

論文内容の要旨

論文題目 日本人集団におけるヒト免疫不全ウイルスのエスケープ変異と
ウイルスの増殖・病態に関する研究

指導教官 岩本 愛吉 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 16 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

古賀 道子

1 型ヒト免疫不全ウイルス (Human immunodeficiency virus type 1 : HIV-1、本要旨では HIV と表記する)は、ヒトに後天性免疫不全症候群(Acquired immune deficiency syndrome : AIDS)を引き起こす原因ウイルスである。HIV は主に、CD4 陽性 T リンパ球とマクロファージ系の細胞に感染し、感染後 1~2 週間にウイルス血症となり、発熱などの急性感染症状を呈する。HIV 特異的な細胞傷害性 T リンパ球 (cytotoxic T lymphocyte : CTL)が速やかに出現し、その増加と共に血中ウイルス量は減少するが、ウイルスは完全に排除されず無症候期へと移行する。この時期に血中 HIV-RNA 量は個々人で比較的安定し(セットポイントとよぶ)、セットポイントは予後を規定する重要なパラメーターであり、その値が低いと AIDS 発症が遅いといわれている。HIV のコントロールには CTL が重要であり、

CTL は主要組織適合抗原複合体（ヒトはヒト白血球抗原 (human leukocyte antigen : HLA)) class I 分子によって提示されている抗原ペプチド(エピトープ) を HLA class I /ペプチド複合体の形で認識する。HLA は多様性に富み、各々提示できるペプチドが異なる。又、HIV は一本鎖 RNA をゲノムとして持つレトロウイルスで、複製エラー頻度が高く (約 $1/10^4$ 塩基)、1 回の複製で平均 1 箇所の変異が入りうる。1 日に約 1×10^{10} 個のウイルス粒子が産生され、HIV は感染個体内で種々の変異をもつ多様なウイルス集団として準種 (quasispecies) を形成していく。一方、感染個体の一時点をとってみると、良好な増殖フィットネスを持つウイルスが準種の中で優位となる。さらに、宿主の自然免疫、獲得免疫などにより、強い選択圧を受けながら HIV は増殖する。

宿主側の要因で、HIV の病態進行に大きな影響を与えるものに HLA-class I 分子がある。日本人が HLA-A24 (以下 A24) を有する割合は 6~7 割 (欧米は 1 割前後) に及び、日本人は 1 つの HLA に偏った集団群といえる。Nef 領域 138 番目のアミノ酸から始まる Nef138-10(RYPLTFGWCF) が A24 に提示されるエピトープの 1 つであるが、2004 年に、当研究室では、Nef138-10(-1T2F) (TREPLTFGWCF) という変異 HIV が流行していることを報告した。これは、CTL の攻撃から逃れるエスケープ変異と推測されている。即ち、現在の日本では、高い A24 保有率の集団の中で特定のエスケープ変異体が流行している状態である。従って、この HIV 変異体が病態進行に影響を及ぼす可能性が考えられたため、実際の患者における HIV-RNA 量を解析し、病態進行に与える影響を解析することを目的とした。

東京大学医科学研究所附属病院に通院し、2006年9月の時点でHLA-A,B型が判明しているHIV感染者391人を対象とした。当研究所のガイドラインに従って対象者からインフォームドコンセントを得た。日本でHIV感染者が初めて確認されたのは1983年であり、米国より輸入された血液製剤を介して感染した血友病感染者であった。しかし、その後の国内でのHIVの感染経路は大きく変化し、現在は国内での性感染が主流となっている。まず、約20年前にA24抗原の保有者が少ない米国で流行したHIVに感染した血友病群と2000年以降にA24抗原の保有者が多い日本国内で流行しているHIVに感染した性感染群で比較し解析した。無症候期の1時点をセットポイントの代わりに用い、未治療でAIDS発症のない感染者群(CD4>100)に対象を絞ったため、血友病群ではA24抗原の有無に関わらず、HIV-RNA量が低い傾向になった(Mann-Whitney U test, $p<0.0001$)。血友病群の感染時期はおおよそ1980年前後であり、当院初診が1995年以降の集団の為、この頃まで無治療であった群は進行の遅い部分集団の可能性があり、本解析ではA24の影響は断定できないと考えられた。

次に、2000年以降に感染が判明し、セットポイントが算出(HIV-RNA量のセットポイントは、未治療で、ある時点を中心に2ヶ月以上間隔が開き、かつHIV-RNA量が5倍以内の3時点でのHIV-RNA量平均値を採用した。)され、日本国内で性感染した対象群を作製した。この対象群(n=97人)を、欧米のデータで比較的予後が良いといわれるHLA-B51(以下B51、日本人・欧米人共に1~2割が保有する)の有無で解析するとB51抗原を保有する感染者のセットポイントは非保有感染者よりも低いことがわかった(同解析 $p=0.0239$)。つまり、

日本人集団でも B51 抗原を保有する感染者は非保有感染者より予後が良い可能性があると見える。しかし、日本人の 6~7 割が陽性で、CTL エスケープ変異 HIV が流行している A24 抗原では、その有無でセットポイントに差はなかった (同解析 $p=0.3946$)。A24 抗原を含んだハプロタイプでの解析では、日本人に頻度の高い 2 つのハプロタイプ (A*2402-B*5201-Cw*1202-DRB1*1502、A*2402-B*0702-Cw*0702-DRB1*0101) で試みたが、有意差は無かった。

以上よりセットポイントを用いた解析から、A24 抗原が高頻度の集団で、A24 拘束性のエスケープ変異 HIV が流行している 2000 年以降でも A24 抗原はその予後にあまり影響せず、病態進行にニュートラルな HLA である可能性が高いと考えられた。

又、当研究室で、A24 陰性感染者の体内で、Nef138-10(-1T2F)をもつ HIV は血中から減少し少なくとも 5 年以上要するものの消失しており、野生型エピトープを持つ HIV が主要なウイルスとなったこと (復帰変異) が示された。このエスケープ変異 HIV は感染個体で増殖しにくく、ウイルスの増殖能が低いいため、A24 の拘束性の無い個体では増殖能にすぐれていた元の配列へと復帰変異が起こったと推測された。

そこで、この Nef138-10 を持つ HIV と Nef138-10(-1T2F)を持つ HIV では、ウイルス自身の増殖能に差異があるのではないかと考え確認することにした。

HIV SF2 株の Nef138-10 部分を Nef138-10(-1T2F) に変異させた HIV (SF2 (-1T2F)) を作製し、Nef138-10(wt)を持つ HIV (SF2(wt)) との増殖能を比較した。まず、各々作成した HIV を PM1 細胞(T 細胞系) に MOI0.0007 で、末梢血単核

球に MOI0.0001 で単独感染させたが、共に増殖能に差は見られなかった。微妙な増殖能を検出するために、2種類の異なった HIV を競合感染させ、その比の推移を時系列でみることで、増殖能の微妙な差を検出するよう計画した。SF2(wt) と SF2(-1T2F)を PM1 細胞に MOI 0.001 で感染させ、2 : 8, 8 : 2 の比で混合、培養を開始し、3~4 日おきに上清を新しい PM1 細胞に再感染させた。上清中の p24 量の時系列変化を追い、HIV が PM1 細胞に感染し、増殖し続けていることが確認された。4、8 週間後の上清中の HIV Nef138-10 のシーケンス解析を 20 クローンずつ施行し、その割合の経時変化をみた。観察期間を 8 週にのばしても、その比は変わらず増殖能の差は検出できなかった。

1 塩基変異部位を nef 以外の RT 領域(pol の一部)にもつ SF2(M184V)を複製し、SF2(wt)との増殖能を比較した。M184V は、逆転写酵素阻害剤を使用中の薬剤耐性変異としてよく知られており、野生型より増殖能の低いことが知られている。その実験からも、採用した HIV 株の複製能が低く、変化を検出するのにより時間がかかった可能性が示唆された。加えて、注目したエピトープが、nef 部位での変異であり、臨床的にも、in vivo でみられる nef 部位の復帰変異は他の構造遺伝子部位より時間がかかっている (nef : 5 年以上、gag : 2~4 年)。そのため、より増殖能の差を検出しにくかったといえる。さらに、Nef は、in vivo では他の細胞との相互作用が知られており、T 細胞単独に感染させる実験系では、結果が出しにくかった可能性もある。

以上より、A24 抗原の有無でセットポイントに差はみられなかった。すなわち、日本人感染者にエスケープ変異が流行している可能性を示唆した報告

はあるが、2000年以降に感染が明らかになった感染者においても A24 抗原は予後を悪化させていない。In vivo では減衰が極めて遅い変異であるという事実はあるが、in vitro の増殖実験もこれを支持しているものと考えられる。CTL による選択圧、エスケープ変異の出現と選択、エスケープ変異の社会的流行、以上の事実があっても HLA-A24 抗原が進行を早める方向に働いていない理由の1つとして、増殖能が野生型と変異体でほとんど変わらないことが考えられた。

本研究では、HLA-class I 抗原によっては抗原の保有率は HIV 感染症の病態進行に関係がないことを始めて明らかにした。民族差 (HLA 頻度の差) があっても HIV 感染症の予後は変わらない可能性がある。今後は CTL を利用した治療ワクチンの開発などでエスケープ変異体の増殖能をより低下させることができれば、病態進行をむしろ遅延させることができ新たな治療法の開発に結びつくと考えられた。