

令和 5 年 10 月 23 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08932

研究課題名(和文) HIV-1感染同一個体内でのR5・X4ウイルスの共存に関わる要因の多面的解析

研究課題名(英文) Analysis of multiple factors involved in the co-existence of R5 and X4 HIV-1s in the infected individuals

研究代表者

前田 洋助 (Maeda, Yosuke)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・准教授

研究者番号：30284764

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：CD4陽性Tリンパ球へのHIV-1の感染によって発症するAIDSの病態に関与するウイルス学的特徴として、CCR5を利用して細胞に侵入するR5ウイルスから、CXCR4を利用するX4へのスイッチがおこることが知られている。本研究では、これらの2種類のウイルスが同一感染者に混合感染している症例においては、その感染者の生体の環境変化に応じて選択されてくること、コレセプタースイッチの機序であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HIV-1の中でR5ウイルスが基本的なウイルスに対して、X4ウイルスは感染後期のAIDSに観察されることが知られているが、このようなウイルスのスイッチがどのような機序でおこっているのかは明らかでなかった。今回の研究により、両者が同じ感染者に共存している場合、R5とX4ウイルスのどちらのウイルスが主要な集団となるかは、それぞれのウイルスの増殖できる生体内環境によることを明らかにした。したがって、今後の研究により、どのような生体内環境の変化がR5ウイルスからX4ウイルスへのスイッチにつながるのかが明らかとなれば、AIDSへの進行を防ぐHIV-1の新たな治療戦略につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：HIV-1 is transmitted by CCR5-using HIV-1, and induces persistent infection. However, CXCR4-using X4 virus emerges in approximately half of HIV-1-infected individuals at late stage with higher viral load and disease progression called AIDS. However, it has been not fully understand how HIV-1 induces coreceptor switch from R5 to X4. In this study, we focused on subtype A/E in drug users (IDUs) in Vietnam, and found higher prevalence of X4 virus, and mixed infection with R5 virus. Next generation analysis revealed that the frequency of mixed infection was much higher, indicating the role of mixed infection for the coreceptor switch from R5 to X4 at late stage. Interestingly, we further found that the viral load in mixed infection was significantly higher compared to that in homogenous infection. Take together, mixed infection of R5 and X4 may be involved in coreceptor switch and associated with higher viral load in late stage of infection.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HIV-1 エイズ病態 コレセプタースイッチ

1. 研究開始当初の背景

HIV-1 の受容体は CD4 分子であるが、補助受容体(coreceptor)として CCR5 ないし CXCR4 が細胞内侵入に必須である。一般に HIV-1 のヒト-ヒト感染は、CCR5 を利用する R5 ウイルスにより媒介され、その後、感染全体で R5 ウイルスが持続感染しているが、感染後期に、病態の悪化とともに、一部の症例でウイルス量の増大を伴う X4 ウイルスへとスイッチしてことが知られている(図1)。

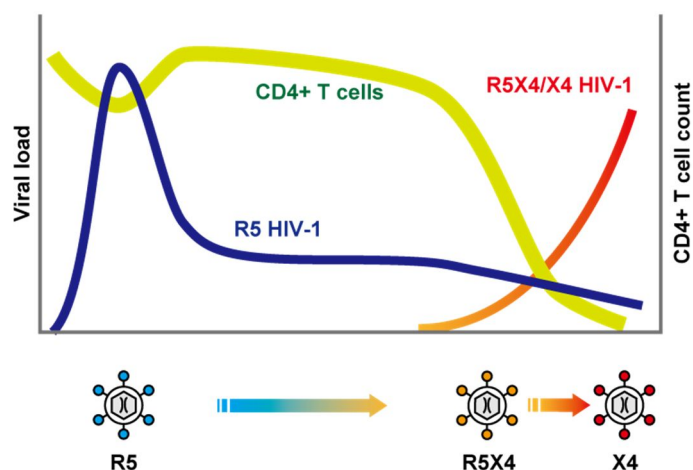


図1. HIV-1 感染者における自然経過における R5 から X4 へのウイルス進化

しかしながらこのような R5 ウイルスから X4 へのシフトが AIDS 病態を説明しているかどうかについては明らかでない。またどのような機序で R5 ウイルスから X4 ウイルスへとスイッチするかについても明らかではない。一般に HIV-1 のコレセプター利用性を主に決定しているのは HIV-1 env の 3 番目の可変領域 (V3) であることが判明しており、過去の研究から、この約 35 アミノ酸の配列から、そのウイルスが R5 なのか X4 なのかを予測することが可能となっており、(<https://coreceptor.genopheno.org/>)、この領域のアミノ酸置換がウイルスのコレセプタースイッチに関与していることが明らかとなっている。

我々はベトナムで流布しているサブタイプ A/E の HIV-1 のコレセプター利用性について解析を行ってきた。その結果、ベトナムのサブタイプ A/E では CXCR4 を利用する X4 ウイルスの頻度が高く、さらに一部の症例では R5 と X4 が同一個体に混在している、いわゆる混合感染症例があることを明らかにした(Maeda et al. JVI 94, 2020)。また、このような集団は遺伝的にお互いにかなり離れている集団として存在しており、単なる HIV-1 集団の進化過程を観察しているわけではなく、共感染や、重感染により新規に感染してきたウイルスが過去のウイルス集団と共存していることを示している。

また、このことは感染初期において R5 ウイルスがメジャー集団を形成している中で、マイナー集団として存在していた X4 ウイルスが、感染後期において何らかの個体側の環境の変化により、R5 ウイルスの複製を凌駕し、メジャー集団へとスイッチした可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、このようなウイルスの R5 から X4 へのコレセプタースイッチとして、我々の過去の研究で推察された R5 と X4 ウイルスの混合感染から X4 ウイルスがメジャー集団として選択される症例があるのかを明らかにし、そのウイルス側並びに感染個体環境について、網羅

の解析を行うことを目的とした。またこのようなコレセプタースイッチが病態の悪化と関連しているのかについても明らかにする。

3. 研究の方法

このような混合感染のコレセプター利用性のスイッチに關与する機序を明らかにするため、X4 ウイルスが血液から直接感染してくる可能性が高い麻薬常用感染者 (injecting drug users, IDU)に焦点をあててウイルス学的解析を行った。IDU 感染者 42 例の血漿から抽出した vRNA から得られた cDNA を鋳型にして、通常の PCR クローニングを行い、8 クローン以上の V3 領域のアミノ酸配列を決定し、そのコレセプター利用性を決定した。

さらに IDU 感染者のウイルス集団がどのような集団として同一個体に存在しているかを、次世代シーケンサー (NGS) を用いて詳細に解析した。方法としては、血漿から抽出された vRNA から合成された cDNA を鋳型として、nested PCR を行った。2nd PCR では NGS 用のアダプターを付加して、Illumina MiSeq により V3 領域の多様性を解析した。

4. 研究成果

通常の PCR クローニングを行い Sanger 法で解析したところ、同一個体内に、遺伝的に異なる集団として、幾つかの R5 と X4 ウイルスの集団が混在している症例が 8 例、19%と高頻度であることが判明した (表 1)。

また NGS 解析では混合感染を Sanger 法で検出できた症例だけでなく、通常の PCR クローニングでは均一なウイルス集団を形成していると判断された症例でも、異なるコレセプターを利用するウイルス集団がマイナー集団として検出できる症例があることが判明した (図 2)。したがって、異なるコレセプター利用性を有するウイルス集団が検出できる症例は 22 例となり、全体の 50%以上となった (表 1)。

表現型	Sanger	%	NGS	%
R5	22	52.4	13	31.0
X4	12	28.6	7	16.7
R5 + X4 (mix)	8	19.0	22	52.4
計	42	100.0	42	100.0

表 1 IDU 感染者における混合感染の頻度

一般に多数のウイルス集団が同一個体に感染すると、ウイルスの複製が高いウイルス集団に置き換わってしまうか、または重感染により組み換え体のウイルスが出現することが一般的であると考えられるものの、本研究の解析から、遺伝的にかなりかけはなれた集団として同一個体内で複数のウイルス集団が共存していることが観察された (図 3, VI-166, VI-180)。興味深いことは、主要なウイルス集団が X4 となっている VI-096 症例では、痕跡程度に R5 ウイルス集団が残存しており、このような症例では、過去には R5 ウイルスが主要集団だったものの、感染の経過で個体の何らかの環境変化により、マイナー集団として共存していた X4 ウイルスが主要なウイルス集団として置き換わってしまったことを意味しているのかもしれない (図 3)。一方、VI-116, VI-063 症例では X4 ウイルスがマイナー集団を形成しているが、今後の経過で、何らかの個体の環境により、主要集団になりうる可能性が推察された (図 3)。

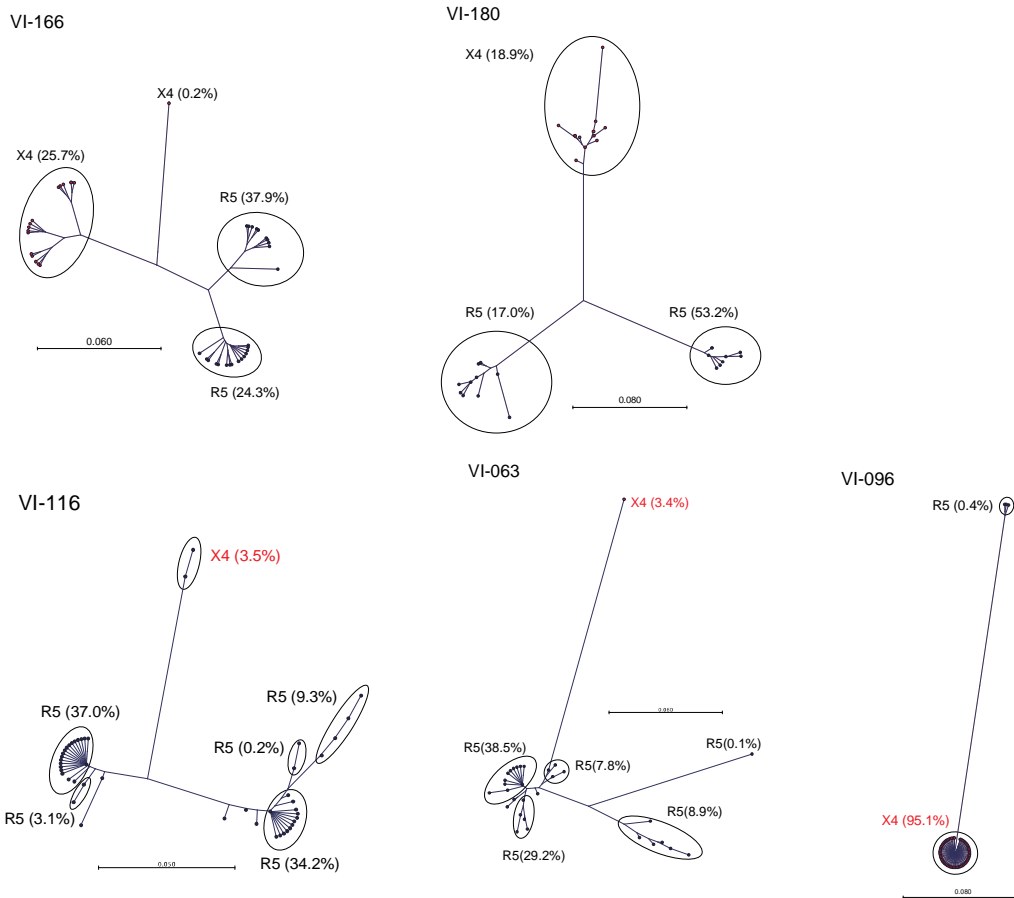


図2 NGSによるIDU感染者由来HIV-1のV3領域の解析の例

また興味深いことに、このような混合感染を有する症例は、均一なウイルス集団を形成している症例に比較して、有意に血漿中のウイルス量が高いことが明らかとなった(図3)。一方でCD4数との関連は明らかではなかった。

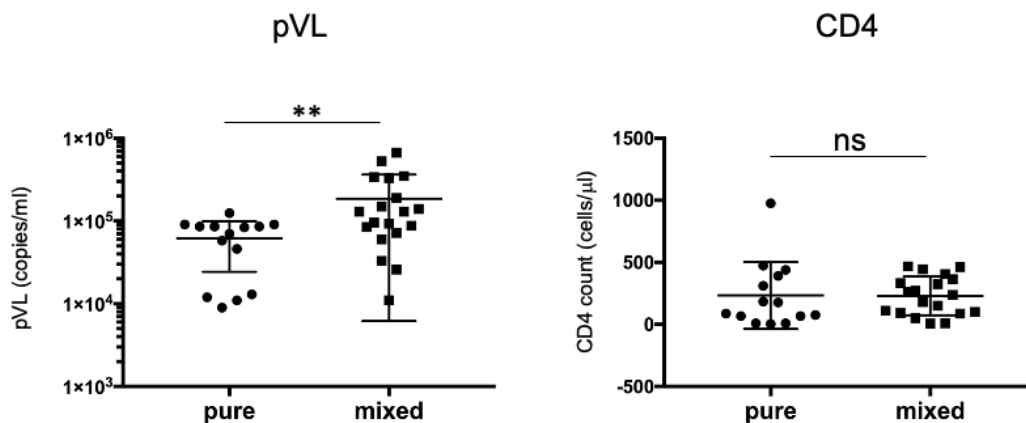


図3 均一感染と混合感染におけるウイルス量とCD4細胞数

R5ウイルスとX4ウイルスが競合せず共存できる機序としては、それぞれのウイルスが存続しているコンパートメントが異なっていて、重感染がおこりにくい環境となっていることが考えられる。一般にCD4陽性T細胞におけるCCR5とCXCR4の発現は、それぞれメモリー細胞とナイーブ細胞により異なり、CCR5の発現は比較的メモリー細胞で高く、CXCR4の発現はナ

イープ細胞で高いと報告されている。したがって R5 ウイルスはメモリー細胞へ、X4 ウイルスはナイーブ細胞に感染して、住みわけていることが想定される。結果として、標的となる感受性細胞集団が、均一ウイルスに比較して多いと考えられ、ウイルスの生存戦略として、複製と多様性を維持できるものと考えられる。

以上の結果から、本研究では HIV-1 の R5 から X4 ウイルスへのスイッチにはそれぞれのウイルスの混合感染が起因して、何らかの個体内環境変化により、感染経過とともに X4 ウイルスが主要な集団となってきたことが推察された。またこのような混合感染ではウイルス量が均一感染より有意に高いため、エイズ期のウイルス量の急激な増大をもたらし、エイズ発症に関連している可能性が考えられた。

今後はどのような感染個体内環境がこのような混合感染からのエイズ発症に関与しているのかを、宿主側からの解析を含めて行い、エイズ発症に関与するウイルス側および宿主側の両者の要因を明らかにすることにより、発症の予測や発症予防の戦略となりえることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kaku Y, Kuwata T, Zahid HM, Hashiguchi T, Noda T, Kuramoto N, Biswas S, Matsumoto K, Shimizu M, Kawanami Y, Shimura K, Onishi C, Muramoto Y, Suzuki T, Sasaki J, Nagasaki Y, Minami R, Motozono C, Toyoda M, Takahashi H, Kishi H, Fujii K, Tatsuke T, Ikeda T, Maeda Y, Ueno T, Koyanagi Y, Iwagoe H, Matsushita S.	4. 巻 36
2. 論文標題 Resistance of SARS-CoV-2 variants to neutralization by antibodies induced in convalescent patients with COVID-19	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 109385 ~ 109385
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.109385	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 -

1. 著者名 Bai Gaowa, Furushima Daisuke, Niki Toshiro, Matsuba Takashi, Maeda Yosuke, Takahashi Atsushi, Hattori Toshio, Ashino Yugo	4. 巻 22
2. 論文標題 High Levels of the Cleaved Form of Galectin-9 and Osteopontin in the Plasma Are Associated with Inflammatory Markers That Reflect the Severity of COVID-19 Pneumonia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4978 ~ 4978
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22094978	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 -

1. 著者名 Maeda Y, Takemura T, Chikata T, Kuwata T, Terasawa H, Fujimoto R, Kuse N, Akahoshi A, Murakoshi H, Trang GV, Zhang Y, Pham CH, Pham AHQ, Monde K, Sawa T, Matsushita S, Nguyen TV, Nguyen VK, Hasebe F, Yamashiro T, Takiguchi M	4. 巻 94
2. 論文標題 Existence of replication-competent minor variants with different coreceptor usage in plasma from HIV-1-infected individuals	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e00193-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.00193-20.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Padilla ST, Niki T, Furushima D, Bai G, Chagan-Yasutan H, Telan EF, Tactacan-Abrenica RJ, Maeda Y, Solante R, Hattori T	4. 巻 10
2. 論文標題 Plasma Levels of a Cleaved Form of Galectin-9 Are the Most Sensitive Biomarkers of Acquired Immune Deficiency Syndrome and Tuberculosis Coinfection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 1495
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom10111495.	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 Bai G, Furushima D, Niki T, Matsuba T, Maeda Y, Takahashi A, Hattori T, Ashino Y	4. 巻 in press
2. 論文標題 High levels of the cleaved form of galectin-9 and osteopontin in the plasma are associated with inflammatory markers that reflect the severity of COVID-19 pneumonia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci in press	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 Maeda Y, Takemura T, Chikata T, Kuwata T, Terasawa H, Fujimoto R, Kuse N, Akahoshi T, Murakoshi H, Van Tran G, Zhang Y, Pham CH, Pham AHQ, Monde K, Sawa T, Matsushita S, Nguyen TV, Van Nguyen K, Hasebe F, Yamashiro T, Takiguchi M.	4. 巻 94
2. 論文標題 Existence of replication-competent minor variants with different coreceptor usage in plasma from HIV-1-infected individuals	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e00193-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.00193-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hamada K, Maeda Y, Mizutani A, Okada S.	4. 巻 42
2. 論文標題 The Phosphatidylinositol 3-Kinase p110 /PTEN Signaling Pathway Is Crucial for HIV-1 Entry.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biol Pharma Bull	6. 最初と最後の頁 130-138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b18-00801.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Win Thida, Takeo Kuwata, Yosuke Maeda, Tetsu Yamashiro, Giang Van Tran, Kinh Van Nguyen, Masafumi Takiguchi, Hiroyuki Gatanaga, Kazuki Tanaka, Shuzo Matsushita	4. 巻 508
2. 論文標題 The role of conventional antibodies targeting the CD4 binding site and CD4-induced epitopes in the control of HIV-1 CRF01_AE viruses	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS	6. 最初と最後の頁 46-51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.11.063	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yosuke Maeda, Takayuki Chikata, Taichiro Takemura, Hiromi Terasawa, Matsufuji Tetsu, Nozomi Kuse, Kazuaki Monde, Tomohiro Sawa, Futoshi Hasebe, Masafumi Takiguchi
2. 発表標題 High frequency of mixed infection with different coreceptor usage in CRF01_AE-HIV-1-infected intravenous drug users
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会・総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 前田 洋助
2. 発表標題 The existence of replication-competent minor variants with different coreceptor usage in CRF01_AE HIV-1-infected individuals in northern Vietnam
3. 学会等名 日本学術振興会研究拠点形成事業シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前田 洋助
2. 発表標題 ウイルスから見たHIV/AIDS
3. 学会等名 災害・熱帯感染症国際セミナー（招待講演）
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
研究協力者	滝口 雅文 (Takiguchi Masafumi) (00183450)	国立法人熊本大学・ヒトレトロウイルス学共同研究センター・シニア教授 (17401)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	近田 貴敬 (Chikata Takayuki) (60749711)	国立法人熊本大学・ヒトレトロウイルス学共同研究センター・特任講師 (17401)	
研究協力者	長谷部 太 (Hasebe Futoshi) (20253693)	長崎大学・熱帯医学研究所・教授 (17301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関