

200908005B

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～21年度 総合研究報告書

主任研究者 明 里 宏 文

平成22(2010)年3月

総合研究報告書目次

I. 総合研究報告書

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. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 15

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 18

I. 総合研究報告書

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。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 SIV およびキメラウイルスである SHIV 感染・発症モデルは、サロゲートモデルとして重要な役割を担ってきた。しかし上記モデルでは、HIV-1 に特異的なウイルス・宿主因子を標的とした新規治療薬や、HIV-1 を標的とした治療・防御ワクチンの有効性評価が行えないことから、HIV-1 が感染しエイズ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。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 (monkey-tropic HIV-1; HIV-1mt) クローンの構築に成功した。そこで本研究では、このクローンを基礎として新たな実験用サル類/HIV-1 感染・発症モデルを確立することを目的とした。

本研究による成果は以下の通りである。(1) 第1世代 HIV-1mt である DT5R 株がカニクイザル PBMC および個体において感染増殖する反面、アカゲザルでは増殖出来ないことを示した。(2) カニクイザル T 細胞株 HSC-F および PBMC において DT5R より格段に高い感染増殖能を獲得した第2世代 (X4-tropic) HIV-1mt クローン MN4-8S の構築に成功した。DT5R を基に、このクローンに新たに導入された部位は HNPP120-123RQQN (Gag), N222K, V234I (Int), E427K (Env) の僅か7アミノ酸残基であった。またこれと平行して、CCR5 発現カニクイザル細胞に高い感染増殖能を獲得した第2世代 R5-tropic HIV-1 クローン MN5-10S の構築にも成功した。さらにこれらのアミノ酸残基置換がもたらす機能、構造的意義について解明した。(3) 第2世代 HIV-1mt のカニクイザル感染実験を行なった結果、X4, R5-tropic HIV-1mt のどちらも DT5R と比較し10倍以上の増殖効率を示した(ピーク時のウイルス RNA 値 ; $>10^4$ copies/ml)。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、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。(4) 第3世代 HIV-1mt である MN4Rh-3 を得た。このクローンに新たに導入された部位は G114E (Gag-CA) のみであるが、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。(5) HIV-1mt 感受性に関するカニクイザル個体差を規定する Trim5 α 遺伝子多型要因の解明に成功した。これにより信頼性の高い評価システム構築が可能となった。本研究成果により、HIV-1mt 霊長類モデルによる新規抗 HIV-1 薬剤・予防ワクチンの評価研究が初めて実施可能となった。

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）

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（図 1 参照）。

B. 研究方法

本研究の最終目標である霊長類 HIV-1 モデル構築に向けて、以下のような 5 段階のロードマップが想定される。すなわち、サル指向性 HIV-1 に関して、①サル末梢血単核球細胞（PBMC）での増殖能獲得、②サル個体での感染増殖能獲得、③サル個体での感染急性期において SIVmac（アカゲザル）もしくは HIV-1（ヒト）と同程度のウイルス増殖能の獲得、④長期ウイルス血症を伴う持続感染能の獲得、⑤CD4 陽性 T 細胞減少を伴う病原性の獲得、である。こうした目標実現に向けて、以下のような方法により研究を立案・実施した。

【平成 19 年度】

- 1) 遺伝子工学的手法及び細胞馴化による改変：サル細胞指向性に重要である Gag（シクロフィリン A 結合ループ）と Vif を一アミノ酸レベルで改変し、得られたウイルスクロンの種々サル細胞での増殖能を検討することにより、サル指向性に必須のアミノ酸残基を特定する。同時に種々のサル細胞指向性 R5-tropic HIV-1 クロンを構築する。
- 2) 第 1 世代サル指向性 HIV-1 のサル感染実験：第 1 世代サル指向性 HIV-1 クロンの感染実験によりサル種や個体ごとの感受性について検討する。その結果を踏まえ、感受性の高いサルへの感染実験を行い、ウイルス学・免疫学的解析結果より個体レベルにおける動態を解析する。

【平成 20 年度】

- 1) 第 1 世代サル指向性 HIV-1 のサル感染実験：サル NL-DT5R 感染実験を継続し、個体レベルにおけるウイルス学・免疫学的各種パラメータを解析する。
- 2) サル細胞による馴化型 HIV-1 クロンの構築：カニクイザル・アカゲザル細胞での継代により増殖効率の高まった馴化型ウイルスを得る。ウイルスゲノム解析より適応変異箇所を解析・予測し親株の分子クローンに変異導入することで馴化に寄与する領域を特定化する。
- 3) R5 指向性 HIV-1 クロンの構築：X4 ウイルスである NL-DT5R に加えて、その R5 ウイルスバリエーション

ンの細胞馴化を行ない広範な HIV-1/サル感染実験を目指した取組みを行なう。

4) 2で得られた馴化型 HIV-1 クローンについて、サル感染実験を行い、ウイルス学・免疫学的解析結果より個体レベルにおける動態を解析する。

【平成21年度】

- 1) 上記4の馴化型 HIV-1 クローンのサル感染実験について、ウイルス増殖動態や CD4 陽性 T 細胞の変動、抗ウイルス免疫応答について引き続き解析を進める。
- 2) 1により急性期における高いウイルス増殖、慢性持続感染を示したサル由来ウイルスについて、個体間継代を行なうことでサルへの更なる馴化を試みる。また平行して、ヒト化抗 CD8 モノクローナル抗体を感染サルに投与し CD8 陽性細胞を除去することで、より効率良い馴化を図る。これらの結果得られた高馴化型ウイルスについて、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を同定する。またこの結果に基づき、馴化型 HIV-1 クローンに適宜変異を導入し個体内馴化を規定した適合変異領域を決定する。
- 3) サル類において、HIV-1 感受性を規定する遺伝子多型解析を行うことにより、将来的な評価研究に有用なサル群の選別技術を確立する。
- 4) 馴化型 HIV-1 クローンについて、そのゲノム変異領域がもたらす影響について、そのウイルスゲノム構造や宿主側因子との相互作用等といった多角的観点から分子機構解析を進める。

(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) カニクイザル PBMC は初代サル指向性 HIV-1 で

ある DT5R に許容性を示した。予想に反しアカゲザル PBMC は DT5R に非許容性であり、殆どウイルス増殖が認められなかった。

2) HIV-1 DT5R をカニクイザルに接種したところ、ウイルス血症およびウイルス特異的抗体応答が認められ、同ウイルスの感染増殖が確認された。しかしその増殖効率は低レベルであり、ピーク時における血中ウイルス量は 10^3 コピー/ml 程度であった。

3) カニクイザル細胞を用いた馴化で同定された適応変異アミノ酸残基の導入、および塩田教授の研究グループ (大阪大学微生物病研究所) との共同研究で明らかにした宿主抵抗性因子 Trim5 α の感受性を規定する領域 (CA helix6/7 ループ) を SIV の対応領域に置換することにより、カニクイザル細胞 (PBMC 及び T 細胞株 HSC-F) において DT5R よりも高い感染増殖能を獲得した第2世代サル指向性 (X4-tropic) HIV-1 クローン MN4-5S の構築に成功した (図2,3)。

4) MN4-5S をベースに、CCR5 発現カニクイザル細胞に高い感染増殖能を獲得した R5-tropic 第2世代 HIV-1 クローンである MN5-10S の構築に成功した。

5) MN4-5S および MN5-10S では、適応変異として Pol-Int 領域 (N222K, V234I) および Env 領域 (E427K; MN4-5S, S304G; MN5-10S) がウイルス増殖亢進に寄与していることが示された。詳細な構造解析の結果、Pol-Int 変異は逆転写過程、Env S304G 及び E427K はそれぞれカニクイザル CCR5 分子及び CD4 分子との結合親和性の向上を規定していることが明らかとなった (図4,5)。

6) 第2世代サル指向性 HIV-1 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 (図6)。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。またウイルス特異的抗体応答ならびに HIV-1 Gag 特異的 CTL 反応誘導が確認された。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 (図 6)。従って、第 2 世代 HIV-1 はサル個体において潜伏感染しうること、また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。

7) 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得られたクローン MN4Rh-3 (図 2) はサル細胞で SIVmac と同程度以上の増殖動態を示すことが明らかとなった。この機序として、宿主抵抗性因子 Trim5 α との親和性に関与することが示唆された。

8) MN4-8S と比較し、第 3 世代 HIV-1 クローン MN4Rh-3 がカニクイザル PBMC における増殖能が向上していることが確認された (図 3)。本実験の過程でウイルス増殖に抵抗性を示すカニクイザルが見られたため、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 Trim5 α 遺伝子がホモであるのに対し、感受性個体では Trim5 α と CyclophilinA とのキメラ型である Trim5 α -CypA のホモもしくはヘテロであることが明らかとなった (図 7)。

9) 第 3 世代 HIV-1 クローン MN4Rh-3 を用いて、カニクイザルへの感染実験を開始したところである。前述のように Trim5 α 遺伝子の genotype が HIV-1 感受性決定に寄与することが示唆されたことから、本実験では Trim5 α 遺伝子の genotype ごとに実験群を設け、個体レベルでの HIV-1 許容性についても併せて検討する。

D. 考察

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。1 月に開始される第 3 世代 HIV-1 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ことから、当初の目的を概ね達成したと判断した。

世界的には、米国研究グループで DT5R と同等のクローンでブタオザルを用いたモデル開発を行なっているが、日本国内ではブタオザルの入手は極めて困難である。こうした状況で、国内で SPF 化個体繁殖や流通環境、さらに特異抗体等の研究基盤が整備されているカニクイザルで実用レベルの評価システムが確立したことは、今後の日本オリジナルの新規治療薬やワクチン開発・臨床応用において非常に有意義と考えられ、社会的・厚労行政上でも高く評価できると思われる。さらに、現在世界に蔓延している HIV-1 の野外株 (臨床分離株) 由来 Env 遺伝子等をこのシステムに導入すれば一段と学術的価値及び医学・社会的価値が増すことになるであろう。

本研究では、科学的エビデンス及び長期的視野に基づき最終目的を達成することを念頭に置いた。すなわち、第 1 世代の DT5R クローンを端緒に、サル細胞での馴化や宿主域研究から得られた分子生物学的情報を基にした決定領域の同定、宿主因子との相互作用の構造科学的解析とそこから得られる情報を基にした遺伝子改変を行ない、その結果構築された第 2, 第 3 世代クローンを細胞レベル、個体レベルで検証するといった手法を採用した。こうした結果により、最終的に第 1 世代クローンに総計僅か 10 アミノ酸にも満たない変異を導入することにより、約 100 倍もウイルス増殖能が向上した高指向性 HIV-1 クローン樹立に成功し、のみならず Trim5 α を初めとして Env や Pol-Int の機能発現や宿主域規定に関わる新たな分子機構の発見に繋がったことは特筆に値すると考えられる。

今後の新規評価システムとしての応用に向け、最終的なフィージビリティテストとして、HIV-1 に特異的な既存もしくは新規開発中の抗 HIV-1 薬を用い

た評価研究を行なうべきである。この結果に基づき、本システムを希望する研究者に広く供給もしくは評価研究の支援を行なうことが望ましい。今後の課題としては、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。具体的には、以下のような研究が今後必要であろう。

- ・ 第3世代 HIV-1 クローンの個体間継代とそれより得られる適応変異の機能・構造学的エビデンスに基づくクローン最適化
- ・ 未知の宿主抵抗性因子とウイルス側責任領域の解析、同定
- ・ 宿主免疫応答回避に関わるウイルス機能の付与もしくは再構築
- ・ HIV-1 臨床分離株由来 Env 遺伝子等を置換した多様なサブタイプに対応可能なモデルシステムの構築

E. 結論

本研究成果により、急性霊長類モデルによる新規抗 HIV-1 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できたことは高く評価できる。特に日本国内での SPF 化個体繁殖や流通環境、さらに特異抗体等の研究基盤が整備されているカニクイザルで実用レベルの評価システムが確立したことは、今後の日本オリジナルの新規治療薬やワクチン開発・臨床応用において非常に有意義と考えられ、社会的・厚労行政上でも高く評価できると思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

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遺伝子. *蛋白質核酸酵素*, 52: 1261-1267, 2007.

8) 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.

9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) Fujita, M., Otsuka, M., Nomaguchi, M., and Adachi, A. 2008. Functional region mapping of HIV-2 Vpx protein. *Microbes and Infection* 10: 1387-1392.
- 17) 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.
- 18) 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.
- 19) 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.
- 20) Takeuchi H, Matano T. Host factors involved in resistance to retroviral infection. *Microbiol Immunol* 52:318-325, 2008.
- 21) 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.
- 22) 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.
- 23) 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* 56: 21-25.
- 24) 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* 11: 164-171.
- 25) 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.

- 26) 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.
- 27) 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.
- 28) 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.
- 29) 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.
- 30) 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.
- 31) 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.
- 32) 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.
- 33) Contribution of RING domain to retrovirus restriction by TRIM5 α 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.

- 34) 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.
- 35) 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.
- 36) 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.

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 143 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 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。

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 21 回日本エイズ学会学術集会、2007 年、広島市。

15) 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.

16) 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。

17) 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。

18) 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。

19) 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。

20) 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 クロウン 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。

21) 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 クロウン 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。

22) 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。

23) 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。

24) 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。

25) 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。

26) Matano T. Impact of vaccine-induced Gag-specific CTL responses on SIV control. The 9th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan,

9/19/2008.

- 28) 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.
- 29) 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.
- 30) 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.
- 31) 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
- 32) 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
- 33) 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.
- 34) 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.
- 35) 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.
- 36) 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.
- 37) 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.
- 38) 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.
- 39) 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
- 40) 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.
- 41) 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.
- 42) 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.
- 43) 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.
- 44) 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.

45) 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.

46) 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.

47) 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

48) 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。

49) 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。

50) 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。

図1. 画期的な霊長類HIV-1モデルによる抗HIV薬/ワクチン評価基盤技術の開発

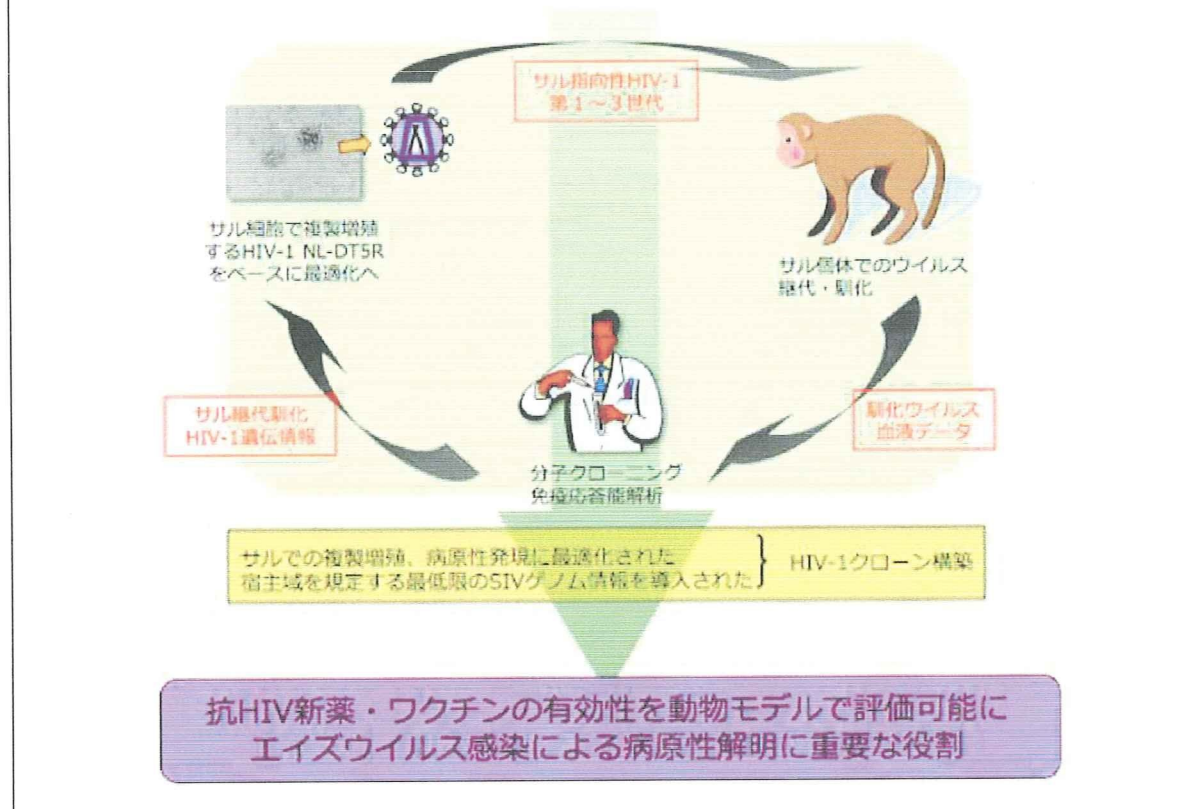


図2. サル指向性HIV-1クローン遺伝子構造

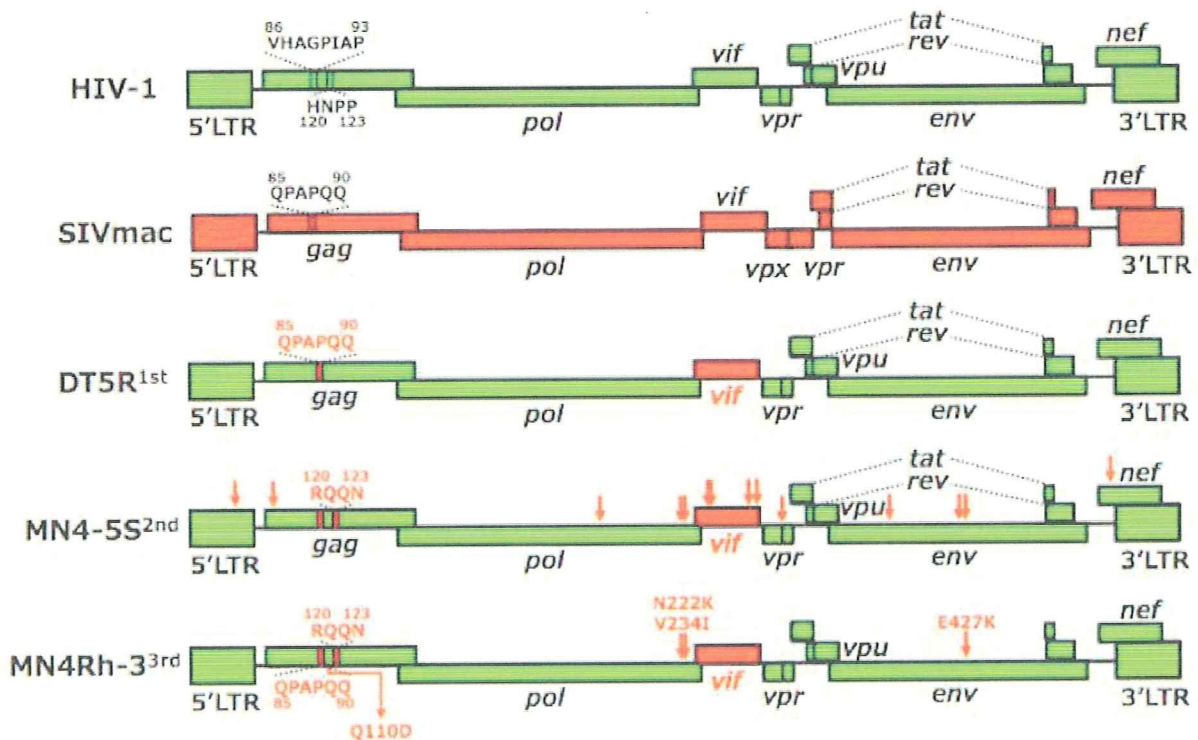


図3. カニクイザルPBMCにおけるサル指向性HIV-1クローンの増殖特性

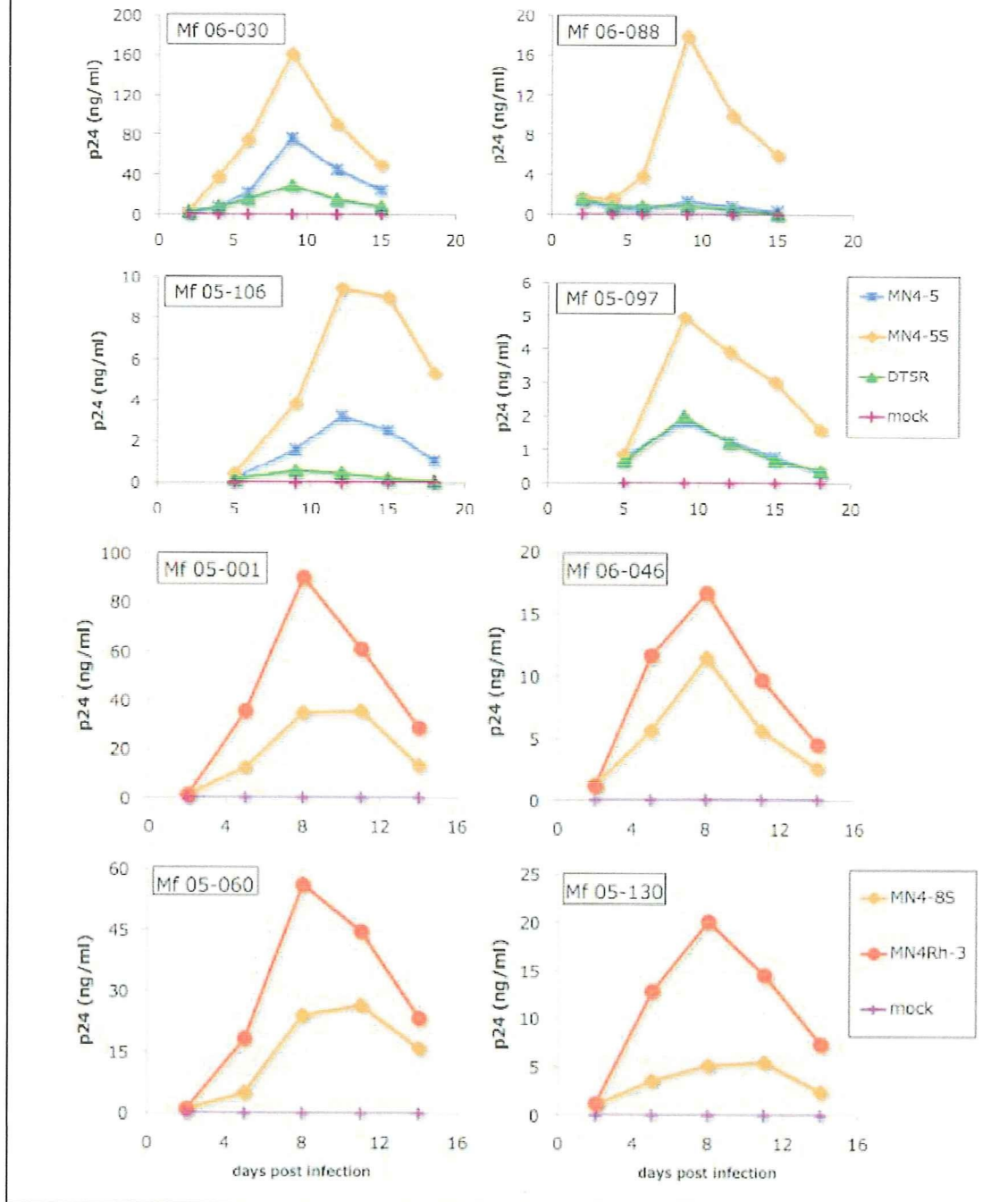


図4. S304GによるV3 loopの構造変化

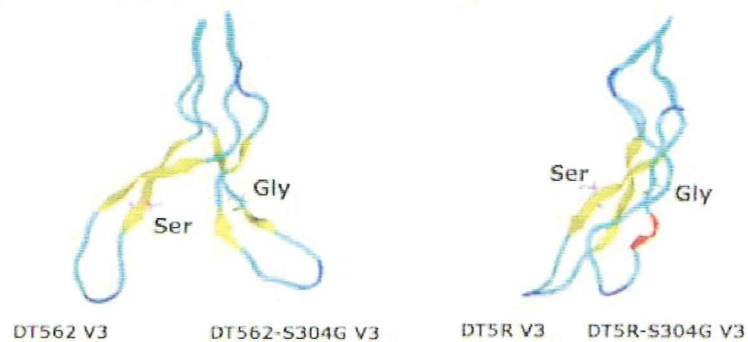


図5. DT5R-E427Kのgp120とカニクイザルCD4との複合体モデル

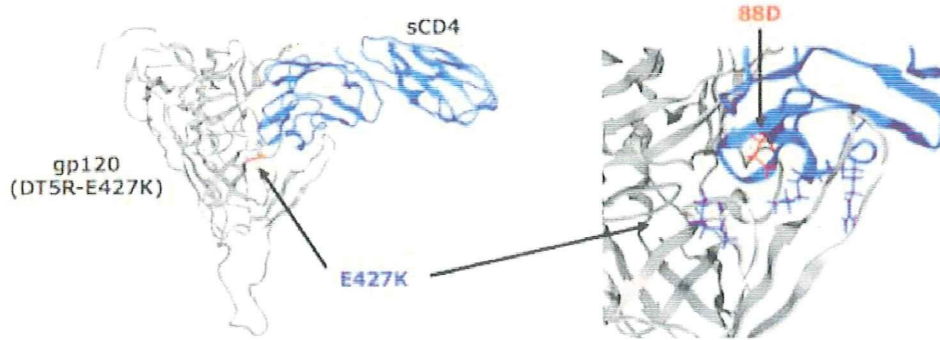


図6. カニクイザルへの第1, 2世代サル指向性HIV-1感染実験

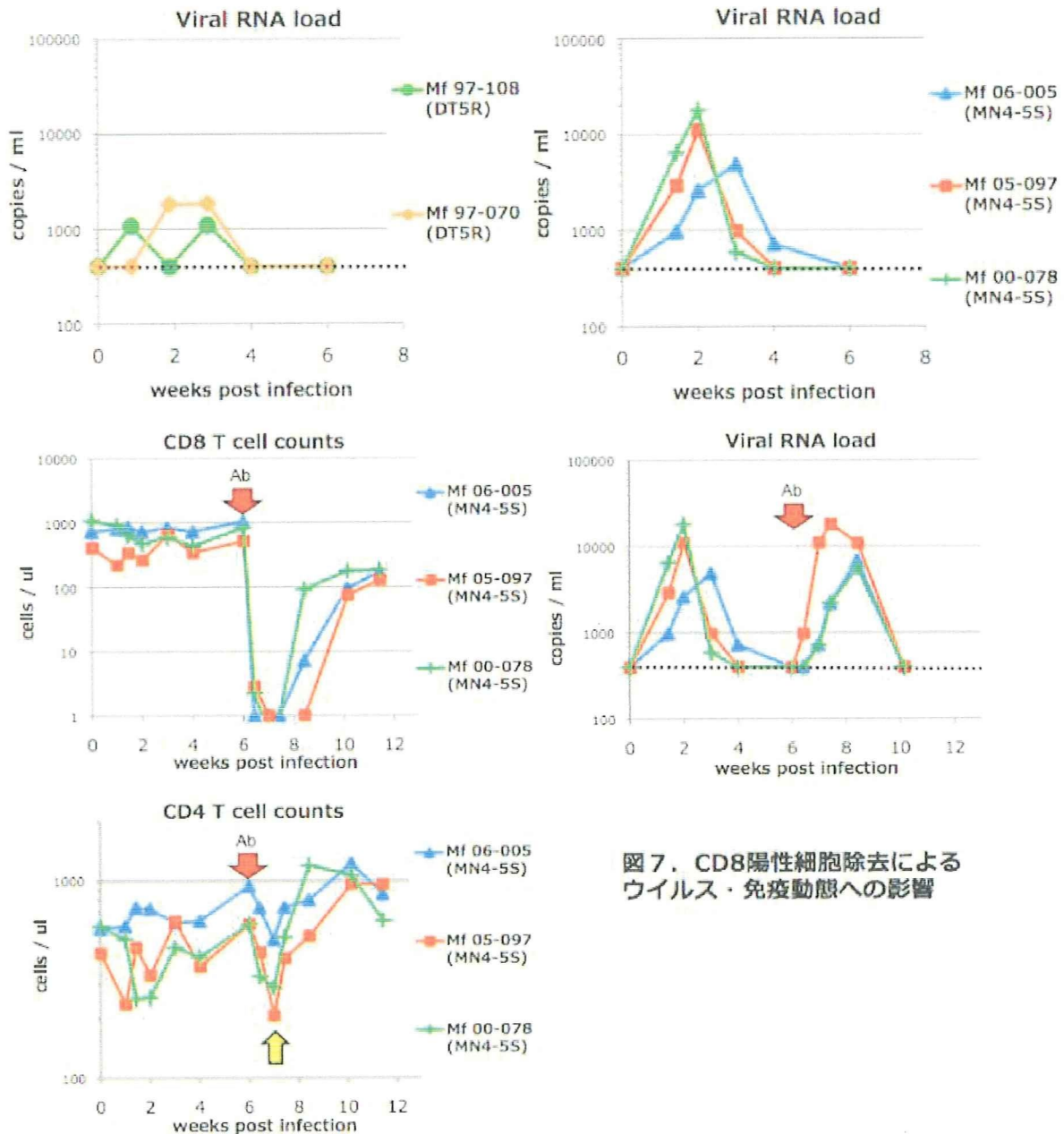
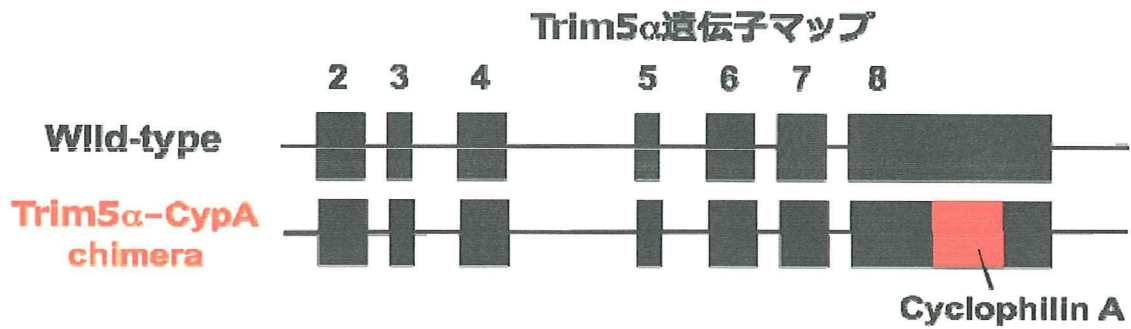


図7. CD8陽性細胞除去によるウイルス・免疫動態への影響

図7. Trim5遺伝子多型は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

Ⅱ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Igarashi, T., Iyengar, R., Byrum, R.A., Buckler-White, A., Dewar, R.L., Buckler, C.E., Lane, H.C., Kamada, K., <u>Adachi, A.</u> , and Martin, M.A.	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
Kawada, M., Tsukamoto, T., Yamamoto, H., Takeda, A., Igarashi, H., Watkins, D.I., and <u>Matano, T.</u>	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.	Journal of Virology	81	5202-5211	2007
Tsukamoto, T., Yuasa, M., Yamamoto, H., Kawada, M., Takeda, A., Igarashi, H., and <u>Matano, T.</u>	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.	Journal of Virology	81	11640-11649	2007
Nomaguchi, M., Doi, N., Kamada, K., and <u>Adachi, A.</u>	Species barrier of HIV-1 and its jumping by virus engineering.	Review in Medical Virology	18	261-275	2008
Fujita, M., Otsuka, M., Miyoshi, M., Khamsri, B., Nomaguchi, M., and <u>Adachi, A.</u>	Vpx is critical for reverse transcription of the human immunodeficiency virus type 2 genome in macrophages.	Journal of Virology	82	7752-7756	2008
Yamashita, T., Doi, N., <u>Adachi, A.</u> , and Nomaguchi, M.	Growth ability in simian cells of monkey cell-tropic HIV-1 is greatly affected by downstream region of the <i>vif</i> gene. Journal of Medical Investigation.	Journal of Medical Investigation	55	236-240	2008
Nomaguchi, M., Fujita, M., and <u>Adachi, A.</u>	Role of HIV-1 Vpu protein for virus spread and pathogenesis.	Microbes Infection	10	960-967	2008
Yamashita, T., Kamada, K., Hacho, K., <u>Adachi, A.</u> , and Nomaguchi, M.	Identification of amino acid residues in HIV-1 Vif critical for binding and exclusion of APOBEC3G/F.	Microbes Infection	10	1142-1149	2008
Hacho, K., Kamada, K., Yamashita, T., <u>Adachi, A.</u> , and Nomaguchi, M.	Replication potentials of <i>vif</i> variant viruses generated from monkey cell-tropic HIV-1 derivative clones NL-DT5/NL-DT5R.	Microbes Infection	10	1218-1222	2008
Fujita, M., Otsuka, M., Nomaguchi, M., and <u>Adachi, A.</u>	Functional region mapping of HIV-2 Vpx protein.	Microbes Infection	10	1387-1392	2008

Morita, D., Katoh, K., Harada, T., Nakagawa, Y., Matsunaga, I., Miura, T., <u>Adachi, A.</u> , Igarashi, T., and Sugita, M.	Trans-species activation of human T cells by rhesus macaque CD1b molecules.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	377	889-893	2008
Seki S, Kawada M, Takeda A, Igarashi H, Sata T, <u>Matano T</u>	Transmission of simian immunodeficiency virus carrying multiple cytotoxic-T-lymphocyte escape mutations with diminished replicative ability can result in AIDS progression in rhesus macaques.	Journal of Virology	82	5093-5098	2008
Tsukamoto T, Dohki S, Ueno T, Kawada M, Takeda A, Yasunami M, Naruse T, Kimura A, Takiguchi M, <u>Matano T</u>	Determination of a major histocompatibility complex class I restricting simian immunodeficiency virus Gag241-249 epitope.	AIDS	22	993-994	2008
Takeuchi H, <u>Matano T</u> .	Host factors involved in resistance to retroviral infection.	Microbiol Immunol	52	318-325	2008
Kawada M, Tsukamoto T, Yamamoto H, Iwamoto N, Kurihara K, Takeda A, Moriya C, Takeuchi H, <u>Akari H</u> , <u>Matano T</u>	Gag-specific cytotoxic T lymphocyte-based control of primary simian immunodeficiency virus replication in a vaccine trial.	Journal of Virology	82	10199-10206	2008
<u>J-i Sakuragi*</u> , S Sakuragi, M Ohishi, and T Shioda.	A rapid recombination assay of HIV-1 using murine CD52 as a novel biomarker.	Microbes Infection	10	396-404	2008
Hiyoshi M, Suzu S, Yoshidomi Y, Hassan R, Harada H, Sakashita N, <u>Akari H</u> , 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
Nakajima T, Ohtani H, Satta Y, Uno Y, <u>Akari H</u> , Ishida T, <u>Kimura A</u>	Natural selection in the TLR-related genes in the course of primate evolution.	Immunogenetics	60	727-735	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, <u>Akari H</u> , Koyanagi Y, Fujita J, Uchiyama T	Mdm2 is a novel E3 ligase for HIV-1 Vif	Retrovirology	6	1	2009
Hohjoh H, <u>Akari H</u> , Fujiwara Y, Hirai H, Wada K	Molecular cloning and characterization of the common marmoset huntingtin gene.	Gene	432	60-66	2009
Iwasaki Y, <u>Akari H</u> , 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
Hassan R, Suzu S, Hiyoshi M, Takahashi-Makise N, Ueno T, Agatsuma T, <u>Akari H</u> , Komano	Dys-regulated activation of a Src tyrosine kinase Hck at the Golgi disturbs N-glycosylation	Journal of Cellular Physiology	221	458-468	2009