

令和元年6月10日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04682

研究課題名(和文) 霊長類モデルによるエイズ病態形成に関する実証的基盤研究

研究課題名(英文) Empirical study on the formation of AIDS pathogenesis by primate model

研究代表者

三浦 智行 (MIURA, Tomoyuki)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・准教授

研究者番号：40202337

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：高病原性SHIVをアカゲザルに接種し、急性期および慢性期のサルにそれぞれ抗ウイルス薬を投与し、新規感染を阻止した状態で観察される血中ウイルス量の減衰を計測した。得られた結果から数理モデル解析により、感染リンパ球および感染マクロファージの半減期を算出した。これらの情報を基に、体内総ウイルス量におけるマクロファージ由来ウイルス量を推定した。個体レベルにおける、現行抗ウイルス薬の感染マクロファージへの抗ウイルス効果を明らかにした。抗ウイルス療法下でマクロファージがウイルスリザーバーとして機能しているか組織化学的に検索した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗HIV薬の開発の過程ではウイルスのリンパ球への感染の阻止が指標として用いられており、マクロファージへの感染阻止および感染マクロファージへの抗ウイルス効果等はこれまでに検索されていない。このように個体レベルで未だ誰も検討していない問題に注目した点が独創的である。本研究計画が解明したHIV感染症におけるマクロファージ感染の意義は、実際の感染個体で得られる知見であるため、現行のヒトの多剤併用療法下で顕在化した諸問題へのマクロファージの関与を考えるうえで直接的かつ重要な基盤的情報となるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Highly pathogenic SHIV was inoculated into rhesus macaques, and antiviral agents were administered to acute and chronic monkeys, respectively, and the attenuation of the amount of virus in blood observed with blocking new infections was measured. From the results obtained, the half-life of infected lymphocytes and infected macrophages was calculated by mathematical model analysis. Based on this information, the amount of macrophage-derived virus in the total amount of virus in the body was estimated. We have clarified the antiviral effect of current antiviral drugs on infected macrophages at individual level. It was examined histochemically whether macrophages function as virus reservoirs under antiviral therapy.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HIV SHIV アカゲザル 動物モデル 感染症 エイズ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

後天性免疫不全症候群(エイズ)の病原ウイルスであるヒト免疫不全ウイルス(HIV)の感染者は全世界で3690万人、新規感染者は200万人、年間死者数は120万人と推定されており(UNAIDS/WHO Global HIV/AIDS Online Database, 2014) HIV感染症およびエイズの制御は依然として地球規模の公衆衛生上の重要課題である。エイズの特徴的な病態としてCD4陽性T細胞の減少および日和見感染や悪性新生物等の免疫不全がある。免疫の司令塔であるCD4陽性T細胞がウイルス感染により細胞死を起し減少する事と、免疫不全は因果関係として直感的に理解できるが、この図式では必ずしも説明できない問題が特に抗HIV薬剤療法下の感染者で顕在化している。すなわち、治療下におけるウイルスの維持及び副次的に派生する腫瘍の様な疾患形成が顕在化し、そこにもう一つのウイルス標的細胞であるマクロファージの関与が疑われているが、その実態は不明である。我々は過去30年以上にわたりエイズ霊長類モデルを用い、HIVの病原性の解明に関する基礎研究に携わって来た。その中で、HIVとサル免疫不全ウイルス(SIV)の遺伝子を組換えたサル/ヒト免疫不全ウイルス(SHIV)をアカゲザルに接種すると、数週間で全身のCD4陽性T細胞を枯渇させ、その後、半年以内にエイズ様の病態を呈する事を報告した。感染サルのCD4陽性T細胞が枯渇してからエイズ様病態を呈するまで、血中ウイルス量は高値を保つが、この間のウイルスはマクロファージが産生している。このSHIV感染の後期は、霊長類レンチウイルスの個体レベル感染において極めて稀な、ほぼ純粋なマクロファージ感染であることが知られている。このユニークな実験動物モデルを用いることにより感染マクロファージの意義を、実際の感染個体で検証・解明できると着想した。

### 2. 研究の目的

エイズ流行の初期からHIVの主要標的細胞としてCD4陽性Tリンパ球およびマクロファージが知られてきたが、HIV感染症におけるマクロファージ感染の意義は解明されていない。近年のHIV多剤併用療法の発展・普及により、従来認識されていなかった問題が顕在化しつつあり、それらとマクロファージ感染の関係が示唆されているが、実証的な根拠が薄弱である。本研究「霊長類モデルによるエイズ病態形成に関する実証的基盤研究」では、個体レベルの感染におけるマクロファージの意義を、霊長類エイズモデル、特に感染後期にほぼ純粋なマクロファージ感染が成立する高病原性SHIVを用いて明らかにし、マクロファージ感染とエイズ病態進行との関係を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

急性感染期にリンパ球が主に感染し、それによってCD4陽性リンパ球が枯渇した慢性期には、ほぼ純粋なマクロファージ感染が成立する高病原性SHIVをアカゲザルに接種する。急性期および慢性期のサルにそれぞれ抗ウイルス薬を投与し、新規感染を阻止した状態で観察される血中ウイルス量の減衰を計測する。得られた結果から数理モデル解析により、感染リンパ球および感染マクロファージの半減期を算出する。これらの情報を基に、1. 体内総ウイルス量におけるマクロファージ由来ウイルス量を推定する。2. 個体レベルにおける、現行抗ウイルス薬の感染マクロファージへの抗ウイルス効果を明らかにする。慢性期に抗ウイルス薬を投与し、血中ウイルス量の減衰からSIV感染におけるマクロファージ由来ウイルスの体内総ウイルス量への貢献を評価する。最終的に抗ウイルス療法下でマクロファージがウイルスリザーバーとして機能しているか組織化学的に検索する。

### 4. 研究成果

(1)以前の研究でSIV感染サルに抗ウイルス薬を適用した所、SIV感染サルの血中ウイルスRNA量は2相性に減衰し検出限界以下になった。同一の抗ウイルス薬を接種8週後からSHIV感染サル1頭に適用した所、SHIV感染サルの血中ウイルスRNA量は3相性に減衰し1000コピー/mlのウイルス量で安定化した。このウイルスRNA量の安定化は再現性があるか検証するため3頭のサルに高病原性SHIVを接種したところ、2頭のサルでは典型的な高病原性の感染病態を呈さなかったため解析出来なかったが、1頭のサルは典型的な高病原性SHIV感染を起こした。このサルに抗ウイルス薬を適用した所、3相性の減衰の後、約1000コピー/mlのウイルス量で安定化した。すなわち再現性が確認された。SIVとSHIV感染サルにおけるウイルス量減衰動態の違いはそもそも高病原性SHIVが、適用した抗ウイルス薬に抵抗性であるため起こったのか検証するため、3頭のSHIV感染サルに急性期(接種9及び10日後)から抗ウイルス剤を適用した所、ウイルスRNA量は2相性に減衰し、検出限界以下に抑制された。従って、SHIVはこれら抗ウイルス薬に感受性である事が明らかとなった。高病原性SHIV感染8週後には体内のリンパ球はほぼ完全に枯渇しており、ウイルス感染細胞はマクロファージである事が、以前の研究から推定される。この結果はマクロファージに感染したウイルスには現行の抗ウイルス剤の効果が限定的である事を示している可能性があり、基礎生物学的な意義に加えてエイズ治療においても重要な知見と考えられる。

(2)急性期治療群として3頭、慢性期治療群として3頭のアカゲザルにSHIVを静脈内接種し、経時的に採血・肺胞洗浄を実施した。血漿中及び肺胞洗浄液上清中のRNAは定量的RT-PCR法を用いて測定した。経時的に肺胞マクロファージを調整し、ウイルス産生マクロファージ数を算出した。非治療群として5頭のアカゲザルにウイルスを接種し、同様の解析を行った。血漿中

ウイルス RNA は、接種 10~14 日後にピークに達し、6~8 週後にかけて安定した。非治療群では、8 週以降も高い値を保持した。急性期治療群は、ピーク後セットポイントに移行せず 10 週後に検出限界以下まで減少した。慢性期治療群のウイルス RNA は、抗ウイルス多剤併用療法後、急激な第一相減衰、緩やかな第二相減衰、定常的な状態の第三相減衰を示した。第三相では 2 頭のウイルス RNA が 1000copies/ml 以上で維持されていた。肺胞マクロファージ中のウイルス産生細胞数は、非治療群は接種 7 週後にピークを迎え、その後も高い値を維持した。治療群では、抗ウイルス多剤併用療法前には非治療群と同等のウイルス産生マクロファージが存在していたが、治療開始 5~9 週後には検出限界まで減少した。血漿中ウイルス RNA が治療後に急激に減衰したことから、感染マクロファージには感染リンパ球よりも半減期が短いものが存在していたと考えられる。さらに減衰曲線が三相性を示したことは、高病原性 SHIV 感染マクロファージは半減期の短い集団や長い集団で構成されている可能性を示唆するものである。第三相が顕在化した理由としては、感染マクロファージの割合が多かったことが関与した可能性が示唆される。

(3) 5 頭のアカゲザルに SHIV 株を接種し、マクロファージが主要感染細胞となる感染後期に多剤併用療法を適用し、前年度までに観察された血中ウイルス量の 3 相性減衰の再現を目指した。3 頭の動物ではウイルス感染により血中のリンパ球が枯渇しなかったため、継時的に生検したリンパ節を組織化学的検索したところ、主要感染細胞はリンパ球であった。残り 2 頭は血中リンパ球が急性感染期に枯渇し、マクロファージが主要感染細胞となった。うち 1 頭は急速に病態が進行し、投薬中にエイズ様症状（食欲廃絶と下痢）を起こしたため安楽殺した。残る 1 頭で 3 相性減衰が再現された。そこで、第三相を担う細胞集団を組織化学的に同定しようと試みた。非治療個体および治療開始前、治療開始直後及び治療終了時の各動物の組織を組織化学的に解析したところ、治療開始前の状態では MAC387 抗原陽性 M1 タイプマクロファージおよび CD163 抗原陽性 M2 タイプマクロファージの両方がウイルス感染したが、治療により血中ウイルス量が 1000 コピー/ml まで減少した第 3 相では M2 タイプマクロファージのみでウイルスが維持されていた。以上のことから、高病原性 SHIV 感染サルにおいて CD163 陽性のマクロファージは治療下でも生き残り得る細胞であることが示された。今後、それらの細胞がなぜ治療下でも生存できるのか、それらの細胞を特異的に排除する方法を確立することでリザーバーの排除に繋がることを期待される。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

Himeno, A., Ishida, Y., Mori, H., Matsuura, K., Kikukawa, M., Sakawaki, H., Miura, T., Induction of neutralizing antibodies against tier 2 human immunodeficiency virus 1 in rhesus macaques infected with tier 1B simian/human immunodeficiency virus., *Archives of Virology*, 164, 1297 ~ 1308, 2019 年、査読有り  
DOI: 10.1007/s00705-019-04173-5

Doi, N., Miura, T., Mori, H., Sakawaki, H., Koma, T., Adachi, A., Nomaguchi, M., CXCR4- and CCR5-Tropic HIV-1 Clones Are Both Tractable to Grow in Rhesus Macaques., *Frontiers in Microbiology*, 9, 2510, 2018 年、査読有り  
DOI: 10.3389/fmicb.2018.02510

Beauchemin, C. A., Miura, T., and Iwami, S., Duration of SHIV production by infected cells is not exponentially distributed: Implications for estimates of infection parameters and antiviral efficacy., *Sci. Rep.*, 7, 42765, 2017 年、査読有り  
DOI: 10.1038/srep42765

Iwanami, S., Kakizoe, Y., Morita, S., Miura, T., Nakaoka, S., and Iwami, S., A highly pathogenic simian/human immunodeficiency virus effectively produces infectious virions compared with a less pathogenic virus in cell culture., *Theor. Biol. Med. Model.*, 14, 9, 2017 年、査読有り  
DOI: 10.1186/s12976-017-0055-8

Seki, S., Nomura, T., Nishizawa, M., Yamamoto, H., Ishii, H., Matsuoka, S., Shiino, T., Sato, H., Mizuta, K., Sakawaki, H., Miura, T., Naruse, T. K., Kimura, A., and Matano, T., In vivo virulence of MHC-adapted AIDS virus serially-passaged through MHC-mismatched hosts., *PLoS Pathog.*, 13, e1006638, 2017 年、査読有り  
DOI: 10.1371/journal.ppat.1006638

Ishida, Y., Yoneda, M., Otsuki, H., Watanabe, Y., Kato, F., Matsuura, K., Kikukawa, M., Matsushita, S., Hishiki, T., Igarashi, T., Miura, T., Generation of a

neutralization-resistant CCR5 tropic simian/human immunodeficiency virus (SHIV-MK38) molecular clone, a derivative of SHIV-89.6.、J Gen Virol, 97: 1249-60, 2016、査読有り  
DOI: 10.1099/jgv.0.000421

Mizuguchi, T., Harada, S., Miura, T., Ohashi, N., Narumi T., Mori, H., Irahara, Y., Yamada, Y., Nomura, W., Matsushita, S., Yoshimura, K., and Tamamura, H.、A minimally cytotoxic CD4 mimic as an HIV entry inhibitor.、Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 26, 397-400, 2016.  
DOI: 10.1016/j.bmcl.2015.11.103

Ishii, H., Matsuoka, S., Nomura, T., Nakamura, M., Shiino, T., Sato, Y., Iwata-Yoshikawa, N., Hasegawa, H., Mizuta, K., Sakawaki, H., Miura, T., Koyanagi, Y., Naruse, T. K., Kimura, A., and Matano, T.、Association of lymph-node antigens with lower Gag-specific central-memory and higher Env-specific effector-memory CD8+ T-cell frequencies in a macaque AIDS model.、Sci. Rep.、6, 30153, 2016.  
DOI: 10.1038/srep30153

三浦智行、霊長類モデルを用いた HIV 感染症の予防・治療法開発、公益社団法人日本実験動物学会編、実験動物感染症と感染症動物モデルの現状、p99-105、2016.

〔学会発表〕(計 14 件)

姫野愛、石田裕樹、森ひろみ、松浦嘉奈子、菊川美奈子、阪脇廣美、三浦智行、Tier1B SHIV 感染サルにおける抗 HIV-1 Tier2 中和抗体の誘導、第 66 回日本ウイルス学会学術集会、2018 年

横山温香、陣野萌恵、関根将、三浦智行、伊吹謙太郎、SIV 感染サル化マウスの AIDS 病態モデルとしての有用性の検討、第 66 回日本ウイルス学会学術集会、2018 年

Shida, H., Kato, S., Okamura, T., Mukai, T., Inoue, M., Shu, T., Miura, T., Yasutomi, Y., Matsuo, K.、Protective effects of immunization using urease-deficient BCG, vaccinia LC16m8d, and Sendai virus expressing SIV genes、第 66 回日本ウイルス学会学術集会、2018 年

野村拓志、寺原和孝、石井洋、山本浩之、三浦智行、俣野哲朗、ワクチンによって誘導された Gag エピトープ特異的 CD8 陽性 T 細胞の交差性、第 66 回日本ウイルス学会学術集会、2018 年

Nomura, T., Ishii, H., Seki, S., Yamamoto, H., Terahara, K., Miura, T., and Matano, T.、Induction of mutant epitope-specific CD8+ T cells is an indicator of the beginning of viral control failure in SIV controllers、35th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS (国際学会)、2017 年

三浦智行、霊長類モデルを用いた HIV 感染症の予防・治療法開発、第 26 回サル疾病ワークショップ、2017 年

姫野愛、石田裕樹、森ひろみ、松浦嘉奈子、菊川美奈子、三浦智行、CCR5 指向性サル/ヒト免疫不全ウイルス感染アカゲザル血漿における中和能の進化、第 65 回日本ウイルス学会学術集会、2017 年

桑田岳夫、佐野雅人、松岡佐織、俣野哲朗、関洋平、明里宏文、三浦智行、松下修三、SIV 感染サルをモデルとした中和抗体誘導メカニズムの解析、第 31 回日本エイズ学会学術集会、2017 年

陣野萌恵、関根将、横山温香、三浦智行、伊吹謙太郎、免疫不全ウイルス感染病態研究におけるサル化マウスの有用性の検討、第 65 回日本ウイルス学会学術集会、2017 年

姫野愛、石田裕樹、米田舞、松浦嘉奈子、菊川美奈子、三浦智行、中和抵抗性 CCR5 指向性サル/ヒト免疫不全ウイルス感染アカゲザル血症における中和能の広域化、第 64 回日本ウイルス学会学術集会、2016 年

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

佐野雅人、桑田岳夫、松岡佐織、関塚剛史、明里宏文、三浦智行、俣野哲朗、中和感受性 SIVsmH635FC 感染における中和抵抗性株 SIVsmE543 交差性中和抗体誘導の経時的解析、第 64 回日本ウイルス学会学術集会、2016 年

Seki, Y., Saito, A., Satou, Y., Harada, S., Yoshimura, K., Ode, H., Iwatani, Y., Yoshida, T., Murata, M., Watanabe, Y., Yasutomi, Y., Matano, T., Miura, T., Akari, H.、カニクイザルにおける R5 指向性 HIV-1 長期潜伏感染の解析、第 64 回日本ウイルス学会学術集会、2016 年

志田壽利、加藤誠一、保富康宏、松尾和浩、三浦智行、五十嵐樹彦、張陔峰、井上誠、成瀬妙子、木村彰方、HIV-1 ワクチン開発とその課題、第 25 回日本組織適合性学会、2016 年

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 連携研究者

連携研究者氏名：岩見真吾

ローマ字氏名：(IWAMI, Shingo)

所属研究機関名：九州大学

部局名：理学研究院

職名：准教授

研究者番号 (8 桁)：90518119

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：川上朗彦

ローマ字氏名：(KAWAKAMI, Akihiko)

研究協力者氏名：松浦嘉奈子

ローマ字氏名：(MATSUURA, Kanako)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。