

## 第13回日本エイズ学会 ECC 山口メモリアルエイズ研究奨励賞受賞研究

## ヒト化マウスモデルを用いた HIV-1 タンパク質の機能解明

Investigation of the Roles of HIV-1-Encoding  
Proteins Using Humanized Mouse Model

佐藤 佳

Kei SATO

京都大学ウイルス研究所ウイルス病態研究領域

Laboratory of Viral Pathogenesis, Institute for Virus Research, Kyoto University

日本エイズ学会誌 15: 96-101, 2013

## はじめに

筆者はこれまで、「HIV-1 感染病態に関与するウイルスタンパク質と宿主タンパク質の機能解明」をテーマの軸に研究を進めてきた。生体内における HIV-1 感染動態を再現するために、HIV-1 の生体内増殖と CD4T 細胞減少という病態を再現する、ヒト造血幹細胞移植マウス（ヒト化マウス）を作成した。そして、種々の HIV-1 アクセサリータンパク質（Vif, Vpu, Vpr）を欠損させたウイルスをヒト化マウスへ接種し、生体内 HIV-1 増殖過程において、それぞれのウイルスタンパク質がどのような細胞のどのような標的分子に働いているか、その分子作用機序のいくつかを明らかにしてきた。本稿では、これまでの研究から明らかとなった、ウイルス-宿主相互作用と病原性発現プロセスの関連について概説するとともに、このモデルシステムを用いてこれから展開する研究計画の概要についても紹介する。

## これまでの研究

## 1. HIV-1 感染ヒト化マウスモデルの作製

後天性免疫不全症候群（エイズ）の原因ウイルスである HIV-1 は、ヒト特異的に感染し、CD4T 細胞の顕減により免疫不全を誘導するレトロウイルスである。抗 HIV 薬の開発と多剤併用療法の導入により、HIV-1 感染症に対する治療成績は格段に改善した。しかしながら、HIV-1 を生体から排除するための根治療法はいまだに確立されていない。その一因として、HIV-1 の宿主域がヒトに限られており、HIV-1 の感染病態を再現できる動物モデルが存在しなかったことがあげられる。

HIV-1 感染病態を再現できる新たな動物モデルを作製・確立するために、重度免疫不全マウスである NOD/SCID/*Il2rg*<sup>-/-</sup> マウス（NOG マウス；実験動物中央研究所により作製<sup>1)</sup>）にヒト CD34 陽性造血幹細胞を移植し、ヒト造血能を1年以上維持できる“ヒト化マウス”を作成した（図1）。ヒト化マウスは HIV-1 増殖を30週以上維持し、血中 CD4T 細胞の漸進的減少に代表される HIV-1 の感染病態を再現した。さらに、生体内 HIV-1 産生細胞を flow cytometry 法によって検出する実験系を確立し、生体内における主要な HIV-1 産生細胞が<sup>2)</sup> effector memory CD4T 細胞であることを、世界に先駆けて同定した<sup>2-4)</sup>。

## 2. 生体内 HIV-1 増殖過程におけるウイルス因子の機能解析

## 2-1. ウイルス因子と宿主因子

ヒト細胞は、HIV-1 ゲノムに G → A 変異を導入し感染性を失効させる APOBEC3G/F<sup>5-7)</sup>、HIV-1 粒子放出を抑制する BST2/tetherin<sup>8,9)</sup> という、HIV-1 増殖抑制能を持つタンパク質（“宿主因子”）を内在的にコードしている。一方、HIV-1 は、構造・機能タンパク質に加え、Vif, Vpu, Vpr, Nef という4つのアクセサリータンパク質（“ウイルス因子”）をコードしている。これまでの研究から、Vif は APOBEC3G/F の、Vpu は BST2/tetherin の抗 HIV 活性をそれぞれ相殺すること<sup>10,11)</sup>、Vpr はアポトーシスと G2 期での細胞周期停止（G2 arrest）を惹起すること<sup>12)</sup> が明らかとなっている。しかしながら、適切な動物モデルがなかったため、生体内の HIV-1 増殖過程における“ウイルス因子”と“宿主因子”の役割については明らかとなっていなかった。

## 2-2. Vif と APOBEC3

生体内 HIV-1 増殖における Vif と APOBEC3 の相克を解明することを目的として、Vif 欠損 HIV-1 と野生型 HIV-1（JR-CSF 株）をそれぞれヒト化マウスに接種した。Vif 欠

著者連絡先：佐藤 佳（〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町 53  
京都大学ウイルス研究所ウイルス病態研究領域）

2013年3月29日受付

損 HIV-1 はヒト化マウス内でまったく増殖せず (図 2A), また, HIV-1 感染の主徴のひとつである末梢血中 CD4T 細胞の減少も確認されなかった (図 2B)。そして, 野生型 HIV-1 のプロウイルスゲノム配列において, 内在性 APOBEC3 (APOBEC3G/F) によるものと考えられる高頻度の G → A 変異 (GA → AA 変異または GG → AG 変異) が確認された (図 2C)。以上の結果から, 生体内の HIV-1 増殖において Vif は必須のウイルス因子であること, また, CD4T 細胞に内在的に発現する APOBEC3G/F は強力な抗ウイルス能を発揮する宿主因子であることが明らかとなった<sup>13)</sup>。

### 2-3. Vpu と BST2/tetherin

生体内 HIV-1 増殖における Vpu と BST2/tetherin の相克

を解明することを目的として, Vpu 欠損 HIV-1 と野生型 HIV-1 (AD8 株) をそれぞれヒト化マウスに接種した。Vpu 欠損 HIV-1 の増殖効率は, ウイルス接種量によらず野生型 HIV-1 に比して顕著に低かった (図 3A)。また, 感染後 7 日齢において脾臓を回収し, flow cytometry 法および ELISA 法により解析を行ったところ, 野生型 HIV-1 感染マウスと Vpu 欠損 HIV-1 感染マウスの脾臓において, 感染細胞の割合は約 2.8 倍程度の差であったのに対し, cell-free のウイルス量は約 38 倍も野生型 HIV-1 感染マウスのほうが高かった (図 3B)。さらに, 野生型 HIV-1 感染細胞の BST2/tetherin 発現レベルは, Vpu 欠損 HIV-1 感染細胞, 非感染細胞に比して有意に低いことが確認された (図 3C)。以上の結果から, Vpu は生体内 HIV-1 増殖に必須で

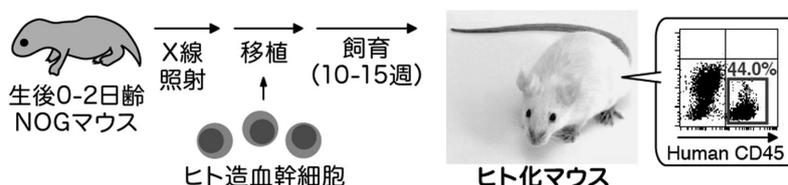


図 1 ヒト化マウス

CD34 陽性ヒト造血幹細胞の移植により, CD4T 細胞をはじめとしたヒト白血球 (CD45 陽性細胞) が 1 年以上にわたりレシピエントマウス (NOG マウス) 体内に維持される。

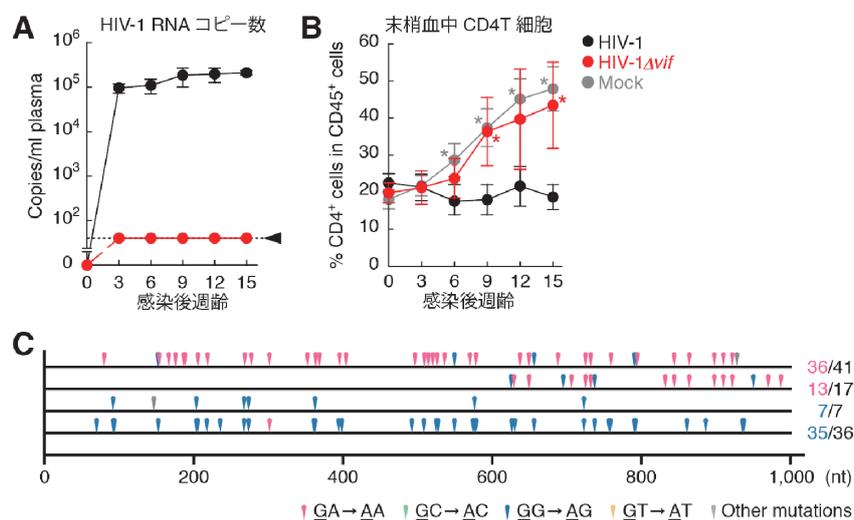


図 2 Vif 欠損 HIV-1 感染ヒト化マウスを用いた解析

(A) 血漿中の HIV-1 RNA コピー数。矢頭は検出限界を示す。(B) 末梢血ヒト白血球 (CD45 陽性細胞) 中におけるヒト CD4T 細胞のパーセンテージ。\* $p < 0.05$  (Student's  $t$  test)。(C) HIV-1 プロウイルス配列解析。感染後 15 週齢の野生型 HIV-1 感染ヒト化マウス脾臓より DNA を回収し, *pol* 領域 (1,002 bp) の塩基配列解析を行った。その代表的な結果を示す。図右の数字は, ひとつのクローン中における [GA → AA または GG → AG 変異の数]/[G → A 変異の数] を示す。

はないものの、BST2/tetherinの抗ウイルス能を相殺し、cell-free ウイルス産生を促進することによりウイルス増殖を亢進させる役割を持つことが強く示唆された<sup>14)</sup>。

#### 2-4. Vpr と制御性 T 細胞

上述した Vif, Vpu はそれぞれ対応する“宿主因子”が同定されているのに対し、Vpr に対応し、かつ HIV-1 複製に深く関与する“宿主因子”はいまだ同定されていない。また、Vpr がアポトーシスや G2 arrest を引き起こす機能を持っていることは古くから明らかとなっていたが、これらの Vpr の機能と HIV-1 の感染病態の関連についてはほとんど明らかとなっていない。

生体内 HIV-1 増殖における Vpr の役割を解明することを目的として、Vpr 欠損 HIV-1 と野生型 HIV-1 (JR-CSF 株) をそれぞれヒト化マウスに接種した。Vpr 欠損 HIV-1 の増殖効率は、野生型 HIV-1 に比して有意に低かった (図

4A)。また、急性期 (感染後 1~3 週齢) の野生型 HIV-1 感染マウスでは、制御性 T 細胞 (Treg) における効率的なウイルス増殖と Treg の枯渇が観察されたのに対し、Vpr 欠損 HIV-1 感染マウスではそれらが観察されなかった (図 4B)。これらの事象は、顕著なアポトーシスと G2 arrest が野生型 HIV-1 感染 Treg では誘導されるのに対し、Vpr 欠損 HIV-1 感染 Treg ではそれらが誘導されないことに起因していると考えられた。以上の結果から、急性期において、HIV-1 は Treg を効率的な自己増幅の場として利用していること、そして、Vpr によって Treg の枯渇と免疫活性化が惹起されることが示唆された (Sato et al., manuscript in revision)。

#### これからの研究

分子生物学の隆盛と発展により、APOBEC3G や BST2/

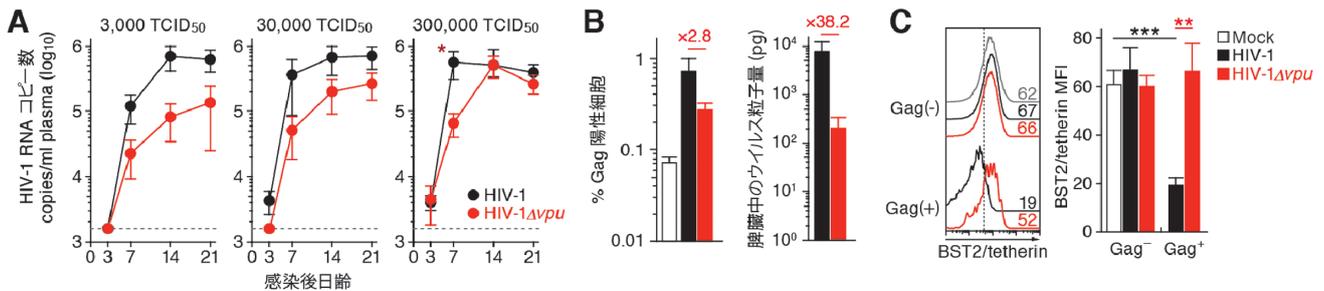


図 3 Vpu 欠損 HIV-1 感染ヒト化マウスを用いた解析

3 点の接種量 (3,000, 30,000, 300,000 TCID<sub>50</sub>/mouse) で野生型 HIV-1 または Vpu 欠損 HIV-1 をヒト化マウスに接種した。(A) 血漿中の HIV-1 RNA コピー数。点線は検出限界を示す。(B) 感染後 7 日齢の脾臓における Gag 陽性細胞のパーセンテージ (左) と脾臓中の cell-free ウイルス量 (右)。赤字は倍率を示す。(D) 感染後 7 日齢の脾臓よりヒト単核球を回収し、Gag 陰性あるいは Gag 陽性 CD4T 細胞の細胞表面上における BST2/tetherin の発現レベルを flow cytometry 法により解析した。ヒストグラム (左) 中の数字は、BST2/tetherin の mean fluorescent intensity (MFI) を示す。\**p*<0.05 ; \*\**p*<0.01 ; \*\*\**p*<0.001 (Student's *t* test)。

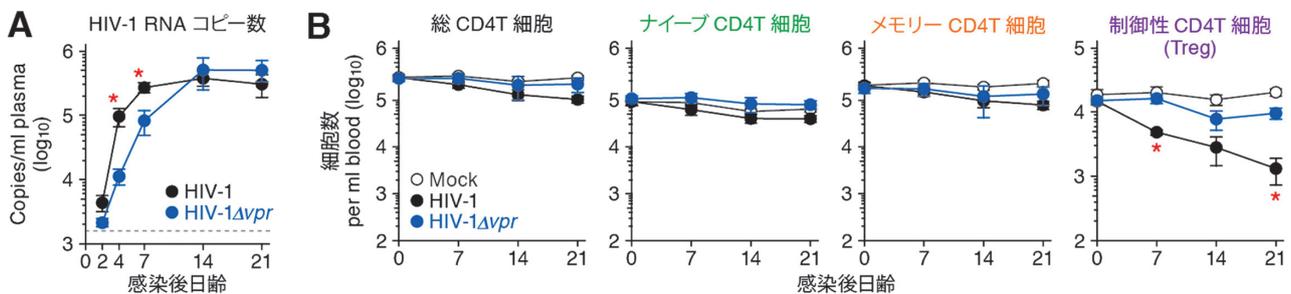


図 4 Vpr 欠損 HIV-1 感染ヒト化マウスを用いた解析

(A) 血漿中の HIV-1 RNA コピー数。点線は検出限界を示す。(B) 末梢血中のヒト CD4 陽性細胞数。総 CD4T 細胞、ナイーブ CD4T 細胞 (CD4+CD45RA+), メモリー CD4T 細胞 (CD4+CD45RA-), 制御性 CD4T 細胞 (Treg ; CD4+CD45RA- FOXP3+) の数をそれぞれ示す。\**p*<0.05 (Student's *t* test)。

tetherinをはじめとしたさまざまな宿主因子が同定された。これにより、HIV-1 感染症、すなわち「ウイルスと宿主（ヒト）の相克」を、「ウイルス因子と宿主因子の相克」として理解・解釈することが可能となった。筆者はこれまで、ヒト化マウスモデルを用い、「生体内 HIV-1 感染動態におけるウイルス因子と宿主因子の相克」の一端を明らかにしてきた。これからの研究では、これまでに行ってきた研究スタイルを継続するに留まらず、「ウイルス因子と宿主因子」に代表される分子レベルのミクロな知見を「ウイルス感染病態」というマクロな動態へと敷衍し、ウイルス感染病態という動的な事象を構成的・総体的に理解することを目的とした研究を計画している。

### 1. 2 光子顕微鏡を用いた生体内 HIV-1 感染ダイナミクスの解明

概枠としての HIV-1 感染ダイナミクスについては理解が進んでいる一方で、「HIV-1 感染細胞が生体内のどこでウイルスを産生しているのか?」「HIV-1 感染細胞と非感染 CD4T 細胞の生体組織内での挙動は同じなのか、異なるのか?」「HIV-1 感染細胞の挙動は各臓器によって異なるのか?」「ひとつの CTL が何個の HIV 感染細胞を殺すことができるのか?」などに代表される、生体内における感染細胞の動態については解析方法がなかったため、ほとんど明らかとなっていない。これらの問いに直接的にアプローチするために、生体内 4 次元（立体+時間）イメージングが可能な 2 光子顕微鏡を導入し、生体内（HIV-1 感染ヒト化マウス）における HIV-1 感染細胞の動態を定量的に明らかにしていく。

### 2. 進化的側面からの HIV-1 学

分子遺伝学・分子系統学・バイオインフォマティクス解析から、HIV-1 の起源はチンパンジー (*Pan troglodytes troglodytes*) のレンチウイルス SIVcpzPtt であること<sup>15,16)</sup>、SIVcpzPtt のヒト界への侵入は約 100 年前に起こったこと<sup>17)</sup> が推定されている。しかしながら、チンパンジーからヒトへのウイルス種間伝播の過程において、どのような適応変異の獲得が必要であったかについては明らかではない。これまでに実施してきたヒト化マウスモデルを用いた実験科学的解析に加え、バイオインフォマティクス・分子遺伝学・進化生物学との学際的融合研究を展開し、HIV-1 が誕生するまでの系譜、すなわち、SIVcpz のヒトへの適応進化過程を実験的に実証していく。

### 3. 数理学と学際的融合研究の展開

実験手法の進歩と技術革新により、ウイルス複製過程の分子メカニズムの詳細にアクセスすることが可能となった。しかしながら、たとえば「ウイルス感染細胞の寿命」や「1 個の感染細胞が生涯に産生するウイルス粒子の個数」のような、ウイルス学としての根本的な問いに対し、

従来の実験科学アプローチのみで回答をもたらすのはきわめて困難である。筆者は現在、九州大学理学研究院 岩見真吾准教授との共同研究として、実験科学（ウイルス感染実験）によって得られたデータを数理科学的に解析するという新しい研究手法を展開している。この学際的研究手法により、上述のようなウイルス学の根本的な問いに回答すること、すなわち、ウイルス増殖ダイナミクスを定量的に理解・解釈することが可能となる<sup>18-20)</sup>。“数理科学的解析”という響きは、実験科学者にとってなじみのないもののように聞こえるが（実際のところ、筆者もはじめはそうでした）、「HIV 感染症とは、一見静的に見えるものの、その実きわめて活発なウイルス産生と感染細胞の減衰の動的平衡状態にある」という現在広く知られている事実<sup>21)</sup> は、臨床データを数理科学的に解析した結果によってもたらされたものである。この実験科学と数理学の学際的な融合研究により、ウイルス増殖ダイナミクスを定量的に理解し、ウイルス学としての根本的な問いに取り組んでいく。

### おわりに

本稿では、筆者がこれまでに行ってきた研究内容と、これから展開していく予定の研究計画について概説した。HIV-1 感染症は、抗ウイルス薬が開発された現在においても、発展途上国などではもっとも重篤かつ深刻なヒト感染症のひとつである。しかしながら、それを根治する方法はいまだ確立されておらず、解決すべき問題は山積している。また、HIV-1 は、ウイルス学の範疇においてもっとも解析手法が発達し、ミクロ/マクロ両面においてもっとも理解の進んだウイルスのひとつである。感染症を理解し、ウイルス学を発展させるためには、この分野の最先端のひとつである HIV-1 研究が担う責務は大きく、また、既存の概念・研究手法に囚われない、多角的な視野を持って研究に取り組む必要があると考える。筆者は、上述したようなさまざまな視点・アプローチから、HIV-1 感染動態の解明に取り組んでいく所存である。「これからの研究」に興味・関心を抱いてくださった方がいらっしゃれば、ぜひこれらの研究にご賛同・ご参画いただき、一緒に研究を発展させていくことができれば幸いである。

### 謝辞

第 13 回 ECC 山口メモリアルエイズ研究奨励賞の受賞にあたり、大学院生時代よりご指導いただき、また本賞へご推薦いただいた京都大学ウイルス研究所 小柳義夫先生に、厚く御礼申し上げます。本研究は、三沢尚子女史（京都大学ウイルス研究所）、Johnny Chuanyi Nie 君（京都大学ウイルス研究所、現トロント大学）のご指導、ご協力がなければ成し遂げることができませんでした。本当にありが

とうございました。また、これまでの研究を遂行するにあたり、ヒト化マウスモデルの作製・確立では、伊藤守先生（実験動物中央研究所）、安東星先生（UCLA）、Vif/APOBEC3に関する研究では、高折晃史先生（京都大学医学研究科）、泉泰輔先生（京都大学医学研究科、現NCI-Frederick）、Vpu/tetherinに関する研究では、岩見真吾先生（九州大学理学研究院）、福原充子さん（京都大学ウイルス研究所）、Vprに関する研究では、松岡雅雄先生（京都大学ウイルス研究所）、佐藤賢文先生（京都大学ウイルス研究所、現熊本大学エイズ学研究所）に多大なるご指導、ご協力をいただきました。心より御礼申し上げます。そして、折々でご指導、ご助言いただいた、京都大学ウイルス研究所ウイルス病態研究領域の皆様、エイズ研究に携わっているすべての皆様に、この場を借りて感謝いたします。

最後に、研究室のマスコットでもあった三沢女史の愛猫こつぶに、本賞を捧げます。

## 文 献

- 1) Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, Suzue K, Kawahata M, Hioki K, Ueyama Y, Koyanagi Y, Sugamura K, Tsuji K, Heike T, Nakahata T : NOD/SCID/ $\gamma$ c<sup>null</sup> mouse : An excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood* 100 : 3175-3182, 2002.
- 2) Nie C, Sato K, Misawa N, Kitayama H, Fujino H, Hiramatsu H, Heike T, Nakahata T, Tanaka Y, Ito M, Koyanagi Y : Selective infection of CD4<sup>+</sup> effector memory T lymphocytes leads to preferential depletion of memory T lymphocytes in R5 HIV-1-infected humanized NOD/SCID/IL-2R $\gamma$ <sup>null</sup> mice. *Virology* 394 : 64-72, 2009.
- 3) Sato K, Koyanagi Y : The mouse is out of the bag : Insights and perspectives on HIV-1-infected humanized mouse models. *Exp Biol Med (Maywood)* 236 : 977-985, 2011.
- 4) Sato K, Nie C, Misawa N, Tanaka Y, Ito M, Koyanagi Y : Dynamics of memory and naive CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in humanized NOD/SCID/IL-2R $\gamma$ <sup>null</sup> mice infected with CCR5-tropic HIV-1. *Vaccine* 28 (Suppl 2): B32-37, 2010.
- 5) Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Malim MH : Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* 418 : 646-650, 2002.
- 6) Liddament MT, Brown WL, Schumacher AJ, Harris RS: APOBEC3F properties and hypermutation preferences indicate activity against HIV-1 *in vivo*. *Curr Biol* 14 : 1385-1391, 2004.
- 7) Wiegand HL, Doehle BP, Bogerd HP, Cullen BR : A second human antiretroviral factor, APOBEC3F, is suppressed by the HIV-1 and HIV-2 Vif proteins. *EMBO J* 23 : 2451-2458, 2004.
- 8) Neil SJ, Zang T, Bieniasz PD : Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* 451 : 425-430, 2008.
- 9) Van Damme N, Goff D, Katsura C, Jorgenson RL, Mitchell R, Johnson MC, Stephens EB, Guatelli J : The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein. *Cell Host Microb* 3 : 245-252, 2008.
- 10) Sato K, Gee P, Koyanagi Y : Vpu and BST2 : Still not there yet ? *Front Microbiol* 3 : 131, 2012.
- 11) Sato K, Yamamoto SP, Misawa N, Yoshida T, Miyazawa T, Koyanagi Y : Comparative study on the effect of human BST-2/Tetherin on HIV-1 release in cells of various species. *Retrovirology* 6 : 53, 2009.
- 12) Andersen JL, Le Rouzic E, Planelles V : HIV-1 Vpr : Mechanisms of G2 arrest and apoptosis. *Exp Mol Pathol* 85 : 2-10, 2008.
- 13) Sato K, Izumi T, Misawa N, Kobayashi T, Yamashita Y, Ohmichi M, Ito M, Takaori-Kondo A, Koyanagi Y : Remarkable lethal G-to-A mutations in *vif*-proficient HIV-1 provirus by individual APOBEC3 proteins in humanized mice. *J Virol* 84 : 9546-9556, 2010.
- 14) Sato K, Misawa N, Fukuhara M, Iwami S, An DS, Ito M, Koyanagi Y : Vpu augments the initial burst phase of HIV-1 propagation and downregulates BST2 and CD4 in humanized mice. *J Virol* 86 : 5000-5013, 2012.
- 15) Keele BF, Van Heuverswyn F, Li Y, Bailes E, Takehisa J, Santiago ML, Bibollet-Ruche F, Chen Y, Wain LV, Liegeois F, Loul S, Ngole EM, Bienvenue Y, Delaporte E, Brookfield JF, Sharp PM, Shaw GM, Peeters M, Hahn BH : Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science* 313 : 523-526, 2006.
- 16) Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, Cummins LB, Arthur LO, Peeters M, Shaw GM, Sharp PM, Hahn BH : Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* 397 : 436-441, 1999.
- 17) Worobey M, Gemmel M, Teuwen DE, Haselkorn T, Kunstman K, Bunce M, Muyembe JJ, Kabongo JM, Kalengayi RM, Van Marck E, Gilbert MT, Wolinsky SM : Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960. *Nature* 455 : 661-664, 2008.
- 18) Iwami S, Holder BP, Beauchemin CA, Morita S, Tada T,

- Sato K, Igarashi T, 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.
- 19) Iwami S, Sato K, De Boer RJ, Aihara K, Miura T, Koyanagi Y : Identifying viral parameters from *in vitro* cell cultures. *Front Microbiol* 3 : 319, 2012.
- 20) Fukuhara M, Iwami S, Sato K, Nishimura Y, Shimizu H, Aihara K, Koyanagi Y : Quantification of the dynamics of enterovirus 71 infection by experimental-mathematical investigation. *J Virol* 87 : 701-705, 2013.
- 21) Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M : Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 373 : 123-126, 1995.