

## ウイルスタンパク質産生時間を考慮した数理モデルの構築

柿添 友輔<sup>1</sup> 岩見 真吾<sup>2</sup>

Yusuke Kakizoe<sup>1</sup> Shingo Iwami<sup>2</sup>

九州大学理学部生物学科<sup>1</sup> 九州大学理学研究院<sup>2</sup>

Kyushu University Science faculty department of biology<sup>1</sup>

Kyushu University Research Institute of Science<sup>2</sup>

### 1. はじめに

SHIV のウイルス複製過程では、まず標的細胞にウイルスが侵入し脱殻する。そして、自身のゲノムを宿主のゲノムに組み込み、転写・複製を開始させる。最後に子孫ウイルスが作られ、放出される。このような過程の中で、ウイルスが脱殻してから子孫ウイルスを複製するまでの間はウイルスを観測することができない。この期間のことを暗黒期と呼ぶ。現在まで暗黒期に関する数理モデル研究は複数報告されているが、暗黒期を定量的に扱った研究はほとんど存在しない。本研究では、SHIV 侵入細胞がウイルスタンパク質を産生するまでの時間（すなわち、暗黒期）がどのように分布しているかを感染実験により調べた。さらに、時間遅れを持つ微分方程式を用いてこれらの暗黒期を詳細に記述する数理モデルを開発し、SHIV 感染実験データを解析した。またこれらの結果と従来の結果を比較・考察を行った。

### 2. 結果

#### 2-1. 培養細胞を用いた SHIV 感染実験から暗黒期の分布を推定する

以下では、研究協力者である三浦智行氏（京都大学ウイルス研究所）が行った実験について説明する。実験では複数のウェルに、カニクイザル由来の HSC-F 細胞を培養した。そして、HSC-F 細胞に高濃度の SHIV-KS661 を接種した。高濃度のウイルス接種下では全ての標的細胞にウイルスが侵入し、子孫ウイルスによる二次感染は起こらない。このような非感染の標的細胞が存在せず、子孫ウイルスによる再感染の起こらない感染実験を「シングルサイクル感染実験」と呼ぶ（以下、SC 感染実験と書く）。ウイルス接種後、全細胞中の Nef（ウイルスタンパク質）産生細胞の割合を時刻  $t$  ( $t=8,12,16,20,24,28,32,74$  時間) で測定した。この際、一つのウェルから全ての細胞を採取して測定している。また Nef は SHIV ライフサイクルの後期に産生される事より、Nef 産生細胞数とウイルス産生細胞数は等しいと仮定する。ここでは、測定された全細胞中の Nef 産生細胞の頻度を精度良く説明できる確率分布を、非線形最小二乗法により推定する。各時刻における測定値と仮定した累積確率分布値の誤差を以下の目的関数により定める。

$$SSR(\theta) = \sum_t (\log A(t) - \log A^*(t))^2. \quad (1)$$

$A(t)$  はそれぞれの分布における各時刻での累積確率分布の値を示している。また、 $A^*(t)$  はそ

それぞれの各時刻における測定値を示している ( $t=8,12,16,20,24,28,32,74$  時間)。目的関数(1)を用い、様々な確率分布を仮定して(指数分布、正規分布、ワイブル分布、ガンマ分布)最小二乗法によるフィッティングを行った。 $\theta$ はそれぞれの確率分布の形状を決めるパラメータである。解析の結果、ガンマ分布( $\tau = 0.98(\text{day}), n = 3.52$ )が SSR の値を最小にすることが分かり、ガンマ分布が最も暗黒期を表現できる事が分かった(図1)。以下ではこの確率密度関数を用いて新しい数理モデルを構築し、実験データを説明していく。

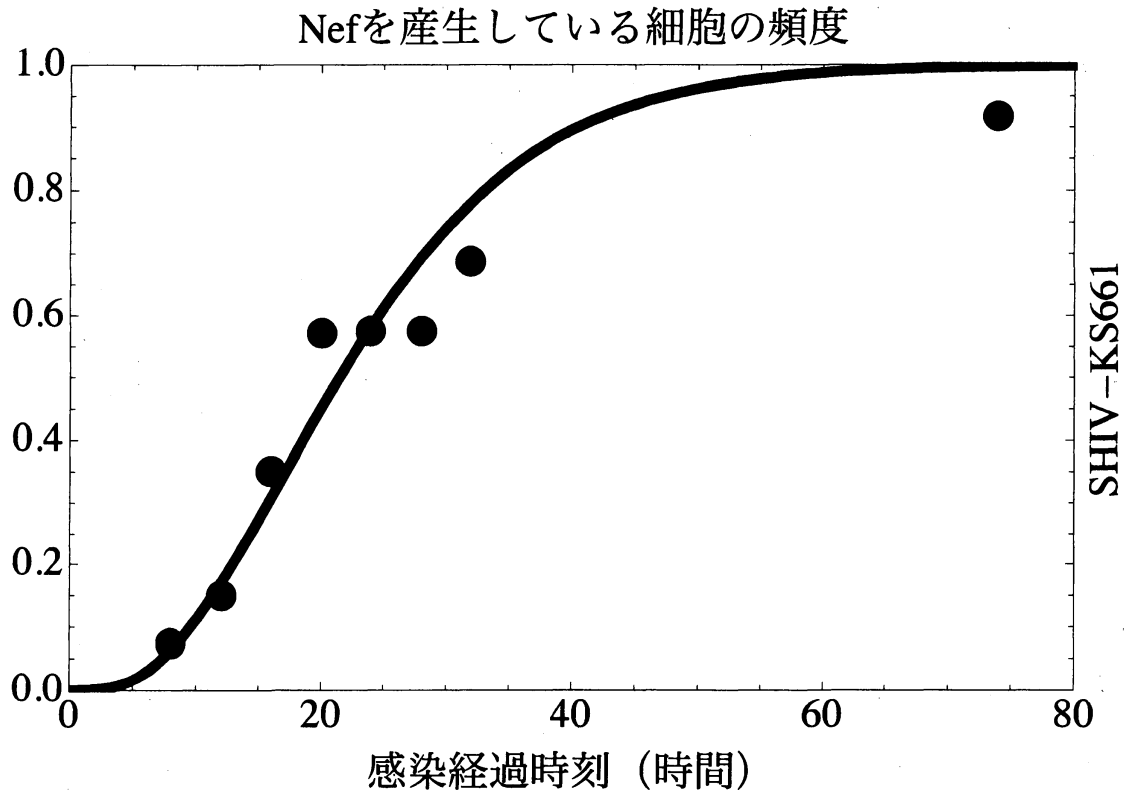


図1. SHIV 感染実験における Nef 産生細胞の頻度をガンマ分布で fitting した図: 横軸は時刻(時間)を表し、縦軸は Nef を産生している細胞の頻度を表している。ウイルス接種直後は多くの細胞が Nef を産生しておらず、20 時間後あたりを境に Nef 産生が急激に上昇することがわかる。そして、80 時間後にはほぼ全ての細胞が Nef を産生していることが確認できる。

## 2-2. 暗黒期を考慮した新しい数理モデルの構築

これまで、ウイルス感染動態の多くの解析では以下に示す数理モデル(以後、基本モデルと記す)が用いられてきた。

$$T'(t) = -\beta T(t)V(t), \quad I'(t) = \beta T(t)V(t) - \delta I(t), \quad V'(t) = pI(t) - cV(t). \quad (2)$$

ここで、変数 $T(t), I(t), V(t)$ はそれぞれ非感染細胞数、ウイルス産生細胞数、ウイルス RNA 量を表している。また定数 $\beta, \delta, p, c$ はそれぞれウイルス感染率、ウイルス産生細胞死亡率、ウイルス産生率、ウイルス除去率を表している。暗黒期を考慮していない基本モデルでは、非

感染細胞がウイルスに感染した後、直ちにウイルスを産生できる(すなわち、暗黒期は指数分布である)と仮定している。しかし、上述の通りこの仮定は誤りであり、暗黒期はガンマ分布する必要がある。従って暗黒期を表現する1つの手段として、時間遅れを持つ微分方程式を用いた数理モデルを考えた。式(2)を改良すると、先行研究[3,4]で解析されている以下のような時間遅れを持った微分方程式になる。

$$\begin{aligned} T'(t) &= -\beta T(t)V(t), \\ I'(t) &= \beta \int_0^\infty f(s)T(t-s)V(t-s) ds - \delta I(t), \\ V'(t) &= pI(t) - cV(t). \end{aligned} \quad (3)$$

ここで、 $s$ は暗黒期であり、 $f(s)$ は暗黒期の確率密度関数を表している。また、暗黒期はガンマ分布していることより $f(s)$ は以下の式で記述される。

$$f(s) = \frac{s^{n-1}}{\Gamma(n) \left(\frac{\tau}{n}\right)^n} e^{-\frac{n}{\tau}s}. \quad (4)$$

さらに、 $n$ が整数の時は Linear-chain-trick という技法(論文[4]を参照)が適用できる事に注意すれば、式(3)は以下の様に常微分方程式に帰着する。 $E_k(t)$ を式(4)のように定義して、

$$E_k(t) = \int_0^\infty \frac{s^{k-1}}{\Gamma(k) \left(\frac{\tau}{n}\right)^k} e^{-\frac{n}{\tau}s} \beta T(t-s)V(t-s) ds \quad (5)$$

$n=3$ であると仮定すれば、式(5)より式(3)は以下のとおり変形できる(ただし  $k=1,2,3,\dots,n$ )。

$$\begin{aligned} T'(t) &= -\beta T(t)V(t), \\ E_1'(t) &= \beta T(t)V(t) - \frac{n}{\tau} E_1(t), \\ E_2'(t) &= \frac{n}{\tau} E_1(t) - \frac{n}{\tau} E_2(t), \\ E_3'(t) &= \frac{n}{\tau} E_2(t) - \frac{n}{\tau} E_3(t), \\ I'(t) &= \frac{n}{\tau} E_3(t) - \delta I(t), \\ V'(t) &= pI(t) - cV(t). \end{aligned} \quad (6)$$

従って、暗黒期を考慮した数理モデルは、常微分方程式を用いて記述できる。ここで導出された式(6) (以後、改良モデルと記す)は、先行研究[5,6]で用いられている数理モデルに一致している。

### 2-3. マルチプルサイクル感染実験におけるウイルスダイナミクスの定量

次に、式(6)を用いて岩見らの論文[8]で解析された SHIV-KS661 による感染実験データを解析する。岩見らの実験では異なるウイルス接種量 ( $2.0 \times 10^{-4}$ 、 $2.0 \times 10^{-5}$ ) の下で、各時刻において非感染細胞数、ウイルス産生細胞数、ウイルス RNA 量を測定している。またウイルス接種の時点で、未感染の標的細胞が存在し子孫ウイルスによる二次感染も起こる。このような感染実験を「マルチプルサイクル感染実験」(MC 感染実験と記す)と呼ぶ。以下、最小二乗法を用いて測定された時系列データから式(6)のパラメータを推定する。ただし、 $n/\tau = 3/0.98$ は SC 感染実験から推定された値を用いる。数理モデルによる予測値と時系列データの誤差に関する目的関数は次のようになる。

$$\begin{aligned}
 SSR(\theta) = & \sum_{t=1}^9 (\log\{T_1(t) + E_{1,1}(t) + E_{1,2}(t) + E_{1,3}(t)\} - \log\{N_1^*(t)\})^2 \\
 & + \sum_{t=1}^9 (\log\{T_2(t) + E_{2,1}(t) + E_{2,2}(t) + E_{2,3}(t)\} - \log\{N_2^*(t)\})^2 \\
 & + \sum_{t=1}^9 (\log I_1(t) - \log I_1^*(t))^2 + \sum_{t=1}^9 (\log I_2(t) - \log I_2^*(t))^2 \\
 & + \sum_{t=1}^9 (\log V_1(t) - \log V_1^*(t))^2 + \sum_{t=1}^9 (\log V_2(t) - \log V_2^*(t))^2. \quad (7)
 \end{aligned}$$

ここで  $T(t), E(t), I(t), V(t)$  は、式(6)より予測された非感染細胞の数、感染しているがウイルスを産生していない細胞の数、ウイルスを産生している細胞の数、ウイルス RNA 量を表している。また、 $N^*(t), I^*(t), V^*(t)$  はそれぞれ各測定時刻における、ウイルスタンパク質を産生していない(Nef-negative)細胞の数、ウイルスを産生している(Nef-positive)細胞の数、ウイルス RNA 量を表している。変数の添字 1,2 はそれぞれウイルス接種量  $2.0 \times 10^{-4}$ (MOI)と  $2.0 \times 10^{-5}$ (MOI)の状況を表している。 $\theta = (T_i(0), E_{i,1}(0), E_{i,2}(0), E_{i,3}(0), I_i(0), V_i(0), \beta, \delta, p)(i = 1, 2)$  は、感染実験データから推定する式(7)のパラメータである。推定されたパラメータは表 1 に示している。図 2 は、上記の目的関数を最小にするパラメータをもとに計算した数理モデルによるシミュレーションである。

パラメータ名	記号	単位	値
形状母数	$n$	—	3
形態母数	$\tau$	—	0.98
ウイルス除去率	$c$	RNA copies $\cdot$ day $^{-1}$	2.01
ウイルス感染率	$\beta$	(RNA/ml $\cdot$ day) $^{-1}$	$4.18 \times 10^{-10}$
ウイルス産生率	$p$	RNA copies $\cdot$ day $^{-1}$	$4.4 \times 10^4$
ウイルス産生細胞死亡率	$\delta$	day $^{-1}$	2.55
ウイルス産生細胞半減期	$\log 2 / \delta$	days	0.28
ウイルスバーストサイズ	$p / \delta$	RNA copies	$1.74 \times 10^4$
基本再生産数	$R_0$	—	23

表 1. MC 感染実験データを用いた改良モデルによるパラメータの推定値

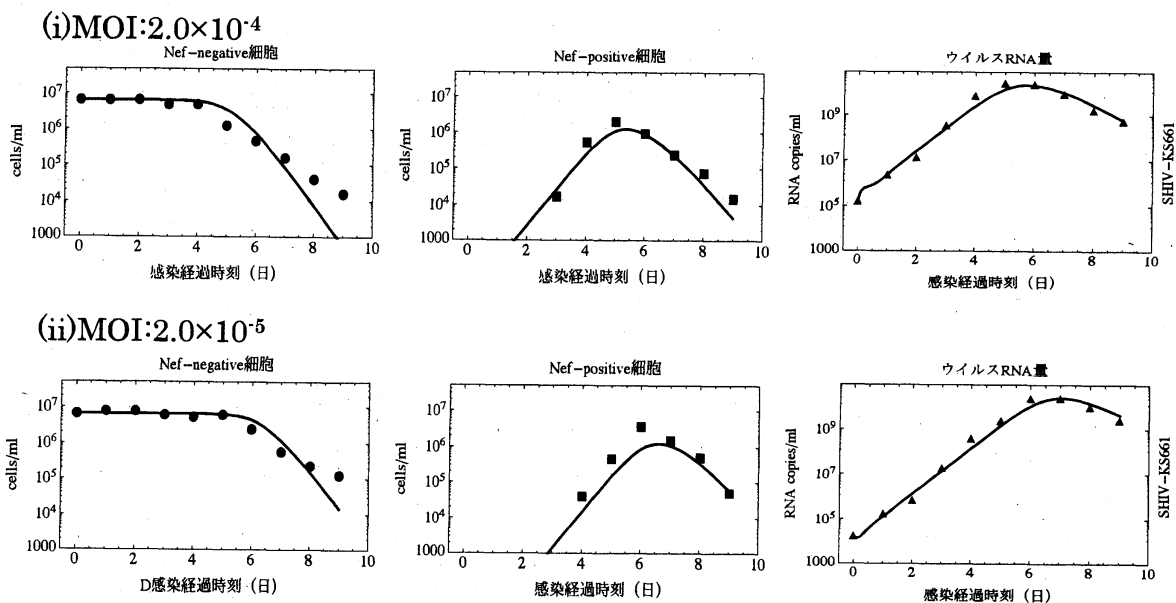


図 2. SHIV 感染実験における時系列データを改良モデルにより fitting した図：左から順に Nef-negative (ウイルスタンパク質を産生していない) 細胞、Nef-positive (ウイルスタンパク質を産生している) 細胞、ウイルス RNA 量を表している。図中の黒印は実験データを、黒実線は最適なパラメータを用いた数理モデルによる予測値を表している。

### 3. 考察

本研究では、SC 感染実験における感染細胞中のウイスタンパク質 Nef を測定する事で、ウイルス感染の暗黒期が平均約 24 時間でガンマ分布している事を明らかにした。この事実は、先行研究[3,4,5,6]で用いられている数理モデルが妥当である事を示唆している。ここでは、MC 感染実験のデータから改良モデルにより推定されたパラメータ（表 1）と基本モデルにより推定されたパラメータを比較する事で、数理モデルにおける暗黒期がパラメータ推定に与える影響を議論する。また、基本モデルにより推定されたパラメータは、岩見らの先行研究[7]を参考にしている（表 2）。

パラメータ名	記号	単位	値
ウイルス感染率	$\beta$	(RNA/ml·day) <sup>-1</sup>	$8.61 \times 10^{-11}$
ウイルス産生率	$p$	RNA copies·day <sup>-1</sup>	$3.26 \times 10^4$
ウイルス産生細胞死亡率	$\delta$	day <sup>-1</sup>	1.75
ウイルス産生細胞半減期	$\log_2/\delta$	days	0.4
ウイルスバーストサイズ	$p/\delta$	RNA copies	$1.87 \times 10^4$
基本再生産数	$R_0$	-	5.1

表 2. MC 感染実験データを用いた基本モデルによるパラメータの推定値（論文[7]から抜粋）

まず、“ウイルス産生”に関するダイナミクスを考察する。ウイルス産生感染細胞の平均的なウイルス産生期間( $1/\delta$ )とウイルス産生率( $p$ )は、改良モデルと基本モデルにおいてそれぞれ 9.6 時間及び  $3.26 \times 10^4$ (RNA copies·day<sup>-1</sup>)と 13.6 時間及び  $4.4 \times 10^4$ (RNA copies·day<sup>-1</sup>)と推定され、大きな差はない(必然的にウイルスバーストサイズについても同じ議論ができる)。従って、ウイルス産生の定量化に関しては、暗黒期のモデリングが大きな影響を及ぼすことはないと考えられる。しかし、“新規感染”に関するパラメータであるウイルス感染率( $\beta$ )は、基本モデルでは  $8.61 \times 10^{-11}$ (RNA/ml·day)<sup>-1</sup>、改良モデルでは  $4.18 \times 10^{-10}$ (RNA/ml·day)<sup>-1</sup>と推定され大きく異なっている。この違いは、ウイルス産生を開始するまでの「遅れ」の影響を考える事で直感的に理解する事ができる。すなわち、改良モデルでは、基本モデルに比べて感染の初期に産生されるウイルス量が小さくなり、同じ傾きのウイルス増殖を実現するためには、より大きな感染率を必要とするからである。

この様に、数理モデルにおける暗黒期は、特に、新規感染に関するウイルスダイナミクス(ウイルス感染率や基本再生産数)に大きな影響を与える事が分かった。

#### 4. 参考文献

- [1] Herz AV, Bonhoeffer S, Anderson RM, May RM, Nowak MA, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 1996;93(14):7247-51.
- [2] Nelson PW, Murray JD, Perelson AS, *Math. Biosci.*, 2000;163(2):201-15.
- [3] Mittler JE, Sulzer B, Neumann AU, Perelson AS, *Math Biosci.*, 1998;152 (2):143-63.
- [4] Nelson PW, Perelson AS, *Math Biosci.*, 2002;179(1):73-94.
- [5] Grossman Z, Feinberg M, Kuznetsov V, Dimitrov D, Paul W, *Immunol. Today*, 1998;19(11):528-32.
- [6] Grossman Z, Polis M, Feinberg MB, Grossman Z, Levi I, Jankelevich S, Yarchoan R, Boon J, de Wolf F, Lange JM, Goudsmit J, Dimitrov DS, Paul WE, *Nat. Med.*, 1999;5(10):1099-104.
- [7] Iwami S, Sato K, De Boer RJ, Aihara K, Miura T, Koyanagi Y, *Front. Microbiol.*, 2012;3:319.