

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

# HIV 感染症の治療開発に関する研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 滝口 雅文

平成20年(2008)年3月

# 目 次

## I. 総括研究報告書

HIV 感染症の治療開発に関する研究 -----	1
主任研究者 滝口 雅文 (熊本大学エイズ学研究センター センター長/教授)	

## II. 分担研究報告書

1. 細胞性免疫を用いた治療法の研究開発 -----	4
滝口 雅文 (熊本大学エイズ学研究センター センター長/教授)	
2. テーラーメイド治療ワクチンへ向けての基礎的・臨床的検討 -----	9
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 センター長)	
3. CCR5 阻害剤などの新規の機序で抗ウイルス効果を発揮する AIDS 治療薬の研究開発 --	13
満屋 裕明 (熊本大学医学薬学研究部 教授)	
4. 逆転写酵素およびプロテアーゼ以外を標的とする新規抗エイズ薬の研究 -----	21
馬場 昌範 (鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 教授)	
5. HIV に対する新規薬剤開発 -----	31
松岡 雅雄 (京都大学ウイルス研究所 教授)	
6. 中和抗体の治療応用に関する基礎研究 -----	36
松下 修三 (熊本大学エイズ学研究センター 教授)	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	43
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	49
-----------------------	----

# I . 総括研究報告書

## HIV 感染症の治療開発に関する研究

主任研究者：滝口 雅文（熊本大学エイズ学研究センター センター長/教授）

分担研究者：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 センター長）

満屋 裕明（熊本大学大学院医学薬学研究部 教授）

馬場 昌範（鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 教授）

松岡 雅雄（京都大学ウイルス研究所 教授）

松下 修三（熊本大学エイズ学研究センター 教授）

### 研究要旨

耐性ウイルスに対応できるような新規薬剤の開発や薬剤以外の新たな治療法の開発のため、柱 1：耐性ウイルスに対応できる新規薬剤の研究開発と、柱 2：HIV-1 特異的免疫を用いた新しい治療法の研究開発の 2 つの柱で研究をおこなった。その結果、以下のような成果が上げられた。1) 新規のプロテアーゼ阻害剤 darunavir の開発を行い、2006 年 6 月に米国 FDA に新薬として認可された後、2007 年 11 月に日本でも新薬として承認された。2) 新規ナフタレン誘導体の JTK-101 に選択的な抗 HIV-1 効果を同定した。この JTK-101 は Tat の cofactor に作用するものと思われた。3) インテグラーゼ阻害剤 JTK303 に対する耐性変異が、他のジケト構造を有するインテグラーゼ阻害剤に対して交叉耐性を有することを明らかにした。また JTK303 は、第 3 相臨床試験を米国で開始した。4) 強い HIV-1 増殖抑制能を持った Nef138 特異的 CTL は、逃避変異が出るまではウイルス量を低下させること、またこの逃避 HIV-1 に対する新たな CTL の誘導を確認した。5) KD-247 抗体の逃避エピトープを明らかにした、また 20 種類の新たな中和抗体をクローニングした。

### A. 研究目的

薬剤耐性ウイルスの出現というエイズ治療における大きな問題が出現してきた。このため、耐性ウイルスに対応できるような新規薬剤の開発や薬剤以外の新たな治療法の開発が強く求められている。本研究班では、1) 柱 1：耐性ウイルスに対応できる新規薬剤の研究開発、2) 柱 2：HIV-1 特異的免疫を用いた新しい治療法の研究開発の 2 つの柱を置き、この両面からエイズの治療に貢献できる成果を目指した研究をおこなう。

### B. 研究方法

1) 柱 1：耐性ウイルスに対応できる新規薬剤の研究開発

・既に米国で認可された新規プロテアーゼ阻害剤 darunavir の日本国内で認可申請をする。また darunavir の阻害機序を解明する。

・HIV-1 プロウイルス DNA からの遺伝子発現を抑制する薬剤を探索した

・インテグラーゼ阻害剤の耐性変異の酵素学的、構造学的解析をおこなった。

2) 柱 2：HIV-1 特異的免疫を用いた新しい治療法の研究開発

・Replication suppression assay を使い、強い HIV-1 増殖抑制能を有した CTL を同定する。更にこの CTL に耐性な HIV-1 の出現を調べ、更にその逃避ウイルスに対する CTL の誘導を調べる。

・強い中和活性能を有した KD-247 の逃避変異エピトープの解析をおこなう。また新たな中和単クローン抗体を作製する。

（倫理面への配慮）

現時点では柱 2 の免疫療法の開発が対象となるが、既にその一部は各施設の倫理委員会の承認を受けている。患者の血液を用いて行なう研究に関しては、これらの倫理委員会が規定する指針に従って行なう。国立国際医療センター：今までの基礎検討となる研究は、以下の国立国際医療センター倫理委員会の承認を得

てきた。1) AIDS に併発した悪性リンパ腫に対する免疫細胞療法 平成 15 年 6 月 13 日承認 (承認番号 162)・DC ワクチンによる免疫誘導法の開発、2) HIV 感染症の進行阻止に関わる宿主因子の探索 平成 14 年 10 月 8 日 (遺伝子解析研究 承認番号 45)・長期未発症者に関する遺伝子解析 熊本大学: HLA の遺伝子解析に関しては、以下の熊本大学倫理委員会の承認を得ている。HIV 感染の免疫防御に関わるヒト遺伝子の検索研究 平成 16 年 7 月 16 日 (ヒトゲノム 48 号)

### C. 研究結果

1) 柱 1: 耐性ウイルスに対応できる新規薬剤の研究開発

新規のプロテアーゼ阻害剤 darunavir は、臨床試験 Phase III を経て 2006 年 6 月に米国 FDA に新薬として認可されたが、今年度日本でも認可申請が承認されて実用化が実現した。一方、darunavir のプロテアーゼ阻害機序を調べたところ、プロテアーゼの重合阻害であることが明らかになった。新規ナフタレン誘導体の JTK-101 に選択的な抗 HIV-1 効果を同定した。JTK-101 は Tat による HIV-1 の活性化を強力に阻害すること、その抗ウイルス効果と細胞内 cyclin T1/CDK9 の発現量に強い相関がみられたことなどから、JTK-101 は Tat の cofactor に作用するものと思われた。インテグラーゼ阻害剤に対する耐性一次変異はインテグラーゼの立体構造上、酵素活性中心近傍に導入されており、同時に LTR 組み込み活性 (strand transfer activity) を低下させていた。二次変異が一次変異の外側に導入されており、酵素活性を補正すると考えられた。JTK303 に対する耐性変異が、他のジケト構造を有するインテグラーゼ阻害剤に対して交叉耐性を有することを明らかにした。

2) 柱 2: HIV-1 特異的免疫を用いた新しい治療法の研究開発

細胞性免疫を用いた治療法の開発の研究では、Nef による HLA クラス I 抗原の発現低下の影響を受けない強い HIV-1 増殖抑制能を有した 5 種類の CTL の存在を明らかにしたが、このうち HLA-A\*2402 拘束性 CTL エピトープである Nef138 に対する CTL から逃避する HIV-1 に対する新たな CTL の誘導を確認し、免疫逃避ウイルスに対する治療法の可能性を示唆した。また急性 STI 患者を用いた研究

で、この CTL は感染 1 年程度では HIV-1 の増殖抑制に関与しているが、その後逃避変異が出てくるとウイルス抑制に関与しないことが分かった。

抗体を用いた治療法の研究開発では、KD-247 に対する中和逃避ウイルスの誘導をおこない、抗体濃度が比較的低濃度の時は、V2 の変異により中和抗体から逃避し、高濃度になると V3-tip に変異が入る事がわかった。V2 領域の P175L という変異が、エンベロープ 3 量体構造を変えることにより、中和抵抗性を与えることを証明した。また、交叉中和活性の強い長期非進行症例から 20 種類の中和単クローン抗体を樹立した。

### D. 考察

まず柱 1 の耐性ウイルスに対する新規薬剤の開発では、満屋によって開発された新規のプロテアーゼ阻害剤 darunavir が、2006 年 6 月に米国 FDA の新薬として承認されたのに引き続き、2007 年 11 月に日本も新薬承認がされ実用化が実現した。このことは本班の大きな成果といえる。またこの darunavir がプロテアーゼの二量体を阻害する新たな機序による薬剤であることを明らかにしたことは今後のプロテアーゼ阻害剤の開発に大きな将来性を挙げたと考えられる。

柱 2 では、強い HIV-1 増殖抑制能を示す Nef138 特異的 CTL は逃避変異が見られない時期にはウイルス量を低下させるが、逃避変異が出現するとこれを認識する CTL が誘導されるのも関わらずウイルス量が低下させることが出来ないことが明らかになった。このためこの逃避ウイルスに対して新たに認識する CTL による治療法の開発をどのように進めるか今後の課題であり、他のエピトープに関しての解析も重要である。中和抗体の研究では、KD-247 の逃避エピトープの解析も進み、更に新たな中和抗体クローンの作成に成功し、多角的に中和抗体の解析が必要である。

### E. 結論

1) 新規のプロテアーゼ阻害剤 darunavir は、2006 年 6 月に米国 FDA に新薬として認可された後、2007 年 11 月に日本でも新薬として承認された。

2) 新規ナフタレン誘導体の JTK-101 に、選択的な抗 HIV-1 効果を同定した。この

JTK-101 は Tat の cofactor に作用するものと思われた。

3) 強い HIV-1 増殖抑制能を持った Nef138 特異的 CTL は、逃避変異が出るまではウイルス量を低下させること、またこの逃避 HIV-1 に対する新たな CTL の誘導を確認した。

4) KD-247 の逃避エピトープを明らかにした、また 20 種類の新たな中和抗体をクローニングした。

#### **F. 健康危険情報**

なし

#### **G. 研究発表**

別紙

#### **H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）**

松下修三 特許出願；「HIV-1 中和単クローン抗体」平成 19 年 11 月 27 日

## Ⅱ. 分担研究報告書

厚生労働省科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）  
分担研究報告書

細胞性免疫を用いた治療法の研究開発

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・センター長）

**研究要旨**

CTLによる免疫圧により HIV-1 の増殖は抑制されるが、一方逃避変異ウイルスが選択されることにもなる。この逃避変異ウイルスが一度出現するとこの変異を認識する CTL は新たには誘導されないと考えられ、免疫治療を考える上で大きな問題となる。HIV-1 感染者の経過を長期観察し、感染1年ほどして出現してから、強い HIV-1 増殖抑制能を持った CTL の逃避変異は出現し、この変異エピトープに対して特異性をもったあらたな CTL が誘導されることを明らかにした。しかしこの逃避変異エピトープ特異的 CTL の変異ウイルスの増殖抑制能は、このワイルドタイプ (WT) に対する CTL の WT ウイルスの増殖抑制能と比べて低下しており、体内での変異ウイルスの抑制力は弱いと考えられた。今後免疫療法を考えるには、逃避エピトープを持ったウイルスの増殖を強く抑制する CTL の誘導の検討が必要である。

**A. 研究目的**

薬剤耐性ウイルスの出現というエイズ治療における大きな問題が出現してきた。このため、耐性ウイルスに対応できるような薬剤以外の新たな治療法の開発が強く求められている。そこで強い HIV-1 の増殖抑制能を示す CTL を明らかにし、これらを用いた治療法の開発を考える。またこれらの CTL から逃避するウイルスに特異的に反応する CTL の誘導を検討する。

**B. 研究方法**

Replication suppression assay を使い、強い HIV-1 増殖抑制能を有した CTL を同定する。この CTL に逃避する HIV-1 の出現を調べる。また逃避エピトープに対する CTL の出現が見られるかテトラマーを用いて調べる。さらに、逃避エピトープを認識する CTL の逃避エピトープを持った HIV-1 の増殖抑制能を調べる。

(倫理面への配慮)

患者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および熊本大学の倫理委員会での承認を得た。

**C. 研究結果**

1. Nef138 特異的 CTL による HIV-1 増殖抑制能  
4 種類の HLA-A\*2402 拘束性 CTL エピトープに特異的な CTL クローンを用いて、HIV-1 の増殖抑制能を調べた。その結果、Nef138 特異的 CTL のみが、HIV-1 感染 CD4T 細胞を用いた場合強い HIV-1 増殖抑制能があることが明らかになった(図1)。

2. Nef138 逃避エピトープ

この CTL による逃避エピトープの選択の可能性を探るために、このエピトープ部位のシークエンスをし、HLA-A\*2402 を持っている患者と持っていない患者で差がでないか検討した。その結果、エピトープの2番目の Thy から Phe に変異している場合が HLA-A\*2402 を持っている患者に有意に多いことが明らかになった。このためこの 2F 変異が逃避エピトープである可能性が示唆された(図2)。

そこで、NL432 の Nef138 の2番目を F に変異させたウイルス (NL432-2F) を作製し、Nef138 特異的 CTL によるこのウイルス増殖抑制能を調べた。その結果、Nef138 特異的 CTL による NL432-2F ウイルスの増殖抑制能は全く見られなかった。このことから、Nef138-2F は



逃避変異エピトープと考えられた。

### 3. Nef138-2F 逃避エピトープに対する CTL の誘導とその機能

Nef138-2F 逃避エピトープウイルスが出現している患者に、新たにこのエピトープに対する CTL が誘導されるかを調べる目的で、Nef138 のワイルドタイプ (WT) のペプチドを用いて作製したテトラマー (緑のアビジン) と Nef138-2F のペプチドを用いて作製したテトラマー (赤のアビジン) を用いたテトラマー競合試験を確立した。このテトラマー競合試験を用いて、感染初期は WT ウイルスに感染したが途中で 2F 変異ウイルスが出現してきた患者での特異的 CTL を調べたところ、感染初期には WT 特異的 CD8T 細胞が出現していたが、2F ウイルスが出現すると 2F 特異的 CD8T 細胞が出現していた (図 3)。これらのことから、患者体内で出現した逃避ウイルスに対する新たな CTL が誘導できることが確認できた。

次にこの 2F 特異的 CTL の 2F ウイルスと WT ウイルスに対する増殖抑制能を調べた。その結果 2F ウイルスの増殖を部分的には抑制するが、WT ウイルスの増殖抑制能と比べて明らかに弱かった。

### D. 考察

本研究により、強い HIV-1 増殖抑制能をもつ CTL が選択する逃避変異エピトープに対するあたらな CTL が誘導されることが明らかになった。しかし WT 特異的 CTL が WT ウイルスの増殖を抑制する能力と比べて、逃避変異エピトープ特異的 CTL が逃避変異ウイルスの増殖を抑制する能力は明らかな低下していた。このことはこれらの患者では 2F ウイルスが出現するとウイルス量が増加する傾向があることから明らかなように、逃避変異エピトープ特異的 CTL では逃避変異エピトープ特異的 CTL では体内でのウイルス増殖を抑制できないことを意味している。これらの逃避エピトープに対して強い認識を示す CTL の誘導方法の検討が、今後の免疫療法の開発には重要である。

### E. 結論

1) HLA-A\*2402 拘束性 Nef138 特異的 CTL は、強い HIV-1 増殖抑制能を持っていること、またこの CTL により Nef138-2F 逃避変異が選択された。

2) 患者体内に出現した Nef138-2F 逃避変異に対してあたらな CTL が誘導できることが明らかになった。この Nef138-2F 特異的 CTL は Nef138-2F 逃避変異ウイルスの増殖を部分的に抑制した。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1) 論文発表

1. Ueno, T., Idegami, Y., Motozono, C., Oka, S. and Takiguchi, M. Altering effects of antigenic variations in HIV-1 on antiviral effectiveness of HIV-specific CTLs **J. Immunol.** 178: 5513-5523, 2007
2. Fujiwara, M. and Takiguchi, M. HIV-1-Specific CTLs Effectively Suppress Replication of HIV-1 in HIV-1-infected Macrophages, **Blood** 109:4832-4838, 2007
3. Fujiwara, M., Tanuma, J., Koizumi, H., Kawashima, Y., Honda, K., Mastuoka-Aizawa, S., Dohki, S., Oka, S. and Takiguchi, M. Different Ability of Escape Mutant-Specific Cytotoxic T Cells to Suppress Replication of Escape Mutant and Wild-type HIV-1 in New Hosts, **J. Virol.** 82: 138-147, 2008
4. Kawashima, Y., Satoh, M., Oka, S., Shirasaka, T. and Takiguchi, M. Different immunodominance of HIV-1-specific CTL epitopes among 3 subtypes of HLA-A\*26 associated with slow progression to AIDS, **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 366: 612-616, 2008
5. Ueno, T., Motozono, C., Douki, S., Mwimanzu, P., Rauch, S., Fackler, OT., Oka, S. and Takiguchi, M. Cytotoxic T lymphocyte-mediated selective pressure influences dynamic evolution and pathogenic functions of HIV-1 Nef, **J. Immunol.** 180:1107-1116, 2008
6. Tsukamoto, T., Douki, S., Ueno, T., Kawada, M., Takeda, A., Yasunami, M., Naruse, T., Kimura, A., Takiguchi, M.\* and Matano\*, T. Determination of a major histocompatibility complex class I restricting simian

immunodeficiency virus Gag<sub>241-249</sub> epitope,  
AIDS In press

HIV-1-specific CTL in vitro and in vivo,  
Center for AIDS Research, Kumamoto  
University, 10th Anniversary Symposium  
(Kumamoto, Japan) November 15-16, 2007

2) 国際学会での発表

1. Hachiya, A., Kodama, E., Sarafianos, SG, Schuckman, M., Matsuoka, M., Takiguchi, M., Gatanaga, H. and Oka, S. A novel mutation, N348I in HIV-1 reverse transcriptase induced by NRTI treatment, confers Nevirapine resistance. 14<sup>th</sup> Conference on retrovirus and opportunistic infections. (Los Angeles, CA, USA) February 25-28, 2007.
2. Fujiwara, M., Tanuma, J., Kawashima, Y., Koizumi, H., Honda, K., Oka, S. and Takiguchi, M. Responses of cytotoxic T cells to escape mutation of immunodominant HIV-1 Nef epitope, Keystone Symposia HIV Vaccines(Whistler, Canada) March 25-30, 2007
3. Kawashima, Y., Fujiwara, M., Gatanaga, H, Hachiya, A., Kitano, M., Oka, S. and Takiguchi, M. Control of HIV-1 replication by strong immune pressure via HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and appearance of lower fitness virus in long-term non-progressing hemophiliacs, Keystone Symposia HIV Vaccines(Whistler, Canada) March 25-30, 2007
4. Honda, K., Koizumi, H., Dohki, S., Kitano, M., Iwatani, T., Oka, S. and Takiguchi, M. Strong ability of HLA-C\*1202-restricted cytotoxic T lymphocytes to suppress HIV-1 replication, 4th International AIDS Society Conference 2007(Sydney, Australia) July 22-26, 2007
5. Ueno, T., Motozono, C., Douki, S., Rauch, S., Mwimanzi, P., Fackler, OT., Oka, S. and Takiguchi, M. CTL-mediated selective pressure influences dynamic evolution and pathogenic functions of HIV-1 Nef, 8th AIDS Seminar in KUMAMOTO (Kumamoto, Japan) September 13-14, 2007
6. Hachiya, A., Kodama, E., Sarafianos, SG, Schuckmann, MM., Sakagami, Y., Gatanaga, H., Matsuoka, M., Takiguchi, M., Oka, S. Amino Acid Mutation, N348I in the Connection Subdomain of HIV-1 Reverse Transcriptase (RT), Confers Multi-class Resistance to Nucleoside and Nonnucleoside RT Inhibitors. 8th Annual Symposium Antiviral Drug Resistance 2007 (Richmond, Virginia, USA) November 11-14, 2007
7. Takiguchi, M., Control of HIV-1 by

H. 知的所有権の出願・取得状況

なし

図 1. Nef138 特異的 CTL クローンによる HIV-1 増殖抑制能

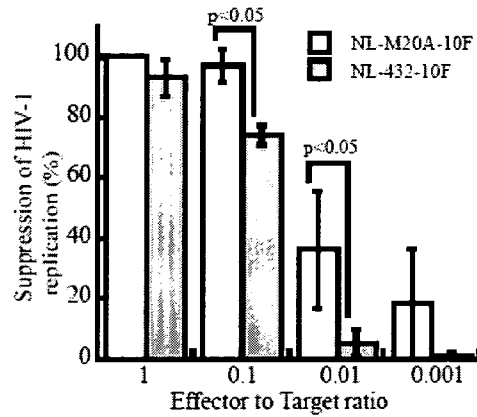


図 2. Nef138 エピトープ部位の変異

- A. HLA-A\*2402 陽性及び陰性感染者における Nef138 エピトープの変異  
 B. HLA-A\*2402 陽性と陰性感染者間で 変異出現の有意差  
 C. 血友病患者での Nef138-2F 変異の出現

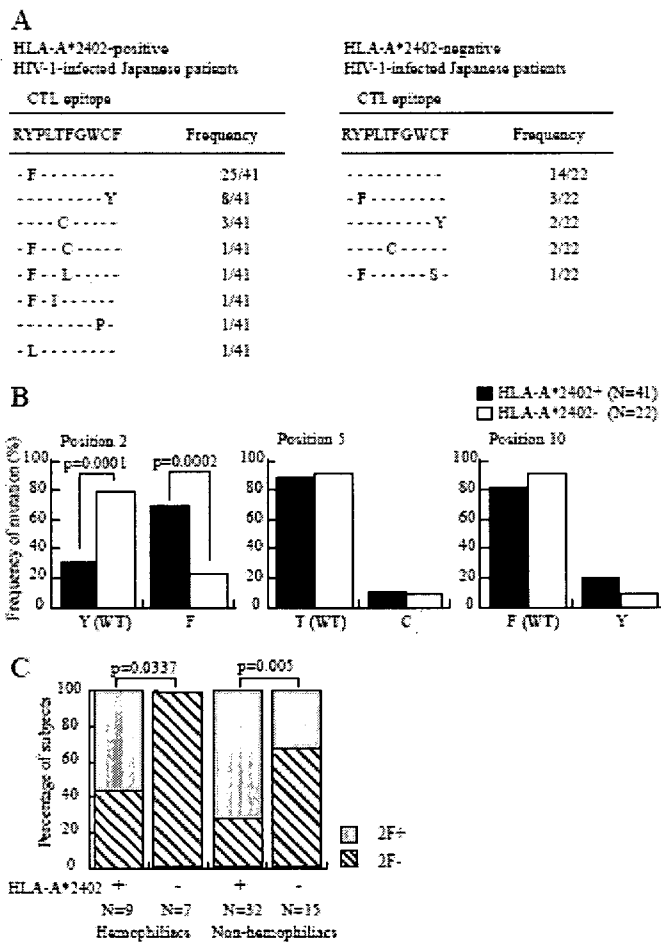
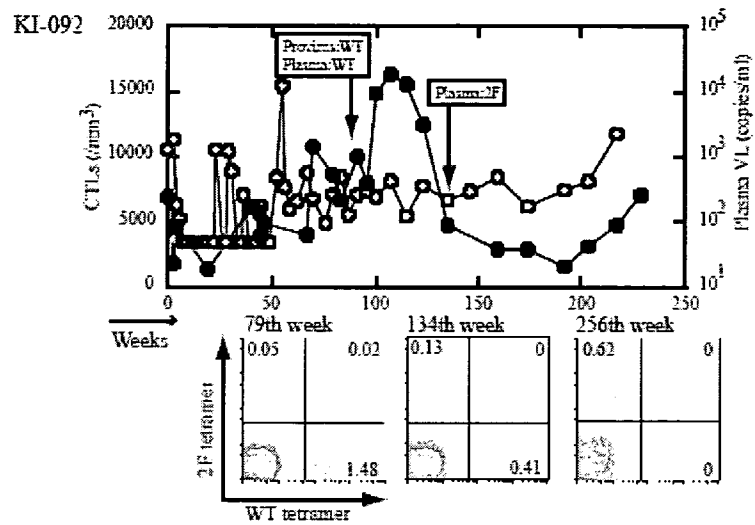


図 3. WT ウイルスに感染した患者 KI-092 での Nef138 および Nef138-2F 特異的 CTL の出現



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

テーラーメイド治療ワクチンへ向けての基礎的・臨床的検討に関する研究

分担研究者：岡 慎一（国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センター長）

研究協力者：井田節子（国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センター）

**研究要旨** テーラーメイド治療ワクチン開発へ向けての基礎検討として、今年度は、免疫賦活に適した HLA の再検討をおこなった。その結果、長期未発症者は HLA-B51/B61 保有者が多く、エイズ発症者には HLA-B60 保有者が多いことがわかった。この中で、B61 と B60 の nef における CTL epitope は、nef92-100 を共有していた。病状の進行が早い B60 保有者では 34% の患者で nef L100M の変異が見られたが、slow progressor の B61 の患者では、この変異は見られなかった。今後この変異の意味づけについて検討したい。

**A. 研究目的**

本研究は、テーラーメイド治療ワクチン開発を目的としている。H18 年度は、基礎・臨床的検討として、GMP grade 試薬を用いた mature DC の作成法を確立し、HLA-B51 患者に対する治療ワクチンを検討していた。ところが、対処患者とするべき B51 患者の持つウイルスは、長期未発症者を除き対象となる CTL epitope はすべて escape していた。そこで、H19 年度は、もう一度免疫賦活に適した HLA の選定を行い、治療ワクチンの対象者を再選定することとした。

**B. 研究方法**

病状の進行に関連する HLA を選定するために、血友病 96 名について slow progressor とそれ以外の HLA 分布、及びエイズで死亡した患者の HLA 解析を行い対比した。Slow progressor の定義は、1) 98 年まで無治療かつ 2) 98 年の CD4 数の median が 350/ml 以上で、VL の median が 10<sup>4</sup>/ml 以下とした。

CTL epitope に関し、nef 領域について sequence を行い、escape variant について検討した。

（倫理面への配慮）

臨床研究に関し通常の日常診療以外に採血が生じる患者からは、すべて文書による同意を得ている。また、患者のプライバシーが漏れないよう考慮した。

**C. 研究結果**

1. Slow progressor の HLA : 96 名の血友病患者のうち slow progressor は 17 名であった。このうち HLA-B51 保有者が 8 名、B61 は 6 名であったが、4 名が B51/B61 保有者であった。B51 の allele 頻度は 23.5% で、日本人の allele 頻度 7.9% に比べ有意に高かった。

2. 死亡者の HLA : 40 名のエイズによる死亡者の解析では、HLA-B61 が 16.3% と日本人の頻度 5.1% に比べ有意に高かった。HLA-B61 と B60 は、nef 92-100 の CTL

epitope を共有していた。

3. Nef sequence : HLA-B51 の 33 名および HLA-B60 の 44 名に関し nef の sequence 解析を行った。HLA-B51 に関しては、B51/B61 の 10 名と B51 単独 23 名に関しては、差はなく、特に B61 の 10 名を見ると

Nef92-100 KEKGGLEGL 9 名

—————I 1 名

であったが、B60 保有者 44 名では、

Nef92-100 KEKGGLEGL 25 名

—————M 15 名 (34%)

—————I 1 名

と L100M の変異を持つ患者が見られた。

B51 の nef epitope は、4 カ所あったが、一定の傾向は認められなかった。

#### D. 考察

前年度まで検討していた HLA-B51 の pol の CTL epitope は、強力ではあったがすでに slow progressor においてはすべて escape していたため、治療ワクチンの対象にはなりにくいことがわかっていた。今回の検討から、HLA-B51/B61 を持っている患者に slow progressor が多く、B51 と B61 の double escape が fitness を落としている可能性が考えられた。このため、epitope の近い部位での解析が重要と考えられる。もう一点は、死亡者に B60 が多かったことであるが、B61 と B60 は、nef の epitope を共有しておりこの部位の解析から、エイズ患者に多い B60 では L100M が多かったことは、この変異が病状の進行に関連していた可能性を示唆している。今後この変異に関する検討が重要であろう。

今回の検討の限界は、解析対象が厳密な意味でのコホートではないことと、N 数が少ないこと、血友病での結果がそれ以外に適応できるか

どうか不明な点である。特に厳密な意味でのコホートでない点に関しては、データの解釈に慎重になる必要がある。

今後 L100M の変異の意味づけを検討する必要はあるが、HLA-B60 保有者に対するペプチドワクチンの可能性を示唆しているであろう。

#### E. 結論

slow progressor とエイズで死亡した患者の HLA 解析の対比から、HLA-B60 および B61 の共通した nef epitope 解析からペプチドワクチンの候補となりうる L100M 変異を見いだした。

#### F. 健康危険情報：なし

#### G. 研究発表

1. Bi X, Gatanaga H, Koike K, Kimura S, and Oka S. Reversal periods and patterns from drug resistant to wild type HIV-1 after cessation of anti-HIV therapy. *AIDS Res Hum Retrovirus* 23: 43-50, 2007.
2. Yamanaka H, Gatanaga H, Kosalaraksa P, Matsuoka-Aizawa S, Kimura S, and Oka S. Novel mutation of human polymerase  $\gamma$  associated with mitochondrial toxicity induced by anti-human immunodeficiency virus treatment. *J Infect Dis* 195: 1419-1425, 2007.
3. Gatanaga H, Yazaki H, Tanuma J, Honda M, Genka I, Teruya K, Tachikawa N, Kikuchi Y, and Oka S. HLA-Cw8 primarily associated with hypersensitivity to nevirapine. *AIDS* (correspondence) 21: 264-265, 2007.

4. Honda M, Yogi A, Ishizuka N, Genka I, Gatanaga H, Teruya K, Tachikawa N, Kikuchi Y, and **Oka S**. Effectiveness of subcutaneous growth hormone in HIV-1 patients with moderate to severe facial lipoatrophy. *Intern Med* 46: 359-362, 2007.
5. Gatanaga H, Ibe S, Matsuda M, Yoshida S, Asagi T, Kondo M, Sagamatsu K, Tsukada H, Masakane A, Mori H, Takata N, Minami R, Tateyama M, Koike T, Itoh T, Imai M, Nagashima M, Gejyo F, Ueda M, Hamaguchi M, Kojima Y, Shirasaka T, Kimura A, Yamamoto M, Fujita J, **Oka S**, and Sugiura W. Drug-Resistant HIV-1 Prevalence in Patients Newly Diagnosed with HIV/AIDS in Japan. *Antiviral Res* 75: 75-82, 2007.
6. Vasilescu A, Terashima Y, Enomoto M, Heath S, Poonpiriya V, Gatanaga H, Do H, Diop G, Hirtzig T, Charneau P, Marullo S, **Oka S**, Kanegasaki M, Lathrop M, Matsushima K, Zagury JF, and Matsuda F. A haplotype of the human CXCR1 gene protective against rapid disease progression in HIV-1 patients. *PNAS* 104: 3354-3359, 2007
7. Ueno T, Idegami Y, Motozono C, **Oka S**, and Takiguchi M. Altering effects of antigenic variations in HIV-1 on antiviral effectiveness of HIV-specific CTLs. *J Immunol* 178: 5513-5523, 2007.
8. Koike K, Tsukada K, Yotsuyanagi H, Moriya K, Kikuchi Y, **Oka S**, and Kimura S. Prevalence of coinfection with human immunodeficiency virus and hepatitis C virus in Japan. *Hepatol Res* 37: 2-5, 2007.
9. The ESPRIT Research Group (Kikuchi Y, Takano M, **Oka S** as members of Japan National Trial Coordinating Center). Predictors of CD4 count change over 8 months of follow up in HIV-1-infected patients with a CD4 count >300 cells/ $\mu$ l who were assigned to 7.5 MIU interleukin-2. *HIV Med* 8: 112-123, 2007.
10. Gatanaga H, Hayashida T, Tsuchiya K, Yoshino M, Kuwahara T, Tsukada H, Fujimoto M, Sato I, Ueda M, Horiba M, Hamaguchi M, Yamamoto M, Takata N, Kimura A, Koike T, Gejyo F, Mastushita S, Shirasaka T, Kimura S, and **Oka S**. Successful dose reduction of efavirenz in HIV-1-infected cytochrome P450 2B6 \*6 and \*26 holders. *Clin Infect Dis* 45: 1230-1237, 2007.
11. Katano H, Sato Y, Hoshino S, Tachikawa N, **Oka S**, Morishita Y, Ishida T, Watanabe T, Rom WN, Mori S, Sata T, Weiden MD, and Hoshino Y. Integration of HIV-1 caused STAT3-associated B cell lymphoma in an AIDS patient *Microbes Infect* 9: 1581-1589, 2007.
12. Fujiwara M, Tanuma J, Koizumi H, Kawashima Y, Honda K, Matsuoka AS, Dohki S, **Oka S**, and Takiguchi M. Accumulation of HIV-1 escape mutant by different responses of escape mutant-specific cytotoxic T cells to escape mutant and wild-type HIV-1 in new

- hosts. *J Virol* 82: 138-147, 2008.
13. Hayashida T, Gatanaga H, Tanuma J, and Oka S. Compromising effect of low HIV-1 load and antiretroviral treatment on IgG-capture BED-enzyme immunoassay. *AIDS Res Hum Retrovirus* (in press)
14. Ueno T, Motozono C, Douki S, Mwimanzi, Rauch S, Fackler OT, Oka S, and Takiguchi M. Cytotoxic T lymphocyte-mediated selective pressure influences dynamic evolution and pathogenic functions of HIV-1 Nef. *J Immunol* 180: 1107-16, 2008
15. Kawashima Y, Satoh M, Oka S, Shirasaka T, and Takiguchi M. Different immunodominance of HIV-1-specific CTL epitopes among 3 subtypes of HLA-A\*26 associated with slow progression to AIDS. *Biochem Biophys Res Commun* 366: 612-616, 2008.
16. Hachiya A, Kodama E, Sarafianos SG, Schuckmann MM, Matsuoka M, Takiguchi M, Gatanaga H, and Oka S. Amino acid mutation, N348I, in the connection subdomain of HIV-1 reverse transcriptase confers multi-class resistance to NRTIs and NNRTIs. *J Virol* Epub 2008 Jan 23.
- H. 知的財産権の出願・登録状況：なし



## 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

## CCR5 阻害剤などの新規の機序で抗ウイルス効果を発揮する AIDS 治療薬の研究開発

分担研究者：満屋 裕明（熊本大学医学薬学研究部血液内科学・感染免疫診療部 教授）

### 研究要旨

HIV-1 が耐性を獲得しにくく、獲得しても他薬剤との交差耐性を有しない新規のプロテアーゼ阻害剤(PIs)の研究開発を米国グループと共同で続けている。また、HIV-1 の増殖に重要である HIV-1 プロテアーゼ二量体形成を評価するために、CFP/YFP タグ付きプロテアーゼ(PR)を有する感染性組み換え HIV-1 クローンを用いた FRET (fluorescence resonance emission transfer)の系を確立し、新たな機序である PR 二量体形成阻害による HIV-1 複製阻害について考察を行った。また CCR5 の微細構造学的解析系の確立、CCR5 阻害剤の結合モデル、分子レベルでの機序解析の研究も進めており、これらの解析結果を基にして、CCR5 結合能のある新規低分子化合物のモデリングを行い、強力な抗 HIV 活性を有する新しい化合物の設計・同定を続けている。

### A. 研究目的

ヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) 感染によって起こる後天性免疫不全症候群 (AIDS) に対する化学療法は長足の進歩を遂げ、かつて「死の病」とされた本疾患は「コントロール可能な慢性感染症」と再定義し得る程となった。この進歩は、逆転写酵素阻害剤 (RTIs) とプロテアーゼ阻害剤 (PIs) を組み合わせた多剤併用療法 (HAART) に負うところが大きい。しかし、HIV-1 が RTIs と PIs の両剤に対して耐性を獲得してその多くが交差耐性であって治療抵抗性となった症例数の増大、また耐性ウイルスによる初感染症例増多の報告が続いており、野生 HIV-1 株と多剤耐性株の双方に強力な活性を発揮し、薬剤耐性を誘導しにくく、副作用が少なく、服用しやすい新規の薬剤の開発が文字通り急務の課題となっている。本

研究では、HIV-1 が耐性を発現しにくい薬剤、発現しても他薬剤との交差耐性を有しない新規の PIs や新しい機序から HIV-1 の感染を阻害する CCR5 阻害剤の開発を進めるとともに、その基礎となるウイルス学・酵素学・細胞生物学・薬理学・結晶解析学的な基礎研究を進める。今後問題となると思われる同剤への耐性発現機序の解明を進め、また、耐性に関わる HIV-1 プロテアーゼの微細構造解析についても分子構造解析機器を用いた構造モデリング、X 線構造解析を進め、再デザインを行い、強力に優れた薬理動態を有する新規の PIs の研究を進める事により HIV-1 が耐性を発現しにくい薬剤、発現しても他薬剤との交差耐性を有しない新規の PIs の前臨床・臨床開発が期待できる。HIV-1 が耐性を発現しにくい薬剤、発現しても他薬剤との交差耐性を有し

ない新規の PIs および CCR5 阻害剤の開発は HIV-1 感染症患者において、長期間ウイルス量を測定感度以下にコントロールし、その結果外来通院による長期加療が可能となり、患者の QOL の改善および医療費の削減にも貢献するものと考えられる。

## B. 研究方法

1) 検討中の化合物の抗 HIV-1 活性評価及びより有望な化合物の開発・評価：抗 HIV-1 活性の評価には MTT、MAGI アッセイなどを用いるが有望なものについては耐性株を含む複数のウイルス株での活性を更に検討するため、p24 アッセイを行う。このアッセイには全自動化学発光度測定機：Lumipulse F を用いる。このようにして見いだされたより有望な化合物について前臨床試験の準備を進める。

2) 抗 HIV-1 作用発現のメカニズム解析：PIs がウイルス、あるいは生体（細胞）へ与える変化、それがどのようにして抗 HIV-1 効果をもたらすかについて解析を進める。この研究には多数の HIV-1 クローンの作成・検討が必要で、しかも HIV-1 の広範な遺伝子部分についての検索が必要とされるが、high throughput の DNA sequencer：ABI-377 を用いるので迅速な実験データの解析が可能となる。

3) 薬剤耐性のメカニズム解析：HIV-1 が極めて高い増殖能を有し、しかも逆転写酵素（RT）が error-prone であるという特性のために、HIV-1 の薬剤耐性発現は不可避である。X 線結晶解析をはじめとするタンパクの微細構造研究の方法論を用いて、多剤耐性 HIV-1 株の発現機序の分子・原子レベルでの解析を行う。その後、構造を基礎とし

た高い抗ウイルス活性を有しかつ耐性の発現に抵抗する薬剤のデザイン・再デザインを行う。新規のプロテアーゼ阻害剤について試験管内で耐性 HIV-1 変異株の誘導を試み、更にそのようにして誘導された HIV-1 についてのウイルス学・生化学・遺伝子的解析や X 線結晶解析を用いて耐性発現のメカニズムの解析を行う。

4) HIV-1 プロテアーゼ（PR）二量体形成（dimerization）阻害：我々は CFP/YFP タグ付き PR を有する感染性組み換え HIV クローンと FRET（fluorescence resonance emission transfer）の系を用いて、HIV PR の二量体形成を確認する系を確立した。dimerization に重要とされるアミノ酸（Asp29、Arg87、Thr26 etc）置換を有する種々の CFP/YFP タグ付き変異体を多数作成、FRET の系を用いてこれらのアミノ酸置換が dimerization を阻害することを明らかとした。dimerization に重要とされるアミノ酸の詳細な解析を進め、新たな HIV-1 PR 阻害への機序を明らかにする。

5) CCR5 の微細構造学的解析・生理学的解析：コンピュータモデリングの手法を用いた CCR5 の微細構造学的解析の系を確立、CCR5 と阻害剤の結合モデル、HIV-1 感染（エンベロープとの結合）と CCR5 の生理作用（ケモカインによる作用）に重要な構造の解析など行っている。また、電子顕微鏡・蛍光/共焦点顕微鏡を用いた細胞表面の CCR5 の局在性・動態解析も行っている。

（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、まず動物実験などでその安全性を十分に確認する。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する。

### C. 研究結果

広いスペクトラムの薬剤耐性株に高い活性を発揮する PI, TMC114/darunavir (Koh & Mitsuya, *Antimicrob Agents Chemother.* 47: 3123-3129, 2003)を分担研究者の Dr. Ghosh との共同研究を開発、本剤は 2006 年 6 月に米国 FDA にて認可され、Prezista<sup>TM</sup>として本邦でも臨床に供されることとなった。さらに我々のグループは試験管内における DRV の研究を続けており、複数の多剤耐性臨床分離 HIV-1 混合株を用いた耐性誘導実験において、複数の PI 耐性変異体の重感染と遺伝子相同組み換えが起こることで HIV が DRV に対する高度耐性を獲得する可能性があることを見出した (未発表)。また DRV は結晶構造解析において、P2 部位に *bis*-THF というユニークな構造を有し、HIV プロテアーゼ (PR) 活性部位である Asp-29/Asp-30 の主鎖(back bone)と極めて強固な水素結合を形成することで強力な抗 HIV 活性を発揮するが、DRV と同様に P2 部位に *bis*-THF 構造を有し、野生型から多剤耐性株における広いスペクトラムでの強力な抗 HIV 活性を発揮する GRL-98065 を同定、本化合物の薬剤高度耐性変異株を含む各種 HIV-1,2 株に対する抗 HIV 活性や細胞毒性を評価し、試験管内耐性誘導実験により HIV-1 の本化合物に対する耐性獲得機序を解明し、更に詳細な結晶構造解析により、*bis*-THF 構造が HIV PR 活性部位である Asp-29/Asp-30 の主鎖と強固な水素結合を有することに加えて、P2' 部位の benzodioxole 構造が HIV PR の flap 領域と水

素結合を持つことで薬剤の結合を安定化させる、といった本化合物における強力な抗 HIV 活性発揮の機序を明らかにした (Amano & Mitsuya, *Antimicrob Agents Chemother.* 51: 2143-2155, 2007)。最近では HIV PR だけでなく PR の基質である HIV-gag 蛋白や gag 蛋白と相互作用 (結合)するとされるいくつかの細胞内因子についての構造学的検討も進められている。我々のグループは PIs 耐性と gag の遺伝子変異についての構造学的検討も進めており、これらの分子を標的とする新規の化合物のデザインの検討も引き続き行っている (Tamiya & Mitsuya, *J. Virol.* 78: 12030-12040, 2004; Gatanaga & Mitsuya, *J Biol Chem.* 281: 1241-1250, 2006)。

HIV PR の二量体形成 (dimerization) は HIV の増殖に重要であり、このことは dimerization の阻害が新規薬剤の標的部位となる可能性を示唆している。我々は CFP/YFP タグ付き PR を有する感染性組み換え HIV クローンと FRET (fluorescence resonance emission transfer)の系を用いて、HIV PR の二量体形成を確認する系を確立した。この系を用いて HIV PR dimerization に重要とされるアミノ酸 (Asp29, Arg87, Thr26 etc)置換が dimerization を阻害することを解明、更に我々が米国の研究グループと共同で開発した *bis*-THF 構造及びその類似構造を有する一連の化合物が HIV PR dimerization 阻害活性を有することを明らかにした (Koh & Mitsuya, *J Biol Chem.* 282: 28709-20, 2007)。

また、新規開発中の HIV-1 逆転写酵素阻害剤である 4'-Ethyanyl-2-Fluoro-2'-Deoxyadenosine におけ

る抗 HIV 活性及び同化合物の細胞内代謝を評価し、ヒト DNA ポリメラーゼに対する影響等を明らかにした (Nakata & Mitsuya, *Antimicrob Agents Chemother.* 51: 2701-2708, 2007)。

ケモカイン受容体である CCR5, CXCR4 は HIV-1 のコレセプターとして HIV-1 の細胞侵入過程に重要な役割を持っている。このようなウイルスの細胞への侵入過程は既存の主な抗 HIV 剤と作用機序の異なる新たな治療薬のターゲットとしても有望であり、満屋は 1999 年より国内の製薬会社との共同研究でケモカイン受容体 (CCR5) 阻害剤の開発に着手、現在までに米国での臨床試験で強力な抗 HIV-1 効果が確認された CCR5 阻害剤 : Aplaviroc (AK602 : 肝障害のため第三相臨床試験は休止中)を始め、複数の CCR5 阻害剤の同定に成功している (Maeda & Mitsuya, *J Biol Chem.* 276:35194-35200, 2001; Maeda & Mitsuya, *J.Virol.* 78: 8654-8662, 2004; Nakata & Mitsuya, *J.Virol.* 79:2087-2096, 2005)。一方で我々はこれらの阻害剤の作用機序の解明のための研究も進めており、結晶解析・コンピュータモデリングの手法を用いた CCR5 の微細構造学的解析の系を確立、CCR5 と阻害剤の結合モデル、HIV-1 感染 (エンベロープとの結合) と CCR5 の生理作用 (ケモカインによる作用) に重要な構造の解析などを既に報告している (Maeda & Mitsuya, *J Biol Chem.* 281:12688-12698, 2006)。

我々はケモカイン受容体阻害剤開発研究の過程で、CCR5 阻害剤分子が細胞表面の CCR5 のすべてに結合しなくても HIV 感染がほぼ完全に抑制されるという事象を見いだした。これに類似するデータとして、細

胞表面に HIV 被感染性の無い (変異) CCR5 が一部 (50%程度) 含まれるだけで HIV-1 感染性が著明に失われることを明らかにしており、これは HIV と細胞の接着・融合の過程で形成される HIV-1 エンベロープ・CD4・ケモカイン受容体 (CCR5) 複合体が正常に形成されないと HIV の侵入・感染が成立しない、という機序を示唆しているものと思われる (Maeda, Nakata & Mitsuya, 投稿準備中)。一方では結晶解析・コンピュータモデリングの手法を用いた CCR5 の微細構造学的解析系の確立、CCR5 阻害剤の結合モデル、分子レベルでの機序解析の研究も進めており、現在ではこのモデルを応用して CCR5 結合のある新規の低分子化合物のモデリングを行い、強力な抗 HIV 活性を有する新しい化合物の設計・同定にも成功している (Yin, Maeda & Mitsuya, 投稿準備中)。今後これらの知見を統合・発展させ、HIV-1 粒子が細胞へ侵入するのに必要な HIV-1 エンベロープ・CD4・CCR5 の量的解析とこれらの結合モデル作成を進めると同時に詳細な CCR5 の微細構造解析を進め、より強力且つ効果的に HIV 感染を阻害する低分子化合物の開発を続けていく。

細胞表面の HIV 受容体と HIV エンベロープの相互作用と HIV 感染の関連をみる手法として、各種画像解析も行っている。具体的には電子顕微鏡・蛍光/共焦点顕微鏡を用いた細胞表面の HIV 受容体の局在性・動態解析の手法を確立し、ウイルス接着時のこれらの分子動態の解明を目標とする。我々は既にレポータータンパク (YFP) を結合させた CCR5 のレーザー顕微鏡での解析により、細胞表面の CCR5 は非常に流動性に富むこと (Nakata & Mitsuya, 投稿準備中)、