

厚生労働科学研究研究費補助金

創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業

ゲノム情報を基盤としたエイズ病態  
制御因子の解明に関する研究

平成 14 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 塩田 達雄

平成 15 (2003) 年 3 月

# 目 次

I. 総括研究報告書	
ゲノム情報を基盤としたエイズ病態制御因子の解明に関する研究	1
大阪大学微生物病研究所 教授 塩田達雄	
II. 分担研究報告	
1. エイズ病態進行に関わる宿主因子の解明に関する研究	12
大阪大学微生物病研究所 教授 塩田達雄	
2. エイズ治療薬ならびにワクチンの有効性に関わる	18
宿主因子の解明に関する研究	
東京大学医科学研究所 教授 岩本愛吉	
3. HIV 母子感染コホートにおける HIV 感染成立に関わる	26
宿主因子の解明に関する研究	
金沢大学大学院医学系研究科 教授 市村宏	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	37
IV. 研究成果の刊行物・別刷	44

ゲノム情報を基盤としたエイズ病態制御因子の解明に関する研究

主任研究者 塩田 達雄（大阪大学微生物病研究所教授）

要旨

HIV-1 感染症に関わる宿主因子について検討し、以下の知見を得た。(1) CCR2 64I のエイズ病態遅延効果は、バリンからイソロイシンに置換することにより細胞質内で CCR2A の安定性が増し、ヘテロオリゴマー形成による CCR5 の細胞表面発現の抑制が強まるためであることが明らかになった。(2) タイ国ランパンの HIV-1 感染者のコホートにおいてこの CCR2 の遺伝子型を決定したところ、多型 CCR2 64I は逆転写酵素阻害剤による治療効果にも影響することが明らかになった。(3) CCR2 遺伝子内の約 600 塩基の領域と CCR5 遺伝子を含む約 8100 塩基の領域の全塩基配列を日本人 50 人ならびに CCR5 delta 32 を持つ欧米人 6 名について決定した。その結果、これまで常に個別に検討され、必ずしもその相互関係が明かでなかった CCR2 と CCR5 の各遺伝的多型の相互関係が初めて明らかになった。(4) プロテアーゼ阻害薬(PI)による耐糖能異常の違いに影響する因子の候補として、peroxisome proliferators-activated receptor-gamma coactivator1 (PGC-1)の遺伝子多型と PI 投与後 1 年目の血糖値の変動との関連を調べた。その結果、PGC-1 の promoter 領域の多型と PI 投与後 1 年目の血糖値の変動に相関がみられ、この遺伝子多型を持つ患者は持たない患者に比べて血糖値が低下する傾向にあることが明らかになった。(5)ヌクレオシド系逆転写酵素阻害薬によるミトコンドリア障害の違いに影響する因子の候補として DNA ポリメラーゼの多型の有無を検討したところ、イントロン内に 1 つの 4 塩基の欠失と 3 つの SNPs を発見した。しかしこれらの多型と身体所見や末梢血単核球中 mtDNA 量の間に関連は認められなかった。(6)ケニア西部の逆転写酵素阻害剤ジドブジン(Zdv)短期投与による HIV 母子感染予防のコホート研究において、短期 ZDV 投与にもかかわらず母子感染が成立した原因が薬剤耐性ウイルスの誘導によるのか否かを検討した。その結果、児のウイルスには ZDV 耐性をひきおこすとされる既知のアミノ酸置換は認められず、ZDV 投与による母子感染予防の失敗は、耐性ウイルス出現以外の原因によることが明らかになった。

A. 研究目的

エイズの病態ならびに進行速度は感染者ごとに大きく異なり、感染後急激に CD4 陽性細胞数の減少をみる感染者から 10 年以上発症しない感染者まで様々である。また、HIV-1 感染感受性自体にも個人差が存在する。本研究は、多数の HIV-1 感染者および非感染者について、HIV-1 の生活環に関わる様々な宿主因子の遺伝的多型を検討し、病態進行や HIV-1 感染感受性の違いを決定する宿主側の

因子を明らかにすることを目的とする。また抗 HIV 薬の有効性や副作用、さらには抗 HIV-1 薬投与によって低下する HIV-1 特異的免疫反応を維持するための治療ワクチンの有効性を決定する宿主因子の同定も重要な課題である。本年度は以下の 6 点を具体的な研究目的とした。

(1) HIV-1 のマイナーなコレセプターである CCR2B の 64 番目のバリン(V)がイソロイシン(I)に置換した多型 CCR2 64I は、ヨーロッパ

パおよびアメリカの HIV-1 感染者のコホートにおいてエイズ発症の遅延と相関するが、64番目がバリンでもイソロイシンでも HIV-1 コレセプター活性もケモカインレセプター活性も違いがなく、そのエイズ発症遅延の分子機構は明らかではなかった。そこで本年度はその分子機構の解明を試みた。

(2) また、この多型のアジア人種のエイズ病態における役割をさらに詳しく解析するために、タイ国ランパン県に新たに設立された HIV-1 感染者コホートにおいて、この CCR2 64I と血清中のウイルス量との関連を検討することを目的とした。

(3) 一方、CCR5 は HIV-1 の主要なコレセプターで、欧米人特異的な 32 塩基の欠損 CCR5 delta 32、アジア人特異的な 1 塩基の欠損 CCR5 893(-)等の多型と HIV-1 感染抵抗性との関係が報告されている。また、HIV-1 感染との関係が未だ不明なコーディング領域内の多型 CCR5 668A も欧米人、アジア人に共通して存在する。CCR5 のプロモーターのハプロタイプの一つ CCR5 P1 のうち CCR5 delta 32 や CCR2 64I と連鎖しないハプロタイプは、逆に HIV-1 感染症の病態進行を加速する。さらに前述の CCR2 64I を含む CCR2 遺伝子は、CCR5 の約 15,000 塩基上流に存在する。しかし、これらの多型間の連鎖非平衡等の相互関係は明かではない。そこで、CCR5 delta 32 を持つ欧米人と持たない日本人の CCR5 遺伝子を含む約 8,100 塩基の領域の全塩基配列と CCR2 遺伝子の約 600 塩基の領域の塩基配列を決定し、CCR5 ならびに CCR2 遺伝子内の各多型間の関係を明かにす

ることを目的とした。

(4) プロテアーゼ阻害剤(PI)の長期内服によりインスリン抵抗性、高脂血症、脂肪分布異常などをもたらし、動脈硬化性疾患の増加が危惧されている。この副作用の発症・程度は感染者ごとにより異なるため、宿主側の因子が副作用発現に大きく関与している可能性がある。そこで、糖・脂質代謝に関与する因子として2型糖尿病や肥満と関連が報告されている peroxisome proliferators-activated receptor-gamma coactivator1(PGC-1)遺伝子多型とPIによる副作用発現との関係を明らかにすることを目的とした。

(5) ヌクレオシド系逆転写酵素阻害薬(Nucleoside Analogue Reverse Transcriptase Inhibitors, NRTIs)による副作用(大球性貧血、末梢神経障害、肺炎、ミオパチー、肝脂肪変性、乳酸アシドーシス等)の多くにミトコンドリア障害が関与しており NRTIs はミトコンドリア DNA (mtDNA) の唯一の合成酵素である核ゲノム由来の DNA ポリメラーゼ $\gamma$ と強い親和性を持ち、mtDNA の合成を阻害する。ポリメラーゼ $\gamma$ は $\alpha$ 、 $\beta$ の二つのサブユニットからなり、酵素活性は $\alpha$ サブユニットにある。 $\alpha$ サブユニット遺伝子は POLG と呼ばれ、23 個のエクソンにわかれている。そこで POLG 遺伝子のプロモーター領域及び 3'側のポリメラーゼ motif のある領域を中心に多型性を検索すると共に、その多型性と抗 HIV 薬による副作用との関連について検討することを目的とした。

(6) ケニア西部において短期 zidovudine (ZDV) 投与による HIV 母子感染予防のコ

ホート研究を 1996 年から 2001 年にかけて行った。このコホート研究において、HIV 感染妊婦に分娩前 1 ヶ月間逆転写酵素阻害剤 ZDV を投与することにより HIV の母子感染を約 3 分の 1 に減少させることができることを確認した。しかし、ZDV の短期投与にもかかわらず 10% 余りの児に母子感染が成立した。そこで、短期 ZDV 投与にもかかわらず母子感染が成立した原因が、薬剤耐性ウイルスの誘導によるのか否かを明らかにすることを目的とした。

## B. 研究方法

(1) CCR5 ならびに CCR2A を発現するセンダウイルスを常法に従って作成した。細胞表面の CCR5 の発現はフローサイトメトリー法で測定した。

(2) タイ国ランパン県で設立されたコホートの HIV-1 感染者 489 名の末梢血より抽出した DNA から、PCR-RFLP 法で CCR2 の遺伝子型を決定した。血清中の HIV-1 量は市販のキットで HIV-1RNA 量を定量した。

(3) CCR5 delta 32 を持つ欧米人 6 名(CCR5 delta 32 のホモ接合体 1 名とヘテロ接合体 5 名)と持たない日本人 50 名の CCR5 遺伝子を含む約 8,100 塩基の領域を PCR で増幅し、塩基配列を決定して比較した。また CCR2 遺伝子内の約 600 塩基の領域を同様に解析し、CCR2 64I の有無を決定した。

(4) PGC-1 遺伝子は染色体 4 番 p15.1 にあり、約 67,000 塩基長で、13 個の Exon から成る。東京大学医科学研究所ヒトゲノムセンターの SNPs 情報および今までに論文発表されている

SNPs 情報に基づいて、Exon, Promoter 領域を中心とした PGC-1 の SNPs 13 ヶ所を検索した。SNPs 情報に公表されているプライマーを用いて PCR 増幅し、ABI PRISM SNaPshot Multiplex Kit (PE Biosystems, Foster City, Calif. USA) を用いて SNP の有無を判定した。

(5) 1995 年から 2001 年 3 月まで、東京大学医科学研究所附属病院に通院し、抗 HIV 薬の投与を受けた HIV-1 感染症患者 35 人及び HIV-1 陰性健常コントロール 29 人の *POLG* 遺伝子の多型を検討した。*POLG* の 14 から 23 番までのエクソン、及びエクソン 1 番とプロモーター領域及びよく知られたエクソン 2 内の CAG 繰り返し配列部の塩基配列を ABI PRISM™ 377 DNA sequencer を用いて決定した。そして、認められた多型と、29 人の健常人、及び未治療時のサンプルがあった 33 人の HIV-1 感染症患者の PBMCs 中 mtDNA 量との関連を解析した。さらに多型と、治療開始後 1 年の血液学的パラメータの変化率との関連、リポアトロフィー、及び末梢神経障害の有無との関連を検討した。

(6) 短期 ZDV 投与を行ったグループの母子 3 組と、行っていないグループの母子 3 組について、末梢血リンパ球からゲノム DNA を抽出し、プロウイルス DNA の *pol* 領域の一部 (697 塩基) を PCR 法を用いて増幅した。次に、その DNA 断片をクローニングし、塩基配列を決定し、ZDV 耐性に関わる既知のアミノ酸置換の有無を調べた。また、得られた塩基配列について近隣結合法を用いて分子系統樹を作成した。

(倫理面への配慮)

HIV-1 感染者ならびに非感染者の検体を使

用するにあたって、検体の提供者には遺伝子解析を行うことを含めて十分に説明を行い、書面による同意を得られた場合のみを解析の対象とし、検体は匿名化して個人情報が特定できないようにして扱った。

### C. 研究結果

(1) CCR2 64I は、疫学的研究からエイズ病態に影響することは明らかだが、その分子機構は明らかではない。CCR2B の 64 番目のアミノ酸をバリンからイソロイシンに置換しても HIV-1 コレセプター活性もケモカインレセプター活性も変化しない。我々は CCR2 遺伝子から alternative splicing によって産生され、C 末端の細胞質内領域のみ CCR2B と異なり、主に細胞質に局在する CCR2A に着目した。CCR2A を発現させたところ、バリンの CCR2A よりイソロイシンの CCR2A の方が細胞内でより安定であった。CCR5 と共発現させたところどちらの CCR2A も CCR5 とヘテロオリゴマーを形成したが、バリンの CCR2A よりイソロイシンの CCR2A の方が CCR5 の細胞表面発現を強く阻害した。この阻害は CCR5 特異的であり、もう一つの主要なコレセプターである CXCR4 は影響を受けなかった。従って、バリンからイソロイシンに置換すると細胞質内で CCR2A の安定性が増し、細胞表面に向かおうとする CCR5 との間でヘテロオリゴマーが形成されて CCR5 の細胞表面発現が低下するものと考えられる。

(2) ランバンコホートの HIV-1 感染者 489 名の CCR2 の遺伝子型を決定したところ、18 名が CCR2 64I のホモ接合、131 名がヘテロ

接合であり、残りの 340 名が CCR2 64I を持っていなかった。血中ウイルス量との関連を調べると、CCR2 64I を持たない感染者では平均 5.02 log copy、持つ感染者では 4.79 で、CCR2 64I を持つ感染者で平均ウイルス量がわずかではあるが有意に低いことが明らかになった (P=0.01)。489 名中 144 名が逆転写酵素阻害剤の治療を受けていたが、治療群と未治療群に分けたところ、治療群においてのみ、CCR2 64I を持つ感染者の平均ウイルス量 (4.09) が持たない感染者 (4.67) よりも有意に低下していた (P=0.002)。

(3) 欧米人 6 名、日本人 50 名の CCR5 ならびに CCR2 遺伝子の塩基配列を決定したところ、多型は CCR2 遺伝子に 1 箇所 (CCR2 64I)、CCR5 遺伝子を含む約 8,100 塩基の領域に 28 箇所認められた。そのうち欧米人特異的な多型が CCR5 delta 32 を含めて 3 箇所認められた。アジア人特異的な CCR5 欠失変異 CCR5 893(-) は 100 本の日本人の染色体のうち 2 本で見出され、いずれも CCR2 64I と連鎖していた。一方、CCR5 のコーディング領域内の多型 CCR5 668A は 100 本の日本人の染色体のうち 5 本で見出され、うち 4 本が CCR2 64I と連鎖していた。しかし、もう一本は CCR2 64I と連鎖しておらず、さらに他の 4 本とは 17 箇所の多型部位が異なっていた。

CCR2 64I は 100 本の日本人の染色体のうち 35 本で見出され、過去の欧米人での報告どおりその全てが CCR5 の第 2 イントロン中の C から T への一塩基多型と連鎖していたが、この C あるいは T の多型は CCR5 のプロモーター活性に影響はなかった。

CCR5 プロモーターのハプロタイプの一つ CCR5 P1 のうち CCR5 delta 32 や CCR2 64I と連鎖しないハプロタイプは、CCR5 delta32 を含むハプロタイプと 4 箇所、CCR2 64I を含むハプロタイプと 4 箇所の多型の部位が異なるのみで、CCR2 64I を含むハプロタイプと同程度の CCR5 プロモーター活性を示した。そして、日本人に最も多く認められたハプロタイプと比較するとプロモーター活性がより高く、17 箇所の多型部位が異なっていた。従って、エイズ病態を加速するハプロタイプと遅延させるハプロタイプとがいずれも CCR5 プロモーター活性が強く、配列もむしろよく似ていることが明らかになった。

(4) HIV感染患者65人について13ヶ所のPGC-1のSNPs解析を行った。65人の患者背景は、男性55人、女性10人、未治療患者7人、PIを含む抗HIV療法を受けた患者45人であった。抗HIV療法を受けた患者のうちNelfinavir (NFV) を含む療法群で、PGC-1SNPと相関がみられた。PGC-1 promoter IMS-JST 108968の変異をもつ患者群で治療前の血糖値は野性型に比べ高値であったが、治療後1年経過後の血糖値はむしろ有意に低かった (Mann-Whitney U test  $p=0.029$ )。また統計学的な有意差に至らないもののPGC-1 Exon8の Gly482Ser とIMS-JST 108973の変異をもつ患者群で同様に血糖値が低下する傾向にあった。

(5) *POLG* 遺伝子の解析を 29 人の健常者について行ったところ、イントロン内に 1 つの 4bp の欠失、3 つの SNPs を発見した。これら 4 つの多型と既に報告のあるエクソン 2 内の

CAG の繰り返し配列部分、ならびにエクソン 23 番内の非翻訳領域のグアニンの欠失を HIV-1 感染患者 35 名について検討した。その結果、これらの多型と身体所見や末梢血単核球中 mtDNA 量に相関は認められなかった。また、35 人中 21 人 (60%) という高い頻度で、リポアトロフィー患者を認めたが、*POLG* の各多型性とリポアトロフィーの有無の間に関連を認めなかった。しかし、LDH、ALP、TC、RBC および WBC の治療開始 1 年後の変化とこれら多型性のあいだに統計学的に有意な関連を認めた。

(6) ケニアの母子感染予防コホートにおいて、母子感染が成立した児の HIV-1 の *pol* 遺伝子領域を解析した結果、短期 ZDV 投与グループと非投与グループのいずれの母親から生まれた児の HIV-1 にも ZDV 耐性をひきおこす既知のアミノ酸置換は認められなかった。一方、短期 ZDV 投与グループの母親 3 名のうち 1 名で、投与後にのみ 10 分の 1 のウイルスクローンが ZDV 耐性をひきおこす既知のアミノ酸置換を持っていた。また、短期 ZDV 非投与グループの母親 3 名のうち 2 名においても ZDV 耐性をひきおこす既知のアミノ酸置換がみられた。

#### D. 考察

(1) CCR2 64I は、アメリカおよびヨーロッパの HIV-1 感染者のコホート研究から AIDS 病態進行の遅延と明らかに相関するが、その分子機構は明らかではなかった。今回の我々の研究結果から、CCR2 遺伝子から alternative splicing によって産生され主に細胞質に局在する

CCR2A の 64 番目のアミノ酸がバリンからイソロイシンに置換すると細胞質内で CCR2A の安定性が増し、細胞表面に向かおうとする CCR5 との間でヘテロオリゴマーが形成され、CCR5 の細胞表面への発現が抑制されることが明らかになった。HIV-1 の主要なコレセプター CCR5 の細胞表面への発現が低下するために CCR2 64I を持つ感染者体内では HIV-1 の複製が低下し、そのことによってエイズ病態進行が遅延するもの、と考えられる。

(2)ランパンの HIV-1 感染者のコホートでは、治療群でのみ、CCR2 64I を持つ感染者の血清中の平均ウイルス量が持たない感染者よりも有意に低下していた。このことから、CCR2 64I は逆転写酵素阻害剤による治療効果に影響する可能性が考えられる。現在、このコホートの HIV-1 感染者をさらに追跡している。

(3)日本人ならびに欧米人の CCR2 と CCR5 遺伝子のハプロタイプを決定することにより、これまで常に個別に検討され、必ずしもその相互関係が明かでなかった CCR2 と CCR5 の各遺伝的多型の相互関係が初めて明らかになった。特にアジア人に見出される CCR5 コーディング領域内の多型の多くが CCR2 64I と連鎖していることが明らかになった。このことから、これら CCR5 コーディング領域内の多型の効果を疫学的に判定する際には、CCR2 64I の影響も考慮する必要があることが明らかになった。

一方、エイズ病態を加速する CCR5 のハプロタイプと遅延させる CCR5 のハプロタイプとがいずれもプロモーター活性が強く、配列の上でもむしろよく似ていることは、やや予

想外の結果であったが、CCR5 遺伝子進化の歴史の中で、CCR5 発現が強い場合に何らかの不利な事態が生じ、CCR5 のプロモーター活性の強いハプロタイプの中から CCR5 の発現を弱める方向への新たな変異 CCR5 delta32 や CCR5 893(-)、CCR2 64I 等が生じて、人間集団の中に蓄積していったのではないかと考えられる。

(4) PGC-1は、核内ホルモンレセプターやエネルギー産生に関わる遺伝子転写の調節の coactivatorとして働く。PGC-1が活性化されると、肝臓での糖新生に関わる主要な酵素 (phosphoenolpyruvate carboxykinase; PEPCKやglucose-6-phosphataseなど) の働きが活性化され糖新生が増加することが知られている。また、インスリンはPEPCKやPGC-1遺伝子発現をブロックすることで肝臓の糖新生を抑えると言われている。日本人におけるPGC-1遺伝子多型と2型糖尿病との関係は2002年に原らにより、PGC-1 Thr394ThrとGly482Serの変異型をもつ群で2型糖尿病との相関が報告されている。

本研究では、Thr394ThrとGly482Serの変異型をもつ群で2型糖尿病との関連は見られず、むしろNFV投与群において変異型をもつ群で血糖値が低下する傾向があり、プロモーター内の多型IMS-JST 108968の変異型を持つ群では有意差を認めた。

NFVは、3T3-L1 adipocyteを用いた研究でインスリンを介したグルコース細胞内への取り込みを障害し、lipolysisを活性化することにより高血糖、高脂血症を起こすと言われている。本研究の結果から、PGC-1の変異型



をもつとNFVの作用に何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆される。糖新生に重要なPGC-1とNFVの研究をさらにすすめることで、NFVが高血糖をもたらすメカニズムを解く糸口となるだろう。

(5)少なくとも日本人においては、POLGのプロモーター領域(-250bpまで)とエクソン1番、及びポリメラーゼmotif (a,b,c) を含む3'側のエクソン (14~23番) に、頻度の高い多型は存在せず、エクソン2内のCAGの繰り返し配列の数もほぼ均一で、この繰り返し数が、ミトコンドリアDNAを介した副作用発現と関係している可能性は低いと考えられた。また、イントロン、及びエクソン23の非翻訳領域に認められた多型と、PBMCs中のミトコンドリアDNA量、リポアトロフィー及び末梢神経障害発症の有無との関連は認められなかった。治療開始一年後の血液学的データの変化において、幾つかのパラメータとPOLG多型性との間に有意な関連を認めたが、本研究では対象者数が少なかったため、その意義に関して、現段階では不明である。

2002年に、Chenらは、7人の末梢神経障害のHIV-1感染症患者及び3人の無症状の患者において、POLGエクソン3、8、19番の配列を検討したところ、末梢神経障害の1患者と無症状の1患者において、エクソン8番にヘテロ接合体としてsilent mutationを認めたのみで多型に乏しいことを報告している。また、乳酸アシドーシスのHIV-1感染症患者三人においては、全てのエクソンをシークエンスした変異を認めなかったと報告している。POLGの多型性と抗HIV薬による副作用の関連を検

討したものは、本研究を含めて2つしか報告されていないが、どちらもスケールが小さかったため、より大きなスケールでの検討が必要であろう。

(6) ケニアの母子感染予防コホートにおいて、短期 ZDV 投与グループならびに短期 ZDV 非投与グループのいずれの児のウイルスクローンにも ZDV 耐性をひきおこすとされる既知のアミノ酸置換はみられなかった。従って、短期 ZDV 投与にもかかわらず 10% あまりの児に母子感染が起こっていた原因は ZDV 耐性ウイルスの誘導ならびに児への感染によるものではないことが示唆された。今後、HIV 母子感染ならびに小児エイズ発症に影響する宿主側因子について検討を行う予定である。

## E. 結論

(1) CCR2 64I のエイズ病態遅延効果は、バリンからイソロイシンに置換することにより細胞質内で CCR2A の安定性が増し、ヘテロオリゴマー形成による CCR5 の細胞表面発現の抑制が強まるためであることが明らかになった。

(2) タイ国ランパンの HIV-1 感染者のコホートにおいて CCR2 の遺伝子型を決定したところ、多型 CCR2 64I は逆転写酵素阻害剤による治療効果にも影響することが明らかになった。

(3) 日本人ならびに欧米人の CCR2 と CCR5 遺伝子のハプロタイプを決定することにより、これまで常に個別に検討され、必ずしもその相互関係が明かでなかった CCR2 と CCR5 の各遺伝的多型の相互関係が初めて明らかに

なった。

(4) NFV投与群におけるPGC-1の遺伝子多型をもつ患者群はNFV内服1年後の血糖値は低下傾向にあった。従ってPGC-1の遺伝子多型は、NFVが血糖値に与える影響に関与していることが示唆された。

(5)NRTIの副作用発現の標的と考えられているDNAポリメラーゼγ遺伝子の多型性について検討をした。その結果、プロモーター領域、及びエクソンの翻訳領域には多型部位を認めなかった。イントロン、及び非翻訳領域のエクソンに認められた多型部位と幾つかの血液学的パラメータとの間に関連を認めたが、これらの意義については、より大きなスケールでの検証が必要と考えられた。

(6)ケニアの母子感染予防コホートにおいて、短期 ZDV 投与にもかかわらず 10% あまりの児に母子感染が起こっていた原因は ZDV 耐性ウイルスの誘導ならびに児への感染によるものではないことが示唆された。

#### F. 健康危険情報

該当なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Jun-ichi Sakuragi, Aikichi Iwamoto, and Tatsuo Shioda. Dissociation of genomic dimerization from packaging functions and virion maturation of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 76:959-967, 2002.

2. Suda Louisirirochanakul, Huanliang Liu, Anuvat Roongpisuthipong, Emi E. Nakayama, Yutaka Takebe, Tatsuo Shioda and Chantapong Wasi. Genetic analysis of HIV-1 discordant couples in Thailand: Association of CCR2 64I homozygosity with HIV-1 negative status. *J. AIDS.* 29, 314-315, 2002.

3. Emi E. Nakayama, Laurence Meyer, Aikichi Iwamoto, Anne Persoz, Yoshiyuki Nagai, Christine Rouzioux, Jean-Francois Delfraissy, SEROCO Study Group, Patrice Debre, Dorian McIlroy, Ioannis Theodorou and Tatsuo Shioda. Protective effect of IL4 -589T polymorphism on HIV-1 disease progression: Relationship with viral load. *J. Infectious Diseases.* 185, 1183-1186, 2002.

4. Yoshihiko Hoshino, Koh Nakata, Satomi Hoshino, Yoshihiro Honda, Doris Tse, Tatsuo Shioda, William N. Rom, Michael Weiden. Maximal HIV-1 replication in alveolar macrophages during tuberculosis requires both lymphocyte contact and cytokines. *J. Exp. Med.* 195, 495-505, 2002.

5. Munehide Kano, Tetsuo Matano, Atsushi Kato, Tatsuo Shioda and Yoshiyuki Nagai. Induction of HIV-1-Specific Neutralizing Antibodies in Mice Vaccinated with a Recombinant Sendai Virus Vector. *Jpn. J. Infect. Dis.* 55, 59-60, 2002.

6. Kawana-Tachikawa A, Tomizawa M, Nunoya J, Shioda T, Kato A, Nakayama EE, Nakamura T, Nagai Y, and Iwamoto A. An efficient and versatile mammalian viral vector system for major histocompatibility complex class I/peptide complexes. *J Virol.* 76:11982-11988, 2002.
7. Murakami N, Ye Y, Kawanishi M, Aoki S, Kudo N, Yoshida M, Nakayama EE, Shioda T, Kobayashi M. New Rev-transport inhibitor with anti-HIV activity from Valerianae Radix. *Bioorg Med Chem Lett.*;12 :2807-2810, 2002.
8. Jun-Ichi Sakuragi, Shigeharu Ueda, Aikichi Iwamoto, and Tatsuo Shioda. Relationship between dimerization and packaging of HIV-1 genome RNA; a possible role of dimerization in genome packaging. *J. Virol.* In press.
9. Ohmine, T., Katsube, T., Tsuzaki, Y., Kazui, M., Kobayashi, N., Komai, T., Hagihara, M., Nishigaki, T., Iwamoto, A., Kimura, T., Kashiwase, H., and Yamashita, M. Anti-HIV-1 activities and pharmacokinetics of new arylpiperazinyl fluoroquinolones. *Bioorganic & Medical Chemistry Letters* 12:739-742, 2002.
10. Takahashi, T., Endo, T., Nakamura, T., Sakashita, H., Kimura, K., Ohnishi, K., Kitamura, Y., and Iwamoto, A. Dihydrofolate reductase gene polymorphisms in *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* in Japan. *J. Med. Microbiol.* 51:510-515, 2002.
11. Tobiume, M., Takahoko, M., Yamada, T., Iwamoto, A., and Matsuda, M. Inefficient enhancement of viral infectivity and CD4 downregulation by Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nef from Japanese long-term nonprogressors. *J. Virol.* 76:5959-5965, 2002.
12. Koibuchi, T., Takahashi, T., Nakamura, T., Suzuki, M., Minamoto, F., Oyaizu, N., Yazawa, K., Mikami, Y., and Iwamoto, A. The first isolation of *Nocardia nova* from an HIV-1 infected individual in Japan. *J. Infect. Chemother.* 8:358-360, 2002
13. Kobayashi, N., Taguchi-Nakamura, H., Goto, M., Nakamura, T., Nakamura, K., Sugiura, W., Iwamoto, A., and Kitamura, Y. Polymorphisms and haplotypes of the CD209L gene and their association with the clinical courses of HIV-positive Japanese patients. *Jpn. J. Infect. Dis.* 55:131-133, 2002.
14. Yamada, T., Kaji, N., Odawara, T., Chiba, J., Iwamoto, A., and Kitamura, Y. Proline 78 is crucial for human immunodeficiency virus type 1 Nef to down-regulate class I human-leukocyte antigen. *J. Virol.* 77:1589-1594, 2003.
15. Endo, T., Miura, T., Koibuchi, T., Nakamura, H., Takahashi, T., Odawara, T.,

- Goto, M., Aisawa, A., Iwamoto, A., and Nakamura, T. Molecular analysis of human herpesvirus 8 using single nucleotide polymorphisms in open reading frame 26. *J. Clin. Microbiol.* In press.
16. Miura, T., Goto, M., Hosoya, N., Odawara, T., Kitamura, Y., Nakamura, T., and Iwamoto, A. Depletion of mitochondrial DNA in HIV-1 infected patients and its amelioration by antiretroviral therapy. *J. Med. Virol.* In press.
17. Songok EM, Fujiyama Y, Tukei PM, Vulule JM, Kiptoo MK, Adungo NO, Kakimoto K, Kobayashi N, Genga IO, Mpoke SO, Ichimura H.: Experiences on the use of short course zidovudine to prevent perinatal transmission of HIV in rural Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* (in press).
18. Ndembu N, Yumo H, Takehisa J, Takemura T, Kobayashi E, Ngansop C, Songok EM, Miura T, Ido E, Hayami M, Kaptue L and Ichimura H.: HIV-1 infection in Pygmy hunter gatherers is from contact with Bantu rather than with nonhuman primates. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* (in press).
19. Songok EM, Lihana RW, Kiptoo MK, Lwenbe R, Genga IO, Kibaya R, Odhianmbo F, Kobayashi K, Ago Y, Ndembu N, Okoth F, Fujiyama Y and Ichimura H.: Identification of Env CRF 10 among HIV Variants Circulating in Rural Western Kenya. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 19 (2): 161-165, 2003.
20. Haga T., Shimizu Y., Okoba M., Kumabe S., Goto Y., Shinjo T., Ichimura H., Kuwata T., Hayami M. and Miura T.: Construction and in vitro properties of chimeric simian and human immunodeficiency virus with the human TNF-alpha gene. *Microbiol. Immunol.* 46 (12): 849-855, 2002.
21. Taniguchi Y, Takehisa J, Bikandou B, Mboundjelea I, N'Doundou-N'Kodia M-Y, M'Paudi OM, M'Pele P, Harada Y, Hayami M, Ichimura H., Parra HJ.: Genetic subtypes of HIV type 1 based on the *vpu/env* sequences in Republic of Congo-Brazzaville. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 18 (1):79-83, 2002.
2. 学会発表
1. Protective effect of IL4 -589T polymorphism on HIV-1 disease progression: Relationship with viral load. Emi E. Nakayama, Laurence Meyer, Aikichi Iwamoto, Anne Persoz, Yoshiyuki Nagai, Christine Rouzioux, Jean-Francois Delfraissy, SEROCO Study Group, Patrice Debre, Dorian McIlroy, Ioannis Theodorou and Tatsuo Shioda. 9 th International Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (Seattle, USA). 324-W.
2. HIV-1 ゲノム二量体化及びパッケージングに

関する解析。櫻木淳一、塩田達雄。第 50 回日本ウイルス学会学術集会（札幌）。IaA09。

3. Study of Genetic Mechanisms of HIV-1 Transmission and AIDS Pathogenesis in Thailand. Nuanjun Ruchusatsawat, Emi E. Nakayama, Archawin Rojanawiwat Panita Pathipvanich, Wattana Auwanit, Suthon Vongsheree, Kunito Yoshiike, Koya Ariyoshi, Tatsuo Shioda and Pathom Sawanpanyalert. 第 16 回日本エイズ学会学術集会（名古屋） 233。

4. Env エイズワクチンへの糖鎖欠失変異の効果。森一泰、杉本智恵、保富康宏、草川茂、武部豊、中山英美、塩田達雄、永井美之。第 15 回日本エイズ学会学術集会（名古屋）。250。

5. 小林永治、Nicaise NDEMBI、武久 盾、竹村太地郎、井戸栄治、速水正憲、市村 宏：カメルーンにおいては HIV 感染が HBV 感染、特に genotype E の感染に影響を与えている、第 50 回日本ウイルス学会学術集会総会、札幌、2002 年 10 月 16-18 日。

6. 武久 盾、Nicaise NDEMBI、竹村太地郎、Elijah SONGOK、喜多佳世子、小林かな、井戸栄治、三浦智行、速水正憲、市村 宏：PCR 法を用いた新型 HIV 検出システムの確立、第 16 回日本エイズ学会総会、名古屋、2002 年 11 月 28-30 日。

7. 喜多佳世子、Nicaise NDEMBI、武久 盾、Raphael LIHANA, Elijah SONGOK、小林かな、竹村太地郎、井戸栄治、三浦智行、速水正憲、市

村 宏：コンゴ民主共和国における HIV-1 流行株の分子系統解析、第 16 回日本エイズ学会総会、名古屋、2002 年 11 月 28-30 日。

8. Raphael LIHANA, Elijah SONGOK、武久 盾、Nicaise NDEMBI、小林かな、喜多佳世子、大石 功、藤山佳秀、市村 宏：Genetic subtypes of HIV-1 among the patients with sexually transmitted diseases (STD) in Nairobi, Kenya、第 16 回日本エイズ学会総会、名古屋、2002 年 11 月 28-30 日。

9. Nicaise NDEMBI、武久 盾、竹村太地郎、小林永治、井戸栄治、三浦智行、速水正憲、市村 宏：HIV-1 infection in pygmy "hunter gatherers" is from contact with Bnatu rather than from contact with non-human primates、第 16 回日本エイズ学会総会、名古屋、2002 年 11 月 28-30 日。

10. Elijah SONGOK、Rukia KIBAYA、武久 盾、Raphael LIHANA、小林かな、Nicaise NDEMBI、喜多佳世子、小林伸好、藤山佳秀、市村 宏：Evolution of HIV-1 in a dually infected individual: appearance and dominance of intersubtype recombination form、第 16 回日本エイズ学会総会、名古屋、2002 年 11 月 28-30 日。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得 該当なし。
2. 実用新案登録 該当なし

エイズ病態進行に関わる宿主因子の解明に関する研究

主任研究者 塩田 達雄（大阪大学微生物病研究所教授）

要旨

HIV-1 の主要なコレセプターCCR5 とマイナーなコレセプターCCR2 の遺伝子多型について検討し、以下の知見を得た。(1) CCR2 の 64 番目のバリン(V)がイソロイシン(I)に置換した多型 CCR2 64I は、ヨーロッパおよびアメリカの HIV-1 感染者のコホートにおいてエイズ発症の遅延と相関することが報告されているが、64 番目がバリンでもイソロイシンでも HIV-1 コレセプター活性もケモカインレセプター活性も違いがなく、そのエイズ発症遅延の分子機構は明らかではなかった。我々は CCR2 遺伝子から alternative splicing によって産生され、C 末端の細胞質内領域のみ CCR2B と異なり、主に細胞質に局在する CCR2A に着目し、バリンとイソロイシンの違いを検討した。その結果、CCR2 64I のエイズ病態遅延効果は、バリンからイソロイシンに置換することにより細胞質内で CCR2A の安定性が増し、ヘテロオリゴマー形成による CCR5 の細胞表面発現の抑制が強まるためであることが明らかになった。(2) タイ国ランパンの HIV-1 感染者のコホートにおいてこの CCR2 の遺伝子型を決定したところ、多型 CCR2 64I は逆転写酵素阻害剤による治療効果にも影響することが明らかになった。(3) CCR2 および CCR5 遺伝子には、CCR2 64I の他、CCR5 delta 32(欧米人特有)、CCR5 893(-)(アジア人特有)、CCR5 P1 など HIV-1 感染に影響する種々の多型が知られているが、それらの相互関係は必ずしも明らかではなかった。そこで知られている多型部位全てを含むハプロタイプ解析を行うために、CCR2 遺伝子内の約 600 塩基の領域と CCR5 遺伝子を含む約 8100 塩基の領域の全塩基配列を日本人 50 人ならびに CCR5 delta 32 を持つ欧米人 6 名について決定した。その結果、これまで常に個別に検討され、必ずしもその相互関係が明かではなかった CCR2 と CCR5 の各遺伝的多型の相互関係が初めて明らかになった。

A. 研究目的

エイズの病態ならびに進行速度は感染者ごとに大きく異なり、感染後急激に CD4 陽性細胞数の減少をみる感染者から 10 年以上発症しない感染者まで様々である。また、HIV-1 感染感受性自体にも個人差が存在する。本研究は、多数の HIV-1 感染者および非感染者について、HIV-1 の生活環に関わる様々な宿主因子の遺伝的多型を検討し、病態進行や HIV-1 感染感受性の違いを決定する宿主側の因子を明らかにすることを目的とする。また抗 HIV 薬の有効性や副作用、さらには抗

HIV-1 薬投与によって低下する HIV-1 特異的免疫反応を維持するための治療ワクチンの有効性を決定する宿主因子の同定も重要な課題である。本年度は以下の 3 点を具体的な研究目的とした。

(1) HIV-1 のマイナーなコレセプターである CCR2B の 64 番目のバリン(V)がイソロイシン(I)に置換した多型 CCR2 64I は、ヨーロッパおよびアメリカの HIV-1 感染者のコホートにおいてエイズ発症の遅延と相関し、アジア人種では HIV-1 の感染感受性にも影響するが、64 番目がバリンでもイソロイシンでも HIV-

1 コレセプター活性もケモカインレセプター活性も違いがなく、そのエイズ発症遅延の分子機構は明らかではなかった。そこで本年度はその分子機構の解明を試みた。

(2) また、この多型のアジア人種のエイズ病態における役割をさらに詳しく解析するために、タイ国ランパン県に新たに設立された HIV-1 感染者コホートにおいて、この CCR2 64I と血清中のウイルス量との関連を検討することを目的とした。

(3) 一方、CCR5 は HIV-1 の主要なコレセプターで、欧米人特異的な 32 塩基の欠損 CCR5 delta 32、アジア人特異的な 1 塩基の欠損 CCR5 893(-)等の多型と HIV-1 感染抵抗性との関係が報告されている。また、HIV-1 感染との関係が未だ不明なコーディング領域内の多型 CCR5 668A も欧米人、アジア人に共通して存在する。CCR5 のプロモーターのハプロタイプの一つ CCR5 P1 のうち CCR5 delta 32 や CCR2 64I と連鎖しないハプロタイプは、逆に HIV-1 感染症の病態進行を加速すること、が知られている。さらに前述の CCR2 64I を含む CCR2 遺伝子は、CCR5 の約 15,000 塩基上流に存在する。しかし、CCR5 delta 32 と CCR2 64I とが同一染色体上に存在しないこと以外には、これらの多型間の相互関係は明かではない。そこで、CCR5 delta 32 を持つ欧米人と持たない日本人の CCR5 遺伝子を含む約 8,100 塩基の領域の全塩基配列と CCR2 遺伝子の約 600 塩基の領域の塩基配列を決定し、CCR5 ならびに CCR2 遺伝子内の各多型間との関係を明かにすることを目的とした

## B. 研究方法

(1) CCR5 ならびに CCR2A を発現するセンダイウイルスを常法に従って作成した。細胞表面の CCR5 の発現はフローサイトメトリー法で測定した。

(2) タイ国ランパン県で設立されたコホートの HIV-1 感染者 489 名の末梢血より抽出した DNA から、PCR-RFLP 法で CCR2 の遺伝子型を決定した。血清中の HIV-1 量は市販のキットで HIV-1RNA 量を定量した。

(3) CCR5 delta 32 を持つ欧米人 6 名 (CCR5 delta 32 のホモ接合体 1 名とヘテロ接合体 5 名) と持たない日本人 50 名の CCR5 遺伝子を含む約 8,100 塩基の領域を PCR で増幅し、ABI377 シーケンサーで直接塩基配列を決定して比較し、多型の位置を決定した。そして、複数の多型が同一染色体上に存在するか否かを明かにするために PCR 産物をクローン化して塩基配列を決定し、一部はアレル特異的 PCR を行った。また CCR2 遺伝子内の約 600 塩基の領域を同様に解析し、CCR2 64I の有無を決定した

(倫理面への配慮)

HIV-1 感染者ならびに非感染者の検体を使用するにあたって、検体の提供者には遺伝子解析を行うことを含めて十分に説明を行い、書面による同意を得られた場合のみを解析の対象とし、検体は匿名化して個人情報が特定できないようにして扱った。

## C. 研究結果

(1) CCR2 64I は、疫学的研究からエイズ病態に影響することは明らかだが、その分子機構

は明らかではない。CCR2B の 64 番目のアミノ酸をバリンからイソロイシンに置換しても HIV-1 コレセプター活性もケモカインレセプター活性も変化しない。我々は CCR2 遺伝子から alternative splicing によって産生され、C 末端の細胞質内領域のみ CCR2B と異なり、主に細胞質に局在する CCR2A に着目した。CCR2A を発現させたところ、バリンの CCR2A よりイソロイシンの CCR2A の方が細胞内でより安定であった。CCR5 と共発現させたところどちらの CCR2A も CCR5 とヘテロオリゴマーを形成したが、バリンの CCR2A よりイソロイシンの CCR2A の方が CCR5 の細胞表面発現を強く阻害した。この阻害は CCR5 特異的であり、もう一つの主要なコレセプターである CXCR4 は影響を受けなかった。従って、バリンからイソロイシンに置換すると細胞質内で CCR2A の安定性が増し、細胞表面に向かおうとする CCR5 との間でヘテロオリゴマーが形成されて CCR5 の細胞表面発現が低下するものと考えられる。

(2)ランパンコホートの HIV-1 感染者 489 名の CCR2 の遺伝子型を決定したところ、18 名が CCR2 64I のホモ接合、131 名がヘテロ接合であり、残りの 340 名が CCR2 64I を持っていないかった。血中ウイルス量との関連を調べると、CCR2 64I を持たない感染者では平均 5.02 log copy、持つ感染者では 4.79 で、CCR2 64I を持つ感染者で平均ウイルス量がわずかではあるが有意に低いことが明らかになった ( $P=0.01$ )。489 名中 144 名が逆転写酵素阻害剤の治療を受けていたが、治療群と未治療群に分けたところ、治療群においての

み、CCR2 64I を持つ感染者の平均ウイルス量 (4.09) が持たない感染者 (4.67) よりも有意に低下していた ( $P=0.002$ )。

(3)欧米人 6 名、日本人 50 名の CCR5 ならびに CCR2 遺伝子の塩基配列を決定したところ、多型は CCR2 遺伝子に 1 箇所(CCR2 64I)、CCR5 遺伝子を含む約 8,100 塩基の領域に 28 箇所認められた。そのうち欧米人特異的な多型が CCR5 delta 32 を含めて 3 箇所認められた。そしてこれらの多型により、15 種類のハプロタイプが存在することが明らかになった。日本人染色体で最も多く見出されたハプロタイプ H1 は、既知のエイズ病態の遅延や加速と関連する多型を一切含まないハプロタイプで、100 本中 35 本見出された。アジア人特異的な CCR5 欠失変異 CCR5 893(-)は 100 本の日本人の染色体のうち 2 本で見出され、いずれも CCR2 64I と連鎖していた (H8)。一方、CCR5 delta 32 を持つ欧米人の染色体 7 本は、過去の報告どおりいずれも CCR2 64I と連鎖していなかった。CCR5 のコーディング領域内の多型 CCR5 668A は 100 本の日本人の染色体のうち 5 本で見出された。うち 4 本が解析した範囲では全く同一の配列でかつ CCR2 64I と連鎖していた (H7)。しかし、もう一本は CCR2 64I と連鎖しておらず、さらに他の 4 本とは 17 箇所の多型部位が異なっていた (H2)。

CCR2 64I は 100 本の日本人の染色体のうち 35 本で見出され、過去の欧米人での報告どおりその全てが CCR5 の第 2 イントロン中の C から T への一塩基多型と連鎖していた。そこで、この C あるいは T の多型を含んだ



CCR5 プロモーターをルシフェラーゼ遺伝子と結合させ Jurkat T 細胞と U937 単球細胞に導入してこれらの細胞でのプロモーター活性を測定したが、この多型の有無により CCR5 のプロモーター活性は変化しなかった。一方、日本人染色体 100 本中 35 本を占めるハプロタイプ H1 の CCR5 プロモーター活性は、CCR2 64I を含むハプロタイプの CCR5 プロモーター活性よりも低かった。

CCR5 プロモーターのハプロタイプの一つ CCR5 P1 のうち CCR5 delta 32 や CCR2 64I と連鎖しないハプロタイプは、日本人では 19 本、欧米人では 4 本の染色体上に見出された (H11)。この H11 は CCR5 delta32 を含むハプロタイプ H15 と 4 箇所、CCR2 64I を含むハプロタイプ H6 と 4 箇所の多型の部位が異なるのみで、CCR2 64I を含むハプロタイプ H6 と同程度の CCR5 プロモーター活性を示した。そして、CCR5 プロモーター活性の弱いハプロタイプ H1 とは 17 箇所の多型部位が異なっていて、エイズ病態を加速するハプロタイプ H11 と遅延させるハプロタイプ H15, H6, H7, H8 とがいずれも CCR5 プロモーター活性が強く、配列の上でもむしろよく似ていることが明らかになった。

#### D. 考察

(1) CCR2 64I は、アメリカおよびヨーロッパの HIV-1 感染者のコホート研究から AIDS 病態進行の遅延と明らかに相関するが、その分子機構は明らかではなかった。今回の我々の研究結果から、CCR2 遺伝子から alternative splicing によって産生され主に細胞質に局在する

CCR2A の 64 番目のアミノ酸がバリンからイソロイシンに置換すると細胞質内で CCR2A の安定性が増し、細胞表面に向かおうとする CCR5 との間でヘテロオリゴマーが形成され、CCR5 の細胞表面への発現が抑制されることが明らかになった。HIV-1 の主要なコレセプター CCR5 の細胞表面への発現が低下するために CCR2 64I を持つ感染者体内では HIV-1 の複製が低下し、そのことによってエイズ病態進行が遅延するもの、と考えられる。

(2) ランパンの HIV-1 感染者のコホートでは、治療群でのみ、CCR2 64I を持つ感染者の血清中の平均ウイルス量が持たない感染者よりも有意に低下していた。このことから、CCR2 64I は逆転写酵素阻害剤による治療効果に影響する可能性が考えられる。現在、このコホートの HIV-1 感染者をさらに追跡している。

(3) 日本人ならびに欧米人の CCR2 と CCR5 遺伝子のハプロタイプを決定することにより、これまで常に個別に検討され、必ずしもその相互関係が明かではなかった CCR2 と CCR5 の各遺伝的多型の相互関係が初めて明らかになった。特にアジア人に見出される CCR5 コーディング領域内の多型の多くが CCR2 64I と連鎖していることが明らかになった。このことから、これら CCR5 コーディング領域内の多型の効果を疫学的に判定する際には、CCR2 64I の影響も考慮する必要があることが明らかになった。

一方、エイズ病態を加速する CCR5 のハプロタイプと遅延させる CCR5 のハプロタイプとがいずれもプロモーター活性が強く、配列の上でもむしろよく似ていることは、やや予

想外の結果であったが、CCR5 遺伝子進化の歴史の中で、CCR5 発現が強い場合に何らかの不利な事態が生じ、CCR5 のプロモーター活性の強いハプロタイプの中から CCR5 の発現を弱める方向への新たな変異 CCR5 delta32 や CCR5 893(-)、CCR2 64I 等が生じて、人間集団の中に蓄積していったのではないかと考えられる。

#### E. 結論

CCR2 64I のエイズ病態遅延効果は、バリオンからイソロイシンに置換することにより細胞質内で CCR2A の安定性が増し、ヘテロオリゴマー形成による CCR5 の細胞表面発現の抑制が強まるためであることが明らかになった。

タイ国ランパンの HIV-1 感染者のコホートにおいて CCR2 の遺伝子型を決定したところ、多型 CCR2 64I は逆転写酵素阻害剤による治療効果にも影響することが明らかになった。

日本人ならびに欧米人の CCR2 と CCR5 遺伝子のハプロタイプを決定することにより、これまで常に個別に検討され、必ずしもその相互関係が明かでなかった CCR2 と CCR5 の各遺伝的多型の相互関係が初めて明らかになった。

#### F. 健康危険情報

該当なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Dissociation of genomic dimerization from packaging functions and virion maturation of human immunodeficiency virus type 1. Jun-ichi Sakuragi, Aikichi Iwamoto, and Tatsuo Shioda. *J. Virol.* 76:959-967, 2002.

2. Genetic analysis of HIV-1 discordant couples in Thailand: Association of CCR2 64I homozygosity with HIV-1 negative status. Suda Louisirotnachanakul, Huanliang Liu, Anuvat Roongpisuthipong, Emi E. Nakayama, Yutaka Takebe, Tatsuo Shioda and Chantapong Wasi. *J. AIDS.* 29, 314-315, 2002.

3. Protective effect of IL4 -589T polymorphism on HIV-1 disease progression: Relationship with viral load. Emi E. Nakayama, Laurence Meyer, Aikichi Iwamoto, Anne Persoz, Yoshiyuki Nagai, Christine Rouzioux, Jean-Francois Delfraissy, SEROCO Study Group, Patrice Debre, Dorian McIlroy, Ioannis Theodorou and Tatsuo Shioda. *J. Infectious Diseases.* 185, 1183-1186, 2002.

4. Maximal HIV-1 replication in alveolar macrophages during tuberculosis requires both lymphocyte contact and cytokines. Yoshihiko Hoshino, Koh Nakata, Satomi Hoshino, Yoshihiro Honda, Doris Tse, Tatsuo Shioda, William N. Rom, Michael Weiden. *J. Exp. Med.* 195, 495-505, 2002.

5. Induction of HIV-1-Specific Neutralizing Antibodies in Mice Vaccinated with a Recombinant Sendai Virus Vector. Munehide Kano, Tetsuo Matano, Atsushi Kato, Tatsuo Shioda and Yoshiyuki Nagai. Jpn. J. Infect. Dis. 55, 59-60, 2002.

6. An efficient and versatile mammalian viral vector system for major histocompatibility complex class I/peptide complexes. Kawana-Tachikawa A, Tomizawa M, Nunoya J, Shioda T, Kato A, Nakayama EE, Nakamura T, Nagai Y, and Iwamoto A. J Virol. 76:11982-11988, 2002.

7. Murakami N, Ye Y, Kawanishi M, Aoki S, Kudo N, Yoshida M, Nakayama EE, Shioda T, Kobayashi M. New Rev-transport inhibitor with anti-HIV activity from Valerianae Radix. Bioorg Med Chem Lett.;12 :2807-2810, 2002.

8. Relationship between dimerization and packaging of HIV-1 genome RNA; a possible role of dimerization in genome packaging. Jun-ichi Sakuragi, Shigeharu Ueda, Aikichi Iwamoto, and Tatsuo Shioda. J. Virol. In press.

## 2. 学会発表

1. Protective effect of IL4 -589T polymorphism on HIV-1 disease progression: Relationship with viral load. Emi E. Nakayama, Laurence Meyer, Aikichi Iwamoto, Anne Persoz,

Yoshiyuki Nagai, Christine Rouzioux, Jean-Francois Delfraissy, SEROCO Study Group, Patrice Debre, Dorian McIlroy, Ioannis Theodorou and Tatsuo Shioda. 9 th International Conference on Retrovirues and Opportunistic Infections (Seattle, USA). 324-W.

2. HIV-1 ゲノム二量体化及びパッケージングに関する解析。櫻木淳一、塩田達雄。第 50 回日本ウイルス学会学術集会（札幌）。IaA09。

3. Study of Genetic Mechanisms of HIV-1 Transmission and AIDS Pathogenesis in Thailand. Nuanjun Ruchusatsawat, Emi E. Nakayama, Archawin Rojanawiwat Panita Pathipvanich, Wattana Auwanit, Suthon Vongsheree, Kunito Yoshiike, Koya Ariyoshi, Tatsuo Shioda and Pathom Sawanpanyalert. 第 16 回日本エイズ学会学術集会（名古屋） 233。

4. Env エイズワクチンへの糖鎖欠失変異の効果。森一泰、杉本智恵、保富康宏、草川茂、武部豊、中山英美、塩田達雄、永井美之。第 15 回日本エイズ学会学術集会（名古屋）。250。

## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし

厚生科学研究費補助金（創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業）  
分担研究報告書

エイズ治療薬の有効性と副作用に関わる宿主因子の解明

分担研究者 岩本 愛吉 東京大学医科学研究所 教授

研究要旨

抗 HIV 療法は HIV 感染者/エイズ患者の予後を著しく改善したが、抗 HIV 薬の長期服用による副作用が問題となっている。プロテアーゼ阻害薬 (PI) では、耐糖能異常、高脂血症、リポアトロフィーなどの副作用が問題となっている。糖・脂質代謝に関与する因子として peroxisome proliferators-activated receptor-gamma coactivator1 (PGC-1) をコードする 13 ヶ所の遺伝子多型を調べた。このうち promoter 領域の遺伝子多型 (IMS-JST 108968) と Nelfinavir 投与後 1 年目の血糖値の変動に相関がみられた。この遺伝子多型を持つ患者は、持たない患者に比べて血糖値が低下する傾向にあった。これは、今までに知られている Nelfinavir によるインスリン抵抗性および細胞内への糖取り込み障害と反する結果であり、PGC-1 の遺伝子多型が Nelfinavir の糖代謝に対する作用に何らかの影響を及ぼしていることが示唆された。

ヌクレオシド系逆転写酵素阻害薬 (NRTI) はミトコンドリア障害を起こすことが知られており、その標的は DNA ポリメラーゼ $\gamma$ と考えられている。DNA ポリメラーゼ $\gamma$ の多型性を 29 人の健常人において検索し、イントロン内に 1 つの 4bp の欠失、3 つの SNPs を発見した。これら 4 つの多型と NCBI の SNP データベースに 2002 年に追加されたエクソン 23 番内の非翻訳領域のグアニンの欠失と身体所見や末梢血単核球中 mtDNA 量に相関は認められなかった。しかし、いくつかの血液学的パラメータで、治療開始 1 年後の変化とこれら多型性のあいだに関連を認めた。より大きなスケールでの検討が必要と考えられた。

A. 研究目的

プロテアーゼ阻害剤 (PI) の長期内服によりインスリン抵抗性、高脂血症、脂肪分布異常などをもたらし、動脈硬化性疾患の増加が危惧されている。この副作用の発症・程度は感染者ごとにより異なるため、宿主側の因子が副作用発現に大きく関与している可能性がある。そこで、糖・脂質代謝に関与する因子として 2 型糖尿病や肥満と関連が報告されている peroxisome proliferators-activated receptor-gamma coactivator1 (PGC-1) 遺伝子の多型性を検索した。PGC-1 の遺伝子多型と臨床データ、副作用発現について検討・比較した。  
ヌクレオシド系逆転写酵素阻害薬 (Nucleoside

Analogue Reverse Transcriptase Inhibitors, NRTIs) による副作用 (大球性貧血、末梢神経障害、膵炎、ミオパチー、肝脂肪変性、乳酸アシドーシス等) の多くにミトコンドリア障害が関与していると考えられており、最近特に問題となっているリポジストロフィー (特に顔面、四肢末梢の脂肪織減少であるリポアトロフィー) もミトコンドリア障害が関与しているのではないかと考えられている。NRTIs はミトコンドリア DNA (mtDNA) の唯一の合成酵素である DNA ポリメラーゼ $\gamma$  (核ゲノム由来) と強い親和性を持ち、mtDNA の合成を阻害することでミトコンドリアの機能を障害し、エネルギー産生を減少させ、細胞障害