

201448002A

厚生労働科学研究委託費

エイズ対策実用化研究事業

HIV感染症の根治に向けた 基盤的研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者

明里宏文

京都大学霊長類研究所
教授

平成27(2015)年3月

厚生労働科学研究委託費
(エイズ対策実用化研究事業)

HIV感染症の根治に向けた基盤的研究

平成 26 年度 委託業務成果報告

業務主任者 明里 宏文

京都大学霊長類研究所

平成 27(2015) 年 3 月

目次

I 委託業務成果報告（総括）	
HIV 感染症の根治に向けた基盤的研究.....5	5
明里宏文（京都大学霊長類研究所）	
II 委託業務成果報告（業務項目）	
1. HIV-1 のサル類評価検証に関する研究.....9	9
明里宏文（京都大学霊長類研究所）	
2. ゲノム編集技術による HIV 制御研究.....12	12
小柳 義夫（京都大学ウイルス研究所）	
3. 再生医療技術による HIV 制御に関する研究.....16	16
塩田 達雄（大阪大学微生物病研究所）	
4. サル指向性ヒト免疫不全ウイルス 1 型感染における アクセサリー遺伝子 vpr の生体内機能.....20	20
間 陽子（理化学研究所）	
5. 潜伏・持続感染における細胞性免疫応答研究.....25	25
俣野 哲朗（国立感染症研究所エイズ研究センター）	
6. 潜伏・持続感染における液性免疫応答研究.....27	27
吉村 和久（国立感染症研究所エイズ研究センター）	
7. APOBEC3 によるウイルス微小集団の遺伝的変容と 病態進行との関連性に関する解析.....31	31
岩谷 靖雅（(独)国立病院機構 名古屋医療センター 臨床研究センター）	
8. 潜伏・持続感染におけるリザーバー研究.....36	36
佐藤 賢文（熊本大学大学院先端機構・エイズ学研究センター）	
III 学会等発表実績.....39	39
IV 研究成果の刊行物・別刷.....45	45

厚生労働科学研究委託費（エイズ対策実用化研究事業）
委託業務成果報告 I（総括項目）

HIV 感染症の根治に向けた基盤的研究

業務主任者 明里 宏文 京都大学霊長類研究所 教授

研究要旨

本研究では、HIV 制御法の確立およびその前臨床評価に有用な病態解析システムの構築を目指す。今年度の研究で、R5-tropism を付与したサル指向性 HIV-1 (HIV-1_{mt}) をカニクイザルに接種することにより長期潜伏感染状態となることが明らかとなった。すなわちこの感染モデルでは、急性期に HIV 感染者とほぼ同程度の高いウイルスロードを示した後に潜伏感染状態へと移行する。この状態は、HIV 特異的抗体応答が依然として維持されプロウイルスも陽性であるなど、長期無症候性キャリアやエリートコントローラーに極めて近似するものであった。本霊長類モデルは、ウイルスリザーバーおよびプロウイルスのクローナリティ解析、獲得免疫応答、病態関連宿主・ウイルス因子等の詳細解析において貴重な情報をもたらすものと期待される。

担当責任者

小柳義夫 京都大学ウイルス研究所・教授
塩田達雄 大阪大学微生物病研究所・教授
間 陽子 理化学研究所・ユニットリーダー
俣野哲朗 国立感染症研究所
エイズ研究センター・センター長
吉村和久 国立感染症研究所
エイズ研究センター・室長
岩谷靖雅 国立病院機構名古屋医療センター・
室長
佐藤賢文 熊本大学エイズ学研究センター・
准教授

に抱えている。さらにアドヒアランス不良に伴う薬剤耐性ウイルスの出現、抗 HIV 薬の副作用による循環・代謝障害、慢性持続感染による悪性腫瘍、HIV 関連神経認知障害 (HAND) 等の合併症、また社会的・精神的な不利益やストレス、加齢化の進行など、数多くの問題点が残されている。これらの解決には、HIV 感染症からの根治を目指したブレークスルー、すなわち自発的な抗 HIV 免疫応答に加えて効果的なウイルス抑制機能の強化による有効かつ終生持続するウイルス制御 (AIDS フリー)、さらに潜伏化したウイルスゲノムの除去 (HIV フリー) を実行する革新的技術の開発が求められている。

A. 研究目的

AIDS の原因ウイルスである HIV-1 の発見以来 30 年を経て、今や「AIDS= 死の病」の図式は改訂されつつある。多彩な抗 HIV 薬の併用による ART 療法が画期的に進展を遂げた結果、HIV 感染症は慢性疾患の一つとなったと言える。しかしながら、HIV 感染者は生涯にわたる抗 HIV 薬の服用が必須であり、服薬の中断によりウイルス増殖とそれによる病態悪化というリスクを常

このような医学的命題に向けて現在さまざまな基礎研究が進められつつあるが、対象となる無症候性キャリア (AC) や長期未発症者 (LTNP)、エリートコントローラー (EC) へ根治のための医療介入を行うためには、それに先立ち病態解明のための適切な評価システムの構築、治療標的となる HIV 潜伏感染細胞の把握、そしてそれらの知見に基づく優れたモデル動物による新規治療法の安全性や有効性の検証が不可欠と考え

られる。このような背景を踏まえ、本研究では、新たな HIV 制御法確立およびその前臨床評価のための病態解析を総合的に推進することにより、HIV 感染症の根治を目指した実現可能な対 HIV 戦略を創出する。

B. 研究方法

AC, LTNP, EC への介入研究にあたっては、その病態解明のための適切な評価システムの構築、治療標的となる HIV 潜伏感染細胞の把握、および優れたモデル動物による新規治療法の安全性や有効性の検証が不可欠である。このような背景を踏まえ、本研究では申請者らが開発した HIV-1 感染霊長類モデルを応用して、新たな HIV 制御法の確立およびその前臨床評価のための病態解析システムの構築を行う。本研究班はその目標達成に向け、以下の 2 チームから構成される。まず HIV 制御研究チームでは、進展が著しい iPS 細胞およびゲノム編集技術を駆使した HIV 制御技術の開発と霊長類モデルを使ったその前臨床試験研究を行う。他方、もう一翼を構成する病態解析チームでは AC/EC に相当する HIV-1 感染霊長類モデルを用いて、プロウイルス量やそのクローナリティ解析、獲得免疫応答、病態関連宿主・ウイルス因子の各側面から HIV-1 潜伏感染の実態を明らかにする。さらに、根治に向けた重要なターゲットであるウイルスリザーバーについて、その定量や動態などヒトでは解析困難な疑問を明らかにする。これらの知見を踏まえ、両研究チームが有機的に連携し前臨床試験までの橋渡し研究を速やかに実施し、HIV 感染症の根治に向けた実現可能な対 HIV 戦略を創出する。

（倫理面への配慮）

本研究では改正動愛法に基づいた動物実験指針および動物福祉規程に則り、各機関の実験動物委員会による承認を得て適切に実験動物の飼育、実験を行う。

C. 研究結果

HIV 制御研究チーム

1. まず複数個体から末梢血リンパ球由来サル iPS 細胞を樹立するとともに、その RNA 発現様式や細胞マーカー等より iPS 細胞としての機能的特性を確認出来た。さらに、この iPS 細胞より CD34 陽性造血幹細胞やマクロファージ様細胞へと分化誘導可能であることを明らかにした。現在、更にリンパ球への分化誘導方法について詳細な比較検討を進めている。
2. CRISPR/Cas9 システムおよび TALEN 法による HIV-1 LTR を標的とするゲノム編集技術を用いることにより、細胞染色体中にインテグレートしているプロウイルス DNA を不活化、排除することが可能であることを明らかにした。

病態解析チーム

1. R5-tropism を付与したサル指向性 HIV-1 (HIV-1mt) をサル個体間で継代することにより、ウイルス増殖能の向上が見られた。この馴化ウイルスゲノムを次世代シーケンサーにより解析を行ったところ、Vif, Nef, MA, p6, RT, Tat において特徴的なアミノ酸置換変異が認められた。これらの変異アミノ酸を持つクローンは、継代とともに主要な集団へと個体内進化したこと、またこれらの変異を有するウイルスは野生株と比較して PBMC においても優れた増殖能を示すことを明らかにした。重要なことに、この馴化ウイルスは感染初期に HIV 感染者とほぼ同程度の高い viral load (約 10^6 viral RNA copies/ml) を示すが、その後 3-4 ヶ月で獲得免疫応答により制御され潜伏感染状態へと移行する。すなわち EC (HIV 陽性、未治療下で viral load が 6-12 カ月以上検出限界以下) の定義に該当する、EC に極めて類似した HIV 感染霊長類モデルであることが明らかになった。
2. EC 状態にある HIV-1mt 感染ザルにおいて、深部リンパ節や脾臓におけるプロウイルス量が末梢血リンパ球と比較して多く検出され、これらの部位におけるウイルスリザーバーの存在が示された。また各臓器において 100 箇所以上のウイルス組込部位を特定出来たことから、クローナリティの時系列解析が今後可能となった。
3. 上述の EC 状態にある HIV-1mt 感染ザルにおいて、HIV-1 特異的な細胞障害性 T リンパ球お

よび抗体応答の経時的な比較検討を現在行っている。これまでの解析により、HIV-1mt 感染ザルで1年以上の長期にわたり血中ウイルス RNA が検出されないにも関わらず抗 Env 抗体価及び中和抗体価が経時的に上昇していることが明らかとなった。このことは、HIV-1mt 感染ザルにおける持続的 HIV 抗原発現を示すとともに、HIV 制御において抗体応答が重要な役割を担っていることを表す結果であり興味深い。

4. また、標的リンパ球の活性化や自然・獲得免疫制御に関わるアクセサリ-蛋白（特に Vif 及び Vpr）と関連宿主因子との機能相関に着目して検討を進めている。これらにより、EC 状態に制御されるメカニズムについて明らかにする。

D. 考察

最終的な HIV 感染症の解決は根治、すなわちウイルスゲノムの完全排除による。しかしその現実的には解決すべき問題が多数存在し、当面の目標は機能的根治＝無治療でウイルス増殖が制御されヘルパー T 細胞が維持される状態を誘導することであろう。現在、HDAC 阻害薬などの潜伏ウイルス活性化薬と抗 HIV 薬の併用療法（shock&kill 療法）や遺伝子改変骨髄幹細胞の移植療法、治療ワクチンなど、さまざまな方法が検討されており、本研究班においても上記の治療法開発に向け研究が進められている。これらの開発における最大の難関はその有効性評価であろう。すなわち HDAC 阻害薬の有効性を評価するため、これまで HIV 潜伏感染細胞株や感染者由来リンパ球が用いられてきた。しかし、用いる薬剤の服用方法や期間、薬剤自体の最適化など、HIV 感染者（特に LTNP/EC 状態にある感染者）での臨床試験は現実的には極めて困難であることが容易に予想される。この点で、今年度の成果である長期 HIV 潜伏感染サルモデルは、これらの適切な評価方法として非常に有望である。すなわち、(1) 馴化 R5 指向性 HIV-1mt 感染カニクイザルは、感染初期に一般的な HIV 感染者とほぼ同程度の高い viral load を示した後 LTNP/EC 状態へと移行する（HIV 陽性、未治療下で CD4 陽性細胞数が維持され、かつ viral load が 6-12 カ月以上低レベルもしくは検出限界以下）、(2) 既にウイルスが分離されており何時でもサル実験感染が可能である、HIV 感受性 / 抵

抗性に関するサル遺伝型（TRIM5/TRIMCyp）が同定済みであり感受性個体の選別が容易である、(3) 本邦での入手や実験実施が容易なカニクイザルを使用可能である、などの利点により、LTNP/EC を誘導するウイルス制御機構の解明、ウイルスリザーバーの同定や経時的動態の解明、そして根治に向けた HIV 制御技術の開発評価研究への貢献が期待される。実際、今年度の本研究班において当該霊長類モデルの解析により、ウイルスリザーバーやクロナリティ、中和抗体に関する非常に興味深い成果が得られている。来年度は、サル iPS 細胞から分化させた CCR5 欠損免疫担当細胞のサルへの移植、LTNP/EC 霊長類モデルによる shock & kill 療法による潜伏化 HIV プロウイルス DNA の除去などの proof-of-concept 研究、リザーバー細胞やウイルス制御免疫の詳細解明など、班員間の連携プロジェクトを機動的に展開しながら新たな切り口により未解明の命題を明らかにしていく。また同時にこれらの成果を踏まえ、感染症を始めとする医科学研究における霊長類モデルの将来に繋がるよう、そのプレゼンスを高めていきたい。

E. 結論

ART 療法の画期的な進展にも関わらず、HIV 感染者は依然として幾多のリスクに曝されている。これらの解決に向け、本研究班では HIV 感染者の自発的な抗ウイルス免疫応答に加えて効果的な HIV 抑制機能による AIDS/HIV フリーのための対 HIV 戦略を創出する。今年度は、今後の各種実証研究に向け、LTNP/EC 霊長類モデルや iPS/ゲノム編集技術といった中核となる研究基盤や連携体制が確立できた。

F. 知的所有権の取得状況

US patent,

Patent No.: US 8,722,861 B2,

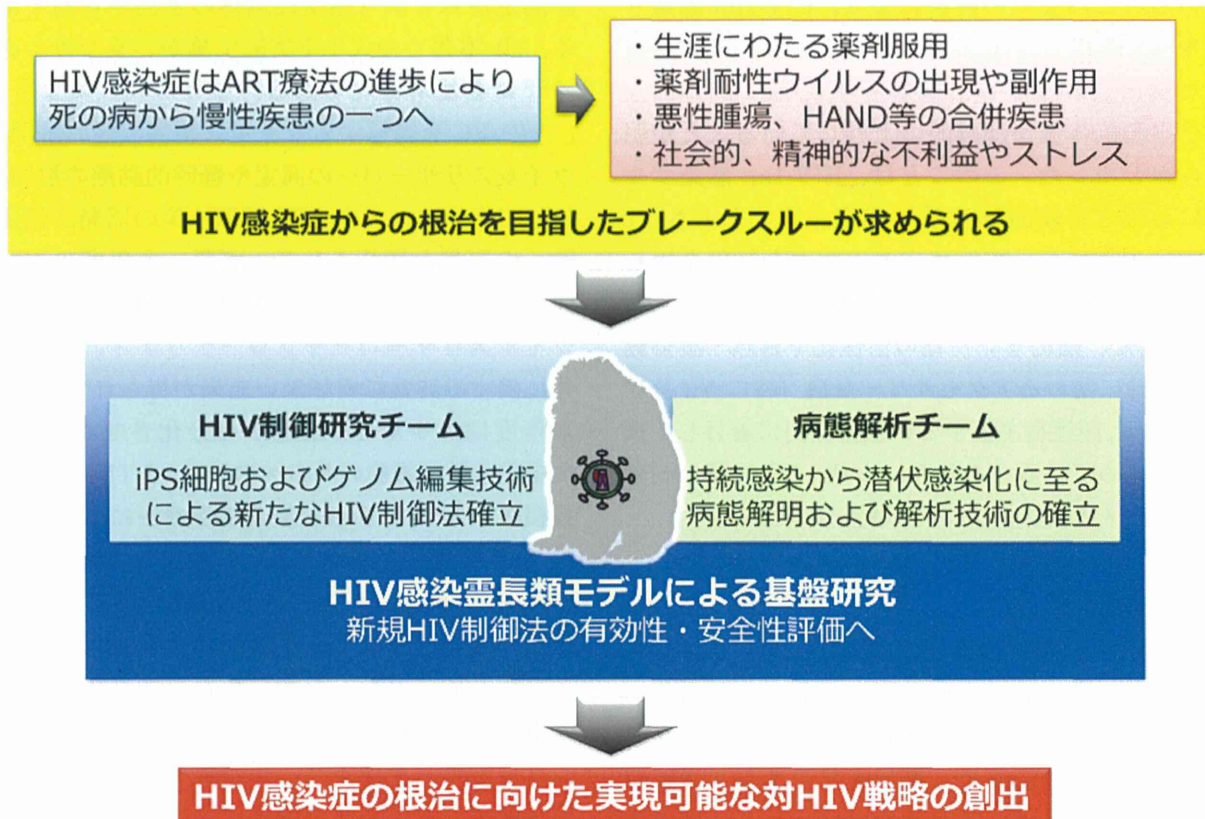
Date of Patent: May 13, 2014

"MONOCLONAL ANTIBODIES THAT

BIND TO THE V3 LOOP OF HIV-1 GP120"

G. 研究発表

III. 学会等発表実績の項を参照のこと



厚生労働科学研究委託費（エイズ対策実用化研究事業）委託業務成果報告 II（業務項目）

HIV-1 のサル類評価検証に関する研究

業務主任者 明里 宏文 京都大学霊長類研究所 教授

研究要旨

本研究では、HIV 制御法の確立およびその前臨床評価に有用な病態解析システムの構築を目指す。今年度の研究で、R5-tropism を付与したサル指向性 HIV-1 (HIV-1mt) をカニクイザルに接種することにより長期潜伏感染状態となることが明らかとなった。すなわちこの感染モデルでは、急性期に HIV 感染者とほぼ同程度の高いウイルスロードを示した後に潜伏感染状態へと移行する。この状態は、HIV 特異的抗体応答が依然として維持されプロウイルスも陽性であるなど、長期無症候性キャリアやエリートコントローラーに極めて近似するものであった。本霊長類モデルは、ウイルスリザーバーおよびプロウイルスのクローナリティ解析、獲得免疫応答、病態関連宿主・ウイルス因子等の詳細解析において貴重な情報をもたらすものと期待される。

A. 研究目的

ART 療法の画期的な進展により、HIV 感染症は今や慢性疾患のひとつとなった。しかし HIV 感染者は、依然として幾多のリスクに曝されている。これらの解決には、HIV 感染者の自発的な抗ウイルス免疫応答に加えて効果的な HIV 抑制機能による有効かつ終生持続するウイルス制御 (AIDS フリー)、さらに潜伏化したウイルスゲノムの除去 (HIV フリー) による HIV 感染症の根治が求められる。このような医学的命題に向けて現在さまざまな基礎研究が進められつつあるが、対象となる無症候性キャリア (AC) や長期未発症者 (LTNP)、エリートコントローラー (EC) への医療介入にあたっては多くの解決すべき懸案が存在する。すなわち、AC/LTNP/EC におけるウイルス制御免疫や治療標的となる HIV 潜伏感染細胞の把握など、その病態解明のための適切な評価システムの構築、および優れたモデル動物による新規治療法の安全性や有効性の検証が不可欠である。このような背景を踏まえ、本研究では申請者らが開発した HIV-1 感染霊長類モデルを応用して、新たな HIV 制御法の確立およびその前臨床評価のための病態解析システムの構築を行った。

B. 研究方法

接種ウイルス：X4 指向性 HIV-1mt クローン (MN4Rh-3) を基に、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 AS38 株を得た。

カニクイザル感染実験：TRIMCyp アリル homozygote カニクイザルに、10ng p24CA 相当の AS38 ウイルス株を経静脈接種し、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。

(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

1. R5-tropism を付与したサル指向性 HIV-1 (HIV-1mt) をサル個体間で継代することにより、ウイルス増殖能の向上が見られた。この馴化ウイルスゲノムを次世代シーケンサーにより解析を行ったところ、Vif, Nef, MA, p6, RT, Tat において特徴的なアミノ酸置換変異が認められた。これらの変異アミノ酸を持つクローンは、継代とともに主要な集団へと個体内進化したこと、またこれらの変異を有するウイルスは野生株と比較して優れた増殖能を有することが示唆された。重要なことに、この馴化ウイルスは感染初期に HIV 感染者とほぼ同程度の高い viral load (約 10^6 viral RNA copies/ml) を示すが、その後 3-4 ヶ月で獲得免疫応答により制御され潜伏感染状態へと移行する。すなわち EC (HIV 陽性、未治療下で viral load が 6-12 カ月以上検出限界以下) の定義にほぼ該当する、EC に極めて類似した HIV 感染霊長類モデルであることが明らかになった。現在、上記の獲得変異を導入した分子クローンを作成し、そのカニクイザルにおける複製増殖能の向上に寄与する領域を同定しているところである。
2. EC 状態にある HIV-1mt 感染ザルにおいて、深部リンパ節や脾臓におけるプロウイルス量が末梢血リンパ球と比較して多く検出され、これらの部位におけるウイルスリザーバーの存在が示された。また各臓器において 100 箇所以上のウイルス組込部位を特定出来たことから、クローナリティの時系列解析が今後可能となった。

D. 考察

最終的な HIV 感染症の解決は根治、すなわちウイルスゲノムの完全排除による。しかしその現実的には解決すべき問題が多数存在し、当面の目標は機能的根治 = 無治療でウイルス増殖が制御されヘルパー T 細胞が維持される状態を誘導することであろう。現在、HDAC 阻害薬などの潜伏ウイルス活性化と抗 HIV 薬の併用療法 (shock&kill 療法) や遺伝子改変骨髄幹細胞の移植療法、治療ワクチンなど、さまざまな方法が検討されており、本研究班においても上記の治療法開発に向け研究が進められている。これらの開発における最大の難関はその有効性評価であろう。すなわち HDAC 阻害薬の有効性を評価

するため、これまで HIV 潜伏感染細胞株や感染者由来リンパ球が用いられてきた。しかし、用いる薬剤の服用方法や期間、さらには薬剤の最適化など、HIV 感染者 (特に LTNP/EC 状態にある感染者) での臨床試験は現実的には極めて困難であることが容易に予想される。この点で、今年度の成果である長期 HIV 潜伏感染サルモデルは、これらの適切な評価方法として非常に有望である。

さらに、LTNP/EC における免疫学的機序やそのウイルスリザーバーの解明などにおいても、このサルモデルは非常に有用と考えられる。今年度の本研究班において、これらの解析により非常に興味深い成果が得られている。

E. 結論

今年度の研究成果として、R5-tropic HIV-1mt をカニクイザルに接種することにより長期潜伏感染状態となることが明らかとなった。本霊長類モデルは、新規治療法の評価モデルとしてのみならず、ウイルスリザーバーおよびプロウイルスのクローナリティ解析、獲得免疫応答、病態関連宿主・ウイルス因子等の解明において貴重な情報をもたらすものと期待される。

F. 知的所有権の取得状況

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ma G, Yasunaga J-i, Akari H, Matsuoka M: TCF1 and LEF1 act as T-cell intrinsic HTLV-1 antagonists by targeting Tax. Proc Natl Acad Sci USA, in press.
- 2) Fujie Y, Fusaki N, Katayama T, Hamasaki M, Soejima Y, Soga M, Ban H, Hasegawa M, Yamashita S, Kimura S, Suzuki S, Matsuzawa T, Akari H, Era T: New type of Sendai virus vector provides transgene-free iPS cells derived from chimpanzee blood. PLoS One 9, e113052, 2014.

2. 学会発表等

- 1) 芳田剛、齊藤暁、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
11 日

- 2) 芳田剛、齊藤暁、松岡和弘、大出裕高、岩谷靖雅、保富康宏、俣野哲朗、三浦智行、杉浦互、明里宏文：サル指向性 HIV-1 の感染個体における増殖効率を上昇させる要因、第 28 回日本エイズ学会学術集会、大阪、2014 年 12 月 3 日

厚生労働科学研究委託費（エイズ対策実用化研究事業）委託業務成果報告 II（業務項目）

ゲノム編集技術による HIV 制御研究

担当責任者 小柳 義夫 京都大学ウイルス研究所 教授
研究協力者 蝦名 博貴 京都大学ウイルス研究所 助教

研究要旨

HIV 感染症の根治を実現する治療コンセプトの確立のために、HIV プロウイルスを標的とするゲノム編集法を用いてウイルス遺伝子除去効果を検討した。HIV-1 LTR の TAR 領域を標的とする CRISPR/Cas9 ならびに TALENs を作製し、そのプロウイルス切断・変異導入効率、ならびに導入法についてヒト T 細胞株を用いて検討した。その結果、TAR 標的 CRISPR に比して TAR 標的 TALENs は効率よくプロウイルスの切断・変異導入が可能であること、その導入核酸を mRNA とすることで単一のトランスフェクションで 90% 以上のプロウイルス不活性化能を有すること、それはプロウイルスの内部配列を除去することも可能であることを明らかにした。すなわち、細胞からのウイルス排除手段としてゲノム編集法がきわめて有効性であることがわかった。

A. 研究目的

HIV 根治を実現するための新規治療コンセプトとして、HIV プロウイルスを標的とするゲノム編集法のウイルス遺伝子除去効果を検証する。

プロウイルスが組込まれた潜伏感染ヒト T 細胞株 (ACH2) を使って検討した。また、導入方法としてこれまでの plasmid DNA に加え、mRNA による遺伝子導入を試みた。

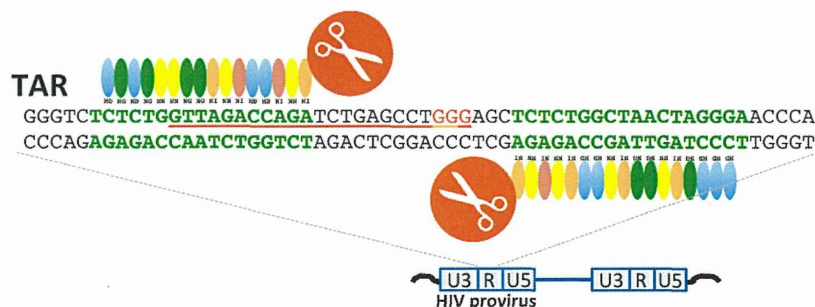
（倫理面への配慮）

B. 研究方法

TAT 結合部位である LTR U5 TAR 領域を標的とする CRISPR/Cas9 (T5 CRISPR) ならびに TALEN (TAR TALENs) を構築し (図 1)、そのプロウイルス切断と変異導入効果について LTR 依存性 TAT・GFP 両発現 HIV-1 ベクター (LTIG) 導入ヒト T 細胞株 (Jurkat) ならびに完全長 HIV

本申請研究では HIV 遺伝子を含む遺伝子組換え実験を行うために原則として P3 レベルの封じ込めが必要な機関承認実験と一部大臣確認実験である。当研究所には P3 レベルの物理的封じ込めが完備しており、既に、組換え HIV 使用に関する機関承認実験、ならびに大臣確認実験の手続きも完了している。

図 1: T5 CRISPR と TAR TALENs の標的配列



T5 CRISPR の認識配列には下線を引き、TAR TALENs 認識配列は太字で示した。

C. 研究結果

T5 CRISPR ならびに TAR TALENs のプロウイルス切断・変異導入効率について、LTIG 導入 Jurkat 細胞の GFP 発現細胞の減少率により比較した。同量の発現 plasmid DNA を導入した場合、TAR TALENs では T5 CRISPR に比して効率良く GFP 発現細胞を減少させることを見出した(図 2 左)。同様に、LTIG プロウイルスが潜伏状態で維持されている Jurkat 細胞株 (c19) でも TAR TALENs は T5 CRISPR に比してより高いプロウイルス切断・変異による不活化効果を示した(図 2 右)。

次に TAR TALENs の導入核酸として、これ

までの plasmid DNA に加え、試験管内合成による mRNA の遺伝子導入を試みた。その結果、T5 CRISPR ならびに TAR TALENs 発現 plasmid DNA の導入に比して、TAR TALEN mRNA のそれがもっとも効率的にプロウイルスの不活性化を誘導可能であり、単一のトランスフェクションにより 90% 以上のプロウイルスが不活性化された(図 3)。また、プロウイルスの両端に配位する LTR を同時に切断することによってプロウイルス内部配列の排除が可能であった。TAR TALENs mRNA を用いた場合、単一のトランスフェクションにより 50% ものプロウイルスの内部配列が排除された(図 4)。

図 2 : T5 CRISPR と TAR TALENs のプロウイルス切断・変異導入効率

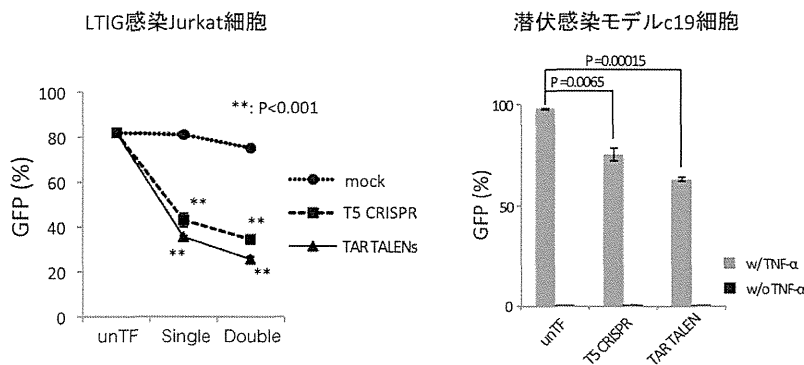


図 3 : ゲノム編集導入方法の検討

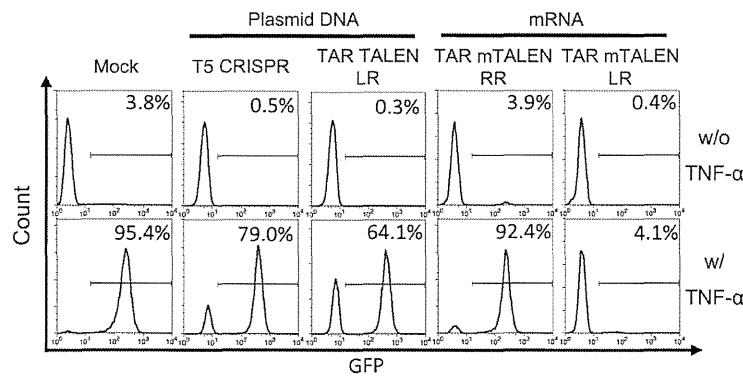
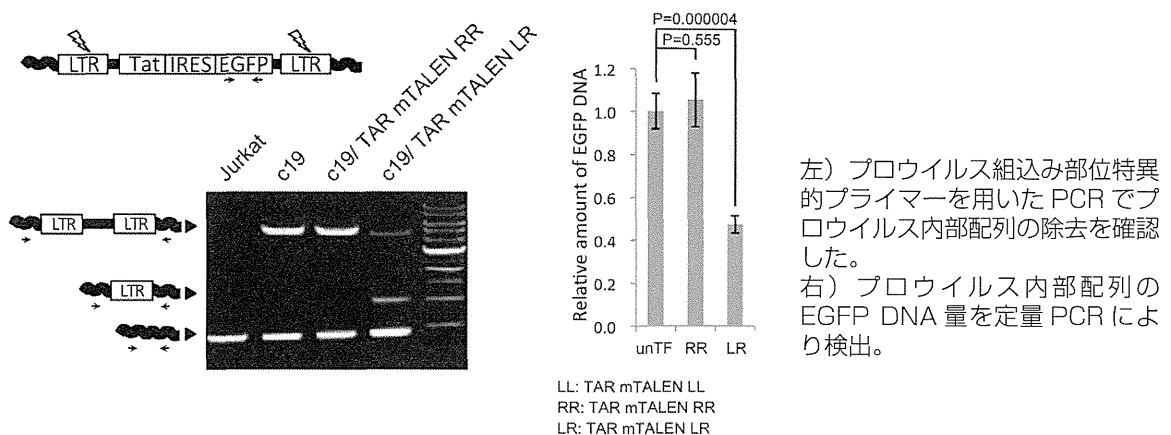


図 4 : TAR TALENs によるプロウイルス内部配列の除去



さらに、ACH2 細胞を用いて、TAR TALENs の完全長プロウイルス排除効果を検討した。その結果、TAR TALENs mRNA の単一のトランスフェクションによって 70% 以上の細胞で p24 陰性となり、さらには、TNF- α 刺激により培養上清に放出されるウイルス抗原 p24 量も TAR TALENs 未処理に比べて 70% 抑制された。すなわち、TAR TALENs によるプロウイルス排除戦略は完全長プロウイルスに対しても有効であった (図 5)。

D. 考察

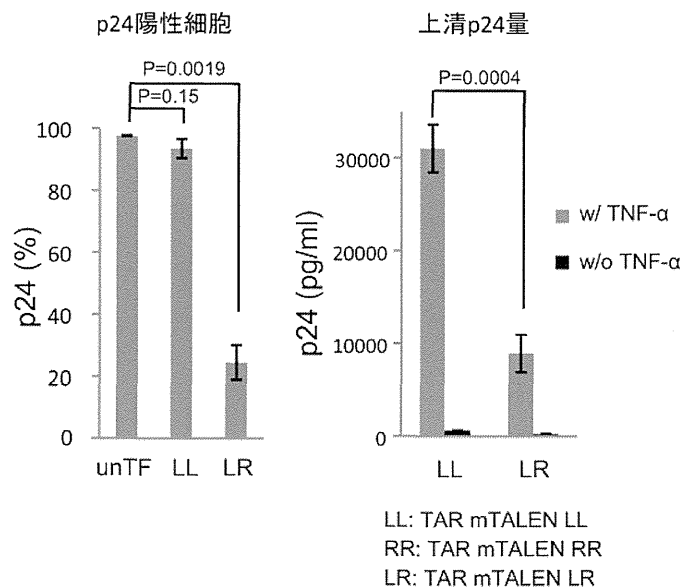
T5 CRISPR ならびに TAR TALENs を HIV 感染細胞に導入することによって、HIV プロウイルスの LTR の切断・変異を導入し、ウイルス遺伝子不活化ならびに除去させることが可能であることが示された。このことは、細胞からのウイルスの排除にゲノム編集法がきわめて有効であることを示唆する。今後、実際にどのようにエイズ治療法へ展開させるか検討を行う。

これまでの実験においては、遺伝子導入実験にがん細胞由来の細胞株を使用してきた。しかし、実際の感染細胞ならびに感染標的細胞である生体内の T 細胞ならびに骨髄系細胞への遺伝子導入によるその有効性評価実験が求められる。すなわち、ゲノム編集法の実用化には、生体内の T 細胞ならびに骨髄系細胞へ遺伝子導入法の

開発が次に求められる。そこで、生体内血液系細胞への導入効率が優れているレンチウイルスベクターによるゲノム編集発現系の開発を予定している。具体的には初代培養細胞へ導入効率をもとに、遺伝子変異効率の優れた CRISPR/Cas9 発現ベクター系を構築する。TALEN 発現レンチウイルスベクターの構築は、その遺伝子には重複配列が多数存在することより困難であると考えている。一方、CRISPR/Cas9 発現レンチウイルスベクターはすでに作製に成功しており、今後広範囲に利用する予定である。HIV プロウイルスに対する標的部位としては、LTR に加えて、Gag, Pol などの必須分子の中でも、特に遺伝子配列が保存されている領域を切断するガイド RNA を設計し、そのウイルス排除効果を検討する予定である。また、HIV のインテグレーションに関わる PSIP1 などの細胞性分子の遺伝子を標的とした場合の抗 HIV 効果も検討する予定である。

CRISPR/Cas9 発現レンチウイルスベクターの抗 HIV 評価実験系として、初代培養 T 細胞へ遺伝子導入を行い、その細胞における複製能のある HIV に対する感染抑制率と耐性ウイルス出現の可能性を検討する。それらの結果、抗 HIV 効果をもっとも強力で認められたものについては、ヒト化マウスの血液幹細胞への遺伝子導入実験を行う。

図 5 : TAR TALENs の完全長 HIV に対する効果



左) p24 陽性細胞の FACS 解析結果、右) 培養上清に含まれる p24 量の ELAISA 解析の結果

E. 結論

HIV-1 プロウイルス不活化ならびに排除には、CRISPR/Cas9 ならびに TALEN 法は有効であることがわかった。

集法を用いた HIV プロウイルスのライブイメージングシステムの構築. 第 37 回日本分子生物学会年会. 2014 年 11 月 25-27 日 (火-木), 横浜

F. 知的所有権の取得状況

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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) Sato K, Takeuchi JS, Misawa N, Izumi T, Kobayashi T, Kimura Y, Iwami S, Takaori-Kondo A, Hu W-S, Aihara K, Ito M, Ando S, Pathak VK, Koyanagi Y. APOBEC3D and APOBEC3F potently promote HIV-1 diversification and evolution in humanized mouse model. *PLOS Pathog*. 10:e1004453, 2014.
- 3) 蝦名博貴、小柳義夫. ゲノム編集技術を用いたエイズ根治療法の可能性. 今すぐ始めるゲノム編集 32:21-22, 2014, 羊土社.
- 4) 佐藤佳、小柳義夫. HIV-1 のウイルス学, HIV 感染症と AIDS 別冊 pp32-38, 2014, 最新医学社.
- 5) 蝦名博貴、小柳義夫. ゲノム編集とエイズ治療. 医学の歩み 252:189-193, 2015, 医歯薬出版株式会社.

2. 学会発表等

- 1) 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. 2014 年 6 月 13-14 日 (金-土), 熊本.
- 2) 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. 18-19 June, 2014.
- 3) 蝦名博貴、金村優香、三沢尚子、佐久間哲史、小林朋子、山本卓、小柳義夫: TALEN 法による HIV プロウイルスの高編集効果. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 2014 年 11 月 11-12 日 (月-水), 横浜.
- 4) 蝦名博貴、金村優香、小柳義夫: ゲノム編

厚生労働科学研究委託費（エイズ対策実用化研究事業）委託業務成果報告 II（業務項目）

再生医療技術による HIV 制御に関する研究

担当責任者 塩田 達雄 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨

最近進展の著しい再生医療技術を用いて HIV 感染症根治のための基盤技術の開発を最終目標として、今年度は現在エイズのサルモデルとして頻用されるものの iPS 細胞樹立についてはごく少数の報告しかないアカゲザルの iPS 細胞樹立を試みた。その結果、ヒトの場合と比べてより厳密な条件が必要となるものの、アカゲザル末梢血から iPS 細胞を樹立できることが明らかになった。また、造血幹細胞や T 細胞、骨髄球系細胞に相当する表現形を持つ分画を試験管内で誘導できることを見出した。また、iPS 細胞樹立に使われているセンダイウイルスベクターを用いて CRISPR 技術を改良し、よりデリバリー効率が高かつ guide RNA の発現が一過性に留まる新しい遺伝子ノックアウト技術の開発を試みたが、センダイウイルスベクターは CRISPR のデリバリーには適さないことが明らかとなった。

A. 研究目的

1990 年代後半に開始された多剤併用療法により感染者の血中 HIV 量は検出限界以下にまで減少させることができ、感染者の予後は著しく改善され、エイズは「死の病」ではなくなった。全世界の HIV 感染者数は 3400 万人超と依然として膨大だが、アジア・アフリカ諸国においても抗 HIV 薬による治療が急速に進展し、全世界では年間死亡者数や新規感染者は着実に減ってきている。それでも、現時点においては、血中の HIV を検出限界以下まで減少させ続けても、感染者の体内から HIV を完全に排除することは不可能である。休止期にある CD4 陽性 T リンパ球やその他の寿命の長い細胞の中で HIV が潜伏し続けることが、HIV 感染症の根治を不可能にしている。しかし、慢性骨髄性白血病の化学療法に引き続き、両側の CCR5 遺伝子に 32 塩基の欠失変異を持ち、HIV が感染できない幹細胞移植を受けた感染者から HIV が検出されなくなったとの報告がなされ、HIV 感染症の「根治」の可能性が議論されるようになった。本研究では、iPS 細胞に代表される最近進展の著しい再生医療技術を用いて HIV 感染症根治のための基盤技術の開発を最終目標とする。すなわち HIV 感染者

から樹立した iPS 細胞の CCR5 をノックアウトあるいはノックダウンし、CD4+ T 細胞（あるいはもう少し前の分化段階で）まで分化誘導を行い、その HIV 感染者に移植する。そして、最終目標としては、HIV-1 感染者に十分量の HIV-1 耐性 CD4 陽性細胞を移植し免疫系の再構築を計ることを目指す。

しかし、心筋や網膜の再生医療と比べて、多様な外来抗原に対応する複雑な免疫系の再生医療は多くの困難が予想される。また、HIV が感染して破壊する CD4 陽性 T 細胞の iPS 細胞からの試験管内での分化は未だ報告がない。そこで、ヒトに応用する前に、単クローンの CD4 陽性 T 細胞の移植が可能になることを最初の目標として目指す。サルを使うことの利点は、試験管内では分化誘導が出来なくても、未分化の細胞をサル個体内で分化誘導させ、その後の T 細胞としての学習を促す可能性を試すことができる点にある。本年度は旧世界サルの中でも、現在エイズのサルモデルとして頻用されるものの iPS 細胞樹立についてはごく少数の報告しかないアカゲザルの iPS 細胞樹立を試みた。また、CCR5 遺伝子のノックアウトのために、iPS 細胞樹立に使われているセンダイウイルスベクターを用い

て CRISPR 技術を改良し、よりデリバリー効率が高くかつ guide RNA の発現が一過性に留まる新しい遺伝子ノックアウト技術の開発を試みた。なお、本研究は京都大学 iPS 細胞研究所の金子新准教授との共同研究である。

B. 研究方法

1. アカゲザル iPS 細胞の作製

アカゲザル末梢血から T 細胞を分離し、ヒト iPS 細胞誘導因子である Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc のいわゆる山中 4 因子を発現するセンダイウイルスを用いてアカゲザルの iPS 細胞樹立を試みた。山中 4 因子導入後に添加するサイトカインの種類や Rock inhibitor の有無等、種々の条件を振って iPS 細胞樹立のための条件の最適化を試みた (図 1)。樹立したアカゲザル iPS 細胞の未分化能は、未分化マーカー SSEA-4 や TRA-1-60 の発現やアルカリホスファターゼ染色により確認した。使用したセンダイウイルスベクターの除去を確認した後、血管内皮増殖因子、幹細胞因子および Flt-3 リガンドを用いて CD34 陽性細胞への分化誘導を行い、フローサイトメーターで表面マーカーの確認を行った。

2. デリバリー効率が高くかつ guide RNA の発現が一過性に留まる新しい遺伝子ノックアウト技術の開発

センダイウイルスに guide RNA を発現させ、Cas9 を発現するプラスミドとともに細胞に導入して遺伝子ノックアウト効率を測定した。

C. 研究結果

1. アカゲザル iPS 細胞の作製

アカゲザル末梢血の T 細胞よりヒト iPS 細胞誘導因子を用いて、ヒトの T 細胞の場合よりも厳密な条件が必要とされるものの iPS 細胞を樹立することが出来た。また、樹立した iPS 細胞より CD34 陽性細胞を分化誘導出来ることと、その CD34 陽性細胞よりマクロファージ様細胞を分化誘導できること、が明らかとなった (図 2)。

2. デリバリー効率が高くかつ guide RNA の発現が一過性に留まる新しい遺伝子ノックアウト技術の開発

センダイウイルスベクターを用いて CRISPR 技術を改良し、よりデリバリー効率の高い遺伝子ノックアウト技術の開発を試みたが、従来の

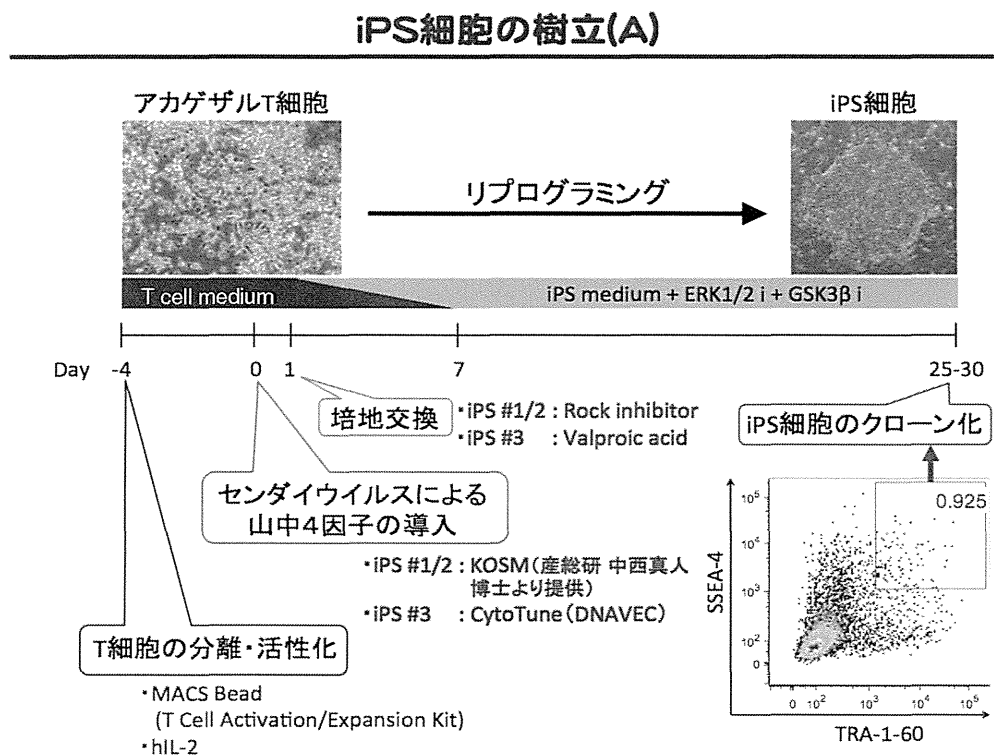


図 1 : アカゲザル iPS 細胞の作製

トランスフェクション法に比べて良好な遺伝子ノックアウト効率を得ることはできず、センダイウイルスベクターは CRISPR のデリバリーには適さないことが明らかとなった。

D. 考察

アカゲザル T 細胞からの iPS 細胞樹立は当初、ヒト T 細胞からの樹立よりも困難であったが、種々の条件を振って iPS 細胞樹立のための条件の最適化に成功した。iPS 細胞由来のマクロファージ様細胞が HIV 感染の標的となり得る否かを、HIV に近縁なサル免疫不全ウイルスを感染させて検討する予定である。また、iPS 細胞由来の CD34 陽性細胞から試験管で T 細胞への分化を試みるとともに、遺伝子導入によって標識した iPS 細胞由来細胞を免疫寛容状態である胎仔ザルに同種移植し、iPS 細胞由来細胞がアカゲザル個体において定着しうるか否かを検討する。また、CRISPR のデリバリーには細胞質でのみ発現するセンダイウイルスベクターは不向きであることが分かったので、細胞核から発現するアデノウイルスベクターを用いて遺伝子ノックアウト効率の改善を試みる。

E. 結論

報告の無かったアカゲザル末梢血から、ヒトの場合と比べてより厳密な条件が必要となるものの、iPS 細胞を樹立できることが明らかになった。また、造血幹細胞や T 細胞、骨髄球系細胞に相当する表現形を持つ分画を試験管内で誘導できることを見出した。一方、センダイウイルスベクターは CRISPR のデリバリーには適さないことが明らかとなった。

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., and Shioda T. Moderate restriction of macrophage-tropic human immunodeficiency virus type 1 by SAMHD1 in monocyte-derived macrophages. *PLoS one* 9: e90969. 2014.
- 2) Takeda E, Kono K, Hulme AE, Hope TJ, Nakayama EE, Shioda T. Fluorescent image analysis of HIV-1 and HIV-2 uncoating kinetics in the presence of old world

コロニーアッセイによる造血活性の確認(G)

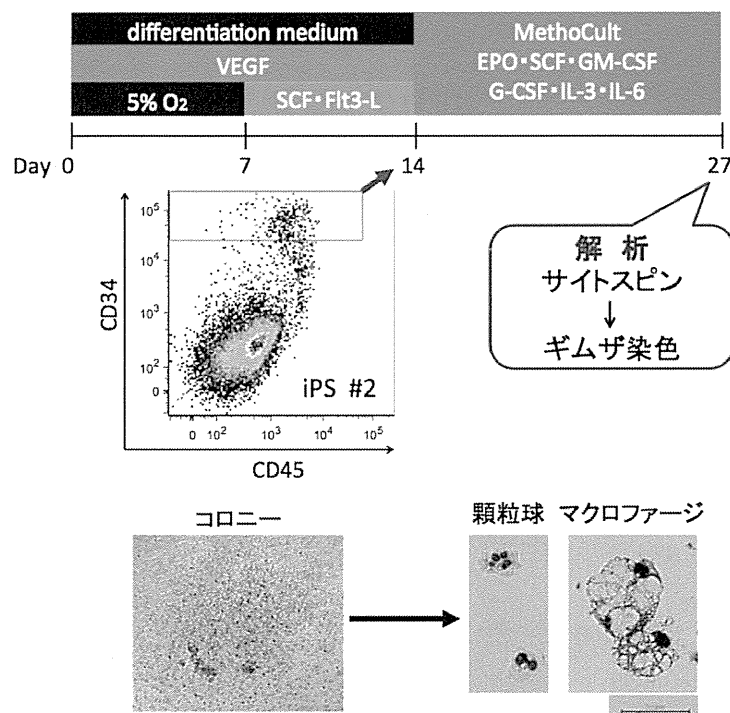


図2: アカゲザル iPS 細胞から作製したマクロファージ様細胞

- monkey TRIM5 *a*. *PLoS one* 2015 Accepted.
- 3) Hayasaka H, Kobayashi D, Yoshimura H, Nakayama EE, Shioda T, Miyasaka M. The HIV-1 gp120/CXCR4 axis promotes CCR7 ligand-dependent CD4 T cell migration: CCR7 homo- and CCR7/CXCR4 hetero-oligomer formation as a possible mechanism for up-regulation of functional CCR7. *PLoS one* 2015 Accepted.
 - 4) Nomaguchi M, Nakayama EE, Yokoyama M, Doi N, Igarashi T, Shioda T, Sato H, Adachi A. Distinct combinations of amino acid substitutions in N-terminal domain of Gag-capsid afford HIV-1 resistance to rhesus TRIM5 α . *Microbes and infection / Institut Pasteur* 16:936-944, 2014.
- ## 2. 学会発表等
- 1) Tatsuo Shioda: Host Factors in the Pathogenesis of HIV Infection. 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) AIDS Panel Meeting 2015 年 1 月 26 日 -29 日 Taipei, Taiwan
 - 2) 櫻木小百合, 塩田達雄, 櫻木淳一: HIV パッケージングシグナル内最重要領域 SL1 の機能的構造に関する多角的解析. 第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会 2014 年 12 月 3 日 -5 日 大阪, 日本
 - 3) 中山英美, Uttayamakul Sumonmal, Tiphaine Oudot-Mellakh, Pimrapat Tengtrakulcharoen, Julien Guergnon, Jean-Francois Delfraissy, Srisin Khusmith, Chariya Sangsajja, Sirirat Likanonsakul, Ioannis Theodorou, 塩田達雄: Genome-wide association study of HIV-related lipotrophy in Thai patients: Association of a DLGAP1 polymorphism with fat loss. 第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会 2014 年 12 月 3 日 -5 日 大阪, 日本
 - 4) 武田英里, 河野健, Amy E. Hulme, Thomas J. Hope, 中山英美, 塩田達雄: TRIM5 α 存在下における HIV-1 および HIV-2 のカプシドコアの脱殻第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会 2014 年 12 月 3 日 -5 日 大阪, 日本
 - 5) 田谷かほる, 武田英里, 中山英美, 塩田達雄, 明里宏文, 金子新. 再生医療技術のエイズ研究応用のためのアカゲザル iPS 細胞樹立と CD34 陽性細胞への分化. 第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会 2014 年 12 月 3 日 -5 日 大阪, 日本
 - 6) Tahmina Sultana, 中山英美, 飛田哲志, 齊藤暁, 明里宏文, 塩田達雄: Novel mutant HIV-1 strains with high degree of resistance to cynomolgus macaque TRIMCyp generated by random mutagenesis. 第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会 2014 年 12 月 3 日 -5 日 大阪, 日本
 - 7) 櫻木淳一, 櫻木小百合, 塩田達雄: HIV-1 パッケージングシグナル内最重要領域 SL1 の機能的構造に関する多角的解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 2014 年 11 月 10 日 -12 日 横浜, 日本
 - 8) 武田英里, 河野健, Amy E. Hulme, Thomas J. Hope, 中山英美, 塩田達雄: TRIM5 α による HIV-1 および HIV-2 のカプシドコアの脱殻促進: 可視化ウイルスによる解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 2014 年 11 月 10 日 -12 日 横浜, 日本
 - 9) Tatsuo Shioda: Host factors in the pathogenesis of HIV infection. International Congress on Medical Virology 2014 2014 年 11 月 5 日 -7 日 Bangkok, Thailand
 - 10) Emi E Nakayama, Tetsushi Tobita, Tahmina Sultana, Akatsuki Saito, Hirofumi Akari, Tatsuo Shioda: Novel mutant HIV-1 strains with high degree of resistance to cynomolgus macaque TRIMCyp generated by random mutagenesis. The 13th Awaji International Forum on Infection and Immunity in Nara 2014 年 9 月 23 日 -26 日 奈良, 日本