

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

In this laboratory, the following two main projects targeting the AIDS virus are on going: (I) Molecular epidemiological studies of HIV/SIV; (II) Development of animal model system for AIDS using monkeys and novel HIV/SIV chimeric viruses (SHIVs).

The research goal of the first project is to clarify the origin of AIDS virus and to predict its future by conducting the molecular phylogenetical studies of HIV and its related primate lentiviruses collected by overseas expeditions, especially from central Africa where most divergent strains of HIV are circulating. The research goal of the second project is to establish a new animal HAART model by use of novel SHIVs that were constructed in this laboratory to possess HIV-1-derived pol genes. The generated SHIVs can infect rhesus macaques. Besides, they are fairly sensitive to anti-HIV-1 drugs unlike SIV or conventional SHIVs because the viruses of the latter group carry the pol genes of SIV.

### **1) Exposure to SIVmd-2 in Southern Cameroon: Public Health Implications: N. NDEMBI\*, E. IDO, D. MBANYA\*, and L. KAPTUE\* (\*University of Yaounde)**

Compelling evidence appeared in 2002 of human exposure to a plethora of primate lentiviruses through hunting, handling of bushmeat and/or animals kept as pets in Cameroon. To determine SIV prevalence in pet animals, analysis of 28 sera of nonhuman primates show no SIV infection in greater spot nosed monkey (0/5) or chimpanzee (0/10), and a prevalence rate of 23.1% (3/13) in mandrills kept as household pets in southern Cameroon. Phylogenetical analysis based on pol-integrase (IN) region and mitochondrial (mt) cytochrome b gene showed that the newly found SIVs from *Mandrillus sphinx* (SIVmndCM-202, SIVmndCM-211 and SIVmndCM-218) clustered significantly with SIVmnd-2. Questionnaire data were also collected to assess whether owners had experienced bites, scratches or exposure to blood and/or body fluid. Risk to human health from cross-species transmission of the newly identified SIVmnd-2 to infect humans remains unknown.

### **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

Ishimatsu, M., Suzuki, H., Akiyama, H., Miura, T., Hayami, M., Ido, E.: 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. *Microbes Infection*, 9(4):475-482, 2007.

---

Ishimatsu, M., Suzuki, H., Akiyama, H., Hayami, M., Miura, T., Ido, E.: Evaluation of a novel SHIV having an HIV-1-derived pr gene / macaque model for protease inhibitors. 21st Century COE Program 'The Active Exchange of Young Scientists' Research across Borders and between Fields', Kyoto, February 28-March 1, 2007.

Ido, E.: Molecular epidemiology of HIV in Africa. Bukavu Catholic University, Bukavu, Democratic Republic of Congo, July 23, 2007.

Ido, E.: Generation of novel SHIVs that possess HIV-1-derived pol genes: Useful tools for animal HAART model. Abstract Book p.86, 8th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance: Targets and Mechanisms, Richmond, U.S.A, November 11-14, 2007.

井戸栄治、石松美沙、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 SHIV-prti のサルにおける in vivo 継代、第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会、広島、11 月 28 日-11 月 30 日、2007.

石松美沙、鈴木元、秋山尚志、三浦智行、速水正憲、井戸栄治：SIVmac に HIV-1 のプロテアーゼ遺伝子を組み込んだ SHIV-pr の in vivo 継代によって生じた遺伝子変異の解析、第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会、広島、11 月 28 日-11 月 30 日、2007.

安永みゆき、Raphael Taty-Taty、Fabien Niyama、Blaise Bikandou、石松美沙、関口永子、米田幸子、Henri-Joseph Parra、井戸栄治：コンゴ共和国の海岸部都市に流行する HIV 遺

伝子多様性の解析、第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会、広島、11 月 28 日-11 月 30 日、2007.

当研究室が平成18年1月に発足して、丁度丸2年が経過しました。本年度研究室のスタッフはチームリーダーとして私(井戸栄治)の他に、非常勤研究員として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2名(関口永子、米田幸子)という構成でスタートしましたが、補佐員の方はそれぞれ都合により中途退職、11月より技術補佐員1名(山下美保子)が新メンバーとして加わりました。

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のテーマは、「アフリカにおけるHIV/SIVの分離と遺伝子解析」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。本年度は、コンゴ共和国およびコンゴ民主共和国を訪問しました。コンゴからの検体は、すべて病院のエイズ患者から得られたもので、これまでに海岸部の都市ポイントノアールで集められた59検体について遺伝子解析がされました。血清学的にすべてHIV-1陽性と判定、env領域の系統解析によって、サブタイプはA型が17(29%)と一番多く、以下G型7(11%)、H型6(10%)、D型4(7%)と続きます。PCRで増幅できない株が16検体(27%)あり、遺伝子の多様性が相当広がっていることが分かりました。pol領域の解析結果もほぼ同様ですが、env領域とはサブタイプの帰属が異なるいわゆるリコンビナント株が全体の7割近くを占めていました。またある1株の系統樹の位置は、従来のグループMとはかなり異なっており、グループ0あるいはグループNと同じ位系統的に離れたユニークな場所を占めることが分かりました。新たなグループが存在する可能性があり、今後解析の領域を拡げて確認する予定です。コンゴ民主からは、これまで全く報告の無かった同国東部地域より80検体が集められました。これらの解析については現在進行中です。またコンゴ民主からは、種々のサル種からも検体が集められています。スクリーニングによって陽性であったドブラザモンキー(*Cercocebus neglectus*)の4検体については、既報告のSIVdebと遺伝子配列が極めて近いという結果でした。カメルーンについては、既に収集してあるエイズ患者検体の解析が現在進行中です。またこれらとは別に、南部カメルーンでペットとして飼われていたマンドリル(*Mandrillus sphinx*)3頭の遺伝子解析がなされ、クラスターを形成していることが分かりました。この地域では、狩猟活動あるいはペットとしてサルを飼うことが多く、ヒトと霊長類の接触が頻繁であり、サル-ヒト間の種間感染がいつ起こらないとも限らない状況が存在しています。

第2のテーマは、「新規 HIV/SIV キメラウイルス (SHIV) を用いたエイズ治療・予防薬の開発」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)。抗 HIV-1 薬剤の複数使用による HAART 療法を臨床適用の前に動物実験レベルで評価できれば、好適な薬剤の組み合わせの探索など、より良い治療法が開発がリスクを伴うことなく進められます。しかし通常サルに感染することが知られている SHIV は、*pol* 遺伝子部分が SIV 由来のため、そのような評価には適しません。そこで我々は、SIVmac のゲノムに PR、RT、INT の各遺伝子だけを HIV-1 由来に置換した一連の新規 SHIV を作成し、これによる感染モデル系、特に HAART モデル系を確立することを目指しました。PR 遺伝子のみが HIV-1 のそれに置換されている SHIV-pr は、アカゲザルに持続感染し、PR 阻害剤カレトラの経口投与によって血中ウイルス量が検出限界以下になることが示されました (Microbes Infection, 2007)。RT と INT 遺伝子のみが HIV-1 のものに置換されている SHIV-rti は、同じくサルに感染し、接種後 1 年余りを経て急激に血中ウイルス量が上昇、かつ CD4 数および体重が減少しつつあることが判明、エイズ発症と考えられます。この他、PR、RT、INT の各遺伝子がすべて HIV-1 由来のものに置換された SHV-prti の感染実験が進行中。初代から現在までに 3 代目への *in vivo* 継代がなされ、徐々にウイルスの増幅能力が上がって来ています。これが持続感染状態に至りますと、ウイルス複製に必要な酵素群に対する阻害剤の併用療法の評価が可能となります。特にインテグラーゼ阻害剤の開発などに有用なツールとなることを期待しています。

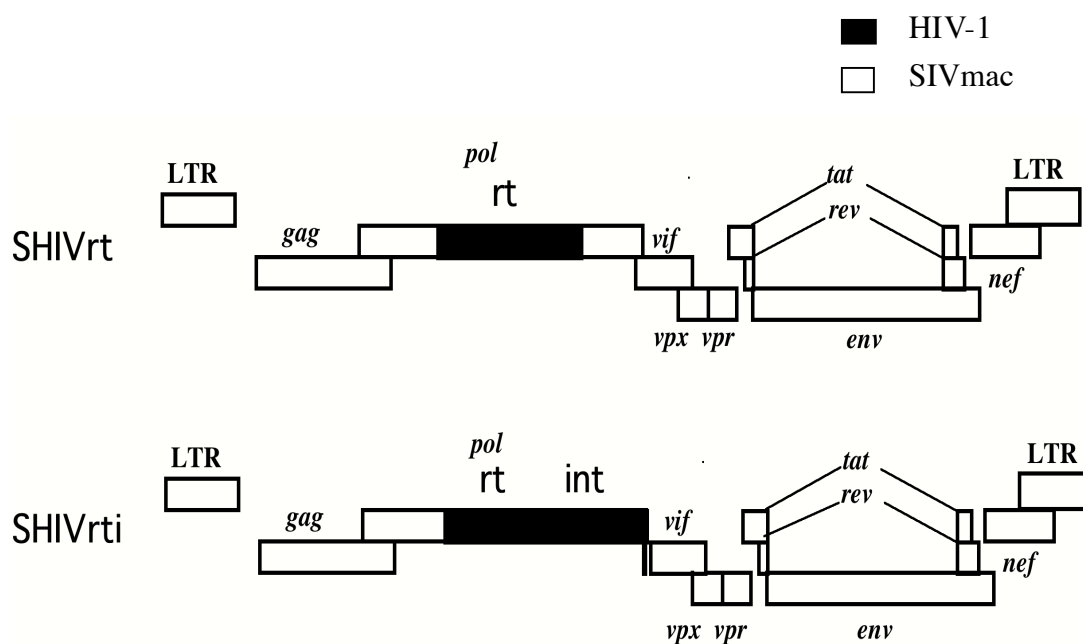


図 1. HIV-1 の逆転写酵素やインテグラーゼ遺伝子を持つ新規 SHIV の遺伝子構造