

博士論文（要約）

サルエイズモデルにおけるウイルス特異的中和抗体応答に  
関する研究

菅野 芳明

サルエイズモデルにおけるウイルス特異的中和抗体応答に関する研究

所属：東京大学大学院医学系研究科 医学博士課程 内科学専攻

指導教員：四柳 宏

申請者：菅野 芳明

ヒト免疫不全ウイルス（HIV）感染症は、後天性免疫不全症候群（AIDS）を引き起こす感染症であり、抗レトロウイルス薬を一生継続することによってウイルス量制御及び AIDS 発症遅延が可能となっているが、現時点で根治は不能であり、世界の罹患人口、新規感染者は多く、予防ワクチンを代表とする免疫学的な介入戦略が強く求められている。

HIV/SIV（サル免疫不全ウイルス）は CCR5 陽性メモリーCD4 陽性 T 細胞の感染急性期における大規模な破壊を来し、ウイルス特異的適応免疫応答の全般的な障害を起こすことが免疫学的に最も著明な特徴である。特に HIV/SIV 感染では、中和抗体（NAb）の誘導効率が感染急性期から慢性期に至るまで非常に低いことが持続感染の成立に寄与するが、このウイルス特異的 NAb 誘導障害が生ずる全容は明らかではない。逆に感染急性期に一定量の NAb 応答が存在すれば、特異的 T 細胞応答の誘導亢進などの機序を介して高度のウイルス複製制御を惹起し得ることも近年判明しており、その存在はウイルス制御に非常に重要である。従って HIV/SIV 特異的 NAb 応答の性質を解明することは重要であり、特にサルエイズモデルを用いた SIV 特異的 NAb の性状、とりわけエンベロープ（Env）標的特異性の解析は、抗体誘導型の HIV 制御戦略の開発に必須と考えられる。

所属研究室ではサルエイズモデルを用いた先行研究において、高度の中和抵抗性を示す SIV<sub>mac239</sub> 株に感染したアカゲザルにおける抗 SIV 抗体応答の長期フォローアップを行ってきた。70 頭につき当該の解析を行ってきた中で、このウイルスに特異的な

NAb を誘導する個体が群単位で初めて同定された。NAb 誘導個体と非誘導個体を比較することで、NAb 誘導に重要な特徴を見出せることが期待され、当該モデルのさらなる描出が見込まれる。そこで私は、この同定された SIV<sub>mac239</sub> 特異的 NAb 誘導サル群 ( $n=8$ ) に注目し、対照 NAb 非誘導群 ( $n=7$ ) との比較を交え、NAb 応答が標的とする Env 領域の解析を行った。

最初に NAb 誘導群と NAb 非誘導群の感染慢性期における血漿中ウイルス RNA の *env* 配列をダイレクトシーケンシングにより経時的に解析し、共通選択の傾向を示した Env アミノ酸置換を探索した。結果、NAb 誘導群においては可変領域 V1 (variable region 1、以下同様)、V2、V4、V5 をコードする 4 領域にアミノ酸置換やアミノ酸欠失を生ずる変異が高率に認められた。

次に、NAb 誘導群及び NAb 非誘導群におけるウイルス Env 領域に対する選択圧の解析を行った。NAb 誘導期及び非誘導群において時期的に対応する感染慢性期の血漿中ウイルス RNA より、各個体につき 20 個の *env* gp120 コード領域のサブクローニングを行った。まず平均の総塩基変異個数を SIV 感染後週数に対してプロットした結果、NAb 誘導群は NAb 非誘導群と比べて異なる線形回帰の傾向を示した。そこで平均の総塩基変異個数を SIV 感染後週数で除した値を総塩基変異蓄積速度と定義し、各個体の代表パラメータとし両群間で比較を行った結果、NAb 誘導群における蓄積速度は NAb 非誘導群と比べて有意に亢進していた。次に総塩基変異のうち同義変異を除いた非同義変異の蓄積速度も同様に計算し群間で比較を行った結果、同様に NAb 誘

導群では NAb 非誘導群と比べて有意に非同義変異蓄積速度の亢進を認めた。すなわち、NAb 誘導群においては Env gp120 領域に対する宿主選択圧の亢進が生じていた。さらにウイルスチャレンジから NAb 誘導までの 2 タイムポイント間と、NAb 誘導以降の 2 タイムポイント間でのダイレクトシーケンシングによるドミナントなアミノ酸変異の蓄積速度を比較した結果、NAb 誘導後に蓄積速度の増加が認められた。NAb 非誘導群で同様の解析を行ったところその傾向は認めず、従ってこの Env 選択圧の亢進は NAb 誘導により加速することが示唆された。

以上の Env 選択圧を呈した NAb 応答の Env 標的特異性の解析を行うため、中和逃避変異と推定した各 Env アミノ酸変異をコードする *env* 変異体ウイルスのパネルを作製した。具体的には、V1 領域 A138S、V2 領域 G201D、V4 領域 A417T、V4 領域 420~426 KPKEQHK 欠失 (420~426 del)、V5 領域 N476D の 5 種類を Env 多型解析の結果及び既報から NAb 逃避変異と推定し、各々の変異を単独、もしくは組み合わせで有する [V1+V4 A138S+A417T (V14mt)、V1+V2+V4 A138S+G201D+A417T (V124mt)、V1+V2+V4+V5 A138S+G201D+A417T+N476D (V1245mt)] 変異体 SIV<sub>mac239</sub> を作製した。増殖曲線を評価した結果、これらの各ウイルスは、それぞれ変異導入による複製能の低下は来さなかった。

この作製した野生株および Env 変異体ウイルス群をパネルとして、NAb 誘導群及び NAb 非誘導群における各ウイルスの中和能を 10 TCID<sub>50</sub> ウイルスキリング型中和アッセイで評価した。その結果、NAb 誘導個体の血漿はいずれもおおむね、野生型 SIV

よりも変異 SIV に対する中和抗体価が低く、複数変異を有する SIV に対する中和抗体価はさらに低かった。NAb 非誘導個体の血漿は野生型 SIV に対する中和抗体価のみならず、すべての Env 変異 SIV に対して中和抗体価が陰性であった。NAb 誘導群の各頭において、野生型に対する中和抗体価と各変異ウイルスに対する中和抗体価を比較解析した結果、Env A138S、G201D、A417T、420~426 del 及び N476D はいずれも野生型と比して有意に低い中和抗体価を示し、本研究の検定水準で NAb 逃避変異と認められた。V1、V2、V4、V5 単独変異体と同様に V14mt、V124mt、V1245mt もそれぞれ NAb 逃避変異体と認められた。最後に NAb 誘導群と NAb 非誘導群につき各ウイルスに対する中和抗体価の比較を施行し、群間での中和能の差が消失する水準の存否を検討した。結果、各 Env 単独変異体に対する中和能は NAb 誘導群で依然 NAb 非誘導群より高く、V14mt、V124mt でも中和能は NAb 誘導群において保たれたが、四重変異体 V1245mt に対する中和能は NAb 誘導群で 8 頭中 5 頭で検出限界以下であり、有意に高くならなかった。すなわち、本研究における動物群を全体として見たときに、中和逃避変異体として定義できるのは V1245mt であることが明らかとなった。

本研究では中和抵抗性 SIV<sub>mac239</sub> 株に対して血漿中に NAb 誘導を示したアカゲザルの群単位における Env 標的領域の解析を初めて行った。今回評価対象とした Env 変異のうち、複数が中和逃避変異であると認められ、さらにその 2 つ以上の組み合わせにより中和能は更なる低下傾向を示した。特に V1、V2、V4、V5 領域の点変異を四重に有する Env 変異体 SIV に対する NAb 誘導群の中和能は、NAb 非誘導群と比較して

有意でない水準まで低下した。本結果は中和抵抗性 SIV に対する NAb 応答が Env の独立した複数領域を多重に標的とすることで達されている可能性を *in vivo* で初めて描出するものである。本研究は抗体誘導型 HIV 制御戦略の作出に向けて重要な知見を与えるものである。