

# 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)

研究協力者 齊藤 暁 (京都大学霊長類研究所)

芳田 剛 (京都大学霊長類研究所)

## 研究要旨

我々は昨年度、ワクチン開発・評価研究において重要となるR5指向性Envを持つHIV-1mtの作出、評価に取り組んだ。細胞内相同組換えにてR5指向性SHIV由来Envを導入したHIV-1mt MN38株はカニクイザルPBMCのみならず、個体レベルにおいても優れた増殖能を有することを明らかにした。そこで今年度は、カニクイザル感染R5指向性HIV-1mtの更なる馴化を試みた。まず、MN38株感染後8週で血中ウイルスが検出限界以下となったサル個体において、CD8陽性リンパ球集団を一過性に除去したところウイルスの再活性化が見られたことから、HIV-1mtは生体内で排除されず持続感染している事が確認された。次に、この再活性化ウイルスを用いた個体間継代を行った。継代を重ねるにつれて、ウイルスのサル個体への馴化、最適化が進み、2代継代個体においてこれまでのHIV-1mt感染実験の中で最も高い血中ウイルス量 ( $1.1 \times 10^6$  copies/ml) を示した。馴化ウイルスゲノムの予備的解析では、継代後に出現した複数箇所の変異がサル個体への馴化に寄与した可能性が考えられる。以上より、R5指向性HIV-1mtによるカニクイザル持続感染モデルを世界で初めて確立できたものと考えられた。

## 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している。

昨年度、我々はワクチン開発・評価研究において重要となるR5指向性Envを持つHIV-1mtの作出、評価に取り組んだ。まず、サル個体で高い増殖能と病原性を獲得したR5指向性SHIV-MK38株由来env領域を細胞内相同組換えにて置換したHIV-1mt MN38株を得た。HIV-1mt MN38はカニクイザル個体由来PBMCにおいて優れた増殖能を示すことが確認されたため、*TRIMCyp* アリル保有カニクイザルへの感染実験を行った。その結果、急性期における血中ウイルスRNA量は約  $4 \times 10^4$  copies/mlとこれまでのHIV-1mtクローン中で最も

優れた増殖性を有することが示された。そこで今年度は、R5指向性HIV-1mtの持続感染成立を目指して、個体間馴化を試みた。

## B. 研究方法

・ R5指向性HIV-1mtの構築：MN5Rh-3は、昨年度までに構築した馴化型X4指向性HIV-1mtクローン (MN4Rh-3) を基に、SF162由来R5指向性env遺伝子に置換し、さらにサル細胞株での長期継代により得られた馴化変異を導入することにより得られたクローンである (徳島大学・足立博士より分与)。他方、サル個体で病原性を獲得したR5指向性SHIV-MK38株 (SHIV-89.6のEnv V3領域へのアミノ酸置換変異によりR5指向性を導入したクローン由来再分離株：京都大学ウイルス研究所・三浦博士より分与) よりenv領域をPCR増幅し、MN4Rh-3バックボーンに細胞内相同組換え法にて挿入することによりHIV-1mt MN38株を得た。

- ・ カニクイザルにおける *in vitro*, *in vivo* 感染実験：TRIMCyp アリル保有カニクイザル由来 PBMC を用いて MN5Rh-3 及び MN38 の増殖能を評価した。この結果を基に、MN5Rh-3 及び MN38 それぞれ 10ng p24CA 相当のウイルスを同アリル保有カニクイザルに経静脈接種し、経時的に血中ウイルス量の推移を検討した。個体間ウイルス継代では、ドナー側個体よりレシピエント側個体に輸血した。
- ・ CD8 陽性リンパ球の生体内除去：サル型化抗 CD8 モノクローナル抗体である M-T807 を 50mg/kg で皮下投与した。

#### (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、各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

TRIMCyp homozygote であるカニクイザル個体に R5 指向性 HIV-1mt MN38 の接種実験を行った。その結果、MN38 接種による血中ウイルス量のピーク値は MN5Rh-3 接種の場合と比べ 6 倍程度高い値 ( $4 \times 10^4$  copies/ml) を示したが、感染後 8 週で血中ウイルスは検出限界以下となった。そこで、

MN38 感染個体へ CD8 特異抗体を投与し CD8 陽性リンパ球集団を一過性に除去したところ、ウイルスの再活性化が見られた。このことから、HIV-1mt は生体内で排除されず持続感染している事が確認された。次に、この再活性化ウイルスを用いた個体間継代を行った。初代継代 (P1) では、血中ウイルス量が  $2 \times 10^5$  copies/ml に至るとともに、感染後約 6 ヶ月まで血中ウイルスが観察され、カニクイザル個体への馴化が示唆された。そこで、前述同様に、MN38/P1 個体への CD8 特異抗体を投与し再活性化したウイルスの再継代を行った。2 代継代 (P2) における血中ウイルス量が  $1.1 \times 10^6$  copies/ml に及ぶとともに P1 個体よりも高いウイルスロードを示した。図 1 にカニクイザル個体間継代によるウイルス動態を表した。カニクイザル個体間継代によりウイルス増殖効率の向上が認められたことから、MN38/P0 から P1, P2 と継代を重ねるにつれて、ウイルスのサル個体への馴化、最適化が進んだものと予想される。この点を明らかにする目的で、現在次世代シーケンサーによるウイルスゲノム変異解析を進めている。予備的な結果では、Vif, Env, Nef など数カ所の領域において、P1 以降において変異が生じ P2 においても同様の変異が維持もしくは拡大している部位が認められた。従って、これらの変異がサル個体への馴化に寄与した可能性が考えられた。

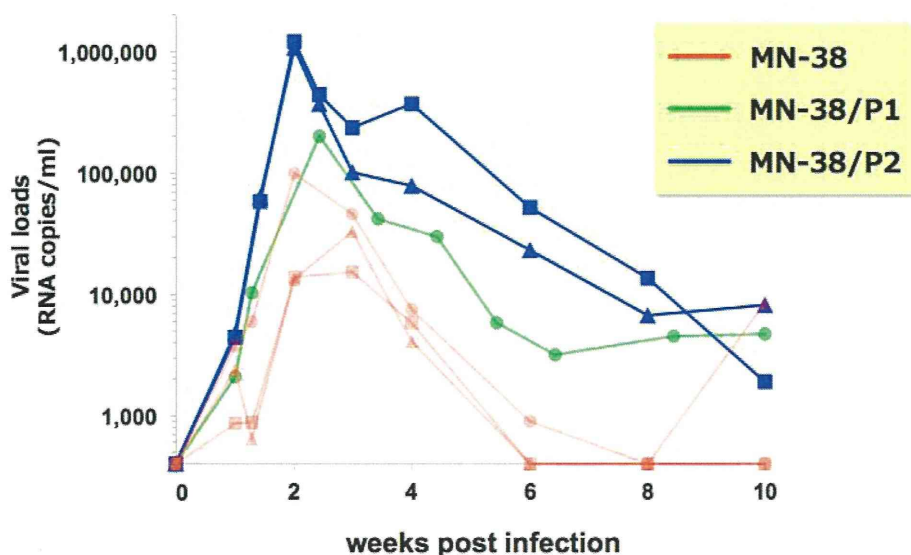


図 1 カニクイザル個体間継代による HIV-1mt 増殖動態の変動

## D. 考察

本研究により、R5指向性HIV-1mtによるカニクイザル持続感染モデルを世界で初めて確立することに成功した。特に、MN38/P2個体においては、血中ウイルス量がHIV-1感染者における急性期のそれとほぼ遜色ない $10^6$  copies/mlを超えたことは特筆すべき点である。このことは、MN38/P2が基本的にカニクイザルでの感染増殖において馴化が進んだことを表しており、当初の目標が達成されたものと考えている。これは、これまでのX4指向性HIV-1mtクローン改良の成果に加え、カニクイザル感染実験での知見やノウハウの蓄積（特にTRIMCypに関する情報）、そして病原性を獲得したR5指向性SHIV由来Envを組み込んだHIV-1mt MN38株の個体間継代による馴化における優位性、など分子から個体までの一貫した研究が全て相まって到達できたことであろう。

他方、MN38およびP1接種個体では、まだviremiaを伴う持続感染には至らなかった（P2接種個体に関しては、今後の経過観察結果を待たねばならない）。どちらにおいてもCD8陽性リンパ球集団を一過性に除去することによりウイルス再活性化が生じたことから、この段階のウイルスはCTLもしくはNK細胞による免疫応答からの回避能が充分には機能していないものと考えられた。

MN38/P0からP1, P2と継代を重ねるにつれて生じた、ウイルスのサル個体への馴化の機序を明らかにする目的で、現在次世代シーケンサーによるウイルスゲノム変異解析を進めているところである。予備的な結果ではあるが、継代後に出現した複数箇所の変異がサル個体への馴化に寄与した可能性が考えられる。今後これらの変異についてさらに解析を進め、その機能的意義について検証するとともに、より効率良く生体内で増殖するR5指向性HIV-1mtの樹立を目指したい。

## E. 結論

本研究班におけるサル個体側およびウイルス側の最適化に関する研究成果に基づき、R5指向性HIV-1mtによるカニクイザル持続感染モデルを世界で初めて確立することに成功した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Moi ML, Takasaki T, Omatsu T, Nakamura S, Katakai Y, Ami Y, Yuriko S, Saijo M, [Akari H](#), Kurane I: Demonstration of marmosets (*Callithrix jacchus*) as a non-human primate model for secondary dengue virus infection: high levels of viremia and serotype cross-reactive antibody responses consistent with secondary infection of humans. *Journal of General Virology*, 95, 591-600, 2014.
- 2) 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.
- 3) 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* 15, 319-328, 2013.
- 4) Yoshida T, Omatsu T, Saito A, Katakai Y, Iwasaki Y, Kurosawa T, Hamano M, Higashino A, Nakamura S, Takasaki T, Yasutomi Y, Kurane I, [Akari H](#): Dynamics of cellular immune responses in the acute phase of dengue virus infection. *Archives of Virology* 158, 1209-1220, 2013.
- 5) 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](#): *TRIM5* genotypes in cynomolgus monkeys primarily influence inter-individual diversity in susceptibility to monkey-tropic human immunodeficiency virus type 1. *Journal of General Virology* 94, 1318-1324, 2013.
- 6) Moi ML, Omatsu T, Hirayama T, Nakamura S, Katakai Y, Yoshida T, Saito A, Tajima S, Ito M, Takasaki T, [Akari H](#), Kurane I: Presence of viral genome in urine and development of hematuria and pathological changes in kidneys in common marmoset (*Callithrix jacchus*) after inoculation with dengue virus. *Pathogens* 2, 357-363, 2013.
- 7) Saito A, [Akari H](#): Macaque-tropic human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1mt): Break out of the host factors. *Frontiers in Microbiology* 4, 187, 2013.
- 8) Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Doi N, Fujiwara S, Saito A, [Akari H](#), Miyakawa K, Ryo A, Ode H, Iwatani Y, Miura T, Igarashi T, Sato H, Adachi A: Generation of

rhesus macaque-tropic HIV-1 clones that are resistant to major anti-HIV-1 restriction factors. *Journal of Virology* 87, 11447-11461, 2013.

- 9) Yoshida T, Suzuki S, Iwasaki Y, Kaneko A, Saito A, Enomoto Y, Higashino A, Watanabe A, Suzuki J, Inoue K, Kuroda T, Takada M, Ito R, Ito M, Akari H: Efficient *in vivo* depletion of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in common marmosets by novel CD8 monoclonal antibody administration. *Immunology Letters* 154, 12-17, 2013.
- 10) Miura M, Yasunaga J, Tanabe J, Sugata K, Zhao T, Ma G, Miyazato P, Ohshima K, Kaneko A, Watanabe A, Saito A, Akari H, Matsuoka M: Characterization of simian T-cell leukemia virus type 1 in naturally infected Japanese macaques as a model of HTLV-1 infection. *Retrovirology* 10, 118, 2013.

## 2. 学会発表等

- 1) 齊藤 暁、中山英美、塩田達雄、吉田友教、東濃篤徳、鈴木紗織、川本芳、明里宏文：レトロウイルス感受性に影響するマカク属サル *TRIM5* 遺伝子の多様性。第60回日本実験動物学会総会（つくば）平成25年5月15-17日
- 2) Saito A, Nakayama EE, Shioda T, Yoshida T, Higashino A, Suzuki S, Kawamoto Y, Akari H: Diversity of antiretroviral host factor *TRIM5* gene in macaque monkeys. Cold Spring Harbor meeting on Retroviruses, May20-25, 2013, New York.
- 3) 齊藤 暁、大附寛幸、東濃篤徳、鈴木紗織、松田健太、高橋尚史、岩谷靖雅、杉浦 互、保富康宏、俣野哲朗、三浦智行、明里宏文：ウイルスの標的細胞指向性はサル指向性HIV-1の増殖に影響するか？。第156回日本獣医学会学術集会（岐阜）平成25年9月20-22日
- 4) 齊藤 暁、大附寛幸、東濃篤徳、鈴木紗織、松田健太、高橋尚史、松岡佐織、岩谷靖雅、杉浦 互、野間口雅子、足立昭夫、保富康宏、俣野哲朗、三浦智行、明里宏文：CCR5指向性を示す新規サル指向性HIV-1はサル個体に持続感染する。第61回日本ウイルス学会学術集会（神戸）平成25年11月10-12日
- 5) 齊藤 暁、大附寛幸、東濃篤徳、鈴木紗織、松田健太、高橋尚史、松岡佐織、岩谷靖雅、杉浦 互、野間口雅子、足立昭夫、保富康宏、俣野哲朗、三浦智行、明里宏文：CCR5指向性を示す新規サル指向性HIV-1はサル個体に持続感染する。第27回日本エイズ学会学術集会（熊本）平成25年11月20日-22日

## G. 知的所有権の取得状況

なし

## 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)

研究協力者 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)

### 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の増殖を抑制する主要な因子 (Restriction factor; RF) は、サルAPOBEC3G/F、BST-2/tetherinおよびサルTRIM5 $\alpha$ である。これまでに、我々はこれらのRF全てに抵抗性を示すHIV-1mtの構築に成功した。一方、HIV/SIVは種間伝播を経る適応・進化の過程において、RF抵抗性獲得以外に、そのゲノムや構造遺伝子にウイルス複製・増殖に有利な変化・変異が生ずることも知られている。そこで本年度は、ウイルス変異・適応・進化とHIV-1mt改良・改変の基盤情報を得るため、サル細胞での増殖能が比較的低いプロトタイプHIV-1mtをサル細胞株で増殖させた時 (ウイルス複製抑制的) に出現する増殖適応変異 (増殖促進変異) について詳細に解析した。

プロトタイプHIV-1mt感染カニクイザル/アカゲザル細胞株を長期間培養すると、増殖能の向上したウイルスが出現し、それらの増殖適応変異はウイルスゲノムの*pol*-IN (integrase) のごく狭い領域と*env*-gp120領域に集中していた。種々の分子ウイルス学的解析の結果、概略以下のことが明らかになった：(1) *pol*-IN変異は塩基配列依存性にウイルスmRNAの発現パターンを変化させ、これによりウイルス複製を増強する；(2) この種の*pol*-IN変異はHIV-1臨床分離株でも見られることから、ウイルス変異・適応に重要な役割を果たしていると考えられる；(3) *env*-gp120変異は、ヒトおよびサル細胞でのウイルス増殖を促進するもの、サル細胞でのみウイルス増殖を促進するもの、および、サル細胞ではウイルス増殖を促進するがヒト細胞では逆に減弱させるもの、の三種類に分類された；(4) 様々な*env*-gp120変異はウイルスの適応能力の高さを示している。

これまでの我々の研究結果はHIV/SIVの変異性、適応性の高さを如実に示している。得られた基礎情報を基に、今後もHIV-1の病原性発現機構の実験的解明を目指した取組みを続行していく。

### 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からマカクザルに病原性を示すHIV-1mtクローンを構築してHIV-1の病原性発現機序の解明に繋げることが本研究の最終目標であ

る。

プロトタイプHIV-1mt (NL-DT5RおよびNL-DT562: Proc Natl Acad Sci USA 103:16959-16964, 2006; J Virol 81:11549-11552, 2007; Rev Med Virol 18:261-275, 2008; J Med Invest 55:236-240, 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/LSDQgtu (X4ウイルス) およびMN5/LSDQgtu (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; Microbes Infect 15:56-65, 2013 ; Microbes Infect 15:319-328, 2013; J Gen Virol 94:1318-1324, 2013; J Virol 87:11447-11461, 2013)。MN4/LSDQgtu はサル細胞に存在する既知の主要RF 全てに抵抗性を示し、アカゲザル末梢血単核細胞において SIVmac239 に比肩できるレベルで増殖する HIV-1mt クローンである。

本年度は、プロトタイプ HIV-1mt のサル細胞における増殖適応変異について詳細に解析した。

## B. 研究方法

1. ウイルスゲノムのクローニング、その改変およびシーケンスの確認は既報に従った (Proc Natl Acad Sci USA 103:16959-16964, 2006)。
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) により行なった。感染実験にはカニクイザル由来 HSC-F 細胞、アカゲザル由来 HSR5.4S1 細胞、ヒト M8166 細胞およびヒト MT4/CCR5 細胞を用いた。シングルサイクルウイルス感染価は VSV-G シュードウイルス/ルシフェラーゼ法により定量した。ウイルス DNA 合成量も VSV-G シュードウイルスを用い、リアルタイム定量 PCR 法で測定した。ウイルス量は培養上清中の逆転写酵素 (RT) 活性、Pol-RT ELISA あるいは Gag-p24 ELISA により測定した。
3. ウイルス馴化実験の標的細胞には HSC-F 細胞および HSR5.4S1 細胞を用いた。
4. ウイルス蛋白質およびウイルス mRNA は、それぞれ、適当な抗体とプローブを用い、ウェスタンブロット法とノザンブロット法で定法通りに解析した。

### (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) の承認を得て行なった。「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. プロトタイプ HIV-1mt (NL-DT5R および NL-DT562) を HSC-F 細胞および HSR5.4S1 細胞に感染させ、二か月程度培養し、感染細胞から二つに分けてウイルスゲノムを分子クローンした。5' 端側ゲノムと 3' 端側ゲノムを持つ分子クローンから、完全長のウイルスゲノムを持つ分子クローンを作製した。それぞれのウイルスクローンの増殖能を親クローンと比較し、優っているものを選択した。これらのクローンが持つ変異の中から、増殖促進変異を同定した。興味深いことに、増殖適応変異は *pol*-IN 変異 4 種類と *env*-gp120 変異 8 種類のみであり、その他のゲノム領域については増殖促進変異は見出されなかった (同様の馴化実験を繰返して再現性を確認した)。
2. ウイルスの細胞馴化による *pol*-IN 適応変異は IN の C 末端領域に集中しており、全ての変異がウイルス複製初期過程に影響せず、ウイルス粒子産生量を増大させるものであった。
3. これらの *pol*-IN 変異の詳細かつ多様な分子ウイルス学的解析から、HIV-1 ゲノム内には、ウイルス mRNA の発現パターンを調節することで塩基配列依存的に後期ウイルス蛋白質の発現量とウイルス複製能を制御する領域 (SA1prox) が存在することが明らかになった。注目すべきことは、この領域内の変異 (ウイルス学的効果のある変異) は臨床分離株に様々な比率で認められ、感染個体集団中のウイルス準種の存在比に影響を与えていると考えられることである。HIV-2 ゲノムにも同様な領域があることが判明している (未発表データ)。
4. ウイルスの細胞馴化による *env* の増殖適応変異は gp120 内の C1、V1、V2 および V3 領域でのみ同定され、receptor あるいは co-receptor への親和性が増大する変異であった。
5. これらの *env*-gp120 変異は次の 3 群に分類された：(i) ヒトおよびサル細胞でウイルス増殖を促進する変異、(ii) サル細胞ではウイルス増殖を促進するが、ヒト細胞ではウイルス増殖効率に影響しない変異、(iii) サル細胞特異的にウイルス増殖効率を向上させ、ヒト細胞では逆にウイルス増殖効率を著しく低下させる変異。同定された Env-gp120 内の増殖適応変異のほとんどは (i) のカテゴリーに属し、CD4 や

CCR5との親和性に影響を及ぼし得ることが示された。(ii)に属する変異は1個のみで、サルCD4への親和性が高まる変異である。(iii)に属する変異も1個のみであるが、ヒトおよびサルCCR5のアミノ酸配列の差がこの変異の生物学的効果を説明する可能性が高く、現在、詳細な解析を行っている。これらの結果から、ウイルスの細胞馴化によるEnv-gp120変異は基本的なウイルス複製効率の増強をもたらすが、種特異的な効果をもたらす場合もあり、ウイルスの反応性・順応性の高さを示している。

#### D. 考察

HIV/SIVが複製抑制的環境下で適応変異を獲得し、ウイルスの存続・伝播を可能・円滑にすることは、SIVcpzからHIV-1、また、SIVsmmからSIVmacへの適応進化の例もあり、当然予想されていた。本研究は、これを実証するとともに、一定の条件では、HIV/SIVは種間バリアーとなっている主要RFに対する抵抗性ではなくゲノムの塩基配列やEnvの機能性を変化させることで環境に適応しより高度の増殖能を獲得していることを明らかにした。ウイルスの高い適応能力を考慮すれば、自然宿主から新しい宿主への適応・進化は容易に想像され、この特性を利用したモデル研究の実現可能性・学術的意義・医学社会学的重要性が理解される。実験エイズモデルとしてのHIV-1mt/アカゲザルシステムの樹立は人工的な系の構築ではなく、HIV/SIVに本来的に備わっているウイルス学的特性に基づくものである。

#### E. 結論

本研究では、塩基配列依存性の新しいHIV-1の適応変異とそれを可能にするゲノム領域(SA1prox)の存在と分子機序を明らかにした(J Virol 88, in press)。また、Env-gp120内の様々な変異によって環境に適応するHIV-1の順応力の高さも示した(論文投稿準備中)。これまでに、我々は主要なRF全てに抵抗性を示すHIV-1mtの構築に成功している(J Virol 87:11447-11461, 2013)。我々の一連の研究成果から、HIV-1/アカゲザルモデルの有用性と実現性が明確に示されたと考える。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Nomaguchi M, Miyake A, Doi N, Fujiwara S,

Miyazaki Y, Tsunetsugu-Yokota Y, Yokoyama M, Sato H, Masuda T, Adachi A.: Natural single-nucleotide polymorphisms in the 3' region of HIV-1 *pol* gene modulate viral replication ability. Journal of Virology 88, in press.

2) Miyake A, Miyazaki Y, Fujita M, Nomaguchi M, Adachi A.: Role of poly-proline motif in HIV-2 Vpx expression. Frontiers in Microbiology 5, 24, 2014.

3) Miyake A, Fujita M, Fujino H, Koga R, Kawamura S, Otsuka M, Ode H, Iwatani Y, Sakai Y, Doi N, Nomaguchi M, Adachi A., Miyazaki Y.: Poly-proline motif in HIV-2 Vpx is critical for its efficient translation. Journal of General Virology 95, 179-189, 2014.

4) Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Doi N, Fujiwara S, Saito A, Akari H, Miyakawa K, Ryo A, Ode H, Iwatani Y, Miura T, Igarashi T, Sato H, Adachi A.: Generation of rhesus macaque-tropic HIV-1 clones that are resistant to major anti-HIV-1 restriction factors. Journal of Virology 87, 11447-11461, 2013.

5) Doi N, Okubo A, Yamane M, Sakai Y, Adachi A., Nomaguchi M.: Growth potentials of CCR5-tropic/CXCR4-tropic HIV-1mt clones in macaque cells. Frontiers in Microbiology 4, 218, 2013.

6) 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.: TRIM5 genotypes in cynomolgus monkeys primarily influence inter-individual diversity in susceptibility to monkey-tropic human immunodeficiency virus type 1. Journal of General Virology 94, 1318-1324, 2013.

7) 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 15, 319-328, 2013.

##### 2. 学会発表等

1) 野間口雅子、三宅在子、土肥直哉、藤原佐知、宮崎恭行、横田恭子、横山勝、佐藤裕徳、増田貴夫、足立昭夫：HIV-1 *pol* (4895-4933) の1塩基置換によるウイルス複製制御機構の解析。第61回日本ウイルス学会。2013年11月10日(日)、神戸。

2) 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-1/HIV-2 CAアセンブリーの安定性に関する解析。第61回日本ウイルス学会。2013年11月10



- 日（日）、神戸。
- 3) 足立昭夫、土肥直哉、藤原佐知、野間口雅子：アカゲザルPBMCで効率良く増殖するHIV-1mtの構築。第61回日本ウイルス学会。2013年11月11日（月）、神戸。
  - 4) 齊藤 暁、大附寛幸、東濃篤徳、鈴木紗織、松田健太、高橋尚史、松岡佐織、岩谷靖雅、杉浦 互、野間口雅子、足立昭夫、保富康宏、侯野哲朗、三浦智行、明里宏文：CCR5指向性を示す新規サル指向性HIV-1はサル個体に持続感染する。第61回日本ウイルス学会。2013年11月11日（月）、神戸。
  - 5) 三宅在子、宮崎恭行、野間口雅子、足立昭夫：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61回日本ウイルス学会。2013年11月11日（月）、神戸。
  - 6) 山本充奈美、野間口雅子、古賀涼子、岩谷靖雅、高宗 暁、三隅将吾、大塚雅巳、足立昭夫、藤田美歌子：マクロファージにおけるSAMHD1非依存的なHIV-2 Vpxの機能。第61回日本ウイルス学会。2013年11月11日（月）、神戸。
  - 7) 土肥直哉、藤原佐知、酒井遥介、大久保綾香、山根瑞萌、足立昭夫、野間口雅子：R5-tropic HIV-1mt Env適応変異の宿主細胞依存性増殖促進機構の解析。第61回日本ウイルス学会。2013年11月10日（日）、神戸。
  - 8) 齊藤 暁、大附寛幸、東濃篤徳、鈴木紗織、松田健太、高橋尚史、松岡佐織、岩谷靖雅、杉浦 互、野間口雅子、足立昭夫、保富康宏、侯野哲朗、三浦智行、明里宏文：CCR5指向性を示す新規サル指向性HIV-1はサル個体に持続感染する。第27回日本エイズ学会。2013年11月20日（水）、熊本。
  - 9) チッフチハリルイブラヒム、古賀涼子、岩谷靖雅、野間口雅子、足立昭夫、大塚雅巳、藤田美歌子：SAMHD1-independent function of HIV-2 Vpx protein。第27回日本エイズ学会。2013年11月20日（水）、熊本。

## 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

近年HIV-1 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。これらのアミノ酸残基はSIVmac239 Vifにおいては保存されておらず、エイズ動物モデルが克服すべき新たな宿主因子を示唆している。

## A. 研究目的

近年HIV-1 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

HIV-1 Vifの機能発現に必須の新規宿主因子であるCBFβとの結合部位を明らかにするため、Vifの保存されたアミノ酸を置換した変異体を作成した。CBFβとの結合を共沈実験により、APOBEC3の分解を共発現・イムノプロット法にて解析した。また、Vifのアミノ酸置換を持つHIV-1ウイルス変異体を作成し、感染実験を行った。

## (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

E88A/W89A変異体はVifと結合せず、APOBEC3の分解も促進しなかった。また、この変異を持つウイルスはAPOBEC3存在下では感染性が著しく低下していた。既報にてCBFβとの結合が示唆されていたW21やW38を置換した変異体

においてもAPOBEC3の分解を促進せず、APOBEC3存在下での感染性が著しく低下していた。

## D. 考察

HIV-1 VifのCBFβとの結合に関与するアミノ酸としてE88/W89を同定した。さらにこれらのアミノ酸および既報のW21およびW38がVifの機能発現に必須であることを証明し、報告した(Virology 449, 82-87, 2014)。これらのアミノ酸残基はSIVmac239 Vifにおいては保存されておらず、エイズ動物モデルが克服すべき新たな宿主因子を示唆していると考えられる。

## E. 結論

エイズ動物モデルが克服すべき新たな宿主因子作用部位を同定した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Matsui Y, Shindo K, Nagata K, Io K, Tada K, Iwai F, Kobayashi M, Kadowaki N, Harris R, Takaori-Kondo A: Defining HIV-1 Vif residues that interact with CBFβ by site-directed mutagenesis. Virology 449, 82-87, 2014.
- 2) Sato T, Kitawaki T, Fujita H, Iwata M, Iyoda T, Inaba K, Ohteki T, Hasegawa S, Kawada K, Sakai Y, Ikeuchi H, Nakase H, Niwa A, Takaori-Kondo A, Kadowaki N: Human CD1c<sup>+</sup> myeloid dendritic cells acquire a high level of retinoic acid-producing capacity in response to vitamin D. Journal of Immunology 191, 3152-60, 2013.
- 3) Yoshioka S, Miura Y, Yao H, Satake S, Hayashi

- Y, Tamura A, Hishita T, Ichinohe T, Hirai H, Takaori-Kondo A, Maekawa T: C/EBP $\beta$  expressed by bone marrow mesenchymal stromal cells regulates early B-cell lymphopoiesis. *Stem Cells* 32, 730-40, 2014.
- 4) Arai Y, Nishinaka Y, Arai T, Morita M, Mizugishi K, Adachi S, Takaori-Kondo A, Watanabe T, Yamashita K: Uric acid induces NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 443, 556-561, 2014.
- 5) Mori F, Ishida T, Ito A, Sato F, Masaki A, Narita T, Suzuki S, Yamada T, Takino H, Ri M, Kusumoto S, Komatsu H, Hishizawa M, Imada K, Takaori-Kondo A, Niimi A, Ueda R, Inagaki H, Iida S: Antitumor effects of bevacizumab in a microenvironment-dependent human adult T-cell leukemia/lymphoma mouse model. *European Journal of Haematology* 92, 219-228, 2014.

## 2. 学会発表

- 1) Matsui Y, Shindo K, Nagata K, Io K, Shinohara M, Harris RS, Takaori-Kondo A: Identification of a novel region of HIV-1 Vif to interact with CBF $\beta$ . Cold Spring Harbor Meeting on Retroviruses 2013.
- 2) 吉永則良、松井佑亮、新堂啓祐、武田俊一、高折晃史：HIV-1 複製に関する DNA 修復系宿主因子の探索。第27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)

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。TRIMCypはTRIM5とサイクロフィリンAの融合蛋白質でやはり抗HIV-1活性を持つ。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 $\alpha$ やTRIMCypの性質を調べ、これらの抗HIV-1因子を回避するHIV-1を作製する必要がある。しかしHIV-1のカプシドとvifを改変し、TRIMCyp遺伝子を両染色体に持つカニクイザル個体に感染させることで一定の増殖が得られたものの、この改変HIV-1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ランダムな変異を導入したライブラリーを作成し、TRIMCyp耐性能を持ち増殖効率の良いウイルスの分離を試みた。独立した2回の実験から得られたカニクイザルTRIMCyp耐性株に認められた変異は、H87R、A88G、P90D、P93Aの組み合わせとH87R、G89E、A92T、P93Tの組み合わせであった。

## 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遺伝子にサイクロフィリンA (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 $\alpha$ やTRIMCypの性質を調べ、TRIM5 $\alpha$ やTRIMCyp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。我々は一昨年度HIV-1のカプシドとvifを改変し、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、この改変HIV-1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。そこで昨年度はサイクロフィリン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。そこで本年度はカプシドに導入する変異の最適化を別の方法で試みることにした。

## B. 研究方法

カニクイザルのTRIMCypによる感染抑制効果を回避したHIV-1カプシド蛋白質を得るために、

NL43株のカプシド蛋白質のCypAが結合する4番目と5番目の $\alpha$ ヘリックス間のループ (L4/5) にランダム変異を導入した $10^4$ クローンのプロウイルスライブラリーを作成した。まず、PRYSPLYドメインを欠くTRIM5を発現するセンダイウイルスを感染させたMT4細胞に感染させ、増殖可能なウイルスを増幅した。次にカニクイザルTRIMCypあるいはカニクイザルまたはアカゲザルのTRIM5 $\alpha$ をセンダイウイルスベクターで高発現させたMT4細胞に感染させ、耐性ウイルスを誘導し、更にセンダイウイルス非感染MT4細胞を培養に加えることでわずかに増殖したウイルスをレスキューするサイクルを数回繰り返し、カニクイザルTRIMCypあるいはカニクイザルTRIM5 $\alpha$ を発現するセンダイウイルス感染MT4細胞でも増殖可能なウイルスを得た。そして感染細胞のプロウイルスDNAから、カプシド蛋白質をコードするウイルス遺伝子部分をPCRで増幅し、その塩基配列を決定した。

観察された変異をNL43株に導入し、VifがSIVmacのもの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) および改変したHIV-1を感染させ、感染1、3、および6日後の培養上清中のp24抗原量をELISA法にて測定した。

#### (倫理面への配慮)

遺伝子組換え実験は「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」を遵守し、大臣確認および機関承認を得て行った。

### C. 研究結果

カニクイザルTRIMCypに耐性のウイルスはセレクションとレスキューを2回繰り返した後に得ることができた(図1)。カニクイザルTRIM5 $\alpha$ に耐性のウイルスはセレクションとレスキューを7回繰り返した現在、センダイウイルス非感染MT4細胞添加によるレスキューがなくてもカニクイザルTRIM5 $\alpha$ 発現下での増殖が確認されているが、アカゲザルTRIM5 $\alpha$ に耐性のウイルスはセレクションとレスキューを5回繰り返した現在も得られていない。独立した2回の実験から得られたカニクイザルTRIMCyp耐性変異は、H87R、A88G、P90D、P93Aの組み合わせ(113配列変異と本報告書では

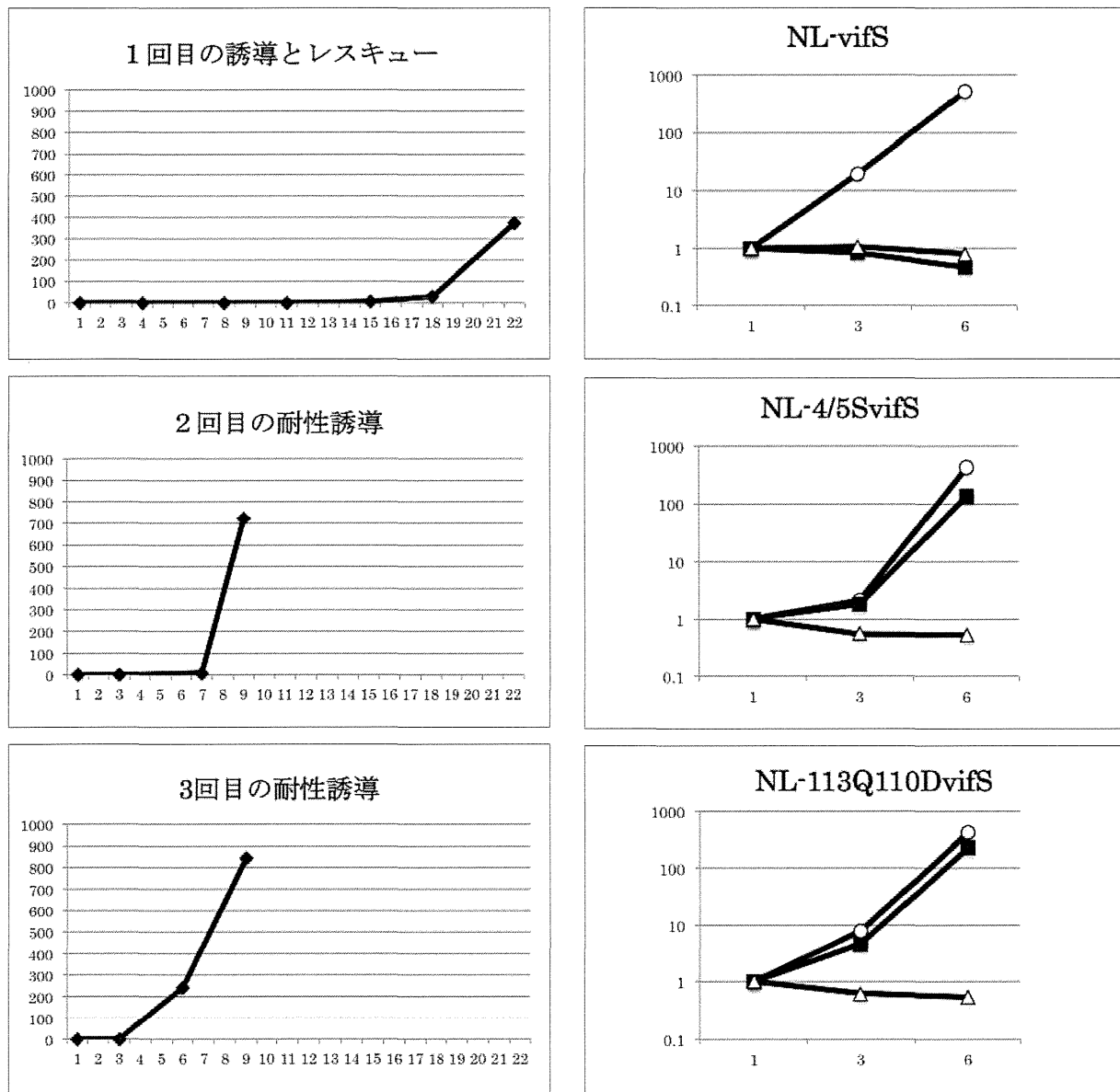


図1 カニクイザルTRIMCyp耐性ウイルスの確立

3回の耐性誘導実験でのウイルス増殖を示す。縦軸はカプシド抗原量 (ng/mL)、横軸は感染後の日数を示す。1回目の耐性誘導実験では、感染後18日目にTRIMCypを発現しないMT4細胞を投入して耐性ウイルスを増幅した。

呼ぶ) と H87R、G89E、A92T、P93T の組み合わせであった。カニクイザル TRIM5 $\alpha$  に耐性のウイルスの遺伝子解析は現在、進行中である。

次に、Vif が SIVmac のものに置き換わっている NL-SVR プラスミドに 113 配列変異を導入した分子クローン由来のウイルスの TRIMCyp 耐性を改めて検証したところ、確かに 4/5SvifS と呼ばれるプロトタイプの変更 HIV-1 や、本研究班の初年度にサル実験に使われた MN4Rh3 ウイルス (vif と L4/5 と L6/7 が SIVmac 由来配列に置換されている以外にも、Q110D (NL43 の上では Q112D) 変異とインテグラーゼとエンベロープにカニクイザル適応変異をもつ) と同程度の TRIMCyp 耐性と増殖能を示した (図2)。我々は以前にカプシドの  $\alpha$  ヘリックス 6 の G116E 変異が単独でカニクイザル TRIM5 $\alpha$  に対する部分耐性を付与することを報告している (Kuroishi et al. *Retrovirology*, 2010)。本研究で得られた 113 配列変異に加えて G116E 変異を導入したウイルスは、やはりカニクイザル TRIM5 $\alpha$  に対する部分耐性を示した。一方、113 配列変異と Q110D の組み合わせではカニクイザル

TRIM5 $\alpha$  に対する耐性獲得にまでは至らなかった。NL-113Q110DvifS は一番増殖効率の良いウイルスであったが、残念ながら親株 (NL43vif) の増殖効率には及ばなかった。

#### D. 考察

同じ変異ウイルスライブラリーを出発材料にしたが、カニクイザル TRIMCyp の耐性ウイルスは容易に得られ、カニクイザル TRIM5 $\alpha$  には困難が伴い、アカゲザル TRIM5 $\alpha$  には現時点で成功していない。これは、ライブラリーウイルスの変異は L4/5 に導入してあり、TRIM5Cyp はカプシドの L4/5 だけに作用しているのに対して、TRIM5 $\alpha$  はカプシド蛋白質表面全体の構造を認識しているために多くの変異の獲得が必要と考えられる。

2 度の実験で得られた TRIMCyp 耐性クローンの配列は、いずれも 87 番目に陽性電荷を持つアミノ酸を配し、一方で 93 番目のプロリンを変化させている。これら 2 つの配列と CypA との結合構造についての解析を行う予定である。

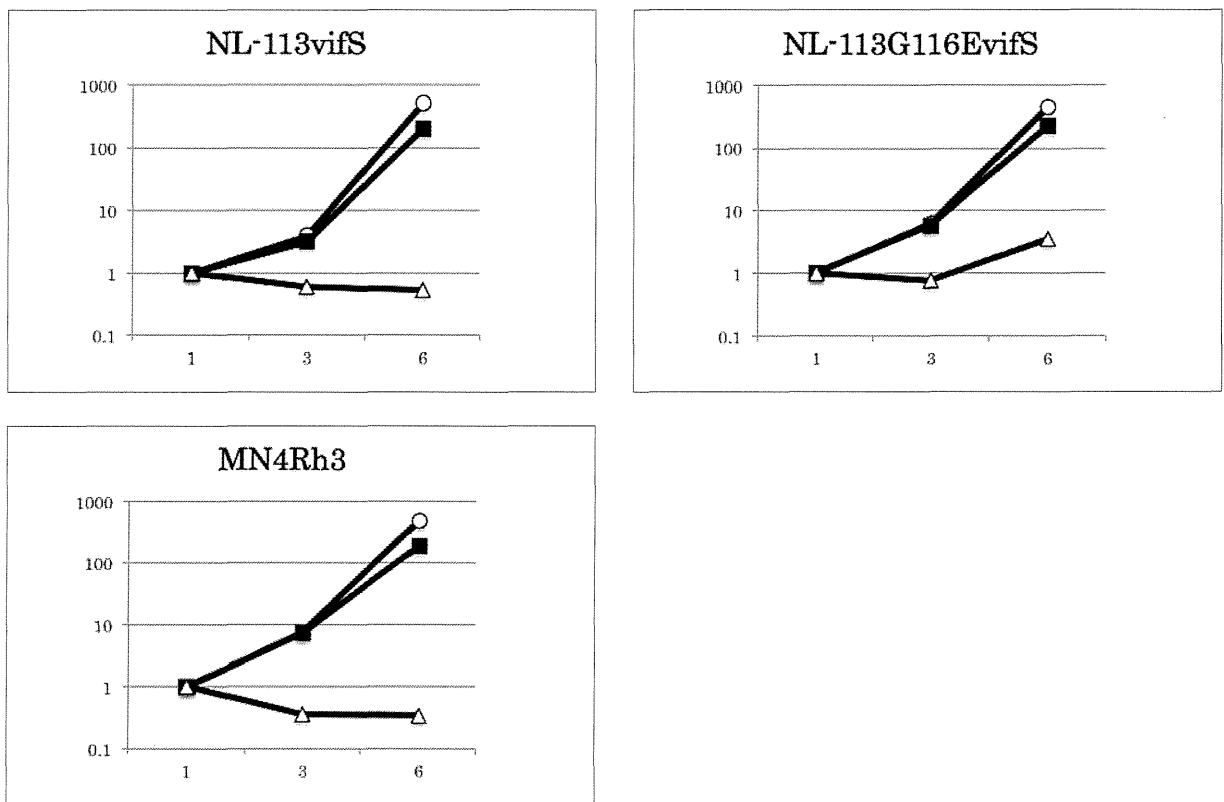


図2 HIV-1 と改変 HIV-1 の増殖

■はカニクイザル TRIMCyp 発現細胞、△はカニクイザル TRIM5 $\alpha$  発現細胞、○は SPRY ドメイン欠損 TRIM5 発現細胞 (抗ウイルス因子陰性コントロール) での各ウイルスの増殖を示す。縦軸はカプシド抗原量 (ng/mL)、横軸は感染後の日数を示す。

## E. 結論

カプシド蛋白質にランダムな変異を導入したライブラリーを作成し、TRIM5 $\alpha$ あるいはTRIMCyp耐性能を持ちかつ増殖効率の高いウイルスの分離を試みた。独立した2回の感染実験から得られたカニクイザルTRIMCyp耐性をHIV-1に付与する変異は、H87R、A88G、P90D、P93Aの組み合わせとH87R、G89E、A92T、P93Tの組み合わせであった。

## F. 知的所有権の取得状況

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Taya K, Nakayama EE, Shioda T. Moderate restriction of macrophage-tropic human immunodeficiency virus type 1 by SAMHD1 in monocyte-derived macrophages. *PLoS One* 8: e90969, 2014.
- 2) Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Doi N, Fujiwara S, Saito A, Akari H, Miyakawa K, Ryo A, Ode H, Iwatani Y, Miura T, Igarashi T, Sato H, Adachi A. Generation of rhesus macaque-tropic HIV-1 clones that are resistant to major anti-HIV-1 restriction factors. *Journal of Virology* 87:11447-11461, 2013.
- 3) Kono K, Takeda E, Tsutsui H, Kuroishi A, Hulme AE, Hope TJ, Nakayama EE, Shioda T. Slower Uncoating Is Associated with Impaired Replicative Capability of Simian-Tropic HIV-1. *PLoS One* 8:e72531, 2013.
- 4) 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. TRIM5 genotypes in cynomolgus monkeys primarily influence inter-individual diversity in susceptibility to monkey-tropic human immunodeficiency virus type 1. *Journal of General Virology* 94:1318-24, 2013.
- 5) 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* 15:319-28, 2013.
- 6) 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 infec-

tion. *AIDS Research and Human Retroviruses* 29:919-24, 2013.

### 2. 学会発表等

- 1) Akatsuki Saito, Emi E. Nakayama, Tatuo Shioda, Tomoyuki Yoshida, Atsunori Higashio, Saori Suzuki, Yoshi Kawaoka, Hirofumi Akari. Diversity of antiretroviral host factor TRIM5 gene in macaque monkeys. *Retroviruses* 2013, 2013年5月20日-25日、Cold Spring Harbor, NY.
- 2) Ken Kono, Eri Takeda, Hiromi Tsutui, Ayumu Kuroishi, Amy E. Hulme, Thomas J. Hope, Emi E. Nakayama, Tatsuo Shioda. Slower uncoating has a deleterious effect on replication of the simian-tropic HIV-1. *Retroviruses* 2013, 2013年5月20日-25日、Cold Spring Harbor, NY.
- 3) Eri Takeda, Ken Kono, Hiromi Tsutsui, Ayumu Kuroishi, Amy E. Hulme, Thomas J. Hope, Emi E. Nakayama, Tatsuo Shioda: Slower uncoating is associated with impaired replicative capability of simian-tropic HIV-1. 第12回あわじしま感染症・免疫フォーラム. 2013年9月10-13日、淡路島.
- 4) Kahoru Taya, Emi E Nakayama, Shioda Tatsuo: Moderate restriction of macrophage tropic human immunodeficiency virus type 1 by SAMHD1 in monocyte-derived macrophages. 第12回あわじしま感染症・免疫フォーラム. 2013年9月10-13日、淡路島.
- 5) 武田英里、河野健、Hulme Amy E、Hope Thomas J、中山英美、塩田達雄：可視化ウイルスをつかったHIV-2カプシドコアの脱核速度測定法の確立 第61回日本ウイルス学会学術集会 2013年11月10-12日、神戸.
- 6) 田谷かほる、中山英美、塩田達雄：マクロファージ指向性 HIV-1も、マクロファージおよび単球において SAMHD1 による増殖抑制を受けている. 第27回日本エイズ学会学術集会・総会 2013年11月20-22日、熊本.

## 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 研究員)

### 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。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株の樹立を試みた。研究班全体として昨年までに研究代表者の明里らがサル個体内で感染が成立し、かつ感染急性期に比較的効率良い増殖能を示しR5指向性HIV-1mt (MN38)の作出に成功している。そこで本分担課題として平成25年度はR5-HIV-1mt (MN38)の持続感染性成立の可能性について検証することを目的に、R5-HIV-1mt (MN38)感染カニクイザルに対し抗CD8抗体を投与しウイルス再活性化を誘導した後、血漿をHIV非感染サル2頭に経皮接種した。接種後末梢血中HIV特異的CD8陽性Tリンパ球反応を解析した結果、接種12週後のリンパ球では2頭ともHIV-Gag特異的CD8陽性リンパ球反応誘導が認められた。以上の結果は接種したR5-HIV-1mtが少なくともある程度持続的な感染を呈した結果を支持していると考えられる。

### 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が成立し、かつHIV自然感染経過により近いR5指向性でサルに対し病原性を呈する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、サル細胞を用いた感染実験において感染の成立・増殖が確認されたHIV変異株を実際にカニクイザルにチャレンジ実験を行い、HIV感染サル個体内の免疫動態の解析を通して感染・病原性に関与する宿主免疫機構を解析することに主眼をおいている。昨年度までに研究代表者の明里らがR5指向性HIV変異株の作成を試み、サル個体内で比較的効率のよい持続感染の可能性が示されたX4指向性HIV-1変異のMN4Rh-3を基にサル個体で病原性を獲得したR5指向性SHIV-1MK38株のenv領域を置換したHIV-1mt (MN38)の作成に成功している。R5-HIV-

1mt (MN38)は感染急性期にサル個体内で効率のよい複製能を示したものの、その後血中ウイルス量は低下した感染8週後に血漿中ウイルス量は検出限界以下になった。しかしながら体内からのウイルスの完全排除に至ったか検証はなされていない。そこで本年度の分担研究として、R5-HIV-1mt (MN38)感染ザルに抗CD8抗体を投与しウイルスの再活性化を誘導した後、サル個体間のウイルス継代により持続感染成立の可能性について検討した。

### B. 研究方法

血漿中HIV-RNAコピー数が検出限界以下あるR5-HIV-1mt (MN38)感染カニクイザルに対し抗CD8抗体50mg/mlを経皮投与した。1週間後に採血を行い、この血液をHIV非感染カニクイザル2頭 (C94-044, C03-108)に接種した。接種後4週目、及び12週目に採血を行い末梢血由来リンパ球を分離し、HIV-1CladeBをモチーフとして作成したoverlapping peptidesと混合培養しIFN- $\gamma$ 陽性細胞数を解析しHIV特異的CD8陽性Tリンパ球反応誘導を評価した。



## (倫理面への配慮)

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

血漿接種4週後、12週後の末梢血由来PBMC $1 \times 10^6$ 個当たりのHIV-Gag特異的IFN- $\gamma$ 産生細胞数の頻度を図1に示した。接種4週目のリンパ球ではGag特異的CD8陽性Tリンパ球反応は検出されなかったのに対し、12週目のリンパ球では2頭ともGag特異的CD8陽性Tリンパ球反応誘導が認められた。

## D. 考察

血漿中ウイルス量が検出限界以下であったR5-HIV-1mt (MN38) 感染に対し抗CD8抗体を接種しウイルスの再活性化を誘導したのちサル個体間で継代実験を行ったカニクイザルにおいて、セットポイント期（接種12週後）にHIV-Gag特異的CD8陽性Tリンパ球反応誘導が認められた。以上の結果は接種したR5-HIV-1mtが少なくともある程度持続的な感染を呈した結果を指示していることが示唆される。

## E. 結論

R5指向性HIV変異株 (MN38) はカニクイザルにおいて、ある程度持続的な感染が成立した可能性が示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

## 2. 学会発表等

- 1) 中村 碧、高原悠祐、松岡佐織、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投与下のCTL誘導ワクチン接種によるSIV複製抑制効果の増強効果の解析。第61回日本ウイルス学術集会、神戸、2013年11月。
- 2) 石井 洋、野村拓志、高橋尚史、松岡佐織、俣野哲朗：サルエイズモデルにおいて感染慢性期に誘導されるSIV特異的CTL反応の標的抗原とメモリーフノタイプとの関連性についての解析。第61回日本ウイルス学術集会、神戸、2013年11月。
- 3) 石井 洋、野村拓志、高橋尚史、松岡佐織、俣野哲朗：感染慢性期において血漿中ウイルス量と相関・逆相関する各抗原特異的CTL反応および優位性についての解析。日本エイズ学会学術集会、熊本、2013年11月。
- 4) Nakamura M, Takahara Y, Matsuoka S, T Matano. Reinforcement of CD8<sup>+</sup> cell capacity to control viral replication by therapeutic vaccination under antiretroviral therapy in SIV-infected rhesus macaque. 31<sup>st</sup> Annual symposium on Nonhuman primate model for AIDS. 31th Annual symposium on Nonhuman primate model for AIDS. Atlanta, USA, 3-6 November, 2013.
- 5) Hiroshi Ishii, Saori Matusoka, Teturo matano. Association of Gag-specific CD28<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-cell responses in lymph nodes with lower viral loads. The Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI). Boston, USA, March 3-6, 2014.

## G. 知的所有権の取得状況

なし

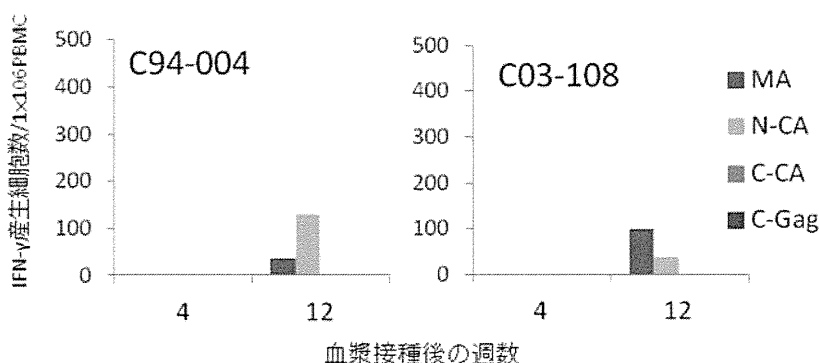


図1 血漿接種4週後、12週後の末梢血由来PBMC $1 \times 10^6$ 個当たりのHIV-Gag特異的IFN- $\gamma$ 産生細胞数の頻度

血漿接種4週後は反応が認められなかったが、12週後では2頭ともHIV-Gag特異的CTL反応誘導が認められた。MA：Matrix、N-CA：N末端側Capsid、C-CA：C末端側Capsid、C-Gag：SP2-NC-SP1

## 刊行物の別刷

# Demonstration of marmosets (*Callithrix jacchus*) as a non-human primate model for secondary dengue virus infection: high levels of viraemia and serotype cross-reactive antibody responses consistent with secondary infection of humans

Meng Ling Moi,<sup>1</sup> Tomohiko Takasaki,<sup>1</sup> Tsutomu Omatsu,<sup>2</sup> Shinichiro Nakamura,<sup>3</sup> Yuko Katakai,<sup>4</sup> Yasushi Ami,<sup>5</sup> Yuriko Suzuki,<sup>5</sup> Masayuki Saijo,<sup>1</sup> Hirofumi Akari<sup>6</sup> and Ichiro Kurane<sup>7</sup>

Correspondence  
Ichiro Kurane  
kurane@nih.go.jp

<sup>1</sup>Department of Virology I, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan

<sup>2</sup>Research and Education Center for Prevention of Global Infectious Diseases of Animals, Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu, Tokyo, Japan

<sup>3</sup>Research Center for Animal Life Science, Shiga University of Medical Science, Otsu, Shiga, Japan

<sup>4</sup>Laboratory of Disease Control, Tsukuba Primate Research Center, National Institute of Biomedical Innovation, Ibaraki, Japan

<sup>5</sup>Division of Experimental Animal Research, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan

<sup>6</sup>Section of Comparative Immunology and Microbiology, Center for Human Evolution Modeling Research Institute, Kyoto University, Inuyama, Aichi, Japan

<sup>7</sup>National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan

There are four dengue virus (DENV) serotypes. Primary infection with one does not confer protective immunity against the others. We have reported previously that the marmoset (*Callithrix jacchus*) is a useful primary DENV infection model. It has been reported that secondary DENV infection with a heterotypic serotype induces viraemia kinetics and antibody responses that differ from those in primary infection. Thus, it is important to determine the utility of the marmoset as a model for secondary DENV infection. Marmosets were infected with heterologous DENV by secondary inoculation, and viraemia kinetics and antibody responses were analysed. The marmosets consistently developed high levels of viraemia after the secondary inoculation with heterologous DENV serotypes. IgM responses were lower compared with primary inoculation responses, whilst IgG responses were rapid and high. Neutralizing activities, which possessed serotype cross-reactive activities, were detected as early as 4 days after inoculation. In addition, infectious viraemia titres were higher when assayed with Fc $\gamma$  receptor-expressing baby hamster kidney (BHK) cells than when assayed with conventional BHK cells, suggesting the presence of infectious virus–antibody immune complexes. After secondary infection with heterotypic DENV, the marmosets demonstrated viraemia kinetics, IgM and IgG responses, and high levels of serotype cross-reactive neutralizing antibody responses, all of which were consistent with secondary DENV infection in humans. The results indicate the marmoset as a useful animal for studying secondary, as well as primary, DENV infection.

Received 8 October 2013

Accepted 9 December 2013

## INTRODUCTION

The global burden of dengue is estimated to be over 300 million infections annually and has increased in recent decades (Bhatt *et al.*, 2013). The development of a safe and effective vaccine is key to reducing the disease burden and should be made a public health priority. There are currently

no licensed vaccines or specific therapeutics for dengue. Considerations in DENV vaccine development include assessment of viraemia, immunogenicity, reactogenicity parameters, definition of correlates of protection and the potential roles of non-neutralizing antibodies in the antibody-dependent enhancement of infection. A better understanding

of the immune responses during protection and disease enhancement in secondary infection is critical for the development of vaccines and control strategies.

Animal models allow the evaluation of vaccine strategies by defining viraemia kinetics and antibody responses. Mice and non-human primates (NHPs) have been used previously as models for infection mechanism and vaccine development studies (Bente *et al.*, 2005; Guriakhoo *et al.*, 2002, 2004; Guy *et al.*, 2009; Halstead *et al.*, 1973a, b; Koraka *et al.*, 2007a). Immunocompromised mice develop overt clinical signs upon dengue virus (DENV) infection, but further manipulation would be required in order to determine the susceptibility of the mouse model to clinical DENV serotypes and define its compatibility with human DENV infection (Shrestha *et al.*, 2006; Tan *et al.*, 2010; Weiskopf *et al.*, 2011). With respect to predicting the accuracy of vaccine efficacy (reviewed by Zompi & Harris, 2012), the immunocompromised mouse model needs further manipulations for analysing cell-mediated immune responses, as the model lacks IFN- $\alpha/\beta/\gamma$ . In contrast, the close genetic relationship that exists between NHPs and humans makes NHPs a suitable animal model for dengue vaccine and therapeutic studies. The NHP models have brought substantial advances in DENV vaccine development. Extensive studies using more than 20 NHP species including rhesus macaques, crab-eating macaques, owl monkeys and chimpanzees have shown that NHPs develop clinical signs including onset and duration of viraemia, and immune responses that reflect those of human DENV infection, but do not succumb to the disease (Bernardo *et al.*, 2008; Clark *et al.*, 2013; Halstead *et al.*, 1973a; Ito *et al.*, 2011; Lubiniecki & Tarr, 1977; Marchette *et al.*, 1973; Omatsu *et al.*, 2011; Onlamoon *et al.*, 2010; Scherer *et al.*, 1978; Schiavetta *et al.*, 2003). However, viraemia during secondary infection has been shown to be inconsistent in these models (Halstead *et al.*, 1973a; Ito *et al.*, 2011; Kochel *et al.*, 2005; Koraka *et al.*, 2007b; Whitehead *et al.*, 1970). Novel approaches using other NHPs that are consistent in their development of viraemia during secondary infection are needed to improve vaccine efficacy and disease mechanism studies (reviewed by Vaughn *et al.*, 2008).

Characterization of immunological responses after secondary infection is a key requirement for evaluating the protective efficacy of future candidate vaccines and vaccine delivery strategies. Macaques have been reported to show humoral and cellular immune responses after secondary challenge that are consistent with the responses observed in natural human infection (Halstead *et al.*, 1973a; Scherer *et al.*, 1972). Vaccine efficacy studies using macaques have been implemented, resulting in an understanding of immune responses during secondary infection. We previously reported the marmoset (*Callithrix jacchus*) to be a useful animal for studies of DENV infection (Moi *et al.*, 2013; Omatsu *et al.*, 2011, 2012). Marmosets consistently develop high levels of viraemia upon primary DENV infection and have demonstrated protective immunity against homologous DENV challenge. In the present study,

we evaluated the marmoset model in secondary heterotypic DENV infection. Marmosets that had been infected previously with one serotype of DENV were infected with heterologous DENV. Viraemia patterns and antibody responses in the secondary infection were analysed. The results indicated that the viraemia and antibody responses of marmosets after secondary DENV infection were consistent with those of humans and suggest the marmoset model as useful for studies of secondary, as well as primary, DENV infection.

## RESULTS

### Consistent development of viraemia in marmosets after secondary inoculation with heterotypic DENV

Levels of dengue viral RNA were assessed at days 0, 2, 3, 4, 7, 10 and 14 after inoculation with DENV (Table 1). Eleven marmosets were inoculated with serotypes that differed from those used in primary inoculation. Three marmosets were inoculated with DENV-2 (experiment 1) and four marmosets were inoculated with DENV-1 (experiment 2) at 59 weeks after primary infection. Two marmosets were inoculated with DENV-1 (experiment 3) and two marmosets were inoculated with DENV-3 (experiment 4) at 83 weeks after primary DENV-2 infection (Table 1). All of the marmosets developed viraemia at days 2–14. The mean viraemia period was 7.5 days. Two marmosets were inoculated with DENV-1 in primary infection (experiment 5). Viraemia was detected from 2 to 10 days post-inoculation (p.i.), with peak levels comparable to those in the secondary inoculation. The results indicated that secondary infection with heterotypic DENV infection consistently resulted in viraemia in the marmoset model and suggested that primary infection in marmosets does not induce protective immunity against heterologous serotypes, results that are consistent with human DENV infection.

### Detection of higher levels of viraemia using Fc $\gamma$ R-expressing baby hamster kidney cells

Plasma samples from marmosets inoculated with DENV-1 in the secondary inoculation were analysed for viraemia levels using baby hamster kidney (BHK) and Fc $\gamma$ R-expressing BHK cells (Table 2). Viraemia was detected in samples from marmosets D2D1-2, D2D1-3 and D2D1-4 when using Fc $\gamma$ R-expressing BHK cells but not when using BHK cells (Table 2, experiment 2). Viraemia levels were approximately 1 log higher in samples from marmosets D2D1-5 and D2D1-6 when using Fc $\gamma$ R-expressing BHK cells than when using BHK cells (Table 2, experiment 3). The mean duration of detectable infectious virus in marmosets during secondary infection was shorter compared with the duration of detectable virus RNA:  $1.2 \pm 1.6$  days (BHK cells) and  $2.4 \pm 1.3$  days (Fc $\gamma$ R-expressing BHK cells). In the case of primary inoculation, similar

**Table 1.** Levels of DENV RNA in plasma samples from marmosets inoculated with DENV

Experiment/animal ID	Inoculated serotype	Period after primary DENV inoculation (weeks)	Inoculated dose (p.f.u. per dose)	Dengue viral RNA copy numbers (log <sub>10</sub> copies ml <sup>-1</sup> ) at indicated day p.i.*						
				0	2	3	4	7	10	14
<b>Secondary heterotypic inoculation</b>										
<i>Experiment 1 (primary DENV-3, secondary DENV-2)</i>										
D3D2-1	DENV-2	59	1 × 10 <sup>7</sup>	–	NT	6.7	NT	4.5	NT	–
D3D2-2				–	NT	6.2	NT	–	NT	–
D3D2-3					NT	6.4	NT	3.9	NT	–
<i>Experiment 2 (primary DENV-2, secondary DENV-1)</i>										
D2D1-1	DENV-1	59	1 × 10 <sup>6</sup>	–	4.4	NT	5.5	7.0	4.4	–
D2D1-2				–	6.9	NT	6.7	–	–	–
D2D1-3				–	5.0	NT	6.3	6.3	–	–
D2D1-4					5.6	NT	6.7	6.1	4.0	3.9
<i>Experiment 3 (primary DENV-2, secondary DENV-1)</i>										
D2D1-5	DENV-1	83	1 × 10 <sup>6</sup>	–	6.4	NT	6.3	4.7	3.9	4.2
D2D1-6					7.0	NT	6.8	5.1	4.6	4.4
<i>Experiment 4 (primary DENV-2, secondary DENV-3)</i>										
D2D3-1	DENV-3	83	1 × 10 <sup>6</sup>	–	4.7	NT	5.4	5.6	–	–
D2D3-2					3.8	NT	5.7	5.5	4.4	–
<b>Primary inoculation</b>										
<i>Experiment 5 (primary DENV)</i>										
D1-1	DENV-1	0	1 × 10 <sup>6</sup>	–	7.0	NT	6.5	5.2	4.7	–
D1-2				–	7.5	NT	7.7	6.0	4.2	–

NT, Not tested.

\*Levels of viral genome were quantified prior to DENV inoculation; –, viral RNA below detection levels.