

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390112

研究課題名(和文)ヒト化マウス解析法によるヒト血液病原性ウイルスの増殖と宿主応答メカニズムの解明

研究課題名(英文)Analysis of viral infection and innate immune response using humanized mice

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト化マウスモデルをつかって生体内におけるウイルス感染について以下ことがわかった。tetherinは個体へのHIV-1感染効率および増殖を抑制する分子であること、Vpuはtetherinの作用を阻害してウイルス複製を増加させること、VprがFOXP3+CD4+制御性T細胞へのHIV-1の感染をまず増強することから始まり、その後のこのウイルスの体内における複製をさらに促進するウイルス感染機序があること、HIV-1増殖過程においてCD4+T細胞に内在的に発現するAPOBEC3FとAPOBEC3Gが誘導され共に抗ウイルス活性を示すこと、APOBEC3Fはウイルス多様性・進化を促進することがわかった。

研究成果の概要(英文)：Using a human hematopoietic stem cell-transplanted humanized mouse model, we found a series of HIV-1 infection mechanisms. Vpu contributes to efficient spread of HIV-1 in vivo. Vpu concomitantly downregulates tetherin and CD4 from the surface of infected cells. Vpr induces depletion of CCR5+ FOXP3+ CD4+ regulatory T cells (Treg) for enhancing viremia of CCR5-tropic HIV-1. APOBEC3F and APOBEC3G fundamentally work as restriction factors against HIV-1 in vivo, but at the same time, that APOBEC3F are capable of promoting viral diversification and evolution in vivo.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ヒト化マウス ウイルス制御因子 HIV tetherin APOBEC3

### 1. 研究開始当初の背景

以下の知見が臨床解析より得られていた。  
(1)ヒト免疫不全ウイルス 1 型(HIV-1) は CD4+T 細胞やマクロファージ細胞に親和性(トロピズム)を有するためにウイルスは排除されずに持続感染する。

(2)ヒト白血病ウイルス I 型(HTLV-I) は母乳を介して新生児期に垂直感染し、40 年以上のちにモノクローナルな T 細胞白血病である成人 T 細胞白血病(ATL)を発症させる。  
(3)Epstein-Barr virus (EBV) は小児期には無症候感染、その後、潜伏化するが、成人初感染者の一部には慢性活動性のウイルス複製により炎症性疾患を誘導する。

これらのウイルスに対して、マウスなどの小動物は感受性がなく、感染個体における複製ならびに病原性の解析は遅れていた。ウイルス感染において自然免疫反応が宿主応答として重要な役割を担っていることは間違いないが、その反応はどのように起きているのか、ウイルス分子はどのように作動するのか、ほとんど未解明であった。

### 2. 研究の目的

(1)ヒトの造血維持環境をマウス内に再構築するヒト化マウスを使って、ヒトの致死性血液ウイルス(HIV-1, HTLV-I, EBV など)の初感染期の詳細なウイルス動態解析とそれに対する宿主応答反応の解析を行い、これらのウイルスの感染・伝播のメカニズムと免疫病原性発現のプロセスを明らかにする。特に、ウイルスはどのように標的細胞に感染し、それに対して血液・リンパ系における自然免疫応答が如何に作動し、それからどのように逃避、あるいは、それを利用して感染が成立するのかを明らかにする。感染防御反応に関わる分子とともに、逆に病原性発現に関わる細胞ならびに分子の実体を解明する。

### 3. 研究の方法

(1)ヒト化マウスの作製とヒト細胞のマーカー解析

ヒト CD34 陽性細胞を免疫不全 NOG 新生児マウスへ移植した。移植後 12 - 14 週目に採血し、flow cytometry により、ヒト CD45、CD3、CD19、CD4、CD8、CD45RA (ナイーブ)、CD45RO (メモリー)などの細胞表面マーカー分子、ウイルス抗原、アポトーシス分子の発現量を測定した。

(2)ウイルス感染実験

野生型と *vif* 欠損、*vif* 部位特異的変異、あるいは、*vpu* あるいは *vpr* 欠損 HIV-1 を腹腔接種し、感染後経時的に採血し、上記細胞表面マーカー分子に対する単クローン抗体による flow cytometry 解析をおこなった。同時に血漿 HIV-1 RNA 量(viral load, VL)を測定した。15 週目に解剖した脾臓よりウイルス DNA を、血漿 RNA をそれぞれ PCR 後、クローン化し遺伝子配列の決定を行った。EBV は Akata 株を腹腔接種し、感染後の血中ウイル

ス DNA 量を PCR 法により測定した。HTLV-I はウイルス産生細胞である MT-2 細胞を経口接種し、感染後のウイルス量を PCR 法により測定した。

(3)統計処理

2 群の比較にはウェルチの t 検定を行なった。P 値が 0.005 以下のものは統計学的に有意な差があるものとした。

(4) (倫理面への配慮)

動物実験の施行にあたり本学実験動物委員会から動物愛護上の配慮ならびに感染実験の適切な施行を行うように指導を受けた。すべての実験は本委員会より承認された。また、CD34 陽性細胞採取にあたり供血者より同意を得るとともに本学倫理委員会より承認された。組換え DNA 実験については、組換え HIV-1 と EBV の使用にあたり、大臣確認実験として承認を得た。

### 4. 研究成果

(1)生体内 HIV-1 増殖におけるウイルス蛋白質 Vpu の機能解明

HIV-1 の複製を負に制御する宿主因子として、近年 tetherin が同定された。tetherin は、自然免疫反応の中核を担うインターフェロンでその発現が誘導され、出芽したウイルス粒子を細胞表面上に繫留し、その放出・遊離を抑制する。一方、HIV-1 は、tetherin の機能を拮抗阻害するために、*vpu* というアクセサリ遺伝子を保有している。培養細胞を用いた実験から、これらの分子の相互作用についての詳細が明らかになっている。本研究では、生体内における tetherin の抗 HIV-1 作用、および、Vpu による抗 tetherin 作用の検討を行った。

ヒト化マウスに野生型 HIV-1 (AD8 株)あるいは Vpu 欠損 HIV-1 を接種したところ、Vpu 欠損 HIV-1 は野生型 HIV-1 よりも個体毎の感染成立率が明らかに低かった。また、Vpu 欠損 HIV-1 は野生型 HIV-1 に比して VL の増加率が低く、個体内、特に脾臓組織におけるウイルス増殖率が低かった。さらに Vpu を有する野生型の HIV-1 感染細胞では、tetherin と CD4 の発現が低下していた。以上の結果より、tetherin は個体への HIV-1 感染効率および増殖効率を抑制する分子であること、Vpu は tetherin の作用を阻害してウイルス複製を増加させることが明らかになった(J. Virol. 2012)。

(2)生体内 HIV-1 増殖におけるウイルス蛋白質 Vpr の機能解明

HIV-1 蛋白質である Vpr は、培養細胞実験を使った解析から細胞周期 G2 期停止活性とアポトーシス誘導活性を有することが知られていた。しかしながら、この分子の生体内での役割については未解明であった。そこで野生型ならびに *vpr* 欠損ウイルスをヒト化マウスに接種し、Vpr のウイルス複製に対する影響を解析した。感染後 1 - 3 週以内の血漿

VL ならびに CD4+各分画細胞数の変化を解析したところ、Vpr を有する野生型 HIV-1 を感染させたマウスの FOXP3+CD4+制御性 T 細胞 (Treg) は、同じマウス内の CD4+ナイーブならびにメモリー T 細胞に比して早期に死滅した。Treg 分画では感染後 1 週目には HIVp24+ならびに G2 期停止細胞が有意に多く、さらに活性型 Caspase3+細胞であることよりウイルス感染誘導性アポトーシスが生じていたことがわかった。一方、Vpr 欠損 HIV-1 ではこのような現象はまったくなかった。生体内では Treg は増殖性の高い細胞群であり、実際このヒト化マウスにおいても Ki67 高発現細胞であったことより分裂状態であること、かつ HIV-1 の補受容体である CCR5 の高発現細胞であった。このマウス内の Treg は T 細胞の活性化を抑制する機能を有することは、Treg 破壊抗体薬(リシン結合 CD25 抗体)の投与による Treg 除去によりメモリー T 細胞の活性化が誘導されることより確認され、さらに血漿 VL が 10 倍以上増加していた。これらの結果より、生体内においては Vpr が Treg への HIV-1 の感染をまず増強することから始まり、その後のこのウイルスの体内における複製をさらに促進するウイルス感染機序を見出した(PLoS Pathog. 2013)。

### (3) 生体内 HIV-1 増殖における抗ウイルス蛋白質 APOBEC3 の機能解明

培養細胞を用いた研究から、ヒトの APOBEC3 蛋白質(A3) 特に A3F と A3G は、HIV-1 粒子に取り込まれ、ウイルスゲノムに G A 変異を挿入することによってその感染を阻害することが明らかになっている。一方、HIV-1 蛋白質である Vif は、ユビキチン-プロテアソーム経路依存的に A3 を分解し、そのウイルス粒子への取り込みを阻害する。また、A3 は強力な抗 HIV-1 蛋白質として知られている一方で、A3 によって挿入される G A 変異が、ウイルスの多様化を促進する可能性も指摘されている。生体内での HIV-1 増殖過程において、(1) 内在的に発現する A3 が抗ウイルス活性を示すのか; (2) A3 による G A 変異は HIV-1 の多様化に影響を与えるのかという疑問について未解明であった。本研究では、内在性 A3 が HIV-1 感染病態に与える影響を解明することを目的として、ヒト化マウスモデルを用いた実験を行った。

CCR5 指向性 HIV-1 (NLCSFV3 株) 野生型、A3F を分解できない変異体 Vif をコードする HIV-1 4A、A3G を分解できない変異体 Vif をコードする HIV-1 5A をそれぞれヒト化マウスに接種した。血漿 VL 量を real-time RT-PCR 法で、血中 CD4+T 細胞数を flow cytometry/hematometry 法で経時的に定量した。また、感染後 6 週齢のマウスを解剖し、脾臓におけるプロウイルス DNA 配列を PCR 法で、血漿中のウイルス RNA 配列を RT-PCR/single genome sequencing 法でそれぞれ解析した。その結果、4A HIV-1 および

5A HIV-1 の増殖効率は、野生型 HIV-1 に比して有意に低く、5A HIV-1 のそれは、4A HIV-1 に比して有意に低かった。また、プロウイルス DNA 配列を解析した結果、4A HIV-1 感染マウスでは GA AA 変異が顕著に観察されたのに対し、5A HIV-1 感染マウスでは GG AG 変異が顕著に観察された。さらに、血漿中のウイルス RNA 配列は、脾臓細胞中のプロウイルス DNA に検出された変異パターンと異なっており、4A HIV-1 の多様性は、野生型 HIV-1 および 5A HIV-1 のそれに比べ、統計的に有意に高かった。さらに、CXCR4 を共受容体とするウイルスが、4A HIV-1 感染マウスに出現していた。以上の結果から、生体内 HIV-1 増殖過程において、CD4+T 細胞に内在的に発現する A3F、A3G が共に抗ウイルス活性を示すこと、A3G の抗ウイルス活性は A3F のそれよりも強力であることが示唆された。一方で、A3F 依存的 G A 変異は、ウイルスの多様化・進化を促進しうるということが強く示唆された(PLoS Pathog. 2014)。

### (4) EBV 関連血球貪食性リンパ組織球症モデル動物の確立

EBV は、ヒトに宿主を限定するガンマヘルペスウイルスである。思春期後の EBV 初感染は伝染性単核球症(IM)に特徴づけられるが、通常自然治癒する。しかしながら、まれに致死性の EBV 関連血球貪食性リンパ組織球症(EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis; EBV-HLH) が起きる。

ヒト化マウスモデルに EBV(Akata 株)を接種したところ、以下の現象が出現した。(1) 肝脾腫大; (2) CD8+T 細胞の増殖・活性化と組織への浸潤; (3) 高 IFN-ガンマ血症; (4) 正球形正色素性貧血; (5) 血小板減少症; (6) 組織球の増殖・活性化; (7) 骨髄、脾臓、肝臓における活発な血球貪食像、の 7 点に代表される EBV-HLH 患者で見られる特徴をすべてマウスで再現することができた。

### (5) 腸管を介した HTLV-I 感染実験系の確立

HTLV-I の感染は感染細胞を介してのみ可能である。従って HTLV 感染細胞がいかにしてヒトに侵入、感染を拡大するのかを解析するために、HTLV-I 発現細胞である MT-2 細胞をヒト化マウスに経口接種した。その結果、感染後 6 週目にはマウス血中に HTLV-I 陽性の細胞を PCR 法により確認した。この HTLV 陽性細胞は経過観察した 15 週目まで検出された。解剖の結果、脾臓細胞にも HTLV 陽性が確認され、血液組織に HTLV が持続感染することがわかった。その後の感染細胞クローンの動態・増殖機構を明らかにする必要があら

## 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 11 件)

Sato K, Misawa N, Fukuhara M, Iwami S, An DS, Ito M, Koyanagi Y. Vpu augments the initial burst phase of HIV-1 propagation and downregulates BST2 and CD4 in humanized mice. *J. Virol.* 86:5000-5013, 2012, 査読有 doi: 10.1128/JVI.07062-11.

Sato, K, Misawa N, Iwami S, Satou Y, Matsuoka M, Ishizaka Y, Ito M, Aihara K, An DS, Koyanagi Y. HIV-1 Vpr accelerates viral replication during acute infection by exploitation of proliferating CD4+ T cells in vivo. *PLoS Pathog.*, 9:e1003812, 2013, 査読有 doi: 10.1371/journal.ppat.1003812.

Hollenbaugh JA, Gee P, Baker J, Daly MB, Amie S, Kasai N, Kanemura Y, Ward BM, Koyanagi Y, Kim B, Host factor SAMHD1 restricts DNA viruses in non-dividing myeloid cells. *PLoS Pathog.*, 9:e1003481, 2013, 査読有 doi: 10.1371/journal.ppat.1003481.

Ebina H, Misawa N, Kanemura Y, Koyanagi Y. Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. *Sci. Rep.* 3:2510, 2013. 査読有 doi: 10.1038/srep02510.

Ogawa Y., Kawamura T., Matsuzawa T., Aoki R., Gee P., Yamashita A., Moriishi K., Yamasaki K., Koyanagi Y, Blauvelt A., Shimada S. Antimicrobial peptide LL-37 produced by HSV-2-infected keratinocytes enhances HIV infection of Langerhans cells *Cell Host Microbe* 13 77-86 2013, 査読有 doi: 10.1016/j.chom.2012.12.002.

Yoshida T, Koyanagi Y, Strebel K. Functional antagonism of rhesus macaque and chimpanzee BST-2 by HIV-1 vpu is mediated by cytoplasmic domain interactions. *J Virol.* 87:13825-13836, 2013, 査読有 doi: 10.1128/JVI.02567-13.

Fukuhara M, Iwami S, Sato K, Nishimura Y, Shimizu H, Aihara K, Koyanagi Y. Quantification of the dynamics of enterovirus 71 infection by experimental-mathematical investigation. *J. Virol.* 87:701-705, 2013, 査読有 doi: 10.1128/JVI.01453-12.

Sato K, Takeuchi SJ, Misawa N, Izumi T, Kobayashi T, Kimura Y, Iwami S, Takaori-Kondo A, Hu WS, Aihara K, Ito M, An DS, Pathak VK, Koyanagi Y. APOBEC3D and APOBEC3F potentially promote HIV-1 diversification and evolution in humanized mice. *PLoS Pathog.*, 10:e1004453, 2014, 査読有 doi: 10.1371/journal.ppat.1004453.

Ikeda H, de Boer RJ, Sato K, Morita S, Misawa N, Koyanagi Y, Aihara K, Iwami S. Improving the estimation of the death rate of infected cells from time course data

during the acute phase of virus infections: application to acute HIV-1 infection in a humanized mouse model. *Theor. Biol. Med. Model.* 11:22, 2014, 査読有 doi: 10.1186/1742-4682-11-22.

Kobayashi T, Koizumi Y, Takeuchi J, Misawa N, Kimura Y, Morita S, Aihara K, Koyanagi Y, Iwami S, Sato K. Quantification of deaminase activity-dependent and -independent restriction of HIV-1 replication mediated by APOBEC3F and APOBEC3G through experimental-mathematical investigation. *J. Virol.* 88:5881-5887, 2014, 査読有 doi: 10.1128/JVI.00062-14.

Yamada E, Yoshikawa R, Nakano Y, Misawa N, Koyanagi Y, Sato K. Impacts of humanized mouse models on the investigation of HIV-1 infection: Illuminating the roles of viral accessory proteins in vivo. *Viruses* 7, 1373-1390, 2015, 査読有 doi: 10.3390/v7031373.

〔学会発表〕(計 11 件)

Koyanagi Y. Overview of infection model of humanized mice. 1st Samsung Humanized Mice Symposium, Seoul, 2012年4月14日  
Sato K. HIV modeling in humanized mice I. 1st Samsung Humanized Mice Symposium, Seoul, 2012年4月14日

Sato K, Misawa N, Satou Y, Matsuoka M, Ito M, Koyanagi Y. Positive contribution of HIV-1 Vpu for viral propagation in vivo. Retroviruses Meeting Cold Spring Harbor, poster, New York, USA, 2012年5月24日

Sato K, Shibata J, Izumi T, Misawa N, Kobayashi T, Kimura Y, Ito M, Pathak KV, Koyanagi Y. Differential Impact of HIV-1 G-to-A Hypermutation Induced by APOBEC3G and APOBEC3F in vivo. 38th Retroviruses Meeting Cold Spring Harbor New York, USA. 2013年5月21日

Koyanagi Y. Intrinsic cellular defenses against retroviruses and DNA viruses. The 12th Awaji International Forum on Infection and Immunity (AIFII 12), 2013年9月12日 Awaji, Japan

Koyanagi Y. Strategy of disrupting latent form of HIV-1 proviral DNA, 14th Kumamoto AIDS Seminar 熊本 Kumamoto JapaN, 2013年10月28日

Koyanagi Y, Misawa N, Sato K, Ebina H HIV strategy for acceleration of viral replication in vivo and eradication approach of HIV proviral DNA, Japan-Russia International Workshop, 2013年10月30日 Kyoto, Japan

Sato K, Shibata J, Izumi T, Misawa N, Kobayashi T, Kimura Y, Ito M, Pathak VK,

Koyanagi Y. APOBEC3F potently promotes HIV-1 diversification and evolution in humanized mouse model. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Retroviruses, New York, USA, 19-24 May, 2014.

Koyanagi Y., Misawa N, Sato K, Ebina H, HIV strategy for acceleration of viral replication in vivo and eradication approach of HIV proviral DNA 9th International Symposium of the Institute Network, Osaka, 18-19 June, 2014

佐藤佳, 竹内(柴田)潤子, 小林朋子, 吉川禄助, 山田英里, 中野雄介, 任鳳蓉, 田中博, 小柳義夫 レンチウイルスと宿主の進化的軍拡競争の分子メカニズム, 日本進化学会第16回大会, 高槻, 2014年8月22日

Koyanagi Y., Sato K. Conflicts and benefits between primate lentiviruses and host restriction factors, 15th Kumamoto AIDS Seminar (invited), Kumamoto, Japan, 1-3 October, 2014

佐藤佳, 竹内(柴田)潤子, 小林朋子, 三沢尚子, 山田英里, 中野雄介, 吉川禄助, 小柳義夫. ヒト化マウスモデルを用いたエイズウイルス適応進化メカニズムの解明, 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜. 2014年11月10日

〔図書〕(計 1 件)

Koyanagi Y., Selective infection of CD4+ memory T cells in “Humanized mice for HIV research”. Poluektova L, Garcia-Martinez V, Koyanagi Y., Manz M, Tager A, ed. Springer, 2014, 255-264.

〔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：  
出願年月日：  
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/Koya>

[nagiHP/](#)

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 なし

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 なし

( )

研究者番号：