

201124031A

HIV-1感染・発症霊長類モデル研究： 宿主内因性及び獲得免疫解析に基づく 前臨床評価システムの最適化

平成23年度総括・分担研究報告書

研究代表者 **明里 宏文**

京都大学霊長類研究所・教授

平成24(2012)年3月

HIV-1 感染・発症霊長類モデル研究：
宿主内因性及び獲得免疫解析に基づく
前臨床評価システムの最適化

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 明里 宏文
京都大学霊長類研究所 教授

平成23年3月(2012年)

HIV-1 感染・発症霊長類モデル研究：
宿主内因性及び獲得免疫解析に基づく前臨床評価システムの最適化

研究代表者

明里 宏文 京都大学霊長類研究所 教 授

研究分担者

足立 昭夫 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 教 授

高折 晃史 京都大学大学院医学研究科 教 授

中山 英美 大阪大学微生物病研究所 助 教

松岡 佐織 国立感染症研究所エイズ研究センター 研究員

研究協力者

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

保富 康宏 医薬基盤研究所霊長類医科学研究センター センター長

目 次

総括研究報告書

HIV-1 感染・発症霊長類モデル研究：宿主内因性及び獲得免疫解析に基づく 前臨床評価システムの最適化	6
--	---

研究代表者 明里 宏文（京都大学霊長類研究所 教授）
 研究分担者 足立 昭夫（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 教授）
 高折 晃史（京都大学医学研究科 教授）
 中山 英美（大阪大学微生物病研究所 助教）
 松岡 佐織（国立感染症研究所エイズ研究センター 研究員）

分担研究報告書

サル指向性HIV-1のサル類評価検証研究.....	14
---------------------------	----

研究分担者 明里 宏文（京都大学霊長類研究所 教授）
 研究協力者 齊藤 暁（京都大学霊長類研究所 特定研究員）

サル病原性HIV-1クローンの構築	18
-------------------------	----

研究分担者 足立昭夫（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 教授）

Vif関連感染抵抗性因子を回避するHIV-1最適化に関する研究.....	22
--------------------------------------	----

研究分担者 高折 晃史（京都大学医学研究科 血液・腫瘍内科 教授）

Gagと相互作用する感染抵抗性因子を回避するHIV-1最適化・検証研究.....	24
--	----

研究分担者 中山 英美（大阪大学微生物病研究所 助教）

サル指向性HIV-1感染サルにおける細胞性免疫反応の解析.....	28
-----------------------------------	----

研究分担者 松岡 佐織（国立感染症研究所エイズ研究センター 研究員）
 研究協力者 高橋 尚史（国立感染症研究所エイズ研究センター 研究生）

研究成果の刊行物に関する一覧表

総括研究報告書

HIV-1 感染・発症霊長類モデル研究： 宿主内因性及び獲得免疫解析に基づく 前臨床評価システムの最適化

研究代表者 明里 宏文（京都大学霊長類研究所 教授）

研究分担者 足立 昭夫（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 教授）

高折 晃史（京都大学大学院医学研究科 教授）

中山 英美（大阪大学微生物病研究所 助教）

松岡 佐織（国立感染症研究所エイズ研究センター 研究員）

研究要旨

抗エイズ薬開発やワクチン開発研究において、その安全性・有効性を評価する上で実験用サル類を用いたトランスレーショナルリサーチは不可欠である。本研究では我々が報告したカニクイザル個体で増殖可能なサル指向性HIV-1（HIV-1mt）クローンを基礎に、宿主内因性及び獲得免疫の基礎的解析に基づき、急性・慢性HIV-1感染霊長類モデルの前臨床評価システムとしての最適化を目指す。今年度は、第3世代HIV-1mtクローンのサル感染実験結果より、これまでのHIV-1mtと比較して格段に複製効率が高いことが確認された。特に、HIV-1感受性に関するサル個体差をTRIM5遺伝子型が規定していることを*in vitro*のみならず*in vivo*でも実証し、HIV-1サルモデル確立に向けてフィリピン産カニクイザル個体の有用性が遺伝子レベルで実証されたことは特筆すべき成果である。さらにTetherinによる抗ウイルス効果を回避可能な第4世代HIV-1mt構築に成功した。これらの成果は、前臨床評価システムとして実用的なHIV-1感染サルモデルの実現に向け大きな進展であると考えられた。

A. 研究目的

新規抗HIV-1薬やワクチン開発、有効性評価研究において、実験用サル類を用いた前臨床試験は今や不可欠である。しかしHIV-1は実験用サル類に感染発症しないことから、これまでSIVおよびSHIV/マカクザル感染発症モデルが汎用されてきた。一方HIV-1特異的でSIV, SHIVモデルでは評価困難な新規薬剤や予防治療ワクチンの前臨床評価研究を目的として、実用的なHIV-1感染霊長類モデルの開発が求められてきた。当該研究課題では、サル類におけるHIV-1感染および病態発現の制御に寄与する宿主内因性及び獲得免疫の基礎的解析に基づき、慢性エイズを発症する病原性HIV-1感染霊長類モデルを確立し急性・慢性HIV-1感染霊長類モデルの前臨床評価システムとしての最適化を目指すものである。

B. 研究方法

本研究チームで同定済みのHIV-1宿主域を規定する宿主内因性免疫因子に関して、その機能ドメインや作用機序解析を進めるとともに、関連ウイルス遺伝子（gag-CA, vif, vpu等）との相互作用を規定する領域の分子構造生物学的検討を進める。この結果を基に、サル末梢血Tリンパ球での増殖能が向上した改良型HIV-1mtを構築し、カニクイザルにおける増殖能および免疫応答を評価する。本研究班においては、各研究班員が合目的に協調して本課題に取り組むことを主眼としている。

（倫理面への配慮）

本研究では改正動物愛法に基づいた動物福祉規程にのっとり、実験動物の飼育・実験・解剖作業を行う。また実験実施機関において実験動物委員会による承認を得た。また用いた組換え生物等については、第二種使用等拡散防止措置確認申請承認（大臣確認）済みである。

C. 研究結果

HIV-1mtの改良とサル細胞・個体での評価実験

高馴化型第3世代HIV-1mtであるMN4Rh-3は、カニクイザルPBMCおよび個体ともに第2世代HIV-1と比較して10倍程度高いウイルス増殖を示した（ $\sim 10^5$ viral RNA copies/ml）。またウイルス増殖に伴い、一過性ではあるが顕著なCD4陽性T細胞の減少が確認された。ウイルス血症はウイルス接種後6週で検出限界以下となったが、ウイルス接種後17週の時点でCD8特異抗体を投与しCD8陽性T細胞除去を行なったところHIV-1mt再活性化が生じウイルスRNAが検出された。このことから、MN4Rh-3はカニクイザルにおいて長期潜伏感染が可能であることが示された。興味深いことに、このサル個体から再分離されたウイルス株はサルPBMCでの増殖能が向上している結果を得ており、適変異を獲得した可能性について現在検証を進めている。

他方、更なるウイルス増殖効率の向上を念頭に、主要な抗HIV-1宿主内因性因子（APOBEC3、TRIM5 α 、CypAおよびTetherin）を回避するHIV-1mtクローンの構築を行なった。最も新しい第4世代HIV-1mtであるMN4/LSDQgtu（X4 type）およびMN5/LSDQgtu（R5 type）は、SIV（SIVmon/mus/gsn）由来vpu遺伝子を持ち、抗サルTetherin活性を示す。これらはプロトタイプであるNL-DT5Rと比較して30個程度のアミノ酸置換（全アミノ酸残基の1%）があるのみであるが、これ以前の様々なHIV-1mtに比較し格段にサル細胞株での増殖能が向上している。現在、サルPBMCにおける増殖能について検証を進めており、この結果を踏まえてカニクイザルにおける評価実験を実施予定である。

抗HIV-1宿主内因性因子に関する解析

我々はこれまでに、HIV-1mt増殖動態が接種カニクイザル個体によって顕著に異なること、TRIM5遺伝子アレルがその主な規定要因であることを示唆する知見を得た。そこで、TRIM5のHIV-1mtへの機能的意義を検討したところ、TRIMCyp（TRIM5 α の一部領域にcyclophilin Aの一部が挿入された変異型アレル）を有するカニクイザル個体では野生型であるTRIM5 α アレル保有個体と比較して、HIV-1mt感染における血中ウイルス量が約50倍高いことを見出した。興味深いことに、TRIM5 α /TRIMCyp頻度はカニクイザルの原産地に

よって大きく異なっており、フィリピン由来個体群におけるTRIMCypアレル頻度（87.0%）はインドネシア及びマレーシア由来個体群のアレル頻度（34.8%、48.9%）と比較して有意に高かった。この地理的多様性は、複数の国内カニクイザル繁殖飼育施設の個体および野生個体でも同様の傾向が認められたことから、カニクイザルのTRIMCypアレル頻度における地理的多様性が実証された。

さらに、ウイルス蛋白Vifとの機能的相互作用が示されている主要な抗HIV-1因子の一つであるAPOBEC3Gおよび癌抑制遺伝子p53について、Vifとの機能的相互作用を解析した。その結果、APOBEC3G Arg122がVifへの結合親和性に重要な役割を担っていること、またVifはp53のSer15、Ser20、Ser37およびSer46のリン酸化を増強させることを見出した。さらにSer15をAlaに置換した変異体ではVifによるp53の発現増強、転写活性増強、G2細胞周期停止がいずれも見られないことを見出した。これらの結果を踏まえ、今後HIV-1とSIV由来Vifの機能的互換性を分子構造科学的観点から探っていきたい。

D. 考察

本研究課題の最終目標は、HIV-1自体を標的としたワクチンや新規抗HIV薬の有効性評価が可能となる実用的なHIV-1感染霊長類モデルの開発である。第3世代HIV-1mtクローンのサル感染実験結果より、急性モデルによる新規薬剤や予防ワクチンの評価が実施可能と考えられる。特に、HIV-1感受性に関するサル個体差をTRIM5遺伝子型が規定していることを*in vitro*のみならず*in vivo*でも実証し、さらにHIV-1サルモデル確立に向けてフィリピン産カニクイザル個体の有用性が遺伝子レベルで実証されたことは特筆すべき成果である。今後はTRIM5遺伝子型に基づきHIV-1mt感受性個体を選別することで、より信頼性・再現性の高い霊長類モデル構築に寄与すると期待される。さらにTetherinによる抗ウイルス効果を回避可能な第4世代HIV-1mtは実用的なHIV-1感染サルモデルの実現に大きく貢献するものと期待され、サルPBMCでの検証実験が終了次第、サル個体での接種実験を行なう予定である。

ところで、CD4陽性T細胞の減少等の病原性を伴う持続感染HIV-1mtクローン確立を本研究の一つのゴールと見なした場合、現状での到達地点は

どの程度であろうか？病原性HIV-1やSIV感染初期におけるピーク時ウイルス量（約 10^7 copies/ml）を一つの評価基準とすると、第一世代DT5Rが 10^3 copies/ml以下、第三世代HIV-1mtであるMN4Rh-3が 10^5 copies/ml程度であることから、道半ばを越えたといったところである。他方、病原性に関してはMN4Rh-3感染ザルでCD4陽性T細胞の一過性であるが有意な減少が生じたことから、 10^5 copies/ml程度以上のウイルス血症が持続すれば病原性を発現すると考えられる。今後、より優れたクローン構築に向け、ウイルス・宿主因子との相互作用や機能決定に関わる新たな構造科学的情報と、それらに基づく宿主因子の回避能力を賦与する変異部位の選択・決定を積極的に推進していきたい。

現在世界に蔓延しているHIV-1の野外株（臨床分離株）由来R5指向性Envを有するHIV-1mtの作出は、今後の重要な課題である。これまで見出された抗HIV-1内因性因子は、Env以外のウイルス蛋白がその宿主域決定要因であった。これを踏まえ、次年度はCD4陽性T細胞の減少およびセットポイントを伴う持続感染HIV-1mtクローン、すなわち主要な内因性因子を回避可能なクローンの作出と平行して、R5指向性Envを持つHIV-1mtの最適化を重点課題として取り組む。

当該研究の目標に向けて、各研究班員が合目的に協調して本課題に取り組んだ結果、サル個体での増殖能が格段に向上したHIV-1mt樹立に成功し、のみならずTRIM5を初めとする宿主内因性因子の機能発現や宿主域規定に関わる新たな分子機構の発見に繋がったことは学術的にも特筆に値する。国際的にも当該研究分野において最先端にある。さらに抗HIV-1薬剤開発における臨床試験への「橋渡し研究」迅速化に向け更なる発展が大いに期待できる事から、社会的にもその意義は高い。

E. 結論

サル類におけるHIV-1感染および病態発現の制御に寄与する宿主内因性及び獲得免疫の基礎的研究成果に基づき、サル個体での増殖能が格段に向上したHIV-1mt樹立に成功し、さらにTRIM5を初めとする宿主内因性因子の機能発現や宿主域規定に関わる新たな分子機構を明らかにした。さらにTetherinによる抗ウイルス効果を回避可能な第4世代HIV-1mt構築に成功した。これらの成果は、前

臨床評価システムとして実用的なHIV-1感染サルモデルの実現に向け大きな進展であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

研究代表者：明里宏文

- 1) Iijima S, Lee Y-J, Ode H, Arold ST, Kimura N, Yokoyama M, Sato H, Tanaka Y, Strebel K, Akari H: A non-canonical mu-1A-binding motif in the N-terminus of HIV-1 Nef determines its activity to down-regulate MHC-I in T lymphocytes. *Journal of Virology*, in press.
- 2) Saito Y, Naruse TK, Akari H, Matano T, Kimura A: Diversity of MHC class I haplotypes in cynomolgus macaques. *Immunogenetics* 64, 131-141, 2012.
- 3) Yoshida T, Omatsu T, Saito A, Katakai Y, Iwasaki Y, Kurosawa T, Hamano M, Nakamura S, Takasaki T, Yasutomi Y, Kurane I, Akari H: CD16 positive natural killer cells play a limited role against primary dengue virus infection in tamarins. *Archives of Virology* 157, 363-368, 2012.
- 4) Takeuchi H, Ishii H, Kuwano T, Inagaki N, Akari H, Matano T: Host cell species-specific effect of cyclosporine A on simian immunodeficiency virus replication. *Retrovirology* 9, 3, 2012.
- 5) Saito A, Kono K, Nomaguchi M, Yasutomi Y, Adachi A, Shioda T, Akari H, Nakayama EE: Geographic, genetic and functional diversity of antiretroviral host factor TRIMCyp in Cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*). *Journal of General Virology* 93, 594-602, 2012.
- 6) Saito A, Nomaguchi M, Iijima S, Kuroishi A, Yoshida T, Lee YJ, Hayakawa T, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Yasutomi Y, Adachi A, Matano T, Akari H: Improved capacity of a monkey-tropic HIV-1 derivative to replicate in cynomolgus monkeys with minimal modifications. *Microbes and Infection* 13, 58-64, 2011.
- 7) Ohtani H, Nakajima T, Akari H, Ishida T, Kimura A: Molecular evolution of immunoglobulin superfamily genes in primates. *Immunogenetics* 63, 417-428, 2011.
- 8) Ito M, Katakai Y, Ono F, Akari H, Mukai RZ, Takasaki T, Kotaki A, Kurane I: Serotype-specific and cross-reactive neutralizing antibody responses

- in cynomolgus monkeys after infection with multiple dengue virus serotypes. **Archives of Virology** 156, 1073-1077, 2011.
- 9) Naruse TK, Okuda Y, Mori K, Akari H, Matano T, Kimura A: ULBP4/RAET1E is highly polymorphic in the Old World monkey. **Immunogenetics** 63, 501-509, 2011.
 - 10) Omatsu T, Moi ML, Hirayama T, Takasaki T, Nakamura S, Tajima S, Ito M, Yoshida T, Saito A, Katakai Y, Akari H, Kurane I: Common marmoset (*Callithrix jacchus*) as a primate Model of dengue virus infection: development of high levels of viremia and demonstration of protective immunity. **Journal of General Virology** 92, 2272-2280, 2011.
 - 11) Iwasaki Y, Mori K, Ishii K, Maki N, Iijima S, Yoshida T, Okabayashi S, Katakai Y, Lee Y-J, Saito A, Fukai H, Kimura N, Ageyama N, Yoshizaki S, Suzuki T, Yasutomi Y, Miyamura T, Kannagi M, Akari H: Long-term persistent GBV-B infection and development of a progressive chronic hepatitis C-like disease in marmosets. **Frontiers in Microbiology** 2, 240, 2011.
- pp.325-348, 2011.
- 7) Chutiwitoonchai N, Hiyoshi M, Mwimanzu P, Ueno T, Adachi A, Ode H, Sato H, Fackler OT, Okada S, Suzu S: The identification of a small molecule compound that reduces HIV-1 Nef-mediated viral infectivity enhancement. **PLoS ONE** 6, e27696, 2011
 - 8) Miyazaki Y, Miyake A, Nomaguchi M, Adachi A: Structural dynamics of retroviral genome and the packaging. **Frontiers in Microbiology** 2, 264.
 - 9) Saito A, Kono K, Nomaguchi M, Yasutomi Y, Adachi A, Shioda T, Akari H, Nakayama EE: Geographic, genetic, and functional diversity of antiretroviral host factor TRIMCyp in cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*). **Journal of General Virology** 93, 594-602, 2012.

中山英美

- 1) Saito A, Kono K, Nomaguchi M, Yasutomi Y, Adachi A, Shioda T, Akari H, Nakayama EE: Geographic, genetic and functional diversity of antiretroviral host factor TRIMCyp in cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*). **Journal of General Virology** 93, 594-602, 2012.
- 2) Miyamoto T, Yokoyama M, Kono K, Shioda T, Sato H, Nakayama EE: Single Amino Acid of Human Immunodeficiency Virus Type 2 Capsid Protein Affects Conformation of Two External Loops and Viral Sensitivity to TRIM5 α . **PLoS ONE** 6: e22779, 2011.
- 3) Saito A, Nomaguchi M, Iijima S, Kuroishi A, Yoshida T, Lee Y, Hayakawa T, Kono K, Nakayama EE, 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. **Microbes and Infection** 13, 58-64, 2011.

松岡佐織

- 1) 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 TK, Kimura A, Takiguchi M, Matano T: Impact of vaccination on cytotoxic T lymphocyte immunodominance and cooperation against simian immunodeficiency virus replication in rhesus macaques. **Journal of Virology** 86, 738-745, 2012.
- 2) Nakamura M, Takahara Y, Ishii H, Sakawaki H, Horiike M, Miura T, Igarashi T, Naruse TK, Kimura A, Matano T, Matsuoka S: Major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic T lymphocyte responses during primary simian

研究分担者

足立昭夫

- 1) Nomaguchi M, Adachi A: HIV-1 Vpr and G2 cell cycle arrest. **Future Microbiology** 6, 375-378, 2011.
- 2) 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. doi: 10.3389/fmicb.2011.00115, 2011.
- 3) Nomaguchi M, Fujita M, Adachi A: The fourth major restriction factor against HIV/SIV. **Frontiers in Microbiology** 2, 132, 2011.
- 4) Fujii H, Ato M, Takahashi Y, Otake K, Hashimoto S, Kaji T, Tsunetsugu- Yokota Y, Fujita M, Adachi A, Nakayama T, Taniguchi M, Koyasu S, Takemori T: HIV-Nef impairs multiple T cell functions in antigen-specific immune response in mice. **International Immunology** 23, 433-441, 2011.
- 5) 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, 2011.
- 6) 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**

- immunodeficiency virus infection in Burmese rhesus macaques. **Microbiology and Immunology** 55, 768-773, 2011.
- 3) Battivelli E, Migraine J, Lecossier D, Matsuoka S, Perez-Bercoff D, Saragosti S, Clavel F, Hance AJ: Modulation of TRIM5 α activity in human cells by alternatively spliced TRIM5 isoforms. **Journal of Virology** 85, 7828-7835, 2011.
 - 4) 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 TK, Kimura A, 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.
- gus macaques controlling a simian-tropic HIV-1 challenge. XV International Congress of Virology, Sept. 13, 2011, Sapporo, Japan.
- 2) Saito A, Nomaguchi M, Kono K, Nakayama, EE, Shioda T, Yoshida T, Yasutomi Y, Matano T, Adachi A, Akari H: Genotypic variation of cynomolgus monkey trim5 α determines the susceptibility to monkey-tropic HIV-1 infection. XV International Congress of Virology, Sept 15, 2011, Sapporo, Japan.
 - 3) 高橋尚史、齊藤 暁、野間口雅子、松岡佐織、足立昭夫、明里宏文、俣野哲朗：サル指向性 HIV-1 感染慢性潜伏期のカニクイサルからの感染性ウイルスの回収 第25回日本エイズ学会学術集会、2011年11月30日 東京。
 - 4) 野間口雅子、土肥直哉、藤原佐知、足立昭夫：Gag-CAおよびVpuの改変によるサル細胞でのHIV複製の増強 第25回日本エイズ学会学術集会 2011年12月1日 東京。
 - 5) 齊藤 暁、河野 健、中山英美、足立昭夫、野間口雅子、保富康宏、俣野哲朗、塩田達雄、明里宏文：サル指向性HIV-1への感受性に影響を与えるマカクサルTRIM5遺伝子の多様性 第25回日本エイズ学会学術集会 2011年12月2日 東京。

2. 学会発表

明里宏文

- 1) Akatsuki Saito, Masako Nomaguchi, Ken Kono, Emi E. Nakayama, Tatsuo Shioda, Tomoyuki Yoshida, Yasuhiro Yasutomi, Tetsuro Matano, Akio Adachi, Hirofumi Akari: Genotypic variation of cynomolgus monkey TRIM5 α determines the susceptibility to monkey-tropic HIV-1 infection. International Union of Microbiological Society 2011 Congress. 11-16 Septemver, 2011, Sapporo.
- 2) Akatsuki Saito, Masako Nomaguchi, Ken Kono, Emi E. Nakayama, Tatsuo Shioda, Tomoyuki Yoshida, Yasuhiro Yasutomi, Naofumi Takahashi, Tetsuro Matano, Akio Adachi, Hirofumi Akari: Susceptibility of cynomolgus monkeys to monkey-tropic HIV-1 infection is determined by TRIM5 α genotypes. 29th Annual Symopjium on Nonhuman Primate Models for AIDS. 25-28 October, 2011, Seattle.
- 3) 高橋尚史、齊藤 暁、野間口雅子、松岡佐織、足立昭夫、明里宏文、俣野哲朗：サル指向性 HIV-1 感染慢性潜伏期のカニクイサルからの感染性ウイルスの回収 第25回日本エイズ学会学術集会（東京）平成23年11月30日-12月2日
- 4) 齊藤 暁、河野 健、中山英美、足立昭夫、野間口雅子、保富康宏、俣野哲朗、塩田達雄、明里宏文：サル指向性HIV-1への感受性に影響を与えるマカクサルTRIM5遺伝子の多様性 第25回日本エイズ学会学術集会（東京）平成23年11月30日-12月2日

足立昭夫

- 1) Takahashi N, Saito A, Nomaguchi M, Adachi A, Akari H, Matano T: Viral recovery from cynomol-

高折晃史

- 1) Katsuhiko Io, Keisuke Shindo, Taisuke Izumi, Masashi Matsui, Masanobu Shinohara and Akifumi Takaori-Kondo: Phosphorylation of p53 is enhanced by HIV-1 Vif and required for Vif-induced G2 cell cycle arrest. Cold Spring Harbor Meeting on Retroviruses 2011
- 2) Taisuke Izumi, Katsuhiko Io, Masaru Yokoyama, Masanobu Shinohara, Kotaro Shirakawa, Masashi Matsui, Hiroshi Kondoh, Takashi Uchiyama, Hironori Sato, Keisuke Shindo, and Akifumi Takaori-Kondo: Arginine at position 122 of APOBEC3G might be involved in interaction to Vif, but not to RNA required for encapsidation. International Congress of Virology 2011

中山英美

- 1) 中山英美、Likansakul S, Rattanatham T, Feangvad S, Uttayamakul S, Prasithsirikul W, Tarkowski M, Riva A, 塩田達雄: 抗レトロウイルス療法副作用の発症に関わる宿主因子 第25回エイズ学会学術集会・総会 2011年 東京。
- 2) 齊藤 暁、河野 健、中山英美、足立昭夫、野間口雅子、保富康宏、俣野哲朗、塩田達雄、明

里宏文：サル指向性HIV-1への感受性に影響を与えるマカクサルTRIM5遺伝子の多様性 第25回エイズ学会学術集会・総会 2011年 東京.

- 3) Saito A, Nomaguchi M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Yoshida T, Yasutomi Y, Matano T, Adachi A, Akari H: Genotypic variation of cynomolgus monkey TRIM5alpha determines the susceptibility to monkey-tropic HIV-1 infection. 第59回日本ウイルス学会学術集会(International Congress of Virology) 2011年、札幌.
- 4) Miyamoto T, Yokoyama M, Kono K, Shioda T, Sato H, 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 α . 第59回日本ウイルス学会学術集会(International Congress of Virology) 2011年、札幌.
- 5) Kono K., Kuroishi A., Nakayama EE, Hulme AE, Hope TJ, Shioda T: Simian-tropic HIV-1 NL-4/5S6/7SVIFS shows slower capsid uncoating in human cells. 第59回日本ウイルス学会学術集会 (International Congress of Virology) 2011年、札幌

松岡佐織

- 1) Takahara Y, Nakamura M, Higashi R, Horiike M, Miura T, Igarashi T, Naruse T, Kimura A, Matano T, Matsuoka S: Cytotoxic T lymphocyte responses during highly active antiretroviral therapy in simian immunodeficiency virus-infected macaques. The XVth International Congress of Virology, Sapporo, Japan, 9/15/2011.
- 2) Takahara Y, Nakamura M, Sakawaki H, Miura T, Igarashi T, Koyanagi Y, Naruse T, Kimura A, Matano T, Matsuoka S: Impact of therapeutic vaccination during HAART on CTL immunodominance in SIV infection. The 12th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 10/21/2011.
- 3) 高橋尚史、齊藤 暁、野間口雅子、松岡佐織、足立昭夫、明里宏文、俣野哲朗：サル指向性HIV-1感染慢性潜伏期のカニクイサルからの感染性ウイルスの回収 第25回日本エイズ学会学術集会 東京 11/30/2011.
- 4) 中村 碧、高原悠佑、阪脇廣美、堀池麻里子、三浦智行、五十嵐樹彦、成瀬妙子、木村彰方、俣野哲朗、松岡佐織 サルエイズモデル感染初期におけるMHCクラスIハプロタイプ別のCTL反応優位パターンの解析 第25回日本エイズ学会学術集会 東京 11/30/2011.
- 5) Nakamura M, Takahara Y, Matsuoka S, Matano T: Analysis of cytotoxic T lymphocyte responses

under HAART in a macaque AIDS model. The 3rd Korea-Japan Joint Symposium on HIV/AIDS, Seoul, Korea, 12/10/2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況 無し

分担研究報告書

サル指向性HIV-1のサル類評価検証研究

研究分担者 明里 宏文 (京都大学霊長類研究所 教授)

研究協力者 齊藤 暁 (京都大学霊長類研究所 特定研究員)

研究要旨

我々は、実用的な前臨床評価システムの構築を目指して、HIV-1 霊長類感染・発症モデルの研究を進行している。本年度は、研究分担者である足立らが構築した新規サル指向性HIV-1 (HIV-1mt) について、カニクイザル末梢血単核球 (PBMC) および個体における増殖レベルを詳細に検討した。興味深いことに、PBMCにおける実験では、HIV-1mt感受性が大きく異なる個体群が存在し、また、その感受性の違いはサルの原産地に依存する傾向が認められた。この感受性の違いに何らかの遺伝的背景が関与しているとの作業仮説に基づき、TRIM5 遺伝子に着目して遺伝学的解析を行ったところ、本研究に用いた個体群には、野生型アリルTRIM5 α だけでなく、変異型アリルTRIMCypを持つ個体が高率に存在することが明らかになった。それぞれのTRIM5 遺伝子型の細胞におけるウイルス増殖を検討したところ、TRIM5 α homozygoteは高い抵抗性を示す一方で、TRIMCyp homozygoteは有意に高い感受性を示した。また、TRIMCyp頻度には明白な地域差が認められたことから、HIV-1mt感受性における地域差はTRIM5 遺伝子型に起因するものであることが示唆された。次に、TRIM5 遺伝子型がサル個体でのHIV-1mt増殖に与えるインパクトを評価するため、TRIM5 α homozygoteとTRIMCyp homozygoteにウイルスを接種し、経時的にウイルス増殖を解析した。その結果、TRIMCyp homozygoteでの血中ウイルスRNA量はTRIM5 α homozygoteでの値より30倍程度高いことが明らかとなった。また、TRIMCyp homozygoteにおいて、持続感染が成立していることを示唆する結果を得た。このことから、TRIM5 遺伝子型はサル個体においてもウイルス増殖レベルを規定する重要な因子であると考えられた。HIV-1mt増殖を規定する宿主因子を同定できたこと、また、サル個体での持続感染の成立を実現できたことから、本研究成果は今後の前臨床評価システム開発に大きく貢献すると考えられる。

A. 研究目的

本研究では、サル細胞での馴化により構築された新規サル指向性HIV-1 (以後、HIV-1mtとする) について、カニクイザル末梢血単核球 (PBMC) および個体における増殖レベルを評価し、実用的な抗HIV-1新規薬剤およびワクチンの前臨床システムとしてのHIV-1 霊長類感染モデルの最適化を進めることを目的とする。また、HIV-1mtの増殖に影響を与えることが予測されるカニクイザル抗

HIV-1 宿主因子について、遺伝学的、ウイルス学的解析を行うことで、より信頼性の高い評価システムの構築を目指す。

B. 研究方法

1. 第3世代HIV-1mtのMN4Rh-3について、カニクイザルの末梢血単核球 (PBMC) におけるウイルス増殖を検討した。実験の際にはPBMCをそのまま用いる群と、抗ウイルス作用を示す

- ことが予測されるCD8陽性細胞を除去した群を準備した。ウイルス増殖の評価はGagカプシドタンパク（p24）量をELISA法で測定することにより行った。
2. 上の実験の過程で、HIV-1mt感受性が大きく異なる2つの個体群が存在することが示唆された。特に、フィリピン原産の個体群は高い感受性を示し、インドネシア原産の個体群は高い抵抗性を示す傾向が見られた。このことから、何らかの遺伝的背景の存在が示唆されたことから、今回、TRIM5遺伝子について遺伝学的解析を行った。
 3. カニクイザル個体におけるMN4Rh-3の増殖を検討した。感染実験に用いる個体は、TRIMCyp homozygoteを6頭、TRIM5 α homozygoteを3頭用意した。感染に用いるウイルスストックはカニクイザルPBMCで調整した。ウイルス感染時にはp24量換算で10 ng/頭のウイルスを経静脈で接種した。感染後、経時的にreal-time PCRでウイルス量を、フローサイトメトリー解析で末梢血中CD4陽性T細胞数の変動を評価した。さらに、HIV-1特異的粒子凝集法（PA法）およびウェスタンブロッティングにより、HIV-1に対する抗体の誘導を評価した。
 4. MN4Rh-3感染ザルにおいて持続感染が成立しているかを明らかにするため、感染後17週目に抗CD8抗体をサルに投与し、CD8陽性細胞を除去することでウイルス増殖の再活性化が認められるかを検討した。
2. TRIM5遺伝子に着目して解析したところ、インドネシア原産の個体群では野生型アリルTRIM5 α が高率に存在し、フィリピン原産の個体群では変異型アリルTRIMCypを極めて高い頻度で保有していることが明らかになった。次に、TRIM5遺伝子型がウイルス増殖に与える影響を考察するため、各遺伝子型個体由来のPBMCにおけるウイルス増殖を検討したところ、MN4Rh-3はTRIMCyp homozygote由来の細胞において、TRIM5 α homozygote由来の細胞よりも有意に高い増殖を示した。
 3. 次に、TRIM5遺伝子型が*in vitro*のみならず*in vivo*においてもウイルス増殖に影響を与えるかを考察するため、6頭のTRIMCyp homozygoteおよび3頭のTRIM5 α homozygoteにおけるMN4Rh-3増殖を検討した。その結果、血中ウイルスRNA量はTRIMCyp homozygoteにおいてTRIM5 α homozygoteと比較して約30倍以上高かった。また、病原性の指標の一つとして測定した末梢血中CD4陽性T細胞数は、TRIMCyp homozygoteにおいてより強い減少が認められた。また、感染後の抗HIV-1抗体の誘導を経時的に測定したところ、TRIMCyp homozygoteにおいて強い抗体誘導が認められた。
 4. カニクイザル個体でのウイルス血症は、感染後6週以降には検出限界以下のレベルになった。MN4Rh-3が持続感染しているのか、もしくは完全に排除されたのかを明らかにするため、感染後17週の時点でCD8陽性細胞枯渇実験を行った。その結果、CD8陽性細胞の減少に伴って、ウイルス増殖の再活性化が認められた。しかし、CD8陽性細胞数の回復に伴って、血中ウイルスRNA量は再び検出限界以下となった。

（倫理面への配慮）

医薬基盤研究所および京都大学霊長類研究所の動物実験倫理規定に従い、動物実験委員会の承認を受けて実施した。また用いた組換え生物等については、第二種使用等拡散防止措置確認申請承認（大臣確認）済みである。

C. 研究結果

1. カニクイザルPBMCにおけるMN4Rh-3の増殖を検討したところ、ある個体由来の細胞では旧世代HIV-1mtよりも有意に高い増殖能を持つことが明らかとなった。一方で、一部の個体由来の細胞では、MN4Rh-3および旧世代ともに殆ど増殖が認められず、HIV-1mt感受性の異なる個体群が存在することが示唆された。

D. 考察

1. 新規HIV-1mtであるMN4Rh-3は、カニクイザルPBMCにおいて、旧世代HIV-1mtよりも有意に高い増殖能を持つことが明らかとなったことから、MN4Rh-3に導入されたアミノ酸置換がウイルス増殖レベルを向上させることが強く示唆された。今後は、その分子メカニズムについての検証を進めるとともに、さらに増殖能を高めた新規クローンの構築を目指す。
2. カニクイザルTRIM5遺伝子について解析を行

ったところ、今回実験に用いた個体群には高率にTRIMCyp保有個体が存在すること、さらにはその頻度には明白な地域差が存在することが示された。*In vitro*での解析結果から、TRIMCyp homozygoteはHIV-1mt感染に対して比較的高い感受性を示すことが明らかとなったことから、HIV-1霊長類感染・発症モデルの開発においては、特にフィリピン産の個体群が有用であると考えられた。

- サル個体でのMN4Rh-3の増殖能を検討したところ、旧世代クローンと比較して、約10倍程度増殖レベルが向上していることが明らかとなった。このことから、MN4Rh-3に導入されたアミノ酸置換は*in vivo*でのウイルス増殖においても重要な機能的意味を持つことが示唆された。また、*in vitro*で明らかとなったTRIM5遺伝子型の影響は*in vivo*においても認められ、TRIMCyp homozygoteではTRIM5 α homozygoteと比較して50倍程度高いレベルのウイルス血症が認められた。これより、HIV-1霊長類感染・発症モデルの最適化の作業においては、TRIM5遺伝子型を予め同定し、HIV-1mt抵抗性個体を実験から除外することで、感受性のばらつきを軽減させられることが示唆される。この作業を行うことにより、より信頼性の高い新規抗HIV-1薬剤・ワクチン前臨床評価系システムの構築が期待される。
- さらに、本研究では、MN4Rh-3感染個体における持続感染成立について検討を行った。ウイルス血症は感染後6週目以降で検出限界以下となっていたが、感染後17週目における抗CD8抗体の投与により、ウイルス増殖の再活性化が認められた。この結果は、MN4Rh-3が低レベルではあるものの、持続感染を成立させうる能力を持つことを示唆している。また一方では、CD8陽性細胞による増殖抑制からの回避が十分でないことが示唆されたことから、これら宿主免疫からの回避が今後の重要な検討課題となると考えられた。

E. 結論

本研究では、新規HIV-1mtであるMN4Rh-3が旧世代クローンと比較して高い増殖能を持つことを明らかにした。また、TRIM5遺伝子型がHIV-1mt感受性に関わる重要な因子であることを明らかに

した。本研究によりTRIMCyp homozygoteがHIV-1mt感染に対して高い感受性を示すことが明らかとなったことから、実用的なHIV-1霊長類感染・発症モデルの開発において、TRIMCyp homozygoteは非常に有用であると考えられた。また、今回確立された、MN4Rh-3とTRIMCyp homozygoteを用いた実験の結果、サル個体での持続感染の成立を実現できたことから、今後の前臨床評価システム開発において本実験系は非常に有望である。一方で、持続感染は成立したものの、サル個体での病原性発現を誘導するにはウイルス増殖のさらなる向上が必要であると考えている。今後の検討課題としては、BST-2やSAMHD1など、近年新たに同定された抗レトロウイルス宿主因子への抵抗性を付与するとともに、宿主の免疫反応からどのように回避させるか、免疫学およびウイルス学的側面から検討を進める必要があると考えられた。

次年度の計画としては、BST-2からの回避を目的として足立らが作成したVpu組み換えHIV-1mt (MN4/LSDQgtuおよびMN5/LSDQgtu) について、サル個体での増殖を検討することを予定している。サル個体で一定のウイルス増殖レベルが認められた際には、積極的にウイルスの個体間継代を進め、サルでAIDS様症状を引き起こしうる病原性HIV-1mtの獲得を目指す。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Saito A, Nomaguchi M, Iijima S, Kuroishi A, Yoshida T, Lee YJ, Hayakawa T, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Yasutomi Y, Adachi A, Matano T, Akari H: Improved capacity of a monkey-tropic HIV-1 derivative to replicate in cynomolgus monkeys with minimal modifications. *Microbes and Infection* 13, 58-64, 2011.
- Ohtani H, Nakajima T, Akari H, Ishida T, Kimura A: Molecular evolution of immunoglobulin superfamily genes in primates. *Immunogenetics* 63, 417-428, 2011.
- Ito M, Katakai Y, Ono F, Akari H, Mukai RZ, Takasaki T, Kotaki A, Kurane I: Serotype-specific and cross-reactive neutralizing antibody responses in cynomolgus monkeys after infection with multiple dengue virus serotypes. *Archives of Virology* 156, 1073-1077, 2011.
- Naruse TK, Okuda Y, Mori K, Akari H, Matano T, Kimura A: ULBP4/RAET1E is highly polymorphic in the Old World monkey. *Immunogenetics* 63, 501-

- 509, 2011.
5. Omatsu T, Moi ML, Hirayama T, Takasaki T, Nakamura S, Tajima S, Ito M, Yoshida T, Saito A, Katakai Y, Akari H, Kurane I: Common marmoset (*Callithrix jacchus*) as a primate Model of dengue virus infection: development of high levels of viremia and demonstration of protective immunity. **Journal of General Virology** 92, 2272-2280, 2011.
 6. Iwasaki Y, Mori K, Ishii K, Maki N, Iijima S, Yoshida T, Okabayashi S, Katakai Y, Lee Y-J, Saito A, Fukai H, Kimura N, Ageyama N, Yoshizaki S, Suzuki T, Yasutomi Y, Miyamura T, Kannagi M, Akari H: Long-term persistent GBV-B infection and development of a progressive chronic hepatitis C-like disease in marmosets. **Frontiers in Microbiology** 2, 240, 2011.
 7. Saito Y, Naruse TK, Akari H, Matano T, Kimura A: Diversity of MHC class I haplotypes in cynomolgus macaques. **Immunogenetics** 64, 131-141, 2012.
 8. Takeuchi H, Ishii H, Kuwano T, Inagaki N, Akari H, Matano T: Host cell species-specific effect of cyclosporine A on simian immunodeficiency virus replication. **Retrovirology** 9, 3, 2012.
 9. Yoshida T, Omatsu T, Saito A, Katakai Y, Iwasaki Y, Kurosawa T, Hamano M, Nakamura S, Takasaki T, Yasutomi Y, Kurane I, Akari H: CD16 positive natural killer cells play a limited role against primary dengue virus infection in tamarins. **Archives of Virology** 157, 363-368, 2012.
 10. Saito A, Kono K, Nomaguchi M, Yasutomi Y, Adachi A, Shioda T, Akari H, Nakayama EE: Geographic, genetic and functional diversity of antiretroviral host factor TRIMCyp in Cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*). **Journal of General Virology** 93, 594-602, 2012.
 11. Iijima S, Lee Y-J, Ode H, Arold ST, Kimura N, Yokoyama M, Sato H, Tanaka Y, Strebel K, Akari H: A non-canonical mu-1A-binding motif in the N-terminus of HIV-1 Nef determines its activity to down-regulate MHC-I in T lymphocytes. **Journal of Virology**, in press.
- International Union of Microbiological Society 2011 Congress. 11-16 September, 2011, Sapporo.
- 2) Akatsuki Saito, Masako Nomaguchi, Ken Kono, Emi E. Nakayama, Tatsuo Shioda, Tomoyuki Yoshida, Yasuhiro Yasutomi, Naofumi Takahashi, Tetsuro Matano, Akio Adachi, Hirofumi Akari: Susceptibility of cynomolgus monkeys to monkey-tropic HIV-1 infection is determined by TRIM5 α genotypes. 29th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS. 25-28 October, 2011, Seattle.
 - 3) 高橋尚史、齊藤 暁、野間口雅子、松岡佐織、足立昭夫、明里宏文、俣野哲朗：サル指向性 HIV-1 感染慢性潜伏期のカニクイサルからの感染性ウイルスの回収 第25回日本エイズ学会学術集会（東京）平成23年11月30日-12月2日
 - 4) 齊藤 暁、河野 健、中山英美、足立昭夫、野間口雅子、保富康宏、俣野哲朗、塩田達雄、明里宏文：サル指向性 HIV-1 への感受性に影響を与えるマカクサル TRIM5 遺伝子の多様性 第25回日本エイズ学会学術集会（東京）平成23年11月30日-12月2日
- G. 知的所有権の取得状況
特になし

2. 学会発表等

- 1) Akatsuki Saito, Masako Nomaguchi, Ken Kono, Emi E. Nakayama, Tatsuo Shioda, Tomoyuki Yoshida, Yasuhiro Yasutomi, Tetsuro Matano, Akio Adachi, Hirofumi Akari: Genotypic variation of cynomolgus monkey TRIM5 α determines the susceptibility to monkey-tropic HIV-1 infection.

サル病原性HIV-1 クローンの構築

研究分担者 足立昭夫（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 教授）

研究要旨

我々は、HIV-1の病原性発現機構の実験的解析を目指し、サル個体で効率良く増殖するマカクザル指向性HIV-1 (HIV-1mt) の構築に取り組んでいる。サル細胞においてHIV-1の増殖を強く抑制する主要な因子は、APOBEC3G/FおよびTRIM5 α である。これまでに、*vif*遺伝子をSIVmacのものに置換してAPOBEC3G/Fの抗ウイルス作用を完全に回避し、*gag*遺伝子のキャプシド (CA) コーディング領域を改変することでTRIM5 α の効果を回避するHIV-1mtクローン (X4およびR5ウイルス) を作製した。本年度はこれらのクローン (MN4/LSDQおよびMN5/LSDQ) の更なる改良を試みた。

HIV-1とSIVmacのゲノムにはそれぞれに固有の遺伝子 *vpu* (HIV-1) および *vpx* (SIVmac) が存在する。これら二つの遺伝子がコードするVpuおよびVpxがHIV-1群とSIVmac群 (HIV-2を含む) の生物学的特性を決定する大きな要因であることが系統樹解析に基づくウイルス進化学や広範なウイルス蛋白質の構造・機能解析で明らかにされている。特に、Vpuがウイルスの種特異性に貢献している点が重要である。しかし、これまでに報告されているHIV-1mtでVpuの標的となるサルTetherinを不活性化できるものはなかった。そこで、我々はサルTetherin不活性化能を示すVpuを構築し、上記のHIV-1mtプロウイルスクローン (MN4/LSDQおよびMN5/LSDQ) に導入してそれらのウイルス学的性状を検証した。最終的に構築されたウイルスクローン (MN4/LSDQgtuおよびMN5/LSDQgtu) は強力な抗サルTetherin活性を示し、サル細胞における増殖効率も向上した。MN4/LSDQgtuおよびMN5/LSDQgtuはHIV-1感染サルモデルの確立に大きく貢献すると期待される。

A. 研究目的

HIV-1は宿主域が狭く、適切な感染・発症動物モデルが存在しない。HIV-1の病原性発現機構の解明や新規抗エイズ戦略構築には、実験用霊長類であるマカクザル (カニクイザルやアカゲザル) に感染・増殖できエイズを発症させるサル病原性HIV-1の構築が不可欠である。マカクザル指向性ウイルス (HIV-1mt) から病原性ウイルスを構築することが本研究の目的である。

プロトタイプHIV-1mt (NL-DT5R: Proc Natl Acad Sci USA 103:16959-16964, 2006; J Virol 81:11549-11552, 2007; Rev Med Virol 18:261-275, 2008) の増殖効率向上を目指し、種々のゲノム改変を加えた結果、サル細胞での増殖効率が飛躍的に向上したMN4/LSDQ (X4ウイルス) および

MN5/LSDQ (R5ウイルス) の構築に成功した (Retrovirology 6:70, 2009; Microbes Infect 13:58-64, 2011; HIV-Host Interactions, pp. 325-384, 2011; 未発表データ)。

しかし、MN4/LSDQやMN5/LSDQウイルスであっても、サル細胞での増殖能効率はSIVmac239 (マカクザルに病原性を示す標準ウイルス) に劣り、更なるゲノム改変が必要と考えられた。着目したのは *vpu* 遺伝子である。この遺伝子は進化学的に見るとHIV-1型のゲノム構造を持つウイルスにしか存在しない。HIV-1 VpuはサルTetherinに対して無効であるが、ある種のSIV (HIV-1型であるSIVmon/mus/gsn) は抗サルTetherin活性を示すVpuをコードしていることが報告されている。SIVmac等はNefが抗サルTetherin活性を担ってい

る。そこで、本研究では、サルTetherinの抗ウイルス効果を回避するVpuを持つHIV-1mtの構築を目指した。

B. 研究方法

1. ウイルスゲノムの改変とシーケンスの確認は定法に従った。発現ベクターやプロウイルスクローンをを用いた分子生物学的解析も既報通りに行なった。
2. ウイルスストックの調製は、ヒト293T細胞へのトランスフェクション(リン酸カルシウム法)により行った。感染実験にはカニクイザル由来HSC-F細胞およびアカゲザル由来M1.3S細胞(Front Microbiol 2:115, 2011)を用いた。サル細胞でのウイルス感染実験はIL-2存在下で行った。ウイルス量は培養上清中の逆転写酵素(RT)活性により測定した。
3. 抗サルTetherin活性を持つVpuとそれをコードするプロウイルスクローンの構築は次の通りである。Vpu遺伝子はウイルスゲノム中央部に位置しており、env遺伝子とのオーバーラップもあるため、TM領域だけを置換するように工夫した。TM領域が抗Tetherin活性を規定していることは我々も報告している(Microbes Infect 10:960-967, 2008; Front Microbiol 1:116, 2010)。
4. 抗サルTetherin活性を持つVpuのスクリーニングは、それぞれのVpu発現ベクター、アカゲザルTetherin発現ベクターおよびVpu欠損プロウイルスクローンを293T細胞に共導入し、ウイルス粒子の産生量を比較することで行った。構築したプロウイルスクローンについては、Tetherin発現ベクターと293T細胞へ共導入し上記と同様にして抗Tetherin活性を解析した。
5. VpuによるアカゲザルやヒトTetherinの細胞表面からのdown-regulationはLLC-MK2細胞およびMAGI細胞を用い、フローサイトメトリーで解析した。

(倫理面への配慮)

ヒト由来臨床材料を使用する研究や動物実験は行なわない。組換えDNA実験は徳島大学遺伝子組換え実験安全管理委員会(委員長:足立昭夫)の承認を得て行なう。「キメラゲノムによるHIV-1の分子遺伝学的研究」をする間に執る拡散防止措置については文部科学大臣の確認が得られている(21受文科振第935号)。

C. 研究結果

1. SIVmon、SIVmusおよびSIVgsn由来のVpu TM領域について検討したが、SIVgsnのもの(gsnTM-Vpu)が最も良くサルTetherinに拮抗し、高いウイルス粒子放出促進能を示した。
2. gsnTM-VpuはアカゲザルTetherinを細胞表面からdown-regulateするがヒトTetherinに対しては効果がなかった。予想通りHIV-1 Vpuはこの逆の活性を示した。
3. MN4/LSDQおよびMN5/LSDQゲノムにgsnTM-Vpuを導入し、活性のあるプロウイルスクローンを構築することに成功した(MN4/LSDQgtuおよびMN5/LSDQgtu)。
4. 米国のグループがHIV-1 Vpuの中にも抗サルTetherin活性を示すものがあるとの論文を発表したため、それも解析対象に加え、各種Vpuのウイルス粒子放出量に関する抗Tetherin活性を検討した。その結果、Vpuには抗ヒトTetherin活性のみ(通常HIV-1)、抗サルおよびヒトTetherin活性(米国グループの報告にあったもの)、あるいは抗サルTetherin活性のみ(gsnTM-Vpu)を示すものがあることが明らかとなった。我々が構築したgsnTM-Vpuは米国のグループのVpuよりはるかに高い抗サルTetherin活性を持つことがわかった。
5. プロウイルスクローンにコードされるVpuの効果はサル細胞における増殖能を解析することで検証した。LSDQgtuウイルスはそれを持つVpuを欠損させたものや親ウイルス(LSDQウイルス)より効率よく増殖した。予想通り、サル細胞においては、LSDQウイルスからVpuを欠損させてもその増殖能に影響がなかった。

D. 考察

祖先HIV-1のゲノム情報に基づく改変により、サルTetherinに強い抵抗性を示すHIV-1mtの構築に成功した。この改変Vpuは株化細胞レベルではウイルス増殖を有意に増強させている。米国のグループが報告した抗サルTetherin能を持つVpu(祖先HIV-1と現在の標準的なHIV-1が持つVpuの中間型か?)は我々のアッセイ系では活性が低いが、それでもサル個体での効率の良い複製や病原性発現に必要とされている。今後は我々が新たに構築したVpuを持つHIV-1mtのPBMCや個体レベルでの増殖能に焦点を当て検証を進めていく。

E. 結論

本研究で構築したMN4/LSDQgtuおよびMN5/LSDQgtuは実用的なHIV-1感染サルモデルの実現に大きく貢献するものであると言える。これらのウイルスはサル細胞に存在する既知の抗HIV-1因子の効果をほぼ回避しており、強いHIV-1抵抗性を示すサル細胞株 (M1.3S) での馴化を行なっても増殖適応変異が生じてこない。個体における検証作業が待たれる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nomaguchi M, Adachi A: HIV-1 Vpr and G2 cell cycle arrest. *Future Microbiology* 6, 375-378, 2011.
- 2) 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. doi: 10.3389/fmicb.2011.00115, 2011.
- 3) 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.
- 4) Fujii H, Ato M, Takahashi Y, Otake K, Hashimoto S, Kaji T, Tsunetsugu- Yokota Y, Fujita M, Adachi A, Nakayama T, Taniguchi M, Koyasu S, Takemori T: HIV-Nef impairs multiple T cell functions in antigen-specific immune response in mice. *International Immunology* 23, 433-441, 2011.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) Chutiwitoonchai N, Hiyoshi M, Mwimanzi P, Ueno T, Adachi A, Ode H, Sato H, Fackler OT, Okada S, Suzu S: The identification of a small molecule compound that reduces HIV-1 Nef-mediated viral infectivity enhancement. *PLoS One* 6, e27696. doi: 10.1371/journal.pone.0027696, 2011
- 8) Miyazaki Y, Miyake A, Nomaguchi M, Adachi A: Structural dynamics of retroviral genome and the packaging. *Frontiers in Microbiology* 2, 264. doi:

10.3389/fmicb.2011.00264, 2011.

- 9) Saito A, Kono K, Nomaguchi M, Yasutomi Y, Adachi A, Shioda T, Akari H, Nakayama EE: Geographic, genetic, and functional diversity of antiretroviral host factor TRIMCyp in cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*). *Journal of General Virology* 93, 594-602, 2012.

2. 学会発表等

- 1) Takahashi N, Saito A, Nomaguchi M, Adachi A, Akari H, Matano T: Viral recovery from cynomolgus macaques controlling a simian-tropic HIV-1 challenge. XV International Congress of Virology, Sept. 13, 2011, Sapporo, Japan.
- 2) Saito A, Nomaguchi M, Kono K, Nakayama, EE, Shioda T, Yoshida T, Yasutomi Y, Matano T, Adachi A, Akari H: Genotypic variation of cynomolgus monkey trim5alpha determines the susceptibility to monkey-tropic HIV-1 infection. XV International Congress of Virology, Sept 15, 2011, Sapporo, Japan.
- 3) 高橋尚史、齊藤 暁、野間口雅子、松岡佐織、足立昭夫、明里宏文、俣野哲朗：サル指向性 HIV-1 感染慢性潜伏期のカニクイサルからの感染性ウイルスの回収 第25回日本エイズ学会学術集会 2011年11月30日 東京.
- 4) 野間口雅子、土肥直哉、藤原佐知、足立昭夫：Gag-CA およびVpuの改変によるサル細胞でのHIV複製の増強 第25回日本エイズ学会学術集会 2011年12月1日 東京.
- 5) 齊藤 暁、河野 健、中山英美、足立昭夫、野間口雅子、保富康宏、俣野哲朗、塩田達雄、明里宏文：サル指向性HIV-1への感受性に影響を与えるマカクサルTRIM5遺伝子の多様性 第25回日本エイズ学会学術集会 2011年12月2日 東京.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし。

2. 新案登録

なし。

3. その他

なし。

