

研究報告書

「AIDSワクチン開発への理論的介入-SHIV感染実験と数理モデル-」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研究者: 岩見 真吾

1. 研究のねらい

HIV感染症は、世界的に流行している最も重要な感染症の一つであり、極めて長い経過をたどる慢性感染症である。この特性のため、HIV感染症の拡大阻止には、長期効果を有するAIDSワクチンの開発が不可欠である。1983年のHIVの単離からすでに30年たった今でも、効果的なワクチンは開発されていない。本研究では、数理モデルと培養細胞・動物実験を用いる事で、HIV・SIV・SHIV感染アカゲザル生体内での病態・免疫反応を実験的・理論的に理解・整備し、次世代改良型ワクチン開発の手がかりを数理科学的な立場から探索してきた。特に、数理モデルを用いて経時的な実験データを解析し、複雑で動的なウイルス感染を定量的に理解するための実験と理論の融合系の確立に注力した。

2. 研究成果

(1) 概要

SHIV-KS661 とSHIV-#64 は、アカゲザルに対して高病原性及び低病原性を示す代表的な2株である*。これまでの蓄積した知見から、アカゲザルに対する病態の違いは、免疫システムで中心的な役割を果たすCD4T細胞の数が感染初期にどの程度減少するかに関連していると考えられている。劇的にCD4T細胞数が減少した場合、宿主はウイルスと闘うための獲得免疫を誘導する事が困難となり、AIDS様症状(CD4T細胞の枯渇)を呈する。一方、CD4T細胞数の減少が緩やかな場合は、獲得免疫が誘導される事でウイルス量が低く維持され、持続感染を示すようになる。これらの理解は、様々なウイルス株を用いた感染実験の断片的な結果から経験的に得られたものであり、体系的に整備されていたものではなかった。さきがけ研究では、以下の研究成果を通じて、SHIV-KS661 とSHIV-#64 を含む様々なCXCR4 指向性SHIVによる感染実験データを数理科学的な手法で解析・整備し、定量的な観点からCXCR4 指向性SHIV病原性を説明した。

* 本研究でいう高病原性、及び、低病原性とは、末梢血中のCD4T細胞の動態に基づいた定義とする。末梢血中のCD4T細胞数が非常に少ない状態まで非可逆的に減少した状態を「CD4T細胞の枯渇」と考え、CD4T細胞を枯渇させるウイルスを高病原性、そうでないウイルスを低病原性と定義する(図3a 赤:高病原性、青:低病原性)。

(2) 詳細

(1) 培養細胞を用いたウイルス感染ダイナミクスの定量化系の開発

1995年以降、多くの臨床データや感染実験データが数理モデルを用いて解析され、様々なウイルス学的発見がなされてきた。本研究では、まず、様々な種類の実験データを高頻度で

計測する事が可能な培養細胞を用いた感染実験から、ウイルス感染ダイナミクスを定量化し、ウイルスが持つ特徴を詳細に解析するための数理科学と実験科学の融合系を開発した (Retrovirology, Front. Microbiol.に掲載)。図1に示すように、試験管内で繰り返されるウイルス感染を殆ど完璧に再現し得る数理モデルを開発する事が出来た。すなわち、ウイルス感染に関連するパラメーターの推定が可能になり、数理モデルにより特徴づけられるウイルス感染に関連する様々な量(感染細胞の半減期・ウイルスバーストサイズ・基本再生産数等)が計算出来るようになった。また、本融合系を応用してエンテロウイルスの感染ダイナミクスの定量化研究も行った(J. Virol. に掲載)。また、論文として報告はできていないが、同様の系を用いて、肝炎ウイルス、免疫不全ウイルス、インフルエンザウイルスの感染ダイナミクス定量化の共同研究を国内外の実験グループと実施している。

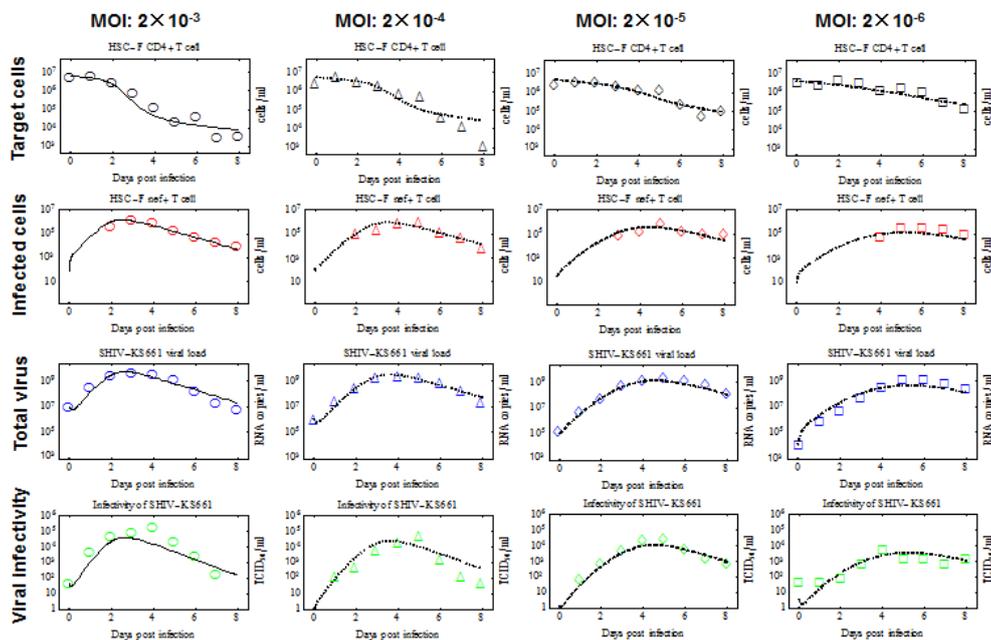


図1 培養細胞内の SHIV 感染実験データ(印)と数理モデルによる予測(点線)

(2) 試験管内の SHIV-KS661 (高病原性株) と SHIV-#64 (低病原性株) の感染ダイナミクスの違い

アカゲザルを用いた感染実験において高病原性を示す SHIV-KS661 株と低病原性を示す SHIV-#64 株の感染ダイナミクスの違いを(1)で開発した融合系を用いて定量的に明らかにした。解析の結果、2株間の決定的な違いは“感染性ウイルス(TCID₅₀)の産生率”である事が分かった。興味深い事に、総ウイルス(感染性ウイルス+非感染性ウイルス:RNA copies)の産生率や感染細胞の死亡率には大きな違いが見られなかった。ここで、感染性ウイルスの産生率が異なる理由は、特に、ウイルスタンパク質のEnv領域において2株の配列が違う事から SHIV-#64 は SHIV-KS661 と比較して、細胞に効率良く侵入できないためであると考えている。

(3) 生体内におけるウイルス増殖率と標的細胞減少率の定量化系の開発

培養細胞を用いた実験と異なり、動物実験では、十分量の時系列データを得る事が困難である。また、低頻度な時系列データを既存の解析手法で分析したとしても、詳細にウイルス感

染ダイナミクスを定量化する事は難しかった。しかし、動物実験は、ヒト生体内で起こるであろうウイルス感染の経過を最も模倣していると考えられ、そこから得られる知見は、極めて貴重である。従って、利用可能なデータから可能な限り正確にウイルス感染ダイナミクスを定量化する手法の開発が望まれていた。そこで、さきがけ研究期間中に、ウイルス量とウイルスの標的細胞数の時系列データより“単位標的細胞あたりのウイルス増殖率”と“標的細胞減少率”を定量化する手法を開発した。このウイルス増殖率及び標的細胞減少率は、様々なウイルスの生体内での感染現象を特徴づける指標になる。本手法を用いて、SHIV-KS661・SHIV-#64 を含む様々な SHIV 感染アカゲザル生体内におけるウイルス増殖率及び標的細胞減少率を推定した(図2)。また、HIV-1 感染ヒト化マウス生体内のウイルス増殖率及び標的細胞減少率も推定した。

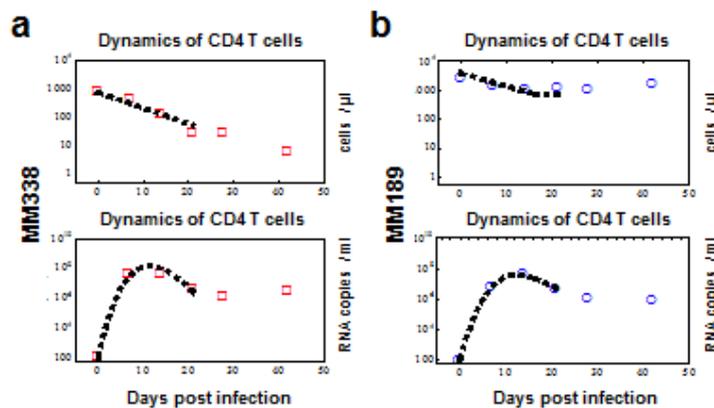


図2 アカゲザルを用いた感染実験データ(a: KS661, b: #64)と数理モデルによる予測(点線)

(4) アカゲザルに対する SHIV-KS661、SHIV-#64 及びその他の SHIV 株の病原性の理解

合計57頭のアカゲザルへのウイルス接種後約21日目までの感染初期のウイルス量と標的細胞である CD4T 細胞数の時系列データを用いて、ウイルス増殖率及び標的細胞減少率を推定した。これらの推定値を用いて、図3a に示されている CXCR4 指向性 SHIV の病原性(赤: 高病原性、青: 低病原性)を定量的に説明する事ができる(ただし、CCR5 指向性の HIV-1 とは異なる病態を示す事を注意しておく)。すなわち、感染初期のデータ解析から、長期のウイルス病原性が CD4T 細胞の減少パターンに依存して(b: 感染後すぐに CD4T 細胞が減少し始める

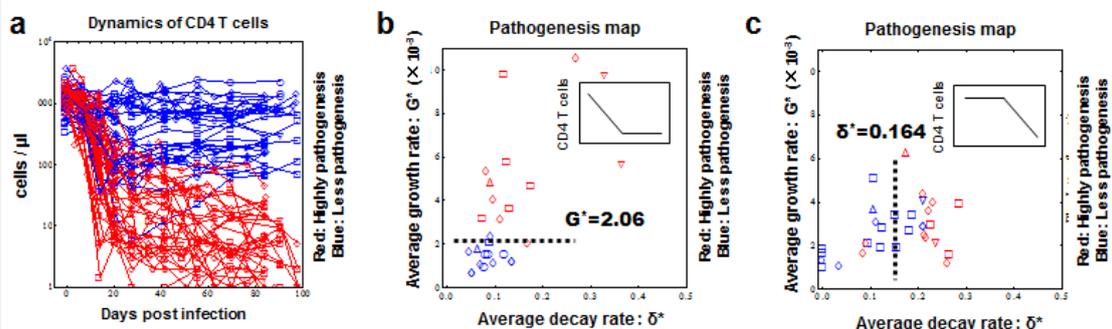


図3 CXCR4 指向性 SHIV の病原性を決定づける要因

c: 感染後しばらくCD4T細胞の減少が無い)ウイルス増殖率及び標的細胞減少率の値から予測されるのである。図3bのとき、マハラノビス距離の観点よりウイルス増殖率が $G^*=2.06$ が、図3cのとき、標的細胞減少率 $\delta^*=0.164$ が高病原性と低病原性の閾値になる事が示唆された。

3. 今後の展開

さきがけ研究では、まず、培養細胞感染実験と数理モデルを用いた解析から、SHIV-KS661 と SHIV-#64 の主な違いが感染性を保持するウイルス産生率である事を示した(図1)。そして、この感染性ウイルス産生率が決定的に異なるという事実と蓄積されていた知見より、感染初期のウイルス感染ダイナミクスを正確に定量化する事が可能になれば、CXCR4 指向性 SHIV の病原性メカニズムを体系的に理解できるのではないかという発想に至った。そこで、生体内でのウイルス感染ダイナミクスを定量できる手法を開発し、SHIV-KS661、及び、SHIV-#64 接種アカゲザルの感染初期の時系列データより、ウイルス増殖率及び標的細胞減少率を推定した(図2)。興味深い事に、高病原性を示すグループと低病原性を示すグループから推定したウイルス増殖率及び標的細胞減少率において、明らかな差異がある事が分かった。この事実は、ごく初期における SHIV の感染ダイナミクスの違いがウイルス病原性に関連が深い事を示唆している。さらに、この考えがその他の CXCR4 指向性 SHIV に対しても一般的に成立するか否かを調べるために、SHIV-KS689、SHIV-KS705、SHIV-DH12R についても感染初期の時系列データを用いて同様の解析を行った(図3)。合計57頭にも及ぶ感染アカゲザルの実験データから得られた結果を整備する事より、長期のウイルス病原性が CD4T 細胞の減少パターンに依存してウイルス増殖率及び標的細胞減少率の値から予測される、即ち、病原性を特徴づける閾値が存在する事を明らかにした。

重要な事は、閾値の存在を示せた事より、CD4T 細胞の減少パターンに依存こそするものの、感染初期においてウイルス増殖率を約 57%もしくは標的細胞減少率を約 28%阻害する事が出来れば、本来高病原性を示すウイルスに感染した個体が低病原性になると示唆できた事である。つまり、非常に高い病原性を示す CXCR4 指向性 SHIV であっても病原性をコントロールする事はそれほど困難ではなく、これらのウイルス株は AIDS ワクチン開発の重要なステップである霊長類を用いたワクチン試験においては不向きな系である事を意味しているのである(何故ならば、防御効果の弱いワクチンを過大評価する可能性があるからである)。これは、多くのウイルス学者が様々な感染実験の断片的な結果から経験的(あるいは、直感的)に考えていた事であるが、今回の研究を通して理論的かつ定量的に説明する事が可能になった。このような定量的な考えは、今後のワクチン開発研究を進めていくうえで極めて重要な役割を果たしていく事になり、さきがけ研究を通して行った様々な場面で時系列データからウイルス感染ダイナミクスを定量化する手法を開発する事が今後希求される事は論を俟たないと考えている(Virology, 応用数理に掲載)。

4. 自己評価

数理モデルと培養細胞・動物実験を用いる事で、SHIV-KS661 と SHIV-#64 の病原性を定量的な観点から理解する事が出来たと考えている。数理モデルを用いた定量的解析と非常に相性が良かった事と相まって、SHIV-KS661 と SHIV-#64 以外のウイルス株に対しても同様の結果が得られた。すなわち、CXCR4 指向性 SHIV の病原性に対する定量的な一般理論を作る事に成功した。しかし、残念ながら実際にヒトの世界で流行している HIV-1 のほとんどが CCR5 指向性ウイルスである事より、今回のさきがけ研究で得られた成果がすぐに、ワクチン開発の手がかりになるとは限らない。今後は、CCR5 指向性ウイルスに対しても、その病原性を感染実験データから定量化するための手法を開発し、病原性を理解する事が重要である。

一方、3年半のさきがけ研究期間を通じて、数理モデルを用いて経時的な実験データを解析し、

ウイルス感染を定量的に理解するための実験と理論の融合系を複数個確立できた事は特筆すべき成果である。これらの融合系を用いて、免疫不全ウイルス、肝炎ウイルス、インフルエンザウイルス、エンテロウイルス、リンパ腫を対象に、国内では7つの実験研究グループと国外では2つの実験研究グループと具体的な共同研究を行う事ができ、いくつかの研究成果は論文として発表する事ができた(国内外で6つの理論研究グループとの共同研究も行っている)。また、さきがけの研究成果を土台に、現在、国内の優秀な若手の実験ウイルス学者と数理科学者を組織して「計算ウイルス学・免疫学」という新たな融合研究分野を展開し始めている。さきがけ研究に応募した当初、国内では、実験ウイルス学研究を対象とした数理モデルを用いた研究がほとんど行われていなかった事を考えると、本さきがけ研究は、数理モデルを日本のウイルス学の中に広める事に大きく貢献し、自身の研究スタイルを確立する事にも繋がったと確信している。

5. 研究総括の見解

HIV 感染症の拡大阻止には効率的な AIDS ワクチンが望まれるが HIV の単離後 30 年経過した現在も効果的なワクチンは開発されていない。本研究では、体内における HIV の動的振舞いを数理モデルを用いて解析し、それによってワクチン開発への手がかりを得ることを目指した。HIV のモデルとなる SHIV をアカゲザルの CD4T 細胞(T helper cell)に感染させる in vitro 実験の結果に基づいて、ウイルス感染ダイナミクスを高精度に再現する数理モデルの構築に成功したことは高く評価できる。この手法はエンテロウイルスを始め他の幾つかのウイルスにも応用されて有効であることが示された。さらに、アカゲザルの生体内における感染時系列データを解析し、SHIV 株の高病原性と低病原性を区別する指標を見いだした。ただし、SHIV とヒト HIV は、感染動態が異なるため、本研究の結果を直ちに HIV に応用できないのは残念である。今後、さらに、この手法やアイデアを発展させて究極目標である AIDS ワクチンの開発へ繋げて行くことを期待する。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. M. Fukuhara [†] , <u>S. Iwami</u> [†] , K. Sato [†] , Y. Nishimura, H. Shimizu, K. Aihara, and Y. Koyanagi. Quantification of the dynamics of enterovirus 71 infection by experimental-mathematical investigation, <i>Journal of Virology</i> . 87:1(2013). ([†] Equal contribution)
2. <u>S. Iwami</u> , BP. Holder, CA. Beauchemin, S. Morita, T. Tada, K. Sato, T. Igarashi, and T. Miura. Quantification system for the viral dynamics of a highly pathogenic simian/human immunodeficiency virus based on an in vitro experiment and a mathematical model, <i>Retrovirology</i> . 9: 18 (2012).
3. <u>S. Iwami</u> , K. Sato, R. J. De Boer, K. Aihara, T. Miura, and Y. Koyanagi. Identifying viral parameters from in vitro cell cultures, <i>Frontiers in Microbiology</i> . 3:319 (2012).
4. <u>S. Iwami</u> [†] , H. Haeno [†] and F. Michor. A race between tumor immunoescape and genome maintenance selects for optimum levels of (epi)genetic instability, <i>PLoS Computational Biology</i> . 8: e1002370 (2012). ([†] Equal contribution)
5. M. Horiike, <u>S. Iwami</u> , M. Kodama, A. Sato, Y. Watanabe, M. Yasui, Y. Ishida, T. Kobayashi, T.



Miura and T. Igarashi. Lymph nodes harbor viral reservoirs that cause rebound of plasma viremia in SIV-infected macaques upon cessation of combined antiretroviral therapy, *Virology*. 423: 107–118 (2012).

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

招待講演

- [1] S. Iwami, Identifying viral parameters from *in vitro* cell culture, OSID 2012, September 25–26, 2012, Korea.
- [2] S. Iwami, Mathematical modeling and *in vitro* experiments in virology, KSMB 2011, August 25–26, 2011, Korea.
- [3] S. Iwami, Estimate of viral productivity and infectivity *in vitro*, KSIAM 2010 Spring Conference, April 24–25, 2010, Korea.
- [4] S. Iwami, Theoretical prediction of SHIV pathogenesis, 1st joint meetings of KMS and AMS, December 16–20, 2009, Korea.
- [5] S. Iwami, Mathematical frameworks for HIV infection, The 5th TEPHINET, November 2–6, 2009, Korea.

受賞

- [1] 岩見真吾, 研究奨励賞, 数理生物学会, 2010 年 9 月.
- [2] 鈴木崇文, 岩見真吾, 竹内康博, 論文賞, 日本応用数理学会, 2010 年 9 月.