

研究課題：HIV-1 複製におけるサイクロフィリン A の機能の解明- 異性化酵素活性欠失変異体を用いた機能解析

課題番号：H23-エイズ-若手-001

研究代表者：竹村 太地郎（国立感染症研究所 エイズ研究センター第3室 研究員）

## 1. 研究目的

多剤併用療法の導入以降、感染者の予後、生活の質は大きく改善したが、現在も長期服薬に伴う副作用や多剤耐性ウイルス出現と感染拡大が大きな課題となっている。現行よりも強力な HIV-1 複製を抑制する方法の開発は服薬量、を減らすこと、耐性ウイルス出現の可能性を減らすことが期待でき、上記の課題の改善に総合的に貢献しうる。自然界には「種間の壁」とも呼べるキャプシド蛋白質 (CA) といくつかの宿主因子が関与した強力な HIV-1 複製抑制機構が存在する。サイクロフィリン A (CypA) も CA と相互作用し HIV-1 複製に関与すると考えられている宿主因子の一つであるが、その作用機序は明らかでない。本研究では HIV-1 複製における CypA の作用機序を解明することを目的とする。特に CypA の異性化酵素活性が HIV-1 複製前期過程に寄与するかという問題に解答を出す。以上より細胞への侵入直後のウイルスと宿主因子の相互作用を明らかにし、新たな機序による HIV-1 感染、増殖を抑制する方法の開発に貢献することを長期目標とする。

## 2. 研究方法

### < 1 > 点変異導入 CypA を用いた解析

PCR 法を用いて異性化酵素活性部位に変異を導入した HA 標識 CypA 発現プラスミドを 3 種類 (R55A, H126A, S99T) 作製した。293T 細胞にこれらの変異 CypA 発現プラスミドと野生型 CypA 発現プラスミドをトランスフェクションし、1 日後細胞数を計測しリプレートした後 HIV-1 分子クローン pNL4-3 をトランスフェクションした。2 日後に培養上清から超遠心法によりウイルス粒子を回収し、ウエスタンブロッティング法によりウイルス粒子中に取り込まれた CypA を検出し変異 CypA と CA の結合効率を評価した。また、293T 細胞に恒常発現 shRNA を導入し内在 CypA 発現抑制細胞株 (293T, CypAsh) と対照として 293T, nonTsh を作製した。これらの細胞株に変異 CypA 発現プラスミドをトランスフェクションし、1 日後に細胞数を計測しリプレートした後、翌日 VSV-G でシュードタイプした Luciferase 発現 HIV-1 ベクターを約 4 時間感染させた。2 日後に細胞中の Luciferase 活性を計測し、それぞれの変異 CypA 発現細胞における HIV-1 感染効率を評価した。

### < 2 > CypA 阻害条件下においても複製可能な変異 HIV-1 の分離と塩基配列の解析

これまでに CypA が HIV-1 CA 中の CypA 結合ループを介して結合し、CypA 結合ループへの変異導入や CypA の競合阻害剤サイクロスポリン A (CsA) の添加により CypA と CA の結合が低下し、HIV-1 の複製効率が低下することが知られている。しかし、CypA 結合ループに変異を導入した NL4-3 (P90A, A92E) 株は CsA の存在化で複製能がさらに低下することが見出され、CypA 結合ループ以外に CypA と相互作用する領域が存在する可能性が考えられた。本研究では野生型 NL4-3 株と CypA 結合ループに変異を導入した NL4-3 (P90A, A92E) 株とを (1) NL4-3 のみ、(2) NL4-3 + 1 $\mu$ M CsA、(3) NL4-3 (P90A, A92) のみ、(4) NL4-3 (P90A, A92) + 1 $\mu$ M CsA の各条件で継代培養し、CypA と CA の結合を阻害した条件下においても複製可能な変異 HIV-1 の分離を試みた。細胞は Jurkat 細胞を用い、初期感染は p24 量で 20ng/2x10<sup>5</sup> 細胞にて行った。ウイルス増殖を p24 ELISA にて評価し、ウイルス増殖の確認後、Gag 領域に注目して塩基配列を決定した。

(倫理面への配慮)

本研究は個人情報を取り扱う研究は含まず、HIV-1 を用いた実験は P3 レベルの実験施設において行った。

## 3. 研究結果

### < 1 > 点変異導入 CypA を用いた解析

これまでに他グループの生化学的解析と構造解析より、本研究で用いた CypA 変異体の基質への結合能と酵素活性は R55A; 基質との結合能が無く酵素活性も無い、H126A; 基質との結合能は変化がないが酵素活性は野生型の 0.5% 程度に低下する、S99T; 基質と結合するが、異性化酵素活性は失う、という報告がなされている (DA Bosco et al. Journal of Molecular Biology. 2010. 403, 723-738)。しかしこれらの解析は短いペプチドを用いた解析であり、HIV-1 CA との結合は明らかでない。そこでまず、各変異 CypA 発現細胞を用いて HIV-1 を作製し、ウイルス粒子中に取り込まれた HA-CypA をウエスタンブロット法にて定量し、変異 CypA と HIV-1 CA の結合効率の評価を行った。その結果、H126A は野生型と同程度以上の結合が確認されたが、R55A と S99T においては結合が見られず、S99T では既報の結果とは相違が見られた。

次に内在 CypA 発現抑制 293T 細胞に各変異 CypA を発現させ、HIV-1 ベクターを用いて複製前期過程における変異

CypA の機能の評価を行った。その結果、対照として用いた野生型 CypA 発現細胞では HIV ベクターの感染効率が復帰したが、H126A を含むすべての変異 CypA において HIV-1 ベクターの感染効率は復帰しなかった。この結果は変異 CypA が HIV-1 複製前期過程をサポートしておらず、CypA の異性化酵素活性が必要である可能性を示唆する。

#### < 2 > CypA 阻害条件下においても複製可能な変異 HIV-1 の分離と塩基配列の解析

前述の (1) から (4) 全ての培養条件において、47 代の継代後ウイルスの増殖が確認された。そこで感染細胞から DNA を抽出し、Gag 領域全域を PCR にて増幅しサブクローニングした後、各条件 4 クローンずつ Gag 領域の塩基配列を決定した。培養条件 (1) ではマトリクスの V35I (MA V35I)、(2) では MA E40K と CA H120N、(3) では CA N121K、(4) では CA G89R と CA R132K の各変異が確認された。もし CypA 結合ループへの CypA の結合が必須なのであれば (3) の条件で CypA 結合ループに変異が生じ CypA との結合能が復帰することが予想されたが、両方の条件において P90A、A92E の変異は保持されていた。一方で、CA H120N、CA N121K、CA R132K の各変異は helix\_6 と\_7 の間の領域 (便宜的に以後ループ 7 領域とする) とその近傍に位置し、HIV-1 複製における CypA 依存性がこの領域に起因することが示唆された。ループ 7 領域には CypA 結合ループに類似する高プロリンモチーフ (<sup>120</sup>PPPIP<sup>123</sup>モチーフ) が存在する。そこでループ 7 領域をアラニンに置換した変異体を作製し、CypA との結合効率を < 1 > と同様の方法により評価した。その結果、ループ 7 領域変異体ではウイルス産生が大きく低下したが、特に 120 番目のプロリンをアラニンに置換した場合に CypA との結合が低下することが確認された。従って、CA のループ 7 領域が別の CypA 結合領域として機能している可能性が考えられた

#### 4. 考察

本研究では HIV-1 複製における CypA の機能解明を目的として、異性化酵素活性欠失変異 CypA を発現させた 293T 細胞における HIV-1 複製前期過程の評価と CypA 阻害条件下における継代培養により得られた CypA 非依存的に増殖可能な変異 HIV-1 の分離と塩基配列の解析を行った。異性化酵素活性欠失 CypA では HIV-1 感染能が復帰しなかったことから、CypA の異性化酵素活性とそれに伴う Gag 蛋白質の構造変化が HIV-1 複製前期過程においては必要と考えられた。また、HIV-1 複製の CypA 依存性が CypA 結合ループとは異なるループ 7 領域による可能性が示され、さらにループ 7 領域に直接 CypA が結合することが示唆された。一方で、他のグループによる MLV、HIV-2 の解析から、ル

ープ 7 相当領域がウイルス複製抑制に働く宿主因子に対する感受性に関与することが今年度報告されており、CypA がそれらのウイルス複製抑制に働く宿主因子からの逃避に関与する可能性も考えられる。CA ループ 7 領域に着目して CypA との結合と構造の変化、さらに他の宿主因子との相互作用を明らかにする必要があると考えている。

#### 5. 自己評価

##### 1) 達成度について

本年度においては異性化酵素活性欠失変異 CypA が HIV-1 複製をサポートしないことを示し、また、CypA が従来考えられていた CA 中の CypA 結合ループのみではなく、別の高プロリンモチーフをもつループ 7 領域に直接結合しうることを示唆する結果が得られた。以上は今まで CypA 結合ループとの相互作用では説明できなかった CypA の作用機序解明につながる進展を得られたと考えている。

##### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

CA には CypA を含め正負両方の因子が相互作用すると考えられている。本研究で示唆されたこれまで考えられていた結合様式とは異なる CypA と CA の相互作用が多様な因子との相互作用を解明する糸口となることが期待でき、学術的な意義は大きい。また、ループ 7 領域変異ウイルスはウイルス産生能も低下することから、CA を標的として複数の複製段階を阻害する方法の開発にもつながることが期待できると考えられる。

##### 3) 今後の展望について

新たに CypA との結合が示唆された CA 中のループ 7 領域の機能に注目した解析を行う必要がある。近年、CA と CypA の相互作用がウイルスゲノムの核移行や組込み段階にまで関与すること、宿主の自然免疫応答に関与すること、等が複数報告されており、HIV-1 複製機構の詳細な理解のため、CypA の機能解明は意義を持つと考えられる。

#### 6. 結論

本研究は HIV-1 複製における CypA の機能解明を目的とした。CypA の異性化酵素活性が HIV-1 複製前期過程においては必要と考えられること、HIV-1 複製の CypA 依存性が CypA 結合ループとは異なる領域 (ループ 7 領域) により、さらにループ 7 領域に直接 CypA が結合する可能性が示された。

#### 7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

なし

研究発表

研究代表者

竹村 太地郎

学会発表(ポスター含む)

海外

- 1) Taichiro Takemura, Miyako Kawamata, and Tsutomu Murakami. Selection and characterization of the mutant HIV-1 that can replicate without CypA in the CypA-dependent Jurkat cell. Cold Spring Harbor Meeting Retroviruses. May 23-28, 2011, Cold Spring Harbor, USA.
- 2) Tsutomu Murakami, Honggui Wu, Miyako Kawamata, Joe Chiba, and Taichiro Takemura. Role of Rab11A in HIV-1 Assembly. Cold Spring Harbor Meeting Retroviruses. May 23-28, 2011, Cold Spring Harbor, USA.

国内

- 1) Taichiro Takemura, Miyako Kawamata and Tsutomu Murakami. Selection and sequencing analysis of the mutant HIV-1 that can replicate without CypA in Jurkat cell. International Union of Microbiological Societies Congresses. Sep11-16, 2011, Sapporo, Japan.
- 2) Tsutomu Murakami, Honggui Wu, Miyako Kawamata, Joe Chiba, and Taichiro Takemura. Role of Rab11 in Virus Assembly of HIV-1. International Union of Microbiological Societies Congresses. Sep11-16, 2011, Sapporo, Japan.
- 3) 竹村 太地郎、川又 美弥子、村上 努. サイクロフィリンA非依存的に増殖可能な新規 HIV-1 変異株の解析. 日本エイズ学会、2011年、東京
- 4) 呉 鴻規、竹村 太地郎、川又 美弥子、千葉 丈、村上 努. HIV-1 粒子形成過程における Rab11a 蛋白質の機能解析. 日本エイズ学会、2011年、東京



研究課題：HIVの構造、増殖、変異に関する研究

課題番号：H22-エイズ一般-003

研究代表者：佐藤 裕徳（国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター 室長）

研究分担者：梁明秀（横浜市立大学医学部微生物学・分子生体防御学 教授）、野間口雅子（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 准教授）、塩田 達雄（大阪大学微生物病研究所・感染機構研究部門 教授）、本村和嗣（国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター 主任研究官）、村上努（国立感染症研究所エイズ研究センター 室長）、増田貴夫（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 准教授）、岡本尚（名古屋市立大学医学研究科 教授）、間陽子（理化学研究所 ユニットリーダー）、岩谷靖雅（国立病院機構名古屋医療センター・臨床研究センター 室長）

## 1. 研究目的

科学的根拠に立脚してエイズ対策を推進するには、エイズの病原である HIV の理解が欠かせない。特に、「HIV の構造、増殖、変異」の知見は、HIV の検査法・制御法・動物モデル等の開発・改良など、エイズ対策の疫学から臨床応用研究に幅広く不可欠な基盤情報となる。HIV は高度に変異性のため、感染者体内で構造や性質を速やかに変える。実験のみで HIV の構造や性質を知るには時間がかかり、ウイルスの変化に迅速に対処するのは難しい。

申請者は、HIV を含む変異性病原体の解析を効果的に支援する手法として、急速に進展している計算科学の技術に着目した。これまでに、コンピュータを用いてウイルスと宿主の蛋白質の立体構造、性質、変化を解析し、国内外の研究者と共同で実験データとの整合性を検証してきた。その結果、計算科学の技術は、ウイルス学、疫学、薬剤耐性、動物モデル開発等、幅広い分野の研究支援に有効であることを立証してきた。

そこで本研究では、国内の基礎ウイルス学研究者が連携し、ウイルス学に視点をおき、実験と計算科学等の技術を併用して HIV の構造、増殖、変異に関する原子・分子・細胞・個体レベルの新知見を幅広く収集し、成果を論文等で広く提供してエイズ対策に役立てる。最終年度も上の方針に沿ってウイルス学情報の収集と解析を行う。計算科学の技術を生命科学に適用する試みは、必ずしも独創的ではない。すでに様々な分野でその有効性が確認されている。しかし、ウイルス研究への適用は、国内外ともに未だ発展の途上にある。本研究の実施は、エイズの病原体の新たな解析技術基盤と情報基盤の形成に寄与することで、エイズ対策を推進するための科学的基盤の強化に貢献する。

## 2. 研究方法

(1)研究代表者：コンピュータを用いた分子解析技術を、HIVの構造、増殖、進化の解析に応用する方法を研究する。研究分担者らと共同で、理論と実験を連動させて HIV のウイルス学情報を収集する。

(2)研究分担者：実験により、HIVの構造、増殖、変異に関する原子・分子・細胞・個体レベルの新知見を幅広く収集する。①HIV蛋白質と相互作用する細胞蛋白質を特定し、HIV複製制御における意義を明らかにし、機能発現に必須の領域とその構造を解析する（梁、塩田、岩谷、増田、村上、間、岡本）。②新型シークエンサーを用いて感染者体内の HIV ゲノム情報を包括的に収集し、体内における変異のプロファイルを解析する（本村）。③HIVの宿主指向性、感染力、増殖能等の変化に関わる変異の種類と構造要因を特定する（野間口）。

なお、HIVの構造、増殖、変異に関する情報収集については、横山勝博士（国立感染症研究所・主任研究官）、櫻木淳一博士（大阪大学微生物病研究所・助教）、三隅将吾博士（熊本大学生命科学研究部・准教授）、久保嘉直博士（長崎大学医学部・准教授）、有海康雄博士（熊本大学エイズ学研究センター・准教授）に研究協力者として支援を受ける。

（倫理面への配慮）

組換え DNA 実験は、実験を実施する研究機関の承認を得て行った。動物実験は、研究機関の倫理審査会の審議を受け、承認を得て行った。ヒト由来臨床材料を使う研究は、関連機関の倫理審査会の承認を得て、提供者本人に十分な説明を行い、承諾を得た上で行った。

## 3. 研究結果

(1)研究代表者（*in silico* 構造解析とウイルス研究）：ホモロジーモデリング法、分子動力学法、結合シミュレーション等を用いて、種々の HIV 増殖制御因子の物理化学的特性を明らかにした。成果を研究分担者らの実験データの考察と新たな実験（変異導入解析等）の支援に活用した。これにより、HIV の増殖能、宿主域、薬剤感受性、免疫逃避能等の生物学的性質の決定に関わる領域の構造特性、並びに変異による性質変化のしくみを分子・原子レベルで明らかにした。

(2)研究分担者

HIV の構造、増殖、変異に関する原子・分子・細胞レベルの新知見を幅広く収集し、成果を論文に公表した。

①増田（HIV ゲノムの逆転写制御因子の構造機能解析）：HIV-1 インテグラーゼ（IN）、逆転写酵素、宿主因子の精製蛋白質標品を用いた無細胞 IN 多量体化アッセイ系を確立した。宿主因子 Gemin2 存在下で IN 2 量体および 4 量体形成効率が顕著に増強されること、逆転写反応に致命的影響を及ぼす IN 変異により Gemin2 依存的多量体化能が消失すること、などがわかった。

②間（HIV ゲノムの核移行制御因子の構造機能解析）：末梢血単核球から未熟樹状細胞（DC）およびマクロファージを調製し、細胞内で Vpr が発現したときの細胞 RNA の発現変動を microarray analysis により網羅的に解析した。Vpr は、interferon 誘導遺伝子、および Ubiquitin 結合酵素の一つである UBE2C 遺伝子の発現を制御することを見出した。

③岡本（HIV ゲノムの転写制御因子の構造機能解析）：P-TEFb/CycT1 立体構造をもとに Tat 転写活性制御に関与するアミノ酸を推定し、その妥当性をシフェラーゼアッセイで検討した。CycT1 分子上で 46, 50, 56 番目のグルタミン残基（Q46, Q50, Q56）、CycT176 番目のフェニルアラニン残基（F176）が Tat の転写活性化に重要であることが判明した。

④岩谷（HIV 感染制御因子とその解除因子の構造機能解析）：X 線結晶構造解析法により、APOBEC3C（A3C）蛋白質の構造決定に成功した（PDB#:3VM8）。Structure-guided mutagenesis により、Vif への結合に関与するアミノ酸残基（11 残基）を同定した。Vif 結合インターフェイスは負電荷に偏り、疎水性側鎖を中心とした“くぼみ”を形成していることがわかった。

⑤塩田（HIV 感染抵抗性因子の構造機能解析）：ヒト TRIM5α の多型（Coiled-coil 領域と SPRY 領域の間のリンカー部分の一塩基多型により生じるアミノ酸置換（A249D））が抗 HIV-1 効果に及ぼす影響をウイルスの多

段増殖ならびに single round infection 法により検討した。抗 HIV-1 効果は 249G の TRIM5 $\alpha$ のほうが 249D の TRIM5 $\alpha$ よりわずかに強いことが、両方アッセイ法で示された。

⑥村上 (HIV の感染御因子の構造機能解析) : HIV-1 Gag MA 蛋白質部分ペプチドの抗 HIV-1 活性を増強する方法を検討した。エンドソーム酸性化阻害剤クロロキンを 5  $\mu$ M 添加することで、細胞毒性に影響を与えずに抗 HIV-1 活性のみ数倍増強することに成功した。HIV-1 Gag CA 蛋白質部分ペプチドにも抗 HIV-1 活性があることを見出した (EC50 で数  $\mu$ M から数十  $\mu$ M)。

⑦梁 (無細胞系蛋白質合成系と蛍光分子相互作用を用いた HIV の増殖制御因子の網羅的同定) : コムギ無細胞蛋白質合成法およびアルファスクリーン法等を用い、ウイルス複製を負に制御する候補宿主因子を網羅的に探索した。HIV-1 Vpu と相互作用する因子として SCYL2 を同定した。SCYL2 は Vpu の脱リン酸化を促進することで Vpu 機能を抑制し、宿主防御因子 Tetherin の抗 HIV 活性を昂進させる補助因子として働きうることがわかった。

⑧本村 (次世代シーケンサーを用いた HIV 準種の包括的ゲノム解析) : 454 を用いて、22 症例の血清試料から HIV-1 アクセサリー遺伝子 (Vpr, Vpu, Nef, Vif) の塩基配列情報を網羅的に取得した (約 4.6 $\times$ 10<sup>8</sup> 塩基)。個体レベルでの配列多様性の情報を得た。得られた情報を元に、アミノ酸変異プロファイルを作成した。

⑨野間口 (HIV 宿主指向性、感染力、増殖能の決定因子の解析) : 遺伝子工学の手法を用いてサル指向性 HIV-1 プロトタイプの Gag CA と Vpu を改変し、既知の全ての抗 HIV-1 因子による抑制を回避する MN4/LSDQgtu の構築に成功した。HIV-1 IN-C 末端領域にはコドン配列依存的にウイルス産生量を抑制し、複製に強く影響を及ぼすサイトがあることを見出した。

#### 4. 考察

##### 1) HIV 研究と計算科学

コンピュータを用いた分子解析技術の有用性を種々の共同研究で示した。第一に、実験データの分子・原子レベルの考察に有用である。第二に、予測を取り入れて効率的に実験を行える。今後も計算機科学と計算科学は急速に進展すると想定されている。その過程で、特に理論に基づく予測能力の進歩が見込まれる。将来は、他の研究分野と同様に、病原体研究においても、理論と実験を併用することで研究の効率や質の向上、あるいは新展開が見込まれる。その基盤を今から構築していくことは重要と考える。

##### 2) HIV の構造、増殖、変異に関わる新知見の収集

特に以下の研究成果は、新規性や研究の基盤形成の観点から特筆できる。①APOBEC3 上の Vif の結合インターフェイスについて、実験による構造情報を世界で初めて示した。(岩谷)。②HIV-1 Vpu 蛋白質の翻訳後修飾を制御し、その抗 Tetherin 活性を変動させる宿主因子として SCYL2 を同定した (梁)。③HIV-2 Gag CA 蛋白質の 1 アミノ酸置換でヒト TRIM5 $\alpha$ 感受性が増加すること、ヒト TRIM5 $\alpha$  の一塩基多型がヒトの HIV-1 感染感受性の変化に結びつく可能性があることを示唆した (塩田)。④宿主蛋白質 Gemin2 に HIV インテグラーゼの多量体化を促進する能力があることを示した (増田)。⑤Vpr が樹状突起細胞やマクロファージで発現した際に発現変動のおきる細胞遺伝子を複数特定した (間)。⑥抗 HIV 作用をもつ HIV-1 マトリックス部分ペプチド誘導体の創成に成功した (村上)。⑦HIV プロウイルスの転写制御に関する構造・機能の新知見を基に HIV 転写阻害剤の候補分子を設計した (岡本)。⑧HIV-1 アクセサリー遺伝子の感染者体内での変異を包

括的に解析するための大規模 HIV 配列リソースを得た (本村)。⑨既知の抗 HIV 因子を全て回避し、サル指向性が増強した HIV-1 の構築に成功した (野間口)。

##### 5. 自己評価

###### 1) 達成度について

研究計画に沿って概ね達成された。個体レベルの知見の情報収集は、最終年度に期待する。

###### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

研究成果は、常時、第三者の査読を経てウイルス学分野等の欧文専門誌に掲載されている。本研究班の活動は、HIV に関わるウイルス学的新知見や新技術を広く国内外に発信・提供する情報プラットフォームとして機能している。

###### 3) 今後の展望について

引き続き、HIV に関わるウイルス学情報を幅広く提供する。特に、HIV の増殖制御法やサルを用いた HIV 感染モデルの開発を進めるために有用な以下の情報の収集に力を入れる。①佐藤 : コンピュータを用いて種々の HIV 増殖制御因子の構造特性を明らかにし、創薬や動物モデル開発の研究に資する。新たに、生体での重要な相互作用部位を推定する方法の研究を始める。②増田 : HIV-1 IN の多量体化と逆転写促進活性の関連を立証し、IN の多量体化に関わる領域と構造特性を明らかにし、新たな逆転写阻害薬開発の基盤を作る。③塩田 : HIV-1/2 のカプシドの構造特性とウイルスのヒト TRIM5 $\alpha$  感受性の関連を検証するとともに、TRIM5 $\alpha$  の構造機能相関に関する知見を集積することで、ヒト TRIM5 $\alpha$  の抗 HIV-1 活性を増強する方法の開発基盤を作る。④岩谷 : APOBEC3C 並びに他の APOBEC ファミリー蛋白質について、Vif との相互作用領域と構造特性を明らかにし、Vif/APOBEC 相互作用を阻止する方法の開発基盤を作る。⑤岡本 : 嫌気性細菌が HIV 感染・複製やエイズ発症の共役因子として働く可能性を検証すると共に、HIV Tat 阻害剤の開発を進める。⑥梁 : これまでに構築した独自の相互作用解析系等を用いて新たな HIV 増殖制御因子を探索し、HIV 複製制御の標的候補の種類を拡充する。⑦間 : マクロファージで発現し Vpr に結合する細胞因子を特定し、その因子が HIV-1 増殖制御に果たす役割を明らかにする。⑧村上 : 抗 HIV 活性をもつ HIV-1 Gag 蛋白質部分ペプチドを探索し、抗 HIV 作用のしくみを明らかにすると共に、それらのペプチドをプローブとして新たな HIV 増殖制御因子を探索する。⑨本村 : 454 で得た HIV-1 アクセサリー遺伝子の大规模配列情報を用いてアミノ酸変異のプロファイルを解析し、病態との関連を検証する。⑩野間口 : サル細胞で未知の抗 HIV 因子もしくは増殖促進因子の存在が示唆されたのでこの因子の存在を検証し、創薬やサル感染モデルの開発基盤を作る。

##### 6. 結論

新しい技術を取り入れながら、HIV の構造、増殖、変異に関する原子・分子・細胞レベルの新知見を幅広く収集し、成果を論文等で提供した。これにより、エイズの病原体に関わる最新情報や最新技術を広く国内外に発信・提供する情報プラットフォームとしての役割を果たした。

##### 7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

1) 特願 2009-158179 号 (Vpr タンパク質の検出方法及び検出用試薬) 発明者 間陽子、鈴木正昭、石井英樹、鈴木辰徳、松田剛。

2) 特願 2010-177176 (特許出願中) : 岡本、朝光、鈴木、宮田。HIV 複製阻害剤。

## 研究発表

## 研究代表者

佐藤裕徳

- 1) Kamiyama H., Kubo Y., Sato H., Yamamoto N., Fukuda T., Ishibashi F., and Iwao M. Synthesis, structure-activity relationships, and mechanism of action of anti-HIV-1 lamellarin  $\alpha$  20-sulfate analogues. *Bioorg Med Chem*. Oct 20[Epub ahead of print], 2011.
- 2) Chutiwitoonchai N., Hiyoshi M., Mwimanzi P., Ueno T., Adachi A., Ode H., Sato H., Fackler O.T., Okada S., and Suzu S. The Identification of a Small Molecule Compound That Reduces HIV-1 Nef-Mediated Viral Infectivity Enhancement. *PLoS One*. 6:e27696, 2011.
- 3) Nishitsuji H., Yokoyama M., Sato H., Yamauchi S., and Takaku H. Identification of amino acid residues in HIV-1 reverse transcriptase that are critical for the proteolytic processing of Gag-Pol precursors. *FEBS Lett*. 585:3372-3377, 2011.
- 4) Miyamoto T., Yokoyama M., Shioda T., Sato H., and Nakayama E. A single amino acid of human immunodeficiency virus type 2 capsid protein affects conformation of two external loops and viral sensitivity to TRIM5 $\alpha$ . *PLoS One* 6:e22779, 2011.
- 5) Yoshii H., Kamiyama H., Goto K., Oishi K., Katunuma N., Tanaka Y., Hayashi H., Matsuyama T., Sato H., Yamamoto N., and Kubo Y. CD4-independent human immunodeficiency virus infection involves participation of endocytosis and cathepsin B. *PLoS One*. Apr 25;6:e19352, 2011.
- 6) Shibata J., Sugiura W., Ode H., Iwatani Y., Sato H., Tsang H., Matsuda M., Hasegawa N., Ren F., and Tanaka H. Within-host co-evolution of Gag P453L and protease D30N/N88D demonstrates virological advantage in a highly protease inhibitor-exposed HIV-1 case. *Antiviral Res*. 90:33-41, 2011.
- 7) 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.

## 研究分担者

間 陽子

- 1) Takeda E, Matsuda G, Murakami T, Zako T, Maeda M, Aida Y. Nuclear Exportin Receptor CAS Regulates the NPI-1-mediated Nuclear Import of HIV-1 Vpr, submitted in PLOS ONE, 6, 11, e27815, 2011.
- 2) Ishii H, Koyama H., Hagiwara K., Miura T., Xue G., Hashimoto Y., Kitahara G, Aida Y, Suzuki M: Synthesis and biological evaluation of hematoxylin derivatives as a novel class of anti-HIV-1 reagents, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, in press, 2011

## 岩谷靖雅

- 1) Li, J., Hakata, Y., Takeda, E., Liu, Q., Iwatani, Y., Kozak, CA., and Miyazawa, M. Two genetic determinants acquired late in Mus evolution regulate the inclusion of exon5, which alters mouse APOBEC3 translation efficiency. *PLoS Pathogens*, *in production*, 2011.
- 2) Kitamura, S., Ode, H., and Iwatani, Y. Structural features of antiviral APOBEC3 proteins are linked to their functional activities. *Frontiers in Microbiology* 2:258, 2011.
- 3) Shibata, J., Sugiura, W., Ode, H., Iwatani, Y., Sato, H., Tsang, H., Matsuda, M., Hasegawa, N., Ren, F., and Tanaka, H. Within-host co-evolution of Gag P453L and protease D30N/N88D demonstrates virological advantage in a highly protease inhibitor-exposed HIV-1 case. *Antiviral Research* 90:33-41, 2011.
- 4) Fujisaki, S., Yokomaku, Y., Shiino, T., Koibuchi, T., Hattori, J., Ibe, S., Iwatani, Y., Iwamoto, A., Shirasaka, T., Hamaguchi, M., and Sugiura, W. Outbreak of infections by hepatitis B virus genotype A and transmission of genetic drug resistance in patients coinfecting with HIV-1 in Japan. *Journal of Clinical Microbiology* 49:1017-1024, 2011.

## 塩田達雄

- 1) Ohishi, M., Nakano, T., Sakuragi, S., Shioda, T., Sano, K., and Sakuragi, JI. The relationship between HIV-1 genome RNA dimerization, virion maturation and infectivity. *Nucleic Acids Res*. 39(8):3404-17, 2011.
- 2) Miyamoto, T., Yokoyama, M., Kono, K., Shioda, T., Sato, H., and Nakayama, EE. A Single Amino Acid of Human Immunodeficiency Virus Type 2 Capsid Protein Affects Conformation of Two External Loops and Viral Sensitivity to TRIM5 $\alpha$ . *PLoS ONE*. 6(7): e22779, 2011.
- 3) Saito, A., Kono, K., Nomaguchi, M., Yasutomi, Y., Adachi, A., Shioda, T., Akari, H., and Nakayama, EE. Geographic, Genetic and functional diversity of antiretroviral host factor TRIMCyp in cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*). *J Gen Virol*. Nov 23, 2011.

## 岡本尚

- 1) Tan Gana NH, Victoriano AF, Okamoto T. Evaluation of online miRNA resources for biomedical applications. *Genes Cells*. 2011. (in press)
- 2) Victoriano AF, Okamoto T. Transcriptional control of HIV replication by multiple modulators and their implication for a novel anti-viral therapy. *AIDS Res Hum Retrovir*. 2011. (in press)
- 3) Asamitsu K, Hibi Y, Imai K, Victoriano AF, Kurimoto E, Kato K, Okamoto T. Functional characterization of

human cyclin T1 N-terminal region for human immunodeficiency virus-1 Tat transcriptional activation. *J Mol Biol.* 410:887-95. 2011.

- Victoriano AF, Imai K, Togami H, Ueno T, Asamitsu K, Suzuki T, Miyata N, Ochiai K, Okamoto T. Novel histone deacetylase inhibitor NCH-51 activates latent HIV-1 gene expression. *FEBS Lett.* 585:1103-11. 2011.

#### 野間口雅子

- Nomaguchi M, Doi N, Fujiwara S, Adachi A. Macaque-tropic HIV-1 derivatives: a novel experimental approach to understand viral replication and evolution *in vivo*. *HIV-Host Interactions*, pp.325-348, 2011.
- Adachi S, Adachi A, Nomaguchi M. Commentary on a new era of investigating 3D structure-based human-virus protein network dynamics. *Frontiers in Microbiology* 2: 186. doi:10.3389/fmicb.2011.00186, 2011.
- Nomaguchi M, Fujita M, Adachi A. The fourth major restriction factor against HIV/SIV. *Frontiers in Microbiology* 2:132. doi: 10.3389/fmicb.2011.00132, 2011.
- Saito, A., Kono, K., Nomaguchi, M., Yasutomi, Y., Adachi, A., Shioda, T., Akari, H., Nakayama, E.E. Geographic, Genetic and functional diversity of antiretroviral host factor TRIMCyp in cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*). *J. Gen. Virol.* doi:10.1099/vir.0.038075-0 (Epub Nov 23, 2011)
- Nomaguchi M, Adachi A. HIV-1 Vpr and G2 cell cycle arrest. *Future Microbiology* 6: 375-378, 2011.
- Doi, N., Fujiwara, S., Adachi, A., Nomaguchi, M. Rhesus M1.3S cells suitable for biological evaluation of macaque-tropic HIV/SIV clones. *Frontiers in Microbiology* 2: 115, 2011.

#### 増田貴夫

- Masuda, T. Non-Enzymatic Functions of Retroviral Integrase: The Next Target for Novel Anti-HIV Drug Development. *Frontiers in Microbiology* 2, 210, 2011.
- Yamamoto S P, Okawa K, Nakano T, Sano K, Ogawa K, Masuda T, Morikawa Y, Koyanagi Y, and Suzuki Y. Huwe1, a novel cellular interactor of Gag-Pol through integrase binding, negatively influences HIV-1 infectivity. *Microbes and infection.* 13. 339-349: 2011.

#### 村上 努

- Narumi, T., M. Komoriya, C. Hashimoto, H. Wu, W. Nomura, S. Suzuki, T. Tanaka, J. Chiba, N. Yamamoto, T. Murakami, and H. Tamamura. Conjugation of cell-penetrating peptides leads to identification of anti-HIV peptides from matrix proteins. *Bioorg. Med. Chem.* In press.
- Tanaka, T., T. Narumi, T. Ozaki, A. Sohma, N. Ohashi, C. Hashimoto, K. Itotani, W. Nomura, T. Murakami, N. Yamamoto, and H. Tamamura. Azamacrocyclic-metal complexes as CXCR4 antagonists. *Chem. Med. Chem.*, 6:834-839, 2011.
- Yanagita, H., E. Urano, K. Mastumoto, R. Ichikawa, Y. Takaesu, M. Ogata, T. Murakami, H. Wu, J. Chiba, J. Komano, and T. Hoshino. Structural and biochemical study on the inhibitory activity of derivatives of 5-nitro-furan-2-carboxylic acid for RNase H function of HIV-1 reverse transcriptase. *Bioorg. Med. Chem.* 19:816-825, 2011

#### 本村和嗣

- SahBandar I, Takahashi K, Motomura K, Djoerban Z, Firmansyah I, Kitamura K, Sato H, Pohan H.T, Sato S. The Indonesian variants of CRF33\_01B: near-full length sequence analysis. *AIDS Res Hum Retroviruses.* ;27(1):97-102 ; 2011.

#### 梁 明秀

- Sugiyama R, Nishitsuji H, Furukawa A, Katahira M, Habu Y, Takeuchi H, Ryo A, Takaku H. Heat shock protein 70 inhibits HIV-1 Vif-mediated ubiquitination and degradation of APOBEC3G. *J. Biol. Chem.* 25:286(12):10051-7, 2011.
- Yoshizaki S, Nishi M, Kondo A, Kojima Y, Yamamoto N, Ryo A. Vaccination with Human Induced Pluripotent Stem Cells Creates an Antigen-Specific Immune Response Against HIV-1 gp160. *Frontiers in Microbiology.* 2: 27, 2011.

#### 和文

##### 岩谷靖雅

- 徳永 研三、足立 昭夫、高折 晃史、中山 英美、岩部 幸枝、岩谷 靖雅. HIV-1 感染阻害因子. *日本エイズ学会誌* 13:56-62, 2011
- 岩谷 靖雅. 宿主防御因子 APOBEC3 ファミリーと抗レトロウイルス機序. *ウイルス* 61:61-72, 2011

##### 岡本尚

- 岡本 尚. HIV プロウイルスからの正および負の転写制御機構について. *ウイルス*. 61 : 81-90, 2011
- 酒井 幸、岡本 尚. 創薬インフォマティクスの実際. *Nagoya Medical Journal*, 2011, in press

##### 増田貴夫

- 増田貴夫. HIV-1 ゲノム逆転写過程の新規制御機構. *ウイルス* 61 : 73-83, 2011.



研究課題：HIVの感染防止、AIDS発症防止に関する免疫学的基礎研究

課題番号：H21-エイズ一般-008

研究代表者：森 一泰（国立感染症研究所エイズ研究センター 主任研究官）

研究分担者：松尾和浩（日本ビーシー製造株式会社 研究開発部長）、駒野 淳（国立感染症研究所エイズ研究センター 主任研究官）、高橋秀宗（国立感染症研究所 感染病理部 室長）、庄司省三（熊本大学薬学部 名誉教授）、玉村啓和（東京医科歯科大学生体材料工学研究所 メディシナルケミストリー分野 教授）、志田壽利（北海道大学遺伝子病制御研究所 感染病態分野 教授）、三浦智行（京都大学ウイルス研究所 感染症モデル研究センター 准教授）、保富康宏（医薬基盤研究所 霊長類医学研究センター センター長）、高橋秀実（日本医科大学 微生物学免疫学教室 教授）、高久 洋（千葉工業大学工学部 教授）

## 1. 研究目的

包括的なエイズ対策において、エイズワクチンの開発は根本的な解決策であり、不可欠である。本研究では、細胞性免疫とともに液性免疫を志向した獲得免疫、さらには自然免疫の概念まで加え、ワクチンによる包括的なHIV感染予防の道を探ることを目的とする。

## 2. 研究方法

(1) 前臨床ワクチン BCG ワクチンの低用量化 (BCG 通常用量：0.1 mg) を目的にウレアーゼ欠損 BCG 東京株の検討を行った。rBCG 株のカクテル (BCG-SIV gp120, rBCG-SIV RTN, rBCG-SIVgag-opt) をインド産アカゲザルに皮下接種し、rVVL16m8delta との prime/boost により感染防御効果を検討した (志田との共同研究) (松尾)。HIV Env と CD40Lm 共発現、CD40Lm 単独発現する各種 rVvm8Δ を作製し種々の組み合わせで Env 発現センダイウイルスベクター (SeV) と prime/boost 法でマウスに免疫し、細胞性免疫、Env 抗体、中和抗体を測定した (志田)。(2) 中和抗体 Env の立体構造に関する理解を深めるため機能的限定変異 Env ライブラリーと中和抗体 KD-247 を用いた結合-中和相関解析を行った (駒野)。gp41 の N 末側と C 末側のヘリックス領域ペプチドの再構築三量体、gp120 のヘアピン領域、コレセプター CXCR4 の N 末端領域と細胞外ループを基に合成した抗原分子の抗体誘導、中和活性を調べた。V3 抗体、CXCR4 アンタゴニストとの併用により抗 HIV 活性の相乗作用を示す CD4 ミミックを創製した (玉村)。抗原として gag 及び env 発現ベクター由来ウイルス様粒子の脂質膜を除いて Core-env 抗原を作成した。トランスジェニックラットへ免疫し、抗血清を得た。異なるサブタイプ env を有する、HIV-1 シュードウイルスを使用し中和試験を行った (高橋)。交叉免疫抗原 (X-factor) の有効性を検討した。CCR5 に対する抗体を誘導するための環状ペプチド cDDR5、SIVmac239 ENV (gp140)、M 細胞標的因子 TGDK を、高分子 PEG で構成されている Hub 抗原に結合させた HIV defense vaccine を調製し、アカゲザル (♀) 鼠頸部皮下に基礎免疫、Hub-TGDK-X-factor でブーストし、血清中の IgG 画分を精製後、抗体価と抗ウイルス活性を検討した。(庄司)。(3) アジュバント・自然免疫 SHIV の nef 欠損ウイルス (SHIV-NI) に抗酸菌分泌抗原 Ag85B を組み込み SHIV-Ag85B を作製し、SHIV-Ag85B と SHIV-NI をカニクイザルに接種し、ウイルス学的ならびに免疫学的な比較を行った (保富)。HIV-1 gag 発現バキュロウイルス (BV) をマウス骨髄由来樹状細胞 (BMDC) へ感染させた。感染後、BMDC の活性化を FACS にて、各種サイトカイン産生を ELISA にて定量した。その後、HIV-1 gag 発現 BV 感染 BMDC を Balb/c マウスに投与し、樹状細胞 (DC) および NK、CD4<sup>+</sup>T、CD8<sup>+</sup>T 細胞や B 細胞の CD69 発現、serum IFN-γ、IgG と Gag-specific cytotoxicity を測定した (高久)。HAART 療法実施症例において、回腸末端部から細胞を分離採取し、HIV 感染細胞の実体、粘膜に潜伏する HIV の V3

領域を遺伝子レベルで解析し、末梢血細胞内 HIV 遺伝子と比較する。(高橋)。(4) 生ワクチンモデル 糖鎖変異 SIV が誘導する感染防御に関連し、1) heterologous challenge を制御した個体に、制御が破綻したサルに出現した変異ウイルスを接種し、多種多様なウイルスに対する感染防御効果を検討した。2) 糖鎖変異 SIV 感染ザルについて、長期感染における獲得免疫、ウイルス感染、長期感染後の感染防御能について解析した。3) 糖鎖変異 SIV の初期感染における感染と免疫系への影響について解析した (森)。(5) ワクチン評価モデル ゲノム改変により種々の病態を呈する SIV/SHIV を得て、霊長類モデルによる感染実験系により防御効果や治療効果の評価基準を確立する (三浦)。(倫理面への配慮)

人材料の取り扱いに関しては、各研究施設の倫理委員会における指針をもとに研究を行う。動物実験は、各施設の諸内規や作業方式に従って、動物愛護の精神で動物に与える苦痛の軽減と排除に努める。

## 3. 研究結果

(1) 前臨床ワクチン ウレアーゼ欠損 BCG 東京株による Gag 特異的 IFN-γ 産生細胞が増加が確認された。コドン最適化 Gag, Env gp120, Rev-Tat-Nef を抗原とする BCG, rVVL16m8delta 株との prime/boost は、SIVmac low dose 経直腸頻回チャレンジにおいて防御効果 (2 頭中 1 頭) を示した (松尾)。Env 発現 m8Δ prime/SeV boost により細胞性と液性免疫が効率よく誘導された。さらに Env と CD40Lm 共発現 m8Δ による prime は抗 Env 抗体を大幅に増強した。Tier 2 中和抗体も検出された (志田)。(2) 中和抗体 定常状態トリガンド結合状態でそれぞれ質の異なるドメイン間相互作用により Env の立体構造が強固に維持されていることが判明した (駒野)。gp41 の N 末側の三量体は、単量体に比べて強い抗体誘導能、中和活性を示した。C 末側の三量体は抗体誘導能、中和活性、さらに単量体に比べて強い阻害活性を示した。gp120 ヘアピン領域については Fab フェージライブラリーから、mAb を得た。CXCR4 の N 末端領域と細胞外ループ 1, 2 の合成ペプチドには顕著な抗体誘導能、中和活性を見出した。種々の CD4 ミミック等合成により侵入阻害活性、gp120 構造変化誘起能を持つ化合物を見つけた (玉村)。Core-env 抗原のラットへの免疫により、サブタイプ A, B, D, AG に対し、希釈倍率 100 倍以上で ID50 以上の阻害を示す血清を見出した (高橋)。HIV defense vaccine を基礎免疫済みのサルへの Hub-TGDK-X-factor 投与により、血清中に ENV 抗体および CCR5 抗体がブーストされ、X-factor の交叉免疫抗原としての有効性が示された。常時抗 ENV 抗体および抗 CCR5 抗体を誘導し続ける HIV vaccine system の構築に重要である (庄司)。(3) アジュバント・自然免疫 SHIV-Ag85B は親株に比べ血漿中のウイルス量のピークが低く、早期に検出感度以下となった。末梢血リンパ球より SHIV DNA の検出を試みた。SHIV-NI 感染ザルでは観察

期間を通じて検出されたが、SHIV-Ag85B 感染では早期に検出不能となった。また、SHIV-Ag85B 感染では SHIV-NI 感染に比べ細胞性免疫が強く誘導されていた(保富)。HIV-1 gag 発現 BV 感染 BMDC をマウスに投与し、脾臓 DC、NK、CD4<sup>+</sup>T、CD8<sup>+</sup>T 細胞、B 細胞の活性化が認められた。血清中の IFN- $\gamma$ 、IgG の上昇と脾臓細胞の Gag 特異的な細胞障害性、APOBEC の発現上昇も認められた。一過性の系であるが、DC ワクチンによる感染制御が確認できた(高久)。HAART により血中 HIV が消失した状態において、CD4<sup>+</sup>DC や CD4<sup>+</sup>NKT 細胞内に末梢血感染 HIV とは異なる、R5-type, X4-type HIV が区画化 (compartment) された形で小腸粘膜組織内において存在し、この区画化は病状進行に伴い破綻する可能性が確認された(高橋)。(4)生ワクチンモデル 1) Heterologous チャレンジを防御した個体は、持続感染を起したが、感染を制御した個体は、多様なウイルスのチャレンジ感染も制御した。2) 糖鎖変異 SIV 感染ザルにおける血漿ウイルス量は、10 年間以上、検出限界以下となった。CD8 抗体投与により感染が確認された個体では SIVmac239 チャレンジ感染を抑制したが、感染が確認されなかった個体では感染抑制を示さなかった。3) 初期感染において、糖鎖変異 SIV と SIVmac239 はそれぞれ異なる CD4<sup>+</sup>T 細胞(Th17, pre-Th1)に感染していた。(森)。(5)ワクチン評価モデル 中和感受性の X4 型 SHIV-KS661 の V3 領域の 5 カ所のアミノ酸を置換することで R5 型にした SHIV-MK1 は親株と同等の中和感受性であり、サル個体における増殖能は低かった。しかし、SHIV-MK1 をサル個体継代により馴化した SHIV-MK38 は、中和抵抗性になっていた。(三浦)。

#### 4. 考察

rBCG/rVV prime/boost ワクチンは統計学的な検証が求められる。rVV については SeV ベクターとの prime/boost による抗体誘導能についても今後の研究結果が期待される。抗体誘導、細胞性免疫誘導に関する基礎研究は、今後、臨床研究への具体的な貢献が求められる。しかし、獲得免疫以外の宿主応答が、多様性・変異性を特徴とする HIV の感染防御には必要と考えられる。自然免疫系の免疫細胞は、特に感染初期、感染と播種、持続感染の成立において鍵となる役割が報告されている。生ワクチンが誘導する SIV 感染防御の機構との関連が示唆される。

#### 5. 自己評価

##### 1) 達成度について

BCG ベクターと増殖型 vv の prime/boost により、SIVmac 経粘膜感染防御効果が見られた。実用化への大きな足掛かとなる(松尾)。CD40Lm 発現は VVm8 $\Delta$ における細胞性、液性免疫の両方に増強効果を示し、特に Tier2 中和抗体の誘導は感染防御ワクチンの可能性を示唆した(志田)。本研究法により X 線構造解析や heterologous virus panel では得られなかった E n v の立体構造特性が初めて明らかになった。他のウイルス株と抗体の組み合わせで解析することにより中和抗体誘導抗原の構造理解が深まることが期待される(駒野)。アプローチした 4 種で抗体誘導に成功したが、gp41 の N 末側と C 末側のヘリックス領域ペプチドの三量体は非常に高い有用性を示した。今後のワクチンの

デザインに大きな方向性を示す(玉村)。Core-env 抗原はラットでも、マウス同様、異なるサブタイプに対する中和抗体を誘導し、HIV ワクチン抗原としての有効性が確認された(高橋)。交叉免疫抗原(X-factor)の結果は、常時抗体を誘導し続ける新しい HIV vaccine system 構築への発展を期待させる(庄司)。ウイルス作製、感染、病態、免疫の解析、いずれにおいても他に報告がなく、HIV ワクチン開発、HIV 感染制御において極めて重要な知見が得られた。(保富)。HIV-1 gag 発現 BV 感染 BMDC は DC ワクチンとしての優れた免疫誘導能を発揮し、感染制御がマウスレベルで確認できた。HIV-1 DC ワクチン開発への貢献が期待される(高久)。HAART 中断によって出現する HIV は、末梢血由来ではなく、粘膜組織における自然免疫担当細胞内由来であることを明らかにした。今後のエイズ制御への新たな指標を提示するものとなろう(高橋)。生ワクチンが誘導する防御免疫の多種多様な HIV による感染に対する有効性が示唆された。その機構として、すでに感染しているウイルスの感染制御に働く宿主応答によるチャレンジ感染の防御が示唆された。糖鎖変異 SIV の初期感染においては SIVmac239 の標的細胞である pre-Th1 細胞での感染が非常に低いことから、この機序の解明が、HIV の病原性・防御免疫の解明の鍵になっていることが示唆された(森)。アカゲザルで良く増殖する中和抵抗性 R5 型の SHIV を得た。今後、中和抗体誘導型ワクチンの評価系の確立に繋がるものと期待できる(三浦)。

##### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

現在、抗レトロウイルス薬の役割に大きな関心が向けられているが、エイズの世界的な蔓延をもっとも効率よく防ぐにはワクチンしかない。本研究班からの感染防御免疫に関する研究成果が感染予防ワクチン、感染制御治療法の開発につながることを期待される。

##### 3) 今後の展望について

HIV 感染制御には多重の宿主応答が働いていると推測される。個々の感染防御に働く宿主応答の解明と評価モデルでの検証を行うことにより有効な免疫治療、予防ワクチン開発の実現に貢献することが期待される。

#### 6. 結論

班員の密な協力と情報交換のもと、HIV 感染予防ワクチンの開発研究を総合的に行った。特に、プライムブースト新規ベクター開発、広域中和抗体、アジュバント自然免疫、生ワクチンモデル、ワクチン評価モデルの研究を精力的に行い、有用な結果が得られた。

##### 7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

特願 2011-175781 粘膜免疫賦活剤特願(庄司)

特願 2011-177385 分子擬態粘膜エイズワクチン(庄司)

遺伝子導入用ウイルスベクターの製造方法(特願 2011-025234)(保富)

国際特許申請(米国)、KPCT011:平成 22 年 9 月 10 日:医薬組成物を製造する方法:(高久洋、鈴木友幸、チャンミンウー、山本典生、若林一夫、千葉工業大学)

## 研究発表

## 研究代表者

森 一泰

- 1) Kaoru Takeuchi, Noriyo Nagata, Sei-ich Kato, Yasushi Ami, Yuriko Suzuki, Tadaki Suzuki, Yuko Sato, Yasuko Tsunetsugu-Yokota, Kazuyasu Mori, Nguyen Van Nguyen, Hideki Kimura and Kyosuke Nagata. Wild-type measles virus with the hemagglutinin protein of the Edmonston vaccine strain retains wild-type tropism in macaques. J. Virol. In press.
- 2) Taeko K. Naruse, Yukiko Okuda, Kazuyasu Mori, Hirofumi Akari, Tetsuro Matano, Akinori Kimura. ULBP4/RAE T1E is highly polymorphic in the Old World monkey. Immunogenetics. 63, 501, 2011.

## 研究分担者

松尾和浩

- 1) Matsuo K, Yasutomi Y. *Mycobacterium bovis* bacilli Calmette-Guerin vector for global infectious disease control. Tuberculosis Research and Treatment 2011: Article ID 574591, 2011.

## 志田壽利

- 1) Fofana IB, Colantonio AD, Reeves RK, Connole MA, Gillis JM, Hall LR, Sato S, Audin CR, Evans DT, Shida H, Johnson RP, Johnson WE. Flow cytometry based identification of simian immunodeficiency virus Env-specific B lymphocytes. J Immunol Methods. 370:75-85. 2011.
- 2) Mina Hikichi, Minoru Kidokoro, Takeshi Haraguchi, Hideo Iba, Hisatoshi Shida, Hideaki Tahara, Takafumi Nakamura. MicroRNA Regulation of Glycoprotein B5R in Oncolytic Vaccinia Virus Reduces Viral Pathogenicity without Impairing its Antitumor Efficacy. Mol. Ther. 19:1107-15. 2011.
- 3) Mika Nagai-Fukataki, Takashi Ohashi, Iwao Hashimoto, Tominori Kimura, Yoshiyuki Hakata, Hisatoshi Shida. Nuclear and Cytoplasmic Effects of Human CRM1 on HIV-1 Production in Rat Cells. Genes to Cells 16:203-216. 2011.

## 駒野 淳

- 1) Takizawa M, Miyauchi K, Urano E, Kusagawa S, Kitamura K, Naganawa S, Murakami T, Honda M, Yamamoto N, Komano J. Regulation of the susceptibility of HIV-1 to a neutralizing antibody KD-247 by non-epitope mutations distant from its epitope. AIDS. 25(18):2209-2216. 2011.
- 2) Watanabe T, Urano E, Miyauchi K, Ichikawa R, Hamatake M, Misawa N, Sato K, Ebina H, Koyanagi Y, Komano J. The Hematopoietic Cell-Specific Rho GTPase Inhibitor ARHGDI/D4GDI Limits HIV Type 1 Replication. AIDS Res Hum Retroviruses. 2011. Epub ahead.
- 3) Imadome K, Yajima M, Arai A, Nakazawa A, Kawano F, Ichikawa S, Shimizu N, Yamamoto N, Morio T, Ohga S, Nakamura H, Ito M, Miura O, Komano J, Fujiwara S. Novel mouse xenograft models reveal a critical role of CD4+ T cells in the proliferation of EBV-infected T and NK cells. PLoS Pathog. 7(10):e1002326. 2011.
- 4) Urano E, Kuramochi N, Ichikawa R, Murayama SY, Miyauchi K, Tomoda H, Takebe Y, Nermut M, Komano J, Morikawa Y. Novel postentry inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 replication screened by yeast membrane-associated two-hybrid system. Antimicrob Agents Chemother. 55(9):4251-60. 2011.
- 5) Aoki T, Miyauchi K, Urano E, Ichikawa R, Komano J. Protein transduction by pseudotyped lentivirus-like nanoparticles. Gene Ther. 18(9):936-41. 2011.

## 高橋秀宗

- 1) Ohtaki N, Takahashi H, Kaneko K, Gomi Y, Ishikawa T, Higashi Y, Todokoro M, Kurata T, Sata T, Kojima A. Purification and concentration of non-infectious West Nile virus-like particles and infectious virions using a pseudo-affinity Cellufine Sulfate column. J Virol Methods. 174(1-2):131-5. 2011.

## 庄司省三

- 1) Misumi S, Inoue M, Dochi T, Kishimoto N, Hasegawa N, Takamune N, Shoji S: Uncoating of human immunodeficiency virus type 1 requires polyisomerase Pin1. J Biol Chem. 285:25185-25195, 2010.

## 玉村啓和

- 1) Nomura W, Hashimoto C, Ohya A, Miyauchi K, Urano E, Tanaka T, Narumi T, Nakahara T, Komano J, Yamamoto N, Tamamura H: Synthetic C34 Trimer of HIV-1 gp41 Shows Significant Increase of Inhibition Potency. ChemMedChem. In press.
- 2) Narumi T, Arai H, Yoshimura K, Harada S, Nomura W, Matsushita S, Tamamura H: Small Molecular CD4 Mimics as HIV Entry Inhibitors. Bioorg Med Chem 19 : 6735-6742, 2011.
- 3) Tanaka T, Narumi T, Ozaki T, Sohma A, Ohashi N, Hashimoto C, Itotani K, Nomura W, Murakami T, Yamamoto

N, Tamamura H: Azamacrocyclic-metal Complexes as CXCR4 Antagonists. *ChemMedChem* 6: 834–839, 2011.

- 4) Xu C, Liu J, Chen L, Liang S, Fujii N, Tamamura H, Xiong H: HIV-1 gp120 Enhances Outward Potassium Current via CXCR4 and cAMP-Dependent Protein Kinase  $\alpha$  Signaling in Cultured Rat Microglia. *Glia* 59: 997-1007, 2011.
- 5) Hashimoto C, Tanaka T, Narumi T, Nomura W, Tamamura H: The Success and Failures of HIV Drug Discovery. *Expert Opin Drug Discovery* 6: 1067-1090, 2011.

#### 三浦智行

- 1) Kuwata, T., Katsumata, Y., Takaki, K., Miura, T. and Igarashi, T.: Isolation of potent neutralizing monoclonal antibodies from an SIV-Infected rhesus macaque by phage display. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 27: 487-500, 2011.
- 2) Takahara, Y., Matsuoka, S., Kuwano, T., Tsukamoto, T., Yamamoto, H., Ishii, H., Nakasone, T., Takeda, A., Inoue, M., Iida, A., Hara, H., Shu, T., Hasegawa, M., Sakawaki, H., Horiike, M., Miura, T., Igarashi, T., Naruse, T. K., Kimura, A. and Matano, T.: Dominant induction of vaccine antigen-specific cytotoxic T lymphocyte responses after simian immunodeficiency virus challenge. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 408: 615-619, 2011.
- 3) Nakamura, M., Takahara, Y., Ishii, H., Sakawaki, H., Horiike, M., Miura, T., Igarashi, T., Naruse, T. K., Kimura, A., Matano, T., and Matsuoka, S.: Major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic T 1 lymphocyte responses during primary simian immunodeficiency virus infection in Burmese rhesus macaques. *Microbiol. Immunol.* 55: 768-773, 2011.

#### 保富康宏

- 1) Saito, A., Kono, K., Nomaguchi, M., Yasutomi, Y., Adachi, A., Shioda, T., Akari, H. and Nakayama, E. E. Geographic, Genetic, and Functional Diversity of Antiretroviral Host Factor TRIMCyp in Cynomolgus Macaque (*Macaca fascicularis*) *J. Gen. Virol.* In press.
- 2) Matsuo, K. and Yasutomi, Y. Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guérin as a vaccine vector for global infectious disease control. *Tuberculosis Res. Treat.* 2011.
- 3) Chono, H., Saito, N., Yasutomi, Y., Mineno, J., and Kato, I. In vivo safety and persistence of endoribonuclease gene-transduced CD4+ T cells in cynomolgus macaques for HIV-1 gene therapy model. *PloS One*. 6: 2011.
- 4) Yama, N., Terao, K., Yasutomi, Y., Mineno, J., Kim, S., Inoue, M. and Kato, I. Acquisition of HIV-1 resistance in T lymphocytes using an ACA-specific E. coli mRNA interferase. *Human Gene Ther.* 22:35-43. 2011.
- 5) Saito, A., Nomaguchi, M., Iijima, S., Lee, Y.-J., Kono, K., Nakayama, E. E., Shioda, T., Yasutomi, Y., Adachi, A., Matano, T., Akari, H. A novel monkey-tropic HIV-1 derivative encoding only minimal SIV sequences can replicate in cynomolgus monkeys. *Micobes and Infection*. 13:58-64. 2011.

#### 高橋秀実

- 1) Nakagawa, Y., Watari, E., Shimizu, M., and Takahashi, H. One-step simple assay to determine antigen-specific cytotoxic activities by single-color flow cytometry. *Biomedical Res.* 32:159-166, 2011.
- 2) Takahashi, H. CO-operation of innate and acquired immunity for controlling tumor cells. *Melanoma in The Clinic* (Ed. Murph. M.) Chapter 7: 107-114, 2011.
- 3) Takahashi, M., Matsumura, J., Inagaki, S., and Takahashi, H. Induction of CD56+ T cells after prolonged activation of T cells in vitro: a possible mechanism for CD4+ T-cell depletion in acquired immune deficiency syndrome patients. *Human Immunol.*, 72:783-790, 2011.
- 4) Inagaki, S., Takahashi, M., Fukunaga, Y., and Takahashi, H. HLTL-I-infected breast milk macrophages inhibit monocyte differentiation to dendritic cells. *Viral Immunol.* 25: 2011.

#### 高久 洋

- 1) Chang MO, Suzuki T, Suzuki H, Takaku H. HIV-1 Gag-Virus-Like Particles Induce Natural Killer Cell Immune Responses via Activation and Maturation of Dendritic Cells. *J. Innate Immun.* 2011.
- 2) Sugiyama R, Nishitsuji H, Furukawa A, Katahira M, Habu Y, Takeuchi H, Ryo A, Takaku H. Heat shock protein 70 inhibits HIV-1 Vif-mediated ubiquitination and degradation of APOBEC3G. *J. Biol. Chem.* 286(12): 10051-10057. 2011.
- 3) Nishitsuji H, Yokoyama M, Sato H, Yamauchi S, Takaku H. Identification of amino acid residues in HIV-1 reverse transcriptase that are critical for proteolytic processing of Gag-Pol precursors. *FEBS Lett.* 585:3372-3377. 2011.

研究課題：HIV 感染病態に関わる宿主因子および免疫応答の解明

課題番号：H21-エイズ-一般-009

研究代表者：横田 恭子（国立感染症研究所 免疫部 室長）

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 教授）、宮澤 正顕（近畿大学医学部 免疫学教室 教授）、田中 勇悦（琉球大学大学院医学研究科 免疫学講座 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 免疫治療学研究室 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 感染症予防治療分野 教授）、上野 貴将（熊本大学エイズ学研究センター 准教授）

## 1. 研究目的

本研究班では、ウイルス制御に関わる宿主因子の同定と作用機構、HIV 感染後の病態形成に重要な役割を果たす多様な抗 HIV 免疫応答について *in vivo* および *in vitro* の系を確立して解析し、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・潜伏化阻止のための基盤を形成する。

## 2. 研究方法

宿主因子による HIV 制御：1) Vpu による BST-2/Tetherin 抑制を補助する因子の探索とともに HIV 感染者における BST-2 と APOBEC3G (A3G) 発現動態を PCR 定量した。また、HIV-1 ベクターウイルス粒子に Vpx 蛋白を取り込ませ、Vpx と相互作用する樹状細胞(DC)蛋白のプロテオーム解析を行った。2) DNA 損傷 (DSB)薬剤 (etoposide や bleomycin) を用い、Integrase (IN) 変異 HIV-1 あるいは IN 阻害剤存在下での感染・挿入効率、Vpr と複合体を形成する Topoisomerase I(TopoI)と Vpr が誘導する DSB の関係について解析した。3) ヒト造血幹細胞移植免疫不全マウス(ヒト化マウス)に野生型と Vpu 欠損 HIV-1 を感染させ、細胞表面抗原や IFN 誘導能を調べた。また、BST-2 と Vpu の分子間相互作用を bi-molecular fluorescent complementation 法で解析した。4) イタリアとタイのコホートにおいて Rac2 遺伝子の機能的多型とエイズ病態や免疫活性化について統計学的解析を行った。また、マウスレトロウイルスに感染した APOBEC3 ノックアウトマウスの B リンパ球機能や表面分子発現変化について解析した。

抗 HIV 免疫応答の解析：1) 異なる蛍光を発する R5 と X4 型 HIV-1 の同時感染において *in vitro* およびヒト化マウス体内でのウイルス増殖、感染細胞動態や分化段階を解析し、GFP を発現する麻疹レンチベクターや麻疹ウイルスの生体内感染様式を確認した。2) 固相化抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体で活性化させた PBMC に HIV-1 を感染させ、3 種類の抗 CXCR4 抗体による HIV-1 抑制効果を

解析した。3) 健常人 T 細胞を抗 CD3/CD28 抗体、retinoic acid、TGF- $\beta$  で刺激して IL-2 存在下に培養維持し、レポーター HIV-1 への感受性を調べた。4) 血中 HIV 量の異なる慢性 HIV 感染者 PBMC において非特異的刺激により産生される  $\beta$ ケモカイン、IFN- $\gamma$ 、IL-2 の遺伝子発現を経時的に比較した。5) 北タイ長期 HIV 感染未発症者コホートの HLA と HIV-1 gag/pol 遺伝子配列に基づいてアジア特有の HLA 型と病態との相関を解析した。6) Positional Scanning Synthetic Combinatorial Peptide Library を作製して HIV 感染者から樹立した HIV Nef(VY8)特異的 CTL の変異ペプチドに対する交差反応性を調べた。

(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の承認を得た後、個人情報保護法に基づいて患者情報の徹底管理下にて実施された。動物実験は実験動物委員会の承認を得、動物愛護の精神に則って動物に与える苦痛の軽減と排除に勤めた。

## 3. 研究結果

宿主因子：1) HIV 感染者の AG3 や BST-2 発現レベルは病態と相関しなかった。Vpx-Vpr 融合タンパク含有 HIV-1 粒子を DC に効率よく感染させ、Vpx と相互作用する DC タンパクを 8 種類同定した。2) IN 非依存的感染において DSB は integration 効率をあげてウイルス産生を高めることと Vpr が TopoI の機能を阻害し Cleavage complex 形成を介して DSB を誘導する可能性を示した。3) 感染個体内では Type I IFN が誘導され、Vpu 依存的に CD4 と BST-2 の発現低下およびウイルス産生増大がおこること、BST-2 の膜貫通領域が Vpu と相互作用するドメインであることが明らかになった。4) イタリアとタイに共通の Rac2 intron5 の感染抵抗性ハプロタイプは CD4 陽性 T 細胞維持に貢献し、大きく 3 つの系統樹に分かれること、3'noncoding 領域の多型は免疫活性化に関わることが明らかとなった。また、AG3 を欠く B リンパ球はレトロウ

イルス感受性が高く、NKG2DのリガンドRAE-1発現が増加してNKの標的となりやすいことが示された。

**免疫応答：**1) X4とR5型HIV-1の同時感染においてR5型HIV-1は*in vitro*でも*in vivo*でも低レベル活性化にある記憶T細胞に選択的に感染増殖すること、麻疹ウイルスワクチン株がヒト化マウスのCD4陽性T細胞で効率よく増殖することを確認した。2)抗CXCR4抗体はX4のみならずR5型HIV-1対しても $\beta$ -chemokineの発現誘導やCCR5発現抑制を介してウイルス増殖を抑制した。3)長期培養可能なヒトiTreg様T細胞株を樹立し、HIV-1の感染感受性が高いことを示した。4)血中HIV量の高い慢性感染者では長時間培養では差はないものの、低HIV量の感染者に比して刺激後5時間のIFN- $\gamma$ とIL-2タンパク産生が低く、刺激後2.5時間ではIL-2のタンパク質、mRNAともに発現量が顕著に低かった。5)CTL epitopeとアジア人特有のHLAの関係を解析する一方で、最適CTL epitopeを推定する新たな精度の高いコンピューター解析モデルを開発した。6)HIV感染者由来3つのNef特異的CTLクローンのTCR $\alpha$ 鎖は共通してTRAV1が可変領域であり、野生型ペプチドに最も高い反応性を示したが、交差反応性は異なっていた。変異アミノ酸情報からインフルエンザのヘマグルチニンペプチドとの交差反応性が明らかとなった。

#### 4. 考察

VpuがCD4やBST-2の発現抑制を介して生体内でのウイルス増殖に寄与していることはヒト化マウスで確認された。既知の制御因子では認めなかったものの、新たなVpuに対する補助因子やVpx標的蛋白が明らかになれば、それらが病態形成に関わる可能はある。Vprに関しては、IN非依存的なHIV感染成立にDSBが関与しているとしても、VprとTopoIの相互作用によるDSBの生理学的意義に関してはIN阻害剤治療後の感染者の細胞等で検証が必要であろう。一方、我々のMVレンチベクター、Gag発現麻疹ワクチンあるいは共刺激分子とケモカインレセプターに対する抗体投与によるHIV制御の可能性は、マウスモデルで検証可能であり、治療法開発のための重要な一歩となる。更に、慢性感染者における抗原刺激に対する即時IL-2応答性の欠如やCTLの交差性拡大の有無は病態形成の制御を試みる時の有用な指標となるであろう。タイHIV感染者のHLAに関与するCTLと病態の関係、Rac2遺伝子の多型が関与する感染抵抗性や免疫活性化に関しては大規模コホートの存在がもたらした大きな成果であり、HIV感染者の少ないわが国のエイズ研究の発展には、今後とも海外との協体制度は不可欠である。

#### 5. 自己評価

##### 1) 達成度について

班全体がめざした共同体制は不完全ながらも、個々の宿主因子の作用機構や多様な抗HIV免疫応答についてはそれぞれの解析系が確立され、小動物モデルの利用価値も明らかとなった。その中からいくつかの新しい基盤的知見も蓄積され、達成度は高いと評価する(85%)。

##### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

Vpu, Vpr, Vifと相互作用する細胞因子に関して*in vitro*と*in vivo*の解析結果は一部論文発表もされて、国際的評価を受けた。免疫応答の多様性や免疫制御の試みも同様で、これらの成果は今後の治療法開発の基盤をなすものであり、将来的に学術上のみならず、社会的に貢献しうる大事な知見が蓄積された。

##### 3) 今後の展望について

現在のエイズ研究における世界的課題である潜伏感染と慢性活性化の理解とその制御法の開発に向けて本研究班で確立された小動物モデルとそれによる検証系を利用し、発展性の高い研究課題に焦点を絞って共同研究を展開することにより、将来の治療法開発に貢献したい。

#### 6. 結論

VifやVpuに拮抗するA3GやBST-2の病態進行との関わりは否定されたが、生体内でBST-2がHIV-1初期感染を制御していることは明白となった。また、VprによるDSBはTopoI作用を介すること、IN非依存的な感染効率増加にDSBが関与することが示された。R5型HIV-1の優位性がヒト化マウスモデルでも実証され、麻疹ワクチンやレンチベクター、CXCR4分子の特定のエピトープを認識する抗体とOX40刺激によるHIV制御の可能性が見えてきた。また、HIV慢性感染者ではIL-2等のサイトカインの即答性が欠如していることが病態形成に重要であり、CTLの交差反応性に対する包括的理解も進んだ。コホート研究により、アジア人特有のHLA拘束性CTLの解析とコンピューターモデル化が進行し、Rac2遺伝子ハプロタイプとエイズ病態発症の相関が明らかになった。

#### 7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

##### 1. 特許取得

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」  
欧州での特許承認 PCT/JP2008/054563

##### 2. 実用新案登録

該当無し

## 研究発表

## 研究代表者

## 横田恭子

- 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.*, in press, 2012
- 2) 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
- 3) 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

## 研究分担者

## 徳永研三

- 1) 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.
- 2) 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.

## 石坂幸人

- 1) 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: 721-35, 2011
- 2) Taneichi D, Iijima K, Doi A, Koyama T, Minemoto Y, Tokunaga K, Shimura M, Ishizaka Y. Identification of SNF2h, a chromatin-remodeling factor, as a novel binding protein of Vpr of human immunodeficiency virus type 1. *J. Neuroimmune Pharmacol* 6: 177-87, 2011.

## 小柳義夫

- 1) Kobayashi T, Ode H, Yoshida T, Sato K, Gee P, Yamamoto SP, Ebina H, Strebel K, Sato H, 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.
- 2) Sato K, Misawa N, Nie C, Satou Y, Iwakiri D, Matsuoka M, Takahashi R, Kuzushima K, Ito M, Takada K, Koyanagi Y. A novel animal model of Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in humanized mice. *Blood* 117: 5663-5673, 2011.
- 3) Sato K, 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.

## 宮澤正顕

- 1) 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 Pathogens, in press, 2011 (DOI: 10.1371/journal.ppat.1002478).

- 2) 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.
- 3) 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.

#### 田中勇悦

- 1) Adachi T, Tanaka R, Kodama A, Saito M, Takahashi Y, Ansari AA, Tanaka Y. Identification of an unique CXCR4 epitope whose ligation inhibits infection by both CXCR4 and CCR5 tropic human immunodeficiency type-I viruses. *Retrovirology*. 2011 8:84.
- 2) 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-1receptors and human OX40 ligand efficiently eliminates HIV-1-infected CD4-positive T cells expressing OX40. *Hum Immunol*. 2011 72(4):295-304.

#### 神奈木真理

- 1) M. Kannagi, A. Hasegawa, S. Kinpara, Y. Shimizu, A. Takamori, A. Utsunomiya. Double control of viral expression by innate and acquired immunity in Human T-cell leukemia virus type-I infection. *Cancer Sci.* 102 : 670-676, 2011.

#### 立川 愛

- 1) 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.*, in press

#### 有吉紅也

- 1) Mori M, Sriwanthana B, Wichukchinda N, Boonthimat C, Tsuchiya N, Miura T, Pathipvanich P, Ariyoshi K, 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
- 2) 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

#### 上野貴将

- 1) 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
- 2) 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: e27696, 2011



研究課題：HIV 感染防御免疫誘導に関する研究

課題番号：H21-エイズ一般-007

研究代表者：俣野 哲朗（国立感染症研究所エイズ研究センター センター長）

研究分担者：保富 康宏（独立行政法人医薬基盤研究所薬学部長類医科学研究センター センター長）、三浦 聡之（東京大学医科学研究所 准教授）、森川 裕子（北里大学北里生命科学研究所 教授）、寺原 和孝（国立感染症研究所免疫部 研究員）、横山 勝（国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター 主任研究官）

## 1. 研究目的

HIV 感染者数増大はグローバルな視点で取り組み克服すべき国際的重要課題である。特に流行地域で極めて深刻な状況にあり、感染拡大が抗 HIV 薬耐性変異や免疫逃避変異を有する HIV 株流行に結びつく危険性も問題視されている。本研究は、この問題解決に必要な予防エイズワクチン開発を目指すものである。

HIV は感染後誘導される免疫反応によっても排除されきらず持続感染に至るため、エイズワクチン開発では、自然感染の模倣を基本とする従来のワクチンの概念を超えた新戦略が必要となる。特に、HIV 感染標的が免疫担当細胞であるため、免疫活性化が必ずしも HIV 複製抑制に結びつかず、逆に複製促進に結びつく可能性がある。そこで本研究は、HIV 複製抑制に結びつく防御免疫反応を選択的に誘導する予防エイズワクチン開発を目的とする。

我々が開発したセンダイウイルス (SeV) ベクターを用いた細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) 誘導エイズワクチンは、サルエイズモデルで初めて有効性を示した点で注目され、HIV 感染拡大抑制効果を期待した第 1 世代ワクチンとして、国際エイズワクチン推進構想 (IAVI) との国際共同臨床試験計画が米国にて進展中である。本研究では、この第 1 世代ワクチンの有効性確立に向けた研究を進展させるとともに、より高い防御効果を有する第 2 世代エイズワクチン開発に向け、HIV 複製抑制に結びつく CTL の選択的誘導に関する研究を進めることとした。一方、我々は近年、中和抗体受動免疫が機能的 T 細胞反応誘導を促進する可能性を示したが、この抗体と T 細胞の協調作用を期待して中和抗体誘導に関する研究を開始した。

具体的には、HIV 複製抑制に結びつく免疫誘導法の選別により、有効な防御免疫を選択的に誘導する予防エイズワクチン確立への進展を企図し、以下の研究を行うこととした。特に (i) ウイルス多様性に対応した CTL 反応、(ii) ヘルパー T リンパ球 (HTL) 反応、(iii) 中和抗体反応と T 細胞反応の協調作用等に注目し、サル免疫不全ウイルス (SIV) 感染サルエイズモデルにおいて、ワクチンによる免疫誘導が曝露後のウイルス複製に与える影響を検証するとともに、HIV 感染者の解析も行い抗原選択に関する検討を進めることとした。

### 1. CTL 誘導ワクチンのデリバリーシステムの研究

1-1. SeV ベクターワクチンシステムの最適化 (俣野)

1-2. 併用プライム法の開発 (保富)

### 2. CTL 誘導ワクチンの抗原選択法の研究

2-1. CTL 抗原提示効率の解析 (森川)

2-2. CTL 逃避変異の解析 (三浦・俣野)

2-3. 各種抗原特異的 CTL メモリー誘導効果の解析 (俣野)

### 3. HTL 反応と中和抗体反応についての研究

3-1. HTL 反応が HIV 複製に及ぼす影響の解析 (寺原)

3-2. 中和抗体誘導に結びつく抗原構造の推定 (横山)

平成 23 年度は、以下の研究を行った。

1-1. 抗 SeV 抗体存在下の SeV ベクターワクチン経鼻接種効果解析の推進

1-2. E 型肝炎ウイルス様粒子 (HEV-VLP) を用いた SIV 抗原発現 DNA ワクチンのサルでの免疫誘導能の解析

2-1. 細胞内 Gag 蛋白動態の解析

2-2. 日本人 HIV 感染者における HLA 関連変異と gag・protease 領域変異が HIV 複製に及ぼす影響の解析

2-3. ワクチンによる CTL メモリー誘導が SIV 曝露後の CTL 優位性および SIV 複製抑制に及ぼす影響の解析

3-1. SIV 感染慢性期の SIV 特異的 HTL 反応の解析

3-2. HIV Env gp120 構造計算および三量体モデル構築

## 2. 研究方法

(1-1) サルでの SIV Gag 発現 SeV (SeV-Gag) ベクターワクチン経鼻・筋肉内接種による Gag 特異的 CTL 誘導実験において、抗 SeV 抗体反応に関する検討等を加えた。

(1-2) 経口投与可能な E 型肝炎ウイルス (HEV) の VLP に HIV Env エピトープを組み込んだキメラ VLP (VLP-HIVenv) ベクターの内腔に SIV gag cDNA を封入したワクチン 10 mg をカニクイザルに 2 週おきに 3 回経口投与し、HIV/SIV 特異的免疫誘導を解析した。

(2-1) 細胞内 Gag 蛋白動態について、サイクロヘキシミド処理 (新規蛋白合成阻害)、MG132 処理 (プロテアソーム分解阻害)、クロロキン処理 (エンドソーム分解阻害) 等により定量的に解析した。さらに Gag-EGFP 発現系を構築し細胞内動態を調べた。

(2-2) 1992-2009 年に東京大学医科学研究所附属病院を受診した無症候日本人未治療慢性 HIV-1 陽性者の血漿から gag・protease 領域を増幅し、HIV 実験株 NL4-3 分子クローンに挿入してキメラウイルスを作製し、その複製能の時代的変化をみた。

(2-3) MHC-I (主要組織適合遺伝子複合体クラス I) ハプロタイプ A 共有サル群において、これまでの研究から高い SIV 複製抑制能を有することが示されている SIV Gag206-216 (Gag206) エピトープおよび Gag241-249 (Gag241) エピトープ特異的 CTL に着目し、各々の単独エピトープ特異的 CTL メモリーの誘導が、SIV 曝露後の CTL 反応および SIV 複製におよぼす影響を解析した。具体的には、DNA プライム・SeV ベクターブーストワクチンシステムを用い、非ワクチン接種群 (第 I 群、n=6)、Gag 特異的 CTL (Gag206・Gag241 特異的 CTL の両者) 誘導ワクチン接種群 (第 II 群、n=5)、Gag241 特異的 CTL 誘導ワクチン接種群 (第 III 群、n=6)、Gag206 特異的 CTL 誘導ワクチン接種群 (第 IV 群、n=5) の比較検討を行った。

(3-1) 非ワクチン接種サルに加え、DNA プライム・SeV-Gag ベクターブーストワクチン接種サルも含めて、SIV 感染慢性期 (20-34 週) の SIV 特異的 HTL 反応を解析した。具体的には、ワクチン非接種群 12 頭およびワクチン接種群 11 頭の末梢血リンパ球を用い、SIV Gag・Pol・Vif・Vpx 発現細胞との共培養による抗原刺激後、CD4 陽性 T リンパ球における MIP-1β・IL-2・TNF-α・IFN-γ・CD107a 誘導を細胞内免疫染色により検出した。

(3-2) ホモロジーモデリング法により、V1/V2 ループを含む HIV gp120 単量体分子モデルを構築した。この単量体分子モデルに糖鎖を付加し、分子動力学計算を行ってより最適な構造を得た。PDB より得た電子顕微鏡構造に分子モデルを重ね合わせ、三量体分子モデルを構築した。(倫理面への配慮)

遺伝子組換え生物等を用いる実験については、実施機関の承認あるいは文部科学大臣の確認を得ている。動物実験については、実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針を遵守し、実施機関の動物実験委員会の承認を得てから開始した。ヒトサンプルを用いる研究については、該当する倫理指針を遵守し、実施機関の倫理委員会の承認を得てから開始した。

### 3. 研究結果

(1-1) SeV-Gag ベクター経鼻接種と筋肉内接種の比較では、誘導される血漿中抗 SeV 抗体は後者の方が優位に高値を示した。2回接種による Gag 特異的 CTL 誘導効率の比較では、経鼻接種の方が優れていることが示唆された。

(1-2) 血中・糞便中の HIV Env および VLP 特異抗体の解析では、VLP ワクチン接種群で HIV Env に対する免疫誘導が確認された。

(2-1) 新規蛋白合成を止めると細胞内の Gag 蛋白量は徐々に減少した。プロテアソーム阻害剤 MG132 処理にてこの減少は阻止されたが、クロロキン処理では阻止されなかった。Gag-EGFP 発現細胞の蛋白合成を止めると、Gag-EGFP の減少と局在変化が認められた。

(2-2) 2000 年以前の HIV-1 陽性者に関する解析では、HLA-A24 の発現の有無により、キメラウイルスの複製能に差が認められたが (A24 陽性 < A24 陰性)、近年では、その違いが認められなくなっていた。

(2-3) SIV 曝露後 2 週目、I 群・II 群では Gag206 特異的 CTL・Gag241 特異的 CTL の両者の反応が認められたが、III 群では Gag241 特異的 CTL 反応、IV 群では Gag206 特異的 CTL 反応のみが認められ、群間で CTL 優位性に大きな違いがみられた。5 週目には、II 群・IV 群で Gag206 特異的 CTL からの逃避変異選択が認められたが、III 群では変異が認められなかった。II 群・III 群では全頭で SIV 複製が制御されたが、IV 群では 2 頭が持続感染を呈した。

(3-1) ワクチン非接種群・ワクチン接種群ともに、感染慢性期の SIV 特異的 HTL の多機能性と血漿中ウイルス量の逆相関を示した。

(3-2) HIV gp120 三量体分子モデルより、V1/V2 ループはウイルス粒子の最外殻に配置され gp120 を覆うと予測された。さらに、糖鎖が gp120 外側ドメインおよび V1/V2 ループにあるため、gp120 はほぼ全体が糖鎖に覆われることが示唆された。

### 4. 考察

(1) SeV ベクター複数回接種において経鼻接種が有利であることが確認された。ヒトにおいては、hPIV-1 抗体の交差認識により低レベルの抗 SeV 中和抗体保有が認められるが、3 年間の本研究により、SeV ベクターワクチン経鼻接種に関しては、このレベルの抗 SeV 中和抗体存在下でも効率よい CTL 誘導能を呈することが示されたことから、CTL 誘導ワクチンとしてヒトでの有用性が期待できる。一方、経口 VLP ワクチンは、粘膜免疫誘導ワクチンとして、併用プライム候補となりうる。

(2) Gag 蛋白の主な分解経路はプロテアソーム経路であると考えられた。この知見は Gag 抗原提示効率を考えるうえで重要である。なお、Gag-EGFP 検出系は Gag 蛋白の分解経路や速度解析系として有用である。HIV 感染者の解析では、邦人で最も頻度の高い HLA-A24 に拘束される CTL 応答からの逃避変異によりウイルス複製能が減弱すると仮定すると、近年、その逃避変異体が邦人集団内に広がり、優勢な HIV 株になっている可能性が考えられた。サルエイズモデルでの解析では、ワクチンによる CTL メモリー誘導が SIV 曝露後の CTL 優位性に大きく影響する

ことに加え、CTL 逃避変異選択の促進・遅延に結びつくことが明らかとなった。したがって、ワクチン抗原選択の仕方、ワクチン抗原特異的 CTL と非ワクチン抗原特異的 CTL の協調パターンに違いが生ずることが判明した。

(3) 感染感染慢性期において体内ウイルス量が低いほど HTL の機能が維持されると考えられた。HIV gp120 三量体分子モデルでは、V1/V2 ループはウイルス粒子の最外殻に配置され、V3 の近傍に位置し、そのため、V1/V2 ループの揺らぎの程度および V3 の配置が、抗 V3 抗体の V3 へのアクセスのしやすさを決めると考えられた。

### 5. 自己評価

#### 1) 達成度について

研究費削減により CTL 反応解析等のためのサル実験の規模を縮小したが、基本的には研究計画に沿って目指したレベルの成果を得た。本研究で得られた Gag 蛋白動態、HIV 変異および CTL メモリー誘導効果に関する知見は、有効な CTL 誘導に結びつくワクチン抗原選択に方向性を与える重要な斬新な成果であり、SeV デリバリーシステムに関して得られた成果とともに、エイズワクチン開発を加速するものとして高く評価できる。

#### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

ワクチンによる CTL メモリー誘導が SIV 曝露後の CTL 反応に及ぼす影響について得られた結果は極めて斬新かつ重要な成果である。さらに、Gag 蛋白動態、HIV 変異、HTL 多機能性および Env 構造に関して得られた成果についても学術的・国際的意義は高い。これらは、第 1 世代エイズワクチンの有効性確立および有効な免疫反応を選択的に誘導する第 2 世代エイズワクチン開発に結びつくものであり、社会的意義も極めて高い。

#### 3) 今後の展望について

本研究で得られた成果をもとに、HIV 複製抑制に結びつく CTL 誘導エイズワクチンの抗原選択を推進するとともに、中和抗体誘導抗原獲得に向けた研究を展開する。

### 6. 結論

CTL 誘導ワクチンのデリバリーシステム最適化に向けた研究では、SeV ベクターの接種経路として経鼻接種が有利であることを確認するとともに、併用プライム候補となりうる経口 VLP ワクチンの免疫誘導能を確認した。CTL 誘導抗原選択法の樹立に向けた研究では、Gag 蛋白の主な分解経路はプロテアソーム経路であることを示す重要な結果を得た。邦人 HIV 感染者の解析から CTL 逃避変異株の広がりを示唆する結果を得た。サルエイズモデルでは、CTL 誘導ワクチン抗原選択のための重要な知見として、ワクチンによる CTL メモリー誘導が SIV 曝露後の CTL 優位性、ワクチン抗原および非ワクチン抗原特異的 CTL の協調パターンに大きく影響することを示す結果を得た。また、感染慢性期の HTL 多機能性と体内ウイルス量の逆相関を確認した。HIV Env 三量体モデルを構築し、V1/V2 ループが抗体の中和エピトープへのアクセス障壁となっていることを示唆する結果を得た。これらは、第 1 世代エイズワクチンの有効性確立および有効な免疫反応を選択的に誘導する第 2 世代エイズワクチン開発に結びつく重要な成果である。

### 7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

- (1) 遺伝子導入用ウイルスベクターの製造方法 (特願 2011-025234)。
- (2) 新規な組換え BCG ワクチン (特願 2011-199422)。

## 研究発表

## 研究代表者

俣野 哲朗

- 1) Takeuchi, H., Ishii, H., Kuwano, T., Inagaki, N., Akari, H., and Matano, T. Host cell species-specific effect of cyclosporine A on simian 1 immunodeficiency virus replication. *Retrovirology*, in press.
- 2) Saito, Y., Naruse, T.K., Akari, H., Matano, T., and Kimura, A. Diversity of MHC class I haplotypes in cynomolgus macaques. *Immunogenetics*, in press (Epub on Sep. 1, 2011).
- 3) Ishii, H., Kawada, M., Tsukamoto, T., Yamamoto, H., Matsuoka, S., Shiino, T., Takeda, A., Inoue, M., Iida, A., Hara, H., Shu, T., Hasegawa, M., Naruse, T.K., Kimura, A., Takiguchi, M., and Matano, T. Impact of vaccination on cytotoxic T lymphocyte immunodominance and cooperation against simian immunodeficiency virus replication in rhesus macaques. *J. Virol.* 86:738-745, 2012.
- 4) Seki, S., and Matano, T. CTL escape and viral fitness in HIV/SIV infection. *Front. Microbiol.* 2:267, 2012.
- 5) Moriya, C., Horiba, S., Kurihara, K., Kamada, T., Takahara, Y., Inoue, M., Iida, A., Hara, H., Shu, T., Hasegawa, M., and Matano, T. Intranasal Sendai viral vector vaccination is more immunogenic than intramuscular under pre-existing anti-vector antibodies. *Vaccine* 29:8557-8563, 2011.
- 6) Nakamura, M., Takahara, Y., Ishii, H., Sakawaki, H., Horiike, M., Miura, T., Igarashi, T., Naruse, T.K., Kimura, A., Matano, T., and Matsuoka, S. Major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic T lymphocyte responses during primary simian immunodeficiency virus infection in Burmese rhesus macaques. *Microbiol. Immunol.* 55:768-773, 2011.
- 7) Matsuoka, S., and Matano, T. Strategy for prevention of HIV-1 transmission. *Journal of Disaster Research* 6:421-425, 2011.
- 8) Naruse, T.K., Okuda, Y., Mori, K., Akari, H., Matano, T., and Kimura, A. ULBP4/RAET1E is highly polymorphic in the Old World monkey. *Immunogenetics* 63:501-509, 2011.
- 9) Takahara, Y., Matsuoka, S., Kuwano, T., Tsukamoto, T., Yamamoto, H., Ishii, H., Nakasone, T., Takeda, A., Inoue, M., Iida, A., Hara, H., Shu, T., Hasegawa, M., Sakawaki, H., Horiike, M., Miura, T., Igarashi, T., Naruse, T.K., Kimura, A., and Matano, T. Dominant induction of vaccine antigen-specific cytotoxic T lymphocyte responses after simian immunodeficiency virus challenge. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 408:615-619, 2011.

## 研究分担者

保富 康宏

- 1) Iwasaki, Y., Mori, K., Ishii, K., Maki, N., Iijima, S., Yoshida, T., Okabayashi, S., Katakai, Y., Lee, J., Saito, A., Fukai, H., Kimura, N., Ageyama, N., Yoshizaki, S., Suzuki, T., Yasutomi, Y., Miyamura, T., Kannagi, M., and Akari, H. Long-term persistent GBV-B infection and development of a chronic and progressive hepatitis C-like disease in marmosets. *Front. Microbiol.*, in press.
- 2) Hirata, H., Kawai, S., Maeda, M., Jinnai, M., Fujisawa, K., Katakai, Y., Hikosaka, K., Tanabe, K., Yasutomi, Y., and Ishihara, C. Identification and phylogenetic analysis of Japanese Macaque Babesia-1 (JM-1) detected from a Japanese Macaque (*Macaca fasciata fasciata*). *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, in press.
- 3) Saito, A., Kono, K., Nomaguchi, M., Yasutomi, Y., Adachi, A., Shioda, T., Akari, H., and Nakayama, E.E. Geographic, Genetic, and functional diversity of antiretroviral host factor TRIMCyp in cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*) *J. Gen. Virol.*, in press.
- 4) Matsuo, K., and Yasutomi, Y. Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guérin as a vaccine vector for global infectious disease control. *Tuberculosis Res. Treat.* Epub 2011.
- 5) Chono, H., Saito, N., Yasutomi, Y., Mineno, J., and Kato, I. In vivo safety and persistence of endoribonuclease gene-transduced CD4+ T cells in cynomolgus macaques for HIV-I gene therapy model. *PLoS One* 6: Epub 2011.
- 6) Xing, L., Wang, J.C., Li, T.C., Yasutomi, Y., Lara, J., Purcell, R., Takeda, N., Miyamura, T., and Holland, R.C. Spatial configuration of hepatitis E virus antigenic domain. *J. Virol.* 85:1117-1124, 2011.
- 7) Chono, H., Matsumoto, K., Tsuda, H., Saito, N., Lee, K., Kim, S., Shibata, H., Ageyama, N., Terao, K., Yasutomi, Y., Mineno J., Kim, S., Inoue, M., and Kato, I. Acquisition of HIV-1 resistance in T lymphocytes using an ACA-specific E.coli mRNA interferase. *Human Gene Ther.* 22:35-43, 2011.
- 8) Okabayashi, S., Uchida, K., Ohno, C., Hanari, K., Goto, I., and Yasutomi, Y. Periventricular Leucomalacia(PVL)-like lesions in two neonatal cynomolgus monkeys (*macaca fascicularis*). *J. Comp. Pathol.* 144:204-211, 2011.

## 三浦 聡之

- 1) Nakayama, K., Nakamura, H., Koga, M., Koibuchi, T., Fujii, T., Miura, T., Iwamoto, A., and 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*, in press (Epub on Sep 23, 2011).
- 2) Mori, M., Sriwanthana, B., Wichukhinda, 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(8):e22680, 2011.
- 3) Huang, KH., Goedhals, D., Carlson, J.M., Brockman, M.A., Mishra S, Brumme, Z.L., Hickling, S., Tang, C.S., Miura, T., Seebregts, C., Heckerman, D., Ndung'u, T., Walker, B., Klenerman, P., Steyn, D., Goulder, P., Phillips, R., Bloemfontein-Oxford Collaborative Group, van Vuuren, C., and Frater, J. Progression to AIDS in South Africa is associated with both reverting and compensatory viral mutations. *PLoS One* 6(4):e19018, 2011.

- 4) Dahirel, V., Shekhar, K., Pereyra, F., Miura, T., Artyomov, M., Talsania, S., Allen, T.M., Altfeld, M., Carrington, M., Irvine, D.J., Walker, B.D., and Chakraborty, A.K. Coordinate linkage of HIV evolution reveals regions of immunological vulnerability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 108(28):11530-11535, 2011.

森川 裕子

- 1) Fukuma, A., Abe, M., Urata, S., Yoshikawa, R., Morikawa, Y., Miyazawa, T., and Yasuda, J. Viral and cellular requirements for the budding of feline endogenous retrovirus RD-114. *Virol. J.*, in press.
- 2) Fukuma, A., Kurosaki, Y., Morikawa, Y., Grolla, A., Feldmann, H., and Yasuda, J. Rapid detection of Lassa virus by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. *Microbiol. Immunol.* 55: 44-50, 2011.
- 3) Yamamoto, S.P., Okawa, K., Nakano, T., Sano, K., Ogawa, K., Masuda, T., Morikawa, Y., Koyanagi, Y., and Suzuki, Y. Huwe1, a novel cellular interactor of Gag-Pol through integrase binding, negatively influences HIV-1 infectivity. *Microbes Infect.* 13: 339-349, 2011.
- 4) Tomita, Y., Noda, T., Fujii, K., Morikawa, Y., and Kawaoka, Y. The cellular factors Vps18 and Mon2 are required for efficient production of infectious HIV-1 particles. *J. Virol.* 85: 5618-5627, 2011.
- 5) Fukuma A., Abe, M., Morikawa, Y., Miyazawa, T., and Yasuda, J. Cloning and characterization of the antiviral activity of feline Tetherin/BST-2. *PLoS One* 6: e18247, 2011.
- 6) Urano E., Kuramochi, N., Ichikawa, R., Yamagata Murayama, S., Miyauchi, K., Tomoda, H., Takebe, Y., Nermut, M., Komano, J., and Morikawa, Y. A novel postentry inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 replication screened by yeast membrane-associated two-hybrid system. *Antimicro. Agents Chemth.* 55: 4251-4260, 2011.

寺原 和孝

- 1) Terahara, K., Yamamoto, T., Mitsuki, 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.*, in press.

横山 勝

- 1) Miyamoto, T., Yokoyama, M., Kono, K., Shioda, T., Sato, H., and Nakayama, E.E. A single amino acid of human immunodeficiency virus type 2 capsid protein affects conformation of two external loops and viral sensitivity to TRIM5 $\alpha$ . *PLoS ONE* 6: e22779, 2011.
- 2) Nishitsuji, H., Yokoyama, M., Sato, H., Yamauchi, S., and Takaku, H. Identification of amino acid residues in HIV-1 reverse transcriptase that are critical for the proteolytic processing of Gag-Pol precursors. *FEBS Letters* 585:3372-3377, 2011.