

- 5) 近藤佳代、張麗峰、児玉 晃、田中礼子、大隈 和、田中勇悦：T細胞のOX40LによるHIV-1増殖調節。第20回日本エイズ学会学術集会(東京)2006年11月
- 6) 田中勇悦、田中礼子、大隈 和：CCR5, CXCR4架橋によるR5及びX4 HIV-1の感染制御。第20回日本エイズ学会学術集会(東京)2006年11月
- 7) 児玉 晃、近藤佳代、張麗峰、田中礼子、大隈 和、田中勇悦：HIV-1による樹状細胞の分化誘導阻害。第20回日本エイズ学会学術集会(東京)2006年11月
- 8) 張麗峰、児玉 晃、近藤佳代、田中礼子、大隈和、田中勇悦：樹状細胞を用いて誘導したIL-10産生Treg細胞のマクロファージへのR5 HIV-1感染抑制。第20回日本エイズ学会学術集会(東京)2006年11月

#### H. 知的所有権の出願・登録状況

- 1) 特許取得  
なし
- 2) 実用新案登録  
なし
- 3) その他  
なし

## 4. HIV 感染抵抗者で働く宿主遺伝子の同定と HIV 感染防御免疫の増強法

分担研究者 宮澤 正顯 近畿大学医学部免疫学教室 教授

研究協力者 金成 安慶 (近畿大学医学部 助手)

研究要旨 HIV 曝露に対し自然に免疫学的抵抗性を示す個体群の遺伝要因を明らかにすることは、有効な HIV 感染防御法開発の早道である。我々は、イタリアコホートの HIV-1 曝露非感染者とその感染パートナー間でマイクロサテライト遺伝子型の比較を行い、第 22 染色体の狭い領域で非感染者への特定アレル集積を見出した (AIDS 19:1015, 2005)。この染色体領域に存在する感染抵抗性遺伝子の実体を解明するため、昨年度までに DNA マイクロアレイを用いた網羅的な発現解析を行い、上記第 22 染色体領域の二つの遺伝子が、HIV 抗原刺激後曝露非感染者でのみ発現誘導を受けることを見出した。そこで今年度は、候補領域の詳細な単一塩基多型 (SNPs) 解析を行い、特定の既知及び新規 SNPs 遺伝子座で、曝露非感染者に有意な遺伝的偏りを見出した。更に、曝露非感染者群と HIV 感染者群間でゲノム DNA 塩基配列の網羅的比較を行い、マイクロアレイによる解析で曝露非感染者にのみ発現上昇を認めた遺伝子について、その下流領域に特定の塩基配列多型の集積を見出した。この領域に曝露非感染者に集積するのと同じハプロタイプを有する健常者の末梢血単核球は、試験管内で CCR5 指向性 HIV 株感染に対し抵抗性を示した。

### A. 研究目的

有効な HIV 感染防御法を開発するには、自然に感染抵抗性を示す個体群の遺伝要因を明らかにするのが早道である。HIV-1 感染の成立に対し抵抗性を付与すると考えられる宿主遺伝子として、これまでに HIV の細胞側受容体であるケモカインレセプターおよびそのリガンド分子の遺伝的多型や、マクロファージ・抗原提示細胞系の機能に関与するマンノース結合レクチン、DC-SIGN などの遺伝子多型が報告されてきた。しかし、ケモカインレセプター発現欠損の頻度は低く、イタリア・タイ・アフリカで把握されてきた HIV-1 曝露非感染者 (HIV-1-exposed seronegative individuals: ESNs) の多くは、CCR5 発現欠損では説明できない。我々はマウスレトロウイルス感染時の中和抗体産生を制御する宿主遺伝子 Rfv3 を第 15 染色体上にマップし、そのヒトオースログが存在すると考えられる第 22 染色体上の多型性マーカー遺伝子型を多数例で決定した結果、ESN

群と HIV-1 感染者群の間で有意に頻度が異なる複数の対立遺伝子型を見出した。さらに、これら第 22 染色体上の多型性マーカーについては、ESN 群のみに見出される連鎖不平衡の切れ目が存在した (Kanari Y et al. AIDS 19: 1015, 2005)。

HIV-1 曝露非感染者では、体内に HIV ゲノムが検出されないにもかかわらず、末梢血 T リンパ球が HIV-1 抗原特異的なサイトカイン産生を示し、粘液中に HIV-1 反応性の IgA 抗体産生が認められる。従って、上記の遺伝的解析の結果は、ヒト第 22 染色体上に、「最小限の HIV-1 曝露に対し強い防御免疫応答を誘導する遺伝因子」が存在している可能性を示唆する。そこで本研究では、ヒト第 22 染色体上の HIV-1 感染抵抗性遺伝子の分子実体を明らかにすることを目的に、網羅的な SNPs 遺伝子型の比較解析と、候補領域ゲノム DNA の塩基配列解析を行った。

## B. 研究方法

### 1) ヒト 22 染色体単一塩基多型 (SNPs) の網羅的解析

マウスレトロウイルス中和抗体産生制御遺伝子 (Rfv3) のマッピング領域に対応する、ヒト第 22 染色体の Mb 遺伝子から Pacsin2 遺伝子までの領域について、そこに存在する全ての既知 SNPs をデータベースから抽出し、白人における低頻度対立遺伝子の割合が 10~40%程度のもので選んだ。これらについて ABI Prism 7700 を用いた Taq-Man PCR 法により、ゲノム DNA を鋳型とする遺伝子型の決定を行った。得られた SNPs 遺伝子型については、Fisher's exact test による群間の頻度比較を行うとともに、Arlequin ver. 2001 を用いた EM アルゴリズムにより、遺伝子座間の連鎖不平衡頻度を推定した。

### 2) 感染抵抗性遺伝子候補領域の網羅的な塩基配列比較

曝露非感染者で末梢血単核球の HIV 抗原刺激後に発現上昇が認められた遺伝子、及び(1)の SNPs 解析において曝露非感染者群と HIV 感染者群の間にアレル頻度の有意な差が認められた遺伝子座の周辺について、ゲノム DNA 断片を高忠実度の long PCR により増幅し、各増幅断片内に塩基配列決定用のプライマーを設定して direct sequencing を行った。

### 3) 塩基配列多型の頻度解析及び連鎖不平衡解析

ゲノム塩基配列多型のアレル頻度を群間で比較するとともに、多型性遺伝子座間の連鎖不平衡の程度を解析するために、ダイナコム社の SNP 疾患関連解析ソフト SNPalyze ver. 5.1 を用いた。既知の SNPs 遺伝子型、及びゲノム塩基配列の決定により新たに見出した多型座位の遺伝子型頻度については、SNPalyze の case-control 解析機能を用いて、 $\chi^2$  検定と Akaike's information criterion (AIC) による有意差検定を行った。また、多型遺伝子座間の連鎖不平衡の程度は Likelihood ratio test により D 値、D' 値、及び r<sup>2</sup> 値を算出し、SNPalyze の画像表示機能により濃淡差の点描とした。

### 4) 末梢血単核球への HIV-1 感染実験

3) の解析により HIV-1 曝露非感染者への有

意な集積が明らかになった、第 22 染色体特定遺伝子領域の塩基配列多型ハプロタイプについて、同一地区未感染健常者の遺伝子型決定を行った。その結果、曝露非感染者と同一のハプロタイプを保有する健常者が少数見つかったので、これら「抵抗性に関連すると期待されるハプロタイプ」を持つ、或いはそれを欠く健常人の末梢血単核球に、in vitro で CCR5 指向性、または CXCR4 指向性 HIV-1 分子クローンを感染させた。その後、経時的に培養上清を採取し、上清中の HIV-1 p24 を ELISA 法により定量した。

(倫理面への配慮)

イタリアの HIV 感染状態非一致カップルコホートについては、現地病院倫理委員会による許可を受け、書面による研究目的の説明と署名による同意を得た上で、ゲノム解析・発現解析のための末梢血採血を行った。これら試料を用いたヒトゲノム遺伝子解析の実施については、近畿大学医学部ゲノム倫理委員会より許可を得た（「HIV 曝露非感染状態を制御する宿主遺伝子の解析」、平成 15 年 5 月 27 日許可）。

## C. 研究結果

### 1) 既知 SNPs の遺伝子型決定による群間の頻度比較

第 22 染色体 Mb 遺伝子から Pacsin2 遺伝子までの領域に存在し、白人でアレル頻度に有意な差が見出せると期待される SNPs について、イタリアコホートの曝露非感染者 74 名と HIV-1 感染者 77 名の遺伝子型を決定、対立遺伝子頻度を Fisher の正確確率計算法で比較検定した。図 1 には、遺伝子型を決定した SNPs のうち、セントロメア寄りの 2/3 の範囲に存在するものだけを示す。

調べた SNPs のうち、図 1 の Gene 3 近傍に位置する二つの SNPs と、以前の解析で群間の遺伝子型頻度に有意差を認めたマイクロサテライト遺伝子座 D22S423 近傍の一つの SNP で、曝露非感染者群と HIV-1 感染者群の間に有意なアレル頻度の差異が見出された。特に、Gene 3 のテロメア寄りに位置する SNP では、群間のアレル頻度差が際立っていた (P = 0.0043)。

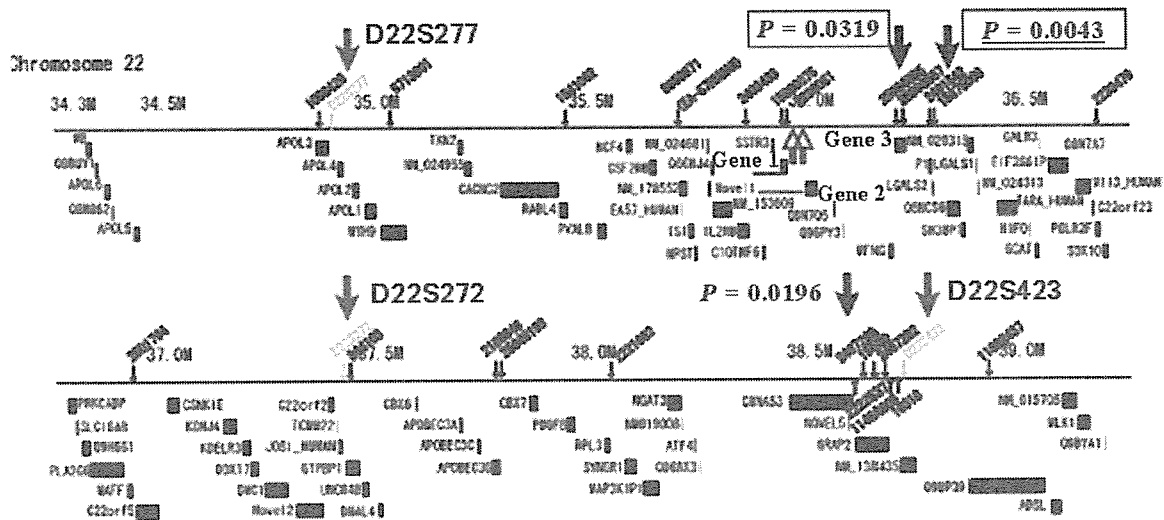


図1. 第22染色体 HIV 感染抵抗性遺伝子候補領域の SNPs 解析。  
 ■はこの領域に報告されている既知の構造遺伝子および open reading frames を示す。Gene 1, Gene 2 は、DNA マイクロアレイを用いた解析で、曝露非感染者でのみ HIV 抗原刺激後に発現上昇が見られた二つの遺伝子。D で始まる番号で示すのは曝露非感染者群と HIV-1 感染者群でアレル頻度に有意差が認められたマイクロサテライト遺伝子座。斜の番号で示すのは遺伝子型を決定した既知の SNPs で、そのうち曝露非感染者群と HIV 感染者群とで対立遺伝子の頻度差を認めたものを太い矢印と P 値で示す。Gene 1 と Gene 2 の間に示す上向きの矢印は、これら二つの遺伝子に共通の転写制御領域内に見出した新規の SNPs で、何れも曝露非感染者群と HIV 感染者群の間で対立遺伝子型の頻度が有意に異なる。

## 2) 感染抵抗性遺伝子候補領域の網羅的な塩基配列比較

SNPs 解析の結果、曝露非感染者で特異的に発現上昇の見られた Gene 1, Gene 2 に隣接した Gene 3 の一つのエクソン、及びその近傍の遺伝子間の SNPs に群間のアレル頻度の有意差が認められたので、Gene 1, Gene 2 の発現誘導に関連するようなゲノム塩基配列多型がこの領域にあるものと想定し、Gene 1 から Gene 3 に及ぶゲノム領域の塩基配列決定を行った。

既知 SNPs のアレル頻度に群間の有意差が認められた Gene 3 周辺については、複数の long PCR 断片について塩基配列置換の頻度差を比較したが、曝露非感染者群と HIV 感染者群で有意な頻度差のある多型座位の集積は認められなかった。但し、見出した塩基配列多型間の連鎖不平衡の程度を比較すると、曝露非感染者群で Gene 3 セントロメア寄り部分の多型座位 (SNPs) 間の連鎖不平衡がより強く、この遺伝子のセントロメア側に位置する小さな open reading frame (ORF-X と表記) にまで繋がるハプロタイプ構成が、曝露非感染者群にのみ明瞭に認められた。

Gene 2 領域についても同様にゲノム塩基配

列を網羅的に比較し、群間でアレル頻度差のある多型座位を複数見出したが、それらの高度な集積は見られず、特定のハプロタイプの集積は無いものと考えられた。

一方、Gene 1 領域のゲノム塩基配列の決定を行った結果、そのセントロメア領域に位置するエクソン 5 とエクソン 6 の間の領域、及びエクソン 7 からその下流にかけての領域に、曝露非感染者群と HIV 感染者群でアレル頻度が有意に異なる多数の塩基配列多型の集積を見出した (図 2)。アレル頻度の異なる塩基配列多型の集積領域 I と II の内部では、それぞれ多型座位間で強い連鎖不平衡が認められたが、その程度は曝露非感染者群の方が HIV 感染者群に比べて強く、更に曝露非感染者群では多型集積領域 I と II との間により強い連鎖不平衡が認められた。即ち、曝露非感染者群では多型集積領域 I と II を通じるハプロタイプ形成があった。

曝露非感染者群に集積の見られるハプロタイプについて、領域 I と II のそれぞれにつき HIV 感染者群と頻度比較を行ったところ、領域 I で  $P=0.0013$ 、領域 II で  $P=0.021$  と有意差があった。

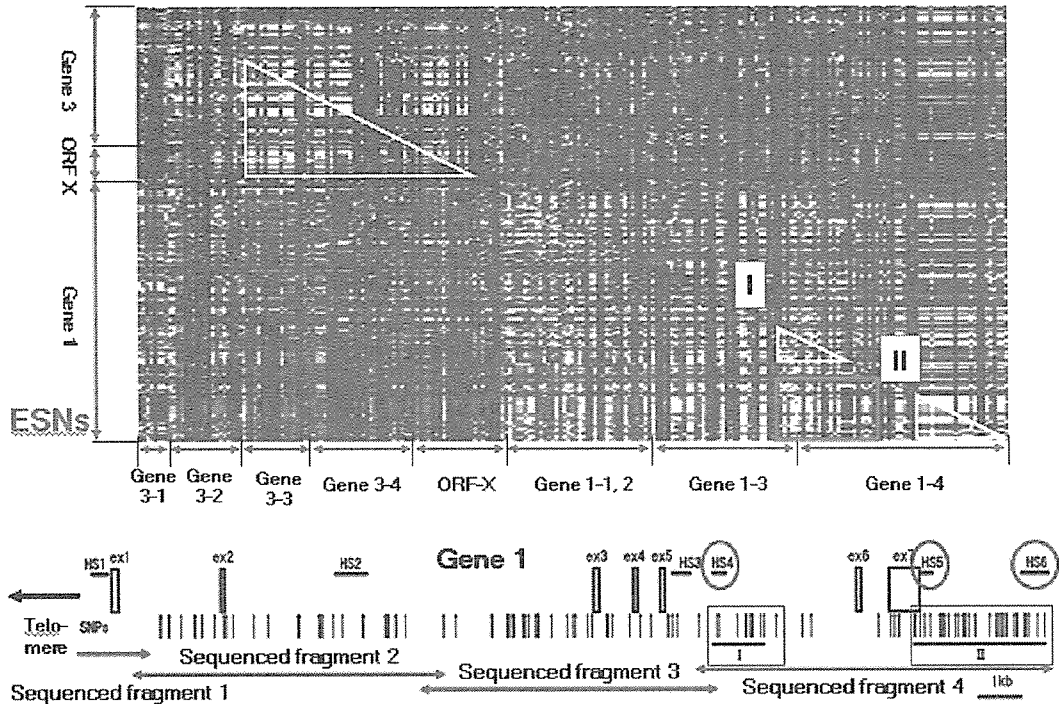


図2. 第22染色体ゲノム塩基配列の群間比較。  
 上半は、塩基配列決定により見出した既知及び新規の SNPs について、それら相互の連鎖不平衡の程度を図示したもの。ゲノム上の狭い領域における連鎖不平衡の解析であるため、D 値、D' 値では殆ど全ての多型座位間で強い連鎖が見られ、群間の差が明瞭とならない。そのため、ここでは  $r^2$  値について  $\chi^2$  検定を行い、得られた P 値を示す。ピクセルが青に近いほど連鎖は弱く、赤に近いほど連鎖が強い。下半は Gene 1 領域の塩基配列決定結果。Sequenced fragments は、ゲノム塩基配列の決定に用いた、互いに重複する long PCR 断片。ex1~ex7 は、この遺伝子のエクソン。細い矢印で示したのが塩基置換による多型の見られた座位で、そのうち I と II の口で囲んだ領域に、曝露非感染者群と HIV 感染者群でアレル頻度に有意な差のある塩基置換座位(赤矢印)が高度に集積している。HS1~HS6 は、この遺伝子領域について報告されている DNase I 高感受性部位で、○で囲んだ HS4 が多型集積部位 I と、また HS5 と HS6 が多型集積部位 II と重なっている。

### 3) Gene 1 領域に曝露非感染者に集積すると同じ塩基配列多型ハプロタイプを持つ健常人における CCR5 指向性 HIV の複製抑制

HIV-1 曝露非感染者コホートと同じトスカナ地方出身の HIV 未感染健常人について、同意を得て末梢血単核球の提供を受け、ゲノム DNA の塩基配列解析を行った。その結果、第 22 染色体上の Gene 1 領域に、曝露非感染者に集積していたのと同じ、即ち HIV-1 感染抵抗性に相関すると考えられる塩基配列多型ハプロタイプを持つ健常人を数名見出した。これら「抵抗性関連ハプロタイプ」を持つ健常人と、これを欠く健常人の末梢血単核球に CCR5 指向性または CXCR4 指向性の HIV-1 分子クローンを感染させ、経時的に培養上清中の p24 を定量した結果、大変興味深いことに「抵抗性ハプロタイプ」をホモ接合で持つ未感染健常人の末梢血では、CCR5 指向性 HIV-BAL の複製がほ

とんど見られなかった。これに対して、「抵抗性ハプロタイプ」を欠く、或いはこれをヘテロ接合で持つ健常人の末梢血では BAL の複製が進み、抵抗性ハプロタイプホモ接合の健常人末梢血であっても、CXCR4 指向性の HIV-IIIIB は複製が進行した。

### D. 考 察

我々はこれまでに、イタリアコホートの HIV-1 曝露非感染者コホートについて遺伝的解析を行い、第 22 染色体 22q12-13 領域の複数のマイクロサテライトマーカーについて、曝露非感染者群への特定アレル集積を報告してきた。また、マイクロサテライト遺伝子座間の連鎖不平衡解析により、曝露非感染者群にのみ 22q12-13 領域内での連鎖の切れ目を見出し、曝露非感染者の祖先でのみ、特定部位で染色体乗換えが生じていた可能性を指摘した。また、

昨年度までにこの領域の全ての既知遺伝子と ORFs を網羅した DNA マイクロアレイによる発現解析を行い、検索した 200 以上の遺伝子中、互いに隣接する特定の二つの遺伝子のみが、曝露非感染者でのみ、HIV 抗原刺激後に発現の上昇を起こすことを見出した。

今年度は、曝露非感染者を特長づける遺伝子多型の分子同定を目指し、第 22 染色体領域の SNPs 解析による候補遺伝子領域の絞り込みと、ゲノム塩基配列多型の解析による責任遺伝子の分子同定を行った。その結果、まず SNPs 解析で、曝露非感染者に特徴的な発現上昇を認められた遺伝子の近傍にアレル頻度の偏りを見出した (図 1)。結果の図中に Gene 3 として示した遺伝子については、そのエクソン中の coding SNP に有意な頻度差を認められたが、特定のアミノ酸配列多型が曝露非感染者に集積するものではなく、これまで観察してきた曝露非感染者の表現型を説明できるものとは考えられなかった。そこで、この Gene 3 から、曝露非感染者で発現上昇が認められた Gene 1 迄のゲノム領域を、互いに重複する long PCR 断片でカバーして塩基配列の決定と比較を行った。その結果、図 2 に示すとおり、Gene 1 領域に塩基配列多型の集積を認め、しかも曝露非感染者では、これら多型座位について特定のアレルの組がハプロタイプとして集積していた。

最初に解析した既知 SNPs について、昨年度までにマイクロサテライト遺伝子型の解析から見出したと同じ染色体部位に連鎖不平衡の切れ目が観察されたこと、曝露非感染者群と HIV 感染者群の間でマイクロサテライト遺伝子型に有意な偏りを認めた D22S277 から D22S423 の領域に、既知 SNPs の遺伝子型で群間の有意な頻度差を認めたこと (図 1) は、昨年度までの観察が単なる偶然ではなく、曝露非感染者群と HIV 感染者群の間に確かな遺伝的偏りが実在することを示す。

更に、網羅的なゲノム塩基配列多型の解析結果は、互いに連鎖不平衡を示す Gene 1 領域の多数の新規 SNPs について、曝露非感染者群に特定のハプロタイプが集積することを示している (図 2)。この前後の領域では、群間の遺伝子型頻度に有意差のある多型の集積が無いに関わらず、この領域にだけ、群間でアレル

頻度が有意に異なる塩基配列多型が高度に集積していることは、このハプロタイプの差こそが、HIV-1 曝露非感染状態の遺伝的基礎を説明するものであることを強く示唆する。

実際、未感染健康人で Gene 1 領域に曝露非感染者と同じ塩基配列多型のハプロタイプを持つ者では、その末梢血単核球が CCR5 指向性 HIV-1 分子クローンに対して感染抵抗性を示した (図 3)。これらの事実から、我々は HIV 曝露非感染者の分子遺伝学的要因に肉薄したものと考える。

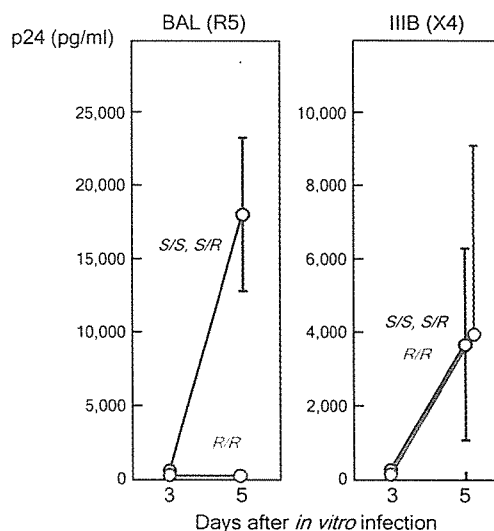


図3. HIV-1 曝露非感染者に集積する「感染抵抗性ハプロタイプ」を持つ健康人末梢血における HIV-1 の複製抑制。イタリコホートの曝露非感染者群と同じ地区出身の未感染健康人で、第 22 染色体上で曝露非感染者群に有意な集積を認めた Gene 1 領域の塩基配列多型ハプロタイプをホモで持つ者 (R/R) 2 名と、これを持たない (S/S) 或いはヘテロで持つ者 (R/S) 合計 6 名について、その末梢血単核球に *in vitro* で HIV 分子クローンを感染させた。CCR5 指向性の BAL、及び CXCR4 指向性の HIV-IIIIB 感染後に経時的に培養上清中の p24 を定量した結果を示す。各データのバーは S. E. M.。

## E. 結論

HIV 曝露非感染者の持つ第 22 染色体領域の遺伝的特徴を、特定の遺伝子の発現調節領域における塩基配列多型の集積としてほぼ同定した。抵抗性のハプロタイプを持つ個体では、CCR5 指向性 HIV-1 の初期複製が抑制される可能性が高い。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kajikawa M, Baba T, Tomaru U, Watanabe Y, Koganei S, Tsuji-Kawahara S, Matsumoto N, Yamamoto K, Miyazawa M, Maenaka K, Ishizu A, Kasahara M: MHC class I-like MILL molecules are  $\beta$ 2-microglobulin-associated, GPI-anchored glycoproteins that do not require TAP for cell surface expression. *J Immunol* 177: 3108-3115, 2006 .
- 2) Biasin M, Piacentini L, Caputo SL, Kanari Y, Magri G, Trabattoni D, Naddeo V, Lopalco L, Clivio A, Cesana E, Fasano F, Bergamaschi C, Mazzotta F, Miyazawa M, Clerici M: APOBEC3G: A possible role in resistance of HIV-exposed seronegative individuals. *J Infect Dis*, 2007. (in press)

### 2. 学会発表

- 1) Miyazawa M, Kanari Y: Host genetic factors that control immune resistance to HIV-1 infection. 7th AIDS Seminar in Kumamoto. September 2006, Aso, Kumamoto.
- 2) 宮澤正顯、北口大輔、湯浅貴恵、坂本真由美、小原 栄、俣野哲朗、森 一泰、木村彰方：ビルマ産アカゲザル MHC class II 領域のハプロタイプ構成と組換えの解析. 第 15 回日本組織適合性学会大会(東京)平成 18 年 9 月
- 3) Miyazawa M: Host genetic factors that control immune resistance mechanisms to HIV-1 and mouse retroviral infections. 近畿大学大学院医学研究科ハイテクリサーチセンタープロジェクト公開シンポジウム「細胞・組織工学を駆使した先端治療学の研究・開発」(大阪)平成 19 年 2 月

## H. 知的所有権の出願・取得状況

該当無し

## 5. 生体分子を介する HIV-1 感染抵抗性

分担研究者 神奈木 真理 東京医科歯科大学医歯学総合研究科 教授

研究要旨 CTL 誘導を目的としたワクチンでは、HIV-1 あるいは SIV の急性期のウイルス複製を減少させることができるが感染防御は達成されていない。その一方で、HIV-1 感染高危険群のヒトの一部に遺伝素因に依らない HIV-1 感染抵抗性を持つ個体がある。このような感染抵抗性は自然免疫による可能性が高い。しかし、HIV-1 感染免疫応答における自然免疫の役割についての知見は少ない。本研究は、HIV-1 感染防御の達成を目指し、自然免疫による HIV-1 防御機構を解明しこの誘導方法を開発することを目的とする。本年度は、自然免疫細胞を担うマクロファージおよび NK 細胞の相互作用を調べる培養系を作成した。健常者由来の末梢血単核球中の NK 細胞は NK 感受性標的細胞刺激に対して細胞傷害性を示すとともに IFN- $\gamma$  を産生する。付着細胞と非付着細胞の分離および再混合実験の結果、IFN- $\gamma$  産生はマクロファージ依存性であった。この系で、標的細胞に Nef を発現させると NK 細胞の細胞傷害には感受性であったが、NK 細胞からの IFN- $\gamma$  産生が著しく阻害された。さらにこの阻害がマクロファージを介することが分かった。NK 細胞による IFN- $\gamma$  産生は、その後の Th1 型の獲得免疫を促進する重要な役割を担っている。本研究結果は、Nef がこれを阻害する可能性を示している。また、本研究により今後自然免疫による HIV-1 防御機構を解析する実験系が得られた。Nef が発現促進あるいは抑制する責任分子については DNA アレイ解析結果から候補遺伝子を選出し現在研究を進めている。

### A. 研究目的

CTL 誘導を目的としたワクチンでは、HIV-1 あるいは SIV の急性期のウイルス複製を減少させることができる。しかし、感染防御は達成されていない。その一方で、HIV-1 その他の病原体に高頻度に曝されながら HIV-1 感染抵抗性のヒト集団が存在する。このような感染抵抗性は一部の個体では一過性であり、遺伝素因や獲得免疫に因るものとは考えにくい。本研究の目的は、HIV-1 感染防御の達成を目指し、これまでに知見の乏しい自然免疫による HIV-1 防御機構を解明し、この誘導方法を開発することである。本年度は、自然免疫細胞を担うマクロファージおよび NK 細胞の相互作用を調べる培養系を作成し、NK 感受性細胞に対するサイトカイン産生を指標として自然免疫応答を検定する実験系を作成した。この系を用い HIV-1 Nef の自然免疫系に対する影響を調べた。

### B. 研究方法

1) 健常人末梢血単核球(PBMC)、マクロファージ、およびNK細胞の調整

PBMC は非感染健常人末梢血から Ficoll-Hypaque 密度勾配遠心により分離した。PBMC 中の付着細胞を 5%ヒト AB 血清入り培地で一週間培養した monocyte derived macrophage をマクロファージとして用いた。非付着細胞に L-Leucine methyl ester hydrochloride (LME, Shigma) を添加し室温で 40 分処理することにより貪食細胞を除去したものを末梢血リンパ球 (PBL) として用いた。NK 細胞の精製は、磁気ビーズ法 (MACS、第一化学) を用いた CD56 陽性細胞のポジティブセレクションにより行なった。

2) NK 細胞機能の検定

PBMC あるいは分離したマクロファージ、NK 細胞を含む培養に K562 あるいは HIV-1 Nef 発現 K562 細胞を加え共培養した。細胞傷害活性は 6 時間の  $^{51}\text{Cr}$ -release assay で、培養上清中



へのサイトカイン産生は ELISA 法により測定した。

### 3) DNA アレイ解析

K562 親株、Nef 発現 K562 株、対照ベクター導入 K562 株の発現遺伝子を比較するため、それぞれの細胞株の cDNA について DNA アレイ解析 (Affymetrics) を行なった。

### 4) HIV-1 産生抑制の検定

HIV-1JR-CSF 株を感染させたマクロファージの培養に種々の TLR-リガンドを加え、培養 4-7 日後上清中の HIV-1 p24 量を ELISA により調べた。

(倫理面への配慮)

本研究では倫理面に配慮する実験を含んでいない。

## C. 研究結果

### 1) マクロファージと NK 細胞の相互作用

NK 感受性細胞 K562 を刺激細胞として健常人由来の PBMC と共培養し、サイトカイン産生を調べた。この結果、培養後 2 日で顕著な IFN- $\gamma$ 、MIP-1a、RANTES、TNF 等のサイトカインの産生が認められた。この後、IFN- $\gamma$  産生を指標として解析を進めた。PBMC から付着細胞および貪食細胞を除くと IFN- $\gamma$  産生は失われた。また、PBMC 中の非付着細胞だけでも IFN- $\gamma$  産生は認められなかった。しかし、付着細胞と非付着細胞を混合すると応答は回復した。非付着細胞から分離した CD56 陽性細胞を用いた場合も、付着細胞との共存下ではじめて IFN- $\gamma$  産生が認められた。これらのことから、NK 細胞の IFN- $\gamma$  産生はマクロファージとの協調が必要と考えられた。

### 2) Nef 発現細胞による NK 細胞からの IFN- $\gamma$ 産生抑制効果

この実験系に対する HIV-1 Nef の影響を調べるため、HIV-1 Nef を恒常的に発現する K562 細胞株 (K562/Nef) を用いて PBMC を刺激したところ、IFN- $\gamma$  産生は著明に抑制された。NK 細胞は K562 細胞に対して傷害性を示すことが知られている。そこで、次に K562 細胞の NK 感受性が Nef により影響されるかどうかを  $^{51}\text{Cr}$ -release 法を用いて調べた。その結果、K562/Nef 細胞に対する NK 活性と、親株 K562 あるいは LacZ を発

現した K562 細胞に対する NK 活性との間に有意差は認められなかった。K562/Nef 細胞の NK 感受性が保たれているにもかかわらず、K562/Nef 細胞が NK 細胞からの IFN- $\gamma$  産生効果を失っている現象は、複数の K562/Nef クローンを用いて確認した。

### 3) Nef によるマクロファージのサイトカイン産生抑制

マクロファージの産生する IL-12 および IL-18 が NK 細胞の IFN- $\gamma$  産生を促進することが報告されている。そこで、K562 細胞とマクロファージを共培養したところ、低レベルの IL-12 産生が検出された。しかし、K562 細胞を用いた場合にはこの応答も抑制されていた。

### 4) 責任分子の網羅的解析

そこで、NK 細胞の IFN- $\gamma$  産生あるいはマクロファージの IL-12 産生に影響する分子を探すため、対照 K562 細胞と K562/Nef 細胞の遺伝子発現の網羅的解析を行ない、いくつかの候補遺伝子が見つかった。

## D. 考 察

自然免疫の中にある HIV-1 感染防御機構を明らかにするため、これまでにあまり解析されていない自然免疫と HIV-1 の関係を調べる実験系の作成を行った。本年度は自然免疫の担い手であるマクロファージと NK 細胞を用いて相互作用をサイトカインを指標として検定する系を作成した。この実験系では、NK 細胞が標的細胞刺激に対してマクロファージとの協調作用により IFN- $\gamma$  を産生する。この系で、標的細胞に Nef を発現させると NK 細胞からの IFN- $\gamma$  産生が著しく阻害され、さらにこの阻害がマクロファージを介することが分かった。NK 細胞による IFN- $\gamma$  産生は、その後の Th1 型の獲得免疫を促進する重要な役割を担っている。本研究結果は、Nef がこれを阻害する可能性を示している。

Nef が発現促進あるいは抑制する責任分子については DNA アレイ解析結果から候補遺伝子が示唆されており現在研究を進めている。

今後、この系を用いてマクロファージおよび T 細胞への HIV-1 防御機構について解析を進めていく予定である。

## E. 結 論

NK細胞が標的細胞刺激に対してマクロファージとの協調作用により IFN- $\gamma$  を産生する。この自然免疫によるサイトカイン応答が、標的細胞の Nef 発現により著しく阻害されることが分かった。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kubo, M., Nishitsuji, H., Kurihara, K., Hayashi, T., Masuda, T., and Kannagi, M. Suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication by arginine deiminase of *Mycoplasma arginini*. *J Gen Virol*, 87: 1589-1593, 2006.
- 2) Nishitsuji, H., Kohara, M., Kannagi, M., and Masuda, T. Effective suppression of human immunodeficiency virus type 1 through a combination of short- or long-hairpin RNAs targeting essential sequences for retroviral integration. *J Virol*, 80: 7658-7666, 2006.
- 3) Hamamoto, S., Nishitsuji, H., Amagasa, T., Kannagi, M., and Masuda, T. Identification of a novel human immunodeficiency virus type 1 integrase interactor, Gemin2, that facilitates efficient viral cDNA synthesis in vivo. *J Virol*, 80: 5670-5677, 2006.

### 2. 学会発表

- 1) 林 隆也、古川裕之、西辻裕紀、増田貴夫、神奈木真理：HIV-1 Nefによる自然免疫系からのサイトカイン産生抑制に対する影響。第 54 回日本ウイルス学会（名古屋）2006 年 11 月
- 2) 西辻裕紀、小櫃冴美、林 隆也、斎藤沙織、佐藤洋子、清水揚子、神奈木真理、増田貴夫：HIV-1 インテグラーゼと宿主因子 Gemin2 との相互作用機構とウイルス複製。第 54 回日本ウイルス学会（名古屋）2006 年 11 月
- 3) 西辻裕紀、小櫃冴美、林 隆也、斎藤沙織、神奈木真理、増田貴夫：HIV-1 複製における SMN 複合体と Gemin2 アイソタイプの役

割。第 54 回日本ウイルス学会（名古屋）2006 年 11 月

- 4) 西辻裕紀、小櫃冴美、林 隆也、斎藤沙織、神奈木真理、増田貴夫：HIV-1 複製サイクルにおける HIV-1 integrase 宿主結合因子 Gemin2 の役割。第 20 回日本エイズ学会（東京）2006 年 11 月
- 5) 林 隆也、古川裕之、西辻裕紀、増田貴夫、神奈木真理：自然免疫系のサイトカイン産生に対する HIV-1 Nef の影響。第 20 回日本エイズ学会（東京）2006 年 11 月

## H. 知的所有権の出願・登録状況

- 1) 特許取得 なし
- 2) 実用新案登録 なし
- 3) その他 なし

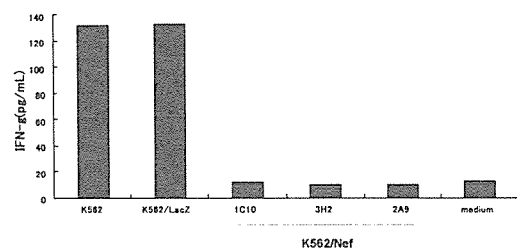


図 1. Nef 発現 K562 細胞クローンに対する IFN- $\gamma$  産生の低下  
健康人由来のマクロファージと NK 細胞との共培養に NK 標的 K562 細胞（親株、あるいは対照 LacZ 発現ベクター導入）を加えると IFN- $\gamma$  が産生されるが、Nef 発現 K562 細胞クローンに対しては IFN- $\gamma$  が著しく抑制された。

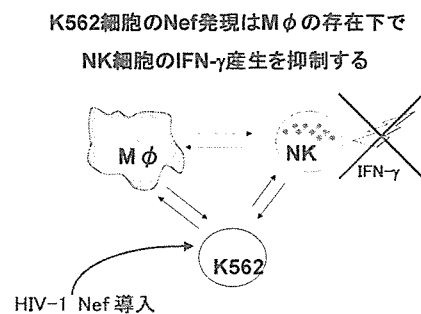


図 2. 自然免疫細胞間の相互作用と Nef による阻害の模式図  
NK 感受性 K562 細胞の刺激により、NK 細胞はマクロファージと協調して IFN- $\gamma$  を産生する。NK 細胞の産生する IFN- $\gamma$  産生は、抗ウイルス効果および獲得免疫の Th1 型へのシフトに重要な役割を果たすが、K562 細胞の Nef 発現はこれを抑制する。

## 6. CRF01\_AE 株由来 Gag タンパクにおける細胞障害性 T 細胞 (CTL) エピトープに関する研究

分担研究者 有吉 紅也 長崎大学熱帯医学研究所感染症予防治療分野 教授

研究協力者 Busarawan Sriwanthana (タイ国立衛生研究所研究員)

西村 生 (長崎大学熱帯医学研究所研究員)

研究要旨 タイにおける CTL 誘導型予防および治療ワクチンの開発に有用な CTL エピトープ情報を得るために、宿主 CTL 免疫とウイルスの相関関係を分子レベルで解明するのが本分担研究の目的である。CTL エピトープマッピング、CTL 免疫圧を受ける HIV ウイルスタンパクアミノ酸変異の同定、ウイルス抗原の細胞内プロセッシング評価ならびに宿主 HLA 多型、さらには宿主の臨床経過との相関といった包括的な CTL 研究を実施している。本年度は CRF01\_AE 株の Gag CTL エピトープ候補領域を新たに 6 箇所発見した。また、114 組 228 名の HIV 感染者の Gag アミノ酸配列を決定し HLA アリールとの相関関係を統計的に解析することにより、特定の HLA アリールと有意な相関のあるアミノ酸変異を 52 箇所発見した。このうち 29 箇所は既知の CTL エピトープ領域およびその近傍もしくは本分担研究の CTL エピトープマッピングより得られた CTL エピトープ領域およびその近傍に位置していた。残りのアミノ酸変異は 1) 連鎖不均衡、2) 免疫圧による 1 次変異の結果生じる Gag 機能障害を補足する 2 次的アミノ酸変異、3) 未知の CTL エピトープが近傍に存在していることが考えられた。本分担研究のような包括的アプローチにより CTL 情報は着実に蓄積されており、継続することにより将来ワクチン開発に有用な情報が得られる可能性がある。

### A. 研究目的

細胞傷害性 T リンパ細胞 (Cytotoxic T-Lymphocyte, CTL) は、宿主内の HIV 増殖抑制に重要な役割を担っており、また有効な予防的もしくは治療的ワクチンの開発に不可欠な免疫反応である。しかし、アジアに流行している CRF01\_AE サブタイプに関する CTL エピトープ情報は限られている。本分担研究の最終目標は、タイにおける CTL 誘導型予防および治療ワクチンの開発に有用な CTL エピトープ情報を提供することにある。

CTL 免疫反応による HIV 増殖抑制効果は宿主によって大きく異なることが知られている。これらは主に HIV ウイルス蛋白の多様性や宿主遺伝子 (特に HLA) の多様性によって決定されると考えられ、有効なワクチン開発には分子レベルでの CTL 情報が不可欠である。そこで、本分担研究の具体的な研究目的は、1)

CRF01\_AE 株の特にワクチン抗原として最も重要視される Gag 領域の CTL エピトープマッピングを行うこと；2) コホートを活用して臨床経過とエピトープ認識情報を関連付けること、特にエイズ進行遅延型 HIV 感染者に特徴的な CTL エピトープ認識パターンを明らかにすること；3) HLA 情報が揃った感染者の gag シーケンス解析を行い CTL 免疫圧とウイルス進化との関係を明確にすること；4) 同定された CTL エピトープの細胞表面上抗原提示効率の評価を加えることにある。

### B. 研究方法

#### 1) CTL エピトープマッピング

北タイ HIV 感染者 38 名の Gag アミノ酸配列情報を基にデザインされた 15-mer x 98 本の Gag オーバーラッピングペプチドを作成、このペプチドを認識して反応する  $\gamma$ IFN 産生リンパ

細胞を Elispot 法にて定量測定する。対象は、北タイランパン病院 HIV 外来に通院する抗 HIV 薬未治療で CD4 値 200cells/ $\mu$ l 以上の HIV 感染者を対象にした。本研究活動は現在も進行中である。

## 2) エイズ進行遅延型 HIV 感染者の CTL エピトープ認識パターン

上記の高 CD4 値を維持している未治療 HIV 感染者をエイズ進行遅延型 HIV 感染者候補とし、同感染者の CTL エピトープ認識パターンを 6 ヶ月毎に前向きに追跡し上記オーバーラッピングペプチドを用いた Elispot 実験を実施し、これらの感染者の CTL 認識パターンを継続的に観察する。本研究活動は現在も進行中である。

## 3) CTL 免疫圧とウイルス進化との関係

今回は、上記ランパン病院 HIV 外来にてリクルートされた HLA 情報がある双方が HIV に感染している夫婦 114 組を対象にした。臨床材料は 24 ヶ月の間隔を置いた 2 観測点より採取された末梢血リンパ細胞で、プロウイルス DNA の gag 領域のダイレクトシーケンスを行った。そして Gag タンパクの各ポジションにおいて優位なアミノ酸を決定し、それからの変異と HLA アリールとの相関をカイ二乗検定によって検索し、特定の HLA アリールによって影響を受けるアミノ酸配列、すなわち CTL 免疫圧がかかっている Gag 領域を検討した。各感染者の HLA 情報は PCR ベースの Microtitre-Plate-Hybridization (PCR-MPH) 法 (湧永製薬、広島県) にて決定した。

## 4) CTL エピトープの細胞表面上抗原提示効率の評価

CTL エピトープの細胞表面上抗原提示効率の評価を行うために Gag を発現させる Env 欠損/pac 遺伝子保有 HIV ベクター [Yokomaku et al. J Virol, 2004] へ、北タイ HIV 感染者由来 Gag クローンを組み込み、VSVG 発現ベクターと共に COS 細胞へトランスフェクションすることにより、VSVG タンパクをウイルス粒子表面抗原とする偽 HIV ウイルス粒子を作製した。これを CTL の標的細胞となる EBV で不死化され

た B 細胞ラインへ感染させ、peuromycin にて HIV ベクター感染 B 細胞のみを選択し、CRF01\_AE Gag を安定して発現する標的細胞の作製を試みた。今年度は、この実験系を繰り返し行っても B 細胞への感染に成功しなかったため、Gag 発現 HIV ベクターと VSVG 発現ベクターに加え、パッケージングシグナルを欠損する env 欠損 IIB 株 gag/pol 発現ベクターの 3 者を同時に COS 細胞へトランスフェクションすることにより、偽ウイルス粒子を構成する Gag タンパクを感染効率の高い IIB 株由来の Gag タンパクに置き換える実験を試みた。

(倫理面への配慮)

本分担研究にて活用した北タイ HIV コHORT は、2006 年 3 月に新たにタイ政府保健省医学研究倫理委員会にて承認され、承認内容の中に本分担研究の研究目的が含まれている。本研究に協力したすべてのコHORT 参加者から署名入り同意書が得られている。

## C. 研究結果

### 1) CTL エピトープマッピング

今年度は、北タイランパン病院 HIV 外来に通院する CD4 値 200/ $\mu$ l 以上の未治療 HIV 感染患者 76 名より Elispot 実験を実施した結果、これまでに認められなかった下記 6 箇所のペプチドに対する CTL 反応を検出した。

#### 1) Peptide #2 [11-25]

G K L D A W E K I R L R P G G

#### 2) Peptide #6 [31-45]

M K H L V W A S R E L E R F A

#### 3) Peptide #35 [176-190]

S E G A T P Q D L N M M L N I

#### 4) Peptide #38 [191-205]

V G G H Q A A M Q M L K E T I

#### 5) Peptides #41/#42 [211-221]

N E E A A E W D R V H P V H A  
E W D R V H P V H A G P I P P

#### 6) Peptide #84 [421-435]

M K D C T E R Q A N F L G K I

今後これらの反応を拘束している HLA の同定、さらには 9-mer レベルでの CTL エピトープの同定を試みる予定である。

## 2) エイズ進行遅延型 HIV 感染者の CTL エピトープ認識パターン

上記の 76 名の高 CD4 値を維持している抗 HIV 薬未治療感染者をエイズ進行遅延型 HIV 感染者候補とし、同感染者の CTL エピトープ認識パターンを 6 ヶ月毎前向きに追跡し上記オーバーラッピングペプチドを用いた Elispot 実験を実施した。この追跡実験は現在も進行中であり、全体の解析は 2 年度から 3 年度にかけて行う予定である。

## 3) CTL 免疫圧とウイルス進化との関係

HLA 情報の揃った HIV 感染夫婦 114 組 228 名 の 全 Gag 領域のダイレクトシーケンスを試みた結果、209 名について第 1 観測点における Gag シーケンス情報が得られた。さらに、このうち 161 名については、24 ヶ月後[平均間隔 19.8 ヶ月、幅 6~27 ヶ月]の第 2 観測点における Gag シーケンス情報が得られた。最低限の統計的パワーを得るために今回の解析は少なくとも 20 名以上の感染者が保有している HLA アリールを解析対象とした。図 1 にこれら対象となった HLA アリール頻度を示した。その結果、本研究で対象とした感染者群で優位な HLA アリール頻度は、A 遺伝子座においては HLA A\*11>A\*02>A:24>A\*33 の順で、また HLA B 遺伝子座においては B\*15>B\*40, B\*46>B\*27, B\*38, B\*51, B\*52, B\*58 の順で多いことが判明し、この対象群は一般的なタイ人の HLA アリール頻度 (Chandanayingyong et al. Mahidol J 7(1): 53-60, 2000) と合致することがわかった。

Gag タンパク全領域 498 アミノ酸の各ポジションにおいて優位なアミノ酸を決定し、上記の HLA アリールと有意な相関のある変異 (カイ二乗検定で p 値 0.01 以下) を検索した結果、52 箇所のアミノ酸変異が特定の HLA アリールと相関があることが判明した (表 1)。このうち 40 箇所は特定の HLA によって正の免疫圧 (すなわち、特定の HLA アリールを保有する感染者は変異が入る傾向にある) また、12 箇所は負の免疫圧 (すなわち、特定の HLA アリールを保有する感染者は変異が入らない傾向にある) 関係が認められた。

これら HLA に相関する Gag アミノ酸変異は、CTL によって免疫圧がかかっている部位、す

なわち CTL エピトープと密接な相関があると想定し、過去に報告された CTL エピトープ領域との位置について比較検討した結果、図 2 に示すとおり、p17 領域に 9 箇所 (図 2a)、p24 領域に 8 箇所 (図 2b)、p2/p7/p1/p6 領域に 4 箇所 (図 2c) の合計 21 箇所のアミノ酸変異が既知の CTL エピトープ領域内もしくはその近傍 5 アミノ酸以内に位置していた。(16 箇所は既知の CTL エピトープ領域内; 5 箇所は、CTL エピトープ領域近傍) さらにオーバーラッピングペプチドによって得られた新たな CTL エピトープ情報を考慮すると、さらに 8 箇所のアミノ酸変異が CTL エピトープと直接関連していることが判明した。

表 2 に既知の CTL エピトープ内に位置するアミノ酸変異について、それぞれ特定の HLA との相関の強さをオッズ比で表した。その結果、B\*58 の p24 の CTL エピトープ領域 [TSTLQEQIGW] に T242 変異と G248X に対するオッズ比がそれぞれ 89.44 (p<0.0001)、12.38 (p<0.0001) と最も強い免疫圧がかかっていることが判明した。次に強い圧力がかかっていたのが、B\*52 の S281X, B\*38 の A196X, B\*40 の E93X でいずれもオッズ比が 10 (p<0.0001) を超えていた。

次にこれら HLA A 遺伝子座と B 遺伝子座のアリール間の連鎖不均衡を検討した結果、本研究対象群においても、過去の報告と同様に A\*33 と B\*58 に強い不均衡があることが確認され、したがって A\*33 と B\*58 に共通して関連する Gag 変異 {T242X, G248X, T310X} は、ちょうど B\*58 CTL エピトープ領域内に位置することから、A\*33 側は連鎖不均衡によるものであることが判明した。

CTL 免疫圧によって 1 次的に生じたアミノ酸変異によって生じる Gag 機能障害を補うために 2 次的変異が起きていると想定し、それらの変異を検索するために、それぞれの HLA 関連変異と相関する Gag アミノ酸変異を調べた。その結果表 3 の結果が得られた。この中には、表 1 のアミノ酸変異が 16 箇所含まれていた。

## 4) CTL エピトープの細胞表面上抗原提示効率の評価

方法のなかで述べたように、CRF01\_AE 臨床

株由来の Gag/Pol タンパクで構成される偽ウイルス粒子では、B 細胞への感染効率が著しく悪いことが判明した。そこで、本年度は偽ウイルス粒子の Gag/Pol タンパクを感染効率のよい HXB2 由来の Gag/Pol タンパクで置き換えたところ、第 1 回目の実験で B 細胞への感染が FACS にて確認された。今後さらに同実験方法を行って CRF01\_AE 臨床株由来 Gag タンパク発現 B 細胞作製系の確立を試みる予定である。

#### D. 考 察

宿主 CTL 免疫とウイルスの相関関係を分子レベルで解明するためには、CTL エピトープ情報（すなわち T-cell receptor）のみならず、CTL 免疫圧を受ける HIV ウイルスタンパクのシーケンス情報、ウイルス抗原の細胞内プロセッシング情報（すなわち CTL エピトープ抗原提示効率）ならびに宿主遺伝子多型（HLA アリール）情報、さらには宿主の臨床経過に関する情報といった、多方面からの包括的研究が必要となる。本分担研究は、北タイの CRF01\_AE に感染した HIV 感染者の Gag タンパクに絞って包括的研究を実施している。

CTL エピトープに関する情報は、適切なオーバーラッピングペプチドを用いることにより着実に蓄積されてきている。本年度はさらに新たに 6 つの 15-mer ペプチドが認識されることが判明し、このペプチド内に新たな CTL エピトープが含まれている可能性が大きい。一方で、これらの CTL 情報を臨床的観点から意味付けるには、対象感染者をさらに長期的に経過観察しエイズ進行遅延型患者の CTL 認識パターンを明らかにすることが重要である。

本年度の最も大きな成果は、114 組夫婦を対象にした Gag シーケンス解析が完了したことであり、このことから特異的 HLA アリールによって拘束される CTL 免疫圧がかかるアミノ酸部位が多数特定されたことである。これら HLA に関連したアミノ酸変異情報と本研究でもさらに蓄積させている CTL エピトープ情報を組み合わせることにより、HLA で拘束される CTL によって HIV Gag タンパクがどのように変貌を遂げるのか、そのウイルスの進化の方向を推測するための情報の一片が得られたと

いう意味で今回の研究成果は大変意義がある。今後さらに個々の夫婦症例を細かく検討することにより、別の HLA 環境にウイルスがおかれた場合に先の変異がどのように変化するかを調べるのが可能になり、世代を超え蓄積される変異を解明してゆく予定である。さらに、個々の変異体有無と感染者の臨床経過との相関を調べ、臨床経過に影響を及ぼすアミノ酸変異の特定を試みる予定である。また、今回の結果から、これまで CTL エピトープとして報告のない領域に位置する HLA と相関のあるアミノ酸変異が複数見つかった。これらの変異は連鎖不均衡や 2 次的アミノ酸変異では説明ができないことから、そこにまだ報告されていない未知の CTL エピトープが潜在している可能性があると考えられた。

#### E. 結 論

- 1) CRF01\_AE の Gag オーバーラッピングペプチドを用いた Elispot 法により CTL エピトープ情報は着実に蓄積される。従って今後も同アプローチによってエピトープマッピングを継続することは意義がある。
- 2) 十分なサンプルサイズの感染者群を対象にシーケンス情報と HLA 情報を得ることにより、統計的手法で CTL 免疫圧のかかるアミノ酸変異を特定することが可能であることが判明した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Deforche K, Camacho R, Grossman Z, Silander T, Soares MA, Moreau Y, Shafer RW, Van Laethem K, Carvalho AP, Wynhoven B, Cane P, Snoeck J, Clarke J, Sirivichayakul S, Ariyoshi K, Holguin A, Rudich H, Rodrigues R, Bouzas MB, Cahn P, Brigido LF, Soriano V, Sugiura W, Phanuphak P, Morris L, Weber J, Pillay D, Tanuri A, Harrigan PR, Shapiro JM, Katzenstein DA, Kantor R, Vandamme AM. Bayesian network analysis of resistance

pathways against HIV-1 protease inhibitors. Infect Genet Evol, Nov 28, 2006

- 2) Wichukchinda N, Nakayama EE, Rojanawiwat A, Pathipvanich P, Auwanit W, Vongsheree S, Ariyoshi K, Sawanpanyalert P, Shioda T. Protective effects of IL4-589T and RANTES-28G on HIV-1 diseases progression in infected Thai females. AIDS, 20: 189-96, 2006
- 3) Snoeck J, Kantor R, Shafer RW, Van Laethem K, Deforche K, Carvalho AP, Wynhoven B, Cane P, Soares MA, Snoeck J, Clarke J, Sirivichayakul S, Cane P, Clarke J, Pillay C, Sirivichayakul S, Ariyoshi K, Holguin A, Rudich H, Rodrigues R, Bouzas MB, Brun-Vezinet F, Reid C, Cahn P, Brigido LF, Grossman Z, Soriano V, Sugiura W,

Phanuphak P, Morris L, Weber J, Pillay D, Tanuri A, Harrigan PR, Camacho R, Shapiro JM, Katzenstein DA, Kantor R, Vandamme AM. Discordances between interpretation algorithms for genotypic resistance to protease and reverse transcriptase inhibitors of human immunodeficiency virus are subtype dependent. Antimicrob Agents Chemother. 50: 694-701, 2006

H. 知的所有権の出願・登録状況

- 1) 特許取得  
なし
- 2) 実用新案登録  
なし
- 3) その他  
なし

図 1. 対象 HIV 感染者群における優位な HLA アリールの頻度

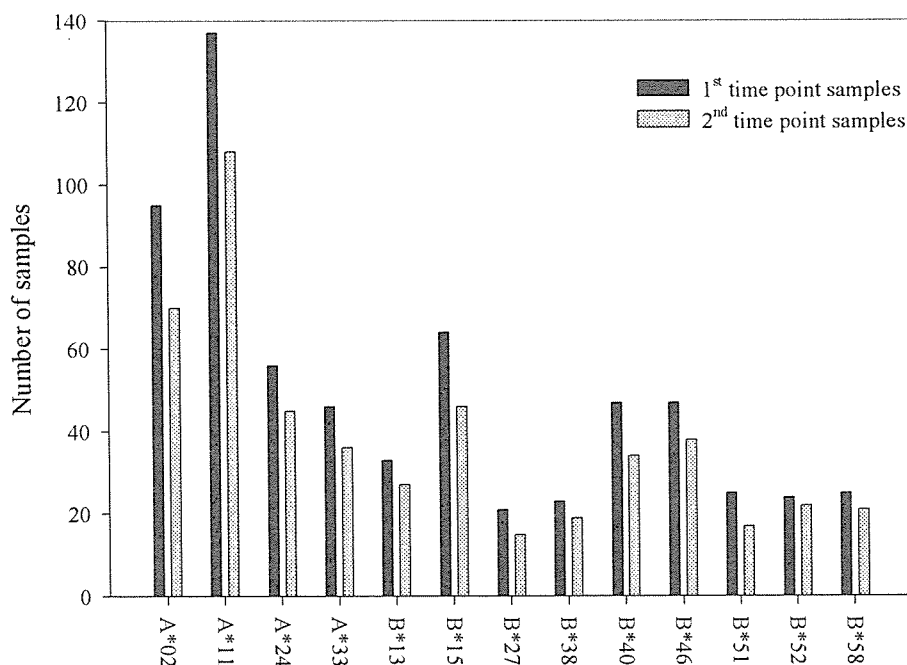


図 2. HLA と関連したアミノ酸変異と既知の CTL エピトープ領域

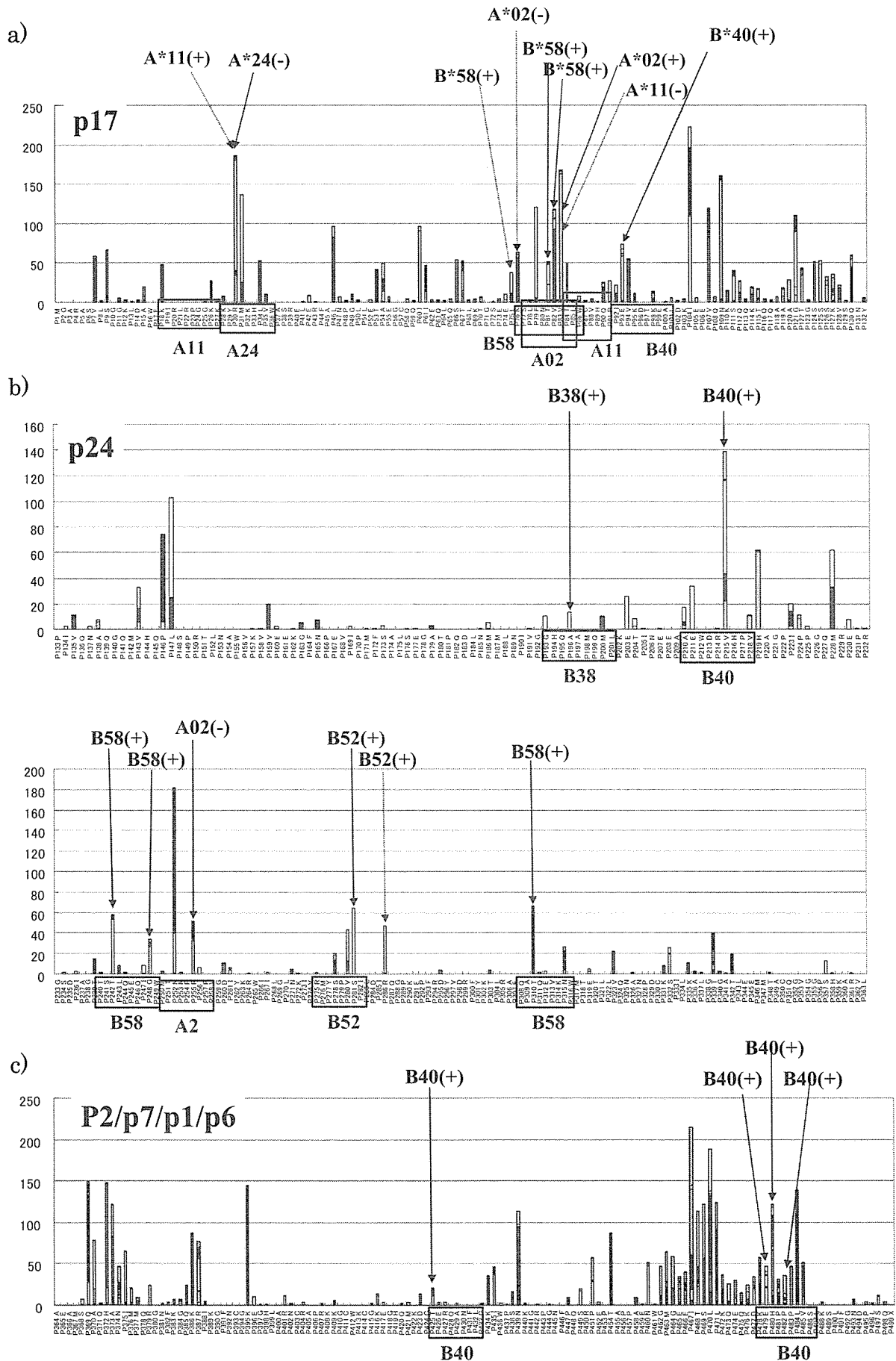




表 1. 特定の HLA と相関する Gag アミノ酸変異

HLA	HLA-associated variation site*		Total sites
	Positive selection	Negative selection	
A02	L46X, T53X, A54X, V83X	K76X, V82X, P255X	7
A11	R30X, I104X, P255X	V83X	4
A24	I60X, K76X, V82X, V83X	R30X, L46X, F79X	7
A33	T242X, G248X, T310X, N315X	K18X	5
B13	S9X, M228X, A374X		3
B15	I437X	H483X	2
B27	I60X		1
B38	A196X	L486X	2
B40	E93X, V215X, T427X, E482X, H483X, P485X	S281X	7
B46	F79X, V280X, V323X	T242X	4
B52	S281X, R286X		2
B58	L75X, T81X, V82X, M228X, T242X, G248X, T310X, V487X		8

\*変異部位は、HXB2 のアミノ酸ポジション情報を基にしている

表 2. 既知の CTL エピトープ内に位置する HLA 相関アミノ酸変異

Variation site*	HLA	Amino acid residue		Odds ratio**	Selection	p-value	HLA-specific epitope***	
		Mutant	Conserve					
R30X	A24	With HLA	18	83	7.67	-	< 0.0001	KY <b>K</b> LKHIVW
		No HLA	168	101				
T81X	B58	With HLA	15	31	3.87	+	0.0003	RSLYNT <b>V</b> ATLY
		No HLA	36	288				
V82X	A02	With HLA	37	128	2.26	-	0.0005	SLYNT <b>V</b> ATL**
		No HLA	81	124				
V83X	A02	With HLA	90	75	1.99	+	0.0012	SLYNT <b>V</b> ATL
		No HLA	77	128				
E93X	B40	With HLA	44	37	10.66	+	< 0.0001	IE <b>I</b> KDTKEAL*
		No HLA	29	260				
A196X	B38	With HLA	7	35	10.73	+	< 0.0001	GHQ <b>A</b> AMQML
		No HLA	6	322				
V215X	B40	With HLA	47	34	2.96	+	< 0.0001	AE <b>W</b> DRVHPV
		No HLA	92	197				
T242X	B58	With HLA	39	7	89.44	+	< 0.0001	T <b>S</b> T <b>L</b> QEQIGW*
		No HLA	19	305				
G248X	B58	With HLA	18	28	12.38	+	< 0.0001	T <b>S</b> T <b>L</b> QEQI <b>G</b> W
		No HLA	16	308				
S281X	B52	With HLA	27	19	11.02	+	< 0.0001	R <b>M</b> YSPTS <b>I</b>
		No HLA	37	287				
T310X	B58	With HLA	23	23	6.53	+	< 0.0001	Q <b>A</b> T <b>Q</b> D <b>V</b> KNW
		No HLA	43	281				
T427X	B40	With HLA	13	68	6.72	+	< 0.0001	T <b>E</b> R <b>Q</b> AN <b>F</b> L
		No HLA	8	281				
E482X	B40	With HLA	26	55	6.03	+	< 0.0001	K <b>E</b> LYPL <b>T</b> SL*
		No HLA	21	268				
H483X	B40	With HLA	50	31	4.95	+	< 0.0001	K <b>E</b> LYPL <b>T</b> SL
		No HLA	71	218				
P485X	B40	With HLA	21	60	3.54	+	0.0001	K <b>E</b> LY <b>P</b> L <b>T</b> SL
		No HLA	26	263				

\*変異部位は、HXB2 のアミノ酸ポジション情報を基にしている; \*\*Odd ratio は、プラスの免疫圧がある場合は、優位アミノ酸を有する感染者における特定 HLA アリール有無の比を変異体を有する感染者における特定 HLA アリール比で割ったもの、マイナスの免疫圧のある場合は、その逆で算出した; \*\*\*既知の CTL エピトープ配列と今回判明した HLA 関連変異が太字で示されている。

表 3. 各 HLA 関連 Gag アミノ酸変異と相関する Gag アミノ酸変異

Variable site	HLA	Linkage site		Total sites
		Positive correlation	Negative correlation	
S9X	B13	<b>M228X, A374X</b>		2
R30X	A11, A24	V7X, M31X, <b>L46X</b>	<b>I60X, I61X, V82X, V83X</b>	7
L46X	<u>A02</u> , A24	<b>R30X</b> , P453X	<b>I60X, V82X</b>	4
A54X	A02	T471X, S472X, K475X		3
I60X	A24, B27	<b>V82X</b>	<b>R30X, L46X</b>	3
L75X	B58	S66X, T67X, E74X, <b>V82X</b> , H219X, <b>T242X</b> , N252X, N315X, K436X, <b>V487X</b>		10
K76X	A02, A24	<b>V82X</b> , A120X		2
F79X	A24, B46	V7X, V159X, T204X, <b>P255X</b>	I61X, <b>V82X</b>	6
T81X	B58	W86X, T471X		2
V82X	A02, A24, B58	<b>I60X</b> , E74X, <b>L75X</b> , <b>K76X</b> , <b>T242X</b> , N441X, <b>V487X</b>	V7X, <b>R30X</b> , <b>L46X</b> , <b>F79X</b> , P453X	12
V83X	A02, A11, A24	G49X, I61X, T84X, R91X	<b>R30X</b> , I92X, <b>I104X</b> , Q369X, K397X	9
E93X	B40	I92X, <b>E482X</b> , <b>H483X</b> , V487X		4
I104X	A11		I61X, <b>V83X</b> , V94X	3
A196X	B38	L243X, N315X		2
V215X	B40	G193X, A210X, E211X, R286X, G466X, E467X, L486X		7
M228X	B13, B58	<b>S9X</b> , H219X, I223X, G248X, G464X, M465X	N252X, P255X	8
T242X	A33, B46, B58	<b>L75X</b> , <b>V82X</b> , V94X, K98X, <b>G248X</b> , <b>T310X</b> , <b>V487X</b>		7
G248X	A33, B58	H219X, <b>M228X</b> , <b>T242X</b> , G464X	N252X	5
P255X	A02, A11	F79X, N252X, I470X	M228X	4
V280X	B46	G163X		1
S281X	B40, B52	E203X, <b>R286X</b> , T303X, T310X, E419X, M465X		6
R286X	B52	V35X, G193X, V215X, S278X, <b>S281X</b> , T303X, E419X, Q476X		8
T310X	A33, B58	E203X, H219X, <b>T242X</b> , S281X, <b>N315X</b> , E319X	L34X, Q369X	8
N315X	A33	E74X, L75X, A196X, <b>T310X</b> , P-X*		5
V323X	B46	S125X		1
A374X	B13	<b>S9X</b>	Q369X, A370X	3
T427X	B40	Q112X		1
I437X	B15	K418X, R429X, K436X	K397X	4
E482X	B40	<b>E93X</b> , Q478X, <b>H483X</b> , <b>P485X</b>		4
H483X	B15, B40	<b>E93X</b> , K481X, <b>E482X</b>	L147X, N462X	5
P485X	B40	K479X, <b>E482X</b> , P-X*, L486X		4
L486X	B38	V7X, V128X, V215X, Q369X, R388X, T471X, K479X, K481X, P485X		9
V487X	B58	K28X, E74X, <b>L75X</b> , <b>V82X</b> , E93X, <b>T242X</b> , G464X		7

\* P484X と P485X の間の Proline は HXB2 には存在していない; 同じ HLA と相関のあるアミノ酸変異は太字でしめた。

## 7. HIV-1感染病態に関わる宿主遺伝子の解析

分担研究者 塩田 達雄 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨 HIV-1 感染症に関わる宿主因子について検討し、以下の知見を得た。1) タイ国ランパンの HIV-1 感染者ならびに HIV-1 感染者の性的パートナーである HIV-1 陰性者の CCR5 ならびに CCR2 遺伝子の多型を検討した。その結果、HIV-1 感染者の性的パートナーである HIV-1 陰性者の中に、CCR5 のコーディング領域内多型 CCR5 G316A と CCR2 のコーディング領域内多型 CCR2 V64I の両方の多型を同時に持つ者が多い傾向が認められ、これらの多型の組み合わせが HIV-1 感染抵抗性に寄与している可能性が示された。2) 旧世界サル細胞で HIV-1 の細胞侵入後に抗 HIV-1 作用を示すことが知られている TRIM5 $\alpha$  の HIV-2 に対する抗ウイルス作用を検討した。その結果、HIV-2 の株間で TRIM5 $\alpha$  への感受性が大きく異なることが明らかになった。そして、HIV-2 のカプシド蛋白の 120 番目のアミノ酸の置換により、HIV-2 の TRIM5 $\alpha$  に対する感受性が大きく変化することが明らかになった。

### A. 研究目的

HIV 感染症の病態進行は感染者ごとに大きく異なる。また、HIV-1 感染感受性自体にも個人差が存在する。本研究は病態進行や HIV-1 感染感受性の違いを決定する宿主側の因子を明らかにすることを目的とする。このような因子が明らかにできれば、各 HIV-1 感染者の予後予測に役立つだけでなく、その因子を標的とした新しい HIV-1 制御の戦略を提示できると考えている。本年度は以下の二つを具体的な研究目的とした。

1) HIV-1 の主要なコレセプター CCR5 のコーディング領域内の 32 塩基の欠失は HIV-1 感染感受性や病態進行に大きく影響するが、アジア人種には認められない。本年度は、タイ国ランパンのコホートにおいて HIV-1 感染者ならびに HIV-1 感染者の性的パートナーである HIV-1 陰性者の CCR5 ならびに CCR2 遺伝子の多型を検討し、アジア人種特異的な CCR5 コーディング領域内の変異が存在するか否か、存在した場合にその多型が HIV-1 感染に影響するか否かを明らかにすることを目的とした。

2) HIV-1 はカニクイザル、アカゲザル等の旧世界サルには感染せず、ワクチン開発の上で大きな障害になっている。アカゲザル、カニクイザルには SIVmac が感染できるが、SIVmac に近縁な HIV-2 は、株により旧世界サルの細胞で増殖できる株とできない株が存在する。TRIM5 $\alpha$  は旧世界サルの HIV-1 細胞侵入後の感染抵抗性因子として報告されたが、本年度は、各種 HIV-2 株のカニクイザル TRIM5 $\alpha$  に対する感受性を明らかにすることを目的とした。

### B. 研究方法

1) タイ国ランパンのコホートに登録された HIV-1 感染女性 347 名、ならびに HIV-1 感染者の性的パートナーである HIV-1 陰性の女性 74 名を研究対象にした。これらの感染者について CCR2 ならびに CCR5 のコーディング領域を PCR にて増幅し、その全塩基配列を DNA シークエンサー ABI3100 で決定した。

(倫理面への配慮)

HIV-1 感染者ならびに非感染者の検体を使用するにあたって、検体の提供者には遺伝子解析を行うことを含めて十分に説明を行い、書面に

よる同意を得られた場合のみを解析の対象とし、検体は匿名化して個人情報が特定できないようにして扱った。ランパンにおける HIV-1 感染者のコホート研究はタイ国政府の倫理委員会から 1999 年 12 月に承認を得た。

2) HIV-2 の株として、UC1、UC2、UC7、UC12、UC14、9421、12741、GH123 の 8 株を使用した。ヒトの CD4 陽性 T 細胞である Hut78 にカニクイザルの TRIM5 $\alpha$  を発現するセンダイウイルスを感染させ、これらの HIV-2 株の TRIM5 $\alpha$  感受性を検討した。

### C. 研究結果

1) タイ国ランパンのコホートに登録された HIV-1 感染女性 347 名、ならびに HIV-1 感染者の性的パートナーである HIV-1 陰性の女性 74 名の CCR2 ならびに CCR5 のコーディング領域の全塩基配列を決定した。エイズ病態進行の遅延と相関する CCR2 V64I の頻度は、HIV-1 感染者において 0.174、HIV-1 陰性者において 0.196 であり、両群間で有意差は無かった ( $P=0.535$ )。CCR5 のコーディング領域には、欧米人特異的な CCR5 の 32 塩基の欠失、欧米人、アフリカ人に認められる CCR5 m303、日本人、中国人に認められる 1 塩基欠失 CCR5 893 (-) はいずれも認められなかった。668 番目の G が A に置換 (223 番目のアルギニンがグルタミンに置換) する CCR5 G668A の頻度は、HIV-1 感染者で 0.017、HIV-1 陰性者で 0.034 であり、両群間で有意差は無かった ( $P=0.33$ )。316 番目の G が A に置換 (106 番目のグリシンがアルギニンに置換) する CCR5 G316A の頻度は、HIV-1 感染者で 0.01、HIV-1 陰性者で 0.02 であり、やはり両群間で有意差が無かった ( $P=0.391$ )。しかし、CCR2 V64I と CCR5 G316A の両者を持つ者の頻度は、HIV-1 感染者で 0.003、HIV-1 陰性者で 0.027 であり、有意差には達しないものの CCR2 V64I と CCR5 G316A の両者を持つ者が HIV-1 陰性者に濃縮されている傾向が認められた ( $P=0.08$ )。

2) UC1、UC2、UC7、UC12、UC14、9421、12741、GH123 の 8 株のカニクイザルの TRIM5 $\alpha$  に対する感受性を検討したところ、UC12 と GH123 の 2

株が感受性、それ以外の 6 株が耐性であった。各 HIV-2 株の TRIM5 $\alpha$  の標的されるカプシド蛋白質をコードするウイルスゲノムの塩基配列を決定したところ、感受性の株ではカプシド蛋白質の 120 番目のアミノ酸がプロリン、耐性の株ではグルタミンあるいはアラニンであった。感受性の GH123 株の分子クローンの 120 番目のプロリンをグルタミンあるいはアラニンに置換したところ、どちらの変異体も耐性に变化した。また、耐性の SIVmac の対応するグルタミンをプロリンに置換したところ、感受性が亢進した。

### D. 考察

1) タイ国ランパンの HIV-1 感染者ならびに HIV-1 感染者の性的パートナーである HIV-1 陰性者の CCR5 ならびに CCR2 遺伝子の多型を検討したところ、HIV-1 感染者の性的パートナーである HIV-1 陰性者の中に、CCR5 のコーディング領域内多型 CCR5 G316A と CCR2 のコーディング領域内多型 CCR2 V64I の両方の多型を同時に持つ者が多い傾向が認められ、これらの多型の組み合わせが HIV-1 感染抵抗性に寄与している可能性が示された。しかし、それらは HIV-1 陰性者の中のごく一部であり、CCR2 および CCR5 の多型の HIV-1 感染抵抗性への寄与はこのコホートでは大きくないことが考えられる。

2) HIV-2 のカプシド蛋白質の 120 番目のアミノ酸が TRIM5 $\alpha$  に対する感受性を決定していることが明らかになった。120 番目のアミノ酸は、カプシド蛋白質の 6 番目と 7 番目のアルファヘリックスの間のループの中であり、カプシドの外側に位置している。この 120 番目のアミノ酸を含むループが TRIM5 $\alpha$  と直接結合するものと思われる。現在、これらの HIV-2 株のカニクイザル以外のサルやヒトの TRIM5 $\alpha$  に対する感受性を検討している。

### E. 結論

1) CCR5 のコーディング領域内多型 CCR5 G316A と CCR2 のコーディング領域内多型