

## **CENTER FOR EMERGING VIRUS RESEARCH LABORATORY FOR VIRUS REPLICATION**

Center for Emerging Virus Research was established in April, 2005 as an affiliate research center to the Institute for Virus Research and this laboratory got started in January 1, 2006. One of the main objectives of our research is to clarify the origin of AIDS virus and to predict its future by conducting the molecular epidemiological studies of HIV and its related primate lentiviruses (HIV/SIV) collected by overseas expeditions, especially from Africa. We are also developing the animal model system for AIDS by generating novel HIV/SIV chimeric viruses (SHIVs) possessing HIV-1-derived genomic regions as widely as possible. Such SHIVs can be used to evaluate anti-HIV drugs using monkeys housed in a P3-level animal facility. The SHIV/monkey project also aims at developing AIDS vaccines and currently the use of a plasmid of a full-sized viral genome that can produce non-infectious viral particles is tested as a DNA vaccine.

### **1) DNA vaccination of macaques by a full-genome SHIV plasmid that has an IL-2 gene and produces non-infectious virus particles: R. HORIUCHI, W. AKAHATA, T. KUWATA, Y. ENOSE, E. IDO, H. SUZUKI, A. MIYAKE, N. SAITO, K. IBUKI, T. GOTO, T. MIURA, and M. HAYAMI**

We previously reported that a mutant full-sized plasmid DNA vaccine regime in macaques was partially effective. In this study, to improve the DNA vaccination regime, a novel plasmid named pSHIV-ZF1\* IL-2 was constructed. Four monkeys were intramuscularly and intradermally injected 4 times with the pSHIV-ZF1\* IL-2. Vaccinated monkeys were intravenously challenged with a highly pathogenic, heterologous SHIV at 11weeks post vaccination. All the vaccinated monkeys suppressed the challenge virus rapidly under the detectable level by 16 weeks post challenge. One vaccinated monkey was protected from a loss of CD4<sup>+</sup> T cells. These results suggest pSHIV-ZF1\* IL-2 alone seems partially effective even against a challenge with a heterologous, pathogenic virus.

### **2) Construction of a novel SHIV having an HIV-1-derived protease gene and its infection to rhesus macaques: a useful tool for in vivo efficacy tests of protease inhibitors: M. ISHIMATSU, H. SUZUKI, H. AKIYAMA, T. MIURA, M. HAYAMI, and E. IDO**

We generated a novel SHIV (termed SHIV-pr) that possesses the HIV-1-derived protease (PR) gene in the corresponding position in the SIVmac genome. SHIV-pr is replication-competent in human and monkey CD4<sup>+</sup> lymphoid cell lines as well as rhesus macaque PBMCs. The viral growth of SHIV-pr was completely blocked in the presence of a peptide-analog PR inhibitor at the tissue culture level. When SHIV-pr was intravenously inoculated into two rhesus macaques, one monkey

resulted in a weak but long-lasting persistent infection whereas the infection of another was only temporary. To enhance the viral growth competence by adaptation, we then passaged the virus in vivo from a monkey up to the fourth generation. The initial peak values of plasma viral loads as well as the set-point values increased generation by generation and reached those of a parental virus SIVmac. When a medication using the content of Kaletra capsule (a mixture of two PR inhibitors, lopinavir and ritonavir) was orally given to three SHIV-pr-infected monkeys for 4 weeks, plasma viral loads dropped to near or below the detection limit and quickly rebounded after the cessation of medication. The results suggest that SHIV-pr can be used to evaluate PR inhibitors using monkeys.

## **LIST OF PUBLICATIONS**

### **Center for Emerging Virus Research**

#### **Laboratory for Viral Replication**

Horiuchi, R., Akahata, W., Kuwata, T., Enose, Y., Ido, E., Suzuki, H., Miyake, A., Saito, N., Ibuki, K., Goto, T., Miura, T., Hayami, M.: DNA vaccination of macaques by a full-genome SHIV plasmid that has an IL-2 gene and produces non-infectious virus particles. *Vaccine*, 24(17):3677-85, 2006.

---

Ido, E.: Development of novel SHIVs having wider HIV-1-derived genomic regions: how can we overcome the species barrier? Institute for Virus Research Colloquium, Kyoto, Feb 13-14, 2006.

Ido, E., Ishimatsu, M., Akiyama, H., Ibuki, K., Miura, T., Hayami, M.: Generation of a novel SHIV that possesses HIV-1-derived integrase gene in addition to reverse transcriptase gene and its infection to macaque monkeys. 24th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, Atlanta, USA, October 4-7, 2006.

Ido, E., Ishimatsu, M., Akiyama, H., Ibuki, K., Miura, T., Hayami, M.: Generation of a novel SHIV that possesses HIV-1-derived integrase gene in addition to reverse transcriptase gene and its infection to macaque monkeys. US-Japan Cooperative Medical Science Program, 19th Joint Meeting of the AIDS Panels, Kagoshima, December 6-7, 2006.

井戸栄治、石松美沙、速水正憲、三浦智行：プロテアーゼ、逆転写酵素、およびインテグラーゼの各遺伝子が HIV-1 由来である新規 SHIV のサル感染実験、第 20 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、11 月 30 日-12 月 2 日、2006.

当研究センターは、近年注目を浴びている新興ウイルス感染症対策のため基礎研究をさらに推進・充実化を図ることを目的に、2005年4月ウイルス研究所内に5年の時限付き附属研究施設として設置されました。センターの人員としては特任ポストとして3人のチームリーダー（助教授）が公募され、私（井戸栄治）は2006年1月1日付けで複製基盤解析チームのリーダーとして着任しました。就任以後は研究室のセットアップ、並びにスタッフや学生の確保に追われましたが、現在では大学院生として京都大学人間環境学研究科D3が1名（石松美沙）、他に教務補佐員1名（安永みゆき）、技術補佐員1名（関口永子）がメンバーとして加わり日夜研究に勤しんでいます。

本研究室は、主に霊長類のレトロウイルス、特にヒトのHIVおよびサルに関連ウイルスSIVの分子生物学的研究を行うことにより、より良いエイズの予防と治療法探索を目指しています。HIVがはたして新興ウイルスなのかと疑問の声が上がるかも知れません。しかし、現在エイズ感染者数の急激な増加が世界中、とりわけ貧困な発展途上国を中心に見られ、またその病原体ウイルスHIVがそう遠くない昔に、おそらくアフリカのとあるサル種からヒトへ伝播した結果今日に至っていることを考えますと、少なくとも現代の人間社会に突然出現した重要なウイルス感染症という認識に間違いはありません。ウイルス病原体が新たな宿主に感染する際に、ウイルス側もしくは宿主側に一体どのような変化が生じたら種の壁を超えることが出来たのかを解明することは、正に新興ウイルス感染症の根本的問題の一つと考えられます。

本研究室の研究活動は、次の2つのテーマに重点を置いています。先ず第1は、「霊長類レトロウイルス(HTLV/STLV)およびレンチウイルス(HIV/SIV)の分離とそれらの遺伝子解析の研究」です。世界各地の国や地域へ海外調査を行い、それにより得られたヒトやサルの血液材料より、HTLV/STLV あるいは HIV/SIV を分離し、得られた株の分子系統学的相互関係を明らかにすることにより、その地域内に流行している遺伝子型を明らかにするだけでなく、ウイルスがどのように伝播したか、さらには各ウイルスの起源と未来を探ることを目的としています。新種のサルからのウイルス分離と同定、あるいはヒトからの新種ウイルスの発見は大きな目標です。近年は、上記ウイルスの故郷と考えられるアフリカの中でも特に起源地と推定される中央アフリカ諸国（コンゴ民主共和国、コンゴ共和国、カメルーン共和国）に焦点を定め、毎年2回程度の調査旅行を行い検体の収集と解析を進めています。また本年度は、コンゴ民主共和国より国立生物医学研究所所長 Jean-Jacques Muyembe 教授を約10日間日本に招聘し、熱帯中央アフリカにおける新興ウイルス感染症について今後双方が強力に共同研究を推進することを合意しました。第2は、「HIV/SIV キメラウイルスを用いたエイズ動物モデルの開発とそれを利用した治療薬開発の研究」です。本研究所内には、日本では極めてユニークな P3 レベルのサル感染実験が可能な動物実験施設が備わ

っています(公的な研究機関としては本学と国立感染症研究所および国立基盤研究所のみ)。この施設を利用し、可能な限り HIV の遺伝子領域を広く持つ種々の SHIV を作成し、それらのサル感染実験により、ヒトでは出来ないエイズウイルスの感染から発症に至るプロセス、あるいは感染防御の研究を個体レベルで行っています。特にエイズ治療薬の主な標的となっている逆転写酵素、プロテアーゼ、さらにはインテグラーゼがエンコードされているウイルスの pol 遺伝子を HIV-1 由来にした新規 SHIV の作成開発を進めており、それを用いて開発中の薬剤が *in vivo* レベルでどのような効果や副作用を及ぼすのかを解析しています。また、この研究では HIV-1 由来の領域をどこまで拡大できるのか、その限界を追求することにより、サルからヒトへ種の壁を超えて感染するには、どのような複製機序が関わっているのかその分子基盤を解明する研究へ発展させたいと考えています。その他には、サルを実験動物として利用できることから、エイズワクチン開発の基礎研究も行っています。特に安全性を確保したものとして、非感染性のウイルス粒子を産生し、それを抗原として感染防御を図るフルゲノムプラスミドを用いた DNA ワクチンの開発研究も行っています。

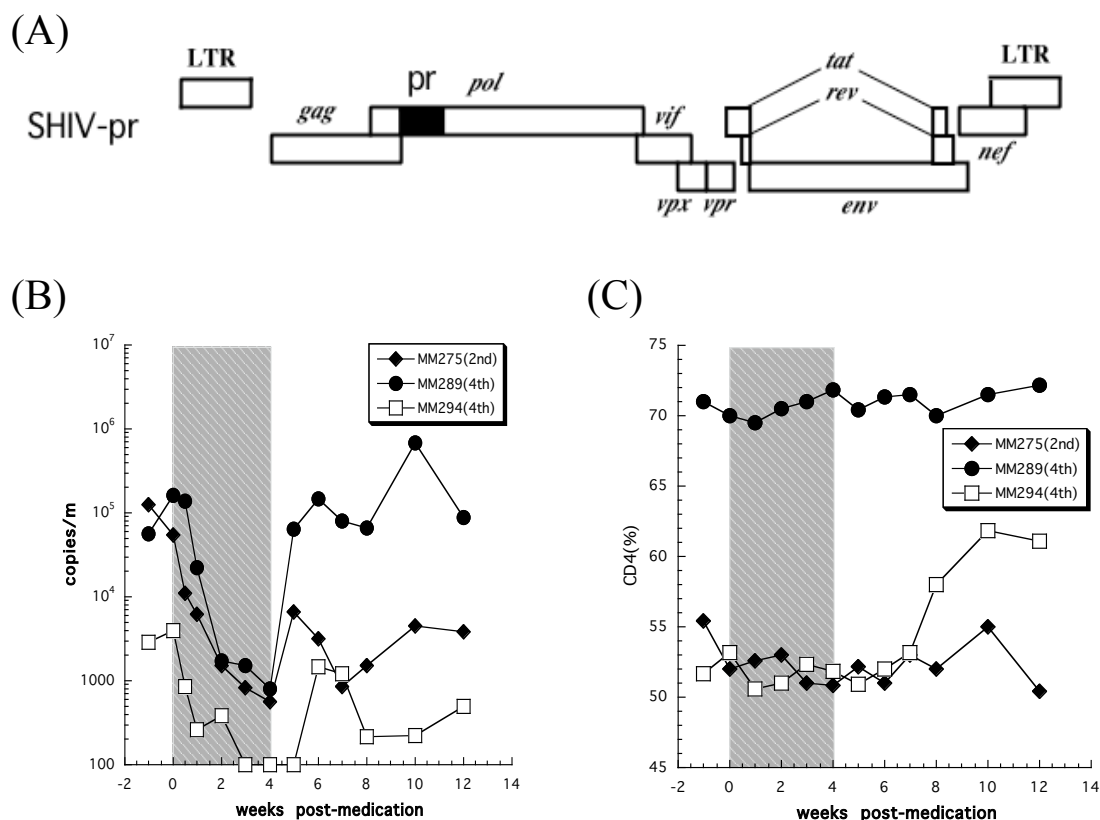


図. プロテアーゼ遺伝子のみがHIV-1由来の新規キメラウイルスSHIV-pr.

SHIV-prの遺伝子構造 (A) と SHIV-prが持続感染しているアカゲザルへのプロテアーゼ阻害剤カレトラの経口投与効果(投薬期間を斜線で示した)。

(B) 血中ウイルス量 (C) CD4細胞数