

201319014A

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25年度 総括・分担研究報告書

平成26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25年度 総括・分担研究報告書

平成26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 1
研究代表者：横田 恭子

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 11
研究分担者：山本 浩之
2. 粘膜・リンパ組織の抗原提示細胞への感染様式の解明 17
研究分担者：五十嵐樹彦
3. 潜伏感染細胞の同定とその成立機構 21
研究分担者：横田 恭子
4. 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 27
研究分担者：渡邊 俊樹
5. 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 35
研究分担者：徳永 研三
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 39
研究分担者：立川 愛
7. HIV複製を自発的に制御する感染者群でのウイルス蛋白質Nefの
機能と免疫活性化における役割 43
研究分担者：上野 貴将
8. 慢性的免疫活性化制御因子の機能解析 47
研究分担者：小柳 義夫
9. T細胞の活性化刺激とHIV感染制御 51
研究分担者：田中 勇悦
- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 55

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：サルモデルにおいて、SIV 初期制御群の病態進行は感染後 1-2 年時点のプロウイルスの Gag 特異的 CTL エスケープ変異の蓄積の有無で 2 分され、それら個体の特異的 CTL 応答とウイルス制御の関係が示唆された。また、新規に非病原性 SIV_{1A11} 潜伏持続感染モデルが確立された。ヒト化マウスモデルでは、Vpr が Treg への感染性促進因子であること、R5 型 HIV-1 存在下で X4 型 HIV-1 が潜伏する可能性が示された。更に、潜伏感染成立機構解析のための初期 T 細胞培養系が確立され、レポーターウイルスに潜伏感染した細胞が異なるメカニズムを経た不均一な集団で、宿主エピジェネティック因子群が潜伏感染制御に関わることが明らかにされた。一方、慢性 HIV 感染者における T 細胞機能不全の要因の一つとして CD4 陽性 T 細胞の老化と IL-2 遺伝子の DNA メチル化というエピジェネティックな変化があることや免疫活性化に関連するウイルス蛋白質 Nef の機能と病態との関係、マクロファージにおいて SAMHD1 非依存的な HIV-1 感染抑制を担う ISG が複数存在する可能性が示唆され、また、HTLV-I 不死化細胞株の OX40L 発現が R5 HIV-1 感染を効率良く抑制し、CXCR4 に対する抗体が T 細胞活性化を抑制することも含め、新たな治療法開発の基盤となる知見が蓄積された。

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。本研究では、latent reservoir

（潜伏感染）と active reservoir（再活性化、持続感染）に関し、主として動物モデルを用いた解析を行う。

B. 研究方法

サルモデル

1) 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 SIV gag と nef 領域の塩基配列解析を行い、感染各期の Gag 特異的 CTL 応答のパターンをフローサイトメーターで評価した。また、SIV 持続制御を示した 1 頭の CD8 を枯渇させ、その後の SIV 特異的 CTL 応答、及び血中ウイルス RNA の gag 領域配列解析を行った。（山本）

2) 非病原性 SIV 1A11 を 1.1×10^7 TCID₅₀ 中国産アカゲザルに経直腸感染させ、接種前後に経時的に血中ウイルス量と血中およびリンパ節中のリンパ球サブセットの解析を行った。また、腸管生検組織から抗体磁気ビーズを用いて抗原提示細胞を精製した。1 頭の感染サルに抗 CD8 抗体 10 mg/kg を麻酔下で皮下投与した。（五十嵐）

ヒト化マウスモデル

1) 異なる蛍光を発現する X4 型と R5 型 HIV-1 を同時にヒト化 NOJ マウスに感染させた時のウイルス感染細胞の分布を FACS で、血中ウイルス量の変動を qRT-PCR で解析した。(横田)

2) HIV-1 vpr 変異株と野生株をヒト化 NOG マウスに感染させ、Treg 細胞や活性化メモリー T 細胞の動態を FACS で解析した。(小柳)

培養系モデル

1) 健康人末梢血から CD4 陽性 T 細胞を調製し、LTR 制御下に GFP-Nef のみ発現する組換えレンチウイルス Lenti GFP-Nef LTR あるいは HIV-1_{NL-E} を感染させた後、DC と SEB による T 細胞受容体刺激し、あるいは IL-7 と IL-15 を添加して 2 週間以上細胞を培養維持 (Homeostatic proliferation: HSP) した。これらの T 細胞の増殖、表面抗原や感染細胞頻度を FACS で解析し、一部の亜集団をソートして HIV や細胞 mRNA 発現、プロウイルスの integration を PCR で定量した。(横田)

2) LTR の下流に Tat-IRES-Venus と EF1 プロモーター下に mRFP 遺伝子を挿入して single-round 感染の dual-color reporter ウイルスを作製し、Jurkat T 細胞に感染させた。メチル化 DNA の検出はバイサルファイト法を用い、LTR 上の修飾ヒストンを ChIP assay によって解析した。DAC の阻害に TSA、SAHA、及び VPA、また PRC2 の阻害には EZH2 の特異的阻害剤である DZNep 及び GSK126 を使用した。(渡辺)

3) 健康人末梢血からマクロファージ、樹状細胞、及び活性化 T リンパ球を調製して IFN α 存在下/非存在下で 24 時間培養し、各遺伝子の発現レベルを定量した。また、I 型インターフェロン (IFN) により強く誘導される 6 種類の蛋白発現ベクターを作成し、シュード HIV ウイルスの感染・増殖に及ぼす影響を検証した。(徳永)

4) 慢性期 HIV 感染者末梢血単核球(PBMC)を CD4⁺ と CD8⁺T 細胞に分画して IL-2 発現およびプロモーター領域の DNA メチル化解析と細胞表面抗原の FACS 解析を行った。(立川)

5) 慢性 HIV 感染者とエリートコントローラー(EC) の検体から nef 遺伝子を増幅してその配列の遺伝子系統樹解析を行い、その機能との関係について医学統計学的に解析した。(上野)。

6) HTLV-1 で不死化した自家 T 細胞株の OX40L 発現とそれによる HIV-1 抑制作用、抗 CXCR4 単クローン抗体(A120)の T 細胞活性化に対する影響を検討した。(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

サルモデル

1) SIV 初期制御個体群は gag 領域に CTL エスケープ変異が蓄積する群 (B 群 5 頭) と蓄積しない群 (A 群 6 頭) に分かれた。感染後 2 カ月では両群とも野生株 Gag が主体で、感染後 1 年では CTL エスケープ蓄積群の 1 頭に単独の CTL エスケープが検出された以外は全頭で野生株であった。また、nef 領域には高度の G-to-A 変異が認められる場合があった。CTL エスケープの蓄積は感染後 2 年を過ぎての血中ウイルスの存在と関連し、Gag エピトープ特異的 CTL は B 群において消退傾向であるのに対し、A 群においては比較的維持された。A 群の 1 頭の CD8 陽性細胞を枯渇させると血中ウイルスが再出現し、同時に SIV 特異的 CTL 応答が広汎化した。また、再出現した血中ウイルスは、それまで野生株であった配列がエスケープ変異体 (Gag L216S, D244E, V375M) の配列に置き換わっていた。(山本)

2) 経直腸 SIV_{1AII} 感染後の中国産アカゲザルにおいて低レベルの一過性複製を確認したが、リンパ球サブセットに変動はなかった。抗 CD8 抗体処理により、血中ウイルス量の一過性上昇を認め、リンパ節で Gag ウイルス抗原陽性細胞を検出した。一方、腸管生検組織から精製した細胞の多くはマクロファージ様形態を示し、CD11c 陽性 (骨髄系樹状細胞) や HLA-DR 陽性でかつ CD123 陽性 (形質細胞様樹状細胞) の細胞が存在したが、10 片の生検組織から、わずかに総計 10⁴ 個程度しか得られなかった。(五十嵐)

ヒト化マウスモデル

1) 同時感染 X4 型と R5 型 HIV-1 に感染したヒト化 NOJ マウスでは、それぞれの単独感染と異なり、特に、X4 型の CCR5 陽性記憶 T 細胞への感染頻度が R5 型 HIV-1 の存在によって有意に低下し、血中からも早期に消失する傾向にあった。(横田)

2) ヒト化 NOG マウスを用い、Treg が HIV-1 の標的になりやすく、アクセサリ蛋白質である Vpr による細胞周期の G2 期停止とアポトーシスの効

率的誘導機能を介して選択的に枯渇され、これにより記憶T細胞の高度活性化とウイルス増殖促進がおきることを明らかにした。(小柳)

培養系モデル

レポーターウイルスや HIV-1 感染実験において、1) HSP 培養で維持される初期 CD4 陽性 T 細胞は緩慢に増殖し、T 細胞受容体を刺激した場合と異なって HIV-1 感染 2 週間後も非増殖細胞が多く存在した。この亜集団にもプロウイルス DNA の integration と低レベルのウイルス mRNA 発現を認めたことから、細胞内への entry は同じで integration まで感染が進行しても、転写レベルで強い抑制を受けていることが示唆された。(横田)

2) 培養細胞株でも感染初期に LTR が急激に不活化する T 細胞集団と、時間依存的に潜伏化していく 2 つの亜集団が存在し、両者は LTR 上のヒストン修飾や再活性化シグナルに対する感受性が異なることを明らかにした。(渡辺)

その他、HIV-1 制御分子の探索に関して、

3) マクロファージにおいて、I 型インターフェロン (IFN) 添加後の SAMHD1 発現変化は小さかったが、IFN α により誘導される既知 ISG 遺伝子の中にははるかに高発現になる遺伝子が 6 種類存在した。これらの遺伝子を過剰発現させるとウイルスの感染・増殖を強く抑制することを確認した。(徳永)

4) 高い血中 HIV-1 を維持する病態進行の早い感染者の CD4 様態 T 細胞では IL-2 遺伝子が高度にメチル化され、その頻度は IL-2 発現量と逆相関し、老化マーカー CD57 の発現とは正の相関を示した。(立川)

5) HIV 感染を完全にコントロールしている EC では、免疫活性化に関連する HIV-1 Nef の機能は減弱していたが、両群の遺伝子配列に顕著な差は認められなかった。(上野)

6) OX40L と OX40 を同時発現する HTLV-1 不死化細胞株では、OX40L のみが β ケモカインの産生促進を介して R5 型 HIV-1 感染を効率良く抑制した。一方、A120 存在下では抗 CD3 抗体刺激による T 細胞活性化が抑制された。(田中)

D. 考察

SIV 初期制御後の病態進行が末梢血 CTL 応答群の推移で予測可能である。制御持続群の reservoir 内では、野生型ウイルスは不活化されて Gag 変異ウイルスの増殖が CD8⁺細胞により制御されている

と考えられ、即ち、変異体の蓄積スピードと病態制御の持続とが関連する可能性が示唆された。非病原性 SIV は比較的短期間に潜伏と再活性化が誘導可能なサルモデルとして今後の解析に有用であろう。ヒト化マウスでは高度に活性化された CCR5 発現細胞が多いため、R5 型 HIV-1 の増殖が良い。一方、X4 型 HIV-1 の感染標的は主として naïve T 細胞であることを考えると、この細胞に感染した HIV が生体内でどのくらい長く存続するのか明らかにする必要がある。また、HIV 感染初期に Vpr 蛋白質が Treg への感染促進作用を有することは、ヒト化マウスで初めて明らかになった現象であるが、病状が進行した慢性期においても同様なのか検討を要する。今後、IFN 処理マクロファージや樹状細胞の HIV-1 感染前期段階抑制因子としての新規 ISG が発見され、我々独自の *in vitro* 潜伏感染・再活性化モデルにおいて新規のエピジェネティック調節因子が明らかになれば、OX40 や A120 抗体と共に今後のエイズ治療開発のために有用である。

E. 結論

サルモデルにおいて、SIV 初期制御群の病態進行は感染後 1-2 年時点のプロウイルスの Gag 特異的 CTL エスケープ変異の蓄積の有無で 2 分され、それら個体の特異的 CTL 応答とウイルス制御の関係が示唆された。また、新規に非病原性 SIV1A11 潜伏持続感染モデルが確立された。ヒト化マウスモデルでは、Vpr が Treg への感染性促進因子であること、R5 型 HIV-1 存在下で X4 型 HIV-1 が潜伏する可能性が示された。更に、潜伏感染成立機構解析のための初期 T 細胞培養系が確立され、レポーターウイルスに潜伏感染した細胞が異なるメカニズムを経た不均一な集団で、宿主エピジェネティック因子群が潜伏感染制御に関わることが明らかにされた。一方、慢性 HIV 感染者における T 細胞機能不全の要因の一つとして CD4 陽性 T 細胞の老化と IL-2 遺伝子の DNA メチル化というエピジェネティックな変化があることや免疫活性化に関連するウイルス蛋白質 Nef の機能と病態との関係、マクロファージにおいて SAMHD1 非依存的な HIV-1 感染抑制を担う ISG が複数存在する可能性が示唆され、また、HTLV-1 不死化細胞株の OX40L 発現が R5 HIV-1 感染を効率良く抑制し、CXCR4 に対する抗体が T 細胞活性化を抑制することも含め、新たな治療法開発の基盤となる知見

が蓄積された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamashita, Y., Hoshino, Y., Oka, M., Matsumoto, S., Ariga, H., Nagai, H., Makino, M., Ariyoshi, K., Tsunetsugu-Yokota, Y.: Multicolor flow cytometric analyses of CD4⁺ T cell responses to Mycobacterium tuberculosis-related latent antigens. *Jp.J.Infect.Dis.*, 3:207-215, 2013.
- 2) Tsunetsugu-Yokota, Y and Muhsen, M. Development of human dendritic cells and their role in HIV infection: antiviral immunity versus HIV transmission. *Front. Microbiol.* 4:1-10, 2013.
- 3) Ikeno, S., Suzuki, M., Muhsen, M., Ishige, M., Kobayashi-Ishihara, M., Ohno, S., Takeda, M., Nakayama, T., Morikawa, Y., Terahara, K., Okada, S., Takeyama, H., Tsunetsugu-Yokota, Y.; Sensitive detection of measles virus infection in the blood and tissues of humanized mouse by one-step quantitative RT-PCR. *Front. Microbiol.*4:1-8, 2013.
- 4) 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. *J.Virol.* in press, 2014.
- 5) Koyama, T., Sun, B., Tokunaga, K., Tatsumi, M., and Ishizaka, Y.: DNA damage aids HIV-1 infection of macrophages by overcoming integrase inhibition. *Retrovirology* 10:21, 2013.
- 6) 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.* 15:280-290, 2013.
- 7) Fujita, H., Iwabu, Y., Tokunaga, K., and Tanaka, Y.: Membrane-associated RING-CH (MARCH) 8 mediates the ubiquitination and lysosomal degradation of the transferrin receptor. *J. Cell Sci.* 126:2798-2809, 2013.
- 8) Tada T., Kadoki, M., Liu, Y., Tokunaga, K., and Iwakura, Y.: Transgenic expression of the human LEDGF/p75 gene relieves the species barrier against HIV-1 infection in mouse cells. *Front. Microbiol.* 4:377, 2013.
- 9) Koyama, T., Arias, J.F., Iwabu, Y., Yokoyama, M., Fujita, H., Sato, H., and Tokunaga, K.: APOBEC3G oligomerization is associated with the inhibition of both Alu and LINE-1 retrotransposition. *PLoS ONE* 8:e84228, 2013.
- 10) Asanuma S, Yamagishi M, Kawanami K, Nakano K, Sato-Otsubo A, Muto S, Sanada M, Yamochi T, Kobayashi S, Utsunomiya A, Iwanaga M, Yamaguchi K, Uchimaru K, Ogawa S, Watanabe T. Adult T-cell leukemia cells are characterized by abnormalities of Helios expression that promotes T-cell growth. *Cancer Sci* 104(8):1097-1106, Aug. 2013 (doi: 10.1111/cas.12181).
- 11) Ly BT, Chi HT, Yamagishi M, Kano Y, Hara Y, Nakano K, Sato Y, Watanabe T. Inhibition of FLT3 expression by green tea catechins in FLT3 mutated-AML cells. *PLoS One* 8(6):e66378, Jun. 2013 (doi: 10.1371/journal.pone.0066378).
- 12) Mahieux R, Watanabe T. Forefront studies on HTLV-1 oncogenesis. *Front Microbiol* 4:156, Jun. 2013 (doi: 10.3389/fmicb.2013.00156).
- 13) Nakano K, Ando T, Yamagishi M, Yokoyama K, Ishida T, Ohsugi T, Tanaka Y, Brighty D-W, Watanabe T. Viral interference with host mRNA surveillance, the nonsense-mediated mRNA decay (NMD) pathway, through a new function of HTLV-1 Rex: implications for retroviral replication. *Microbes Infect* 15(6-7):491-505, Jun. 2013 (doi: 10.1016/j.micinf.2013.03.006).
- 14) Shimizu A, Kawana-Tachikawa A, Yamagata A, Han C, Zhu D, Sato Y, Nakamura H, Koibuchi T, Carlson J, Martin E, Brumme CJ, Shi Y, Gao GF, Brumme ZL, Fukai S, Iwamoto A. Structure of TCR and antigen complexes at an immunodominant CTL epitope in HIV-1 infection. *Sci Rep.* 3:3097, 2013.
- 15) Teeranaipong P, Hosoya N, Kawana-Tachikawa A, Fujii T, Koibuchi T, Nakamura H, Koga M, Kondo N, Gao GF, Hoshino H, Matsuda Z,

- Iwamoto A. Development of a rapid cell-fusion-based phenotypic HIV-1 tropism assay. *J Int AIDS Soc.* 16:18723, 2013.
- 16) Kasahara D, Takara A, Takahashi Y, Kodama A, Tanaka R, Ansari AA, Tanaka Y. Natural OX40L expressed on human T cell leukemia virus type-I-immortalized T cell lines interferes with infection of activated peripheral blood mononuclear cells by CCR5-utilizing human immunodeficiency virus. *Virology* 10:338. 2013.
 - 17) Sato, K., Misawa, N., Iwami, S., Satou, Y., Matsuoka, M., Ishizaka, Y., Ito, M., Aihara, K., An, D.S., Koyanagi, Y.: HIV-1 Vpr accelerates viral replication during acute infection by exploitation of proliferating CD4⁺ T cells in vivo. *PLOS Pathog.* 9:e1003812, 2013.
 - 18) Ogawa, Y., Kawamura, T., Matsuzawa, T., Aoki, R., Gee, P., Yamashita, A., Moriishi, K., Yamasaki, K., Koyanagi, Y., Blauvelt, A., Shimada, S.: Antimicrobial peptide LL-37 produced by HSV-2-infected keratinocytes enhances HIV infection of Langerhans cells. *Cell Host Microbe* 13, 77-86, 2013.
 - 19) Hollenbaugh, J.A., Gee, P., Baker, J., Daly, M.B., Amie, S., Kasai, N., Kanemura, Y., Ward, B.M., Koyanagi, Y., Kim, B.: Host factor SAMHD1 restricts DNA viruses in non-dividing myeloid cells. *PLOS Pathog.* 9, e1003481, 2013.
 - 20) Ebina, H., Misawa, N., Kanemura, Y., Koyanagi, Y.: Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. *Sci. Rep.* 3, 2510, 2013.
 - 21) Shi S, Seki S, Matano T, Yamamoto H. IL-21-producer CD4⁺ T cell kinetics during primary simian immunodeficiency virus infection. *Microbes Infect.* 15:697-707, 2013.
 - 22) Nakane T, Nomura T, Shi S, Nakamura M, Naruse TK, Kimura A, Matano T, Yamamoto H. Limited impact of passive non-neutralizing antibody immunization in acute SIV infection on viremia control in rhesus macaques. *PLoS ONE* 8:e73453, 2013.
 - 23) Iwamoto N, Takahashi N, Seki Sm Nomura T, Yamamoto H, Inoue M, Shu T, Naruse TK, Kimura A, Matano T. Control of simian immunodeficiency virus replication by vaccine-induced Gag- and Vif-specific CD8⁺ T cells. *J Virol.* 88:425-433, 2014.
 - 24) Oue, M., Sakabe, S., Horiike, M., Yasui, M., Miura, T., and Igarashi, T. No viral evolution in the lymph nodes of SIV-infected rhesus macaques during combined antiretroviral therapy. *J. Virol.* 87:4789-93, 2013.
 - 25) Nomaguchi, M., Yokoyama, M., Kono, K., Nakayama, E.E., Shioda, T., Doi, N., Fujiwara, S., Saito, A., Akari, H., Miyakawa, K., Ryo, A., Ode, H., Iwatani, Y., Miura, T., Igarashi, T., Sato, H., and Adachi, A. Generation of rhesus macaque-tropic HIV-1 clones that are resistant to major anti-HIV-1 restriction factors. *J. Virol.* 87:11447-61, 2013.
 - 26) Otsuki, H., Hishiki, T., Miura, T., Hashimoto, C., Narumi, T., Tamamura, H., Yoshimura, K., Matsushita, S., and Igarashi, T. Generation of a replication-competent simian-human immunodeficiency virus, the neutralisation sensitivity of which can be enhanced in the presence of a small molecule CD4 mimic. *J Gen Virol.* 94:2710-6, 2013.
 - 27) Mwimanzi P, Markle TJ, Ogata Y, Martin E, Tokunaga M, Mahiti M, Kuang XT, Walker BD, Brockman MA, Brumme ZL, Ueno T. Dynamic range of Nef functions in chronic HIV-1 infection. *Virology* 439:74-80, 2013.
 - 28) Motozono C, Miles JJ, Hasan Z, Gatanaga H, Meribe SC, Price DA, Oka S, Sewell AK, Ueno T. CD8⁺ T cell cross-reactivity profiles and HIV-1 immune escape towards an HLA-B35-restricted immunodominant Nef epitope. *PLoS ONE* 8: e66152, 2013.
 - 29) Motozono C, Yokoyama M, Sato H, Ueno T. Cross-reactivity analysis of T cell receptors specific for overlapping HIV-1 Nef epitopes of different lengths. *Microbes Infect* 2014 in press.
2. 学会発表
- 1) 西村 研吾、曾家 義博、服部 静夫、影山 努、大西 和夫、高山 郁代、小林 美栄、高橋 仁、横田 恭子「化学発光免疫測定法を用いた高感度 H5HA 検出系の開発とベトナムにおける H5N1 感染試料を用いた検出感度の検討」第 27 回インフルエンザ研究者

- 交流会シンポジウム、札幌、2013年6月29日。
- 2) 池野翔太、鈴木基臣、寺原和孝、石毛真行、駒瀬勝啓、竹田誠、森川裕子、中山哲夫、柳雄介、竹山春子、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61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013年11月11日。
 - 3) 小林(石原)美栄、高橋仁、西村研吾、高山郁代、大西和夫、板村繁之、影山努、横田(恒次)恭子「H5N1インフルエンザウイルス高感度検出系開発に向けたH5HA特異的抗体のエピトープ解析」第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013年11月11日。
 - 4) Koyama, T., Tada, T., Fujita, H., Tokunaga, K.: Membrane-associated RING-CH (MARCH) 8 protein inhibits HIV-1 infection. *Frontiers of Retrovirology Conference 2013*, Cambridge, UK, 2013. 9.
 - 5) 小山貴芳、多田卓哉、藤田英明、徳永研三: 新規宿主因子 MARCH8 は HIV-1 感染を抑制する. 第61回日本ウイルス学会総会(神戸) 2013. 11.
 - 6) 張延昭、小山貴芳、多田卓哉、山岡昇司、徳永研三: SAMHD1 非依存的な HIV-1 複製阻害に關与する IFN 誘導性抗ウイルス宿主因子の探索. 第61回日本ウイルス学会総会(神戸) 2013. 11.
 - 7) Juan F Arias、小山貴芳、岩部幸枝、横山勝、佐藤裕徳、徳永研三: APOBEC3G の二量体化は LINE-1 転移抑制に重要である. 第61回日本ウイルス学会総会(神戸) 2013. 11.
 - 8) 小山貴芳、多田卓哉、藤田英明、徳永研三: 膜貫通蛋白 MARCH8 による HIV-1 感染阻害. 第36回日本分子生物学会(神戸) 2013. 12.
 - 9) Koyama, T, Arias, J.F., Iwabu, Y., Yokoyama, M., Fujita, H., Sato, H., Tokunaga, K. APOBEC3G oligomerization is associated with the inhibition of Alu and LINE-1 retrotransposition. *Keystone Symposia "Mobile Genetic Elements and Genome Evolution"*, Santa Fe, USA, 2014. 3.
 - 10) Yamagishi M, Watanabe T, "EPIGENETIC DEREGULATION OF MIRNA IN MALIGNANT LYMPHOMAS", 18th Congress of EHA, Stockholm, Sweden, June 16(June 12-June 16), 2013 (Oral) .
 - 11) Watanabe T, "Hematological neoplasms and viral Infections", XXVI Symposium IACRLRD, Lingotto Conference Center, Torino, Italy, Sept. 14(Sept. 11- Sept. 14), 2013(Invited).
 - 12) Yamagishi M, Fujikawa D, Kurokawa N, Soejima A, Takahashi R, Sakai N, Nakagawa S, Nakano K, Kobayashi S, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Uchimaru K, Ogawa S, Watanabe T, "Molecular hallmarks of adult T cell leukemia: miRNA, epigenetics, and emerging signaling abnormalities", 16th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses, Montreal, Canada, June 29(June 26-30), 2013(Oral).
 - 13) 渡邊俊樹、「我が国における HTLV-1/ATL 研究の現状」、大河内メモリアルシンポジウム1:HTLV-1の現状、第61回日本輸血・細胞治療学会総会、パシフィコ横浜、横浜、2013年5月16日(2013年5月16日—5月18日)(招待講演)
 - 14) 渡邊俊樹、「ATLの分子病態を基盤とした新規治療法の可能性」、腫瘍別シンポジウム、第72回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜、横浜、2013年10月3日(2013年10月3日—10月5日)(口演発表)
 - 15) 渡邊俊樹、「ウイルス複製を有利にする HTLV-1 Rex の新たな機能と宿主細胞への影響」、シンポジウム1発癌ウイルス、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場、神戸、2013年11月10日(招待講演)
 - 16) Yamagishi M, Katano H, Nakano K, Ota Y, Hishima T, Okada S, Watanabe T, "Coordinated epigenetic regulation of mRNAs activates simultaneous signaling in malignant lymphoma", 第75回日本血液学会学術集会、ロイトン札幌、札幌、2013年10月11日(口演発表)
 - 17) Kaori Nakayama-Hosoya, Takaomi Ishida, Noriaki Hosoya, Hitomi Nakamura, Michiko Koga, Tomohiko Koibuchi, Aikichi Iwamoto, Ai Kawana-Tachikawa. Low IL-2 expression by epigenetic modification is associated with immunosenescence in HIV non-controllers. *Keystone symposia, HIV Pathogenesis – Virus vs Host*. Banff, Alberta, Canada, Mar 2014.
 - 18) Meribe SC, Hasan Z, Gatanaga H, Miura T, Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A, Oka S, Ueno

- T. Linkage between disease status and a naturally-arising mutation in functional region of HIV-1 Nef. 21th conference on retroviruses and opportunistic infections. Boston, USA. Mar 2014.
- 19) Kawana-Tachikawa A. The 9th China-Japan Laboratory Workshop: Pathogenesis, Gene regulation, and signal transduction. "Interaction between virus and host immune response during chronic HIV-1 infection.", Beijing, China, Nov 2013.
- 20) Kaori Nakayama-Hosoya, Takaomi Ishida, Noriaki Hosoya, Hitomi Nakamura, Michiko Koga, Tomohiko Koibuchi, Aikichi Iwamoto, Ai Kawana-Tachikawa. The essential role of epigenetic regulation for CD4⁺ T cell dysfunction during chronic HIV-1 infection. AIDS Vaccine 2013 Conference. Barcelona, Spain, Oct 2013.
- 21) 立川 (川名) 愛、韓忠勇、清水晃尚、細谷紀彰、中村仁美、古賀道子、鯉渕智彦、岩本愛吉. 重複する CTL エピトープ部位に生じた 1 アミノ酸変異によるエピトープの消滅と出現. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 2013 年 11 月.
- 22) 田中 勇悦, 田中 礼子: CXCR4 架橋による HIV-1 感染と T 細胞活性化の抑制 第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会 熊本 (2013.11.20) .
- 23) Sato, K., Iwami, S., Koyanagi, Y.: Quantification system of HIV replication dynamics in vivo. 1st Annual q-bio Meeting, Honolulu, USA, February, 2013.
- 24) Sato, K., Misawa, N., Satou, Y., Matsuoka, M., Ito, M., Koyanagi, Y.: HIV-1 Vpr accelerates viral replication by exploiting regulatory CD4⁺ T cells in humanized mice. 20th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Atlanta, USA, March, 2013.
- 25) Sato, K., Shibata, J., Izumi, T., Misawa, N., Kobayashi, T., Kimura, Y., Ito, M., Pathak, K.V., Koyanagi, Y.: Differential Impact of HIV-1 G-to-A Hypermutation Induced by APOBEC3G and APOBEC3F in vivo. Retroviruses Meeting Cold Spring Harbor, New York, USA. May, 2013.
- 26) Koyanagi, Y. Intrinsic cellular defenses against retroviruses and DNA viruses. The 12th Awaji International Forum on Infection and Immunity (AIFII 12), Awaji, Japan. September, 2013.
- 27) Sato, K., Takeuchi, J.S., Misawa, N., Izumi, T., Kobayashi, T., Kimura, Y., Iwami, S., Takaori-Kondo, A., Hu W.-S., Aihara, K., Ito, M., An, D.S., Pathak, K.V., Koyanagi, Y.: Restriction and diversification of HIV-1 mediated by APOBEC3-induced G-to-A mutation in humanized mouse model. 4th International Workshop on Humanized mice, Seoul, Korea. September 30-October 2, 2013.
- 28) Kobayashi, T., Sato, K., Misawa, N., Yoshikawa, R., Shibata, J., Kanemura, Y., Fukuhara, M., Okamoto, M., Miyazawa, T., Yasunaga, J., Matsuoka, M., Aihara, K., An, D. S., Ito, M., and Koyanagi, Y.: Assessment of the pathogenic potential of simian retrovirus type 4 in humanized mice model, 4th International Workshop on Humanized Mice, Seoul, Korea, 2013 年 10 月.
- 29) Koyanagi, Y.: Strategy of disrupting latent form of HIV-1 proviral DNA, 14th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, October, 2013.
- 30) Takeuchi, J. S., Sato, K., Iwami, S., Misawa, N., Kobayashi, T., Aihara, K., Koyanagi, Y.: Quantification of HIV cell-free and cell-to-cell transmissions based on experimental-mathematical investigations, 14th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, October, 2013.
- 31) Koyanagi, Y. Misawa N., Sato K., Ebina H.: HIV strategy for acceleration of viral replication in vivo and eradication approach of HIV proviral DNA, Japan-Russia International Workshop, Kyoto, Japan. October, 2013.
- 32) 小柳義夫, Gee Peter, 金村優香. 核酸代謝酵素 SAMHD1 による HSV-1 複製の抑制、第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸. 2013 年 11 月.
- 33) 佐藤佳, 竹内 (柴田) 潤子, 三沢尚子, 泉泰輔, 小林朋子, 木村雄一, 岩見真吾, 高折晃史, Hu, W.-S., 合原一幸, 伊藤守, An, D. S., Pathak, V. K., 小柳義夫. 生体内 HIV-1 増殖過程における APOBEC3G, APOBEC3F 依存的 G→A 変異のウイルス学的意義の解明, 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 2013 年

- 11月.
- 34) 竹内(柴田)潤子, 佐藤佳, 岩見真吾, 三沢尚子, 小林朋子, 合原一幸, 小柳義夫. HIV-1感染における Cell-free 感染と Cell-to-cell 感染の定量的解析, 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 2013 年 11 月.
- 35) Takeuchi, J. S., Sato, K., Iwami, S., Kobayashi, T., Aihara, K., Koyanagi, Y.: Quantification of HIV cell-free and cell-to-cell transmissions based on experimental-mathematical investigations, The 3rd International Symposium on Innovative Mathematical Modelling, Tokyo, 2013 年 11 月.
- 36) Sato, K., Takeuchi, J. S., Izumi, T., Misawa, N., Iwami, S., Kobayashi, T., Kimura, Y., Pathak, V. K., Aihara, K., Koyanagi, Y.: Differential Impact of HIV-1 G-to-A Hypermutation Induced by APOBEC3G and APOBEC3F in vivo, The 3rd International Symposium on Innovative Mathematical Modelling, Tokyo, 2013 年 11 月.
- 37) 蝦名博貴, 三沢尚子, 金村優香, 小柳義夫. ゲノム編集技術による潜伏 HIV プロウイルスの制御と除去, 第 27 回日本エイズ学会学術集会, 熊本. 2013 年 11 月.
- 38) Ebina, H., Misawa, N., Kanemura, Y., Koyanagi, Y.: Development of the CRISPR/Cas9 system editing for latent HIV-1 provirus. 第 36 回日本分子生物学会年会, 神戸. 2013 年 12 月.
- 39) 金村優香, Peter Gee, 蝦名博貴, Yoo Ji Seung, 藤田尚志, 小柳義夫. Novel function of SAMHD1 to involve in regulation of type I interferon induction. 第 36 回日本分子生物学会年会, 神戸. 2013 年 12 月.
- 40) Yamamoto H. Selection of a survival signal-modulating CTL escape mutant precedes SIV neutralizing antibody induction. 12th Awaji International Forum of Infection and Immunity (AIFI12), Hyogo, Japan, September 2013.
- 41) Yamamoto H. & Matano, T. Selection of a survival signal-modulating CTL escape precedes neutralizing antibody induction against highly resistant SIV. Cold Spring Harbor Meeting Harnessing Immunity to Prevent and Treat Disease, New York, USA, November 2013.
- 42) 山本浩之, 俣野哲朗. センダイウイルスベクターを用いたエイズワクチン. 第 17 回日本ワクチン学会学術集会 (シンポジウム 1: ウイルスベクターとワクチン)、津、2013 年 11 月.
- 43) Yamamoto H. Neutralizing antibodies against highly antibody-resistant SIV: protective activity and induction correlates. Weekly Young Investigator's Seminar (WYIS), Univ. Kumamoto, Kumamoto, Japan, February 2014.
- 44) 石田裕樹, 加藤文博, 川岸崇裕, 小林剛, 日紫喜隆行, 三浦智行, 五十嵐樹彦: フィリピンカニクイザルにおけるデングウイルス自然感染, 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 2013 年 11 月 10-12 日.
- 45) 大附寛幸, 丸田泰広, 橋本知恵, 鳴海哲夫, 廣田雄樹, 原田恵嘉, 三浦智行, 吉村和久, 玉村啓和, 松下修三, 五十嵐樹彦: 抗 V3 抗体および低分子 CD4 ミミック曝露後投与によるアカゲザルでの SHIV 複製抑制 第 27 回日本エイズ学会学術集会、熊本、2013 年 11 月 20 日-22 日.
- 46) Stanley M, Kawana-Tachikawa A, Ueno T. Naturally arising amino-acid polymorphisms within functional regions of HIV-1 nef influence viral persistence in vivo. Annual meeting of the Japanese Society for Immunology, Dec 11-13, 2013.
- 47) Stanley M, Hasan Z, Gatanaga H, Miura T, Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A, Oka S, Ueno T. Effects of naturally occurring polymorphisms in functional domains of HIV-1 nef on in vivo disease progression. The 27th Annual meeting of Japanese Society for AIDS Research, Nov 20-22, 2013.
- 48) Mahiti M, Mwimanzani P, Ogata Y, Tokunaga M, Walker BD, Brumme ZL, Brockman MA, Ueno T. Differential modulation of Nef-mediated downregulation activity of HLA-A and B in HIV-1 chronic infection. The 27th Annual meeting of Japanese Society for AIDS Research, Nov 20-22, 2013.
- 49) 豊田真子, Mwimanzani P, Markle TJ, 緒方陽子, Mahiti M, Brumme ZL, Brockman MA, 上野貴将: HIV-1 感染者由来の Nef を用いた機能ドメインの解析, 第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会-熊本、2013 年 11 月 20 日-11 月 22 日
- 50) Mahiti M, Mwimanzani P, Ogata Y, Tokunaga M,

Walker BD, Brumme ZL, Brockman MA, Ueno T. Impact of naturally-occurring HIV-1 polymorphisms on differential modulation of Nef-mediated down-regulation between HLA class I loci. 61st Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Kobe International Conference Center, Kobe, Japan. November 10th-12th, 2013.

- 51) Stanley M, Hasan Z, Gatanaga H, Miura T, Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A, Oka S, Ueno T. Acceleration of disease Progression by a single naturally-arising polymorphism, within functional region of HIV-1 nef. 14th Kumamoto AIDS Seminar, Oct 29-31, 2013.
- 52) Mahiti M, Mwimanzi P, Ogata Y, Tokunaga M, Walker BD, Brumme ZL, Brockman MA, Ueno T. Differential modulation of Nef-mediated downregulation activity of HLA class I alleles in HIV-1 chronic infection. 14th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan. October 29-31, 2013.
- 53) Kamori D, Hasan Z, Gatanaga H, Oka S, Miura T, Iwamoto A, Kawana-Tachikawa A, Ueno T. HLA-A*02 allelic variants differently influence amino acid polymorphisms in an immunodominant epitope of HIV-1 Vpr. 14th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan. October 29-31, 2013.
- 54) Toyoda M, Mwimanzi P, Mahiti M, Walker BD, Brumme ZL, Brockman MA, Ueno T. Analysis of naturally-occurring polymorphisms of HIV-1 Nef that impair CD4 down-regulation activity. 14th Kumamoto AIDS Seminar, Oct 29-31, 2013.
- 55) Mahiti M, Mwimanzi P, Ogata Y, Tokunaga M, Walker BD, Brumme ZL, Brockman MA, Ueno T. Differential Nef-mediated down-regulation of

HLA-A and B in chronic HIV-1 infection. Immune Activation in HIV Infection: Basic Mechanisms and Clinical Implications (D2), [Breckenridge, Colorado USA] April 3-8, 2013.

- 56) Mahiti M, Mwimanzi P, Ogata Y, Tokunaga M, Walker BD, Brumme ZL, Brockman MA, Ueno T. Naturally-arising amino acid polymorphisms of HIV-1 Nef that differentially modulate downregulation of HLA-A and HLA-B molecules. Frontiers of Retrovirology conference, at Churchill College, Cambridge, UK. September 16th -18th 2013.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

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。本群における潜伏 SIV の長期制御に結び付く宿主免疫応答の実態は不明である。本研究では SIV 潜伏感染状態の評価を目的に、SIV 初期制御後の潜伏プロウイルスの安定的な検出を確立し、感染慢性期の配列を解析することで CTL エスケープの様式と病態の相関の評価を試みた。

前年度では、末梢血 CD4 陽性 T 細胞中の SIV 長期制御中のプロウイルス配列は、感染後 2 年の時点でコードする Gag 蛋白に CTL エスケープ変異が蓄積しない群 (A 群) と蓄積する群 (B 群) に二分されることを見出した。本年度は当該群の時系列的な解析を行った結果、A 群と B 群のプロウイルス配列の差は感染後 1 年以降に主に生じることが見出された。CTL エスケープの有無は、感染後 2 年以降の血中ウイルス再出現例の有無と対応した。また制御持続の質を評価する目的で、A 群の 1 頭につき CD8 陽性細胞枯渇実験を行ったところ血中に再出現したウイルスは Gag 特異的 CTL エスケープを蓄積した変異株であり、持続制御中に SIV プロウイルスが存在する分画には変異体が選択されてゆく active reservoir と野生株が主に残存する abortive reservoir の 2 種以上が存在する事が示唆された。

今後は上記結果を踏まえ当該群における IL-7+IL-15 の個体レベルの投与試験を行い、SIV を初期制御・潜伏後に再増殖に至らない形に至らせる手法の探索を行うことを検討する。

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。CTL 主体に初期 SIV 複製制御に至ったアカゲサル群に関し、持続制御期における CTL 応答と潜伏ウイルス中のエスケープ変異の蓄積状況を時系列的に遡って明らかにする。さらに各種の個体レベルでの病態介入実験を行うことで、持続制御の関連因子を明らかにしてゆくことを目標とする。

B. 研究方法

①前年度に着手した、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の更なる検討を行

った。当該群の感染後 2 カ月、及び 1 年時 [血中ウイルスが制御直前、および検出下限 (400 RNA copies/ml plasma) 以下の時期] に遡り、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 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で 1.0×10^6 個の細胞につき DNeasy extraction kit を用い 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。一部個体については、nef 領域の解析も行った。

②各頭の血中ウイルス量に関しては、感染後 2 年以降までの長期フォローアップを行った。

③感染各期の Gag 特異的 CTL 応答のパターンを評価した。手法としては樹立済み自家 B 細胞芽球に当該の Gag エピトープ領域ペプチドを一

定濃度で載せ、評価対象の PBMC とゴルジ体阻害剤 (monensin) 存在下で 6 時間共培養し、抗原特異的な IFN- γ 産生に関し、細胞内サイトカイン染色と CD3/CD4/CD8 表面染色を組み合わせ処理しフローサイトメーターで評価した。

④初年度の評価で SIV 持続制御を示した A 群の 1 個体 (個体番号 Mq3) につき個体レベルでの CD8 枯渇実験を行った。抗 CD8 cM-T807 抗体を、皮下注/静注 2 回/2 週 計 4 回、初回 10mg/kg、2 回目以降 5mg/kg で投与した。その後の SIV 特異的 CTL 応答、及び血中ウイルス RNA の gag 領域配列解析を行った。

(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・承認を得て動物愛護の精神に則って取扱いを行った。

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を行った。前年度では、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 (B 群 5 頭) と蓄積しない群 (A 群 6 頭) に二分されたが、時系列的に遡った結果、感染後 2 カ月では両群とも野生株 Gag が主体であり、感染後 1 年では CTL エスケープ蓄積群の 1 頭に単独の CTL エスケープが検出された以外は全頭で野生株であった (図 1)。また、nef 領域配列を A 群 2 頭の感染 2 年時検体につき解析した結果、当該領域には高度の G-to-A 変異が認められる場合があることが判明した。

2. CTL エスケープの蓄積の有無は、感染後 2 年を過ぎての血中ウイルスの再検出例の有無と対応した (図 2)。

3. 当該の期間中において Gag エピトープ特異的 CTL は B 群において消退傾向を示し、A 群においては比較的維持された。

4. 持続制御が生じていると目された A 群の 1 頭につき、抗 CD8 抗体を用いた CD8 陽性細胞

枯渇実験を施行した。施行後、予定通りに末梢血中より CD8 陽性細胞集団の消失を認めた。それに伴って速やかに血中ウイルスの再出現を認め、同時に SIV 特異的 CTL 応答の広汎化が生じていた。再出現した血中ウイルスの gag 領域塩基配列を解析した結果、それまで野生株であった配列が主要な Gag 特異的 CTL 全てからエスケープを呈した変異体 (Gag L216S, D244E, V375M) の配列に置き換わっていた (図 3)。

D. 考察

SIV 初期制御群は、感染後 2 年時点の末梢血 CD4 陽性 T 細胞中プロウイルスにおける CTL エスケープの有無で層別化されることが昨年度までに明らかになった。本年度はその差異が出現する時期をまず調べた結果、感染後 1 年までは B 群において同様のエスケープの兆候は明らかではなく、それ以降の変化であることが見出された。また、CTL エスケープの有無は以後の病態進行と直接的な連関がある可能性が見出され、それは制御経過中の Gag エピトープ特異的 CTL レベルの推移とよく対応した。

本年度の特徴的な成果として、CD8 枯渇実験時の再出現血中ウイルスの性状が挙げられる。即ち、再出現ウイルスは、感染 2 年次までの制御経過中の野生株プロウイルスと異なり、CTL エスケープ蓄積を来したものであった。

他方、nef 領域に G-to-A 変異を蓄積した A 群個体の持続制御期プロウイルスが、PBMC 刺激培養上清中に RNA 検出を認めなかった例と対応することを併せて考慮すると、

①プロウイルスとして PBMC 中に検出される野生株ウイルスは、(active reservoir ではない) 一種の abortive reservoir に由来する。即ち抗原としての Gag は産生され続けているものの極低レベルである、もしくは特異的 CTL に認識されにくい局所に存在するため、当該の野生株の形で末梢血中を循環している。

②末梢血にリアルタイムにウイルス表現型が反映されない active reservoir 中では、持続感染中に Gag 特異的 CTL エスケープ変異体がすでに優位となっているが、Gag 以外の SIV 特異的 CTL 群によって複製が高度に抑制されている。

以上の 2 要素の組み合わせから成る個体レベルの

SIV 持続制御の図式が考えられた。

E. 結論

SIV 初期制御アカゲサル群にて、長期制御期の末梢血 CD4 陽性 T 細胞中プロウイルス Gag 配列を時系列的に解析した結果、CTL エスケープの蓄積の存否は感染後 1 年以降に生じ、また変異蓄積が生じない A 群でも末梢血に反映されにくい分画で変異蓄積が既に生じている可能性が明らかとなった。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重要な基礎的知見を与えるものである。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shi S, Seki S, Matano T, Yamamoto H. IL-21-producer CD4⁺ T cell kinetics during primary simian immunodeficiency virus infection. *Microbes Infect.* 15:697-707, 2013.
- 2) Nakane T, Nomura T, Shi S, Nakamura M, Naruse TK, Kimura A, Matano T, Yamamoto H. Limited impact of passive non-neutralizing antibody immunization in acute SIV infection on viremia control in rhesus macaques. *PLoS ONE* 8:e73453, 2013.
- 3) Iwamoto N, Takahashi N, Seki Sm Nomura T, Yamamoto H., Inoue M, Shu T, Naruse TK, Kimura A, Matano T. Control of simian immunodeficiency virus replication by vaccine-induced Gag- and Vif-specific CD8⁺ T cells. *J Virol.* 88:425-433, 2014.

2. 学会発表

- 1) Yamamoto H. Selection of a survival signal-modulating CTL escape mutant precedes SIV neutralizing antibody induction. 12th Awaji International Forum of Infection and Immunity (AIFI12), Hyogo, Japan, September 2013.
- 2) Yamamoto H. & Matano, T. Selection of a survival signal-modulating CTL escape mutant precedes neutralizing antibody induction against highly resistant SIV. Cold Spring Harbor Meeting Harnessing Immunity to Prevent and Treat Disease, New York, USA, November 2013.

- 3) 山本浩之、俣野哲朗. センダイウイルスベクターを用いたエイズワクチン. 第 17 回日本ワクチン学会学術集会 (シンポジウム 1: ウイルスベクターとワクチン)、津、2013 年 11 月.
- 4) Yamamoto H. Neutralizing antibodies against highly antibody-resistant SIV: protective activity and induction correlates. Weekly Young Investigator's Seminar (WYIS), Univ. Kumamoto, Kumamoto, Japan, February 2014.

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。

ID/provirus	2mo p.c.	1Y p.c.	2Y p.c.		
Group A	WT	WT	WT		
Mq1	WT	WT	WT		
Mq2	WT	WT	WT		
Mq3	WT	WT	WT		
Mq4	WT	WT	WT		
Mq5	WT	WT	WT		
Mq6	WT	WT	WT		
Group B					
Mq7	WT	WT	L216S	D244E	A373T
Mq8	WT	WT	L216S	V243A D244E	
Mq9	WT	WT	L216S	V243A D244E	
Mq10	WT	WT	D205E L216S	D244E	I247L
Mq11	WT	L216S	L216S V243A		L372F

図 1. SIV 持続制御群における末梢血 CD4 陽性 T 細胞中プロウイルスの *gag* 領域配列解析.

SIV 感染後 2 カ月、1 年、2 年の各ウイルス複製制御期における、対応する Gag 蛋白中に生じた非同義置換を示す。D205E, L216S は $Gag_{206-216}$ 特異的 CTL エスケープ、V243A, D244E, I247L は $Gag_{241-249}$ 特異的 CTL エスケープ、L372F, A373T は $Gag_{373-380}$ 特異的 CTL エスケープをそれぞれ示す。

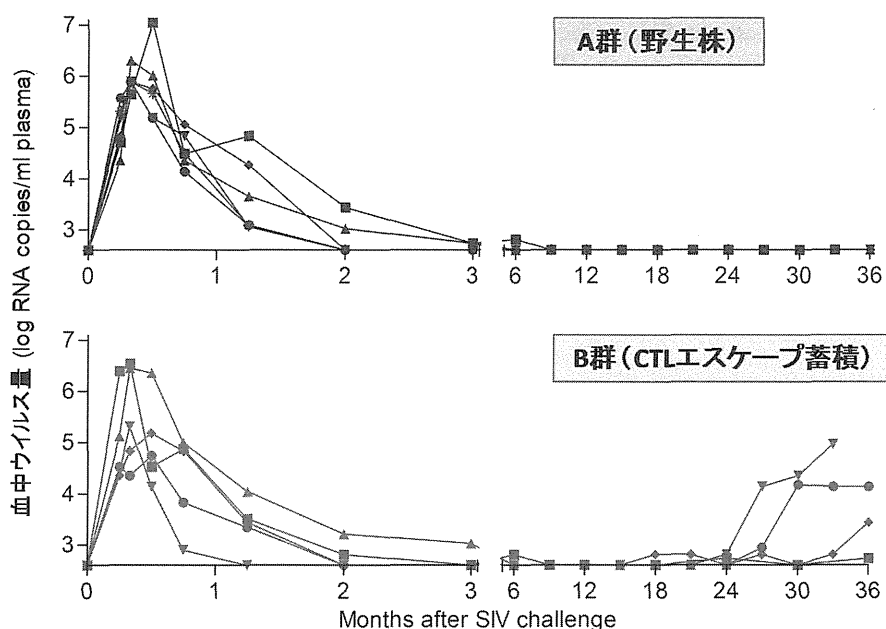
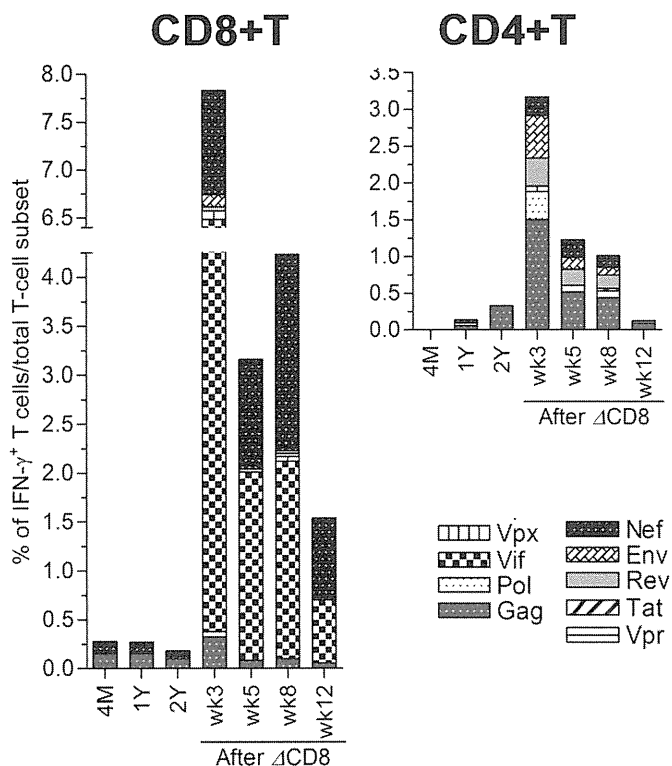


図 2. SIV 持続制御群における血中ウイルス量の解析.

SIV 感染後の血中ウイルス量 (*gag* RNA コピー数/ml 血漿) の経時変化を示す。

A



B

ID/viral RNA	2 wks post-CD8 depletion		
Group A			
Mq3	L216S	D244E	V375M

図 3. SIV 持続制御・A 群(末梢血プロウイルス Gag 配列:野生株)個体 Mq3 における CD8 陽性細胞枯渇試験の解析.

A: CD8 陽性細胞枯渇試験前後の各 SIV 蛋白抗原特異的 CTL レベル(全 CD3 陽性 T 細胞に対する存在比率)を示す。B: CD8 枯渇試験の開始 2 週後に血中に再検出されたウイルス RNA 中の gag 領域変異に対応する Gag 非同義置換の内、代表的なエピトープ特異的 CTL に対するエスケープ変異を示す。

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 を低感受性である事が知られている中国産アカゲザルに昨年度接種した。SIV1A11 は接種後数週間ウイルス血症を誘導したがその後制御された。接種 32 週後に抗 CD8 抗体を投与した所、一過性のウイルス血症及びリンパ節におけるウイルス抗原陽性細胞の出現が観察された。正常サル粘膜組織生検試料から抗原提示細胞の精製を試行したが、収率が低く更に検討を要する。

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事から、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。

・サル感染実験

1. 1×10^7 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。接種 1 週間前に、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。

・ウイルス RNA の定量

経時的に採取した末梢血より血漿を調製、RNA を抽出し、逆転写/リアルタイム PCR により SIV gag 領域を増幅、定量した。

・リンパ球サブセット測定

経時的に採取した末梢血を蛍光標識単クローン抗体 (抗 CD3, CD4, CD8 および CD20) と反応させ、フローサイトメトリーにより解析した。また、生検したリンパ節から細胞浮遊液を調製し、蛍光標識抗体を用いて同様に解析した。

・抗 CD8 抗体処理

ウイルス接種 32 週後に 1 頭の感染サルに抗 CD8 抗体 (M-T087R1, NIH Nonhuman Primate Reagent Resource より入手) 10 mg/kg を麻酔下で皮下投与した。

・腸管組織からの抗原提示細胞の調製

非感染アカゲザルの直腸組織を麻酔下で生検鉗子を用いて採取、キレート剤及び蛋白質分解酵素処理により細胞浮遊液を調製した。更に、抗 CD1b 抗体 (京都大学ウイルス研究所杉田昌彦博士より分与を受けた) 及び磁気ビーズを用いて細胞を精製、フローサイトメトリーにより発現抗原を検索した。

C. 研究結果

・腸管組織からの抗原提示細胞の調製

抗原提示細胞に感染するウイルスの量、ウイルスの存在様式 (持続的複製があるか、プロウイルスとして潜伏しているか) を明らかにする