

研究報告書

「ウイルス感染に伴い変化する生体システムの力学的理解と制御」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成26年10月～平成30年3月

研究者: 岩見 真吾

1. 研究のねらい

ヒトには、常に体の環境を一定の良い状態(健常状態)に維持する機構が備わっている。これは生体の恒常性維持機構と呼ばれ、病気とはこの健常状態から別状態へ推移する事である。例えば、ウイルスに感染する事で、生体システムが変化し、病気になった場合であっても、免疫システムの修復機構によって再び健常状態へと回復し得る。本研究では、ウイルス感染下における生体の恒常性維持・変容を生体システムの変化や破綻の観点から定量的に理解し、疾患を制御する方法を提案する。特に、国の緊急対策研究事業に指定されているB型肝炎ウイルス(HBV)を中心に、培養細胞、及びヒト化マウスを用いた感染実験を行い、実験データを取得する。また、臨床試験から得られたデータと合わせて、数理モデルを基軸にした理論解析を実施し、実験科学と数理科学の融合的研究を進める。

現在、HBV 慢性感染者に対して核酸アナログ製剤(エンテカビル:ETV)を使用する事で、血中ウイルス量は検出限界値以下に抑える事が可能であるが、肝内の完全閉鎖二本鎖 DNA(cccDNA)量を減少させる事は難しい。また、核酸アナログ製剤の使用を中断すると肝炎が再燃する症例が多数報告されている。つまり、生体システムの復元が達成されない原因は、cccDNAが肝細胞核内に維持される事にある。本研究では、まず、培養系を利用した感染実験と数理モデルによるデータ解析を融合させる事で、(I)肝細胞における HBV の生活環を定量的に解析する。特に、HBV 生活環において培養肝細胞の核内で維持される cccDNA の産生・分解の動態を明らかにする。次に、(II)ヒト化マウスを用いて HBV 感染実験を行う。ヒト化マウス感染実験では、測定できるデータに量的制限がある事より、縮約した数理モデルの開発が必要である。データ解析から、生体内における cccDNA の産生・分解動態を定量する。最後に、(III)臨床データを解析し、(I)(II)で得られた知見と合わせて、生体システムを復元し健常状態への回復させる方法を探索する。培養細胞実験、動物実験、臨床データを数理モデルによる定量的解析で繋ぐ。そして、多角的なアプローチにより HBV 感染に起因する生体システムの変化を理解し、制御する方法を探索して行く。

本研究が進展し、方法論を進化させる事ができれば、様々な新興再興感染症やウイルス性疾患の新規治療法開発に有用な実験的・理論的技術基盤を提供する事に繋がる。

2. 研究成果

(1) 概要

ヒトには、常に体の環境を一定の状態(健常状態)に維持する機構が備わっている。これは生体の恒常性維持機構と呼ばれ、病気とはそれらの破綻した状態である。恒常性維持は生体の持つ本質的な性質であり、免疫系や内分泌系といった階層をまたぐ相互作用ネットワークから構成される生体システムにより実現されている。たとえウイルスに感染する事で、一旦

この恒常性が破綻し、病気になった場合であっても、生体の持つ修復機構によって再び健常状態へと回復し得る。本研究では、HBV を中心に、C 型肝炎ウイルス(HCV)[論文-2,3]、ヒト免疫不全ウイルス(HIV-1)[論文-5]、ヒト T 細胞白血病ウイルス(HTLV-1)[論文-1]やエボラウイルス[論文-4]など様々なウイルスが感染した場合、生体恒常性を変容・維持させるメカニズムを数理科学と実験科学の融合的アプローチにより解明してきた。また、数理科学と実験科学の融合的なアプローチを駆使することで、本さがけ研究期間を通して、領域内外の研究者および産業界との共同研究を積極的に進める事もできた。

(2) 詳細

さがけ研究で中心的に取り扱ってきた B 型肝炎ウイルスに関する研究成果と研究目標の達成状況について主に報告した後、その他のウイルス感染に関する研究成果について概要を報告する。

【B 型肝炎ウイルスに関する研究】

(I) 培養肝細胞による HBV 感染実験データの定量的解析と HBV 生活環の理解

Hep38.7-Tet 系を用いた HBV 感染実験より、細胞内 ccc DNA 及び細胞内外の HBV DNA の時系列データを様々な条件下で計測した。また、HBV の生活環を記述する数理モデルを構築し、コントロール時の時系列データに加えて、(a)day0 以降で ETV 処理、(b)day9 以降でテトラサイクリン処理、(c)day30 移行で ETV 処理、(d)day30 移行でテトラサイクリン処理、した場合の時系列データからパラメータ推定を実施した。また、異なる条件下で同様の感染実験を実施し、コンピュータシミュレーションによる予測と比較することで、構築した数理モデルと推定したパラメータの妥当性を検証した。Hep38.7-Tet 系における HBV 生活環の一部は臨床的な観測とは齟齬があるがものの、世界で初めて cccDNA の半減期を定量的に示すことに成功した(論文執筆中)。すでに、より生体内環境に近い初代ヒト肝臓細胞(PHH)を用いて同様の実験を終えている。現在、これらの時系列データを解析する事でより詳細な cccDNA の産生・分解の動態を分析している。また、さがけ研究で可能になった、Hep38.7-Tet 系から簡便に HBV の cccDNA の半減期を定量できる方法は、HBV 創薬研究に展開している。

(II) ヒト化マウスによる HBV 感染実験データの定量的解析と生体システムの理解

ヒト肝マウスを用いた HBV 感染実験を実施した。感染後、血中の HBV DNA 量が定常状態に達した後、IFN- γ および ETV を投与した。コントロール群と比べて投与群では、2週間で 90~99%の血中 DNA 量が排除された。また、day3 および day14 で解剖したマウスの肝臓組織から cccDNA 量の定量も行っている。定量的なデータ解析を実施するには、さらなるデータの拡充が必要となるので追加の感染実験を検討している段階である。また、本項目で使用する数理モデルは、細胞内ウイルス複製と細胞間ウイルス感染をマルチスケールに記述する必要がある。“感染細胞年齢”という新しい時刻を導入することで、偏微分方程式による描写に成功した。開発した数理モデルは、次項目の臨床データの解析にも用いられている。

(III) 臨床データの定量的解析と生体システム復元のための方法論の探索

ETV 及びラミブジン(LVD)による HBV 慢性感染者の48治療症例の臨床データのうち、治療開始後の血中 HBV DNA 量、コア関連抗原量、S 抗原量をマルチスケールモデルにより解析した。検討段階ではあるが平均的な cccDNA の半減期は2.7年にもおよぶことから、cccDNA は HBV のリザーバーとなっており、生体から HBV を排除するための最大の要因となり得ることが定量的に示唆できた。ETV や LVD を含む核酸アナログ製剤は、直接的に cccDNA 分解に作用しない事より、cccDNA を標的とする副作用の少ない新たな抗 HBV 治療薬の開発が望まれている。また、現在、cccDNA の分解促進の可能性が示唆されている IFN- α を用いた HBV 慢性感染者の治療症例も解析にも着手している。核酸アナログを用いた治療と比較して、どの程度 cccDNA の半減期が短縮されているのかを明らかにすることは基礎研究としても臨床研究としても極めて大きな意義を持つ。

【C 型肝炎ウイルスに関する研究】

肝がんの原因の 70%を占め、現在日本では約 100 万人の持続感染者がいると考えられている C 型肝炎ウイルス(HCV)感染症の治療は約 20 年間に大きな進歩があった。当時は、IFN- α と呼ばれる副作用の強い薬剤のみが唯一の治療方法であったが、現在では 10 種類以上の抗ウイルス薬が開発・認可されつつある。HIV 感染症と同様に、異なる薬剤の組み合わせによる有効な多剤併用療法が始まり顕著な治療成果を上げ始めている。しかし、HCV 治療における多剤併用療法の歴史は浅く、十分な基礎的および臨床的知見の蓄積があるとは言えない。私達は、HCV の細胞内複製をハイスループットに計測できる“レプリコンシステム”を開発し、感染実験から得られた実験データを数理モデルにより定量的に分析する、という独創的な異分野融合研究を進めてきた。そして、近年発表した H. Ohashi et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 114: E4527-E4529 (2017) [論文-3]および Y. Koizumi et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 114:1922-1927 (2017) [論文-2]の論文にて、臨床前段階における任意の抗 HCV 薬剤組み合わせが持つ抗ウイルス効果の網羅的な分析結果を報告した。特筆すべきは、生体内における各抗 HCV 薬剤の臨床濃度と HCV 粒子の総産生量を考慮する事で、任意の薬剤組み合わせに対する耐性ウイルスの出現リスクを評価できる理論的な枠組みを整備した点、である。本研究成果は、プレスリリースおよびメディア掲載された[プレスリリース-2、メディア掲載-2]。

【ヒト免疫不全ウイルスに関する研究】

エイズの原因ウイルスであるヒト免疫不全ウイルスI型(HIV-1)の感染様式の定量化に成功した。HIV-1 の感染には、細胞外に放出されたウイルス粒子が新たな標的細胞に感染する“cell-free 感染”と、感染細胞が大量のウイルス粒子を標的細胞に接触して直接受け渡す“cell-to-cell 感染”という2つの様式がある。しかし、これら2つの様式がどのように相互作用し、協同的にウイルス感染を広げているかは明らかにされていなかった。さきがけ研究では、数理科学と実験科学を融合するというユニークなアプローチによって2つの感染様式を定量的に解明した。具体的には、開発した数理モデルより再生方程式を導き、基本再生産数(ひとつの感染細胞が、その生涯に感染させる2次感染細胞数を基本再生産数:R0)を cell-to-cell 感染由来の2次感染細胞数(Rcc)と cell-free 感染由来の2次感染細胞数(Rcf)に分解した。

そして cell-to-cell 感染は感染全体の約 60% (i.e., $100 \times R_{cc}/(R_{cf}+R_{cc})$) を担っている事を示した。また、数理モデルよりマルサス係数を計算する事で、cell-to-cell 感染はウイルスの適応度(ウイルス感染の速度)を 3.9 倍も増加させている事も示した。本研究成果は S. Iwami et al., *Elife*, 4, (2015)として報告し、プレスリリースおよびメディア掲載された[論文-5、プレスリリース-1、メディア掲載-1]。

【ヒト T 細胞白血病ウイルスに関する研究】

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) は感染細胞の生存・増殖により生体内で持続感染し、感染者に成人 T 細胞白血病や脊髄症などの関連炎症性疾患を引き起こす。HTLV-1 は cell-to-cell 感染を介した新規感染あるいはクローン増殖を経て感染細胞数を増加させている。既に報告されている様に cell-to-cell 感染を起こすには感染細胞は Tax 遺伝子を発現する必要がある。興味深いことに、私達の研究から Tax 発現は間欠的に振る舞うことが分かった。さきがけ研究では、間歇的 Tax 発現を再現する数理モデルを開発し、HTLV-1 感染細胞の 1 細胞計測から定量した Tax 発現持続時間 (Tax-period) を再現する数理モデルのパラメータを推定する事に成功した。そして、ギレスピーアルゴリズムを用いた確率シミュレーションにより、Tax 発現間隔時間 (Tax-interval) が推定可能となった。また、推定した Tax 発現持続時間と Tax 発現間隔時間を組み込んだ HTLV-1 感染細胞増殖のエージェント・ベース・シミュレーション (ABM) を開発し、間歇的な Tax 発現が細胞群を維持するうえで重要な役割を果たしていることを示した。本研究成果は M. Mahgoub et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, In Press として報告された[論文-1]。

【エボラウイルスに関する研究】

エボラウイルスはヒトを含む霊長類に高い病原性を示し、時として重篤な出血熱を引き起こす。さきがけ研究では、エボラウイルス感染症を定量的に理解することを目的として、エボラウイルス増殖の数理モデルを構築した。2000-01 年のウガンダにおけるアウトブレイクで得られた 45 名の患者血中ウイルス量データを用いた数理解析により、致死的な感染においては血中ウイルス量が非致死的な感染と比較して優位に高く、そのウイルス増殖は、マクロファージ等の感受性細胞が大量にウイルス増殖部位にリクルートされることによって維持されることを明らかにした。また、作用機序の異なる抗エボラウイルス薬の効果を定量的に解析し、いずれの抗ウイルス薬でもウイルス感染初期に約 80% の増殖を抑制できれば発症を防げることを示した。本研究成果は A. Martyushev et al., *Antiviral Research*, 135: 62-73 (2016) として報告された[論文-4]。

3. 今後の展開

感染者生体内から HBV を駆逐する事が容易でない理由は、そのウイルス生活環に由来する。HBV は標的細胞である肝細胞への侵入後、cccDNA という形で核内に蓄積される。IFN- α や ETV では、血中のウイルス量を下げる事はできるが、核内に蓄積・維持されている cccDNA を分解する事が出来ない。即ち、肝細胞核内に cccDNA が維持される事が HBV 根治の障壁になっている。未だ不明な点が多い cccDNA の産生および分解の動態を定量的に理解し、cccDNA を高率に減少させる候補化合物を探索する必要がある。新規化合物を効率的に探索

するために、一般に最適実験条件を設定し自動化あるいは手動によるハイスループットスクリーニング(HTS)が行われる。しかし、現在まで化合物ライブラリーを用いた cccDNA 分解薬候補探索の試みは、ことごとく失敗に終わっている。さきがけ研究で確立した Hep38.7-Tet 系を用いた HBV 生活環を定量的に再現する数理モデルを用いた解析から「その理由」と「解決方法」を明らかにした。すなわち、従来通りのスクリーニングでは未来永劫見つからない事が明白となった。現在行われている多くの HTS では経験的な知見による従来のスクリーニング条件が用いられている。この条件は、実は ETV(HBV の逆転写の阻害が作用機序)による抗 HBV 効果が最も観察されやすい条件である。化合物により cccDNA の分解促進を観察したいのであれば、異なる条件で HTS を行う必要がある。さらに、たとえ HTS の条件が最適であったとしても細胞外の HBV DNA 量には化合物による cccDNA の分解促進が反映されない事が分かる。HBV cccDNA に直接作用し、分解を促進する化合物を見つける為には、化合物添加後の(細胞外 HBV DNA 量ではなく)細胞内 cccDNA 量を測定する必要がある。

これまで、理論的な根拠なしに行われていた網羅的な HTS に、数理モデルやコンピュータシミュレーションといった数理科学的な手法を導入する事で、理論的な根拠に基づいた HTS によりヒット化合物を探索する事を進めていく。さきがけ研究の今後の展開である、『数理モデルを援用した新規抗 HBV 薬のスクリーニング』は候補化合物同定の可能性を飛躍的に向上させる事が期待できる。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

HBV を中心に、培養細胞、及びヒト化マウスを用いた感染実験を行い、実験データを取得してきた。また、臨床試験から得られたデータと合わせて、数理モデルを基軸にした理論解析を実施し、実験科学と数理科学の融合的研究を進めることができた。特筆すべき成果は、Hep38.7-Tet 系における HBV 生活環を完全に定量することに成功し、その成果を新規抗 HBV 薬の創薬研究に応用する事ができている点である。今後、特に cccDNA の分解促進化合物が発見されれば、社会・経済への波及効果は計り知れない。一方、ヒト肝マウスから得られる動物実験データと臨床データの解析は現在進行中であるが、数学的にも新規性の高いマルチスケールモデルを完成させる事ができた。本モデルを適用すれば、血中のウイルス量の解析から肝臓内に蓄積されている cccDNA 量を予測することが期待できる。

また、HBV 以外のウイルス感染症に関する研究では、*Proc Natl Acad Sci USA* から3報、*Cell Host & Microbe* から1報、*PLoS Pathogens* から2報、*eLife* から1報、ウイルス感染以外の領域内共同研究では *Nature & Medicine* から1報を含む合計26報もの論文を3年半という短い期間で報告する事ができた。特に、HIV-1 に関する cell-to-cell 感染の寄与率の定量化研究および HCV に関する抗ウイルス治療薬の組み合わせ研究は、プレスリリースを通じて複数のマスメディアに取り上げられたことより、さきがけ研究の社会発信に貢献できた。加えて、2017年4月には、関連分野における歴史的に重要な論文と私が開拓してきた新しい分野のオリジナル研究の一部を、共立出版からシリーズ現象を解明する数学「ウイルス感染と常微分方程式」として出版できた。拙著はさきがけ研究の一部を若手研究者に知ってもらう上で、重要な役割を果たすと考えている。

さらに、さきがけ研究を通じて、フランスの INSERM 及びオーストラリアの UNSW と人材循環を伴う国際的共同研究の基盤が整理された。また、ロスアラモス国立研究所、ユトレヒト大学、インペリアルカレッジロンドンなどに在籍する数理モデルや数理解析を専門とする研究者と共同研究にも着手した。今後は、さきがけ研究により確立した、数理科学と実験科学の融合的アプローチ、現在までに蓄積した経験と培われたノウハウを駆使して、あらゆる共同研究ニーズに対応可能な特色のある研究を進めることが期待できる。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

C型肝炎に関しては、既に特効薬が上市され、治すことができる肝炎となっているがB型肝炎に関しては未だ特効薬はない。

B型肝炎ウイルスの慢性感染者に対しては、核酸アナログ製剤であるエンテカビルが投与され、血中ウイルス量は検出限界値以下に低下するが、肝細胞内の完全閉鎖二本鎖DNA(cccDNA)量を減少させることは難しいのが現状である。岩見真吾研究者は、培養肝細胞を用いてB型肝炎ウイルスの生活環を感染実験結果と数理モデルを融合することで明らかにし、cccDNAの半減期を定量的に示した。岩見研究者は同様の手法をヒト肝炎マウスにおけるB型肝炎ウイルス感染に用いて現在解析中である。また、臨床データの解析も行いcccDNAの半減期を定量的に示した。岩見研究者は、同様の手法を、ヒト肝マウスにおけるB型肝炎ウイルス感染に用いて現在解析中である。

また、臨床データの解析も行いcccDNAの半減期が2-7年にも及ぶことを明らかにした。

岩見研究者は数理科学と実験科学の融合的アプローチを駆使することで、領域内外の研究者ならびに産業界との共同研究を積極的に推進したことも高く評価でき、今後の活躍が十分に期待できる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. M. Mahgoub, *J. Yasunaga, S. Iwami, S. Nakaoka, Y. Koizumi, K. Shimura, and *M. Matsuoka. Sporadic on/off switching of HTLV-1 Tax expression is crucial to maintain the whole population of virus-induced leukemic cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, In Press. (*Corresponding author)
2. H. Ohashi, Y. Koizumi, K. Fukano, T. Wakita, AS. Perelson, *S. Iwami†, and *K. Watashi†. Reply to Padmanabhan and Dixit: Hepatitis C virus entry inhibitors for optimally boosting direct-acting antiviral-based treatments, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114: E4527-E4529 (2017). (†Equal contribution/*Corresponding author)
3. Y. Koizumi, H. Ohashi, S. Nakajima, Y. Tanaka, T. Wakita, AS. Perelson, *S. Iwami†, and *K. Watashi†. Quantifying antiviral activity optimizes drug combinations against hepatitis C virus infection, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*

<i>America</i> , 114: 1922–1927 (2017). (†Equal contribution/*Corresponding author)
4. A. Martyushev, S. Nakanoka, K. Sato, *T. Noda†, and * <u>S. Iwami</u> †. Modelling Ebola virus dynamics: Implications for therapy, <i>Antiviral Research</i> , 135: 62–73 (2016). (†Equal contribution/*Corresponding author)
5. * <u>S. Iwami</u> †, JS Takeuchi†, S Nakaoka, F Mammano, F Clavel, H Inaba, T Kobayashi, N Misawa, K Aihara, Y Koyanagi, *K Sato. Cell-to-cell infection by HIV contributes over half of virus infection, <i>Elife</i> , 4, (2015). (†Equal contribution/*Corresponding author)

(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)

【主な学会発表:全て招待講演】

1. S. Iwami, Quantification of virus infection in cell culture, *A3-NIMS joint workshop on mathematical biology*, May 12–14, 2017, Korea.
2. S. Iwami, Quantifying antiviral activity optimizes drug combinations against hepatitis C virus infection, *Innovative Mathematical Modeling for the Analysis of Infectious Disease Data 2016*, October 10–11, 2016, Japan.
3. S. Iwami, Modelling Ebola virus dynamics: Implications for therapy, *European Conference on Mathematical and Theoretical Biology 2016*, July 11–15, 2016, England.
4. S. Iwami, Modelling Ebola virus dynamics: Implications for therapy, *the International Conference for the 70th Anniversary of Korean Mathematical Society*, October 20–23, 2016, Korea.
5. S. Iwami, Quantifying combination activity of anti-HCV drugs in vitro, *2nd Workshop on Virus Dynamics*, July 17–18, 2015, Canada.

【主な著作物】

1. 岩見真吾, 佐藤佳, 竹内康博. シリーズ現象を解明する数学「ウイルス感染と常微分方程式」, 共立出版, 2017年4月.

【主なプレスリリース】

1. HIV-1 の感染様式を定量化！-数学と実験の融合研究で新しい抗ウイルス薬開発を加速- (2015/09/28)
2. 理想的な C 型肝炎治療を目指して-数学と実験の融合研究で C 型肝炎治療を加速- (2017/02/07)

【主なメディア掲載】

1. HIV、細胞接触で増殖 (2015/10/26 日経産業新聞)
2. C型肝炎薬最適な併用法 (2017/02/10 日経産業新聞)