

霊長類モデルを用いた HIV 感染症の予防・治療法開発

三浦智行

京都大学ウイルス研究所

要 約

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が、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-2に近縁なSIVがマカク属のサルに感染し、エイズ様症状を引き起こす。SIVのサル感染実験により、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が、これらの研究では、ヒトでは不可能な適時的剖検による深部組織の詳細な解析が威力を発揮した。また、SIVは遺伝的にHIV-1とは異なるウイルスであることから、我々のグループはSIVをベースにしてHIV-1遺伝子を組み換えたSHIVを世界に先駆けて作製した。SHIV研究により、HIV-1のenv遺伝子により決定されるセカンドレセプター（CCR5やCXCR4）指向性によって感染個体における標的細胞・組織や病態が大きく異なることが明らかとなり、ヒトのエイズ病態に重要なのはCCR5指向性ウイルスであることがわかってきた。また、全ゲノムの9割以上がHIV-1由来の組換え体ウイルスHIV-1mtが近年報告されている。本稿では、これらSIV / SHIV / HIV-1mtの霊長類モデルによるエイズの病態解析や予防・治療法開発研究について、我々のエイズ霊長類モデル研究の現状と共に紹介する。

はじめに

1981年に最初の後天性免疫不全症候群（エイズ）が報告されてから既に30年以上が過ぎ、この間エイズの病原ウイルスであるヒト免疫不全ウイルス（human immunodeficiency virus, HIV）の感染は世界中に飛躍的に広まった。WHOとUNAIDSによる統計では、2014年の世界中のHIV感染者の概算数は3690万人で、新規感染者は200万人、年間死亡者数は120万人と推定されており、エイズは依然として世界的な公衆衛生上の重要課題である。作用機序の異なる抗HIV薬をいくつか組み合わせて投与する多剤併用療法（combined antiretroviral therapy, cART）の確立は、HIV感染者の劇的な死亡率低下をもたらしたが、薬剤耐性、副作用、費用の面で解決すべき問題が多く残されている。さらにcARTでは、体内に潜伏しているウイルス（リザーバー）を完全に除去することはできず、未だエイズの根本的治療法は確立されていない。また、有効なHIV感染予防ワクチンについても実用化の目処が立っていないのが現状である。

1. HIVとSIVの系統関係

1980年以前には認識されていなかったエイズウイルスがなぜ急速に広がったのか？これらのウイルスはいったいどこからやってきたのであろうか？HIVの発見後間もなく米国の霊長類センターにおいて、エイズ様症状を呈して死亡したアカゲザルからHIVに類似したウイルス（SIV）が分離された。自然界においてアカゲザルを含むアジア産マカク属のサルにおけるSIV感染は全く検出されなかったが、アフリカミドリザルをはじめとする種々のアフリカ産のサルがSIVに反応する抗体を保有していることが明らかとなり、エイズウイルスのアフリカ産サル由来説が唱えられるようになった。しかし、その後アフリカミドリザルなどのアフリカ産のサルが保有しているSIVの遺伝子解析が進むにつれて、アフリカミドリザルからヒトへの感染といった単純なシナリオは否定された。サル由来のウイルスはSIVとひとまとめにされる傾向があるが、実際には多くの種類があり、その系統関係は複雑である。

我々は、アフリカミドリザルのウイルス（SIVagm）

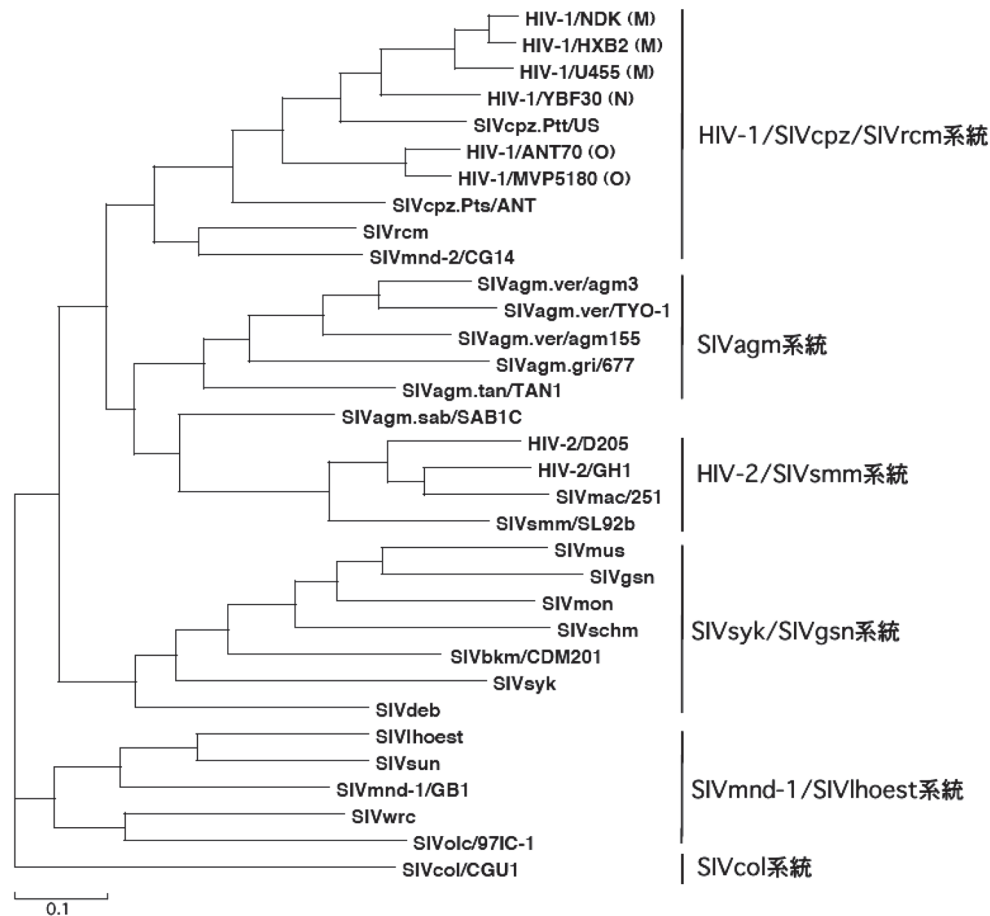


図 1. 霊長類レンチウイルスの分子進化系統樹。Pol 遺伝子領域の塩基配列に基づいて最尤法により作成した。HIV-1 は、中央アフリカに棲息するチンパンジーが保有する SIVcpz 由来、HIV-2 は、西アフリカに棲息するスーティーマンガベが保有する SIVsmm 由来であると考えられる。マカクエイズモデルとして最もよく用いられている SIV は、米国の霊長類センターで飼育中にエイズ様症状を呈したアカゲザルから分離された SIVmac であり、HIV-2 に近縁で SIVsmm 由来と考えられる。

の全塩基配列を明らかにし、HIV は、アフリカミドリザルから直接ヒトへきたものではないことを示した [1]。また、翌年には、マンドリルのウイルス (SIVmnd) の全塩基配列を報告し、多様な霊長類レンチウイルスの全体像を示すことに貢献した [2]。ほぼ、時を同じくして西アフリカに生息するスーティーマンガベのウイルス SIVsmm が、やはり西アフリカに局限して感染流行している新型の HIV (HIV-2) に近縁であること [3]、チンパンジーの保有するウイルス SIVcpz が世界的に流行している従来型 HIV (HIV-1) に近縁であることが明らかとなり [4]、SIV を含めた霊長類レンチウイルス群全体における HIV-1 と HIV-2 の系統関係が確定したのである (図 1)。

2. SIV モデル

HIV-1 の発見に続く、分子・細胞レベルでの研究の進展は著しいものであったが、その多くは部分的な分析的研究に留まり「エイズの感染宿主における病態発現機構」すなわち「HIV-1 がなぜエイズを起すのか」の根本命題は依然として不明な点が多い。その解明およびエイズ予防・治療法開発の為にはウイルス側の要因と宿主側の要因とを併せて多角度から統合的に解析する必要がある、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、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。ヒトの臨床検体からも個体レベルの重要な知見が得られるが、感染時期の特定ができず、末梢血を用いた解析に留まり、また治療薬の影響等、制約が大きい。一方、HIV-2に近縁なSIVはアカゲサルやカニクイザル等のアジア産マカク属のサルに感染し、エイズ様症状を引き起こす。

SIVの発見に著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。本稿で論じるSIVは、前述のように1980年代に米国の霊長類センターでエイズ様症状を呈したアカゲザルから分離された(系統解析の結果から、飼育中にスーティーマンガベイから伝播したと考えられている)SIV_{mac}で、現在最も広く使われているエイズ動物モデルである。SIVはマカク属サルに接種すると、1-2年でエイズを発症し、その病態はHIV感染者で見られるものとほぼ同一であり、HIV感染の病態・病原性を研究するために大変優れたモデルである。

SIVのサル感染実験により、エイズの感染病態研究において極めて重要な知見が明らかにされたが、これらの研究では、ヒトでは難しい経時的生検やヒトでは不可能な適時的剖検による深部組織の詳細な解析が威力を発揮した。エイズ研究におけるSIV研究の主要な貢献を以下に挙げる。1) SIVがサルエイズの病原因子であることを明らかにし、SIV感染病態がヒトHIV感染病態と酷似することを証明した。2) HIV感染症が人獣共通感染症であることを示した。3) 感染制御における細胞性免疫の重要性を示した。4) 弱毒SIVによる感染防御が可能なことを示した。5) 主要な標的臓器が腸管である事を示した[5, 6]。

我々の研究室では、最近、抗HIV薬を混ぜ込んだ餌をアカゲザルに給餌することでヒトのcARTをSIVモデルに適用する実験系を確立し[7]、1年以上にわたるcARTの期間中のウイルス遺伝子解析により、感染しているSIVに新たな変異の蓄積はおこらないこと、すなわち、cARTの期間中に感染ザルで新規感染は起きていない事を示した[8]。今後、この強力なcART/SIVモデルと組み合わせた新規治療法の開発研究が促進されるものと期待される。

3. SHIV モデル

SIVモデルは、HIV感染の病態・病原性の研究には大変優れたモデルであるが、ウイルスの外皮タンパク(Env)の構造や抗原性がSIVとHIVでは異なっ

ており、感染防御における中和抗体の役割の研究等には不向きである。そこで我々の研究グループでは、遺伝子工学的手法によりSIVのゲノムをベースにしてHIV-1のEnvをコードするenv遺伝子を中心としたゲノム領域を組み換えたサル/ヒト免疫不全ウイルス(SHIV)を作製することに世界に先駆けて成功した[9](図2)。その後、このSHIVにおいて種々の病原性・非病原性株が得られ[10]、霊長類モデルでHIVのEnvに関して感染病態における機能的意義や感染防御における中和抗体の意義等を研究する事が出来るようになった。例えば、SHIVモデル研究における重要な発見の一つとして、HIV-1のenv遺伝子により決定されるセカンドレセプター指向性(CCR5型やCXCR4型)によって感染個体における標的組織や病態が大きく異なることが明らかにされたことが挙げられる[11]。

我々は、高病原性SHIV-KS661と、これと同じ由来であるが慢性経過を辿るSHIV-#64の比較解析により、感染・増殖力が弱く宿主免疫系によって容易に制御されるSHIV-#64感染でも感染初期に小腸のCD4が減少することを明らかにし[12]、また、末梢血レベルで感染制御された宿主でも小腸の病態は進行しうることを示した[13]。従来、血中ウイルス量の減少と末梢血CD4の回復がエイズの予防・治療目標とされてきたが、近年、腸管CD4の減少がエイズの主要な病態として注目されている[14]。SHIV霊長類モデル研究においても、小腸がSHIV感染に対して非常に脆弱であることが浮き彫りにされたことから、今後、感染サルにおける小腸病態の解析が、エイズの病原性解明と予防・治療法開発に重要と考えられる。

SHIVモデルによるエイズワクチン開発のための基礎研究も我々が行ってきた。最近では、マウスを用いた実験で免疫増強効果が認められた生分解性ナノ粒子について評価した。生分解性ナノ粒子は、アカゲザルにおいてもマウスと同様にenv抗原特異的な免疫応答を増強させたが、残念ながら感染防御効果はなく、むしろ感染増強傾向が認められた[15]。すなわち、免疫系の細胞で増殖するウイルスでは免疫応答の増強は、必ずしも感染防御効果の増強に繋がらないのである。エイズワクチン開発には、感染防御効果に真に有効な免疫機構を適切な動物モデルを用いて明らかにする必要がある。

2007年メルクによるHIVワクチンの臨床試験が突然中止された。SHIVモデルで感染防御効果が示された候補ワクチンが、ヒトの臨床試験で全く感染防御効果がなく、むしろワクチン群の方が血中ウイルス量が高い傾向を示してしまった。つまり、SHIVは候



SHIVの粒子構造と遺伝子構造

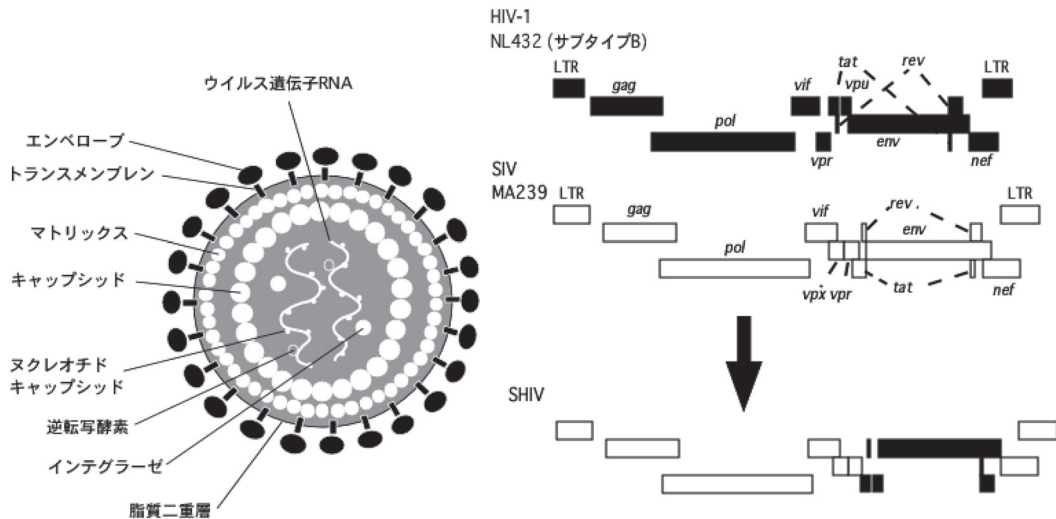


図2. アカゲザル等のマカク属サルに感染する HIV-1 と SIV の組換えウイルス (SHIV) の粒子構造と遺伝子構造の模式図。黒い部分は HIV-1 遺伝子由来で、白い部分は SIV 由来。SHIV は、ウイルス粒子の外皮蛋白をコードする *env* 遺伝子を中心とする領域が HIV-1 由来である。

補ワクチンの効果を過大評価してしまったのである。この事実から、SHIV は感染防御しやすく HIV や SIV は感染防御しにくいことが明らかとなった。なぜこのような事が起きたのだろうか？ 従来使用されてきた高病原性 SHIV と HIV/SIV では、セカンドレセプター指向性の違いにより標的細胞が異なるため、病態も大きく異なる点が指摘されている [16]。従来使用されてきた高病原性 SHIV は、CXCR4 に親和性が高いためナイーブ T 細胞によく感染し、末梢血中の CD4 陽性 T 細胞を急速に枯渇させるが、CCR5 親和性の SIV や HIV は、腸管粘膜などのエフェクターサイトに多く存在するメモリー T 細胞によく感染する [17]。従来、CXCR4 指向性 SHIV を用いた研究が数多くなされてきたが、ヒトのエイズ病態に重要なのは CCR5 指向性ウイルスであると考えられ、CCR5 指向性 SHIV による研究が現在求められている。

我々は、高病原性 CXCR4 指向性 SHIV-KS661 は、静脈内接種では全身の CD4 陽性 T リンパ球を枯渇させ、感染サルに抗体産生が起こらず、高い血中ウイルス量が持続し、劇症エイズ病態を引き起こすが、直腸内に接種すると抗体応答が起きて血中ウイルス量は一過性の増殖の後検出限界以下に抑制されてしまうことを示した [13]。これに対して SIV は、直腸内接種で抗体応答が起きて安定して高い血中ウイ

ルス量の持続感染を引き起こす (図3)。また、SHIV-KS661 は Env の V3 領域にエピトープがある中和モノクローナル抗体 KD-247 に対して、HIV-1 臨床分離株に比べて 10 倍以上中和されやすいこともわかった。

我々は、よりヒトのエイズに近い SHIV モデルを構築する目的で、高病原性 CXCR4 指向性 SHIV-KS661 の *env* 遺伝子の V3 領域の 5 アミノ酸を置換することにより CCR5 指向性に変化させ、動物継代によってアカゲザルに順化させることに成功した [18]。このアカゲザルに順化した CCR5 指向性 SHIV-MK38 は、感染サルの血漿中の抗体に対して元の SHIV-KS661 に比べて抵抗性になっていた。更に、中和モノクローナル抗体 KD-247 に対しても HIV-1 臨床分離株と同等レベルの中和抵抗性を獲得していた。*env* 遺伝子領域の遺伝子解析で 11 カ所の新たな変異が確認されたが、その殆どが N 結合型糖鎖付加部位やチャージの変化を伴うものであったことから、立体構造的な遮蔽により中和抗体がアクセスしにくくなっているものと推察される。今後、この中和抵抗性 CCR5 指向性 SHIV-MK38 が、直腸内接種で宿主に抗体応答が起きて高い血中ウイルス量で持続感染することができるか、すなわちワクチン評価のための適切な攻撃接種ウイルスとして期待できるか確認実験を行う予定である。

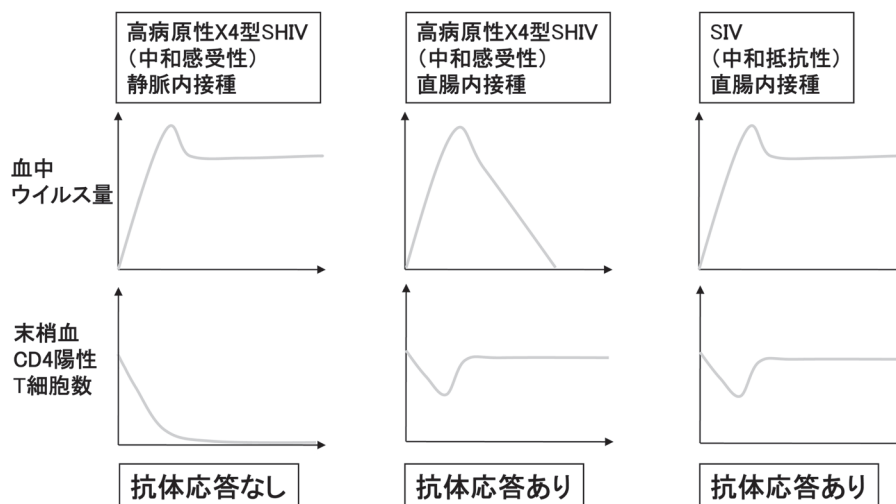


図 3. 高病原性 X4 型 SHIV と SIV の病態比較。高病原性 X4 型 SHIV は、静脈内接種により短期間に末梢血中の CD4 陽性 T 細胞を枯渇させ、宿主に抗体応答を起こさせずに高い血中ウイルス量で持続感染する。しかし、直腸内接種すると末梢血中の CD4 陽性 T 細胞は一過性の減少後回復するため宿主に抗体応答が起こり、血中ウイルス量は検出限以下に抑制される。一方、SIV は、直腸内接種で宿主に抗体応答が起こっても高い血中ウイルス量で持続感染する。

4. HIV-1mt モデル

ウイルスは複製する時に、感染した宿主細胞の様々な分子と相互作用をするので、感染過程を促進あるいは抑制する宿主因子との相互作用によって宿主域が決定される。ウイルス側は変異によって、感染抑制に働く相互作用を減少させ、感染促進に働くように変化させることによって新しい感染宿主を獲得すると考えられる。一般的には感染過程の最初のステップとなる宿主細胞側のレセプター分子との相互作用が重要と考えられ、HIV の場合は宿主細胞側の細胞表面に発現している CD4 や CCR5 / CXCR4 等の分子とウイルス側の Env との相互作用がこれにあたり、感染個体内での標的細胞や組織への親和性に関与していることは既に述べた。

HIV-1 がアカゲザルに感染しないことから作製された SHIV の *env* 遺伝子が HIV-1 由来であったことから、HIV-1 がアカゲザルに感染しない理由として、最初のステップである Env と細胞表面レセプターとの相互作用は関係なく、次のステップ以降の細胞内因子との相互作用が重要であることが示唆されていた。近年、APOBEC3G [19] や TRIM5 α [20] などの抑制因子が宿主細胞内に存在することが明らかとなり、ウイルス側は、これら宿主側の抑制因子に対抗する機構を発達させてきたことがわかってきた。これら

の宿主抑制因子と相互作用するウイルス側の遺伝子は *vif* 遺伝子 (APOBEC3G に対応) や *gag* 遺伝子 (TRIM5 α に対応) であり、アカゲザルの HIV-1 抵抗性に関与する。これらの事実から *gag* 遺伝子の一部と *vif* 遺伝子のみを SIV 由来にした、全ゲノムの 9 割以上が HIV-1 由来の組換え体ウイルス (HIV-1mt) が作製され [21, 22]、実際にマカク属のサルに感染可能であることが示された [23]。

我々も、HIV-1mt モデル研究を行っており [24, 25]、病原性モデルを確立するにはまだ少々時間がかかりそうであるが、このような研究は有効なエイズの動物モデル開発という意義に加えて、どのようにして種間感染が起こりうるのかを理解する上でも重要である。

おわりに

これまでに蓄積されてきた培養細胞レベルの研究で得られている知見が、感染個体レベルでどのように病原性となって現れるかを結び付けることによって、SIV / SHIV / HIV-1mt の強毒性・弱毒性の解明につながり、そこで得られる情報は実際のヒトのエイズの病原性解明と治療・予防法開発に大きく貢献するものと期待される。また、SIV / SHIV / HIV-1mt 研究を通して得られる研究材料や経験・技術・情報は、



有効なエイズの感染・発症動物モデル系を提供し、エイズの予防・治療法開発を行う多くの研究者に役立つであろう。

京都大学ウイルス研究所では、全国共同利用・共同研究拠点（ウイルス感染症・生命科学先端融合的共同研究拠点）として霊長類感染実験施設を利用した共同研究を受け入れており、エイズワクチン開発や新規治療法開発のための基礎研究を共同研究として行っている。

(http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/kyoten/kyodo_top.html)

引用文献

1. Fukasawa, M. *et al.* Sequence of simian immunodeficiency virus from African green monkey, a new member of the HIV/SIV group. *Nature* 333: 457–461 (1988).
2. Tsujimoto, H. *et al.* Sequence of a novel simian immunodeficiency virus from a wild-caught African mandrill. *Nature* 341: 539–541 (1989).
3. Hirsch, V. M., Olmsted, R. A., Murphey, C. M., Purcell, R. H. & Johnson, P. R. An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature* 339: 389–392 (1989).
4. Huet, T., Cheynier, R., Meyerhans, A., Roelants, G. & Wain, H. S. Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1 [see comments]. *Nature* 345: 356–359 (1990).
5. Gardner, M. B. Simian AIDS: an historical perspective. *J Med Primatol* 32: 180–186 (2003).
6. Veazey, R. S. *et al.* Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection. *Science* 280: 427–431 (1998).
7. Horiike, M. *et al.* Lymph nodes harbor viral reservoirs that cause rebound of plasma viremia in SIV-infected macaques upon cessation of combined antiretroviral therapy. *Virology* 423: 107–118, doi:10.1016/j.virol.2011.11.024 (2012).
8. Oue, M. *et al.* No viral evolution in the lymph nodes of simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaques during combined antiretroviral therapy. *J Virol* 87: 4789–4793, doi:10.1128/JVI.03367-12 (2013).
9. Shibata, R. *et al.* Generation of a chimeric human and simian immunodeficiency virus infectious to monkey peripheral blood mononuclear cells. *J Virol* 65: 3514–3520 (1991).
10. Reimann, K. A. *et al.* A chimeric simian/human immunodeficiency virus expressing a primary patient human immunodeficiency virus type 1 isolate env causes an AIDS-like disease after in vivo passage in rhesus monkeys. *J Virol* 70: 6922–6928 (1996).
11. Harouse, J. M., Gettie, A., Tan, R. C., Blanchard, J. & Cheng-Mayer, C. Distinct pathogenic sequela in rhesus macaques infected with CCR5 or CXCR4 utilizing SHIVs. *Science* 284: 816–819 (1999).
12. Fukazawa, Y. *et al.* Small intestine CD4+ T cells are profoundly depleted during acute simian-human immunodeficiency virus infection, regardless of viral pathogenicity. *J Virol* 82: 6039–6044, doi:10.1128/JVI.02753-07 (2008).
13. Inaba, K. *et al.* Small intestine CD4+ cell reduction and enteropathy in simian/human immunodeficiency virus KS661-infected rhesus macaques in the presence of low viral load. *J Gen Virol* 91: 773–781, doi:10.1099/vir.0.017368-0 (2010).
14. Brenchley, J. M. *et al.* CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* 200: 749–759 (2004).
15. Himeno, A. *et al.* 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, doi:10.1016/j.vaccine.2010.04.110 (2010).
16. Watkins, D. I., Burton, D. R., Kallas, E. G., Moore, J. P. & Koff, W. C. Nonhuman primate models and the failure of the Merck HIV-1 vaccine in humans. *Nat Med* 14: 617–621, doi:10.1038/nm.f.1759 (2008).
17. Nishimura, Y. *et al.* Highly pathogenic SHIVs and SIVs target different CD4+ T cell subsets in rhesus monkeys, explaining their divergent clinical courses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 12324–12329 (2004).
18. Matsuda, K. *et al.* 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, doi:10.1016/j.virol.2010.01.008 (2010).
19. Sheehy, A. M., Gaddis, N. C., Choi, J. D. & Malim, M. H. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* 418: 646–650, doi:10.1038/nature00939 (2002).
20. Stremlau, M. *et al.* The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* 427: 848–853, doi:10.1038/nature02343 (2004).

21. Hatziioannou, T. *et al.* Generation of simian-tropic HIV-1 by restriction factor evasion. *Science* 314: 95, doi:10.1126/science.1130994 (2006).
22. Kamada, K. *et al.* Generation of HIV-1 derivatives that productively infect macaque monkey lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 16959–16964 (2006).
23. Igarashi, T. *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 derivative with 7% simian immunodeficiency virus genetic content is able to establish infections in pig-tailed macaques. *J Virol* 81: 11549–11552, doi:10.1128/JVI.00960-07 (2007).
24. Otsuki, H., Yoneda, M., Igarashi, T. & Miura, T. Generation of a monkey-tropic human immunodeficiency virus type 1 carrying env from a CCR5-tropic subtype C clinical isolate. *Virology* 460–461: 1–10, doi:10.1016/j.virol.2014.04.037 (2014).
25. Nomaguchi, M. *et al.* Generation of rhesus macaque-tropic HIV-1 clones that are resistant to major anti-HIV-1 restriction factors. *J Virol* 87: 11447–11461, doi:10.1128/JVI.01549-13 (2013).