

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

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。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と期待される。

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。発症しない原因を究明することによってエイズ治療法の糸口が握めると考えられる。このような症例を対象にした研究により、遺伝的背景（CCR5Δ32 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 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%、1411 名が感染した。その

うち、現在までに 581 名（感染者の約 41%）が死亡している。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。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。

近年、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たため、日本と西欧諸国におけるエイズ病期進行について文献的比較を行った。また、エイズ病期進行と相関する液性因子（immune correlate）探索や NK レセプター多型の解析を試みた。

B. 研究方法

1980～1985 年に非加熱血友病第製剤で HIV-1 に感染したと思われる血友病患者群を、2000 年までにエイズを発症したグループ（Progressors, PR）、エイ

ズ未発症のグループ SP に分ける。HIV 陰性の血友病患者群(HIV(-), sero-negative, SN)を対象群とした。PR 群の患者は薬剤投与をうけているもの、死亡した例を含む。

1) 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た。検討した文献は以下の通り: 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 hemophilic 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.これらの報告と 1980-1985 年に非加熱血友病製剤で HIV-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。

2) 血漿における抗ウイルス活性を 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 Masciola JR, et al., *J Virol*. 2005 Aug;79(16):10103-7. を参照のこと。本実験は Duke 大学の Dr. Montefiori の協力により米国の同大学にて実施・評価された。

3) KIR の typing は日本人患者の HIV 抗体陽性症例で長期未発症例の PBMC から抽出されたゲノム

DNA を用いた。KIR の typing ではミルテニーバイオテック社の KIR typing kit を用いた。LTNR 群から 11 例、PR 群から 6 例を抽出し解析を行った。LTNR または PR 群に有為が高い頻度で陽性となる KIR アレルあるいは有為に低くなるものの存在について chi square test により統計学的な検討を行った。

(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

1) 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。

2) Duke 大学の報告によると、Tire 1 virus において 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 Tire 2 virus 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。

3) 日本人血友病患者における KIR 遺伝子座保有頻度について、2DS2 *00101-00103; *002-005, 2DS3

*00101-00103 が著しく低い事が明らかとなった。その他の遺伝子座はほぼ前例が保有頻度が高かった(表2)。統計学的に有意な差をもつ KIR 遺伝子座は存在しなかった。テストしたもののうち、以下の遺伝子座は P 値が 1 を下回った。2DL5 all *001-005, 2DLXa, 2DLXb (P=0.64), 2DL5B *00-004 (P=0.60), 2DS4 del *003, *004, *006, *007 (P=0.33), 3DS1 *010-014 (P=0.64)。

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。その意味で本コホートをを用いた研究は非常に意味のあるものと思われる。

1) 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。

2) 本研究により、中和抗体が発症遅延と関連している可能性が示唆されたが実際に発症遅延にどれだけ貢献しているかは明らかではない。その主な理由は中和抗体が発症遅延に関連するかを実験により検証することが困難だからである。中和抗体が発症遅延と関連していることを直接証明することは今後の検討課題として解析を続けたい。

3) 日本人における KIR 遺伝子座に関する解析はほとんど報告されておらず、本解析における血友病有病者群における KIR 遺伝子座の頻度を意義づけることは困難であった。エイズ発症と未発症グループで有意差をしめす KIR 遺伝子座が存在しなかったのは、分類が至適ではない可能性がある。今後は MHC クラス I との共因子解析や詳細な病期進行区分による解析とより多くの問者群を解析する事によりエイズ発症と関連する KIR 遺伝子座を明らかに出来るかもしれない。特に諸外国で報告のある 3DS1 にやや低い P 値が示された事は意義深い(Long BR et al., J Virol 2008; Boulet S et al., AIDS 2008;ほか)。日本人でも KIR3DS1 とエイズ発症に関連がある可能性をさらに解析する必要があると思われる。

E. 結論

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日本人血友病における HIV 感染者における致死率が有意に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遺伝学的・免疫学的要因が関与している重要な知見である。これらを同定することにより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と期待される。

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) Urano E, Kariya Y, Futahashi Y, Ichikawa R, Hamatake M, Fukazawa H, Morikawa Y, Yoshida T, Koyanagi Y, Yamamoto N, Komano J. Identification of the P-TEFb complex-interacting domain of Brd4 as an inhibitor of HIV-1 replication by functional cDNA library screening in MT-4 cells. FEBS Let (in press)

2) Hamatake M, Aoki T, Futahashi Y, Urano E, Yamamoto N, Komano J. Ligand-independent higher-order multimerization of CXCR4, a G-protein-coupled chemokine receptor involved in the targeted metastasis. Cancer Sci (in press)

3) Urano E, Aoki T, Futahashi Y, Murakami T, Morikawa Y, Yamamoto N, Komano J. Substitution of the myristoylation signal of human immunodeficiency virus type 1 Pr55Gag with the phospholipase C delta 1 pleckstrin homology domain results in infectious pseudovirion production. J Gen Virol (in press)

4) 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. AIDS. May 31; 22(9):1081-3, 2008.

5) Akihide 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. Proc Natl Acad Sci U S A. Jan 8; 105(1):294-9 2008.

6) Takeshi Yoshida, Yuji Kawano, Kei Sato, Yoshiharu Miura, Yoshinori Ando, Jun Aoki, Jun Komano, Yuetsu Tanaka, Yoshio Koyanagi. A CD63 mutant inhibits T-cell tropic human immunodeficiency virus type 1 entry by disrupting CXCR4 trafficking to the plasma membrane. Traffic. Apr; 9(4):540-58 2008.

7) 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. AIDS. May 31; 22(9):1081-3, 2008.

8) Akihide 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. Proc Natl Acad Sci U S A. Jan 8; 105(1):294-9 2008.

9) Takeshi Yoshida, Yuji Kawano, Kei Sato, Yoshiharu Miura, Yoshinori Ando, Jun Aoki, Jun Komano, Yuetsu Tanaka, Yoshio Koyanagi. A CD63 mutant inhibits T-cell tropic human immunodeficiency virus type 1 entry by disrupting CXCR4 trafficking to the plasma membrane. Traffic. Apr; 9(4):540-58 2008.

- 10) 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.
- 11) Kameoka M, Kitagawa Y, Utachee P, Jinnopat 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.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) Miyauchi K, Curran R, Matthews E, Komano J, Hoshino T, Engelman DM, Matsuda Z.: Mutations of conserved glycine residues within the membrane-spanning domain of human immunodeficiency virus type I gp41 can inhibit membrane fusion and incorporation of Env onto virions. *Jpn J Infect Dis.* 2006 Apr;59(2):77-84.
- 16) Miyauchi K, Komano J, Myint L, Futahashi Y, Urano E, Matsuda Z, Chiba T, Miura H, Sugiura W, Yamamoto N. Rapid propagation of low-fitness drug-resistant mutants of human immunodeficiency virus type 1 by a streptococcal metabolite sparsomycin. *Antivir Chem Chemother.* 2006;17(4):167-74
- 学会発表 (抜粋)
海外
- 1) Takeshi Yoshida, Yuji Kawano, Yoshinori Ando, Kei Sato, Jun Komano, Yuetsu Tanaka and Yoshio Koyanagi. A CD63 MUTANT INHIBITS CXCR4 TRAFFICKING TO THE PLASMA MEMBRANE AND BLOCKS X4 HIV-1 ENTRY. CSH Meeting on Retroviruses, May 18-24, 2008, Cold Spring Harbor, NY
- 2) Emiko Urano, Yuki Kariya, Yuko Futahashi, Makiko Hamatake, Yuko Morikawa, Takeshi Yoshida, Yoshio Koyanagi, Naoki Yamamoto, and Jun Komano. Identification of the carboxy-terminal domain of bromodomain containing 4 as a specific silencer of HIV-1 replication. CSH Meeting on Retroviruses, May 18-24, 2008, Cold Spring Harbor, NY
- 3) Toru Aoki, Saki Shimizu, Emiko Urano, Yuko Futahashi, Makiko Hamatake, Kazuo Terashima, Hirokazu Tamamura, Tsutomu Murakami, Yuko Morikawa, Naoki Yamamoto and Jun Komano. FUNCTIONAL SUBSTITUTION OF THE MYRISTOYLATION SIGNAL OF HIV-1 GAG WITH PHOSPHOLIPASE C DELTA 1 PLECKSTRIN HOMOLOGY DOMAIN. CSH Meeting on Retroviruses, May 18-24, 2008, Cold Spring Harbor, NY
- 4) 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
- 5) 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

6) Toru Aoki, Saki Shimiz, 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

7) 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

8) 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

9) 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

10) Saki Shimizu, Emiko Urano, Jun Komano, Yuko Futahashi, Kosuke Miyauchi, Maya Isogai, Zene Matsuda, Kyoko Nohtomi, Kazunari Onogi, Yutaka Takebe, Naoki Yamamoto. Inhibiting HIV-1 replication by HEXIM1, a cellular inhibitor of cdk9/cyclinT complex (P-TEFb), CSH Meeting on Retroviruses, May

23-27, 2006, Cold Spring Harbor, NY

11) Jun Komano. Characterization of neutralizing antibodies found in long-term non-progressors of Japanese hemophiliacs. 3rd Taiwan-Japan Symposium on HIV/AIDS, Center for Disease Control Department of Health. Spt7-9, Taiwan, R.O.C.

国内

1) Makiko Hamatake, Yuko Futahashi, Toru Aoki, Naoki Yamamoto, Jun Komano. Detection of ligand-independent higher-order oligomerization state of a G-protein-coupled receptor CXCR4 by BiFC/BRET. The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity Awaji 2008, 2008年、兵庫

2) Toru Aoki, Saki Shimizu, Emiko Urano, Makiko Hamatake, Kazuo Terashima, Hirokazu Tamamura, Tsutomu Murakami, Yuko Morikawa, Naoki Yamamoto, Jun Komano. Substitution of the myristoylation signal of HIV-1 Pr55Gag with PLC delta I pleckstrin homology domain results in fully infectious pseudovirion production. The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity Awaji 2008, 2008年、兵庫

3) Emiko Urano, Yumi Kariya, Makiko Hamatake, Hidesuke Fukazawa, Yuko Morikawa, Yoshio Koyanagi, Naoki Yamamoto, Jun Komano. P-TEFb complex-interacting domain of Brd4 inhibits HIV-1 replication through restricting Tat-mediated enhancement of LTR promoter activity. The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity Awaji 2008, 2008年、兵庫

4) 浦野 恵美子, 奥長浩之, 森川裕子, 駒野 淳. DNA J/HSP40 Co-chaperone family による HIV-1 複製抑制. 第56回日本ウイルス学会学術集会 2008年、岡山

5) 駒野 淳, 浦野 恵美子, 刈屋 祐美, 二橋 悠子, 市川 玲子, 濱武 牧子, 深觸 秀輔, 森川 裕子, 芳田 剛, 小柳 義夫, 山本 直樹. T細胞における HIV-1 抵抗性遺伝子のスクリーニング - Brd4 C

末端ドメインの同定とその機能解析. 第56回日本ウイルス学会学術集会2008年、岡山

6) 駒野 淳、濱武 牧子、青木 徹、浦野 恵美子、二橋 悠子、山本 直樹. BiFC/BRETによる転移増強分子 CXCR4 の Ligand 非依存的な多量体形成の解析. 第67回日本癌学会学術総会、2008、名古屋

7) 村上 努、大隈 和、田中礼子、仲宗根正、濱武牧子、駒野 淳、谷中幹郎、田中勇悦、山本直樹. KRH-3955 は経口投与可能な高活性抗 X4 HIV-1 阻害剤である. 第22回日本エイズ学会学術集会・総会、2008、大阪

8) 青木 徹、清水佐紀、浦野恵美子、濱武牧子、寺嶋一夫、玉村啓和、村上 努、森川裕子、山本直樹、駒野 淳. HIV-1 Pr55Gag のミリストイル基非依存性ウイルス粒子産生と感染性. 第22回日本エイズ学会学術集会・総会、2008、大阪

9) 高橋良明、村上 努、駒野 淳、古田 篤司、田中礼子、山本直樹、田中勇悦. 宿主由来タンパク OX40L, OX40 の HIV-1 感染に与える影響. 第22回日本エイズ学会学術集会・総会、2008、大阪

10) 浦野 恵美子、奥長浩之、森川裕子、山本直樹、駒野 淳. Inhibition of HIV-1 replication by co-chaperone DNA J/HSP40 protein family. 第22回日本エイズ学会学術集会・総会、大阪

11) 小林明子、芳田 剛、駒野 淳、小柳義夫. レンチウイルスバクスターを用いた抗HIV因子のスクリーニングとその解析. 第22回日本エイズ学会学術集会・総会、2008、大阪

12) Makiko Hamatake, Yuko Futahashi, Toru Aoki, Naoki Yamamoto, Jun Komano. Detection of ligand-independent higher-order oligomerization state of a G-protein-coupled receptor CXCR4 by BiFC/BRET. BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会)、2008、神戸

13) Emiko Urano, Yumi Kariya, Makiko Hamatake,

Hidesuke Fukazawa, Yuko Morikawa, Yoshio Koyanagi, Naoki Yamamoto, Jun Komano. P-TEFb complex-interacting domain of Brd4 inhibits HIV-1 replication through restricting Tat-mediated enhancement of LTR promoter activity. BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会)、2008、神戸

14) Toru Aoki, Saki Shimizu, Emiko Urano, Makiko Hamatake, Kazuo Terashima, Hirokazu Tamamura, Tsutomu Murakami, Yuko Morikawa, Naoki Yamamoto, Jun Komano. Substitution of the myristoylation signal of HIV-1 Pr55Gag with PLC delta 1 pleckstrin homology domain results in fully infectious pseudovirion production. BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会)、2008、神戸

15) 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

16) 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 互 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

17) 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 互 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

18) 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5

5 回日本ウイルス学会学術集会 2007 年,札幌

19) 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チ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

20) 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

21) 浜武 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-1 α . 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

22) Toru Aoki, Saki Shimizu, Emiko Urano, Yuko Futahashi, Makiko Hamatake, Hirokazu Tamamura, Kazuo Terashima, Tsutomu Murakami, Naoki Yamamoto and Jun Komano. 非ミリスチル化 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

23) 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

24) Saki Shimizu, Emiko Urano, Jun Komano, Yuko Futahashi, Kosuke Miyauchi, Maya Isogai, Zene Matsuda, Kyoko Nohtomi, Kazunari Onogi, Yutaka Takebe, Naoki Yamamoto. Inhibiting HIV-1 replication by HEXIMI1, a cellular inhibitor of cdk9/cyclinT

complex (P-TEFb), 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress in conjunction with 79th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society and 29th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, 2006, 京都

25) Kosuke Miyauchi, Rachael Curran, Erin Mathews, Jun Komano, Tsutomu Murakami, Naoki Yamamoto, Don M. Engelman, Zene Matsuda. Alteration of intracellular transport of the envelope protein of HIV-1 by a shift in a helical phase within its membrane-spanning domain. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress in conjunction with 79th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society and 29th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, 2006, 京都

26) Fuji, H., Tatsumi, J., Komano, A., Hoshino, T., Development of HIV-1 RNaseH inhibitor by Computer-Assisted Drug Design. Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2006, 沖縄

27) Saki Shimizu, Yutaka Takebe, Emiko Urano, Yuko Futahashi, Kosuke Miyauchi, Maya Isogai, Zene Matsuda, Kyoko Nohtomi, Kazunari Onogi, Naoki Yamamoto, Jun Komano. Inhibiting HIV-1 replication by HEXIMI1, a cellular inhibitor of CDK9/Cyclin T complex (P-TEFb). 7th AIDS Seminar in Kumamoto, 2006, 熊本

28) 青木 徹, 貝の瀬 由成, 二橋 悠子, 清水 佐紀, 松田 善衛, 山本 直樹, 駒野 淳. HIV-1 GagN 末端のミリスチン酸化非依存的な分子集合・出芽および VLP の性質に関する解析. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会, 2006, 名古屋

29) 濱武 牧子, 浦野 恵美子, 花房 忠次, 加藤 真吾, Tee Kok Keng, 武部 豊, 山本 直樹, 駒野 淳, AIDS 長期未

発症のHIV感染血友病患者における高力価中和抗体の存在とその病期進行への寄与に関する解析、第54回日本ウイルス学会学術集会,2006,名古屋

30) 駒野淳, 二橋悠子, 磯貝まや, 濱武牧子, 松田善衛, 佐藤裕徳, 椎野貞一郎, 武部豊, 山本直樹, 挿入変異を伴う多剤耐性 HIV-1(CRF01_AE)における薬剤耐性亢進のメカニズム—薬剤耐性獲得におけるRNase H 活性の関与. 第54回日本ウイルス学会学術集会,2006,名古屋

31) 駒野淳, 姉崎裕介, 二橋悠子, 磯貝まや, 藤義秀, 星野忠次, 武部豊, 山本直樹, HIV-1の逆転写酵素が持つRNase H 活性に対する特異的阻害剤の開発. 第54回日本ウイルス学会学術集会,2006,名古屋

32) Komano J. Myristoylation independent assembly, transport, and VLP formation of HIV-1 Gag. 第20回日本エイズ学会学術集会,2006,東京

33) 駒野淳, 姉崎裕介, 二橋悠子, 磯貝まや, 武部豊, 山本直樹. HIV-1の逆転写酵素に内在するRNase H 活性阻害薬の開発(1)—小分子化合物ライブラリーからのスクリーニング. 第20回日本エイズ学会学術集会,2006,東京

34) 濱武牧子, 浦野恵美子, 花房忠次, 加藤真吾, Tee Kok Keng, 武部豊, 山本直樹, 駒野淳. 血友病患者におけるエイズ長期未発症症例における高力価中和抗体の存在と標的部位の同定. 第20回日本エイズ学会学術集会,2006,東京

35) 駒野淳, 二橋悠子, 磯貝まや, 濱武牧子, 松田善衛, 佐藤裕徳, 椎野貞一郎, 武部豊, 山本直樹. HIV-1逆転写酵素 polymerase active siteへの薬剤耐性変異が誘導するRNase H 活性の低下と耐性亢進への寄与. 第20回日本エイズ学会学術集会,2006,東京

36) 藤秀義, 辰巳絢子, 駒野淳, 星野忠次. HIV-1の逆転写酵素に内在するRNase H 活性阻害薬の開発—in silico 解析による作用機序解析と最適化の試み—, 第20回日本エイズ学会学術集会,2006,東京

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

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
日本人血友病HIV感染者におけるKIR遺伝子座頻度とエイズ発症に関する解析

遺伝子名とアレルの特異性	遺伝子座保有者数		有意差** [P値]
	エイズ未発症者 (11例)	エイズ発症者 (6例)	
ZDL1 *001, *002, *00301-00303, *0040101, *0040102, *006, *006	10	6	1
ZDL2 *001-003	11	6	1
ZDL3 *001-006	11	6	1
ZDL4 *00101, *00102, *0010301, *0010302, *000104, *00201, *00202, *003-007, *0060101-0060103, *0060201, *0060202, *009-011	11	6	1
ZDL5a1 *001-005, ZDL5a, ZDL5b	4	3	0.64
ZDL5A *001	5	3	1
ZDL5B *00-004	3	3	0.8
ZD51 *001-004	11	6	1
ZD52 *00101-00103, *002-005	1	0	1
ZD53 *00101-00103	1	1	1
ZD54 del *003, *004, *006, *007	4	4	0.33
ZD54 ins *0010101-0010103, *00102, *002	11	6	1
ZD55 *001-005	8	5	1
ZDL1 *00101, *00102, *002, *00401, *00402, *005-009, *01501, *01502, *016-019	10	6	1
ZDL2 *001-012	11	6	1
ZDL3 *001, *00201, *00202, *003, *004	11	6	1
ZD51 *010-014	4	3	0.64
ZDP1 *001, *002	11	6	1
ZDP1 *001, *002, *00301, *00302, *004	11	6	1

* 判定不能例あり10例中10名/陽性

** 有意差判定はchi square testによる

研究課題名：アジア・大平洋地域における HIV・エイズの流行・対策状況と日本への波及 に関する研究

分担研究者名：花房 秀次 荻窪病院 副院長・

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。今年度はLTNPに影響する要因の解析と治療開始基準に関する検討を行った。

B. 研究方法

荻窪病院 血液科を受診している血友病患者586名中、1985年1月に登録されていた血友病HIV感染者133名を対象として追跡調査を施行した。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以下または治療開始になるまでの期間、および死亡率をKaplan-Meier法を用いて検討した。

HIVに感染後20年以上を経過し、治療なしで長期に免疫が安定している長期未発症血友病患者（Long term non-progressor: LTNP）とし、抗HIV剤を投与されて生存している群をProgressor群（P群）とし、死亡群を含めて解析を行った。

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、2008年12月までの死亡者は45名で死亡率は38.3%であった。1985年時点でのCD4数(中央値)は、LTNP群が743(494～1679)でP群は701(231～1393)で有意差はなかった(p=0.56)。1997年の時点でのCD4数は、LTNPが631(337～823)、P群が257(12～699)でLTNP群のほうが高かった(p=0.017)。HIV VLはLTNP群が1800(<400～7800)copies/mlでP群が10000(<400～10⁶)copies/mlと有意差はなかった(p=0.24)。1985年の時点で、HIV死亡群を生存群(LTNP+P群)と比較すると、CD4数は、死亡群が396(12～1168)、生存群が703(231～1679)で死亡群の方が低い傾向(p=0.14)を認め、1985年での年齢は死亡群が16.1(2.4～57.3)歳、生存群が14.8(3.8～45.4)歳で死亡群の方が高い

傾向(p=0.07)を認めた。

1996年以後に導入されたHAART開始からのCD4数の増加を、治療開始時のCD4数が150未満の群と150以上の群で分類して解析した。治療開始時のCD4数が150未満の群では、治療開始時、開始後3年、5年、9年でのCD4数が114(15～149),367(249～654),382(197～732),433(167～983)であった。治療開始時のCD4数が150以上の群では、治療開始時、開始後3年、5年、9年でのCD4数が199(150～332),469(269～810; p=0.92),535(410～849; p=0.28),701(336～1096; p=0.62)で、CD4数が150未満で治療開始した群と有意な差を認めなかった。

D. 考察

今回の検討で、我が国の血友病HIV感染者の死亡率は海外先進国に比べて明らか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)で、我が国では2006年までに42.2%*(622/1431)、荻窪病院では2008年12月までに38.3%*(45/133)であった。(*p<0.001)

非加熱濃縮製剤による血友病患者のHIV感染は主として米国の汚染血液に由来しており、ウイルス学的な相違は考えにくい。また、我が国での血友病HIV感染は1983年を中心に1970年代後半から1985年までに生じたとされており、感染時期も諸外国と大きな差はない。逆にHAART導入は米国では1995年で、我が国では1996年からと少し遅れて導入された。また、血友病HIV感染者の年齢層別で生存率を比較検討しても、荻窪病院血友病感染者は海外先進国よりも有意に生存率が高いことを昨年示した。結果として我が国の血友病HIV感染者の死亡率が低い原因は、我が国血友病感染者の免疫力による差と考えられる。

荻窪病院でのLTNPの要因を検討したが、1985年でのCD4数が特に高くはなく、1997年では有意差が生じていた。免疫力の要因として中和抗体について昨年報告したが、1997年においてはLTNP群でVLが有意に低くはなく、中和抗体以

外にも要因があることが示唆された。

1996年以後に HAART を開始した群で、開始時の CD4 数を 150 未満と 150 以上で分けて 9 年間 CD4 数の増加を追跡したが、両群ともに CD4 数の増加は良好で有意差は認めなかった。1996 年以後に生存しているわが国の血友病 HIV 感染者は、rapid progressor である死亡群をのぞいた slow progressor の多い集団であり、明らかに性感染者の集団とは異なる。海外での治療開始基準は血友病患者以外の HIV 感染者での検討であり、治療開始基準の根拠も血友病以外のコホート研究に基づいている。我が国での血友病 HIV 感染者は海外先進国よりも有意に死亡率が低く、生存群では slow progressor が多く、CD4 数が低くても HAART 開始後の CD4 数の増加が良好であることが示された。すなわち、わが国での血友病 HIV 感染者では海外性感染者と同様に HAART 開始を早める科学的根拠は今のところない。HAART 開始を遅くした場合に、血友病患者で悪性腫瘍や脳心血管障害が有意に増加することを示すデータもない。今後、我が国血友病 HIV 感染者の長期予後を追跡調査することが必要である。

現段階においては、早期の治療開始で得られるメリットよりも長期内服に伴う副作用のほうが深刻であり、HAART の早期開始には慎重であるべきと考えられる。

E. 結論

我が国の血友病 HIV 感染者は海外先進国の血友病 HIV 感染者よりも有意に死亡率が低く、海外での性感染者よりも HIV/AIDS の進行が遅いことが明らかになった。その要因として中和抗体や他の免疫機能が関与していると考えられる。我が国の血友病 HIV 感染者では HAART 開始基準に関しては慎重であるべきと考えられる。

1) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

今後、我が国の血友病 HIV 感染者の HIV/AIDS 進行が緩やかな原因を解明でき、治療に応用できれば多大な貢献が可能と考えられる。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。

2) 今後の展望について

中和抗体やそれ以外の 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

Yoshii T, Hamatani T, Hanabusa H, Yoshimura Y, Kato S. Buoyant density and sedimentation

dynamics of HIV-1 in two density-gradient media for semen processing.

Fertil Steril. 2007 Dec 29. [Epub ahead of print]

Tanaka R, Hanabusa H, Kinai E, Hasegawa N, Negishi M, Kato S Intracellular efavirenz levels in peripheral blood mononuclear cells from human immunodeficiency virus-infected individuals.

Antimicrob Agents Chemother. 2008 Feb;52(2):782-5. Epub 2007 Dec 10.

Tanaka Y, Hanada K, Hanabusa H, Kurbanov F, Gojohori T, Mizokami M. Increasing genetic diversity of hepatitis C virus in haemophiliacs with human immunodeficiency virus coinfection.

J Gen Virol. 2007 Sep;88(Pt 9):2513-9.

4. Kinai E, Hanabusa H, Kato S.

Prediction of the efficacy of antiviral therapy for hepatitis C virus infection by an ultrasensitive RT-PCR assay.

J Med Virol. 2007 Aug;79(8):1113-9.

国内論文

インヒビター保有先天性血友病患者に対する止血治療ガイドライン(解説)

田中一郎(奈良県立医科大学 小児科), 天野景裕, 瀧正志, 岡敏明, 酒井道生, 白幡聡, 高田昇, 高松純樹, 竹谷英之, 花房秀次, 日笠聡, 福武勝幸, 藤井輝久, 松下正, 三間屋純一, 吉岡章, 嶋緑倫, 日本血栓止血学会学術標準化委員会血友病部会
日本血栓止血学会誌(0915-7441)19 巻 4 号
Page520-539(2008.08)

国内のインヒビター保有血友病患者における遺伝子組換え活性型凝固第 VII 因子製剤(注射用ノボセプン)の高用量単回投与に関する臨床研究

白幡聡(産業医科大学 小児科), 嶋緑倫, 岡敏明, 天野景裕, 花房秀次, 瀧正志, 三間屋純一, 松下正, 高松純樹, 日笠聡, 小阪嘉之, 須賀健一, 酒井道生, 梶原真清恵, 高田昇, 吉岡章
日本血栓止血学会誌(0915-7441)19 巻 2 号
Page244-256(2008.04)

わが国における後天性凝固因子インヒビターの実態に関する 3 年間の継続調査 予後因子に関する検討

田中一郎(奈良県立医科大学 小児科), 天野景裕, 瀧正志, 岡敏明, 酒井道生, 白幡聡, 高田昇, 高松純樹, 竹谷英之, 花房秀次, 日笠聡, 福武勝幸, 藤井輝久, 松下正, 三間屋純一, 吉岡章, 嶋緑倫
日本血栓止血学会誌(0915-7441)19 巻 1 号
Page140-153(2008.02)

わが国におけるインヒビター保有先天性血友病患者に対するバイパス止血療法の現状

田中一郎(奈良県立医科大学 小児科), 天野景裕, 瀧正志, 岡敏明, 酒井道生, 白幡聡, 高田昇, 高松純樹, 竹谷英之, 花房秀次, 日笠聡, 福武勝幸, 藤井輝久, 松下正, 三間屋純一, 吉岡章, 嶋緑倫
日本血栓止血学会誌(0915-7441)18 巻 6 号
Page627-639(2007.12)

国内における遺伝子組換え活性型凝固第 VII 因子製剤(注射用ノボセブ)の高用量単回投与に関する臨床研究第 I 相試験結果 安全性についての報告

白幡聡(産業医科大学 小児科), 嶋緑倫, 岡敏明, 天野景裕, 花房秀次, 瀧正志, 三間屋純一, 松下正, 高松純樹, 日笠聡, 小阪嘉之, 須賀健一, 酒井道生, 梶原真清恵, 高田昇, 吉岡章
日本血栓止血学会誌(0915-7441)18 巻 6 号
Page614-618(2007.12)

インヒビターのない血友病患者の急性出血、処置・手術における凝固因子補充療法のガイドライン(解説)

松下正(名古屋大学 大学院医学系研究科血液・腫瘍内科), 天野景裕, 瀧正志, 岡敏明, 酒井道生, 白幡聡, 高田昇, 高松純樹, 竹谷英之, 花房秀次, 日笠聡, 福武勝幸, 藤井輝久, 田中一郎, 三間屋純一, 吉岡章, 嶋緑倫, 日本血栓止血学会学術標準化委員会血友病部会
日本血栓止血学会誌(0915-7441)19 巻 4 号
Page510-519(2008.08)

HIV 感染夫婦の生殖補助医療

花房秀次(荻窪病院 血液科)
日本エイズ学会誌(1344-9478)9 巻 3 号
Page223-230(2007.08)

著書

【病気と薬の説明ガイド 2007】 免疫疾患 薬物療法編 医薬品情報編 後天性免疫不全症候群
木内英(荻窪病院 血液科), 花房秀次
薬局(0044-0035)58 巻 4 号 Page1429-1440(2007.03)

よく使う日常治療薬の正しい使い方 抗 HIV 薬の使い方 正しい理解のために

Author: 木内英(荻窪病院 血液科), 花房秀次
レジデントノート(1344-6746)10 巻 4 号
Page589-594(2008.07)

学会

CRF01 とサブタイプ B からなる新規組換えウイルス株(URF)の同定とその公衆衛生上の意義
上西理恵(国立感染症研究所), 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, 相良裕子, 花房秀次, 加藤真吾, 草川茂, 武部豊

日本エイズ学会誌(1344-9478)9 巻 4 号
Page545(2007.11)

母子感染予防における出生児への HAART の安全性の検討

木内英(荻窪病院 血液科), 岩室紳也, 近藤真規子, 今井光信, 花房秀次, 加藤真吾
日本エイズ学会誌(1344-9478)9 巻 4 号
Page435(2007.11)

インヒビター保有先天性血友病患者に対する止血治療ガイドライン案

田中一郎(奈良県立医科大学 小児科), 天野景裕, 瀧正志, 岡敏明, 酒井道生, 白幡聡, 高田昇, 高松純樹, 竹谷英之, 花房秀次, 日笠聡, 福武勝幸, 藤井輝久, 松下正, 三間屋純一, 吉岡章, 嶋緑倫
日本血栓止血学会誌(0915-7441)18 巻 5 号
Page468(2007.10)

血友病患者の凝固因子補充療法の標準化

松下正(日本血栓止血学会), 天野景裕, 瀧正志, 岡敏明, 酒井道生, 白幡聡, 藤井輝久, 高田昇, 高松純樹, 竹谷英之, 花房秀次, 日笠聡, 福武勝幸, 三間屋純一, 田中一郎, 吉岡章, 嶋緑倫, 日本血栓止血学会学術標準化委員会血友病部会
日本血栓止血学会誌(0915-7441)18 巻 5 号
Page468(2007.10)

HIV/AIDS の現状と HIV 診療の進歩 HIV superinfection, HIV 陽性夫婦の生殖補助医療など

花房秀次(荻窪病院)
神奈川県感染症医学会プログラム・抄録集 62 回
Page4(2007.09)

凝固因子製剤の種類がインヒビター発現に及ぼす影響

嶋緑倫(奈良県立医科大学 小児科), 瀧正志, 天野景裕, 岡敏明, 高田昇, 高松純樹, 竹谷英之, 花房秀次, 日笠聡, 福武勝幸, 松下正, 三間屋純一, 吉岡章, 白幡聡, 日本血栓止血学会学術標準化委員会血友病部会
日本血栓止血学会誌(0915-7441)18 巻 1 号
Page87-88(2007.02)

我が国における HIV 感染血友病患者の医学的・社会的現状と今後の課題 血友病 HIV 感染者の特徴と今後求められる医療

花房秀次(荻窪病院 血液科)
日本エイズ学会誌(1344-9478)9 巻 4 号
Page374(2007.11)

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：東南アジアにおける HIV-1 流行株のウイルス学的・免疫学的研究の基盤となる研究材料の整備

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

当地域における代表的な HIV-1 サブタイプ・CRF (流行型組換体) であるサブタイプ B'、C、CRF01_AE、CRF07_BC、CRF08_BC について感染性分子クローンを構築した。また CRF01_AE 感染性分子クローン 93JP-NH1 を用いて、これまでにマカクザルを用いた系では報告されていない CRF01_AE 由来フラグメントをもつ pSHIV を構築した。これらは、サブタイプ特異的なウイルス学的性質や、地域特異的な予防治療法開発のための有用なツールとなる。

A. 研究目的

HIV-1 感染性分子クローンは、完全長の HIV-1 ゲノム cDNA をクローン化したもので、それをトランスフェクションすることによって標的細胞に感染性をもつウイルスを産生するものをいう。感染性分子クローンから得られたウイルスは、その塩基配列が一定なため、塩基/アミノ酸配列とウイルスの持つ機能の相関関係を検討する研究に特に有用である。

これまでに多くの HIV-1 感染性分子クローンや、これを基にして SIV と HIV-1 のキメラウイルスである SHIV クローンが構築されてきたが、これらの多くは欧米の流行株であるサブタイプ B 由来の HIV-1 領域を持っている。しかしながら、サブタイプ B は HIV-1 世界流行の 10% 以下にすぎず、広く流行しているサブタイプや CRF のこうしたクローンは、各流行地における HIV-1 のウイルス学的研究や検査、将来のワクチン研究の基盤を構築するために有用な材料となりうる。

これまで私たちは、dual tropic および R5 ウイルスの CRF01_AE と dual tropic のサブタイプ B' の感染性分子クローンの樹立に成功してきたが、本研究では、それら以外の主要な流行株の感染性分子クローンの樹立と SHIV の構築を行った。

B. 研究方法

本研究に用いた分離株を、表 1 に示した。これらの分離株は、PHA であらかじめ刺激した PBMC (PHA-PBMC) と感染者由来 PBMC を共培養することにより得た。完全長 HIV-1 cDNA は、分離株を感染させた PHA-PBMC から抽出したプロウイルス DNA を含むゲノム DNA を鋳型に、5' LTR 直後に保存されている NarI サイトを挟むように 5'

側約 700 bp、3' 側約 9100 bp を PCR 法で増幅して得た。これらを NarI サイトで結合させることにより、完全長 HIV-1 cDNA を含むプラスミドを構築した (図 1)。得られたプラスミドを 293T 細胞にトランスフェクト後 3 日目の培養上清を PHA-PBMC に感染させ、3 日毎に半量の培養液交換を行いながら 2、3 週間培養し、ウイルスの増殖を認めたものを感染性分子クローンとした (図 2)。この方法で目的のプラスミドが得られなかった場合、各分離株に特異的な制限酵素認識部位を用いて新たな PCR 産物を挿入し、同様にスクリーニングを行った。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の形成とウイルスの増殖を指標に決定した。さらに、末梢血単球由来のマクロファージ (MDM) に対する感染性を検討した。

サブタイプ/CRF の同定は、塩基配列のアライメントをもとに近隣結合法によって作成した系統樹と、similarity plot 法、bootscanning 法によるサブタイプ間組換構造の解析によって行った。

SHIV 構築のベースとして、HIV-1 89.6 の tat 遺伝子から env 遺伝子までを SIVmac239 に組込んだ SHIV89.6 を用いた。SHIV89.6 の 5' half および 3' half を含むプラスミドは、AIDS Reagent Program から入手した。トランスフェクションによるウイルス産生を簡便に行うために、これらを結合し、完全長の pSHIV89.6 を作製した。新規 SHIV は、この SHIV89.6 の HIV-1 由来領域を、CRF01_AE で dual tropic の感染性分子クローン 93JP-NH1 由来フラグメントと置換することによって構築した。これらの SHIV プラスミドを 293T 細胞にトランスフェクトして得た培養上清を CEMx174 細胞に感染

させ、その感染性の有無を検討した。

(倫理面への配慮)

特になし。

C. 研究結果

1) HIV-1 感染性分子クローンの樹立とその解析

gag 遺伝子から pol 遺伝子 RT 領域までの約 2600 bp と env 遺伝子 C2/V3 領域 約 400 bp の塩基配列のアライメントに基づいて同定したサブタイプ/CRF の結果をもとに使用する分離株を選択した (表 1)。

CRF08_BC 分離株 HH040 は、中国雲南省南部に位置する紅河における感染者から分離した (表 1)。この分離株から得られた感染性分子クローン HH040_22eapx4 は PHA-PBMC で増殖した (図 3 左)。また、コレセプター使用能を調べたところ、分離株と同様に R5 ウイルスであった (図 3 右)。

CRF07_BC 分離株 HH043 は、HH040 と同様に中国雲南省紅河において収集した検体から分離した (表 1)。この分離株から 2 クローンの感染性分子クローンが得られた。トランスフェクションにより得られたウイルスはいずれも PHA-PBMC で増殖し (図 4 左)、分離株と同様に CCR5 をコレセプターとして使用した (図 4 右)。

サブタイプ B' 分離株 DH002 は、中国雲南省西部のミャンマーとの国境に近い徳宏における感染者から分離した (表 1)。この分離株から 2 クローンの感染性分子クローンが得られた。トランスフェクションにより得られたウイルスはいずれも PHA-PBMC で増殖し (図 5 左)、分離株と同様に R5 ウイルスであった (図 5 右)。

これらのウイルスを MDM に感染させ、経時的に回収した培養上清中に産生されたウイルス量を定量したところ、DH002 由来のクローンの一つで、明らかな細胞変性は見られないもののウイルスの増殖が見られた (図 6)。一方、T cell line (MT2, M8166, H9, MOLT4) に対しては、感染性を示さなかった。

これらクローンの全塩基配列を決定し、それに基づくサブタイプ/CRF の同定を行った。

HH040_22eapx4 は系統樹上で CRF08_BC のレファレンス株とクラスターを形成し (図 7)、そのサブタイプ間組換構造は CRF08_BC の標準株である 98CN006 と一致していた (図 8)。HH043_1 は、CRF08_BC のレファレンス株とクラスターを形成し (図 7)、そのサブタイプ間組換構造は CRF07_BC の標準株である 97CN001 と一致していた (図 9)。

HH043_2 も同様であった。DH002_2 はサブタイプ B' のレファレンス株とクラスターを形成し (図 7)、bootscanning の結果から、他のサブタイプの領域を含まないことが確認された (図 10)。DH002_1 も同様の結果であった。

2) HIV-1 東南アジア流行株の領域を含む SHIV 樹立の試み

私たちが既に樹立した CRF01_AE 感染性分子クローン 93JP-NHI を用いて、マカクザルの系ではこれまでに報告の無い CRF01_AE 由来のフラグメントを持つ SHIV の樹立を試みた (図 11 上)。まず SHIV89.6 の 5' half と 3' half のクローンを結合して得た完全長のプラスミドを 293T 細胞にトランスフェクトしたところ、ウイルスの産生が見られ、そのウイルスは CEMx174 細胞に感染性を示した (図 11 下)。

次に、この pSHIV89.6 の tat 遺伝子から env 遺伝子までを 93JP-NHI 由来のフラグメントと置換した pSHIV-NHI_{sr} を作製した。これを同様に 293T 細胞にトランスフェクトしたところ、pSHIV89.6 と同様にウイルスの産生が見られた (図 12 左)。しかしながら得られたウイルスは、93JP-NHI も増殖できる CEMx174 細胞に対し感染性を示さなかった (図 12 右)。

これまでにサブタイプ B' 以外の多くのサブタイプや CRF の SHIV の構築が試みられてきたが、同様に感染性を検出できないことが多い。近年、サブタイプ B 由来の SHIV の、vpu とオーバーラップする領域の後から gp41 の膜貫通領域の手前までをサブタイプ C 由来のフラグメントと置換することによって、感染性を有する SHIV の構築に成功したことが報告された (Song R.J., et al., (2006) J. Virol. 80(17):8729-38.)。そこで、同じ構造の NHI 由来のフラグメントを組込んだ SHIV の構築を試みた。89.6 の vpu と env がオーバーラップする領域の後に KpnI サイトがあるので、PCR によって NHI の同じ位置に KpnI サイトを挿入した。膜貫通領域の手前には適当な制限酵素認識部位が無かったので、オーバーラップエクステンション法によって NHI と 89.6 の組換えフラグメントを作製した。これを挿入して、新しい pSHIV を構築した。その構造を図 13 に示した。オーバーラップエクステンション法に用いたプライマーに挟まれた領域が NHI 由来のもの (kp1) と 89.6 由来のもの (kp2) の 2 種類のクローンが得られた。

D. 考察

私たちは、東南アジアにおける HIV-1 流行の分子疫学的解析を通して、その流行を形成しているサブタイプ/CRF の同定とその伝播の様相について明らかにしてきた。

この地域における流行株は、これまでウイルス学的、免疫学的研究によく用いられてきたサブタイプ B ではなく、サブタイプ B のこの地域に特異的なバリエーションであるサブタイプ B'、サブタイプ C、CRF01_AE の 3 種類と、それらのサブタイプ間組換え体であった。これらは、サブタイプ B との免疫学的交差性の問題だけではなく、様々なサブタイプに特異的なウイルス学的特性を有している可能性がある。これまでに、(1) サブタイプ C 感染者では、病状の進行に伴うコレセプター使用能の変化 (CCR5 から CXCR4) がまれである。サブタイプ C 由来のエンベロープを持つ CRF07_BC や CRF08_BC でも同様な傾向が見られる。(2) サブタイプ C の LTR は、NFkB site が多く、より高いプロモーター活性を有していることが示されている。私たちが中国雲南省徳宏で見出したサブタイプ B' と C の間の URF 10 検体のすべてがサブタイプ C 由来の LTR を有しており、生物学的な優位性をもつ可能性が示唆される。(3) サブタイプ C は、サブタイプ A や D より垂直感染が高い割合で起こる。また同一病期でも、サブタイプ C は、サブタイプ A や D より血中のウイルスコピー数が優位に高い。(4) サブタイプ B はサブタイプ特異的な IgA が誘導されやすいのに対し、サブタイプ A や D の感染ではサブタイプ間で交差性の高い IgA が誘導される、などの報告がある。また、タイにおいて、流行初期に異性間の性的接触による感染者の間で CRF01_AE 流行が急速に拡大したことに、その性質が関わっている可能性も否定できない。サブタイプ B 以外の感染性分子クローンを樹立することは、地域特異的な予防治療法の開発への貢献だけでなく、こうした塩基/アミノ酸配列とウイルスの持つ機能の相関関係の解析にも有用である。

表 2 に、私たちが感染性分子クローンを樹立したウイルス株の一覧を示した。この地域におけるすべての主要なサブタイプ/CRF の感染性分子クローンを樹立することができた。感染性分子クローンから得られたウイルスは、その塩基配列が一定であるという特徴を持つことから、今後サブタイプ特異的なウイルス学的性質の研究の進展に寄与すること

が期待される。

ところで、HIV-1 の宿主域は非常に限定されている。これまでエンベロープ蛋白を標的とするワクチンの評価には、SIVmac239 のエンベロープを含む領域を HIV-1 と組換えたウイルスすなわち SHIV を作製し、マカクザルに感染させるシステムが用いられてきた。このシステムを使えば、ワクチンの有効性の評価だけではなく、HIV-1 の病原性に対するエンベロープ蛋白の役割を研究することもできる。しかしながら、これまでに報告されている SHIV のほとんどは、欧米で流布しているサブタイプ B 分離株由来のエンベロープをもつものであった。しかし、サブタイプ B は、世界で報告されている HIV-1 の 10% 以下であり、世界的に流行が報告されているサブタイプや CRF の SHIV の報告はあまりない。

そこで私たちが既に樹立した CRF01_AE 感染性分子クローン 93JP-NH1 を用いて、マカクザルの系ではこれまでに報告の無い CRF01_AE のフラグメントを持つ pSHIV の樹立を試みた。しかし、tat から env までを 93JP-NH1 由来のフラグメントと置換した pSHIV-NH1sr は、これまでの多くの試みと同様に、トランスフェクションによりウイルスは産生されるが、産生されたウイルスは標的細胞に対し感染性を認めなかった (図 1 2)。

Song らが 2006 年、サブタイプ B 由来の SHIV の、vpu とオーバーラップする領域の後から gp41 の膜貫通領域の手前までをサブタイプ C 由来のフラグメントと置換することによって、感染性を有する SHIV の構築に成功したことを報告した (J. Virol. 80(17):8729-38)。そこで、同様に 93JP-NH1 のフラグメントを組み込んだ pSHIV を構築した (図 1 3)。現在、その感染実験に必要な手続きが進行中であり、承認されしだい、実験を開始する予定である。このクローンが感染性を有していれば、HIV-1 CRF01_AE のエンベロープを標的とする予防治療法の研究にとって有用なツールとなる。

E. 結論

この地域におけるすべての主要なサブタイプ/CRF の HIV-1 感染性分子クローンを樹立することができた。今後サブタイプ特異的なウイルス学的性質の解析や、地域特異的な予防治療法開発のためのツールとして、研究の進展に寄与することが期待される。

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.

A formylpeptide receptor, FPRL1, has the capacity to work as a novel efficient coreceptor for human and simian immunodeficiency viruses.

Shimizu N., Tanaka A., Mori T., Ohtsuki T., Hoque A., Jinno-Oue A., Apichartpiyakul C., Kusagawa S., Takebe Y. and Hoshino H.

Retrovirology. 2008 5(1): 52.

2. 学会発表

草川茂、武部豊：HIV-1 CRF08_BC

感染性分子クローンの構築とそのウイルス学的性質の解析。第54回日本ウイルス学会学術集会総会、2006年11月

草川茂、武部豊：HIV-1 サブタイプB' 感染性分子クローンの樹立とその性状の解析。第20回日本エイズ学会学術集会総会、2006年12月

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、Nguan 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
廖華南、Kok Keng Tee、長谷彩希、上西理恵、Li Xiao-jie、Adeeba Kamarulzaman、草川茂、Pham Hong Thang、Nguyen tran Hien、Xiaoxu Han、Hong Shang、Pybus Oliver、武部豊：HIV-1 組換え型流行株のアジアにおける感染拡大の年代推定

第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月
長谷彩希、上西理恵、廖華南、草川茂、人見重美、武部豊：日本における HIV-1 感染症の最近動向：東関

東地域における新発見

第22回日本エイズ学会学術集会総会、2008年11月

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし。

表 1: 使用した HIV-1 分離株の一覧

分離株	収集場所	リスク因子	病期	サブタイプ (Gen. Ref., no. 12)	コレセプター
HH040	雲南省紅河	ID	AC*	CRF08_BC	CCR5
HH043	雲南省紅河	ID	AC	CRF07_BC	CCR5
HH002	雲南省徳宏	ID	AC	サブタイプ B'	CCR5

*AC: Asymptomatic carrier

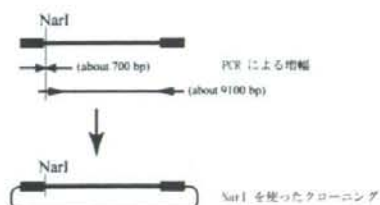


図 1: 完全長 HIV-1 cDNA クローンの構築法

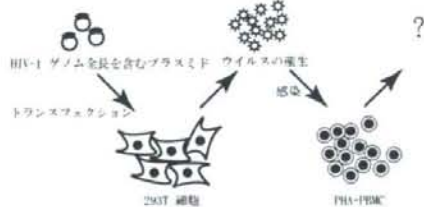


図 2: 完全長クローンの感染性のスクリーニング法

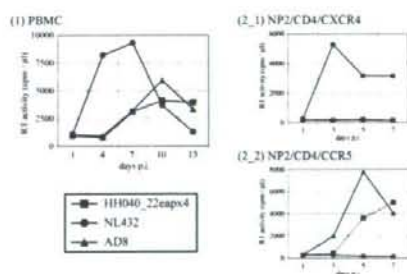


図 3: 分離株 HH040 から得られた感染性分子クローンの標的細胞における増殖能

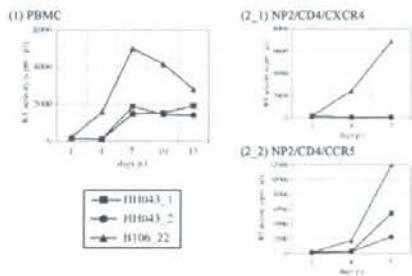


図 4: 分離株 IH043 から得られた感染性分子クローンの標的細胞における増殖能

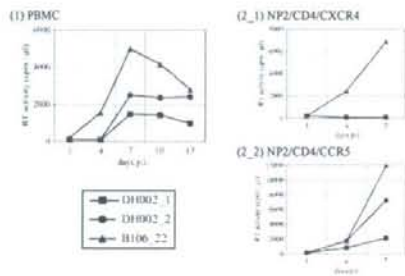


図 5: 分離株 DH002 から得られた感染性分子クローンの標的細胞における増殖能

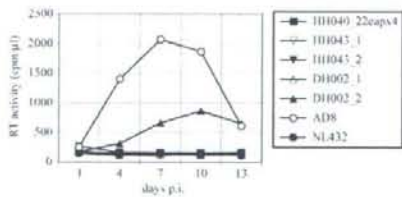


図 6: 感染性分子クローンから得られたウイルスの MDM における増殖

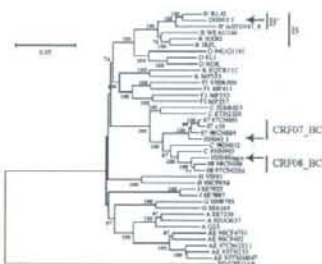


図 7: 構築したクローンの系統樹解析