

研究種目：基盤研究 (B)  
 研究期間：2007～2010  
 課題番号：19406019  
 研究課題名 (和文) HIV-1 感染症のタイ、バングラディッシュにおける特殊性の疫学的解析  
 研究課題名 (英文) Epidemiological characterization on HIV-1 infection in Thailand and Bangladesh  
 研究代表者  
 星野洪郎 (HOSHINO HIROO)  
 群馬大学・大学院医学研究科・教授  
 研究者番号：00107434

研究代表者の専門分野：予防医学  
 科研費の分科・細目：社会医学・衛生学  
 キーワード：HIV-1、エイズ、コレセプター、抗酸化剤、感染抵抗性

### 1. 研究計画の概要

HIV に感染している人がタイには既に 60 万人位いる。しかし多くの人が経済的な理由から標準的な医療を受けられていない。医療面での大きな制約がアジアにはある。本研究ではエイズ発症を遅らせる簡便な方法を探索する。またバングラディッシュでは、不思議なことにまだ HIV 感染の大きな流行が起きていない。感染拡大の実態を解明することにより有効な感染防止対策を提案する。

#### 1) HIV 感染の特徴のウイルス学的解析

バングラディッシュで HIV 感染状況をモニタリングし、HIV の遺伝子解析を行う。HIV 感染のウイルス学的解析により、今後の流行の予知やウイルスの病原性を解析する。バングラディッシュ人のリンパ球が HIV 抵抗性であれば、その抵抗性の理由を明らかにする。

#### 2) 抗酸化剤の培養系での性質の解析

酸化ストレス下では、TNF $\alpha$  など因子が産生され、TNF は HIV 増殖を促進する。そこで、抗酸化剤 (緑茶抽出物、アスタキサンチン) について以下の検討を行う。a. 抗酸化剤の TNF 産生抑制作用について。b. TNF による細胞死に対する抗酸化剤の影響について。c. HIV による細胞死の抗酸化剤の阻止効果について。d. HIV 感染者における酸化状態の特徴・病原性について。

#### 3) 抗酸化剤の viral load に対する影響について

登録した HIV 感染者のうち、同意の得られた人 45 人 (15 人に緑茶抽出物、15 人にアスタキサンチン、15 人を対照群) に薬剤を投与する。投与前、1 月後、2 月後、3 月後に、HIV ウイルス量、CD4 リンパ球、血中 TNF $\alpha$  量などのデータを測定し、その影響を解析する。

### 2. 研究の進捗状況

抗酸化剤として、緑茶抽出物 (green tea extract: GTE) 錠剤 (狭山茶業研究所製)、アスタキサンチン (ヤマハライフサイエンス事業)、および GTE の抗酸化作用の主成分 (-)epigallocatechin gallate (EGCG) につい

て、ヒトへの投与と培養系での活性の検討を行った。

まず、EGCG について、(1) TNF $\alpha$  による細胞毒性への影響、および (2) MT-2 細胞の培養上清の細胞毒性活性の産生への影響について検討した。TNF $\alpha$  は、ネコ腎臓由来の 8C 細胞に細胞毒性を示す。EGCG 存在下で 8C 細胞を培養し、ヒト型レコンビナント TNF $\alpha$  を加えた所、その細胞毒性 (MTT 法で検討) を軽減した。また、MT-2 細胞を EGCG 存在下で培養し、その培養上清を 8C 細胞に加え培養し、細胞毒性を検討した。EGCG を添加すると MT-2 細胞の上清の細胞毒性活性が弱められた。MT-2 細胞の上清中の細胞毒性活性は、主に TNF $\alpha$  に由来すると考えられているので、EGCG 存在下では、MT-2 細胞からの TNF $\alpha$  の産生が抑制される可能性が示唆された。

抗酸化剤は、HIV-1 の LTR に働き、その NF $\kappa$ B サイトからのウイルス RNA の転写を抑制し、HIV-1 感染者での HIV-1 の産生を抑制する可能性が考えられる。この可能性をタイのチェンマイ大学との共同研究で検討している。まず、本研究について群馬大学およびチェンマイ大学の倫理審査委員会に申請した。GTE は、お茶の成分であり、古くから飲用に用いられてきたこと、また、アスタキサンチンについても天然物は健康食品として既に用いられており大きな副作用は知られていない。

このような状況から、GTE (6錠/日: 1日に緑茶 6 杯相当) あるいはアスタキサンチンカプセル (16mg/日) の無症候性 HIV-1 感染者 (asymptomatic carrier: AC) への投与は、健康上問題ないと判定され、倫理委員会の承認の承認得られた。両薬剤のどちらか、あるいは placebo のカプセルを、チェンマイ大学に登録している AC、あるいはチェンマイの隣のランパン県の国立 Lampang 病院に登録している AC のヒト計 60 名 (各群 20 名ずつ) に投与し、投与前、1 月後、2 月後、3 月後に採血し、プラズマ中の HIV-1 量 (viral load)、CD4 細胞数、抗酸化状態の生化学的検査を行っている。現在までに、少数のデータが得られたが、なお例数を増やすように検

討している。

本研究の目的のためには、多様な HIV-1 臨床分離株を分離する必要がある。HIV-1 感染者の PBL からの HIV-1 の分離は、非感染の PBL との混合培養によって行われることが通例であるが、その場合、CCR5 や CXCR4 をコレセプターとして使用する HIV-1 が高頻度に分離されやすい。本研究では、最初から FPRL1 あるいは GPR1 を発現させた NP-2/CD4 細胞 (NP-2/CD4/FPRL1 および NP-2/CD4/GPR1 細胞) を HIV-1 感染者の PBL と混合培養した。

出来る限り多くの HIV-1 臨床材料を得るために、群馬大学医学部附属病院血液内科とタイ国チェンマイ大学医学部との間に検体提供体制を確立しました (両機関の医学倫理審査委員会の承認済み)。

両機関を受診する HIV-1 感染者のうちで同意が得られた方から末梢血液の提供を受け、遠心法で血清を分離するとともに、Ficoll-Paque 法で末梢血リンパ球を分離した。リンパ球と血清は、ただちに NP-2/CD4/FPRL1 および NP-2/CD4/GPR1 細胞と混合培養して HIV-1 を分離するとともに、凍結保存した。血清の HIV-1 RNA 量は、アンプリコア法と定量的 PCR 法で定量した。

HIV-1 のコレセプター使用性を含めたウイルス学的性質の多くは外被糖蛋白質 Env のアミノ酸配列と密接に関連するので、HIV-1 の感染が検出された NP-2/CD4/FPRL1 および NP-2/CD4/GPR1 細胞から PCR 法で env 遺伝子 DNA を増幅し、塩基配列とアミノ酸配列を決定して、コレセプター使用責任配列を解析した。

21 年度においては、以上のように HIV-1 臨床株を集中的に分離収集するとともに、その分離効率、臨床検査情報、Env 蛋白質アミノ酸配列などのデータを蓄積したので、それらに比べて生体内 population が小さいことが予想される FPRL1 や GPR1 をコレセプターとして使用する HIV-1 の分離をする。

### 3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

NP-2 細胞を用い、20 種類以上の GPCR (コレセプターおよびコレセプター候補) を発現した細胞を作製できた。これらを用いて、日本人 HIV-1 感染者由来の臨床分離株のコレセプター利用性を解析できた。

抗酸化剤の HIV-1 感染に対する影響は、タイチェンマイ大学との共同研究で実施しつつある。現在までに 30 人程に 3 月まで投与したデータを集積できた。

### 4. 今後の研究の推進方策

今後は、FPRL1 や GPR1 をコレセプターとして使用する HIV-1 株について、そのウイルス学的性質 (増殖性、細胞障害性、抗原性、細胞指向性など) を解析することで、それらの臨床的な役割を推測する。

抗酸化剤の HIV-1 感染に対する影響は、タイチェンマイ大学との共同研究で実施しつつあるが、もう少し投与者を増やし、投与期間を長くして検討したい。

### 5. 代表的な研究成果

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① Shimizu N, Tanaka A, Oue A, Mori T, Ohtsuki T, Apichartpiyakul C, Uchiyama H, Nojima Y, and Hoshino H Broad usage spectrum of G protein-coupled receptors as coreceptors for primary isolates of human immunodeficiency virus article type. AIDS 2009, 23: 761-769 査読有
- ② Nedellec R, Coetzer M, Shimizu N, Hoshino H, Polonis V R, Morris L, Martensson U E, Binley J, Overbaugh J, and Mosier D E Virus entry via the alternative coreceptors CCR3 and FPRL1 differs by human immunodeficiency virus type 1 subtype. J Virol 2009, 83: 8353-8363 査読有
- ③ Shimizu N, Tanaka A, Jinnou-Oue A, Mori T, Ohtsuki T, and Hoshino H Identification of the conformational requirement for the specificities of coreceptors for human and simian immunodeficiency viruses. AIDS Res Human Retroviruses 2009, 23: 761-769 査読有
- ④ N Shimizu, A Tanaka, A Oue, T Mori, C Apichartpiyakul and H Hoshino. A short amino acid sequence containing tyrosine in the N-terminal region of G protein-coupled receptors is critical for their potential use as co-receptors for human and simian immunodeficiency viruses. J Gen Virol 2008, 89: 3126-3136 査読有
- ⑤ P Xiao, O Usami, Y Suzuki, H Ling, N Shimizu, H Hoshino, M Zhuand, Y Ashino, H Gu and T Hattori. Characterization of a CD4-independent clinical HIV-1 that can efficiently infect human hepatocytes through chemokine (C-X-C motif) receptor 4. AIDS 2008, 22:1749-1757 査読有

[学会発表] (計 19 件)

- ① 清水宣明、星野洪郎 HIV コレセプター活性を持つ Gタンパク質共役受容体の分子系統関係の特徴、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009.10.26 都市センターホテル(東京)
- ② Hoque Sk Ariful、清水宣明、星野洪郎 Incorporation of non-susceptible bystander cells into HIV-1 syncytia、第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会、2008.11.26、大阪国際交流センター (大阪)
- ③ 星野洪郎、清水宣明、田中淳、大上厚志 重粒子線照射による細胞形質の特徴的変化についてウイルスを利用した解析。日本放射線影響学会 2007.11.16 幕張メッセ国際会議場(千葉)
- ④ 清水宣明、田中淳、星野洪郎 色々な Gタンパク質共役受容体を発現したヒト細胞を用いた HIV-1 感染者末梢血リンパ球からの HIV-1 分離。第 55 回日本ウイルス学会 2007.10.22 札幌コンベンションセンター (札幌)
- ⑤ 清水宣明、田中淳、大上厚志、星野洪郎 HIV-1 感染感受性に対する重粒子線の効果の解析。第 21 回日本エイズ学会 2007.11.28 広島国際会議場(広島)