

審査の結果の要旨

氏名 大亀 路生

本研究は、患者由来のHIVの準種（個体内で様々な変異を持ったウイルスの集まり）の副受容体使用を詳細に見るための方法として96検体の副受容体使用を一度に決定するHigh throughput cell-fusion assayを作製し、臨床検体に用いてクローン解析しHIVの副受容体使用の特徴を明らかにすることを試みた。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試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. ヒトグリオーマ由来細胞株にCD4受容体、CCR5副受容体またはCXCR4副受容体、DSP1-7の3者を発現させたものをレセプター発現細胞として、ヒト胎児腎臓細胞株に患者由来のHIVのエンベロープ (Env) とDSP8-11を発現させたものをEnvタンパク質発現細胞としてそれぞれ準備し、それぞれのレセプター発現細胞との細胞融合が起きるかを見ることで副受容体使用を決定するCell-fusion assayを形質転換後から96wellプレートで行うHigh throughput cell-fusion assayを作製し、96検体の副受容体使用を一度に決定することを可能にした。
2. 副受容体の使用がR5ウイルスからDM (R5/4ウイルスまたはR5ウイルス、X4ウイルス、R5/X4ウイルスがMIXの状態) ウイルスに変化した8名の初診後早期と経過観察後の検体それぞれ合わせて16検体をクローン解析し、Bulk (ウイルスが混在した状態) でR5ウイルスからDMウイルスへ副受容体使用が変化することで、R5/X4ウイルスクロンの割合とN4X4細胞のルシフェラーゼ活性 (RLU) が上昇することを示した。
3. N4X4細胞にさまざまなRLUを示したR5/X4ウイルスクロンを用いて検出限界をみたところ、N4X4細胞のRLUが高いほどR5/X4ウイルスクロンは少ない割合で検出可能で、10000 RLU以上のR5/X4ウイルスクロンは20%存在すれば検出可能であることを示した。また、クロンのN4X4細胞のRLUと遺伝子型副受容体決定法のGeno2phenoのFalse positive rate (FPR)との相関をみたところ、N4X4細胞のRLUが高いほどGeno2phenoのFPRが低く、FPRが20%のマイナーヴァリエントが存在する場合でもBulkで検出可能でDMウイルスと判定することを示した。
4. 初診後早期40名の臨床検体の副受容体使用をcell-fusion assayで判定し、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が相関することを示した。
5. 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クロンのEnv全長を解析し、副受容体使用の変化に関与する可能性のあるC1領域の51番目のアミノ酸に点変異(Asn→Lys)を加えた結果、R5ウイルスクロンがR5/X4ウイルスクロンに変化し、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

以上、本論文は High throughput cell-fusion assay を作製し、96 検体の副受容体使用を一度に決定することを可能にし、臨床検体に用いて 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 陽性細胞数の減少が早いことを明らかにした。また、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。本研究は副受容体使用決定法を作製しその有用性を示し、Env をもつウイルスの細胞膜融合などの研究にも貢献が可能であり、また、HIV の副受容体使用に新知見を提唱したことにより、学位の授与に値するものと考えられる。