

第 3 回接種用

年 月 日	アフエレーシス 単核球分離、凍結 TRC にスケジュールを連絡
Day 1 年 月 日	単核球解凍 付着 30 分間 (RPMI) 付着 12-24 時間 (完全培地)
Day 2 年 月 日	GM-CSF、IL4 入り完全培地、7 日間 培養
Day 9 年 月 日	TNF α 添加、24 時間培養
Day 10 年 月 日	ペプチド添加、12-16 時間培養
Day 11 年 月 日	細胞回収 表面抗原解析 患者への接種

第4回接種用

年	月	日
---	---	---

アフエレーシス
単核球分離、凍結
TRC にスケジュールを連絡

Day 1	年	月	日
-------	---	---	---

単核球解凍
付着 30 分間 (RPMI)
付着 12-24 時間 (完全培地)

Day 2	年	月	日
-------	---	---	---

GM-CSF、IL4 入り完全培地、7 日間
培養

Day 9	年	月	日
-------	---	---	---

TNF α 添加、24 時間培養

Day 10	年	月
--------	---	---

ペプチド添加、12-16 時間培養

Day 11	年	月
--------	---	---

細胞回収
表面抗原解析
患者への接種

第 5 回接種用

年 月 日	アフェレーシス 単核球分離、凍結 TRC にスケジュールを連絡
Day 1 年 月 日	単核球解凍 付着 30 分間 (RPMI) 付着 12-24 時間 (完全培地)
Day 2 年 月 日	GM-CSF、IL4 入り完全培地、7 日間 培養
Day 9 年 月 日	TNF α 添加、24 時間培養
Day 10 年 月 日	ペプチド添加、12-16 時間培養
Day 11 年 月 日	細胞回収 表面抗原解析 患者への接種

第 6 回接種用

年	月	日
---	---	---

アフエレーシス
単核球分離、凍結
TRC にスケジュールを連絡

Day 1	年	月	日
-------	---	---	---

単核球解凍
付着 30 分間 (RPMI)
付着 12-24 時間 (完全培地)

Day 2	年	月	日
-------	---	---	---

GM-CSF、IL4 入り完全培地、7 日間
培養

Day 9	年	月	日
-------	---	---	---

TNF α 添加、24 時間培養

Day 10	年	月
--------	---	---

ペプチド添加、12-16 時間培養

Day 11	年	月
--------	---	---

細胞回収
表面抗原解析
患者への接種

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

分担研究報告書

HIV 感染及び HIV 感染症の病態に関わるヒトゲノム多型性の研究

分担研究者 塩田 達雄（大阪大学微生物病研究所教授）

研究要旨

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) HIV-1 の主要なコレセプター CCR5 の発現を抑制するサイトカイン IL4 のプロモーター内多型 IL4 -589T は、フランス人 HIV-1 感染者集団においてエイズ発症の遅延と相関する。本年度は、タイ国ランパンの HIV-1 感染者コホートにおいてこの遺伝子多型を解析した。その結果、女性においてのみ、IL4 -589T のホモ接合の感染者において、ヘテロ接合や野生型の感染者と比べ、有意に血清中の HIV-1 量が低く、CD4 細胞数が多いことが明らかになった。本コホートにおいては、男性感染者の多くが登録された時点ですでにエイズを発症しており、特に感染初期にエイズ発症遅延効果を示すと考えられる IL4 -589T の効果が男性では認められなかったものと思われる。

(2) HIV-1 はカニクイザル、アカゲザル等の旧世界サルには感染せず、ワクチン開発の上で大きな障害になっている。旧世界サルの細胞には HIV-1 の細胞侵入直後の過程を阻害する因子が存在するものと考えられているが、その HIV-1 感染抵抗性因子の同定を目標とし、サル細胞の DNA を HIV-1 感染感受性細胞に導入して感染抵抗性の細胞株を作出できるか否かを検討した。その結果、HIV-1 感染感受性が低下した細胞株が得られ、サル細胞の持つ HIV-1 感染抵抗性を、DNA トランスフェクションにより感染感受性細胞に付与できたことが示唆された。現在、組み込まれたサルゲノムの構造を解析している。

A. 研究目的

HIV 感染症の病態進行は感染者ごとに大きく異なる。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。このような因子が明らかにできれば、各 HIV-1 感染者の予後予測に役立つだけで

なく、その因子を標的とした新しい HIV-1 制御の戦略を提示できると考えている。本年度は以下の二つを具体的な研究目的とした。

(1) タイ国ランパン県に設立された HIV-1 感染者コホートにおいて、先に本分担研究者らが HIV-1 感染症の病態進行の遅延と相関することを見出した IL4 プロモーター内

の遺伝子多型 IL4 -589T を解析し、この遺伝子多型と血清中のウイルス量ならびに CD4 陽性 T 細胞数との関連を明らかにすることを目的とした。

(2) HIV-1 はカニクイザル、アカゲザル等の旧世界サルの細胞には感染せず、ワクチン開発の大きな障害となっている。旧世界サルの細胞には HIV-1 の細胞侵入直後の過程を阻害する因子が存在するものと考えられている。その HIV-1 感染抵抗性因子の同定を目標とし、本年度は、サル細胞の DNA を HIV-1 感染感受性細胞に導入することにより、サル細胞の感染抵抗性の表現形を感染感受性細胞に付与できるか否かを明らかにすることを目的とした。

B . 研究方法

(1) タイ国ランパンのコホートに登録された HIV-1 感染者 595 名について、IL4 遺伝子多型を PCR-RFLP 法で解析した。CD4 細胞数ならびに血清中のウイルス量は常法により測定し、ノンパラメトリックな Kruskal-Wallis の方法で統計学的検定を行った。

(2) チミジンキナーゼ活性を欠損するハムスター由来の TK-TS13 細胞は、水疱性口内炎ウイルスの糖タンパク質 (VSV-G) を用いた HIV-1 ベクターに感受性を示す。この TK-TS13 細胞に、アフリカミドリザル腎臓由来の CV1 細胞の全 DNA を導入して形質転換し、VSV-G を用いて単純ヘルペス型ウイルスの チミジンキナーゼ遺伝

子を発現する HIV-1 ベクターを感染させ、BudR でチミジンキナーゼ陰性細胞を選別した。得られた生残細胞の中から HIV-1 感染感受性が確かに低下した細胞株をさらに GFP を発現する HIV-1 ベクターを用いて選別した。

(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特定できないようにして扱った。ランパンにおける HIV-1 感染者のコホート研究はタイ国政府の倫理委員会から 1999 年 12 月に承認を得た。

C . 研究結果

(1) タイ国ランパンの 595 名の HIV-1 感染者の IL4 遺伝子多型を決定したところ、IL4-589T のホモ接合が 364 名、ヘテロ接合が 207 名、IL4 -589C のホモ接合が 24 名で、多型の頻度は 78.6% にものぼり、タイにおいてはこの遺伝子多型が多く存在することが明らかになった。IL4 -589T の多型と、それぞれの感染者がコホートに登録された時点での血清中の HIV-1 量との関連を解析したところ、女性おいてのみ、IL4 -589T のホモ接合の感染者で平均 4.71 log copy、ヘテロ接合の感染者で 4.89、IL4 -589C のホモ接合の感染者で 5.07 であり、IL4 -589T を持っているとは有意に血清中の

HIV-1量が低いことが明らかになった (P=0.016)。またCD4細胞数も、ホモ接合の感染者で平均302個/ μ l、ヘテロ接合で264個、IL4-589Cのホモ接合で224個であり、IL4-589Tを持っていると有意にCD4細胞数が多かった (P=0.040)。

(2)チミジンキナーゼ遺伝子を発現するHIV-1ベクターを感染させ、BudRで選別して得た生細胞の一部は、確かにGFPを発現するHIV-1ベクターの感染感受性が低下していた。最近、サル細胞をサイクロスポリンAで処理するとHIV-1感染感受性が回復することが報告されたが、今回得られたHIV-1/GFP感染感受性の低下した細胞をサイクロスポリンAで処理すると、サル細胞と同様に、HIV-1/GFPの感染感受性が回復した。従ってこの細胞株にはサル細胞の持つHIV-1感染抵抗性因子が導入されたものと考えられる。

D. 考察

(1)タイ国ランパンのコホートにおいては、男性感染者の多くが登録された時点で既にエイズを発症しており、特に感染初期にエイズ発症遅延効果を示すと考えられるIL4-589Tの効果は男性では認められなかったものと思われる。現在、このコホートのHIV-1感染者をさらに追跡している。

(2)サル細胞の持つHIV-1感染抵抗性を、DNAトランスフェクションにより感染感受性細胞に付与できたことが示唆された。現在、組み込まれたサルゲノムの構造を解

析している。

E. 結論

(1)タイ国ランパン県のHIV-1感染者のコホートにおいて、女性においてのみIL4-589Tが血清中HIV-1量の低値ならびにCD4陽性細胞数の高値と相関することが明らかになり、先に著者らがフランス人HIV-1感染者の解析からエイズ発症の遅延と相関することを見出したこの多型がタイにおいてもエイズ発症を抑制する方向に働く可能性が示唆された。

(2)サル細胞の持つHIV-1感染抵抗性を、DNAトランスフェクションにより感染感受性細胞に付与できたことが示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Sakuragi, J., Ueda, S., Iwamoto, A. and Shioda, T. Possible role of dimerization in Human Immunodeficiency virus type 1 genome packaging. *J. Virol.* 77:4060-4069 (2003).

Matano, T., Kano, M., Takeda, A., Nakamura, H., Nomura, N., Furuta, Y., Shioda, T. Nagai, Y. No significant enhancement of protection by Tat-expressing Sendai viral

vector-booster in a macaque AIDS model. *AIDS*. 17:1392-1394 (2003).

Nakayama, E. E., Tanaka, Y., Nagai, Y., Iwamoto, A. and Shioda, T. A CCR2-V64I polymorphism affects stability of CCR2A isoform. *AIDS*. In press.

2. 学会発表

Nakayama, E. E., Tanaka, Y., Nagai, Y., Iwamoto, A. and Shioda, T. A CCR2-V64I polymorphism affects stability of CCR2A isoform. 2003 International Meeting of the Institute of Human Virology (Baltimore). Abstract 209 (2003).

HIV-1 ゲノム二量体化に関する解析。櫻木淳一、塩田達雄。第 51 回日本ウイルス学会学術集会 (京都)。WS08-03。

CCR2 遺伝子多型とエイズ病態進行遅延効果。中山英美、田中勇悦、岩本愛吉、永井美之、塩田達雄。第 51 回日本ウイルス学会学術集会 (京都)。IIaA02。

HIV-1 ゲノム二量体化およびパッケージングに関する解析。櫻木淳一、塩田達雄。第 17 回日本エイズ学会学術集会 (神戸)。001。

糖鎖欠失 SIV の新規 attenuated virus としての性質。杉本智恵、保富康宏、塩田達

雄、山本直樹、永井美之、森一泰。第 17 回日本エイズ学会学術集会 (神戸)。106。

Env エイズワクチンにおける糖鎖の重要性。森一泰、杉本智恵、中山英美、塩田達雄、草川 茂、武部 豊、保富康宏、永井美之。第 17 回日本エイズ学会学術集会 (神戸)。111。

ヒト樹状細胞への遺伝子導入効率の検討：センダイウイルスベクターとアデノウイルスベクターの比較。細谷紀彰、三浦聡之、立川愛、塩田達雄、小田原隆、中村哲也、北村義浩、狩野宗英、加藤篤、弘中孝史、長谷川護、永井美之、岩本愛吉。第 17 回日本エイズ学会学術集会 (神戸)。195。

CCR2 遺伝子多型のエイズ病態進行遅延効果。中山英美、田中勇悦、岩本愛吉、永井美之、塩田達雄。第 17 回日本エイズ学会学術集会 (神戸)。260。

HIV 母子感染および病態進行に影響を及ぼす宿主因子の検討。小林かな。Songok Eliah、Lwembe Raphael、大石功、影山誠二、塩田達雄、木村和子、市村宏。第 17 回日本エイズ学会学術集会 (神戸)。262。

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。

ゲノム多型性及び株化T細胞による長期未発症者の研究

分担研究者 三間屋 純一 静岡県立こども病院血液腫瘍科

研究要旨

20年に渡ってフォローアップしてきた日本人 HIV-1 感染血友病患者の長期未発症者およびその対象群のコホートから患者の個人情報情報を十分に保護管理しつつ検体を収集し、共同研究などにより検体の有効利用を最大限にはかっている。

さらに、このコホートの検体から Herpesvirus saimiri を用いて T細胞を 305 株樹立し、その中の 114 株で HIV-1 増殖抑制効果が認められた。この増殖抑制因子はウイルス吸着以降に働き、IFN 以外の物質であり、未知の抑制因子の存在が推定された。

A. 研究目的

20年に渡ってフォローアップしてきた日本人 HIV-1 感染血友病患者の長期未発症者およびその対象群のコホートから患者の個人情報情報を十分に保護管理しつつ検体を収集し、共同研究などにより検体の有効利用を最大限にはかり、エイズ発症阻止因子を明らかにし、その結果を患者に還元するための検討をする。

B. 研究方法

以下の研究はすべて下記の倫理面に配慮しておこなっている。

HIV-1 感染以来主治医によりフォローされている日本人 HIV-1 感染血友病患者について、三間屋らは 1995 年以来厚生労働省の班会議などで長期未発症者の調査をおこない、その主治医とともにコホートを確立した。今回はそのコホートを用いて、患者の理

解と協力の下、主治医に血液を採取していただき、その検体の匿名化、処理、保存、管理をおこない、共同研究に供与する体制を整えている。

また、共同研究の一つとして、エイズ発症遅延因子の検索のため、患者リンパ球から Herpesvirus saimiri により株化 Tリンパ球を樹立して、その培養上清中の抗 HIV 活性を VSV-G Env pseudotype HIV-1 の系により Luciferase 活性を測定し、上清が HIV 増殖抑制効果を示す T細胞株を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成 13 年 3 月 29 日 文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号）を遵守して遂行されている。検体の採取にあたっては、上記指針を遵守した研究計画について検体処理施設と検体提供施設の両

方の倫理委員会で審査・承認を受けている。さらに、研究対象者には、その人権擁護上の配慮や研究方法による研究対象者に対する不利益・危険性の排除などを、口頭と文書で十分説明して、研究対象者からインフォームド・コンセントを文書で得た後、採血し、匿名化を徹底した後、採血検体の処理・保存をおこなっている。共同研究者がそれらの検体のヒト遺伝子について解析をおこなう場合には共同研究者が所属する施設で研究内容について倫理委員会での審査・承認などを受けている。

C. 研究結果

日本人の HIV-1 感染血友病者の長期未発症者とその対照群のコホートを確立し、現時点で 117 例の検体を収集・保存している。これまでに集まった検体は、HIV-1 に感染してから 16 年以上の間、抗 HIV 薬未使用、臨床的にエイズ未発症、CD4 数が $500/\mu\text{l}$ 以上の長期未発症者の検体は 19 例、同様の期間、抗 HIV 薬未使用、臨床的にエイズ未発症だが、CD4 数が $500/\mu\text{l}$ 未満 $350/\mu\text{l}$ 以上の slow progressor の検体が 15 例、CD4 数が $350/\mu\text{l}$ 未満の slow progressor の検体が 10 例である。さらに、抗 HIV 薬を使用中または使用経験のある HIV-1 感染血友病者で、CD4 数が $500/\mu\text{l}$ 以上、 $500/\mu\text{l}$ 未満 $350/\mu\text{l}$ 以上、 $350/\mu\text{l}$ 未満の患者の検体は、これまでのところそれぞれ 11 例、10 例、15 例集まっている。さらに、血友病以外の

HIV-1 感染者、HIV-1 に感染していない血友病患者、HIV-1 に感染しておらず血友病でもない健康人の検体が 9 例、18 例、10 例集まっている。現在さらに検体収集を続けている。(当院高嶋能文医師・山梨大照沼裕博士との共同研究)

これらの検体は長期未発症者のトランスクリプトーム解析(渡辺慎哉分担研究者報告書参照)や株化 T リンパ球の培養上清中の抗 HIV-1 複製抑制因子の検索など、8 件の共同研究に有効利用されている。

株化 T リンパ球の培養上清中の抗 HIV-1 複製抑制因子の検索については、このコホートの患者検体 33 例から Herpesvirus saimiri を用いて T 細胞を 305 株樹立した。その内、209 株が CD4 陽性 T 細胞で、96 例が CD8 陽性 T 細胞であった。それらの細胞株培養上清について HIV-1 増殖活性に及ぼす影響を pseudovirus の系で測定し、増殖活性が 30% 以下となったものを増殖抑制効果があるとした場合、305 株中 114 株 (37%) の培養上清で HIV-1 増殖抑制効果を認めた。そのうち、85 株が CD4 陽性 T 細胞、29 例が CD8 陽性 T 細胞であった。その培養上清中の interferon (IFN) α , β , ω 量を ELISA で測定したが、いずれも検出限界以下であり、また、それらの検出限界値では標準品を使用した実験では増殖抑制活性を認めないことを確認した。さらに、培養上清中の IFN γ についても測定したが、その濃度では説明できない増殖抑制効果が上清中

に認められた。(山梨大山下篤哉博士との共同研究)

D. 考察

この日本人 HIV-1 感染血友病者のコホートは検体収集時で最低 16 年、現在は 20 年以上にわたりフォローアップが続けられている非常に良く管理されているコホートであり、大変貴重である。その中には長期未発症者も含まれており、エイズ発症阻止の機序を検索するために共同研究により多角的な検討が進められている。

トランスクリプトーム解析については、解析に多量の RNA が必要であり、HIV-1 感染者の少量の血液検体からリンパ球の大量培養法を新たに確立したので、現在新しい方法で症例を増やすための検体収集を継続している。

また、HIV-1 の吸着以降の過程で作用している HIV 増殖抑制因子を分泌する T 細胞株を 114 株確立し、ウイルスの吸着以降の過程での増殖抑制活性を CD4 陽性 T リンパ球 209 株中 85 株 (41%)、CD8 陽性 T リンパ球 96 株中 29 株 (30%) で検出した。この抑制活性は既知のサイトカインでは説明できず、未知の抑制因子の存在が推定された。

今後、これらの検討に基づき、感染者の予後をいかに改善していくかを検討していきたい。

E. 結論

日本人の HIV-1 感染長期未発症者

とその対照群のコホートから、現時点で 117 例の検体 (長期未発症者 19 例を含む) を収集・保存し、複数の共同研究により、その有効利用がはかられている。

さらに、このコホートの検体から Herpesvirus saimiri を用いて T 細胞を 305 株 (209 株が CD4 陽性 T 細胞、96 例が CD8 陽性 T 細胞) が樹立された。HIV-1 増殖抑制効果を細胞株培養上清中に認める CD4 陽性または CD8 陽性 T 細胞株が確立され、IFN 以外の未知の抑制因子の存在が推定された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

とう学文、照沼裕、山下篤哉、葛西宏威、加藤真吾、斉藤有紀、小田原史知、高嶋能文、花房秀次、藤井輝久、石川正明、酒井道生、白幡聡、岡慎一、高橋義博、池田柊一、三浦琢磨、松田重三、伊藤正彦、三間屋純一：エイズ長期未発症から発症にいたる際のウイルス産生動態 第 17 回日本エイズ学会、2003 年 11 月。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

分担研究報告書

DNA マイクロアレイを用いたエイズ発症阻止の研究

分担研究者 渡辺 慎哉 東京医科歯科大学・客員助教授

研究要旨

エイズ発症の阻止・遅延に関与する宿主因子遺伝子の同定を目標として、独自に改良・開発した技術に基づいた合成 DNA マイクロアレイ・システムを用いて、HIV 感染長期未発症者 (LTNP) を含む HIV 感染者由来リンパ球サンプルを中心とした対象について、ゲノムワイドでの遺伝子発現解析を行った。41 サンプルから得られた遺伝子発現プロファイルより LTNP3 例に共通した発現レベルを示した遺伝子 (21 種類) のみの情報を抽出し、全サンプル間クラスタ分析を行ったところ、LTNP3 例と HIV 非感染者 1 例からなる群が、残りの 37 例からなる群と明確に二分化されることがあきらかになった。同様の解析を slow progressor についておこなったところ、共通する遺伝子数が少なく、かつ、それらの遺伝子について全サンプル間のクラスタ分析を行っても他との明確な二分化はできなかった。これらの結果は、LTNP 群と発症群で発現レベルに差のある 21 遺伝子を絞り込むことができたことを示している。しかしながら、LTNP がわずかに 3 例であることから、完全な結論を得るには LTNP の解析数をさらに増やすことが要求されると判断する。

A. 研究目的

1. 本研究は、HIV 感染者由来の試料を中心にゲノムワイドでの遺伝子発現解析を行うことにより、エイズ発症機構の解明を目指すとともに、HIV 感染長期未発症者の末梢血単核細胞由来試料のトランスクリプトーム解析を行い、発症の阻止・遅延に関与する宿主因子遺伝子の同定を目指す。
2. 本研究の最大の特徴は独自に改良・開発した技術に基づいた合成 DNA マイクロアレイ・システムを用いるところにある。この技術を用いれば、マイクロアレイ化する遺伝子を自由自在に選定、遺伝子数を容易に増加、低コス

トで大量のアレイを作製できる。分担研究者 (渡辺) は平成 14 年内までに合成 DNA マイクロアレイ技術に関する 6 件の特許申請を行った。これらの出願特許をもとに大量のマイクロアレイを作製し、可能な限り数多くの遺伝子を対象としてトランスクリプトーム解析が可能である。

3. 平成 14 年度までに、22,656 ヒト遺伝子を搭載した合成 DNA マイクロアレイを用いて、LTNP4 例を含む 56 検体の末梢単核細胞由来培養細胞の遺伝子発現プロファイルの取得を完了し、LTNP 特異的な発現パターンを示す可能性のある遺伝子候補を含む遺伝子群として 58 遺伝子を

特定した。しかしながら、平成 15 年度は、リンパ球の培養方法とマイクロアレイのハイブリダイゼーション方法に大きな技術革新が生じたことにより、前年度までのデータとの直接比較が困難となったため、サンプルの再調製およびそれらについて遺伝子プロファイルの再取得を行うことを第一の目標とした。さらに、年度末までにヒト遺伝子 28,800 遺伝子に対応するプローブを同一領域内に集積した合成 DNA マイクロアレイを作製し、28,800 遺伝子を対象とした発現プロファイル取得を開始することを次なる目標とした。

4. 最終的に、本研究は、エイズの発症阻止・遅延因子を明らかにすることにより、すでに HIV に感染してしまった多くの患者の発症阻止に貢献することを目標とする。

B. 研究方法（倫理面への配慮）

1. 合成 DNA マイクロアレイの大量作製

平成 14 年度中にすでにアレイ化の完了したヒト遺伝子 22,656 種類に、新たに 6,414 種類を追加し、総計 28,800 遺伝子をマイクロアレイ化した（28.8K アレイ、平成 15 年 12 月末に完成）。

2. HIV 感染者および非感染者からのサンプル調製

HIV 感染者および非感染者の末梢血から単核細胞を分画し、抗 CD3/CD28 抗体ビーズおよび IL-2 存在下で培養後、mRNA を抽出した。これらの RNA を、22 種類の細胞株の mRNA を等量ずつ混合したレファレンスを対照としてマイクロアレイ（28.8K アレイの完成までは 22,656 遺伝子アレイを使用）にハイブリダイズ（平成 15 年夏にシステム的大幅な高感度化を達成）させ、発現プロファイリングを得た。

（倫理面での配慮）

HIV 感染者からサンプル提供をうけるにあ

っては、共同研究者の山梨大学・照沼裕博士が個人情報の保全に十分留意した上で担当各機関の倫理委員会の了承を受けており、問題ないと判断した。照沼博士は、平成 13 年三省合同（文部科学省・厚生労働省・経済産業省）「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従い、12 年度倫理審査委員会で受けた研究計画の審査・承認に加え、三省合同基準を満たすように変更を加えて再承認を得た。また、患者主治医の所属施設の倫理委員会での審査・承認、その所属施設長からの研究協力許可書、主治医からの研究協力承諾書を得た。さらに、患者への文書と口頭で研究内容を説明し、研究協力を了解していただいた方から同意書を得た。

C. 研究結果

1. HIV 感染者の末梢単核細胞のトランスクリプトーム解析

LTNP3 サンプルを含む 41 サンプル（平成 15 年 1 月からリンパ球培養方法が変更になったため、変更後のサンプルだけを対象を限定した）について、平成 15 年夏に大幅な高感度化が完了したハイブリダイゼーション・システムと 22,656 遺伝子アレイを用いてヒト遺伝子発現プロファイルの取得を行った。22,656 遺伝子の内、共通レファレンスに対して少なくとも 2 倍以上あるいは 1/2 倍以下に発現レベルの変化を示した遺伝子は、13,305 種類であった。次に、全 41 サンプルについて各遺伝子の平均発現比を算出し、その値から少なくとも 1.68 倍以上または 1/1.68 倍以下に発現レベルの変化を示した遺伝子を抽出したところ、11,429 遺伝子が特定できた。この 11,429 遺伝子からなるデータ集合体から、LTNP3 例すべてで共通して 1.68 倍以上および 1/1.68 倍以下となる遺伝子群を抽出したところ、21 遺伝子が特定され、それらについて 41 サンプルのサンプル間クラスタ分析を行ったところ、LTNP3 例と

HIV 非感染者 1 例からなる群が、残りの 37 例からなる群と明確に二分化されることがあきらかになった。同様の解析を slow progressor についておこなったところ、共通する遺伝子数が少なく、かつ、それらの遺伝子についてサンプル間のクラスタ分析を行っても他との明確な二分化はできなかった。

D. 考察

1. HIV 感染者の末梢単核細胞のトランスクリプトーム解析

22,656 遺伝子を対象とした本年度の解析結果から、LTNP 群と発症群で発現レベルに差のある 21 遺伝子を絞り込むことができたといえる。しかしながら、LTNP がわずかに 3 例であることから、完全な結論を得るには LTNP の解析数をさらに増やすことが要求されると判断する。また、これまでは末梢単核細胞由来の培養細胞をそのままの状態に溶解して mRNA サンプルを調製してきたが、これに加えて異なる条件、たとえば外部からなにかの化学的・生物学的刺激を加えることにより、その条件に対する細胞応答の差異をトランスクリプトームの視点から調べていくような研究戦略が必要かもしれない。

2. 達成度について

独自のマイクロアレイ・システムの構築は計画通りすすみ、来年度中にはゲノムワイドの解析が可能となる予定である。また、あらゆる実験工程についての条件検討によりプロファイリングデータの再現性も安定してきており、数多くの異なるサンプルを並行して解析できる見通しが十分についた。HIV 感染者のサンプル取得に関しては、得に LTNP の検体収集およびサンプル調製が当初の計画よりもかなり遅れており、今後の課題である。

3. 研究結果の学術的・国際的・社会的意義につ

いて

HIV 感染後の LTNP と発症例との違いを大規模に解析する研究も他に例がない。これは、照沼裕博士の掌握している血友病罹患者を中心とした協力者集団の存在と数に制限なく使用できる合成 DNA マイクロアレイ・システムの存在がともにあって初めて可能となった本研究班の高い独自性を示すものである。

4. 今後の展望について

LTNP のサンプルをできる限り増やして対照群と比較することが今後もっとも重要な課題である。解析対象サンプル数をできるだけ大きくする事により、個人差・培養実験誤差等の様々なノイズを含む膨大なデータエレメントから構成されるトランスクリプトーム解析結果から LTNP に特異的な発現プロファイルを示す遺伝子群がより明確に浮かび上がってくるのではないかと予想する。

E. 結論

22,656 ヒト遺伝子からなる合成 DNA マイクロアレイを用いて、LTNP3 例を含む 41 検体の末梢単核細胞由来培養細胞の遺伝子発現プロファイルの取得・解析を完了し、LTNP 群と発症群で発現レベルに差のある遺伝子群 (21 遺伝子) を特定した。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Kanamori M, Watanabe S, Honma R, Kuroda M, Imai S, Takada K, Yamamoto N, Nishiyama Y, Kawaguchi Y. Epstein-Barr virus nuclear antigen leader protein induces expression

of thymus and activation-regulated chemokine in B cells. J Virol. (2004) in press.

- (2) Ito E, Honma R, Imai J, Azuma S, Kanno T, Mori S, Yoshie O, Nishio J, Iwasaki H, Yoshida K, Gohda J, Inoue J, Watanabe S, Semba K. A Tetraspanin-Family Protein, T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia-Associated Antigen 1, Is Induced by the Ewing's Sarcoma-Wilms' Tumor 1 Fusion Protein of Desmoplastic Small Round-Cell Tumor. Am J Pathol. (2003) 163 (6) :2165-72.

2. 学会発表

- (1) 渡辺慎哉 ウイルス感染細胞のトランスクリプトーム：宿主遺伝子とウイルス遺伝子の包括的発現解析 第 51 回日本ウイルス学会学術集会・総会 シンポジウム
- (2) 渡辺慎哉 各種正常および株化細胞におけるサイトメガロウイルスと宿主遺伝子の同時並行トランスクリプトーム解析 第 51 回日本ウイルス学会学術集会・総会

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許出願（予定を含む）

なし

ヒトとマウスのゲノム比較による HIV 感染・エイズ発症阻止の研究

分担研究者 宮澤 正顯（近畿大学医学部 教授）

研究要旨 マウスレトロウイルス感染時に中和抗体産生の有無を制御する非MHCの宿主遺伝子を、第15染色体上にマッピングした。これと相同なヒト22染色体領域に存在する多型性マーカーについて、イタリア及びタイコホートの HIV-1 曝露非感染者と HIV-1 感染者集団、及び非感染健康者の遺伝子型を比較した。その結果、HIV-1 曝露非感染者集団に有意に高い頻度で集積する遺伝子型の存在を見出した。また、第22染色体を横断する連鎖不平衡を解析した結果、HIV-1 曝露非感染者集団でのみ、22q13.1 領域と 22q13.2 領域の間で連鎖不平衡が不連続となっていた。このことから、ヒトに HIV-1 に対する免疫学的抵抗性を誘導する遺伝子が、第22染色体 22q12-13 領域に存在する可能性が示唆された。

A. 研究目的

これまで HIV-1 感染に対する自然抵抗性を付与する宿主遺伝子として、HIV の細胞側レセプターであるケモカインレセプターおよびそのリガンド分子の遺伝的多型性が明らかにされてきた。しかし、ケモカインレセプター発現欠損の頻度は低く、イタリア・タイ・アフリカで把握されてきた HIV-1 曝露非感染者では、ケモカインレセプター遺伝子異常のホモ接合体はほとんど報告されていない。一方、我々がマウスの第15染色体上にマップしたレトロウイルス感染時の中和抗体産生を制御する宿主遺伝子について、そのヒトホモログが存在すると考えられる第22染色体上の多型性マーカーの遺伝子型が、HIV-1 曝露非感染者群と HIV-1 感染者群で異なる可能性が示唆された。そこで本研究では、マウス第15染色体上のレトロウイルス中和抗体産生制御遺伝子を分子同定し、それと相同なヒト第22染色体上の遺伝子が HIV-1 曝露非感染状態の成立に果たす役割を明らかにすることを最終目的とした。

B. 研究方法

1) HIV 感染状態非一致カップルコホートを用いたゲノム解析

イタリア(フィレンツェ地区)およびタイ(ランバン地区)の HIV-1 感染者・HIV-1 曝露非感染者カップルより末梢血単核球を採取し、第22染色体上の複数の多型性マーカー遺伝子について、PCR 増幅断片のフラグメント解析により、その遺伝子型を同定した。得られた遺伝子型の頻度が HIV-1 曝露非感染者グループと HIV-1 感染者グループで異なるか否かを客観的に解析し、同時に多重比較に関する補正を行うため、parametric bootstrap 法によるコンピュータ解析を開発した(文部科学省統計数理研究所・藤澤洋徳助教授との共同研究)。

また、第22染色体を横断する連鎖不平衡の有無について、likelihood ratio test によるコンピュータ解析を行った。

2) トランスジェニックマウス作製のための細菌人工染色体(BAC)コンテグ作製

マウス側については、第15染色体内約2.8Mbpの範囲に、感染早期の中和抗体産生を制御する遺伝子の存在部位をマップしている。そこで、この範囲を重複してカバーするBACクローンについて、その内部に存在する多型性マーカー遺伝子を PCR 法で確認し、ゲノムデータベース上の遺伝子配列と BAC クローン上のそれを比較検討して、全ての既知遺伝子と ORF を切れ目無く網羅するコンテグの構築を試みた。

【倫理面への配慮】

イタリアおよびタイの HIV 感染状態非一致カップルコホートについては、それぞれの施設の倫理委員会による許可を受けた上で、書面による研究目的の説明と署名による同意を得てゲノム解析のための末梢血採血を行った。両コホートからの連結可能匿名化サンプルを用いたヒトゲノム遺伝子解析の実施については、近畿大学医学部ゲノム倫理委員会より許可を得た(「HIV 曝露非感染状態を制御する宿主遺伝子の解析」、平成15年5月27日許可)。

動物実験は、わが国の関連法規及び近畿大学医学部共同研究施設・実験動物共同研究室の規約を遵守し、疼痛の防止に配慮し、動物愛護の精神に則って行った。

C. 研究結果

1) HIV-1 曝露非感染者と HIV-1 感染者の遺伝子多型の解析

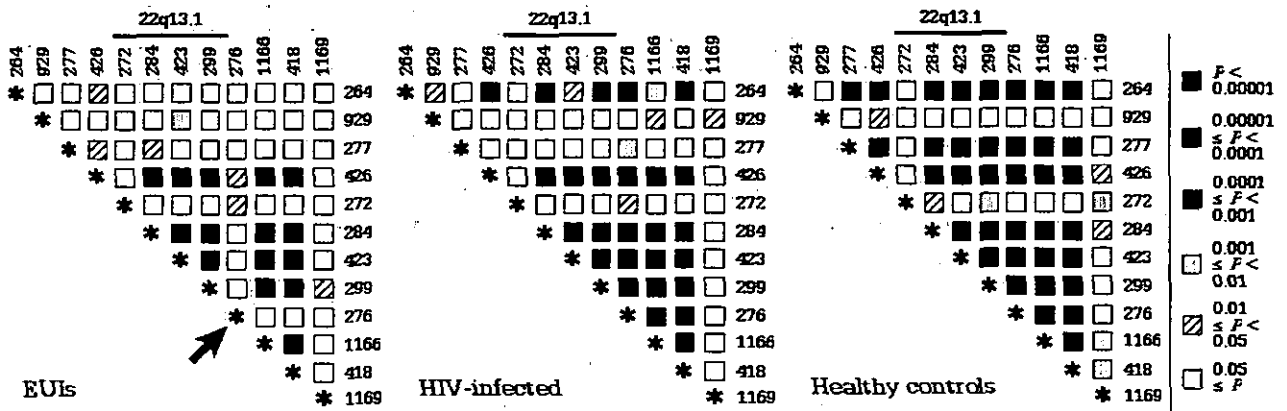


図 1. 第22染色体を横断する連鎖不平衡の、HIV-1 曝露非感染者集団における分析

第22染色体上の多型性マーカー遺伝子座について、HIV-1 曝露非感染者集団 (EUIs)、HIV-1 感染者集団 (HIV-infected)、及び同一地区健常者 (Healthy controls) の遺伝子型を決定し、Arlequinソフトウェアを用いて likelihood ratio 法による連鎖不平衡の解析を行った。遺伝子座間の連鎖不平衡の程度を色で示す。

イタリアコホートの HIV-1 感染状態非一致カップルについては、HIV-1 曝露非感染者42名、それらの HIV-1 感染パートナーと同一地区の HIV-1 感染者合計49名、および健常人47名を対象として、第22染色体上の13の多型性 STS マーカーについてその遺伝子型を決定した。得られた遺伝子型一覧を parametric bootstrap 法により客観的に比較解析した結果、22q12.2 に位置する D22S277 遺伝子座について、HIV-1 曝露非感染者では対立遺伝子 156 または 158 を持つ者の頻度が HIV-1 感染者群或いは健常者群のおよそ4倍高く、多重比較に関する補正後も統計的に有意であること(補正後 $p = 0.038-0.045$)、22q13.1 に位置する D22S423 についても、対立遺伝子 229 の頻度が HIV-1 曝露非感染者群で HIV-1 感染者群の4倍以上高く、多重比較に関する補正後も統計的に有意差があること(補正後 $p = 0.032$)が明らかになった。また、第22染色体を横断する連鎖不平衡を調べると、HIV-1 感染者群および健常者群では 22q13.1 の D22S284 から 22q13.2 の D22S1166 に至る連鎖不平衡が認められるが、HIV-1 曝露非感染者群ではこの領域の連鎖不平衡が 22q13.1 と 22q13.2 の境界部に近い D22S276 で分断されていた(図1)。

タイ・ランパンのコホートについても、HIV-1 曝露非感染者154名と HIV-1 感染者75名について、同様の遺伝子型決定を遂行した。予備的な解析で、D22S276 の遺伝子型に群間の頻度差を見出している。

- 2) BAC コンティグの作製と候補遺伝子存在領域の ORF 一覧作製
- マウスでレトロウイルス中和抗体産生制御遺伝子

の存在範囲を限定した D15Mit1~D15Mit18 の領域について、これを重複してカバーする24クローンの BAC でコンティグを形成することに成功した(図2)。既に、中和抗体産生能を欠く(BALB/c × A)F₁ マウスの受精卵に、中和抗体産生能を持つ B6 マウスの BAC を導入することに成功している。また、この領域に存在する全ての既知遺伝子と機能未知の ORF を網羅した一覧を作製し、発現解析のための DNA チップを作製した。そこで、中和抗体産生能を持つ(B6 × A)F₁ 及びこれを欠く A マウスにフレンド白血病レトロウイルスを感染後、経時的に脾臓の RNA を抽出して、現在候補遺伝子存在領域の mRNA 発現量を系統間で比較中である。

D. 考察

イタリアコホートの HIV-1 曝露非感染者に関する免疫学的解析で、曝露非感染者の大半が尿道または腔粘液中に HIV-1 抗原と反応する IgA クラスの抗体を持つこと、またこれら非感染者の抹消血単核球が HIV-1 Env ペプチドの刺激により IFN- γ を産生することが示されている。血清中の抗 HIV-1 IgG 非存在下で粘液中に IgA が検出されるのは一件奇妙な現象であるが、最近インフルエンザウイルスの感染系やワクチン投与の実験系で、粘膜免疫系と全身免疫系の活性化の乖離が示されており、ノックアウトマウスを用いた実験でも IgG 産生に要する抗原提示シグナルと IgA 産生に要するそれとが異なることが示唆されていることから、HIV-1 曝露非感染者では、HIV-1 に対する粘膜免疫応答のみを特に強く誘導するような抗原提示シグナル系が活性化されている可能性がある。

我々がマウスの実験系で見出したレトロウイルス中和抗体産生制御遺伝子は、MHC とは無関係な第15染色体上にあり、MHC と協調して T リンパ球の活性化に関与する遺伝子であると考えべき証拠がある。また、この遺伝子の作用は明らかに中和抗体のクラススイッチも促進する。従って、マウスで我々が見出した遺伝子のヒトホモログが、HIV-1 感染では粘膜免疫応答の制御に関与するとしても大きな矛盾はないと考える。

イタリアコホートで観察された HIV-1 曝露非感染

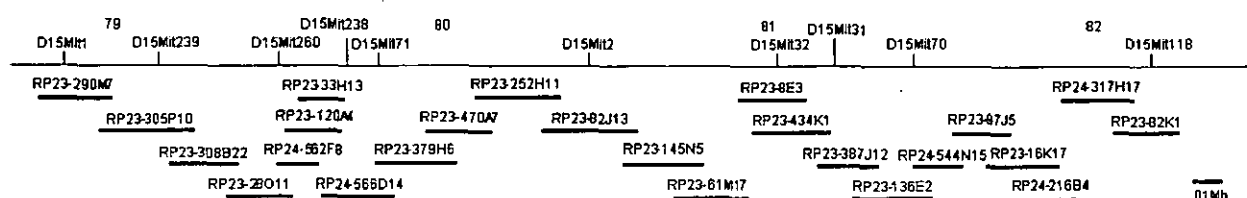


図 2. レトロウイルス産生制御遺伝子をマップしたマウス15染色体領域をカバーする細菌人工染色体(BAC)のコンテイング

これらを順次(BALB/c×A)F₁ マウス受精卵に導入中である。

者群と HIV-1 感染者群の遺伝子多型の相違は、多重比較を考慮しても統計的に有意である上、丁度同じ領域で HIV-1 曝露非感染者群にのみ染色体を横断する連鎖不平衡の分断が見られた。このことは、HIV-1 曝露非感染者の祖先でのみ、第22染色体 22q13.1 領域周辺で遺伝子変異或いは染色体の組換えが起こったとの仮説と矛盾しない。

この染色体領域に存在する多型性機能遺伝子の分子同定が急務であり、今後マウス側とヒト側の両面から DNA マイクロアレイを用いた発現解析を進めたい。

E. 結論

HIV-1 曝露非感染状態に相関する多型性遺伝子マーカーを、ヒト第22染色体上に見出した。また、その存在部位の近くで、第22染色体を横断する連鎖不平衡が、HIV-1 曝露非感染者群のみで途切れていることを見出した。従って、この領域(22q12-13)に、HIV-1 曝露後早期に粘膜抗 HIV-1 IgA 産生を誘導するような免疫調節性の遺伝子が存在する可能性がある。

F. 健康危険情報

該当するもの無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Sugahara, D., S. Tsuji-Kawahara, and M. Miyazawa. Identification of a protective CD4⁺ T-cell epitope in the p15^{gag} of Friend murine leukemia virus and the role of the MA protein targeting to the plasma membrane for its immunogenicity. *J. Virol.* in press, 2004.

2) Tahara, H., N. Iwanami, N. Tabata, H. Matsumura, T. Matsuura, T. Kurita, and M. Miyazawa. Both T and non-T cells with proliferating potentials are effective in inducing suppression of allograft responses by alloantigen-specific intravenous presensitization combined with suboptimal doses of 15-deoxyspergualin. *Transplant Immunol.* in

press, 2004.

3) Matano, T., M. Kobayashi, H. Igarashi, A. Takeda, H. Nakamura, M. Kano, C. Sugimoto, K. Mori, A. Iida, T. Hirata, M. Hasegawa, T. Yuasa, M. Miyazawa, Y. Takahashi, M. Yasunami, A. Kimura, D. H. O'Connor, D. I. Watkins, and Y. Nagai. Cytotoxic T lymphocyte-based containment of simian immunodeficiency virus replication in a preclinical AIDS vaccine trial. *submitted for publication*, 2003.

4) Kanari, Y., M. Clerici, H. Abe, H. Kawabata, D. Trabottoni, S. Locaputo, F. Mazzotta, H. Fijisawa, A. Niwa, C. Ishihara, Y. A. Takei, and M. Miyazawa. Genotypes at chromosome 22q are associated with HIV-exposed but uninfected status in Italians. *submitted for publication*, 2003.

2. 学会発表

1) Miyazawa, M. Genetic basis for resistance against retroviral infections: mouse models to gene chips. Thai NIH, Lampang Hospital, Milano University, Kinki University Joint Meeting on Resistance to HIV Infection and Disease Progression. Nonthaburi, Thailand. October 13-14, 2003.

2) 小川達也、湯浅貴恵、松村治雄、宮澤正顯. マウスレトロウイルス感染初期におけるNK細胞の活性化機構. 第33回日本免疫学会総会・学術集会(福岡). 2003年12月8-10日. 日本免疫学会総会・学術集会記録 33:145, 2003.

3) 河俣浩之、河原(辻)佐智代、宮澤正顯. マウスレトロウイルスの持続感染を制御する宿主因子. 第33回日本免疫学会総会・学術集会(福岡). 2003年12月8-10日. 日本免疫学会総会・学術集会記録 33:298, 2003.

4) 菅原大輔、河原(辻)佐智代、宮澤正顯. マウスレトロウイルス Gag 蛋白上の感染防御エピトープの同定. 第33回日本免疫学会総会・学術集会(福岡). 2003年12月8-10日. 日本免疫学会総会・学術集会記録 33:298, 2003.

H. 知的所有権の出願・登録状況

Miyazawa, M. and M. Clerici, inventors. Marker Genes (HIV 曝露非感染状態と相関する遺伝的マーカーとその応用). 国際特許出願 PCT/GB2003/004493.

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

分担研究報告書

HIV 特異的 CTL とその機能の研究

分担研究者 滝口 雅文（熊本大学エイズ学研究センター・ウイルス制御分野・教授）

研究協力者 上野 貴将（熊本大学エイズ学研究センター・ウイルス制御分野・助手）

研究要旨：HIV 感染者由来の T 細胞株を再スクリーニングして、HIV に特異性を持ちながらも、HIV 感染細胞を殺傷しない CTL の同定に成功した。T 細胞の活性化に関わる因子を解析したところ、この CTL では T 細胞レセプターと抗原との結合が強すぎるために、T 細胞の活性化がかえって減弱してしまい、結果として HIV 感染細胞に応答しなくなったことを明らかとした。HIV 特異的 CTL の抗ウイルス活性の喪失が、TCR の抗原認識レベルで起きることを示した研究は初めてで、HIV の CTL からの逃避に新たな視点を与える。

A. 研究目的

CD8 陽性の細胞傷害性 T 細胞（CTL）は、HIV 感染細胞の排除に大きな役割を担うが、HIV はさまざまな方法で CTL から逃避するため、適切な化学療法をしない限り、ほぼすべての HIV 感染者はエイズを発症する。この原因としてはこれまでに HIV の変異獲得、Nef タンパク質による HLA クラス I 分子の発現抑制、末梢 CD8 T 細胞の分化・成熟異常が提唱されているが、未だその全容は明らかではない。一方、T 細胞の抗原認識の質的な違いは、T 細胞の機能に大きな影響を与えることが知られている。そこで我々は、HIV 特異的 CTL の T 細胞レセプター（TCR）の抗原認識の質が、CTL の HIV 感染細胞に対する傷害活性に与える影響を解析し、HIV による CTL 回避の新たな機構を明らかとする。

B. 研究方法

HIV 感染患者から調製した末梢リンパ球を、HIV 由来抗原ペプチドで刺激して、多数の HIV 特異的な T 細胞株を樹立した。樹立した T 細胞株から TCR 遺伝子をクローニングして、可変領域の構造を決定した。さらに、TCR の可変領域に特異的な抗体を用いて、抗原特異的な T 細胞

の亜集団をフローサイトメトリーで解析した。T 細胞の機能的な側面については、ペプチドをパルスした細胞あるいは HIV 感染細胞をターゲットとして、HLA クラス I 拘束性かつエピトープ特異的な細胞傷害活性と抗ウイルス性サイトカインの発現活性を測定した。

（倫理面への配慮）

共同研究先の国際国立医療センターおよび熊本大学において、研究計画を前もって提出するとともに、該当する倫理審査委員会で認可を受けた方法に従って研究を進めている。

C. 研究結果

我々はこれまでに多数の HIV 特異的 CTL クローンを HIV 慢性感染者の末梢リンパ球から樹立しているが、このことは HIV 慢性感染者では HIV 特異的 CTL 活性が低下していることと矛盾する。これは、我々が細胞傷害活性が陽性のものだけに注目したため、実は同時に HIV 感染細胞を殺傷しない T 細胞株を樹立していたのかもしれない。そこで本研究では、HIV 感染者からこれまでに樹立した多数の T 細胞株を用いて、HIV 感染細胞に対し細胞傷害活性を示さない細胞を再度スクリーニングし