

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17480

研究課題名（和文）HIV感染者体内の残存ウイルスリザーバー評価系構築と臨床学的バイオマーカーの探索

研究課題名（英文）Establishment of an evaluation system for residual viral reservoirs in HIV-infected individuals and discovery of clinical biomarkers

研究代表者

松田 幸樹（Matsuda, Kouki）

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・エイズ治療・研究開発センター・リサーチ・レジデント

研究者番号：70796193

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、cART治療中のHIV感染者の末梢残存プロウイルスの定量評価系の構築及び、ウイルスリザーバーサイズに相関するバイオマーカーの探索を行なった。対象の20名の加療中HIV感染患者検体を刺激後のHIV-mRNA発現上昇レベルで2群に分け、様々なバイオマーカーになり得る因子を解析した結果、刺激後のHIV-mRNA発現上昇レベルと有意に相関するいくつかのマーカーが明らかとなった。またddPCRを用いた高感度HIVリザーバー解析の結果、これらの因子がintactなHIVリザーバーサイズと相関することが明らかとなった。これらのバイオマーカーがHIV潜伏感染治療の標的となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HIV潜伏感染細胞（リザーバー）の存在がHIV感染症根治の妨げとなっている。リザーバー細胞は一見すると正常な非感染細胞との見分けがつかず、プロウイルスDNAの有無でしか選別することができない。また、患者体内のリザーバーサイズや性質は異なると考えられている。本研究で見出されたバイオマーカーは簡便にリザーバー細胞のサイズを評価するための新たなツールとしてだけではなく、体内でのウイルスリザーバー形成ならびに潜伏感染機序の全容解明につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we established a quantitative evaluation system for peripheral residual provirus in HIV-infected patients on cART treatment and discovered biomarkers correlated with viral reservoir size. 20 HIV-infected patients were divided into two groups based on the level of elevated HIV-mRNA expression after stimulation, and various potential biomarkers were analyzed. High-sensitivity HIV reservoir analysis using ddPCR also revealed that these factors correlated with intact HIV reservoir size. These biomarkers were suggested as potential targets for treatment of latent HIV infection.

研究分野：感染症内科学

キーワード：HIV潜伏感染 HIV cure HIVリザーバー HIV感染症 バイオマーカー

### 1. 研究開始当初の背景

抗ウイルス療法の進歩により患者の予後は飛躍的に改善、AIDS は致死的な疾患から治療可能な慢性感染症となった。その一方で、cART は患者体内で産生されるウイルスを検出限界以下に減らすことはできても、患者の細胞の中に組み込まれた HIV DNA を体内から排除することはできない。そしてそれらの感染細胞は治療薬の中断後に再びウイルスを産生することとなる。つまり一度 HIV に感染した患者は生涯にわたり治療を受ける必要がある。

近年 HIV の治癒 (Cure) に向けた研究が精力的に行われており、既存の抗 HIV 療法とは異なる新規の治療法も提唱されつつある。レトロウイルスである HIV-1 は、宿主のゲノムにウイルス自身のゲノムを組み込むことで感染を成立させ感染者体内に長期間潜伏、この潜伏感染細胞 (ウイルスリザーバー) の存在が HIV 感染症根治の妨げとなっている。潜伏感染細胞は一見すると正常な非感染細胞との見分けがつかず、プロウイルス DNA の有無でしか選別することができない。体内で HIV リザーバー細胞を構築・維持するためには、長期の cART でウイルス血症が抑えられている中で、何年もの間 replication-competent なプロウイルスを保持し続ける必要がある。本邦で研究者が用いることができる HIV 患者由来の検体は末梢血に限られることが多く、末梢血に存在する replication-competent なプロウイルスを持つ潜伏感染細胞を解析することでその患者の体内 (特にリンパ節など) に残存するリザーバーの全体像を予測するしか無いのが現状と言える。さらに過去の治療経過などによって患者体内のリザーバーサイズや性質は異なると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では cART 治療中の HIV 感染者末梢血を用いて、末梢の残存プロウイルスの定量評価系の構築を第一の目的とし、そこで確立された手法を用いてウイルスリザーバーサイズに相関するバイオマーカーを探索することを第二の目的とする。HIV リザーバー細胞は末梢血中の CD4<sup>+</sup>T 細胞 10<sup>6</sup> 細胞あたり 1-2 個程度と、非常にレアな細胞集団であるため、少量の血液サンプルを用いた定量系であることが望まれる。本研究課題の第一の目的である、高感度な末梢残存 HIV リザーバー定量評価系の構築により、様々な臨床的背景を有する HIV 感染者のリザーバー細胞を詳細に解析することができるようになる。一方で、感染者体内の真のリザーバー細胞はリンパ組織内に存在しているとされており、採取可能な検体量にも限りがある。本研究課題の第二の目的であるウイルスリザーバーサイズに相関する生体のバイオマーカーが明らかになれば、簡便にリザーバー細胞のサイズを評価するための新たなツールとしてだけでなく、体内でのウイルスリザーバー形成ならびに潜伏感染機序の全容解明につながることを期待される。

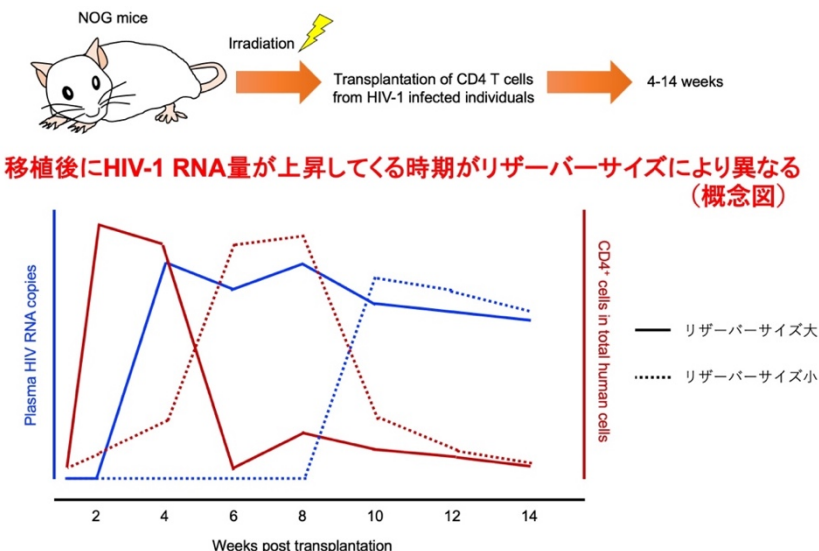
### 3. 研究の方法

#### (1) 新規の末梢残存 HIV リザーバー定量評価系の構築

我々はこれまでに、当研究センターエイズ治療・研究開発センター (ACC) との共同研究において、新規 LRA 創薬研究の中で HIV 感染患者検体を用いたウイルス再活性化実験を行い (Hattori S

and Matsuda K et al. *Front Microbiol.* 2018, 9:2022; Matsuda K et al. *J Biol Chem.* 2019, 294(1):116-129)、その過程において全ての HIV 感染患者検体で LRA による HIV 再活性化が起こるわけではないことを mRNA の induction レベルで確認しており、治療を受けた患者の細胞内 HIV-DNA 量はほとんどの患者細胞で検出限界以下であるとする結果を得ている。また、これらは部分的な DNA、RNA の解析で

(図1) HIV-1患者由来細胞移植モデルを用いた  
残存リザーバーサイズの定量 (mVOA)



あり、活性化に反応して正常なウイルスを作り出す様な replication-competent な HIV プロウイルスを解析していることにはならない。従って、replication-competent な HIV プロウイルスのみを検出可能な高感度の HIV リザーバー解析系の構築が必須である。そこで本研究課題 1 では熊本大学ヒトレトロウイルス学共同研究センター造血・腫瘍制御学分野との共同研究で、マウスモデルを用いた mouse Viral Outgrowth Assay (mVOA)法 (Metcalf Pate KA et al. *Retrovirology*. 2017, 14:52) を用いて正常なウイルスを作り出す replication-competent な HIV プロウイルスの解析を行う (図 1 (概念図))。本法は高度免疫不全マウス (NOG マウス) に HIV 患者由来の CD4<sup>+</sup>T 細胞を移植し、ヒト細胞の生着 (ヒト化) に伴いマウス体内で HIV 複製が起こる。マウス血中の HIV ウイルス量をモニターすることで各患者のリザーバーサイズを推測することが可能である。これと並行して新たに導入した droplet digital PCR (ddPCR) 装置を用いた簡便な HIV リザーバー解析 (Intact Provirus DNA Assay: IPDA) についても実施する。

#### (2) HIV リザーバーサイズに相関するバイオマーカーの探索

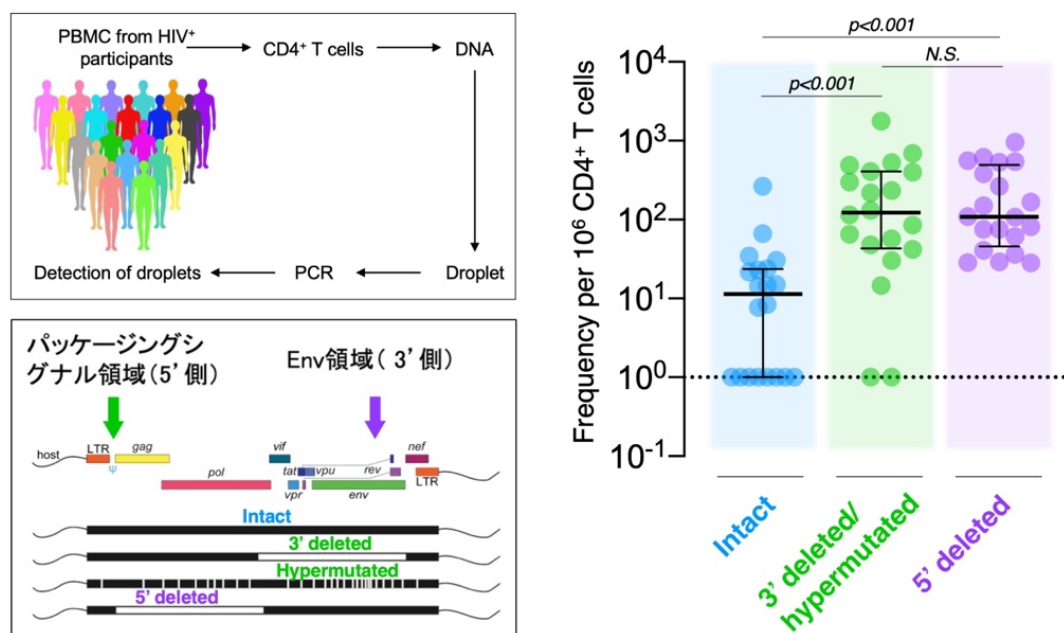
cART で血漿ウイルス量が検出限界以下 (<20 copies/ml) に抑えられている HIV 感染患者の PBMC より CD4<sup>+</sup> T 細胞を分離し、PMA/Ionomycin で 24 時間刺激後の細胞内 HIV mRNA 発現上昇を quantitative-PCR で評価し、再活性化の有無でリザーバーサイズのグループ分けを行う。種々の臨床学的バイオマーカーを2群間で比較し、リザーバーサイズを反映する因子を探索する。特に血漿中のタンパク、細胞表面マーカー、RNA-seq 解析による網羅的な遺伝子発現解析を実施する。

### 4. 研究成果

#### (1) 高感度 HIV リザーバー解析

本研究では、国立国際医療研究センターACC の 20 名の加療中 HIV 感染患者検体を用いて、免疫不全マウスを用いた高感度 HIV リザーバー解析 (mVOA) を実施した。当初 25 例で解析予定であったが同意取得等の問題で 20 例での解析となった。全検体で正常なウイルスを作り出す intact な HIV プロウイルスの検出には至らなかった。また、ddPCR 法を用いた IPDA を行い、cART 治療を受けた患者体内に存在するプロウイルスは大部分が欠損型であることを見出した (図 2)。

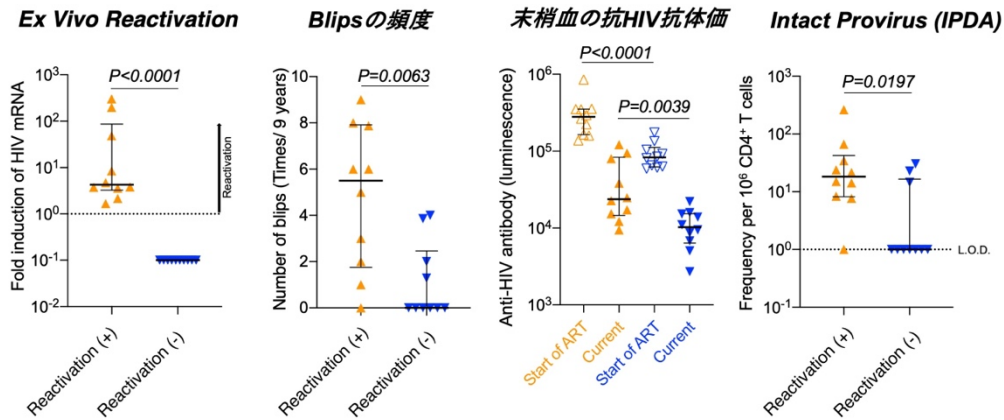
(図2) ddPCR法を用いたIPDAによるHIVリザーバー解析



#### (2) 刺激後の細胞内 HIV mRNA 発現上昇量による群分け

次に、cART 加療中の患者 PBMC より CD4<sup>+</sup> T 細胞を分離し刺激後の細胞内 HIV mRNA 発現上昇量を比較した所、20 例中 10 例で HIV 再活性化が認められたため再活性化の有無での群分けを行なった (図 3)。様々なバイオマーカーになり得る因子を解析した結果、治療期間中に見られた blips の頻度と相関することを明らかにした。Blips は治療で血中ウイルス量が検出限界以下に下がっ

(図3) 刺激後のHIV-mRNA発現上昇レベルと blipsの頻度, 抗HIV抗体価, IPDAの比較

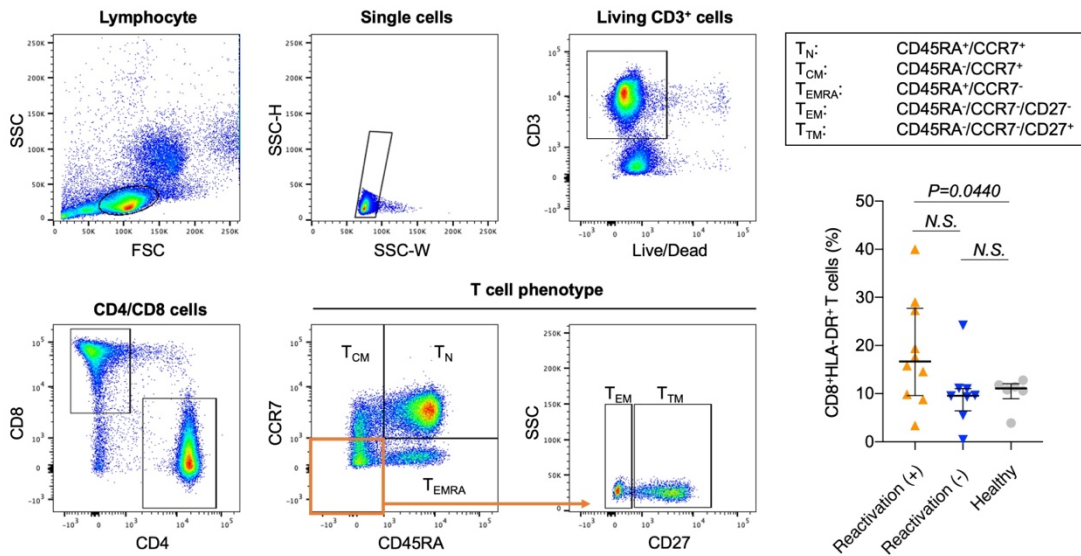


た後、間欠的に測定感度以上の低レベルの血中ウイルスが検出される現象であるが、blipsの頻度が多いほど現在のリザーバーサイズが大きいことが明らかとなった。また blips に伴う免疫動態の変化が抗体価に与える影響に着目し、刺激後の HIV mRNA 発現上昇レベルと治療前・後の抗 HIV 抗体価が有意に相関することを明らかにした (図3)。さらに ddPCR を用いた IPDA の結果、刺激後の HIV mRNA 上昇群では intact な HIV プロウイルスが有意に多く (図3)、blips の頻度とも相関することを明らかにした。

(3) 各種細胞表面マーカー解析

T細胞サブセットごとの細胞表面マーカー解析の結果、刺激後の HIV mRNA 発現上昇が認められた群では Healthy control と比して CD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>T<sub>CM</sub> が有意に上昇していることを明らかにした (図4)。

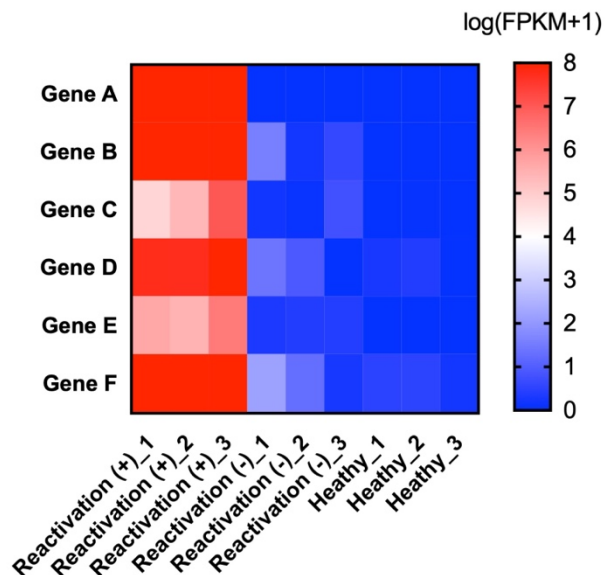
(図4) T細胞サブセットごとの細胞表面マーカー解析



#### (4) RNA-seq 解析

CD4<sup>+</sup>T 細胞を用いて RNA-seq 解析を行なった結果、刺激後の HIV mRNA 発現上昇が認められた群では antimicrobial 関連遺伝子の発現が上昇しており、リザーバーサイズを反映し得る可能性を明らかにした (図 5)。これらの細胞群・遺伝子群が HIV 潜伏感染治療の標的となる可能性が示唆された。

(図5) RNA-seqより同定した、HIVリザーバーサイズを反映し得る遺伝子の発現解析



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Matsuda Kouki, Islam Saiful, Takada Toru, Tsuchiya Kiyoto, Yang Tan Benjy Jek, Hattori Shin-ichiro, Katsuya Hiroo, Kitagawa Kosaku, Kim Kwang Su, Matsuo Misaki, Sugata Kenji, Delino Nicole S., Gatanaga Hiroyuki, Yoshimura Kazuhisa, Matsushita Shuzo, Mitsuya Hiroaki, Iwami Shingo, Satou Yorifumi, Maeda Kenji	4. 巻 1
2. 論文標題 A widely distributed HIV-1 provirus elimination assay to evaluate latency-reversing agents in vitro	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports Methods	6. 最初と最後の頁 100122 ~ 100122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.crmeth.2021.100122	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 Matsuda Kouki, Kobayakawa Takuya, Kariya Ryusho, Tsuchiya Kiyoto, Ryu Shoraku, Tsuji Kohei, Ishii Takahiro, Gatanaga Hiroyuki, Yoshimura Kazuhisa, Okada Seiji, Hamada Akinobu, Mitsuya Hiroaki, Tamamura Hirokazu, Maeda Kenji	4. 巻 12
2. 論文標題 A Therapeutic Strategy to Combat HIV-1 Latently Infected Cells With a Combination of Latency-Reversing Agents Containing DAG-Lactone PKC Activators	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 636276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2021.636276	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 Kitamura Haruki, Sukegawa Sayaka, Matsuda Kouki, Tanimoto Kousuke, Kobayakawa Takuya, Takahashi Kazuho, Tamamura Hirokazu, Tsuchiya Kiyoto, Gatanaga Hiroyuki, Maeda Kenji, Takeuchi Hiroaki	4. 巻 641
2. 論文標題 4-phenylquinoline-8-amine induces HIV-1 reactivation and apoptosis in latently HIV-1 infected cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 139 ~ 147
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.12.024	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 松田幸樹、前田賢次	4. 巻 31
2. 論文標題 HIV潜伏感染細胞に対する新規治療法開発に向けた研究	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cytometry Research	6. 最初と最後の頁 7-13
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松田幸樹
2. 発表標題 HIV潜伏感染細胞に対する新規治療法開発に向けた研究
3. 学会等名 第31回日本サイトメトリー学会学術集会（若手招聘シンポジウム）（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松田幸樹
2. 発表標題 DAG-lactone骨格を有するPKC活性化剤を含むLRAの併用によるHIV-1潜伏感染細胞治療戦略
3. 学会等名 第35回日本エイズ学会学術集会・総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松田幸樹、土屋亮人、小泉吉輝、刈谷龍昇、岡田誠治、吉村和久、満屋裕明、岩見真吾、瀧永博之、岡慎一、前田賢次
2. 発表標題 HIV感染者体内の残存ウイルスリザーバーサイズを反映する臨床学的バイオマーカーの探索
3. 学会等名 第30回抗ウイルス療法学会学術集会・総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松田幸樹、土屋亮人、小泉吉輝、刈谷龍昇、岡田誠治、吉村和久、満屋裕明、岩見真吾、瀧永博之、岡慎一、前田賢次
2. 発表標題 HIV感染者体内に残存するウイルスリザーバーサイズを反映する臨床学的バイオマーカーの探索
3. 学会等名 第36回日本エイズ学会学術集会・総会
4. 発表年 2022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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------