

## HIV-1 感染における重感染の定量的解析 -細胞の感受性の不均一性の影響-

伊藤悠介<sup>1</sup>, Azaria Remion<sup>2</sup>, Fabrizio Mammano<sup>2</sup>, 巖佐庸<sup>3</sup>, 岩見真吾<sup>2,3,4</sup>

九州大学理学部生物学科<sup>1</sup>

INSERM, U941, Paris, France<sup>2</sup>

九州大学大学院理学研究院生物科学部門<sup>3</sup>

科学技術振興機構さきがけ<sup>4</sup>

Yusuke Ito<sup>1</sup>, Azaria Remion<sup>2</sup>, Fabrizio Mammano<sup>2</sup>, Yoh Iwasa<sup>3</sup>, and Shingo Iwami<sup>2,3,4</sup>

Department of Biology, Faculty of Sciences, Kyushu University<sup>1</sup>

INSERM, U941, Paris, France<sup>2</sup>

Department of Biology, Faculty of Sciences, Kyushu University<sup>3</sup>

PRESTO, Japan Science and Technology Agency<sup>4</sup>

### ABSTRACT

HIV-1 の重感染は、1 細胞内に複数のウイルスが同時に感染する現象であり、遺伝的組替えの効率を高める事で HIV-1 の多様性に寄与すると考えられている。特に HIV-1 の重感染が、特定の細胞に偏って生じるという「HIV-1 重感染における偏向性」が近年注目され、この偏向性には「細胞の感受性の不均一性」が大きく関与している可能性が実験的にも理論的にも明らかにされてきた。本稿では、HIV-1 重感染の偏向性を記述する確率モデルの構築と HIV-1 感染実験データの定量的解析について報告する。さらに、開発した数理モデルと推定したパラメーターを用いる事で明らかになった、実験解析では特定が容易ではない「1 細胞に感染するウイルス数」に関する知見についても説明する。

Key words: HIV-1 重感染；細胞の感受性の不均一性；確率モデル

### 1. はじめに

HIV-1 の遺伝的多様性を形成する 1 つのメカニズムとして、近年 HIV-1 の重感染が注目を浴びている[1,2]。HIV-1 の重感染は、1 細胞内に複数のウイルスが同時に感染する現象であり、遺伝的組替えの効率を高める事で HIV-1 の多様性に寄与すると考えられている。近年の HIV 研究において、HIV-1 の重感染はランダムに生じるよりも多く起こる事が明らかになってきた[1,2]。この現象は、「HIV-1 重感染における偏向性」と言われる。先行研究[1]によると、標的細胞の感受性の不均一性が原因となり、HIV-1 重感染の偏向性が引き起こされると考えられている。そこで本稿では、HIV-1 重感染の偏向性

を記述する確率モデルの構築と HIV-1 感染実験データの定量的解析を行った。具体的には、(1)HIV-1 重感染の偏向性に重要な要因と示された細胞の感受性の不均一性を考慮した確率モデルを構築した。そして、この連続的な感受性不均一性を考慮することで、(2)理論的に HIV-1 重感染の偏向性を示す。また、不均一性を考慮したモデルによる HIV-1 感染実験データを解析した結果、(3)実験解析から定量する事が容易ではない 1 細胞に感染するウイルス数を推定する事が出来た。

## 2. HIV-1 重感染を記述する確率モデルの構築

### 2.1. HIV-1 重感染に対する確率モデルの導入

HIV-1 重感染において、実験解析から定量する事が容易ではない現象がある。例えば、HIV-1 感染に影響を及ぼす細胞の感受性や細胞に感染するウイルス数などである。本稿では、HIV-1 の重感染を定量的に解析するために、ウイルス感染はランダムであり細胞の感受性が不均一であることを仮定した確率モデルを考える。まず、感染実験の時間内に発生するウイルスの標的細胞への感染回数、すなわち、細胞に感染する HIV-1 数（プロウイルス数）がポアソン分布  $f(X = x)$  に従うと仮定する。この時、単位細胞内に侵入できるウイルス数の分布は、以下の式で書き表せる：

$$f(X = x) = \frac{(\beta s V)^x e^{-\beta s V}}{x!}. \quad (1)$$

ここで、 $x$  は 1 細胞内に侵入する HIV-1 の粒子数であり、 $\beta$  は HIV-1 の感染率、 $s$  は細胞の感受性、 $V$  は感染に関与するウイルス量を表している。また、感染細胞内にある HIV-1 平均プロウイルス数は  $\beta s V$  である。次に、細胞の感受性を表すパラメーター  $s$  は以下のガンマ分布に従うと仮定する：

$$g(s) = \frac{q^p s^{p-1} e^{-sq}}{\Gamma(p)}. \quad (2)$$

この時、 $p > 0$  と  $1/q > 0$  はそれぞれガンマ分布の形状母数と尺度母数であり、細胞感受性の平均と分散は  $p/q$  と  $p/q^2$  となる。

### 2.2. 負の二項分布の導出; HIV-1 重感染における偏向性を説明する

標的細胞の感受性を示すパラメーター  $s$  がガンマ分布に従い連続的に分布している事より、標的細胞に感染するウイルス数の確率密度関数  $\Pr(X = x)$  は式(1)(2)より以下の様に計算できる：

$$\begin{aligned} \Pr(X = x) &= \int_0^\infty \frac{(\beta s V)^x e^{-(\beta s V)}}{x!} \frac{q^p s^{p-1}}{\Gamma(p)} e^{-sq} ds \\ &= (\beta V)^x q^p \frac{1}{x! \Gamma(p)} \int_0^\infty s^{x+p-1} e^{-(\beta V + q)s} ds \\ &= \frac{\Gamma(x+p)}{x! \Gamma(p)} \left( \frac{q}{\beta V + q} \right)^p \left( \frac{\beta V}{\beta V + q} \right)^x \end{aligned}$$

$$= \binom{x+p-1}{x} \left( \frac{1}{1+\frac{\beta V}{q}} \right)^p \left( \frac{\frac{\beta V}{q}}{1+\frac{\beta V}{q}} \right)^x. \quad (3)$$

従って、1つの標的細胞に感染するウイルス数は平均 $\beta p V/q$ 、分散 $\beta p V(1+\beta V/q)/q$ の負の二項分布に従う事が分かる。特に、平均と分散が一致しているポアソン分布と比べて、負の二項分布は平均よりも分散が大きい。つまり、感受性の低い細胞にはウイルスは感染しづらくなり、一方で感受性の高い細胞にはウイルス感染が多く生じる事が示された。確率モデル(3)を用いて、以下 HIV-1 の重感染の偏向性の理論的解析と実験融合の定量的解析を行っていく。

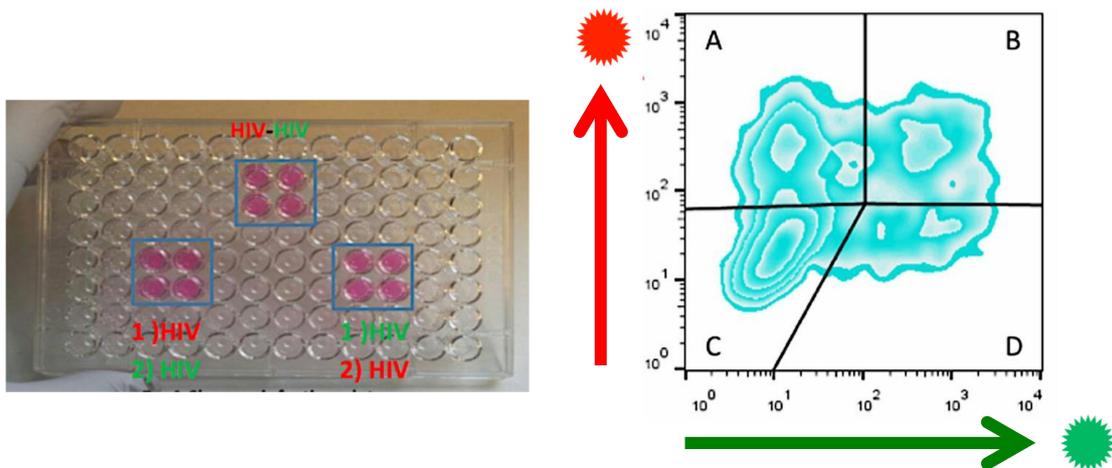


図 1：感染実験の様子(左)とフローサイトメトリー(FACS)による細胞の分画(右)

(左) 感染実験の様子であり各ウェルに対して1つのFACSの結果を得た。(右) FACSは細胞の状態に応じて、標的細胞を明確に4つに区分できる。なお実験データとして、各区画の細胞の割合(%)を取得した。

### 3. HIV-1 重感染の理論的予測

#### 3.1. HIV-1 重感染実験の概要

赤と緑の蛍光タンパク質を用いて、2種類のHIV-1を作製し感染実験を行った。標的細胞がどちらのウイルスに感染しているのかは、フローサイトメトリー(FACS)を用いた解析により特定出来る。フローサイトメトリーは、細胞の特性に応じて1つ1つの細胞を分画できる実験装置である。具体的には図1右において、蛍光タンパク質の発現量に応じて、0種類(未感染細胞)、1種類(赤もしくは緑のウイルス)、2種類のウイルスに感染した細胞(赤と緑のウイルスの両方)をそれぞれ分画する。なお図1右における各区画に対応する細胞の割合を以下のように定義する。

$$\text{(未感染細胞の割合)} = z(0,0),$$

$$\text{(赤のウイルスに感染した細胞の割合)} = z(0,1),$$

$$\text{(緑のウイルスに感染した細胞の割合)} = z(1,0),$$

$$(\text{重感染した細胞の割合}) = z(1,1).$$

感染実験では、上記のフローサイトメトリー上の各区画に対応する細胞の割合を取得した。3.2節ではこれらの実験データに対応する理論値を計算する。

### 3.2. FACS 上の各区画の細胞の割合の理論値

フローサイトメトリーによる解析では、“感染していない細胞”と“1つ以上のウイルスに感染した細胞”を区別する事が出来る。例えば感染に関与する赤ウイルス数を $V_R$ とした時、感受性が $s$ である細胞のうち赤ウイルスに感染していない細胞の頻度は $\Pr(X=0) = e^{-(\beta s V_R)}$ であり、赤ウイルスに感染している細胞の頻度は $\Pr(X \geq 1) = 1 - e^{-(\beta s V_R)}$ となる。赤ウイルスと緑ウイルスの感染が完全に独立であると仮定した時、細胞感受性 $s$ がガンマ分布している事に注意すれば、各区画に対応する細胞の割合は以下のように計算できる：

$$\begin{aligned} Z(1,1) &= \int_0^{\infty} (1 - e^{-\beta s V_R})(1 - e^{-\beta s V_G}) \frac{q^p s^{p-1}}{\Gamma(p)} e^{-qs} ds, \\ Z(0,1) &= \int_0^{\infty} (1 - e^{-\beta s V_R}) e^{-\beta s V_G} \frac{q^p s^{p-1}}{\Gamma(p)} e^{-qs} ds, \\ Z(1,0) &= \int_0^{\infty} e^{-\beta s V_R} (1 - e^{-\beta s V_G}) \frac{q^p s^{p-1}}{\Gamma(p)} e^{-qs} ds, \\ Z(0,0) &= \int_0^{\infty} e^{-\beta s V_R} e^{-\beta s V_G} \frac{q^p s^{p-1}}{\Gamma(p)} e^{-qs} ds. \end{aligned}$$

従って、以下の関係を得る：

$$\begin{aligned} Z(1,1) &= 1 - \frac{1}{\left(1 + \frac{\beta}{q} V_R\right)^p} - \frac{1}{\left(1 + \frac{\beta}{q} V_G\right)^p} + \frac{1}{\left(1 + \frac{\beta}{q} (V_R + V_G)\right)^p}, \\ Z(0,1) &= \frac{1}{\left(1 + \frac{\beta}{q} V_G\right)^p} - \frac{1}{\left(1 + \frac{\beta}{q} (V_R + V_G)\right)^p}, \\ Z(1,0) &= \frac{1}{\left(1 + \frac{\beta}{q} V_R\right)^p} - \frac{1}{\left(1 + \frac{\beta}{q} (V_R + V_G)\right)^p}, \\ Z(0,0) &= \frac{1}{\left(1 + \frac{\beta}{q} (V_R + V_G)\right)^p}. \end{aligned}$$

### 3.3 オッズ比(OR)：重感染の偏向性の指標

次に、HIV-1 の重感染の起こりやすさを定量するためにオッズ比(OR)を計算する。ここで、オッズとは感染が起こった確率 $p$ と起こらなかった確率 $1-p$ の比で以下のように定義される。

$$\frac{p}{1-p}$$

例えば、赤ウイルスに感染している細胞が緑ウイルスに感染する場合のオッズは、

$$\frac{\frac{z(1,1)}{z(1,1)+z(0,1)}}{1-\frac{z(1,1)}{z(1,1)+z(0,1)}}$$

となる。一方、赤ウイルスに感染していない細胞が緑ウイルスに感染する場合のオッズは、

$$\frac{\frac{z(1,0)}{z(1,0)+z(0,0)}}{1-\frac{z(1,0)}{z(1,0)+z(0,0)}}$$

である。この時、赤ウイルスによる感染の有無に応じた緑ウイルスによる感染の起こりやすさは、上記 2 つのオッズの比で与えられる：

$$OR = \frac{\frac{\frac{z(1,1)}{z(1,1)+z(0,1)}}{1-\frac{z(1,1)}{z(1,1)+z(0,1)}}}{\frac{\frac{z(1,0)}{z(1,0)+z(0,0)}}{1-\frac{z(1,0)}{z(1,0)+z(0,0)}}} = \frac{\frac{z(1,1)}{z(0,1)}}{\frac{z(1,0)}{z(0,0)}} = \frac{z(1,1)z(0,0)}{z(0,1)z(1,0)}$$

ここでオッズ比が 1 であれば、赤ウイルスによる感染の有無にかかわらず同程度に緑ウイルスによる感染が起こる。すなわち、HIV-1 の重感染がランダムに生じている事を意味している。また、オッズ比が 1 より大きい場合、HIV-1 の重感染はランダムに生じるよりも起こりやすい事を意味している。興味深い事に、 $z(0,0)$ 、 $z(1,0)$ 、 $z(0,1)$ 、 $z(1,1)$ を用いて理論的なオッズ比を計算すると次の関係を得る：

$$OR = \frac{z(1,1)z(0,0)}{z(0,1)z(1,0)} = \frac{(1-A-B+C)C}{(B-C)(A-C)} = 1 + \frac{C-AB}{(B-C)(A-C)} > 1.$$

ここで便宜上、 $A = 1/(1 + \beta V_R/q)^p$ 、 $B = 1/(1 + \beta V_G/q)^p$ 、 $C = 1/(1 + \beta(V_R + V_G)/q)^p$ と置いた。 $B - C > 0$ 、 $A - C > 0$ 、 $C - AB > 0$ である事に注意すればオッズ比は常に 1 より大きくなることが示される。ただし、細胞の感受性が一定であれば、オッズ比は 1 になる。つまり、標的細胞の感受性の不均一性が原因となり、HIV-1 重感染の偏向性が引き起こされると説明できるのである。この結果は、細胞の感受性を離散的に考えていた先行研究[1]を拡張している。

## 4. HIV-1 重感染実験の定量的な解析

### 4.1. HIV-1 重感染実験の詳細

開発した確率モデルを用いて HIV-1 重感染を定量的に解析していく。ここでは、赤ウイルスと緑ウイルスを用いた“重感染実験のデータ”と、赤ウイルスのみ、あるいは、緑ウイルスのみを用いた“単一感染実験のデータ”を説明する。赤ウイルスによる単一感染実験では、3種類の赤ウイルス接種量(37 $\mu$ l、75 $\mu$ l、100 $\mu$ l)を用い、緑ウイルスによる単一感染実験では、3種類の緑ウイルス接種量(50 $\mu$ l、75 $\mu$ l、100 $\mu$ l)を用いた。また、重感染実験では、赤ウイルスと緑ウイルスによる単一感染実験で使用されたウイルス接種量を組み合わせて用いた。例えば重感染実験の1つでは、37 $\mu$ lの赤ウイルスと50 $\mu$ lの緑ウイルスを用いて行われた。このような HIV-1 感染実験において、フローサイトメトリー上の各区画に対応する赤ウイルスと緑ウイルスに感染した細胞の割合を取得した。それぞれの実験で用いたウイルス接種量は表1にまとめられている。

表1：各実験で使用したウイルス希釈量( $\mu$ l)				
赤ウイルスの 単一感染実験	緑ウイルスの 単一感染実験	重感染実験		
37 $\mu$ l	50 $\mu$ l	37 $\mu$ l $\times$ 50 $\mu$ l	37 $\mu$ l $\times$ 75 $\mu$ l	37 $\mu$ l $\times$ 100 $\mu$ l
75 $\mu$ l	75 $\mu$ l	75 $\mu$ l $\times$ 50 $\mu$ l	75 $\mu$ l $\times$ 75 $\mu$ l	75 $\mu$ l $\times$ 100 $\mu$ l
100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l $\times$ 50 $\mu$ l	100 $\mu$ l $\times$ 75 $\mu$ l	100 $\mu$ l $\times$ 100 $\mu$ l

### 4.2. パラメーター推定

フローサイトメトリーの各区画に対応する細胞割合の実験値と理論値との誤差を、以下の目的関数で定義する。

$$SSR = \sum_{n=1}^3 \sum_{i=0}^1 \{z_n(0, i) - z_n(\overline{0, i})\}^2 + \sum_{n=1}^3 \sum_{i=0}^1 \{z_n(i, 0) - z_n(\overline{i, 0})\}^2 + \sum_{n=1}^9 \sum_{i=0}^1 \sum_{j=0}^1 \{z_n(i, j) - z_n(\overline{i, j})\}^2.$$

目的関数の第1項は赤ウイルスによる単一感染実験における最小二乗法を、第2項は緑ウイルスによる単一感染実験における最小二乗法を、第3項は重感染実験における最小二乗法を計算している。ここで第1項の $z_n(0, i)$ と $z_n(\overline{0, i})$  ( $i = 0, 1$ )は、赤ウイルスによる単一感染実験における未感染細胞と赤ウイルスに感染した細胞の割合の実験値と理論値をそれぞれ表す。第2項の $z_n(i, 0)$ と $z_n(\overline{i, 0})$  ( $i = 0, 1$ )は、緑ウイルスによる単一感染実験における未感染細胞と緑ウイルスに感染した細胞の割合の実験値と理論値をそれぞれ表す。第3項の $z_n(i, j)$ と $z_n(\overline{i, j})$  ( $i, j = 0, 1$ )は、重感染実験における未感染細胞、赤ウイルスに感染した細胞、緑ウイルスに感染した細胞、重感染した細胞の割合の実験値と理論値をそれぞれ表す。また、添字 $n$ は異なるウイルス接種量を用いた実験の試行回数である。なお、上記の目的関数(4)を最小にする、HIV-1の感染率 $\beta$ 、感染に関与する赤ウイルス数 $V_R$ 、緑ウイルス数 $V_G$ 、形状母数 $p$ 、尺度母数 $1/q$ を推定した。ここで、ウイルス数 $V_R$ と $V_G$ はウイルス摂取量に比例すると仮定している。

### 4.3. 結果：HIV-1 重実験データとの比較

HIV-1 重感染において、細胞に感染するウイルス数やその頻度を実験解析から定量する事は容易ではない。しかし、実験データから推定した数理モデルのパラメーターにより“1細胞に感染するウイルス数”を計算する事ができる(図2)。例えば、本研究では、大部分の感染細胞は1個のウイルスにより感染が起こっている事が分かった。今後、生体内における感染細胞で観測されているウイルス数(平均3個程度)と比較する事で、どの程度のウイルス数が標的細胞に感染する事がHIV-1の遺伝的多様性を維持する上で重要であり、また最適であるのかを検討していく。

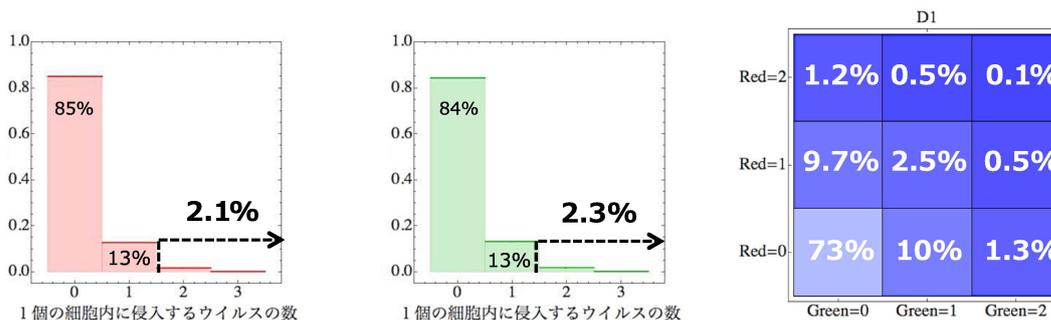


図2：1細胞内に感染するウイルス数の推定

(左)赤の単一感染実験(中央)緑の単一感染実験(右)重感染実験での、1細胞内の感染ウイルス数とその頻度を示す。

## 5. 考察

本稿では、細胞の感受性の不均一性に着目し、HIV-1 重感染の偏向性を記述する確率モデルの構築と定量的解析について報告した。また、開発した数理モデルと推定したパラメーターを用いる事で“1細胞に感染するウイルス数”に関する理論的な知見を得る事が出来た。今後、本研究を進めて行く事で、感染するウイルス数の推定によりHIV-1の遺伝的組換えの頻度に対する影響やHIV-1多様性への理解につながる事が期待出来る。

## 6. References

- [1] Dang, Q. et al, 2004. Nonrandom HIV-1 infection and double infection via direct and cell-mediated pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:632-637.
- [2] Chen J. et al, 2005. Mechanisms of Nonrandom Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection and Double Infection: Preference in Virus Entry Is Important but Is Not the Sole Factor. *J. Virol.* **79**:4140-4149.
- [3] Robertson D. L et al :Recombination in HIV-1. *Nature* 1995, **374**:124-126.
- [4] Remion A. et al, Kinetics of the establishment of HIV-1 viral interference and comprehensive analysis of the contribution of viral genes. *Virology.* **487**:59-67