

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670218

研究課題名(和文)再生医療技術を利用した新規HIV-1感染サルモデルの作成

研究課題名(英文) Trial of generating HIV-1-susceptible rhesus monkeys by using technologies in reproductive medicine

研究代表者

塩田 達雄 (Shioda, Tatsuo)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：00187329

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：最近進展の著しい再生医療技術を用いてHIV感染症根治のための基盤技術の開発を最終目標として、現在エイズのサルモデルとして頻用されるもののiPS細胞樹立についてはごく少数の報告しかないアカゲザルのiPS細胞樹立を試みた。その結果、ヒトの場合と比べてより厳密な条件が必要となるものの、アカゲザル末梢血からiPS細胞を樹立できること、造血幹細胞や骨髄球系細胞の表現形を持つ細胞を試験管内で誘導できることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Currently it is impossible to eradicate HIV from infected individuals since HIV persists in resting memory T cells that have long half-life. Therefore, it is necessary to work out a totally novel strategy to eradicate HIV from infected individuals. To apply iPS cell technologies to HIV eradication strategies, we established iPS cells from peripheral blood mononuclear cells of rhesus monkeys. Human Oct3/4, Sox2, Klf4, and c-Myc genes worked in rhesus monkey cells for reprogramming, although more stringent condition was required to establish rhesus monkey iPS cells. We were able to induce CD34+ hematopoietic stem cells and macrophage-like cells from the rhesus monkey iPS cells. We are now planning autologous transplantation of iPS cells with a marker into rhesus monkeys.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HIV感染症 iPS細胞 再生医療 アカゲザル

1. 研究開始当初の背景

1990年代後半に開始された多剤併用療法により感染者の血中 HIV 量は検出限界以下にまで減少させることができ、感染者の予後は著しく改善され、エイズは「死の病」ではなくなった。全世界の HIV 感染者数は 3400 万人超と依然として膨大だが、アジア・アフリカ諸国においても抗 HIV 薬による治療が急速に進展し、全世界では年間死亡者数や新規感染者は着実に減ってきている。それでも、現時点においては、血中の HIV を検出限界以下まで減少させ続けても、感染者の体内から HIV を完全に排除することは不可能である。休止期にある CD4 陽性 T リンパ球やその他の寿命の長い細胞の中で HIV が潜伏し続けることが、HIV 感染症の根治を不可能にしている。しかし、2009 年に、慢性骨髄性白血病の化学療法に引き続き、HIV のレセプターである CCR5 の両側の遺伝子に 32 塩基の欠失変異があるために HIV が感染できない幹細胞を移植された感染者から HIV が検出されなくなったとの報告がなされ、HIV 感染症の「根治」の可能性が議論されるようになった。

2. 研究の目的

本研究では、iPS 細胞に代表される最近進展の著しい再生医療技術を用いて HIV 感染症根治のための基盤技術の開発を最終目標とする。すなわち HIV 感染者から樹立した iPS 細胞の CCR5 をノックアウトあるいはノックダウンし、CD4+T 細胞（あるいはもう少し前の分化段階で）まで分化誘導を行い、その HIV 感染者に移植する。そして、最終目標としては、HIV-1 感染者に十分量の HIV-1 耐性 CD4 陽性細胞を移植し免疫系の再構築を計ることを目指す。

しかし、心筋や網膜の再生医療と比べて、多様な外来抗原に対応する複雑な免疫系の再生医療は多くの困難が予想される。また、HIV が感染して破壊する CD4 陽性 T 細胞の iPS 細胞からの試験管内での分化は未だ報告がない。そこで、ヒトに応用する前に、サルを用いて単クローンの CD4 陽性 T 細胞の移植を可能にすることを最初の目標とする。サルを使うことの利点は、試験管内では CD4 陽性 T 細胞にまで分化誘導が出来なくても、未分化の細胞をサル個体内の環境を利用して分化誘導させ、さらにその後の T 細胞としての学習を促す可能性を試すことができる点にある。

3. 研究の方法

iPS 細胞誘導因子である Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc のいわゆる山中 4 因子を発現するセンダイウイルスを用いてアカゲザルの iPS 細胞樹立を試みた。山中 4 因子導入後に添加するサイトカインの種類や Rock inhibitor の有無等、種々の条件を振って iPS 細胞樹立のための条件の最適化を試みた。樹立したアカゲザル iPS 細胞の未分化能は、未分化マーカー

SSEA-4 や TRA-1-60 の発現やアルカリホスファターゼ染色により確認した。使用したセンダイウイルスベクターの除去を確認した後、血管内皮増殖因子、幹細胞因子および Flt-3 リガンドを用いて CD34 陽性細胞への分化誘導を行い、フローサイトメーターで表面マーカーの確認を行った。

4. 研究成果

アカゲザル末梢血の T 細胞よりヒト iPS 細胞誘導因子を用いて、ヒトの T 細胞の場合よりも厳密な条件が必要とされるものの iPS 細胞を樹立することが出来た。また、樹立した iPS 細胞より CD34 陽性細胞を分化誘導出来ること（図 1）と、その CD34 陽性細胞よりマクロファージ様細胞を分化誘導できること（図 2）が明らかとなった。

図 1: アカゲザル T 細胞由来の iPS 細胞からの CD34 陽性細胞の誘導（図上部の四角内）

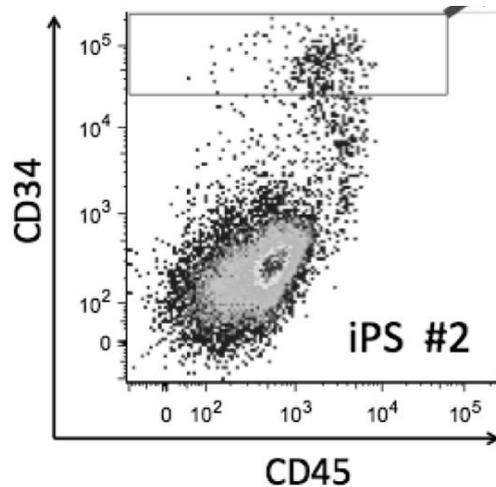
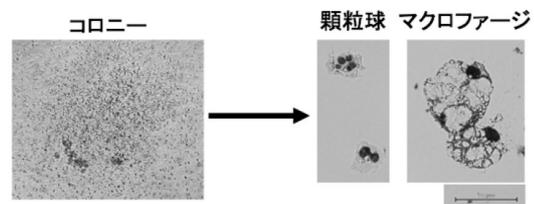


図 2: 図 1 の CD34 陽性細胞からの顆粒球、マクロファージの誘導



アカゲザル T 細胞からの iPS 細胞樹立は当初、ヒト T 細胞からの樹立よりも困難であったが、種々の条件を振って iPS 細胞樹立のための条件の最適化に成功した。iPS 細胞由来のマクロファージ様細胞が HIV 感染の標的となり得るか否かを、HIV に近縁なサル免疫不全ウイルスを感染させて検討する予定である。また、iPS 細胞由来の CD34 陽性細胞から試験管で T 細胞への分化を試みるとともに、

遺伝子導入によって標識した iPS 細胞由来細胞を免疫寛容状態である胎仔ザルに同種移植し、iPS 細胞由来細胞がアカゲザル個体において定着しうるか否かを検討する予定である。

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)すべて査読有り

1) Likanonsakul S, Suntisuklappon B, Nitiyanontakij R, Prasithsirikul W, Nakayama EE, Shioda T, Sangsajja C. A Single-Nucleotide Polymorphism in ABCC4 Is Associated with Tenofovir-Related Beta2-Microglobulinuria in Thai Patients with HIV-1 Infection.

PLoS One. 2016.11:e0147724.
doi:10.1371/journal.pone.0147724.

2) Sultana T, Nakayama EE, Tobita S, Yokoyama M, Seki Y, Saito A, Nomaguchi M, Adachi A, Akari H, Sato H, Shioda T. Novel mutant human immunodeficiency virus type 1 strains with high degree of resistance to cynomolgus macaque TRIMCyp generated by random mutagenesis.

J Gen Virol. 2016.97:963-76.
doi: 10.1099/jgv.0.000408.

3) Nakayama EE, Shioda T. Impact of TRIM5 in vivo. AIDS. 2015.29:1733-43.
doi: 10.1097/QAD.0000000000000812.

4) Sakuragi S, Shioda T, Sakuragi J. Properties of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase recombination upon infection.

J Gen Virol. 2015.96:3382-8.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26282329>

5) Uttayamakul S, Oudot-Mellakh T, Nakayama EE, Tengtrakulcharoen P, Guernon J, Delfraissy JF, Khusmith S, Sangsajja C, Likanonsakul S, Theodorou I, Shioda T. Genome-Wide Association Study of HIV-Related Lipodystrophy in Thai Patients: Association of a DLGAP1 Polymorphism with Fat Loss.

AIDS Res Hum Retroviruses. 2015.31:792-6.
doi: 10.1089/AID.2014.0266.

6) Takeda E, Kono K, Hulme AE, Hope TJ, Nakayama EE, Shioda T. Fluorescent image analysis of HIV-1 and HIV-2 uncoating kinetics in the presence of old world monkey TRIM5 PLoSOne.2015.10:e0121199.
doi: 10.1371/journal.pone.0121199.

7) Hayasaka H, Kobayashi D, Yoshimura H, Nakayama EE, Shioda T, Miyasaka M. The HIV-1 Gp120/CXCR4 axis promotes CCR7 ligand-dependent CD4 T cell migration: CCR7 homo- and CCR7/CXCR4 hetero-oligomer formation as a possible mechanism for up-regulation of functional CCR7.

PLoS One. 2015.10:e0117454.
doi: 10.1371/journal.pone.0117454

8) Nomaguchi M, Nakayama EE, Yokoyama M, Doi N, Igarashi T, Shioda T, Sato H, Adachi A. Distinct combinations of amino acid substitutions in N-terminal domain of Gag-capsid afford HIV-1 resistance to rhesus TRIM5. Microbes Infect. 2014.16:936-44.

doi: 10.1016/j.micinf.2014.08.017.

9) Taya K, Nakayama EE, Shioda T. Moderate restriction of macrophage-tropic human immunodeficiency virus type 1 by SAMHD1 in monocyte-derived macrophages.

PLoS One. 2014.9:e90969.

doi: 10.1371/journal.pone.0090969.

10) 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. 2013.8:e72531.

doi: 10.1371/journal.pone.0072531.

11) 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. 2013.87:11447-61.

doi: 10.1128/JVI.01549-13.

[学会発表](計 18 件)

1) Sultana T, Nakayama EE, Tobita S, Yokoyama M, Seki Y, Saito A, Nomaguchi M, Adachi A, Akari H, Sato H, Shioda T. Novel mutant human immunodeficiency virus type 1 strains with high degree of resistance to cynomolgus macaque TRIMCyp generated by random mutagenesis. The annual Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections 2016 年 2 月 22 日-25 日、ボストン(米国)

2) 中山英美, Sirirat Likanonsakul, Bussakorn Suntisuklappon, Ravee

Nitiyanontakij, Pimrapat
Tengtrakulcharoen, Wisit Prasithsirikul,
Chariya Sangsajja, 塩田達雄。テノフォ
ビア服用による尿中ベータグロブリンの高
値は ABC4 遺伝子の一塩基多型と相関する、
第 29 回日本エイズ学会学術集会・総会 2015
年 11 月 30 日-12 月 1 日。東京ドームホテル
(東京・文京区)

3) 櫻木小百合、武田英里、塩田達雄、櫻木
淳一。HIV-1 Gag p1 ペプチドのウイルス生活
環における機能的解析。第 29 回日本エイズ
学会学術集会・総会、2015 年 11 月 30 日-12
月 1 日、東京ドームホテル(東京・文京区)

4) Sultana Tahmina, Emi E. Nakayama,
Satoshi Tobita, Akatsuki Saito, Masako
Nomaguchi, Akio Adachi, Hirohumi Akari,
Tatsuo Shioda. Novel mutant HIV-1 strains
with high degree of resistance to
cynomolgus macaque TRIMCyp generated by
random mutagenesis.
第 63 回日本ウイルス学会学術集会、2015 年
11 月 22 日-24 日、福岡国際会議場(福岡・
博多)

5) Tatsuo Shioda. Host Factors in the
Pathogenesis of HIV Infection. 17th
International Conference on Emerging
Infectious Diseases (EID) AIDS Panel
Meeting、2015 年 1 月 28 日、Taipei(台湾)

6) Tahmina Sultana, 中山英美, 飛田哲志, 齊
藤暁, 明里宏文, 塩田達雄。Novel mutant
HIV-1 strains with high degree of
resistance to cynomolgus macaque TRIMCyp
generated by random mutagenesis. 第 28 回
日本エイズ学会学術集会・総会 2014 年 12 月
3-5 日。大阪国際会議場(大阪・大阪)

7) 櫻木小百合, 塩田達雄, 櫻木淳一: HIV パッ
ケージングシグナル内最重要領域 SL1 の機
能的構造に関する多角的解析。第 28 回日本
エイズ学会学術集会・総会 2014 年 12 月 3
日-5 日 大阪国際会議場(大阪・大阪)

8) 中山英美, Uttayamakul Sumonmal,
Tiphaine Oudot-Mellakh, Pimrapat
Tengtrakulcharoen, Julien Guernon,
Jean-Francois Delfraissy, Srisin
Khusmith, Chariya Sangsajja, Sirirat
Likanonsakul, Ioannis Theodorou, 塩田達
雄: Genome-wide association study of
HIV-related lipotrophy in Thai patients:
Association of a DLGAP1 polymorphism with
fat loss. 第 28 回日本エイズ学会学術集
会・総会 2014 年 12 月 3 日-5 日大阪国際
会議場(大阪・大阪)

9) 武田英里, 河野健, Amy E. Hulme, Thomas J.

Hope, 中山英美, 塩田達雄: TRIM5 α 存在下にお
ける HIV-1 および HIV-2 のカプシドコアの脱
殻第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会
2014 年 12 月 3 日-5 日大阪国際会議場(大阪・
大阪)

10) 田谷かほる, 武田英里, 中山英美, 塩田達
雄, 明里宏文, 金子新. 再生医療技術のエイ
ズ研究応用のためのアカゲザル iPS 細胞樹
立と CD34 陽性細胞への分化. 第 28 回日本
エイズ学会学術集会・総会 2014 年 12 月 3 日
-5 日 大阪国際会議場(大阪・大阪)

11) 櫻木淳一, 櫻木小百合, 塩田達雄: HIV-1
パッケージングシグナル内最重要領域 SL1
の機能的構造に関する多角的解析. 第 62 回
日本ウイルス学会学術集会 2014 年 11 月 10
日-12 日, パシフィコ横浜(神奈川・横浜)

12) 武田英里, 河野健, Amy E. Hulme, Thomas
J. Hope, 中山英美, 塩田達雄: TRIM5 によ
る HIV-1 および HIV-2 のカプシドコア
の脱殻促進: 可視化ウイルスによる解析. 第
62 回日本ウイルス学会学術集会 2014 年 11
月 10 日-12 日, パシフィコ横浜(神奈川・横
浜)

13) Tatsuo Shioda: Host factors in the
pathogenesis of HIV infection.
International Congress on Medical
Virology 2014 2014 年 11 月 5 日-7 日
Bangkok (Thailand)

14) Nakayama EE., Tobita, S., Sultana, T.,
Saito A., Akari H., and Shioda T. Novel
mutant HIV-1 strains with high degree of
resistance to cynomolgus macaque TRIMCyp
generated by random mutagenesis.
Retroviruses 2014, 2014 年 5 月 19 日-24
日, Cold Spring Harbor(アメリカ)

15) 田谷かほる、中山英美、塩田達雄: 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
市民会館(熊本・熊本)

16) 武田英里、河野健、Hulme Amy E.、Hope
Thomas J.、中山英美、塩田達雄: 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、神戸国
際会議場(兵庫・神戸)

17) Akatsuki Saito, Emi E. Nakayama, Tatsuo
Shioda, Tomoyuki Yoshida, Atsunori
Higashio, Saori Suzuki, Yoshi Kawaoka,
Hirofumi Akari. Diversity of

antiretroviral host factor TRIM5 gene in macaque monkeys. Retroviruses 2013, 2013年5月20日-25日、Cold Spring Harbor(アメリカ)

18)Ken Kono, Eri Takeda, Hiromi Tsutui, Ayumu Kuroishi, Amy E. Hulme, Thomas J. Hope, Emi E. Nakayama, Tatsuo Shioda. 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(アメリカ)

〔その他〕

ホームページ

http://www.biken.osaka-u.ac.jp/act/act_shioda.php

6. 研究組織

(1)研究代表者

塩田 達雄 (SHIODA Tatsuo)
大阪大学・微生物病研究所・教授
研究者番号： 00187329

(2)研究分担者

明里 宏文 (AKARI Hirofumi)
京都大学・霊長類研究所・教授
研究者番号： 20294671