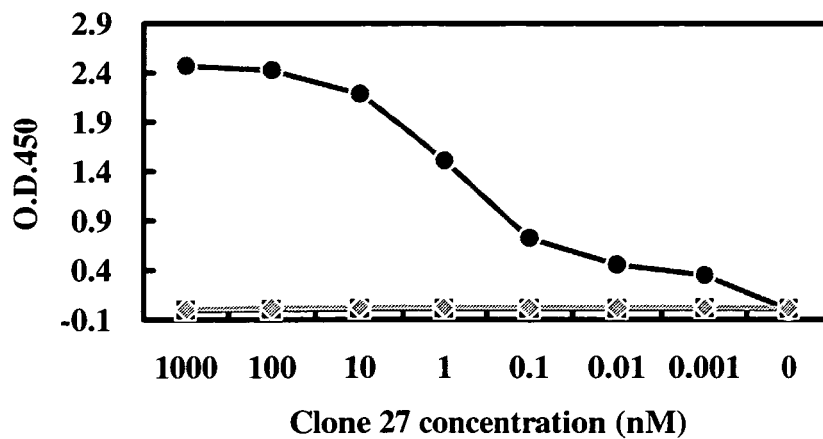


(A)



(B)

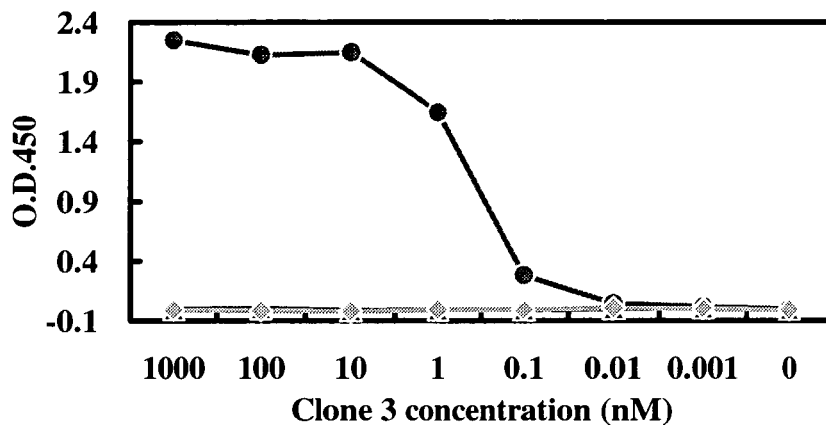
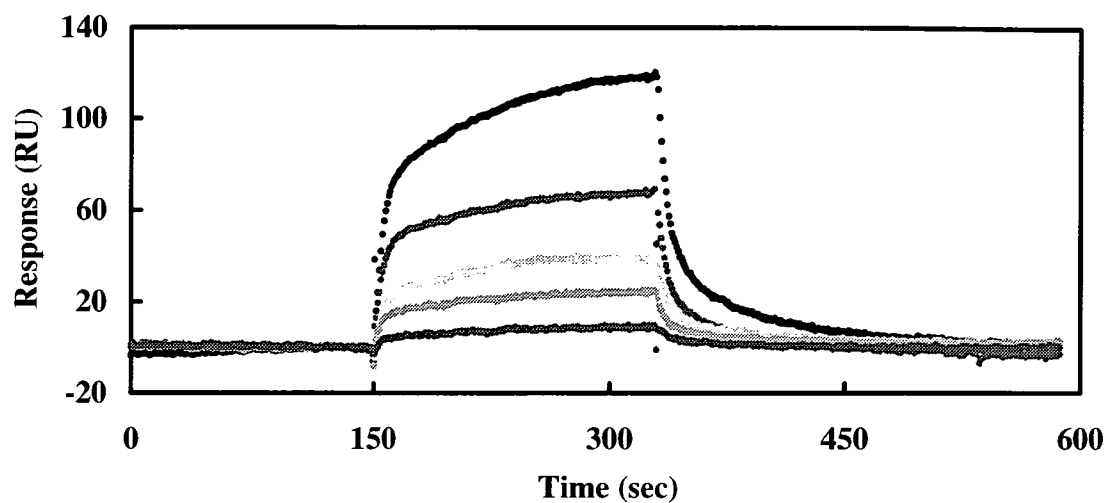


図 5. 組換え免疫グロブリンの抗原特異性の解析

作製したヒト免疫グロブリン(クローン 27 及 3)の結合特異性を ELISA で解析した。検出は、HRP 標識抗ヒト IgG Fc 抗体を用いて行った。(A)にクローン 27、(B)にクローン 3 の結果を示した。赤線は A24/Nef 複合体、青線は A24/Env 複合体、灰色線は BSA に対する結合を示した。縦軸に 450 nm における吸光度の値、横軸に組換えヒト免疫グロブリンの濃度を示した。

(A)



(B)

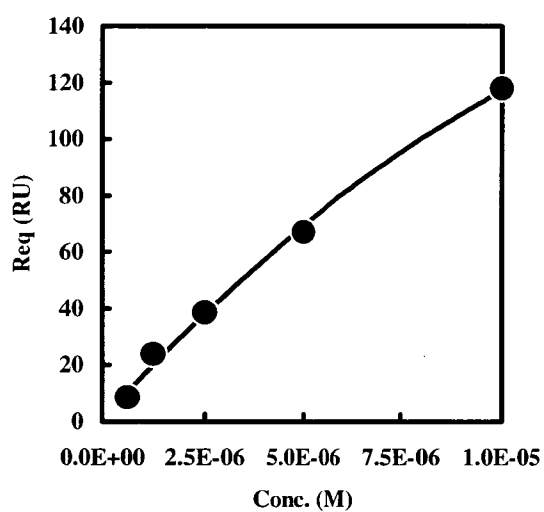
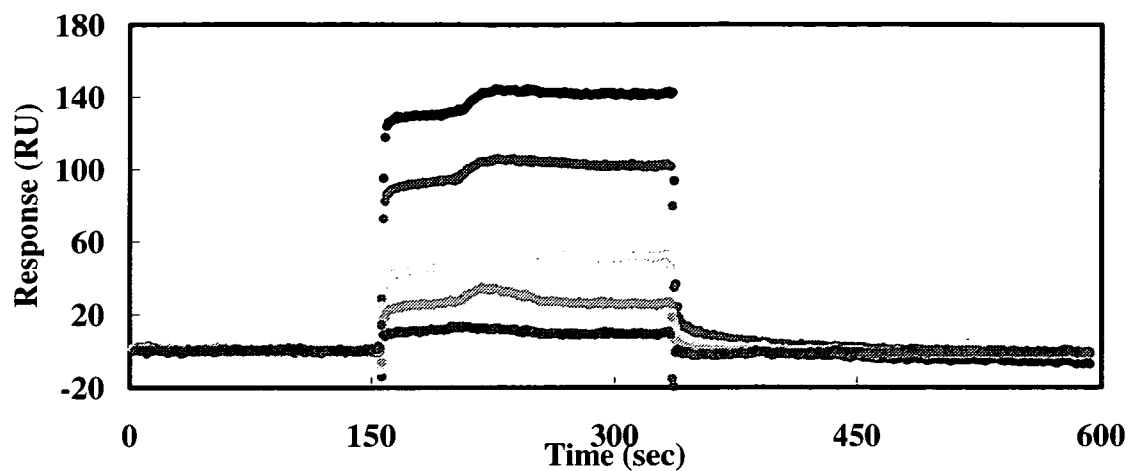


図6. 抗原抗体反応(クローン3)の相互作用の解析

表面プラズモン共鳴法により、A24/Nef 複合体に対するヒト IgG(クローン3)の相互作用を解析した。(A) Biacore 1000 を用いて得られたセンサーグラムを示した。縦軸に得られたシグナル強度(RU)、横軸に時間(sec)を示した。(B) Req 値を濃度に対してプロットした。縦軸に Req (RU)、横軸にアナライト濃度(M)を示した。

(A)



(B)

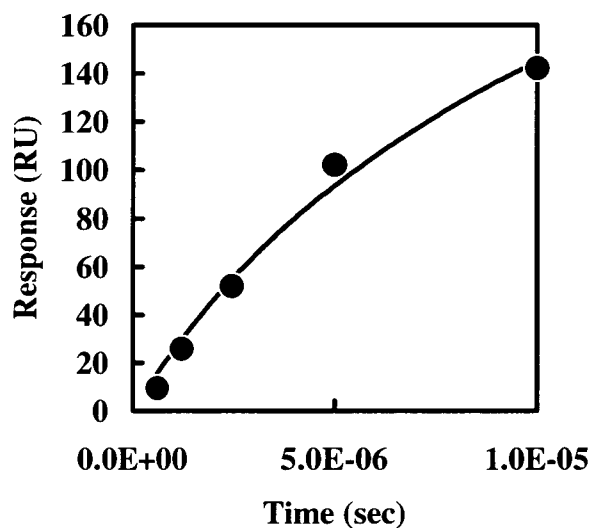


図7. 抗原抗体反応(クローン 27)の相互作用の解析

表面プラズモン共鳴法により、A24/Nef 複合体に対するヒト IgG(クローン 27)の相互作用を解析した。(A) Biacore 1000 を用いて得られたセンサーグラムを示した。縦軸に得られたシグナル強度(RU)、横軸に時間(sec)を示した。(B) Req 値を濃度に対してプロットした。縦軸に Req(RU)、横軸にアナライト濃度(M)を示した。

	Clone 3	Clone 27
K_A (1/M)	$4.22 \pm 0.02 \times 10^4$	$5.09 \pm 2.3 \times 10^4$
K_D (M)	$2.30 \pm 0.04 \times 10^{-5}$	$2.01 \pm 0.8 \times 10^{-5}$

図8. 樹立した単クローン抗体の K_A 及び K_D

表面プラズモン法を用いた相互作用の結果(図 6 及び 7)から、BIAevaluation3.0(BIACORE)を用いて、 K_A 及び K_D を算出した。

HIV 感染症の病態進行を左右する宿主因子の探索

分担研究者 塩田 達雄 (大阪大学微生物病研究所教授)

研究要旨

HIV感染症に関わる宿主因子について検討し、以下の知見を得た。

(1) タイにおいて抗レトロウイルス剤Nevirapineを含む3剤併用療法を開始したHIV-1感染者の中で、Nevirapineによる薬疹のためNevirapine投与を中断した39名と、薬疹を起こさず投与を継続できた57名のHLA-Cの遺伝子型を決定したところ、HLA-Cw*04が薬疹発症と強く相関していることが明らかになった(P=0.00057)。

(2) HIV-1は、カニクイザル、アフリカミドリザル等の旧世界サルの細胞では増殖できない。旧世界サル細胞中のTRIM5 α がこの増殖抑制に寄与するが、我々は、TRIM5 α が発現しない状況でも、旧世界サル細胞中ではサイクロフィリンAがHIV-1の増殖を阻害することを明らかにした。

A. 研究目的

エイズの病態ならびに進行速度は感染者ごとに大きく異なり、感染後急激に CD4 陽性細胞数の減少をみる感染者から10年以上発症しない感染者まで様々である。また、HIV-1 感染感受性自体にも個人差が存在する。本研究は、多数の HIV-1 感染者および非感染者について、HIV-1 の生活環に関わる様々な宿主因子の遺伝的多型を検討し、病態進行や HIV-1 感染感受性の違いを決定する宿主側の因子を明らかにすることを目的とする。また抗 HIV 薬の有効性や副作用の個人差を決定する宿主因子の同定も重要な課題である。本年度は以下の 2 点を具体的な研究目的とした。

(1) 抗レトロウイルス剤Nevirapineは強力な逆転写酵素阻害剤であるが、薬疹や肝機能障害等の薬物過敏症を副作用として引き起こす。Nevirapineを含む3剤併用療法が広く普及しているタイにお

いて、感染者の HLA-C の遺伝子型が Nevirapine による薬疹発症に影響するか否かを明らかにすることを目的とした。

(2) HIV-1 は、カニクイザル、アフリカミドリザル等の旧世界サルの細胞では増殖できない。旧世界サル細胞中のレトロウイルス抑制因子 TRIM5 α が HIV-1 のカプシドに結合してこの増殖抑制機能を担う。一方、HIV-1 のカプシドにはサイクロフィリン A も結合する。旧世界サルの細胞における HIV-1 の増殖抑制に果たすサイクロフィリン A の役割の詳細を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

(1)タイにおいて Nevirapine を含む 3 剤併用療法を開始した HIV-1 感染者の中で、Nevirapine による薬疹のため Nevirapine 投与の中断を余儀なくされた 39 名と、薬疹を起こさず投与を継続できた感染者のうち中断した 39 名と性別、年齢、治療歴の

一致する57名のHLA-Cの遺伝子型を、ワクナガMPH-2 HLA タイピング試薬 HLA-C を用いて決定した。

(2) センダイウイルスベクターを用い、サイクロフィリン A あるいは SPRY 領域を欠くカニクイサルの TRIM5 α を発現させた。SPRY 領域を欠くカニクイサルの TRIM5 α は、カニクイザルのみならずヒト、アフリカミドリザル等の別種の TRIM5 α の抗ウイルス作用を失わせるドミナントネガティブ効果を示す。また、TRIM5 α に対する small interfering RNA (siRNA)を用いて、TRIM5 α の発現を抑制した。各種細胞の HIV-1 感染感受性は、水疱性口内炎ウイルスの外皮膜糖タンパク質をエンベロープに持ち GFP を一過性に発現する HIV-1 ベクターを用いて測定した。

(倫理面への配慮)

HIV-1 感染者ならびに非感染者の検体を使用するにあたって、検体の提供者には遺伝子解析を行うことを含めて十分に説明を行い、書面による同意を得られた場合のみを解析の対象とし、検体は匿名化して個人情報が特定できないようにして扱った。HIV-1 感染者の遺伝子解析は平成13年に大阪大学研究倫理審査委員会の承認を得た。

C. 研究結果

(1) タイにおいてNevirapineを含む3剤併用療法を開始したHIV-1感染者の中で、Nevirapineによる薬疹のためNevirapine投与の中断を余儀なくされた39名と、薬疹を起こさず投与を継続できた感染者のうち中断した39名と性別、年齢、治療歴の一致する57名のHLA-Cの遺伝子型を決定した。その結果、薬疹のためNevirapine投与の中断を余儀なくされた39名では、Cw*01は12(頻度

0.154)、Cw*03は4(0.052)、Cw*04は18(0.231)、Cw*05は2(0.026)、Cw*06は8(0.103)、Cw*07は17(0.218)、Cw*08は10(0.128)、Cw*12は4(0.051)、Cw*14は1(0.013)、Cw*15は2(0.026)認められ、Cw*02、Cw*09、Cw*10、Cw*11およびCw*13は認められなかった。一方、薬疹を起こさず投与を継続できた57名では、Cw*01は12(0.105)、Cw*03は18(0.158)、Cw*04は6(0.053)、Cw*05は3(0.026)、Cw*06は11(0.096)、Cw*07は36(0.316)、Cw*08は15(0.132)、Cw*12は8(0.070)、Cw*14は3(0.026)、Cw*15は2(0.018)認められ、薬疹群と同様、Cw*02、Cw*09、Cw*10、Cw*11およびCw*13は認められなかった。薬疹群と対照群を比較すると、Cw*03は薬疹群で少なく(薬疹群0.051、対照群0.158、 $P=0.036$)、Cw*04は薬疹群で有意に多かった(薬疹群0.231、対照群0.053、 $P=0.00057$)。

(2) 旧世界サルの細胞Vero、CV1、LLC-MKでSPRY領域を欠くカニクイサルのTRIM5 α を発現させると、TRIM5 α の機能が阻害され、HIV-1感染感受性が上昇した。また、TRIM5 α に対するsiRNAを用いてTRIM5 α の発現を抑制してもHIV-1感染感受性が上昇した。これらTRIM5 α の機能が阻害された旧世界サルの細胞にサイクロフィリンAを発現させると、HIV-1感染感受性は低下した。一方、ヒト細胞MT4と293Tで同様の実験を行っても、感染感受性は全く変化せず、サイクロフィリンAによるHIV-1感染阻害効果は旧世界サル細胞特異的であることが明らかになった。サイクロフィリンAとの結合能を失う変異をカプシド遺伝子に導入したHIV-1の感染性はサイクロフィリンAにより影響されず、HIV-1カプシドとの結合能を失う変異を導入したサイクロフィリンAでは、

HIV-1感染阻害効果は認められなかった。

D. 考察

(1) タイにおいてNevirapineを含む3剤併用療法を開始したHIV-1感染者の中で、Nevirapineによる薬疹を起こした39名と薬疹を起こさなかった57名のHLA-Cの遺伝子型を決定したところ、HLA-Cw*04が薬疹発症と強く相関していることが明らかになった($P=0.00057$)。この結果は、今後、タイにおける薬疹発症予防に貢献できる可能性がある。

特定のHLAと相関する薬疹は、原因薬剤あるいはその代謝産物とそのHLAによって提示されるため、と考えられている。薬疹を含めたNevirapine過敏症のHIV-1感染者については、2006年にイタリア人HIV-1感染者でHLA-B*08-Cw*08との相関(Littera et al. AIDS, 20:1621-1626, 2006)、2007年には日本人HIV-1感染者でHLA Cw08との相関(Gatanaga et al. AIDS, 21:264-265, 2007)が報告されている。本研究では、薬疹群、対照群間でHLA-Cw*08の頻度に差が無くこれらの報告の結果を確認できなかった。本研究ではNevirapine過敏症のうち明白に判定できる薬疹に焦点を絞って解析した点が上記の報告とは異なっている。従って本研究の結果は、薬疹と肝機能障害その他の過敏症症状の発症機序が異なることを示唆するのもかも知れない。あるいは国により過敏症と相関するHLAが異なるとすると、薬疹の発症機序はNevirapineあるいはその代謝産物が当該HLAによって提示されるためではなく、Nevirapineによってプロセッシングが影響される環境中の何らかの因子が当該HLAによって提示されるためかも知れない。

(2) TRIM5 α に加え、旧世界サル細胞中ではサイクロフィリンAもHIV-1感染を阻害することが明らかになった。本研究により、旧世界サル細胞における抗HIV-1作用がTRIM5 α とサイクロフィリンAの二つの因子によって担われていることがはっきりしたため、今後、旧世界サルのHIV-1感染モデル作出に弾みがつくものと考えられる。また、サイクロフィリンAのアミノ酸配列には、ヒトと旧世界サルの間で違いがないため、サイクロフィリンAと相互作用する旧世界サル細胞中の何らかの因子がHIV-1感染阻害を決定しているものと考えられる。

E. 結論

(1) タイにおいてNevirapineを含む3剤併用療法を開始したHIV-1感染者の中で、Nevirapineによる薬疹を起こした39名と薬疹を起こさなかった57名のHLA-Cの遺伝子型を決定したところ、HLA-Cw*04が薬疹発症と強く相関していることが明らかになった。

(2) TRIM5 α が発現しない状況でも、旧世界サル細胞中ではサイクロフィリンAがHIV-1の増殖を阻害することが明らかになった。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

Song, H, Nakayama, EE, Likanonsakul, S, Wasi, C, Iwamoto A, and Shioda T. A three-base-deletion polymorphism in the upstream non-coding region of human interleukin 7 (IL-7) gene could enhance levels of IL-7 expression. International Journal of

Immunogenetics. 2007;34:107-13.

Nuanjun Wichukchinda, Archawin Rojanawiwat, Yoshihiro Kitamura, Emi E Nakayama, Panita Pathipvanich, Wattana Auwanit, Pathom Sawanpanyalert, Aikichi Iwamoto, Tatsuo Shioda, and Koya Ariyoshi. The polymorphisms in *DC-SIGNR* affect the susceptibility to HIV-1 infection. *AIDS. Res. Hum. Retrovir.* 2007;23:686-92.

Raphael Lwembe, Washington Ochieng, Annie Panikulam, Charles O. Mongoina, Mary Owens, Yusuke Koizumi, Seiji Kageyama, Naohiko Yamamoto, Tatsuo Shioda, Rachel Musoke, Angel D'Agostino, Elijah M. Songok, Hiroshi Ichimura. Anti-Retroviral Drug Resistance-Associated Mutations Among Non-subtype B HIV-1-Infected Kenyan Children With Treatment Failure. *J. Med. Virol.* 2007;79:865-72.

Masahisa Ohishi, Tatsuo Shioda, and Jun-ichi Sakuragi. Retro-transduction by virus pseudotyped with glycoprotein of vesicular stomatitis virus. *Virology.* 2007;362:131-8.

Yusuke KOIZUMI, Seiji KAGEYAMA, Yoshihide FUJIYAMA, Michiko MIYASHITA, Raphael LWEMBE, Keiki OGINO, Tatsuo SHIODA, Hiroshi ICHIMURA. RANTES -28G delays and DC-SIGN -139C enhances AIDS progression in HIV-1-infected Japanese

hemophiliacs. *AIDS Research and Human Retroviruses.* 2007;23:713-9.

Nakayama EE, Carpentier W, Costagliola D, Shioda T, Iwamoto A, Debre P, Yoshimura K, Autran B, Matsushita S, Theodorou I. Wild type and H43Y variant of human TRIM5alpha show similar anti-human immunodeficiency virus type 1 activity both in vivo and in vitro. *Immunogenetics.* 2007 ;59:511-5.

Song H, Nakayama EE, Yokoyama M, Sato H, Levy JA, Shioda T. A single amino acid of the human immunodeficiency virus type 2 capsid affects its replication in the presence of cynomolgus monkey and human TRIM5alphas. *J Virol.* 2007;81:7280-5.

Sakuragi J, Sakuragi S, Shioda T. Minimal region sufficient for genome dimerization in the human immunodeficiency virus type 1 virion and its potential roles in the early stages of viral replication. *J Virol.* 2007;81:7985-92.

Koh Y, Matsumi S, Das D, Amano M, Davis DA, Li J, Leschenko S, Baldrige A, Shioda T, Yarchoan R, Ghosh AK, Mitsuya H. Potent inhibition of HIV-1 replication by novel non-peptidyl small molecule inhibitors of protease dimerization. *J Biol Chem.* 2007;282:28709-20.

Liu H, Nakayama EE, Theodorou I, Nagai Y,

Likanonsakul S, Wasi C, Debre P, Iwamoto A, Shioda T. Polymorphisms in CCR5 chemokine receptor gene in Japan. *Int J Immunogenet.* 2007;34:325-335.

Louisirirotchanakul S, Sutthent R, Wasi C, Chuenchitra T, Nitayaphan S, Brown AE, Polonis VR, Nakayama EE, Shioda T, Liu H, Takebe Y. Host Genetic Analysis of HIV-1 Subtype CRF01_AE(E)-Infected Thai Patients with Different Rates of Disease Progression. *AIDS Research and Human Retroviruses.* 2007;23:1605-1607

Sugimoto C, Nakayama EE, Shioda T, Villinger F, Ansari AA, Yamamoto N, Suzuki Y, Nagai Y, Mori K. Impact of Glycosylation on Antigenicity of Simian Immunodeficiency Virus SIV239: Induction of Rapid V1/V2 Specific Non-neutralizing Antibody and Delayed Neutralizing Antibody Following Infection with an Attenuated Deglycosylated SIV239 Mutant. *Journal of General Virology.* 2008;89:554-66.

Hosoya N, Miura T, Kawana-Tachikawa A, Koibuchi T, Shioda T, Odawara T, Nakamura T, Kitamura Y, Kano M, Kato A, Hasegawa M, Nagai Y, Iwamoto A. Comparison between Sendai virus and Adenovirus vectors to transduce HIV-1 genes into human dendritic cells. *Journal of Medical Virology.* in press

Nuanjun Wichukchinda, Emi E Nakayama,

Archawin Rojanawiwat, Panita Pathipvanich, Wattana Auwanit, Suthon Vongsheree, Koya Ariyoshi, Pathom Sawanpanyalert, and Tatsuo Shioda. Effects of CCR2 and CCR5 polymorphisms on HIV-1 infection in Thai females. *Journal of AIDS.* in press

Ken Kono, Haihan Song, Yasuhiro Shingai, Tatsuo Shioda and Emi E. Nakayama. Comparison of anti-viral activity of rhesus monkey and cynomolgus monkey TRIM5 α against HIV-2 infection. *Virology.* in press

Jun-ichi Sakuragi, Sayuri Sakuragi, Masahisa Ohishi, and Tatsuo Shioda. A rapid recombination assay of HIV-1 using murine CD52 as a novel biomarker. *Microbes and Infection.* in press

Nakayama, EE., Shingai, Y., Kono, K. and Shioda, T. TRIM5 α -independent anti-human immunodeficiency virus type 1 activity mediated by cyclophilin A in Old World monkey cells. *Virology.* In press

2. 学会発表

Song H, Nakayama EE, Yokoyama M, Sato H, Levy JA, Shioda T. A single amino acid of the human immunodeficiency virus type 2 capsid affects its replication in the presence of cynomolgus monkey and human TRIM5 α s. *Conference for Retrovirus and Opportunistic Infection 2008, Boston, USA.*

中山英美、塩田達雄。サイクロフィリン A の HIV-1 感染阻害効果。第 55 回日本ウイルス学会学術集会、札幌。

櫻木淳一・櫻木小百合・塩田達雄 HIV-1 ゲノム組換え標的の必要条件 第 55 回日本ウイルス学会学術集会、札幌。

大石真久・櫻木淳一・塩田達雄 HIV-1 のゲノム二量体化とウイルス粒子成熟との相関に関する研究 第 55 回日本ウイルス学会学術集会、札幌。

櫻木淳一・塩田達雄 HIV-1 ゲノム組換え標的の必要条件に関する解析 第 21 回日本エイズ学会学術集会、広島。

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

中和抗体によるエイズ発症阻止の研究

分担研究者 松下修三 熊本大学エイズ学研究センター 教授

研究要旨

我々は臨床分離株を用い、HIV-1 のエンベロープが三量体を形成し、中和抵抗性となることを報告した。一方、これらのウイルスの多くは、可溶性 CD4 の結合後に中和感受性の増強が観察される。我々は化血研と共同で中和単クローン抗体 KD-247 の臨床応用に向けた研究を展開しているが、本年度は、HIV-1 エンベロープの立体構造を変化させて、中和抗体の感受性を増強させる、低分子化合物の検索を行った。その結果、分子量 350 前後の低分子化合物 (NBD compounds) の中に sCD4 に似た立体構造変化を引き起こす、NBD-556 を見いだした。そして、NBD-556 が KD-247 の抗ウイルス効果を著しく増強することを証明した。現在、NBD-556 の基本的な性質の検索の継続とともに、臨床応用可能な中和抗体増強・低分子化合物の開発を行っている。KD-247 は米国にて第 I 相 b 試験中であり、今後の併用療法の可能性を示すものである。

A. 研究目的

抗ウイルス薬の多剤併用療法 (HAART 療法) は、AIDS の発症率や死亡率を低下させたが、治療の長期継続と関連して、薬剤耐性の蓄積や長期毒性などの問題がますます深刻となっている。HIV-1 のエンベロープ蛋白である gp120 は中和抗体の主要な標的であるが、gp120 に反応する中和抗体はループ構造を作る第 3 可変領域 (V3 loop: V3L) に反応する V3 抗体、CD4 結合部位に反応する CD4bs 抗体 (CD4 binding site antibody)、可溶性 CD4 分子 (soluble CD4: sCD4) 存在下に反応性が増強する CD4i 抗体 (antibodies to CD4 induced epitope) に分類されている。我々は化血研と共同でクレイド B ウイルスの 47% に反応するヒト型化中和単クローン抗体 KD-247 の臨床応用に向けた基礎研究を展開している。KD-247 は gp120 の V3-tip 部分に反応し、強力な中和活性を持つ単クローン抗体である。

HIV-1 は、その変異性によって、中和抗体から容易に

逃避すると考えられているが、HIV-1 感染症例に存在する中和抗体の多くは、エピトープが保存されていると考えられる場合においても、中和能がほとんど検出されないことが報告されている。このような事実は、臨床分離株が、さまざまな抗体に対して中和抵抗性であることとして知られている。この中和抵抗性のメカニズムに関して、さまざまな機序が研究されてきた。我々は最近、エンベロープが三量体を形成しその立体構造により、中和に重要なエピトープを遮蔽することが、臨床分離株の中和抵抗性に関与していることを示した (Shibata J et al., J. Virol. 81:3757-3768, 2007)。この研究のなかから、三量体構造による、立体遮蔽を解除し、中和抗体が中和エピトープに到達可能となれば、既に体内に存在する多くの抗体でウイルスを中和できるようになる可能性を考えた。また、このような化合物を開発することは、ウイルスの中和抗体からの逃避メカニズムを知る上でも重要なツールになる。また、今後臨床応用が予定されている、治療用

抗HIV-1抗体KD-247との併用薬剤としても有望となる。このように HIV-1 のエンベロープに立体構造変化を起こさせる低分子化合物を見つけ、それをリードコンパウンドとして、ウイルスがより中和抗体感受性となるような化合物を合成することが本研究の目的である。

B. 研究方法

低分子化合物および機能的エンベロープへの結合活性;東京医科歯科大学、生体材料工学研究所、機能分子部門、分子認識分野の玉村啓和教授との共同研究で HIV-1 のエンベロープに立体構造変化を起こさせる低分子化合物およびその誘導体の合成を行い、抗ウイルス効果と抗体の反応性の変化を調べた。HIV-1 はウイルス粒子上および慢性感染細胞表面に標的細胞に膜融合をおこす機能的エンベロープを持つことが知られている。HIV-1_{JR-FL} 株慢性感染細胞(PM1/JR-FL)の細胞表面に対する抗体の結合活性を sCD4 または低分子化合物の存在下または非存在下でインキュベートし、フローサイトメーター、FACSCalibur (Beckton-Dickinson) にて調べた。取り込んだデータは Cell Quest にて解析した。

Gp120 単量体に対する抗体の結合増強効果;低分子化合物および sCD4 の gp120 単量体に対する抗体の結合増強効果は gp120-capture ELISA をもちいて検討した。96well polypropyren plate (Falcon) に gp120-C5 sheep 抗体(D7324, Aalto Bioreagents, Dublin, Ireland) をコートし、blocking buffer でブロック後 1 μg/ml に希釈した単量体 gp120 (gp120-SF2; Austral Biologicals, San Ramon, California) を 50 μl ずつ加えた。2 時間室温に静置した後、ELISA wash buffer で 3 回洗浄し、gp120-captured plate とした。段階希釈した単クローン抗体を 0.5 μg/ml の sCD4 存在もしくは非存在下に 2 時間反応させ吸光度(405nm)を測定した。

低分子化合物の中和増強効果の測定;PM1/CCR5 細胞を標的細胞とし、HIV-1_{JR-FL} や他の臨床分離株を用いて、MTT assay で解析した。また、広範囲ウイルス中和抗体 KD-247 を用いて、この抗体の中和感受性の増強

効果を 2 種類の異なる synergy 判定法(Chou and Talalay's method と 3-Dimensional method)で確認した。

(倫理面での配慮)

本年度の研究は倫理的問題を含まないものである。

C. 研究結果

まず、はじめに HIV-1 エンベロープの立体構造を変化させて、中和抗体の感受性を増強させる化合物の検索を行った。ある種の侵入阻害剤が中和抗体の結合活性を上げることはこれまで報告されている(Zhao Q, et al., Virology, 339:213-25, 2005; Huang L., et al., AIDS Res Hum Retroviruses, 23:28-32, 2007)。この中から、特に、*N*-(4-Chlorophenyl)-*N'*-(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-yl)-oxalamide (NBD-556) を中心にして検討を行った。この化合物は、HIV-1 のエンベロープに存在する CD4 結合部位に、CD4 と競合的に結合することで、ウイルスの侵入を阻害する侵入阻害剤として報告されたが、ウイルス感染阻害効果は IC₅₀ で計算すると 5-30 μM 程度であり、CCR5 阻害剤などの現在開発中の侵入阻害剤に比べると、必ずしも活性が強いことを、我々の実験系で確認した。一方、NBD-556 は、熱力学的変化の測定により、今まで報告されたことのない程強い、CD4 結合時と同等の gp120 立体構造変化誘導能を持つことが、報告された(Schon A, Biochemistry, 45:10973-80, 2006)。 Schon らの報告は、熱力学的な検索に限られていたため、我々は、HIV-1_{JR-FL} に慢性感染した PM1 細胞に対する、抗 gp120 抗体の結合反応が、NBD-556 存在下に増強されるかどうかを、FACS 解析を用いて調べた。その結果、NBD-556 は CD4i 抗体や抗 V3 抗体の反応に関して、sCD4 存在下と同等の結合増強効果を示すことが観察された。このことは、NBD-556 が sCD4 と同様に、機能的エンベロープ三量体に立体構造変化を惹起し、ブリッジングシートや V3 エピトープの露出を引き起こした可能性を示す。一方、エンベロープ単量体に対する

NBD-556による反応性の増強の有無を、gp120-capture ELISAで調べたところ、sCD4が引き起こすのと同等の反応促進効果を示した。これらの結果から、このCD4 mimic small compound NBD-556は、sCD4結合時に引き起こされるエンベロープの立体構造変化に似た変化を誘導することが確認できた。

次に、HIV-1の増殖抑制に関して中和抗体KD-247との相乗効果を検討した。KD-247は、6種類のV3のtip部分を含むペプチドを連続してマウスに免疫することにより得られたもので、gp120の可変領域以外の部分をヒト型に置き換え、HIV-1感染者への臨床投与を目指して開発されて来た単クローン抗体である(Eda Y, et al., *J Virol* 80:5552-5562, 2006, *J Virol* 80:5563-5570, 2006)。NBD-556とKD-247を同時にウイルスと反応させて、それぞれ単独投与時と比較して、相乗効果が見られるかを2種類の異なるsynergy判定法(Chou and Talalay's method と 3-Dimensional method)で確認した。はじめに、KD-247とsCD4との組み合わせでR5ウイルスであるJR-FLを用いて、抗ウイルス効果を調べたところ、非常に強い相乗効果を示すことが分かった。次に、NBD-556について、同様の検討を行ったところ、こちらも非常に強いKD-247の抗ウイルス能増強効果を示した。特に、NBD-556は、sCD4と違い単独ではJR-FLに対する抗ウイルス能を持たないので、純粋にKD-247の中和能を高める役割を示したことが分かった。

D. 考察

分子量350前後の低分子化合物中にsCD4に似た立体構造変化を引き起こすものが存在し、しかもV3に対する中和抗体の抗ウイルス効果を増強する機能を持つことを証明した。現在、NBD-556に関する検討のひとつとして、この化合物がどのようにウイルスのgp120と結合しているかを予測するため、我々が新規に樹立したin vitro耐性誘導システムを用いて(Yoshimura K, et al., *AIDS*, 20:2065-2073, 2006)、化合物に耐性のウイ

ルスを誘導し、解析中である。同時にNBDの誘導体を合成し、より我々の目的にあった新規化合物の探索を進めている。すなわち、より低濃度で、強力に中和抗体の感受性を増強し、細胞毒性も低いものを追求している。

E. 結論

本年度の研究成果として、我々は、低分子化合物NBD-556がgp120の立体構造を大きく変化させ、中和抗体の反応性を増強することを証明した。これらの結果から、この化合物とその誘導体が非常に有望なHIVのエンベロープ構造変化誘導物質であることが示唆された。現在、引き続きNBD-556の基本的な性質の検索(結合部位の特定等)を行うと同時に、臨床応用を目指した、新規中和抗体増強低分子化合物の開発を継続している。

F. 健康危機情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Shibata J, Yoshimura K, Honda A, Koito A, Murakami T, Matsushita S.: Impact of V2 mutations for escape from a potent neutralizing anti-V3 monoclonal antibody during in vitro selection of a primary HIV-1 isolate. *J Virol*.81:3757-3768,2007
2. Nakayama E.E., Carpentier W, Costagliola D., Shioda T., Iwamoto A., Debre P, Yoshimura K, Autran B, Matsushita S, Theodorou I. Wild type and H43Y variant of human TRIM5 α show similar anti-human immunodeficiency virus type 1 activity both in vivo and in vitro. *Immunogenetics*. 59:511-515, 2007.
3. Gatanaga H, Hayashida T, Tsuchiya K, Yoshino M, Kuwahara T, Tsukada H, Fujimoto K, Sato I, Ueda

M, Horiba M, Hamaguchi M, Yamamoto M, Takata N, Kimura A, Koike T, Gejyo F, Matsushita M, Shirasaka T, Kimura S, Oka S.: Successful efavirenz dose reduction in HIV-1-infected individuals with cytochrome P450 2B6*6 and *26. *Clin Infect Dis.*45: 1230-1237, 2007.

4. Ryo A, Tsurutani N, Ohba K, Kimura R, Komano J, Nishi M, Soeda H, Hattori S, Perrem K, Yamamoto M, Chiba J, Mimaya J, Yoshimura K, Matsushita S, Honda M, Yoshimura A, Sawasaki, T, Aoki, I, Morikawa Y, Yamamoto N. SOCS1 is an inducible host factor during HIV-1 infection and regulates the intracellular trafficking and stability of HIV-1 Gag. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:294-299, 2008.

2. 学会発表

1. Matsushita S., Ikeda, T, Shibata J., Honda A., Koito K, Yoshimura. Persistence of proviral DNA and the integration sites of HIV-1 in patients on prolonged and effective HAART. 4th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. Sydney, Australia. June. 22-25, 2007.
2. Yoshimura, K., Shibata, J., Honda A., Tamamura, H., and Matsushita S.: A potent neutralizing anti-V3 monoclonal antibody, KD-247 shows favorable synergism with other antiretrovirals, sCD4 and CD4 mimic small compound in vitro. 4th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. Sydney, Australia. June. 22-25, 2007.
3. Nishida, Y., Shibata, J., Kazuhisa, Y., and Matsushita, S.: Broad neutralization against the HIV-1 subtype B panel of reference strains by human monoclonal antibodies established from an HIV-1-infected long-term non-progressor. 8th AIDS Seminar in Kumamoto. Sep 13-14, 2007. Aso, Kumamoto.
4. Shibata J, Yoshimura K, Matsushita S. :The single mutation in V2 domain affects quaternary structure of trimer gp120 and dramatically increases the sensitivity of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates to neutralizing antibodies. 8th AIDS Seminar in Kumamoto. Sep 13-14, 2007. Aso, Kumamoto.
5. Hatada, M., Yoshimura K, Shibata J, Matsushita S. HIV-1BaL mutants escaping neutralization from a potent neutralizing anti-V3 monoclonal antibody KD-247. . 8th AIDS Seminar in Kumamoto. Sep 13-14, 2007. Aso, Kumamoto.
6. Yoshimura, K., Shibata, J., Honda A., Tamamura, H., and Matsushita S.: A potent neutralizing anti-V3 monoclonal antibody, KD-247 shows favorable synergism with other antiretrovirals, sCD4 and CD4 mimic small compound in vitro. 8th AIDS Seminar in Kumamoto. Sep 13-14, 2007. Aso, Kumamoto.
7. Matsushita S.: Development of broadly reactive neutralizing monoclonal antibody KD-247: implications for passive immunotherapy. Tentative Program for the 3rd Japan-Germany HIV/AIDS Symposium. Nov. 26, 2007. Hiroshima.
8. Matsushita S., Nishida, Y., Shibata J., Honda A., Yoshimura, K: Broad cross-neutralization mediated by combination of anti-V3 and CD4 binding site antibodies in an HIV-1 infected patient with long-term non-progressive disease. 15th Conference on Retroviruses and Opportunistic infections. Feb. 3-6, 2008, Boston, USA

9. Yoshimura, K, Shibata J., Honda, A., Yamada, Y., Nasuo, H., Tamamura, H., Matsushita S.: In vitro induction of human immunodeficiency virus type 1 variants resistant to a low-molecular CD4 mimic compound, N-(4-Chlorophenyl)-N'-(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-yl)-oxalamide (NBD-556). 15th Conference on Retroviruses and Opportunistic infections. Feb. 3-6, 2008, Boston, USA.
10. 松下修三、西田吉辰、柴田潤二、畑田万紀子、吉村和久: 長期非進行症例(LTNP)における交叉中和のメカニズムの研究 I; 中和単クローン抗体の作成と解析. 第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2007.11.28-11.30. 広島.
11. 西田吉辰、柴田潤二、吉村和久、松下修三: 長期非進行症例(LTNP)における交叉中和のメカニズムの研究 II; 中和単クローン抗体の subtype B panel に対する交差中和活性. 第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2007.11.28-11.30. 広島.
12. 畑田万紀子、吉村和久、柴田潤二、松下修三: 強力な抗 HIV-1 gp120-V3 抗体 KD-247 に対する HIV-1BaL の中和逃避のメカニズム解析. 第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2007.11.28-11.30. 広島.
13. 柴田潤二、吉村和久、松下修三: 中和抗体高度抵抗性ウイルスを感受性にする変異は gp120 三量体構造に影響を与える。第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2007.11.28-11.30. 広島.
14. 吉村和久、柴田潤二、畑田万紀子、山田裕子、増野弘幸、玉村啓和、松下修三: CD4 mimic small compound と anti-HIV monoclonal antibody のウイルス中和における相乗効果。第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2007.11.28-11.30. 広島.

H. 知的所有権の出願・取得状況

特許出願; 1 件

発明の名称 「抗 HIV モノクローナル抗体」、整理番号; A71717A, 平成 19 年 11 月 19 日

分担研究報告書

非 B 型 HIV-1 感染小児のエイズ発症に影響を及ぼす因子に関する研究

—非 B 型 HIV-1 感染小児における薬剤耐性関連遺伝子変異の出現—

分担研究者 市村 宏

金沢大学大学院医学系研究科・教授

研究協力者 R.ルエンベ、R.リハナ

同上

・大学院生

研究要旨

非 B サブタイプ HIV-1 に感染しており、逆転写酵素阻害剤（RTI）による治療に抵抗性を示したケニアのエイズ孤児のウイルス RTI 耐性関連アミノ酸変異の出現パターンを明らかにすることを目的とした。ケニアの N 孤児院（ナイロビ市）において抗レトロウイルス療法を受けている HIV 感染小児 21 例から経時的に採取された血漿中のウイルス遺伝子を RT-PCR で増幅し、塩基配列を決定し、RTI 耐性関連アミノ酸変異の有無ならびにサブタイピングを行った。児に感染している HIV-1 のサブタイプは、A（12 例）、C（2 例）、D（6 例）と CRF02_AG（1 例）であった。NRTI 治療後最初に出現する薬剤耐性関連アミノ酸変異にはチミジン類似体に関連した変異（TAM）が最も多く、必ずしも M184V が最初に出現する訳ではなかった。また、異なる系列の TAM（M41L, L210W, T215Y と D67N, K70R, K219Q）の共存例が認められた。NNRTI（NVP または EFV）治療後最初に出現する薬剤耐性関連アミノ酸変異には K103N が最も多かったが、K101E/Q/R, K103S, Y188L などのアミノ酸変異が NVP 治療例でのみ認められた。以上の結果より、非 B サブタイプ HIV では、サブタイプ B とは異なる RTI 耐性関連アミノ酸変異の出現パターンをとる場合があることが示唆された。

A. 研究目的

逆転写酵素阻害剤（RTI）とプロテアーゼ阻害剤（PI）による強力な多剤併用療法が臨床の場に導入され、先進諸国において

はエイズによる死亡数は激減した。しかし、

これらの抗レトロウイルス剤（ARV）に対する耐性ウイルスが出現し、治療効果の消失やエイズ患者の予後不良という新たな

問題が生じている。これらの薬剤耐性ウイルスは性的接触や母子感染などで伝播し、HIV初感染・未治療者においても、薬剤耐性ウイルスの存在が明らかとなってきた。WHOの3 by 5イニシアチブなどにより抗レトロウイルス療法(ART)がアフリカなどの開発途上国へ積極的に導入され始めており、HIV-1薬剤耐性株の出現は、今後ますます大きな問題となってくることが予想される。

今回の研究では、非BサブタイプHIV-1に感染しているケニアの母子感染児においてウイルス薬剤耐性関連遺伝子変異とその出現パターンを検討し、非B型HIVのエイズ治療に重要な基礎的および臨床的データを提供することを目的とした。

B. 研究方法

対象:ケニアのN孤児院で生活している児93名の中で抗レトロウイルス療法(ART)を受けているHIV感染小児85名(平均治療期間:4.3年)のうち治療抵抗性を示した21名(男児14名、女児7名;平均年齢8.4歳、2007年8月現在)を対象とした。これらの児は誕生日までにN孤児院に入所

し、生後18ヶ月の時点でHIV抗体の存在が確認されており、これまでにARTの治療歴はない。

方法:これらの児から経時的に採取された血漿中のHIV-1逆転写酵素遺伝子領域(*pol-RT*)をRT-PCRで増幅し、直接またはクローニングした後、塩基配列およびアミノ酸配列を解析した。これらの領域における変異部位と関連する臨床的データおよびサブタイプBを基にした薬剤耐性のデータと比較検討した。

倫理面への配慮

本研究はケニア国の医学研究に関する研究審査委員会および倫理審査委員会と金沢大学医学部の倫理委員会の承認を受けている。

C. 研究結果

HIV-1感染サブタイプ

児に感染しているHIV-1のサブタイプ(RT領域)は、A(12例)、C(2例)、D(6例)とCRF02_AG(1例)であった。ART抵抗性を示した4例はA(2例)とD(2例)であった(表1)。

NRTI耐性関連変異(表1)

NRTI 治療後最初に出現する薬剤耐性関連アミノ酸変異にはチミジン類似体に関連した変異 (Thymidine analogue mutation (TAM):class 1 (M41L, L210W, T215Y) と class 2 (D67N, K70R, T215F, K219Q)) が最も多く見られた。サブタイプ B での報告とは異なり、3TC が含まれるレジメで治療しても必ずしも M184V が最初に出現する訳ではなく、また TAM 1 と TAM 2 の共存例が認められた。

NNRTI 耐性関連変異 (表 2)

NVP または EFV による治療後最初に出現する薬剤耐性関連アミノ酸変異には K103N が最も多かった。しかしながら、サブタイプ B での報告とは異なり、K101E/Q/R, K103S, Y188L などのアミノ酸変異が NVP 治療例でのみ見られた。

D. 考察

非サブタイプ B 型 HIV では、サブタイプ B 型 HIV とは異なる RTI 耐性関連アミノ酸変異の出現パターンをとる場合があることが示唆された。

E. 研究発表

1. 論文発表

- Yamada R, Ichimura H, et al.: Human papillomavirus infection and cervical abnormality in Nairobi, Kenya, an area with high prevalence of human immunodeficiency virus infection. *J Med Virol* (in press).
- Kageyama S, Ichimura H, et al.: HIV-2 amino acid substitutions in Gag and Env occurred simultaneously with viral load upsurge in a drug-naïve patient. *J Infect Chemother* (in press).
- Ndembu N, Ichimura H, et al.: Molecular Characterization of HIV-1 and HIV-2 in Yaounde, Cameroon: Evidence of Major Drug Resistance Mutations in Newly Diagnosed non-B Infected Patients. *J Clin Microbiol*, 46(1):177-84, 2008.
- Koizumi Y, Ichimura H, et al.: *RANTES* -28G delays and *DC-SIGN* -139C enhances AIDS progression in HIV-1-infected Japanese hemophiliacs. *AIDS Res Hum Retroviruses* 23(5):713-9, 2007.
- Lwembe R, Ichimura H, et al.: Anti retroviral drug resistance-associated

mutations among non-subtype B HIV-1 infected Kenyan children with treatment failure. *J Med Virol* 79(7):865-72, 2007.

2. 学会発表

・ *RANTES* -28G delays and *DC-SIGN* -139C enhances AIDS progression in HIV-1-infected Japanese hemophiliacs. H. Ichimura, et al. The 4th IAS conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. 2007. 7. Sydney.

・ Analysis of HIV-1 from 54 antiretroviral-naïve people in rural western Cameroon detected mutations conferring resistance to protease inhibitors to reverse transcriptase inhibitors (RTIs). N. Ndemi, Y. Koizumi, H. Ichimura, L. Kaptue. . The 4th IAS conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. 2007. 7. Sydney.

・ フィリピンにおける B 型肝炎ウイルスの Basal Core promoter 遺伝子変異と慢性 B 型肝炎に対するインターフェロン治療効果. 景山誠二、市村宏. 第 55 回日本ウイ

ルス学会学術集会. 2007. 10, 札幌.

・ ケニア・ナイロビの HIV 多発地域における HPV 感染と子宮頸部異常. 笹川寿之、市村宏. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会. 2007. 10, 札幌.

・ フィリピンにおける感染 HPV 型と細胞診異常の関連性. 宮下宙子、市村宏、他 6 名. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会. 2007. 10, 札幌.

・ DNA Chip 法とアンプリコアリニアアレイ HPV ジェノタイプングキットの比較検討. 松下香織、市村宏、他 6 名. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会. 2007. 10, 札幌.

・ Changes in the HIV-1 envelope gene from children in Kenya. R. Lwembe, H. Ichimura, et al. 第 21 回日本エイズ学会学術集会. 2007. 11, 広島.

・ 非 B サブタイプ HIV-1 の薬剤耐性遺伝子解析. 市村宏. 第 10 回白馬シンポジウム. 2008. 2. 金沢.

F. 知的財産権の出願・登録状況

特に予定なし。

Table 1. Patterns of NRTI-resistance mutations in non-B HIV-1-infected children according to treatment

ID/sex	Subtype	Regimen	Order of NRTI mutation Appearance (testing timepoints)					5th pt (months)
			1st pt (months)	2nd pt (months)	3rd pt (months)	4th pt (months)	5th pt (months)	
A041M	D		M184V (17)	N/D	N/D	N/A	N/D	N/D
A036M	D		M184V+1 TAM2 (6)	M184V+1 TAM2 (13)	M184V+1 TAM2 (18)	1 TAM2 (24)	1 TAM2 (24)	V118I+1 TAM1+2 TAM2 (66)
A083M	A		M184V+1 TAM1 (13)	M184V+1 TAM1+T69N (22)	M184V+1 TAM1+1 TAM2 (38)	M184V +1 TAM1+1 TAM2+T69N+ L74I (55)	N/D	N/D
A085F	02_AG		M184V+1 TAM2 (9)	M184V+1 TAM2 (12)	M184V+1 TAM1+1 TAM2(35)	M184V+1 TAM1+1 TAM2 (41)	M184V+1 TAM1+1 TAM2+V118S (47)	M184V+1 TAM1+1 TAM2+V118S (47)
A089F	A1		M184V+1 TAM1 (8)	2 TAM2 (13)	1 TAM1+1 TAM2+ D67E (21)	M184V+1 TAM1+3 TAM2 (28)	N/D	N/D
A079M	A1		none	M184V + V75M (10)	M184V+V75M (13)	M184V +T69I +V75M, (18)	N/D	N/D
A060F	A1	AZT/3TC	none	M184V (28)	N/D	N/D	N/D	N/D
A090F	D		none	M184V (9)	M184V (12)	M184V (44)	N/D	M184V+ 2 TAM2 (50)
A069M	A1		none	M184V (10)	1 TAM1+3 TAM2 (38)	N/D	N/D	N/D
A030F	A		4 TAM2 (31)	4 TAM2 (35)	4 TAM2 (45)	3 TAM2 (57)	4 TAM2 (77)	4 TAM2 (72)
A033F	A		1 TAM2 (23)	1 TAM2 (34)	M184V+ 3 TAM2 (60)	2 TAM2 (66)	2 TAM2 (72)	2 TAM2 (72)
A062M	A		2 TAM2 (6)	4 TAM2 (12)	4 TAM2 (22)	2 TAM2 (44)	4 TAM2 (50)	4 TAM2 (50)
A038M	C		1 TAM2 (8)	1 TAM1+3 TAM2 (15)	1 TAM1+3 TAM2 (17)	2 TAM1+3 TAM2 (23)	2 TAM1+3 TAM2 (48)	2 TAM1+3 TAM2 (48)
A056M	D		none	none	1 TAM1 (21)	M184V +2 TAM1 (27)	M184V+ 3 TAM1+1 TAM2 (33)	M184V+ 3 TAM1+1 TAM2 (33)
A048M	D		none	none	1 TAM2	N/A	N/A	M184V
A063M	A		none	none	none	none	2 TAM2 (56)	2 TAM2 (56)
A044M	A	AZT/DDI	4 TAM2 (11)	1 TAM1+2 TAM2+V75M (19)	1 TAM1+1 TAM2 (35)	1 TAM1+4 TAM2+V75M (42)	2 TAM1+3 TAM2+V75M (59)	2 TAM1+3 TAM2+V75M (59)
A068M	C		none	1 TAM1+T69D (54)	N/D	1 TAM1+2 TAM2+ T69D (66)	N/D	N/D
A042F	A	ABC/3TC	2 TAM2+ L74I (23)	1 TAM2+L74I (35)	1 TAM2 (47)	M184V + 3 TAM2+ L74I+ Y115F (71)	1 TAM2+ L74I (76)	1 TAM2+ L74I (76)
A010M	A		none	1 TAM1 (18)	1 TAM1+2 TAM2 (30)	1 TAM1+2 TAM2 (35)	N/D	N/D
A019M	D	D4T/3TC	M184V+1 TAM2 (17)	1 TAM1+1 TAM2 (38)	2 TAM1+2 TAM2+V118I (42)	1 TAM1+1 TAM2 (54)	1 TAM1+1 TAM2+ V118I (60)	1 TAM1+1 TAM2+ V118I (60)

TAM1: M41L, L210W, T215Y; TAM 2: D67N, K70R, T215F, K219Q; N/A: Not amplified; N/D: Not done

Table 2. Patterns of NNRTI- resistance mutations in non-B subtype HIV-1-infected children according to treatment

ID/sex	Age (years)	Regimen	0 (mo. bt)	1st (mo. pt)	2nd (mo. pt)	3rd (mo. pt)	4th (mo. pt)	5th (mo. pt)
A019M	19			K103S, G190A (18)	N/A	K103S (39)	K103S, G190A (43)	K103S (55)
A033F	11			K101Q (11)	K101Q (34)	K103N (60)	K103N (66)	K103N (72)
A038M	10			none	none	none	none	K101P, Y188L (47)
A041M	10			K103N (16)	N/D	N/D	N/D	N/D
A048M	10			N/A	K103N (24)			
A056M	9		K103N (-1, -4)	K103N (5)	K103N (9)	K103N (21)	N/D	N/D
A060F	8			none	none	none	K103N (28)	
A062M	8	NVP		G190A (6)	G190A (12)	G190A, Y181C (26)	K101P (48)	K101P, G190A (54)
A063M	8			none	none	none	K103N (56)	
A069M	6		K103N (-4)	K103N (10)	K103N (39)	N/D	N/D	N/D
A073F	4			K103N (24)	N/A	N/D	N/D	N/D
A079M	6			none	K101E, G190A (10)	K101E, Y181C, G190A (14)	K101E, Y181C, G190A (19)	N/A
A083M	5			K103N (12)	K103N (22)	K103N (38)	K103N (49)	K103N (54)
A085F	5			K103N (9)	K103N (12)	K103N (35)	K103N (41)	K103N (47)
A089F	2			K101E, G190A (7)	K101E (9)	K101E (12)	K101E, G190A (16)	N/D
A090F	2		Y181C (-25)	K103N (11)	K103N (13)	K103N (44)	K103N (50)	N/D
A030F	11			K103N (31)	K103N (35)	K103N (45)	K103N (57)	K103N (69)
A042F	10	EFV		none	none	K103N (64)	K103N (70)	
A044M	9		K103N (-3)	K103N, G190A(10)	K103N, G190A (18)	K103N (34)	K103N, G190A (58)	N/D
A036M	11			K103N (13)	K103N (16)	K103N, G190A (24)	K103N, G190A (34)	K103N, G190A (66)

N/A: Not amplified, N/D: Not done