

200500696 B

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15～17年度 総合研究報告書

主任研究者 岩本愛吉

平成18年3月

# CONTENTS

<b>I. 総合研究報告</b>	
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	
<b>・ 分担研究報告</b>	
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	18
静岡県立こども病院： 副院長 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	24
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	33
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	42
熊本大学エイズ学研究センター・ウイルス制御分野： 教授 滝口雅文	
7. HIV感染症の病態と宿主の免疫応答の研究	50
熊本大学エイズ学研究センター病態制御分野： 教授 松下修三	
8. エイズ発症阻止に関する研究	56
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	62
京都大学ウイルス研究所・エイズ研究施設感染病態研究領域： 教授 小柳義夫	
10. 免疫調節能を有する樹状細胞を用いたエイズ制御の研究	84
琉球大学医学部免疫学分野： 教授 田中勇悦	
11. 「Vprを標的としたエイズ発症阻止」に関する研究	91
国立国際医療センター研究所： 部長 石坂幸人	
<b>II. 研究成果の刊行に関する一覧表</b>	95
<b>III. 研究成果の刊行物・別刷</b>	115

総合研究報告書

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、エイズ発症阻止に直結する方法論の確立を目指した。(1)ではタイにおける HIV 感染コホートや日本人 HIV 感染血友病患者において SNPs 解析及びトランスクリプトーム解析を行った。ヒトとマウスの相同遺伝子座の解析からレトロウイルス抵抗性の可能性を持つ遺伝子座を同定した。(2)では、医科学研究所において治療ワクチントライアルを行い、安全性や臨床検体の解析を行った。(3)では、HIV 抵抗性を持つ宿主因子の機能ドメインが明らかにされ、全く新規の HIV 抵抗性宿主因子を見出し、その解析を進めた。ウイルス因子としては Vpr、Nef の研究を行った。Hu-PBL-SCID マウス系を用いて HIV 抵抗性を誘導できる樹状細胞の試験管内分化法を開発や治療薬候補薬剤の検討を行った。

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）  
宮澤正顯（近畿大学医学部・教授）  
滝口雅文（熊本大学エイズ学センター・教授）  
松下修三（熊本大学エイズ学センター・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ず、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った。

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 感染血友病患者のコホート研究を行った（三間屋・渡辺）。マウス・フレンド白血病ウイルス (Fv) 感染時の中和抗体産生を制御する宿主遺伝子をバッククロス実験等により同定した。イタリアの HIV 暴露非感染を含むコホート研究と共同し、ヒトの相同位置にある遺伝子座の連鎖不平衡から HIV 感染抵抗性遺伝子を同定した（宮澤）。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）

文部科学省、厚生労働省、経済産業省合同の『ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針』および文部科学省、厚生労働省合同の『疫学研究に関する倫理指針』に該当する研究においてはこれらを遵守する。本研究の成果をヒトに臨床応用する場合には研究担当者の所属する機関の承認を得、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得た上で、安全に細心の注意を払う。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

IL4-589T のホモ接合体あるいは RANTES-28G を持つ HIV 感染者はそれぞれの対照群より死亡率が低い。一方、RANTES-403A を持つ HIV 感染者は対照群より優位に死亡率が高い (塩田)。HIV に感染してほぼ 20 年経過している日本人血友病者のコホートを再編成し、長期未発症者 (LTNP) を含め、平成 15 年度には 117 検体を収集した (三間屋)。感染時期がおおよそ特定できる HIV 感染血友病 (LTP 5 例を含む) の総計 111 の培養末梢血由来リンパ球から遺伝子発現プロファイリングを行ったが、LTNP に特異的な発現を示す遺伝子の特定にはいたらなかった (渡辺)。Fv 抵抗性遺伝子をマウス第 15 染色体上 D15Mit71 近傍にマップした。抗体産生能に関係ありそうな候補遺伝子をレンチウイルスベクターでマウス受精卵に導入し、その機能同定を行っている。マウス第 15 染色体上 D15Mit71 近傍と相同的なヒト D22S272 近傍の解析をイタリアの HIV 暴露非感染コホートで行い、暴露非感染者で頻度が高い新規 SNP を発見した (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 例に対して実施した。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。4 名中 2 名で Nef138 エピトープに特異的に反応する CD8 陽性細胞の増加が見られた (岩本)。HLA-B\*3501 陽性患者の HIV 遺伝子配列解析から CTL による選択圧の結果と思われる特異変異を見出した (滝口)。HIV 感染後 10 年以上未治療・未発症の HIV 感染血友病患者では HLA-B\*1507 の頻度が高く、HLA-B\*5401 の頻度が低い。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)。HIV の中和エスケープに関して env 遺伝子可変部位のみならず C3 領域の配列の変異も重要であることを明らかにした (松下)。

#### (3) HIV の病態に関わる宿主側及びウイルス側の因子

HIV 感染抵抗性宿主因子 TRIM5 $\alpha$  の B30.2 領域がウイルス特異性を決定していることを見出した (塩田)。HIV 感染に重要な宿主因子として Nup98 及び CD63 (+その変異体 CD63dN) を同定した。核膜孔複合体の構成蛋白質である Nup98 はウイルス cDNA の核内移行に必須である。CD63 の N 末端欠損変異体は CXCR4 の細胞表面発現を完全に抑制し、HIV 感染抵抗性に働く。野生型の CD63 も HIV 感染粒子の形成を 100 分の 1 以下に抑制する (小柳)。OVA 特異的 T 細胞レセプターとアデノウイルスレセプターを共発現す

るトランスジェニックマウスを作製し、nef 遺伝子組換えアデノウイルスベクターにより成熟 T 細胞に Nef を発現させた。Nef 発現により T 細胞の表現型がヘルパー型から抑制型に変化する可能性が示されたが確認にはいたらなかった。Nef 発現 T 細胞はヘルパー活性が低下し、nef による CD4 発現抑制が原因と考えられた (竹森)。Vpr の発現によって高頻度に染色体分離異常が認められ、染色体 DNA の二重鎖切断 (Double strand breaks: DSB) が誘導されることを見出した。患者血清中の 100pg~1ng/ml 程度の Vpr を検出できる測定系を開発した (石坂)。Hu-PBL-SCID マウスの実験系を用いてケモカインレセプター阻害薬の効果や耐性ウイルスの出現を検討できる系を作製した。IL4 または IL4+GM-CSF 存在下で抗 CCR5 及び抗 CXCR4 単クローン抗体を用いて単球を架橋すると樹状細胞 (DC) に分化した。この DC を不活化 HIV 粒子で感作すると R5 HIV 抑制因子を産生する CD4 陽性細胞を誘導した。ここにさらに CXCR4 阻害薬を投与すると R5 ウイルスと X4 ウイルスの重感染に抵抗性となった (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  
タイ国では HIV 感染のうねりが男性から女性へと大きく変化した。ランバ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、女性においてのみ有意差の見られた SNP もあった (塩田)。平成 15 年度に LTNP に特徴的な発現を示すと考えられた 21 遺伝子は LTNP が 3 例しか含まれていなかったためのノイズであると考えられた。LTNP 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。(渡辺)。HIV 暴露非感染者と感染パートナーとで対立遺伝子頻度の異なるマイクロサテライトマーカーと SNP 遺伝子座を発見した (宮澤)。

#### (2) HIV 特異的細胞性及び液性免疫

“治療ワクチン”によって特異免疫を誘導できなかった 2 症例は HAART 開始前の最低 CD4 数が低く (50 及び 2/ $\mu$ l)、いったん免疫が荒廃した感染者ではワクチン効果がより不良である可能性が示唆された (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)。発症促進の可能性が認められた HLA-B\*5401 は、欧米人には少ないが日本人や中国人では頻度の高いアレルである (三間屋)。高い交差中和抗体活性を持つ LTNP から新規の中和抗体を樹立しその中和メカニズムを研究する必要がある (松下)。

#### (3) HIV の病態に関わる宿主側及びウイルス側の因子

Nup98 及び CD63 とその変異体の 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

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)。血清中の Vpr が測定できるようになったことで、HIV 感染病態と Vpr の関係が新たな側面から解析できる。Vpr によるクロマチンリモデリングが静止期の細胞への HIV の感染能力やエイズにおける悪性腫瘍の多発に関連している可能性がある(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。単球上のケモカインレセプターを架橋することにより Th1 誘導性 DC を培養誘導できることを発見した。これらの実験系を使って未知の R5 HIV 抑制性 CD4 ファクターを発見できた(田中)。

#### E. 結論

HIV 抵抗性遺伝子や SNPs の同定、治療ワクチンの臨床応用研究等で成果を挙げたが、今後メンバーの組換え等により新たな視点や共同研究を盛り込み、エイズ発症阻止に向けたさらなる研究が必要である。

#### F. 研究発表

##### 別紙

##### 主任研究者

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. Rojanawiwat, A., Miura, T., Thaisri, H., Pathipvanich, P., Umnajsirisuk, S., Koibuchi, T., Vongheree, S., Iwamoto, A., Ariyoshi, K., and Sawanpanyalert, P. Frequent detection of Epstein-Barr virus and cytomegalovirus but not JC virus DNA in cerebrospinal fluid samples from human immunodeficiency virus-infected patients in northern Thailand. *J. Clin. Microbiol.* 43:3484-3486, 2005.

6. Tomonari, A., Takahashi, S., Shimohakamada, Y., Ooi, J., Takasugi, K., Ohno, N., Konuma, T., Uchimaru, K., Tojo, A., Odawara, T., Nakamura, T., Iwamoto, A., and Asano, S. Unrelated cord blood transplantation for a human immunodeficiency virus-1-seropositive patient with acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplantation* 36:261-262, 2005.

##### 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.
2. Emi E. Nakayama, Hiroyuki Miyoshi, Yoshiyuki Nagai, and Tatsuo Shioda. A specific region of 37 amino acid residues in the SPRY (B30.2) domain of African green monkey TRIM5 $\alpha$  determines species-specific restriction of SIVmac infection. *J. Virol.* 79, 8870-8877, 2005.
3. Kazuyasu Mori, Chie Sugimoto, Shinji Ohgimoto, Emi E. Nakayama, Tatsuo Shioda, Shigeru Kusagawa, Yutaka Takebe, Munehide Kano, Tetsuro Matano, Takae Yuasa, Masaaki Miyazawa, Yumiko Takahashi, Michio Yasunami, Akinori Kimura, Naoki Yamamoto, Yasuo Suzuki, and Yoshiyuki Nagai. Influence of glycosylation on the efficacy of an Env-based vaccine against SIVmac239 in a macaque AIDS model. *J. Virol.* 79, 10386-10396, 2005.
4. Nuanjun Wichukchinda, Emi E Nakayama, Archawin Rojanawiwat, Panita Pathipvanich, Wattana Auwanit, Suthon Vongsheree, Koya Ariyoshi, Pathom Sawanpanyalert, and Tatsuo Shioda. Protective Effects of IL-4 -589T and RANTES -28G on HIV-1 disease progression in infected Thai females. *AIDS.* in press.

##### 三間屋純一

1. Munkanta M, Terunuma H, Takahashi M, Hanabusa H, Miura T, Ikeda S, Sakai M, Fujii T, Takahashi Y, Oka S, Matsuda J, Ishikawa M, Taki M, Takashima Y, Mimaya J, Ito M, Kimura A, Yasunami M: HLA-B polymorphism in Japanese HIV-1-infected long-term surviving hemophiliacs. *Viral Immunology* 18, 500-505, 2005.

##### 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. Sakamoto A, Imai J, Nishikawa A, Honma R, Ito E, Yanagisawa Y, Kawamura M, Ogawa R, Watanabe S. Influence of inhalation anesthesia assessed by comprehensive gene expression profiling. *Gene.* (2005) 356:39-48.

##### 宮澤正顯

1. 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.
2. Sugahara, D., S. Tsuji-Kawahara, and M. Miyazawa. Identification of a protective CD4<sup>+</sup> T-cell epitope in p15<sup>gag</sup> of Friend murine leukemia virus and role of the MA protein targeting to the plasma membrane in immunogenicity. *J. Virol.* 78: 6322-6334, 2004.
  3. Kanari, Y., M. Clerici, H. Abe, H. Kawabata, D. Trabattoni, S. Lo Caputo, F. Mazzotta, H. Fujisawa, A. Niwa, C. Ishihara, Y. A. Takei, and M. Miyazawa. Genotypes at chromosome 22q12-13 are associated with HIV-1-exposed but uninfected status in Italians. *AIDS* 19: 1015-1024, 2005.
  4. Kawabata, H., A. Niwa, S. Tsuji-Kawahara, H. Uenishi, N. Iwanami, H. Matsukuma, H. Abe, N. Tabata, H. Matsumura, and M. Miyazawa. Peptide-induced immune protection of CD8<sup>+</sup> T cell-deficient mice against Friend retrovirus-induced disease. *Int. Immunol.*: in press, 2005.
- 滝口雅文
1. Ueno T., Tomiyama H., Fujiwara M., Oka S., and Takiguchi M.: Functionally impaired HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells show high-affinity T cell receptor-ligand interactions. *J. Immunol.* 173: 5451-5457, 2004.
  2. Ueno T., Fujiwara M., Tomiyama H., Onodera M., and Takiguchi M.: Reconstitution of anti-HIV effector functions of primary human CD8<sup>+</sup> T lymphocytes by transfer of HIV-specific  $\alpha\beta$  TCR genes, *Eur. J. Immunol.*, 34(12): 3379-3388, 2004.
  3. Fujiwara, M., Takata H., Oka S., Tomiyama H., and Takiguchi, M.: Patterns of cytokine production in HIV-1-specific human CD8<sup>+</sup> T cells after stimulation with HIV-1-infected CD4<sup>+</sup> T cells, *J. Virol.* 79: 12536-12543, 2005.
- 松下修三
1. Yoshimura, K., Ido, E., Akiyama, H, Kimura, T., Aoki, M., Suzuki, H., Mitsuya, H., Hayami, M., Matsushita, S. The impact of highly active antiretroviral therapy by the oral route on the CD8 subset in monkeys infected chronically with SHIV89.6P. *J. Virol. Methods.* 112:121-128, 2003.
  2. Koito, A., Kameyama, Y., Cheng-Mayer, C., Matsushita, S. Susceptibility of mink (Mustelavision)-derived cells to replication by human immunodeficiency virus type-1. *J. Virol.*, 77:5109-5117, 2003.
  3. Matsushita, S., Yoshimura, K., Kimura T., Kamihira, A., Takano, M., Eto, K., Shirasaka, T., Mitsuya, H., Oka, S.: Spontaneous recovery of hemoglobin and neutrophil levels in Japanese patients on a long-term Combivir® containing regimen. *J.Clin.Virol.* 33:188-193, 2005
4. Sakaguchi, N., Kimura T., Matsushita, S., Fujimura S., Shibata J., Araki M., Sakamoto T., Minoda S., and Kuwahara K. Generation of high-affinity antibody against T cell-dependent antigen in ganp gene-transgenic mouse. *J. Immunol.* 174 : 4485-4494, 2005.
- 小柳義夫
1. Miura Y, Misawa N, Kawano Y, Okada H, Inagaki Y, Yamamoto N, Ito M, Yagita H, Okumura K, Mizusawa H, Koyanagi Y. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induces neuronal death in a murine model of HIV central nervous system infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100: 2777-2782, 2003.
  2. 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.
  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. 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  $\gamma$ -chain-knocked-out AIDS mouse model. *J. Virol.* 79: 2087-2096, 2005.
- 竹森利忠
1. Honma K, Udono H, Kohno T, Yamamoto K, Ogawa A, Takemori T, Kumatori A, Suzuki S, Matsuyama T, Yui K. Interferon regulatory factor 4 negatively regulates the production of proinflammatory cytokines by macrophages in response to LPS. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102: 16001-16006, 2005
  2. Takahashi, Y., Inamine, A., Hashimoto S., Haraguchi, S., Yoshioka, E., Kojima, N., Abe, R. and Takemori, T. Novel role of the Ras cascade in memory B cell response. *Immunity* 23: 127-138, 2005
- 石坂幸人
1. Shimura, M., Tokunaga, K., Konishi, M., Sato, Y., Kobayashi, C., Sata, T., and Ishizaka, Y. Premature sister chromatid separation in HIV-1-infected peripheral blood lymphocytes. *AIDS*, 19, 1434-1438,

2005.

2. Tachiwana, H., Shimura, M., Nakai-Murakami, C., Tokunaga, K., Takizawa, Y., Sata, T., Kurumizaka, H., and Ishizaka, Y. HIV-1 Vpr induces DNA double-strand breaks. *Cancer Res.*, almost in press.

田中勇悦

1. 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.
2. Yoshida A, Kodama A, Tanaka R, Yamamoto N, Ansari A A and Tanaka Y. Identification of HIV-lepitopes

that induce the synthesis of a R5 HIV-1 suppressor factor by human CD4+T cells isolated from HIV-1 immunized hu-PBL SCID mice. *Clinical and Developmental Immunology*, 2006. in press.

G. 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）  
（総合）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  
主任研究者 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。ワクチン接種後に抗 HIV 療法を中断し経過観察を行ったが、4 名とも抗 HIV 療法開始前と同程度の血中 HIV RNA 量の再増殖がみられ、ワクチン接種による臨床効果は確認できなかった。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/mm<sup>3</sup> 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ョンにて分離し、GM-CSF および IL4 存在下で数日間培養したのち TNF- $\alpha$  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: KYKCLKHIVW

Gag28-3R: KYRLKHIVW

Gag296: RDYVDRFYKTL

Nef138-wt: RYPLTFGWCF

Nef138-2F: RFPLTFGWCF

Env584-wt: RYLRDQQLLGI

Env584-4Q: RYLQDQQLLGI

約  $1 \times 10^7$  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。

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、選択した4箇所（CTLエピトープ部位のうち少なくとも2箇所は患者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：樹状細胞接種に関する有害事象としては、接種部位の局所反応が2例に全身倦怠感が1例に見られたが程度は軽く、安全性に関して問題を認めなかった。抗HIV療法（HAART）中止後、全例でHAART開始前と同程度の血中HIV RNA量の増加が見られた。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。HAART再開により血中HIV RNA量は検出感度以下にまで減少した。

3. ワクチンによる特異免疫の誘導：参加者4名のうち、7種類のエピトープペプチドを混合して約 $1 \times 10^7$ 個の樹状細胞にパルスした2名（症例1, 2）ではワクチン接種によってNef138に特異的に反応するIFN-

$\gamma$ 産生CD8<sup>+</sup>T細胞が増加した。エピトープペプチドを約 $1.4 \times 10^6$ 個の樹状細胞にパルスした2名（症例3, 4）では特異的反応が誘導されなかった。HAART中断後に血中ウイルス量が増加した後でも、症例3ではNef138に、症例4ではEnv584に対する免疫反応が誘導されたに過ぎなかった。

4. HAART中止後の臨床経過：ワクチン接種後に抗HIV療法を中断し経過観察を行ったが、4名とも抗HIV療法開始前と同程度の血中HIV RNA量の再増殖がみられ、ワクチン接種による臨床効果は確認できなかった。全例とも治療再開基準に到達したが、治療再開後は血中HIV RNA量は中断前のレベル（検出感度以下）に減少している。HAART中断中に1例で急性HIV感染症様症状が見られた。また、1名ではHAART中止後4週目にプロテアーゼ阻害薬耐性変異株（M36I）が一過性に出現したが、6週目にはこの耐性株は消失した。

### D. 考察

臨床試験全体を通じて重篤な有害事象を認めず、安全に実施することができた。また、GMPグレードで樹状細胞を誘導する技術を習得する事ができた。1例で認めた一過性のプロテアーゼ阻害薬耐性変異は、潜伏感染HIVからのオリゴクローナルな増殖をとらえたのではないかと推測している。ワクチンによる特異免疫が誘導されなかった症例3, 4ではエピトープを $1.4 \times 10^6$ 個の樹状細胞にパルスしたが、HIV感染者ではこの抗原量では免疫反応を惹起するのに不十分な可能性がある。また、症例3, 4はHAART開始前の最低CD4数が低かった症例であり（それぞれ $50/\mu\text{l}$ 、 $2/\mu\text{l}$ ）、このようにいったん免疫系の荒廃が進行した感染者では、HIV特異的免疫を誘導することは特に困難であることが推測された。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., 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.
- (7) Tomonari A, Takahashi S, Shimohakamada Y, Ooi J, Takasugi K, Ohno N, Konuma T,

Uchimaru K, Tojo A, Odawara T, Nakamura T, Iwamoto A, Asano S. Unrelated cord blood transplantation for a human immunodeficiency virus-1-seropositive patient with acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant*. 36:261-2, 2005.

- (8) T. Maeda, T. Fujii, T. Matsumura, T. Endo, T. Odawara, D. Itoh, Y Inoue, T. Okubo, A. Iwamoto, T. Nakamura. AIDS-related cerebral toxoplasmosis with hypertense foci on T1-weighted MR images: A case report. *J. Infect.* in press

### 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.
- (2) 中村哲也、富澤麻利子、立川 愛、小田原隆、細谷紀彰、井出冬章、岩本愛吉 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（免疫学的解析）. *J. AIDS Research* 7: 473, 2005.
- (3) 井出冬章、富澤麻利子、立川 愛、小田原隆、細谷紀彰、中村哲也、岩本愛吉 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（臨床的解析）. *J. AIDS Research* 7: 433, 2005.

## 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

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。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ところ、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) 上記の IL4 -589T のランパンの HIV-1 感染者コホートにおける約 3 年間の死亡率に及ぼす影響を解析した。その結果、女性において、IL4 -589T のホモ接合の感染者が、ヘテロ接合や野生型の感染者と比べ、有意に約 3 年間の死亡率が低いことが明らかになり、タイにおいてもこの多型がエイズ発症遅延効果を示すことが確認された。

(3) 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。また、その上流の多型 RANTES -403A は、欧米の HIV-1 感染者コホートにおいてエイズ発症を加速させる。タイ国ランパンの HIV-1 感染者コホートにおいてこれらの多型を解析したところ 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、RANTES -28G を持たずに RANTES -403A を持つ感染者は逆に死亡率が高く、タイ国においてもこの多型がエイズ病態進行に影響することが確認された。

(4) 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 $\alpha$  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 $\alpha$  とアフリカミドリザルの TRIM5 $\alpha$  をヒト細胞に導入したところ、カニクイザルの TRIM5 $\alpha$  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 $\alpha$  は HIV-1 と SIVmac の両者を阻害した。カニクイザルの TRIM5 $\alpha$  とアフリカミドリザルの TRIM5 $\alpha$  のキメラを作成したところ、アフリカミドリザルの TRIM5 $\alpha$  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。以下の 4 点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関連する。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 IL-4 の遺伝子多型を解析し、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) さらに上記のランパンの HIV-1 感染者コホートの 2000 年 7 月から 2003 年 10 月までの約 3 年間の追跡調査を行い、IL4 -589T 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。

(3) RANTES は CCR5 の生理的リガンドで、HIV-1 の外被膜糖蛋白質 gp120 の CCR5 への結合を競合的に阻害する。我々は先に、RANTES のプロモーター内の遺伝子多型 RANTES -28G が、RANTES 遺伝子転写のための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関連すると報告してきた。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必要であった。また、白色人種や黒色人種におい

ては、エイズ発症に促進的に働くことが報告されている多型 RANTES -403A のアジア人における効果も不明であった。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これら RANTES -28 ならびに RANTES -403 の遺伝子多型を解析し、2000 年 7 月から、2003 年 10 月までの追跡結果を踏まえ、これらの遺伝子多型がタイ国においても 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。

(4) 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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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、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) 遺伝的多型の病態進行への影響を解析する目的から、タイ国ランパンのコホートに登

録されたHIV-1感染者のうちエイズ病態がまだ初期にある感染者の多い女性246名を研究対象にした。これらの感染者についてIL-4のプロモーターの多型をPCR-RFLP法で解析した。また、これらの感染者について2003年10月までの追跡調査を行い、Kaplan-Meier解析をおこなった。相対危険度はコックスのProportional Hazard Modelを用いて計算した。

(3)(2)と同様にRANTESプロモーターの多型を解析した。

(4)アフリカミドリザルおよびカニクイザルのTRIM5 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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、女性においてのみ、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/ $\mu$ 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)。

(1)タイ国ランパンのエイズ病態がまだ初期にある感染者の多い女性246名のIL4遺伝子多型は、IL4-589Tのホモ接合が147名、ヘテロ接合が87名、IL4-589Cのホモ接合が12名で、多型の頻度は77.4%であった。IL4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、IL4-589Tのホモ接合の感染者が、それ以外の感染者と比較して、未治療の期間、有意に高い生存率を示した(P=0.034, Log-rank test)。IL4-589Tの相対危険度は0.59であり、この危険度は年齢、コホート登録以前の治療歴の有無、コホート登録時のエイズ発症の有無で補正しても0.61で殆ど同じであったが、コホート登録時の血中ウイルス量とCD4陽性細胞数で補正すると0.95となった。

(3) 上記タイ国ランパンの246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3名、ヘテロ接合が38名、RANTES -28Cのホモ接合が205名であり、非感染者119名における頻度とほぼ同様であった。従ってタイにおけるRANTES -28G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。また、RANTES -403Aのホモ接合が27名、ヘテロ接合が95名、RANTES -403Gのホモ接合が124名であり、やはり非感染者119名における頻度とほぼ同程度であった。従ってタイにおけるRANTES -403Aの頻度は30%であり、これは、日本人、欧米人における頻度とほぼ同様であった。また、日本人、欧米人、アフリカ人と同様に、RANTES -28GはRANTES -403Aと強い連鎖不平衡にあり、RANTES -28Gを持つ感染者は必ずRANTES -403Aを持っていた。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、RANTES-28Gを持つ感染者が未治療の期間、有意に高い生存率を示した (P=0.043, Log-rank test)。一方、RANTES -403AはRANTES -28Gと強い連鎖不平衡にあるため、感染者を(a)RANTES -28G、RANTES -403Aいずれも持たない者、(b)RANTES -403Aを持つがRANTES -28Gを持たない者、(c)RANTES -28Gを持つ者、の3群に分けたところ、(b)は(a)、(c)と比較して有意に生存率が低かった (P=0.004, Log-rank test)。以上の結果から、タイにおいても、RANTES -28GはHIV-1感染症の病態進行の遅延と関連し、RANTES -28Gを伴わないRANTES -403Aは、病態進行を促進

させることが、明らかになった。RANTES -28Gの相対危険度は0.30、RANTES -403Aの相対危険度は1.75であり、年齢や治療歴の有無で補正してもRANTES -28は0.27、RANTES -403Aは1.94で大きく変わらなかった。興味深いことに、IL4 -589Tと異なり、コホート登録時の血中ウイルス量とCD4陽性細胞数で補正しても、RANTES -28Gは0.27、RANTES -403Aは1.98と変化しなかった。

(4) カニクザルTRIM5 $\alpha$ がHIV-1のみを阻害したのに対し、アフリカミドリザルTRIM5 $\alpha$ はHIV-1、SIVmacの両者の感染を阻害した。従って、それぞれのTRIM5 $\alpha$ 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 $\alpha$ のキメラを作成したところ、アフリカミドリザルのTRIM5 $\alpha$ 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、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)タイ国ランパンのコホートにおける追跡調査によってもIL4 -589Tがエイズ病態進行の遅延と関連することが明らかになった。また、IL4 -589Tの相対危険度が、コホート登録時の血中ウイルス量とCD4陽性細胞数で補正

するとほぼ 1 になることから、IL4 -589T のホモ接合の感染者内では血中ウイルス量が低く抑えられているために病態進行が遅延するもの、と考えられる。

(3)タイ国ランパンのコホートにおいても RANTES -28G は病態進行の遅延と、RANTES -403A は病態進行の加速と関連していることが明らかになった。また、IL4 -589T とは異なり、コホート登録時の血中ウイルス量と CD4 陽性細胞数で補正しても相対危険度が変わらなかった。このことから、RANTES の多型のエイズ病態進行への影響は、RANTES の HIV-1 増殖抑制以外の機構による可能性が示唆される。RANTES は CCR5 以外にも CCR1 や CCR3 をレセプターとし、CD8 陽性 T 細胞をはじめとして様々な細胞でこれらのケモカインレセプターの発現が認められる。従って、多型の有無により、免疫系の何らかの細胞の増殖や走化性が変化し、日和見感染症の発症等に微妙な影響があるのかもしれない。

(4)TRIM5 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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、エイズ病態進行が初期にある感染者の多い女性においてのみ 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関連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関連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)タイ国ランパンコホートの追跡調査によっても IL4 -589T がエイズ病態進行の遅延と関連することが明らかになり、この多型がタイにおいてもエイズ病態進行を遅延させる方向に働くことが確認された。

(3)タイ国ランパンのコホートにおいても RANTES -28G は病態進行の遅延と、RANTES -403A は病態進行の加速と関連していることが明らかになり、タイにおいてもこれらの多型がエイズ病態進行に影響することが確認された。

(4) TRIM5 $\alpha$  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 $\alpha$  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

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.* 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 $\alpha$  determines species-specific restriction of SIVmac infection. *J. Virol.* 79, 8870-8877, 2005.

Mori, K., Sugimoto, C., Ohgimoto, S., Nakayama, E. E., Shioda, T., Kusagawa, S.,

Takebe, Y., Kano, M., Matano, T., Yuasa, T., Miyazawa, M., Takahashi, Y., Yasunami, M., Kimura, A., Yamamoto, N., Suzuki, Y., and Nagai, Y. Influence of glycosylation on the efficacy of an Env-based vaccine against SIVmac239 in a macaque AIDS model. *J. Virol.* 79, 10386-10396, 2005.

Wichukchinda, N., Nakayama, E. E., Rojanawiwat, A., Pathipvanich, P., Auwanit, W., Vongsheree, S., Ariyoshi, K., Sawanpanyalert, P., and Shioda, T. Protective Effects of *IL-4 -589T* and *RANTES -28G* on HIV-1 disease progression in infected Thai females. *AIDS.* 20, 189-196, 2006.

Song, H., Nakayama, E. E., and Shioda, T. Effects of human interleukin 7 on HIV-1 replication in monocyte-derived human macrophages. *AIDS.* In press.

Nakayama, E. E., Maegawa, H., and Shioda, T. A dominant negative effect of cynomolgus monkey TRIM5 $\alpha$  on anti-SIVmac activity of African green monkey orthologue. *Virology.* In press.

Sakuragi, S., Sakuragi, J.-I., Morikawa, Y., Shioda, T. Development of a rapid and convenient method for the quantification of HIV-1 budding. *Micorbes and Infection.* 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。

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 $\beta$ 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。

Emi E. Nakayama, Hiroyuki Miyoshi, Yoshiyuki Nagai, and Tatsuo Shioda. A specific region of 37 amino acid residues in the SPRY(B30.s) domain of African green monkey TRIM4alpha determines

species-specific restriction of SIVmac infection, Seventh International Congress on AIDS in Asia and the Pacific. (Kobe) 2005.

Jun-ichi Sakuragi, Sayuri Sakuragi, and Tatsuo Shioda. Genome dimerization of HIV-1 and its roles for viral replication. The 5th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji, Japan.

Song, H., Nakayama, E. E., and Shioda, T. Effects of human interleukin 7 on HIV-1 replication in monocyte-derived human macrophages. The 5th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji, Japan.

中山英美、永井美之、塩田達雄。TRIM5alpha のレンチウイルス感染阻害効果。第53回日本ウイルス学会学術集会、横浜。

櫻木淳一・塩田達雄。HIV-1 感染初期過程とゲノム二量体化。第 53 回日本ウイルス学会学術集会、横浜。

小泉裕介、景山誠二、宮下宙子、Lwembe R、塩田達雄、藤山佳秀、市村 宏。血友病患者の HIV-1/AIDS 病態進行に関する宿主免疫因子の影響。第 53 回日本ウイルス学会学術集会、横浜。

中山英美、永井美之、塩田達雄。アフリカミドリザル由来 TRIM5alpha のレンチウイルス感

染阻害効果。第19回日本エイズ学会学術集会、熊本。

櫻木淳一、塩田達雄。HIV-1 サブタイプ間へテロゲノム二量体化効率の解析。第19回日本エイズ学会学術集会、熊本。

森 一泰、杉本智恵、中山英美、塩田達雄、保富康宏、山本直樹。ウイルス特異的CD4+T 細胞免疫誘導のための Sendai virus vector を用いた CD4+T 細胞エピトープ発現系の開発。第19回日本エイズ学会学術集会、熊本。

杉本智恵、中山英美、塩田達雄、山本直樹、永井美之、森、一泰。糖鎖欠失 SIV の弱毒

化のメカニズムの解析。第19回日本エイズ学会学術集会、熊本。

櫻木淳一・塩田達雄。HIV-1 感染初期過程へのゲノム二量体化の影響。第28回日本分子生物学会年会、博多。

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副院長

研究要旨

日本の血友病長期未発症のコホートにおいて、日本人血友病患者 HIV 感染長期観察コホートの HLA-B 座の解析の結果、長期生存者において HLA-B\*1507 の頻度の有意な増加と HLA-B\*5401 の頻度の有意な減少を認め、これまで欧米のコホートで報告されているような HIV 抵抗性アリル (HLA- B\*27, B\*57, B\*58) や感受性アリル (HLA- B\*7, B\*35, B\*56) の頻度は日本人一般集団のそれと変わらなかった。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

1985 年までに血液製剤にて 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。それらの患者は感染時からすでに 20 年以上経過している長期生存者といえる。さらに、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。この HIV-1 感染日本人血友病患者の長期生存者のコホートは、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

期生存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

ヒト白血球抗原 (Human Leukocyte Antigen、以下 HLA と略す) のうち、HLA-B Locus のタイピングを終了し、HLA-A, -DR Locus のタイピングを継続している。

対象は、日本人 HIV-1 感染血友病患者で、エイズ発症の兆候がなく薬剤投与を受けたことがない患者 42 名、および感染