

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790453

研究課題名(和文) ヒト化マウスモデルにおける HIV-1 潜伏感染形成機序に関する研究

研究課題名(英文) Study for the mechanism of HIV-1 latent infection in a humanized mouse model

研究代表者

寺原 和孝 (Terahara, Kazutaka)

国立感染症研究所・免疫部・主任研究官

研究者番号：50469954

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 0円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)の潜伏感染形成機序についてヒト化マウスモデルでの解析によりその解明を目指した。ヒト化マウスにCXCR4指向性(X4)およびCCR5指向性(R5)ウイルスをそれぞれ単独あるいは混在で接種したところ、R5ウイルスはX4ウイルスの有無に関わらず活性化メモリーCD4陽性T細胞を主たる感染標的としていた。一方、X4ウイルスは全てのCD4陽性T細胞亜集団を感染標的とするものの、R5ウイルス混在下では活性化メモリーCD4陽性T細胞に対する感染効率が低下した。本結果から、X4・R5ウイルスについて、それぞれ異なる細胞亜集団からリザーバーが構築されると考えられた。

研究成果の概要(英文)：This study was aimed at elucidating the mechanism of latent infection of HIV-1 by analyzing a humanized mouse model. Humanized mice were challenged with CXCR4-tropic (X4) and/or CCR5-tropic (R5) HIV-1. We found that R5 HIV-1 preferentially targeted to activated memory CD4+ T cells irrespective of X4 HIV-1. In contrast, although X4 HIV-1 substantially infected to activated memory CD4+ T cells, the infection efficiency in the cell population was markedly reduced in the presence of R5 HIV-1. These results suggest that the respective X4 and R5 HIV-1 reservoirs are formed from different subsets of CD4+ T cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：HIV ヒト化マウス T細胞

1. 研究開始当初の背景

ヒト免疫不全ウイルス type-1 (HIV-1) は補助受容体として CCR5 を利用する R5 ウイルスと CXCR4 を利用する X4 ウイルスに分けられる。HIV-1 感染患者において、急性感染期では R5 ウイルスが優位であるのに対し、慢性感染期を経てエイズ発症に至る際には X4 ウイルスが優位となる。In vivo における R5・X4 それぞれのウイルスの感染性・病原性の違いについては、近年、サル免疫不全ウイルス (SIV) 感染サルモデルや HIV-1 感染ヒト化マウスモデルでも示されており、R5 ウイルス感染では活性化 CCR5+CD4+メモリーT細胞が主たる標的となり、急性感染期では高レベルのウイルス複製を伴う。一方、X4 ウイルス感染ではほぼ全ての CD4+ T細胞が標的となり、急激な CD4+ T細胞の枯渇による急性エイズを呈する。しかしながら、HIV-1 潜伏感染に関しては腸管における静止期メモリーCD4+ T細胞が R5 ウイルスの主要なリザーバーであると考えられているものの、X4 ウイルスの潜伏感染形成についてはほとんど知られていない。さらに、HIV-1 感染時は R5・X4 両ウイルスが混在状態であることが十分考えられるものの、両ウイルス混在下での各ウイルスの感染動態も明らかになっていないのが現状である。

2. 研究の目的

R5・X4 両ウイルス混在による感染初期のウイルス感染動態について、ヒト化マウスモデルで明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 蛍光レポーターを有する組換え HIV-1 の調製

X4 ウイルスである HIV-1_{NL432} および R5 ウイルスである HIV-1_{NLAD8} それぞれのプロウイルスクローンに EGFP あるいは DsRed 蛍光レポーター遺伝子を組み込んだ。293T 細胞にこれら組換えプロウイルスクローンをトランスフェクションして目的のウイルスを調製した。

(2) ex vivo での HIV-1 感染

ヒト末梢血から磁気分離法により CD4 陽性 T 細胞を精製した後、spinoculation 法により HIV-1 感染を行った。

(3) ヒト化マウスの作製

生後 2 日以内の NOD/SCID/Jak3 KO マウス肝臓に、ヒト臍帯血由来造血幹細胞を移植した。移植後 8 週目以降から末梢血を 1 ヶ月毎定期的に末梢血を採取し、フローサイトメトリー解析によりヒト白血球の分化について確認した。

(4) ヒト化マウスへの HIV-1 感染

移植後 10 週目以降のヒト化マウスに対し、EGFP を組み込んだ X4 ウイルス (HIV-1_{NL-E}) あるいは DsRed を組み込んだ R5 ウイルス (HIV-1_{AD8-D}) をそれぞれ単独あるいは混在

(各ウイルスは p24 あたり 200ng) で経静脈接種した。

(5) 血中ウイルス量の解析

ヒト化マウスに HIV-1 を接種後、1 週毎に末梢血を採取し、血漿中のウイルスゲノム RNA を単離した。そして、この RNA サンプルを用い、gag、egfp、あるいは dsred 遺伝子を標的とした定量的 real-time RT-PCR 法によりウイルスのコピー数を同定した。

(6) 感染細胞の解析

HIV-1 接種ヒト化マウスの脾臓を採取し、感染細胞の性状解析をフローサイトメトリーにて行った。

本研究は国立感染症研究所の動物実験委員会ならびに医学研究倫理委員会の承認を受け、その指針に従って実験を行った。

4. 研究成果

(1) 蛍光レポーターを有する組換え HIV-1 感染細胞の同定

これまで我々のグループでは、蛍光レポーターを有する組換え HIV-1 を用いることで、フローサイトメトリーによる感染細胞の同定が簡便に行えることを示した。また、異なる蛍光レポーターの組合せによる R5・X4 ウイルスの同時感染解析系も確立された (Yamamoto et al., 2009, PLoS Pathog.)。本研究の更なる解析から、レポーターの蛍光シグナル強度とウイルス産生量が関連すること、また、ウイルス複製を指標とした感染細胞の同定においては p24 に対する細胞内染色法と比較して簡便であり、かつ、高い信頼性を示した (Terahara et al., 2012, Front. Microbiol.)。

(2) ヒト化 NOD/SCID/Jak3 KO マウスの HIV-1 感染モデルとしての評価

ヒト化マウスにおけるヒト CD4 陽性 T 細胞の分化について解析した結果、時間経過とともに活性化メモリーフェノタイプを示す亜集団の頻度が上昇することを認めた。そして、R5 ウイルスをヒト化マウスに接種してその感染動態を解析した結果、CD4 陽性 T 細胞の活性化・分化進行レベルがウイルス複製量に深く関連することが示された。つまり、HIV-1 感染モデルとしてヒト化マウスを使用する場合、CD4 陽性 T 細胞の活性化・分化進行レベルを考慮に入れる必要があると考えられた (Terahara et al., 2013, PLoS One)。また、X4 ウイルスについても同様に解析した結果、ヒト化マウスは X4 ウイルスに対しても感染性を有し、ナイーブフェノタイプを含む全ての CD4 陽性 T 細胞亜集団においてウイルス感染細胞が検出された。しかしながら、X4 ウイルスの血中ウイルス量は R5 ウイルス感染ヒト化マウスにおけるそれと比較して 10-100 倍程度低かった (投稿準備中)。

(3) R5・X4 HIV-1 同時感染ヒト化マウスにおける解析

まず、HIV-1 感染後 1 週目から 6 週目までの血中ウイルス量の経時的変動について解析した結果、R5 ウイルスは $10^4 \sim 10^7$ copies/ml の範囲で恒常的に検出されるのに対し、X4 ウイルス量は R5 ウイルス量よりも低く、しかもその検出は一過性であった。ヒト化マウスに X4 ウイルスを単独で感染させた場合には、血中ウイルス量は低量ながらも恒常的に検出されるため、R5・X4 同時感染においては X4 ウイルスの感染伝播が R5 ウイルスにより抑制を受けていることが予想された。そして、フローサイトメトリーによる細胞レベルでの解析を行ったところ、CD4 陽性 T 細胞の中で CCR5 陽性亜集団における X4 ウイルスの感染頻度が有意に低下していた。この CCR5 陽性亜集団は活性化メモリーフェノタイプを示し、他の CD4 陽性 T 細胞亜集団よりも高いウイルス複製能を示すことが知られている。本結果は、感染急性期における R5 ウイルスの優先的な感染伝播を裏付けるものと考えられた。また、R5・X4 ウイルスそれぞれの潜伏感染リザーバーは異なる CD4 陽性 T 細胞亜集団によって構築されることが予想された (投稿準備中)

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 6 件)

(1) S. Ikeno, M. Suzuki, M. Muhsen, M. Ishige, M. Kobayashi, S. Ohno, M. Takeda, T. Nakayama, Y. Morikawa, K. Terahara, S. Okada, H. Takeyama, Y. Tsunetsugu-Yokota. Sensitive detection of measles virus infection in the blood and tissues of humanized mouse by one-step quantitative RT-PCR. *Frontiers in Microbiology*. 4, 298, 2013. doi: 10.3389/fmicb.2013.00298. 査読有.

(2) K. Terahara, M. Ishige, S. Ikeno, Y. Mitsuki, S. Okada, K. Kobayashi, Y. Tsunetsugu-Yokota. Expansion of activated memory CD4⁺ T cells affects infectivity of CCR5-tropic HIV-1 in humanized NOD/SCID/JAK3^{null} mice. *PLoS ONE*. 8(1), e53495, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0053495. 査読有.

(3) Y. Mitsuki, K. Terahara, K. Shibusawa, T. Yamamoto, T. Tsuchiya, F. Mizukoshi, M. Ishige, S. Okada, K. Kobayashi, Y. Morikawa, T. Nakayama, M. Takeda, Y. Yanagi, Y. Tsunetsugu-Yokota. HIV-1 infection *ex vivo* accelerates measles virus infection by upregulating signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) in CD4⁺ T cells. *Journal of Virology*. 86, 7227-7234, 2012. doi: 10.1128/JVI.06681-11. 査読有.

(4) T. Nomura, H. Yamamoto, T. Shiino, N.

Takahashi, T. Nakane, N. Iwamoto, H. Ishii, T. Tsukamoto, M. Kawada, S. Matsuoka, A. Takeda, K. Terahara, Y. Tsunetsugu-Yokota, N. Iwata-Yoshikawa, H. Hasegawa, T. Sata, T. Naruse, A. Kimura, T. Matano. Association of major histocompatibility complex class I haplotypes with disease progression after simian immunodeficiency virus challenge in Burmese rhesus macaques. *Journal of Virology*. 86, 6481-6490, 2012. doi: 10.1128/JVI.07077-11. 査読有.

(5) Y. Tsunetsugu-Yokota, K. Terahara. (Editor Article) Receptor usage and the pathogenesis in acute and chronic virus infections. *Frontiers in Microbiology*. 3, 289, 2012. doi: 10.3389/fmicb.2012.00289. 査読有.

(6) K. Terahara, T. Yamamoto, Y. Mitsuki, K. Shibusawa, M. Ishige, F. Mizukoshi, K. Kobayashi, Y. Tsunetsugu-Yokota. Fluorescent reporter signals, EGFP and DsRed, encoded in HIV-1 facilitate the detection of productively infected cells and cell-associated viral replication levels. *Frontiers in Microbiology*. 2, 280, 2012. doi: 10.3389/fmicb.2011.00280. 査読有.

[学会発表](計 8 件)

(1) 池野翔太、鈴木基臣、寺原和孝、石毛真行、駒瀬勝啓、竹田誠、森川裕子、中川哲夫、柳雄介、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(II), 第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013年11月10-12日

(2) Y. Tsunetsugu-Yokota, M. Ishige, S. Ikeno, K. Terahara. Humanized mice as an animal model for human-tropic virus infection. *Immunological Mechanisms of Vaccination, Keystone Symposia, Ottawa, Ontario, Canada, Dec 13-18, 2012.*

(3) S. Ikeno, K. Terahara, M. Ishige, M. Suzuki, Y.-y. Mitsuki, Y. Morikawa, T. Nakayama, Y. Tsunetsugu-Yokota. Application of humanized mice for the evaluation of measles virus vector. *The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Hyogo, Japan, Sep 11-14, 2012.*

(4) 池野翔太、寺原和孝、石毛真行、鈴木基臣、光木裕也、森川裕子、中川哲夫、横田恭子：ヒト化マウスの麻疹ウイルスベクター評価系への応用、第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012年11月13-15日

(5) 鈴木基臣、モリテツシ、寺原和孝、横田（恒次）恭子、竹山春子：キャピラリープレートを用いた単一細胞解析のためのデジタルPCR法の開発とHIV研究へのアプローチ、第6回バイオ関連化学シンポジウム、札幌、2012年9月6-8日

(6) 寺原和孝：サルエイズモデルにおけるヘルパーT細胞反応の解析、第14回白馬シンポジウムin京都、京都、2012年6月7-8日

(7) 石毛真行、寺原和孝、渋谷謙太郎、光木裕也、池野翔太、小林和夫、岡田誠治、横田（恒次）恭子：R5およびX4 HIV-1同時感染ヒト化マウスモデルによる感染早期のウイルス優位性の解析、第25回日本エイズ学会学術集会、東京、2011年11月30日-12月2日

(8) 渋谷謙太郎、寺原和孝、石毛真行、光木裕也、横田（恒次）恭子：麻疹ウイルス偽型化HIV-1抑制性shRNA発現レンチウイルスベクターのヒト化マウスにおけるin vivo評価、第25回日本エイズ学会学術集会、東京、2011年11月30日-12月2日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺原 和孝 (TERAHARA KAZUTAKA)
国立感染症研究所・免疫部・主任研究官

研究者番号：50469954