

## 論文の内容の要旨

論文題目 HIV-1 *gag* 遺伝子に関連したウイルス複製能の経年変化の研究

氏名 野村滋

ヒト免疫不全ウイルス 1 型 Human Immunodeficiency type I (HIV-1) は、宿主の免疫選択圧によって急速に進化する。一方、宿主では、細胞傷害性 T 細胞 Cytotoxic T Lymphocyte (CTL) が HIV-1 の免疫応答に重要な役割を果たしていると考えられている。CTL は、宿主の HLA に拘束されており、HIV-1 *gag* 領域のエピトープは CTL の最も重要な標的とされている。日本人の HLA alleles の頻度は、HIV-1 の研究が盛んな欧米諸国、患者が最も多いアフリカの人種とは異なっており、ウイルスにとっての宿主内の免疫的な環境が異なると考えられる。また、北米では、最近では同性間性交での感染に加え異性間性交での感染や、注射薬物使用による感染拡大もあり、HIV-1 感染患者の多くが同性間性交である日本人とは社会的環境も異なっている。日本で流行が始まってから今日までに、HIV-1 は欧米とは異なる進化をしている可能性がある。本研究では、HIV-1 に感染した AIDS を発症していない慢性期にあり、未治療の 177 人の日本人を対象に、HIV-1 *gag* の塩基配列、subtype を同定し、日本で流行している HIV-1 subtype B Gag に関連したキメラ NL4-3 の複製能を調べた。177 検体中 168 検

体で gag-protease の増幅に成功し gag の塩基配列を同定することができた。168 検体中 158 検体はサブタイプ B であった。

サブタイプ B 以外のウイルス (n=8)、recombinant ウイルス (n=2)、実験過程の汚染が疑われるウイルス (n=2) を除外し、計 156 人の未治療、慢性感染期の日本人の HIV-1 感染患者を対象とし、複製能の実験、解析を行った。流行初期に分離された HIV-1 の機能的性質は、近年のそれと異なっている可能性があるが、ウイルス複製能の変化を調査した研究はほとんど見当たらない。本研究では、流行初期と近年とで、日本人から得られたウイルス由来の Gag-Protease に関連した複製能を比較した。gag-protease をコードしたキメラ NL4-3 を作製するために、156 人の未治療、慢性感染期の日本人 156 人から得られた HIV-1 subtype B からキメラ NL4-3 ウイルスを作製し、LTR-driven GFP-reporter T cell line に感染させ、感染の増加率を計算し、複製能とした。その結果、キメラ NL4-3 の複製能は、診断された年と有意な負の相関を示し、ウイルス複製能は経年的に低下していることが示唆された。病期による影響を考え、病期の指標となる臨床マーカーである CD4 陽性 T 細胞数とウイルス量を加味した多変量解析を行い、同様の傾向を認めた。同様の考えから、比較的高い CD4 陽性 T 細胞数を維持している患者由来のウイルスのみで解析を行い、複製能と診断された年の有意な負の相関を認めた。次に、本研究での対象期間内にそれまでとは異なる系統の HIV-1 subtype B が日本に持ち込まれ、新たに増加し始めた場合の影響について検討した。Los Alamos National Laboratory の HIV-1 塩基配列データベースの北米の塩基配列を含めた系統樹を作成した。系統樹上で日本のウイルス由来の塩基配列のみで形成される cluster がいくつか存在したが、HIV-1 感染診断年に偏りは見られず、最も大きな cluster は 55 の日本人由来のウイルスで形成されていた。最も大きな cluster を形成した 55 の塩基配列に限定して複製能と診断年との解析を行ったが、やはり複製能と診断された年の有意な負の相関が認められた。これは、本研究での結果が、異なった lineage の subtype B HIV-1 が新たに日本に持ち込まれたためではないと考えられた。さらに、本研究ではバックボーンである NL4-3 の

*gag-protease* を患者の *gag-protease* に置換しているため、NL4-3 と患者の *gag-protease* との間の遺伝的な不適合が経年的に大きくなり、その影響で複製能が低下している可能性がある。そこで、NL4-3 と患者由来の *gag-protease* の遺伝的距離を計算し、NL4-3 と患者由来の塩基配列の遺伝的距離とウイルス複製能の相関を調べた。その結果、遺伝的距離とウイルス複製能との相関はみられず、遺伝的距離を含めた多変量解析でウイルスの複製能と診断された年との有意な負の相関をみとめた。したがって、日本において *gag-protease* 関連の HIV-1 複製能が経年的に低下傾向を示しているという結果は、NL4-3 と近年の患者から得られた *gag* との遺伝的な不適合が原因ではないと考えられる。Protease は Gag のスプライシングに関連する酵素であり、Gag と Protease の適合の程度が複製能に影響する可能性があり、それを避けるために本研究では患者の protease を含んでいる。Protease 阻害薬に対する major 耐性変異は 12 個報告されており、本研究で対象となった 156 検体中 140 検体の protease 塩基配列を同定し、Protease 阻害薬耐性変異は 6 検体で存在した。Protease 阻害薬耐性変異が存在しない 134 検体で複製能と診断された年との相関を調べると、やはり有意な負の相関を認めた。このように、交絡因子を考慮した上での解析でも、ウイルス複製能と診断された年の有意な負の相関はみられ、日本で HIV-1 の流行が始まってから今日までの間に、Gag-Protease に関連した HIV-1 の複製能は低下してきていることを示唆する。

HLA class I alleles を介する免疫選択圧が、本研究で認めたウイルス複製能の経年的低下に関与している可能性について検討した。ある特定の HLA class I alleles の有無でウイルスの複製能を比較したが、HLA class I の発現とウイルスの複製能に有意な相関をみとめる HLA alleles は存在しなかった。しかし、HIV-1 の診断された年で、流行初期（2002 年以前）と近年（2003 年以降）とで 2 群に分けて解析を行うと、流行初期では HLA-A\*24 を発現している患者から得られたウイルスの複製能は、HLA-A\*24 を発現していないウイルスの複製能より有意に低下していた。そして、近年では、HLA-A\*24 の発現の有無でウイルス複製能に有意差はなく、流行初期での HLA-A\*24 を発現している患者から得られたウイルスと同程度に

複製能は低かった。このような現象は、他の HLA alleles ではみられなかった。A\*24 関連逃避変異により複製能の低下したウイルスが、A\*24 を発現していない患者に伝播し保持されることによって、集団レベルで日本人集団内に増加していったという可能性が考えられた。最後に、本研究でのデータを用いて、ウイルス複製能に関連するアミノ酸変異の同定を試みたが、統計学的に有意な関連を示すアミノ酸変異は存在しなかった。

本研究では、過去 15 年間で、日本で流行している HIV-1 の *gag-protease* に関連した HIV-1 複製能が有意に低下してきていることを示した。多くの交絡因子が存在する可能性があるため、主な交絡因子に関して検討を加えた。本研究での結果が日本特有な現象なのか、一般的な現象なのかを調べるために、より大規模な研究を行い、他の地域や宿主集団でも確認する必要があるだろう。