

第14回日本エイズ学会 学会賞（シミック賞）受賞研究

HIV-1 の分子ウイルス学の展開研究

Development of HIV-1 Molecular Biology

小柳 義夫

Yoshio KOYANAGI

京都大学ウイルス・再生医科学研究所

Institute for Frontier Life and Medical Sciences, Kyoto University

日本エイズ学会誌 20: 106-108, 2018

1981年6月、私は卒後の医師国家試験を無事パスし、大学病院で研修を始めた。記録を見ると同月に UCLA の Gottlieb 博士が5例のカリニ肺炎（のちに初めてのエイズ症例と分かった）を CDC に報告とあり、1986年に UCLA に留学した際に博士のお顔を拝することができた。ところで、臨床は無理と考えた私は研修医を3カ月で辞し、ヒトの白血病レトロウイルスとして HTLV の発見に沸いた京大ウイルス研の日沼頼夫教授の門をたたき、助手の山本直樹博士に実験の手ほどきを受けることになった。実験を始めた第一週目に臍帯血から私が分離したリンパ球が、HTLV の発がんウイルスとしての実証実験に使われたのには驚いた¹⁾。さて、HIV-1 研究を始める前の HTLV 研究は、私にとってウイルス研究の基礎習得に格好の機会をくれた。HIV-1 と HTLV の標的細胞は CD4⁺ T 細胞であり、当時 Gallo 博士が開発した T 細胞増殖因子 (TCGF, 後に IL-2 と判明) の調整法が確立され、それまで職人技といわれたヒト T 細胞の初代培養がだれでもできる時代になった。さらにウイルス抗原検出に感染者の血清が使えること、また、マウスハイブリドーマが普及し、単クローン抗体が次々と作出されてきた。この経験が1983年に始まった HIV-1 の分離とその遺伝子単離競争に1986年と遅れて加わった際に威力を発揮した。

さて、1984年に助手から直接、山口大教授にジェット機のように昇格された山本先生に京大院生のまま拾ってもらった。そこに現熊本大学長の原田信志博士も助手として参加された。そして、「HIV-1 と HTLV を一緒に培養したらどうなるんじゃ」というきわめて単純かつ予測不能な実験を、山本先生はご自身でやってみせられた。これが、現在も多くの実験室で使われる MT-4 細胞 (HTLV 感染細胞) による HIV-1 感染価測定のための限界希釈法 (TCID) の確立である。すぐに原田先生がこれをプラーク法に進化させて HIV-1 定量法確立が世界に発表された²⁾。この直前に私ども

は本邦の血友病患者に HIV-1 抗体陽性者を見出し³⁾、ウイルス分離により HIV-1 の存在を証明した⁴⁾。エイズパニックや薬害エイズ事件が明るみになりはじめるころである。そして、1986年に UCLA にポストドクの職を得て、その病院で問題になりつつあったエイズ脳症患者のウイルス学的解析を担当することになった。20例以上のエイズ脳症患者の解剖に立ち合い、脳組織からのウイルス分離とその遺伝子ならびに生物活性の解析を担当した。UCLA では HTLV-2 の研究で有名だった Irvin Chen 博士（当時若干31歳の准教授）のチームに加わり、分子クローニング技術を習得した。私にとって幸運だったのは1例目の症例から既報のウイルスと異なる HIV-1 を分離したことである。脳組織より初代培養により分離されるウイルス株は脳内に複数あること (JR-CSF と JR-FL)、そして脳実質組織由来の JR-FL は、T 細胞を除去したマクロファージ細胞培養系できわめて効率的に複製することである⁵⁾。次に、これらの感染性遺伝子のクローン化に成功した (図)。そして、マクロファージへの感染に必要な配列をみつけた⁶⁾。gp120 V3 領域として今は知られている。ウイルス分離と遺伝子クローニングは私ひとりで行った。そして、それまでそっと眺めていたまわりの研究者は、私の結果が Science に発表され、さらに DNA トランスフェクションによりクローンウイルスが回収できるとわかると私の言うことを聞いてくれるようになった。そして、ポストである Chen 博士の号令のもと、実験室総出で全塩基配列を決めた。まだ、シーケンサーなんて機械はなかった。これらの感染性ウイルス DNA が今は世界中の研究者が使っている JR-CSF と JR-FL である。これらの HIV-1 DNA クローンは、私どもの HIV-1 のマクロファージ感染の意義の解明⁷⁾、さらに、多くの研究者によって中和抗体の評価実験に利用され、抗 HIV 剤の開発ならびに HIV-1 の病原性解明に貢献したと考える。NIH や UCSF の分子クローンの単離より遅れた私どもの HIV-1 DNA クローンは現在繁用される理由は、ウイルス分離のための培養期間が11~14日間ときわめて短期間であった

著者連絡先：小柳義夫 (〒606-8397 京都市左京区聖護院川原町53 京都大学ウイルス・再生医科学研究所)

2018年3月20日受付

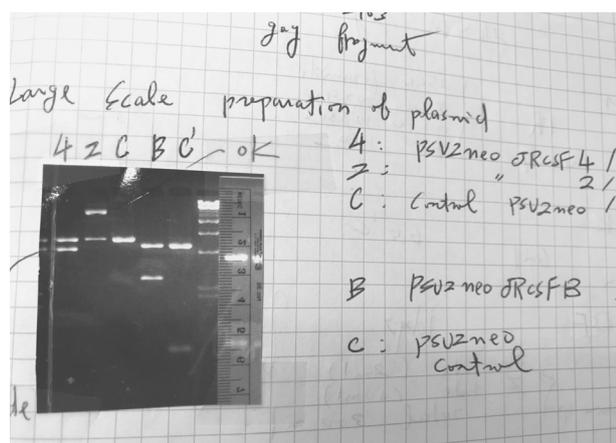


図 HIV-1 感染性遺伝子のクローニング

HIV-1 陽性のラムダファージから JR-CSF の *EcoRI* 切断 DNA フラグメントを、プラスミドベクター pSVneo に移し変えた DNA の切断電気泳動パターンである。*EcoRI* 部位は JR-CSF にはなかったため、2 とマークしたレーンに完全長の HIV-1 フラグメントを確認した。上の長いフラグメントに OK と記している。一方、隣の手前の 4 とマークしたレーンには短い HIV-1 欠損フラグメントがある。他に B とマークしたレーンに欠損フラグメントが見えるように、たくさんの欠損ウイルスを含んだライブラリーの中に完全長のクローンは 1 つであった。幸運であった。C とマークしたレーンには control のプラスミドベクター (pSV2neo) のフラグメントが検出されている (1987 年 5 月 13 日の私のノートより)。

からである。それまでの白血病由来のがん細胞株で長期間培養により分離されたウイルス株由来のクローンでは、遺伝子欠損や変異が培養の間に起きていた。今は HIV-1 感染実験では当たり前の初代培養細胞をつかった T 細胞やマクロファージ感染実験法を、私どもの実験室のとなりに造血研究チームがいたので、いろいろとアドバイスをもらって独自に開発した。

そして、帰国後は山本先生が主催されていた山口大、そして東京医科歯科大に赴任し、それまでの培養実験に限界を感じて HIV-1 感染小動物モデルとして、免疫不全マウスへヒト細胞を移植させるという動物実験に取り組んだ⁸⁻¹²⁾。北里大学の田中勇悦博士 (現琉球大学) と共同研究を組み、実験動物中央研究所の伊藤守博士らが開発した免疫不全マウス株 (NOG マウス) の利用研究においてウイルス感染実験を担当し、そしてヒト血液幹細胞移植によるヒト化マウスが完成した¹³⁾。1999 年に東北大そして 2004 年に京大ウイルス研で独立研究室を構える機会を得て、ヒト化マウスを HIV-1 研究に利用し¹⁴⁾、HIV-1 DNA クローン変異体の解析からそのアクセサリタンパク質 (Vif, Vpu, Vpr) の機能解明を進めることができた¹⁵⁻²⁰⁾。CCR5 を補受容体とする

HIV-1 (R5 ウイルス) の分子ウイルス学が私どもの HIV-1 DNA クローンから始動し、エイズ研究の飛躍的な進歩が達成されたのではないかと考える。また、第 22 回エイズ学会学術集会で会長を拝命し、日本エイズ学会に恩返しもできたとも思える。

謝辞

最後に大学卒業からこれまでの研究生活に際し、日沼先生、山本先生、Irvin Chen 先生の超実証主義の研究指導に深く感謝するとともに、多くのすぐれた国内外の共同研究者、大学や企業の研究者、学生、スタッフ、そして、特に残念ながら抗 HIV 剤がなかった時代に自らの試料を提供いただいた患者さんに感謝を申し上げる。「私の血を研究に使ってください」と言っていたことは忘れられない。

文 献

- 1) Yamamoto N, Okada M, Koyanagi Y, Kannagi M, Hinuma Y : Transformation of human leukocytes by cocultivation with an adult T cell leukemia virus producer cell line. *Science* 217 : 737-739, 1982.
- 2) Harada S, Koyanagi Y, Yamamoto N : Infection of HTLV-III/LAV in HTLV-I carrying cells MT-2 and MT-4 and application in a plaque assay. *Science* 229 : 563-566, 1985.
- 3) Koyanagi Y, Kobayashi S, Harada S, Kikukawa R, Yamamoto N, Watanabe K, Okino F, Kajii T : Detection of antibodies to human T-lymphotropic virus type I and III in Japanese hemophiliacs. *AIDS Res* 1 : 353-358, 1984.
- 4) Yoshiyama H, Koyanagi Y, Nakashima H, Ishihara T, Uchino F, Harada S, Okino F, Kajii T, Yamamoto N : Detection and isolation of an acquired immune deficiency syndrome (AIDS) related virus (HTLV-III/LAV) from a Japanese boy with AIDS-related complex. *Jpn J Cancer Res* 77 : 16-20, 1986.
- 5) Koyanagi Y, Miles S, Mitsuyasu RT, Merrill JE, Vintess HV, Chen ISY : Dual infection of the central nervous system by AIDS viruses with distinct cellular tropisms. *Science* 236 : 819-822, 1987.
- 6) O'Brien WA, Koyanagi Y, Namazie A, Zhao JQ, Diagne A, Idler K, Zack J, Chen ISY : HIV-1 tropism for mononuclear phagocytes can be determined by region of gp120 outside the CD4-binding domain. *Nature* 348 : 69-73, 1990.
- 7) Koyanagi Y, O'Brien WA, Zhao JQ, Golde DW, Gasson JC, Chen ISY : Cytokines alter production of HIV-1 from primary mononuclear phagocytes. *Science* 241 : 1673-1675, 1988.
- 8) Koyanagi Y, Tanaka Y, Kira J, Ito M, Hioki K, Misawa N, Kawano Y, Yamasaki K, Tanaka R, Suzuki Y, Ueyama Y,

- Terada E, Tanaka T, Miyasaka M, Kobayashi T, Kumazawa Y, Yamamoto N : Primary human immunodeficiency virus type 1 viremia and central nervous system invasion in a novel hu-PBL-immunodeficient mouse strain. *J Virol* 71 : 2417–2424, 1997.
- 9) Kawano Y, Tanaka Y, Misawa N, Tanaka R, Kira JI, Kimura T, Fukushi M, Sano K, Goto T, Nakai M, Kobayashi T, Yamamoto N, Koyanagi Y : Mutational analysis of human immunodeficiency virus type 1 accessory genes : Requirement of a site in the nef gene for HIV-1 replication in activated CD4⁺ T cells *in vitro* and *in vivo*. *J Virol* 71 : 8456–8466, 1997.
- 10) Suzuki Y, Koyanagi Y, Tanaka Y, Murakami T, Misawa N, Maeda N, Kimura T, Shida H, Hoxie JA, O'Brien WA, Yamamoto N : Determinant in human immunodeficiency virus type 1 for efficient replication under cytokine induced CD4⁺ T helper 1 (Th1)- and Th2-type conditions. *J Virol* 73 : 316–324, 1999.
- 11) Miura Y, Misawa N, Maeda N, Inagaki Y, Tanaka Y, Ito M, Kayagaki N, Yamamoto N, Yagita H, Mizusawa H, Koyanagi Y : Critical contribution of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) to apoptosis of human CD4⁺ T cells in HIV-1-infected hu-PBL-NOD-SCID mice. *J Exp Med* 193 : 651–659, 2001.
- 12) Miura Y, Misawa N, Kawano Y, Okada H, Inagaki Y, Yamamoto N, Ito M, Yagita H, Okumura K, Mizusawa H, Koyanagi Y : Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induces neuronal death in a murine model of HIV central nervous system infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 : 2777–2782, 2003.
- 13) 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/ γ cnul mouse : an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood* 100 : 3175–3182, 2002.
- 14) 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⁺ effector memory T lymphocytes leads to preferential depletion of memory T lymphocytes in R5 HIV-1-infected humanized NOD/SCID/IL-2R γ^{null} mice. *Virology* 394 : 64–72, 2009.
- 15) 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.
- 16) 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.
- 17) Sato K, Misawa N, Iwami S, Satou Y, Matsuoka M, Ishizaka Y, Ito M, Aihara K, An DS, Koyanagi Y : HIV-1 Vpr accelerates viral replication during acute infection by exploitation of proliferating CD4⁺ T cells *in vivo*. *PLoS Pathog* 9 : e1003812, 2013.
- 18) Sato K, Takeuchi SJ, Misawa N, Izumi T, Kobayashi T, Kimura Y, Iwami S, Takaori-Kondo A, Hu WS, Aihara K, Ito M, An DS, Pathak VK, Koyanagi Y : APOBEC3D and APOBEC3F potently promote HIV-1 diversification and evolution in humanized mouse model. *PLoS Pathog* 10 : e1004453, 2014.
- 19) Nakano Y, Misawa N, Juarez-Fernandez G, Moriwaki M, Nakaoka S, Funo T, Yamada E, Soper A, Yoshikawa R, Ebrahimi D, Tachiki Y, Iwami S, Harris RS, Koyanagi Y, Sato K : HIV-1 competition experiments in humanized mice show that APOBEC3H imposes selective pressure and promotes virus adaptation. *PLoS Pathog* 13 : e1006348, 2017.
- 20) Yamada E, Nakaoka S, Klein L, Reith E, Langer S, Hopfensperger K, Iwami S, Schreiber G, Kirchhoff F, Koyanagi Y, Sauter D, Sato K : Human-specific adaptations in Vpu conferring anti-tetherin activity are critical for efficient early HIV-1 replication *in vivo*. *Cell Host Microbe* 23 : 110–120, 2018.

著者寸描

小柳義夫 (こやなぎ よしお)



1981年 熊本大学医学部卒業
 1986年 京都大学大学院医学研究科修了医学博士
 1986年 UCLA 血液腫瘍学博士研究員
 1989年 山口大学医学部助手
 1990～1999年 東京医科歯科大学医学部助手, 講師, 助教授
 1999年 東北大学大学院医学研究科教授
 2004年 京都大学ウイルス研究所教授
 2014年 京都大学ウイルス研究所所長
 2016年 京都大学ウイルス・再生医科学研究所教授 副所長
 2017年 京都大学研究連携基盤長