

氏名	あき やま ひさ し 秋 山 尚 志
学位の種類	博 士 (人間・環境学)
学位記番号	人 博 第 222 号
学位授与の日付	平成 16 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	人間・環境学研究科人間・環境学専攻
学位論文題目	Construction of New Simian / Human Immunodeficiency Chimeric Viruses (SHIVs) towards a Better Animal Model for HIV-1 Infection in Humans (新規SIV / HIV-1キメラウイルス (SHIV) の作製 — より良い HIV-1 感染動物モデルの構築にむけて —)
論文調査委員	(主査) 教授 速水正憲 教授 加藤 真 教授 松井正文 教授 小松賢志 助教授 三浦智行

論 文 内 容 の 要 旨

1983年にヒト免疫不全ウイルス1型 (HIV-1) がエイズの病原体として発見・同定されてから約20年が経過した。以後、精力的な研究が世界的規模で行われ、多くの知見が得られている。特に、遺伝子レベルならびに細胞レベルにおける研究の進展はめざましい。それに比し、ウイルスの病原性の解明やワクチンの開発といった個体レベルでの研究は思うようには進んでいない。その原因の一つとして、HIV-1がヒト以外にはチンパンジーといった限られた動物にしか感染せず、アカゲザル等の医学実験用動物を用いて実験的解析が行えないことによる HIV-1 感染動物モデルの欠如が挙げられる。そこで、HIV-1に近縁で、サルに感染しヒトのエイズ様症状を引き起こすサル免疫不全ウイルス (SIV) とサルの系が HIV-1 感染動物モデルとして用いられてきた。しかしながら、HIV-1とSIVは近縁とはいえ異なるウイルスである。そこでサルに感染する HIV-1の開発を目指し、SIVを基に HIV-1 遺伝子をもつキメラウイルスが作製された。この SHIV は HIV-1 の外被蛋白質である Env を持つことから、これを攻撃接種ウイルスとして用いることにより、HIV-1 Env を標的とするワクチン候補の効果判定がサルを用いることにより可能になった。加えて、この SHIV には病原性と非病原性のものが得られていることから、病原性の解析も個体レベルで可能となり、SHIV-サルの系は現在広く用いられている。ところが、従来の SHIV の多くは *env* を含むゲノムの 3' 側半分のみが HIV-1 由来であった。そこで本研究では、HIV-1 感染により近い動物モデルを構築することを目的に、できる限り広範な HIV-1 遺伝子を持つ SHIV を作製し、それらの感染増殖能を細胞レベルならびに個体レベルで解析した。

第一章では、3' 側半分に加えて *pol* の逆転写酵素 (RT) コード領域 (*rt*) も HIV-1 由来のものに置換した SHIV_{rt/3rn} を作製した。SHIV_{rt/3rn} は、ヒトおよびサル由来細胞株のみならず、サル末梢血単核球 (PBMC) においても増殖能を有した。また、HIV-1 の RT を持つことから、HIV-1 特異的 RT 阻害剤によってその増殖が阻害されることを示した。その感受性は HIV-1 と同等であり、このウイルスを薬剤の効果判定に用いることができると考えられる。さらに、SHIV_{rt/3rn} を 2 頭のアカゲザルに接種し、サル個体内における感染増殖能を検討した。血漿中ウイルス量、プロウイルスの検出、感染性ウイルスの分離等の結果から、SHIV_{rt/3rn} はサル個体内で感染増殖能を有することが示された。

第二章では、上記の SHIV_{rt/3rn} の遺伝子構造に加えて、*pol* のインテグラーゼ (IN) コード領域 (*int*) も HIV-1 由来のものに置き換えた SHIV_{rti/3rn} を作製した。SHIV_{rti/3rn} はヒトおよびサル細胞株においては明らかな増殖を示したものの、サル PBMC においてはその増殖は微弱であった。そこで、サル細胞への馴化を狙い、サル由来細胞株において SHIV_{rti/3rn} を継代したところ、SHIV_{rti/3rn} はサル PBMC においても明らかな増殖を示すようになった。一方、ヒト由来細胞株においては継代前後で増殖能に大きな差異はみられず、馴化はサル細胞特異的であることが示唆された。また、継代後のウイルス遺伝子に 9 カ所の変異を同定した。加えて、その継代後のウイルスのサル由来細胞株への傷害性が高まったこ

とも示した。しかしながらそれらの変異と増殖能および細胞傷害性との因果関係は現段階では明らかではない。さらに、個体内での感染増殖能を検討するために、この継代後のSHIVrti/3rnを3頭のアカゲザルに接種した。血漿中のウイルス量は接種後初期に高値を示し、プロウイルスも早い段階から検出され、感染性ウイルスも分離されたことなどから、SHIVrti/3rnはサル個体内でも感染増殖能を有することが示された。

これらのSHIV、特に第二章で作製したSHIVrti/3rnはHIV-1の*rt*、*int*、*vpr*、*vpu*、*tat*、*rev*、*env*ならびに*nef*遺伝子領域を持つことから、従来報告されているサルに感染するSHIVに比べ遺伝子構造が最もHIV-1に近い。ゆえに、そのサル感染はHIV-1によるヒト感染により近い動物モデルと言える。加えて、これらのSHIVはHIV-1のEnv、RTさらにはINを有することから、HIV-1特異的RT阻害剤や、現在治療薬として開発中のIN阻害剤、さらにはEnvを標的にした侵入阻害剤を用いた新たな多剤併用療法の個体レベルでの評価を可能とした。

論文審査の結果の要旨

ヒト免疫不全ウイルス1型(HIV-1)はエイズの病原体として約20年前に発見されて以来、その感染者は今なお増加している。現在、ワクチンの開発が急務となっているが、未だ実用化に至っていない。また、その開発の基盤となる「なぜHIV-1はエイズを起こすのか」という問題も未解明である。その理由として、HIV-1は宿主域が狭く、アカゲザルといった医学実験用動物には感染しないため、ワクチン開発等に必要不可欠な個体レベルでの実験的研究が難しいことが挙げられる。この困難を乗り越えるべく、HIV-1に近縁でサルに感染するサル免疫不全ウイルス(SIV)とHIV-1遺伝子の約半分を組み合わせたキメラウイルス(SHIV)が開発された。以後、サルに感染するSHIVを用いたサル感染実験系が確立され、個体レベルでの重要な知見を数多くもたらしてきた。

今日まで多数のSHIVが作製され、エイズ発症機序の解明やワクチン開発研究に利用されてきたが、その殆どは遺伝子の3'側半分のみがHIV-1由来であった。そこで申請者は、できる限り広範なHIV-1由来遺伝子領域を持つSHIVの作製を試み、HIV-1感染により近い動物モデルの構築を目指したのが本研究である。

第一章では、従来のSHIVが持つHIV-1の3'側半分の遺伝子に加えて*pol*遺伝子領域の逆転写酵素(RT)領域もHIV-1由来であるSHIVrt/3rnを作製した。このウイルスが培養サル末梢血単核球(PBMC)のみならず、サル個体内においても感染増殖能を有することを示した。また、HIV-1特異的RT阻害剤によってその増殖が抑制されることを細胞レベルで示した。この結果は従来のSHIVのHIV-1遺伝子領域の拡張に成功したことを示している。次に第二章では、上記のSHIVのHIV-1由来遺伝子領域に加えてさらに*pol*のインテグラーゼ(IN)領域もHIV-1由来であるSHIVrti/3rnを作製した。当初このウイルスのサルPBMCでの増殖は微弱であったが、サル樹立細胞株における継代によってサル細胞に馴化し、サルPBMCにおいても明らかな増殖能を示した。さらに、継代後のウイルスはサル個体内においても感染増殖能を有することを明らかにした。このウイルスは現在HIV-1に最も近い遺伝子構造を持っており、申請者はヒトのHIV-1感染に現在、最も近いモデルの確立に成功したと言える。この新しく作製されたSHIVはHIV-1由来のEnvに加えてRTとINを持っていることから、現在臨床で用いられているRT阻害剤や開発中のINやEnv阻害剤といったエイズ治療薬の効果判定にサルを用いることを可能とした。また本論文では、このウイルスがサル細胞に馴化する過程で生じた変異を同定している。この変異はウイルス増殖に関わる宿主側因子との相互関係により生じ、サルPBMCにおける増殖能の向上をもたらしたものと申請者は推論している。今後、その変異をもたらした宿主側因子の同定が期待され、その成果はウイルス増殖機序の解明の上で重要な知見になると考えられる。

以上、申請者は本学位論文でサルに感染するHIV-1に最も近い新規SHIVの作製に世界に先駆けて成功し、ヒトのHIV-1感染により近い動物モデルを構築した。この新しいSHIVは、既存の抗HIV-1剤や現在開発中のINやEnvを標的にした阻害剤などの単独評価のみならず、それらの組み合わせによる新たな多剤併用療法の個体レベルでの評価にサルを用いることを可能にした。このことは、今後エイズ治療の選択肢を増やすことにつながり、現在問題となっている薬剤耐性ウイルスを克服する方法を確立する上でも有用な成果と考えられる。また本論文は、HIV-1感染動物モデルの構築にとどまらず、ウイルス増殖に関わる宿主側因子の同定、さらには「HIV-1がなぜサルには感染増殖しないのか」という命題の解明へつながるものと言えよう。ウイルスが種の壁を乗り越えて感染し新たな宿主と新たな関係に入る過程を明らかにする研究に、

本研究が将来発展することが期待される。申請者は本論文の内容に関して、既に第一章に関する論文を国際学術誌 (Journal of General Virology 誌) に公表しており、本論文の価値は当該分野の研究者にも高く評価されている。また、本学位論文は、人間と環境の問題を総合的に考察し、現在人類が直面している困難な諸問題の根本的な解決に資する創造的研究を目指して創設された人間・環境学専攻自然環境論講座にふさわしい内容を備えたものと言える。

よって本論文は博士 (人間・環境学) の学位論文として価値あるものと認める。また、平成16年1月20日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。