

20000563

平成12年度厚生科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

課題番号 H-10-エイズ-003

HIVの病原性決定因子に関する研究

研究報告書

平成13年3月

主任研究者 田代 啓

(京都大学・遺伝子実験施設・助教授)

平成12年度厚生科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

課題番号 H-10-エイズ-003

HIVの病原性決定因子に関する研究

研究報告書

平成13年3月

主任研究者 田代 啓

(京都大学・遺伝子実験施設・助教授)

## 目次

I. 平成12年度研究組織	.....	1
II. 総括研究報告書	.....	2-6
1. 総括研究報告書（平成12年度）		
主任研究者：田代 啓	（京都大学・遺伝子実験施設・助教授）	
分担研究者：本庶 佑	（京都大学医学部・医化学 I・教授）	
III. 業績一覧（2000-2001）	.....	7
IV. 研究成果の刊行物・別刷	.....	8-23

HIVの病原性決定因子に関する研究班

平成12年度研究組織

主任研究者： 田代 啓（京都大学・遺伝子実験施設・助教授）

分担研究者： 本庶 佑（京都大学医学部・医化学Ⅰ・教授）

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）  
総括研究報告書

HIVの病原性決定因子に関する研究

主任研究者 田代 啓 京都大学遺伝子実験施設 助教授

研究要旨

1. 米国NCIのO'Brien博士や申請者らによる共同研究で見出された、SDF1遺伝子座のAIDS発症遅延型遺伝子型（3'A/3'A）について、AIDS発症遅延がSDF-1のタンパク質量の差によるとの仮説に基づき、遅延の分子メカニズムを解明することを目指した。11年度と12年度の本研究の成果により、SDF-1のタンパク質量は後天的要因、なかでもHIV感染によって変動することが明らかになったので、米国コホートサンプルを細かくグループ分けして検討する必要性が生じた。我々が推奨する採血方法によって新たにきめ細かい採血がオブライエン博士らによって現在実行されている。2. 本研究中の10年度の成果として、「高感度イムノアッセイ法」（早大・CRESTの松本博士との共同発明）を用いて、「HIV感染者群の血中SDF-1タンパクレベルがHIV非感染者群に比べ3倍以上に上昇しており、しかもCXCR4のSDF-1結合KD値に近い症例が約10%ある。」知見を得た。3. 本研究中の11年度の成果として、CXCR4のKD値付近の濃度のSDF-1タンパクが、実際にCD4陽性細胞表面CXCR4（HIVウイルス受容体）がダウンモジュレートされることを実験動物のvivoで示した。（世の中に、これをvivoで示したデータはこれまではなかった。）4. 上の2つの結果から、「SDF-1が宿主（ヒト）側のHIVの病原性決定因子の一つである」が、強く示唆された。5. エイズ進行例群（CD4：200以下、ウイルスコピー数10000以上）では、非進行例群に比べてSDF-1タンパクが有意（ $p < 0.1\%$ ）に増加していることを見出した。つまり、SDF-1がエイズ進行と相関することが見出された。6. 2から5の成果によって、学術的には、血中SDF-1タンパク濃度はHIV感染症におけるCD4細胞数とウイルスコピー数に次ぐ第3の検査項目候補となったと言えるが、実際臨床的にどの程度役に立ち得るかを評価する準備を進めた。

分担研究者 本庶 佑  
京都大学医学部医学研究科  
教授

**A. 研究目的** 米国NCIのO'Brien博士や主任研究者らによる共同研究で見出された、SDF13'A遺伝子座のAIDS発症遅延型遺伝子型について、遅延の分子メカニズ

ムを解明することを本研究の目的とする。「体内SDF-1タンパク量が病原性決定因子であること」が確定すれば、SDF-1タンパク量モニターによるHIV感染者の予後推定や治療方針決定にただちに役立つばかりでなくgp120/SDF-1/CXCR4を作用点とする治療法開発の具体的指針を提示できるという形で、厚生行政に貢献でき

る。そのために、血中SDF-1タンパク濃度がHIV感染症におけるCD4とviral loadに次ぐ第3の検査項目候補として、どの程度臨床的に役に立ち得るかを評価する。血中SDF-1値が、「HIV感染症進行度」と相関するかどうかの他、CD4細胞数や血中viral loadでは予測し得ない、「HIVウイルスの患者体内での指向性の変化」と「エイズ随伴症候群出現」の予測に有用であるかどうかについて、検討する。一方、AIDS発症遅延がSDF-1タンパク質量の差によらないのならば、*SDF1*遺伝子座の近傍に、別のAIDS発症時期決定遺伝子が存在することが考えられる。その可能性を検討する。

## B. 研究方法

1. 10年度は、早大・CREST・松本博士と共同で樹立した、新発明の高感度免疫アッセイ法「SDF-1 TR-FIA」を改良・完成し、それによりヒト血中SDF-1タンパク濃度の信頼性の高い測定を世界に先駆けて達成した。感度は30pg/mlに向上した。数100例の日本人HIV感染者と健常ボランティア及び米国HIV-1感染者の血清及び血漿中のSDF-1タンパク質を測定した。
2. 11年度と12年度は、実はこれまでは技術的困難により、意外にもvivoでの実験が極めて乏しかった「SDF-1タンパクが内因性のHIV感染症病原性決定因子であること」を示す具体的な学術的項目を、東大医科研と熊本大学の共同研究者から提供を受けた試料を測定し、検討した。(倫理面への配慮) 今回の発見は、HIV感染の診断と治療に重大なヒントを与えるのみならず、これが直接各個人の予後の予測等につながるケースもあると考えられる。個々人のデータ

管理には注意を払う必要がある。3A' 遺伝子型のデータ管理も同様である。

## C. 研究結果

12年度の特筆すべき成果として「HIV-1感染者の進行度が高い群で血中SDF-1濃度がより高い」ことを、日本のHIV-1感染者と非感染者の血中SDF-1濃度を測定・比較することにより見出した (Ikegawaら、AIDS Research and Human Retroviruses, in press; 東大医科研 岩本博士ら、熊本大学 松下博士ら、早稲田大学・CREST 松本博士らとの共著)。これは、本研究の10年度の成果として世界に先駆けて成功した、「十分な感度と信頼性を備えた血中SDF-1タンパク濃度測定方法樹立」(これによって世界で初めて正常ヒト血中SDF-1濃度が明らかになった。Ikegawaら、同上)と、本研究の11年度の成果、「HIV-1感染者群の血中SDF-1濃度は非感染者群に比べて高いこと」(Ikegawaら、同上)に立脚した研究成果である。

本研究以前は、SDF-1がvivoでHIV感染症進行に関わるかどうか不明であったが、SDF-1タンパクがHIV感染症進行に何らかの役割を果たし得ることを示唆する以下の具体的実験データを得た。

a. 内因性SDF-1タンパク量が、HIV-1感染補助受容体CXCR4のKD値の数分の1以内にのぼる個体(ヒト)が、測定した100数10例のHIV感染者のうち約20例実在することを明らかにした。

b. 内因性SDF-1タンパク量に個体差が存在し、その個体差が数倍や10数倍にのぼることを明らかにした。CXCR4のKD値付近の個体と、その1/10以下の個体が実在することを明らかにした。

c. CXCR4のKD値付近の濃度のSDF-1タ

ンパクが、実際にvivoでCD4陽性細胞表面CXCR4をダウンモジュレートさせることをマウスを用いた実験で示した（ヒトでは実験できないためマウスを用いた）。d. 内因性SDF-1タンパク量が、HIV感染者群と非感染者群で有意水準0.1%で有意差があることを示した。e. 内因性SDF-1タンパク量が、HIV感染症進行例（CD4値200以下でviral load10000以上）群とHIV感染症非進行例（CD4値200以上でviral load10000以下）群で有意水準0.1%で有意差があることを示した。

#### D. 考察

主任研究者と親密な共同研究者である米国NCIのO'Brien博士の本研究成果への理解と絶賛と協力を得て、日本発の技術で日本で見出した知見をもとに、さらに詳細に血中SDF-1値が諸パラメーターとの相関を調べる共同研究を実行中である。特に、血中SDF-1値が「HIV感染症進行度」「HIVウイルスの患者体内での指向性の変化」「エイズ随伴症候群出現」と相関してHIV感染症進行度の良い指標になりうるかどうかについて、O'Brien博士が提供する米国のエイズコホートの血液試料を京大で測定し、当グループの池川博士が渡米してO'Brien研の統計専門家と共に臨床情報との相関を検討して池川博士を筆頭著者とする論文を作成する手筈になっている。そのためには、これまでO'Brien博士が収集した米国エイズコHORTサンプルは、genomic DNAの長期安定確保のための細胞株確保を重視するあまり血清や血漿がきれいにとれておらず、細胞をフィコール分画したあとの残りを「血漿」と称していたので、

改めてきれいな血清を採取する作業が米国で現在進行中である。フィコールの混入は、血中SDF-1測定値の信頼性に著しい悪影響を与えることをO'Brien博士から提供を受けたサンプルについてわれわれが見出してO'Brien博士に通告したからである。

また、ゲノム上のSDF1遺伝子座の上流と下流の塩基配列を決定し、高速SNP検出装置・WAVEを用いて遺伝子多型探索を実行中である。

SDF-1が宿主（ヒト）側のHIVの病原性決定因子の一つであることをほぼ確定的に示した達成度は高い。これにより、本研究中の発明、「高感度イムノアッセイ法」（平成11年9月29日特許申請）を用いる血中SDF-1測定をHIV感染者を対象に行い、予後予測と治療方針決定に役立てることができるようになった。これを、HIV感染者全員にやるか、どのような体制でやるか、など真に厚生行政の手腕を問われる課題に変貌させつつある達成度は大と考える。このように学術的成果をあげていながら現時点ではまだ臨床的有用性についての最終的な結論が出ていないのは、怠慢その他の理由によるものではなく、京大での本研究の成果に基づいて米国コホートの血液サンプル採取方法自体を変更するという、とてつもなく手間のかかるステップを実行し始めたことによる。2001年3月3日にWinkler博士が、2001年6月にはO'Brien博士が、京都に、我々が推奨した新しいフォーマットで採取したコHORTサンプルを担いで来ることが決定しており、共同研究は、数年のレンジを想定して極めて友好的かつ建設的に行われているが、残念ながら本年度中に結論が出る可能性は無い。

SDF13'A多型と血中SDF-1タンパク濃度との相関の検討については、後天要因、特に HIV感染症によって血中SDF-1タンパク濃度が影響を受けることを、11年度と12年度の本研究でわれわれ自身が見出して、サンプリングについてO'Brien博士に注文をつけたため、12年秋までに行った測定は、一旦凍結して、米国コホートのサンプル採取方法自体を変更するという、ステップを実行することになったために結論がでていない。が、Winkler博士とO'Brien博士が京都にコホートサンプルを持参してくれることが決定している。同一症例について遺伝情報と血液サンプルが得られるため、縦糸と横糸として各病期における3'A多型の役割が解析できるのが特長である。

本研究は、実はこれまで意外にもvivoでの実験が極めて乏しかった「SDF-1のHIV-1感染症での役割とエイズ発症遅延の分子メカニズム」について、「SDF-1タンパクが内因性のHIV感染症病原性決定因子である」ことを示す具体的なデータを提示した学術的意義がある。もしも結果が「HIV-1感染者の血中SDF-1濃度は非感染者に比べて有意に高い。」ということにとどまっていれば、インパクトはさほどではなく、「それが分かった。でもその先の展開がない。」ということになっていたのかもしれない。しかし、本研究のデータは、「個体間の差が10数倍に及ぶこと。」及び「CXCR4のKD値付近のSDF-1タンパク濃度をもつ個体から、その1/10以下の個体までいること。」及び「vivoでCXCR4のKD値付近のSDF-1タンパク濃度でCXCR4のダウンモジュレーションがおこることを世界で初めて示したこと。」という具体的データによ

り、「内因性SDF-1タンパクが、HIV感染症の病原性決定因子の一つであること」を世界で最初に明らかにした点に、今後の展望を拓いた高い学術的意義がある。

この成果は、日本の技術と日本のサンプルで世界に先駆けて得た学術的業績であり、今後、米国の試料を用いて一般化する点が、よくある「米国の成果の後追い研究」と本研究との顕著な差異である。今後の本研究は、日本にはエイズコホートがないため、世界最大級のサンプル数を利用できるO'Brien博士との共同研究で臨床応用達成を図っているが、決して米国の後追い研究でなく、問題設定の段階から田代が中心になっているところから、日本発の国際的な独創的研究である。特に、米国エイズコホートの血液サンプル採取方法にまで本研究の成果に基づいて踏み込んだ国際協力を行っている点が意義深い。本研究ではHIV感染症における第3の臨床検査項目候補として、血中SDF-1タンパク濃度が診断と治療にどの程度役に立ち得るかを評価することを目的に検討を進めている。血中SDF-1値が、「HIV感染症進行度」と相関するかどうかの他、CD4細胞数や血中viral loadでは予測し得ない、「HIVウイルスの患者体内での指向性の変化」と「エイズ随伴症候群出現」の予測に有用であるかどうかについて、検討している。この部分は、なお進行途中であり臨床的有用性についての結論は出ていないが、現在望み得る最高の共同研究を設定して実行中であるので、数年以内に、社会的意義を発揮できるかどうか判明する見込みである。なお、「高感度サイトカインイムノアッセイ法」については、11年と12年に田代を筆頭著者として、共同研究者の松本博士の所属する日本政府関連団体、CRESTを

通じて国際特許申請した。この新技術は  
拡がりを見せ、共同研究として既に2つ  
の学術論文（リストの2, 3）を発表して  
いる。

## E. 結論

SDF-1タンパク量がHIV感染症病原性  
決定因子の一つであることが、本研究で明  
らかになった。これをふまえて、*SDF13'A*  
遺伝子多型によるエイズ発症遅延の分子機  
構解明と、HIV感染者の予後予測と治療方  
針決定（特に「HIVウイルスの患者体内で  
の指向性の変化」と「非ホジキンリンパ腫  
等のエイズ随伴症候群対策」のために臨床  
検査の一つに加えるかどうかを検討するさ  
らなる研究進展が望まれる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

[1] Ikegawa, M., Yuan, J., Matsumoto, K.,  
Herrmann, S., Iwamoto, I, Nakamura, T.,  
Matsushita, S., Kimura, T., Honjo, T. and  
Tashiro, K. Elevated Plasma SDF-1  
Protein Level in the Progression of HIV-1  
Infection/AIDS *AIDS Research and Human  
Retroviruses* 97, 3354-3360 (2001)

[2] Hattori, K., Rafii, S., Heissig, B.,  
Tashiro, K., Honjo, T., Takeno, M.,  
Shieh, J-H, Hackett, N. R., Crystal, R.  
G., and Moore, M. S. Plasma elevation of  
stromal derived factor-1 induces  
mobilization of mature and immature  
hematopoietic progenitor and stem cells.  
*Blood* 17, 587-595 (2001)

### 2. 学会発表

第73回日本生化学会大会  
2000.10.11-10.14 SDF-1のin vivo CXCR4  
down modulationおよびchemoattractant活性

の定量的考察

池川雅哉<sup>1</sup>、田代 啓<sup>2</sup>、松本和子<sup>3</sup>、本庶  
佑<sup>1</sup> 1. 京大院医・医化学、2. 京大・遺  
伝子、3. 早大・理工・CREST

## G. 知的所有権の出願・取得状況

該当なし

### III. 業績一覽(2000-2001)

1. Hattori, K., Rafii, S., Heissig, B., Tashiro, K., Honjo, T., Takeno, M., Shieh, J-H., Hackett, N. R., Crystal, R.G., and Moore, M.S. Plasma elevation of stromal derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood* 97, 3354-3360 (2001)
  
2. Ikegawa, M., Yuan, J., Matsumoto, K., Herrmann, S., Iwamoto, I., Nakamura, T., Matsushita, S., Kimura, T., Honjo, T., and Tashiro, K. Elevated Plasma SDF-1 Protein Level in the Progression of HIV-1 Infection/AIDS *AIDS Research and Human Retroviruses* 17, 587-595 (2001)

20000563

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので  
前頁をご参照ください

