

(続紙 1)

京都大学	博士 (人間・環境学)	氏名	堀池 麻里子
論文題目	Mesenteric lymph nodes harbor viral reservoirs that cause viral rebound in SIV-infected macaques upon cessation of combined antiretroviral therapy (SIV感染サル ¹ の腸間膜リンパ節に存在する抗ウイルス化学療法中止後のウイルスリバウンドを起こすリザーバーに関する解析)		
(論文内容の要旨)			
<p>現在ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染者に実施されている主な治療は、抗ウイルス薬を複数組み合わせ投与する多剤併用療法である。多剤併用療法により血中ウイルス量は検出限界以下まで減少するものの、完全に抑制することはできず、治療を中断すると血中ウイルス量はリバウンドする。これは、多剤併用療法中もわずかではあるがウイルスが産生されていることを示しており、この現象に関与する細胞群 (リザーバー) を明らかにすることがエイズの根治に繋がる。</p> <p>リザーバー同定のため、HIV感染者から容易に得られる末梢血の解析が中心に行われていたが、これでは不十分であることが示唆されていた。この理由は、HIVの標的細胞の多くは、末梢血中ではなくリンパ系組織および粘膜免疫を担う肺、生殖器、腸管に多く存在するためである。それゆえに、本研究ではサル免疫不全ウイルス (SIV) を接種したサルに多剤併用療法を実施し、上記組織を含む全身組織の解析によるリザーバーの同定を目的とした。</p> <p>初めに、SIV感染サルにおける多剤併用療法レジメンを確立するため、MT-4細胞を用いたMTTアッセイにより抗SIV活性を持つ薬剤の選択を実施した。薬剤の投薬方法としては、サルに負担がかからない経口投与を選択し、サルが自発的に、そして確実に摂取するような方法として、通常与えている飼料およびバナナと混合した。投薬量は成人の半量、投薬頻度はヒトと同様とした。上記の条件が適切かを確認するため、サル9頭に薬剤入り飼料を与えたところ、7頭が摂食した。さらに、これらの個体における血中薬物濃度は、いずれもヒトでのトラフ値を上回っていたことから、7頭のSIV感染サルの内4頭に対し上記投与計画での治療を一年間実施した。その結果、血中ウイルス量は治療開始後14週以内に検出限界以下まで減少し、ウイルス抑制効果は剖検時まで持続した。さらに、数理モデルにより解析した治療開始後の血中ウイルス量の減少率は、多剤併用療法を実施したHIV患者と非常に良く似通っていた。</p> <p>次に、治療中も組織内でウイルスが複製されているのかを確認するため、</p>			

剖検により得られた全身組織を定量的逆転写PCR（酵素連鎖反応法）により解析したところ、“その他の組織<肺、膣、腸管<リンパ系組織”の順に高いウイルスRNA量を検出した。これらの結果より、一年間治療を継続し、血中 ウイルス量が検出限界以下になった個体においても、組織中でウイルスが複製されていること、そしてそれは、リンパ系組織において最も活発に起きていることが明らかになった。

しかし、リザーバー同定のため組織化学染色を実施したところ、ウイルス RNAまたはタンパク質を発現している細胞を検出することはできなかった。一般に、組織化学染色による検出感度はPCRにおけるそれよりも低いと考えられることから、リザーバーにおけるウイルス複製を促進し、組織化学染色での検出を可能にするため、治療の中断を提案した。組織中のウイルス複製促進により血中ウイルス量のリバウンドが予測されることから、治療中断後は二、三日毎に血中ウイルス量の測定を行うこととした。

新たなサル2頭にSIVを接種、多剤併用療法を実施し、治療中断十日後に剖検を行った。剖検時の血中ウイルス量は一頭では1400コピー/ml、もう一頭は検出限界以下であった。次に、定量的逆転写PCRにより全身組織を解析した結果、ウイルスRNA量の分布は先の治療群と同様であることが明らかになった。そこで、血中ウイルス量がリバウンドした個体において組織化学染色を実施したところ、リンパ系組織濾胞内においてウイルスタンパク質であるNef陽性細胞を検出した。さらに、蛍光色素を用いた組織化学染色により、Nef陽性細胞は CD3陽性、つまりT細胞であることが明らかになった。そこで、全てのリンパ系組織切片において組織化学染色を実施した結果、305枚中16枚においてNef陽性T細胞を検出した。これらの切片のうち12枚は腸間膜リンパ節、残り4枚は他のリンパ系組織のものであった。そして全てのNef陽性T細胞のうち、75%が濾胞内に位置していた。血中ウイルス量がリバウンドしなかった個体において検出できたNef陽性T細胞は、組織切片136枚中ただ1枚であった。従って、血中ウイルス量がリバウンドしたサルにおけるNef陽性細胞、おそらくウイルス複製細胞のほとんどは、腸間膜リンパ節濾胞内に存在することが明らかになった。

以上の事から、腸間膜リンパ節が治療中断後の血中ウイルスリバウンドの原因となるリザーバーを保持する主要な組織であることを示唆し、治療中断後血中ウイルス量がリバウンドしたSIV感染サルは、リザーバー研究における サロゲートモデルになり得ることを示した。

(論文審査の結果の要旨)

エイズは世界三大感染症の一つであり、原因ウイルスであるHIVの発見から30年経った現在もなお、世界規模の問題である。しかしワクチンは未だ開発されておらず、主流となっている抗ウイルス薬を併用する多剤併用療法もまた、多くの問題を抱えている。最大の問題は、エイズ完治の妨げとなっている、治療中もウイルスを産生する細胞群（リザーバー）の存在である。リザーバー同定のため、これまで主に、HIV感染者の末梢血を用いた研究が行われてきたが、未だ同定には至っていないのが現状である。この理由は、倫理的な観点から、ウイルス標的細胞が多く存在するリンパ系組織および肺、生殖器、腸管の解析が進んでいないことにある。上記深部組織解析のため、サル免疫不全ウイルス（SIV）感染サルを用いた解析が有用であると考えられるが、この動物モデルにおける、ヒトでの多剤併用療法を再現する投与計画は確立されていなかった。このような状況を鑑み、SIV感染サルにおける多剤併用療法を確立し、上記組織解析によりリザーバー同定を試みたのが本研究である。

申請者は初めに、SIV感染サルにおける多剤併用療法のレジメン確立を目的とし、抗SIV活性を有する薬剤を選択、さらに、サルに自発的かつ確実に摂取させるため、通常の固形飼料およびバナナと混合する方法を考案した。上記の方法により、サル9頭中7頭が薬剤入り飼料を摂食し、いずれの個体の血中薬物濃度もヒトでのトラフ値を上回っていた。そこで、4頭のSIV感染サルに対し治療を一年間実施した結果、血中ウイルス量を長期間検出限界以下に抑制することに成功した。さらに、治療開始後の血中ウイルス量の減少率は、HIV感染者で見られるものと同様であったため、SIV感染サルにおける多剤併用療法を確立したと結論づけた。この成果は、治療下HIV患者におけるウイルス動態を良く再現し、長期間治療可能な上記サルモデルの確立は、世界初であり、リザーバーを同定するにあたり有用であると考えられる。

続いて、治療により血中ウイルス量が検出限界以下となった個体においても、組織中でウイルス複製が起こっているかを確認するため、治療実施中のサルを安楽殺、剖検し、定量的逆転写PCR（酵素連鎖反応法）により組織中のウイルスRNAを検索した。その結果、高いウイルスRNA量が検出された組織は、リンパ系組織、続いて肺、膣、腸管であった。従って治療中であっても、組織内、特にリンパ系組織内で活発にウイルス複製が起こっていることを明らかにした。このような検索は動物モデルを用いることで初めて可能であり、現行の治療戦略の限界を明らかにした点で意義深い。

しかし、リザーバー、つまりウイルスRNAまたはタンパク質発現細胞を組織化学的に検出することはできなかった。この原因は組織化学染色の感度の低

さにあると考えた申請者は、組織内のリザーバーにおけるウイルス複製を促進し組織化学染色でのウイルス抗原の検出を可能にするため、治療中断後の組織解析を提案した。そこで、2頭のSIV感染サルに8週間治療を実施、中断後に1頭において血中ウイルス量のリバウンドが確認されたため、治療中断10日後に剖検、解析を行った。これら2頭の組織におけるウイルスRNA量の分布は、先の治療群と同様であった。続いて組織化学染色を用いた解析の結果、大多数のウイルスタンパク質陽性T細胞が血中ウイルスリバウンド個体リンパ系組織濾胞内に存在することを明らかにした。化学療法に抵抗するウイルス

リザーバーがリンパ節、特に腸間膜リンパ節に存在し得ることを示したこの結果は、エイズ完治へ向けた治療戦略を立てる上で非常に有用なものである。

以上、申請者は本学位論文において、SIV感染サルにおける多剤併用療法を確立し、治療下個体の組織解析により血中ウイルス量が検出限界以下であっても組織内ではウイルスが複製されていることを明らかにした。更にサロゲートモデルとして治療中断後血中ウイルス量がリバウンドした個体の組織を解析することにより、腸間膜リンパ節がリザーバーを保持する主な組織であることを示唆した。これらの結果は、HIV患者の治療において、血中ウイルス量は深部組織におけるウイルス量を正確に反映するわけではないことについて注意を喚起し、体内HIVの完全排除のため、多剤併用療法に加え、組織内のウイルスを標的とした新しい抗ウイルス戦略の開発の必要性を提示した。

本研究の目的であったリザーバーの同定を含めた、治療中のHIV制御戦略は、昨年の国際エイズ会議において今後4年間に優先的に取り組むべき分野として採択されたことから、本研究で確立したSIV感染サルにおける多剤併用療法および治療を中断し血中ウイルス量がリバウンドした個体をサロゲートモデルとして用いる手法は、今後当該分野の研究において多用されることが期待されている。

申請者は本論文の内容を、既に国際学術誌（VIROLOGY誌）において公表しており、その価値は当該分野の研究者にも高く評価されている。このように、本学位論文は、自然と人間との自立的な関わり of 限界特性を明らかにし、自然環境動態の将来予測を行うための方法論と実際を教育研究することを目指して設立された相関環境学専攻自然環境動態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有るものと認める。また平成24年1月24日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降