

201029003B

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

エイズ多剤併用療法中のリザーバーの特定および選択的障害に関する研究

平成20年度～22年度 総合研究報告書

研究代表者 五十嵐 樹彦

平成23(2011)年 4月

目 次

- I. 総合研究報告
エイズ多剤併用療法中のリザーバーの特定および選択的障害に関する研究 ----- 3
五十嵐 樹彦
- II. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----12
- III. 研究成果の刊行物・別刷 -----15

I. 厚生労働科学研究費補助金（エイズ・肝炎・新興再興感染症研究事業）
（総合）研究報告書

エイズ多剤併用療法中のリザーバーの特定および選択的障害に関する研究

研究代表者 五十嵐 樹彦 京都大学ウイルス研究所教授

研究要旨

抗 HIV-1 多剤併用療法適用下の感染者において、ウイルス複製は完全に抑制出来ない。この治療下でもウイルスを産生し続けるリザーバーを同定する目的で、サルエイズモデルを用いた検索を行った。検索に当たり、本モデル系において未確立であった、長期間安定的に経口投与可能な多剤併用療法レジメンを確立した。このレジメンを短期間適用した SIV 感染サルにおいて、血漿中ウイルス RNA 量は速やかに減少し、検出限界以下に抑制されたが、治療を中断すると毛中ウイルス量は速やかに上昇し、本モデル系においてもリザーバーが存在する事が示された。一年間にわたる長期治療を適用し、その間血中ウイルス量が検出限界以下に抑制された個体を検索した所、エフェクターサイト及びリンパ系組織でウイルス RNA が検出され、これら組織において治療下でもウイルス複製が持続している事が示された。更に、RNA 量がより高かったリンパ系組織切片を多重組織化学染色により検索した所、ウイルス RNA 及びウイルスタンパクを発現している細胞は圧倒的大多数が、リンパ球ではなくマクロファージであった。以上の結果より、長期間にわたる多剤併用療法下においてマクロファージでウイルス複製が進行している事が示唆された。

A. 研究目的

抗 HIV-1 多剤併用療法の確立により、HIV-1 感染症は死に至る病ではなくなったが、この療法は未だ完全なものではなく、問題も認識されている。多剤併用療法の根本的な問題は感染者からウイルスを完全に排除する事が出来ない点である。治療が成功している感染者においても residual viremia が認められ、一端治療を中断すると血中ウイルス量は治療

前のレベルに速やかに戻る。この為、感染者は薬剤を一生服用せねばならず、薬剤の副作用、変異ウイルスの出現、高額な医療費等の問題が派生する。本研究計画では多剤併用療法中にウイルスを産生し続けるリザーバーを特定、そのリザーバーを選択的に傷害する方法の開発を最終目的とする。リザーバーの全身レベルでの検索を行う為、サルエイズモデルである SIVmac/アカゲザル実験系を用い、

検索をおこなった。

B. 研究方法

1. 多剤併用療法レジメン

多剤併用療法に用いる抗ウイルス薬として、抗 SIV 効果が知られている逆転写阻害剤ジドブジン(AZT)、ラミブジン (3TC)、テノフォビル (TDF) を選択した。プロテアーゼ阻害剤は抗 SIV 効果が公表されているものが少ないため、入手可能な代表的な 3 剤、サキナビル(SQV)、ロピナビル(LPV)、アタザナビル(ATV) に関して、ヒト T 細胞系株化細胞 MT-4 を用い、ウイルス感染に依って誘導される細胞死が被験薬剤により阻止される試験系により抗 SIV 効果を評価した。投薬は選択した抗ウイルス剤 (市販、成人感染者推奨服薬量の半量) を粉碎、同じく粉碎したサル飼料 (PMI 社製 Certified animal diet 5048) 30 グラムとバナナ 75 グラムを混合、成形し、1 日 2 回 (TDF のみ 1 日 1 回)、10 時間および 14 時間間隔で自由摂食させた。

2. 感染実験

インド産及び中国産アカゲザル計 9 頭を実験に用いた。ウイルスは病原性 SIVmac239 を 2000 TCID₅₀ 静脈内接種した。ウイルス接種前より末梢血及び肺胞リンパ球サブセットの検索、接種後は経時的に採取した血漿中のウイルス RNA 量を PCR により定量した。

3. 多剤併用療法

9 頭の SIV 感染サルのうち、2 頭 (中国産) は短期治療群、4 頭 (インド産) は長期治療群、3 頭 (中国産 1 頭及びインド産 2 頭) は非治療群とした。短期治療群は感染 8 週間よ

り 10 週間の投薬を行い、一端中断した。接種 38 週間より 8 週間、再度投薬を行い、治療中断 10 日後に安楽殺、解剖し、組織を採取した。

長期治療群は、感染 8 週間から 61-65 週間まで投薬した。化学療法適用下で安楽殺し、全身のリンパ系組織及び主要組織を採材した。非治療群は接種 66—117 週後に安楽殺し、同様に組織を採取した。

4. PCR による組織ウイルス RNA の定量

PCR 検索には RNA 安定化溶液に浸漬後凍結保存した各組織片より総 RNA を抽出し、SIV gag 特異的プライマー/プローブを用い、リアルタイム RT-PCR により遺伝子の増幅・定量を行った。

5. 組織学的検索

2 種の多重組織化学染色、即ち、ウイルス RNA 陽性細胞 (in situ hybridization) と細胞マーカーの多重染色及びウイルスタンパク陽性細胞 (免疫組織化学) と細胞マーカー多重染色を行った。各組織を 10% 中性ホルマリン (免疫組織化学検索用) および 4% パラホルムアルデヒド (in situ hybridization 用) 固定後、包埋・薄切した。組織切片はウイルス RNA プローブまたは SIV Nef 特異的単クローン抗体を反応させた後、細胞マーカーとして CD3 (T 細胞) および CD68 (マクロファージ) に対する単クローン抗体を反応させ、異なる蛍光色素で標識後、共焦点顕微鏡で検索した。

(倫理面への配慮)

実験は「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」に基づく「京都大学における動物実験の実施に関する規定」を遵守

し行った。

C. 研究結果

1. プロテアーゼ阻害剤の抗 SIV 効果

検索した抗 HIV-1 プロテアーゼ阻害剤三剤はそれぞれ異なる EC₅₀ で MT-4 細胞における SIV の複製を抑制した (SQV, 12.6nM, LPV, 38.6nM, ATV, 59.3nM)。同時に検索した HIV-1 IIIb 株に対するこれら薬剤の EC₅₀ は、SQV, 33.3nM, LPV, 42.7nM, ATV, 25.6nM であった。SQV は SIV を、ATV は HIV-1 をより低濃度で、LPV はどちらもほぼ同じ濃度で抑制した。ヒトにおいて既に知られているそれぞれの薬剤の血中半減期は SQV, 1-2 時間、LPV, 5-6 時間、ATV, 7 時間であり、抗 SIV 効果及び血中半減期を勘案し、LPV/リトナビルを選択した。

2. 投薬

薬剤入り飼料を通常の飼料と置換したことで、実験に用いた 2 頭のサルは投薬後 1 週間以内に摂食率が 90% に達し、その後安定して摂食した。投薬 14 時間後の薬物血中濃度を測定した所、16.1 および 25.7 μ M であった。感染者が服用する際目標とされる血中濃度トーフ値は 1-1.5 μ M であることから、投薬量は十分と判断した。

3. 短期多剤併用療法による SIV 感染アカゲザル血中ウイルス量の抑制効果

3 頭のアカゲザルに 2000 TCID₅₀ の SIV239 を静脈内接種し、血漿中ウイルス RNA 量を経時的に検索した。全てのサルで接種 1 または 2 週後に 8×10^5 - 6×10^7 コピー/ml のピークに達し、その後、接種 4-5 週後に

10^5 コピー/ml 台まで低下し、安定した。接種 8 週後からこのうちの 2 頭に対して多剤併用療法を適用した。投薬開始後 4 週間以内に血漿中ウイルス RNA 量は検出限界の 200 RNA コピー/ml 以下に低下、10 週間の治療期間中に 2 回、数百コピー/ml の「ブリップ」を経験したがそれ以外は検出限界以下に抑制された。

接種 18 週後に投薬を中断した所、治療群の血中ウイルス量は 2 週間以内に非治療サルと同じレベルに上昇し、以後、非治療サルと同様に漸増した。接種 38 週後に治療経験群に対して再度投薬を行った所、血漿中ウイルス量は一頭で治療開始 2 週間以内、もう一頭でも 4 週間以内に検出限界以下に抑制され、8 週間の治療期間中検出限界以下に抑制された。接種 46 週後に 2 回目の投薬を中断し、その 10 日後にこれらサルを安楽殺したが、その際の血漿中ウイルス RNA 量はそれぞれ検出限界以下及び 1400 RNA コピー/ml であった。

これら短期治療群及び非治療個体に関して末梢血単核球中のプロウイルス量を定量した所、血漿中ウイルス RNA 量と同様、接種 1 週間後に 10^4 - 10^6 コピー/ μ g 総 DNA のピークに達し、接種 3 週後に 10^4 コピー/ μ g 総 DNA に減少、以後漸減した。この漸減傾向は投薬によって有意に変化する事は無かった。

4. 短期多剤併用療法の SIV 感染アカゲザル末梢血リンパ球サブセットへの影響

短期治療群及び非治療個体の末梢血中 CD4 陽性 T リンパ球数を追跡したところ、すべての個体で接種 1 週後に顕著に減数し、4 週後に回復した。その後すべての個体で増減を繰

り返したが、投薬によって傾向が変わる事は無かった。

5. 短期多剤併用療法の SIV 感染サル肺胞腔リンパ球の変動への影響

SIV は標的細胞への侵入に際して、細胞表面に発現する受容体である CD4 分子に加えて CCR5 分子を共受容体として用いる事が知られている。CCR5 陽性 CD4T 細胞は機能的にメモリー細胞であるが、末梢血中ではメモリー細胞は少数である。これに対し、消化管、生殖器粘膜及び肺胞腔はエフェクターメモリー細胞が多数存在する。そこで、SIV 感染によって CD4T 細胞が大きく変動する「エフェクターサイト」の代表として、肺胞腔リンパ球を検索した。感染前に 40-50% あった肺胞腔 CD4T 細胞は接種 4 週後には 4-5% まで減少した。その後、すべての個体で漸増したが、治療群では治療期間中に接種前のレベルまで回復したものの、非治療個体では同じ観察期間中に接種前の 70% のレベルの回復に留まった。

6. 長期多剤併用療法による SIV 感染アカゲザル血中ウイルス量の抑制効果

6 頭のアカゲザルに SIV239 を静脈内接種し、血漿中ウイルス RNA 量を経時的に検索した。全てのサルで接種 1 または 2 週後に $8 \times 10^6 - 3 \times 10^7$ コピー/ml のピークに達し、その後、接種 5 週後に 10^5 コピー/ml 台まで低下したが再び上昇を始めた。接種 8 週後からこのうちの 4 頭に対して多剤併用療法を適用した。治療開始時の血漿中ウイルス RNA 量の高い個体ほど検出限界以下まで抑制するのに長い期間を要したが、全ての個体で接種 22

週後までには血漿注ウイルス RNA 量は検出限界 (200 コピー/ml) 未満まで抑制された。

この後安楽殺までの 1 年間 (53-57 週間) 全てのサルでウイルス RNA は検出限界以下に抑制され、一過性の上昇は見られなかった。

7. 各組織におけるウイルス RNA 量

短期治療群 (2 頭)、長期治療群 (4 頭) 及び非治療群 (3 頭) の各組織を剖検時に採取し、RNA を抽出し、SIV ウイルス RNA を定量的に検索した。短期及び長期治療個体の非リンパ系主要臓器 (心、肝、腎) におけるウイルス RNA 量は検出限界 (2.9×10^3 コピー/ μg 総 RNA) 以下であった。非治療個体ではこれら臓器で $1.3 \times 10^5 - 3.3 \times 10^6$ コピー/ μg 総 RNA のウイルス RNA が検出された。

HIV-1 および SIV 感染急性期には、腸管等の「エフェクターサイト」でウイルスが爆発的に複製し、リンパ球を著減させる事が知られている。非治療個体の膣、肺および消化管 (空腸、回腸、結腸および直腸) は、それぞれ 3.2×10^5 、 1.2×10^6 、 $6 \times 10^4 - 5 \times 10^7$ コピー/ μg 総 RNA のウイルス RNA が検出された。治療群のこれら組織から $10^3 - 10^4$ コピー/ μg 総 RNA のウイルス RNA が検出された。これら個体の血漿中ウイルス RNA 量が検出限界以下であった事から、血中ウイルス量が必ずしも体内ウイルス複製を正確に反映しない事が示唆された。

中枢神経系は現行の抗 HIV-1 剤が到達せず、ウイルスの聖域と考えられている。SIV 感染非治療個体では中枢神経系ウイルス RNA 量は大脳、小脳、脳幹においてそれぞれ 2.6、3.9、 3.7×10^4 コピー/ μg 総 RNA であったが、

治療群個体では全頭検出限界以下であった。

HIV-1 および SIV はリンパ球指向性である事から、リンパ系組織は非治療個体においてはウイルス量が多い。そこでこの組織における多剤併用療法のウイルス抑制効果を解析した。非治療個体では 7×10^5 – 5×10^8 コピー/ μg 総 RNA と非常に高いウイルス量が検出された。治療群個体では、これより低いものの、検索したほぼ全てのリンパ系組織でウイルス RNA が検出された (5×10^3 – 4×10^5 コピー/ μg 総 RNA)。

8. リンパ系組織における感染細胞の検出

PCR 検索から一年間にわたる治療によってもウイルス RNA 発現が抑制されない組織としてリンパ系組織が同定された。この組織に絞ってウイルス感染細胞の多重組織化学染色による検出を試みた。はじめに PCR 検索と同様にウイルス RNA を検出した所、非常に低い頻度ながら陽性細胞が検出された。同時に行った CD3 及び CD68 染色により、ウイルス RNA 陽性細胞はほぼ全て CD68 陽性、即ちマクロファージであった。次に、ウイルス感染細胞において大量の発現が見られる Nef タンパクを指標に免疫組織化学を実施した。ウイルス RNA 陽性細胞よりも更に低い頻度で Nef 陽性細胞が検出された。これら細胞は RNA 陽性細胞と同様、マクロファージマーカー陽性であった。

D. 考察

長期間の治療が成功している感染者においても residual viremia が報告されており、多剤併用療法下でのウイルス複製が示されている。サルエイズモデルを用いた、一年間にわたる

多剤併用療法を適用した本研究結果から、そのウイルスは主にエフェクターサイトとリンパ系組織で産生されている事、さらにマクロファージがウイルス産生をしている事が示唆された。このモデル系において血中薬物濃度のトラフ値は感染者で推奨されている量の約 10 倍であり、投薬量が不足していた可能性は排除できる。耐性ウイルスの出現の可能性に関しては現在ウイルスの塩基配列を検索している。本研究ではプロウイルスよりも治療下でウイルス複製環が維持されている、即ちウイルス RNA 発現のある細胞、更に転写のみならずウイルスタンパク発現細胞を検索した所、リンパ球よりもマクロファージが同定された。感染マクロファージの半減期は 2 週間ほどと見積もられている事から、今回検出した Nef 陽性マクロファージは治療下での新規感染を示すものと考えられる。多剤併用療法により理論的には新規感染が起こらなくなると考えられているが、実際には新規感染阻止が不可能なのか、マクロファージへの新規感染が特に抑制困難か明らかにする必要がある。

今回の検索に用いた SIV239/アカゲザルエイズモデルは現在、最も広く用いられているエイズ動物モデルであるが、

1. ウイルスが分子クローンである事、
2. T 細胞指向性である事から、実際の HIV-1 感染を再現していない可能性がある事も忘れてはならない。

E. 結論

SIV239/アカゲザルエイズモデルにおいて多剤併用療法下でリンパ系組織及びそこに存

在するマクロファージでは新規感染が維持されている事が示唆された。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1.論文発表

- Fukazawa Y., Miyake A., Ibuki K., Inaba K., Saito N., Motohara M., Horiuchi R., Himeno A., Matsuda K., Matsuyama M., Takahashi H., Hayami M., Igarashi T., and Miura T. Small intestinal CD4⁺ T-cells are profoundly depleted during acute infection of simian-human immunodeficiency virus regardless of its pathogenicity. *J.Virol.* 82: 6039-6044, 2008.
- Laird, M.E., Igarashi, T., Martin, M.A., and Desrosiers, R.C. The importance of the V1/V2 loop region of simian-human immunodeficiency virus envelope gp120 in determining the strain specificity of the neutralizing antibody response. *J.Virol.* 82: 11054-11065, 2008.
- Morita, D., Katoh, K., Harada, T., Nakagawa, Y., Matsunaga, I., Miura, T., Adachi, A., Igarashi, T., and Sugita, M. Trans-species activation of human T cells by rhesus macaque CD1b molecules. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 377: 889-893, 2008.
- Suzuki, T., Yamamoto, N., Nonaka, M., Hashimoto, Y., Matsuda, G., Takeshima, S. N., Matsuyama, M., Igarashi, T., Miura, T., Tanaka, R., Kato, S., and Aida, Y.: Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) nuclear import via Vpr-Importin alpha interactions as a novel HIV-1 therapy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 380: 838-843, 2009.
- Inaba, K., Fukazawa, Y., Matsuda, K., Himeno, A., Matsuyama, M., Ibuki, K., Miura, Y., Koyanagi, Y., Nakajima, A., Blumberg, R. S., Takahashi, H., Hayami, M., Igarashi, T., and Miura, T. (2010) Small intestine CD4⁺ cell reduction and enteropathy in SHIV-KS661-infected rhesus macaques in presence of low viral load. *J. Gen. Virol.*, 91: 773-781.
- Matsuda, K. Inaba, K. Fukazawa, Y. Matsuyama, M. Ibuki, K. Horiike, M. Saito, N. Hayami, M. Igarashi, T. and Miura, T. In vivo analysis of a new R5 tropic SHIV generated from the highly pathogenic SHIV-KS661, a derivative of SHIV-89.6. *Virology.* 399:134-43, 2010.
- Himeno, A., Akagi, T., Uto, T., Wang, X., Baba, M., Ibuki, K., Matsuyama, M., Horiike, M., Igarashi, T., Miura, T. and Akashi, M. Evaluation of the immune response and protective effects of rhesus macaques vaccinated with biodegradable nanoparticles carrying gp120 of human

immunodeficiency virus. Vaccine.
28:5377-85, 2010.

- Nishimura, Y. Shingai, M. Willey, R. Sadjadpour, R. Lee, W. R. Brown, C. R. Brenchley, J. M. Buckler-White, A. Petros, R. Eckhaus, M. Hoffman, V. Igarashi, T. and Martin, M. A. Generation of the Pathogenic R5-Tropic Shivad8 by Serial Passaging in Rhesus Macaques. J. Virol. 84:4769-4781, 2010.

2.学会発表

- Igarashi T.: "Work In Progress" toward developing a better non-human primate model for AIDS.9th Kumomoto AIDS Seminar, Sep.18-19, 2008, Kumamoto
- Inaba, K., Fukazawa, Y., Horiuchi, R., Matsuda, K., Himeno, A., Matsuyama, M., Hayami, M., Igarashi, T., Miura, T.: CD4+ cell reduction and enteropathy in small intestine can be occurred irrespective of viral load in simian/human immunodeficiency virus infection. 9th Kumomoto AIDS Seminar, Sep.18-19, 2008, Kumamoto
- Fukazawa, Y., Ibuki, K., Inaba, K., Saito, N., Matsuda, K., Himeno, A., Hirai, K., Matsuyama, M., Hayami, M., Igarashi, T., Miura, T.: Live attenuated AIDS vaccine conferred a strong protection against highly pathogenic SHIV challenge. 9th Kumomoto AIDS Seminar, Sep.18-19, 2008, Kumamoto
- Matsuda, K., Inaba, K., Ibuki, K., Fukazawa, Y., Matsuyama, M., Saito, N., Horiike, M., Hirai, K., Hayami, M., Igarashi, T., Miura, T.: Construction and in vivo analysis of R5 tropic SHIV. 9th Kumomoto AIDS Seminar, Sep.18-19, 2008, Kumamoto
- 稲葉一寿、深澤嘉伯、堀内勲生、松田健太、姫野愛、松山めぐみ、伊吹謙太郎、速水正憲、五十嵐樹彦、三浦智行：SHIV-KS661長期感染アカゲサルにおけるウイルス増殖、CD4陽性T細胞の減少およびEnteropathyについて、第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月26-28日、岡山
- 五十嵐樹彦：サルモデルを用いたHIV-1病原性の研究、シンポジウム4ヒトはなぜエイズになるのか、第22回日本エイズ学会学術集会、2008年11月26-28日、大阪
- 深澤嘉伯、伊吹謙太郎、稲葉一寿、齋藤尚紀、姫野愛、平井郁、松田健太、松山めぐみ、元原麻貴子、速水正憲、五十嵐樹彦、三浦智行：nef欠損弱毒生ワクチン免疫ザルに対する急性発症型SHIV攻撃接種後早期でのウイルス動態および免疫細胞の解析、第22回日本エイズ学会学術集会、2008年11月26-28日、大阪
- 松田健太、稲葉一寿、伊吹謙太郎、深澤嘉伯、松山めぐみ、齋藤尚紀、堀池麻里子、平井郁、姫野愛、速水正憲、五十嵐樹彦、三浦智行：ワクチン評価に有用なR5指向性SHIVの作製、第22回日本エイズ学会学術集会、2008年11月26-28日、大阪
- 堀池麻里子、松山めぐみ、佐藤彰彦、稲葉一寿、深澤嘉伯、松田健太、三浦智行、五

- 土嵐樹彦：サル/エイズモデルにおける HAART療法の確立に向けて、第22回日本エイズ学会学術集会、2008年11月26-28日、大阪
- 松田健太、稲葉一寿、伊吹謙太郎、深澤嘉伯、松山めぐみ、斉藤尚紀、堀池麻里子、姫野愛、速水正憲、五十嵐樹彦、三浦智行：新規CCR5指向性SHIVの作製とアカゲザルへの順化、第148回日本獣医学会学術集会、2008年9月25-27日、鳥取
 - 松田健太、稲葉一寿、深澤嘉伯、伊吹謙太郎、松山めぐみ、堀池麻里子、速水正憲、五十嵐樹彦、三浦智行：抗HIVワクチン評価に有用なR5指向性SHIVの作製、第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月25-27日、東京
 - 高原悠佑、武内寛明、石井洋、高橋尚史、三浦智行、五十嵐樹彦、俣野哲朗：ビルマ産アカゲザルSIV感染により誘導される CTLエピトープの探索、第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月25-27日、東京
 - 中村仁美、五十嵐樹彦、三浦智行：相同組換えによって作製した新規サル/ヒト免疫不全ウイルスの遺伝子解析、第149回日本獣医学会学術集会、2010年3月26-28日、東京
 - S. Iwami, Y. Takeuchi, T. Igarashi and T. Miura: Estimate of viral productivity and infectivity in vitro. KSIAM, Chungnam National University, April 24-25, 2010
 - S. Iwami, Y. Takeuchi, T. Igarashi and T. Miura: Estimate of viral productivity and infectivity in vitro. CMPD3, Bordeaux, France, May 31- June 4, 2010
 - 中村仁美、五十嵐樹彦、三浦智行：相同組換えによって作製した新規サル/ヒト免疫不全ウイルスの遺伝子解析、第19回サル疾病ワークショップ、2010年7月3日、東京
 - S. Iwami, M. Horiike, T. Miura and T. Igarashi: Contribution of Long-Lived Productively Infected Cells in SIV Infection. SIAM Conference on Life Science, Pittsburgh, Pennsylvania, July 12-15, 2010
 - 岩見真吾、多田哲子、五十嵐樹彦、三浦智行：計算ウイルス学・免疫学の展開-ウイルス感染力推定法の開発-、日本応用数学会、2010年9月8日、東京
 - 岩見真吾、多田哲子、五十嵐樹彦、竹内康博、守田智、三浦智行：保存量を用いたウイルス感染力推定法の開発、第20回日本数理生物学会、2010年9月14日、札幌
 - 岩見真吾、堀池麻里子、三浦智行、稲葉寿、守田智、五十嵐樹彦：SIV感染アカゲザルによるHAART治療モデルのデータ解析とその理論、第20回日本数理生物学会、2010年9月14日、札幌
 - 岩見真吾、多田哲子、五十嵐樹彦、三浦智行：数理モデルによるウイルス感染力推定法の開発、第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7日-9日、徳島
 - 大附寛幸、藤田泰久、小林剛、三浦智行、五十嵐樹彦：新規組換え技術によるR5指向性 clade C env を持つサル指向性HIV-1の

- 創出、第58回日本ウイルス学会学術集会、
2010年11月7日-9日、徳島
- 高原悠佑、松岡佐織、石井洋、堀池麻里子、
三浦智行、五十嵐樹彦、俣野哲朗：サルエイ
ズモデルにおけるHAART実施前後の
CTL反応の比較、第58回日本ウイルス学会
学術集会、2010年11月7-9日、徳島
 - 仲宗根咲子、松山めぐみ、小林剛、三浦智
行、五十嵐樹彦：マクロファージにおける
霊長類レンチウイルス出芽様式の超微形態
学的解析、第58回日本ウイルス学会学術集
会、2010年11月7-9日、徳島
 - 堀池麻里子、松山めぐみ、安井美加、小林
剛、三浦智行、五十嵐樹彦：多剤併用療法
実施下のサルエイズモデルにおけるリンパ
節内でのウイルス新規感染の可能性、第58
回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月
7-9日、徳島
 - 五十嵐樹彦、堀池麻里子：サルエイズモデ
ルを用いた多剤併用療法下におけるウイル
スリザーバーの検索、第24回日本エイズ学
会学術集会、2010年11月24-26日、東京
 - 岩見真吾、堀池麻里子、三浦智行、五十嵐
樹彦：SIV感染アカゲザルによるHAART治
療モデルのデータ解析、第24回日本エイズ
学会学術集会、2010年11月24-26日、東京
 - 中村仁美、大附寛幸、松田健太、小林剛、
五十嵐樹彦、三浦智行：相同組換えによっ
て作製した新規サル指向性ヒト免疫不全ウ
イルスの遺伝子解析、第24回日本エイズ学
会学術集会、2010年11月24-26日、東京
 - 藤田泰久、大附寛幸、小林剛、三浦智行、
五十嵐樹彦：新規組換え技術によるCCR5指

向性clade C HIV-1株のenv領域を持った
SHIVの作製、第24回日本エイズ学会学術集
会、2010年11月24-26日、東京

H.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
なし

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍 なし

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
Fukazawa Y., Miyake A., Ibuki K., Inaba K., Saito N., Motohara M., Horiuchi R., Himeno A., Matsuda K., Matsuyama M., Takahashi H., Hayami M., <u>Igarashi T.</u> , and Miura T.	Small Intestine CD4+ T-cells are Profoundly Depleted during Acute Simian-Human Immunodeficiency Virus Infection, Regardless of Viral Pathogenicity.	Journal of Virology	82	6039-6044	2008
Laird, M.E., <u>Igarashi T.</u> , Martin, M.A., and Desrosiers, R.C.	Importance of the V1/V2 loop region of simian-human immunodeficiency virus envelope gp120 in determining the strain specificity of the neutralizing antibody response.	Journal of Virology	82	11054-110 65	2008

Morita, D., Katoh, K., Harada, T., Nakagawa, Y., Matsunaga, I., Miura, T., Adachi, A., <u>Igarashi, T.</u> , and Sugita, M.	Trans-species activation of human T cells by rhesus macaque CD1b molecules.	Biochem.B iophys.Res. Commun.	377	889-893	2008
Suzuki, T., Yamamoto, N., Nonaka, M., Hashimoto, Y., Matsuda, G., Takeshima, S. N., Matsuyama, M., Igarashi, T., Miura, T., Tanaka, R., Kato, S., and Aida, Y.	Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) nuclear import via Vpr-Importin α interactions as a novel HIV-1 therapy.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	380	838-843	2009
Inaba, K., Fukazawa, Y., Matsuda, K., Himeno, A., Matsuyama, M., Ibuki, K., Miura, Y., Koyanagi, Y., Nakajima, A., Blumberg, R. S., Takahashi, H., Hayami, M., <u>Igarashi, T.</u> , and Miura, T.	Small intestine CD4 ⁺ cell reduction and enteropathy in SHIV-KS661-infected rhesus macaques in presence of low viral load.	Journal of General Virology	91	773-781	2010

Matsuda, K. Inaba, K. Fukazawa, Y. Matsuyama, M. Ibuki, K. Horiike, M. Saito, N. Hayami, M. <u>Igarashi, T.</u> and Miura, T.	In vivo analysis of a new R5 tropic SHIV generated from the highly pathogenic SHIV-KS661, a derivative of SHIV-89.6.	Virology	399	134-143	2010
Himeno, A., Akagi, T., Uto, T., Wang, X., Baba, M., Ibuki, K., Matsuyama, M., Horiike, M., <u>Igarashi, T.</u> , Miura, T. and Akashi, M.	Evaluation of the immune response and protective effects of rhesus macaques vaccinated with biodegradable nanoparticles carrying gp120 of human immunodeficiency virus.	Vaccine	28	5377-5385	2010
Nishimura, Y. Shingai, M. Willey, R. Sadjadpour, R. Lee, W. R. Brown, C. R. Brenchley, J. M. Buckler-White, A. Petros, R. Eckhaus, M. Hoffman, V. <u>Igarashi, T.</u> and Martin, M. A.	Generation of the Pathogenic R5-Tropic Shivad8 by Serial Passaging in Rhesus Macaques.	Journal of Virology	84	4769-4781	2010

III. 研究成果の刊行物・別刷

Small Intestine CD4⁺ T Cells Are Profoundly Depleted during Acute Simian-Human Immunodeficiency Virus Infection, Regardless of Viral Pathogenicity[∇]

Yoshinori Fukazawa,^{1†} Ariko Miyake,^{1,2†} Kentaro Ibuki,¹ Katsuhisa Inaba,¹ Naoki Saito,¹ Makiko Motohara,¹ Reii Horiuchi,¹ Ai Himeno,¹ Kenta Matsuda,¹ Megumi Matsuyama,¹ Hidemi Takahashi,³ Masanori Hayami,¹ Tatsuhiko Igarashi,¹ and Tomoyuki Miura^{1*}

Laboratory of Primate Model, Experimental Research Center for Infectious Diseases, Institute for Virus Research, Kyoto University, 53 Shogoinkawaramachi, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan¹; Laboratory of Tumor Cell Biology, Department of Medical Genome Sciences, Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, Tokyo 162-8640, Japan²; and Department of Microbiology and Immunology, Nippon Medical School, Tokyo 113-8602, Japan³

Received 27 December 2007/Accepted 27 March 2008

To analyze the relationship between acute virus-induced injury and the subsequent disease phenotype, we compared the virus replication and CD4⁺ T-cell profiles for monkeys infected with isogenic highly pathogenic (KS661) and moderately pathogenic (#64) simian-human immunodeficiency viruses (SHIVs). Intrarectal infusion of SHIV-KS661 resulted in rapid, systemic, and massive virus replication, while SHIV-#64 replicated more slowly and reached lower titers. Whereas KS661 systemically depleted CD4⁺ T cells, #64 caused significant CD4⁺ T-cell depletion only in the small intestine. We conclude that SHIV, regardless of pathogenicity, can cause injury to the small intestine and leads to CD4⁺ T-cell depletion in infected animals during acute infection.

The highly pathogenic simian-human immunodeficiency virus (SHIV) SHIV-C2/1-KS661 (KS661), which was derived from SHIV-89.6 (23), replicates to high titers and causes the irreversible depletion of the circulating CD4⁺ T cells during the acute phase of intravenous infection, followed by AIDS-like disease within 1 year (23). We previously reported that KS661 massively replicates and depletes CD4⁺ T cells in both peripheral and mucosal lymphoid tissues during the initial 4 weeks postinfection (16). On the other hand, the isogenic SHIV-#64 (#64), which was derived from SHIV-89.6P, is moderately pathogenic. The genomic sequences of the two SHIVs differ by only 0.16%, resulting in a total of six amino acid changes in the products of the *pol*, *env-gp41*, and *rev* genes. The intravenous inoculation of rhesus macaques with #64 induces plasma viral burdens comparable to those induced by KS661 during the acute phase of infection and causes a transient reduction of the circulating CD4⁺ T lymphocytes (10). After the acute phase, the viral loads decline to undetectable levels and the populations of CD4⁺ T cells recover to preinfection levels.

To clarify the relationship between acute viral replication kinetics and subsequent clinical courses for these isogenic SHIVs with distinct pathogenicities, we examined proviral DNA, infectious-virus-producing cells (IVPCs), and CD4⁺ T-

cell depletion in peripheral and mucosal lymphoid tissues of 17 infected (Table 1) and 7 uninfected adult rhesus macaques (*Macaca mulatta*). Both Chinese and Indian rhesus monkeys were randomly assigned to these groups. The monkeys were used in accordance with the institutional regulations approved by the Committee for Experimental Use of Nonhuman Primates of the Institute for Virus Research, Kyoto University, Kyoto, Japan. The animals were inoculated via intrarectal infusion as described previously (17). Following serial euthanasia, tissues were collected and analyzed up to 27 days postinfection (dpi) as described previously (16, 17).

Gross virus replication was assessed by measuring plasma viral loads by reverse transcriptase PCR (16). By 6 dpi, plasma viral RNA levels became detectable in all the KS661-infected macaques (Fig. 1A) and three of seven #64-infected macaques (animals MM372, MM391, and MM374) (Fig. 1B). Although the plasma viral loads of the two groups at 13 dpi, when the virus loads reached their initial peaks, were not significantly different ($P = 0.1673$), the average load (\pm the standard deviation) in KS661-infected monkeys ($9.3 \times 10^8 \pm 15.9 \times 10^8$ copies/ml) was about 10 times higher than that in #64-infected monkeys ($6.3 \times 10^7 \pm 11.6 \times 10^7$ copies/ml). These results suggest that KS661 spread faster and reached a somewhat higher titer than did #64 when the viruses were inoculated intrarectally.

Levels of peripheral blood CD4⁺ T lymphocytes in all the KS661-infected monkeys decreased substantially within 4 weeks (Fig. 1C). On the other hand, the reductions in the levels of CD4⁺ T cells varied among the #64-infected monkeys (Fig. 1D). For example, MM378 did not exhibit any appreciable changes, even though the plasma viral RNA load in this monkey reached 2.6×10^7 copies/ml by 21 dpi (Fig. 1 B and D).

* Corresponding author. Mailing address: Laboratory of Primate Model, Experimental Research Center for Infectious Diseases, Institute for Virus Research, Kyoto University, 53 Shogoinkawaramachi, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan. Phone: 81-75-751-3984. Fax: 81-75-761-9335. E-mail: tmiura@virus.kyoto-u.ac.jp.

† These authors contributed equally to this work.

[∇] Published ahead of print on 9 April 2007.

TABLE 1. Experimental schedule for individual monkeys^a

Virus (inoculum size)	Monkeys examined at:		
	6 dpi	13 dpi	27 dpi
KS661 (2×10^3 TCID ₅₀)	MM300, MM309	MM313, MM334, MM392, MM393	MM308, MM310, MM394, MM395
#64 (2×10^5 TCID ₅₀)	MM379, MM390	MM372, MM373*, MM391	MM374, MM378

^a TCID₅₀, 50% tissue culture infective doses; *, MM373 received 2×10^3 TCID₅₀ of #64.

These data suggest that the decline in circulating CD4⁺ T cells in KS661-infected animals was more severe and more reproducible than that in the #64-infected monkeys.

Another highly pathogenic SHIV, SHIV-DH12R, is known to cause systemic and synchronous replication events in animals following intravenous inoculation (6). To reveal the spread of virus in monkeys following intrarectal infection, we measured proviral DNA loads in a variety of tissues as described previously (16). KS661 proviral DNA was detected not only in samples from the rectums, the site of virus inoculation, but also in peripheral blood mononuclear cells and some

lymph nodes (LN) at 6 dpi (Fig. 2A), suggesting that the virus was already spreading systemically. At 13 dpi, when the viral RNA loads in peripheral blood increased to the highest titers, proviral DNA levels in all of the tissues examined also increased, with levels in most monkeys exceeding 10^4 copies/ μ g of DNA. The levels of proviral DNA in all the tissues declined remarkably by 27 dpi. In contrast, #64 proviral DNA was detected only in the rectum of one (MM390) of the two monkeys examined at 6 dpi (Fig. 2A). At 13 dpi, the amount of proviral DNA in each tissue sample from #64-infected monkeys ($<10^4$ copies/ μ g of DNA) was considerably smaller than

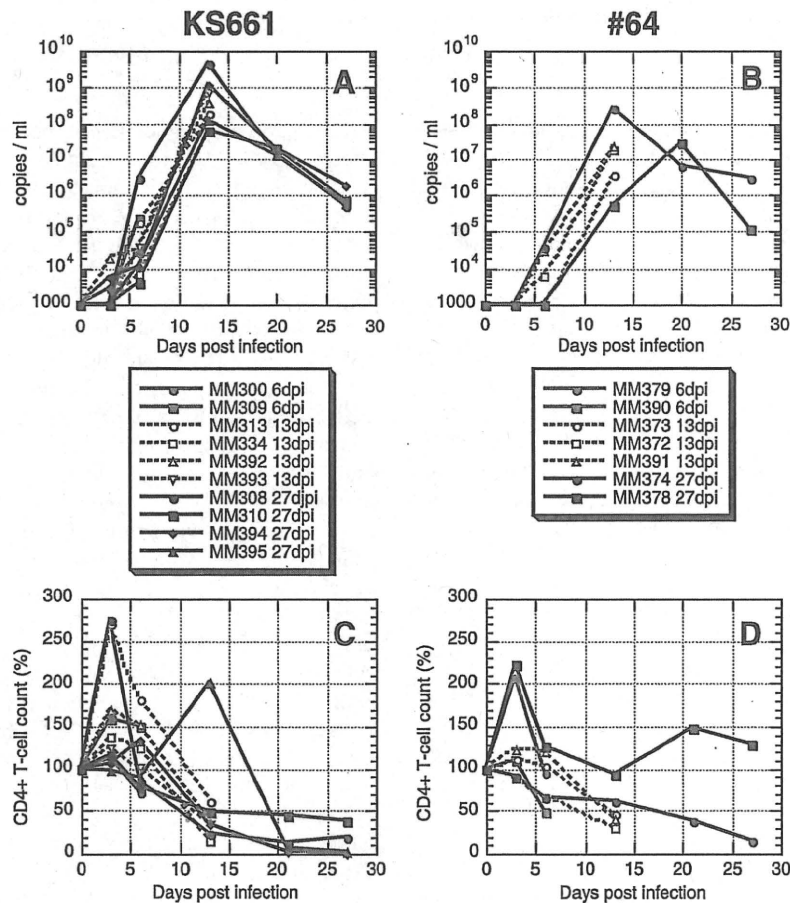


FIG. 1. Plasma viral RNA loads and profiles of circulating CD4⁺ T cells for monkeys intrarectally infected with highly pathogenic KS661 and moderately pathogenic #64. (A and B) Plasma viral RNA loads were measured by quantitative reverse transcriptase PCR. The detection limit of this assay was 10^3 copies/ml. (C and D) Levels of CD4⁺ T cells in peripheral blood samples from monkeys infected with KS661 and #64. The absolute number of CD3⁺ CD4⁺ cells in peripheral blood immediately before infection (day 0 postinfection) was defined as 100% for each monkey.

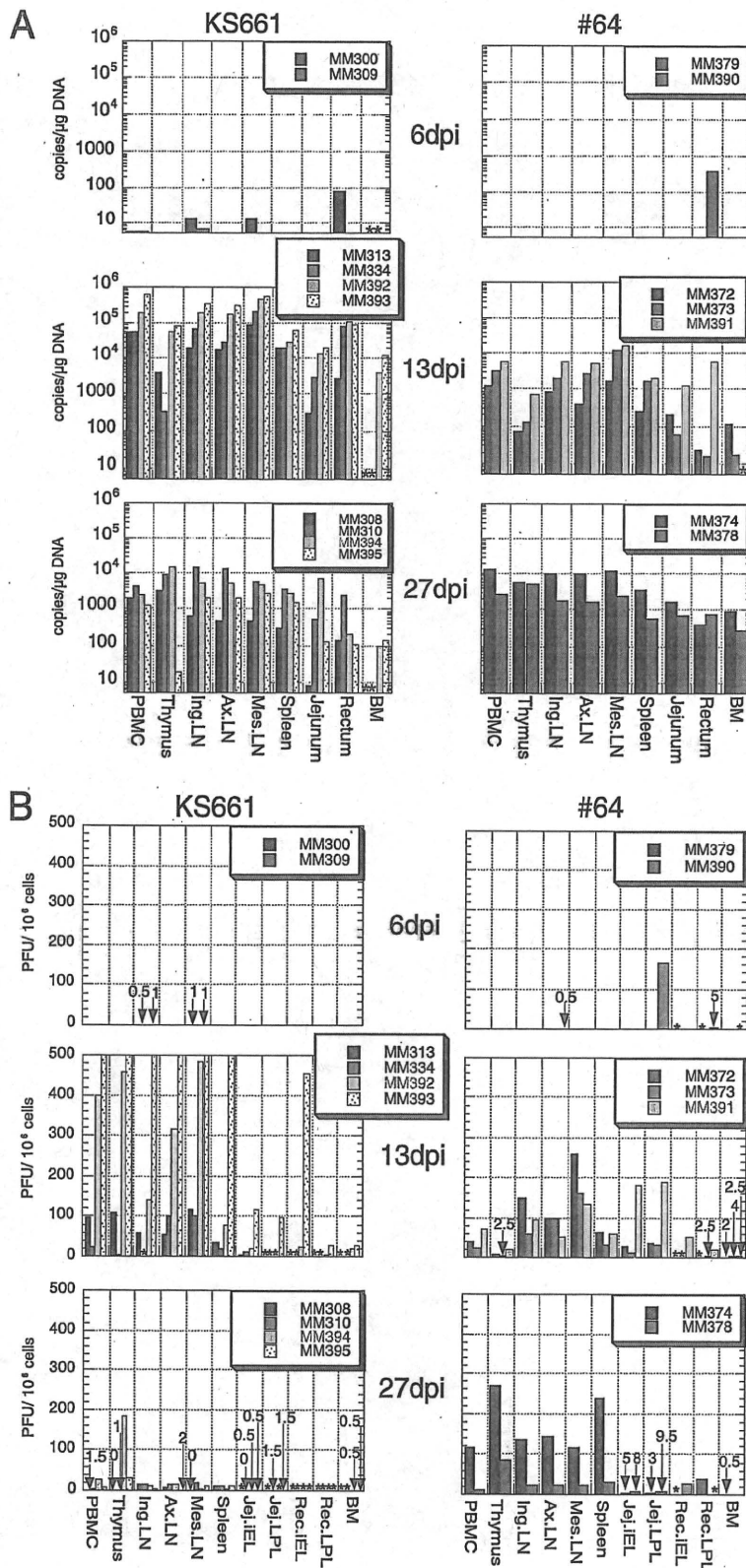
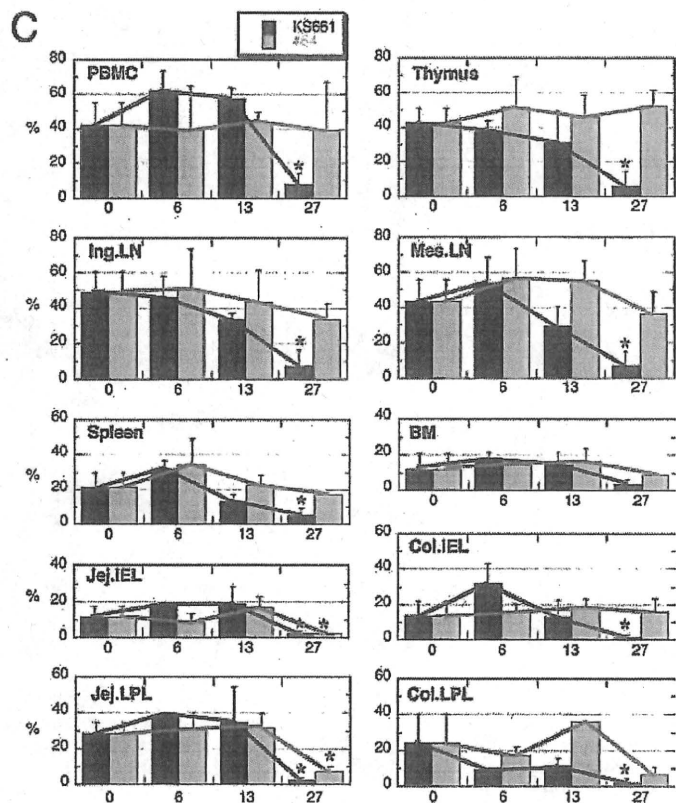
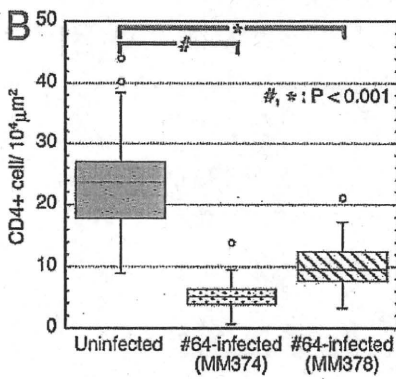
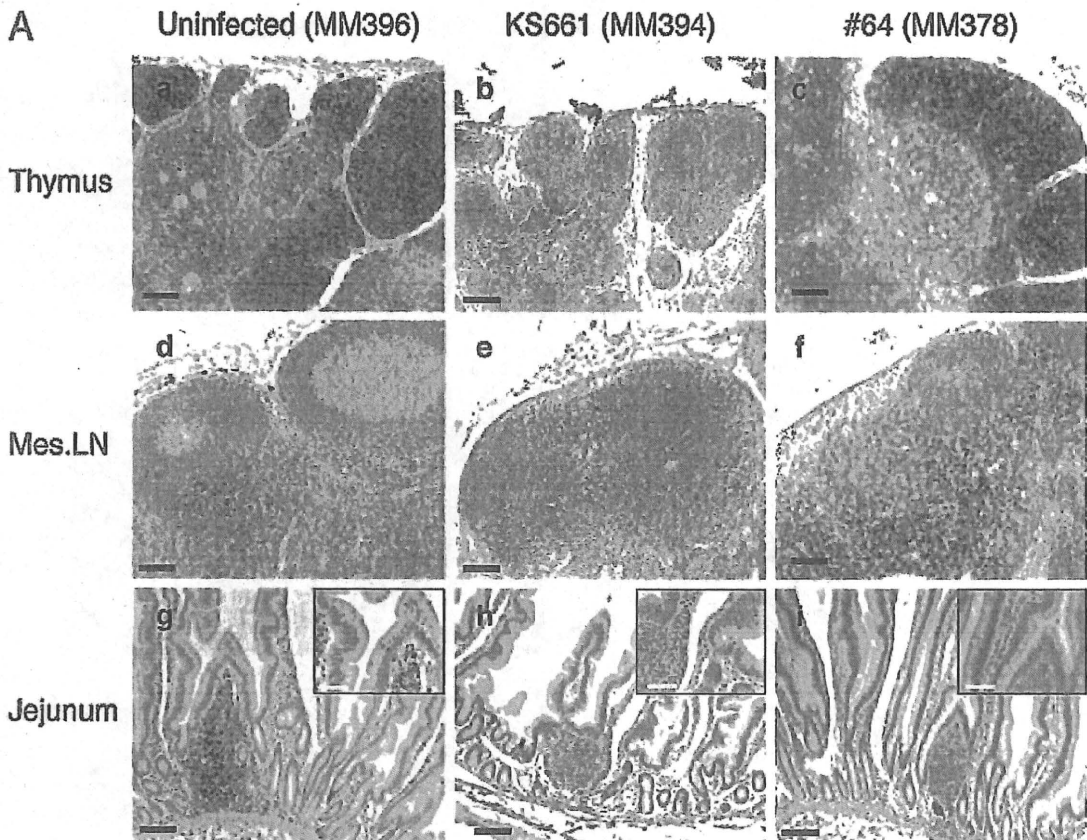


FIG. 2. (A) Proviral DNA loads in tissues of KS661- and #64-infected monkeys at 6, 13, and 27 dpi. Viral burdens were determined by quantitative PCR and expressed as the numbers of viral DNA copies per microgram of total DNA extracted from tissue homogenates. PBMC, peripheral blood mononuclear cells; Ing., inguinal; Ax., axillary; Mes., mesenteric; BM, bone marrow; *, not done. (B) Numbers of IVPCs in tissues of KS661- and #64-infected monkeys at 6, 13, and 27 dpi. Numbers of IVPCs were determined by an infectious plaque assay and were expressed as the numbers of PFU per 10^6 cells. Jej., jejunum; Rec., rectum; iEL, intraepithelial lymphocytes; *, not done.



that in each sample from the KS661-infected monkeys. However, unlike the KS661 proviral DNA levels, the #64 proviral DNA levels in most tissues were maintained up to 27 dpi. These results suggest that #64 spread more slowly than KS661 and that the amounts of proviral DNA in a variety of tissues from the #64-infected animals were smaller than those in the tissues from KS661-infected animals around the initial peak of plasma viremia.

Because the amount of proviral DNA measured by PCR may include nonreplicating remnants of the viral genome, we also measured the number of IVPCs in each tissue sample by a plaque assay as described previously (9, 15). Briefly, cells prepared from infected animals were mixed with human T-lymphoid M8166 indicator cells, resuspended in culture medium containing 0.4% agarose, and plated into petri dishes. The plaques that formed in the cell layer were counted after 10 days of cultivation, and the number of IVPCs was calculated. For the KS661-infected monkeys, high numbers of IVPCs in all the tissue samples examined at 13 dpi were detected (Fig. 2B). Among these samples, the thymus and mesenteric LN samples harbored especially high numbers of IVPCs (more than $500/10^6$ cells) at 13 dpi. The numbers of IVPCs declined remarkably from 13 to 27 dpi. We concluded that KS661 replicated systemically and synchronously in a variety of tissues, including the intestinal tract, at 13 dpi. In contrast, #64 production patterns in different tissues were not synchronous. Among #64-infected monkeys at 6 dpi, virus production was most active in the jejunum lamina propria lymphocytes (LPL) of MM390 (166 IVPCs/ 10^6 cells). At 13 dpi, interestingly, mesenteric LN became the center of virus production in two of the three monkeys examined (MM372 and MM373; 259 and 160 IVPCs/ 10^6 cells). In the other monkey (MM391), the jejunum had the highest number of IVPCs, followed by the mesenteric LN. These results suggested that the virus that replicated in the jejunum spread directly into the mesenteric LN via the flow of lymphatic fluid. At 27 dpi, the thymus tissues of both monkeys examined (MM374 and MM378) exhibited the highest numbers of IVPCs. In summary, the systemic dissemination of #64 was slower than that of KS661, and it was particularly delayed in the thymus during the acute phase.

Systemic CD4⁺ cell depletion is the signature of disease induced by highly pathogenic SHIVs (7, 8, 22). We therefore compared the frequencies of CD4⁺ cells in tissues from the animals infected with KS661 and #64, in addition to those of the circulating CD4⁺ T lymphocytes. As representatives of the major virus-producing organs, the thymus, the mesenteric LN, and the jejunum were selected for examination. CD4 cell num-

bers were measured by immunohistochemistry analyses as described previously (18). Uninfected thymus tissue contained abundant CD4⁺ cells that were stained brown (Fig. 3A, panel a), while the tissue collected from the KS661-infected animal at 27 dpi harbored few such cells (Fig. 3A, panel b). #64 caused virtually no CD4⁺ cell depletion in the thymus at 27 dpi (Fig. 3A, panel c). In the mesenteric LN of uninfected monkeys, CD4⁺ cells were found in the paracortical region (Fig. 3A, panel d). KS661 depleted CD4⁺ cells in this area (Fig. 3A, panel e). Unlike KS661, #64 did not reduce the level of CD4⁺ cells (Fig. 3A, panel f). The jejunum samples from uninfected animals contained CD4⁺ cells in the lamina propria and follicles of gut-associated lymphatic tissues (Fig. 3A, panel g). KS661 depleted CD4⁺ cells in these tissues, too (Fig. 3A, panel h). Interestingly, #64 caused CD4⁺ cell depletion in the small intestine comparable to that caused by KS661 (Fig. 3A, panel i). To confirm the observed cell reduction in the jejunum samples, we randomly selected a total of 40 fields on the tissue sections from each animal for viewing at a total magnification of $\times 400$, counted CD4⁺ cells, and averaged the numbers (Fig. 3B). The CD4⁺ cell densities in the jejunum samples from the #64-infected monkeys were significantly lower than those in the samples from uninfected animals ($P < 0.001$). This gut-specific CD4⁺ cell depletion caused by #64 prompted us to analyze the frequencies of CD4⁺ T cells (including CD4 and CD8 doubly positive cells) in a variety of tissues by flow cytometry (Fig. 3C). KS661 caused systemic CD4⁺ T-lymphocyte depletion by 27 dpi (Fig. 3C). In agreement with the immunohistochemistry results, #64 significantly depleted CD4⁺ T cells only in the jejunum intraepithelial lymphocytes and LPL ($P = 0.01$ and 0.003 , respectively) (Fig. 3C) by 27 dpi, although we examined only two #64-infected monkeys at 27 dpi. In conclusion, the CD4⁺ T-cell depletion patterns caused by KS661 and #64 were distinct, and the small intestine was the only site in which CD4⁺ T cells were significantly depleted by the moderately pathogenic #64.

Taken together, our results show that #64 disseminated more slowly and replicated less than KS661 in systemic lymphoid tissues, as well as in peripheral blood, during the acute phase of infection. We believe that because of its low rate and low levels of replication, #64 could not cause irreversible injury before the host mounted an immune reaction. As a result, CD4⁺ T cells were not completely depleted in all the tissues examined, except in the small intestine. These results suggest that the small intestine is the tissue most sensitive to virus-induced CD4⁺ T-cell depletion during the acute phase of infection. Recent reports revealed that severe acute depletions

FIG. 3. Profiles of CD4⁺ T cells in systemic lymphoid tissues during acute infection. (A) Immunohistochemical staining for CD4 molecules (stained brown) in the thymus, mesenteric (mes.) LN, and jejunum tissues of KS661- or #64-infected monkeys at 27 dpi, in addition to those of uninfected monkeys. Black scale bars, 100 μ m; white scale bars in insets of panels g, h, and i, 50 μ m. (B) Comparison of CD4⁺ cell frequencies in the jejunum LPL of uninfected and #64-infected monkeys at 27 dpi. A total of forty randomly selected fields (total magnification, $\times 400$) of at least four tissue sections per animal were used for the analysis of jejunum LPL. *P* values (determined by Student's *t* test with 95% confidence intervals) are for comparisons of each #64-infected monkey with uninfected monkeys. (C) Percentages of CD4⁺ T cells among total lymphocytes from KS661- and #64-infected monkeys. In each graph, data for 0 dpi (time points postinfection are shown along the *x* axis) are averages of percentages for seven uninfected control monkeys. Percentages of CD4⁺ T cells (including CD4 and CD8 doubly positive cells) were obtained by first gating lymphocytes and then CD3⁺ T cells with a flow cytometer. PBMC, peripheral blood mononuclear cells; Ing., inguinal; Jej., jejunum; iEL, intraepithelial lymphocytes; BM, bone marrow; Col., colon; *, $P < 0.05$ (percentage at 0 dpi versus that at 27 dpi; Student's *t* test with a 95% confidence interval).