

## 2. ヒト化マウスモデルを用いたウイルス感染病態の解明

佐藤 佳

京都大学ウイルス研究所 ウイルス病態研究領域

ヒト免疫不全ウイルス1型 (HIV-1) は、エイズの原因ウイルスとして1983年に同定されて以来、現在に至るまで約7,000万人もの感染者を生み出したと推定されている。1990年代後半に抗レトロウイルス薬多剤併用療法が開発・導入されたことにより、日本を含む先進国において、エイズは”死の病”ではなくなった。また、分子生物学の発展により、HIV-1複製の分子メカニズムの詳細が明らかとなった。しかしながら、HIV-1感染症を根治する方法は未だ確立されていない。その一因として、HIV-1感染を支持・再現できる適切な動物モデルがないことが挙げられる。筆者らはこれまで、生体内におけるHIV-1感染病態のダイナミクスを再現することを目的として、“ヒト化マウス”という新たな動物モデルを作出することに成功した。また、このモデル動物を用い、生体内におけるHIV-1複製ダイナミクスにおけるウイルスタンパク質と宿主タンパク質の相克の詳細について解析を行ってきた。本稿では、現在の“ヒト化マウス”モデルに至るまでの歴史と筆者のこれまでの研究の経緯について概説すると共に、筆者らがこれまで“ヒト化マウス”モデルを用いて明らかにしてきた研究成果を紹介する。

ヒト免疫不全ウイルス1型 (HIV-1) は、エイズの原因ウイルスとして1983年に同定された<sup>1)</sup>。HIV-1は現在もパンデミック (世界的大流行) を引き起こしており、2014年末のHIV-1感染者数は約3,000万人、これまでの累計感染者数は7,000万人以上と推定されている (<http://www.unaids.org/en/>)。

ウイルス感染病態の解明のためには動物モデルの確立が不可欠であるが、HIV-1の宿主域はヒトとチンパンジーに限られており、感染動物モデルの作製はきわめて困難であった。そのため、エイズ病態の再現・解析は、HIV-1に近縁なサル属のレトロウイルスSIVmacを、アジア産のアカゲザルに感染させることで代用されている。しかしながら、HIV-1はチンパンジーのウイルスSIVcpzを起源とするの

に対し、SIVmacは、アフリカに生息するスーティーマンガベイという小型のサルのウイルスSIVsmmのアカゲザルへの継代接種により人為的に作製されたウイルス<sup>2)</sup>であり、HIV-1とSIVmacは、1) 進化系譜; 2) 細胞指向性; 3) コードしている遺伝子の種類・機能、において異質である。

抗レトロウイルス薬多剤併用療法が1990年代半ばに開発され、エイズを含むHIV-1感染症の治療成績は格段に改善し、日本を含む先進国において、エイズは”死の病”ではなくなった。しかしながら、HIV-1感染症を根治する方法は未だ確立されていない。また、分子細胞生物学的解析手法の発展により、HIV-1をはじめとしたレトロウイルスの生活環・複製の分子メカニズムの詳細が明らかになってきている。しかしながら、生体内 (*in vivo*) においてHIV-1はどのように複製・増殖するのか、またどのようにして病原性を発現するのか、その動態については不明な点が多い。これらの未解決の問題の一因として、HIV-1感染を支持・再現できる適切な動物モデルがないことが挙げられる。

### 1. “ヒト化マウス (humanized mouse)” 誕生までの歴史

まず始めに、現在の”ヒト化マウス”モデルに至るまでの歴史・経緯について概説する (図1)。

#### 連絡先

〒606-8507

京都府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

TEL: 075-751-4813

FAX: 075-751-4812

E-mail: ksato@virus.kyoto-u.ac.jp

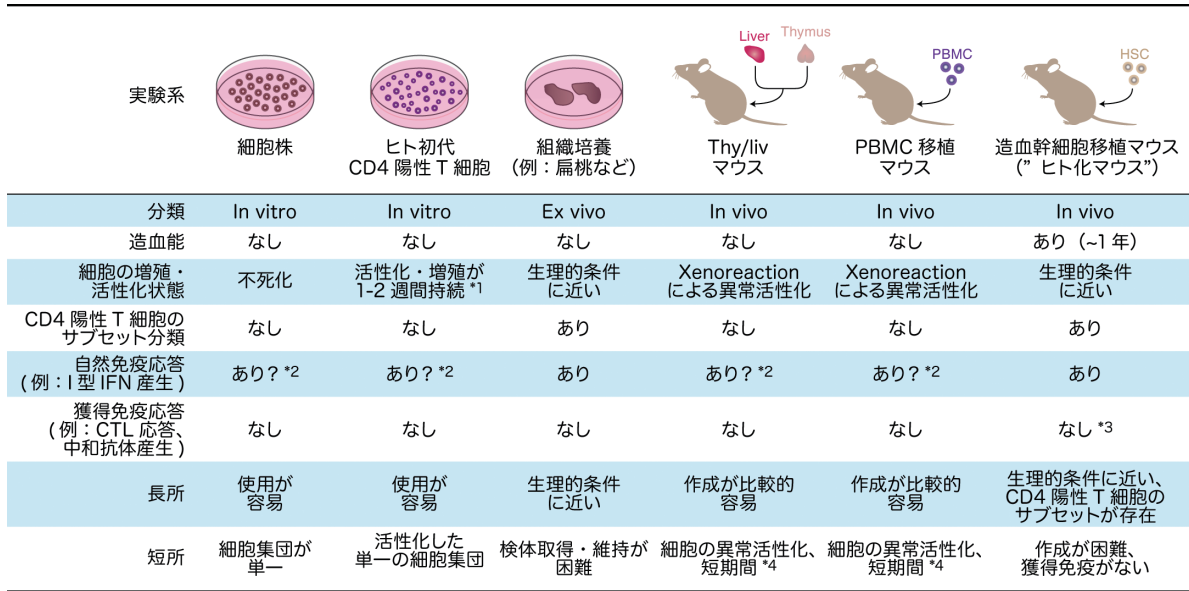


図1 "ヒト化マウス" と他の HIV-1 感染実験系の比較

HIV-1 感染実験に頻用される実験系についてまとめた。\*1, HIV-1 感染を支持するためには、末梢血などから分離されたヒト初代 CD4 陽性 T 細胞は、PHA や抗 CD3/CD28 抗体などの mitogen 刺激によって予め活性化させておく必要がある。逆に言えば、末梢血などから分離されたヒト初代 CD4 陽性 T 細胞は、人為的な活性化刺激なしでは HIV-1 感染・複製をほとんど支持することができない。\*2, HIV-1 感染などの刺激によって、I 型インターフェロン (interferon; IFN) の産生および interferon-stimulating genes (ISGs) の発現誘導は確認することができる。\*3, ヒト化マウスで de novo 分化したヒト T 細胞はマウス胸腺において、マウス MHC を介して教育される。そのため、cytotoxic T lymphocyte (CTL) 応答や中和抗体産生に代表される適切な獲得免疫応答は惹起できない。\*4, 移植されたヒト細胞がマウス組織を異物として認識し、xenoreaction を惹起する。Xenoreaction によって異常活性化したヒト CD4 陽性 T 細胞が HIV-1 感染・複製を高効率に支持するものの、xenoreactive な T 細胞によって引き起こされる GVHD のために、マウスを長期間維持することができない。

世界初の"ヒト化マウス"は、1983年(筆者が1歳の時、奇しくも HIV の発見・同定と同年である)に作出された。「マウスの"ヒト化 (humanization) 」"という試みは、Bosma ら<sup>3)</sup>によって、純系の突然変異マウスシリーズの中から、C.B-17 という、T 細胞と B 細胞の欠損による重度複合免疫不全 (severe combined immunodeficiency; SCID) マウスが発見されたことに端を発する。同年、McCune, Weissman ら<sup>4)</sup>によって、この C.B-17/SCID マウスにヒト胎児由来の胸腺組織と肝組織を移植した、世界初の"ヒト化マウス (Thy/liv マウス)"が作製された(図1)。

1988年(筆者が6歳の時)、Namikawa, McCune ら<sup>5)</sup>がこのマウスに HIV-1 を接種し、初めての HIV-1 感染動物モデルを作出することに成功した。しかし、このモデル系は、HIV-1 増殖を移植組織であるヒト胸腺内でのみ支持することができた。逆に言えば、全身性のウイルス増殖は再現できないモデル系であった(図1)。

その後、1991年以降、C.B-17/SCID マウス、あるいは C.B-17/SCID マウスと NOD (non-obese diabetes; 補体成分の欠損により、先天的に I 型糖尿病を発症する) マウスを交配した NOD/SCID マウスがレシピエントマウスとし

て用いられるようになる。これらのマウスにヒト末梢血由来 CD4 陽性 T 細胞を移植した hu-PBL-SCID マウス(あるいは PBMC-SCID マウス)が作出され、新たな HIV-1 感染動物モデルとなった<sup>6,7)</sup>。このモデル系では、移植したヒト CD4 陽性 T 細胞が HIV-1 複製を支持するため、全身性のウイルス増殖を確認することが可能となった。またこれにより、開発が進んでいた抗 HIV 薬の in vivo における評価も可能となった(図1)。しかしこのモデル系の問題は、移植したヒト CD4 陽性 T 細胞が、レシピエントマウスの組織を異物として認識し (graft-versus-host disease; GVHD)、そのような xenoreaction によってヒト CD4 陽性 T 細胞が異常活性化してしまっていること<sup>8)</sup>、そして GVHD により、このキメラマウスは数か月しか生存することができないことが難点であった。この問題点を克服するために、より良い(つまり、より「ヒト細胞の移植に適した」)レシピエントマウスの作出が世界的に進められた。

そして2002年(筆者が成人した年)、伊藤(実験動物中央研究所)、菅村、小柳らによって、従来の NOD/SCID マウスに IL2 受容体  $\gamma$  鎖ノックアウトマウスをかけ合わ

せた” NOG マウス (NOD/SCID/IL2R $\gamma$  KO マウス)” が作出された<sup>9)</sup>。NOG マウスは主要な免疫細胞 (T 細胞, B 細胞, NK 細胞など) を先天的に欠損しており, それにより, 移植された異種の細胞が高効率に定着する特徴を有している<sup>9)</sup>。このマウスにヒト CD34 陽性造血幹細胞を移植することにより, ヒト白血球の造血が成立すること, またそれを 1 年以上も維持できることが確認された。このマウスは HIV-1 複製を 1 年近くも維持できることが可能であり, また, hu-PBL-SCID マウスで見られたような GVHD は誘起されない (図 1)。さらに, hu-PBL-SCID マウスの中で HIV-1 複製を支持するのは xenoreactive な活性化ヒト CD4 陽性 T 細胞であったのに対し, このマウス (以降, 話を簡略化するために, この” ヒト CD34 陽性造血幹細胞移植 NOG マウス” を” ヒト化マウス” と呼ぶ) では *de novo* なヒト造血がレシピエントマウスの中で成されるため, ヒト化マウス中のヒト CD4 陽性 T 細胞は, ナイブ, メモリー, 制御性 T 細胞など, 各種サブセットに分類することができる (図 1)。すなわち, より生理的条件下に近い生体内環境を再現していると言える<sup>10, 11)</sup>。実際, このヒト化マウスに CCR5 指向性 HIV-1 (HIV-1 は, 感染の際の受容体として CD4 を, 共受容体として CXCR4 あるいは CCR5 を用いるが, 臨床分離株のほとんどは CCR5 を用いることが知られている) を接種すると, メモリー CD4 陽性 T 細胞の漸進的な減少という, HIV-1 感染者で確認される感染病態を忠実に再現することが, 筆者らのグループを含めた複数の論文によって明らかとなっている<sup>12-19)</sup>。

これ以降, 類似の, あるいはさらに改変の進んだヒト造血幹細胞移植ヒト化マウスの開発が世界中で展開され, 現在ではバラエティに富んだレシピエントマウス, および各種ヒト細胞・組織移植マウスシリーズが開発されている。

## 2. “ヒト化マウス” の長所と短所

次に, このヒト化マウスモデルの長所と短所について概説する。

長所は上述のとおり, ヒト生体内環境に近似した, 生理的条件下の (すなわち, 異常活性化していない) ヒト CD4 陽性 T 細胞サブセットを長期間維持できる点である。一方, “ヒト化マウス” の短所は, 正常な獲得免疫応答を惹起できない点にある。たとえば, ヒト化マウス内で分化・成熟するヒト T 細胞はマウスの胸腺で教育されるため, そのヒト T 細胞は, ヒトの主要組織適合抗原 (MHC) を認識することができない。また, ヒト化マウスではヒト IgM, IgG の産生は認められるものの, 抗原特異的な抗体 (つまり中和抗体) の産生はほとんど確認されない。これらの短所を改善すべく, 主に欧州ではレシピエントマウスのさらなる遺伝子改変が進められており, より正常に近いヒト免疫細胞・免疫環境を再現するために, 複数のヒト遺伝子をノックインしたマウスの作製が進められている<sup>20)</sup>。

一方, 米国では, 造血幹細胞に加えて胎児の胸腺組織や肝組織を共移植したマウス (bone marrow/liver/thymus の略語として” BLT マウス” と通称される) が作製されている<sup>21)</sup>。BLT マウスではより機能的なヒト T 細胞の分化・成熟が認められるが, 機能的に分化したヒト T 細胞は, 今度はマウス組織およびマウス MHC を異物と認識してしまい, GVHD に似た異常活性化を引き起こしてしまうようである。また, BLT マウスの作出には中絶胎児の組織を使用するため, 生命倫理の観点から, 米国以外での使用例はほとんどない。

モデル動物はあくまで「モデル」であり, 「真の状態 (HIV 感染症の場合における HIV 感染者)」を完全に再現することは不可能である。上述のように, ヒト化マウスモデルにはいくつかの短所があるが, それを逆に長所として捉えることも可能である。たとえば, HIV 感染症における「真の状態」とは, ウイルス増殖とそれに対する獲得免疫応答の平衡状態を指すが, その動的平衡状態がウイルス側の要因によって維持されているのか, 免疫活性によって維持されているのかを検証するのは困難である。一方, ヒト化マウスモデルは獲得免疫応答が惹起されないため, 生体内で HIV が複製・増殖する際に選択する戦略をウイルス側の視点から捉えることが可能である。また, 以下に詳述するが, ヒトは「内因性免疫 (intrinsic immunity)」と呼ばれる抗ウイルスタンパク質を先天的に有している<sup>22-25)</sup>。生体内 HIV 複製過程において, HIV がどのようにして内因性免疫を回避しているかについては, 適切な動物モデルが存在しなかったため, ほとんど明らかとなっていなかった。

## 3. “ヒト化マウス” を用いた HIV-1 感染病態の研究： 2008-2010

筆者は 2005 年に京都大学大学院生命科学研究所 (ウイルス研究所・小柳研究室) に進学し, 修士課程では培養細胞を用いた HIV-1 複製, 特に HIV-1 複製に関わるヒトタンパク質の機能解析を行った<sup>26, 27)</sup>。その後の博士課程から, 幸運なことに, HIV-1 感染ヒト化マウスモデルの研究に従事する機会をいただいた。上述のとおり, 当時 (2000 年代後半) は世界中で HIV-1 感染ヒト化マウスモデルの開発に関する報告が頻出しており, その中でいかにオリジナルな研究を展開・発表していくかでいつも頭を悩ませていたのを覚えている。類似のモデル系を用いた研究に関する論文がすでに多数報告されていたため, 「HIV-1 複製を支持できる新たな動物モデルを作出した」だけでは学術論文にならない。どのようにして最初の論文をまとめるか, 指導教官であった小柳教授はもちろんのこと, 当時カナダから短期留学でラボに滞在していた Chuanyi Nie 君 (ジョニー君) や, マウス実験に実際に従事していた三沢女史らと, 連日ああでもないこうでもないという議論を交わしていたのを覚えている。当時の HIV-1 感染ヒト化マウスモ

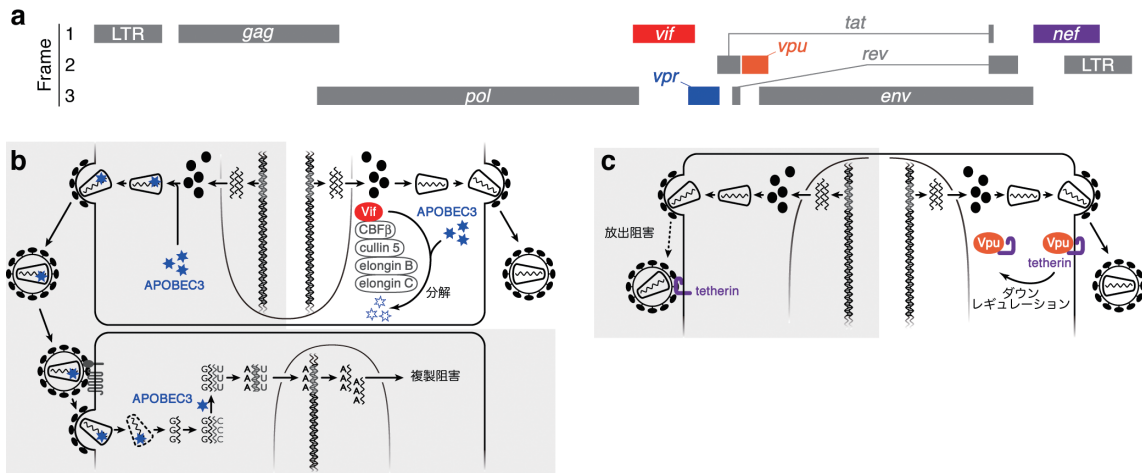


図2 「内因性免疫 (intrinsic immunity)」とウイルス因子

- (a) HIV-1 のゲノム構造とウイルス因子. HIV-1 は、約 10 kb のプラス鎖 RNA ウイルスであり、9つの遺伝子をコードしている。そのうち 4つの遺伝子 (*vif*, *vpu*, *vpr*, *nef*) は「アクセサリ遺伝子」あるいは「ウイルス因子」と呼ばれる。これらウイルス因子の機能については、培養細胞を用いた実験系においてその分子メカニズムの詳細が解析されているが、これらの因子の重要性・必要性は、細胞の種類や培養状態などによって異なる。また、生体内 HIV-1 複製を支持できる動物モデルが存在しなかったため、これらウイルス因子が生体内 HIV-1 複製においてどのような役割を担っているかについては不明な点が多い。
- (b) APOBEC3 による抗ウイルス効果とウイルス因子 Vif による拮抗阻害作用. Vif 非存在下 (図中グレー) において、ウイルス産生細胞内で発現する APOBEC3 タンパク質は、産生されるウイルス粒子に取り込まれ、次感染細胞に持ち込まれる。HIV-1 の逆転写過程において、細胞性シチジン脱アミノ化酵素である APOBEC3 タンパク質は、ウイルスのマイナス鎖 DNA のシトシン (C) を脱アミノ化することによってウラシル (U) へと変換する。これにより、ウイルスのプラス鎖 DNA のグアニン (G) はアデニン (A) へと変換される (G → A 変異)。この G → A 変異がウイルス遺伝子のミスセンス変異あるいはナンセンス変異となり、ウイルスの複製能・感染性を失効させる。一方、Vif 存在下においては、Vif は細胞性 E3 ユビキチンリガーゼ複合体である cullin 5, elongin B/C, CBFβ を動員し、APOBEC3 タンパク質をユビキチン-プロテアソーム経路依存的に分解することによって、APOBEC3 の抗ウイルス効果を拮抗阻害する。
- (c) tetherin による抗ウイルス効果とウイルス因子 Vpu による拮抗阻害作用. Vpu 非存在下 (図中グレー) において、ウイルス産生細胞の細胞質膜上に発現する細胞性膜貫通タンパク質 tetherin は、出芽したウイルス粒子を細胞表面に繋留 ("tether") することにより、その放出を阻害する。一方、Vpu 存在下においては、Vpu は細胞質膜上に発現する tetherin ダウンレギュレーションすることによって、tetherin の抗ウイルス効果を拮抗阻害する。

デルの論文の大半は、「HIV-1 を接種した→ (とりあえず) 増えた」「CD4 陽性 T 細胞が減った」という現象を記述するものが大半であった。小柳教授は学問に対して厳しい方であった (ある) ため、「同じような現象を記述しただけの論文ではダメだ」「なにかオリジナリティーを示す論文でなければ」とのお考えであった。しかも、今でこそ三沢女史の多大なる貢献のおかげで安定的にヒト化マウスが供給されるすばらしい研究環境が整っているものの、当時はマウスの数・質ともにきわめて限られた状況であった (注: ヒト化マウスはある種の「ヒト細胞移植キメラマウス」であるため、ヒト白血球の定着効率はマウスやドナーによって著しく異なるのが常である。しかし現在は、三沢女史 (小柳研究室技術補佐員) のスーパーテクニックにより、ほぼ同等なヒト細胞の定着率を維持したヒト化マウスの安定的な供給が可能となっている)。そのような状況の下、どのようにしてどのようなオリジナリティーを見出せるのか。

ジョニー君とああでもないこうでもないと、ビールを飲みながら連日京都の木屋町で頭を悩ませていたのも、今となってはいい思い出である。

ある日、修士課程までに培ってきた、培養細胞における HIV-1 の細胞生物学の知識と技術をヒト化マウスモデルに盛り込んではどうかと考えた。そこでまず、HIV-1 感染ヒト化マウスの中で HIV-1 複製を支持している細胞を、flow cytometry で検出することを試みた。HIV-1 の Gag タンパク質 (細胞内抗原) に対する抗体を用いて flow cytometry を行ったところ、見事抗原陽性の細胞を脾臓において確認することに成功した。さらに他の抗体との共染色を施すことにより、感染細胞の表面に発現している CD4 分子は強力にダウンレギュレーションされていること、そして感染細胞の大半は、「エフェクターメモリー」というサブセットに分類される CD4T 細胞 (CD45RO+ CD45RA- CCR7-) であることを明らかにした。当時、flow cytometry によ

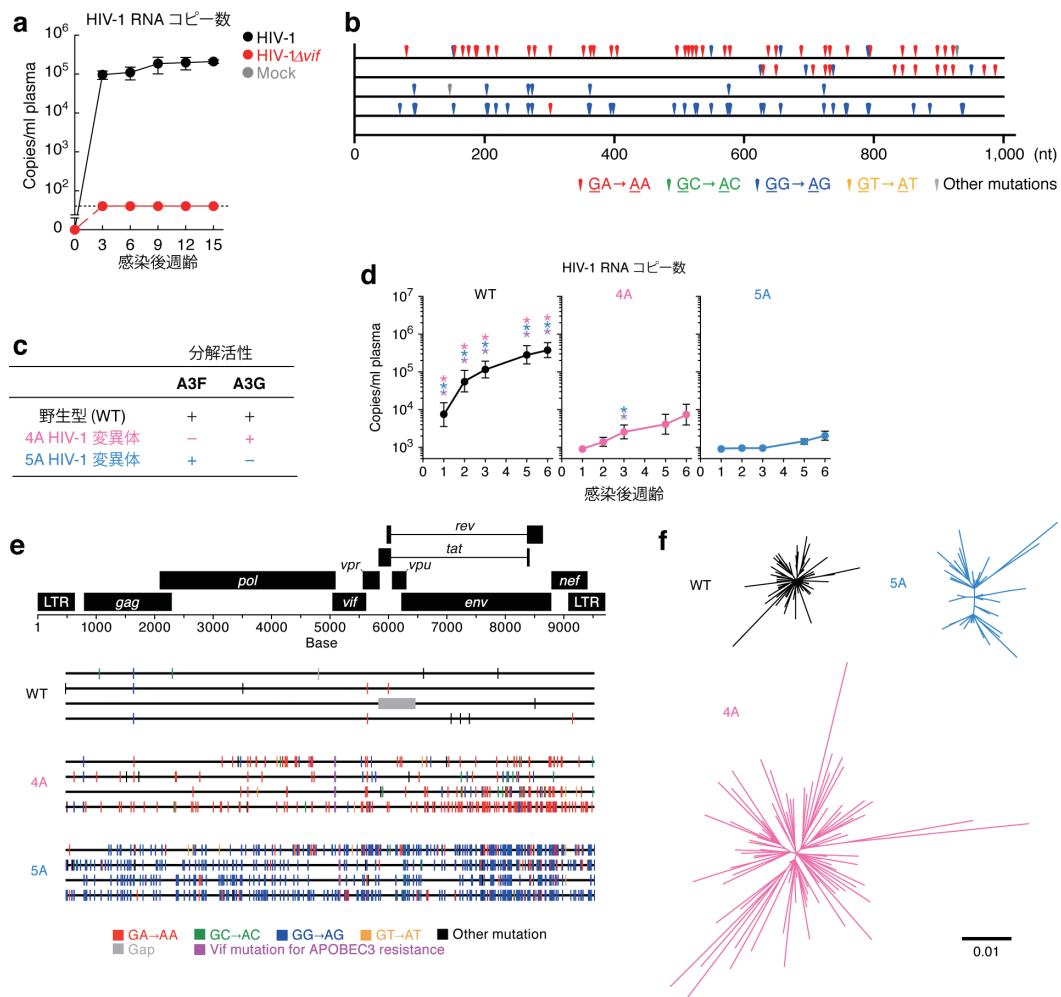


図3 生体内 HIV-1 複製における Vif-APOBEC3 の相克

(a and b) ヒト化マウスに、野生型 (wild-type; WT, 黒) HIV-1 または *vif* 欠損 HIV-1 (赤) を接種した。(a) 血漿中の HIV-1 RNA コピー数。検出限界を点線で示す。(b) HIV-1 プロウイルス DNA 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。

(c-f) ヒト化マウスに、WT HIV-1 (黒), 4A HIV-1 変異体 (ピンク), または HIV-1 変異体 (水色) を接種した。(c) 各ウイルスの A3F, A3G 分解活性。WT HIV-1 の Vif タンパク質は A3F, A3G 共に分解することができるが、4A HIV-1 は A3F を、5A HIV-1 は A3G をそれぞれ分解できない。すなわち、4A HIV-1 は A3F の、5A HIV-1 は A3G の抗ウイルス効果の影響のみを受ける変異体である。(d) 血漿中の HIV-1 RNA コピー数。\*,  $P < 0.05$  (by Student's *t* test)。(e) HIV-1 プロウイルス DNA 配列解析。感染後 6 週齢のヒト化マウス脾臓より DNA を回収し、プロウイルス全長の塩基配列解析を行った。その代表的な結果を示す。(f) HIV-1 ウイルス RNA 配列解析。感染後 6 週齢のヒト化マウス血漿より RNA を回収し、ウイルス RNA (すなわち、ヒト化マウスで増殖しているウイルス) *env* 遺伝子の塩基配列を single genome sequence 法によって解析した。得られた塩基配列を基に作成した系統樹を示す。

て HIV-1 感染ヒト化マウスの中の感染細胞の characterization を試みた論文はなかった。これを突破口にジョニー君と一緒に論文を書き進め、晴れて僕にとって最初の HIV-1 感染ヒト化マウスに関する学術論文を出版することができた<sup>17)</sup>。

#### 4. “ヒト化マウス” を用いた HIV-1 感染病態の研究： 2011- 現在

上述のように、まずは HIV-1 感染ヒト化マウスについての初報を上梓した。では、次に何ができるか？

現在に至るまで、HIV-1 感染ヒト化マウスの基本的な用途、その世界的なトレンドは、” toward cure for HIV/

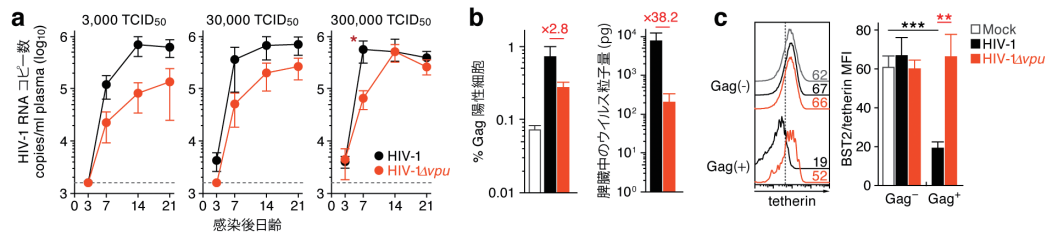


図4 生体内 HIV-1 複製における Vpu-tetherin の相克

3点の接種量 (3,000, 30,000, 300,000 TCID<sub>50</sub>/mouse) で WT HIV-1 (黒) または *vpu* 欠損 HIV-1 (オレンジ) 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 HIV-1 抗原 (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. (c) 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 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, tetherin の mean fluorescent intensity (MFI) を示す. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  (Student's *t* test).

AIDS”である. そのための動物モデルであり, 新たな治療法の模索, 検証, 評価のためのツールとして使用する, というのが, 世界中ほとんどの HIV-1 感染ヒト化マウスを用いた研究者のスタンスである. だが, 本当に方向性はそれだけなのか? 筆者は医師でも獣医師でも薬剤師でもない, いわゆる”ノンライセンス”の研究者 (卵かヒヨコ) である. 「治療」「予防」が感染症研究の最大のゴールではあることは論を俟たないが, 目指すべきゴールとそのためにもゆるべき道筋はそれだけなのだろうか? このモデル動物を, もっと基礎学術的な用途に用いることはできないのだろうか? また正直なところ, 同じような土俵で, 同じようなトレンドに乗って研究を進めて, 果たして欧米のグループに勝てるのだろうか?, という不安もあった.

上述のように, 筆者は HIV-1 複製と宿主因子の関連についての研究を進めるためのある程度の知識と技術は習得していた. そこで筆者は, あえて世界的な潮流にはのらず, 「ヒト化マウスモデルで HIV-1 複製の基礎医学研究をする」という戦略を立てた.

ヒト細胞は, HIV-1 を始めとしたレンチウイルスの複製を強く抑制するタンパク質 (「内因性免疫 (intrinsic immunity)」あるいは「宿主因子」と呼ばれる) をコードしている<sup>22-25</sup>. その例として, HIV-1 ゲノムに G → A の変異を挿入することによりウイルスの感染性を失効させる細胞性シチジン脱アミノ化酵素である APOBEC3 (A3) ファミリータンパク質<sup>23, 25</sup> (図 2b), 出芽したウイルス粒子を感染細胞上に繫留し, その放出を阻害する細胞性膜貫通タンパク質 tetherin<sup>22, 24</sup> などが挙げられる (図 2c). 一方, HIV-1 は, A3 ファミリータンパク質を分解する Vif タンパク質, tetherin をダウンレギュレーションする Vpu タンパク質を獲得することにより, 宿主因子の抗ウイルス活性を相殺する<sup>11</sup> (図 2a). そのような「ウイルスタンパク質と宿主因子の相克」が, 当時の (また現在に至るまでの)

HIV-1 の細胞生物学の dogma である. しかし, これらの知見はあくまで培養細胞を用いて得られたものであり, 生体内における HIV-1 増殖・複製の過程において, この相克が, いつ, どこで, どのようにして, あるいはどの程度の役割を果たしているのかについては明らかではない. そこで筆者は, 上述のような知識と技術をヒト化マウスモデルに持ち込み, 「ウイルスタンパク質と宿主因子の相克」が生体内 HIV-1 増殖・複製において果たしている役割を明らかにすることとした.

#### 4-1. Vif と APOBEC3<sup>28, 29</sup>

生体内 HIV-1 複製における Vif と A3 ファミリータンパク質の機能を明らかにすることを目的として, 筆者らはまず, Vif 欠損 HIV-1 と野生型 HIV-1 をそれぞれヒト化マウスに接種した. 野生型 HIV-1 は効率良く増殖したのに対し, Vif 欠損 HIV-1 はヒト化マウス内でまったく増殖しなかった<sup>28</sup> (図 3a). また, HIV-1 のプロウイルス DNA に, A3 によるものと思われる高頻度の G → A 変異が確認された<sup>28</sup> (図 3b). 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, A3 ファミリータンパク質は生体内においても強力な抗ウイルス能を発揮する宿主防御因子であることが明らかとなった.

A3 ファミリータンパク質は, 7つのタンパク質 (A3A, B, C, D, F, G, H) から構成される. その中でも特に, A3G と A3F が強力な抗 HIV-1 活性を有すること, そしてこれらのタンパク質の活性は Vif によって相殺されることが知られている<sup>23, 25</sup>. 上述の筆者らの研究により, A3 ファミリータンパク質が生体内 HIV-1 増殖を強力に抑制することが明らかとなったが, どの A3 ファミリータンパク質, 特に A3G と A3F のいずれが特にウイルス増殖抑制に寄与しているかは不明であった. これを明らかにするために, 筆者らは, A3F のみを分解できない変異体 Vif をコードする



図5 Special Thanks!

(a) ジョニー君(左)と、2009年2月、バンクーバーにて。(b) 初代佐藤チーム(2013年10月、京都にて。左から：柴田さん、小林さん、三沢さん、筆者、木村くん)。(c) 2代目佐藤チーム(2015年10月、京都にて。左から：山田さん、吉川くん、三沢さん、筆者、中野くん)。

HIV-1 (4A 変異体) と A3G のみを分解できない変異体 Vif をコードする HIV-1 (5A 変異体) をリバーシジェネティクス法によってそれぞれ作製し、これらのウイルスをヒト化マウスに接種した (図 3c)。その結果、4A 変異体および 5A 変異体のヒト化マウスにおける増殖効率は、野生型 HIV-1 に比して有意に低く、また、5A 変異体の増殖効率は、4A 変異体のそれに比して有意に低かった<sup>29)</sup>(図 3d)。また、A3G は特に GG → AG 変異を、A3F は GA → AA 変異をそれぞれ指向することが知られている<sup>30)</sup>。そこで、感染後 6 週の脾臓におけるプロウイルス配列を解析した結果、4A 変異体 HIV-1 感染マウスでは GA → AA 変異が顕著に観察されたのに対し、5A 変異体 HIV-1 感染マウスでは GG → AG 変異が顕著に観察された<sup>29)</sup>(図 3e)。以上の結果から、生体内 HIV-1 感染動態において、CD4 陽性 T 細胞に内在的に発現する A3F、A3G が共に抗ウイルス活性を示すこと、また、A3G の抗ウイルス活性は A3F のそれよりも強力であることが示唆された。さらに興味深いことに、血漿中のウイルス RNA (すなわち、ヒト化マウスで増殖しているウイルス粒子中の RNA) の配列は、脾臓の細胞内のプロウイルス DNA で観察された変異パターンと異なっており、特に 4A 変異体 HIV-1 感染マウスで増殖するウイルスの多様性が有意に上昇していた<sup>29)</sup>(図 3f)。これは、A3G によって惹起される GG → AG 変異は終止変異を誘導しやすい (たとえば、TGG はトリプトファンをコードするコドンであるが、ここに GG → AG 変異が挿入されると TAG [終止コドン] へと置換される) のに対し、A3F によって惹起される GA → AA 変異は終止変異を誘導しにくく、非同義置換が蓄積するためと考えられる<sup>29, 30)</sup>。これらの結果から、A3F は強力な抗 HIV-1 宿主因子であると同時に、HIV-1 の多様化を促進する機能も有することが明らかとなった。この事実は、A3F による変異によって、薬剤耐性株や免疫逃避株の出現など、HIV-1 にとって有益な進化が誘導される可能性を示唆している。実際、筆者らの研究

により、感染共受容体を CCR5 から CXCR4 に変化させたウイルスが 4A 変異体 HIV-1 感染マウス特異的に出現すること、そして、その機能変異が A3F によって惹起されたものであることが明らかとなっている<sup>29)</sup>。さらに最近、同様の結果が臨床検体においても確認されることが報告されている<sup>31)</sup>。筆者らの結果は、A3F の酵素活性はむしろ、ウイルスに有益に働いてしまう可能性、すなわち、宿主にとってもウイルスにとっても諸刃の剣として働いている可能性を示唆している。

#### 4.2. Vpu と tetherin<sup>32)</sup>

次に、生体内 HIV-1 複製における Vpu と 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 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<sup>32)</sup>(図 4a)。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 感染マウスの方が高かった<sup>32)</sup>(図 4b)。さらに、野生型 HIV-1 感染細胞の 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<sup>32)</sup>(図 4c)。以上の結果から、Vpu は生体内 HIV-1 増殖に必須ではないものの、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、特に感染急性期における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。

#### 5. “ヒト化マウス” を用いた HIV-1 感染病態の研究：今後の展望

これまで、ヒト化マウスモデルができるまでの経緯と、

筆者がこれまで進めてきたヒト化マウスモデルを用いた研究概要<sup>10, 11, 17, 19, 28, 29, 32-35)</sup>のそれぞれについて、原則的に chronological に記述した。最後に、このモデル動物を用いてできること、そして、これから展開していきたいと考えている研究の展望について概説し、本稿を終えたい。

筆者はこれまで、ヒト化マウスモデル（生体内 HIV-1 増殖）におけるウイルスと宿主の相克をテーマに研究を進めてきた。これまでの研究の過程で、いわゆる既存の実験ウイルス学だけではアプローチが困難な問題・現象があることに気づいた。たとえば、血液中に充満するウイルス粒子は、そもそもどこから産生されているのか？ ウイルスを産生している細胞の寿命はどの程度で、その細胞は死ぬまでどのくらいの量のウイルス粒子を産生するのか？ 生体内ではどのようにしてウイルス感染が維持されているのか（ウイルス粒子を介した伝播なのか？ または細胞間接触によるのか？ 両方だとしたら、それらの比率は？）？ 感染細胞はどの程度の頻度で臓器間を移動するのか？ それらの現象に、宿主（ヒト）のタンパク質はどのように寄与しているのか？ など。

既存の実験ウイルス学的なアプローチだけで、これらの問いに解を与えることはおそらくきわめて困難である。過去、分子生物学的実験手法の確立・勃興がウイルス学の発展に多大なる貢献を果たしたように、現在はまだウイルス学にとって「異分野」として認知されているような学術分野、たとえばバイオインフォマティクスや数理科学、定量生物学、システムズバイオロジー、ビッグデータという別の視点・観点からの分野横断的な理解が、これからのウイルス学の発展に寄与していくものと考えている。そのような試みは、基礎ウイルス学的に重要な知見をもたらすのみならず、今後の感染症の「治療」「予防」という医学的なゴールにも繋がるものとなるはずである。そして、そのようなさまざまな糸が密接に絡み合い、融合することで、新しいオリジナルで独創的な「糸」を生み出していくことができれば、と考えている。

## 謝 辞

これまでの研究を進めていくにあたり、恩師である小柳義夫教授をはじめとしたさまざまな先生方に多大なるご指導をいただきましたことを、この場をお借りして感謝申し上げます。今後ともご指導ご鞭撻のほど、何卒よろしくお願い致します。また、杉浦奨励賞にご推薦いただきました小柳義夫先生、塩田達雄先生、これまでの私の研究を評価してくださいました選考委員の先生方に、深く御礼申し上げます。

そして、ヒト化マウスの作成から感染実験まで、多方面でのサポートをいただいている三沢尚子女史には、この場をお借りして深謝致します。本当にありがとうございます。また、学術論文の書き方をいちから教えてくれた”ジョ

ニー” Chuanyi Nie 君（現・クイーンズ大学医師）、拙いリーダーの下に参集し研究に励んでくれた柴田（竹内）潤子さん（現・国立感染症研究所博士研究員）、小林朋子さん（現・東京農業大助教）、中野雄介君（現・小柳研博士研究員）にも、心から感謝しています。そして、これまであるいは現在、小柳研究室で僕のプロジェクトに従事してくれている（くれた）大学院生のみなさんにも、とても感謝しています。至らぬところ多々あるかと思いますが、これからも楽しく頑張っていけたらと思っています。皆様、これからもどうぞよろしくお祈りします。

## Conflict-of-interest（利益相反開示）

本稿に関連し、開示すべき利益相反状態にある企業等はありません。

## 参考文献

- 1) Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dautet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., Montagnier, L.: Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220:868-871, 1983.
- 2) Letvin, N.L., Daniel, M.D., Sehgal, P.K., Desrosiers, R.C., Hunt, R.D., Waldron, L.M., MacKey, J.J., Schmidt, D.K., Chalifoux, L.V., King, N.W.: Induction of AIDS-like disease in macaque monkeys with T-cell tropic retrovirus STLV-III. *Science* 230:71-73, 1985.
- 3) Bosma, G.C., Custer, R.P., Bosma, M.J.: A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* 301:527-530, 1983.
- 4) McCune, J.M., Namikawa, R., Kaneshima, H., Shultz, L.D., Lieberman, M., Weissman, I.L.: The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science* 241:1632-1639, 1988.
- 5) Namikawa, R., Kaneshima, H., Lieberman, M., Weissman, I.L., McCune, J.M.: Infection of the SCID-hu mouse by HIV-1. *Science* 242:1684-1686, 1988.
- 6) 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.
- 7) Mosier, D.E., Gulizia, R.J., Baird, S.M., Wilson, D.B., Spector, D.H., Spector, S.A.: Human immunodeficiency virus infection of human-PBL-SCID mice. *Science* 251:791-794, 1991.
- 8) Nakata, H., Maeda, K., Miyakawa, T., Shibayama, S., Matsuo, M., Takaoka, Y., Ito, M., Koyanagi, Y., Mitsuya, H.: Potent anti-R5 human immunodeficiency virus type 1 effects of a CCR5 antagonist, AK602/ONO4128/GW873140, in a novel human peripheral



- blood mononuclear cell nonobese diabetic-SCID, interleukin-2 receptor gamma-chain-knocked-out AIDS mouse model. *J Virol* 79:2087-2096, 2005.
- 9) 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)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood* 100:3175-3182, 2002.
  - 10) Sato, K., Koyanagi, Y.: The mouse is out of the bag: insights and perspectives on HIV-1-infected humanized mouse models. *Exp Biol Med* 236:977-985, 2011.
  - 11) Yamada, E., Yoshikawa, R., Nakano, Y., Misawa, N., Koyanagi, Y., Sato, K.: Impacts of humanized mouse models on the investigation of HIV-1 infection: illuminating the roles of viral accessory proteins in vivo. *Viruses* 7:1373-1390, 2015.
  - 12) Baenziger, S., Tussiwand, R., Schlaepfer, E., Mazzuchelli, L., Heikenwalder, M., Kurrer, M.O., Behnke, S., Frey, J., Oxenius, A., Joller, H., Aguzzi, A., Manz, M.G., Speck, R.F.: Disseminated and sustained HIV infection in CD34+ cord blood cell-transplanted Rag2<sup>-/-</sup>-gamma c<sup>-/-</sup> mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:15951-15956, 2006.
  - 13) Berges, B.K., Wheat, W.H., Palmer, B.E., Connick, E., Akkina, R.: HIV-1 infection and CD4 T cell depletion in the humanized Rag2<sup>-/-</sup>-gamma c<sup>-/-</sup> (RAG-hu) mouse model. *Retrovirology* 3:76, 2006.
  - 14) Sun, Z., Denton, P.W., Estes, J.D., Othieno, F.A., Wei, B.L., Wege, A.K., Melkus, M.W., Padgett-Thomas, A., Zupancic, M., Haase, A.T., Garcia, J.V.: Intrarectal transmission, systemic infection, and CD4+ T cell depletion in humanized mice infected with HIV-1. *J Exp Med* 204:705-714, 2007.
  - 15) Watanabe, S., Ohta, S., Yajima, M., Terashima, K., Ito, M., Mugishima, H., Fujiwara, S., Shimizu, K., Honda, M., Shimizu, N., Yamamoto, N.: Humanized NOD/SCID/IL2Rgamma(null) mice transplanted with hematopoietic stem cells under nonmyeloablative conditions show prolonged life spans and allow detailed analysis of human immunodeficiency virus type 1 pathogenesis. *J Virol* 81:13259-13264, 2007.
  - 16) Watanabe, S., Terashima, K., Ohta, S., Horibata, S., Yajima, M., Shiozawa, Y., Dewan, M.Z., Yu, Z., Ito, M., Morio, T., Shimizu, N., Honda, M., Yamamoto, N.: Hematopoietic stem cell-engrafted NOD/SCID/IL2Rgamma null mice develop human lymphoid systems and induce long-lasting HIV-1 infection with specific humoral immune responses. *Blood* 109:212-218, 2007.
  - 17) 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-2Rgamma null mice. *Virology* 394:64-72, 2009.
  - 18) Strowig, T., Gurer, C., Ploss, A., Liu, Y.F., Arrey, F., Sashihara, J., Koo, G., Rice, C.M., Young, J.W., Chadburn, A., Cohen, J.I., Munz, C.: Priming of protective T cell responses against virus-induced tumors in mice with human immune system components. *J Exp Med* 206:1423-1434, 2009.
  - 19) Sato, K., Nie, C., Misawa, N., Tanaka, Y., Ito, M., Koyanagi, Y.: Dynamics of memory and naive CD8+ T lymphocytes in humanized NOD/SCID/IL-2Rgamma null mice infected with CCR5-tropic HIV-1. *Vaccine* 28:B32-37, 2010.
  - 20) Shultz, L.D., Brehm, M.A., Garcia-Martinez, J.V., Greiner, D.L.: Humanized mice for immune system investigation: progress, promise and challenges. *Nat Rev Immunol* 12:786-798, 2012.
  - 21) Hatziioannou, T., Evans, D.T.: Animal models for HIV/AIDS research. *Nat Rev Microbiol* 10:852-867, 2012.
  - 22) Sato, K., Gee, P., Koyanagi, Y.: Vpu and BST2: Still Not There Yet? *Front Microbiol* 3:131, 2012.
  - 23) Kitamura, S., Iwatani, Y.: [Multifunctional HIV accessory proteins are hub proteins antagonizing host antiviral factors]. *Uirusu* 63:187-198, 2013.
  - 24) Sauter, D.: Counteraction of the multifunctional restriction factor tetherin. *Front Microbiol* 5:163, 2014.
  - 25) Harris, R.S., Dudley, J.P.: APOBECs and virus restriction. *Virology* 479-480:131-145, 2015.
  - 26) Sato, K., Aoki, J., Misawa, N., Daikoku, E., Sano, K., Tanaka, Y., Koyanagi, Y.: Modulation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity through incorporation of tetraspanin proteins. *J Virol* 82:1021-1033, 2008.
  - 27) Sato, K., Yamamoto, S.P., 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.
  - 28) 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.
  - 29) Sato, K., Takeuchi, J., Misawa, N., Izumi, T., Kobayashi, T., Kimura, Y., Iwami, S., Takaori-Kondo, A., Hu, W., Aihara, K., Ito, M., An, D., Pathak, V., Koyanagi, Y.: APOBEC3D and APOBEC3F potently promote HIV-1 diversification and evolution in humanized mouse model. *PLoS Pathog* 10:e1004453, 2014.
  - 30) Kobayashi, T., Koizumi, Y., Takeuchi, J.S., Misawa, N., Kimura, Y., Morita, S., Aihara, K., Koyanagi, Y., Iwami, S., Sato, K.: Quantification of deaminase activity-dependent and -independent restriction of HIV-1 replication mediated by APOBEC3F and APOBEC3G through experimental-mathematical investigation. *J Virol* 88:5881-5887, 2014.
  - 31) Kim, E.Y., Lorenzo-Redondo, R., Little, S.J., Chung, Y.S., Phalora, P.K., Maljkovic Berry, I., Archer, J., Penugonda, S., Fischer, W., Richman, D.D., Bhattacharya, T., Malim, M.H., Wolinsky, S.M.: Human APOBEC3 induced mutation of human immunodeficiency virus type-1 contributes to adaptation and evolution in natural infection. *PLoS Pathog* 10:e1004281, 2014.

- 32) Sato, K., Misawa, N., Fukuhara, M., Iwami, S., An, D.S., 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.
- 33) Sato, K., Misawa, N., Nie, C., Satou, Y., Iwakiri, D., Matsuoka, M., Takahashi, R., Kuzushima, K., Ito, M., Takada, K., Koyanagi, Y.: A novel animal model of Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in humanized mice. *Blood* 117:5663-5673, 2011.
- 34) Sato, K., Misawa, N., Iwami, S., Satou, Y., Matsuoka, M., Ishizaka, Y., Ito, M., Aihara, K., An, D.S., 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.
- 35) Sato, K., Kobayashi, T., Misawa, N., Yoshikawa, R., Takeuchi, J.S., Miura, T., Okamoto, M., Yasunaga, J., Matsuoka, M., Ito, M., Miyazawa, T., Koyanagi, Y.: Experimental evaluation of the zoonotic infection potency of simian retrovirus type 4 using humanized mouse model. *Sci Rep* 5:14040, 2015.

## Investigation of HIV-1 pathogenesis using humanized mouse model

**Kei SATO**

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

53 Shogoinkawara-cho, Sakyo-ku, Kyoto, Kyoto 606-8507, Japan.

E-mail: ksato@virus.kyoto-u.ac.jp

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), the causative agent of AIDS, is a human-specific virus. Because HIV-1 cannot infect and cause disorders in other animals, it has been an arduous struggle to investigate the dynamics of HIV-1 infection *in vivo*. In order to understand and elucidate HIV-1 pathogenesis *in vivo*, we have established a human hematopoietic stem cell-transplanted “humanized” mouse model, which has the potential to maintain human hematopoiesis including human CD4-positive leukocytes under a physiological condition. In HIV-1-infected humanized mice, we reproduced HIV-1 pathogenesis including the gradual decline of peripheral CD4-positive T cells and immune activation.

HIV-1 encodes four “accessory” genes, Vif, Vpu, Vpr, and Nef. It is known that these accessory genes are occasionally crucial for viral replication in *in vitro* cell culture system. However, since there were no adequate animal models for HIV-1 infection, the roles of these HIV-1 accessory genes in viral infection, replication, and pathogenesis *in vivo* remain unclear. By utilizing humanized mouse model and a series of mutated HIV-1, we have revealed that these viral accessory proteins potently promote viral replication by antagonizing/degrading anti-viral cellular proteins or exploiting a unique subset of human CD4-positive T cells.

In this paper, I introduce the findings in HIV-1-infected humanized mouse model particularly focusing on the roles of HIV-1 accessory proteins in viral replication *in vivo*.