

特集：HIV 感染症の根治を目指して**HIV-1 ウイルスリザーバの成立・維持の仕組み****Generation and Maintenance Mechanisms Underlying HIV Reservoir**

佐藤 賢文

Yorifumi SATOU

熊本大学ヒトレトロウイルス学共同研究センター ゲノミクス・トランスクリプトミクス講座

Division of Genomics and Transcriptomics, Joint Research Center for Human Retrovirus Infection, Kumamoto University

日本エイズ学会誌 21: 167-172, 2019

はじめに

近年の抗ウイルス薬の進歩によって、HIV-1 感染者における血中ウイルス量を劇的に減少させ、AIDS 発症を阻止することが可能となってきた。その一方で、抗ウイルス薬による治療でも感染者体内からウイルスを完全に排除されることはなく、薬剤を中止するとふたたび高いレベルのウイルス血症を示すようになる。したがって、感染者の大部分は服薬の継続を余儀なくされている。しかも、長期治療症例のなかには、血中ウイルス量の抑制が良好であるにもかかわらず、非感染者より若年で癌や認知症、骨代謝異常を認めることが多く、長期的予後においては現在も問題点を抱えている。

そのようななか、治療下で残存するウイルスをさらに減少させ、休薬してもウイルスが再活性化せずにコントロールできる状態、さらには HIV の排除を目指しさまざまな研究が世界的に展開されている。ところが、治療中の感染者においてウイルスリザーバがどのように成立し、そして維持されているのか、まだまだ不明な点が多く残されており、ウイルスリザーバの全体像が見えていない。したがって、実際にウイルスリザーバを減少させる有効な治療法はいまだに確立されていない。本稿では、ウイルスリザーバに関するポイントを最近の話題を中心に紹介し、今後クリアすべき問題点などについて概説したい。

1. 抗ウイルス療法下におけるウイルスリザーバについて

抗ウイルス療法中の感染者において、ウイルスリザーバが成立・維持される仕組みとしてはリザーバとなる臓器の特性、宿主細胞の性質、細胞内におけるウイルス抗原発現制御機構など、多くの因子が多層的に関与して成り立って

いると考えられる。本稿では論点を明確にするため、リザーバを構成する因子について、以下の2つに大別して、それぞれについて論じることとする。

1-1. 解剖学的見地からのウイルスリザーバ形成・維持メカニズム

前述のように、治療中の HIV 感染者のほとんどでは血中ウイルス量が劇的に減少し検出限界以下になるが、感染者体内でウイルスリザーバが維持されているため、薬剤を中断するとリザーバのウイルス産生が亢進し、ウイルス血症が再燃する。

休薬後に再活性化するウイルスは体内のどこでどのように維持されている？

感染者における、末梢血液をみると感染細胞の割合がきわめて低く、その大部分が欠損型プロウイルスであることから、末梢血中のリンパ球や単球がウイルスリザーバの主役とは考えにくい。抗ウイルス療法下にウイルスリザーバとなりうる組織に関して、動物モデル・感染者検体の解析などにより、これまで多くの知見が報告されていて、休薬後にリバウンドするウイルスの源と考えられている。

サル免疫不全ウイルスである SIV の霊長類動物感染モデルを用いて、未治療でもウイルス血症が低く抑えられる個体（エリートコントローラー）のリンパ節の解析が行われた¹⁾。その結果、ウイルス RNA の発現がリンパ濾胞組織において顕著に高かったことから、リンパ濾胞性ヘルパー T (T_{HH}) 細胞にはウイルスが高率に感染しており、ウイルスリザーバとなっていることが示唆されている。リンパ節のリンパ濾胞領域は細胞障害性 T 細胞 (CTL) が少ないことが知られており、ウイルス感染細胞にとっては免疫監視を受けにくい解剖学的サンクチュアリーといわれる。リンパ濾胞ではある程度のウイルス複製が許容されるものの、そこから流出した感染細胞は、CTL など抗ウイルス免疫により認識され排除されるので、感染者個体レベルでのウイルス複製はきわめて低いレベルに維持され、末梢血中のウイルス血症も低く維持されることが考えられる。

著者連絡先：佐藤賢文 (〒860-0811 熊本市中央区本荘 2-2-1 IRCMS 303 熊本大学ヒトレトロウイルス学共同研究センター)

2019 年 7 月 10 日受付

長期間 ART 治療を受けているヒト感染者検体においても、リンパ節 T_{HH} 細胞が高率に感染しており、複製可能なウイルス源となっていることが示されている²⁾。また、未治療でウイルス血症が低く抑えられる感染者（エリートコントローラー）の解析では、リンパ節の T_{HH} 細胞だけでなく、非濾胞性ヘルパー T 細胞も同時期に採取した血清中に認めるウイルス（同時期に感染者体内で増えているウイルス）と同じウイルスに感染していることが報告され、解剖学的ウイルスリザーバとしてリンパ節の重要性が示されている³⁾。

リンパ節のリンパ濾胞領域以外にも、免疫からの回避が可能な解剖学的場所として、脳、眼、精巣や尿道などが想定される。以前の報告で、精巣がウイルスリザーバとなっていることが示唆されている⁴⁾。さらに最近の研究で、抗ウイルス療法で血中ウイルス量が検出限界以下に抑制されている感染者の尿道組織を利用して、ウイルスリザーバについて評価が行われた。その結果、同組織中では T 細胞よりもむしろマクロファージが高率に HIV に感染しており、LPS で刺激することで複製可能なウイルス粒子を産生することが示された⁵⁾。

HIV 治療を目指した治療を行う際には、これら解剖学的ウイルスリザーバにどう対処するのか、解決すべき重要課題の 1 つである。

1-2. 感染細胞レベルにおけるウイルスリザーバ維持・形成メカニズム

感染細胞内でウイルス複製がストップし、ウイルス抗原が発現しない場合、その感染細胞は抗レトロウイルス薬や抗ウイルス免疫によって排除されることがない。そのような潜伏感染細胞は、上述したような解剖学的局在にかかわらず、個々の細胞レベルでウイルスリザーバになりうると考えられる。HIV 感染者の末梢血では抗ウイルス治療開始後わずか数週間欠損型プロウイルスが蓄積することが知られている⁶⁾。欠損型プロウイルスは感染細胞がウイルス抗原を発現しない機序の 1 つとなるが、ウイルス複製能を失うような欠損を持つプロウイルスは、もはやウイルスのリザーバとしては機能しない。再活性化能を維持した状態で、ウイルス粒子やウイルス抗原を発現せず潜伏化している感染細胞が問題となる。

なぜ、潜伏感染細胞は可逆的な状態でウイルス発現を静止しているのか？

主に T 細胞における潜伏感染細胞は以下の仕組みで成立すると考えられている。活性化 T 細胞にウイルスが感染したのち、大部分の感染細胞はウイルス粒子を産生し、それに伴う細胞へのダメージにより細胞死を引き起こす。ところが、一部の感染細胞は細胞死から逃れ、活性化 T 細胞からエフェクター T 細胞に移行し、resting memory T 細胞になる。

活性化 T 細胞から resting memory T 細胞になるにつれて、細胞の転写因子活性が低下して潜伏感染状態になると考えられる。最近の研究で、実際にウイルスプロモーター LTR の転写に関わる転写因子 NF- κ B の標的遺伝子群の発現が、活性化 T 細胞では上昇しているが、effector T 細胞で減弱していることが示されている⁷⁾。つまり、T 細胞が抗原と出会って活性化する際にウイルスに感染するが、細胞の状態が変化して resting memory T 細胞へと移行していく過程で、LTR に作用する転写因子活性が低下して、潜伏感染が成立する。

ヒトのゲノム DNA はヒストンタンパクに巻き付く形でクロマチン DNA として核内に存在している。HIV-1 プロウイルスも宿主 DNA に組み込まれたのち、ヒト DNA と同様にクロマチン化される。このクロマチン構造も、プロウイルス遺伝子発現を規定する重要な因子の 1 つであり、クロマチンが開いた状態のプロウイルスには、転写因子がウイルスプロモーターにアクセスしやすいが、逆にクロマチンが閉じていると転写因子が遺伝子発現を誘導することができない。

つまり、ウイルス遺伝子発現を規定する因子としては、前述の 5' LTR からの転写に関わる転写因子に加え、プロウイルス DNA のクロマチン状態が上げられる（図 1）。

この細胞レベルでのウイルス潜伏化細胞はウイルスリザーバの一翼を担っていると考えため、この潜伏状態を解除してウイルスリザーバを減少させる、いわゆる LRA (latency reversing agent) 開発研究が現在行われている。ウイルス遺伝子発現に関連した転写因子を活性化する薬剤として、T 細胞刺激剤である PKC (Protein kinase C) 活性化剤などが用いられる。また、閉じたクロマチンを開かせるという意図で、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (HDAC 阻害剤) などが用いられる。それら従来型の LRA 薬剤は、ウイルス遺伝子発現のみならず、宿主細胞遺伝子発現に対しても作用するため、副作用を惹起する可能性が考えられる。さらにこれまでの臨床研究においてウイルスリザーバ減少効果自体も明確に示されていない。

最近行われた、primary CD4 T 細胞を用いた *in vitro* の感染実験によると、既存の LRA では潜伏感染細胞のごく一部しか潜伏解除できないこと、それはウイルスの組み込み部位と宿主遺伝子との関係性や、組み込み部位のエピゲノム環境に依存することが示唆されている⁸⁾。より有効性の高い LRA 開発には、更なる潜伏化メカニズム研究の進展が必要である。

2. 末梢血におけるリザーバ測定の意義

ウイルスリザーバを標的とした治療を行う際には、治療有効性を評価する判定基準が必要である。しかしながら、

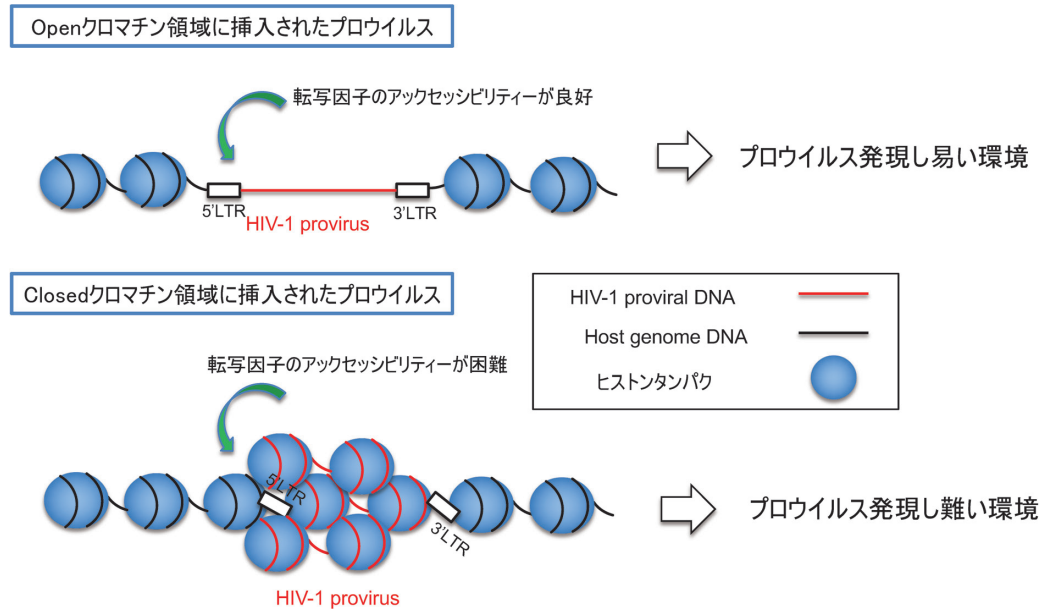


図 1 プロウイルスのエピゲノム環境と遺伝子発現の関係性

前述のような解剖学的リザーバとなる組織を直接採取することは容易ではなく、末梢血を用いた評価が現実的である。

実際の臨床試験では休薬後からウイルス血症再燃までの時間が基準になされたりしているが、実際に治療を行う場面を想定すると、末梢血で休薬前にリザーバ評価ができることが望ましい。しかしながら、末梢血では感染細胞の割合が少ない上に欠損型プロウイルスの割合が高いため、末梢血液を循環しているリザーバ細胞の出現頻度は低いと考えられる⁷⁾。

末梢血でのウイルスリザーバ測定は不可能？

未治療でウイルスコントローラー (plasma HIV RNA levels < 1,000 copies/mL) となっている症例解析において、末梢血リンパ球内の一部にも、同時期に血清で複製しているウイルスと同じ配列を持った感染細胞が存在することが示された³⁾。このことは、Tリンパ球にとってはリンパ節が主たるウイルスリザーバであるものの、その一部は末梢循環に流れ込み、末梢血液中でも検出可能であることを示している。最近の末梢血液における HIV-1 プロウイルスに関するキーポイントについてまとめてみたい。

2-1. 完全長型と欠損型のプロウイルス

前述のように末梢血では欠損型プロウイルスが多い。しかも、感染後数週という短期間に欠損型ウイルスが蓄積する。欠損型ウイルスを持つ感染細胞が感染者体内でどのような役割を果たしているかは、議論の余地があるところである。ウイルスリザーバとしては機能を持たないが、ウイルス抗原を発現する能力を保持したものも多く、ウイルス

抗原を産生して、抗ウイルス免疫応答を維持する役割を持つことが示唆されている⁹⁾。ウイルスリザーバとして対策が必要なのは、ウイルス粒子産生能を持つ完全長型プロウイルスを持つ感染細胞である。

2-2. ウイルス組み込み部位に関する考察

レトロウイルス感染時には感染イベントごとに宿主ゲノムのさまざまな場所にウイルスゲノムの組み込みが生じる。それぞれの感染クローンは、ウイルスが組み込まれている場所が異なる。そして、おのおののウイルス組み込み部位情報が感染クローンを識別する目印として用いられる。近年、PCR と次世代シーケンスを活用したウイルス組み込み部位解析が確立され、ウイルス組み込み部位情報がきわめて高感度に取得可能となった¹⁰⁾ (図2)。

HIV-1 は転写がアクティブな宿主遺伝子領域を好んでプロウイルス DNA を組み込ませる傾向がある。感染者で観察されるウイルス組み込み部位は、上述の組み込み時の指向性要因に加え、生体内でのそれぞれの感染クローンの選択という2つの要因の総和で規定される。つまり感染者体内では抗ウイルス免疫や抗ウイルス薬存在下で、生き残りやすい感染クローンが選択され蓄積することが想定される。最近の、抗ウイルス療法中感染者末梢血の解析で、複製可能なプロウイルスは遺伝子間領域に組み込まれていることが多いことが示された¹¹⁾。また、遺伝子内に組み込まれている場合には、宿主遺伝子の方向と逆向きに組み込まれていることが多く、ウイルス組み込み部位に加えて、宿主遺伝子との関係性も、ウイルス遺伝子発現制御に関わることが示唆されている。今後研究が進み、プロウイルス特

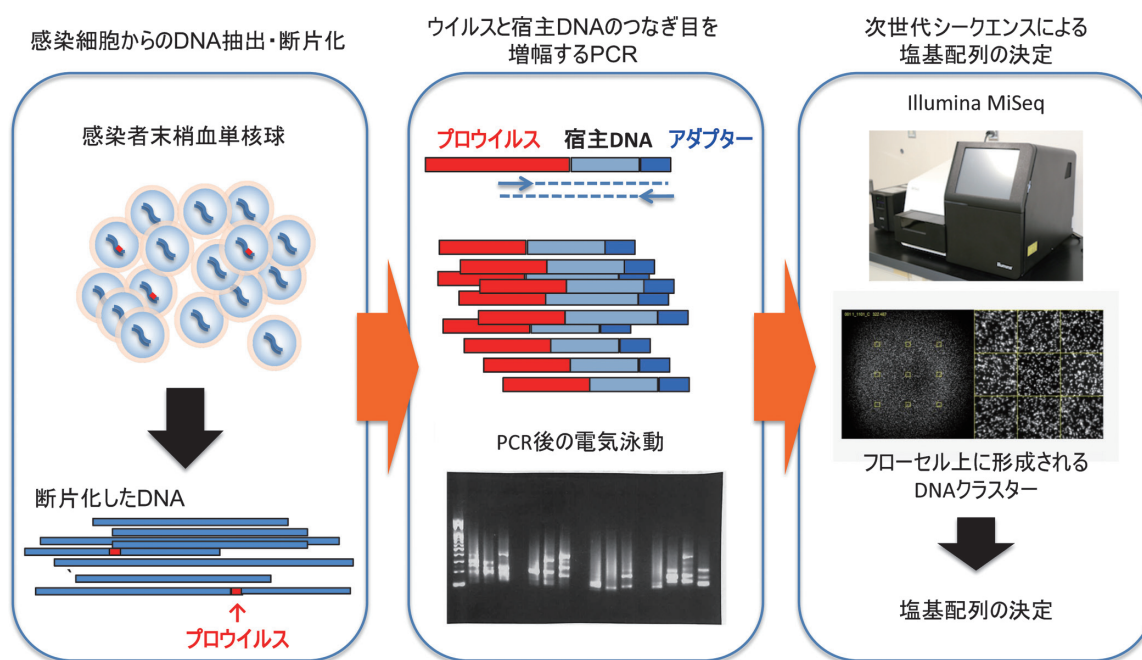
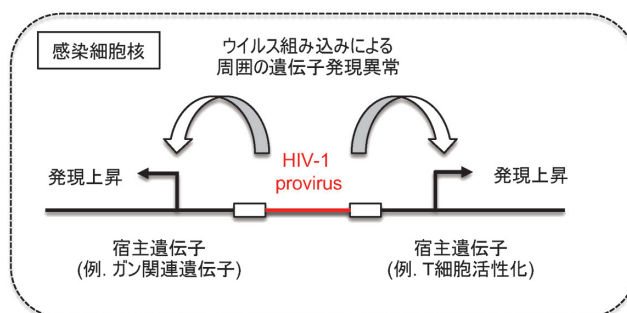
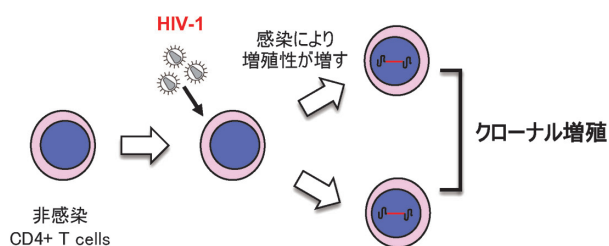


図 2 次世代シーケンスによるウイルス組み込み部位解析

A. ウイルス感染が細胞増殖を誘導する場合



B. もともと増殖している細胞にウイルスが感染する場合

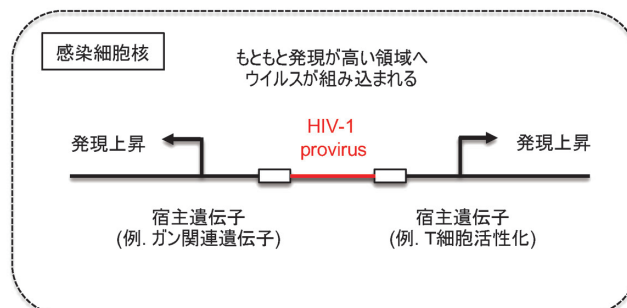
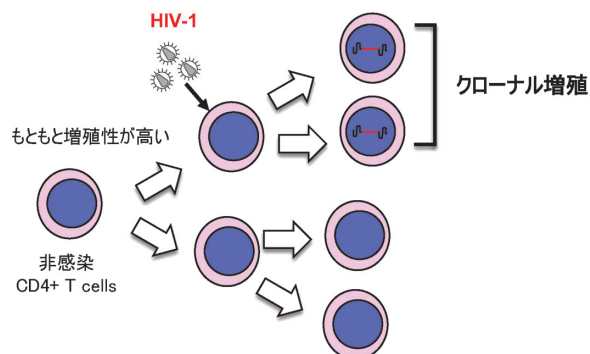


図 3 感染細胞のクローン性増殖機序

異的な転写抑制メカニズムが明らかになれば、プロウイルスに選択性の高い、より効率的なLRAの開発に繋がると考えられる。

2-3. 感染細胞のクローン性増殖

前述の次世代シーケンスを活用したウイルス組み込み部位解析では組み込み部位情報だけでなく、感染クローンの増殖度が評価可能である¹²⁾。同じヒトレトロウイルスであるHTLV-1感染細胞の特性としてよく知られた現象である感染細胞のクローン性増殖が、HIV感染細胞でも生じているという報告が2014年になされた^{13,14)}。従来、HIV-1感染者とHTLV-1感染者では自然経過がまったく異なるが、HIV-1感染者が抗レトロウイルス薬でウイルス血症が低く抑えられると、HTLV-1感染者でと同じような側面がみえてくる点は興味深い。もともと2つのウイルスの主要な標的細胞であるCD4⁺T細胞は獲得免疫の中心的役割を果たす細胞であり、免疫記憶という仕組みが備わっている。免疫の記憶は特定のT細胞クローンがクローン性に増殖したり長期間生存したりすることで成立することを考えると、HTLV-1感染細胞だけでなく、HIV-1感染細胞も、クローン性増殖をして、長期生存するものが存在するのは至極当然のことに思える。われわれのヒト化マウスを用いた感染モデルでの解析によると、クローン性増殖は比較的短期間で、全身性に播種することが明らかとなっている¹⁵⁾。クローン性増殖のメカニズムはいまだ不明な点が多いものの、クローン性増殖している細胞にはウイルス組み込み部位に特徴があると言われている。そのような感染細胞では、ウイルスが、ガン関連遺伝子に挿入されていることが報告されている^{13,16)}。われわれのヒト化マウスの検討でも、クローン性増殖を来した感染クローンでは、ウイルスが特定の機能を持った遺伝子領域に挿入されており、クローン性増殖とウイルス組み込み部位とは密接な関連性があると考えられる^{15,17)}。ウイルスが挿入されたことにより、近傍のガン関連遺伝子が発現亢進したのか、もともとガン関連遺伝子の発現が高い細胞にウイルスが感染したのか、2つの可能性が考えられる(図3)。感染者検体の解析で、末梢血中のクローン性に増殖している感染細胞のほとんどは欠損型プロウイルスを持っていて、ウイルスリザーバとしての役割は果たさないが¹⁸⁾、一部には複製可能な感染クローンも存在しており¹⁹⁾、感染者におけるウイルスリザーバ多様性の一翼を担っていることが考えられる。

3. おわりに

サル免疫不全ウイルスであるSIVの霊長類動物感染モデルを用いて、TLR9と中和抗体の併用療法で、効果が示された。LRAに加え抗ウイルス免疫を増強させることの重要性が示唆される。また、そのサルの治療介入は感染後き

わめて早期であり、感染から治療開始までの経過時間も、ウイルスリザーバの形成には重要と考えられる²⁰⁾。HIV-1感染症のよりよいコントロールを目指す際には、感染を未然に防ぐこと、感染が成立したら早期に治療を行うことが重要である。そして、慢性感染期の感染者については、ウイルスリザーバを減らして、抗ウイルス免疫を増強して、治療フリーでもウイルス量がコントロールできる状態を目指した研究開発が必要となってくる。

今後のリキッドバイオプシーなどで新たなバイオマーカーの特定など、ブレイクスルーとなる研究成果によって、より精度の高いリザーバ評価系が確立され、HIV治療を目指した研究が加速することを期待したい。

利益相反：開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Fukazawa Y, Lum R, Okoye AA, *et al* : B cell follicle sanctuary permits persistent productive simian immunodeficiency virus infection in elite controllers. *Nat Med* 21 : 132-139, 2015.
- 2) Banga R, Procopio FA, Noto A, *et al* : PD-1(+) and follicular helper T cells are responsible for persistent HIV-1 transcription in treated aviremic individuals. *Nat Med* 22 : 754-761, 2016.
- 3) Boritz EA, Darko S, Swaszek L, *et al* : Multiple origins of virus persistence during natural control of HIV infection. *Cell* 166 : 1004-1015, 2016.
- 4) Houzet L, Matusali G, Dejucq-Rainsford N : Origins of HIV-infected leukocytes and virions in semen. *J Infect Dis* 210 (Suppl 3) : S622-630, 2014.
- 5) Ganor Y, Real F, Sennepin A, *et al* : HIV-1 reservoirs in urethral macrophages of patients under suppressive antiretroviral therapy. *Nat Microbiol* 4 : 633-644, 2019.
- 6) Bruner KM, Murray AJ, Pollack RA, *et al* : Defective proviruses rapidly accumulate during acute HIV-1 infection. *Nat Med* 22 : 1043-1049, 2016.
- 7) Shan L, Deng K, Gao H, *et al* : Transcriptional reprogramming during effector-to-memory transition renders CD4(+) T cells permissive for latent HIV-1 infection. *Immunity* 47 : 766-775 e3, 2017.
- 8) Battivelli E, Dahabieh MS, Abdel-Mohsen M, *et al* : Distinct chromatin functional states correlate with HIV latency reactivation in infected primary CD4(+) T cells. *Elife* 7 : e34655, 2018.
- 9) Pollack RA, Jones RB, Perteau M, *et al* : Defective HIV-1 proviruses are expressed and can be recognized by cytotoxic

- T lymphocytes, which shape the proviral landscape. *Cell Host Microbe* 21 : 494–506 e4, 2017.
- 10) Gillet NA, Malani N, Melamed A, *et al* : The host genomic environment of the provirus determines the abundance of HTLV-1-infected T-cell clones. *Blood* 117 : 3113–3122, 2011.
 - 11) Einkauf KB, Lee GQ, Gao C, *et al* : Intact HIV-1 proviruses accumulate at distinct chromosomal positions during prolonged antiretroviral therapy. *J Clin Invest* 129 : 988–998, 2019.
 - 12) Berry CC, Gillet NA, Melamed A, *et al* : Estimating abundances of retroviral insertion sites from DNA fragment length data. *Bioinformatics* 28 : 755–762, 2012.
 - 13) Maldarelli F, Wu X, Su L, *et al* : HIV latency. Specific HIV integration sites are linked to clonal expansion and persistence of infected cells. *Science* 345 : 179–183, 2014.
 - 14) Wagner TA, McLaughlin S, Garg K, *et al* : HIV latency. Proliferation of cells with HIV integrated into cancer genes contributes to persistent infection. *Science* 345 : 570–573, 2014.
 - 15) Satou Y, Katsuya H, Fukuda A, *et al* : Dynamics and mechanisms of clonal expansion of HIV-1-infected cells in a humanized mouse model. *Sci Rep* 7 : 6913, 2017.
 - 16) Ikeda T, Shibata J, Yoshimura K, *et al* : Recurrent HIV-1 integration at the BACH2 locus in resting CD4⁺ T cell populations during effective highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 195 : 716–725, 2007.
 - 17) Haworth KG, Scheffer LE, Norgaard ZK, *et al* : HIV infection results in clonal expansions containing integrations within pathogenesis-related biological pathways. *JCI Insight* 3 : 99127, 2018.
 - 18) Cohn LB, Silva IT, Oliveira TY, *et al* : HIV-1 integration landscape during latent and active infection. *Cell* 160 : 420–432, 2015.
 - 19) Wang Z, Gurule EE, Brennan TP, *et al* : Expanded cellular clones carrying replication-competent HIV-1 persist, wax, and wane. *Proc Natl Acad Sci USA* 115 : E2575–E2584, 2018.
 - 20) Okoye AA, Hansen SG, Vaidya M, *et al* : Early antiretroviral therapy limits SIV reservoir establishment to delay or prevent post-treatment viral rebound. *Nat Med* 24 : 1430–1440, 2018.