博士（理　学）　中　屋　隆　明

学 位 論 文 題 名

ヒト免疫不全ウイルスとボルナ病ウイルスの持続感染機序に関する研究

学位論文内容の要旨

ウイルスの感染を受けた細胞は、大別して３つの運命をたどる。一つは、ウイルスの増殖に伴い、細胞が破壊される溶解感染（lytic infection）である。第２の感染様式は、ウイルスの感染によって、細胞が、がん化（transformation）する場合である。そして第３番目は、細胞とウイルスが共存する感染様式であり、持続感染（persistent infection）ないしは潜伏感染（latent infection）と呼ばれる。特に、溶解感染を起こし、死滅するか、あるいは持続感染を起こし、ウイルスとの共存下で生き続けるかは、ウイルスの細胞傷害性と深く関わる。また、潜伏感染からの活性化は宿主側の免疫応答能と深く関与する。本研究では、ヒトに持続、潜伏感染し、免疫疾患を引き起こすヒト免疫不全ウイルス、および精神神経疾患との関連性が示唆されているボルナ病ウイルスについて、その感染機序を解明することを目的とした。

ヒト免疫不全ウイルス１型（Human immunodeficiency virus type 1：HIV-1）は、後天性免疫不全症候群（AIDS）の原因ウイルスであり、感染機序の解明は、治療法を確立する上で極めて重要である。本研究では、HIV-1の感染様式を*in vitro*の実験系において検討し、HIV-1の細胞傷害性および持続感染機序に関与する遺伝子の同定を試みた。また、HIV-1の調節タンパク質の一つであるRevの働きを阻害するデコイオリゴヌクレオチドを用いて、抗ウイルス剤としての可能性を検討した。

ボルナ病ウイルス（Borna disease virus：BDV）は、元来ウマに脳炎を起こすボルナ病の原因ウイルスとして分離されたものであるが、最近の研究により、ヒト、特に精神疾患患者との関連性が指摘されている。一方、慢性疲労症候群は、その病因にウイルス感染症が疑われており、うつ症状などの精神症状も見られることから、本研究では、BDVと慢性疲労症候群との関連性を検討した。さらに、免疫抑制状態にあるHIV-1感染者および悪性脳腫瘍患者に対するBDVの疫学調査を行い、ヒトにおけるBDVの感染様式についても検討した。

従って、本論文は「第１章：ヒト免疫不全ウイルス１型（HIV-1）の細胞傷害性の低下に関わるアクセサリー遺伝子の変異」、「第２章：RREデコイオリゴヌクレオチドによるHIV-1増殖抑制効果」および「第３章：ヒトにおけるボルナ病ウイルスの感染に関する研究」から構成される。

第１章は以下の内容に要約される。

１．HIV-1の*in vitro*における継代感染により、低細胞傷害性のウイルスが現れ、継代4代以降は持続感染する細胞が出現した。継代と共に*vpr*遺伝子内のナンセンス変異の割合が増加し、20代以降の持続感染細胞では、ほぼ全てのプロウイルスDNAが変異型であった。これらのことから、*vpr*遺伝子の変異が細胞傷害性の低下をもたらす一因であることが示唆された。

２．継代50代において、*vif*から*vpr*にかけてミスアライメント欠失と考えられる変異を伴うウイルスが検出された。この欠失ウイルスは、複製、増殖が可能であり、さ

らに細胞傷害性をほぼ消失していることが、組み換えウイルスを用いた感染実験により明らかとなった。

3．*vpr* 遺伝子内のナンセンス変異は生体内のプロウイルスにも高率に認められ、*in vivo* における存在様式の一つであることが示唆された。

第2章は以下の内容に要約される。

1．Rev response element（RRE）内のRevタンパク質結合部位（bubble構造）を含むオリゴヌクレオチド（RREオリゴヌクレオチド）を合成した。これらのオリゴヌクレオチドはRevと結合することが明らかとなった。

2．RREオリゴヌクレオチド（ARO-2）は、1から10 μMの濃度において、ヒトT細胞由来株であるMOLT#8 およびM10細胞に持続的に感染したHIV-1（実験室株）のウイルス産生を抑制した。また、HIV-1が潜伏感染したヒトT細胞由来株（CEM）であるACH-2細胞において、TNF-α刺激によるウイルスタンパク質の合成（ウイルスの再活性化）を抑制した。一方、添加濃度10 μMにおいて、RREオリゴヌクレオチドの細胞に対する傷害性は認められなかった。

3．RREオリゴヌクレオチド（ARO-2）は、ヒト末梢血単核球に感染したHIV-1（臨床分離株）のウイルス産生を抑制した。

第3章は以下の内容に要約される。

1．HIV-1感染者は非感染者に比べ、BDV抗体陽性率が有意に高く、特に性病（STD）を併発している患者ではその傾向は顕著であった。また、一般に免疫抑制状態であることが報告されている悪性脳腫瘍患者（グリオブラストーマ）の脳腫瘍組織からもBDV RNAが高率に検出された。

2．日本国内の慢性疲労症候群（CFS）患者では、健常者と比較し、抗BDV抗体およびBDV遺伝子の陽性率が有意に高かった。

3．CFSの家族内集団発症例において、CFSと診断された患者（両親、次男および長女の4名）は全てBDVとの関連が示された。一方、CFSのいずれの基準にも該当しない長男は抗BDV抗体および末梢血単核球中のBDVp24遺伝子は陰性であった。

以上のことから、HIV-1 はアクセサリー遺伝子*vif* および*vpr* の変異により、宿主細胞と共存している可能性が示唆されること、また変異が起きにくい領域（RRE）のアナログであるRREデコイオリゴヌクレオチドの抗ウイルス剤としての有用性を明らかにすることができた。さらに、ヒトにおけるBDVの存在様式は、宿主生体の免疫応答により抑制された状態にある可能性を指摘すると共に、BDV感染とCFS患者の発病あるいは症状との関連性を示唆する知見を得た。

学位論文審査の要旨

主　査　教　授　東　　市　郎
副　査　教　授　谷　口　和　彌
副　査　教　授　菊　池　九二三
副　査　教　授　生　田　和　良

大学院医学研究科（免疫科学研究所）

学位論文題名

ヒト免疫不全ウイルスとボルナ病ウイルスの持続感染機序に関する研究

ウイルスの感染を受けた細胞は、大別して３つの運命をたどる。一つは、ウイルスの増殖に伴い、細胞が破壊される溶解感染（lytic infection）である。第２の感染様式は、ウイルスの感染によって、細胞が、がん化（transformation）する場合である。そして第３番目は、細胞とウイルスが共存する感染様式であり、持続感染（persistent infection）ないしは潜伏感染（latent infection）と呼ばれる。特に、溶解感染を起こし、死滅するか、あるいは持続感染を起こし、ウイルスとの共存下で生き続けるかは、ウイルスの細胞傷害性と深く関わる。また、潜伏感染からの活性化は宿主側の免疫応答能に深く関与する。申請者は、ヒトに持続、潜伏感染し、免疫疾患を引き起こすヒト免疫不全ウイルス、および精神神経疾患との関連性が示唆されているボルナ病ウイルスについて、その感染機序を解明することを目的とした。

ヒト免疫不全ウイルス１型（Human immunodeficiency virus type 1：HIV-1）は、後天性免疫不全症候群（AIDS）の原因ウイルスであり、感染機序の解明は、治療法を確立する上で極めて重要である。申請者は、HIV-1の感染様式を*in vitro*の実験系において検討し、HIV-1の細胞傷害性および持続感染機序に関与する遺伝子の同定を試みた。また、HIV-1の調節タンパク質の一つであるRevの働きを阻害するデコイオリゴヌクレオチドを用いて、抗ウイルス剤としての可能性を検討した。

ボルナ病ウイルス（Borna disease virus：BDV）は、元来ウマに脳炎を起こすボルナ病の原因ウイルスとして分離されたものであるが、最近の研究により、ヒト、特に精神疾患患者との関連性が指摘されている。一方、慢性疲労症候群は、その病因にウイルス感染が疑われており、うつ症状などの精神症状も見られることから、申請者は、BDVと慢性疲労症候群との関連性を検討した。さらに、免疫抑制状態にあるHIV-1感染者および脳腫瘍患者に対するBDVの疫学調査を行い、ヒトにおけるBDVの感染様式についても検討した。

本論文の重要な結果は以下の３点である。

1．HIV-1の*in vitro*における継代感染により、低細胞傷害性のウイルスが出現し、一部の感染細胞に持続感染が成立した。これら細胞傷害性の低下はアクセサリー遺伝子である*vif*、*vpr*遺伝子の変異（*vpr*遺伝子のナンセンス変異、および*vif*から*vpr*におけるミスアライメント欠失）によることを明らかにした。また、今回同定された*vpr*遺伝子のナンセンス変異は生体内のプロウイルスにも高率に認められ、*in vivo*におけるHIV-1の存在様式の一つであることが示唆された。

2．Rev response element（RRE）内のRevタンパク質結合部位（bubble構造）を含むオリゴヌクレオチド（RREオリゴヌクレオチド）を合成した。これらのオリゴヌクレオチドは、ヒトT細胞由来株であるMOLT#8細胞、M10細胞およびACH-2細胞に持続、潜伏感染したHIV-1（実験室株）のウイルス産生を抑制した。さらに、RREオリゴヌクレオチドは、ヒト末梢血単核球に感染したHIV-1（臨床分離株）のウイルス産生を抑制した。

3．日本国内の慢性疲労症候群患者では、健常者と比較し、抗BDV抗体およびBDV遺伝子の陽性率が有意に高かった。また、慢性疲労症候群の家族内集団発症例において慢性疲労症候群と診断された患者は全てBDVとの関連が示された。一方、慢性疲労症候群や精神疾患との関連性が認められないが、免疫抑制状態にあると考えられるHIV-1感染者および悪性脳腫瘍患者（グリオブラストーマ）においても、抗BDV抗体およびBDV遺伝子検出率は健常者に比べて有意に高かった。

以上、申請者は、HIV-1 の持続感染に関与するウイルス遺伝子を同定すると共に、HIV-1において変異が起きにくい領域（RRE）のアナログであるRREデコイオリゴヌクレオチドの抗ウイルス剤としての有用性を明らかにした。これらの研究成果はヒトに重篤な疾患をもたらすHIV-1の持続感染機構の解明および抗ウイルス剤の開発に大きく寄与するものである。さらに、ヒトにおけるBDVの存在様式は、宿主生体の免疫応答により抑制された状態にある可能性を指摘すると共に、BDV感染と慢性疲労症候群患者の発病あるいは症状との関連性を示唆する知見を得た。この様に、ヒトにおけるBDVの感染様式を検討し、未だ病因が同定されていない慢性疲労症候群とBDVとの関連性を指摘したことは、ヒトにおけるBDV感染の影響を研究する上での大きな貢献であると評価される。審査員一同は申請者が博士（理学）の学位を受けるに充分な資格を有するものと認めた。