

## 論文の内容の要旨

論文題目：臨床検体を用いた HIV 副受容体の使い分けとその変化に関する研究

氏名 大亀 路生

### 【背景と目的】

HIV (human immunodeficiency virus type 1)は CD4 受容体と共に副受容体が宿主細胞に侵入する際に必要であり、副受容体の使用法に応じて CCR5 指向性ウイルス (R5 ウイルス) と CXCR4 指向性ウイルス (X4 ウイルス)、両者の副受容体を使用できるウイルスは両指向性ウイルス (R5/X4 ウイルス) に分類される。一人の個体の中には R5 ウイルスや R5/X4 ウイルスや X4 ウイルスが混在することがあり、Dual (R5/X4 ウイルス) or MIX という意味で DM ウイルスと呼ばれる。ウイルスの感染初期には R5 ウイルスが大多数を占め、慢性感染期を経て R5/X4 ウイルスや X4 ウイルスが感染患者の約半数に検出されるようになり、その出現が CD4 陽性細胞数の減少と病期の進行に関与していると考えられている。マラビロクは CCR5 受容体を阻害することで、HIV の侵入を阻害する新規の抗 HIV 薬である。マラビロクは R5 ウイルスのみに有効であり、X4 ウイルスや R5/X4 ウイルスに感染している患者には、治療失敗につながるためマラビロクを使用する前には副受容体指向性を確認することが必要となる。副受容体指向性を決定する方法には phenotypic tropism assay (PTA) と genotypic tropism assay (GTA) の二通りがある。現在利用可能な PTA は Trofile assay<sup>®</sup>のみである。一方、GTA は、env の V3 領域を遺伝子解析し副受容体指向性を決定する。PTA はシュードウイルスを使用するため、P3 施設が必要な点や、時間がかかること、高額であることなどの欠点がある。一方、GTA は安価で迅速など利点はあるが、env の V3 領域のみの解析であること、15-25%のマイナーヴァリエントが検出できないなどの欠点がある。我々の研究室では、P3 施設がなくても副受容体使用を特定できる PTA の開発を目指した。その方法は、Dual split protein (DSP : GFP とルシフェラーゼの分割タンパク質をそれぞれ融合タンパク質として発現させ、両者を再会合することで活性が復活する特徴を有する) を用いた細胞融合法 (cell-fusion assay) である。これまでに X4 ウイルスのラボラトリーストレインを用いた実験では良好な X4 ウイルスの検出感度を得てきた。

現在の cell-fusion assay は患者由来の HIV の準種の集まった状況 (Bulk) の副受容体使用を見ており、個体内のウイルスの詳細解析はできない。そこで、96 クローンの副受容体使用を一度に決定する High throughput cell-fusion assay を作製した。そして、cell-fusion assay を臨床検体に用いて HIV 副受容体使用を評価し、クローン解析することで、cell-fusion assay の

Bulk の副受容体使用判定の特徴を明らかにした。さらに、R5 ウイルスから R5/X4 ウイルスの副受容体使用の変化に関与する領域を同定することを目的に解析も行った。

#### 【方法】

40 名の HIV 感染患者の初診後早期と経過観察後の保存血漿を用いた。Cell-fusion assay は、患者血漿からウイルス RNA を抽出し、*env* 全長遺伝子を RT-PCR で増幅し、*env*/DSP<sub>8-11</sub> 発現ベクターに組み込み、*env*/DSP<sub>8-11</sub> 発現ベクターを用いて細胞に *env* と DSP<sub>8-11</sub> を発現させる。もう片方の細胞に CD4 受容体と CCR5 副受容体 (N4R5 細胞) または CXCR4 副受容体 (N4X4 細胞) と DSP<sub>1-7</sub> を発現させ、別々に培養した細胞を合わせ細胞融合が起きるか見るものである。細胞融合が起きると、DSP が再会合しルシフェラーゼ活性 (RLU) を測定する。患者血漿中のウイルス全体をクローニングしたものを Bulk と呼び、単体のウイルスをクローニングしたものをクローンと呼ぶ。副受容体使用が Bulk で R5 ウイルス→DM ウイルスに変化した患者検体を 1 検体当たり 96 クローンを cell-fusion assay を行い、さらに各クローンの *env* V3 領域を遺伝子解析し Geno2pheno も行い、表現型と遺伝子型による解析を行った。臨床解析は初診後早期の副受容体使用が R5 ウイルスと DM ウイルスの 2 群の初診後早期からの CD4 陽性細胞数が 25%減少した時点をエンドポイントとして Kaplan・マイヤー曲線を描いた。cell-fusion assay で同じ *env* V3 のアミノ酸配列を持ち副受容体使用が異なったクローンに点変異を加え、副受容体使用の変化に関与するアミノ酸の特定を試みた。

#### 【結果と考察】

まず High throughput cell-fusion assay を作製したことで 96 検体の副受容体使用を一度に判定することを可能にした。そして、Bulk の副受容体使用判定が R5 ウイルスの 8 検体と DM ウイルスであった 8 検体をクローン解析したところ、N4X4 細胞に反応した R5/X4 ウイルスクローンの割合は DM ウイルス群で多く、N4X4 細胞の R5/X4 ウイルスクローンのルシフェラーゼ活性 (RLU) は DM ウイルス群で高い結果となり、Bulk で R5 ウイルスと DM ウイルスと判定する違いは、R5/X4 ウイルスクローンの割合と RLU の違いが関係すると考えられた。そこで N4X4 細胞にさまざまな RLU を示す R5/X4 ウイルスクローンを用いて、Bulk で DM ウイルスと判定されるために必要な R5/X4 ウイルスクローンの割合をみた。その結果、N4X4 細胞の RLU が 1000・10000 の R5/X4 ウイルスクローンは 20-40%の割合で存在すること、RLU が 10000 以上の R5/X4 ウイルスクローンは 5-20%あれば Bulk の状態で DM ウイルスと判定することがわかった。N4X4 細胞の RLU と Geno2pheno の FPR の関係をみたところ、相関係数  $r = -0.5653$  と負の相関を認め ( $P = 0.0002$ )、N4X4 細胞の RLU が高いほど Geno2pheno の FPR が低い結果となった。また N4X4 細胞の RLU が 10000 以上のクローンは FPR が 20%以下で認められた。これより、Cell-fusion assay で Bulk の副受容体使用判定において Geno2pheno の FPR が 20%のマイナーヴァリエントが存在する場合でも DM ウイルスと判定する特徴があ

ることがわかった。

Cell-fusion assay で初診後早期 R5 ウイルス (15 名) と DM ウイルス (25 名) と判定した患者 40 名の臨床解析を行い、CD4 陽性細胞数の減少速度をみたカプラン・マイヤー曲線を描いた結果、DM ウイルス群において R5 ウイルス群よりも CD4 陽性細胞数の減少が有意に早かった (Log-rank  $p=0.0155$ )。クローン解析と臨床解析の結果より DM ウイルスと判定された患者は R5 ウイルスと判定された患者よりも CD4 陽性細胞数の減少速度が早く、マイナーヴァリエントの存在と、CD4 陽性細胞数の減少速度と相関することがわかった。

クローン解析時に同じ *env* V3 のアミノ酸配列を持つもので副受容体使用が異なる 74 クローン (R5 クローン : 26 R5/X4 クローン : 48) の *env* の全長を遺伝子解析し Fisher's exact test によって解析した結果、Env C1 領域に有意差のついたアミノ酸変異を認めた。C1 領域のアミノ酸が 51N で R5 クローンである 2278-90 と C1 領域のアミノ酸が 51K で R5/X4 クローンである 2278-70 それぞれに点変異を加え (2278-90 : N→K、 2278-70 : K→N)、副受容体使用への影響を確認した。その結果、2278-90 は N4X4 細胞に対する反応を獲得し R5/X4 ウイルスクローンに変化した。一方 2278-70 は R5/X4 ウイルスクローンのままだったが N4X4 細胞に対する反応は著しく低下した。C1 領域の 51 番目のアミノ酸は、Env の C1 と C5 と gp41 のループ A 領域が相互作用しウイルスが受容体と結合する際の結合時間に関与する場所に存在する。51N→51K への変化は中性から塩基性アミノ酸の変化であり、また N 結合型糖鎖の付加がなくなることより、gp41 との相互作用に影響し副受容体使用の変化に影響する可能性が考えられた。C1 領域の副受容体使用の変化に関する報告はほとんどないことが今回の新しい知見である。

#### 【結論】

本研究では High throughput cell-fusion assay を作製し 96 検体の副受容体使用を一度に判定することを可能にした。また、臨床検体を用いた Cell-fusion assay の Bulk の副受容体使用を High throughput cell-fusion assay でクローン解析したことで、Cell-fusion assay で Bulk の副受容体使用判定において、Geno2pheno の FPR が 20% のマイナーヴァリエントが存在する場合でも DM ウイルスと判定できること明らかにし、DM ウイルスと判定された患者は R5 ウイルスと判定された患者よりも CD4 陽性細胞数の減少速度が早く、マイナーヴァリエントの存在と CD4 陽性細胞数の減少速度との相関を示したことに意義がある。そして、R5 ウイルスと R5/X4 ウイルスの副受容体使用の違いが Env V3 領域だけでなく C1 領域の違いが関与することを示したことで、副受容体使用に関する領域に関して新たな知見を示した。

今後 Cell-fusion assay が薬剤スクリーニング、細胞膜融合に必要な因子の検索、他の Env を持つウイルスへ応用など、ウイルスの基礎研究や疫学、臨床解析に利用されていくことが望まれる。