

200808013A

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

宿主側及びウイルス側要因からみた
HIV感染症の病態解明と新規医薬品・
診断薬品の開発によるエイズ発症防止の研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岩本 愛吉

平成21年3月

目 次

I. 総括研究報告

- 宿主側及びウイルス側要因からみたHIV感染症の病態解明と
新規医薬品・診断薬品の開発によるエイズ発症防止の研究 ----- 1

研究代表者 岩本愛吉 (東京大学医科学研究所 教授)

II. 分担研究報告

1. CTLエピトープを介した宿主とウイルスの攻防に関する研究 ----- 9

東京大学医科学研究所 教授 岩本愛吉

2. HIV感染症の病態進行を左右する宿主因子の探索に関する研究 ----- 13

大阪大学微生物病研究所 教授 塩田達雄

3. 中和抗体によるエイズ発症阻止の研究 ----- 18

熊本大学エイズ学研究センター 教授 松下修三

4. 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 ----- 21

金沢大学大学院医学系研究科 教授 市村 宏

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 29

- IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 37

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
総括研究報告書

宿主側及びウイルス側要因からみた HIV 感染症の病態解明と新規医薬品・
診断薬の開発によるエイズ発症防止の研究

研究代表者 岩本 愛吉
東京大学医科学研究所 先端医療研究センター
感染症研究分野 教授

研究要旨 網羅的手法により、日本人 HIV-1 感染者においてリンフォトキシン α の 13 番目のアルギニン
をシステインに置換する多型が、有意に病態進行の遅延と相関することが明らかになった。Nevirapine を含
む ART により血中ウイルス量が検出限界以下まで低下したタイプの HIV-1 感染者の解析では、*CYP2B6*
*Q172H*の遺伝子多型と CD4 陽性細胞の回復速度には相関がなかった(塩田)。非 B 亜型 HIV-1 に感染し
たケニアの小児において、コレセプターの変化は病態進行によるものと考えられた(市村)。耐性誘
導の結果から、NBD-556 は sCD4 と非常に近い形で結合していることが示唆された。今後、毒性が低
くより効果の強い誘導体の開発を目指していく予定である(松下)。マイクロアレイを用いた解析に
より、VL に影響する宿主因子の候補が明らかとなってきた。今後さらに絞り込み、定量 PCR 法
による確認を行う(岩本)。

研究分担者

塩田達雄 大阪大学微生物病研究所・教授
松下修三 熊本大学エイズ学研究センター
教授
市村 宏 金沢大学大学院医学系研究科・教授

より具体的には、感染者毎に大きく異なるエイズ病態進行や ART への反応の個人差を決定
付ける宿主遺伝子多型を、網羅的手法により
明かにする。エイズ病態進行、治療効果やそ
の副作用の個人差を決定する宿主因子が解明
できれば、無益な投薬による耐性株の出現を
阻止できる。新たな宿主因子が明らかになれ
ば、エイズ制御の新たな分子標的となりうる
ことからその解析を行う(塩田)。ケニアをフ
ィールドに薬剤耐性 HIV (非サブタイプ B) の
遺伝子解析、薬剤耐性ウイルスの母子感染と
児の予後、治療効果等への影響、非サブタイ
プ B の予後に関する宿主因子の研究を行う
(市村)。20 年以上無治療の長期非進行症例
で、強力な交差中和活性を持つ症例から、中
和単クローン抗体を作成し、発症阻止療法を
開発する。また、現在米国で臨床試験を計画
している中和抗体、KD247 と他薬剤併用療法
の基礎を作る(松下)。CTL エピトープにはエ

A. 研究目的

先進工業国においては、抗レトロウイルス
療法 (ART) が普及し、治療を受けている HIV
感染者の予後は著しく改善した。しかし、薬
剤耐性ウイルスの問題や薬剤長期服用による
毒性がしばしば問題となっている。抗ウイル
ス薬以外のエイズ発症阻害法の開発は非常に
重要な課題である。もちろん、高価な抗 HIV
薬が購入できない途上国にとっての意義も大
きい。本研究は (1) ゲノム情報を駆使した
宿主因子の解明、(2) HIV に対する細胞性及
び液性獲得免疫の解析とその応用、(3) ケニ
アやタイ、日本の臨床現場と直結したウイル
スと宿主の研究である、ことを特徴とする。

スケーブ変異だと考えられる定型的な突然変異体が生じやすが、免疫応答の詳細はわかっていない。本研究では、CTL エピトープを認識する単鎖抗体（すでに樹立済み）からより使いやすいヒト化抗体を作製し、それをツールとして抗原提示の状況を詳細に解析する。また、このエピトープに対する CTL レスポンスの詳細な解析を行う。CTL は急性感染期及び慢性感染期のウイルスコントロールに重要な役割をしていると考えられており、本研究は今後の HIV ワクチン開発にも重要な示唆を与えるものである（岩本）。

B. 研究方法

日本人 HIV-1 感染者で、未治療でも病態進行が著しく緩慢な感染者 30 名と標準的な進行経過を示した感染者 28 名について Affymetrix 社の SNP アレイを用い、238,306 カ所の一塩基多型の頻度を比較検討した。タイにおいて、Nevirapine を含む三剤の抗レトロウイルス療法 (ART) により血中ウイルス量が検出限界以下に達した 527 名の中で、治療開始後 1 年間で CD4 陽性細胞が $150 \text{ 個}/\cdot\text{l}$ 以上回復した感染者 157 名と、1 年間での回復が $100 \text{ 個}/\cdot\text{l}$ に満たない感染者 81 名について、米国で最近 Nevirapine の代謝に関係することが報告された *CYP2B6 Q172H* の遺伝子多型を Real time PCR を用いた TaqMan 法で検討した（塩田）。

2007 年 8 月までに最低 3 回追跡調査出来たケニア人小児 81 人を対象とした。41 人が ART を受けており（平均治療期間：7.6 年）、残り 40 人は未治療であった。経時的に採取された血漿中の HIV-1 *env*-C2V3 領域を RT-PCR で増幅し、塩基配列およびアミノ酸配列を解析した。*env*-V3 領域のアミノ酸配列により、HIV-1 のコレセプター使用を予想した。即ち、V3 ループの電荷が +6 以上を R5 ウイルス、+4 以

下を X4 ウイルス、+5 の場合には、V3 ループの 11 番目と 25 番目のアミノ酸がアルギニンまたはリジンでなければ R5 ウイルスとした（市村）。

PM1/CCR5 細胞に IIIB ウイルスを感染させ、NBD-556 または sCD4 をそれぞれ 1mM 及び 1mg/ml 存在下に培養した。NBD-556 は 50mM (21 passage)、sCD4 は 20mg/ml (5 passage) まで培養を続け、パッセージごとにエンベロープのシーケンスを行い、それぞれの変異部位を同定した。また、耐性変異アミノ酸を持った pseudovirus を作製し、NBD-556 と sCD4 に対する感受性を野生株のエンベロープを持つものと比較検討した（松下）。

無症候期（慢性期）の HIV 感染者で、血中ウイルス量 (VL) が高値の群 ($VL > 25,000$ コピー/ml; $N=5$) と低値の群 ($VL < 5,000$ コピー/ml; $N=5$) より、PBMC を分離し HIV Gag オーバーラップペプチド (OLP: $1 \mu\text{g}/\text{ml}$) で 18 時間刺激した。コントロールとして Mock 刺激 (ペプチド無し) で培養した。total RNA を抽出し、oligo-dT プライマーにより逆転写を行い、二本鎖 cDNA を得た。プライマーに含まれた T7 プロモーターを用いてアンチセンス RNA を調製した。蛍光色素で標識した後、Human Immunity and Metabolic Syndrome 9K チップ（東レ）を用いて発現解析を行った。Mock 刺激に対して 2 倍以上の傾向強度を得たものを中心に解析した。

（倫理面への配慮）

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ている（塩田）。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（市村）。東京大学医科学研究所に通院する HIV-1 感染

者の研究は、東京大学医科学研究所の倫理審査委員会の承認を受けている (No. 11-2) (岩本)。松下の本年度の研究内容は、倫理審査に該当しない。

C. 研究結果

緩慢な進行経過を示した感染者30名と標準的な進行経過を示した感染者28名について、238,306カ所の一塩基多型を検討した。45,825カ所については、多型を認めなかった。一塩基多型を認めた192,481箇所について2群間で比較を行い、タンパク質のアミノ酸の置換を伴うものあるいはアミノ酸の置換を伴うものと強い連鎖不平衡にあるものを検索したところ、リンフォトキシン α の13番目のアルギニンをシステインに置換する多型が、SNPアレイを行った感染者群($P=0.0016$)および独立した感染者群において有意に病態進行の遅延と相関していた($P=0.026$)。

タイにおいて、Nevirapineを含むARTを受けたHIV-1感染者527名の中で、治療開始後1年間でCD4陽性細胞が150個/ μ l以上回復した感染者157名と、1年間での回復が100個/ μ lに満たない感染者81名について *CYP2B6 Q172H* の遺伝子多型を検討した結果、両群間での違いは認められなかった ($P=0.712$) (塩田)。

解析した小児に感染していた HIV-1 サブタイプ (*env*-C2V3 領域) は、A1 (65例)、A2 (4例)、C (2例)、D (9例) と CRF02_AG (1例) であった。HIV-1 の subtype/CRF と推定されるコレセプター使用の間には有意な相関は認められなかった。

ARTを受けた小児41人中35人の治療前のウイルスはR5ウイルスと推定された。平均年齢5.5歳 (1-12歳)、血中ウイルス量 5.2×10^6 コピー/ml、CD4⁺T細胞数 $537/\text{mm}^3$ であった。7人 (20%) で追跡期間中にR5ウイルス

からX4ウイルスへの変化が推定された。残りの6人のウイルスは治療前からX4ウイルスが存在した。

未治療小児40人中32人で、追跡開始時にはR5ウイルスと推定された。平均年齢8.0歳 (3-19歳)、血中ウイルス量 4.8×10^6 コピー/ml、CD4⁺T細胞数 $684/\text{mm}^3$ であった。3人 (9.4%) が、追跡期間中にR5ウイルスからX4ウイルスに変化したと推定された。8人では追跡開始時からX4ウイルスが検出された (市村)。

NBD-556は50mM (21 passage)、sCD4は20mg/ml (5 passage) まで培養を続け、パッセージごとに感染細胞のproviral DNAからPCRによりシーケンスを行い、変異部位の同定を行った。それぞれの耐性誘導で得られた変異部位を比較すると、NBD-556 50mM存在下ではEnvのC3領域(S375N)とC4領域(A433T)に変異がみられた。一方、sCD4による耐性誘導では、経過中gp120に6つの変異が確認でき(P212L、V255E、N280K、S375N、G380R、G431E)、最終的に20mM存在下でV255E、G380R、G431Eの3つが残った。

S375N、A433T、V255E 変異 Env を持つ pseudovirus を作成し、NBD-556 と sCD4 に対する感受性を single-round assay で調べた結果、NBD-556 はすべての変異ウイルスに対して耐性となり、sCD4はV255Eを持つウイルスに対しては高度耐性であるが、NBD 耐性 Env clones に対しては IC_{50} の値で数倍耐性を示した。NBD-556 は sCD4 に比べると、gp120 に対する結合がやや弱い可能性が示唆された (松下)。

低 VL 群では 720 遺伝子、高 VL 群では 658 遺伝子において Gag オーバーラップペプチドの刺激により有意な発現変化を認めた。このうち両群間で発現の変化量が違い

がある遺伝子を Student T test により抽出した ($P < 0.05$)。両群間で発現の変化量に差が付いた遺伝子は 71 あった (岩本)。

D. 考察

日本人 HIV-1 感染者において、リンフトキシン α の 13 番目のアルギニンをシステインに置換する多型が、有意に病態進行の遅延と相関していた。リンフトキシン α は HIV-1 の LTR からの転写増強作用が報告されており、この多型は、リンフトキシン α の発現量に影響する可能性が考えられる。しかし、他の遺伝子上の多型との間の連鎖不平衡を観察している可能性もあるため、リンフトキシン α その他の遺伝子を含む広い領域でこの一塩基多型と連なる連鎖不平衡の広がり具合を検討している。

タイにおいて Nevirapine を含む ART により血中ウイルス量が検出限界以下まで低下した HIV-1 感染者の中で、治療開始後速やかに CD4 陽性細胞が回復した感染者と、回復が遅れた感染者について、*CYP2B6 Q172H* の遺伝子多型を検討したところ、この多型はタイにおいては CD4 陽性細胞の回復速度には影響しないことが明らかになった。米国での報告と我々の結果が一致しない理由は不明であるが、このタイのコホートでは今後、CD4 陽性細胞の回復速度に影響する宿主因子を探索には Nevirapine の代謝速度を考慮する必要がない (塩田)。

非 B 亜型 HIV-1 感染小児では、ウイルスのコレセプターが CCR5 から CXCR4 へ変化するの、ART より病態の進行に影響を受けていることが示唆された (市村)。

V3 に対する中和抗体の効果を増強する低分子化合物 NBD-556 は、*in vitro* 耐性誘導実験の結果、sCD4 の結合部位に近い場所に結合していることが分かった。現在進めている誘導体の設計上たいへん有用な情報である。今回

の結果をもとに、現在 10 種類以上の NBD 誘導体を合成している。今後、より強力に中和抗体の感受性を増強し、細胞毒性も低い物質を探求する (松下)。

慢性感染期の HIV-1 感染患者における DNA マイクロアレイ解析により、VL が高い群、低い群ともに、450~500 の遺伝子で発現の増加を認め、約 200 の遺伝子で発現低下を認めた。発現増加が認められた遺伝子では特に、両群の間でオーバーラップしている遺伝子が多かった。両群間で発現の差が顕著な遺伝子を絞り込むため、T 検定を行い、 $P < 0.05$ で 71 の遺伝子に発現差が認められた。これらの遺伝子について今後さらに解析を進めていく予定である (岩本)。

E. 結論

網羅的手法により、日本人 HIV-1 感染者においてリンフトキシン α の 13 番目のアルギニンをシステインに置換する多型が、有意に病態進行の遅延と相関することが明らかになった。Nevirapine を含む ART により血中ウイルス量が検出限界以下まで低下したタイの HIV-1 感染者の解析では、*CYP2B6 Q172H* の遺伝子多型と CD4 陽性細胞の回復速度には相関がなかった (塩田)。非 B 亜型 HIV-1 に感染したケニアの小児において、コレセプターの変化は病態進行によるものと考えられた (市村)。耐性誘導の結果から、NBD-556 は sCD4 と非常に近い形で結合していることが示唆された。今後、毒性が低くより効果の強い誘導体の開発を目指していく予定である (松下)。マイクロアレイを用いた解析により、VL に影響する宿主因子の候補が明らかとなってきた。今後さらに絞り込み、定量 PCR 法による確認を行う (岩本)。

F. 健康危険情報
特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kono K, Song H, Shingai Y, Shioda T, Nakayama EE. Comparison of anti-viral activity of rhesus monkey and cynomolgus monkey TRIM5 α s against human immunodeficiency virus type 2 infection. *Virology*. 2008;373(2):447-56.
- 2) Sakuragi J, Sakuragi S, Ohishi M, Shioda T. A rapid recombination assay of HIV-1 using murine CD52 as a novel biomarker. *Microbes Infect*. 2008; 10(4):396-404.
- 3) Nakayama EE, Shingai Y, Kono K, Shioda T. TRIM5 α -independent anti-human immunodeficiency virus type 1 activity mediated by cyclophilin A in Old World monkey cells. *Virology*. 2008; 375(2):514-20.
- 4) Maegawa H, Nakayama EE, Kuroishi A, Shioda T. Silencing of tripartite motif protein (TRIM) 5 α mediated anti-HIV-1 activity by truncated mutant of TRIM5 α . *J Virol Methods*. 2008; 151(2):249-56.
- 5) 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(Pt 2):554-66.
- 6) Wichukchinda N, Nakayama EE, Rojanawiwat A, Pathipvanich P, Auwanit W, Vongsheree S, Ariyoshi K, Sawanpanyalert P, Shioda T. Effects of CCR2 and CCR5 polymorphisms on HIV-1 infection in Thai females. *Journal of AIDS*. 2008;47:293-97.
- 7) Ishizaki A, Ichimura H, et al.: Profile of HIV-1 infection and genotypic resistance mutations to antiretroviral drugs in treatment-naïve HIV-1 infected individuals in Hai Phong, Viet Nam. *AIDS Res Hum Retroviruses* (in press).
- 8) Miyashita M, Ichimura H, et al.: High-risk HPV types for uterine abnormal cervixes of female commercial sex workers in the Philippines. *J Med Virol* 2009;81(3):545-551.
- 9) Hosaka N, Ichimura H, et al.: Rapid Detection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 group M by a Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay. *J Virol Methods* 2009;Jan 30[Epub].
- 10) Lwembe R, Ichimura H, et al.: Changes in the HIV-1 envelope gene from non-subtype B HIV-1-infected children in Kenya. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2008;Dec 24 [Epub]. Khamadi SA, Ichimura H, et al.: HIV type 1 genetic diversity in Moyale, Mandera, and Turkana based on env-C2-V3 sequences. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2008;24(12):1561-1564.
- 11) Kiptoo M, Ichimura H, et al.: Prevalence of nevirapine associated resistance mutations after single dose prophylactic treatment among antenatal clinic attendees in North Rift Kenya. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2008; 24(12):1555-1559.
- 12) 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* 2008;80(5):847-855.
- 13) 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* 2008;14(2):151-155.
- 14) 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* 2008;46(1):177-184.
- 15) 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., and Yamamoto, N. SOCS1 is an inducible host factor during HIV-1 infection the intracellular trafficking and stability of HIV-1 Gag. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:294-299, 2008.
- 16) Ikeda, T., Ohsugi, T., Kimura, T., Matsushita, S., Maeda, Y., Harada, S., Koito, A. The anti-retroviral potency of APOBEC1 deaminase from small animal species. *Nucleic Acids Research*, 36(21): 6859-6871, 2008.
- 17) Hosoya, N., Miura, T., Kawana-Tachikawa, A., Shioda, T., Odawara, T., Nakamura, T., Kitamura, Y., Kano, M., Kato, A., Hironaka, T., Hasegawa, M., Nagai, Y., and Iwamoto, A. Comparison between Sendai virus and Adenovirus vectors in induction of HIV-1 genes into human dendritic cells. *J. Medical Virology*, 80:373-382, 2008.
- 18) Komuro, I., Sunazuka, T., Akagawa, K.S., Yokota, Y., Iwamoto, A., and Omura, S. Erythromycin derivatives inhibit HIV-1 replication in macrophages through modulation of MAPK activity to induce small isoforms of C/EBPbeta. *Proc. Natl. Acad. USA*. 105: 12509-12514, 2008.
- 19) Hou, W, Aoki, C, Yu, L, Wen, X, Xue, Y, Gao, B, Liu, W, Gao, GF, Iwamoto, A, and Kitamura, Y. A recombinant replication-competent hepatitis C virus expressing Azami-Green, a bright green-emitting fluorescent protein, suitable for visualization of infected cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 377: 7-11, 2008.
- 20) Zong, L., Chen, Y., Peng, H., Gao, F., Iwamoto, A., and Gao, GF. Rehus macaque: a tight homodimeric CD8alpha/alpha Proteins: Structure, Function and Bioinformatics, in press.
- 21) Kondo, N., Ebihara, A., Ru, H., Kuramitsu, S., Iwamoto, A., Rao, Z., and Matsuda, Z. Thermus thermophilus-derived protein tags that aid in preparation of insoluble viral proteins. *Anal Biochem*, in press.
- 22) Miyazaki, E., Kawana-Tachikawa, A., Tomizawa, M., Nunoya, J., Odawara, T., Fujii, T., Shi, Y., Gao, G.F., and Iwamoto, A. Highly restricted TCR repertoire in the CD8-positive T cell response against an HIV-1 epitope with a stereotypic amino acid substitution. *AIDS*, in press.
2. 学会発表
- 1) 塩田達雄 Gag と相互作用する細胞因子 第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山。
- 2) 櫻木淳一・櫻木小百合・大石真久・塩田達雄 レトロウイルスゲノム二量体化とウイルスゲノム組替えの厳密な相関 第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山。
- 3) 前川彦一郎・中山英美・黒石歩・塩田達雄 ドメイン欠失 TRIM5・変異体による TRIM5・の HIV-1 抵抗性の解除 第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山。
- 4) 中山英美・塩田達雄 カプシド変異とウイルス増殖 第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山。
- 5) 河野健・塩田達雄・中山英美 HIV-2 感染阻害におけるアカゲザル、カニクイザル TRIM5・の違い 第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山。
- 6) 中山英美・Song Haihan・塩田達雄 カプシド変異とウイルス増殖 第 22 回日本エイズ学会学術集会、大阪。
- 7) 河野健・塩田達雄・中山英美 HIV-2 感染阻害におけるアカゲザル、カニクイザル TRIM5・の違い 第 22 回日本エイズ学会学術集会、大阪。
- 8) 櫻木淳一・櫻木小百合・大石真久・塩田

- 達雄 HIV-1 ゲノム二量体化とウイルスゲノム組替えの厳密な相関 第 22 回日本エイズ学会学術集会、大阪。
- 9) 大石真久・塩田達雄・櫻木淳一 HIV-1 Gag 前駆体プロセシングのゲノム二量体化への影響 第 22 回日本エイズ学会学術集会、大阪。
- 10) 前川彦一郎・中山英美・黒石歩・塩田達雄 ドメイン欠失 TRIM5alpha 変異体による TRIM5alpha の HIV-1 抵抗性の解除 第 22 回日本エイズ学会学術集会、大阪。
- 11) ベトナム国ハイフォン市における薬剤耐性 HIV-1. 石崎有澄美、市村宏、他、22 回日本エイズ学会学術集会、2008. 11, 大阪。
- 12) Non-B Subtype HIV-1 Drug-resistance Mutations among Vertically-infected Children on ART. リハナ RW、市村宏、他、22 回日本エイズ学会学術集会、2008. 11, 大阪。
- 13) 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。
- 14) 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.
- 15) Yoshimura, K, Hatada, M., Harada S., Shibata J., Masuo, H., Tamamura, H., Matsushita S.: In vitro induction of human immunodeficiency virus type 1 variants resistant to a low-molecular CD4 mimic compound. 9th Kumamoto AIDS Seminar. Sep. 18-19, 2008, Aso, Kumamoto.
- 16) Hatada, M., Yoshimura, K, Ishikawa T., Harada S., Matsushita S.: The impact of an N-linked glycosylation site insertion in HIV-1 gp120 region to escape from a potent neutralization anti-V3 monoclonal antibody. 9th Kumamoto AIDS Seminar. Sep. 18-19, 2008, Aso, Kumamoto.
- 17) Narahara C., Yoshimura, K, Hatada, M., Harada S., Matsushita S.: Different mutation in HIV-1 gp120 V3-tip region for escape from a potent neutralizing anti-V3 monoclonal antibody during in vitro selection with low or high concentration of the Mab. 9th Kumamoto AIDS Seminar. Sep. 18-19, 2008, Aso, Kumamoto.
- 18) Yoshimura, K, Harada S., Hatada, M., Matsushita S.: Mutations in V4 and C4 regions of the HIV-1 CRF-BC envelope induced by the in vitro selection of Maraviroc Confer cross-resistance to other CCR5 inhibitors. 16th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI 2009). 2009. 8-11, Montreal, Canada.
- 19) 吉村和久、原田恵嘉、畑田万紀子、増野弘幸、玉村啓和、松下修三: CD4 mimic small compound の in vitro 耐性誘導による結合部位の予測、第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会、2008. 11. 26-11. 28. 大阪
- 20) 畑田万紀子、吉村和久、石川哲也、原田恵嘉、松下修三: V2 領域の N-glycosylation site 挿入が抗 V3 中和抗体エスケープに及ぼす影響、第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会、2008. 11. 26-11. 28. 大阪
- 21) 榎原知里、吉村和久、畑田万紀子、原田恵嘉、松下修三: 中和抗体高感受性 R5 臨床分離株の抗 V3 抗体による in vitro 中和と逃避ウイルス誘導、第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会、

- 2008.11.26-11.28. 大阪
- 22) Kawana-Tachikawa A, Nakayama K, Koga M, Odawara T, Fujii T, Iwamoto A. Contribution of Gag-specific CD8+ T cells to HIV control in a population lacking HLA-B57/27. Keystone Symposia: HIV Immunobiology. Infection to immune control. Keystone. Mar 2009.
- 23) 中山香、立川（川名）愛、小田原隆、藤井毅、岩本愛吉。HIV セットポイントを規定する免疫関連因子と HIV 特異的細胞生免疫応答の解析。第 56 回日本ウイルス学会学術集会。岡山 H20.10.
- 24) 古賀道子、立川（川名）愛、小田原隆、岩本愛吉。日本人集団において HLA 多型性が慢性感染期血中 HIV-1 ウイルス量に与える影響の解析。第 22 回に本エイズ学会学術集会。大阪 H20.12.
- 25) 中村仁美、宮崎菜穂子、藤井毅、小田原隆、岩本愛吉。第 22 回に本エイズ学会学術集会。超多剤耐性患者における新規抗 HIV 薬 Etravirin、Darunavir、Raltegravir、の併用効果大阪 H20.12.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
1. 特許取得
特許取得なし
 2. 実用新案登録
登録なし
 3. その他
なし

CTL エピトープを介した宿主とウイルスの攻防に関する研究
分担研究者 岩本 愛吉

東京大学医科学研究所先端医療研究センター感染症分野 教授

HIV 感染者の個体内において、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) がウイルスのコントロールに重要な役割を果たしている。しかし、CTL の作用は部分的であり、感染者の中にはウイルスの増殖を比較的抑制できる者とできない者が存在する。HIV に対するワクチン開発は現在のところすべて挫折しており、HIV 感染症の病態を包括的に把握することが求められている。そのアプローチの一つとして DNA マイクロアレイによる宿主遺伝子の発現解析が考えられる。われわれは血中ウイルス量の比較的低い群と高い群につき、PBMC を CTL エピトープペプチドで刺激し、これら感染者における宿主遺伝子の動態について解析を行った。

A. 研究目的

HIV 感染症の自然経過では、急性感染期に高いウイルス血症を示した後、比較的血中ウイルス量の安定した無症候期（慢性期）に入る。無症候期の血中ウイルス量には大きな個人差があり、ウイルスのセットポイントと呼ばれ、臨床的にも重要な数値である。即ち、AIDS 発症までの無症候期の長さには極めて大きな個人差があり、その長さとセットポイントには有意な相関があることが知られている。セットポイントの低い患者では無症候期が長く、セットポイントの高い患者では比較的早く AIDS 発症へと至りやすい。

セットポイントが低く予後の良い例として、Nef 遺伝子が欠損した HIV による感染事例が知られている。しかし、セットポイントの高低は特定の HIV 株による感染のような小集団で見られる現象ではなく、もっと大きな集団で観察されていることから、宿主の遺伝的背景の個人差などによる影響が大きいと推測されている。

従来の Elispot 法により、HIV 特異的に

IFN- γ を産生する細胞を定量化しても、高ウイルス群と低ウイルス群の間で明らかな差異を認めない (1)。IFN- γ だけでなく、IL-2, TNF- α , CCL4 を含む複数のサイトカインやケモカイン産生 T 細胞が HIV 感染症のコントロールに重要であることも報告されている (2)。一方、HIV 感染症においては HIV 特異的 T 細胞の分化障害が指摘されており (3)、病態をトータルに評価するためにはサイトカイン産生のみならず、T 細胞の細胞膜上に発現する補助刺激分子、細胞周期に関与する分子、細胞内シグナリングに関与する分子、アポトーシス感受性なども同時に把握する必要があると思われる。事実、多くの宿主因子が全経過を通じて影響を与えることが明らかになっている (4, 5)。以上のような背景をふまえて、最近 DNA マイクロアレイを用いた包括的な研究が行われている。Chun TW, (6) および Boutboul F, (7) らは患者由来 PBMC 由来の CD4 もしくは CD8 分画および PBMC における遺伝子発現プロファイルを解析しているが対象患者群の低ウイルス量群はいずれも HAART 治療群であり、HIV 感染症の真の病態を反映しているとは考

えにくい。Sankaran S. (8)らの研究では対象はともに未治療患者であるが小腸サンプルの解析しか行われておらず、臨床へのフィードバックが困難である。本研究では慢性期の HIV 感染者を低ウイルス量群と高ウイルス量群に分け、末梢血 PBMC 由来の T cell に発現している遺伝子群に着目し、ウイルス量決定に関与している宿主因子を探索することを目的とした。

1 *Curr Opin Immunol.* 2006, Brnder C.

2 *Nat Immunol.* 2006, Heeney JL.

3 *Nat Med.* 2002, Appay V.

4 *Cell* 2001, Rowland-Jones S.

5 *AIDS* 2004, Nolan D.

6 *PNAS* 2003, Chun TW.

7 *AIDS* 2005, Boutboul F.

8 *PNAS* 2005, Sankaran S.

B. 研究方法

細胞の調製、刺激培養

当院通院中の慢性期外来患者のうちウイルス量が高値で経過している高ウイルス量群(N=5)と低値を保っている低ウイルス量群(N=5)より、採血後 PBMC を分離し未刺激群(陰性コントロール)とペプチド刺激群(HIV Gag オーバーラップペプチド(OLP:1 μ g/ml))に分けて 37 $^{\circ}$ C で 18 時間培養した。

ターゲットの調製とチップへのハイブリダイゼーション

培養後 PBMC から total RNA を抽出し、oligo-dT プライマーにより逆転写を行い、mRNA 由来の二本鎖 cDNA を得る。プライマーには T7 プロモーターが付加されており、T7 RNA ポリメラーゼによるリニア増幅により、最終的にアンチセンス RNA を得る。このときアミノアリル-UTP を加えることにより、アミノアリル基が取り込まれ、アミノアリル基に蛍光色素

である Cy5, Cy3 をラベルされるが(ダブルステップラベリング)、ラベルされたアンチセンス RNA を最終産物としてマイクロアレイチップにアプライする。チップは東レの IMS (Human Immunity and Metabolic Syndrome)9K チップを使用した。未刺激サンプルから調整した RNA と Gag-OLP 刺激サンプルから調整した RNA を一枚のチップ上で競合的にハイブリダイゼーションさせる(37 $^{\circ}$ C、18 時間)。ハイブリダイズ後、チップを専用スキャナーでスキャンして各々の蛍光強度を数値として得た。

データの normalization

ブランクのスポットにおける Cy5, Cy3 シグナル値から各上下 5%を除いたデータの平均値(バックグラウンド)を得る。バックグラウンド + 2SD 以上を有効スポットとし、Cy5, Cy3 シグナル値生データからそれぞれバックグラウンドを減算したものをシグナル値とする。ここで得られた Cy5 シグナル値を Cy5, Cy3 シグナル値の中央値の比で割返した値を補正後 Cy5 シグナル値とする。補正後 Cy5 シグナル値と Cy3 シグナル値の比較において 2 倍以上変化があったものを有意な遺伝子発現の変化とみなした。

<倫理面への配慮>

HIV 感染者の試料採取に関しては、研究目的やその為に必要な事項、いつでも研究から離脱できること等の十分な説明を行い、自由意志による同意(インフォームドコンセント)を書面によって得られた場合のみを解析対象とした。本研究はすでに東京大学医科学研究所の倫理審査委員会により承認済みである。また、「臨床研究に関する倫理指針」を遵守し研究を行った。

C. 研究結果

18 時間の Gag-OLP 刺激によりいづれかの群で半数以上(N=3 以上)の個体に発現変化(Mock と比べて 2 倍以上の増加、又は 0.5 倍以下の減少)のあった遺伝子をその群で発現変化があった遺伝子とする。低セットポイント群では 720 遺伝子、高セットポイント群では 658 遺伝子に発現変化を認めた。低セットポイント群で down regulate した遺伝子は 228、高セットポイント群で down regulate した遺伝子は 211 であり、いずれも up regulate した遺伝子数(492 遺伝子と 447 遺伝子)の方が 2 倍以上多かった。高セットポイント群又は低セットポイント群で gag-OLP 刺激により発現に変化が認められた遺伝子のうち両群間で発現の変化量に違いがある遺伝子を Student T test により抽出した(P<0.05)。両群間で発現の変化量に差が付いた遺伝子は 71 あった。

D. 考察

慢性感染期の HIV 感染患者において、HIV の血中ウイルス量が高い患者では AIDS の発症が早いことが知られている。慢性感染期における血中ウイルス量を抑えることが AIDS の発症抑制に重要だと考えられており、血中ウイルス量をコントロールする免疫機構を解明するために DNA マイクロアレイを用いて網羅的に免疫担当細胞である T 細胞、単球、樹状細胞が含まれる PBMC での HIV 特異的免疫機構が働く際の個体間の遺伝子発現の変化を調べた。

DNA マイクロアレイでは抗原ペプチドに対する特異的免疫機構発動時における PBMC の遺伝子変化を観察した。血中ウイルス量がコントロールされている低セットポイント群でも、コントロールされていない高セットポイント群でも 450

~500 程度の遺伝子で発現の増加と 200 程度の遺伝子の発現低下が認められた。発現増加が認められた遺伝子は特に両群間でオーバーラップしている遺伝子が多く、これらの遺伝子産物は HIV に対する特異的免疫機構に関与しているかもしれない。

次に両群間で発現の差が顕著な遺伝子を絞り込むため、T 検定を行った。P<0.05 では 71 の遺伝子に発現差が認められた。これらの遺伝子は血中ウイルス量の抑制に重要な役割を果たしている可能性がある。これらの遺伝子については今後解析を進めていく予定である。

E. 結論

マイクロアレイを用いてウイルスセットポイントを決定する因子の検索を行った。ウイルス量を免疫で抑制できている低セットポイント群と抑制できていない高セットポイント群の PBMC では 71 の遺伝子で Gag OLP 刺激に対する反応が異なっていた。これらの遺伝子は HIV に対する特異的免疫反応に関与する遺伝子であり、両群間での反応が異なることからセットポイントに何らかの影響を及ぼす遺伝子であることが考えられる。今後、これらの遺伝子について機能を明らかにしていく予定である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hosoya, N., Miura, T., Kawana-Tachikawa, A., Shioda, T., Odawara, T., Nakamura, T., Kitamura, Y., Kano, M., Kato, A., Hironaka, T., Hasegawa, M., Nagai, Y., and Iwamoto, A. Comparison between Sendai virus and Adenovirus vectors in induction of HIV-1 genes into human dendritic cells.

- J. Medical Virology, 80:373-382, 2008.
- 2) Komuro, I., Sunazuka, T., Akagawa, K.S., Yokota, Y., Iwamoto, A., and Omura, S. Erythromycin derivatives inhibit HIV-1 replication in macrophages through modulation of MAPK activity to induce small isoforms of C/EBPbeta. *Proc. Natl. Acad. USA.* 105: 12509-12514, 2008.
 - 3) Hou, W, Aoki, C, Yu, L, Wen, X, Xue, Y, Gao, B, Liu, W, Gao, GF, Iwamoto, A, and Kitamura, Y. A recombinant replication-competent hepatitis C virus expressing Azami-Green, a bright green-emitting fluorescent protein, suitable for visualization of infected cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 377: 7-11, 2008.
 - 4) Zong, L., Chen, Y., Peng, H., Gao, F., Iwamoto, A., and Gao, GF. Rhesus macaque: a tight homodimeric CD8alpha/alpha Proteins: Structure, Function and Bioinformatics, in press.
 - 5) Kondo, N., Ebihara, A., Ru, H., Kuramitsu, S., Iwamoto, A., Rao, Z., and Matsuda, Z. Thermus thermophilus-derived protein tags that aid in preparation of insoluble viral proteins. *Anal Biochem*, in press.
 - 6) Miyazaki, E., Kawana-Tachikawa, A., Tomizawa, M., Nunoya, J., Odawara, T., Fujii, T., Shi, Y., Gao, G.F., and Iwamoto, A. Highly restricted TCR repertoire in the CD8-positive T cell response against an HIV-1 epitope with a stereotypic amino acid substitution. *AIDS*, in press.
- Koga M, Odawara T, Fujii T, Iwamoto A. Contribution of Gag-specific CD8+ T cells to HIV control in a population lacking HLA-B57/27. *Keystone Symposia: HIV Immunobiology. Infection to immune control. Keystone.* Mar 2009.
 - 2) 中山香、立川(川名)愛、小田原隆、藤井毅、岩本愛吉。HIVセットポイントを規定する免疫関連因子と HIV 特異的細胞生免疫応答の解析。第 56 回日本ウイルス学会学術集会。岡山 H20.10.
 - 3) 古賀道子、立川(川名)愛、小田原隆、岩本愛吉。日本人集団において HLA 多型性が慢性感染期血中 HIV-1 ウイルス量に与える影響の解析。第 22 回に本エイズ学会学術集会。大阪 H20.12.
 - 4) 中村仁美、宮崎菜穂子、藤井毅、小田原隆、岩本愛吉。第 22 回に本エイズ学会学術集会。超多剤耐性患者における新規抗 HIV 薬 Etravirin、Darunavir、Raltegravir, の併用効果 大阪 H20.12.

2. 学会発表

- 1) Kawana-Tachikawa A, Nakayama K,

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) 日本人HIV-1感染者のうち未治療でも病態進行が著しく緩慢な感染者群と標準的な進行経過を示した感染者群の238,306カ所の一塩基多型を検討した。そして両群間で $P=0.01$ 以下の有意差を示した多型のうち、タンパク質のアミノ酸の置換を伴うものあるいはアミノ酸の置換を伴うものと強い連鎖不平衡にあるものについて、独立した感染者群でも同様の傾向が認められるか否かの検討を行った。その結果、リンフォトキシン α の13番目のアルギニンをシステインに置換する多型が有意に病態進行の遅延と相関していた。

(2) 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、血中ウイルス量が検出限界以下まで低下したHIV-1感染者の中で、治療開始後速やかにCD4陽性細胞が回復した感染者と、回復が遅れた感染者について、Nevirapineの代謝に関係することが米国から報告されているCYP2B6 Q172Hの遺伝子多型を検討した。その結果、CYP2B6 Q172Hの多型は、タイにおいてはCD4陽性細胞の回復速度には影響しないことが明らかになった。

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) Affymetrix社のSNPアレイを用い、日本人

HIV-1感染者のうち未治療でも病態進行が著しく緩慢な感染者群と標準的な進行経過を示した感染者群の238,306カ所の一塩基多型の頻度を比較検討し、HIV-1感染症に関わる新たな宿主遺伝子多型を見出すことを目的とした。

(2) 抗レトロウイルス剤Nevirapineは強力な逆転写酵素阻害剤であり、Efavirenzの代謝速度が変化させるCYP2B6 Q172Hの多型がNevirapineの代謝速度も変化させ、治療開始後のCD4陽性細胞の回復速度にも影響することが最近米国より報告された(AIDS, 21, 2191-2199, 2007)。そこで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、CYP2B6 Q172Hの多型が治療開始後のCD4陽性細胞の回復速度にも影響するか否かを明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

(1)日本人 HIV-1 感染者の中で、未治療でも病態進行が著しく緩慢な感染者 30 名と標準的な進行経過を示した感染者 28 名について、Affymetrix 社の SNP アレイ GeneChip Human Mapping 250K Sty Array を用いて 238,306 カ所の一塩基多型を検討した。そして両群間で $P=0.002$ 以下の有意差を示した多型のうち、タンパク質のアミノ酸の置換を伴うものあるいはアミノ酸の置換を伴うものと強い連鎖不平衡にあるものについて、独立した感染者群(未治療で CD4 陽性細胞数が 500 個/ μl を超える感染者 27 名と 100 個未満の感染者 52 名でも同様の傾向が認められるか否かの検討を Real time PCR を用いた TaqMan 法を行った。

(2) 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、血中ウイルス量が検出限界以下まで低下した HIV-1 感染者 527 名の中で、治療開始後 1 年間で CD4 陽性細胞が 150 個/ μl 以上回復した感染者 157 名と、1 年間での回復が 100 個/ μl に満たない感染者 81 名について、Nevirapine の代謝に関係することが最近報告された *CYP2B6 Q172H* の遺伝子多型を Real time PCR を用いた TaqMan 法で検討した。

(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) 緩慢な進行経過を示した感染者 30 名と標準的な進行経過を示した感染者 28 名について、Affymetrix 社の SNP アレイを用いて 238,306 カ所の一塩基多型を検討した。その結果、平均 99.22% の一塩基多型について遺伝子型が決定でき、45,825 カ所の一塩基多型については、多型を認めなかったため、192,481 箇所の一塩基多型について 2 群間で比較を行った。そして $P=0.002$ 以下の有意差で両群間での違いを認めた 180 カ所について、タンパク質のアミノ酸の置換を伴うものあるいはアミノ酸の置換を伴うものと強い連鎖不平衡にあるものを検索したところ、10 カ所の一塩基多型が残り、これら 10 カ所について独立した感染者群で再検討を行った。その結果、リンフォキシリン α の 13 番目のアルギニンをシステインに置換する多型が、SNP アレイを行った感染者群 ($P=0.0016$) と同様に、独立した感染者群においても有意に病態進行の遅延と関連していた ($P=0.026$)。

(2) 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、血中ウイルス量が検出限界以下まで低下した HIV-1 感染者 527 名の中で、治療開始後 1 年間で CD4 陽性細胞が 150 個/ μl 以上回復した感染者 157 名と、1 年間での回復が 100 個/ μl に満たない感染者 81 名について、*CYP2B6 Q172H* の遺伝子多型を検討した。その結果、CD4 細胞数が 1 年間に 150 個/ μl 以上回復した感染者群では、157 名中 *CYP2B6 Q172H* のホモ接合が 13 名、ヘテロ接合が 69 名認められ、アレル頻度 0.30 を示した。一方、1 年間での回復が 100 個/ μl に満たない感染者群では、81 名ではホモ接合が 10 名、ヘテロ接合が 32

名認められ、アレル頻度0.32を示し、両群間での違いは認められなかった(P=0.712)。

D. 考察

(1) 網羅的手法により、リンフォトキシン α の13番目のアルギニンをシステインに置換する多型が、日本人HIV-1感染者において有意に病態進行の遅延と相関することが明らかになった。リンフォトキシン α はHIV-1のLTRからの転写を増強する作用が報告されており、この多型は、リンフォトキシン α の発現量に影響する可能性がまず考えられる。しかしリンフォトキシン α 遺伝子の存在する染色体6番の領域には多数の遺伝子が存在しており、HIV-1感染症の病態進行の個人差と真に相関する他の遺伝子上の多型との間の連鎖不平衡を観察している可能性もある。現在、リンフォトキシン α その他の遺伝子を含む広い領域でこの一塩基多型と連なる連鎖不平衡の広がり具合を検討している。

(2) タイにおいてNevirapineを含む3剤併用療法を開始し、血中ウイルス量が検出限界以下まで低下したHIV-1感染者の中で、治療開始後速やかにCD4陽性細胞が回復した感染者と、回復が遅れた感染者について、Nevirapineの代謝に関係し、治療開始後のCD4陽性細胞の回復速度に影響することが最近米国から報告されたCYP2B6 Q172Hの遺伝子多型を検討したところ、この多型はタイにおいてはCD4陽性細胞の回復速度には影響しないことが明らかになった。米国での報告と我々の結果が一致しない理由は不明であるが、米国での報告は、白人種の小児のHIV-1感染者に限られており、体重あたりの服用量も平均的な成人よりも少ない。一方、我々の感染者は全てア

ジア人成人である。人種差に加え、Efavirenzとは異なりNevirapineでは服用量が少ない場合にのみCYP2B6 Q172Hの多型が治療開始後のCD4陽性細胞の回復速度に影響するのかもしれない。いずれにせよ、今後、CD4陽性細胞の回復速度に影響する宿主因子を探索するために、Nevirapineの代謝速度を考慮する必要のないコホートを樹立できた、と考えている。

E. 結論

(1) 網羅的手法により、日本人HIV-1感染者においてリンフォトキシン α の13番目のアルギニンをシステインに置換する多型が、有意に病態進行の遅延と相関することが明らかになった。

(2) タイにおいてNevirapineを含む3剤併用療法を開始し、血中ウイルス量が検出限界以下まで低下したHIV-1感染者の中で、治療開始後速やかにCD4陽性細胞が回復した感染者と、回復が遅れた感染者について、CYP2B6 Q172Hの遺伝子多型を検討したところ、この多型はタイにおいてはCD4陽性細胞の回復速度には影響しない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

1. 論文発表

- 1) Kono K, Song H, Shingai Y, Shioda T, Nakayama EE. Comparison of anti-viral activity of rhesus monkey and cynomolgus monkey TRIM5 α s against human immunodeficiency virus type 2 infection. *Virology*.2008;373(2):447-56.

- 2) Sakuragi J, Sakuragi S, Ohishi M, Shioda T. A rapid recombination assay of HIV-1 using murine CD52 as a novel biomarker. *Microbes Infect.* 2008; 10(4):396-404.
- 3) Nakayama EE, Shingai Y, Kono K, Shioda T. TRIM5alpha-independent anti-human immunodeficiency virus type 1 activity mediated by cyclophilin A in Old World monkey cells. *Virology.* 2008; 375(2):514-20.
- 4) Maegawa H, Nakayama EE, Kuroishi A, Shioda T. Silencing of tripartite motif protein (TRIM) 5alpha mediated anti-HIV-1 activity by truncated mutant of TRIM5alpha. *J Virol Methods.* 2008; 151(2):249-56.
- 5) 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(Pt 2):554-66.
- 6) 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.* 2008;80:373-82.
- 7) Wichukchinda N, Nakayama EE, Rojanawiwat A, Pathipvanich P, Auwanit W, Vongsheree S, Ariyoshi K, Sawanpanyalert P, Shioda T. Effects of CCR2 and CCR5 polymorphisms on HIV-1 infection in Thai females. *Journal of AIDS.* 2008;47:293-97.
2. 学会発表
 - 1) 塩田達雄 Gag と相互作用する細胞因子 第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山。
 - 2) 櫻木淳一・櫻木小百合・大石真久・塩田達雄 レトロウイルスゲノム二量体化とウイルスゲノム組替えの厳密な相関 第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山。
 - 3) 前川彦一郎・中山英美・黒石歩・塩田達雄 ドメイン欠失 TRIM5α変異体による TRIM5αの HIV-1 抵抗性の解除 第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山。
 - 4) 中山英美・塩田達雄 カプシド変異とウイルス増殖 第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山。
 - 5) 河野健・塩田達雄・中山英美 HIV-2 感染阻害におけるアカゲザル、カニクイザル TRIM5αの違い 第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山。
 - 6) 中山英美・Song Haihan・塩田達雄 カプシド変異とウイルス増殖 第 22 回日本エイズ学会学術集会、大阪。
 - 7) 河野健・塩田達雄・中山英美 HIV-2 感染阻害におけるアカゲザル、カニクイザル TRIM5αの違い 第 22 回日本エイズ学会学術集会、大阪。
 - 8) 櫻木淳一・櫻木小百合・大石真久・塩田達雄 HIV-1 ゲノム二量体化とウイルスゲノム組替えの厳密な相関 第 22 回日本エイズ学会学術集会、大阪。
 - 9) 大石真久・塩田達雄・櫻木淳一 HIV-1 Gag 前駆体プロセッシングのゲノム二量体化への影響 第 22 回日本エイズ学会学術集会、大阪。
 - 10) 前川彦一郎・中山英美・黒石歩・塩田達雄 ドメイン欠失 TRIM5alpha 変異体による TRIM5alpha の HIV-1 抵抗性の解除 第 22 回日本エイズ学会学術集会、大阪。

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 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 (NBD-556) に関する研究を昨年度に引き続き行った。NBD-556 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、化合物に耐性のウイルスをとり、sCD4 の耐性ウイルスとシークエンスを比較した。その結果、NBD-556 耐性ウイルスは、sCD4 耐性変異と非常に近い場所、すなわち CD4 cavity といわれる CD4 結合部位に集中してみられることが分かった。よって、この低分子化合物が CD4 cavity に結合し gp120 の立体構造変化を起こしていることが強く示唆された。現在までに、NBD の誘導体を 10 以上合成しており、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検索しているところである。

A. 研究目的

昨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分かった。そこで、今年度は 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 NBD-556 が、gp120 のどの部位と結合しているかを *in vitro* 耐性誘導により調べた。

B. 研究方法

PM1/CCR5 細胞に IIBB ウイルスを感染させ、NBD-556 または sCD4 をそれぞれ 1mM 及び 1mg/ml 存在下に培養を開始する。NBD-556 は 50mM (21 passage)、sCD4 は 20mg/ml (5 passage) まで培養を続け、パッセージごとにエンベロープのシークエンスを行い、それぞれの変異部位を同定した。また、耐性変異アミノ酸を持った pseudovirus を作製し、NBD-556 と sCD4 に対する感受

性を野生株のエンベロープを持つものと比較検討した。

(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

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いくつか知られている (Zhao Q, et al., *Virology*, 339:213-25, 2005; Huang L., et al., *AIDS Res Hum Retroviruses*, 23:28-32, 2007)。特に、*N*-(4-Chlorophenyl)-*N'*-(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-yl)-oxalamide (NBD-556) 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ているが、ウイルス感染阻害効果は従来のものに比べるとそれほど強くない (IC_{50} : 5-30mM)。ただし、今まで報告されたことのない程強い、CD4 結合時に見られるような gp120 立体構造変