

201226022A

厚生労働科学研究費補助金
エイズ対策研究事業

HIVの潜伏・再活性化および慢性的 免疫活性化を左右する細胞因子・ 免疫応答の解明とその制御

平成24年度 総括・分担研究報告書

平成25年 3 月

研究代表者 横 田 恭 子
(国立感染症研究所)

厚生労働科学研究費補助金
エイズ対策研究事業

HIV の潜伏・再活性化および慢性的 免疫活性化を左右する細胞因子・ 免疫応答の解明とその制御

平成24年度 総括・分担研究報告書

平成25年 3 月

研究代表者 横 田 恭 子

(国立感染症研究所)

目 次

I. 総括研究報告書

HIVの潜伏・再活性化および慢性的免疫活性化を左右する 細胞因子・免疫応答の解明とその制御 研究代表者：横田 恭子	1
---	---

II. 分担研究報告書

1. SIV感染におけるウイルス潜伏化機構とCTL応答 研究分担者：山本 浩之	11
2. 粘膜・リンパ組織の抗原提示細胞への感染様式の解明 研究分担者：五十嵐樹彦	15
3. 潜伏感染細胞の同定とその成立機構 研究分担者：横田 恭子	19
4. HIV潜伏・再活性化に関与するウイルス蛋白と宿主因子の分子機構 研究分担者：徳永 研三	23
5. HIVゲノムの潜伏化・再活性化に関わるエピジェネティック調節 機構とその制御 研究分担者：渡邊 俊樹	29
6. HIV感染者における慢性的な免疫活性化とT細胞疲弊の要因 研究分担者：立川 愛	35
7. HIV感染に伴う制御性・抑制性リガンドの発現とT細胞疲弊化 について 研究分担者：上野 貴将	39
8. 慢性的免疫活性化制御因子の機能解析 研究分担者：小柳 義夫	43
9. T細胞の活性化刺激とHIV感染制御 研究分担者：田中 勇悦	47

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	49
---------------------	----

I . 総括研究報告書

HIVの潜伏・再活性化および慢性的免疫活性化を 左右する細胞因子・免疫応答の解明とその制御

研究代表者 横田 恭子 国立感染症研究所 免疫部 第一室長

研究要旨：

SIV 感染モデルでは、初期制御群の CD4⁺ T 細胞中プロウイルス配列に CTL エスケープ変異蓄積の有無の 2 群が存在し、病態進行に関わるプロウイルスの特徴が明らかになりつつある。また、新規潜伏感染モデルとして、非病原性 SIVmac1A11 株感染サルを用いた解析技術を整え、腸管粘膜感染に着手した。分子レベルでは、Vpx と結合する新規タンパクが Vpx 機能の補助因子である可能性、LTR のメチル化を制御する polycomb ファミリー因子が HIV の潜伏化の導入と維持に関与することが示された。本研究で新たに作製されたレポーターウイルスやヒト化マウスの X4 型 HIV 潜伏感染系は今後の潜伏感染機構解明の鍵となることが期待される。一方、HIV 感染者の Nef 遺伝子多型は免疫活性化因子(CD74)の発現上昇に関与しなかったものの、慢性的 T 細胞機能不全に IL-2 遺伝子のエピジェネティックな制御異常が関連する可能性が示された。また、Treg が HIV-1 の標的となりやすく、Vpr による Treg の効率の破壊と枯渇による免疫活性化の現象がヒト化マウスの系を用いることにより初めて明らかとなった。更に、機能的 OX40L を高発現する HTLV-I⁺不死化 T 細胞は、βケモカインを介して R5 型 HIV 増殖を効果的に抑制することが確認され、新たな治療戦略として有望となった。

研究分担者

徳永研三（国立感染症研究所感染病理部・主任研究官）

渡邊俊樹（東京大学大学院新領域創成科学研究科・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・准教授）

田中勇悦（琉球大学大学院医学研究科・教授）

小柳義夫（京都大学ウイルス研究所・教授）

山本浩之（国立感染症研究所エイズ研究センター・研究員）

五十嵐樹彦（京都大学ウイルス研究所・教授）

上野貴将（熊本大学エイズ学研究センター・准教授）

A. 研究目的

HIV の潜伏感染とウイルス再活性化および慢性的免疫活性化による T 細胞の疲弊化を左右する細胞内因子および免疫学的要因を明らかにすること

により、エイズ病態を制御する新規治療戦略のための基盤を確立する。

B. 研究方法

1) SIV 初期制御群の CD4 陽性 T 細胞を IL-7+IL-15 で刺激培養して naïve/memory T 細胞分画の変化を FACS 解析するとともに、細胞 DNA を回収し、gag 領域を増幅してプロウイルス塩基配列の解析を行った。（山本）。

2) 非病原性 SIV 1A11/中国産アカゲザルモデル系の確立のため、ウイルスストックを調製し、PBMC 単球由来マクロファージ(MDM)に感染させた。各個体より herpes papio を用いて自己 B 細胞を不死化した（五十嵐）。

3) Vpx を発現させた樹状細胞のプロテオーム解析から得られた候補タンパクの発現調節レンチウイルスベクター、HA タグ発現ベクターを作製し、Vpx や SAMHD1 との免疫沈降を行った。また、東大医科学研究所附属病院(岩本愛吉教授・立川愛

准教授)と豪州王立パース病院 (Dr. Simon Mallal・Dr. David Nolan) から提供を受けた HIV-1 感染者マクロファージ (Mφ) の SAMHD1 mRNA 発現を multiplex real-time RT-PCR で定量した (徳永)。

4) HIV-1 及び潜伏感染解析用新規レポーターウイルス、様々な遺伝子ノックダウン用レトロウイルスベクターを作製し、細胞株や PHA 刺激 T 細胞に感染させた。ウイルス遺伝子発現と LTR 上のメチル化ヒストンはそれぞれ RT-PCR と ChIP アッセイで評価した。(渡辺)。

5) 潜伏感染機構解析のため、LTR から GFP-Nef のみ発現する組換えレンチウイルスを作製した。また、NOJ ヒト化マウスに異なる蛍光を発現する X4 型(GFP)と R5 型(DsRed) HIV-1 を同時に同量感染させ、感染後の血中ウイルス量の変化と感染細胞の組織分布をそれぞれ定量 RT-PCR と FACS で解析した (横田)。

6) 東大医科学研究所付属病院の HIV 感染者末梢血単核球(PBMC)を PHA 刺激し、経時的に各種サイトカイン産生、IL-2 と IFN- γ mRNA 量を測定した。また、PBMC を CD4⁺と CD8⁺T 細胞に分画して DNA を抽出し、プロモーター領域の DNA メチル化解析を行った (立川)。

7) 46 名の慢性 HIV 感染者血中ウイルス RNA より nef 遺伝子をクローニングして組換えウイルスを作製し、HIV の受容体を発現するヒト B 細胞株に感染させ、MHC Class II-associated invariant chain (CD74)の発現を FACS 解析した (上野)。

8) 野生型あるいは vpr 欠損 R5 型 HIV-1 を NOG ヒト化マウスに腹腔接種し、CD4 陽性の CD45RO⁻naïve、CD45RO⁺memory および FOXP3⁺制御性 T (Treg)細胞数、血中ウイルス RNA 量、脾細胞の細胞周期やアポトーシス関連分子について FACS で解析した。(小柳)。

9) HTLV-I 感染者から、OX40L を発現する自家 HTLV-I 不死化細胞をいくつか樹立した。OKT-3 抗体で活性化した健常人 PBMC に X4 型または R5 型 HIV-1 を感染させ、OX40L を発現する HTLV-I 不死化細胞等と混合培養して ELISA で上清中の p24 産生を測定、あるいは細胞内 Gag 染色で感染細胞を FACS 解析した (田中)。

(倫理面への配慮)

臨床材料や血液の提供を受ける場合には、各施設の医学研究倫理委員会の承認を得、書面による同意確認と提供者の個人情報 の保管管理を徹底し

つつ実施した。動物実験は各施設の実験動物委員会の承認を得、実施の際は動物愛護の精神に則って動物に与える苦痛の軽減・排除に努めた。

C. 研究結果

潜伏感染とその再活性化機構の解析

1) 感染後 2 年目の SIV 複製制御群において IL-7 と IL-15 を添加した培養すると 4 日目から 6 日目にかけて CD95 陽性メモリー分画の比率の上昇を認め、6 日目までに主に CD28 陽性 CD95 陽性セントラルメモリー分画で CCR5 陽性分画が増加する傾向にあった。これらの細胞 DNA を用いることにより、安定的にプロウイルスが検出され、CTL エスケープ変異蓄積の有無で 2 群に分かれることが明らかとなった。(山本)。

2) 非病原性 SIVmac1A11 はアカゲザル PBMC において効率良く複製し、病原性 SIV 239 とほぼ同様力価、 3.8×10^5 TCID₅₀/ml のウイルスストックができた。リンパ球指向性 SIV 239、マクロファージ指向性 SIV 316 を対照ウイルスとしてこの SIV 1A11 を MDM に接種した。SIV 316 と比較して遅れるものの、ウイルス粒子産生を伴う複製が再現された。更に、各サル個体より B-LCL を樹立し、新規潜伏感染モデルの準備が整ったことから、経直腸感染実験を開始した (五十嵐)。

3) プロテオーム解析により得られた 8 種類の Vpx 標的宿主因子候補のうち、3 つが Vpx と結合し、1 つは Vpx による感染性増強能に関与しており、Vpx の補助因子として作用しうることが示唆された。一方、HIV-1 感染者 Mφ の SAMHD1 の発現レベルは PBMC のそれより 10 倍近く高いが、Type I IFN を加えてもその発現は両者とも変化しなかった。また、これら SAMHD1 発現レベルと CD4 細胞数との相関は認められなかった (徳永)。

4) ヒストンのメチル化は HIV-1 の転写抑制に関与しており、HIV-1 の潜伏化の導入と維持には polycomb ファミリー分子やアンチセンスが関わっていた。ヒストンメチル化の導入とアセチル化レベルの低下は LTR の不活化に重要であり、これらの因子は T 細胞において非常に動的に制御されていることを明らかにした (渡辺)。

5) 潜伏感染細胞を培養系で同定するため、抗原特異的に活性化維持される T 細胞の長期培養系と LTR 制御下に GFP と Nef を発現する新たなレポーターレンチウイルスを作製し、Tat を発現しない

細胞では発現が低レベルであることを確認した。また、NOJ ヒト化マウスへの X4 型と R5 型 HIV-1 同時感染では、R5 型 HIV-1 の血中レベルが持続的に高いのに対し、X4 型 HIV-1 は感染後 5~6 週目には検出限界以下となった。これまでに、細胞レベルでは脾臓中の CCR5 陽性の CD4⁺記憶 T 細胞は R5 型 HIV-1 に選択的に感染しやすいことを観察しており、生体内でどの組織や細胞分画に X4 型 HIV-1 が感染し、潜伏化しうるのかを解析するためのモデルが確立できた（横田）。

慢性的免疫活性化と疲弊化の機構

6) IL-2、IFN- γ のプロモーター／エンハンサー領域に存在する CpG サイトはそれぞれ 6 カ所、4 カ所あり、IFN- γ では、CD4⁺T 細胞及び CD8⁺T 細胞のいずれの CpG サイトにおいても高 HIV 群、低 HIV 群、健常人群間でメチル化状態に違いはなかった。一方、IL-2 では CD4⁺T 細胞で最も転写開始地点に近い CpG サイト (CpG1) が、高 HIV 群で有意に高度メチル化されていたことから、IL-2 の遺伝子発現には CpG1 サイトにおけるメチル化が発現制御に重要であることが示唆された。また、高 HIV 群では刺激初期(5 時間)の IL-2 産生量低下がその後の多様なサイトカインの産生低下と関連していた。興味深いことに、HAART によりウイルスを制御している治療群においては治療後に IL-2 遺伝子の CpG1 のメチル化頻度が減少していた（立川）。

7) HIV 感染者由来 nef 遺伝子を発現する pNL43 組換えウイルスをヒト B 細胞株に感染させた結果、nef 遺伝子多型による差は、HLA-I の発現抑制よりも CD74 の発現昂進作用の方が大きかったものの、どちらも病態とは関連しなかった。CTL 逃避にかかわる HLA-I 発現抑制と免疫活性化にかかわる CD74 発現昂進機能は、Nef の異なった領域が担っており、生体内では独立に制御されていることが示唆された（上野）。

8) ヒト化マウスにおいて野生株 HIV-1 は Treg に効率よく感染し、1 週目に脾臓でウイルスが産生され、3 週目には細胞が破壊され枯渇した。この Treg 枯渇により、CD8⁺T 細胞は活性化(CD38 高発現)していた。一方 vpr 欠損 HIV-1 ではその活性は顕著に減弱化していた。野生型ウイルス感染細胞では Vpr を持つことにより高率に G₂M 期の停止が起き、それに続くアポトーシスが生じていることが明らかになった（小柳）。

9) HTLV-I で不死化したヒト T 細胞株は、OX40L と OX40 を細胞表面に発現するが、OX40L のみが活性をもち、この細胞株の OX40 分子には OX40L の結合部位に何らかの修飾が起こっていることが示唆された。組換え OX40L と同様、HTLV-I⁺不死化ヒト T 細胞株の OX40L は活性化 PBMC に β ケモカイン産生を誘導することにより R5 型 HIV-1 の感染を強く抑制し、X4 型 HIV-1 は阻害しないことを確認した（田中）。

D. 考察

SIV 感染初期制御後の病態進行はプロウイルスの性状で層別化されることが示唆された。また、SIV1A11 はサル PBMC 特にマクロファージでの複製は良好であることを確認した。SIV1A11 の個体感染における低複製性には vpr 遺伝子欠損とマクロファージ指向性 Env 蛋白が関与すると想定されており、新規サル潜伏感染モデルとして興味深い。

樹状細胞のプロテオーム解析により同定された Vpx と相互作用を示す SAMHD1 以外の蛋白の 1 つは、ジーンサイレンシングにより Vpx の機能を低下させたことから、Vpx の新規補助因子である可能性が高い。HIV-1 感染者 M ϕ での SAMHD1 の発現レベルが病態と関連しなかった点は、樹状細胞でも検討すべきであろう。また、HIV-1 はインテグレートしてから早い段階で宿主のエピジェネティクスによって潜伏化が誘導されると考えられ、LTR を取り巻くクロマチンの詳細な解析が LTR 制御を考える上でも重要となる。本研究班で潜伏感染の成立と維持を試験管内でモニターできる新規ウイルス感染培養系やヒト化マウスでの潜伏感染システムが確立されたことから、今後の潜伏感染機構を明らかにするための研究の進展が期待される。

今回注目した CD74 分子の発現昂進と Nef の遺伝子多型はその関連性が認められなかったものの、HIV-1 感染者 CD4⁺T 細胞におけるエピジェネティックな制御による IL-2 産生低下が T 細胞による多様なサイトカイン産生能低下の一因であることが明らかとなった。これらの解析結果は、慢性的免疫機能不全の背景を理解する上で重要な知見となる。また、HIV-1 感染ヒト化マウスにおいて Vpr 依存性に Treg の優位なウイルス感染と細胞破壊、それによる免疫活性化が起きたことは、

試験管内の感染実験のみでは不明であった、ウイルス感染個体内における Vpr の機能を明らかにした良い例である。この様な生体でのウイルス蛋白の機能解析から、今まで知られていない新たな知見が得られると期待される。更に、HTLV-I で不死化した T 細胞株が発現する OX40L が R5 HIV-1 による自家 PBMC の感染を効率良く抑制したことから、OX40L を利用した新規エイズ予防戦略への手掛かりが得られた。

E. 結論

サルエイズ潜伏感染モデルとして、SIV 感染 2 年後の初期制御群の CD4 陽性 T 細胞を IL-7+IL-15 で刺激培養し、細胞中のプロウイルス配列を解析した結果、CTL エスケープ変異蓄積の有り無しの 2 群が存在し、SIV 初期制御後の病態進行に関わるプロウイルスの特徴を解析することが容易となった。非病原性 SIVmac1A11 株感染サルを用いて新規潜伏感染モデルの準備が整い、経直腸感染実験を開始した。潜伏感染機構の培養細胞系による解析のため、新たなレポーターウイルスを作製し、ヒト化マウスを用いて生体内の X4 型 HIV-1 潜伏感染系を確立した。HIV-1 の潜伏化の導入と維持には LTR のメチル化に関わる polycomb ファミリー因子が T 細胞において非常に動的に制御されていること、Vpx と結合する SAMHD1 以外の蛋白 3 つのうち 1 つは Vpx の機能の補助因子であることが示唆された。また、HIV-1 感染者 Mφ における SAMHD1 の遺伝子発現は病態進行と関連しないことを明らかにした。

HIV-1 感染者の nef 遺伝子多型は今回注目した免疫活性化因子(CD74)の発現昂進には関与しなかったものの、高い血中ウイルス量を保持する感染者の慢性的 T 細胞機能不全には IL-2 遺伝子のエピジェネティックな制御異常が関連する可能性を初めて示した。更に、ヒト化マウスでは、Treg が HIV-1 の標的となりやすく、Vpr による Treg の効率良い破壊と枯渇を介して生体内での免疫活性化が誘導されることが明らかになった。一方、HTLV-I で不死化した T 細胞は機能的 OX40L の発現が高く、それらが R5 HIV-1 感染をβケモカイン依存性に抑制することが確認され、新たな治療戦略としての有用性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Terahara, K., Ishige, M., Ikeno, S., Mitsuki, Y-y, Okada, S., Kobayashi, K. and Tsunetsugu-Yokota, Y.: Expansion of activated memory CD4⁺ T cells affects infectivity of CCR5-tropic HIV-1 in humanized NOD/SCID/JAK3^{null} mice. PLoS One, 8:e53495, 2013.
- 2) Tsunetsugu-Yokota, Y. and Terahara, K: Receptor usage and the pathogenesis in acute and chronic virus infections. Front. Microbiol.3:289, 2012
- 3) Sugimoto, C., Nakamura, S., Hagen, S.I., Tsunetsugu-Yokota, Y., Villinger, F., Ansari, A.A., Suzuki, Y., Yamamoto, N., Nagai, Y., Picker, L.J., Mori, K.: Glycosylation of SIV influences immune-tissue targeting during primary infection that leads to immunodeficiency or viral control J. Virol. 86:9323-9336, 2012
- 4) Nomura, T., Yamamoto, H., Shiino, T., Takahashi, N., Nakane, T., Iwamoto, N., Ishii, H., Tstukamoto, T., Kawada, M., Matsuoka, S., Takeda, A., Terahara, K., Tsunetsugu-Yokota, Y., Iwata-Yoshikawa, N., Hasegawa, H., Sata, T., Naruse, T.K., Kimura, A., Matano, T. Association of major histocompatibility complex class I haplotypes with disease progression after simian immunodeficiency virus challenge in Burmese rhesus macaques. J. Virol. 86:6481-6490, 2012
- 5) Mitsuki, Y-Y., Terahara, K., Shibusawa, K., Yamamoto, T., Tsuchiya, T., Ishige, M., Kobayashi, K., Morikawa, Y., Nakayama, T., Takeda, M., Yanagi, Y., and Tsunetsugu-Yokota, Y. HIV-1 infection accelerates measles virus infection by upregulating signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) in CD4⁺ T cells. J. Virol. 86:7227-7234, 2012.
- 6) Takeuchi, K., Nagata, N., Kato, S., Ami, Y., Suzaki, Y., Suzuki, T., Sato, Y., Tsunetsugu-Yokota, Y., Mori, K., Nguyen, V. N., Kimura, H., and Nagata, K. (2012). Wild-type measles virus with the hemagglutinin protein of the Edmonston vaccine strain retains wild-type

- tropism in macaques. *J. Virol* 86:3027-3037, 2012.
- 7) Tokunaga, K. HIV-1 Vpu and BST-2/tetherin: Enemies at the Gates. *Current HIV Res.*, 10: 275-276, 2012.
 - 8) Arias, J.A., Iwabu, Y., and Tokunaga, K. Sites of action of HIV-1 Vpu in BST-2/tetherin downregulation. *Current HIV Res.*, 10: 283-291, 2012.
 - 9) Fujita, H., Fujimoto, K., Tokunaga, K., and Tanaka, Y. Intracellular Logistics of BST-2/Tetherin. *Current HIV Res.*, 10: 321-326, 2012.
 - 10) Arias, J.A., Koyama, T., Kinomoto, M., and Tokunaga, K. Retroelements versus APOBEC3 family proteins: No great escape from the magnificent seven. *Front Microbiol.*, 3, 275, 2012.
 - 11) Zheng, Y.-H., Jeang, K.-T., and Tokunaga, K. Host Restriction Factors in Retroviral Infection: Promises in Virus-Host Interaction. *Retrovirology* 9:112, 2012.
 - 12) Chutiwitoonchai, N., Hiyoshi, M., Hiyoshi-Yoshidomi, Y., Hashimoto, M., Tokunaga, K., and Suzu, S. Characteristics of IFITM, the newly identified IFN-inducible anti-HIV-1 family proteins. *Microbes Infect.* In press.
 - 13) Koyama, T., Sun, B., Tokunaga, K., Tatsumi, M., and Ishizaka, Y. DNA damage aids HIV-1 infection of macrophages by overcoming integrase inhibition. *Retrovirology* In press.
 - 14) Yamagishi M, Watanabe T. New Paradigm of T cell Signaling: Learning from Malignancies (Review Article). *J Clin Cell Immunol.* S12:007, 15pp, 2012.
 - 15) Yamagishi M, Watanabe T. Molecular Hallmarks of Adult T Cell Leukemia (Review Article). *Front Microbiol.* 3: 334, 2012.
 - 16) Iwanaga M, Watanabe T., Yamaguchi K. Adult T-cell leukemia: a review of epidemiological evidence. *Front Microbiol* 3: 322, 2012.
 - 17) Nakano K, Watanabe T. HTLV-1 Rex: the courier of viral messages, making use of the host vehicle. *Front Microbiol* 3:330, 2012.
 - 18) Kobayashi-Ishihara M, Yamagishi M, Hara T, Matsuda Y, Takahashi R, Miyake A, Nakano K, Yamochi T, Ishida T, Watanabe T. HIV-1-encoded antisense RNA suppresses viral replication for a prolonged period. *Retrovirology*, 9:38- , 2012.
 - 19) Ando T, Imamura H, Suzuki R, Hideki Aizaki H, Watanabe T., Wakita T, Suzuki T. Visualization and Measurement of ATP Levels in Living Cells Replicating Hepatitis C Virus Genome RNA. *PLoS Pathogens*, 8(3):e1002561, 2012.
 - 20) Nomura S, Hosoya N, Brumme ZL, Brockman MA, Kikuchi T, Koga M, Nakamura H, Koibuchi T, Fujii T, Carlson JM, Heckerman D, Kawana-Tachikawa A., Iwamoto A, Miura T. Significant Reductions in Gag-protease Mediated HIV-1 Replication Capacity Over the Course of the Epidemic in Japan. *J Virol.* 87:1465-76, 2013.
 - 21) Kikuchi T, Iwatsuki-Horimoto K, Adachi E, Koga M, Nakamura H, Hosoya N, Kawana-Tachikawa A., Koibuchi T, Miura T, Fujii T, Kawaoka Y, Iwamoto A. Improved neutralizing antibody response in the second season after a single dose of pandemic (H1N1) 2009 influenza vaccine in HIV-1-positive adults. *Vaccine.* 30:3819-23, 2012.
 - 22) Watanabe, T., Urano, E., Miyauchi, K., Ichikawa, R., Hamatake, M., Misawa, N., Sato, K., Ebina, H., Koyanagi, Y. and Komano J.: The hematopoietic cell-specific Rho GTPase inhibitor ARHGDI/D4GDI limits HIV-1 replication. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 28:913-922, 2012.
 - 23) Sato, K., Misawa, N., Fukuhara, M., Iwami, S., An, D.S., Ito, M. and Koyanagi, Y.: Vpu augments the initial burst phase of HIV-1 propagation and downregulates BST2 and CD4 in humanized mice. *J. Virol.* 86:5000-5013, 2012.
 - 24) 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 histocompatibility complex class I haplotypes

- with disease progression after simian immunodeficiency virus challenge in Burmese rhesus macaques. *J Virol.* 86:6481-6490, 2012.
- 25) Iwami, S., Holder, B.P., Beauchemin, C.A., Morita, S., Tada, T., Sato, K., Igarashi, T., and Miura, T. Quantification system for the viral dynamics of a highly pathogenic simian/human immunodeficiency virus based on an in vitro experiment and a mathematical model. *Retrovirology* 9:18, 2012.
 - 26) Morita, D., Yamamoto, Y., Suzuki, J., Mori, N., Igarashi, T., and Sugita, M. Molecular requirements for T cell recognition of N-myristoylated peptides derived from the simian immunodeficiency virus Nef protein. *J. Virol.* 87:482-8, 2013.
 - 27) Fujita, Y., Otsuki, H., Watanabe, Y., Yasui, M., Kobayashi, T., Miura, T., and Igarashi, T. Generation of a replication-competent chimeric simian-human immunodeficiency virus carrying *env* from subtype C clinical isolate through intracellular homologous recombination. *Virology* 436:100-111, 2013.
 - 28) Takahashi, N., Nomura, T., Takahara, Y., Yamamoto, H., Shiino, T., Takeda, A., Inoue, M., Iida, A., Hara, H., Shu, T., Hasegawa, M., Sakawaki, H., Miura, T., Igarashi, T., Koyanagi, Y., Naruse, T.K., Kimura, A., and Matano, T. A novel protective MHC-I haplotype not associated with dominant Gag-specific CD8⁺ T-cell responses in SIVmac239 infection of Burmese rhesus macaques. *PLoS ONE* 8:e54300, 2013.
 - 29) Zafrul Hasan, Jonathan M Carlson, Hiroyuki Gatanaga, Anh Q. Le, Chanson J Brumme, Shinichi Oka, Zabrina L Brumme, Takamasa Ueno. Minor contribution of HLA class I-associated selective pressure to the variability of HIV-1 accessory protein Vpu. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 421, 291-29, 2012.
 - 30) Philip Mwimanz, Tristan J. Markle, Takamasa Ueno, Mark A. Brockman. HLA class I down-regulation by HIV-1 Nef: What might we learn from natural sequence variants? *Viruses* 4, 1844, 2012.
 - 31) Philip Mwimanz, Tristan J Markle, Eric Martin, Yoko Ogata, Xiaomei T Kuang, Michiyo Tokunaga, Macdonald Mahiti, Florencia Pereyra, Toshiyuki Miura, Bruce D Walker, Zabrina L Brumme, Mark A Brockman and Takamasa Ueno. Attenuation of multiple Nef functions in HIV-1 elite controllers. *Retrovirology* 10: 1, 2013.
2. 学会発表
- 1) Ikeno, S., Terahara, K., Ishige, M., Suzuki, M., Mitsuki, Y-y, Morikawa, Y., Nakayama, T., Tsunetsugu-Yokota, Y.: Application of humanized mice for the evaluation of measles virus vector. The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Hyogo, September, 2012.
 - 2) Tsunetsugu-Yokota, Y., Ishige, M. Ikeno, S., and Terahara, K.: Humanized mice as an animal model for human-tropic virus infection, in *Immunological Mechanisms of Vaccination, Keystone Symposium, Ottawa, Canada, December, 2012.*
 - 3) 池野翔太、寺原和孝、石毛真行、鈴木基臣、光木裕也、森川裕子、中山哲夫、横田恭子。ヒト化マウスの麻疹ウイルスベクター評価系への応用。第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、平成24年11月。
 - 4) 岩田奈緒子、永田典代、鈴木忠樹、佐藤由子、横田恭子、西條政幸、森川茂、長谷川秀樹。SARS-CoV感染動物モデルを用いたUV不活化SARS-CoVの副反応発生機序について。第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、平成24年11月。
 - 5) T. Kikuchi, Y. Iwabu, A. Kawana-Tachikawa, M. Koga, N. Hosoya, S. Nomura1, Z.L. Brumme, H. Jessen, A. Kelleher, M. Markowitz, F. Pereyra, A. Trocha, B.D. Walker, A. Iwamoto, K. Tokunaga, and T. Miura: Anti-APOBEC3G activity of HIV-1 Vif protein from elite controllers is attenuated compared to those from untreated chronic progressors or those from individuals with acute infection. XIX International AIDS Conference, Washington D.C., USA, 2012. 7.
 - 6) 張延昭、岩部幸枝、立川（川名）愛、中村仁美、David Nolan、Simon Mallal、長谷川秀樹、山岡昇司、岩本愛吉、徳永研三：HIV-1 感染

- 者における抗ウイルス宿主因子の発現レベルと病態進行との相関性の有無. 第 59 回日本ウイルス学会総会 (大阪) 2012. 11.
- 7) 小山貴芳、Juan F. Arias、岩部幸枝、徳永研三：HIV-2 Vpx に不活化される抗ウイルス宿主因子の探索. 第 59 回日本ウイルス学会総会 (大阪) 2012. 11.
 - 8) Juan F Arias、小山貴芳、岩部幸枝、横山勝、佐藤裕徳、長谷川秀樹、徳永研三：APOBEC3G による Alu 転移抑制の分子生物学的および構造学的解析. 第 59 回日本ウイルス学会総会 (大阪) 2012. 11.
 - 9) 菊地正、岩部幸枝、立川(川名)愛、古賀道子、野村滋、細谷紀彰、Zabrina L. Brumme、Heiko Jessen、Anthony D. Kelleher、Martin Markowitz、Florescia Pereyra、Alicja Trocha、Bruce D. Walker、岩本愛吉、徳永研三、三浦聡之：HIV-1 elite controller における HIV-1 Vif の抗 APOBEC3G 活性の低下. 第 59 回日本ウイルス学会総会 (大阪) 2012. 11.
 - 10) 小山貴芳、Juan F Arias、横山勝、佐藤裕徳、徳永研三：APOBEC3G の抗 Alu レトロ転移活性に寄与するアミノ酸の同定. 第 35 回日本分子生物学会 (福岡) 2012. 12.
 - 11) Watanabe T., “The role of microRNAs in Adult T-Cell Leukemia”, Viruses, Genes and Cancer workshop, Venice, Italy, Oct. 25-27, 2012 .
 - 12) 松田有加、山岸誠、小林美栄、原 拓馬、石田尚臣、渡邊俊樹、「HIV-1 潜伏化の成立と維持における Polycomb group の機能解析」、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪国際会議場、2012 年 11 月
 - 13) 小林美栄、山岸誠、松田有加、中野和民、矢持忠徳、石田尚臣、渡邊俊樹、「HIV-1 由来 antisense RNA によるウイルス複製抑制メカニズムの解析」、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪国際会議場、2012 年 11 月.
 - 14) 小林(石原)美栄、山岸誠、松田有加、中野和民、矢持忠徳、石田尚臣、渡邊俊樹、「HIV-1 由来新規 antisense RNA, *ASP-L* はウイルスを制御する機能性 RNA である」、第 35 回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場、2012 年 12 月.
 - 15) Kikuchi T, Iwabu Y, Kawana-Tachikawa A, Koga M, Nomura S, Hosoya N, Brumme ZL, Heiko J, Kelleher AD, Markowitz M, Pereyra F, Trocha A, Walker BD, Iwamoto A, Tokunaga K, Miura T. Anti-APOBEC3G activity of HIV-1 Vif protein from elite controllers is attenuated compared to those from untreated chronic progressors of those from individuals with acute infection. XIX International AIDS Conference, Washington DC, USA, July 2012.
 - 16) Han C, Shimizu A, Zhu D, Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A. Impact of an amino acid change within overlapping CTL epitopes in HIV-1 infection. Keystone symposia; HIV Vaccines, Keystone, CO, USA, Feb, 2013.
 - 17) 菊地正、岩部幸枝、立川(川名)愛、古賀道子、野村滋、細谷紀彰、Brumme ZL, Heiko J, Kelleher AD, Markowitz M, Pereyra F, Trocha A, Walker BD, 岩本愛吉、徳永研三、三浦聡之. HIV-1 elite controller における HIV-1 Vif の抗 APOBEC3G 活性の低下. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012 年 11 月.
 - 18) 田中勇悦、高橋良明、田中礼子 HTLV-I 感染自家 T 細胞株による CCR5 指向性 HIV-1 感染制御：Tax が誘導する免疫亢進性 OX40 リガンドの応用 第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会 横浜 (2012.11.24) .
 - 19) Sato, K., Misawa, N., Satou, Y., Matsuoka, M., Ito, M. and Koyanagi, Y.: Induction of immune activation by the depletion of regulatory CD4+ T cell during acute HIV-1 infection in humanized mouse model. 19th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI), Seattle, March, 2012.
 - 20) Koyanagi, Y.: Overview of infection model of humanized mice. 1st Samsung Humanized Mice Symposium, Seoul, April, 2012.
 - 21) Sato, K., Misawa, N., Satou, Y., Matsuoka, M., Ito, M. and Koyanagi, Y.: Positive contribution of HIV-1 Vpu for viral propagation *in vivo*. Retroviruses Meeting Cold Spring Harbor, poster, New York, USA, May, 2012.
 - 22) 小柳義夫. レトロウイルス感染におけるエフェクター分子、北海道大学遺伝子制御研究所研究集会「感染と癌 - 感染癌のエフェクター分子とその標的 -」, 札幌、2012 年 9 月.
 - 23) 佐藤佳、三沢尚子、佐藤賢文、松岡雅雄、伊藤守、小柳義夫. Vpr の制御性 T 細胞特異的な

- 消耗促進作用による生体内 HIV-1 増殖亢進, 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 2012 年 11 月.
- 24) Yamamoto, H. *In vivo correlates of neutralizing antibody induction against SIVmac239.* 26th annual meeting of the Japanese Society for AIDS Research, Yokohama, Japan, November, 2012.
 - 25) 史蕭逸、関紗由里、俣野哲朗、山本浩之. サル免疫不全ウイルス感染個体群における IL-21 シグナル基軸の解析. 第 26 回日本エイズ学会学術集会、横浜、2012 年 11 月.
 - 26) Hiroyuki Otsuki, Takeshi Kobayashi, Tatsuhiko Igarashi, Tomoyuki Miura: Generation of monkey-tropic human immunodeficiency virus strains carrying a variety of CCR5-utilizing env genes from HIV-1 subtype C clinical isolates through intracellular homologous recombination 19th East Asia Joint Symposium on Biomedical Research, Seoul, Korea, 2012.8.22-25.
 - 27) 三浦智行、大附寛幸、米田舞、一瀬裕太郎、小林剛、五十嵐樹彦: 霊長類エイズモデル感染病態に関わるウイルスゲノム基盤に関する研究 第 154 回日本獣医学会、岩手、2012 年 9 月.
 - 28) 岩見真吾、de Boer Rob、五十嵐樹彦、三浦智行: 培養細胞実験と数理モデルによるウイルス感染動態の定量化ーウイルス病原性の解明への応用ー 第 60 回日本ウイルス学会、大阪、2012 年 11 月.
 - 29) 大附寛幸、一瀬裕太郎、小林剛、原田恵嘉、吉村和久、鳴海哲夫、玉村啓和、松下修三、五十嵐樹彦、三浦智行: 中和感受性を増強する薬剤による抗 HIV-1 治療戦略に向けた新規 SHIV/アカゲザル評価モデルの開発 第 60 回日本ウイルス学会、大阪、2012 年 11 月.
 - 30) 米田舞、一瀬裕太郎、大附寛幸、松田健太、松下修三、五十嵐樹彦、三浦智行: サルに順化した CCR5 指向性 SHIV-MK38 の中和抗体に対する抵抗性 第 60 回日本ウイルス学会、大阪、2012 年 11 月.
 - 31) 渡部 祐司、岩見 真吾、西山 由利子、森 ひろみ、三浦 智行、五十嵐樹彦: 高病原性 SHIV 感染サルにおける感染マクロファージの半減期の推定 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012 年 11 月.
 - 32) 岩見真吾、Rob de Boer、三浦智行、西村佳哲、五十嵐樹彦: SHIV 感染アカゲザルにおいて病原性を決定づけるウイルス感染動態の探索ー数理モデルによるデータ解析の視点からー 第 26 回日本エイズ学会、神奈川、2012 年 11 月.
 - 33) 大附寛幸、一瀬裕太郎、小林剛、五十嵐樹彦、三浦智行: 細胞内相同組換えを利用した CCR5 指向性サブタイプ C HIV-1 由来 env を持つサル指向性 HIV-1 の作出 第 26 回日本エイズ学会、神奈川、2012 年 11 月.
 - 34) 中村碧、高原悠佑、松岡佐織、阪脇廣美、三浦智行、五十嵐樹彦、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、神奈川、2012 年 11 月.
 - 35) 廣田雄樹、鳴海哲夫、橋本知恵、吉村和久、原田恵嘉、大附寛幸、三浦智行、五十嵐樹彦、相川春夫、野村渉、松下修三、玉村啓和: HIV 外被タンパク質 gp120 を標的とするインドール型低分子 CD4 ミミックの創製研究 第 26 回日本エイズ学会、神奈川、2012 年 11 月.
 - 36) Zafrul Hasan, J. Carlson, H. Gatanaga, A. Le, S. Oka, Z. Brumme, Takamasa Ueno. Impact of HLA class I-driven genetic variability in HIV-1 accessory gene vpu. COLD SPRING HARBOR ASIA CONFERENCES: Frontiers of Immunology in Health and Disease. Suzhou Dushu Lake Conference Center, China. September, 2012.
 - 37) Zafrul Hasan, J. Carlson, H. Gatanaga, A. Le, C. Brumme, S. Oka, Z. Brumme, Takamasa Ueno. HLA class I-mediated sequence polymorphism in HIV-1 accessory protein Vpu. The 13th KUMAMOTO AIDS Seminar and GCOE Joint International Symposium, Hotel Nikko Kumamoto and Aso Resort Grandvrio Hotel, Kumamoto, Japan. October, 2012.
 - 38) Chihiro Motozono, John S. Bridgeman, Masaaki Miyazawa, Andrew K. Sewell and Takamasa Ueno. The impact of a single amino acid difference in CDR3 α on TCR $\alpha\beta$ cross-reactivity, ワークショップ 32 ヒト免疫、第 41 回日本免

疫学会総会・学術集会、神戸、兵庫、2012 年 12 月 5-7 日.

- 39) Chihiro Motozono, John J. Miles Zafrul Hasan Hiroyuki Gatanaga, Meribe Stanley. C, Shinichi Oka, Masaaki Miyazawa, Andrew K. Sewell, and Takamasa Ueno. HIV-1 immune escape and cross-reactivity profiles of virus-specific cytotoxic T lymphocytes, YIS-A Session II, 13th Kumamoto AIDS Seminar Global COE Joint International Symposium, Aso Resort GRANDVRIO, Kumamoto, Japan, October, 2012.
- 40) 緒方陽子、Philip Mwimanzi、徳永美知代、Tristan Markle、三浦聡之、Bruce Walker、Zabrina Brumme、Mark Brockman、上野貴将：Nef のウイルスレセプター発現低下機能と病態、第 14 回白馬シンポジウム in 京都、京都市国際交流会館、2012 年 6 月.
- 41) 上野貴将：HIV-1 Nef の遺伝子多型性と機能的可塑性、第 14 回白馬シンポジウム in 京都、京都市国際交流会館、2012 年 6 月.
- 42) 上野貴将、Mwimanzi Philip、Markle Tristan、緒方陽子、徳永美知代、Mahiti Macdonald、三浦聡之、Pereyra Florencia、Walker Bruce、Brumme Zabrina、Brockman Mark：Genetic and functional analyses of HIV-1 Nef in elite controllers.第 60 回日本ウイルス学会学術集会、グランキューブ大阪（大阪国際会議場）、2012 年 11 月.
- 43) 緒方陽子、Philip Mwimanzi、李小光、徳永美知代、Tristan Markle、三浦聡之、Bruce Walker、Zabrina Brumme、Mark Brockman、上野貴将：Nef のウイルスレセプター発現低下機能と病態、第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会、慶應義塾大学日吉キャンパス、2012 年 11 月.
- 44) T. Ueno. Functional impairment of HIV-1 Nef in elite controllers and its correlation with immune-mediated selective pressure. 13th Kumamoto AIDS Seminar Global COE Joint International Symposium, Kumamoto, Japan. October, 2012.

- 45) M. Mahiti, P. Mwimanzi, Y. Ogata, M. Tokunaga, B. Walker, Z. Brumme, M. Brockman, T. Ueno. Modulation of HIV-1 Nef-mediated HLA class I down-regulation activity during disease progression. 13th Kumamoto AIDS seminar Aso Resort Grandiovrio Hotel, Kumamoto, Japan 24th October, 2012.
- 46) X. Kuang, A Le, P Mwimanzi, T Markle, R Danroth, T Ueno, T Miura, B Walker, Z Brumme, M Brockman, and the Acute HIV and International HIV Controllers study group. Reduced HIV-1 Nef Function in Acute/Early Individuals who become Viremic Controllers. 20th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI), Georgia World Congress Center, Atlanta, USA. March, 2013.

II. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

琉球大学の知財本部を通して近日中に特許出願をする予定である。(田中)

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

Ⅱ. 分担研究報告書

SIV 感染におけるウイルス潜伏化機構と CTL 応答

研究分担者 山本 浩之 国立感染症研究所 エイズ研究センター研究員

研究要旨：

SIV 感染サルエイズモデルの先行解析により、CTL を主体とした安定な初期 SIV 制御に至る MHC クラス I ハプロタイプ共有アカゲサル群が同定された。本群でも潜伏 SIV は高率に残存し、ウイルス長期制御に結び付く免疫応答の実態は明らかではない。本研究では初期 SIV 制御サル群での潜伏感染状態を評価することを目的に、特定の生理活性物質を組み合わせた刺激培養による潜伏ウイルス検出系の改良を試みるとともに、感染慢性期の潜伏ウイルスの配列を解析し CTL エスケープの評価を試みた。

IL-7 + IL-15 存在下の CD4 陽性 T 細胞の刺激培養で、メモリー分画の増幅を伴う形で複製制御期検体からのプロウイルス検出が安定に得られた。本法で SIV 長期制御中のプロウイルス配列を解析した結果、感染後 2 年の時点で Gag 領域に CTL エスケープ変異が蓄積する群と蓄積しない群に二分された。今後は当該群における CTL エスケープの経時的変化の評価を交え、初期制御・潜伏後に再増殖に至らないウイルスの性状解明を行う。

A. 研究目的

HIV の潜伏感染・再活性化を左右する細胞内因子および免疫学的要因を明らかにすることを目的に、本研究では個体レベルの初期エイズウイルス制御に至った SIV（サル免疫不全ウイルス）感染サルエイズモデルを用い、持続的なウイルス制御下におけるウイルス潜伏化・CTL 応答の探索を行う。先行解析の段階で CTL を主体に初期 SIV 複製制御に至ったアカゲサル群を同定したことを踏まえ、当該群の慢性期における CTL 応答と潜伏ウイルス中のエスケープ変異の蓄積状況、並びに病態進行の関係を明らかにしてゆくことを目標とする。

B. 研究方法

MHC クラス I ハプロタイプ 90-120-Ia 共有 SIV_{mac239} 初期制御群（ $n = 11$ ）の潜伏プロウイルスの解析および新規プロウイルス検出系の検討を行った。具体的には、当該群の感染後 2 年時〔血中ウイルスが検出下限（400 RNA copies/ml plasma）以下の時期〕の末梢血単核球（PBMC）より CD4 陽性 T 細胞を磁気分離した。分離には non-human primate CD4⁺ T cell isolation kit を用いた。非培養の細胞、あるいは各種の生

理活性物質を組み合わせて一定期間刺激培養した 1.0×10^6 個の細胞につき DNeasy extraction kit を用いて total DNA を抽出し、KOD FX neo を用いた nested PCR 法により SIV Gag 領域の塩基配列解析を行った。培養上清中のウイルス RNA は High pure viral RNA extraction kit を用いて抽出し、Prime script RT-PCR kit と KOD Plus を用い nested PCR 法で同様に配列を解析した。刺激培養中の分画変化を評価する際には、PE-Cy7 標識抗 CD95 抗体と抗 Cy7 マイクロビーズを用いた間接標識法によりメモリー分画（CD95 陽性）とナイーブ分画（CD95 陰性）を磁気分離し、純度を確認したのち表面抗原の発現をフローサイトメーターで解析した。

（倫理面への配慮）

遺伝子組換え生物等を用いる実験には、所属機関承認・文部科学大臣承認を取得済みであり、医用霊長類の利用時は、所属機関、医薬基盤研究所の動物実験委員会の審査・承認を得て取扱いを行った。

C. 研究結果

1. SIV 初期制御個体群における CD4 陽性 T 細胞中プロウイルス検出の各種刺激培養法を検討

した結果、IL-7 (10 ng/ml) + IL-15 (10 ng/ml) 存在下で 8 日間刺激培養を行う手法による SIV 複製制御群からのプロウイルス検出法を採用した。表示した試験例 (5 頭由来) においては、全頭で培養 4 日目から 6 日目にかけて CD95 陽性メモリー分画の比率の上昇を認めた (図 1A)。また培養期間中には、6 日目までに CD28 陽性 CD95 陽性セントラルメモリー分画を主体として CCR5 陽性分画が増加するケースが優位 (4/5 頭) であることが認められた (図 1B)。

2. 上記方法で刺激培養した CD4 陽性 T 細胞中のプロウイルス DNA 配列を SIV 初期制御群につき解析した結果、感染後 2 年の時点で Gag 領域に CTL エスケープ変異が蓄積しない群 (6 頭) と蓄積する群 (5 頭) に二分された (表 1)。両群における培養上清中のウイルス RNA 検出は、CTL エスケープ変異を認めない群では 1/6 頭、変異蓄積群では 4/5 頭であった。

D. 考察

SIV 複製制御期の潜伏ウイルス検出を試み、CD4 陽性 T 細胞の IL-7 + IL-15 刺激培養で全頭においてプロウイルス検出に至った。培養時には CD95 陽性メモリー分画の増加を認め、これは IL-7 の homeostatic proliferation 作用や IL-15 の抗原非依存的メモリー維持作用が反映されたものと考えられる。本法でのメモリー分画増幅を伴うプロウイルス検出法は、非培養時、或いは mitogen (PHA) 刺激等と比べてより均質な検体評価に寄与する可能性が示唆された。培養上清へのウイルス粒子産生パターンの、IL-7 + IL-15 刺激との関係性は今後の検討課題となりうる。

SIV 初期制御群は、感染後 2 年時点に至ってプロウイルス中の CTL エスケープの有無で層別化されることが判明した。初期制御の早期破綻を来した過去の報告例 (Kawada et al, 2006) とは異なり、当該群は①持続制御を示しつつも CTL エスケープの蓄積を認める群、②CTL エスケープが検出されない群より成立していることが見出され、両群ともコホートとしての新規性は非常に高い。従って今後は、①CTL エスケープ蓄積群・非蓄積群での血中ウイルス量再出現に感染後 2 年以降で差が認められるか、②観

察された CTL エスケープの蓄積がどの時点から始まるか、③感染後 2 年以前の CTL 応答パターンが変異蓄積群・非蓄積群でどのように異なるか、④変異蓄積群・非蓄積群で CTL 以外の淘汰圧がどのように異なりうるかを考慮することの 4 点が重要であると考えられた。

E. 結論

SIV 初期制御アカゲサル群にて、IL-7 + IL-15 刺激培養を用いた長期制御期 CD4 陽性 T 細胞が感染後 2 年でのプロウイルス Gag 領域配列を解析した結果、CTL エスケープの蓄積の存否で 2 群に大別されることが明らかとなった。本研究は、潜伏後に再増殖に至らないエイズウイルスの性状解明への基礎的知見を与えるものである。

G. 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 histocompatibility complex class I haplotypes with disease progression after simian immunodeficiency virus challenge in Burmese rhesus macaques. J Virol. 86:6481-6490, 2012.

2. 学会発表

- 1) Yamamoto, H. In vivo correlates of neutralizing antibody induction against SIV_{mac239}. 26th annual meeting of the Japanese Society for AIDS Research, Yokohama, Japan, November, 2012.
- 2) 史蕭逸、関紗由里、俣野哲朗、山本浩之. サル免疫不全ウイルス感染個体群における IL-21 シグナル基軸の解析. 第 26 回日本エイズ学会学術集会、横浜、2012 年 11 月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

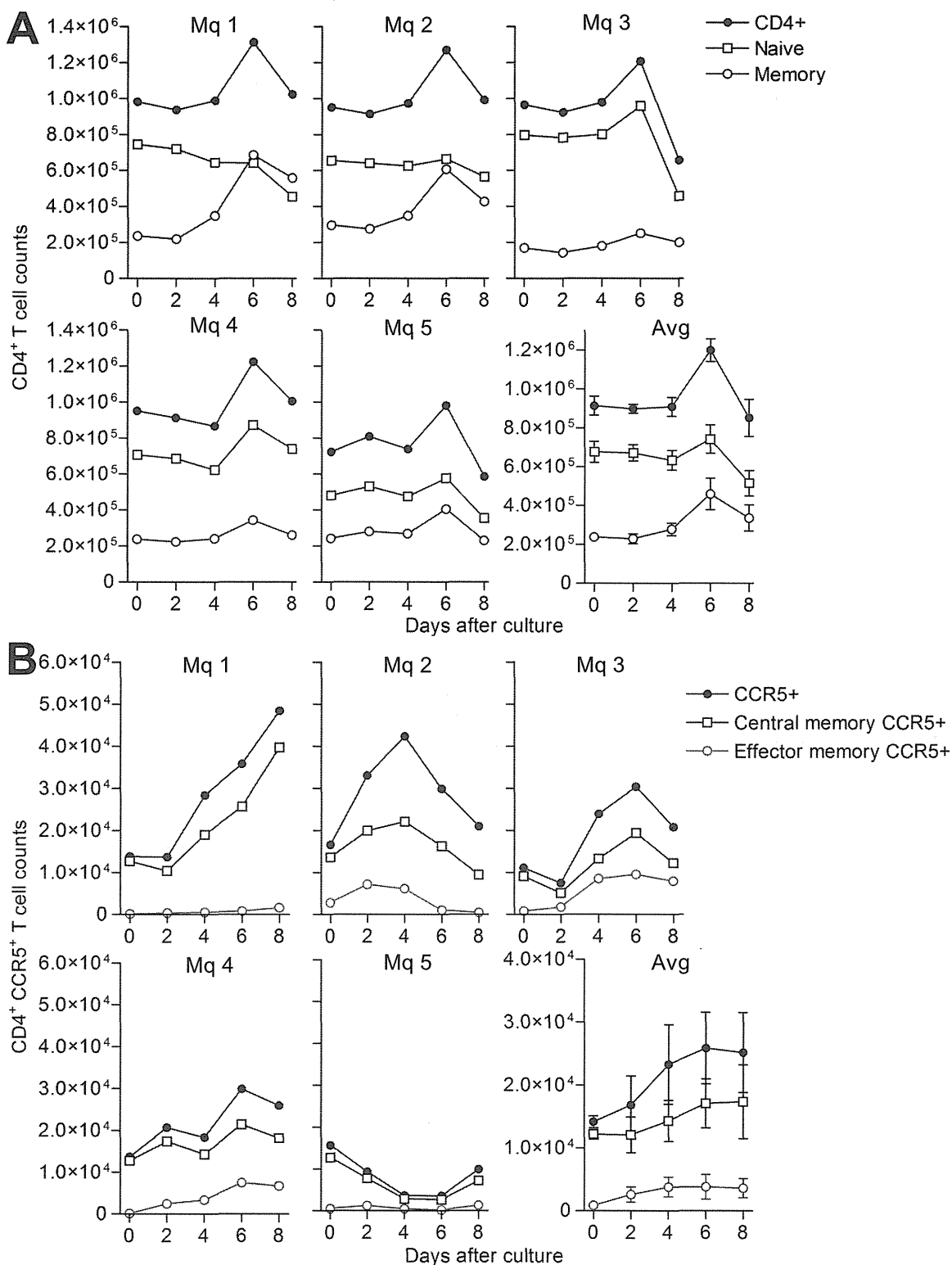


図1. CD4陽性T細胞のIL-7 + IL-15刺激培養による分画変化

SIV複製制御個体PBMC由来のCD4陽性T細胞(1.0×10^6 個)をIL-7+IL-15存在下で培養後、推移を解析した。(A) CD4陽性T細胞中のCD95陰性naïve分画とCD95陽性Memory分画。右下は平均を表す。(B) CD4陽性細胞中のCCR5陽性率の推移。CD28陽性CD95陽性セントラルメモリー分画、CD28陰性CD95陽性エフェクターメモリー分画でゲートした結果を併記した。

ID	Wks p.i.	E116	V145	P172	D205	L216	P223	V243	D244	I247	P293	K315	V340	L372	A373	V375	P390	V495
Mq1	102																	
Mq2	121																	
Mq3	123																	
Mq4	110																	
Mq5	94																	
Mq6	94																	
Mq7	125					S			E			R			T	M		
Mq8	128			S		S		V	E		S					M		M
Mq9	90	G		S		S		A	E							M		
Mq10	121		A		E	S	L		E	L			M			M	S	
Mq11	108			S		S		A						F				

表1. SIV初期制御個体のCD4陽性T細胞内プロウイルスGag領域アミノ酸変異

SIV感染後約2年の持続制御期の末梢血単核球（PBMC）より磁気分離のち、IL-7（10ng/ml）＋ IL-15（10ng/ml）で8日間刺激培養したCD4陽性T細胞（ 1.0×10^6 個）よりDNAを抽出してプロウイルス中のCTLエスケープの存否を解析した。網掛けの非同義置換は、左から順にMHC class I ハプロタイプ90-120-1aが拘束する3エピトープGag₂₀₆₋₂₁₆, Gag₂₄₁₋₂₄₉, Gag₃₇₃₋₃₈₀内に選択されたCTLエスケープをそれぞれ示す。

粘膜・リンパ組織の抗原提示細胞への感染様式の解明

研究分担者 五十嵐 樹彦 国立大学法人京都大学ウイルス研究所
附属感染症モデル研究センター霊長類モデル研究領域 教授

研究要旨：

HIV 潜伏・再活性化サルモデルを構築する目的で、非病原性分子クローン SIV 1A11 及びウイルスに低感受性である事が知られている中国産アカゲザルを選抜した。SIV 1A11 が感染性である事及びマクロファージ指向性である事を追試し、動物感染実験用のウイルスストックを調製した。感染サルの細胞性免疫応答解析に用いる自己 B 細胞株を樹立した。本格的な感染実験に先立って、一頭のサルを用いてパイロット実験を開始した。

A. 研究目的

慢性的なウイルス抗原刺激による T 細胞の活性化及び疲弊は HIV 感染症の病原性として特徴付けられる。T 細胞活性化は、樹状細胞に代表される抗原提示細胞との相互作用により誘導されることから、ウイルス感染により抗原提示細胞の質または量に変化し、慢性的な T 細胞活性化を引き起こしている可能性が考えられる。先行研究では、感染により血中の樹状細胞数の推移が主に報告されているが、樹状細胞の感染状況に関する報告は多くない。更に、個体におけるウイルス複製の主要な場であるリンパ節及び消化管に代表される粘膜における樹状細胞感染に関しては、SIV サルエイズモデルを用いて極めて限られた研究が行われているにすぎず（Choi *et al.* J. Pathol. 201;616-28, 2003.）、理解が進んでいるとは言えない。

本分担研究の目的は、個体レベルにおける主要なウイルス複製の場であるリンパ節及び粘膜における抗原提示細胞の感染様態を明らかにする事である。

B. 研究方法

非病原性 SIV 1A11/中国産アカゲザルモデル系を構築し、ウイルスの潜伏・再活性化時に組織で起きる事象を検索する。

・ SIV 1A11

同プロウイルスプラスミドを NIH AIDS Reagent Program より入手した。DNA を調製

し、293T 細胞に遺伝子導入 48 時間後の培養上清を採取し、アカゲザル末梢血単核細胞に接種し、ウイルスストックを調製した。

・ SIV 1A11 マクロファージ指向性

アカゲザル末梢血単核細胞より単球を調製、M-CSF 存在下で培養し、単球由来マクロファージ (MDM) を調製した。MDM に SIV 1A11, SIV 239 および SIV 316 を、感染価を統一して接種した。培養上清を 48 時間ごとに採取し、上清中の逆転写酵素活性によりウイルス複製を評価した。

・ 自己 B 細胞株の樹立

中国産アカゲザル 3 頭を入手し、末梢血から末梢血単核細胞を調製した。Herpes papio 持続感染細胞である 594S の培養上清を上記の細胞に接種し、活発に分裂増殖を始めるまで維持培養した。

・ サル感染実験

3.8×10^5 TCID₅₀ の SIV1A11 ウイルスストックを麻酔下のアカゲザル直腸にシリコンチューブを用いて非観血的に導入し、30 分間静置した。ウイルス接種前より採血を行い、血漿の保存及び末梢血リンパ球サブセットの測定を行った。同時に、麻酔下で直腸組織を生検し、RNA 抽出、組織学的検索のために固定、保存した。

C. 研究結果

エイズ動物モデルとして SIV/アカゲザル系が

確立され、世界中で用いられているが、これは病原性 SIV 株を感受性の高いインド産アカゲザルに接種するものである。この系は短期間に HIV 感染者と同様の病態を誘導する事から価値が高い一方、サル体内でウイルスは高力価で複製し続けており、本研究課題であるウイルスの潜伏・再活性化を研究するために適当とは言えない。

そこで、本分担課題では最初にウイルスの潜伏が望める系の確立を目指した。SIV は 1980 年代以降複数の分離株が報告されている。その中で、SIV 1A11 株に注目した。本ウイルスは 1980 年代に分離され、感染性分子クローンも作製されたが (Luciw et al. AIDS Res. Hum. Retroviruses 8:395-402, 1992)、サルに非病原性であった。また、マクロファージ指向性である事、ゲノム中の *vpr* 遺伝子が途中から欠損している事が知られている。

アカゲザルには大きくインド産及び中国産があり、SIV の感受性はインド産アカゲザルがより高い事が知られている (Reimann et al. J. Virol. 88:8878-85, 2005)。そこで、感染急性期にウイルスは複製するものの、その後検出限界以下になる様な系として SIV 1A11/中国産アカゲザル系を確立する事とした。

SIV 1A11 当該ウイルスはサル末梢血単核細胞において高効率に複製する事が我々の追試で再現された。同細胞を用いて調製したウイルスストックの力価は 3.8×10^5 TCID₅₀/ml であり、SIV 239 の力価と同様であった。

SIV 1A11 の MDM における複製 アカゲザル末梢血単球から調製した MDM にリンパ球指向性 SIV 239、マクロファージ指向性 SIV 316 を対照ウイルスとして SIV 1A11 を接種した所、SIV 316 と比較して遅れるものの、ウイルス粒子産生を伴う複製が再現された。

自己 B 細胞株の樹立 感染サルの細胞性免疫応答を検索する際に用いる抗原提示細胞として、Herpes papio により不死化した自己 B 細胞株を樹立した。中国産アカゲザルもインド産アカゲザルと同様に樹立に成功した。

SIV 1A11 パイロット感染実験 中国産アカゲザルに経直腸経路で SIV 1A11 を感染させた報告がない事から、本分担課題でその実現可能性を検討する事とした。現在、接種 2 週間後であるが、接種一週後の血漿中にウイルス RNA は検出されてい

ない。現在までの所、末梢血 CD4 陽性 T 細胞サブセットの変動は観察されていない。

D. 考察

SIV1A11 はサル末梢血単核球でウイルスストックを調製した際、病原性の SIV239 と同等の力価が得られた事から本ウイルスの試験管内での複製は良好と言える。既に報告されている本ウイルスの個体感染における低複製性に関して解明はなされていないが、考えられる原因として *vpr* 遺伝子の欠損およびマクロファージ指向性を規定する Env タンパクの構造が想定される。*vpr* 及び *vpx* を欠損した SIV は野性型と比べサル個体での病原性が大幅に減弱している事 (Gibbs et al. J. Virol. 69:2378-83, 1995)、扁桃組織の histoculture 系において *vpr* 欠損 HIV-1 は野性型と比べ、複製効率が劣る事 (Eckstein et al. J. Exp. Med. 194:1407-19, 2001)、Vpr は DNA ワクチン及び SIV Nef ワクチンによる免疫応答を減弱させる事 (Ayyavoo et al. Int. Immunol. 14:13-22, 2002, Bagarazzi et al. J. Med. Primatol. 31:179-85, 2002) 等の報告があり、細胞培養系では明らかに出来ない Vpr の病原性に関わる機能が考えられる。マクロファージ指向性の SIV 239 の変異体である SIV 316 は CD4 が発現していない細胞に共受容体との相互作用で感染する。既に Env の構造が共受容体との相互作用が可能になっているためと説明されているが、そのためこのウイルスは中和抗体に高感受性である。SIV 1A11 に関して SIV239/316 の様な解析はなされていないが、SIV 316 と同様の Env 構造を持つ可能性も考えられる。

パイロット感染実験は結論を出すには尚早であるが、ウイルスが感染を確立しない可能性も存在する。その場合は同じウイルス量を頻回接種する様な方法を試行する。

E. 結論

非病原性 SIV 1A11/中国産アカゲザルモデル系構築のための準備が整った。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Iwami, S., Holder, B.P., Beauchemin, C.A., Morita, S., Tada, T., Sato, K., Igarashi, T., and