

201421008A

厚生労働科学研究費補助金
エイズ対策研究事業（エイズ対策実用化研究事業）

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26年度 総括・分担研究報告書

平成27年 3月

研究代表者 横 田 恭 子
(東京工科大学)

厚生労働科学研究費補助金
エイズ対策研究事業（エイズ対策実用化研究事業）

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26年度 総括・分担研究報告書

平成27年3月

研究代表者 横 田 恭 子
(東京工科大学)

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 9
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 15
研究分担者：三浦 智行・五十嵐 樹彦
3. 潜伏感染細胞の同定とその成立機構 19
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 25
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 29
研究分担者：徳永 研三
6. HIV感染細胞の潜伏・再活性化における宿主免疫への抗原提示の
解析 35
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Nefの
機能と免疫活性化における役割 39
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 43
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 47
研究分担者：田中 勇悦

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 東京工科大学 医療保健学部 教授

研究要旨: SIV 初期制御サル群の SIV 持続的制御は、homeostatic proliferation (HSP) 関連因子である IL-7 と IL-15 の効果に影響されなかった。これに関連して、in vitro HSP 培養で維持される静止期ナイーブ CD4 陽性 T 細胞における潜伏感染では、強力な TCR 刺激後静止状態に戻った記憶 CD4 陽性 T 細胞とは異なる LTR 制御を受けていることが示唆された。また、感染初期の潜伏感染集団に注目して CD4 陽性 T 細胞への HIV-1 潜伏化の成立にかかわる分子メカニズムの多様性を明らかにし、新たな再活性化因子を検索する系が確立された。一方、弱毒 SIV の潜伏・再活性化モデルでは、潜伏感染サルの CD8 による抑制を解除した際にリンパ節中の Treg が早期感染標的となる可能性が示唆され、ヒト化マウスの Vif 変異株感染で APOBEC 亜種の異なる機能がもたらすウイルス変異の特徴が明らかにされたことは、初期制御・潜伏後のウイルスの性状やそれに関わる病態解明に向けた重要な基礎的知見である。更に、本研究で HIV 潜伏感染細胞の再活性化に伴う抗原提示動態の解析系が構築され、Nef による免疫活性化と抗ウイルス免疫応答の関連性の一端を明らかにできたこと、I 型 IFN の強力な HIV-1 感染前期抑制に関し、3 種類の IFITM ファミリー蛋白は MX2 と同等の抑制活性を示すものの未知の遺伝子を含む複数の遺伝子が感染抑制に寄与している可能性が示され、静止期の細胞表面 CCR5 や CXCR4 を抗体によって架橋することによる活性化 PBMC の HIV-1 抑制性 β ケモカイン産生誘導と、それによる HIV-1 感染拡大阻止効果が確認されたことは、今後の新たな治療法開発のための有用な基盤を提供するものである。

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 (国立感染症研究所エイズ研究センター・室長)

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・グループ長)

五十嵐樹彦・三浦智行 (京都大学ウイルス研究所・教授・准教授)

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

1) MHC クラス I ハプロタイプ 90-120-Ia 共有 SIVmac239 初期制御群 ($n = 11$) のうち感染 2 年後 SIV 安定制御を示した A 群の 2 個体、および CTL エスケープ変異の蓄積を認めた B 群の 1 個体に IL-7+IL-15 皮下注射 3 回/2 週 計 6 回投与し、PBMC 中の CD4 陽性・CD8 陽性 T 細胞メモリー

分画の変動、SIV 特異的 CTL 応答、血中ウイルス量の測定を行った。(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、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。潜伏感染サルに抗 CD8 抗体 10 mg/kg を麻酔下で皮下投与し、2 日後にリンパ節および直腸バイオプシー検体から細胞を回収して細胞表面マーカーや p27 発現感染細胞をフローサイトメーターで解析した。(三浦) ヒト化マウスモデル

免疫不全マウスにヒト臍帯血由来造血幹細胞を移植した NOJ(横田)あるいは NOG(小柳)マウスを作製した。

CCR5 指向性 HIV-1 (NLCSFV3 株) 野生型、A3G を分解できない変異体 Vif をコードする 4A HIV-1、A3F を分解できない変異体 Vif をコードする 5A HIV-1、両者を分解できない変異体 Vif をコードする 4A5A HIV-1 をそれぞれ作製し、ヒト化マウス NOG に接種して血漿ウイルス RNA 量と血中 CD4 陽性 T 細胞数を経時的に定量した。感染後 6 週齢のマウス脾臓中のプロウイルス DNA 配列と血漿中のウイルス RNA 配列を PCR あるいは RT-PCR 法でそれぞれ解析した。(小柳)

培養系モデル

1) PBMC より CD4 陽性 T 細胞を調製し、GFP を発現する HIV-1_{NL-E} あるいは VSV-psudotype した HIV-1_{NL-E} を感染させた後、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 培養) 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 ウイルスを作製した。CD4 陽性 T 細胞に感染させ、抗 CD3/CD28 抗体で刺激してフローサイトメーターで Venus の発現を解析した。(渡辺)

3) I 型 IFN 関連遺伝子として同定した IFITM1、IFITM2、IFITM3、ISG15 及び RSAD2 と新規蛋白 MX2 の安定発現細胞株あるいは CRISPR/Cas9 による安定ノックアウト THP-1 細胞を作製した。これらの細胞に HIV-1 ルシフェラーゼレポーターウイルスを感染させて感染性の定量を行った。(徳永)

4) HIV 潜伏感染モデル細胞として HLA-A24 恒常発現 ACH-2 細胞株(A24-ACH2)を樹立した。TNF- α で再活性化後、HLA-A*24:02 陽性 HIV 感染者末梢血から樹立した HLA-A*24:02 拘束性 CTL エピトープ特異的 CTL クローンと共培養し、IFN- γ ELISpot assay により IFN- γ 産生細胞数を経時的に定量した。(立川)

5) コントローラーと急性感染者の検体から nef 遺伝子を増幅して配列解析をするとともに、プロウイルスベクターにクローニングして、Nef の機能を解析した。遺伝子系統樹解析や医学統計学的手法で、対照群間での差を解析した。経時的にサンプリングした検体を用いて、個体内での変化を解析した (上野)。

6) PBMC を、mAb を固相化したウエルで 1 日培養し、別に他のウエルで固相化 anti-CD3 抗体で 1 日刺激培養した自家新鮮 PBMC と混合し、その系に R5 型 HIV-1JR-FL を添加して培養した。CCR5 や CXCR4 に対するラット mAb の R5 型 HIV-1 の感染に対する効果を、HIV-1 core p24 を検出するフローサイトメトリーと ELISA で比較検討した。(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) IL-7+IL-15 投与後 7 日目までに全 3 頭で PBMC 中の CD4 陽性及び CD8 陽性 T 細胞中の CD95 陽性 CD28 陽性セントラルメモリー分画が増多し、SIV 特異的 CTL 応答は、21 日目までに応答亢進を示した。感染標的となりうる SIV 蛋白特異的 CD4 陽性 T 細胞応答についても投与開始後 14 日目までに応答亢進を示したが、SIV 特異的 CTL 応答の著明な亢進にも拘わらず血中ウイルス量は検出されなかった。(山本)

2) SIV 1A11 接種中国産アカゲザルにおいてウイルス接種後一過性のウイルス血漿が検出されたが、その後検出限界以下に抑制され、潜伏感染となった。抗 CD8 抗体を投与した所、血中ウイルス RNA 量が投与 3 日以内に 10^4 コピー/ml まで一過性に上昇した。抗体投与直前及に生検したリンパ

節細胞の gag ウイルス抗原陽性細胞 (0.03%) は 2 日後に生検したリンパ節細胞では 0.12% に増加し、SIV 感染 FoxP3 陽性細胞が増加する傾向が観察された。(五十嵐)

ヒト化マウスモデル

1) X4 型と R5 型 HIV-1 に同時感染したヒト化 NOJ マウスにおける R5 型 HIV-1 の CCR5+CD4 陽性 T 細胞への優先的感染についての知見を論文にまとめた。(横田)

2) ヒト化マウスにおいて 4A HIV-1 および 5A HIV-1 の増殖効率は、野生型 HIV-1 に比して有意に低く、5A HIV-1 の増殖効率は、4A HIV-1 に比して有意に低かった。また、4A HIV-1 感染マウスではプロウイルスの GA→AA 変異が、5A HIV-1 と 4A5A HIV-1 感染マウスでは GG→AG 変異が顕著に観察された。興味深いことに、血漿中のウイルス RNA 配列は脾臓のプロウイルス DNA 変異パターンと異なり、4A HIV-1 の多様性は、野生型 HIV-1 および 5A HIV-1 のそれに比べて有意に高く、CXCR4 を補受容体とするウイルスが、4A HIV-1 感染マウスに特徴的に出現していた。(小柳)

培養系モデル

1) 静止期にある CD4 陽性 T 細胞を HIV-1 に感染させ、ナイーブあるいはメモリー T 細胞の恒常性維持に必須の IL-7 と IL-15 を添加して培養する HSP (HomeoStatic Proliferation) 培養系を確立した。この培養で維持されるナイーブ T 細胞は、低レベルの HIV-1 の mRNA を発現するものの、in vitro での TCR 刺激や HDAC 阻害剤による mRNA の増加 (再活性化) は誘導されなかったことから、静止期ナイーブ T 細胞での LTR 制御は強力な TCR 刺激をうけて静止状態に戻ったメモリー CD4 陽性 T 細胞のそれとは異なっていることが示唆された。(横田)

2) 正常 T 細胞においても細胞株を用いた場合と同様に、感染直後に LTR が抑制される集団が存在し、抗原刺激による細胞の活性化によって縮小されるものの、潜伏化集団として残存することがわかった。また EZH2 と HDAC の阻害剤によっても感染初期の潜伏化集団サイズを縮小できるが十分ではないことがわかった。そこで、潜伏化 LTR の再活性化化合物検索のため、Jurkat 細胞に dual-color ウイルスを感染させて感染初期潜伏化細胞を分取し、21 万種類の化合物スクリーニングを開始した。(渡辺)

3) ウイルス複製サイクル前期の HIV-1 に対する IFN の抗ウイルス活性は I 型特異的であり、I 型

IFN 関連遺伝子 (ISG) の一つである IFITM ファミリーは、MX2 と同程度の HIV-1 感染抑制効果を示した。更にこれらの遺伝子をノックアウトした実験から、一部の既知の ISG のみならず、未知の遺伝子も含めた複数の因子が協調して、ウイルス複製サイクルの様々なステップを抑制的に制御している可能性が示唆された。(徳永)

4) 複数の A24-ACH2 クローンを樹立し、バックグラウンドが低くて再活性化後の活性化レベルが高いクローンを選択した。この細胞を TNF- α で再活性化して HLA-A*24:02 拘束性 Nef 特異的 CTL クローンとの共培養を行い、Nef 特異的 CTL クローンへの抗原提示を継時的に解析した。その結果、TNF- α 刺激 6 時間以内で IFN- γ 産生細胞が出現し、24 時間後まで徐々に増加していた。(立川)

5) 急性感染後にコントローラーとなる 10 名 (AC) と、同じ地域の急性病態進行者 50 名の検体由来 HIV-1 Nef 遺伝子を増幅して Nef の特徴的な機能である、ウイルス感染性の増強作用、HLA クラス I (HLA-I) および CD4 の発現抑制作用について解析した。AC 群由来の Nef では、3 つとも顕著に減弱化していた。また、AC においてのみ HLA-I 発現抑制機能が経時的に減弱化していた。1 年後のウイルス量が著しく低下した検体の Nef の変異と機能との関連を解析し、4 つの変異を同定すると、全て感染者の持つ HLA アリルに相関していた。更に、4 つの変異が組み合わさった時のみ顕著な Nef の機能低下を認め、蛋白質量も著しく低下していた。(上野)

6) CCR5 抗体の一種類と CXCR4 抗体 4 種類全てが加えた活性化 PBMC における R5 型 HIV-1 の感染を著明に抑制し、R5 型 HIV-1 抑制に関与する β ケモカイン 3 種に対する中和抗体を添加することにより、抑制が解除された。従って、直接 R5 型 HIV-1 のケモカイン受容体中和サイトに結合しない抗体でも、静止期の PBMC の CCR5 や CXCR4 を架橋することにより β ケモカインが産生され、結果として R5 型 HIV-1 感染を抑制することが可能であることが明らかとなった。(田中)

D. 考察

SIV 初期制御群 3 頭に IL-7+IL-15 を投与した結果、SIV 特異的 CD4 陽性 T 細胞応答の亢進が投与開始後 14 日目まで、SIV 特異的 CTL 応答の全体的な亢進が投与開始後 21 日目までにおきていた一方で、CD8 枯渇試験で生じたような血中ウイルス

出現は認めなかった。これには、近年報告された B 細胞濾胞中の CD4 陽性 T_{FH} 細胞が組織学的に CTL に対する聖域として SIV 潜伏感染している (Fukazawa Y et al., Nat Med 2015) という知見を考慮すると、個体レベルで潜伏する SIV の再増殖に CTL 応答が即時対応して血中ウイルス量が検出不能なレベルで推移した可能性が高い。SIV 1A11 の感染は、一過性のウイルス血症の後制御されて潜伏感染となり、抗 CD8 抗体処理による「抑制解除」に再活性化したことから、恐らく全身性にウイルスの再活性化は起こっていると考えられるが、このモデルでサル個体に存在する感染細胞の存在部位や感染細胞の性状については更に詳細に検討する予定である。

本研究で、HSP 培養維持された静止期にある naïve T 細胞での潜伏感染は、一度 TCR を受けたメモリー・エフェクター細胞とは異なる未知の制御を受けていることが示唆された。最近同定された Stem cell memory T 細胞 (Buzon et al., Nat. Med. 20:139, 2014) は、naïve T 細胞に類似した表現型の T 細胞亜集団であるが、HIV 感染者においてはメモリー T 細胞と比較して低頻度ながら長期にわたり存続し、再活性化が困難な潜伏感染細胞集団であることが示唆されている (Jaafoura ら、Nat. Comm., 5:5407, 2014)。このようなプロウイルスを持つナイーブ様の細胞が生体内のどのような条件で再活性化しうるのか、あるいはまったく silent なまま経過するのか、今後分子レベルで解析していく必要がある。同様に、従来は潜伏化したメモリー T 細胞の活性化と HDAC の阻害が有効であるとされてきたのに対し、潜伏化集団を可視化すると、正常細胞においても非常に多くの潜伏感染の残存し、現在使用できる阻害剤ではこれらの潜伏感染ウイルスの完全な除去には至らないことが明らかとなった。今後、感染初期に成立する潜伏感染集団に注目して新たな分子メカニズムを検討し、HIV-1 潜伏化制御に取り組む必要がある。また、A24-ACH2 潜伏感染モデル細胞による抗原提示動態の解析系において、早期タンパク質である Nef に由来するエピトープは速やかに抗原提示されることが示された。この系は、生体内の潜伏感染細胞が再活性化されるプロセスにおける CTL による抗原認識と機能発現の動態を解析するための重要な手法となると期待される。Nef に関しては、その機能と細胞性免疫応答がウイルス感染制御に関わるとともに、逃避変異の選択を通

じて免疫活性化に影響することが HIV-1 感染者のコホートで明らかになっており、病態を理解する上で重要な知見である。

治療法開発のための基盤として、ISG 遺伝子の安定発現細胞の樹立が可能となり、MX2 と三種類の IFITM ファミリー蛋白が HIV-1 に対して最も強い抑制活性を示すことが明確になった。しかしながら、各遺伝子のノックアウトの結果から、HIV 抑制に関与する ISG 関連細胞因子はまだ多数存在することが示唆され、今後も未知の因子を検索することは意味がある。また、CCR5 または CXCR4 に対する mAb で架橋培養すると、 β ケモカインの産生誘導により共存する活性化 PBMC に対する R5 HIV-1 感染が強く抑制されることから、再活性化因子とこれら抗体の併用は次におこりうる感染の拡大を防ぐために有用かもしれない。

E. 結論

SIV 初期制御アカゲサル群の SIV 持続的制御は、抗 CD8 抗体投与と異なり、homeostatic proliferation (HSP) 関連因子である IL-7 と IL-15 の効果に影響されなかった。これに関連して、in vitro HSP 培養で維持される静止期ナイーブ CD4 陽性 T 細胞における潜伏感染では、強力な TCR 刺激後静止状態に戻った記憶 CD4 陽性 T 細胞とは異なる LTR 制御を受けていることが示唆された。また、感染初期の潜伏感染集団に注目して CD4 陽性 T 細胞への HIV-1 潜伏化の成立にかかわる分子メカニズムの多様性を明らかになり、新たな再活性化因子を検索する系が確立された。一方、弱毒 SIV の潜伏・再活性化モデルでは、潜伏感染サルに抗 CD8 抗体を投与して CD8 による抑制を解除した際にリンパ節中の Treg が早期感染標的となる可能性が示唆され、ヒト化マウスの Vif 変異株感染で APOBEC 亜種の異なる機能がもたらすウイルス変異の特徴が明らかにされたことは、初期制御・潜伏後のウイルスの性状やそれに関わる病態解明に向けた重要な基礎的知見であると思われる。更に、本研究で HIV 潜伏感染細胞の再活性化に伴う抗原提示動態の解析系が構築され、Nef による免疫活性化と抗ウイルス免疫応答の関連性の一端を明らかにできたこと、I 型 IFN の強力な HIV-1 感染前期抑制を担う ISG 遺伝子について解析し、3 種類の IFITM ファミリー蛋白が既知の MX2 と同等の抑制活性を示すものの、未知の遺伝子を含

む複数の遺伝子が感染抑制に寄与している可能性が示されたこと、静止期の細胞表面 CCR5 や CXCR4 を抗体によって架橋することによる活性化 PBMC の HIV-1 抑制性 β ケモカイン産生誘導と、それによる HIV-1 感染拡大阻止効果が確認されたことは、今後の新たな治療法開発のための有用な基盤を提供するものである。

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., Okada, S., Kobayashi-Ishihara, M., Ato, M., and Tsunetsugu-Yokota, Y.; Humanized mice dually challenged with R5 and X4 HIV-1 show preferential R5 viremia and restricted X4 infection of CCR5⁺CD4⁺ T cells. *Microb. Infect.* 2015, in press.
- 2) Terahara, K., Ishii, H., Nomura, T., Takahashi, N., Takeda, A., Shiino, T., Tsunetsugu-Yokota, Y. and Matano, T. Vaccine-induced CD107a⁺ CD4⁺ T cells are resistant to depletion following AIDS virus infection. *J. Virol.*, 88: 14232-40, 2014.
- 3) Zhou, D., Wang, Y., Tokunaga, K., Huang, F., Sun B, Yang, R.: The HIV-1 accessory protein Vpr induces the degradation of the anti-HIV-1 agent APOBEC3G through a VprBP-mediated proteasomal pathway. *Virus Res.* 195:25-34, 2015.
- 4) Kikuchi, T., Iwabu, Y., Tada, T., Kawana-Tachikawa, A., Koga, M., Hosoya, N., Nomura, S., Brumme, Z.L., Jessen, H., Pereyra, F., Piechocka-Trocha, A., Walker, B.D., Iwamoto, A., Tokunaga, K (co-corresponding author), Miura, T.: Anti-APOBEC3G activity of HIV-1 Vif protein is attenuated in elite controllers. *J. Virol.* 2015, in press.
- 5) Matsuda Y, Kobayashi-Ishihara M, Fujikawa D, Ishida T, Watanabe T, Yamagishi M. Epigenetic Heterogeneity in HIV-1 Latency Establishment. *Sci. Rep.* 5:7701, Jan. 2015 (doi: 10.1038/srep07701).
- 6) Nakayama-Hosoya K, Ishida T, Youngblood B, Nakamura H, Hosoya N, Koga M, Koibuchi T, Iwamoto A, Kawana-Tachikawa A. Epigenetic repression of interleukin-2 expression in senescent CD4⁺ T cells during chronic human immunodeficiency virus type-1 infection. *J Infect Dis.* 211:28-39, 2015.
- 7) Han C, Kawana-Tachikawa A, Shimizu A, Zhu D, Nakamura H, Adachi E, Kikuchi T, Koga M, Koibuchi T, Gao GF, Sato Y, Yamagata A, Martin E, Fukai S, Brumme ZL, Iwamoto A. Switching and emergence of CTL epitopes in HIV-1 infection. *Retrovirology.* 11:38, 2014.
- 8) 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, V.K., Koyanagi, Y. APOBEC3D and APOBEC3F potently promote HIV-1 diversification and evolution in humanized mouse model. *PLOS Pathog.* 10:e1004453, 2014.
- 9) Ebina, H., Kanemura, Y., Misawa, N., Sakuma, T., Kobayashi, T., Yamamoto, T., Koyanagi, Y. A high excision potential of TALENs for integrated DNA of HIV-based lentiviral vector. *PLoS One*, 2015, in press.
- 10) Nomura T, Yamamoto H, Takahashi N, Naruse TK, Kimura A, Matano T. Identification of SIV Nef CD8(+) T cell epitopes restricted by a MHC class I haplotype associated with lower viral loads in a macaque AIDS model. *Biochem Biophys Res Commun* 450:942-947, 2014.
- 11) Otsuki, H., Yoneda, M., Igarashi, T., and Miura, T.: Generation of a monkey-tropic human immunodeficiency virus type 1 carrying env from a CCR5-tropic subtype C clinical isolate. *Virology*, 460-461: 1-10, 2014.
- 12) Adachi, A. and Miura, T.: Animal model studies on viral infections. *Frontiers in Microbiology*, 5: Article 672, 2014.
- 13) 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* 16: 320-327, 2014.
- 14) Kuang X, Li X, Anmole G, Mwimanzi P, Shahid A, Le A, Chong L, Qian H, Miura T, Markle T, Baraki B, Connick E, Daar E, Jessen H, Kelleher A, Little S, Markowitz M, Pereyra F, Rosenberg E, Walker B, * Ueno T, *Brumme Z, *Brockman M.

- Impaired Nef function is associated with early control of HIV-1 viremia. *J Virol* 88, 10200-10213, 2014 *co-senior authors.
- 15) Motozono C, Bridgeman J, Price D, Sewell A, Ueno T. Clonotypically similar hybrid $\alpha\beta$ TCRs can exhibit markedly different surface expression, antigen specificity and cross-reactivity. *Clinic Exp Immunol*, 2015 in press.
2. 学会発表
- 1) 池野翔太、寺原和孝、石毛真行、駒瀬勝啓、竹田誠、森川裕子、竹山春子、横田(恒次)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(3)」第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月。
- 2) 和田倭、小林(石原)美栄、寺原和孝、池野翔太、徳永研三、川名(立川)愛、山岸誠、竹山春子、横田(恒次)恭子「恒常的に培養維持されたCD4陽性T細胞へのHIV-1の感染とその転写制御機構の解明」第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月。
- 3) 寺原和孝、石毛真行、池野翔太、小林(石原)美栄、岡田誠治、横田(恒次)恭子「R5・X4 HIV-1混在感染ヒト化マウスの感染早期にみられるR5ウイルス優位性とその要因について」第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月。
- 4) Shota Ikeno, Kazutaka Terahara, Yasuko Tsunetsugu-Yokota 「Induction of human cytokines in humanized mice improves dendritic cell development and antigen-specific antibody production」第43回日本免疫学会学術集会、京都、2014年12月。
- 5) 多田卓哉、張延昭、小山貴芳、山岡昇司、藤田英明、徳永研三：新規抗ウイルス宿主因子 MARCH8 による HIV-1 感染抑制機構の解明. 第 62 回日本ウイルス学会総会、横浜、2014 年 11 月。
- 6) 張延昭、多田卓哉、山岡昇司、徳永研三：HIV-1 複製前期の抑制に関わる IFN 誘導性抗ウイルス宿主因子群の解析. 第 62 回日本ウイルス学会総会、横浜、2014 年 11 月。
- 7) 多田卓哉、張延昭、小山貴芳、山岡昇司、藤田英明、徳永研三：新規宿主因子 MARCH8 は HIV-1 のエントリーを阻害する. 第 28 回日本エイズ学会、大阪、2014 年 12 月。
- 8) Tada, T., Zhang, Y., Koyama, T., Yamaoka, S., Fujita, H., and Tokunaga, K (speaker): Novel restriction factor MARCH8 blocks HIV-1 replication. XX International AIDS Conference, Melbourne, Australia, 2014. 7. (Late breaker's oral abstract).
- 9) 山岸誠、松田有加、小林(石原)美栄、藤川大、石田尚臣、渡邊俊樹、「HIV-1 潜伏化の不均一性とその分子メカニズムの解析」、第 62 回日本ウイルス学会学術総会、横浜、2014 年 11 月。
- 10) Kawana-Tachikawa A. Disruption of T cell immunity during chronic HIV-1 infection. The 21st East Asia Joint Symposium on Biomedical Research. Seoul, Korea. Jul 2014.
- 11) Hirao M, Suzuki K, Kawana-Tachikawa A, Nakauchi H, Cooper DA, Kelleher AD, Kaneko S. Proposal of new immune cell source for HIV-1 infection study based on iPSCs and evaluation of impact of viral replication in iPSCs-derived macrophage expressing shRNAs targeting HIV-1 promoter. 20th International AIDS Conference, Melbourne, Australia, Jul 2014.
- 12) 細谷(中山)香、石田尚臣、中村仁美、細谷紀彰、古賀道子、鯉渕智彦、岩本愛吉、立川(川名)愛：HIV-1 感染における CD4 陽性 T 細胞の IL2 遺伝子発現低下分子メカニズムの解明. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月。
- 13) 佐藤秀憲、細谷(中山)香、菊地正、安達英輔、古賀道子、中村仁美、鯉渕智彦、岩本愛吉、立川(川名)愛：HIV 感染者の CD8 陽性 T 細胞における補助刺激分子 OX40 の検討. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月。
- 14) 石坂彩、佐藤秀憲、立川(川名)愛、中村仁美、古賀道子、細谷紀彰、鯉渕智彦、野本明男、岩本愛吉、水谷壮利：HIV-1 残存感染細胞の活性と免疫活性化の相関. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月。
- 15) 田中勇悦、田中礼子：HIV-1 co-receptor (CXCR4, CCR5) 架橋を介した R5 HIV-1 感染制御. 第 28 回日本エイズ学会、大阪、2014 年 12 月。
- 16) Sato, K., Shibata, J., Izumi, T., Misawa, N., Kobayashi, T., Kimura, Y., Ito, M., Pathak, V. K.,

- Koyanagi, Y. APOBEC3F potently promotes HIV-1 diversification and evolution in humanized mouse model, Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Retroviruses, New York, USA, May, 2014.
- 17) Koyanagi, Y., Sato, K., Conflicts and benefits between primate lentiviruses and host restriction factors, 15th Kumamoto AIDS Seminar (invited), Kumamoto, Japan, October, 2014.
- 18) 佐藤佳, 竹内(柴田)潤子, 小林朋子, 三沢尚子, 山田英里, 中野雄介, 吉川禄助, 小柳義夫. ヒト化マウスモデルを用いたエイズウイルス適応進化メカニズムの解明, 第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月。
- 19) Yamamoto H. *In vivo* determinants of SIV neutralizing antibody induction. 15th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, October 2014.
- 20) Saito, A., Matsuoka, K., Ode, H., Otsuki, H., Yoshida, T., Iwatani, Y., Sugiura, W., Matano, T., Miura, T., and Akari, H.: A novel HIV-1mt encoding CCR5-tropic Env established persistent infection in *Cynomolgus* macaques. 2014 Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Boston, March 3-6, 2014.
- 21) 三浦智行、米田舞、大附寛幸、松下修三、日紫喜隆行、五十嵐樹彦: 新規 CCR5 指向性 SHIV のサルへの順化と中和抗体抵抗性の解析、第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月。
- 22) 渡部祐司、岩見真吾、森ひろみ、松浦嘉奈子、石田裕樹、日紫喜隆行、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は感染リンパ球と同程度の半減期を示す、第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月。
- 23) Mahiti M, Jia X, Toyoda M, Mwimanzi F, Walker BD, Brumme ZL, Brockman MA, Xiong Y, Ueno T. Differential down-regulation of the HLA class I allotypes by HIV-1 Nef primary isolate. The annual Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI). Seattle, Washington, USA Feb 23-26, 2015,
- 24) Mahiti M, M. Toyoda M, Mwimanzi F, Walker BD, Brumme ZL, Brockman MA, Ueno T. HIV-1 Nef differentially recognizes the cytoplasmic tails of HLA-A and HLA-B molecules for down-regulation. The 43rd Annual Meeting for Japanese Society of the Immunology. Kyoto, Japan, Dec 10-12, 2014.
- 25) Mahiti M, Toyoda M, Mwimanzi F, Walker BD, Brumme ZL, Brockman MA. Ueno T. Naturally-isolated HIV-1 Nef differentially recognize the cytoplasmic tails of HLA-A and HLA-B molecules for down-regulation. 15th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan. Oct 01-03, 2014.
- 26) Mahiti M, Toyoda M, Mwimanzi F, Walker BD, Brumme ZL, Brockman MA. Ueno T. Natural variability of HIV-1 Nef responsible for selective recognition of the HLA-A over HLA-B molecules for down-regulation. 16th Hakuba Symposium, Kumamoto, Japan. Jun 13-14, 2014.

Ⅱ. 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・グループ長

研究要旨：

SIV 感染サルエイズモデルにおいて、CTL 主体の初期 SIV 制御を示す動物群が同定された。長期制御を担う応答解明のため、プロウイルス検出系を確立して配列を解析し、*in vivo* 介入実験を加え CTL エスケープと病態の相関評価を試みた。

当該群は、末梢血 CD4 陽性 T 細胞中 SIV プロウイルス配列中 Gag 特異的 CTL エスケープ変異蓄積の有無で二分された。変異蓄積は制御喪失と対応した。CD8 枯渇試験により、プロウイルス残存分画として、変異体選択が生じる active なものと野生株が残る abortive なものの 2 種が示唆された。

本年度は、T 細胞の homeostatic proliferation (HSP) 関連刺激が SIV 増殖を促進し制御破綻を促す可能性を考え、IL-7+IL-15 投与試験を行った。SIV 特異的 CTL・CD4 陽性 T 細胞応答の促進を認めたが、ウイルス再出現は認めなかった。以上から、高度の CTL 応答存在下でもエスケープ変異の選択の場が T 細胞 HSP 非依存的に存在し、当該領域外のウイルス複製の阻止が、SIV 初期制御・潜伏後に再増殖に至らない条件として示唆された。

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。

手法としては、CTL 応答を主体に初期 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。

平成 24-25 年度は当該群の末梢中プロウイルス中の Gag 特異的 CTL エスケープ変異蓄積パターンの時系列の解析を主に行い、感染後 1 年以降 2 年目までに病態が 2 群に大別されることを明らかにした。これに続いて平成 25-26 年度は、個体レベルの病態介入実験（CD8 枯渇試験・IL-7+IL-15 投与試験）に重点をおいて研究を進め

た。

B. 研究方法

過去 2 年間に扱った、MHC クラス I ハプロタイプ 90-120-Ia 共有・SIV_{mac239} 初期制御群 ($n=11$) を引き続き研究対象として次の試験を行った。

①初年度の評価で感染後 2 年時点にて SIV 安定制御を示した A 群の 2 個体（個体番号 Mq1, Mq2）、および CTL エスケープ変異の蓄積（制御喪失）を認めた B 群の 1 個体（個体番号 Mq9）につき個体レベルでの IL-7+IL-15 投与試験を行った。

具体的には、感染後 2 年以降の Mq1（感染後 221 週）、Mq2（同 140 週）、Mq9（同 206 週）に対し、IL-7+IL-15 皮下注射 3 回/2 週 計 6 回、クール毎に初回 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、2 回目・3 回目 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ で投与した。

②上記開始後、末梢血単核球（PBMC）における CD4 陽性・CD8 陽性 T 細胞メモリー分画の変動、SIV 特異的 CTL 応答、血中ウイルス量の測定を主として 7 日毎に介入開始後 35-42 日の

安楽殺時まで評価を行った。

③手法としては、樹立済み自家B細胞芽球に(1)各蛋白領域をカバーするオーバーラッピングペプチドを一定濃度で載せ、あるいは(2) VSV シュードタイプ SIV を 72 時間感染させてから、評価対象の PBMC とゴルジ体阻害剤存在下で 6 時間共培養し、抗原特異的な IFN- γ 産生の細胞内染色と CD3/CD4/CD8/CD28/CD95 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。

(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

IL-7+IL-15 投与試験により、次の結果を得た。

1. 投与後 7 日目 (クール 1 終了時) までに全 3 頭で、PBMC 中の CD4 陽性及び CD8 陽性 T 細胞中の CD95 陽性 CD28 陽性セントラルメモリー分画が増多した (図 1)。

2. VSV シュードタイプ SIV 特異的 CTL 応答は、全 3 頭につき投与開始後 21 日目 (クール 2 終了後 7 日) までに 3 倍-4 倍の応答亢進を示した (図 2 上段)。

3. SIV 各蛋白特異的 CTL 応答は、全頭で 21 日目にピーク値を示し、Mq1 で約 1.7 倍、Mq2 及び Mq9 で約 3 倍の全応答亢進を認めた (図 2 下段)。

4. 感染分画となりうる SIV 特異的各蛋白 CD4 陽性 T 細胞応答についても評価した結果、全 3 頭につき投与開始後 14 日目までに 1.5 倍-2 倍の応答亢進を示した (図 3)。

5. 血中ウイルス量については、(制御喪失と相関傾向にある) SIV 特異的 CTL 応答の著明な亢進を来したにも拘わらず再検出を認めることはなかった。

D. 考察

高度のウイルス特異的 CTL 応答を主徴とした SIV 初期制御群は、感染後 1 年以降 2 年時点までの末梢血 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 2 群に層別化されることを昨年度までに明らかにした。本年度はその両群から利用可能であった計 3 頭につき、T 細胞集団のターンオーバー (homeostatic proliferation) に関与する因子が個体レベル潜伏下のウイルス複製を促進する可能性を検討するため、IL-7+IL-15 の投与試験を行った。

結果、IL-7+IL-15 投与により SIV 特異的 CTL 応答の全体的な亢進が投与開始後 21 日目までに生じる事を示した。この際に応答レパトワの著明な変化はなく、SIV 特異的 CD4 陽性 T 細胞応答の亢進を全頭で投与開始後 14 日目までに伴うものであった。この結果からは、直接的にはウイルス感染分画を含む SIV 特異的 CD4 陽性 T 細胞の増多による抗原刺激活性化と、それに直後に対応する SIV 特異的 CTL 応答の亢進が推察される。しかしその一方で、CD8 枯渇試験で生じたような血中ウイルス出現は認めなかった。この結果からは、次の 2 通りの可能性が考えられる。

①個体レベルで (二次リンパ節などに) active reservoir に潜伏する SIV につき増殖の亢進が認められ、それに対し反応性に CTL 応答が生じた結果、血中ウイルス量が検出不能なレベルで推移した。

②IL-7+IL-15 が刺激を呈した SIV 感染細胞の対象が abortive reservoir のみに留まり、そもそも SIV 複製が再度生じる可能性が限定されていた。上記に関連して、近年他のグループより、B 細胞濾胞中の CD4 陽性 T 細胞が組織学的な意味での初期制御下の SIV 潜伏感染細胞となっている (Fukazawa Y et al., Nat Med 2015) ことが報告されている。濾胞 CD4 陽性 T 細胞は、表面抗原の表現型として IL-7, IL-15 に対して不応性であることがこれまでに認められていないのを鑑みると、②は否定的であり、①またはそれに準じた可能性が有力と思われる。

また今回の実験結果と対照的に、SIV 感染急性期に IL-7 を個体内投与した際には血中ウイルス量の増加傾向が認められるという結果が報

告されている (Vassena L et al., PLoS Pathogens 2012)。同様に、予防ワクチン接種後 SIV 感染初期の IL-15 投与が CD4 陽性 T 細胞増殖をともなってセットポイントウイルス量削減の規模を減少させるという報告も過去に存在する (Hryniewicz A et al., J Immunol 2007)。

SIV 初期制御下で認めた IL-7+IL-15 投与の作用はこれらとは逆の、病態制御に対して促進的な役割を果たす可能性もある。他方、今回の投与量・期間では示さなかった形で、当初予想した持続制御の破綻の方向に IL-7+IL-15 が作用する可能性もあり、今後の追加評価が期待される。また今後の解析対象として、IL-7+IL-15 投与試験中の SIV プロウイルス配列などが考えられる。

E. 結論

SIV 初期制御アカゲサル群において、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 エスケープの感染後 1 年以降 2 年目までの蓄積の有無で病態が大別されることが判明し、さらに変異蓄積を認めない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示唆された。本年度の結果から、このような SIV 持続制御は、これまで考えられているのとは異なり、homeostatic proliferation 関連因子の存在により急速に促進されるものではないことも示唆された。これらの結果より本研究は、初期制御・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) Nomura T, Yamamoto H, Takahashi N, Naruse TK, Kimura A, Matano T. Identification of SIV Nef CD8(+) T cell epitopes restricted by a MHC class I haplotype associated with lower viral loads in a macaque AIDS model. *Biochem*

Biophys Res Commun 450:942-947, 2014.

2. 学会発表

- 1) Yamamoto H. *In vivo* determinants of SIV neutralizing antibody induction. 15th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, October 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。

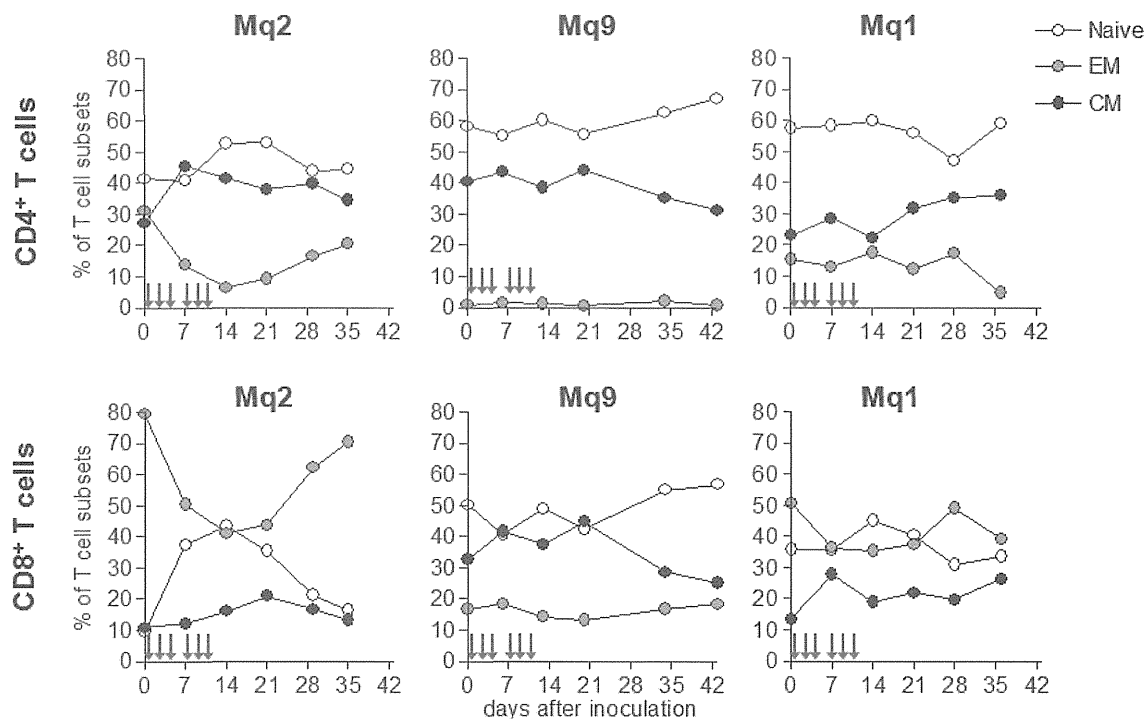


図 1. SIV 持続制御個体における IL-7+IL-15 投与試験時の末梢血中 T 細胞分画の推移

MHC クラス I ハプロタイプ *90-120-1a* 共有・SIV_{mac239} 初期制御個体の持続制御期(感染後 2 年以降)における、個体レベルの IL-7+IL-15 投与試験の結果。Mq1, Mq2 は A 群(感染後 2 年時点で末梢血 CD4 陽性 T 細胞中 Gag プロウイルスの CTL エスケープ蓄積陰性)、Mq9 は B 群(感染後 2 年時点で末梢血 CD4 陽性 T 細胞中 Gag プロウイルスの CTL エスケープ蓄積陽性)に由来する。Naïve: CD28+CD95-, CM (central memory): CD28+CD95+, EM (effector memory): CD28-CD95+ でゲーティングした結果の、全 CD4 陽性 T 細胞(上段)・CD8 陽性 T 細胞(下段)に対する百分率を経時的に示す。

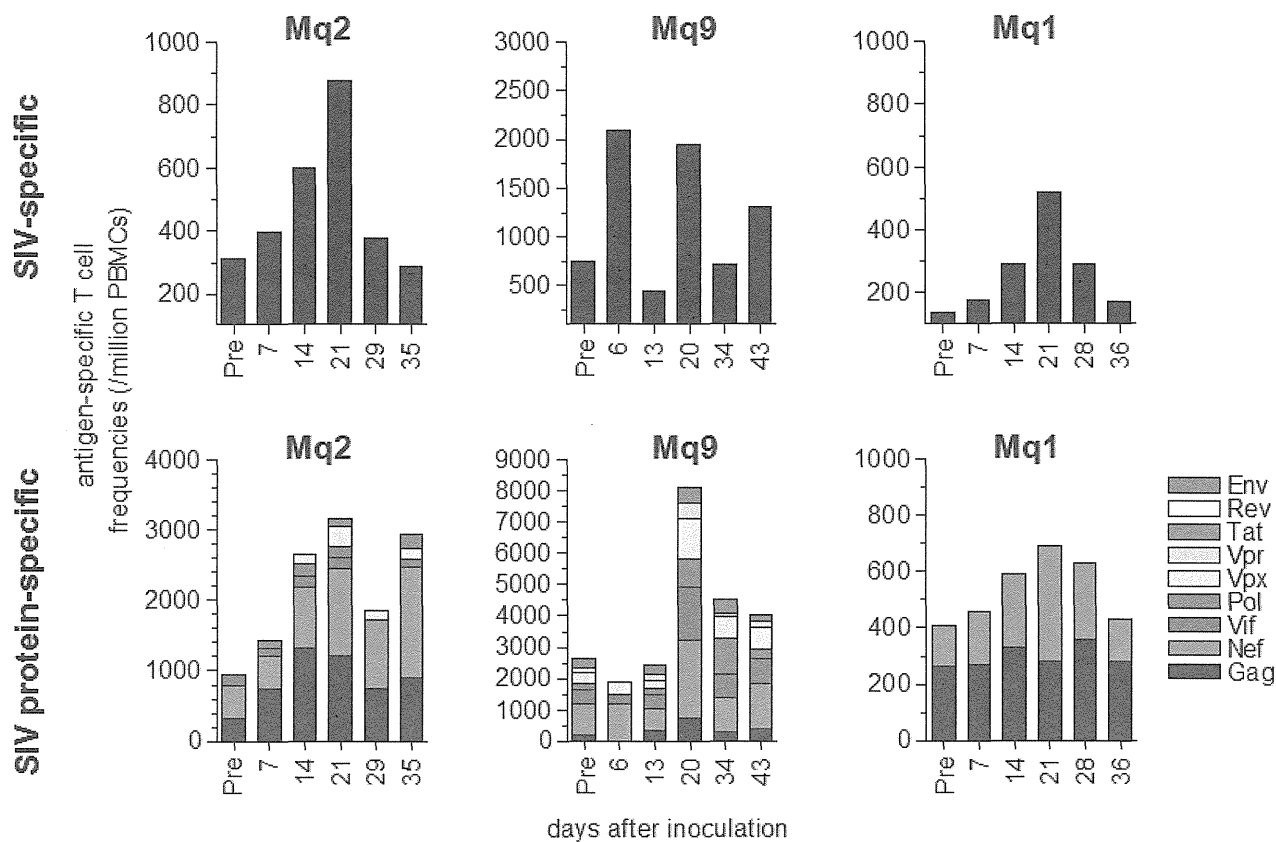


図 2. SIV 持続制御個体における IL-7+IL-15 投与後のウイルス特異的 CTL 応答

VSV-G でシュードタイプした SIV(上段)、SIV 各蛋白特異的ペプチドプール(下段)で PBMC を特異刺激した時の応答の経時変化を示す。

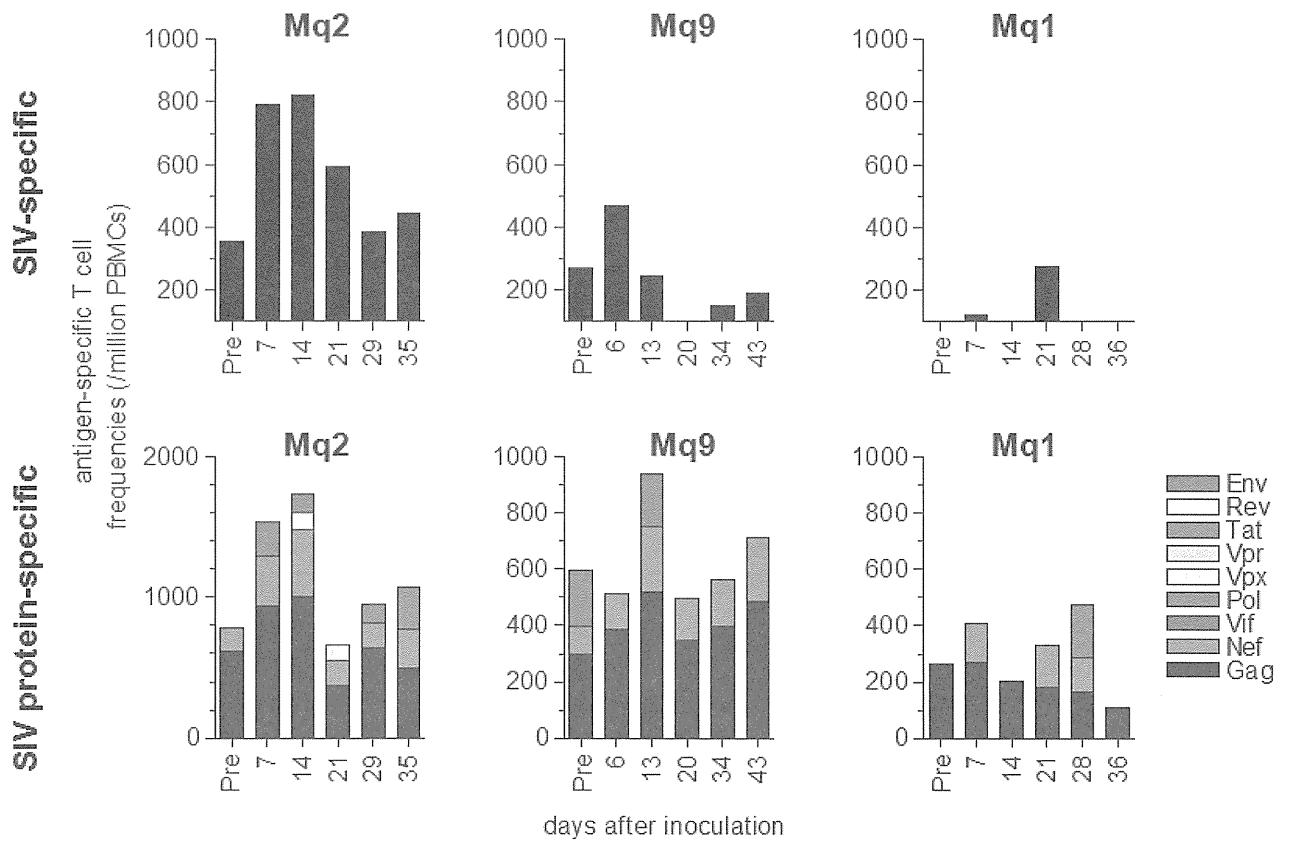


図 3. SIV 持続制御個体における IL-7+IL-15 投与後のウイルス特異的 CD4 陽性 T 細胞応答

VSV-G でシュードタイプした SIV (上段)、SIV 各蛋白特異的ペプチドプール (下段) で PBMC を特異刺激した時の応答の経時変化を示す。

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 京都大学ウイルス研究所 教授
研究分担者 三浦 智行 京都大学ウイルス研究所 准教授

研究要旨：

SIV/アカゲザル潜伏・再活性化モデルを確立し解析した結果、潜伏感染個体内で CD8 による抑制を解除した場合に、いち早くウイルスが増殖する細胞はリンパ節中の Treg である可能性が示唆された。

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、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

1.1×10⁷TCID₅₀ 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種々の蛍光標識単クローン抗体（抗 CD3, CD4, CD8 および CD20 等）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

ウイルス接種数週間後に感染サルに抗 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。

（倫理面への配慮）

動物実験に当たっては、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」に基づいた「京都大学における動物実験の実施に関する規定」を遵守する。当施設におけるアカゲザルの飼養については、「特定外来生物による生態系等に係わる被害の防止に関する法律」の規定に基づき、環境大臣より許可を受けている。また、「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」の輸入禁止地域等を定める省令に基づき輸入サル飼育施設の指定を受けている。「動物の愛護及び管理に関する法律」も遵守する。

C. 研究結果

SIV 1A11 接種中国産アカゲザルにおいてウイルス接種後一過性のウイルス血漿が検出されたが、その後検出限界 (200 コピー/ml) 以下に抑制され、潜伏感染となった。CD4 陽性および CD8 陽性リンパ球サブセットはウイルス感染によって変動しなかった。感染サルは観察期間中臨床的に霊長類レンチウイルス関連疾患を示さなかった。

潜伏感染サルに抗 CD8 抗体を投与した所、血中ウイルス RNA 量が投与 3 日以内に検出限界以下から 10^4 コピー/ml まで一過性に上昇した。抗体投与直前及び投与 2 日後に生検したリンパ節細胞の解析の結果、投与前に殆ど検出されなかった gag ウイルス抗原陽性細胞 (0.03%) が、2 日後に 0.12% 検出された。再活性化の前後でウイルス抗原陽性 CD4 陽性 T 細胞を比較したところ、再活性化後に FoxP3 陽性細胞が増加する傾向が観察された。しかし、ウイルス抗原陽性の抗原提示細胞を直接検出することはできなかった。

D. 考察

SIV 1A11 は当初予想した通り、一過性のウイルス血症の後制御され「潜伏感染」となったが、抗 CD8 抗体処理による「抑制解除」により少なくとも末梢血及びリンパ節において「再活性化」した事から、恐らく全身性にウイルスの再活性化は起こっていると考えられる。すなわち本研究によって SIV/アカゲザル潜伏・再活性化モデルを確立することができた。潜伏感染個体において抗 CD8 抗体を投与することによって CD8 によるウイルス抑制を解除してウイルスの再活性化を誘導した時に、いち早くウイルスが増殖する細胞はリンパ節中の Treg である可能性が示唆された。

E. 結論

SIV/アカゲザル潜伏・再活性化モデルを確立し解析した結果、潜伏感染個体内で CD8 による抑制を解除した場合に、いち早くウイルスが増殖する細胞はリンパ節中の Treg である可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Otsuki, H., Yoneda, M., Igarashi, T., and Miura, T.: Generation of a monkey-tropic human immunodeficiency virus type 1 carrying env from a CCR5-tropic subtype C clinical isolate. *Virology*, 460-461: 1-10, 2014.
- 2) Adach, A. and Miura, T.: Animal model studies on viral infections. *Frontiers in Microbiology*, 5: Article 672, 2014.

2. 学会発表

- 1) Saito, A., Matsuoka, K., Ode, H., Otsuki, H., Yoshida, T., Iwatani, Y., Sugiura, W., Matano, T., Miura, T., and Akari, H.: A novel HIV-1mt encoding CCR5-tropic Env established persistent infection in *Cynomolgus* macaques. 2014 Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Boston, March 3-6, 2014.
- 2) 米田舞、大附寛幸、松下修三、日紫喜隆行、五十嵐樹彦、三浦智行: 新規 CCR5 指向性サルヒト免疫不全ウイルスのサルへの順化における env 遺伝子変異と中和抗体抵抗性の解析、日本動物遺伝育種学会第 15 回大会和光、2014 年 10 月 31 日-11 月 1 日
- 3) 三浦智行、米田舞、大附寛幸、松下修三、日紫喜隆行、五十嵐樹彦: 新規 CCR5 指向性 SHIV のサルへの順化と中和抗体抵抗性の解析、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月 10-12 日
- 4) 渡部祐司、岩見真吾、森ひろみ、松浦嘉奈子、石田裕樹、日紫喜隆行、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は感染リンパ球と同程度の半減期を示す、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月 10-12 日
- 5) 芳田剛、齋藤暁、松岡和弘、大出裕高、岩谷靖雅、杉浦互、保富康宏、俣野哲朗、三浦智行、明里宏文: サル個体におけるサル指向性 HIV-1 の増殖効率を上昇させる要因 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月 10-12 日
- 6) 関紗由里、野村拓志、西澤雅子、横山勝、佐藤裕徳、團塚愛、三浦智行、小柳義夫、俣野哲朗: SIV の持続感染・伝播における変異蓄積に関する研究、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月 10-12