

氏名	いし まつ み さ 石 松 美 沙
学位(専攻分野)	博 士 (人間・環境学)
学位記番号	人 博 第 375 号
学位授与の日付	平 成 19 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 相 関 環 境 学 専 攻
学位論文題目	Construction of a novel SHIV having an HIV-1-derived protease gene and its infection to rhesus macaques: a useful tool to conduct in vivo efficacy tests for protease inhibitors (HIV-1のプロテアーゼ遺伝子を組み込んだ新規 SHIV の作成とそのサル感染実験—抗 HIV-1 プロテアーゼ阻害剤の in vivo 評価に有用なツールの創出)
論文調査委員	(主 査) 教 授 小 松 賢 志 助 教 授 倉 橋 和 義 助 教 授 三 浦 智 行

論 文 内 容 の 要 旨

後天性免疫不全症候群 (AIDS) の病原ウイルスであるヒト免疫不全ウイルス (HIV) は主にヒトの CD4陽性 T 細胞に感染し、その免疫中枢機構を破壊することで最終的には個体を死に至らしめる。HIV のウイルス増殖を抑制する種々の抗ウイルス薬が開発され、実際に臨床に使われているが、単剤で使用した場合には直ちに耐性変異株が出現するなど、治療効果の持続性には大きな問題があった。複数の抗 HIV 薬剤を併用した多剤併用療法 (HAART) が1990年代後半に開発・導入され、AIDS 発症の抑制効果は著しく向上したが、一方で、薬剤服用の副作用や多剤耐性変異株出現という難題が生じている。このような問題を解決するのに、*in vitro*での薬剤評価や解析には限界があり、*in vivo*レベルでの解析実験が可能な動物モデル系が必須であることは言うまでもない。ところが、現在世界中で流行している1型 HIV (HIV-1) はヒトおよび限られた種類の霊長類にしか感染することができない。そこで HIV-1 に近縁なサル免疫不全ウイルス (SIV) とサルの動物モデル系がワクチン開発や病態研究に利用されてきた。しかしながら HAART に利用される大半の抗 HIV 薬は HIV-1 の立体構造特異的に設計されているため、近縁ではあるがアミノ酸配列および立体構造が多少異なる SIV に対して効果が必ずしも同じではないことが知られている。抗 HIV 薬の標的となるウイルス酵素遺伝子を HIV-1 のものにして、なおかつサル個体で増殖可能な人工のウイルスが作成できればこれらの問題を解決できると考えられる。申請者はウイルスのプロテアーゼ (PR) 遺伝子を HIV-1 由来にした新規サル/ヒト免疫不全組換えウイルス (SHIV-pr と命名) を作成し、それを用いて PR 阻害剤の *in vivo* 評価系を確立することを目的として研究を行った。

PCR 法を用いて作成した SHIV-pr は *in vitro* において Gag タンパク質を親株の SIV と同じように切断・プロセッシングすることが示され、サル由来のリンパ球系細胞株で増殖することが明らかとなった。また、サル末梢血より得られた単核球細胞でも SIV に比べやや弱いものの増殖することが示された。そこで、SHIV-pr をアカゲザル 2 頭に静脈内接種したところ、1 頭では血中ウイルス RNA が持続的に検出され、抗体価も上昇したが、他の 1 頭では一過的な感染の証拠しか検出できなかった。ウイルス増殖能の増強を目指し、持続感染したサルの血漿やリンパ節を新規のサルに植え継いで 4 代目まで個体による継代を行った。その結果、SHIV-pr は継代を重ねるごとに血中ウイルス RNA 量を上昇させ、4 代目では高い値で血中ウイルス RNA 量を維持するようになった。継代の 2 代目から 4 代目の各 1 頭計 3 頭のサルの感染後 1~3 週目の血漿から得られたウイルス RNA の PR 領域 (99 アミノ酸残基) について配列を決定したところ、A71V と V77I の 2 ヶ所のアミノ酸変異が見つかった。これらは 2 代目から 4 代目で共通に見られた変異であり、2 代目への継代以前に生じ、*in vivo* 継代によって固定されたものと考えられた。また、Gag 領域中の PR によって認識される切断部位近傍でも 2 代目から 4 代目に共通する変異が見つかり、これらの変異が SHIV-pr のサル個体レベルでの増殖能向上に関わっている可能性が示唆された。

次にこの SHIV-pr/サル系の PR 阻害剤の薬剤評価に有用であるかどうかを検討するため、SHIV-pr が持続感染しているサル 3 頭に PR 阻害剤であるカレトラ錠成分（ロピナビルとリトナビルの混合薬）を飲料水に混ぜ、4 週間経口投与した。カレトラ投与開始後、いずれのサルの血中ウイルス RNA 量も急速に減少し、投与終了時点ではほとんど検出限界レベルにまで到達した。また、投与終了後血中ウイルス RNA 量は急速に投与前のレベルにまで復帰した。このうち 2 頭のサル個体から得られた投薬前後の血中に存在するウイルス RNA の PR の遺伝子配列を決定したところ、1 頭では投薬の前後において特異的な変異は見出せず、もう 1 頭では 1 ケ所のみ同定された。PR 阻害剤投与による耐性変異は PR の他、Gag の PR による切断部位にも集積すると言われているが、今回の実験ではこの切断部位近傍においてそのような特異的な変異は発見されなかった。このことは、4 週間のカレトラ投与において実質的な耐性変異が生じなかったことを示している。これらの結果から、この新しい SHIV-pr/サル系の感染モデル系は HIV-1 用に開発された PR 阻害剤の *in vivo* 評価系として有用であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

ヒト免疫不全ウイルス（HIV）感染によって引き起こされる後天性免疫不全症候群（AIDS）はウイルスの持つ酵素を標的とした抗ウイルス薬の開発と、それらを複数同時に使用する多剤併用療法（HAART）により発症を長期にわたって抑止することができるようになった。しかしながら、HAART も AIDS の発症を完全に制御できるわけではなく、薬剤服用による副作用やウイルスの多剤耐性変異株出現の問題が常に付き纏う。こうした問題に対処するために HIV の基礎研究は重要であり、特に申請者の所属する研究室ではサルを用いた動物モデル系を開発・利用することにより、HIV 感染の個体レベルでの解析が行われている。HIV-1 が実験に利用可能なサルには感染しないというウイルスの宿主特異性の理由から、AIDS の動物モデルとして主に HIV と近縁な SIV とサルの系が利用されている。しかしながら、HIV 特異的に開発された抗ウイルス薬は SIV に対して必ずしも HIV に対するのと同様の効果を示さないことが知られている。SIV に HIV-1 の遺伝子領域を組み込んだ SHIV が研究に利用されているが、それらはほとんどワクチン研究のための *env* 領域を HIV-1 由来とするものであり、薬剤の標的タンパクであるウイルスが持つ逆転写酵素やプロテアーゼ（PR）は SIV のものであった。そこで申請者は PR を HIV-1 由来とする新規キメラウイルス（SHIV-pr）を作成し、PR 阻害剤 - の *in vivo* 評価系を確立することを目的とした。

作成された SHIV-pr は *in vitro* においてサル由来のリンパ球系細胞で増殖能を示した。続いてサル個体に接種したところ感染が確認され、SHIV-pr がウイルスとしての機能を果たしていることが明らかとなった。SHIV-pr は *in vivo* 継代により強い増殖能を獲得し、4 代目では長期に渡って高い血中ウイルス RNA 量を維持するようになった。このことは、SHIV-pr/サル系の感染モデル系が *in vivo* レベルで薬剤評価に使用できることを示している。実際に申請者は PR 阻害剤の投薬実験を *in vitro* と *in vivo* で行っているが、どちらの実験でも SHIV-pr の増殖は阻害剤によって非常によく抑制された。特に *in vivo* の実験において 4 週間の投薬終了後に血中ウイルス RNA 量が投薬前のレベルに直ちに復帰したことから、SHIV-pr は HIV-1 の PR 阻害剤に対して非常に感受性が高かったことが判った。従って、この新規キメラウイルス SHIV-pr/サル系の系は HIV の PR 阻害剤開発において極めて有用なツールであると考えられる。

申請者はまた *in vivo* 継代の馴化機序を明らかにするために、ウイルスの遺伝子解析も行っており、2 代目以降のサルから取られたウイルスに共通なアミノ酸変異を伴う遺伝子変異を PR 領域において 2 ケ所と Gag 領域において 4 ケ所同定している。PR 領域の変異は 2 ケ所とも活性中心から離れていたが、Gag 領域の変異の 1 つは PR による切断認識部位にあった。これらの変異は SHIV-pr の個体増殖能に深く関わる要因である可能性が高く、今後の研究展開が期待される。

以上の研究成果は HIV の宿主特異性や感染個体における増殖能と病原性との関係を考察する上で重要な知見をもたらすものである。また、結果的に PR 遺伝子を標的とした薬剤評価を *in vivo* レベルで可能とする新しい動物モデル系を構築することに繋がった。本論文に記述された SHIV-pr は今後の AIDS 治療薬開発においても大きな役割を果たしていくものと考えられる。本論文の内容は国際学術誌に掲載予定であり、国際学会でも口頭発表の機会を与えられるなど当該分野の研究者に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 の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相応

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19年1月26日、論文内容とそれに関する事項について試問を行った結果、合格と認めた。