

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名 : (日本語) エイズ対策実用化研究事業
(英語) Research Program on HIV/AIDS

研究開発課題名 : (日本語) 感染動態・病態の連関解明に向けた HIV/AIDS の実証的研究
(英語) Demonstrative research on HIV/AIDS to understand the relationship between viral replication dynamics and disease progression in host individuals

研究開発担当者 (日本語) 大学院医歯薬学研究部 特命教授 足立昭夫
所属 役職 氏名 : (英語) Tokushima University Graduate School of Medical Science,
Distinguished Professor, Akio Adachi

実施期間 : 平成28年 4月 1日 ~ 平成29年 3月31日

分担研究 (日本語) 研究総括・ファウンダー-HIV-1rmt の構築
開発課題名 : (英語) Research Organization・Generation of founder HIV-1rmt clones

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人徳島大学 特命教授 足立昭夫
所属 役職 氏名 : (英語) Tokushima University, Distinguished Professor, Akio Adachi
分担研究 (日本語) HIV-1 の腸管粘膜感染と免疫応答の解析
開発課題名 : (英語) Immunological analysis of HIV infection in intestinal mucosa

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人徳島大学 教授 安友康二
所属 役職 氏名 : (英語) Tokushima University, Professor, Koji Yasutomo

分担研究 (日本語) SA1prox 配列と HIV-1 個体内複製・病態進行の連関解析
開発課題名 : (英語) Linkage analysis between HIV-1 SA1prox nucleotide sequence and viral replication/disease progression in individuals

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人徳島大学 教授 野間口雅子
所属 役職 氏名 : (英語) Tokushima University, Professor, Masako Nomaguchi
分担研究 (日本語) APOBEC3 分解阻害剤の開発
開発課題名 : (英語) Identification of chemical compounds to block Vif-induced degradation

研究開発分担者 (日本語) 独立行政法人名古屋医療センター臨床研究センター 研究員 大出裕高
所属 役職 氏名: (英語) Clinical Research Center, National Hospital Organization Nagoya
Medical Center, Research staff, Hirotaka Ode

分担研究 (日本語) アクセサリー蛋白質による HIV-1 の免疫逃避機序の解析
開発課題名: (英語) Analysis of immune evasion activity by HIV-1 accessory proteins

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人熊本大学 准教授 上野貴将
所属 役職 氏名: (英語) Kumamoto University, Associate Professor, Takamasa Ueno

分担研究 (日本語) HIV-1 感染症病態進行と腸内細菌叢の連関解析
開発課題名: (英語) Metagenomic analysis of HIV/SIV infection

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人大阪大学 准教授 中山英美
所属 役職 氏名: (英語) Osaka University, Associate Professor, Emi Nakayama

分担研究 (日本語) アカゲザル実験・HIV-1rmt の確立
開発課題名: (英語) Rhesus macaque experiment・Establishment of HIV-1rmt

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人京都大学ウイルス・再生医科学研究所 准教授 三浦智行
所属 役職 氏名: (英語) Institute for Frontier Life and Medical Sciences, Kyoto University,
Associate Professor, Tomoyuki Miura

II. 成果の概要 (総括研究報告)

感染動態と感染病態の科学的理解に基づく新しい抗 HIV-1 戦略が必要とされている。本研究班は、霊長類感染実験系と感染者検体から得られる情報を統合し、新たな抗 HIV-1 療法の開発に資することを旨とする。HIV-1/アカゲザル感染システムの構築、アクセサリー蛋白質/抗 HIV-1 宿主細胞因子/感染病態の総合的解析、及び腸管粘膜感染と病態進行の相関解析を主要テーマに研究に取り組む。

(足立昭夫) 平成 27 年度までに構築した臨床分離株由来 R5-tropic env を持つ HIV-1rmt の増殖効率向上を目指し、サル細胞 (M1.3S) での馴化実験を行った結果、馴化型ウイルスクローンを得た。これらのクローンは、これまでに構築した R5-tropic HIV-1rmt よりも増殖能が高く、M1.3S 細胞では X4-tropic HIV-1rmt と同程度の増殖能を示した。これまでの経験上、M1.3S 細胞での増殖能増強は、サル個体での増殖効率の向上に結び付くため、平成 29 年度は個体感染実験を実施する。

(安友康二) 平成 28 年度にはアカゲザルの末梢血および大腸生検サンプルから得た免疫細胞の表現型の検討と、HIV の感染方法の確立を目指した。細胞の刺激手法等を種々検討し、今後の実験で必要となるアカゲザル腸管の粘膜固有層および上皮間リンパ球分画で検出するための方法論と、その刺激・感染方法についての条件を確立できた。来年度は本方法論を用いた試験管内でのウイルス感

染と個体感染との関係性を明らかにすることを目指している。

(野間口雅子) SA1prox 配列と Vif 発現量・個体内複製との関連を明らかにするため、平成 27 年度までに HIV-1 Vif 発現量を変動させる SA1prox 内の 1 塩基置換を同定した。この情報を基に、臨床検体由来 SA1prox 配列を調べた結果、未治療患者群では Vif 発現量は増加し、治療患者群では逆に低下すると予測された。実際にプロテアーゼ阻害剤耐性患者由来の SA1prox 配列を持つ HIV-1 クローンでは、親株よりも vif mRNA 産生量が低下していることが分かった。今後さらに解析を続け、本領域の塩基配列と個体内複製能との関連解析を行っていく。

(大出裕高) APOBEC3 分解阻害剤の開発を目指し、APOBEC3F CTD(C 末端側ドメイン)中の Vif 結合領域に結合する低分子化合物の *in silico* スクリーニングを行った。その結果、化合物の結合安定性が高く、APOBEC3F CTD 上の Vif 結合領域(浅い凹み)の表面に乗るように結合することが予想される化合物を発見した。

(上野貴将) アクセサリー蛋白質による HIV-1 免疫逃避機序を明らかにするため、本年度は、約 400 名の感染者から集めた検体を用いて、vpr 遺伝子の配列を決定し、感染者の血漿ウイルス RNA コピー数および CD4 カウントとの関連性について解析した。その結果、55 番目のアラニン (Ala-55) と Thr-63 がウイルス量の低下と CD4 カウントの上昇と関連することを見出した。Vpr 領域で同定した感染病態と関連する 2 つのアミノ酸は、機能的に重要な同一の α ヘリックス上に位置しており、何らかの機能に関わるものと推察された。

(中山英美) 腸内細菌叢と病態進行との関連を解析するため、非感染アカゲサル 4 頭と SHIV 感染アカゲサル 4 頭から糞便を採取した。また、同一個体内での感染の有無による変化を検討するために、2 頭のアカゲサルの感染前とサル指向性 HIV 感染後 2 週間ごとに 4 回、糞便を採取した。一方で、ヒトでの治療前後での変化を観察するために、感染者からも糞便を採取した。現在のところ、13 例が採取されていて、うち 8 名が治療前 (AIDS 発症者 5 名、未発症者 3 名)、5 名が治療後である。すべての検体は次世代シーケンサーによるメタゲノム解析により腸内細菌叢の構成を解析した。

(三浦智行) サル病原性 HIV-1mt の確立を目指し、臨床分離株と同等レベルの中和抗体抵抗性の CCR5 指向性 SHIV-MK38 の env 遺伝子領域を組み込んだ新規 HIV-1mt[AK818]の性状解析を行った。その結果、HIV-1mt[AK818]は、CCR5 指向性であり、親株 SHIV-MK38 と同等レベルの中和抵抗性を示すことが明らかになった。また、アカゲサル細胞での増殖能も確認された。新規に構築した HIV-1mt[AK818]は、期待通り親株 SHIV-MK38 の CCR5 指向性および中和抵抗性が反映されていたため、今後、アカゲサル感染実験を行い、アカゲサルでの増殖能を調べる実験に進むことが可能となった。

(徳永研三) 抗ウイルス宿主因子 MARCH8 の作用機序の解明を目指している。平成 28 年度は、1) MARCH8 の C 末端側細胞質領域に 2 箇所存在する Yxx Φ モチーフ (クラスリン依存的エンドサイトーシスに關与) のうち、上流側 Yxx Φ モチーフが抗ウイルス活性すなわち抗 Env 活性に重要であること、2) MARCH8 は、HIV-1 Env をダウンレギュレーションした後、Env をトランスゴルジ網に滞留させること、3) MARCH8 の抗ウイルス機能およびそれに関与する領域が哺乳類の種間で広く保存されていること、を明らかにした。

Novel strategies against HIV-1 based on understanding the relationship between viral replication dynamics and disease progression in hosts are vitally required to achieve the functional cure from AIDS and related diseases. In this study project, we aim to found the solid base for new anti-HIV-1 therapeutic methods by combining important information derived from a primate model system and from infected humans. Major 3 themes in our research team are: establishment of the HIV-1/rhesus macaque infection system, comprehensive analysis on the

accessory proteins/anti-HIV-1 host cellular factors/disease progression, and relationship between the mucosal infection and pathogenesis. We vigorously work to elucidate these issues.

(Akio Adachi) We constructed several R5-tropic HIV-1rmt clones with clinical isolates-derived env gene in last year. With the aim of improving the HIV-1rmt replication ability, we perform viral adaptation experiments in a macaque lymphoid cell line (M1.3S cells) and generated adapted viral clones. Growth ability of these new clones was higher than that of parental clones and was similar to that of X4-tropic HIV-1rmt with the highest replication ability in macaques. Next year, we are planning to conduct macaque infection experiments using the new adapted HIV-1rmt clones.

(Koji Yasutomo) To evaluate HIV-1rmt/SIV growth ability in immune cells prepared from intestinal biopsy, we established the experimental infection system by determining an activation condition of immune cells and a method of virus infection. Next year, we will analyze whether there is a relationship between replication capacity in intestinal immune cells and that in macaque individuals.

(Masako Nomaguchi) We identified naturally-occurring single nucleotide mutations within HIV-1 SA1prox that vary Vif expression levels. Based on this result, we predicted that HIV-1 clones carrying SA1prox nucleotide sequences from untreated patients display increased Vif levels but those from patients treated with antiviral drugs decrease Vif expression levels. In fact, vif mRNA levels of HIV-1 clones with SA1prox sequences from treated patients were lower than that of a parental clone. We are planning to systematically examine the effect of SA1prox sequence of clinical samples on vif mRNA/viral replication levels, and elucidate the linkage between the SA1prox sequence and replication ability in the individuals.

(Hiroataka Ode) We searched low-molecular chemical compounds that likely bind to the Vif-binding site in APOBEC3F CTD from Namiki chemical compound library containing 618,522 compounds by *in silico* screening. Computational simulations found compounds that attach onto APOBEC3F CTD surface as higher ranked compounds.

(Takamasa Ueno) HIV-1 Vpr plays important roles in HIV-1 replication, but it is not known yet whether immune-driven Vpr polymorphisms are associated with the disease outcome. Here, we analyzed Vpr sequence polymorphisms and their association with disease outcome, by using plasma viral RNA isolated from 444 HLA-typed, treatment-naïve, chronically HIV-1 infected individuals in Japan. We found that Ala-55 and Thr-63 were significantly associated with lower plasma viral load and that the number of the two amino acid residues, located in a functionally-important α -helical domain, correlated inversely with plasma viral load. Our results suggest that Vpr polymorphisms at functionally-important and immune-reactive sites may contribute to viral replication and disease outcome *in vivo*.

(Emi Nakayama) Rectal swab samples were collected from 4 SHIV infected and 4 un-infected rhesus macaques. To know the effect of HIV infection, rectal swab samples were collected from 2 macaques periodically before and after infection. In addition, the rectal swab samples were also collected from individuals infected with HIV-1 including 8 un-treated and 5 treated patients.

(Tomoyuki Miura) Characterization analysis of novel HIV-1mt[AK818] incorporating *env* gene region of neutralizing antibody resistant CCR5 tropic SHIV-MK38 was performed. As a result, it

was revealed that HIV-1mt[AK818] is CCR5 tropic and shows neutralization resistance equivalent to that of the parent SHIV-MK38. The ability to proliferate in rhesus monkey cells was also confirmed. Since the newly constructed HIV-1mt[AK818] reflected the CCR5 tropism and the neutralization resistance of the parent SHIV-MK38 as expected, it becomes possible to go forward to investigate the proliferation ability of the virus in rhesus macaques.

(Kenzo Tokunaga) To determine the responsible region of MARCH8, we created and analyzed mutants of two different YxxΦ motifs located at C-terminal cytoplasmic domains, which is associated with clathrin-dependent endocytosis, and clarified that the upstream YxxΦ motif is critical for antiviral activity i.e. anti-Env activity. We analyzed MARCH8-induced intracellular retention of HIV-1 Env by performing immunofluorescence, and found out that MARCH8 accumulated HIV-1 Env at trans-Golgi network after its downregulation. We also investigated species specificity in antiviral function of MARCH8, and found that its function and related regions are widely conserved among mammalian species.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 件、国際誌 件）

足立昭夫

1. *Yokoyama M, *Nomaguchi M, Doi N, Kanda T, Adachi A, Sato H. In silico analysis of HIV-1 Env-gp120 reveals structural bases for viral adaptation in growth-restrictive cells. *Frontiers in Microbiology*. 2016, 7, article 11. *, Co-first authors.
2. Sultana T, Nakayama EE, Tobita S, Yokoyama M, Seki Y, Saito A, Nomaguchi M, Adachi A, Akari H, Sato H, Shioda T. Novel mutant HIV-1 strains with high degree of resistance to cynomolgus macaque TRIMCyp generated by random mutagenesis. *Journal of General Virology*. 2016, 97, 963-76.
3. Nomaguchi M, Doi N, Sakai Y, Ode H, Iwatani Y, Ueno T, Matsumoto Y, Miyazaki Y, Masuda T, Adachi A. Natural single-nucleotide variations in the HIV-1 genomic SA1prox region can alter viral replication ability by regulating Vif expression levels. *Journal of Virology*. 2016, 90, 4563-78.
4. Sakai Y, Miyake A, Doi N, Sasada H, Miyazaki Y, Adachi A, Nomaguchi M. Expression profiles of Vpx/Vpr proteins are co-related with the primate lentiviral lineage. *Frontiers in Microbiology*. 2016, 7, article 1211.
5. Sakai Y, Doi N, Miyazaki Y, Adachi A, Nomaguchi M. Phylogenetic insights into the functional relationship between primate lentiviral reverse transcriptase and accessory proteins Vpx/Vpr. *Frontiers in Microbiology*. 2016, 7, article 1655.

安友康二

1. Arimochi H, Sasaki Y, Kitamura A, Yasutomo K. Differentiation of preadipocytes and mature adipocytes requires PSMB8. *Scientific Reports*. 2016, 6, 26791.
2. Gamrekelashvili J, Giagnorio R, Jussofie J, Soehnlein O, Duchene J, Briseno CG, Ramasamy SK, Krishnasamy K, Limbourg A, Kapanadze T, Ishifune C, Hinkel R, Radtke F,

- Strobl LJ, Zimmer-Strobl U, Napp LC, Bauersachs J, Haller H, Yasutomo K, Kupatt C, Murphy KM, Adams RH, Weber C, Limbourg FP. Regulation of monocyte cell fate by blood vessels mediated by Notch signaling. *Nature Communications* 2016, 7, 12597.
3. Furukawa T, Ishifune C, Tsukumo SI, Hozumi K, Maekawa Y, Matsui N, Kaji R, Yasutomo K. Transmission of survival signals through Delta-like 1 on activated CD4+ T cells. *Scientific Reports*. 2016, 6, 33692.
 4. Okamura K, Kitamura A, Sasaki Y, Chung DH, Kagami S, Iwai K, Yasutomo K. Survival of mature T cells depends on signaling through HOIP. *Scientific Reports*. 2016, 6, 36135.

野間口雅子

1. *Yokoyama M, *Nomaguchi M, Doi N, Kanda T, Adachi A, Sato H. In silico analysis of HIV-1 Env-gp120 reveals structural bases for viral adaptation in growth-restrictive cells. *Frontiers in Microbiology*. 2016, 7, article 11. *, Co-first author
2. Sultana T, Nakayama EE, Tobita S, Yokoyama M, Seki Y, Saito A, Nomaguchi M, Adachi A, Akari H, Sato H, Shioda T. Novel mutant HIV-1 strains with high degree of resistance to cynomolgus macaque TRIMCyp generated by random mutagenesis. *Journal of General Virology*. 2016, 97, 963-76.
3. Nomaguchi M, Doi N, Sakai Y, Ode H, Iwatani Y, Ueno T, Matsumoto Y, Miyazaki Y, Masuda T, Adachi A. Natural single-nucleotide variations in the HIV-1 genomic SA1prox region can alter viral replication ability by regulating Vif expression levels. *Journal of Virology*. 2016, 90, 4563-78.
4. Sakai Y, Miyake A, Doi N, Sasada H, Miyazaki Y, Adachi A, Nomaguchi M. Expression profiles of Vpx/Vpr proteins are co-related with the primate lentiviral lineage. *Frontiers in Microbiology*. 2016, 7, article 1211.
5. Sakai Y, Doi N, Miyazaki Y, Adachi A, Nomaguchi M. Phylogenetic insights into the functional relationship between primate lentiviral reverse transcriptase and accessory proteins Vpx/Vpr. *Frontiers in Microbiology*. 2016, 7, article 1655.

大出裕高

1. Nomaguchi M, Doi N, Sakai Y, Ode H, Iwatani Y, Ueno T, Matsumoto Y, Miyazaki Y, Masuda T, Adachi A. Natural single-nucleotide variations in the HIV-1 genomic SA1prox region can alter viral replication ability by regulating Vif expression levels. *Journal of Virology*. 2016, 90, 4563-78.
2. Hayashida T, Hachiya A, Ode H, Nishijima T, Tsuchiya K, Sugiura W, Takiguchi M, Oka S, Gatanaga H. Rilpivirine resistance mutation E138K in HIV-1 reverse transcriptase predisposed by prevalent polymorphic mutations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2016, 71, 2760-6.
3. Nakashima M, Tsuzuki S, Awazu H, Hamano A, Okada A, Ode H, Maejima M, Hachiya A, Yokomaku Y, Watanabe N, Akari H, Iwatani Y. Mapping region of human restriction factor APOBEC3H critical for interaction with HIV-1 Vif. *Journal of Molecular Biology*. 2017, 429, 1262-76.

上野貴将

1. Mahiti M, Toyoda M, Jia S, Kuang S, Mwimanzi F, Mwimanzi P, Walker B, Xiong Y, Brumme Z, Brockman M, Ueno T. Relative resistance of HLA-B to downregulation by naturally occurring HIV-1 Nef sequences. *mBio*. 2016, 7, e01516-15.
2. Nomaguchi M, Doi N, Sakai Y, Ode H, Iwatani Y, Ueno T, Matsumoto Y, Miyazaki Y, Masuda T, Adachi A. Natural single-nucleotide variations in the HIV-1 genomic SA1prox region can alter viral replication ability by regulating Vif expression levels. *Journal of Virology*. 2016, 90, 4563-78.
3. Kamori D, Hasan Z, Ohashi J, Kawana-Tachikawa A, Gatanaga H, Oka S, Ueno T. Identification of two unique naturally occurring Vpr sequence polymorphisms associated with clinical parameters in HIV-1 chronic infection. *Journal of Medical Virology*, 2017, 89, 123–29.
4. Kamori D, Ueno T. HIV-1 Tat and viral latency: what we can learn from naturally occurring sequence variations. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8, 80.

中山英美

1. Sultana T, Nakayama EE, Tobita S, Yokoyama M, Seki Y, Saito A, Nomaguchi M, Adachi A, Akari H, Sato H, Shioda T. Novel mutant human immunodeficiency virus type 1 strains with high degree of resistance to cynomolgus macaque TRIMCyp generated by random mutagenesis. *Journal of General Virology*. 2016, 97, 963-76.
2. Likansakul S, Suntisuklappon B, Nitiyanontakij R, Prasithsirikul W, Nakayama EE, Shioda T, Sangsajja C. A Single-Nucleotide Polymorphism in ABCC4 Is Associated with Tenofovir-Related Beta2-Microglobulinuria in Thai Patients with HIV-1 Infection. *PLoS One*. 2016, 11, e0147724.
3. Saeng-Aroon S, Locket R, Plipat T, Lumyai S, Chu PY, Sangkitporn S, Nakayama EE, Takeda N, Shioda T, Motomura K. Circulation of HIV-1 Multiple Complexity Recombinant Forms Among Female Sex Workers Recently Infected with HIV-1 in Thailand. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 2016, 32, 694-701.

三浦智行

1. Mizuguchi T, Harada S, Miura T, Ohashi N, Narumi T, Mori H, Irahara Y, Yamada Y, Nomura W, Matsushita S, Yoshimura K, Tamamura H. A minimally cytotoxic CD4 mimic as an HIV entry inhibitor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2016, 26, 397-400.
2. Ishida Y, Yoneda M, Otsuki H, Watanabe Y, Kato F, Matsuura K, Kikukawa M, Matsushita S, Hishiki T, Igarashi T, Miura T. Generation of a neutralization-resistant CCR5 tropic SHIV-MK38 molecular clone, a derivative of SHIV-89.6. *Journal of General Virology*. 2016, 97, 1249-60.
3. 三浦智行. 霊長類モデルを用いた HIV 感染症の予防・治療法開発. 公益社団法人日本実験動物学会編: 実験動物感染症と感染症動物モデルの現状. 2016, p99-105.
4. Ishii H, Matsuoka S, Nomura T, Nakamura M, Shiino T, Sato Y, Iwata-Yoshikawa N, Hasegawa H, Mizuta K, Sakawaki H, Miura T, Koyanagi Y, Naruse T.K, Kimura A, Matano T. Association of lymph-node antigens with lower Gag-specific central-memory and higher

Env-specific effector-memory CD8+ T-cell frequencies in a macaque AIDS model. Scientific Reports. 2016, 6, 30153.

5. Kato F, Ishida Y, Oishi S, Fujii N, Watanabe S, Vasudevan SG, Tajima S, Takasaki T, Suzuki Y, Ichiyama K, Yamamoto N, Yoshii K, Takashima I, Kobayashi T, Miura T, Igarashi T, Hishiki T. Novel antiviral activity of bromocriptine against dengue virus replication. Antiviral Research. 2016, 131, 141-7.

徳永研三

1. 多田卓哉、徳永研三 (責任著者). 新規宿主因子 MARCH8 による HIV-1 エンベロープ糖タンパク質のダウンレギュレーション Downregulation of HIV-1 envelope glycoprotein by a novel host factor MARCH8. 臨床免疫・アレルギー科. 2016, 66, 82-7.
2. Yuan T, Yao W, Tokunaga K, Yang R, Sun B. An HIV-1 capsid binding protein TRIM11 accelerates viral uncoating. Retrovirology. 2016, 13, 72.
3. Takahata T, Takeda E, Tobiume M, Tokunaga K, Yokoyama M, Huang YL, Hasegawa A, Shioda T, Sato H, Kannagi M, Masuda T. Critical Contribution of Tyr15 in the HIV-1 Integrase (IN) in Facilitating IN Assembly and Nonenzymatic Function through the IN Precursor Form with Reverse Transcriptase. Journal of Virology. 2016, 91, e02003-16.
4. Tsunetsugu-Yokota Y, Kobayashi-Ishihara M, Wada Y, Terahara K, Takeyama H, Kawana-Tachikawa A, Tokunaga K, Yamagishi M, Martinez JP, Meyerhans A. Homeostatically maintained resting naïve CD4+ T cells resist latent HIV reactivation. Frontiers in Microbiology. 2016, 7, article 1944.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

足立昭夫

1. Effects of mutations HIV-1 Gag-CA helix 7 and linker domain on the virion production, ポスター, Fujimoto K, Doi N, Sakai Y, Adachi A, Nomaguchi M, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 2016/10/23-25, 国内.
2. An ultra-low vif type of HIV-1 SA1D2prox variant can adapt and evolve under the high level of APOVEC3G. ポスター, Adachi A, Doi N, Sakai Y, Fujimoto K, Nomaguchi M, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 2016/10/23-25, 国内.
3. Identification of cis-elements involved in the HIV-1 vif mRNA production, ポスター, Nomaguchi M, Doi N, Fujimoto K, Sakai Y, Nakanishi S, Adachi A, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 2016/10/23-25, 国内.
4. Replication and pathogenicity of HIV-1rmt: towards evaluation of viral growth ability in gut-derived cells, ポスター, Doi N, Ishifune C, Yasutomo K, Miura T, Sakai Y, Fujimoto K, Harada S, Yoshimura K, Nomaguchi M, Adachi A, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 2016/10/23-25, 国内.
5. Studies on the adaptation process of HIV-1 Env in macaque cells, ポスター, Sakai Y, Fujimoto K, Doi N, Nomaguchi M, Adachi A, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 2016/10/23-25, 国内.
6. 中和抵抗性かつ CCR5 指向性の新規 HIV-1rmt の構築, ポスター, 川上朗彦, 姫野愛, 菊川美奈子, 石田裕樹, 野間口雅子, 足立昭夫, 三浦智行, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会,

2016/10/23-25, 国内.

安友康二

1. Replication and pathogenicity of HIV-1rmt: towards evaluation of viral growth ability in gut-derived cells, ポスター, Doi N, Ishifune C, Yasutomo K, Miura T, Sakai Y, Fujimoto K, Harada S, Yoshimura K, Nomaguchi M, Adachi A, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 2016/10/23-25, 国内.

野間口雅子

1. Effects of mutations HIV-1 Gag-CA helix 7 and linker domain on the virion production, ポスター, Fujimoto K, Doi N, Sakai Y, Adachi A, Nomaguchi M, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 2016/10/23-25, 国内.
2. An ultra-low vif type of HIV-1 SA1D2prox variant can adapt and evolve under the high level of APOVEEC3G. ポスター, Adachi A, Doi N, Sakai Y, Fujimoto K, Nomaguchi M, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 2016/10/23-25, 国内.
3. Identification of cis-elements involved in the HIV-1 vif mRNA production, ポスター, Nomaguchi M, Doi N, Fujimoto K, Sakai Y, Nakanishi S, Adachi A, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 2016/10/23-25, 国内.
4. Replication and pathogenicity of HIV-1rmt: towards evaluation of viral growth ability in gut-derived cells, ポスター, Doi N, Ishifune C, Yasutomo K, Miura T, Sakai Y, Fujimoto K, Harada S, Yoshimura K, Nomaguchi M, Adachi A, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 2016/10/23-25, 国内.
5. Studies on the adaptation process of HIV-1 Env in macaque cells, ポスター, Sakai Y, Fujimoto K, Doi N, Nomaguchi M, Adachi A, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 2016/10/23-25, 国内.
6. 中和抵抗性かつ CCR5 指向性の新規 HIV-1rmt の構築, ポスター, 川上朗彦, 姫野愛, 菊川美奈子, 石田裕樹, 野間口雅子, 足立昭夫, 三浦智行, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 2016/10/23-25, 国内.

大出裕高

1. Structural features of the APOBEC3H region critical for HIV-1 Vif interaction, 口頭, Nakashima M, Tsuzuki S, Awazu H, Ode H, Maejima M, Hachiya A, Yokomaku Y, Watanabe N, Akari H, Iwatani Y, The 2016 CSHL meeting on retroviruses, 2016/5/24, 国外.
2. Comparative analyses of integration sites between HIV-1 and HIV-2, ポスター, Ode H, Inoue A, Matsuda M, Imamura J, Hachiya A, Yokomaku Y, Iwatani Y, The 2016 CSHL meeting on retroviruses, 2016/5/25, 国外.
3. APOBEC3H region critical for HIV-1 Vif interaction: Implications for virus-host coevolution, ポスター, Nakashima M, Tsuzuki S, Awazu H, Ode H, Maejima M, Hachiya A, Yokomaku Y, Watanabe N, Akari H, Iwatani Y, The 15th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2016/9/8, 国内.
4. Structural characterization of the APOBEC3H region important for HIV-1 Vif interaction, 口頭, Iwatani Y, Nakashima M, Tsuzuki S, Awazu H, Ode H, Maejima M, Okada A, Hamano

- A, Hachiya A, Yokomaku Y, Watanabe N, Akari H, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 2016/10/23, 国内.
5. Comparative analyses of HIV-1 and HIV-2 integration sites, ポスター, Ode H, Inoue A, Matsuda M, Imamura J, Hachiya A, Yokomaku Y, Iwatani Y, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 2016/10/23, 国内.
 6. R5-tropic HIV-1 infection leads to long-term latency in cynomolgus macaques, 口頭, Seki Y, Saito A, Satou Y, Harada S, Yoshimura K, Ode H, Iwatani Y, Yoshida T, Murata M, Watanabe Y, Yasutomi Y, Matano T, Miura T, Akari H, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 2016/10/25, 国内.
 7. 抗 HIV 療法における核酸系逆転写酵素阻害剤の腸内細菌叢への影響に関する研究, 口頭, 大出裕高, 井上歩美, 根本理子, 松田昌和, 今橋真弓, 羽柴知恵子, 重見麗, 岡崎玲子, 蜂谷敦子, 今村淳治, 中畑征史, 小暮あゆみ, 横幕能行, 岩谷靖雅, 第 30 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2016/11/26, 国内.
 8. APOBEC3G による HIV-1 逆転写伸長反応抑制作用の検討, 口頭, 岡田彩加, 濱野章子, 前島雅美, 大出裕高, 松田昌和, 蜂谷敦子, 横幕能行, 岩谷靖雅, 第 30 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2016/11/26, 国内.
 9. APOBEC3H の HIV-1 Vif 結合領域の構造学的研究, 口頭, 栗津宏昭, 中島雅晶, 大出裕高, 濱野章子, 都築伸弥, 前島雅美, 岡田彩加, 蜂谷敦子, 横幕能行, 明里宏文, 渡邊信久, 岩谷靖雅, 第 30 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2016/11/24, 国内.
 10. HIV-1 Vif PPLP 領域の APOBEC3 の分解における役割, 口頭, 都築伸弥, 大出裕高, 濱野章子, 岡田彩加, 栗津宏昭, 蜂谷敦子, 横幕能行, 渡邊信久, 岩谷靖雅, 第 30 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2016/11/25, 国内.

上野貴将

1. Naturally Occurring HLA-Associated Nef Polymorphisms that are associated with decreased plasma viral load and impaired Nef-mediated enhancement of virion infectivity, ポスター, 豊田真子, Kamori D, Ueno T, Cold Spring Harbor Laboratory: Retroviruses, 2016/5/23-28, 国外.
2. HIV-1 Nef-mediated immune evasion activities toward HLA class II-restricted CD4+ T lymphocytes, 口頭, Macdonald Mahiti, Takamasa Ueno, The Fourth MUHAS Scientific Conference 2016, 2016/6/23-24, 国外.
3. Impact of naturally occurring Vpr sequence polymorphisms on clinical parameters in HIV-1 chronic infection, 口頭, Kamori Doreen Donald, Murakami T, Hasan Z, Meribe S, Carlson J, Siarot L, Miura T, Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A, Gatanaga H, Oka S, Aida Y, Ueno T, The Fourth MUHAS Scientific Conference 2016, 2016/6/23-24, 国外.
4. Relative resistance of HLA-B for downregulation by naturally occurring HIV-1 Nef sequences is a fundamental property across viral subtypes, ポスター, Francis Mwimanzi Method, Macdonald Mahiti, Toyoda Mako, Jaclyn K Mann, Thumbi Ndung'u, Takamasa Ueno, 第 15 回あわじしま感染症・免疫フォーラム, 2016/9/6-9, 国内.
5. Viral fitness cost imposed by naturally occurring HLA-associated polymorphisms across HIV-1 accessory proteins, 口頭, Toyoda M, Kamori D, Ueno T, The 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, 2016/10/23-25, 国内.

6. Correlation between HLA-associated viral polymorphisms in accessory proteins and clinical outcome among HIV-1 infected individuals, ポスター, Kamori D, Hasan Z, Gatanaga H, Oka S, Miura T, Iwamoto A, Kawana-Tachikawa A, Takamasa Ueno, 2nd Kumamoto IRCMS International symposium and 17th Kumamoto AIDS Seminar, 2016/10/31-11/2, 国内.
7. Naturally occurring HIV-1 Nef variants that impair Nef's ability to counteract SERINC5 and enhance virion infectivity, ポスター, Toyoda M, Kamori D, Pizzato M, Ueno T, 2nd Kumamoto IRCMS International Symposium and 17th Kumamoto AIDS Seminar, 2016/10/31-11/2, 国内.
8. Viral fitness cost imposed by naturally occurring HLA-associated polymorphisms across HIV-1 accessory proteins, 口頭, Toyoda M, Kamori D, Kawana-Tachikawa A, Gatanaga H, Oka S, Ueno T, The 30th Annual Meeting of the Japanese Society for AIDS Research, 2016/11/23-25, 国内.

中山英美

1. A Single-Nucleotide Polymorphism in ABCC4 Is Associated with Tenofovir-Related Beta2-Microglobulinuria in Thai Patients with HIV-1 Infection, ポスター, Likanonsakul S, Suntasuklappon B, Nitiyanontakij R, Prasithsirikul W, Nakayama EE, Shioda T, Sangsajja C, Cold Spring Harbor Laboratory: Retroviruses, 2016/5/23-28, 国外.
2. Naturally occurring HIV-1 CRF01_AE capsid mutations affect viral sensitivity to restriction factors, 口頭, Emi Nakayama, Tahmina Sultana, Zhuan Jin, Kyotaro Nohata, Masato Shibata, Miho Hosoi, Kazushi Motomura, Tatsuo Shioda, Somchai Sangkitporn, Ruangchai Loket, Siriphan Seang-aroon, 第 6 4 回日本ウイルス学会学術集会, 2016/10/23-25, 国内.
3. HIV-1 CRFO_AE に見られる M×2 耐性を付与するカプシド変異, 口頭, 中山英美, Sultana Tahmina, Jin Zhuan, 野畑享太郎, 柴田真人, 細井美帆, 本村和嗣, 塩田達雄, Sangkitporn Somchai, Loket Ruangchai, Seang-aroon Siriphan, 第 30 回日本エイズ学会学術集会・総会 2016/11/24-26, 国内.
4. CPSF6 結合能がサル指向性 HIV-1 の fitness 与える影響, 口頭, 斎藤 暁, Jason Nomburg, Tahmina Sultana, 中山英美, 塩田達雄, 第 30 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2016/11/24-26 国内.

三浦智行

1. HIV-1 ワクチン開発とその課題, 口頭, 志田壽利, 加藤誠一, 保富康宏, 松尾和浩, 三浦智行, 五十嵐樹彦, 張陔峰, 井上誠, 成瀬妙子, 木村彰方, 第 25 回日本組織適合性学会, 2016/10/22-24, 国内.
2. 中和抵抗性 CCR5 指向性サル/ヒト免疫不全ウイルス感染アカゲザル血漿における中和能の広域化, ポスター, 姫野愛, 石田裕樹, 米田舞, 松浦嘉奈子, 菊川美奈子, 三浦智行, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 2016/10/23-25, 国内.
3. 中和抵抗性かつ CCR5 指向性の新規 HIV-1rmt の構築, ポスター, 川上朗彦, 姫野愛, 菊川美奈子, 石田裕樹, 野間口雅子, 足立昭夫, 三浦智行, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 2016/10/23-25, 国内.
4. アカゲザル病原性 HIV-1 の個体内複製と病原性：腸管由来細胞での感染評価技術の確立に向け

- て、ポスター、土肥直哉、石舟智恵子、安友康二、三浦智行、酒井遙介、藤本薫平、原田恵嘉、吉村和久、野間口雅子、足立昭夫、第 64 回日本ウイルス学会学術集会、2016/10/23-25 日、国内。
5. 中和感受性株 SIVsmH635FC 感染における中和抵抗性株 SIVsmE543 交差性中和抗体誘導の経時的解析、口頭、佐野雅人、桑田岳夫、松岡佐織、関塚剛史、明里宏文、三浦智行、俣野哲朗、第 64 回日本ウイルス学会学術集会、2016/10/23-25、国内。
 6. カニクイザルにおける R5 指向性 HIV-1 長期潜伏感染の解析、ポスター、Seki Y, Saito A, Satou Y, Harada S, Yoshimura K, Ode H, Iwatani Y, Yoshida T, Murata M, Watanabe Y, Yasutomi Y, Matano T, Miura T, Akari H, R5-tropic HIV-1 infection leads to long-term latency in cynomolgus macaques, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会、2016/10/23-25、国内。

徳永研三

1. Tada T, Zhang Y, Koyama T, Tobiume M, Tsunetsugu-Yokota Y, Yamaoka S, Fujita H, Tokunaga K (presenter), MARCH8 is a novel antiviral factor that inhibits HIV-1 infection by blocking Env incorporation into virions, 第 11 回日中国際ウイルス学会、2016/7/1、国内。
2. Tokunaga K (invited speaker), The novel restriction factor MARCH8 inhibits HIV-1 infection, The 3rd China–Russia International Conference on Microbiology, Immunology and Infectious Diseases, China, 2016/9/2, 海外。
3. Tokunaga K (invited speaker), Restriction of HIV-1 infection by host transmembrane proteins, The retrovirus seminar at Wuhan University, China, 2016/9/4, 海外。
4. Tada T, Yao W, Zhang Y, Fujita H, Yamaoka S, Tokunaga K (presenter), MARCH2 is another antiviral MARCH family member that inhibits HIV-1 infectivity, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会、2016/10/23、国内。
5. Yao W, Zhang Y, Fujita H, Yamaoka S, Tokunaga K, Guanylate Binding Protein 5 does not mediate inhibition of HIV-1 infectivity, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会、2016/10/25、国内。
6. Tokunaga K (invited speaker), MARCH8 is a novel restriction factor that inhibits HIV-1 infection, 第 17 回 熊本エイズセミナー、2016/10/31、国内。
7. 高橋紫蓉、濱美月、藤井佑樹、José C.J.M.D.S. Menezes, 高橋宏隆、竹田浩之、澤崎達也、本川智紀、徳永研三、藤田英明、膜結合型ユビキチンリガーゼ RNF152 は後期エンドソームにおいてチロシンナーゼと相互作用・共局在する、第 27 回日本色素細胞学会、2016/11/12、国内。
8. 徳永研三 (シンポジスト)、新規抗ウイルス宿主因子 MARCH8, 第 30 回日本エイズ学会学術集会、2016/11/26、国内。

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

(4) 特許出願

該当なし

平成28年度医療研究開発推進事業費補助金

(エイズ対策実用化研究事業) 成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) エイズ対策実用化研究事業
(英語) Research Program on HIV/AIDS

補助事業課題名： (日本語) 感染動態・病態の連関解明に向けた HIV/AIDS の実証的研究
(英語) Demonstrative research on HIV/AIDS to understand the relationship between viral replication dynamics and disease progression in host individuals

補助事業担当者 (日本語) 国立感染症研究所 感染病理部 主任研究官 徳永研三
所属 役職 氏名： (英語) Department of Pathology, National Institute of Infectious Diseases
Senior Scientist, Kenzo Tokunaga

実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究課題名： (日本語)
(英語)

補助事業分担者 (日本語)
所属 役職 氏名： (英語)

II. 成果の概要 (総括研究報告)

補助事業代表者： 国立感染症研究所・感染病理部・徳永研三 総括研究報告を参照。

和文

MARCH8 の責任領域を検討するため、C 末端側細胞質領域に 2 箇所存在する YxxΦ モチーフ (クラスリン依存的エンドサイトーシスに関与) の変異体を作製して解析した結果、上流側 YxxΦ モチーフ変異体が抗ウイルス活性すなわち抗 Env 活性に重要であることが明らかになった。MARCH8 による HIV-1 Env の細胞内滞留の場について蛍光抗体法により解析した結果、MARCH8 が HIV-1 Env をダウンレギュレーションした後、Env をトランスゴルジ網に滞留させることが明らかになった。MARCH8 の抗ウイルス機能における種特異性を検討したところ、MARCH8 の抗ウイルス機能およびそれに関与する領域が哺乳類の種間で広く保存されていることが明らかになった。

英文

To determine the responsible region of MARCH8, we created and analyzed mutants of two different YxxΦ motifs located at C-terminal cytoplasmic domains, which is associated with clathrin-dependent endocytosis, and clarified that the upstream YxxΦ motif is critical for antiviral activity i.e. anti-Env activity. We analyzed MARCH8-induced intracellular retention of HIV-1 Env by performing immunofluorescence, and found out that MARCH8 accumulated HIV-1 Env at trans-Golgi network after its downregulation. We also investigated species specificity in antiviral function of MARCH8, and found that its function and related regions are widely conserved among mammalian species.

III. 成果の外部への発表

- (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 件、国際誌 件)
1. 多田卓哉、徳永研三 (責任著者) : 新規宿主因子 MARCH8 による HIV-1 エンベロープ糖タンパク質のダウンレギュレーション Downregulation of HIV-1 envelope glycoprotein by a novel host factor MARCH8. 臨床免疫・アレルギー科. 2016. 66: 82-87.
 2. Yuan, T., Yao, W., Tokunaga, K., Yang, R., and Sun, B. An HIV-1 capsid binding protein TRIM11 accelerates viral uncoating. *Retrovirology* 2016. 13:72.
 3. Takahata, T., Takeda, E., Tobiume, M., Tokunaga, K., Yokoyama, M., Huang, Y-L., Hasegawa A., Shioda, T., Sato, H., Kannagi, M., Masuda, T. Critical Contribution of Tyr15 in the HIV-1 Integrase (IN) in Facilitating IN Assembly and Nonenzymatic Function through the IN Precursor Form with Reverse Transcriptase. *J. Virol.* 2016. e02003-16s.
 4. Tsunetsugu-Yokota, Y., Kobayashi-Ishihara, M., Wada, Y., Terahara, K., Takeyama, H., Kawana-Tachikawa, A., Tokunaga, K., Yamagishi, M., Martinez, J.P., Meyerhans, A. Homeostatically maintained resting naïve CD4+ T cells resist latent HIV reactivation. *Front. Microbiol.* 2016. 7:1944.
- (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表
1. Tada, T., Zhang, Y., Koyama, T., Tobiume, M., Tsunetsugu-Yokota, Y., Yamaoka, S., and Fujita, H., Tokunaga, K (presenter). MARCH8 is a novel antiviral factor that inhibits HIV-1 infection by blocking Env incorporation into virions. 第 11 回日中国際ウイルス学会 (観音寺) 2016/7/1, 国内.
 2. Tokunaga, K (invited speaker). The novel restriction factor MARCH8 inhibits HIV-1 infection. The 3rd China–Russia International Conference on Microbiology, Immunology and Infectious Diseases. Harbin, China, 2016/9/2, 海外.
 3. Tokunaga, K (invited speaker). Restriction of HIV-1 infection by host transmembrane proteins. The retrovirus seminar at Wuhan University. Wuhan, China, 2016/9/4, 海外.
 4. Tada, T., Yao, W., Zhang, Y., Fujita, H., Yamaoka, S., and Tokunaga, K (presenter). MARCH2 is another antiviral MARCH family member that inhibits HIV-1 infectivity. 第 64 回日本ウイルス学会総会 (札幌) 2016/10/23, 国内.
 5. Yao, W., Zhang, Y., Fujita, H., Yamaoka, S., and Tokunaga, K. Guanylate Binding Protein 5 does not mediate inhibition of HIV-1 infectivity. 第 64 回日本ウイルス学会総会 (札幌) 2016/10/25
 6. Tokunaga, K (invited speaker). MARCH8 is a novel restriction factor that inhibits HIV-1 infection. 第 17 回 熊本エイズセミナー (熊本) 2016/10/31, 国内.
 7. 高橋紫蓉、濱美月、藤井佑樹、José C.J.M.D.S. Menezes、高橋宏隆、竹田浩之、澤崎達也、本

川智紀、徳永研三、藤田英明：膜結合型ユビキチンリガーゼ **RNF152** は後期エンドソームにおいてチロシナーゼと相互作用・共局在する。第 27 回日本色素細胞学会（岐阜）2016/11/12, 国内。

8. 徳永研三（シンポジスト）：新規抗ウイルス宿主因子 **MARCH8**。第 30 回日本エイズ学会総会（鹿児島）2016/11/26, 国内。

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

(4) 特許出願