

201124009A

厚生労働科学研究費補助金
エイズ対策研究事業

HIV 感染病態に関わる宿主因子 および免疫応答の解明

平成23年度 総括・分担研究報告書

平成24年 3 月

研究代表者 横 田 恭 子

(国立感染症研究所)

厚生労働科学研究費補助金
エイズ対策研究事業

HIV 感染病態に関わる宿主因子 および免疫応答の解明

平成23年度 総括・分担研究報告書

平成24年 3 月

研究代表者 横 田 恭 子

(国立感染症研究所)

目 次

I. 総括研究報告書

- HIV感染病態に関わる宿主因子および免疫応答の解明 1
研究代表者： 横田 恭子

II. 分担研究報告書

1. 感染病態を制御する宿主抗ウイルス蛋白とそれを標的とする HIV-1蛋白の機能解析 15
研究分担者： 徳永 研三
2. マクロファージ感染に関与する宿主側因子の同定 23
研究分担者： 石坂 幸人
3. 宿主因子による HIV 抑制法の開発研究 29
研究分担者： 小柳 義夫
4. HIV-1感染およびAIDS発症抵抗性遺伝子 *Rac2* の発現調節と作用機序 35
研究分担者： 宮澤 正顯
5. ウイルスベクターワクチン抗原に対する免疫応答とHIV感染制御 39
研究分担者： 横田 恭子
6. OX40L/OX40を介するHIV感染増殖抑制の研究 43
研究分担者： 田中 勇悦
7. HIV-1感染における調節性T細胞の意義 47
研究分担者： 神奈木 真理
8. HIV感染の病態進行に関わる免疫関連宿主因子の研究 49
研究分担者： 立川 愛
9. 北タイHIV-1 CRF01_AE感染長期未発症者におけるCTL活性の分子レベルの研究 53
研究分担者： 有吉 紅也
10. CTLの多様性と抗HIV機能の制御 61
研究分担者： 上野 貴将

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 65

I . 総括研究報告書

HIV 感染病態に関わる宿主因子および免疫応答の解明

研究代表者 横田 恭子 国立感染症研究所免疫部 第一室長

研究要旨：

二本の柱から、病態形成と治療法開発に向けて重要な知見が蓄積された。即ち、宿主因子 1) Vpu の抗 BST-2 機能補助因子候補と樹状細胞で Vpx の標的となる 8 種類の新たな候補タンパクが得られた。2) DNA 損傷を誘導する Vpr がマクロファージ感染で IN 活性非依存的なプロウイルス DNA の挿入頻度を上げ、これに関与するトポイソメラーゼ I を同定した。3) ヒト化マウス HIV-1 感染モデルを用い、BST2 分子が生体内で HIV-1 感染を負に制御し、Vpu がこれに拮抗していることを確認した。4) Rac2 ハプロタイプは人種の違いにより進化的生物学的にいくつかのグループに分かれ、イントロン 5 の高発現型 T ハプロタイプがイタリア曝露非感染者に、ハプロタイプ C2 がタイ長期未発症者に集積していた。更に、アジア人 T2 ハプロタイプは病態と強く関連した。

抗 HIV-1 免疫応答 5) ヒト化マウスの CXCR4⁺CCR5⁺CD4⁺記憶 T 細胞では R5 有意で、X4 型は naive T 細胞に高頻度に感染した。また、SLAM を標的とする MV Lenti は VSV Lenti よりも DC-T への感染伝播を強く抑制した。6) CXCR4 細胞外領域ループの立体構造を認識する A120 抗体が X4-HIV のみならず MIP-1 α 産生誘導を介して R5 HIV-1 の感染増殖を強く抑制した。7) HIV-1 感受性の CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T 細胞類似株を樹立した。8) 病態進行の早い高 VL 量の HIV 感染者では持続的な活性化が IL-2 発現低下を発端とする型特異的 T 細胞機能低下を引き起こすことが示唆された。9) CRF01_AE に感染したアジア人 HLA と Gag アミノ酸変異との関連に関する大量の情報を蓄積した。更に、新たに HLA 結合モチーフに非依存性に CTL エピトープを推定するコンピューターモデルを開発し、より精度の高い推定が可能となった。10) HIV 特異的 CTL のエピトープ交差反応性から、感染免疫は、遺伝的因子のみならず個体の感染経験に影響をうけることが示唆された。

研究分担者

徳永研三（国立感染症研究所感染病理部・主任研究官）
石坂幸人（国立国際医療センター研究所難治性疾患研究部・部長）
小柳義夫（京都大学ウイルス研究所ウイルス病態研究領域・教授）
宮澤正顯（近畿大学医学部・教授）
田中勇悦（琉球大学医学部・教授）
神奈木真理（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・免疫治療学分野・教授）
立川愛（東京大学医科学研究所先端医療研究センター感染症分野・助教）
有吉紅也（長崎大学熱帯医学研究所・教授）
上野貴将（熊本大学エイズ学研究センター・准教授）

A. 研究目的

制御不能な HIV 増殖と潜伏感染リザーバーの存在はエイズ病態形成の主たる要因である。本研究班では、ウイルス制御に関わる宿主因子の同定とその作用機構の解明、HIV 感染後の病態形成に重要な役割を果たす多様な抗 HIV 免疫応答の解析を二本の柱とし、宿主因子を利用したウイルス増殖制御と有効な抗 HIV 免疫応答誘導による感染拡大・潜伏化の阻止をめざす。

B. 研究方法

宿主因子によるウイルス制御

1) Vpu の補助因子探索のため、Vpu2/6 または Vpu Δ CT 発現レンチウイルスを HeLa 細胞に感染させて Vpu を免疫沈降した。また、Vpr を介して Vpx を粒子中にとりこんだレンチウイルスを単球由来樹状細胞(DC)に感染させ、Vpx

の存在下で減少するタンパクのプロテオーム解析を行った。これら Vpx 標的タンパク候補の cDNA 発現ベクターを Vps 発現ベクターと共に 293T 細胞にトランスフェクトした。更に、HIV-1 感染者(東大医科研・立川愛博士)由来末梢血リンパ球の RNA を用いて宿主因子の real-time RT-PCR を行った (徳永)

2) NL4-3-luc/VSV-G を用い、DNA damage 薬を加えて感染効率の変化を調べた。Alu-PCR 法あるいは NeoR 遺伝子を持つウイルスを用いたコーンアッセイ法で Integration 効率を測定し、linear-amplification-mediated (LAM)-PCR 法によってプロウイルス/ゲノム境界部の DNA 断片を増幅してシーケンスした。HIV-1_{NLAD8} を integrase(IN)阻害剤存在下(10 μM)で MDM に感染させ、IN 非依存的なウイルス複製時に DNA damage 薬を加えて HIV-1 RNA コピー数を qRT-PCR 定量した。Vpr との結合タンパクとして同定したトポイソメラーゼ I (TopoI)を siRNA で発現抑制し、組換え Vpr タンパク添加による DSB(double strand brake)誘導をコメントアッセイで評価した。TopoI タンパクを精製して GST-Vpr との in vitro における相互作用を解析した。(石坂)。

3) ヒト CD34 陽性細胞を免疫不全 NOG 新生児マウスに移植してヒト化マウスを作製し、野生型あるいは Vpu 欠損 HIV-1_{AD8} 株を腹腔より接種した。ウイルス量を RNA PCR 法により、p24 抗体 (2C2;琉球大学田中勇悦教授より分与) 染色陽性ウイルス感染細胞の CD4 や BST2 などの細胞表面抗原の変化を FACS により解析した。bi-molecular fluorescent complementation (BiFC)法による分子間相互作用定量系を用いて BST2 変異体の Vpu に対する結合量を測定し、293 細胞に変異 BST2 発現 DNA と感染性 HIV-1 DNA をコトランスフェクションして培養上清中のウイルス産生量を測定した。(小柳)。

4) イタリア暴露非感染者とタイ・ランパンコホートの長期未発症感染者において同定した Rac2 遺伝子イントロン多型の各ハプロタイプ遺伝子を、luc 遺伝子発現ベクターの多型のない Rac2 遺伝子 promoter 下に個々に挿入して luciferase 活性を比較し、更に相互の置換を行った。イントロン 5 及び 3' 非翻訳領域 (UTR) のハプロタイプについて、塩基配列決定データから人種分布を解析した。また、各ハプロタイプ間のそれぞれの単一塩基多型 (SNP) における遺伝子型頻度の比較から、Rac2 遺伝子座全体のハプロタイプ系統樹を作製した。更に、ランパンコホート HIV-1 感染者末梢血中 HIV-1 コピー数及び CD4 陽性 T リンパ球数と Rac2

遺伝子型を Bartlett 法で群間解析した。(宮澤)。
抗 HIV 免疫応答の解析

5) ヒト CD34 陽性細胞を免疫不全 NOJ マウスに移植してヒト化マウスを作製し、異なる蛍光を発する組換え HIV-1_{NL-E} (X4)あるいは HIV-1_{NLAD8-D} (R5)を同時感染させて感染細胞の分布や分化・活性化度を FACS 解析した。また、野生型麻疹ウイルス(MV) envelope に被覆したレンチウイルスベクター(Lenti)を作製し、健康人の未刺激 T 細胞や LPS で成熟化させた SLAM 陽性 DC での遺伝子導入効率を VSV-G 被覆 Lenti と比較した。更に、MV 被覆あるいは VSV-G 被覆した shNef366 発現 HIV 抑制性 Lenti を DC に感染させて翌日 HIV-1_{NLAD8-D} を感染させ、アロ CD4 陽性 T 細胞と共培養した後 5 日目の感染細胞を FACS 解析した (横田)。

6) PBMC を固相化抗 CD3 抗体で活性化し、低濃度の R5 型(JR-FL)あるいは X4 型(NL4-3) HIV-1 を感染させ、CXCR4 単クローン抗体を加えて 37° C で培養した。培養上清中の p24 抗原を ELISA で HIV-1 の増殖を、細胞内 p24 染色して FACS 用細胞計測ビーズで感染細胞数を測定した。サイトカイン定量や β ケモカインに対する阻止抗体は市販品を用いた(田中)。

7)健康人 PBMC から CD4 陽性 T 細胞を分離し、CD3/CD28 および retinoic acid 刺激を加えて TGF-β と IL-2 存在下に培養した。VSV-G/HIV-1 NL43-luc を用いて luciferase 活性と細胞計測 kit により、HIV-1 への感染性を評価した (神奈木)。

8)血中 HIV 量の高い(HVL)あるいは低い(LVL)未治療と治療中 HIV 感染者の PBMC を PHA で刺激し、18 時間後の RNA 発現を網羅的に解析した。得られたいくつかのサイトカイン遺伝子について、2.5、5、18 時間刺激培養後の mRNA 発現量を real-time PCR で定量した (立川)。

9) 北タイ HIV コホート患者の HLA アリール情報を有するすべての HIV 感染者(627名)を対象に、PBMC の DNA から gag/pol 遺伝子を PCR 増幅し、ダイレクトシーケンスによって、Gag タンパクアミノ酸配列を推定した。さらに HLA と相関する Gag アミノ酸変異を統計解析 (Fisher's Exact Test)した。コンピューター解析プログラムとして、Molecular Operating Environment® (MOE) (CCG Inc., Montreal, Canada) および MOE-ASEDock® (Ryoka System Inc., Tokyo, Japan)を用いて新たに開発したドッキングシュミレーションモデルを、ロスアラモスデータベースより 52 の最適化された HIV 特異的 CTL エピトープを含む重複ペプチドを想定して評価した (有吉)。

10) さまざまな病態にある HIV 感染者の血液検体 (国立国際医療センター・岡先生および瀧永先生との共同研究) から、Nef ペプチド特異的な CTL クローンの樹立を行った。これらクローンの T 細胞受容体遺伝子を比較し、8mer ペプチドの Positional Scanning Synthetic Combinatorial Library (PS-SCL) と称される各アミノ酸変異をほぼすべて網羅するライブラリーを用いて、各 CTL クローンの交差反応性を解析した (上野)。

(倫理面への配慮)

該当する実験は各施設の医学研究倫理委員会による倫理審査を受けて承認を得、個人情報保護法に基づいて患者情報の徹底管理下に実施される。動物実験は各施設の実験動物委員会の承認を得、動物愛護の精神に則り、動物に与える苦痛の軽減と排除に努める。

C. 研究結果

宿主因子によるウイルス制御

1) β TrCP 結合不全変異型 Vpu で特異的に検出される 67 種類のスポット、CT 欠失変異型 Vpu で特異的に検出される 21 種類のスポットを見出し、候補タンパクを同定している。今年度新たに Vpx 発現樹状細胞において分解を受ける 8 種類の候補タンパクを同定した。これら候補タンパクは HIV-2 Vpx との共発現によりタンパク分解を受けること、候補のうちの 6 つが Vpx との結合能を有していることを明らかにした。また、HIV-1 感染者 PBMC の APOBEC3G 及び BST-2 mRNA 発現レベルと病態進行に明らかな相関性は認められなかった。(徳永)。

2) ウイルス DNA のゲノムへの挿入は、DNA 損傷によって上昇し、この現象が IN 阻害剤では抑制できないこと、IN 阻害剤存在下に挿入されたプロウイルス DNA から感染性ウイルスが産生されることを示した。また、DNA 損傷を誘導する Vpr は IN 活性非依存的なプロウイルス DNA の挿入頻度を上昇させ、その現象はマクロファージへの感染において顕著であった。一方、Vpr 誘発 DNA 損傷に関与する宿主側因子として Topo-I を同定し、作用機序を解明した (石坂)。

3) Vpu 欠損 HIV-1 感染と野生型 HIV-1 感染ヒト化マウスを比較すると、感染早期の血漿ウイルス RNA レベルは Vpu 欠損ウイルス感染マウスで明らかに低下していた。この時、野生型 HIV-1 では、ウイルス感染細胞表面上の CD4 と BST2 の発現が低下し、Vpu 欠損ウイルスでは、その効果は減弱化した。また、ヒト BST2

の膜貫通領域(TM)が Vpu との結合に唯一必要な領域であること、BST2 TM の I34、L37 および L41 が Vpu との相互作用にそれぞれ必要なアミノ酸残基で、そのアラニン置換変異体は、Vpu によるウイルス放出促進作用に抵抗性を示した。従って、これらのアミノ酸は Vpu との相互作用だけでなくその反応性の決定基である。(小柳)。

4) 曝露非感染者や長期未発症者に特徴的な *Rac2* のイントロン 5 と 3' UTR の SNPs についてハプロタイプ解析を行った結果、人類の持つ *Rac2* ハプロタイプは大きく 3 つの系統に分かれ、イタリアコホートの HIV-1 曝露非感染者に集積する高発現型ハプロタイプ T を特徴とする rs739041 が最近の分岐点を決定すること、3' UTR 多型はより以前に分岐したハプロタイプグループを決定することを示した。これらハプロタイプグループの人種間分布を比較すると、3' UTR のハプロタイプグループ B は西アフリカ、同じ分岐のハプロタイプグループ A1 と A2 はヨーロッパ人とアジア人にそれぞれ頻度が高かった。また、A1 と A2 のグループのうち、アジア人ではイントロン 5 の rs739041 遺伝子型が C であるハプロタイプがより多く、欧米人では T であるものと C であるものがほぼ拮抗していた。一方、タイの C2 ハプロタイプでは、イントロン 5 の rs4140870 が G である場合、A の場合に比べて *Rac2* 遺伝子発現が有意に高まることが判明した。更に、本来アジア人で頻度の低い T ハプロタイプには、上記の C2 ハプロタイプ同様に rs4140870[G] の遺伝子型が加わった T2 ハプロタイプが存在し、このハプロタイプ T2 を持つ者では、持たない者に比べて有意に CD4 陽性 T リンパ球数が高いことを明らかにした ($P = 0.0003$) (宮澤)。

抗 HIV 免疫応答の解析

5) ヒト化マウスに X4 型と R5 型 HIV-1 を同時に同量感染させ、脾臓の感染細胞におけるケモカイン受容体の発現を見ると、いわゆる CCR5+CD4+記憶 T 細胞分画には CD4 発現が強く抑制された R5 感染細胞が多く、X4 感染細胞は少なかった。この CCR5+CD4+記憶 T 細胞における R5 感染優位性は統計学的にも有意であった ($P < 0.05$)。従って、*in vitro* と *in vivo* の両方の解析において、CCR5+CD4+記憶 T 細胞には R5 型 HIV-1 が選択的に感染を成立させる細胞内機構が存在することが明らかとなった。また、X4 感染細胞の多くは naïve であるものの、EGFP 陽性細胞の蛍光強度から判断して細

胞あたりの X4 ウイルス産生量は memory 細胞で高かった。更に、未刺激 T 細胞や SLAM 陽性成熟 DC において MV Lenti は VSV Lenti より遺伝子導入効率が良く、抗 HIV-1 shRNA 発現 MV Lenti に感染した DC を介した CD4+T 細胞への HIV-1 感染伝播において VSV より抑制効果が強いことを示した。(横田)。

6) それぞれ異なるエピトープを認識するヒト CXCR4 に対する 3 種類の単クローン抗体(ラット IgG)のうち、A120 抗体は CXCR4 細胞外領域のループ(ECL) 1 および ECL-2 からなる立体構造依存性エピトープ、A145 抗体は N 末領域、A80 抗体は ECL-3 領域を認識する。中でも A120 抗体は X4-HIV のみならず R5 HIV-1 の感染増殖を強く抑制し、これは産生誘導された MIP-1 α による効果であることを明らかにした。(田中)。

7) 健常人 PBMC から CD4 陽性 T 細胞を分離し、CD3/CD28 および retinoic acid 刺激を加え、TGF- β と IL-2 存在下に長期培養して誘導した CD4+CD25+ Foxp3+T 細胞株は regulatory T 細胞に類似し、HIV-1 に感染した(神奈木)。

8) HVL 群、LVL 群、健常人群各 5 名ずつの PBMC を刺激して 18 時間後に発現する 9000 遺伝子 mRNA の網羅的解析の結果、HVL 群—LVL 群間で発現量に有意差のあった遺伝子は 163 個、HVL 群と健常人群で有意差のあった遺伝子は 246 個あり、55 個が重複していた。この 55 遺伝子と β -chemokine をコードする各遺伝子の mRNA 定量解析を行ったところ、IFN- γ 、granzyme B、IL-10、IL-17F はマイクロアレイの結果と同様に HVL 群で有意に発現量が低かったのに対して β -chemokine は群間で全く差が見られなかった。これらの遺伝子はいずれも IL-2 が発現制御に関連していることから IL-2 遺伝子の解析を行ったところ、HVL 群で発現が低い傾向が見られた。(立川)。

9) これまでに 291 の HLA と Gag アミノ酸変異との相関を発見した。情報量を飛躍的に(約 5 倍)増やすことにより、4 か所において B*3505 との新たな相関が認められた。更に、CRF01_AE ウイルスと CTL 免疫圧との相関に関する gag 遺伝子シーケンス情報量を量的および質的に飛躍的に拡大させ、HLA 結合モチーフ非依存性に CTL エピトープを推定する新たなドッキングシミュレーションモデルを開発した。そのエピトープ推定正解率は、公開されている HLA 結合モチーフ依存性の推定プログラムと比べて遜色なかった(有吉)。

10) 樹立した Nef 特異的 CTL クローンの T 細

胞受容体遺伝子は極めて高い共通性を示した。これら CTL クローンの交差反応性を解析した結果、アミノ酸変異に対しては、異なった応答性を示したが、総じて野生型配列が最も反応性が高かった。交差反応するペプチド (IPVRAWSY) に対して、類似アミノ酸配列を持つペプチドの検索を行ったところ、インフルエンザウイルスのヘマグルチニンの LPARWSY 配列は、もとの HIV-1 Nef 由来の配列 (VPLRPMTY) に比較すると 10~100 倍程度弱いものの、非常に明確な交差反応性を示すことが明らかとなった(上野)。

D. 考察

各分担研究者の関連する成果をまとめて以下に討議する。

1) ヒト化マウスモデルにおいて HIV-1 の感染を増強する Vpu の効果が示され、Vpu と相互作用する BST-2 の重要なアミノ酸が明らかにされた。Vpu の抗 BST-2 活性を補助している新たな細胞内タンパクが同定されれば、治療標的候補が発見できるかもしれない。また、DC での HIV-1 感染を制御する因子を明らかにするため、HIV-2 の感染を高めている Vpx に注目し、Vpx の存在下に DC で減少している新たなタンパクが同定された。この様な宿主タンパクを HIV-1 感染の制御に応用できるかどうかは更なる解析が必要である。

2) DNA 損傷は IN 非依存的な感染において重要な役割を果たし、Vpr と相互作用する細胞タンパクとして Topo I の DNA 損傷誘発機構が明らかにされた。一方、マクロファージにおいては、IN 非依存的な integration が全体の約 1% の頻度で生じていると試算されている。しかしながら、Vpr による DNA 損傷誘発と IN 非依存的な integration を介したマクロファージ感染との直接的な関係はまだ明らかではない。

3) イタリアやタイのコホート研究では自然抵抗性を示す宿主の Rac2 や HLA に関するゲノム情報と宿主免疫機能の解析情報を更に蓄積することにより、新たな治療法やワクチンデザインの方向性が示されつつある。また、日本人慢性 HIV-1 感染者の体内ウイルス量に依存した免疫細胞機能不全の解析により IL-2 産生調節機構の障害が要因として絞られてきた。この様な解析から、慢性的 HIV 感染においてエイズ発症を阻止するために有益な情報が得られることが期待される。

4) ヒト化マウスにおける HIV-1 感染モデルは、変異ウイルスを用いたウイルス学的な観点か

らのみならず、特に感染細胞の動態や分布を介した病態形成に重要な要因に関する知見が得られる。古くから知られる感染初期の R5 優位性の現象も、ヒト化マウスにおける CCR5+CD4+記憶 T 細胞の特殊性という点で *in vitro* の実験結果と一致しており、マウス体内で成立する HIV-1 感染細胞の潜伏化について解析するモデルとしても有用である。また、活性化した T 細胞における β -chemokine の強力な誘導法の開発は、R5 型 HIV-1 が主体となって形成される病態の改善に有効であることが期待されるが、ヒト化マウスでの検証が必要となる。

5) CTL クローンの様々な交差反応性を解析した結果、もとの Nef 由来の配列に極めて強い応答を示し、このような dominant epitope の存在は、わずかなアミノ酸の違い (たとえば CTL 逃避変異) に対して活性を失いやすいと考えられた。従って、ワクチン免疫では、ウイルスの逃避を考慮し、最初から交差反応性の高い subdominant エピトープに対する CTL を誘導する手法を開発した方が宿主には有利かもしれない。

E. 結論

二つの柱から、病態形成と治療法開発に向けていくつかの重要な知見が蓄積された。即ち 宿主因子の解析では、

1) Vpu の抗 BST-2 機能に必要な補助因子候補 67 種類はプロテオーム解析中であるが、Vpx 取込み型/Vpx 発現レンチベクターウイルス粒子を用いて樹状細胞で Vpx の標的となる 8 種類の新たな候補タンパクを得、Vpx によるそれらタンパクの発現と分解を確認した。HIV/AIDS 患者由来末梢血リンパ球の APOBEC3G 及び BST-2 の mRNA 発現レベルと CD4 数または血中ウイルス量との間に相関はなかった。

2) ウイルス DNA のゲノムへの挿入効率は DNA 損傷によって IN 非依存的に高まり、この条件下に挿入されたプロウイルス DNA より感染性を有するウイルスが産生された。DNA 損傷を誘導する Vpr は特にマクロファージ感染で IN 活性非依存的なプロウイルス DNA の挿入頻度を上昇させた。この Vpr 誘発 DNA 損傷に関与する宿主側因子として Topo-I を同定して作用機構を明らかにした。

3) ヒト化マウスを HIV-1 感染モデルに応用し、BST2 分子が生体内においても HIV-1 感染に負に制御していること、そして、この作用は Vpu

の拮抗作用により解除されることが確認された。

4) Rac2 ハプロタイプは人種の違いにより進化生物学的にいくつかのグループに分かれた。ヨーロッパ人では、イントロン 5 の T ハプロタイプを含むグループ A1 と A2 はほぼ同頻度で、イントロン 5 の高発現型 T ハプロタイプが曝露非感染者に有意に集積していた。アジア人ではグループ A1 の頻度は低く遺伝子型が C であるハプロタイプグループ A2 の頻度が高いが、この A2 グループで G を持つことで高発現型となったイントロン 5 のハプロタイプ C2 が長期未発症者に集積していた。更に、アジア人には稀な A1 グループのイントロン 5 ハプロタイプ T に G の加わった T2 ハプロタイプが HIV-1 感染者における CD4 陽性 T リンパ球数高値と強く相関した。

抗 HIV-1 免疫応答に関しては、

6) ヒト化マウスに同時に感染した X4 型と R5 型 HIV-1 の感染細胞を解析すると、CXCR4⁺CCR5⁺CD4⁺記憶 T 細胞では R5 有意に感染がおきていて、CD4 発現低下も強くおこるのに対し、X4 型は naive T 細胞に高頻度に感染するが、そのウイルス発現は記憶 T 細胞で強かった。また、SLAM を標的とする MV Lenti により DC に導入した HIV 抑制性 Lenti は VSV Lenti よりも T 細胞への感染伝播を強く抑制した。

7) 活性化 PBMC において CXCR4 細胞外領域のループ (ECL) 1 および ECL-2 からなる立体構造依存性エピトープを認識する A120 抗体は、X4-HIV のみならず MIP-1 α 産生誘導を介して R5 HIV-1 の感染増殖を強く抑制した。

8) 健常人 PBMC に CD3/CD28 および retinoic acid 刺激を加えて TGF- β と IL-2 存在下に長期培養し、HIV-1 感受性の CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T 細胞類似株を得た。

9) 病態進行の早い高 VL 量の HIV 感染者では IL-2 の顕著な発現低下が二次的に IFN- γ 、 β -chemokine、IL-17 産生を低下させていることが明らかとなった。このことはメモリー T 細胞の活性化・疲弊状態と関連しており、HIV による持続的な活性化が IL-2 発現低下を発端とする型特異的 T 細胞機能低下を引き起こしていることが示唆された。

9) HLA と Gag アミノ酸変異との相関に関して量的・質的に飛躍的に増やえた情報は、CRF01_AE に感染したアジア人における良質の CTL 免疫反応を分子レベルで解明するため大いに役立つことが期待できる。また、新た

に開発した HLA 結合モチーフに非依存性に CTL エピトープを推定するドッキングシミュレーションモデルと公開プログラムを組み合わせることにより、より精度の高い推定が可能となった。

10) HIV 特異的 CTL が、インフルエンザ由来抗原に交差反応性を示した。従って、免疫応答は、遺伝的な因子だけでなく、個体ごとの感染症に関する経験・履歴として次の感染に対して影響をうけることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Terahara, K., Yamamoto, T., Mitsuki, Y-y, Shibusawa, K., Ishige, M., Mizukoshi, F., Kobayashi, K., and Tsunetsugu-Yokota, Y.: Fluorescent reporter signals, EGFP and DsRed, encoded in HIV-1 facilitate the detection of productively infected cells and cell-associated viral replication levels. *Front. Microbiol.*, 2:1-11, 2012.
- 2) Fujii1, H, Ato, M., Takahashi, Y., Otake, K., Hashimoto, S-I., Kaji, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Fujita, M., Adachi, A., Nakayama, T., Taniguchi, M., Koyasu, S., and Takemori, T.: HIV-Nef impairs multiple T cell functions in antigen- specific immune response in mice. *Int. Immunol.* 23:433-441, 2011.
- 3) Salaun, B., Yamamoto, T., Bardran, B., Tsunetsugu-Yokota, Y., Roux, A., Baitsch, L., Rouas, R., Fayyad-Kazan, H., Baumgaertner, P., Devevre, E., Ramesh, A., Braun, M., Speiser, D., Autran, B., Martiat, P., Appay, V., and Romero, P.: Differentiation associated regulation of microRNA expression in vivo in human CD8+ T cell subsets. *J. Transl. Med.* 9:44-52, 2011.
- 4) Takeuchi, K., Nagata, N., Kato, S., Ami, Y., Suzaki, Y., Suzuki, T., Sato, Y., Tsunetsugu-Yokota, Y., Mori, K., Nguyen, V. N., Kimura, H., and Nagata, K. (2012). Wild-type measles virus with the hemagglutinin protein of the Edmonston vaccine strain retains wild-type tropism in macaques. *J. Virol.* in press, 2012.
- 5) Arias, J.A., Iwabu, Y., and Tokunaga, K. Structural basis for antiviral activity of BST-2/tetherin and its viral antagonisms. *Front. Microbiol.* 2: 250, 2011.
- 6) Shimura, M., Toyoda, Y., Iijima, K., Kinomoto, M, Tokunaga, K., Yoda, K., Yanagida, M., Sata, T., and Ishizaka, Y. Epigenetic displacement of HP1 from heterochromatin by HIV-1 Vpr causes premature sister chromatid separation. *J. Cell Biol.* 194(5):721-35. 2011.
- 7) Ikeda, T., Abd El Galil, K., Tokunaga, K., Maeda, K., Sata, T., Sakaguchi, N., Harada, S., Heidmann, T., and Koito, A. Intrinsic restriction activity by apolipoprotein B mRNA editing enzyme APOBEC1 against the mobility of autonomous retrotransposons. *Nucleic Acids Res.* 39: 5538-5554. 2011.
- 8) Taneichi, D., Iijima, K., Doi, A., Koyama, T., Minemoto, Y., Tokunaga, K., Shimura, M., and Ishizaka, Y. Identification of SNF2h, a Chromatin-Remodeling Factor, as a Novel Binding Protein of Vpr of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J. Neuroimmune Pharm.* 6:177-87. 2011.
- 9) Sapsutthipas, S., Kitagawa, Y., Tokunaga, K., Ikuta, K., and Kameoka, M. Viral factors involved in adapter-related protein complex 2 alpha 1 subunit-mediated regulation of human immunodeficiency virus type 1 replication. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 42:311-319. 2011.
- 10) Kobayashi, T., Ode, H., Yoshida, T., Sato, K., Gee, P., Yamamoto, S.P., Ebina, H., Strebel, K., Sato, H., and Koyanagi, Y.: Identification of amino acids in the human tetherin transmembrane domain responsible for HIV-1 Vpu interaction and susceptibility. *J. Virol.* 85:932-945, 2011.
- 11) Sato, K., Misawa, N., Nie, C., Satou, Y., Iwakiri, D., Matsuoka, M., Takahashi, R., Kuzushima, K., Ito, M., Takada, K., and Koyanagi, Y.: A novel animal model of Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in humanized mice. *Blood*, 117:5663-5673, 2011.
- 12) Sato, K., and Koyanagi, Y.: The mouse is out of the bag: insights and perspectives on HIV-1-infected humanized mouse models. *Exp. Biol. Med.* 236:977-985, 2011.

- 13) Gee, P., Ando, Y., Kitayama, H., Yamamoto, S.P., Kanemura, Y., Ebina, H., Kawaguchi, Y., and Koyanagi, Y.: APOBEC1-mediated editing and attenuation of herpes simplex virus 1 DNA indicate that neurons have an antiviral role during herpes simplex encephalitis. *J. Virol.* 85:9726-9736, 2011.
- 14) Watanabe, T., Urano, E., Miyauchi, K., Ichikawa, R., Hamatake, M., Misawa, N., Sato, K., Ebina, H., Koyanagi, Y., and Komano, J.: The hematopoietic cell-specific Rho GTPase inhibitor ARHGDI/D4GDI limits HIV-1 replication. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 2011 Nov 22.
- 15) Sato, K., Misawa, N., Fukuhara, M., Iwami, S., An, D.S., Ito, M., and Koyanagi, Y.: Vpu augments the initial burst phase of HIV-1 propagation and downregulates BST2 and CD4 in humanized mice. *J. Virol.* in press.
- 16) Li, J., Y. Hakata, E. Takeda, Q. Liu, Y. Iwatani, C. A. Kozak, and M. Miyazawa. Two genetic determinants acquired late in Mus evolution regulate the inclusion of exon 5, which alters mouse APOBEC3 translation efficiency. *PLoS Pathog.* 8: e1002478, 2012.
- 17) Miyazawa, M., S. Takamura, S. Tsuji-Kawahara, E. Kajiwara, T. Chikaishi, and M. Kato. A hole in the T-cell repertoire induced after retroviral infection of immunocompetent adult mice. *Retrovirology* 8 (Suppl. 2):O30, 2011.
- 18) Sironi, M., F. R. Guerini, C. Agliardi, M. Biasin, R. Cagliani, M. Fumagalli, D. Caputo, A. Cassinotti, S. Ardizzone, M. Zanzottera, E. Bolognesi, S. Riva, Y. Kanari, M. Miyazawa, and M. Clerici. An evolutionary analysis of *RAC2* identifies haplotypes associated with human autoimmune diseases. *Mol. Biol. Evol.* 28: 3319-3329, 2011.
- 19) Ogawa, T., S. Tsuji-Kawahara, T. Yuasa, S. Kinoshita, T. Chikaishi, S. Takamura, H. Matsumura, T. Seya, T. Saga, and M. Miyazawa. Natural killer cells recognize Friend retrovirus-infected erythroid progenitor cells through NKG2D-RAE-1 interactions in vivo. *J. Virol.* 85: 5423-5435, 2011.
- 20) Hayasaka, N., K. Aoki, S. Kinoshita, S. Yamaguchi, J. K. Wakefield, S. Tsuji-Kawahara, K. Horikawa, H. Ikegami, S. Wakana, T. Murakami, R. Ramabhadran, M. Miyazawa, and S. Shibata. Attenuated food anticipatory activity and abnormal circadian locomotor rhythms in Rgs16 knockdown mice. *PLoS ONE* 6: e17655, 2011.
- 21) Adachi T, Tanaka R, Kodama A, Saito M, Takahashi Y, Ansari AA, Tanaka Y. Identification of a unique CXCR4 epitope whose ligation inhibits infection by both CXCR4 and CCR5 tropic human immunodeficiency type-I viruses. *Retrovirology.* 8:84. 2011.
- 22) Tsuruno C, Okuma K, Takahashi Y, Tanaka R, Tanaka Y. Takahama Y, Hamaguchi Y, Hamaguchi I, Yamaguchi K. A recombinant vesicular stomatitis virus encoding HIV-1 receptors and human OX40 ligand efficiently eliminates HIV-1-infected CD4-positive T cells expressing OX40. *Hum Immunol.* 72(4):295-304, 2011.
- 23) Nakayama K, Nakamura H, Koga M, Koibuchi T, Fujii T, Miura T, Iwamoto A, Kawana-Tachikawa A. Imbalanced Production of Cytokines by T Cells Associates with the Activation/Exhaustion Status of Memory T Cells in Chronic HIV Type 1 Infection. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2011 *in press*
- 24) Nakamura H, Miyazaki N, Hosoya N, Koga M, Odawara T, Kikuchi T, Koibuchi T, Kawana-Tachikawa A, Fujii T, Miura T, Iwamoto A. Long-term successful control of super-multidrug-resistant human immunodeficiency virus type 1 infection by a novel combination therapy of raltegravir, etravirine, and boosted-darunavir. *J Infect Chemother.* 17, 105-10. 2011.
- 25) Mori M, Sriwanthana B, Wichukchinda N, Boonthimat C, Tsuchiya N, Miura T, Pathipvanich P, Ariyoshi K, and Sawanpanyalert P.: Unique CRF01_AE Gag CTL Epitopes Associated with Lower HIV-Viral Load and Delayed Disease Progression in a Cohort of HIV-Infected Thais. *PLoS One* 6: e22680, 2011.
- 26) Rojanawiwat A, Tsuchiya N, Pathipvanich P,

- Pumpradit W, Schmidt WP, Honda S, Auwanit W, Sawanpanyalert P, Ariyoshi K.: Impact of the National Access to Antiretroviral Program on the incidence of opportunistic infections in Thailand. *International Health* 3: 101-107, 2011.
- 27) Philip Mwimanzi, Zafrul Hasan, Ranya Hassan, Shinya Suzu, Masafumi Takiguchi and Takamasa Ueno: Effects of naturally-arising HIV Nef mutations on cytotoxic T lymphocyte recognition and Nef's functionality in primary macrophages. *Retrovirology* 8:50, 2011.
- 28) Nopporn Chutiwitoonchai, Masateru Hiyoshi, Philip Mwimanzi, Takamasa Ueno, Akio Adachi, Hirotaka Ode, Hironori Sato, Oliver T. Fackler, Seiji Okada, Shinya Suzu : The identification of a small molecule compound that reduces HIV-1 Nef-mediated viral infectivity enhancement. *PLoS ONE* 6(11): e27696, 2011.
2. 学会発表
- 1) Mitsuki, Y-y., Shibusawa, K., Terahara, K., Kobayashi, K., Moriakwa, Y., Takeda, M., Yanagi, Y., and Tsunetsugu-Yokota, Y.: HIV-1 infection enhances the susceptibility of T cells to measles virus infection by upregulating signaling lymphocyte activation molecule (SLAM) expression. International Union of Microbio-logical Societies 2011 Congress XV International Congress of Virology. September, 2011, Sapporo.
- 2) Tsunetsugu-Yokota, Y.: HIV-1 transmission through immunological synapse and T-cell activation: How can we control virus replication? US-Japan AIDS Panel Meeting, September 21-23, 2011, Atlanta, USA.
- 3) Tsunetsugu-Yokota, Y., Ishige, M., Mitsuki, Y-y., Shibusawa, K., Okada, S., and Terahara, K.: Impact of selective infection and expansion of CCR5-utilizing HIV-1 in CD4+CXCR4^{high} CCR5+ memory T cells in humanized mouse model. 8th German-Japanese HIV-Symposium, November 21-22, 2011, Bochum, Germany.
- 4) 渋谷謙太郎、寺原和孝、石毛真行、光木裕也、横田 (恒次) 恭子。麻疹ウイルス偽型化HIV-1抑制性shRNA発現レンチウイルスベクターのヒト化マウスにおける *in vivo* 評価。第25回日本エイズ学会学術集会・総会、12月、東京。
- 5) 石毛真行、寺原和孝、渋谷謙太郎、光木裕也、池野翔太、小林和夫、岡田誠治、横田 (恒次) 恭子。R5およびX4 HIV-1同時感染ヒト化マウスモデルによる感染早期のウイルス優位性の解析。第25回日本エイズ学会学術集会・総会、12月、東京。
- 6) Nii-Trebi, N., Kinomoto, M., Brandful, J., Barnor, J., Tatsumi, M., Sata, T., Ampofo, W., Osei-Kwasi, M., Tokunaga, K.: Infectivity of HIV-1 Subtypes Isolated from Ghanaian Patients. WSU Joint International Conference. East London, 2011.9, South Africa.
- 7) Takayoshi Koyama, Kenzo Tokunaga, Tetsutaro Sata, Yukihiro Ishizaka: HIV-1 DNA integration into host chromosomal double-strand break sites is not attenuated by raltegravir, an integrase inhibitor. IUMS 2011, 2011.9, Sapporo.
- 8) 藤田英明、岩部幸枝、佐多徹太郎、徳永研三、田中嘉孝：膜結合型ユビキチンリガーゼ MARCH8 によるトランスフェリン受容体のユビキチン化およびダウンレギュレーションの分子機構。第 84 回日本生化学会大会、2011. 9、京都。
- 9) Yukie Iwabu, Juan F. Arias, Masaru Yokoyama, Hironori Sato, Tetsutaro Sata and Kenzo Tokunaga: Homodimerization of APOBEC3G is required for inhibition of Alu retrotransposition. *Frontiers of Retrovirology Conference 2011*, 2011. 10, Amsterdam, The Netherlands.
- 10) Takayoshi Koyama, Kenzo Tokunaga, Yukihiro Ishizaka: HIV-1 integraion into host DNA double-strand break sites is the majority event in integrase inhibitor-treated cells. 第 34 回日本分子生物学会、2011. 12、横浜。
- 11) Koyama, T., Tokunaga, K., Sata, T., Ishizaka, Y.: HIV-1 DNA integration into host chromosomal double-strand break sites is not attenuated by raltegravir, an integrase inhibitor. IUMS 2011, September, 2011, Sapporo.
- 12) Koyama, T., Tokunaga, K., Ishizaka, Y.: HIV-1 integraion into host DNA double-strand break sites is the majority event in integrase inhibitor-treated cells. 第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月、横浜。
- 13) 飯島健太、奥平准之、田村政人、石坂幸人

- DNA 二重鎖切断による LINE-1 レトロトランスポジション誘導機構. 2011, 12/1、日本分子生物学会 横浜.
- 14) Ishizaka, Y., Okudaira, N., Oka, S., Okamura, T.: Neurocognitive disorder by Vpr-induced retrotransposition of LINE-1. The 12th Kumamoto AIDS seminar GCOE Joint International symposium. October, 2011. Kumamoto.
 - 15) 石坂幸人: HIV-1 アクセサリー蛋白質 Vpr の陰と陽. 第 13 回白馬シンポジウム. 5 月、2011、札幌.
 - 16) Shimura, M., Toyoda, Y., Iijima, K., Kinomoto, M., Tokunaga, K., Yoda, K., Yanagida, M., Sata, T. and Ishizaka, Y.: Epigenetic displacement of HP1 from heterochromatin by HIV-1 Vpr causes premature sister chromatid separation. The 6th German-Japanese HIV-1 Symposium. November, 2011, Bohoem.
 - 17) Ishizaka, Y., Okudaira, N., Oka, S., Okamura, T.: HIV-1 associated neurocognitive disorder by retrotransposition by Vpr. The 6th German-Japanese HIV-1 Symposium. November, 2011, Bohoem.
 - 18) Matsunaga, A., Shimura, M., Mochizuki, M., Ishizaka, Y., Hagiwara, S.: DNA methylation profiling in HIV-1 associated lymphomas. The 6th German-Japanese HIV-1 Symposium. November, 2011, Bohoem.
 - 19) Sato, K., Misawa, N., and Koyanagi, Y.: Dynamics of human-specific virus infection in humanized mice. T lymphocyte dynamics in acute and chronic viral infection – Infectious Disease Research Network, 2011 年 1 月, London, England.
 - 20) Gee, P., and Koyanagi, Y.: P202 binds to retrovirus preintegration complex and attenuates retrovirus infection when fused with an inflammasome pyrin binding domain. 18th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI), 2011 年 2 月, Boston.
 - 21) Kobayashi, T., Ode, H., Yoshida, T., Sato, K., Gee, P., Yamamoto, S.P., Ebina, H., Strebel, K., Sato, H., and Koyanagi, Y.: Mutagenesis and Molecular Modeling Studies Reveal Structural Insights into Human Tetherin Recognition by HIV-1 Vpu. 18th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI), poster, 2011 年 2 月, Boston.
 - 22) Iwami, S., Sato, K., Misawa, N., Kobayashi, T., De Boer, R., and Koyanagi, Y.: DNA labeling system by peripheral blood of humanized mouse. 1st International Symposium on Innovative Mathematical Modeling, P-215, 2011 年 3 月, Tokyo.
 - 23) 小柳義夫, 細胞性 HIV 抑制因子. 第 2 回 ナノバイオ創薬研究シンポジウム, 2011 年 3 月、京都.
 - 24) Koyanagi, Y.: Intracellular anti-HIV factor, International Symposium. Virus, host and diseases. 2011 年 3 月, Kyoto.
 - 25) Sato K., Misawa N., Satou Y., Matsuoka M., Ito M. and Koyanagi Y.: Efficient HIV-1 infection in regulatory CD4+ lymphocytes during acute phase in humanized mice. Retroviruses Meeting Cold Spring Harbor, 2011 年 5 月, New York, USA.
 - 26) Yoshida, T., Shingai, M., Martin, M.A., Kobayashi, T., Koyanagi, Y., and Strebel, K.: Discrepancy of the potential of Vpu to interact and counteract BST-2. Retroviruses Meeting Cold Spring Harbor, 2011 年 5 月, New York, USA.
 - 27) 佐藤佳, 三沢尚子, 小柳義夫. ヒト化マウスモデルを用いた HIV-1 感染病態の解析, 第 25 回近畿エイズ研究会, 2011 年 6 月、京都.
 - 28) Ebina, H., Kanemura, Y., Suzuki, Y., Urata, K., and Koyanagi, Y.: Integrase independent retroviral cDNA integration, which is indefensible with integrase inhibitor. 第 6 回 研究所ネットワーク国際シンポジウム, 2011 年 6 月、東京.
 - 29) 小柳義夫. 小さなウイルスがなぜ病気を起こすのか. 第 10 回みちのくウイルス塾, 2011 年 7 月、仙台.
 - 30) 小柳義夫, Peter Gee, 川口寧, 北山裕子, 安藤良徳. APOBEC1 による HSV-1 DNA の editing と抗ウイルス効果. 第 18 回ヘルペス感染症フォーラム (JHIF)、2011 年 8 月、札幌.
 - 31) Iwami, S., Sato, K., and Koyanagi, Y.: Mathematical modeling and in vitro experiments in virology. Korean Society for Mathematical Biology 2011 annual meeting, Ulsan, 2011 年 8 月, Korea.
 - 32) Watanabe, T., Urano, E., Miyauchi, K., Ichikawa, R., Hamatake, M., Sato, K.,

- Hirota, E., Koyanagi, Y., and Komanao, J.: The hematopoietic cell-specific Rho GTPase inhibitor ARHGDI/D4GDI limits HIV-1 replication. XV International Congress of Virology, 2011年9月, 札幌.
- 33) Sato K., Misawa N., Ito M. and Koyanagi Y. HIV-1 Vpr protein accelerates HIV-1 replication during acute phase in vivo. XV International Congress of Virology, 2011年9月, 札幌.
- 34) Ebina, H., Kanemura, Y., Suzuki, Y., Urata, K., and Koyanagi, Y. HIV-1 cDNA integration and persistent infection by DNA repair system. XV International Congress of Virology, 2011年9月, 札幌.
- 35) Koyanagi, Y., and Sato K.: Depletion of regulatory T cells in acute phase may enforce HIV systemic infection. 12th Kumamoto AIDS Seminar-GCOE Joint International Symposium, 2011年10月, 熊本.
- 36) Gee P., Okamoto S., Fukuhara M., Kanemura Y., Ebina H. and Koyanagi Y. Biochemical characterization of the HIV-1 restriction factor SAMHD1. 12th Kumamoto AIDS Seminar-GCOE Joint International Symposium, 2011年10月, 熊本.
- 37) Sato, K., Misawa, N., Ito, M., and Koyanagi, Y.: HIV-1 Vpr protein accelerates HIV-1 replication during acute phase in vivo. 3rd International Workshop on Humanized mice, 2011年10月, Pittsburgh, USA.
- 38) Sato K., Misawa N., Nie C., Satou Y., Matsuoka M., Ito M. and Koyanagi Y. Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in humanized mice. 3rd International Workshop on Humanized mice, 2011年10月, Pittsburgh, USA.
- 39) Koyanagi, Y.: Humanized mouse models for HIV-1 and EBV infection. 2011 International Symposium on Infectious Disease and Signal Transduction, 2011年11月, 台南, 台湾.
- 40) Gee, P., Ando, Y., Kitayama, H., Yamamoto, S.P., Kanemura, Y., Ebina, H., Kawaguchi, Y., and Koyanagi Y.: APOBEC1-mediated editing and attenuation of HSV-1 DNA implicates an antiviral role in neurons during encephalitis. 第40回日本免疫学会, 2011年11月, 幕張.
- 41) 佐藤佳, 三沢尚子, 佐藤賢文, 松岡雅雄, 伊藤守, 小柳義夫.: 急性感染期のHIV-1増殖における制御性T細胞とVprの寄与. 第25回日本エイズ学会, WS1-006, , 2011年12月, 東京.
- 42) 小柳義夫.: 細胞性ウイルス抑制因子:ヘルペスウイルスとレトロウイルスの共通メカニズム 平成23年度北海道大学遺伝子病制御研究所研究集会 「感染、免疫、炎症、発癌」、2011年12月, 札幌.
- 43) Ebina H., Urata K., Kanemura Y. and Koyanagi Y. Construction of labeling method for nucleosome-formed viral DNA. 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月, 横浜.
- 44) Ebina, H., Kanemura, Y., Suzuki, Y., Urata, K., Misawa, N., and Koyanagi, Y. Integrase-independent HIV-1 infection is augmented under condition of DNA damage and produces a viral reservoir. 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月, 横浜.
- 45) Miyazawa, M., S. Takamura, S. Tsuji-Kawahara, E. Kajiwara, T. Chikaishi, and M. Kato. A hole in the T-cell repertoire induced after retroviral infection of immunocompetent adult mice. *Frontiers of Retrovirology* 2011. Oct. 3-5, 2011, Amsterdam, The Netherlands.
- 46) Miyazawa, M., S. Tsuji-Kawahara, S. Kinoshita, T. Chikaishi, H. Matsukuma and H. Kawabata. Host immune responses determine integration of either F-MuLV alone or F-MuLV plus SFFV in Friend virus leukemogenesis. The 23rd Workshop on Retroviral Pathogenesis. Nov. 2-5, Montpellier, France.
- 47) Miyazawa, M., S. Tsuji-Kawahara, Y. Hakata, J. Li, E. Takeda, and C. Ishihara. Functional consequences of mouse APOBEC3 gene polymorphisms and multiple genetic factors that influence the production of virus-neutralizing antibodies in Friend virus-infected mice. The 23rd Workshop on Retroviral Pathogenesis. Nov. 2-5, Montpellier, France.
- 48) Kato, M., S. Tsuji-Kawahara, S. Kinoshita, T. Chikaishi, S. Takamura, and M. Miyazawa. Production of virus-neutralizing antibodies and protection against lethal retroviral infection in AID-deficient mice. 第40回日本免疫学会学術集会. 平成23年11月

- 月 27 ~ 29 日, 千葉.
- 49) Takamura, S., E. Kajiwara, S. Tsuji-Kawahara, T. Chikaishi, M. Kato, S. Kinoshita, M. Itoi, N. Sakaguchi, and M. Miyazawa. Infection of thymus with murine retrovirus induces virus-specific central tolerance that prevents dynamic differentiation of functional memory CD8⁺ T cells. 第 40 回日本免疫学会学術集会. 平成 23 年 11 月 27~29 日, 千葉.
 - 50) 田中勇悦, 児玉晃, 西澤雅子, 杉浦互, 田中礼子. CXCR4 架橋による CXCR4 および CCR5 親和性 HIV-1 の感染制御. 第 25 回日本エイズ学会学術集会. 2011 年 12 月, 東京.
 - 51) 大隈和, 深川耕次, 高馬卓也, 渡辺哲, 田中勇悦, 山本直樹, 浜口功. ヒト化 NOG マウスを用いた R5 HIV-1 標的組換え VSV の薬効性評価. 第 25 回日本エイズ学会学術集会. 2011 年 12 月, 東京.
 - 52) 久保嘉直, 神山陽香, 鹿子木桂, 田中勇悦, 林 日出喜, 松山俊文, 佐藤裕徳, 山本直樹. エンドソームに局在する宿主自然免疫因子による HIV-1 増殖抑制. 第 25 回日本エイズ学会学術集会. 2011 年 12 月, 東京.
 - 53) Tanaka Y. Epitope-specific Ligation of Human CXCR4 Blocks Infection of Activated Peripheral Blood Mononuclear Cells with Both CCR5- and CXCR4-tropic HIV-1. US-Japan AIDS Panel Meeting – BTS – Atlanta. 2011.9.22. 米国 ジョージア州 アトランタ.
 - 54) Takahashi Y, Villinger F, Ansari AA, Tanaka Y. Inhibition of X4-, R5- and R5X4-tropic HIV-1 and SHIV by a novel anti-CXCR4 monoclonal antibody in vitro. The 29th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS. 2011.10.26. 米国 ワシントン州 シアトル.
 - 55) Ahmed N, Hayashi T, Hasegawa A, Furukawa H, Okamura N, Chida T, Masuda T, and Kannagi M. Suppression of HIV-1 replication in macrophages by commensal bacteria through innate immune response. IUMS2011 国際ウイルス学会, 2011 年 9 月, 札幌.
 - 56) 神奈木 真理. 自然免疫による HIV-1 抵抗性第 25 回 日本エイズ学会イブニングセミナー, 2011 年 11 月, 東京.
 - 57) Nomura S, Hosoya N, Kikuchi T, Koga M, Nakamura H, Koibuchi T, Fujii T, Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A, Miura T. Replication capacities of chimeric NL4-3 encoding gag-protease from modern HIV-1 isolates are significantly reduced compared to those derived from isolates in the early days of epidemic in Japan. 6th International AIDS Society Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention, July, 2011, Rome Italy.
 - 58) 立川 (川名) 愛. HIV 感染慢性期における T 細胞の免疫病態. 第 25 回日本エイズ学会学術集会. 2011 年 12 月, 東京
 - 59) 野村滋, 菊地正, 細谷紀彰, 古賀道子, 中村仁美, 鯉渕智彦, 藤井毅, 立川愛, 岩本愛吉, 三浦聡之. 無症候慢性 HIV-1 陽性者由来 gag-protease を発現するキメラ NL4-3 ウイルス複製能の患者初診年による変化. 第 25 回日本エイズ学会学術集会. 2011 年 12 月, 東京.
 - 60) N Tsuchiya, P Pathipvanich, A Rojanawiwat, K Ariyoshi, P Sawanpanyalert. Frequency and Determinants of Modifying the First Antiretroviral Drug Regimen in Northern Thailand. The 10th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific. 6-30 August, 2011, Busan, Republic of Korea, (Oral presentation).
 - 61) P Pathipvanich, N Tsuchiya, A Rojanawiwat, P Sawanpanyalert, K Ariyoshi. Fifteen years of experience in treating HIV-infected patients at a single HIV center of a government hospital in northern Thailand. The 10th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific. Busan, 26-30 August, 2011, Republic of Korea, (Poster presentation).
 - 62) 土屋菜歩, P Pathivanich, A Rojanawiwat, P Sanwayanwalert, 有吉紅也. 北タイ政府系病院 HIV 外来における. 15 年間の死亡率の変化と患者数の推移. 日本熱帯医学会・日本国際保健医療学会合同大会, 2011 年 11 月, 東京 (口頭発表).
 - 63) 土屋菜歩, P Pathivanich, N Wichukchinda, P Sanwayanwalert, 有吉紅也. 北タイ政府系病院 HIV 外来における多剤併用療法の薬剤変更率とその原因について. 日本エイズ学会, 2011 年 12 月, 東京 (口頭発表).
 - 64) 土屋菜歩, K Ruchasawat, P Pathipvanich, 田中靖人, P Sanwayanwalert, 有吉紅也 北タイ政府系病院 HIV 外来通院 B 型肝炎重複

- 感染者におけるラミブジン耐性ウイルスの出現状況について. 日本エイズ学会 2011 年 12 月、東京 (口頭発表).
- 65) 有吉紅也 HIV 治療の進歩からエイズ流行制圧へ. 第 296 回日本内科学会九州地方会 生涯教育講演会. 2012 年 1 月、福岡 (招待講演) .
- 66) N Tsuchiya, P Pathipvanich, A Rojanawiwat, W Auwanit, K Ariyoshi, P Sawanpanyalert. HLA-B*3505 and female gender were strong predictive factors of modifying the first antiretroviral drug regimen due to adverse effect in Thailand. CROI, March, 2012, Seattle, USA, (Oral presentation).
- 67) P Pathipvanich, N Tsuchiya, A Rojanawiwat, W Auwanit, P Sawanpanyalert, K Ariyoshi. Impact of the national antiretroviral program on mortality and the duration of access to treatment among HIV-infected patients in northern Thailand. CROI, March, 2012, Seattle, USA, (Poster presentation).
- 68) M Mori, N Wichukchinda, R Miyahara, M Yasunami, K Ariyoshi. Viral adaptation against KIR2D-associated Gag immune pressure & their effect on clinical outcome among HIV-1 CRF01_AE-infected Thais. CROI, March, 2012, Seattle, USA, (Poster presentation).
- 69) Philip Mwimanzzi, Tristan Markle, Michiyo Tokunaga, Toshiyuki Miura, Eric Martin, Florencia Pereyra, Bruce Walker, Zabrina Brumme, Mark Brockman, Takamasa Ueno. Impaired viral infectivity and viral replication capacity by nef alleles from HIV elite controllers. 25th Annual Meeting of Japanese Society for AIDS Research, Tokyo Hyatt Regency, November 30th - 2nd December, 2011, Tokyo, Japan.
- 70) Philip Mwimanzzi, Tristan Markle, Michiyo Tokunaga, Toshiyuki Miura, Eric Martin, Florencia Pereyra, Bruce Walker, Zabrina Brumme, Mark Brockman, Takamasa Ueno. Population analysis of viral replication capacity by nef alleles of HIV elite controllers. 12th Kumamoto AIDS Seminar, 19-21 October 2011, Kumamoto.
- 71) Philip Mwimanzzi, Tristan Markle, Michiyo Tokunaga, Toshiyuki Miura, Eric Martin, Florencia Pereyra, Bruce Walker, Zabrina Brumme, Mark Brockman, Takamasa Ueno. Impairment of viral replication capacity by nef alleles from HIV elite controllers. Frontiers of Retrovirology, Complex retroviruses, retroelements and their hosts, 3-5 October 2011, Amsterdam, Netherlands.
- 72) Philip Mwimanzzi, Tristan Markle, Michiyo Tokunaga, Toshiyuki Miura, Eric Martin, Florencia Pereyra, Bruce Walker, Zabrina Brumme, Mark Brockman, Takamasa Ueno. Impairment of virion infectivity by nef alleles from HIV elite controllers. Nef activity in enhancement of virion infectivity is impaired in HIV elite controllers. XV, International Congress of Virology, 11-16 September 2011, Sapporo.
- 73) Philip Mwimanzzi, Tristan Markle, Michiyo Tokunaga, Toshiyuki Miura, Eric Martin, Florencia Pereyra, Bruce Walker, Zabrina Brumme, Mark Brockman, Takamasa Ueno. Impairment of virion infectivity by nef alleles from HIV elite controllers. Keystone Symposia HIV Evolution, Genomics and Pathogenesis, March 20-25, 2011, Canada.
- 74) Zafrul Hasan, J. Carlson, H. Gatanaga, A. Le, C. Brumme, S. Oka, Z. Brumme, T. Ueno. Impact of HLA class I-driven genetic variability in HIV-1 accessory genes in Japanese sequences. Keystone Symposia HIV Evolution. Genomics and Pathogenesis: Whistler, March 20 - 25, 2011, Canada.
- 75) Zafrul Hasan, J. Carlson, H. Gatanaga, A. Le, C. Brumme, S. Oka, Z. Brumme, T. Ueno. Subtle effect of HLA class I-driven selective forces on the variability of HIV-1 accessory genes. 12th Kumamoto AIDS Seminar and GCOE Joint International Symposium. Hotel Nikko Kumamoto and Aso Resort Grandvrio Hotel, October 19-21, 2011, Kumamoto.
- 76) Zafrul Hasan, J. Carlson, H. Gatanaga, A. Le, C. Brumme, S. Oka, Z. Brumme, T. Ueno. Effect of HLA class I-mediated selective pressure on HIV-1 accessory genes. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress: Virus and host response, Sapporo Convention Center, September 11-16, 2011, Sapporo.
- 77) Zafrul Hasan, J. Carlson, H. Gatanaga, A. Le, C. Brumme, S. Oka, Z. Brumme, T. Ueno. Impact of HLA class I-driven genetic variability in HIV-1 accessory genes. 2011

The Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. November 27-30, 2011, Chiba.

- 78) Chihiro Motozono, John J. Miles, Linda Wooldridge, David A. Price, Takamasa Ueno, Andrew K. Sewell. The cross-reactivity footprints of HIV-specific CTLs. 12th Kumamoto AIDS Seminar and GCOE Joint International Symposium. October 19-21, 2011, Kumamoto.
- 79) 緒方陽子、大津家裕仁、Philip Mwimanzi、徳永美知代、Tristan Markle、三浦聡之、Bruce Walker、Zabrina Brumme、Mark Brockman、上野貴将:Nef のウイルスレセプター発現低下機能と病態、一般演題「アクセサリー遺伝子-2」第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、2011 年 12 月、東京。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

- 1) 発明人；石坂幸人、長谷川正勝、野原 聡
発明の名称；「新規核移行ペプチド」
PCT/JP2008/054563 出願人；
国立国際医療研究センター総長
移行手続き完了；
2009/9/8 欧州での特許承認
- 2) 琉球大学の知財部門を通して国内、国外への特許出願中である。

Ⅱ. 分担研究報告書

感染病態を制御する宿主抗ウイルス蛋白と それを標的とする HIV-1 蛋白の機能解析

研究分担者 徳永 研三 国立感染症研究所感染病理部 主任研究官
研究協力者 Juan F. Arias 国立感染症研究所感染病理部 流動研究員

研究要旨： ヒト抗ウイルス蛋白 BST-2/tetherin (BST-2) を標的とする HIV-1 アクセサリー蛋白 Vpu の補助因子の探索、またマクロファージや樹状細胞における HIV-1 感染阻害に関与する未知の宿主因子の探索を、また HIV-1/AIDS 患者検体における抗ウイルス蛋白の発現レベルの病態進行の関連について以下の様に試みた。(1) Vpu の抗 BST-2 活性の約半分は β TrCP に依存しているが、残り半分には未知の宿主因子が関与していると考えられる。 β TrCP 結合不全 Vpu および細胞質領域欠損型 Vpu の安定発現細胞を用いて免疫沈降を行い、沈降物の二次元電気泳動による画像解析比較を行った。その結果 β TrCP 結合不全 Vpu と特異的に相互作用する候補蛋白が 67 種類得られた。(2) 樹状細胞の HIV-1 に対する低感受性は HIV-2/SIV アクセサリー蛋白 Vpx 発現により高感受性へと変わることから、樹状細胞における宿主抗ウイルス蛋白の存在が示唆されてきた。今回我々は Vpx 発現樹状細胞において特異的に分解される蛋白のスクリーニングを行い、プロテオーム解析により 8 種類の候補蛋白を同定した。これら候補蛋白の cDNA から発現ベクターを複製して蛋白発現を確認、HIV-2 Vpx との共発現により全ての蛋白が Vpx により分解を受けることが分かった。更に Vpx との免疫沈降反応を行なった結果、候補のうち 6 つまでが Vpx との結合能を有していることを明らかにした。(3) HIV-1 感染者由来末梢血リンパ球より抽出した RNA を用いて real-time RT-PCR を行った結果、APOBEC3G 及び BST-2 mRNA 発現レベルと病態進行に明らかな相関性は認められなかった。

A. 研究目的

これまで HIV-1 に対する抗ウイルス宿主因子として APOBEC3G (以下 A3G; Nature 2002. 418:646-50)、TRIM5 α (Nature. 2004. 427:848-53)、BST-2/tetherin (以下 BST-2; Nature 2008; 451:425-30) が報告されてきた。そのうち TRIM5 α においてヒト型は HIV-1 複製抑制効果を示さない。A3G と BST-2 に対して HIV-1 はアクセサリー蛋白 Vif 及び Vpu をそれぞれ備えている。先頃報告された SAMHD1 (Nature 2011. 474:654-7) はミエロイド細胞特異的に発現している新規抗ウイルス宿主蛋白で、HIV-2・SIV アクセサリー蛋白 Vpx により不活

化されるが、HIV-1 は SAMHD1 に対する防御蛋白を有しない。

BST-2 は産生されるウイルス粒子を細胞表面で繋ぎ止めてウイルス放出を抑制する。Vpu はそれを不活化してウイルス粒子放出を促進させる。我々は一昨年、Vpu の抗 BST-2 活性には、BST-2 との相互作用に必須の膜貫通領域 (TM) 以外に、細胞内領域 (CT) も重要であること、また Vpu による CD4 分解の場合と同様に、Vpu は CT の 52/56 番目のセリンを介したユビキチン複合体構成蛋白 β TrCP との相互作用が、BST-2 の機能阻害に必要であるが、 β TrCP 依存性は部分的であることを報告した。

これらの結果より Vpu は CT に結合する β TrCP 以外の cofactor を要求性する可能性が考えられることから、本年度はこの cofactor を検索・同定することを目的とした。

未知の宿主抗ウイルス蛋白が樹状細胞またはマクロファージに発現している可能性は以前から示唆されており、それが HIV-1 感染を阻害し、HIV-2/SIV Vpx により分解されると考えられてきた。その性質を利用して今回我々は Vpx をレンチベクターで導入した樹状細胞で特異的に発現レベルが低下する蛋白のスクリーニングを行い宿主因子探索に取り組んだ。プロテオーム解析により、昨年 6 月に Nature 誌上に報告された SAMHD1 以外の 8 種類の候補蛋白を同定した。

B. 研究方法

1. 発現プラスミド DNA の構築

Vpu 発現レンチトランスファーベクター (β TrCP 結合不全変異体 [Vpu2/6] 及び CT 欠失変異体 [Vpu Δ CT]) 及び HIV-2 GH1-2 由来 Vpx レンチトランスファーベクターを作製した。Rev-responsive element (RRE) を有した Vpx、Vpr 及び Vpr/Vpx 融合型の発現プラスミドを哺乳類発現ベクター pCAGGS バックボーン (N 末または C 末 FLAG タグ付き) で作製した。プロテオーム解析において候補に挙がった 8 種類の蛋白について、HeLa 細胞から抽出したトータル RNA より作製した cDNA をもとに PCR を行い、各フラグメントを C 末 HA タグ付加 pCAGGS に組込んで各発現ベクターを作製した。同様に SAMHD1 のヒト、サル、マウス型の HA タグ付き発現ベクターを作製した。また候補蛋白及び SAMHD1 の各々の shRNA レンチベクターベース発現ベクターを構築した。作製した各発現ベクターの遺伝子配列は ABI3130 シークエンサー (ABI) により確認した。

2. 細胞の preparation

Lymphoprep (Axis-Shield) を用いて健常人末梢血リンパ球を分離した後、抗ヒト CD14 磁気ビーズ (Miltenyi) を用いた positive selection により CD14 陽性細胞を精製した。ヒト GM-CSF (10 ng/ml) 及び IL-4 (50 ng/ml) (ともに eBioscience) を CD14 陽性細胞に添加して 7 日間

培養したものをヒト樹状細胞として使用した。ヒト単球系細胞株 THP-1 に PMA (30 ng/ml; Sigma) を添加して 18 時間培養したものを differentiated macrophages として使用した。他の細胞株として HeLa、293T、HOS 細胞を使用した。

3. プロテオーム解析による候補蛋白スクリーニング

(1) Vpu の補助因子探索: Vpu2/6 または Vpu Δ CT 発現レンチトランスファーベクター、パッケージングベクター及び水疱性口炎ウイルス G 蛋白 (VSV-G) 発現ベクターを 293T 細胞へコトランスフェクションし、48 時間後に上清中のウイルス量を p24 ELISA Kit (Advanced BioScience Lab) により定量した。HeLa 細胞に MOI 3 で transduce して安定発現細胞を樹立、最終的にそれぞれ 10 cm dish 10 枚ずつで大量培養後、CHAPS バッファーで細胞を溶解した。それらの細胞溶解物を用いて免疫沈降を行った。沈降物をそれぞれ Cy3、Cy5 でラベリングして、二次元電気泳動後にスポット比較を行った。

(2) 樹状細胞における未知抗ウイルス宿主因子の探索: Vpr-RRE 発現ベクター+空レンチトランスファーベクターまたは Vpr/Vpx 融合型発現ベクター+Vpx レンチトランスファーベクターをパッケージングベクター及び VSV-G 発現ベクターと共に 293T 細胞へコトランスフェクションし、48 時間後に上清中のウイルス量を p24 ELISA Kit により定量した。10⁶ 個のヒト樹状細胞に 50 ng のレンチベクターウイルスを感染させ、72 時間後に細胞を CHAPS バッファーで溶解した。細胞溶解液を 2D Cleanup Kit (BioRad) で精製した後、二次元電気泳動/銀染色を行いスポット比較した。Vpx 発現樹状細胞で発現が認められずコントロール細胞で認められるスポットのみをピックアップして MALDI-TOF MASS 解析 (Aproscience) による候補蛋白質の同定を行った。

4. Vpx 感受性テスト

同定後に作製した候補蛋白 8 種の HA タグ付き発現プラスミド及びヒト SAMHD1 発現 HA タグ付きプラスミドを Vpx 発現プラスミドまたは空ベクターと 293T 細胞へコトランスフェクションした。48 時間後に細胞を溶解し、それ