

研究種目：特定領域研究

研究期間：2006～2010

課題番号：18073008

研究課題名（和文）

レトロウイルス（HIV、その他）の増殖・生活環および病原性発現機構の研究

研究課題名（英文）

Study of replication, life cycle, and pathogenesis of retrovirus (HIV)

研究代表者 小柳義夫 (KOYANAGI YOSHIO)

京都大学・ウイルス研究所・教授

研究者番号：80215417

研究成果の概要（和文）：

HIV と SIV の増殖・生活環および病原性に関わる宿主因子として、テトラスパニンならびにテザリンが抑制的に働く分子機序の解明、ウイルスがどのようにそれを逃避するか、さらに、急性期における中和抗体による CD4 陽性 T 細胞を介する抗ウイルス活性、慢性期におけるウイルス特異的 CTL 抗原の広汎化などを明らかにした。これらの結果から、エイズウイルス感染の本体解明とその治療法への新たな展開を開いた。

研究成果の概要（英文）：

It has been extensively investigated on HIV and SIV replication, life cycle and pathogenesis. We show how tetraspanin and tetherin inhibit HIV infection and virus possesses accessory machinery to escapes from the inhibition. Furthermore, we show that neutralizing antibody has a role on anti-viral response of CD4+ T cells in acute phase and number of anti-viral CTL epitopes increases in chronic phase in SIV infected macaques. These data indicates the insight of HIV/SIV life cycle and pathogenesis and opens the road for its therapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成18年度	36,400,000	0	36,400,000
平成19年度	36,400,000	0	36,400,000
平成20年度	36,400,000	0	36,400,000
平成21年度	36,400,000	0	36,400,000
平成22年度	36,400,000	0	36,400,000
総計	182,000,000	0	182,000,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：HIV、動物モデル、テトラスパニン、テザリン、中和抗体、SIV、CTL

1. 研究開始当初の背景

細胞生命体のゲノム解析が終了しつつあったポストゲノム時代において、それぞれの遺伝子がコードするそれぞれの分子機能を明らかにすることが次の課題であった。そして、ウイルス、細菌、寄生虫といった感染病原体とそれに対する生体防御反応の解明に特化した本研究は、ウイルス遺伝子導入法や

解析法、ウイルス感染における細胞内分子の機能解析法、そして、これら感染病原体に対する生体防御反応過程における免疫関連分子の解析法などの研究手法、ならびに、今後の研究進展においてもきわめて重要であった。

2. 研究の目的

レトロウイルスの感染増殖の解析という

アプローチから明らかにできる細胞生命体の分子機能を解明する研究を申請する5年間において遂行すること目的とした。すなわち、その対象はエイズの原因ウイルスである human immunodeficiency virus (HIV) であり、このウイルスの増殖・生活環を制御する HIV 関連細胞性因子の作用メカニズムの解明、さらに、HIV に近縁のウイルスである simian immunodeficiency virus (SIV) をつかって感染モデル動物の解析により、宿主である多細胞生命体における相克現象、そして、その病原性発現機構の根本的理解、そして、宿主個体のこのウイルスに対する応答機序制御機構の解明をめざした。

3. 研究の方法

- (1) 目的遺伝子ならびに cDNA ライブラリを発現するレンチウイルスベクター
- (2) 細胞内 HIV 関連分子の移行過程解析のための GFP タグ付加蛋白質の共焦点顕微鏡によるトレース実験系
- (3) HIV Vpu 蛋白質と HIV 抑制因子テザリンの結合とウイルス遊離抑制実験
- (4) 分子動力学法
- (5) 細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) 誘導のためのベクターワクチンシステム
- (6) ヒトリンパ球ならびに血液幹細胞移植ヒト化マウスの開発と HIV 感染実験
- (7) SIV 感染サルモデル・解析系の確立と利用する MHC 標準化アカゲサルの構築システム
- (8) SIV 感染サルモデルにおける中和抗体移行実験と CD4 陽性 T 細胞反応の評価

4. 研究成果

HIV 増殖に関わる細胞性因子の作用機序の解明と生体における持続感染成立機序の解明のために、in vitro ならびに in vivo のモデル実験系を用い、以下の結果を得た。

- (1) HIV 補受容体である CXCR4 のゴルジ体から細胞質膜の移行は、4 回膜貫通蛋白(テトラスパニン)のひとつである CD63 により抑制されること、この活性はその分子の糖鎖修飾部位を介して CXCR4 と結合し、その作用を示すことを見出した。この結果は、細胞質膜への移行に新たな選別機序が存在することを示すものである。
- (2) CD9, CD63, CD81, CD82, CD231 などのほとんどのテトラスパニン分子は、ウイルスが遊離される際に細胞質膜からウイルスエンベロープに移行すること、そして、HIV に取り込まれたテトラスパニンは、次の細胞への融合過程を抑制することを見出した。テトラスパニンが HIV 感染を制御しうることを示した。
- (3) HIV 放出抑制蛋白質であるテザリンの機能発揮には補助因子が介在しないこと、一方、

テザリンは HIV-1 のアクセサリ蛋白質 Vpu により、その細胞表面の発現が阻止されることを明らかにした。さらに、テザリンとそれに対する Vpu の相互作用定量系を確立し、種々の変異体の結合能を検討し機能ドメインを明らかにした。相互作用に必須のドメインは、膜貫通領域 (TM) 領域内のヘリックス片側面の 3 つのアミノ酸に集積すること、一方、Vpu に耐性のサル種テザリンには同じアミノ酸が保存されているが、上流のアミノ酸の欠失のために 3 次元構造が異なることがわかった。これらの結果をもとに分子動力学計算解析を行い、予想されるテザリンの TM 領域の分子構造を明らかにした。

(4) ヒト造血幹細胞移植によるヒト化マウスを確立し、HIV-1 接種実験により、in vivo における HIV-1 のウイルス産生細胞はエフェクターメモリー T 細胞であることを見出し、さらに、APOBEC3 が HIV 複製に対して Vif 存在下でも G→A 変異導入により抑制していることを証明した。

(5) in vivo のモデル実験系として、SIV モデルを用い、抗体ならびに CD8 陽性 T 細胞のウイルス複製抑制効果について解析を進めた。感染初期における中和抗体の HIV 複製への影響を知る目的で、SIV 感染成立後 7 日目に SIV 特異的中和抗体受動免疫を行い、中和抗体接種群ではセットポイント期の血漿中ウイルス量が対照群と比較して有意に低くなることを見出した。感染急性期の中和抗体反応が、高レベルの polyfunctional CD4 陽性 T 細胞の誘導に結びつき、その結果 SIV の複製抑制にいたることを明らかにした。この結果は、感染成立後の中和抗体が機能的に細胞性免疫を誘導すること、SIV 複製抑制効果と polyfunctional CD4 陽性 T 細胞レベルとに相関を初めて示すものであり、HIV 感染初期における中和抗体誘導不全が HIV 慢性持続感染成立に寄与していることを示唆するものである。

(6) HIV の感染抑止には、ウイルス特異的な CTL の誘導が重要であり、そのためにはウイルス特異的 CD4 陽性ヘルパー T 細胞の反応が重要と考えられてきた。ところが、この特異的 CD4 陽性 T 細胞は HIV の重要な標的であるため、そのメモリーをワクチンにより誘導することは、HIV 感染標的細胞の増加によるウイルス増殖促進による悪化が考えられる。そこで、予防ワクチンによるウイルス特異的 CD4 陽性 T 細胞誘導を伴わない SIV 特異的メモリー CTL 誘導の効果を、動物モデルにて検討した。その結果、SIV 特異的 CD4 陽性 T 細胞の誘導がないように誘導した SIV 特異的メモリー CTL は、SIV 曝露後、2 次反応により SIV 複製抑制効果を発揮可能であることがわかった。すなわち、HIV 抗原によらない特異的 CD4 陽性 T 細胞誘導による HIV 特異的 CTL

の誘導は、予防エイズワクチン開発における一つの新戦略として期待されることを明らかにした。

(7) これまでに樹立した SIV 複製制御維持群 (ワクチンにより SIV 複製制御に至る MHC-I ハプロタイプ A 共有サル群) における CTL 反応を解析した。このワクチン接種サル群では、Gag206-216 および Gag241-249 エピトープ特異的 CTL が野生型 SIV 複製制御に中心的役割を担っており、上記 CTL からの逃避変異を有する変異 SIV チャレンジを制御することができない。しかし、ワクチン接種後の野生型 SIV チャレンジを制御できたサルの慢性期に変異 SIV をスーパーチャレンジしたところ感染が防御された。これらのサルではより多様な SIV 抗原を認識しうる広汎な CTL 反応が誘導され、培養細胞系で変異 SIV 複製抑制能力を有する CTL が誘導されることが判明した。この広汎化機序の解明により、広汎な CTL 誘導法の開発に結びつくことが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(1) 主な論文発表

[雑誌論文] (計 45 件)

①Sato K, Koyanagi Y, the mouse is out of the bag: insights and perspectives on HIV-1-infected humanized mouse models (review). *Exp Biol Med*, 印刷中 査読有.

②Yamamoto SP, Koyanagi Y, Suzuki Y. 9 人中 8 番目 Hwuel, a novel cellular interactor of Gag-Pol through integrase binding, negatively influences HIV-1 infectivity. *Microbes Infect* 13:339-349, 2011 査読有.

③Sato K, Misawa N, Koyanagi Y. 11 人中 11 番目 A novel animal model of Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in humanized mice *Blood* 117:5663-5673, 2011 査読有.

④Kobayashi T, Ode H, Koyanagi Y. 11 人中 11 番目 Identification of amino acids in the human tetherin transmembrane domain responsible for HIV-1 Vpu interaction and susceptibility. *J Virol* 85: 932-945, 2011 査読有.

⑤Saito A, Nomaguchi M, Matano T, Akari H 14 人中 13 番目 Improved capacity of a monkey-tropic HIV-1 derivative to replicate in cynomolgus monkeys with minimal modifications. *Microbes Infect* 13: 58-64, 2011 査読有.

⑥Sato K, Nie C, Misawa N, Tanaka Y, Ito M, Koyanagi Y. Dynamics of memory and naive CD8⁺ T lymphocytes in humanized NOD/SCID/IL-2R gamma null mice infected with

CCR5-tropic HIV-1. *Vaccine*, 28S2:B68-B74, 2010 査読有.

⑦Hoshino S, Koyanagi Y, Kano S, Itabe H, Ishizaka Y. 10 人中 7 番目 HIV-1 Vpr induces TLR4/MyD88-mediated IL-6 production and reactivates viral production from latency. *J Leukoc Biol* 87:1133-43, 2010 査読有.

⑧Sato K, Izumi T, Koyanagi Y. 9 人中 9 番目 Remarkable lethal G-to-A mutations in vif-proficient HIV-1 provirus by individual APOBEC3 proteins in humanized mice. *J Virol* 84:9546-9556, 2010 査読有.

⑨ Izumi T, Koyanagi Y, Uchiyama T, Takaori-Kondo 13 人中 11 番目 A. HIV-1 viral infectivity factor interacts with TP53 to induce G2 cell cycle arrest and positively regulate viral replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:20798-20803, 2010 査読有.

⑩Iwamoto N, Tsukamoto T, Matano T. 7 人中 7 番目 Broadening of CD8⁺ cell responses in vaccine-based simian immunodeficiency virus controllers. *AIDS* 24: 2777-2787, 2010 査読有.

⑪Inagaki N, Takeuchi H, M, Matano T. 8 人中 8 番目 A structural constraint for functional interaction between N-terminal and C-terminal domains in simian immunodeficiency virus capsid proteins. *Retrovirology* 7 : e90, 2010 査読有.

⑫ Yamamoto H, Matano T Neutralizing antibodies in SIV control: co-impact with T cells. *Vaccine* 28S :B13-B17, 2010 査読有.

⑬Naruse TK, Matano T, Kimura A 11 人中 10 番目 Diversity of MHC class I genes in Burmese-origin rhesus macaques. *Immunogenetics* 62 28S: 601-611, 2010 査読有

⑭Nie C, Sato K, Koyanagi Y. 11 人中 11 番目 Selective infection of CD4⁺ effector memory T lymphocytes leads to preferential depletion of memory T lymphocytes in R5 HIV-1-infected humanized NOD/SCID/IL-2R gamma^{null} mice. *Virology* 394:64-72, 2009 査読有.

⑮Yoshida T, Ebina H, Koyanagi Y. N-linked glycan-dependent interaction of CD63 with CXCR4 at the Golgi apparatus induces downregulation of CXCR4. *Microbiol Immunol* 53:629-635, 2009 査読有.

⑯Sato K, Yamamoto SP, Misawa N, Yoshida T, Miyazawa T, Koyanagi Y. Comparative study on the effect of human BST-2/Tetherin on HIV-1 release in cells of various species. *Retrovirology* 6: e53,

2009 査読有.

⑦Sato K, Aoki J, Koyanagi Y. 7人中7番
Modulation of human immunodeficiency
virus type 1 infectivity through
incorporation of tetraspanin proteins. *J
Virol* 82: 1021-1033, 2008 査読有.

⑧Yoshida T, Kawano Y, Koyanagi Y. 9人中
9番目 A CD63 mutant inhibits T-cell tropic
HIV-1 entry by disrupting CXCR4
trafficking to the plasma membrane.
Traffic 9: 540-558, 2008 査読有.

⑨Kitayama H, Miura Y, Ando Y, Hoshino S,
Ishizaka Y, Koyanagi Y. Human
immunodeficiency virus type 1 Vpr inhibits
axonal outgrowth through induction of
mitochondrial dysfunction. *J. Virol.* 82:
2528-2542, 2008 査読有.

⑩Takeda A., Igarashi H, Matano, T. 10
人中 10 番目 Evaluation of the
immunogenicity of replication-competent
V-knocked-out and replication-defective
F-deleted Sendai virus vector-based
vaccines in macaques. *Vaccine*
26:6839-6843, 2008 査読有.

⑪Yu S, Feng X, Shu T, Matano, T. 10人中
4 番目 Potent specific immune responses
induced by prime-boost-boost strategies
based on DNA, adenovirus, and Sendai virus
vectors expressing gag gene of Chinese
HIV-1 subtype B. *Vaccine* 26:6124-6131,
2008 査読有.

⑫Kawada M, Tsukamoto T, Matano T. 10
人中 10 番目 Gag-specific cytotoxic T
lymphocyte-based control of primary
simian immunodeficiency virus replication
in a vaccine trial. *J Virol* 82:10199-10206,
2008 査読有.

⑬ Yamamoto H, Matano T. Anti-HIV
adaptive immunity: determinants for viral
persistence. *Rev Med Virol* 18:293-303,
2008 査読有.

⑭ Takeuchi H, Matano T. Host factors
involved in resistance to retroviral
infection. *Microbiol. Immunol.* 52:318-325,
2008 査読有.

⑮Moriya C, Horiba S, Matano T. 7人中7
番目 Antigen-specific T-cell induction by
vaccination with a recombinant Sendai
virus vector even in the presence of
vector-specific neutralizing antibodies
in rhesus macaques. *Biochem Biophys Res
Commun* 371:850-854, 2008 査読有.

⑯Tsukamoto T, Dohki S, Matano, T. 10 人
中 10 番目 Determination of a major
histocompatibility complex class I
restricting simian immunodeficiency virus
Gag241-249 epitope. *AIDS* 22:993-994, 2008

査読有.

⑰Sekii S, Kawada M, Takeda A, Igarashi H,
Sata, T, Matano T. Transmission of simian
immunodeficiency virus carrying multiple
cytotoxic-T-lymphocyte escape mutations
with diminished replicative ability can
result in AIDS progression in rhesus
macaques. *J Virol* 82:5093-5098, 2008 査読
有.

⑱Moriya C, Igarashi H, Matano T. 12人中
12番目 Abrogation of AIDS vaccine-induced
cytotoxic T lymphocyte efficacy in vivo
due to a change in viral epitope flanking
sequences. *Microbes Infect*10:285-292,
2008 査読有.

⑲Yamamoto H, Kawada M, Matano T. 10人中
10番目 Vaccine-based, long-term, stable
control of simian/human immunodeficiency
virus 89.6PD replication in rhesus
macaques. *J Gen Virol* 88:652-9, 2007 査
読有.

⑳Tsukamoto T, Yuasa M, Matano T. 7人中
7番目 Induction of CD8+ cells able to
suppress CCR5-tropic simian
immunodeficiency virus SIVmac239
replication by controlled infection of
CXCR4-tropic simian-human
immunodeficiency virus in vaccinated
rhesus macaques *J Virol* 81: 11640-1164,
2007 査読有.

㉑Kawada M., Tsukamoto T, Matano T. 7人
中 7 番目 Long-term control of simian
immunodeficiency virus replication with
central memory CD4+ T-cell preservation
after non-sterile protection by a
cytotoxic T lymphocyte-based vaccine. *J
Virol* 81, 5202-5211, 2007 査読有.

㉒Yamamoto H, Kawada M, Takeda A, Igarashi
H, Matano T. Post-infection
immunodeficiency virus control by
neutralizing antibodies. *PLoS ONE* 2:
e540, 2007 査読有.

㉓Kawada M, Igarashi H, Matano T. 8人中
8 番目 Involvement of multiple
epitope-specific cytotoxic T-lymphocyte
responses in vaccine-based control of
simian immunodeficiency virus replication
in rhesus macaques. *J Virol* 80:1949-1958,
2006 査読有.

(2) 主な学会発表

[学会発表] (計 124 件)

①小柳義夫、小林朋子、大出裕高、佐藤裕徳、
HIV 増殖制御宿主因子：BST-2 の機能と構造、
第 12 回白馬シンポジウム 2010 年 6 月 14
日徳島大学附属大学病院 (徳島市)

②小柳義夫、小林朋子 HIV のアクセサ

リー蛋白質 Vpu とその阻害蛋白テザリン
第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010 年
11 月 8 日あわぎんホール (徳島市)

③ 俣野哲朗、エイズワクチン開発: HIV 感染
症克服への挑戦、第 24 回日本エイズ学会学
術集会 2010 年 11 月 26 日 グランドプリンス
ホテル高輪 (東京都)

④ Ishii H, Matano T, Alteration of CTL
dominancy post-viral exposure by
prophylactic AIDS vaccination. AIDS
Vaccine 2010, 2010 年 9 月 30 日 Omni Hotel
at CNN Center (アトランタ市)

⑤ Matano T, Vaccine-based SIV control in
a group of Burmese rhesus macaques sharing
a MHC class I haplotype. 9th International
Veterinary Immunology Symposium, 2010 年
8 月 19 日 Tower Hall Funabori (東京都)

⑥ 小柳 義夫、Investigation of HIV-1
pathogenesis in humanized mice, The 3rd
China-Japan Science Forum, 2010 年 3 月 16
日、Wuhan 会議場 (武漢市)

⑦ 小柳義夫、佐藤佳、テトラスパニンによる
レトロウイルス感染制御、第 32 回日本分子
生物学会年会、2009 年 12 月 12 日、パシフィ
コ横浜 (横浜市)

⑧ Matano T, Sendai virus. Satellite
Session: Replicating Viral Vectors for use
in AIDS Vaccines, AIDS Vaccine 2009, 2009
年 10 月 19 日 Marriott Rive Gauche
Conference Center (パリ市)

⑨ 俣野 哲朗、Impact of cytotoxic T
lymphocyte responses on HIV/SIV
replication, The 3rd China-Japan Science
Forum 2010 年 3 月 16 日 Wuhan 会議場 (武
漢市)

10. 俣野哲朗. エイズ. 第 34 回日本医学会
シンポジウム、2008 年 7 月 17 日 (東京都).

[図書] (計 2 件)

① Koyanagi Y, Tanaka Y, Ito M, Yamamoto N,
Humanized mice for human retrovirus
infection. "Humanized Mice", *Curr Top
Microbiol Immunol* 324:133-148, 2008.
Nomura, Tatsuji; Watanabe, Takeshi; Habu,
Sonoko (Eds.)

② Nagai Y, Inoue M, Iida A, Zhu Y-F,
Hasegawa M, Kato A, Matano T, Transworld
Research Network, Sendai virus
engineering: From reverse genetics to
vector development. *Virus Expression
Vectors* 390 ページ, 2007.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/Lab/saito/TOP.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小柳 義夫 (KOYANAGI YOSHIO)

京都大学・ウイルス研究所・教授

研究者番号: 80215417

(2) 研究分担者

俣野 哲朗 (MATANO TETSURO)

国立感染症研究所・エイズ研究センター・
センター長

研究者番号: 00270653

(3) 連携研究者

()

研究者番号: