

培養細胞系を用いた cell-free 感染における

細胞の感受性の不均一性を考慮した

HIV-1 重感染現象の動態予測

伊藤悠介^a, 岩見真吾^{a,b,c}

a 九州大学 数理生物学研究室

b 科学技術振興 PRESTO

c 科学技術振興 CREST

Yusuke Ito^a, Shingo Iwami^{a,b,c}

a Department of Biology, Faculty of Sciences, Kyushu University, Fukuoka 819-0395, Japan.

b PRESTO, JST, Saitama 332-0012, Japan.

c CREST, JST, Saitama 332-0012, Japan.

1. はじめに

ヒト免疫不全ウイルス (HIV-1)は遺伝的組替を通じて迅速に遺伝的変異を蓄積していくが、これは多重感染に起因することが示唆されている (Azaria Remion, 2013; Law et al., 2016; Soetaert and Petzoldt, 2010)。つまり、多重感染現象は薬剤耐性ウイルスの産生を促進させる可能性があり、免疫回避や病態進行を引き起こし得る。ここで多重感染とは、同時に複数の HIV-1 が細胞に感染するウイルス現象のことである (Azaria Remion, 2013)。近年、偶発的に多重感染が生じるよりも多い頻度で生じることが *in vitro*系でも *in vivo*系でも実証されている (Chen et al., 2005; Dang et al., 2004; Remion et al., 2016)。これは HIV-1 感染症において普遍的なウイルス現象であることを示唆している。またこの普遍的なウイルス感染は、細胞の感受性の不均一性によって駆動されていることが提唱されている (Dang et al., 2004)。さらに HIV-1 患者体内で多重感染が生じている (Josefsson et al., 2011; Smith et al., 2005)。以上より、細胞の感受性の不均一性を考慮した HIV 多重感染現象の動態を明らかにすることは、HIV-1 感染症におけるウイルス感染メカニズムの解明に非常に重要である。ここで先行研究において、HIV 感染症で重要な感染様式である cell-to-cell 感染における多重感染動態の解明が進んでいる (Law et al., 2016)。しかしながら cell-free 感染における特に細

胞の感受性の不均一性を考慮されていない。そこで本研究では、cell-free 感染の *in vitro* 系での多重感染現象の動態を明らかにすることを目的に、細胞の感受性の連続的な変化と多重感染数を考慮した数理モデルを構築した。そして、98.3%の多重感染細胞は高感受性細胞集団から生じることを明らかにした。

2. HIV-1 多重感染実験とパラメーター推定

2.1. HIV-1 多重感染実験

本解析に使用する HIV-1 のプラスミドは pNL4-3 である (Remion et al., 2016)。また感染状況の確認を行うために、2種類の蛍光タンパク質 (HSA, GFP) とフローサイトメトリーを用いて、HIV-1 多重感染実験を行った (図 1)。ここでフローサイトメトリーの結果は FACSCalibur instrument (Becton Dickinson, Le Pont-de Claix, France) により取得し、ソフトウェア FlowJo (Treestar, Ashland, OR, USA) により解析を行った。なお本研究で用いた多重感染実験の委細は次の論文を参照されたい (Ito et al., 2017; Remion et al., 2016)。

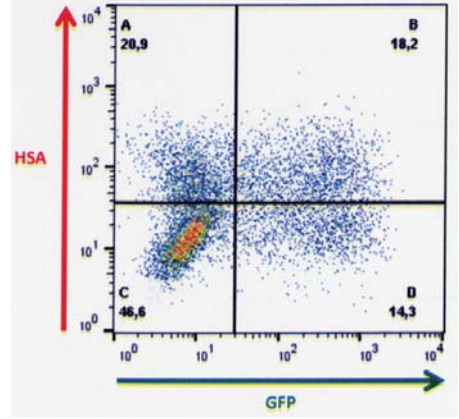


図 1: HIV-1 多重感染実験のフローサイトメトリー解析

2.2. パラメーター推定

上記フローサイトメトリーを用いた実験科学では、感染数やその挙動を推定するのが容易ではない (Dang et al., 2004; Remion et al., 2016)。本研究では、HIV-1 多重感染における感染動態を解明するために、ベイズ推定を用いたパラメーター推定を実装した。具体的には、目的関数を次のように設定した：

$$\begin{aligned}
 SSR(\theta) = & \sum_{r=1}^{10} \left\{ \left(F_{A,r} - \tilde{F}_{A,r}(\theta) \right)^2 + \left(F_{C,r} - \tilde{F}_{C,r}(\theta) \right)^2 \right\} \\
 & + \sum_{g=1}^{10} \left\{ \left(F_{C,g} - \tilde{F}_{C,g}(\theta) \right)^2 + \left(F_{D,g} - \tilde{F}_{D,g}(\theta) \right)^2 \right\} \\
 & + \sum_{co=1}^{18} \left\{ \left(F_{A,co} - \tilde{F}_{A,co}(\theta) \right)^2 + \left(F_{B,co} - \tilde{F}_{B,co}(\theta) \right)^2 + \left(F_{C,co} - \tilde{F}_{C,co}(\theta) \right)^2 \right. \\
 & \left. + \left(F_{D,co} - \tilde{F}_{D,co}(\theta) \right)^2 \right\}.
 \end{aligned}$$

$F_{*,\#}$ と $\tilde{F}_{*,\#}$ は、それぞれ実験値と理論予測値を示している。また*はフローサイトメトリーの各

区画に対応し(A,B,C,D)、#は異なるウイルス接種量の時のHSA HIV-1感染実験、GFP HIV-1感染実験、多重感染実験をそれぞれ表す。また実験によって生じるデータの不確実性を考慮するために、ベイズ推定を実装した (Soetaert and Petzoldt, 2010)。サンプリング試行回数を30万回で最後の10万回を採択し、traceplotと頻度分布により収束を確認した。

3. 結果

3.1. 細胞の感受性の不均一性とウイルス感染数を考慮した数理モデルの構築

提唱されている細胞の感受性の不均一性と実験科学だけでは容易ではない多重感染実験でのウイルス感染数を考慮するために、以下の数理モデルを構築した：

$$\begin{aligned}
 \frac{dT_i}{dt} &= -\beta_{S_i}V_R T_i - \beta_{S_i}V_G T_i \\
 \frac{dI_i^{R_1}}{dt} &= \beta_{S_i}V_R T_i - \beta_{S_i}V_R I_i^{R_1} - \beta_{S_i}V_G I_i^{R_1}, \\
 \frac{dI_i^{R_2}}{dt} &= \beta_{S_i}V_R I_i^{R_1} - \beta_{S_i}V_G I_i^{R_2}, \\
 \frac{dI_i^{G_1}}{dt} &= \beta_{S_i}V_G T_i - \beta_{S_i}V_R I_i^{G_1} - \beta_{S_i}V_G I_i^{G_1}, \\
 \frac{dI_i^{G_2}}{dt} &= \beta_{S_i}V_G I_i^{G_1} - \beta_{S_i}V_R I_i^{G_2}, \\
 \frac{dI_i^{R_1 G_1}}{dt} &= \beta_{S_i}V_R I_i^{G_1} + \beta_{S_i}V_G I_i^{R_1} - \beta_{S_i}V_R I_i^{R_1 G_1} - \beta_{S_i}V_G I_i^{R_1 G_1}, \\
 \frac{dI_i^{R_2 G_1}}{dt} &= \beta_{S_i}V_G I_i^{R_2} + \beta_{S_i}V_R I_i^{R_1 G_1} - \beta_{S_i}V_G I_i^{R_2 G_1}, \\
 \frac{dI_i^{R_1 G_2}}{dt} &= \beta_{S_i}V_R I_i^{G_2} + \beta_{S_i}V_G I_i^{R_1 G_1} - \beta_{S_i}V_R I_i^{R_1 G_2}, \\
 \frac{dI_i^{R_2 G_2}}{dt} &= \beta_{S_i}V_R I_i^{R_1 G_2} + \beta_{S_i}V_G I_i^{R_2 G_1}, \\
 \frac{dV_R}{dt} &= -cV_R, \\
 \frac{dV_G}{dt} &= -cV_G.
 \end{aligned} \tag{1}$$

ここで、 T_i は未感染細胞集団、 $I_i^{R_j}$ と $I_i^{G_k}$ は HSA HIV-1 か GFP HIV-1 に感染した細胞集団、 $I_i^{R_j G_k}$

は多重感染細胞集団、 V_R と V_G はHSAとGFP HIV-1の総ウイルス量を表している。特に、添字 i は細胞の感受性の不均一性を、添字 j と k はHSA HIV-1もしくはGFP HIV-1による感染数をそれぞれ表している。例えば $i = 2$ は、異なる感受性をもつ二つの標的細胞集団、つまり“高感受性細胞集団”と“低感受性細胞集団”が存在している状況を示している。ここで各細胞集団の感受性は、 i が増加するごとに低下すると仮定している ($s_i > s_{i-1} (i \geq 2), s_1 = 1$)。これにより、細胞の感受性の異質性を考慮する。またHSA HIV-1 100 μ l と GFP HIV-1 100 μ lを用いた多重感染実験では、99.9%以上のウイルス感染は1個もしくは2個のウイルス感染により成立している (Ito et al., 2017)。そのため、式(1)で3個以上のウイルス感染する細胞(つまり添字 $j, k > 3$)は無視できると仮定した。なお本実験ではウイルス感染は一回のみ生じるため、ウイルス産生率ではなくウイルス除去率 c のみ考慮し、本感染実験時間が2時間であるため感染細胞は死滅しないと仮定した (Ito et al., 2017; Remion et al., 2016)。

3.2. AICを用いた細胞の異質性の決定

各 i について赤池情報要約量 (AIC)を計算し比較することで、細胞の異質性を決定した(式(2); 図2) :

$$AIC = N_{pts} \ln \left(\frac{SSR(\theta)}{N_{pts}} \right) + 2N_{par}. \quad (2)$$

N_{pts} と N_{par} は、総感染感染実験数とパラメーター数を、 $SSR(\theta)$ は実験値と理論予測値の残差二乗和をそれぞれ表している。興味深いことに、細胞の感受性が同質性の時 ($i = 1$; 細胞集団数が一つ)、本感染実験を十分再現できない (AICが高い)ことである (図2)。これは先行研究で細胞の感受性の異質性が提唱されている結果とよく合致している (Chen et al., 2005; Dang et al., 2004; Remion et al., 2016)。加えて、二つの細胞集団が存在する時 ($i = 2$) が尤も多重感染感染実験を説明することができるが、複数の細胞集団が存在する状況でも本実験を説明し得る。つまり多重感染現象を説明するためには、細胞の感受性の異質性を考慮する重要性を強く示唆している。また図3は、二つの細胞集団が存在する時 ($i = 2$)の実験値と理論予測値の比較を表している。赤、緑、青の棒グラフはフローサイトメトリーの各区画における実験値、白い棒グラフとエラーバーは数理モデルによる予測値と95%信用区間を示している。これは上記の単一感染実験 (図3a, b)と多重感染実験(図3c)において、数理モデルによる予測が実験を上手く説明できることを示している。

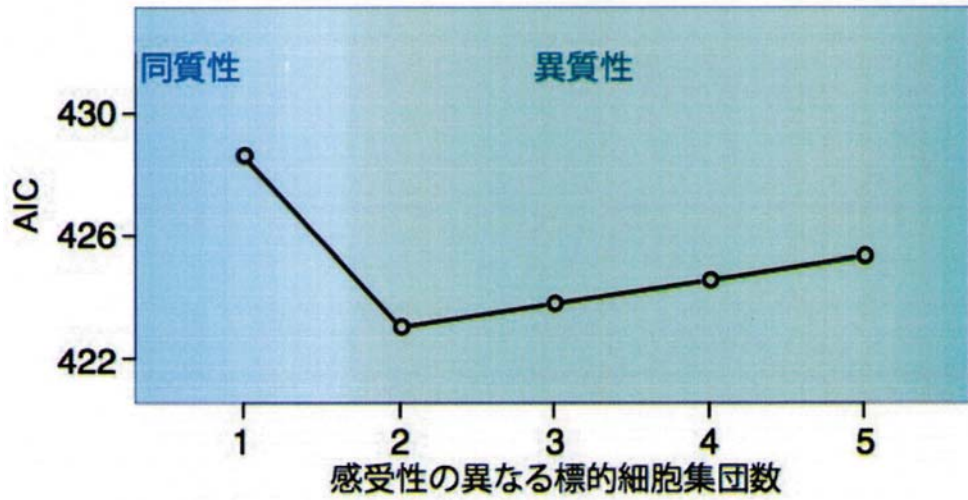


図2: AICを用いた、細胞の異質性の決定。“高感受性細胞集団”と“低感受性細胞集団”が存在する時、HIV-1多重感染実験を説明することができる

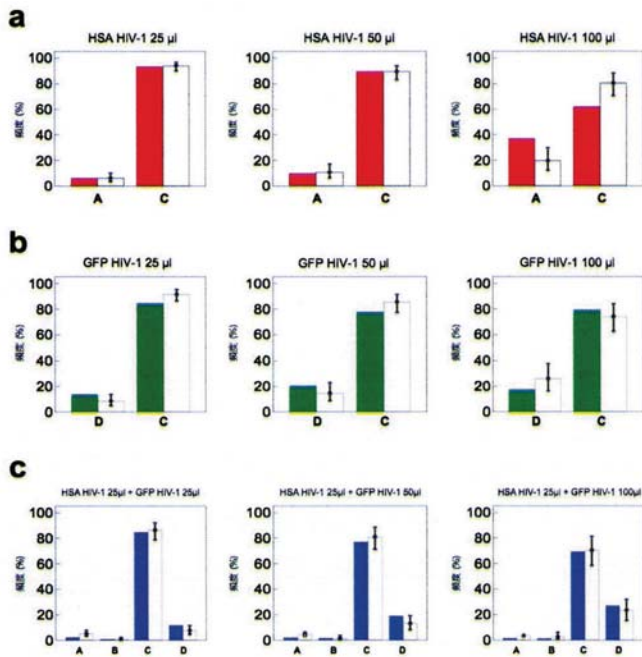


図3: 実験値と理論予測値との比較 (a)HSA HIV-1 感染実験 (b) GFP HIV-1 感染実験 (c)HSA HIV-1 と GFP HIV-1 を用いた多重感染実験

3.3. cell-free 感染における HIV-1 多重感染の動態

フローサイトメトリー解析では、感染細胞におけるウイルス感染数を検出することや HIV-1 多重感染の挙動に関する情報は得ることができない。そこで本研究では数理モデルとベイズ推定により得たパラメーターを用いて、cell-free 感染での *in vitro* における HIV-1 多重感染動態を明らかにした。例えば、図4にあるように、HSA 100 μ l GFP 100 μ l における HSA HIV-1 感染細胞 (図4a)、多重感染細胞 (図4b)、標的細胞集団 (図4c)、GFP HIV-1 感染細胞 (図4d) を予測した。興味深いことは感染実験2時間後、高感受性細胞集団は、低感受性細胞集団よりも6.11倍多く感染することを明らかにした。つまり、HIV-1 感染においてある特定の細胞集団が選択的に HIV-1 に感染していることを示唆している。さらに感染数の推移を計算し、感染2時間で多重感染現象が10%以上に達していることがわかった (図4e)。これは多重感染が迅速に細胞集団中に蓄積し、遺伝的組替を誘発している可能性を示唆している。

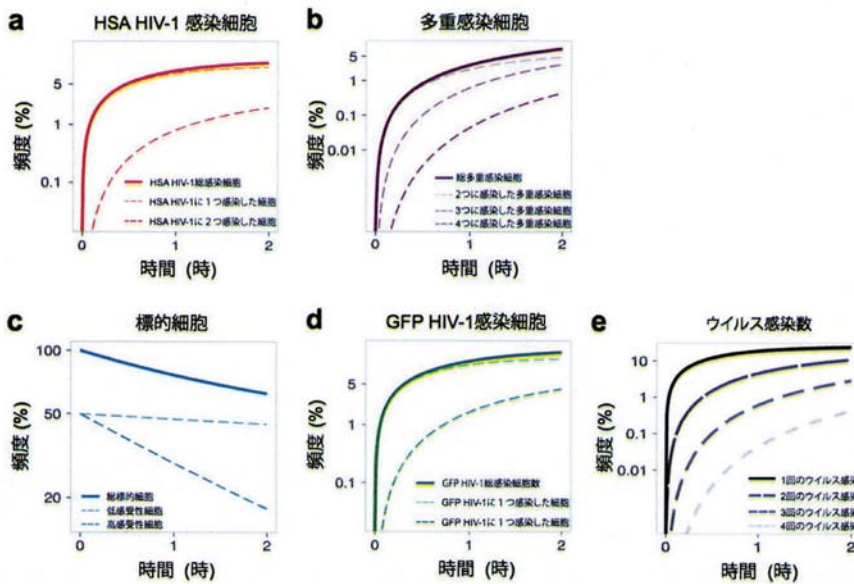


図4: HIV-1 多重感染動態 (a)HSA HIV-1 感染細胞 (b)多重感染細胞 (c)標的細胞集団 (d) GFP HIV-1 感染細胞

3.4. 各標的細胞集団から多重感染の寄与率の推定

多重感染現象がウイルス進化を加速させることを考慮すると、多重感染現象のメインファクターの特定やその定量化は非常に重要な知見になりうる。そのため数理モデル (式 (1)) を用いて、各細胞集団から多重感染数への寄与率を推定した。なお感染実験 2 時間後における各細胞集団(T_i)による寄与率を以下のように定義した：

$$\frac{I_i^{R_2}(2) + I_i^{G_2}(2) + \sum_{j=1}^2 \sum_{k=1}^2 I_i^{R_j G_k}(2)}{\sum_{i=1}^2 I_i^{R_2}(2) + \sum_{i=1}^2 I_i^{G_2}(2) + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=1}^2 \sum_{k=1}^2 I_i^{R_j G_k}(2)}$$

興味深いことは、cell-free 感染における多重感染細胞の平均 98.3%が、高感受性細胞集団(最も感受性の高い細胞集団： T_1)から生じていることがわかった。つまり HIV-1 の多重感染現象には標的細胞全体から生じるのではなく、ある特定の細胞集団が大いに貢献しているのである。上記のことは、ウイルス感染に高い感受性を示す細胞集団が HIV-1 の遺伝的組替を駆動し、薬剤耐性株や免疫回避株の産生に寄与している可能性を示唆している。

4. まとめ

HIV-1 感染症において遺伝的組替は、ウイルス進化を駆動し患者体内での免疫回避を誘発する (Gottlieb et al., 2004; Nora et al., 2007; Price et al., 1997)。そのため従来、遺伝的組替の *in vitro* と *in vivo* に関する研究は幅広く展開されてきた (Cromer et al., 2016; Law et al., 2016; Levy et al., 2004; Schlub et al., 2010)。一方で、遺伝的組替を誘発する機構に多重感染現象があり、近年数理モデルを用いた理論研究も行われている (Dixit and Perelson, 2005; Keele et al., 2008)。しかしながら、Dang, Q. et al, 2004 で提唱されているように、多重感染現象に重要な要因である細胞の感受性の連続的な変化を考慮しきれていなかった。

そこで細胞の感受性の連続的な変化を考慮した多重感染動態の解明を行うために、本研究ではウイルス感染数と同時に細胞の感受性に関する異質性を考慮した数理モデルを考案した (式(1))。HIV-1 多重感染の実験データと数理モデルを用いて細胞の感受性に関する異質性を明らかにした (図 2)。特に標的細胞集団が高感受性細胞集団と低感受性細胞集団が存在するとき ($i=2$)、実験データを説明できる (図 2, 図 3)。ここで先行研究において 5 つの細胞の感受性が異なる細胞集団が考慮されているが (Dang et al., 2004)、実験データに基づく推測ではなく *in silico* による結果である。つまり本研究での異質性に関する予測の方が、多重感染現象をより再現できると期待できる。

さらに実験データと数理モデルによるベイズ推定を推定なうことで、cell-free 感染 *in vitro* での多重感染動態を明らかにした (図 4)。特に、感染直後に多重感染が迅速に蓄積していることより、HIV-1 多重感染が迅速に蓄積し遺伝的組替を促進していることが示唆され

る。さらに興味深い成果は、多重感染の98%以上が高感受性細胞集団から生じることである。これは HIV-1 感染症においてある特定の細胞集団が、多重感染現象の主な感染源であることを意味している。このため本研究成果より示唆できることは、高感受性細胞集団が選択的に感染シアポトーシスにより死滅するため、多重感染率やそれに起因する遺伝的組替率は上限値が存在する可能性がある。これは実証研究と合わせて今後の研究課題としたい。

HIV-1 多重感染現象は、遺伝的組替を通じてウイルス進化や薬剤耐性を誘引する重要な感染機構である。先行研究により (Iwami et al., 2015)、cell-to-cell 感染が約 60%の感染拡大に貢献しているが、人・人間の感染拡大には cell-free 感染が非常に有効な感染様式であることが知られている (Iyer et al., 2017; Parrish et al., 2013; Sattentau, 2008)。さらに患者体内の HIV 感染株の約 80%は、感染初期に生じる HIV に起因することが報告されている (Keele et al., 2008)。以上より、cell-free 感染時の複数のウイルスによる感染動態を解明するためには、本研究での培養細胞実験と数理モデルを用いた HIV-1 多重感染における動態予測は非常に有効である。

6. 謝辞

Dr. Azaria Remion, Dr. Alexandra Tautzin, Prof. Fabrizio Mammano,らより、本感染実験データの提供を受けた。また江島啓介博士研究員に統計的手法についてご教授頂いた。この場を借りて、上記の方々に御礼申し上げます。

7. 参考文献

- Azaria Remion, M. D., Sentob Saragosti, Fabrizio Mammano, 2013. Co-infection, super-infection and viral interference in HIV. *Retrovirology* 10, 72, doi:10.1186/1742-4690-10-S1-P72.
- Chen, J. B., Dang, Q., Unutmaz, D., Pathak, V. K., Maldarelli, F., Powell, D., Hu, W. S., 2005. Mechanisms of nonrandom human immunodeficiency virus type 1 infection and double infection: Preference in virus entry is important but is not the sole factor. *Journal of Virology* 79, 4140-4149, doi:10.1128/Jvi.79.7.4140-4149.2005.
- Cromer, D., Grimm, A. J., Schlub, T. E., Mak, J., Davenport, M. P., 2016. Estimating the in-vivo HIV template switching and recombination rate. *Aids* 30, 185-92, doi:10.1097/qad.0000000000000936.
- Dang, Q., Chen, J. B., Unutmaz, D., Coffin, J. M., Pathak, V. K., Powell, D., KewalRamani, V. N., Maldarelli, F., Hu, W. S., 2004. Nonrandom HIV-1 infection and double infection via direct and cell-mediated pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 632-637, doi:10.1073/pnas.0307636100.
- Dixit, N. M., Perelson, A. S., 2005. HIV dynamics with multiple infections of target cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 8198-8203, doi:10.1073/pnas.0407498102.

- Gottlieb, G. S., Nickle, D. C., Jensen, M. A., Wong, K. G., Grobler, J., Li, F. S., Liu, S. L., Rademeyer, C., Learn, G. H., Karim, S. S. A., Williamson, C., Corey, L., Margolick, J. B., Mullins, J. I., 2004. Dual HIV-1 infection associated with rapid disease progression. *Lancet* 363, 619-622, doi:Doi 10.1016/S0140-6736(04)15596-7.
- Ito, Y., Remion, A., Tauzin, A., Ejima, K., Nakaoka, S., Iwasa, Y., Iwami, S., Mammano, F., 2017. Number of infection events per cell during HIV-1 cell-free infection. *Scientific Reports* 7, doi:ARTN 655910.1038/s41598-017-03954-9.
- Iwami, S., Takeuchi, J. S., Nakaoka, S., Mammano, F., Clavel, F., Inaba, H., Kobayashi, T., Misawa, N., Aihara, K., Koyanagi, Y., Sato, K., 2015. Cell-to-cell infection by HIV contributes over half of virus infection. *Elife* 4, doi:10.7554/eLife.08150.
- Iyer, S. S., Bibollet-Ruche, F., Sherrill-Mix, S., Learn, G. H., Plenderleith, L., Smith, A. G., Barbian, H. J., Russell, R. M., Gondim, M. V., Bahari, C. Y., Shaw, C. M., Li, Y., Decker, T., Haynes, B. F., Shaw, G. M., Sharp, P. M., Borrow, P., Hahn, B. H., 2017. Resistance to type 1 interferons is a major determinant of HIV-1 transmission fitness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, E590-e599, doi:10.1073/pnas.1620144114.
- Josefsson, L., King, M. S., Makitalo, B., Brannstrom, J., Shao, W., Maldarelli, F., Kearney, M. F., Hu, W. S., Chen, J. B., Gaines, H., Mellors, J. W., Albert, J., Coffin, J. M., Palmer, S. E., 2011. Majority of CD4(+) T cells from peripheral blood of HIV-1-infected individuals contain only one HIV DNA molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 11199-11204, doi:10.1073/pnas.1107729108.
- Keele, B. F., Giorgi, E. E., Salazar-Gonzalez, J. F., Decker, J. M., Pham, K. T., Salazar, M. G., Sun, C., Grayson, T., Wang, S., Li, H., Wei, X., Jiang, C., Kirchherr, J. L., Gao, F., Anderson, J. A., Ping, L. H., Swanstrom, R., Tomaras, G. D., Blattner, W. A., Goepfert, P. A., Kilby, J. M., Saag, M. S., Delwart, E. L., Busch, M. P., Cohen, M. S., Montefiori, D. C., Haynes, B. F., Gaschen, B., Athreya, G. S., Lee, H. Y., Wood, N., Seoighe, C., Perelson, A. S., Bhattacharya, T., Korber, B. T., Hahn, B. H., Shaw, G. M., 2008. Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 7552-7, doi:10.1073/pnas.0802203105.
- Law, K. M., Komarova, N. L., Yewdall, A. W., Lee, R. K., Herrera, O. L., Wodarz, D., Chen, B. K., 2016. In Vivo HIV-1 Cell-to-Cell Transmission Promotes Multicopy Micro-compartmentalized Infection. *Cell Reports* 15, 2771-2783, doi:10.1016/j.celrep.2016.05.059.
- Levy, D. N., Aldrovandi, G. M., Kutsch, O., Shaw, G. M., 2004. Dynamics of HIV-1 recombination in its natural target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 4204-9, doi:10.1073/pnas.0306764101.
- Nora, T., Charpentier, C., Tenaillon, O., Hoede, C., Clavel, F., Hance, A. J., 2007. Contribution of recombination to the evolution of human immunodeficiency viruses expressing resistance to antiretroviral treatment. *Journal of Virology* 81, 7620-7628, doi:10.1128/Jvi.00083-07.
- Parrish, N. F., Gao, F., Li, H., Giorgi, E. E., Barbian, H. J., Parrish, E. H., Zajic, L., Iyer, S. S., Decker, J. M., Kumar, A., Hora, B., Berg, A., Cai, F., Hopper, J., Denny, T. N., Ding, H., Ochsenbauer, C., Kappes, J. C., Galimidi, R. P.,

- West, A. P., Jr., Bjorkman, P. J., Wilen, C. B., Doms, R. W., O'Brien, M., Bhardwaj, N., Borrow, P., Haynes, B. F., Muldoon, M., Theiler, J. P., Korber, B., Shaw, G. M., Hahn, B. H., 2013. Phenotypic properties of transmitted founder HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 6626-33, doi:10.1073/pnas.1304288110.
- Price, D. A., Goulder, P. J., Klenerman, P., Sewell, A. K., Easterbrook, P. J., Troop, M., Bangham, C. R., Phillips, R. E., 1997. Positive selection of HIV-1 cytotoxic T lymphocyte escape variants during primary infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 1890-5.
- Remion, A., Delord, M., Hance, A. J., Saragosti, S., Mammano, F., 2016. Kinetics of the establishment of HIV-1 viral interference and comprehensive analysis of the contribution of viral genes. *Virology* 487, 59-67, doi:10.1016/j.virol.2015.09.028.
- Sattentau, Q., 2008. Avoiding the void: cell-to-cell spread of human viruses. *Nat Rev Microbiol* 6, 815-26, doi:10.1038/nrmicro1972.
- Schlub, T. E., Smyth, R. P., Grimm, A. J., Mak, J., Davenport, M. P., 2010. Accurately measuring recombination between closely related HIV-1 genomes. *PLoS Comput Biol* 6, e1000766, doi:10.1371/journal.pcbi.1000766.
- Smith, D. M., Richman, D. D., Little, S. J., 2005. HIV superinfection. *J Infect Dis* 192, 438-44, doi:10.1086/431682.
- Soetaert, K., Petzoldt, T., 2010. Inverse Modelling, Sensitivity and Monte Carlo Analysis in R Using Package FME. *Journal of Statistical Software* 33.