

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：84407

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09097

研究課題名(和文) 抗レトロウイルス療法下におけるHIVプロウイルスの量的および質的動態に関する研究

研究課題名(英文) Quantitative and qualitative analysis of HIV-1 proviral DNA in acutely and chronically infected individuals on antiretroviral therapy

研究代表者

森 治代 (MORI, HARUYO)

地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所・微生物部・総括研究員

研究者番号：20250300

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：抗レトロウイルス療法によりウイルスの増殖が抑制された後も、HIVはプロウイルスとして感染者の体内に残存し、完治への妨げとなっている。本研究では、急性期および慢性期に治療を開始したHIV-1感染症例を対象として、治療開始時期がその後のプロウイルスの動態に及ぼす影響を調べた。その結果、急性期症例では治療前からプロウイルス量が低く、開始後は速やかに均一なクローン集団を形成した。一方、慢性期症例のプロウイルスは治療開始後に減少はするものの高い多様性を維持しており、急性期症例の残存プロウイルスとは質的に異なっていると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

治療薬の進歩によりHIV感染症は慢性疾患と認識されるようになったが、治療により血液中のウイルス量が検出できないレベルにまで低下した後もリンパ球中に組み込まれたプロウイルスが長期に渡って残存し、完治への障壁となっている。本研究において、治療下でのプロウイルスの動態を詳細に解析することにより、プロウイルスの根絶、すなわちHIV感染症の治癒につながる手がかりが得られるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：HIV-1 can persist in PBMCs as a provirus even after suppression of plasma viremia by antiretroviral therapy (ART). In this study, we investigated the kinetics of HIV-1 provirus in acutely and chronically infected individuals after initiating ART. Proviral DNA (pDNA) load in acutely infected patients was lower than chronically infected patients even when untreated (101.2 vs 356.1 copies/1 million PBMCs in median). Single-genome sequencing revealed that the variability of pDNA clones in acutely infected patients was quite low and became identical soon after the initiation of ART. On the other hand, proviruses were highly diverse and 3 months to more than 1 year was required until clonal expansions appeared in chronically infected patients after the initiation of ART.

研究分野：HIV分子疫学

キーワード：HIV プロウイルス 抗レトロウイルス療法 G-to-A hypermutation

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

HIV 感染症の治療開始時期については時代と共に変化しているが、近年実施された大規模な臨床試験 (Cohen MS *et al.*, 2016) の結果から、抗レトロウイルス療法 (ART) によって感染者のウイルス量を検出限界未満に抑制すれば他者への感染をほぼ予防できることが明らかになり、“Treatment as Prevention (予防としての治療)” の考えのもと、現在は HIV 感染が診断されたすべての人に対してただちに治療を開始することが推奨されている。しかしながら、HIV は ART により増殖が抑制された後も感染者の T 細胞にプロウイルスの形で長期に渡って存在し続け、現在の ART では細胞ゲノムに組み込まれた HIV プロウイルスを体内から排除することは出来ない。その大部分は欠損ウイルスであるが、その中にごく一部ウイルス産生能を持ったプロウイルスが存在するため、HIV 感染症の完治を目指すには潜伏感染しているプロウイルスの根絶が大きな課題となっている。

APOBEC3G/F (A3G/F) は抗 HIV-1 活性を有する宿主因子のひとつで、HIV-1 粒子に取り込まれた A3G/F は標的細胞内でウイルスがゲノムを複製する際に G から A への変異を高頻度に導入する (G-to-A Hypermutation) ことにより HIV-1 の複製を阻害することが知られている (高折ら、2012)。

我々は、長期 ART 成功例をフォローアップする中で、プロウイルス量の減少に伴って G-to-A Hypermutation が多数導入されたプロウイルスがしばしば検出されることに気付いたが、その出現頻度に明らかな経年変化は認められなかった。一方、急性感染期の重篤な初期症状のため早期に ART を開始した 1 症例において、A3G/F によると考えられる G-to-A Hypermutation が高い頻度でプロウイルス中に検出された。これらのことから、A3G/F により引き起こされる Hypermutation は ART 施行下での残存プロウイルスの排除に大きく関与していると考えた。

2. 研究の目的

急性期および慢性期 HIV-1 感染症例において ART 導入前の未治療期と ART 施行下におけるプロウイルスの量的・質的変動を詳細に比較解析することにより、ART とプロウイルスの動態との関わりについての理解を深め、プロウイルスの根絶、すなわち HIV 感染症の治療を実現するための手がかりを探求することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 研究の対象

急性期に HIV-1 感染が診断され、3 ヶ月以内に ART を開始した 8 例および慢性期に ART を開始した 9 例を対象とし、ART 開始以前の未治療期と ART 開始後概ね 1 年後までの比較的短期間に焦点を置いて、ART 開始時期とプロウイルスの動態との関連を検討した。

(2) プロウイルス コピー数の計測

HIV-1 感染者から得られた末梢血単核球 (PBMC) より DNA を抽出し、HIV-1 *gag* 領域にプライマー・プローブセットを設定した TaqMan リアルタイム PCR 法にてプロウイルスコピー数を計測した。DNA の濃度からコピー数計測に用いた細胞数を算出し、PBMC 10^6 個当たりのプロウイルスコピー数を算出した。

(3) single-genome PCR / シークエンス法によるプロウイルスクローンの遺伝子解析

ART 開始後に複数回サンプリングが可能であった急性期 6 症例、慢性期 7 症例の末梢血単核球 (PBMC) (急性期 21 検体、慢性期 28 検体、計 49 検体) より抽出した DNA を限界希釈し、single-genome PCR 法により HIV-1 プロテアーゼ (PR) / 逆転写酵素領域 (RT) およびインテグラーゼ / *vif* 領域を増幅した。得られた HIV-1 DNA クローン (概ね 20 クローン / 検体) について、BigDye terminator 法により遺伝子配列を決定した。

(4) 薬剤耐性変異および G-to-A hypermutation の検出

Single-genome PCR / シークエンス法により得られた遺伝子配列について、Stanford HIV Drug Resistance Database (<https://hivdb.stanford.edu/hivdb/by-sequences/>) 薬剤耐性解析プログラムを利用して、APOBEC3G/F による G-to-A Hypermutation の有無をスクリーニングした。Hypermutation が検出されたクローンについては、Hypermut 2.0 (<https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HYPERMUT/background.html>) を用いて変異の数や出現箇所等をさらに詳細に解析した。

4. 研究成果

(1) ART 開始前後における HIV-1 プロウイルス量の変動

17 症例の HIV-1 感染患者より経時的に採取された血液検体におけるプロウイルスコピー数につ

いて、未治療期、ART 開始後に血漿中の HIV-1 RNA 量 (VL) が 20 コピー以下になるまでの間、20 コピー以下に抑制されて以降に分けて、急性期症例と慢性期症例と比較したところ、全期間を通して急性期のプロウイルスコピー数が慢性期より低い傾向にあったが、個人差が大きいため有意差は認められなかった。中央値で見ると、未治療期のプロウイルスコピー数は急性期の 101.2 コピー/10⁶ PBMC に対して慢性期では 356.1 コピーと高い傾向が見られたが、ART 開始後に急性期と同じレベルにまで大きく減少した (図 1)。

	プロウイルスコピー数 (copies/ 10 ⁶ PBMC)		
	pre-ART	on-ART VL >20	on-ART VL <20
急性期 (8症例)	162.9±180.8	146.3±120.0	18.3±1.55
慢性期 (9症例)	803.2±1314.7	178.0±204.1	89.3±152.9

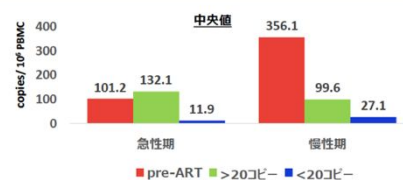


図 1 ART開始前後におけるHIV-1プロウイルス量の変動

(2) single-genome PCR / シークエンス法によるプロウイルスクローンの解析

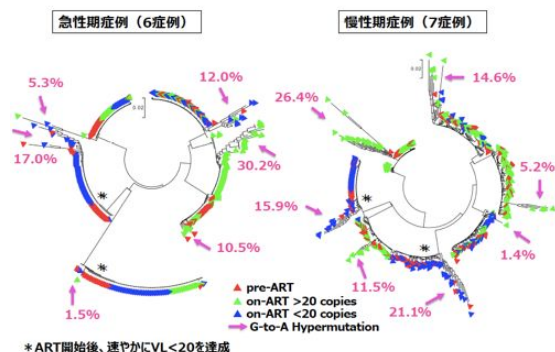


図 2 Single-genome PCR/シークエンス法によるクローンの解析がわかった。

ART を開始した 13 症例より経時的に得られた 49 検体について、single-genome PCR 法により HIV-1 PR-RT 領域を増幅し、886 クローンを得た。それらプロウイルスクローンについて系統樹解析を行ったところ、急性期症例では治療前からプロウイルスの多様性が低く、多くの症例で治療開始後速やかに均一なクローン集団を形成した (図 2 左)。一方、慢性期症例では非常に多様に富んだプロウイルスが検出され、多くの場合は治療前から VL が 20 コピー以下に達して以降も高い多様性を維持しており (図 2 右) プロウイルスの一部に clonal な増殖が認められるようになるまでに 3 ヶ月~1 年以上かかる

(3) G-to-A Hypermutation の導入率

解析した 886 クローンの約 13% において A3G/F によると考えられる G-to-A Hypermutation が検出された (図 2 矢印)。急性期症例と慢性期症例の比較では治療前、治療開始後 VL>20、VL<20 全てにおいて変異導入率に有意差は認められなかったが、両群ともに ART 開始後 VL が<20 コピーに到達するまでの間は ART 開始前に比べて変異導入率が有意に高かった。特に慢性期症例では、20 コピー以下に達して以降も hypermutation 導入クローンが同程度の割合で存在していることが示された (図 3)。これは、VL が抑制されて以降も慢性期では blips などがより頻回に起こっていることを示唆しているのかもしれない。

	クローン数 (n=886)							
	pre-ART		on-ART VL >20		on-ART VL <20		All	
	Total	Hypermut* (%)	Total	Hypermut (%)	Total	Hypermut (%)	Total	Hypermut (%)
急性期 (6症例)	111	9 (8.1)	124	22 (17.7)	141	16 (11.3)	376	47 (12.5)
慢性期 (7症例)	118	6 (5.1)	231	38 (16.5)	161	25 (15.5)	510	69 (13.5)

* Hypermut 2.0%以上p<0.05と判定されたクローン数



図 3 G-to-A Hypermutationが導入されたクローン数と変異導入率

(4) vif 領域に検出された変異

HIV-1 Vif 蛋白は A3G/F に結合して、その抗 HIV-1 活性を中和するウイルス側の対抗因子として知られている (Sheehy AM *et al.*, 2002)。そこで、G-to-A Hypermutation の導入率を解析した 13 症例について vif 領域のシークエンスを調べたところ、6 症例において APOBEC 関連アミノ酸モチーフ 8 カ所のうち 1 カ所以上に何らかの変異が検出され、また 2 症例の vif-C 末端にユニークな変異が認められた (図 4)。Hypermutation 導入率との関連性は認められなかった。

	Hyper mut %	14	17	40	44	64	66	69	72
		DRMR	YRHHY	LxI	YxxL				
急性期	1	30.2
	2	1.54	L.....
	3	10.5	...KV
慢性期	4	1.39
	5	14.6K
	6	21.1

	Hyper mut %	74	79	144	149	161	164	171	175	192
		TGERDW	SLQYLA	PPLP	EDRWN	H				
急性期	1	30.2K
	2	1.54	...K
	3	10.5K	Q
慢性期	4	1.39	T.....
	5	14.6
	6	21.1	T.....	D

図 4 VifのAPOBEC3G/F関連アミノ酸モチーフに検出された変異

<引用文献>

Cohen MS, Chen YQ, McCauley M, Gamble T, Hosseinipour MC, Antiretroviral Therapy for the Prevention of HIV-1 Transmission, N Engl J Med, 2016, 375, 830-9, DOI: 10.1056/NEJMoa1600693

高折晃史、特集:HIV と闘う宿主防御因子 APOBEC3G、日本エイズ学会誌、2012、14、10-16

Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Malim MH, Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. Nature, 2002, 418, 646-650

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kondo Makiko, Sudo Koji, Sano Takako, Kawahata Takuya, Itoda Ichiro, Iwamuro Shinya, Yoshimura Yukihiko, Tachikawa Natsuo, Kojima Yoko, Mori Haruyo, Fujiwara Hiroshi, Hasegawa Naoki, Kato Shingo	4. 巻 13
2. 論文標題 Comparative evaluation of the Geenius HIV 1/2 Confirmatory Assay and the HIV-1 and HIV-2 Western blots in the Japanese population	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0198924
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1371/journal.pone.0198924	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kojima Y, Furubayashi K, Kawahata T, Mori H, Komano J.	4. 巻 57
2. 論文標題 Circulation of distinct Treponema pallidum strains in individuals with heterosexual orientation and men who have sex with men	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Clin Microbiol	6. 最初と最後の頁 e01148-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1128/JCM.01148-18.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Matsuoka S, Kano K, Nagashima M, Sadamasu K, Mori H, Kawahata T, Zaitzu S, Nakamura A, Souza MS, Matano T.	4. 巻 16
2. 論文標題 Estimating HIV-1 incidence in Japan from the proportion of recent infections	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Preventive Medicine Reports	6. 最初と最後の頁 100994
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pmedr.2019.100994	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡崎玲子, 蜂谷敦子, 佐藤かおり, 豊嶋崇徳, 佐々木悟, 小島洋子, 森 治代, 吉村和久, 菊地正 (他32名)
2. 発表標題 国内新規HIV/AIDS診断症例における薬剤耐性HIV-1の動向
3. 学会等名 第32回日本エイズ学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齊藤孝子, 松浦基夫, 川畑拓也, 森 治代, 小島洋子
2. 発表標題 HIV急性感染におけるHIVAg/Abの発光強度とHIV-1 RNA定量の乖離について
3. 学会等名 第32回日本エイズ学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森 治代, 小島洋子, 川畑拓也
2. 発表標題 大阪府におけるHIVの分子疫学解析
3. 学会等名 第31回日本エイズ学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森 治代, 小島洋子, 川畑拓也
2. 発表標題 急速な病期進行を伴う感染初期例群に検出された新型変異HIV-1の解析
3. 学会等名 平成29年度地研近畿支部ウイルス部会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岡崎玲子, 蜂谷敦子, 瀧永博之, 渡邊 大, 長島真美, 貞升健志, 近藤真規子, 南 留美, 吉田 繁, 小島洋子, 森 治代, 内田和江, 椎野禎一郎, 加藤真吾, 岡慎一, 松田昌和, 横幕能行, 岩谷靖雅, 吉村和久
2. 発表標題 国内新規HIV/AIDS診断症例における薬剤耐性HIV-1の動向
3. 学会等名 第31回日本エイズ学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 椎野禎一郎、健山正男、石原美紀、南 留美、蜂谷敦子、横幕能行、吉田繁、近藤真規子、貞升健志、古賀道子、森 治代、杉浦互、吉村和久
2. 発表標題 国内伝播クラスタの検索プログラムの開発1：未知の塩基配列の所属する伝播クラスタの解析力の検証
3. 学会等名 第31回日本エイズ学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森 治代、小島洋子、阪野文哉、川畑拓也、森田 諒、小西啓司、麻岡大裕、白野倫徳、古西 満
2. 発表標題 抗レトロウイルス療法下におけるHIV-1プロウイルスの動態
3. 学会等名 第33回日本エイズ学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 蜂谷敦子、佐藤かおり、豊嶋崇徳、伊藤俊広、林田庸総、岡 慎一、渦永博之、古賀道子、長島真美、貞升健志、近藤真規子、椎野禎一郎、須藤弘二、加藤真吾、堀場昌英、太田康男、茂呂 寛、渡邊珠代、松田昌和、重見 麗、岡崎玲子、岩谷靖雅、横幕能行、渡邊 大、小島洋子、森 治代、菊地正、他15名
2. 発表標題 国内新規HIV/AIDS診断症例における薬剤耐性HIV-1の動向
3. 学会等名 第33回日本エイズ学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川畑拓也、砂山智子、山田香保理、森川哲也、阪野文哉、森 治代
2. 発表標題 ダイナスクリーン・HIV Combo抗原偽陽性事例の検討
3. 学会等名 第33回日本エイズ学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	小島 洋子 (KOJIMA YOKO) (70291218)	地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所・企画部・主任 研究員 (84407)	
研究 分担者	川畑 拓也 (KAWAHATA TAKUYA) (80270768)	地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所・微生物部・主 幹研究員 (84407)	