

第22回日本エイズ学会シンポジウム記録

シンポジウム4:「ヒトはなぜエイズになるのか」

Basis for AIDS Pathogenesis

オーガナイザー：足立昭夫（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部），
 俣野哲朗（東京大学医科学研究所感染症国際研究センター）

座長：足立昭夫，俣野哲朗
 Akio ADACHI, Tetsuo MATANO

シンポジスト：中山英美（大阪大学微生物病研究所）
 野間口雅子（徳島大学大学院）
 五十嵐樹彦（京都大学ウイルス研究所）
 上野貴将（熊本大学エイズ学研究センター）

シンポジウムの趣旨と概要：

本シンポジウムは、エイズ基礎研究の究極の目標である「エイズ発症機構の理解」を目指し、HIV学の現状と今後の課題・展望とを捉え直すことを目的として企画した。様々な意見があったが、学会長の強いご要望もあり敢てこの大きなタイトルを選択した。シンポジストには、基礎HIV学の領域でユニークかつ先端的な研究を展開する気鋭の若手・中堅研究者を選んだ。いずれの研究者もHIVに関する最重要課題を具体的な研究プロジェクトに設定し、様々な現代ウイルス学的アプローチで果敢にウイルス病原性研究を実践している。

近年、HIVの自然宿主細胞に存在する種々の抗ウイルス分子・因子が明らかにされ、それを契機としてHIVの基礎ウイルス学は格段に進展した。HIVはこれらの抗ウイルス細胞因子の働きを抑制・制御する武器を持っており、それらにより着実に増殖して感染個体内に存続し、最終的に、エイズを発症させる。シンポジストは、それぞれ、抗HIV-1細胞因子TRIM5 α とウイルス側相互作用領域、HIV-1のサル細胞内での変異・進化・適応機構、マクロファージ指向性SHIVのウイルス学的意義およびCTL免疫淘汰圧とNef機能について講演した。

HIV/AIDSの基礎研究は、現在も広範かつ急速に進展している。講演内容には今後解明・解決されなければならない多くの課題も含まれていたが、本シンポジウムにより、単なる分子生物学に留まらない基礎研究にチャレンジする

著者連絡先：足立昭夫（〒770-8503 徳島市蔵本町3-18-15
 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部微生物病原学分野）

2009年4月19日受付

ことの重要性、また、それによる知的インパクトの大きさも理解いただけたと思う。

HIV 感染阻害因子 TRIM5 α HIV restriction factor, TRIM5 α

大阪大学微生物病研究所ウイルス感染制御分野
 中山英美

Emi NAKAYAMA

HIV-1は宿主域が非常に狭く、ヒト以外に感染するのはチンパンジーのみであり、実験動物として使われるアカゲザルやカニクイザルには感染しない。そのため動物実験モデルとして現在、サル免疫不全ウイルスSIVmac、またはHIV-1とSIVmacのキメラウイルスSHIVをアカゲザルに接種する系が主に使われている。

2006年にKamadaらが発表したNL-ScaVRは、近年明らかになったサル細胞が持つ抗HIV因子に対抗するために必要な配列のみを、HIV-1のものからSIVmacのものに入れ替えた、限りなくHIV-1に近いSHIVであった。具体的には、apoB mRNA editing catalytic sub unit (APOBEC) 3Gに対抗するためにVifを、cyclophilin A (CypA)に対抗するためにカプシドのN末端から数えて4番目と5番目の α -ヘリックスの間のループ(L4/5)をSIVmac由来の配列に置換してある。

APOBEC3G, CypA以外にサルの持つHIV感染阻害因子としてTRIM5 α が知られている。TRIM5 α はアカゲザルのcDNAライブラリーからHIV-1の感染を抑制する因子として同定された。アカゲザルTRIM5 α はHIV-1の感染を阻害することができるが、ヒトのTRIM5 α はHIV-1の感染を弱くしか阻害することができない。その種特異性

は α アイソフォームに特異的な SPRY 領域の配列によって決まることが明らかとなっている。ウイルス側の相互作用領域は CypA のそれと重なり L4/5 であるとの報告があったため、NL-ScaVR は CypA を回避すると同時にサル TRIM5 α による感染抑制をも回避していると想定されていた。

しかし、われわれは TRIM5 α の研究をすすめるうちに、L4/5 以外にも TRIM5 α との相互作用に重要な領域があることに気づいた。なぜなら、ヒト免疫不全ウイルス 2 型 (HIV-2) に対するカニクイサル TRIM5 α の感染抑制効果を調べていたところ、カニクイザル TRIM5 α によって感染が抑制される株と、抑制されない株があり、感染が抑制

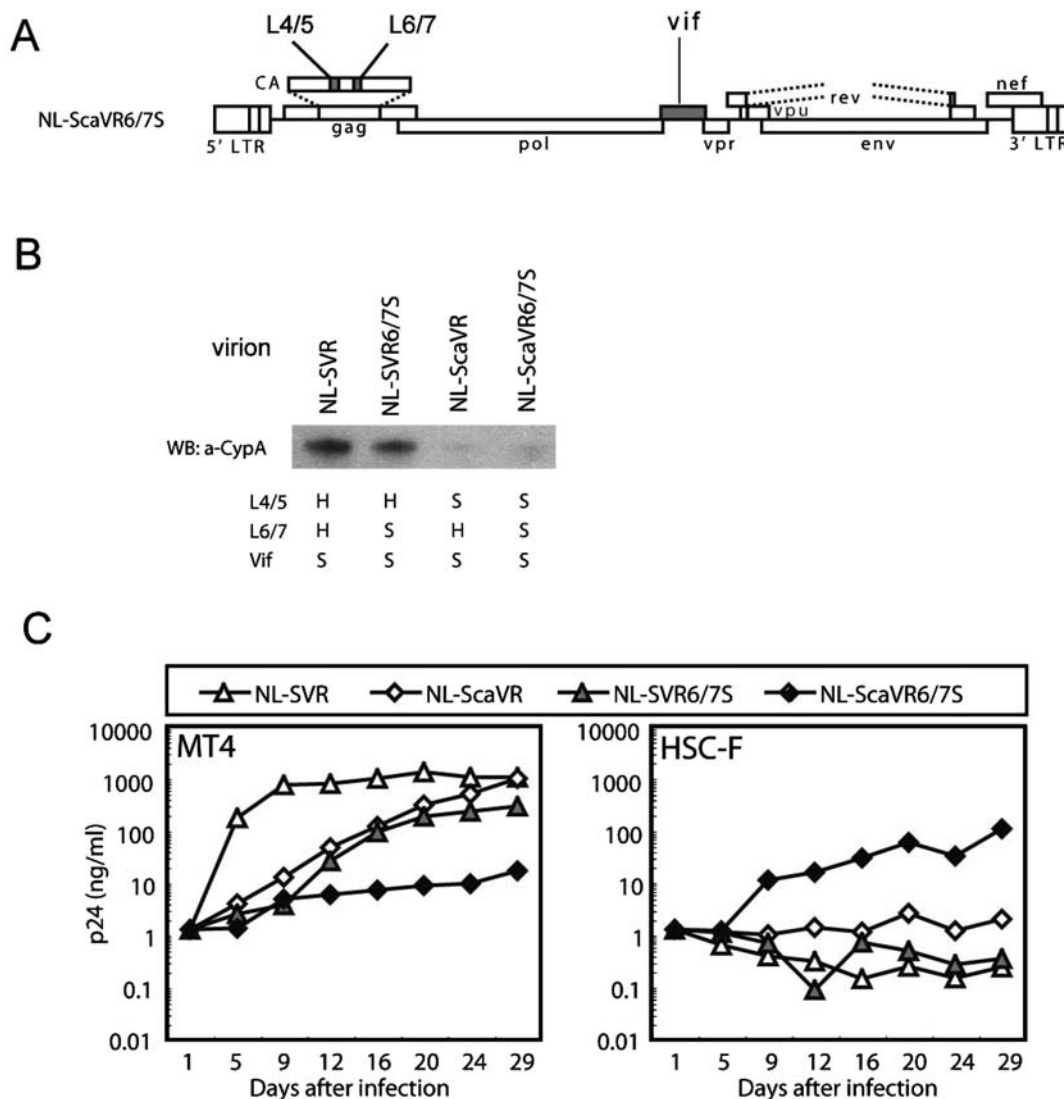


図 1 (A) NL-ScaVR6/7S ウイルスのゲノム構造。白は HIV-1 由来、黒は SIVmac 由来の配列を示す。L4/5 はカプシド N 末端から数えて 4 番目と 5 番目の α ヘリックスの間のループ、L6/7 は 6 番目と 7 番目の間のループを指す。(B) ウイルス粒子中に取り込まれたサイクロフィリン A (CypA)。H は HIV-1 由来、S は SIVmac 由来配列を持つことを示す。L4/5 が HIV-1 由来である NL-SVR および NL-SVR6/7S と CypA は結合するのに対して、L4/5 が SIVmac 由来である NL-ScaVR および NL-ScaVR6/7S には CypA が結合できないことがわかる。(C) ヒト MT4 細胞とカニクイザル HSC-F 細胞でのキメラウイルスの増殖曲線。Vif のみ SIVmac 由来の NL-SVR (Δ) は HSC-F 細胞では全く増殖できないが、SIVmac Vif に加えて SIVmac 由来 L4/5 を持つ NL-ScaVR (\diamond) は HSC-F 細胞で若干増殖できる。L6/7 も SIVmac 由来のものに置換した NL-ScaVR6/7S (\blacklozenge) は更に増殖が良くなった。しかし L4/5 を HIV-1 由来に戻した NL-SVR6/7S (\blacktriangle) は HSC-F 細胞での増殖能を失ってしまった。

される株はカプシドの 120 番目 (株によっては 119 番目) のアミノ酸がプロリン, 感染が抑制されない株はグルタミンあるいはアラニンであったからである。120 番目のアミノ酸はカプシド蛋白質の 6 番目と 7 番目の α ヘリックスの間のループ (L6/7) 中にある。

そこで, われわれは NL-ScaVR の L6/7 を SIVmac 由来のものに置換したウイルス NL-ScaVR6/7S を作成した (図 1A)。このウイルスはカニクイザルの T 細胞株 (図 1C 右) および初代培養 CD4 陽性細胞で, NL-ScaVR よりも良く増殖するようになった。また, Env に変異を持ち更にサル細胞に適応した NL-DT5R に対しても, L6/7 の置換は有効であった。SHIV を継代してサル細胞適応ウイルスを分離する試みはなされているが, これまでに L6/7 に変異が入った報告はない。L6/7 の置換はウイルスの増殖力には負に働く (図 1C 左) ため自然には変異が選択されないと考えられる。

一方, L6/7 のみが SIVmac 由来で L4/5 は HIV-1 のままのウイルスはカニクイザル T 細胞株で増殖することができなかった。この結果は, サル CypA が感染抑制効果を発揮したためだと考えて全く矛盾はない。しかし, それに加えて TRIM5 α が L4/5 および L6/7 の両者を含む領域全体の構造を認識する可能性も考えられたため以下の実験を行った。感染抑制因子としての TRIM5 α は多量のコアをあらかじめ細胞内に導入すると飽和することができる。飽和能力が高いウイルスのコアは TRIM5 α との結合が強く, 飽和能力が低いウイルスのコアは TRIM5 α との結合が弱いと解釈できる。L4/5 のみ, L6/7 のみ, L4/5 と L6/7 の両者を SIVmac のものと置換したウイルスを予め感染させた上で, CypA 単独による感染抑制を受けないように L4/5 を SIVmac に置換した GFP 発現 HIV-1 ベクターを感染させ, GFP 陽性細胞数を測定した。すると, L4/5 と L6/7 の両者を SIVmac に置換したものの飽和効果が最も低いことが明らかとなり, TRIM5 α が L4/5 および L6/7 の両者を含む領域全体の構造を認識していることが示唆された。HIV-1 の L4/5 には CypA が結合できるが, CypA を介して TRIM5 α が認識しているのか, それとも L4/5 を直接認識しているのか, 明らかにする必要がある。

(本研究は阪大微研ウイルス感染制御分野と徳島大学足立教授, 基盤研筑波霊長類センター明里博士のグループとの共同研究である。)

HIV-1 の病原性 : 細胞から個体へ

Adaptation and evolution of HIV-1 in simian cells

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部

微生物病原学分野

野間口雅子

Masako NOMAGUCHI

HIV-1 は宿主域が狭く, 実験用小動物はもちろん, 実験用霊長類にも感染することができない。このため, HIV-1/エイズ発症サルモデルが存在せず, HIV-1 病原性発現機構の解明や新規抗エイズ薬・ワクチンの開発などが妨げられている。従って, サル細胞およびサル個体に効率よく感染してエイズを発症する HIV-1 の構築は広範な基礎および臨床研究に大きく貢献すると期待される。我々の研究室では長年この課題に取り組んでおり, 2006 年に世界に先駆け, サル指向性 HIV-1 クローンである NL-DT5R (5R) を構築した (PNAS 103 : 16959, 2006)。5R はサル細胞に感染・増殖するが, サル個体で病原性を示さなかった (J. Virol. 81 : 11549, 2007)。我々は, サル病原性 HIV-1 分子クローン構築のためには, サル細胞での増殖効率をサル病原性標準株 SIVmac239 と同程度にまで向上させる必要があると考えた。まず, 5R Env の遺伝子工学的改変により, X4 ウイルスである 5R から R5 ウイルスの 5R5-1 を得た。5R の Gag および Vif の改変も行ったが, いずれも 5R よりも増殖効率が低下した。そこで, 遺伝子工学に依らず, サル細胞 (カニクイザルリンパ球由来 HSC-F) での馴化を試みた。5R および 5R5-1 を感染させた HSC-F の長期培養により, サル細胞での増殖効率が著しく増強した馴化型ウイルスが出現した。これから分子クローンを構築し, MN4 (馴化型 5R 由来) および MN5 (馴化型 5R5-1 由来) と名付けた。MN4 にも MN5 にもゲノム全長にわたって数箇所の一塩基置換が認められた。これらの変異を一つずつ 5R や 5R5-1 に導入し, HSC-F での増殖特性を比較した。その結果, サル細胞での増殖促進に寄与する変異はエンベロープ (Env) の C4 領域 (MN4) と V3 領域 (MN5), およびインテグラーゼ (IN) C 末端領域の 1 アミノ酸変異であることが分かった。2 種類のウイルスクローンを別々に馴化したにも関わらず, IN と Env に共通してサル細胞での増殖を促進する変異が認められたことは, これらの領域がサル細胞での HIV-1 の増殖に重要であることを示している。以上のことから, サル細胞で効率よく増殖する HIV-1 の構築にあたっては, 1) HIV-1 のシクロフィリン A 結合領域と Vif とを SIVmac239 の対応領域に置換すること (5R 構築において必須), かつ, 2) サル細胞での馴化による変異, が必要であることが示された (図 2 参照)。加えて, ヘリックス

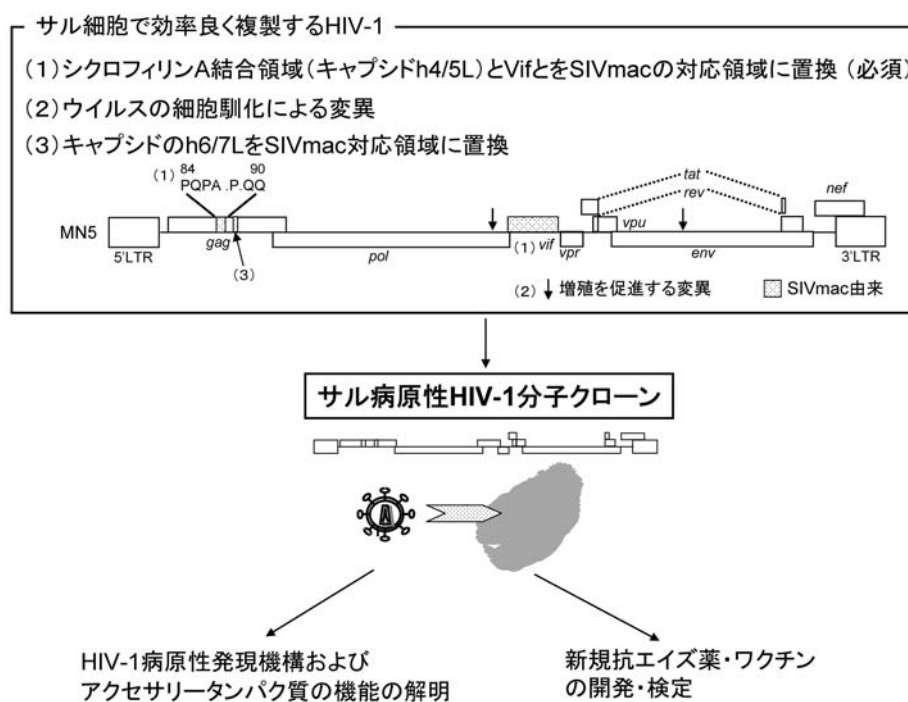


図 2

6番目と7番目のループ(h6/7L)のSIVmac239対応領域(h6/7LS)への置換も、サル細胞での増殖を促進することが明らかになってきた(図2参照; 阪大微研, 塩田達雄博士, 中山英美博士らとの共同研究)。MN4やMN5へのh6/7LS導入(MN4S, およびMN5S)による増殖効率増強は、サルPBMCにおいて顕著であった。今後は、MN4SおよびMN5Sを用いて、サル個体感染実験を行う予定である。

一方、サル種によりウイルス感受性は異なり、アカゲザルはカニクイザルよりもHIV-1複製抑制能が高い。HSC-Fでは効率よく増殖するMN4やMN5でも、アカゲザルリンパ球由来HSR5.4細胞での増殖効率は低いままであり、MN4SやMN5Sでは増殖効率が改善される。そこで、MN4SとMN5Sを用いてHSR5.4での馴化を試みることにした。HSR5.4で効率よく増殖するクローンが得られれば、このクローンとMN4SやMN5Sとのシーケンスを比較することにより、複製抑制回避に関わるHIV-1側の領域と、この領域と相互作用する宿主側の複製抑制因子を明らかにすることができると考えたからである。MN4SおよびMN5S感染HSR5.4で出現した馴化型ウイルスの分子クローニングにより、増殖効率の増加したクローン(MN5Rh-1)を得た。シーケンスの結果、MN5Rh-1には興味深い領域に3箇所のアミノ酸変異が認められ、機能・構造解析を進めている。

これらの戦略により得られたサル病原性HIV-1分子ク

ローンによる感染サルモデルの確立は、HIV-1病原性発現におけるアクセサリ蛋白質の本質的な役割の解明や、新規抗エイズ薬・ワクチンの開発・評価を進展させる。さらに、臨床研究への展開を視野に入れ、臨床分離株由来のシーケンスを導入したクローンも作製する予定である。我々は、馴化により得られたデータから、ウイルスの変異・進化に大変興味を持っており、今後、HIV-1側の変異に焦点を当て、病原性発現との関連や種間差・個体差の解析を行っていきたいと考えている。

サルモデルを用いたHIV-1病原性の研究： マクロファージ指向性ウイルスの意義 Significance of macrophage tropic virus in AIDS pathogenesis

京都大学ウイルス研究所 霊長類モデル研究領域
五十嵐樹彦

Tatsuhiko IGARASHI

エイズの病原ウイルスであるHIV-1は宿主域が狭く、ヒト以外にはチンパンジーだけが感染する、しかもチンパンジーは感染するが発症しない事が知られていた。HIV-1も他のウイルス感染症と同様、病原性の解明や予防・治療法の確立のためには動物モデル系を用いた研究が必要である。そこでチンパンジーに代わるより実際のエイズの動

高病原性 SHIV DH12R 感染におけるマクロファージ相およびマクロファージ指向性ウイルス

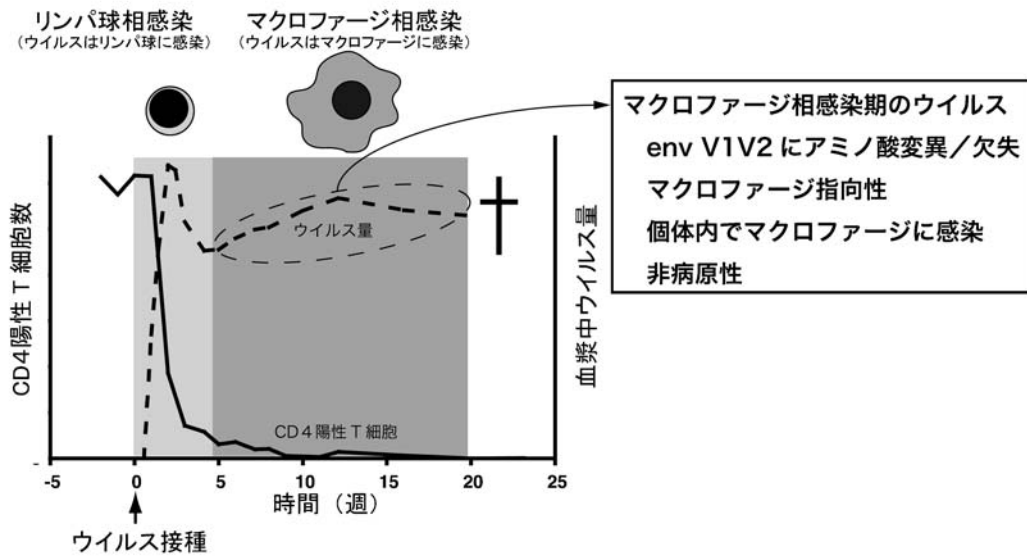


図 3

物モデルとして、スキッドマウスのように宿主を HIV-1 感受性にする方向、HIV-1 に近縁の SIV を代替ウイルスとしてサルに接種する方向が模索され、それぞれ優れたモデル系に発展した。もう一つの方向として HIV-1 の宿主域を拡大し、サルに感染してエイズを発症させる HIV-1 の複製を目標として SIV に env を含む HIV-1 由来の遺伝子を導入した SHIV が 1991 年に作製された。第一世代の SHIV はサルに持続感染し、中和抗体やウイルス特異的細胞を誘導したが、サルに病原性がなかった。これら非病原性 SHIV を動物経代する事により、末梢血 CD4 陽性 T 細胞を非可逆的に著減させ、エイズ様の病態を起こす高病原性 SHIV が 1996 年に作出された。筆者の作出した SHIV DH12R 株も他の高病原性 SHIV と同様の病態を感染サルに起こしたので、全身でのウイルス複製および CD4 陽性細胞の動態を解析した (図 3)。その結果、ウイルスは接種後 2-3 週間で末梢血中だけでなく胸腺、脾臓およびリンパ節を含む全身のリンパ系組織において同時に CD4 陽性 T 細胞を非可逆的に著減させる事、この時ウイルスは T 細胞で複製する事が *in situ* ウイルス RNA ハイブリダイゼーションと CD3 分子の複合組織科学染色により明らかになった。急性感染期に CD4 陽性 T 細胞が無くなった後、サルがエイズ様の臨床状態を呈して安楽死せねばなくなる迄の間、高い血中ウイルス負荷が維持される。この時期における組織化学的検索では、主要なウイルス RNA 陽性細胞はリンパ球ではなく、組織中のマクロファージであった (マクロファージ相感染)。即ち、感染の前期と後期では主要なウイルス産

生細胞が交代していた。ウイルスの細胞指向性が変わった可能性が考えられたため、元の SHIV DH12R 株、5 頭の感染サルにおける急性感染期およびマクロファージ相感染期のウイルスの env 領域の塩基配列を検索した。その結果、元の SHIV DH12R 株は遺伝的多様性の大きな swarm である事、急性感染期にはそのうちの特定の遺伝子型が優勢になる均質化がおこる事、更にマクロファージ相感染期には V1V2 領域中の特異的なアミノ酸の置換および欠失が見られた。V2 領域に特徴的に見られた変異を元の SHIV DH12R の分子クローンに導入したところ、初代サル肺胞マクロファージにおける複製能を獲得した。この結果から DH12 env において V1V2 領域がマクロファージ指向性を決定する部位となる事が明らかとなった。マクロファージ相感染は高病原性 SHIV 感染の末期であり、その時に分離されてくるウイルスは細胞指向性を拡大していたので、マクロファージ指向性ウイルスは元のウイルスと比べて病原性が更に高くなっている事が予想された。そこでマクロファージ相感染期に分離された 6 株のウイルスを 1 株につき 2 頭ずつのサルに新たに接種したが、6 株中 5 株は高病原性 SHIV の典型的病態を示さず弱毒化していた。また、残る 1 株は元の SHIV DH12R と違わない典型的な高病原性 SHIV の病態を呈した。即ち、いずれの株も古典的な有蹄類のレンチウイルスで見られるようなマクロファージ指向性と関連した病態を示す事はなかった。しかし、これらマクロファージ指向性 SHIV は T 細胞指向性の SIVmac239 と比較して個体レベルの感染で、より多くの肺胞マクロファージに感染

している事が認められた。

ウイルスのマクロファージ指向性獲得は第一義的な標的細胞 (CD4 陽性 T 細胞) の枯渇による代替標的細胞への適応の結果であり、病原性と関係ない事が分かった。これらの結果はあくまで SHIV/マカクサルエイズモデルで得られたものだが、ここからマクロファージ指向性の HIV-1 病原性への貢献について考察すると以下のような事が考えられる。

1. エイズはやはりメモリー CD4 陽性細胞が漸減してゆくメモリー細胞病である。
2. マクロファージ指向性ウイルスは HIV-1 感染を通して感染者の体内に常に存在しているが、感染末期では出現頻度が増す事が知られている。
3. マクロファージ指向性ウイルスは本質的に弱毒ウイルスであるが、宿主の免疫系が衰えると「危険な」ウイルスとなる。
4. マクロファージ指向性ウイルスは無症候期にはウイルスリザーバーを形成し間断なく子孫ウイルスを放出する事で徐々に免疫系を切り崩し、宿主を免疫不全に追い込んでゆく。

CTL 免疫淘汰圧と Nef 病原性機能

CTL-mediated selective pressure and Nef's pathogenic function

熊本大学エイズ学研究センターウイルス制御分野

上野貴将

Takamasa UENO

(1) はじめに

HIV-1 は、常に免疫系の淘汰圧にさらされているが、排除されるには至らず、慢性的に増殖して病態を進行させる。我々は、HIV-1 の病原性因子である Nef に着目して、HIV-1 感染者体内で、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) による免疫淘汰圧に対して Nef 機能がどのように移り変わるか解析した。

(2) 宿主 HLA アリルに関連した HIV 遺伝子変異の検索

CTL 応答は HLA クラス I によって拘束されるため、CTL によって選択される変異は、宿主の HLA-I アリルに依存すると予想される。Nef 中央領域の免疫原性の高い領域 (75 から 85 番目のアミノ酸) を、データベースで検索すると、70% 以上は RPQVPLRPMTY という配列 (以降、野生型配列と呼ぶ) を持つが、75 番が R から T、あるいは 85 番が Y から F となった変異体がそれぞれ約 5% ずつ存在する (図 4A)。60 人以上の日本人 HIV 感染者から分離した HIV の配列を調べたところ、HLA-B35 を持たない患者群では、データベースの場合とほぼ同様の変異分布を示し

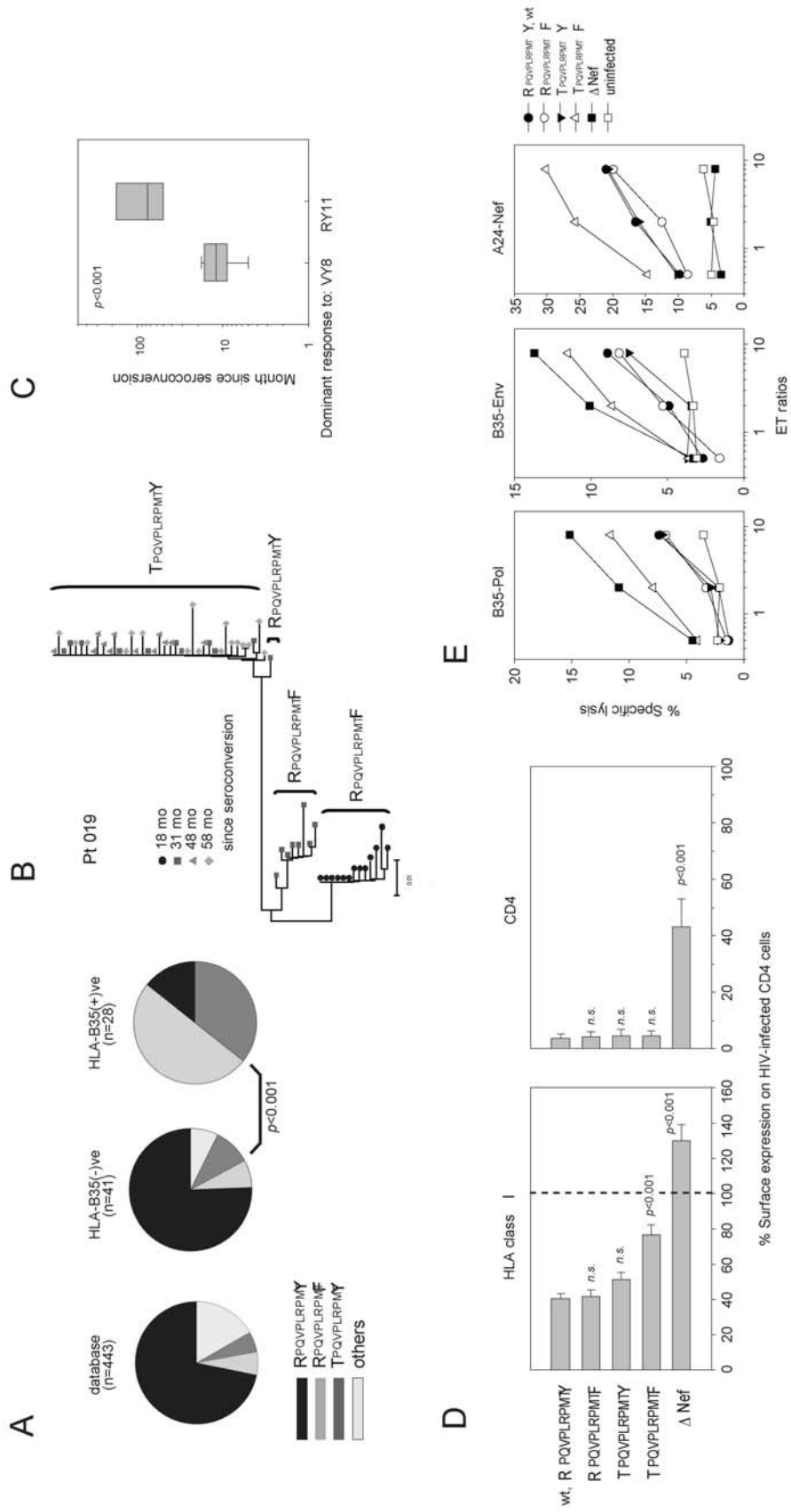
た (図 4A)。一方、HLA-B35 を持つ患者群では著しく異なった変異分布を示し、R75T あるいは Y85F 変異がほぼ半数ずつであった (図 4A)。興味深いことに、両方の変異を同時に持つ変異型ウイルスは非常に稀で、データベース上でたった 1 個のみであった。HLA-B35 陽性者のうち、野生型あるいは R75T、Y85F 変異を持つ群の特徴を調べたところ、R75T 変異は慢性感染者で、Y85F 変異は急性期の感染者で有意に多く選択されていた (データ未掲載)。しかしながら、こうして見出された変異パターンが感染者群の違いという横断的解析結果を表すものなのか、あるいは個々の経時変化に起因する結果を反映しているか不明である。そこで、一人の感染者から長期に渡って経時的に採取した検体を用いて、HIV 遺伝子の系統樹解析を行ったところ、R75T 変異は、Y85F 変異体とは別の系統にある変異群から新たに選択されたことが明らかとなった (図 4B)。このことは、CTL の選択圧が経時的に変化することを示唆するばかりでなく、淘汰圧に応じて HIV 感染者内に蓄積された非常に多くの HIV 変異型プールから新しい環境に適した変異株が新たに選択されて増殖すると考えられた。

(3) CTL 応答の解析

HLA-B35 陽性の HIV 感染者検体を用いて CTL 応答の解析を行ったところ、互いに相重なる 2 つの抗原ペプチド {VY8 (VPLRPMTY) と RY11 (RPQVPLRPMTY)} に特異的な CTL 応答が、HIV 感染者で強く誘導されていることがわかった (データ未掲載)。興味深いことに、VY8 特異的 CTL は急性感染期の感染者で多く見られるが、逆に RY11 特異的 CTL は慢性期に認められた (図 4C)。また、変異ペプチドや変異型 HIV を用いて CTL の抗原認識を解析したところ、Y85F 変異と R75T 変異は、それぞれ VY8 および RY11 特異的 CTL から逃避する変異と分かった (データ未掲載)。

(4) CTL によって選択された変異が Nef の機能に与える影響

Y85F 変異と R75T 変異は、PxxP と呼ばれる Nef の機能性領域に位置していることから、両変異が Nef の機能に与える影響を解析した。野生型および変異型 HIV 分子クローンを作成し、HIV 陰性ボランティアから調製した CD4 陽性 T 細胞に感染させた。その後、表面抗原 (CD4 と MHC クラス I 分子) と細胞内 p24 Ag を染色し、フローサイトメトリーで解析した。同様の実験を 4 人の HIV 陰性ボランティア検体を用いて測定し、その結果を統計学的に評価したところ (図 4D)、両変異を持つ Nef は明らかに MHC-I 発現低下能力が低くなっていた (つまり HIV 感染細胞上の MHC-I が多い)。一方、CD4 発現低下能力にはどの変異体でも差が認められなかった。このことは、CD4 発現低下に関わる責任領域は PxxP ではなく、Nef の C 末端側にあ



4

るというこれまでの報告とよく一致していた。

次に Nef 変異体による MHC-I 発現低下作用の差が、実際に HIV 感染細胞に対する CTL の認識および細胞殺傷作用として反映されるか検討した。変異ウイルスは、Nef の PxxP 領域にのみ変異を持つため、Pol や Env あるいは Nef の他の領域のアミノ酸配列は同一である。そこで Pol や Env あるいは拘束性の異なる Nef 特異的 CTL をエフェクターとして、HIV 感染細胞に対する殺傷力を測定した (図 4E)。その結果、Nef に Y85F 変異と R75T 変異を持つウイルスに感染した細胞は Pol や Env 特異的 CTL にかえて殺されやすいことが分かった。したがって、この変異体は、生体内では CTL の選択圧に対して不利に働き、淘汰されてしまうと考えられた。

(5) まとめ

HIV に対する CTL 応答がこれまで考えられてきた以上にダイナミックで、HIV 感染症の進行とともに日々変化するものであることが明らかとなった。同一個体内においても HIV の進化と複製能、CTL の抗原特異性と抗ウイルス活性はすべて互いに影響しあいながらダイナミックに推移することが分かった。Nef に対する CTL 応答が HIV に強い選択圧として働くことから、免疫応答によって Nef の機能を抑制することは、新たな HIV 感染制御法となるかもしれない。

エイズ学会シンポジウムでの発表ならびに本稿執筆の機会を下さいました、足立先生、俣野先生に感謝いたします。