

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

研究課題：アジア及び太平洋地域における HIV 感染症の疫学に関する研究

課題番号：H15-エイズ-019

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

分担研究課題：日本人エイズ長期未発症者におけるエイズ発症に影響を与える遺伝学的・免疫学的要因の探索 - クレドをこえたウイルスにも有効な中和活性の解析

研究要旨

エイズの病期進行を制御する要因には遺伝的背景、ウイルス、免疫学的因子があげられる。HIV 感染血友病患者群はウイルス暴露時期が特定できるために、病期進行分類に基づく群間比較によりエイズの病期進行を制御する要因の解析に非常に適している。我々は日本人 HIV 感染血友病患者群コホートを解析し、西欧諸国の同様のコホート群と比較して有意に致死率が低い事をみいだした。日本人特有のエイズ長期未発症者におけるエイズ発症に影響を与える遺伝学的・免疫学的要因探索という研究のよりどころとなる重要な知見であると思われる。そのヒントとして、我々は複数の長期エイズ未発症者の血漿中にクレドをこえてウイルス複製を阻害する液性因子について検索を行い、独立の実験系でその存在を強く示唆する結果を得た。本研究の成果は日本人特有のエイズ病態の解明とエイズ予防・発症阻止法の開発につながる事が期待できる。

A. 研究目的

HIV に感染した方でエイズを発症していない患者が存在する。発症しない要因を究明することによってエイズ治療法の糸口が掴めると考えられる。このような症例を対象にした研究により、遺伝的背景 (CCR5d32 など)、ウイルス (nef 欠損株 など)、免疫学的因子などがエイズの病期進行に関与することが報告されている。この種の研究の多くはコホートによる解析であるが、コホートはその対象の差異 (地域格差、性差、遺伝的背景、感染ルート) により結果に違いがあることがまれではない。確実に複数のコホートで同じ結果が出ているのは、CCR5, CCR2, HLA-B52 など一部の要因に限られる。日本人特有の遺伝的背景あるいは日本人 HIV-1 感染者由来の抗エイズ因子についての研究は大きく遅れている。

日本では 1980～1985 年にかけて血液製剤によって HIV-1 が血友病患者に暴露された。その結果当時日本の血友病患者の約 40%、1431 名が感染した (資料により多少がある)。そのうち、現在までに 604 名 (感染者の約 41%、資料により多少がある) が死亡している。HIV-1 感染血友病患者群はウイルス暴露時期が特定できるために、病期進行分類に基づく群間比較によりエイズの病期進行を制御する要因の解析に非常に適している。また、定期的に通院するため、medical record が比較的豊富であるという利点もある。

本年度までに西欧諸国の同様な経緯を持つ同質の患者群に置ける長期フォローアップの結果が発表され、文献的にそれらを比較する土壌が形成されたため、本年度は日本人におけるエイズ病期進行について詳細な解析を行った。また、我々

は昨年度までに HIV seropositive 日本人血友病患者でエイズ未発症例の血漿中に含まれる抗 HIV-1 因子に着目してエイズ病期進行と相関する液性因子 (immune correlate) 探索を試みたが、その結果長期エイズ未発症者にクレードをこえたウイルスにも有効な高い抗 HIV-1 活性をもつ複数の症例を認めた。本年度は海外の検査機関と共同で、独立の検査機関による抗ウイルス活性調査を行った。

B. 研究方法

西欧諸国において 1980 年前後に凝固因子の異常を有する患者にたいして非加熱血液製剤により HIV-1 に感染した患者群の長期フォローアップに関する報告が近年になって著されたことから、これらの報告と 1980～1985 年に非加熱血友病第製剤で HIV1-1 に感染したと思われる日本人血友病患者群における致死率を比較し考察を加えた。報告は以下のものを検討した: Darby SC, Kan SW, Spooner RJ, et al. The impact of HIV on mortality rates in the complete UK haemophilia population. *AIDS* 2004;18(3):525-33. ; Lichterfeld M, Schmeisser N, Qurishi N, et al. Clinical outcomes of HIV-HCV co-infection in a large cohort of hemophiliac patients. *J Infect* 2005;50(3):221-8. ; del Amo J, Perez-Hoyos S, Moreno A, et al. Trends in AIDS and mortality in HIV-infected subjects with hemophilia from 1985 to 2003: the competing risks for death between AIDS and liver disease. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006;41(5):624-31. ; Arnold DM, Julian JA, Walker IR. Mortality rates and causes of death among all HIV-positive individuals with hemophilia in Canada over 21 years of follow-up. *Blood* 2006;108(2):460-4. Epub 2006 Mar 21.

1980～1985 年に非加熱血友病第製剤で HIV1-1 に感染したと思われる血友病患者群の中で 2000 年までにエイズを発症しなかったグループにクレードをこえたウイルスにも有効な高い抗ウイルス活性をもつ複数の症例が散見された。そのためこれを primary isolate-derived envelope を使用した TZM-bl を感染標的とした single round pseudotype assay にて評価した。Protocol および使用されたウイルスの詳細は Li M, et al., *J Virol.* 2005 Aug;79(16):10108-25. および Mascola JR, et al., *J Virol.* 2005 Aug;79(16):10103-7. を参照のこと。

(倫理面への配慮)

国立感染症研究所と荻窪病院の倫理委員会の審査承認を得て、患者の同意の上研究を遂行する。

C. 研究結果

オーストリア、イギリス、スペイン、カナダから報告された文献によると、1980 年前後に凝固製剤により HIV-1 に感染した凝固異常を有する患者における 15-21 年にわたるフォローアップで観察された患者の致死率は 61.5-67.7% であり、日本全体における同質の患者群の致死率である 42.2% にくらべて有意に高い事が分かった (表 1)。死亡原因に関する統計ではエイズ死が過半数を占め、次に C 型肝炎である。complication に関する統計においてはカンジダ症と *pneumocystis pneumonia* (PCP) が大半を占め、この傾向については西欧諸国と日本のコホートについて同様であった。日本全体と荻窪でのコホートデータを比較すると、荻窪での致死率 32.4% で、これを含めた日本全体が 42.2% であり、荻窪での患者群において致死率が低い事が判明した。

長期エイズ未発症グループにクレードをこえたウイルスにも有効な高い抗 HIV-1 活性をもつ複

数の症例が散見されたため、Duke University Dr. David Montefiori のグループに協力を仰ぎ一部の症例についてこれを primary isolate-derived envelope を使用した TZM-bl を感染標的とした single round pseudotype assay にて評価した (表 2)。その結果、我々の実験結果において抗ウイルス活性が検出されなかった HK0100、HH2740 では同様に抗ウイルス活性を示さなかった。抗レトロウイルス剤を服用している患者においてはどのウイルスに対しても同等の抗ウイルス活性を検出した (HH0980)。高い抗ウイルス活性としては 50% ウイルス複製阻害活性をあたえる血漿希釈倍率が 4 万を越える例が 4 例認められた。クレード B のウイルスに感染しているにもかかわらず、クレード A、C のウイルスに対する抗ウイルス活性が明らかに認められておりその 50% ウイルス複製阻害活性をあたえる血漿希釈倍率は 50 倍を大きく越えるものであった。

D. 考察

HIV に感染しても発症が遅延する原因を探索することは、感染が認められた後 15 年以上たった今にして可能となった研究であり、ウイルスがみつかって 15 年以上経ちウイルスの性質や宿主との相互作用に関する情報が蓄積した今こそ詳細な発症遅延研究が可能である。そもそも感染次期特定が困難である HIV においては、厳密には長期未発症に移行する割合が本コホートと他のコホートと高いかどうかを比較することは難しい。そのため、同様の理由でウイルスに暴露された患者群での致死率比較は貴重な情報である。致死率はエイズウイルス複製を制御する因子だけでなく、肝炎ウイルスや日和見感染症等などへの遺伝的免疫学的抵抗性の総和であるため、複数の要因が関与している事が考えられるが、西欧人種においては CCR5d32 のアレル頻度が高く、アジア人種では低い事、逆に CCR2V64I はアジア人種で多い

事、MHC アレル頻度も大きく異なる。各国における医療や衛生状況が一概に同じとはいえないが、おおむね先進諸国間におけるそれに大きな違いがないとすると、既知の抗発症因子だけでは観察された致死率の違いをうまく説明できないと思われる。よって、本データが示唆する事は日本人特有のエイズ長期未発症者におけるエイズ発症に影響を与える遺伝学的・免疫学的要因の存在である。荻窪での患者群において致死率が低い理由は年齢が低いため、あるいはインターフェロン療法などの使用、および抗レトロウイルス剤の使用に関する取り扱いが異なる事が一因と考えられる。いずれにしてもそれらが発症抵抗性の一つの要因となる事が判り、そのメカニズムを分子レベルで解明する事が出来れば日本人特有のエイズ病態の解明とエイズ予防・発症阻止法の開発につながる事が期待できる。

独立のアッセイでもクレイド B に暴露された individual に、広いクレイドに対して有効な液性因子の存在が指摘された。薬剤服用者における抗ウイルス活性をのぞき、血漿の抗ウイルス因子の titer を TZM-bl によるデータは本邦のアッセイ系のデータと $P < 0.01$ にて相関する結果であり、抗ウイルス活性のデータはその希釈倍率などがウイルスや細胞により異なるが、その絶対値が tire 1 virus とほぼ同程度である事も判明し、我々の結果の信頼性が担保されたと思われる。この結果は明らかにクレード B 感染日本人 HIV-1 感染患者において発症しない症例の原因の一つである可能性を示唆しているとおもわれる。これが欧米のコホートでそれほど見いだされないのは日本人特有の遺伝的背景があたえる免疫学的特質なのかもしれない。動物実験による重要な知見として、血清を 40 倍希釈してウイルス複製を 50% 抑制するとウイルス感染を 99% 防ぐことができる、との報告がある。当症例の希釈倍率は複数のクレード

でこれを上回るものであり、患者体内でウイルス複製を抑制する効果は十分得られているのではないかとの仮説に矛盾しない。プロテインAによる精製タンパク質分画において抗ウイルス活性が見られる事などからこの抗ウイルス活性が抗体に依存する事が強く示唆されている。複数のウイルス株の複製を抑制することができる中和抗体を誘導することによりエイズ治療・予防に役立てることができる。その意味において本症例に学ぶ事は多いと思われる。それはどのような抗原がこれら中和抗体を誘導したのか、これら中和抗体は何を認識しているのか、それはモノクローナルかポリクローナルなのか、などである。今後更なる検討を加えていきたい。

E. 結論

日本人HIV感染血友病患者群コホートを解析し、西欧諸国の同様のコホート群と比較して有意に致死率が低い事をみいだした。日本人特有のエイズ長期未発症者におけるエイズ発症に影響を与える遺伝学的・免疫学的要因探索という研究のよりどころとなる重要な知見であると思われる。日本人HIV感染血友病患者群における長期エイズ未発症者にクレードをこえたウイルスにも有効な高い抗ウイルス活性をもつ複数の症例を認め複数の評価系により確証を得た。本研究の今後の成果により、治療・予防ワクチン開発に貢献する事が期待できる。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Emiko Urano, Saki Shimizu, Yuko Futahashi, Makiko Hamatake, Yuko Morikawa, Naoko Takahashi, Hidesuke Fukazawa, Naoki Yamamoto,

Jun Komano. Cyclin K/CPR4 inhibits primate lentiviral replication by inactivating Tat/P-TEFb-dependent LTR transcription. (in submission)

- 2) Akihito Ryo, Naomi Tsurutani, Kenji Ohba, Ryuichiro Kimura, Jun Komano, Mayuko Nishi, Hiromi Soeda, Shinichiro Hattori, Kilian Perrem, Mikio Yamamoto, Joh Chiba, Jun-ichi Mimaya, Kazuhisa Yoshimura, Shuzo Matsushita, Mitsuo Honda, Akihiko Yoshimura, Ichiro Aoki, Yuko Morikawa and Naoki Yamamoto. SOCS1 is an inducible host factor during HIV-1 infection and regulates the intracellular trafficking and stability of HIV-1 Gag. (PNAS, in press)
- 3) Takeshi Yoshida, Yuji Kawano, Kei Sato, Yoshiharu Miura, Yoshinori Ando, Jun Aoki, Jun Komano, Yuetsu Tanaka, Yoshio Koyanagi. CD63 and its mutants disrupt CXCR4 trafficking to the plasma membrane and inhibit T-cell tropic HIV-1 entry. (Traffic in press)
- 4) Matsuda Z, Iga M, Miyauchi K, Komano J, Morishita K, Okayama A, Tsubouchi H. In vitro translation to study HIV protease activity. Methods Mol Biol. 375: 135-49. 2007. Review.
- 5) Kameoka M, Kitagawa Y, Utachee P, Jinnopatt P, Dhepakson P, Isarangkura-na-ayuthaya P, Tokunaga K, Sato H, Komano J, Yamamoto N, Oguchi S, Natori Y, Ikuta K. Identification of the suppressive factors for human immunodeficiency virus type-1 replication using the siRNA mini-library directed against host cellular genes. Biochem Biophys Res Commun. Aug 3; 359(3):729-34, 2007.
- 6) Shimizu S, Urano E, Futahashi Y, Miyauchi K, Isogai M, Matsuda Z, Nohtomi K, Onogi T, Takebe Y, Yamamoto N, Komano J. Inhibiting lentiviral replication by HEXIM1, a cellular negative regulator of the CDK9/cyclin T complex. AIDS. Mar 12; 21(5):575-82, 2007.
- 7) Futahashi Y, Komano J, Urano E, Aoki T, Hamatake M, Miyauchi K, Yoshida T, Koyanagi Y, Matsuda Z, Yamamoto N. Separate elements are required for ligand-dependent and -independent internalization of metastatic

potentiator CXCR4. Cancer Sci. Mar; 98(3):373-9, 2007.

8) Murakami T, Gottlinger H, Morikawa Y, Komano J, Ryo A, Sato H. Regulation of Gag trafficking and functions (Review) The Journal of AIDS Research. 9(2); 102-107, 2007.

2. 学会発表 (抜粋)

海外

- 1) Emiko Urano, Saki Shimizu, Makiko Hamatake, Yuko Morikawa, Naoki Yamamoto, and Jun Komano. Upregulating expression of cyclin K/CPR4 limits the replication of HIV-1. CSH Meeting on Retroviruses, May 22-27, 2007, Cold Spring Harbor, NY (poster)
- 2) Takeshi Yoshida, Yuji Kawano, Yoshinori Ando, Kei Sato, Jun Komano, Yoshiharu Miura, Yuetsu Tanaka and Yoshio Koyanagi . CD63 AND ITS MUTANTS INHIBIT FUSION OF CXCR4-CONTAINING VESICLES TO THE PLASMA MEMBRANE AND BLOCK X4 HIV-1 ENTRY. CSH Meeting on Retroviruses, May 22-27, 2007, Cold Spring Harbor, NY (poster)
- 3) Toru Aoki, Saki Shimizu, Urano Emiko, Yuko Futahashi, Makiko Hamatake, Kazuo Terashima, Tsutomu Murakami, Naoki Yamamoto , and Jun Komano, RERouting the plasma membrane targeting of HIV-1 and MLV gag by replacing myristoylation signal with membrane proteins. CSH Meeting on Retroviruses, May 22-27, 2007, Cold Spring Harbor, NY (poster)
- 4) Kei Miyagawa, Tsutomu Murakami, Yuki Ohsaki, Jun Komano, Toyoshi Fujimoto and Naoki Yamamoto. Analysis of interaction between HIV-1 Gag and tip47 and its associated proteins. CSH Meeting on Retroviruses, May 22-27, 2007, Cold Spring Harbor, NY (poster)
- 5) Kosuke Miyauchi, Rachael Curran, Erin Matthews, Jun Komano, Tsutomu Murakami, Naoki Yamamoto, Donald M Engelman, and Zene Matsuda. the specific phase of membrane-spanning helix of hiv-1 gp41 is critical for intracellular transport of env. CSH Meeting on Retroviruses, May 22-27, 2007, Cold Spring Harbor, NY (poster)
- 6) Jun Komano, Characterization of neutralizing antibodies purified from Japanese LTNP hemophiliacs, US-Japan Cooperative Medical

Science Program 20th Joint Meeting of the AIDS Panels September 13-14, 2007 & NHPM2007 Presentation at AIDS Panel: Sept 14, 2007, Monterey, CA

国内

- 1) 藤秀義、辰巳絢子、栗田明宙、駒野淳、星野忠次 : コンピュータ支援による HIV-1 治療薬の開発. レトロウイルス研究会夏期セミナー2007 プログラム 2007 年
- 2) 濱武 牧子 駒野 淳 浦野 恵美子 巖 馬華 中原 徹 堤 浩 宮内 浩典 森川 裕子 玉村 啓和 杉浦 亙 山本 直樹. HIV-1 インテグラーゼ阻害活性を有する6アミノ酸モチーフの同定とその抗ウイルス活性. 熊本エイズセミナー 2007 年、熊本
- 3) 駒野 淳 浦野 恵美子 巖 馬華 中原 徹 堤 浩 濱武 牧子 宮内 浩典 森川 裕子 玉村 啓和 杉浦 亙 山本 直樹. HIV-1 インテグラーゼ阻害活性を有する6アミノ酸モチーフの同定とその抗ウイルス活性. 第55回日本ウイルス学会学術集会 2007 年、札幌
- 4) Emiko Urano, Saki Shimizu, Makiko Hamatake, Yuko Morikawa, Naoki Takahashi, Hidesuke Fukazawa, Naoki Yamamoto, and Jun Komano. Cyclin K/CPR4 による HIV-1 複製抑制とそのメカニズムの解析. 第55回日本ウイルス学会学術集会 2007 年、札幌
- 5) Toru Aoki, Saki Shimizu, Emiko Urano, Yuko Futahashi, Makiko Hamatake, Hirokazu Tamamura, Kazuo Terashima, Tsutomu Murakami, Naoki Yamamoto and Jun Komano. Gag タンパク質の形質膜輸送シグナルがミリストイル化であることのウイルス学的意義について. 第21回日本エイズ学会学術集会, 2007 年, 広島
- 6) 浦野 恵美子、奥長 造之、森川 裕子、駒野 淳. Co-chaperone タンパク質 DNA J/HSP40 family による HIV-1 複製抑制. BMB2007 (第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会), 2007 年, 横浜
- 7) 濱武 牧子、二橋 悠子、青木 徹、山本 直樹、駒野 淳. Biophysical analysis of homotypic interaction facets that mediate the clustering of the G-protein-coupled receptor CXCR4 in the absence of SDF-1alpha. BMB2007 (第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同

大会), 2007年, 横浜

8) Toru Aoki, Saki Shimizu, Emiko Urano, Yuko Futahashi, Makiko Hamatake, Hirokazu Tamamura, Kazuo Terashima, Tsutomu Murakami, Naoki Yamamoto and Jun Komano. 非ミリストイル化 Gag を用いたレトロウイルス Gag の Vps 輸送経路を通過することによる影響およびそのウイルス学的意義. BMB2007 (第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会), 2007年, 横浜

9) 辰巳絢子、藤秀義、駒野淳、根矢三郎、星野忠次. HIV-1 の RNaseH を標的とした新規抗 HIV 薬の設計・評価・合成、日本薬学会第128年会, 2008年

H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表 1
Comparison of the death rates of HIV-1-seropositive coagulation disorder populations through the clotting factor concentrate

Country	HIV -1 infection	Follow up (years)	No. of patients	No. of death	Death rate (%)
UK	early 1980s	1985 - 2000 (15)	1246	812	65.2%
Austria	1970s	1985 - 2002 (17)	288	195	67.7%
Spain	late 70s - early 80s	1985 - 2003 (18)	585	354	60.5%
Canada	1982-1985	1982 - 2003 (21)	660	406	61.5%
Japan, total	late 70s-1985	1985 - 2006 (21)	1431	604	42.2% **
Japan, Ogikubo*	late 70s-1985	1985 - 2006 (21)	142	46	32.4% **

* The number of patients was included in Japan, total.

** $P < 0.001$ against each data from Western countries by Pearson's exact test.

表 2
The breadth of HIV-1 neutralization tested by a single-round pseudotype assay in TZM-bl cells

Pseudovirus	Clade	ID#	ID50 in TZM-bl cells ¹										
			HK0100	HH0380	HH0810	HH0980	HH1120	HH1270	HH1450	HH1460	HH1650	HH2220	HH2740
<i>Tier 1 virus:</i>													
SF162.LS	B	1404	<20	>43,740	13,595	866	235	5,830	>43,740	>43,740	>43,740	4,631	<20
<i>Tier 2 viruses:</i>													
6535.3	B	837	<20	158	124	229	<20	104	371	1,247	623	72	<20
QH0692.42	B	506	<20	95	43	242	27	52	157	28	84	<20	<20
PVO.4	B	1307	<20	<20	<20	200	<20	25	<20	<20	<20	<20	<20
REJO4541.67	B	636	<20	137	71	268	33	139	173	312	220	<20	<20
Du156.12	C	711	<20	90	45	229	21	26	50	80	82	<20	<20
Du172.17	C	1292	25	<20	41	262	43	28	20	78	<20	<20	<20
ZM197M.PB7	C	732	<20	105	49	332	43	45	181	43	123	21	<20
CAP210.2.00.E8	C	971	20	26	52	323	39	34	32	49	20	<20	<20
Q842.d12	A	1523	<20	<20	<20	188	<20	60	<20	29	23	40	<20
Q168.a2	A	654	<20	41	40	294	32	55	32	41	92	<20	<20
Q461.e2	A	659	<20	22	27	262	20	<20	<20	<20	31	<20	<20
Q769.d22	A	660	<20	30	35	278	<20	55	<20	31	48	<20	<20
GMT ²			11	39	37	255	21	43	38	53	51	14	10

健康人随性コントロール

抗レトロウイルス使用者コントロール

低中和活性保持患者

厚生労働科学研究費補助金（エイズ研究事業）
（分担）研究報告書

研究課題名：アジア・太平洋地域における HIV・エイズの流行・対策状況と日本への波及に関する研究
課題番号：
主任研究者名：武部豊
分担研究者名：花房秀次 荻窪病院 副院長・血液科部長

日本人血友病患者の HIV/AIDS 進行が遅い要因の研究

A. 研究目的

HIV に感染した血友病患者の中で感染から 20 年以上経過しても免疫が良好に保たれている長期未発症患者（Long term non-progressor: LTNP）の病態を検討することにより、HIV/AIDS の新しい治療法を開発することを目的とする。

B. 研究方法

荻窪病院 血液科を受診した血友病患者 553 名中、1985 年 1 月に登録されており、その後も定期的に追跡調査された血友病 HIV 感染者 133 名を対象とした。抗 HIV 剤の投与開始は原則として CD4<200 に維持した。1985 年以後、毎年定期的に CD4 数を測定した。CD4 数が 200 以下になるまでの期間、および死亡率を Kaplan-Meier 法を用いて検討した。

HIV に感染後 15 年以上を経過しても免疫が安定している長期未発症血友病患者（Long term non-progressor: LTNP）を対象としてウィルス検査を施行した。

慶應義塾大学微生物教室では、LTNP の血漿を用いて、HIV の増殖抑制効果を検討した。LAI 培養上清に患者血漿および希釈液を加え、37℃で 1 時間インキュベーションし、Donor PBMC120 ml (4 days, 8×10⁴ cells) を加え、37℃で 1 日培養後洗浄し、その後 2 日間培養して p24 抗原量を測定した。国立感染症研究所では、LTNP の血液から IgG を抽出し、HIV への中和活性を検討した。

また、以前に施行した LTNP の HLA-B alleles の解析、chemokine receptor 解析、cytokine 解析との相関を検討した。

本研究は HIV に関する調査研究であり、倫理面への配慮が重要であり、検査にあたっては研究に関する説明を文書で行い、対象各個人から書面による同意書を得ることとした。同意を得た患者から採血し、国立感染症研究所および慶應義塾大学微生物教室に検体を送付した。

C. 研究結果

1985 年 1 月 1 日に荻窪病院血液科に通院中の血友病 HIV 感染者は、133 名で、年齢の中央値は 14.8 歳（3.8 歳～43.3 歳）であった。133 名中、転居などによる脱落例が 9 名、2007 年 12 月までの死亡者は 43 名で死亡率は 32.3% であった。死亡者群の 1985 年における平均年齢は 16.1（2.4～57.3）歳であった。1985 年 1 月での年齢が 15 歳以上と 15 歳未満の群を比較検討したが、死亡率に有意な差は認めなかった。年齢別の死亡率は 1～14 歳までの群が 25%（15/61）、15 歳～34 歳の群が 35%（23/65）、35 歳～54 歳の群が 67%（4/6）55 歳以上が 100%（1/1）であった。

HIV 感染血友病患者において、CD4 数が 200 以下になるのは、中央値で 1995 年であった。死亡群では CD4<200 となったのは、4.3（0.5～18.3）年であった。現在、生存している群では CD4<200 となったのは 1985 年から 11.9（2.8～23）年後であった。

感染後 22 年以上を経過した 2007 年においても CD4>200 を保ち、無治療でいるのは 21 名で、その群の 1985 年における年齢は 14.3（6.3～27.5）歳であった。2007 年において生存して HIV 治療を受けている群は 69 名で、その群の 1985 年における年齢の中央値は 11.7（2.8～23）歳であった。

HLA-B allele の解析では、我が国の血友病 HIV 感染者で

は HLA-B*57 は認めなかった。B*27 の発現は LTNP で 2.4%、HIV 感染症が進行して HAART を受けている群では 18.4% であった。また、HLA B*5101 も LTNP との関連を認めなかった。一方、LTNP では、HLA-B*5401 の発現が有意に低かった。

Chemokine receptor の解析では、LTNP 群において CCR5-59653T/CCR2-64 I と RANTES-28G の発現率が高かった。

末梢血単核球 Cytokine 産生能について LTNP と HAART 群を比較したところ、LTNP において IL-1 beta, IL-12, IL-18 の産生が低下していたが、TNF-alpha, IL-6 は有意差を認めなかった。

慶應での検討結果では、LTNP の 2 名の血漿で LAI 株の増殖を抑制した。

国立感染症研究所駒野グループでの検討では、HIV env に対する中和抗体を測定した結果、LTNP 群の中に高い中和活性を示す患者を認め、詳細を確認作業中である。

D. 考察

今回の検討で、我が国の血友病 HIV 感染者の死亡率は諸外国に比べて有意に低いことが示された。各先進国における血友病 HIV 感染者の死亡率は、イギリスでは 2000 年までに 65.2%（812/1246 名）、オーストリアでは 2002 年までに 67.7%（195/288）、スペインでは 2003 年までに 60.5%（354/585）、カナダでは 2003 年までに 61.5%（406/660）と報告されている。一方、我が国の血友病 HIV 感染者全体の死亡率は 2006 年までに 42.3%*（604/1431）であり、荻窪病院の血友病 HIV 感染者の死亡率は 2007 年までに 32.3%*（43/133）であった。（*p<0.001）

海外では感染時の年齢が高いほど死亡率が高いと報告されている。今回、1985 年の年齢が 15 歳以下と 15 歳以上に分けて検討したところ、15 歳以上の方において死亡率が高い傾向にあったが、有意差はなかった（p=0.43）。各年齢別の死亡率をイギリスの報告と比較検討したところ、1985 年の年齢が、1-14 歳の群と 15-34 歳の群において死亡率の差が著明に低かった。

荻窪病院血液科では抗 HIV 剤の投与開始基準を常に CD4<200 と一定に保ち続けてきた。1996 年に HAART が導入され、早期治療が推奨されてきたが、HAART では血中の HIV DNA 量の変化が乏しく、数年でウィルスを排除できるとした当時の考えに否定的であることを学会等で指摘すると共に、1996 年において生存している血友病 HIV 感染者は進行が緩やかな群であり、進行が速い群を混ぜた性感染者とは異なるので、性感染者を対象としたコホート研究に基づいた治療開始基準は適応されないと考えてきた。さらに、HAART の長期副作用が深刻であること、CD4 数が低下しても HAART で CD4 数の回復は可能であること、当時の HAART では耐性変異が多いことなどを理由に挙げて治療開始基準を定めた。その結果、CD4 数が 200 以下となるまでの正確なコホート研究が可能となった。これほどの長期に及ぶ LTNP の正確なコホート研究は治療開始基準を一定に保った血友病患者においてのみ可能である。

先進国における血友病 HIV 感染は、USA での血漿を原料として感染した場合がほとんどで、HIV/AIDS の進行の差を検討するうえで、ウィルス側の要因は同一であり、死亡率の差は感染者側の要因によると考えられる。我が国の血友病患者での HIV 感染は 1970 年代末から 1985 年までに生じた

が、1983年が peak と考えられている。そうすると、荻窪病院での血友病 HIV 感染者は、HIV に感染後 CD4 数が 200 以下になるまでに平均 14 年と推測される。AIDS 発症までには、さらに多くの年数が加わり、性感染者の HIV/AIDS 進行よりも明らかに遅いと考えられる。

LTNP の中には感染後 20 年以上を経過しても血中 VL<50 copies/ml を保ち続けている elite controller もいるが、海外で報告されている HLA-B*57,27 は我が国の血友病 LTNP では関連を認めなかった。また、我が国の血友病 elite controller の中和抗体活性は高くなかった。このことから中和抗体以外にも強い HIV 抑制効果が働いていることが推測される。

これまでに我々は LTNP 群では CCR5-59653T/CCR2-64I と RANTES-28G の発現率が高いことや、LTNP 群は HIV 進行群に比較して HLA-B 1507 の発現率が高く、HLA-B 5401 の発現率が低いことを報告した。今後、これらの要因以外に CTL 活性などの細胞性免疫、HIV 増殖能の解析などを進めて新しい治療法の開発を検討することは大変有意義である。

今回の検討で LTNP の中に高い中和抗体活性が認められた感染者がおり、その中和抗体が他の HIV clades に対しても強い抑制効果を持つことは大変注目される。中和抗体の検討は使用する HIV や方法によって結果が異なる場合もあり、現在、統一された assay 法は確立されていない。しかし、LTNP の中に高い中和活性を示す感染者が複数認められ、慶應での異なる方法によっても HIV 増殖抑制効果が認められた。

一方、elite controller においては中和抗体の活性は高くなく、中和抗体以外の要因があると推測される。これら

の HIV/AIDS を抑制する因子が、日本人に限定された遺伝要素が関与しているのか、アジア人によるのかなども今後の検討課題である。アジアなどでの発展途上国では高価な濃縮製剤を使用した血友病患者は少なく、追跡調査は不可能である。アジア全体での性感染者 HIV/AIDS の追跡調査も必要である。

E. 結論

本研究グループでなされている LTNP の研究は我が国の血友病患者でしか行われておらず、意義あるものと判断される。

1) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

今後、わが国の血友病 HIV 感染者の HIV/AIDS 進行が諸外国に比較して著明に遅い要因を解明することは新たな治療方法の開発が期待される。中和抗体の解明が進めば、世界中の HIV clades に有効なワクチン開発も期待される。

2) 今後の展望について

さらに中和抗体以外の HIV 抑制因子を検討し、HIV 感染者の免疫進行を抑制する治療法の開発を検討する。

G. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

H. 知的所有権の出願・取得状況

現在のところ予定なし。

研究課題： アジア型 HIV-1 流行株の感染性分子クローンの樹立

分担研究者： 草川 茂（国立感染症研究所エイズ研究センター・主任研究官）

研究要旨

中国・東南アジアにおいて収集した HIV-1 臨床検体から分離したウイルスを材料に、トランスフェクションによって高い titer の感染性ウイルスを得ることができる感染性分子クローンを樹立した。本年度、中国雲南省で収集した CRF07_BC およびサブタイプ B'（アジア型サブタイプ B）の樹立に成功し、当地域における代表的なサブタイプ・CRF（流行型組換え体）についてクローンが整備された。これらは、当地域の流行株のウイルス学・免疫学的研究に有用なツールとなる。

A. 研究目的

これまでに我々は、中国および東南アジア諸国における HIV-1 感染者由来検体を入手し、分子疫学的解析を通してその流行の動態について明らかにしてきた。同時にそれらの材料から、ウイルスの分離を行ってきた。臨床分離株と異なり、感染性分子クローンからは高い titer のウイルスを容易に得ることができるだけでなく、得られたウイルスの塩基配列が均一なので、ウイルスの構造と機能の関連を調べるために有用である。さらにその DNA の組換えによって、ワクチン抗原の作製や HIV 感染モデルへの応用などにも期待できる。本年度は、中国における主要な流行株である CRF07_BC および B' の感染性分子クローンの樹立を行った。

B. 研究方法

中国雲南省において収集した臨床検体から分離した CRF07_BC 分離株 HH043 および B' 分離株 DH002 を感染させた PBMC からプロウイルス DNA を含む total DNA を抽出した。これをテンプレートにゲノムの 5' LTR から pbs までの約 800 bp および pbs から 3' LTR までの約 9000 bp を PCR 法によって増幅後、2LTR form のゲノムがより安定にクローニングできるよう開発した pBR322 ベースの TA クロ

ーニングベクター pBRTA2 にクローニングした。さらに多くのクローンをスクリーニングするため、NarI から nef に存在する XhoI サイトまでの領域を、新たに PCR で増幅した DNA と置き換えたゲノム完全長のクローンを多数作製した。これらのプラスミドを 293T 細胞にトランスフェクトし、その培養上清を PBMC に感染させ、感染性の有無を検討した。コレセプター使用能は、CD4 と CXCR4 または CCR5 を発現させた NP2 細胞におけるシンシチウム形成とウイルス産生を指標として決定した。得られた感染性分子クローンの全塩基配列を決定し、系統樹の作製、Similarity plot および Bootscanning plot 法で、そのサブタイプ・CRF を同定した。

（倫理面への配慮）

特になし。

C. 研究結果

1) HH043 (CRF07_BC)

gag 遺伝子から pol 遺伝子の RT 領域までのダイレクトシーケンスによって CRF07_BC と同定された臨床検体 HH043 から得たゲノム完全長を含む 120 クローンの感染性を検討したところ、PBMC に対する感染性を有するものが 2 クローン得られた（図 1）。コレセプター使用能を検討したところ、いずれ

も CCR5 をコレセプターとして使用する R5 ウイルスであった (図 1)。これらの全塩基配列を決定し系統樹を作製したところ、CRF07_BC の reference 株とクラスターを形成した (図 2)。さらにサブタイプ間組換え構造を解析したところ、その組換え構造が CRF07_BC の標準株 97CN001 と一致していた (図 3) ので、これらのクローン全長が CRF07_BC であると同定した。

2) DH002 (サブタイプ B')

gag 遺伝子から pol 遺伝子の RT 領域および env C2/V3 領域の解析でサブタイプ B' と同定された臨床検体 DH002 から得たゲノム完全長を含む 38 クローンの感染性を同様に検討した。その結果 2 クローンの感染性分子クローンが樹立できた (図 4)。これらは、いずれも CCR5 をコレセプターとして使用する R5 ウイルスであった (図 4)。これらのクローンの全塩基配列を決定し系統樹を作製したところ、いずれもサブタイプ B' reference 株とクラスターを形成した (図 5) ので、これらはサブタイプ B' であると同定された。

D. 考察

これまでに我々は、中国および東南アジア諸国における HIV-1 流行の分子疫学的解析を通して、当地域における流行が CRF01_AE、サブタイプ B' (アジア型サブタイプ B) およびサブタイプ C とこれらの間の組換え体 (CRF07_BC、CRF08_BC、CRF15_01B、CRF33_01B、CRF) として認められないユニークな組換え体) によることを明らかにしてきた。同時に PBMC との共培養法によってウイルス分離を行ってきた。近年、病原体の輸送、とりわけ国家間の移動が非常に困難になっている現在、これらの分離ウイルスは、東南アジアにおける流行株の解析を行う上で貴重な研究材料である。

HIV-1 のほぼ全ゲノムの cDNA を有し、哺乳動物細胞にトランスフェクトすることによって標的細胞に感染性を有するウイルスを産生する感染性分子ク

ローンは、臨床分離株と異なり、高い titer のウイルスを容易に得ることができるだけでなく、得られたウイルスの塩基配列が均一なので、ウイルスの構造と機能の関連を調べるために有用である。さらにその DNA の組換えによって、ワクチン抗原の作製や HIV 感染モデルへの応用などにも期待できる。また DNA 自体には感染性が無いため、移動の面でも分離ウイルスと比べて有利である。

アジア地域における流行株から樹立された感染性分子クローンは、これまでにインドにおけるサブタイプ C 分離株から樹立された IndieC1 がある。我々はこれまでに、CRF01_AE (93JP-NH1 (dual tropic) および 93JP-NH2env (R5))、サブタイプ B' (B106 (dual tropic & R5))、CRF08BC (HH040 (R5)) の感染性分子クローンを樹立してきた (図 6)。さらに CRF33_01B の感染性分子クローンについても入手した分離株を用いて研究が進行中であり、アジア地域における代表的なサブタイプ・CRF のほとんどについて感染性分子クローンが樹立できる。

当地域の流行株の感染性分子クローンの樹立できたことで、今後ウイルス学および免疫学的研究の基盤となる研究材料の整備、とりわけアジアをターゲットとしたワクチン研究のための抗原の作製や HIV 感染モデルの構築を進める予定である。

E. 結論

今年度、これまでに樹立したものに加えて、中国由来株の CRF07_BC およびサブタイプ B' の感染性分子クローンの樹立できたことで、当地域における代表的なサブタイプ・CRF のほとんどについて、ウイルス学および免疫学的研究の基盤となる研究材料のベースとなる感染性分子クローンが樹立できた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

An HIV-2-infected Japanese man who was a

long-term nonprogressor for 36 years.

Utsumi T, Nagakawa H, Uenishi R, Kusagawa S,
Takebe Y.

AIDS. 2007 Aug 20;21(13):1834-5

2. 学会発表

草川茂、上西理恵、内海孝信、長谷彩希、Huonan
Liao、小野木成美、林明男、永川博康、武部豊：HIV-2
感染後 36 年にわたる長期未発症例の同定とその解
析：我が国における最古の HIV 感染例

第 21 回日本エイズ学会学術集会総会、2007 年 11 月
廖華南、Kok Keng Tee、長谷彩希、上西理恵、Xiao Jie
Li、Nguen Tran Hien、草川茂、Pybus Oliver、武部
豊：アジアにおける CRF01_AE 伝播の年代推定

第 21 回日本エイズ学会学術集会総会、2007 年 11 月
上西理恵、正兼亜季、近藤真規子、長谷彩希、廖華
南、小野木成美、今井光信、上田幹夫、相楽裕子、
花房秀次、加藤真吾、草川茂、武部豊：CRF01 とサ
ブタイプ B からなる新規組換えウイルス (URF) の
同定とその公衆衛生上の意義

第 21 回日本エイズ学会学術集会総会、2007 年 11 月
H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

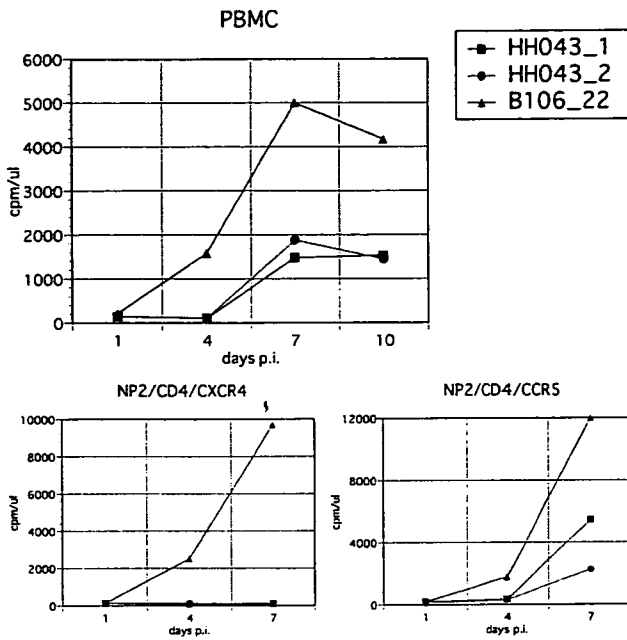


図1：CRF07_BC 感染性分子クローンの PBMC における増殖（上）とコアセプター使用能（下）

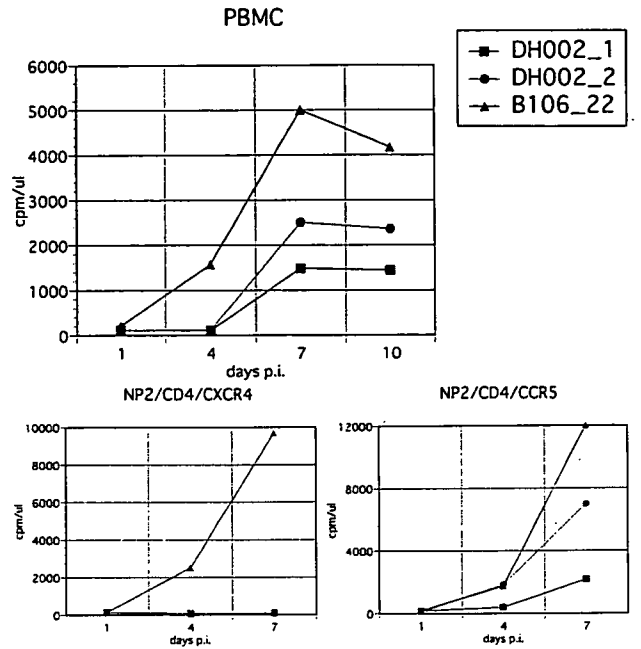


図4：サブタイプB' 感染性分子クローンの PBMC における増殖（上）とコアセプター使用能（下）

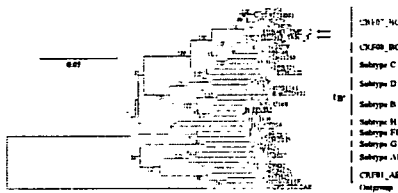


図2：CRF07_BC 感染性分子クローンの系統樹解析



図5：サブタイプB' 感染性分子クローンの系統樹解析

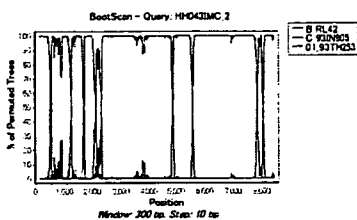


図3：CRF07_BC 感染性分子クローンのサブタイプ間組換え構造

Subtype	Strain	Country	Coreceptor usage
Subtype B'	B106	Myanmar	dual, CCR5
	DH002	China	CCR5
CRF01_AE	NH1	Japan	dual
	NH2#	Japan	CCR5
CRF07_BC	HH043	China	CCR5
CRF05_BC	HH10-10	China	CCR5

#NH1 の lat から env を組換えたもの

図6：中国・東南アジア地域の分離株から樹立した感染性分子クローン

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

平成18年度分担研究報告書

研究課題：HIV-1の高度薬剤耐性変異に関する分子集団遺伝学的解析

分担研究者：椎野 禎一郎（国立感染症研究所エイズ研究センター・主任研究官）

研究要旨

HIV-1の流行形成と病理の両方に重要な役割を持つゲノム多様性の維持機構を知るため、in vitro、in vivo、inter-hostにおける遺伝子配列変異の推移を調べ、分子集団遺伝学的手法を用いて多様性の維持に関わる様々な因子を解析した。in vivo例は、CRF01_AEの国内の家族内感染例NH3の逆転写酵素（RT）領域における高度・多剤耐性変異ウイルスの発生と消失過程に注目した。in vitro例は、NH3の解析結果を元にRT領域の耐性変異のもととなったと考えられるM41L, 69Ins, T69IとL210W, T215Yの2つのハプロタイプを持つ感染性クローンを作成し、さらにL210W, T215YについてはT69とW210間の約400ヌクレオチドの領域に存在する20個の制限酵素サイトに、それぞれアミノ酸配列を変えないように変異を導入し（NH1-RT Δ RS_WY）、これらの共感染競合実験を行った。inter-hostの例は、名古屋医療センターにて診療を受けた患者のうちHIV-1サブタイプBに感染した134名のRT領域配列を利用した。NH3のRT領域は、NH3-2期にM41L, 69Ins, T69I, L210W, T215Yのハプロタイプを持つ高度多剤耐性形質が生じたが、これらはフィンガー領域とパーム領域の変異群間の遺伝子組換えによって生まれた（ $p < 0.01$ ）。投与薬剤の変更の後には、provirusアーカイブ中のvariantに由来する野生型変異体が優勢となった。In vitro競合培養では、培養細胞において交叉点が明確な組換えウイルスを大量に発生させることが可能となった。得られたウイルスのクローン配列を解析したところ、組換え価は 1.8×10^{-4} /bp/dayと推定された。これらの塩基配列に加えて、NH3と同一家族感染者のNH1から採取されたenv C2V3領域のクローン配列および名古屋医療センターの検体から明らかになったRT領域配列を用いて、Coalescent theoryの手法を使い、多様性の維持に関わる因子であるpopulation mutation parameter ($4N_e\mu$)、population recombination parameter ($4N_e\rho$)、集団有効サイズ (N_e) およびTajimaのDを推定した。in vitro競合感染実験におけるRT領域では突然変異と組換えがNRTIの濃度にかかわらず一定の寄与割合であったが、in vivoでは採取時期によって大きく変動していた。RTで見られた変動は、C2V3領域では観察されなかったが、患者間の配列では、HARRTを開始している群において組換えの寄与が有意に高かった。有効集団サイズは、すべての解析で 10^2 オーダーであった。一方、TajimaのDによる自然選択圧の解析は、in vivoにおける耐性変異が発生した時期およびinter-hostの標本におけるHARRTを開始している群である遺伝子型にかかる選択圧が有意に高いことを示した。

A. 研究目的

HIV-1 のゲノム多様性は、流行形成と病理の両方に重要な役割を持っている。ゲノム多様性の主な要因は、各アミノ酸遺伝子座に生じる突然変異と、遺伝子座間の組換えによるハプロタイプの変異である。こうして生じた多様性の維持には、閉鎖的集団においては集団の有効サイズと自然選択圧が関わる。HIV-1 においては、突然変異率が極めて大きく、ウイルス生産量も大きいことが多様性を生んでいると考えられている。一方、HIV-1 では異なるゲノムを持つウイルスが共感染する際に、ゲノム間の組換えが高頻度で生じることも報告されている。HIV-1 の流行サブタイプの中に存在する、サブタイプ間組換え型流行ウイルス (circulating recombinant form: CRF) や、東アジアの流行地域でしばしば発見される unique recombinant form (URF) は、HIV-1 の組換えがある条件下ではかなりの頻度で生じることを示している。また、宿主内においては、こうした組換えが薬剤治療などの宿主環境の変化へのウイルスの適応に重要な役割を持っているという知見もある。しかし、宿主間・宿主内の HIV-1 の集団動態に、突然変異率・集団サイズ・遺伝子組換えがどの程度寄与しているかはあまり明らかになっていない。こうした現象の解明には、ウイルス変異形成過程におけるゲノムレベルの集団遺伝学的解析が有効である。本研究は、HIV-1 の組換えの宿主内での集団遺伝学的解析を通して、ウイルスゲノムの集団動態を解明することを目的とする。

B. 研究方法

宿主内、宿主間の様々な状況における集団動態を研究するため、本研究では以下の4種類の検体を解析に用いた。

1) CRF01AE 感染性クローン 93JP-NH1 と同系統のウイルス株に感染し抗ウイルス剤療法を受けた感染者 (NH3) の4期にわたる血液検体。それぞれ、NH3-1 (1993年採取) が感染初期、NH3-2 (1999年12月採取) が HAART 療法 (AZT+ddI → AZT+3TC+NFV or IDV) の失敗期、NH3-3 (2000年3月採取) が NRTI 耐性変異の形成を受けて薬剤療法を NNRTI (NVP) と PR 阻害剤 (SQV, IDV) に変更した直後、NH3-4 (2003年5月採取) が NH3-3 で選択した治療が継続している時期である。これらの血液検体を血清と PBMC に分画し、RNA と DNA をそれぞれ抽出、RT 領域 (624bp) を PCR により増幅したのちにクローニングし、各々32配列以上の塩基配列を得た。

2) in vitro 競合感染実験の経時サンプルより採取された RT 領域のクローン配列。競合実験は、以下の方法で行った。93JPNH1 をバックボーンにして M41L, 69Ins, T69I と L210W, T215Y のハプロタイプそれぞれを持つ2つの感染性クローンを作成し、さらに L210W, T215Y については T69 と W210 間の約400ヌクレオチドの領域に存在する20個の制限酵素サイトすべてのアミノ酸配列を変えないように変異を導入したクローン (NH1-RT Δ RS_WY) を作成した (昨年度の報告書を参照)。これらを HeLa 細胞に co-transfection して共感染実験用の混合ウイルス株 (LI:WY=60:40) を生成し、NP2 系の細胞に感染させ、上清を経時的に採取した。この際、培養液にさまざまな濃度の NRTI を加えた。上清中のウイルスの RT 遺伝子領域を高精度・低組換え率の RT-PCR で増幅したのち、DNA クローニングを行い1実験区あたり32本以上の塩基配列を決定した。

3) NH3 と同じ家族から提供された、NH1 血液検体より採取された、envC2V3 の86配列のク

ローン。これらの配列はすでに V3 領域のアミノ酸配列と coreceptor usage の関係が phenotypic に明らかになっている。

4) 名古屋医療センターを、2001年から2006年までに受診した HIV 感染者のうち、subtype B に感染した 134 検体の RT 領域の配列。これらの検体情報は、名古屋医療センター臨床研究センターの厚意により、塩基配列の形で提供を受けた。感染者は、HARRT を受けている群と未治療群に分類されていた。

得られた塩基配列は、ClustalW と人の手による多重アライメントを行ったあと、MEGA3 によって Tamura と Nei の方法による塩基置換推定を行い、近隣接合法による系統樹を作成した。組換えウイルスの存在は、bootscan 解析と subregion tree 解析 (配列の前 200bp と後 200bp を比較) で確認した。2つの subregion tree が異なる進化過程を経ていることの検定には、Incongruent length distance (ILD) test を採用し、PAUP4.0 を用いて行った。解析された配列は、これらの解析で明らかに出来た以上に組換えによってセグメント間で異なる過程を経ていたと考えられたため、これらのすべてを図示する目的で、phylogenetic network 解析を行った。In vitro 競合実験では、RT の 69 座位と 210 座位の間の中立遺伝子マーカーを詳細に解析することで、微小領域に生じた交叉数が計測可能である。このデータから、各遺伝子セグメントにおける交叉率を Kosambi の公式 ($y=1/2 \tanh 2x$) で補正した後、領域の塩基長と補正後の交叉率の関係を直線回帰することで 1日あたり 100bp あたりの割合に換算した。4種類の配列データは、coalescent theory の手法を用いた集団動態の解析に提供された。Population mutation parameter ($\theta=4N\mu$)、population recombination parameter ($\rho=4N\gamma$) は LDHat パッケージの pairwise プログラム

を用いて解析した。 θ の 95%信頼区間は、DnaSP プログラムを用いて推定した。 ρ の信頼区間は、LDHat の解析結果である coalescent likelihood の値が、最大値から 2 log 分減少した値の示す範囲をとって示した。集団有効サイズ (N_e) の推定は、 $\nu=3.0 \times 10^{-5}$ site/generation として、 θ の値から算出した。Tajima の D と D の 0 からの偏差の検定は、DnaSP プログラムを用いて行った。

(倫理面への配慮)

本研究で用いた検体は、すべて感染者の通院する病院の倫理委員会において研究の承認を得た上で、感染者本人に HIV-1 ゲノム情報の採取と利用に関するインフォームドコンセントを行った。

C. 研究結果

感染者 NH3 の血清中および PBMC より見出された RT 領域の塩基配列は、各採取時期の血清中のウイルスが別々の lineage を形成していた。一方、PBMC から取られたクローンの塩基配列は、系統樹の根元に位置した。そのうち、NH3-2 の時期に採取された配列は、NH3-1 と同じ cluster に属するもの (野生型)、M41L と 69Ins を持つもの (LI 型)、L210W、T215Y を持つもの (WY 型)、K70R、L210W を持つもの (RW 型) の 4 つの lineage に分類できた。組換え体解析の結果は、NH3-2 の血清中に見つかる多剤耐性変異株 (M41L, D67N, 69Ins, K70R, L210W, T215Y) が PBMC に見つかる LI 型と WY 型の lineage のウイルスの組換え体であることを強く示唆した ($P<0.01$ ILD test)。NH3-3 では多剤耐性変異の lineage は完全に消失し、NRTI 耐性変異を 1 個～5 個持つ新たな lineage の変異体に置き換わっていた。phylogenetic network 解析の結果、NH3-3 の変異は LI 型と RW 型のウイルスの間の組換え体であることが示唆された。NH3-4 ではこの lineage も消失し、NRTI 耐性変異を 0 個～2 個持ち挿入

変異を失った新たな lineage の変異体に置き換わっていた。この lineage では、すべての配列が Y181C の NNRTI 耐性変異を持ち、そのうち 7 個は K103N の NNRTI 耐性変異も持っていた。

210W・215Y の 2 つの NRTI 耐性変異を持つクローン元を、挿入変異部位 (69Ins) と 210W の間にある 17 箇所の制限酵素切断部位をすべて欠失させた変異クローン (NH1-RTΔRS_WY) を作成した。この制限酵素切断部位欠失クローンと、M41L, D67N, 69Ins, T69I を持つ感染性クローン (NH1-LI) を HeLa 細胞に co-transfection し、NH1-RTΔRS_WY/NH1-LI 混合株を作成した。NP2-CD4-CCR5 および NP2-CD4-CXCR4 を宿主細胞とした、NH1-RTΔRS_WY/NH1-LI 混合株の共感染・培養実験の結果、組換えウイルスは 3 日目の検体から低頻度で出現し、10 日目以降は高頻度に観察された。組換え RT の遺伝子型は、培養液中に NRTI が存在しないときには野生型が優勢であり、M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y (LIWY 型) の遺伝子型を持つ RT は NRTI の濃度に依存して選択を受けていた。得られた組換え体の塩基配列解析から、RT のこの領域 (約 400bp) の *in vitro* 系での組換え価は 1.8×10^{-4} /bp/day と推定された。

NH3 の *in vivo* 検体の RT 領域の配列・*in vitro* 感染実験の結果・NH1 の envC2V3 の配列・患者検体の RT 配列のそれぞれについて、Coalescent theory に基づいて population recombination parameter ($\rho=4Ner$) と population mutation parameter ($\theta=4Neu$) を推定した。この 2 つの推定値を用いて、集団の変異形成に関する点突然変異に対する組換えの寄与 (r/u) を検体の採取時期・薬剤環境・ウイルス性状等で比較した。NH3 の RT 領域に関する検体と感染実験を比較すると、*in vitro* では、薬剤濃度にかかわらず点突然変異に対する組換えの寄与は一定であったが、*in vivo*

では θ はほぼ一定であるにもかかわらず ρ は薬剤治療の失敗期に大きく成功期には少なくなっていた。HARRT を受けた患者と受けない患者の間の比較では、HARRT を受けた患者では ρ が有意に高かった。Env 領域の配列で、同様の比較を行ってみたが、coreceptor usage との関係はなかった。

HIV-1 の *in vivo* での世代あたりの突然変異率 (u) については、いくつかの推測がある。 u の推測値を $\theta=4Neu$ に当てはめれば、集団有効サイズ (Ne) が推定可能である。本研究では、Mansky L.M. and TEmin H. M. の 1995 年の推定値 ($u=3.0 \times 10^{-5}$ site/generation: J. Virol. 1995;69:5087-5094) を用いて、集団有効サイズの推定を行った。集団有効サイズは、すべての実験で誤差を入れても 10^2 の範囲にあり、ほぼ一定だった。また、NH3 の患者検体と感染実験では、それぞれ血中・上清中ウイルス量が AMPLICOA によって測定されたウイルスコピー数は $10^2 \sim 10^8$ /ml の範囲で上下していたが、集団有効サイズとは関係がなかった。

患者内、患者間で生じている自然選択圧の種類と大きさを、Tajima の方法 (1989) で解析した。RT 領域の NH3 の配列データでは、NH3-2 の時期 (高度薬剤耐性変異が優位だった時期) のみで D が有意に 0 より小さかった。また、患者間の配列データでは、HARRT を受けている患者で D が有意に 0 より小さかった。これ以外の検体では、D は 0 から有意に離れているとはいえなかった。D が 0 より有意に小さいことは、解析時の多様性の形成過程で一定の対立遺伝子が選択上有利 (または不利) であったことを示す。薬剤存在下での薬剤耐性変異の獲得過程には、当然のことながら自然選択が強く関わっていることが証明された。

D. 考察

NH3-2 の多剤耐性変異は、TAM 耐性変異に加えて 69 番サイトに 13 残基の大きな挿入変異があ

る。このハプロタイプを持ったウイルスは、AZT, ddI に対する強い耐性を持ち、その他の NRTI に対しても耐性を持つことがわかっている。この phenotype の完成には、少なくとも 4 箇所の・突然変異とひとつの挿入突然変異が必要であり、組換えが関与することで速い進化が期待できる。NH3 の各時期から得られたウイルスクローン配列の分子進化的解析は、NH3-2 以降の血清中のウイルスが、NH3-1 と NH3-2 期の PBMC にあるウイルスの組換えによって放散したことを示している。NH3-2 期の PBMC のウイルスのうち多剤耐性変異以外の型は、いずれも系統樹の枝が短いことから世代を重ねていないことが示唆される。このような PBMC 中のウイルスは、NH3-1 ~NH3-2 の間にリザーバー細胞に休止状態で残った「アーカイバ」の一部と考えられる。本研究の結果は、高度耐性変異はアーカイバの変異の遺伝子組換えによって宿主環境に最も適したハプロタイプを持つウイルスが選ばれて血液中に循環した結果であることを示した。実際、*in vitro* 競合実験では、すでにアーカイバにあるような変異を与えた場合には、薬剤の濃度を上げることで高度耐性変異が組換えによって速やかに発生し、集団中に広まることが証明された。

薬剤耐性ウイルスは一般に野生型に比べて増殖効率が落ちるため、薬剤の選択圧がない環境では急速に置換されることが予想できるが、この場合も再突然変異によるリバータントは出来にくい。*in vitro* 競合実験では、薬剤のない環境ではやはり組換えを経て野生型のハプロタイプが増えてくることが観察された。一方、感染者の体内においては、アーカイバの変異がより多様性に富むため事情は複雑になる。NH3-3, 4 では、NH3-2 の高度耐性変異を生んだのとは別の系統のハプロタイプから、野生型が生じている。また、NH3-4 の NNRTI 耐性変異は、点突然変異で起こってい

るように見える。薬剤耐性変異の生成における組換えの重要性についてはすでに多くの報告があるが、リバータントの生成をアーカイバの配列情報とあわせて観察した例は少ない。本研究の結果は、HIV-1 の circulate するウイルスの多様性と未来の進化過程には、過去に蓄積したアーカイバの多様性とその間で生じる組換えが大きな影響を及ぼしていることを明確に示している。

宿主内では、アーカイバ変異の関与により環境によって組換えの寄与率は変動することが予測できた。このことは、*coalescent theory* に基づく解析でさらに確認された。組換えの寄与は、*in vitro* では薬剤にかかわらず有利なハプロタイプの頻度にしたがって増えた。このことは、*in vitro* の系では、有利な変異が主に組換えによって形成されることを再度示している。一方、*in vivo* では多剤耐性変異の出現期にのみ大きくなっていった。これは、それ以外の時期、とりわけリバータントが出現した NH3-3 以降では組換えによる新規の変異よりアーカイバの多様性からの復帰が重要であるためであろう。にもかかわらず、感染者間を比較した観察では、HART を受けた感染者で組換えの寄与が高い。

多様性の形成を考える際、選択的に有利な変異が蓄積したのか、中立な変異が偶然固定したのかが論ずるのは重要である。*In vitro* 競合感染実験のように、多様性の形成に関わる対立遺伝子が限られ、かつ個々に解析が可能な状況であれば、なにかが‘有利’であるかを実験で証明することが可能である。実際、本研究ではこれらの変異の薬剤耐性能は調査しており、競合実験の結果と矛盾しない。しかし、*in vivo* の *quasispecies* は、はるかに多様なハプロタイプで形成されるため、選択圧の強さをウイルス学的に計測することは容易ではない。こうした場合、Tajima の方法のような *coalescent theory* に基づく解析法が強力な手

段となる。4種類の検体それぞれで計算された Tajima の D 統計量のうち、0より有意に小さい、すなわち特定の遺伝子型に選択圧がかかる状況にあるのは NH3-2 の血漿中と感染者間検体の HARRT を受けている者であった。これらは、組換えの寄与の大きな集団でもあり、見掛けの組換え率の上昇に選択圧が関わることを示している。これらの結果から、薬剤耐性の獲得に対する組換えの重要性は高いと考えられる。

$\theta=4N_e\mu$ に既知の μ である 3.0×10^{-5} site/generation を代入し、集団有効サイズ (N_e) が推定したところ、すべての実験で誤差を入れても 10^2 の範囲にあり、血中・上清中ウイルス量が大きく変動したにもかかわらずほぼ一定だった。今回の θ の推定値は、Charpentier らが 2006 年に行った同様の解析の結果とほぼ同じである。誤差はあるものの、HIV-1 は宿主内において 100~1000 個程度のウイルスゲノムでその多様性を維持しているらしい。これは、感染者体内の HIV-1 の産生量 ($0.68 \sim 2.07 \times 10^9$ 個/日) からすると、極めて少数であり、さらなる検討が必要であろう。また、これが確かなのであれば、HIV-1 の多様性を生み出しているのは、ウイルス量の多さではなく突然変異率そのものということとなり、薬剤療法やワクチン開発における宿主内変異への対策という観点から重要な知見となる。一方、有効集団サイズが小さいことは、自然選択が生じた際に有利な遺伝子型に置換する時間がかかることを意味する。In vitro 競合実験で、耐性変異の頻度が予想されたよりもゆっくり上昇したのは、HIV-1 の遺伝様式 (半二倍体様) のほかにこうした要因もあるかもしれない。

E. 結論

1. in vivo, in vitro 両方で、投与薬剤環境に適応したハプロタイプが遺伝子組換えによって生成されていることが確認された。

2. 感染者体内の HIV-1 の組換えの多様性への貢献度は、薬剤耐性変異の生成期に高かった。また、感染者間の解析では、HARRT を受けている感染者において高かった。
3. in vitro 競合実験では、組換えの貢献度は適応度の高いハプロタイプの増加に伴い上昇した。
4. RT 領域においては、in vivo, 感染者間の薬剤投与時の選択圧が存在していた。これらの結果から、選択圧がありかつ有利な遺伝子型がアーカイブ中不在の場合、HIV-1 のゲノム進化に組換えが重要な役割をもつことを示している。
5. 有効集団サイズは、すべての解析で 100~1000 の間にあった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

学会発表

椎野禎一郎、佐藤裕徳、保科佳美、山本直樹、武部 豊: HIV-1 の RT 領域における遺伝子組換え価と突然変異率の多様性への寄与 日本エイズ学会第 21 回大会 (広島)

T. Kaneda, S. Fujisaki, T. Shiino, K. Shimizu, K. Nakamura, J. Hattori, S. Fujisaki, S. Ibe, U. Shigemitsu, M. Hamaguchi, N. Mamiva and Y. Yokomaku: Identification of unique form of clade B HIV-1 in Nagoya, Japan. 4th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention, Sydney 2008

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

HIV-1 の分子疫学的研究
— 首都圏で流行している HIV-1 サブタイプ B の diversity —

分担研究者 近藤真規子 (神奈川県衛生研究所)
研究協力者 倉井華子、相楽裕子 (横浜市立市民病院)、岩室紳也 (厚木市立病院)
今井光信 (神奈川県衛生研究所)

研究要旨

日本で流行している HIV の特徴を明らかにするため、2004 年から 2006 年に主として神奈川県内の医療機関に来院した HIV 感染者 137 名の HIV-1 遺伝子について解析した。HIV-1 サブタイプは感染経路により特徴が見られ、同性間性行為感染ではほとんどがサブタイプ B である一方、異性間では CRF01_AE が 45% と最も多く、次いでサブタイプ B が 37% であり、全体ではサブタイプ B が 67%、CRF01_AE が 23% を占めた。RT 領域においてサブタイプ B の 24% が一つのクラスターを形成しており、近縁性の高いサブタイプ B の集団の存在が明らかになった。また、異性間性行為による日本人感染者では男女ともに 1994 年以降 CRF01_AE が増加し 2002 年までは男性感染者の 69%、女性感染者の 55% が CRF01_AE であったが、2003 年以降男性感染者においてサブタイプ B が増加していることを確認した。HIV 感染者に占める女性感染者の割合は低いものの、今後は女性においてもサブタイプ B の流行の拡大が懸念され、感染予防対策がますます重要と考えられる。

A. 研究目的

世界的に HIV の流行が大きな問題となっており、特にアフリカやアジアでの感染者が著しく増加している。日本においても HIV 感染者は年々増加しており、2003 年末には HIV 感染者と AIDS 患者の累積報告数が 1 万人を超え、年間の感染者・患者報告数が 1000 人を超えるなど、HIV 感染症の拡大傾向が加速しつつあり、HIV 流行の監視や予防対策がますます重要となってきている。

我々は日本で流行している HIV の特徴を明らかにし、流行の実態を把握するため、性行為による HIV 感染が急増し始めた 1990 年代前半より HIV のサブタイプ解析を継続して行っている。これまでの分子疫学的解析により明らかになった最近の流行および流行株の特徴について報告する。

B. 研究方法

1) 試料

2004 年から 2006 年に神奈川県内の医療機関に来院した HIV 感染者 137 名より得られた末梢血単核球 (PBMC) および血漿。

2) HIV-1 サブタイプの決定と流行の解析

HIV-1 感染者 137 名の検査試料から抽出された HIV-1 遺伝子を用いてサブタイプを解析した。すなわち、HIV-1 の *pol* 領域 (Pro, RT) および *env* C2V3 領域を nested PCR (あるいは RT-PCR) 法で増幅し、ダイレクトシーケンシング法で塩基配列を決定後

neighbor-joining 法による系統樹解析により、サブタイプを決定した。

2004 年から 2006 年の HIV 流行株間の *env* C2V3 領域における進化距離を MEGA3 ソフトを用いて計算し、リファレンス株および 2000 年以前の流行株の進化距離と比較した。

(倫理面への配慮)

主治医から患者に研究内容について説明を行い、研究への同意の得られた症例について研究を実施した。患者名はすべて記号化して扱っており、プライバシーの流出防止など患者の人権保護に十分配慮した。尚、本研究は当研究所の倫理委員会承認されている。

C. 結果および考察

2004 年から 2006 年に神奈川県内の医療機関に来院した HIV-1 感染者 137 名について、HIV-1 遺伝子の *env* C2V3 領域のサブタイプ結果を表 1 に示した。

HIV-1 サブタイプは感染経路により特徴が見られ、同性間性行為感染のほとんどがサブタイプ B である一方、異性間では CRF01_AE (45%) が最も多く、次いでサブタイプ B (37%)、その他、サブタイプ A、C、D 等 (18%) が検出された。しかし、異性間性行為による日本人男性感染者ではサブタイプ B が最も多く、全体の 58% を占めていた。

HIV-1 陽性判明年と異性間性行為による日本人