

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23406013

研究課題名(和文) ケニアのHIV-1感染小児の病態進行に関する宿主及びウイルス側因子の解明

研究課題名(英文) Comparison of the virologic and host characteristics between HIV-1-infected Kenyan children with rapid and slow disease progression

研究代表者

市村 宏 (ICHIMURA, Hiroshi)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：10264756

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：HIV-1感染児における病態進行に関連するウイルス並びに宿主因子を明らかにすることを目的とした。ケニアの早期発症児[5歳以下で抗レトロウイルス療法(ART)を開始した児29名]と遅発症児[10歳までARTを必要としなかった児32名]の間で、HIV-1 gagとnef遺伝子の多様性に有意差は認められなかった。遅発症児では早期発症児に比べ、病態遅延に関するHLA型を持つ割合が高く、NefおよびGag蛋白質の両方でより多くのHLA-B関連エпитープを有していた。これらの結果から、HIV感染児では、宿主因子であるHLAがウイルス因子に比し、病態進行により重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we aimed at elucidating the factors related to disease progression in HIV-1 infected children. For this purpose, we compared sequence variations in the HIV-1 gag and nef genes between the rapid and slow progressors, and further investigated the presence of reported protective or susceptible HLA types and the predicted MHC-1 binding capability of the Gag and Nef epitopes between the two groups. Our present findings showed that the slow and rapid progressors did not have distinct sequence variations in both Nef and Gag. Compared to the rapid progressors, the slow progressors had more protective HLA-A alleles and more HLA-B-related epitopes in both Nef and Gag. These results suggest that the HLA, a host factor, plays a more important role in disease progression than the viral factors, such as variations in HIV-1 Nef and Gag, among HIV-1-infected Kenyan children.

研究分野：ウイルス感染症学

キーワード：HIV感染小児 病態進行関連因子 遅発症者 早期発症者 HLA ケニア

1. 研究開始当初の背景

我々のグループは、2000年からヒト免疫不全ウイルス1型(HIV-1)が蔓延しているサハラ砂漠以南アフリカの国の一つケニアにおいて HIV-1 母子感染小児の追跡調査(CD4⁺T細胞数/3ヶ月、血中ウイルス量/6ヶ月)を行っている。これまでに、抗レトロウイルス療法(ART)開始後の薬剤耐性関連遺伝子変異の出現とその種類¹、早期発症群と遅発症群における HIV-1 コレセプター変換²、ART開始後2年間の治療成績³などに関して報告してきた。これらの HIV-1 母子感染児102名の中に後天性免疫不全症候群(エイズ)遅発症群[AR不要・正常 CD4⁺T細胞数:32名]と早期発症群[生後5年以内にART開始:29名]の存在が明らかとなってきた。成人においては HIV-1 感染者の遺伝的背景に応じた適切な予後診断および治療指針の策定(Tailor made therapy)が可能な時代を迎えようとしている。しかしながら、小児の遺伝的背景が HIV-1 感染、エイズ発症、ARTによる治療効果やその副作用の出現などに与える影響を調査した報告はほとんどない。

2. 研究の目的

HIV-1 感染小児の病態進行に影響する宿主ならびにウイルス側因子を明らかにすることを目的とした。

小児エイズ発症阻止のための新たな治療標的を見出すとともに、個人差に対応した予後診断および適切な抗 HIV-1 治療開始時期等に関するガイドライン策定への提言を目指した。

3. 研究の方法

ケニア国ナイロビ市の Nyumbani 孤児院に入所している HIV-1 感染児[エイズ遅発症群(32名、男17/女15)と早期発症群(29名、男15/女14)]を対象とした。これらの児の末梢血単核球からゲノム DNA を、血漿からウイ

ルス RNA を抽出し、早期発症群と遅発症群の間で(1) HIV-1 gag と nef 遺伝子の塩基配列、(2) 病態遅延と促進に関与することが知られている HLA 型の割合(WakFlow HLA Typing kits)(3) MHC-1(主要組織適合遺伝子複合体)に結合することが予想される HIV-1 Nef および Gag 蛋白質エピトープの数を比較検討した。Immune Epitope Database (IEDB) MHC Binding prediction tool (http://tools.immuneepitope.org/main/html/tcell_tools.html)を用いた *in silico* 法で行った。統計学的解析は Mann-Whitney test を用いて行った。

4. 研究成果

(1) HIV-1 サブタイプ(*nef*領域) A1/D の割合は、早期発症群で 62.5%/12.5%、遅発症群で 66.7%/20% であった。これら二群間で HIV-1 サブタイプの分布に有意差は認められなかった($p=0.8$)。(表1)

(2) HIV-1 Nef 蛋白質の10の機能性ドメインの中で唯一 PxxP₃領域において、早期発症群(33.3%)では遅発症群(7.7%)に比べ高率に変異が認められた(33.3% vs. 7.7%, $p=0.048$) (図1)。一方、Gag 蛋白質のアミノ酸配列には二群間で有意差は認められなかった。

(3) エイズ発症遅延に関与することが報告されている HLA-A アレルである A*7401 と A*3201 が遅発症群(39.3%)では早期発症群(11.1%)に比べ高率に観察された($p=0.049$)。一方、エイズ発症促進に関与する HLA-B*4501 は早期発症群(33.3%)で遅発症群(7.4%)に比べ高率に観察された($p=0.045$)。

(4) 遅発症群では早期発症群に比べ、Nef 蛋白質の HLA-B に関連した 12-mer エピトープの中間値(3 vs. 2, $p=0.037$) Gag 蛋白質の HLA-B に関連した 11-mer エピトープの中間値(2 vs. 1, $p=0.029$)、そして Gag 蛋白質の HLA-A に関連した 9-mer エピトープの中間値(4 vs. 1, $p=0.051$)が高かった。一方、遅

発症群では早期発症群に比べ、Nef 蛋白質の HLA-C 関連エピトープの中間値(4 vs. 5, $p=0.046$)と Gag 蛋白質に関連した 11-mer エピトープの中間値(1 vs. 1.5, $p=0.044$)が低かった。(図 2、図 3)

(5) 以上のように、遅発症群では早期発症群に比べ、エイズ発症遅延に関与することが知られている HLA-A と Nef と Gag 蛋白質における HLA-B 関連エピトープがより多く観察された。これらのことから、ケニアの HIV-1 感染小児において宿主因子である HLA がウイルス因子 (Nef や Gag 蛋白質の変異など) よりもエイズ発症により重要な役割を果たしていることが示唆された。

<参考文献>

Lwembe R, Ichimura H, et al., *J Med Virol* 79(7):865-872, 2007.

Lwembe R, Ichimura H, et al., *AIDS Res Hum Retroviruses* 25(2):141-147, 2009.

Lihana R, Ichimura H, et al., *J Clin Virol* 52(2):123-128, 2011.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

Soo-Yon Rhee, Ichimura H, et al. (74 名中 36 番目) Geographic and Temporal Trends in the Molecular Epidemiology and Genetic Mechanisms of Transmitted HIV-1 Drug Resistance: an Individual Patient and Sequence-level Meta-Analysis. *PLoS Medicine* 2015 Apr 7;12(4):e1001810. DOI:10.1371/journal.pmed.1001810. (査読あり)

Kibaya RM, Ishizaki A, Bi X, Ichimura H, et al. (11 名中 10 番目) Characterization of HBV Among HBV/HIV-1 Co-Infected Injecting Drug Users from Mombasa, Kenya.

Current HIV Res 2015 Jan 20. (査読あり)

Osman S, Ishizaki A, Bi X, Ichimura H, et al. (8 名中 7 番目) Diversity of HIV-1 and Drug Resistance Mutations among Injecting Drug Users in Kenya. *AIDS Res Hum Retroviruses* 29(1):187-90, 2013. DOI:10.1371/journal.pmed.1001810. (査読あり)

〔学会発表〕(計 10 件)

Saina M, Bi X, Lihana R, and Ichimura H. Sequence variation in the HIV-1 *gag* gene among rapid, slow and non progressor children. 2014 年 9 月 23-26 日、第 13 回あわじしま感染症・免疫フォーラム「奈良県新公会堂」.

畢 袖晴、石崎 有澄美、市村 宏ほか. HIV 感染小児における腸内細菌の体内移行と免疫活性化. 2014 年 12 月 3-5 日. 第 28 回日本エイズ学会学術集会「大阪国際会議場」.

Bi X, Ichimura H, et al. Sequence variations in the HIV-1 *nef* gene in rapid, slow and non-progressor children. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会 2012 年 11 月 13-15 日「大阪国際会議場」.

市村 宏. 世界の HIV 感染症 -HIV の起源から治療の現状まで- 2012 年 11 月 5-6 日. 第 55 回日本感染症学会中日本地方会学術集会/第 82 回日本感染症学会西日本地方会学術集会/第 60 回日本化学療法学会西日本支部総会「アクロス福岡」.

〔図書〕(計 1 件)

Lihana R and Ichimura H. HIV infection in Sub-Saharan Africa. In “Environmental Health and Education for Sustainable Development.” Ed. by Nakamura H, Suzuki K, and Hayakawa K. Kanazawa e-Publishing Co. Ltd. P59-64, 20 Dec 2012.

〔その他〕

ホームページ等

<http://virus.w3.kanazawa-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

市村 宏 (ICHIMURA, Hiroshi)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：10264756

(2) 連携研究者

畢 袖晴 (BI, Xiuqiong)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：50565413

(3) 連携研究者

石崎 有澄美 (ISHIZAKI, Azumi)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：30456420

Table 1. Characteristics of the subjects

Characteristics		Rapid (N=29)	Slow (N=32)	p value
Male:Female		15:14	17:15	
At sampling	Age (years)	4.6 (0.9-12.8)	12.5 (7.7-28.1)	<0.001
	VL (Log ₁₀ copies/ml)	4.7 (2.6-5.7)	4.5 (2.6-5.6)	0.120
	CD4 (cells/μl)	844 (6-2000)	530 (165-1202)	0.001
	Number on ART (%)	25 (86.2%)	9 (28.1%)	<0.001
	ART duration (years)	1.8 (0.1-8.0)	2.3 (0.2-8.3)	0.878
HM subtypes by Nef		n=24	n=30	0.795
	A1	15 (62.5%)	20 (66.7%)	
	D	3 (12.5%)	6 (20%)	
	C	0	3 (10%)	
	G	1 (4.2%)	0	
	CRF02	1 (4.2%)	0	
	CRF10	1 (4.2%)	0	
	D-A1	3 (12.5%)	1 (3.3%)	
HM subtypes by Gag		n=21	n=29	0.873
	A1	16 (76.2%)	20 (69.0%)	
	D	2 (9.5%)	4 (13.8%)	
	C	0	4 (13.8%)	
	G	1 (4.8%)	0	
	CRF02	1 (4.8%)	0	
	D-A1	1 (4.8%)	1 (3.4%)	

Values: median (range); VL: HIV viral load; P values: by Mann-Whitney test

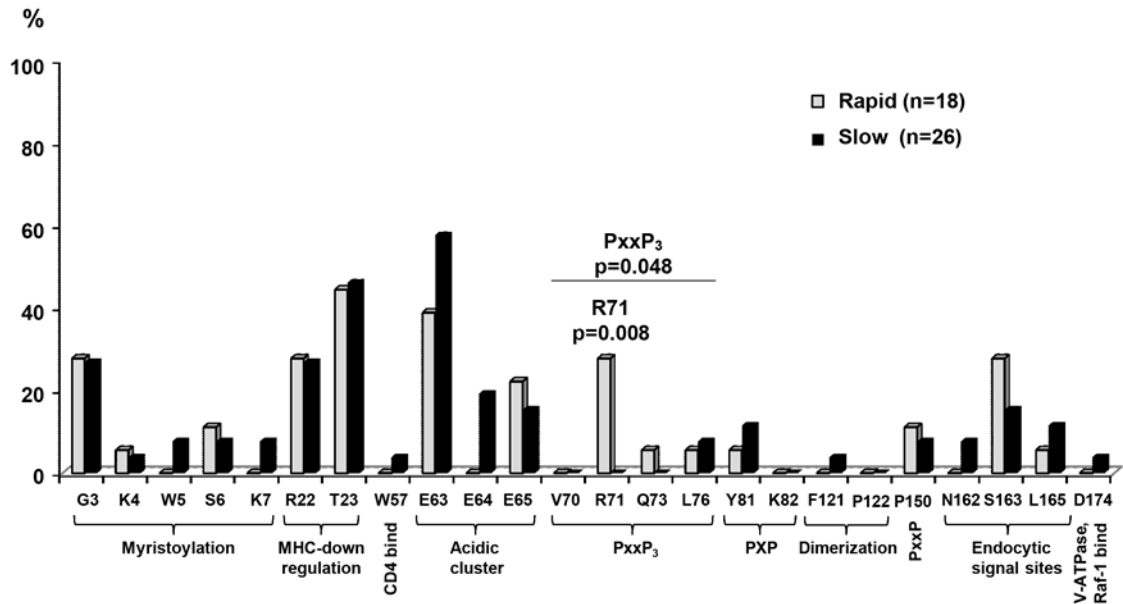


Fig 1. Comparison of amino acid variations in Nef functional domains of HIV-1 subtypes A1 and D. The graph shows the positions (based on HIV-1 HXB2) of amino acid variations within the Nef functional domains. To compare the difference per functional domain, the presence of different amino acids compared with the reference within that domain was considered “one”.

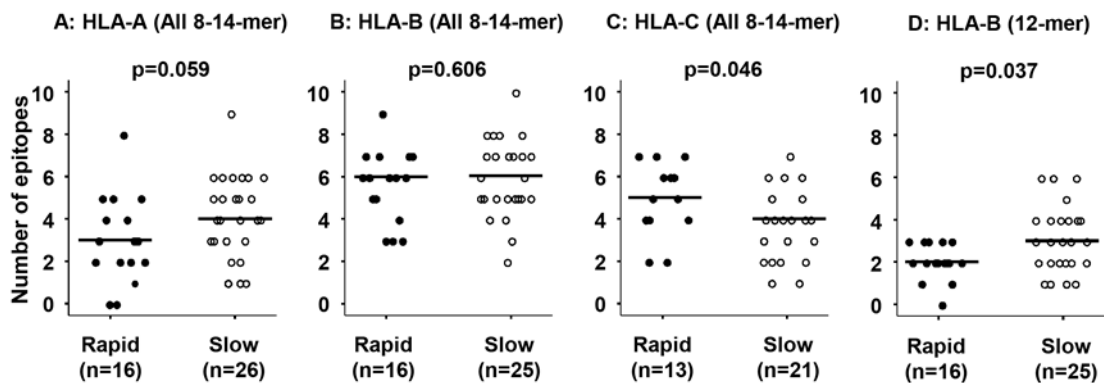


Fig 2. Comparison of the number of predicted MHC-I related Nef epitopes.

The total number of Nef epitopes (of 8-14 amino acids in length) recognized *in silico* by an individual’s HLA-A (A), HLA-B (B), and HLA-C (C), as well as the specific 12-mer length peptide recognized by HLA-B (D). Horizontal lines indicate the median number of epitopes.

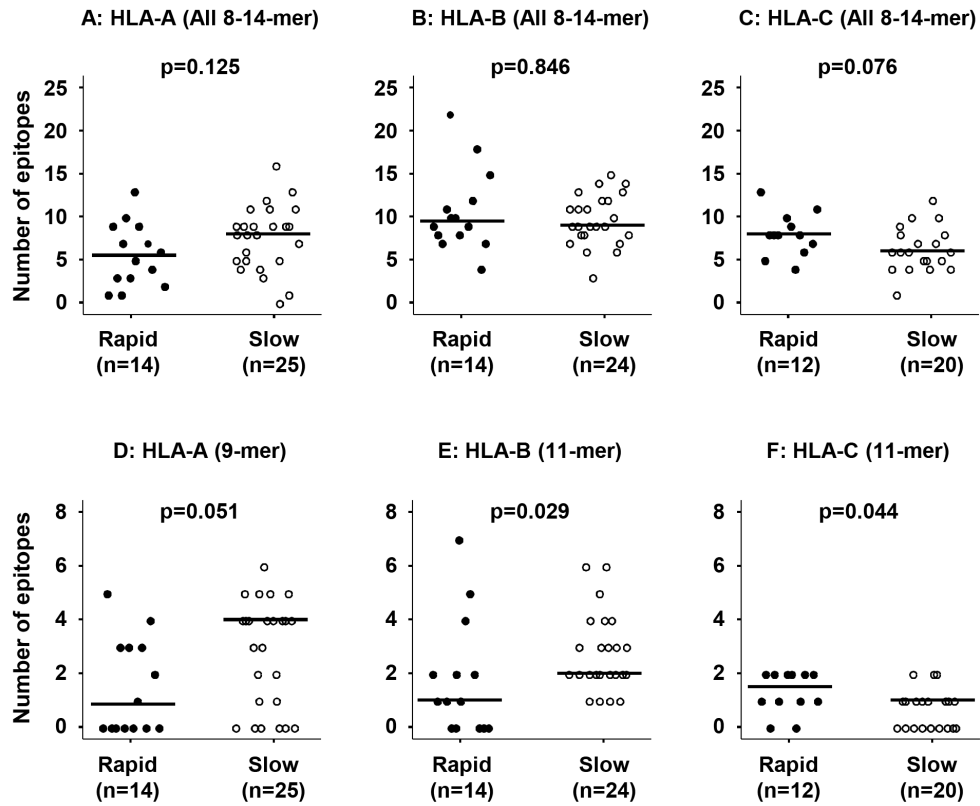


Fig 3. Comparison of the number of predicted MHC-I related Gag epitopes.

The total number of Gag epitopes (of 8-14 amino acids in length) recognized *in silico* by an individual's HLA-A (A), HLA-B (B), and HLA-C (C), as well as epitopes of specific lengths that showed statistically significant differences, including 9-mer-HLA-A (D), 11-mer-HLA-B (E), and -HLA-C (F). Horizontal lines indicate the median number of epitopes.