

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2006～2008

課題番号：18256003

研究課題名（和文） 北タイにおける HIV 伝播とエイズ病態に関する宿主遺伝子多型研究

研究課題名（英文） Host gene polymorphisms associated with HIV-transmission and AIDS-progression among HIV-1-infected individuals in northern Thailand

研究代表者

有吉 紅也（ARIYOSHI KOYA）

長崎大学・熱帯医学研究所・教授

研究者番号：30311400

研究成果の概要：

北タイ HIV コホートを発展させるため、死亡・日和見感染・抗 HIV 薬治療結果・副作用出現に関する詳細な臨床情報を収集解析し、さらに北タイ HIV 拠点病院間連携を確立して HIV 非感染配偶者・HIV 長期生存者の参加者数を倍増させた。HIV 感染者 765 名、HIV 非感染配偶者 105 名について HLA クラス I A, B, C アリールを 4 桁レベルで決定し、ウイルス量や副作用と強く相関する新たなアリールを複数発見した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	14,100,000	4,230,000	18,330,000
2007 年度	11,700,000	3,510,000	15,210,000
2008 年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
年度			
年度			
総計	33,000,000	9,900,000	42,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：人類遺伝学

キーワード：①HIV 感染 ②ウイルス伝播 ③エイズ病態 ④宿主遺伝子多型 ⑤タイ

1. 研究開始当初の背景

HIV 伝播やエイズ進行と宿主遺伝子多型との相関関係を明らかにすることは、HIV 伝播やエイズ進行のメカニズムの解明に繋がり、如いては新たな HIV 感染予防治療方法の開発に繋がる。これらの病態と相関する宿主遺伝子多型を発見するには、十分な数の対象者が適切に選択され、すべての対象者について正確な人口統計学的・臨床的情報および臨床検体材料が揃った追跡率の高いコホート研究が有用である。これまで欧米を中心に流行したサブタイプ B の HIV-1 に感染した白人を対象とした宿主遺伝子多型研究は数多く論文発表されてきたが、日本を含むアジア地域に

流行する CRF01_AE サブタイプの HIV-1 に感染したアジア人を対象とした研究は殆どない。特に HIV に感染した配偶者から何度も暴露されたにもかかわらず HIV 感染に抵抗性を示す配偶者（Exposed to HIV but seronegative, ESN）や HIV 感染後抗 HIV 薬未治療であるにもかかわらず長期間にわたってエイズへ進行していない長期生存 HIV 感染者を対象にした国際級の臨床疫学フィールドはほとんどない。その結果、アジア人における HIV 伝播やエイズ進行に関連する宿主遺伝子多型の情報は非常に限られている。

2. 研究の目的

本研究では、アジアで最も HIV 流行が浸淫したタイ国の研究者と日本の研究者による国際共同研究チームを組織して、代表研究者らによって進行中の北タイ HIV コホート研究を維持・発展させ、このコホート研究をベースとした種々の宿主遺伝子多型研究を実施することを2つの柱としている。申請時当初の具体的な目的は以下のとおりである：

(1) 北タイ HIV コホート

- ① 死亡率・日和見感染症罹患率に関する情報を収集すること
- ② 2003 年から急速に普及したジェネリック抗 HIV 薬 (GPOvir®) による治療成功率・副作用出現率、治療失敗リスク因子を明らかにすること。
- ③ 隣県の HIV 拠点病院との連携を確立させ ESN 配偶者および長期生存 HIV 感染者群を拡大すること

(2) 宿主遺伝子多型研究

- ① 一連の免疫関連遺伝子の一塩基多型 (SNP) を調べ HIV 感染抵抗性と関連する新たな遺伝子多型を見出す
- ② 一連の免疫遺伝子の一塩基多型 (SNP) を調べエイズ進行遅延と関連する宿主遺伝子多型を見出す
- ③ 一連の免疫遺伝子の一塩基多型 (SNP) を調べ各種日和見感染症に関わる宿主遺伝子多型を見出す
- ④ 一連の免疫遺伝子の一塩基多型 (SNP) を調べ GPOvir® 治療成功もしくは副作用出現に有意に関連する宿主遺伝子多型を見出す

3. 研究の方法

(1) 2000 年 7 月より本代表研究者とタイ国立衛生研究所 (NIH) との共同で北タイランパン県に位置するランパン病院エイズ専門外来に通院する HIV 感染者およびその配偶者を対象に HIV コホートを開始した。本研究では、① 同病院の診療録からコホート参加者の臨床経過 (死亡、日和見感染症罹患) に関する詳細な情報を収集し死亡率、主要な日和見感染症の罹患率やリスク因子について解析する。② 2003 年頃から急速に普及したジェネリック抗 HIV 薬 (GPOvir®) 治療開始後 6 ヶ月および 24 ヶ月のウイルス量 (400 コピー/ml 以上) にて判定した治療成績、治療後 24 ヶ月間の副作用についての情報を収集し、さらに治療開始後 6 ヶ月および 24 ヶ月時に収集した患者の服用行動や社会経済背景に関する質問票の結果と連携させて治療失敗に対するリスク因子解析を実施する。③ ランパン病院に近接する複数のエイズ拠点病院 (パヤオ県病院、チェンマイ県病院、チェンライ総合病院) との連携協力を確立させ ESN 配偶者および長期生存 HIV 感染者の参加者数を増やす。

(2) 上記コホート参加者から得られた臨床

情報および DNA 検体を用いて種々の宿主遺伝子多型研究を推進するために、研究計画当初は京都大学松田文彦分担研究者によって選別された約 180 の免疫関連遺伝子の機能に影響を与える約 500 の SNP 解析を実施する予定であった。しかし、欧米の国際共同研究チーム (CHAVI) による世界最大級のゲノムワイド SNP 解析研究が 2007 年に発表され、結局エイズ進行と強く関連する領域は MHC 領域のみであったという結果を考慮し、さらに共同研究者会議での検討を経て、幅広く SNP 解析を行うという当初の遺伝子多型解析戦略を、MHC 領域で最も重要である HLA 遺伝子を高分解能で解析するという狭く深く遺伝子多型を解析する方針へ大きく方向転換させた。具体的には、HIV 感染者 765 名、ESN 配偶者 105 名について、HLA クラス IA, B, C 遺伝子のアリアルを 4 桁レベルで同定し、さらには HLA クラス IIDRB1 遺伝子の同定を行うこととなった (クラス II 遺伝子多型と臨床像との解析は現在も進行中である)。

4. 研究成果

(1) 北タイ HIV コホート

① 1999 年 11 月 1 日から 2006 年 9 月 31 日までにランパン病院エイズ専門外来を受診した 2,105 名の HIV 感染者について 2006 年 10 月 31 日時点での生存調査を実施し、1,896 名 (90.1%) について情報が得られた。その結果 725 名が死亡、1,171 名が生存していることが確認された。図 1 に 6 ヶ月毎の死亡率の推移を示した。タイ政府による「HIV・エイズ患者のための抗 HIV 薬普及プログラム」(NAPHA) が 2003 年に開始されて以来、同専門外来において GPOvir® 治療を開始した患者数が急速に増加したのに反比例して、死亡率はプログラム開始前の約 30 death / 100 Person-Year-Obsevation (PYO) から 2006 年の 5.3 death / 100 PYO へと劇的に減少した。タイ国において、本研究のように 90% という高い追跡率が得られ、さらに NAPHA プログラムの前後で死亡率の変化を正確に示したデータは他に例がない。さらに 2008 年 10 月の生存調査結果を加えて論文発表する予定である。

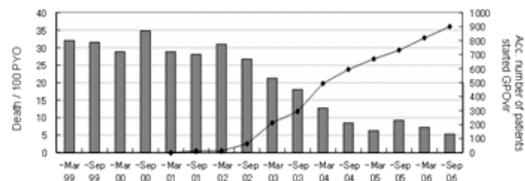


図1 ランパン病院エイズ専門外来通院患者の6ヶ月毎死亡率の推移(棒グラフ)とGPOvir服用開始患者の累計数(折れ線グラフ)

② 我々は抗 HIV 薬普及プログラム開始前の 445 名および同プログラム開始後 GPOvir 治療を開始した 409 名を対象に、死亡率低下の原

因として最も重要な日和見感染症罹患状況を詳細に調べ、罹患率を比較した。(図2)その結果、プログラム前後の各罹患率比(Incidence Rate Ratios)は、日和見感染症のタイプによって大きく異なることが判明した。この相違は、追跡開始時点でのCD4値や日和見感染症の既往歴によって影響を受けることから、Cox 比例ハザードモデルにより、これらの因子と年齢・性別を補正し主要な日和見感染症罹患に対する抗 HIV 薬治療の影響をハザード比で求めたところ、結核(TB all)が 0.18 (95% C.I., 0.10 - 0.31)、クリプトコッカス(Crypto)が 0.20 (95% C.I., 0.10 - 0.40)、ニューモシスチス肺炎(PCP)が 0.01 (95% C.I., 0.001-0.08)、ペニシリオーシス(Penicilliosis)が 0.12 (95% C.I., 0.05 - 0.32)とニューモシスチス肺炎において最も大きな影響があることが定量的に示された。日和見感染症の頻度を断面的研究で調査した論文は過去に発表され、日和見感染症頻度が地域によって異なることは知られている。しかし、本研究のように東南アジアにおける日和見感染症の罹患率を縦断的研究で詳細に調査した研究はない。本データは、日和見感染症の罹患率を示したのみならず、抗 HIV 薬普及プログラムによる日和見感染症への影響を正確に示した点で大変意義があり、現在投稿論文準備中である。

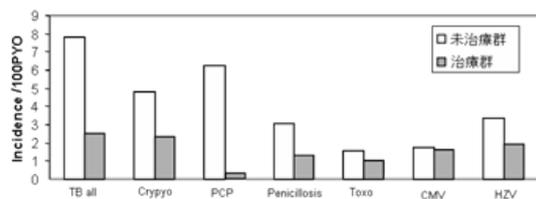


図2 抗HIV薬普及プログラム前後における日和見感染症罹患率(incidence rate)の比較

③ GPOvir®治療成績と治療失敗と相関するリスク因子に関する研究では、同病院エイズ専門外来でGPOvir®治療を開始した409名の感染者について情報が得られ、治療失敗率が6ヶ月時点で17%、24ヶ月時点で15%であった。また、ロジスティック法により治療失敗に対するリスク因子を解析したところ、抗 HIV 薬の治療歴(オッズ比 3.08, 95%信頼区間 1.71 - 5.57)と服用行動(オッズ比 2.97, 95%信頼区間 1.47-6.0)に加えて、養育する子供の有無がオッズ比で 1.85(95%信頼区間 1.10 - 3.34)と有意に関連することが判明した。このように社会的因子が治療成績と関連していることを示した報告は他に例がなく、この結果は論文に掲載された。

上記、死亡および日和見感染症罹患に関する追跡情報、治療成績や副作用出現率に関する情報は、本研究における宿主遺伝子多型研究の重要な基礎データとなった。さらに、本

研究を通じて北タイにあるパヤオ県病院、チェンマイ県病院、チェンライ総合病院エイズ専門外来と研究協力関係を確立させた。その結果、ESN 配偶者および長期生存 HIV 感染者がそれぞれ新たに 150 症例の参加者を得ることに成功した。これらの群から得られた臨床情報と検体は、ランパン病院における宿主遺伝子多型研究結果を検証する対象として位置づけられ、将来の研究発展に非常に意義がある。

(2) 宿主遺伝子多型研究

① HIV 感染者 763 名および ESN 配偶者 105 名の HLA が 4 桁レベルでタイピングされ、HIV 感染者のうち 1 名でこれまでに報告例のない B15 ジェノタイプが見つかった。いずれの群においても、頻度の高いアリアルは、A 遺伝子座で A*1101, A*0203, A*0207, A*2402, A*3303, B 遺伝子座で B*4601, B*5801, B*4001, B*1301, B*1502, C 遺伝子座で Cw*0102, Cw*0702, Cw*0304, Cw*0801 であった。アリアル頻度を両群で比較したところ、A*0201 の保有頻度が ESN 群で 6.67%(n=7)であり HIV 感染者群の 2.65%(N=20)に比べ有意に高かった(p=0.027)。しかし、この相関は強いものではなく、別の ESN 集団で再度確認する必要がある。また、それ以外のアリアルについても統計的に有意な差は認められなかった。

② HIV 感染者におけるエイズ進行速度は、各感染者のもつセットポイントウイルス量と非常に強く相関することが知られている。そこで、HLA タイプが得られた 763 名の感染者について各 HLA アリアル保有群のセットポイントウイルス量を全体の中央値 5.183 (25パーセンタイル、75パーセンタイル: 4.49, 5.63) Log₁₀RNAcopies/ml と比べてみたところ、B*5701 を保有する群のウイルス量が 3.99 (2.60, 5.19) Log₁₀RNAcopies/ml であり、統計的に有意差(p=0.0052; Kruskal-Wallis non-parametric test)をもって約 10 倍低いことが判明した(図3)。

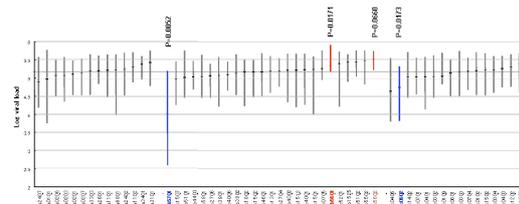


図3 HLA クラスIアリアルとHIVウイルス量との相関関係
各アリアルを有する感染者のHIVウイルス量中央値(25%スタイル、75%スタイル)が棒で、全感染者のHIVウイルス量中央値が点線で示してある。相関はKruskal-Wallisテストにて検定

Cw*0602 群のウイルス量も統計的に有意に低かったが(p=0.017)、これは B*5701 との強い連鎖不均衡による(p<0.0001)。一方、B*5601 群と B*5602 群において、それぞれ 5.33 (5.17, 5.91), 5.52 (5.21, 5.74) Log₁₀RNA copies

/ml と統計的に有意に高いウイルス量が認められた (B*5601 と B*5602 をあわせて比較した場合の有意差は $p=0.0024$) (図 4)。B*5701 と低ウイルス量との相関は、サブタイプ B に感染した白人およびサブタイプ C に感染した黒人で示されているが、CRF01_AE サブタイプに感染したアジア人でこのように明確に相関を示したデータはこれがはじめてであり、論文投稿準備中である。

③ 次に主要な日和見感染症の発症と関連する HLA アリールを検討してみたところ、結核罹患歴のない感染者に比べ肺外結核患者群に Cw*0403 保有者が有意に多いことが判明した (8.97% vs 24.0% ; $p=0.012$)。しかし、肺結核も含めてそれ以外の日和見感染症と相関する HLA アリールはなかった。一方、本研究と同じ感染者群 ($n=711$) を対象に実施された GBV-C 重複感染に関する森内浩幸教授らの研究から 78 名 (11%) の感染者において血漿中 GBV-C RNA が PCR にて検出され、GBV-C 持続感染が確認された。このデータを用いて、GBV-C 持続感染に関連する HLA アリールを検討したところ、A*3101 保有者群 24 名では 29% ($n=7$; $p=0.004$)、B*1512 保有者群 7 名中 42.9% ($n=3$; $p=0.007$) に GBV-C 持続感染を認め有意な相関関係があった。

④ 最後に HLA アリール情報が得られた 763 名の HIV 感染者のうち GP0vir®治療を開始した 221 名の HIV 感染者について治療成否および副作用を検討したところ、治療失敗症例と相関するアリールはなかった。しかし、24 ヶ月の追跡期間中 76 名 (34.4%) に副作用を認め：内訳は薬疹 ($n=28$, 12.7%)、肝障害 ($n=9$, 4.1%)、末梢神経障害 ($n=9$, 4.1%)、リポジストロフィー ($n=27$, 12.2%)、乳酸アシドーシス ($n=3$, 1.4%) であることが判明した。これらの副作用と HLA アリールとの関連について検討したところ、B*1501, B*5701, Cw*0602 との間に強い相関が認められた (各 $p=0.003$, $p<0.001$, $p<0.001$)。尚、B*5701 に加えて B*1501 と Cw*0602 との間にも連鎖不均衡があり ($p<0.001$)、副作用の出現は Cw*0602 との関係によると考えられた。興味あることに、Cw*0602 保有感染者に出現する副作用に薬疹はなかった。その一方で、B*3505, B*3901 保有患者群における薬疹の出現頻度は、各 40% ($n=4$, $p=0.026$, by Fisher's exact test), 45.5% ($n=5$, $p=0.006$ by Fisher's exact test) と全体に比べ有意に高かった。過去に GP0vir®治療を開始したタイの感染者群における Case-control study において B*3505 と薬疹との報告はあるが、本研究ではバイアスのない患者群において同様の結果が得られたこと、また、B*3505 に加えてさらに副作用出現に相関する B*3901, Cw*0602 との関係を示した点において臨床に役立つ情報である。

以上のように本研究は、当初広く SNP 解析を行うという宿主遺伝子多型研究戦略をもって開始したが、世界の研究状況を考慮して HLA に焦点を絞り深く解析した結果、CRF01_AE サブタイプの HIV-1 に感染したアジア人を対象にした HLA 研究としては世界に例を見ないレベルの高い研究に発展させ、ウイルス量や抗 HIV 薬副作用と関連する HLA の発見につながった。また、本研究を通じて北タイ HIV コホート研究の臨床情報が充実し、北タイ HIV 感染者の詳細な状況が得られた。さらに北タイの他の拠点診療機関と連携して ESN や長期生存者の参加者数が倍増させることに成功しており、これらの成果は、今後の同地域における宿主遺伝子多型研究や GBV-C 重複感染などの臨床科学研究への発展に寄与することが多いに期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Rojanawiwat A, Ariyoshi K, Pathipvanich P, Tsuchiya N, Auwanit W, Sawanpanyalert P. Substantially exposed but HIV-negative individuals are accumulated in HIV-serology-discordant couples diagnosed in a referral hospital in Thailand. *Jpn J Infect Dis.* 62(1): 32-36, 2009 査読有
2. Wichukchinda N, Nakayama EE, Rojanawiwat A, Pathipvanich P, Auwanit W, Vongsheree S, Ariyoshi K, Sawanpanyalert P, Shioda T. Effects of CCR2 and CCR5 Polymorphisms on HIV-1 Infection in Thai Females. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 47(3): 293-297, 2008 査読有
3. Saeng-Aroon S, Yoshida LM, ③ Ariyoshi K, 他 8 名. An Efficient Tool for Surveying CRF01_AE HIV Type 1 Resistance in Thailand to Combined Stavudine-Lamivudine-Nevirapine Treatment: Mutagenically Separated PCR Targeting M184I/V. *Aids. Res. Hum. Retrovir.* 23(12): 1461-1468, 2007 査読有
4. Wichukchinda N, Kitamura Y, Rojanawiwat A, ⑩ Shioda T, ⑪ Ariyoshi K. The polymorphisms in *DC-SIGNR* affect susceptibility to HIV type 1 infection. *Aids. Res. Hum.*

Retrovir. 23(5): 686-692, 2007 査読有

5. Pumpradit W, Ariyoshi K, 他 6 名. Mycobacterium avium and Burkholderia pseudomallei (Melioidosis) coinfection in an HIV-positive patient. Asian Pac J Allergy Immunol. 24(4): 239-243, 2006 査読有

[学会発表] (計 7 件)

1. Sriwanthana B, Mori M, Wichukchinda N, ⑦ Ariyoshi K: Overlapping CRF01_AE Gag peptides identified several novel CTL epitopes in long-term slow-progressors in northern Thailand. Keystone Symposia. March 22-27, 2009. Colorado, USA.
2. 土屋菜歩, Pathipvanich P, Rojanawiwat A, Sawanpanyalert P, 有吉紅也: HAART 療法普及前の北タイにおいて HIV/HBV・HCV 重複感染が生存率に与えた影響についての研究. 第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2008 年 11 月 26-28 日. 大阪.
3. Tsuchiya N, Rojanawiwat A, Sawanpanyalert P, Pathipvanich P, Ariyoshi K: Changes in incidence of major opportunistic infections among HIV-infected patients before and after initiation of highly active antiretroviral therapy in northern Thailand. XVIIth International Congress for Tropical Medicine and Malaria. September 29-October 3, 2008. Jeju, Korea.
4. Tsuchiya N, Pathipvanich P, Rojanawiwat A, Sawanpanyalert P, Ariyoshi K: Survival in patients with HIV and viral hepatitis B co-infection before HAART era in northern Thailand. XVIIth International Congress for Tropical Medicine and Malaria. September 29-October 3, 2008. Jeju, Korea.
5. Mori M, Gesprasert G, Wichukchinda N, ⑩ Ariyoshi K: Evolution of HIV-1 CRF01_AE Gag in HIV-sero-concordant couples with HLA class I allele discrepancy in northern Thailand. Keystone Symposia. March 27-April 1, 2008. Banff, Canada.

6. Thaisri H, Tominaga N, Naganuma M, ⑨ Ariyoshi K, Moriuchi H: Favorable clinical outcome in HIV-1/GB virus-C-coinfected individuals in the Lampang HIV cohort in northern Thailand. Keystone Symposia. March 27-April 1, 2008. Banff, Canada.

7. 有吉紅也, 森 正彦, 椎野禎一郎, 吉田レイミント: HIV に感染した夫婦間における HLA クラス I アレルの相違と Gag タンパクアミノ酸変異. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会, 2007 年 10 月 21-23 日. 札幌

[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]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有吉 紅也 (ARIYOSHI KOYA)

長崎大学・熱帯医学研究所・教授

研究者番号: 30311400

(2) 研究分担者

塩田 達雄 (SHIODA TATSUO)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号: 00187329

松田 文彦 (MATSUDA FUMIHIKO)

京都大学・医学 (系) 研究科 (研究院)・

教授

研究者番号: 50212220

(3) 連携研究者

パトム サワンパンヤラート (Pathom Sawanpanyalert)

タイ国保健省・国立衛生研究所・所長

ヌアンチャン ウチクチンダ (Nuanjun Wichukchinda)

タイ国保健省・国立衛生研究所・研究員

パニータ パチーバニッチ (Panita Pathipvanich)

タイ国保健省・ランパン病院・臨床医