

NFV/d4T/3TC を中心に施行した。

免疫細胞療法としては、CD3-LAK 療法、腫瘍 lysate DC CTL 療法、peptide DC CTL 療法が投与された。

ELISOPT 解析では、LAK 療法、腫瘍 lysate DC CTL 療法中には認められなかった CTL 細胞数の上昇が、peptide DC CTL 療法時に認められた (【図2】参照)。

● 症例 2

33 歳男性。2000 年 帯状疱疹を契機に HIV 陽性が判明。HIV 療法は不完全であった。2003 年 12 月に悪性リンパ腫を合併。CD4 127/mm³、血漿 HIV-RNA 量 9.9×10^4 copies/ml、血漿 EBVDNA 量 $3 \times$

10^2 copies/ml であった。胃の生検より悪性リンパ腫 (anaplastic large cell lymphoma) と診断され stage IVB であった。

病理上は Diffuse Large B-cell Lymphoma で CD20(+), EBER(-), LMP-1(-) であった。症例 2 においては EBV の関与は血漿 EBVDNA 量の上昇のみであった。

化学療法としては EPOCH 療法+抗 CD20 抗体であった (最終治療は 04 年 7 月)。HIV 療法としては NFV/d4T/3TC を中心に施行した。腫瘍は消失し、06 年 3 月現在で完全寛解 (約 1 年半) に至っている (【図3】参照)。

免疫細胞療法としては、CD3-LAK 療法、DC(1) peptide CTL 療法、DC(2) peptide CTL 療法が施行さ

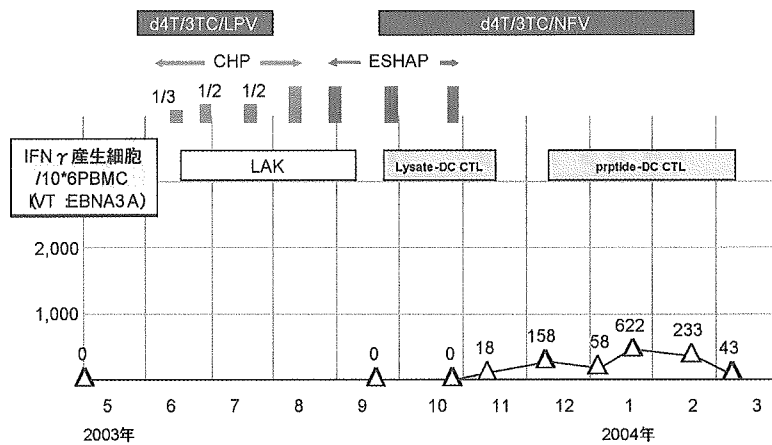


図 2. 症例 1 の免疫細胞療法と ELISPOT 解析

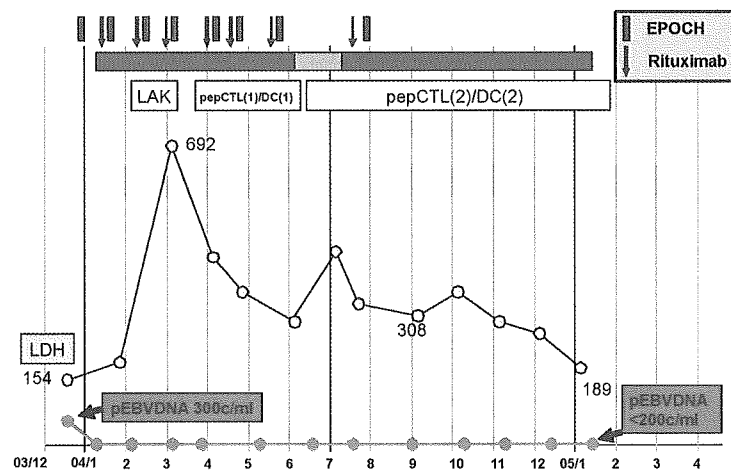


図 3. 症例 2 の臨床経過

れた。特に DC(2) peptide CTL 療法が施行された 04 年 6 月より ELISPOT 解析にて非常に強い CTL の誘導が認められている (【図 4】 参照)。

症例 2 の寛解状態は持続し、CD4 数も $300/\text{mm}^3$ 以上が持続されたことより、05 年 4 月より免疫細胞療法の中断を試みた。この結果一旦低下したようにも思える CTL 細胞数は、それ以後も維持されていた。可能性として、①免疫細胞療法による成立した CTL が維持されている可能性、②免疫細胞療法により成立した CTL は低下したが、症例自身の免疫能が抗 HIV 療法にて回復し、置き換わった可能性、が考えられた (【図 5】 参照)。それに関する傍証として、症例 2 と非悪性リンパ腫 HIV 患者 (対照群) での ELISPOT 解析を比較した。症例 2 では複数回の測定での IFN- γ 産生細胞数は 2160 個/ 10^6 個であったのに対して、対照群では 130 個/ 10^6 個であった (【図 6】 参照)。個人差が大きい結果であり、即断

はできないが、①の可能性を示唆する結果であった。

E. 結論

第 2 症例にては当センターで始めて内科的治療のみで AIDS 悪性リンパ腫の CR (完全寛解) に至ることが可能となった。腫瘍量は多く臨床病期は進行していたが、有効な化学療法+抗 CD20 抗体療法+抗 HIV 療法+免疫細胞療法により救命可能であったと考えられる。

今回の症例では、EBV が悪性腫瘍成立にどれだけ関与しているかは不明であるが、免疫細胞療法に関しての方向性は示されたと考えられる。また AIDS 期にある症例においても免疫細胞療法の可能性が示唆された。

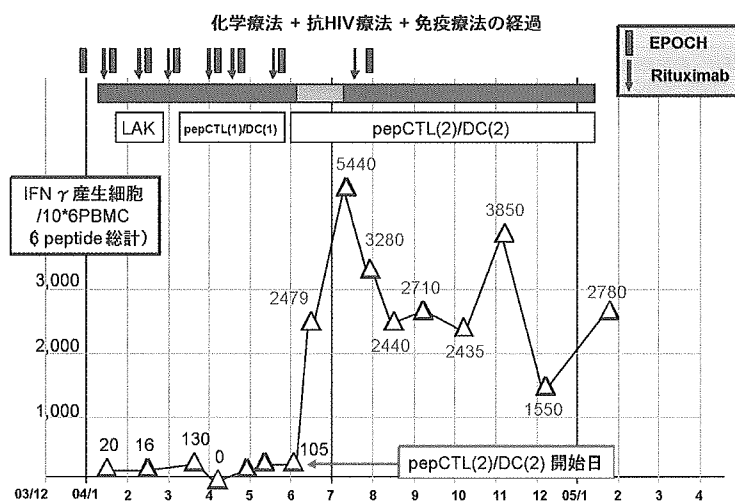


図 4. 症例 2 の免疫細胞療法と ELISPOT 解析

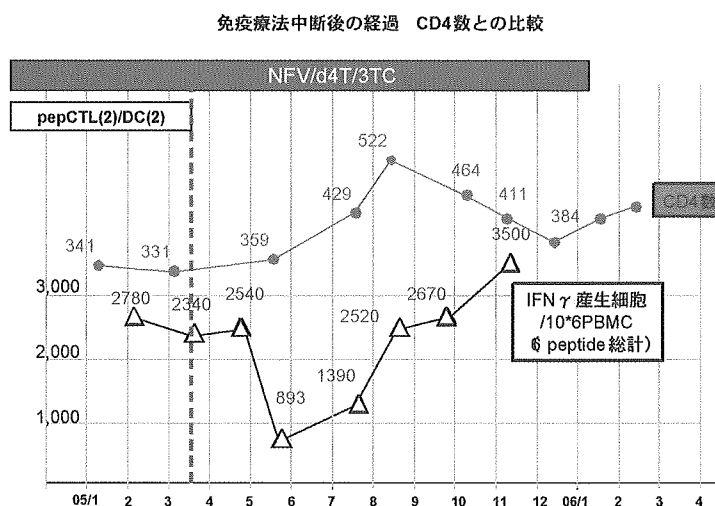


図 5. 免疫療法中断後の経過・ELISPOT 解析

EBV由来6 peptide に対するELISPOT 解析 (末梢血PBMC 1×10^6 個)

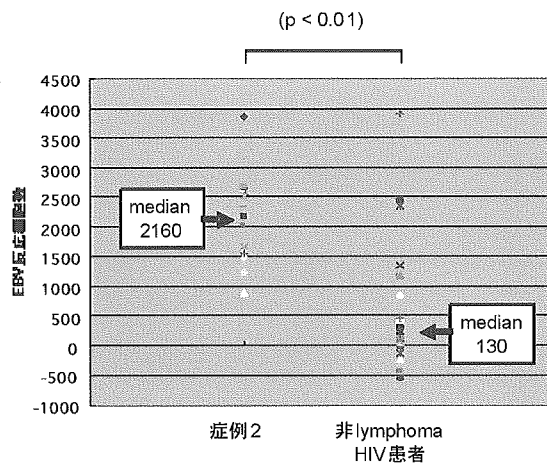


図 6. 症例 2 の非悪性リンパ腫症例での ELISPOT 解析の比較

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

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



3 免疫療法による各種ウイルスに対する細胞性免疫応答の解析

分担研究者：滝口 雅文（熊本大学エイズ学研究センター ウイルス制御分野 教授）

研究協力者：岡 慎一

（国立国際医療センター エイズ治療・研究開発センター 部長）

研究要旨

AIDS に合併する EB ウイルス (EBV) リンパ腫と HIV-1 に対する免疫療法の可能性を検討した。AIDS に合併した EBV リンパ腫患者の一卵性双生児 (HIV-1 非感染者) から誘導した EBV 特異的 CD8T 細胞を、AIDS に合併した EBV リンパ腫患者への移入をおこなうと共に、DC を用いた特異的 CTL の誘導を 2 組の一卵性双生児間でおこなった。EBV 特異的 CD8T 細胞を、テトラマーを用いて患者末梢血で検出した結果、それぞれ 2 つの EBV エピトープに対して特異的 CD8T 細胞が検出できた。特に治療予後が良かった 2 例目の患者では長期間、EBV 特異的 CD8T 細胞を確認できた。一方、エイズ発症遅延との相関が知られている HLA-B*5101 が提示する 4 つの HIV-1 エピトープ特異的 CTL の HIV-1 感染 CD4T 細胞に対する細胞傷害活性と HIV-1 増殖抑制能を測定したところ、2 つの Pol 特異的 CTL は非常に強い活性を示した。7 名の HLA-B*5101 陽性の無治療血友病 HIV-1 感染者において、テトラマーを用いてこれらの 4 つの HIV-1 特異的 CD8T 細胞が検出したところ、ウイルス量が少ない 4 名の患者のみに両方の Pol 特異的 CD8T 細胞が高頻度に見られた。これらの結果から、これら 2 つの Pol 特異的 CTL が、患者体内で HIV-1 の増殖抑制に関与していると考えられた。

A. 研究目的

HIV-1 感染者では、免疫不全が進行するにしたがって EB ウイルス (EBV) によるリンパ腫が発症する患者が日本ではよく見られ、患者の予後に重大な影響を及ぼす。そこで、EBV 特異的 CD8T 細胞の用いた免疫療法をおこない、患者体内での EBV 特異的 CD8T 細胞の誘導を解析し、その効果を検討する。さらに新たな HIV-1 に対する免疫療法の基盤を確立するために、エイズ発症遅延との相関が知られている HLA-B*5101 が提示する HIV-1 エピトープ特異的 CTL の HIV-1 増殖抑制能と細胞傷害活性を調べ、強い HIV-1 増殖抑制能と細胞傷害活性を示す CTL が存在するかを明らかにする。またそのような CTL が存在する場合は、患者の体内で HIV-1 の増殖抑制に関与しているかを明らかにする。

増殖抑制に関与しているかを明らかにする。

B. 研究方法

1. EBV 特異的 CD8T 細胞の解析

EBV 特異的 CD8T 細胞を解析するために、EBV 特異的 CD8T 細胞を検出する HLA クラス I テトラマー (2 種類の EBV エピト-プペプチドを結合した HLA-A*1101 テトラマー、および 2 種類の EBV エピト-プペプチドを結合させた HLA-A*2402 テトラマー) を作製した。これを用いて、リンパ腫を発症した患者末梢血中の EBV 特異的 CD8T 細胞を検出した。

2. HIV-1 特異的 CTL の HIV-1 感染 CD4T 細胞に対する細胞傷害性活性および HIV-1 増殖抑制能

4つの HIV-1 エピトープを認識する HLA-B*5101 拘束性 CTL クローンおよび、2つ HIV-1 エピトープを認識する HLA-A*3303 拘束性 CTL クローンをを用いて、これらの CTL クローンの HIV-1 感染 CD4T 細胞に対する細胞傷害性活性および HIV-1 増殖抑制能を解析した。

3. 4つの HLA-B*5101 拘束性 HIV-1 特異的 CD8T 細胞の無治療血友病患者での検出

HLA-B*5101 が提示する 4つの HIV-1 エピトープに特異的な CTL の誘導を、20年間以上無治療で経過した血友病患者で明らかにするために、これらのエピトープを結合させた HLA-B*5101 テトラマーを用いて、HLA-B*5101 を持った血友病患者での特異的 CD8T 細胞の検出を試みた。

(倫理面への配慮)

患者及びその兄弟の血液の使用については、インフォームドコンセントをおこない書面にて承諾を得た。さらに、国立国際医療センターの倫理委員会での承認を得た。これらの患者の HLA のタイピングは、熊本大学の倫理委員会での承認を得た。

C. 研究結果

1. 悪性リンパ腫が発症した HIV-1 患者に対する免疫誘導療法における EBV 特異的 CD8T 細胞の解析

EBV 特異的 T細胞レセプター (TCR) を認識できるテトラマーを用いて、2人の EBV 特異的 CD8T 細胞を誘導する免疫療法 (HIV-1 非感染の一卵性双

生児の兄弟の末梢血からペプチドで刺激して誘導した EBV 特異的 CD8T 細胞の移入およびペプチドをパルスした樹上細胞の投与) を受けた患者の末梢血中を解析し、特異的 CD8T 細胞が検出できるかを調べた。その結果、HLA-A*1101 をもった患者 (KI-179) では、特異的 CTL 移入両方を開始する以前には、ほとんど末梢血には特異的な CD8T 細胞の検出はされなかったが、治療開始後、高頻度に2つのエピトープ特異的 CD8T 細胞が検出された (図1)。

また同様に HLA-A*2402 をもった患者 (KI-185) でも、特異的 CTL 移入両方を開始する以前には、ほとんど末梢血には特異的な CD8T 細胞の検出はされなかったが、治療開始後、2つのエピトープ特異的 CD8T 細胞の誘導が確認された。現時点まで2年以上 EBV 特異的 CD8T 細胞の誘導が維持された (図2)。

2. HIV-1 特異的 HLA-B*5101 拘束性 CTL による HIV-1 感染 CD4T 細胞に対する細胞傷害活性と HIV-1 増殖抑制能

4つの HIV-1 特異的 HLA-B*5101 拘束性 CTLのうち、2つの Pol エピトープ特異的 CTL は、Nef による HLA class I の downregulation の影響を受けないほどの強い HIV-1 増殖抑制能 (図3) と強い HIV-1 感染 CD4T 細胞に対する細胞傷害活性 (図4) を示した。一方、Gag および Rev 特異的 HLA-B*5101 拘束性 CTL および2つの HLA-A*3303 拘束性 CTL は、Nef による HLA class I の downregulation の影響を受けて、HIV-1 感染 CD4T 細胞に対する細胞傷害性活性はみられず、HIV-1 増殖抑制能の大幅な低下が見られた。

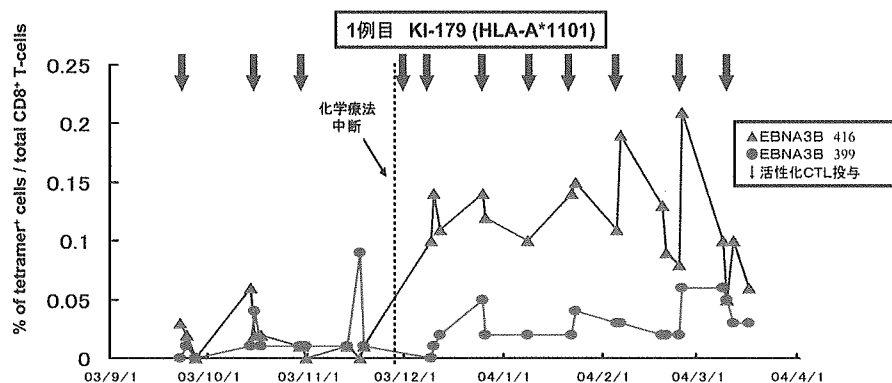


図 1

KI-185におけるEBV特異的CD8⁺T細胞の変動

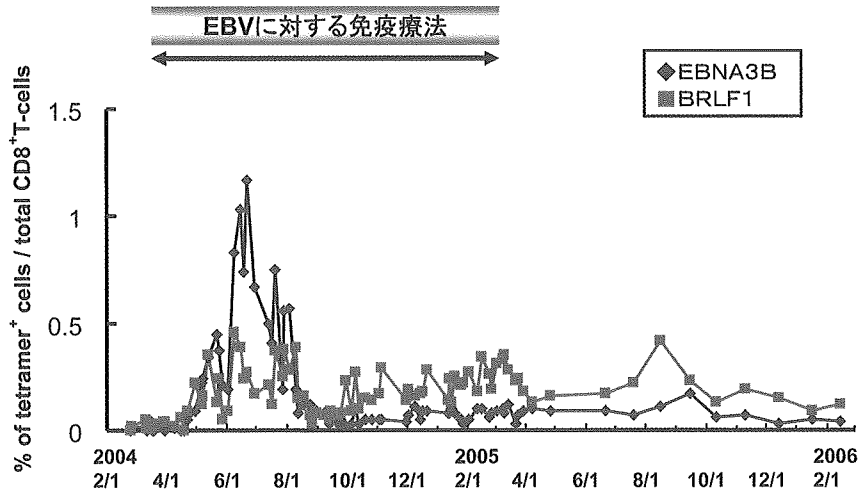


図 2

HIV-1 特異的CTLによるHIV-1増殖抑制能

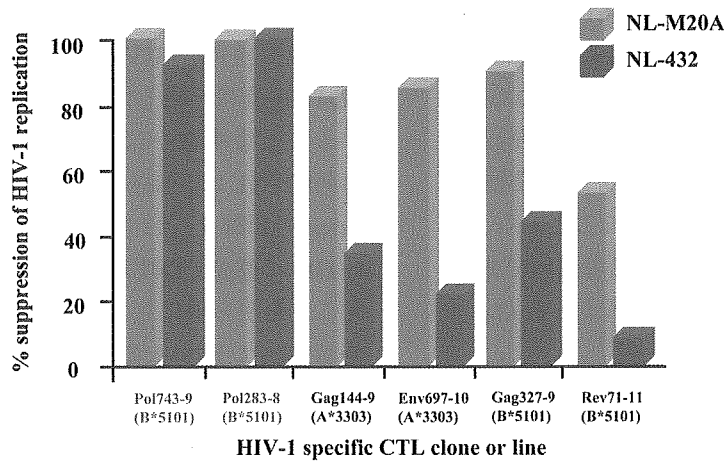


図 3

HIV-1感染CD4T細胞に対するHIV-1特異的CTLの細胞傷害活性

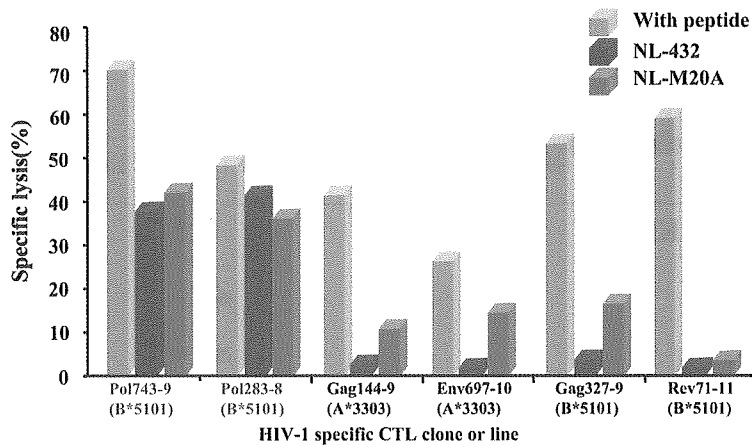


図 4

3. 4つのHLA-B*5101拘束性HIV-1特異的CD8T細胞の無治療血友病患者での解析

まず、4つのHLA-B*5101拘束性CTLエピトープ (Pol 743, Pol 283, Gag 327, Rev71) 特異的B*5101テトラマーを作製し、特異的CTLクローンを用いて特異性を調べた。次に、*In vitro*で強いHIV-1増殖抑制を示した2つのPol特異的CTLと、弱いHIV-1増殖抑制を示したRev及びGagに対するCTLが無治療血友病患者でどの程度誘導されているか調べるために、このテトラマーを用いて、患者末梢血でのそれぞれに特異的なCD8T細胞の検出をおこなった。その結果、3人のLTNPでは、2つのPolに対する特異的CD8T細胞が検出できた。特に2人のLTNPでは、ほとんどウイルスがされないにもかかわらず、2つのPolに対する特異的CD8T細胞が調べたどの時点でも検出できた(図5)。しかし、4人の発症遅延者では、ウイルス量が最も低い一人は、Pol283とPol743に対して特異的CD8T細胞が検出できたが、他の3人はPol743に対しては検出がまったくできなかった。またGag327特異的CD8T細胞に対しては、約半数に検出できたが、臨床経過とは相関が見られず、またRev特異的CD8T細胞は、ほとんどの検出できなかった。以上のことから、この2つのPol特異的CD8T細胞が、患者体内でHIV-1の増殖抑制に強く関与していると考えられた。

D. 考察

2人の悪性リンパ腫患者に、HIV-1非感染の一卵性双生児の兄弟の末梢血からペプチドで刺激して誘導したEBV特異的CD8T細胞の移入およびペプチドをパルスした樹状細胞の投与をした結果、それぞれ2つのEBVエピトープに対して特異的CD8T細胞の増加が認められたことを明らかにした。特に2例目の患者は治療開始後約2年にわたり末梢血中に特異的CD8T細胞検出できた。この患者ではDCによって特異的なT細胞が誘導できたことに加え、ARTによりHIV-1の増殖抑制が制御され免疫能が回復したため、EBV特異的CTLが維持され、また良好な臨床経過を得たと考えられた。今後DCを用いたHIV-1特異的CTLの誘導をめざす治療法の確立のためにも、非常に多くの情報が得られた。

我々も含めた今までの研究成果から、HIV-1特異的CTLは、HIV-1感染CD4T細胞に対して細胞傷害活性を示さないことが明らかになっている。また我々は以前に、HIV-1特異的CTLは、HIV-1感染CD4T細胞に感染したHIV-1の増殖を部分的に抑制することを明らかにした。今回我々は、2つのPol特異的CTLは、NefによるHLA class Iのdownregulationの影響を受けず、強いHIV-1増殖抑制能と強いHIV-1感染CD4T細胞に対する細胞傷害活性を示すことを明らかにした。これらのCTLは、HIV-1感染者体内でHIV-1の増殖抑制に関与していることが、強く示唆された。

2人のLTNPでのHIV-1特異的CD8T細胞数の変移

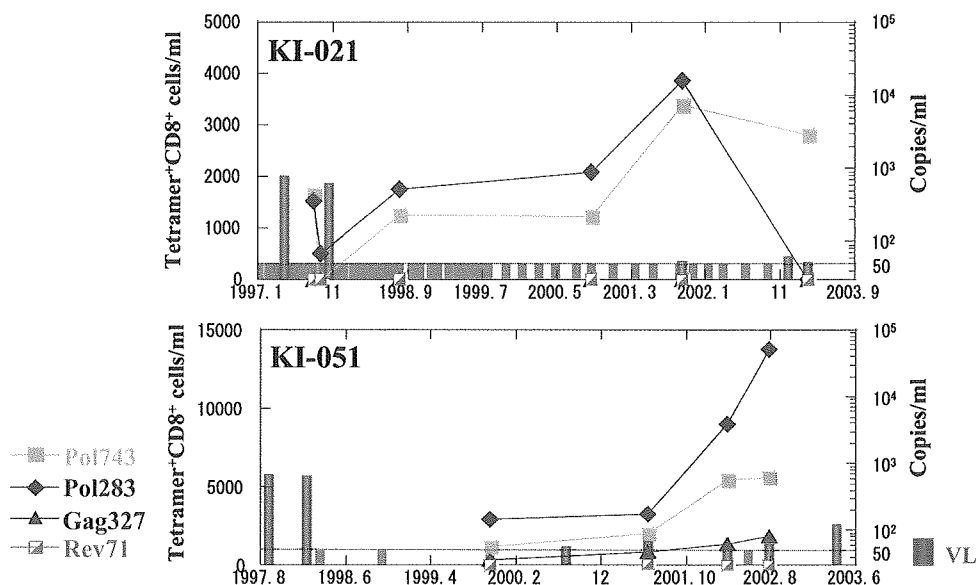


図 5

今年度は、7名の HLA-B*5101 を持った血友病患者の解析をおこなった。これらの患者はすべて無治療であり、そのうち3名は、LTNPであった。この3名の LTNP とウイルス量が最も少なかった1名は、2つの Pol 特異的 CD8T 細胞が検出できたことから、これらの2種類の CD8T 細胞により、HIV-1 の増殖が抑制されていると考えられた。HLA-B*5101 はエイズ発症遅延に関与した HLA 抗原として知られている。今回の結果から、HLA-B*5101 を持った患者では、HIV-1 の増殖を強力に抑制する CTL 誘導されやすく、その結果エイズ発症遅延に及ぶと考えられた。

今後、このような体内で HIV-1 の増殖を抑制する CTL の誘導する治療法の開発が期待できる。

E. 結論

1. 2人の悪性リンパ腫患者に、HIV-1 非感染の一卵性双生児の兄弟の末梢血からペプチドで刺激して誘導した EBV 特異的 CD8T 細胞の移入およびペプチドをパルスした樹上細胞の投与をした臨床試験で、2例目の患者では2年以上にわたり2つの EBV エピトープに対して特異的 CD8T 細胞の増加と維持が認められた。これらの免疫療法による抗 EBV 細胞性免疫の誘導は可能性が示唆された。
2. 4つの HIV-1 特異的 HLA-B*5101 拘束性 CTL のうち、2つの Pol エピトープ特異的 CTL は、Nef による HLA class I の downregulation の影響を受けないほどの強い HIV-1 増殖抑制能と強い HIV-1 感染 CD4T 細胞に対する細胞傷害活性を示し、これらの CTL による体内での HIV-1 増殖の抑制が示唆された。
3. HLA-B*5101 を持った7人の無治療血友病患者中、3名の LTNP とウイルス量が最も少ない患者で、HIV-1 増殖抑制能が非常に強い2つの Pol 特異的 CD8T 細胞が検出できた。これらの2つの CTL が両方存在することで、体内で HIV-1 の増殖が抑えられると考えられた。このような CTL を誘導する新たな治療法の開発が考えられた。

F. 研究発表

論文発表

1. Hossain MS., Tomiyama H., Inagawa T., Ida S., Oka S., and Takiguchi M. Identification and characterization of HLA-A*3303-restricted, HIV-1 Pol- and Gag-derived cytotoxic T cell epitopes. *AIDS Res. Huma. Retroviruses.* 19:503-510, 2003.
2. Ueno T., Tomiyama H., Fujiwara M., Oka S., and Takiguchi M. HLA class I-restricted recognition of an HIV-derived epitope peptide by a human T cell receptor α chain having a V δ 1 variable segment. *Eur. J. Immunol.* 33:2910-2916, 2003.
3. Yokomaku Y., Miura H., Tomiyama H., Kawana-Tachikawa A., Takiguchi M., Kojima A., Nagai Y., Iwamoto A., Matsuda Z., and Ariyoshi K. Impaired Processing and Presentation of Cytotoxic T-Lymphocyte (CTL) Epitope is a Major Escape Mechanism from CTL Immune Pressure in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *J. Virol.* 78: 1324-1332, 2004.
4. Tomiyama, H., Takata, H., Matsuda, T., and Takiguchi, M. Phenotypic classification of human CD8+ T cells reflecting their function: An inverse correlation between quantitative expression of CD27 and cytotoxic effector function. *Eur. J. Immunol.* 34: 999-1010, 2004.
5. Takata, H., Tomiyama, H., Fujiwara, M., Kobayashi, N., and Takiguchi, M. Cutting Edge: Expression of Chemokine Receptor CXCR1 on Human Effector CD8+ T Cells. *J. Immunol.* 173: 2231-2235, 2004.
6. Ueno, T., Tomiyama, H., Fujiwara, M., Oka, S., and Takiguchi, M. Functionally impaired HIV-specific CD8 T cells show high-affinity T cell receptor-ligand interactions. *J. Immunol.* 173: 5451-5457, 2004.
7. Ueno, T., Fujiwara, M., Tomiyama, H., Onodera, M., and Takiguchi, M. Reconstitution of anti-HIV effector functions of primary human CD8 T lymphocytes by transfer of HIV-specific $\alpha\beta$ TCR genes. *Eur. J. Immunol.*, 34(12): 3379-3388, 2004.
8. Kobayashi, N., Takata, H., Yokota S., and Takiguchi, M. Down-regulation of CXCR4 expression on human CD8+ T cells during peripheral differentiation, *Eur. J. Immunol.*, 34(12): 3370-3378, 2004.
9. Tomiyama, H., Fujiwara, M., Oka, S., and Takiguchi, M. Cutting Edge: Epitope-dependent effect of Nef-mediated HLA class I down-regulation on ability of HIV-1-specific CTLs to suppress HIV-1 replication, *J. Immunol.*, 174: 36-40, 2005.

10. Satoh, M., Takamiya, Y., Oka, S., Tokunaga, K. and Takiguchi, M.: Identification and characterization of HIV-1-specific CD8+ T cell epitopes presented by HLA-A*2601. *Vaccine*. 23: 3783-3790, 2005.
11. Fujiwara, M., Takata, H., Oka, S., Tomiyama, H. and Takiguchi, M.: Patterns of cytokine production in HIV-1-specific human CD8+ T cells after stimulation with HIV-1-infected CD4+ T cells. *J. Virol.* 79: 12536-12543, 2005.
12. Borghan, MA., Oka, S. and Takiguchi, M.: Identification of HLA-A*3101-restricted cytotoxic T lymphocyte response to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in patients with chronic HIV-1 infection. *Tissue Antigens*. 66:305-313. 2005.
13. Kawashima, Y., Satoh, M., Oka, S. and Takiguchi, M.: Identification and characterization of HIV-1 epitopes presented by HLA-A*2603: Comparison between HIV-1 epitopes presented by A*2601 and A*2603. *Human Immunol.* In press.
6. Takiguchi M. HIV-1 escape from HIV-1-specific CD8 T cells in individuals with HIV-1 infection. International symposium "Infection and Immunity" in annual meeting of Japanese Society of Immunology(Fukuoka, Japan) December 8-10, 2003.
7. 上野貴将、富山宏子、岡 慎一、滝口雅文 (2003) HIV 感染細胞に不応答性を示す HIV エピトープ特異的 CD8 T 細胞の *ex vivo* 解析。第 51 回日本ウイルス学会 (京都) 平成 15 年 10 月 27 日 ~ 29 日
8. 佐藤愛美、高宮裕児、岡 慎一、滝口雅文 (2003) HLA-A*2601 に提示される HIV-1 CD8 T 細胞のエピトープ同定。第 17 回日本エイズ学会 (神戸) 平成 15 年 11 月 27 日 ~ 29 日
9. 藤原 守、富山宏子、滝口雅文 (2003) 同じ特異性を持つ HIV-1 特異的 CTL クローンのサイトカイン産生プロフィール。第 33 回日本免疫学会 (福岡) 平成 15 年 12 月 8 ~ 10 日
10. 高田比呂志、富山宏子、滝口雅文 (2003) CXCR1/IL8 の獲得免疫での役割: effector CD8+ T 細胞上での CXCR1 の発現。第 33 回日本免疫学会 (福岡) 平成 15 年 12 月 8-10 日

学会発表

1. Ueno T., Tomiyama H., Fujiwara M., and Takiguchi M. HIV-specific cytotoxic T lymphocyte clone unable to kill HIV-infected cells shows increased binding capacity to peptide-HLA complex. The Second International AIDS Society Conference on HIV Pathogenesis and Treatment (Paris, France) July 13-16, 2003.
2. Takiguchi M. HIV-1 escape from HIV-1-specific CD8 T cells in individuals with HIV-1 infection. 7th Asia-Oceania Hitocompatibility Workshop and Conference (Karuzawa, Japan) September 16-19, 2003.
3. Fujiwara M., Tomiyama M., and Takiguchi M. Effect of Nef-mediated HLA class I down-regulation on ability of HIV-1-specific CD8+ T cells to suppress HIV-1 replication. 7th Asia-Oceania Hitocompatibility Workshop and Conference (Karuzawa, Japan) September 16-19, 2003.
4. Satoh M., Takamiya Y., Oka S., Tokunaga K., and Takiguchi M. Identification of HIV-1 CD8 T cell epitopes presented by HLA-A*2601. 7th Asia-Oceania Hitocompatibility Workshop and Conference (Karuzawa, Japan) September 16-19, 2003.
5. Takata H., Tomiyama H., and Takiguchi M. Characterization of HCMV-specific CD8 T cells using HLA-A*02 tetramers. 7th Asia-Oceania Hitocompatibility Workshop and Conference (Karuzawa, Japan) September 16-19, 2003.
11. 佐藤愛美、高宮裕児、岡 慎一、滝口雅文 (2003) Reverse immunogenetics を用いた HLA-A*2601 に提示される HIV-1 CD8 T 細胞のエピトープ同定。第 33 回日本免疫学会 (福岡) 平成 15 年 12 月 8-10 日
12. 富山宏子、藤原 守、滝口雅文 (2003) HIV-1 感染細胞に対する HIV-1 特異的 CD8 T 細胞の認識。第 33 回日本免疫学会 (福岡) 平成 15 年 12 月 8-10 日
13. 上野貴将、富山宏子、滝口雅文 (2003) TCR の抗原結合親和性と T 細胞活性化の再検討。第 33 回日本免疫学会 (福岡) 平成 15 年 12 月 8-10 日
14. Ueno, T., Tomiyama, H. and Takiguchi M. Impaired responsiveness of HIV-specific CD8 T cells to HIV-infected cells is caused by high-affinity TCR-ligand interactions: An insight into immune evasion by HIV. *Keystone Symposia 2004 (Keystone, Canada)* April 12-18, 2004.
15. Takata H., Tomiyama H., Fujiwara M., Kobayashi N. and Takiguchi M. The Role of CXCR1/IL-8 in Acquired Immunity: CXCR1 Expression on Effector CD8+ T Cells. 12th International Congress of Immunology(Montreal, CANADA) July 17-23, 2004.
16. Fujiwara M., Tomiyama H., Oka S. and Takiguchi M. HLA-B*5101-restricted, HIV-1-specific cytotoxic T cells effectively suppress HIV-1 replication and control HIV-1 in long-term non-progressors and slow progressors, *AIDS Vaccine 2004 International Conference (Lausanne, Switzerland)* August 30-September 1, 2004.

17. Takata H., Tomiyama H., Fujiwara M., Oka S. and Takiguchi M. Impaired responsiveness of HIV-specific CD8 T lymphocytes caused by high-affinity T cell receptor-ligand interactions. 12th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (Boston MA, USA) Feb. 22-25, 2005.
18. 上野貴将、井手上結香、富山宏子、岡 慎一、滝口雅文 (2004) HIV の変異と T 細胞レパートリーのダイナミクス。第 52 回日本ウイルス学会学術集会 (横浜) 2004 年 11 月 21 日～23 日
19. 藤原 守、富山宏子、岡 慎一、滝口雅文 (2004) HLA-B*5101 拘束性 HIV-1 特異的 CTL の HIV-1 増殖抑制能と病態進行への関与に関する解析 第 52 回日本ウイルス学会学術集会 (横浜) 2004 年 11 月 21 日～23 日
20. 近藤孝昭、滝口雅文 (2004) EBV 特異的 memory CD8+T 細胞の機能的解析。第 52 回日本ウイルス学会学術集会 (横浜) 2004 年 12 月 1 日～12 月 3 日
21. 滝口雅文、藤原 守、富山宏子、岡 慎一 (2004) HLA-B*5101 拘束性 HIV-1 特異的 CTL の HIV-1 増殖抑制能と AIDS 進行への関与。第 34 回日本免疫学会総会・学術集会 (札幌) 2004 年 12 月 1 日～12 月 3 日
22. 上野貴将、井手上結香、富山宏子、岡 慎一、滝口雅文 (2004) 抗原変異が T 細胞レパートリーに与える影響。第 34 回日本免疫学会総会・学術集会 (札幌) 2004 年 12 月 1 日～12 月 3 日
23. 高田比呂志、富山宏子、藤原 守、小林直樹、滝口雅文 (2004) エフェクター CD8+ T 細胞に発現する CXCR1 の機能解析。第 34 回日本免疫学会総会・学術集会 (札幌) 2004 年 12 月 1 日～12 月 3 日
24. 近藤孝昭、滝口雅文 (2004) EBV 特異的 memory CD8+T 細胞の機能的解析。第 34 回日本免疫学会総会・学術集会 (札幌) 2004 年 12 月 1 日～12 月 3 日
25. Takiguchi M., Tomiyama H., Fujiwara M., Oka S. (2004) Epitope-dependent effect of Nef-mediated HLA class I down-regulation on ability of HIV-1-specific CTLs to suppress HIV-1 replication. 第 18 回日本エイズ学会学術集会 (静岡) 2004 年 12 月 9 日～11 日
26. 佐藤愛美、岡 慎一、滝口雅文 (2004) HLA-A * 2601 拘束性・HIV-1 特異的 CTL による変異エピトープの認識 第 18 回日本エイズ学会学術集会 (静岡) 2004 年 12 月 9 日～11 日
27. 川島夕佳、佐藤愛美、岡 慎一、滝口雅文 (2004) HLA-A * 2603 に提示される HIV-1 T 細胞エピトープ同定 第 18 回日本エイズ学会学術集会 (静岡) 2004 年 12 月 9 日～11 日
28. 小泉寛和、富山宏子、藤原 守、上野貴将、岡 慎一、滝口雅文 (2004) 長期未治療患者における Nef 特異的 HLA-A * 1101 拘束性 CD 8+T 細胞の解析 第 18 回日本エイズ学会学術集会 (静岡) 2004 年 12 月 9 日～11 日
29. 上野貴将、藤原守、井手上結香、富山宏子、滝口雅文 (2004) T 細胞レセプター導入による新たな免疫療法の検討。第 18 回日本エイズ学会学術集会 (静岡) 2004 年 12 月 9 日～11 日
30. Ueno, T., Tomiyama, H., Fujiwara, M., Oka, S. and Takiguchi, M.: Impaired responsiveness of HIV-specific CD8 T lymphocytes caused by high-affinity T cell receptor-ligand interactions. 12th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (Boston MA, USA), Feb. 22-25, 2005.
31. Fujiwara, M., Takiguchi, M.: Different cytokine production patterns in CD8+ T cells specific for the same and different HIV-1 epitopes. Keystone symposia HIV Pathogenesis (Keystone, Canada) April 9-15, 2005.
32. Kawashima, Y., Satoh, M., Oka, S. and Takiguchi, M.: Identification of HIV-1-specific CTL epitopes presented by HLA-A*2603. Seventh International Congress on AIDS in Asia and the Pacific (Kobe, Japan) July 1-5, 2005.
33. Koizumi, H., Fujiwara, M., Ueno, T., Oka, S. and Takiguchi, M.: Escape of HIV-1 from A*1101-restricted Nef-84-specific CTL. Seventh International Congress on AIDS in Asia and the Pacific (Kobe, Japan) July 1-5, 2005.
34. Takata, H. and Takiguchi, M.: Expression pattern of effector molecules in human CD8+ T cells during peripheral differentiation, Gordon Research Conference on Immunochemistry and Immunobiology (Oxford, UK) August 7-12, 2005.
35. Takiguchi, M.: Effective suppression of HIV-1 replication by HIV-1-specific CTLs in long-term non-progressors and slow progressors, International Symposium -The Cooperative Research Project on Clinical and Epidemiological Studies of Emerging and Re-emerging Infectious Diseases (Kumamoto, Japan) September 16, 2005.
36. Takata, H. and Takiguchi, M.: Expression pattern of effector molecules in human CD8+ T cells during peripheral differentiation, International Symposium -The Cooperative Research Project on Clinical and Epidemiological Studies of Emerging and Re-emerging Infectious Diseases (Kumamoto, Japan) September 16, 2005.

37. Koizumi, H., Fujiwara, M., Ueno, T., Ariumi, Y., Oka, S. and Takiguchi, M.: Effect of two HLA-A*1101-restricted Nef-specific CTLs on HIV-1 evolution, International Symposium -The Cooperative Research Project on Clinical and Epidemiological Studies of Emerging and Re-emerging Infectious Diseases (Kumamoto, Japan) September 16, 2005.
38. Kawashima, Y., Fujiwara, M., Satoh, M., Oka, S. and Takiguchi, M.: Analysis of two immunodominant Pol epitopes presented by HLA-A*51 associated with slow progression to AIDS: speculation of mechanisms for suppression of viral replication in HLA-B*5101-positive LTNP, International Symposium - The Cooperative Research Project on Clinical and Epidemiological Studies of Emerging and Re-emerging Infectious Diseases (Kumamoto, Japan) September 16, 2005.
39. Borghan, MA., Oka, S. and Takiguchi, M.: Identification of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific HLA-A*3101-restricted cytotoxic T lymphocyte epitopes, International Symposium -The Cooperative Research Project on Clinical and Epidemiological Studies of Emerging and Re-emerging Infectious Diseases (Kumamoto, Japan) September 16, 2005.
40. 滝口雅文 (2005) 免疫療法ーエイズ患者に対する細胞性免疫療法の将来ー。第 46 回日本臨床ウイルス学会 (福岡) 平成 17 年 6 月 3 日～4 日
41. 本園千尋、上野貴将、井手上結香、滝口雅文 (2005) 可変領域に Vδ1 を有す αβ 型 T 細胞レセプターの抗原認識機構。第 5 回日本蛋白質科学会年会 (福岡) 平成 17 年 6 月 30 日～7 月 2 日
42. 滝口雅文 (2005) HIV-1 の細胞傷害性 T 細胞からの逃避機構。第 16 回日本生体防御学会 (東京) 平成 17 年 8 月 4 日～6 日
43. 上野貴将、井手上結香、岡 慎一、滝口雅文 (2005) HIV の抗原変異に対する細胞傷害性 T 細胞応答の解析。第 6 回熊本エイズセミナー (熊本) 平成 17 年 9 月 15 日
44. 藤原 守、高田比呂志、岡 慎一、滝口雅文 (2005) HIV-1 特異的 CD8+T 細胞による HIV-1 感染 CD4+T 細胞認識とサイトカイン産生。第 6 回熊本エイズセミナー (熊本) 平成 17 年 9 月 15 日
45. 滝口雅文 (2005) HIV-1 の細胞傷害性 T 細胞からの逃避機構。第 14 回日本組織適合性学会 (熊本) 平成 17 年 10 月 2 日～10 月 4 日
46. 上野貴将、井手上結香、岡 慎一、滝口雅文 (2005) HIV の CTL エスケープ変異体に対する CTL の応答。第 53 回日本ウイルス学会学術集会 (横浜) 平成 17 年 11 月 20 日～22 日
47. 小泉寛和、藤原 守、川島夕佳、有海康雄、上野貴将、岡 慎一、滝口雅文 (2005) 2 つの HLA-A*1101 拘束性 Nef 特異的 CTL によるウイルス増殖抑制とウイルス変異の誘導。第 53 回日本ウイルス学会学術集会 (横浜) 平成 17 年 11 月 20 日～22 日
48. 川島夕佳、藤原 守、佐藤愛美、岡 慎一、滝口雅文 (2005) HLA-B*5101 拘束性 HIV-1 Pol 特異的 CTL のエイズ発症遅延における役割。第 53 回日本ウイルス学会学術集会 (横浜) 平成 17 年 11 月 20 日～22 日
49. Borghan, MA., Oka, S. and Takiguchi, M.: (2005) Identification of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific HLA-A*3101-restricted cytotoxic T lymphocyte epitopes. 第 53 回日本ウイルス学会学術集会 (横浜) 平成 17 年 11 月 20 日～22 日
50. 藤原 守、滝口雅文 (2005) HIV-1 感染初期における免疫誘導の解析: HIV-1 感染マクロファージに対する HIV-1 特異的 CD8+T 細胞応答。第 53 回日本ウイルス学会学術集会 (横浜) 平成 17 年 11 月 20 日～22 日
51. 上野貴将、井手上結香、岡 慎一、滝口雅文 (2005) 抗 HIV 活性を喪失した HIV 特異的な細胞傷害性 T 細胞の解析。第 19 回日本エイズ学会学術集会 (熊本) 12 月 1 日～3 日
52. 小泉寛和、藤原 守、川島夕佳、有海康雄、上野貴将、岡 慎一、滝口雅文 (2005) 2 つの HLA-A*1101 拘束性 Nef 特異的 CTL による HIV-1 の排除と変異の誘導。第 19 回日本エイズ学会学術集会 (熊本) 12 月 1 日～3 日
53. 川島夕佳、藤原 守、佐藤愛美、岡 慎一、滝口雅文 (2005) HLA-B*5101 を持つ長期未発症者における HIV-1 Pol 特異的 CTL の役割。第 19 回日本エイズ学会学術集会 (熊本) 12 月 1 日～3 日
54. 藤原 守、高田比呂志、岡 慎一、滝口雅文 (2005) HIV-1 特異的 CD8⁺T 細胞による HIV-1 感染 CD4⁺T 細胞認識とサイトカイン産生。第 19 回日本エイズ学会学術集会 (熊本) 12 月 1 日～3 日
55. 本園千尋、上野貴将、滝口雅文 (2005) 可変領域に Vδ1 を有する αβ 型 T 細胞レセプター構成蛋白質の HIV 抗原に対する相互作用解析。第 35 回日本免疫学会学術集会 (横浜) 12 月 13 日～15 日
56. Kondo, T., Takata, H. and Takiguchi, M. (2005) Selective expression of CCR6 chemokine receptors on a subset of human memory CD8+ T cells having ability to produce multiple cytokines. 第 35 回日本免疫学会学術集会 (横浜) 12 月 13 日～15 日

57. Takata, H. and Takiguchi, M.: (2005) Multi-color flowcytometric analysis of effector molecule expression in human CD8+ T cells during peripheral differentiation. 第 35 回日本免疫学会学術集会 (横浜) 12 月 13 日～15 日
58. 上野貴将、滝口雅文 (2005) HIV の CTL エスケープ変異と変異体に対するヒト CTL 応答の解析。第 35 回日本免疫学会学術集会 (横浜) 12 月 13 日～15 日
59. 本園千尋、滝口雅文、上野貴将 (2005) HIV 抗原と T 細胞レセプターの相互作用による T 細胞の抗ウイルス機能制御(Control of T cell Antiviral function by T cell receptor recognition of HIV-1-derived peptides)。第 6 回日本蛋白質科学会 (京都) 月 24 日～26 日

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし



4 ケモカインレセプターに影響しない侵入阻害薬の開発

分担研究者：満屋 裕明（熊本大学医学部 免疫病態学内科学第二 教授）

研究協力者：塩田 達雄¹、松岡 雅雄²

（¹大阪大学微生物病研究所 教授、²京都大学ウイルス研究所 教授）

研究要旨

AIDS に対する化学療法での薬剤耐性 HIV に対する治療法の確立は今や重要な課題の 1 つである。本研究では宿主（細胞側）因子であるケモカインレセプター(CCR5)に作用し既存の抗 HIV 剤に耐性のウイルスに対しても活性を示す AK602/aplaviroc (AVC) の開発を進めると共に AVC の作用機序解析を進め、CCR5 を介したケモカイン本来の生理作用に影響を与えない新しい抗 HIV 剤の開発を目指した。まず我々は AVC が多剤耐性株を含む R5-HIV-1 の感染・増殖を試験管内で強力に抑制、動物モデル (NOG-SCID マウス) の系でも強力な抗ウイルス活性を発揮する一方で、ケモカイン (RANTES) の CCR5 への結合にはわずかしか影響せず、RANTES の CCR5 を介した生理的作用を部分的にしか阻害しないことを明らかにした。AVC のこのような特徴を構造学的に解析するために CCR5 と CCR5 阻害剤の結合モデルの構築を行ったところ、AVC は CCR5 の細胞外ドメインと上部膜貫通ドメインで形成される疎水性ポケットに結合し、その結合様式は他の構造を有する CCR5 阻害剤 (SCH-C, TAK-779) といくつかの点で異なっていることを見出した。更に CCR5 の AVC 結合ポケットの一部 (第 4-5 膜貫通ドメイン近傍) に HIV 感染に重要でありながら、ケモカイン-CCR5 の相互作用へはほとんど影響しない領域があることを明らかにし、HIV 感染に重要なコンポーネントのみをターゲットとした低分子化合物をデザインすることで、ケモカインレセプターの生理的作用を阻害しない抗 HIV 薬のモデリングが可能である事を示した。今回の研究成果は既存の抗 HIV 剤との交差耐性が無く、抗 HIV 作用に特化した新しい治療薬/治療法の開発に繋がる有用な所見と考えられる。

A. 研究目的

AIDS に対する HAART 療法を主とした化学療法は一定の成果を挙げているが、副作用、薬剤耐性変異株の出現、アドヒアランスの低下などクリアすべき課題が山積している。分担研究者（満屋）は最近、多剤耐性 HIV にも有効な抗 HIV 薬開発の一環として細胞側因子であるケモカインレセプター (CCR5) に対する一群のアンタゴニストの研究を進めてきたが、本研究では spirodiketopiperazine (SDP)

誘導体の一員で *in vitro/in vivo* で強力な活性を有する AK602/GW873140/aplaviroc (AVC) と一連の誘導体を用いて HIV 感染を阻害する具体的なメカニズム、CCR5 阻害剤・ケモカインと CCR5 の相互作用などの基礎的研究を進め、ケモカインを介した免疫系など各種の生理作用に影響を与えない CCR5 阻害剤の開発を進めた。

B. 研究方法

- 1) 抗 HIV 化合物の活性評価には試験管内での評価 (p24 アッセイ・MTT アッセイ・MAGI アッセイ) に加え、SCID-hu マウス AIDS モデルを用いた評価系を用いた。
- 2) CCR5 阻害剤の³H ラベル体作成および複数の変異 CCR5 発現細胞株を作成、更に¹²⁵I ラベル化されたケモカイン (RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β) を用いて野生株・変異 CCR5 との結合能や CCR5 阻害剤とケモカインとの相互作用の検討を行なった。
- 3) ウシロドプシン結晶構造を基に CCR5 の構造的解析を行なった。更に変異 CCR5 とケモカイン・CCR5 阻害剤との結合能の変化のデータを基に CCR5 との結合様式の解析を進めた。

(倫理面への配慮)

開発中の化合物の臨床試験導入に際しては、動物実験などでその安全性を十分に確認した。さらに医学部・大学内の該当する IRB で倫理面での適合性について許可を申請、認可された後で、試験を開始した。

C. 研究結果

ケモカインレセプター (CCR5) に対する一群のアンタゴニストは CCR5 をコレセプターとして用いる R5 HIV-1 の抑制効果を示した (Maeda & Mitsuya, *J Biol Chem.* 276:35194-200, 2001)。特に aplabiroc (AVC) (図 1) は試験管内で強力な活性を示し (IC₅₀: 0.2nM)、既存の抗 HIV 剤 [逆転写酵素阻害剤 (RTIs)、プロテアーゼ阻害剤 (PIs)] と全く交差耐性を認めず (Maeda & Mitsuya, *J. Virol.* 78: 8654, 2004)、動物モデル (huPBL-NOG-SCID マウス) の系でも強力な抗 HIV 活性 (血中ウイルスレベルが 2 log 減少) と CD4 陽性細胞数の減少を有意に抑制した (Nakata & Mitsuya, *J. Virol.* 79:2087, 2005) (平成 15-16 年度)。

更に AVC は逆転写酵素阻害剤 (AZT、NVP)、プロテアーゼ阻害剤 (IDV)、侵入阻害剤 (AMD3100、sCD4)、融合阻害剤 (T-20) などとの併用で多くの薬剤との強い相乗効果を認め、CCR5 阻害剤が多剤併用療法で著明な効果を示す事が示された (Nakata & Mitsuya, 投稿準備中) (平成 16-17 年度)。一方で AVC は CCR5 に対する強力な結合親和性 (K_D 値: ~3 nM) を有しながら、ケモカイン (RANTES)

の CCR5 への結合にはわずかしき影響を与えず (図 2) (Maeda & Mitsuya, *J. Virol.* 78: 8654, 2004) (平成 15 年度)、RANTES が CCR5 を介してもたらず生理的作用についても完全には阻害しないことを共焦点顕微鏡を用いた解析などで明らかにした (Nakata & Mitsuya, 投稿準備中) (平成 16-17 年度)。

AVC のこのような特徴を構造的に解析するために³H ラベル CCR5 阻害剤と変異 CCR5 発現細胞株を用いた生物学的結合能解析実験系に CCR5・CCR5 阻害剤のコンピューターモデリングの手法を組み合わせた構造解析系を確立した (平成 15-17 年度)。AVC は CCR5 の細胞外ドメインと上部膜貫通ドメインで形成される疎水性ポケットに結合しており (図 3. A,B)、その結合部位は他の構造を有する CCR5 阻害剤 (SCH-C, TAK-779) ともおおよそ一致するもののいくつかの領域でその結合様式が異なっていることを見出した。

既に複数の CCR5 阻害剤の詳細な結合様式解析 (ドッキングモデリング作成) を終了 (Maeda & Mitsuya, *J Biol Chem.* Published on-line; Feb. 13, 2006)、現在、より詳細なモデル構築を進めている。更に AVC を含む CCR5 阻害剤の結合に重要な CCR5 のポケットがケモカイン作用および HIV 感染に与える影響についてアミノ酸レベルでの詳細な検討を行った。その結果、ポケットの一部 (第 4-5 膜貫通ドメイン近傍) に HIV 感染に重要でありながらケモカイン作用へはほとんど影響しない領域があることを明らかにし (図 3-B; Gly163, Ile198 など)、このような HIV 感染のみに重要な構造をターゲットとした低分子化合物をデザインすることでケモカインレセプターの生理的作用を阻害しない抗 HIV 薬のモデリングが可能である事を示した (Maeda & Mitsuya, *J Biol Chem.* Published on-line; Feb. 13, 2006) (平成 17 年度)。

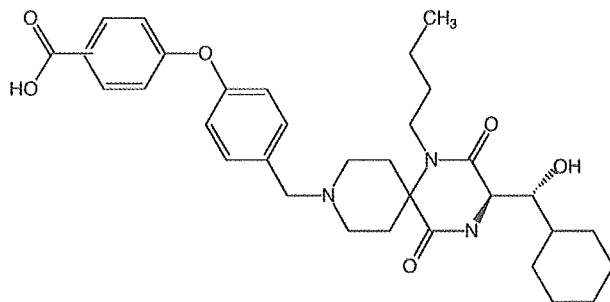


図 1. Aplaviroc (AVC)の構造

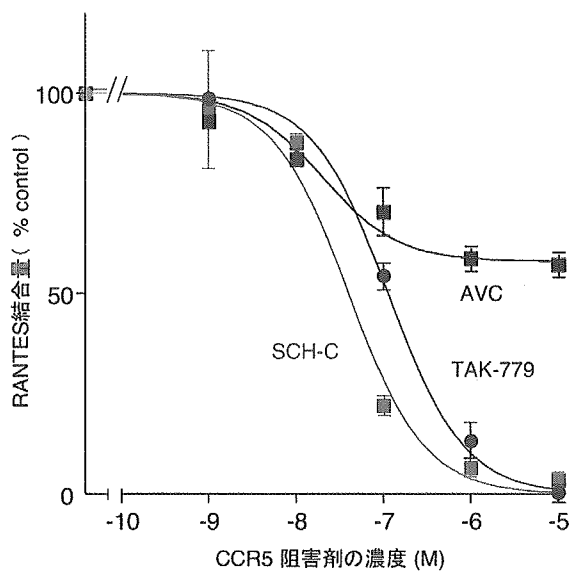


図 2. 高濃度の AVC 存在下でも RANTES と CCR5 との結合は半分程度しか阻害されない。

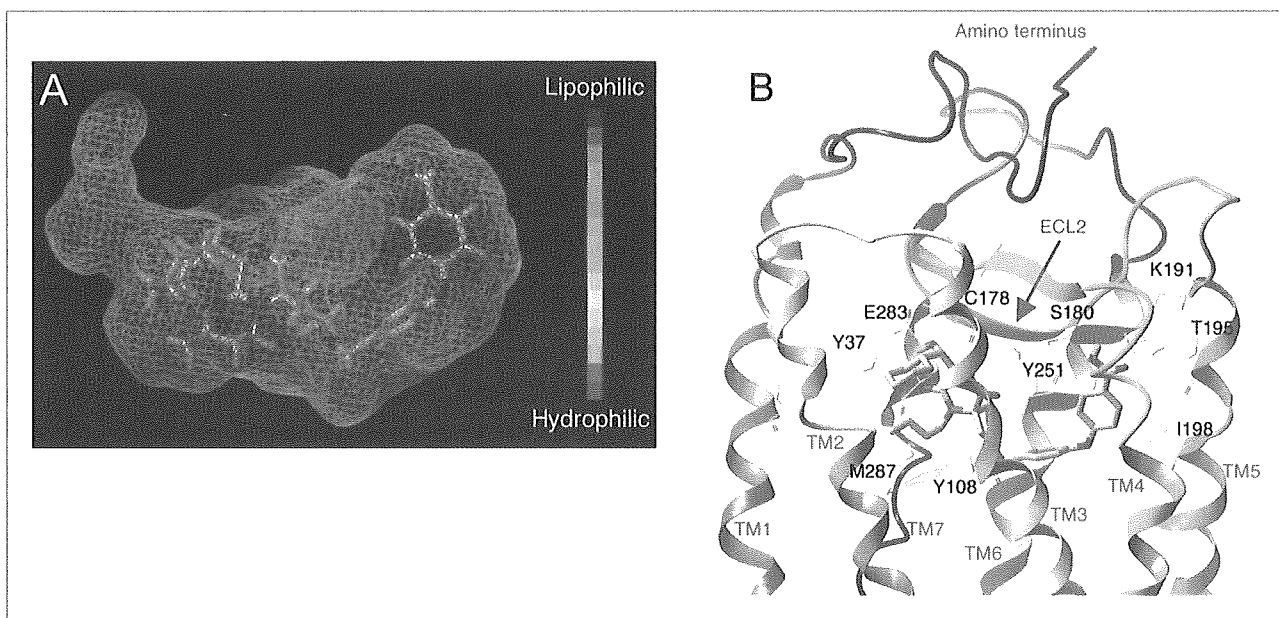


図 3

AVC は CCR5 の疎水性のポケットに結合する (A)。ポケットは上部膜貫通 (TM) ドメインと細胞外ループ (ECL) の間に位置し、その中でも Gly163, Lys191, Glu283 などのアミノ酸が AVC との結合に重要である (B)。

D. 考察

分担研究者（満屋）は抗 AIDS 薬の研究・開発および耐性発現メカニズムの解析に早い時期から精力的に取り組んできたが、今回の CCR5 をターゲットとした抗 HIV 剤開発もその 1 つである。ケモカインレセプター阻害剤は既存の抗 HIV 薬と異なり生体（細胞）の分子を標的とした薬剤であるため、長期に亘りケモカイン作用を阻害する事による生体への影響は否定できない。実際に CCR5 を含むケモカインレセプターが各種感染症に対する免疫応答や移植片拒絶反応に関与しているという報告がされている。今回の研究成果は薬剤の作用機序の詳細な構造学的解析により免疫系を含む生体への影響の少ない新規薬剤の計画的デザインの可能性を示唆するものである。本研究では非常に詳細な CCR5 の構造学的モデリングと抗 HIV 特異的化合物の標的となり得る有望な部位（構造）の同定に成功しており、目的の達成度は極めて高いと評価できる。しかも詳細な構造モデルから抗 HIV 作用に特化した化合物のデザインを図る系は今のところ世界的に見ても非常に独自性に富むものと思われる。AVC は米国での臨床試験（第 3 相試験）で AIDS 患者に単剤および併用で投与されて、強力な抗 HIV 活性を発揮することが示されたが、不測の肝障害が一部の患者で見られて、臨床試験への新しい患者の enrollment は中断されている（2005 年 12 月現在）。現在、我々が検討した多数の類似体（congeners）の中から back-up の SDP 誘導体を選定中である。

上述の通り、研究者は膨大な生物学的・構造学的解析結果を基に非常に信頼性の高い CCR5 と低分子化合物の構造モデルの構築を終えており、既にこのモデルを用いて新たな化合物のデザインも始めている。このように科学的データに基づいた新規化合物のデザインが有望な薬剤の開発に繋がる可能性は高いと期待される。

E. 結論

本研究は構造学的データから、より特異的・選択的な薬剤のデザインを図るといふ最近の分子標的のアプローチに即した研究といえる。今回の研究成果がより新しい、免疫系を含む生体への影響の少ない抗 HIV 作用に特化した新しい治療薬の同定、開発へとつながる可能性は高いと評価してよいと思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

業績

1. Kawamura, T., Gatanaga, H., Borris, D.L., Mitsuya, H., and Blauvelt, A. (2003) Decreased stimulation of CD4+ T cell proliferation and IL-2 production by highly enriched populations of HIV-infected dendritic cells. *J. Immunol.* 170:4260-4266.
2. Matsumi, S., Kosalaraksa, P., Hsinyi Tsang, H., Kavlick, M.F., Harada, S., and Mitsuya, H. (2003) Pathways for the emergence of multi-dideoxynucleoside-resistant human immunodeficiency virus type 1 variants. *AIDS* 17:1127-1137
3. Little, R.F., Pittaluga, S. Drbohalav, N., Steinberg, S.M., Kavlick, M.F., Mitsuya, H., Franchini, G., Gutierrez, M., Raffeld, M., Jaffe, E.S., Shearer, G., Yarchoan, R., and Wilson, W.H. (2003) Highly effective treatment of acquired immunodeficiency syndrome-related lymphoma with dose-adjusted EPOCH: impact of antiretroviral therapy suspension and tumor biology. *Blood* 101:4653-4659.
4. Chen, X., Matsumi, S., Mitsuya, H., and Zemlicka, J. (2003) Synthesis of (Z)-(2,3 bis-hydroxymethyl)methylenecyclopropane analogues of purine nucleosides. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 22:265-274.
5. Tamamura, H., Koh, Y., Ueda, S., Sasaki, Y., Yamasaki, T., Aoki, M., Maeda, K., Warai, Y., Arikuni, H., Otaka, A., Mitsuya, H., and Fujii, N. (2003) Reduction of peptide character of HIV protease inhibitors that exhibit nanomolar potency against multi-drug resistant HIV-1 strains. *J. Med. Chem.* 46:1764-1768.
6. Choi, Y., George, C., Comin, M.J., Barchi, J.J., Jr., Kim, H.S., Jacobson, K.A., Balzarini, J., Mitsuya, H., Boyer, P.L., Hughes, S.H., and Marquez, V. E. (2003). A conformationally locked analogue of the anti-HIV agent stavudine. An important correlation between pseudorotation and maximum amplitude. *J Med Chem* 46:3292 3299.
7. Yoshimura, K., Ido, E., Akiyama, H., Kimura, T., Aoki, M., Suzuki, H., Mitsuya, H., Hayami, M., and Matsushita, S. (2003) The impact of HAART by oral route on the CD8 subset and turnover in the chronically SHIV89.6P-infected monkeys. *J. Virol. Methods.* 112:121-128.

8. Koh, Y., Maeda, K., Ogata, H., Bilcer, G., Devasamudram, T., Kincaid, J.F., Boross, P., Wang, Y.-F., Tie, Y., Volarath, P., Gaddis, L., Louis, J.M., Harrison, R.W., Weber, I.T., Ghosh, A.K., and Mitsuya, H. (2003) Novel *bis*-tetrahydrofuranyl urethane-containing nonpeptidic protease inhibitor (PI) UIC-94017 (TMC114) potent against multi-PI-resistant human immunodeficiency virus *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:3123-3129.
9. Wang, R., Harada, S., Mitsuya, H., and Zemlicka, J. (2003) Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Reverse Transcriptase by Synadenol Triphosphate and Its E-Isomer. *J. Med. Chem.* 46: 4799-4802
10. Kohgo, S., Yamada, K., Kitano, K., Sakata, S., Hayakawa, H., Nameki, D., Kodama, E., Matsuoka, M., Mitsuya, H., and Ohru, H. (2003). Synthesis of 4'-C-ethynyl and 4'-C-cyano purine nucleosides from natural nucleosides and their anti-HIV activity. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 22:887-889.
11. Maeda, K., Nakata, H., Koh, Y., Miyakawa, T., Ogata, H., Takaoka, Y., Shibayama, S., Sgawa, K., Fukushima, D., Moravek, J., Koyanagi, Y., and Mitsuya, H. (2004) Spirodiketopiperazine-based CCR5 inhibitor which preserves CC-chemokine/CCR5 interactions and exerts potent activity against R5 human immunodeficiency virus type 1 *in vitro*. *J. Virol.* 78:8654-8662
12. Kitano, K., Kohgo, S., Yamada, K., sakata, S., Ashida, N., Hayakawa, H., Nameki, D., Kodama, E., Matsuoka, M., Mitsuya, H. & Ohru, H. (2004) Attempt to reduce cytotoxicity by synthesizing the L-enantiomer of 4'-C-ethynyl-2'-doxypurine nucleosides as antiviral aganets against HIV and HBV. *Antiviral Chem. Chemother.* 14:161-167.
13. Siddiqui, M.A., Hughes, S.H., Boyer, P.L., Mitsuya, H., Sarafinanos, S.G., and Marquez, V.E. (2004) A 4'-C-ethynyl-2',3'-dideoxynucleoside analogue highlights the role of the 3'-OH in anti-HIV active 4'-C-ethynyl-2'-deoxy nucleosides. *J. Med. Chem.* 47: 5041-5048.
14. Depboylu, C; T. A. Reinhart; W. J. Schwaeble; M. K.-H. Schäfer; H. Maeda; H. Mitsuya; R. Damadzic; D. M. Rausch; L. E. Eiden; and E. Weihe. (2004) Brain C1q biosynthesis is increased in SIV infection in the Rhesus macaque, and is directly related to brain virus burden. *Eur. J. Neuroscience*, 19:2997-3005
15. Kohgo, S., Yamada, K., Kitano, K., Iwai, Y., Sakata, S., Ashida, N., Hayakawa, H., Nameki, D., Kodama, E., Matsuoka, M., Mitsuya, H. And Ohru, H. (2004) Design, efficient synthesis, and anti-HIV activity of 4'-C-cyano- and 4'-C-ethynyl-2'-deoxy purine nucleosides. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids.* 23: 671-690.
16. Yasunaga, J., Taniguchi, Y., Nosaka, K., Yoshida, M., Stou, Y., Sakai, T., Mitsuya, H., and Matsuoka, M. (2004) Identification of Aberrantly Methylated Genes in Association with Adult T-Cell Leukemia. *Cancer Research*, 64:6002-6009.
17. Hayakawa, H., Kohgo, S., Kitano, K., Ashida, N., Kodama, E., Mitsuya, H., and Ohru, H. (2004) Potential of 4'-C-substituted nucleosides for the treatment of HIV 1. *Antiviral Chem. Chemother.* 15: 169-187.
18. Tamiya, S., Mardy, S., Kavlick, M.F., Yoshimura, K., and Mitsuya, H. (2004) Amino Acid Insertions near Gag Cleavage Sites Restore the Otherwise Compromised Replication of HIV-1 Variants Resistant to Protease Inhibitors. *J. Virol.* 78:12030-12040.
19. Hachiya, A., Gatanaga, H., Kodama, E., Ikeuchi, M., Matsuoka, M., Harada, S., Mitsuya, H., Kimura, S., and Oka, S. (2004) Novel patterns of nevirapine-resistance associated mutations of human immunodeficiency virus type 1 in treatment-naive patients. *Virology* 327:215-24
20. Maeda, K., , H., Ogata, H., Koh, Y., Miyakawa, T., and Mitsuya, H. (2004) The current status of, and challenges in, the development of CCR5 inhibitors as therapeutics for HIV-1 infection. *Curr. Opin. Pharmacol.* 4:447-452.
21. Zhou, S., Kern, E.R., Gullen, E., Cheng, Y.-C., Drach, J.C., Matsumi, S., Mitsuya, H. And Zemlicka, J. (2004) (Z)- and (E)-[2-fluoro-2-(hydroxymethyl)cyclopropylidene] methylpurines and -pyrimidines, a new class of methylenecyclopropane analogues of nucleosides: Synthesis and antiviral activity. *J. Med. Chem.* 47:6964-6972.
22. Ghosh, A.K., Swanson, L.M., Cho, H., Leshchenko, S., Hussain, K.A., Kay, S., Wlaters, D.E., Koh, Y., and Mitsuya, H. (2005) Structure-Based Design: Synthesis and biological evaluation of a series of novel cycloamide-derived HIV-1 protease inhibitors. *J Med Chem* 48:3576-3585.
23. Nakata, H., Maeda, K., Miyakawa, T., Shibayama, S., Matsuo, M., Takaoka, Y., Ito, M., Koyanagi, Y., and Mitsuya, H. (2005) Potent anti-R5 human immunodeficiency virus type 1 effects of a CCR5 antagonist, AK602/ONO4128/GW873140, in a novel human peripheral blood mononuclear cell nonobese diabetic-SCID, interleukin-2 receptor γ -chain-knocked-out AIDS mouse model. *J. Virol.* 79: 2087-2096.

24. Matsushita, S., Yoshimura, K., Kimura, T., Kamihira, A., Takano, M., Etoh, K., Shirasaka, T., Mitsuya, H., and Oka, S. (2005) Spontaneous recovery of hemoglobin and neutrophil levels in Japanese patients on a long-term Combivir® containing regimen. *J. Clin. Virol.* 33:188-193.
25. Depboylu, C., Schafer, M.K., Schwaeble, W.J., Reinhart, T.A., Maeda, H., Mitsuya, H., Damadzic, R., Rausch, D.M., Eiden, L.E., and Weihe, E. (2005) Increase of C1q biosynthesis in brain microglia and macrophages during lentivirus infection in the rhesus macaque is sensitive to antiretroviral treatment with 6-chloro-2',3' dideoxyguanosine. *Neurobiol Dis* 20:12-26.
26. Gatanaga, H., Das, D., Suzuki, Y., Yeh, D.D., Hussain, K.A., Ghosh, A.K., and Mitsuya, H. (2006) Altered HIV-1 gag protein interactions with cyclophilin A (CypA) upon the acquisition of H219Q and H219P substitutions in the CypA binding loop. (2006) *J. Biol. Chem.* 281, 1241-50.
27. Maeda, K., Das, D., Ogata-Aoki, H., Nakata, H., Miyakawa, T., Takaoka, Y., Ding, J., Arnold, E., and Mitsuya, H. (2006) Structural and molecular interactions of CCR5 inhibitors with CCR5. *J. Biol. Chem.* Published on-line on February 13, 2006.
28. Ghosh, A.K., Schiltz, G., Perali, R. S., Leschenko, S., Kay, S., Walters, D. E., Koh, Y., Maeda, K., Mitsuya, H. (2006) Design and synthesis of novel HIV-1 protease inhibitors incorporating oxyindoles as the P2'- ligands. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 76: 1869-1873.
29. Yin, P.D., Das, D., and Mitsuya, H. (2006) Overcoming HIV Drug Resistance through Rational Drug Design Based on Molecular, Biochemical, and Structural Profiles of HIV Resistance. *Cell Mol Life Sci.* (In press)
4. Yasuhiro Koh, H Nakata, H Ogata-Aoki, S Leschenko, A Ghosh, and H Mitsuya UIC-02031: A Novel Nonpeptidic Protease Inhibitor Containing a Stereochemically Defined Fused Cyclopentanyltetrahydrofuran Potent against Multi-PI-Resistant HIV-1 *in vitro*. 12th CROI, Feb 22-25, 2005.
5. Hiroto Nakata, K Maeda, H Ogata, T Miyakawa, Y Koyanagi, H Mitsuya A CCR5 inhibitor AK602/ONO4128/GW873140 Potent against HIV-1, Its CCR5 Binding Profile and the Synergy with Other Anti-HIV-1 Agents. 7th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific, July 1-5, 2005.
6. Yasuhiro Koh, H Nakata, H Ogata-Aoki, S Leschenko, A Ghosh, and H Mitsuya UIC-02031: A Novel Nonpeptidic Protease Inhibitor Containing a Stereochemically Defined Fused Cyclopentanyltetrahydrofuran Potent against Multi-PI-Resistant HIV-1 *in vitro*. 7th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific, July 1-5, 2005.
7. Hiroto Nakata, Y Koh, E Kodama, G Yang, S Kohgo, H Hayakawa, H Ohru, M Matsuoka, Y C Chen and H Mitsuya Intracellular metabolism of 2'-deoxy-4'-c-ethynyl-s-fluoroadenosine, a novel 4'-c-ethynyl nucleoside analog potent against multidrug-resistant HIV-1 variants. The 13th CROI, Denver, Colorado, Feb.5-8, 2006.
8. Yasuhiro Koh, H Nakata, H Ogata-Aoki, M Nakayama, S Leschenko, A Ghosh and H Mitsuya Determination of resistance profile of GRL-02031, a novel nonpeptidic protease inhibitor containing a cyclopentanyltetrahydrofuran moiety. The 13th CROI, Denver, Colorado, Feb.5-8, 2006.
9. Manabu Aoki, H Aoki and H Mitsuya TTNTRNS: An amino acid insert near the p17/p24 Gag cleavage site associated with resistance to protease inhibitors. The 13th CROI, Denver, Colorado, Feb. 5-8, 2006.

学会発表

1. K Maeda, H Ogata, S Harada, Y Tojo, T Miyakawa, H Nakata, Y Takaoka, S Shibayama, K Sagawa, F Daikichi, J Moravek, E Arnold, and H Mitsuya Determination of Binding Sites of a Unique CCR5 Inhibitor AK602 on Human CCR5. 11TH CROI, Feb 8-11, 2004.
 2. Y Koh, M Aoki, H Ogata, K Yoshimura, and H Mitsuya Role of Gag Mutations in HIV in Its Replication Fitness and Acquisition of Resistance to Protease Inhibitors. 11TH CROI, Feb 8-11, 2004.
 3. Hiroto Nakata, Y Koh, K Maeda, Y Takaoka, H Tamamura, N Fujii, and H Mitsuya Greater Synergistic Anti-HIV Effects upon Combinations of a CCR5 inhibitor AK602/ONO4128/GW873140 with CXCR4 Inhibitors than with Other Anti-HIV Drugs. 12th CROI, Feb 22-25, 2005.
- H. 知的所有権の出願・登録状況
1. 特許取得
 1. 特願 2000-137975 整理番号 YP2000-007 (平成 12 年) 4'-C-エチニルピリミジンヌクレオシド化合物
 2. 特願 2001-079611 整理番号 ONP3741 (平成 13 年) トリアザスピロ [5, 5] ウンデカン誘導体を有効成分とする HIV 感染の予防および／または治療剤