

令和元年5月30日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(A) (海外学術調査)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H02658

研究課題名(和文) ベトナムでのHIV感染者コホートをを用いた治療・感染予防戦略研究

研究課題名(英文) A study of therapy and prevention in a Vietnamese cohort of HIV-1 infection

研究代表者

滝口 雅文 (TAKIGUCHI, Masafumi)

熊本大学・エイズ学研究センター・教授

研究者番号：00183450

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,400,000円

研究成果の概要(和文)：無治療のHIV-1サブタイプA/E感染ベトナム人536名の解析を行い、HLA-C\*12:02はHIV-1感染進行を遅らせることを、逆にHLA-A\*29:01-B\*07:05-C\*15:05は、HIV-1感染進行を促進させるHLAハプロタイプであることを明らかにした。また303個のCTL逃避変異と考えられるHLA相関変異を同定した。治療患者の解析では、90%以上のウイルス学的抑制率を治療開始後42ヶ月維持できた。また治療失敗と診断された26名中5名に、プロテアーゼ阻害剤に対する薬剤耐性変異が検出された。LPVrと生活習慣病の関連の解析で、LPVr内服と高脂血症の有症率との関連を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、HIV-1サブタイプA/E慢性感染者で、エイズ進行に関与するHLAを同定できた。また、初めてHIV-1サブタイプA/Eに対する免疫逃避変異を明らかにでき、HIV-1増殖抑制能を有したCTLを明らかにできたことは、今後のHIV-1サブタイプA/Eに対するワクチン開発に貢献できる。治療患者の解析では、ベトナムでも日本と同じレベルの治療効果が得られたが、プロテアーゼ阻害剤に対する薬剤耐性変異が確認され、今後このような薬剤耐性ウイルスが広まるのが危惧された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the association of HLA with clinical outcome in 536 HIV-1 subtype A/E-infected treatment-naive Vietnamese and found that HLA-C\*12:02 and HLA-A\*29:01-B\*07:05-C\*15:05 were protective allele and detrimental haplotype, respectively. We further analyzed the sequences of HIV-1 in these individuals and identified 303 HLA-associated mutations which are candidates of CTL escape mutations. We analyzed ART treatment patients and found 90% success rate of treatment for 42 months. Out of 26 patients with treatment failure, 5 patients were infected with HIV-1 having drug resistance mutations in protease. We also found a significant association of TPVr treatment with hyperlipidemia in the treatment patients.

研究分野：ウイルス免疫学

キーワード：HIV-1 エイズ ベトナムコホート

## 1. 研究開始当初の背景

現在 3,500 万人の人が HIV に感染しており、ほぼ同数の人が既にエイズで死亡している。近年のエイズ治療薬の開発により、その恩恵にあずかれる先進国ではエイズは慢性疾患になりつつあるが、一方、経済的理由により治療薬が十分使えないアフリカやアジアの国々では未だエイズで年間 160 万人が死亡しており、約 230 万人の人が新規に HIV に感染している (2013 UNAIDS Report)。東南アジアでは、日本や欧米で流行している subtype B ウイルスとは違う subtype A/E ウイルスが流行しており、そのウイルス学的性格、免疫反応、薬剤治療に対する反応性は十分に解析されていない。また治療薬も先進国ほど最近開発されたものが速やかに使われることも少なく、耐性ウイルスの出現等が大きな問題になりつつある。アフリカと同様に新規感染者数が多いことから、ワクチン開発の必要性を強く求められている。

東南アジアの中でもベトナムは、2012 年の時点で 30 万人の人が HIV に感染しており、既に 200 人に一人が感染している状況になっている。欧米・日本ほど薬剤治療は十分でなく、そのため薬剤耐性ウイルスの出現等の問題を抱えている。また薬剤の副作用などの問題も、欧米人とは違った状況にあると推定されている。しかし、これらの研究・調査はほとんどされていない状況である。このような状況の中、我々はベトナム・ハノイの国立熱帯病病院 (NHTD) を中心にして、2007 年から治療コホートを、また 2012 年からは無治療コホートを立ち上げ、以上の問題を解決するために HIV 感染者のリクルートをしてきた。既に治療コホートでは 2,000 名以上が、また無治療コホートでも 450 名がリクルートされており、臨床データと検体の収集を進めている。

## 2. 研究の目的

ベトナム・ハノイでの HIV-1 感染者の 2 つのコホート (薬剤治療コホート及び無治療コホート) を用いて、1) 治療コホートでは薬剤治療による耐性ウイルスの出現と薬剤の副作用の解析を行い、2) 無治療コホートでは、エイズ進行に影響を与える HLA 抗原と HIV 特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の同定を行う。これにより治療コホートでの解析から、今後のベトナムでの HIV 治療薬の治療戦略を立てる。一方、無治療コホートの解析から、東南アジア地区で流行している HIV-1 subtype A/E ウイルスに対する有効なワクチン開発のために必要な HIV 抗原部分を同定し、感染阻止のための戦略を立てる。これらの研究は、アフリカに次いで HIV の流行地域である東南アジア地区における治療と感染阻止に対する今後の戦略に貢献する。

## 3. 研究の方法

### (1) ハノイコホートでのデータ・検体採集

ハノイの NHTD での患者のリクルートと臨床データの収集と検体を採取する。薬剤治療対象群と無治療群の 2 つのグループに分ける。また、これまでリクルートした患者の各種臨床検査等のデータを集め、無治療コホート群では末梢血リンパ球、血漿、治療群では血漿のサンプリングを、治療コホート群からは臨床データの収集と検体を採取する。

### (2) 治療コホート群の解析

治療中の患者で、安定期の患者は、年 1 回のウイルス量測定を行っているが、この時点でウイルスが検出された症例に関しては、翌月にも採血を行い、2 回連続してウイルスが検出されたものは、遺伝子解析を行う。耐性変異の出現頻度とパターンのデータを蓄積し、耐性変異の蓄積の実体を明らかにする。また、薬剤による生活習慣病との関連を解析した。

### (3) 無治療コホートの解析

#### 1) CD4T 細胞数と pVL に相関する HLA アリルの解析：

新規リクルート患者の HLA タイピングを行う。今までに解析した患者と新規にリクルートした患者を合わせて、患者のリクルート時の CD4T 細胞数、血漿 HIV ウイルス量 (pVL) と各 HLA アリルの相関を解析し、CD4 T 細胞数と pVL に相関する HLA アリルを明らかにする。

#### 2) Overlapping HIV-1 peptide に反応する T 細胞の解析：

新規リクルート患者から採取した末梢血リンパ球を用いて、3 つの HIV 蛋白 (Nef, Gag, Pol) 領域に対する 17-mer overlapping peptide を作製し、これに対する T 細胞の反応性を、ELISPOT アッセイを用いて調べる。それぞれのペプチドに対して反応している患者と、していない患者との間に、CD4T 細胞数と pVL に相関がみられるかを解析し、HIV-1 の増殖抑制に関与している T 細胞を明らかにする。さらに、末梢血リンパ球を 17-mer peptide で刺激、培養して誘導した T 細胞に対して、短いペプチドに対する反応を ICS アッセイで解析し、最適のエピトープペプチドを同定する。患者の HLA を 1 つのみ発現している細胞 (HLA が発現していない 221 細胞に遺伝子導入して作製する) を刺激細胞として、HLA 拘束分子を決定する。

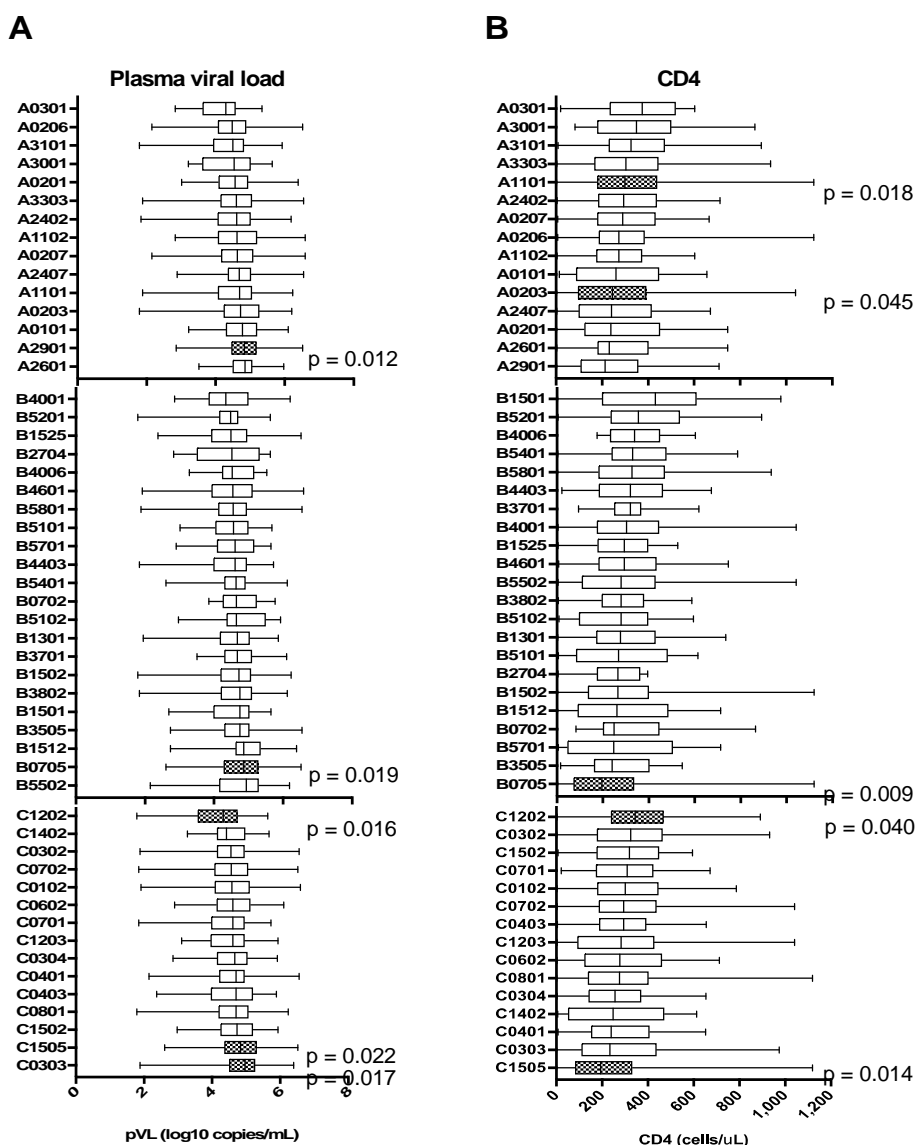
## 4. 研究成果

### (1) 無治療コホート群の解析

ハノイの NHTD での患者のリクルートを行い、無治療の HIV-1 サブタイプ A/E 慢性感染者 536 名に関して、HLA アリルタイピングを行い、続いて HLA アリルと感染者の CD4 陽性 T 細胞数 (cells/ul) および血中ウイルス量 (copies/ml) との関連性を Mann-Whitney 検定により分析した。さらに、HLA-AP (Tran and Chikata et al., AIDS, 2016) の出現数および出現の有無の

感染者の病態進行への影響を、それぞれ Spearman 検定および線形回帰分析により解析した。HLA アリルは、それぞれ HLA-A : 15 種、HLA-B : 22 種、HLA-C : 15 種が同定された。続いて病態に対する相関分析を行った結果、HLA-C\*12:02 は感染者の低い血中ウイルス量と、HLA-A\*29:01、B\*07:05、C\*03:03 および C\*15:05 が高い血中ウイルス量と有意に相関していた。また HLA-A\*11:01 および C\*12:02 は高い CD4 陽性 T 細胞数と、HLA-A\*02:03、B\*07:05 および C\*15:05 は低い CD4 陽性 T 細胞数と有意に相関していた (図 1)。一方で、本コホートでは HLA-A\*29:01、B\*07:05 および C\*15:05 は大きい連鎖不平衡を形成していた。さらに、Pol 領域の HLA-A\*29:01-B\*07:05-C\*15:05 関連 HIV-1 変異の出現数と CD4 値は負の相関関係を示し、血中ウイルス量と正の相関の傾向を示した。本研究の結果により、ベトナム人 HIV-1 慢性感染者において、HLA-C\*12:02 が HIV-1 感染に対し有利な HLA アリルであり、また HLA-A\*29:01-B\*07:05-C\*15:05 ハプロタイプが不利な HLA アリルであることが明らかとなった。さらに、ハプロタイプに選択される変異により、CTL による HIV-1 のコントロールが何らかの影響を受け、その結果悪い病態を示すことが示唆された。

図 1 HLA と血漿ウイルス量と CD4T 細胞数との相関



次に、ベトナム人 HIV-1 subtype A/E 慢性感染者 383 名を対象として、HIV-1 タンパク質の Gag, Pol, Nef 遺伝子領域のアミノ酸配列を決定し、phylogenetic dependency network model により計 303 個 (Gag : 79 個、Pol : 114 個、Nef : 110 個) の HLA 相関変異 (HLA-AP) を同定した。続いて、HLA-AP の感染者の病態 (CD4 数および血中ウイルス量) に対する相関分析を行った結果、個々の感染者の Pol 領域における HLA-AP の総数は、血中ウイルス量と有意に正の相関関係が認められ、一方で CD4 数は有意に負の相関関係が認められた。また Gag 領域では、血中ウイルス量のみ正の相関関係が認められた。さらに、個々の感染者における HLA 関連逃避変

異アミノ酸の割合と病態との相関分析をした結果、Pol 領域では血中ウイルス量と有意に正の相関関係が認められ、CD4 数は有意に負の相関関係が認められた。一方で、Gag 領域では、CD4 数のみに負の相関関係が認められた。続いて、個々の HLA-AP を詳細に解析したところ、Gag および Pol 領域のそれぞれ 7 か所の HLA-AP が高い血中ウイルス量と、また Gag 領域の 2 か所および Pol 領域の 13 か所の HLA-AP が低い CD4 数と関連していることが明らかになった。本研究では、初めて大規模かつ網羅的に HIV-1 subtype A/E の HLA-AP の解析を行い、ベトナム人集団においては Pol 領域に選択される HLA-AP の蓄積が感染者の病態に悪い影響を与えていることが示唆された。さらに、HLA-C\*15:05 拘束性 SL9 特異的 CTL が、Pol653 での 2 つの変異 (A, T) を認識できないことを明らかにし、SL9 特異的 CTL によるこの 2 つの変異の選択とその蓄積が病態進行に関わっていると考えられた。

HIV-1 特異的 CTL の解析を 449 名の感染者に対して、Gag, Pol, Nef overlapping peptides を用いて、ELISPOT assay で行った。その結果、Pol, Gag に対する反応は、ウイルス量に負の相関、CD4T 細胞数には正の相関が見られた。これらのことから、Pol, Gag に対する CTL の一部は、HIV-1 subtype A/E の増殖抑制に関与していることが強く示唆された。

#### (2) 治療コホート群の解析

治療中の患者は、半年ごとに臨床情報を収集した。これらのデータを用いて、長期治療によるウイルス学的抑制率および免疫学的効果 (CD4 数の回復) と治療失敗に関連する因子について解析し、ART12 ヶ月目のウイルス学的抑制率は 95.5% で、90% 以上のウイルス学的抑制率を 42 ヶ月維持できていた。治療失敗に関連する最も重要な因子は鬱状態で、社会サポートの有無が重要であったことを明らかにした。さらに、初回治療に失敗した 26 名中 5 名にプロテアーゼ阻害剤に対する薬剤耐性変異が検出された。また、HIV 治療中の患者 1,346 名を対象に、LPVr と生活習慣病の関連を精査し、LPVr 内服と高脂血症の有症率が有意に関連していたが、LPVr 内服と心血管系疾患の発症率に有意な関連は見られなかった。

### 5. 主な発表論文等

#### [雑誌論文](計 14 件)

Thida W, Kuwata T, Maeda Y, Yamashiro T, Tran GV, Nguyen KV, Takiguchi M, Gatanaga H, Tanaka K, Matsushita S, The role of conventional antibodies targeting the CD4 binding site and CD4-induced epitopes in the control of HIV-1 CRF01\_AE viruses, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有, Vol.508, 2019, pp.46-51

DOI:10.1016/j.bbrc.2018.11.063

Mizushima D, Nguyen DTH, Nguyen DT, Matsumoto S, Tanuma J, Gatanaga H, Trung NV, van Kinh N, Oka S, Tenofovir disoproxil fumarate co-administered with lopinavir/ritonavir is strongly associated with tubular damage and chronic kidney disease, *Journal of Infection and Chemotherapy*, 査読有, Vol.24, 2018, pp.549-554

DOI: 10.1016/j.jiac.2018.03.002

Chikata T, Tran GV, Murakoshi H, Akahoshi T, Qi Y, Naranbhai V, Kuse N, Tamura Y, Koyanagi M, Sakai S, Nguyen DH, Nguyen DT, Nguyen HT, Nguyen TV, Oka S, Martin MP, Carrington M, Sakai K, Nguyen KV, Takiguchi M, HLA Class I-Mediated HIV-1 Control in Vietnamese Infected with HIV-1 Subtype A/E, *Journal of Virology*, 査読有, Vol.92, 2018, Article No.e01749-17

DOI: 10.1128/JVI.01749-17

Tanuma J, Matsumoto S, Haneuse S, Cuong DD, Vu TV, Thuy PTT, Dung NT, Dung NTH, Trung NV, Kinh NV, Oka S, Long-term viral suppression and immune recovery during first-line antiretroviral therapy: a study of an HIV-infected adult cohort in Hanoi, Vietnam, *Journal of the International AIDS Society*, 査読有, Vol.20, 2017, Article No.e25030

DOI: 10.1002/jia2.25030

Van Tran G, Chikata T, Carlson JM, Murakoshi H, Nguyen DH, Tamura Y, Akahoshi T, Kuse N, Sakai K, Sakai S, Cobarrubias K, Oka S, Brumme ZL, Van Nguyen K, Takiguchi M; NHTD Treatment-Naive Cohort Study Group, A strong association of human leukocyte antigen-associated Pol and Gag mutations with clinical parameters in HIV-1 subtype A/E infection, *AIDS*, 査読有, Vol.30, 2016, pp.681-689

DOI: 10.1097/QAD.0000000000000969

Kuse N, Rahman MA, Murakoshi H, Tran GV, Chikata T, Koyanagi M, Nguyen KV, Gatanaga N, Oka S, Takiguchi M, Different effects of NNRTI-resistance mutations on CTL recognition between HIV-1 subtype B and subtype A/E infections, *Journal of Virology*, 査読有, Vol.89, 2015, pp.7363-7372

DOI: 10.1128/JVI.00974-15

#### [学会発表](計 3 2 件)

Takiguchi M, CTL- and NK cell-mediated HIV-1 control in Asians, 19th Kumamoto AIDS Seminar (国際学会) 2018

Murakoshi H, Zou C, Kuse N, Akahoshi T, Chikata T, Gatanaga H, Oka S, Hanke T, Takiguchi M, Control of HIV-1 by CD8+ T cells specific for epitopes of conserved mosaic vaccine immunogens, HIVR4P 2018 (国際学会) 2018

Takiguchi M, HLA class I - mediated HIV - 1 control in Vietnamese infected with HIV subtype A/E, National Scientific Conference on Infectious Diseases, HIV/AIDS, The 8th ASEAN Conference of Tropical Medicine and Parasitology (招待講演)(国際学会) 2018

Takiguchi M, Chikata T, Tran GV, Murakoshi H, Akahoshi T, Qi Y, Naranbhai V, Kuse N, Tamura Y, Koyanagi M, Sakai S, Nguyen DH, Nguyen DT, Nguyen HT, Nguyen TV, Oka S, Martin MP, Carrington M, Sakai K, Nguyen KV, HLA class I-mediated HIV-1 control in Vietnamese infected with HIV-1 subtype A/E, 20th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim /U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program: AIDS and Immunology Joint Panel (招待講演)(国際学会) 2018

近田 貴敬, 村越 勇人, 湯永 博之, 岡 慎一, 滝口 雅文, 日本人およびベトナム人 HIV-1 感染者の病態進行の抑制に関する細胞傷害性 T 細胞, 第 31 回日本エイズ学会学術集会・総会 (シンポジウム)(招待講演) 2017

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.caids.kumamoto-u.ac.jp/data/takiguchi/default.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名: 岡 慎一

ローマ字氏名: (OKA, Shinichi)

所属研究機関名: 独立行政法人国立国際医療研究センター

部局名: エイズ治療・研究開発センター

職名: センター長

研究者番号(8桁): 20194326

### (2)研究協力者

研究協力者氏名: 村越 勇人

ローマ字氏名: (MURAKOSHI, Hayato)

研究協力者氏名: 久世 望

ローマ字氏名: (KUSE, Nozomi)

研究協力者氏名: 赤星 智寛

ローマ字氏名: (AKAHOSHI, Tomohiro)

研究協力者氏名: 近田 貴敬

ローマ字氏名: (CHIKATA, Takayuki)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。