

135. エイズウイルスの種間伝播・病原性獲得原理の解明

佐藤 佳

京都大学 ウイルス研究所 ウイルス病態研究領域

Key words : HIV-1, レンチウイルス, 適応進化, 進化的軍拡競争

緒 言

種々の病原体の中には、ヒト特異的に感染し、病原性を発現する病原体が存在する。ヒト特異的病原体の代表例として、エイズの原因ウイルスであるヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) が挙げられる。抗 HIV-1 薬多剤併用療法の確立により、HIV-1 感染症の治療成績は格段に改善した。しかしながら、根治療法はいまだに確立されておらず、より効果的な新規治療法が求められている。これまで根治療法が確立できなかった一因として、HIV-1 の病原性がヒトに限られており、HIV-1 感染病態を生体内で忠実に再現できる動物モデルが存在しなかったことが挙げられる。この問題を解決するために、筆者は、重度免疫不全マウスである NOG マウス (実験動物中央研究所が作製) に、ヒト CD34 陽性造血幹細胞を移植することにより、ヒト造血能を有する"ヒト化マウス"を作製した (図 1)。作製したヒト化マウスは、HIV-1 増殖を 30 週以上持続することができ、HIV-1 感染者で確認される病態を忠実に再現した。さらに、作製した HIV-1 感染ヒト化マウスモデルを駆使し、HIV-1 感染病態の分子メカニズムの詳細を世界に先駆けて明らかにしてきた¹⁾。

これまでの研究から、パンデミックを引き起こした HIV-1 (HIV-1M) は、チンパンジーの弱病原性ウイルス SIVcpz が約 100 年前にヒトに種間伝播・適応進化することにより誕生したと推定される (図 2)。しかし、SIVcpz がパンデミック HIV-1 としてヒトへの適応進化を遂げる上で、どのように適応進化し、強病原性を獲得したのかについては不明である。

また、HIV-1 はレトロウイルス科レンチウイルス属に分類されるウイルスであるが、病原性レンチウイルスとして他に、旧世界ザルやネコに病原性を発現する simian immunodeficiency virus (SIV) や feline immunodeficiency virus (FIV) が知られている。しかしながら、これらのレンチウイルスがどのようにして病原性を発現・獲得してきたのか、どのようにしてそれぞれの種に適応進化してきたのかについては不明な点が多い。

本研究では、ヒト化マウスモデルと数理科学・分子系統学的手法を用いたレンチウイルスの病原性獲得メカニズムの解明 (計画 1) ; レンチウイルスの感染病態獲得メカニズムの分子生物学的・系統学的解明 (計画 2-4) を目的とした。

方 法

1. ヒト化マウスモデルを用いた SIVcpz のヒトへの適応進化・病原性獲得メカニズムの再現と理解 (計画 1)

新興病原性ウイルスの出現原理は、"off-the-shelf emergence"と"tailor-made emergence"のふたつに大別される。前者は「新宿主への適応性を旧宿主内で予め獲得していたウイルスが種間伝播した」こと、後者は「新宿主への適応性を新宿主への侵入後に変異・獲得した」ことにそれぞれ起因する²⁾。

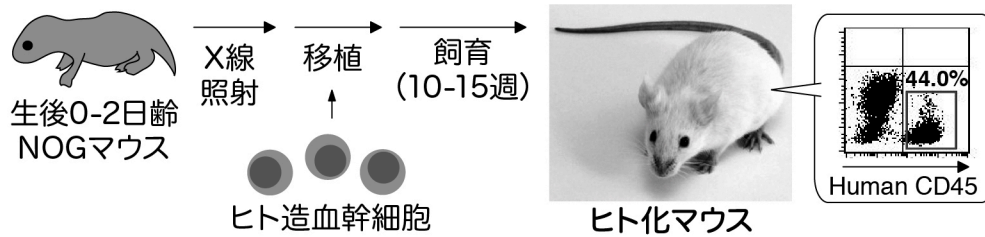


図1. ヒト化マウスの作製方法

ヒト CD34 陽性造血幹細胞の移植により、ヒト CD45 陽性白血球（図枠内）が1年以上、マウス体内に維持される。

パンデミック HIV-1 にもっとも近縁な SIVcpz (MB897 株) とそうではない SIVcpz (EK505 株) (図2)、パンデミック HIV-1 2 株 (JRCSF 株、AD8 株) をそれぞれヒト化マウスに接種し、血漿中ウイルス RNA 量を real-time RT-PCR 法で、血中 CD4T 細胞数を flow/hematocytometry 法でそれぞれ経時的に測定した。感染後 15 週齢のマウスを解剖し、脾臓におけるウイルス感染細胞を flow cytometry 法で解析した。また、293T 細胞、TZM-bl 細胞を用い、ウイルスがコードするウイルスタンパク質の機能解析を行った。

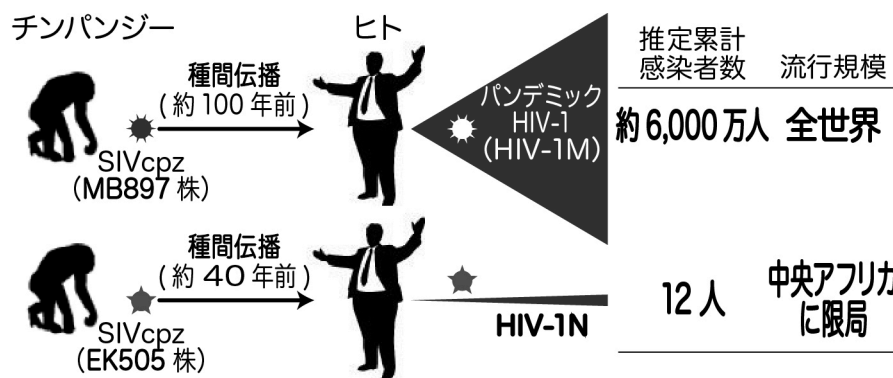


図2. SIVcpz/HIV-1 のヒトへの種間伝播と流行規模

パンデミック HIV-1 (HIV-1M) は、チンパンジーのウイルス SIVcpz が約 100 年前にヒトに種間伝播することにより誕生した、と推定されている。

2. レンチウイルスの適応進化メカニズムの分子生物学的・分子系統学的理解 (計画 2-4)

細胞性シチジン脱アミノ化酵素である APOBEC3 (A3) は、HIV-1 をはじめとしたレンチウイルス複製を強力に抑制する抗ウイルス因子である。イエネコは、A3Z3 と呼ばれる抗レンチウイルス遺伝子をコードしている。一方、FIV をはじめとするレンチウイルスがコードしている viral infectivity factor (Vif) は、A3 を分解することでその抗ウイルス能を相殺する。最近、イエネコ A3Z3 には少なくとも 7 つの多型が存在することが報告された³⁾。本研究では、イエネコ A3Z3 遺伝子の多型と抗ウイルス活性・Vif 感受性の関連について、分子系統学的手法と実験ウイルス学的手法により検証した。

また、SIV がそれぞれの旧世界ザルに適応進化するためのステップとして、多機能なウイルスタンパク質 Nef の機能が関連している可能性が疑われている。本研究では、感染受容体のダウンレギュレーション活性と、抗ウイルスタンパク質 tetherin の拮抗阻害活性に着目し、培養細胞を用いた細胞生物学的実験と分子系統学的解析を実施した。

さらに、ウイルスの伝播効率を定量的に理解するために、実験データに基づいた数理科学解析を実施した。

結果および考察

1. ヒト化マウスモデルを用いた SIVcpz のヒトへの適応進化・病原性獲得メカニズムの再現と理解 (計画 1)

培養細胞を用いた実験の結果、各 SIVcpz の感染性および各ウイルスタンパク質の機能に差異は確認されなかった。一方、ヒト化マウスモデルを用いた実験の結果、興味深いことに、パンデミック HIV-1 に関連のない SIVcpz に比べ、生体内における SIVcpz MB897 株 (パンデミック HIV-1 にもっとも近縁な株) の増殖性、病原性は、パンデミック HIV-1 のそれらにきわめて酷似していた (図 3)。以上の結果から、SIVcpz は原則的に "off-the-shelf emergence" としてヒトへの適応進化を遂げたこと、すなわち、元来ヒトへの適応性のきわめて高い SIVcpz がヒトに伝播し、パンデミック HIV-1 へと変貌したことが唆された。現在、SIVcpz MB897 株がさらなるヒトへの適応進化を遂げるために必要な獲得変異について、詳細な解析を進めている (Sato *et al.* 論文投稿準備中)。

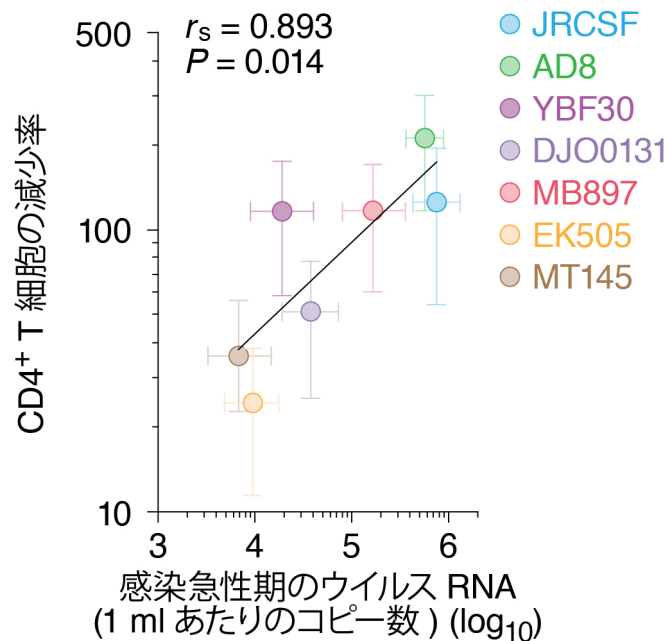


図 3. 各ウイルス感染による CD4T 細胞の減少とウイルス増殖

各ウイルス感染による CD4T 細胞の減少率 (縦軸) と、感染急性期 (2 週) におけるウイルス増殖 (横軸) の相関を示した。これらの値の間に統計的に有意な相関があること (Spearman's correlation test, $P = 0.014$) を示している。また、SIVcpz MB897 株の値が、他の SIVcpz に比べ、パンデミック HIV-1 (JRCSF 株、AD8 株) の値に近いことが明らかとなった。

2. FIV の種間伝播・適応進化メカニズムの分子生物学的・分子系統学的理解 (計画 2)

分子系統学的解析 (PAML 法) により、ネコ A3Z3 の 65 番目のコドンが正の選択を受けていることがわかった。また、培養細胞を用いた実験ウイルス学的解析から、全ての多型は同程度の抗ウイルス活性を示した。一方、興味深いことに、ひとつの多型 (Haplotype V) は FIV Vif の分解能に対して抵抗性を示した。各多型のアミノ酸を比較検討したところ、正の選択を受けていた 65 番目のアミノ酸残基の大きさが、Vif に対する感受性を規定していることを明らかにした。そして、分子系統学的解析 (BEAST 法) から、FIV 抵抗性を示す Haplotype V は、約 6 万年前に出現したことが推定された⁴⁾。

3. SIV の種間伝播・適応進化メカニズムの分子生物学的・分子系統学的理解 (計画 3)

培養細胞を用いた実験から、SIV の Nef タンパク質の受容体 (CD4)、共受容体 (CCR5, CCR2B, CXCR6) のダウンレギュレーション活性には大きな差がないことが明らかとなった。すなわち、SIV Nef タンパク質の受容体・共受容体のダウンレギュレーション活性は、種間伝播の効率および病原性発現と関連しないことが推察された⁵⁾。

一方で、検討したすべての SIV Nef タンパク質は、旧世界ザルの共通祖先 (分子系統学的手法によって推定・作成した) の tetherin を効率良く拮抗阻害することが明らかとなった。この結果は、分子系統学的解析で得られた情報を基に分子生物学的解析を試みた、新規性に富んだ研究である⁶⁾。

4. 実験ウイルス学と数理生物学の学際融合研究 (計画 4)

得られたさまざまな実験データを基に、実験ウイルス学と数理生物学の学際融合研究を展開した。具体的には、振とう培養系においてウイルス感染実験を実施し、各種実験データ (培養上清中のウイルス量、感染細胞数、非感染細胞数) を経時的に取得し、細胞間接触がウイルス伝播に与える効率を推定した。その結果、細胞間接触によってウイルスの細胞間伝播効率を 3.9 倍亢進することを明らかにした。本研究では、培養細胞を用いた感染実験によって得られた実験データを数理科学的に解析・解釈することにより、「ウイルス粒子を介さない感染伝播」という、実験的には検証不可能なパラメーターを抽出し、またそれを定量的に評価することに成功した⁷⁾。

文 献

- 1) Impacts of humanized mouse models on the investigation of HIV-1 infection: illuminating the roles of viral accessory proteins in vivo. Yamada E, Yoshikawa R, Nakano Y, Misawa N, Koyanagi Y, Sato K. *Viruses*. 2015 Mar 23;7(3):1373-90. doi: 10.3390/v7031373. PMID: 25807049
- 2) Homles, *The Evolution and Emergence of RNA Viruses*, 2009, pp. 131-155.
- 3) Analysis of single-nucleotide polymorphisms in the APOBEC3H gene of domestic cats (*Felis catus*) and their association with the susceptibility to feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus infections. de Castro FL, Junqueira DM, de Medeiros RM, da Silva TR, Costenaro JG, Knak MB, de Matos Almeida SE, Campos FS, Roehe PM, Franco AC. *Infect Genet Evol*. 2014 Oct;27:389-94. doi: 10.1016/j.meegid.2014.08.024. PMID: 25173082
- 4) A Naturally Occurring Domestic Cat APOBEC3 Variant Confers Resistance to Feline Immunodeficiency Virus Infection. Yoshikawa R, Izumi T, Yamada E, Nakano Y, Misawa N, Ren F, Carpenter MA, Ikeda T, Münk C, Harris RS, Miyazawa T, Koyanagi Y, Sato K. *J Virol*. 2015 Oct 21;90(1):474-85. doi: 10.1128/JVI.02612-15. PMID: 26491161
- 5) Down-modulation of primate lentiviral receptors by Nef proteins of simian immunodeficiency virus (SIV) of chimpanzees (SIVcpz) and related SIVs: implication for the evolutionary event at the emergence of SIVcpz. Nakano Y, Matsuda K, Yoshikawa R, Yamada E, Misawa N, Hirsch VM, Koyanagi Y, Sato K*. *J Gen Virol*. 2015 Sep;96(9):2867-77. doi: 10.1099/vir.0.000207. PMID: 26041873
- 6) Coevolutionary dynamics between tribe Cercopithecini tetherins and their lentiviruses. Takeuchi JS, Ren F, Yoshikawa R, Yamada E, Nakano Y, Kobayashi T, Matsuda K, Izumi T, Misawa N, Shintaku Y, Wetzel KS, Collman RG, Tanaka H, Hirsch VM, Koyanagi Y, Sato K. *Sci Rep*. 2015 Nov 4;5:16021. doi: 10.1038/srep16021. PMID: 26531727
- 7) Cell-to-cell infection by HIV contributes over half of virus infection. Iwami S*, Takeuchi JS, Nakaoka S, Mammano F, Clavel F, Inaba H, Kobayashi T, Misawa N, Aihara K, Koyanagi Y, Sato K. *Elife*. 2015 Oct 6;4. doi: 10.7554/eLife.08150. PMID: 26441404