

## 口頭発表

## 海外

- 1) Kondo, M., Sudo, K., Tanaka, R., Shima, T., Sagara, H., Iwamuro, S., Takebe, Y., Kato, S., and Imai, M. A quantification of HIV-1 group M proviral DNA using a TaqMan MGB realtime PCR. XVI International AIDS Conference. August 13-18, 2006, Toronto, Canada.
- 2) Shima, T., Isshiki, M., Tsukada, M., Shiomi, S., Yasunari, R., Watanabe, H., Ueyama, H., Sudo, K., Kondo, M., Nakase, K., and Imai, M. Implementation and Effectiveness of Rapid HIV Testing at Publicly Funded Voluntary HIV Counseling and Testing (VCT) Sites in Japan. XVI International AIDS Conference. August 13-18, 2006, Toronto, Canada.
- 3) Yamada, R., Shima, T., Imai, M., Genka, I., Ogane, M., Kawado, M., Taniguchi, H., Tsukahara, Y., and Inaba, N. The false positive rate of antenatal HIV screening is very high in Japan. XVI International AIDS Conference. August 13-18, 2006, Toronto, Canada.
- 4) Nakase, K., Shima, T., Imai, M., and Tachibana, T. Introduction of rapid test to VCT and continuous evaluation systems in Japan. XVI International AIDS Conference. August 13-18, 2006, Toronto, Canada.

## 国内

- 1) 佐野(嶋) 貴子、近藤真規子、須藤弘二、宮崎裕美、倉井華子、相楽裕子、岩室紳也、今井光信. 抗 HIV 抗体と HIV-1p24 抗原が同時検出可能な HIV 迅速検査試薬の検討. 第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会、2007 年、広島.
- 2) 山中 晃、金子 恵、青木 眞、高 明志、山元泰之、福武勝幸、嶋 貴子、今井光信. 民間クリニックにおける即日検査の役割・診療所における HIV 迅速検査の現況報告. 第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会、2007 年、広島.
- 3) 宮崎裕美、佐野貴子、近藤真規子、須藤弘二、今井光信. ろ紙を用いたドライスポット法による HIV 検査法の検討. 第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会、2007 年、広島.
- 4) 須藤弘二、宮崎裕美、佐野貴子、近藤真規子、加藤真吾、今井光信. HIV 郵送検査に関する実態調査と検査精度の調査. 第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会、2007 年、広島.
- 5) 今井敏幸、小島弘敬、大野理恵、嶋 貴子、今井光信. 検査の受検解析～受検理由・受検回数などからの一考察～. 第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会、2007 年、広島.
- 6) 貞升健志、長島真美、新開敬行、尾形和恵、吉田靖子、矢野一好. 東京都内保健所等の HIV 検査陽性例の血清学的、遺伝子学的解析. 第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会、2007 年、広島.
- 7) 木村和子. 個人輸入による HIV 自己検査キットの実態. 第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会、2007 年、広島.
- 8) 矢永由里子、野口博文. HIV 対策における電話相談の役割: 今後に向けて～エイズ予防財団、電話相談の活動を通して～. 第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会、2007 年、広島.
- 9) 松浦基夫、岳中美江、岡本学、土居加寿子、榎本てる子、山中京子、藤山佳秀、市川誠一. 大阪・土曜日常設 HIV 検査事業における「結果お知らせ」担当者に対する研修体制. 第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会、2007 年、広島.
- 10) 小島洋子、川畑拓也、森治代、大竹徹、大國剛. 大阪府内の STI 関連クリニックにおける HIV 感染初期例. 第 21 回近畿エイズ研究会学術集会、2007 年、大阪.

## 特許出願

- 1) 発明の名称: HIV-1 プロウイルス定量法. 発明者: 近藤真規子、加藤真吾. 発願年月日: 平成 18 年 5 月 2 日. 出願番号: 特願 2006-128565.

研究課題：「薬剤耐性 HIV の動向把握のための調査体制確立およびその対策に関する研究」

課題番号：H19-エイズ-一般-007

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

分担研究者：栗原 健（独）国立病院機構大阪医療センター 薬剤科 副薬剤科長、加藤真吾（慶應義塾大学医学部微生物免疫学教室 助手）、仲宗根 正（国立感染症研究所 エイズ研究センター 第1研究グループ 主任研究官）、石ヶ坪良明（横浜市立大学医学部医学部 教授）、伊藤俊広（独）国立病院機構仙台医療センター 血液内科 医長、瀧永博之（国立国際医療センター エイズ治療・研究開発センター 専門外来医長）、金田次弘（独）国立病院機構名古屋医療センター 臨床研究センター 客員研究員）、小池隆夫（北海道大学大学院医学研究科病態制御学講座 教授）、巽 正志（国立感染症研究所 エイズ研究センター 第2室 室長）、藤井 毅（東京大学医科学研究所 先端医療研究センター 講師）、白坂琢磨（独）国立病院機構大阪医療センター HIV/AIDS 先端医療開発センター センター長）、福武勝幸（東京医科大学医学部臨床検査医学科 教授）、上田幹夫（石川県立中央病院 血液病治療部 部長）、南 留美（独）国立病院機構九州医療センター 感染症対策室 医師）、下条文武（新潟大学医歯学総合病院 第2内科 教授）、貞升健志（東京都健康安全研究センター 微生物部 主任研究員）、森 治代（大阪府立公衆衛生研究所ウイルス科 主任研究員）、松下修三（熊本大学エイズ学研究センター 病態制御分野 教授）、近藤真規子（神奈川県衛生研究所 微生物部 主任研究員）、佐藤武幸（千葉大学医学部附属病院感染症管理治療部 准教授）、健山正男（琉球大学大学院医学研究科感染病態制御学講座 准教授）、木村昭郎（広島大学原爆放射線医科学研究所ゲノム疾患治療研究部門 血液内科 教授）、原 孝（茨城県衛生研究所 主任研究員）

## 1. 研究目的

本研究班は我が国における薬剤耐性 HIV の発生動向の把握とその増加を抑制するために必要な対応を明確にすることを目的とし、その達成のために以下4項目の研究に取り組む。

(1) 薬剤耐性調査研究：これは本邦における新規 HIV/AIDS 診断症例および既治療症例における薬剤耐性 HIV の発生動向の把握と調査体制確立を目標とする研究で、薬剤耐性 HIV の現状を正確に把握するために必要である。(2) 薬剤耐性 HIV 発生機序の解析研究：これは薬剤耐性 HIV の伝播形式などの解明を目標とする研究で、調査情報の質を高め、疫学状況の理解を深めるために必要である。(3) 薬剤耐性検査の質的管理：これは薬剤耐性 HIV 検査の外部精度管理と検査標準化を目標とする研究で、全国同質の薬剤検査の実施を実現するために必要な研究である。(4) 薬剤血中濃度測定研究：これは薬剤耐性血中濃度測定検査の提供と情報発信を目標とする研究で、適切な抗 HIV 療法の実践のために必要な研究である。

## 2. 研究方法

研究全期間を通じて協力施設を増やし調査対象の拡大を目指し国内を網羅する調査ネットワークの完成を目指していく。研究協力は分担研究者の推薦・紹介を通じて募っていくほか、研究班のホームページを開設し、調査情報の発信と協力受付等を行う。また収集する疫学情報の質と量をあげてより詳細な実態の把握を目指していく。

(1) 薬剤耐性調査研究：新規診断症例の捕捉とその薬剤耐性検査およびサブタイピングを実施する。薬剤耐性検査については従来のプロテアーゼと逆転写酵素領域に加えて、新薬の標的であるインテグラーゼ領域の解析についても一部の施設で実施する。遺伝子解析方法は参加施設毎に若干の相違があるが、いずれの施設も平成17・18年の2回のヴァリデーションに参加し、その精度が担保された方法を用いている。治療を受けている症例の薬剤耐性に関しては平成19年度に実施した予備調査に基づき、リストアップされた多剤耐性症例についてより詳細な情報を入手し、多剤耐性にいたる背景、臨床経過、遺伝子配列の変化について解析を進めていく。新規診断症例、耐性症例ともに収集した遺伝子情報を管理するデータベースを完成させる。

(2) 薬剤耐性 HIV 発生機序の解析研究：HIV 感染症は感染成立時に特徴的な自覚兆候がないため感染時期の特定が困難な疾患である。しかし現在発生している新たな感染の状況を理解するには感染時期の特定・推測とその情報が必須である。本研究班では米国 CDC が開発した血清中の HIV 特異的 IgG の総量から感染時期を推測する BED アッセイを調査のルーチン検査項目として実施し、捕捉した新規診断症例を最近感染した症例とそれ以前の慢性感染症例に分類して比較する。研究班では受診した医療機関で診断

の確定した症例を主に調査対象として解析しているが、一部施設では医療機関に到達するより早い確認検査で陽性となった検体を対象に薬剤耐性の調査を実施している。これら二つのラインでの検体の相違を比較・考察し新規な感染の動向に迫りたい。また通常の薬剤耐性検査法では検出できない、潜在する薬剤耐性ウイルスの検出法を定量 PCR 等を基盤に開発を進めており、将来調査項目に加えていくことを検討している。

(3) 薬剤耐性検査の質的管理：平成19年度に研究班実用校正サンプルとして作製した感染性クローンを薬剤耐性検査実施機関に送付し、其々の施設毎のプロトコルに則って薬剤耐性遺伝子検査を実施してもらう。その結果を元にプロテアーゼ、逆転写酵素、インテグラーゼ各領域の研究班推奨基準測定法の作成を進める。

(4) 薬剤血中濃度測定研究：ホームページを介しての検査受付と情報発信を行う。さらに研究班で提案された非侵襲且つアドヒアランスを客観的に評価する毛髪検査、唾液による血中濃度の推定などの新たな技術開発をさらに進める。

（倫理面への配慮）

薬剤耐性調査研究では全ての検体が匿名化されるため、万が一の情報漏えいの事態においても個人情報流出は起こりえない。また実施に当たっては疫学研究に関する倫理指針（平成19年8月16日改定）で定めた倫理規定等を遵守すると共に必要に応じて施設ごとの倫理委員会の承認を得るものとする。薬剤耐性 HIV の発生機序に関する研究では実施にあたり臨床研究に関する倫理指針（平成16年厚生労働省告示第459号）で定めた倫理規定等を遵守するとともに、必要に応じて施設ごとの倫理委員会の承認を得るものとする。

## 3. 研究結果

研究班一年目として以下の成果を挙げた。

(1) 薬剤耐性調査研究：平成19年上半年（1月～6月）で新規感染症例300例を捕捉し、その薬剤耐性検査を実施した。補足した症例のプロファイルは性別（男：285例、女：15例）、感染経路（同性間：214例、異性間：52例、同異性間：5例、不明：29例）、サブタイプ（B：263例、AE：17例、C：8例、AG：3例、A：3例、その他：4例）であった。薬剤耐性変異に関しては全体28例（9.3%）、NRTI：16例（5.3%）、NNRTI：1例（0.3%）、PI：11例（3.7%）であった。感染経路別に見てみると同性間で18例（6.3%）、異性間では8例（15.3%）と頻度としては異性間のほうが高い値を示した。治療症例の薬剤耐性に関しては平成20年度に予定をしている本調査の準備として、拠点病院における抗 HIV 療法と薬剤関連アンケート調査を実施した。その結果合計133例の薬剤耐性症例が報告された。またこれとは別に HIV/AIDS 治療患者の多い医療機関25施設に対し

てアンケートによる予備調査を実施した。その結果 16 施設より回答があり、多剤耐性症例 40 例が報告された。

(2) 薬剤耐性 HIV 発生機序の解析研究：BED アッセイを実施した症例では 30%前後の症例が BED 陽性と判定された。確認検査陽性検体 161 例について薬剤耐性の調査では 16 例 (9.9%) に耐性変異が認められた。潜在する薬剤耐性ウイルスを検出するために定量 PCR 等を応用した検出法の開発を代表的な NRTI 耐性変異である D67N, K70R, M184V について行った。新たな方法として LC-MS を用いた微小集団の検出法を開発した。RT：K103N, M184V, T215Y, PR:L90M 其々の変異について作成し、0.1~1%程度の微小集団の検出に成功した。

(3) 薬剤耐性検査の質的管理：。薬剤耐性を獲得した患者分離 HIV 株を元にサブタイプ B と CRF\_01AE それぞれの全長感染性クローンを作製し、薬剤耐性遺伝子検査の研究班実用校正サンプル候補とした。インテグラーゼ領域の遺伝子検査法についての検討を開始しサブタイプ B:104 例、CRF01\_AE:37 例の解析を行った。

(4) 薬剤血中濃度測定研究：平成 19 年度までに 6749 件の HP へのアクセスがあり、また 482 件の血中濃度測定検査が行われた。平成 19 年 11 月に新たに承認された新しいプロテアーゼ阻害剤ダルナビル/リトナビル/ゾラフィド/エタラピリンの血中濃度測定法を開発した。ロピナビル/リトナビル/ゾラフィド/エタラピリン錠剤への剤型変更に伴う血中濃度と副作用及ばず影響について検討を行った結果、ソフトカプセル投与群に比して錠剤投与群では薬剤のトラフ値が有意に低値を示した。しかしこれは薬効に影響するレベルではなく、むしろ錠剤への変更により冷所保存が不要になり、食事に関係無く服薬できるようになった点について好ましい返答が多く寄せられた。

#### 4. 考察

欧米各国では新規 HIV/AIDS 診断症例の 10%以上に何らかの耐性変異を持つものが認められ、初回治療の薬剤の選択に大きな障害となりつつある。わが国では平成 15 年から新規 HIV/AIDS 診断症例における薬剤耐性変異の全国調査を実施しており、平成 15 年から 17 年までは例年 5%前後で推移してきた。その後、平成 18 年度の調査では 6.3%と若干増加傾向がみられたことから、翌平成 19 年の頻度が上向きか下向きか気になりであった。平成 19 年度より開始した本研究班では前述の調査を基盤に平成 19 年の新規 HIV/AIDS 診断症例について調査を行ったが、その結果、9.3%という平成 18 年度を上回る頻度で薬剤耐性変異を獲得した症例が確認された。感染経路別に頻度をみると同性間：6.3%に対し異性間：15.3%であった。本抄録執筆時は 2007 年の上半期のデータであり、まだ最終的な結論ではないが、薬剤耐性 HIV の拡散の兆し、それも異性間の性交渉において増加が見受けられ、今後の薬剤耐性 HIV の動向にさらに注意する必要があると考えられる。今後 BED アッセイや確認検査陽性検体の結果等の新たな情報を加味して、薬剤耐性 HIV の拡散の実態を理解し、適切な対策を取ることが重要であると思われる。治療中の HIV/AIDS 症例における薬剤耐性 HIV の状況は平成 17 年度以降調査が途絶えており、本研究班で改めてその実態把握を目指している。治療症例における薬剤耐性の状況把握は新規診断症例における薬剤耐性の動向の理解に必要な情報であるだけでなく、新薬が承認された際に、その需要をはかり、また適切な使用を進めるために重要な情報と考えられる。本年度はアンケートによる予備調査を実施したが、40~120 名の薬剤耐性症例が確認された。すべての施設からの回答ではないことから、この数値は実態より低く見積もられていると思われる。近年の治療の進歩により一時期より薬剤耐性による治療困難症例は減少したとはいうものの、2 桁以上の症例が薬剤耐性 HIV による治療困難に直面しており、依然として深刻な問題であることが明らかになった。薬剤耐性 HIV 発生機序の解析研究で進めている

BED アッセイは擬陽性が多いことが知られており、そのデータの解釈に当たっては患者の情報などを合わせて行うことが必要である。確認検査検体については、本研究班で収集している症例とは異なる集団であるが、両集団を比較することにより、HIV 感染の状況についての考察が可能であると考えている。

#### 5. 自己評価

1) 達成度について：新規診断症例における薬剤耐性 HIV の調査研究は研究班の目標を達成したと考えている。治療症例における薬剤耐性調査には年度当初に評価委員から受けたアドバイスに沿い、本年度は主にアンケートによる予備調査を行い次年度からの本格調査に備えた。目標は概ね達成した。薬剤耐性 HIV 発生機序の解析研究については BED アッセイの実施を決定し、一部施設で検査を開始した。潜在的な薬剤耐性の検出法の開発については複数の方法を開発したが、臨床検体での評価には到達していない。目標は概ね達成した。薬剤耐性検査の質的管理については検査の研究班実用校正サンプルを決定し本年度の目標は達成した。血中濃度測定研究については臨床現場において十分に活用されており、本研究班の使命は完全に達成したと考えている。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について：新規 HIV/AIDS 診断症例における薬剤耐性 HIV の頻度を明らかにしたことは HIV/AIDS の疫学動向を理解するうえで学術的に意義がある。また薬剤耐性 HIV 発生機序の解析研究とあわせて増加しつつある HIV/AIDS の予防対策などの戦略を立てる上でも重要な情報であり、その社会的意義は大きい。薬剤耐性検査の質的管理研究は、国内何処でも同質の薬剤耐性検査を受けられることを目指しており、その臨床的・社会的意義は大きい。また他国を見てもこのような取り組みは稀であり他国の範となる仕事である。治療薬剤血中濃度測定は至適治療を行う上での有用な情報として臨床現場で活用されており、その社会的意義は大きい。

3) 今後の展望について：薬剤耐性調査研究では調査ネットワークを構築して新規 HIV/AIDS 診断症例の収集を進めているが、動向委員会の集団との比較で、捕捉集団に若干の偏りがあることが明らかになった。今後は偏りを補正する形で参加施設を充実させたい。また、調査で得られた情報を、予防啓発活動に活用していけるように、臨床および社会学分野の研究者等との連携を目指したい。薬剤耐性 HIV 発生機序の解析研究では BED アッセイの情報、確認検査検体における薬剤耐性の状況など新たな疫学情報を得ることにより、我が国における HIV/AIDS の状況を詳細に明らかにしていきたい。薬剤耐性検査の質的管理では研究班推奨基準測定法の完成と検査の標準化を目指していきたい。血中濃度測定に関してはホームページを介しての発信情報の充実を目指していきたい。

#### 6. 結論

新規 HIV/AIDS 診断症例の薬剤耐性を調査する全国規模の調査体制を構築し、2007 年に新規に HIV/AIDS 診断がなされた 300 例について解析を行った。その結果、9.3%に薬剤耐性 HIV が確認された。平成 15 年~18 年の同頻度と比較すると明らかに高くなっており、今後の動向監視が重要であると考えられる。治療中の症例における薬剤耐性の状況についてアンケートによる予備調査を実施した。BED アッセイを正式に研究班の調査項目として取り上げ、データの収集を進めている。薬剤耐性検査の研究班実用校正サンプルを作成した。合計 482 例の薬剤血中濃度測定検査の実施と情報発信を行った。

7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)  
該当なし

## 研究発表

## 主任研究者

杉浦 互

- 1) Ode H, Matsuyama S, Hata M, Hoshino T, Kakizawa J, Sugiura W: Mechanism of drug resistance due to N88S in CRF01\_AE HIV-1 protease, analyzed by molecular dynamics simulations. *J Med Chem.* 2007 Apr 19;50(8):1768-77.
- 2) Chiba-Mizutani T, Miura H, Matsuda M, Matsuda Z, Yokomaku Y, Miyauchi K, Nishizawa M, Yamamoto N, Sugiura W: Use of new T-cell-based cell lines expressing two luciferase reporters for accurately evaluating susceptibility to anti-human immunodeficiency virus type 1 drugs. *J Clin Microbiol.* 2007 Feb;45(2):477-87.
- 3) Hamatake M, Nishizawa M, Yamamoto N, Kato S, Sugiura W: A simple competitive RT-PCR assay for quantitation of HIV-1 subtype B and non-BRNA in plasma. *J Virol Methods.* 2007 Jun;142(1-2):113-7.
- 4) Afework Kassu, Masayuki Fujino, Masakazu Matsuda, Masako Nishizawa, Fusao Ota, Wataru Sugiura: Molecular Epidemiology of HIV-1 in Treatment Naïve Patients in North Ethiopia, *AIDS Research and Human Retroviruses*, 2007 Apr;23(4):564-568.
- 5) Hirota Ode, Saburo Neya, Masayuki Hata, Wataru Sugiura, Tyuji Hoshino: Computational Simulations of HIV-1 Proteases-Multi-drug Resistance Due to Nonactive Site Mutation L90M. *J. AM.Chem.Soc.*, 128:7887-7895, 2006

## 分担研究者

石ヶ坪良明

- 6) Tomita N, Motomura S, Hyo R, Takasaki H, Takemura S, Taguchi J, Fujisawa S, Ogawa K, Ishigatsubo Y, Takeuchi K. Comparison of peripheral Tcell lymphomas and diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer.* 2007 109(6):1146-51.
- 7) Tomita N, Kodama F, Motohashi K, Fujita A, Hyo R, Hashimoto C, Takemura S, Yamazaki E, Taguchi J, Sakai R, Fujisawa S, Kanamori H, Motomura S, Ishigatsubo Y, Takeuchi K. Outcome of involved-field radiotherapy for stage I follicular lymphoma. *Int J Hematol.* 2006 ;83(4):370-2.

瀧永博之

- 8) 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 S, Shirasaka T, Kimura S, Oka S. Successful efavirenz dose reduction in HIV type 1-infected individuals with cytochrome P450 2B6 \*6 and \*26. *Clinical Infectious Diseases* 2007 Vol.45 (1230-1237)
- 9) Gatanaga H, Ibe S, Matsuda M, Yoshida S, Asagi T, Kondo M, Sadamasu K, Tsukada H, Masakane A, Moti 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, Sugiura W. Drug-resistant HIV-1 prevalence in patients newly diagnosed with HIV/AIDS in Japan. *Antiviral Research* 2007 Vol.75 (75-82)

貞升健志

- 10) 貞升健志、長島真美、新開敬行、尾形和恵、吉田靖子、矢野一好、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染症—東京都における検査と解析,58,2007 (印刷中)

仲宗根 正

- 11) Eda Y, Murakami T, Ami Y, Nakasone T, Takizawa M, Someya K, Kaizu M, Izumi Y, Yoshino N, Matsushita S, Higuchi H, Matsui H, Shinohara K, Takeuchi H, Koyanagi Y, Yamamoto N, Honda M. Anti-V3 humanized antibody KD-247 effectively suppresses ex vivo generation of human immunodeficiency virus type 1 and affords sterile protection of monkeys against a heterologous simian/human immunodeficiency virus infection. *Journal of Virology*, 80, 5563-5570, 2006.

岩本愛吉

- 12) Wichukchinda N, Kitamura Y, Rojanawiwat A, Nakayama EE, Song H, Pathipvanich P, Auwanit W, Sawanpanyalert P, Iwamoto A, Shioda T, Ariyoshi K. The polymorphisms in DC-SIGNR affect susceptibility to HIV type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 23: 686-92, 2007
- 13) Maeda T, Fujii T, Oyaizu N, Endo T, Odawara T, Iwamoto A, Nakamura T. Pneumocystis jiroveci pneumonia in an AIDS patient: Unusual manifestation as multiple nodules with expansive multiloculated cavities. *Eur J Radiol extra*, 61, 49-52, 2007.
- 14) 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.* 34: 325-35, 2007.

近藤真規子

- 15) Kondo M, Sudo K, Nishizawa M, Shima T, Iwamuro S, Okabe T, Takebe Y, Imai M: Identification of Attenuated Variants of HIV-1 Circulating Recombinant Form 01\_AE That Are Associated with Slow Disease Progression Due to Gross Genetic Alterations in the nef/Long Terminal Repeat Sequences. *J. Infect. dis.*192:56-61 (2005).

伊藤俊広

- 16) Seiichiro Fujisaki, Saeko Fujisaki, Shiro Ibe, Tsukasa Asagi, Toshihiro Itoh, Shigeru Yoshida, Takao Koike, Masayasu Oie, Makiko Kondo, Kenji Sadamasu, Mami Nagashima, Hiroyuki Gatanaga, Masakazu Matsuda, Mikio Ueda, Aki Masakane, Mami Hata, Yasushi Mizogammi, Haruyo Mori, Rumi Minami, Kiyomi Okada, Kanako Watanabe, Takuma Shirasaka, Shinichi Oka, Wataru Sugiura and Tsuguhiro Kaneda: Performance and quality assurance of genotypic drug resistance test for human immunodeficiency virus type 1 in japan. *Jpn.J.Infect.Dis.*,60:113-117,2007

栗原 健

- 17) T. Makie, S. Nagai, A. Sasakawa, K. Kawamura, T. Kuwahara, Predicting Tenofovir Concentration on the Basis of Renal Factors Determined by Routine Tests, *American Journal of Therapeutics*, 14, (2007) in press

南 留美

- 18) Rumi Minami, Masahiro Yamamoto, Soichiro Takahama, Tomoya Miyamura, Hideyuki Watanabe, Eiichi Suematsu. RCAS1 induced by HIV-Tat is involved in the apoptosis of HIV-1 infected and uninfected CD4+ T cells.

Cellular Immunology 243:41-47,2006

19) Rumi Minami, Masahiro Yamamoto. Elevated serum levels of RCAS 1 are associated with Poor recovery of CD4+T cell count after ART in HIV-1-infected patients. *Journal of AIDS Research* 8:25-27, 2006

上田幹夫

20) 正兼亜季、小川哲、森下英理子、谷内江昭宏、上田幹夫：東海・北陸地域におけるフローサイトメーターを用いたCD4陽性Tリンパ球測定に関するアンケート調査。日本検査血液学会雑誌8(2):192-197.

21) 山川朋子、木村和子、小野俊介、辻典子、上田幹夫：石川県の病院・診療所におけるHIV抗体検査の実態と初期対応。日本エイズ学会誌8:163-168, 2006.

森 治代

22) Yoko Kojima, Takuya Kawahata, Haruyo Mori, Isao Oishi, Toru Otake, Recent Diversity of HIV-1 in Individuals who visited STI-related clinics in Osaka, Japan. *J. Infect. Chemotherapy* (in press)

23) 川畑拓也、小島洋子、森 治代、大竹 徹、大國 剛、当所にてHIV感染を確認した、2例のイムノクロマトグラフィー法陰性の感染初期例、感染症学雑誌、2007、81、76-77

小池隆夫

24) Yoshida, S., Hige, S., Yoshida, M., Yamashita, N., Fujisawa, S., Sato, K., Kitamura, T., Nishimura, M., Chuma, M., Asaka, M. and Chiba, H. Quantification of lamivudine-resistant HBV mutants by type-specific TaqMan minor groove binder probe assay in patients with chronic hepatitis B. *Annal. Cli. Biochem.*, in press, 2008.

25) Yanai, H., Watanabe, I., Ishii, K., Morimoto, M., Fujiwara, H., Yoshida, S., Shu-Ping, Hui., Matsuno, K., Chiba, H. Attenuated aerobic exercise capacity in CD36 deficiency. *J Med Genet.*, 44:445-447, 2007.

加藤真吾

26) Hamatake, M., Nishizawa, M., Yamamoto, N., Kato, S., and Sugiura, W. (2007) A simple competitive RT-PCR assay for quantitation of HIV-1 subtype B and non-B RNA in plasma. *J. Virol. Methods* 142:113-117.

27) Tanaka, R., Hanabusa, H., Kinai, E., Hasegawa, N., Negishi, M., and Kato, S., Intracellular efavirenz levels in peripheral blood mononuclear cells from HIV-infected individuals. *Antimicrob. Agents Chemother.* (in press)

松下修三

28) 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

29) Ikeda, T., Shibata, J., Yoshimura, K., Koito, K., Matsushita, S. Recurrent HIV-1 integration at the BACH2 locus in resting CD4+ T cell populations during effective HAART. *J. Infect. Dis.* 195:716-725, 2007.

健山正男

30) Gatanaga, Ibe S, Matsuda M, Yoshida S, Asagi T, Kondo M, Sadamasu K, Tsukada H, Masakane A, Mori H1, 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, Hujita J, Oka S1), Sugiura W. Drug-resistant HIV-1 prevalence in patients newly diagnosed with HIV/AIDS in Japan. *Antiviral Research.* 75: 75-82.2007.

福武勝幸

31) 西田恭治、山元泰之、香川和彦、天野景裕、鈴木隆史、篠澤圭子、尾形享一、内田泰斗、高 明志、大瀧 学、加藤宏基、清田育男、福武勝幸、HIV感染症におけるウイルス性肝炎感染状況とA・B型肝炎ワクチンの効果に関する研究、日本エイズ学会誌、9(1):30-35 2007

白阪琢磨

32) 白阪琢磨：初回療法の考え方、*The Journal of AIDS Reseach*9(2) : 91-93、2007

33) 吉野宏宏、矢倉裕輝、栗原健、富成伸次郎、椎木創一、渡邊大、山本善彦、上平朝子、白阪琢磨：初回治療における硫酸アタザナビルの使用経験、感染症学雑誌81:263、2007

金田次弘

34) S. Ibe, J. Hattori, S. Fujisaki, U. Shigemi, S. Fujisaki, K. Shimizu, K. Nakamura, T. Kazumi, Y. Yokomaku, N. Mamiya, M. Hamaguchi and T. Kaneda: Trend of Drug-Resistant HIV-1 Emergence among Therapy-Naive Patients in Nagoya, Japan an 8-Year Surveillance from 1999 to 2006 *AIDS Research and Human Retroviruses.* in press.

35) Fujisaki S., Fujisaki S., Ibe S., Asagi T., Ito T., Yoshida S., Koike T., Oie M., Kondo M., Sadamasu K., Nagashima M., Gatanaga H., Matsuda M., Ueda M., Masakane A., Hata M., Mizogami Y., Mori H., Minami R., Okada K., Watanabe K., Shirasaka T., Oka S., Sugiura W. and Kaneda T: Performance and Quality Assurance of Genotypic Drug-Resistance Testing for Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases.* 60,113-117,2007

下条文武

36) Gatanaga H, Ibe S, Matsuda M, Yoshida S, Asagi T, Kondo M, Sadamasu 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, Sugiura W. Drug-resistant HIV-1 prevalence in patients newly diagnosed with HIV/AIDS in Japan. *Antiviral Res.* 2007 Jul;75(1):75-82.

佐藤武幸

37) Nakamura H, Sato T, Okada K, Miura G, Ariyoshi N, Makazawa K and Kitada M: Population pharmacokinetics of oral busulfan in young Japanese children before hematopoietic stem cell transplantation. *Ther Drug Monit.* In press (2007)

38) Kosaka Y, Koh K, Kinukawa N, Wakazono Y, Isoyama K, Oda T, Hayashi Y, Ohta S, Moritake H, Oda M, Nagatoshi Y, Kigasawa H, Ishida Y, Ohara A, Hanada R, Sako M, Sato T, Mizutani S, Horibe K, Ishii E. : Infant acute lymphoblastic leukemia with MLL gene rearrangements: outcome following intensive chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 104 : 3527-3534, 2004.

## 研究課題：薬剤耐性 HIV の発生機序とその制御方法に関する研究

課題番号：H19- エイズ- 一般- 001

主任研究者：佐藤裕徳（国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター 室長）

分担研究者：湯永博之（国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センター 専門外来医長）、遊佐敬介（熊本大学大学院医学薬学研究部 講師）、上野貴将（熊本大学エイズ学研究センター 准教授）、村上努（国立感染症研究所エイズ研究センター 室長）、西澤雅子（国立感染症研究所エイズ研究センター 研究官）、増田貴夫（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 准教授）、岡本尚（名古屋市立大学医学研究科 教授）、高折晃史（京都大学大学院医学研究科 助教）、足立昭夫（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 教授）、間陽子（理化学研究所 前任研究員）、森川裕子（北里大学北里生命科学研究所 教授）

### 1. 研究目的

本研究では、薬剤耐性 HIV の発生機序とその制御方法に関する基礎研究を行なう。薬剤耐性 HIV の発生は、4000 万人規模の感染者が影響を受ける世界共通の社会問題である。抗 HIV 治療の効果を確保するには、早急に対策に取り組む必要がある。

本研究では、計算科学を感染症研究に応用する新しい研究戦略の構築を試みる。感染者における薬剤耐性 HIV の発生と持続的増殖のしくみを明らかにする。ウイルス学情報と立体構造情報に立脚した新しい HIV 制御法を提案する。HIV の薬剤耐性検査、疫学調査、薬剤治療、抗 HIV 薬とワクチン開発を実施する科学的基盤を提供する。

### 2. 研究方法

現行の耐性研究の手法（薬剤標的酵素の遺伝子断片の配列解析、分離ウイルスや組換えウイルスを用いた薬剤感受性試験）では、治療中の感染者で持続的に増殖するウイルスの特徴を十分に把握できない。遺伝子断片の配列解析では、未知の変異の意義がわからない。分離ウイルスや組換えウイルスは、感染者のウイルスを反映する保証が無い。いずれの手法も、薬剤標的酵素の変化と連動して生じる他の領域の連鎖変異の解析ができない。感染者で持続的に増殖するウイルスの特徴を把握するには、新たな方法論を必要とする。

本研究では、新しい研究戦略の構築を試みる。計算科学（コンピュータを用いて生命現象を研究する学問）と HIV 全ゲノム解析を活用して、感染者の HIV の特徴と変化を解析する。現在、変異蛋白質の構造、および低分子基質や薬剤との結合構造は、X 線結晶構造と同等の精度で予測できる。自然界で観察される変異の意義（薬剤親和性変化等）を迅速に解析できる。

計算科学、ウイルス学、HIV ゲノム科学を共同で研究する枠組みをつくる。計算科学とゲノム科学の研究は、主任研究者が担当する。ウイルス学研究は、11名の分担研究者と5名の協力研究者が担当する。2つの研究の柱を設定する。柱1では、薬剤耐性 HIV の発生機構、柱2では、HIV 感染・増殖機構を研究する。3年計画で、計算科学を感染症研究に活用する環境をつくる。感染者の耐性ウイルスの特徴を明らかにする。個体、細胞、分子レベルでレトロウイルス感染と増殖の新たな制御機構を見つける。薬剤耐性 HIV の発生と持続的増殖のしくみの作業仮説をつくる。ウイルス学情報と立体構造情報に立脚した新しい HIV 制御法を提案する。

（倫理面への配慮）

ヒト由来臨床材料を使う研究は、必要に応じて関連機関の倫理審査会の審議を受け、提供者の承諾とプライバシーの保護に万全を期す。HLA などの検体提供者本人の遺伝子解析を含む研究は、倫理審査会の承認を得て、提供者本人に十分な説明を行い、文書による同意を得た場合に限る。動物実験は、研究機関の倫理審査会の審議を受け、認証を得て行う。

### 3. 研究結果

平成19年度は、3年計画の初年度にあたる。主に研究の基盤整備と予備的解析を行なった。

（1）計算科学の適用研究：計算科学の応用と実験により、Env V3 の立体配置変化に基づく抗体中和と逃避機序を見つけた。V3 の配置は V3 荷電の変化で変わる。ウイルスに CCR5 指向性を付与する機能をもつ V3 は抗体中和抵抗性の配置をとることがわかった（佐藤、協力研究者＝国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター 横山勝、横浜市立大学 長縄聡）。

（2）柱1の研究：感染者血液から直接 HIV の全ゲノム情報を取得し、計算科学を応用して蛋白質の構造機能を解析し、変異ウイルスの特徴を明らかにするシステムをつくった（佐藤、協力研究者＝国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター 本村和嗣、横山勝）。感染者血中に存在する HIV-1 変異集団のプロテアーゼの分子進化を解析できる培養細胞系をつくった（遊佐）。薬剤治療中に細胞生免疫応答が持続し、CTL 逃避ウイルスが選択される証拠を得た（上野）。EFV 耐性の誘導実験を行ない、新たな耐性変異候補を見つけた（湯永）。感染者から Atazanavir 耐性、lopinavir 耐性ウイルスを分離した（西澤）。HIV-1 の感染阻害剤耐性の誘導実験を行なう培養細胞系をつくった（村上）。

（3）柱2の研究：Vif, Gag 等の機能調節を解析し、レトロウイルスの種特異性発現の責任領域を規定することで、新たな HIV 感染サルモデルの開発基盤をつくった（足立）。HIV-1 インテグラーゼの制御機構を解析する培養細胞系をつくった（増田）。APOBEC3G の機能調節を解析し、リン酸化されると Vif 誘導性分解作用に抵抗性となることを見つけた（高折）。HIV-1 Gag の機能調節を解析し、Gag-Pol 前駆体の細胞内輸送と、Gag の成熟場所に関する新知見を得た（森川）。HIV-1 Vpr の機能調節を解析し、核移行制御に関する新知見を得た（間）。HIV-1 の転写調節を解析し、ウイルス増殖阻害剤候補をスクリーニングした（岡本）。

（4）他の協力研究：HIV-1 粒子の脱殻過程に Peptidyl-prolyl Isomerase Pin1 が関与することを見つけた（熊本大学医学薬学研究部 三隅将吾）。HIV-1 ゲノム組換え効率は、ゲノム二量体化効率と相関することを定量的に示した（大阪大学微生物病研究所 櫻木淳一）。

### 4. 考察

薬剤耐性 HIV の問題は、行政、社会科学、臨床医学、基礎医学が一体となって対処する必要がある。本研究は、HIV の薬剤耐性検査、疫学調査、薬剤治療、抗 HIV 薬とワクチン開発等を実施する際の科学的基盤を提供する。

また、計算科学とゲノム解析技術を感染症研究に応用する新しい研究戦略の構築が期待される。ウイルス分離を経ずに自然界のウイルスの特徴と変化様式を知ることで、薬剤逃避と持続的増殖のしくみを正しく理解する道が開ける。より有効な HIV 増殖制御法を開発できる。

今、HIVの薬剤耐性と増殖のしくみを研究するための新しい発想や方法論の構築が強く求められている。計算科学とゲノム科学の進展は著しく、様々な生命現象の解析に応用できる普遍性をもつ。感染症研究にも適用できるはずである。しかし、十分に活用されているとは言えない。本研究の試みは、感染症研究に新たな方法論を確立していくうえで重要な意義を持つ。

佐藤らの計算科学の研究成果は、学術的意義と応用上の有用性が高い。HIV-1の免疫逃避とR5ウイルスの持続感染を理解する分子基盤を提供する。感染症研究に計算科学を適用する道を開いた。

足立らの種特異性機構の研究成果も、大きな意義をもつ。レトロウイルスの種特異性が生じるしくみの理解が格段に進んだ。必要だが困難であったHIV-1感染サルモデル構築への道を開いた意義は大きい。

3年の研究期間で独自の新しい研究システムの構築を試みることは、他の分担研究者にも求められている。遊佐らの解析系は、治療変更後に生じる耐性変異を予測する実験系として興味深い。上野、鴻永らは、ヒト免疫系の多型が耐性発現に及ぼす影響を解析する系の準備を進めている。佐藤、鴻永らは、治療中の感染者のHIVゲノム解析の準備を進めている。鴻永、村上、西澤らは、薬剤耐性変異に関する貴重な情報の蓄積を続けている。

足立、増田、高折、岡本、森川、間、村上らのレトロウイルス増殖機構研究は、新たなHIV増殖阻害剤開発の基盤を提供する。薬剤耐性HIVの制御につながる。研究協力者(三隅、櫻木)の研究も同等の大きな意義をもつ。一方で、学術的意義をもつ。各々は、独自の視点と解析系をもつ。今後も、新しい発想や方法論に基づき地道な基礎知見を積み重ね、より高いレベルの学術研究に発展させていくことが強く求められている。

## 5. 自己評価

### 1) 達成度について

初年度は、計画通りに進んだ。

### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

本研究の試みが軌道に乗れば、学術的意義は大きい。ウイルス学と計算科学をつなぐ境界領域研究として、国際的な先端性がある。柱1、2の研究は、社会的意義も大きい。エイズ対策の科学的基盤を提供する。HIVの薬剤耐性検査、疫学調査、薬剤治療、治療薬とワクチン開発等を実施するうえで必要不可欠な基礎ウイルス学情報を提供する。

### 3) 今後の展望について

前年度の成果を発展させる。計算科学の研究では、薬剤逃避のしくみ、免疫逃避のしくみ、HIV感染のしくみ、HIV増殖のしくみ等の研究への適用を研究する(佐藤)。柱1では、治療中のウイルスゲノムの特徴(佐藤、鴻永)、耐性ウイルスの遺伝子と生物活性の特徴(鴻永、遊佐、村上、西澤)、ヒト免疫系の遺伝的多型が耐性獲得にあたる影響(上野、鴻永)を解析する。柱2では、個体レベルでのレトロウイルスの感染・増殖の制御機構(足立、佐藤)、細胞レベルでの制御機構(増田、森川、間)、分子レベルでの制御機構(岡本、高折)を解析する。薬剤耐性HIVの発生と持続的増殖のしくみを考察する。

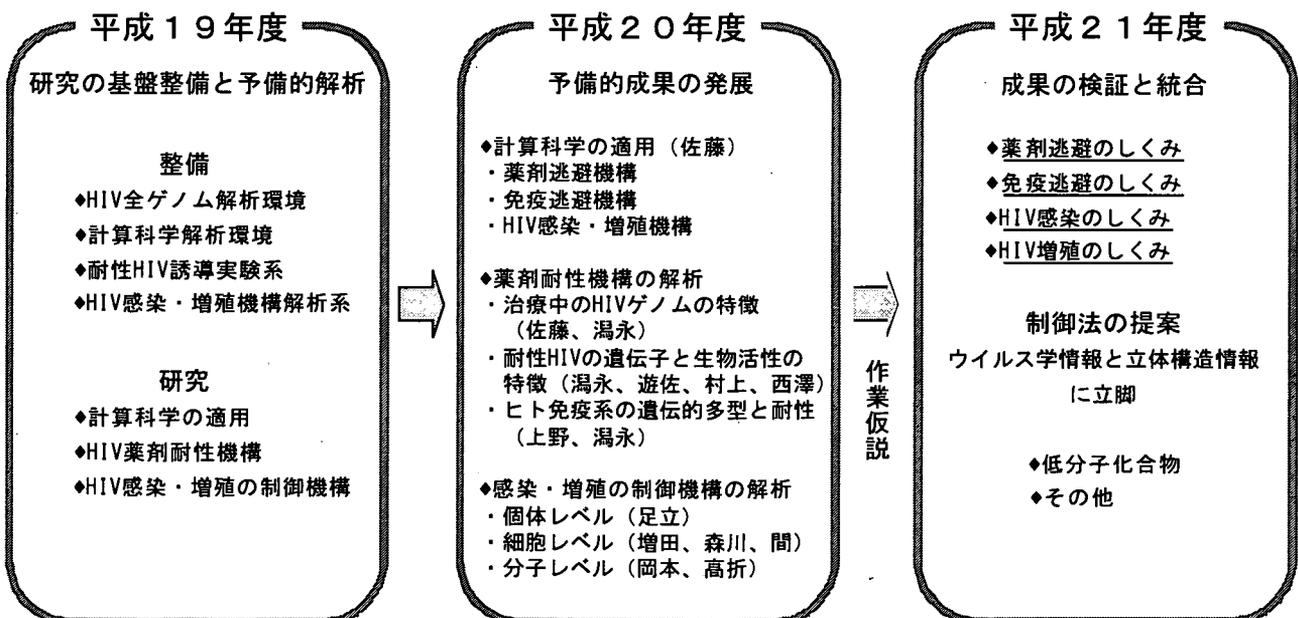
最終年度は、主要な発見や仮説を検証し、統合する。ウイルス学情報と立体構造情報に立脚した新しいHIV制御法(薬剤耐性ウイルスを含む)を提案する。

## 6. 結論

新しい研究戦略の構築が順調に進んだ。残り2年間の研究で、各自が、新しい方法論の検討を重ねる。薬剤耐性HIVの発生機構を明らかにする。個体、細胞、分子レベルでレトロウイルスの感染と増殖の新たな制御機構を明らかにする。薬剤耐性HIVの発生と持続的増殖のしくみについて作業仮説をつくる。ウイルス学情報と立体構造情報に立脚した新しいHIV制御法を提案する。

## 7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

なし。



## 研究発表

## 主任研究者

## 佐藤裕徳

- 1) Oka T, Yamamoto M, Yokoyama M, Ogawa S, Hansman GS, Katayama K, Miyashita K, Takagi K, Tohya Y, Sato H, and Takeda N. Highly conserved configuration of catalytic amino acid residues among calicivirus-encoded proteases. *J. Virol.* 81:6798-6806,2007.
- 2) Song H, Nakayama EE, Yokoyama M, Sato H, Levy JA, and Shioda T. A single amino acid of Human immunodeficiency virus type 2 capsid determines susceptibility to cynomolgus monkey and human TRIM5 $\alpha$  restriction. *J. Virol.* 81:7280-7285,2007.
- 3) Kameoka M, Kitagawa Y, Utachee P, Jinnopat P, Isarangkura-na-ayuthaya P, Dhepakson P, Tokunaga K, Sato H, Komano K, Yamamoto N, Oguchi S, Natori Y, Nishimune Y, Sawanpanyalert P, and Ikuta K. Identification of the suppressive factors for human immunodeficiency virus type-1 replication using the siRNA mini-library directed against host cellular genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 359:729-734,2007.
- 4) Kubo Y, Yokoyama M, Yoshiia H, Mitania C, Tominaga C, Tanaka Y, Sato H, and Yamamoto N. N-glycan-mediated protection of human cells from human immunodeficiency virus type 1 X4 virus infection and a viral mechanism to counteract the host defense system. *J. Gen. Virol.* 88:3139-3144,2007.

## 分担研究者

## 湯永博之

- 1) Honda M, Yogi A, Ishizuka N, Genka I, Gatanaga H, Teruya K, Tachikawa N, Kikuchi Y, Oka S. Effectiveness of subcutaneous growth hormone in HIV-1 patients with moderate to severe facial lipoatrophy. *Internal Medicine.* 46(7): 359-362,2007.
- 2) Yamanaka H, Gatanaga H, Kosalaraksa P, Matsuoka-Aizawa S, Takahashi T, Kimura S, Oka S. Novel mutation of human DNA polymerase gamma associated with mitochondrial toxicity induced by anti-HIV treatment. *Journal of Infectious Diseases.* 195(10):1419-1425,2007.
- 3) Fujisaki S, Fujisaki S, Ibe S, Asagi T, Itoh T, Yoshida S, Koike T, Oie M, Konda M, Sadamasu K, Nagashima M, Gatanaga H, Matsuda M, Ueda M, Masakane A, Hata M, Mizogami Y, Mori H, Minami R, Okada K, Watanabe K, Shirasaka T, Oka S, Sugiura W, Kaneda T. Performance and quality assurance of genotypic drug-resistance testing for human immunodeficiency virus type 1 in Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases.* 60(2-3):113-117, 2007.
- 4) 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 S, Shirasaka T, Kimura S, Oka S. Successful efavirenz dose reduction in HIV type 1-infected individuals with cytochrome P450 2B6 \*6 and \*26. *Clinical Infectious Diseases.* 45 (9):1230-1237,2007.

## 遊佐敬介

- 1) Monde K, Maeda Y, Tanaka Y, Harada S, Yusa K. Gp120 V3-dependent impairment of R5 HIV-1 infectivity due to virion incorporated CCR5. *J. Biol. Chem.* In press.
- 2) Maeda Y, Yusa K, Harada S. Altered sensitivity of an R5X4 HIV-1 strain 89.6 to coreceptor inhibitors by a single amino acid substitution in the V3 region of gp120. *Antiviral Res.* In press.
- 3) Harada S, Monde K, Tanaka Y, Kimura T, Maeda Y, Yusa K. Neutralizing antibodies decrease the envelope fluidity of HIV-1. *Virology.* In press.
- 4) Harada S, Yokomizo K, Monde K, Maeda Y, Yusa K. A broad antiviral neutral glycolipid, fattviracin FV-8, is a membrane fluidity modulator. *Cell. Microbiol.* 9:196-203,2007.

## 上野貴将

- 1) Ueno T, Motozono C, Douki S, Mwimanzu P, Rauch S, Fackler OT, Oka S, and Takiguchi M. CTL-mediated selective pressure influences dynamic evolution and pathogenic functions of HIV-1 Nef. *Journal of Immunology.* In press.
- 2) 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. *Journal of Immunology* 178:5513-5523,2007.

## 村上 努

- 1) Murakami T. Roles of the interactions between Env and Gag proteins in the HIV-1 replication cycle. *Microbiol. Immunol.* In press.
- 2) Murakami T, and Yamamoto N. AIDS: How Do We Overcome This Social or Biodisaster? *The Journal of Disaster Research.* 2:71-80,2007.

## 西澤雅子

- 1) Hamatake M, Nishizawa M, Yamamoto N, Kato S, Sugiura W. A simple competitive RT-PCR assay for quantitation of HIV-1 subtype B and non-B RNA in plasma. *J. Virol. Methods.* 142:113-117,2007.

- 2) Kassu A, Fujino M, Matsuda M, Nishizawa M, Ota F, Sugiura W. Molecular epidemiology of HIV type 1 in treatment-naïve patients in north Ethiopia. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 3:564-568,2007.

## 足立昭夫

- 1) Nomaguchi M, and Adachi A. Role of HIV-1 Vpu protein for virus spread and pathogenesis. *Microbes and Infection*. In press.
- 2) Nomaguchi M, and Adachi A. Species barrier of HIV-1 and its jumping by virus engineering. *Reviews in Medical Virology*. In press.
- 3) Igarashi T, Iyengar R, Byrum R A, Buckler-White A, Dewar R L, Buckler C E, Lane H C, Kamada K, Adachi A, and Martin M A. An HIV-1 derivative with 7% SIV genetic content is able to establish infections in pig-tailed macaques. *J. Virol*. 81:11549-11552,2007.
- 4) Piroozmand A, Yamamoto Y, Khamsri B, Fujita M, Uchiyama T, and Adachi A. Generation and characterization of APOBEC3G-positive 293T cells for HIV-1 Vif study. *Journal of Medical Investigation*. 54:154-158,2007.

## 岡本 尚

- 1) Enya K, Hayashi H, Takii T, Ohoka N, Kanata S, Okamoto T, and Onozaki K. The interaction with Sp1 and reduction in the activity of histone deacetylase 1 are critical for the constitutive gene expression of IL-1 $\alpha$  in human melanoma cells. *J. Leuk. Biol*. In press.
- 2) Sanda T, Okamoto T, Uchida Y, Nakagawa H, Iida S, Kayukawa K, Suzuki T, Oshizawa T, Suzuki T, Miyata N, and Ueda R. Proteome analyses of the growth inhibitory effects of NCH-51, a novel histone deacetylase inhibitor, on lymphoid malignant cells. *Leukemia*. In press.
- 3) Hamano T, Matsuo K, Hibi Y, Victoriano A-F B, Takahashi N, Mabuchi Y, Soji T, Irie S, Sawanpanyalert P, Yanai H, Hara T, Yamazaki S, Yamamoto N, and Okamoto T. A single nucleotide synonymous mutation in *gag* gene controlling human immunodeficiency virus type 1 virion production. *J. Virol*. 81:1528-1533,2007.
- 4) Kato H, Honma R, Sanda T, Fujiwara T, Ito E, Yanagisawa Y, Imai J, Okamoto T, and Watanabe S. Knock down of hSNF5/Inil causes cell-cycle arrest and apoptosis in a p53-dependent manner. *BBRC*. 2007;361:580-585.
- 5) Tanaka K, Hasegawa J, Asamitu K, and Okamoto T. Mabnolia ovoata extract and its active component magnolol prevnt skin photoaging via inhibition of nuclear factor kappa B. *Eur. Journal of Pharmacology*. 565:212-219,2007.
- 6) Itoh T, Hayashi H, Xu J, Takii T, Miyazawa K, Ariga H, Akahoshi T, Nagaya W Y, Otsuka T, Okamoto T, and Onozaki K. Dihydrotestosterone inhibits tumor necrosis factor  $\alpha$  induced interleukin-1 $\alpha$  mRNA expression in rheumatoid fibroblast-like synovial cells. *Biol. Pharm. Bull*. 30(6): 1140-1143,2007.

## 高折晃史

- 1) Noguchi C, Hiraga N, Mori N, Tsuge M, Imamura M, Takahashi S, Fujimoto Y, Ochi H, Abe H, Maekawa T, Yatsuji H, Shirakawa K, Takaori-Kondo A, and Chayama K. Dual Effect of APOBEC3G on Hepatitis B Virus. *J. Gen. Virol*. 88(2): 432-440,2007.

## 間 陽子

- 1) Mwangi W, Brown WC, Splitter GA, Davies CJ, Howard CJ, Hope JC, Aida Y, Zhuang Y, Hunter BJ, and Palmer GH. DNA vaccine construct incorporating intercellular trafficking and intracellular targeting motifs effectively primes and induces memory B- and T-cell responses in outbred animals. *Clin. Vaccine Immunol*. 14:304-311,2007.
- 2) Nitahara-Kasahara Y, Kamata M, Yamamoto T, Zhang X, Miyamoto Y, Muneta K, Iijima S, Yoneda Y, Tsunetsugu-Yokota Y, and Aida Y\*. Novel nuclear import of Vpr promoted by importin  $\alpha$  is crucial for human immunodeficiency virus type 1 replication in macrophages. *J. Virol*. 81:5284-5293,2007.
- 3) Hashizume C, Kuramitsu M, Zhang X, Kurosawa T, Kamata M, and Aida Y\*. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr interacts with spliceosome-associated protein 145 to mediate cellular pre-mRNA splicing inhibition. *Microbes Infect*. 9:490-497,2007.
- 4) Takeshima S, Miki A, Kado M, and Aida Y\*. Establishment of a sequence-based typing system for *BoLA-DQA1* exon 2. *Tissue Antigens*. 69:189-199,2007.

## 森川裕子

- 1) Morikawa Y, Goto T, Yasuoka D, Momose F, and Matano T. Defect of human immunodeficiency virus type 2 Gag assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Virol*. 81:9911-9921,2007.
- 2) Momose F, Kikuchi Y, Komase K, and Morikawa Y. Visualization of microtubule-mediated transport of influenza viral progeny ribonucleoprotein. *Microbes Infect*. 9:1422-1433,2007.

研究課題：多剤耐性 HIV における将来的な変異・構造予測と新規抗 HIV 薬開発

課題番号：H19-エイズ-若手-003

主任研究者：川下 理日人（大阪大学大学院薬学研究科 助教）

分担研究者：岡本 晃典（大阪大学大学院薬学研究科 助教）、中村 昇太（大阪大学微生物病研究所 タイ感染症共同研究センター 特任助教）、後藤 直久（大阪大学微生物病研究所附属遺伝情報実験センター 特任研究員）、U. Chandimal de Silva（大阪大学微生物病研究所 タイ感染症共同研究センター 特任研究員）

## 1. 研究目的

HIV は変異速度がきわめて速く、阻害剤耐性株の生じやすいウイルスであるため、多剤耐性ウイルスが出現しており、既存の HAART に限界が生ずるのは時間の問題である。

そのような状況に対処すべく、既存の抗 HIV 薬の改変や新しい作用機序を有する抗 HIV 薬の開発が急務となっている。しかし、それらに対しても耐性ウイルスが既に報告されており、さらなる対策が必要となる。

そこでこれら耐性変異が生じる位置、それらの構造変化を前もって予測することができれば、耐性ウイルス出現時にも速やかに対処可能となる。よって、本研究ではそのような背景下、以下の4つの項目に沿って研究を行う。

①耐性ウイルスに対する網羅的配列解析と正の淘汰圧を持つ変異部位の確定 ②多剤耐性ウイルス蛋白質に対する構造予測および阻害剤予測 ③今後起こりうる耐性変異の予測とそれら変異蛋白質の構造予測 ④構造未知蛋白質の X 線結晶構造解析

本年度はまず、HIV-1 ウイルスのサブタイプごとにおける配列解析を行い、保存部位、非保存部位に分類する。また、多剤耐性ウイルスのプロテアーゼなどに対して、ホモロジーモデリング等による構造予測を行い、それに対応する阻害剤を予測する。一方、実験面からは、合わせて多剤耐性ウイルスプロテアーゼなどの X 線構造解析を行う。

## 2. 研究方法

### <プロテアーゼ阻害剤>

①Los Alamos の HIV データベースより、8 カ国・地域に関する AE 型および B 型の HIV-1 プロテアーゼの核酸配列を入手し、それらの核酸配列をアミノ酸配列に翻訳した。

②カテゴリごとにアミノ酸配列をアライメントした後、残基ごとに最も頻度の高いアミノ酸を決定し、これらの組み合わせからなる配列をそのカテゴリ中での平均配列と決定した。さらにサブタイプ AE と B の二つグループに分け、各グループ間の平均配列の差を検討した。なお、同じ平均配列は統合した。

③結晶構造 (PDB ID: 1HVC) をテンプレートとし、統

合計算化学ソフト MOE を用いて、平均配列のホモロジーモデリングを行った。

④これらに対し、MOE DOCK 及び FlexSIS を用いて、9 種のプロテアーゼ阻害剤とのドッキングスタディを行い、それらの結果と実際の薬剤耐性に関する実験結果との比較を行っている。

また、中村はタイで主に蔓延しているサブタイプ AE 型のプロテアーゼが、既存のサブタイプ B 型で開発されたプロテアーゼ阻害剤に対してどのような感受性や耐性を示すか調べるために、HIV 陽性患者のうち、プロテアーゼ阻害剤に感受性を持つサンプルと、プロテアーゼ阻害剤を5年間用いてきたサンプルを入手し、遺伝子解析やドッキングシミュレーションによる比較、薬剤結合評価を行った。<膜融合阻害剤>

①HIV データベースからすべての AE 型 (236 個)、B 型 (2325 個)、AG 型 (83 個) の HIV-1 gp41 のアミノ酸配列を入手し、その中の C-HR 部分の 34 残基を抽出した。なお、抽出時に同じ配列となった場合はこの際に消去した。

②MOE を用いて、これらの配列全てに対しホモロジーモデリングを行った。構造最適化後、各モデルの全エネルギーを計算することにより、それらの安定性を測定した。

③より膜融合阻害活性の強いペプチドを探索するために、②において最も安定性が高い配列を元に、各残基を変異させ、より安定性の高い配列を設計した。

### (倫理面への配慮)

計算化学的手法を用いた分子設計に関しては、ヒトの遺伝子や個人情報等の利用がないため、別段考慮する必要はない。もし、研究協力者がウイルス関係の実験を行うに当たり、個人の血液サンプル等を用いる場合は、倫理委員会の規定に則ると共に、担当研究者以外にその個人情報が漏れないよう、十分配慮する。

## 3. 研究結果

### <プロテアーゼ阻害剤>

先の平均配列から、結果として共通の配列となったものを統合した計9つの平均配列 (B 型 5 種、AE 型 4 種) に

関して、ホモロジーモデリングとドッキングスタディを行った結果、ドッキングスコアでは、nelfinavir が他のもの比べて高スコアとなった。

また、中村による研究では、得られたサンプルの遺伝子解析の結果、明らかに耐性変異と思われる遺伝子変異が見つかった。また、ドッキングシミュレーションの結果、用いた2種の薬剤だけでなく、9種中6種の薬剤に対して耐性を獲得している可能性が示唆された。

#### <膜融合阻害剤>

具体的な C-HR 類似ペプチドの配列は公開しないが、ある残基を変異させることにより、N-HR との相互作用エネルギーおよび C-HR 類似ペプチドの安定性が大幅に増加した。以前の研究で、計算化学的手法による相互作用エネルギーと実験的な膜融合阻害活性にはある程度の相関が認められることを報告しており、現在、これらを候補ペプチドとして、それらペプチドの合成、および生物活性の評価を研究協力者に依頼している。

### 4. 考察

#### <プロテアーゼ阻害剤>

現在、平均配列に対するスコアリングは終了したが、これだけでは耐性変異の有無を判別することは不可能であるため、今後は耐性変異を有する配列を用いて同様の検討を行い、平均配列との差を取ることで、耐性の有無に関する評価を行う予定である。また、中村による研究では、耐性を有する構造が示唆されているが、実際の構造的な確認は不十分であるため、それらの確認を行う予定である。

#### <膜融合阻害剤>

配列に関する詳細な情報は省くが、この変異を導入することにより、構造的には C-HR 類似ペプチドの  $\alpha$ -ヘリックスがより固定され、また、N-HR とも新たな相互作用を生むため、相互作用エネルギーおよびペプチドの安定性ともに増大したものと考えられる。

### 5. 自己評価

#### 1) 達成度について

プロテアーゼの配列解析、および保存部位・非保存部位の抽出に関しては、ほぼ完了している。それゆえ、次年度はこれを利用して、変異傾向の把握などを行う。また、可能であれば、同様の研究を逆転写酵素等、他の蛋白質に関しても検討する。ホモロジーモデリングやドッキングスタディに関しては、平均配列に関してほぼ完了しており、現在実験結果との照合を行っている。また、これらの研究は中村によりタイで入手したサンプルを用いても行っており、これらの目標はほぼ達成されたものと考えている。た

だし、阻害剤予測や X 線結晶構造解析に関しては進展しておらず、これらは次年度早急に解決する必要がある。

膜融合阻害剤に関しては、特別な目標設定をおいていなかったが、計算機上で予想外に安定なペプチドを見出し、合成および生物活性評価にかかる予定であるため、プロテアーゼ阻害剤と合わせて、達成度に関しては概ね問題はないと考えている。

#### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

既存の薬剤耐性プロテアーゼに関するドッキングスタディによる研究データの蓄積は、今後出現する変異ウイルスの薬剤耐性を見積もる良い指標となると考えられる。すなわち、これらの情報をもとに、早期の治療対策を考慮できるのではないかと考える。

#### 3) 今後の展望について

先に述べたように、平均配列の解析のみでは薬剤耐性の判別に使用できないため、まず、既存の耐性配列を用いて同様の検討を行い、ドッキングスコアによる耐性の有無に関する判別を行いたい。また、タイに関するサンプルでは、なぜこの変異パターンによって6種もの耐性を獲得できるのか、構造的な基盤を精査したい。

膜融合阻害剤では、先に見出した配列を用い、合成と生物活性評価を行うほか、それらで得られた情報を元に、再び計算化学へのフィードバックを行い、分子軌道計算なども取り入れた、より精度の良い膜融合阻害活性ペプチドの設計を検討する。

また、これらの配列解析による情報を利用して、将来的な変異予測に関する研究も行う。

### 6. 結論

今回我々は、配列解析、ホモロジーモデリング、ドッキングスタディなど、計算機を用いた手法を利用して、プロテアーゼおよび膜融合阻害剤に関する情報を得、一部では阻害剤開発に直結するペプチドの設計を行った。今後、これらの情報を活用して、実際の薬剤耐性ウイルスに対する適用、および阻害剤候補となるペプチドに関しては、実験的な評価を行う予定であり、これらが首尾良く成功すれば、エイズ対策への強力な手段となりうると考えている。

### 7. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

膜融合阻害剤に関しては、先行研究と比較して顕著な効果を有することが判明すれば、特許取得も可能であると考えられる。それ以外には知的所有権の取得、および出願予定は現在のところない。

## 研究発表

## 主任研究者

川下 理日人

学会発表

海外

- 1) Norihito Kawashita, Yu-Shi Tian, Masashi Yasuda, U. Chandimal de Silva, Shota Nakamura, Kousuke Okamoto, Naohisa Goto, Rika Nishikiori, Masanori Kameoka, Masaya Kawase, Teruo Yasunaga, Kazuyoshi Ikuta, Tatsuya Takagi  
Computational Studies for HIV Envelope Protein.  
The 2nd Thailand-Japan Joint Forum on Infectious Diseases, Bangkok, 2007.10

国内

- 1) Yu-Shi Tian, Norihito Kawashita, Masashi Yasuda, Akiko Kawaguchi, Noriyuki Yamashita, U. Chandimal de Silva, Shota Nakamura, Kousuke Okamoto, Naohisa Goto, Rika Nishikiori, Masanori Kameoka, Masaya Kawase, Teruo Yasunaga, Kazuyoshi Ikuta, Tatsuya Takagi  
Computational alanine scanning for the 6-helix bundle model between HIV-1 gp41 N-terminal heptad repeat and membrane fusion inhibitor C34  
Computational Biology and Chemistry, 広島、2008年10月
- 2) 川下理日人、田雨時、中村昇太、岡本晃典、後藤直久、U. Chandimal de Silva、亀岡正典、川瀬雅也、安永照雄、生田和良、高木達也  
蛋白質間相互作用計算によるアミノ酸残基と HIV gp41 膜融合阻害剤の阻害活性との関係  
日本エイズ学会学術集会、広島、2008年11月

## 分担研究者

岡本 晃典

原著論文による発表

欧文

- 1) Ximei Wu, Takuma Iguchi, Norio Itoh, Kousuke Okamoto, Tatsuya Takagi, Keiichi Tanaka, Tsuyoshi Nakanishi.  
Ascorbic Acid transported by sodium-dependent vitamin C transporter 2 stimulates steroidogenesis in human choriocarcinoma cells.  
*Endocrinology*, 149, 73-83, (2008).
- 2) Ohgaru, T.; Shimizu, R.; Okamoto, K.; Kawase, M.; Shirakuni, Y.; Nishikiori, R.; Takagi, T.  
Ordinal Classification using Comparative Molecular Field Analysis,  
*J. Chem. Inf. Model.*, in press.

学会発表

国内

- 1) 錦織理華, 米倉聡, 岡本晃典, 大軽貴典, 松浦晶子, 越智雪乃, 森本正太郎, 斉藤直, 川下理日人, 安永照雄, 川瀬雅也, 高木達也  
PLS アルゴリズムを用いたノンパラメトリック回帰手法の改良 情報化学討論会 2008 京都
- 2) 山崎広之, 大軽貴典, 岡本晃典, 川下理日人, 高原淳一, 錦織理華, 川瀬雅也, 安永照雄, 高木達也  
回帰判別分析の改良 情報化学討論会、京都、2008年10月
- 3) 石塚賀彦, 大軽貴典, 岡本晃典, 川下理日人, 高原淳一, 錦織理華, 安永照雄, 川瀬雅也, 高木達也  
Druglikeness を有する化合物の oral bioavailability 予測 構造活性相関シンポジウム、京都、2008年10月

## 中村 昇太

## 原著論文による発表

- 1) Lin L., Nakano H., Nakamura S., Uchiyama S., Fujimoto S., Matsunaga S., Kobayashi Y., Ohkubo T., and Fukui K.,  
Crystal Structure of *Pyrococcus horikoshii* PPC Protein at 1.60 Å Resolution.,  
*Proteins*, 67, 505-507 (2007).
- 2) Takahashi R., Nakamura S., Yoshida T., Kobayashi Y., and Ohkubo T.,  
Crystallization of human nicotinamide phosphoribosyltransferase.,  
*Acta Crystallogr. F63*, 375-377 (2007).
- 3) Ogawa K., Sonoyama T., Takeda T., Ichiki S., Nakamura S., Kobayashi Y., Uchiyama S., Nakasone K., Takayama S., Mita H., Yamamoto Y., and Sambongi Y.,  
Roles of Shortly Connecting Disulfide Bond in the Protein Stability and Redox Function of *Shewanella violacea* Cytochrome *c*<sub>5</sub>,  
*Extremophiles*, 6, 797-807 (2007).

## 学会発表

## 海外

- 1) Shota Nakamura, Nuanjun Wichukchinda, Masanori Kameoka, Piyamat Jinopat, Panasda Isarangkura-na-ayuthaya, Panita Pathipvanich, Teruo Yasunaga, Kazuyoshi Ikuta, Wattana Auwanit and Pathom Sawanpanyalert  
The resistance patterns of Protease inhibitor in HIV-1 CRF01\_AE clinical isolates  
The 2nd Thailand-Japan Joint Forum on Infectious Diseases, Bangkok, 2007.10

## 国内

- 1) Shota Nakamura, Tomotaka Oroguchi, Tsutomu Yamane, Mitsunori Ikeguchi, Sachiyo Kataoka, Maiko Koga, Masayuki Oda, Yuji Kobayashi and Tadayasu Ohkubo  
Molecular dynamics simulation of 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase with NADH: Structural changes in the substrate-binding loop  
第45回日本生物物理学会年会、横浜、2007年12月

## 後藤 直久

## 原著論文による発表

## 欧文

- 1) Naohisa Goto, Ken Kurokawa, Teruo Yasunaga  
Analysis of invariant sequences in 266 complete genomes  
*Gene*, 401, 172-180, (2007).
- 2) Hilmar Lapp, Sendu Bala, James P. Balhoff, Amy Bouck, Naohisa Goto, Mark Holder, Richard Holland, Alisha Holloway, Toshiaki Katayama, Paul O. Lewis, Aaron J. Mackey, Brian I. Osborne, William H. Piel, Sergei L. Kosakovsky Pond, Art F.Y. Poon, Wei-Gang Qiu, Jason E. Stajich, Arlin Stoltzfus, Tobias Thierer, Albert J. Vilella, Rutger A. Vos, Christian M. Zmasek, Derrick J. Zwickl and Todd J. Vision  
The 2006 NESCent Phyloinformatics Hackathon: a field report,  
*Evolutionary Bioinformatics*, 3, 357-366, (2007).

## U. Chandimal de Silva

なし

研究課題：RNAi 耐性ウイルス株の出現に対処する第二世代の RNAi 医薬品の開発

課題番号：H17-エイズ-002

主任研究者：高久 洋 (千葉工業大学・工学部・生命環境科学科・教授)  
 分担研究者：岡田 誠治 (熊本大学・エイズ学研究センター・予防開発分野・教授)  
 黒崎 直子 (千葉工業大学・工学部・生命環境科学科・准教授)  
 橋本 香保子 (千葉工業大学・工学部・生命環境科学科・講師)  
 山本 典生 (東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・助教)

## 1. 研究目的

エイズは多剤併用療法 (HAART 療法) により慢性疾患化へと変化しつつある反面、多剤耐性株の出現を増大と難治治療例を増加させることが長期療養の潜在的問題点の一端である。この解決のため、RNAi システムの利用を考えた。しかし、RNAi 耐性ウイルス株の出現、shRNA による IFN 誘導といった問題点が明らかとなってきた。本研究では第二世代 RNAi の RNAi 薬剤耐性 HIV-1 に対する抗ウイルス効果の評価を行うと共にその抗ウイルス効果メカニズムを詳細に解析することを目的とする。また、ここで構築した機能性 RNA 発現ベクターの抗 HIV-1 活性を評価するために使用したウイルスは、野生株のみならず、これまでに分離された薬剤耐性ウイルスを用いて抗ウイルス活性を検討し、単に RNAi 耐性ウイルス株に対処だけではなく、今まで問題となっている薬剤耐性ウイルス株に対してもその長期にわたって HIV-1 ウィルス増殖抑制可能な遺伝子医薬 (shRNA) の開発を目指す。そのために、HIV-1 感染モデルマウスを用いて *in vivo* における薬剤効果の評価系を樹立する。そして、*in vitro* である程度の効果が確認されている decoy-TAR RNA と shRNA-Vif の *in vivo* における効果を確かめる。

## 2. 研究方法

shRNA は HIV-1 の PBS (primer binding site) 下流にある DIS 領域において 21 塩基を標的としたものを 5 種類 T7 RNA ポリメラーゼを用いて合成した。shRNA は HeLa CD4<sup>+</sup>細胞に導入した際の IFN 産生と CPE をそれぞれ検討した。つぎに shRNA (100pmol) を HIV-1 発現プラスミド (pNL-luc または pNL4-3) と共に HeLa CD4<sup>+</sup>細胞へ導入し、48 時間培養後の細胞内のルシフェラーゼ活性または上清中の p24 蛋白質量を測定した。また、ウエスタンブロット法にて各種ウイルスタンパク質 (Pr55gag, vif, tat, nef) の発現も確認した。つぎに、これらの shRNA 配列を組込んだレンチウイルスベクターを作製し、Sup T1 細胞に感染させた。そこに野生株ウイルスを感染させ、感染阻害効果ならびに耐性ウイルス株の出現について検討した。千葉工業大学の羽生・高久らによって開発されたヒト T 細胞の長期培養系にレンチウイルスを用いて decoy-TAR RNA と shRNA-Vif を遺伝子導入する。遺伝子導入された T 細胞を放射線照射した高度免疫不全マウス (NOD/Scid/Jak3 欠損マウス) に移植、更に HIV-1 JRFL 株を攻撃接種する。2 週間後にマウス体内のヒト CD4 陽性 T 細胞数、細胞内 p24、マウス血清中 p24 などを測定して、decoy-TAR RNA と shRNA-Vif の *in vivo* における効果を判定する。また、ヒト臍帯血由来造血幹細胞にレンチウイルスを用いて decoy-TAR RNA と shRNA-Vif を遺伝子導入し、更に NOD/Scid/Jak3 欠損マウスに移植する。移植後 12 週間以降に T 細胞の出現を確認した後、HIV-1 JRFL 株を攻撃接種する。経時的にマウスから採血し、p24 と CD4 陽性 T 細胞の割合を計測することにより、decoy-TAR RNA と shRNA-Vif の *in vivo* における効果を判定する。

(倫理面への配慮)

HIV-1 の感染実験は P3 で行い、環境中への拡散が起こらないよう配慮した。

ヒト由来試料 (末梢血・臍帯血等) を用いた研究は、熊本大学大学院医学薬学研究部等倫理委員会の承認を受け、規則に従い実施した。また、免疫不全マウスの作成及び移植実験等の動物実験は、熊本大学本荘地区動物実験委員会の承認を得た上で「熊本大学動物実験指針」に従い実施した。

## 3. 研究結果

本年度は pppG (n=2)-shRNA での IFN-β の抑制をメカニズムを詳細にするため、コントロールとして pppG (n=2) siRNA を作製した。その結果 pppG (n=2) siRNA では IFN-β の産生が確認された。また dsRNA による RIG-I 認識、さらに下流の IRF-3 の活性化を検討したところ、pppG (n=2)-shRNA ではいずれの場合でも関与は認められなかった。一方、pppG (n=2) siRNA と pppG (n=0, 1)-shRNA は活性化された。これらの結果から pppG (n=2)-shRNA は 5' 末端には 2 つの G 残基と二重鎖部位はヘアピン構造を有することで、TLR, RIG-I からの認識が回避されることが明らかとなった。また shRNA と decoyRNA を組み合わせることで RNAi 耐性ウイルスに対しても長期的な抗 HIV-1 効果が確認できた。さらに、ガイド RNA-EGSs、(tRNase Z が基質を認識し切断するための RNA 酵素) は EGS 耐性ウイルスの出現は回避できたことから shRNA-EGS の組み合わせが可能となった。

つぎに、ヒト T 細胞の長期培養系により増殖した T 細胞を NOD/Scid/Jak3 欠損マウスに移植したところ 2-4 週にわたりマウス体内において T 細胞が増殖することを確認した。そこで、レンチウイルスが誘導する decoy-TAR RNA と shRNA-Vif を遺伝子導入し、さらに遺伝子導入された T 細胞を放射線照射した高度免疫不全マウス (NOD/Scid/Jak3 欠損マウス) に移植、更に HIV-1 JRFL 株の攻撃接種を試みた。しかし、移植後の細胞の生着の割合が不安定であり、効果判定には至っていない。今後、マウスに生着しやすいドナーの選択により、安定した評価系の樹立を目指す。また、ヒト臍帯血由来造血幹細胞をヒト SCF+IL-6 の存在下で培養し、レンチウイルスが誘導する decoy-TAR RNA と shRNA-Vif を遺伝子導入を試みた。GFP を指標として 90% 以上の細胞への遺伝子導入が可能であった。これらの細胞を放射線照射した NOD/Scid/Jak3 欠損マウスに移植した。移植 12 週後に解析したところヒト細胞のマウスへの生着は認められたが、遺伝子導入された GFP 陽性細胞は、ほとんど認められなかった。遺伝子導入後の造血幹細胞が分化してしまった可能性が高いため、遺伝子導入期間の短縮などの改良を試みている。

サブタイプ間で保存性の高い配列を選出したところ、gag, pol, LTR にそのような配列が見出された (6 種類)。それらを標的とする RNAi ベクターを構築し、分子クロー

ンプラスミドと RNAi ベクターを co-transfection して培養上精中の p24 量を測定したところ、4 種類 (RNAi-1, RNAi-2, RNAi-3, RNAi-6) について p24 量の低下を認めた。つぎに、これらを用いてレンチウイルスベクターを複製し、jurkat T 細胞株に遺伝子導入を行った。しかしながら、これらのレンチウイルスベクターは、パッケージング細胞内において働いてしまい、ウイルス粒子の産生効率の大きな低下が見られた。CS-vif-TAR の抗ウイルス活性については、感染後 1 週間前後で control だけでなく、CS-TAR や CS-vif でもウイルス量のはっきりとした増加が認められた。一方、vif-TAR ではウイルスの複製が低く抑えられていた。さらに薬剤耐性株でも同様の傾向が認められ、特に CS-vif-TAR では、感染後 2 週間でも control と比較してウイルス量の低下が認められた。

#### 4. 考察

T7 RNA ポリメラーゼを用いて合成した pppG (n=2)-shRNA は 5' 末端には 2 つの G 残基と二重鎖部位はヘアピン構造を有することで、TLR, RIG-I からの認識を回避できることが示唆された。また shRNA と decoyRNA を組み合わせることで RNAi 耐性ウイルスに対しても抗 HIV-1 効果が認められた。さらに EGS に対しても EGS 耐性ウイルスの出現は回避できたことから shRNA-EGS の組み合わせが可能となった。

サブタイプ間で保存性の高い配列を選出し、それらを標的とする RNAi ベクターを構築し、分子クローンプラスミドと co-transfection して評価したところ、ウイルス産生の低下が示唆された。これらは gag, pol, LTR を標的としており、全長を持つウイルス RNA を標的とすることで gag, pol タンパク質を減少させ、ウイルスの産生を抑制していることが示唆された。CS-vif-TAR については、野生型株でも薬剤耐性株でも感染後 2 週間でウイルス量の低下が認められたことから、RNAi ベクターとして有望であると思われる。

高度免疫不全マウス (NOD/Scid/Jak3 欠損マウス) にレンチウイルスが誘導する decoy-TAR RNA と shRNA-Vif を遺伝子導入した T 細胞と造血幹細胞を用いた系の樹立を試みた。しかし、レンチウイルスで遺伝子導入した細胞のマウス体内における増殖・維持は困難であった。長期培養したヒト T 細胞がマウス体内で増殖することは確認したので、今後、遺伝子導入法の工夫により *in vivo* における薬剤効果の評価系の樹立は可能であると考えられる。

一方、RNAi 医薬品の新たな標的としての Nef の有用性を確認した。今後、従来の薬剤に加えて RNAi 医薬品の有効性が期待できるため、その *in vivo* における評価系の樹立は重要である。

#### 5. 自己評価

##### 1) 達成度について

T7 RNA ポリメラーゼを用いて合成した pppG (n=2)-shRNA は TLR, RIG-I からの認識を回避できることが示唆された。shRNA と decoyRNA を組み合わせることで RNAi 耐性ウイルスに対しても抗 HIV-1 効果が認められたので目的が達成できた。

サブタイプ間で保存性の高い領域をウイルス株の配列を比較して選出し、それを標的とする RNAi ベクターを構築することができた。さらに、少なくとも transfection による実験においてウイルス産生を抑制するものを見出すことが出来た。今後は CS-vif-TAR 耐性ウイルスの長期培養した場合の評価の解析等を行う必要がある。

RNAi 医薬品の効果や副作用を *in vivo* で確認する系の樹立を目指し、高度免疫不全マウス (NOD/Scid/Jak3 欠損

マウス) にレンチウイルスを用いて decoy-TAR RNA と shRNA-Vif を遺伝子導入した T 細胞と造血幹細胞を用いた系の樹立を試みたが、1 年間と期間が短かったこともあり、期間内での達成はできなかった。しかし、長期培養系で得られた T 細胞がマウス体内で増殖可能なことを見出しており、今後 HIV-1 感染モデルマウスを用いた *in vivo* における RNAi 医薬品の評価系を樹立が期待できる。また、RNAi 医薬品の新たな標的として Nef が有望であることを示すことが出来た点は評価できる。

##### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

エイズは現在でも非常に多数の患者が世界中におり、HIV-1 感染症は人類が解決すべき大きな問題である。HIV-1 は非常に変異を起こす率が高いことが知られており、それが治療に対する耐性を獲得しやすいことにつながっている。保存性の高い配列を標的にすることは、様々なウイルス株に対して有効であることと耐性が生じにくいことの 2 つが期待され、有望な治療戦略であると考えられる。治療に耐性のウイルス株の問題を解決するには、作用点が異なる治療戦略を含んだ新たな併用療法を開発することが有効と思われるが、本研究で用いた RNAi ベクターはその候補となりうるであろう。エイズは国際的・社会的に大きな問題であることから、本研究の国際的・社会的意義は大きいと思われる。

##### 3) 今後の展望について

shRNA と decoyRNA を組み合わせることで RNAi 耐性ウイルスに対しても抗ウイルス効果は高く、長期治療が可能になった。また、野生型株でも薬剤耐性株でも感染後 2 週間でウイルス量の低下が認められたことから、RNAi ベクターとして有望であると思われる。サブタイプ間で保存性の高い配列を選出し、それらを標的とする RNAi ベクターを構築に成功したが、今後は、これまで評価してきた CS-vif-TAR 等を組み合わせて、より効果の高い RNAi ベクターの開発を行う。また、安定して RNAi 医薬品の評価が可能なマウス系の樹立を目指す。平行して、新たな分子標的としての Nef に対する RNAi 医薬品の開発を試みる。

#### 6. 結論

本研究によって、RNAi 耐性ウイルスに対する TAR-decoy と vif sh RNA を組み合わせた CS-vif-TAR、は RNAi 耐性ウイルスに対しても長期間にわたり抗ウイルス活性を示した。従来行われてきた HAART と CS-vif-TAR とを組み合わせることで、多剤耐性変異株を含む薬剤耐性 HIV-1 の増殖をも抑制しうるより効果の高い新規治療法が開発可能であると思われる。decoy-TAR RNA と shRNA-Vif を標的とした RNAi 医薬品の *in vivo* における評価系の樹立をめざした。そして、長期培養系で樹立した T 細胞が NOD/Scid/Jak3 欠損マウス体内で増殖可能であることを見出した。近い将来、ヒト免疫系を構築した免疫不全マウスを用いた前臨床試験の確立により、RNAi 医薬品を始めとする新規抗 HIV-1 薬の早期の認可が可能になることが期待できる。HIV-1 感染症の世界的な広がりや薬剤耐性株出現という問題を考えると、このような新しい治療法の開発は国際的にも社会的にも極めて大きな意義を持つものと考えられる。

#### 7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

特開 2007-195440 バキュロウイルスベクターを利用した HIV 感染症治療薬 平成 19 年 8 月 9 日

## 研究発表 a

主任研究者：高久 洋

## 原著論文による発表（欧文）

- 1) Suzuki H., Kaneko H., Tamai N., Shimotohno K., Miyano-Kurosaki N., and Takaku H. (2007) Suppression of Hepatitis C virus core protein by short hairpin RNA expression vectors in the core protein expression Huh-7 cells. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*. in press.
- 2) Gondai T., Yamaguchi K., Hashimoto K., Miyano-Kurosaki N., and Takaku H. (2007) Lack of interferon (IFN) response to T7 Transcribed pppG (n)(n=2,3)–shRNA. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*. in press.
- 3) Kitajima M., Abe T., Miyano-Kurosaki N., Taniguchi M., Nakayama T., and Takaku H. (2007) Induction of NK cell-dependent antitumor immunity by the Autographa californica multiple nuclear polyhedrosis virus. *Molecular Therapy*, in press.
- 4) Gondai T., Yamaguchi K., Miyano-Kurosaki N., Habu Y., and Takaku H. (2007) Short-hairpin RNAs synthesized by T7 phage polymerase do not induce interferon. *Nucleic Acids Research*, in press.
- 5) Noguchi K., Ishitu Y., Miyano-Kurosaki N., and Takaku H. (2007) Expression of shRNA using intron splicing. *Nucleic Acids Symp.Ser.*, **51**, 409-410.
- 6) Kato K., Habu Y., and Takaku H. (2007) Non-sequence specific RNA inhibition of HIV-1 replication. *Nucleic Acids Symp.Ser.*, **51**, 411-412.
- 7) Kitajima M., and Takaku H. (2007) Induction of antitumor-acquired immunity by baculovirus Autographa californica multiple nuclear polyhedrosis virus infection in mice. *Clin. Vaccine Immunol.* in press,
- 8) Miyatake K., Inoue H., Hashimoto K., Takaku H., Takata Y., Yasui N., and Itakura M. (2007) The effects of PKC 412 (CGP41251) on the proliferation and lipopolysaccharide-induced inflammatory responses of RAW 264.7 macrophages. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **360**, 115-121.

## 口頭発表（海外）

- 1) Takaku H.: Hsp90 inhibitors as novel HCV chemotherapeutic agents. Recent Status and Future Prospect of Antiviral Chemotherapy (The Korea-Japan Basic Scientific Cooperation), Jeju, Korea (2007.12)
- 2) Chang Myint Oo, Suzuki T., and Takaku H.: HIV-GagVLPs induce activation of innate and adapted immune responses by activation of dendritic cells, T cells and NK cells. 1<sup>st</sup> Vaccine Congress, Amsterdam, Netherlands (2007.12)
- 3) Ujino S., Yamaguchi S., Tobita R., Miyano-Kurosaki N., Shimotohno K., and Takaku H.: Inhibition of Hsp90 and the proteasome promotes hepatitis C virus genome suppression. 14<sup>th</sup> International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses, Glasgow, UK (2007.9)
- 4) Habu Y., Miyano-kurosaki N., and Takaku H.: Inhibition of HIV-1 replication by a combination of RNase P and 3'tRNase-associated external guide sequences American society of Gene Therapy, 10<sup>th</sup> Annual Meeting, Seattle, USA (2007.5)
- 5) Hayafune M., Mouri Y., Miyano-Kurosaki N., Hashimoto K., and Takaku H.: Human immunodeficiency virus type 1 does not escape from novel single-stranded DNAzyme expression-mediated inhibition. 20<sup>th</sup> International Conference on Antiviral Research. California, USA (2006.4-5)

## （国内）

- 1) 古川亜矢子、水内祐基、河合文隆、羽生勇一郎、杉山隆一、高久洋、永田崇、片平正人：HIV 感染の防御に関する APOBEC3G の構造機能解析。第 30 回日本分子生物学会、第 80 回日本生化学大会合同大会 横浜（2007.12）
- 2) 鈴木等、齋藤大史、黒崎直子、下遠野忠、松浦善治、高久 洋：shRNA 発現バキュロウイルスベクターによる感染症治療。第 17 回アンチセンスシンポジウム 金沢（2007, 12）。
- 3) 後藤丈基、野口耕生、石津賀夫、黒崎直子、高久洋：shRNA 発現システムの開発 第 17 回アンチセンスシンポジウム 金沢（2007, 12）。
- 4) 羽生勇一郎、山本典生、日吉真照、黒崎直子、石川晃一、松田昌和、岡田誠治、松浦互、山本直樹、高久洋：shRNA decoy RNA 共発現レンチウイルスベクターによる HIV-1 複製阻害効果の検討。第 21 回日本エイズ学会 広島（2007.11）
- 5) 杉山隆一、羽生勇一郎、長沼晴樹、古川亜矢子、永田崇、片平正人、高久洋：Hsp70 による HIV-1 ウイルス粒子形成への影響。第 21 回日本エイズ学会 広島（2007.11）
- 6) Chang Myint Oo、鈴木友幸、笠井勇太、渡辺恵、高久洋：HIV-1 GagVLPs inhibit HIV-1 replication by induction of innate and adapted immune responses through activation of human dendric cells and NK cells. 第 21 回日本エイズ学会 広島（2007.11）
- 7) 杉山隆一、羽生勇一郎、長沼晴樹、高久洋：APOBEC3G と Hsp70 の相互作用による HIV-1 ウイルス粒子形成への影響。第 55 回日本ウイルス学会 札幌（2007.10）
- 8) 毛利友香、鈴木等、志田壽利、高久洋：HTLV-1 Rex タンパク質による RNase III-Dicer の活性阻害。第 55 回日本ウイルス学会 札幌（2007.10）
- 9) Chang Myint Oo、鈴木友幸、笠井勇太、渡辺恵、高久洋：HIV GagVLPs induction of innate and acquired immunity activation of human dendric cells, T cells and NK cells. 第 55 回日本ウイルス学会 札幌（2007.10）
- 10) 高久 洋、西部好美、金子央賢、浜野隆一、橋本香保子、松浦善治：バキュロウイルスによる肝硬変の改善 第 66 回日本癌学会学術総会 横浜（2007.10）
- 11) 野口耕生、石津賀夫、黒崎直子、高久洋：shRNA 発現システムの開発。9<sup>th</sup> RNA ミーティング 名古屋（2007.7）

分担研究者：岡田誠治

原著論文による発表（欧文）

- 1) Ohsugi T, Kumadaka T, Okada S, and Urano T; (2007) HTLV-1 Tax promotes oncogenesis not only in immature T cells but also mature T cells. *Nature Medicine* 13(5):527-528.
- 2) Suzu S, Hiyoshi M, Yoshidomi Y, Harada H, Takeya M, Kimura F, Motoyoshi K, and Okada S; (2007) M-CSF-mediated macrophage differentiation but not proliferation is correlated with increased and prolonged ERK activation. *J Cell Physiol* 212(2):519-525.
- 3) Harada H, Goto Y, Ohno T, Suzu S, and Okada S; (2007) Proliferative activation up-regulates the expression of HIV-1 receptors on NK cells and induces HIV-1 infection of NK cells. *Eur J Immunol* 37(8): 2148-2155.
- 4) Ohsugi T, Kumasaka T, Okada S, Ishida T, Yamaguchi K, Horie R, Watanabe T, and Umezawa K; (2007) Dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ) therapy reduces tumor formation in mice inoculated with Tax-deficient adult T-cell leukemia-derived cell lines. *Cancer Lett* 257(2):206-215.
- 5) Hiyoshi M, Suzu S, Yoshidomi Y, Hassan R, Harada H, Sakashita N, Akari H, Motoyoshi K, and Okada S; Interaction between Hck and IV-1 Nef negatively regulates cell surface expression of M-CSF receptor. *Blood* in press.

分担研究者：黒崎直子

原著論文による発表（欧文）

- 1.) Suzuki H., Kaneko H., Tamai N., Shimotohno K., Miyano-Kurosaki N., and Takaku H. (2007) Suppression of Hepatitis C virus core protein by short hairpin RNA expression vectors in the core protein expression Huh-7 cells. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*. in press.
- 2.) Gondai T., Yamaguchi K., Hashimoto K., Miyano-Kurosaki N., and Takaku H. (2007) Lack of interferon (IFN) response to T7 Transcribed pppG (n)(n=2,3) -shRNA. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*. in press.
- 3.) Kitajima M., Abe T., Miyano-Kurosaki N., Taniguchi M., Nakayama T., and Takaku H. (2007) Induction of NK cell-dependent antitumor immunity by the Autographa californica multiple nuclear polyhedrosis virus. *Molecular Therapy*, in press.
- 4.) Gondai T., Yamaguchi K., Miyano-Kurosaki N., Habu Y., and Takaku H. (2007) Short-hairpin RNAs synthesized by T7 phage polymerase do not induce interferon. *Nucleic Acids Research*, in press.

口頭発表(海外)

- 1) Habu Y., Miyano-kurosaki N., and Takaku H.: Inhibition of HIV-1 replication by a combination of RNase P and 3'tRNase-associated external guide sequences American society of Gene Therapy, 10<sup>th</sup> Annual Meeting, Seattle, USA (2007.5)
- 2) Hayafune M., Mouri Y., Miyano-Kurosaki N., Hashimoto K., and Takaku H.: Human immunodeficiency virus type 1 does not escape from novel single-stranded DNAzyme expression-mediated inhibition. 20<sup>th</sup> International Conference on Antiviral Research. California, USA (2006.4-5)

(国内)

- 1) 鈴木等、齋藤大史、黒崎直子、下遠野忠、松浦善治、高久 洋：shRNA 発現バキュロウイルスベクターによる 2)
- 2) 羽生勇一郎、山本典生、日吉真照、黒崎直子、石川晃一、松田昌和、岡田誠治、松浦互、山本直樹、高久洋：shRNA decoy RNA 共発現レンチウイルスベクターによる HIV-1 複製阻害効果の検討。第 21 回日本エイズ学会 広島 (2007.11)

分担研究者：橋本香保子

原著論文による発表（欧文）

- 1) Gondai T., Yamaguchi K., Hashimoto K., Miyano-Kurosaki N., and Takaku H. (2007) Lack of interferon (IFN) response to T7 Transcribed pppG (n)(n=2,3) -shRNA. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*. in press.
- 2) Miyatake K., Inoue H., Hashimoto K., Takaku H., Takata Y., Yasui N., and Itakura M. (2007) The effects of PKC 412 (CGP41251) on the proliferation and lipopolysaccharide-induced inflammatory responses of RAW 264.7 macrophages. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 360, 115-121.

分担研究者：山本典生

原著論文による発表（欧文）

- 1) Ujike M, Nishikawa H, Otake A, Yamamoto N, Yamamoto N, Matsuoka M, Kodama E, Fujii N, Taguchi F. Heptad repeat-derived peptides block the protease-mediated direct entry from cell surface of SARS coronavirus but not entry via endosomal pathway. *J Virol.* (2007) in press
- 2) Qi X, Koya Y, Saitoh T, Saitoh Y, Shimizu S, Ohba K, Yamamoto N, Yamaoka S, Yamamoto N. (2007) Efficient induction of HIV-1 replication in latently infected cells through contact with CD4(+) T cells: Involvement of NF-kappaB activation. *Virology* 361, 325-334.

口頭発表(国内)

- 1) 山本典生、田中千香、佐藤人美、山本陽子、山本直樹、山岡昇司。NAF1 の HIV-1 複製抑制性ドメインについての検討。日本エイズ学会、広島 (2007, 11).

研究課題：電算機的アプローチを活用した RNaseH 活性を標的とする HIV-1 複製阻害剤開発に関する研究（若手育成型）

課題番号：H18- エイズ- 若手-003

主任研究者：駒野 淳（国立感染症研究所 エイズ研究センター 第3室 主任研究官）

分担研究者：星野 忠次（千葉大学薬千葉大学 大学院薬学研究院 物理化学 准教授）

## 1. 研究目的

日本の HIV-1 感染者は増加の一途をたどっており、エイズ患者/HIV-1 感染者の救済は厚生労働省に求められる重要な緊急課題の一つである。近年、多剤併用化学療法に抵抗性を示す薬剤耐性ウイルスが世界的に蔓延の兆しをみせており、日本も例外ではない。これに対する迅速且つ実現可能な方策の一つとして新規抗 HIV 薬の開発を推進することが挙げられる。

新規抗 HIV 薬開発が重要である3つの主な理由は、（1）ワクチン開発の早急な実現は困難であること、（2）既存の抗エイズ薬との併用により効果増強が期待できること、（3）現在問題となっている薬剤耐性ウイルスに対しても治療効果が期待できるためである。我々は HIV-1 の逆転写酵素が持つ RNaseH 活性の阻害薬が未だ実用化されていないことに着目した。3年間の開発期間中に電算機によるタンパク質立体構造解析手法を有効に活用し前臨床試験施行に値する RNaseH 活性阻害剤先導化合物を供給することを目標に掲げる。

## 2. 研究方法

（1）Computer-assisted drug design(CADD)による RNaseH 阻害薬先導化合物の最適化：逆転写酵素 RNaseH ドメインのタンパク質立体構造情報にもとづいて第一次最適化により得られた有望な先導化合物と酵素の結合部位を予測し、作用機序を予測すると同時に、より強い効果をもつ阻害薬をデザイン・合成し、その RNaseH 活性阻害能力を評価する。Software としては GOLD を用いて小分子化合物と標的 RNaseH ドメインとの相互作用部位を同定し、局所熱力学的安定性を加味した Orientation により実際の分子間相互作用を詳細に推定する。この結果にもとづいて RNaseH 阻害薬をデザインし合成を試みる。デザインに際しては側鎖修飾に用いる官能基がもつ潜在的な毒性を加味して行う。

（2）先導化合物の抗 HIV-1 活性と細胞毒性

の評価：先導化合物が持つ抗ウイルス活性と細胞毒性を同時に迅速に評価できる MT-4 をもとにした実験系の構築を行う。先導化合物がどれくらいの濃度で細胞培養の増殖を抑制するかを検討し、合成展開の核とするリード化合物を同定する。有望な化合物について Toxic dose 50(TD50)に満たない濃度で代表的な HIV-1 実験室株 NL4-3 の複製を阻害するかを NP2CD4CXCR4 および PBMC を用いて p24 ELISA による検出系を使用した細胞培養レベルの実験で検討する。

（倫理面への配慮）

該当せず。

## 3. 研究結果

（1）Computer-assisted drug design(CADD)による RNaseH 阻害剤先導化合物の最適化：Orientation が acetylcholine esterase の酵素活性—阻害剤モデルにおける実験値と非常によく一致することを証明しその有用性に関する検証とした。この演算アルゴリズムにて H18 年度の研究成果として得られた RNaseH 阻害剤と酵素相互作用の更に詳細な解析を行い pharmaeophore model を得た。この model によって活性中心のマグネシウムイオンをキレートする分子を中心にして3方向に疎水性ポケットを有する構造が阻害剤デザインとして最適であることが示唆された。化合物デザインはリード化合物に対して安定性を増強させ毒性が減弱すると同時に合成ステップを減らすよう考慮して-CO-NH-を-CO-NCN-に、furan 環の oxygen を sulfer にしたチオフェン誘導体するなどし、元来9ステップを要した合成ステップを3ステップに減少させ医薬品としてよく使用される官能基へと置換した。

（2）先導化合物の抗 HIV-1 活性と細胞毒性の評価：培養細胞においてリード化合物の抗 HIV-1 活性と細胞毒性を簡便に同時に測定することができる実験系 MT-4 Luc を樹立した。RNaseH 阻害剤リード化合物を試験したところ、リード化合物のもとになった化合物には抗ウイルス活

性が検出されなかったが、*in silico drug design* に基づいて得られた誘導体には抗ウイルス活性を示すものを2種類同定した。そのうち、40 $\mu$ Mにて明らかな細胞毒性が検出されなかったリード化合物#17について、ウイルス抗原を検出する細胞培養ウイルス増幅系にて抗ウイルス活性を直接的に検索した。本化合物#17はNP2CD4CXCR4にて濃度依存的ウイルス抑制を示し、25 $\mu$ M以上で顕著な抗HIV-1活性を示した。また25 $\mu$ MにおけるPBMCでのHIV-1複製抑制について検索したところ、溶媒コントロールとして用いたDMSOと比較して顕著なウイルス複製抑制活性を認めたが明らかな細胞毒性は検出されなかった。

#### 4. 考察

研究開始より2年以内で抗ウイルス活性のないリード化合物からComputer-assisted drug design (CADD)を効果的に利用した最適化を経て、これまで報告されたものとは構造が異なる化学構造を有する小分子化合物で培養細胞レベルにおける抗HIV-1活性をもつ誘導体を得たことは特筆すべき進展である。培養細胞レベルでの薬剤有効性評価において最も*in vivo*に近いと考えられるPBMCを使用した実験系で抗HIV-1活性を示す誘導体を得たことは、電算機によるバーチャル薬剤デザインと実際のスクリーニングとを協調して行うことにより短期間で効率的に薬剤開発を行うという本研究のコンセプトの潜在的パワーを示す重要な知見と思われる。

#### 5. 自己評価

##### 1) 達成度について

研究計画は概ね当初の年度計画通り順調に進行している。研究の進達が当初の研究開発スケジュールと合致している事からも研究計画が十分練られたものであることを示している。

##### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

RNaseH活性は、HIV-1の複製能力、病原性、相同組換えによる新たな株間組み換えウイルスの発生、さらには逆転写酵素に対する耐性機構に大きく関与していることが近年指摘されている。我々の研究はこれらの諸問題に対する学術的貢献が期待できる。

多剤併用療法 (HAART) の進歩によりエイズ患者の死亡率は著しく減少した。しかし HAART 療法が著効しない薬剤耐性ウイルスが蔓延の兆しをみせており、既存の薬剤のみでは薬剤耐性ウイルス感染者の救済は困難となることが近い将来に懸念される。作用機序が既存の薬剤と異なるメカニズムである新規抗 HIV 薬を開発する本研究が達成できたら、厚生労働省に求められる重要な緊急課題の一つであるエイズ患者/HIV 感染者の救済に大きく貢献するものと期待される。

##### 3) 今後の展望について

強い抗 HIV-1 活性・低細胞毒性を示した誘導体#17等を核としてさらに特異的かつ強力なRNaseH阻害剤の合成とその活性検証を進めると同時に、既存の抗 HIV-1 薬との相乗効果、本剤に対する薬剤耐性、および作用機序の同定等を進める。化学合成は最も研究経費および時間が必要とされるが研究の成功に直結するプロセスであるため研究開発への支援を引き続き要望したい。

本研究がもつ有用性はRNaseH阻害剤開発だけではなく立体構造が既知のタンパク質に対する阻害剤開発にも適応できると考えられる。我々は電算機アルゴリズムを用いた抗 HIV-1 薬開発において、Integrase inhibitor リード化合物の最適化にも本研究を応用しエイズ治療薬の開発に資する等、本研究の成果を他の研究領域に積極的に応用を試みていきたい。

#### 6. 結論

電算機アプローチと実際のスクリーニングを併用する事により、短期間で抗ウイルス活性のないRNaseH阻害活性を有するリード化合物から抗HIV-1活性を示す誘導体を得た。

#### 7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

HIV-1複製阻害活性を有する新規RNaseH阻害剤 (予定)

## 研究発表

主任研究者 駒野 淳

原著論文による発表

欧文

- (1) Emiko Urano, Saki Shimizu, Yuko Futahashi, Makiko Hamatake, Yuko Morikawa, Naoko Takahashi, Hidesuke Fukazawa, Naoki Yamamoto, Jun Komano. Cyclin K/CPR4 inhibits primate lentiviral replication by inactivating Tat/P-TEFb-dependent LTR transcription. (in submission)
- (2) Akihide Ryo, Naomi Tsurutani, Kenji Ohba, Ryuichiro Kimura, Jun Komano, Mayuko Nishi, Hiromi Soeda, Shinichiro Hattori, Kilian Perrem, Mikio Yamamoto, Joh Chiba, Jun-ichi Mimaya, Kazuhisa Yoshimura, Shuzo Matsushita, Mitsuo Honda, Akihiro Yoshimura, Ichiro Aoki, Yuko Morikawa and Naoki Yamamoto. SOCS1 is an inducible host factor during HIV-1 infection and regulates the intracellular trafficking and stability of HIV-1 Gag. (PNAS, in press)
- (3) Takeshi Yoshida, Yuji Kawano, Kei Sato, Yoshiharu Miura, Yoshinori Ando, Jun Aoki, Jun Komano, Yuetsu Tanaka, Yoshio Koyanagi. CD63 and its mutants disrupt CXCR4 trafficking to the plasma membrane and inhibit T-cell tropic HIV-1 entry. (Traffic, in press)
- (4) Matsuda Z, Iga M, Miyauchi K, Komano J, Morishita K, Okayama A, Tsubouchi H. In vitro translation to study HIV protease activity. Methods Mol Biol. 375: 135-49. 2007. Review.
- (5) Kameoka M, Kitagawa Y, Utachee P, Jinnopat P, Dhepakson P, Isarangkura-na-ayuthaya P, Tokunaga K, Sato H, Komano J, Yamamoto N, Oguchi S, Natori Y, Ikuta K. Identification of the suppressive factors for human immunodeficiency virus type-1 replication using the siRNA mini-library directed against host cellular genes. Biochem Biophys Res Commun. Aug 3: 359(3):729-34, 2007.
- (6) Shimizu S, Urano E, Futahashi Y, Miyauchi K, Isogai M, Matsuda Z, Nohtomi K, Onogi T, Takebe Y, Yamamoto N, Komano J. Inhibiting lentiviral replication by HEXIM1, a cellular negative regulator of the CDK9/cyclin T complex. AIDS. Mar 12: 21(5):575-82, 2007.
- (7) Futahashi Y, Komano J, Urano E, Aoki T, Hamatake M, Miyauchi K, Yoshida T, Koyanagi Y, Matsuda Z, Yamamoto N. Separate elements are required for ligand-dependent and -independent internalization of metastatic potentiator CXCR4. Cancer Sci. Mar; 98(3):373-9, 2007.

和文

- (1) 村上 努、駒野 淳. ARV の Universal Access 時代を迎えて；エイズ研究センターの国際研修活動について。病原微生物検出情報 Infectious Agents Surveillance Report (IASR) Vol. 28, No. 6 (No.328) : 164-166, 2007.
- (2) Murakami T, Gottlinger H, Morikawa Y, Komano J, Ryo A, Sato H. Regulation of Gag trafficking and functions (Review) The Journal of AIDS Research. 9(2): 102-107, 2007.

学会発表

海外

- (1) Emiko Urano, Saki Shimizu, Makiko Hamatake, Yuko Morikawa, Naoki Yamamoto, and Jun Komano. Upregulating expression of cyclin K/CPR4 limits the replication of HIV-1. CSH Meeting on Retroviruses, May 22-27, 2007, Cold Spring Harbor, NY (poster)
- (2) Takeshi Yoshida, Yuji Kawano, Yoshinori Ando, Kei Sato, Jun Komano, Yoshiharu Miura, Yuetsu Tanaka and Yoshio Koyanagi. CD63 AND ITS MUTANTS INHIBIT FUSION OF CXCR4-CONTAINING VESICLES TO THE PLASMA MEMBRANE AND BLOCK X4 HIV-1 ENTRY. CSH Meeting on Retroviruses, May 22-27, 2007, Cold Spring Harbor, NY (poster)
- (3) Toru Aoki, Saki Shimizu, Urano Emiko, Yuko Futahashi, Makiko Hamatake, Kazuo Terashima, Tsutomu Murakami, Naoki Yamamoto, and Jun Komano. RErouting the plasma membrane targeting of HIV-1 and MLV gag by replacing myristoylation signal with membrane proteins. CSH Meeting on Retroviruses, May 22-27, 2007, Cold Spring Harbor, NY (poster)
- (4) Kei Miyagawa, Tsutomu Murakami, Yuki Ohsaki, Jun Komano, Toyoshi Fujimoto and Naoki Yamamoto. Analysis of interaction between HIV-1 Gag and tip47 and its associated proteins. CSH Meeting on Retroviruses, May 22-27, 2007, Cold Spring Harbor, NY (poster)
- (5) Kosuke Miyauchi, Rachael Curran, Erin Matthews, Jun Komano, Tsutomu Murakami, Naoki Yamamoto, Donald M Engelman, and Zene