

# 厚生労働科学研究費補助金

## エイズ対策研究事業

計算機を活用したH I Vの薬剤耐性評価

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 星野 忠次

平成17(2005)年 3月

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）  
「計算機を活用したH I Vの薬剤耐性評価」  
平成16年度 総括・分担研究報告書

目 次

I. 総括研究報告	
計算機を活用したH I Vの薬剤耐性評価	----- 1
星野忠次	
II. 分担研究報告	
1. 薬剤耐性評価のための計算遂行	----- 6
畑 晶之	
2. 薬剤耐性解析技術の臨床評価	----- 10
佐藤 武幸	
3. 耐性モニタリング技術としての計算解析法の評価	----- 13
杉浦 亙	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 18
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 20

計算機を活用したHIVの薬剤耐性評価

主任研究者 星野忠次（千葉大学大学院薬学研究院 助教授）

研究要旨 抗エイズ薬に対する HIV 感染患者の個別ウィルスの薬剤耐性度を、計算機を利用して予測するための技術開発を行った。耐性予測評価プログラムの開発を星野(千葉大学薬学研究院)が行い、実際の計算解析を畑(千葉大学薬学研究院)が遂行した。計算結果と既存の実験的検査結果との照合を杉浦(国立感染症研究所エイズ研究センター)が担当し、臨床データとの比較を佐藤(千葉大学医学部附属病院)が行った。薬剤-酵素間の親和性に関して従来の計算方法では評価が困難であった微少な違いを、再現性良く求める手法を開拓した。既にフェノタイプ検査が実施された臨床検体由来の菌株10検体について、この方法を適用したところ、複数の評価方法を組み合わせることで、既存の実験データと計算値との間に良い整合性が見られるようになった。検証例を増やすことが今後の課題である。

分担研究者

畑 晶之（千葉大学大学院薬学研究院 助手）

佐藤武幸（千葉大学医学部附属病院 感染症管理  
治療部長、助教授）

杉浦 互（国立感染症研究所、エイズ研究センター  
第2研究グループ長）

協力研究者

横幕能行（千葉大学医学部附属病院 助手）

布施 晃（国立感染症研究所 血液・安全性研究  
部長）

A. 研究目的

抗HIV薬は長期にわたる投与を余儀なくされるため、ウィルスが薬剤抵抗性を獲得し、耐性ウィルスが発生してしまうことが、HIV感染症治療では深刻な問題となっている。そこでHIV感染患者に薬を投与する前に、予め薬剤耐性検査を行うことが、抗HIV療法をより充実させるために重要である。これに対応して、HIVのジェノタイプとフェノタイプを迅速に決める検査技術が開発され、抗HIV療法の一環として、耐性検査を行うことが現実のものとなっている。

本研究では、ジェノタイプ検査やフェノタイプ

検査に並ぶ新しい薬剤耐性検査法として、「コンピュテーショナル検査」を提案している。この技術の実現に向け、計算手法の開拓を中心に開発を推進している。本研究の目標は、計算機を駆使した理論的方法により、国内で認可されている抗HIV薬のうち、個々の患者にとって最も適した薬剤を選択できる技術を確立することである。

B. 研究方法

患者ごとに異なる酵素の構造変異を計算機内で再現し、抗エイズ薬への抵抗性を算出するシステムを構築することが本研究の目標である。この実現に向けて、方法論の開拓ならびに実験的知見との整合性確認という2つの観点より、以下に示す項目に分けて研究を進めた。特に本研究では、計算機で評価された検査結果に、高い信頼性があるか、十分に新規の医療技術として臨床に応用できるものかを確認することが、最大のポイントである。そこで、従来のジェノタイプ検査やフェノタイプ検査と照らし合わせて、計算機で算出した値が、実験的測定値と整合性があるかを詳細に調べる。

ソフトウェア開発（方法論の開拓）

- ・ 計算評価法改良と計算機プログラムの作成
- ・ 計算の迅速化に向けた取り組み  
   既存データとの比較（整合性確認）
- ・ フェノタイプ検査が既知のデータを、照合例として使用
- ・ 変異情報から、検体固有の酵素を計算機内で仮想的に作成し、薬剤-変異酵素結合構造を構築
- ・ 薬剤と酵素の結合力の算出と薬剤抵抗性の評価
- ・ 計算機算出値と実験データとの比較  
   臨床データとの比較（整合性確認）
- ・ 患者からのサンプル採取とウイルス量の測定
- ・ 国立感染症研究所エイズ研究センターでのサンプルのジェノタイプ検査
- ・ ジェノタイプ検査、治療経過および計算評価結果を比較

#### （倫理面への配慮）

患者からの試料採取は、千葉大学大学院医学研究院倫理審査委員会での審議を経て行い、提供者に菌株が実験に利用される旨の説明をして同意を得る。分担研究者(佐藤)以外は、個人識別情報は全く参照できない。コンピュータショナル検査の実施においては、主任研究者らは患者とは全く接点が無い。

### C. 研究結果

#### ソフトウェア開発

薬剤耐性の予測法として、薬と標的酵素の結合エネルギーから評価する方法、反応ポケットの歪みと反応ポケットの体積の増加を測定する方法、さらに接合面のゆらぎ具合から推定する方法の3つを試みた。

エネルギー評価法では、薬剤と酵素の間の静電力的力と分子間力を算出し、疎水部分の接触面積から疎水相互作用の効果を、芳香族環から $\pi$ - $\pi$ 相互作用の効果を算出し、全てを加え合せて評価するプログラムを作成した。

反応ポケットの構造変化から評価する方法では、まず活性残基である Asp25 から Ile50' の距離と Asp25' から Ile50 の距離の差で、構造の歪みを測る。さらに Asp25-Ile50' -Asp25' -Ile50 の作る平面により反応ポケット領域の構造変化を測る。これは薬剤とプロテアーゼの結合親和性が低くなると、プロテアーゼのフラップ領域の閉じ具合が不良となるために、反応ポケット領域の体積が増加するという知見に基づいている。歪みと構造変化を組み合わせて、親和性を評価するプログラムを作成した。

ゆらぎ評価法では、計算中における薬剤と酵素の間の接合面の変動の周期（良く結合している場合は接合面の揺らぎがゆったりとしているが、結合が緩いと細かく変動する）から、親和性を評価するプログラムを作成した。

当初、一つの薬剤のシミュレーションには3週間程必要であったが、計算方法を工夫することで、計算精度を落とさずに、最大で計算時間を従来の半分程度に抑えることができた。但し、現在の最新の計算機では、さらにその半分程度まで計算時間を短縮することができる。

当初、一つの薬剤のシミュレーションには3週間程必要であったが、計算方法を工夫することで、計算精度を落とさずに、最大で計算時間を従来の半分程度に抑えることができた。但し、現在の最新の計算機では、さらにその半分程度まで計算時間を短縮することができる。

#### 既存データとの比較

分担研究者(杉浦)の蓄積している解析データの中より、検査会社(Virco)によりフェノタイプ検査の行われた36検体について、主任研究者(星野)は分担研究者(畑)と共に計算機解析を始めた。計算が実行しやすいことならびにジェノタイプ検査だけの結果のみでは十分に耐性度が推定できず、本研究で開発するシステムの有用性が高いことから、本研究ではプロテアーゼ阻害剤に絞り研究を進めた。臨床検体から分離された一つの HIV-1 プロテアーゼ株につき、現在国内で認可されている7つのプロテアーゼ阻害剤との結合親和性を順次に求め、10検体について計算を実施することができた。その結果、エネルギー評価法では、インジナビル以外では、臨床検体のフェノタイプの耐性検査と計算予測値との整合性が、ある程度、取れるようになった。

反応ポケットの構造変化から評価する方法で

は、10 検体のうち半分程の検体について、臨床検体のフェノタイプ耐性検査の結果と計算予測値との間に良い整合性が見られた。

ゆらぎ評価法では、変異が 1,2 箇所だけの実験室株に対しては、計算値は実験的薬剤感受性と良い相関が見られた。この評価法を抗原-抗体結合に適用した結果も良い推測値を与えることができるようになった。ところが HIV の臨床株に対しては満足に行く結果は得られなかった。

#### 臨床データとの比較

実際の患者 2 例について、評価を試みた。但し、計算機による薬剤耐性評価が確立していないので、この結果は参考程度であり、実用面では目立った進展がなかった。患者の薬剤投与履歴とウイルス量変化やウイルス変異の経過を追跡する必要があるので、分担研究者(佐藤)は、幾つかのサンプルについて、国立感染症研究所に検査を依頼して、後の評価検討のための準備を進めた。

#### D. 考察

評価を試みた 3 種類の方法のうち、エネルギー評価法と構造変化評価法は、検体によっては、フェノタイプの耐性検査との間に十分な整合性を示した。エネルギー評価法で 4 例、構造変化評価法で 6 例が整合性のある結果を与えた。10 検体のうち、エネルギー評価法で整合性の悪かった検体は、構造変化評価法では良好な整合性を示した。また逆に構造変化評価法であまり整合性が良くない検体は、エネルギー評価法で良い整合性を示した。結局、エネルギーと構造変化は相反し、計算評価は相互に補完するので、両者を併用すると予測精度が著しく向上するということが見えてきた。

本研究で開発してきたエネルギー評価法ならびにゆらぎ評価法は、従来、創薬や生物学の分野で標準的に利用されてきた自由エネルギー計算手法 (MMGBSA 法や MMPBSA 法) よりは、信頼性の高い結果を与えている。但し薬物候補のスクリーニングでの利用とは異なり、臨床における薬剤選択に利用されるには、相当に計算精度を上げる必

要がある。HIV-1 プロテアーゼの薬剤に対する感受性変化が 2~3 倍変化するのに対し、1kcal/mol 程度のエネルギー変化しかないと言われており、従来の方法では対処しきれない。従って、本研究で開発された計算手法は、精度の面よりかなり有望であると考えている。本研究で開発してきたエネルギー評価ならびにゆらぎ評価のいずれの方法も、十分に長く計算シミュレーションを行うと精度が向上する。

臨床検体ウィルスの遺伝子配列解析では、A, T, G, C に分類できないコドン (例えば R は A または G に対応) も存在する。これは臨床検体には複数の遺伝型を持つウィルスが混在しているためであると考えられる。検体によっては、確定のできないコドンが複数箇所あるために、HIV-1 プロテアーゼ遺伝子の全長に対して千通り以上の組み合わせが生じる場合も多々ある。計算ではどれか一つに確定しないとモデルが作成できないので、一旦、全てのアミノ酸配列の組み合わせを作成し、それを比較して一つの配列に絞り込むことを行った。具体的には、ジェノタイプ検査のデータベースで指摘されている重篤な変異の有無、電荷の変化、かさ高さの変化などに順位付けを行い、変異が入ったときに野生株から最も大きな影響を及ぼす可能性のあるものが選択されるようにした。これはフェノタイプ検査との不整合の一因となってしまうが、重大なアミノ酸変異を見逃すことの無いようにとの判断である。実際に検体を用いた評価を実行すると、この絞り込みを行ったとしても、フェノタイプ検査の結果と整合性が保てることが判明した。

#### E. 結論

薬剤抵抗性評価に用いるソフトウェアの開発には、一定の成果があった。エネルギー評価法では、実験室株ならびにインジナビルを除くプロテアーゼ阻害剤について、一部の検体について、計算機による親和性の算出値と実験による測定値の間の整合性がみられるようになった。構造変化

評価法でも、一部の検体に対して良好な整合性を示した。エネルギー評価と構造変化評価は相反し、計算評価は相互に補完する。すなわちエネルギー評価の整合性が高いものは、構造変化評価の整合性が低く、逆にエネルギー計算評価の整合性が低いものは構造変化評価の整合性が高い。従って、両者を併用すると予測精度が著しく向上するということがわかった。今後、評価法をさらに改良し、全種プロテアーゼ阻害剤について、短時間で変異株に関して、全ての検体について十分に信頼性の高い予測ができるようにする必要がある。

## F. 健康危険情報

特に無し。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- Ode, H., Ota, M., Neya, S., Hata, M., Sugiura, W., Hoshino T., “Resistant Mechanism against Nelfinavir of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Proteases”, J. Phys. Chem. B 109, 564-574, 2005.

### 2. 学会発表

- Ode, H., Neya, S., Hata, M., Sugiura, W., Hoshino, T., “Insight into the Resistant Mechanism against HIV-1 Protease Inhibitor through Molecular Dynamics Simulations.”, Int. Symp. on Molecular Nano-Engineering and Its Development into Microsystems, Tokyo, Japan, 60-61 (2004) Tokyo.
- Hattori, T., Yokoyama, M., Sato, H., Hoshino, T., “Computational Identification of HIV-1 Specific CTL Epitopes”, Int. Symp. on Molecular Nano-Engineering and Its Development into Microsystems, Tokyo, Japan, 60-61 (2004) Tokyo.
- Fuji, H., Yokomaku, Y., Syouji, Y., Narita, T., Miyauchi, K., Matsuda, Z., Sato, H.,

Hoshino, H., Hoshino, T., “Construction of HIV-1 *env* Clone Library -Rapid Cloning and Expression of HIV-1 *env*, and Production of Recombinant HIV-1”, Int. Symp. on Molecular Nano-Engineering and Its Development into Microsystems, Tokyo, Japan, 60-61 (2004) Tokyo.

- 太田雅美、簾貴士、大出裕高、畑晶之、佐藤武幸、横幕能行、布施晃、杉浦互、星野忠次 「臨床応用に向けたコンピュータによるエイズ治療薬の適正予測」 第 18 回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集, 234 (2004) 静岡
- 藤秀義、田中真理、宮内浩典、松田善衛、星野忠次、有吉紅也、星野洪郎、佐藤裕徳、横幕能行 「HIV-1 *env* クローンライブラリー作成の試み—HIV-1 *env* の迅速なクローニング、発現および組み換えウイルス作成システム構築—」 第 18 回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集, 311 (2004) 静岡
- 星野忠次、太田雅美、簾貴士、大出裕高、畑晶之、根矢三郎、横幕能行、佐藤武幸、杉浦互、布施晃 「計算機によるエイズウイルスの薬剤耐性評価」 第 48 回日本薬学会関東支部大会講演要旨集, 20 (2004) 千葉
- 大出裕高、根矢三郎、畑晶之、杉浦互、星野忠次 「HIV-1 プロテアーゼのアミノ酸変異による阻害剤耐性機構の解明」 第 48 回日本薬学会関東支部大会講演要旨集, 45 (2004) 千葉
- 藤秀義、横幕能行、庄司祐介、成田友之、宮内浩典、松田善衛、佐藤裕徳、星野洪郎、根矢三郎、星野忠次 「HIV *env* の迅速クローニング・発現・組み換えウイルス作製システムの構築と基礎・臨床応用」 第 48 回日本薬学会関東支部大会講演要旨集, 96 (2004) 千葉
- 大出裕高、畑晶之、根矢三郎、杉浦互、星野忠次 「分子動力学法を用いた HIV-1 Protease 阻害剤耐性機構の解明」 情報計算化学生物学会 2004 年大会予稿集, 75-76 (2004) 東京
- 藤秀義、庄司祐介、宮内浩典、星野忠次、根矢

- 三郎, 松田善衛, 横幕能行 「Non-Clade Bを含む HIV-1 感染者由来 env 発現系の構築」 レトロウイルス研究会夏期セミナー (2004) 千葉
- 庄司祐介, 大出裕高, 藤秀義, 横幕能行, 根矢三郎, 星野忠次 「コンピューターシミュレーションでタンパク質構造予測はどこまで可能か？」 レトロウイルス研究会夏期セミナー (2004) 千葉
  - 大出裕高, 太田雅美, 畑晶之, 根矢三郎, 杉浦互, 星野忠次 「HIV-1 protease 阻害剤耐性の分子動力的評価」 日本薬学会第 124 年会要旨集 - 3, 29 (2004) 大阪
- H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)  
実績無し。

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

分担研究報告書

薬剤耐性評価のための計算遂行

分担研究者 畑 晶之（千葉大学大学院薬学研究院 助手）

研究要旨 ウィルスの抗エイズ薬に対する薬剤耐性を評価するための計算手続きと親和性評価に用いるソフトウェアを開発した。計算手続きとしては、ウィルスの塩基配列から薬剤と変異型酵素複合体のモデルを作成する部分、計算準備としてモデルへ生体内条件を適用する部分、生体内シミュレーションを実行して構造平衡化を計算する部分、最終的に結合エネルギーや構造変化ならびにゆらぎ解析を行う部分を構築した。これらが半自動的にできるようにプログラムの作成を行い、計算実行の効率化を図った。また、親和性評価に用いる結合エネルギー解析、構造変化解析、ならびにゆらぎ解析を良く知られたアミノ酸変異を持つ菌株に適用し、これらが実験的に知られている薬剤耐性評価と整合性のあることを確認した。

A. 研究目的

ウィルスの薬剤耐性の獲得は、現在のエイズ治療において最も深刻な問題の一つである。現実には耐性ウィルスの発生により、治療上、薬剤変更が余儀なくされる。従って、最少量の薬剤投与により十分な薬物効果をあげてウィルス量を抑えることが必要になる。仮に、患者ごとに最も適した薬剤を事前に選択することができるようになれば、一般的な経験則による不用意な薬剤投与と薬剤耐性発生を回避することができ、患者の負担を軽減することができる。さらに、不必要なウィルス耐性発生を抑えられるので、使用可能な薬剤の選択を広げられ、よりよい治療効果を期待できる。本研究班は、多様な変異 HIV 株に特異的に有効な治療薬を、コンピュータシミュレーションを用いて予測することで、HIV 感染患者の薬物治療を

効率的なものとすることを目指している。そこで本研究では、薬剤選択に利用するコンピューター計算プログラムの開発と実行を通じて、実用向きのソフトウェアを提供する。

B. 研究方法

計算を実行する際のソフトウェア開発として、(1)計算手続きをルーチン化し、共通の計算を遂行できるようにすること、(2)親和性評価の精度の向上を図り計算による予測の信頼性を確保すること、を具体的課題とした。(1)の計算手続きをルーチン化は、これまで通常行われている分子シミュレーションを HIV-1 プロテアーゼと阻害剤の結合に限ることで、計算の手間を効率化を図るためのものである。従って、分子シミュレーション中の共通化できる部分をプログラム化するこ



とで実現する。(2)親和性評価の精度の向上には、実験で測定されたフェノタイプ検査の測定値と計算で算出される値を比較して行う。この計算の手法を考え出し、プログラム化する作業となる。実験測定値としては、既にジェノタイプで耐性になると知られている単一のアミノ酸変異だけを持つ単純な実験室株での測定値を利用する。具体的には、D30NやL90MやN88DならびにWildタイプのプロテアーゼに阻害剤 Nelfinavir が結合した場合を利用する。計算手法として、(a)薬と標的酵素の結合エネルギーから評価する方法、(b)反応ポケットの歪みと反応ポケットの体積の増加を測定する方法、(c)接合面のゆらぎ具合から推定する方法の3つを試みた。

(倫理面への配慮)

患者固有のデータは使用しない。

## C. 研究結果

### (1) 計算手続きのルーチン化

計算を実行し評価するまでに、(A)ウィルスの塩基配列から薬剤と変異型酵素複合体のモデルを作成する部分、(B)計算準備としてモデルへ生体内条件を適用する部分、(C)生体内シミュレーションを実行して構造平衡化を計算する部分、(D)最終的に結合エネルギーや構造変化ならびにゆらぎ解析を行う部分が必要となる。(A)ウィルスの塩基配列から薬剤と変異型酵素複合体のモデルを作成する部分では、SEQ\_DETERM というソフトウェアを独自に開発した。これにより塩基配列からアミノ酸配列への変換やPDBファイルの編集が可能となる。これ以外に、MultiAlignment, Transform, Makeparm などのソフトウェアが開発され、実際に利用している。(B)計算準備としてモデルへ生体内条件を適用する部分では、標準的な市販分子動力学ソフトウェアパッケージであ

る AMBER8 を利用するために、Leap\_load\_data, res2res などのプログラムが作成された。これにより酵素のまわりに溶媒として水分子を発生させ、初期値の絶対零度から生体温度までの昇温を行う。(C)生体内シミュレーションを実行して構造平衡化を計算する部分では、AMBER8 の分子動力学計算を 2n 秒程度実行する。このとき Constraint\_sander や PiPi\_sander という市販ソフトウェアを修正したものが利用される。(D)最終的に結合親和性評価を行う部分では、エネルギーや構造変化ならびにゆらぎ解析を実施する。このために EnergyDiv\_sander, binding\_surface, pipi-calc, Volume\_area, InterFaceFluctuate, SC\_calc などのプログラムが作成された。

### (2) 親和性評価の精度の向上

酵素と薬物の結合親和性を評価するために、(a)結合エネルギー評価、(b)構造変化による評価、(c)接合面のゆらぎ評価の3つの方法が開発され、試みられた。(a)結合エネルギー評価では、結合エネルギーをクーロン相互作用エネルギー、ファンデルワールス相互作用エネルギー、疎水相互作用エネルギー、 $\pi$ - $\pi$ 相互作用エネルギーの4つの総和として算出することにした。WildタイプのプロテアーゼとD30NならびにN88D変異体で、この方法を適用したところ、実験から測定された阻害薬物濃度の比の対数値とほぼ線形の相関が得られた。(b)構造変化による評価では、活性残基である Asp25 から Ile50' の距離と Asp25' から Ile50 の距離の差で構造の歪みの程度を測り、Asp25-Ile50' -Asp25' -Ile50 の作る平面の面積により反応ポケット領域の大きさを測る。これは歪みが大きいほどプロテアーゼの安定性には不利であり、また薬剤とプロテアーゼの結合親和性が低くなると、プロテアーゼのフラップ領域の閉じ具合が不良となり、反応ポケット領域の面積が

増加するという知見に基づいている。距離差と面積変化を変数として、これに適当な定数を掛け合わせることで、親和性を評価するプログラムを作成した。Wild タイプのプロテアーゼと L90M ならびに N88D 変異体で、この方法を適用したところ、実験での測定された変異構造の薬物抵抗性とほぼ線形の相関が得られた。(c)接合面のゆらぎ評価では、ファンデルワールスエネルギーの時間変動をフーリエ変換して、この要素を加え合わせるにより評価を行う。この方法についても、Wild タイプのプロテアーゼと D30N ならびに N88D 変異体に適用したところ、実験から測定された阻害薬物濃度の比の対数値とほぼ線形の相関が得られた。

#### D. 考察

計算機によるアプローチでも実験と同様に、計算を実行する人により若干方法が異なるので、必ずしも同一の計算値が算出されるとは限らない。そこでなるべく計算の工程を自動化して、誰が計算しても、また計算機を使うことに不慣れな人でも適正な算出値が得られるように工夫をしている。

計算機による薬剤耐性評価を行う場合に、コストの面で実験的なフェノタイプ検査より安価でなくてはならない。計算中では、(C) の生体内シミュレーションを実行が最も時間が掛かる。これは薬物が変異の入った HIV-1 プロテアーゼに結合したときの生体温度における平衡構造を求めるためのものである。この構造が正確でないと評価の精度は向上しない。この構造を正確に求めるためには計算機シミュレーションは長ければ長いほど信頼性が高くなる。しかし計算時間からの制約から一つのモデルに対して、2n 秒のシミュレーションを行うこととした。構造がなるべく早く適

切なものになるように、計算の初めにおいて一部の水分子や原子間に束縛を課すなどの工夫をしている。これにより比較的短い時間のうちに適切な構造が得られるようになった。

今回の研究で開発された 3 つの結合親和性評価方法は、単純な変異しか持たない実験室株については、良好な評価を与えた。多くの臨床由来の検体は十数箇所に入り変異が入っていることが多い。計算は Wild タイプの薬物-酵素複合体を元に、これに変異を入れる方式で、薬物-変異型酵素複合体のモデル作成を行う。従って、アミノ酸変異の箇所が増えるほど、平衡化構造を得られるまでの計算時間が長くなる。計算時間の制約上、計算時間を決めて実行するが、これが臨床由来の検体を取り扱う場合に計算予測精度を下げる事が予想される。従って、計算時間と計算精度の間に適切な折合いを見つけることが重要になる。

エネルギー評価プログラムの改良と並行して、変異型酵素のシミュレーションも多数行った。今後は、プロテアーゼ阻害剤と多数の変異株 HIV-1 プロテアーゼとの相互作用・構造安定性をデータ化し、実際の患者の治療結果に本研究結果を適用する際の問題とその解決に向けて研究を進める予定である。

#### E. 結論

コンピューターシミュレーションを用いて、抗エイズ薬に対するウィルスの薬剤耐性を予測するという目的を実用に近づけるために、計算手続きと親和性評価に用いるソフトウェアを開発した。計算をルーチン化し、これらが半自動的にできるようにプログラムの作成を行い、計算実行の効率化を図った。また、親和性評価に用いる結合エネルギー解析、構造変化解析、ならびにゆらぎ解析を開発し、これらが実験的に知られている薬

剤耐性評価と整合性のあることを確認した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- H. Ode, M. Ota, S. Neya, M. Hata, W. Sugiura, T. Hoshino : Resistant Mechanism against Nelfinavir of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Proteases, *J. Phys. Chem. B* 109, 564-574 (2005)
- Y. Sato, M. Hata, S. Neya, T. Hoshino : Computational analysis on the transient movement of helices in sensory rhodopsin II, *Protein Science*, 14, 183-192 (2005)
- T. Osakabe, Y. Fujii, M. Hata, M. Tsuda, S. Neya, T. Hoshino : Quantum Chemical Study on Base Excision Mechanism of 8-oxoguanine DNA Glycosylase: Substrate-Assisted Catalysis of the N-Glycosidic Linkage Cleavage Reaction, *Chem-Bio Inform. J.*, 4, 73-92 (2004)
- M. Hata, Y. Hirano, T. Hoshino, R. Nishida, M. Tsuda : Theoretical Study on Compound I Formation in Monooxygenation Mechanism by Cytochrome P450, *J. Phys. Chem. B*, 108, 11189-11195 (2004)
- K. Mori, M. Hata, S. Neya, T. Hoshino : MD simulation of asymmetric phospholipid bilayers with ions and cholesterol, *Chem-Bio Inform. J.*, 4, 15-26 (2004)

### 2. 学会発表

- Ode, H., Neya, S., Hata, M., Sugiura, W., Hoshino, T., "Insight into the Resistant Mechanism against HIV-1 Protease Inhibitor through Molecular Dynamics Simulations."

Int. Symp. on Molecular Nano-Engineering and Its Development into Microsystems, Tokyo, Japan, 60-61 (2004) Tokyo.

- 太田雅美、簾貴士、大出裕高、畑晶之、佐藤武幸、横幕能行、布施晃、杉浦互、星野忠次 「臨床応用に向けたコンピュータによるエイズ治療薬の適正予測」 第 18 回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集, 234 (2004) 静岡
- 星野忠次, 太田雅美, 簾貴士, 大出裕高, 畑晶之, 根矢三郎, 横幕能行, 佐藤武幸, 杉浦互, 布施晃 「計算機によるエイズウィルスの薬剤耐性評価」 第 48 回日本薬学会関東支部大会講演要旨集, 20 (2004) 千葉
- 大出裕高, 根矢三郎, 畑晶之, 杉浦互, 星野忠次 「HIV-1 プロテアーゼのアミノ酸変異による阻害剤耐性機構の解明」 第 48 回日本薬学会関東支部大会講演要旨集, 45 (2004) 千葉
- 大出裕高, 畑晶之, 根矢三郎, 杉浦互, 星野忠次 「分子動力学法を用いた HIV-1 Protease 阻害剤耐性機構の解明」 情報計算法学生物学会 2004 年大会予稿集, 75-76 (2004) 東京
- 大出裕高, 太田雅美, 畑晶之, 根矢三郎, 杉浦互, 星野忠次 「HIV-1 protease 阻害剤耐性の分子動力的評価」 日本薬学会第 124 年会要旨集 - 3, 29 (2004) 大阪

G. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)  
実績無し。

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

分担研究報告書

薬剤耐性解析技術の臨床評価

分担研究者 佐藤武幸（千葉大学医学部附属病院感染症管理治療部長、助教授）

研究要旨 抗 HIV 療法をより充実させるために、予め HIV 感染患者の薬剤耐性検査を行うことが重要となってきた。薬剤耐性検査法の一つとして、計算機を用いて、患者ごとに薬剤の効果を評価する方法が提案されている。その際、新規の医療技術として臨床に応用できるものか否かを、十分に確認することが必要である。本研究では、従来のジェノタイプ検査も併せて実施して、計算機による耐性検査が、既存の方法と整合性があるか、現実の医療技術として利用可能であるか、を詳細に調べる。

A. 研究目的

現在、抗 HIV-1 感染症治療薬剤として、逆転写酵素を標的としたものが 9 種類、プロテアーゼを標的としたものが 7 種類、併せて 16 種類が実用化されている。一見、種類が豊富に見える抗 HIV-1 薬剤も、同種類の薬剤間で交差耐性が存在するために、ある薬剤に対して一旦耐性を獲得すると、次に効果の期待できる薬剤の選択肢は大きく制限されてしまう。このことから薬剤耐性変異の有無の判定は適切な治療薬剤選択に必須の検査として位置づけられている。その結果、1995 年の多剤併用療法 (HAART) の導入以降、多くの薬剤耐性遺伝子検査が実施されてきた。

幾度も治療内容を変更し、多数の耐性変異を獲得した症例では、遺伝子検査の結果だけでは薬剤耐性のレベルを判定するのが困難な場合がある。基本的に耐性変異が集積すると耐性レベルは上昇するが、耐性変異間の相互作用により薬剤感受性がむしろ回復するような組み合わせ

も知られている。薬剤耐性変異間の相互作用に関する知識は、薬剤耐性症例に対する適切な治療薬剤を選択する上で重要である。このような情報を得るために遺伝子検査と感受性検査を対比させたデータベースの構築の試みが行われてきた。最近ではさらに薬剤耐性遺伝子検査の結果を感受性検査と対比させるのではなく、薬剤耐性症例にどのような薬剤が投与され、治療の結果がどうであったか、という情報の集積が重要となっている。

本研究班では、HIV 感染患者の抗エイズ薬に対する薬剤耐性を、計算機を利用して評価するための技術開発を行っている。計算機による方法では、原理的にデータベース等の過去の治療情報を必要とせず、複数の耐性変異があっても問題がない。ところがこれは計算による予測精度が十分に高いことが前提にあり、これを保証するために幾つかの症例で現実の系との比較が必要である。また現実の医療に応用するには、十

分に迅速に予測結果を得ることが求められる。これらの点から、本研究では、臨床面から計算機を活用した HIV の薬剤耐性評価の有効性を検討する。

## B. 研究方法

次の手順により、HIV の薬剤耐性評価に関する計算結果と現実系の比較を行う。

- (1) 分担研究者(佐藤)の担当している患者から、倫理審査委員会で審議を経た上で、血液をサンプルとして採取する。同時に CD4 細胞数や HIV-RNA 量などの臨床上の諸量を測定する。
- (2) 採取されたサンプルは、国立感染症研究所エイズ研究センターに送付する。分担研究者(杉浦)は、通常業務の中でこのサンプルのジェノタイプとフェノタイプ検査を行う。
- (3) ジェノタイプ検査の際に、DNA シーケエンサーにより読み取られた酵素の変異情報を、主任研究者(星野)に送る。
- (4) 変異情報から、患者固有の酵素に関して、薬剤-変異酵素結合構造をコンピューター内で構築し、薬剤と酵素との結合親和性から、薬剤抵抗性を評価する。
- (5) 主任研究者からは計算機による薬剤評価が示される。また、変異によって、著しく薬効が減少したものについて、薬剤抵抗性の注意が示される。
- (6) ジェノタイプ検査ならびに計算結果のフィードバックを受け、HIV 感染者への治療の中で、この情報を比較検討し、技術の有意性を判断する。

## C. 研究結果

現在、70名程の HIV-1 感染患者を診断している。また1ヶ月に1,2名程の新規の患者が来院している。そのうち抗 HIV 薬の投与が必要と判断

される患者は、30%程度である。HIV-1 感染症では、CD4 陽性 T 細胞の著しい低下が見られ、これにより免疫不全が引起される。従って、CD4 細胞の量により患者群を分類すると、(1)CD4 が 100 未満または急速に低下中のため、薬剤の変更を検討している患者、(2)CD4 が 300~400 位で不満足ながらも積極的に薬剤変更は考えていない患者、(3)ほぼ治療に反応している患者となる。

薬剤の変更を要する患者あるいは新規に治療を開始しウイルス変異を経時的に追跡できる患者のうち、大学の倫理審査委員会での審議を経て行い、提供者に菌株が実験に利用される旨の説明をして同意を得られた患者について、サンプルの採取を行った。

また、幾つかのサンプルについて、分担研究者(杉浦：国立感染症研究所)に遺伝子変異の解析を依頼して、ジェノタイプの実施を実施した。ジェノタイプ検査をもとに計算機による検査を主任研究者に依頼したが、計算による予測は、まだ完全に信頼性が保証されないとの理由で、提出が見合わされている。今後、計算精度の向上により計算結果を処方への参考にすることも期待されるので、定期的にウイルスを保存し、後日の検討を可能するための準備を行っている。

## D. 考察

ジェノタイプ検査では、ウイルス遺伝子内に誘導された変異を見ることにより、耐性を示す薬剤と感受性を保持した薬剤を判定することが可能となる。薬剤耐性変異は単独で出現することもあれば、複数が組み合わさることもある。変異が複数誘導されれば変異間の相互作用も生じる。この結果が逆に感受性として働くこともありうる。フェノタイプ検査からの結果は、野生株の薬剤感受性と比較対照して、何倍耐性という数値で表現さ

れる。これは実験的に測定する直接的な方法である。現在、病院業務の中では、上記のいずれの検査も、院内で行いことは難しい。国内では、ジェノタイプ検査については、国立感染症研究所エイズ研究センターにサンプルを送ることで、これに対応する仕組みがある。一方で、フェノタイプ検査となると、国外の商業検査会社に依頼する必要があり、費用負担が大きい。従って国内で検査ができる体制として、ジェノタイプと計算機解析の組み合わせには期待している。

本研究の中で検査依頼をしたサンプルは、wildタイプに比べて、十数箇所のアミノ酸変異がある。主任研究者が行っている過去の臨床由来のサンプルでは、99 アミノ酸残基のうち、少ないもので8箇所、多いもので17箇所の変異がある。従って、変異数では、それらの臨床由来の検体と同程度である。変異箇所が少ないウィルス株については、計算予測は精度が高いが、変異箇所が増えるにしたがって、予測は難しくなる。最近、主任研究者より臨床検体についても相関係数 0.8 程度で計算機予測とフェノタイプ検査の整合性が出せるようになったとの報告があり、今後、本研究で取り扱う臨床変異株についても、満足のいく相関が得られるかどうかを評価する必要がある。

#### E. 結論

主任研究者による計算機による薬剤耐性評価が実施された場合に備えて、患者の薬剤投与履歴とウィルス量変化やウィルス変異の経過追跡を行った。また、幾つかのサンプルについて、国立感染症研究所に検査を依頼して、後の評価検討のための作業を進めた。

#### F. 研究発表

##### 学会発表

- ・太田雅美、簾貴士、大出裕高、畑晶之、佐藤武幸、横幕能行、布施晃、杉浦互、星野忠次 「臨床応用に向けたコンピュータによるエイズ治療薬の適正予測」 第 18 回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集, 234 (2004) 静岡
- ・星野忠次, 太田雅美, 簾貴士, 大出裕高, 畑晶之, 根矢三郎, 横幕能行, 佐藤武幸, 杉浦互, 布施晃 「計算機によるエイズウィルスの薬剤耐性評価」 第 48 回日本薬学会関東支部大会講演要旨集, 20 (2004) 千葉

#### G. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

無し。

耐性モニタリング技術としての計算解析法の評価

分担研究者 杉浦 互（国立感染症研究所、エイズ研究センター 第2研究グループ長）

研究要旨 薬剤耐性検査法の一つとして、計算機を用いて患者固有のウィルスへの薬剤の効果を評価する方法が提案されている。プロテアーゼ阻害剤の一つである Nelfinavir については、幾つかの変異体について、既に実験室株を作成し、薬剤耐性を系統的かつ詳細に解析している。そこで計算機による耐性検査の方法論の開発と計算評価結果との整合性確認を行うため、実験的な薬剤耐性評価と計算結果を比較した。併せて、NFV と関係の深い D30N、N88D、D30N/N88D、L90M 変異体の構造学的解析から耐性機序を考察した。

A. 研究目的

今日行われている薬剤耐性ウィルスを検出する方法には、薬剤耐性遺伝子検査 (Genotyping) と薬剤感受性検査 (Phenotyping) という2つの手法がある。遺伝子検査は、治療薬の標的である逆転写酵素あるいはプロテアーゼの遺伝子配列を解析し、耐性を引き起こす遺伝子変異の有無を調べる手法である。一方、感受性検査は HIV の薬剤感受性を試験管内で測定する直接的な方法である。一般に、治療薬剤の使用歴が長ければ長いほど耐性変異は集積してゆく。そして変異が複数誘導されれば変異間の相互作用が生じ、遺伝子検査評価の前提である変異と薬剤の対応関係が乱れる場合がある。このような症例には感受性検査が有効である。但し、感受性検査を遂行するには、高い実験技術と多額の費用が必要であり、通常の検査として実施されにくい面もある。

HIV 感染が激増しているアジア、アフリカ地域では、経済的な理由より今まであまり抗エイズ

薬が普及してこなかった。これらの地域では、サブタイプ B 以外の感染症例が圧倒的に多い。これまで治療薬開発や薬剤耐性の研究は、欧米先進諸国で感染の主流であったサブタイプ B を対象に行われてきた。従って、薬剤耐性ウィルスの知識はサブタイプ B に基づくものであり、これがそのまま非サブタイプ B のウィルスの薬剤耐性に適用できるか否かは明確でない。

計算機による薬剤耐性評価は、検査の費用の問題や非サブタイプ B の薬剤耐性を解析するための支援技術として期待される。但し、これを実用化するためには、計算評価結果の信頼性を確認しておかなければならない。我々のグループでは、これまでプロテアーゼ阻害剤 Nelfinavir に関する変異体の薬剤耐性を系統的に解析している。そこで、このデータを用いて計算機による耐性評価の信頼性の確認を行う。

Nelfinavir (NFV) による治療により、D30N、N88D、L90M 変異体の出現が数多く報告されてい

る。D30N は NFV に対して特異的に発現する primary mutation であり、secondary mutation として高頻度に N88D が起こる。一方、L90M は NFV ばかりでなく、他のプロテアーゼ阻害剤にも耐性を起こす多剤耐性変異である。しかしながら、これらの変異間の相互作用は明確ではない。NFV に対するこれらの変異の相互作用と、これによる耐性機序を解明することも、本研究の重要な目的である。

## B. 研究方法

wild type および各変異体 (D30N, N88D, D30N/N88D, L90M) の HIV-1 PR/NFV 複合体モデルを構築し、分子動力学 (MD) 計算を行った。HIV-1 PR/NFV 複合体 (wild-type, D30N, N88D, D30N/N88D, L90M) モデルを構築する際には、Asp25/Asp25' のプロトン化状態を考慮する必要があるが、エネルギーの最も低い荷電 Asp25/中性 Asp25' のモデルを採用した。

分子間に働く静電ポテンシャルエネルギーを算出するために、予め量子化学計算プログラム (Gaussian98) を用いて、NFV の最安定構造を求めた上で、各原子の電荷を計算した。

MD 計算プログラムは AMBER7 を使い、力場パラメーターには parm99 を使用した。プロテアーゼを結晶構造に設定し、その周囲に水分子を配置して、各原子に運動エネルギーを与える形で温度を上げた。300K まで温度を上げた後に、300K で 1n 秒以上の MD シミュレーションを行い、アミノ酸変異に伴う構造変化と阻害剤との結合の変化を観察した。エネルギー算出には、Lee-Richard 法による溶媒露出面積の計算や Poisson-Boltzmann 法による溶媒効果の算出、MMPB/SA 法による全結合エネルギー計算を実行した。

## C. 研究結果

### (プロテアーゼ構造変化)

Wild タイプのプロテアーゼと比較すると、D30N, N88D, D30N/N88D, L90M 変異体のうち、L90M 変異体で大きな構造変化が見られた。特にフラップ領域とループ領域で顕著であった。90 番目のアミノ酸残基は、フラップ領域からもループ領域からも、また活性ポケットからも離れているが、構造変化には大きな影響を及ぼす。N88D は、59Y-75V の  $\beta$  シート部分に特徴的な変化が表れた。D30N/N88D 変異体でも N88D 変異体と類似の  $\beta$  シートの変化が表れたが、その変化はそれ程大きくはない。

### (水素結合系)

プロテアーゼと阻害剤の結合において、水素結合が構造安定性に重要な役割を持っている。Wild タイプのプロテアーゼと NFV との間の水素結合をリストアップすると、NFV とは活性残基である 25D/25'D、フラップの 50I/50'I、30D、29'D が直接の水素結合を形成し、これとは別に水分子を介しての水素結合も見られる。S2 ポケット部位の 30D に注目すると、この残基は NFV のフェノール基と水素結合を形成している。N88D や L90M 変異体では、水分子を介して、30D とフェノール基が相互作用している。一方で、D30N や D30N/N88D 変異体では、この水素結合は完全に消失している。フラップ領域の中心にある 50I ならびに 50'I は、水分子を介して NFV と水素結合系を保持している。D30N では、この水素結合は保たれる。一方で、N88D や L90M 変異体では、50I あるいは 50'I のいずれかの水分子を介した水素結合が解消してしまい、このことは結合の不安定性につながっている。

### (疎水相互作用)



疎水相互作用の効果をみるために、プロテアーゼと阻害剤が結合したときの表面積の変化を測定した。プロテアーゼと阻害剤の間には幾つかの疎水相互作用部位が存在するが、プロテアーゼの 50I/50`I 部位と 84I/84`I 部位の寄与が大きく、次に 28A/28`A、48G/48`G、81`P が大きい。L90M 変異体は、NFV と 48`G あるいは 81`P との間の疎水相互作用がとれずに、著しく安定性の低下を招く。D30N 変異体は、表面積の変化にはほとんど変化を与えない。N88D 変異体は、逆に疎水相互作用を増加させる。

#### D. 考察

(D30N) NFV の芳香性水酸基(-OH)は、Asp30 の主鎖と水素結合を形成することで安定化する。D30N 変異体は NFV に対して特異的に多く見られるが、アミノ酸側鎖の違いから、クーロン相互作用を低下させるであろうと予想される。本研究におけるシミュレーションにおいてもクーロン相互作用の低下が見られた。しかしながら、その主たる機序は Asn30 に変異したことによる微小な構造変化に起因すると考えられる。また HIV-1PR の揺らぎが増大や、クーロン相互作用の低下から、Asp30 は NFV の安定化に大きく影響しているといえる。

(N88D) N88D 変異体は、しばしば D30N に続く NFV の secondary mutation として発現する。N88/D88 は non-active site に存在するため、その役割は D30N のような active site mutation よりもはっきりしていない。本研究によるシミュレーションにより、25D と 50I/50`I 間が狭まることが見られた。SA の増大や HIV-1 PR の揺らぎの低下が生じていることから、N88D は HIV-1 プロテアーゼや NFV の安定化に関与していると思われる。従って、N88D 単独では、薬剤感受性

になる。

(D30N/N88D) D30N/N88D 変異体は、D30N により結合親和性の低下が引き起こされる。Wild タイプでは 88N は水を介して 74T と水素結合をとっているが、N88D によりこれが解消される。このことは周辺の 29D、31T、74T の動き易さを生む。従って、D30N に引き続き N88D が表れる理由は、基質ペプチドの切断能を増加するためと想像している。

(L90M) L90M は NFV だけでなく他のプロテアーゼ阻害剤でも耐性を引き起こし、さらには 90L や 90M が非活性部位にあるため、N88D と同様にその耐性機序が明らかでなかった。本研究において、50I/50`I での大きな構造変化を引き起こし、クーロン相互作用、vdW 相互作用をともに低下させることを見いだした。50I/50`I の構造変化は、他の PIs への影響も大きいことが予想され、多剤耐性の要因とも考えられる。

#### E. 結論

本研究において、NFV と関係の深い D30N、N88D、L90M 変異体の構造学的解析から耐性機序を考察した。NFV に特異的な D30N 変異では、Asp30 がわずかに外側へと動くことで、水素結合の解離が起こり、クーロン相互作用を低下させた。Secondary mutation である N88D は NFV 結合時に接触する面積の増大を起こす。これは HIV-1 PR の安定化に寄与しているものと考えられる。一方、L90M では、flap 領域での構造を大きく変化させ、NFV と I50/I50' とのクーロンおよびファンデルワールス相互作用に大きな影響を示した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

・Shiomi K, Matsui R, Isozaki M, Chiba H, Sugai

- T, Yamaguchi Y, Masuma R, Tomoda H, Chiba T, Yan H, Kitamura Y, Sugiura W, Omura S, Tanaka H  
Fungal phenalenones inhibit HIV-1 integrase. *Journal of Antibiotics*. 2005, Vol.58, 65-68
- Ode H, Ota M, Neyya S, Hata M, Sugiura W, Hoshino T  
Resistant Mechanism against Nelfinavir of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Proteases. *J. Phys. Chem. B*. 2005, Vol.109, 565-574
  - Zhu D, Taguchi NH, Goto M, Odawara T, Nakamura T, Yamada H, Kotaki H, Sugiura W, Iwamoto A, Kitamura Y  
Influence of single-nucleotide polymorphisms in the multidrug resistance-1 gene on the cellular export of nelfinavir and its clinical implication for highly-active antiretroviral therapy. *Antiviral Therapy* 2004, Vol.9, 929-935
  - Sugiura W, Matsuda M, Chiba T, Kakizawa J, Nishizawa M, Miura H, Hamatake M, Ueda T, Fujino M, Yamamda K, Yamamoto N  
Changes in Prevalence and Patterns of Drug Resistant Mutations in Japan-Summary of Nationwide HIV-1 Drug Resistance Surveillance Study (1996 to 2003) in Japan. *Antiviral Therapy* 2004, Vol.9, S901
  - Yan H, Chiba T, Kitamura Y, Nishizawa M, Fujino M, Yamamoto N, Sugiura W  
Novel Small - Molecule Compounds which inhibit strand transfer activity of HIV-1 integrase. *Antiviral Therapy* 2004, Vol.9, S6
  - Yan H, Miyagi T, Satoh E, Sugiura W, Yamamoto N, Kimura H  
Phenotype and function of GM-CSF independent dendritic cells generated by long-term propagation of rat bone marrow cells. *Cellular Immunology* 2004, Vol. 229, 117-129
  - Saeng A. S, Wichukchinda N, Myint L, Pathipvanich P, Ariyoshi K, Rojanawiwat A, Matsuda M, Sawanpanyalert P, Sugiura W, Auwanit W  
Study of Antiretroviral Drug Resistant HIV-1 Genotypes in Northern Thailand : Role of Mutagenically Separated Polymerase Chain Reaction as a Tool for Monitoring Zidovudine - Resistant HIV-1 in Resource - Limited Settings. *J. Acquired Immune Deficiency Syndromes* 2004, Vol.36, 1051-1056
- ## 2. 学会発表
- Ode, H., Neyya, S., Hata, M., Sugiura, W., Hoshino, T., “Insight into the Resistant Mechanism against HIV-1 Protease Inhibitor through Molecular Dynamics Simulations.”, *Int. Symp. on Molecular Nano-Engineering and Its Development into Microsystems*, Tokyo, Japan, 60-61 (2004) Tokyo.
  - 太田雅美、簾貴士、大出裕高、畑晶之、佐藤武幸、横幕能行、布施晃、杉浦互、星野忠次 「臨床応用に向けたコンピュータによるエイズ治療薬の適正予測」 第18回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集, 234 (2004) 静岡
  - 星野忠次, 太田雅美, 簾貴士, 大出裕高, 畑晶之, 根矢三郎, 横幕能行, 佐藤武幸, 杉浦互, 布施晃 「計算機によるエイズウイルスの薬剤耐性評価」 第48回日本薬学会関東支部大会講演要旨集, 20 (2004) 千葉
  - 大出裕高, 根矢三郎, 畑晶之, 杉浦互, 星野忠次 「HIV-1 プロテアーゼのアミノ酸変異による阻害剤耐性機構の解明」 第48回日本薬学会関東支部大会講演要旨集, 45 (2004) 千葉

- ・大出裕高, 畑晶之, 根矢三郎, 杉浦互, 星野忠次 「分子動力学法を用いた HIV-1 Protease 阻害剤耐性機構の解明」情報計算法学生物学会 2004 年大会予稿集, 75-76 (2004) 東京
- ・大出裕高, 太田雅美, 畑晶之, 根矢三郎, 杉浦互, 星野忠次 「HIV-1protease 阻害剤耐性の分子動力学的評価」日本薬学会第 124 年会要旨集- 3, 29 (2004) 大阪

G. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)  
無し。

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
Ode H, Ota M, Neya S, Hata M, Sugiura W, Hoshino T	Resistant Mechanism against Nelfinavir of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Proteases.	Journal of Physical Chemistry B	Vol.109, No.1	565- 574	2005
Shiomi K, Matsui R, Isozaki M, Chiba H, Sugai T, Yamaguchi Y, Masuma R, Tomoda H, Chiba T, Yan H, Kitamura Y, Sugiura W, Omura S, Tanaka H	Fungal phenalenones inhibit HIV-1 integrase.	Journal of Antibiotics	Vol. 58, No.1	65- 68	2005
Zhu D, Taguchi N H, Goto M, Odawara T, Nakamura T, Yamada H, Kotaki H, Sugiura W, Iwamoto A, Kitamura Y	Influence of single-nucleotide polymorphisms in the multidrug resistance-1 gene on the cellular export of nelfinavir and its clinical implication for highly-active antiretroviral therapy.	Antiviral Therapy	Vol.9	929- 935	2004
Sugiura W, Matsuda M, Chiba T, Kakizawa J, Nishizawa M, Miura H, Hamatake M, Ueda T, Fujino M, Yamamda K, Yamamoto N	Changes in Prevalence and Patterns of Drug Resistant Mutations in Japan-Summary of Nationwide HIV-1 Drug Resistance Surveillance Study (1996 to 2003) in Japan.	Antiviral Therapy	Vol. 9	S109	2004
Yan H, Chiba T, Kitamura Y, Nishizawa M, Fujino M, Yamamoto N, Sugiura W	Novel Small - Molecule Compounds which inhibit strand transfer activity of HIV-1 integrase.	Antiviral Therapy	Vol. 9	S6	2004
Yan H, Miyagi T, Sato E, Sugiura W,	Phenotype and function of GM-CSF independent dendritic cells generated by	Cellular Immunology	Vol.229, No.2	117- 129	2004