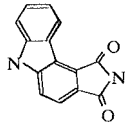


a. Carbazoleの基本構造



MW: 337.377~431.449

•Topoisomerase I, II, Protein Kinase Cの阻害剤

•抗癌剤、抗ウイルス剤としての開発

b. 類縁8化合物のまとめ

| 化合物名 | 化学構造 | 抗HV-1活性 IC ₅₀ (μM) | 抗IN活性 IC ₅₀ (μM) | Vero毒性 IC ₅₀ (μM) | 化合物名 | 化学構造 | 抗HV-1活性 IC ₅₀ (μM) | 抗IN活性 IC ₅₀ (μM) | Vero毒性 IC ₅₀ (μM) |
|------|------|----------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|-------|------|----------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| CA-1 | | 0.92 | 1.98 | 2.93 | CA-9 | | 0.79 | 2.28 | 3.76 |
| CA-4 | | 1.52 | 5.21 | 5.04 | CA-10 | | 0.8 | 1.8 | 2.23 |
| CA-5 | | 0.48 | 1.18 | 2.81 | CA-13 | | 0.69 | 1.78 | 3.78 |
| CA-8 | | 0.51 | 2.18 | 2.55 | CA-14 | | 0.51 | 0.79 | 1.97 |

図11

Carbazol誘導体はstrand transfer を拮抗阻害する

CA-8

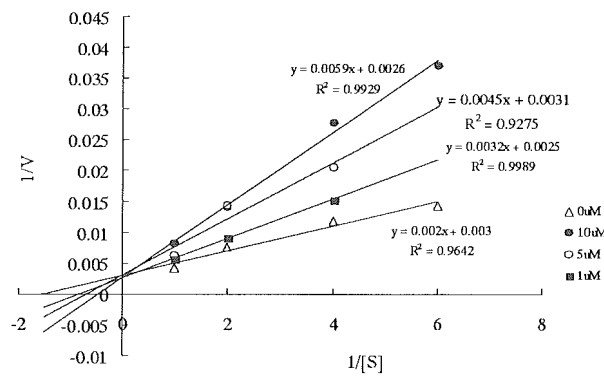


図12

厚生労働科学研究費補助金（創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業）

分担研究報告書

インテグラーゼ阻害剤の探索 ～組み換え酵素の構造と機能に関する研究～

分担研究者 北村義浩 東京大学医科学研究所 先端医療研究センター 感染症分野 助教授

研究要旨

ヒト免疫不全ウイルス（HIV）は感染後細胞内でウイルスゲノム RNA を相補 DNA に変換して組み換え前複合体を形成し、その後核内に移行し宿主染色体に入り込む。この DNA への変換以降のステップのメカニズムを構造と機能の両面から明らかにし、これを制御する技術を開発することを目的とし研究を行った。HIV のウイルス中央多プリン配列（cPPT）を挿入した HIV ベクターの遺伝子導入効率はその cPPT の長さあるいは、cPPT の近傍領域の配列に依存する場合があることを示した。cPPT は核移行効率に関わるというよりも核移行後のなんらかのステップに重要であることを明らかにした。cPPT の近傍領域には HIV ベクターの RNA 量に関わる働きのあることも明らかにした。ウイルスの組み込みに cis に関わる領域のあることが明らかになった。

A. 研究目的

HIV は(+) 鎖 RNA をゲノムとして有するレトロウイルスであり、ヒト CD 4 陽性細胞に感染する。感染細胞内の細胞質でゲノム RNA は逆転写酵素（RT）によって線状 2 本鎖 DNA に変換される。この DNA 分子は HIV の組み込み酵素(IN)を含む様々なタンパク質とともに沈降係数が 300S 以上の大きな核酸-タンパク質複合体（組み込み前複合体、preintegration complex; PIC)を形成する。しかし、この構造について、cDNA、IN、RT が含まれること以外は、具体的なことはほとんど分かっていない。PIC に Vpr、MA、などウイルスタンパク質の他、さらに、宿主の HMG-I(Y)タンパク質などが共存しているという報告が散見されるもののその報告者とは異なる研究者による厳密な検証はなされていないので、真偽は不明である。さらに、メカニズムは不明であるが、この巨大核酸タンパク質複合体 (PIC) は細胞質から細胞核に移行し、細胞核内で宿主ゲノム DNA に組み込み（狭義の組み込み反応）を起こしてプロウイルスとなる。この一連の過程はレトロ

ウイルスに特徴的な反応なので、この過程を特異的に阻害することは理論上可能である。そのような制御が可能になれば、治療に大いに役立つであろう。本研究は、この DNA への変換以降のステップのメカニズムを明らかにする事を目的とする。

B. 研究方法

まず HIV をベースにしたベクターを作製した。ベースとして採用したのは HXN ベクター（島田隆博士より供与を受けた）である。HIV-1 の構造から、5'の LTR、3'の LTR、gag の 5'末端領域以外の gag のほぼ全部、pol、env が欠失している。かわりに、Tk プロモーターでドライブされる neomycin 耐性遺伝子が組み込まれている。従ってこのベクターが組み込まれた細胞は G418 に耐性となる。従来 HIV ベクターに HIV のウイルス中央多プリン配列（cPPT）を挿入すると遺伝子導入効率が高まるとされてきた。そこで、HXN の Tk プロモーターのすぐ上流に従来報告されていた 178 塩基の cPPT または、それを含みさらにそれよりも長い 282 塩基の cPPT

を挿入したベクターを作製しその量を p24 量と RNA 量で定量した。遺伝子導入効率、組み込み効率、核移行高効率を調べた。遺伝子導入効率は同じ p24 量(1ng 程度)のベクターを HeLa 細胞に感染させ、出現する G418 耐性細胞コロニー数で定量した。組み込み効率はいわゆる Alu-PCR 法で組み込み接合領域を増幅して半定量的に調べた。核移行効率は 2LTR 接合領域を PCR 法で増幅して半定量的に調べた。

(倫理面での配慮)

該当しない

C. 研究結果

282 塩基長の cPPT 領域を有する HXN ベクターではそうでない HXN ベクターに比べて遺伝子導入効率が効率が 15%程度にまで低下した。挿入の向きに依存しなかった。178 塩基長の cPPT 領域を有する HXN ベクターではそうでない HXN ベクターに比べて遺伝子導入効率が逆に効率が 200%程度にまで上昇した。これも挿入の向きに依存しなかった。

HIV の cPPT を含む 178 塩基の領域を有する HIV ベクターではそうでない HIV ベクターに比べて遺伝子導入効率が高く、これは向きに依存すると一般には信じられてきた。そのメカニズムは cPPT を挿入することによって生ずると信じられている cDNA の当該領域部の DNA flap が cDNA の細胞核への移行効率を高めるためであろうと信じられている。そこで我々の系でベクターの cDNA の核移行の程度を調べた。282 塩基長であれ 178 塩基長であれ cPPT 領域を有する HXN ベクターとそうでない HXN ベクターで核移行の程度は同じであった。しかし、遺伝子導入効率から予想されたように組み込み効率は 282 塩基長の cPPT 領域を有する HXN ベクターでのみ低下していた。

282 塩基長と 178 塩基長の 2つの cPPT の差であ

る 104 塩基長の配列を有する HXN ベクターを作製しようと DNA を 293T 細胞にトランスフェクトしてもベクターは産生されなかった。293T 細胞でベクター-RNA がは全く合成されなかったことが原因であることが分かった。

D. 考察

cPPT を挿入した HIV ベクターの遺伝子導入効率はその cPPT の長さあるいは、cPPT の近傍領域の配列に依存する場合があることを示した。cPPT は核移行効率に関わるというよりも核移行後のなんらかのステップに重要であることを明らかにした。cPPT の近傍領域には HIV ベクターの RNA 量に関わる働きのあることも明らかにした。これらが例外的な事象か、一般的かを様々な構造と様々な遺伝子を trasngene とした場合の組み合わせで調べねばならないだろう

E. 結論

HIV の組み込みに cis に関わる領域のあることを明らかにした。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 発表

1.論文発表

1) Miura T, Goto M, Hosoya N, Odawara T, Kitamura Y, Nakamura T, Iwamoto A. "Depletion of mitochondrial DNA in HIV-1-infected patients and its amelioration by antiretroviral therapy." J Med Virol. 70(4):497-505. (2003)

2) Sakuma R, Kobayashi N, Ae K, Kitamura Y. "Inhibitory and enhancing effects of insertion of

central polypurine tract sequence on gene expression with vectors derived from human immunodeficiency virus type 1." *Biochem Biophys Res Commun.* 302(3):489-95. (2003)

3) Yamada T, Kaji N, Odawara T, Chiba J, Iwamoto A, Kitamura Y. "Proline 78 is crucial for human immunodeficiency virus type 1 Nef to down-regulate class I human leukocyte antigen." *J Virol.* 77(2):1589-94. (2003)

4) 北村義浩、仲嶋一範 (編著)、必ず上手くいく 遺伝子導入と発現解析プロトコール、羊土社、2003年9月

5) 村松正実 (監修)、北村、井上、田中、禾 (編著)、新ラボマニュアル遺伝子工学、丸善、2003年9月

2.学会発表

佐久間龍太、北村義浩、HIV-1 cPPT/CTS の隣接配列のベクター産生に及ぼす影響、日本ウイルス学会、2003年10月

厚生労働科学研究費補助金（創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業）

分担研究報告書

薬物毒性の解析 ～抗 HIV-1 薬剤を評価するための小動物実験系の確立～

分担研究者 木村廣光 国立成育医療センター・研究所 共同研究管理室 室長

研究要旨：

ヒト臍帯血，並びに小動物（マウス・ラット）骨髄血液幹細胞から，HIV-1ウイルスの標的細胞の一つと考えられる，樹状細胞の大量純粋培養の確立と、同細胞への遺伝子導入システムの確立を目的として，サイトカインGM-CSF非依存性樹状細胞前駆細胞への増殖・分化因子の探索並びに種々の遺伝子導入ヴェクターシステムについて導入効率の検討を行った。

A. 研究目的

ヒト臍帯血中の CD34 陽性・CD133 血液幹細胞から，HIV-1 の標的細胞である，T 細胞，マクロファージ・樹状細胞を，それぞれ大量純粋培養・分離する培養技術を確立し，更に，小動物実験系の移植システムを確立する事により，抗 HIV-1 薬剤を評価するための実験系を確立する事を目的とする。

マウス・ラット骨髄細胞から GM-CSF 非依存性樹状細胞を、大量培養し、樹状細胞の分離・精製に必要な細胞表面マーカーを同定する。

各種遺伝子ヴェクターシステムによる遺伝子導入効率を解析・検討する。

B. 研究方法

材料：ヒト臍帯血中の CD34 陽性及び CD133 陽性血液幹細胞、或いはマウス・ラット骨髄細胞を実験材料として用いた

細胞培養：GIT 培地，各種サイトカイン（Flt3,SCF,IL-6,GM-CSF,IL-4,TNF- α ）を用い $1 \times 10^5/ml$ にて培養

（倫理面への配慮）：

1. ヒト由来細胞は BioWhittaker 社：米国 FDA 認

可正常細胞提供プログラムにて調整されたものを実験材料とした。

2. 小動物の取り扱い並びに飼育・実験方法に関しては，国立成育医療センター・研究所・動物委員会・動物取り扱い規則に準じて，実験動物・実験方法に関する申請書関係類書の承諾を得て後，実験を行った。

C. 研究結果

GM-CSF リセプターノックアウトマウス骨髄細胞から，Flt3、SCF と IL-6 を組み合わせる事により，GM-CSF 非依存性に樹状細胞前駆細胞の増殖が観察され、その後他の分化因子（IL-4,TNF- α ）との組み合わせにより結果として、樹状細胞の分化促進により、同細胞の大量培養の可能性が示された。樹状細胞の分化の進展に伴い、NKR-P1A(CD161)のマーカーが表出され、本マーカーを指標に同細胞の分離・精製が可能となった。

(ア) NKR-P1A(CD161)陽性樹状細胞への遺伝子導入は、現行のあらゆる遺伝子導入システムを用いても、極めて導入効率が低いものと考えられた (less than one in ten thousand)。

D. 考察

従来、樹状細胞の増殖因子・分化因子の必須なサイトカイン一つと、考えられ用いられてきた GM-CSF では、ヒト・マウス・ラットいずれのシステムにおいても、血液幹細胞から樹状細胞・前駆細胞を増殖・分化させる事は出来なかった。また樹状細胞固有の特異的細胞表面マーカーは未だ確立されているわけではないが、成熟樹状細胞が CD161 を有する事から、同細胞の分離・精製に極めて有効なマーカーである事が示され、同細胞への種々の遺伝子導入システムの導入効率を解析したところ、成熟樹状細胞への遺伝子導入は、electroporation, Adeno virus vector, Lenti virus vector, HVJ 不活化 virus いずれの方法によっても、極めて導入効率が低い事が示された。即ち、0.01%以下である。

E. 結論

マウス・ラット・ヒトいずれのシステムに於いても、GM-CSF は樹状細胞前駆細胞に対する分化因子である事を示した。樹状細胞前駆細胞は、主として Flt3 と IL-6(補助的に SCF も可能と考えられる)のサイトカインの組み合わせにて、長期(2ヶ月間)に分裂増殖を繰り返し、その課程において、これらの細胞は、IL-4/TNF α にて、さらに成熟樹状細胞に分化できる事。またこれらの樹状細胞は、従来 NK 細胞のマーカーと考えられてきた NKR-P1A (CD161) を表出する事により、同細胞の分離・精製が可能である。分離精製された、成熟樹状細胞へ、現行の遺伝子導入はほぼ不可能である事(導入効率は、最大でも 0.01%以下である)、但し HIV 改変 Lenti virus vector システムにより、培養初期から、使用することにより、培養から3週間を経て、導入

効率 90~95%程度まで、上げる事が出来る。本研究から、HIV 感染が、樹状細胞をホストとして進入、増殖する課程は、成熟樹状細胞を標的細胞とする可能性は極めて低いものと考えられる。

F. 健康危険情報

特記すべき事なし

G. 研究発表

1) 論文発表

Iwasaki S, Kimura H: Further studies on thermal treatment of two-cell stage embryos to produce complete ES-cell derived mice by cell-aggregation methods

Development, Growth and Differentiation (in press)

2) Satoh E, Yan H, Robb L, Hikino H, Miyagi T, Saito H, Gold DP, Li X-K, Teramoto K, Arai S, Kimura H: Generation of GM-CSF independent myeloid dendritic cells (DC) from bonemarrow cells (BMC) in GM-CSF receptor deficient mouse Transplantation Proceeding (in press)

3) Satoh E, Yan H, Miyagi T, Saito H, Gold DP, Li X-K, Fujino M, Teramoto K, Arai S, Kimura H. Cytokine requirement from the generation of a large number of rat dendritic cells (DC) by in vitro culturing of bone marrow cells and its selection of CD161 (NKR-P1A). Transplantation Proceeding (in press)

4) Satoh E, Kokai Y, Teramoto K, Arai S, Kimura H: Transgenic enhanced green fluorescence protein (EGFP) and beta galactosidase (b-gal) genes behave as minor histocompatibility

- antigens. Transplantation Proceeding (in press)
- 5) Satoh E, Li X-K., Yan H, Miyagi T, Saito H, Gold DP, Fujino M, Taga T, Amemiya H, Suzuki S, Teramoto K, Arie S, Kimura H: Cytokine requirement for the GM-CSF independent development of human dendritic cells (DC) by in vitro culturing of hematopoietic stem cell. Transplantation Proceeding (in press)
- 6) Hattori Y, Satoh E, Yan H, Miyagi T, Li X-K., Sugiura W, Yamamoto N, Teramoto K, Arie S, Kimura H: Effect of long term drainage of thoracic duct on immunological T cell memory in adult thymectomized rats. Transplantation Proceeding (in press)
- 7) Guo L, Fujino M, Kimura H, Funeshima N, Kitazawa Y, Harihara Y, Tezuka K, Makuuchi M, Suzuki S, Li XK: Simultaneous blockade of co-stimulatory signals, CD28 and ICOS, induced a stable tolerance in rat heart transplantation Transplant Immunology 12:41-48, 2003
- 8) Guo L, Fujino M, Kimura H, Funeshima N, Kitazawa Y, Harihara Y, Tezuka K, Makuuchi M, Suzuki S, Li XK: AdCTLA-4Ig combined with donor splenocytes, bone marrow cells and anti-ICOS antibody treatment induce tolerance in a rat heart transplantation model. Transplantation International, 2003
- 9) Hayakawa K, Guo L, Terentyeva EA, Li XK, Kimura H, Hirano M, Yoshikawa K, Yoshinaga T, Nagamine T, Katsumata N, Tanaka T: Size-exclusion chromatography of biological samples which contain extremely alkaline proteins. J Biochem Biophys Methods 56:153-63, 2003
- 10) Guo L, Li X, Enosawa S, Harihara Y, Funeshima N, Kimura H, Fujino M, Makuuchi M, Suzuki S: Prolongation of liver xenograft survival by adenovirus vector-mediated CTLA-4Ig gene transfer. Transplant Immunology 11:155-162, 2003
2. 学会発表
- 1) Eigo Satoh, Yasuo Kokai, Kenichi Teramoto, Shigeki Arie, Hiromitsu Kimura: Immunological Behavior of Enhanced Green Fluorescence Protein (EGFP) and Beta Galactosidase (B-Gal) Gene Product: I. Effect of Minor Histocompatibility Antigen. American Transplant Congress 2003, Washington, D.C., May 30-June 4, 2003
- 2) Eigo Satoh, Hua Yan, Xiao-K. Li, Kenichi Teramoto, Shigeki Arie, Hiromitsu Kimura: Cytokine Requirement for the Generation of a Large Number of Rat Dendritic Cells (DC) by In Vitro Culturing of Bone Marrow Cells And Its Selection of CD161 (NKR-P1A). 12th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophage 2003, Utunomiya, June 19-20, 2003
- 3) Eigo Satoh, Hua Yan, Robb L, Hajime Hikino, Tohko Miyagi, Saito Hirohisa, Daniel P. Gold, Xiao-K Li, Kenichi Teramoto, Shigeki Arie, Hiromitsu Kimura: GENERATION OF GM-CSF INDEPENDENT MYELOID DENDRITIC CELLS (DC) FROM BONE MARROW CELLS (BMC) IN GM-CSF RECEPTOR DEFICIENT MOUSE. 8th Congress of the Asian Society of

Transplantation, Kuala Lumpur, September23-27, 2003

4) Eigo Satoh, Hua Yan, Tohko Miyagi, Saito Hirohisa, Daniel P. Gold, Xiao-K.Li, Masayuki Fujino, Kenichi Teramoto, Shigeki Arii, Hiromitsu Kimura:CYTOKINE REQUIREMENT FOR THE GENERATION OF A LARGE NUMBER OF RAT DENDRITIC CELLS (DC) BY IN VITRO CULTURING OF BONE MARROW CELLS AND IT S SELECTION OF CD161 (NKR-P1A).8th Congress of the Asian Society of Transplantation, Kuala Lumpur, September23-27, 2003

5) Eigo Satoh, Yasuo Kokai, Kenichi Teramoto, Shigeki Arii, Hiromitsu Kimura:TRANSGENIC ENHANCED GREEN FLUORESCENCE PROTEIN (EGFP) AND BETA GALACTOSIDASE (B-GAL) GENES BEHAVE AS MINOR HISTOCOMPATIBILITY ANTIGENS. 8th Congress of the Asian Society of Transplantation, Kuala Lumpur September23-27, 2003

6) Eigo Satoh, Xiao-K. Li,, Yan Hua, Tohko Miyagi, Saito Hirohisa, Daniel P. Gold, Masayuki Fujino, Taga Tetsuya, Hiroshi Amemiya, Seiichi Suzuki, Kenichi Teramoto, Shigeki Arii, Hiromitsu Kimura:CYTOKINE REQUIREMENT FOR THE GM-CSF INDEPENDENT DEVELOPMENT OF HUMAN DENDRITIC CELLS (DC) BY IN VITRO CULTURING OF HEMATOPOIETC STEM CELL.

8th Congress of the Asian Society of Transplantation, Kuala Lumpur, September23-27,

2003

7) Yuhichi Hattori, Eigo Satoh, Hua Yan, Tohko Miyagi, Xiao-Kang Li, Wataru Sugiura, Naoki Yamamoto , Kenichi Teramoto, Shigeki Arii, Hiromitsu Kimura:EFFECT OF LONG TERM DRAINAGE OF THORACIC DUCT ON IMMUNOLOGICAL T CELL MEMORY IN ADULT THYMECTOMIZED RATS.8th Congress of the Asian Society of Transplantation, Kuala Lumpur, September23-27, 2003

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

研究要旨

- (1) 微生物由来のインテグラーゼ阻害剤の探索研究において、真菌 *Penicillium* sp. FKI-1463 株がインテグラーゼ阻害物質を生産していることを見出し、単離して構造解析を行った結果、atrovenetinone methyl acetal と同定された。本物質は、 $IC_{50}=19 \mu M$ でインテグラーゼを阻害し、 $IC_{50}=7 \mu M$ で抗 HIV 活性を示した。
- (2) 当研究室で発見された抗 HIV タンパク質アクチノヒピン (AH) の構造活性相関を調べた結果、gp120 への結合には AH を構成する 3 つのセグメントが必要であり、セグメントを構成するアミノ酸の中で 5 種類のアミノ酸残基が必須であることが明らかになった。
- (3) ELISA 及び分子間相互作用解析装置を用いて AH が結合する糖鎖の解析を進めた結果、AH は gp120 の $\alpha 1-2$ 結合の高マンノース糖鎖部分に結合すると推定された。

A. 研究目的

エイズの発症予防と治療のために、現在逆転写酵素阻害剤とプロテアーゼ阻害剤を用いる多剤併用療法が実施され、成果を挙げているが、多剤耐性株の出現、治療中断によるウイルスのリバウンド、様々な副作用などの問題が残されており、しかも完全治癒は不可能である。

本研究では、逆転写酵素やプロテアーゼ以外のターゲットとしてインテグラーゼを選び、分担研究者の一人北村によって調製された酵素試料を用いて、微生物培養液からの探索を実施した。また、本分担研究者らが構築した合胞体形成系を用いる探索によって発見した抗 HIV タンパク質アクチノヒピン (AH) の活性発現に必要な構造並びに作用機構に関する研究も実施したので合わせて報告する。

B. 研究方法

<インテグラーゼ阻害活性の測定>

分担研究者の北村により供給された酵素試料を用いてインテグラーゼ反応を行った後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により阻害活性を測定した。

<AH 変異体の調製>

当教室ですでに確立された大腸菌による組み換え AH 生産系を用いた。(Inokoshi J., et al, Biochem Biophys Res Commun (2001) 281 P1261-1265)

<合胞体形成阻害活性の測定>

当教室で確立した合胞体形成系を用いて以下のようにして測定した。96 穴プレートに、受容体発現細胞 (HeLa/CD4/LacZ) を 1.6×10^5 cells/ml に調製して 50 μ l ずつまき、試験サンプル 10 μ l を添加した。続いて env 発現細胞 (HeLa/T-en/Tat) を同量まき、5% CO₂ 気流下 37 °C で 24 時間培養後、 β -galactosidase 活性を測定した。(Chiba H., et al, J Antibiot (2001) 54 P818-826)

<AH-rgp120 結合阻害活性の測定>

AH を固定化した ELISA プレートに rgp120 とサンプルを加え反応後、AH に結合した rgp120 を抗体を用いて測定した。

<分子間相互作用解析>

分子間相互作用解析には Affinity Sensors 社の IAsys を用いた。サンプルの固相化には carboxylate または amino キュベットを用いた。

C. 実験結果と考察

(1) インテグラーゼ阻害剤の探索

微生物の生産する HIV-1 インテグラーゼ阻害物質のスクリーニングを行った結果、*Penicillium* sp. FKI-1463 の培養液中にインテグラーゼ阻害活性が認められた。そこで、本菌株を大量培養して培養液中のインテグラーゼ阻害物質を精製・単離した。

得られた化合物の構造を検討したところ、フェナレノン系の atrovenetinone にメタノールの付加した atrovenetinone methyl acetal であると同定された。Atrovenetinone はメタノールで容易に methyl acetal に変化することが知られている。そのときメトキシ基のつけねはラセミ体になり、FKI-1463 はジアステレオマーとして得られる。これは FKI-1463 が NMR において 2 種類のジアステレオマーの混合物として観察されることで確認された。

ベンゼン環 3 個のフェナレノン骨格にケトンや水酸基が結合した化合物をフェナレノンと呼び、真菌や植物によって生産される。FKI-1463 は真菌の生産するフェナレノンの一種である。Atrovenetinone methyl acetal は myosin light chain kinase の阻害物質 ($IC_{50}=3.7 \mu M$) として報告されているものである (Biosci. Biotech. Biochem. (1995) 59, 1333)。

本物質は $IC_{50}=19 \mu M$ (7 $\mu g/ml$) でインテグラーゼを阻害した (HeLa 細胞毒性 $IC_{50}=35 \mu M$)。感染研の *in vitro* 抗 HIV 活性は 7 μM で約 50% の阻害を示したが、13 μM では細胞毒性を示した。

他のフェナレノン系化合物の生物活性としては、抗グラム陽性菌、抗酸化活性 (25 $\mu g/ml$)、caspase カスケード活性化 (10 $\mu g/ml$)、免疫賦活 (5 $\mu g/ml$)、phosphodiesterase 阻害 ($IC_{50}=6.5 \mu M$) などが知られている。また eukaryotic DNA polymerase α や β を $IC_{50}=12-25 \mu M$ で阻害するという報告があるが、HIV reverse transcriptase を 120 μM でも阻害していない (Biochemistry (2002) 41, 7610)。従って、これまでフェナレノン系化合物の抗ウイルス活性についての報告はないと考えられる。

北里では以前にフェナレノン系新規物質として cholesteryl ester transfer protein 阻害物質 erabulenols (erabulenol B で $IC_{50}=58 \mu M$) 及び type I collagenase 阻害物質 funalenone ($IC_{50}=170 \mu M$) を発見した。そこで、それらのインテグラーゼ阻害活性と HeLa 細胞毒性を調べたところ、erabulenol B ではインテグラーゼを $IC_{50}=8.4 \mu M$ で阻害し、細胞毒性は 71 μM であった。また、funalenone ではインテグラーゼを $IC_{50}=10 \mu M$ で阻害し、細胞毒性は 120 μM であった。

(2) アクチノヒビン (AH) の変異体及び欠失体の合胞体形成阻害活性と gp120 結合活性並びに構造活性相関

昨年度に引き続き、AH の活性必須領域の解明を目的として、種々の AH 変異体及び欠失体の合胞体形成阻害活性を測定し、さらに gp120 結合活性も合わせて調べた。AH は 114 アミノ酸残基から構成されており分子内に互いに相同性の高い 3 つのセグメントを持つが、これらのセグメントを 2 つにした欠失体の合胞体形成阻害活性は約 1/15 に低下した。また、セグメントを 1 つにした欠失体の合胞体形成阻害活性は 1/100 以下となった。これらの変異体の HIV 表面タンパク質 gp120 との親和性について ELISA で調べた結果、セグメントを 2 つにした欠失体の gp120 との親和性は AH の約 1/5、セグメントを 1 つにした欠失体では AH の約 1/40 であり、合胞体形成阻害活性との相関性が見られた。そこで、AH の N 末端より欠失させた各種変異体の活性を調べた結果、N 末より 12 アミノ酸を欠失させるとセグメントを 2 つにした欠失体と同程度の活性に低下した。AH の各セグメントの C 末端にあるグルタミン-X-トリプトファン (QXW) モチーフのグルタミンをアラニンに置換した変異 AH の合胞体形成阻害活性を調べた結果、1 つのセグメントのグルタミンをアラニンに置換した変異体ではセグメントを 2 つにした欠失体と同程度の活性に低下し、2 つのセグメントのグルタミンをアラニンに置換した変異体では 1/100 以下に低下した。

以上の結果からアクチノヒビンを構成するセグメントはいずれも gp120 との親和性を有しているが、単独では十分な合胞体形成阻害活性は示さず、3 つのセグメントがタンデムに配置された構造が合胞体形成阻害活性の発現に重要であることが示唆された。

次に、gp120 との結合に関係しているアミノ酸残基を同定するために、セグメント 1 をモデルとして、gp120 の糖鎖との結合ポケットを形成していると予想される領域の各種アラニン置換変異体を作成し合胞体形成阻害活性を調べた。その結果、15Asp、23Tyr、28Asn、32Tyr、33Gln に変異を導入すると、合胞体形成阻害活性が低下したことから、これらの

アミノ酸残基がgp120との結合に重要であると考えられた。

(3) AHの作用機構

HIVの細胞への接着侵入過程を阻害するAHは、これまでの研究からHIVの外殻タンパク質gp120のhigh mannose type糖鎖に結合することが推定されている。AHとgp120の結合がyeast mannan (α type mannan) を添加することにより強く阻害されることから ($IC_{50}=3 \mu\text{g/ml}$)、AHはyeast mannanに親和性を示すものと考えられた。分子間相互作用解析装置を用いてAHとyeast mannanの結合を調べたところ、両者は結合することが分かった。Yeast mannanは α 1-6結合のmannose主鎖に α 1-2または α 1-3結合のmannose側鎖からなるが、AHがこれらmannoseの結合の違いを認識していると考え、 α 1-6、 α 1-2、 α 1-3 mannobioseを用いてAHとgp120の結合阻害を指標に検討を行った結果、高濃度ではあるが α 1-2 mannobioseの添加で阻害されることが分かった。 α 1-2 mannose結合はhigh mannose type糖鎖に存在するので、gp120(サンプル量に限りがあるため)と同様にhigh mannose及びcomplex type糖鎖を持ちAHと結合する糖タンパク質thyroglobulinを用いて、 α 1-2 mannose結合を切断する酵素で処理したときにAHとの結合が変化するかどうか検討したところ、酵素処理により結合が低下することが分かった。Thyroglobulinについてcomplex type糖鎖を切断する酵素で処理した場合にはAHとの結合に影響がなかったことから、AHとthyroglobulinの結合はhigh mannose type糖鎖の α 1-2 mannose結合が関与していることが明らかとなった。これらの結果から、AHがgp120のhigh mannose type糖鎖の α 1-2 mannose糖鎖部分に結合することにより抗HIV活性を示すと考えられる。

E. 結論

微生物由来のインテグラーゼ阻害剤として、既知物質ではあるがatrovenetinone methyl acetalが同定され、インテグラーゼ阻害剤探索資源の1つとし

て微生物が有用であることが示された。

また、AHの結合糖鎖がgp120に含まれる α 1-2結合のマンノース糖鎖であることが明らかとなり、gp120の糖鎖が抗HIV薬の重要なターゲットであることが示された。

F. 健康危険情報:該当なし

G. 研究発表

1.論文発表 なし

2.学会発表

(1)高橋 淳、猪腰淳嗣、千葉春美、大村 智、田中晴雄 放線菌由来抗HIV蛋白質アクチノヒビンの各種変異体の生物活性 日本薬学会123年会(長崎)2003.3.27-29

(2)猪腰淳嗣、千葉春美、高橋 淳、大村 智、田中晴雄 接着・侵入を阻害する抗HIVタンパク質アクチノヒビンの構造と活性 第16回微生物シンポジウム(大阪)2003.9.5-6

(3)Atsushi Takahashi, Junji Inokoshi, Harumi Chiba, Satoshi Omura, Haruo Tanaka Analysis of essential regions for biological activities of the potent anti-HIV protein actinohivin 第76回日本生化学会大会(横浜)2003.10.15-18

(4)Eri Kanda, Harumi Chiba, Junji Inokoshi, Satoshi Omura, Haruo Tanaka The anti-HIV protein actinohivin binds to HIV gp120 第76回日本生化学会大会(横浜)2003.10.15-18

(5)高橋 淳、猪腰淳嗣、千葉春美、大村 智、田中晴雄 放線菌由来抗HIV蛋白質アクチノヒビンの各種変異体の生物活性II 第47回日本薬学会関東支部大会(東京)2003.10.4

(6)神田恵里、千葉春美、猪腰淳嗣、大村 智、田中晴雄 抗HIVタンパク質アクチノヒビンの糖鎖結合特異性 第47回日本薬学会関東支部大会(東京)2003.10.4

(7)千葉春美、神田恵里、猪腰淳嗣、大村 智、田中晴雄 抗HIVタンパク質アクチノヒビンの高マンノース型糖鎖への結合 第14回天然薬物の開発と応用シンポジウム(仙台)2003.11.6-7

厚生労働科学研究費補助金（創薬等ヒューマンサイエンス総合研究 研究事業）

化合物の選定および合成 ～新規合胞体形成阻害剤の検索～

分担研究報告書

分担研究者 野村伸彦 富山化学工業株式会社 主任研究員

研究要旨

HIV-1 の細胞への融合と侵入に関する過程は、新たな治療薬剤の標的として注目されている。我々は、20000 検体の低分子化合物を対象に、HIV-1 の T-cell 指向性及びマクロファージ指向性の外皮蛋白を発現する細胞を用いて阻害物質の探索を行った。その結果、強い阻害活性を示すサンプルが M-tropic 系で 5 検体、T-tropic 系で 1 検体見出された。M-tropic 系で活性を示した 3 検体の抗 HIV 活性を CCR5 ウイルス株 JR-CSF を用いて評価したところ、合胞体形成阻害試験系で示す阻害活性と相関した抗 HIV 活性を示した。

A. 研究目的

現在、HIV 感染症は、薬剤の耐性化の問題から、新たな作用機序を有する薬剤の開発が望まれている。最近、HIV-1 の細胞への融合と侵入に関する過程は、新たな治療薬剤の標的として注目されている。本研究では、本過程を阻害する新たな薬剤開発を目指す。

B. 研究方法

(1) 評価系及び評価方法

分担研究者田中晴雄が確立した方法 (H.Chiba & H.Tanaka et.al. J. Antibiot. (2001), 54, 818-826) を用いて、HIV-1 の外皮タンパク (env) 及び Tat を発現する HeLa 細胞と CD4 及び LTR で制御された LacZ を発現する細胞を用いた合胞体形成反応を阻害する化合物の検索を行った。T-tropic ウイルスに対しては、NL4-3 env 発現 HeLa/T-env/Tat 及び HeLa/CD4/LacZ 細胞を、M-tropic ウイルスに対しては、SF162 env 発現 HeLa/M-env /Tat 及び HOS/CD4/CCR5 /LacZ 細胞を用いた。10%FBS 添加 D-MEM で懸濁した各々の Receptor 発現細胞 (T-tropic 系: HeLa/CD4/LacZ, M-tropic: HOS/CD4/CCR5/LacZ) を 8×10^5 cells/well 播種し、化合物を添加後、各々の Env 発現細胞 (T-tropic 系:

HeLa/T-env/Tat, M-tropic:HeLa/M-env/Tat) を 8×10^5 cells/well 播種した。37°C, 5%CO₂ 条件下で 18-24 時間インキュベートし、検鏡により細胞の融合を確認後、培養液をアスピレートし、0.05% Triton X-100 添加後、LacZ assay により発色、吸光度を測定した。LacZ 発現量は合胞体形成率に依存することから、検索物質存在下での LacZ 発現を定量することにより、その阻止率を評価した (図 1)。化合物の 2 次評価に関しては、濃度を変化させた際の T/C から、IC₅₀ の算出を試みた。

(2) ライブラリ

分担研究者野村伸彦が所属する富山化学工業が保有する低分子化合物ライブラリー 20000 検体を対照とした。

C. 研究結果

1 次評価は T-tropic 系及び M-tropic 系において 20 μ M の試験濃度にて T/C \leq 10%を示す化合物を選択した結果、M-tropic 系: 168 化合物, T-tropic 系: 20 化合物, T-&M-tropic 系: 22 化合物に活性を見出した。更に、ヒット化合物の詳細な濃度と阻害率の関係及び細胞毒性を評価し、化合物の絞り込

みを行った。その結果、LacZ の発現阻害活性：IC₅₀ ≤0.5 を示すサンプルが M-tropic 系で 5 検体、T-tropic 系で 1 検体であった。

M-tropic 系で活性を示した (IC₅₀: 0.04~0.42 μM) 3 検体 (TCM-1, TCM-2, TCM-3) の抗 HIV 活性を CCR5 ウイルス株 JR-CSF を用いて評価したところ、合胞体形成阻害試験系で示す阻害活性と関連した抗 HIV 活性を示した (IC₅₀: 0.07~0.38 μM)。現在、更に類縁の化合物を合成、評価し、構造と活性に関する知見を蓄積している。

D. 研究成果 (論文、学会発表など)

1. 論文発表

1) Matano T, Kano M, Takeda A, Nakamura H, Nomura N, Furuta Y, Shioda T, Nagai Y.

“No significant enhancement of protection by Tat-expressing Sendai viral vector-booster in a macaque AIDS model.”

AIDS. 2003 Jun 13;17(9):1392-4.

2. 学会発表

1) 巖馬華, 千葉智子, 西澤雅子, 野村伸彦, 北村義浩, 山本直樹, 杉浦 互

新規カルバゾール誘導体による HIV-1 インテグラーゼ活性の抑制

第 17 回日本エイズ学会学術集会 (神戸)

2003.11.27-29

E. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得:

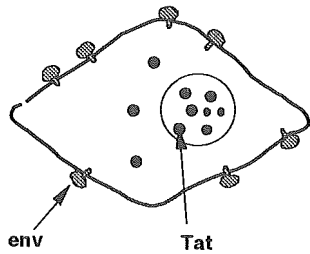
カルバゾール誘導体またはその塩を有効成分とするインテグラーゼ阻害薬および抗レトロウイルス剤申請中

2. 実用新案登録: 該当なし

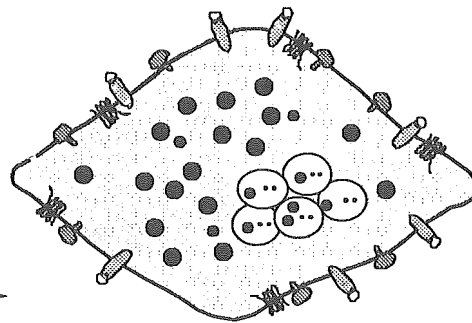
3. その他: 該当なし

レポーター細胞を用いた合胞体形成スクリーニング系

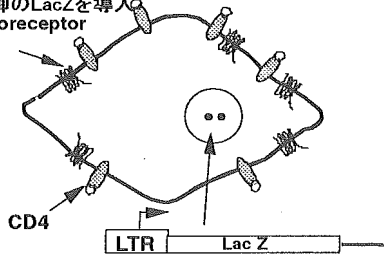
HIV env と tat を発現させた HeLa 細胞



合胞体を形成すると β galactosidase を発現



CD4 とケモカインレセプター細胞膜上に発現させた細胞 (HeLa もしくは HOS) に LTR 制御の LacZ を導入 coreceptor



融合

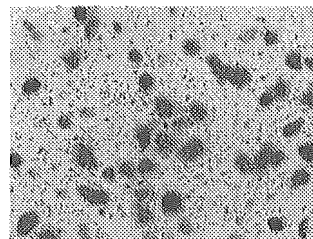


図 1

厚生労働科学研究費補助金（創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業）

分担研究報告書

プロテアーゼ阻害剤の探索

分担研究者 松田善衛 国立感染症研究所 エイズ研究センター 第三室長

研究要旨

近年薬剤耐性などの面で新たな問題点を生じている後天性免疫不全症候群の原因ウイルスである人免疫不全ウイルス（HIV-1）の増殖・複製に必須であるプロテアーゼ産物の阻害剤開発を目的に迅速プロテアーゼアッセイ系 VLP-ELISA 法を用いて、候補化合物ライブラリー 12,000 について、1次、2次スクリーニングを行い10種の化合物を選択した。その作用機序を探る目的で COS 細胞を用いたウイルスタンパク質発現への影響を調べるとともに、指示細胞 HPBMa を用いて T 細胞株での効果評価を試みた。その結果いずれの候補化合物もおそらくプロテアーゼそのものを標的とはしていないことを示唆する結果がえられた。

A.研究目的

後天性免疫不全症候群の原因ウイルスである人免疫不全ウイルス（HIV-1）の増殖・複製に必須であるプロテアーゼ産物の阻害剤の開発を行うことを最終目的とした。

B.研究方法

1次及び2次スクリーニングにはわれわれが開発した迅速プロテアーゼ活性測定法（VLP-ELISA）を用いた。この系は Gag を基質として、基質・酵素の比率が実際の HIV-1 感染と同等となる状態で測定を行う。プロテアーゼ活性は切断 p24 量（p24 ELISA 値）と基質前駆体量（gag 遺伝子と同じプロモーターから読まれるルシフェラーゼ量、ただしルシフェラーゼ量活性で代用）の比 P（p24/ルシフェラーゼ活性）をもって推定される。昨年度までに行った1次、2次スクリーニング（2次スクリーニングでは VLP-ELISA のプロウイ

ルス部分を HIV-1 の全ての遺伝子が存在するコンストラクトに換えて実験）により選択された10化合物についてその作用機序を明らかにする目的で COS 細胞にプロウイルス DNA をトランスフェクトし、その細胞内ウイルスタンパク質プロフィール、産生ウイルス量及びウイルスタンパク質プロフィールを調べて検討した。COS 細胞でのプロテインプロフィールは実験室株 HXB2 のプロウイルス DNA をトランスフェクション後試験化合物濃度を 50 μ M に維持して 48 時間培養し、細胞、ウイルスそれぞれについてウエスタンブロッティング法によりウイルスタンパク質の発現を調べた。さらに HIV-1 の本来の宿主細胞である T 細胞における阻害効果を評価するために、ウイルス感染に際してルシフェラーゼ活性が上昇するように LTR の下流にレポーター遺伝子をもつ DNA が染色体に組み込まれた T 細胞指示細胞 HPBMa を用いて阻害効果の検討を試みた。

C. 研究結果

プロテインプロフィール解析には2次スクリーニングに用いたのと同様の、すべての構造遺伝子、副遺伝子が発現するような感染性実験室分子クローンHIV-1プロウイルスプラスミドを用いて測定を行った。VLP ELISAでは理論的にはプロテアーゼ阻害化合物以外に、ウイルスタンパク質発現以降の種々の後期過程、すなわち細胞内タンパク質移送、出芽、放出、成熟の各過程に何らかの障害があれば候補化合物としてスクリーニングを通過する。これらのどの過程が影響を受けているかを正確に調べるためには、細胞内でのウイルスタンパク質の発現量(転写、翻訳そのものへの効果)、そのプロセスのされ方(プロテアーゼ機能を反映)、産生ウイルスの量(細胞内移送、発芽の効率に依存)、産生ウイルスにおける構造タンパク質のプロセッシング(成熟過程の評価)をウエスタンブロットングを用いて評価するのが妥当であると考えた。結果を図1に示す。評価した10化合物のうち#1、3、13については細胞内でのウイルスタンパク質産生の低下を認められた。他の化合物についてはそのような量的差異を認めなかった。産生ウイルス量は同じく#1、3、13で低下していたがこれは細胞内での発現量低下を反映していると考えられた。他の化合物で出芽効率の低下を来している化合物は見いだされなかった。またいずれの化合物においても構造タンパク質Gag、あるいはPolのプロセッシングには著変を認めなかった。この実験と並行してCOSに加えて293細胞を用いてVLP ELISAアッセイを行ったが、候補化合物#1、3は細部毒性が強く、#13は細胞毒性が#1、3に比べて軽度であった。COS細胞で得られた結果をもとに上記10化合物についてHPBMa細胞でのウイルス感染を指標とした評価を試みたが

5 μ M以上では細胞毒性のため評価が行えなかった。5 μ Mの濃度ではウイルス増殖阻害作用は認められなかった。(COSにおいても5 μ Mでは阻害効果を認めなかった)

D. 考察

VLP ELISAを用いたプロテアーゼ活性迅速スクリーニングにより選出した10化合物についてその作用機序を探る目的で実験を行った。当初期待したプロテアーゼそのものへの阻害効果はいずれの薬剤についても確認できなかった。VLP ELISA法ではプロテアーゼ阻害剤のみでなく、翻訳後過程(ウイルスタンパク質の細胞内輸送、出芽、成熟の各ステップ)での阻害剤もスクリーニングを通過することは予見されていたのでその可能性の検討も含めて候補化合物存在下でのHIV-1タンパク質の発現、性状について調べたが、候補化合物#1、3、13についてはウイルスタンパク質の発現低下が認められ、ウイルス増殖過程のより上流への寄与が示唆された。いずれの候補化合物についても構造タンパク質のプロセッシングには影響が認められなかった。VLP ELISAでは細胞毒性への評価がルシフェラーゼ活性の測定で可能であるが、スクリーニングに用いたCOS細胞の結果がそのまま他の細胞に(例えば今回のHPBMa)は当てはまらない場合があることが示唆された。細胞毒性のみをもつての化合物の評価は賛否両論のあるところであるが、スクリーニング遂行上は再考が必要と思われる。今回の結果を受けて#13を中心とした関連化合物の検討および一次、二次スクリーニングの結果を再検討して、さらにいくつかの候補化合物について今回と同様の評価を加えてみることは有用であると思われる。

E. 結論

VLP ELISA 法を用いてスクリーニングを行い 12,000 化合物の中から選択した 10 化合物についてその作用機序の解析を行った。いずれの薬剤についても当初期待されたプロテアーゼに対する直接の阻害効果は認められなかった。しかし、選択化合物のいくつかはウイルスタンパク質産生阻害効果を示し、これらのスクリーニングは当初予定していた作用機作が得られなかったものの、阻害作用のある化合物は選択されたことになる。ただし T 細胞株を用いた評価では COS で得られた毒性濃度よりも低い値に閾値が見いだされ評価が困難であることが示唆され、今後のスクリーニングにあたり、将来評価を行う細胞での毒性試験も早期に評価する必要があると考えられた。

F. 健康危険情報: 特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Yokomaku, Y., Miura, H., Tomiyama, H., Kawana-Tachikawa, A., Takiguchi, M., Kojima, A., Nagai, Y., Iwamoto, A., Matsuda, Z., Ariyoshi, K. Impaired Processing and Presentation of Cytotoxic T Lymphocyte (CTL) Epitopes Are

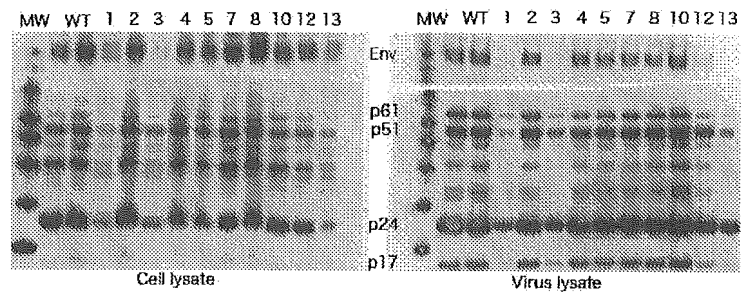
Major Escape Mechanisms from CTL Immune Pressure in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection J. Virol. 78, 2004 (in press)

2. 学会発表

横幕能行, 松田善衛, 千葉智子, 巖馬華, 松田昌和, 杉浦互: 抗 HIV-1 新規候補薬剤検索のための多検体処理可能なスクリーニングシステム構築 第 17 回日本エイズ学会, 神戸 2003 年 11 月 27-29 日

H. 知的財産権の出願登録情報: 該当なし

図 1 候補化合物存在下でのタンパク質プロフィール



候補化合物 # 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 12, 13 (50 μ M) 存在下に COS 細胞の系におけるウエスタンブロッティングによるウイルスタンパク質発現プロフィールを示す。上部に化合物番号を示した (WT: 化合物非存在下)。ウイルスポテアーゼでプロセスされる Gag 産物 p24, p17 および Pol 産物 p61, p51 を示した。

III.研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

| 著者氏名 | 論文タイトル名 | 書籍全体の 編集者名 | 書 籍 名 | 出版社名 | 出版地 | 出版年 | ページ |
|------|------------------------|-------------------------|-------------------------------------|------|-----|------|---------|
| | | 北村義浩、 仲嶋一範 | 必ず上手くいく 遺伝子導入と発 現解析プロトコ ール | 羊土社 | 東京 | 2003 | |
| | | 村松正実、 北村、井上、 田中、禾 | 新ラボマニユア ル遺伝子工学 | 丸善 | 東京 | 2003 | |
| 田中晴雄 | 微生物のゲノムと構 造・機能—細胞壁— | 田中晴雄・ 土屋友房 | 微生物薬品化学 第4版 | 南江堂 | 東京 | 2003 | 65-72 |
| 田中晴雄 | 化学療法薬（感染症治 療薬）各論 | 田中晴雄・ 土屋友房 | 微生物薬品化学 第4版 | 南江堂 | 東京 | 2003 | 197-256 |

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|--|--|---|----|---------|-------|
| Lay Myint, Masakazu Matsuda, Zene Matsuda, Yoshiyuki Yokomaku, Tomoko Chiba, Aiko Okano, Kaneo Yamada, Wataru Sugiura | Contribution of Gag Non-Cleavage Site Mutations for full Recovery of Viral Fitness in Protease Inhibitor Resistant HIV-1. | Antimicrobial Agents & Chemotherapy | 48 | 444-452 | 2004 |
| Koya Ariyoshi, Masakazu Matsuda, Hideka Miura, Sachiko Tateishi, Kaneo Yamada, Wataru Sugiura. | Patterns of Point Mutations Associated With Antiretroviral Drug Treatment Failure CRF01_AE(Subtype E) Infection Differ From Subtype B Infection | JAIDS | 33 | 336-342 | 2003, |
| J Snoeck, R Kantor, RW Shafer, I Derdelinckx, AP Carvalho, B Wynhoven, MA Soares, P Cane, J Clarke, C Pillay, S Sirvichayakul, K Ariyoshi, A Holguin, Z Grossman, R Rodrigues, MB Bouzas, P Cahn, LF Brigido, V Soriano, W Sugiura, P Phanuphak, L Morris, J Weber, D Pillay, A Tanuri, PR Harrigan, R Camacho, JM Schapiro, D Katzenstein, AM Vandamme | Evaluation of Five Interpretation Algorithms for the Prediction of Drug Susceptibility in Non-B Subtype. | Antiviral Therapy | 8 | s111 | 2003 |

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|---|---|---|--------|-----------|------|
| R Kantor, RW Shafer, AP Carvalho, B Wynhoven, MA Soares, P Cane, J Clarke, J Snoeck, C Pillay, S Sirivichayakul, K Ariyoshi, A Holguin, Z Grossman, R Rodrigues, MB Bouzas, P Cahn, LF Brigido, V Soriano, W Sugiura, P Phanuphak, L Morris, A-M Vandamme, J Weber, D Pillay, A Tan D Katzenstein | Nucleic acid differences between HIV-1 non-B and reverse transcriptase and protease sequences at drug resistance positions. | Antiviral Therapy | 8 | s58 | 2003 |
| L Myint, M Matsuda, T Chiba, H Yan, J Kakizawa, A Okano, M Hamatake, M Nishizawa, W Sugiura | Analysis of Virion Morphology and Assembly Process in Protease Inhibitor Resistant HIV-1. | Antiviral Therapy | 8 | s91 | 2003 |
| Wataru Sugiura, Kazunori Shimada, Masakazu Matsuda, Tomoko Chiba, Lay Myint, Aiko Okano and Kaneo Yamada | Novel Genotyping Assay for Human Immunodeficiency Virus Type-1 Drug Resistance Using Enzyme Linked Mini-Sequence Assay. | Journal of Clinical Microbiology | 41 | 4971-4979 | 2003 |
| 杉浦 互 | HIV の薬剤耐性研究の現状と今後の課題 | 現代医療 | 35 (6) | 113-118 | 2003 |
| 杉浦 互 | 日本における薬剤耐性 HIV-1 の現状 | 臨床とウイルス | 31(4) | 272-282 | 2003 |
| 金田次弘、加藤真吾、山元泰之、千葉智子、杉浦 互 | 抗 HIV 療法のモニタリング | 日本エイズ学会誌 | 5 | 109-112 | 2003 |
| Miura T, Goto M, Hosoya N, Odawara T, Kitamura Y, Nakamura T, Iwamoto A. | Depletion of mitochondrial DNA in HIV-1-infected patients and its amelioration by antiretroviral therapy. | J Med Virol. | 70(4) | 497-505 | 2003 |
| Sakuma S, Kobayashi N, Ae K, Kitamura Y | Inhibitory and Enhancing Effects of Insertion of Central Polypurine Tract and Central Termination Sequence on Gene Expression with Vectors Derived from Human Immunodeficiency Virus Type 1 | Biochemical and Biophysical Research Communications | 302(3) | 489-495 | 2003 |
| Yamada T, Kaji N, Odawara T, Chiba J, Iwamoto A, Kitamura Y | Proline 78 is crucial for human immunodeficiency virus type 1 Nef to down-regulate class I human leukocyte antigen. | J Virol. | 77 | 1589-1594 | 2003 |
| Iwasaki S, Kimura H | Further studies on thermal treatment of two-cell stage embryos to produce complete ES-cell derived mice by cell-aggregation methods | Development, Growth and Differentiation | | in press | 2004 |
| Satoh E, Yan H., Robb L, Hikino H, Miyagi T, Saito H, Gold DP, Li X-K., Teramoto K, Arie S, Kimura H | Generation of GM-CSF independent myeloid dendritic cells (DC) from bonemarrow cells (BMC) in GM-CSF receptor deficient mouse | Transplantation Proceeding | | in press | 2004 |
| Satoh E, Yan H, Miyagi T, Saito H, Gold DP, Li X-K, Fujino M, Teramoto K, Arie S, Kimura H. | Cytokine requirement from the generation of a large number of rat dendritic cells (DC) by in vitro culturing of bone marrow cells and its selection of CD161 (NKR-P1A) | Transplantation Proceeding | | in press | 2004 |