

平成 11 年度 厚生科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

HIV 病原性の分子基盤の解明に関する研究

研究報告書

班 長 山 田 章 雄

国立感染症研究所
筑波医学実験用霊長類センター

目次

I. 総括研究報告書

1. HIV 病原性の分子基盤の解明に関する研究..... 1
国立感染症研究所 筑波霊長類センター 山田章雄

II. 分担報告書

2. HIV ビリオン細胞侵入過程の無細胞解析系..... 5
国立感染症研究所 感染病理部 小島朝人
3. HIV-1 の適応進化..... 8
国立感染症研究所 エイズ研究センター 佐藤裕徳
4. IL-4 遺伝子内 polymorphism と AIDS 病態との関連に関する研究..... 15
大阪大学 微生物病研究所 塩田達雄
5. HIV-1 型 oligomeric envelope protein gp120-gp41 の高次構造と抗体性の解析..... 23
国立感染症研究所 エイズ研究センター 杉浦瓦
6. HIV Trapping System による HIV 感染性クローンの樹立と解析..... 25
国立感染症研究所 獣医科学部 巽正志
7. 日本の HIV-1 の遺伝子・分子生物学的解析 (集団的解析) 29
国立感染症研究所 エイズ研究センター 仲宗根正
8. 抗 gp41 抗体の中和活性と gp41 由来ペプチドの融合阻止機構..... 34
東北大学大学院 医学系研究科 感染病態学 服部俊夫
9. gp41 細胞質内部分の構造・機能関連についての基礎研究..... 39
国立感染症研究所 エイズ研究センター 松田善衛
10. 病原性を決定するウイルス因子としての env 糖鎖の役割..... 42
国立感染症研究所 筑波霊長類センター 森一泰

III. 研究協力者

11. 臨床株 HIV Gag タンパク上の HIV 特異的細胞障害性 T 細胞 (CTL)
エピトープに関する研究..... 47
国立感染症研究所 エイズ研究センター 有吉紅也

I. 総括研究報告書

HIV 病原性の分子基盤の解明に関する研究

主任研究者 山田章雄 国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センターセンター長

研究要旨 HIV 病原性を決定する因子を解明するために、ウイルス構造蛋白の機能並びに構造解析を行い、gp41由来の複数の合成ペプチドが X4ウイルスの標的細胞への感染を R5ウイルスよりも高率に阻害することが明らかとなった。同様に gp41の細胞内ドメインがウイルス増殖に対し、トランスドミナントネガティブであることが認められた。また、ウイルスの感染者個体内あるいは感染者集団内での変異を解析し、何れの場合にもウイルスがダイナミックに変化していることが示された。一方、今後の解析に必須と思われる技術基盤として、感染性ウイルスクローンを効率よく得る方法の開発、可溶性オリゴマー gp140に対するモノクローナル抗体の作成、並びに無細胞系におけるウイルス侵入過程の解析システムを構築した。更にヒトにおけるサイトカイン遺伝子の多型性と病態との関連の解析を行い、IL4遺伝子のプロモーター領域における多型性が、ウイルスの感染個体内でのウイルスポピュレーションの変化に深く関わっている可能性を示した。ウイルス感染の制御における免疫反応の重要性に関してはサルにおける SIV 感染実験を行い、gp120から糖鎖を除去したウイルスが弱毒化していることが明らかとなった。また、感染者体内における CTL エピトープの解析を行い、CTL 活性とアミノ酸配列にある程度の相関は認められるものの、CTL エピトープには変化がないにも関わらず、CTL 活性の検出できない場合があることが明らかになった。

分担研究者

小島朝人 国立感染症研究所感染病理部室長
佐藤裕徳 国立感染症研究所エイズセンター
主任研究官
塩田達雄 大阪大学微生物研究所教授
巽 正志 国立感染症研究所獣医科学部
主任研究官
仲宗根 正 国立感染症研究所エイズセンター
主任研究官
松田善衛 国立感染症研究所エイズセンター
主任研究官
服部俊夫 東北大学医学部教授
森 一泰 国立感染症研究所エイズセンター
主任研究官

協力研究者

有吉紅也 国立感染症研究所エイズセンター
主任研究官

A. 研究目的

HIV はウイルス感染者体内で著しい多様性を示し、感染初期には比較的病原性の低い NSI タイプのウイルスがドミナントであるが、永い潜伏期の後、病原性の高い SI タイプへ変化することが発症と深く関わっていると考えられている。またエイズの爆発的流行地では母子感染の防止がエイズ対策において極めて重要であるが、特定のウイルス集団が母子感染に関わっていることが示唆されている。グローバルに見た場合には様々なサブタイプのウイルスが流行しており、各ウイルスの病原性も含め世界に流行するウイルスはダイナミックな変化をしているものと考えられる。本研究では HIV の個体レベル並びに集団レベルでのダイナミズムを特に病原性の側面から明らかにすることを目的とする。一方、エイズ制圧の有効な手段としてのワクチン開発は未だに成功していない。本

研究では有効かつ安全なワクチン開発への道を拓くことを可能にすることを念頭に置きつつ、HIV 並びに SIV の病原性の分子的な基盤を明らかにする。

B. 研究方法

今年度は昨年度に構築した技術基盤を踏まえ、昨年度までの研究を更に発展させた。即ち、subtype C ウイルスから樹立した感染性クローンの全塩基配列を決定し、B のクローンと比較解析した。また同様の手法を用いて他の subtype の感染性クローンを樹立した。HIV の分子疫学に関しては日本人の親子間感染者から gp120の V3領域及び逆転写酵素の塩基配列から感染者個体内でのウイルスの変異を解析した。また、感染者集団では矢張り日本人感染者から得られたウイルスの V3領域の遺伝子解析から国内に存在するウイルスについて解析した。母子間並びに同一個体内でのウイルスのダイナミズムを知るために、複数の母子及び同一患者の各感染ステージにおいて分離されたウイルスの gp120の塩基配列を解析した。一方、gp41の機能解析は融合コア部分を構成する合成ペプチド並びにタンパクの細胞質内部分を発現させることにより行った。HIV-1感染症の病態進行に関わる宿主側の因子の解析については遺伝的多型に着目して解析を進めた。特に今年度は IL-4プロモーターの遺伝的多型を検索し、HIV 感染の病態との関連を検討した。マカカ属サルを用いた感染系では、env の糖鎖並びに nef の病原性への関与を欠失変異株を用いて解析した。

(倫理面への配慮)

本研究では様々な臨床分離ウイルスが使用されているが、それらのウイルスが分離された患者情報については厳密に管理されており、個人情報漏れることのないように細心の注意を払っている。サルを用いた実験は国立感染症研究所動物実験委員会による倫理審査を受け承認されている。

C. 研究結果

昨年度までに本研究を推進する上で不可欠な技術的基盤の確立を目指し、世界に先駆けサブタイプ C の感染性クローンの作成に成功し、この技術を更に A, E のサブタイプにも応用し、両者の感染性クローンを樹立した。特に A は G との組換え体であることが判明した。サブタイプ C の感染性クローンについて全塩基配列を決定したところ、本ウイルスがインドで分離されたサブタイプ C とクラスターを形成することが確認できた。B タイプのウイルスと比較すると rev 遺伝子に新たな欠損が認められるなど生物学的な新知見が得られた(巽)。また感染の成立に重要な働きをすると考えられる gp41 の構造と機能を解析するために、大腸菌における大量発現並びに精製までの方法論を確立した。具体的にはマルトース結合蛋白との融合蛋白として大腸菌で発現させ、アミロースレジンカラムを用いて精製した(松田)。一方 Subtype E 型ウイルス CM235 由来可溶性 oligomeric gp140 を抗原としてモノクローナル抗体の作成を試み、9 種類のクローンを回収した。現在その性状を解析中である(杉浦)。更に HIV 侵入機構における新たな因子を探索するため、無細胞系での HIV 侵入解析系の確立を試み、CD4/CXCR4 陽性細胞から調整した膜画分にビリオン添加後、吸着/融合/脱核に由来すると思われるコア蛋白 p24 の遊離を指標とする検出系を確立した(小島)。

こういった技術基盤の確立とともに gp41 の融合殻構造の解析を行い、特に gp41 由来の複数の合成ペプチドが X4 ウイルスの標的細胞への感染を R5 ウイルスよりも高率に阻害することを明らかにした(服部)。また gp41 細胞質内部分を発現した細胞では、この部位がウイルス複製に対し、トランスドミナントネガティブに作用することが明らかになった(松田)。これはこの部位に存在する amphipathic helices に依存しており、エンベロープ蛋白のウイルス粒子への取り込みを阻害するためと考えられた。

日本における HIV の動的傾向を知るために、垂直感染集団に重点を絞って解析した結果、母親由来並びに児由来 HIV-1 集団には、様々なサブタイプが混在するが、母親個体内の HIV-1 は quasispecies が強いものに対して、児体内の HIV-1 は、ほぼ単一クローン傾向であることが明らかになった(仲宗根)。一方、HIV の感染者体内でのダイナミズムに関しては、V3 領域の解析から CCR5 をコレセプターとするウイルスは感染者体内での選択圧に比較的低感受性であり、感染初期から後期にかけて持続的に存在するのに対し、CXCR4 をコレセプターとするウイルスは選択圧に感受性で、感染後期に優位となることが明らかになった(佐藤)。また、多剤併用療法を受けていた患者体内のウイルス逆転写酵素の解析から、新たな 33 塩基の挿入変異を見いだした(佐藤)。

HIV 病態に関わる宿主因子に関しては、昨年度にケモカイン RANTES のプロモーター領域の多型性が HIV 感染の病態を修飾することを明らかにしたが、今年度は IL-4 の多型性について同様に解析した結果、IL-4 のプロモーター領域の遺伝的多型 (C-589T) が HIV-1 の感染個体内進化に影響す

ることが明らかになった(塩田)。

一方、env 並びに nef 領域の病原性との関わりを in vivo で明らかにするためにアカゲザルでの感染実験を行った結果、env の糖鎖を欠失させると病原性が著しく低下することが明らかになった。この病原性の低下にウイルス中和抗体への感受性の上昇が疑われたが、中和抗体の関与は否定された(森)。また、感染者体内における gag 蛋白由来 CTL エピトープの解析を行い、CTL 活性とエピトープを構成するペプチドの一次構造とにある程度の相関は認められるものの、CTL エピトープには変化がないにも関わらず、CTL 活性の検出できない場合があることが明らかになった(有吉)。

D. 考察

複数のサブタイプの感染性クローンを確実にしかも迅速に樹立する方法論が確立したことは、発展途上国を中心に流行しているウイルスサブタイプの感染予防・治療に極めて有意義であると考えられる。一方で、昨年度の RANTES 並びに本年度の IL4 に関する成績は免疫系に関わる様々な宿主タンパクの発現における多様性が、HIV 感染の病態に大きな影響を及ぼすことを示しており、感染者の risk 評価、予後の評価をはじめとする診療方針の決定に大きく貢献するものと思われる。ウイルスタンパク遺伝子の機能とその病原性における役割の解析については、更なる研究が必要であると思われる。

E. 結論

昨年度に引き続き HIV 病原性を分子レベルで理解することを目的として研究を行い、複数のサブタイプに対する感染性クローンの樹立、IL4 遺伝子の多様性がエイズ病態に関わることを中心に、新しい知見を得ることができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

・ Mochizuki, N., Otsuka, N., Matsuo, K., shiino, T., Kojima, A., Kurata, T., Sakai, K., Yamamoto, N., Isomura, S., Dhole, T. N., Takebe, Y., Matsuda, M. and Tatsumi, M. An infectious DNA clone of HIV type 1 subtype C. AID Res. Human Retroviruses 15: 1321-1324, 1999.

・ Shinohara K, Sakai K, Ando S, Ami Y, Yoshino N, Takahashi E, Someya K, Suzaki Y, Nakasone T, Sasaki Y, Kaizu M, Lu Y, and Honda M. A highly pathogenic simian/human immunodeficiency virus with genetic changes in cynomolgus monkey. J. Gen. Virol. 80:1231-1240, 1999.

・ Nakasone T, Shinohara K, Ami Y, Yoshino N, Kaizu M, Takahashi E, Touzjian N, Lu Y, Nagai Y and Honda M. SHIV carrying C1-V3 of HIV-1 subtype E infected to a cynomolgus monkey. J. Med. Primatol., 2000 (in press)

・ Nakasone T, Takamatsu J, Yamada K, Nagai Y and Honda M. Declining of HIV-1 Isolation Rate in Japan. Lancet 2000 (submitted for

publication)

• Tokunaga, K., Ikuta, K., Adachi, A., Matsuda, M., Kurata, T. and Kojima, A.: The cellular kinase binding motifs (PxxP and RR) in human immunodeficiency virus type 1 Nef protein are dispensable for producer cell-dependent enhancement of viral entry. *Virology*, 257, 285-289, 1999.

• Sato H, Kato K, Takebe Y: Functional complementation of the envelope hypervariable V3 loop of human immunodeficiency virus type 1 subtype B by the subtype E V3 loop. *Virology* 257: 491-501, 1999

• Kato K, Sato H, Takebe Y: Role of naturally-occurring basic amino acid substitutions on viral co-receptor usage and cellular tropism in human immunodeficiency virus type 1 subtype E envelope V3 loop. *J. Virol.* 73: 5520-5526, 1999.

• Sato H, Shiino T, Kodaka N, Taniguchi K, Tomita Y, Miyakuni T, and Takebe Y: Evolution and biological characterization of human immunodeficiency virus type 1 subtype E gp120 V3 sequences following horizontal and vertical virus transmission in a single family. *J. Virol.* 73: 3551-3559, 1999

• Shiino T, Kato K, Kodaka N, Miyakuni T, Takebe Y, Sato H: A group of V3 sequences of human immunodeficiency virus type I subtype E nonsyncytium-inducing, CCR5-using variants are resistant to positive selection pressure. *J. Virol.* in press.

• Shiori Koseki, Tsuyoshi Tanabe, Kenzaburo Tani, Shigetaka Asano, Tatsuo Shioda, Yoshiyuki Nagai, Takashi Shimada, Jun Ohkawa, and Kazunari Taira. Factors governing the activity in vitro of ribozymes transcribed by RNA polymerase III. *J. Virol.* 73. 1868-1877, 1999.

• Gatanaga, H., Oka, S., Ida, S., Wakabayashi, T., Shioda, T., and Iwamoto, A. Active HIV-1 redistribution and replication in the brain with HIV encephalitis. *Arch. Virol.* 144, 29-43, 1999.

• Tomiyama, H., Chujo, Y., Shioda, T., Miwa, K., Oka, S., Kaneko, Y., and Takiguchi, M. Cytotoxic T-lymphocyte recognition of HLA-B*5101-restricted HIV-1 Rev epitope which is naturally processed in HIV-1 infected cells. *AIDS*. 13, 861-863, 1999.

• Huanliang Liu, David Chao, Emi E. Nakayama, Hitomi Taguchi, Mieko Gotoh, Xiaomi Xin, Jun-ki Takamatsu, Hidehiko Saito, Yoshihide Ishikawa, Tatsuya Akaza, Takeo Juji, Yutaka Takebe, Takeshi Ohishi, Katsuyuki Fukutake, Yoshikazu Maruyama, Shinji Yashiki, Shunro Sonoda, Tetsuya Nakamura, Yoshiyuki Nagai, Aikichi Iwamoto and Tatsuo Shioda. Polymorphism in RANTES chemokine promoter affects HIV-1 disease progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Track II. 96,

4581-4585, 1999.

• Kawana, A., Tomiyama, H., Takiguchi M., Shioda, T., Nakamura, T., and Iwamoto, A. Accumulation of specific amino acid substitutions in HLA B35-restricted human immunodeficiency virus type-1 cytotoxic T lymphocyte epitopes. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 15, 1099-1107, 1999.

• Hidenobu Toriyoshi, Tatsuo Shioda, Hironori Sato, Masahiro Sakaguchi, Yasuyuki Eda, Sachiko Tokiyoshi, Kayoko Kato, Kyoko Nohtomi, Shigeru Kusagawa, Kiyomi Taniguchi, Teiichiro Shiio, Atsushi Kato, Suporn Foongladda, Sirirat Linkanonsakul, Shin-ichi Oka, Aikichi Iwamoto, Chantapong Wasi, Yoshiyuki Nagai, and Yutaka Takebe. Sendai virus based production of HIV-1 subtype B and subtype E gp120 antigens and their use for highly sensitive detection of subtype-specific serum antibodies. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 15, 1109-1120, 1999.

• Xiaomi Xin, Tatsuo Shioda, Atsushi Kato, Huanliang Liu, Yuko Sakai, and Yoshiyuki Nagai. Enhanced anti-HIV-1 activity of CC-chemokine LD78b, a non allelic variant of MIP-1a/LD78a. *FEBS Letters.* 457, 219-222, 1999.

• Huanliang Liu, Tatsuo Shioda, Yoshiyuki Nagai, Aikichi Iwamoto, Chantapong Wasi, Jingxiang Ma, Wenhua Liang, Yutaka Takebe, Ioannis Theodorou, Magda Magierowska, Rajagopal Krishnamoorthy, Andr. Chaventr., French ALT and IMMUNOCO Study Groups, and Patrice Debre. Distribution of HIV-1 disease modifying RANTES haplotypes in Asians, Africans and Caucasians. *AIDS*, 13, 2602-2603, 1999.

• Akari H, Nam K.-H, Mori K, Otani I, Shibata H, Adachi A, Terao K and Yoshikawa Y. Effects of SIVmac infection on peripheral blood CD4+CD8+ T lymphocytes in cynomolgus. 1999. *Clinical Immunology* 91: 321-329.

学会発表

• Tatsumi, M; Efficient molecular cloning of infectious HIV-1 subtype C and E by MAGIC-5 cell virus cloning and long PCR. the XIth International Congress of Virology, 11 August 1999, Sydney, Australia.

• Zene Matsuda, Tun-Hou Lee and Max Essex. A Recombinant protein, which contains the cytoplasmic domain of gp41, interferes with the replication of HIV-1. 13th Protein Society Symposium, July 23-28, Boston, USA

• 松田善衛, gp41細胞質内部分を含む28kD タンパク質による HIV-1複製の阻害 第47回日本ウイルス学会, 1999. 11. 7-9, 横浜

• 松田善衛, Inhibition of HIV-1 replication with a recombinant protein containing the cytoplasmic portion of TM 第13回日本エイズ学

会学術集会、1999. 12. 2-4, 東京

・巽 正志; CCR5発現 MAGI 細胞 (MAGIC-5) による HIV ウイルスおよび DNA クローニング

第47回日本ウイルス学会11月9日、横浜

・望月直樹、松田道行、巽 正志; HIV-1サブタイプ C の感染性クローン pIndie-C1 第47回日本ウイルス学会11月9日、横浜

・庄谷祐子、巽 正志、高橋秀宗、倉田 毅; 異種細胞における HIV-1複製制御機構の解析 第47回日本ウイルス学会11月9日、横浜

・向井 徹、河本聡志、黒須 剛、巽 正志、生田和良; HIV-1 タイ E 型塩基配列解析および感染性プラスミドの構築 第47回日本ウイルス学会11月9日、横浜

・飛梅 実、望月直樹、大塚尚美、巽 正志、松田道行; HIV-1感染における Nef 要求性についての解析 第47回日本ウイルス学会11月7日、横浜

・巽 正志; MAGIC-5A 細胞による感染性 HIV 分子クローンの確立 第13回日本エイズ学会12月2日、東京

・蜂谷敦子、相沢佐織、田中真理、高橋由紀子、平林義弘、井田節子、巽 正志、岡 慎一; CCR5発現 HeLa/CD4-LTR-betaGal 細胞 (MAGIC-5 clone 1-10) を用いた抗 HIV 薬剤耐性検査に関する検討 第13回日本エイズ学会12月3日、東京

・須藤弘二、斉藤隆行、近藤真規子、林 孝子、蜂谷敦子、岡 慎一、巽 正志、今井光信; MAGIC-5細胞を用いた HIV 分離株の培養実験の基礎的検討 第13回日本エイズ学会12月3日、東京

G. 知的所有権の取得状況

なし

Ⅱ. 分担研究報告書

HIVビリオン細胞侵入過程の無細胞解析系

分担研究者 小島 朝人 (国立感染症研究所感染病理部)
共同研究者 倉田 毅 (国立感染症研究所感染病理部)
原田 貴之 (国立感染症研究所感染病理部)

研究要旨：昨年度、HIV Nefがウイルスの細胞内侵入を促進して感染性を増強していることを示した。しかし、HIV感染に必須なCD4とco-receptorを持つにも拘らず感染しない細胞が人には存在する。そこで、HIV 侵入の新たな要因を探索するため、無細胞系でのHIV侵入解析系の確立を試みた。感染性DNAクローン由来HIVから非感染性p24画分を除去したビリオンに、CD4/CXCR4陽性細胞から調整した膜画分を添加すると、吸着/融合/脱核に由来すると思われるコア蛋白p24の遊離が観察された。この反応は、ビリオンと膜画分の量比を変動させるとそれぞれ飽和状態に達し、抗-CD4抗体で阻害されることから、ウイルス膜と細胞膜の特異的な反応であることが示唆された。

A. 研究目的

我々はHIVの感染性に関する昨年度までの研究で、①HIV修飾蛋白の一つであるNefが細胞侵入過程を促進すること、を明らかにしてきた。また、②この細胞内侵入効率化はウイルスを産生する細胞に依存して発揮されることから、細胞側の何らかの因子が関与していることも明らかにしてきた。このような宿主側の要因に関して、人の生体内にはHIV感染に必須なCD4とco-receptorを保持するにも拘らずウイルス侵入の成立しない細胞さえ存在することが報告されている。このことは、ウイルス侵入にレセプター以外の因子が関与していることを示唆している。そこで、HIV 侵入における新たな因子・機構を探索するため、今年度は無細胞系でのHIV侵入解析系の確立を試みた。

B. 研究方法

HIVの調整：感染性DNAクローンpNL432を付着性細胞株293Tにトランスフェクションして得たHIVを、T細胞株M8166に感染させて高感染価のウイルス液を調整した。このウイルス液からセントリコンを用いて感染性HIVを濃縮・精製して実験に用いた。ウイルス量の測定：ウイルス感染価はHeLa-CD4-LTR- β -gal (MAGI)細胞を用いたMAGIアッセイで定量した。感染性・非感染性ビリオンを含めた全HIV量は、市販のサンドイッチp24 ELISAキットを用いたELISAアッセイ

で測定した。細胞膜画分の調整：細胞をホモジナイズして破壊後、未破壊細胞と核を低速遠心で除去した。その上清を4,000xgで遠心した沈殿画分を懸濁し、蛋白量を定量後細胞膜画分として実験に用いた。無細胞ヒュージョンアッセイ：セントリコンで濃縮・精製したHIVビリオンと細胞膜画分を混合後、37°Cで8~10時間インキュベートした。この反応混液を100,000xgで超遠心した上清中のp24量を、遊離p24としてELISAキットで測定した。

C. 研究結果

無細胞HIV侵入解析系を確立するためには、アッセイを拮抗的に阻害する可能性の高い非感染性p24画分を除去して、感染性ウイルスに富む画分を調整する必要がある。そこで、種々の分画サイズのセントリコンを用いて感染性ウイルスの濃縮を試みた。その結果、出発材料としたウイルス液p24量の20%以下にほぼ100%の感染価が回収されるHIV画分を得ることが出来た。このとき除去されたp24画分中の感染性ウイルスは1%未満であった。また、濃縮HIV画分にビリオンが回収されていることは、超遠心で沈降することから確認された。なお、未濃縮ウイルス液の場合には超遠心で沈降するp24量は遠心上清中p24量の15%程度であった。

次に、上記の濃縮HIVとCD4/CXCR4陽性細胞から調整した膜画分を混合し、インキュベートし

た。一定時間の反応後遠心し、遠心上清中の遊離p24量を測定した。その結果、細胞膜画分無添加の場合には観察されない遊離p24が、添加群では観察された。このp24遊離反応は、ビリオン量を一定にして添加する膜画分の量を変動させた場合(図1)にも、逆に、膜画分の量を固定して添加ビリオン量を増加させた場合(図2)にも、それぞれ飽和状態に達することから、ウイルス膜と細胞膜の特異的な反応であることが示唆された。さらには、ビリオンの侵入を阻害する抗-CD4抗体を反応系に添加すると(図3)、p24の遊離が抑制された。なお、VSVのG蛋白をエンベロープに持つ偽HIVでは、このような反応は観察されなかった。

D. 考察

HIVビリオンの細胞内侵入には、CD4リセプターとCXCR4ないしはCCR5 co-receptorだけでは説明できない現象が種々報告されている。しかし、ウイルスの吸着だけで細胞側には何らかのシグナルが入り細胞を変化させる可能性があるため、生細胞を用いて侵入機構・関与する因子等を解析することは原理的に不可能である。そのためには無細胞のin vitro侵入解析系が必須であるが、未だに報告がなく未解決のままである。

そこで本年度は、解析系確立を目指して研究を進めた。当初は、未精製のウイルスを用いて細胞膜画分との相互作用による遊離p24の検出を試みたが不首尾であった。しかし、結果の項に示したように、感染性ウイルスを濃縮精製して用いたところ、吸着/融合/脱核に由来すると思われるコア蛋白p24の遊離が観察された。このin vitro反応は、HIV感染抑制活性のある抗-CD4抗体存在下で抑制されることから、HIV侵入解析の無細胞系として活用できることが示唆された。現在、本解析系のHIV感染における意味についてより詳細な検討を加えている。一方、in vitroアッセイ系としての問題点は、反応系にHIVをp24量にして20ng/mlの濃度で添加したのに対して、検出される遊離p24はその10~20%であり、残りの80%以上は未反応のままに留まっている点にある。これは感染性ビリオンの精製が不完全であることに因るためと思われる。

更にビリオン精製度を上げて感度を高める必要があるだろう。

E. 結論

無細胞HIV侵入解析系の確立を試みた。非感染性画分を除去して濃縮精製した感染性HIVと、CD4/CXCR4陽性細胞膜画分の混合で、p24の遊離が観察された。遊離p24量はHIVと膜画分の量比変動でそれぞれ飽和に達し、抗-CD4抗体で阻害されることから、ウイルス膜と細胞膜の特異的な吸着/融合/脱核に由来することが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Tokunaga, K., Ikuta, K., Adachi, A., Matsuda, M., Kurata, T. and Kojima, A.: The cellular kinase binding motifs (PxxP and RR) in human immunodeficiency virus type 1 Nef protein are dispensable for producer cell-dependent enhancement of viral entry. *Virology*, 257, 285-289, 1999.

2) Mochizuki, N., Otsuka, N., Matsuo, K., Shiino, T., Kojima, A., Kurata, T., Sakai, K., Yamamoto, N., Isomura, S., Dhole, T. N., Takebe, Y., Matsuda, M. and Tatsumi, M.: An infectious DNA clone of HIV type 1 subtype C. *AIDS Res. Human Retroviruses*, 15, 1321-1324, 1999.

2. 学会発表

1) 大場浩美、寺尾圭一、稲葉麻記、寺田 知絵子、岩澤恵理子、小島朝人、倉田 毅、千葉 丈: 逆転写酵素に対する細胞内免疫によるHIV-1複製の阻害. 第47回日本ウイルス学会総会、1999年10月、横浜.

2) 北川善紀、吉原清美、柚原純子、千葉 丈、倉田 毅、小島朝人: 組換えワクシニアウイルス、バキュロウイルス、plasmidベクターにより発現されるキメラHIV-1 Gag VLPの抗原性・免疫原性. 第3回日本ワクチン学会総会、1999年11月、名古屋.

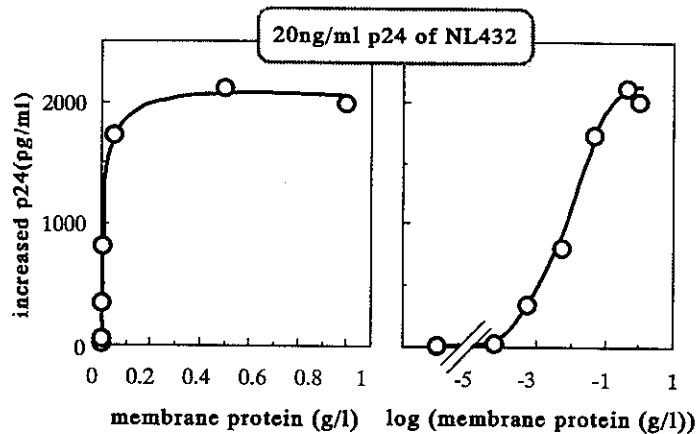


図1 ウイルス p24 放出に対する細胞膜濃度依存性

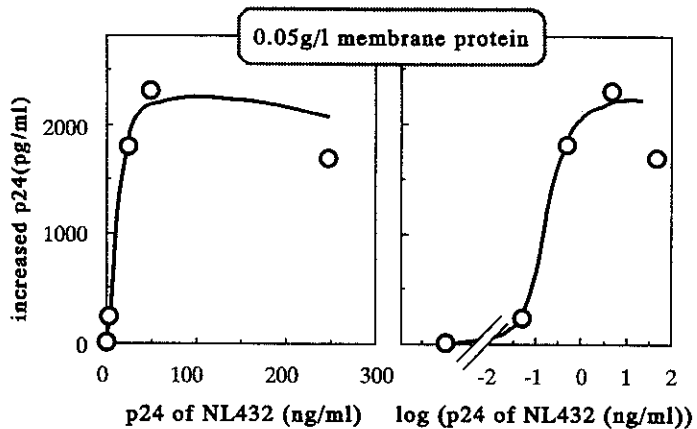


図2 ウイルス p24 放出に対する添加ウイルス濃度依存性

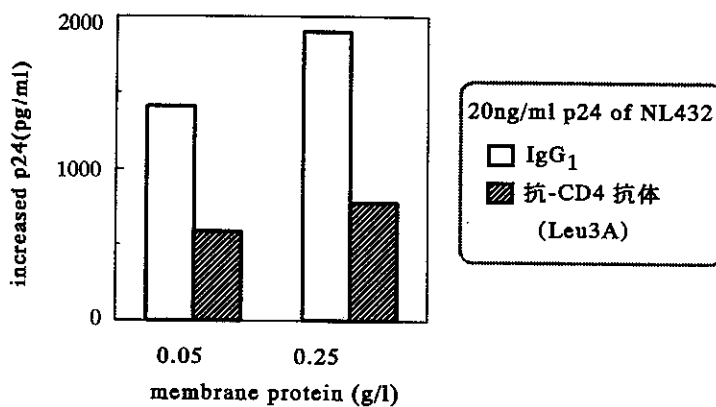


図3 ウイルス p24 放出に対する抗-CD4 抗体の影響

HIV-1 の適応進化

分担研究者 国立感染症研究所 エイズ研究センター 佐藤 裕徳

研究要旨： HIV-1 の抗体感受性あるいは逆転写酵素 (RT) 阻害感受性と密接な関連を持つ gp120 V3 と RT について、感染個体内で経時的に蓄積される変異とその変異がウイルスの形質変化に果たす役割を分子進化学、分子生物学およびウイルス学的手法で解析した。V3 解析により、i) HIV-1 サブタイプ E の多様な V3 配列集団の中に、均一性を保持しつつ感染全時期に持続する subpopulation が存在し、ii) この V3 配列集団が、V3 配列多様性を生み出す選択圧と考えられている『V3 抗体の正の選択圧 (positive selection force) 』に非感受性であり、iii) ウイルスに CCR5 使用能を付与する共通機能をもつことを明らかにした (国立感染研椎野博士との共同研究)。また、種々の RT 阻害剤多剤治療を長期に受けウイルス量低下の認められないサブタイプ E 感染者について、RT finger subdomain にこれまで未報告の 3 塩基対挿入変異を見出した。分離株の RT 配列解析と薬剤感受性試験から、挿入変異がウイルスの多剤耐性獲得に関与する可能性が示唆された。さらに、サブタイプ E ゲノムに生じた変異とウイルスの形質変化の関連を明確にする目的で、*in vitro* 変異体作製の出発材料となるサブタイプ E 感染性分子クローン pNH1m-3 を作製し、MAGIC-5A 細胞 (国立感染研巽博士作製) における複製能と薬剤感受性を確認した。

A. 研究目的

HIV は、感染者体内で点変異と組み換えにより多様なゲノム RNA 集団を形成し、生体の環境変化に速やかに適応する能力をもつ。しかし、ウイルスの適応進化の分子機構については不明な点が多い。適応進化研究は、HIV 持続感染、病原性発現の理解と HIV 感染予防、治療立案につながる。

以上の観点から、本研究では、ウイルスの抗体感受性および薬剤感受性発現と密接な関連を持つ gp120 V3 と RT 領域に着目し、感染個体内で経時的に生じる変異を分子進化学的手法で解析した。さらに、一連の組み換え体、点変異体、サブタイプ E 分子クローンを作製し、新たに生じた変異がウイルスの形質変化に果たす役割について検討した。

B. 研究方法

1. 感染者の臨床経過と治療歴 (図 1) : 日本人家族内感染例をモデルケースとした。この家族は父親 (NH1)、母親 (NH2)、子供 (NH3) の 3 人からなり、1989-1991 年の間にタイ起源の HIV-1 サブタイプ E に感染した。NH1 は 1992

年 10-11 月の間 AZT (400mg/day) の投与を受けた後治療を中断し、1993 年 6 月に AIDS を発症し 1994 年 3 月に死亡した。NH2 は 1996 年 2 月に AIDS を発症し、同年 4 月より AZT (400mg/day)、同年 5 月より AZT (300mg/day) と ddI (200mg/day) の投与を受け、1998 年 12 月に死亡した。NH3 は、1996 年 2 月以降後に a) AZT+ddI, b) AZT+3TC+IDV, c) AZT+3TC+IDV, の多剤療法を受けた。

2. ウイルス分離：感染者と非感染者末梢血リンパ球 (PBMC) の共培養法により HIV-1_{NH1}、HIV-1_{NH2}、HIV-1_{NH3} (1993 年検体由来)、HIV-1_{NH2-II} (1996 年検体由来)、HIV-1_{NH2-III} (1997 年検体由来)、HIV-1_{NH3-II} (1999 年検体由来) の計 6 種類の分離株が得られた。なお薬剤感受性試験に用いた高感染価 HIV-1_{NH3-II} 株は、国立感染研巽博士により、MAGIC-5A 細胞を用いて分離された。

3. 塩基配列決定：感染者 PBMC、血漿または分離ウイルスの核酸抽出標品より、gp120 C2V3 領域 (324bp) あるいは RT N 末端領域 (1011bp) を PCR により増幅し、直接または一旦プラスミドにクロ-

ニングしたのち塩基配列を決定した。

4. 塩基配列の分子進化解析：塩基配列の進化系統樹は CLUSTAL W と PHYLIP パッケージ (NEIGHBOR, DNABOOT, CONSENCE) を用いて作製した。塩基配列集団内の同義置換および非同義置換は、Nei and Gojobori の方法で MEGA プログラムを用いて計算した。

5. V3 組み換えウイルス、点変異ウイルスの作製：感染者 PBMC プロウイルスの C2/V3 領域をクローニングし、87 クローンのユニーク塩基配列を決定したところ、V3 アミノ酸配列としては22種のユニーク配列が得られた。これら全てについて PCR を用いた overlap extension 法により、サブタイプ B LAI 株の V3 を種々のサブタイプ EV3 と正確に置換した LAI-EV3 組み換えウイルスを作製した (22種)。さらに、R5 ウイルスである HIV-1_{NH2} の V3 に site-directed-mutagenesis により点変異を導入した V3 点変異ウイルス (8種) を作製した。

6. コレセプター使用域の解析：RT 活性でウイルス量を標準化した標品の希釈系列を用い、限界希釈法により HOS-CD4-CCR5 細胞と HOS-CD4-CXCR 細胞における各ウイルスの感染価 (TCID50) を決定した。

7. ウイルスの薬剤感受性試験：CD8 陽性細胞を除去しウイルス感受性を向上させた PBMC または臨床分離株高感受性細胞 MAGIC-5A を用い、核酸系 RT 阻害剤 (AZT, ddI, 3TC, d4T)、非核酸系 RT 阻害剤 (Nevirapine) の感受性試験を行い、それぞれの分離ウイルスについて感染価を 50% 低下させる薬剤濃度 (IC50) を決定した。なお HIV-1_{NH3-II} の感受性試験は、国立国際医療センター蜂谷博士、岡博士により MAGIC-5A を用いて行われた。

8. サブタイプ E 感染性分子クローンの作製：

HIV-1_{NH1} を PBMC または MT2 に感染させ low molecular weight DNA (Hirt DNA) を抽出し、SpeI で切断し、9-12kbDNA を精製した後、ZAP Express の SpeI site にクローニングした。得られた組み換え

体ファージライブラリー (約 5×10^6 pfu) から、HIV-1_{NH1} *env, gag* PCR 増幅産物をプローブにして、HIV DNA 陽性組み換え体ファージを同定した (40 positive clones / 4×10^5 recombinants)。このうち6クローンを pBR322 系のプラスミドに組み換え、2LTR プロウイルスの形に修復した DNA クローン pHIV-1NH1m1-3 等を得た。

9. 分子クローンの感染能の解析：分子クローン DNA を HeLa 細胞へトランスフェクションし、培養上清を PHA 刺激 PBMC に感染させ、培養上清中の RT 活性を経時的に 21 日間追跡した。並行して、トランスフェクション後の培養上清を MAGIC-5A に感染させ青色融合細胞形成能の有無を検討した。なお、MAGIC-5A 細胞を用いた解析は、国立感染研異博士により行われた。

C. 研究結果

1. V3 の多様度と進化様式

1) 87種の PBMC プロウイルス V3 塩基配列について、LAI-EV3 組み換えウイルスのコレセプター使用域の解析結果を基に i) CCR5 との相互作用に関与する V3 をコードする塩基配列集団 (R5 ウイルス V3、51種) と ii) CXCR4 との相互作用に関与するをコードする塩基配列集団 (X4 ウイルス V3、35種) を特定した (図2)。

2) R5 ウイルス V3 配列集団は i) 比較的均一な点変異集団として感染初期から後期に持続的に存在すること (図2)、ii) 同義置換が非同義置換より優位に固定し、正の選択圧に低感受性であること (図3A) を見出した。

4) 一方 X4 ウイルス V3 配列集団は i) は多様な点変異集団として感染後期に優勢となること (図2)、ii) 非同義置換が同義置換より優位に固定し、正の選択圧に高感受性であること (図3B) を見出した。

2. 薬剤治療に伴う RT 変異と多剤耐性

1) RT 阻害剤多剤療法を受け、血中ウイルス量の

低下が認められない患者 NH3 において、末梢血ウイルス RNA は RT 領域に既知の AZT 耐性点変異 (図 4 A) とともに未報告の 3 3 塩基 (1 1 アミノ酸) の挿入変異を有するものが優勢となっていた (図 4 B)。他の薬剤耐性に関与する点変異は見い出されなかった。

2) GeneBank および SwissProt 等には、挿入配列と同一の配列は見い出されなかった。

3) NH3 からの分離株 HIV-1_{NH3-II} は RT の AZT 耐性点変異および挿入変異を保持しており (図 4 A&B)、種々の RT 阻害剤に高度耐性であることを明らかにした (図 5)。

3. 感染性サブタイプ E 分子クローンのスクリーニング、構造決定、および生物活性

1) 得られた 6 種の DNA 分子クローン由来ウイルスストックを PHA 刺激 PBMC に感染したところ、感染後 2 1 日まで培養上清中の RT 活性は検出されなかった。一方、MAGIC-5A に感染した結果、全てのサンプルで 2 日以内に細胞融合が観察され、分子クローンの外皮タンパク質と rev の活性保持が示唆された。しかし、青色融合細胞形成能には差があり、tat の活性に差があることが示唆された。さらに、培養上清を同細胞で継代したところ 2 クローン (pNH1m1-3 と pNH1m-2) が再現性よく青色融合細胞を形成した。

2) 上記 2 クローンのうち pNH1m1-3 の HIV-1 DNA 全構造を決定した。NH1m1-3 は、全長 9694bp かなり、vpu の開始コドンを除く以外は全ての遺伝子は open reading frame をコードしていた。

3) pNH1m1-3 を HeLa 細胞へトランスフェクションすることにより高濃度のウイルスストックが得られた (図 6 A)。このウイルスは MAGIC-5 で増殖し (図 6 B)、出発材料である NH1 臨床分離株 (HIV-1_{NH1}) 同様 AZT 感受性であった (図 6 C)。

D. 考察

1. V3 の多様度と正の選択：高い免疫原性を有

する V3 が、生体内で他の領域より多様な配列集団として存在する機構として、これまでに次の作業仮説が提唱されている。すなわち、V3 に変異が生じた新規変異株は抗原変異を通じて V3 抗体の選択圧に非感受性となり、ウイルス集団内で固定し (新規変異株の正の選択がおきる) 多様性が維持される、と考えられている。本研究により、初めて、i) 多様な V3 配列集団の中に、感染全時期において正の選択圧非感受性で均一性を保持する V3 subpopulation が存在すること、ii) これらの配列はウイルスに CCR5 使用能を付与する機能をもつこと、が明らかにされた。この結果から、『HIV-1 サブタイプ E V3 集団の中で、CCR5 と相互作用する能力を獲得した V3 配列はその機能的制約から同時に抗 V3 抗体の選択圧低感受性能も獲得している』とする作業仮説が考えられる。この仮説は、サブタイプ E R5 ウイルス V3 の一次構造の特徴 (図 7)、すなわち X4 ウイルス V3 に比べ荷電したアミノ酸が少なく、gp120 内部への埋没度がより高い可能性があること、および糖鎖付加部位配列 (NNT) が高度に保存され、糖鎖修飾が抗体接近の際立体障害となりうること、などの知見ともよく一致する。現在、サブタイプ E V3 がウイルスに V3 抗体感受性の低下をもたらす能力があるか否かを検討している。

2. RT 変異と多剤耐性：図 4、5 の結果から i) RT 阻害剤多剤療法と関連して、RT 領域に未報告の 3 3 塩基挿入変異が生じる例があること、ii) 挿入変異が、ウイルスの多剤耐性形質獲得に関与している可能性があること、が示唆される。現在、本研究で作製した AZT 感受性分子クローン pNH1m1-3 を用い、site-directed-mutagenesis を用いて挿入配列の多剤耐性獲得における役割を検討している。また、並行して、挿入変異による RT 高次構造の変化、基質特異性の変化も検討したい。さらに、挿入配列の形成機構については興味深い検討課題として残されている。挿入配列周辺には繰り返し配列は無く、挿入配列が単純な RT の pausing あるいは primer slippage に

より生じたとは考えにくい。そこで組み換えによる挿入配列形成を視野に入れ、挿入配列の起源について検討する予定でいる。

3. サブタイプ E 分子クローンの樹立：今回得られたサブタイプ E 分子クローン pNH1m1-3 は、i) トランスフェクションにより培養上清中に活性型 RT を放出すること、ii) MAGIC-5A 細胞を用いて継代可能であること、iii) AZT に感受性であること、から逆転写反応を経由して複製する感染性ウイルス粒子を作製する能力があることが確認された。したがって、MAGIC-5A 細胞を用いた RT 変異体解析に用いることが可能と考えられる。一方、PHA 刺激 PBMC での増殖が確認できないことから、i) 宿主域、ii) PHA 刺激 PBMC で増殖が制限される理由、などについて検討する必要がある。

E. 結論

1. V3 の多様度と正の選択：本研究は、初めて、i) 感染者体内の多様な V3 配列集団の中に、正の選択圧非感受性で均一性を感染全時期に渡って保持する V3 subpopulation が存在すること、ii) これらの配列は一樣にウイルスに CCR5 使用能を付与する機能をもつこと、を明らかにし、V3 の多様度と正の選択圧感受性が、ウイルスのコレセプター使用域に依存することを示唆した。これら一連の研究により HIV-1 の適応進化研究に新しい概念を導入した。

2. RT 変異と多剤耐性：HIV-1 多剤耐性獲得に関連して、RT finger subdomain に未報告の 11 アミノ酸挿入変異が見い出された。挿入変異の起源、多剤耐性獲得に果たす役割、RT の高次構造と機能変化については、ウイルスの多剤耐性発現と適応進化に関連する今後の検討課題である。

3. サブタイプ E 分子クローンの樹立：今回得られたサブタイプ E 分子クローン pNH1m1-3 は、MAGIC-5A 細胞で複製し、AZT 感受性であることから、同細胞を用いたサブタイプ E RT 耐性変異体の解析に応用可能と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

A. 直接関連する論文

1) **Sato H**, Shiino T, Kodaka N, Taniguchi K, Tomita Y, Miyakuni T, and Takebe Y: Evolution and biological characterization of human immunodeficiency virus type 1 subtype E gp120 V3 sequences following horizontal and vertical virus transmission in a single family. *J. Virol.* 73: 3551-3559, 1999.

2) **Sato H**, Kato K, Takebe Y: Functional complementation of the envelope hypervariable V3 loop of human immunodeficiency virus type 1 subtype B by the subtype E V3 loop. *Virology* 257: 491-501, 1999.

3) Kato K, **Sato H**, Takebe Y: Role of naturally-occurring basic amino acid substitutions on viral co-receptor usage and cellular tropism in human immunodeficiency virus type 1 subtype E envelope V3 loop. *J. Virol.* 73: 5520-5526, 1999.

4) Shiino T, Kato K, Kodaka N, Miyakuni T, Takebe Y, **Sato H**: A group of V3 sequences of human immunodeficiency virus type 1 subtype E nonsyncytium-inducing, CCR5-using variants are resistant to positive selection pressure. *J. Virol.* 74: 1069-1078, 2000.

5) **Sato H**, Tomita Y, Shibamura K, Shiino T, Miyakuni T, and Takebe Y: Convergent evolution of reverse transcriptase (RT) gene between human immunodeficiency virus type 1 subtypes E and B following nucleoside analogue RT inhibitor therapies. *J. Virol.* *accepted*

B. 間接的に関連する論文

1) Kusagawa S, **Sato H**, Kato K, Nohtomi K, Shiino T, Samrith C, Bun Leng H, Phalla T, and Takebe Y: HIV type 1 *env* subtype E in Cambodia. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 15:91-94, 1999.

2) Toriyoshi H, Shioda T, **Sato H**, Sakaguchi M, Eda Y, Tokiyoshi S, Kato K, Nohtomi K, Kusagawa S, Kiyomi T, Shiino T, Kato A, Foongladda S, Oka S, Iwamoto A, Wasi C, Nagai Y, Takebe Y: Sendai virus based production of HIV-1 subtype B and E gp120 and their use for highly sensitive detection of subtype-specific serum antibody. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 15: 1109-1120, 1999.

3) Kato K, Shiino T, Kusagawa S, **Sato H**, Nohtomi K, Shibamura K, Hien NT, Chi PK, Lien TX, Anh MH, Long HT, Bunyaraksyotin G, Fukushima Y, Honda M, Wasi C, Yamazaki S, Nagai Y, Takebe Y: Genetic similarity of HIV-1 subtype E in a recent outbreak among IDUs in Northern Vietnam to strains in Guangxi province of southern China. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 15: 1157-1168, 1999.

2. 学会発表

1) **Sato, H.**, Shiino, T., Kato, K., and Takebe, Y. Evolution and biological characterization of human immunodeficiency virus gp120 V3 sequences following horizontal and vertical virus transmission. XIth International Congress of Virology. Sidney, Australia, Aug. 9-13, 1999.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

図1 History of drug administration in NH family

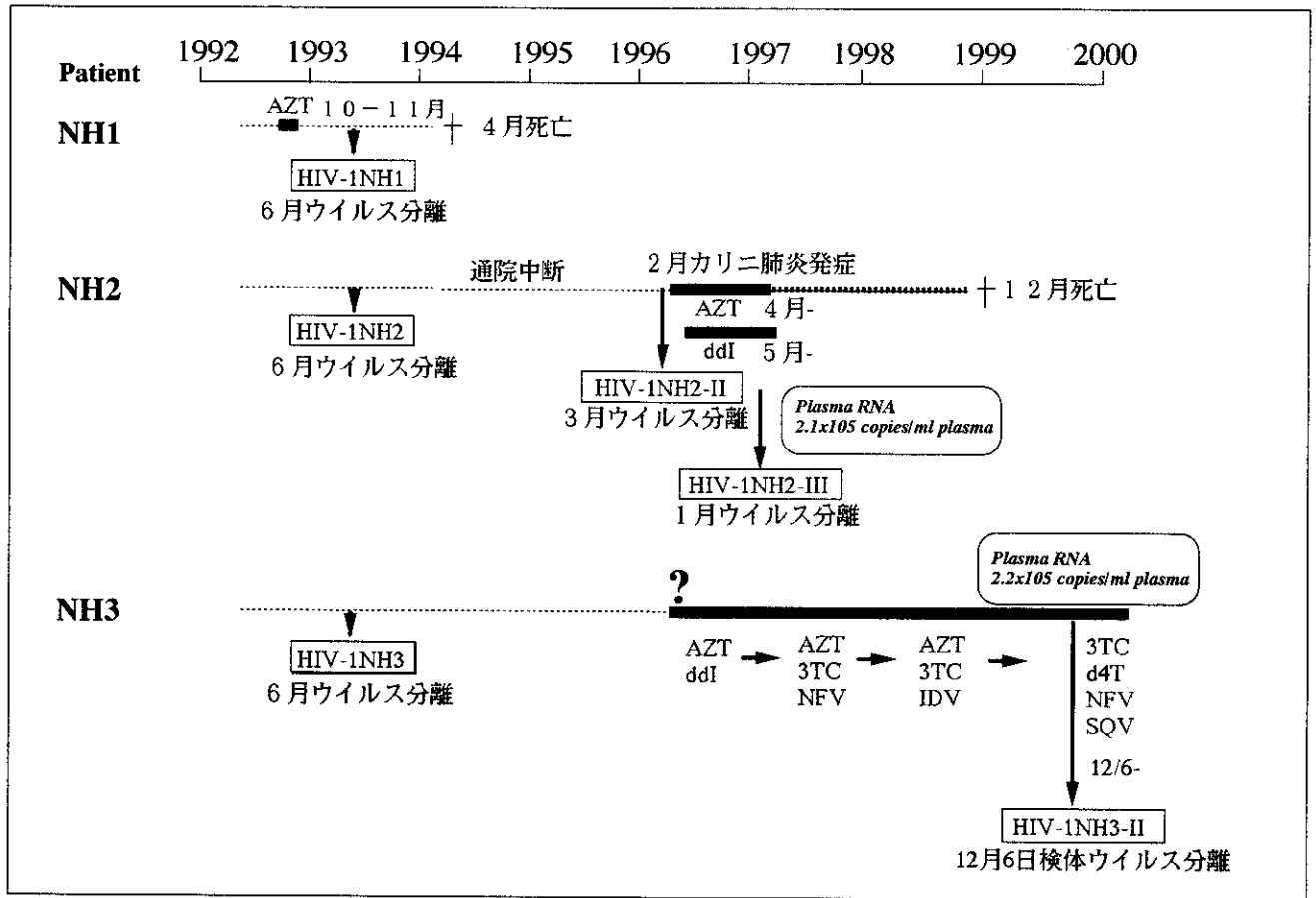


図2 Evolution of V3 sequence and function in an NH family by point mutations

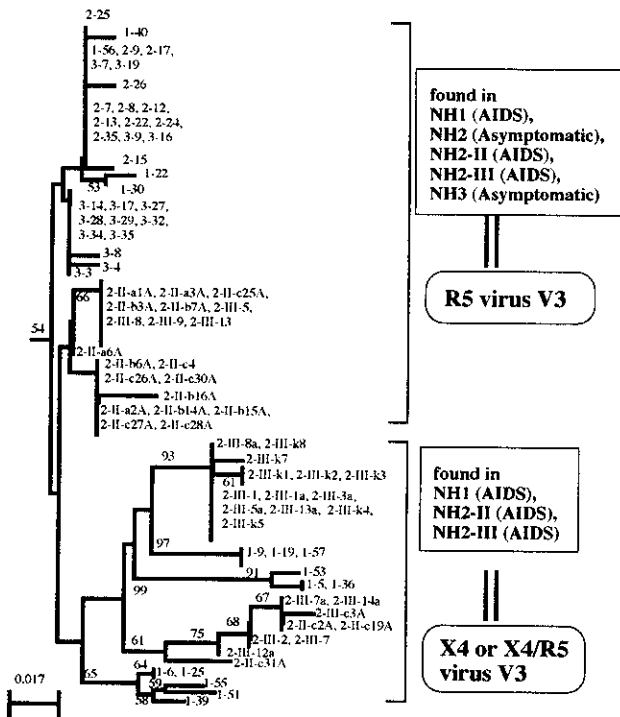
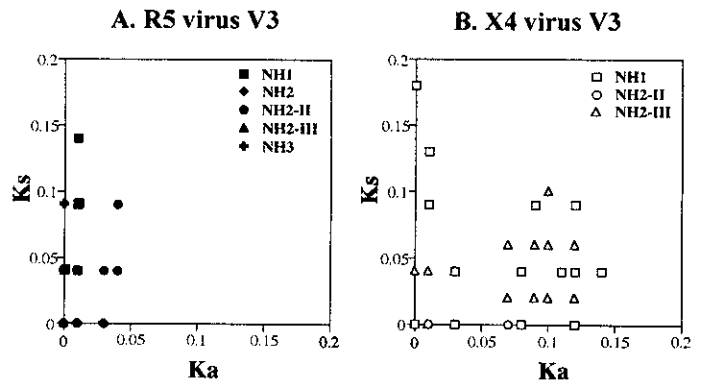


図3 Differential sensitivity to the positive selection pressure between R5 and X4 viruses



4

A. AZT-resistance-associated point mutations

	41	67	70	210	215	219
wt	M	D	K	L	T	K
AZT res. mt	5' aug gac	aaa	uug acu	aaa 3'		
	5' c-- a-- -g-	-g- ua/u-	g-- 3'			
	L	N	R	W	Y/F	K
AZT untreated						
NH2	---	---	---	---	---	---
NH2-II	---	---	---	---	---	---
NH3	---	---	---	---	---	---
AZT treated						
NH1 (1 month)	---	---	-g-	---	---	---
NH2-III (9 months)	---	a--	-g-	---	uu-	c--
NH3-II (?)	---	---	---	---	---	---
plasma virus RNA	c--	a/g--	---	-g-	ua-	---
PBMC provirus	c--	a/g--	---	-g-	ua-	---
pl RNA clone#4	c--	a	---	-g-	ua-	---
pl RNA clone #11	c--	---	---	-g-	ua-	---
virus isolate	c--	---	---	-g-	ua-	---

B. 11-amino-acid Insertion

						67		68			
						K	K	D		S	
NH1, NH2, NH2-II, NH2-III, NH3	5'	aaa	aag	gac						agc	
										acc	
										aaa	
										3'	
NH3-II viruses	N	I	E	G	G	R	D/G	Q	G	P	A
plasma virus	aac	auu	cac	gga	gga	agg	gac	cag	ggc	ccg	gcc
pl RNA cl#4	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
pl RNA cl #11	---	---	---	---	---	---	-g-	---	---	---	---
PBMC provirus	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
virus isolate1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
virus isolate2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
virus isolate3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

5

Drug Susceptibility of HIV-1_{NH3-II}

Chemicals	NH1		NH3-II	
	IC50 (uM)	fold resistance	IC50 (uM)	fold resistance
RT inhibitors				
AZT	0.08	0.9	> 10	> 400
3TC	0.48	0.96	> 100	> 227
d4T	1.1	0.37	.58	72.5
NVP	0.032	1.52	0.05	0.35
PR inhibitors				
RTV	0.026	0.86	0.12	4
SQV	0.0064	1.6	0.006	1.5
NFV	0.015	7.5	0.022	11
IDV	0.013	13	0.004	4
APV	0.0058	0.34	0.03	1.7

7

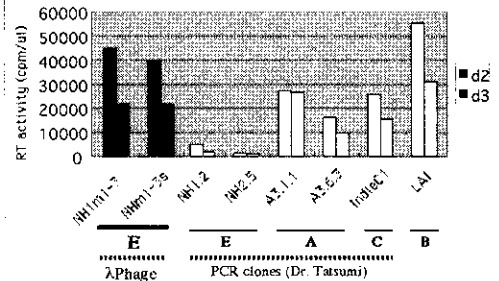
Characteristics of primary structure of HIV-1 subtype E V3

Virus	V3 loop amino acid sequence	Freq.	Net Charge	Glyco. site
R5	CTRPSNNVIRTSITIGPGQVWVRTGDITGNIRRAYC	19/89	+4	+
R5I.....	10/89	+4	+
R5I.....Q...	9/89	+2	+
X4K..RV..M...R.....V.D.....	3/89	+6	-
X4F..R..R..M...R.....E.V.D...H.	2/89	+6	-
X4P...R..M...R.....E...S.K....	1/89	+7	-

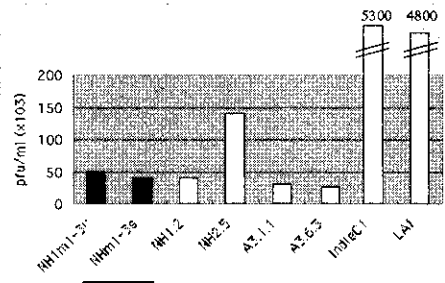
6

Biological Characterization of a full-length subtype E DNA clone pNH1m1-3

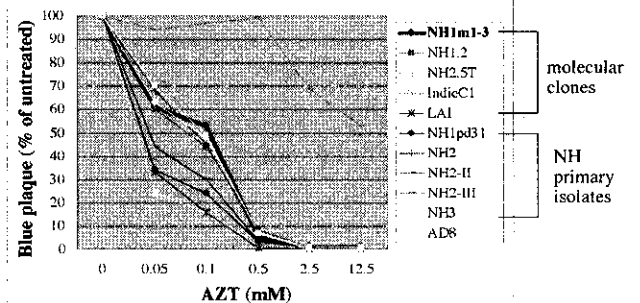
A. RT activity following transfectoin in HeLa cells



B. Blue plaque forming unit in MAGIC-5A



C. AZT dose response curve in MAGIC-5A



IL-4遺伝子内polymorphismとAIDS病態との関連に関する研究

分担研究者

塩田達雄

大阪大学微生物病研究所

研究要旨 HIV-1は感染者の病態進行とともに巨細胞を形成しないR5ウイルスから巨細胞を形成するX4ウイルスへと進化する。X4ウイルスの出現は、しばしばCD4陽性T細胞の急速な減少に先立つ。一方、IL-4はR5ウイルスのコレセプターCCR5の細胞表面発現を低下させ、X4ウイルスのコレセプターCXCR4の細胞表面発現を増強する。近年IL-4遺伝子プロモーター領域の遺伝的多型が、プロモーター活性および血中のIgE値の上昇と相関することが報告された。我々はこのIL-4遺伝子内の多型とHIV-1の感染個体内進化およびAIDS病態との関連を検討するため、日本人HIV-1感染者339人と非感染者52人のIL-4プロモーターの遺伝子多型の有無をPCR-RFLP法で決定した。その結果、日本人HIV-1非感染者群のIL-4遺伝子プロモーターの変異頻度は0.69であり感染者群では0.64であった。しかし異性間性的接触によってHIV-1に感染した集団に限ると変異頻度は0.56と有意に低値を示し (P=0.025)、この変異が異性間性的接触によるHIV-1感染にある程度抵抗性を付与する可能性が考えられた。一方、ウイルスの巨細胞形成能との関係を検討したところこの変異をホモに持つ個体の50%がX4ウイルスを持つのに対し、ホモには持たない個体では25.4%と有意に低値を示し (P=0.0091)、この変異がX4ウイルスの出現を促進することが明らかになった。

A. 研究目的

HIV-1は感染者の病態進行とともに巨細胞を形成しないR5ウイルスから巨細胞を形成するX4ウイルスへと進化するが、そのメカニズムは不明である。X4ウイルスの出現は、しばしばCD4陽性T細胞の急速な減少に先立つ。一方、IL-4はR5ウイルスのコレセプターCCR5の細胞表面発現を低下させ、X4ウイルスのコレセプター

CXCR4の細胞表面発現を増強する。近年IL-4遺伝子プロモーター領域の遺伝的多型（翻訳開始点の上流589番目の塩基がCあるいはTの多型）が、プロモーター活性および血中のIgE値の上昇と相関することが報告された。我々はこのIL-4遺伝子内多型とHIV-1の感染個体内進化およびAIDS病態との関連を検討した。

B. 研究方法

日本人HIV-1感染者339人と非感染者52人のIL-4プロモーターの遺伝的多型の有無をPCR-RFLP法で決定した。また、感染者105名の末梢血単核細胞より臨床 HIV-1株を分離し、Envタンパク質のV3ループに対応するHIV-1ゲノムの領域をRT-PCRで増幅し、ABIシークエンサーで塩基配列を決定してV3ループの11番目あるいは25番目のアミノ酸が塩基性の場合にX4ウイルス、そうでない場合にR5ウイルスと判定した。

C. 研究結果

表1に日本人HIV-1非感染者および感染者におけるIL-4遺伝子の変異頻度を示す。非感染者群における変異頻度は0.69、感染者群では0.65であり、有意な差はみられなかった ($p=0.092$)。しかし異性間性的接触によってHIV-1に感染した集団に限ると変異頻度は0.56と有意に低値を示し ($P=0.025$)、この変異が異性間性的接触によるHIV-1感染にある程度抵抗性を付与する可能性が考えられた。一方、ウイルスの巨細胞形成能との関係を検討したところこの変異をホモに持つ個体の50%がX4ウイルスを持つのに対し、ホモには持たない個体では25.4%と有意に低い値を示し (表2、 $P=0.0091$)、この変異がX4ウイルスの出現を促進することが明らかになった。最後に、IL-4遺伝子型と血漿中のIgE値との関係を調べたところ、変異をホモには持たな

い個体では平均513IU/ml、変異をホモに持つ個体では平均1519IU/mlであり、変異をホモに持つ個体では血漿中のIgEの値が有意に高値であった ($p=0.008$)。

D. 考察

以上の研究結果から、IL-4プロモーターの遺伝的多型とX4型のHIV-1の出現頻度との間に一定の相関が存在することが明らかになった。この結果は、HIV-1の感染個体内進化にIL-4が実際に重要な役割を果たしていることを示唆している。

E. 結論

IL-4のプロモーター領域内の遺伝的多型が異性間性的接触によるHIV-1感染にある程度抵抗性を付与する可能性が考えられた。一方、ウイルスの巨細胞形成能との関係では、この変異がX4ウイルスの出現を促進することが明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Factors governing the activity *in vitro* of ribozymes transcribed by RNA polymerase III. Shiori Koseki, Tsuyoshi Tanabe, Kenzaburo Tani, Shigetaka Asano, Tatsuo Shioda, Yoshiyuki Nagai, Takashi Shimada, Jun Ohkawa, and Kazunari Taira. J. Virol. 73. 1868-1877, 1999.