

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月4日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21300152

研究課題名（和文）霊長類エイズモデル感染病態に関わるウイルスゲノム基盤に関する研究

研究課題名（英文）Basic study on viral genome related to pathogenesis of SHIV infection in non-human primate AIDS model

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：ウイルスの共受容体決定部位に相当する *env* の V3 領域に 5 箇所のアミノ酸置換を加えることにより、既存の CXCR4 指向性ウイルスである強病原性 SHIV-KS661 を CCR5 指向性に転換した。このウイルスをアカゲザル個体継代により順化し、中和抵抗性の CCR5 指向性 SHIV-MK38 を得た。このウイルスの *env* 領域を新規サル指向性 HIV-1mt に導入することにも成功した。よりよいエイズモデルの構築に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Highly pathogenic SHIV-KS661 was switched from CXCR4-tropic virus to CCR5-tropic by adding five amino acid substitutions to the *env*-V3 domain, which is the co-receptor determinant of the virus. The virus was adapted to rhesus monkey and neutralization-resistant CCR5-tropic SHIV-MK38 was obtained by in vivo passages. The *env* region of the virus was successfully introduced into new monkey tropic HIV-1mt. These results will contribute to establish a better AIDS model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2010年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2011年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
総計	13,200,000	3,960,000	17,160,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学

キーワード：感染症、エイズ、動物モデル、アカゲザル、HIV、SHIV

1. 研究開始当初の背景

急務とされるエイズ予防・治療法開発のためには、感染個体レベルで実験的に解析できる実験動物モデルが必須である。しかし、現在世界的に蔓延しているエイズの原因ウイル

スであるヒト免疫不全ウイルス1型(HIV-1)は、ヒトとチンパンジーにしか感染しないため、HIV-1 そのものを用いて感染動物実験を行うことは困難である。一方、HIV-1 に近縁なサル免疫不全ウイルス(SIV)がアカゲサル

に感染し、エイズ様症状を引き起こすことが知られている。SIV の発見に申請者らも少なからず貢献したが、これらの発見以来、サルを用いた研究の重要性が欧米で認識され、特に米国では8つの霊長類センターの強化、サルの供給体制や施設の改修、研究費の増大、研究者の投入等によりSIVを用いた研究が盛んに行われた。SIVのサル感染実験により、*nef* 遺伝子がエイズの病原性に重要であることや、それに基づく弱毒生ワクチンの可能性、エイズウイルスの主要な標的臓器は腸管であること等、エイズ研究において極めて重要な知見が明らかにされた。これらの研究では、ヒトでは不可能な経時的生検や殺処分による深部組織の詳細な解析が威力を発揮した。一方、SIVは遺伝的にHIV-1とは異なるウイルスであることから、SIVをベースにしたHIV-1遺伝子をもつSHIVの作製に我々は世界に先駆けて成功した。近年、このSHIVにおいて種々の病原性・非病原性株が得られ、更にそれらの分子クローンウイルスが得られていることから、HIV-1遺伝子の感染個体における病原性の実験病理学的解析が可能となった。実際に、このSHIVクローンを用いることにより、HIV-1の*env* 遺伝子により決定されるセカンドレセプター親和性(CCR5型やCXCR4型)によって感染個体における標的細胞や病態が異なることが明らかになった。国内では、SHIVのサル感染実験が可能なP3レベルのサル飼育施設を稼働させている研究機関は極めて限られており、厚生労働省関連施設として国立感染症研究所と医薬基盤研究所霊長類医科学研究センターがあるが、大学関係では当施設のみである。

2. 研究の目的

本研究では、種々のサル/ヒト免疫不全ウイルス(SHIV)分子クローンを作製し、それらと宿主細胞との相互作用を分子/細胞/個体の各レベルで統合的に解析することによって、病原性発現過程において重要な役割を果たすメカニズムをウイルスゲノム上の最小限の遺伝的差違に基づく宿主分子との分子間相互作用(素過程)として分離同定する。そして、感染個体レベルでの病態形成をこれら素過程の総合的結果としてSHIV分子クローンのゲノム上に再構築し、検証することにより、エイズ病態形成機構のウイルスゲノム基盤の解明と、より有効な霊長類エイズモデルの確立を期すものである。

3. 研究の方法

第一段階として既に得られているCXCR4型の強毒/弱毒SHIVの比較解析に加えて、よりHIV-1とヒトに近い病態を示すことが期待されるCCR5型のSHIVを以下の戦略により新規に作製する。CXCR4型強毒SHIVを、報告され

ているウイルスゲノム情報に基づいて*env*-V3領域の最小限のアミノ酸改変によりCCR5型に変える。この新規に作製したSHIVをサル由来培養細胞やサル個体を用いて順化させることによって強毒ウイルスを得る。そして、この強毒化の過程で起こったウイルスゲノム上の変異を明らかにし、それら変異の病原性における意義を分子/培養細胞/感染個体レベルでの統合的解析により、ウイルスゲノム上の最小限の遺伝的差違に基づく宿主分子との分子間相互作用(素過程)として同定する。このような情報の蓄積により、エイズの病原性の解明に資するとともに、エイズの予防・治療法開発に適したより有効なSHIV-アカゲザル感染モデル系の構築に繋げる。

4. 研究成果

(1) HIV-1は*env* 遺伝子により決定されるセカンドレセプターの指向性(CCR5やCXCR4)によって、その感染伝播や病態が大きく異なる。CCR5指向性ウイルスは、感染初期に検出されるウイルスであるためワクチン開発などに重要とされるが、サル動物モデルで扱われるSHIVにおいてCCR5指向性でありかつ中和抗体抵抗性を示すものは未だ少ない。そこで中和抗体抵抗性のCCR5指向性SHIVアカゲザルモデルを確立することを目的として以下の研究を進めた。ウイルスの共受容体決定部位に相当する*env*のV3領域に5箇所のアミノ酸置換を加え、既存のCXCR4指向性ウイルスであるSHIV-KS661をCCR5指向性のウイルスへ転換した。このウイルスはアカゲザル個体内で複製能を示し、*in vivo*での順化を繰り返したところ3代目のサルで高い血漿ウイルスRNA量の持続が確認され、これを分離しMK38と命名した。MK38はCCR5指向性を維持しており、V3領域には復帰変異は認められなかった。MK38は、KS661や順化前のMK-1と比べ感染サル血漿中の中和抗体に対して抵抗性を示した。またMK38は、継代前は感受性であった抗V3モノクローナル抗体KD-247に対しても、中和抵抗性を示した。*env*の遺伝子解析を行った結果、KD-247に対する中和エピトープは継代後も保存されており、V2領域で糖鎖修飾部位やチャージの変化を伴うアミノ酸変異が起きていた。中和抗体抵抗性を獲得した理由として、V2領域の変異による*env*の立体構造の変化やグリカンシールドによる抗体に対する立体遮蔽の可能性が示唆された。

(2) これまでに作製されたSHIVは分子クローン由来であるが、HIV-1は元来、多様性を保持した変異集団であり、このことがウイルスの適応度を高める要因の一つと考えられる。また、HIV-1の感染にはCD4の他にケモ

カイン受容体が必要であり、CCR5 を利用する R5 型ウイルスが、感染伝播と感染個体内での病態に重要なウイルスと考えられるが、既存の SHIV は CXCR4 を使用する X4 型ウイルスが多かった。一方、全ゲノムの 93% が HIV-1 で構成されサルに感染しうる HIV-1mt が足ららによって構築されたが、このウイルスは X4 型であり、サルにおける増殖能はまだ不十分である。そこで、サル個体内で馴化させることにより増殖能が向上し、遺伝的多様性を蓄積した R5 型 SHIV-MK38 の *env* 領域を HIV-1mt に組み込んだ新規ウイルス DT5R-MK38 を相同組換え法により作製した。遺伝子解析を行ったところ、DT5R-MK38 の組換えポイントは重複領域内に複数箇所存在し、SHIV-MK38 の多様性の一部を保持していた。独立に作製したウイルス間で MK38 の多様性の異なる系統を継承することがわかり、それらを混合することにより、元の MK38 の遺伝的多様性を再構築できるものと考えられた。このウイルスをアカゲザルの末梢血単核球 (PBMC) を用いて馴化を試みたところ、CD8 を除去したアカゲザル PBMC で安定して増殖するようになった。今後、サル個体で高増殖能を保持するウイルスが得られれば、エイズの病原性解明やワクチン、薬剤開発に貢献するものと期待される。

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 15 件)

- ① Fujita, Y., Otsuki, H., Watanabe, Y., Yasui, M., Kobayashi, T., Miura, T., and Igarashi, T.: Generation of a replication-competent chimeric simian-human immunodeficiency virus carrying *env* from subtype C clinical isolate through intracellular homologous recombination. *Virology*, 436: 100-111, 2013. 査読有
[10.1016/j.virol.2012.10.036](https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.10.036)
- ② Iwami, S., Holder, B. P., Beauchemin, C. A. A., Morita, S., Tada, T., Sato, K., Igarashi, T., and Miura, T.: Quantification system for the viral dynamics of a highly pathogenic simian/human immunodeficiency virus based on an in vitro experiment and a mathematical model. *Retrovirology*, 9: 18, 2012. 査読有
[10.1186/1742-4690-9-18](https://doi.org/10.1186/1742-4690-9-18)
- ③ Himeno, A., Akagi, T., Uto, T., Wang, X., Baba, M., Ibuki, K., Matsuyama, M., Horiike, M., Igarashi, T., Miura, T., and Akashi, M.: Evaluation of the immune response and protective effects of rhesus macaques vaccinated with biodegradable nanoparticles carrying gp120 of human immunodeficiency virus. *Vaccine*, 28: 5377-5385, 2010. 査読有
[10.1016/j.vaccine.2010.04.110](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.04.110)
- ④ Matsuda, K., Inaba, K., Fukazawa, Y., Matsuyama, M., Ibuki, K., Horiike, M., Saito, N., Hayami, M., Igarashi, T., and Miura, T.: In vivo analysis of a new R5 tropic SHIV generated from the highly pathogenic SHIV-KS661, a derivative of SHIV-89.6. *Virology*, 399: 134-143, 2010. 査読有
[10.1016/j.virol.2010.01.008](https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.01.008)
- ⑤ Inaba, K., Fukazawa, Y., Matsuda, K., Himeno, A., Matsuyama, M., Ibuki, K., Miura, Y., Koyanagi, Y., Nakajima, A., Blumberg, R. S., Takahashi, H., Hayami, M., Igarashi, T., and Miura, T.: Small intestine CD4⁺ cell reduction and enteropathy in SHIV-KS661-infected rhesus macaques in presence of low viral load. *J. Gen. Virol.*, 91: 773-781, 2010. 査読有
[10.1099/vir.0.017368-0](https://doi.org/10.1099/vir.0.017368-0)

[学会発表] (計 43 件)

- ① 米田舞、大附寛幸、一瀬裕太郎、松田健太、松下修三、五十嵐樹彦、三浦智行: 新規 CCR5 指向性 SHIV のサルへの馴化と中和抵抗性の解析 第 155 回日本獣医学会、東京、2013 年 3 月 28-30 日
- ② 大附寛幸、一瀬裕太郎、小林剛、五十嵐樹彦、三浦智行: 細胞内相同組換えを利用した CCR5 指向性サブタイプ C HIV-1 由来 *env* を持つサル指向性 HIV-1 の作出 第 26 回日本エイズ学会、神奈川、2012 年 11 月 24-26 日
- ③ 岩見真吾、Rob de Boer、三浦智行、西村佳哲、五十嵐樹彦: SHIV 感染アカゲザルにおいて病原性を決定づけるウイルス感染動態の探索—数理モデルによるデータ解析の視点から— 第 26 回日本エイズ学会、神奈川、2012 年 11 月 24-26 日
- ④ 米田舞、一瀬裕太郎、大附寛幸、松田健太、松下修三、五十嵐樹彦、三浦智行: サルに馴化した CCR5 指向性 SHIV-MK38 の中和抗体に対する抵抗性 第 60 回日本ウイルス学会、大阪、2012 年 11 月 13-15 日
- ⑤ 大附寛幸、一瀬裕太郎、小林剛、原田恵嘉、吉村和久、鳴海哲夫、玉村啓和、松下修三、五十嵐樹彦、三浦智行: 中和感受性を増強する薬剤による抗 HIV-1 治療戦略に向けた新規 SHIV/アカゲザル評価

モデルの開発 第 60 回日本ウイルス学会、大阪、2012 年 11 月 13-15 日

- ⑥ 岩見真吾、de Boer Rob、五十嵐樹彦、三浦智行：培養細胞実験と数理モデルによるウイルス感染動態の定量化ーウイルス病原性の解明への応用ー 第 60 回日本ウイルス学会、大阪、2012 年 11 月 13-15 日
- ⑦ 三浦智行、大附寛幸、米田舞、一瀬裕太郎、小林剛、五十嵐樹彦：霊長類エイズモデル感染病態に関わるウイルスゲノム基盤に関する研究 第 154 回日本獣医学会、岩手、2012 年 9 月 14-16 日
- ⑧ 大附寛幸、三浦智行、小林剛、吉村和久、玉村啓和、松下修三、五十嵐樹彦：中和抵抗性のサル/ヒト免疫不全ウイルスの作製と in vitro における立体構造変化誘導剤による中和感受性増強効果の評価 第 25 回日本エイズ学会学術集会、東京、2011 年 11 月 30 日-12 月 2 日
- ⑨ 藤田泰久、大附寛幸、小林剛、三浦智行、五十嵐樹彦：新規組換え技術による CCR5 指向性 clade C HIV-1 株の env 領域を持った SHIV の作製、第 24 回日本エイズ学会学術集会、2010 年 11 月 24-26 日、東京
- ⑩ 中村仁美、大附寛幸、松田健太、小林剛、五十嵐樹彦、三浦智行：相同組換えによって作製した新規サル指向性ヒト免疫不全ウイルスの遺伝子解析、第 24 回日本エイズ学会学術集会、2010 年 11 月 24-26 日、東京
- ⑪ 三浦智行：霊長類エイズモデル研究の展開、第 6 回霊長類医科学フォーラム、2010 年 11 月 18 日、つくば
- ⑫ 大附寛幸、藤田泰久、小林剛、三浦智行、五十嵐樹彦：新規組換え技術による R5 指向性 clade C env を持つサル指向性 HIV-1 の創出、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010 年 11 月 7 日-9 日、徳島
- ⑬ 中村仁美、五十嵐樹彦、三浦智行：相同組換えによって作製した新規サル/ヒト免疫不全ウイルスの遺伝子解析、第 149 回日本獣医学会学術集会、2010 年 3 月 26-28 日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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