

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6 月 7 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390203

研究課題名（和文）ヒト免疫不全ウイルス複製能のヒト集団内における経年変化の解析

研究課題名（英文）Investigation of change in HIV-1 replication capacity over the epidemic

研究代表者

三浦 聡之 (MIURA TOSHIYUKI)

長崎大学・熱帯医学研究所・客員教授

研究者番号：00296576

研究成果の概要（和文）：ヒト免疫不全ウイルス (Human Immunodeficiency virus type I: HIV) は免疫などの様々な選択圧にさらされており、変異を起こしやすい逆転写酵素を持つため、進化の速度が速い。我々は HIV-1 の試験管内複製能の経年変化をヒト集団レベルで解析した。その結果、1990 年代半ばから 2000 年代後半にわたる日本における臨床検体から HIV-1 の Gag-Protease 領域を実験株 HIV-1 に組み込み複製能を解析したところ、その複製能力が経年的に低下してきていることが示された。

研究成果の概要（英文）：Human Immunodeficiency Virus type I (HIV-1) is evolving rapidly due to various selection pressures and its error-prone reverse-transcriptase. Temporal change in replication capacity of HIV-1 at a population level was examined. It was found that in vitro HIV-1 replication capacity associated with Gag-Protease has been declined in Japan. This result will provide significant insight to the research community with regard to the direction of HIV evolution.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2011 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2012 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：感染症防御学

1. 研究開始当初の背景

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) は fidelity の低い逆転写酵素とその類まれなる可塑性のため、宿主 (ヒト) 体内の様々な選択圧から逃避することができる。ヒト体内での HIV 複製コントロールに主要な役割をしているのは特異的細胞障害性 T 細胞 (Cytotoxic T Lymphocyte: 以下 CTL) であるが、ウイルスタンパク質の標的部 (エピトープ) にアミノ酸変異が入ることにより、ウイルスは、CTL 応答から逃避することができる。これらの逃

避変異は感染個体内ではほぼ必発である。一部の HLA に拘束される CTL 応答からの逃避変異は、ウイルスの複製能 (フィットネス) を落とすことがわかっており、また多くの CTL 逃避変異は HIV 感染症流行の進行とともに集団内に蓄積することが報告されている。それは将来 CTL の標的が次第に失われていくことを意味し、HIV の病原性の上昇につながり、またワクチン開発の支障となることが危惧される。一方で、CTL 逃避変異はウイルス複製能を低下させることから、そのヒト集団内

蓄積は、時代とともにウイルス複製能が低下していくことも示唆する。しかしながら、HIV 感染症の流行初期に循環していたウイルス株と、最近流行しているウイルス株の間でのウイルス複製能の違いについてはほとんどわかっていなかった。HIV の複製能の時代的变化を検討した論文は、同じグループから二つあった。彼らは分離されたウイルスそのものを使用したが、わずか 20-30 のウイルス株を感染年代で層別化して比較し、互いに相反する結果を得ている。従って、HIV 複製能の経年変化についてはまったく不明と言ってよかった。彼らの手法の問題点は、感染者の病期ステージにより著しく機能が変化していくエンベロープタンパク質を含むウイルスを使用した点と、サンプルの数が少なすぎたことであった。

より正確な手法を用い、大きなスケールで HIV の複製能を測定することが HIV のヒトへの進化適応の方向性を予測する上で必須であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、HIV 複製能のヒト集団内での経年変化を試験管内で明らかにし、ウイルス複製能の経年変化の原動力が HLA 拘束性 CTL 応答からの逃避変異であるか検討する。これにより HIV の将来の複製能を予測し、同ウイルスが将来の地球規模の公衆衛生に与える影響を考察する。具体的には、

- (1) 複数の流行地、日本及びタイ国において、流行初期の HIV 株に比べて、最近の流行株の複製能が減弱しているかを検証する。
- (2) どの HLA アリルで拘束される CTL 応答からの逃避変異の蓄積が、ヒト集団内でのウイルス複製能の経年変化に強く寄与しているか検討する。

3. 研究の方法

本研究は、異なった HIV サブタイプが流行している二つの地域、日本とタイ国において行った。日本においては 1992 年以降東大医科研附属病院に保存されている約 180 名の HIV 陽性患者(ほとんどが男性同性愛者)血液からの cladeB ウイルスを対象にした。タイ国チェンマイ大学では、1992 年から現在にいたるまでの約 200 名の CRF01_AE サンプル(異性間性交感染者)を対象にした。上記患者の保存血漿からウイルス RNA を抽出し、RT-PCR により gag-protease 領域を増幅し、実験ウイルス株の感染性クローンである pNL4-3 に相同組み換えにより挿入しキメラウイルスをえた。ウイルスの感染力価を測定し、LTR-driven GFP reporter T cell に感染させ GFP 発現細胞の率を FACS でモニターし、

ウイルス増殖曲線を描き、その複製速度を調べた。

4. 研究成果

日本のサンプルを用いた実験では、キメラウイルスの複製能と「HIV-1 感染と診断された年」との間に有意な負の相関があることが分かった(図 1, $R = -0.27$, $p = 0.0006$)。感染個体内でも HIV の複製能は病期の進行に伴い変化して行くが、この相関は採血時の CD4 陽性 T 細胞数とウイルス量による調整後も有意であり(図 2)、血漿ウイルス量と CD4 陽性細胞数に關係なく、gag-protease 関連の HIV-1 複製能が、日本において経年的に低下してきていることを示唆していた。

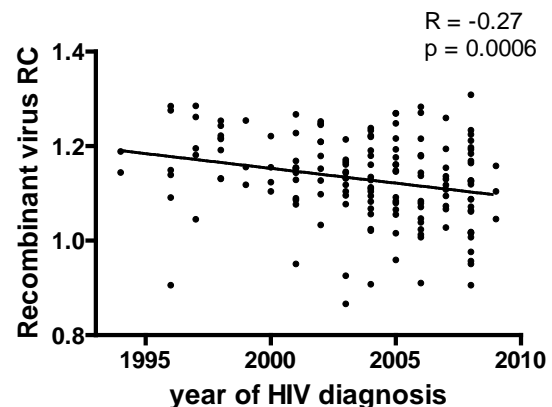
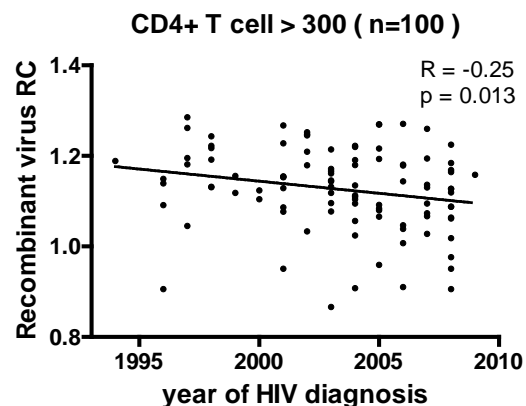
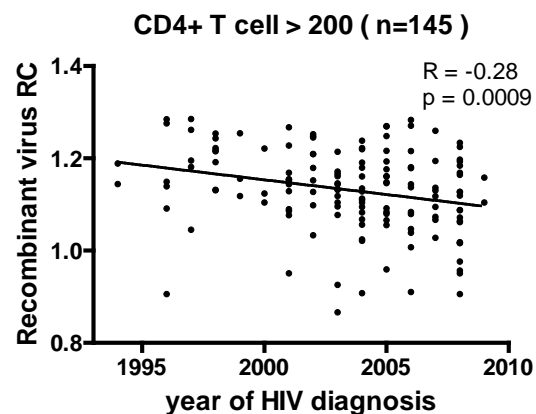


図 1. ウイルス複製能と HIV-1 感染診断年



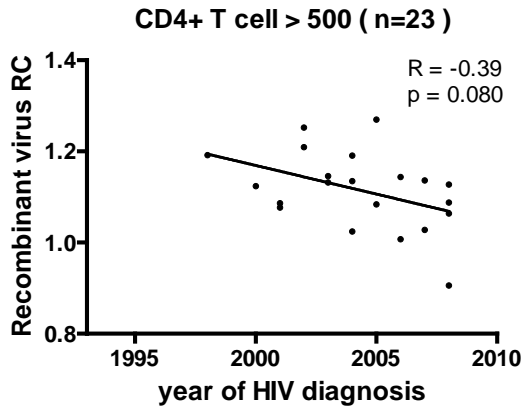


図 2. CD4 陽性細胞数による層別解析

他に結果に影響を及ぼしうる因子として、性質の非常に異なった cladeB が日本での流行中に持ち込まれた可能性や、キメラウイルスの背景ウイルスとして使用された NL4-3 と臨床株ウイルスとの遺伝的な距離の影響(図 3)、1990 年後半から使用されるようになったプロテアーゼ阻害薬に対する耐性変異の蓄積なども考慮した統計解析も行ったが、有意な負の相関は残った。同様の現象が認められるかタイ国チェンマイ大学との共同研究が進行中である。

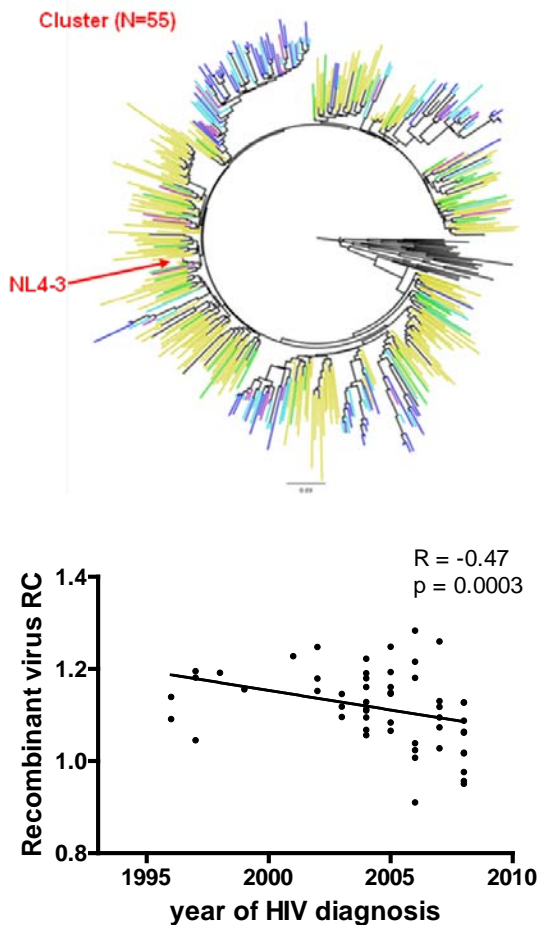


図 3. 系統樹上みられる日本独自のクラスター (n=55) に限定した解析

この複製能力の変化の原動力のひとつとして、細胞傷害性T細胞からの逃避変異体の蓄積を可能性として考えさらに解析をすすめたところ、流行初期では日本人に最も頻度の高い HLA-A*24 を発現している患者から得られたキメラウイルスの複製能は、A*24 を発現していない患者から得られたキメラウイルスの複製能より有意に低下していたが、近年のものでは両者に有意差は得られなかった(図 4)。

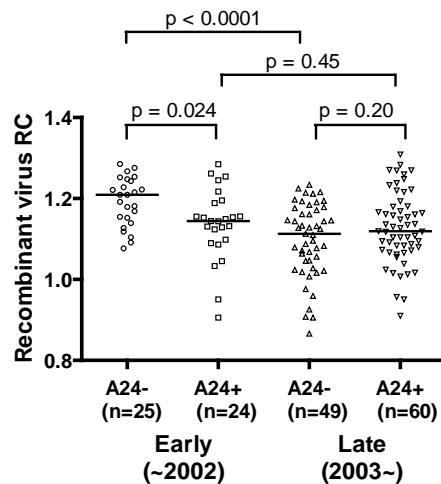


図 4. HLA-A*24 の有無によるウイルス複製能

これは、A*24 を発現していない患者におけるウイルスの複製能が近年、A*24 を発現している患者体内のウイルス複製能に相当するほど低下してきている可能性を示唆している。日本人のおよそ 70% が HLA-A*24 を発現しており、もっとも頻度の高い HLA class I alleles である。仮説として A*24 関連逃避変異により複製能の低下したウイルスが、A*24 を発現していない患者に伝播することによって、日本人の間に広まっていった可能性も考えられた。この関係はその他の HLA では認められなかった。

HLA-A*24 拘束性 CTL 逃避変異の蓄積があるかウイルスアミノ酸配列を調べたが、既知の CTL エピトープ部位に明らかな変異の蓄積は認められなかった。また、HLA-A*24 と統計的に関連があることが判明しているアミノ酸置換の明らかな蓄積も認めなかった。未だ同定されていない A*24 拘束性 CTL エピトープが存在することは十分考えられるため、今後より詳細な検討が必要と考えられた。

一方で、CTL 逃避変異蓄積の系統的な解析が進行中であり、近日中に論文投稿できる予定

である。

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)

[雑誌論文] (計 1 件)

Nomura, S., N. Hosoya, Z. L. Brumme, M. A. Brockman, T. Kikuchi, M. Koga, H. Nakamura, T. Koibuchi, T. Fujii, J. M. Carlson, D. Heckerman, A. Kawana-Tachikawa, A. Iwamoto, and T. Miura. Significant Reductions in Gag-Protease-Mediated HIV-1 Replication Capacity during the Course of the Epidemic in Japan. J Virol 87:1465-76. 査読有 doi: 10.1128/JVI.02122-12

[学会発表] (計 1 件)

S. Nomura, N. Hosoya, T. Kikuchi, M. Koga, H. Nakamura, T. Koibuchi, T. Fujii, A. Kawana-Tachikawa, A. Iwamoto, T. Miura. Replication capacities of chimeric NL4-3 encoding gag-protease from modern HIV-1 isolates are significantly reduced compared to those derived from isolates in the early days of epidemic in Japan. 6th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. 2011年07月17日～2011年07月20日. ローマ, イタリア

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 聡之 (MIURA TOSHIYUKI)
長崎大学・熱帯医学研究所・客員教授
研究者番号: 00296576

(2) 研究分担者

立川 愛 (TACHIKAWA AI)
東京大学・医科学研究所・准教授
研究者番号: 10396880

細谷 紀彰 (HOSOYA NORIAKI)
東京大学・医科学研究所・特任助教
研究者番号: 30568928

有吉 紅也 (ARIYOSHI KOYA)
長崎大学・熱帯学研究所・教授
研究者番号: 30311400