

後時間を経て薬剤投与を開始した38名を対象として、インフォームドコンセントを得た後、採血をおこなった。

方法は、患者の血液検体からDNAを抽出し、PCR-SSO法とSBT法によるDNAタイピングをおこなった。さらに、日本人一般集団194名のタイピングデータを対象とした。

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

前述のエイズ未発症・未治療群の42名と薬剤治療群の38名との比較では、頻度が有意に異なるHLA-Bアレルは認められなかった。両群を併せてHIV感染後のエイズ発症が緩徐な患者群として、一般集団と比較すると、HLA-B\*1507の頻度が増加(6.25% vs. 1.03%, OR=6.40, p=0.039)、HLA-B\*5401の頻度が減少(3.75% vs. 14.95%, OR=0.22, p=0.016)していた。しかし、その他には有意な変化を示すHLA-Bアレルは認められなかった。(表1)

欧米のコホートではHLA-B7sをホモで持つ患者ほど血中HIVのRNA量が高く、

HLA-B27sやB57sをホモで持つ患者ほどRNA量が低いことが報告されている。しかし、本コホートではHLA-B supertypeと末梢血中のHIV RNA量の間に関係を見出すことはできなかった。(表2)

さらに、本コホートではNK細胞の抑制性受容体(KIR: killer-cell immunoglobulin-like receptor)のリガンドであるHLA-Bw4やBw4-80Ileの頻度に有意な変化は認めなかった。(表3)

また、NK細胞数の検討では、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1)。

### 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-B\*27, B\*57, B\*58のアレルを持つ人で病気の進行が遅くなり、HLA-B\*7, B\*35, B\*56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。今回の研究では日本人の発症遅延や促進に関わるHLA-Bアレルの頻度は白人や黒人とは違う可能性を示唆した。

また、HLA-BアレルにはNK細胞の抑制性受容体KIRのリガンドであるHLA-Bw4が高HIV血症やエイズ発症遅延に関連し、さらに、NK細胞の活性化受容体であるKIR3DS1とそのリガンドであるHLA-Bw4Ile80を同時に持つ場合にエイズ発症遅延を認めることが報告されている。しかし、本コホートではHLA-Bw4やBw4-80Ileの頻度に有意な変化は認めなかった。

以上のような本コホートと他の欧米のコホートの相違点は、日本人民族集団の免疫遺伝学的特徴を反映していると考えられる。しかし、血友病患者ではC型肝炎ウイルスにも感染しているため、さらにHIV-1に感染していない血友病患者でのHLA-B遺伝子型を解析し、本コホートと比較検討する必要がある。

また、欧米コホートとの違いは日本人のためのHIV-1ワクチン開発などにあたっては日本人でのHLA-Bアレルの出現頻度をよく考慮する必要があることを示唆している。

HIV感染者ではNK細胞の機能不全が認められ、病期の進行に伴いNK活性が抑制

されることが以前から報告されていたが、本研究ではNK細胞の数をCD4陽性リンパ球数と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。

## E. 結論

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抵抗性アレル（HLA-B\*27, B\*57, B\*58）や感受性アレル（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。

白人や黒人と遺伝子的背景が異なる日本人ではHLA-Bアレルの出現頻度も違っており、HIV-1による病期の進行やワクチンに対する反応性が違ってくる可能性が示唆された。

また、NK細胞数をCD4陽性リンパ球数と一緒に測定することが患者の病期の判定に有効であ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、山梨大学伊藤雅彦先生、荻窪病院花房秀次先生、静岡県立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. 論文発表

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.

2. 学会発表

照沼裕、他 13 名、三間屋純一、他 3 名：  
日本人 HIV-1 感染長期未発症者における  
HLA-B 遺伝子多型の検討. 日本エイズ学会  
誌 7 巻 4 号 473 頁 2005.

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。

表1 日本人血友病患者HIV長期観察コホートのHLA-Bアレルの頻度

HLA-B allele	長期生存群 陽性率 (N=80)	対照群 (N=194)	Odds ratio	HLA-B allele	長期生存群 陽性率 (N=80)	対照群 (N=194)	Odds ratio
B*0702	12.5 (%)	11.9 (%)	1.06	B*4003	2.5 (%)	0.5 (%)	4.95
B*1301	2.5	0.5	4.95	B*4006	6.3	10.8	0.55
B*1302	1.3	0.0	(7.34)	B*4402	3.8	0.5	7.52
B*1501	22.5	15.0	1.65	B*4403	11.3	13.4	0.82
B*1502	0.0	1.6	(0.34)	B*4501	0.0	0.5	(0.80)
B*1507	6.3	1.0	6.40 (P=0.039)	B*4601	7.5	11.3	0.63
B*1511	2.5	2.6	0.97	B*4801	2.5	7.7	0.31
B*1518	2.5	5.2	0.47	B*5101	21.3	11.3	2.11 (P=0.052)
B*2704	1.3	0.0	(7.34)	B*5102	0.0	0.5	(0.80)
B*2705	0.0	0.5	(0.80)	B*5201	17.5	27.3	0.56
B*3501	7.5	10.3	0.71	B*5401	3.8	15.0	0.22 (P=0.016)
B*3701	1.3	0.0	(7.34)	B*5502	6.3	6.2	1.01
B*3802	0.0	1.0	(0.48)	B*5504	0.0	0.5	(0.80)
B*3901	3.8	4.6	0.80	B*5601	1.3	2.6	0.48
B*3902	0.0	0.5	(0.80)	B*5603	1.3	1.0	1.22
B*3904	0.0	0.5	(0.80)	B*5801	2.5	1.0	2.46
B*4001	12.5	10.3	1.24	B*5901	3.8	5.7	0.69
B*4002	21.3	11.3	2.11 (P=0.052)	B*6701	6.3	2.1	3.17

表2 長期観察コホートのHLA-B supertypeと血中HIV-1 RNA量

HLA-B supertype 陽性者	未治療・未発症群 (N=41)	viral RNA (copies/ml)			
		<10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup> -10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup> -10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup> <
B7s	N=17	5	4	6	2
B27s	N= 1	0	1	0	0
B44s	N=23	7	6	6	4
B58s	N= 1	0	0	1	1
B62s	N=24	5	6	6	6

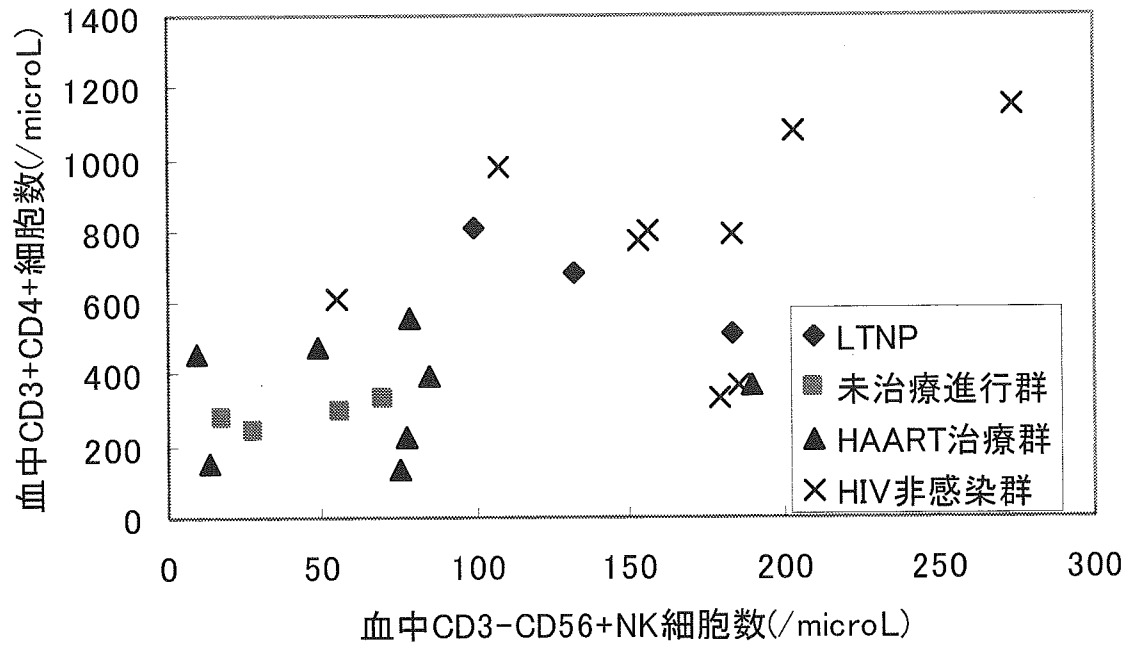
  

HLA-B supertype 遺伝子型	未治療・未発症群 (N=41)	viral RNA (copies/ml)			
		<10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup> -10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup> -10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup> <
B7s/B7s	N= 3	1	1	0	1
B7s/(B44s+B62s)	N=11	4	1	5	1
B7s/blank	N= 2	0	1	1	0
(B44s+B62s)/(B44s+B62s)	N=22	4	8	5	5
(B44s+B62s)/blank	N= 3	0	0	3	0
(B27s+B58s)/B7s	N= 1	0	0	1	1
(B27s+B58s)/(B44s+B62s)	N= 2	5	6	6	6
(B27s+B58s)/ (B27s+B58s)	N= 0	0	0	0	0

表3 日本人血友病患者HIV長期観察コホートのHLA-Bw4の頻度

陽性率	長期生存群 (N=80)	対照群 (N=194)	Odds ratio
Bw4	58.8 (%)	52.1 (%)	1.31
Bw4-IleThr	21.3	15.5	1.48
Bw4-80Ile	45.0	41.8	1.14
Bw6	90.0	87.6	1.27

図1 血中NK細胞数とCD4陽性Tリンパ球数



## 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・寄附講座教員

### 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（平成 15-16 年度）。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、この目的をみたす遺伝子群の特定は不可能であった。

一方、平成 17 年度には、HIV 感染長期未発症者（LTNP）を含む HIV 感染者および健康対照者の末梢血 1 ml から直接 RNA を抽出・増幅して遺伝子発現を解析できる系を構築した。その系を用いて、11 例（LTNP: 4 例）の遺伝子発現解析を行ったが、統計学的有意差のある遺伝子群の特定には至っていない。

平成 16 年度まで行っていた末梢血単核細胞由来の培養リンパ球での解析系と同様に、平成 17 年度に開始した末梢血を培養せずに直接解析対象とする系も、その方法論自体の妥当性が問題となる。さらに、遺伝子発現データの統計学的処理に決定的に大きな影響をおよぼす LTNP および slow progressor の分類の規準に関しても見直し・再検討が迫られる可能性がある。

### 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 15 年度は、前年度までに解析した 41 検体（末梢血由来の培養リンパ球）についてサンプルの再調製を行い、遺伝子発現プロファイルを

取得した。この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 例とその他をクラスタ分析上明確に異なる 2 つの群として区別可能な 21 遺伝子を特定した。平成 16 年度は、総計 111 の培養リンパ球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す遺伝子群を複数の異なる統計学的解析方法にもとづいて特定しようと試みた。しかしながら、この条件をみたす遺伝子群の特定は不可能であった。平成 15 年度に抽出した 21 遺伝子は、LTNP の解析対象がわずかに 3 例であることから生じた解析のノイズであったと結論した。

- 平成 17 年度は、これまでのサンプル調製方法（末梢血由来のリンパ球を培養して使用する）にかえ、少量の末梢血を直接解析対象とすることを目標とし、末梢血 1 ml を出発材料として mRNA を増幅して解析する系の構築を計画した。さらに、その系を用いて LTNP を含む末梢血サンプル（非培養）の遺伝子発現解析を行い、末梢血サンプルから LTNP 特異的な遺伝子群を同定できるかどうか試みることにした。

## B. 研究方法（倫理面への配慮）

- 合成 DNA マイクロアレイの大量作製（平成 15 年度）

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）。

- 合成 DNA マイクロアレイの大量作製（平成 16 年度）

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）。

- 合成 DNA マイクロアレイの作製（平成 17 年度）

31,872 種類の転写産物を代表する 80mer の合成 DNA を、スライドガラス上の 18 mm x 36 mm の領域内に極微量分注・配列化し、合成 DNA マイクロアレイ（32K アレイ）を作製した。

- HIV 感染者および非感染者からのサンプル調製

平成 16 年度に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共通レファレンスを、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。

- 末梢血からの RNA 抽出と in vitro 増幅

末梢血 1 ml から Isogen-LS 試薬（ニッポンジーン社製）を用いて total RNA を抽出した。その RNA を 4 等分し、エタノール沈澱させ保存した。そのうちの 1 本のサンプルについて、SMART mRNA amplification kit（Clontech 社製）により、添付のプロトコルにしたがって cDNA 合成および sense 鎖 RNA の in vitro transcription による増幅を行った。これら一連の精製・合成・増幅の過程について、実験者間の結果の誤差が最少になるように、種々の条件検討を加えた。また、ラットの各組織から調製した total RNA も条件検討用材料として使用し、同様の方法で増幅を行った。

- サンプル調製

上記 5 で検討を加えたプロトコルにしたがって、健常対照群および LTNP を含む HIV 感染者から提供された末梢血中に含まれる mRNA を増幅した。

- マイクロアレイによる遺伝子発現レベルの測

定

サンプル mRNA から増幅して得られた sense 鎖 RNA、および、これまでの解析にもちいてきた共通レファレンス RNA (22 種類の細胞株の mRNA の等量混合物) を鋳型として、それぞれ Cyanine-5 dUTP および Cyanine-3 dUTP の存在下で cDNA 合成し、標識 cDNA を調製した。増幅サンプルおよび共通レファレンス由来の標識 cDNA を混合し、32K アレイとハイブリダイズさせ、各スポットの蛍光強度を測定し、各遺伝子の発現比 ( $\log_2$  サンプル蛍光強度/共通レファレンス蛍光強度) を算出し、解析用データとした。

## 8. データ解析

算出した各遺伝子の発現比 ( $\log_2$ ) をすべてのサンプルについて統合し、データ行列を作成した。このデータ行列から、LTNP の群と slow progressor/progressor の群の間で t 検定を行った。(倫理面への配慮)

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 感染者の培養末梢単核細胞のトランスクリプトーム解析

平成 15 および 16 年度は、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
- #8) HIV 非感染者(血友病): 18 例
- #9) HIV 非感染者(健康人): 5 例
- #10) HIV 非感染者(非血友病疾患): 43 例

30,336 遺伝子の内、すべてのサンプルでデータが取得され、かつ、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、8,727 種類であった(基本データ行列)。

次に、基本データ行列から、上記分類#1 特異的遺伝子の絞り込みを試みた。まず、等分散性が棄却される遺伝子があるため、ノンパラメトリック検定であるスチール検定を用いて、分類#1 と他の 9 分類の多重比較を行ったところ、すべての比較で統計量が  $P < 0.01$  の規準を超える遺伝子は存在せず、すべての比較で統計量が  $P < 0.05$  の規準を超える遺伝子を 23 種類特定した。この 23 遺伝子について、111 サンプルの発現データを抽出し、サンプル間でのクラスタ分析を行ったところ、LTNP(分類#1) の 5 サンプル特異的なクラスタは形成されず、この 23 遺伝子では LTNP と他を明瞭に区別できないことが判明した。



次に、分類#1 と他の分類の多重比較で、総計9比較のうち任意の8比較で $P < 0.05$ なる遺伝子を抽出したところ、基本データ行列から237遺伝子が特定された。この237遺伝子の発現データのみでサンプル間のクラスタ分析を行った。このクラスタ分析でも、LTNP（分類#1）の5サンプル特異的なクラスタは形成されなかった。

以上のことから、分類#1に対象を限ることは無理と判断し、全10種の分類を見直し、分類#1~3をグループ1(LTNPとslow progressor)、分類#4~6(progressor)をグループ2とし、LTNPを含むslow progressorとprogressorの2群で発現レベルに有意な差のある遺伝子群が特定されるかどうかを調べた。グループ1と2の間でウェルチのt検定を行い、両者で差のある( $P < 0.002$ )遺伝子群を抽出したところ、52遺伝子が特定された。この52遺伝子の発現データのみで全サンプル間のクラスタ分析を行った。LTNPは大きく分かれた2群のうち的一方のみに含まれたが、その群には多くのprogressorサンプルも含まれ、slow progressorとprogressorを明確に分類できるデータではないことが明らかとなった。

さらに、上記グループ1、2に加え、分類#7単独でグループ3、分類#8~10をグループ4と定義し、グループ1と他のグループのスチール検定による多重比較を行った。すべての比較で $P < 0.01$ となる遺伝子群は、917種類であり、これらの遺伝子の発現データのみによる全サンプル間のクラスタ分析では、グループ1と2が混在するクラスタが形成され、両者の分類は不可能であった。

最後に、上記の917遺伝子の中から、さらに規準を厳しくした70遺伝子を抽出し、同様のサンプル間クラスタ分析を行った。この分析でも、グループ1と2に属するサンプルが混在して含まれるクラスタしか形成されなかった。

## 2. サンプル調製条件の違いと遺伝子発現プロフ

ファイル

本分担研究では、平成12年度以来、末梢血中の単核細胞を培養したサンプルを解析対象としてきた。これは、本研究開始直後の解析において同一人に由来するサンプルの違いが培養条件の違いよりも大きいことが明らかとなり、特定の個人間の差が遺伝子発現プロファイルによって判別できる可能性を示唆したためであった。その後、解析対象遺伝子数は当初の約3,000からヒト全遺伝子数にせまる30,000超となり、検出系自体の性能が年々高くなったことを受け、あらためてサンプルの調製条件の違いがサンプル中の遺伝子発現におよぼす影響を調べなおすことにした。

平成16年度解析した全111サンプルについて、基本データ行列のサンプル間クラスタ分析を行ったところ、きわめて明瞭な2つのクラスタが形成された。この2群を区別する遺伝子群として、ウェルチのt検定を行い、 $P < 1.0E-18$ なる非常に厳しい条件下で208遺伝子を抽出した。この208遺伝子のみのデータによる全サンプル間のクラスタ分析を行ったところ、わずかの例外を含みながら、基本データ行列を分けるクラスタと一致した。この遺伝子群には細胞傷害応答遺伝子が多く含まれており、培養状態による違いが遺伝子発現に対して大きく影響していることが示唆された。さらに、同一人から採取した血液サンプルを2分割してそれぞれの研究施設で独立に培養したサンプルが、これらの明瞭な2群にそれぞれ含まれることが判明した。この同一血液に由来し異なる施設で培養された2サンプルについては、マイクロアレイ解析を追試し、2サンプル間の遺伝子発現プロファイルの違いにおける再現性を確認した。また全サンプルについて、培養を行った研究施設(2ヶ所)を調べたところ、培養施設ごとに偏ったクラスタを形成していることがわかり、これらの結果は培養施設や培養条件などによって遺伝子発現プロファイルが異なるものに変化してしまうことを示している。

### 3. in vitro RNA 増幅の条件検討

平成17年度当初におこなったkit付属のプロトコルによる増幅実験では、同一実験者の行った複数の同一サンプルの間で遺伝子発現プロファイル上無視できないほどの大きな差異が生じ、そのままの方法で増幅すれば、サンプルの違いよりも増幅実験の誤差のほうが大きくなってしまい、使用に耐えられないことが判明した。そこで、kitの各種反応について同一サンプル（ラット組織由来 total RNA）を用いた仔細におよぶ条件検討（各種条件の評価はラットマイクロアレイを用いた遺伝子発現プロファイルの比較解析による）を行った。

反応に持ち込む酵素等の試薬の体積、および、反応温度の管理、さらには実験環境の物理的条件等の各種条件が一定になるように検討したところ、ようやく、増幅 RNA を用いても異なるサンプル（ラット組織各種）を遺伝子発現上非増幅サンプルと同等の解像度で区別できるような精度まで到達した。

以上のことから、検討した諸条件を遵守することによって、in vitro 転写を基本とした mRNA 増幅法によって増幅した RNA サンプルを用いても遺伝子発現解析が可能となったと判断した。

### 4. 必要血液量の検討

サンプル取得を担当する臨床現場からは、実際問題として採血できる量は数ミリリットルであるという制限が提示されており、そのため、本分担研究のこれまでの解析では末梢血を直接解析する（非増幅の polyA+ RNA が  $2\mu\text{g}$  以上必要；末梢血40 ml 以上に相当）ことを断念し、培養リンパ球を解析してきたという経緯がある。

そこで、本年度条件検討をくわえることによって確立した RNA 増幅プロトコルを使う場合、必要血液量をどれだけ減らせるか調べた。最終的に決定したプロトコルにしたがって、末梢血 1 ml から total RNA を抽出し、それらを定量せずに 4 等分後、分注サンプルを独立に増幅し、

定量したところ、十分量（ $3\sim 10\mu\text{g}$ ）の RNA が取得できることが明らかとなった。

以上のことは、マイクロアレイのラベリングにこれまで同様  $2\mu\text{g}$  の sense 鎖 RNA を用いても、最悪でも増幅をくりかえすことにより、複数回のラベリングが十分に可能なだけの RNA サンプルを末梢血 1ml から増幅により取得できることを示している。

### 5. HIV 感染者および対照群の末梢血サンプルの遺伝子発現解析

上記で確立した RNA 増幅法によって取得したサンプルは、平成18年1月現在で11であった。それらをこれまで用いてきたエイズの発症状態の分類（10段階）に当てはめると、次の通りであった。

#1) LTNP（血友病、 $\text{CD4} \geq 500$ ）：4例

#2) Slow progressors（血友病、 $500 > \text{CD4} \geq 350$ ）：1例

#3) Slow progressors（血友病、 $350 > \text{CD4}$ ）：0例

#4) Progressors（血友病、ARV療法、 $\text{CD4} \geq 500$ ）：0例

#5) Progressors（血友病、ARV療法、 $500 > \text{CD4} \geq 350$ ）：0例

#6) Progressors（血友病、ARV療法、 $350 > \text{CD4}$ ）：2例

#7) HIV 感染者（非血友病）：0例

#8) HIV 非感染者（血友病）：3例

#9) HIV 非感染者（健常人）：1例

#10) HIV 非感染者（非血友病疾患）：0例

これらのサンプルの遺伝子発現プロファイルを取得し、LTNP 群（4サンプル）と slow progressor/progressor 群（3サンプル）での2群比較（t検定； $P < 0.01$ ）をおこなったところ、137 遺伝子が LTNP 特異的遺伝子候補として挙がってきた。さらに、この137 遺伝子に対して、統計学的有意差だけでなく生物学的有意差を加味した評価を与えるために、比較対象の2群の平均発現比が2倍以上になるものを選択したところ、候補はわずかに9 遺伝子となった。

さらに、これらの9遺伝子による全サンプルのクラスタ分析を行ったところ、たしかに両群が異なるクラスタには分類されたものの、両群の遺伝子発現パターンを比較すると、それらの間で大きな差異があるとは言いがたい微妙なものであり、統計処理における誤差の範囲であると結論した。

#### D. 考察

##### 1. 末梢単核細胞由来培養細胞のトランスクリプトーム解析

30,336遺伝子を対象とした平成16年度までの解析結果は、本分担研究で調べてきたサンプル（末梢血由来の培養リンパ球）からLTNP群と発症群で発現レベルに差のある遺伝子群を特定することはできないことを示す。平成15年度までに抽出されていた遺伝子群は、LTNPの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。

本分担研究で行っているような臨床サンプルの遺伝子発現解析では、サンプルの分類（どの群とどの群を区別するのか）が極めて重要な情報となる。すなわち、区別したい群と対象群の違いが、遺伝子発現プロファイル以外の情報によってすでに明確になっているものであればあるほど、その違いに対応する遺伝子群の特定が容易となる。

したがって、本分担研究のLTNP特異的遺伝子群を特定する試みにおいて、LTNPの定義がもっとも重要である。すなわち、LTNPとslow progressorの違いはなにか、また、slow progressorとprogressorの違いはなにか、という規準が明確でなければ、それ以上の詳しい解析は意味をなさない。これまで本研究では、臨床経過とCD4値による分類を用いてきたが、この規準がはたして妥当であったのかどうかについては疑問である。

さらに、本研究の経過とともに、当初LTNPに分類されていたものが、slow progressorに再

分類される例が続いた。これは、LTNPが単一ではなく、特徴を異にする複数の集団の混在であることを示す良い例といえる。LTNPが複数の集団の集合であるとするれば、それらの複数の集団をいかなる規準で分類すべきなのか、それぞれのサンプル数を十分（統計的な解析にはすくなくとも各集団最低10サンプルは必要）確保できるかどうかという現実的な問題とともに、LTNPの研究をさらに進展させるためには、この点を明らかにしなければならない。

本分担研究では、臨床経過に加えて、CD4値に注目した分類を採用してきた。CD4値が必ずしも臨床経過とよく対応するとは言いきれず、CD4値に加えてさらなるメルクマールが必要である。

上記結果の最後に、同一血液サンプルを2分割して異なる施設で培養した場合、無視できない遺伝子発現プロファイルの差が存在することを記述した。この結果は、単核細胞を培養することによる細胞populationの変化に基づいていると考えられる。採取した血液サンプルの処理の仕方をさらに厳密にコントロールしなければ、個人差に基づく遺伝子発現プロファイルの違いよりも大きな変化として、培養方法の差をとらえてしまう危険性を示している。これまでのサンプル調製に十分な反省をくわえるとともに、今後のサンプル収集について臨床サイドを含めた再検討が迫られる。

仮に、これまで同様の培養細胞を解析対象とする場合、末梢単核細胞由来の培養細胞に、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。しかしながら、培養細胞を使って実験的な環境の変化を再現（なんらかの刺激を与える、とくにIL-4などの炎症に関連するサイトカイン等を用いて）できたとして

も、培養細胞を使うことで真の違いを見逃す危険性を避けられない。これは、真のターゲットが培養中に消失ないし変質してしまう可能性があるためである。

## 2. 非培養末梢血サンプルにおける LTNP 特異的遺伝子発現の解析

平成 17 年度は、前年度まで行ってきた末梢血由来の培養リンパ球を対象とした解析が統計学的有意差をもつ LTNP 特異的遺伝子群の同定に到達できなかったことをうけ、あらたに、少量のサンプルから RNA を増幅することによってこれまで同様のマイクロアレイ・システムを応用できる系を確立し、提供者に負担のかからない量の末梢血を直接解析して LTNP 特異的遺伝子群の特定を試みた。しかしながら、RNA の増幅系の確立にはしたものの、それによる解析では、現時点において明確な（統計学的有意差をもつ）候補遺伝子群の同定には至っていない。

以上のような結果になった原因は次のようなものと考えられる。1) サンプル数の絶対的不足（LTNP 4 例と slow progressor/progressor 群 3 例）； 2) 比較対象とした群のサンプル設定ミス、すなわち、slow progressor と progressor をあわせて LTNP 群の対照としたことの誤り； 3) slow progressor と progressor の分類の規準の不確かさ； 4) 遺伝子発現データのノイズの取り扱いの誤り。これらはいずれも方法論的な不適切さをしめすものであり、本来あるべき差を検出できていない可能性を示すものである。

しかしながら、本研究が根本的に抱える問題として、末梢血およびそれに由来する細胞が LTNP 特異的な特徴を果たして有しているのか、さらには、それらが存在するとしても遺伝子発現レベルの違いに起因するものであるのかどうか、という大きな命題が未解決のまま依然として存在している。この根本命題に対する明確な答えを出すためには、統計学的に有意差をいえるほどサンプル数が十分に大きいこと、および、解析に用いる方法論の実験誤差が十分に小

さいことの 2 つの条件をみたした研究が必要である。

## 3. 到達度について

平成 17 年度の最初の課題、すなわち、少量の末梢血からでも遺伝子発現解析可能な系を確立すること自体は目標に到達したと判断する。しかしながら、本分担研究の本来の目的である LTNP 特異的遺伝子群の同定には至らず、この点において本来の目標は到達に程遠いと言わざるをえない。本分担研究課題は、当初の予想をはるかにこえて困難なものであることを痛感する。

## 4. 研究結果の学術的・国際的・社会的意義について

LTNP を遺伝子発現の視点で特徴づけようとする研究が本年度中に論文発表された（PNAS 2005: 9860-9865）。その論文では、小腸粘膜の生検サンプルを材料として本分担研究と同様にマイクロアレイによる遺伝子発現解析を行い、4 例の LTNP に特異的な遺伝子群を報告している。きわめて貴重なサンプルを用いた困難な研究ではあるが、わずかに 4 例でのデータであり、ここで言及された遺伝子群の真の関与については今後の研究をまって結論を急がず、慎重に対処すべきであろう。サンプル数の絶対的不足が本分担研究同様、最大の問題といえる。また、この論文では、ある特殊なリンパ球における LTNP 特異的遺伝子発現パターンを報告しているが、このことは、やはり LTNP を特徴づけるのはリンパ球であることを示すものであり、研究対象としては血球細胞、特にリンパ球を選定すること自体に大きな誤りはないと考えられる。しかしながら、末梢血がはたして適しているかどうかの結論を現段階でくださことは不可能である。

本分担研究のような臨床検体を直接解析対象とする研究は、個人差・外的内的刺激の有無など、さまざまな変動要因の影響（ノイズ）を、サンプル数を増やすことおよび統計学的手法を用いることによって克服していかなければ

ならない。その意味において、臨床検体を対象とした大規模な LTNP 研究は、本研究班三間屋博士および共同研究者の照沼博士が長期間にわたってフォローしている血友病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自前の合成 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になるものであり、その独自性を最大限にいかして、地道な臨床検体の解析を継続することそのものに意義がある。

#### 5. 今後の展望について

少量の末梢血から調製した RNA を増幅して遺伝子発現解析を行うシステムは、平成 17 年度後半になってようやく確立をみた。したがって、解析したサンプルはわずかに 11 であり、評価するにはあまりに不十分である。解析サンプル数を 100 例（以上）程度まで増やし、データのノイズを極力低減化して解析を続け、末梢血を直接解析する方法論自体の妥当性について議論し、結論を出すべきであると考えている。

#### E. 結論

30,336 ヒト遺伝子からなる合成 DNA マイクロアレイを用いて、LTNP5 例を含む 111 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・解析を完了したところ、LTNP 群と発症群で発現レベルに差のある遺伝子群を特定できないことが明らかとなった。さらに、末梢血由来の増幅 RNA 11 例を対象とした遺伝子発現解析でも、統計学的有意差をもつ LTNP 特異的遺伝子群の特定には至らなかった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) Fujita N, Miyamoto T, Imai J, Hosogane N, Suzuki T, Yagi M, Morita K, Ninomiya K, Miyamoto K, Takaishi H, Matsumoto M, Morioka H, Yabe H, Chiba K, Watanabe S, Toyama Y, Suda T. CD24 is expressed specifically in the nucleus pulposus of

intervertebral discs. *Biochem Biophys Res Commun.* (2005) 338:1890-6.

- (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.
- (3) Abate DA, Watanabe S, Mocarski ES. Major human cytomegalovirus structural protein pp65 (ppUL83) prevents interferon response factor 3 activation in the interferon response. *J Virol.* (2004) 78(20):10995-1006.
- (4) Imanishi T, Watanabe S, et al. Integrative annotation of 21,037 human genes validated by full-length cDNA clones. *PLoS Biology.* (2004) 2(6):856-875.
- (5) 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.* (2004) 84(1):185-92.
- (6) 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) 78(8):3984-93.
- (7) 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

G. 知的所有権の出願・取得状況

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）  
研究協力者 金成 安慶（近畿大学医学部 助手）

**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。また、これと相同なヒト22染色体領域のマикроサテライトマーカー、及び単一塩基多型(SNPs)の遺伝子型が、HIV-1曝露非感染者と HIV 感染者で有意に異なることを明らかにした。レトロウイルス中和抗体の産生を制御する宿主遺伝子、及び HIV-1 曝露非感染状態を規定する宿主遺伝子を分子同定するため、マウス側ではマイクロアレイを用いた発現解析により候補遺伝子を絞り込み、これを中和抗体早期産生系統のマウスから中和抗体産生能欠損マウスの受精卵へと導入して、トランスジェニックマウスを得た。また、ヒト側についても、マイクロアレイによる発現解析とゲノム塩基配列の比較を併用して、曝露非感染者末梢血で HIV 抗原刺激後に発現が上昇する遺伝子の、発現調節部位と考えられる領域に、曝露非感染者群と HIV 感染者群で頻度の異なる塩基多型を同定した。

### A. 研究目的

これまで、HIV-1 の感染成立に対する自然抵抗性因子として、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の遺伝的多型性が明らかにされてきた。一方、特定の HIV 感染者と長期にわたり非防御的な性的接触を反復しながら、末梢血中に HIV-1 ゲノムも IgG クラスの抗 HIV 抗体も検出されない、HIV-1 曝露非感染者 (HIV-1-exposed seronegatives: ESNs) と呼ばれる一群の人たちが知られている。これまでにイタリア・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おらず、本研究開始時点で、これらの人たちに共通する遺伝的背景は明らかでなかった。HIV-1 曝露非感染者では、体内に HIV ゲノムが検出されないにもかかわらず、末梢血 Tリンパ球が HIV-1 抗原特異的なサイトカイン産生を示し、粘液中に HIV-1 反応性の抗体産生が認められる。このことは、HIV-1 曝露非感染者では、感染パートナーからの HIV 粒子侵入に伴って、ごく早期に極めて効率的な免疫応答が起こり、これが感染抵抗性の原因となっている可能性を示唆する。

一方、我々はマウスのフレンドレトロウイルス感染モデルを用いて、宿主の免疫学的感染抵抗性を決定する遺伝子群を同定し、その作用機序を解明してきた。我々が同定した宿主抵抗性遺伝子の大半は MHC 領域に存在し、ウイルス抗原に対する T 細胞免疫応答の有無またはサイトカイン産生パターン、あるいは NK 細胞活性を制御している。一方、感染抵抗性を最も大きく左右する非

MHC の遺伝子があり、ウイルス中和抗体産生の有無を決定していると考えられた。我々は多数の退交配マウスを用いることにより、このウイルス中和抗体産生制御遺伝子 (*Rfv-3*) を第15染色体上にマップした。

本研究は、マウスレトロウイルス感染時にウイルス中和抗体産生の有無を決定する第15染色体上の宿主遺伝子を分子同定し、そのヒトホモログが、HIV-1 曝露非感染者に認められる免疫学的な HIV 感染抵抗性の原因となっている可能性を検定することを目標とした。

### B. 研究方法

#### 1) HIV-1 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(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は、Arlequin ver. 2001 を用いて、likelihood ratio test によるコンピュータ解析を行った。

## 2) DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析

我々が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をマップした、第15染色体のD15Mit68からD15Mit107までの領域、およびこれとシntenニーを持つヒト第22染色体の*Mb* 遺伝子から*Pacsin2* 遺伝子までの領域について、それぞれに含まれる全ての既知遺伝子、および機能未同定の open reading frames (ORFs) を完全に網羅した DNA マイクロアレイを作製した。

マウス側マイクロアレイには、226の遺伝子とORFsについて、1遺伝子当たり二つずつの配列特異的オリゴDNAプローブを設計し、アレイ上に1プローブにつき21~22箇所のスポットを配列した。一方、ヒト遺伝子のマイクロアレイについては、対照も含め157の遺伝子とORFsについて、そのサイズにより2箇所から10箇所(通常の遺伝子については平均6箇所)の配列特異的オリゴDNAプローブを設定し、アレイ上に1プローブ当たり6つのスポットを分散させて配列した。

遺伝子発現の解析は、通常の方法により蛍光標識 cRNA の結合を測定することにより行い、結果は各スポットの蛍光強度の中央値の平均から、陰性対照オリゴDNAプローブが結合したスポットの蛍光強度中央値の平均を引いて算出した。さらに、系統間・個体間、あるいは抗原刺激前後の発現データを比較するため、GAPDH および  $\beta$ -アクチンの発現量による正規化を行った。

## 3) cRNA 検体の調製

フレンド白血病レトロウイルス(FV)感染後早期に中和抗体を産生する B10.A 由来  $F_1$  マウスと、早期の中和抗体産生能を欠く A/WySn 系統のマウスに FV を接種し、経時的に脾臓を採取して全 RNA を調製、ゲノム DNA を除去後 cDNA 化した。今回は、予備実験において系統間の遺伝子発現の差が大きいことが明らかとなった、FV 感染9日後の検体を用いて発現解析を行った。

ヒトについては、イタリア・フィレンツェ地区の HIV-1 感染者および HIV-1 曝露非感染者カップルより末梢血単核球を採取し(ミラノ大学医学部・Mario Clerici 教授との共同研究)、複数の MHC 遺伝子産物で共通に提示されることがわかっている HIV-1 envelope および gag 抗原ペプチド混合物(最終濃度 2.5 $\mu$ M)で刺激を行った。刺激前、および刺激後の RNA later 処理末梢血単核球より全 RNA を抽出し、cDNA を調製した。

これらマウス及びヒトの cDNA を精製後、ピオチン標識 UTP 存在下で MEGAscript 転写キットを用いて cRNA を作製、RNeasy で精製した。

## 4) ヒト22染色体単一塩基多型(SNPs)の網羅的解析

マウスレトロウイルス中和抗体産生制御遺伝子(*Rfa-3*)のマッピング領域に対応する、ヒト第22染色体の*Mb* 遺伝子から*Pacsin2* 遺伝子までの領域について、そこに存在する全ての既知 SNPs をデータベースから抽出し、白人における低頻度対立遺伝子の割合が 10~40%程度のものを選んだ。これらについて ABI Prism 7700 を用いた Taq-Man PCR 法により、ゲノム DNA を鋳型とする遺伝子型の決定を行った。

得られた SNPs 遺伝子型については、Fisher's exact test による群間の頻度比較を行うとともに、マイクロサテライトに關すると同様、Arlequin ver. 2001 を用いた EM アルゴリズムにより、遺伝子座間の連鎖不平衡頻度を推定した。

## 5) レンチウイルスベクターを用いたトランスジェニックマウスの樹立

マウス側について、系統間で発現の差が見つかった候補遺伝子の一つとBリンパ球特異的な発現誘導を促すプロモーター及びエンハンサー配列を繋いだものを、複製欠損型のレンチウイルスベクターに組込んだ。得られた組換えレンチウイルスを、中和抗体産生能を欠く A/WySn マウスの受精卵に導入し、トランスジェニック(TG)個体を作製した。得られた TG 個体について、ゲノム中の導入遺伝子の存在を PCR 法により、また末梢血中での導入遺伝子の発現を RT-PCR 法により確認した。

### 【倫理面への配慮】

イタリアの HIV 感染状態非一致カップルコホートについては、現地病院倫理委員会による許可を受け、書面による研究目的の説明と署名による同意を得た上で、ゲノム解析・発現解析のための末梢血採血を行った。これら試料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て、疼痛の防止に努め、動物愛護の精神に則ってこれを行った。

## 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



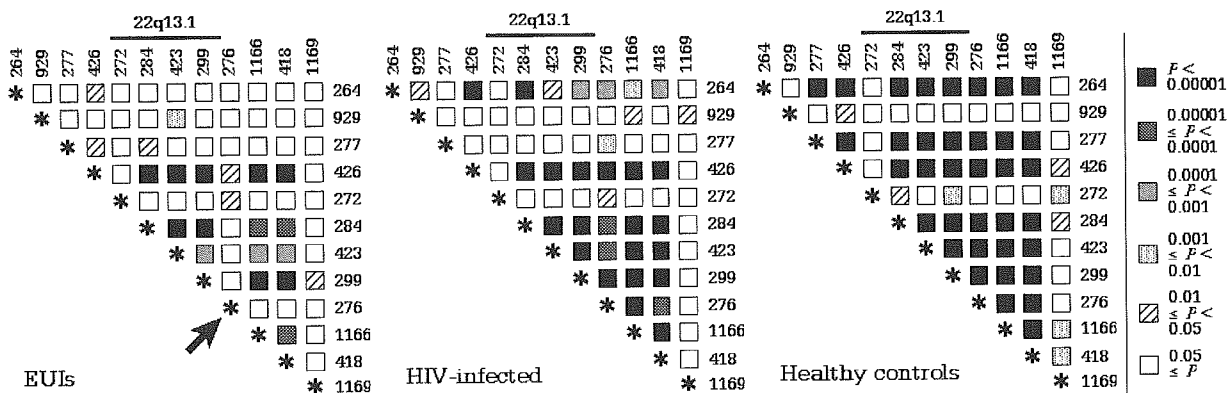


図 1. 第22染色体を横断する連鎖不平衡の、HIV-1 曝露非感染者集団における分析

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)。

## 2) HIV-1 曝露非感染者及び HIV 感染者ゲノムの網羅的 SNP 解析

第22染色体領域における HIV-1 曝露非感染者と HIV 感染者の遺伝的差異をより詳細に絞り込むため、上記と同じ染色体領域に存在する

SNPs の遺伝子型を、曝露非感染者74名及び HIV 感染者77名について比較解析した。SNPs を解析した集団について、マイクロサテライト解析で統計的に有意な頻度差が認められた D22S423 の遺伝子型を確認したところ、両群の間に  $P = 0.0012$  の有意な差が確認された。

解析を行った SNPs の ABI SNP Browser による ID 番号、連鎖する遺伝子、及び観察された遺伝子型を以下の表に示す。表中の  $P$  値は、曝露非感染者群と HIV 感染者群における遺伝子型頻度の差を Fisher の方法で検定した結果である。

hCV ID number	Linked Gene	Alleles		P
		1	2	
1088426	<i>APOL3</i>	A	T	
8713601	<i>MYH9</i>	A	G	
1841062	<i>RABL4</i>	A	G	
8956971	<i>EA57_HUMAN</i>	C	T	
25968036	<i>EA57_HUMAN</i> (exon 1 coding)	A	G	
2403433	<i>IL2RB</i>	G	T	
2403368	<i>C1QTNF6</i>	C	G	
8957740	<i>CARD10</i>	C	T	
25994985	<i>CARD10</i>	C	T	
25993567	<i>CARD10</i>	C	T	0.0313
2491542	<i>CDC42EP1</i>	A	G	0.0043
15875008	<i>LGALS2</i>	A	G	
2233479	<i>POLR2F</i>	C	T	
2501764	<i>MAFF</i>	A	T	
344103	<i>GTPBP1</i>	G	C	
2189646	<i>APOBEC3G</i> (exon4 coding)	A	G	
25649193	<i>APOBEC3G</i> (exon6 coding)	C	G	
2221682	<i>RPL3</i>	G	A	
2222537	<i>GRAP2</i> promoter	A	G	
2222563	<i>GRAP2</i> (intron 1)	A	G	0.0196
2467289	<i>GRAP2</i> (intron 2)	A	G	

15530	GRAP2 (intron 3)	A	G	
2467292	GRAP2 (intron 3)	G	T	
11484908	GRAP2 (exon8 coding)	C	T	
16318	GRAP2 (3' intron)	C	T	
11882437	Q9UP9Q	A	G	
224082	NOVEL10 (LOC63929)	C	T	
2497323	TOB2	G	A	
2481122	NM_024821 (FLJ22349)	C	G	
2189968	BAFF-R	A	G	
2189972	G22orf18	A	G	
2468720	TCF20	A	T	
2986155	NM_170698 (dJ222E13.2)	A	G	0.0218
1150511	A4GALT	C	G	

表の通り、近接する二箇所、即ち *Card10* と *CDC42EPI1* に連鎖した SNP 座位で、曝露非感染者群と HIV 感染者群の間に有意な遺伝子型頻度の偏りを認め、特に *CDC42EPI1* に連鎖した SNP でその程度が強かった。また、他にも二箇所、群間で遺伝子型頻度が異なった座位を認めた。

これら SNPs 間の連鎖不平衡を解析したところ、曝露非感染者群では、マイクロサテライトマーカーの解析で連鎖の切れ目が認められたのと同じ位置、即ち *Tob2* 遺伝子の近傍で同様の連鎖の切れ目が観察された(図2)。

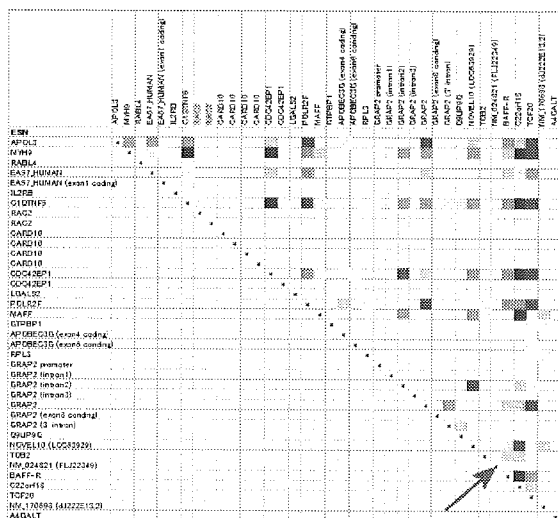


図 2. 曝露非感染者群に認められる、SNPs 遺伝子型連鎖不平衡の切れ目

各 SNPs 座位相互の連鎖不平衡の有無を EM アルゴリズムにより推計した。色が濃いほど強い連鎖を示す。矢印の連鎖の切れ目は、第 22 染色体上で D22S276 と隣接する。

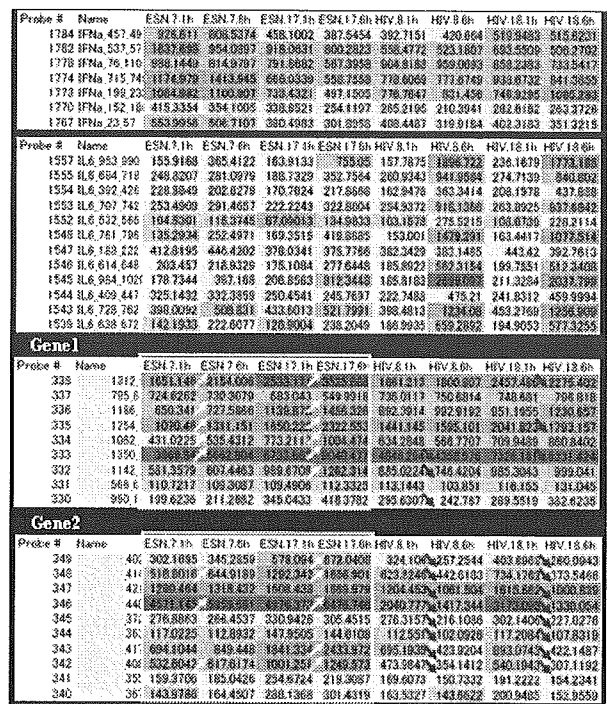


図 3. マイクロアレイによるヒト第22染色体遺伝子発現誘導の比較

上から、それぞれ複数プローブによる IFN- $\alpha$ 、IL-6、及び第22染色体の隣接する二遺伝子 (Gene 1, Gene 2 とする) の発現。検体はそれぞれ二名ずつの HIV-1 曝露非感染者 (ESN7, ESN17) と HIV 感染者 (HIV8, HIV18) の末梢血単核球から、HIV 抗原刺激1時間後 (1h) 及び6時間後 (6h) に得た。

### 3) マイクロアレイによるヒト側遺伝子発現解析

イタリアコホートの HIV-1 曝露非感染者および HIV-1 感染者の末梢血単核球を、HIV-1 抗原ペプチド混合物で刺激後1時間および6時間の RNA と、刺激前の RNA を用い、マイクロアレイによる発現解析を行った。刺激後1時間では、刺激前と遺伝子発現パターンに大きな違いは見られなかったが、刺激後6時間になると、刺激前とは全く異なるパターンの遺伝子発現が見られた。

抗原刺激前後の遺伝子発現パターンを定量的に比較するためには、同一プローブに対する蛍光強度をマイクロアレイ間で正規化する必要がある。そこで、GAPDH 及び  $\beta$ -アクチン遺伝子のそれぞれ複数のプローブについて、アレイ上の互いに対応するスポットの蛍光強度測定値をグラフにプロットし、これが直線となるよう Loess 関数による正規化を行った。

正規化後の各遺伝子の発現量 (蛍光強度) を HIV 抗原刺激の前後で比較すると、曝露非感染者で抗原刺激6時間後に発現の増強が見られ、HIV-1 感染者ではむしろ発現が減弱する遺伝子が二つ見つかった(図3)。これら二つの遺伝子は、

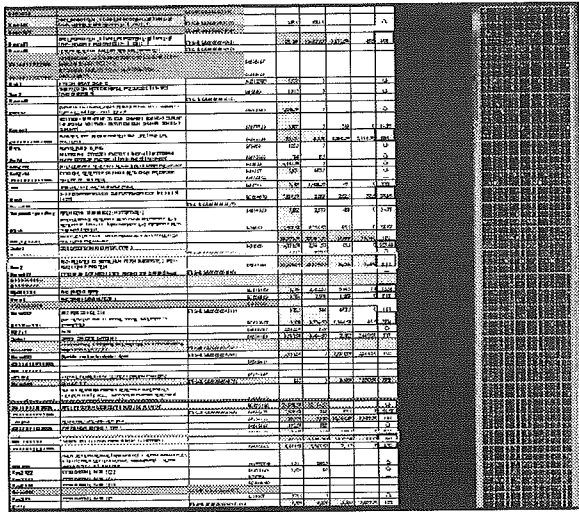


図 4. DNA マイクロアレイを用いたフレンドウイルス感染後の遺伝子発現パターン解析

マイクロアレイの蛍光像を右に示す。左は中和抗体産生能を持つ(B10.A × A/WySn)F<sub>1</sub> およびこれを欠く A/WySn マウスにおける、FV 感染9日後の遺伝子発現パターンのまとめ。各2個体を解析した。中央の四列で背景色が濃いものは遺伝子発現が強い。(B10.A × A/WySn)F<sub>1</sub> で強く発現し、A/WySn では発現の無い遺伝子が認められる。

知られている機能がリンパ球の遊走や活性化に関係する。一方、HIV 感染者の末梢血単核球では、HIV 感染に伴う全般的な遺伝子発現の低下や、抗原刺激に伴って活性化する T リンパ球サブポピュレーションの減少がある可能性が考えられた。この点を検証するため、マイクロアレイ上に複数のサイトカイン遺伝子のプローブを設定した。図3に示すとおり、I 型インターフェロンや IL-6 などのサイトカイン遺伝子は、HIV 感染者末梢血でも抗原刺激後に発現の増加が見られ、その程度はむしろ曝露非感染者よりも高かった。

従って、曝露非感染者で HIV 抗原刺激に伴って発現が増加し、HIV 感染者の末梢血単核球では発現が低下した遺伝子は、曝露非感染者に特異的に発現増強が起こっている可能性がある。

#### 4) マイクロアレイによるマウス側遺伝子発現解析

FV 感染9日後の(B10.A × A/WySn)F<sub>1</sub> および A/WySn マウスの脾臓における遺伝子発現パ

ターンをマイクロアレイにより比較した結果、発現レベルが十分に高く、しかも系統間で発現量に3倍以上の差がある遺伝子7個を見出した(図4)。これらのうち一つは、中和抗体早期産生能を持つ(B10.A × A/WySn)F<sub>1</sub> マウスの脾臓で強く発現しており、中和抗体産生を欠く A/WySn マウスでは全く発現が認められなかった。また、同じ遺伝子が B リンパ球の分化に関与することが既に報告されており、ゲノムレベルで A/WySn マウスにはトランスポゾンの組込による構造遺伝子変異が存在することが明らかであった。

#### 5) *Rfv-3* 候補遺伝子トランスジェニックマウスの作製

上記の発現解析及び構造遺伝子解析の結果に基づき、中和抗体早期産生能を持つ B10.A マウスと同じ遺伝子型を持った C57BL/6 マウスから、A/WySn マウスで変異している遺伝子の cDNA 全長をクローニングし、B リンパ球特異的な発現を促すよう免疫グロブリン遺伝子 V<sub>H</sub> プロモーターと κ 鎖 3'エンハンサーを結合させたコンストラクトを作製、これを複製欠損性のレンチウイルスベクターに組込んだ。通常のマイクロインジェクション法ではトランスジェニックマウスの作製が困難である

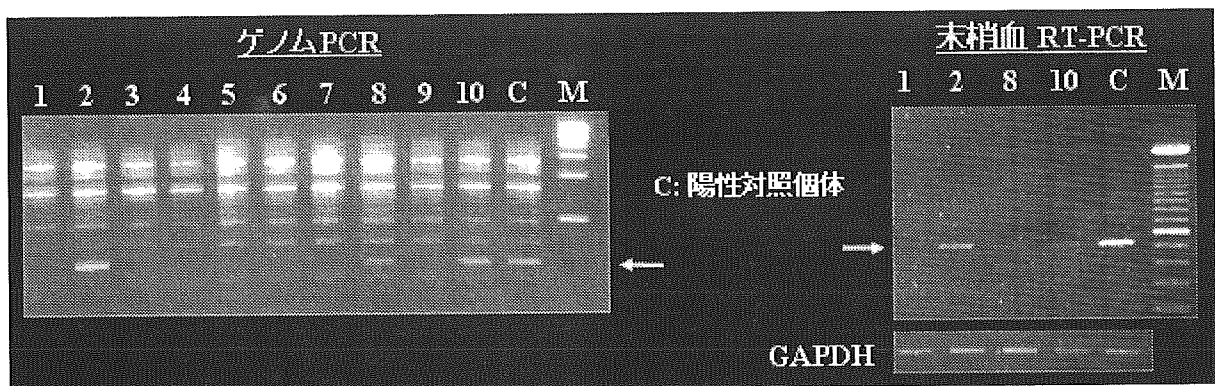


図 5. *Rfv-3* 候補遺伝子トランスジェニックマウスの樹立

中和抗体早期産生性の B10.A マウスと同じ遺伝子型を持つ C57BL/6 マウスから、*Rfv-3* 候補遺伝子の cDNA 全長をクローニング、V<sub>H</sub> プロモーター及び Igκ エンハンサーとともにレンチウイルスベクターに組込んだ。これを A/WySn 受精卵に導入し、得られた子孫個体についてゲノム DNA の PCR 解析、及び末梢血単核球での RT-PCR による発現解析を行った。

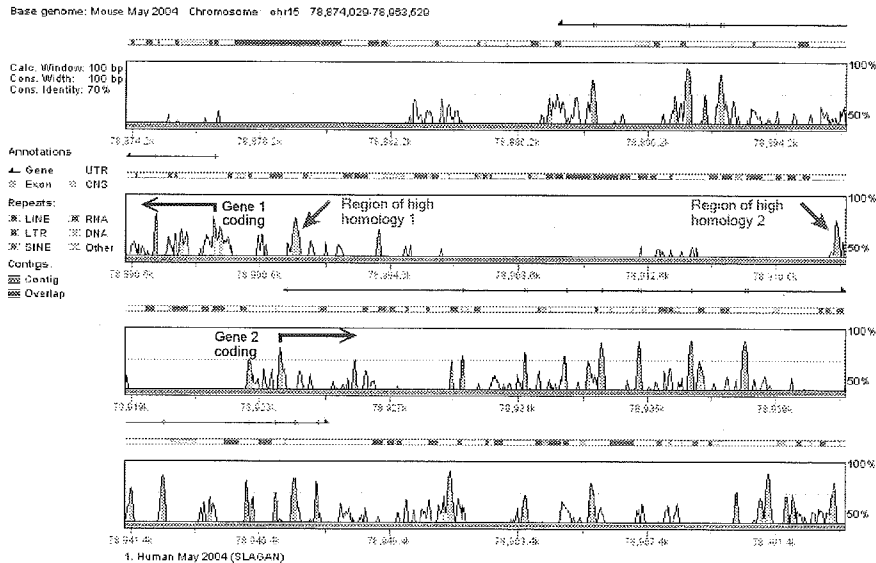


図 6. ヒトとマウスのゲノム比較による遺伝子発現調節部位の推定

マイクロアレイ解析によって、HIV-1 曝露非感染者で抗原刺激後発現の上昇が見られた、互いに隣接する二つの遺伝子 (Gene 1, Gene 2) について、それらに挟まれた領域の塩基配列を種間で比較した。マウスとヒトの間で50%を越える相同性を示す部分が二箇所あった (矢印)。これらは、その配列の特徴からエンハンサー領域と考えられた。

A/WySn 系統のマウスであっても、レンチウイルスベクターを用いることにより、受精卵への遺伝子導入が可能であった。

図5に示すとおり、ファウンダー系統 2, 8, 10 でゲノムへの候補遺伝子導入が検出でき、導入した遺伝子は末梢血単核球で発現していた。

現在、これらファウンダーマウスを交配して多数の子孫マウスを得ており、十分な数が確保出来次第、FV を接種して中和抗体産生の有無を決定する予定である。

#### 6) 種間ゲノム比較による高発現遺伝子調節部位の推定と塩基配列多型の検出

マイクロアレイを用いた発現解析によって、HIV 抗原刺激後曝露非感染者の末梢血単核球で発現上昇が見出された二つの遺伝子は、SNPs の解析で曝露非感染者群と HIV 感染者群に遺伝子型頻度の偏りが認められた *Card10* と *CDC42EPI* に、ごく隣接して存在している。そこで、曝露非感染者に認められた遺伝子発現上昇に、発現調節部位のゲノム多型が関与している可能性を考え、発現が上昇した二つの遺伝子の周辺に調節配列の存在を探った。

一般に、遺伝子発現の調節に関わる染色体領域は、構造遺伝子の間にありながら種間で塩基

配列の保存性が高い。曝露非感染者で発現の上昇が見られた二つの遺伝子は、その転写方向が互いに逆を向いており、その間に共通の調節領域が存在する可能性が考えられた。そこで、この領域の塩基配列をヒトとマウスの間で比較したところ、それぞれの遺伝子の転写開始部位の近傍に、合計二箇所、種間の相同性が高い領域を見出した (図6)。さらに、それぞれの領域の塩基配列の特徴から、これらの領域は遺伝子発現のエンハンサーとして機能する可能性が考えられた。

そこで、これら二つの領域の塩基配列をゲノムのシーケンシングによって決定し、HIV-1 曝露非感染者と HIV 感染者間で比較を行った。その結果、何れの領域にも新規の塩基多型が存在し、二つの領域の遺伝子型同士でハプロタイプを形成していること、曝露非感染者には、HIV 感染者では頻度の低い特定のハプロタイプが集積していることが見出された (図7)。

#### D. 考察

##### 1) 研究結果の考察

我々は、マウスレトロウイルス感染時にウイルス中和抗体の産生を制御する宿主遺伝子 (*Rfv-3*) を第15染色体上にマップし、これと相同なヒト第22染色体領域の複数のマーカー遺伝子型が、

hap		hap3	not hap3
1	G-T	ESN	10
2	A-T	HIV	2
3	A-G		12
4	G-G		13

図 7. 発現上昇の認められた遺伝子間に存在するエンハンサーと推定される配列の多型。曝露非感染者に特定のハプロタイプ (hap 3) が集積する。