi, M. 2009. Evasion from CypA- and APOBEC-mediated restrictions is insufficient for HIV-1 to efficiently grow in simian cells. *Microbes and Infection*, in press.
  - 10) Nagao, T., Hacho, K., Doi, N., Fujiwara, S., Adachi, A., and Nomaguchi, M. 2009. Amino acid alterations in Gag that confer the ability to grow in simian cells on HIV-1 are located at a narrow CA region. *Journal of Medical Investigation*, in press.
  - 11) Seki S, Kawada M, Takeda A, Igarashi H, Sata T, Matano T. Transmission of simian immunodeficiency virus carrying multiple cytotoxic-T-lymphocyte escape mutations with diminished replicative ability can result in AIDS progression in rhesus macaques. *J Virol* 82:5093-5098, 2008.
  - 12) 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* 22:993-994, 2008.
  - 13) Takeuchi H, Matano T. Host factors involved in resistance to retroviral infection. *Microbiol Immunol* 52:318-325, 2008.
  - 14) Kawada M, Tsukamoto T, Yamamoto H, Iwamoto N, Kurihara K, Takeda A, Moriya C, Takeuchi H, Akari H, Matano T. Gag-specific cytotoxic T lymphocyte-based control of primary simian immunodeficiency virus replication in a vaccine trial. *J Virol* 82:10199-10206, 2008.
  - 15) 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.
  - 16) Izumi T, Takaori-Kondo A, Shirakawa K, Higashitsuji H, Itoh K, Io K, Matsui M, Iwai K, Kondoh H, Sato T, Tomonaga M, Ikeda S, Akari H, Koyanagi Y, Fujita J, Uchiyama T: Mdm2 is a novel E3 ligase for HIV-1 Vif. *Retrovirology*, 6, 1, 2009.
  - 17) Akari H, Iwasaki Y, Yoshida T, Iijima S: Non-human primate surrogate model of hepatitis C virus infection. *Microbiology and Immunology* 53, 53-57, 2009.
  - 18) Iwasaki Y, Akari H, Murakami T, Kumakura S, Dewan MZ, Yanaka M, Yamamoto N: Efficient inhibition of SDF-1 $\alpha$ -mediated chemotaxis and HIV-1 infection by novel CXCR4 antagonists. *Cancer Science*, in press.
  - 19) Sakuragi JI, Sakuragi S, Ohishi T, Shioda T: A rapid recombination assay of HIV-1 using murine CD52 as a novel biomarker. *Microbes and Infection* 10: 396-404, 2008.
- ## 2. 学会発表
- 1) Nomaguchi M., Doi, N., and Adachi, A. HIV-1 adapts and evolves to grow efficiently in simian cells. The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Sept. 9, 2008, Awaji, Japan.
  - 2) 藤田美歌子, 大塚雅巳, 野間口雅子, 足立昭夫: HIV-2 Vpx の富プロリン領域は蛋白質の安定性に必須である。第 56 回日本ウイルス学会学術集会、2008 年 10 月 26 日、岡山。
  - 3) 土肥直哉, 野間口雅子, 山下知輝, 足立昭夫: サル細胞で効率よく複製する HIV-1 の構築。第 56 回日本ウイルス学会学術集会、2008 年 10 月 26 日、岡山。
  - 4) 野間口雅子, 土肥直哉, 足立昭夫: HIV-1 Env の 1 アミノ酸変異はサル細胞での増殖を著しく増強する。第 56 回日本ウイルス学会学術集会、2008 年 10 月 26 日、岡山。
  - 5) 足立昭夫: アクセサリー蛋白質と抗ウイルス

- 細胞因子。第56回日本ウイルス学会学術集会シンポジウム3 (HIV感染症)、2008年10月27日、岡山。
- 6) 齊藤暁、飯島沙幸、岩崎優紀、海津雅彦、足立昭夫、野間口雅子、俣野哲朗、明里宏文：新規 HIV-1/サルモデルの開発；新規 HIV-1 クローン NL-DT5R はカニクイザル個体内で増殖する。第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月28日、岡山。
  - 7) 海津雅彦、齊藤暁、飯島沙幸、岩崎優紀、足立昭夫、野間口雅子、俣野哲朗、明里宏文：新規 HIV-1/サルモデルの開発；新規 HIV-1 クローン NL-DT5R はカニクイザル個体内で増殖する。第22回日本エイズ学会学術集会、2008年11月27日、大阪。
  - 8) 野間口雅子、足立昭夫：HIV-1 のサル細胞における適応進化。第22回日本エイズ学会学術集会、2008年11月28日、大阪。
  - 10) 櫻木淳一、櫻木小百合、塩田達雄：HIV-1 ゲノム組換え標的の必要条件。第56回日本ウイルス学会学術集会、札幌。
  - 11) 大石真久、塩田達雄、櫻木淳一：HIV-1 Gag 前駆体プロセシングのゲノム二量体化への影響。第22回日本エイズ学会学術集会、大阪。
  - 12) 櫻木淳一、櫻木小百合、大石真久、塩田達雄：HIV-1 ゲノム二量体化とウイルスゲノム組換えの厳密な相関。第22回日本エイズ学会学術集会、大阪。
  - 13) Matano T. Impact of vaccine-induced Gag-specific CTL responses on SIV control. The 9th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 9/19/2008.
  - 14) 武内寛明、石井洋、桑野哲夫、稲垣奈都子、明里宏文、俣野哲朗：Cyclophilin A はサルエイズウイルスの宿主域を規定する細胞性因子である。第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山、10/27/2008.
  - 15) 稲垣奈都子、川田真幹、俣野哲朗：SIV Gag CA の N domain の変異に対する C domain の代償性変異。第22回日本エイズ学会学術集会、大阪、11/26/2008.
  - 16) 堀場聡、川田真幹、武内寛明、俣野哲朗：サル細胞とヒト細胞で複製能への影響が異なる gag 変異を有する SIV。第22回日本エイズ学会学術集会、大阪、11/28/2008.
  - 17) 齊藤暁、飯島沙幸、岩崎優紀、海津雅彦、明里宏文：マカクザル感染性新規 HIV-1 クローンの解析。第146回日本獣医学会学術集会、2008年、宮崎

#### G. 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

今年度は、昨年度用いた第1世代サル指向性 HIV-1 クローンである NL-DT5R と比較して、サル細胞株での増殖能が向上した第2世代 HIV-1 クローンを用いて、細胞レベルおよび個体レベルでの解析を行った。その結果、第2世代サル指向性 HIV-1 クローンはカニクイザル末梢血単核球における増殖能が著しく亢進し、また、カニクイザル個体内においては NL-DT5R よりも少なくとも10倍以上高いレベルのウイルス血症を引き起こした。さらに R5-tropic HIV-1 がカニクイザル個体で増殖することを世界で初めて明らかにした。SIV superchallenge 実験では heterologous virus の増殖を抑制するという新たな知見が得られ、その機序の解析が期待される。今回の一連の実験結果は、HIV-1 サル感染発症モデル確立に向けて非常に有望な成果であると考えられた。

抗エイズ薬およびワクチン開発においては、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ショナルリサーチが不可欠である。HIV-1 は実験用サル類に感染しないことから、主にアカゲザルを用いたサル免疫不全ウイルス (SIV) および SIV の一部に HIV-1 遺伝子を組み込んだキメラウイルス (SHIV) 感染・発症モデルが汎用されてきた。これらのモデルにおいては、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におけるウイルス動態や免疫応答の解析、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。一方で、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ねばならず、その経費も莫大なものとなる。このことから、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結果より、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プロトタイプサル指向性 HIV-1 クローン (NL-DT5R) の構築に成功した。そこで本研究ではこのクローンもしくはよりサル細胞での増殖が向上した第2世代サル指向性 HIV-1 クローンを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にお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、画期的なブレイクスルーと期待される。

また、昨年度の実験において NL-DT5R を接種した妊娠カニクイザル (現在までに出産済み) を用いて新しい概念のワクチンの検討を行った。一般に、霊長類レンチウイルスのワクチンとしては、生ワクチンが最も強力な免疫を誘導するとされている。しかし、安全性を高めた生ワクチン候補

として、病原性発現に強く関わる nef 遺伝子を欠損させたウイルスであっても、特に幼若個体においては病原性を発揮することがあり、ヒトへの応用は現状では不可能である。ところで、上述の生ワクチンは autologous もしくは非常に近縁なチャレンジウイルスに対してのみ有効であると考えられており、SIV と HIV-1 のように遺伝的距離の離れたウイルス間でも防御免疫が誘導できるのかについては知られていない。その理由として、SIV と HIV-1 が感染しうる実験動物がこれまでになかったことがあげられる。そこで本研究では NL-DT5R の一過性増殖が認められたカニクイザルに SIV を superchallenge し、HIV-1 に対する免疫反応が heterologous virus の増殖を抑制するか否かを解析した。今回の実験はサルで増殖可能な HIV-1 がなければ実施不可能であることから、非常に新規性がある。また、今回の実験により、heterologous virus の増殖抑制が認められれば、将来的には、ヒトにおいて HIV-1 よりマイルドな増殖をしめす SIV を基にした、抗 HIV-1 生ワクチン開発につながるものと期待される。

## B. 研究方法

### ・ ウイルス

足立らが先述の NL-DT5R をカニクイザル T 細胞株である HSC-F 細胞で長期培養し、結果として馴化型クローンとして得られた第 2 世代サル指向性 HIV-1 である MN4-5 (X4-tropic) および MN5-10 (R5-tropic) を用いた。さらに、近年塩田らのグループにより報告された、サル細胞における抗 HIV-1 因子 (TRIM5 $\alpha$ ) からの逃避を可能とする SIV 由来配列を両クローンに導入した MN4-5S および MN5-10S を用いた。比較として NL-DT5R も用いた。各プラスミドを 293T 細胞にトランスフェクションし、ウイルスを得た。サル感染実験用ウイルスは、カニクイザル由来 CD8(-) PBMC への感染実験により得た。

### ・ 細胞

In vitro 感染実験ではカニクイザル由来 PBMC を用いた。PBMC からの CD8 陽性細胞除去には immunobeads 法を用いて行った。本法により 99%

以上の CD8 陽性細胞の除去が可能であった。

### ・ カニクイザル実験

カニクイザルは当施設で繁殖している SPF 個体を用いた。サルへのウイルス接種及び採血は、ケタミン麻酔下で行った。

### ・ 血漿ウイルス定量

in vitro 実験では主に p24 ELISA 法によりウイルス定量を行った。In vivo 実験では、plasma viral RNA をリアルタイム RT-PCR 法により測定した。

### ・ カニクイザル superchallenge 実験

昨年度の研究において NL-DT5R を接種したカニクイザル 2 頭を用いた。NL-DT5R 感染 4 週後以降、plasma から HIV-1 の RNA は検出されていない。この 2 頭のカニクイザルに SIVmac239 を 100 TCID<sub>50</sub> 静脈内接種した。コントロールとして、ナイーブカニクイザル 2 頭に同様に SIVmac239 を接種し、経時的に plasma viral RNA の定量を行うとともに、FACS にて細胞集団 (特に CD4 陽性 T 細胞) の変動を追跡した。

### (倫理面への配慮)

すべての動物実験は、倫理面をふくめて、医薬基盤研究所の動物実験委員会の審査を受け、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) カニクイザル PBMC における HIV-1 感染実験

サル個体への感染実験を前提に、カニクイザル由来 PBMC における感染実験を行った。昨年度の第 1 世代サル指向性 HIV-1 クローン (NL-DT5R) を用いた実験同様、よりウイルスへの感受性を高めた条件下で実験を行うため、immunobeads 法により PBMC から CD8 陽性細胞を除去した。この細胞を PHA 刺激にて活性化した後、100 ng p24 相当の各ウイルスを感染させ、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、次のことが明らかとなった。① X4 クローンにおいては、

NL-DT5Rと比較してMN4-5は高い増殖能を示した。さらに、塩田らにより報告された配列を導入したMN4-5Sは格段に高い増殖を示すことが明らかとなった。②R5クローンにおいても、MN5-10Sは有意な増殖を示した。以上の結果より、サル個体感染実験にはMN4-5SおよびMN5-10Sを用いることとした。

#### (2) カニクイザルにおける HIV-1 感染実験

カニクイザルCD8(-) PBMCにおいて増殖したMN4-5SもしくはMN5-10Sを含む培養上清(10 ng)を各ウイルス3頭ずつのカニクイザルに静脈接種し、その後の経過を観察した。その結果、感染2週間において、MN4-5Sはすべての個体で、MN5-10Sでは3頭中1頭でウイルス増殖が確認された。特にMN4-5Sを接種した個体2頭およびMN5-10S接種個体1頭において感染14日時点で $10^4$  copies/ml以上のウイルスRNAが検出された(図2)。現在感染ザルにおけるリンパ球サブポピュレーションのおよびウイルス量の経過を引き続き観察中である。

昨年度のNL-DT5Rを用いた感染実験ではその増殖のピークが $10^3$  copies/ml程度であったことから、今回用いた第2世代サル指向性HIV-1クローンはカニクイザル個体における増殖能が少なくとも10倍以上向上していることが示された。

#### (3) NL-DT5R 感染ザルへの SIV superchallenge

SIV感染後のplasma viral RNAを測定したところ、急性期においては両群に大きな差はなかった(俣野らの報告書参照)。しかし、FACS解析の結果から、central memory CD4陽性T細胞数の変動に相異点が認められた。すなわちNaïve群では大きな減少が認められたが、NL-DT5R接種群ではほとんど変動がみられなかった(図3)。一般に、SIVmac239接種後にはcentral memory CD4陽性T細胞の減少が認められることから、NL-DT5R接種により賦与された免疫がSIVmac239によるcentral memory CD4陽性T細胞減少を抑制した可能性が示唆された。極めて重要なことに、SIV感染7週後の時点でのplasma viral RNA定量の結果、naïve群では2頭中2頭で持続的なviremiaが観察されたが、NL-DT5R接種群では2頭中2頭

で検出限界以下のレベルであった(俣野らの報告書参照)。これらの結果から、NL-DT5R感染によりSIV増殖を抑制するワクチン様効果をカニクイザルに付与した可能性が示唆された。

#### D. 考察

本研究では、よりカニクイザルT細胞株に馴化した第2世代サル指向性HIV-1クローンをを用いて、細胞レベルおよび個体レベルにてその増殖能を解析した。CD8(-) PBMCにおける感染実験の結果より、X4クローンであるMN4-5SはNL-DT5Rよりも高い増殖を示すことが示された。その増殖亢進効果は、R5クローン(MN5-10S)においても確認された。このin vitro実験結果を受け、カニクイザル個体にMN4-5SもしくはMN5-10Sを静脈接種した。その結果、MN4-5S接種個体のすべてと、MN5-10S接種個体1頭でウイルス増殖が検出され、そのレベルはNL-DT5Rと比較して少なくとも10倍以上高かった。このことから、in vitroでの増殖能の向上がin vivoでの増殖能の向上にもつながることが示唆された。今後さらに経過を観察していくが、次の課題としては慢性化に繋がるかどうかのポイントとなる。これまでのSHIV感染における報告で、HIV-1特異的CD8陽性T細胞がウイルス制御に寄与しており、特異抗体投与によるCD8陽性T細胞の除去によってウイルス抑制が解除されることによりウイルス再活性化が生じること、さらにこの結果ウイルスの変異誘導、適応変異が起こることが知られている。そこで、上記感染ザルについてCD8陽性T細胞の除去処理を行ない果たしてHIV-1再活性化や慢性化が生じるかについて検討する予定である。

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、充分な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、すでに俣野らはMHC-I、MHC-II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、足立らが構築を進めているアカゲザル指向性を獲得したHIV-1クローンについてもサルレベルでの感受



性について、さらに検討を進めていきたい。

NL-DT5R 感染カニクイザルへの SIV スーパーチャレンジ実験の結果、興味深いことに、naïve 群と比較して NL-DT5R 接種群ではセットポイント期以降の SIV 増殖が抑制されているといった予備的知見が得られた。今後、引き続き詳細なウイルス学的、免疫学的解析を行いたい。本予備的知見が正しいならば、そのウイルス増殖制御を規定する免疫機序を解明する重要なモデルとなるとともに、SIV をベースとした抗 HIV-1 生ワクチン開発への応用が期待される。

## E. 結論

今年度は第 2 世代サル指向性 HIV-1 である MN4-5S (X4-tropic) および MN5-10S (R5-tropic) を用いて、カニクイザルの細胞レベルおよび個体レベルでの増殖を解析した。その結果、第 1 世代サル指向性 HIV-1 である NL-DT5R よりも高い増殖を示すことが確認され、さらには、R5-tropic HIV-1 がカニクイザル個体で増殖することを世界で初めて明らかにした。SIV superchallenge 実験では heterologous virus の増殖を抑制するという新たな知見が得られ、その機序の解析が期待される。今回の一連の実験結果は、HIV-1 サル感染発症モデル確立に向けて非常に有望な成果であると考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

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.

Kawada M, Tsukamoto T, Iwamoto N, Kurihara K, Takeda A, Moriya C, Takeuchi H, Akari H, Matano T: Gag-specific cytotoxic T lymphocyte-based viral containment in a macaque AIDS model. **Journal of**

**Virology** 82, 10199-10206, 2008.

Izumi T, Takaori-Kondo A, Shirakawa K, Higashitsuji H, Itoh K, Io K, Matsui M, Iwai K, Kondoh H, Sato T, Tomonaga M, Ikeda S, Akari H, Koyanagi Y, Fujita J, Uchiyama T: Mdm2 is a novel E3 ligase for HIV-1 Vif. **Retrovirology**, 6, 1, 2009.

Akari H, Iwasaki Y, Yoshida T, Iijima S: Non-human primate surrogate model of hepatitis C virus infection. **Microbiology and Immunology** 53, 53-57, 2009.

Iwasaki Y, Akari H, Murakami T, Kumakura S, Dewan MZ, Yanaka M, Yamamoto N: Efficient inhibition of SDF-1 $\alpha$ -mediated chemotaxis and HIV-1 infection by novel CXCR4 antagonists. **Cancer Science**, in press.

### 2. 学会発表

齊藤暁、飯島沙幸、岩崎優紀、海津雅彦、明里宏文: マカクザル感染性新規 HIV-1 クローンの解析。第 146 回日本獣医学会学術集会、2008 年、宮崎

齊藤暁、飯島沙幸、岩崎優紀、海津雅彦、足立昭夫、野間口雅子、俣野哲朗、明里宏文: 新規 HIV-1/サルモデルの開発; 新規 HIV-1 クローン NL-DT5R はカニクイザル個体内で増殖する。第 56 回日本ウイルス学会学術集会、2008 年、岡山

海津雅彦、齊藤暁、飯島沙幸、岩崎優紀、足立昭夫、野間口雅子、俣野哲朗、明里宏文: 新規 HIV-1/サルモデルの開発; 新規 HIV-1 クローン NL-DT5R はカニクイザル個体内で増殖する。第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会、2008 年、大阪

## G. 知的財産権の出願・登録状況

無し。

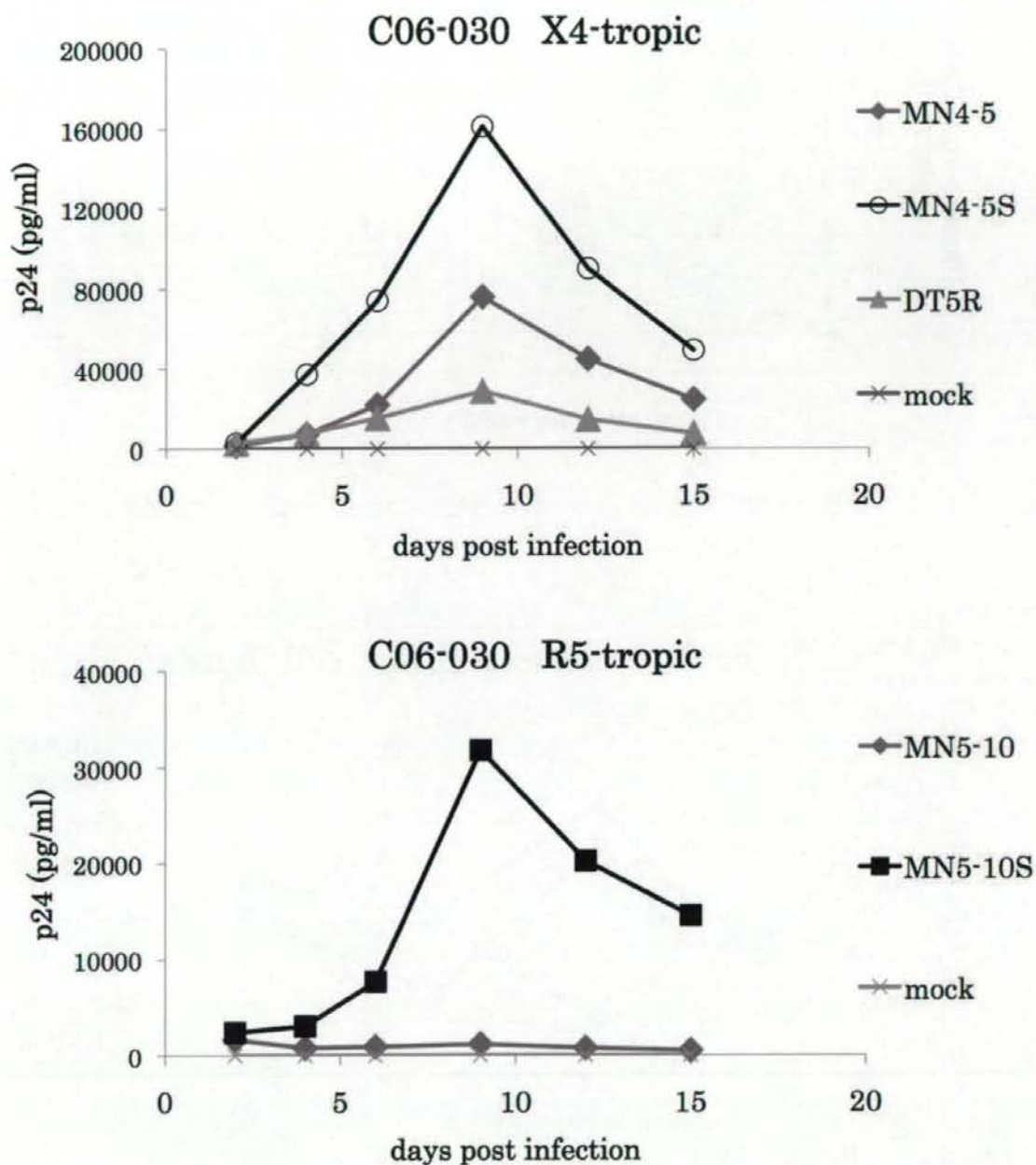


図1. カニクイザル CD8(-) PBMC におけるサル指向性 HIV-1 クローン感染実験  
(上: X4-tropic クローン 下: R5-tropic クローン)

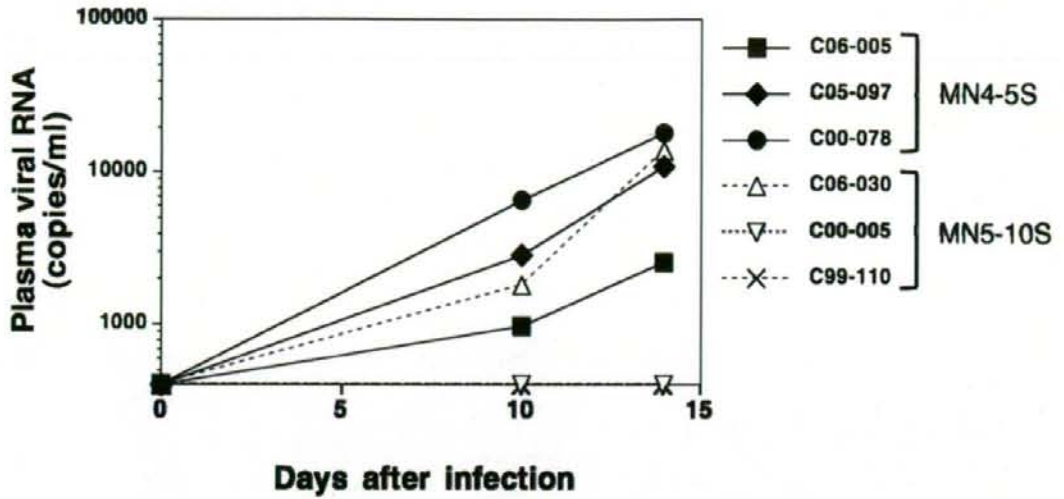


図2. 第2世代サル指向性 HIV-1 クローン接種個体における血漿ウイルス RNA 量の推移

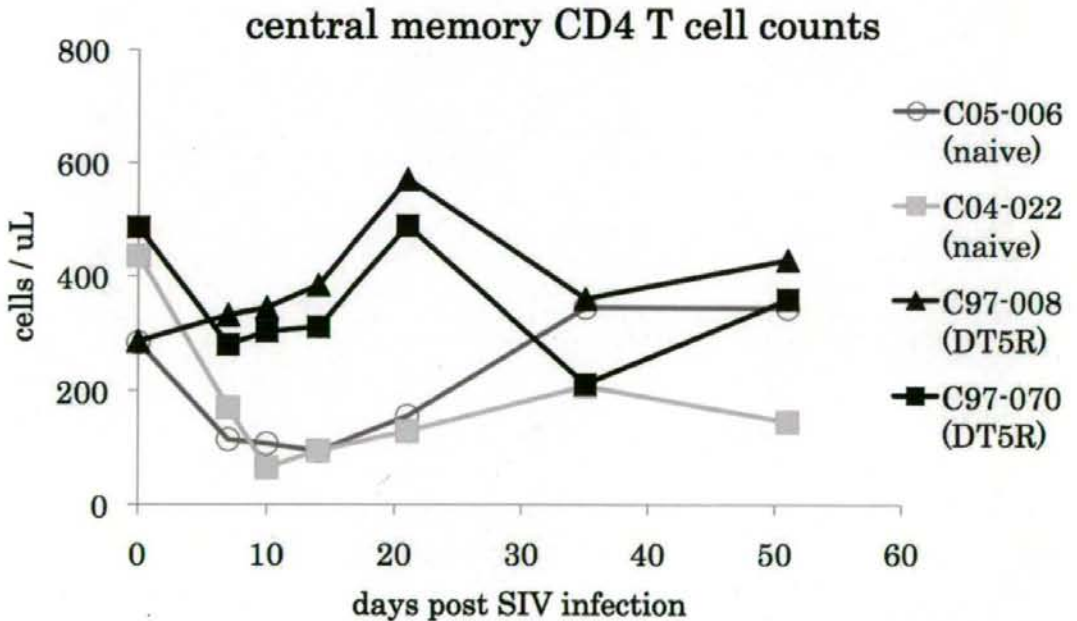


図3. SIV superchallenging 後の central memory CD4 陽性細胞の推移

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

研究分担者 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  
研究協力者 野間口雅子 徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部 講師

**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・増殖に適化した HIV-1 クローンの分子構築を目指して実験を行ない、以下の結果を得た。カニクイザル細胞 HSC-F での増殖に適化した MN4 (X4 ウイルス) と MN5 (R5 ウイルス) ウイルスのゲノムには、それぞれ 10 あるいは 6 個の変異があった。このうち、増殖効率の増強に貢献しているものは両者とも Pol-*IN* と Env-gp120 の一アミノ酸変異の二ヶ所のみであった (MN4 と MN5 とで変異部位は異なる)。変異 Env-gp120 の機能・構造解析はこの結果を良く支持していた。この二つのクローンの Gag-CA helix 6/7 loop を SIVmac239 型に置換したウイルスを構築したところ (MN4S および MN5S)、アカゲザル細胞 HSR5.4 で感染が持続するようになり、この細胞に馴化・適応したクローン (MN4Rh および MN5Rh) が得られた。

#### 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 (CA helix 4/5 loop に対応) 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、アカゲザル由来 HSR5.4 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、ブタオザルやカニクイザル個体にも感染・増殖できる (PNAS 103:16959-16964, 2006; J Virol 81:11549-11552, 2007; Rev Med Virol 18:261-275, 2008; 未発表データ)。しかしながら、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、ブタオザルやカニクイ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; 未発表データ)。

本年度は、HIV-1/マカクザル感染システムの確立を目指し、カニクイザルやアカゲザル

由来細胞での増殖に適化した X4 および R5 ウイルスの機能・構造解析を中心とした基礎研究を行なった。

#### B. 研究方法

1. サル細胞指向性 HIV-1 である NL-DT5R (X4 ウイルス) および NL-DT5R5-1 (R5 ウイルス)、また、これらを感染させた細胞からの PCR 法による分子ウイルスクローンの構築は既報 (PNAS 103:16959-16964, 2006; Rev Med Virol 18: 261-275, 2008) の通りである。
2. トランスフェクションには 293T 細胞を用いた。ウイルス感染実験には、ヒト M8166 細胞、カニクイザル HSC-F 細胞およびアカゲザル HSR5.4 細胞を用いた。293T 細胞は 10%FCS 加 MEM 培地で、M8166、HSC-F および HSR5.4 細胞は 10%FCS 加 RPMI1640 培地で維持し、サル細胞での感染実験は IL-2