

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質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

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 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管理部・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 90-120-1a 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。それらの細胞に 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 産生細胞数を継時的に定量した。(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 抑制に關与する 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 枯渴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、鯉淵智彦、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、鯉淵智彦、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、鯉淵智彦、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, 吉川祿助, 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.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1 . 特許取得

無し

2 . 実用新案登録

無し

3 . その他

無し

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に対応した。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 90-120-1a 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。

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（制御準喪失）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 投与実験を行った。

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。

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。

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ることで処理し、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。

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。

IL-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、は否定的であり、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。

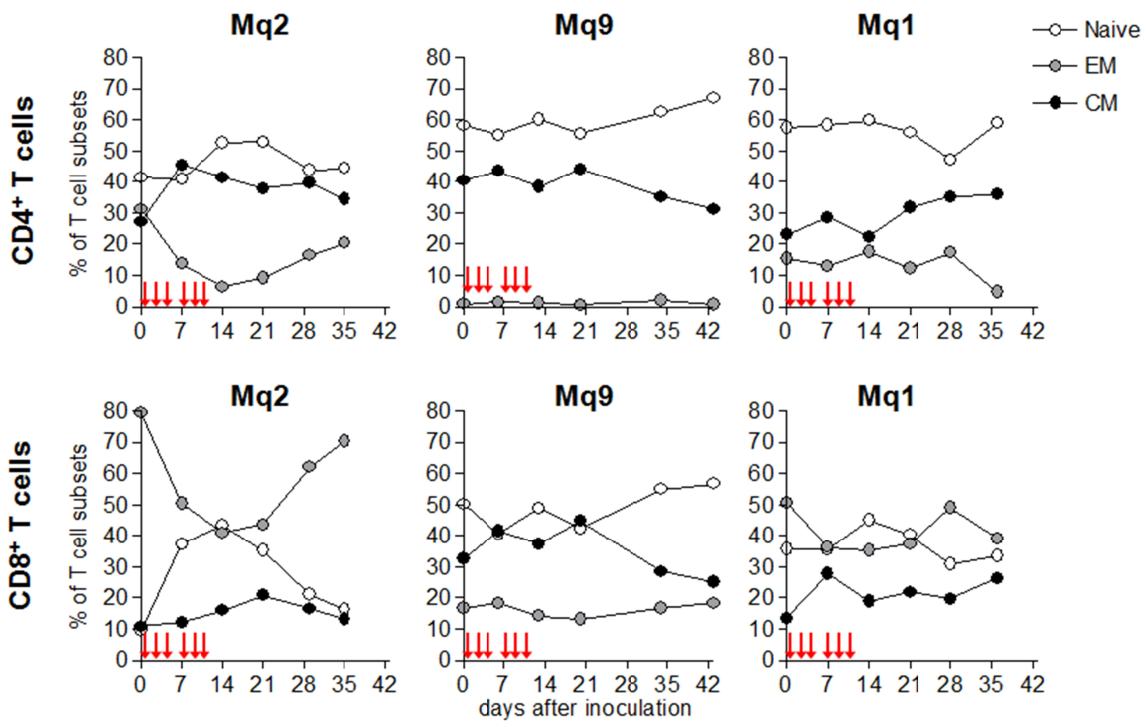


図 1. SIV 持続制御個体における IL-7+IL-15 投与試験時の末梢血中 T 細胞分画の推移

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。

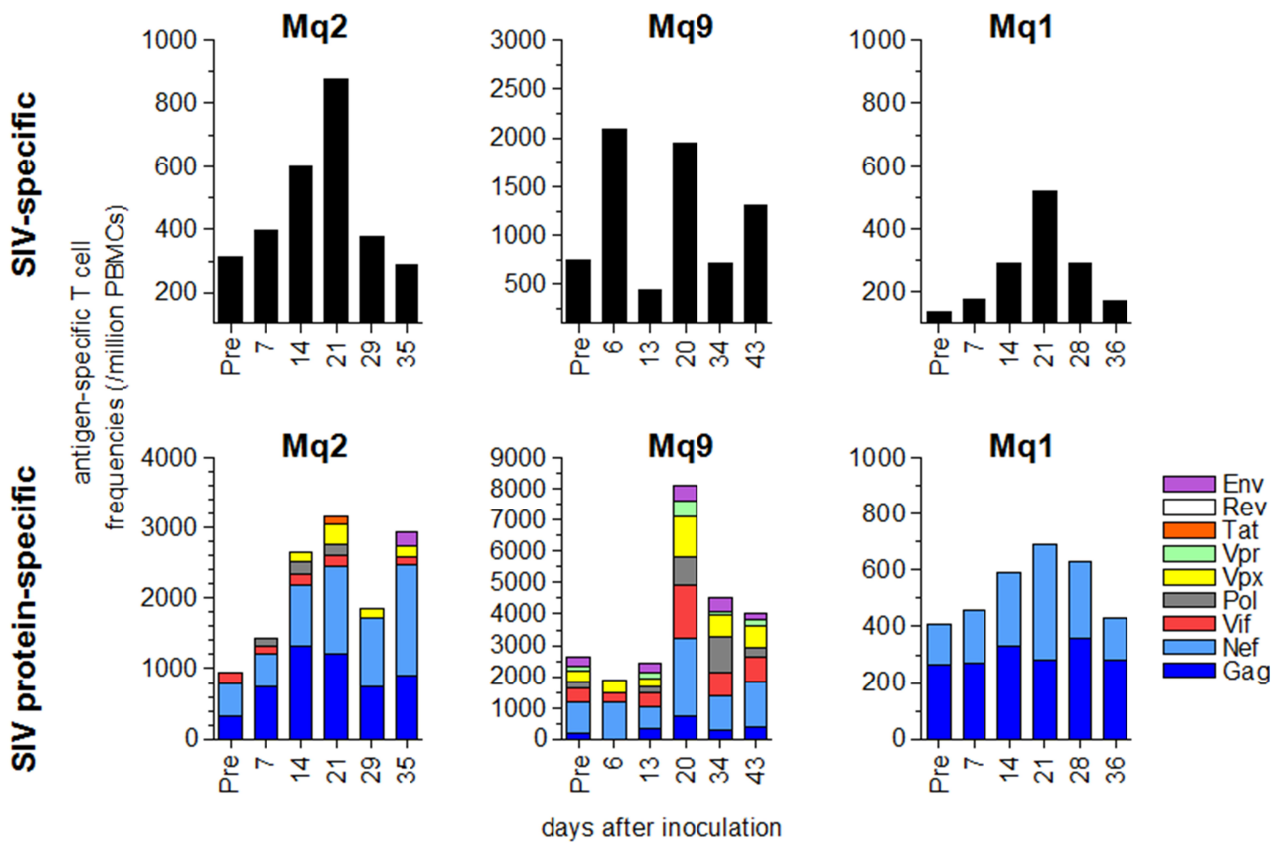


図 2. SIV 持続制御個体における IL-7+IL-15 投与後のウイルス特異的 CTL 応答

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。

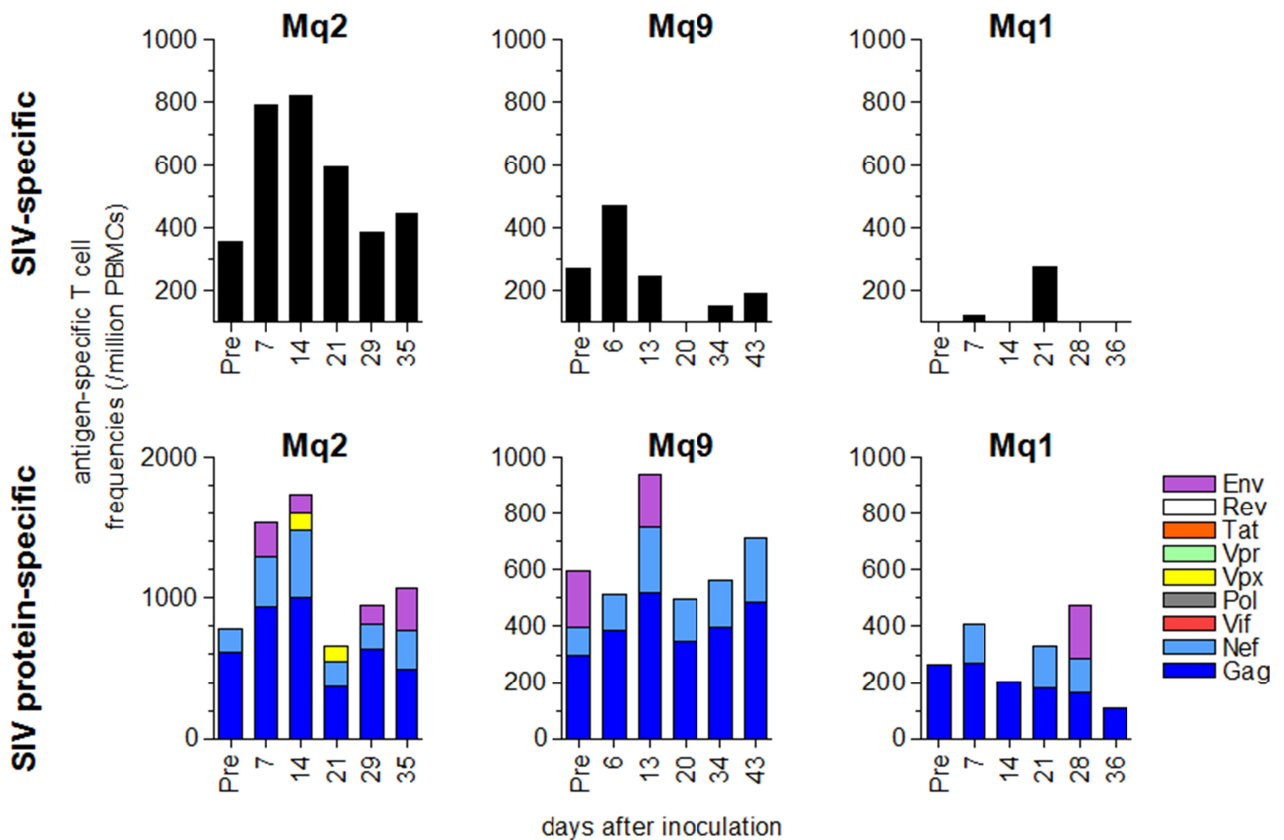


図 3. SIV 持続制御個体における IL-7+IL-15 投与後のウイルス特異的 CD4 陽性 T 細胞応答

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が変化し、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

- 7) 中村碧、高原悠佑、松岡佐織、三浦智行、小柳義夫、成瀬妙子、木村彰方、俣野哲朗：抗 HIV 薬投与下の治療ワクチン接種により誘導される CD8 陽性 T 細胞の SIV 複製抑制能の解析、第 28 回日本エイズ学会学術集会、大阪、2014 年 12 月 3-5 日

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

潜伏感染細胞の同定とその成立機構

研究分担者	横田 恭子	東京工科大学	医療保健学部	教授
研究協力者	寺原 和孝	国立感染症研究所	免疫部	主任研究官
研究協力者	小林 美栄	国立感染症研究所	免疫部	流動研究員
研究協力者	和田 倭	国立感染症研究所	免疫部	研究生

研究要旨：

静止期にある CD4 陽性 T 細胞を長期培養維持可能な HSP (HomeoStatic Proliferation) 培養系は、おそらく体内のリンパ組織で恒常維持されている CD4 陽性 T 細胞を模倣した状態でナイーブ T 細胞も含めて培養維持できる。この培養で維持されるナイーブ T 細胞は、in vitro での TCR 刺激や HDAC 阻害剤による HIV-1 mRNA の増加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 刺激を受けて静止状態に戻った記憶 CD4 陽性 T 細胞とは異なることが示唆された。

A. 研究目的

静止期で維持される試験管内潜伏感染モデルシステムを確立し、ゲノムに挿入された proviral DNA の発現制御、及びヒト化マウスにおける HIV 潜伏感染細胞集団の同定とその性状を解析することにより、潜伏化の成立に関与する細胞因子を明らかにする。

B. 研究方法

1. 組換えレンチウイルスの作製

細胞ゲノムに挿入されて LTR からの転写を解析するため、P2 レベルのレンチウイルスベクター pCS-CDF-GFP-Nef-LTR を構築した。これをトランスファープラスミドとする組換えレンチウイルス作製用 DNA (gag/pol、 rev および VSV-G 発現ベクター)、あるいは env 欠損 HIV-1_{NLE} (GFP 発現) proviral DNA と VSV-G 発現ベクター-DNA を 293T 細胞に塩化カルシウム沈殿法でトランスフェクションし、ウイルスを作製した。

2. ヒト CD4 陽性 T 細胞の培養維持とウイルス感染

健康人末梢血単核球(PBMC)より CD4⁺ T cell isolation kit (ミリテニ)を用いて negative selection して CD4⁺ T 細胞を純化した。この細胞に色素 (Violet tracer; Invitrogen)をとりこませた後、GFP

発現組換えレンチウイルス(Lenti GFP-Nef-LTR)あるいは VSV psudotype した HIV-1_{NLE} を spinoculation により感染させた。細胞を洗浄後、IL7 と IL-15 を加えて培養維持し、これを HSP (Homeostatic proliferation) 培養とした。一部は固相化抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体で T 細胞受容体 (TCR)を刺激し、IL-2 存在下に培養した(TCR 刺激培養)。

3. 細胞の増殖・活性化のフローサイトメーター解析

レンチウイルスあるいは HIV 感染細胞を感染後 5 日あるいは 12 日以降に一部回収し、Aqua live/dead dye (L34957, Invitrogen)と反応させた後、細胞表面を PE-Cy7 標識 CD45RA, PerCP 標識 CD4, PE 標識 HLA-DR, Alexa647 標識 CD11a, Alexa700 標識 CD27(すべて Bio Legend)で染色して FACScanto で解析した。必要に応じ、同様に染色した感染細胞の T 細胞亜集団を FACSaria で分画した。

4. 定量 PCR 解析

分画したレンチウイルス感染細胞より RNA を抽出し、cDNA を合成して GFP や tat の mRNA 発現を Real Time PCR で定量した。また、感染細胞の DNA を調整し、Alu-primer を用いた integration の解析を行った。

PCR 解析では以下のプライマー・プローブセッ

トを用いた Taqman 法、あるいは Syber Green 法による Real Time PCR で定量した。

GFP: forward, 5'-gaccactaccagcagaacac-3', reverse, 5'-gaactccagcaggaccatg-3', probe, [6-FAM]-agcaccagtcgccctgagca-[BHQ-1], HIV-1 tat は、forward, 5'-catccaggaagtcagcctaaaact-3', reverse, 5'-tcgctgtctcgccttcttc-3'。また、細胞の endogenous control gene expression として RNaseP 遺伝子発現を定量した (forward: 5'-agatttgacctgcgagcg-3', reverse, 5'-gagcggctgtctccacaagt-3', および probe, [6-FAM]-ttctgacctgaaggctctgcgcg-[BHQ-1])。

ゲノムに組込まれたプロウイルス DNA の定量は、山本らの方法(Virus Genes 32:105, 2006)に準じ、Alu-1 primer (5'-tccagctactggggaggctgAGG-3' Alu-2 primer (5'-gcctccaaagtgtctgggattacag-3') first-gag-R primer (5'-caatatcatagccgagagtgctgcgcttcagcaag-3') で 1st PCR を行い、全 DNA を 1×10^5 copies β -globin となるように調整して Alu sites を一定にした。2nd PCR は U5 (5'-ccgtctgtgtgactctgg-3') second-tag-R (5'-caatatcatagccgagagtgctgc-3') と probe [6-FAM]-cgcttcagcaagccgagctctgc-[BHQ-1]を用いた。

5. その他の薬剤

HDAC 阻害剤 SAHA (virinostat) とメチル化阻害剤 2'-deoxy-5-azacytidine (dAzCyt)は Sigma-Aldrich 社より購入した。

(倫理面への配慮等) ヒト末梢血調整のため、国立感染症研究所の倫理委員会の承認を得、ボランティアから同意を得て採血を行った。

C. 研究結果

静止期にある末梢血由来 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といわれる IL-7 と IL-15 を添加して培養することにより、潜伏感染モデルとしての HSP (HomeoStatic Proliferation)培養系を確立した。LTR の制御下に GFP を発現するレンチウイルスを感染させた時、静止期の GFP 陰性 CD4 陽性 T 細胞において低レベルの GFP mRNA の発現を認めた。これが Tat の発現が無いレンチウイルスであるためかどうかを確認するため、野生株 HIV-1_{NL-E} を感染させたところ、図 1 A 左に示すように、4.96%の細胞が GFP を発現しており、特に静止期(非分裂)細胞に GFP 陽性細胞が多かった。ナイーブ T 細胞にゲートをかけると、GFP 陽性細胞は 1.83%存在しており、メモリーよりは少ないもののナイーブ T 細胞にも感染は成立していることが明らかとなった(図 1 B)。野生株では培養中

に感染した細胞が多いことが考えられたため、ナイーブ T 細胞をエンリッチして(85%程度)から同様に VSV pseudotype した HIV-1_{NL-E} を感染させて HSP 培養して 14 日後に解析すると、図 1 B に示すように、GFP 陽性細胞は 0.95%に減少した。このうち GFP 陰性の静止期にあるナイーブ T 細胞にゲートをかけてソートし、再活性化を試みた。TCR 刺激を加えて 1 日目と 6 日目の細胞より RNA を回収し、GFP および tat の mRNA 発現を RT-PCR で定量したところ、図 2 に示すように、HSP 培養を継続して発現している GFP(A)や tat (B)の発現はむしろ低下した。従って、integrate した HIV-1 の再活性化は TCR 刺激では誘導されないことが明らかとなった。そこで同様に感染した細胞を 8 日目にソートし、HSP 培養を継続して 13 日目に TCR 刺激、HDAC 阻害剤である SAHA(0.5 μ M)やメチル化阻害剤 dAzCyt(1.0 μ M)を加えて更に 48 時間後に GFP mRNA の発現を解析したところ、TCR や dAzCyt よりも保たれてはいるものの、SAHA による再活性化誘導はできなかった。一方、ここには示していないが、同じ細胞を感染直後に TCR を刺激して維持した細胞では SAHA により 5 倍程度の GFP mRNA 発現が見られていることから、HSP 培養維持される静止期ナイーブ CD4 陽性 T 細胞はこれまでに知られている再活性化刺激に反応しないことが明らかとなった。

D. 考察

HIV-1 の潜伏過程には T 細胞によって様々な因子が作用していることが指摘されている。培養細胞を用いた in vitro の系では、CD4 陽性 T 細胞株や TCR 刺激後に生存する初期培養 T 細胞が主として使用されてきた。しかしながら、このような T 細胞はすべてメモリー・エフェクターに分化した細胞である。また、感染者の体内 PBMC に潜伏感染した HIV-1 の再活性化をめざす、いわゆる”shock and kill”治療法において、TCR 刺激だけでなく HDAC 阻害剤を含めた様々な薬剤が試されてきたが、その効果は部分的でしかない。HSP 培養維持された静止期にある naïve T 細胞は低レベルの HIV-1 mRNA のみ発現しており、TCR や HDAC 阻害剤にも反応しなかったことから、これらの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も異なる未知の制御を受けていると推察される。最近同定された Stem cell

memory T 細胞 (Buzon et al., Nat. Med. 20:139, 2014)は、本研究の静止期 naïve T 細胞に類似した低頻度の T 細胞亜集団であるが、メモリー T 細胞と比較して活性化されてウイルスによる細胞傷害を受けにくいためその存在は長期にわたり、HIV 感染者における潜伏感染に重要な役割を果たす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。HSP 培養は今後の潜伏感染成立過程の詳細な解析に有用な in vitro 培養系であると思われる。

E. 結論

静止期にある CD4 陽性 T 細胞を長期培養維持可能な HSP (HomeoStatic Proliferation)培養系は、おそらく体内のリンパ組織で恒常維持されている CD4 陽性 T 細胞を模倣した状態でナイーブ T 細胞も含めて培養維持できる。この培養で維持されるナイーブ T 細胞は、in vitro での TCR 刺激や HDAC 阻害剤による HIV-1 mRNA の増加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記憶 CD4 陽性 T 細胞とは異なることが示唆された。このような静止期の T 細胞への HIV-1 感染と潜伏化の成立過程やその存在意義について更に検討が必要である。

F. 健康危険情報

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) Kobayashi-Ishihara, M., Takahashi, H., Ohnishi, K., Nishimura, K., Terahara, K., Ato, M., Itamura, S., Kageyama, T., Tsunetsugu-Yokota, Y.; Broad Cross-Reactive Epitopes of the H5N1 Influenza Virus Identified by Murine Antibodies Against the A/Vietnam/1194/2004 Hemagglutinin. PLoS One, 9(6):e99201, 2014
 - 4) Tsunetsugu-Yokota, Y., Nishimura, K., Misawa, S., Kobayashi, M., Takahashi, H., Takayama, I., Ohnishi, K., Itamura, S., Nguyen, H. L. K. Le, M. T. Q., Dang, G. T., Nguyen, L. T., Tashiro, M., Kageyama, T.; Development of a sensitive novel diagnostic kit for the highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus. BMC Infect Dis., 14:362, 2014
 - 5) Iwata-Yoshikawa, N., Uda, A., Suzuki, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Sato, Y., Morikawa, S., Tashiro, M., Sata, T., Hasegawa, H. and Nagata, N.; Effects of Toll-like Receptor Stimulation on Eosinophilic Infiltration in Lungs of BALB/c Mice Immunized with UV-inactivated Severe Acute Respiratory Syndrome-related Coronavirus Vaccine. J. Virol., 88:8597-8614, 2014
 - 6) Matsuzakia, Y., Sugawaraa, K., Nakauchi, M., Takahashi, Y., Onodera, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Matsumura, T., Ato, M., Kobayashi, K., Shimotai, Y., Mizuta, K., Hongo, S., Tashiro, M., Nobusawa, E.; Epitope mapping of the hemagglutinin molecule of A/(H1N1)pdm09 virus by using monoclonal antibody escape mutants. J. Virol., 88:12364-73, 2014
- ### 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10日
 - 2) 和田倭、小林(石原)美栄1)、寺原和孝1)、池野翔太1)2)、徳永研三3)、立川(川名)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10日

- 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10日
- 4) 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、横浜、2014年11月10日
- 5) Yoppy R Candra, Anna L Poetranto, Aldise M Natri, Edith F Puruhito, 横田(恒次) 恭子, 西村研吾, 影山努, 高原悠佑, 堀田博, 清水一史「Comparative analysis for the detection of

avian influenza H5N1 virus by using a novel luminescence analyzer (POCube) and real-time RT-PCR」第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月10日

- 6) 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10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

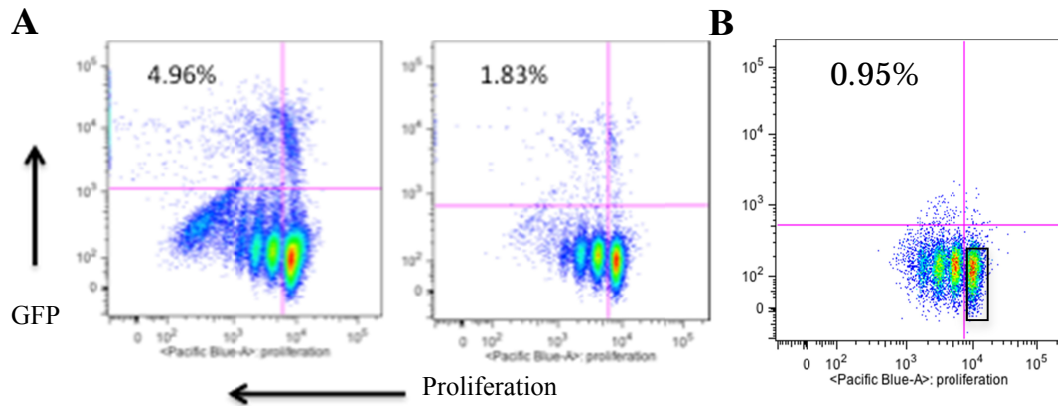


図1 静止期 CD4 陽性 T 細胞における HIV-1 感染とその発現

(A) 末梢血 CD4 陽性細胞に GFP を発現する HIV-1_{NL-E} を感染させた。この細胞を IL-7 と IL-15 添加した HSP 培養し、感染 9 日後にフローサイトメーターで感染細胞 (GFP, 縦軸) と増殖レベル (横軸) を解析した。

(B) 末梢血 CD4 陽性細胞を更に naive 細胞に分け、VSV pseudotype した HIV-1_{NL-E} を感染させて HSP 培養し、感染 14 日後の細胞増殖と GFP 発現をフローサイトメーターで解析した。

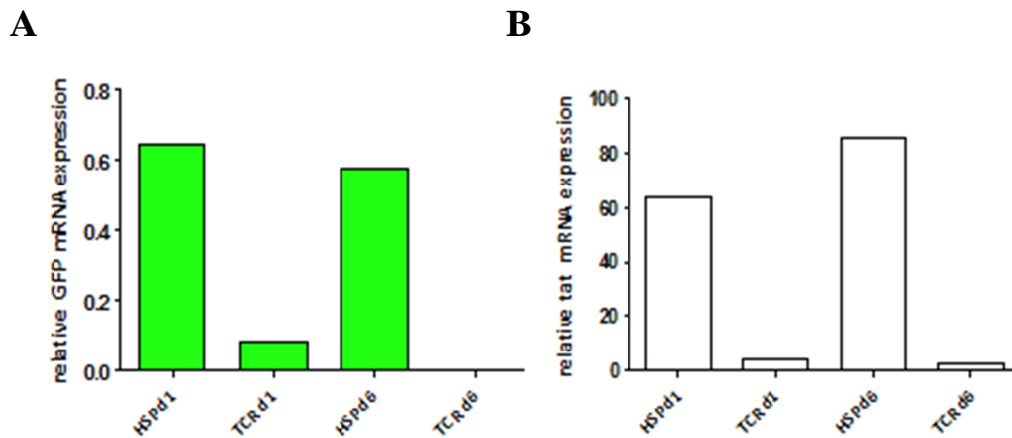


図2 GFP を発現しない静止期 CD4 陽性 naive T 細胞でのウイルス mRNA 発現

VSV pseudotype した HIV-1_{NL-E} を感染させて HSP 培養 14 日後 (図 1 B) の GFP 陰性、細胞非分裂 (静止期) CD4 陽性 T 細胞を FACSaria でソートし、HSP 培養を継続あるいは TCR 刺激を加えて 1 日後および 6 日後に RNA を抽出した。cDNA 合成後、定量 PCR にて GFP (A) および tat (B) の mRNA 発現量を解析した。縦軸は、細胞内 endogenous mRNA コントロールとして RNase P の mRNA に相対的な GFP および tat の発現レベルとして示した。

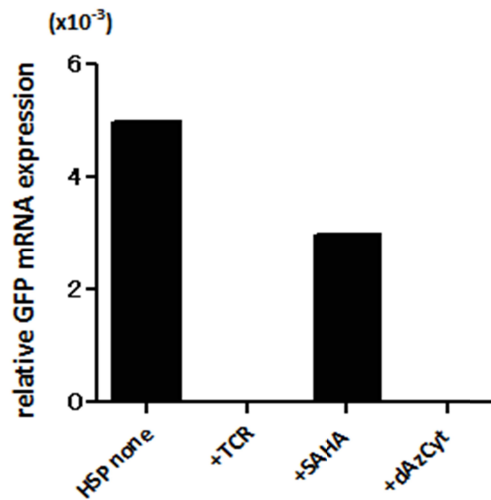


図3 潜伏感染した静止期 CD4 陽性 naïve T 細胞における HIV の再活性化誘導

図2同様に VSV pseudotype した HIV-1_{NL-E} を感染させて HSP 培養 8 日後に GFP 陰性、細胞非分裂（静止期）CD4 陽性 T 細胞を FACSaria でソートし、HSP 培養を更に持続して 15 日後に RNA を抽出した。一部は 13 日目に TCR 刺激、あるいは SAHA, dAzCyt を添加し、同じく 15 日目に RNA を抽出して cDNA を合成して GFP mRNA を PCR 定量した。縦軸は、細胞内 endogenous mRNA コントロールとして RNase P の mRNA に相対的な GFP の発現レベルとして示した。

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

研究分担者 渡邊 俊樹 東京大学大学院新領域創成科学研究科 教授
研究協力者 山岸 誠 東京大学大学院新領域創成科学研究科 特任研究員

研究要旨：

HIV 潜伏化の分子メカニズムを知るためには、感染細胞集団全体を正確に可視化した上で LTR の活性レベルをモニターする必要がある。本研究では新たな dual-color reporter を作成し、感染初期及び後期における感染細胞集団の特定と分子レベルでの潜伏化メカニズムの検証を行った。その結果、感染細胞の一部において感染後非常に早期に LTR が不活性化する集団が存在することが明らかになった。本年度は、作成した新規レポーターウイルスを正常 T 細胞に導入し、潜伏化成立の実態を明らかにした (Matsuda *et al.*, Scientific Reports, 2015)。また大規模化合物スクリーニングにより、潜伏化 LTR を効果的に再活性化できる化合物取得の検討を開始した。

A. 研究目的

HIV-1 は体内で CD4⁺ T 細胞に感染し、感染細胞を破壊することで、感染者に重篤な免疫不全を引き起こす。2009 年の報告では世界中に約 3400 万人の HIV-1 感染者がいると推定されており、社会に大きな影響を与えている感染症のひとつである。現在 HIV-1 感染者に対しては複数の抗 HIV 薬を併用する多剤併用療法(HAART)が行われており、AIDS の発症を効果的に防ぐことが可能である。しかし体内の様々な組織に HIV-1 latent reservoir と呼ばれる感染細胞が残存しているため、HAART によって体内から完全に HIV-1 を排除することは不可能である。Latent reservoir からのウイルスの再活性化を防ぐために、患者は長期に渡り抗 HIV 薬を服用しなければならず、薬剤耐性ウイルスの出現、重篤な副作用、医療費などの問題が生じており、潜伏感染ウイルスの排除が新たな課題となっている。HIV-1 latent reservoir の中でもウイルス血症の主な原因となっているのは潜伏感染 CD4⁺ T cell である。この細胞ではプロウイルスの状態では HIV-1 遺伝子の発現が抑制されており、従って抗 HIV 薬の標的とならない。このような潜伏感染細胞集団の解析と LTR の不活性化の分子メカニズムの解明が世界中で

進められているが、どのような細胞において潜伏感染が成立しているのかは未だ明らかにされておらず、潜伏化成立段階に関わる分子群の特定も不十分である。

最終年度は、作成した新規レポーターウイルスを正常 T 細胞に導入し、潜伏化成立のダイナミクスとその制御の可能性を検討した。また大規模化合物スクリーニングにより、潜伏化 LTR を効果的に再活性化できる化合物の取得を目的とした。

B. 研究方法

1. 正常 CD4⁺T 細胞を用いた感染実験

末梢血由来正常 CD4⁺T 細胞は健常人 PBMC から磁気ビーズを用いて濃縮を行った。昨年度までに作成した dual-color レポーター DNA を 293FT 細胞に導入し、高濃度ウイルス液を作成したのち、spinoculation によって正常細胞に導入した。その後、CD3/CD28 抗体によって T 細胞を刺激し、その前後の LTR の活性レベルをフローサイトメトリーで解析を行った。

2. 潜伏化 LTR を再活性化する化合物の大規模スクリーニング

Jurkat 細胞に dual-color ウイルスを感染させ、感

染初期に成立した潜伏化細胞を分取したのち、21万種類の低分子化合物を処理する。LTRの活性レベルはHigh Content Analysisによって検出、定量し、化合物の同定を試みている。

C. 研究結果

1. 正常 CD4⁺T 細胞における LTR の潜伏化成立の検出

健康人由来 CD4⁺T 細胞に高濃度 dual-color レポーターを感染させ、その後の LTR の活性レベルを検討した。またこれらの集団に対して CD3/CD28 抗体を用いて抗原刺激を行い、細胞の活性化レベルと潜伏化の検討を行った。さらに前年度までに明らかにした EZH2 の阻害剤と HDAC の阻害剤を処理し、潜伏化の成立に与える影響を検証した。

その結果、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 が抑制された集団が成立することがわかった。この集団は抗原刺激による細胞の活性化によって縮小されたが、潜伏化集団が依然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ことがわかった。しかしながら、潜伏化集団を完全には除去できず、これらの集団を除去する新たな戦略の必要性を浮き彫りにした。

研究成果として昨年度までの細胞株のデータと正常細胞を用いた HIV-1 の潜伏化成立の新たな分子メカニズムについて論文で発表した (Matsuda *et al.*, Scientific Reports, 2015)。

2. 潜伏化 LTR を再活性化する化合物の大規模スクリーニング

Jurkat 細胞に dual-color ウイルスを感染させ、感染初期に成立した潜伏化細胞を分取したのち、低分子化合物を処理した。またポジティブコントロールとして PMA+Ionomycin を処理し、検出系の最適化と定量性の確認を行った。LTR の活性レベルは High Content Analysis によって検出、定量し、化合物の同定を試みた。

現在までに実験系の最適化を終了し、現在 21万種類の化合物スクリーニングを開始している。

D. 考察

本研究で作成した新たなレポーターウイルスは、感染細胞集団の一部に含まれる潜伏化集団をリアルタイムで検出、解析できる系であり、潜伏感染の分子メカニズムを知る非常に有用である。今回得られた正常細胞における潜伏化の成立は、HIV-1 感染症の cure を目指す戦略を組み立てる上で非常に重要な発見であった。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が、我々の系で潜伏化集団の可視化を行うことで、非常に多くの残存が明らかになった。本研究結果で示した polycomb 依存的な LTR の抑制は新たな標的の一つとなると考えられるが、現在使用できる阻害剤では完全な除去には至らなかった。今後これらの分子メカニズムを基盤とした新たな戦略が必要であると考えられた。

本研究では、新たな化合物と分子標的を創出すべく、化合物の大規模スクリーニングを開始した。これまでも潜伏化 HIV を標的とした化合物スクリーニングが報告されているが、我々は感染初期に成立集団に注目して検討を始めている。この結果を得て新たな分子メカニズムの検討と HIV-1 潜伏化の制御を試みる。

E. 結論

正常 T 細胞において、HIV の潜伏化には複数のエピジェネティックメカニズムが存在し、ヘテロな集団の形成を担っている。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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)

2. 学会発表

- 1) 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、パシフィコ横浜、横浜、2014 年 11 月 12 日 (2014 年 11 月 10 日～12 日)(一般口演)

- 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総会、パシフィコ横浜、横浜、

2014 年 11 月 12 日 (2014 年 11 月 10 日～12 日)(一般口演)

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

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

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
研究協力者 張 延昭 国立感染症研究所感染病理部 研究生

研究要旨：本年度、まず我々は、HIV-1 感染抑制活性がインターフェロン（IFN）の II 型、III 型には殆どなく I 型特異的であることを確認した。そこで I 型 IFN の誘導により発現が著しく惹起される 6 種類の候補蛋白（APOBEC3A、IFITM1、IFITM2、IFITM3、ISG15、及び RSAD2）と新規蛋白 MX2 の安定発現細胞、更に CRISPR/CAS9 システムによるそれら遺伝子のノックアウト細胞を用いて、HIV-1 ルシフェラーゼレポーターウイルスによる感染実験を行った。その結果、前者の実験で、特に IFITM ファミリー蛋白が MX2 レベルの感染抑制活性を示すことを見出した。一方、後者の実験では、個々の遺伝子のジーンサイレンシングでは I 型 IFN による強力な感染抑制からの回復は不十分であった。以上のことから、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唆された。

A. 研究目的

我々はこれまでの研究において、マクロファージ及び樹状細胞の I 型インターフェロン（IFN）処理による著しい HIV-1 感染前期抑制は Vpx 存在下でも解除されないこと、つまり、SAMHD1 非依存的な HIV-1 感染抑制効果を見出した。本研究においては、I 型 IFN 誘導性遺伝子（ISG）の同定を試みることを目的とした。昨年度までに、IFN- α によって強力に誘導されることが明らかになった 6 種類の候補遺伝子、APOBEC3A、IFITM1、IFITM2、IFITM3、ISG15、及び RSAD2 を 3 種類の異なる方法により発現させ、HIV-1 ルシフェラーゼレポーターウイルスを用いた感染実験を行うことにより、候補遺伝子産物による感染抑制効果を検討した。また CRISPR/CAS9 システムを用いた候補遺伝子のノックアウトにより、IFN 存在下において、HIV-1 感染効率の回復が認められるか否かを調べた。

B. 研究方法

まず、HIV-1 感染抑制効果が I 型 IFN 特異的か否かを検証した。次に昨年、候補遺伝子として

同定した IFITM1、IFITM2、IFITM3、ISG15 及び RSAD2 と新規蛋白 MX2 の安定発現細胞株を、DNA 導入後の薬剤選択またはレンチウイルスによるトランスダクションの二種類、計三種類の方法で樹立した。それらの細胞に HIV-1 ルシフェラーゼレポーターウイルスを感染させてルシフェラーゼアッセイにより感染性の定量を行った。詳細は以下の通り。

1. IFN I 型・II 型・III 型の処理による単球細胞株の調製

単球細胞株 THP-1 を phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; Sigma) 30 ng/ml で一晩処理した後、I 型 IFN (α , β , 及び ω) II 型 IFN (γ) または III 型 IFN (λ) をそれぞれ 500 U/ml を加えて培養した。

2. ネオマイシン耐性候補遺伝子発現プラスミドの構築

pCXN2（京大ウイルス研・朝長先生より分与）から切り出した TK プロモーター/ネオマイシン耐性遺伝子を pCAGGS に挿入した後、そのマルチクローニングサイトに C 末 HA タグを挿入して、PCR 増幅した各候補遺伝子を挿入して作製した。

3. T細胞株 M8166 へのトランスフェクションによる安定発現細胞株の樹立

2 で作製したネオマイシン耐性候補遺伝子発現プラスミドをそれぞれ、T細胞株 M8166 に 4D-Nucleofector システム (Lonza) を用いてトランスフェクションし、48 時間後に 1 mg/ml の G418 (Wako) を添加、1 週間培養して安定発現細胞を樹立した。

4. 候補遺伝子発現レンチウイルスベクターの構築

前述の pCAGGS バックボーンに HA タグ付き候補遺伝子発現ベクターのインサート部分をタグごと PCR 増幅した後、レンチシャトルベクターに挿入して作製した。

5. レンチウイルスベクターによる候補遺伝子の 293T 細胞へのトランスダクション

4 で作製した候補遺伝子発現レンチウイルスベクター、パッケージングベクター、Rev、Tat、及び水疱性口炎ウイルス G 蛋白 (VSV-G) 発現ベクターを 293T 細胞にコトランスフェクションして、48 時間後に上清中のウイルス量を p24 antigen capture ELISA (ABL) により測定した。得られたレンチウイルスベクターを MOI 5 で 293T 細胞にトランスダクションした。

6. ネオマイシン耐性遺伝子付き候補遺伝子発現レンチウイルスベクターの構築

上記の候補遺伝子発現レンチウイルスベクターの GFP 遺伝子部分をそれぞれネオマイシン耐性遺伝子と取り換えることにより作製した。

7. ネオマイシン耐性遺伝子付加レンチウイルスベクターによる安定発現 HeLa 細胞の樹立

6 で作製したネオマイシン耐性遺伝子付き候補遺伝子発現レンチウイルスベクターを用いて、5 と同様にコトランスフェクションして、p24 量を測定した。得られたレンチウイルスベクターを MOI 5 で HeLa 細胞にトランスダクションした。48 時間後に 500 µg/ml の G418 を添加、4 日間培養して安定発現細胞を樹立した。

8. 候補遺伝子ノックアウト用 CRISPR/Cas9 発現レンチウイルスベクターの構築

3'側に PAM 配列を有する 20 塩基の標的配列を候補遺伝子ごとにデザインして、各オリゴリンカーを CRISPR/Cas9 発現レンチウイルスベクターに挿入することにより作製、候補遺伝子発現ベクターとのコトランスフェクションによ

り、ノックアウト効率を確認した。コントロールとして SAMHD1 ノックアウトベクターも作製した。

9. CRISPR/Cas9 レンチウイルスベクターによる候補遺伝子ノックアウト THP-1 細胞の樹立
8 で作製した CRISPR/Cas9 レンチウイルスベクターを用いて、5 と同様にコトランスフェクションして、p24 量を測定した。得られたレンチウイルスベクターを MOI 3 で THP-1 細胞にトランスダクションした。48 時間後に 0.5 µg/ml の puromycin を添加、4 日間培養して安定発現細胞を樹立した。

10. SIV Vpx 取込み用の SIV gag p6 付加 HIV-1 ルシフェラーゼレポータープロウイルス DNA の構築

HIV-1 ルシフェラーゼレポータープロウイルス DNA の gag p6 領域に、SIV の Vpx 結合モチーフである DPAVDLL 配列を挿入して作製した。また RRE 配列を付加した SIVmac 由来 Vpx 発現ベクターを各 PCR 断片の pCAGGS への挿入により構築した。

11. 感染実験 上記の 1 で調整した IFN 処理細胞は IFN 添加後の翌日、3、7 及び 9 で調整した安定発現細胞は樹立後すぐに、また 5 で調整した細胞はトランスダクションの 48 時間後に感染実験に用いた。1 の IFN 処理細胞または 3、5、及び 7 の候補遺伝子発現細胞を用いる感染実験では、まず Env 変異型ルシフェラーゼレポーター HIV-1 プロウイルス DNA 及び VSV-G 発現ベクターを 293T 細胞へコトランスフェクションした。48 時間後に上清中の p24 量を測定して、各細胞に感染を行い、更に 48 時間後に細胞溶解液を調製した。それを用いてルシフェラーゼ活性を測定して感染性を定量化した。9 の候補遺伝子ノックアウト細胞を用いる感染実験では、ウイルスの調製のために、10 で作製した SIV gag p6 付加 HIV-1 ルシフェラーゼレポータープロウイルス DNA と SIVmac Vpx 発現ベクター及び VSV-G 発現ベクターをコトランスフェクションした。48 時間後に上清中の p24 量を測定して、予め PMA 処理により分化させ、IFN-α 存在下または非存在下で培養したノックアウト THP-1 細胞に感染、ルシフェラーゼ活性を測定した。また各細胞における候補遺伝子の発現は全てウエスタンブロッ

ト法により確認した。

[倫理面への配慮] 遺伝子組換え実験は、国立感染症研究所・組換え DNA 実験安全委員会において平成 25 年 9 月 13 日付け承認番号・機 25-53 及び平成 27 年 1 月 15 日付け承認番号・機 26-85 により、また大臣確認(平成 25 年 9 月 20 日、大臣確認通知番号 25 受文科振第 1849 号)により承認を得たプロトコールに従って行われた。

C. 研究結果

1. IFN の HIV-1 感染前期抑制能は I 型特異的である

分化させた THP-1 細胞における IFN の HIV-1 感染前期抑制は III 型 (λ) では認められず、II 型 (γ) では部分的に観察された。I 型 (α 、 β 、及び ω) においては非常に強い抗ウイルス活性が認められ、特に IFN- β で最も顕著であった。この結果より、我々は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 型特異的であると結論づけた。

2. IFITM ファミリー蛋白は強い抗ウイルス活性を有する

プラスミドベースの安定発現細胞の実験では、いずれの細胞においても感染抑制効果は比較的小さかったものの IFITM ファミリー蛋白発現細胞では感染を 30~40%抑制する効果が認められた。実験系をレンチウイルスベクターの系に変更して行った結果、ISG15 または RSAD2 で 50%程度の抑制効果が、また IFITM ファミリー蛋白では平均で 75%程度の抑制効果が認められた。後者は MX2 発現細胞とほぼ同程度であった。レンチウイルスベクターの系で認められた結果を再現的に観察するために、全てのレンチウイルスベクターにネオマイシン耐性遺伝子を挿入して、作製したウイルスを用いたトランスダクションを行った後、G418 による薬剤選択をして安定発現細胞株を樹立した。これらの細胞において、IFITM ファミリー蛋白発現細胞における HIV-1 感染阻害はより顕著となり、MX2 発現細胞とともに 90%以上の抑制効果を示した。

3. I 型 IFN による HIV-1 感染前期抑制は MX2 や IFITM ファミリーのみではない

今回、CRISPR/Cas9 システムを導入して効率よ

いジーンサイレンシングを試みた。各候補遺伝子に対してそれぞれ作製した CRISPR/Cas9 レンチウイルス発現ベクターの高いノックアウト効率を確認した後に、安定ノックアウト THP-1 細胞を作製した。なお、分化した THP-1 細胞において SAMHD1 が高発現しており、実際 SAMHD1 による感染阻害は無視できないことから、HIV-1 ルシフェラーゼレポータープロウイルス DNA に SIV gag p6 配列を付加して Vpx を効率よく取り込めるプロウイルス DNA を作製した。新たに構築した SIVmac Vpx 発現ベクターとのコトランスフェクションによって得られたウイルスを用いて、分化させたノックアウト THP-1 細胞 (IFN- α 処理または未処理) に対する感染実験を行った。その結果、IFN- α 処理後の細胞においては、MX2 ノックアウトの場合に感染回復率は 15%程度認められ、APOBEC3A や IFITM ファミリー蛋白ノックアウトではそれぞれ 5%弱の回復が観察された。以上より、一部の ISG のみならず、MX2 をはじめ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。

D. 考察

今年度の研究において、まず HIV-1 に対する IFN の抗ウイルス活性が I 型に非常に特異的であることが明らかになった。候補遺伝子発現プラスミドのトランスフェクションによる安定発現細胞の実験においては、APOBEC3A 発現細胞が恐らくその毒性により、極めて低い細胞増殖率を示したため、これ以降からの蛋白発現実験からは除外することとした。それ以外の安定発現細胞においても、プラスミドベースの実験では増殖率にばらつきがあり、感染時に細胞数を揃えてもアッセイの時点で細胞数が異なったことから、レンチウイルスベクターの系へと変更した。しかしながら、当初はウイルスベクター DNA に薬剤耐性遺伝子が含まれていなかったため、トランスダクション後に薬剤選択が出来ず、MOI を上げることで、理論上 100%の細胞に目的遺伝子が導入されているものとして実験を行った。その実験系では、実験をリピートする毎に感染実験の測定値が大きくなるため、最終的にレンチウイルスベクター

DNA にネオマイシン耐性遺伝子を入れることによって、薬剤選択による安定発現細胞の樹立が可能となった。その結果、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らかとなった。その一方で、各遺伝子のジーンサイレンシングにおいては、IFN- 処理による感染抑制からの回復はどれも不十分で、決して一つや二つの主要細胞因子が抑制に寄与しているわけではないことが判明した。

E. 結論

(1) IFN の HIV-1 感染前期抑制は I 型 (α , β , 及び ω) に特異的な機能であった。

(2) 候補遺伝子の単独安定発現系において、三種類の IFITM ファミリー蛋白が MX2 と比べても遜色ない抑制活性を示すことが分かった。

(3) 候補遺伝子のノックアウト細胞の樹立により、それぞれの遺伝子のサイレンシングによる感染回復効果は弱く、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唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

- 1) Utachee, P., Isarangkura-na-ayuthaya, P., Tokunaga, K., Ikuta, K., Takeda, N., Kameoka, M.: Impact of amino acid substitutions in the V2 and C2 regions of human immunodeficiency virus type 1 CRF01_AE envelope glycoprotein gp120 on viral neutralization susceptibility to broadly neutralizing antibodies specific for the CD4 binding site. *Retrovirology* 11:32, 2014.
- 2) 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.
- 3) 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.* In press.

- 4) 多田卓哉、徳永研三：抗ウイルス宿主因子 BST-2/tetherin とそれに拮抗するウイルス蛋白の分子間対決 Molecular Confrontation between the Host Restriction Factor BST-2/Tetherin and Its Viral Antagonists . 日本エイズ学会誌 16: 126-136, 2014.

学会発表

- 1) 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. 11.
- 2) 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. 11.
- 3) 高畑辰郎、徳永研三、長谷川温彦、神奈木真理、増田貴夫： HIV-1 インテグラーゼの非酵素的機能の解析 . 第 62 回日本ウイルス学会総会 (横浜) 2014. 11.
- 4) 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総会(横浜) 2014. 11.
- 5) 高畑辰郎、徳永研三、長谷川温彦、神奈木真理、増田貴夫： HIV-1 インテグラーゼの逆転写過程以前における機能の解析 .第 28 回日本エイズ学会 (大阪) 2014. 12.
- 6) 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. 12.
- 7) 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)

H . 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

- 1 . 特許取得
なし
- 2 . 実用新案登録
なし
- 3 . その他
なし

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

研究分担者 立川 愛 国立感染症研究所エイズ研究センター 室長
(東京大学医科学研究所先端医療研究センター感染症分野 准教授)

研究要旨：再活性化した HIV 潜伏感染細胞における HIV 特異的 CTL への抗原提示の様態を明らかにするため、HIV 潜伏感染モデル細胞株を用いて抗原提示解析系の構築を行った。再活性化した特定の HLA を発現する HIV 潜伏感染細胞と HIV 特異的 CTL クローンとを共培養することによって、再活性化により発現された Nef タンパク質由来の CTL エピトープは、速やかに HIV 感染細胞表面で提示されていることが示された。本システムは新たな治療戦略としての潜伏感染細胞再活性化の実用化に向けて、再活性化後の速やかな HIV 感染細胞除去に有用な CTL の探索に有用である。

A. 研究目的

抗 HIV 薬の進歩により、HIV 感染症は先進国では致死性の疾患ではなくなったが、現状の抗 HIV 療法(cART)では治癒の可能性はない。若年層での感染が主である HIV 感染において、長期 cART による薬物毒性、副作用、医療経済上の問題は深刻であり、治癒を目指す治療法の確立が急務である。

HIV 感染症において治癒を妨げているのは長期生存可能な潜伏感染細胞である。ウイルスタンパク質の発現を伴わない HIV 潜伏感染細胞は宿主の免疫監視機構から完全に逃れることができる。近年潜伏感染細胞を再活性化し、宿主免疫応答により感染細胞除去を目指す治療戦略が提唱されている。HIV 特異的細胞傷害性 T 細胞(CTL)は、再活性化後の HIV 感染細胞排除の重要なエフェクターとして位置づけられる。しかしながら、どのような CTL が再活性化後の HIV 潜伏感染細胞排除に効果的に作用するか、明らかでない。

HIV 特異的 CTL は、個々でその抗 HIV 効果が異なる。それぞれの CTL が認識するエピトープの、細胞表面での抗原提示量、すなわち個々のエピトープを提示する HLA 分子の数や、その抗原提示のタイミングが大きく影響すると考えられる。そこで、本研究では、再活性化後の HIV 感染細胞における抗原提示の動態を明らか

にするために、抗原提示解析系の構築を試みた。

B. 研究方法

HLA-A*24:02 発現 HIV 潜伏感染細胞株の樹立

HIV 潜伏感染モデル細胞として、CD4 陽性 T 細胞株の ACH-2 を用いた。ACH-2 にウイルスベクターを用いて HLA-A*24:02 遺伝子を導入後、薬剤選択、クローニングを行い、HLA-A24 恒常発現 ACH-2 細胞株(A24-ACH2)を樹立した。複数のクローンについて、定常状態(未刺激)と TNF- α で活性化後の HIV 産生について明らかにするため、培養上清中の RT 活性試験を行った。

HLA-A24 恒常発現 HIV 潜伏感染細胞株での抗原提示の解析

A24-ACH2 を TNF- α で再活性化後、継時的に 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 クローンと共培養を開始した。4 時間の培養後、IFN- γ ELISpot assay により、IFN- γ 産生細胞数を定量した。

(倫理面への配慮)

臨床材料の提供を受ける場合には研究目的や必要事項を文書を用いて説明し、書面でインフォームドコンセントを得た。研究対象者への負担は、臨床上必要な採血に加えての少量の血液採取のみであり、倫理面への問題はないと判断される。本研

究内容は東京大学医科学研究所倫理審査委員会により承認されている。

C. 研究結果

ウイルスベクターを用いて ACH-2 細胞に HLA-A*2402 遺伝子を導入し、薬剤選択後クローニングを行い、複数の A24-ACH2 クローンを得た。TNF- α にて再活性化後 RT 活性を測定したところ、再活性化後の活性化レベルと定常状態でのバックグラウンドレベル(未刺激での RT 活性)は、クローンによって大きく異なっていた。バックグラウンドが低く、再活性化後の活性化レベルが高いクローンを選び、実験に用いた。

A24-ACH2 を TNF- α にて再活性化後、継時的に Nef 由来の HLA-A*24:02 拘束性 CTL エピトープ特異的 CTL クローンとの共培養を行い、IFN-ELISpot assay を行うことで、Nef 特異的 CTL クローンへの抗原提示を解析した。その結果、TNF- α による刺激をしなかった場合、また A24 を発現しない ACH-2 ではほとんど IFN- γ 産生細胞が見られなかったのに対して、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。

D. 考察

A24-ACH2 を用いた潜伏感染モデル細胞を用いて、抗原提示動態の解析系を構築し、Nef 特異的 CTL を用いて解析を行った。再活性化による HIV タンパク発現開始後、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ていることが示された。定常状態(未刺激)での HIV 産生がほとんどない A24-ACH2 細胞株を用いた本システムは、抗原提示動態の解析に有用であることが明らかとなった。今後、タンパク質発現のタイミングが異なる Gag や Pol 由来のエピトープに対しても同様の検討を行い、由来するウイルスタンパク質の発現動態と抗原提示の関連性を明らかにする。さらに、切り出し効率やペプチドの安定性等も抗原提示に影響を与えるため、同じウイルスタンパク質由来の複数のエピトープ特異的 CTL を用いて同様の検討をすることも重要である。

E. 結論

再活性化 HIV 潜伏感染細胞における抗原提示動態の解析系を構築した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) Gu L, Kawana-Tachikawa A, Shiino T, Nakamura H, Koga M, Kikuchi T, Adachi E, Koibuchi T, Ishida T, Gao GF, Matsushita M, Sugiura W, Iwamoto A, Hosoya N. Development and Customization of a Color-Coded Microbeads-Based Assay for Drug Resistance in HIV-1 Reverse Transcriptase. *PLoS One*. 9:e109823, 2014.
- 3) 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.

2. 学会発表

- 1) 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.
- 2) 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
- 3) 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, 湯永博之, 岡慎一, 間陽子, 上野貴将: Effects 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、横浜、2014年11月
- 4) 細谷(中山)香、石田尚臣、中村仁美、細谷紀彰、古賀道子、鯉淵智彦、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
- 5) Gu L, Han Y, Guan S, Yang F, Zhu T, 合田仁、Cao Y, 立川(川名)愛、細谷紀彰、Gao FG, 岩本愛吉、Li T, 石田尚臣: 中国 HIV-1 感染者の未治療検体における副受容体指向性の検査. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月
- 6) 佐藤秀憲、細谷(中山)香、菊地正、安達英輔、古賀道子、中村仁美、鯉淵智彦、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
- 7) 石坂彩、佐藤秀憲、立川(川名)愛、中村仁美、古賀道子、細谷紀彰、鯉淵智彦、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
- 8) 和田倭、小林(石原)美栄、寺原和孝、池野翔太、徳永研三、立川(川名)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
- 9) 藤田由利子、小野敏明、落合央、立川愛、Leen AM, Heslop HE, 森尾友宏、高橋聡: 実臨床応用に向けたウイルス特異的 T 細胞療法の開発. 第 6 回血液疾患免疫療法研究会学術集会、京都、2014年9月
- 10) 小野敏明、藤田由利子、立川(川名)愛、高橋聡、森尾友宏: 臨床応用に向けた多ウイルス特異的 T 細胞培養法の確立とその特性解析. 第 42 回日本臨床免疫学会総会、東京、2014年9月

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

国内特許出願 (申請中)

出願人: 公益財団法人微生物化学研究会、発明者: 水谷壮利、石坂彩、立川愛

「免疫状態の判定方法、CD4⁺T細胞数の増加予測方法、及び CD4⁺T細胞数の減少予測方法、並びにそれらのためのキット」特願 2014-128028、出願日: 2014年6月23日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

【HIV潜伏感染細胞再活性化時の抗原提示解析】

HIV 複製を自発的に制御する感染者群でのウイルス蛋白質 Nef の機能と免疫活性化における役割

研究分担者 上野 貴将 熊本大学エイズ学研究センター 准教授

研究要旨: HIV 慢性感染に伴う免疫活性化と免疫制御の関連を明らかにする目的で、HIV を自発的に制御している極めて稀な感染者であるコントローラーの検体を用いて、ウイルス病原性に関わる Nef の遺伝学的特徴と機能解析を行なう。本年度は、後にコントローラーとなる感染者の急性感染期の検体を集め、Nef 機能の解析を行った。病態が進行する感染者グループの急性感染期の検体を対照群とした。その結果、コントローラーでは Nef 機能が減弱化しており、感染者の HLA 型に相関する変異が機能の減弱化に関係することが分かった。これらのことから、感染急性期に免疫逃避によって選択される変異が Nef の機能の減弱化および病態制御に影響することが明らかとなった。治療なしに HIV 感染制御ができていない検体を用いたユニークなアプローチをとることで、生体内で実際に起きている免疫活性化と免疫応答の複雑な関係の一端を明らかにできた。

A. 研究目的

HIV 慢性感染に伴う免疫活性化と免疫制御の関連を明らかにする目的で、HIV を自発的に制御している極めて稀な感染者であるコントローラーの検体を用いて、ウイルス病原性に関わる Nef の遺伝学的特徴と機能解析を行なう。

B. 研究方法

ポストンなどでリクルートした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。

（倫理面への配慮）

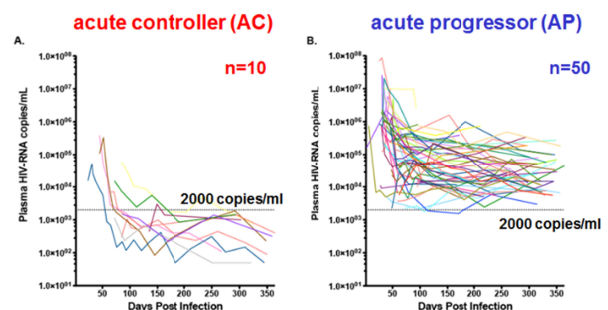
米国マサチューセッツ総合病院より、臨床材料の提供を受けた。研究倫理委員会の承認を得、書面による同意確認と提供者の個人情報の保管管理を徹底しつつ実施する。また、研究の実施に当たっては、熊本大学の倫理審査会の審議を受け、承認を得ている。承認を受けた研究計画に厳密にしたがって遂行した。

C. 研究結果

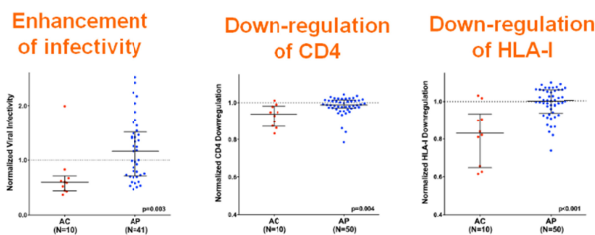
ウイルス複製を自発的に制御しているコントローラーでは、慢性的な免疫活性化が非常に低い頻度でしか観察されないことが知られている。そこで、免疫活性化と関連するウイルス蛋白質である Nef の機能について、さまざまな病態にある感染者の検体を用いて解析した。

（1）感染急性期の検体

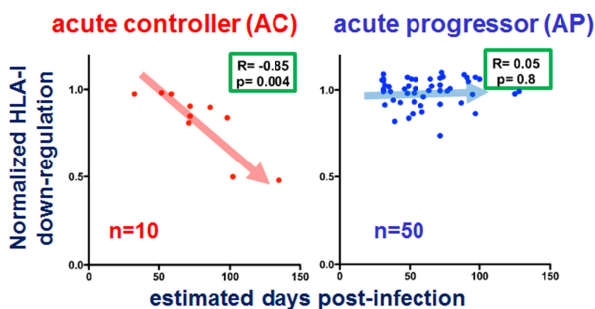
急性感染期からフォローアップしている検体で、後にコントローラー（1年後に 2000 RNA copy/ml 未満）となる 10 名を用いた。対照群として、同じ地域の急性期の感染者で、病態が制御されない 50 名の検体を用いた。両群のウイルス RNA から、HIV-1 Nef 遺伝子を増幅した。急性コントローラーを AC、急性病態進行者を AP と記す。



(2) Nef の機能解析
 遺伝子配列の系統樹解析からは、特に両群に特徴的なクラスター等は認められなかった。また、Nef 蛋白質の発現量や、組換えウイルスの生産量などには、両群由来の Nef に差は認めなかった。次に、Nef の 3 つの特徴的な機能として、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。その結果、3 つの機能とも急性コントローラー群由来の Nef では、顕著に減弱化していた。



(3) HLA-I 発現抑制機能は、経時的に減弱化している
 3 つの機能について、経時的な変化を調べたところ、AC において、HLA-I 発現抑制機能が経時的に減弱化していることが分かった。他の機能にそうした特徴は見られなかった。



AC01: A*01:01/A*31:01, B*37:01/B*51:09, C*01:02/C*06:02

(No typical protective allele in AC01)



(4) HLA 相関変異 (CTL 逃避変異) が、Nef 機能の減弱化に関係する

1 年後のウイルス量が著しく低くなっていた AC01 という検体について、Nef の変異と機能との関連を解析した。まず、2 つのサンプリングポイントで Nef のアミノ酸配列を比較したところ、4 つの変異を見出した。この感染者の HLA アリルを見たところ、4 つの変異とも感染者の持つ HLA アリルに相関する変異であった。このことは、感染者の細胞性免疫応答による淘汰圧が働いたと推察される。

次に、4 つの変異をさまざまに組み合わせて導入して機能に与える影響を調べたところ、4 つの変異が組み合わさったときのみ、顕著な機能低下を認めた。また、このとき、蛋白質質量も著しく低下していた。

D. 考察

ウイルスに対する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 (免疫学的な選択圧) Nef 蛋白質の機能と免疫活性化に影響することが明らかとなった。

E. 結論

極めて特徴的な臨床検体を用いて、ウイルス学的、免疫学的な包括的解析を行うことによって、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することができた。

F. 健康危険情報

該当なし。

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 T18-8V 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 アクセサリー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 依存性 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という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 potently 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 potently 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, 吉川祿助, 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

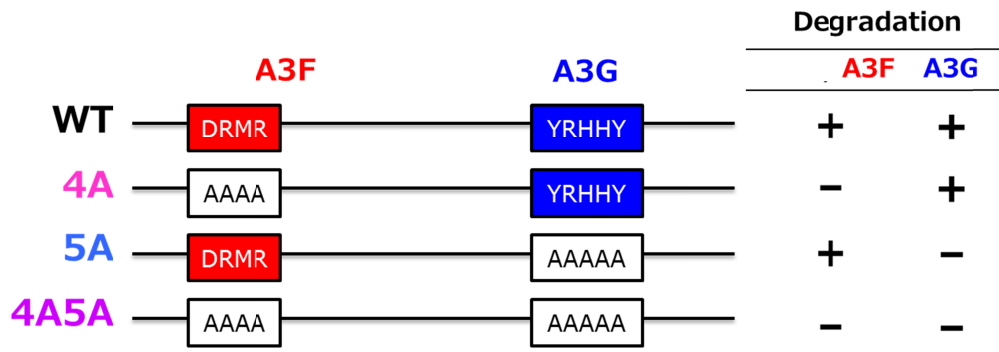


図1. 部位特異的 Vif 変異 HIV-1

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。

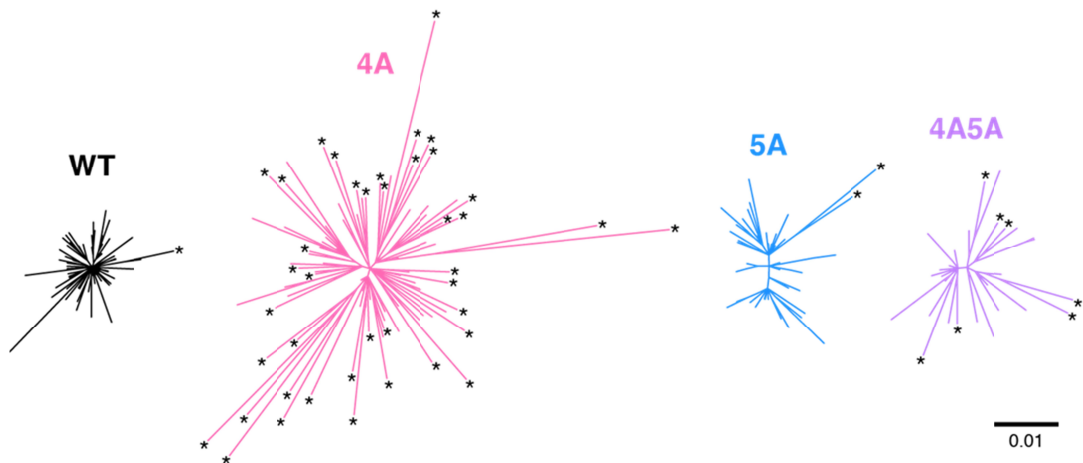


図2. ヒト化マウスで増殖するウイルス遺伝子配列の多様性比較.

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

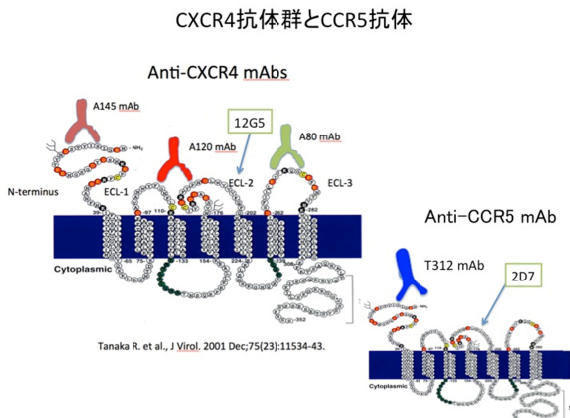
研究要旨: HIV co-receptor 修飾を介する HIV 感染制御法について詳しく検討する目的で、静止期の末梢血単核球(PBMC)に対して固相化した anti-CXCR4 および CCR5mAb によるそれぞれの受容体の架橋が、活性化 PBMC の R5 HIV-1 感染にどのような影響を与えるかを検討した。感染後、用いた CXCR4 抗体 4 種類全てと anti-CCR5 抗体の T312 は陰性コントロール抗体と比較して R5 HIV-1 の感染を顕著に抑制した。抑制のメカニズムは間接的であり、新鮮単核球からの CCR5 結合性 ケモカインの産生誘導が考えられた。以上のことから、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

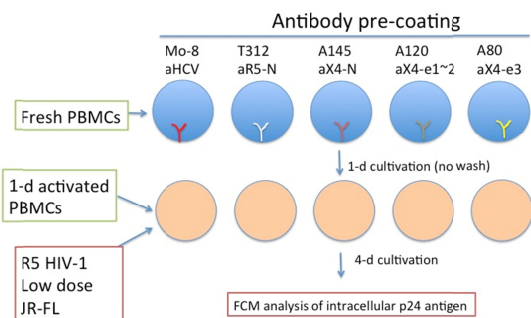
B. 研究方法

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



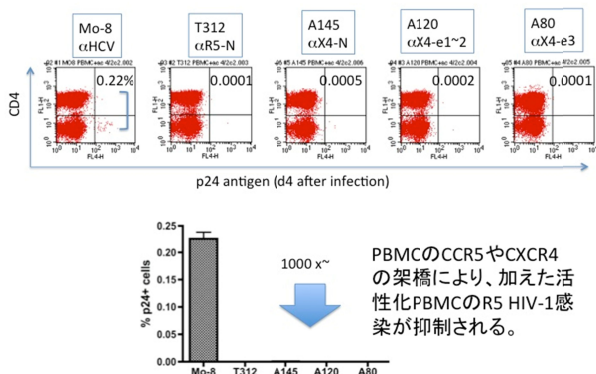
(倫理面への配慮)

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

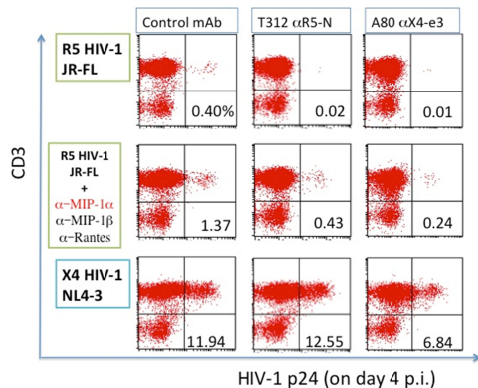
(1) 静止期の PBMC をプレートに固相化した CCR5 抗体の一種類と CXCR4 抗体 4 種類全で処理すると、陰性コントロール抗体処理と比較して、処理されたウエルに加えた活性化 PBMC における R5 HIV-1 の感染を著明に抑制した。

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 抑制に関与する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

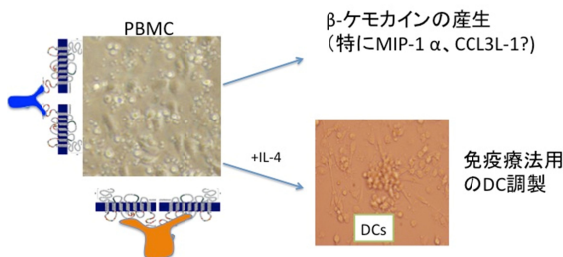
る R5 HIV-1 感染が最も強く抑制されることが明らかとなった。T312 は R5 HIV-1 感染を立体的に阻害することはなく、また A80 は anti-CXCR4 であり長期刺激培養した PBMC では HIV-1 感染を促進させることから、抑制のメカニズムは間接的であり、新鮮単核球からの CCR5 結合性ケモカインの産生誘導と考えられた。

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を単クロー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

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</u> (co-corresponding author), 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 potentially 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 TCRs can exhibit markedly different surface expression, antigen specificity and cross-reactivity.	Clin Exp Immunol	in press		2015