

CENTER FOR EMERGING VIRUS RESEARCH LABORATORY FOR VIRUS REPLICATION

The following two main projects are currently under way in this laboratory: (I) Molecular epidemiology of HIV/SIV in central Africa; (II) Development of animal HAART model system for AIDS studies using macaque monkeys and novel HIV/SIV chimeric viruses (SHIVs) having part or full of the HIV-1-derived pol gene.

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 analyses of HIV and its related primate lentiviruses collected by overseas expeditions, especially from central Africa where most divergent strains of HIV/SIV are circulating. The research goal of the second project is to establish the animal HAART model by use of newly constructed SHIVs that possess part or full of the pol gene of HIV-1. These novel SHIVs can potentially infect rhesus macaques. In addition, they are fairly sensitive to anti-HIV-1 drugs, suggesting that this novel system would be very useful to evaluate tested compounds at the in vivo level.

- 1) Construction and infection of a new simian/human immunodeficiency chimeric virus (SHIV) containing the integrase gene of the human immunodeficiency virus type 1 genome and analysis of its adaptation to monkey cells: H. AKIYAMA, M. ISHIMATSU, T. MIURA, H. HAYAMI and E. IDO**

Expanding the HIV-1-derived regions in the SHIV genome may help to clarify the viral restriction factors determining the host range. In this study, we constructed a new SHIV having the reverse transcriptase and integrase-encoding regions of HIV-1 in addition to the 3' half genomic region of HIV-1. This SHIV, termed SHIVrti/3rn, could replicate in a monkey CD4⁺ T cell line, HSC-F, although its replication in monkey PBMCs was very weak. After SHIVrti/3rn was passaged in HSC-F cells for 26 weeks, it gradually began to replicate in monkey PBMCs. This monkey-cell-adapted virus, termed SHIVrti/3rnP, could replicate in rhesus macaques. The whole genome of SHIVrti/3rnP was sequenced and was found to differ from SHIVrti/3rn at eleven positions. We constructed a series of mutants having some or all of these mutations and investigated their replication kinetics. The mutational analysis revealed that all of the mutations, but mainly the mutations in env, were responsible for the adaptation in HSC-F cells and were enough to replicate in rhesus PBMCs. Of all the SHIVs reported so far that can infect rhesus monkeys in vivo, SHIVrti/3rnP is the one that is genetically the closest to HIV-1.

- 2) Genetic analysis of HIV at a clinic in Point-Noire, a coastal city in western Republic of Congo: E. IDO, R. TATY TATY¹, M. YASUNAGA, A. TASAKA, F. NIAMA², T.**

TADA, M. ISHIMATSU, A. UMEHARA, S. IWAMOTO and H.J. PARRA² (¹Centre de Pathologie Infectieuse, Republic of Congo, ²Laboratoire National de Sante Publique, Republic of Congo)

To clarify the molecular epidemiological status of HIV at a small clinic in Point-Noire, a costal city in western Republic of Congo, we collected bloods from 59 adult AIDS patients who visited the clinic in 2005. DNAs were extracted and nested PCRs were performed in pol (288 bp) and envC2V3 (approximately 550 bp) regions, and then all the sequence data were subjected to phylogenetic analysis. Subtype distribution based on pol sequences was as follows: 19 subtype A (32.2 %), 16 subtype G (27.1 %), 6 CRF19 (10.2 %), 5 subtype D (8.5 %), 4 unclassified (6.8 %), 3 subtype H (5.1 %), 1 each of subtype C, F, J (1.7 %, respectively), and 3 unamplified (5.1 %). One case was dual infection of subtypes A and C. The results based on the env sequences were basically similar to those from the pol data, but 16 cases (27.1 %) were not amplified. According to the survey conducted by our group in this country in 2002, the predominant subtype was A (38 %) followed by subtypes G and H (24 % each). It is noteworthy that the genetic diversity has dramatically expanded during the last several years.

3) Molecular epidemiology of HIV in the eastern part of Democratic Republic of Congo: E. IDO, Z. KASHONGWE¹, T. TADA, S. KARHEMERE², A. UMEHARA, S. IWAMOTO and J. J. MUYEMBE² (¹Bukavu General Hospital, Democratic Republic of Congo, ²National Institute of Biomedical Research, Democratic Republic of Congo)

Democratic Republic of Congo (DRC, former Zaire) is a vast country located in center of the African continent mostly covered with tropical rain forests. It is well-known that a variety of HIV genotypes are cocirculating in this region. However, little is known about the molecular epidemiology of DRC, especially that of its eastern part, because the area has been battle fields for a long time since early 1990's. To clarify the genotypic distribution of HIV in eastern, we collected blood specimens from 10 AIDS patients who visited a clinic in Kisangani, a capital city of Oriental Province in 2006 and from 48 AIDS patients who visited a hospital in Bukavu, a capital city of South Kivu Province in 2007. DNAs were extracted and a nested PCR was performed in pol (288 bp) region. PCR products were obtained from 57 out of 58, but one specimen from Kisangani could not be amplified. Phylogenetic analysis based on the pol sequences revealed that the predominant was subtype A amounting to 33 (57.9 %) followed by 10 subtype C (17.5 %), 7 subtype G (12.3 %), 4 subtype D (7.0 %), 3 subtype F (5.3 %), 1 subtype H (1.8 %), and 2 unclassified (3.5 %). One case was dual infection of subtypes A and F, and another case was triple infection of subtypes A, F and G. The predominant subtype was subtype A in both two cities, suggesting that this subtype might have originated from this area and spread over the neighboring areas. However, the subtypic

distribution of each province was quite different, that is, the second largest subtype was subtype G in Kisangani whereas the one was subtype C in Bukavu. In order to delineate how respective subtypes have disseminated over the African continent additional data especially from Kisangani may be needed.

LIST OF PUBLICATIONS

Center for Emerging Virus Research

Laboratory for Viral Replication

Akiyama, H., Ishimatsu, M., Miura, T., Hayami, M., and Ido, E.: Construction and infection of a new simian/human immunodeficiency chimeric virus (SHIV) containing the integrase gene of the human immunodeficiency virus type 1 genome and analysis of its adaptation to monkey cells. *Microbes Infection*, 10:531-539, 2008.

Ndembi, N., Ido, E., Mbanya, D., and Kaptue, L.: Exposure to SIVmd-2 in Southern Cameroon: Public Health Implications, *HIV&AIDS Review*, 8(3):16-19, 2008.

Ido, E., Taty-Taty, R., Yasunaga, M., Ishimatsu, M., Niama, F., and Parra, H-J.: Genetic diversity of HIV-1 has dramatically increased in Republic of Congo during the last decade. 15th East Asia Joint Symposium on Biomedical Research, Seoul, Korea, June 20-22, 2008.

Ido, E., Ishimatsu, M., Tetsuko Tada, T., and Ibuki, K.: Novel SHIVs that possess HIV-1-derived pol genes can infect rhesus macaques. 26th Annual Symposium on Nonhuman Primate Model for AIDS, San Juan, Puerto Rico, December 9-12, 2008.

井戸栄治、多田哲子、Stormy Karhemere、Masimango Imani、田坂暁子、多田秀子、Steve Ahuka、Zaccharie Kashongwe、Jean-Jacques Muyembe : コンゴ民主共和国東部地域における HIV の分子疫学、第 23 回日本国際保健医療学会学術大会、東京、10 月 25-26 日、2008.

井戸栄治、Raphael Taty-Taty、安永みゆき、田坂暁子、Fabien Niyama、多田哲子、多田秀子、石松美沙、Henri-Joseph Parra : コンゴ共和国西部の町ポイント・ノアールの診療所における HIV の遺伝子解析、第 23 回日本国際保健医療学会学術大会、東京、10 月 25-26 日、2008.

井戸栄治、石松美沙、三浦智行、多田哲子、多田秀子、伊吹謙太郎 : HIV-1 の逆転写酵素とインテグラーゼ遺伝子を持つ SHIV-rti はアカゲザルに持続感染しエイズ様症状を引き起こす、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、10 月 26-28 日、2008.

井戸栄治、石松美沙、三浦智行、多田哲子、多田秀子、伊吹謙太郎 : HIV-1 由来の pol 遺伝子を持つ SHIV-prti のアカゲザル in vivo 継代による感染増殖能の増加、第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会、大阪、11 月 26-28 日、2008.

当研究室は、平成20年12月末をもって新興ウイルス感染症研究センターがスタートしてから丁度丸3年が経過したことになります。リーダーは私(井戸栄治)で、他に技術補佐員3名(多田哲子、岩元静香、梅原綾)から成っています。何分小さなチームですから、いつも和気あいあいとした雰囲気の極めて家族的な研究室です。

本研究室では、主に2つの研究テーマに重点を置いて活動しています。先ず第1のテーマは、「中央部アフリカにおけるHIV/SIVの遺伝子解析」です。海外調査により得られたヒトやサルの血液材料より、HIV/SIV(あるいはHTLV/STLV)を分離し、それらの分子系統解析を行なうことにより、その調査対象地域内に流行している株の遺伝子型を明らかにしつつ、ウイルスの伝播経路、さらにはその起源や将来予測をすることを究極の目標としています。ヒトやサルから新種ウイルスを発見することは大きな狙いの一つです。この10年間は、実に多様な遺伝子型が存在することからエイズウイルスの起源地と推定される中央アフリカ地域(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、調査活動を展開しています。2008年は、コンゴ共和国とコンゴ民主共和国の2ヶ国を訪問しました。コンゴ共和国から集められたある一群の検体は、大西洋に近いポイントノール市内の診療所から得たものです。この診療所は現地の所長の並々ならぬ努力により、アフリカとしては特例的と言ってよい程に患者らに対するケアが行き届いており、通常発展途上国では至難である同一患者に対する追跡調査が可能になっています。現在流行している株の分子疫学的解析(図1参照)だけでなく、薬剤耐性変異出現の経過やウイルス変異・リコンビネーションなど個体内ウイルス進化に関する貴重なデータが得られるものと期待されています。またこれとは別に、コンゴ共和国の中北部キュヴェット州オワンドウ町より54検体が、コンゴ民主共和国の東部オリエンタル州キサンガニ市より100検体が集められました。これらの検体は、これまで治安上の理由や劣悪な交通事情などにより非常にアクセスが難しく、従ってどの国の研究グループも調査に入ったことのない地域から集められたもので、こちらからは新型ウイルスの発見などが期待されています。

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。京都大学ウイルス研究所内には、全国でも珍しいBSL3サル感染実験が可能な動物飼育施設が設置されています。当研究室では、このユニークな施設をエイズ基礎研究のために最大限活用すべく、特に抗HIV-1薬剤をサル個体レベルで評価できる系の確立を目指しています。通常サルに感染することが知られているSHIVは、env遺伝子だけがHIV-1由来でありpol遺伝子部分(ここには薬剤の多くが標的とするPR、RT、INTの各遺伝子がコードされている)はSIV由来のため、抗HIV薬の評価には適しません。そこで我々は、SIVmacのゲノムにHIV-1のpol遺伝子の一部または全部を置換導入した一連の新規SHIVを作成することにしました。これまでにPR遺伝子のみを置換した

SHIV-pr や RT から INT 遺伝子までを置換した SHIV-rti のアカゲザル感染実験が行なわれ、それらが感染成立するだけでなく、接種後1〜3年を経てエイズ発症に至ることなどを明らかにしました。pol 遺伝子全体が HIV-1 由来のものに置換された SHV-prti は、現在 4 代目まで in vivo 継代されており、代を重ねる毎にウイルスの感染増殖能力が上がっていることが観察されています。これら感染サルを用いたサル HAART モデルの確立が当面の大きな目標です。この他、HIV-1 領域をより一層拡大する試みとして、pol 遺伝子領域だけでなく env 遺伝子領域も HIV-1 由来にした SHIV-rti/3rn も作成されました。このウイルスを in vitro レベルでサル細胞に馴化させた後アカゲザルに接種すると感染が成立することが明らかとなりました(Akiyama, et al., Microbes Infection, 2008)。この SHIV-rti/3rn は全ゲノム中約 70 %が HIV-1 由来となっており、アカゲザルで感染増殖が示されたウイルスとしては最も HIV-1 に近い遺伝子構造を持った SHIV ということになります。

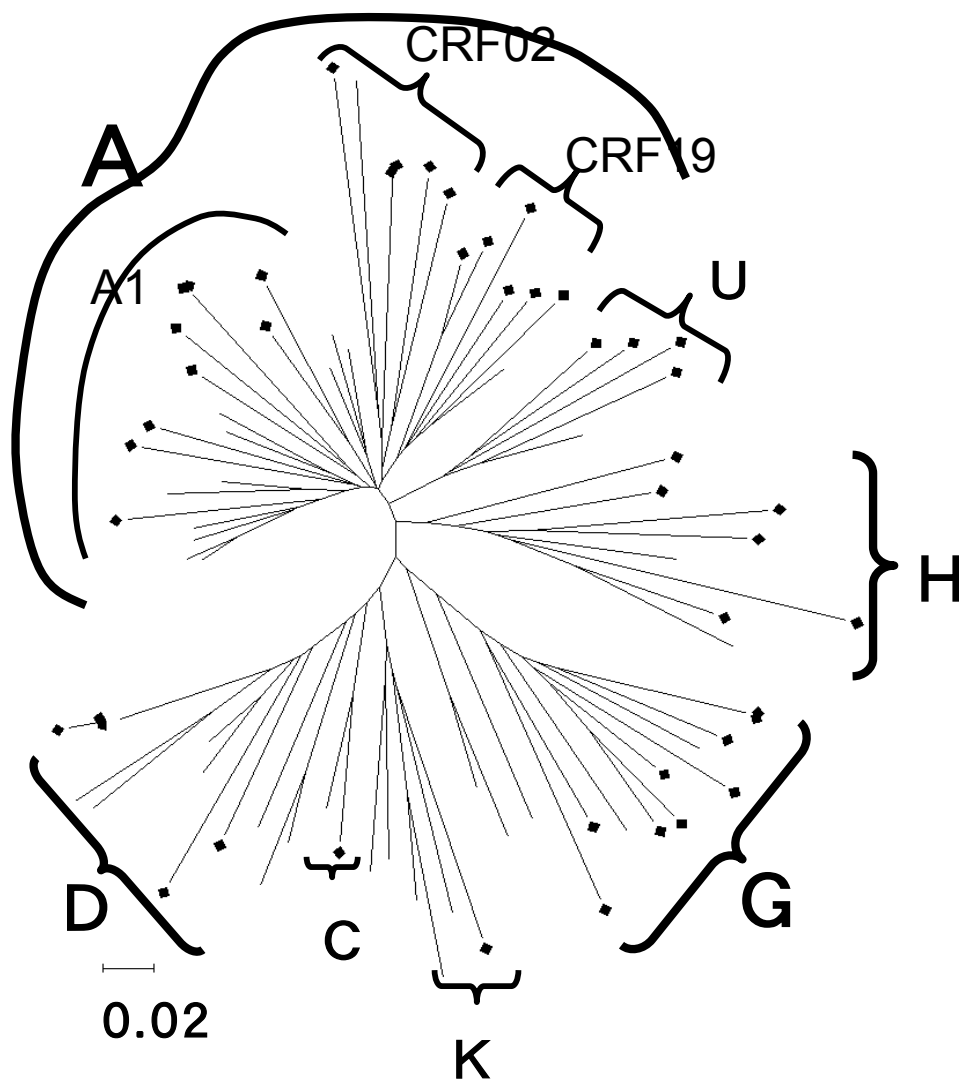


図 1. コンゴ共和国ポイントノアール市のとある診療所において分離された HIV-1 株の envC3V3 領域(550 bp)核酸配列に基づく系統樹.