

論文の内容の要旨

論文題目 免疫不全ウイルスの持続感染・伝播における変異蓄積に関する研究

氏名 関 紗由里

ウイルス感染症において、ウイルスは宿主との相互作用により変化すると考えられる。ヒトでの増殖能を獲得したウイルスは、増殖に必要な宿主因子との相互作用能と抵抗性因子からの逃避能を有すると考えられるが、増殖能獲得後のヒト遺伝子多様性へのさらなる適応についての理解は十分に進んでいない。本研究は、ウイルスと宿主の相互作用が長期に渡り継続し病態形成にいたるヒト免疫不全ウイルス (HIV) 慢性持続感染症を対象とし、ウイルス感染・伝播におけるウイルス変化および個体における増殖能の変化を知ることを目的とした。

HIV はヒト CD4 陽性 T 細胞を標的として感染するレトロウイルスである。HIV 感染症では、慢性持続感染が成立し、最終的にエイズ (後天性免疫不全症候群) 発症にいたる。ウイルス特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 反応は HIV の複製抑制に中心的な役割を担っていることから、HIV 感染症では CTL の認識から逃れるエスケープ変異を有するウイルスがしばしば選択され、その変異がウイルス複製能の低下に結びつく場合があることも知られている。CTL の標的エピトープは、宿主の主要組織適合遺伝子複合体クラス I (MHC-I) 分子によって感染細胞表面に提示されるため、MHC-I 遺伝子型によって異なる。そのため、MHC-I 遺伝子型の異なる個体間の HIV 伝播の結果、新たな CTL 標的領域にエスケープ変異が選択されるとともに、伝播前のウイルスに存在したエスケープ変異を含む領域が CTL の標的領域でなくなることから、ウイルス複製能の回復のため復帰変異を起こす可能性も知られている。このような HIV 伝播に伴う集団

レベルでのウイルス変化・病原性変化の解明には、HIV 感染ヒト集団の解析に加え、サルエイズモデルにおける解析が必要である。

私達の研究室では、各種 MHC-I ハプロタイプを共有するビルマ産アカゲサルを用いたサル免疫不全ウイルス (SIV) 感染エイズモデルを確立してきた。特に、SIVmac239 感染後、強いウイルス複製抑制能を有する CTL が誘導される MHC-I ハプロタイプ *90-120-Ia* (A) 共有群では、複数の SIV Gag CTL エピトープおよび複製能の低下を伴うエスケープ変異が同定されている。その中で感染早期に選択される 1 つのエスケープ変異のみを有する SIV を MHC-I ハプロタイプ A 陰性サルに接種すると、感染 3 か月以内に野生型への復帰変異がみられたが、複数のエスケープ変異を有する SIV の A 陰性サルへの接種では、感染後 1 年目でも一部の復帰変異の選択しか認められなかった。この結果は、SIV 伝播において CTL エスケープ変異が維持される可能性を示唆するものである。HIV 感染ヒト集団の解析でも、集団レベルでの CTL エスケープ変異蓄積およびそれに伴うウイルス複製能の低下の可能性が示唆されている。

しかし、MHC-I 遺伝子型の多様な個体間の伝播が免疫不全ウイルスの変化に及ぼす影響について、HIV 感染ヒト集団における研究のみでは以下の解析が困難であり不十分であった。

- ① 特定の複数個体間におけるウイルス伝播の直接的な追跡
- ② 伝播によって出現した変異ウイルスそのものの *in vitro* 複製能
- ③ 伝播によって出現した変異ウイルスの新規個体における増殖能

そこで本研究では、伝播に伴う HIV 変化を明らかにすることを目的として、上の①～③について解析を行うこととした。初めに①のために、サルエイズモデルにおいて 3 代に渡って SIV 伝播実験を行い、ウイルス変化および個体における増殖能の変化を調べることとした。MHC-I ハプロタイプ A 陽性サル (1 代目) の野生型 SIVmac239 接種後 1 年目の血漿を、MHC-I ハプロタイプ A 陰性 *90-010-Ie* (E) 陽性または A 陰性 *89-002-Ip* (P) 陽性サル 2 頭ずつに接種し (2 代目)、さらに 2 代目の感染 1 年後の血

漿を、A・E 陰性 P 陽性あるいは A・P 陰性 E 陽性サルに接種した（3 代目）。その結果、2 代目の 1 頭を除いて持続感染が成立した。1 代目の感染 1 年後の血漿中ウイルス（1 代目 SIV）は多数の CTL エスケープ変異を含む非同義変異を有していたが、その多くが 2 代目のみならず 3 代目でも維持され、3 代目の感染 1 年後の血漿中ウイルス（3 代目 SIV）にも認められた。さらに 2、3 代目の個体内でも新たな非同義変異が選択され、伝播を重ねることにより変異は蓄積した。

次に②の解析として、上記の各伝播実験に用いた血漿より回収した SIV を用い、各々を感染させた培養細胞（サルリンパ球系細胞株）を野生型 SIV 感染細胞と共培養することにより、各 SIV の *in vitro* 複製能を野生型 SIV と比較した。経時的に共培養上清中の SIV ゲノムの塩基配列を調べたところ、いずれの共培養でも感染後の日数の経過とともに野生型 SIV の配列が優位となったことから、これらの伝播 SIV は野生型 SIV より低い *in vitro* 複製能を有したまま、持続感染・伝播を継続したことが判明した。

さらに③の解析のために、A 陽性サル→E 陽性サル→P 陽性サルと伝播させて得られた 3 代目 SIV と A 陽性サル→P 陽性サル→E 陽性サルと伝播させて得られた 3 代目 SIV の個体における増殖能を調べる目的で、各々の血漿を A 陽性サル 2 頭（計 4 頭）と A/E/P 陰性サル 3 頭（計 6 頭）に接種し、ウイルス学および免疫学的解析を行った。その結果、A/E/P 陰性サルのいずれも持続的なウイルス血症を示し、私達の研究室でこれまでに解析してきた野生型 SIV 接種 A 陰性サル群と同様な血漿中ウイルス量を示した。これらのサルでも、3 代目 SIV の非同義変異の多くが維持され、新たな非同義変異の選択も認められた。A 陽性サルも全頭持続感染を呈し、感染後 6 か月目の血漿中ウイルス量は、野生型 SIV 接種 A 陽性サル群（6 頭）と比べて有意に高値を示した。

以上より本研究では、先に述べた①、②の解析で、これまでの HIV 感染ヒト集団における研究結果を支持し、さらにヒトで実施することが困難な解析の結果をサルエイズモデルによって得ることができた。また③のような、伝播の繰り返しによって変化したウイルスの個体レベルの増殖能を、MHC-I 遺伝子型の特定された複数個体に感染させ

て直接解析した結果は、HIV 感染ヒト集団の研究で得ることは事実上不可能であり、本研究でサルエイズモデルを用いて初めて得られたものである。①～③の解析結果から、多様な MHC-I 遺伝子型を有する宿主間の伝播を重ねると、免疫不全ウイルスのゲノムには CTL エスケープ変異を含む多数の変異が蓄積することが明らかとなった。さらに、このような変異を蓄積したウイルスは、培養細胞レベルで野生型より低い複製能を有するが、個体内では野生型と同様なウイルス量を示し、特に感染・伝播を一度経由した個体と同じ MHC-I 遺伝子型を有する別の個体に新規感染した際に高い増殖能を示す可能性を見出した。したがって、HIV はヒト集団での伝播の繰り返しの伴い、より高い病原性を示す可能性が示唆された。本研究結果は、MHC-I の遺伝的多様性を有する個体間の伝播における HIV の変化（進化）を推定するための論理基盤として重要と考えられる。