

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）

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－遺伝子 *vpr* の生体内機能の解明

担当責任者 間 陽子 理化学研究所 ユニットリーダー

研究要旨

HIV-1 のアクセサリ－蛋白質 Vpr の機能における宿主特異性およびその分子生物学的機序を明らかにするために、一つの *vpr* 遺伝子を持つ HIV-1、SIVagm 及び SIVcpz および *vpr* と *vpx* 遺伝子の両方を持つ HIV-2 及び SIVmac239 の *vpr* または *vpx* 遺伝子をヒト及び各種サル細胞に発現させそれらの機能を比較した。まず、HIV-1、SIVagm、SIVcpz、HIV-2 及び SIVmac239 の Vpr および Vpx 蛋白質の核局在能をヒト由来 HeLa 細胞とアフリカミドリザル由来 COS 細胞で調べたところ、良く保存されていた。次に G2 期停止能およびアポトーシス能を解析したところ、HIV-2 及び SIVmac239 由来の Vpx 蛋白質はそれらの機能を示さなかった。一方、HIV-1 の Vpr 蛋白質に最も近縁の SIVcpz の Vpr 蛋白質のみが HIV-1 よりは低いが G2 期停止能やアポトーシス能を示した。さらに、Vpr 関連性ヒト宿主因子、DCAF1、Sap145、HIP1、PRMT5、SLX4 は HeLa 細胞、COS 細胞および MK.P3 細胞に mRNA レベルで発現していた。

A. 研究目的

新規ワクチンや抗 HIV 薬の安全性、有効性をヒトに最も近縁なサル類で評価することを目的として、実験用サル類に感染・発症する新規サル指向性 HIV-1 (HIV-1mt) 感染サルモデルの開発が進められている。これまでの研究で、マカク属サルで良好な増殖効率を有する HIV-1mt clone が開発されているが、未だに感染サルに CD4 T 細胞数の減少や免疫不全を呈するような病原性 HIV-1mt の確立には至っていない。

HIV-1 はアクセサリ－遺伝子である *vpr*, *nef*, *vif* および *vpu* を有するという特徴がある。中でも、*vpr* 遺伝子産物はエイズ患者の血清中に大量に存在し、ウイルス感染効率の上昇および HIV 潜伏感染細胞からのウイルス産生を惹起するなど、エイズ発症のキー蛋白質として注目されている。また、Vpr は細胞の核移行、G2 期停止、分化およびアポトーシスなどを誘導する。最近、ヒト化マウスを用いた HIV-1 感染実験において Vpr が Treg 細胞に G2 期停止およびアポトーシ

スを誘導し、HIV-1 複製を上昇させることが報告された。また、Vpr が SYCP3-like X-linked 4 (SLX4) の早期活性化を誘導し、G2 期停止を惹起すると同時に自然免疫の低下をもたらすことも明らかとなった。更に、我々はマクロファージ複製に重要な新規 Vpr 関連因子として HIP1 および PRMT5 を同定した。このように、Vpr の新規機能と関連因子が次々と報告されている。

しかし、サルに感染するウイルスである SIV は Vpr と Vpx をもち、Vpr の多機能性が HIV-1 Vpr と必ずしも一致しない。この HIV-1 Vpr の機能の欠損が、サル個体感染における病原性の欠失と関連している可能性がある。

そこで本研究では、Vpr 蛋白質機能における宿主特異性およびその分子細胞生物学的機序を明らかにするとともに、サル細胞における *vpr* 機能の最適化に必要な分子構造学的検討を行う。さらにこれらの結果を踏まえ、*vpr* 改変 HIV-1mt のサル個体での増殖効率や病原性について解析することにより、病原性 HIV-1mt の構築を推進する。

B. 研究方法

1) 発現ベクターの構築：HIV-1 NL4-3, SIVcpz TAN3.1, SIVagm 9063 から *vpr* 遺伝子を、HIV-2 ROD10, SIVmac239 から *vpr* 及び *vpx* 遺伝子を、pME18-neo 発現ベクターにクローニングし、各々の N 末端側に FLAG 配列を、C 末端側に IRES と ZsGreen1 遺伝子を導入したプラスミドを構築した。

2) 系統樹解析：HIV-1 NL4-3, SIVcpz TAN3.1, SIVagm 9063, HIV-2 ROD10, SIVmac239 からの *vpr* 及び *vpx* 遺伝子の予測されるアミノ酸配列の遺伝子距離を Nei's genetic distance 法を使用して計算し、Neighbor-joining 法により系統樹を構築した。

3) 細胞株とトランスフェクション：ヒト細胞として HeLa 細胞、サル細胞として COS 細胞（アフリカミドリザル）及び MK.P3 細胞（カニクイザル）、そしてマウス細胞として NIH3T3 に FUGEN を用いてトランスフェクションし、抗 Flag 抗体を用いた Western blot 法によって発現と分子量を確認した。

4) 機能解析：G2 期停止をフローサイトメトリーにより、核局在を共焦点顕微鏡観察により、アポトーシス誘導能を caspase アッセイにより解析した。

5) Real time-RT-PCR：既知の Vpr 関連性ヒト宿主因子 (DCAF1, Sap145, HIP1, PRMT5, SLX4) のヒト、チンパンジー、アフリカミドリザル、アカゲザル、カニクイザルに保存されている領域に対するプライマー及びプローブを設

計し、各々の発現量を real time-RT-PCR で測定し、各細胞における発現量を比較した。

(倫理面の配慮) 特になし

C. 研究結果

一つの *vpr* 遺伝子を持つ HIV-1, SIVagm および SIVcpz、および *vpr* と *vpx* 遺伝子の両方を持つ HIV-2 及び SIVmac239 の *vpr* または *vpx* 遺伝子のヒトおよび各種サル細胞における機能を比較した。

まず、Gene Bank から収集した塩基配列情報に基づいて予測されるアミノ酸配列を用いて系統樹解析を行った (図 1)。HIV-2 及び SIVmac239 の *vpx* 遺伝子は、HIV-1, SIVagm, SIVcpz, HIV-2 及び SIVmac239 の *vpr* 遺伝子とは異なるクラスターに分類された。さらに、5つの *vpr* 遺伝子の中で、HIV-1 と SIVcpz、および HIV-2 及び SIVmac239 が最も近縁で、SIVagm が他の 4 種類とはかなり離れていた。

次に、Vpr および Vpx 蛋白質の機能を解析するために、各々の *vpr* または *vpx* 遺伝子発現ベクターを構築して HeLa 細胞に導入して、抗-Flag 抗体を用いた Western blot 法を行った。その結果、目的の分子量の位置にバンドを確認できた。そこで、各種蛋白質発現細胞 (HeLa 細胞および COS 細胞) における局在を抗-Flag 抗体を用いて蛍光染色後に共焦点レーザー顕微鏡で観察した (図 2)。その結果、全ての Vpr あるいは Vpx 蛋白質は核に局在していた。しかし、

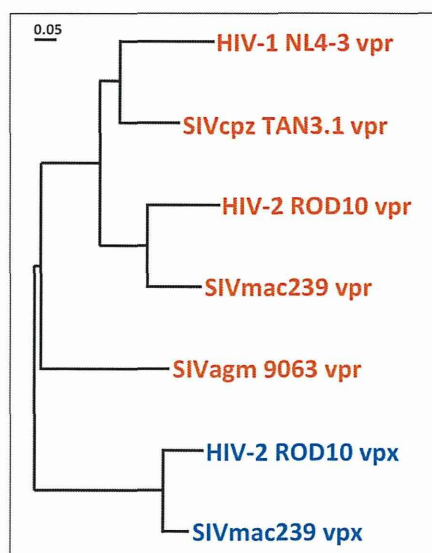


図 1 Vpr/Vpx の系統樹

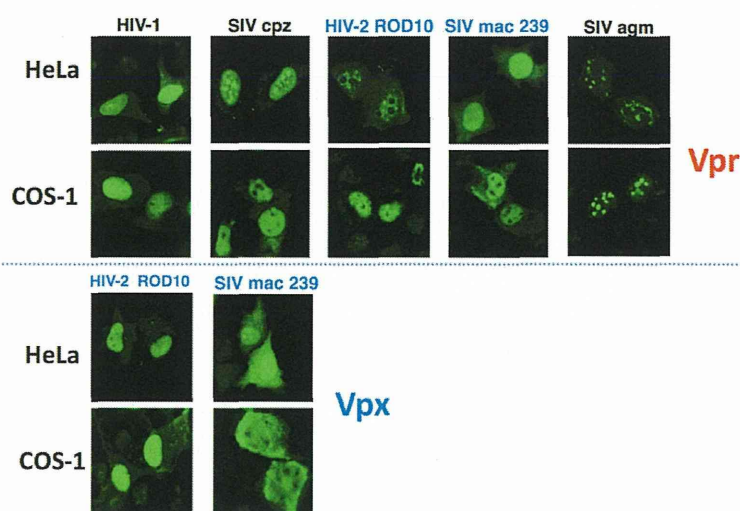


図 2 Vpr/Vpx の HeLa, 及び COS 細胞における核局在

SIV mac 239 の Vpr および Vpx 蛋白質は核だけでなく細胞質にも発現していた。また、SIVagm の Vpr 蛋白質は核小体に強く局在していた。

続いて、G2 期停止およびアポトーシス誘導能を HeLa 細胞を用いて解析した（図 3）。その結果、HIV-2 及び SIVmac239 由来の Vpx 蛋白質は G2 期停止能を全く示さなかった。一方、HIV-1 の Vpr 蛋白質は強い G2 期停止能を示した。興味深い事に、HIV-1 の Vpr 蛋白質に最も近縁の SIVcpz の Vpr 蛋白質のみが HIV-1 よりは低いけれども G2 期停止能を示したが、他は示さなかった。さらに、HeLa 細胞、COS 細胞及び MK.P3 細胞を用いて、caspase アッセイによりアポトーシス誘導能を調べた。HIV-2 及び SIVmac239 由来の Vpx 蛋白質は 3 種類の細胞のいずれにおいてもアポトーシス誘導能を示さなかった。一方、HIV-1 および SIVcpz の Vpr 蛋白質はアポトーシスを示した。さらに、他の 3 種類の Vpr 蛋白質は非常に弱いか、あるいは擬陽性レベルでしか誘導していなかった。

サル細胞での HIV-1 Vpr の種特異性を決定している宿主因子を同定するために、既知の Vpr 関連性ヒト宿主因子、である DCAF1、Sap145、HIP1、PRMT5、SLX4 の HeLa 細胞、COS 細胞および MK.P3 細胞における発現量を realtime-PCR 法によって解析した。その結果、ヒト由来の HeLa 細胞に比較してアフリカミドリザル由来の COS 細胞は全ての因子の mRNA の発現が高い傾向を、カニクイザル由来の MK.P3 細胞は HIP1 を除いた他の因子が低い傾向を示した。

D. 考察

HIV-1、SIVagm、SIVcpz、HIV-2 および SIVmac 239 の Vpr と Vpx 蛋白質のアミノ酸配列のアライメントを比較したところ（図 4）、核移行能およびウイルス粒子への取込に関連する N 端領域は高い保存性を示したが、G2 期停止およびアポトーシス誘導能に関連する C 端領域の保存性は低かった。事実、HIV-1、SIVagm、SIVcpz、HIV-2 及び SIVmac239 の Vpr および Vpx 蛋白質はいずれも核に局在したが、G2 期停止およびアポトーシス誘導能は、HIV-1 の Vpr 蛋白質に最も近縁の SIVcpz の Vpr 蛋白質のみが HIV-1 よりは低いけれども示した。本年度は、トランスフェクションし易いヒトおよびサル由来の繊維芽細胞を用いて実験を行ったが、今後は T 細胞指向性アデノウイルス発現ベクターを用いて、ヒト、チンパンジー、カニクイザル、アカゲザル、ブタオザル及びニホンザルの T 細胞株（明里より分与）に導入する予定である。

E. 結論

- 1) HIV-1、SIVagm、SIVcpz、HIV-2 及び SIVmac 239 の Vpr および Vpx 蛋白質の核局在能は保存されていた。
- 2) HIV-2 及び SIVmac239 由来の Vpx 蛋白質は G2 期停止能およびアポトーシス能を示さなかった。
- 3) HIV-1 の Vpr 蛋白質に最も近縁の SIVcpz の Vpr 蛋白質のみが HIV-1 よりは低いけれども G2 期停止能やアポトーシス能を示した。
- 4) Vpr 関連性ヒト宿主因子、DCAF1、Sap145、

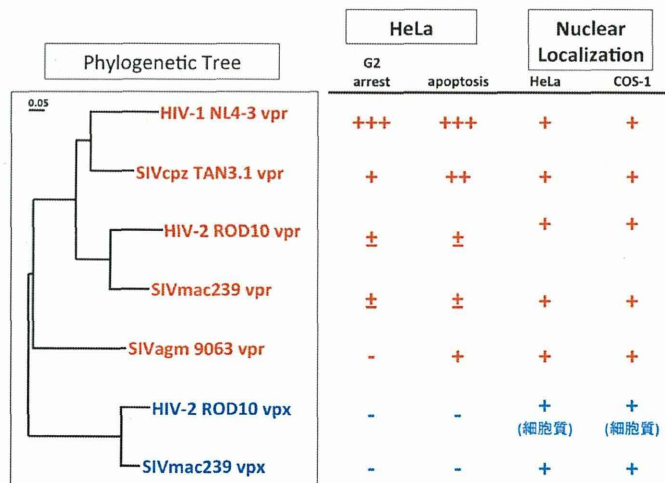


図 3 Vpr/Vpx の系統樹と HeLa 及び COS 細胞における機能

HIP1、PRMT5、SLX4 は HeLa 細胞、COS 細胞および MK.P3 細胞に mRNA レベルで発現していた。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Zahoor M. A, Xue G, Sato H, Murakami T, Takeshima S-n, Aida Y. HIV-1 Vpr induces interferon-stimulated genes in human monocyte-derived macrophages. *PloS One*, 9(8):e106418, 2014.
- 2) Miyatake H, Sanjoh A, Unzai S, Matsuda G, Tatsumi Y, Miyamoto Y, Dohmae N, Aida Y. Crystal structure of human importin- α 1 (Rch1), revealing a novel autoinhibition mechanism involving homodimerization. *PloS One*, 10(2): e0115995, 2015
- 3) Hagiwara K, Ishii H, Murakami T, Takeshima S-n, Chutiwitoonchai N, Kondoh Y, Honda K., Osada H, Tsunetsugu-Yokota Y, Suzuki M, and Aida Y. Synthesis of a Vpr-binding derivative for use as a novel HIV-1 inhibitor. *Antivirus Res.*, in press.

2. 学会発表等

- 1) Kamori D, Murakami T, Hasan Z, Carlson J, Siarot L, Miura T, Kawana-Tachikawa

A, Iwamoto A, Gatanaga H, Oka S, Aida Y, Ueno T. : Effects of naturally arising mutations in HLA-A*02-restricted immunodominant region on the functions of HIV-1 Vpr, 第 16 回白馬シンポジウム、2014.6.14、熊本

- 2) Zahoor A. M, 薛光愛, 佐藤洋隆, 村上知行, 竹嶋伸之輔, 間陽子 : HIV Vpr 発現マクロファージにおけるマイクロアレイによる遺伝子発現解析, 第 157 回日本獣医学会学術集会、2014.9.9-12、札幌
- 3) Siarot L, 佐藤洋隆, Chutiwitoonchai N, 間陽子 : Screening of small molecules Interfering the specific interaction between human immunodeficiency virus-type I(HIV-1) Gag and ESCRT Tsg 101, 第 157 回日本獣医学会学術集会、2014.9.9-12、札幌
- 4) 村上知行, 間陽子 : Vpr は新規 Vpr 結合因子 HIP1 のリン酸化の制御を介して G2 期停止を調節する, 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014.11.10-12、横浜
- 5) Chutiwitoonchai N, 間陽子 : TSG101 over-expression induces Gag aggregation at perinuclear region and this aberrance is rescued by Vpr : 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014.11.10-12、横浜 (パシフィコ横浜)
- 6) Siarot L, 佐藤洋隆, Chutiwitoonchai N, 間陽子 : Gag-Tsg 101 targeting anti-human immunodeficiency virus-typeI (HIV-I) therapy, 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014.11.10-12、横浜

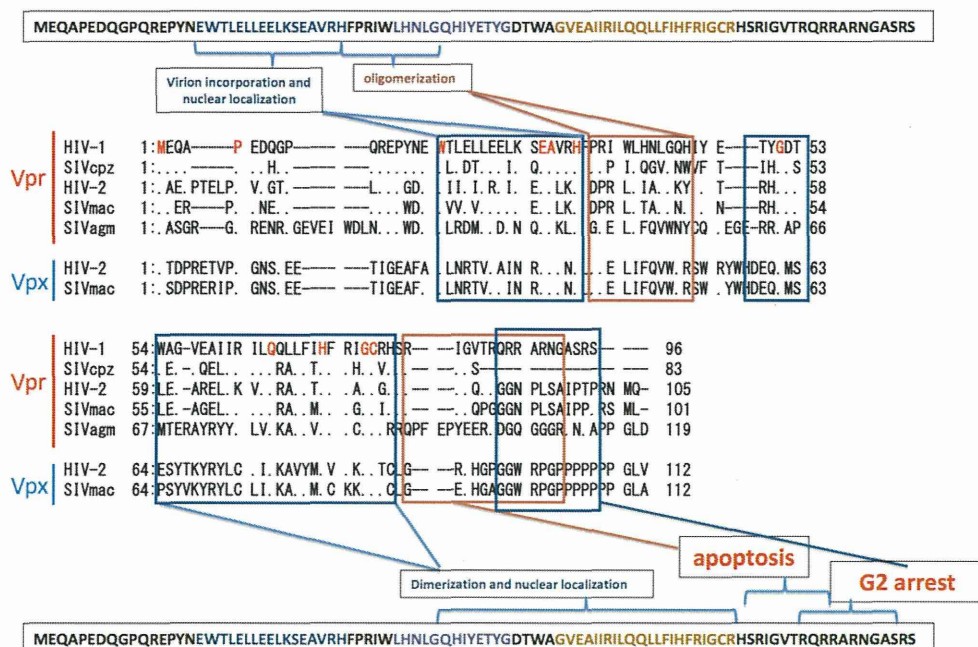


図 4 Vpr/Vpx のアライメントと機能的ドメイン

- 7) 佐藤洋隆、阿部昌子、大貫哲男、黒田和道、長澤洋介、武井正美、山本樹生、吉田稔、間陽子：HIV-1 アクセサリー蛋白質 Vpr を標的とした新規抗 HIV 治療薬スクリーニング系の構築、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014.11.10-12、横浜
- 8) 萩原恭二、村上知行、石井英樹、竹嶋伸之輔、近藤恭光、本田香織、長田裕之、横田(恒次)恭子、鈴木正昭、間陽子：アクセサリータンパク質 Vpr の核移行を標的にしたマクロファージに対する新規 HIV-1 阻害剤の最適化研究、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014.11.10-12、横浜
- 9) Kamori D.、村上知行、Hasan Z、Meribe S、Carlson J.、Siarot L、三浦聡之、立川(川名)愛、岩本愛吉、瀧永博之、岡慎一、間陽子、上野貴将：Effect of natural variability of an immunodominant Vpr region on immunological footprints, clinical outcome and protein functions、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014.11.10-12、横浜
- 10) L.L. Siarot, H. Satol, N Chutiwitoonchai, T. Aono, Y. Aida : Screening of small molecule inhibitors for human immunodeficiency virus-type I(HIV-1) by targeting Gag-Tsg101 interaction. 2015. 3.5-7, 2015 Palm Spring Symposium, CA, USA

H. 知的所有権の取得状況

無し

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）

潜伏・持続感染における細胞性免疫応答研究

担当責任者 俣野 哲朗 国立感染症研究所エイズ研究センター長
研究協力者 石井 洋 国立感染症研究所エイズ研究センター研究員

研究要旨

HIV 感染症において細胞性免疫反応は、ウイルス複製抑制に中心的役割を担っている。本研究では、サル免疫不全ウイルス（SIV）感染サルエイズモデルにおいて、慢性期のそけいリンパ節由来のリンパ球を用い、SIV 抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞反応の解析を行った。その結果、Gag（N 末端側：Gag-N）抗原特異的 CD95 陽性 CD28 陽性 CD8 陽性 T 細胞頻度と血漿ウイルス量が逆相関を示すことを見出した。リンパ節の SIV Gag CA p27 抗原陰性群は、陽性群と比較して有意に高い Gag-N 特異的 CD8 陽性 T 細胞頻度を示した。これらの結果は、ウイルス抗原の中で特に Gag（Gag-N）抗原に特異的な CD8 陽性 T 細胞が、感染慢性期の SIV 複製抑制に重要な役割を担っていることを示すものと考えられる。

A. 研究目的

抗 HIV 薬治療によりエイズ発症抑制が可能となったものの、HIV 感染症治療にいたる治療法はなく、感染者はほぼ生涯にわたって服薬を継続する必要がある。その結果、薬剤耐性、副作用および医療費高騰等の問題が生じている。さらに近年、抗 HIV 薬治療下においても、検出限界以下の潜伏感染に基づき、骨粗鬆症や心血管障害等が促進されることが問題視されている。これらの問題解決に向けては、まず、HIV 持続感染機序および抗 HIV 薬治療下の潜伏感染機序を理解することが重要である。

HIV 感染症において、細胞性免疫反応、特に細胞傷害性 CD8 陽性 T 細胞（CTL）反応は、ウイルス複製抑制に中心的役割を担っている。しかし、CTL によってもその標的の違いにより、ウイルス複製抑制能に違いがあることが指摘されてきている。そこで本研究では、サル免疫不全ウイルス（SIV）感染サルエイズモデルにおいて、ウイルス各抗原特異的 CTL 反応とウイルス持続感染・潜伏感染との関連を解析することとした。特に、ウイルス増殖と CTL 反応の相互作用の場であるリンパ節に着目し、SIV 抗原特異

的 CTL 反応を解析した。

B. 研究方法

SIV 感染実験に用いたサル（20 頭）の慢性期の末梢血由来リンパ球およびそけいリンパ節由来リンパ球を用いた。SIV 各抗原のアミノ酸配列をカバーする overlapping peptide pools を用いてリンパ球を刺激した後、インターフェロン γ （IFN- γ ）誘導を細胞内免疫染色により測定した。

（倫理面への配慮）

動物実験については、倫理面も含めて実施機関および所属機関の動物実験委員会の審査をうけ、その承認を得てから開始した。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）および機関承認済みである。

C. 研究結果

これまでの研究から、まず Gag 抗原に着目し、N 末端側（Gag-N）と C 末端側（Gag-C）の 2 つに分けて解析を行った。リンパ節由来リンパ球を用いた解析で、Gag-N 特異的 CD8 陽性 T 細胞

頻度と血漿中ウイルス量との逆相関がみられた。CD95 および CD28 マーカーの解析を行ったところ、Gag-N 特異的 CD95 陽性 CD28 陽性 CD8 陽性 T 細胞頻度と血漿中ウイルス量間で特に強い逆相関が認められた。末梢血由来リンパ球でもこれらの逆相関が認められたが、リンパ節由来リンパ球を用いた解析の方がより強い逆相関を示した。また、リンパ節の固定標本を用いた免疫染色で SIV Gag CA p27 抗原が陰性であった群は、陽性群と比較して有意に高い Gag-N 特異的 CD8 陽性 T 細胞頻度を示した（図 1）。

D. 考察

SIV 感染慢性期のリンパ節において、Gag-N 特異的 CD95 陽性 CD28 陽性 CD8 陽性 T 細胞頻度と血漿ウイルス量が逆相関を示すことを見出した。ウイルス増殖と CTL 反応の相互作用の場であるリンパ節で、末梢血と比べてより強い逆相関が得られたことは高い意義を有すると考えられる。リンパ節の p27 抗原陰性群が、陽性群と比較して有意に高い Gag-N 特異的 CD8 陽性 T 細胞頻度を示したことは、上記の逆相関を支持している。CD95 陽性 CD28 陽性分画はセントラルメモリー分画と考えられており、特にこの分画が p27 抗原陰性群で高いことは、SIV 各抗原の中でも特にこの Gag-N 領域に特異的な CD8 陽性 T 細胞が、感染慢性期の SIV 複製抑制に貢献していることを意味するものと考えられる。

E. 結論

SIV 感染サルエイズモデルにおいて、慢性期のそけいリンパ節由来のリンパ球を用い、Gag (Gag-N) 抗原抗原特異的 CD95 陽性 CD28 陽性 CD8 陽性 T 細胞頻度と血漿ウイルス量が逆相関を示すことを見出した。リンパ節の SIV Gag CA p27 抗原が陰性群は、陽性群と比較して有意に高い Gag-N 特異的 CD95 陽性 CD28 陽性 CD8 陽性 T 細胞頻度を示した。本研究結果は、Gag(Gag-N) 抗原特異的な CD8 陽性 T 細胞が、感染慢性期の SIV 複製抑制に重要な役割を担っていることを示すものと考えられる。

F. 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

該当無し。

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し。

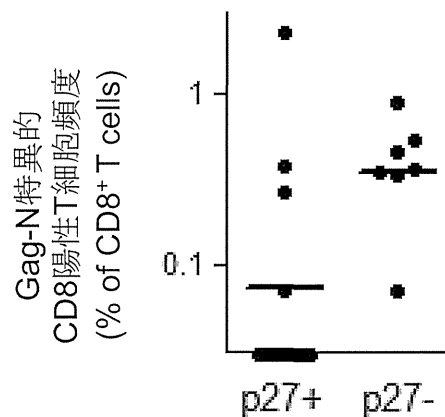


図 1

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）

潜伏・持続感染における液性免疫応答研究

担当責任者 吉村 和久 国立感染症研究所エイズ研究センター 室長

研究要旨

われわれは、これまでに CCR5 inhibitor[maraviroc (MVC)] からの逃避ウイルスが anti-Env 中和抗体に感受性になる一群の変異を同定してきた。これらの中和感受性の異なるウイルスのセットを用い、HIV-1mt 感染サルにおける中和抗体価を測定し、結合抗体価と比較検討した。その結果、サル間でウイルスを継代することに結合抗体だけでなく、中和抗体価も上昇していくことが観察できた。1 継代目のウイルス感染サルでは、結合抗体価が上昇しても中和抗体は出現せず、ウイルスの血中量と中和抗体の誘導が密接に関与していることが示唆された。これらのウイルスセットで感染サルの血中に含まれる中和抗体の大まかな種類と力価が測定可能となれば、ウイルスシークエンスと中和抗体産生の関係を知る事が出来るだけでなく、ウイルスの潜伏・持続感染に液性免疫がどのように関与するかを調べる事が可能となる。

A. 研究目的

我々が独自開発中の中和感受性の異なるウイルスパネル（同じバックボーンの Env で、異なる変異を持つウイルスセット）を用いる事で、血中抗体のワイドでかつ細かな反応特異性の解析が可能になりつつある。今回 HIV-1mt 感染サルの血清の中和力価を測定し、結合抗体価と比較し、その解析を試みた。

B. 研究方法

我々が樹立した中和感受性の異なる subtype B 感染性ウイルスパネル (HIV-1_{KP-5pc}, HIV-1_{KP-5pm1}, HIV-1_{KP-5mvr}) を用いて、TZM-bl 細胞により HIV-1mt 感染サルの血清の中和感受性を測定した。また、ELISA により Env 結合抗体の力価も測定し、比較を行った。

（倫理面への配慮）

該当事項なし

C. 研究結果

われわれは R5 臨床分離株を用いて in vitro で高度 MVC 耐性ウイルスを誘導してきた。また、

低 CCR5 細胞馴化ウイルスも同時に樹立した。次に、MVC 高度耐性ウイルス、およびコントロールウイルスの Env を pNL43 ベースの plasmid に組み込み、それぞれの感染性クローンウイルスを作製した。これらの組換えウイルスを用いて、gp120 の変異と中和抗体感受性との関連性を調べた結果、高度 MVC 耐性変異 Env を持つウイルスは、パッセージコントロールウイルスと比較して、CD4bs と CD4i 抗体に対して感受性になっただけでなく、抗 V3 中和抗体に対しても高度感受性へと変化する事が分かった。一方、CCR5 発現の低い細胞で継代したウイルスは、CD4bs 抗体や gp41 抗体 (MPER) に関しては、MVC 高度耐性ウイルスよりもやや感受性が高く、抗 V3 抗体や CD4i 抗体に関しては感受性が低かった。また一部の抗 glycan 抗体に対しても MVC 耐性ウイルスよりも感受性が低かった。

これら 3 種類のウイルスセットを用いて、サルに馴化させた HIV-1mt を継代した感染サルの血清 (C95-006, P0; C98-051, P1; C94-044, P2) に対する中和感受性を測定した。また、比較のため血中の HIV-1_{89.6} Env gp120 蛋白への結合も同時に ELISA で測定した (図 1)。

その結果、1 継代目のサル (C95-006, P0) の血中の結合抗体は 45 週目では力価は低いものの認められたが、中和活性はまったく見られなかった。2 継代目のサル (C98-051, P1) の血中の結合抗体は 18 週目には既に確認できており、42 週でプラトーに達し 76 週目まで高い力価を維持していた。一方で、CD4bs 抗体に感受性の HIV-1_{KP-5pml} の中和活性が 13 週目の plasma 中には見え始めており、

42、76 週と経つに連れ徐々に中和能が上がっていた。3 継代目のサル (C94-044, P2) では、P1 よりさらに結合抗体の上がり方が早くかつ、高力価を維持していた。中和能も同様に出現時期が早く力価も高かった。しかも、CD4i 抗体や抗 V3 抗体に感受性の高い HIV-1_{KP-5mvcR} の中和が 24 週の時点で既に認められており、P1 とは異なる種類の抗体の存在が示唆された。

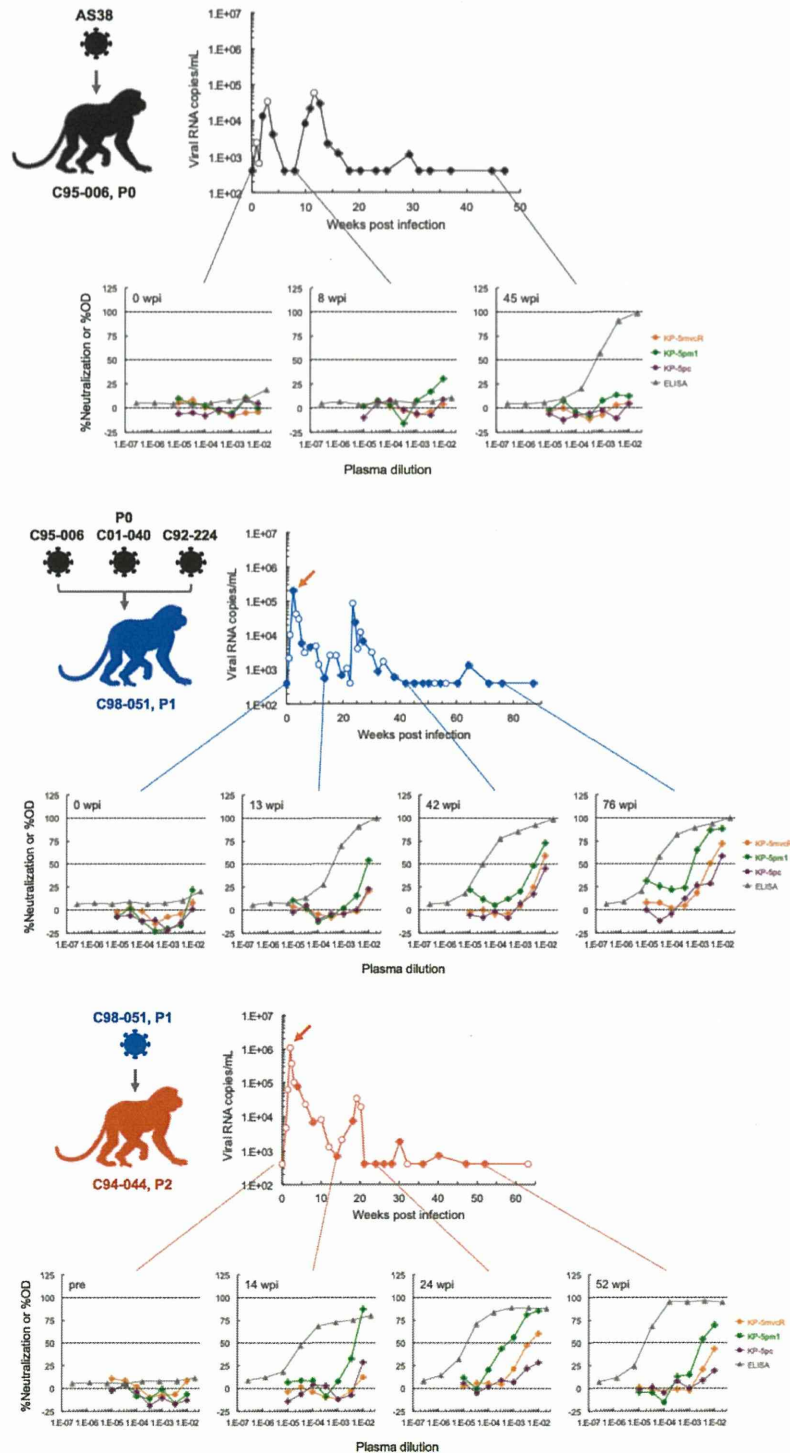


図 1. HIV-1mt を継代した感染サル (C95-006, P0; C98-051, P1; C94-044, P2) の血清に対する抗体感受性の異なるウイルスセットの中和感受性と結合抗体活性の測定

D. 考察

これまで感染サルの血清中の抗体の種類は特定抗原領域に対する結合性や、V3 ペプチドや sCD4 との拮抗阻害などを、ELISA や FACS 等非常に煩雑な方法で決定する必要があった。しかし、われわれが構築しているウイルスセットは、ウイルスの感受性を調べるだけで、およその抗体の種類と力価が推定可能となることが示唆された。同じ Env バックボーンを持つ感染性ウイルスを用いて中和抗体力価を簡便に測定する系は非常に有用であると言える。

E. 結論

高度 MVC 耐性変異及び低 CCR5 馴化 Env をもつ組換えウイルスを作製し、抗体に対する中和感受性の異なるウイルスセットの構築を行った。このパネルを用いて、HIV-1mt を継代した感染サルの血清 (C95-006, P0; C98-051, P1; C94-044, P2) に対する中和感受性を測定したところ、サル間でウイルスを継代するごとに結合抗体だけでなく、中和抗体価も上昇していくことが観察できた。これらのウイルスセットで感染サルの血中に含まれる中和抗体の大まかな種類と力価が測定可能となれば、ウイルスシーケンスと中和抗体産生の関係を知る事が出来るだけでなく、ウイルスの潜伏・持続感染に液性免疫がどのように関与するかを調べる事が可能となるであろう。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表 (*corresponding author)

1. Matsushita S, Yoshimura K, Ramirez K-P, Pisupati J, Jenkins J, Murakami T on behalf of the KD-1002 Study Group. Passive transfer of neutralizing monoclonal antibody KD-247 reduces plasma viral load in patients chronically infected with HIV-1. *AIDS*, 29, 453-462, 2015.
2. Ramirez K-P, Kuwata T, Maruta Y, Tanaka K, Alam M, Yoshimura K, Matsushita S. Complementary and synergistic activities of anti-V3, CD4bs and CD4i antibodies derived from a single individual can cover a wide

range of HIV-1 strains. *Virology*, 475, 187-203, 2015.

3. Kirby KA, Ong YT, Hachiya A, Laughlin TG, Chiang LA, Pan Y, Moran JL, Marchand B, Singh K, Gallazzi F, Quinn TP, Yoshimura K, Murakami T, Matsushita S, Sarafianos SG. Structural basis of clade-specific HIV-1 neutralization by humanized anti-V3 monoclonal antibody KD-247. *The FASEB Journal*, 25, 70-80, 2015.
4. ○ Yoshimura K†*, Harada S†, Boonchawalit S, Kawanami Y, Matsushita S*. Impact of maraviroc-resistant and low-CCR5-adapted mutations induced by in vitro passage on sensitivity to anti-envelope neutralizing antibodies. *Journal of General Virology*, 95, 1816-1826, 2014. *Corresponding author† These authors contributed equally.

学会発表

(国際学会)

1. Shigeyoshi Harada, Yu Irahara, Samatchaya Boonchawalit, Mai Goryo, Hirokazu Tamamura, Tetsuro Matano, Shuzo Matsushita, Kazuhisa Yoshimura. Mutations at the bottom of the Phe43 cavity are responsible for cross-resistance to NBD analogues. The annual Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI) 2015, Seattle, USA, 2.23-26, 2015.
2. Kazuhisa Yoshimura. Impact of the Drug-Escaped HIV Envelope Mutations on Susceptibility to Neutralizing Antibodies. 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID), AIDS Panel Meeting, Taipei, Taiwan, 1. 28-29, 2015.
3. Shigeyoshi Harada, Masaru Yokoyama, Samatchaya Boonchawalit, Hironori Sato, Shuzo Matsushita, Kazuhisa Yoshimura. Resistance Profile of CD4 Mimic Small Compounds (CD4MCs) and the Structure Analysis by Molecular Dynamic (MD) Simulation. HIV Research For Prevention (HIVR4P) 2014, Cape Town, South Africa, 10.28-31 2014.
4. Shigeyoshi Harada, Masaru Yokoyama, Samatchaya Boonchawalit, Hironori Sato, Shuzo Matsushita, Kazuhisa Yoshimura. Genetic and Structure-Function Analyses of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Escape from CD4 Mimic Small Compounds (CD4MCs). 15th Kumamoto AIDS Seminar,

- Kumamoto, Japan, 10.1-3. 2014.
5. Samatchaya Boonchawalit, Shigeyoshi Harada, Shuzo Matsushita, Kazuhisa Yoshimura. Impact of maraviroc (MVC)-resistant mutations in the C1 and C4 regions of gp120 on sensitivity to antibody-mediated neutralization. 15th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 2014.10.1-3.
 6. Samatchaya Boonchawalit, Shigeyoshi Harada, Shuzo Matsushita, Kazuhisa Yoshimura. Impact of Maraviroc (MVC)-resistant mutations in C1 and C4 regions of gp120 on sensitivity to antibody-mediated neutralization. 20th International AIDS Conference Melbourne, Australia, 2014.7.20-25.

(国内学会)

1. 吉村和久. 代表的な薬剤耐性のメカニズム. 第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪, 2014.12.3-5.
2. 泉福英信, 有家巧, 富永燦, 丸岡豊, 吉村和久. HIV 感染者唾液を用いたに口腔疾患発症予測因子の検討. 第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪, 2014.12.3-5.
3. Samatchaya Boonchawalit, 原田恵嘉, 松下修三, 吉村和久. Impact of maraviroc (MVC)-resistant mutations in the C1 and C4 regions of gp120 on sensitivity to antibody-mediated neutralization. 第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪, 2014.12.3-5.
4. 原田恵嘉, 横山勝, Samatchaya Boonchawalit, 佐藤裕徳, 松下修三, 吉村和久. CD4 類似低分子化合物誘導体 (CD4MCs) の耐性プロフェイルと分子動力的機構解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 2014.11.10-12.
5. 原田恵嘉, 横山勝, Samatchaya Boonchawalit, 佐藤裕徳, 松下修三, 吉村和久. 新規エントリー阻害剤の組み合わせによる抗ウイルス効果と耐性変異の解析. 第 16 回 白馬シンポジウム, 熊本, 2014.6.13-14.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

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"

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）

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

担当責任者 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 室長

研究要旨

ヒトの HIV-1 感染病態において、宿主防御因子 APOBEC3 は感染病態に重要な役割を果たしている。実際、Vif を欠失したウイルスは APOBEC3 により霊長類個体では増殖できない。一方、APOBEC3 はシチジン脱アミノ化酵素として G-to-A hypermutation 作用をもち、ウイルス遺伝子の変異を誘導することが知られている。そのため、in vitro の実験から薬剤耐性ウイルスの出現あるいは獲得免疫からの逃避に関与し感染病態を助長するのではないかと推測されている。しかし、感染個体における APOBEC3 の病態への影響について全く明らかになっていない。本研究課題では、特に感染個体において、1) 細胞防御因子である APOBEC3 がウイルス動態あるいは、その後の病態進行にどのように影響を与えるのか明らかにするため、2) 病態進行に伴うウイルスの遺伝的変容がどのように推移しているのかを明らかにするため、研究を行った。当該年度は、霊長類モデルより、APOBEC3 ファミリー遺伝子をクローニングし遺伝的解析を行った。さらに、エイズ病態モデルとして馴化された HIV-1mt が馴化の過程でどの部位に遺伝的変異を獲得したのか、次世代シーケンサーを用いて解析した。その結果、in vivo passage に伴って全 9 カ所に有意な遺伝的変化（変異）が認められた。

A. 研究目的

ヒトの HIV-1 感染病態において、宿主防御因子 APOBEC3 は自然免疫のひとつとして獲得免疫が確立していない急性期にウイルス制御に寄与し、セットポイントを規定する因子のひとつとして知られている。しかし、感染初期の感染者の病態把握は現実的には困難であるため、APOBEC3 などの宿主防御因子の病態への影響については学術的にも不明な点が多い。一方、ウイルスは APOBEC3 の解除因子である Vif タンパク質を発現しなければ生体内（サルモデル）では増殖しないことが分かっている。Vif は HIV-1/-2 と SIVmac 間では 25% の相同性しかない。そのため、HIV-1 mt クローンでは、vif 遺伝子全領域が SIVmac 由来のものを利用している。さらに、種間あるいは個体間における

APOBEC3 の抗ウイルス作用の差異やその違いに基づく感染病態あるいは個体内でのウイルス動態への影響について全く明らかになっていない。本研究課題では、特に感染個体において、1) 細胞防御因子である APOBEC3 がウイルス動態あるいは、その後の病態進行にどのように影響を与えるのか明らかにすること、2) 病態進行に伴うウイルスの遺伝的変容がどのように推移しているのかを明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析

HIV-1 あるいは HIV-1mt 陽性血漿からウイルス RNA を抽出し、おのおのが約 1kb 程度重なる 4 領域 (gag-rt 2.7kb、rt-in 2.7kb、in-env 3.5kb、env-nef 2.7kb) に分割して遺伝子増幅し

た。Nextera DNA sample prep kit によるライブラリ作製後、MiSeq Reagent Kit v2 を用い 2x 250bp ペアエンド配列解析を行った。得られた配列情報をもとに、1%以上の変異を検出可能なソフトウェアパイプラインを用いて変異頻度解析を行った。配列のマッピングは Burrows-Wheeler Aligner を用いた。以上の概要を図 1 に示す。

APOBEC3 遺伝子のクローニングと遺伝子解析

非感染個体サル (*Macaca fascicularis*) (5 頭) の末梢血リンパ球 PBMC より Total RNA を抽出し、7 種 (A と B, C, D, F, G, H) の APOBEC3 遺伝子 (cDNA) をクローニングした。プライマーの設定は、*Macaca mulatta* 由来の既登録の cDNA 配列より検討した。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え実験に関しては「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」を遵守して行われた。本研究で使用した複製可能な組換えウイルスは大臣確認 (22 受文科振第 1878 号) ほか、組換え DNA 実験は本研究センターに機関承認 (2010-2 2012-2 ほか) され実施された。

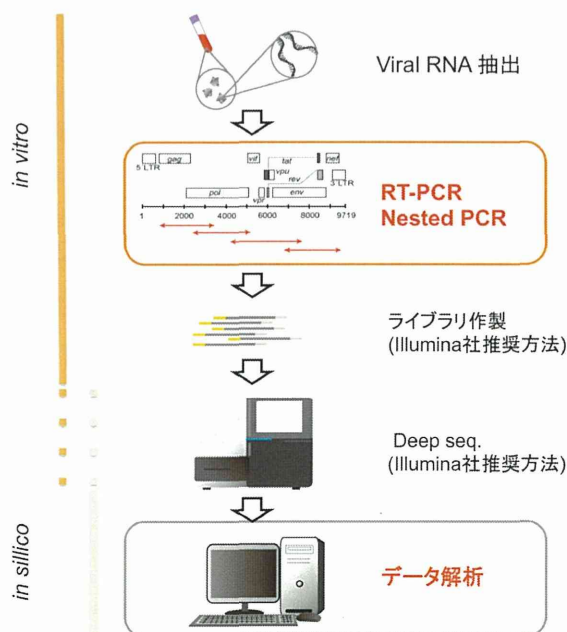


図 1. illumina MiSeq による HIV-1/HIV-1mt 近全長配列の解析の概略

C. 研究結果

次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析

まず、次世代シーケンサー illumina MiSeq を用いて、確立した遺伝子解析系を HIV-1 (NL43 株) を用いて、検証した。作製したライブラリーの MiSeq による解析により約 90 万配列を取得した。これらの取得配列を未補正のままマッピングした場合、得られたコンセンサス配列は pNL43 配列と完全一致した。しかし、<10%の頻度の解析エラー (変異) が認められた。解析エラーはチミンの座位で多く認められ、>99%は置換によるものであり、ベースコールの確度が低いことが観察された。そこで平均確度 >99%の塩基のみを抽出し解析すると、>1%の頻度の解析エラーは認められなくなった。さらに、より長い領域のハプロタイプ解析をめざし、対となるペアエンド配列 (最大長 500bp) を作成し、マッピングおよび補正を行った。その結果作成された約 30 万の長鎖配列は pNL43 配列と完全に一致、>1%の頻度の解析エラーは認めなかった。以上、MiSeq を用いた HIV ゲノム配列において解析エラー率等を考慮することにより、精度の高い解析系の構築を達成した。

さらに、この解析系を活用して、本研究班研究代表者によりカニクイザルで馴化された HIV-1mt の遺伝子変化を網羅的に解析した。その結果、核時点において多くの遺伝子変異が認められた。その中で、各個体間継代によって HIV-1mt が馴化し、それに伴い優位にかつ漸次増加する遺伝子型を解析した。その結果、Vif 領域、gp41 (260 番目)、Nef (54 番目)、MA (58 番目)

- pNL4-3 による精度検証 - 各座位における >1% の頻度のエラーを選択的に排除

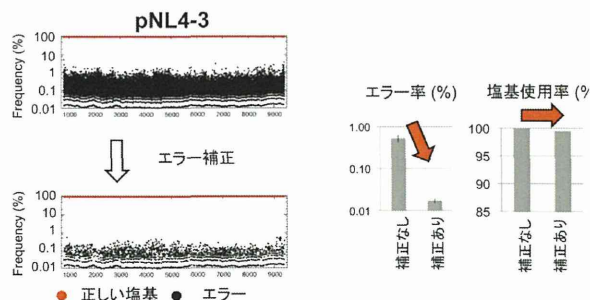


図 2. 各遺伝子座位における >1%の頻度を選択的に排除することにより、精度が高い解析系を確立できた。

p6 (30 番目)、RT (101 番目)、gp120 (144 番目)、Nef (33 番目)、Nef (62 番目) の全 9 ヲ所に優位な遺伝子変化が認められた (図 3)。

さらに、Env の領域に着目し、各個体継代前後で優位に認められた部位を解析した結果、V1 (N136、D137、T138、N139 など)、V5 (N462 など)、gp41 CT 領域に優位な変異変化が認められた (図 4)。

ていた。A3F に関して、異なる残基は、46V、81T、149Y、163E、182/183RM であった。遺伝多型と機能、抗ウイルス作用については現在解析中である。

D. 考察

HIV-1 のウイルス病態解析のために開発してきた“illumina MiSeq を用いたウイルス微小集団の遺伝子学的追跡する手法”を HIV-1mt においても活用できることが証明できた。HIV-1mt の個体間継代により、研究代表者の結果から、急性感染期の血中ウイルス RNA 量が大幅に上昇しそのため、個体間継代により感染個体におけるウイルスの増殖効率が飛躍的に改善されたことが示唆されている。今回、MiSeq を用いた我々

APOBEC3 遺伝子のクローニングと遺伝子解析

非感染個体サル (*Macaca fascicularis*) (5 頭) より、7 種 (A と B, C, D, F, G, H) の APOBEC3 遺伝子領域 (翻訳領域 cDNA) をクローニングすることに成功した。遺伝子多型解析した結果、*Macaca mulatta* ほぼ一致 (A3F では、97%) し

Passage 0 で 3 変異パターン、
Passage 1 で 6 変異の出現を検出

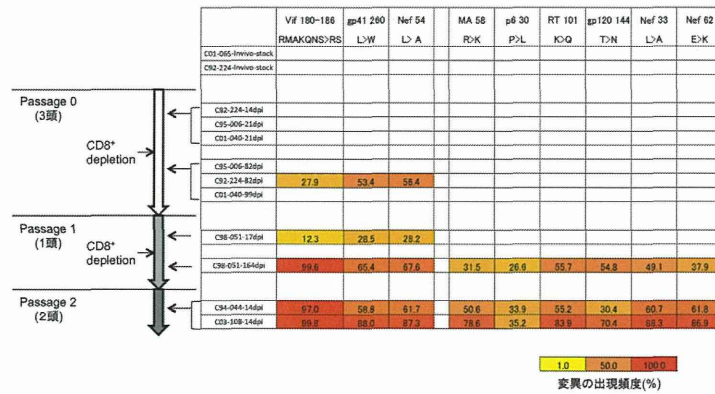


図 3. 個体間継代に伴って優位に変容した遺伝子部位 (9 ヲ所) を示す。

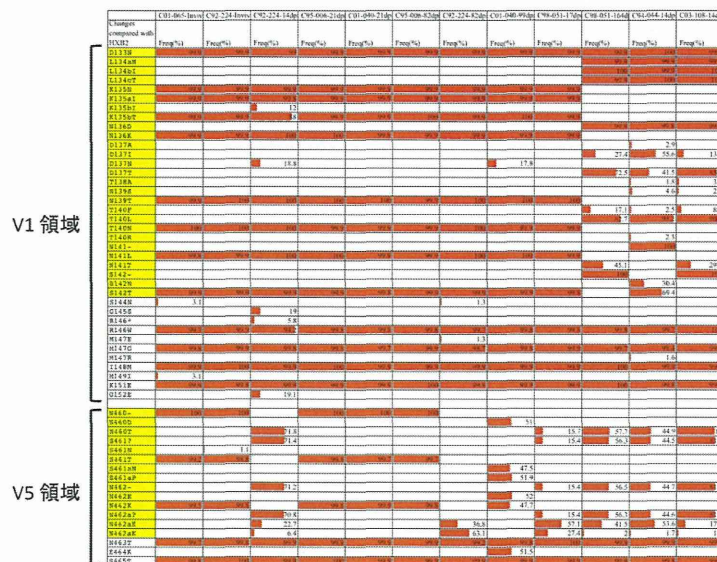


図 4. 個体間継代に伴い認められた Env 領域の変異部位は、主に V1 および V5 領域に集中していた。

の遺伝子解析系を用いて、HIV-1mt の馴化・病態変化に伴って、9 ヶ所の遺伝子部位が漸次変化し、変異が固定化された。これらの9 ヶ所の残基が HIV-1mt の馴化、病勢に大きな影響を与える可能性があると考えられる。特に、*vif* 遺伝子領域の 15 塩基欠失（5 アミノ酸欠失）は、Vif の抗 APOBEC3 機能に何らかの影響を与える可能性が考えられる。HIV-1 Vif の配列から、5 アミノ酸欠失部位は、APOBEC3F の結合に重要な F3 box 領域近傍である。一方、*Macaca fascicularis* の APOBEC3F は、*Macaca mulatta* の APOBEC3F と 6 残基（46V、81T、149Y、163E、182/183RM）異なっている。これらのことから、一つの可能性として、APOBEC3F（あるいはそのホモログの APOBEC3D/C）に適応するために、HIV-1mt Vif に 5 アミノ酸の欠失が入ったことも考えられる。次年度は、欠失型 Vif が、それぞれの APOBEC3 に対して、どのようなアンタゴナイズ機能を有するのか明らかにし、上述の可能性を検証したいと考えている。

今回、illumina MiSeq を用いた HIV-1/HIV-1mt の近全ゲノム配列解析技術を応用することにより、多型変異パターン、ウイルスの微小集団、および APOBEC3 による特有な変異形跡 (mutational signature) の質的变化が、ウイルス病態（特に、急性期から潜伏感染状態への移行の中でウイルスの状態にどのような違いがあるのか）と因果関係があるのか調べるようになった。この点で、初年度の目的を達成したと考えられる。

また、7 種の APOBEC3 をクローニングし、遺伝子配列を比較解析した結果、*Macaca fascicularis* 由来の 7 種の APOBEC3 遺伝子配列は、*Macaca mulatta* と一致していることから、基本的に、既報の機能解析データを活用できる可能性が高い。一方、APOBEC3 の限られた部位で、マカク属間あるいはヒトとの間に配列の違いが少なからずあり、これらの残基が個体におけるウイルス動態に大きな影響を与えている可能性もあるため、今後詳細な解析が必要である。

E. 結論

感染個体において、1) 細胞防御因子である APOBEC3 がウイルス動態あるいは、その後の

病態進行にどのように影響を与えるのか明らかにするため、2) 病態進行に伴うウイルスの遺伝的変容がどのように推移しているのかを明らかにするため、研究を行った。当該年度は、霊長類モデルより、APOBEC3 ファミリー遺伝子をクローニングし遺伝的解析を行った。さらに、次世代シーケンサーを用いたウイルスゲノムの近全長配列解析法を確立し、エイズ病態モデルとして個体間継代された HIV-1mt の遺伝的変容・変異を網羅的に解析した。その結果、*in vivo* passage に伴って漸次変化した遺伝子領域は全 9 ヶ所であることを特定した。特に、Vif 配列には 5 アミノ酸の欠失が生じ、APOBEC3 に対する適応変異が起こった可能性が示唆された。今後、さらに詳細な解析を進め、感染個体における APOBEC3 の病態への影響について明らかにしたいと考えている。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakurai D, Iwatani Y, Ohtani H, Naruse T, Terunuma H, Sugiura W, Kimura A: APOBEC3H polymorphisms associated with the susceptibility to HIV-1 infection and AIDS progression in Japanese. *Immunogenetics*. *in press*.
- 2) Mitra M, Singer D, Mano Y, Hritz J, Nam G, Gorelick RJ, Byeon IJ, Gronenborn AM, Iwatani Y, Levin JG: Sequence and structural determinants of human APOBEC3H deaminase and anti-HIV-1 activities. *Retrovirology*. 12, 3, 2015.
- 3) Imahashi M, Izumi T, Watanabe D, Imamura J, Matsuoka K, Ode H, Masaoka T, Sato K, Kaneko N, Ichikawa S, Koyanagi Y, Takaori-Kondo A, Utsumi M, Yokomaku Y, Shirasaka T, Sugiura W, Iwatani Y, Naoe T: Lack of Association between Intact/Deletion Polymorphisms of the APOBEC3B Gene and HIV-1 Risk. *PLoS One*. 9, e92861, 2014.
- 4) Shiino T, Hattori J, Yokomaku Y, Iwatani Y, Sugiura W: Japanese Drug Resistance HIVSN: Phylodynamic analysis reveals CRF01_AE dissemination between Japan and neighboring Asian countries and the

role of intravenous drug use in transmission, *PLoS One*. 9, e102633, 2014.

2. 学会発表

国際学会

- 1) Imahashi M, Izumi T, Imamura J, Matsuoka K, Ode H, Masaoka T, Sato K, Koyanagi Y, Takaori-Kondo A, Yokomaku Y, Sugiura W, Iwatani Y. Lack of Association between Intact/Deletion Polymorphisms of the *APOBEC3B* Gene and HIV-1 Risk. Cold Spring Harbor Laboratory Annual meeting on Retroviruses, Cold Spring Harbor, NY, USA, May 19-24, 2014.
- 2) Nakashima M, Kitamura S, Kurosawa T, Ode H, Kawamura T, Mano Y, Naganawa Y, Yokomaku Y, Watanabe N, Sugiura W, Iwatani Y. Fine-tuned HIV-1 Vif- interaction interface of anti-retroviral cytidine deaminase APOBEC3F. Cold Spring Harbor Laboratory Annual meeting on Retroviruses, 2014, Cold Spring Harbor, NY, USA, May 19-24, 2014.
- 3) Nakashima M, Kitamura S, Kurosawa T, Ode H, Kawamura T, Imahashi Y, Yokomaku Y, Watanabe N, Sugiura W, and Iwatani Y. 23rd Congress and general assembly of the international union of crystallography, Montreal, Canada. Aug 5-12, 2014.

国内学会

- 1) 重見麗, 蜂谷敦子, 松田昌和, 今村淳治, 渡邊綱正, 横幕能行, 岩谷靖雅, 杉浦互 HIV-1 感染急性期における HIV 特異的な病態バイオマーカーの探索について 第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会 大阪 2014 年 12 月 3-5 日
- 2) 芳田剛, 齋藤暁, 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・総会 大阪 2014 年 12 月 3-5 日
- 3) 大出裕高, 中島雅晶, 河村高志, 北村紳悟, 長縄由里子, 黒澤哲平, 真野由有, 粟津宏昭, 松岡和弘, 横幕能行, 渡邊信久, 杉浦互, 岩谷靖雅 HIV-1 Vif における APOBEC3C/F 結合インターフェース 第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会 大阪 2014 年 12 月 3-5 日
- 4) 松田昌和, 大出裕高, 松岡和弘, 蜂谷敦子, 横幕能行, 岩谷靖雅, 杉浦互 Illumina MiSeq を用いた HIV-1 近全長遺伝子配列解析の試み

第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会 大阪 2014 年 12 月 3-5 日

- 5) Ciftci Ibrahim, 藤野悠那, 山本充奈美, 川村宗吾, 岩谷靖雅, 大塚雅巳, 藤田美歌子 Mutational Analysis of HIV-2 Vpx concerning on ability to degrade SAMHD1 第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会 大阪 2014 年 12 月 3-5 日
- 6) 鬼頭優美子, 大出裕高, 松田昌和, 松岡和弘, 蜂谷敦子, 清水宣明, 今村淳二, 岩谷靖雅, 杉浦互, 横幕能行 Maraviroc 治療失敗症例にみる envelope 領域の遺伝的多様性の解析 第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会 大阪 2014 年 12 月 3-5 日
- 7) 中島雅晶, 大出裕高, 長縄由理子, 黒澤哲平, 真野由有, 横幕能行, 杉浦互, 渡邊信久, 岩谷靖雅 HIV-1 Vif は複数の APOBEC3 結合インターフェースをもつ 第 37 回日本分子生物学会年会 横浜 2014 年 11 月 25-27 日
- 8) 櫻井大祐, 今橋真弓, 岩谷靖雅, 大谷仁志, 成瀬妙子, 照沼裕, 杉浦互, 木村彰方 *APOBEC3H* ハプロタイプと HIV-1 感染および AIDS 発症との関連 第 59 回日本人類遺伝学会 東京 2014 年 11 月 19-22 日
- 9) 大出裕高, 松岡和弘, 松田昌和, 蜂谷敦子, 横幕能行, 岩谷靖雅, 杉浦互 Deep sequencing による HIV-1 臨床検体の近全長ゲノム配列解析系の構築 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 横浜 2014 年 11 月 10-12 日
- 10) 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 in vivo 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
- 11) 中島雅晶, 大出裕高, 河村高志, 北村紳悟, 長縄由里子, 黒澤哲平, 真野由有, 粟津宏昭, 松岡和弘, 横幕能行, 渡邊信久, 杉浦互, 岩谷靖雅 空間的に異なる APOBEC3 結合インターフェースをもつ HIV-1Vif 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 横浜 2014 年 11 月 10-12 日
- 12) 大出裕高, 松田昌和, 蜂谷敦子, 服部純子, 横幕能行, 岩谷靖雅, 杉浦互 Deep Sequencing による近全長 HIV-1 ゲノムの Quasispecies 解析と微小薬剤耐性変異の検出 第 16 回白馬シンポジウム 熊本 2014 年 6 月 13-14 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

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）

潜伏・持続感染におけるリザーバー研究

担当責任者 佐藤 賢文 熊本大学大学院先導機構・
エイズ学研究センター・准教授

研究要旨

近年、抗レトロウイルス療法（ART）の進歩により、HIV 感染症がコントロール可能な慢性疾患になりつつある。しかしながら、感染者体内からウイルスを完全に排除する事は極めて困難であるため、慢性持続潜伏感染の問題が、次の重要な研究課題の 1 つと考えられる。本研究では霊長類 HIV-1 感染モデルを用いて、生体内潜伏感染細胞の新規評価系を確立し、HIV-1 慢性持続感染メカニズムを明らかにすることを研究目的とする。レトロウイルスである HIV-1 は宿主ゲノムにウイルスゲノムが組み込まれる。宿主ゲノム中に存在する HIV-1 プロウイルスが慢性持続感染時の主たるウイルス存在様式と考えられるため、プロウイルス定量、及びウイルスの宿主ゲノム組み込み部位解析を行った。

感染霊長類モデルにおいて、ウイルス感染から長期経過し、血清中ウイルスが検出限界以下となった個体でも、プロウイルスが各臓器に存在している事が、今年度の解析で確認された。実際に、ウイルスの組み込み部位を数百カ所特定することが出来た。今年度の解析結果から、本感染モデルが潜伏感染動態を解析するために有用である事が示唆されたため、次年度以降、更に詳細な解析を行う予定。

A. 研究目的

現在、世界的におよそ 4000 万人、我が国でも 2 万人を超える HIV 感染者が存在する。近年、抗レトロウイルス療法（ART）の進歩により、HIV 感染症がコントロール可能な慢性疾患になりつつある。しかしながら、ART によっても感染者体内からウイルスを完全に排除する事は極めて困難であり、感染者は長期にわたり治療を受けなければならない。長期治療に伴う薬剤耐性ウイルスの出現、薬剤副作用、慢性持続感染による種々の合併疾患（悪性腫瘍、認知症など）など、解決すべき課題が多い。持続潜伏感染は、ウイルスと宿主細胞の関連性のみならず、抗ウイルス免疫や生体内薬物動態など、多くの因子が関連して病態が形成されるため、試験管内の研究だけでは不十分である。そのような問題点解決に向け、本研究では霊長類 HIV-1 感染モデルを用いて、生体内潜伏感染細胞の新規評価系

を確立する。確立した系を用いることで、高感度かつ高精度な潜伏感染細胞動態解析を行い、HIV-1 の慢性持続感染メカニズムを明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

【研究材料】

本研究班代表者である明里らにより開発された HIV-1mt 感染霊長類モデルを用いて、以下の生体内潜伏感染細胞動態の解析を行った。HIV-1mt 感染後約 1 年経過したサル 6 個体を解析した。

【解析方法】

A. 感染サル個体各臓器のプロウイルス量測定

上述したサル検体の各臓器から DNA を抽出し、定量的 PCR による各臓器のプロウイルス分布解析を行った。ウイルスコピー数の算出には

gag 領域を、宿主細胞コピー数の算出のために alb 遺伝子を増幅する。コピー数を算出するため、それぞれの PCR 産物をクローニングしたプラスミドを用い、標準曲線を作成した。

B. 生体内感染クローン動態解析

それぞれのウイルス感染クローンは独自のウイルス組み込み部位を有している。上述したサル検体を用い、Limker-mediated PCR (LM-PCR) と次世代シーケンスを利用したウイルス組み込み部位解析を行った (N Gillet et al, Blood 117, 3113-3122, 2011)。HIV-1mt の宿主ゲノムへの組み込み部位を決定した。ウイルスと宿主ゲノムのつなぎ目を PCR で増幅し、次世代シーケンスで解析した。

C. 研究結果

A. プロウイルス量測定

HIV-1mt 感染カニクイザルの各臓器のプロウイルス DNA の測定を行った。

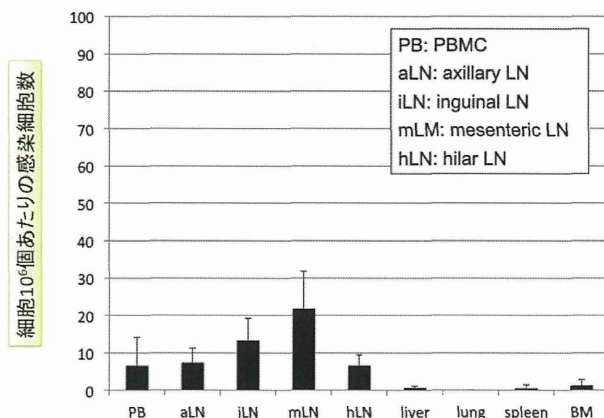
上図に示すように末梢血、リンパ節 (鼠径部リンパ、腋窩リンパ、頸部リンパ、腸管膜リンパ) において、プロウイルス量が測定される個体が検出された。検出された量は細胞数 100 万個当たり 10—100 個と極めて微量であった。

また下図に示すように、個体間によりプロウイルスの存在量に差を認めた。

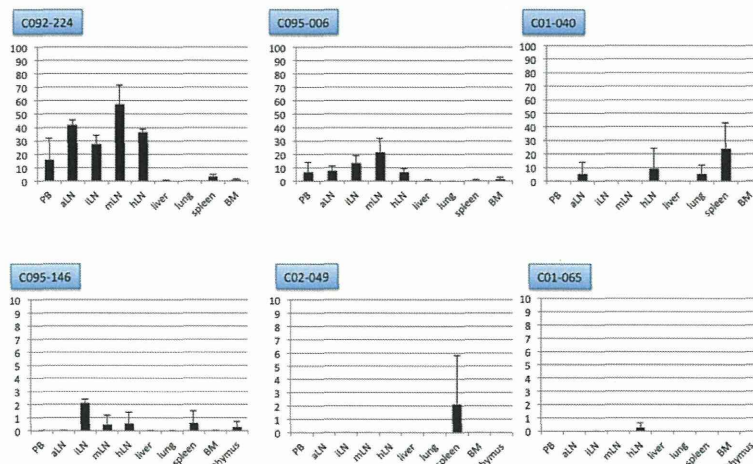
B. 生体内感染クローン動態解析

上記解析でプロウイルス量が高かった個体で、各種臓器のウイルス組み込み部位解析を行った。合計 100 箇所を超える組み込み部位を特定できたため、解析系として使用可能である事が確認された。

各臓器におけるプロウイルス量測定



HIV-1mt 感染カニクイザルの各個体におけるプロウイルス測定結果



D. 考察

本感染モデルにおいて、ウイルス感染後長期経過し、血清中のウイルスが検出限界以下になった個体でも、プロウイルスが各臓器に存在している事が確認された。潜伏感染動態を解析するモデルとしての有用性が示唆された。

ウイルスの検出に gag 領域を用いたが、存在頻度が極めて低いため、動態解析を行うには、通常の定量的 PCR 法では、定量の精度が不十分と考えられる。より精度の高いプロウイルス定量法を確立する事が望ましいため、次年度以降デジタル PCR 法の導入を検討すべきである。また、本解析では検出したプロウイルスが完全型か欠損型かに関して区別することが出来ない。従って、現時点では検出されたプロウイルスが複製能を持っているかどうかは不明である。今後更なる検討、解析系の改良が必要である。

ウイルス組み込み部位を用いた感染クローン動態に関しても、得られた組み込みイベント数が少ないため、ゲノム情報との関連性を調べる事は出来なかった。今後、感染モデルの改良や検出感度を高めるなど、感染クローン動態を可能にする工夫が必要である。

E. 結論

今年度の解析結果から、本感染モデルが潜伏感染動態解析のためのツールとして、有用である事が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Zhao T, Satou Y, Matsuoka M. Development of T cell lymphoma in HTLV-1 bZIP factor and Tax double transgenic mice. Arch Virol., 159:1849-56, 2014.

2. 学会発表

国際学会

- 1) Satou Y, Ishihara K, Miyazato P, Nakao M, Bangham CRM. HTLV-1 Encodes a Functional CTCF-binding Site. European HTLV-1 meeting, Rome, Italy, 2014
- 2) Satou Y, Fukuda A, Miyazato P, Tokunaga

M, Anat M, Bangham CRM and Matsushita S. HIV-1 integration site analysis by using next generation sequencing: a tool to study HIV-1 reservoir cells. Kumamoto AIDS seminar, Kumamoto, Japan, 2014

- 3) Stanoeva K, Fukuda A, Kuwata T, Kawanami Y, Satou Y and Matsushita S. Measuring the HIV reservoir in a cohort of Japanese patients on long-term ART. Korea-Japan Joint Seminar on HIV/AIDS, Kumamoto, Japan, 2015
- 4) Satou Y, Miyazato P, Matsushita S, Bangham CRM. Proviral analysis of HIV-1 and HTLV-1. 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) Taipei, January 26-27, 2015

国内学会

- 1) 佐藤賢文、宮里パオラ、福田麻美、野坂生郷、石原宏、中尾光善、Charles Bangham : クロマチン高次構造制御分子 CTCF による HTLV-1 プロウイルス制御機構 : 第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会、東京、2014 年 8 月 23-24 日
- 2) 佐藤賢文、石原宏、野坂生郷、宮里パオラ、渡邊武久、中尾光善、Charles Bangham : クロマチン高次構造制御分子 CTCF による HTLV-1 プロウイルス制御機構 : 日本血液学会、大阪、2014 年 10 月 31 日 -11 月 2 日

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

3. その他

なし

II. 学会等発表実績

1. 学会等における口頭・ポスター発表

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 (ポスター)	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	第 62 回日本ウイルス学会学術集会	2014 年 11 月	国内
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 (ポスター)	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	第 28 回日本エイズ学会学術集会	2014 年 12 月	国内
Effects of naturally arising mutations in HLA-A*02-restricted immunodominant region on the functions of HIV-1 Vpr (口頭発表)	Kamori D, Murakami T, Hasan Z, Carlson J, Siarot L, Miura T, Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A, Gatanaga H, Oka S, Aida Y, Ueno T	第 16 回白馬シンポジウム	2014 年 6 月	国内
HIV Vpr 発現マクロファージにおけるマイクロアレイによる遺伝子発現解析 (口頭発表)	Zahoor A M, 薛光愛、佐藤洋隆、村上知行、竹嶋伸之輔、間陽子	第 157 回日本獣医学会学術集会	2014 年 9 月	国内
Screening of small molecules Interfering the specific interaction between human immunodeficiency virus-type I(HIV-1) Gag and ESCRT Tsg 101 (口頭発表)	Siarot L, 佐藤洋隆、Chutiwitoonchai N, 間陽子	第 157 回日本獣医学会学術集会	2014 年 9 月	国内
Vpr は新規 Vpr 結合因子 HIP1 のリン酸化の制御を介して G2 期停止を調節する (口頭発表)	村上知行、間陽子	第 62 回日本ウイルス学会学術集会	2014 年 11 月	国内
TSG101 overexpression induces Gag aggregation at perinuclear region and this aberrance is rescued by Vpr (ポスター発表)	Chutiwitoonchai N, 間陽子	第 62 回日本ウイルス学会学術集会	2014 年 11 月	国内
Gag-Tsg 101 targeting anti-human immunodeficiency virus-type I (HIV-I) therapy (ポスター発表)	Siarot L, 佐藤洋隆、Chutiwitoonchai N, 間陽子	第 62 回日本ウイルス学会学術集会	2014 年 11 月	国内
HIV-1 アクセサリー蛋白質 Vpr を標的とした新規抗 HIV 治療薬スクリーニング系の構築 (ポスター発表)	佐藤洋隆、阿部昌子、大貫哲男、黒田和道、長澤洋介、武井正美、山本樹生、吉田稔、間陽子	第 62 回日本ウイルス学会学術集会	2014 年 11 月	国内
アクセサリータンパク質 Vpr の核移行を標的にしたマクロファージに対する新規 HIV-1 阻害剤の最適化研究 (ポスター発表)	萩原恭二、村上知行、石井英樹、竹嶋伸之輔、近藤恭光、本田香織、長田裕之、横田(恒次)恭子、鈴木正昭、間陽子	第 62 回日本ウイルス学会学術集会	2014 年 11 月	国内
Effect of natural variability of an immunodominant Vpr region on immunological footprints, clinical outcome and protein functions (口頭発表)	Kamori D, 村上知行, Hasan Z, Meribe S, Carlson J, Siarot L, 三浦聡之、立川(川名)愛、岩本愛吉、瀧永博之、岡慎一、間陽子、上野貴将	第 62 回日本ウイルス学会学術集会	2014 年 11 月	国内
Screening of small molecule inhibitors for human immunodeficiency virus-type I (HIV-1) by targeting Gag-Tsg 101 interaction (口頭発表)	Siarot L, Sato H, Chutiwitoonchai N, Aono T, Aida Y.	2015 Palm Spring Symposium	2015 年 3 月	国外
ゲノム編集法のエイズ治療への展望 (口頭)	蝦名博貴、三沢尚子、金村優香、小柳義夫	第 16 回白馬シンポジウム	2014 年 6 月	国内
HIV strategy for acceleration of viral replication in vivo and eradication approach of HIV proviral DNA (口頭)	Koyanagi Y, Misawa N, Sato K, Ebina H	9th International Symposium of the Institute Network	2014 年 6 月	国内
TALEN 法による HIV プロウイルスの高編集効果 (口頭)	蝦名博貴、金村優香、三沢尚子、佐久間哲史、小林朋子、山本草、小柳義夫	第 62 回日本ウイルス学会学術集会	2014 年 11 月	国内
ゲノム編集法を用いた HIV プロウイルスのライブイメージングシステムの構築 (ポスター)	蝦名博貴、金村優香、小柳義夫	第 37 回日本分子生物学会年会	2014 年 11 月	国内
Novel mutant HIV-1 strains with high degree of resistance to cynomolgus macaque TRIMCyp generated by random mutagenesis	Emi E Nakayama, Tetsushi Tobita, Tahmina Sultana, Akatsuki Saito, Hirofumi Akari, Tatsuo Shioda	The 13th Awaji International Forum on Infection and Immunity in Nara	2014 年 9 月	国内