

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

アジア・太平洋地域における HIV 感染症の疫学に関する研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

武 部 豊

平成18（2006）年3月

厚生労働科学研究費補助金研究報告書目次

I. 総括研究報告書

| | |
|-----------------------------------|-----|
| 武部 豊 | 1～5 |
| 「アジア及び太平洋地域における HIV 感染症の疫学に関する研究」 | |

II. 分担研究報告書

| | |
|---|------|
| 武部 豊 | 7～12 |
| 「マレーシアに出現した新規組換え型流行株 (CRF33_01B) の発見とその疫学的意義」 | |

| | |
|-------------------------------------|-------|
| 駒野 淳 | 13～22 |
| 「HIV-1 感染血友病患者におけるエイズ発症メカニズムに関する研究」 | |

| | |
|--------------------------------------|-------|
| 草川 茂 | 23～29 |
| 「HIV-1 サブタイプ B'感染性分子クローンの樹立とその性状の解析」 | |

| | |
|---|-------|
| 椎野禎一郎 | 31～39 |
| 「タイ型 HIV-1 ヴァリアント CRF01_AE の高度薬剤耐性変異に関する分子進化学的解析とそれを用いたレトロウイルス組換え解析系の開発の試み」 | |

| | |
|---------------------|----|
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 | 41 |
|---------------------|----|

| | |
|------------------|-------|
| IV. 研究成果の刊行物・別刷り | 43～65 |
|------------------|-------|

I. 総括研究報告書

研究課題：アジア及び大平洋沿岸地域におけるHIV感染症の疫学に関する研究
課題番号： H15-エイズ-019
主任研究者： 武部 豊 国立感染症研究所エイズ研究センター 室長

研究要旨

本研究班は、アジアにおけるエイズ流行に関する分子疫学・ウイルス学研究を主要な柱として研究を進め、今年度、次の研究成果を得た。

(柱I) 「アジアにおけるエイズ流行の全容解明に向けた分子疫学研究」

近年急速に流行が拡大しつつあるアジア諸国の一つであるマレーシアにおけるエイズ流行の成立ちとアジア全体の流行との相互関係を解明するために、現地研究者との共同で、分子疫学研究を進め、その結果、マレーシアにおける感染者全体の約 20%に、CRF01_AE とサブタイプ B/B'からなる新しいタイプの組換えウイルスを見い出した。さらに疫学的に関連性のない 4 名の感染者からの 4 種の HIV-1 株の全塩基配列を決定し、それらが同一の組換え構造をもつことを確認した。この新型組換えウイルスは、今年（2006 年）1 月に国際的 HIV sequence database から、第 33 番目の組換え型流行株（CRF33_01B）として正式承認された。CRF33_01B は我が国研究機関が報告する最初の CRF となった（武部班員）。

一方、東京都内の HIV-1 感染者（132 名）を対象にした研究によって、日本人男性同性愛者間ではサブタイプ B が圧倒的に優勢(57/57)であることが再確認された。それに対して、日本人の異性間感染者の間ではサブタイプ B (14/34)と CRF01_AE (14/34)がほぼ同規模で流布していることが明らかになった（研究協力者 加藤真吾）。

(II) 「アジア型 HIV-1 流行株に関する基盤的研究資源の開発・整備」

われわれは、アジア型ウイルスの解析試薬として重要な意義をもつ感染性分子クローンの完全なセットの樹立を目指しているが、本年度、東南アジア地域の注射薬物乱用者や中国内陸部の供血者における HIV 流行に重要な役割を果たしている HIV-1 subtype B'のより広い宿主領域をもつ感染性分子クローンの樹立を行った（草川班員）。

一方、これまでの研究によって、アジアでは、多様な組換えウイルスが絶えず新生していることを明らかにしてきたが、HIV-1 の遺伝子組換えのメカニズムを解析するために、逆転写酵素遺伝子のフィンガーとパーム領域の変異間の組換えによって高度多剤耐性形質が獲得されるという系を利用した、組換え機構の解析システムを開発した（椎野班員）。

また、これまでに蓄積してきたアジア型流行株に関する研究資源を利用して、ヒトパラインフルエンザ 2 型ウイルス(hPIV2)を用いた新規粘膜ワクチンの開発を試みた。マウスに経鼻投与したところ全身および粘膜で env 特異的細胞性および液性免疫が誘導され、粘膜免疫誘導可能な新規ワクチンベクターとして有効であることが示唆された（研究協力者 保富康宏）。

(III) 「エイズ発症に関与する宿主、ウイルス側因子の探索に関する分子疫学研究」

我が国の HIV-1 感染血友病患者の中には、感染後 20 年を経過したにもかかわらず、未治療のまま、なおエイズ発症から免れている患者群が存在する。これら患者群における発症遅延機序を解明する目的で HIV-1 複製調節に関連する可能性のある遺伝子の発現を RNA レベルで解析し、その結果、HIV-1 複製関連遺伝子の一つに関して、epigenetic な制御により転写産物から特定のエクソンが欠失する現象を見い出した。また完全長の transcript よりも splice variant が多く発現している症例が、健常者群に比較して長期未発症患者群で有意に高い頻度に見られることを明らかにした（駒野班員）。

これらの成果は、アジアと日本における HIV 感染症の最新動向の把握に加え、アジアの流行の成立ち、流行拡大の背景にある宿主側・ウイルス側の要因の解明、ワクチン等新規の感染阻害・発症防止技術の開発に重要な意義があると考えられる。

| | |
|------------|----------------------------|
| 分担研究者：所属施設 | |
| 草川 茂 | 国立感染症研究所エイズ研究センター 主任研究官 |
| 椎野禎一郎 | 国立感染症研究所エイズ研究センター 主任研究官 |
| 駒野 淳 | 国立感染症研究所エイズ研究センター 主任研究官 |
| 研究協力者 | |
| 保富 康宏 | 三重大学大学院医学系研究科 助教授 |
| 加藤 信吾 | 慶応義塾大学医学部微生物学・ 免疫学教室 助手 |

A. 研究目的とその背景

アジアにおけるエイズ流行は現在重要な転換期を迎えつつある。特に中国では 90 年代中頃より毎年 30%もの割合で感染者数が増加しており、有効な対策がとられない場合 2010 年までには、感染者数が 1,000 万人を突破する可能性があるなど、アジアにおいてさらに深刻なエイズ危機の到来が危惧される。

このような状況を背景として、本研究班は、本年度、我が国を含むアジア地域におけるエイズ流行に関する分子疫学的研究およびアジア型 HIV-1 ヴァリエントに関するウイルス学的研究を主要な柱として、研究を推進し、我が国およびアジアでの流行動向・将来動向を探ると共に、アジアにおける流行制圧と予防に向けた研究の「科学的基盤」の構築を目指した。

B. 研究方法

(柱 I) 「分子疫学研究」

〔国外研究 (マレーシア)〕 (武部班員)

- ① 国立マラヤ大学医療センターを受診する患者・感染者から血液検体 (n=184) を収集し、プロテアーゼおよび逆転写遺伝子領域の塩基配列に基づいて遺伝子型をスクリーニングした。
- ② 一方、共培養法によって HIV-1 株を分離し、領域毎のサブタイプ帰属に不一致が見い出される HIV-1 分離株に関して、ほぼ完全長の HIV-1 ゲノムをクローニングして、全塩基配列を決定した。
- ③ 近隣結合法による系統樹解析および各種組換え点解析プログラム (bootscanning analysis, informative site analysis, subregion tree analysis) を用いて、組換え点の微細マッピングを行い、流行ウイルス株の系統関係、相互関係を検討した。

〔国内研究〕 (加藤班員)

- ④ 都内 2 病院を受診する患者・感染者 (n=132) から、informed consent を得た後、年齢、性別、国籍、推定感染経路に関するインタビューを行い、血液検体を収集し、env (C2/V3)、一部検体に関してはプロテアーゼおよび逆転写遺伝子領域の塩基配列を参考として遺伝子型を決定した。

(柱 II) 「アジア型 HIV-1 流行株に関する基盤的研究資源の開発・整備」 (草川・椎野班員)

- ① 広い宿主域をもつ HIV-1 subtype B' 感染性分子クロンの作出
最初に得た感染性分子クローン B106_22 は T cell line やマクロファージで増殖できなかったがその責任領域を、T cell tropic の NL432、マクロファージ tropic の AD8 とのによ

って検討し、宿主域の拡大した新しい感染性分子クローンを得た。感染性のスクリーニングは、得られたプラスミドをそれぞれ 293T 細胞に transfect し、ウイルスの産生を確認した後、あらかじめ PHA で刺激した PBMC に感染させ、感染性を検討する方法で行った。coreceptor usage は、CD4 と CXCR4 または CCR5 を発現させた NP2 細胞におけるシンシチウム形成とウイルス産生を指標として決定した。T細胞株への感染性は、M8166、MT2、CEMx174 細胞で検討した。マクロファージへの感染性の検討は、末梢血由来単球を M-CSF で 1 週間誘導したもので行った。

② 高度多剤耐性の表現型を利用してフィンガー領域とパーム領域の間で組換えが生じたウイルスを選択できることに注目し、L210W, T215Y を持った CRF01_AE 感染性クロンのフィンガーとパーム領域間の約 400 ヌクレオチドの領域に存在する 20 個の制限酵素サイトに、それぞれアミノ酸配列を変えないように変異を導入した変異ウイルスクローン (NH1-RTΔRS_WY) を作成し、NH1-RTΔRS_WY と M41L, 69Ins, T69I を持った CRF01_AE 感染性クローンを共感染させることで、組換えウイルスを発生させ、組換え点の解析を行った。

③ rhPIV2 の作出とそのワクチン効果の評価：hPIV2 の NP 領域の NotI サイトに NL43、中国での分離株 NH1.1、SIVgag 遺伝子を挿入した。コントロールとして同一部位に GFP 遺伝子挿入 rhPIV2 も作成し、Balb/c マウス気管内に rhPIV2 (5x10⁶) を投与して、HiVenv 特異的 T 細胞を CD8⁺ 細胞の特異的 IFN-γ 産生細胞の ELISPOT によって測定した。

(柱 III) アジアにおけるエイズ流行の背景にある宿主側・ウイルス側要因の解析：「血友病長期未発症者における発症遅延機序に関する研究」 (駒野班員)

ウイルス複製に関連することが報告されているが、発症との関連が不明である宿主因子のうち、ヒト細胞における遺伝子産物発現等による抗ウイルス状態の誘導を実験的に証明できることが可能なものを解析対象とし、長期未発症に分類される末梢血 CD4 リンパ球数 200 以下で未治療の患者群から末梢血リンパ球の RNA を抽出し、RT-PCR により各種ウイルス複製制御遺伝子を増幅し、これらの ORF の塩基配列を検討した。

(倫理面への配慮)

国内研究に関しては、協力医療機関および国立感染症研究所倫理委員会からの承認済み。いずれも研究協力の意思を同意書をもって確認されている。またアジア各国エイズ研究機関との共同研究に関しては各国政府所轄機関の指示する倫理規程に従って遂行された (なお本年度研究課題であるマレーシアにおける分子疫学研究は国立マラヤ大学倫理審査委員会により承認済み)。

C. 研究結果

(柱 I) 「分子疫学研究」 (武部班員)

- ① マレーシアに出現した新規組換え型流行株 (CRF33_01B) 疫学的に関連性のない 4 症例から分離したウイルス株の全塩基配列を決定し、それらが CRF01_AE とサブタイプ B/B' からなる同一の組換え構造をもつ組換えウイルスであり、また先にタイにおいて報告された CRF15_01B とは異なることから、新型の組換え型流行株 (CRF33_01B) であることが、正式に承認された (HIV sequence database, 2006 年 1 月)。CRF33_01B はマレーシアにおける感染者全体の 19% (35/184) を占める。その比率はとりわけ注射薬物乱用者

(IDU)の間で高い(42%, 21/50)が、性的ルートによる感染者にも10-19%の割合で見出されることから、CRF33_01Bは、おそらく最初にIDU集団で生まれ、ついで異なるリスク集団へ伝播している可能性が推定された。

② 我が国における HIV-1 感染症の分子疫学の最新動向 (研究協力者 加藤真吾)

日本人感染者 120 例に関してみると、サブタイプ B が 98 例 (81.7%)、CRF01_AE が 15 例 (12.5%)、サブタイプ A が 4 例 (3.3%)、サブタイプ C が 2 例 (1.7%)、CRF02_AG が 2 例 (1.7%) であった。男性ではサブタイプ B が 96 例、CRF01_AE が 13 例と圧倒的にサブタイプ B が多かったのに対して、女性ではサブタイプ B が 2 例、CRF01_AE が 3 例とあまり変わらなかった。異性間性交渉で感染したと推測される 34 人 (うち女性 8 人) のうち、14 人 (女性 2 人) はサブタイプ B に、14 人 (女性 3 人) は CRF01_AE に感染していた。一方、同性間性交渉で感染したと推測される 57 人 (全員男性) はすべてサブタイプ B に感染しており、その他のサブタイプによる感染はみられなかった。感染経路不明の症例は 32 人で、そのうち 31 人はサブタイプ B に、1 人は CRF01_AE に感染していた。これらの症例はすべて男性で、その多くは既婚者であった。感染経路は現時点では明確ではない。

(柱 II) 「アジア型 HIV-1 流行株に関する基盤的研究資源の開発・整備」

④ 広い宿主域をもつ HIV-1 subtype B' 感染性分子クローンの作出: T cell line やマクロファージに対する感染性を T 細胞組換え実験決定するサブタイプ B' の T cell line やマクロファージでよく増殖する感染性分子クローンが得られたことで、より幅広いウイルス学的研究への応用が期待される (草川班員)。

⑤ 組換えウイルスゲノムを大量に構造解析するため、96well-microtiter plate を用いた細胞・上清からの RT 領域の RT-PCR~クローニング~塩基配列決定の手順を確立した。RT-PCR を用いたクローニング手法は、PCR 反応中に組換えが生じてしまうが、これの大半は部分的に増幅した断片が次の増幅過程に介入して生じる現象であり、伸長反応を十分に長くとることで回避することができた。得られた組換え体の塩基配列解析から、RT のこの領域 (約 400bp) では組換えの生じにくい領域が 2 箇所検出されたが、乗換え点の分布は塩基長とほぼ比例関係にあり組換えが極端に生じやすい領域は存在しなかった。この実験系では、得られたウイルスはすでに何世代かを経過しておりその間の自然選択や機会的浮動の影響を受けているため、サンプル集団の誤差分布を再検討する必要があるものの、組換えは特定のホットスポットで生じてはいないように見える (椎野班員)。

(柱 III) アジアにおけるエイズ流行の背景にある宿主側・ウイルス側要因の解析: 「血友病長期未発症者における発症遅延機序に関する研究」 (駒野班員)

CCR5、CyclophilinA や TRIM5 α のウイルス複製関連ドメインには異常を認めなかったが、HIV-1 複製関連遺伝子の一つ (not disclosed) において興味深い変異を同定した。長期未発症者群において、完全長と予想される転写産物から約 164nt 短い mRNA 転写産物が存在することが RT-PCR にて確認された。患者によって短い転写産物しか検出できないもの、完全長と予想される転写産物といろいろな比率で共存するものが存在した。当該遺伝子のスプライスバリエーションはこれまで報告されていない。健康人 (7 例) と比較すると、短い転写産物の割合が多い割合は長期未発症群

(11 例中 7 例) に有意に多いことが判明した (図 1 : P=0.04、健康人は 7 例中 1 例)。

(柱 III) 「ウイルス学的研究」 (草川・椎野班員)

① 先に確立した両側の LTR を含むベクターを用いた高能率の感染性 HIV-1 分子クローンの構築技術を用い、本年度あらたに中国の経血液ルートでの流行の重要な動因となっている HIV-1 subtype B' (subtype B のタイプ別ヴァリエント) に関して非常に良好な複製能力を示す感染性分子クローンの作出に成功した。このクローンは CCR5 と CXCR4 の両者をコレセプターとして用いる X4R5 型であることを確認した。② 高度多剤耐性の表現型を利用してフィンガー領域とパーム領域の間で組換えが生じたウイルスを選択できることに注目し、この領域に生じる交叉と組換えの詳細な解析を試みている。この解析のために、L210W, T215Y を持った CRF01_AE 感染性クローンのフィンガーとパーム領域間の約 400 ヌクレオチドの領域に存在する 20 個の制限酵素サイトに、それぞれアミノ酸配列を変えないように変異を導入した変異ウイルスクローン (NH1-RT Δ RS_WY) を作成した。NH1-RT Δ RS_WY と M41L, 69Ins, T69I を持った CRF01_AE 感染性クローンを共感染させることで、培養細胞において交叉点が明確な組換えウイルスを大量に発生させることが可能となった。

D. 考察

(柱 I) 「分子疫学研究」 (武部班員)

① CRF33_01B はとりわけ IDU 集団においてその prevalence が高いことから、IDU 集団において最初に生まれたと推測される。これまでに報告されている CRF のかなりの部分が、必ずしも集団に広く分布している証拠に乏しいのに対して CRF33_01B は薬物乱用による経血液ルートだけでなく性感ルートによって流行が拡大している明確な証拠が存在し、まさに CRF に相応しい性質をもつ流行株であることが明らかにされた。また CRF33_01B に関連する類縁の組み換えウイルスの存在は、マレーシア国内で新たな遺伝子組換えが継続的に起っていることを示唆するものと考えられる。これらの知見はアジアにおける流行の最新動向を反映するものと考えられる。

HIV-1 サブタイプの分布は 2 つの日本人リスクグループの間で大きく異なり、男性同性愛者間ではサブタイプ B が圧倒的に優勢であるのに対して、異性間性交渉者間では男女ともサブタイプ B と CRF01_AE がほぼ拮抗して流行していることが示された。わが国の HIV 感染の予防策とワクチン開発を進めるにあたっては、以上述べたような、わが国特有のサブタイプ流行パターンを考慮することが重要であると考えられる。マレーシアに出現した本組換えウイルス (CRF33_01B) は集団内に高い比率で広まりつつある組換えウイルスとしては、CRF01_AE, CRF07_BC, CRF08_BC に次ぐアジアで 4 番目のものである。

(柱 III) 「ウイルス学的研究」 (草川・椎野班員)

タイやミャンマーで注射薬物乱用者の間に発見されたものであるが、東南アジア地域における注射薬物乱用者の間の爆発的流行にだけでなく中国内陸部の供血者の間に起った悲劇的アウトブレイクの原因ウイルスとして重要性が再認識されている HIV-1 サブタイプ B' ヴァリエントの感染性分子クローンが確立されたことは、今後の東アジア地域を標的とするワクチン開発に向けた基盤的研究ツールを開発する上で重要な一歩となると期待される。また、HIV-1 組換え現象を現実のフィールド株をベースにして解析するシステムの構築されたことは意義深いと考えられる。

(柱 III)アジアにおけるエイズ流行の背景にある宿主側・ウイルス側要因の解析：「血友病長期未発症者における発症遅延機序に関する研究」

我々の見出した HIV-1 複製関連遺伝子のエクソン7欠失転写産物の存在はエイズ発症と関連するものなのかは現段階では明かではない。文献的には、遺伝子 A のエクソン7は、ウイルス遺伝子産物と相互作用するドメインであることが知られている。この相互作用は効率のよいウイルス複製には必須である。過去の機能解析の結果と照らし合わせると、発症関連因子である可能性は低いと思われる。直接的なテストとして、この短い転写産物をクローニングしては乳類発現プラスミドに導入し、T 細胞株に恒常的に発現させ、20kDa の蛋白質発現により HIV-1 複製が抑制されるかを検証しようと計画している。

E. 結論

①マレーシアにおける近年のエイズ流行の加速に関与すると推測される新型の組換え型流行株 (CRF33_01B) を見出した。アジア諸地域においてはエイズ流行が急速に拡大しているが、新規組換えウイルスの出現はこのような流行の最新動向を反映するものと考えられる。

② 感染者・患者報告数の著しい増加傾向の見られる我が国において、新規感染者の過半数を占める男性同性愛者においては欧米型のサブタイプ B が圧倒的なファウンダー株となっているが、異性間感染者の間では東南アジアに起源をもつ CRF01_AE がサブタイプ B に拮抗する割合にまで増加しているという傾向が明らかとなった。

③ アジアを標的とするワクチン開発の基盤整備のため、アジア型流行株の中で、とりわけ中国内陸部の供血者の間のアウトブレイクの原因となっている HIV-1 サブタイプ B' の広い宿主細胞域を示す感染性分子クローンを樹立した。また高度多剤耐性変異を用いた試験管内の HIV-1 遺伝子組換えの解析システムを樹立した。

④ 我が国の HIV 感染血友病患者の間にみられる未治療のままエイズ発症を免れている感染者におけるエイズ発症遅延機序の解析を進め、HIV-1 複製関連遺伝子の一つに関してスプライシング制御などの epigenetic な効果により転写産物からエクソン7が欠失する現象を見出した。健常者群に比較すると長期未発症患者群に有意に高い頻度で観察されることから、長期未発症の原因遺伝子として非常に魅力的な候補であると考えられる。

F. 健康危険情報

本年度、当班よりの報告はありません。

G 研究発表

論文発表

1. Kondo, M., Shima, T., Sudo, K., Nishizawa, M., Iwamuro, S., Okabe, T., Takebe, Y., Imai, M. (2005). Identification of attenuated HIV-1 CRF01_AE variant associated with slow disease progression due to gross genetic alterations in the *nef*-LTR sequences. *J. Inf Dis.* **192**: 56-61.
2. Mori, K., Sugimoto, C., Ohgimoto, S., Shioda, T., Kusagawa, S., Takebe, Y., Kano, M., Matano, T., Yuasa, T., Kitaguchi, D., Miyazawa, M., Takahashi, Y., Yasunami, M., Kimura, A., Yamamoto, N., Suzuki, Y., and Nagai, Y. (2005). Influence of glycosylation on the efficacy of an Env-based vaccine against SIVmac239 in a macaque AIDS model. *J. Virol.* **79** (16):

10386-10396.

3. Takamura, S., Matsuo, K., Takebe, Y., and Yasutomi, Y. (2005). Ag85B of mycobacteria elicits effective CTL responses through activation of robust Th1 immunity as a novel adjuvant in DNA vaccine. *J. Immunol.* **175**: 2541-2547.
4. Li, X.-J., Kusagawa, S., Xia, X., Yang, C., Wang, Q., Yokota, Y., Hoshina, Y., Onogi, T., Nohtomi, K., Imamura, Y., Shiino, T., Yang, R., Yamamoto, N., Ben, K., and Takebe, Y. (2005). Molecular Epidemiology of the Heterosexual HIV-1 Epidemic in Kunming, Yunnan Province, China, Suggests Origin from the Local IDU Epidemic. *AIDS Res and Human Retroviruses* **21** (11): 977-980.

学会発表

武部豊 (班員: 主任研究者)
駒野淳・草川茂・椎野禎一郎 (班員)
保富康宏・加藤信吾 (協力研究員)

1. 武部豊、横田侑子、小泉寛和、Xi Xiao-Jie、滝口雅文、岡慎一。(2005)。HIV-1 スーパー感染: レジデント・ウイルスとスーパー感染ウイルス間の組換えウイルスの急速な出現とその生物学的意義。第53回日本ウイルス学会(2005.11.20-22。横浜)
2. 近藤真規子、嶋貴子、武部豊、加藤真吾、今井光信。(2005)。Real-time PCR 法を用いた HIV-1 プロウイルス定量法—6種類の HIV-1 サブタイプとプライマー、プローブの反応性の検討 第53回日本ウイルス学会(2005.11.20-22。横浜)
3. 草川茂、武部豊。(2005)。広い宿主域と高い増殖能を持つ HIV-1 CRF08_BC 感染性分子クローンの構築。第53回日本ウイルス学会(2005.11.20-22。横浜)
4. 清水佐紀、駒野淳、浦野恵美子、二橋悠子、宮内浩典、磯貝まや、松田善衛、納富香子、小野木利成、武部豊、山本直樹。(2005)。HIV-1 感染細胞における Tat を介した P-TEFb の活性化を抑制する細胞内因子の解析。第53回日本ウイルス学会(2005.11.20-22。横浜)
5. 武部豊、納富香子、小野木利成、西郷薫、内藤雄樹。(2005)。バイオインフォマティクスの手法に基づいた抗 HIV-1 至適汎用 siRNA の設計とそれによる HIV-1 増殖阻害効果の評価。第53回日本ウイルス学会(2005.11.20-22。横浜)
6. 武部豊、Xi Xiao-Jie、Ma Yanling、Xia Xueshan。(2005)。HIV-1 遺伝子組換えにおけるサブタイプ CLTR の selective advantage (選択優位性)。第19回日本エイ

- ズ学会 (2005.12.1-3. 熊本)
7. 駒野淳、二橋悠子、浦野恵美子、青木徹、貝の瀬由成、宮内浩典、磯貝まや、松田善衛、山本直樹. (2005). Cell surface expression of CXCR4 is regulated by a non-tyrosine-based diacidic motif within the cytoplasmic tail. 第19回日本エイズ学会 (2005.12.1-3. 熊本)
 8. 清水佐紀、駒野淳、浦野恵美子、二橋悠子、宮内浩典、磯貝まや、松田善衛、納富香子、小野木利成、武部豊、山本直樹. (2005). T-type cyclin/CDK9 複合体の活性化を抑制する細胞因子による HIV-1 複合制御. 第19回日本エイズ学会 (2005.12.1-3. 熊本)
 9. 武部豊、横田侑子、小泉寛和、Xi Xiao-Jie、滝口雅文、岡慎一. (2005). HIV-1 スーパー感染とウイルスの個体内進化に関する解析. 第19回日本エイズ学会 (2005.12.1-3. 熊本)
 10. Tee Kok-Keng, Li Xiao-Jie, Nohtomi Kyouko, Pon Chee Keong, Kamarulzaman Adeeba, Ng Kee Peng, Takebe Yutaka. (2005). Emergence of new HIV-1 recombinant forms in Malaysia. 第19回日本エイズ学会 (2005.12.1-3. 熊本)
 11. 近藤真規子、須藤弘二、田中里恵、嶋貴子、足立拓也、設楽裕子、岩室紳也、向出雅一、武部豊、加藤真吾、今井光信. (2005). 各種サブタイプに対応できる real-time PCR 法による HIV-1 プロウイルスの定量法の検討. 第19回日本エイズ学会 (2005.12.1-3. 熊本)
 12. Yutaka Takebe. (2005). Precise mapping of recombination breakpoints of HIV-1 recombinants in Asia: Insight into *in vivo* recombination mechanism. The 12th International Workshop on HIV Dynamics and Evolution (April 23-26, 2005 Cleveland, Ohio, USA).
 13. Yutaka Takebe. (2005). Selective advantage of LTR of HIV-1 subtype C over that of subtype B in *in vivo* recombination event. 6th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance (November 13-16, 2005 Chantilly, Virginia, USA).
 14. Yutaka Takebe. (2006). Selective advantage of HIV-1 subtype C LTR in inter-subtype recombination *in vivo*. 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. (February 5-8, 2006 Denver, Co, USA).
 15. Yutaka Takebe. (2006). Inter-CRF recombinants (ICRs): New class of HIV-1 recombinants and its epidemiological implications. (February 5-8, 2006 Denver, Co, USA).

II. 分担研究報告書

マレーシアに出現した新規組換え型流行株 (CRF33_01B)の発見とその疫学的意義

分担研究者： 武部 豊 (国立感染研エイズ研究センター)

協力研究者： Kok Keng Tee^{1, 2}, 納富香子¹, Xiao-Jie Li^{1, 3}, 小野木利成^{1, 2}, Kee Peng Ng², Adeeba Kamarulzaman² (¹ 国立感染研エイズ研究センター、² 国立マラヤ大学医学部、マレーシア、³ エイズ予防財団)

研究要旨 われわれは、近年急速に流行が拡大しつつあるアジア諸国の一つであるマレーシアにおいて、CRF01_AE とサブタイプ B/B'からなる新しいタイプの組換え型流行株 (CRF33_01B) を見出した。疫学的に関連性のない 4 名の感染者から分離された HIV-1 株の全塩基配列の決定の結果、CRF33_01B は、CRF01_AE からなる基本骨格に 2 個の連続した短いサブタイプ B/B'断片が gag-RT 領域に挿入されていることが明らかになった。先にタイで見いだされた CRF15_01B とは異なる構造をもつ。CRF33_01B は今年 (2006 年) 1 月に国際的 HIV sequence database から我が国研究機関が報告する最初の CRF として正式承認を受けた。CRF33_01B はマレーシアにおける感染者全体の 19% (35/184) を占める。その比率はとりわけ注射薬物乱用者 (IDU) の間で高い (42%, 21/50) が、性的ルートによる感染者にも 10-19%の割合で見出されることから、CRF33_01B は、最初に IDU 集団で生まれ、ついで異なるリスク集団へのウイルス伝播の架け橋としての役割を担っている可能性が推定された。また、感染者の一部 (3%, 6/184) には、CRF33_01B とは異なるが、類縁の構造をもつ CRF01_AE/サブタイプ B/B' 間の組換えウイルスが見出されることから、異なる系統のウイルス株の間の遺伝子組換えが継続的に起っていることが示唆された。アジア諸地域における流行ウイルス株の継続的な遺伝学的モニタリングは、我が国を含むアジア諸地域における流行の新規動向を探り、さらにアジアにおける将来のワクチン戦略を考察する上で、重要な意義があると考えられる。

A. 研究の背景とその目的

マレーシアは近年急速に流行が拡大しつつあるアジア諸国の一つである (図 1)。これまでの研究からマレーシアにおいて近年新しいタイプの組換えウイルスの存在を示唆する証拠が得られている。そこでわれわれは、マレーシアに生まれた新しいタイプの HIV-1 組換えウイルスの分離を行い、ウイルスゲノムのクローニングによって全塩基配列の決定を目指した。また分子疫学的な見地からマレーシアにおける流行の成立ちに関する解明を進めた。

B. 研究方法

様々なリスク集団から血液検体 (n=184) を収集し、プロテアーゼおよび逆転写遺伝子領域の塩基配列に基づいて遺伝子型をスクリーニングした。両領域のサブタイプ帰属に不一致が見い出される HIV-1 分離株に関して全塩基配列を決定し、その組換え構造を種々の組み換え点解析技

術 (bootscanning analysis, informative site analysis, subregion tree analysis) を用いて解析した。

(倫理面への配慮) 本研究は国立マラヤ大学倫理審査委員会により承認済み。研究協力の意思は同意書をもって確認されている。

C. 研究結果

疫学的に関連性のない 4 症例から分離したウイルス株の全塩基配列を決定した結果、それらが CRF01_AE とサブタイプ B/B'からなる同一の組換え構造をもつ組換えウイルスであることが明らかとなった (図 2)。現在の HIV 遺伝子型分類・命名基準に照らして、新型の組換え型流行株 (CRF33_01B) であることが、今年 (2006 年) 1 月に米国ロスアラモス国立研究所の HIV sequence database より、正式に承認された。

CRF33_01B は、CRF01_AE からなる基本骨格の中に短いサブタイプ B/B'に由来する遺伝子断

片が2個挿入された構造をもっており、先にタイプで見い出された、同様に CRF01_AE とサブタイプ B/B'からなる CRF15_01B とは明確に異なる構造をもっている。

CRF33_01B は、解析した 184 検体の中の 19% (35/184)を占めるマレーシアにおける有力な流行ウイルス株であることが明らかになった(図3)。特に注射薬物乱用者 (injecting drug user, IDU) での割合は、42% (21/50)と際立って高いが、その他、男性同性愛者/両性愛者においては 19% (3/16)、異性間感染者では 10% (9/92)と様々なリスク集団に広く広がっている。

さらに CRF01_AE とサブタイプ B/B'からなる異なるタイプの組換え構造を示す組み換えウイルス (minor recombinant form) が少数 (3%, 6/184) (図3) であるが、見い出された。その多くは CRF33_01B のもつ組換え点と共通するなど類縁の構造をもつ組み換えウイルスであった(図4)。

D. 考察

CRF33_01B はとりわけ IDU 集団においてその prevalence が高いことから、IDU 集団において最初に生まれたと推測される。これまでに報告されている CRF のかなりの部分が、必ずしも集団に広く分布している証拠に乏しいの対して CRF33_01B は薬物乱用による経血液ルートだけでなく性感ルートによって流行が拡大している明確な証拠が存在し(図3)、CRF に相応しい性質をもつ流行株であることが明らかにされた。また CRF33_01B に関連する類縁の組み換えウイルスの存在(図3、4)は、マレーシア国内で新たな遺伝子組換えが継続的に起っていることを示唆するものと考えられる。

E. 結論

われわれはマレーシアにおける様々なリスク集団に広く蔓延する新型の組換え型流行株 (CRF33_01B) を見い出した。この新型 CRF はマレーシアにおける異なるリスク集団間のウイルス伝播を架橋するものと考えられる。CRF33_01B は我が国機関から報告され、国際的 HIV sequence database によって正式承認された最初の CRF として意義深い。今後の流行ウイルス株の遺伝学的モニタリングはマレーシアを含むアジア地域における流行の新規動向を探り、また将来のワクチン戦略を考察する上で極めて

重要であると考えられる。

F. 健康危険情報

本年度は当班よりの報告はありません。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kondo, M., Shima, T., Sudo, K., Nishizawa, M., Iwamuro, S., Okabe, T., Takebe, Y., Imai, M. (2005). Identification of attenuated HIV-1 CRF01_AE variant associated with slow disease progression due to gross genetic alterations in the *nef*-LTR sequences. *J. Inf Dis.* **192**: 56-61.
- 2) Mori, K., Sugimoto, C., Ohgimoto, S., Shioda, T., Kusagawa, S., Takebe, Y., Kano, M., Matano, T., Yuasa, T., Kitaguchi, D., Miyazawa, M., Takahashi, Y., Yasunami, M., Kimura, A., Yamamoto, N., Suzuki, Y., and Nagai, Y. (2005). Influence of glycosylation on the efficacy of an Env-based vaccine against SIVmac239 in a macaque AIDS model. *J. Virol.* **79** (16): 10386-10396.
- 3) Takamura, S., Matsuo, K., Takebe, Y., and Yasutomi, Y. (2005). Ag85B of mycobacteria elicits effective CTL responses through activation of robust Th1 immunity as a novel adjuvant in DNA vaccine. *J. Immunol.* **175**: 2541-2547.
- 4) Li, X.-J., Kusagawa, S., Xia, X., Yang, C., Wang, Q., Yokota, Y., Imamura, Y., Hoshina, Y., Nohtomi, K., Shiino, T., Onogi, T., Yang, R., Yamamoto, N., Ben, K., and Takebe, Y. (2005). Molecular Epidemiology of the Heterosexual HIV-1 Epidemic in Kunming, Yunnan Province, China, Suggests Origin from the Local IDU Epidemic. *AIDS Res and Human Retroviruses* **21**: 977-980.
- 5) Takebe, Y. and Telesnitsky, A. (2006). Evidence for the acquisition of multidrug resistance by an HIV clinical isolate *via* human gene transduction. submitted to *Nature Med.*
- 6) Tee, K. K., Li, X.-J., Nohtomi, K., Ng, K. P., Kamarulzaman, A., and Takebe, Y. (2006). Emergence of Novel Circulating Recombinant Form (CRF33_01B) Disseminating Widely among Various Risk Populations, Malaysia. submitted to *Emerging Infectious Dis.*
- 7) Li, X.-J., Kusagawa, S., Aye, K.T., Hoshina, Y., Yokota, Y., Xia, X., Ben, K., Oo, K. Y., Aung, T.,

Thant, K. Z., Moe, K., Thwe, M., and Takebe, Y. (2006). Dual infections with multiple lineages of HIV-1 strains in unique geographical recombination “hotspots” in Asia. submitted to *AIDS*.

2. 学会発表

- 1) 武部豊、横田侑子、小泉寛和、Xi Xiao-Jie、滝口雅文、岡慎一。(2005)。HIV-1 スーパー感染：レジデント・ウイルスとスーパー感染ウイルス間の組換えウイルスの急速な出現とその生物学的意義。第53回日本ウイルス学会(2005.11.20-22。横浜)
- 2) 近藤真規子、嶋貴子、武部豊、加藤真吾、今井光信。(2005)。Real-time PCR法を用いたHIV-1 プロウイルス定量法—6種類のHIV-1 サブタイプとプライマー、プローブの反応性の検討 第53回日本ウイルス学会(2005.11.20-22。横浜)
- 3) 草川茂、武部豊。(2005)。広い宿主域と高い増殖能を持つHIV-1 CRF08_BC 感染性分子クローンの構築。第53回日本ウイルス学会(2005.11.20-22。横浜)
- 4) 清水佐紀、駒野淳、浦野恵美子、二橋悠子、宮内浩典、磯貝まや、松田善衛、納富香子、小野木利成、武部豊、山本直樹。(2005)。HIV-1 感染細胞における Tat を介した P-TEFb の活性化を抑制する細胞内因子の解析。第53回日本ウイルス学会(2005.11.20-22。横浜)
- 5) 武部豊、納富香子、小野木利成、西郷薫、内藤雄樹。(2005)。バイオインフォマティクスの手法に基づいた抗 HIV-1 至適汎用 siRNA の設計とそれによる HIV-1 増殖阻害効果の評価。第53回日本ウイルス学会(2005.11.20-22。横浜)
- 6) 武部豊、Xi Xiao-Jie、Ma Yanling、Xia Xueshan。(2005)。HIV-1 遺伝子組換えにおけるサブタイプ C LTR の selective advantage (選択優位性)。第19回日本エイズ学会(2005.12.1-3。熊本)
- 7) 駒野淳、二橋悠子、浦野恵美子、青木徹、貝の瀬由成、宮内浩典、磯貝まや、松田善衛、山本直樹。(2005)。Cell surface expression of CXCR4 is regulated by a non-tyrosine-based diacidic motif within the cytoplasmic tail。第19回日本エイズ学会(2005.12.1-3。熊本)
- 8) 清水佐紀、駒野淳、浦野恵美子、二橋悠子、

宮内浩典、磯貝まや、松田善衛、納富香子、小野木利成、武部豊、山本直樹。(2005)。T-type cyclin/CDK9 複合体の活性化を抑制する細胞因子による HIV-1 複合制御。第19回日本エイズ学会(2005.12.1-3。熊本)

9) 武部豊、横田侑子、小泉寛和、Xi Xiao-Jie、滝口雅文、岡慎一。(2005)。HIV-1 スーパー感染とウイルスの個体内進化に関する解析。第19回日本エイズ学会(2005.12.1-3。熊本)

10) Tee Kok-Keng, Li Xiao-Jie, Nohtomi Kyouko, Pon Chee Keong, Kamarulzaman Adeeba, Ng Kee Peng, Takebe Yutaka. (2005). Emergence of new HIV-1 recombinant forms in Malaysia. 第19回日本エイズ学会(2005.12.1-3。熊本)

11) 近藤真規子、須藤弘二、田中里恵、嶋貴子、足立拓也、設楽裕子、岩室紳也、向出雅一、武部豊、加藤真吾、今井光信。(2005)。各種サブタイプに対応できる real-time PCR 法による HIV-1 プロウイルスの定量法の検討。第19回日本エイズ学会(2005.12.1-3。熊本)

12) Yutaka Takebe. (2005). Precise mapping of recombination breakpoints of HIV-1 recombinants in Asia: Insight into *in vivo* recombination mechanism. The 12th International Workshop on HIV Dynamics and Evolution (April 23-26, 2005 Cleveland, Ohio, USA).

13) Yutaka Takebe. (2005). Selective advantage of LTR of HIV-1 subtype C over that of subtype B in *in vivo* recombination event. 6th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance (November 13-16, 2005 Chantilly, Virginia, USA).

14) Yutaka Takebe. (2006). Selective advantage of HIV-1 subtype C LTR in inter-subtype recombination *in vivo*. 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. (February 5-8, 2006 Denver, Co, USA).

15) Yutaka Takebe. (2006). Inter-CRF recombinants (ICRs): New class of HIV-1 recombinants and its epidemiological implications. (February 5-8, 2006 Denver, Co, USA).

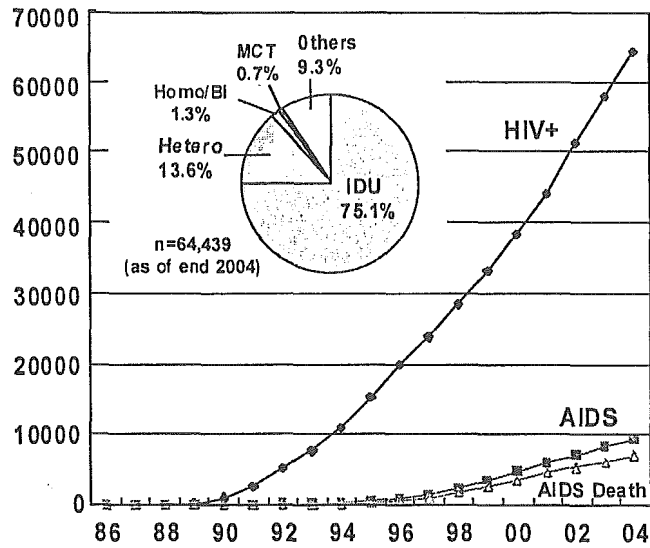
H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) 「RNA 干渉ポリヌクレオチド混合物の設計方法、RNA 干渉ポリヌクレオチド混合物の設計装置、RNA 干渉ポリヌクレオチド混合物の作製方法、RNA 干渉ポリヌクレオチド混合物の設計プ

プログラム、及び RNA 干渉ポリヌクレオチド混合物」(特願 2005-55064、平成 17 年 2 月 28 日出願)(東大理・内藤雄樹、西郷薫博士と共同出願)

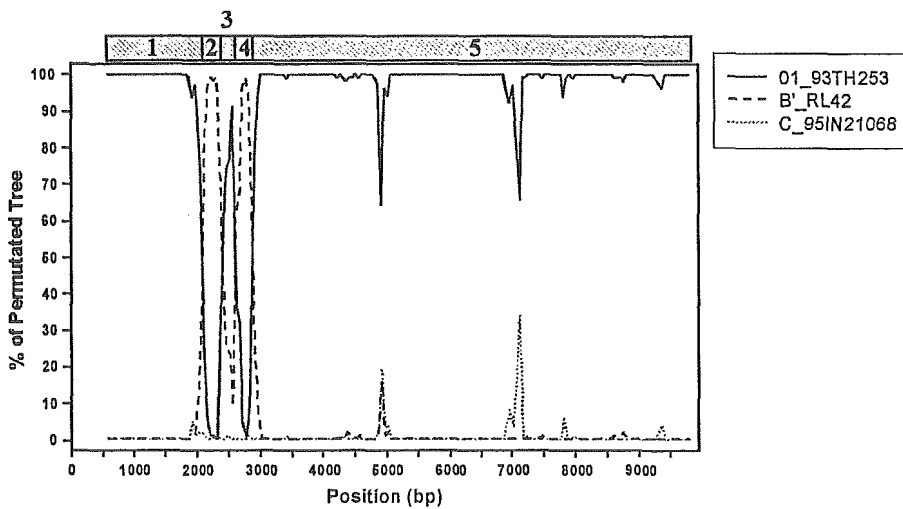
2)「中国型 HIV-1 流行株の複製可能 DNA クローン」(出願準備中)

HIV/AIDS epidemic in Malaysia



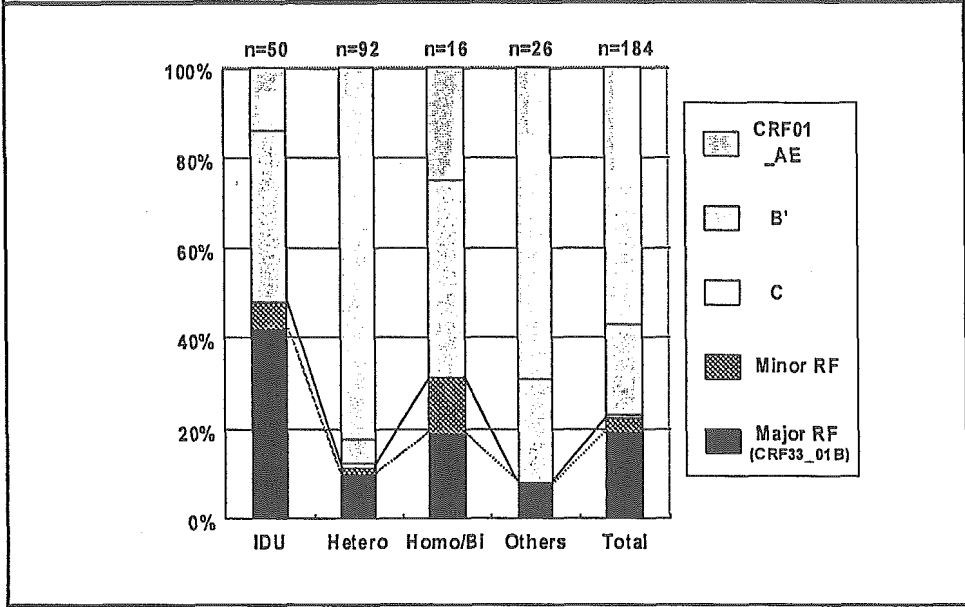
☒ 1

Bootscanning analysis of major RF (CRF33_01B)



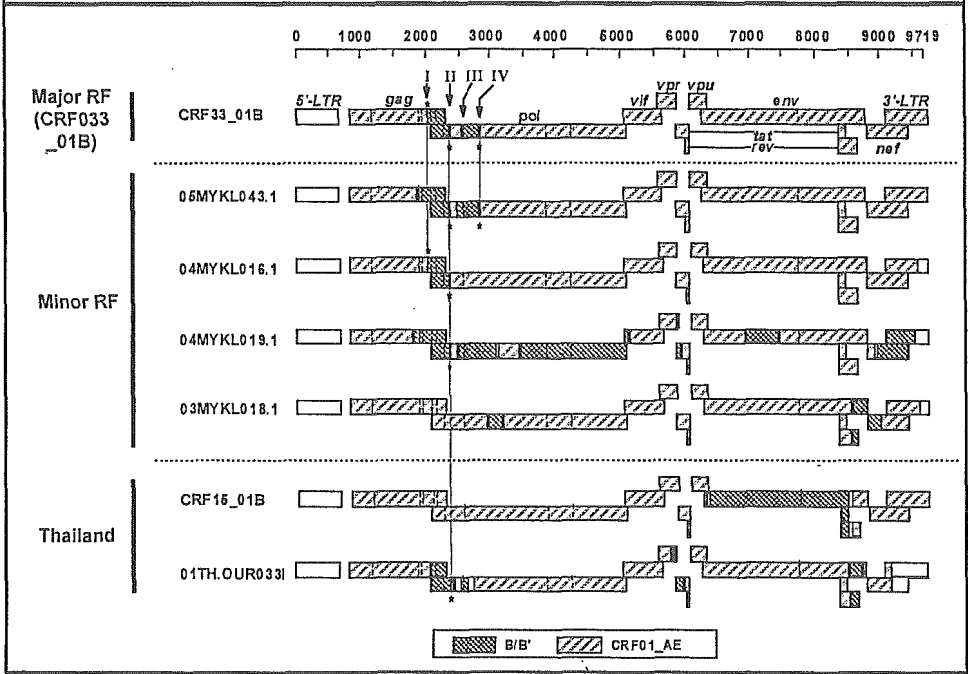
☒ 2

Distribution of HIV-1 genotypes in Kuala Lumpur, Malaysia



☒ 3

Subtype structure of Malaysian CRF01_AE/B recombinants



☒ 4

分担研究課題 HIV-1 感染血友病患者におけるエイズ発症メカニズムに関する研究

分担研究者：駒野 淳（国立感染症研究所 エイズ研究センター 第3室 主任研究官）

研究要旨

日本の抗 HIV-1 抗体陽性血友病患者の中で未治療にも関わらず感染後 20 年を経過したにもかかわらず、なおエイズ発症から免れている患者群が存在する。これら患者群の遺伝子発現を RNA レベルで解析することにより、我々は日本人におけるエイズ病期進行に関連する遺伝的要因の同定を試みている。本年度の解析により、ウイルス複製関連遺伝子 A において、epigenetic な制御により転写産物から特定のエクソンが欠失する現象を世界ではじめて明らかにした。完全長の transcript よりも splice variant が多く発現している症例は、健常者群に比較すると長期未発症患者群に有意に高い頻度で存在することを明らかにした。また網羅的遺伝子発現解析により、健常者群と長期未発症患者群にはインターフェロン関連遺伝子を含む数多くの宿主—病原体相互作用因子群の遺伝子発現の変動が有意に高まることを見いだした。これら宿主因子がどのようなメカニズムで HIV-1 によるエイズ病期進行抵抗性を与えるのかを解析することにより、エイズ治療薬およびワクチン開発に多大な貢献が期待できる。

A. 研究目的

日本の血友病患者の HIV-1 大量感染（1994 年 12 月調査時、1792 人が感染し、同年 2 月現在の血友病患者の抗 HIV-1 抗体陽性率は 46% と報告されている。1997 年までに、600 人強が発症し、そのうち 400 人以上の生命が既に失われている。血友病製剤による HIV-1 暴露から 20 年が経過した。その間、徐々に病期が進行し HAART 療法にてエイズ発症を抑止する必要がある症例が大半を占めるようになってきた。しかし、いまなおエイズウイルス（HIV-1）に感染しながら、末梢血 CD4 リンパ球数が 200/uL を維持し、エイズを発症しない症例がある。HIV-1 感染は初期感染症状が弱いために一般的に感染者のウイルス暴露時期を特定することが難しい。そのため、「長期」が何年を指すかは不透明ではある。しかし多くの症例が世界的に経験された今、エイズが発症に至る経過はおよそ十年と考えられるようになった。血液製剤による血友病患者のウイルス感染は時期が特定できるという意味で特殊かつ貴重

な患者集団である。発病していない感染者の一部は、発症を予防するための化学療法（HAART 療法）などを受けていない。HIV-1 感染から 20 年にわたってエイズを発症していない患者群は、特殊な抗 HIV-1 要因を有することが推測される。発病しない仕組みを解き明かすことにより、発症のメカニズム、治療方法の開発（治療薬やワクチン開発）などへの応用が期待されるが、長期未発症のメカニズムは依然として不明な点が多い。我々は抗 HIV-1 抗体陽性血友病患者における長期未発症者における発症阻止／遅延に関する因子を同定することを目標に掲げ研究を推進した。

エイズ発症を阻止する要因としては、次の 2 つの因子が挙げられる。

- (1) ウイルス因子
- (2) 宿主因子

ウイルス因子として代表的なものには、vif や nef の欠損に起因する病原力が低下したウイルス感染が考えられる。しかし血液製剤作成には複数の献血ド

ナー由来のサンプルをプールすることから、ある特殊なウイルス感染が長期未発症の原因になることは考えにくい。そのため宿主因子の重要性がこれまで指摘されてきた。宿主因子のなかには2つの要素がある。

(2-a) 免疫学的因子

(2-b) 遺伝学的因子

免疫学的要因には、抗原認識や抗原提示に関する能力や獲得免疫としての細胞障害性 T 細胞活性、中和抗体の産生能力や自然免疫（非特異的免疫）である NK 活性などの関与が考えられる。遺伝学的因子を検索するための方法には、現在 DNA、RNA、蛋白質レベルでの解析があり、それぞれ SNP 法、microarray 解析、proteome 解析がこれに相当する。これまで最も精力的に行われてきたものは、SNP 解析と呼ばれる DNA レベルでの解析である。これまで知られている宿主因子には、リンパ球の型 (HLA)、血清中の SDF-1a 濃度や RANTES 濃度およびその遺伝子型、CCR5delta32 や CCR2 V64I の polymorphism などが知られているほか、複数の遺伝的背景について報告がなされている（詳細は表 1）。

宿主因子同定における問題点は、あるコホートによって同定された遺伝的背景が必ずしも別のコホートで追認されることがない点と、実験的に抗ウイルス因子であることを証明することが困難なことが多い。コホート間の相違点は多岐にわたるため一概にコホート間の結果の違いを与える原因の特定は難しい。しかし、異なる人種間における遺伝的差異が存在することが原因の一つであることは間違いない。例えば、アジア人に CCR5delta32 が少なく CCR5 V64I が多いのに対し、欧米人種がこの逆である。これは、日本人を対象にしてエイズ発症阻止因子の同定をすることの重要性を指摘するものである。また、コホートによる疫学的・統計学的解析には限界がありこともわかる。実験的にそのウイルス複製抵

抗メカニズムの検証を伴わなければ、コホートによる疫学的・統計学的解析の信憑性は低い可能性があることも意味する。一方、SNP 解析で得られた塩基配列多型はそれ自身が生物学的活性を持たないことも多く、このような場合、間接的に連鎖した遺伝子の活性が表現型と関連することになる。すると、SNP 解析結果から、直接培養細胞等を利用した抗 HIV-1 活性を検証することは非常に困難となる。これらの点をどのように対処して長期エイズ未発症群におけるエイズ発症阻止因子の同定をすればよいのだろうか？

近年ウイルス複製の分子メカニズムに対する理解が急速に深まりつつある。特に、ウイルス複製を制御する宿主因子が次々に発見され、そのメカニズムが詳細に解析され報告されている。しかし、これらの宿主因子がエイズ発症に関与するかについて未だ詳細な解析はされていない。我々が対象にした抗 HIV-1 抗体陽性血友病患者群における長期エイズ未発症群は数十症例である。本来急速に病期進行する患者群との比較が必須であるにもかかわらず、これらは既に入手不可能である。諸外国のコホートのスケールに患者数においては及ばないため、統計的な差異を追求する点においては感度が低いと予想される。しかし、対象が日本人であること、質においては20年もの間 CD4 数が保たれており未治療の状態を維持していること、病歴が詳細に把握できること、複数の症例があるという優位性がある。この優位性を生かすため次のような戦略を立てた。

B. 研究方法

戦略1 RNA レベルにおける特定遺伝子の質的診断

ウイルス複製に関連することが報告されているが、発症との関連が不明である宿主因子のうち、ヒト細胞における遺伝子産物発現等による抗ウイルス状態の誘導を実験的に証明できることが可能なものを解

析対象とし、長期未発症に分類される末梢血 CD4 リンパ球数 200 以下で未治療の患者群から末梢血リンパ球の RNA を抽出し、RT-PCR により各種ウイルス複製制御遺伝子を増幅し、これらの ORF の核酸配列を確認した。

戦略 2 RNA レベルにおける遺伝子発現の網羅的解析

マイクロアレイによる末梢血由来 RNA の発現解析を長期未発症患者群と非感染群にて行い、発症遅延に関与する可能性がある遺伝子について戦略 1 の範疇にはいるものを選定しこれを推進する。

戦略 3 遺伝子発現によるウイルス複製制御効果の検討

ヒト T 細胞株に候補遺伝子を恒常的に発現させた細胞を樹立し、この細胞における HIV-1 複製効率を探索し、1 と 2 で得られた候補遺伝子発現による抗ウイルス状態の誘導の有無を実験的に証明する。

戦略 1 および 2 を通じて、実験的に実証可能な病期進行に関連する遺伝子候補を限られた数だけを実験室レベルで抗 HIV-1 活性を証明する「実証主義」により、本コホートとしての弱点である患者数と対照群の問題を回避することに主眼をおいた。本年度はいくつか病期進行に関連する遺伝子候補を同定したのでここに報告する。

(倫理面への配慮) 当研究は国立感染症研究所ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会の承認を得ると同時に、荻窪病院倫理委員会の承認を得て行っている。

C. 結果

戦略 1 RNA レベルにおける特定遺伝子の質的診断

長期エイズ未発症患者群から末梢血リンパ球の RNA を抽出し、RT-PCR により各種ウイルス複製制御遺伝子を増幅し、これらの ORF の全長または一部の核酸配列を確認した。CCR5、CyclophilinA や TRIM5alpha のウイルス複製関連ドメインには異常を認めなかった。ところが遺伝子 A において興味深い変異を同定した。長期未発症患者群において、完全長と予想される転写産物から約 164nt 短い mRNA 転写産物が存在することが RT-PCR にて確認された。患者によって短い転写産物しか検出できないもの、完全長と予想される転写産物といろいろな比率で共存するものが存在した。当該遺伝子のスプライスバリエントはこれまで報告されていない。健康人 (7 例) と比較すると、短い転写産物の割合が多い割合は長期未発症群 (11 例中 7 例) に有意に多いことが判明した (図 1 : P=0.04、健康人は 7 例中 1 例)。また治療を開始された血友病患者群においても高い頻度で短い転写産物の割合が多い例が同定された (7 例中 5 例)。この結果は PCR による artifact ではないことは PCR 産物の再 PCR 等により検証されている。10 種類以上の培養細胞株由来の RNA においては、組織・人種由来に関らず長い転写産物が検出された (図 1)。

次にこの転写産物の核酸配列解析を行った。遺伝子 A は 9 つのエクソンから構成される。短い転写産物は、9 つのエクソンのうちエクソン 7 だけが欠失していることが判明した (図 2)。しかし、ゲノム遺伝子を増幅すると、ゲノムにはエクソン 7 が完全長で存在することが明らかとなった。以上の結果は、epigenetic な制御により完全長 mRNA とエクソン 7 を失った mRNA が存在することを示している。我々はエクソン 7 近傍のイントロン配列を PCR で増幅して核酸配列を決定することを試みている。少なくともイントロン 6 のエクソン 7 側末端約 150nt とイントロン 7 の全長には標準的なゲノム配列との相違を認めなかった。現在イントロン 6 の残りの部

分について核酸配列を決定する作業を行っている。

健康人由来のサンプルに唯一存在した短い転写産物を多く有するドナー（ドナーX）由来の PBMC とその他7名の PBMC を活性化させ、HIV-1 の複製をモニターしたところ、ドナーX の PBMC におけるウイルス複製効率は低い群に属するという結果を得た。これは、少なくともエクソン7の欠失がウイルス複製を促進させるものではないことを意味し、病期進行とエクソン欠損との関連を示唆するものである。

戦略2 RNA レベルにおける遺伝子発現の網羅的解析

長期未発症者と健康者由来の PBMC から RNA を抽出し、これを Affimetrix 社の microarray により全遺伝子の発現変動を網羅的に解析することを試みた。解析は健康者2名の平均値にたいして長期未発症者1名の遺伝子発現との比較による。54,675 種類の mRNA を標的とした解析を行い、十分シグナルを検出した信頼性の高い遺伝子から長期未発症者において健康者の 2.5 倍または 1/2.5 倍に発現が変動する 91 種類（それぞれ 47 種類と 44 種類）の遺伝子を同定した。その結果、表2に示す遺伝子群の有意な増減を認めた（表2）。これらの遺伝子群は既知の遺伝子機能をもとに分類された遺伝子群 Host-Pathogen interaction ($P < 2.99 \times 10^{-13}$) および Defense proteins ($P < 3.23 \times 10^{-8}$) に関する遺伝子群と有意な相関を有する。未発症者に高い発現が見られるものの中に、interferon に発現が誘導される蛋白質（interferon alpha-inducible protein ほか）が数多く存在した。これは長期未発症者の遺伝的背景に生来「高い抗ウイルス状態」を持つか、あるいは HIV-1 感染に対する反応性が非常に高く抗ウイルス状態を効率よく維持することが出来る可能性を示唆している。今後3例以上の長期未発症者を解析し、それらに共通する候補遺伝子あるいは病歴を反映する特徴的な

遺伝子発現を認めた場合、これを RT-PCR 等で数多くの症例にて解析を深め、戦略3に示した実験レベルにおける抗 HIV-1 作用の証明に値する候補遺伝子を絞り込むこととする。

D. 考察

日本人に固有の抗 HIV-1 因子の検索に、抗 HIV-1 抗体陽性血友病患者群の長期未発症患者は大きな貢献を果たすと期待される。しかし、コホートとしての脆弱さから、どのような群間を比較してもただけではウイルス抵抗因子かどうかを統計学的に解析することは著しく困難である。特に RNA を用いた遺伝子発現解析には新鮮な末梢血を必要とする。本来は長期未発症患者群と急速に病期進行する患者群との比較が必須だが、理想的な対照群は永眠されておられるので実現不可能である。次善の策として、HIV-1 非感染血友病患者群、健康者群と長期未発症患者の比較を行う。潜在的問題点は、例数が少ないと長期未発症と関連した因子ではなく、ウイルス感染に対する反応、サンプル採取時の生理状態などとの関連も強く反映されることである。しかし、今回の結果はこの懸念は必ずしも当たらないことを期待させるものとなった。

遺伝子 A 転写産物の epigenetic なエクソン欠失は世界初の事実であり、その生理的意義を問うことも重要である。このため、異なる組織由来の RNA を標的にして RT-PCR を行い、転写産物の組織特異性等を検索する必要がある。

はたして我々の発見した HIV-1 複製関連遺伝子 A のエクソン7欠失転写産物の存在はエイズ発症と関連するものなのか？文献的には、遺伝子 A のエクソン7は、ウイルス遺伝子産物と相互作用するドメインであることが知られている。この相互作用は効率のよいウイルス複製には必須である。過去の機能解析の結果と照らし合わせると、発症関連因子である可能性は低くないと思われる。核酸の配列を解

析すると、エクソン7欠失により、遺伝子 A はエクソン6-8結合部位でフレームシフトが起こり、エクソン8の途中まで異常アミノ酸が合成された上、翻訳が停止し、本来ならば 80kDa の蛋白質であるはずの遺伝子 A が約 20kDa となることが予想される。我々はエクソン7欠失を有する症例由来の PBMC を Immunoblot 解析することでこの蛋白質の存在を確かめようと考えている。もし 20kDa の蛋白質が発現していたら、この短い転写産物をクローニングしては乳類発現プラスミドに導入し、T 細胞株に恒常的に発現させ、20kDa の蛋白質発現により HIV-1 複製が抑制されるかを検証しようと考えている。

特定のエクソンが欠失することが原因の疾患には複数の遺伝性疾患 (cystic fibrosis など) が知られている。Splicing 異常によってエクソンを失う原因には、splice acceptor や splice donor およびその周辺配列の配列に mutation が導入される場合と、イントロン中にある polypyrimidine tract に結合する PTB や U2AF などの蛋白質 (エクソンを規定する役割を持つと考えられている) の発現量、量比、または性質が関係することが知られている。我々の対象とする症例では、Cyclophilin A などの splicing に問題がないことから、遺伝子 A 特異的な splicing regulation の異常が考えられる。今後解析されていない intron 核酸配列を決定すると同時に RNA expression profiling による splicing factor の発現変動を解析することが検討課題となろう。

網羅的解析においては、既知の遺伝子情報から予想されるウイルス複製制御能あるいは病期進行に影響する可能性を有する候補を絞り込む必要がある。そのためには複数の長期未発症患者由来の検体を検討する必要がある。本年度の解析からは、microarray technology が発症に関連する因子を洗い出すことが可能にする有用な方法であることが推察された。それは interferon-induced genes が相当数分離同定され

たことと、既に HIV-1 複製を負に制御することが知られている 2,5-oligoadenylate synthetase が検出されたことに集約されよう。引き続き HIV-1 非感染血友病患者群と長期未発症患者の比較を行う予定である。

E. 結論

本年度の解析により、ウイルス複製関連遺伝子 A において、ゲノム遺伝子は存在するがおそらくスプライシング制御などの epigenetic な効果により転写産物からエクソン7が欠失する現象を世界ではじめて明らかにした。この splice variant が完全長の点産物よりも多く存在する率は、健常者群に比較すると長期未発症患者群に有意に高い頻度で存在することから、長期未発症の原因遺伝子として非常に魅力的な候補であると思われる。また網羅的遺伝子発現解析により宿主-病原体相互作用因子群の遺伝子発現の変動が有意に高まることを見いだした。

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

(欧文発表)

1) Miyauchi K, Komano J, Yokomaku Y, Sugiura W, Yamamoto N, Matsuda Z. Role of the specific amino acid sequence of the membrane-spanning domain of human immunodeficiency virus type 1 in membrane fusion.

J Virol. 2005 Apr; 79(8): 4720-4729

2) Komano J, Futahashi Y, Urano E, Miyauchi K, Murakami T, Matsuda Z, Yamamoto N.

The Interaction of HIV-1 with the Host Factors.

Jpn J Infect Dis. 2005 Jun; 58(3): 125-30.