

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293104

研究課題名(和文) HIV-1個体内複製と病原性に関する基礎研究：アクセサリ-蛋白質の機能解析

研究課題名(英文) Basic study on HIV-1 replication and pathogenicity in host individuals:
functional analysis of accessory proteins

研究代表者

足立 昭夫 (ADACHI, Akio)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・特命教授

研究者番号：90127043

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：HIV-1の個体内複製機構や病原性発現機構を解明するにはアカゲザル感染実験系を確立することが極めて重要であり、研究代表者らは、アカゲザル個体内で充分良く増殖し持続感染から発症に至る能力を備えたCCR5細胞指向性/アカゲザル指向性HIV-1(HIV-1rmt)の構築に取組んだ。その結果、アカゲザル細胞においてベストの増殖性を示す既存のCXCR4細胞指向性HIV-1rmtと同等以上の複製能を持つ複数のCCR5細胞指向性HIV-1rmtの構築に成功し、アクセサリ-蛋白質の個体内機能を解析するためのアカゲザル個体感染実験へと進展させることができた。

研究成果の概要(英文)：It is critically important to establish the rhesus/viral infection system to elucidate HIV-1 replication and pathogenicity in host individuals. We have made every effort to generate CCR5- and rhesus macaque-tropic HIV-1 (HIV-1rmt) clones that grow enough to cause persistent infection and finally induce AIDS. We have successfully obtained molecular HIV-1rmt clones that grow equally or better in rhesus cells relative to the best-growing CXCR4-tropic HIV-1rmt previously described. We thus have advanced to the rhesus-infection experiments to functionally analyze HIV-1 accessory proteins.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ウイルス HIV-1 HIV-1rmt アクセサリ-蛋白質 アカゲザル

1. 研究開始当初の背景

HIV-1 の感染者数は、世界で 3-4 千万人のほり、本邦でもその数は増加傾向にある。抗エイズ薬の開発や多剤併用療法の確立によりエイズ患者の予後は劇的に改善されたが、薬剤耐性 HIV-1 の出現・伝播が新たな問題となっている。さらに、近年の HIV-1 ワクチン臨床試験の断念は、HIV-1 感染霊長類モデルの必要性和 HIV-1 の病原性発現機構の理解に基づく新しい抗エイズ戦略の重要性を改めて示した (Nature 453:439, 2008 等)。HIV-1 は宿主域が狭く実験用霊長類に感染しないため、サル細胞・個体で効率良く増殖し病原性を示す HIV-1 の構築は、基礎および臨床研究の進展に大きく貢献する。研究代表者らは、サル細胞での増殖に必要な最小領域の SIVmac239 由来配列を持つ HIV-1mt クローン NL-DT5R を構築したが、SIVmac239 に比較すると、サル細胞およびサル個体内での増殖効率が劣り、個体でのウイルス増殖は一過性で病原性を示さなかった (Proc.Natl.Acad.Sci.USA.103:16959,2006; J.Virol.81:11549,2007)。米国の研究グループが同時期に構築した HIV-1mt も同様の結果であった (Science 314:95,2006; Proc.Natl.Acad.Sci.USA.106:4425,2009; J.Virol.85:3767,2011)。これらの研究から、SIVmac239 および HIV-1mt のサル PBMC におけるウイルス増殖効率とサル個体急性感染時のウイルス産生量とは非常に良く相関することも明らかとなった。したがって、ウイルスが病原性を持つためには、SIVmac239 のように急性感染時に個体内で効率良く増殖しウイルスの多様性を増大させ、個体の防御機構を一定程度回避し、一過性でない慢性のウイルス持続感染に移行する必要があることが強く示唆された。これらを踏まえ、研究代表者らはウイルスの細胞馴化による改変と配列・構造情報に基づくウイルスゲノムの遺伝子工学的改変とを適宜組み合わせ、NL-DT5R の改良を目指す実験を精力的かつ持続的に行った (Rev.Med.Virol.18:261,2008; Retrovirology 6:70,2009; Microbes Infect.13:58,2011; Microbes Infect.15:319,2013; Microbes Infect 15:319,2013)。その結果、僅かな変異導入の積み重ねによって、サル PBMC やサル個体で比較的効率良く増殖するウイルス (MN4Rh-3) を作製することができたが、これでもなおサル個体でのエイズ発症に繋がる持続感染化には至らなかった (J.Gen.Virol.94:1318,2013)。しかし、研究代表者らは、この MN4Rh-3 から HIV-1 の宿主域 (種特異性) を規定する既知の全てのサル抗ウイルス因子 (TRIMCyp/TRIM5 蛋白質、APOBEC3 蛋白質群及び Tetherin) に抵抗性を示しアカゲザル PBMC で SIVmac239 と同様に効率良く増殖する HIV-1mt クローン MN4/LSDQgtu の構築に成功した (J.Virol.87:11447,2013)。MN4Rh-3 を用いたサル感染実験の結果との比較から、MN4/LSDQgtu はアカゲザル感染個体における

ピーク時に SIVmac239 なみのウイルスロード (107 RNA copies/mL in plasma) が見込まれる。したがって、少なくともウイルス感染初期については MN4/LSDQgtu・アカゲザルのモデルによる実験的解析が可能である。

研究代表者らが初めて構築した SHIV (SIVmac をベースに env 遺伝子を中心とするウイルスゲノムの 3' 領域が HIV-1 である組換えウイルス) (J.Virol.65:3514,1991) が端緒となり、SHIV を用いたアカゲザルモデル研究が米国や日本で活発に行われている。アカゲザルに病原性を示す SHIV も構築され、主として Env 変異研究やワクチン等の抗ウイルス療法の検証に精力的に用いられている。SHIV は HIV-1 遺伝子を僅かしか持たないため、その使用目的は限局されている。しかし、アクセサリ-蛋白質をコードするアクセサリ-遺伝子については HIV-1 遺伝子で置換可能で、病原性 SHIV を改変することにより個体実験も可能となる。また、Env により決定される CXCR4/CCR5 細胞指向性は HIV-1 の生物学を理解する上で極めて重要である。HIV-1 の持続感染や伝播には CCR5 指向性ウイルスが中心的役割を果たすので、ヒトのエイズ病態をより良く反映させるモデル構築のためには CCR5 指向性のウイルスが必要とされることが示されている (Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2:a007443, 2012 等)。米国 NIH-NIAID の Martin 博士らはアカゲザルにエイズを発症させる CCR5 指向性 SHIV 分子クローン (SHIVAD8) の構築に成功し、精力的に実験解析を続けているが (Proc.Natl.Acad.Sci.USA.109:19769,2012)、研究代表者はこのクローンの分与を受けた。SHIVAD8 は本研究課題の重要な研究材料である。

2. 研究の目的

HIV-1 は宿主域が狭く適切な動物モデルが存在しない。HIV-1 のこの特性は、病原性発現機構解明等の基礎研究や新規抗エイズ戦略開発等の臨床応用研究の大きな障壁となっている。研究代表者らはこの課題の克服に向け、ウイルス抑制細胞因子に抵抗性を示す一連のサル細胞指向性 HIV-1 (HIV-1mt) を作製してきた。その結果、アカゲザル由来末梢血単核細胞 (PBMC) においてサル免疫不全ウイルス (SIV) のアカゲザル病原性標準株 (SIVmac239) と比肩できるレベルで増殖するアカゲザル指向性 HIV-1rmt クローン (MN4/LSDQgtu) の構築に世界で初めて成功した。本申請課題では、MN4/LSDQgtu を基に、HIV-1 の個体内複製と病原性発現に必須であるアクセサリ-蛋白質群 (Vif、Vpr、Vpu 及び Nef) の機能・活性及びそれらと宿主因子との関わりについて、アカゲザル個体を用いた総合的実験的解析を世界に先駆けて展開する。

3. 研究の方法

本研究では、アカゲザル PBMC で SIVmac239

レベルの増殖能を有する HIV-1rmt クローン (MN4/LSDQgtu) とアカゲザル病原性 SHIV クローン (SHIVAD8) を基に HIV-1 アクセサリー蛋白質 (Vif, Vpr, Vpu 及び Nef) の個体内機能の解明に取り組む。このために、まず、MN4/LSDQgtu と SHIVAD8 とから種々の置換体や変異体を作製する。アカゲザル PBMC 等でウイルス学的解析を行なった後に、これらのクローンの一部につきアカゲザル個体感染実験を行う。並行して、アカゲザル細胞の抗 HIV-1 因子の遺伝子多型について解析する。さらに、HIV-1 遺伝子の個体内変異性について検証する。また、SIVmac239 Vif 及び Vpx が HIV-1 複製にもたらす効果についても解析する。これらを総合して、HIV-1 の個体内複製・存続・変異・進化や病原性発現におけるアクセサリー蛋白質の役割の解明を目指す。

4. 研究成果

HIV-1 は高度にヒトに特化したウイルスであり、アクセサリー蛋白質がこの特性を担っている。したがって、HIV-1 の個体内複製機構や病原性発現機構の解明、さらに、これらに基づく抗 HIV-1 戦略の新規開発には、霊長類感染実験系を確立するとともに、そのシステムを用いてアクセサリー蛋白質の機能解析を行う必要がある。研究代表者らは、アカゲザル個体内で充分良く増殖し持続感染から発症に至る能力を備えた CCR5 指向性/アカゲザル指向性 HIV-1 (HIV-1rmt) の構築に取り組んでいる。

最終年度は、遺伝子工学的に構築した 4 種類の CCR5 指向性 HIV-1rmt クローンをアカゲザル個体に単独あるいは混合感染させた。いずれの感染個体でもウイルス複製が確実に観察されたが、CXCR4 指向性 HIV-1rmt の標準クローンと比較すると、約 1/4 程度であり、持続感染を個体で成立させるためには更なる改善が必要であると考えられた。この実験と並行して、文献的に最も優れた増殖能を持つ CCR5 指向性 HIV-1rmt クローン (研究代表者ら、2013) を比較対照とし、5 種類の CCR5 指向性 HIV-1rmt クローンをアカゲザルリンパ球細胞株 M1.3S に接種し長期培養を行った。その結果、M1.3S 長期感染細胞から増殖能が顕著に向上した 2 種類の分子ウイルスクローンの取得に成功した。いずれも臨床分離株由来の env 遺伝子を持つクローンである。この他、親クローンより著しく増殖能の向上した分子クローンが多数得られており、ウイルスの多様性を確保しアカゲザルにおけるウイルス増殖能、変異性、病原性発現能等を厳密に検証するため、それぞれについて細胞レベルで解析を進めている。これらの成果に基づき、アカゲザル末梢単核細胞での確認実験により適当なクローンを複数選択し、アクセサリー蛋白質変異体の構築、アカゲザル個体感染実験へと進展させる。

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)

Y. Sakai, N. Doi, Y. Miyazaki, A. Adachi, M. Nomaguchi, Phylogenetic insights into the functional relationship between primate lentiviral reverse transcriptase and accessory proteins Vpx/Vpr, *Frontiers in Microbiology*, 査読有, 7, article 1655, 2016
DOI:10.3389/fmicb.2016.01655.

Y. Sakai, A. Miyake, N. Doi, H. Sasada, Y. Miyazaki, A. Adachi, M. Nomaguchi, Expression profiles of Vpx/Vpr proteins are co-related with the primate lentiviral lineage, *Frontiers in Microbiology*, 査読有, 7, article 1211, 2016
DOI:10.3389/fmicb.2016.01211.

M. Nomaguchi, N. Doi, Y. Sakai, H. Ode, Y. Iwatani, T. Ueno, Y. Matsumoto, Y. Miyazaki, T. Masuda, A. Adachi, Natural single-nucleotide variations in the HIV-1 genomic SA1prox region can alter viral replication ability by regulating Vif expression levels, *Journal of Virology*, 査読有, 90, 4563-4578, 2016
DOI:10.1128/JVI.0239-15.

T. Sultana, E.E. Nakayama, S. Tobita, M. Yokoyama, Y. Seki, A. Saito, M. Nomaguchi, A. Adachi, H. Akari, H. Sato, T. Shioda, Novel mutant HIV-1 strains with high degree of resistance to cynomolgus macaque TRIMCyp generated by random mutagenesis, *Journal of General Virology*, 査読有, 97, 963-976, 2016
DOI:10.1099/jgv.0.000408.

*M. Yokoyama, *M. Nomaguchi, N. Doi, T. Kanda, A. Adachi, H. Sato, In silico analysis of HIV-1 Env-gp120 reveals structural bases for viral adaptation in growth-restrictive cells, *Frontiers in Microbiology*, 査読有, 7, article 110, 2016, *, Co-first authors
DOI:10.3389/fmicb.2016.00110.

N. Doi, Y. Sakai, Y. Miyazaki, A. Adachi, M. Nomaguchi, Single-amino acid mutation 66SR in Gag-matrix enhances viral single-cycle infectivity of R5-tropic HIV-1rmt, *Journal of Medical Investigation*, 査読有, 62, 228-232, 2015
DOI:10.2152/jmi/62/228

A. Adachi, T. Miura, Animal model studies on viral infections, *Frontiers in Microbiology*, 査読有, 5, article 672, 2014

DOI:10.3389/fmicb.2014.00672.

M. Nomaguchi, E.E. Nakayama, M. Yokoyama, N. Doi, T. Igarashi, T. Shioda, H. Sato, A. Adachi, Distinct combinations of amino acid substitutions in N-terminal domain of Gag-capsid afford HIV-1 resistance to rhesus TRIM5 α , *Microbes and Infection*, 査読有, 16, 936-944, 2014

DOI:10.1016/j.micinf.2014.08.017

N. Doi, A. Adachi, M. Nomaguchi, Growth properties of macaque-tropic HIV-1 clones carrying vpx/vpr genes from simian immunodeficiency viruses in place of their vpr regions, *Journal of Medical Investigation*, 査読有, 61, 374-379, 2014

DOI:10.2152/jmi/61/374

M. Nomaguchi, N. Doi, A. Adachi, Virological characterization of HIV-2 vpx gene mutants in various cell systems. *Microbes and Infection*, 査読有, 16, 695-701, 2014

DOI:10.1016/j.micinf.2014.06.004

M. Nomaguchi, A. Miyake, N. Doi, S. Fujiwara, Y. Miyazaki, Y. Tsunetsugu-Yokota, M. Yokoyama, H. Sato, T. Masuda, A. Adachi, Natural single-nucleotide polymorphisms in the 3' region of HIV-1 pol gene modulate viral replication ability, *Journal of Virology*, 査読有, 88, 4145-4160, 2014

DOI:10.1128/JVI.01859-13.

[学会発表](計 17 件)

K. Fujimoto, N. Doi, Y. Sakai, A. Adachi, M. Nomaguchi, Effects of mutations HIV-1 Gag-CA helix 7 and linker domain on the virion production, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会、2016 年 10 月 23 日~10 月 25 日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

A. Adachi, N. Doi, Y. Sakai, K. Fujimoto, M. Nomaguchi, An ultra-low vif type of HIV-1 SA1D2prox variant can adapt and evolve under the high level of APOVE3C3G, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会、2016 年 10 月 23 日~10 月 25 日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

M. Nomaguchi, N. Doi, K. Fujimoto, Y. Sakai, S. Nakanishi, A. Adachi, Identification of cis-elements involved in the HIV-1 vif mRNA production, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会、2016 年 10 月 23 日~10 月 25 日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

N. Doi, C. Ishifune, K. Yasutomo, T. Miura, Y. Sakai, K. Fujimoto, S. Harada,

K. Yoshimura, M. Nomaguchi, A. Adachi, Replication and pathogenicity of HIV-1rmt: towards evaluation of viral growth ability in gut-derived cells, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会、2016 年 10 月 23 日~10 月 25 日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

Y. Sakai, K. Fujimoto, N. Doi, M. Nomaguchi, A. Adachi, Studies on the adaptation process of HIV-1 Env in macaque cells, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会、2016 年 10 月 23 日~10 月 25 日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

川上朗彦、姫野愛、菊川美奈子、石田裕樹、野間口雅子、足立昭夫、三浦智行、中和抵抗性かつ CCR5 指向性の新規 HIV-1rmt の構築、第 64 回日本ウイルス学会学術集会、2016 年 10 月 23 日~10 月 25 日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

T. Sultana, E.E. Nakayama, S. Tobita, M. Yokoyama, Y. Seki, A. Saito, M. Nomaguchi, A. Adachi, H. Akari, T. Shioda, Novel mutant human immunodeficiency virus type 1 strains with high degree of resistance to cynomolgus macaque TRIMCyp generated by random mutagenesis, The 23rd Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, 2016 年 2 月 22 日~2 月 25 日、Boston(USA)

野間口雅子、土肥直哉、吉田知哉、酒井遙介、宮崎恭行、足立昭夫、SA1prox の 1 塩基置換による HIV-1 Vif 発現量変動機構、第 63 回日本ウイルス学会学術集会、2015 年 11 月 22 日~11 月 24 日、福岡国際会議場(福岡県福岡市)

足立昭夫、土肥直哉、酒井遙介、吉田知哉、宮崎恭行、野間口雅子、HIV-1 Vif 発現量を増減させる SA1D2prox 塩基配列の同定、第 63 回日本ウイルス学会学術集会、2015 年 11 月 22 日~11 月 24 日、福岡国際会議場(福岡県福岡市)

土肥直哉、野間口雅子、酒井遙介、足立昭夫、CCR5-tropic アカゲザル指向性 HIV-1 の構築とウイルス学的性状解析、第 63 回日本ウイルス学会学術集会、2015 年 11 月 22 日~11 月 24 日、福岡国際会議場(福岡県福岡市)

酒井遙介、土肥直哉、宮崎恭行、足立昭夫、野間口雅子、HIV-1 Gag-CA I134/I135/S149 の 1 アミノ酸変異はウイルス複製後期過程に影響する、第 63 回日本ウイルス学会学術集会、2015 年 11 月 22 日~11 月 24 日、福岡国際会議場(福岡県福岡市)

T. Sultana, E.E. Nakayama, S. Tobita, A. Saito, M. Nomaguchi, A. Adachi, H. Akari, T. Shioda, Novel mutant HIV-1

strains with high degree of resistance to cynomolgus macaque TRIMCyp generated by random mutagenesis, The 63rd Annual Meeting of The Japanese Society for Virology, 2015年11月22日～11月24日, Fukuoka International Congress Center (Fukuoka, Fukuoka)
足立昭夫、抗HIV細胞因子と抗HIV戦略、第28回日本エイズ学会学術集会、2014年12月3日～12月5日、大阪国際会議場(大阪府大阪市)
野間口雅子、土肥直哉、酒井遥介、泉泰輔、宮崎恭行、足立昭夫、SA1prox の遺伝子配列は Vif/APOBEC3G 依存的にウイルス複製能を変動させる、第62回日本ウイルス学会学術集会、2014年11月10日～11月12日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
酒井遥介、笹田ひかり、土肥直哉、泉泰輔、宮崎恭行、足立昭夫、野間口雅子、HIV/SIV Vpx 蛋白質の発現調節に寄与する領域の解析、第62回日本ウイルス学会学術集会、2014年11月10日～11月12日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
宮崎恭行、泉泰輔、野間口雅子、内山恒夫、足立昭夫、In vitro 構築系を用いた HIV-1/HIV-2 CA 重合能に関する研究、第62回日本ウイルス学会学術集会、2014年11月10日～11月12日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
土肥直哉、宮崎恭行、酒井遥介、泉泰輔、内山恒夫、足立昭夫、野間口雅子、HIV-1 Gag-CA ヘリックス7の変異がウイルス複製後期過程に及ぼす影響の解析、第62回日本ウイルス学会学術集会、2014年11月10日～11月12日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

〔図書〕(計 0 件)

〔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：
取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

足立 昭夫 (ADACHI, Akio)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・特命教授
研究者番号：90127043

(2) 研究分担者

野間口 雅子 (NOMAGUCHI, Masako)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授
研究者番号：80452647

宮崎 恭行 (MIYAZAKI, Yasuyuki)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教
研究者番号：70607233

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし