

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590541

研究課題名(和文) 感染動物モデル実験系樹立のためのカニクイザル抗HIV因子解析

研究課題名(英文) Analysis of Restriction Factors of cynomolgus monkey in establishment of HIV-1/monkey model

研究代表者

中山 英美 (Nakayama, Emi)

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号：70324845

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：サルにおけるHIV-1の感染抵抗性因子としてTRIM5 と、TRIM5遺伝子にCypA遺伝子が挿入された変異によって生じるTRIMCypが知られている。HIV-1感染動物モデルを樹立するためには、サルTRIM5 やTRIMCypの性質を調べ、これらのタンパク質による感染抑制を回避するウイルスを作成する必要がある。カニクイザルのTRIM5遺伝子を調べたところ、TRIMCypの頻度がアカゲザルに比較して高かった。あるサル指向性HIV-1の感染実験にTRIMCyp変異を両染色体にもつ個体を用いた場合、変異を持たない個体よりも高いウイルス増殖が観察され、HIV-1感染動物モデルの樹立に一步、近づいた。

研究成果の概要(英文)：TRIM5alpha was previously identified as an intrinsic factor that restricts HIV-1 replication in rhesus monkey cells. Thereafter, TRIMCyp was discovered as a mutated allele of TRIM5 gene. We demonstrated that the frequencies of TRIMCyp in cynomolgus monkey markedly higher than that of rhesus monkey. Then, we infected monkey-tropic HIV-1 (MN4Rh-3) to TRIMCyp homozygotes or TRIM5alpha homozygotes. The viral growth was higher in TRIMCyp homozygotes than that in TRIM5alpha homozygotes. These results indicated that genotyping of TRIM5 gene is important to select monkey susceptible to monkey-tropic HIV-1 in establishment of HIV-1/monkey model system.

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：ヒト免疫不全ウイルス 感染抑制因子 動物モデル

1. 研究開始当初の背景

HIV-1(human immunodeficiency virus type 1、ヒト免疫不全ウイルス 1型)は宿主域が狭く、ヒト以外に感染する動物はチンパンジーのみであり、マウス/ラット等の小動物はもちろんのこと、実験によく用いられるアカゲザル/カニクイザルにも感染しない。モデル動物がないため、感染予防のワクチンの有効性を実験的に検定することは困難であり、前臨床試験を経ることなく大規模な臨床試験を途上で展開する倫理的にも経済的にも問題のある方法論に頼らざるを得ない実情が、ワクチン開発の大きな障害となっている。

TRIM5 α は2004年にアカゲザルで発見された抗 HIV-1 因子である。アカゲザルにおいては、TRIM5 遺伝子に多型があることが知られている。われわれは以前に、アカゲザルの TRIM5 α の PRYSRY ドメインの 339 番目のアミノ酸の TFP と Q の違いは、HIV-2 に対する感染抑制効果を変化させることを報告した。一方、新世界サル(ヨザル)で報告されたサイクロフィリン A 遺伝子の挿入(TRIMCyp 変異)が、旧世界ザル(ブタオザル、アカゲザル、カニクイザル)でも起きていることが報告された。

一方、新世界サル(ヨザル)で報告されたサイクロフィリン A 遺伝子の挿入(TRIMCyp 変異)が、旧世界ザル(ブタオザル、アカゲザル、カニクイザル)でも起きていることが報告された。

HIV-1 の代替手段としてサル感染実験に使用されているサル免疫不全ウイルス(SIV)を部分的に組み込んだキメラウイルス SHIV がサルに感染可能なことが知られている。初期の SHIV は外被膜タンパク質 Env を HIV-1 に置き換えた SHIV で、Env を標的とする抗体の誘導の評価には使用可能であるが、Gag を標的とする細胞性免疫の誘導の評価には不適であった。2006年に徳島大学の足立らが、vif といわゆる CypA 結合ループとして以前から知られているカプシドの N 末端から数えて 4 番目と 5 番目の α ヘリックス間のループ(L4/5)のみを SIV 由来にした HIV-1 でもカニクイザル細胞に感染可能であると発表した。我々はそれに加えて、カプシド 120 番目を含む 4 アミノ酸(L6/7)を SIV のものに置換する改変を行い、カニクイザル細胞でのより良い増殖能を示すサル指向性 HIV-1 の作成に成功したが、残念ながら通常の HIV-1 感染のような AIDS 症状を感染サルに再現するには至らなかった。

2. 研究の目的

ワクチン開発に必須の HIV-1 感染動物モデルを樹立するために

(1) サル TRIM5 の性質を解析する。本研究ではカニクイザルの TRIM5 遺伝子多型と、それぞれのタンパク質の抗ウイル

ス効果を解析する。

(2) TRIM5 による感染抑制を回避するウイルスを作成する。

3. 研究の方法

(1) ¹カニクイザルの遺伝子多型解析のために末梢血液からゲノム DNA を抽出し PCR にて TRIM5 遺伝子を増幅した。² TRIM5 α および TRIMCyp を発現するセンダイウイルスを構築し、抗ウイルス作用を解析した。³ 遺伝子型を一致させたカニクイザルを選び、改変 HIV-1 を感染させ、血液中のウイルス量を継続的に測定した。

(2) アミノ酸をコードするコドンの 1 位と 2 位に atgc の 4 つの塩基を混在させたプライマーを用いて PCR を行い、カプシド L4/5 にランダムな変異を導入したライブラリーを作成した。カニクイザルの TRIMCyp あるいは TRIM5 α を発現するセンダイウイルスを感染させた MT4 細胞に感染させ、耐性を持ち増殖効率の良いウイルスを分離し、選択された変異を同定した。

4 研究成果

(1) ¹ フィリピン、マレーシア、インドネシア産のカニクイザル 77 頭の TRIM5 遺伝子の解析を行ったところ、TRIMCyp の頻度は、フィリピンで 86%、マレーシアで 54%、インドネシアで 38%と地域差が見られ、ミャンマー産で約 20%、中国産では検出されないと報告されているアカゲザルと比較して、カニクイザルでは TRIMCyp 遺伝子がむしろ優勢であることがわかった。更に詳しくカニクイザル TRIM5 遺伝子を調べると、TRIMCyp 遺伝子を持たない 12 個体では PRYSRY 領域の 339 番目(アカゲザルでは Q あるいは TFP の多型が見られる場所)に多型は見られなかったが、TRIMCyp 遺伝子を持つ 64 個体では TRIMCyp の CypA 部分の配列に、66 番目のアミノ酸がアスパラギン酸(D)でかつ 143 番目がリジン(K)の DK ハプロタイプと、66 番目のアミノ酸がアスパラギン(N)でかつ 143 番目がグルタミン酸(E)の NE ハプロタイプの 2 つのハプロタイプが存在することが明らかになった。また、NE ハプロタイプの頻度はどの地域においても、TRIMCyp 遺伝子の 10%程度存在していた。

² TRIMCyp タンパク質の抗ウイルス効果を調べたところ、DK ハプロタイプの TRIMCyp はアカゲザル TRIMCyp とは異なり HIV-1 の感染を抑制し、HIV-2 および SIVmac の感染は抑制しなかった。一方で NE ハプロタイプの TRIMCyp はアカゲザル TRIMCyp と同様に、HIV-1 よりもむしろ HIV-2 の感染を強く阻害したが、SIVmac の感染は阻害しなかった。更に NE ハプロタイプに連鎖する 285 番目のアルギニンとグリシンのアミノ酸変異の抗 HIV-1 効果に対する影響を調べたところ、285 番目にアルギニンよりもグリシンを持つ TRIMCyp のほうが抗 HIV-1 効果が若干だが弱

くなった。

TRIMCyp の結合は、いわゆる CypA 結合ループ (L4/5) と考えられる。これまでに作成されたサル指向性 HIV-1 は L4/5 と L6/7 を SIVmac 由来のものに置き換えてあるが、いまだカニクイザル TRIM5 α からの逃避は完全ではない。しかし、DK および NE の両方のハプロタイプのカニクイザル TRIMCyp による抑制は完全に回避していることが明らかとなった。

3そこで、サル指向性 HIV-1(MN4Rh-3 株:徳島大学足立・野間口博士との共同研究)を TRIM5 アレルを両方の染色体上に持つ個体 (TRIM5 α -homo) 3 頭と TRIMCyp アレルを両方の染色体上に持つ個体 (TRIMCyp-homo) 6 頭に感染させ、経時的に血液中のウイルス量を測定した(京大霊長研、明里・齊藤博士との共同研究)。その結果、血中ウイルス量は TRIM5 α -homo ではピーク値が 10_コピー/mL 程度であったのに対して、TRIMCyp-homo では 10_コピー/mL と高かった。また、病原性の指標の 1 つとして測定した末梢血中の CD4 陽性 T 細胞数は、TRIMCyp-homo 個体において減少が見られ、感染成立の指標として、抗 HIV-1 抗体の誘導も強く見られた。

血中のウイルス量は、TRIMCyp-homo 個体においても、感染後 6 - 8 週で検出限界以下となったが、抗 CD8 抗体の投与により CD8 陽性 T 細胞が減少するに伴って、再び血中ウイルス量の増加が観察され、TRIMCyp-homo 個体においてサル指向性 HIV-1 は染色体ゲノムに組み込まれた状態で保持されており、CD8 細胞による免疫により感染がコントロールされていることが明らかとなった。

(2) MN4Rh-3 株のサル個体でのウイルス量のピーク値は TRIMCyp-homo であっても、一般的な SIV 感染サルには適わなかった。その原因は TRIMCyp からの回避が不完全であるというよりは、サル指向性を持たせるために導入した変異が、ウイルスの増殖効率そのものは低下させてしまった fitness-cost と考えられた。そのため、TRIMCyp あるいは TRIM5 α との相互作用に極めて重要と考えられる L4/5 にランダム変異を導入したライブラリーを作成し、TRIMCyp あるいは TRIM5 α を高発現する細胞に感染させて、耐性能を持ち増殖効率の良いウイルスの分離を試みた。独立した 2 回の実験から得られたカニクイザル TRIMCyp 耐性株に認められた変異は、H87R、A88G、P90D、P93A の組み合わせと H87R、G89E、A92T、P93T の組み合わせであった。それらの変異を導入したクローンウイルスは確かにカニクイザル TRIMCyp に対する耐性は確認できたが、ウイルスの増殖能としては、MN4Rh-3 と同程度に留まった。一方で、TRIM5 α 高発現下で増殖してきたウイルスは、V86AG116E 変異を持っていた。これらの変異を持つウイルスの TRIM5 α 耐性は、完全ではなく、センダイウイルスを用いる高発現 TRIM5 α の存在下では若

干の増殖抑制が観察されたが、TRIM5 α 非存在下での増殖は親株の HIV-1 と比較して遜色のないものを得ることが出来た。

カニクイザル TRIM5 α からの完全逃避変異を持つ HIV-1 はこれまで報告がないので、新しい変異 HIV-1 の候補として期待が持てる。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 15 件)

1 Taya K, Nakayama EE, Shioda T. Moderate restriction of macrophage-tropic human immunodeficiency virus type 1 by SAMHD1 in monocyte-derived macrophages. PLoS ONE 9:e90969, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0090969. eCollection 2014. 査読有

2 Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Doi N, Fujiwara S, Saito A, Akari H, Miyakawa K, Ryo A, Ode H, Iwatani Y, Miura T, Igarashi T, Sato H, Adachi A. Generation of rhesus macaque-tropic HIV-1 clones that are resistant to major anti-HIV-1 restriction factors. J Virol. 87: 11447-11461, 2013. DOI: 10.1128/JVI.01549-13. Epub 2013 Aug 21. 査読有

3 Kono K, Takeda E, Tsutsui H, Kuroishi A, Hulme AE, Hope TJ, Nakayama EE, Shioda T. Slower uncoating is associated with impaired replicative capability of simian-tropic HIV-1. PLoS ONE 8:e72531, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0072531. eCollection 2013. 査読有

4 Saito A, Nomaguchi M, Kono K, Iwatani Y, Yokoyama M, Yasutomi Y, Sato H, Shioda T, Sugiura W, Matano T, Adachi A, Nakayama EE, Akari H. TRIM5 genotypes in cynomolgus monkeys primarily influence inter-individual diversity in susceptibility to monkey-tropic human immunodeficiency virus type 1. J Gen Virol. 94:1318-1324, 2013. DOI: 10.1099/vir.0.050252-0. Epub 2013 Mar 13. 査読有

5 Nakayama EE, Nakajima T, Kaur G, Mimaya J, Terunuma H, Mehra N, Kimura A, Shioda T. A naturally occurring single amino acid substitution in human TRIM5 α linker region affects its anti-HIV-1 activity and susceptibility to HIV-1 infection. AIDS Res Hum Retroviruses, 29:919-924, 2013. DOI: 10.1089/AID.2012.0369. Epub 2013 Feb 26. 査読有

6 Nomaguchi M, Doi N, Fujiwara S, Saito

A, Akari H, Nakayama EE, Shioda T, Yokoyama E, Sato H, Adachi A. Systemic biological analysis of the mutations in two distinct HIV-1mt genomes occurred during replication in macaque cells. *Microbes Infect.*

15:319-328, 2013. DOI:10.1016/j.micinf.2013.01.005. Epub 2013 Feb 4. 査読有

⁷ Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Saito A, Akari H, Yasutomi Y, Matano T, Sato H, Adachi A. Gag-CA Q110D mutation elicits TRIM5-independent enhancement of HIV-1mt replication in macaque cells. *Microbes Infect.* 15:56-65, 2013. DOI: 10.1016/j.micinf.2012.10.013. Epub 2012 Nov 1. 査読有

⁸ Likanonsakul S, Rattanatham T, Feangvad S, Uttayamakul S, Prasithsirikul W, Srisopha S, Nitiyanontakij R, Tengtrakulcharoen P, Tarkowski M, Riva A, Nakayama EE, Shioda T. Polymorphisms in *Fas* gene is associated with HIV-related lipotrophy in Thai patients. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 29:142-150, 2013. DOI:10.1089/AID.2012.0114. Epub 2012 Aug 20. 査読有

⁹ Miyamoto T, Nakayama EE, Yokoyama M, Ibe S, Takehara S, Kono K, Yokomaku Y, Pizzato M, Luban J, Sugiura W, Sato H, Shioda T. The cauboxyl-terminus of human immunodeficiency virus type 2 circulating recombinant form 01_AB capsid protein affects sensitivity to human TRIM5. *PLoS ONE* 7:e47757, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0047757. Epub 2012 Oct 19. 査読有

¹⁰ Saito A, Kawamoto Y, Higashino A, Yoshida T, Ikoma T, Suzuki Y, Ami Y, Shioda T, Nakayama EE and Akari H. Allele Frequency of Antiretroviral Host Factor TRIMCyp in Wild-caught Cynomolgus Macaques (*Macaca fascicularis*). *Front Microbiol.* 3:314, 2012. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00314. eCollection 2012. 査読有

¹¹ Bozek K, Nakayama EE, Kono K, Shioda T. Electrostatic potential of human immunodeficiency virus type 2 and rhesus macaque simian immunodeficiency virus capsid proteins. *Front Microbiol.* 3:206, 2012. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00206. eCollection 2012. 査読有

¹² Nakayama EE, Shioda T. The role of human

TRIM5 in intrinsic immunity. *Front Microbiol* 3:97, 2012. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00097. eCollection 2012. 査読有

¹³ Nakayama EE, Shioda T. TRIM5 and species tropism of HIV/SIV. *Front Microbiol* 3:13, 2012. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00013. eCollection 2012. 査読有

¹⁴ Saito A, Kono K, Nomaguchi M, Yasutomi Y, Adachi A, Shioda T, Akari H, Nakayama EE. Geographic, Genetic and Functional Diversity of Antiretroviral Host Factor TRIMCyp in Cynomolgus Macaque (*Macaca fascicularis*). *J Gen Virol* 93:594-602, 2012. DOI: 10.1099/vir.0.038075-0. Epub 2011 Nov 23. 査読有

¹⁵ Miyamoto T, Yokoyama M, Kono K, Shioda T, Sato H, Nakayama EE. Single Amino Acid of Human Immunodeficiency Virus Type 2 Capsid Protein Affects Conformation of Two External Loops and Viral Sensitivity to TRIM5. *PLoS one* 6: e22779, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0022779. Epub 2011 Jul 28. 査読有

〔学会発表〕(計 12 件)

1 田谷かほる：マクロファージ指向性 HIV-1も、マクロファージおよび単球において SAMHD1 による増殖抑制を受けている。第27回日本エイズ学会学術集会・総会 2013年 11月20-22日、熊本

2 武田英里：可視化ウイルスをつかった HIV-2カプシドコアの脱核速度測定法の確立 第61回日本ウイルス学会学術集会 2013年 11月10-12日、神戸

3 Akatsuki Saito: Diversity of antiretroviral host factor TRIM5 gene in macaque monkeys. *Retroviruses* 2013, 2013年5月20日-25日、Cold Spring Harbor, NY

4 Emi E. Nakayama: Slower uncoating has a deleterious effect on replication of the simian-tropic HIV-1. *Retroviruses* 2013, 2013年5月20日-25日、Cold Spring Harbor,

NY

⁵ 中山英美: ヒト TRIM5 リンカー領域の多型の抗 HIV-1 活性に及ぼす影響. 第 26 回エイズ学会学術集会・総会. 2012 年 11 月 24-26 日、横浜.

⁶ Emi E. Nakayama: A Naturally Occurring Single Amino Acid Substitution in Human TRIM5 Linker Region Affects Its Anti-HIV-1 Activity and Susceptibility to HIV-1 Infection. *Retroviruses* 2012. May 21-26, 2012, NY(USA).

⁷ Emi E. Nakayama: Genetic Diversity of TRIM5 Gene and HIV-1 Susceptibility in *Cynomolgus* Magaque (*Macaca Fascicularis*). *Retroviruses* 2012. May 21-26, 2012, NY(USA).

⁸ 中山英美: 抗レトロウイルス療法副作用の発症に関わる宿主因子. 第 25 回エイズ学会学術集会・総会, 2011 年 11 月 30 日-12 月 2 日, 東京.

⁹ 齋藤暁: サル指向性 HIV-1 への感受性に影響を与えるマカクサル TRIM5 遺伝子の多様性. 第 25 回エイズ学会学術集会・総会, 2011 年 11 月 30 日-12 月 2 日, 東京.

¹⁰ Saito A: 第 59 回日本ウイルス学会学術集会 (International Congress of Virology), 2011 年 9 月 12 日-16 日、札幌.

¹¹ Miyamoto T: A single amino acid of human immunodeficiency virus type 2 capsid protein affects conformation of two external loops and viral sensitivity to TRIM5 . 第 59 回日本ウイルス学会学術集会 (International Congress of Virology), 2011 年 9 月 12 日-16 日、札幌.

¹² Kono K.: Simian-tropic HIV-1 NL-4/5S6/7SVifS shows slower capsid uncoating in human cells. 第 59 回日本ウイルス学会学術集会 (International Congress of Virology), 2011 年 9 月 12 日-16 日、札幌

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

中山 英美 (NAKAYAMA, E. Emi)

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号 : 70324845