

three-base-deletion polymorphism in the upstream non-coding region of human interleukin 7 (IL-7) gene could enhance levels of IL-7 expression.第54回日本ウイルス学会学術集会、名古屋、平成18年11月。

櫻木淳一、塩田達雄。HIV-1 サブタイプ間組換え体生成機構の解析。第54回日本ウイルス学会学術集会、名古屋、平成18年11月。

大石真久、櫻木淳一、塩田達雄。水疱性口内炎ウイルス(VSV)の糖タンパク質を用いたシールドタイピングに潜む問題点。第54回日本ウイルス学会学術集会、名古屋、平成18年11月。

Polymorphisms in CCR5 chemokine

receptor gene in Japan. Huanliang Liu, Emi E. Nakayama, Ioannis Theodorou, Yoshiyuki Nagai, Sirirat Likanonsakul, Chantapong Wasi, Patrice Debre, Aikichi Iwamoto and Tatsuo Shioda。第20回日本エイズ学会学術集会、東京、平成18年12月。

櫻木淳一・塩田達雄。ウイルスゲノムの二量体化の感染初期過程に及ぼす影響。第20回日本エイズ学会学術集会、東京、平成18年12月。

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ワクチン開発と 発症阻止に関する基礎的研究

所属 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
研究者 岩本 愛吉

CTL 賦活化を目的としたワクチン開発の基礎的検討として TAP 阻害分子の ICP-47 とエピトープ融合 $\beta 2m$ を用いた抗原提示増強を試みた。ICP47 とエピトープ融合 $\beta 2m$ を共発現させることで TAP による内在タンパク質由来のペプチド輸送を阻害し、目的のエピトープを効率良く提示させることに成功した。

A. 研究目的

HIV 感染症においてウイルスのコントロールには HIV 特異的な細胞性免疫応答が重要であることが明らかになってきており、ワクチン戦略として細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の賦活化が有効であると考えられる。

CTL は細胞表面にある MHC (ヒトでは HLA) クラス I 分子に提示される抗原ペプチド (エピトープ) を認識するが、細胞表面には細胞内タンパク質由来の何千種類ものペプチドが MHC クラス I 分子によって提示されており、特定のペプチドを提示する MHC クラス I 分子は多いものでも全体の MHC クラス I 分子の 0.1%にも満たない。一方、CTL 応答は MHC クラス I/ペプチド複合体の細胞表面密度に依存しているため、目的のペプチドを提示する MHC クラス I 分子の密度を上げることができれば、より効果的に CTL 応答を誘導することができる。

さらにウイルスベクターをワクチンとして用いる場合の問題点として、ベクター由来の抗原に対する免疫応答が誘導されることで、ベクター感染細胞が排除されたり、目的の抗原に対する免疫応答が弱まることも懸念される。

そこで本研究では目的の抗原ペプチドを効率良く提示するシステムの構築を目的とした。抗原ペプチドは TAP と呼ばれるアミノ酸トランスポーターを介して粗面小胞体 (ER) へ輸送され、ER で MHC クラス I 分子と複合体を形成することで抗原提示される。MHC クラス I 分子は多様性に富む重鎖、 $\beta 2$ ミクログロブリン ($\beta 2m$)、抗原ペプチドの 3 者で安定な複合体を形成しており、TAP 欠損細胞株などでは ER へペプチドが供給されないため細胞表面に MHC クラス I 分子にほとんど存在しないことが知られている。単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) 由来のタンパク質、ICP47 は TAP によるペプチドの輸送を阻害する

分子として知られ、ICP47 を発現した細胞では細胞表面の MHC クラス I 分子量が低下する。

一方で $\beta 2$ ミクログロブリン ($\beta 2m$) の N 末端にリンカーを介してエピトープを融合させることで TAP 非依存的にエピトープを MHC クラス I 分子に提示させることができることが知られている。本研究では TAP 阻害分子である ICP47 とエピトープ融合 $\beta 2m$ とを同一細胞内に共発現させることで目的のエピトープを高効率に提示させることを目的とし、*in vitro*での検討を行った。ウイルスベクターとしてセンダイウイルス (SeV) を使い、エピトープとして日本人に高頻度に見られる HLA-A24 に提示される Immunodominant な Nef タンパク質由来の CTL エピトープ、Nef138-10 (RYPLTFGWCF) を用いた。HLA-A24 陽性 CD4+T 細胞に ICP47 と Nef138-10 融合 $\beta 2m$ を共発現する SeV を感染させ、細胞表面の Nef138-10 を提示する HLA-A24 分子の発現量、Nef138-10 特異的 CTL による認識を解析した。

B. 研究方法

＜センダイウイルスの作製＞

$\beta 2m$ と Nef タンパク質由来の HLA-A24 拘束性の Nef138-10 との融合タンパク質 Nef138- $\beta 2m$ を発現する SeV (N- $\beta 2m$ /SeV)、ICP47 を発現する SeV (ICP47/SeV)、またその両者を発現する SeV (<N- $\beta 2m$ +ICP47>/SeV)を作製した。

＜細胞表面 HLA クラス I 分子の解析＞

細胞は HLA-A24、B7 陽性の T 細胞株、KWN-T4 を用いた。各 SeV を m.o.i. 10 で KWN-T4 に感染させ 18 時間後にクエン酸バッファー (pH3.3) にて細胞を処理し、6 時間後に抗 HLA 抗体にて細胞表面染色を行った。染色には抗 HLA クラス I 抗体 W6/32、抗 HLA-A24 抗体 A11.1M、抗 HLA-B7 抗体 BB7.1 を用いフローサイトメーターにて解析を行った。

<CTLによる ICP47、Nef138-β2m 発現細胞の認識>
HIV-Gag を発現する Gag/SeV と、ICP47/SeV あるいは <N-β2m+ICP47>/SeV を重感染させ、上記方法で酸処理を行った細胞を標的細胞とし、Nef138-10 特異的 CTL、HIV-Gag 特異的 CTL をエフェクター細胞として ⁵¹Cr release assay を行った。

C. 研究結果

<TAP 阻害分子 ICP47 による細胞表面の HLA クラス I 分子発現量の低下>

まず、TAP 阻害分子である ICP47 による細胞表面 HLA クラス I 分子の発現低下を確認するため、ICP/SeV 感染細胞の HLA クラス I 分子を染色し、フローサイトメーターにて解析した。ICP47 は既に細胞表面に存在する HLA クラス I 分子の発現量には影響しないため、ICP による新規に合成された HLA クラス I 分子の細胞表面の発現低下を見ることは難しい。そこで ICP による効果を明瞭にするため、ICP47/SeV 感染 18 時間後 (ICP47 の発現が確認された後) に酸処理を行うことで既存の細胞表面 HLA クラス I 分子を低下させた。(pH を下げることで細胞表面に存在する MHC クラス I/ペプチド複合体上のペプチドが剥がれ、立体構造が破壊される。) 酸処理を行ってから 6 時間後 (新規に合成された MHC クラス I の細胞表面への発現が十分に回復する時間) に抗 HLA クラス I 抗体で染色することで新規合成された HLA クラス I 分子の細胞表面量を調べた。その結果、ICP47/SeV 感染細胞は野生型 SeV 感染細胞と比べて HLA クラス I 分子量が低下していた。この結果から ICP/SeV 感染細胞において ICP による TAP 阻害効果により細胞内タンパク質を提示する MHC クラス I 分子の細胞表面発現量が低下していることが明らかとなった。

<ICP47 と Nef138-β2m 共発現による細胞表面 HLA クラス I 分子の回復>

次に ICP47 と、Nef138 と β2m の融合タンパク質である N-β2m とを共発現する SeV、<N-β2m +ICP>/SeV を感染した HLA-A24, B7 陽性の KWN-T4 細胞について同様の解析を行った。ICP47 の発現によって細胞内タンパク質由来の抗原ペプチドの提示は低下するが、N-β2m と結合した HLA-A24 分子のみが細胞表面での発現が見られると予想されるため、抗 HLA-A24 抗体 (A11.1M) と抗 HLA-B7 抗体 (BB7.1) を用いて「細

胞内タンパク質由来抗原を提示する MHC クラス I 分子」と「Nef138-β2m を提示する HLA-A24 分子」を染め分けることとした。その結果、ICP47/SeV を感染した細胞では HLA-A24、HLA-B7 ともに発現が低下していたのに対して、<N-β2m +ICP>/SeV を感染した細胞では HLA-B7 は低下したまま HLA-A24 のみ発現が回復していた (図 1)。<N-β2m +ICP>/SeV 感染細胞表面では Nef138 を提示する HLA-A24 分子が高頻度に存在していることが示唆された。

<ICP47 と Nef138-β2m 共発現細胞の CTL による認識>

実際に <N-β2m +ICP>/SeV 感染細胞において、Nef138-10 のみが効率良く提示されているかを確認するため、細胞内発現タンパク質由来ペプチドの CTL による認識と、Nef138-10 の CTL による認識について検討を行った。<N-β2m +ICP>/SeV と HIV-Gag 発現 SeV を重感染させた細胞を標的細胞とし、Nef138 特異的 CTL と Gag 特異的 CTL による細胞傷害性試験を行ったところ、Gag と N-β2m を発現する細胞は Nef138-CTL、Gag-CTL の双方に認識されたのに対して、ICP47、N-β2m、Gag の 3 者を発現する細胞は Nef138-CTL にのみ認識された (図 2)。この結果から、<N-β2m +ICP>/SeV 感染細胞において目的の Nef138-10 を提示する HLA クラス I 分子が効率良く存在しているのに対して細胞内タンパク質由来のペプチドの提示は抑制されていることが示唆された。

D. 考察

本研究により TAP 阻害分子とエピトープ融合 β2m を共発現させることで目的のエピトープを高効率に抗原提示させることができることが明らかになった。エピトープ融合 β2m の MHC クラス I 分子への結合能はエピトープ単独よりも高いことが明らかになっているため、MHC クラス I への結合能が低いエピトープに関しては β2m と融合することでより安定に抗原提示されると考えられる。HIV や腫瘍由来のエピトープの中には結合能が低いものが多いことも知られているため、エピトープ融合 β2m を用いることで抗原提示量を上昇させることができる。さらに ICP47 と同時に発現させることで、ベクター由来の抗原の提示を阻害することでより CTL への提示効率を高めることが可能である。本システムを用いて樹状細胞などのプロフェッショナル抗原提示細胞に目

的のエピトープを高効率に発現させることができれば、誘導され得なかった新たな CTL をプライミングできるかもしれない。In vivo での効果を明らかにするためには動物モデルを使ったさらなる検討が必要と考えられる。

E. 結論

本研究では CTL 賦活化を目的としたワクチン開発の基礎的検討として、TAP 阻害分子である ICP-47 とエピトープ融合 β 2m を用いた抗原提示増強法の検討を行った。ICP47 により TAP のペプチド輸送を阻害し、目的の抗原ペプチドは β 2m と融合タンパク質として発現させることで TAP 非依存的に発現することに成功した。MHC クラス I 分子との結合能が弱いエピトープに関して、本研究で検討した技術を用いることで CTL を効率良く誘導できる可能性がある。またウイルスベクターを用いたワクチンにおいてしばしば問題となる、ベクターに対する免疫応答を減弱することも可能であると考えられる。

本研究で有用性が明らかになった TAP 阻害分子とエピトープ融合 β 2m を用いた抗原提示増強法は「CTL 誘導型 HIV ワクチン」の開発への応用が期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Maeda, T., Fujii, T., Matsumura, T., Endo, T., Odawara, T., Itoh, D., Inoue, Y., Ohkubo, T., Iwamoto, A., and Nakamura, T. AIDS-related cerebral toxoplasmosis with hyperintense foci on T1-weighted MR images: A case report. *Journal of Infection* 53:e167-e170, 2006.
- 2) Shinoe, T., Wanaka, A., Nikaido, T., Kakuta, Y., Masunaga, A., Shimizu, J., Duyckaerts, C., Imaizumi, K., Iwamoto, A., and Kanazawa, 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.
- 3) Hoshino, S., Sun, B., Konishi, M., Shimura, M., Segawa, T., Hagiwara, Y., Koyanagi, Y., Iwamoto, A., Mimaya, J., Terunuma, H., Kano, S., and Ishizaka, Y. Vpr in plasma of HIV-1-positive patients is correlated with the HIV-1 RNA titers.

In press. *AIDS Research and Human Retroviruses*.

4) Takahashi, H., Yotsuyanaggi, H., Yasuda, K., Koibuchi, T., Suzuki, M., Kato, T., Nakamura, T., Iwamoto, A., Nishioka, K., Iino, S., Koike, K., and Itoh, F. Molecular epidemiology of hepatitis A virus in the Metropolitan Area in Japan. *J. Gastroenterology*. In press.

5) Wichukchinda, N., Kitamura, Y., Rojanawiwat, A., Nakayama, E.E., Song, H., Pathipvanich, P., Auwanit, W., Sawanpanyalert, P., Iwamoto, A., Shioda, T., and Ariyoshi, K. The polymorphisms in DC-SIGNR affect susceptibility to HIV-1 infection. *AIDS Research and Human Retroviruses*. In press.

6) Fujii, T., Nakamura, T., Iwamoto, A. Pneumocystis pneumonia in patients with HIV infection - Clinical manifestations, laboratory findings and radiological features -. *J Infect Chemother*. 2006, in press

7) Maeda, T., Oyaizu, N., Endo, T., Odawara, T., Nakamura, T., Iwamoto, A., Fujii, T. Pneumocystis jiroveci pneumonia in an AIDS patient: Unusual manifestation of multiple nodules with multiloculated cavities. *European Journal of Radiology*, In Press.

2. 学会発表

1) 渡邊紗也香、立川(川名)愛、小田原隆、中村哲也、岩本愛吉『HIV 伝播が確認された感染者間における HIV の遺伝子解析』日本エイズ学会。平成 18 年 11 月。東京。

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
特許取得なし

2. 実用新案登録
登録なし

3. その他
なし

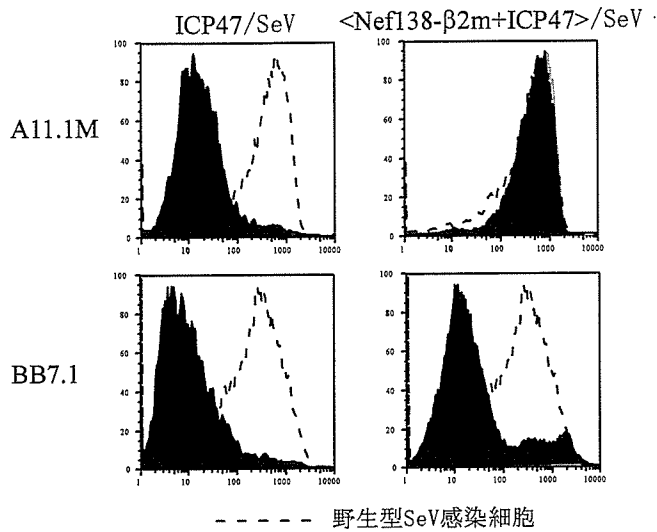


図1 ICP47 と N-β2m 共発現細胞での HLA-A24 分子特異的な細胞表面への発現

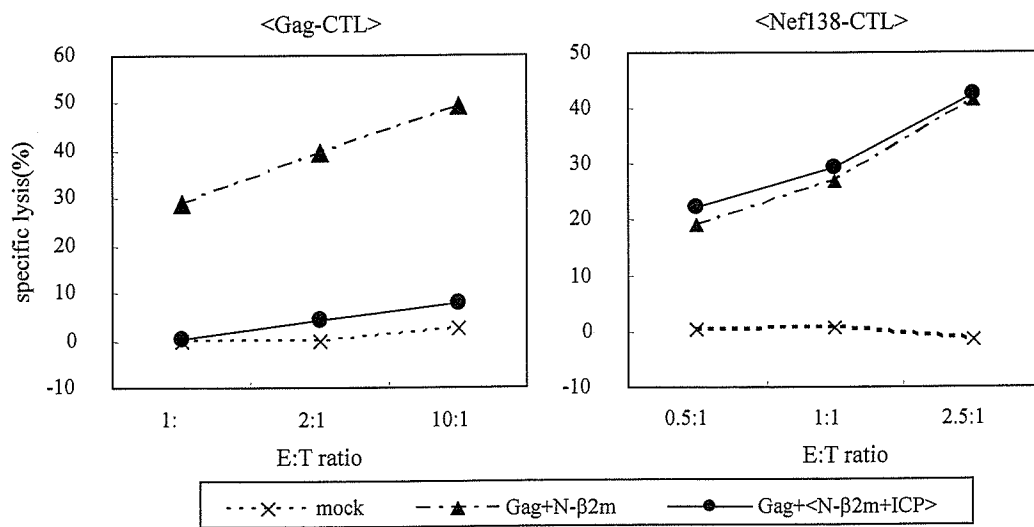


図2 HIV-Gag、ICP47、N-β2m 共発現細胞における Gag-CTL、Nef138-CTL の認識

分担研究報告書

ケニアにおける HIV 母子感染と病態進行速度に影響を及ぼす宿主因子の検討

-チトクローム P450 2B6 の遺伝子多型の頻度-

-母子感染による HIV-1 薬剤耐性株伝播の臨床的重要性-

分担研究者 市村 宏 金沢大学大学院医学研究科教授

研究協力者 R.ルエンベ 金沢大学大学院医学系研究科

研究要旨

HIV 母子感染児に対しより良い抗レトロウイルス療法 (ART) を行なうために、ケニアの N 孤児院において抗レトロウイルス療法 (ART) を受けている HIV 感染小児 55 例を対象に、チトクローム P450 2B6 (CYP2B6)-516 の遺伝子多型の解析を行なった。解析できた 53 例中 CYP2B6-516 G/G が 26 例 (49.1%)、G/T が 19 例 (35.8%)、T/T が 8 例 (15.1%) であり、現在、非核酸系逆転写酵素阻害剤である efavirenz の血中濃度測定中である。

また、母子感染による HIV-1 薬剤耐性株の伝播とその後の治療に及ぼす影響について検討したので報告する。ケニアの N 孤児院において ART を受けている HIV 感染小児 55 例のうち治療抵抗性を示した 12 例を対象とした。これらの児から経時的に採取された血漿中のウイルス遺伝子を RT-PCR で増幅し、クローニングした後、塩基配列を決定し、逆転写酵素阻害剤 (RTI) 耐性関連アミノ酸変異の解析を行った。ART 抵抗性を示した 12 例中 4 例 (33.3%) で治療開始前に主要な RTI 耐性関連遺伝子変異が認められた。3 例の児 (5, 6, 7 歳) では、K103N が治療前から存在しており、治療後も持続して存在した。1 例の児 (1 歳) では、Y181C が治療前に認められたが、治療開始後に消失した。また、1 例の児では K103N の変異を持つウイルス株がマイナー集団として出現し、治療後、メジャー集団になるのが観察された。以上の結果より、母子感染したと考えられる RTI 耐性関連変異を持ったウイルス株が RTI 未使用下でも長期間存在すること、そして ART の予後を知るうえで、血中ウイルスのマイナー集団の検討が必要であることが示唆された。

A. 研究目的

逆転写酵素阻害剤 (RTI) とプロテアーゼ阻害剤 (PI) による強力な多剤併用療法が臨床の場に導入され、先進諸国においてはエイズによる死亡数は激減した。しかし、治療の失敗や中断によってこれらの抗レトロウイルス剤 (ARV) に対する耐性ウイルスが出現し、治療効果の消失やエイズ患者の予後不良という新たな問題が生じている。さらにこれらの薬剤耐性ウイルスは性的接触や母子感染などで伝搬し、HIV 初感染・未治療者においても、薬剤耐性ウイルスの存在が明らかとなってきた。HIV-1 薬剤耐性株の出現は、WHO の 3 by 5 イニシアチブなどにより ARV がアフリカなどの開発途上国へ積極的に導入され始めている現在、非常に重要な問題となってきた。今回の研究では、母子感染による HIV-1 薬剤耐性株の伝搬とその後のエイズ治療に及ぼす薬剤耐性株の影響を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

対象: ケニアの N 孤児院において抗レトロウイルス療法 (ART) を受けている HIV 感染

小児 55 例 (平均治療期間: 23.3 ヶ月)

のうち治療抵抗性を示した 12 例 (男児 8 名、女児 4 名; 平均年齢 7.4 歳、2004 年 8 月現在) を対象とした。これらの児は誕生日までに N 孤児院に入所し、生後 18 ヶ月の時点で HIV 抗体の存在が確認されており、これまでに ART の治療歴はない。

方法: これらの児から経時的に採取された血漿中のウイルス遺伝子を RT-PCR で増幅し、クローニングした後、塩基配列を決定し、サブタイプの決定と逆転写酵素阻害剤 (RTI) 耐性関連アミノ酸変異の解析を行った。

倫理面への配慮

本研究はケニア中央医学研究所 (KEMRI、Kenya Medical Research Institute) の研究審査委員会および倫理審査委員会と金沢大学医学部の倫理委員会の承認を受けている。

C. 研究結果

HIV-1 感染サブタイプ

児に感染している HIV-1 のサブタイプ (RT 領域) は、A1 (7 例)、C (1 例)、D (3 例) と CRF02_AG (1 例) であった。ART 抵

抗性を示した4例はA1(2例)とD(2例)であった。

RTI 耐性関連遺伝子変異

ART 抵抗性を示した12例中4例(33.3%)で治療開始前に主要なRTI耐性関連遺伝子変異が認められた(図1)。3例の児(5, 6, 7歳)では、K103Nが治療前から存在しており、治療後も持続して存在した。1例の児(1歳)では、Y181Cが治療前に認められたが、治療開始後に消失した。また、1例の児ではK103Nの変異を持つウイルス株がマイナー集団として持続し(1/5クローン)、治療後、メジャー集団(7/7クローン)になるのが観察された。

D. 考察

母子感染したと考えられるRTI耐性関連変異を持ったウイルス株がRTI未使用下でも長期間存在すること、母子感染したRTI耐性関連変異株がその後のARTの成否に影響を及ぼすこと、そして血中ウイルスのマイナー集団の検討がARTの予後を知るうえで必要である可能性が示唆された。

E. 研究発表

1. 論文発表

・ Koizumi Y, Ndembu N, Miyashita M, Lwembe R, Kageyama S, Mbanya D, Kaptue L, Fujiyama Y, Ichimura H.: Emergence of ART-resistance associated primary mutations among drug-naïve HIV-1-infected individuals in rural western Cameroon. *J Acq Immun Def Synd* 43(1):15-22, 2006.

・ Kageyama S, Agdamag DM, Alesna ET, Leano PS, Herdia AM, Abellanos-Tac-An IP, Jereza LD, Yamamura J, and Ichimura H.: A Natural inter-genotypic (2b/1b) recombinant of hepatitis C virus in the Philippines. *J Med Virol* 78(11):1423-8, 2006.

・ Ndembu N, Abraha A, Mbanya D, Pilch H, Ichimura H, Kaptue L, Arts EJ and Salata R.: Primary Antiretroviral Resistance and Molecular Characterization of HIV-1 among Acutely Non-B infected Patients in Yaounde, Cameroon. *J Acq Immun Def Synd* (in press).

2. 学会発表

・ Drug resistant mutations in children failing antiretroviral therapy in Kenya. E.M.Songok, R.Lwembe, W. Ochieng, S. Kageyama, H. Ichimura. XVI International AIDS Conference, 2006. 8.Tronto, Canada.

・ 途上国における感染症対策と日本. 市村宏. 国際協力フォーラム in ISHIKAWA. 2006.11. 金沢.

・ フィリピンで確認された組換え C 型肝炎ウイルス. 景山誠二、谷本朋陽、市村宏. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会. 2006. 11. 名古屋.

・ Anti-retroviral drug resistance associated mutations among non-subtype B HIV-1-infected Kenyan children with treatment failure. Raphael Lwembe、山本直彦、塩田達雄、景山誠二、市村宏. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会. 2006. 11. 名古屋.

・ フィリピンにおける STI の現状. 宮下宙子、松下香織、アグダマグドロシー、ルエンベラファエル、笹川寿之、景山誠二、市村宏. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会.

2006. 11. 名古屋.

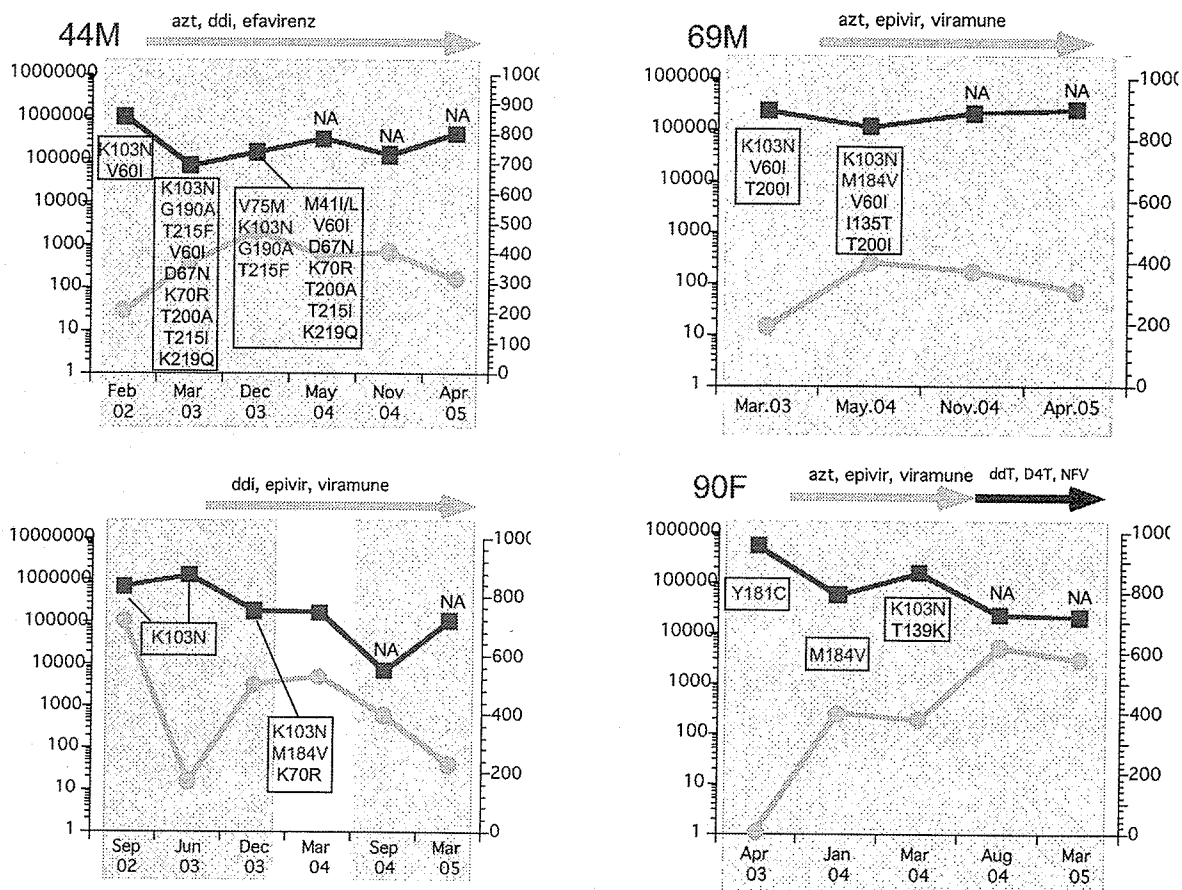
・ フィリピンにおける血液媒介感染による HIV 流行の端緒形成の可能性. 景山誠二、市村宏. 第 20 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2006, 11, 東京.

・ アフリカ、ケニアにおける HIV 感染と HPV 感染. 第 20 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2006, 12, 東京.

F. 知的財産権の出願・登録状況

特に予定なし。

Fig. 1. NNRTI resistance mutations detected before and during treatment in non-B HIV infected children



研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nuanjun Wichukhinda, Emi E Nakayama, Archawin Rojanawiwat, Panita Pathipvanich, Wattana Aesuwanit, Suthon Vongsheree, Koyaka Ariyoshi, Pathom Sawanpanyalert, and Tatsuo Shioda .	Protective Effects of <i>IL-4 -589T</i> and <i>RANTES -28G</i> 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	20	937-939	2006
Nakayama, EE, Maegawa, H, and Shioda, T.	A dominant-negative effect of cynomolgus monkey tripartite motif protein TRIM5 α on anti-simian immunodeficiency virus SIVmac activity of an African green monkey orthologue.	Virology	350	158-163	2006
Sakuragi S, Sakuragi J, Morikawa Y, Shioda T.	Development of a rapid and convenient method for the quantification of HIV-1 budding.	Microbes Infect	8	1875-1881	2006
Shioda T, Nakayama EE.	Human genetic polymorphisms affecting HIV-1 diseases.	Int J Hematol	84	12-17	2006

Song, H, Nakaya ma, EE, Likanon sakul, S, Wasi, C, Iwamoto A, and Shioda T.	A three-base-deletio n polymorphism in th e upstream non-codi ng region of human interleukin 7 (IL-7) gene could enhance levels of IL-7 expre ssion.	International Journal of Immunogenet ics.	34	107-113	2007
Nuanjun Wichuk hinda, Archawin Rojanawiwat, Y oshihiro Kitamu ra, Emi E Nakay ama, Panita Pat hipvanich, Watt ana Auwanit, Pa thom Sawanpanya lert, Aikichi I wamoto, Tatsuo Shioda, and Koy a Ariyoshi.	The polymorphisms in DC-SIGNR affect the susceptibility to Hr. IV-1 infection.	AIDS. Res. H um. Retrovi	In press		
Raphael Lwembe, Washington Oc hieng, Annie Pa nikulam, Charle s O. Mongoina, Mary Owens, Yus uke Koizumi, Se iji Kageyama, N aohiko Yamamot o, Tatsuo Shiod a, Rachel Musok e, Angel D'Agost ino, Elijah M. Songok, Hiroshi Ichimura.	ANTI-RETROVIRAL DRUG RESISTANCE-ASSOCIAT ED MUTATIONS AMONG N ON-SUBTYPE B HIV-1-I NFECTED KENYAN CHILD REN WITH TREATMENT F AILURE.	J. Med. Viro	In press		
Masahisa Ohis hi, Tatsuo Shio da, and Jun-ich i Sakuragi.	Retro-transduction b y virus pseudotyped with glycoprotein of vesicular stomatiti s virus.	Virology	In press		
Yusuke KOIZUMI, Seiji KAGEYAM A, Yoshihide F UJIYAMA, Michik o MIYASHITA, Ra phael LWEMBE, K eiki OGINO, Tatsuo SHIODA, Hiroshi ICHIM URA.	RANTES -28G delays and DC-SIGN -139C e nhances AIDS progre ssion in HIV-1-infe cted Japanese hemop hiliacs.	AIDS Researc h and Human Retroviruse s.	In press		

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Maeda, T., Fujii, T., Matsumura, T., Endo, T., Odawara, T., Itoh, D., Inoue, Y., Ohkubo, T., Iwamoto, A., and Nakamura, T.	AIDS-related cerebral toxoplasmosis with hyperintense foci on T1-weighted MR images: A case report.	Journal of Infection	53	e167-e170	2006
Shinoe, T., Wanaka, A., Nikaido, T., Kakuta, Y., Masunaga, A., Shimizu, J., Duyckaerts, C., Imaizumi, K., Iwamoto, A., and Kanazawa, 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
Hoshino, S., Sun, B., Konishi, M., Shimura, M., Segawa, T., Hagiwara, Y., Koyanagi, Y., Iwamoto, A., Mimaya, J., Terunuma, H., Kano, S., and Ishizaka, Y.	Vpr in plasma of HIV-1-positive patients is correlated with the HIV-1 RNA titers.	AIDS Research and Human Retroviruses.	In press		

Takahashi, H., Yotsuyanaggi, H., Yasuda, K., Koibuchi, T., Suzuki, M., Kato, T., Nakamura, T., Iwamoto, A., Nishioka, K., Iino, S., Koike, K., and Itoh, F.	Molecular epidemiology of hepatitis A virus in the Metropolitan Area in Japan.	Gastroenterology	In press		
Wichukchinda, N., Kitamura, Y., Rojanawiwat, A., Nakayama, EE., Song, H., Pathipvanich, P., Auwanit, W., Sawanpanyalert, P., Iwamoto, A., Shioda, T., and Ariyoshi, K.	The polymorphisms in D C-SIGNR affect susceptibility to HIV-1 infection.	AIDS Research and Human Retroviruses.	In press		
Fujii, T, Nakamura T, Iwamoto A.	Pneumocystis pneumonia in patients with HIV infection - Clinical manifestations, laboratory findings and radiological features -.	J Infect Chemother.	In press		
Maeda, T., Oyaizu, N., Endo, T., Odawara, T., Nakamura, T., Iwamoto, A., Fujii, T.	Pneumocystis jiroveci pneumonia in an AIDS patient: Unusual manifestation of multiple nodules with multiloculated cavities.	European Journal of Radiology,	In press		

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト (参考)

書籍 : なし

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Seiji Kageyama, <u>Hiroshi Ichimura</u> 他8名	A Natural inter-genotypic (2b/1b) recombinant of hepatitis C virus in the Philippines.	J Med Virol	78(11)	1423-1428	2006
Koizumi Y, <u>Hiroshi Ichimura</u> 他8名	Emergence of ART-resistance associated primary mutations among drug-naïve HIV-1-infected individuals in rural western Cameroon.	J Acq Immun Def Synd	43(1)	15-22	2006

Protective Effects of *IL4-589T* and *RANTES-28G* on HIV-1 disease progression in infected Thai females

Nuanjun Wichukchinda^{a,b}, Emi E. Nakayama^b, Archawin Rojanawiwat^a, Panita Pathipvanich^c, Wattana Auwanit^a, Suthon Vongsheree^a, Koya Ariyoshi^d, Pathom Sawanpanyalert^a and Tatsuo Shioda^b

Objective: To evaluate the effect of polymorphisms in interleukin-4 (*IL4*) and *RANTES* promoters on disease progression in HIV-1 infected Thais.

Design: Antiretroviral (ARV) drug-free HIV-1 infected females from the prospective cohort.

Methods: A total of 246 DNA samples were genotyped for *IL4* and *RANTES* promoter polymorphisms by PCR-RFLP. Associations of genotype with HIV-1 disease progression were assessed with respect to baseline clinical data including plasma HIV-1 load, CD4 cell counts, and proportion of symptomatic/AIDS, and survival status during 3 years of follow-up.

Results: Patients with homozygous *IL4-589T* allele showed a significantly lower HIV-1 viral load ($P = 0.005$) and a higher CD4 cell count ($P = 0.003$) than the other patients with heterozygous *IL4-589C/T* or homozygous *IL4-589C* allele. Kaplan-Meier analysis demonstrated an apparent but insignificant trend towards better survival in homozygous *IL4-589T* patients. On the other hand, patients with *RANTES-28G* allele showed a significantly better survival while those with *RANTES In1.1C* allele without *RANTES-28G* showed a significantly poorer survival compared with those who did not possess either *RANTES In1.1C* or *RANTES-28G* ($P = 0.02$), although those polymorphisms only weakly associated with baseline viral load and CD4 cell counts.

Conclusions: Our results implicate the significant protective effect of *IL4-589T* and *RANTES-28G* on HIV disease progression in Thais. In contrast, *RANTES In1.1C* without *RANTES-28G* had an accelerating effect on HIV disease progression.

© 2006 Lippincott Williams & Wilkins

AIDS 2006, 20:189–196

Keywords: *IL4-589T*, *RANTES* promoter polymorphisms, HIV disease progression, survival, Thailand, viral load, CD4 cells

Introduction

HIV-1 infected individuals have widely different rates of disease progression. Some infected individuals become symptomatic within 2–3 years while others remain asymptomatic for more than 10–15 years [1]. It is

important to investigate factors modulating rates of disease progression for designing novel therapies and vaccines.

RANTES is a natural CCR5 ligand and potently inhibits cell entry of HIV-1 that uses CCR5 as a coreceptor

From the ^aNational Institute of Health, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Nonthaburi, Thailand, the ^bResearch Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Osaka, Japan, the ^cDay Care Center, Lampang Hospital, Lampang, Thailand, and the ^dAIDS Research Center, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan.

Correspondence to T. Shioda, Department of Viral Infections, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, 3-1 Yamada-oka, Suita-shi, Osaka, 565-0871 Japan.

Tel: +81 6 6879 8346; fax: +81 6 6879 8347; e-mail: shioda@biken.osaka-u.ac.jp

Received: 26 May 2005; revised: 9 September 2005; accepted: 27 October 2005.

ISSN 0269-9370 © 2006 Lippincott Williams & Wilkins

189

Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

(R5 virus). Two single nucleotide polymorphisms (SNP) in *RANTES* promoter; $-403G/A$ and $-28C/G$, were identified [2]. The *RANTES-28G* variant was shown to elevate promoter activity *in vitro* [2,3] and is associated with a slower rate of CD4 cell depletion in HIV-1 infected Japanese patients [2]. Although this result was not confirmed in subsequent studies in other ethnic groups in which the *RANTES-28G* frequency was lower than in the Japanese [3–5], McDermott *et al.* reported that patients with *RANTES-28G* showed a clear trend towards slower rate of CD4 cell depletion in HIV-1 infected European Americans [6].

With respect to *RANTES-403A* variants, HIV-1 infected European Americans with *RANTES-403A* were initially reported to progress more slowly to AIDS [6]. However, subsequent studies with a larger sample size showed that *RANTES-403A* or *RANTES In1.1C*, a *RANTES* intron polymorphism which is in a strong linkage disequilibrium with *RANTES-403A* and which negatively affects *RANTES* transcription *in vitro*, was reported to be associated with an increased rate of disease progression [3,4].

A variant of the interleukin-4 (*IL4*) promoter, $-589T$ was found to be associated with elevated levels of serum IgE and to accelerate phenotypic switches of HIV-1 from non-syncytium inducing (NSI) to syncytium-inducing (SI) type in HIV-infected Japanese patients probably due to the suppressive effect of *IL4* on *CCR5* expression together with its enhancing effect on *CXCR4* expression [7]. This allele was subsequently found to be associated with a lower viral load and a slower rate of disease progression in HIV-infected French patients [8,9]. However, studies in other ethnic groups did not show consistent results [10,11].

There is a considerable variation in allele frequencies at these loci among different ethnic groups. Furthermore, diverse strains of HIV-1 circulate in different geographical areas and effects of host genetic polymorphisms may differ in individuals infected with different HIV-1 subtypes. Therefore, it is important to study influences of host genetic polymorphisms in different populations; however, such data in Asian populations remain sparse. In this paper, we report that polymorphisms in *IL4* and *RANTES* influence HIV load, CD4 cell count and survival time in Thai patients infected with HIV-1 subtype E.

Materials and methods

Patients and samples

We conducted a prospective cohort study at the HIV clinic in the Day Care Center of Lampang Hospital in northern Thailand. The Lampang Hospital is a government referral hospital with approximately 800 beds. It is located in the center of Lampang province, a province

600 km to the north of Bangkok. We approached all HIV-1 infected individuals who attended the clinic from 6 July 2000 to 12 July 2001 and asked them to participate in this cohort study. After giving written informed consent, all participants were interviewed by trained study coordinators, and clinically examined by two designated doctors. EDTA-treated blood was taken from each individual. Plasma and buffy coat fractions were separated and stored at -80°C until use. For a control group we collected blood samples from 119 female blood donors at the blood bank of the Lampang Hospital.

Plasma HIV-1 RNA copy number was measured using a commercial kit (Amplicor HIV-1 Monitor Test, Roche Molecular System, Inc. Branchburg, New Jersey, USA), which has a lower limit of detection of 400 copies/ml. CD4 cell count was measured by FACSscan (BD Biosciences, California, USA) using fresh EDTA-treated whole blood samples at the time of recruitment. The survival status of participants until 1 October 2003 was ascertained from the cohort database, mailing letters, and death certificates at the Lampang Provincial Health Office. Data were double entered and validated using the access program. This study was approved by the Ethical Review Committee for Research in Human Subjects, Ministry of Public Health, Thailand in January 2000.

Polymorphism genotyping

Genomic DNA was extracted and purified from the buffy coat fraction using QIAamp mini blood kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany). Each specimen was analyzed for *IL4-589C/T*, *RANTES-403G/A*, *RANTES-28C/G*, *RANTES In1.1T/C*, and *RANTES 3'222T/C* by PCR-RFLP as described elsewhere [2,3,7].

Sample analysis

We conducted this study strictly in blinded manner so that field investigators were masked from any host genetic polymorphism data and laboratory investigators were masked from any clinical data. The data set was analyzed only after deleting sample and patient's identification number. Continuous variables of two groups with different genetic background were compared by a non-parametric Kruskal-Wallis test. Qualitative variables of two groups were compared by the Chi-square test. Significance in Kaplan-Meier analysis was determined by the log-rank test. Statistical analyses were carried out using Epi Info version 3.01 (US-CDC). *RANTES* haplotypes were constructed and calculated for their frequencies by an Expectation-Maximization algorithm using software (Arlequin version 2.01, Genetica and Biometry Laboratory, Geneva, Switzerland). D' measure for linkage disequilibrium was also calculated by using Arlequin. Incidence rate ratios were calculated by STATA (Stata Corp., Texas, USA). Crude and adjusted relative risks (RR) and their 95% confidence intervals (CI) were calculated by Cox proportional hazard models using StatView (SAS Institute Inc. North Carolina, USA).

Results

Baseline characteristics of study subjects

During the study period, 487 HIV-infected individuals participated in this study. There were 187 males and 300 females; baseline CD4 cell counts and antiretroviral (ARV) drug use information was available in 185 males and 297 females. We found that HIV-disease was significantly more advanced in men than in women. Median [interquartile range (IQR)] CD4 cell count at the time of recruitment in men [66 (15–258) cells/ μ l] was significantly lower ($P < 0.0001$) than that in women [262 (90–418)]. The proportion of patients diagnosed as AIDS was also higher ($P < 0.0001$) in men (77/185; 41.6%) than in women (44/297; 14.8%). Because the aim of this study was to investigate the influence of host genetic polymorphisms on disease progression and the majority of male individuals were already in the advanced stage of HIV disease, we analyzed the data of men and women separately and in this paper we present our analysis on the 297 females.

Among these females, 186 were ARV drug naive and 111 were ARV drug experienced: 51 were receiving ARV drugs and 60 reported prior ARV treatment but were not on ARV at the time of recruitment. The latter group included 18 females who were given zidovudine (ZDV) as prophylaxis for HIV mother-to-child transmission. The remaining 42 subjects stopped ARV drugs because of financial constraints.

All females reported that they had contracted HIV-1 through heterosexual contact. Baseline characteristics of ARV drug naive and ARV drug interrupted groups were similar (Table 1). In this analysis, we excluded the 51 individuals who were on ARV drug treatment, because on-going ARV drug treatment considerably affects CD4 cell count and viral load so that an association between these parameters and genetic polymorphisms may be obscured.

Allele frequencies of *IL4-589T* and *RANTES-403A*, *RANTES-28G*, *RANTES In1.1C*, and *RANTES 3'222C*

We genotyped 246 ARV drug-free females and 119 blood donors for *IL4-589C/T*, *RANTES-403G/A*, *RANTES-*

28C/G, *RANTES In1.1T/C*, and *RANTES 3'222T/C*. Allele frequency of *IL4-589T* was 0.774 in 246 ARV drug-free females and 0.798 in 119 blood donors. Frequencies of four *RANTES* SNP in ARV drug-free females and blood donors are shown at the bottom of Table 2. There was no difference in frequency of those five SNP among subgroups, including the ARV-treated group (data not shown). All of the observed genotypes were in Hardy-Weinberg equilibrium (data not shown).

Table 2 shows estimated *RANTES* haplotype distribution in 246 ARV drug-free females and 119 blood donors. As reported in European- and African-Americans, the haplotype R1 was the most common. In European- and African-Americans, approximately 75% and 55% of *RANTES-403A* was associated with *RANTES In1.1C*, respectively. *RANTES-403A* was more closely associated with *RANTES In1.1C* in Thai patients than in European- and African-Americans, since 93.4% of *RANTES-403A* were associated with *RANTES In1.1C* in 246 ARV drug-free female patients ($D' = 1.0$, Table 2). Therefore, we focused on *RANTES-28G* and *RANTES In1.1C* in the subsequent analysis among four *RANTES* polymorphisms, as *RANTES-28G* and *RANTES In1.1C* were shown to be functional and actually affected *RANTES* promoter activity [2,3], while roles of *RANTES-403A* and *RANTES 3'222T/C* as functional alleles were not yet confirmed.

Genotype variation and HIV disease status (clinical, CD4 cell count, viral load)

We analyzed viral load, CD4 cell count, and clinical status among ARV drug-free females at recruitment by stratifying individuals according to their host genetic background (Table 3). We found that patients with the homozygous *IL4-589T* allele showed a significantly lower HIV-1 viral load ($P = 0.005$) and higher CD4 cell count ($P = 0.003$) than patients with heterozygous *IL4-589C/T* or homozygous *IL4-589C* alleles. Furthermore the proportion of symptomatic individuals was lower among females with homozygous *IL4-589T* allele than among others, although this trend did not reach statistical significance ($P = 0.183$).

Patients with *RANTES-28G* allele (C/G or G/G) showed a weak trend toward a higher CD4 cell count

Table 1. Baseline data of ARV drug-free HIV-1 infected females.

Characteristics	ARV drug naive (n = 186)	ARV treatment interrupted (n = 60)	Combined (ARV drug free) (n = 246)
Age at recruitment: median years (IQR)	31 (28–36)	31 (27.5–38)	31 (28–36)
CD4 cell count [median cells/ μ l (IQR)]	269 (71–422)	259.5 (63–400.5)	262 (67–421)
HIV-1 load [median log ₁₀ HIV RNA copies/ml (IQR)]	5.084 (4.424–5.549)	5.0194 (3.897–5.592)	5.078 (4.331–5.571)
AIDS-related symptoms [% (n)]	37.1(69)	45(27)	39 (96)
95% CI	30.1–44.5	32.1–58.4	32.9–45.4
Diagnose of AIDS [% (n)]	15.6 (29)	20 (12)	16.7 (41)
95% CI	10.7–21.6	10.8–32.3	12.3–21.9

ARV, Antiretroviral; IQR, interquartile range; CI, confidence interval.

Table 2. *RANTES* haplotype frequencies in ARV drug free HIV-1 infected females and female blood donors.

<i>RANTES</i> Haplotype	<i>RANTES</i> polymorphism site				ARV drug free ^a (n = 246)	Blood donor ^b (n = 119)
	-403	-28	In1.1	3'222		
R1	G	C	T	T	0.697	0.731
R2	A	C	T	T	0.020	0.034
R3	A	C	C	T	0.002	0.000
R4	A	C	C	C	0.191	0.160
R5	A	G	C	T	0.089	0.076

^aAllele frequencies of *RANTES-403A* = 0.303, *RANTES-28G* = 0.089, *RANTES In1.1C* = 0.283, and *RANTES 3'222C* = 0.191.

^bAllele frequencies of *RANTES-403A* = 0.269, *RANTES-28G* = 0.076, *RANTES In1.1C* = 0.235, and *RANTES 3'222C* = 0.160. ARV, Antiretroviral.

(*P* = 0.165), although the differences were not statistically significant. There was no significant difference in HIV-1 viral load or proportion of symptomatic individuals between patients with and without the *RANTES-28G* allele. Patients with *RANTES In1.1C* showed no difference from those without this allele in HIV-1 viral load, CD4 cell count, or proportion of symptomatic cases.

Genotype variation and survival status

Of 246 ARV drug-free females, we obtained follow-up information from 238 (96.7%): the median (IQR) of follow-up was 964 (495–1072) days. During the follow-up period, 55 patients had started ARV drug treatment. Among 524.05 persons-years of follow up, 54.16 persons-years were ARV drug treatment positive. Therefore, the majority (89.7%) of our study subjects was

ARV drug-free. There was no difference in proportion of patients who started ARV drugs during the observation period among each genotype group (Table 3). During the follow up period, 65 deaths occurred (including one suicide). Death was then used as the marker for HIV-1 disease progression. We found that the mortality rate among homozygous *IL4-589T* individuals was slightly lower than for the other groups, but this difference did not reach statistical significance [incidence rate ratio (IRR), 0.68; 95% CI, 0.40–1.14; *P* = 0.121] (Table 3). For *RANTES* promoter, there was significantly lower mortality rate among individuals with *RANTES-28G* allele when compared to those without this allele (IRR, 0.41; 95%CI, 0.15–0.95; *P* = 0.024) (Table 3). In contrast, there was no difference in the mortality rate between individuals with *RANTES In1.1C* and those without this allele (IRR, 1.11; 95%CI, 0.66–1.84; *P* = 0.67).

Table 3. Median HIV-1 load and CD4 cell count, HIV-1 related symptoms, diagnosis of AIDS and number of deaths/person years of observation (PYO) stratified by *IL4-589C/T*, *RANTES-28C/G*, and *RANTES In1.1T/C* genotype group.

	<i>IL4-589</i>		<i>RANTES-28</i>		<i>RANTES In1.1</i>	
	C/C and C/T (n = 99)	T/T (n = 147)	C/C (n = 205)	C/G and G/G (n = 41)	T/T (n = 133)	T/C and C/C (n = 113)
Median viral load [log ₁₀ copies/ml (IQR)]	5.381 (4.519–5.650)	4.908 (4.214–5.441)	5.107 (4.406–5.578)	4.843 (4.177–5.491)	5.098 (4.287–5.615)	5.053 (4.433–5.507)
<i>P</i> (Kruskal–Wallis test)		0.005		0.275		0.929
Median CD4 count [(cells/μl) (IQR)]	171 (46–354)	303 (144–433)	261 (58–412)	297 (144–451)	285 (66–414)	244 (71–421)
<i>P</i> (Kruskal–Wallis test)		0.003		0.165		0.684
HIV-1 related symptoms [% (n)]	44.4(44)	35.4(52)	40.5(83)	31.7(13)	37.6(50)	40.7(46)
(95% CI)	(34.5–54.8)	(27.7–43.7)	(33.7–47.5)	(18.1–48.1)	(29.3–46.4)	(31.6–50.4)
<i>P</i> (Chi ² test)		0.153		0.293		0.618
Diagnosis of AIDS [% (n)]	19.2(19)	15(22)	17.1 (35)	14.6 (6)	16.5(22)	16.8(19)
(95% CI)	(12.0–28.3)	(9.6–21.8)	(12.2–22.09)	(5.6–29.2)	(10.7–24.0)	(10.4–25.0)
<i>P</i> (Chi ² test)		0.383		0.702		0.954
Deaths (n)	30	35	59	6	34	31
PYO	192.59	331.90	420.84	103.66	288.17	236.33
Mortality rate (%)	15.58	10.54	14.02	5.79	11.8	13.12
(95% CI)	(10.01–21.15)	(7.05–14.03)	(10.44–17.60)	(1.16–10.42)	(7.83–15.77)	(8.5–17.74)
Incidence rate ratio of death (95% CI)		0.68 (0.40–1.14)		0.41 (0.15–0.95)		1.11 (0.66–1.84)
<i>P</i> (Chi ² test)		0.121		0.024		0.67
ARV treatment during follow-up	22	33	44	11	32	23
Observed (n)	94	144	197	41	129	109
<i>P</i> (Chi ² test)		0.930		0.534		0.499

IQR, Interquartile range; CI, confidence interval.

Consistent with the results on mortality rate, the Kaplan–Meier analysis demonstrated an insignificant better survival in homozygous *IL-589T* ($P = 0.125$) (Fig. 1a), a significant better survival in individuals carrying *RANTES-28G* ($P = 0.037$) (Fig. 1b), and no difference between individuals carrying *RANTES In1.1C* and those

without this allele ($P = 0.668$) (Fig. 1c). Since *RANTES-28G* was associated with *RANTES In1.1C* (Table 3), we then grouped the patients as: (i) individuals who possessed neither *RANTES-28G* nor *RANTES In1.1C*; (ii) individuals who possessed *RANTES In1.1C* but not *RANTES-28G*; and (iii) individuals who possessed

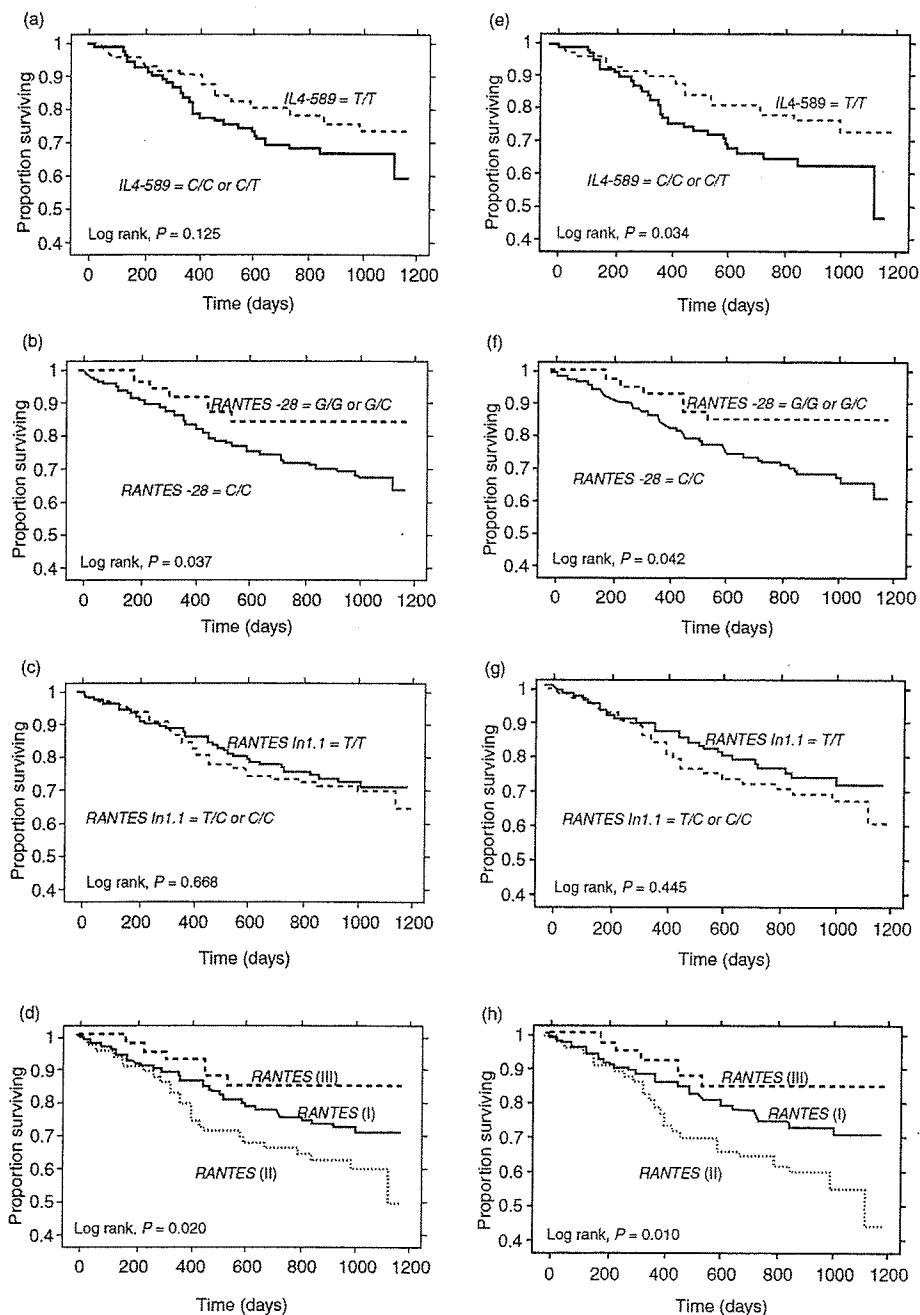


Fig. 1. Kaplan–Meier analysis of the effect of promoter polymorphism of *IL4* and *RANTES* on survival in ARV drug-free HIV-1 infected Thai females during the total observation period (a–d) or untreated period (e–h). (a and e) *IL4-589T*; (b and f) *RANTES-28*; (c and g) *RANTES-403*; and (d and h): grouped *RANTES* as (I) individuals who possessed neither *RANTES In1.1C* nor *RANTES-28G*, (II) individuals who possessed *RANTES in1.1C* but not *RANTES-28G*, and (III) individuals who possessed *RANTES-28G*.