

平成21年5月28日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18380182
 研究課題名（和文） HIVがサルから種間障壁を乗り越えた機序のヒト／サル組換えウイルスを用いた解明
 研究課題名（英文） Elucidation of the mechanism that HIV got over a species barrier from monkey to human using simian/human recombinant immunodeficiency virus.
 研究代表者
 速水 正憲 (HAYAMI MASANORI)
 平安女学院大学・生活福祉学部・客員教授
 研究者番号：40072946

研究成果の概要：

プロテアーゼ遺伝子を HIV-1 由来にした新規 SHIV-pr をサルへ順化した。逆転写酵素とインテグラーゼの各遺伝子を HIV-1 由来に置換した新規 SHIV-rti 接種サル1頭でエイズ様症状を呈して死亡したことから発症モデル開発の可能性が示唆された。プロテアーゼ、逆転写酵素、インテグラーゼの各遺伝子を HIV-1 由来にした新規 SHIV-prti のサルへの順化を試み、サル個体において弱いながらも感染可能であることを確認した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2007年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2008年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
年度			
年度			
総計	15,400,000	4,620,000	20,020,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用獣医学

キーワード：感染症、ウイルス、エイズ、アカゲザル、実験動物、遺伝子組み換え

1. 研究開始当初の背景

近年、アジアを中心としたSARSの流行や、高病原性鳥インフルエンザの流行など種の壁を越えたヒトへの感染、いわゆる人畜共通感染症が大きな問題となっている。人獣共通感染症は古くから存在しており、特にヒトに近縁であるサルからもしくはサルを経由しての感染はサル痘、Bウイルス、マールブルクウイルスなどが挙げられ、いずれもヒトへ

の致死性が高い。現在アフリカを中心に全世界で流行しているHIV-1もその一つであり、元来サルが保有していたSIVが、幾度もの種間感染を経て最終的にチンパンジーからヒトへ感染伝播したものである。SIVはサルに感染しうるが、HIV-1はサルからもたらされたにもかかわらずサルに感染しない。このことはサル（細胞）にはHIV-1にとっての種間障壁が存在することを示している。HIV-1は

サルから伝播したにもかかわらずなぜサルに感染しないのか？サル・ヒト間でどのような障壁が存在し、どのような機序が働いているのか？このような疑問に答えるべく、申請者らはSIVをベースにHIV-1の遺伝子を有するキメラウイルス（SHIV）の作製に世界に先駆けて成功した。当初、種特異性を決定しているのはインフルエンザ等で知られているウイルスの外被タンパク質（env）と思われていたが、サルに感染するSHIVはHIV-1のenvを含むゲノムの3'側半分の遺伝子を持つことから、envやその周辺の調節遺伝子はHIV-1の種特異性の決定因子ではないことを初めて明らかにした。また、HIV-1がサルを含めその他の実験動物に感染しないことは、HIV-1の病原性の解明やワクチン開発に必須である動物モデルがないことであり、我々のSHIV作製の成功はその確立に道を拓いた。すなわち、これらのSHIVはHIV-1のenvを有することから、envを標的にした抗HIV-1ワクチンのサルを用いたin vivo 評価系における攻撃接種ウイルスとして、また、HIV-1の個体レベルでの感染機序の解明（特にenvの関連）に有用であり、現在、欧米で盛んに利用されている。しかし従来のSHIVはHIV-1の3'側半分（env、nef、vpr、vpu）の領域に限られていたが、サルに感染するHIV-1に限りなく近いSHIVの作製を目指して、HIV-1由来領域の拡大を試みてきた。その結果、envはSIV由来だがpol（プロテアーゼ、逆転写酵素、インテグラーゼ）をHIV-1に置き換えたSHIVの作製に成功し、サル細胞に感染・増殖することを明らかにしてきた。さらに、HIV-1遺伝子をできるだけ広く、SIV遺伝子は最小限に持つサルに感染するSHIVの作製を行い、近年、HIV-1由来の3'側のみならずpol遺伝子領域の逆転写酵素領域を持つ新規SHIVを作製し、サルに感染増殖することを明らかにした。これは現在、最も広く

HIV-1遺伝子を持ちサルに感染するSHIVであるが、本研究はさらにHIV-1遺伝子を拡大する試みである。

2. 研究の目的

HIV-1（ヒト免疫不全ウイルス 1 型）はサル免疫不全ウイルス（SIV）がサルからヒトへ種を越えて感染したものと考えられている。病原体がどのように種間障壁を越えるのか、その分子機序を明らかにすることは、病原体と宿主の関わりを明らかにするとともに、今後の治療・ワクチン戦略への重要な知見となる。そこで本研究では、HIV がサルから種間障壁を越えてヒトへ感染・伝播するに至った分子機序を解明することを目的とする。その解明の鍵となるのが、「HIV-1はサルから伝播したにもかかわらず、サルには感染しない」という HIV-1 の種特異性である。そこで我々は、SIV と HIV-1 の種々の遺伝子組換えウイルス（SHIV）を作製して、第一に、HIV-1 と SIV の宿主特異性を決定しているウイルス遺伝子を同定することを目的とする。最終的な目標としては、それらの遺伝子と相互作用する宿主因子の同定とそれらに関わる種特異性の分子機序の解明を目指す。それにあたってSIVに可能な限り広範に HIV-1 遺伝子を導入した SHIV を作製してサル種特異的な SIV 遺伝子を同定する。このことは一方、サルに感染する HIV-1 に限りなく近いウイルスを作製することであり、HIV-1 がサルに感染しない為に困難をきたしている HIV-1 の病原性の実験的解明やワクチン開発の為に必須なエイズ動物モデルを確立することでもある。

3. 研究の方法

SHIV の HIV-1 遺伝子領域をそれ以外の領域へ順次拡大した SHIV の作製を行う。ついで、それらのサル細胞での感染増殖能を調べ、サル細胞における増殖を制限する HIV-1 遺伝子

の同定とサル細胞に感染する為に必要な SIV 遺伝子の同定を行う。最終的に、それらの種特異性を決定している遺伝子のウイルス増殖過程における役割の解明とそれらの遺伝子と相互作用する宿主因子を探索する。また、この過程でサルに感染しうる HIV-1 に限りなく近い SHIV の開発につなげる。具体的には本研究課題の期間中に以下の点を推し進める。HIV-1 遺伝子領域を拡大した種々の SHIV の作製を作成し、ヒトおよびサル培養細胞を用いての感染・増殖能の検討を行い、サル個体における感染増殖能、病原性の検討を行う。

4. 研究成果

(1) 本研究では、霊長類レンチウイルスの種特異性の決定機序を解明するために、サル／ヒトの種特異性を決定する SIV/HIV-1 遺伝子の同定を目的とし、SHIV の HIV-1 遺伝子領域を順次拡大した SHIV を作製する。まずウイルスのプロテアーゼ (PR) 遺伝子を HIV-1 由来にした新規サル／ヒト免疫不全組換えウイルス (SHIV-pr) を作製した。SHIV-pr は *in vitro* において Gag タンパク質を親株の SIV と同じように切断・プロセッシングすることが示され、サル由来のリンパ球系細胞株で増殖することが明らかとなった。また、サル末梢血より得られた単核球細胞でも SIV に比べやや弱いものの増殖することが示された。そこで、SHIV-pr をアカゲザル 2 頭に静脈内接種したところ、1 頭では血中ウイルス RNA が持続的に検出され、抗体価も上昇したが、他の 1 頭では一過的な感染の証拠しか検出できなかった。ウイルス増殖能の増強を目指し、持続感染したサルの血漿やリンパ節細胞を新規のサルに植え継いで 4 代目まで個体による継代を行った。その結果、SHIV-pr は継代を重ねるごとに血中ウイルス RNA 量を上昇させ、4 代目では高い値で血中ウイルス RNA 量を維持するようになった。継代の 2 代目から

4 代目の各 1 頭計 3 頭のサルの感染後 1~3 週目の血漿から得られたウイルス RNA の PR 領域 (99 アミノ酸残基) について配列を決定したところ、A71V と V77I の 2 ヶ所のアミノ酸変異が見つかった。これらは 2 代目から 4 代目で共通に見られた変異であり、2 代目への継代以前に生じ、*in vivo* 継代によって固定されたものと考えられた。また、Gag 領域中の PR によって認識される切断部位近傍でも 2 代目から 4 代目に共通する変異が見つかり、これらの変異が SHIV-pr のサル個体レベルでの増殖能向上に関わっている可能性が示唆された。

(2) SIVmac のゲノムに逆転写酵素とインテグラーゼの各遺伝子を HIV-1 由来に置換した新規 SHIV (SHIV-rti と命名) のサル感染実験を行った。感染性分子クローンから調製した SHIV-rti を 2 頭のアカゲザル (MM402 と MM403) に静脈内接種した。SHIV-rti 接種後、各々のサルから 2~10 週目に採取された PBMC よりウイルスが再分離され、それ以降はウイルス分離ができなくなった。しかし MM402 については、21 週目から再びウイルスが分離できるようになり、それに合わせて PA 抗体価も上昇を示し、以後 ≥ 16384 の力価を下回ることはなかった。血中ウイルス量は、当初こそ $10^3 \sim 10^4$ copies/ml 程度に留まり、その後暫く測定限界以下が続いたが、70 週目を過ぎてから再び急激な増加を示し、 10^6 copies/ml 以上の高い数値を維持するようになった。CD4 細胞数は初め接種前のレベルを維持していたが、血中ウイルス量の増加とほぼ時期を同じくして下がり始め、やがて接種前と比べ 10 % 以下にまで減少した。同様に体重も徐々に減少傾向を示し、166 週目に衰弱死亡した。一方、MM403 は PA 抗体価が 32~64 に留まったままで持続感染状態に至らなかったが、接種後 60 週目で死亡した。

上記の成績から、我々が作成した SHIV-rti はサル個体において感染増殖することが明らかとなった。とりわけ、1 頭のみではあるが持続感染状態を経て最終的にエイズ様症状を呈して死亡した個体があったことは、この新規 SHIV とアカゲザルのモデル系が将来的にエイズ治療薬や投与方法の開発に利用できることを示唆するものと考えられる。

(3) SIVmac のゲノムにプロテアーゼ、逆転写酵素、インテグラーゼの各遺伝子を HIV-1 由来に置換した新規 SHIV (SHIV-prti と命名) を作製し、サル培養細胞への順化及びサル感染実験を行った。SHIV-prti を先ずカニクイサル由来の HSC-F 細胞において *in vitro* 培養による継代を続け、サル細胞への馴化を計った。この馴化したウイルスを 2 頭のアカゲザルに静脈内接種した。またこの内の 1 頭から分離されたウイルスを、さらに増殖能を高めるために新たな 2 頭のサルに *in vivo* 継代した。作製した分子クローンの SHIV-prti は、10 代程度の *in vitro* 継代によってサル細胞中での増殖速度が顕著に早まった。サル感染実験では、2 頭とも接種後 1 週目の血中 viral RNA 量が 10^3 copies/ml 前後を示し、内 1 頭からはウイルス分離もされた。しかし、その後はウイルス増殖を示す明確な指標は得られず、PA 抗体価もほとんど上がらなかった。2 代目への *in vivo* 継代では、接種後 1 週目に 2 頭共からウイルスが分離され、特にその内の 1 頭からはウイルス分離が継続し、PA 抗体価も上昇した。これまでのところ、接種したいずれのサルにおいても CD4/8 比に大きな変動は観察されていない。上記の成績より、SHIV-prti は、基本的にサル個体において弱いながらも感染可能であると考えられた。

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 5 件)

(1) Akiyama, H. 他 (Hayami, M. 5 名中 4 番目): Construction and infection of a new simian/human immunodeficiency chimeric virus (SHIV) containing the integrase gene of the human immunodeficiency virus type 1 genome and analysis of its adaptation to monkey cells. *Microbes and Infection*, 10: 531-539, 2008.

(2) Fukazawa, Y. 他 (Hayami, M. 14 名中 12 番目): Small intestine CD4⁺ T-cells are profoundly depleted during acute infection of simian-human immunodeficiency virus regardless of its pathogenicity. *J. Virol.*, 82: 6039-6044, 2008.

(3) Ishimatsu, M. 他 (Hayami, M. 6 名中 5 番目): Construction of a novel SHIV having an HIV-1-derived protease gene and its infection to rhesus macaques: a useful tool for *in vivo* efficacy tests of protease inhibitors. *Microbes and Infection*, 9: 475-482, 2007.

(4) Miyake, A. 他 (Hayami, M. 12 名中 12 番目): Rapid dissemination of a pathogenic simian/human immunodeficiency virus to systemic organs and active replication in lymphoid tissues following intrarectal infection., *J. Gen. Virol.*, 87: 1311-1320, 2006.

(5) Motohara, M. 他 (Hayami, M. 13 名中 12 番目): Impaired T cell differentiation in the thymus at the early stages of acute pathogenic SHIV infection in contrast to less pathogenic SHIV infection. *Microbes and Infection*, 8: 1539-1549, 2006.

[学会発表] (計 1 1 件)

(1) 井戸栄治、石松美沙、三浦智行、多田哲

子、多田秀子、伊吹謙太郎：HIV-1 由来の pol 遺伝子を持つ SHIV-prti のアカゲザル in vivo 継代による感染増殖能の増加、第 22 回日本エイズ学会学術集会、2008 年 11 月 26-28 日、大阪

(2) 井戸栄治、石松美沙、三浦智行、多田哲子、多田秀子、伊吹謙太郎：HIV-1 の逆転写酵素とインテグラーゼ遺伝子を持つ SHIV-rti はアカゲザルに持続感染しエイズ様症状を引き起こす、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、2008 年 10 月 26-28 日、岡山

(3) 稲葉一寿、深澤嘉伯、堀内励生、松田健太、姫野愛、松山めぐみ、伊吹謙太郎、速水正憲、五十嵐樹彦、三浦智行：SHIV-KS661 長期感染アカゲザルにおけるウイルス増殖、CD4 陽性 T 細胞の減少および Enteropathy について、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、2008 年 10 月 26-28 日、岡山

(4) 石松美沙、鈴木元、秋山尚志、三浦智行、速水正憲、井戸栄治：SIVmac に HIV-1 のプロテアーゼ遺伝子を組み込んだ SHIV-pr の in vivo 継代によって生じた遺伝子変異の解析、第 21 回日本エイズ学会学術集会、2007 年 11 月 28 日-30 日、広島

(5) 井戸栄治、石松美沙、三浦智行：プロテアーゼ、逆転写酵素、およびインテグラーゼの各遺伝子が HIV-1 由来である SHIV-prti のサルにおける in vivo 継代、第 21 回日本エイズ学会学術集会、2007 年 11 月 28 日-30 日、広島

(6) Ibuki, K., Inaba, K., Fukazawa, Y., Matsuyama, M., Hayami, M., Miura, T.：Virological and immunological analysis of systemic lymphoid tissues in SHIV-infected monkeys. 25th annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, Monterey, U.S.A., Sep. 10-13, 2007

(7) 三浦智行、稲葉一寿、深澤嘉伯、松山めぐみ、伊吹謙太郎、速水正憲：～エイズの標

的組織は小腸である～霊長類エイズモデルの全身深部組織解析から見えてきたこと、第 143 回日本獣医学会学術集会、2007 年 4 月 3 日-5 日、つくば

(8) 井戸栄治、石松美沙、速水正憲、三浦智行：プロテアーゼ、逆転写酵素、およびインテグラーゼの各遺伝子が HIV-1 由来である新規 SHIV のサル感染実験、第 20 回日本エイズ学会学術集会、2006 年 11 月 30 日～12 月 2 日、東京

(9) 松山めぐみ、堀内励生、深澤嘉伯、稲葉一寿、伊吹謙太郎、速水正憲、三浦智行：強毒 SHIV 感染サルの全身臓器におけるウイルス変異の解析、第 54 回日本ウイルス学会学術集会、2006 年 11 月 19 日～21 日、名古屋

(10) Fukazawa, Y., Miyake, A., Ibuki, K., Inaba, K., Saito, N., Motohara, M., Horiuchi, R., Himeno, A., Matsuda, K., Nakamura, M., Matsuyama, M., Hayami, M., Miura, T.：Even low pathogenic SHIV lead to decrease CD4+ T-cell of the small intestine significantly from early phase of infection. 24th annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, Oct. 4-7, 2006, Atlanta.

(11) Miura, T.：Virological and immunopathological analysis of systemic lymphoid tissues in SHIV-infected monkeys: Importance of small intestine as target organ of AIDS. The 7th Kumamoto AIDS Seminar, Sep. 21-22, 2006, Kumamoto.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

速水 正憲 (HAYAMI MASANORI)

平安女学院大学・生活福祉学部・客員教授

研究者番号：40072946

(2) 研究分担者

三浦 智行 (MIURA TOMOYUKI)

京都大学・ウイルス研究所・准教授

研究者番号：40202337

井戸 栄治(IDO EIJI) (2006-2007)

京都大学・ウイルス研究所・特別教育研究准教授

研究者番号：70183176

伊吹 謙太郎(IBUKI KENTAROU) (2006-2007)

京都大学・ウイルス研究所・助手

研究者番号：00273524

(3)連携研究者

井戸 栄治(IDO EIJI) (2008)

京都大学・ウイルス研究所・特別教育研究准教授

研究者番号：70183176

伊吹 謙太郎(IBUKI KENTAROU) (2008)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：00273524