

平成30年 5月29日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19119

研究課題名(和文)SIV複製制御サル群を用いたエイズウイルスLatent Reservoirの解析

研究課題名(英文)Analysis of latent reservoir in SIV controllers

研究代表者

野村 拓志(Nomura, Takushi)

熊本大学・エイズ学研究センター・特定事業研究員

研究者番号：80711001

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：SIV感染サルの凍結サンプルより各種細胞分画をSortingし、ウイルスゲノムを解析する系を樹立した。SIV感染サルの直腸、リンパ節などの組織および末梢血のCD4陽性細胞分画のプロウイルス解析の結果、ある複製制御個体では末梢血CD4陽性細胞分画でCTL逃避変異が少なかったが、直腸およびリンパ節では多くみられた。また別の個体の解析では、末梢血中のウイルスRNAと組織中のCD4陽性細胞分画のウイルスゲノム配列に差異があり、主なりザーバーとはならないものの独自の潜伏感染ウイルスを有する環境が体内に存在することが示唆された。本研究はSIV感染サルにおけるプロウイルスゲノムの体内分布の一端を解明した。

研究成果の概要(英文)：We established methodology of analysis of proviral genomes from sorted multiple cell subsets derived from Macaque tissues. By the analysis of proviral genomes in tissues in an SIV controller, number of CTL escape mutations in CD4+ cells in Lymph node cells and in Rectal tissues tended to be higher than in PBMCs. In another animal, proviral genomes in the specific tissues were distinct from viral genomes derived from plasma. These data suggest existence of independent environment of SIV latent infection in SIV infected animals. This study elucidated a part of dynamics of provirus in SIV infected rhesus macaque.

研究分野：感染病態学

キーワード：SIV Latent Reservoir CTL 逃避変異 プロウイルス 複製制御

1. 研究開始当初の背景

HIV 感染者数は今日でも増加傾向にあり、2012 年には世界でおよそ 3500 万人が HIV に感染しているとみられている。わが国では新規 HIV 感染者数は増加傾向にあり、2007 年以降は毎年 1000 人以上の新規 HIV 感染者が報告されている。抗 HIV 薬剤による治療 (ART) が行われるようになったことで、AIDS の発症の遅延と死亡率の低下が先進諸国で見られるようになったが、病態の進行を抑えるためには抗 HIV 薬を服用し続ける必要があり、各国の社会保障費用の負担となっている。ART を中断した場合は速やかな血中ウイルス量の再出現が認められ、体内にはこれの起源となる HIV の潜伏感染の場 (Latent Reservoir) が存在すると考えられる。

ヒトにおける HIV 感染症と高い近似性を示す動物モデルとして SIV 感染アカゲザルエイズモデルを用いて所属研究室では CTL 誘導型予防エイズワクチンの開発を行っている。MHC-I ハプロタイプ *90-120-1a* 共有アカゲザルは Gag 発現センダイウイルスベクターを用いた CTL 誘導型予防エイズワクチンの接種により SIVmac239 感染後の血中ウイルス量を検出限界未満に抑制する群である。これまでの研究代表者の研究では長期 SIV 複製制御群の解析の結果、慢性期の PBMC CD4 陽性 T 細胞由来プロウイルスの *gag* 塩基配列に変異の認められない群 (グループ N) と、CTL 逃避変異を含む複数の変異が選択されている群 (グループ M) が存在することを明らかとした (Nomura T., et al, PLOS Pathogens, 11:e1005247, 2015)。グループ N では、感染後 2 年にわたり CTL 応答パターンに大きな変化はなく SIV Gag/Nef 特異的 CTL 応答が優位であった。グループ M では、感染 4 か月より Gag/Nef 特異的 CTL 応答に加えて、他の抗原特異的 CTL 応答も誘導され、サブドミナントな CTL 応答が認められた。またグループ 2 ではプロウイルスゲノムに CTL 逃避変異が検出される個体数が経時的に増加しており、複製制御個体においても CTL 逃避変異の選択が緩徐ながら進行していることが示唆された。複製制御群のグループ M では *gag* と比較して *vif* および *nef* の CTL 逃避変異選択が遅く、Gag 特異的 CTL によるウイルス複製抑制圧は感染後 2 年までに低下するものの、サブドミナント CTL 応答が複製制御維持に寄与することが示唆された。グループ M と比較してグループ N がより安定した複製制御を維持していると考えられ、実際にグループ M の複数の個体において、感染後 2 年以降に CTL 逃避変異体の増殖により複製制御が破綻し、血中ウイルス量の再出現が認められた。ART 下のヒト HIV 感染者と同様に、CTL 依存的に複製制御を果たした SIV 感染アカゲザル個体内においても Latent Reservoir が存在しておりウイルス量再出現の起源となっていると考えられる。

2. 研究の目的

ART 下における Latent Reservoir の細胞分画には諸説あり長期間休止 CD4 陽性 T 細胞、腸管マクロファージ、CD4 陽性メモリー幹細胞、CD34 陽性多機能造血幹細胞などが挙げられている (Persaud D., et al, J. Clin. Invest. 105:995-1003, 2000; Smith P.D., et al, J. Leukoc. Biol. 74:642-649, 2003; Buzon M.J., et al, Nat. Med. 20:139-142, 2014; Carter C.C., et al, Nat. Med. 16:446-451, 2010)。これらのいずれかまたは複数の候補分画が実際に Latent Reservoir であるかは未確定で体内動態も確定されていない。いっぽう CTL 依存的に自己の免疫応答で以て HIV/SIV 複製の制御を達成した個体内での Latent Reservoir の詳細な解析はこれまでなされていない。研究代表者のこれまでの研究により、CTL 依存的に複製制御を果たした SIV 感染アカゲザルにおいては CTL 逃避変異体の選択が緩徐ながら進行している可能性が示唆されているが、CTL のウイルス複製制御圧をどの程度受け、その結果 CTL 逃避変異の選択がどの程度生じているのかは不明である。複製制御個体内では単位細胞あたりのプロウイルスゲノムコピー数が極めて少なく検出は容易ではない。本研究ではこれらの問題解決に向け、対象とする細胞分画を高精度で Sorting し潜伏感染プロウイルスを高感度に検出系する系の樹立を最初の目的とした。所属研究室では研究代表者の先行研究などで MHC-I ハプロタイプ *90-120-1a* の拘束する複数の SIV 特異的 CTL エピトープを同定しており (Nomura T., et al, Biophys. Res. Commun. 450:942-947, 2014) CTL 逃避変異体の検出が可能である。複製制御個体内ではチャレンジ株である SIVmac239 wild type のプロウイルスが CD4 陽性 T 細胞分画に多数存在することが示唆されているが、実際に複製制御の破綻の原因となるウイルスは CTL 逃避変異体であることから、Latent Reservoir では CTL 逃避変異体が持続して選択されていると推察している。所属研究室で開発中の CTL 誘導型予防エイズワクチンの効果をより高め、複製制御をより長く持続させるために、Latent Reservoir の基礎研究は重要である。本研究では先に樹立するプロウイルスゲノム検出系を用い、SIV 感染個体内におけるプロウイルスゲノムの動態分布を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) サル *ex vivo* サンプルからの各種細胞分画の高純度な Sorting とプロウイルスゲノム検出法の樹立

Tfh 細胞、CD4 陽性細胞、CD34 陽性多機能造血幹といった細胞分画は、特に抗レトロウイルス薬治療を行った際の HIV/SIV 感染症における Latent Reservoir の可能性が論じられている。これらの分画は CTL 依存的 SIV 複製制御アカゲザルにおける Latent Reservoir

となりうる細胞分画であるため、SIV 感染サル
の細胞を用いてこれらの細胞分画を、FACS
を用いた多重染色により識別し、さらに高純
度で Sorting する条件検討を行った。このよ
うにして得られた細胞より細胞内 DNA を抽出
し、nested PCR によりプロウイルスゲノムの
増幅および検出を行い、塩基配列の解析を試
みた。

(2)SIV 複製制御個体におけるプロウイルス ゲノムの分布動態の解析

CTL 依存的 SIV 複製制御アカゲザルは体内
の Latent Reservoir が常に低レベルの増殖
を許容しており、CTL 逃避変異の蓄積が進行
していると考えられる。プロウイルスゲノム
の高感度検出により体内での CTL 逃避変異選
択の進行が最も進んだ分画を Latent
Reservoir と評価できると考えられる。この
ため MHC-I ハプロタイプ *90-120-1a* 共有 SIV
複製制御アカゲザルの各種組織より得られ
た検体を用いて SIV プロウイルスゲノムの増
幅を行い、CTL 逃避変異体の蓄積の解析を行
った。

4. 研究成果

Latent Reservoir では大多数の SIV wild
type プロウイルスゲノムに対して、きわめて
少数の CTL 逃避変異を含むプロウイルスゲ
ノムが混在していると考えられる。CTL 依存的
SIV 複製制御アカゲザルにおけるプロウイル
ス中の微小集団の解析のため、まずウイルス
複製を制御していない SIV 感染サルの凍結サ
ンプルを用い、Tfh 細胞、CD4 陽性メモリー
幹細胞、CD34 陽性多機能造血幹細胞といった
細胞分画を、多重染色により識別し、FACS
Aria を用いて高純度で Sorting する実験系を
作製した。このようにして各種組織より得ら
れた細胞より total DNA を抽出し、微小集団
の検出・解析のために、Real time PCR 法に
よる全プロウイルスゲノム中の wild type と
CTL 逃避変異体のコピー数の測定法の確立を
目指したが奏功しなかった。このため nested
PCR 法によりウイルスゲノムを増幅し塩基配
列を解析する系を樹立した。

SIV 複製を制御しない個体の各組織の各細
胞分画より得られたプロウイルスゲノムの
塩基配列を解析したところ、やはり血漿中に
みられるウイルス RNA の配列との差異はほと
んどなく、体内の各組織には一様のウイルス
が存在していると考えられた。

一方、複製制御個体の直腸、リンパ節およ
び末梢血の CD4 陽性細胞分画のプロウイルス
解析の結果、ある個体では末梢血の CD4 陽性
細胞分画では CTL 逃避変異の蓄積が少なか
ったが、これに対し直腸およびリンパ節での
CTL 逃避変異は多くみられた。また別の個体
ではいずれの組織からも急性期にインテグ
レーションされたと思われる wild type の
プロウイルスゲノムのみが得られ、CTL 逃避変
異が選択されたプロウイルスゲノムは検出

されなかった。この個体の血中ウイルス量再
出現後の検体を解析したところ、末梢血中の
ウイルス RNA と組織中の CD4 陽性細胞分画の
ウイルスゲノム配列に差異があり、主なりザ
ーバーとはならないものの独自の潜伏感染
ウイルスを有する環境が体内に存在するこ
とが示唆された。

本研究は SIV 感染サルにおけるプロウイル
スゲノムの体内分布の一端を解明した。
Latent Reservoir 動態の詳細な解明が HIV 感
染症の制圧に必須であり本研究はその一部
を担うと考えられる。また、本研究による知
見は ART により複製制御を果たした HIV 感染
者における Latent Reservoir の解析、将来
行われるであろう治癒を目指した治療や、
CTL 誘導型予防エイズワクチンの開発への寄
与が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. *Sayuri Seki, *Takushi Nomura,
*Masako Nishizawa(以上共同筆頭著者),
Hiroyuki Yamamoto, Hiroshi Ishii,
Saori Matsuoka, Teiichiro Shiino,
Hironori Sato, Kazuta Mizuta, Hiromi
Sakawaki, Tomoyuki Miura, Taeko K.
Naruse, Akinori Kimura and Tetsuro
Matano. PLoS Pathogens, 査読有, 2017,
13:e1006638.
DOI: 10.1371/journal.ppat.1006638
2. Hiroyuki Yamamoto, Sumire Iseda, Taku
Nakane, Takushi Nomura, Naofumi
Takahashi, Sayuri Seki, Midori
Nakamura, Hiroshi Ishii and Tetsuro
Matano. Augmentation of anti-simian
immunodeficiency virus activity in
CD8+ cells by neutralizing but not
nonneutralizing antibodies in the
acute phase. AIDS, 査読有, 2016,
30:2391-2394
DOI: 10.1097/QAD.0000000000001221
3. Hiroshi Ishii, Saori Matsuoka,
Takushi Nomura, Midori Nakamura,
Teiichiro Shiino, Yuko Sato, Naoko
Iwata-Yoshikawa, Hideki Hasegawa,
Kazuta Mizuta, Hiromi Sakawaki,
Tomoyuki Miura, Yoshio Koyanagi,
Taeko K. Naruse, Akinori Kimura and
Tetsuro Matano. Association of
lymph-node antigens with lower
Gag-specific central-memory and
higher Env-specific effector-memory
CD8(+) T-cell frequencies in a macaque
AIDS model. Scientific reports, 査読
有, 2016, 6:30153.
DOI: 10.1038/srep30153
4. Sumire Iseda, Naofumi Takahashi, Hugo
Poplimont, Takushi Nomura, Sayuri

Seki, Taku Nakane, Midori Nakamura, Shoi Shi, Hiroshi Ishii, Shota Furukawa, Shigeyoshi Harada, Taeko K. Naruse, Akinori Kimura, Tetsuro Matano and Hiroyuki Yamamoto. Biphasic CD8+ T-Cell Defense in Simian Immunodeficiency Virus Control by Acute-Phase Passive Neutralizing Antibody Immunization. Journal of Virology, 査読有, 2016, 90:6276-6290. DOI: 10.1128/JVI.00557-16

5. Takushi Nomura, Hiroyuki Yamamoto, Hiroshi Ishii, Hirofumi Akari, Taeko K. Naruse, Akinori Kimura, Tetsuro Matano. Broadening of Virus-Specific CD8+ T-Cell Responses Is Indicative of Residual Viral Replication in Aviremic SIV Controllers, PLOS Pathogens, 査読有, 2015, 11:e1005247 DOI:10.1371/journal.ppat.1005247

〔学会発表〕(計 7件)

1. Takushi Nomura, Hiroshi Ishii, Sayuri Seki, Hiroyuki Yamamoto, Kazutaka Terahara, Tomoyuki Miura and Tetsuro Matano, Induction of mutant epitope-specific CD8+ T cells is an indicator of the beginning of viral control failure in SIV controllers, 35th Annual symposium on nonhuman primate models for AIDS, 2017, 8/22-25, Madison, Wisconsin
2. Takushi Nomura, Hiroshi Ishii, Sayuri Seki, Hiroyuki Yamamoto, Kazutaka Terahara, Tomoyuki Miura and Tetsuro Matano, Analysis of wild-type and mutant epitope-specific CD8+ T cell responses in SIV controllers, 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, 2017, 10/24-26, Osaka
3. 野村拓志, 石井洋, 関紗由里, 山本浩之, 寺原和孝, 三浦智行, 俣野哲朗, SIV 複製制御個体における SIV 野生型/変異型 エピトープ特異的 CTL 誘導動態の解析, 第 31 回日本エイズ学会学術集会, 2017, 11/24-26, 東京
4. Takushi Nomura, Hiroyuki Yamamoto, Kazutaka Terahara, Sayuri Seki and Tetsuro Matano, Analysis of proviral genome sequences in individual cell subsets in SIV-infected rhesus macaques, 34th Annual Symposium on Nonhuman Primate. 2016, 11/11-14, Portland, Oregon
5. Takushi Nomura, Hiroyuki Yamamoto, Kazutaka Terahara, Sayuri Seki and Tetsuro Matano, Proviral genome sequences in lymph nodes and bone marrows in SIV-infected rhesus macaques, The 64th Annual Meeting of

the Japanese Society for Virology, 2016, 10/23-25, Sapporo

6. Takushi Nomura, Hiroyuki Yamamoto, Kazutaka Terahara, Sayuri Seki and Tetsuro Matano, Analysis of proviral genome sequences in multiple cell subsets in SIV-infected rhesus macaques, 17th Kumamoto AIDS seminar, 2016, 10/31-11/2, Kumamoto
7. Takushi Nomura, Hiroyuki Yamamoto, and Tetsuro Matano, Effects of IL-7 and IL-15 administration on SIV controllers, The 63rd Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, 2015, 11/22-24, Fukuoka

〔図書〕(計 3件)

1. 野村拓志, サルエイズモデルを用いた長期ウイルス複製制御機序の解析「Analysis of mechanism of long-term viral control in SIV infected rhesus macaque AIDS model」, 日本エイズ学会誌、日本エイズ学会、第 19 巻、144-149、2017
2. 野村拓志, 俣野哲朗, エイズ研究の最前線、オベリスク、ハムリー第 22 巻第 1 号、2017
3. 野村拓志, 俣野哲朗, HIV 粘膜感染と宿主免疫、実験医学、羊土社、第 34 巻第 13 号、2162-2166、2016

〔産業財産権〕

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www0.nih.go.jp/niid/ARC/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野村 拓志 (NOMURA, Takushi)

熊本大学・エイズ学研究センター・特定事業研究員

研究者番号: 80711001

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし