

200500991A

厚生労働科学研究研究費補助金

創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業

ゲノム情報を用いたエイズワクチン  
開発と発症阻止に関する基礎的研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 塩田 達雄

平成18(2006)年3月

# 目 次

I. 総括研究報告	
ゲノム情報を用いたエイズワクチン開発と発症阻止に関する基礎的研究	1
大阪大学微生物病研究所・教授・塩田達雄	
II. 分担研究報告	
1. ゲノム情報を用いたエイズ発症阻止に関する研究	12
大阪大学微生物病研究所・教授・塩田達雄	
2. エイズワクチン開発とエイズ発症阻止に関する基礎的研究	18
東京大学医科学研究所・教授・岩本愛吉	
3. 母子感染に関わるHIVおよび宿主側因子に関する研究	23
金沢大学大学院医学系研究科・教授・市村宏	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	29
IV. 研究成果の刊行物・別刷	34

ゲノム情報を用いたエイズワクチン開発と発症阻止に関する基礎的研究

主任研究者 塩田 達雄（大阪大学微生物病研究所教授）

研究要旨

HIV-1感染症に関わる宿主因子について検討し、以下の知見を得た。(1) 104名のHIV-1感染者のゲノムワイドスキャンによりHIV-1感染症の病態進行の個人差と相関する候補遺伝子多型と考えられた92箇所の一塩基多型を、独立の120名のHIV-1感染者集団で再検討して4箇所の多型にまで絞り込んだ。(2) HIVプロテアーゼ阻害剤ネルフィナビルを含む3剤複合療法によるCD4陽性細胞数の回復速度の個人差と強く相関する1箇所の遺伝子多型が、近傍の遺伝子のプロモーター部分の多型と強い連鎖不平衡にあることを見出した。(3) HIV感染症においてCTLによる細胞性免疫が重要な防御機構として働いており、治療ワクチン開発においてもCTLを賦活化することが重要と考えられている。本研究では本邦で流行しているHIVに関して日本人に高頻度に見られるHLA-A24に提示されるイムノドミナントなCTLEピトープに注目しHIVの遺伝子解析を行った。(4) HIV感染細胞におけるCTLへの抗原提示量を定量することを目的とし、「HIV CTLEピトープを提示するHLA-A24分子」に特異的な抗体の作製を試みた。(5) 遺伝子改変が容易な酵母のHIV様粒子産生系を用いて、HIV粒子産生に関わる宿主因子の探索を行っている。本年度は、エンドゾームからトランスゴルジネットワークへの輸送経路であるレトロマーコンプレックスを構成するサブユニットのノックアウト株ではウイルス様粒子の萌芽・放出量が増加するという予想外の結果を得た。(6) ケニアにおけるHIV 母子感染と感染児の病態進行速度並びに日本の血友病患者の病態進行速度に影響を及ぼす種々の宿主因子の検討を行っている。本年度は後者について、RANTES遺伝子のプロモーター内の多型RANTES-28GはAIDS発症遅延に、DC-SIGN遺伝子のプロモーター内の多型DC-SIGN -139CはAIDS発症促進に関連することを見出した。

分担研究者

岩本愛吉・東京大学医科学研究所・教授

市村 宏・金沢大学大学院医学研究科・教授

A. 研究目的

エイズの病態ならびに進行速度は感染者ごとに大きく異なり、感染後急激にCD4陽性細胞数の減少をみる感染者から10年以上発症しない感染者まで様々である。また、HIV-1感染感受性自体にも個人差が存在する。本研究は、多数のHIV-1感染者および非感染者について、HIV-1の生活環に関わる様々な宿

主因子の遺伝的多型を検討し、病態進行やHIV-1感染感受性の違いを決定する宿主側の因子を明らかにすることを目的とする。また抗HIV薬の有効性や副作用を決定する宿主因子の同定やワクチン開発のための基礎的検討も重要な課題である。本年度は以下の6点を具体的な研究目的とした。

(1) 昨年度、病態進行の緩慢な51名と病態進行の速やかな53名のHIV-1感染者の遺伝子多型について、Affymetrix社製Gene Chip Human Mapping 10K Arrayを利用したゲノムワイドスキャンを行って約一万箇所の一塩

基多型を網羅的に検討し、両群間での多型の頻度の差をカイ二乗検定で検定したところ、危険率 0.01 未満の差が認められる多型を 92 箇所認めた。本年度は、これら 92 箇所の多型が、上記 104 名の HIV-1 感染者とは重複しない他の HIV-1 感染者集団でも病態進行に関して同様の傾向が認められるか否か、を明らかにすることを目的とした。

(2) 昨年度、HIV プロテアーゼ阻害剤ネルフィナビルを含む 3 剤複合療法を開始し、血清中の HIV-1 量を検出限界以下に抑制できた HIV-1 感染者 52 名について同様にゲノムワイドスキャンを行い、CD4 陽性細胞数の回復速度と強く相関する一箇所の候補遺伝子多型を見出した。本年度は、この遺伝子多型が CD4 陽性細胞の回復速度と相関する機構を明らかにすることを目的とした。

(3) HIV 感染症において細胞傷害性 T 細胞 (CTL) による細胞性免疫応答はウイルスのコントロールに重要であることが知られている一方で、CTL からのエスケープ変異ウイルスが出現することも明らかとなってきた。ワクチン開発においてその解析は重要であるため、外国でも多くの研究がなされている。しかしながら CTL による抗原認識は宿主の HLA によって異なるため、本邦にて流行している HIV とそれに対する CTL 応答を解析することが重要である。私たちは日本人集団に高頻度に見られる HLA-A24 によって提示される CTL エピトープについて、日本で流行している HIV の性状を検討しており、昨年までに Nef 由来のエピトープ Nef138-10 (RYPLTFGWCF) において CTL からのエ

スケープ変異であると考えられるステレオタイプなアミノ酸変化を見出した。私たちはこのエピトープに注目しさらに症例数を増やし HIV の遺伝子解析を行うとともに、CTL による認識について詳細な解析を行うことを目的とした。

(4) CTL 応答は T 細胞レセプター (TCR) が標的細胞表面の HLA クラス I 分子によって提示される抗原 (エピトープ) を認識することで惹起される。そのため細胞表面に存在する抗原量、すなわち特定のエピトープを提示する HLA クラス I 分子の数は CTL による免疫応答を考える上で非常に重要である。しかしながらその測定は非常に困難であり、これまでに全く明らかにされていない。そこで本研究では上記 Nef138-10 を提示する HLA-A24 分子 (A24/Nef138-10) に特異的な抗体を作製することを試みた。特異的な抗体を樹立できれば HIV 感染細胞を染色することによって A24/Nef138-10 量を可視化することができ、私たちが見出したアミノ酸変化を持つエピトープの抗原提示量を測定できる可能性がある。本研究ではヒト B 細胞由来の単鎖抗体 (scFv) フェージディスプレイライブラリーを用いて A24/Nef138-10 複合体特異的 scFv の樹立を試みた。

(5) 遺伝子改変が容易な酵母の HIV 様粒子産生系を用いて HIV 粒子産生に関わる宿主因子の探索を行っている。本年度は、昨年度樹立した酵母の遺伝子欠損ライブラリーの中から HIV 様粒子産生能を失った株の選別を簡便に行う実験系を用いて、既知の HIV 粒子産生に関わる宿主因子をノックアウトした場

合に、確かにこの系においてその影響が検出できるか否かを明らかにすることを目的とした。

(6) HIV 感染症では、HIV 感受性及び感染後の病態進行速度に個人差があることが知られている。近年、これらの原因となる宿主免疫因子遺伝子多型 (SNP) の存在が明らかになりつつある。しかしながら、未だ評価の定まらないものも多い。これまでに著者らのグループは、*CCR5* プロモーター領域の SNP が日本の HIV-1 感染血友病患者の病態進行に影響を与えることを報告した。今回、さらに *SDF-1 3A'*、*RANTES*・*IL-4*・*DC-SIGN* プロモーター領域内の SNPs に着目し、HIV-1 感染後 AIDS 発症までの期間との関係を明らかにすることを目的とした。

## B. 研究方法

(1) 性的接触で HIV-1 に感染し、1999 年時点で血中の CD4 陽性 T 細胞数が 50 個/μl 未満の 80 名および 200 個/μl 以上の 40 名の HIV-1 感染者について、リアルタイム PCR を利用した一塩基多型遺伝子型決定法を用いて、昨年度、104 名の HIV-1 感染者の解析から病態進行の個人差と関連していた 92 箇所の多型のうち 38 箇所の多型を決定し、両群間での多型頻度を比較した。

(2) 昨年度、ネルフィナビルを含む 3 剤複合療法を開始し、血清中の HIV-1 量を検出限界以下に抑制できた HIV-1 感染者 52 名において、CD4 陽性細胞数の回復速度の個人差と強く関連することが明らかになった一箇所の遺伝子多型について、この多型の近傍約 8000

塩基の領域を PCR で増幅して塩基配列を決定して、この多型と連鎖不平衡にある多型の検索を行った。

(3) HLA-A24 陽性 HIV-1 感染者の血漿から HIV ゲノム RNA を含むトータル RNA を抽出し Nef138-10 を含む領域を RT-PCR 法により増幅し、シーケンシングにて塩基配列を解析しアミノ酸配列を決定した。複数の塩基配列が混在しているため一義的に決定できなかったサンプルに関してはクローニングを行い 10 クローン前後について同様にアミノ酸配列を決定した。一部の感染者においては経時的な解析も行った。

(4) Nef138-10 を提示する HLA-A24 分子 (A24/Nef138-10) を特異的に認識する抗体の作製には単鎖抗体 (scFv) ファージディスプレイ法を用いた。得られた scFv ファージは ELISA にて特異性を検討した。捕捉分子として A24/Nef138-10 複合体、あるいは陰性対照として異なる CTL エピトープを提示した A24/Env584-11 複合体を、検出抗体として M13 ファージ表面タンパク質に対する抗体を用いた。次に特異性が確認された scFv ファージにおいて G3P タンパク質の代わりに myc タグを付加し scFv を分泌型にした。得られた分泌型 scFv は検出抗体を抗 myc 抗体に変更し上記と同様の ELISA を行った。A24/Nef138-10 に特異性が見られた scFv クローンの多様性は *BstOI* による消化パターンによって判断した。そして得られた scFv を用いて Nef138-10 をパルスした HLA-A24 陽性 B 細胞株 (A24+/LCL) の細胞表面染色を行った。検出にはビオチン標識抗 myc 抗体、

ストレプトアビジン-PE を用いた。陰性コントロールとして Env584-11 をパルスした A24+/LCL を用いた。

(5) 昨年度作成した HIV-1 の gag 遺伝子のオープンリーディングフレームにホタルのルシフェラーゼ遺伝子のオープンリーディングフレームをフレームが合うように結合した出芽酵母用蛋白発現ベクターを用いて、HIV 粒子産生に関わる既知の因子やその関連遺伝子をノックアウトした出芽酵母株を形質転換した。得られた形質転換株の細胞壁を取り除いてスフェロプラスト化し、等張の培養液中に HIV-1 様粒子が産生されるか否かを、その培養上清中のルシフェラーゼ活性測定を測定することにより検討した。

(6) 1987 年～1996 年の期間に「HIV-1 感染者の発症予防と治療研究班」を通じて採取され、凍結保存されていた日本の血友病患者 104 名の末梢血単核球(PBMC)を使用した。これらの血友病患者は、1982-1985 年に HIV-1 に感染したと考えられている。CDC の診断基準(1987 年)に従い、全ての患者を 2 つの群：感染後 10 年以上無治療で AIDS を発症していない群(AIDS 遅発症群、n=55)と感染後 10 年以内に AIDS を発症した群(AIDS 発症群、n=49)、に分類した。そして *SDF1* 遺伝子の 3'UTR (-801) [*SDF-1* 3A']、*RANTES* のプロモーター領域 (-28, -403)、*RANTES* のイントロン領域 (In1.1C)、*IL-4* のプロモーター領域 (-589)、*DC-SIGN* のプロモーター領域 (-139, -336) について PCR 増幅産物のダイレクトシーケンス法にて検討を行った。なお、この 104 名の HIV-

1 感染者は(1)の研究の 104 名とは別の集団である。

(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特定できないようにして扱った。また各研究は、大阪大学研究倫理審査委員会、東京大学医科学研究所倫理審査委員会ならびに金沢大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会の承認を得てある。

### C. 研究結果

(1) 昨年度、病態進行の緩慢な 51 名と病態進行の速やかな 53 名の HIV-1 感染者の遺伝子多型について、Affymetrix 社製 Gene Chip Human Mapping 10K Array を利用したゲノムワイドスキャンを行って約一万箇所の一塩基多型を網羅的に検討し、両群間での多型の頻度の差をカイ二乗検定で検定したところ、危険率 0.01 未満を示す多型を 92 箇所認めた。長期未発症症例が比較的稀であることから、病態進行の緩慢な群における多型の頻度が病態進行の速い群における頻度よりもアジア人の平均的頻度からかけ離れている多型が真に病態進行に関わると考えられる。今年度は、そのような 38 箇所の多型について上記 104 名の感染者とは全く重複しない 120 名の HIV-1 感染者について改めて検討したところ、そのうち 4 箇所がこの 120 名においても病態進行の個人差と関連していた。

(2) 昨年度、HIVプロテアーゼ阻害剤ネルフィナビルを含む3剤複合療法を開始し、血清中のHIV-1量を検出限界以下に抑制できたHIV-1感染者52名についてゲノムワイドスクランを行った。治療開始後一年以内にCD4陽性細胞が100個/μl以上回復した感染者25名と、治療開始後一年たってもCD4細胞が100個/μl回復できなかった感染者27名間で多型の頻度の差をカイ二乗検定で検定した場合、危険率0.000002を示す多型が一箇所認められた。これは1万回の多重検定補正(Bonferroniの補正)を行った後でもP=0.02の危険率で有意差が認められたことになる。この多型の近傍8000塩基の近傍には、個体内での細胞増殖に関わる癌抑制遺伝子である可能性が示唆されている遺伝子が存在する。そこで、この多型からその遺伝子までの8000塩基の領域の多型の有無と連鎖状況を検討したところ、その遺伝子のプロモーター部分に5箇所にわたってこの一塩基多型と強い連鎖不平衡を示す多型が見出された。

(3) HLA-A24 陽性 HIV 感染者において Nef138-10 が野生型である例は 1 例も見られず、49 名中 42 名(86%)で 2 番目のタイロシン (Y) がフェニルアラニン (F) に変化した Y2F の変異を有していた。Y2F 以外には 5 番目のアミノ酸がスレオニン (T) からシステイン (C) へ変化している T5C の変異、6 番目のフェニルアラニン (F) がロイシン (L) に変化した F6L の変異が見られた。T5C、F6L を持つ感染者の他の HLA 型を調べたところ、T5C 変異を持つ感染者では共通性が見られなかったが、F6L を持つ感染者は全て

HLA-B52 陽性であった。そこで F6L 変異に注目し、F6L 変異が個体内で安定であるかどうか調べるために F6L 変異を有する感染者の経時的に解析を行った。その結果、4 名では年余に渡って F6L 変異が維持されていた。それに対して 1 名では感染後 1 年以内の時点では F6L であったのに対して、その 1 年後には F6L を持つウイルスは完全に消失し、Y2F 変異ウイルスに取って代わられていた。

(4) scFv ファージディスプレイライブラリを用いて A24/Nef138-10 複合体特異的 scFv を発現するファージをパニング法によって増幅培養した。その結果 3 回のパニングによって A24/Nef138-10 複合体と結合する scFv を約 4200 倍に濃縮でき、そのうち 80 クローンについて ELISA にて A24/Nef138-10 複合体との結合能を調べたところ、64 クローン (80%) が A24/Nef138-10 に結合した。さらに 80 クローン全てを A24/Nef138-10 複合体と、異なるエピトープを提示する HLA-A24 分子、A24/Env584-11 複合体に対する結合能を調べるため ELISA を行った。その結果 16 クローン (20%) が A24/Nef138-10 複合体には結合するが A24/Env584-11 複合体には結合しない「A24/Nef138 特異的な」scFv であった。これらは制限酵素 BstO1 切断パターンによる遺伝子解析の結果 8 種類の独立したクローンであることがわかった。そのうち 4 種類に関して分泌型 scFv を作製し ELISA を行った。その結果 4 種類とも HLA-A24/Nef138 複合体への特異性は維持されていたが、そのうち 2 種類では結合能が低下していた。最終的に

A24/Nef138-10 複合体特異的 scFv として 2 種類のクローン clone3 と clone27 が得られた。

そこで、実際に clone3、clone27 を用いて A24/Nef138-10 複合体を提示する細胞を染色した。その結果、どちらの clone も Env584-11 をパルスした A24+/LCL は染まらなかったが、Nef138-10 をパルスした A24+/LCL は PE で染まっていた。細胞表面に提示された A24/Nef138-10 複合体と結合する scFv を得られた。

(5) これまでに報告されている HIV-1 の出芽に関与する蛋白やトランスポゾン Ty3 のトランスポジションに関与する蛋白などのノックアウト株では野生株と比べてウイルス様粒子の出芽・放出量が少なく、これまでの報告と一致していた。しかしながら、エンドゾームからトランスゴルジネットワークへの輸送経路であるレトロマーコンプレックスを構成するサブユニットのノックアウト株ではウイルス様粒子の出芽・放出量が増加するという予想外の結果を得た。

(6) *RANTES*-28 の genotype 解析では、C/G と G/G が AIDS 発症群に比べ遅発症群で高頻度に見られる傾向が認められた ( $P=0.11$ )。また、*DC-SIGN*-139 T/C と C/C は AIDS 発症群でより高頻度に見られる傾向が認められた ( $P=0.068$ )。*RANTES*-403, *RANTES* In1.1, *SDF-1* 3'A, *IL-4*-589 では、genotype 分布に 2 群間で有意差ならびに傾向は認められなかった。

*RANTES*-28G の allelic frequency は AIDS 発症群(0.08)に比較し遅発症群(0.189)

で有意に高かった( $P=0.037$ , OR=0.37, 95%CI [0.149, 9.926]。また、*DC-SIGN*-139C の allelic frequency は遅発症群(0.337)に比較し AIDS 発症群 (0.200)で有意に高かった ( $P=0.028$ , OR=2.03, 95%CI [1.084, 3.804]。

しかしながら、*RANTES*-403A, *RNATES* In1.1C, *SDF-1* 3'A, *IL-4*-589T, *DC-SIGN*-336C の allelic frequency は両群間に有意差は認められなかった。

#### D. 考察

(1) 昨年度、病態進行の速やかな HIV-1 感染者 53 名と緩慢な 51 名とについて、約 1 万箇所の一塩基多型を網羅的に検討し、二群間での多型の頻度の差をカイ二乗検定で検定した結果、危険率 0.01 未満で頻度の差を示す多型が 92 箇所認められた。そのうち 38 箇所についてこれら 104 名の感染者とは重複しない 120 名の感染者について検討したところそのうち 4 箇所がこの 120 名においても病態進行の個人差と強く相関していた。現在、この 4 箇所の多型についてより大規模な HIV-1 感染者集団を用いて病態進行の個人差と関連するか否かの検討を行っている。しかし病態進行との関連が明らかになった 4 箇所の多型については、いずれも相関の程度がやや弱いものであり、スキャンする多型の数を 50 倍程度増やしてより強く相関する多型の検索を行う必要があり、その作業を開始した。

(2) 抗 HIV 薬の有効性の個人差を決定する宿主因子の検索も本研究の重要な課題である。しかし抗 HIV-1 薬の有効性には、HIV-1 側の耐性変異の有無が大きく関わるため解析は容



易ではない。そこで、HIVプロテアーゼ阻害剤ネルフィナビルを含む3剤複合療法を開始し、血清中のHIV-1量を検出限界以下に抑制できたHIV-1感染者を対象を絞り、CD4陽性細胞の回復速度の違いに関わる宿主因子の探索を行ってきた。その結果、CD4陽性細胞の回復の速い群と緩慢な群とで危険率0.000002で違いを示す遺伝子多型が1箇所認められた。これは1万回の多重検定補正を行った後でもP=0.02の危険率で有意差が認められたことになる。この多型の近傍には個体内での細胞増殖に関わる癌抑制遺伝子である可能性が示唆されている遺伝子が存在するが、その遺伝子の多型との連鎖不平衡を解析したところ、プロモーター部に強い連鎖不平衡を示す5箇所の多型が見出された。現在、この5箇所の多型がこの遺伝子のプロモーター活性に影響するか否かを検討している。また、HIV-1感染者の少ない日本においてこのような研究を遂行することには限界があるため、generic医薬品の抗HIV-1薬GPOvirが最近急速に普及したタイ国において同様の研究を開始した。

(3) 私たちは HLA-A24 によって提示されるエピトープの中で、イムノドミナントな Nef138-10 に注目し HIV 感染者における HIV の遺伝子解析を行った。HLA-A24 陽性感染者においてはそのほとんどが Y2F 変異を有することを昨年度報告したが、本年度新たに症例数を増やし解析を行った結果 5 名の感染者で F6L の変異が見られ、全て HLA-B52 陽性感染者においてであった。日本人での B52 の遺伝子頻度が 10%程度であること

を考えると F6L を持つ HIV の出現は HLA-B52 によって提示される CTL エピトープの存在を示唆している。あるいは日本人において HLA-A\*2402-B\*5201-Cw\*1202 は最も高頻度に存在するハプロタイプであり、HLA-B52 を有する個体はほぼ Cw\*1202 であると考えられるので、Cw\*1202 により提示されるエピトープである可能性も考えられる。HIV の Nef タンパク質は抗原性が高いことが知られており、複数の HLA クラス I 分子によって提示される領域が存在し得る。現在 HLA-B52 陽性者の末梢血単核球を用いて Nef138-10 周辺領域に対する CTL 応答を解析中である。

(4) 効果的なワクチンの開発には高い免疫誘導能を持つ抗原を使用することが重要だが、生体内で抗原に対して誘導される免疫応答の程度が何によって規定されているかは明らかにされていない。TCR が「抗原」として認識するのは実際には「エピトープを提示する HLA クラス I 分子」であって、その絶対的な量が免疫応答を規定する重要な因子であることは間違いない。特定のエピトープを提示する HLA 分子の数は、そのエピトープを含むタンパク質の量、プロセッシングの際にエピトープが正確に切り出される効率、HLA 分子との結合能など多くの要因によって決定されると考えられる。しかしながら現時点ではその測定法が存在しないため、詳細は全く明らかになっていない。私たちは「個々のエピトープを提示する HLA 分子に対する抗体」を樹立できれば目的のエピトープを提示する HLA 分子を検出することが可能となると考

え、A24/Nef138-10 複合体に対する単鎖抗体 (scFv) の作製を試みた。ファージディスプレイ法は目的の scFv をファージ表面に提示させパニング法によって増幅培養できるという点で優れており、それを繰り返すことによって目的の抗原と結合する scFv を濃縮することができる。私たちが得た A24/Nef138-10 複合体と結合する 64 クローンのうち A24/Nef138-10 複合体特異的な scFv は 16 クローンであったが、残りの 48 クローンは HLA-A24 あるいは  $\beta$  2 ミクログロブリン分子に結合する scFv であると考えられる。分泌型にした scFv のうち 2 クローンが A24/Nef138-10 複合体との結合能が低下していたが、分泌型にしたことによる構造的な変化が影響を及ぼしていると考えられる。

A24/Nef138-10 複合体との結合力が維持されていた clone3、7 を用いて実際に A24/Nef138-10 複合体を提示する細胞を特異的に染めることができた。このことから得られた抗体はフローサイトメーターでの解析に耐え得る結合能を有していることが明らかになった。今後 Nef 発現細胞、あるいは HIV 感染細胞において A24/Nef138-10 複合体の発現量を検討したい。

(5) レトロマーは、出芽酵母では加水分解酵素を液胞へ運ぶための受容体をトランスゴルジネットワークへ戻すために使われている。一方高等真核細胞ではカチオン非依存性マンノース 6 リン酸受容体の輸送や EGF 受容体の分解に関与している。今後は酵母の遺伝子欠損ライブラリーのスクリーニングを行うとともに、上記のような細胞内で起こっている

事象とウイルス様粒子の出芽・放出との関係を出芽酵母に加えて高等真核細胞を用いて調べていく予定である。

(6) 今回の結果から、日本の HIV-1 感染血友病患者において、RANTES -28G は AIDS 発症遅延に、そして DC-SIGN -139C は AIDS 発症促進に関連することが示唆された。

## E. 結論

(1) 昨年度、ゲノムワイドスキャンから危険率 0.01 未満で病態進行の個人差と相関することが見出された 92 箇所の一塩基多型を、独立の HIV-1 感染者集団で再検討して 4 箇所の多型にまで絞り込んだ。

(2) HIV プロテアーゼ阻害剤ネルフィナビルを含む 3 剤複合療法による CD4 陽性細胞数の回復速度と相関する 1 箇所の遺伝子多型が、近傍の遺伝子のプロモーター部分の多型と強い連鎖不平衡にあることを見出した。

(3) 日本人の 70% が有する HLA-A24 によって提示される Nef138-10 においてステレオタイプなアミノ酸変化が見られ、さらに同じ部位が他の HLA 分子によっても提示された結果と思われるアミノ酸変異の存在が明らかになった。

(4) 単鎖抗体ファージディスプレイライブラリを用いて「Nef138-10 を提示する HLA-A24 分子」に特異的な scFv が得られた。この scFv を用いて感染細胞における抗原提示量を定量できる可能性がある。

(5) エンドゾームからトランスゴルジネットワークへの輸送経路であるレトロマーコンプレックスを構成するサブユニットのノックア

ウト株ではウイルス様粒子の出芽・放出量が増加するという予想外の結果を得た。

(6)日本の HIV-1 感染血友病患者において、*RANTES* -28G は AIDS 発症遅延に、そして *DC-SIGN* -139C は AIDS 発症促進に関連することが示唆された。

#### F. 健康危険情報

該当なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Nakayama, E. E., 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.

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.

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.

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.

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

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.

Shinoe, T., Wanaka, A., Nikaido, T., Kakuta, Y., Masunaga, A., Shimizu, J., Duyckaerts, C., Imaizumi, K., Iwamoto, A., and Kanawzawa, I. The pro-apoptotic human BH3-only peptide harakiri is expressed in cryptococcus-infected perivascular macrophages in HIV-1 encephalitis patients. *Neuroscience Letters* 393:102-107, 2006.

Ide, F., Nakamura, T., Tomizawa, M., Kawana-Tachikawa, A., Odawara, T., Hosoya, N., Iwamoto, A. Peptide-loaded dendritic-cell vaccination followed by treatment interruption for chronic HIV-1 infection: A phase 1 trial. *J. Med. Virol.* in press, 2006.

Khamadi SA, Ichimura H., et al.: HIV-1 subtypes in circulation in Northern Kenya.

*AIDS Res. Hum. Retroviruses* 21(9):810-4, 2005.

Agdamag DM, Ichimura H., et al.: Rapidly spreading HCV infections from limited sources simulating an AIDS outbreak in the Philippines. *J Med Virol* 77:221-226, 2005.

Kurbanov F, Ichimura H., et al.: A New Subtype (Subgenotype) Ac (A3) of Hepatitis B Virus and Recombination between Genotypes A and E in Cameroon. *J Gen Virol* 86:2047-2056, 2005.

Takemura T, Ichimura H., et al.: A novel SIV from black mangabey (*Lophocebus aterrimus*) in Democratic Republic of Congo. *J Gen Virol* 86:1967-1971, 2005.

## 2. 学会発表

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 TRIM5alpha 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.

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 5 3 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 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。

櫻木淳一、塩田達雄。HIV-1 サブタイプ間ヘ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。

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。

立川（川名）愛、渡辺紗也香、富澤麻利子、小川照美、細谷紀彰、小田原隆、中村哲也、岩本愛吉。HIV-1 感染における CTL エスケープ変異体の出現に関する解析。第 53 回日本ウイルス学会学術集会・総会（横浜）

フィリピンにおいて急速に伝播している HCV の解析（2002 年－2005 年）。景山誠二、

市村宏。第 5 3 回日本ウイルス学会学術集会、2005. 11, 横浜。

血友病患者の HIV/AIDS 病態進行に関する宿主因子の影響。小泉祐介、景山誠二、宮下宙子、Lwembe R、塩田達雄、藤山佳秀、市村宏。第 5 3 回日本ウイルス学会学術集会、2005. 11, 横浜。

HIV-1 subtypes in the northern border region of Kenya. Lwembe R、市村宏、他。第 1 8 回日本エイズ学会学術集会・総会、2004, 12, 静岡。

カメルーン北西部における HIV-1 サブタイプ分布と未治療群内の薬剤耐性株頻度の解析。小泉祐介、宮下宙子、Lwembe RW、Nicaise N、景山誠二、藤山佳秀、市村宏。第 1 9 回日本エイズ学会学術集会・総会、2005, 12, 熊本。

REVERSE TRANSCRIPTASE RESISTANCE MUTATIONS IN HIV-1 NON-B STRAINS INFECTING TREATED CHILDREN IN KENYA . R. Lwembe, E.M.Songok, M.Miyashita, Y.Koizumi, S.Kageyama, H.Ichimura。第 1 9 回日本エイズ学会学術集会・総会、2005, 12, 熊本。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし

ゲノム情報を用いたエイズ発症阻止に関する研究

主任研究者 塩田 達雄（大阪大学微生物病研究所教授）

研究要旨

HIV-1感染症に関わる宿主因子について検討し、以下の知見を得た。

(1) 104名のHIV-1感染者のゲノムワイドスキャンによりHIV-1感染症の病態進行の個人差と相関する候補遺伝子多型と考えられた92箇所の一塩基多型を、独立の120名のHIV-1感染者集団で再検討して4箇所の多型にまで絞り込んだ。

(2) HIVプロテアーゼ阻害剤ネルフィナビルを含む3剤複合療法によるCD4陽性細胞数の回復速度の個人差と強く相関する1箇所の遺伝子多型が、近傍の遺伝子のプロモーター部分の多型と強い連鎖不平衡にあることを見出した。

(3) 遺伝子改変が容易な酵母のHIV様粒子産生系を用いて、HIV粒子産生に関わる宿主因子の探索を行っている。本年度は、エンドゾームからトランスゴルジネットワークへの輸送経路であるレトロマーコンプレックスを構成するサブユニットのノックアウト株ではウイルス様粒子の出芽・放出量が増加するという予想外の結果を得た。

A. 研究目的

エイズの病態ならびに進行速度は感染者ごとに大きく異なり、感染後急激にCD4陽性細胞数の減少をみる感染者から10年以上発症しない感染者まで様々である。また、HIV-1感染感受性自体にも個人差が存在する。本研究は、多数のHIV-1感染者および非感染者について、HIV-1の生活環に関わる様々な宿主因子の遺伝的多型を検討し、病態進行やHIV-1感染感受性の違いを決定する宿主側の因子を明らかにすることを目的とする。また抗HIV薬の有効性や副作用の個人差を決定する宿主因子の同定も重要な課題である。本年度は以下の3点を具体的な研究目的とした。

(1) 昨年度、病態進行の緩慢な51名と病態進行の速やかな53名のHIV-1感染者の遺伝子

多型について、Affymetrix社製Gene Chip Human Mapping 10K Arrayを利用したゲノムワイドスキャンを行って約一万箇所の一塩基多型を網羅的に検討し、両群間での多型の頻度の差をカイ二乗検定で検定したところ、危険率0.01未満の差が認められる多型を92箇所認めた。本年度は、これら92箇所の多型が、上記104名のHIV-1感染者とは重複しない他のHIV-1感染者集団でも病態進行に関して同様の傾向が認められるか否か、を明らかにすることを目的とした。

(2) 昨年度、HIVプロテアーゼ阻害剤ネルフィナビルを含む3剤複合療法を開始し、血清中のHIV-1量を検出限界以下に抑制できたHIV-1感染者52名について同様にゲノムワイドスキャンを行い、CD4陽性細胞数の回復

速度と強く相関する一箇所の候補遺伝子多型を見出した。本年度は、この遺伝子多型がCD4陽性細胞の回復速度と相関する機構を明らかにすることを目的とした。

(3) 遺伝子改変が容易な酵母の HIV 様粒子産生系を用いて HIV 粒子産生に関わる宿主因子の探索を行っている。本年度は、昨年度樹立した酵母の遺伝子欠損ライブラリーの中から HIV 様粒子産生能を失った株の選別を簡便に行う実験系を用いて、既知の HIV 粒子産生に関わる宿主因子をノックアウトした場合、確かにこの系においてその影響が検出できるか否かを明らかにすることを目的とした。

## B. 研究方法

(1) 性的接触でHIV-1に感染し、1999年時点で血中のCD4陽性T細胞数が50個/μl未満の80名および200個/μl以上の40名のHIV-1感染者について、リアルタイムPCRを利用した一塩基多型遺伝子型決定法を用いて、昨年度、104名のHIV-1感染者の解析から病態進行の個人差と相関していた92箇所の多型のうち38箇所の多型を決定し、両群間での多型頻度を比較した。

(2) 昨年度、ネルフィナビルを含む3剤複合療法を開始し、血清中のHIV-1量を検出限界以下に抑制できたHIV-1感染者52名において、CD4陽性細胞数の回復速度の個人差と強く相関することが明らかになった一箇所の遺伝子多型について、この多型の近傍約8000塩基の領域をPCRで増幅して塩基配列を決定して、この多型と連鎖不平衡にある多型の検索を行った。

(3) 昨年度作成したHIV-1のgag遺伝子のオープンリーディングフレームにホタルのルシフェラーゼ遺伝子のオープンリーディングフレームをフレームが合うように結合した出芽酵母用蛋白発現ベクターを用いて、HIV粒子産生に関わる既知の因子やその関連遺伝子をノックアウトした出芽酵母株を形質転換した。得られた形質転換株の細胞壁を取り除いてスフェロプラスト化し、等張の培養液中にHIV-1様粒子が産生されるか否かを、その培養上清中のルシフェラーゼ活性測定を測定することにより検討した。

(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特定できないようにして扱った。日本人HIV-1感染者の遺伝子解析は平成13年に大阪大学研究倫理審査委員会の承認を得た。

## C. 研究結果

(1) 昨年度、病態進行の緩慢な51名と病態進行の速やかな53名のHIV-1感染者の遺伝子多型について、Affymetrix社製Gene Chip Human Mapping 10K Arrayを利用したゲノムワイドスキャンを行って約一万箇所の一塩基多型を網羅的に検討し、両群間での多型の頻度の差をカイ二乗検定で検定したところ、危険率0.01未満を示す多型を92箇所認めた。長期末発症症例が比較的稀であることから、病態進行の緩慢な群における多型の頻度が病

病態進行の速い群における頻度よりもアジア人の平均的頻度からかけ離れている多型が真に病態進行に関わると考えられる。今年度は、そのような38箇所の多型について上記104名の感染者とは全く重複しない120名のHIV-1感染者について改めて検討したところ、そのうち4箇所がこの120名においても病態進行の個人差と関連していた。

(2) 昨年度、HIVプロテアーゼ阻害剤ネルフィナビルを含む3剤複合療法を開始し、血清中のHIV-1量を検出限界以下に抑制できたHIV-1感染者52名についてゲノムワイドスクランを行った。治療開始後一年以内にCD4陽性細胞が100個/ $\mu$ l以上回復した感染者25名と、治療開始後一年たってもCD4細胞が100個/ $\mu$ l回復できなかった感染者27名間で多型の頻度の差をカイ二乗検定で検定した場合、危険率0.000002を示す多型が一箇所認められた。これは1万回の多重検定補正(Bonferroniの補正)を行った後でも $P=0.02$ の危険率で有意差が認められたことになる。この多型の近傍8000塩基の近傍には、個体内での細胞増殖に関わる癌抑制遺伝子である可能性が示唆されている遺伝子が存在する。そこで、この多型からその遺伝子までの8000塩基の領域の多型の有無と連鎖状況を検討したところ、その遺伝子のプロモーター部分に5箇所にわたってこの一塩基多型と強い連鎖不平衡を示す多型が見出された。

(3) これまでに報告されているHIV-1の出芽に関与する蛋白やトランスポゾンTy3のトランスポジションに関与する蛋白などのノックアウト株では野生株と比べてウイルス様粒子の

出芽・放出量が少なく、これまでの報告と一致していた。しかしながら、エンドゾームからトランスゴルジネットワークへの輸送経路であるレトロマーコンプレックスを構成するサブユニットのノックアウト株ではウイルス様粒子の出芽・放出量が増加するという予想外の結果を得た。

#### D. 考察

(1) 昨年度、病態進行の速やかなHIV-1感染者53名と緩慢な51名とについて、約1万箇所の一塩基多型を網羅的に検討し、二群間での多型の頻度の差をカイ二乗検定で検定した結果、危険率0.01未満で頻度の差を示す多型が92箇所認められた。そのうち38箇所についてこれら104名の感染者とは重複しない120名の感染者について検討したところそのうち4箇所がこの120名においても病態進行の個人差と強く関連していた。現在、この4箇所の多型についてより大規模なHIV-1感染者集団を用いて病態進行の個人差と関連するか否かの検討を行っている。しかし病態進行との関連が明らかになった4箇所の多型については、いずれも関連の程度がやや弱いものであり、スクランする多型の数を50倍程度増やしてより強く関連する多型の検索を行う必要があり、その作業を開始した。

(2) 抗HIV薬の有効性の個人差を決定する宿主因子の検索も本研究の重要な課題である。しかし抗HIV-1薬の有効性には、HIV-1側の耐性変異の有無が大きく関わるため解析は容易ではない。そこで、HIVプロテアーゼ阻害剤ネルフィナビルを含む3剤複合療法を開始



し、血清中のHIV-1量を検出限界以下に抑制できたHIV-1感染者に対象を絞り、CD4陽性細胞の回復速度の違いに関わる宿主因子の探索を行ってきた。その結果、CD4陽性細胞の回復の速い群と緩慢な群とで危険率0.000002で違いを示す遺伝子多型が1箇所認められた。これは1万回の多重検定補正を行った後でもP=0.02の危険率で有意差が認められたことになる。この多型の近傍には個体内での細胞増殖に関わる癌抑制遺伝子である可能性が示唆されている遺伝子が存在するが、その遺伝子の多型との連鎖不平衡を解析したところ、プロモーター部に強い連鎖不平衡を示す5箇所の多型が見出された。現在、この5箇所の多型がこの遺伝子のプロモーター活性に影響するか否かを検討している。また、HIV-1感染者の少ない日本においてこのような研究を遂行することには限界があるため、generic医薬品の抗HIV-1薬GPOvirが最近急速に普及したタイ国において同様の研究を開始した。

(3) レトロマーは、出芽酵母では加水分解酵素を液胞へ運ぶための受容体をトランスゴルジネットワークへ戻すために使われている。一方高等真核細胞ではカチオン非依存性マンノース6リン酸受容体の輸送やEGF受容体の分解に関与している。今後は酵母の遺伝子欠損ライブラリーのスクリーニングを行うとともに、上記のような細胞内で起こっている事象とウイルス様粒子の出芽・放出との関係を出芽酵母に加えて高等真核細胞を用いて調べていく予定である。

#### E. 結論

(1) 昨年度、ゲノムワイドスキャンから危険率0.01未満で病態進行の個人差と相関することが見出された92箇所の一塩基多型を、独立のHIV-1感染者集団で再検討して4箇所の多型にまで絞り込んだ。

(2) HIVプロテアーゼ阻害剤ネルフィナビルを含む3剤複合療法によるCD4陽性細胞数の回復速度と相関する1箇所の遺伝子多型が、近傍の遺伝子のプロモーター部分の多型と強い連鎖不平衡にあることを見出した。

(3) エンドゾームからトランスゴルジネットワークへの輸送経路であるレトロマーコンプレックスを構成するサブユニットのノックアウト株ではウイルス様粒子の出芽・放出量が増加するという予想外の結果を得た。

#### F. 健康危険情報

該当なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Nakayama, E. E., 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.

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.

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.

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.

## 2. 学会発表

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 TRIM5 $\alpha$  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.

中山英美、永井美之、塩田達雄. TRIM5 $\alpha$  のレンチウイルス感染阻害効果。第 5 3 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 TRIM5 $\alpha$  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 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。

櫻木淳一、塩田達雄. HIV-1 サブタイプ間ヘ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。

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。

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

ゲノム情報を用いたエイズワクチン開発と発症阻止に関する基礎的研究

分担研究者 岩本 愛吉

東京大学医科学研究所先端医療研究センター感染症分野 教授

HIV 感染症において CTL による細胞性免疫が重要な防御機構として働いており、治療ワクチン開発においても CTL を賦活化することが重要と考えられている。本研究では本邦で流行している HIV に関して日本人に高頻度に見られる HLA-A24 に提示されるイムノドミナントな CTL エピトープに注目し HIV の遺伝子解析を行った。また HIV 感染細胞における CTL への抗原提示量を定量することを目的とし、「HIV CTL エピトープを提示する HLA-A24 分子」に特異的な抗体の作製を試みた。

A. 研究目的

HIV 感染症において細胞傷害性 T 細胞 (CTL) による細胞性免疫応答はウイルスのコントロールに重要であることが知られている一方で、CTL からのエスケープ変異ウイルスが出現することも明らかとなってきた。ワクチン開発においてその解析は重要であるため、外国でも多くの研究がなされている。しかしながら CTL による抗原認識は宿主の HLA によって異なるため、本邦にて流行している HIV とそれに対する CTL 応答を解析することが重要である。私たちは日本人集団に高頻度に見られる HLA-A24 によって提示される CTL エピトープについて、日本で流行している HIV の性状を検討しており、昨年までに Nef 由来のエピトープ Nef138-10 (RYPLTFGWCF) において CTL からのエスケープ変異であると考えられるステレオタイプなアミノ酸変化を見出した。私たちはこのエピトープに注目しさらに症例数を増やし HIV の遺伝子解析を行うとともに、CTL による認識について詳細な解析を行うことを目的とした。

CTL 応答は T 細胞レセプター (TCR) が標的細胞表面の HLA クラス I 分子によって提示される抗原 (エピトープ) を認識

することで惹起される。そのため細胞表面に存在する抗原量、すなわち特定のエピトープを提示する HLA クラス I 分子の数は CTL による免疫応答を考える上で非常に重要である。しかしながらその測定は非常に困難であり、これまでに全く明らかにされていない。そこで本研究では上記 Nef138-10 を提示する HLA-A24 分子 (A24/Nef138-10) に特異的な抗体を作製することを試みた。特異的な抗体を樹立できれば HIV 感染細胞を染色することによって A24/Ne138-10 量を可視化することができ、私たちが見出したアミノ酸変化を持つエピトープの抗原提示量を測定できる可能性がある。本研究ではヒト B 細胞由来の単鎖抗体 (scFv) ファージディスプレイライブラリーを用いて A24/Nef138-10 複合体特異的 scFv の樹立を試みた。

B. 研究方法

<日本で流行している HIV の遺伝子解析>  
HLA-A24 陽性 HIV-1 感染者の血漿から HIV ゲノム RNA を含むトータル RNA を抽出し Nef138-10 を含む領域を RT-PCR 法により増幅し、シーケンスにて塩基配列を解析しアミノ酸配列を決定した。複数の塩基配列が混在しているため一義的に決定できなかったサンプルに関してはクローニングを行