

研究課題別評価

1 研究課題:ウイルスとの共生:生まれながらにして持つ自然抵抗性機構の解明

2 研究者氏名:宮沢 孝幸

グループメンバー:辛 磷実(研究期間:H14.2.4~H15.3.31)

森 嘉生(研究期間:H14.4.1~H15.3.31)

山岸 潤也(研究期間:H16.4.1~H16.11.30)

中村 理加(研究期間:H16.4.1~H17.3.31)

3 研究の狙い:

人はヒト免疫不全ウイルス(HIV)に対して感受性であるが、アカゲザルやアフリカミドリザルはHIVに対して抵抗性である。この事実を説明するために我々は、サルがHIVに対して細胞内で働く抵抗性因子をもっているが、人はもっていないという仮説をたてた。本研究では、その物質的基盤を明らかにすることを第一の目的とした。研究を開始してまもなく、ロンドン大学のグループにより、人やサルがN指向性のマウス白血病ウイルス(N-MLV)に対して抵抗性因子(*Ref-1*)をもち、さらにサルの*Ref-1*が、HIVに対しても抵抗性を発揮すること(*Lv-1*活性をもつこと)が報告された。そこで、人がもつ*Ref-1*因子のcDNAクローニングを試みた。また、動物がもっているさまざまなレトロウイルスの宿主特異性決定機構および病原性発現機構の解明を行った。

4 研究成果:

1)マウス以外にも、サルやウサギなど、さまざまな動物がN-MLVに対して細胞内で働く抵抗性因子(*Ref-1*活性)をもっていることを明らかにした。また、アフリカミドリザルやアカゲザルなどのサル類がHIV-1に対して抵抗性(*Lv-1*活性)をもっていることを明らかにした。この抵抗性を担う蛋白のcDNAのクローニングを、レトロウイルスを用いた新規発現クローニング法で試みた。感染の指標としてEGFPを用いる方法、アポトーシスを誘導するBims遺伝子を用いる方法、ジフテリア毒素レセプターとジフテリア毒素を用いる方法、リボザイムライブラリーを用いる方法など、さまざまな方法を試みた。いくつかの候補遺伝子をクローニングしたが、解析の結果、我々が追いつめている*Ref-1*遺伝子ではなく、非特異的にウイルス増殖を抑えるものであった。

2)豚のトランスジェニック技術およびノックアウト技術の進歩により、豚から人への異種間臓器移植の際の、超急性拒絶反応を回避する豚が作出できるようになった。しかし、その実用化の前に大きく立ちどかっている問題が、豚がもっている内在性レトロウイルス(豚内在性レトロウイルス(PERV))である。人に感染する可能性のあるPERVは少なくとも2種類(PERV-AおよびPERV-B)存在する。我々は、PERVのレセプター遺伝子のクローニングを試み、PERV-Aのレセプター遺伝子のクローニングに成功した。さらに、PERVの感染が、他のレトロウイルスのエンベロープ蛋白の一部の助けを借りて、非特異的に感染を成立させてしまうことも明らかにした。

3)HIVやサル免疫不全ウイルス(SIV)は、レトロウイルス科レンチウイルス属に分類される。レンチウイルス属に分類されるウイルスは、馬、羊、山羊、牛や猫などの家畜にも存在する。その中でHIV感染に酷似した免疫不全を引き起こすのは、ネコ免疫不全ウイルス(FIV)のみである。レンチウイルスの感染機構を明らかにするために、FIVのレセプターのクローニングを試みた。その結果、CD134(OX40)がプライマリーレセプターとしてクローニングされ、FIVがCD134をプライマリーレセプターに、CXCR4をコレセプターとして使用することが明らかとなった。興味深いことに、コレセプターには、種特異性はなく、種特異性をエントリーレベルで規定しているのは、プライマリーレセプターであることがわかった。

5 自己評価:

本研究では、HIV に対して細胞内で働く抵抗性因子が様々な動物に存在する、という仮説のもとで研究を開始した。研究開始早々から、抵抗性因子の存在に気づき、その本体の蛋白の遺伝子クローニングに専念した。さらに研究の過程で、人がもっている N 指向性 MLV に対する抵抗性因子 (*Ref-1*) と HIV に対する抵抗性因子 (*Lv-1*) が同一であるという可能性を知り、何としてもその遺伝子を世界に先駆けてクローニングしたかったのであるが、他のグループに先を越された形となった。しかしながら、*Ref-1* と同定された TRIM5 α が、我々が追い求めていたものと異なるという実験結果も出ており、TRIM5 α の作用機序も依然として不明である。*Ref-1* および *Lv-1* に関する研究は今後継続する必要があると考えている。

一方、レトロウイルスを用いた発現クローニング法の改良を行い、ウイルスのレセプターを効率よくクローニングする系を確立することができた。この系を応用して、FIV のレセプターのクローニングに成功し、*Science* 誌に発表することができたことには満足している。他に、異種間臓器移植実用化の際に問題となっている PERV の、レセプター遺伝子のクローニングにも成功したことは、大きな成果であると考えている。現在、カリシウイルスのレセプター遺伝子のクローニングにも成功しており、今後、様々なウイルスのレセプター遺伝子のクローニングに、我々が開発した発現クローニング法が応用できると考えている。

6 研究総括の見解:

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) に対してヒトは感受性があるがアカゲザルやアフリカミドリザルは抵抗性であるのは、サルが HIV に対して細胞内で働く抵抗因子を持っていることを示すことにより、動物のレトロウイルス宿主特異性決定機構および病原性発現機構の解明の手がかりとすることを目的とした研究である。ヒトやサルがマウス白血病ウイルスに対して抵抗性因子を持ち、サルのこの抵抗性因子は HIV に対しても抵抗性を発揮することを証明し、その遺伝子をクローニングした。さらにレトロウイルスを用いた発現クローニング法の改良を行い、ウイルスのレセプターを効率よくクローニングする系を確立し、今後のウイルスレセプター遺伝子の効率良いクローニングへの道を拓いた。

7 主な論文等:

(1) 論文

1. Mariko Kohmoto, Yasuhiro Ikeda, Eiji Sato, Yorihiro Nishimura, Yasuo Inoshima, Masayuki Shimojima, Takeshi Mikami, and Takayuki Miyazawa (2003) Experimental mucosal infection with molecularly cloned feline immunodeficiency virus. *Clin.Diagn. Lab. Immunol.* 10: 185-188.
2. Kazuya Nakamura, Yosiyuki Suzuki, Yasuhiro Ikeda, Eiji Sato, Ninn T. P. Nguyen, Kazuho Ikeo, Takashi Gojobori, Takeshi Mikami, and Takayuki Miyazawa (2003) Phylogenetic analysis of Vietnamese isolates of feline immunodeficiency virus: genetic diversity of subtype C. *Arch. Virol.* 148: 783-791..
3. Takashi Kurihara, Takayuki Miyazawa, Shuji Miyakawa, Keizo Tomonaga, Kenji Hazama, Junko Yamada, Ryota Shirakura, and Yoshiharu Matsuura (2003) Sensitivity to human serum of gammaretroviruses produced from pig endothelial cells transduced with glycosyltransferase genes. *Xenotransplantation* 10: 562-568.
4. Masayuki Shimojima, Takayuki Miyazawa, Yumiko Sakurai, Yorihiro Nishimura, Yukinobu Tohya, Yoshiharu Matsuura, and Hiroomi Akashi (2003) Usage of myeloma and panning in retrovirus-mediated expression cloning. *Anal. Biochem.* 315: 138-140.
5. Masayuki Shimojima, Yorihiro Nishimura, Takayuki Miyazawa, Kentaro Kato, Yukinobu

- Tohya, and Hiroomi Akashi (2003) CD56 molecules in feline lymphoid cells. *J. Vet. Med. Sci.* 65: 767–773.
6. Hang T. T. Phung, Yukinobu Tohya, Masayuki Shimojima, Kentaro Kato, Takayuki Miyazawa and Hiroomi Akashi (2003) Establishment of a GFP-based indicator cell line to quantitate feline foamy virus. *J. Virol. Meth.* 109: 125–131.
 7. Thomas A. Ericsson, Yasuhiro Takeuchi, Christian Templin, Gary Quinn, Shelli F. Farhadian, James C. Wood, Beth A. Oldmixon, Kristen M. Suling, Jennifer K. Ishii, Yoshinori Kitagawa, Takayuki Miyazawa, Daniel Salmon, Robin A. Weiss, and Clive Patience (2003) Identification of receptors for pig endogenous retrovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100: 6759–6764.
 8. Risa Nakata, Takayuki Miyazawa, Yeon-Shil Shin, Rie Watanabe, Takeshi Mikami, and Yoshiharu Matsuura (2003) Reevaluation of host ranges of feline leukemia virus subgroups. *Microbes Infect.* 5: 947–950.
 9. Masayuki Shimojima, Yorihiro Nishimura, Takayuki Miyazawa, Yukinobu Tohya and Hiroomi Akashi (2003) Phenotypic changes of CD8⁺ peripheral blood lymphocytes in cats infected with feline immunodeficiency virus. *Microbes Infect.* 5: 1171–1177.
 10. Kenji Hazama, Shuji Miyagawa, Takayuki Miyazawa, Junko Yamada, Keizo Tomonaga, Mitsunori Ota, Hikaru Matsuda, and Ryota Shirakura (2003) The significance of N-linked glycosylation in pig endogenous retrovirus infectivity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310: 327–333.
 11. Masato Nakamura, Kazuya Nakamura, Takayuki Miyazawa, Yukinobu Tohya, Masami Mochizuki, and Hiroomi Akashi (2003) Monoclonal antibodies that distinguish antigenic variants of canine parvovirus. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10: 1085–1089.
 12. Rie Watanabe, Takayuki Miyazawa, and Yoshiharu Matsuura (2004) Comparison of serum sensitivity of pseudotype retroviruses produced from newly established packaging cell lines of human and feline origins. *Virus Res.* 99: 89–93.
 13. Yasuhiro Ikeda, Takayuki Miyazawa, Yorihiro Nishimura, Kazuya Nakamura, Yukinobu Tohya, and Takeshi Mikami (2004) High genetic stability of TM1 and TM2 strains of subtype B feline immunodeficiency virus in long-term infection. *J. Vet. Med. Sci.* 66: 287–289.
 14. Yumiko Sakurai, Masayuki Shimojima, Takayuki Miyazawa, Kohta Masuoka, Yukinobu Tohya, and Hiroomi Akashi (2004) Identification of the feline CD63 homologue using retrovirus-mediated expression cloning. 98: 185–191.
 15. Masayuki Shimojima, Yorihiro Nishimura, Takayuki Miyazawa, Yukinobu Tohya and Hiroomi Akashi (2004) T cell subpopulations mediating inhibition of feline immunodeficiency virus replication in mucosally infected cats. *Microbes Infect.* 6: 265–271.
 16. Masayuki Shimojima, Takayuki Miyazawa, Yasuhiro Ikeda, Elizabeth L. McMonagle, Hayley Haining, Hiroomi Akashi, Yasuhiro Takeuchi, Margaret J. Hosie, and Brian J. Willett (2004) Use of CD134 as a primary receptor by the feline immunodeficiency virus. *Science* 303: 1192–1195.
 17. Yorihiro Nishimura, Masayuki Shimojima, Eiji Sato, Yoshihiro Izumiya, Yukinobu Tohya, Takeshi Mikami, and Takayuki Miyazawa (2004) Down-modulation of CD3 ϵ expression of CD8 $\alpha^+\beta^-$ T cells of feline immunodeficiency virus-infected cats. *J. Gen. Virol.* 85: 2585–2589.
 18. Masato Nakamura, Yukinobu Tohya, Takayuki Miyazawa, Masami Mochizuki, H. T. T. Phung, N. H. Nguyen, L. M. T. Huynh, P. N. Nguyen, P. V. Nguyen, N. P. T. Nguyen, and H. Akashi (2004) A novel antigenic variant of Canine parvovirus from a Vietnamese dog. *Arch. Virol.* 149: 2261–2269.

19. Naho Nagashima, Masaharu Hisasue, Kazuo Nishigaki, Takayuki Miyazawa, Rui Kano, and Atsuhiko Hasegawa (2005) In vitro selective suppression of feline myeloid colony formation by a molecularly cloned strain of feline leukemia virus with unique long terminal repeat. Res. Vet. Sci. 78: 151-154.
20. Rie Wanabate, Takayuki Miyazawa, and Yoshiharu Matsuura Cell-binding properties of the envelope proteins of porcine endogenous retroviruses. Microbes Infec (in press)
21. Hang T. T. Phung, Yukinobu Tohya, Takayuki Miyazawa, and Hiroomi Akashi Characterization of Env antigenicity of feline foamy virus (FeFV) using FeFV-infected cat sera and a monoclonal antibody. Vet. Microbiol. (in press)
22. Shuji Miyagawa, Junko Yamada, Kenji Hazama, Aki Yamamoto, Katsuyoshi Matsunami, Keizo Tomonaga, Takayuki Miyazawa, and Ryota Shirakura Prevention of PERV infections in pig to human xenotransplantation by the RNA interference silences gene. J. Biochem. (in press)

(2) 総説

1. 下島昌幸、宮沢孝幸:ネコ免疫不全ウイルスのプライマリーレセプター、細胞工学、VOL. 23、458-459.
2. 宮沢孝幸:ネコ免疫不全ウイルスのレセプター、医学のあゆみ、VOL.209、No.11、907-908.
3. 宮沢孝幸:レンチウイルスの受容体、膜、2005(印刷中)

(3) 受賞

1. Best Oral Presentation 賞、6th International Feline Retrovirus Research Symposium, 2002 年 12 月 フロリダ、USA
2. 日本獣医学会賞(第 95 号)、2004 年 4 月

(4) 招待講演

国内会議・シンポジウム等 3件

(5) その他学会発表

国内 15件／国際 3件