

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04870

研究課題名(和文) 抗ウイルス療法(ART)下に残存するHIV持続感染細胞の克服を目指した研究

研究課題名(英文) Research toward elimination of HIV persistent infected cells remaining under antiretroviral therapy (ART)

研究代表者

松下 修三 (Matsushita, Shuzo)

熊本大学・エイズ学研究センター・教授

研究者番号：00199788

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：抗ウイルス療法(ART: antiretroviral therapy)下に残存するウイルスは、HIV-1感染症の治癒に向けた治療法開発の標的である。我々は、1996年から長期にわたり治療下にある59症例の末梢血単核球(PBMC)840検体について、qPCRを用いプロウイルスDNA(pDNA)の動態を研究した。pDNAは無治療時にはPBMC 100万個当たり平均284コピーであったが、ART開始によって低下した。一方、長期治療の過程では、症例ごとに異なるレベルとなった。慢性合併症を持つ症例では、大きく増減を繰り返すなど、ART下におけるpDNAの動態には、異なるパターンが推測された。

研究成果の概要(英文)：HIV-1 infected cells persisting under antiretroviral therapy (ART) are targets for therapeutic development for the cure of HIV-1 infection. We investigated the kinetics of proviral DNA (pDNA) using qPCR for 840 specimens of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of 59 cases under long-term treatment from 1996. When untreated, pDNA was 284 copies on average per million PBMCs, but it decreased with ART initiation. On the other hand, in the course of long-term treatment, pDNA plateaued at a certain level that varies from case to case. In cases with chronic complications, it was inferred that there are different patterns in the kinetics of pDNA under ART, such as repeatedly increasing and decreasing greatly.

研究分野：血液学

キーワード：感染症治療学 感染症防御学 ウイルス 内科

1. 研究開始当初の背景

本研究の最終的な目的は、HIV-1 感染症の「治癒に向けた治療法開発」の最も困難な課題である「残存ウイルス」の排除である。抗ウイルス療法 (ART: antiretroviral therapy) の進歩により、HIV-1 感染症の予後は著名に改善した。しかし、現在の治療法はウイルスの増殖を阻害するが、排除できないため、治療を中断すると、HIV-1 は直ちにリバウンドし免疫不全を進行させる。このため、ART は一生継続しなければならない。一方、ART による長期治療の過程では、薬剤耐性ウイルスの出現に加え、様々な慢性合併症が起こる。その病態には、残存するウイルスと慢性炎症の関与が考えられ、「残存ウイルス」の排除をめざす研究は、「治癒に向けた研究」ばかりでなく今日の ART の長期間継続という観点からも、本領域で最も重要な研究である (Deeks S. et al., Nat. Rev. Immunol.12, p607, 2012)。

ART で長期にわたりウイルス増殖が抑制されているにもかかわらず残存するウイルスに関しては、*in vitro* での研究が困難なため、研究が進んでこなかった。最近、この領域のブレークスルーとして、米国の二つのグループの研究が注目された。これらは、特定の遺伝子座に HIV-1 が組み込まれた細胞を検出し、HIV がウイルスとしてではなく、感染細胞として増殖し、長期にわたる ART 治療下にも残存するという報告である (Maldarelli et al., Science 345; 179, 2014, Wagner et al., Science;10.1126/science 1256304, 2014)。これはまさに、我々が 2007 年に報告した内容に一致している。すなわち、我々は、長期間の有効な ART 治療が行われた症例に残存する感染細胞では BACH2 遺伝子の特定部位に HIV が組み込まれた感染細胞が長期間残存し、その比率が増えると報告した (Ikeda et al., J. Infect. Dis.195; 726, 2007)。我々の研究は、先駆的研究として、両論文ばかりでなく、Science 誌のトピックスにも引用された (Margolis and Bushman, Science 345; 143, 2014)。2014 年の CROI での発表の前に、第一著者の Maldarelli から私に連絡があり、ワシントンでお会いし研究内容を聞いた。大変驚いたことに、我々の症例で見られた BACH2 遺伝子の HIV の組み込み部位とほぼおなじ組み込み部位を持ち、長期にわたり残存する感染細胞を持つ症例があるとのことだった。我々が 2007 年にインパクトファクターの高い雑誌に投稿した際は、HIV の組み込みはランダムであるという観察と、プロウイルス DNA

(pDNA) のほとんどは欠損ウイルスであるとの判断から、研究のインパクトを低く評価された。これらの批判は、*in vitro* の感染実験や *de novo* の感染を繰り返している無治療の症例の研究を根拠にしており、当時のレビューアーにとっても未知の領域であったと考えられる。

一方、最近、次世代シーケンサー (next generation sequencer: NGS) による検体の大量処理、デジタル PCR による pDNA の高感度測定法などの技術的革新があり、残存ウイルスに関する次の段階の研究が可能になってきた。共同研究者の佐藤博士は、HITLV-1 の転写制御や組み込み部位に関する研究を英国で行い、熊本大学エイズ学研究センターに赴任した。赴任直後より本研究内容に沿った HIV の臨床検体での組み込み部位の同定に関する共同研究を開始し、NGS を用いた組み込み部位同定の基礎データが蓄積してきている。一方、我々は ART が導入された直後より治療を開始し、これまで長期間 (最長 17 年間) ウイルスが抑制されている感染例を多数フォローアップしている。2007 の論文で、これらの症例に残存するプロウイルスを定量し、BACH2 という宿主の遺伝子にウイルスが組み込まれた細胞の選択的増殖が見られる症例を報告したが、この時の症例は今でも治療を継続中であり、佐藤博士とともに臨床研究に関する倫理申請を行い、これらの症例を含んだ長期治療の症例から検体を集めている。

2. 研究の目的

本研究の最終的な目的は、HIV-1 感染症の「治癒に向けた治療法開発」の最も重要な標的である「残存ウイルス」の排除である。抗ウイルス療法 (ART: antiretroviral therapy) の進歩により、HIV-1 感染症の予後は著名に改善したが、現在の治療法ではウイルスを排除できず、治療は一生継続されなければならない。ART 下に残存するウイルスに関しては、proviral DNA (pDNA) の個々の症例における動態と HIV-1 の組み込み部位に関連した持続感染の病態研究が重要である。これらの研究により、pDNA のレベルにかかわる宿主因子の同定が可能になり、さらに *in vivo* におけるウイルス潜伏のメカニズムや ART 下における pDNA の HIV 感染病態への関与の解明が可能になる。これらの成果の蓄積の上に、「残存ウイルス」の排除に向けた治療法が開発できる。

3. 研究の方法

本研究の第一の目的は、有効な ART 下の proviral DNA (pDNA) の長期動態を調べる

ことである。長期にわたり ART でウイルス増殖が抑えられている症例の pDNA を従来の real time PCR 法と新しいデジタル PCR 法にて定量し、残存ウイルス (pDNA) 量の分布を検討する。これらの症例においては、次世代シーケンシング (NGS) を用いた HIV 組み込み部位を解析する。有効な ART 下にあるにもかかわらず pDNA レベルが高い症例に関しては、endpoint dilution cultures を行い、残存ウイルスの増殖能、ウイルス RNA の転写制御などを、組み込み部位の遺伝子と関連づけて検討し、pDNA が HIV 感染病態に及ぼす影響を明らかにする。これらの知見を蓄積し、残存ウイルス排除に向けた治療戦略を立てる。

4. 研究成果

長期間 ART によってウイルスが抑制されている症例をリクルートし、説明と同意の後に採血し、末梢血単核球 (PBMC) を得た。本臨床研究に関しては、熊本大学生命科学研究部ヒトゲノム遺伝子解析倫理審査委員会承認済みの説明と同意書を用いて同意をとった (ゲノム第 248 号)。

我々は、1996 年頃から、9~21 年の長期にわたり ART を行っている 59 症例の末梢血単核球 (PBMC) から DNA を抽出し、SYBER Green qPCR を用い gag 部分を増幅し、これを Alb の DNA で標準化して比較した。およそ 1~2 年に 1 回のサンプリングした 840 検体 (一症例あたり平均 1.4 ポイント) について、10 年以上に及ぶ長期間の pDNA 動態を解析した。pDNA は無治療時には平均 2.84×10^6 コピー/ 10^6 PBMC であったが、ART 開始によって低下した。一方、長期治療の過程で、pDNA は症例ごとに異なるレベルとなった。

慢性合併症 (comorbidities) を持つ血友病症例では、pDNA レベルが大きく増減を繰り返す症例が見られるなど、ART 下における pDNA の動態には、症例により異なるパターンがあることが推測された。ART 治療下における pDNA 量が 200 コピー/ 10^6 PBMC を越える大きな変動を示した症例 (unstable cases) は、非血友病症例では 2.7% であったのに対し、血友病症例では 5.9% と有意に多く見られた。一方、pDNA 量の変動がほとんど見られない症例 (stable cases) は、血友病症例では 14% に過ぎないのに対し、非血友病症例では 3.5% 見られた。この観察の理由は明らかではないが、ART 開始までの経過は、血友病症例のほうが長いと考えられ、pDNA の変動が、HIV に感染後の無治療期間の長さや関連する可能性が考えられた。一方、HCV の共感染に関しては大きな影響は見られなかった (J Acquir Immune Defic Syndr 2018, in press)。

長期にわたり ART 治療を受けている HIV-1 感染症例 12 症例に関して、経時的検体を用いて、ウイルスの組み込み部位を決定し、感染細胞クローンの動態解析を進めている。組み込み部位に関連した持続感染細胞のクローン性増殖は、多くの検体で認められたが、

長期治療の影響を調べるために、治療開始前 (または開始後早期) と長期治療後の組み込み部位を比較する研究を行っている。症例 1 ではクローン性増殖が 43.7% から 40.6% と変わらず、また最もドミナントなクローンの割合も 10.4% から 12% とほぼ不変であった。しかし、症例 2 では、クローン性増殖が、22.6% から 72.6% まで増加し、ドミナントクローンも 16.5% から 24.8% まで増加していた。現在まで、1610 カ所の組み込み部位を特定し、感染細胞のクローン性増殖を検出してきたが、pDNA の絶対量が少ない場合の感度が十分でないなどの課題も明らかとなった。これまで確立できた方法でさらに検体数を増やすとともに、感度を改良した方法に関して検討を加えている。

HIV-1 感染症の治癒に向けた治療法開発の標的である HIV 持続感染細胞の動態を解析した。抗ウイルス療法の進歩により、HIV-1 感染症の予後は著明に改善したが、現在の治療法ではウイルスを排除できず、治療は一生継続する必要がある。ART 下に残存するウイルスに関しては pDNA の動態と HIV-1 の組み込み部位に関連した持続感染細胞増殖の病態研究が重要である。これらの研究は、残存ウイルスの排除に向けた治療法の開発に結びつく。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Stanoeva, K. R., König, A., Fukuda, A., Kawanami, Y., Kuwata, T., Satou Y., Matsushita, S. Total HIV-1 DNA dynamics and influencing factors in long-term ART-treated Japanese adults: retrospective longitudinal analysis. JAIDS, 査読有, in press, 2018.
2. Komatsu, A., Ikeda, A., Kikuchi, A., Minami, C., Tan, M., Matsushita, S. Osteoporosis-related fractures in HIV-infected patients receiving long-term tenofovir disoproxil fumarate: an observational cohort study. Drug Safety, 査読有, in press, 2018.
DOI : 10.1007/s40264-018-0665-z.
3. Miyazaki N, Sugiura W, Gatanaga H, Watanabe D, Yamamoto Y, Yokomaku Y, Yoshimura K, Matsushita S; Japanese HIV-MDR Study Group. High antiretroviral coverage and viral suppression prevalence in Japan: an excellent profile for downstream HIV care spectrum. Jpn J Infect Dis., 査読有, 70(2), 2017, 158-160
DOI: 10.7883/yoken.JJID.

4. Satou Y, Katsuya H, Fukuda A, Misawa N, Ito J, Uchiyama Y, Miyazato P, Islam S, Fassati A, Melamed A, Bangham CRM, Koyanagi Y, Sato K. Dynamics and mechanisms of clonal expansion of HIV-1-infected cells in a humanized mouse model. *Sci Rep.*, 査読有, 7(1), 2017, 6913, .
DOI : 10.1038/s41598-017-07307-4
5. Ishida Y., Yoneda M., Otsuki H., Watanabe Y., Kato F., Matsuura K., Kikukawa M., Matsushita S., Hishiki T., Igarashi T., Miura T. Generation of a neutralization-resistant CCR5 tropic SHIV-MK38 molecular clone, a derivative of SHIV-89.6. *J Gen Virol.*, 査読有, 97(5), 2016, 1249-60
DOI: 10.1099/jgv.0.000421.
6. Maruta Y., Kuwata T., Tanaka K., Alam M., Ramirez-Valdez K-P., Egami Y., Yoshiaki Suwa Y., Morioka H., Matsushita S. Cross-neutralization activity of single-chain variable fragment (scFv) derived from anti-V3 monoclonal antibodies mediated by post-attachment binding. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 査読有, 69(5) 2016, 395-404.
DOI: 10.7883/yoken.JJID.
7. Satou Y, Miyazato P, Ishihara K, Yaguchi H, Melamed A, Miura M, Fukuda A, Nosaka K, Watanabe T, Rowan A, Nakao M, and Bangham CRM*. The retrovirus HTLV-1 inserts an ectopic CTCF-binding site into the human genome. *PNAS*, 査読有, 113, 2016, 3054-59
DOI: 1073/pnas.1423199113
8. Boonchawalit, S., Harada, S, Shirai, N., Gatanaga, H., Oka, S., Matsushita, S., and Yoshimura, K. Impact of maraviroc-resistant mutation M434I in the C4 region of HIV-1 gp120 on sensitivity to antibody-mediated neutralization. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 査読有, 69, 2015, 236-243
DOI:10.7883/yoken.JJID.
3. Mamun M., Maruta Y., Tanaka K., Muntasir A., Thida, W., Kuwata T., Matsushita S. Evaluation of Binding affinity and kinetics, Neutralization Potency and Coverage of anti-V3 scFv' s against HIV-1 Subtype-B viruses in vitro. 18th Kumamoto AIDS seminar. 2017.10.30-11.1. Kumamoto.
4. Kaku Y., Tanaka K., Hassan Z., Takahama S., Kuwata T., Matsushita S. Development of anti-idiotypic antibodies for neutralizing antibodies against V3-loop of HIV-1. 18th Kumamoto AIDS seminar. 2017.10.30-11.1. Kumamoto.
5. Thida Win, 桑田岳夫, Muntasir Alam, 田中和樹, Alam Mohammad Mamun, 清水美紀子, 河波陽子, 松下修三. Isolation and characterization of HIV-1 envelope glycoprotein in Japanese patients with recent diagnosis. 第31回日本エイズ学会学術集会・総会. 2017.11.24-26, 東京.
6. 郭 悠, 桑田岳夫, 田中和樹, Alam Mohammad Mamun, 高濱正吉, Hassan MD Zahid, 松下修三. Single cell sortingによる抗 V3 中和 単クローン抗体に対する抗イデオタイプ. 第31回日本エイズ学会学術集会・総会. 2017.11.24-26, 東京.
7. Alam Mohammad, 田中和樹, Muntasir Alam, Win Thida, 桑田岳夫, 松下修三. Evaluation of Binding affinity and Neutralization Potency and Coverage of anti-V3 scFv' sagainst HIV-1 Subtype-B viruses. 第31回日本エイズ学会学術集会・総会. 2017.11.24-26, 東京.
8. Increased total HIV DNA levels in long-term treated patients with hemophilia. 口頭 Stanoeva K, König A, Fukuda A, Kawanami Y, Kuwata T, Satou Y., Matsushita S. 第30回日本エイズ学会学術集会・総会. 2016.11.24-26, 鹿児島.
9. Mamun M., Maruta Y., Tanaka K., Muntasir A., Thida W., Kuwata T., Matsushita S. Construction, purification and analysis of neutralization potency of anti-V3 scFv' s against HIV-1 strains in vitro. 2nd Kumamoto IRCMS International Symposium. 17th Kumamoto AIDS seminar. 2016.10.31-11.2. Kumamoto.
10. Thida W., Kuwata T., Muntasir A., Tanaka K., Mamun M., Shimizu M., Kawanami Y., Matsushita S. Isolation and characterization of HIV-1 envelope glycoprotein in Japanese patients with recent diagnosis. 2nd Kumamoto IRCMS International Symposium. 17th Kumamoto AIDS seminar. 2016.10.31-11.2.

[学会発表] (計 30 件)

1. Matsushita S. Broadly neutralizing antibody for treatment and prevention of HIV infection. ISAAR & ICIC 2017 September 14-16, 2017. Busan, Korea.
2. Thida W., Kuwata T., Muntasir A., Tanaka K., Mamun M., Shimizu, M., Kawanami, Y., Matsushita S. Neutralization sensitivities of clade B and CRF01_AE viruses of HIV-1 isolated from patients with recent diagnosis in Japan. 18th Kumamoto AIDS seminar. 2017.10.30-11.1. Kumamoto.

- Kumamoto.
11. Stanoeva KR., König A., Fukuda A., Kawanami Y., Kuwata T., Satou Y., Matsushita S. Total HIV DNA levels dynamics upon ART initiation. 2nd Kumamoto IRCMS International Symposium. 17th Kumamoto AIDS seminar. 2016. 10. 31-11. 2. Kumamoto. 国内
 12. 佐藤賢文、勝屋弘雄、福田麻美、三沢尚子、伊東潤平、内山良一、宮里パオラ、Mohammad S Islam, Ariberto Fassati、Charles RM Bangham、小柳義夫、佐藤圭. 次世代シーケンスによるヒト化マウス HIV-1 感染モデルにおけるウイルス感染細胞クローン動態解析. 第 27 回抗ウイルス療法学会学術集会. 5. 18-20, 2017. 熊本.
 13. Benjy Tan Jek Yang, Miyazato P., Saiful I., Iwase S., Kudo E., Okada S., Satou Y. Improving the Resolution of HIV-1 Transcriptome Analysis Through Targeted Enrichment. 第 20 回日本レトロウイルス研究会 夏期セミナー 6. 29-30, 2017.
 14. Saiful I., Seki Y., Miyazato P., Benjy Tan Jek Yang, Akari H., Satou Y. Absolute Quantitation of Integrated HIV-1 DNA In Vivo by using Droplet Digital PCR. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会. 10. 24. -26, 2017 大阪
 15. Benjy Tan Jek Yang, Miyazato P., Saiful I., Iwase S., Kudo E., Okada S., Satou Y. Improving the Resolution of HIV-1 Provirus RNA Sequencing through Targeted Enrichment. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会. 2017. 10. 24. -26. 大阪.
 16. Saiful I., Miyazato P., Seki H., Benjy Tan Jek Yan, Iwase S., Akari H., Satou Y. Quantitative and Qualitative Evaluation of HIV-1 Proviral DNA by Droplet Digital PCR and High-throughput Sequencing. 第 18 回熊本エイズ学セミナー2017. 10. 30-11. 1. 熊本.
 17. Benjy Tan Jek Yang, Miyazato P., Saiful I., Iwase S., Kudo E., Okada S., Satou Y. High Resolution HIV-1 Provirus Transcriptome Analysis with DNA Probe Enrichment. 第 18 回熊本エイズ学セミナー2017. 10. 30-11. 1. 熊本.
 18. Saiful I., Miyazato P., Seki Y., Benjy Tan Jek Yang, Iwase S., Akari H., Satou Y. Quantitative and qualitative evaluation of HIV-1 proviral DNA by digital droplet PCR and high-throughput sequencing 第 31 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2017. 11. 24-26, 東京.
 19. Benjy Tan Jek Yang, Miyazato P., Saiful I., Saori I., Eriko K., Okada S., Satou Y. High Resolution HIV-1 Provirus Transcriptome Analysis with DNA Probe Enrichment. 第 31 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2017. 11. 24-26, 東京.
 20. Saiful I., Miyazato P., Matsuda K., Benjy Tan Jek Yan, Iwase S., Seki Y., Yoshimura K., Akari H., Maeda K., Satou Y. Evaluation of HIV-1 Proviral DNA by Newly Established Approaches. JSPS_NUS Symposium. 2018. 01. 18-20, Kumamoto.
 21. 宮里パオラ, 佐藤賢文 他. Application of targeted enrichment to the next-generation sequencing of retroviruses integrated into the host human genome. 第 64 回 日本ウイルス学会学術集会. 2016. 10. 23. -25. 札幌.
 22. 佐藤賢文 他. Application of next generation sequencing to elucidate regulatory mechanism of retroviruses integrated into the host human genome. 第 17 回 熊本エイズセミナー. 2016. 10. 31-11. 2. 熊本.
 23. 宮里パオラ, 佐藤賢文 他. Application of targeted enrichment to the next-generation sequencing of retroviruses integrated into the host human genome. 第 17 回 2016. 10. 31-11. 2. 熊本.
 24. Islam Mohammad Saiful, 佐藤賢文 他. Quantification of HIV-1 proviral DNA in various tissues of a macaque model of HIV-1 infection. 第 17 回 熊本エイズセミナー. 2016. 10. 31-11. 2. 熊本.
 25. 佐藤賢文 他. 次世代シーケンスによる HIV-1 プロウイルス解析. 第 30 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2016. 11. 24-26, 鹿児島.
 26. 佐藤賢文 他. ヒトゲノムに組み込まれた外来性レトロウイルスの転写制御メカニズム. 大阪大学蛋白質研究所セミナー. 2016. 12. 28, 大阪.
 27. Satou Y., Fukuda A., Stanoeva K., Miyazato P., Katsuya H, Tokunaga M., Anat M., Yoshikazu U., Bangham C., Matsushita S. HIV-1 integration site analysis in PBMCs of HIV-1-infected individuals by using next generation sequencing. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会 2015. 11. 22-24. 福岡.
 28. Satou Y., Fukuda A., Stanoeva K., Katsuya H, Miyazato P., Tokunaga M., Matsuo M., Yoshikazu U., Bangham C., Matsushita S. Clonality of HIV-1-infected cells in PBMCs of HIV-1-infected individuals. 16th Kumamoto AIDS Seminar. October 7-9, 2015, Kumamoto

29. 佐藤賢文. HIV-1 プロウイルス研究. 日本エイズ学会 シンポジウム講演
2015. 11. 20-12. 1. 東京

〔図書〕（計 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松下 修三 (MATSUSHITA, Shuzo)
熊本大学・エイズ学研究センター・教授
研究者番号：00199788

(2) 研究分担者

佐藤 賢文 (SATOU, Yorifumi)
熊本大学・エイズ学研究センター・教授
研究者番号：70402807

(3) 連携研究者

桑田 岳夫 (KUWATA, Takeo)
熊本大学・エイズ学研究センター・特任講師
研究者番号：70346063

(4) 研究協力者

()