

学 位 論 文 題 名

The role of viral quasispecies in the pathogenesis of HIV-1 and related viruses

(HIV およびその関連ウイルスの病原性におけるウイルス準種の役割)

学位論文内容の要旨

HIV (ヒト免疫不全ウイルス) が感染すると、免疫機能の低下に伴う種々の日和見感染症の合併が起こり、AIDS (後天性免疫不全症候群) を発症する。AIDS に対する治療法は過去 20 年ほどの間に劇的な進歩を遂げ、1996 年から導入された 3 種以上の薬の併用療法である HAART (多剤併用療法) の使用により、多くの症例において、長期間に渡り血液中の HIV コピー数を検出限界以下に抑えることが可能になった。しかしながら、この HAART 療法にも限界があり、HAART によっても体内から完全に HIV ウイルスを駆逐することはできず、ウイルスの血中レベルが 2 年以上検出限界以下に抑えられていた患者においても、低レベルでのウイルスの増殖が長期間に渡って維持されていることを示唆するデータが、数多くの研究グループによって報告されている。こうした検出限界以下ながらもごく低レベルに存在するウイルスの増殖が、CD4 陽性 T 細胞以外の細胞で起こっている可能性を示唆するデータも、これまでに多く発表されており、ウイルスに感染しても細胞が死滅しないこと、現在使用されている AIDS 治療薬に対する感受性が低いこと、また、感染細胞の半減期が非常に長いこと等の理由から、HAART 投与期間におけるウイルス増殖に対するマクロファージの関与が現在大いに注目されている。そこで、本研究では、HAART 投与患者における、低レベルのウイルス増殖のメカニズムと組織マクロファージ指向性に関与するウイルス因子の解明に関する研究を行った。

本研究の対象として、アメリカ国立アレルギーおよび感染症研究所の AIDS クリニックにおける臨床試験に参加していた患者の中から、HAART 療法により血中のウイルスレベルが 1 ～ 3 年もの長期に渡り検出限界以下に抑えられていた患者 3 名を選んだ。HAART 治療開始前、HAART 投与期間内、および、HAART 中断後の 3 点において、血液サンプルを採取し、血中に存在するウイルスの DNA シークエンスを解析した。HIV のプロテアーゼ領域を用いたウイルスの DNA シークエンス解析の結果、HAART 投与開始以前に存在していたウイルス産生細胞 (レザバー) からのウイルスの増殖は、HAART 投与によっても完全に抑制されていないことが明らかとなった。この期間には、PBMC (末梢血単球) からは常にウイルス RNA が検出され、HAART 投与期間に血中より採取してきた PBMC を培養下で刺激すると、正常なウイルスの産生が見られることも併せて見出された。さらに、HAART 存在下、長期間に渡り低レベルのウイルスの増殖を担ってきたレザバーは、HAART 投与中断後、速やかに増殖サイクルを回復させることが本研究により明らかとなった。こうした低レベルのウイルスの増殖が、どこでどの様な細胞によってまかなわれているかについては、現在不明であるが、ウイルスに感染しても細胞が死滅しないこと、現

在使用されているエイズ治療薬に対する感受性が低いこと、また、感染細胞の半減期が非常に長いこと等の理由から、組織マクロファージの役割が現在大いに注目されている。

HIVは、細胞表面上に存在するCD4およびケモカインレセプターを使って、標的細胞に侵入する。主なケモカインレセプターとして、CXCR4とCCR5の2種が知られており、これらがウイルスのある程度の細胞指向性を決めるのに役立っていることが知られている。しかしながら、組織マクロファージに対するウイルスの指向性に関しては、末梢血から比較的簡単に入手可能なT細胞などに比べ、体内組織に存在するマクロファージの入手が大変困難であることから、これまでに大きな研究の進歩は見られていない。そこで、我々は、HIVのエンベロープの遺伝子をコードするSIV（サル免疫不全ウイルス）とHIVのキメラウイルスであるSHIVを用いたアカゲザルの動物モデル系において、感染初期には主に血中のCD4陽性細胞により（T-cell phase）、また、感染後期においては組織中に存在するマクロファージによってウイルスの増殖が維持されている（Macrophage phase）という点に着目して、T-cell phaseからMacrophage phaseへの変遷期にウイルスにどのような変化が起こっているのかについて検討した。そして、SHIVのエンベロープ領域を用いたウイルスのDNAシーケンス解析の結果、アカゲザルにおけるSHIV感染後期にあたるMacrophage phaseには、エンベロープのV2ループにアミノ酸残基を欠損したウイルスが多く検出され、また、V2にアミノ酸欠損を持つウイルスの中には、糖鎖の欠損を伴うものがあることが明らかとなった。特に、アミノ酸164-165に欠損を持つウイルスは肺マクロファージに強い指向性を示し、また、マクロファージ指向性の認められたウイルスには全てCD4非依存性感染が認められた。活性化したPBMCと較べた場合、マクロファージ細胞表面上に存在するCD4およびケモカインレセプターの発現量が非常に低いことが知られていることから、CD4陽性T細胞がほぼ完全に末梢血中から消滅してしまっているSHIVの感染後期においては、CD4を低レベル、あるいは全く発現していないターゲット細胞にも感染できるV2アミノ酸欠損変異株が、ウイルスの進化の過程で優先的に選択されたものと考えられる。

長年のエイズ研究の成果により、HIV感染はコントロール可能な慢性ウイルス感染症と変貌しつつある。しかしながら、現在使用されているHAARTによってもウイルスを根絶することはできず、低レベルながらもウイルスの増殖を続けるレザバーがHAART存在下においても存在していることが、本研究により明らかとなった。ウイルスのレザバーとして最も着目されているのが組織マクロファージであり、本研究においては、SHIV／アカゲザルの動物モデル系を使うことにより、マクロファージ指向性に関与するウイルス因子を同定することに成功した。本研究で確立されたウイルスは、SHIVウイルスとしては初のマクロファージ指向性を獲得したウイルスであり、このウイルスを使用することにより、ウイルスがどのような経路でマクロファージに感染するかを個体レベルで調べることが可能になった。また、HAART投与後の長期に渡るウイルスの増殖の組織マクロファージにおけるメカニズムについても、個体レベルで言及することが可能になり、今後の検討が望まれる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 横 沢 英 良

副 査 教 授 有 賀 寛 芳

副 査 助 教 授 高 橋 和 彦

副 査 助 教 授 川 原 裕 之

学 位 論 文 題 名

The role of viral quasispecies in the pathogenesis of HIV-1 and related viruses

(HIV およびその関連ウイルスの病原性におけるウイルス準種の役割)

AIDS に対する治療法は過去 20 年ほどの間に劇的な進歩を遂げ、1996 年から導入された 3 種以上の薬の併用療法である HAART (多剤併用療法) の使用により、多くの症例において、長期間にわたり血液中の HIV (ヒト免疫不全ウイルス) コピー数を検出限界以下に抑えることが可能になった。しかし、この HAART 療法によっても体内から完全に HIV を駆逐することはできず、HAART 投与患者において低レベルでのウイルスの増殖が長期間にわたり維持されていることが判明した。現在、HAART 投与期間における低レベルでのウイルスの増殖に対する組織マクロファージの関与が注目されているが、HIV 感染患者からの組織マクロファージの入手が非常に困難であることや、適切な動物モデルが存在しないことなどから、組織マクロファージに関する研究が進んでいない。

本論文提出者は、HAART 投与患者における低レベルのウイルス増殖のメカニズムと組織マクロファージ指向性に関与するウイルス因子の解明に関する一連の研究を展開し、以下の成果をおさめた。

(1) HAART 投与患者における低レベルでのウイルス増殖のメカニズムの研究対象として、アメリカ国立アレルギーおよび感染症研究所の AIDS クリックにおける臨床試験に参加していた患者の中から、HAART 療法により血中のウイルスレベルが長期にわたり検出限界以下に抑えられていた患者 3 名を選出して、HAART 治療開始前、HAART 投与期間内、および HAART 中断後の 3 点において血液サンプルを採取し、HIV のプロテアーゼ領域を用いて、血中に存在するウイルスの DNA シークエンスを解析した。そして、HAART 投与開始以前に存在していたウイルス産生細胞 (レザバ

一)からのウイルスの増殖が、HAART投与によっても完全に抑制されていないことを明らかにした。また、この期間にはPBMC(末梢血単球)からは常にウイルスRNAが検出されること、HAART投与期間に血中より採取したPBMCを培養下で刺激すると正常なウイルスが産生されることを明らかにした。さらに、HAART存在下、長期間にわたり低レベルでのウイルスの増殖を担ってきたレザバーが、HAART投与中断後、すみやかに増殖サイクルを回復させることを明らかにした。

(2)SHIV(サルーヒト免疫不全キメラウイルス)を用いたアカゲザルの動物モデル系を用いて、感染初期(T-cell phase)では主に血中のCD4陽性細胞により、また、感染後期(Macrophage phase)では組織中に存在するマクロファージによって、ウイルスの増殖が維持されていることに着目して、T-cell phaseからMacrophage phaseへの変遷期にウイルスに起こっている変化について検討した。そして、アカゲザルにおけるSHIV感染後期にあたるMacrophage phaseには、エンベロープのV2ループにアミノ酸残基を欠損したウイルスが多く検出されること、V2にアミノ酸欠損を持つウイルスの中には糖鎖が欠損しているものがあることを明らかにした。特に、アミノ酸位置164・165に欠損を持つウイルスは肺胞マクロファージに強い指向性を示し、マクロファージ指向性の認められたウイルスには全てCD4非依存性感染が認められることを明らかにした。活性化したPBMCと比較した場合、マクロファージ細胞表面上に存在するCD4およびケモカインレセプターの発現量が非常に低いことが知られており、本研究の結果から、CD4陽性細胞がほぼ完全に末梢血中から消滅してしまっているSHIVの感染後期においては、CD4を低レベルあるいは全く発現していないターゲット細胞にも感染できるV2アミノ酸欠損変異株が、ウイルスの進化の過程で優先的に選択されたと提案した。

以上の知見およびそれを得るために用いた新研究技法は、HAART投与患者における低レベルでのウイルス増殖のメカニズムの理解にとどまらず、HAART療法における限界を実証したという点で、臨床的にも意義のあるものであると言える。また、本研究で確立されたウイルスはSHIVウイルスとしては初のマクロファージ指向性を獲得したウイルスであり、このウイルスを使用することにより、ウイルスがどのような経路でマクロファージに感染するかを個体レベルで調べることが可能になった。これは、HAART投与後の長期にわたるウイルスの増殖の組織マクロファージにおけるメカニズムを個体レベルで言及する上で、重要な寄与をなすものである。

審査員一同このことを高く評価し、本論文提出者が博士(薬学)の称号を受けるにふさわしいものと一致して判断した。