

5. MN4/LSDQgtuのゲノム中央部を改変して様々なVprやVpxを持つウイルスを構築した(図2)。しかし、どのウイルスもMN4/LSDQgtuより増殖能で劣っていた(図2)。
6. MN4/LSDQgtuのアクセサリ-遺伝子変異体を構築してそれらの増殖特性を親株と比較検討した(図2)。Vpr変異体が最も増殖性が減じている(vif変異体を除く)ことから、MN4/LSDQgtuのVprはサル細胞において機能していると推測される。

D. 考察

サルTRIM5とBST-2/tetherinに強い抵抗性を示し、アカゲザルPBMCで非常に効率良く増殖するHIV-1mt(MN4/LSDQgtu)の構築に成功した。MN5/LSDQgtuは明らかにMN4/LSDQgtuより増殖能が劣るので、R5指向性のEnvを持つウイルスの構築が大きな課題である。次年度はMN4/LSDQgtuのアカゲザルでの増殖能に焦点を当て検証を進めていく。

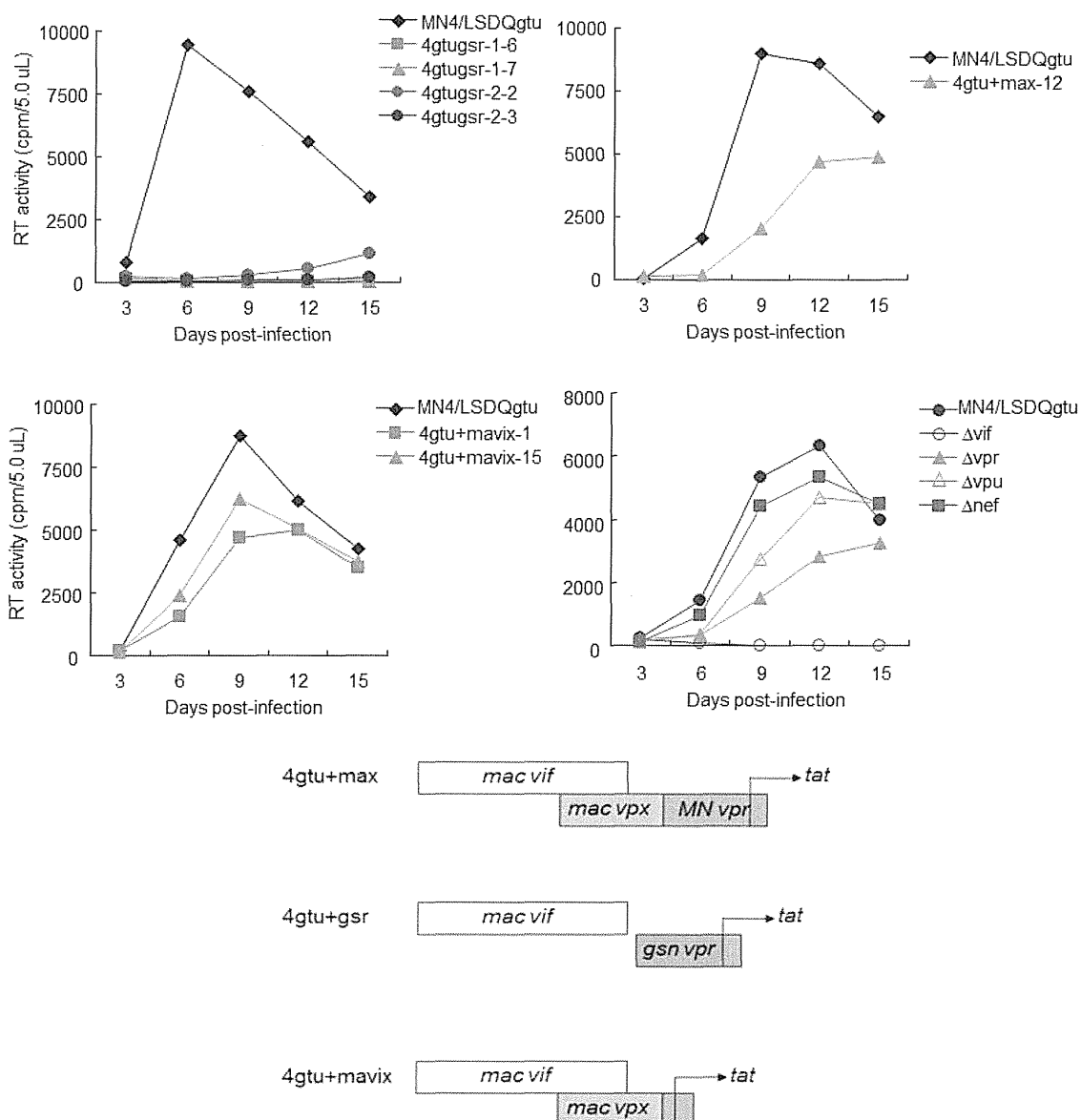


図2 アカゲザル細胞株 (M1.3S) での増殖特性

## E. 結論

本研究で構築したMN4/LSDQgtuはアカゲザルを用いた実用的なHIV-1感染モデルの実現に大きく貢献するものであると言える(図1)。アクセサリ-蛋白質の機能性についても問題がないと考えられる(図2)。こ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、アカゲザルPBMCにおいてSIVmac239レベルの増殖能を示すことがある。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) Saito A, Nomaguchi M, Kono K, Iwatani Y, Yokoyama M, Yasutomi Y, Sato H, Shioda T, Sugiura W, Matano T, Adachi A, Nakayama EE, Akari H: TRIM genotypes in cynomolgus monkeys primarily influence inter-individual diversity in susceptibility to monkey-tropic human immunodeficiency virus type 1. *Journal of General Virology*, in press.
- 2) Nomaguchi M, Doi N, Fujiwara S, Saito A, Akari H, Nakayama EE, Shioda T, Yokoyama M, Sato H, Adachi A: Systemic biological analysis of the mutations in two distinct HIV-1mt genomes occurred during replication in macaque cells. *Microbes and Infection*, in press.
- 3) Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Saito A, Doi H, Yasutomi Y, Matano T, Sato H, Adachi A: Gag-CA Q110D mutation elicits TRIM5-independent enhancement of HIV-1mt replication in macaque cells. *Microbes and Infection* 15, 56-65, 2013.
- 4) Miyakawa K, Sawasaki T, Matsunaga S, Tokarev A, Quinn G, Kimura H, Nomaguchi M, Adachi A, Yamamoto N, Guatelli J, Ryo A: Interferon-induced SCYL2 limits release of HIV-1 by triggering PP2A-mediated dephosphorylation of the viral protein Vpu. *Science Signaling* 5, ra73, 2012.
- 5) Fujita M, Nomaguchi M, Adachi A, Otsuka M: SAMHD1-dependent and -independent functions of HIV-2/SIV Vpx protein. *Frontiers in Microbiology* 3, 297, 2012.
- 6) Nomaguchi M, Fujita M, Miyazaki Y, Adachi A: Viral tropism. *Frontiers in Microbiology* 3, 281, 2012.
- 7) Nomaguchi M, Doi N, Matsumoto Y, Sakai Y, Fujiwara S, Adachi A: Species tropism of HIV-1 modulated by viral accessory proteins. *Frontiers in Microbiology* 3, 267, 2012.

### 2. 学会発表等

- 1) 宮崎恭行、三宅在子、野間口雅子、内山恒夫、足立昭夫：*in vitro*再構築系を用いたHIV-2 CAアセンブリーの安定性に関する解析 第60回日本ウイルス学会 2012年11月13日(火) 大阪
- 2) 土肥直哉、藤原佐知、酒井遙介、松本唯、足立昭夫、野間口雅子：R5-tropic HIV-1mt NL-DT562のEnv適応変異による増殖促進機構の解析 第60回日本ウイルス学会 2012年11月13日(火) 大阪
- 3) 三宅在子、藤野悠那、古賀涼子、川村宗吾、大出裕高、岩谷靖雅、野間口雅子、足立昭夫、大塚雅巳、藤田美歌子、宮崎恭行：Vpx発現におけるC末端ポリプロリンモチーフの機能の解析 第60回日本ウイルス学会 2012年11月14日(水) 大阪
- 4) 藤田美歌子、野間口雅子、古賀涼子、藤野悠那、大塚雅巳、足立昭夫：SAMHD1非依存的なHIV-2 Vpxの機能 第60回日本ウイルス学会 2012年11月14日(水) 大阪
- 5) 野間口雅子、三宅在子、土肥直哉、藤原佐知、宮崎恭行、足立昭夫：HIV-1インテグラーゼC末端領域の1塩基置換によるウイルス複製制御機構の解析 第60回日本ウイルス学会 2012年11月14日(水) 大阪
- 6) 藤野悠那、三宅在子、古賀涼子、川村宗吾、大出裕高、岩谷靖雅、野間口雅子、足立昭夫、大塚雅巳、宮崎恭行、藤田美歌子：HIV-2 Vpx富プロリン領域の機能 第26回日本エイズ学会 2012年11月24日(土) 横浜

## 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

# 抗HIV-1 宿主内因性因子に関する解析

研究分担者 高折 晃史 (京都大学医学研究科 教授)

## 研究要旨

我々はHIV-1 Vif が誘導する細胞周期G2停止がTP53依存性であることおよび感染を促進することをすでに報告しているが、今回VifがTP53のSer15、20、37、46がリン酸化することを見出した。さらにSer15のリン酸化が細胞周期停止やウイルス感染増強に必須であることを証明した。また、近年Vifの機能発現に必須の宿主因子としてCBFβが同定されたが、我々はCBFβとの相互作用に含まれるVifの残基としてGlu88、Trp89を同定した。

## A. 研究目的

我々はHIV-1 Vif が誘導する細胞周期G2停止がTP53依存性であることおよび感染を促進することを報告したが (Izumiら、PNAS 2010)、その詳細なメカニズムは依然不明である。そこで、本研究ではTP53のリン酸化について検討した。また、近年Vifの機能発現に必須の宿主因子としてCBFβが同定されたが、VifとCBFβが相互作用する残基の情報は限定的である。そこで、CBFβとの相互作用を部位の同定をすべく解析を行った。

## B. 研究方法

Vif遺伝子を細胞に導入し、抗リン酸化セリンTP53特異抗体を用いたイムノブロット法によりTP53のリン酸化を検討した。さらに、これらのセリン残基をアラニンに置換した変異体を作成し、細胞に一過性あるいは恒常的に導入し、細胞周期の検討やウイルス感染実験を行った。また、TP53のリン酸化に関わる宿主キナーゼの検索を種々の阻害剤を用いて行った。また、Vifの様々な変異体を用い、CBFβとの共沈実験を行った。

## (倫理面への配慮)

本研究では、組み換えDNAや病原体を用いるため、拡散の防止や種の多様性に関する配慮が必要であり、「組み換えヒト免疫不全ウイルスを用いたエイズ発症機構の解明と抗HIV-1宿主因子APOBEC3ファミリー蛋白によるウイルスの感染制御機構に関する研究」として第二種使用等拡散防止処置確認申請を行い、平成23年2月10日付けで承認済である。

## C. 研究結果

VifはTP53のSer<sup>15</sup>、Ser<sup>20</sup>、Ser<sup>37</sup>およびSer<sup>46</sup>のリン酸化を増強することを見出した。さらに、これらのセリン残基をアラニンに置換した変異体の解析により、Ser<sup>15</sup>のリン酸化がVifの誘導するG2停止やウイルス感染の増強に必須であることを示した。また、AMPK阻害剤によりVifによるTP53のSer<sup>15</sup>のリン酸化が抑制されることや、VifによりAMPKのT<sup>172</sup>のリン酸化が誘導されることを見出した。また、VifのE88A/W89A変異体はCBFβと結合しないことを見出した。さらに、この変異体はCEM-SS細胞では野生株と同様の感染性を示すが、APOBEC3を発現するCEM細胞では複製能が低下していることを確認した。

## D. 考察

Vifの誘導するG2停止やウイルス感染の増強に関して、そのメカニズムの一端を明らかにした。これらの結果はVifに未知の細胞内標的因子があることも示唆しており、今後の更なる研究の成果が期待できる。また、CBFβとの相互作用に関わるVifの残基を同定した。これらの新しい情報を基に、Vifとサル宿主因子の相互作用を検討することで動物モデルの改良につながる可能性がある。

## E. 結論

HIV-1 Vifが感染性を増強するメカニズムの一部を明らかにした。

## F. 研究発表

## 1. 論文発表

- 1) Shinohara M, Io K, Shindo K, Matsui M, Sakamoto T, Tada K, Kobayashi M, Kadowaki N, Takaori-Kondo A: APOBEC3B can impair genomic stability by inducing base substitutions in genomic DNA in human cells. *Scientific Reports* 2, 806, 2012.
- 2) Fujita H, Kitawaki T, Sato T, Maeda T, Kamihira S, Takaori-Kondo A, and Kadowaki N: The tyrosine kinase inhibitor dasatinib suppresses cytokine production by plasmacytoid dendritic cells by targeting endosomal transport of CpG DNA. *European Journal of Immunology* 43, 94-104, 2012.
- 3) Chonabayashi K, Hishizawa M, Kawamata S, Nagai Y, Ohno T, Ishikawa T, Uchiyama T, and Takaori-Kondo A: Direct binding of Grb2 has an important role in the development of myeloproliferative disease induced by ETV6/FLT3. *Leukemia*, doi: 10.1038.leu/2012.333, 2012.
- 4) Furukawa A, Okamura H, Morishita R, Matsunaga S, Kobayashi N, Ikegami T, Kodaki T, Takaori-Kondo A, Ryo A, Nagata T, Katahira M: NMR study of xenotropic murine leukemia virus-related virus protease in a complex with amprenavir. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 425, 284-9, 2012.
- 5) Matsunaga S, Sawasaki T, Ode H, Morishita R, Furukawa A, Sakuma R, Sugiura W, Sato H, Katahira M, Takaori-Kondo A, Yamamoto N, Ryo A: Molecular and enzymatic characterization of XMRV protease by a cell-free proteolytic analysis. *Journal of Proteomics* 75, 4863-73, 2012.
- 6) Takaori-Kondo A, Shindo K: HIV-1 Vif: a guardian of the virus that opens up a new era in the research field of restriction factors. *Frontiers in Microbiology* 4, 34, 2013.

## 2. 学会発表

- 1) Io K, Matsui Y, Shindo K, Izumi T, Matsui M, Shinohara M, Takaori-Kondo A: HIV-1 Vif induces serine phosphorylation of p53 likely through proteasomal degradation of cellular targets. Cold Spring Harbor Meeting on Retroviruses 2012
- 2) 松井佑亮、新堂啓祐、永田佳代子、永井雄也、井尾克宏、篠原正信、多田浩平、阪本貴士、小林正行、高折晃史：BiFC法（蛍光蛋白再構成法）による HIV-1 Vif と CBF $\beta$  の相互作用解析 第26回日本エイズ学会

- 3) 井尾克宏、新堂啓祐、泉 泰輔、西澤正俊、松井道志、篠原正信、阪本貴士、多田浩平、松井佑亮、丸山 互、小林正行、高折晃史：Vifはp53のリン酸化を介してHIV-1の感染性を増強する 第26回日本エイズ学会

## G. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

該当なし

# 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

研究分担者 中山 英美 (大阪大学微生物病研究所 准教授)

## 研究要旨

TRIM5 $\alpha$ はアカゲザルで発見された抗HIV-1因子である。ワクチン開発に必須のHIV-1感染・発症霊長類モデルを最適化するためには、サルTRIM5の性質を調べ、TRIM5による感染抑制を回避するウイルスを作成する必要がある。昨年度TRIMCyp遺伝子を両染色体に持つカニクイザル個体を選ぶことで一定の増殖が得られたものの、HIV-1mtの増殖はサル免疫不全ウイルスSIVmac239の増殖には及ばなかった。そこで本年度はカプシドに導入する変異の最適化を試みた。サイクロフィリンA (CypA) との結合を妨げるとの報告のある変異を導入したが、TRIMCypから回避しているウイルスは得られなかった。CypAとの結合が弱まっていると考えられるにも拘らずTRIMCypから回避できない理由として、CypAとは異なりTRIMCypはB-box2とCoiled-coilドメインを介して多量体の格子を形成して結合力を上昇させていることが考えられた。

## A. 研究目的

Gagと相互作用する感染抵抗性因子としてTRIM5 $\alpha$ とTRIM5遺伝子にCypA遺伝子が挿入された変異によって生じるTRIMCypが知られている。ワクチン開発に必須のHIV-1感染・発症霊長類モデルを最適化するためには、サルTRIM5の性質を調べ、TRIM5による感染抑制を回避するウイルスを作成する必要がある。我々は昨年度、カニクイザルのTRIM5遺伝子を調べ、(1) TRIMCypの頻度がアカゲザルに比較して高いこと、(2) カニクイザルのTRIMCypタンパク質はHIV-1の感染を阻害するが、SIVmacの感染を阻害しないこと、(3) 頻度は少ないながらTRIMCypの中に多型の存在も検知したが、これまでに作成されたサル指向性HIV-1 (HIV-1mt) は、頻度の多いカニクイザルTRIMCypと少ないTRIMCyp両方の感染抑制を回避していること、を明らかにした。さらにサル個体への感染実験において、TRIM5 $\alpha$ 遺伝子を両染色体に持つ個体よりもTRIMCyp変異を両染色体にもつ個体のほうがHIV-1mtへの感染感受性が高いことを証明した。

しかし残念ながら、HIV-1mtの増殖は培養細胞を用いた実験においてもサル個体における実験に

においてもサル免疫不全ウイルスSIVmac239の増殖には及ばなかった。ウイルス増殖力の差はサル細胞のみならず、ヒトCD4陽性細胞MT4を用いた実験においても観察された。昨年度用いたHIV-1mt (MN4Rh-3) はVifとカプシドに変異を導入している。Vifに関しては足立班員が既に様々な変異導入を試み最適化している。そこで本年度はカプシドに導入する変異の最適化を試みることにした。

## B. 研究方法

図1に示す9種類のカプシド変異をPCR法により作成して、VifがSIVmacに置き換わっているNL-SVRプラスミドのBssH IIとSpe I制限酵素部位を用いて組換えた。常法に従い293T細胞にプラスミドを導入し、3日後の培養上清をウイルスストックとして回収した。株化T細胞MT4にカニクイザルTRIMCypあるいはSPRY領域を欠いたTRIM5 $\alpha$ を発現させるセンダイウイルスベクターを感染させ、9時間後にHIV-1 (NL4-3) およびサル指向性HIV-1を感染させ、感染1、3、6日後の培養上清中のp24抗原量をELISA法にて測定した。



TRIMCypからの回避を示すウイルスは見当たらなかった(図2)。

TRIM5 $\alpha$ による感染抑制を回避するために、カプシドのL4/5の変異(L4/5S)に加えてL6/7をSIVmacの配列に置換した変異(L6/7S)を導入したが、L6/7S変異がウイルスの増殖力を悪化させることを我々は報告している。昨年度、サル個体に感染させたMN4h-3はL4/5SとL6/7Sの変異に加えてQ110D変異を持っている。L6/7S変異は

TRIMCypからの回避には寄与していないので、L4/5SとQ110Dだけの変異を持つウイルスも作成したが、増殖力はL4/5Sウイルスと同程度で向上は見られなかった。

#### D. 考察

TRIMCypは、RING、B-box2、coiled-coilの3つのドメインの後ろにリガンド結合ドメインとしてSPRYドメインの代わりにCypAの配列に置換して

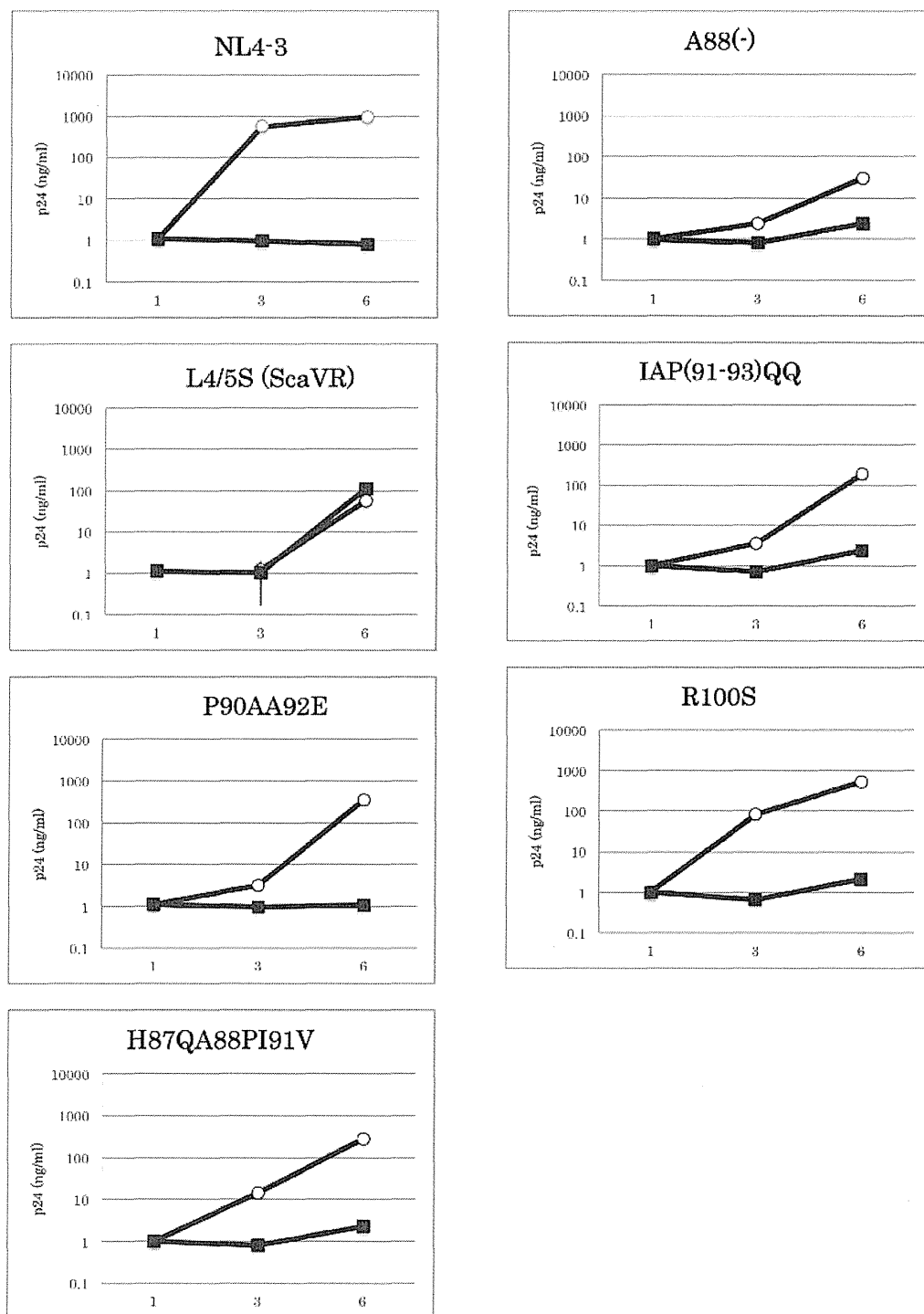


図2 MT4細胞におけるHIV-1mtの増殖

■はカニクイザルTRIMCyp発現細胞、○はSPRYドメイン欠損TRIM発現細胞での増殖を示す。横軸は感染後の日数を示す。

いるキメラタンパク質である。単量体のCypAは、単量体のカプシドのL4/5と結合できる。一方でTRIM5 $\alpha$ は単量体のカプシドとの結合は弱く、TRIM5 $\alpha$ のB-box2およびCoiled-coilドメインを介して多量体の格子を形成し、カプシドの多量体であるコアを包み込むようにして認識する結合モデルが最近、提唱されている。CypA結合能を失ったはずのカプシド変異（P90AA92EおよびH87QA88PI91V）を持つHIV-1mtであってもTRIMCypによる感染抑制を回避できなかったのは、単量体のCypAよりも多量体を形成するTRIMCypはカプシドとの結合力が向上しているためと考えられた。

今後はもっと多数の変異を導入したウイルスライブラリーを作成してTRIMCyp発現細胞で選択し、馴化ウイルスを得る必要がある。

## E. 結論

現段階では、カニクイザルTRIMCyp個体へ感染させたMN4Rh-3ウイルスが最もTRIMCypによる感染抑制を回避し、かつ増殖力の良いウイルスであった。

## F. 知的所有権の取得状況

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Nomaguchi M, Doi N, Fujiwara S, Saito A, Akari H, Nakayama EE, Shioda T, Yokoyama M, Sato H, Adachi A: Systemic biological analysis of the mutations in two distinct HIV-1mt genome occurred during replication in macaque cells. *Microbes and Infection* in press.
- 2) Nakayama EE, Nakajima T, Kaur G, Mimaya JI, Terunuma H, Mehra N, Kimura A, Shioda T: A naturally occurring single amino acid substitution in human TRIM5 $\alpha$  linker region affects its anti-HIV-1 activity and susceptibility to HIV-1 infection. *AIDS Research and Human Retroviruses* in press.
- 3) Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Saito A, Akari H, Yasutomi Y, Matano T, Sato H, Adachi A: Gag-CA Q110D mutation elicits TRIM5-independent enhancement of HIV-1mt replication in macaque cells. *Microbes and Infection* 15, 56-65, 2013.
- 4) Miyamoto T, Nakayama EE, Yokoyama M, Ibe S,

Takehara S, Kono K, Yokomaku Y, Pizzato M, Luban J, Sugiura W, Sato H, Shioda T: The carboxyl-terminus of human immunodeficiency virus type 2 circulating recombinant form 01\_AB capsid protein affects sensitivity to human TRIM5 $\alpha$ . *PLOS ONE* 7, e47757, 2012

- 5) Saito A, Kawamoto Y, Higashino A, Yoshida T, Ikoma T, Suzaki Y, Ami Y, Shioda T, Nakayama EE, Akari H: Allele Frequency of Antiretroviral Host Factor TRIMCyp in Wild-caught Cynomolgus Macaques (*Macaca fascicularis*). *Frontiers in Microbiology* 3,314, 2012
- 6) Likanonsakul S, Rattanatham T, Feangvad S, Uttayamakul S, Prasithsirikul W, Srisopha S, Nitiyanontakij R, Tengtrakulcharoen P, Tarkowski M, Riva A, Nakayama EE, Shioda T: Polymorphisms in Fas gene is associated with HIV-related lipodystrophy in Thai patients. *AIDS Research and Human Retroviruses* 29, 142-150, 2013.
- 7) Bozek K, Nakayama EE, Kono K, Shioda T. Electrostatic potential of human immunodeficiency virus type 2 and rhesus macaque simian immunodeficiency virus capsid proteins. *Frontiers in Microbiology* 3,206, 2012.

### 2. 学会発表等

- 1) E Nakayama, T Nakajima, G Kaur, H Terunuma, J-I Mimaya, H Ohtani, N Mehra, A Kimura, Tatsuo Shioda : A Naturally Occurring Single Amino Acid Substitution in Human TRIM5 $\alpha$  Linker Region Affects Its Anti-HIV-1 Activity and Susceptibility to HIV-1 Infection. Cold Spring Harbor Laboratory (Retroviruses) . 2012. May 21-26, 2012, NY (USA) .
- 2) Emi Nakayama, Toshiaki Nakajima, Gurbinder Kaur, Jun-ich Mimaya, Hiroshi Terunuma, Narinder Mehra, Akinori Kimura, Tatsuo Shioda : A naturally occurring single amino acid substitution in human TRIM5 $\alpha$  linker region affects its anti-HIV-1 activity and susceptibility to HIV-1 infection. 第11回あわじしま感染症・免疫フォーラム 2012年9月11-14日 淡路島
- 3) 中山英美、中島敏晶、Gurbinder Kaur、三間屋純一、照沼裕、Narinder Mehra、木村彰方、塩田達雄：ヒトTRIM5 $\alpha$ リンカー領域の多型の抗HIV-1活性に及ぼす影響 第26回エイズ学会学術集会・総会 2012年11月24-26日 横浜



# カニクイサルを用いたサル指向性HIV-1株の評価実験

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)

## 研究要旨

HIV-1 感染症は慢性持続感染を呈しエイズ発症に至る致死的感染症である。しかしながら HIV-1 は宿主域が狭く、治療薬及びワクチン開発に有用な感染・エイズ発症の動物モデルは存在しない。そこで本研究ではHIV霊長類モデルの確立を目指し、サル指向性HIV-1株の樹立を推し進めている。研究班全体として昨年までに研究代表者の明里、研究分担者の足立、中山らが標準的分子HIV-1 クローンpNL4-3を遺伝子背景にサル細胞株において増殖能を有するサル指向性HIV株を樹立した。そこで本年度は分担研究としてこの第3世代HIV-1 変異体のうちR5指向性サル指向性第三世代HIV-1 (MN5Rh-3) をカニクイザル3頭にチャレンジ実験を行い、*vivo*における増殖能を評価した。その結果、感染急性期血中ウイルス量は $10^4$ /mlに達し、その後ウイルス量は減少するものの感染後少なくとも3カ月以上血中からHIVゲノムが検出された。この結果から接種した第三世代R5指向性HIV-1 はサル個体において持続感染が成立した可能性が示唆された。今後はより増殖能が高く慢性持続感染に結び付くR5指向性サル指向性HIV-1 の獲得を目指すとともに、その発症機序の解明を求めて免疫学的観点から解析を進める。

## A. 研究目的

HIV-1はヒトに感染しエイズ発症を起す原因ウイルスである。この治療薬、ワクチンの開発の前臨床評価にはHIV動物モデルが必須である。しかしながら HIV-1は宿主域が極めて狭いことから適切なHIV感染・発症動物モデルが存在しない。そこで本研究班では実験用霊長類モデルであるマカクザル個体において感染・増殖し、サル病原性を呈するHIV-1株の樹立を目的に研究を進めている。

この中で本分担研究では、サル細胞を用いた実験で感染の成立・増殖が確認されたHIV株を実際にカニクイサルを用いて感染実験を行い、HIV感染サル個体の免疫動態の解析を通して感染・病原性に関与する免疫機構の解析に主眼をおいている。平成24年度はヒトのHIV自然感染経過により近いR5指向性サル指向性HIV株の樹立を目的として、分担研究者の足立、中山らによってカニクイザルにおいて急性感染症を呈したものの持続感染の成立しなかったプロトタイプ (Mn4Rh3) 株をR5指向性に改良されたMn5Rh3をカニクイサルに接種し、サル個体内におけるウイルス増殖動態、免疫動態を解析し、持続感染成立の可能性について検

証することを目的とした。

## B. 研究方法

感染実験に用いたウイルス液の調整に関しての概要を図1に示した。第3世代R5指向性HIV-1-MN5Rh-3 (Nomaguchi et al, 2012. *Microbes Infect.* 15:56-65) は293T細胞、HIV接種予定個体のHIV未感染自己PBMCを用いて調整し、ウイルスを含む培養上清を経静脈にてカニクイサル3頭に接種した。HIV-1感染後サル個体より経時的に採血を行い、血漿中ウイルス量を解析した。なお接種前にウイルス遺伝子解析を行ったが新たな変異の挿入は認められなかった。

生体内の免疫動態の指標の一つとして細胞障害性T細胞 (CTL) 誘導の有無を解析するため、末梢血より分離したリンパ球 (PBMC) はHIV-1CladeBまたはSIVmac239のアミノ酸配列をモチーフに作成したオーバーラップペプチドと混合培養しIFN $\gamma$ 陽性細胞数を解析した。

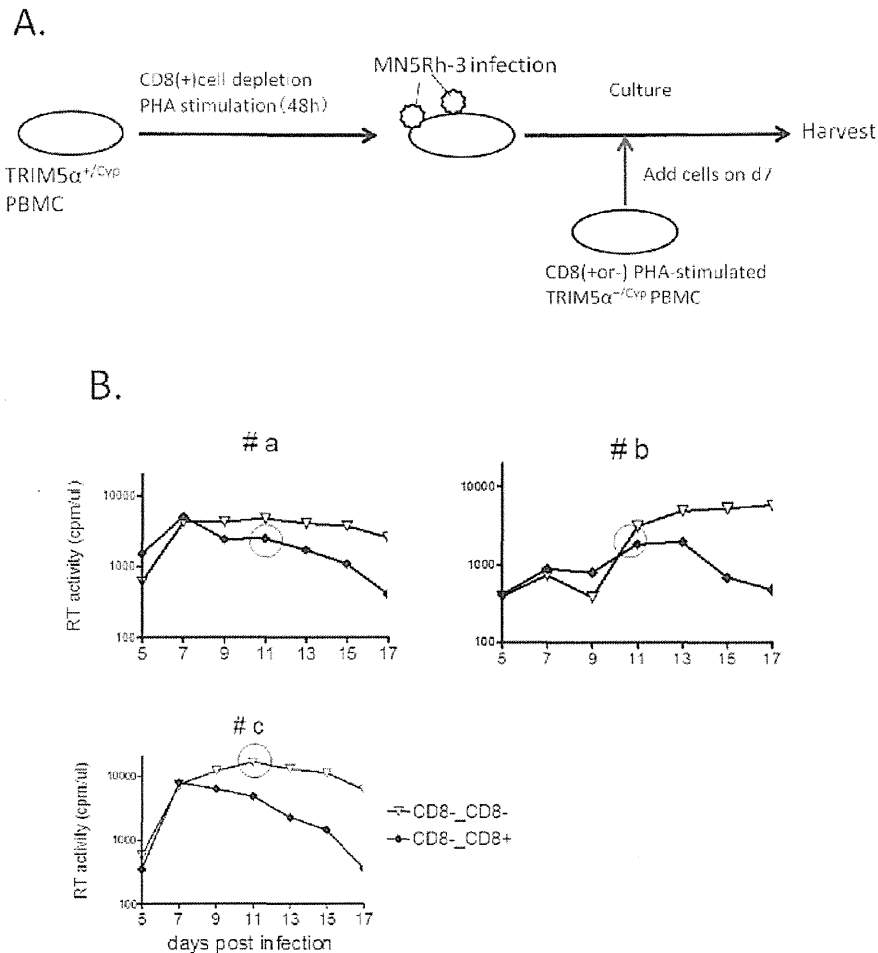


図1 チャレンジウイルスの調整

A. プロトコール 293T細胞を用いて調整した第3世代R5指向性HIV-1 (MN5Rh-3) をCD8陽性細胞を除去したHIV未感染自系PBMCと7日間共培養した後、CD8除去、非除去の自系PBMCを追加し培養を行った。  
 B. チャレンジウイルスの選択 PBMC共培養開始11日目、すなわちPBMCを追加した4日後の培養上清をチャレンジウイルス (○) とした。この時、逆転写酵素活性比 (CD8除去培養系/CD8非除去培養系) が2以上であった#cはCD8除去培養系のウイルスをチャレンジウイルスとして選択した。

(倫理面での配慮)

動物実験の実施にあたり、実施機関及び国立感染症研究所の実験動物倫理規定に従い、実験計画、実施の承認を受けて実施した。また用いた組換え生物等に関しては第二種使用等拡散防止設置確認申請承認 (大臣確認) 及び機関承認済みである。

C. 研究結果

感染実験に用いるウイルスはHIV投与予定個体の自系PBMCを用いて調整した。概要を図1に示した。293T細胞を用いて調整した第3世代R5指向性HIV-1 (MN5Rh-3) を、CD8陽性細胞を除去したHIV未感染自系PBMCと7日間共培養した後、CD8除去、非除去の自系PBMCを追加し培養を継続した。CD8除去 (以下CD8 (-) 培養系) または

非除去 (CD8 (+) 培養系) の自系PBMCを追加した4日後、すなわち共培養開始11日目の2ml/頭を接種ウイルス液としてカニクサル3頭に対し経静脈にて接種した。なお2つの培養系の逆転写酵素を比較し、3頭中2頭にCD8陽性細胞を除去したPBMCを用いて調整したウイルス液を、1頭にはCD8陽性細胞を含むPBMCにて調整したウイルス液を用いて評価実験を行った。

ウイルス接種後の血漿中ウイルス量を解析した。感染実験を行った3頭すべてにおいて感染2週目に血漿中ウイルス量は $10^4$ コピー/ml以上に達し急性期ウイルス血漿が観察された。特に3頭中1頭は感染2週後の血中ウイルス量は $10^4$ コピー/mlに達し、その後減少するもの少なくとも感染後15週までは血漿中ウイルス量は1000コピー/ml以上を維

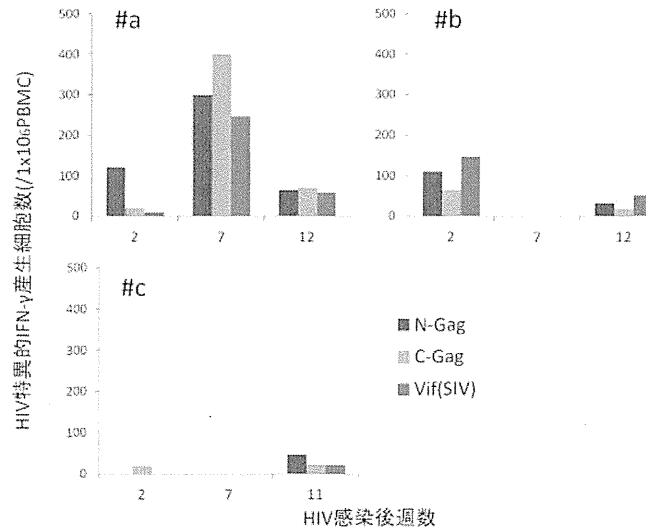


図2 HIV特異的CTL反応

HIV感染後2週、7週、12週のサルPBMCを用いてHIV特異的CTL頻度を解析した。MN5Rh-3株はVifをSIVに置換しているため、Vif特異的CTL反応の解析にはSIVをモチーフとして作成したペプチドを解析に使用した。N-Gag; HIV-Gag-N末端領域特異的CTL、C-Gag; C HIV-Gag-C末端領域特異的CTL、VIF (SIV) : SIV-Vif特異的CTL。

持っていた。

宿主HIV感染防御効果の指標の一つとして、サル個体HIV特異的CTL反応を解析した。感染後2週、7週のPBMC  $1 \times 10^6$ 個当たりのHIV特異的IFN- $\gamma$ 産生細胞数の頻度を図2に示した。個体a及びcは感染後2週もしくは7週でHIV-GagまたはVif特異的CTL反応が認められものの、その反応はその後減弱した。それに対し個体bは感染急性期においてもウイルス特異的CTL反応は検出されなかった。

#### D. 考察

本実験でカニクイザル3頭全頭を用いて第3世代R5指向性HIV-1 (MN5Rh-3) の感染実験を行いウイルス増殖動態、宿主免疫の指標の一つとしてHIV特異的CTL誘導能を解析した。

感染実験を行った3頭全頭において感染急性期においてウイルス血漿が認められ、さらにそのうち1頭では少なくとも感染後15週までは血漿中からウイルスゲノムが検出されたことから第3世代R5指向性HIV株 (MN5Rh-3) はカニクイザル個体内においても十分に増殖能を有し、持続感染成立に結び付く可能性がある株であることが示唆された。

二つ目として、CD8陽性細胞を含む自己PBMCにおいて比較的効率よく増殖し、この培養上清を接種した2個体の生体内ではウイルス特異的CTLの誘導が認められた。更にこのうち一頭には持続

感染の可能性が認められた。以上の結果から、CD8陽性細胞がチャレンジウイルスのファウンダー効果 (Founder effect) を変調する可能性を有すること、及び感染急性期に誘導されるウイルス特異的CTLが持続感染成立の成否を規定する主要な因子の一つであることが示唆される。今後はサル個体においてより増殖能が高く慢性持続感染に結び付くHIV株の開発に向けて、CD8陽性細胞の感染急性期における影響の解析を進めることを計画している。

#### E. 結論

本研究においてカニクイザル3頭を用いて第3世代R5指向性HIV株 (MN5Rh-3) のチャレンジ実験を行い、3頭中一頭で持続感染成立の可能性が示された。

#### 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Nomura T, Yamamoto H, Shiino T, Takahashi N, Nakane T, Iwamoto N, Ishii H, Tsukamoto T, Kawada M, Matsuoka S, Takeda A, Terahara K, Tsunetsugu-Yokota Y, Iwata-Yoshikawa N, Hasegawa H, Sata T, Naruse TK, Kimura A, Matano T. Association of major histocompatibil-

ity complex class I haplotypes with disease progression after simian immunodeficiency virus challenge in Burmese rhesus macaques. J Virol.2012. 86(12):6481-90

- 2) 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. J Virol. 2012 86(2):738-745.

## 2. 学会発表等

- 1) Y. Takahata, S. Matsuoka, H. Sakawaki, T. Miura, T. Igarashi, Y. Koyanagi, A. Kimura, and T. Matano: Impact of therapeutic vaccination on CTL dominance and viral suppression in SIV-infected macaque under HAART. The 19<sup>th</sup> International AIDS Congress, Washington DC, US, 20, 21/7/2012.
- 2) 石井 洋、野村 拓、高橋尚史、高原悠佑、松岡佐織、俣野哲朗：SIV感染アカゲザルにおける各ウイルスタンパク抗原特異的CTL反応の網羅的解析 第60回日本ウイルス学会学術集会 大阪 2012/11/13-15
- 3) 栗原京子、石井 洋、松岡佐織、上野貴将、滝口雅文、俣野哲朗：ビルマ産アカゲサルエイズモデルにおける細胞傷害性Tリンパ球のT細胞受容体遺伝子の同定 第60回日本ウイルス学会学術集会 大阪 2012/11/13-15
- 4) 中村 碧、高原悠佑、松岡佐織、阪脇廣美、三浦智行、小柳義夫、成瀬妙子、木村彰方、俣野哲朗：サルエイズモデルにおける抗HIV薬投与下のCTL誘導治療ワクチン接種効果の解析 第26回日本エイズ学会学術集会 横浜 2012/11

## G. 知的所得研の取得状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし



## 研究成果の刊行に関する一覧



## 研究成果の刊行に関する一覧



## 明里宏文

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Saito A, Nomaguchi M, Kono K, Iwatani Y, Yokoyama M, Yasutomi Y, Sato H, Shioda T, Sugiura W, Matano T, Adachi A, Nakayama EE, <u>Akari H</u>	<i>TRIM5</i> genotypes in cynomolgus monkeys primarily influence inter-individual diversity in susceptibility to monkey-tropic human immunodeficiency virus type 1.	Journal of General Virology		in press	2013
Nomaguchi M, Doi N, Fujiwara S, Saito A, <u>Akari H</u> , Nakayama EE, Shioda T, Yokoyama M, Sato H, Adachi A	Systemic biological analysis of the mutations in two distinct HIV-1mt genomes occurred during replication in macaque cells.	Microbes and Infection		in press	2013
Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Saito A, <u>Akari H</u> , Yasutomi Y, Matano T, Sato H, Adachi A	Gag-CA Q110D mutation elicits TRIM5-independent enhancement of HIV-1mt replication in macaque cells.	Microbes and Infection	15	56-65	2013
Saito A, Kawamoto Y, Higashino A, Yoshida T, Ikoma T, Suzaki Y, Ami Y, Shioda T, Nakayama EE, <u>Akari H</u>	Allele Frequency of Antiretroviral Host Factor TRIMCyp in Wild-caught Cynomolgus Macaques ( <i>Macaca fascicularis</i> ).	Frontiers in Microbiology	3	314	2012
Ohtani H, Naruse TK, Iwasaki Y, <u>Akari H</u> , Ishida T, Matano T, Kimura A	Lineage-specific evolution of T-cell immunoglobulin and mucin domain 1 gene in the primates.	Immunogenetics	64	669-678	2012
Iijima S, Lee Y-J, Ode H, Arold ST, Kimura N, Yokoyama M, Sato H, Tanaka Y, Strebel K, <u>Akari H</u>	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	86	3944-51	2012

足立昭夫

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Saito A, Nomaguchi M, Kono K, Iwatani Y, Yokoyama M, Yasutomi Y, Sato H, Shioda T, Sugiura W, Matano T, <u>Adachi A</u> , Nakayama EE, Akari H	<i>TRIM5</i> genotypes in cynomolgus monkeys primarily influence inter-individual diversity in susceptibility to monkey-tropic human immunodeficiency virus type 1.	Journal of General Virology		in press	2013
Nomaguchi M, Doi N, Fujiwara S, Saito A, Akari H, Nakayama EE, Shioda T, Yokoyama M, Sato H, <u>Adachi A</u>	Systemic biological analysis of the mutations in two distinct HIV-1mt genomes occurred during replication in macaque cells.	Microbes and Infection		in press	2013
Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Saito A, Akari H, Yasutomi Y, Matano T, Sato H, <u>Adachi A</u>	Gag-CA Q110D mutation elicits TRIM5-independent enhancement of HIV-1mt replication in macaque cells.	Microbes and Infection	15	56-65	2013
Miyakawa K, Sawasaki T, Matsunaga S, Tokarev A, Quinn G, Kimura H, Nomaguchi M, <u>Adachi A</u> , Yamamoto N, Guatelli J, Ryo A	Interferon-induced SCYL2 limits release of HIV-1 by triggering PP2A-mediated dephosphorylation of the viral protein Vpu.	Science Signaling	5	ra73	2012
Nomaguchi M, Fujita M, Miyazaki Y, <u>Adachi A</u>	Viral tropism.	Frontiers in Microbiology	3	281	2012
Fujita M, Nomaguchi M, <u>Adachi A</u> , Otsuka M	SAMHD1-dependent and -independent functions of HIV-2/SIV Vpx protein.	Frontiers in Microbiology	3	297	2012
Nomaguchi M, Doi N, Matsumoto Y, Sakai Y, Fujiwara S, <u>Adachi A</u>	Species tropism of HIV-1 modulated by viral accessory proteins.	Frontiers in Microbiology	3	267	2012

## 高折晃史

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shinohara M, Io K, Shindo K, Matsui M, Sakamoto T, Tada K, Kobayashi M, Kadowaki N, and <u>Takaori-Kondo A</u>	APOBEC3B can impair genomic stability by inducing base substitutions in genomic DNA in human cells	Scientific reports	2	806	2012
Fujita H, Kitawaki T, Sato T, Maeda T, Kamihira S, <u>Takaori-Kondo A</u> , and Kadowaki N	The tyrosine kinase inhibitor dasatinib suppresses cytokine production by plasmacytoid dendritic cells by targeting endosomal transport of CpG DNA	European journal of immunology	43	93-103	2012
Chonabayashi K, Hishizawa M, Kawamata S, Nagai Y, Ohno T, Ishikawa T, Uchiyama T, and <u>Takaori-Kondo A</u>	Direct binding of Grb2 has an important role in the development of myeloproliferative disease induced by ETV6/FLT3	Leukemia			2012
Furukawa A, Okamura H, Morishita R, Matsunaga S, Kobayashi N, Ikegami T, Kodaki T, <u>Takaori-Kondo A</u> , Ryo A, Nagata T, Katahira M	NMR study of xenotropic murine leukemia virus-related virus protease in a complex with amprenavir	Biochemical and Biophysical Research Communications	425	284-9	2012
Matsunaga S, Sawasaki T, Ode H, Morishita R, Furukawa A, Sakuma R, Sugiura W, Sato H, Katahira M, <u>Takaori-Kondo A</u> , Yamamoto N, Ryo A	Molecular and enzymatic characterization of XMRV protease by a cell-free proteolytic analysis	Journal of Proteomics	75	4863-73	2012
<u>Takaori-Kondo A</u> , Shindo K	HIV-1 Vif: a guardian of the virus that opens up a new era in the research field of restriction factors	Frontiers in Microbiology	4	34	2013

中山英美

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nomaguchi M, Doi N, Fujiwara S, Saito A, <u>Akari H</u> , <u>Nakayama EE</u> , Shioda T, Yokoyama E, Sato H, Adachi A.	Systemic biological analysis of the mutations in two distinct HIV-1mt genomes occurred during replication in macaque cells.	Microbes and Infection			in press
<u>Nakayama EE</u> , Nakajima T, Kaur G, Mimaya J, Terunuma H, Mehra N, Kimura A, Shioda T.	A naturally occurring single amino acid substitution in human TRIM5a linker region affects its anti-HIV-1 activity and susceptibility to HIV-1 infection.	AIDS Research and Human Retroviruses			in press
Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, <u>Nakayama EE</u> , Shioda T. Saito A, <u>Akari H</u> , Yasutomi Y, Matano T, Sato H, Adachi A.	Gag-CA Q110D mutation elicits TRIM5-independent enhancement of HIV-1mt replication in macaque cells.	Microbes and Infection	15	56-65	2013
Likanonsakul S, Rattanatham T, Feangvad S, Uttayamakul S, Prasithsirikul W, Srisopha S, Nitiyanontakij R, Tengtrakulcharoen P, Tarkowski M, Riva A, <u>Nakayama EE</u> , Shioda T.	Polymorphisms in <i>Fas</i> gene is associated with HIV-related lipoatrophy in Thai patients.	AIDS Research and Human Retroviruses	29	142-150	2013
Miyamoto T, <u>Nakayama EE</u> , Yokoyama M, Ibe S, Takehara S, Kono K, Yokomaku Y, Pizzato M, Luban J, Sugiura W, Sato H, Shioda T.	The cauboxyl-terminus of human immunodeficiency virus type 2 circulating recombinant form 01_AB capsid protein affects sensitivity to human TRIM5 $\alpha$ .	PLoS One	7	e47757	2012