

平成21年5月25日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18300142
 研究課題名（和文） 霊長類モデルによるエイズ病態形成の分子基盤に関する研究
 研究課題名（英文） Study for molecular basis of AIDS pathogenesis on non-human primate model
 研究代表者
 三浦 智行(MIURA TOMOYUKI)
 京都大学・ウイルス研究所・准教授
 研究者番号：40202337

研究成果の概要：(1)強毒/弱毒 SHIV 感染初期に見られる胸腺内の未成熟な T 細胞の分化増殖能の差異が、その後の病態進行を反映することが示唆された。(2)SHIV の病原性に影響を及ぼすウイルスゲノム上の変異がウイルス産生能と感染力の 2 つの素過程として同定された。(3)強毒/弱毒 SHIV は感染初期において全身への拡散速度と CD4+細胞傷害作用が大きく異なり、この差異が病態進行に関与する事が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2007 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2008 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
年度			
年度			
総計	15,400,000	4,620,000	20,020,000

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：感染症、ウイルス、エイズ、アカゲザル、病原性

1. 研究開始当初の背景

SIVの発見に申請者らも少なからず貢献したが、これらの発見以来、サルを用いた研究の重要性が欧米で認識され、特に米国では8つの霊長類センターの強化、サルの供給体制や施設の改修、研究費の増大、研究者の投入等によりSIVを用いた研究が盛んに行われた。SIVのサル感染実験により、nef遺伝子がエイズの病原性に重要であることや、それに基づく弱毒生ワクチンの可能性、エイズウイルス

の標的臓器は腸管であること等、エイズ研究において極めて重要な知見が明らかにされた。これらの研究では、ヒトでは不可能な経時的生検や殺処分による深部組織の詳細な解析が威力を発揮した。一方、SIVは遺伝的にHIV-1とは異なるウイルスであることから、SIVをベースにしたHIV-1遺伝子をもつSHIVの作製に我々は世界に先駆けて成功した。近年、このSHIVにおいて種々の病原性・非病原

性株が得られ、更にそれらの分子クローンウイルスが得られていることから、HIV-1遺伝子の感染個体における病原性の実験病理学的解析が可能となった。実際に、このSHIVクローンを用いることにより、HIV-1のenv遺伝子により決定されるセカンドレセプター親和性(CCR5型やCXCR4型等)と標的臓器との関連性も明らかになりつつある。国内では、SHIVのサル感染実験が可能なP3レベルのサル飼育施設を有している研究機関は極めて限られており、大学関係では当施設のみである。

2. 研究の目的

急務とされるエイズ予防・治療法開発のためには、感染個体レベルで実験的に解析できる実験動物モデルが必須である。そこで我々は、SIVmac を用いて、外皮蛋白遺伝子(env)を中心とした約半分のゲノム領域をHIV-1のものと同じく置換えた SIVmac/HIV-1 キメラウイルス(SHIV)を作製し、アカゲザルを用いたエイズの感染実験動物モデル系を開発した。これまでの研究により、感染後一ヶ月程で末梢血中のCD4陽性細胞を枯渇させ、感染サルにほとんど免疫反応を起こさせないまま半年～1年程で全身のリンパ系組織を崩壊させ、死に至らしめる急性発症株(劇症エイズモデル)や、感染初期に急性発症株と同等に増殖し、一過性に末梢血CD4陽性細胞を減少させるが、その後宿主の免疫応答によりウイルス増殖が低レベルに制御され慢性経過を辿る株(慢性感染モデル)、感染初期にわずかに増殖するのみで、CD4陽性細胞数も変化せず5年以上の経過観察でも血漿中ウイルス量が検出限界以下で全く病態進行がみられない株(長期未発症モデル)等、異なる病態を呈するSHIV株の分子クローンが得られている。本研究では、これら種々の病原性を呈するSHIV分子クローンについて、詳細に比較解析を行い、病原性発現過程において中心的

な役割を果たす未知のビルレンス因子群をウイルスゲノム上の最小限の遺伝的差違に基づく素過程として分離同定すること、そして、それらの宿主細胞および宿主免疫系との相互作用に与える影響を分子・細胞・個体の各レベルで統合的に解析することによって、病態形成分子基盤の素過程を個別に明らかにすることを目的とする。そして、感染個体レベルでの病態形成をこれら素過程の総合的結果としてSHIV分子クローンのゲノム上に再構築可能な形で理解することにより、エイズ病態形成機構の分子基盤解明と、より有効なサルエイズモデルの確立に資することを期すものである。

3. 研究の方法

感染後一ヶ月程で末梢血中のCD4陽性細胞を枯渇させ、感染サルにほとんど免疫反応を起こさせないまま半年～1年程で全身のリンパ系組織を崩壊させ、死に至らしめる急性発症型SHIV-KS661(強毒SHIV)分子クローンと、感染初期に急性発症株と同等に増殖し、一過性に末梢血CD4陽性細胞を減少させるが、その後宿主の免疫応答によりウイルス増殖が低レベルに制御され慢性経過を辿る慢性感染型SHIV-#64(弱毒SHIV)分子クローンについて遺伝子・細胞・個体の各レベルでウイルス学的、免疫学および病理学的に統合的かつ詳細に比較解析する。

4. 研究成果

(1) 強毒SHIVによる胸腺T前駆細胞増殖分化障害機構の解析: HIV感染における特徴的な病態として全身におけるCD4陽性細胞数の減少が知られているが、その原因の一つとして、胸腺機能の低下にともなうCD4陽性細胞のde novo産生の抑制が示唆されている。我々は、感染による胸腺内成熟T細胞の破壊だけでなく、未成熟なT細胞の分化増殖障害がde novo

産生の抑制に関与している可能性を考え、アカゲザルとSHIVの動物モデルを用い、強毒・弱毒ウイルス感染初期の胸腺内T前駆細胞およびその分化増殖能を比較解析した。強毒SHIV-KS661と弱毒SHIV-#64をアカゲザル6頭に経直腸感染させ、6日、13日、27日目に剖検を行い、採取した胸腺のプロウイルス量の測定およびFACS解析を行った。さらに、胸腺内T前駆細胞(CD3-CD4-CD8-)をソーティングし、デオキシグアノシン処理したマウスの胎児胸腺と共培養(FTOC)を行なうことで、分化増殖能の検討を行った。接種後4週間では、血漿中ウイルスRNA量の動態と血中CD4陽性T細胞の減少は強毒株・弱毒株感染ザルで大きな差は見られなかった。しかし、胸腺組織での感染性ウイルス量とプロウイルス量は強毒株感染ザルの方が弱毒株感染ザルより著しく高かった。また、強毒株感染ザルではCD4陽性細胞だけでなくCD4+CD8+共陽性(DP)細胞の減少が見られたが、弱毒株感染ザルでの減少は見られなかった。さらに、FTOCによる胸腺内T前駆細胞(CD3-CD4-CD8-)の分化増殖能を調べたところ、強毒株感染ザルから感染6日目以降に採取したものは、ほとんどがDP細胞に分化増殖しなかったのに対して、弱毒株感染ザルではいずれもDP細胞にまで分化増殖した。以上の結果から、強毒・弱毒SHIV感染初期において見られた胸腺内の未成熟なT細胞の分化増殖能の差が、その後の病態の進行を反映しているものと考えられた。

(2) 強毒/弱毒SHIV分子クローン間の遺伝的差の解析：強毒SHIV分子クローンと弱毒SHIV分子クローンの塩基配列を比較し、変異部位を部分的に交換した分子クローンを作製し、培養細胞レベルでの性状および感染サルでの病態やゲノム変異について比較解析を行なった。培養細胞レベルでの性状解析結果からウイルスゲノムの5'側と3'側に独立

にウイルス増殖を増強させる変異が存在することを明らかにした。弱毒・強毒クローンを5'側と3'側の約半分ずつを組み換えたウイルスをサルに接種したところ、サルによって強毒型、弱毒型あるいは中間型の病態を示すものに分かれた。感染サルの血漿中ウイルスの全ゲノム解析から、primer binding site、逆転写酵素、そしてenv-gp41領域の2カ所の塩基置換がin vivoでの病原性に重要であることが示唆された。この結果をin vitroの結果とあわせて考えると、SHIVの病原性に影響を及ぼすウイルスゲノム上の変異がウイルス産生能と感染力の2つの素過程として同定されたと考えられる。今後、それぞれの素過程が感染個体レベルでの病原性に与えるメカニズムの解明に向けて研究を進める基盤が出来た。

(3) 強毒/弱毒SHIV感染初期の全身臓器におけるウイルス動態の解析：SHIV粘膜感染初期のウイルス動態とその後の病態との関係を明らかにする為に、急性免疫不全を引き起こすSHIV強毒株及び、同じ親株由来であるが感染後3年以上エイズを発症しない弱毒株についてそれぞれ粘膜感染実験を行った。そして両株についてウイルス動態、CD4+細胞への影響を全身臓器で経時的に解析した。強毒クローン株SHIV-KS661及び、弱毒クローン株SHIV-#64をそれぞれアカゲザルに経直腸接種後、6、13、27日目に各2頭の剖検を行い、各種臓器を採取した。それらより分離したリンパ球のプロウイルスDNAを定量PCR法により定量、感染性ウイルス産生細胞をプラークアッセイにより定量した。また、リンパ球中CD4+細胞のポピュレーションの変化を解析した。両株間で血漿中ウイルスRNA量に大差は無かったが、全身臓器を解析する事によりウイルス動態の違いが示された。強毒株は接種13日後で全身臓器におけるプロウイルス

DNA量、ウイルス産生細胞数がピークであった。27日後ではプロウイルスDNA量と共にウイルス産生細胞数は著減し、CD4+細胞は全身臓器で枯渇状態だった。これに対し、弱毒株ではプロウイルスDNA量は全身臓器で27日後がピークであり、ウイルス産生細胞は13日後に腸管、腸間膜リンパ節で、27日後には胸腺でピークが見られた。また、27日後までに小腸でのみCD4+細胞の著しい減少がみられた。強毒株の経直腸感染では13日後までに全身臓器でほぼ同時多発的にウイルス増殖のピークを迎え、その後全身のCD4+細胞が枯渇した。一方、弱毒株のウイルス拡散は遅く、感染局所近傍から順にウイルス増殖のピークがあり、CD4+細胞の減少も限局的であった。よって、これら両株は感染初期において全身への拡散速度、CD4+細胞傷害作用が大きく違い、それら差異がその後の病態に深く関与する事が示唆された。

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)

[雑誌論文] (計5件)

- ① Akiyama, H. 他(Miura, T. 5名中3番目): Construction and infection of a new simian/human immunodeficiency chimeric virus (SHIV) containing the integrase gene of the human immunodeficiency virus type 1 genome and analysis of its adaptation to monkey cells. *Microbes and Infection*, 10: 531-539, 2008. 査読有
- ② Fukazawa, Y. 他(Miura, T. 14名中14番目): Small intestine CD4+ T-cells are profoundly depleted during acute infection of simian-human immunodeficiency virus regardless of its pathogenicity. *J. Virol.*, 82: 6039-6044, 2008. 査読有

- ③ Ishimatsu, M. 他(Miura, T. 6名中4番目): Construction of a novel SHIV having an HIV-1-derived protease gene and its infection to rhesus macaques: a useful tool for in vivo efficacy tests of protease inhibitors. *Microbes and Infection*, 9: 475-482, 2007. 査読有

- ④ Miyake, A. 他(Miura, T. 12名中11番目): Rapid dissemination of a pathogenic simian/human immunodeficiency virus to systemic organs and active replication in lymphoid tissues following intrarectal infection. *J. Gen. Virol.*, 87: 1311-1320, 2006. 査読有

- ⑤ Motohara, M. 他(Miura, T. 13名中13番目): Impaired T cell differentiation in the thymus at the early stages of acute pathogenic SHIV infection in contrast to less pathogenic SHIV infection. *Microbes and Infection*, 8: 1539-1549, 2006. 査読有

[学会発表] (計11件)

- ①井戸栄治、石松美沙、三浦智行、多田哲子、多田秀子、伊吹謙太郎: HIV-1由来のpol遺伝子を持つSHIV-prtiのアカゲザルin vivo継代による感染増殖能の増加、第22回日本エイズ学会学術集会、2008年11月26-28日、大阪
- ②井戸栄治、石松美沙、三浦智行、多田哲子、多田秀子、伊吹謙太郎: HIV-1の逆転写酵素とインテグラーゼ遺伝子を持つSHIV-rtiはアカゲザルに持続感染しエイズ様症状を引き起こす、第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月26-28日、岡山
- ③稲葉一寿、深澤嘉伯、堀内励生、松田健太、姫野愛、松山めぐみ、伊吹謙太郎、速水正憲、五十嵐樹彦、三浦智行: SHIV-KS661長期感染アカゲザルにおけるウイルス増殖、CD4陽性T

細胞の減少およびEnteropathyについて、第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月26-28日、岡山

④石松美沙、鈴木元、秋山尚志、三浦智行、速水正憲、井戸栄治：SIVmacにHIV-1のプロテアーゼ遺伝子を組み込んだSHIV-prの*in vivo*継代によって生じた遺伝子変異の解析、第21回日本エイズ学会学術集会、2007年11月28日-30日、広島

⑤井戸栄治、石松美沙、三浦智行：プロテアーゼ、逆転写酵素、およびインテグラーゼの各遺伝子がHIV-1由来であるSHIV-prtiのサルにおける*in vivo*継代、第21回日本エイズ学会学術集会、2007年11月28日-30日、広島

⑥ Ibuki, K., Inaba, K., Fukazawa, Y., Matsuyama, M., Hayami, M., Miura, T.：Virological and immunological analysis of systemic lymphoid tissues in SHIV-infected monkeys. 25th annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, Monterey, U.S.A., Sep. 10-13, 2007

⑦三浦智行、稲葉一寿、深澤嘉伯、松山めぐみ、伊吹謙太郎、速水正憲：一エイズの標的組織は小腸である一霊長類エイズモデルの全身深部組織解析から見えてきたこと、第143回日本獣医学会学術集会、2007年4月3日-5日、つくば

⑧井戸栄治、石松美沙、速水正憲、三浦智行：プロテアーゼ、逆転写酵素、およびインテグラーゼの各遺伝子がHIV-1由来である新規SHIVのサル感染実験、第20回日本エイズ学会学術集会、2006年11月30日-12月2日、東京

⑨松山めぐみ、堀内励生、深澤嘉伯、稲葉一寿、伊吹謙太郎、速水正憲、三浦智行：強毒SHIV感染サルの全身臓器におけるウイルス変異の解析、第54回日本ウイルス学会学術集会、

2006年11月19日-21日、名古屋

⑩ Fukazawa, Y., Miyake, A., Ibuki, K., Inaba, K., Saito, N., Motohara, M., Horiuchi, R., Himeno, A., Matsuda, K., Nakamura, M., Matsuyama, M., Hayami, M., Miura, T.：Even low pathogenic SHIV lead to decrease CD4+ T-cell of the small intestine significantly from early phase of infection. 24th annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, Oct. 4-7, 2006, Atlanta.

⑪ Miura, T.：Virological and immunopathological analysis of systemic lymphoid tissues in SHIV-infected monkeys: Importance of small intestine as target organ of AIDS. The 7th Kumamoto AIDS Seminar, Sep. 21-22, 2006, Kumamoto.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 智行(MIURA TOMOYUKI)
京都大学・ウイルス研究所・准教授
研究者番号：40202337

(2) 研究分担者

井戸 栄治(IDO EIJI) (2006年度~2007年度)
京都大学・ウイルス研究所・特別教育研究准教授
研究者番号：70183176

(3) 連携研究者

井戸 栄治(IDO EIJI) (2008年度)
京都大学・ウイルス研究所・特別教育研究准教授
研究者番号：70183176