

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

ゲノム情報を用いたエイズワクチン
開発と発症阻止に関する基礎的研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 塩田 達雄

平成17（2005）年3月

目 次

I. 総括研究報告

- ゲノム情報を用いたエイズワクチン開発と発症阻止に関する基礎的研究 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. ゲノム情報を用いたエイズ発症阻止に関する研究 12
大阪大学微生物病研究所・教授・塩田達雄
2. エイズワクチン開発とエイズ発症阻止に関する基礎的研究 18
東京大学医科学研究所・教授・岩本愛吉
3. 母子感染に関わるHIVおよび宿主側因子に関する研究 23
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 34

IV. 研究成果の刊行物・別刷 37

ゲノム情報を用いたエイズワクチン開発と発症阻止に関する基礎的研究

主任研究者 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)病態進行が詳細に記載された HIV-1 感染者の遺伝子多型について、DNA チップを利用したゲノムワイドスキャンを行って一万箇所の一塩基多型を網羅的に検討し、病態進行速度と関連する可能性の高い 11 箇所の候補遺伝子多型を見出した。また、HIV プロテアーゼ阻害剤ネルフィナビルを含む 3 剤複合療法を開始し、血清中の HIV-1 量を検出限界以下に抑制できた HIV-1 感染者について同様に解析し、CD4 陽性細胞数の回復速度と相関する可能性の高い 7 箇所の候補遺伝子多型を見出した。(2) 日本人の約 60~70%がもつ HLA-A24 によって拘束される HIV-1 の CTL エピトープを解析したところ、複数箇所について患者間で共通した変異を認めた。このことは、感染個体内で HLA-A24 拘束性 CTL エピトープへの選択圧が働いている可能性を示唆している。特に、nef 遺伝子内の nef138-10 エピトープの特定の変異(Y2F)が日本人性感染者間で流行していることが明らかになった。(3) HIV 特異的 CTL を賦活化するための免疫遺伝子治療ベクターとしてセンダイウイルスベクター (SeV) とアデノウイルスベクター (AdV) の樹状細胞に対する遺伝子導入効率を比較した結果、SeV ベクターは感染多重度 2 で感染させて 24 時間後、AdV ベクターは感染多重度 1000 で感染させて 48 時間後の発現効率が最良であることがわかった。(4) HIV-1 の Gag 蛋白質とルシフェラーゼ蛋白質の融合蛋白質を酵母内で発現させ細胞壁を取り除いたところ、培養液中に効率良くルシフェラーゼ活性を含んだ HIV1-様粒子が産生されることが明らかになった。この実験系を用いることにより、遺伝子改変が容易な酵母の遺伝子欠損ライブラリーの中から HIV 様粒子産生能を失った株の選別を簡便に行うことが可能になった。(5) 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、ZDV 非投与群で、RANTES プロモーター領域内の-403 が A/A である児は G/A である児に比べて母子感染の危険が減少する傾向がみられたが、有意ではなかった。また、IL4 と SDF-1 の多型は母子感染の危険に影響しなかった。

分担研究者

岩本愛吉・東京大学医科学研究所・教授

市村 宏・金沢大学大学院医学研究科・教授

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を決定する宿主因子の同定やワクチン開発のための基礎的検討も重要な課題である。本年度は以下の 5 点を具体的な研究目的とした。

(1) 病態進行が詳細に記載されている HIV-1

感染者 104 名の遺伝子多型について、Affymetrix 社製 Gene Chip Human Mapping 10K Array を利用したゲノムワイドスキャンを行って HIV 感染症との関わりが明らかなものから HIV 感染症との関連が全く不明なものまで約一万箇所の一塩基多型を網羅的に検討し、病態進行速度と関連する可能性の高い候補遺伝子多型を見出すこと、ならびに HIV プロテアーゼ阻害剤ネルフィナビルを含む 3 剤複合療法を開始し、血清中の HIV-1 量を検出限界以下に抑制できた HIV-1 感染者 52 名について同様にゲノムワイドスキャンを行い、CD4 陽性細胞数の回復速度と関連する可能性の高い候補遺伝子多型を見出すこと、を目的とした。

(2) 多剤併用療法 (HAART) の効果を補填する治療ワクチンの開発を目指している。しかし、HIV は変異を起こしやすいウイルスであり、宿主の免疫応答に対応した変異体が選択される可能性がある。CTL は HLA class I 分子によって提示された抗原ペプチド (CTL エピトープ) を認識するが、多型性に富む HLA は、民族によって異なった分布を示す。遺伝的背景を異にする集団において、どのような特徴を持った HIV が流行しているかを解析することは、治療ワクチンあるいは予防ワクチンの開発において極めて重要な基礎的データを提供すると考える。本研究では日本人の約 70% が発現する HLA class I 分子 (HLA-A24) により提示される HIV の CTL エピトープに注目し、日本で流行している HIV 遺伝子の特徴を明らかにすることを目的とした。

(3) 強力な抗原提示細胞であり、細胞性免疫応

答の賦活化に有効な樹状細胞 (DC) を用いた免疫強化手段として、ペプチド、蛋白、遺伝子治療ベクター等の可能性が考えられる。本研究ではウイルスベクターの中でも、DC に関して既に検討が行われているアデノウイルス (AdV) と比較しながら国産ベクターであるセンドライウイルス (SeV) の有用性の比較を行った。そして、DC への遺伝子導入効率と細胞毒性、及びタンパク質発現量を比較し、さらにウイルスベクター導入による DC への影響を明らかにすることを目的とした。

(4) 遺伝子改変が容易な酵母の HIV 様粒子産生系を用いて、HIV 粒子産生に関わる宿主因子の探索を行っている。本年度は、酵母の遺伝子欠損ライブラリーの中から HIV 様粒子産生能を失った株の選別を簡便に行うことを可能にする実験系の確立を目的とした。

(5) HIV 母子感染例の大半を占めるアフリカにおいて、宿主因子が HIV 母子感染に与える影響を調査した報告は少なく、その評価は確立していない。本研究では HIV コレセプターやその関連遺伝子の多型に着目し、昨年引き続き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において、遺伝子多型と HIV 母子感染との関係を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

(1) 病態進行が詳細に記載されている HIV-1 感染者 104 名の末梢血あるいは末梢血単核細胞より常法に従ってゲノム DNA を抽出した。Affymetrix 社のプロトコールに従い、ゲノム

DNA を部分切断、アダプター付加、PCR 増幅、DNase 処理、ビオチン標識の後、HIV 感染症との関わりが明らかなものから HIV 感染症との関連が全く不明なものまで一万箇所以上の一塩基多型のプローブがのっている Gene Chip Human Mapping 10K Array に一晩ハイブリダイズさせ、蛍光色素で標識の後、Affymetrix 社製のスキャナーでデータを取得し、解析した。また、HIV プロテアーゼ阻害剤ネルフィナビルを含む 3 剤複合療法を開始し、血清中の HIV-1 量を検出限界以下に抑制できた HIV-1 感染者 52 名について同様にゲノムワイドスキャンを行った。

(2) HIV サブタイプ B に感染している日本人 HIV 感染者 71 名の血漿を用いた。そのうち HLA-A24 陽性者が 38 名、HLA-A24 陰性者が 33 名であった。また感染経路は性感染が 43 名、(HLA-A24 陽性 23 人、陰性 20 人) と汚染血液製剤による感染 (血友病患者) が 28 名 (HLA-A24 陽性 15 人、陰性 13 人) であった。血漿から HIV ゲノム RNA を含むトータル RNA を抽出し HLA-A24 に提示されることの知られている 5 ヶ所のエピトープ (Gag28-9, Gag263-10, Gag296-11, Env584-11, Nef138-10) を含む領域を RT-PCR 法により増幅し、塩基配列を決定した。その結果からアミノ酸配列を決定しエピトープ同定に使われた標準株 (SF2 株) のアミノ酸配列と比較した。一部の感染者では約 1 年間隔の 2 時点以上で解析を行った。

(3) DC は健常人末梢血単核球 (PBMC) を用いて作製した。PBMC 中の付着細胞を GM-CSF、IL-4 存在下で 7 日間培養し未熟 DC

(imDC) を得、さらに TNF- α 存在下で 2 日間培養し成熟 DC (mDC) を得た。

AdV、SeV ベクターによる遺伝子導入効率の検討のため、GFP 遺伝子を発現するアデノウイルス (GFP/AdV) とセンダイウイルス (GFP/SeV) を作製し、感染に用いるウイルス量 (MOI) を AdV では MOI=50, 100, 1000, 2500、SeV では MOI=0.5, 2, 10, 50 と変化させて imDC への感染を行った。感染後経時的にフローサイトメーター (FACS) にて GFP 陽性細胞の割合とその平均蛍光強度 (MFI) を測定した。その際同時にヨウ化プロピディウム (PI) で死細胞の染色を行い、細胞毒性も検討した。

HIV Gag-Pol を発現し Rev Response Element (RRE) を持つ AdV (GPR/AdV)、HIV Rev を発現する AdV (Rev/AdV)、HIV Env を発現する AdV (Env/AdV)、また HIV Gag を発現する SeV (Gag/SeV)、HIV Env を発現する SeV (Env/SeV) を作製し imDC への感染を行い、感染細胞溶解液を抗 Gag p24 抗体と抗 Env gp120 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行い、Gag、Env の発現量を検討した。

野生型 AdV、SeV (外来遺伝子の挿入の無いウイルスベクター) の imDC への感染を行い、DC の分化の状態を表す MHC class I, MHC class II, CD83, CD86, CD40 に対する抗体を用いて染色し、FACS にて解析を行って AdV、SeV ベクター感染による DC への影響を検討した。

(4) HIV-1 の gag 遺伝子のオープンリーディングフレームにホタルのルシフェラーゼ遺伝

子のオープンリーディングフレームをフレームが合うように結合させ、出芽酵母用蛋白発現ベクターpKT10に組み込み、出芽酵母を形質転換した。得られた形質転換株の細胞壁を取り除いてスフェロプラスト化し、等張の培養液中にHIV-1様粒子が産生されるか否かを、その培養上清中のルシフェラーゼ活性測定や密度勾配遠心後のウエスタンブロット等で検討した。

(5) 1996年から2001年にかけて、ケニア西部の非都市部で行われた「短期 ZDV 投与による HIV 母子感染予防のコホート研究に参加した抗 HIV 抗体陽性の妊婦から生まれた小児のうち、HIV 感染の有無及び出生後2年間の生死が確認できた小児147名を対象とした。このうち、短期 ZDV 投与を受けた母親から生まれた小児は114名、短期 ZDV 投与を受けていない母親から生まれた小児は33名であった。あらかじめ児の末梢血リンパ球から抽出されたゲノム DNA を用い、PCR 法を用いて目的の SNP を含む領域をそれぞれ増幅した。次に、ダイレクトシーケンス法などを用いて RANTES、IL4 ならびに SDF-1 の遺伝子多型を決定した。

(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that特定できないようにして扱った。また各研究は、大阪大学研究倫理審査委員会、東京大学医科学研究所倫理審査委員会ならびに金沢大学ヒ

トゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会の承認を得てある。

C. 研究結果

(1) 病態進行が詳細に記載されている HIV-1 感染者104名を、病態進行の速い53名と緩慢な51名に分けて解析した。病態進行が緩慢な51名の中には、プロテアーゼ阻害剤あるいは非核酸系逆転写酵素阻害剤を含む三剤複合療法未経験の血友病患者で CD4 陽性細胞数が 200 個/ μl を超えるいわゆる non-progressor 症例25例が含まれる。今回は、解析の対象となる感染者の多くが血友病患者の男性であるため、Gene Chip Human Mapping 10K Array にのっている 10,204 箇所の一塩基多型のうち、X 染色体上の多型ならびに染色体が明らかでない多型を除いた 9,588 箇所の多型について解析を行った。その結果、病態進行の速い53名と緩慢な51名との間で、多型の頻度の差をカイ二乗検定で検定した時に、危険率 0.001 未満を示す多型が 11 箇所認められた。

一方、HIV プロテアーゼ阻害剤ネルフィナビルを含む三剤複合療法を開始し、血清中の HIV-1 量を検出限界以下に抑制できた HIV-1 感染者 52 名について同様の方法でゲノムワイドスキャンを行った。治療開始後一年以内に CD4 陽性細胞が 100 個/ μl 以上回復した感染者 25 名と、治療開始後一年たっても CD4 細胞が 100 個/ μl 回復できなかった感染者 27 名に分けて解析した結果、多型の頻度の差をカイ二乗検定で検定した時に危険率 0.001 未満の差を示す多型が 7 箇所認められた。そのうち一箇所は危険率 0.000002 を示し、こ

れは1万回の多重検定補正 (Bonferroniの補正) を行った後でも $P=0.02$ の危険率で有意差が認められたことになる。

(2)解析した5ヶ所のCTLエピトープのうち、3ヶ所 (Gag28-9, Env584-11, Nef138-10) において HLA-A24 陽性 HIV 感染者で高頻度に見られるアミノ酸変異が明らかになった。Gag28-9 では3番目のリジン (K) がアルギニン (R) へ (Gag28(K3R))、Env584-11 では4番目の R が K へ (Env584(R4K))、Nef138-10 では2番目のタイロシン (Y) がフェニルアラニン (F) へ (Nef138(Y2F)) の変異が高頻度に認められ、HLA-A24 陽性感染者における出現頻度は Gag28(K3R)は81%、Env584(R4K)は66%、Nef138(Y2F)は93%であった。それに対して世界的なデータベース上の HIV サブタイプ B における出現頻度を調べるとそれぞれ37%、47%、27%であり、いずれの変異の出現頻度も日本人 HLA-A24 陽性感染者で見られた出現頻度に比べて低かった。それに対して Gag263-10, Gag296-11 では標準株と同じアミノ酸配列が保持されていた。

HLA-A24 陽性 HIV 感染者での出現頻度がデータベース上の頻度に比べて特に高かった Nef138-10 に注目し、このエピトープを含む領域のアミノ酸配列の経時的変化を調べたところ、HLA-A24 陽性 HIV 感染者では Nef138(Y2F)の変異は年余に渡って維持されていた。それに対して感染初期には Nef138(Y2F)であった HLA-A24 陰性 HIV 感染者では時を経るにつれて2番目の F が標準株の配列と同じ Y に置換されていた。また、

HLA-A24 陰性 HIV 感染者における Nef138(Y2F)の出現頻度を感染経路別に解析すると、性感染群において Nef138(Y2F)の出現頻度が血友病群に比べて有意に高かった。

(3) GFP/AdV、GFP/SeV を imDC に感染後48時間でFACS解析を行った。その結果 GFP/AdV は MOI=1000 で感染させた場合に GFP 陽性細胞数は約90%、MFI=6075 で最も高く、死細胞も10%程度であった。それに対して GFP/SeV は MOI=2 で感染させた場合 GFP 陽性細胞数は約40%、MFI=1422 で最も高く、死細胞は約40%であった。

次に上記の条件 (GFP/AdV は MOI=1000 にて、GFP/SeV は MOI=2 にて感染) で DC に感染後経時的に GFP 陽性細胞数、MFI を調べたところ、GFP/AdV は感染後48時間が、GFP/SeV は24時間後が GFP 陽性細胞数、MFI ともに最も高かった。

AdV、SeV それぞれ遺伝子導入効率の最も良い条件 (AdV: MOI=1000、感染後48時間、SeV: MOI=2、感染後24時間) で GPR/AdV、Env/AdV、Gag/SeV、Env/SeV を DC への感染を行い、Gag、Env の発現量をウエスタンブロットニングにて比較したところ、Gag の発現は AdV ベクター、SeV ベクターではほぼ同等であった。GPR/AdV は Rev/AdV と重感染すると Gag の発現量は約10倍高くなった。一方、Env の発現は SeV ベクターの方が AdV ベクターに比べて約4倍高かった。

野生型 AdV、SeV を同様の条件にて imDC へ感染させ、細胞表面マーカーの発現を imDC、mDC と比較した。その結果、AdV ベクター

感染では CD83、MHC class I、MHC class II 分子の発現が著明に増加し mDC とほぼ同等の発現が見られた。一方、SeV ベクター感染では CD86、CD40、MHC class I 分子の増加が見られた。

(4) HIV-1のGag蛋白質とルシフェラーゼ蛋白質の融合蛋白質を酵母内で発現させ、細胞壁を除去してスフェロプラスト化し、等張液中で培養した。その結果、培養液中に高力価のルシフェラーゼ活性が認められた。蔗糖密度勾配遠心で分画すると、ルシフェラーゼ活性のピークは比重1.16の画分に認められ、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後、ウエスタンプロットしてHIV-1感染者血清と反応させると、HIV-1Gag蛋白質とルシフェラーゼ蛋白質との融合蛋白質の分子量にほぼ等しい約100Kdの蛋白質が、ルシフェラーゼ活性のピークと一致して認められた。以上の結果から、HIV-1のGagとルシフェラーゼの融合蛋白質は効率良く酵母細胞からHIV-1様の粒子を形成して放出されていることが明らかになった。

(5)ケニアの母子感染予防コホートにおいて、各々の SNP について、ZDV 投与群の児と ZDV 非投与群の児との間で遺伝子型の分布に差がないことを確認するために、「児の遺伝子型」と「母親に対する ZDV 投与の有無」との関係について3×2分割表を用い Fisher's exact 検定を行った。その結果、ZDV 投与群の児と ZDV 非投与群の児との間で、今回検討した遺伝子型の分布に有意差は認められなかった。なお、RANTES-28G は今回検討したケニア人には一人も認められなかった。

ZDV 投与群の児と ZDV 非投与群の児との間で遺伝子型の分布に有意差が認められなかったが、「短期 ZDV 投与による HIV-1 母子感染減少効果」と「児の遺伝子型による HIV 母子感染への影響」との混同を避けるために、ZDV 投与群の児と ZDV 非投与群の児に分けて HIV 母子感染の有無との関係を検討した。その結果、ZDV 非投与群で、RANTES プロモーター領域内の-403 が A/A である児は G/A である児に比べて母子感染の危険が減少する傾向がみられたが、有意ではなかった (OR: 0.14, [0.018, 1.161]。その他の SNP については HIV 母子感染への影響は認められなかった

D. 考察

(1) Affymetrix 社製 Gene Chip Human Mapping 10K Arrayを用い、病態進行の速いHIV-1感染者53名と緩慢な51名とについて、約1万箇所の一塩基多型を網羅的に検討した。二群間での多型の頻度の差をカイ二乗検定で検定した結果、危険率0.001未満の頻度の差を示す多型が11箇所認められた。現在、これら11箇所の多型を、今回解析しなかった他の HIV-1感染者集団で検討し、病態進行に関して同様の傾向が認められるか否か、検討している。また、今回得られたデータを用いて、連鎖不平衡が及ぶ1000キロ塩基以内の距離にある多型を組み合わせることによって、二群間の頻度の差についての統計学的有意性が向上する組み合わせが存在するか否かの検討を行っている。

抗HIV薬の有効性の個人差を決定する宿主

因子の検索も本研究の重要な課題である。しかし抗HIV-1薬の有効性には、HIV-1側の耐性変異の有無が大きく関わるため解析は容易ではない。そこで、今回は、HIVプロテアーゼ阻害剤ネルフィナビルを含む3剤複合療法を開始し、血清中のHIV-1量を検出限界以下に抑制できたHIV-1感染者を対象を絞り、CD4陽性細胞の回復速度の違いに関わる宿主因子の探索を行った。その結果、CD4陽性細胞の回復の速い群と緩慢な群とで危険率0.001以下の頻度の違いを示す遺伝子多型が7箇所認められた。そのうち一箇所は、1万回の多重検定補正を行った後でも $P=0.02$ の危険率で有意差が認められたため、現在、この多型の近傍の遺伝子内に連鎖する多型が存在するか否か検討している。

(2)本研究では日本人で高頻度に見られるHLA-A24に注目し、複数のHLA-A24拘束性CTLエピトープを含む領域の遺伝子解析を行うことによって、日本で流行しているHIVの特性を調べた。その結果、一部のエピトープではHLA-A24陽性感染者で高頻度に見られる特定のアミノ酸変異があることが明らかとなった。このうち、特に日本人集団において出現頻度の高かったNef138(Y2F)に注目して詳細な解析を行ったところ、Nef138(Y2F)はHLA-A24陽性感染者体内では維持されるのに対して、HLA-A24陰性感染者体内では数ヶ月～数年のうちに野生型が優勢となることが明らかになった。この結果からNef138(Y2F)を持つHIVは野生型のHIVに比べてHLA-A24を持つ個体で選択され、優位に増殖できることが示唆された。

Nef138(Y2F)は、HIVの増殖にとって負の影響を及ぼす変異であるが、CTLによる選択下では優位なウイルスとして選択される、ことが示唆された。

また、HLA-A24陰性感染者において、血友病患者群に比べて性感染群で有意にNef138(Y2F)の出現頻度が高いことが明らかになった。血友病患者群は欧米から輸入された汚染血液製剤により感染しており、1980年代に欧米で流行したHIVに感染したと考えられる。それに対して性感染群は日本国内で流行しているHIVに感染していることから、日本ではNef138(Y2F)を持つ変異HIVが流行していることが示唆された。

(3)本研究ではDCへのHIVタンパク質の遺伝子導入を目的としてAdVベクター、SeVベクターの有用性を検討した。SeVベクターは低いMOIでも効率よく遺伝子を導入することが可能であり、AdVベクターは高いMOIを必要とするが、細胞毒性は低いことが明らかになった。HIVタンパク質の発現はAdV、SeVベクターどちらも高いことが示された。

DCは抗原取り込み能が高いimDCから抗原提示能が高いmDCへと分化するが、細胞性免疫応答を効率よく賦活化するためにはmDCへの分化(成熟化)が重要である。AdV、SeVベクターともにimDCに感染するとmDCで発現が高いことが知られているCD83、CD86、MHC class I、MHC class II分子の発現が上昇していたことから、DCの成熟化を誘導することが明らかになった。これらの結果からAdV、SeVともにHIV感染症に対する免疫遺伝子治療ベクターとして有用であ

ることが示唆された。

(4) HIV-1 の Gag 蛋白質とルシフェラーゼ蛋白質との融合蛋白質を出芽酵母内で発現させ細胞壁を除去したところ、培養上清中にルシフェラーゼが HIV-1 様粒子の形で放出されていることが明らかになった。ルシフェラーゼ活性は培養上清から濃縮や精製することなく検出可能であり、この系を用いて酵母の遺伝子欠損ライブラリーの中から HIV 様粒子産生能を失った株の選別を簡便に行うことが初めて可能になった。

(5) RNATES-403A/A をもつ児は HIV-1 母子感染の危険が減少する傾向が認められたが、有意な相関を見出すことは出来なかった。今後、これらの SNP の出生後の生存率推移への影響も併せて検討したい。

E. 結論

(1) 病態進行が詳細に記載されている HIV-1 感染者の持つ遺伝子多型について、DNAチップを利用したゲノムワイドスキャンを行って約一万箇所の一塩基多型を網羅的に検討し、病態進行速度と関連する可能性の高い11箇所候補遺伝子多型を見出した。また、HIV プロテアーゼ阻害剤ネルフィナビルを含む3剤複合療法を開始し、血清中の HIV-1 量を検出限界以下に抑制できた HIV-1 感染者について、ゲノムワイドスキャンを行い、CD4陽性細胞数の回復速度と相関する可能性の高い7箇所候補遺伝子多型を見出した。

(2) 本研究ではワクチン開発において重要な因子である「抗原」と「免疫方法」に関する基礎的検討を行った。HIV は変化の激しいウイ

ルスであり、地域ごとに流行している HIV は大きく異なっている。本邦における HIV 感染症に対するワクチン開発において、本研究で明らかになった日本で流行している HIV に対する知見は重要な情報である。

(3) 樹状細胞への遺伝子導入ベクターとしてアデノウイルス、センダイウイルスベクターの有用性が明らかになった。今後、これらの知見をもとに HIV 感染症に対する効果的な治療ワクチンの開発が期待される。

(4) HIV-1 の Gag 蛋白質とルシフェラーゼ蛋白質の融合蛋白質を酵母内で発現させ細胞壁を取り除いたところ、培養液中に効率良くルシフェラーゼ活性を含んだ HIV-1 様粒子が産生されることが明らかになり、酵母の遺伝子欠損ライブラリーの中から HIV 様粒子産生能を失った株の選別を簡便に行うことが初めて可能になった。

(5) RNATES-403A/A をもつ児は HIV-1 母子感染の危険が減少する傾向が認められたが、有意な相関を見出すことは出来なかった。

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).

Nakayama, E. E., Miyoshi, H., Nagai, Y.,

and Shioda, T. A specific region of 37 amino acid residues in the SPRY (B30.2) domain of African green monkey TRIM5 α determines species-specific restriction of SIVmac infection. *J. Virol.* In press.

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.

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.

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.

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.

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.

Kita K, Ichimura H, et al.: Genetic Diversity of HIV Type 1 in Likasi, Southeast of the Democratic Republic of Congo. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 20(12): 1352-7, 2004.

Ndembi N, Ichimura H, et al.: Genetic Diversity of HIV Type 1 in Rural Eastern Cameroon. *J Acquir Immune Defic Syndr* 37(5):1641-1650, 2004

Songok EM, Ichimura H, et al.: Active generation and selection for HIV intersubtype A/D recombinant forms in a co-infected patient in Kenya. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 20(2): 255-8, 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.

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

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 β 2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.

HIV 感染流行予測のための HCV 感染動態の検討。景山誠二、市村宏。第 52 回日本ウイルス学会学術集会。2004. 11, 横浜.

HIV-2感染例における血中ウイルス量の増加とその多様性の推移。景山誠二、市村宏。第 18 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2004, 12, 静岡.

HIV-1 subtypes in the northern border region of Kenya. Lwembe R, 市村宏、他.

第18回日本エイズ学会学術集会・総会,
2004, 12, 静岡.

中央アフリカ地域におけるHIV-1の多様性の
拡大と新しい組換えウイルス群の出現. 原田
礼忠、市村宏、他. 第18回日本エイズ学会
学術集会・総会, 2004, 12, 静岡.

Loop-mediated Isothermal Amplification

(LAMP)法を用いたHIV-1 RNAの検出. 保坂
憲光、市村宏、他. 第18回日本エイズ学会
学術集会・総会, 2004, 12, 静岡.

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

ゲノム情報を用いたエイズ発症阻止に関する研究

主任研究者 塩田 達雄（大阪大学微生物病研究所教授）

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)病態進行が詳細に記載されているHIV-1感染者の遺伝子多型について、DNAチップを利用したゲノムワイドスキャンを行ってHIV感染症との関わりが明らかなものからHIV感染症との関連が全く不明なものまで約一万箇所の一塩基多型を網羅的に検討し、病態進行速度と関連する可能性の高い11箇所の候補遺伝子多型を見出した。

(2)HIVプロテアーゼ阻害剤ネルフィナビルを含む3剤複合療法を開始し、血清中のHIV-1量を検出限界以下に抑制できたHIV-1感染者について、(1)と同様にゲノムワイドスキャンを行い、CD4陽性細胞数の回復速度と相関する可能性の高い7箇所の候補遺伝子多型を見出した。

(3)遺伝子改変が容易な酵母のHIV様粒子産生系を用いて、HIV粒子産生に関わる宿主因子の探索を行っている。本年度は、HIV-1のGag蛋白質とルシフェラーゼ蛋白質の融合蛋白質を酵母内で発現させ細胞壁を取り除いたところ、培養液中に効率良くルシフェラーゼ活性を含んだHIV1-様粒子が産生されることが明らかになった。この系を用いることにより、酵母の遺伝子欠損ライブラリーの中からHIV様粒子産生能を失った株の選別を簡便に行うことが可能になった。

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の個人差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) 病態進行が詳細に記載されている HIV-1

感染者 104 名の遺伝子多型について、Affymetrix 社製 Gene Chip Human Mapping 10K Array を利用したゲノムワイドスキャンを行って HIV 感染症との関わりが明らかなものから HIV 感染症との関連が全く不明なものまで約一万箇所の一塩基多型を網羅的に検討し、病態進行速度と関連する可能性の高い候補遺伝子多型を見出すことを目的とした。

(2) HIV プロテアーゼ阻害剤ネルフィナビルを含む3剤複合療法を開始し、血清中のHIV-1量を検出限界以下に抑制できた HIV-1 感染者 52 名について(1)と同様にゲノムワイドスキャンを行い、CD4 陽性細胞数の回復速度と相関する可能性の高い候補遺伝子多型を見出すこ

とを目的とした。

(3) 遺伝子改変が容易な酵母の HIV 様粒子産生系を用いて、HIV 粒子産生に関わる宿主因子の探索を行っている。本年度は、酵母の遺伝子欠損ライブラリーの中から HIV 様粒子産生能を失った株の選別を簡便に行うことを可能にする実験系の確立を目的とした。

B. 研究方法

(1) 病態進行が詳細に記載されている HIV-1 感染者 104 名の末梢血あるいは末梢血単核細胞より常法に従ってゲノム DNA を抽出した。Affymetrix 社のプロトコールに従い、ゲノム DNA を部分切断、アダプター付加、PCR 増幅、DNase 処理、ビオチン標識の後、HIV 感染症との関わりが明らかなものから HIV 感染症との関連が全く不明なものまで一万箇所以上の一塩基多型のプローブがのっている Gene Chip Human Mapping 10K Array に一晚ハイブリダイズさせ、蛍光色素で標識の後、Affymetrix 社製のスキャナーでデータを取得し、解析した。

(2) HIV プロテアーゼ阻害剤ネルフィナビルを含む 3 剤複合療法を開始し、血清中の HIV-1 量を検出限界以下に抑制できた HIV-1 感染者 52 名について(1)と同様の方法でゲノムワイドスキャンを行った。

(3) HIV-1 の gag 遺伝子のオープンリーディングフレームにホタルのルシフェラーゼ遺伝子のオープンリーディングフレームをフレームが合うように結合させ、出芽酵母用蛋白発現ベクター pKT10 に組み込み、出芽酵母を形質転換した。得られた形質転換株の細胞壁を

取り除いてスフェロプラスト化し、等張の培養液中に HIV-1 様粒子が産生されるか否かを、その培養上清中のルシフェラーゼ活性測定や密度勾配遠心後のウエスタンブロット等で検討した。

(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。日本人 HIV-1 感染者の遺伝子解析は平成 13 年に大阪大学研究倫理審査委員会の承認を得た。

C. 研究結果

(1) 病態進行が詳細に記載されている HIV-1 感染者 104 名を、病態進行の速い 53 名と緩慢な 51 名に分けて解析した。病態進行が緩慢な 51 名の中には、プロテアーゼ阻害剤あるいは非核酸逆転写酵素阻害剤を含む三剤複合療法未経験の血友病患者で CD4 陽性細胞数が 200 個/μl を超えるいわゆる non-progressor 症例 25 例が含まれる。今回は、解析の対象となる感染者の多くが血友病患者の男性であるため、Gene Chip Human Mapping 10K Array にのっている 10,204 箇所の一塩基多型のうち、X 染色体上の多型ならびに染色体が明らかでない多型を除いた 9,588 箇所の多型について解析を行った。

表 1 に 104 検体について行った 9,588 箇所の多型解析の結果を示す。9,588 箇所の多型のうち、104 検体全てについて多型の有無を決

定できたのが3,697箇所 (39%)、95%の検体で74%の多型、90%の検体で86%の多型、80%の検体で95%の多型を決定できたことになる。

表2に病態進行の速い53名と緩慢な51名との間で、頻度が異なる多型の数を示す。多型の頻度の差をカイ二乗検定で検定して、危険率0.001未満の多型が11箇所認められた。

(2) HIVプロテアーゼ阻害剤ネルフィナビルを含む3剤複合療法を開始し、血清中のHIV-1量を検出限界以下に抑制できたHIV-1感染者52名について(1)と同様の方法でゲノムワイドスキャンを行った。治療開始後一年以内にCD4陽性細胞が100個/ μ l以上回復した感染者25名と、治療開始後一年たってもCD4細胞が100個/ μ l回復できなかった感染者27名に分けて解析した結果を図3に示す。多型の頻度の差をカイ二乗検定で検定した場合、危険率0.001未満の差を示す多型が7箇所認められた。そのうち一箇所は危険率0.000002を示し、これは1万回の多重検定補正 (Bonferroniの補正) を行った後でも $P=0.02$ の危険率で有意差が認められたことになる。

(3) HIV-1のGag蛋白質とルシフェラーゼ蛋白質の融合蛋白質を酵母内で発現させ、細胞壁を除去してスフェロプラスト化し、等張液中で培養した。その結果、培養液中に高力価のルシフェラーゼ活性が認められた。蔗糖密度勾配遠心で分画すると、ルシフェラーゼ活性のピークは比重1.16の画分に認められ、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後、ウエスタンブロットしてHIV-1感染者血清と反応させると、HIV-1Gag蛋白質とルシフェラーゼ蛋白質との融合蛋白質の分子量にほぼ

等しい約100Kdの蛋白質が、ルシフェラーゼ活性のピークと一致して認められた。以上の結果から、HIV-1のGagとルシフェラーゼの融合蛋白質は効率良く酵母細胞からHIV-1様の粒子を形成して放出されていることが明らかになった。

D. 考察

(1) Affymetrix社製 Gene Chip Human Mapping 10K Arrayを用い、病態進行の速いHIV-1感染者53名と緩慢な51名について、約1万箇所の一塩基多型を網羅的に検討した。二群間での多型の頻度の差をカイ二乗検定で検定した結果、危険率0.001未満の頻度の差を示す多型が11箇所認められた。現在、これら11箇所の多型を、今回解析しなかった他のHIV-1感染者集団で検討し、病態進行に関して同様の傾向が認められるか否か、検討している。また、今回得られたデータを用いて、連鎖不平衡が及ぶ1000キロ塩基以内の距離にある多型を組み合わせることによって、二群間の頻度の差についての統計学的有意性が向上する組み合わせが存在するか否かの検討を行っている。

(2) 抗HIV薬の有効性の個人差を決定する宿主因子の検索も本研究の重要な課題である。しかし抗HIV-1薬の有効性には、HIV-1側の耐性変異の有無が大きく関わるため解析は容易ではない。そこで、今回は、HIVプロテアーゼ阻害剤ネルフィナビルを含む3剤複合療法を開始し、血清中のHIV-1量を検出限界以下に抑制できたHIV-1感染者を対象を絞り、CD4陽性細胞の回復速度の違いに関わる宿主

因子の探索を行った。その結果、CD4陽性細胞の回復の速い群と緩慢な群とで危険率0.001以下の頻度の違いを示す遺伝子多型が7箇所認められた。そのうち一箇所は、1万回の多重検定補正を行った後でもP=0.02の危険率で有意差が認められたため、現在、この多型の近傍の遺伝子内に連鎖する多型が存在するか否か検討している。

(3) HIV-1のGag蛋白質とルシフェラーゼ蛋白質との融合蛋白質を出芽酵母内で発現させ細胞壁を除去したところ、培養上清中にルシフェラーゼがHIV-1様粒子の形で放出されていることが明らかになった。ルシフェラーゼ活性は培養上清から濃縮や精製することなく検出可能であり、この系を用いて酵母の遺伝子欠損ライブラリーの中からHIV様粒子産生能を失った株の選別を簡便に行うことが初めて可能になった。

E. 結論

(1) 病態進行が詳細に記載されているHIV-1感染者の持つ遺伝子多型について、DNAチップを利用したゲノムワイドスキャンを行って約一万箇所の一塩基多型を網羅的に検討し、病態進行速度と関連する可能性の高い11箇所の候補遺伝子多型を見出した。

(2) HIVプロテアーゼ阻害剤ネルフィナビルを含む3剤複合療法を開始し、血清中のHIV-1量を検出限界以下に抑制できたHIV-1感染者について、ゲノムワイドスキャンを行い、CD4陽性細胞数の回復速度と相関する可能性の高い7箇所の候補遺伝子多型を見出した。

(3) HIV-1のGag蛋白質とルシフェラーゼ蛋

白質の融合蛋白質を酵母内で発現させ細胞壁を取り除いたところ、培養液中に効率良くルシフェラーゼ活性を含んだHIV-1様粒子が産生されることが明らかになり、酵母の遺伝子欠損ライブラリーの中からHIV様粒子産生能を失った株の選別を簡便に行うことが初めて可能になった。

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).

Nakayama, E. E., Miyoshi, H., Nagai, Y., and Shioda, T. A specific region of 37 amino acid residues in the SPRY (B30.2) domain of African green monkey TRIM5 α determines species-specific restriction of SIVmac infection. *J. Virol.* 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. 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 β 2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。

表1.一塩基多型タイプピングの結果

決定できた検体数	一塩基多型の数	%
17	1	0.01
34-38	2	0.02
39-43	3	0.03
44-48	5	0.05
49-53	12	0.13
54-58	12	0.13
59-64	18	0.19
64-68	44	0.46
69-73	63	0.66
74-78	133	1.39
79-83	185	1.93
84-88	345	3.6
89-93	560	5.84
94-98	1096	11.4
99-103	3412	35.6
104	3697	38.6
合計	9588	100

表2. HIV-1感染症の病態進行速度の速い感染者と
緩慢な感染者との間で頻度の異なる一塩基多型の数

P value*	一塩基多型の数
<0.0001	0
0.0001-0.001	11
0.001-0.01	81
0.01-0.05	402
>0.05	9094
合計	9588

*多型頻度についてのカイ二乗検定による

表3. 治療開始後のCD4+細胞数回復の速い感染者と
緩慢な感染者との間で頻度の異なる一塩基多型の数

P value*	一塩基多型の数
<0.000001	0
0.000001-0.00001	1
0.00001-0.0001	0
0.0001-0.001	6
0.001-0.01	82
0.01-0.05	408
>0.05	9091
合計	9588

*多型頻度についてのカイ二乗検定による

厚生労働科学研究費補助金（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

エイズワクチン開発とエイズ発症阻止に関する基礎的研究

分担研究者 岩本 愛吉

東京大学医科学研究所先端医療研究センター感染症分野

研究要旨 HIV に対する防御において、細胞性免疫が大きな役割を果たす。CTL は、感染細胞表面の HLA クラス I 分子上に結合した HIV 由来の蛋白質の一部（CTL エピトープ）を認識してその機能を発揮するが、HLA のゲノム多型性には民族差が存在する。日本人は、約 7 割が HLA-A24 を発現する特長ある集団である。そこで我々は、CTL エピトープに注目して日本人の間で流行している HIV の特性を明らかにした。また、HIV 特異的 CTL を賦活化するための免疫遺伝子治療ベクターとしてアデノウイルスベクターとセンダイウイルスベクターの有用性について検討した。

A. 研究目的

抗 HIV 薬の進歩、多剤併用療法（HAART）の導入により HIV 感染症は「コントロール可能な慢性感染症」的な側面を持つようになってきた。しかしながら薬剤耐性ウイルスの出現、長期服用による副作用、医療費増加といった深刻な問題点も多々存在し、抗 HIV 薬のみに依存しない治療法の開発が急務である。HIV は感染個体において非常に強い免疫応答を誘導することが知られており、特に HIV 特異的細胞性免疫が HIV のコントロールに重要であることが知られている。我々のグループでは、HAART の効果を補填するような治療ワクチンの開発を目指しているが、その基礎として日本で流行している HIV について、細胞傷害性 T 細胞（CTL）の標的となる配列（CTL エピトープ）の解析を行うとともに、効果的な遺伝子免疫治療ベクターについての検討を行った。

HIV は変異を起こしやすいウイルスであり、宿主の免疫応答に対応した変異体が選択される可能性がある。CTL は HLA class I 分子によって提示された抗原ペプチド（CTL エピトープ）を認識するが、多

型性に富む HLA は、民族によって異なった分布を示す。遺伝的背景をことにする集団において、どのような特徴を持った HIV が流行しているかを解析することは、治療ワクチンあるいは予防ワクチンの開発において極めて重要な基礎的データを提供すると考える。本研究では日本人の約 70%が発現する HLA class I 分子（HLA-A24）により提示される HIV の CTL エピトープに注目し、日本で流行している HIV の遺伝子解析を行った。

ついで、どのように有効な免疫強化手段が有効か、について基礎的検討を行った。強力な抗原提示細胞であり、細胞性免疫応答の賦活化に有効な樹状細胞（DC）を用いた免疫強化手段として、ペプチド、蛋白、遺伝子治療ベクター等の可能性が考えられる。本研究ではウイルスベクターの中でも、DC に関して既に検討が行われているアデノウイルス（AdV）と比較しながら国産ベクターであるセンダイウイルス（SeV）の有用性の比較を行った。DC への遺伝子導入効率と細胞毒性、及びタンパク質発現量を比較し、さらにウイルスベクター導入による DC への影響を検討した。