

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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
- 2) Hasan C, Kamori D, Ueno T. Role of host immune responses in sequence variability of HIV-1 Vpu. *World Journal of Immunology* 4, 107-115, 2014
- 3) 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
- 4) Yanaka S, Ueno T, Shi Y, Qi J, Gao G, Tsumoto K, Sugase K. Peptide-dependent conformational fluctuation determines the stability of the human leukocyte antigen class I complex. *J Biol Chem*. 289, 24680-24690, 2014
- 5) Kuse N, Akahoshi T, Gatanaga H, Ueno T, Oka S, Takiguchi M. Selection of TI8-8V mutant associated with long-term control of HIV-1 by cross-reactive HLA-B*51:01-restricted cytotoxic T cells. *J Immunol*, 193, 4814-4822, 2014
- 6) Chen J, Tibroni N, Sauter D, Galaski J, Miura T, Alter G, Mueller B, Haller C, Walker B, Kirchhoff F, Brumme Z, Ueno T, Fackler O. Modest Attenuation of HIV-1 Vpu Alleles Derived from Elite Controller Plasma. *PLoS ONE*, 2015 in press
- 7) 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) Kamori D, Murakami T, Hasan Z, Meribe S, Carlson J, Siarot L, Miura T, Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A, Gatanaga H, Oka S, Aida Y, Ueno T. Effects of natural variability of

an immunodominant Vpr region on immunological footprints, clinical outcome and protein functions. The 62nd Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Nov 10-12, 2014.

- 2) Kamori D, Murakami T, Hasan Z, Meribe S, Carlson J, Siarot L, Miura T, Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A, Gatanaga H, Oka S, Aida Y, Ueno T. Effects of natural variability of Vpr on immunological footprints and protein functions. *Keystone Symposia HIV Vaccines (X5)*, March 22-27, 2015.
- 3) 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,
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

慢性的免疫活性化制御因子の機能解析

研究分担者 小柳 義夫 京都大学ウイルス研究所 教授
研究協力者 佐藤 佳 京都大学ウイルス研究所 助教
研究協力者 三沢 尚子 京都大学ウイルス研究所 技術補佐員

研究要旨：

抗ウイルス宿主因子である APOBEC3G(A3G) と APOBEC3F(A3F)に結合活性を消失させたそれぞれの部位特異的 Vif 変異 HIV-1 のヒト化マウスへの接種実験を行った。A3G と A3F の変異塩基隣接配列が異なるために、ウイルス抑制活性とウイルス遺伝子変異誘導によるウイルス機能変換活性それぞれは量的な差異があることがわかった。その結果、A3F は抗ウイルス因子であるとともにウイルス遺伝子変異誘導因子ともなることを実証した。慢性的な免疫活性化が生じ、その発現が誘導される A3F は両義的機能を発揮することが示唆される。

A. 研究目的

慢性疾患である HIV 感染症において、細胞の活性化やインターフェロン作用に伴って誘導され、そして、強力な抗 HIV-1 活性を示す APOBEC3 (A3) は、一方で遺伝子変異誘導蛋白質であり、それによって挿入される G→A 変異が、ウイルス遺伝子の多様化 (diversification) を促進するという仮説がある。培養細胞を用いた研究から、特に A3F と A3G は、HIV-1 粒子に取り込まれ、ウイルスゲノムに G→A 変異を挿入する。一方、HIV-1 アクセサリ蛋白質のひとつである Vif は、ユビキチン-プロテアソーム経路依存的に A3 を分解し、そのウイルス粒子への取り込みを阻害する。しかしながら、HIV-1 感染者における増殖過程において、(1) 内在的に発現する A3 が抗 HIV-1 活性を示すのか； (2) A3 による G→A 変異は HIV-1 の多様化 (diversification) に影響を与えるのか、についてはこれまで不明であった。本研究では、内在性 A3 が個体内における HIV-1 感染に与える影響を解明し、細胞性因子がウイルスの増殖過程だけでなく、その多様化に対する影響を明らかにすることを目的として、HIV-1

感染ヒト化マウスモデルを用いた実験を行った。

B. 研究方法

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、そのウイルスをヒト化マウスに接種した。ヒト化マウスはヒト血液幹細胞を移植した NOG マウスである。血漿ウイルス RNA 量を real-time RT-PCR 法で、血中 CD4 陽性 T 細胞数を flow cytometry/hematometry 法で経時的に定量した。また、感染後 6 週齢のマウスを解剖し、脾臓におけるプロウイルス DNA 配列を PCR 法で、血漿中のウイルス RNA 配列を RT-PCR/single genome sequencing 法でそれぞれ解析した。

(倫理面への配慮)

ヒト由来の試料として提供者の同意のもとに採取を行い、その利益ならびに人権保護の取り扱いに十分配慮した。京都大学の医の倫理委員会承認済みである。実験動物に対す

る動物愛護上の配慮を考慮した実験計画は京都大学動物委員会承認済みである。組換えDNA実験についても、P3レベルの物理的封じ込めの必要な大臣確認実験も含め承認済みである。

C. 研究結果

4A HIV-1 および 5A HIV-1 のヒト化マウスにおける増殖効率は、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、プロウイルス DNA 配列を解析した結果、4A HIV-1 感染マウスでは GA→AA 変異が顕著に観察されたのに対し、5A HIV-1 ならびに 4A5A HIV-1 感染マウスでは GG→AG 変異が顕著に観察された。さらに興味深いことに、血漿中のウイルス RNA 配列は、脾臓のプロウイルス DNA で観察された変異パターンと異なっており、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、統計的に有意に高かった (図 2)。さらに、CXCR4 を補受容体とするウイルスが、4A HIV-1 感染マウス特異的に出現していることがわかった。

D. 考察

生体内 HIV-1 増殖過程において、CD4 陽性 T 細胞に内在的に発現する A3F と A3G が共に抗ウイルス活性を示すこと、A3G の抗ウイルス活性は A3F のそれよりも強力であることが示唆された。A3F 依存的 G→A 変異は、ウイルスの多様化、そしてウイルスの機能的進化を促進しうることが強く示唆された。

E. 結論

慢性的免疫活性化によって誘導される A3F がウイルス抑制作用以外に多様性促進というウイルスの変化を惹起することがわかった。

F. 健康危険情報

HIV-1 の感染実験、ウイルスの保管は全て京都大学ウイルス研究所で定める感染微生物取り扱い安全管理委員会、動物委員会、組換え

DNA 委員会の規定に基づき、すべて P3 実験施設で行われた。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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 potentially promote HIV-1 diversification and evolution in humanized mouse model. *PLoS Pathog.* 10:e1004453, 2014.

2) 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*, in press.

2. 学会発表

1) Sato, K., Shibata, J., Izumi, T., Misawa, N., Kobayashi, T., Kimura, Y., Ito, M., Pathak, V. K., Koyanagi, Y. APOBEC3F potentially promotes HIV-1 diversification and evolution in humanized mouse model, Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Retroviruses, New York, USA, May, 2014.

2) 蝦名博貴、三沢尚子、金村優香、小柳義夫。ゲノム編集法のエイズ治療への展望。第 16 回白馬シンポジウム、熊本、2014 年 6 月。

3) Koyanagi Y., Misawa N., Sato K., Ebina H., HIV strategy for acceleration of viral replication in vivo and eradication approach of HIV proviral DNA. 9th International Symposium of the Institute Network, Osaka. June, 2014.

4) Koyanagi, Y., Sato, K., Conflicts and benefits between primate lentiviruses and host restriction factors, 15th Kumamoto AIDS Seminar (invited), Kumamoto, Japan, October, 2014.

5) 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。

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

| | | Degradation | | |
|------|-----------|-------------|-----|---|
| | | A3F | A3G | |
| WT | A3F: DRMR | A3G: YRHHY | + | + |
| 4A | A3F: AAAA | A3G: YRHHY | - | + |
| 5A | A3F: DRMR | A3G: AAAAA | + | - |
| 4A5A | A3F: AAAA | A3G: AAAAA | - | - |

図1. 部位特異的 Vif 変異 HIV-1

A3G を分解できない変異体 Vif をコードする HIV-1 4A、A3F を分解できない変異体 Vif をコードする HIV-1 5A、A3F と A3G 両者を分解できない変異体 Vif をコードする 4A5A HIV-1 を作製した。

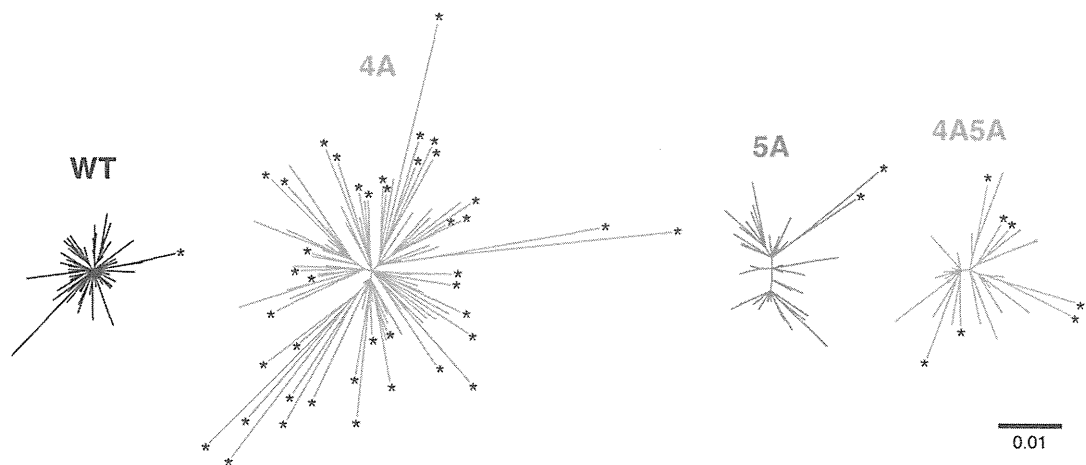


図2. ヒト化マウスで増殖するウイルス遺伝子配列の多様性比較.

A3F の影響を受けるウイルス(4A, 図中ピンク)は、野生型のウイルス(WT, 図中黒)や A3G の影響を受けるウイルス(5A, 図中青)に比べて顕著に多様化していた。

T 細胞の活性化刺激と HIV 感染制御

研究分担者 田中勇悦 琉球大学 大学院医学研究科 免疫学講座 教授

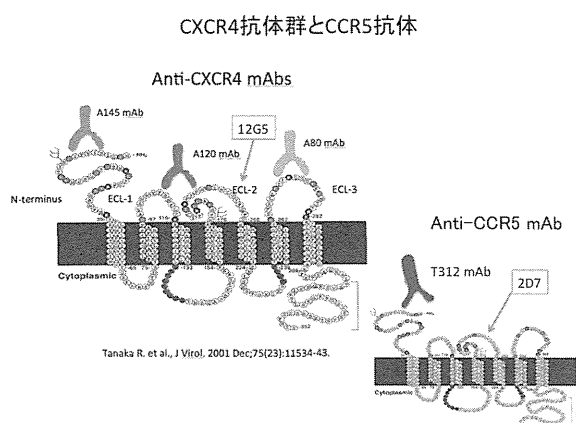
研究要旨： HIV co-receptor 修飾を介する HIV 感染制御法について詳しく検討する目的で、静止期の末梢血単核球 (PBMC) に対して固相化した anti-CXCR4 および CCR5mAb によるそれぞれの受容体の架橋が、活性化 PBMC の R5 HIV-1 感染にどのような影響を与えるかを検討した。感染後、用いた CXCR4 抗体 4 種類全てと anti-CCR5 抗体の T312 は陰性コントロール抗体と比較して R5 HIV-1 の感染を顕著に抑制した。抑制のメカニズムは間接的であり、新鮮単核球からの CCR5 結合性 β ケモカインの産生誘導が考えられた。以上のことから、末梢 T 細胞活性化に付随して起きる HIV-1 の感染拡大を制御する新たな方法として抗体を使った新鮮 PBMC の HIV-1 主要 co-receptor の架橋が候補として挙げられる。

A. 研究目的

我々は、OX40L や抗 CXCR4 単クローン抗体 (mAb) A120 が活性化 PBMC において R5 HIV-1 感染を強力に抑制することを既に報告した。その主なメカニズムは、 β ケモカインの誘導である。今回、HIV co-receptor 修飾を介する HIV 感染制御法についてさらに詳しく検討する目的で、静止期 PBMC への固相化した anti-CXCR4 および CCR5mAb による作用が活性化 PBMC の R5 HIV-1 感染にどのような影響を与えるかを検討した。

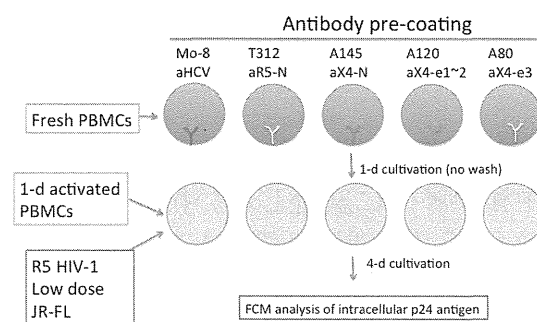
B. 研究方法

用いた mAb は全てラット由来の IgG であり、それぞれの認識エピトープを以下の図に示す。



正常人由来の新鮮 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、その系に低 m. o. i. の R5 HIV-1JR-FL を添加して培養した。各々の抗体の R5 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。その概要を以下に示す。なお、ラット IgG コントロールとして、anti-HCV IgG mAb 抗体を用いた。

Stimulation of fresh PBMCs with anti-CCR5 or CXCR4 mAbs



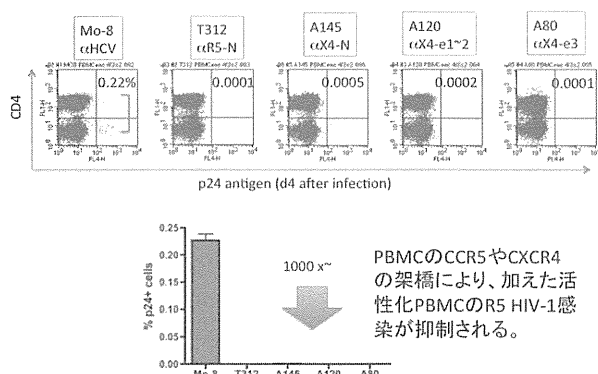
(倫理面への配慮)

健常人の PBMC を使用する実験は倫理委員会で承認され、また、抗体を産生する遺伝子組換え生物等使用実験と動物実験も琉大で承認されている。

C. 研究結果

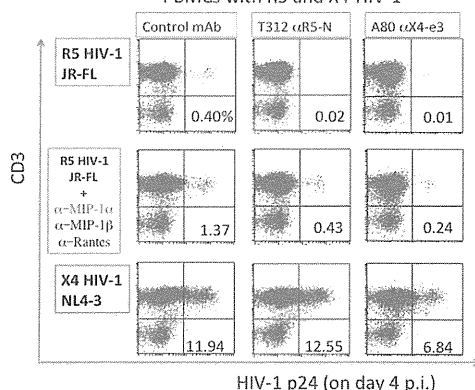
(1) 静止期の PBMC をプレートに固相化した CCR5 抗体の一種類と CXCR4 抗体 4 種類全で処理すると、陰性コントロール抗体処理と比較して、処理されたウエルに加えた活性化 PBMC における R5 HIV-1 の感染を著明に抑制した。

Inhibition of HIV-1 infection of PBMCs by pre-stimulation with anti-R5 or X4 mAb



この抑制の系に R5 HIV-1 抑制に關与する β ケモカインケモカイン 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。

Effect of pre-cross-linking of CCR5 and CXCR4 on infection of PBMCs with R5 and X4-HIV-1



したがって、直接 R5 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 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。

D. 考察

今回の実験により新鮮 PBMC の CCR5 または CXCR4 をそれぞれ T312 または A80 で架橋培養した場合に、共存する活性化 PBMC に対す

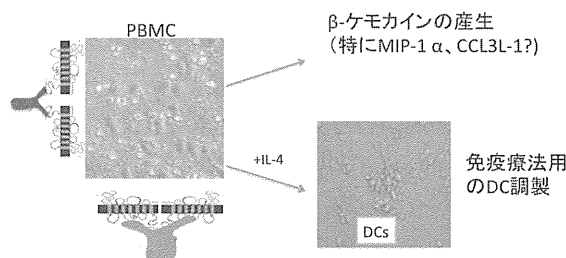
る R5 HIV-1 感染が最も強く抑制されることが明らかとなった。T312 は R5 HIV-1 感染を立体的に阻害することではなく、また A80 は anti-CXCR4 であり長期刺激培養した PBMC では HIV-1 感染を促進させることから、抑制のメカニズムは間接的であり、新鮮単核球からの CCR5 結合性 β ケモカインの産生誘導と考えられた。

E. 結論

静止期における PBMC の細胞表面 CCR5 や CXCR4 を抗体によって架橋することにより、活性化 PBMC の HIV-1 抑制 β ケモカイン産生が産生され、HIV-1 感染拡大を阻止する。付け足しであるが、この架橋によって単球の接着性が促進し、IL-4 存在下、樹状細胞への分化起きる。

まとめ

末梢 新鮮PBMCのCCR5やCXCR4を単クロン抗体でエピトープ依存性に架橋することによりβケモカインが産生され、マクロファージや活性化CD4⁺T細胞がR5 HIV-1感染に抵抗する。



F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし (論文作成中)
2. 学会発表
(1) 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 回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪 (12. 3-5, 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

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

| 著者氏名 | 論文タイトル名 | 書籍全体の 編集者名 | 書 籍 名 | 出版社名 | 出版地 | 出版年 | ページ |
|------|---------|---------------|-------|------|-----|-----|-----|
| 無し | | | | | | | |

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|---|---|-----------------|----------|----------|-------|
| Terahara, K., Ishige, M., Ikeno, S., Okada, S., Kobayashi-Ishihara, M., Ato, M., and <u>Tsunetsugu-Yokota, Y.</u> | 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. | in press | | 2015. |
| Terahara, K, Ishii, H., Nomura, T., Takahashi, N., Takeda, A., Shiino, T., <u>Tsunetsugu-Yokota, Y.</u> and Matano, T. | Vaccine-induced CD107a ⁺ CD4 ⁺ T cells are resistant to depletion following AIDS virus infection. | J. Virol. | 88 | 14232-40 | 2014 |
| Zhou, D., Wang, Y., <u>Tokunaga, K.</u> , 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 |
| Kikuchi, T., Iwabu, Y., Tada, T., <u>Kawana-Tachikawa, A.</u> , Koga, M., Hosoya, N., Nomura, S., Brumme, Z.L., Jessen, H., Pereyra, F., Piechocka-Trocha, A., Walker, B.D., Iwamoto, A., <u>Tokunaga, K (co-corresponding author).</u> , Miura, T. | Anti-APOBEC3G activity of HIV-1 Vif protein is attenuated in elite controllers. | J. Virol. | 89 | in press | 2015 |

| | | | | | |
|---|---|----------------------------|----------|--------------------------------------|------|
| Matsuda Y, Kobayashi-Ishihara M, Fujikawa D, Ishida T, <u>Watanabe T</u> , Yamagishi M. | Epigenetic Heterogeneity in HIV-1 Latency Establishment. | Sci. Rep | 5:7701 | 11pp. (doi: 10.1038/srep07701) | 2015 |
| Nakayama-Hosoya K, Ishida T, Youngblood B, Nakamura H, Hosoya N, Koga M, Koibuchi T, Iwamoto A, <u>Kawana-Tachikawa A</u> . | 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 |
| Han C, <u>Kawana-Tachikawa A</u> , Shimizu A, Zhu D, Nakamura H, Adachi E, Kikuchi T, Koga M, Koibuchi T, Gao GF, Sat 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 |
| Sato K, Takeuchi JS, Misawa N, Izumi T, Kobayashi T, Kimura Y, Iwami S, Takaori-Kondo A, Hu W-S, Aihara K, Ito M, An DS, Pathak VK, <u>Koyanagi Y</u> | APOBEC3D and APOBEC3F potently promote HIV-1 diversification and evolution in humanized mouse model. | PLOS Pathogens | 10 | e1004453 | 2014 |
| Ebina H, Kanemura Y, Misawa N, Sakuma T, Kobayashi T, Yamamoto T, <u>Koyanagi Y</u> . | A high excision potential of TALENs for integrated DNA of HIV-based lentiviral vector. | PLoS One | in press | | 2015 |
| Nomura T, <u>Yamamoto H</u> , 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 |

| | | | | | |
|--|---|---------------------------|----------|-------------|------|
| Otsuki, H., Yoneda, M., <u>Igarashi, T.</u> , and <u>Miura, T.</u> | 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 |
| Adachi, A. and <u>Miura, T.</u> | Animal model studies on viral infections. | Frontiers in Microbiology | 5 | Article 672 | 2014 |
| C. Motozono, M. Yokoyama, H. Sato, <u>T. Ueno</u> | Cross-reactivity analysis of T cell receptors specific for overlapping HIV-1 Nef epitopes of different lengths. | Microbes Infect. | 16 | 320-327 | 2014 |
| X. Kuang, X. Li, G. Anmole, P. Mwimanzi, A. Shahid, A. Le, L. Chong, H. Qian, T. Miura, T. Markle, B. Baraki, E. Connick, E. Daar, H. Jessen, A. Kelleher, S. Little, M. Markowitz, F. Pereyra, E. Rosenberg, B. Walker, * <u>T. Ueno</u> , *Z. Brumme, *M. Brockman, *co-senior authors | Impaired Nef function is associated with early control of HIV-1 viremia. | J Virol | 88 | 10200-10213 | 2014 |
| C. Motozono, J. Bridgeman, D. Price, A. Sewell, <u>T. Ueno</u> | Clonotypically similar hybrid $\alpha\beta$ TCRs can exhibit markedly different surface expression, antigen specificity and cross-reactivity. | Clin Exp Immunol | in press | | 2015 |

