

平成21年4月30日現在

研究種目：若手研究 (B)
研究期間：2007～2008
課題番号：19790705
研究課題名 (和文) 治療中断成功例におけるHIV-1プロウイルス転写活性の解析
研究課題名 (英文) Analysis on proviral activity in HIV-1-infected cases with therapy interruptions
研究代表者
伊部 史朗 (Ibe Shiro)
独立行政法人国立病院機構名古屋医療センター・臨床研究センター感染免疫研究部・研究員
研究者番号：10399595

研究成果の概要：3症例は、多剤併用療法(HAART)中断後に血中HIV-1 RNA量(viral load)の再上昇が観察された症例であり、末梢血白血球中のHIV-1 DNA、及び、HIV-1 mRNAは、共に、viral loadとはほぼ完全に同調した推移を示し、viral loadの再上昇を予見する因子として広く利用できる可能性は低いと判断された。1症例はHAART中断後、長期にわたりviral loadを低レベルで維持しており、HAART施行期間や中断期間において、末梢血白血球中にHIV-1 DNA、及び、HIV-1 mRNAが検出されることはなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,500,000	0	1,500,000
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	450,000	3,450,000

研究分野：分子ウイルス学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、膠原病・アレルギー・感染症内科学

キーワード：HIV-1、プロウイルス

1. 研究開始当初の背景

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)は、免疫応答の要となるCD4陽性Tリンパ球を破壊し、後天性免疫不全症候群(AIDS)を引き起こす病原ウイルスである。HIV-1感染症患者に対する治療法は、抗HIV-1薬の多剤併用療法 (highly active antiretroviral therapy, HAART)の進歩により大きな前進を遂げ、先進国においてHIV-1感染症はもはや死の病ではなくなったと言われるまでになった。しかし、強力なHIV-1複製抑制効果を発揮するHAARTをもってして

もHIV-1感染症を治癒するまでには至っていない。その理由は、HAARTはウイルス複製を効果的に阻害するが、プロウイルスを保有した感染細胞の除去には機能しないためである。末梢CD4陽性Tリンパ球中のプロウイルス量の経時的測定研究によると、感染細胞の駆逐には60年の歳月を要し、感染患者は一生、抗HIV-1薬を服用し続けなければならないという結果が報告され、それ以後「HAARTは一生継続」が共通認識となっている。実際、血中HIV-1 RNA量(viral load)を検出限度(50コピー/ml)以下に維持しているHAART著効例

においても、HAART を中断するとウイルス複製が活発に行われ、viral load が速やかに再上昇することが一般的な事象として知られている。

2. 研究の目的

興味深いことに、当院では、副作用等の出現により HAART を中断したものの、1,000 コピー/ml 未満の低レベルの viral load が数回観察されたのみで、驚くことに4年9ヶ月が経過した時点でもウイルス増殖の制御に成功している症例が存在する。CD4 陽性細胞数は HAART 中断直後に一時的に減少したが、その後は安定に推移している。この症例では、HAART 施行中に何らかの内在性のウイルス増殖制御機構が惹起された可能性が考えられ、非常に興味深い。本研究は、HAART 中断後もウイルス増殖制御に成功した症例を対象に、末梢白血球中の残存プロウイルス量とその転写産物である全長 HIV-1 mRNA 量を測定することにより経時的な残存プロウイルスの活動度を解析し、HAART 中断前後の残存プロウイルスの活動度が HAART 中断後のウイルス増殖制御の成否を予見する候補因子である可能性を評価することを目的とした。具体的には、viral load を検出限度以下に維持していた HAART 著効例のうち、HAART 中断後にウイルス増殖の制御が観察された症例 (HAART 中断成功例) と、対照として HAART 中断後に活発なウイルス複製が観察された症例 (HAART 中断不成功例) を研究対象とする。経時的に末梢白血球中のプロウイルス量、及び、全長 HIV-1 mRNA 量を測定し、診療経過における残存プロウイルス活動度の推移を把握する。そして、残存プロウイルスの活動度が HAART 中断後のウイルス増殖制御の成否を予見する候補因子として評価できるかを判定する。

3. 研究の方法

(1) 対象：同意が得られた HAART 中断後もウイルス複製が継続して抑制されている1症例 (症例#1) と、HAART 著効例であったものの、HAART 中断後に viral load が急増した3症例 (症例#2~4) を対象とした。

(2) プロウイルス量の測定：我々のグループが確立したプロウイルス量の測定系は、定量 PCR を導入することにより、高感度測定を可能とした。測定手順は、まず、末梢白血球から精製した DNA 溶液を一部用いてヒト β ミクログロブリン (β 2M) 遺伝子コピー数を測定し、定量前増幅に添加する β 2M 遺伝子コピー数を把握した。続いて、real-time PCR を用いた定量の前に、20 サイクルの PCR を行い、 β 2M と HIV-1 gag の両遺伝子を同時増幅した (定量前増幅)。この際、 β 2M と HIV-1 gag の両遺伝子が指数増幅的に、かつ、同じ増幅率

で増加することを確認した。定量前増幅反応後、 β 2M と HIV-1 gag 遺伝子コピー数を real-time PCR で測定した。増幅後の β 2M 遺伝子コピー数を増幅前の β 2M 遺伝子コピー数で割ることで、定量前増幅反応の増幅率を求め、最後に増幅後の HIV-1 gag 遺伝子コピー数を増幅率で割ることで、増幅前の HIV-1 gag 遺伝子コピー数を算出した。また、 β 2M 遺伝子はヒトのゲノム上に偽遺伝子が報告されておらず、2コピーの β 2M 遺伝子は1細胞に換算できるので、添加した DNA 量が何細胞分に相当するのかを算出した。残存プロウイルス量は 10^6 細胞あたりのコピー数で表記した。

(3) 全長 HIV-1 mRNA 量の測定：我々のグループが確立したプロウイルス定量系は、HIV-1 gag 遺伝子を定量的な標的遺伝子としており、細胞内 HIV-1 mRNA の定量に応用すると、唯一、スプライシングされていない全長 HIV-1 mRNA だけを選択的に測定することができる。即ち、プロウイルスからのウイルス産生過程後期の HIV-1 mRNA だけを選択的に定量することが可能である。測定手順は、まず、白血球から精製したトータル RNA 溶液中の mRNA を oligo (dT)₃₀ を用いて逆転写し、cDNA に変換した。cDNA へ変換した後は、 β 2M cDNA と HIV-1 gag cDNA を対象にして、残存プロウイルス量の測定と同様の手順で高感度リアルタイム PCR を行い、最終的に増幅前の全長 HIV-1 mRNA 由来の cDNA コピー数を算出した。細胞内全長 HIV-1 mRNA 量は 10^6 細胞あたりのコピー数で表記した。

4. 研究成果

(1) 症例#1：本症例は、HAART 中断後も低レベルの viral load を維持している HAART 中断成功例である。初診時の viral load は 14000 コピー/ml であり、CD4 陽性細胞数は 726 細胞/ μ l であった。診療開始から 1.2 ヶ月目にジドズジン (AZT)、サルシタピビン (ddC)、インジナビル (IDV) を用いた HAART が施行され、viral load は順調に減少した。その後、HAART のレジメンを変更しつつ、13.6 か月目から検出限度以下の viral load を維持していた。81.4 ヶ月目より副作用等の出現により HAART を中断した。注目すべきことに、中断後も viral load は、1000 コピー/ml 以下の低いレベルで維持されており、中断から 56.8 ヶ月 (4年9ヶ月) が経過している。中断後、CD4 陽性細胞数はなだらかに減少しているが、中断から 56.8 ヶ月目においても 660 細胞/ μ l という比較的高い数値を維持している。末梢白血球中の HIV-1 DNA、及び、HIV-1 mRNA に関しては、HAART 開始直後から両者は共に検出されず、HAART 中断後も引き続き両者共に検出されない状態が維持されていた (図 1)。

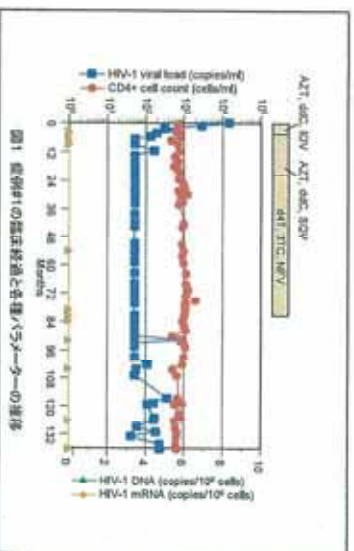


図1 症例#1の血中ウイルス量と各種ウイルスマーカーの推移

(2) 症例#2: 本症例は、HAART 中断後、viral load が速やかに再上昇した症例である。初診時の viral load は 11000 コピー/ml であり、CD4 陽性細胞数は 271 細胞/ μ l であった。診療開始から 8.9 ヶ月目に AZT, ラミブジン (3TC), コピナビル/リトナビル (LPV/r) を用いた HAART が施行され、viral load は順調に減少し、11.9 ヶ月目から検出限度以下を完全に維持していた。48.1 ヶ月目に副作用等の出現により HAART を中断したが、中断後 2 週間後の時点で、viral load は 67000 コピー/ml へ急上昇した (図 2)。中断後 1.9 ヶ月目に、レジメンを変更して HAART を再開し、viral load は再び検出限度以下まで減少した (図に示さず)。HAART 開始前の時点で、末梢白血球中の HIV-1 DNA、及び、HIV-1 mRNA はそれぞれ、 $62 \sim 88$ 、及び、 $5 \sim 11$ コピー/ 10^6 細胞ずつ検出されたが、HAART 開始後、両者は共に減少し、HAART を中断するまで低いレベルを維持していた。HAART 中断後は、viral load の推移と同様に、両者とも再上昇した (図 2)。

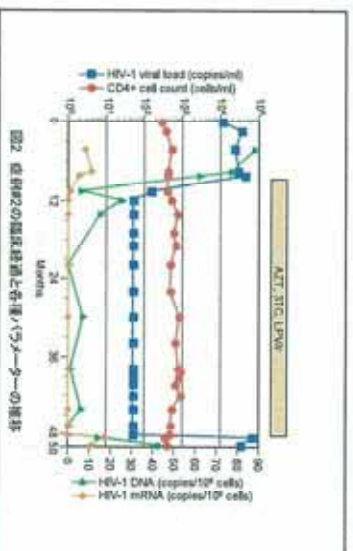


図2 症例#2の血中ウイルス量と各種ウイルスマーカーの推移

(3) 症例#3: 本症例も HAART 中断後、viral load が速やかに再上昇した症例である。初診時の viral load は 40000 コピー/ml であり、CD4 陽性細胞数は 8 細胞/ μ l であった。初回診療後よりサニルナジン (d4T), 3TC, ネルブイナビル (NFV) を用いた HAART が施行され、viral load は速やかに減少し、3.0 ヶ月目からはほぼ完全に検出限度以下を維持していた。39.2 ヶ月目に副作用等の出現により HAART を中断したが、中断後 3 週間目で、viral load

は 2200 コピー/ml へ上昇し始め、中断後 1.6 ヶ月後には、440000 コピー/ml と初診時を凌ぐレベルまで急上昇した (図 3)。中断後 2.0 ヶ月目に、レジメンを変更して HAART を再開し、再度 viral load は検出限度以下まで減少した (図に示さず)。初診時の時点では、末梢白血球中の HIV-1 mRNA は 10^4 細胞あたり 18 コピー検出され、HAART 開始後 4.1 ヶ月まで検出されたが、5.1 ヶ月後より検出されない状態が維持されていた。HAART 中断後、viral load の推移と同様に末梢白血球中の HIV-1 mRNA が再上昇した。この症例においては、末梢白血球中の HIV-1 DNA が期間を通して全く検出されなかったことが特徴として挙げられる (図 3)。

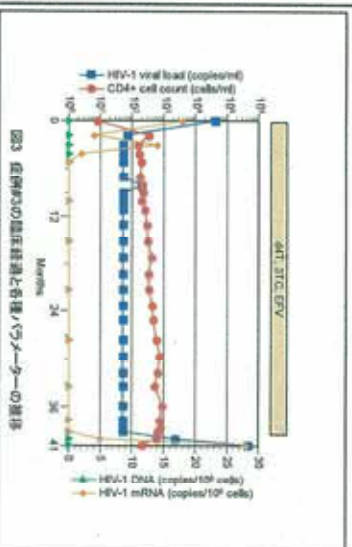


図3 症例#3の血中ウイルス量と各種ウイルスマーカーの推移

(4) 症例#4: 本症例は HAART 中断後も約 4 ヶ月間、viral load を検出限度以下に維持した後、viral load が再上昇した症例である。初診時の viral load は 130000 コピー/ml であり、CD4 陽性細胞数は 395 細胞/ μ l であった。1 週間後より AZT, 3TC, IDV/r を用いた HAART が施行され、viral load は順調に減少し、4.2 ヶ月目から完全に検出限度以下を維持していた。58.3 ヶ月目に副作用等の出現により HAART を中断したが、中断後 3.9 ヶ月間、viral load は検出限度以下のまま維持されていた。しかし、中断後 6.2 ヶ月目に、viral load が 13000 コピー/ml へ再上昇していた (図 4)。中断後 41.2 ヶ月目に、レジメンを変更して HAART を再開し、再度 viral load は検出限度以下まで減少した (図に示さず)。HAART 開始前の時点では、末梢白血球中の HIV-1 DNA、及び、HIV-1 mRNA が、それぞれ、 10^6 細胞あたり 23、及び、3 コピー検出されたが、HAART 開始後、HIV-1 mRNA は全く検出されず、HIV-1 DNA も低レベルのまま推移した。中断後に viral load が検出限度以下のまま維持されていた期間でも、両者は低いレベルを推移していたが、viral load が再上昇したのちは、再び検出されるようになった (図 4)。

学会等名：第21回 日本エイズ学会学術集会
発表年月日：2007年11月28日
発表場所：広島

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊部 史朗 (Ibe Shiro)
独立行政法人国立病院機構名古屋医療セ
ンター・臨床研究センター感染免疫研究
部・研究員
研究者番号：10399595

(2) 研究協力者

近藤 恭子 (Kondo Kyoko)
独立行政法人国立病院機構名古屋医療セ
ンター・臨床研究センター感染免疫研究
部・研究員
研究者番号：なし
金田 次弘 (Kaneda Tsuguhiro)
独立行政法人国立病院機構名古屋医療セ
ンター・臨床研究センター感染免疫研究
部・客員研究員
研究者番号：60183274

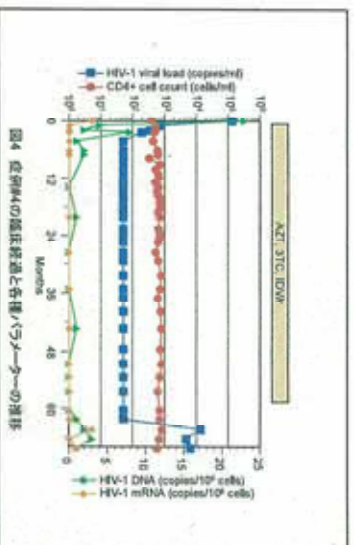


図4 症例#4のHIV-1 DNA濃度と各種/ウイルスの推移

(5) 総合討論：症例#2～4は、HAART中断後に viral load の再上昇が観察された症例であった。症例3の HIV-1 DNA の推移だけは例外になるが、これら3症例では、末梢白血球中の HIV-1 DNA、及び、HIV-1 mRNA は、共に、viral load とほぼ完全に同調した推移を示した。即ち、症例数は少ないが、今回の結果からは、末梢白血球中の HIV-1 DNA、及び、HIV-1 mRNA レベルは、HAART 中断後の viral load の再上昇を予見する因子として広く利用できる可能性は低いと判断された。一方、症例#1は HAART 中断後、約4年9ヶ月にわたって viral load を 1000 コピー/ml 以下の低いレベルで維持している症例であり、HAART 施行期間においても、又、HAART 中断期間においても、末梢白血球中の HIV-1 DNA、及び、HIV-1 mRNA は検出されなかった。この結果は、HAART 中断後も体内のウイルス産生レベルが低い状態のままに維持されていることを示唆している。HAART 中断期間に観察された 1000 コピー/ml 以下の低い viral load は、末梢血では採取できない組織中の感染細胞より産生されたウイルス粒子を反映していると推察される。HAART 施行前に viral load が 14000 コピー/ml あったことを考慮すると、HAART によって人為的にウイルス増殖を抑制している期間に、何らかの内在性のウイルス増殖抑制機構が惹起し、HAART 中断後も HIV-1 の複製を制御することに成功したことを示唆しており、たいへん興味深い。今後、このような症例において、ウイルス増殖抑制機構を解明することにより、HIV-1 感染症の治療に有益な知見が供与されると考えられる。

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)

【学会発表】(計1件)

①発表者名：伊部史朗、岡田清美、近藤恭子、廣部雅美、魚住利樹、加堂真由、和山行正、金田次弘

発表標題：プロウイルス活動指数測定法の一般検査化のための基礎検討