

200908005A

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 21 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 明 里 宏 文

平成 22 (2010) 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 | 京都大学霊長類研究所 | 教授 |
| 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 |

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 (京都大学霊長類研究所 教授) | |

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 (京都大学霊長類研究所 教授) | |
| 2. サル類に感染性・病原性を示すHIV-1クローンの構築 ----- | 16 |
| 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 ----- | 20 |
| 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 ----- | 25 |
| 分担研究者 櫻木淳一 (大阪大学微生物病研究所 助教) | |

| | |
|---------------------------|----|
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- | 29 |
|---------------------------|----|

| | |
|-----------------------|----|
| IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- | 31 |
|-----------------------|----|

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 京都大学霊長類研究所・教授

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した。第2世代 HIV-1mt である MN4-5S はカニクイザル個体において第1世代 HIV-1mt よりも高い増殖能を示すことが確認された。カニクイザル細胞における増殖能がさらに向上した第3世代 HIV-1mt を構築し、カニクイザル感染実験を開始した。本研究成果により、急性モデルによる新規薬剤や予防ワクチンの評価研究が実施可能となった。HIV-1 感受性に関するサル個体差を規定する宿主要因を同定することに成功し、一部の HIV-1 高抵抗性個体を実験群から除外することにより信頼性の高い評価システムを構築することが可能となった。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。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。

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）

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。

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

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。

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 の複製増殖素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-3 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（足立）。

・抗サル TRIM5 α 活性の測定。カニクイザルおよびアカゲザルの TRIM5 α を PCR 法で分子クローンし、これらを恒常的に発現するネコ CRFK 細胞を樹立した。これらの細胞に対するウイルス感染価を VSV-G シュードタイプウイルスを用いるルシフェラーゼアッセイで定量した（足立）。

(2) カニクイザル個体における HIV-1/SIV 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、俣野）。

・カニクイザル superchallenge 実験：第 2 世代サル馴化型 HIV-1 (MN4-5S と MN5-10S) チャレンジを行ったカニクイザルのうち 4 頭に、チャレンジ後約 10 カ月の時点で、SIVmac239 をスーパーチャレンジした。スーパーチャレンジ後 2 週目と 5 週目の血漿中 SIV 量 (SIV RNA コピー数) を定量した。スーパーチャレンジ直前および 2 週間後の末梢血単核球 (PBMC) を分離し、SIV の Gag、

Pol、Vif、Vpx・Vpr、Env、Tat・Rev、Nef 各々の抗原アミノ酸配列をカバーするオーバーラッピングペプチドを用いた抗原刺激特異的インターフェロン γ 誘導を細胞内染色により測定することにより、SIV 抗原特異的 CTL 反応を解析した（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

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。

ウイルスの粒子成熟過程を検証する変異体においては、5箇所の Gag 蛋白切断点各々にアミノ酸置換変異を導入し、切断が起こらないように改変した。さらにこの点変異を組み合わせて2重から5重変異体を作成した。Gag の切断についてはウェスタンブロットにて確認した。

293T 細胞にプラスミドをトランスフェクトし、48-72 時間後に上清を回収し超遠心にてウイルス粒子を精製した。精製粒子を用いて粒子内逆転写効率測定、ノザンブロット、電子顕微鏡による粒子形態解析を行った。透過電子顕微鏡によるウイルス粒子形態観察および計数は大阪医科大学の微生物学研究教室との共同研究にて行われた。

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。

ネイティブノザンブロット・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. プロトタイプサル指向性 HIV-1 感染サル細胞の長期培養により得られた増殖適応変異（Gag-CA、Pol-IN および Env-SU）とそれらの構造解析等から予測された増殖能向上変異（Gag-CA）を全て持つウイルスを分子構築した（感染症研究所/佐藤裕徳室長らとの共同研究）。最終的に得られた MN4Rh-3（X4 ウイルス）および MN5Rh-3（R5 ウイルス）は HSC-F 細胞と HSR5.4 細胞において SIVmac239 と同等以上に効率良く増殖した。MN4Rh-3 はカニクイザル PBMC においても、カニクイザル個体に持続感染可能な旧版のウイルスクローンよりはるかに良く増殖した（京都大学/明里宏文らとの共同研究）。しかし、MN4Rh-3 でさえもアカゲザル PBMC ではほとんど増殖できなかった（京都大学/明里宏文らとの共同研究）。

2. 上記の結果を受け、CRFK/TRIM 細胞を用いて MN4Rh-3 の抗サル TRIM5 α 活性を検証した。ヘリックス 4/5 および 6/7 ループを SIVmac239 型に置換した Gag-CA を持つウイルスは（MN4Rh-3 を含む）効率良くカニクイザル TRIM5 α を抑制した。これに対し、アカゲザル TRIM5 α （*mamu-3* および *mamu-4*）の抑制は充分回避できなかった。

（2）HIV-1/SIV 感染実験

1. 第2世代 HIV-1mt/カニクイザル感染実験

第2世代 HIV-1mt クローン MN4-5S をカニクイザルに接種したところ、DT5R と比較して 10 倍以上高い ($>10^4$ コピー/ml) ウイルス血症とともに一過性の CD4⁺ T リンパ球の減少が認められた。このウイルス血症は感染 3-4 週で検出限界以下となった。これらの感染サル個体にヒト化抗 CD8 モノクローナル抗体である cM-T807 を投与し血中 CD8 陽性細胞をほぼ完全に除去することにより、全ての個体においてウイルスの再活性化が認められ、急性期と同程度のウイルス血症および一過性の CD4⁺ T リンパ球の減少が確認された。従って、第2世代 HIV-1mt はサル個体において潜伏感染しうることを、また CD8 陽性細胞を主体とする抗ウイルス免疫応答により制御されることが示された。上記ウイルス血症における HIV-1 の適応変異については、現在ウイルスゲノム

シーケンス解析を実施し、遺伝子変異箇所の同定を進めているところである。

2. カニクイザル PBMC における第 3 世代 HIV-1mt 感受性に関する検討

アカゲザル細胞株 HSR-5.4 を用いた MN4-5S の馴化により増殖能が向上した変異株を得た。適応変異は Gag-CA の G114E であった。当該領域に関する構造解析によって推定・最適化された Q110D の変異および MN4-5S における導入変異の内増殖に寄与する変異のみ (MN4-8S) を導入して最終的にクローン MN4Rh-3 が得られた。このウイルスは、カニクイザル PBMC において第 1, 2 世代 HIV-1mt と比較し増殖能が格段に向上した。この機序として、宿主抵抗性因子 Trim5a との親和性に関与することが示唆された。そこで MN4Rh-3 を用いて、カニクイザルへの感染実験を開始した。

3. HIV-1mt 感受性に関するカニクイザル個体差規定要因の解析

カニクイザル PBMC における HIV-1mt 感染実験の過程で、ウイルス増殖においてカニクイザル個体差が見られたため、その宿主側要因についてゲノム解析を行なった。その結果、抵抗性個体では Trim5a 遺伝子がホモであるのに対し、感受性個体では Trim5a と CyclophilinA とのキメラ型である Trim5a-CypA のホモもしくはヘテロであることが明らかとなった。以上より、Trim5a 遺伝子の genotype が HIV-1mt 感受性決定に寄与することが示された。

(4) HIV-1mt 感染ザルへの SIV superchallenge

第 2 世代 HIV-1mt 感染カニクイザル 4 頭

(C00-078, C05-097, C06-005, C06-030) について、SIV スーパーチャレンジ後 2 週目と 5 週目の血漿中 SIV 量を定量し、以前の実験で得られている結果 (ナイーブザルへの SIV チャレンジ後の血漿中 SIV 量と第 1 世代サル馴化型 HIV-1 感染ザルへのスーパーチャレンジ後の血漿中 SIV 量) と比較した。その結果、今回のスーパーチャレンジ実験では、サル馴化型 HIV-1 感染により SIV 感染に対して防御的な免疫反応が誘導されるかどうかについての結論を得ることができなかった。

これら第 2 世代サル馴化型 HIV-1 感染ザル 4 頭

のうち 3 頭では、SIV スーパーチャレンジ後に効率よい SIV 特異的 CTL 反応が認められた。特に 2 頭では、第 2 世代サル馴化型 HIV-1 と SIV が共有する SIV Vif 抗原特異的 CTL 反応が極めて高レベルに誘導されていた。

(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

1. 粒子成熟は HIV-1Gag タンパク内の 5 つの切断点がウイルスプロテアーゼによってプロセシングされることによって起こるが、この 5 点の切断速度は順序があり、サイトによって切断速度に大きな差があることが生化学的解析によって明らかとなっている。つまり粒子の成熟過程は斉一なものではなく、いくつかの段階が存在していると考えられる。我々は各点に非切断変異を導入し、またこの変異を組み合わせることで粒子成熟過程が中断する一連の変異体を作成した。これらの変異体を用いて、粒子成熟過程におけるゲノム二量体化/粒子形態の変化についての観察を行った。単変異体の観察から、ヌクレオカプシド(NC)末端の切断は NC 末どちらも安定なゲノム二量体形成に影響を及ぼすことが明らかとなった。粒子成熟過程では Gag の最初の切断点である p2-NC の切断によりゲノム二量体の安定化が一気に起き、引き続いて起こる他点の切断によって均一で安定した二量体が完成することが示唆された。量論的解析からは、p2-NC の切断による二量体安定化には閾値が存在しない可能性が示された。電子顕微鏡像による粒子形態観察の結果、ゲノム二量体化にはウイルスコアの形成は必要なく、粒子成熟に伴う形態変化とゲノム二量体化の間に必ずしも明確な同期は見られなかった。ウイルス内逆転写能測定の結果、どの変異体粒子内にも十分な活性を持った逆転写酵素が存在するにもかかわらず、p2-NC の切断があって初めてウイルスゲノムの逆転写が高いレベルで検出されることが明らかとなった。

2. 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 においては非翻訳ゲノムの方がパッケージされにくい傾向があった（5割未満）。これは既報を裏付ける結果であったが、そのバイアスは文献で見られたものに比べやや低かった。これに対し SIVmac はその比率が7割に上昇しており、非翻訳 RNA を取込む能力には違いが見られた。

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。本研究で得られたカニクイザル指向性が格段に高まった第3世代 HIV-1mt クローンはこれらの目標に向け極めて有望である。

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 HIV-1mt を用いて、個体レベルにてその増殖能を解析した。その結果、MN4-5S 接種個体のすべてにおいて NL-DT5R と比較して少なくとも10倍以上高いウイルス増殖が検出された。またこれまでの SHIV 感染における報告と同様、HIV-1 特異的 CD8 陽性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が確認された。またその後の解析で、検出限界以下ではあるものの潜伏感染状態にあることが確認された。より増殖能の高まった第3世代 HIV-1mt を用いることで持続的なウイルス増殖状態にあるような感染が成立することが期待される。

本研究課題の最終目標は、HIV-1 自体を標的としたワクチンや新規抗 HIV 薬の有効性評価が可能となる実用的な HIV-1 感染霊長類モデルの開発である。第2世代 HIV-1 クローンのサル感染実験の結果より、

急性モデルによる新規薬剤や予防ワクチンの評価が実施可能となった。特に、HIV-1 感受性に関するサル個体差を規定する宿主要因を同定することに成功し、一部の HIV-1 高抵抗性個体を実験群から除外することにより信頼性の高い評価システムを構築できたことは高く評価できる。現在開始した第3世代 HIV-1 のカニクイザル感染実験によりさらに利便性の高い評価システムとなることが期待される。今後の課題として、新規抗 HIV 薬や治療ワクチン等による慢性症例への有効性評価モデル構築があげられる。そのためには、長期持続感染や CD4⁺T 細胞障害など病原性を有するクローン確立が必要と考えられる。

これまで、第2世代サル馴化型 HIV-1 感染により HIV-1 特異的 CTL 反応が誘導されることを確認してきたが、今回の SIV スーパーチャレンジ実験では、第2世代サル馴化型 HIV-1 と SIV が共有する SIV Vif 抗原特異的 CTL 反応が強く認められた。この系は、SIV Vif 特異的 CTL が SIV・HIV-1 増殖に対してもたらす影響の解明に有用であると考えられる。

正常なゲノム二量体化はウイルスが感染能を獲得するために必須の過程であると考えられる。今回の解析によりこの二つの多段階のステップは同期しつつ進行するものの、多くの転換点は互いに異なるという興味深い知見が得られた。成熟過程のかなり早い段階でウイルス内でゲノムは逆転写の鋳型として機能しうることも示されたが、実際の粒子の細胞に対する感染能とは一致していない。このことは粒子成熟と脱殻や Trim などの宿主因子との関連を示唆するものとも考えられ、今後の検討課題になりうるものであった。特に SHIV においては種特異的宿主因子のバリアをどう越えるかが重要な点であり、今回の結果は効率良い増殖能を持つ SHIV 開発へ寄与する基礎的知見をもたらす可能性がある。HIV/SIV のゲノムパッケージング能に関しては、HIV-2 と SIVmac のパッケージングスキームが異なる可能性があるという意外な結果が得られた。HIV-2 と SIVmac は遺伝子配列的には非常に近く、今回の機能的差異がどこに起因しているのかを追求することで宿主を変えた二つのウイルスの分岐点を明らか

にできる可能性が考えられた。

E. 結論

第2世代 HIV-1mt である MN4-5S はカニクイザル個体において第1世代 HIV-1mt よりも高い増殖能を示すことが確認された。カニクイザル細胞における増殖能がさらに向上した第3世代 HIV-1mt を構築し、カニクイザル感染実験を開始した。本研究成果により、急性モデルによる新規薬剤や予防ワクチンの評価研究が実施可能となった。HIV-1 感受性に関するサル個体差を規定する宿主要因を同定することに成功し、一部の HIV-1 高抵抗性個体を実験群から除外することにより信頼性の高い評価システムを構築することが可能となった。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

- 1) Nagao, T., Hatcho, 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* 56: 21-25.
- 2) Kamada, K., Yamashita, T., Hatcho, 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* 11: 164-171.
- 3) Kuroishi, A., Saito, A., Shingai, Y., Shioda, T., Nomaguchi, M., Adachi, A., Akari, H., and Nakayama, E.E. 2009. Modification of a loop sequence between α -helices 6 and 7 of virus capsid (CA) protein in a human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) derivative that has simian immunodeficiency virus (SIVmac239) *vif* and CA α -helices 4 and 5 loop improves replication in cynomolgus monkey cells. *Retrovirology* 6: 70.
- 4) Jere, A., Fujita, M., Adachi, A., and Nomaguchi, M. 2010. Role of HIV-1 Nef protein for virus replication *in vitro*. *Microbes and Infection* 12: 65-70.
- 5) Yamashita, T., Nomaguchi, M., Miyake, A., Uchiyama, T., and Adachi, A. 2010. Status of APOBEC3G/F in cells and progeny virions modulated by Vif determines HIV-1 infectivity. *Microbes and Infection* 12: 166-171.
- 6) Fujita, M., Otsuka, M., Nomaguchi, M., and Adachi, A. 2010. Multifaceted activity of HIV Vpr/Vpx proteins: the current view of their virological functions. *Reviews in Medical Virology*, in press.
- 7) Hohjoh H, Akari H., Fujiwara Y, Hirai H, Wada K: Molecular cloning and characterization of the common marmoset huntingtin gene. *Gene* 432, 60-66, 2009.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) Iwasaki Y, Akari H., Murakami T, Kumakura S, Dewan MZ, Yanaka M, Yamamoto N: Efficient inhibition of SDF-1 α -mediated chemotaxis and HIV-1 infection by novel CXCR4 antagonists. *Cancer Science* 100, 778-781, 2009.
- 11) Hassan R, Suzu S, Hiyoshi M, Takahashi-Makise N, Ueno T, Agatsuma T, Akari H., Komano J, Takebe Y, Motoyoshi K, Okada S: Dys-regulated activation of a Src tyrosine kinase Hck at the Golgi disturbs N-glycosylation of a cytokine receptor Fms. *Journal of Cellular Physiology* 221, 458-468, 2009.
- 12) Yamamoto T, Iwamoto N, Yamamoto H, Tsukamoto T, Kuwano T, Takeda A, Kawada M, Tsunetsugu-Yokota Y, Matano T. Polyfunctional CD4⁺ T-cell induction in neutralizing antibody-triggered control of simian immunodeficiency virus infection. *J Virol* 83:5514-5524, 2009.
- 13) Tsukamoto T, Takeda A, Yamamoto T, Yamamoto H, Kawada M, Matano T. Impact of cytotoxic-T-lymphocyte memory induction without

virus-specific CD4+ T-cell help on control of a simian immunodeficiency virus challenge in rhesus macaques. *J Virol* 83:9339-9346, 2009.

- 14) Contribution of RING domain to retrovirus restriction by TRIM5alpha depends on combination of host and virus. H. Maegawa, T. Miyamoto, J.-i. Sakuragi, T. Shioda, and E. E. Nakayama. *Virology*, 399: 212-220, 2010.
2. 学会発表
- 1) Kuroishi, A., Saito, A., Shingai, Y., Shioda, T., Nomaguchi, M., Adachi, A., Akari, H., and Nakayama, E. E. Modification of a loop between α -helices 6 and 7 of virus capsid protein improves human immunodeficiency virus type 1 replication in cynomolgus monkey cells. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Sept. 10, 2009, Awaji, Japan.
 - 2) 三宅在子、野間口雅子、土肥直哉、藤原佐知、足立昭夫 HIV-1 インテグラーゼ (IN) C 末端領域 (CTD) における 1 アミノ酸変異によるウイルス増殖促進機構の解析. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 25 日、東京.
 - 3) 土肥直哉、野間口雅子、藤原佐知、三宅在子、足立昭夫 サル細胞指向性 HIV-1 の増殖適応変異の解析. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 26 日、東京.
 - 4) 野間口雅子、土肥直哉、藤原佐知、三宅在子、横山 勝、大出裕高、佐藤裕徳、足立昭夫 HIV-1 Env の 1 アミノ酸変異による増殖促進機構の解析. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 26 日、東京.
 - 5) 齊藤 暁、飯島沙幸、岩崎優紀、黒石 歩、中山英美、塩田達雄、足立昭夫、野間口雅子、俣野哲朗、明里宏文 SIV 由来 CA h6/7 loop を持つ第 2 世代サル指向性 HIV-1 クローンはカニクイザル個体で効率よく増殖する. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 26 日、東京.
 - 6) 黒石 歩、齊藤 暁、塩田達雄、野間口雅子、足立昭夫、明里宏文、中山英美 サル指向性 HIV-1 のサル細胞でのウイルス増殖におけるカプシド α -ヘリックス 6-7 間のループの重要性. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 26 日、東京.
 - 7) 横山 勝、大出裕高、野間口雅子、神田忠仁、足立昭夫、佐藤裕徳 HIV-1 Env V3 ループ構造の安定性を制御するアミノ酸. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 27 日、東京.
 - 8) 三宅在子、野間口雅子、土肥直哉、藤原佐知、足立昭夫 HIV-1 増殖過程におけるインテグラーゼ (IN) C 末端領域 (CTD) の影響. 第 23 回日本エイズ学会学術集会、2009 年 11 月 26 日、名古屋.
 - 9) 黒石 歩、齊藤 暁、新開泰宏、塩田達雄、野間口雅子、足立昭夫、明里宏文、中山英美 サル指向性 HIV-1 のサル細胞でのウイルス増殖におけるカプシド α -ヘリックス 6-7 間のループの重要性. 第 23 回日本エイズ学会学術集会、2009 年 11 月 26 日、名古屋.
 - 10) 横山 勝、大出裕高、野間口雅子、神田忠仁、足立昭夫、佐藤裕徳 HIV-1 Env V3 ループ構造の安定性を制御するアミノ酸. 第 23 回日本エイズ学会学術集会、2009 年 11 月 26 日、名古屋.
 - 11) 野間口雅子、土肥直哉、藤原佐知、三宅在子、横山 勝、大出裕高、佐藤裕徳、足立昭夫 サル細胞指向性 HIV-1 の細胞馴化による増殖適応変異の解析. 第 23 回日本エイズ学会学術集会、2009 年 11 月 28 日、名古屋.
 - 12) 齊藤 暁、飯島沙幸、岩崎優紀、黒石 歩、中山英美、塩田達雄、足立昭夫、野間口雅子、俣野哲朗、明里宏文 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いて効率よく増殖する. 第 23 回日本エイズ学会学術集会、2009 年 11 月 28 日、名古屋.
 - 13) Takahashi N, Tsukamoto T, Iwamoto N, Takahara Y, Naruse T, Kimura A, Matano T. Mapping of cytotoxic T lymphocyte epitopes in rhesus macaques showing vaccine-based control of simian immunodeficiency virus replication. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan, 9/9/2009.
 - 14) Matano T. Effect of vaccine-induced memory T cells on HIV/SIV replication after virus exposure. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan, 9/11/2009.
 - 15) Tsukamoto T, Matano T. Impact of single epitope-specific CD8+ T cell memory

- induction by prophylactic vaccination on immunodeficiency virus control. AIDS Vaccine 2009, Paris, France, 10/20/2009.
- 16) 岩本南、塚本徹雄、俣野哲朗。広範な SIV 特異的細胞性免疫誘導機序の解析。第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、10/26/2009
- 17) HIV-1 ゲノム二量体化と粒子成熟ステップの相関 櫻木淳一・大石真久・中野隆史・櫻木小百合・佐野浩一・塩田達雄 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、ワークショップ、東京。
- 18) HIV-1 ゲノム二量体化と粒子成熟ステップの相関 櫻木淳一・大石真久・中野隆史・櫻木小百合・佐野浩一・塩田達雄 第 23 回日本エイズ学会学術集会、一般口演、名古屋。
- 19) Relationship between virion maturation steps and genome dimerization of HIV-1 (Poster). M Ohishi and J-I Sakuragi. 7th International Retroviral Nucleo-capsid Symposium, 2009 Sep, MN, USA.

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 京都大学霊長類研究所・教授
研究協力者 齊藤暁、吉田友教 医薬基盤研 霊長類医科学研究センター
中山恵美、河野健、塩田達雄 大阪大学微生物病研究所

研究要旨

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、第2世代 HIV-1mt である MN4-5S はカニクイザル個体において高い増殖能を示すことが確認された。また、より増殖能が向上した第3世代 HIV-1mt の予備評価が終了しカニクイザル感染実験を開始した。本研究結果により、急性モデルによる新規薬剤や予防ワクチンの評価研究が実施可能となった。さらに HIV-1mt 感受性に関するサル個体差を規定する宿主要因を同定することに成功し、一部の HIV-1 高抵抗性個体を実験群から除外することにより信頼性の高い評価システムを構築することが可能となった。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。

A. 研究目的

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ー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プロトタイプサル指向性 HIV-1 (monkey-tropic HIV-1; HIV-1mt) クローンである NL-DT5R の構築に成功した。昨年度までに我々は、(1) 第1世代 HIV-1mt クローンである NL-DT5R のカニクイザル感染実験により個体レベルで増殖が可能であること、(2) サル細胞株での増殖能が向上した第2世代 HIV-1 クローンの解析を行った結果、第2世代 HIV-1mt 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たこと、等を明らかにした。

今年度は、これまでの研究成果をさらに発展するべく以下の3点について検討を行なった。すなわち、(1) 第2世代 HIV-1mt クローンである MN4-5S を用いたカニクイザル感染実験のフォローアップを行なうとともに、CD8 リンパ球細胞の生体内除去によりウイルスの再活性化を試みた。次に、(2) MN4-5S を基に、さらにサル細胞株に

おける馴化により得られた適応変異部分を導入した第3世代 HIV-1mt MN4Rh-3 (足立らの分担報告書を参照) について、カニクイザル PBMC における増殖性を検討した。さらに (3) HIV-1mt 感受性に関するカニクイザル間の個体差を規定する宿主因子を同定するとともに、その機序について解析した。

B. 研究方法

・ ウイルス

MN4-5 は足立らが構築した第1世代 HIV-1mt クローン NL-DT5R を、カニクイザル T 細胞株である HSC-F 細胞で長期培養した結果馴化型クローンとして得られたものである。これを基に、さらに近年塩田らのグループにより見出された TRIM5 α 関連宿主域決定領域を挿入したものが MN4-5S であり、これを第2世代 HIV-1mt とした。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

カニクイザルは医薬基盤研究所・霊長類医学研究センターで繁殖している 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。

・ ウイルス、免疫学的解析

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。また FACS にて細胞集団(特に CD4/CD8 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

承認を得て霊長類医学研究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) 第2世代 HIV-1mt/カニクイザル感染実験

第2世代 HIV-1mt クローン MN4-5S をカニクイザルに接種したところ、DT5R と比較して 10 倍以上高い ($>10^4$ コピー/ml) ウイルス血症とともに一過性の CD4⁺ T リンパ球の減少が認められた。このウイルス血症は感染 3-4 週で検出限界以下となった (図 1)。これらの感染サル個体にヒト化抗 CD8 モノクローナル抗体である cM-T807 を投与し血中 CD8 陽性細胞をほぼ完全に除去することにより、全ての個体においてウイルスの再活性化が認められ、急性期と同程度のウイルス血症および一過性の CD4⁺ T リンパ球の減少が確認された (図 2)。従って、第2世代 HIV-1mt はサル個体において潜伏感染しうること、また CD8 陽性細胞を主体とする抗ウイルス免疫応答により制御されることが示された。上記ウイルス血症における HIV-1 の適応変異については、現在ウイルスゲノムシーケンス解析を実施し、遺伝子変異箇所の同定を進めているところである。

(2) カニクイザル PBMC における第3世代 HIV-1mt 感受性に関する検討

アカゲザル細胞株 HSR-5.4 を用いた MN4-5S の馴化により増殖能が向上した変異株を得た。適応変異は Gag-CA の G114E であった。当該領域に関する構造解析によって推定・最適化された Q110D の変異および MN4-5S における導入変異の内増殖に寄与する変異のみ (MN4-8S) を導入して最終的にクローン MN4Rh-3 が得られた。このウイルスは、カニクイザル PBMC において第1, 2世代 HIV-1mt と比較し増殖能が格段に向上した (図 3)。この機序として、宿主抵抗性因子 Trim5a との親和性に関与することが示唆された。そこで MN4Rh-3 を用いて、カニクイザルへの感染実験を開始した。

(3) HIV-1mt 感受性に関するカニクイザル個体

差規定要因の解析

カニクイザルPBMCにおけるHIV-1mt感染実験の過程で、ウイルス増殖においてカニクイザル個体差が見られたため、その宿主側要因についてゲノム解析を行なった。その結果、抵抗性個体ではTrim5a遺伝子がホモであるのに対し、感受性個体ではTrim5aとCyclophilinAとのキメラ型であるTrim5a-CypAのホモもしくはヘテロであることが明らかとなった。以上より、Trim5a遺伝子のgenotypeがHIV-1mt感受性決定に寄与することが示された(図4)。

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HIV-1mtを用いて、個体レベルにてその増殖能を解析した。その結果、MN4-5S接種個体のすべてにおいてNL-DT5Rと比較して少なくとも10倍以上高いウイルス増殖が検出された。またこれまでのSHIV感染における報告と同様、HIV-1特異的CD8陽性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が確認された。またその後の解析で、検出限界以下ではあるものの潜伏感染状態にあることが確認された。より増殖能の高まった第3世代HIV-1mtを用いることで持続的なウイルス増殖状態にあるような感染が成立することが期待される。

本研究課題の最終目標は、HIV-1自体を標的としたワクチンや新規抗HIV薬の有効性評価が可能となる実用的なHIV-1感染霊長類モデルの開発である。第2世代HIV-1クローンのサル感染実験の結果より、急性モデルによる新規薬剤や予防ワクチンの評価が実施可能となった。特に、HIV-1感受性に関するサル個体差を規定する宿主要因を同定することに成功し、一部のHIV-1高抵抗性個体を実験群から除外することにより信頼性の高い評価システムを構築できたことは高く評価できる。現在開始した第3世代HIV-1のカニクイザル感染実験によりさらに利便性の高い評価システムとなることが期待される。今後の課題として、新規抗HIV薬や治療ワクチン等に

る慢性症例への有効性評価モデル構築があげられる。そのためには、長期持続感染やCD4⁺T細胞障害など病原性を有するクローン確立が必要と考えられる。

E. 結論

第2世代HIV-1mtであるMN4-5Sはカニクイザル個体において第1世代HIV-1mtよりも高い増殖能を示すことが確認された。より増殖能が向上した第3世代HIV-1mtの予備評価が終了しカニクイザル感染実験を開始した。本研究成果により、急性モデルによる新規薬剤や予防ワクチンの評価研究が実施可能となった。特に、HIV-1感受性に関するサル個体差を規定する宿主要因を同定することに成功し、一部のHIV-1高抵抗性個体を実験群から除外することにより信頼性の高い評価システムを構築することが可能となった。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

- 1) Hohjoh H, Akari H, Fujiwara Y, Hirai H, Wada K: Molecular cloning and characterization of the common marmoset huntingtin gene. **Gene** 432, 60-66, 2009.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) Iwasaki Y, Akari H, Murakami T, Kumakura S, Dewan MZ, Yanaka M, Yamamoto N: Efficient inhibition of SDF-1 α -mediated chemotaxis and HIV-1 infection by novel CXCR4 antagonists. **Cancer Science** 100, 778-781, 2009.
- 5) Hassan R, Suzu S, Hiyoshi M, Takahashi-Makise N, Ueno T, Agatsuma T, Akari H, Komano J, Takebe Y, Motoyoshi K, Okada S: Dys-regulated activation of a Src tyrosine kinase Hck at the Golgi disturbs N-glycosylation of a cytokine receptor Fms. **Journal**

of *Cellular Physiology* 221, 458-468, 2009.

6) Kuroishi A, Saito A, Shingai Y, Shioda T, Nomaguchi M, Adachi A, Akari A, Nakayama EE: Modification of a loop sequence between alpha-helices 6 and 7 of virus capsid (CA) protein in a human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) derivative that has simian immunodeficiency virus (SIVmac239) vif and CA alpha-helices 4 and 5 loop improves replication in cynomolgus monkey cells. *Retrovirology* 6, 70, 2009.

2. 学会発表

1) 齊藤暁、飯島沙幸、岩崎優紀、黒石歩、中山英美、塩田達雄、足立昭夫、野間口雅子、俣野哲朗、明里宏文

SIV由来CA h6/7 loopを持つ第2世代サル指向性

HIV-1 クローンはカニクイザル個体で効率よく増殖する

第57回ウイルス学会（東京）平成21年10月25-27日

2) 齊藤暁、飯島沙幸、岩崎優紀、明里宏文

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いて効率良く増殖する

第23回日本エイズ学会学術集会（名古屋）平成21年11月26-28日

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

特になし

Fig 1. Second generation of HIV-1mt infection in Macaques *in vivo*

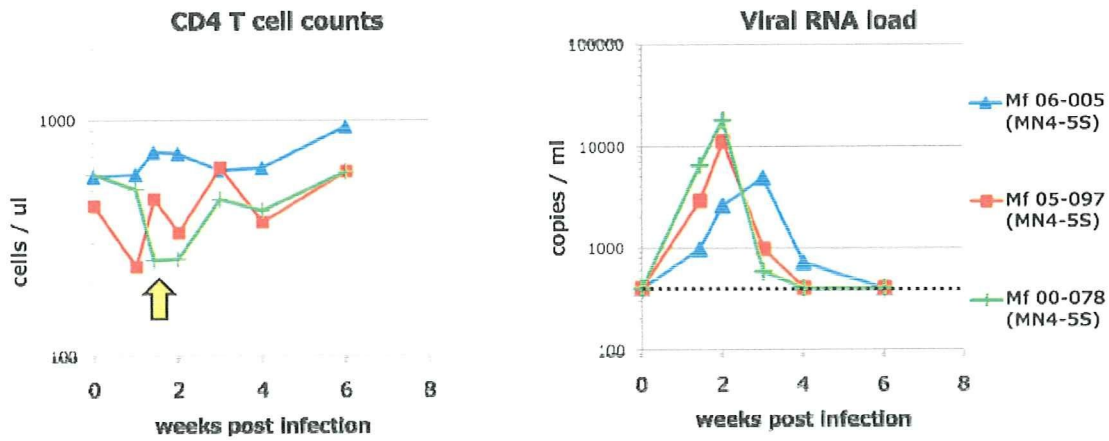


Fig 2. Effect of CD8⁺ lymphocytes *in vivo* Depletion on viral replication

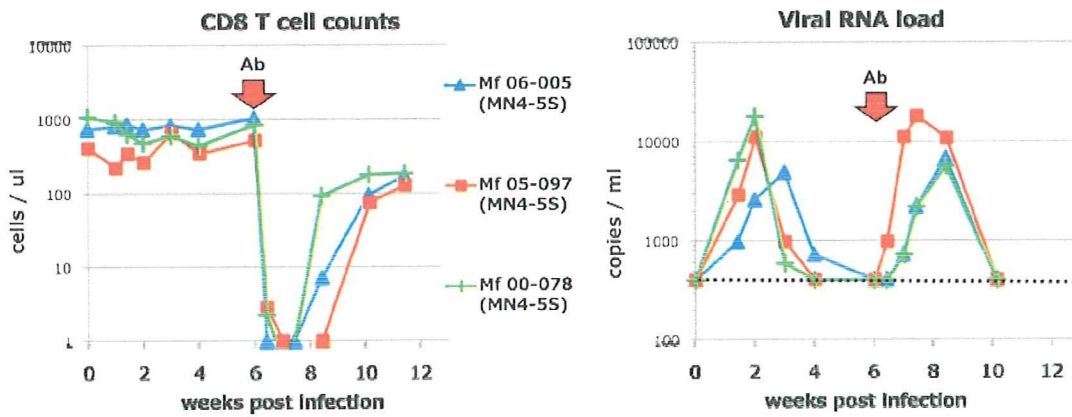


図3. カニクイザルPBMCにおけるサル指向性HIV-1クローンの増殖特性

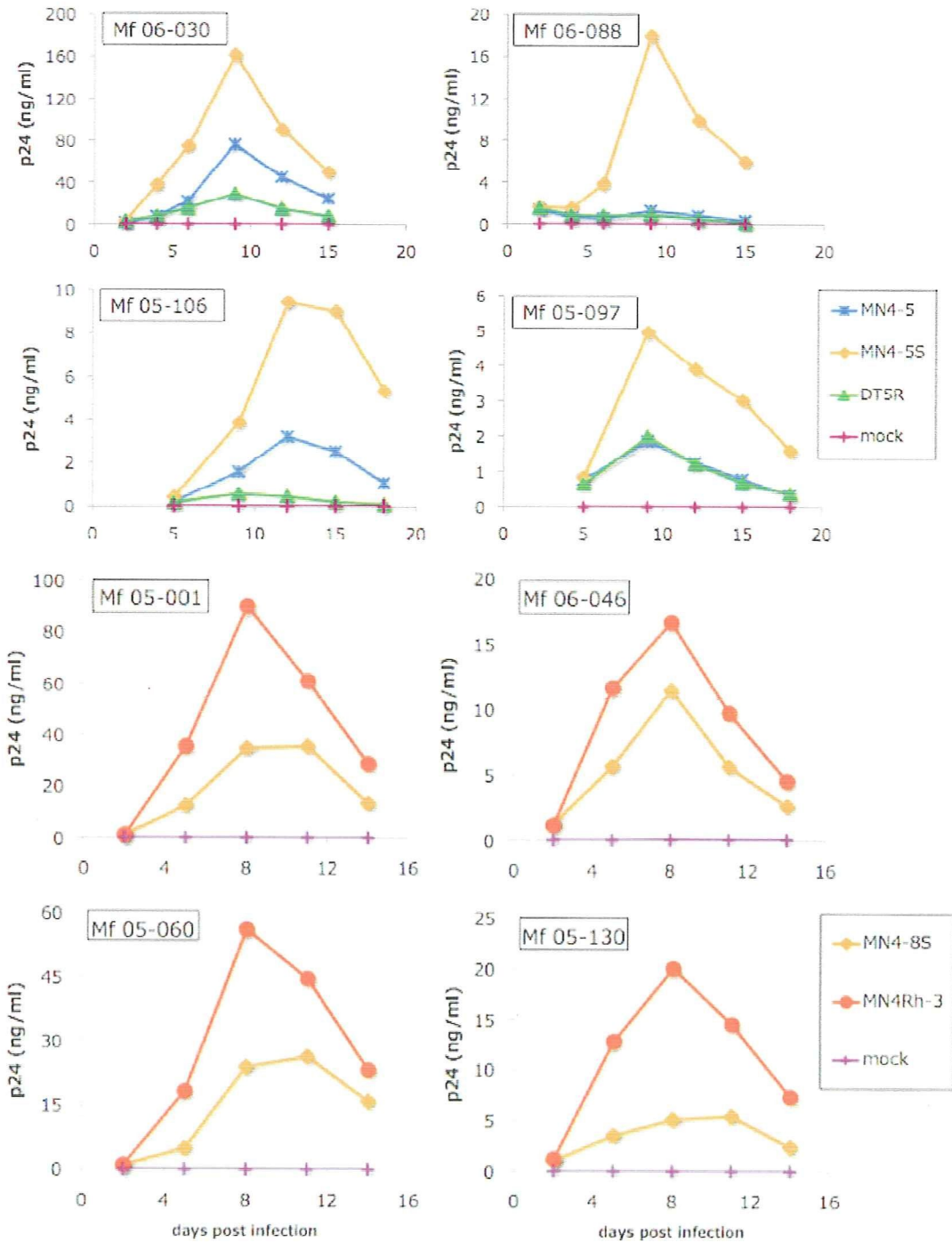
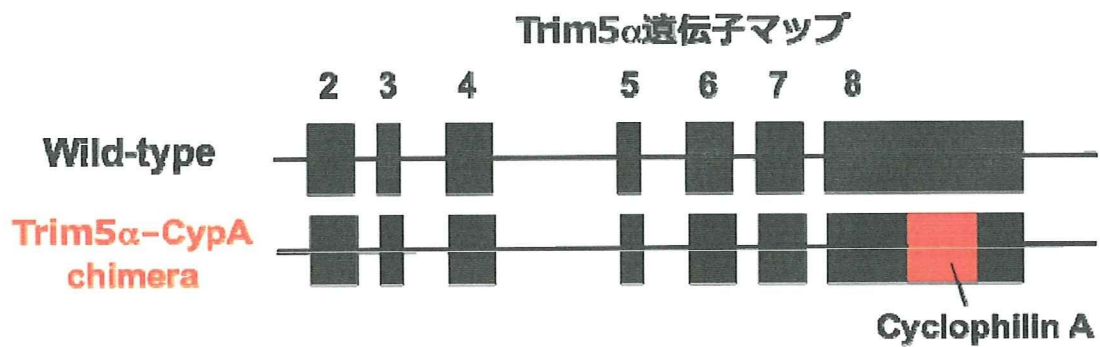


図4. Trim5遺伝子多型HIV-1mt感受性に関するサル個体差を規定する



| Trim遺伝子型 | HIV-1感受性 |
|-----------------------|----------|
| Trim-CypA homo | 高 |
| Trim/Trim-CypA hetero | 中 |
| Trim homo | 低 |