

論文の内容の要旨

論文題目 獲得及び自然免疫機能から見た HIV 感染者の病態研究

氏名 菊地 正

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染症は、多剤併用抗 HIV 療法の進歩により、血液中のウイルス量を検出限界以下にまで抑制することが可能になり、AIDS による死亡者数は激減した。しかし、抗 HIV 薬による長期の副作用や薬剤耐性の出現、早期老化や心血管疾患リスク、さらには免疫系の破綻による悪性腫瘍や様々な感染症のリスクが依然として懸念され、HIV 予防ワクチンや新たな機序の薬剤の開発、Functional Cure (抗 HIV 療法なしにウイルスの抑制あるいは免疫系の破綻を防ぐ) に向けた研究、HIV 感染者における様々な感染症への有効なワクチン接種方法についての研究等の重要性がさらに増している。

HIV 感染者の中には、抗 HIV 薬の投与をせずに、血漿ウイルス量を検出限界以下 (<50copies/mL) にまで、長期間自らコントロールできる患者群が存在し、エリートコントローラー (EC) とよばれており、Functional Cure の自然モデルと考えられる。

EC を規定する宿主側因子として HLA class I が大きく関与することが知られており、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) によるウイルス制御の重要性が示唆されている。その他にも様々な宿主因子と EC との関連が明らかとなってきたが、今まで知られている宿主因子のみでは全ての EC を説明することはできない。また、ウイルスタンパク **Gag, Pol, Env** などの機能が EC において低下していることも近年報告され、宿主因子とウイルス側因子の双方がエリートコントロールに関与している可能性が示唆されてい

る。EC に関わる新たなウイルス側因子を解明することにより、新たな治療薬の開発や、**Functional Cure** へ向けた研究に重要な示唆を与えられたい。

また、HIV の制御には、獲得免疫機能とともに、apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G (APOBEC3G) などの自然(あるいは内因性)免疫が重要であることが近年知られるようになってきた。APOBEC3G は HIV の逆転写の阻害あるいは逆転写の過程でマイナス 1 本鎖 DNA のシトシン残基を脱アミノ化し、ウラシル残基に変換することにより、ウイルス複製を阻害する。HIV-1 アクセサリー蛋白の一つである Vif はウイルス産生細胞において APOBEC3G を分解に導き、正常なウイルス複製を維持している。Vif は末梢血リンパ球でのウイルス複製に必須であるが、Vif の機能と EC との関連についての知見はほとんどない。Vif を新たな治療薬やワクチンのターゲットとして研究する際に、Vif の機能と臨床的なウイルス抑制との関連を、臨床検体を用いて調べるのが求められている。

次に、HIV 感染症では獲得免疫機能の疲弊と機能低下が重要な役割を担っていることが知られてきた。そのため、HIV 感染者は様々な感染症や悪性腫瘍のリスク集団であるのみならず、様々な感染症に対する予防ワクチンにおけるプライム効果の低下と、長期的な抗体価の維持やブースター効果の低下が報告されている。2009 年にパンデミックとなったインフルエンザ(H1N1)2009 は多くのヒトにおいて新たな抗原であり、インフルエンザワクチンのプライム効果と、2 年目の 2 回目の接種のブースター効果を臨床的に評価できる初めての機会を与えることとなった。この知見は、今後、新たなインフルエンザが出現した際の、HIV 感染者に対する望ましいワクチンの接種回数についても重要な示唆を与える。

以上のような背景から、HIV 感染者における病態を自然免疫機能(APOBEC3G)に対するウイルス側戦略(Vif の機能)と、インフルエンザ(H1N1)2009 ワクチンに対する獲得免疫機能の 2 つの点から患者検体を用いて研究することを目指した。

第 1 部の自然免疫機能とウイルスの抗自然免疫戦略の観点からは未治療の HIV-1 エリートコントローラーにおける HIV-1 Vif タンパクの抗 APOBEC3G 活性について検討を行なった。米国あるいはドイツで集められた HIV 感染者(EC49 人、慢性期非コントローラー(NC)49 人、急性期感染者(AI)44 人)の血漿から超遠心法により抽出された RNA を用い、*vif* 遺伝子を nested RT-PCR により増幅し、C 末端 FLAG タグ付き哺乳類発現ベクター-pCAGGS に挿入し Vif 発現ベクターを作製した。これら患者由来 Vif 発現ベ

クターと、水疱性口内炎ウイルスグリコプロテイン (VSV-G) 発現ベクター、ルシフェラーゼレポーター遺伝子を有する *vif*・*env* 遺伝子欠損型 HIV-1 プロウイルス DNA、及び APOBEC3G 発現ベクターを 293T 細胞へ導入し、シュードウイルスを作製した。得られたウイルスの Gag p24 抗原量を測定し、等力価で 293T 細胞に感染させた。細胞内ルシフェラーゼ活性 (RLU) により感染性を定量化し、各々の患者由来 Vif の抗 APOBEC3G 活性を評価した。その結果、EC 由来 Vif は、NC または AI 由来 Vif と比較して、有意に抗 APOBEC3G 活性が低下していた (EC vs NC: $p < 0.0001$, EC vs AI: $p < 0.0001$, Mann-Whitney's test)。EC との関連性が知られている HLA-B*57 または HLA-B*27 保有者を除いた解析においてもこの結果は影響を受けなかった。それ以外の HLA class I と Vif の抗 APOBEC3G 活性との有意な相関も認められなかった。*vif* 遺伝子のシーケンス解析では APOBEC3G との結合を含むユビキチン複合体形成に重要な領域は保存されており、EC 全体に特異的なアミノ酸変異も存在しなかった。このことから今まで知られていない領域の統計学的には検出できないマイナーな変異やそれらの組み合わせなどが全体として EC 由来 Vif の機能を低下させている可能性が考えられた。EC 由来 Vif の機能が低下している要因として、ウイルス側因子の結果として EC となった可能性と、EC の宿主因子の結果として Vif の機能が低下した可能性の両者が考えられ、Vif の機能あるいは、Vif に対する宿主免疫が臨床的に重要であることが示唆された。

第 2 部の HIV 感染者における獲得免疫機能の観点からは、インフルエンザ (H1N1) 2009 ワクチンに対する中和抗体価の 2 年間にわたる推移を成人日本人 HIV 感染者において検討し、多くの人にとって新たな抗原と考えられるインフルエンザ (H1N1) 2009 に対する最初のワクチンによって誘導される中和抗体価と、2 年目の 2 回目のワクチンによって誘導される中和抗体価が HIV 感染者においてどのように異なるかを調べた。接種 2 ヶ月後の中和抗体有意上昇率 (接種前の抗体価と比較し接種後の抗体価が 4 倍以上上昇した被験者の割合) は 2009/2010 シーズン 49.0% (50/102, 95%CI: 39.0%-59.1%) であったのに対し、2010/2011 シーズンは 66.7% (42/63, 95%CI: 53.7%-78.1%) へと有意に上昇した。中和抗体価幾何平均は、2009/2010 シーズンはワクチン接種時 4.4 倍 (95%CI: 3.3-5.7 倍)、接種 2 ヶ月後 19.0 倍 (95%CI: 13.4-26.8 倍)、接種 4 ヶ月後 13.7 倍 (95%CI: 9.3-20.2 倍) であったのに対し、2010/2011 シーズンはワクチン接種時 8.3 倍 (95%CI: 5.8-11.7 倍)、接種 2 ヶ月後 47.0 倍 (95%CI: 32.2-68.6 倍)、接種 4 ヶ月後 38.2 倍 (95%CI: 23.8-61.4 倍) と接種前後の各時点で、1 年目より 2 年目で有意に高かった。抗体有意上昇と

現在あるいは過去の CD4 陽性細胞数、HIV-RNA 量、抗 HIV 療法の有無との間には有意な相関は認めなかった。この研究により、HIV 感染者において、パンデミック最初の年のインフルエンザ(H1N1)2009 ワクチン 1 回接種による免疫反応は低いものの、免疫記憶は 1 年間持続すること、2 年目のワクチン接種がブースター効果をもたらすことが明らかとなった。また、今後新たなインフルエンザが出現し、同様の不活化ワクチンを用いる場合には、HIV 感染者に対し初回は 2 回以上の接種が望ましいことが示唆された。