

200400651A

厚生労働科学研究費補助金
エイズ対策研究事業

エイズ発症阻止に関する研究

平成16年度総括・分担研究報告書

平成17年3月

主任研究者 岩本愛吉

CONTENTS

I. 総括研究報告書	
エイズ発症阻止に関する研究	1
主任研究者 東京大学医科学研究所： 教授 岩本愛吉	
II. 分担研究報告書	
1. HIV感染症の病態とHIV特異的免疫の解析に関する研究	6
主任研究者 東京大学医科学研究所： 教授 岩本愛吉	
2. 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	9
大阪大学微生物病研究所： 教授 塩田達雄	
3. HIV-1感染長期未発症者における宿主因子に関する研究	13
静岡県立こども病院血液腫瘍科： 科長 三間屋純一	
4. DNAマイクロアレイを用いたエイズ発症阻止の研究	17
東京医科歯科大学： 客員助教授 渡辺慎哉	
5. 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	23
近畿大学医学部： 教授 宮澤正顯	
6. HIV特異的CTLとその機能の研究	28
熊本大学エイズ研究センター・ウイルス制御分野： 教授 滝口雅文	
7. HIV感染症の病体と宿主の免疫応答の研究	36
熊本大学エイズ研究センター病体制御分野： 教授 松下修三	
8. エイズ発症阻止に関する研究	39
国立感染症研究所免疫部： 部長 竹森利忠	
9. HIVの感染過程や病原性に関わる宿主因子の解析とその抑制に関する研究	44
京都大学ウイルス研究所感染病態研究領域： 教授 小柳義夫	
10. エイズ発症阻止に関する研究班	55
琉球大学大学院医学研究科免疫学分野： 教授 田中勇悦	
11. 「Vprを介したエイズ発症阻止」に関する研究	58
国立国際医療センター研究所： 部長 石坂幸人	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	62
IV. 研究成果の刊行物・別刷	73

総括研究報告書

エイズ発症阻止に関する研究

主任研究者：岩本愛吉（東京大学医科学研究所教授）

研究要旨

われわれは、(1) ヒトゲノム多型性 (SNPs) 及びトランスクリプトーム、(2) HIV 特異的細胞性及び液性免疫、(3) HIV の病態に関わる宿主側及びウイルス側の因子、などの研究を通じて、新しい視点からエイズ発症阻止に直結する方法論の確立を目指している。(1)では、タイや日本人コホートにおけるゲノム・トランスクリプトーム研究やヒトとマウスのレトロウイルス抵抗性遺伝子の比較研究を行った。(2)では、細胞傷害性T細胞、中和抗体などの研究、さらに医科学研究所においてこれまでの研究成果に基づいた治療ワクチンの臨床試験を4人に対して行った。(3)では、HIV 抵抗性のある宿主因子の機能ドメインが明らかにされ、全く新規の HIV 抵抗性宿主因子も今年度発見された。Hu-PBL-SCID のモデル系を用いた新規薬剤の研究、ウイルス因子としての Vpr、Nef の研究を行った。

分担研究者：

塩田達雄（大阪大学微生物病研究所・教授）

三間屋純一（静岡県立こども病院・血液腫瘍科・科長）

渡辺慎哉（東京医科歯科大学・助教授）

宮澤正顕（近畿大学医学部・教授）

滝口雅文（熊本大学エイズ学研究センター・教授）

松下修三（熊本大学エイズ学研究センター、教授）

竹森利忠（国立感染症研究所・部長）

小柳義夫（京都大学・教授）

田中勇悦（琉球大学医学部附属沖縄・アジア医学研究センター・教授）

石坂幸人（国立国際医療センター研究所・部長）

A. 研究目的

抗 HIV 薬の併用 (HAART) によって HIV 感染者の治療状況は大幅に改善された。しかし、長期間の HAART によってもウイルスは排除できないうえに、薬剤耐性や HAART の長期毒性などの諸問題が既に明らかとなっている。エイズ発症阻止のためには、HAART の代替治療あるいは、HAART を補填する治療法の開発が必須である。われわれは、(1) ヒトゲノム多型性 (SNPs) 及びトランスクリプトーム、(2) HIV 特異的細胞性及び液性免疫、(3) HIV の病態に関わる宿主側及びウイルス側の因子、などの研究を通じて新しい視点からエイズ発症阻止を目指した総合的な研

究を行う。

B. 研究方法

核酸の解析や細胞培養は常法にて行った。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、2003 年 10 月までの追跡調査を行い、Kaplan-Myer 解析をおこなった (塩田)。感染時期の特定できる日本人 HIV 感染血友病者のコホート研究を行った (三間屋・渡辺)。臨床試験名「ヒト免疫不全ウイルス感染症に対する特異的免疫療法と計画的抗ウイルス薬の中断 (第 I 相試験)」を東京大学医科学研究所附属病院内で実施した。参加症例は MHC Class I の遺伝子型が A*2402 の HIV 感染者で、抗 HIV 療法により過去 6 ヶ月間の血中 HIV RNA 量が 400 コピー/ml 未満の者 4 例 (岩本)。

(倫理面への配慮)

本研究に臨床材料が使用される場合には、血液など臨床材料提供者の個人情報が出漏らないよう厳格にプライバシーを保護する。臨床材料の保存・使用に際しては、インフォームドコンセントを得ることとし、ヒトゲノム研究に関しては研究者の所属する機関の承認を得、個人を特定できないようにすべて匿名化を行う。本研究の成果をヒトに応用する場合には、研究対象者の安全性に細心の注意を払い、研究担当者の所属する機関の承認を得る。また、研究対

象者から必ず文書によるインフォームドコンセントを取る。動物を用いる実験に関しては、動物愛護の精神に則って研究を行う。

C. 研究結果

(1) ヒトゲノム多型性 (SNPs) 及びトランスクリプトーム

タイ国ランパンの 595 名の HIV-1 感染者の IL4 と RANTES の遺伝子多型と、それぞれの感染者の 2003 年 10 月までの追跡調査の結果を解析したところ、女性においてのみ、エイズ発症遅延と相関する RANTES プロモーターの多型 RANTES-28G を持つ感染者が全観察期間を通じて有意に高い生存率を示した(塩田)。HIV-1 感染病態の進行や血漿 HIV-1 量と関連して NK 細胞数が減少し、その減少は主に CD56dim の NK 細胞サブセットに認められた(三間屋)。長期未発症者 (LTNP) 6 例と対照群 110 例のトランスクリプトーム解析では、LTNP に特徴的な mRNA プロファイルが得られなかった(渡辺)。マイクロアレイ解析により、マウスレトロウイルス (Fv) に対する中和抗体産生遺伝子の候補が見つかった。HIV-1 曝露非感染者と HIV-1 感染者の PBMC についてマイクロアレイ解析を行ったところ、HIV 抗原刺激後 6 時間で大きな差異を認めた(宮澤)。

(2) HIV 特異的細胞性及び液性免疫

日本人の約 70% が発現する HLA-A24 によって提示される HIV 上の CTL エピトープ 4 箇所、7 ペプチドを患者末梢血から分離誘導した自身の樹状細胞 (DC) にパルスして、HAART 治療中の患者に“治療ワクチン”として投与し、その後計画的に治療中断 (Strategic treatment interruption: STI) を行う、第 1 相臨床試験を 4 例に対して行った。DC は安全に接種できたが、全員で血漿中ウイルスのリバウンドが見られ、1 例では急性 HIV 感染症様の発熱が認められた(岩本)。HLA-B*3501 陽性患者の HIV 遺伝子配列解析から、Pol 遺伝子内の CTL エピトープでは N 末端が Ile から Val に変異していた。Pol 特異的 CD8 T 細胞の TCR レパートリーを調べたところ、新たに出現した T 細胞の相対頻度が経時的に増大していた。HIV 感染細胞に対する傷害活性を測定したところ、後から出現した T 細胞は変異エピトープにのみ弱い傷害活性を示した。(滝口)。複数の症例について、env 遺伝子 V3 領域の配列は保存されているにもかかわらず、抗 V3 抗体に対する中和感受性に有意な差が見られ、C3 領域の配列の変化が重要であることがわかった(松下)。

(3) HIV の病態に関わる宿主側及びウイルス側の因

子

カニクザル TRIM5 α が HIV-1 のみを阻害したのに対し、アフリカミドリザル TRIM5 α は HIV-1、SIVmac の両者の感染を阻害した。カニクザルとアフリカミドリザル TRIM5 α のキメラを作成したところ、アフリカミドリザルの TRIM5 α の B30.2 領域内の 37 アミノ酸からなる領域が SIVmac を阻害する能力を担っていることが明らかになった(塩田)。4 回膜貫通ドメインを有する tetraspanin 分子群のひとつである CD63 の変異体が HIV 抑制活性を有することを見出した。この CD63 遺伝子の導入は細胞増殖にはまったく影響しない。強力にウイルスコレセプター分子である CXCR4 の細胞表面からの消失を促進する結果、HIV 感染に抵抗性を獲得していた。その機能は N 末端の細胞外ドメインを欠損した変異体では明らかに増強される。さらに、この CD63 そのものとある変異体はウイルスの放出も特異的に阻害していた(小柳)。マウス T 細胞に Nef を発現させることにより抗原刺激に対する反応とケモカインに対する遊走能が低下し、さらに生体内における抗原刺激への応答性とダイナミクスの異常が誘導された。Nef 発現により T 細胞の表現型が抑制型に変化することが示された(竹森)。Vpr の存在によって G2 期だけでなく、細胞分裂 (M) 期の細胞周期異常も認められることがわかった。海洋エキス約 6000 個のスクリーニングの結果、抗 Vpr 因子の候補が同定された(石坂)。抗 CCR5 N-terminus 抗体である T-312 を固相化したプレートにより、効率よく PBMC からマクロファージへの分化を誘導できた。T-312 刺激単球に IL-4 を加えて培養することにより機能的な DC が誘導し、さらに不活化 HIV-1 で hu-PBL-SCID マウスを免疫することによって、R5 ウイルス抵抗性を付与できた。このマウスに CXCR4 アンタゴニスト (KRH-1636 を 10mg/kg) を毎日投与することにより、X4 ウイルスに対する抵抗性も付与することができた(田中)。

D. 考察

(1) ヒトゲノム多型性 (SNPs) 及びトランスクリプトーム

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すでにエイズを発症しており、RANTES-28G の効果が男性では認められなかったものと思われる(塩田)。

細胞傷害作用をもつサブセットと考えられる CD56dim の NK 細胞減少を認め、血中 HIV-1 量をコントロールすることで NK による自然免疫能が改善し、エイズ発症予防につながる可能性が示唆された(三

間屋)。LTNP の解析数を増やす必要があるが、臨床的分類である以上、病態進行症例も避けられないことが解析を難しくしている。PBMC 由来の培養細胞ではなく、何らかの刺激に対する反応性の mRNA プロファイリングが必要かもしれない(渡辺)。マイクロアレイによる発現解析がマウス及びヒトの HIV 抵抗性の解析に有用であることが示された(宮澤)。

(2) HIV 特異的細胞性及び液性免疫

STI 後のウイルスなどにつき、さらに解析が必要である。HIV 特異的免疫の誘導には更なる改良が必要であると思われた(岩本)。HIV の抗原変異に対するヒトの T 細胞免疫系の応答様式とその機能を明らかにした(滝口)。抗体の反応エピトープ以外のアミノ酸の変化が中和抵抗性に関係している。中和抵抗性のウイルスでも感染細胞表面では、エンベロープに対する抗体の結合活性が保たれており、そのメカニズムの解明がさらに必要である(松下)。

(3) HIV の病態に関わる宿主側及びウイルス側の因子

サル細胞の HIV 抵抗性は、TRIM5 α だけでは説明できない可能性がある(塩田)。CD63 の HIV 増殖調節機序が明らかになることより、新たな HIV 抑制法が開発されることが期待される(小柳)。Nef を発現した T 細胞の存在によって生体内における相対的な免疫状態がどのように変化するか、解析する必要がある(竹森)。Vpr の新しい機能的側面が明らかとなった(石坂)。効率的な DC 誘導法と R5 ウイルス及び X4 ウイルス双方に対し抵抗性を付与する実験系が確立できた(田中)。

E. 結論

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

主任研究者

1. Yokomaku, Y., Miura, H., Tomiyama, H., Kawana-Tachikawa, A., Takiguchi, M., Nagai, Y., Iwamoto, A., Matsuda, Z., and Ariyoshi, K. Impaired epitope processing and presentation as a major escape mechanism from CTL recognition in HIV-1 infection. *J. Virol.* 78:1324-1332, 2004.
2. Yamada, T., Watanabe, N., Nakamura, T and Iwamoto, A. Antibody-dependent cellular

cytotoxicity via a humoral immune epitope of Nef protein expressed on cell surface. *J. Immunology* 172:2401-2406, 2004.

3. Nakayama, E.E., Tanaka, Y., Nagai, Y., Iwamoto, A., and Shioda, T. A CCR2-V64I polymorphism affects stability of CCR2A isoform. *AIDS* 18:729-738, 2004.
4. Sakurai, A., Jere, A., Yoshida, A., Yamada, T., Iwamoto, A., Adachi, A., and Fujita, M. Functional analysis of HIV-1 vif genes derived from Japanese long-term non progressors and progressors for AIDS. *Microbes and Infection* 6:799-805, 2004.
5. Furutsuki, T., Hosoya, N., Kawana-Tachikawa, A., Tomizawa, M., Odawara, T., Goto, M., Kitamura, Y., Nakamura, T., Kelleher, A.D., Cooper, D.A., and Iwamoto, A. Frequent transmission of CTL-escape HIV-1 in highly HLA-A24-positive Japanese population. *J. Virol.* 78:8437-8445, 2004.
6. Zhu, D., Taguchi-Nakamura, H., Goto, M., Odawara, T., Nakamura, T., Yamada, H., Kotaki, H., Sugiura, W., Iwamoto, A., and Kitamura, Y. Influence of single-nucleotide polymorphisms in the multidrug resistance-1 gene on the cellular export of nelfinavir and its clinical implication for highly active antiretroviral therapy. *Antiviral Therapy* 9:929-935, 2004.

分担研究者

塩田達雄

1. Nakayama, E. E., Tanaka, Y., Nagai, Y., Iwamoto, A. and Shioda, T. A CCR2-V64I polymorphism affects stability of CCR2A isoform. *AIDS*. 18, 729-738, 2004.

渡邊慎哉

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.* 78(8):3984-93, 2004.
2. Kobayashi S, Ito E, Honma R, Nojima Y, Shibuya

M, Watanabe S, Maru Y. Dynamic regulation of gene expression by the Flt-1 kinase and Matrigel in endothelial tubulogenesis. *Genomics*. 84(1):185-92, 2004.

宮澤正顯

1. Miyazawa, M. Host genes that influence immune and non-immune resistance mechanisms against retroviral infections. *Recent Res. Devel. Virol.* 6: in press, 2004.
2. Miyazawa, M., E. Kajiwara, N. Tabata, T. Ogawa, T. Yuasa, and H. Matsumura. Pathogenicity of autoantibodies reactive with the endogenous retroviral envelope glycoprotein gp70. In *From Animal Models to Human Genetics: Research on the Induction and Pathogenicity of Autoantibodies* (K. Conrad, et al. editors). Pabst Science Publishers, Lengerich, 2004. pp85-96.
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 control of simian immunodeficiency virus replication in a preclinical AIDS vaccine trial. *J. Exp. Med.* 199: 1709-1718, 2004.
4. Sugahara, D., S. Tsuji-Kawahara, and M. Miyazawa. Identification of a protective CD4⁺ T-cell epitope in p15^{gag} of Friend murine leukemia virus and role of the MA protein targeting to the plasma membrane in immunogenicity. *J. Virol.* 78: 6322-6334, 2004.
5. 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.* 13:25-32, 2004.

松下修三

1. Matsushita, S., Yoshimura, K., Kimura T., Kamihira, A., Takano, M., Eto, K., Shirasaka, T., Mitsuya, H., and Oka S. Spontaneous recovery of hemoglobin and neutrophil levels in Japanese patients on a long-term Combivir[®] containing regimen. *J. Clin. Virol.* (in press).

小柳義夫

1. Ebina H, Aoki J, Hatta S, Yoshida T, Koyanagi Y. Role of Nup98 in nuclear entry of human immunodeficiency virus type 1 cDNA. *Microbes & Infection* 6, 715-724, 2004.
2. Feng J, Misu T, Fujihara K, Misawa N, Koyanagi Y, Shiga Y, Takeda A, Sato S, Takase S, Kohnosu T, Saito H, Itoyama Y. Th1/Th2 balance and HTLV-I proviral load in HAM/TSP patients treated with interferon- α . *J. Neuroimmunol.* 51:189-194, 2004.
3. Maeda K, Nakata H, Koh Y, Miyakawa T, Ogata H, Takaoka Y, Shibayama S, Sagawa K, Fukushima D, Moravek J, Koyanagi Y, Mitsuya H. Spirodiketopiperazine-based CCR5 inhibitor which preserves CC-Chemokine/CCR5 interactions and exerts potent activity against R5 human immunodeficiency virus type 1 in vitro. *J. Virol.* 78:8654-8662, 2004.
4. Kawano Y, Yoshida T, Hieda K, Aoki J, Miyoshi H, Koyanagi Y. A lentiviral cDNA library employing lambda recombination used to clone an inhibitor of human immunodeficiency virus type 1-induced cell death. *J. Virol.* 78:11352-11359, 2004.
5. Kamada M, Li RY, Hashimoto M, Kakuda M, Okada H, Koyanagi Y, Ishizuka T, Yawo H. Intrinsic and spontaneous neurogenesis in the postnatal slice culture of rat hippocampus. *Eur J. Neurosci.* 20, 2499-2508, 2004.
6. Nakata H, Maeda K, Miyakawa T, Shibayama S, Matsuo M, Takaoka Y, Ito M, Koyanagi Y, Mitsuya H. Potent Anti-R5-human immunodeficiency virus type 1 effects of a CCR5 antagonist, AK602/ONO4128/GW873140, in a novel human peripheral blood mononuclear cell nonobese diabetic-SCID, interleukin 2

receptor α -chain-knocked-out AIDS mouse model. J. Virol., in press.

田中勇悦

1. Nakayama EE, Tanaka Y, Nagai Y, Iwamoto A, Shioda T. A CCR2-V64I polymorphism affects stability of CCR2A isoform. AIDS 18(5):729-738, 2004.
2. Murakami T, Ablan S, Freed EO, Tanaka Y. Regulation of human immunodeficiency virus type 1 Env-mediated membrane fusion by viral protease activity. J Virol.

78(2):1026-1031, 2004.

3. Zingoni A, Sornasse T, Cocks BG, Tanaka Y, Santoni A, Lanier LL. Cross-talk between activated human NK cells and CD4+ T cells via OX40-OX40 ligand interactions. J Immunol. 173(6):3716-3724, 2004

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

宮澤正顯： **Resistance Genes**: Supplementary Patent Application to PCT/GB2003/004493 (Filed December 23, 2004) .

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 感染症の病態と HIV 特異的免疫の解析に関する研究

分担研究者 岩本愛吉 東京大学医科学研究所附属病院長

研究要旨 HIV 感染者 4 名に HIV ペプチド添加樹状細胞をワクチンとして投与し、その安全性および効果を検討した。樹状細胞ワクチン接種に関する安全性に問題はなく、4 名中 2 名にワクチン効果を認めた。今後、さらに効果の高いワクチンの開発が必要である。

A. 研究目的

抗 HIV 療法を施行している HIV 感染者に対し、HIV 由来ペプチドを添加した自己樹状細胞をワクチンとして皮下注射し、その安全性および HIV 特異的細胞性免疫が誘導されるか否かを検討する。また、樹状細胞ワクチンを接種した患者について、抗 HIV 療法を計画的に中断し、自己の免疫能で HIV の増殖を制御できるか否か、誘導された HIV 特異的細胞性免疫が効果を及ぼしたか否かを検討する。

B. 研究方法

東京大学医科学研究所附属病院において、上記を第 I 相臨床試験として実施した。臨床試験名「ヒト免疫不全ウイルス感染症に対する特異的免疫療法と計画的抗ウイルス薬の中断（第 I 相試験）」として、当研究所治験審査委員会より承認を得た。

参加症例は、MHC class I A24 を有する HIV 感染者で、抗 HIV 療法によりウイルス量が 400copy/ml 未満、CD4 数が 300/mm³ 以上の症例に限定した。樹状細胞は、患者末梢血単核球をアフレーシスにて分離し、GM-CSF および IL4 存在下で数日間培養したのち TNF- α を加えて作成した。培養は GMP レベルの P3 実験室で SOP に従って行った。添加する HIV 由来ペプチドは、A24 に結合し CTL 誘導能を有することが報告されているエピトープ (Gag28, Gag296, Nef138, Env584)

を選択した。Gag296 以外のエピトープ部位はアミノ酸変異が多いため、各エピトープのコンセンサスシーケンスに相当するペプチドと頻度の高い変異ペプチドをの計 2 種類を使用した。以下が、使用したペプチドの名称とアミノ酸配列で、米国 MULTIPLE PEPTIDE SYSTEM 社に合成を依頼し、臨床使用レベルのペプチドを入手した。

Gag28-wt: KYKPKHIVW

Gag28-3R: KYRLKHIVW

Gag296: RDYVDRFYKTL

Nef138-wt: RYPLTFGWCF

Nef138-2F: RFPLTFGWCF

Env584-wt: RYL RDQQLLGI

Env584-4Q: RYLQDQQLLGI

約 1×10^7 個の HIV 由来ペプチド添加樹状細胞を 2 週間隔で計 6 回接種を行い、6 回目接種終了 1-3 ヶ月後より全ての抗 HIV 薬を中断した。中断に際し、耐性が誘導されやすい抗 HIV 薬はあらかじめ他の薬剤に変更した。中断後は 8 週間毎週血液検査を行い、ウイルス量と CD4 数がプロトコールで定めた治療再開基準に達した場合、抗 HIV 療法を再開した。治療再開の有無にかかわらず、樹状細胞接種開始から治療中断後 2 年間経過観察する予定である。

ワクチン効果は患者末梢血リンパ球を用いて、ELISPOT アッセイおよびテトラマーアッセイを行い解析した。

(倫理面への配慮)

HIV 感染者からの血液採取に関しては、

当該組織（東京大学医科学研究所倫理委員会）における倫理審査を受け、既に承認を得ている。承認された内容に従って、患者およびその家族に対して倫理的、人権的な配慮を最大限に講ずる。ヒトゲノム・遺伝子解析研究については、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日文科科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）を遵守する。また、ヘルシンキ宣言（2000年10月エジンバラ改訂版）の趣旨に則って、十分な説明のもとでインフォームド・コンセントを得るものとする。

C. 研究成果

1. **参加症例**：4名の患者が参加した。参加時の平均年齢44.2才（36-52）、平均CD4数424（310-635）であった。患者HIVのCTLエピトープのアミノ酸配列を決定し、使用するペプチドのいくつかは患者HIVシーケンスと一致することを確認した。

2. **本臨床試験の安全性**：本報告記載時点で治療中断から平均279日間（133日-396日）観察を行った。樹状細胞接種中に、接種箇所の局所症状を2名に、全身倦怠感を1名に認めたが、程度は軽微であった。一般血液検査上の有害事象は認めなかった。治療中断後のHIVの再増加時に、急性HIV感染症様の所見（発熱、咽頭痛、肝障害）を呈した症例が1名あったが、経過観察で数日で軽快した。

3. **症例の臨床経過と特異免疫の誘導**：全例において抗HIV療法中断4週以内にウイルスの再増殖がみられ、治療再開基準に到達した。治療再開後は血中HIV RNA量は中断前のレベルに復している。4名中2名ではNef183に対する特異免疫がELISPOTアッセイにおいて検出されたが、残り2名では検出し得なかった。テトラマーアッセイでは、4症例とも陽性となる集団を検出できなかった。

D. 考察

この第I相試験の目的である樹状細胞ワクチン接種の安全性の確認に関しては、特に重篤な有害事象がみられないという結果が得られた。ワクチンとしての有効性は満足できるものではなく、接種する樹状細胞の量・質的な検討や、抗原提示法の改良が必要と考えられた。

E. 結論

HIV感染症の病態を解析する目的で、HIVペプチド添加樹状細胞をワクチンとしてHIV感染者に投与する臨床試験を実施した。本治療は安全に実施できることが確認され、今後さらに免疫原性の高いワクチンへの改良が望まれる。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Yamada, T., Watanabe, N., Nakamura, T and Iwamoto, A. Antibody-dependent cellular cytotoxicity via a humoral immune epitope of Nef protein expressed on the cell surface. *J. Immunology.* 172: 2401-6, 2004.
- (2) Furutsuki T, Hosoya N, Kawana-Tachikawa A, Tomizawa M, Odawara T, Goto M, Kitamura Y, Nakamura T, Kelleher AD, Cooper DA, Iwamoto A. Frequent transmission of cytotoxic-T-lymphocyte escape mutants of human immunodeficiency virus type 1 in the highly HLA-A24-positive Japanese population. *J Virol.* 78: 8437-45, 2004.
- (3) D Zhu, H Taguchi-Nakamura, M Goto, T Odawara, T Nakamura, H Yamada, H Kotaki, W Sugiura, A Iwamoto & Y Kitamura. Influence of single-nucleotide polymorphisms in the multidrug resistance-1 gene on the cellular export of nelfinavir and its clinical implication for highly active antiretroviral therapy. *Antiviral Therapy* 9:929-35, 2004.
- (4) Yokomaku, Y., Miura, H., Tomiyama, H., Kawana-Tachikawa, A., Takiguchi, M., Nagai, Y., Iwamoto, A., Matsuda, Z., and Ariyoshi, K. Impaired epitope processing and presentation as a major escape mechanism from CTL recognition in HIV-1 infection. *J. Virol.* 78:1324-1332, 2004.
- (5) Nakayama, E. E., Tanaka, Y., Nagai, Y.,

別紙 4

- Iwamoto, A., and Shioda, T. A CCR2-V64I polymorphism affects stability of CCR2A isoform. AIDS 18:729-738, 2004.
- (6) Sakurai, A., Jere, A., Yoshida, A., Yamada, T., Iwamoto, A. Adachi, A., and Fujita, M. Functional analysis of HIV-1 vif genes derived from Japanese long-term non progressors and progressors for AIDS. Microbes and Infection 6:799-805, 2004.

2. 学会発表

- (1) T Odawara, M Tomizawa, A Kawana-Tachikawa, F Ide, T Furutsuki, N Hosoya, T Nakamura, and A Iwamoto. Sequences of HLA-A24-restricted HIV-1 CTL epitopes among highly HLA-A24 positive Japanese patients and a phase I clinical trial of therapeutic vaccine based on peptides and autologous dendritic cells. XV International AIDS Conference

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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

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 の生理的リガンド RANTES のプロモーター内多型 RANTES -28G は、RANTES プロモーター活性を上昇させ、日本人 HIV-1 感染者集団においては CD4 陽性細胞数の減少速度の遅い感染者に多く見出され、エイズ発症の遅延と相関すると考えられている。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、RANTES -28G を持つ感染者はコホート登録後の死亡率が有意に低く、タイ国においてもこの多型がエイズ発症遅延効果を示すと考えられる。

(2) HIV-1 はアフリカミドリザル、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。アカゲザル、カニクイザルには SIVmac が感染できるが、アフリカミドリザルには HIV-1 のみならず SIVmac も感染できない。最近、アカゲザルの TRIM5 α が HIV-1 感染抵抗性因子であるとの報告がなされた。カニクイザルの TRIM5 α とアフリカミドリザルの TRIM5 α をヒト細胞に導入したところ、カニクイザルの TRIM5 α が HIV-1 のみの感染を阻害し、SIVmac の感染を阻害しなかったが、アフリカミドリザルの TRIM5 α は HIV-1 と SIVmac の両者を阻害した。カニクイザルの TRIM5 α とアフリカミドリザルの TRIM5 α のキメラを作成したところ、アフリカミドリザルの TRIM5 α の B30.2 領域内の 37 アミノ酸からなる領域が SIVmac を阻害する能力を担っていることが明らかになった。

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) HIV-1 の主要なコレセプター CCR5 の生

理的リガンド RANTES のプロモーター内多型

RANTES -28G は、RANTES プロモーター活性を上昇させ、日本人 HIV-1 感染者集団においては CD4 陽性細胞数の減少速度の遅い感染者に多く見出され、エイズ発症の遅延と相関すると考えられている。しかし、この多型は白色人種や黒色人種には殆ど認められないため、上記の知見が一般性を持つか否かについては、日本人以外のアジア人 HIV-1 感染者における解析が待たれたいた。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 RANTES の遺伝子多型を解析し、さ

らに 2003 年 10 月までの追跡調査を行い、この遺伝子多型が HIV-1 感染症の進行に影響を及ぼすか否か、を明らかにすることを目的とした。

(2) HIV-1 はアフリカミドリザル、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。アカゲザル、カニクイザルには SIVmac が感染できるが、アフリカミドリザルには HIV-1 のみならず SIVmac も感染できない。最近、アカゲザルの TRIM5 α が HIV-1 感染抵抗性因子であるとの報告がなされた。そこで、アフリカミドリザル細胞の SIVmac 抵抗性がやはり TRIM5 α によって担われているか否か、担われている場合にアフリカミドリザルの TRIM5 α のどの領域が SIVmac 抵抗性に重要であるか、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、2003 年 10 月までの追跡調査を行い、Kaplan-Meier 解析をおこなった。

(2) アフリカミドリザルおよびカニクイザルの TRIM5 α 遺伝子をクローン化し、ヒト細胞にセンダイウイルスベクターで発現させ、それぞれの TRIM5 α が HIV-1 および SIVmac 感染抵抗性を示すか否かを検討した。

(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。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 RANTES 遺伝子多型を決定したところ、RANTES -28G のホモ接合が 5 名、ヘテロ接合が 84 名、RANTES -28C のホモ接合が 506 名であった。従ってタイにおけるこの多型の頻度は約 8% で、日本人 (約 16%) と欧米人 (約 2%) の中間程度の頻度を示すことが明らかになった。595 名の HIV-1 感染者の RANTES の遺伝子多型と、それぞれの感染者の 2003 年 10 月までの追跡調査の結果を解析したところ、女性においてのみ、RANTES-28G を持つ感染者が全観察期間を通じて有意に高い生存率を示し ($P=0.038$, Log-rank test)、タイにおいてもこの多型が HIV-1 感染症の病態進行の遅延と相関することが明らかになった。

(2) カニクイザル TRIM5 α が HIV-1 のみを阻害したのに対し、アフリカミドリザル TRIM5 α は HIV-1、SIVmac の両者の感染を阻害した。従って、それぞれの TRIM5 α の示すウイルス阻害の特異性は、それぞれのサル種の示すウイルス阻害の特異性と一致することが明らかになった。カニクイザルとアフリカミドリザル TRIM5 α のキメラを作成したところ、アフリカミドリザルの TRIM5 α の B30.2 領域内の 37 アミノ酸からなる領域が SIVmac を阻害する能力を担っていることが明らかになった。

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すでにエイズを発症しており、RANTES -28G の効果が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)以上の結果から、TRIM5 α のB30.2領域内の37アミノ酸からなる領域が感染阻害のウイルス特異性を担っていることが明らかになった。おそらくこのB30.2領域を介してTRIM5 α が、細胞に侵入してきたHIV-1やSIVmacのカプシド蛋白に結合して感染阻害を引き起こすものと考えられる。また、それぞれのTRIM5 α の示すウイルス阻害の特異性が、それぞれのサル種の示すウイルス阻害の特異性と一致することから、サル細胞のHIV-1感染抵抗性のかなりの部分がTRIM5 α そのものによって説明できることが明らかになった。現在、TRIM5 α の発現量に差が認められないのにも関わらずHIV-1感染感受性が大きく異なるサル細胞の比較解析からサル細胞のHIV-1感染抵抗性がTRIM5 α のみによって説明できるか否かを検討している。

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、日本人においてエイズ発症遅延と相関するRANTESプロモーターの多型RANTES-28Gを持つ感染者が全観察期間を通じて有意に高い生存率を示した。このことからタイにおいてもこの多型

がエイズ発症を遅延と相関することが明らかになった。

(2) TRIM5 α のB30.2領域がウイルス特異性を決定していること、サル細胞のHIV-1感染抵抗性のかなりの部分がTRIM5 α そのものによって説明できることが明らかになった。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Nakayama, E. E., Tanaka, Y., Nagai, Y., Iwamoto, A. and Shioda, T. A *CCR2-V64I* polymorphism affects stability of CCR2A isoform. *AIDS*. 18, 729-738 (2004).

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. The International Congress of AIDS (Bangkok) 2004, WePeA5610.

N. Wichukchinda, E.E. Nakayama, T. Matsumi, A. Rojanawiwat, P. Pathipvanich, W. Auwanit, S. Vongsheree, K. Ariyoshi, T. Shioda, P. Sawanpanyalert. Significant associations of *IL4-589T*, *CCR2-64I*, and *HLA-B* alleles with viral load among HIV-1 infected Thais. The International Congress of AIDS (Bangkok) 2004, WePeA5620.

中山英美、塩田達雄。アフリカミドリザル由来 TRIM5alpha の HIV-1 感染阻害効果。第 52 回日本ウイルス学会学術集会(横浜) 2004, 3WSA5。

櫻木淳一、塩田達雄。HIV-1 ゲノム二量体化に関する解析。第 52 回日本ウイルス学会学術集会(横浜)2004, 2P059。

杉本智恵、塩田達雄、中山英美、扇本真治、山本直樹、永井美之、鈴木康夫、森一泰。糖鎖欠失 SIV の弱毒化とウイルス学的性質の変化。第 52 回日本ウイルス学会学術集会(横浜)2004, 3WSA2。

川名愛、細谷紀彰、加藤篤、塩田達雄、永井美之、岩本愛吉。エピトープ結合β2ミクログロブリンと TAP 阻害タンパク質を用いた

HIV-1 特異的 CD8 陽性 T 細胞への効率的な抗原提示法の開発。第 52 回日本ウイルス学会学術集会(横浜) 2004, 3E02。

中山英美、塩田達雄。アフリカミドリザル由来 TRIM5alpha の HIV-1 感染阻害効果。第 18 回日本エイズ学会学術集会(静岡)2004, 035。

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-1 感染長期未発症者における宿主因子に関する研究

分担研究者 三間屋 純一 静岡県立こども病院部長

研究要旨

日本の血友病長期未発症のコホートにおいて、HLA-A, B, DRB1 について、DNA タイピングをおこなっている。長期未発症者とそのコントロール患者のアリル頻度には違いがみられる。その差が有意であるかどうかを、現在症例数を増やして検討中である。また、NK 細胞数は CD4 細胞数と併せて検討することにより HIV-1 感染症の病期の進行をモニターするのに有効な指標の一つとなる可能性が示唆された。

A. 研究目的

約 20 年前に血液製剤にて HIV-1 に感染した日本人血友病患者は長きにわたり詳しく経過が観察されてきた。その中の一部の感染者はこれまで抗 HIV 剤が未使用にもかかわらず、長い間、CD4 陽性リンパ球の数が保たれ、エイズ未発症で経過している HIV-1 感染長期未発症者である。さらに、このコホートは、人種・感染経路・感染時期などが均一な貴重なコホートである。この研究では、この長期未発症者のコホートについて検討することにより、日本人で重要なエイズ発症阻止因子を明らかにし、発症予防や治療に新たな可能性を開くことを目的としている。

B. 研究方法

今年度は、ヒト白血球抗原 (Human Leukocyte Antigen、以下 HLA と略す) のうち、HLA-A, -B, -DR Locus のタイピングを開始した。

対象は、日本人 HIV-1 感染血友病患者で、長期未発症者とそれ以外の血友病患者で比較をおこなっている。

方法は、まず、血液検体より抽出した DNA を、HLA-DRB1 から DRA の部分と HLA-B から A の部分に分けてそれぞれ PCR で増幅した。そして、その PCR 産物を複数のプライマーを用いてシーケンシングして DNA タイピングをおこなった。

また、患者の一部については、フローサイトメーターや全自動血球測定器など

を用いてNK細胞数を測定し、CD4陽性Tリンパ球数・血中HIV-1量・患者の病期などと併せて検討した。

(倫理面への配慮)患者さんに十分説明し、インフォームドコンセントを書類で確認し、研究を進めている。

C. 研究結果

これまでに、HLA-Aは長期未発症者20アレル、コントロール群は157アレル、HLA-Bは長期未発症者19アレル、コントロール群は68アレル、HLA-DRB1は長期未発症者20アレル、コントロール群は114アレルのタイプを決定した。長期未発症者とそのコントロール群では、一部のアレル頻度に違いを認めるが、現時点では、その偏りに統計学的有意さは認められない。現在、さらに、長期未発症者とそのコントロール群の症例数を増やしてHLAタイピングを継続している。

このコホートでのNK細胞数の検討では、長期未発症者ではウイルス量が高くてもNK細胞数が高い傾向があった(図)。さらに、CD4陽性Tリンパ球数だけでは病期の判定は難しい検体もあるが、NK細胞数を併せてみることで、長期未発症者・HIV非感染の血友病患者群は、未治療進行群・HAART治療群と容易に区別することが可能であった(図)。さらに、症例数を増やして検討中である。

D. 考察

HLA遺伝子群は、ヒト第6染色体に位置しており、class I subregionにA, C, Bが、class II subregionにDR, DQ, DPが並んでおり、白血球抗原をコードしている。そのなかでも、HLA-A, B, DRB1はそのタイプが多く、Tリンパ球での抗原提示に重要な役割を果たしている。

欧米のコホートでは、HIV-1感染者において、HLA-B57, B27のアレルを持つ人で病気の進行が遅くなり、HLA-B35のアレルを持つ人で病気の進行が早くなることが報告されている。これらは細胞傷害性Tリンパ球(CTL)による細胞傷害を誘導することに関連していると考えられる。しかし、slow progressionに関わるB57やB27は日本人での頻度は低く、日本人で病態の進行とHLAにどのような傾向があるかは不明である。そこで、長期未発症者のコホートについて、これらHLA-A, B, DRのDNAタイピングをおこなっている。

また、この日本人長期未発症者の個々の例について、HLAとそれで提示されるHIV-1のエピトープの関係を調べていくことにより、ワクチンなどのCTLによるエイズ発症阻止が可能となることが期待される。

MHC class I抗原の免疫反応における役割として、CTLがMHC-I-antigenic peptide complexを”altered self”として認識することの他に、NK細胞がMHC-I

の消失による” missing of self”として傷害すべき細胞を認識する上でも重要である。そこで、CD4 陽性 T リンパ球数だけでなく、NK 細胞数も測定して、病期と併せて検討してみた。

すると、図で示したように CD4 細胞数だけでは病期の区別が難しかった例が、NK 細胞数も併せて検討することにより容易に区別することができるようになった。このことから、CD4 細胞数と NK 細胞数を併せて測定することで、患者の病態のモニターが容易になる可能性が示唆された。現在、NK 細胞についての検討も症例数を増やして検討を進めている。

NK 細胞の HIV-1 感染において果たす役割としては、1) MHC-I の表出が低下した HIV-1 感染細胞の傷害、2) ADCC

(Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) 活性による HIV-1 感染細胞の傷害、3) 日和見感染症や悪性腫瘍の抑制などが考えられる。HIV-1 の発症阻止のために、CTL を介しての免疫制御の他に、NK 細胞を介しての免疫制御についても今後検討を加えていきたい。

E. 結論

日本の血友病長期未発症のコホートにおいて、HLA-A, B, DRB1 について、DNA タイピングをおこなっている。長期未発

症者とそのコントロール患者のアリル頻度には違いがみられる。その差が有意であるかどうかを、現在症例数を増やして検討中である。また、NK 細胞数は CD4 細胞数と併せて検討することにより HIV-1 感染症の病期の進行をモニターするのに有効な指標の一つとなる可能性が示唆された。

(この研究は、東京医科歯科大学難治疾患研究所木村彰方先生・安波道郎先生、日本バイオセラピー研究所照沼裕先生・とう学文先生、山梨大学伊藤正彦先生・Munkanta Mwansa 先生、荻窪病院花房秀次先生、静岡こども病院高嶋能文先生との共同研究である。)

F. 健康危機情報

なし。

G. 研究発表

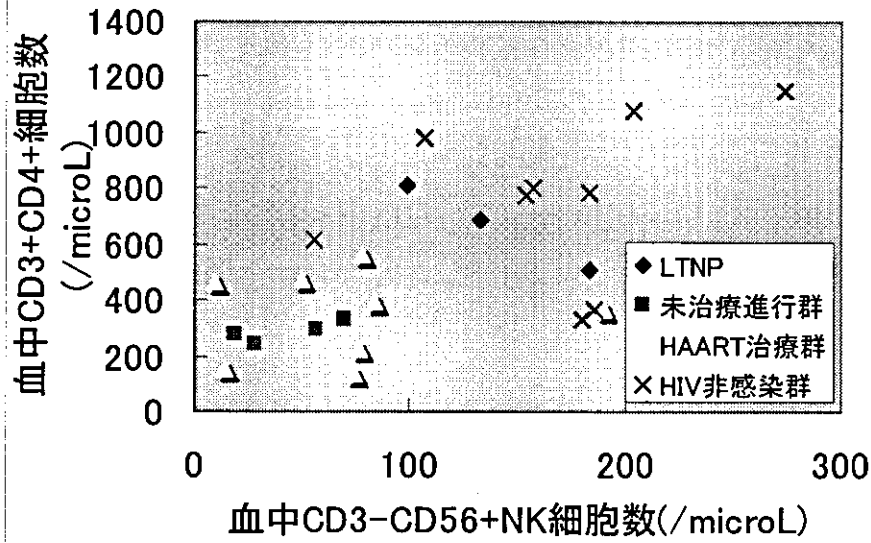
1. 学会発表

とう学文、他 10 名、三間屋純一 : HIV-1 感染の病態進行に伴う NK 細胞サブセットの変化についての検討. 日本エイズ学会誌 6 巻 4 号 489 頁 2004.

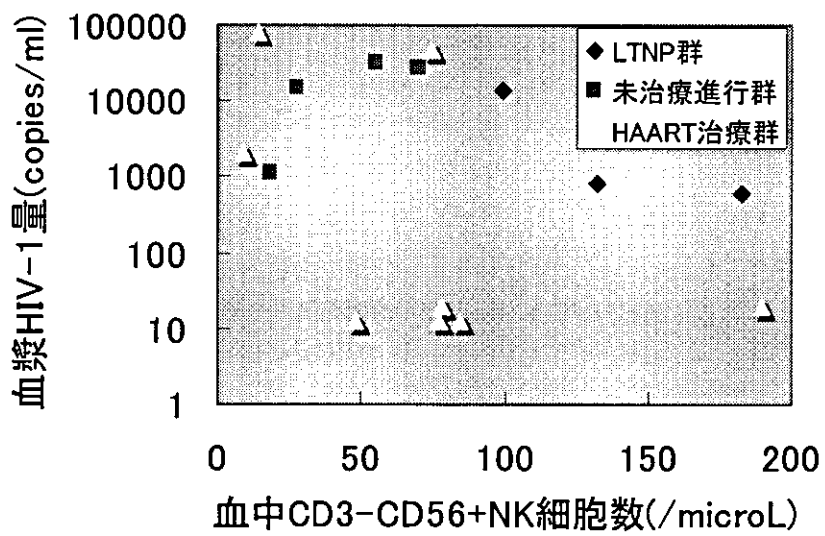
H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

血中NK細胞数とCD4陽性Tリンパ球数



血中NK細胞数と血漿HIV-1量



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。総計 111 サンプルから得られた遺伝子発現プロファイルより、LTNP5 例に共通し、かつ、他のサンプルとは異なる発現レベル変化を示した遺伝子群を、複数の異なる統計学的処理を行うことによる特定を試みた。しかしながら、この目的をみだす遺伝子群の特定は不可能であった。前年度までに抽出されていた遺伝子群は、LTNP 解析対象がわずかに 3 例であることから生じた解析中のノイズであったと結論せざるを得ない。遺伝子発現によるサンプルの分類においてきわめて重要な意味をもつ、LTNP、slow progressor、progressor を区別する規準の見直しが迫られる。さらに、これまで用いてきた、末梢血由来の単核細胞を培養して数を増やしたサンプルを解析対象とすることの妥当性が問われる。今後は、これまでのサンプル調製方法にかわり、少量の末梢血を直接解析対象とすることが必要であり、そのためのマイクロアレイ解析系そのものの改変が急務である。

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、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資することを最終的目標とする。
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の自由自在な選定や遺伝子数の増加が容易に可能となり、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たトランスクリプトーム解析を可能にした。

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。平成 15 年度では、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、41 検体についてサンプルの再調製を行い、遺伝子プロファイルを取得した。取り直した並行比較可能な 41 検体の遺伝子発現データから、LTNP3 例および HIV 未感染者 1 例、合計 4 例と他を、明確に異なる 2 つの群として区別することが可能な 21 遺伝子を特定した。しかしながら、この 21 遺伝子を特定するために用いた LTNP 標本数はわずかに 3 例であり、これをもって、LTNP 群と発症群で発現レベルに差のある遺伝子を絞り込むことができたかどうかについては結論できない状況であった。

4. 平成 16 年度は、解析対象遺伝子数をさらに増加させる（ヒト全遺伝子数に迫る）とともに、LTNP のサンプル数をさらに可能なかぎり増やし、LTNP 特異的な遺伝子群が果たして同定可能なかどうかについて、結論を出すことを目標とした。

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 15 年度中にすでにアレイ化の完了したヒト遺伝子 28,800 種類に、新たに 1,536 種類を追加し、総計 30,336 遺伝子をマイクロアレイ化した（30K アレイ；さらに、平成 15 年 12 月末に、総数 31,872 遺伝子を搭載する 32K アレイが完成した）。

2. HIV 感染者および非感染者からのサンプル調製 新たに取得しなおした LTNP および対照群

（slow progressor 含む）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 と、対照として 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、それぞれ鋳型として標識 cDNA を作製し、マイクロアレイ（32K アレイの完成までは 30,336 遺伝子アレイを使用）にハイブリダイズさせ、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受けるにあたっては、共同研究者の山梨大学（当時）・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を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

平成 15 年度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 30,336 遺伝子アレイを用いて、末梢血単核細胞由来培養細胞のヒト遺伝子発現プロファイルの取得を行った。各サンプルの臨床データに基づく分類、および、その数は次の通りであった（総計 111 例）。

#1) LTNP（血友病、 $CD4 \geq 500$ ）： 5 例

#2) Slow progressors（血友病、 $500 > CD4 \geq 350$ ）： 3 例

#3) Slow progressors（血友病、 $350 > CD4$ ）： 6 例

#4) Progressors（血友病、ARV 療法、 $CD4 \geq 500$ ）： 6 例

#5) Progressors（血友病、ARV 療法、 $500 > CD4 \geq 350$ ）： 4 例

#6) Progressors（血友病、ARV 療法、 $350 > CD4$ ）： 11 例

#7) HIV 感染者（非血友病）： 10 例