

研究課題：アジア及び太平洋地域における HIV 感染症の疫学に関する研究

課題番号：H15-エイズ-019

分担研究者：駒野 淳（国立感染症研究所 エイズ研究センター 第3室 主任研究官）

分担研究課題：日本人エイズ長期未発症者におけるエイズ発症に影響を与える遺伝学的・免疫学的要因の探索－クレードをこえたウイルスにも有効な中和抗体の同定

研究要旨

エイズの病期進行を制御する要因には遺伝的背景、ウイルス、免疫学的因子があげられる。HIV 感染血友病患者群はウイルス暴露時期が特定できるために、病期進行分類に基づく群間比較によりエイズの病期進行を制御する要因の解析に非常に適している。我々は日本人 HIV 感染血友病患者群コホートを解析し、長期エイズ未発症者にクレードをこえたウイルスにも有効な高い中和抗体価—ウイルス複製を90%抑止する血漿希釈倍率が1万倍希釈をこえる—をもつ複数の症例を認めた。本研究の成果は中和抗体誘導型治療・予防ワクチン開発に適切な標的エピトープを示唆すると同時に、モノクローナル抗体の樹立により抗体医薬を開発することにより受動免疫によるエイズ予防・発症阻止法の開発も期待できる。

A. 研究目的

HIV に感染した方でエイズを発症していない患者が存在する。発症しない原因を究明することによってエイズ治療法の糸口が掴めると考えられる。このような症例を対象にした研究により、遺伝的背景（CCR5d32 など）、ウイルス（nef 欠損株など）、免疫学的因子などがエイズの病期進行に関与することが報告されている。この種の研究の多くはコホートによる解析であるが、コホートはその対象の差異（地域格差、性差、遺伝的背景、感染ルート）により結果に違いがあることがまれではない。確実に複数のコホートで同じ結果が出ているのは、CCR5, CCR2, HLA-B52 など一部の要因に限られる。日本人特有の遺伝的背景あるいは日本人 HIV-1 感染者由来の抗エイズ因子についての研究は大きく遅れている。

日本では 1980～1985 年にかけて血液製剤によ

って HIV が血友病患者に暴露された。その結果当時日本の血友病患者の約 40%、1411 名が感染した。そのうち、現在までに 581 名（感染者の約 41%）が死亡している。HIV 感染血友病患者群はウイルス暴露時期が特定できるために、病期進行分類に基づく群間比較によりエイズの病期進行を制御する要因の解析に非常に適している。また、定期的に通院するため、medical record が比較的豊富であるという利点もある。

我々は HIV seropositive 日本人血友病患者でエイズ未発症例の血漿中に含まれる抗 HIV-1 因子に着目してエイズ病期進行と関連する液性因子（immune correlate）探索を試みた。

B. 研究方法

1980～1985 年に非加熱血友病第製剤で HIV-1 に感染したと思われる血友病患者群を、2000 年

までにエイズを発症したグループ (Progressors, PR)、エイズ未発症のグループ SP に分ける (表 1)。HIV 陰性の血友病患者群 (HIV(-), sero-negative, SN) を対象群とした。PR 群の患者は薬剤投与をうけているもの、死亡した例を含む。我々は CD4 カウント 200 を抗レトロウイルス薬投与開始の目安にした。

ウイルスは分子クローンとして標準的な HXB2, NL4-3, JR-CSF, JR-FL, NH1 を、primary isolate は患者由来のウイルスと Polonis らが virus panel として供給しているウイルス株である (J Virol 2005 参照)。

ウイルス複製抑制活性は、MT-4 を用いた CPE アッセイ、LuSIV を用いたレポーターアッセイ、NP2CD4CCR5 を用いて細胞培養上清に含まれるウイルス抗原 p24 量を ELISA にて測定する系などを用いた。

(倫理面への配慮)

国立感染症研究所と荻窪病院の倫理委員会の審査承認を得て、患者の同意の上研究を遂行する。

C. 研究結果

抗 HIV 活性の有無を検索するために、HIV-1-induced CPE の形成が plasma 存在下で抑制されるかを HXB2-MT-4 系にて調査した。血漿非存在下における CPE を陽性コントロールとすると、HXB2 感染によって誘導される MT-4 細胞の giant cell 出現はいくつかの SP 由来の plasma によって強く抑制され、その抑制が濃度依存的であることが判明した (図 1)。SN にも anti-HIV 活性が観察されたがその例数はわずかであった。CD4 陽性 HeLa 細胞に HIV-1 を感染させたときに multinuclear cell 出現が観察される。いくつかの SP 由来の plasma はこの multinuclear cell 形成も抑制することが観察された (data not

shown)。

次に全症例における Plasma anti-HIV-1 活性の定量を行い、群間比較を行った。そのため、ウイルス複製を 90%抑制するのに必要な最大血清希釈倍率 (Receptor dilution for 90% maximal inhibition of HIV-1 replication, RDI90) を JR-CSF-NP2/CD4 /CCR5 系にて測定した。まず、JR-CSF (2.5 ng p24 相当) に希釈したプラズマを混合し、37°C で 30 分 incubate する。これを NP2/CD4 /CCR5 細胞に暴露し、細胞を洗浄して、培養 4 日後の培養上清中の p24 値を ELISA にて測定した。コホート全例を調査した結果、RDI90 が顕著に高い症例が SP 群に見いだされた (表 2)。RP に比べて統計学的に有意に高い RDI90 を有する症例が SP に多かった ($P < 0.05$ 、Fisher's exact-test)。同様の結果は異なるウイルスと細胞の実験系 (HXB2/LuSIV 系) にても得ることが出来た (data not shown)。この結果を受けて、複製宿主をより relevant にするため、高い RDI90 を持つ症例の plasma が PMBC でのウイルス複製を抑制するかを検討してみた。SN 血漿を 1:2500 希釈しても JR-FL の複製は血漿非存在下とほぼ変わらなかった。つまり、この倍率では非特異的 anti-HIV-1 activity は検出されないことを意味する。一方、高い RDI90 の代表例である SP の case 7, 8, 9 の血漿は 2500 倍希釈で完全に JR-FL の複製を抑制した。さらに physiological relevance を達成するために、SP case 8 の血漿が持つ PBMC における Primary isolate に対する複製抑制力を評価した。これには BaL (clade B) を使用した。その結果、20,000 倍希釈までウイルス複製を抑制するが、40,000 希釈では血漿非存在下と同程度の複製 profile となった。40,000 希釈のウイルス増殖 kinetics は SN 血漿存在下の BaL 複製とほぼ同じであった。NP2 system における SP case 8 の RDI90 は 12,800

倍であった。両結果はお互いよく一致するものである。以上のことから、SP の血漿の anti-HIV-1 activity は PBMC における primary isolate の複製をも強力に抑制することが判明した。

次にウイルス複製抑制活性が plasma 中の immunoglobulin かどうかを試験した。Plasma を多く得ることが出来た RDI90 の高い SP 症例 3 例と SN および healthy donor-derived plasma(control)から protein A agarose affinity chromatography により回収された Ig 分画にウイルス複製抑制活性が検出されるかを HXB2-LuSIV、NL4-3-LuSIV system および JR-CSF/NP2 system で検査した。その結果 control, SN では全くウイルス複製を抑制しないが、SP case7, 4, 8 は約 62, 31, 8ug/ml がそれぞれ 90%RDI に相当することが判明した(図 2)。これは血漿中を 10,000 倍希釈して得られるイムノグロブリン濃度とほぼ一致する。一方、protein A sepharose による immunoglobulin depletion にてウイルス複製抑制活性はほぼ検出限界以下となった。以上から、HIV-1 複製抑制活性は中和抗体によるものであることが強く示唆された。

Nab の標的は chemokine receptor ではないらしい。なぜなら、中和抗体が R5-tropic virus と X4-troic virus の両方のウイルス複製を抑制するからである。CD4 に対する monoclonal antibody clone RPA-T4 は HIV-1 の Env と相互作用する部分に結合して、ウイルスの感染を阻止する活性がある。ウイルス複製を阻止する濃度の患者血漿で処理した CD4 陽性細胞に FITC-labelled RPA-T4 を作用させると、蛍光シグナル陽性となる。故に、中和抗体は CD4 に結合して HIV-1 感染を block する自己抗体ではないことが示唆された(data not shown)。

中和抗体はウイルスの Env を標的にすると考えられたため、その epitope mapping を行った。

その結果、V3 loop も、2F5/4E10 の認識する中和エピトープも本抗体の標的ではないようであったが、CD4BS/CD4i が epitope である可能性が示唆された。そのため、その部位に変異を導入した感染性を有する分子クローンに対する中和活性を検索したところ、N425R 変異により中和感受性が大きく減弱すること、しかし高濃度の immunoglobulin 存在下では複製を抑制することから少なくとも CD4BS が epitope の一部かあるいは N425R 変異により誘導される Env の立体構造変化部位が中和抗体の epitope であることが示唆された。また、他にも中和に供する抗体が複数存在すること、症例によって epitope の違いが存在することなどが明らかになった(図 3)。

血漿を 2500 倍以上希釈すると、SN 由来の血漿に HIV-1 複製抑制活性は検出されない。そこで血漿の希釈倍率 2500 倍で高い RDI90 値を持つ 3 症例の SP 由来の plasma に primary isolate に対する抗ウイルス活性を示すかどうかを検討した。使用した primary isolate は患者由来のウイルスと、全世界から集められたクレイド A, B, C, D, AE, AG で V.R. Polonis らの提唱する vaccine candidate を validate するための virus panel から pick up した(表 3)。R5-tropic および X4-tropic virus を含んでいる。Healthy donor-derived CD8-depleted PBMC を感染宿主として 3 症例および SN 由来の plasma をテストした。ウイルスの複製は培養上清中に含まれる p24 抗原量にて評価した。その結果、血漿の希釈倍率 2500 倍ですべての primary isolate の複製をほぼ完全に抑制した。

D. 考察

HIV に感染しても発症が遅延する原因を探索することは、感染が認められた後 15 年以上たった今にして可能となった研究であり、ウイルス

がみつかつて15年以上経ちウイルスの性質や宿主との相互作用に関する情報が蓄積した今こそ詳細な発症遅延研究が可能である。その意味で本コホートをを用いた研究は非常に意味のあるものと思われる。

そもそも感染次期特定が困難である HIV においては、厳密には長期未発症に移行する割合が本コホートと他のコホートと高いかどうかを比較することは難しい。一方で PR と SP を比較して SP により高い RDI90 例が統計学的に有意に多く存在することは驚きである。中でも特記すべきことは、clade B のウイルスにより感作されたにもかかわらず患者由来の中和抗体はクレイド B 以外のウイルスを中和したことである。これは、この中和抗体の誘導されたメカニズムや抗原エピトープの詳細を解析することで免疫源やその投与方法を工夫すれば中和抗体誘導型ワクチンの開発が可能かもしれないことを示唆する。

なぜクレイド B に暴露された individual に、広いクレイドに対して有効な中和抗体が生じたのか？その原因は（1）virus の持つ Env が特に優良な中和抗体誘導をしやすい抗原であった可能性、（2）感染した virus の特性が特殊であった可能性、（3）感染ルートや感染源になされた処理などが特殊であった可能性、（4）これらの患者がもともと特異な免疫力を持っていた可能性などが考えられる。同時期に同じ製剤で同様のスケジュールで感作された血友病患者が必ずしも一様に高い中和抗体価を有していないことから Env そのものが優良な抗原であったことは否定的である。また高 RID90 症例から分離された HIV は他の primary isolate と比較して複製能、遺伝情報などに特記すべき違いはなく、ウイルスそのものが特殊であった可能性も低い。感染ルートも特殊とは言えないが、ウイルスを非加熱血液製剤として調整するプロセス

には中和抗体を誘導しやすいようなウイルスを作出する原因となったものがあるかもしれない。PR が相当数存在したことを考えると、この可能性もあまり高くないと思われる。現在血友病患者が健常人と比較して凝固系以外に免疫力が質的に異なっていることを示唆するデータは存在しない。実際、これらの患者の一般的な免疫力の指標の血清生化学的所見には他と大きな差はなかった（例えば、NK 活性、Ig の濃度、Ig の分画など）。よって、中和抗体誘導の成否は個人の持つ特定の免疫力の差に依存することが高いかもしれない。この詳細な解析は今後の検討課題である。患者の免疫力と高力価中和抗体の保有について関連があるかを調べるうえで、HLA は意味あるものと思われる。高力価中和抗体の保有と特定の HLA に関連があるかを調査したが、class I、及び class II の全ての遺伝子座に高い中和抗体価を持つことと相関する HLA を見いだすことはできなかった。過去に記述のある HIV 抵抗性 HLA として知られている MHC も共通に存在せず、中和抗体陽性例の病期進行が特定の MHC に依存するためである可能性は低かった。以上の所見は HLA に拘束されず特定のクレイドの Env 抗原で広いクレイドを中和する中和抗体を誘導できること、つまり液性免疫志向型のワクチン開発が可能かもしれないことを示唆する。

本研究により、中和抗体が発症遅延と関連している可能性が示唆されたが実際に発症遅延にどれだけ貢献しているかは明らかではない。その主な理由は中和抗体が発症遅延に関連するかを実験により検証することが困難だからである。この論証には少なくとも中和抗体以外の理由で長期未発症となっている訳ではないという傍証を挙げるしかできないからである。SP が発症に際し、（1）本中和抗体の顕著な減弱が見られた場合に病状悪化が認められる、あるいは（2）

発症すると同時に中和抗体抵抗性の変異ウイルスが現れる場合などがこの仮説を強く支持するが、やはり傍証でしかないといわざるをえない。文献的には動物実験による重要な知見として、血清を 40 倍希釈してウイルス複製を抑制しなければウイルス感染を 99%防ぐことはできないとの報告がある。当症例の希釈倍率はこれを大きくこえるものであり、患者体内でウイルス複製を抑制する効果は十分得られているのではないかとの仮説に矛盾しない。その他の遺伝的要因については、これまで発症遅延に関わっているとされる CCR5d32 は全例陰性、high RDI90 のうち 3 例 (50%) が CCR2V64I 陽性であった。HLA については先に述べた通りである。もう一点は、患者血漿は患者由来のウイルス複製を抑制したという実験事実と、予想される中和抗体 epitope が患者由来のウイルスに温存されており、患者のウイルスがいまだ中和感受性を維持していると考えられる点ある (data not shown)。つまり、中和抗体の高い症例で既知の発症遅延原因が存在せず、中和抗体感受性を保ったウイルスであることから、本中和抗体の存在がエイズ発症遅延に関与しないとは言えないと結論できる。繰り返しとなるが、中和抗体が発症遅延と関連していることを直接証明することは困難であるが今後の検討課題として解析を続けたい。

当症例からモノクローナル抗体産生細胞を樹立し、モノクローナル抗体を精製することにより、抗体の標的および作用機序の解明を行う必要がある。これはワクチン開発に資するだけでなく、これを利用して受動免疫を行うことにより、エイズの小動物モデルなどにて直接的に発症遅延と中和抗体の因果関係を証明することができるかもしれない。さらには抗体医薬としてのエイズ治療薬あるいは予防薬の開発に繋がる可能性があるからである。広範なウイルス株の

複製を抑制することができる本中和抗体をエイズ治療・予防に役立てることができるか更なる検討を加えていきたい。

E. 結論

我々は日本人 HIV 感染血友病患者群コホートを解析し、長期エイズ未発症者にクレードをこえたウイルスにも有効な高い中和抗体価をもつ複数の症例を認めた。本研究の成果は中和抗体誘導型治療・予防ワクチン開発に適切な標的エピトープを示唆すると同時に、モノクローナル抗体の樹立により抗体医薬を開発することにより受動免疫によるエイズ予防・発症阻止法の開発も期待できる。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Futahashi Y, *Komano J, Urano E, Aoki T, Hamatake M, Miyauchi K, Yoshida T, Koyanagi Y, Matsuda Z, Yamamoto N. Separate elements are required for ligand-dependent and -independent internalization of metastatic potentiator CXCR4. *Cancer Science*. 2006. In press.

2) Shimizu S, Urano E, Futahashi Y, Miyauchi K, Isogai M, Matsuda Z, Nohtomi K, Onogi T, Takebe Y, Yamamoto N, Komano J. Inhibiting lentiviral replication by HEXIM1, a cellular inhibitor of cdk9/cyclinT complex. *AIDS*. 2006. In press.

3) Miyauchi K, *Komano J, Myint L, Futahashi Y, Urano E, Matsuda Z, Chiba T, Miura H, Sugiura W, Yamamoto N. Rapid propagation of low-

fitness drug resistant mutants of human immunodeficiency virus type 1 by a streptococcal metabolite sparsomycin. *Antivir Chem Chemother.* 2006;17(4): 167-174

4) Miyauchi K, Curran R, Matthews E, Komano J, Hoshino T, Engelman DM, *Matsuda Z. Mutations of conserved glycine residues within the membrane-spanning domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 can inhibit membrane fusion and incorporation of Env onto virions. *Jpn J Infect Dis.* 2006 Apr;59(2):77-84.

2. 学会発表 (抜粋)

1) Shimizu S, Urano E, Futahashi Y, Miyauchi K, Isogai M, Matsuda Z, Nohtomi K, Onogi T, Takebe Y, Yamamoto N, Komano J. Inhibiting HIV-1 replication by HEXIM1, a cellular inhibitor of cdk9/cyclinT complex (P-TEFb). May 23-27, 2006. CSH Meeting on Retroviruses, Cold Spring Harbor, NY

2) Shimizu S, Urano E, Futahashi Y, Miyauchi K, Isogai M, Matsuda Z, Nohtomi K, Onogi T, Takebe Y, Yamamoto N, Komano J. Inhibiting HIV-1 replication by HEXIM1, a cellular inhibitor of cdk9/cyclinT complex (P-TEFb), Poster, 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress in conjunction with 79th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society and 29th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. Jun 18-23, 2006. Kyoto, Japan.

3) Miyauchi K, Curran R, Mathews E, Komano J, Murakami T, Yamamoto N, Engelman DM, *Matsuda Z. Alteration of intracellular transport of

the envelope protein of HIV-1 by a shift in a helical phase within its membrane-spanning domain. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress in conjunction with 79th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society and 29th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. Jun 18-23, 2006. Kyoto, Japan.

4) Komano J. Characterization of neutralizing antibodies found in long-term non-progressors of Japanese hemophiliacs. 3rd Taiwan-Japan Symposium on HIV/AIDS. Sep 7-9, 2006. Center for Disease Control Department of Health, Taiwan, R.O.C.

5) Shimizu S, Urano E, Futahashi Y, Miyauchi K, Isogai M, Matsuda Z, Nohtomi K, Onogi T, Takebe Y, Yamamoto N, Komano J. Inhibiting HIV-1 replication by HEXIM1, a cellular inhibitor of CDK9/Cyclin T complex (P-TEFb). 7th AIDS Seminar in Kumamoto, Kumamoto. Sep 21-22, 2006. Japan.

6) Komano J, Futahashi Y, Isogai M, Hamatake M, Matsuda Z, Shiino T, Takebe Y, Sato H, Yamamoto N. Drug Resistance Mutations in the Polymerase Catalytic Domain Negatively Affect the RNase H Activity of HIV-1 Reverse Transcriptase. 7th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance. 2006 Nov 12-15. Chantilly VA, USA

7) Murakami T, Yasutomi E, Ablan S, Miyakawa K, Komano J, Matsuda Z, Freed EO, Yamamoto N. Detailed analyses of HIV-1 matrix mutants: Effects on an early stage of infection. 7th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance. 2006 Nov 12-15. Chantilly VA, USA

8) 青木徹, 貝の瀬由成, 二橋悠子, 清水佐紀, 松田善衛, 山本直樹, 駒野淳. HIV-1 GagN 末端のミリスチン酸化非依存的な分子集合・出芽および VLP の性質に関する解析. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会. Nov 19-21, 2006. 名古屋

9) 濱武牧子, 浦野恵美子, 花房忠次, 加藤真吾, Tee Kok Keng, 武部豊, 山本直樹, 駒野淳. AIDS 長期未発症の HIV 感染血友病患者における高力価中和抗体の存在とその病期進行への寄与に関する解析. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会. Nov 19-21, 2006. 名古屋

10) 駒野淳, 二橋悠子, 磯貝まや, 濱武牧子, 松田善衛, 佐藤裕徳, 椎野貞一郎, 武部豊, 山本直樹. 挿入変異を伴う多剤耐性 HIV-1 (CRF01_AE) における薬剤耐性亢進のメカニズムー薬剤耐性獲得における RNase H 活性の関与. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会. Nov 19-21, 2006. 名古屋

11) 駒野淳, 姉崎裕介, 二橋悠子, 磯貝まや, 藤義秀, 星野忠次, 武部豊, 山本直樹. HIV-1 の逆転写酵素が持つ RNase H 活性に対する特異的阻害剤の開発. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会. Nov 19-21, 2006. 名古屋

12) Komano J. Myristoylation independent assembly, transport, and VLP formation of HIV-1 Gag. 第 20 回日本エイズ学会学術集会. Nov 30-Dec 2, 2006. 東京

13) 駒野淳, 姉崎裕介, 二橋悠子, 磯貝まや, 武部豊, 山本直樹. HIV-1 の逆転写酵素に内在する RNase H 活性阻害薬の開発 (1) —小分子化合物ライブラリーからのスクリーニング. 第 20 回日本エイズ学会学術集会. Nov 30-Dec 2, 2006. 東京

14) 濱武牧子, 浦野恵美子, 花房忠次, 加藤真吾, Tee Kok Keng, 武部豊, 山本直樹, 駒野淳. 血友病患者におけるエイズ長期未発症症例におけ

る高力価中和抗体の存在と標的部位の同定. 第 20 回日本エイズ学会学術集会. Nov 30-Dec 2, 2006. 東京

15) 駒野淳, 二橋悠子, 磯貝まや, 濱武牧子, 松田善衛, 佐藤裕徳, 椎野貞一郎, 武部豊, 山本直樹. HIV-1 逆転写酵素 polymerase active site への薬剤耐性変異が誘導する RNase H 活性の低下と耐性亢進への寄与. 第 20 回日本エイズ学会学術集会. Nov 30-Dec 2, 2006. 東京

16) Jun Komano. Broadly reactive strong neutralizing antibody against HIV-1 in long-term survivors of HIV-1-infected haemophiliacs. The US-Japan Cooperative Medical Science Program 19th Joing Meeting of AIDS Panel. Dec 6-7, 2006. Kagoshima, Japan

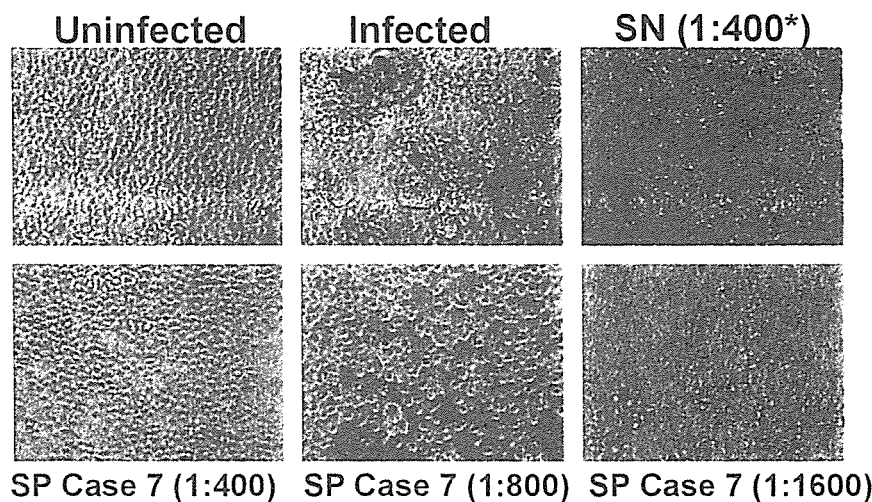
17) 駒野淳. HIV-1 複製制御の分子メカニズムとエイズ治療法への展望. 造血幹細胞移植と感染症対策. Feb 03, 2007. 東京

18) Jun Komano et al. Broadly reactive strong neutralizing antibody against HIV-1 in long-term survivors of HIV-1-infected haemophiliacs. Keystone symposia, HIV vaccine and molecular and cellular determinants of HIV pathogenesis. Mar 25-30, 2007. Whistler, British Columbia, Canada

H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

図 1 SP血漿によるCPE抑制活性の検出



Micrographs showing the MT-4 CPE (arrows) induced by HIV-1_{HXB2}
 *plasma dilution.

図 2 精製抗体によるウイルス複製抑制

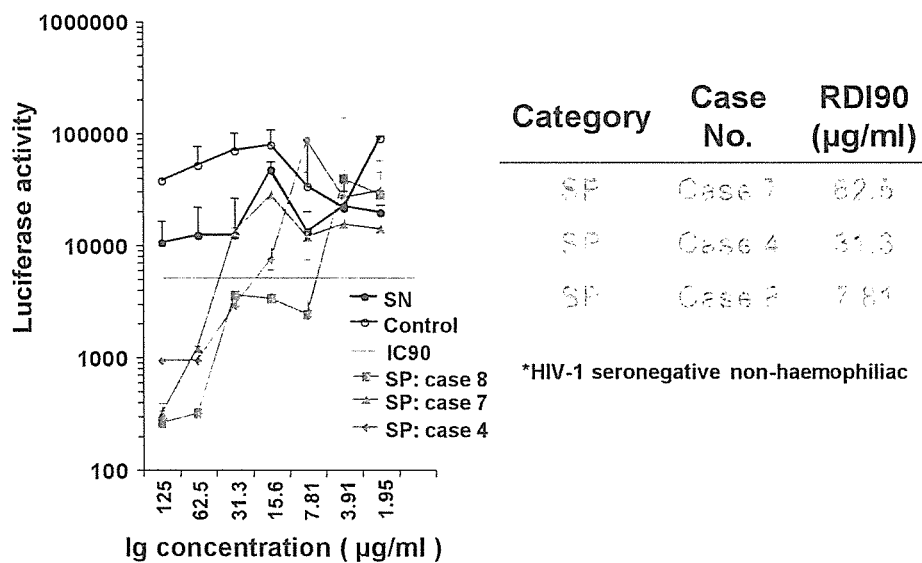


図 3 N425R変異による中和感受性の変化

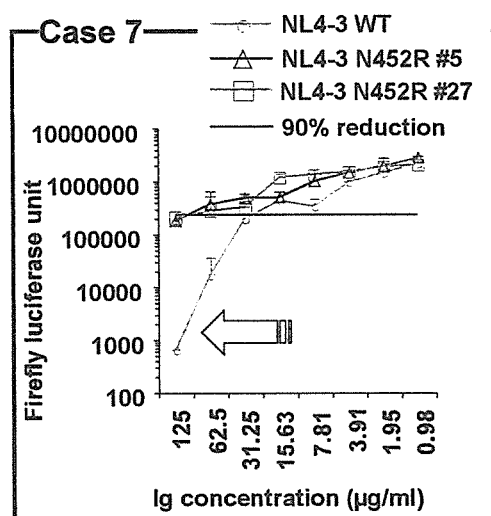


表 1 本コホート群のまとめ

Group	n	Median (range)	CD4 count (per mm ³)* ¹ mean ± sd	Viral load (copies/ml)* ² mean ± sd
SN	16	27 (11-68)	864 ± 349	n.t.
PR	24	26 (16-46)	161 ± 115	1.6 ± 3.8 × 10 ⁵
SP	23	29 (24-46)	481 ± 159	5.9 ± 7.5 × 10 ³

*¹ The CD4 count measured at or the closest time point when the neutralization assay was performed.

*² The viral load measured at or the closest time point when the neutralization assay was performed. The viral load of four progressors were not available.

表 2 SN, PR, SP群におけるRDI90の比較

group	n	RDI90				
		<200	200	800	3200	≥12800
SN	16	16	0	0	0	0
PR	24	7	8	5	4	0
SP	23	4	8	4	0	7

*Fisher's exact-test $P<0.05$ (PR vs SP)

表 3 本研究で用いたprimary isolate

Clade/CRF	Isolate	Full-length	Coreceptor
A	00KE_KNH1144	AF457066	R5
	00KE_KNH1207	AF457068	R5
B	85US_Ba-L	AY713409	R5
	92FR_BX08	AY713411	R5
	89BZ_167	AY173956	X4
C	98US_MSC5016	AY444801	R5
	93MW_965	AY713413	R5
	89SM_145	AY713415	R5
D	99UG_A07412M1	AF484477	R5
	99UG_A08483M1	AY304496	R5
	00UG_J32228M4	AF484516	R5
CRF01_AE	90TH_CM235	AF259955	R5
	98TH_NP1251	AY713422	R5
CFR02_AG	01CM_0008BBY	AY371124	R5
	01CM_1475MV	AY371138	R5

*Viruses provided by Dr. Polonis

研究課題名 : アジア・太平洋地域における HIV・エイズの流行・対策状況と日本への波及 に関する研究
課題番号 :
主任研究者名 : 武部豊
分担研究者名 : 花房 秀次 (荻窪病院 血液科部長)
血友病 HIV 感染者における長期未発症患者の免疫状態と中和抗体の検討

A. 研究目的

HIVに感染した血友病患者の中で感染から20年以上経過しても免疫が良好に保たれている長期未発症患者 (Long term non-progressor: LTNP) の病態を検討することにより、ワクチン開発などHIV/AIDSの新しい治療法を開発することを目的とする。

B. 研究方法

荻窪病院 血液科を受診した血友病患者 526 名中、HIV 感染者 154 名を対象として調査を施行した。このうち、AIDS での死亡者は 46 名、抗 HIV 剤内服患者は 72 名、抗 HIV 剤内服を必要としていない患者は 23 名であった。HIV に感染後 20 年以上を経過し、長期に免疫が安定している血友病患者、HIV 感染が進行している血友病患者、及び HIV 陰性の血友病患者を対象として血液検査を施行した。

本研究は HIV に関する調査研究であり、倫理面への配慮が重要であり、検査にあたっては研究に関する説明を文書で行い、対象各個人から書面による同意書を得ることとした。

同意を得た患者から採血し、国立感染症研究所に検体を送付した。

C. 研究結果

荻窪病院 血液科に通院中の血友病 HIV 感染者の内、感染後 20 年以上経過しても治療を必要としない LTNP は 23/154 で約 15% であった。年齢の中央値 (range) は抗 HIV 剤内服群が 35.8(25.8~53.8) 歳、LTNP 群が 37.1 (28.7~42.9) 歳であった。AIDS 死亡者は高齢者と小児に多かった。LTNP の検査の中央値 (range) は、CD4 数が 402 (150~919)、HIV RNA 17000 (<50~ 70000) copies/ml であった。

HIV env に対する中和抗体を測定した結果、LTNP 群の中に高い中和活性を示す患者を認め、駒野先生の研究グループが詳細を検討中である。現在までに判明している中和抗体は単に自分自身の HIV を抑制するだけでなく、世界中から報告されている全ての HIV clades に対して高い中和活性を示すことが判明している。

しかし、一方では LTNP の中でも中和抗体活性が高くない群においても VL が低く、CD4 数が高く安定している患者も認め、中和抗体以外にも免疫を安定させている要素があることが確認された。これらの患者群で細胞性免疫などを検討中である。

D. 考察

荻窪病院 血液科では抗 HIV 剤の投与開始基準を常に CD4<200 と一定に保ち続けてきた。1996 年に HAART が導入され、早期治療が推奨されてきたが、HAART では血中の HIV DNA 量に変化がなく、数年でウィルスを排除できるとした当時の考えに否定的であることを学会で指摘し続けてきた。さらに、HAART の長期副作用が深刻であること、血友病患者群では HIV/AIDS の rapid progressor は早期に死亡しており HAART が導入された時期に生存している

患者群は slow progressor が多く一般の性感染者のコホート研究とは異なること、CD4 数が低下しても HAART で CD4 数の回復は可能であること、当時の HAART では耐性変異が多いことなどを理由に挙げて学会で治療開始基準の見直しを主張し続けてきた。そのために安定したコホート研究が可能となっている。これほどの長期に及ぶ LTNP の正確なコホート研究は治療開始基準を一定に保った血友病患者においてのみ可能である。開始基準を遅らせたことが荻窪病院 血液科において LTNP が全国調査より多い理由の一つとして考えられる。

今回の検討で LTNP の中に高い中和抗体活性が認められた感染者があり、その中和抗体が他の HIV clades に対しても強い抑制効果を持つことは大変注目される。今後、中和抗体の認識 epitope を解析し、中和抗体をワクチンに応用できれば大変有効である。これによって HIV 感染の防止や AIDS 発症を遅らせることが可能になると思われる。また、複数の中和抗体を組み合わせる方が有効かどうかの検討も必要である。

LTNP の中には感染後 20 年以上を経過しても血中 VL<50 copies/ml を保ち続けている感染者もいるが、その中和抗体活性は高くなかった。このことから中和抗体以外にも強い HIV 抑制効果が働いていることが推測される。これまでに我々は LTNP 群では CCR5-59653T/CCR2-64I と RANTES-28G の発現率が高いことや、LTNP 群は HIV 進行群に比較して HLA-B 1507 の発現率が高く、HLA-B 5401 の発現率が低いことを報告した。今後、これらの要因以外に CTL 活性などの細胞性免疫、HIV 増殖能の解析などを進めて新しい治療法の開発を検討することは大変有意義である。

E. 結論

本研究グループでなされている LTNP の研究は我が国の血友病患者でしか行われておらず、意義あるものと判断される。

1) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

今後、中和抗体を解明し、世界中の HIV clades に有効なワクチン開発に応用できれば多大な貢献が可能と考えられる。

2) 今後の展望について

中和抗体の認識 epitope を解明し、単clonal抗体を作製し、ワクチン開発を行う。さらに中和抗体以外の HIV 抑制因子を検討し、HIV 感染者の免疫進行を抑制する治療法の開発を検討する。

G. 研究発表

なし

H. 知的所有権の出願・取得状況

現在のところ予定なし。

研究課題：中国南西部における HIV-1 流行株 CRF08_BC の感染性分子クローンのウイルス学的性状の解析

分担研究者： 草川 茂 （国立感染症研究所エイズ研究センター・主任研究官）

研究要旨

中国南西部における代表的な流行株である CRF08_BC 分離株から、新しい感染性分子クローンを樹立した。これまでに樹立した CRF08_BC の 2 種類のクローン HH040_NX4 および 22 は、いずれも分離株同様 PBMC で増殖し、CCR5 をコレセプターとして使用するウイルスであったが、NP2/CD4/CCR5 細胞では NX4 の方が強い細胞変性を伴いながらよく増殖するのに対し、PBMC では NX22 の方が早い kinetics で増殖した。共通な制限酵素認識部位を用いて相互の組換え体を作成し、これらの細胞種特異性を決定している領域の特定を行った結果、これらの組換えにより、いずれの細胞でもよく増殖する新しい感染性分子クローン 22eapx4 を樹立した。アジア地域で分離後継代数の少ない材料から感染性分子クローンを樹立したことは、当地域における将来の予防・治療法の開発にとって重要な知見であり、またこの地域における流行株のウイルス学的研究への応用が期待できると考えられた。

A. 研究目的

これまでに我々は、HIV 流行の急速な進行が問題となっているアジアにおいて流行している HIV-1 サブタイプの解析を行ってきた。CRF08_BC は HIV-1 サブタイプ B' と C のサブタイプ間組換え体であり、中国広西省や雲南省など南西部における主要な流行株のひとつである。この地域は中国国内でも感染者数の多い地域であり、CRF08_BC の分離株を材料に、トランスフェクションによって感染性のウイルスをつくる感染性分子クローンは、この地域における流行株のウイルス学的解析や、予防・治療法の開発にとって重要なツールになる。本研究では、標的細胞の種類によって感染性が異なり、またこれまでに樹立された感染性分子クローンと比べて増殖能の劣る 2 つの感染性分子クローンを組換えることによって、新しい CRF08_BC の感染性分子クローンを樹立することを目的とした。

B. 研究方法

すでに樹立した 2 つの感染性分子クローン NX4、NX22 および新たなフラグメントとの組換えを、図 1 に示した制限酵素認識部位を使って

行った。これらのクローン DNA を 293T 細胞にトランスフェクトしてウイルスを回収した。そのウイルスの感染性は、PHA で刺激したヒト末梢血単核細胞（PBMC）、CD4 と CXCR4、CCR5 を発現させた NP2 細胞、CCR5 発現 C8166 細胞、ヒト末梢血単球から M-CSF 存在下で 1 週間培養して誘導したマクロファージ（MDM）で検討した。増殖能の比較は、3 回以上の独立した実験を行い確認した。

（倫理面への配慮）

なし。

C. 研究結果

まず nef 遺伝子内の PacI サイトを使ってその前後を組換えたクローンを作製し、増殖能を決定している領域を検討した（図 2）。PBMC では PacI より 5' 側が NX22 由来のものが NX22 と同様の増殖を示し、これら 2 つのクローンの PBMC における増殖の差を決定している領域が PacI より 5' 側にあると思われた。NP2/CD4/CCR5 では組換えたクローンは中間的な増殖を示し、両方の領域に NP2/CD4/CCR5 における増殖能の差を決定している領域があることが示唆された。

次に、gag 遺伝子内の SpeI、vpu 遺伝子内の PacI までの領域について検討した（図 3）。NP2/CD4/CCR5 で増殖の良い NX4 の SpeI から pol 遺伝子内の BclI までの領域を NX22 由来のフラグメントに置換することで（4sb22）、NP2/CD4/CCR5 における増殖能が NX4 より高まった。また SpeI から PacI までを NX22 由来のフラグメントに置換したもの（4sp22）は 4sb22 より増殖が劣っていたことから、BclI から PacI までの領域が NX4 由来であることが、NP2/CD4/CCR5 における増殖を高めていると考えられた。さらに、NX22 の BclI から PacI までだけを NX4 由来のフラグメントに組換えたもの（22bp4）は、4sb22 よりも増殖が高まった。BclI から PacI までの領域の重要性が裏付けられたとともに、SpeI から上流も NX22 由来のフラグメントを用いることで NP2/CD4/CCR5 での増殖が高まると考えられた。しかしながらこのウイルスは、PBMC においては NX4 と同様にあまり増殖できなかった。逆に、PBMC での増殖の良くない NX4 のこの領域を NX22 由来のフラグメントと組換えたものが、NX4 と比べて高い増殖能を示した。これらの結果から、BclI から PacI までの領域に、2つの標的細胞に対する特異性を決定している領域が存在した。

そこで、さらに BclI から PacI までに存在する3種類の制限酵素認識部位を用いた組換え体を作成し、同様の検討を行った。PBMC においては（図 4）、pol 遺伝子内の AflIII から vpr 遺伝子内の NcoI 間での領域が NX22 由来のクローンで高い増殖を示した。NP2/CD4/CCR5 では、pol 遺伝子内の EcoRI から AflIII までが NX4 由来、pol 遺伝子内の AflIII から vpr 遺伝子内の NcoI 間での領域が NX22 由来のクローンが最も良く増殖した。

以上の検討から得られた新しい CRF08_BC 感

染性分子クローン 22eapx4 は、最初に樹立したクローン NX4、NX22 のいずれよりも、PBMC および NP2 において最も良い増殖を示した（図 5）。22eapx4 は、分離株 HH040 が感染する MDM に対しては感染性を認めなかった（図 6）。しかしながら、env 遺伝子を含む PacI から XhoI までの領域を新たなフラグメントと置換したクローンのひとつではわずかな感染性を認めた。

D. 考察

これまで HIV-1 研究に用いられてきた感染性分子クローンの多くはサブタイプ B（欧米型サブタイプ B）であり、しかも実験室において T 細胞株などを用いて馴化されたウイルスを鋳型に樹立されたものが多い。アジア地域において流行しているサブタイプおよびサブタイプ間の組換え体を用いたウイルス学的研究の報告は限られており、この地域で分離後継代数の少ない材料から樹立した感染性分子クローンは、この地域における流行株のウイルス学的解析や、将来の予防・治療法の開発にとって重要なテーマである。

CRF08_BC は、中国広西省や雲南省など南西部における主要な流行株のひとつである。これまでに我々は、雲南省において分離した CRF08_BC 分離株 HH040 から2つの感染性分子クローンを樹立した。しかしながら、これらがクローンごとに細胞種による増殖の善し悪しが見られたこと、分離ウイルスが増殖できる MDM において増殖を認めなかったことから、さらに新たなクローンを得る努力が必要であると考えられた。そこでまず、宿主毎の増殖の善し悪しを決定している領域を同定し、2つのクローンを組換えることによって、PBMC と NP2/CD4/CCR5 いずれの宿主細胞においても良く増殖するクローンの作成を試みた。

図 1 に示した制限酵素認識部位を使って2つ

の感染性分子クローン NX4、NX22 相互の組換え体を作成し、その感染性を検討した。その結果、1) pol 遺伝子内の BclI より上流は NX22 由来のフラグメントを用いることでいずれの細胞でも増殖が高まった。2) pol 遺伝子内の EcoRI から AflIII までは NX4 由来のフラグメントを用いることで NP2/CD4/CCR5 での増殖が高まった。3) AflIII から vpr 遺伝子内の NcoI 間での領域は NX22 由来のフラグメントを用いることでいずれの細胞でも増殖が高まった。4) vpu 遺伝子内の PacI から 3' 側は NX4 由来のフラグメントを用いることで NP2/CD4/CCR5 での増殖が高まった。このような構造を持つクローン 22eapx4 は、PBMC、NP2/CD4/CCR5 のいずれにおいても、最初に樹立したクローン NX4、NX22 より優れた増殖を示した (図 5)。

E. 結論

アジア地域の HIV-1 流行株のウイルス学的研究や、予防・治療法開発の基盤構築の一つとして、この地域の流行株の感染性分子クローンの構築を行ってきた。既に樹立したサブタイプ B' (タイ型サブタイプ B) に加えて CRF08_BC の感染性分子クローンを樹立した。また複数のウイルス学的性状の異なるクローンが得られたことで、今後より幅広いウイルス学的研究への応用が期待できる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

草川茂、武部豊 : HIV-1 CRF08_BC

感染性分子クローンの構築とそのウイルス学的性質の解析。第 54 回日本ウイルス学会学術集会総会、2006 年 11 月

草川茂、武部豊 : HIV-1 サブタイプ B' 感染性分子クローンの樹立とその性状の解析。第 20 回日本エイズ学会学術集会総会、2006 年 12 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

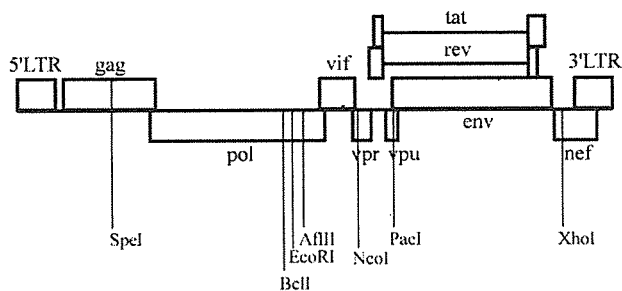


図 1：組換えに用いた制限酵素認識部位

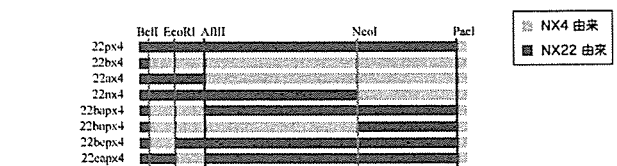
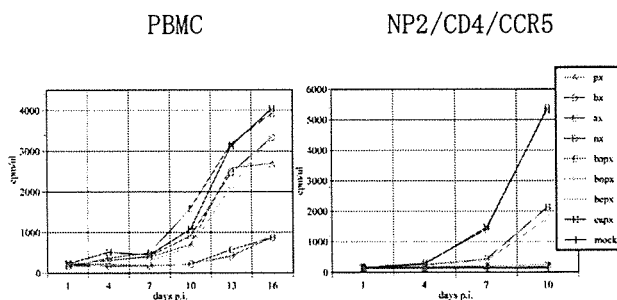


図 4：BclI-PacI 間の組換え体の PBMC および NP2/CD4/CCR5 における増殖

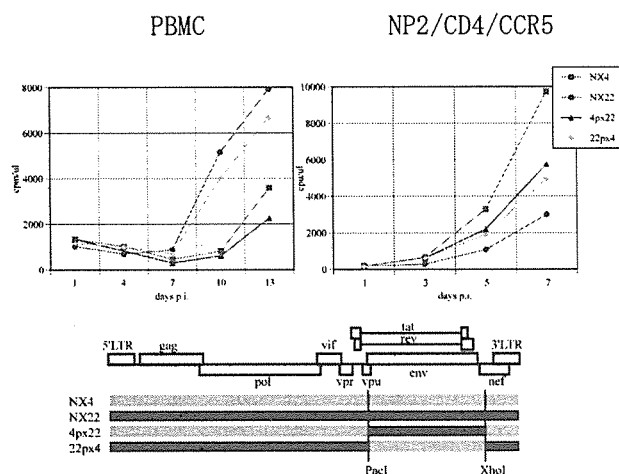


図 2：PacI 前後の組換え体の PBMC および NP2/CD4/CCR5 における増殖

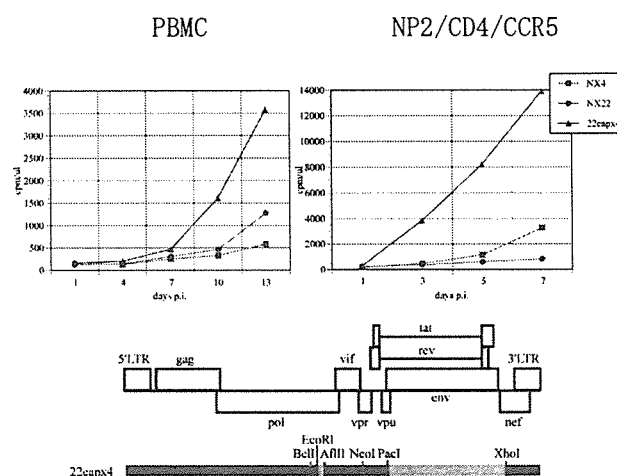


図 5：新しいクローン 22eapx4 の PBMC および NP2/CD4/CCR5 における増殖

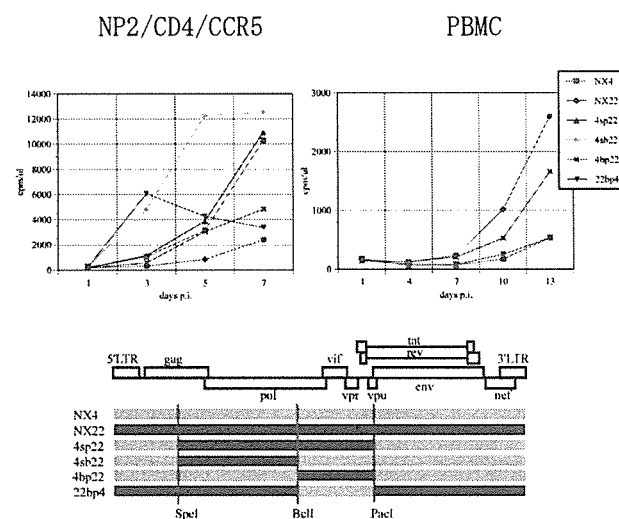


図 3：PacI より上流の領域の組換え体を用いた検討

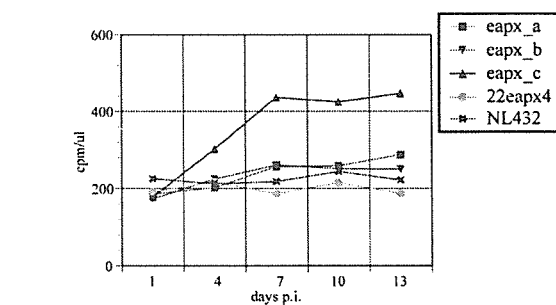


図 6：新しいクローンの MDM における増殖

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

平成18年度分担研究報告書

研究課題：タイ型 HIV-1 ヴァリアント CRF01_AE の高度薬剤耐性変異に関する分子集団遺伝学的解析

分担研究者：椎野 禎一郎（国立感染症研究所エイズ研究センター・主任研究官）

研究要旨

アジア地域の HIV-1 の流行形成に重要な役割を果たしつつある組換えウイルスの生成機構を知るため、in vivo で組換えが生じた例の解析と、in vitro 系での感染後組換え実験の結果を比較した。in vivo で組換えが生じた例として、CRF01_AE の国内の家族内感染例 NH3 の、高度・多剤耐性変異ウイルスの発生と消失過程が観察された。NH3 より経時的に採取した検体を用いた逆転写酵素領域の分子進化学的解析から、M41L, 69Ins, T69I, L210W, T215Y のハプロタイプを持つ高度多剤耐性形質がフィンガー領域とパーム領域の変異群間の遺伝子組換えによって生まれたことがわかった ($p < 0.01$)。治療失敗に伴う投与薬剤の変更によって、このハプロタイプはその後次第に消失し、かわりに以前 provirus として存在していた variant が組換えを伴って re-circulate した変異体が優勢となった。各採取時期のクローン配列を集団遺伝学的手法で解析したところ、いくつかの交叉地点が観察できたが、各時期の交叉地点は一致していなかった。一方、薬剤耐性表現型を利用してフィンガー領域とパーム領域の間の組換え体を選択的に増大できることに注目し、in vitro でのこの領域に生じる交叉と組換えの詳細な解析を行った。CRF01_AE 感染性クローンのフィンガーとパーム領域間の約 400 ヌクレオチドの領域に存在する 20 個の制限酵素サイトに、それぞれアミノ酸配列を変えないように変異を導入した変異ウイルスクローン（NH1-RTΔRS_WY）と M41L, 69Ins, T69I を持った CRF01_AE 感染性クローンを共感染させることで、培養細胞において交叉点が明確な組換えウイルスを大量に発生させた。得られたウイルスのクローン配列を解析したところ、組換え価は 0.018 /bp/day と推定された。各 SNP 間の実際の組換え価を先の理論値と比較したところ、有意な差のある領域が2つ発見されたが、両方とも理論値より実測値が低く、ホットスポットではなかった。Coalescent analysis の手法を用いてウイルスの変異形成に関する組換えと突然変異の寄与の比較を行ったところ、in vitro では NRTI の濃度にかかわらず一定の寄与割合であったが、in vivo では採取時期によって大きく変動していた。

A. 研究目的

HIV-1 には、塩基配列によって系統的に分類可

能なサブタイプのほかにサブタイプ間の組換え

で生じたと思われるウイルスが存在する。こう

した組換えウイルスの中には、従来のサブタイプと同様に感染を広げている型（circulating recombinant form: CRF）も見つかっている。東南アジアから東アジア地域ではこうした CRF や、CRF や subtype が個々の感染者において複雑な再組換えを起こした unique recombinant form (URF) が疫学的に重要な型となっている。アジア地域で現在起こりつつある現象は、HIV-1 の組換えがある条件下ではかなりの頻度で生じることを示している。これらのウイルスのゲノム構造には、組換えの際に交叉が生じるサイトに共通点があることが多いが、これが組換えのホットスポットによるものなのか、組換え現象の不均衡と集団構造によるものなのかは不明である。こうした現象を解明するためには、ウイルス変異形成過程における組換えの集団遺伝学的意義を研究する必要があるが、こうした研究はあまり行われていない。本研究は、HIV-1 の組換えの宿主内での集団遺伝学的解析を通して、組換えのウイルスゲノム変異への寄与を知ることが目的とする。

B. 研究方法

組換えの遺伝学的解析には、ゲノム上に組換えが起こったことを示すマーカー遺伝子を置く必要があるとともに、組換えを起こしたウイルスのみを選択する系があることが望ましい。In vivo の解析では、quasispecies を形成する各変異体のもつ single nucleotide polymorphism (SNP) がこれを解決できる。一方、in vitro で組換えを観察する場合、感染性クローンに意図的に大量の変異を導入する必要がある。組換え体の選択が可能となるとさらに解析効率があがるだろう。本研究では、in vivo で組換えが生じた例として、CRF01_AE の国内の家族内感染例 NH3 の RT 領域に薬剤治療の遍歴に応じて生じ

た耐性変異ウイルスの組換えによる生成過程を対象とし、in vitro の実験系は NH3 とほぼ同じゲノム配列を持つ感染性クローン 93JP-NH1 にさらに薬剤耐性変異と同義置換を導入したものを作成し用いた。

我々は、93JP-NH1 と同系統のウイルス株に感染し抗ウイルス剤療法を受けた感染者（NH3）の血液検体の提供を4回にわたって受けた。4回の時期はそれぞれ、NH3-1（1993年採取）が感染初期、NH3-2（1999年12月採取）が HAART 療法（AZT+ddI→AZT+3TC+NFV or IDV）の失敗期、NH3-3（2000年3月採取）が NRTI 耐性変異の形成を受けて薬剤療法を NNRTI(NVP)と PR 阻害剤（SQV, IDV）に変更した直後、NH3-4（2003年5月採取）が NH3-3 で選択した治療が継続している時期となる。これらの血液検体を血清と PBMC に分画し、RNA と DNA をそれぞれ抽出、RT 領域(624bp)を PCR により増幅したのちにクローニングし、各々32 配列以上の塩基配列を得た。塩基配列は、ClustalW と人の手による多重アライメントを行ったあと、MEGA3 によって Tamura と Nei の方法による塩基置換推定を行い、近隣接合法による系統樹を作成した。組換えウイルスの存在を調べるために、bootscan 解析と subregion tree 解析（配列の前 200bp と後 200bp を比較）を行った。2つの subregion tree が異なる進化過程を経ていることの検定には、Incongruent length distance (ILD) test が採用された。ILD test は PAUP4.0 を用いて行った。解析された配列は、これらの解析で明らかに出来た以上に組換えによってセグメント間で異なる過程を経ていたと考えられたため、これらのすべてを図示する目的で、phylogenetic network 解析を行った。

NH3-2 にある耐性ウイルス株は、佐藤らによって報告された活性部位の大きな挿入配列と点突

然変異 (M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y) によって、複数の NRTI に対して高い耐性を獲得している。このウイルスは、事前解析によってすでに組換えによって形成されたことが疑われていたため、*in vitro* の実験系の構築にあたっては、このウイルスの形成を再現することを目論んだ。多重薬剤に対する高耐性を発現するためには、耐性変異のすべてがそろふ必要がある。挿入配列は、K70R の近傍に位置するため、M41L, K70R と挿入配列のみを持つウイルス株と、L210W, T215Y のみを持つウイルス株を作成し、両者を複数の NRTI 存在下で共感染させれば、これらの突然変異のおよそ 400bp の間に組換えが生じるか、または複数の点突然変異が生じた場合のみ、感染が成立する。組換えと新たな点突然変異を区別するために、これらのウイルス株では、K70R の 30bp 下流と L210W の 7bp 上流に存在する *SacI* の切断部位を同義置換で切断不能に改変した。さらに、L210W, T215Y を持つクローンを元に、400bp の中間部に存在し同義置換での改変が可能な 17 箇所の制限酵素切断部位をすべて改変したウイルス(NH1-RT Δ RS_WY)を作成した。NH1-RT Δ RS_WY と M41L, 69Ins, T69I を持った CRF01_AE 感染性プラスミドを 1:1 の割合で HeLa 細胞に co-transfection し、共感染実験用のウイルス上清を作成した。このウイルス上清を、1000TCID₅₀ のウイルス濃度で NP2-CD4-CCR5 細胞および NP2-CD4-CXCR4 細胞に感染させ、上清を経時的に全量採取した。上清中の遊離ウイルス中の RT 遺伝子領域を高精度・低組換え率の RT-PCR で増幅したのち、DNA クローニングを行い 1 実験区あたり 32 本以上の塩基配列を決定した。塩基配列データは、アライメントを行ったあと、MEGA 3 を用いて組換え点の解析を行った。遺伝子セグメントにおける交叉率は、Kosambi の公式 ($y=1/2 \tanh 2x$) を用いて多重

組換えの補正を行った後、1 日あたり 100bp あたりの割合に換算した。培養液にさまざまな濃度の NRTI を加えることで、組換えウイルスの遺伝子型とその発生頻度を解析した。すべての実験区の交叉率を用いて、平均値の t 検定を行った。得られた *in vivo* と *in vitro* の配列データを、coalescent likelihood 解析の手法を用いて分析することで、変異形成に関する組換えと突然変異の寄与の割合を知ることを試みた。Population mutation parameter ($\theta=4N_e\mu$) と population recombination parameter ($\rho=4N_e r$) は LDHat パッケージの pairwise プログラムを用いて解析した。また、同じ解析過程で算出される Rmin を用いて、*in vivo* 検体中の交叉地点の推定を行った。

C. 研究結果

感染者 NH3 の血清中および PBMC より見出された RT 領域の塩基配列は、各採取時期の血清中のウイルスが別の lineage を形成していた。NRTI 耐性変異が dominant だった NH3-2 の時期には、PBMC 中に系統樹の根元に位置し NH3-1 に採取されたウイルスと近い配列のハプロタイプが 7/32 配列存在していた。これらは、NH3-1 と同じ cluster に属するもの (野生型)、M41L と 70Ins を持つもの (LI 型)、L210W, T215Y を持つもの (WY 型)、K70R, L210W を持つもの (RW 型) の 4 つの lineage に分類できた。NH3-3 では多剤耐性変異の lineage は完全に消失し、NRTI 耐性変異を 1 個～5 個持つ新たな lineage の変異体に置き換わっていた。NH3-4 では、この lineage も消失し、NRTI 耐性変異を 0 個～2 個持ち挿入変異を失った新たな lineage の変異体に置き換わっていた。この lineage では、すべての配列が Y181C の NNRTI 耐性変異を持ち、そのうち 7 個は K103N の NNRTI 耐性変異も持っていた。

Bootscan 解析、subregion tree 解析の結果はいずれも、NH3-2 の多剤耐性変異株 (M41L, D67N, 70Ins, K70R, L210W, T215Y) が PBMC 中に存在する LI 型と WY 型の lineage のウイルスの組換え体であることを強く示唆した ($P < 0.01$ ILD test)。さらに、phylogenetic network 解析の結果、NH3-3 の変異は LI 型と RW 型のウイルスが複雑に組換わったものであることが示唆された。

210W・215Y の 2 つの NRTI 耐性変異を持つクローンを元に、挿入変異部位 (In79) と 210W の間にある 17 箇所の制限酵素切断部位をすべて欠失させた変異クローン (NH1-RT Δ RS_WY) を作成した。この制限酵素切断部位欠失クローンと、M41L, D67N, 挿入配列, T69I を持つ感染性クローン (NH1-LI) を HeLa 細胞に co-transfection し、NH1-RT Δ RS_WY/NH1-LI 混合株を作成した。RT-PCR と制限酵素解析によって、この株内には NH1-RT Δ RS_WY と NH1-LI のゲノムがおおよそ 4:6 で含まれていることが確認された。耐性変異を持つ感染性クローンの薬剤耐性検査の結果から、培養液中に AZT と ddI を $2.5\mu\text{M}$ 以上の濃度で加えることで、5'側・3'側それぞれの変異のみをもつウイルスの間の組換えの結果としての 5 つのアミノ酸変異を持つウイルスを選択できることが期待された。組換えウイルスゲノムを大量に構造解析するため、96well-microtiter plate を用いた細胞・上清からの RT 領域の RT-PCR～クローニング～塩基配列決定の手順を確立した。RT-PCR を用いたクローニング手法は、PCR 反応中に組換えが生じてしまうが、これの大半は部分的に増幅した断片が次の増幅過程に介在して生じる現象であり、伸長反応を十分に長くすることで回避することができた。

NP2-CD4-CCR5 および NP2-CD4-CXCR4 を宿主細胞とした、NH1-RT Δ RS_WY/NH1-LI 混合株の共感染・培養実験の結果、組換えウイ

ルスは 3 日目の検体から低頻度で出現し、10 日目以降は高頻度に観察された。組換え RT の遺伝子型は、培養液中に NRTI が存在しないときには野生型が優勢であり、M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y (LIWY 型) の遺伝子型を持つ RT は NRTI の濃度に依存して選択を受けていた。得られた組換え体の塩基配列解析から、RT のこの領域 (約 400bp) の in vitro 系での組換え価は 0.018 /bp/day と推定された。この値を理論値として領域別に観察された交叉率を比較したところ、組換えの生じにくい領域が 2 箇所検出されたが、交叉点の分布は塩基長とほぼ比例関係にあり組換えが極端に生じやすい領域は存在しなかった。この実験系では、得られたウイルスはすでに何世代かを経過しており、その間の自然選択や機会的浮動の影響を受けているためにサンプル集団の誤差分布を再検討する必要があるかもしれない。In vivo (NH3) のデータは、意図的なマーカーがあるわけではないため、上のような解析は不可能である。そこで、得られたすべての SNP の間で coalescent likelihood analysis を行い、尤度の期待値との log 比を観察する方法で、領域ごとの組換えの起こりやすさを推定したところ、やはりすべての採取時期で共通して組換えが生じる領域は見出されなかった。また、Hudson & Kaplan (1985) の Rmin を計算し比較したが、やはり共通する組換えホットスポットは見出されなかった。

Coalescent likelihood 解析では、組換え価そのものは推定できないが、population recombination parameter ($\rho=4Ner$) を推定することは可能である。一方、集団中の点突然変異の分布から、Population mutation parameter ($\theta=4Ne\mu$) は推定可能である。この 2 つの推定値を用いれば、集団の変異形成に関する点突然変異に対する組換えの寄与 (r/μ) を知ることがで

きる。このアイデアを用いて、in vivo, in vitro 双方における組換えの寄与を各標本群で比較したところ、in vitro では、薬剤濃度にかかわらず、点突然変異に対する組換えの寄与は一定であったが、in vivo では $\theta=4Ne\mu$ はほぼ一定であるにもかかわらず組換えの寄与は大きく変動していた。組換えの寄与は、薬剤治療の失敗期に大きく、成功期には少ない。

D. 考察

NH3-2 で dominant だった多剤耐性変異は、一般的な TAM 耐性変異に加えて 70 番サイトに 13 残基の大きな挿入変異がある。このハプロタイプを持ったウイルスは、AZT, ddI に対する強い耐性を持ち、その他の NRTI に対してもある程度の耐性を持つことがわかっている。この phenotype の完成には、D67N を除くすべての耐性変異が揃う必要があり、突然変異の蓄積だけでは進化が難しい。また、こうしたウイルスは一般に野生型に比べて増殖効率が落ちるため、NH3-3 以降のような NRTI を使わない治療に変更された場合には速やかに置換されることが予想できるが、この場合も再突然変異によるリバータントは出来にくい。NH3 の各時期から得られたウイルスクローン配列の系統樹解析の結果は、NH3-2 以降の血清中のウイルスが、NH3-1 と NH3-2 期の PBMC にあるウイルスから放散したことを示している。NH3-2 期の PBMC のウイルスのうち多剤耐性変異以外の型は、いずれも系統樹の枝が短いことから進化速度が遅いことが示唆される。これは、突然変異速度が遅いというより世代を重ねていないことが原因と考えたほうがよい。NH3-2 期の PBMC で得られたウイルスは、NH3-1~NH3-2 の間にいわゆるリザーバー細胞に休止状態で残った「アーカイバ」の内容を反映していると考えられる。系統樹解

析の結果は、NH3-2 以降ではこのアーカイバの変異から、その時の治療環境に最も適したハプロタイプを持つウイルスが選ばれて血液中に循環していることを示している。

Bootscan、subregion tree の解析結果は、NH3-2 の多剤耐性変異体が、アーカイバ中の LI 型と WY 型のハプロタイプの組換え体であることを強く示唆した。NH3-3 の変異は、phylogenetic network 解析がアーカイバ中の LI 型と RW 型の組換え体であることを示唆したが、NH3-4 では組換えが選択的に有利な変異を生んだ証拠は得られず、NNRTI に対する耐性変異は新たな点突然変異で主に起こっている。薬剤耐性変異の生成における組換えの重要性についてはすでに多くの報告があるが、リバータントの生成をアーカイバの配列情報とあわせて観察した例は少ない。本研究の結果は、HIV-1 の circulate するウイルスの多様性と未来の進化過程には、過去に蓄積したアーカイバの多様性が大きな影響を及ぼしていることを明確に示している。この際、NH3-2 のように組換えにより複雑なハプロタイプを得ることが選択的に有利な状況では、組換えの寄与は突然変異に対して相対的に大きくなる。しかし、アーカイバ中に有用な変異が十分にある状況では、組換えの寄与なしに適応度の高いウイルスを生成しうる。In vitro の系では、アーカイバの多様性を再現できていないため、組換えと突然変異の寄与率は常に一定なのであろう。

一方、RT 領域の組換えが起こりやすい領域があるかどうかの問いには、今回の研究からは探し出せないと答えるしかない。検出された組換えウイルスは、複製を何世代も繰り返したものと推測され、祖先ウイルスでの選択や機会的浮動の効果が推定できないためこうしたウイルスの頻度をもって、配列部位による乗換えの起こりやすさを断定はできない。しかし、これまで