

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
総合分担研究報告書

エイズの流行とウイルス変異に関する研究

研究分担者 俣野 哲朗 国立感染症研究所エイズ研究センター長
研究協力者 石川 晃一 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 感染症は世界三大感染症の一つであり、その克服は国際的重要課題である。細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) 反応は HIV 複製抑制に中心的な役割を担っており、CTL 逃避変異を有する HIV の選択は感染病態に大きく影響しうる。この CTL 逃避変異を反映する HLA 関連 HIV 変異の動向把握は、HIV 感染症制圧に向けた取組みにおいて重要である。各 HLA アレル頻度は人種間で大きく異なるため、世界各地域の流行 HIV 株の HLA 関連変異同定が必要である。そこで本研究では、アジアの HIV 感染流行地域の一つとして重要なインド国の国立コレラ腸管感染症研究所 (NICED) との共同研究で、HLA 関連 HIV 変異同定に向け、インド国 HIV 感染者の HLA 遺伝子型同定法を確立し、解析を開始した。解析結果では、HLA-A、HLA-B および HLA-C 各々について、比較的頻度の高いアレルが見出された。このうち、ベトナムでも頻度の高い HLA-A*11:01 に注目し、この HLA の関連変異候補を HIV gag MA 遺伝子領域に見出した。

A. 研究目的

世界三大感染症の一つである HIV 感染症は、宿主免疫によるウイルス複製抑制が困難で慢性持続感染を呈し、エイズ発症に至る致死感染症である。その克服は国際的重要課題であり、HIV 変異の伝播状況の把握は、HIV 感染症制圧に向けた取組みにおいて重要な基盤情報となる。特に HIV ゲノム塩基配列の解析研究は以下のように進められてきた。

(1) 1980年代からの主に env 領域の解析に基づく多様性に関する研究：各種サブタイプが同定され、HIV の各地域への経時的な伝播についての知見が得られてきている。

(2) 1990年代後半の抗レトロウイルス薬治療導入以降の主に pol 領域の解析に基づく薬剤耐性変異に関する研究：逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤等の抗レトロウイルス薬に対する耐性変異の同定が進められてきた。

(3) 近年の主に gag 領域の解析に基づく HLA 関連

変異に関する研究：HIV 感染病態に最も影響の大きい宿主因子として知られているヒト白血球抗原 HLA (クラス I) の遺伝子型を各々の HIV 感染者について決定し、HIV ゲノム変異の解析結果とあわせて HLA 関連変異を同定するものである。細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) の標的抗原エピトープの提示に關与する HLA の遺伝子型の違いは、CTL 標的の違いに直結するので、HLA 関連変異の多くは CTL 逃避変異を反映するものとして、その解析研究が進められている。特に最近、Gag 抗原特異的 CTL の有効性が示唆されていることから、gag 領域の解析が先行している。

本研究は上記(3)の HLA 関連変異に着目するものである。CTL 反応は HIV 複製抑制に中心的な役割を担っており、CTL 逃避変異を有する HIV の選択は感染病態に大きく影響しうる。近年、抗 HIV 薬投与により HIV 複製のコントロールが可能となったが、その複製抑制には CTL 反応が不可欠であるこ

とも知られている。この CTL 逃避変異を反映する HLA 関連 HIV 変異の動向把握は、HIV 感染症対策において重要である。各 HLA アレルの頻度は人種間で大きく異なっているため、世界各地における流行 HIV 株の HLA 関連変異を同定することが必要であり、インドはアジアにおける HIV 感染流行地域の一つとして重要な対象地域である。そこで本研究では、インド国立コレラ腸管感染症研究所(NICODE) の Sekhar Chakrabarti 博士との共同研究で、インド国 HIV 感染者における HLA 遺伝子型同定を進めることとした。NICED より十分な数の検体を得ることが困難であったため、HLA 遺伝子型解析で見出した比較的頻度の高い HLA-A アレルのうち、ベトナムでも頻度の高い HLA-A*11:01 に注目し、この HLA の関連変異の同定を試みた。

B . 研究方法

インド国の HIV 感染者由来の末梢血リンパ球より抽出されたゲノム DNA を用い、HLA タイピング(遺伝子型決定) を行った。また、ベトナムの HIV 感染者由来の末梢血リンパ球より抽出された DNA を用い、HIV プロウイルスの gag MA 領域の塩基配列解析を行った。これらの結果をもとに統計学的手法を用いて HLA-A*11:01 関連変異同定を試みた。

(倫理面への配慮)

ヒトサンプルを用いる研究については、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に従い、国立感染症研究所の倫理委員会の承認のもと推進した。また、インドおよびベトナムの共同研究者所属機関の倫理委員会の承認も得ている。

C . 研究結果

インド国の HIV 感染者 14 名の末梢血リンパ球より得られた DNA を用い、東京医科歯科大学難治疾患研究所の木村先生・成瀬先生の協力のもと HLA-A、HLA-B、HLA-C 遺伝子型を同定した(表 1)。HLA-A アレルでは、A*11:01/02、A*33:03、A*68:01、A*01:01、A*24:02、A*31:01 が 10% を超える頻度

で見出されたが、このうち、インドに関する既報(Immunogenetics 53:1009, 2002)およびベトナムに関する我々の以前の解析で共に 5% 以上の頻度で見出されたものは、A*11:01、A*33:03、A*24:02 であった。その中で A*11:01 に焦点を絞り、A*11:01 陽性者と陰性者における HIV gag MA 領域の塩基配列について統計学的解析に基づき、Gag の第 83 番目のアミノ酸置換を生ずる変異を、HLA-A*11:01 関連 HIV gag 変異候補として同定した。

D . 考察

本研究では、インド人の HLA 遺伝子型同定法を確立し、HIV 感染者検体を用いた解析で、HLA-A、HLA-B および HLA-C 各々について、比較的頻度の高いアレルを見出した。その中で、インドおよびベトナムの双方で共通して頻度の高い HLA-A アレルを見出し、そのうちの HLA-A*11:01 について関連ゲノム変異候補を、HIV gag MA 領域に同定した。このように HLA 関連 HIV ゲノム変異同定システムを構築できたことから、今後、各 HLA アレルに相関する HIV ゲノム変異情報を収集することが可能となった。

HIV 流行地域では、HIV 感染者集団における HLA 関連変異蓄積の可能性が示唆されている。HLA 関連変異の蓄積は、CTL による抑制がよりかかりにくい感染病態に結びつき、薬剤による治療効果に影響を及ぼす可能性も危惧される。したがって、本研究のようなアジア HIV 流行地域における HLA 関連変異情報の収集は、日本を含むアジア地域の HIV 感染症の制圧に貢献するものである。

E . 結論

インド NICED との共同研究で、インド国 HIV 感染者における HLA 遺伝子型同定を行った。さらにインドおよびベトナムの双方で比較的頻度の高い HLA-A アレルを複数見出し、そのうちの HLA-A*11:01 関連変異候補を HIV gag MA 領域に見出した。

F. 研究発表

1 論文発表

- (1) Takahara Y, Matsuoka S, Kuwano T, Tsukamoto T, Yamamoto H, Ishii H, Nakasone T, Takeda A, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Sakawaki H, Horiike M, Miura T, Igarashi T, Naruse TK, Kimura A, Matano T. Dominant induction of vaccine antigen-specific cytotoxic T lymphocyte responses after simian immunodeficiency virus challenge. *Biochem Biophys Res Commun* 408:615-619, 2011.
- (2) Ishii H, Kawada M, Tsukamoto T, Yamamoto H, Matsuoka S, Shiino T, Takeda A, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Naruse TK, Kimura A, Takiguchi M, Matano T. Impact of vaccination on cytotoxic T lymphocyte immunodominance and cooperation against simian immunodeficiency virus replication in rhesus macaques. *J Virol* 86:738-745, 2012.
- (3) Seki S, Matano T. CTL escape and viral fitness in HIV/SIV infection. *Front Microbiol* 2:267, 2012.
- (4) Nomura T, Yamamoto H, Shiino T, Takahashi N, Nakane T, Iwamoto N, Ishii H, Tsukamoto T, Kawada M, Matsuoka S, Takeda A, Terahara K, Tsunetsugu-Yokota Y, Iwata-Yoshikawa N, Hasegawa H, Sata T, Naruse TK, Kimura A, Matano T. Association of major histocompatibility complex class I haplotypes with disease progression after simian immunodeficiency virus challenge in Burmese rhesus macaques. *J Virol* 86:6481-6490, 2012.
- (5) Nomura T, Matano T. Association of MHC-I genotypes with disease progression in HIV/SIV infections. *Front Microbiol* 3:234, 2012.
- (6) Takahashi N, Nomura T, Takahara Y, Yamamoto H, Shiino T, Takeda A, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Sakawaki H, Miura T, Igarashi T, Koyanagi Y, Naruse TK, Kimura A, Matano T. A novel protective MHC-I haplotype not associated with dominant Gag-specific CD8+ T-cell responses in SIVmac239 infection of Burmese rhesus macaques. *PLoS ONE* 8:e54300, 2013.
- (7) Nakane T, Nomura T, Shi S, Nakamura M, Naruse TK, Kimura A, Matano T, Yamamoto H. Limited impact of passive non-neutralizing antibody immunization in acute SIV infection on viremia control in rhesus macaques. *PLoS ONE* 8:e73453, 2013.
- (8) Iwamoto N, Takahashi N, Seki S, Nomura T, Yamamoto H, Inoue M, Shu T, Naruse TK, Kimura A, Matano T. Control of SIV replication by vaccine-induced Gag- and Vif-specific CD8+ T cells. *J Virol* 88:425-433, 2013.

2 学会発表

- (1) Nomura T, Iwamoto N, Inagaki N, Matsuoka S, Yamamoto H, Matano T. Dynamics of viral CTL escape mutations toward higher viral replicative ability in vivo. The 6th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention, Rome, Italy, 7/18/2011.
- (2) Nomura T, Yamamoto H, Shi S, Iwamoto N, Matano T. Analysis of viral genome sequences in SIV controllers. The XVth International Congress of Virology, Sapporo, Japan, 9/13/2011.
- (3) Matano T. Impact of prophylactic vaccination on post-exposure CTL cooperation against SIV replication in

- rhesus macaques. 12th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 10/20/2011.
- (4) 中村碧、高原悠佑、阪脇廣美、堀池麻里子、三浦智行、五十嵐樹彦、成瀬妙子、木村彰方、俣野哲朗、松岡佐織 . サルエイズモデル感染初期におけるMHCクラスIハプロタイプ別のCTL反応優位パターンの解析 . 第 25 回日本エイズ学会学術集会、東京、11/30/2011 .
- (5) Takahara Y, Nakamura M, Matsuoka S, Sakawaki H, Miura T, Igarashi T, Koyanagi Y, Naruse T, Kimura A, Matano T. Impact of therapeutic vaccination on CTL immunodominance and viral suppression in SIV-infected rhesus macaques under HAART. The XIXth International AIDS Conference, Washington, DC, USA, 7/26/2012.
- (6) Matano T. Stable viral control in the presence of silent proviruses in a macaque AIDS model. The 13th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 10/24/2012 .
- (7) 野村拓志、山本浩之、明里宏文、俣野哲朗 .SIV複製抑制マカクサルにおける CTL 逃避変異体の選択による複製抑制破綻機構の解析 . 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、11/14/2012 .
- (8) 高橋尚史、山本浩之、成瀬妙子、木村彰方、俣野哲朗 . サルエイズモデルにおける Nef 抗原特異的細胞傷害性 T リンパ球反応が関与するウイルス複製制御機序に関する研究 . 第 26 回日本エイズ学会学術集会、東京、11/24/2012 .
- (9) Matano T. Vif can be a promising CD8 T cell target for HIV/SIV control. The 14th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 10/29/2013 .
- (10) 野村拓志、俣野哲朗 .SIV 感染制御群における制御維持への Vif および Nef 特異的細胞傷害性 T リンパ球反応の関与に関する研究 . 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、11/12/2013 .
- G. 知的財産権の出願・登録状況
無し。

表 1 . インド人 HIV 感染者検体の解析で見出された HLA アレル

| HLA-A | 頻度 |
|------------|------|
| A*01:01 | 11 % |
| A*11:01/02 | 25 % |
| A*24:02 | 11 % |
| A*31:01 | 11 % |
| A*33:03 | 18 % |
| A*68:01 | 14 % |

| HLA-B | 頻度 |
|---------|------|
| B*07:02 | 11 % |
| B*40:06 | 14 % |
| B*44:03 | 21 % |
| B*52:01 | 11 % |
| B*57:01 | 8 % |
| B*58:01 | 8 % |

| HLA-C | 頻度 |
|---------|------|
| C*03:02 | 8 % |
| C*06:02 | 11 % |
| C*07:01 | 25 % |
| C*07:02 | 14 % |
| C*12:03 | 8 % |
| C*15:02 | 17 % |