

200830011A

厚生労働科学研究費補助金
エイズ対策研究事業

HIV感染症の治療開発に関する研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 滝口 雅文
平成21年(2009年)3月

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

HIV 感染症の治療開発に関する研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 滝口 雅文

平成21年(2009年)3月

目 次

I. 総括研究報告書

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

II. 分担研究報告書

1. 細胞性免疫を用いた治療法の研究開発 ----- 9
滝口 雅文 (熊本大学エイズ学研究センター センター長/教授)
2. テーラーメイド治療ワクチンへ向けての基礎的・臨床的検討に関する研究 ----- 13
岡 慎一 (国立国際医療センター エイズ治療・研究開発センター センター長)
3. CCR5 阻害剤などの新規の機序で抗ウイルス効果を発揮する AIDS 治療薬の研究開発 ----- 18
満屋 裕明 (熊本大学大学院医学薬学研究部 教授)
4. 逆転写酵素およびプロテアーゼ以外を標的とする新規抗エイズ薬の研究 ----- 25
馬場 昌範 (鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 教授)
5. HIV に対する新規薬剤開発 ----- 30
松岡 雅雄 (京都大学ウイルス研究所 教授)
6. 中和抗体の治療応用に関する基礎研究 ----- 35
松下 修三 (熊本大学エイズ学研究センター 教授)

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 43

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 53

I . 総括研究報告書

HIV 感染症の治療開発に関する研究

研究代表者：滝口 雅文（熊本大学エイズ学研究センター センター長/教授）

研究分担者：岡 慎一（国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センター センター長）

満屋 裕明（熊本大学大学院医学薬学研究部 教授）

馬場 昌範（鹿児島大学大学院医学総合研究科 教授）

松岡 雅雄（京都大学ウイルス研究所 教授）

松下 修三（熊本大学エイズ学研究センター 教授）

研究要旨：耐性ウイルスに対応できるような新規薬剤の開発や薬剤以外の新たな治療法の開発のため、柱1：耐性ウイルスに対応できる新規薬剤の研究開発と、柱2：HIV-1 特異的免疫を用いた新しい治療法の研究開発の2つの柱で研究をおこなった。その結果、以下のような成果が上げられた。1) 新規のプロテアーゼ阻害剤 darunavir は、2006年6月に米国FDAに新薬として認可された後、日本でも承認され、実用化した。2) EFdAの抗HIV作用を解明し、動物実験での効果を証明した。3) 強いHIV-1増殖抑制能を持ったPol283特異的CTLの逃避変異の蓄積を世界9つのコホートで確認し、14個のCTLエピトープ解析から免疫逃避変異ウイルスの蓄積が世界レベルで起きていることを明らかにした。

A. 研究目的

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

B. 研究方法

1) 柱1：耐性ウイルスに対応できる新規薬剤の研究開発

・新規HIV-1 PDI (protease dimerization inhibitors) の開発とPDI耐性機序の解析：蛍光蛋白CFP/YFPタグ付きPRを有する感染性組み換えHIVクローンをを用いたFRETの系を用いて、構造学的デザインに基づいた新規PDIの開発を進めた。またPR dimerizationに重要とされるアミノ酸、PDI耐性関連変異アミノ酸の詳細な解析を進め、HIV-1 PR阻害への新たな機序、結晶構造解析、モデリングの手法を用いてPDIとHIV PR monomer subunitとの結合様式を明らかにした。

・新規のヌクレオチド系逆転写酵素阻害剤4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine (EFdA) の抗ウイルス活性、細胞内代謝経路、耐性機構を

解析する。さらに高い抗HIV-1活性をNOG-SCIDマウス、更にSIV感染サルでの実験を進め(米国Pittsburgh Universityのグループとの共同研究)、末期SIV感染サル(n=2)で高い抗SIV活性、長毒性についても検討した。

・核酸系逆転写酵素阻害剤4'-Ed4Tについて、その薬剤耐性プロフィールを更に詳しく検討するために、4'-EFdAと、我々が分離した4'-Ed4T耐性ウイルスに対する感受性について調べた。

・HIV-1の転写阻害剤を同定する目的で、HIV-1遺伝子発現機構に関わる分子(例えばcyclin T1/CDK9)と種々の薬剤との分子間相互作用をコンピューター上で解析する、いわゆるin silicoスクリーニングを導入し、薬剤ライブラリーから可能性のある薬剤を選び出した。

2) 柱2：HIV-1特異的免疫を用いた新しい治療法の研究開発

・Replication suppression assayを使い、強いHIV-1増殖抑制能を有したCTLを同定する。更にこのCTLに耐性なHIV-1の出現を調べ、逃避ウイルスの蓄積度を調べた。

・非サブタイプBウイルスに対する中和単クローン抗体の中和活性の測定を15種類のエンベロープベクターを用いて、pseudovirus neutralization assayでおこなった。PM1/CCR5細胞を用いて、臨床分離株の中和抵抗性のメカニズムを検討した。

(倫理面への配慮)

現時点では柱2の免疫療法の開発が対象となるが、既にその一部は各施設の倫理委員会の承認を受けている。患者の血液を用いて行なう研究に関しては、これらの倫理委員会が規定する指針に従っておこなった。

C. 研究結果

1) 柱1: 耐性ウイルスに対応できる新規薬剤の研究開発

・新規のプロテアーゼ阻害剤 darunavir を開発し、2008年に1日1回投与の初回治療薬としても認可され、日本でも認可申請が承認されて実用化した。HIVの増殖に必須である HIV PR の二量体形成を確認する FRET-HIV 発現系を確立し、DRV を含めた一連の新規化合物 HIV PR dimerization inhibitor (PDIs) を開発した。

・ 2'-deoxy-4'-C-ethynyl-2-fluoroadenosine (EFdA) を同定し、*in vitro* で野生型 HIV に対して強力な抗ウイルス活性 (EC50=0.073nM) を示すのみでなく耐性ウイルスに対しても強い抑制効果を有することを明らかにした。EFdA は 4'-ethynyl-deoxyadenosine (EdA) に対して誘導した耐性ウイルス (I142V/T165R/M184V) に対しても抗ウイルス活性を保っていた。一方、EFdA の高い抗 HIV-1 活性を NOG-SCID マウスで証明、更に SIV 感染サルでの実験を進め、末期 SIV 感染サル (n=2) で高い抗 SIV 活性を確認、長期毒性についても検討、サルでの安全性が確認された。

・ HIV-1 が 4'-Ed4T に対する耐性を獲得するためには、逆転写酵素領域のアミノ酸変位 M184V に加えて、さらに2つの変位 (P119S および T165A) が必要であると考えられており、これにより HIV-1 は 4'-Ed4T に対して約 10 倍、4'-EFdA に対して約 25 倍の耐性を獲得した。

・ 200,000 化合物からなる薬剤ライブラリーに対し、cyclin T1 のポケット領域に結合する可能性を有する化合物の *in silico* スクリーニングを行い、その結果を基に 124 種類の薬剤を選び出すことに成功した。

2) 柱2: HIV-1 特異的免疫を用いた新しい治療法の研究開発

細胞性免疫を用いた治療法の開発の研究では、Nef による HLA クラス I 抗原の発現低下の影響を受けない強い HIV-1 増殖抑制能を有した 5 種類の CTL の存在を明らかにした。このうち HLA-B*5101 拘束性 CTL エピトープである Pol283 に対する CTL から逃避するエピトープ (I8T) を有する HIV-1 の蓄積を、日本を含めて世界 9 か所で確認をした。

サブタイプ B に感染した長期非進行症例より

作製した HIV-1 単クローン中和抗体のうち、CD4bs 抗体 (3 種類) と CD4i 抗体 (1 種類) のどれかは 15 種類のうち 10 のウイルスに対する抑制活性がみられた。一方、中和抵抗性のメカニズム解明の研究では、V2 に N-linked glycosylation site (NGS) の付加と V3 エピトープの変異が誘導された。

D. 考察

柱1の耐性ウイルスに対する新規薬剤の開発では、満屋によって開発された新規のプロテアーゼ阻害剤 darunavir の実用化が進み、また同様に機能をもった PI の開発も進んでおり順調に進展している。また新たな EFdA の開発が、松岡・満屋によって進められており、今後臨床試験への transfer が期待できる。

一方、馬場により、4'-Ed4T は既存の核酸系逆転写酵素阻害薬とは異なる耐性プロフィールを有しており、ミトコンドリア毒性もないことから、次世代の新規抗エイズ薬として、現在臨床開発が進行中である。

柱2では、強い HIV-1 増殖抑制能を示す HLA-B5101 拘束性 Pol283 特異的 CTL は、8 番目のアミノ酸が I から T へ逃避変異 (I8T) を選択することを、世界 9 か所のコホートで明らかにした。この変異は Reversion を起こさないため、これらの 9 か所で HLA-B5101 の頻度に比例して蓄積していた。1997 年時点では、B5101 を持っている人は持っていない人と比べて、CD4 の値は有意に高かった。その後変異が蓄積するに従って、この効果は見られなくなった。このように、HIV-1 は細胞性免疫から逃避する方向に変異を蓄積するように進化していくことが明らかになった。

CD4bs と CD4i 抗体のどれかが 10/15 のウイルスに対して中和活性を示したが、中和にはいずれも高濃度を要した。生体内で有効な抗体としては、subtype 特異的であっても、強力な V3 抗体が必要と考えられた。

自己評価

1) 達成度について

柱1「耐性ウイルスに対応できる新規薬剤の研究開発」は、満屋により米国 Purdue 大学の Dr. Ghosh のグループと共同で開発した、ユニークな bis-THF グループを有し、耐性が発現しにくく、優れた薬理動態を有し、しかも多剤耐性変異株にも極めて高い活性を発揮する「新世代の PI」として強調して良い。本研究は HIV PR の 2 量体形成過程を阻害する新規的作用機序を有する低分子化合物 (HIV PR dimerization inhibitors; PDIs) の開発を目的としており、目的をほぼ達成できたと考えている。

松岡・満屋により新規抗HIV剤、EFdAの開発に成功し、その有効性の機序を明らかにした。現在、両研究者の共同研究がさらに進んでおり、この化合物の臨床試験に向けての準備が進んでいる。本研究班における有機的連携が抗HIV剤開発に大きく貢献していると考えている。

馬場により開発された4'-Ed4Tは臨床試験を開始したことから、一応の達成度に到達することが出来たと考えている。さらに臨床試験が進めば、本研究成果の学術的・国際的・社会的意義はさらに高まるものと思われる。

柱2「HIV-1特異的免疫を用いた新しい治療法の研究開発」では、免疫逃避ウイルスの蓄積が世界的レベルで起きていることが確認できた。このため CTL によるウイルスの増殖抑制効果が、以前と比べて低くなっていると考えられ、実際 HLA-B5101 を持っている感染者の臨床結果は悪くなっていることが確認できた。これらの発見は今後のワクチン開発のため重要な成果である。中和抗体の研究では、新たにサブタイプを超える単クローン抗体を確認できた。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

幅広い耐性株に効果がある darunavir は、日本でも承認され、国際的にも高く評価されている。すでに使用されており、社会的意義があるのは言うまでもない。また、新たに開発している薬剤、特に進入阻害剤は耐性が出にくいと考えられ、その開発はきわめて重要である。

CTL から逃避する変異を持ったウイルスが蓄積することが世界的レベルで明らかになり、今後の治療・ワクチン開発には重要な発見となった。

3) 今後の展望について

本研究班によって展開される研究により、今後2-4年間に新規の機序による薬剤の開発が期待される。特にプロテアーゼの二量体形成を阻害する薬剤が開発される可能性があり、これが可能になれば、幅広い耐性ウイルスに効果がある薬剤になると考えられる。

また、免疫療法に関しては、CTL から免疫逃避した HIV-1 を認識する CTL を誘導する治療法の開発や中和抗体との組み合わせの療法がより必要であることが明らかになった。

E. 結論

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

2) EFdAの抗HIV作用を解明し、動物実験での効果を証明した。

3) 強い HIV-1 増殖抑制能を持った Nef138 特異的 CTL の逃避変異の蓄積を世界9つのコホートで確認し、14個の CTL エピトープ解析から免疫逃避変異ウイルスの蓄積が世界レベルで起きていることを明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表 (2008~in press 本研究班課題に関連したもののみ掲載)

- 1) Kawashima, Y., Pfafferott, K., Frater, J., Matthews, P., Payne, R., Addo, M., Gatanaga, H., Mamoru, F., Hachiya, A., Koizumi, H., Kuse, N., Oka, S., 他29名, Takiguchi, M.*, and Goulder, P.* (*equally contributed). Adaptation of HIV-1 to human leukocyte antigen class I. *Nature*. In press
- 2) Koizumi, H., Iwatani, T., Tanuma, J., Fujiwara, M., Izumi, T., Oka, S., and Takiguchi, M. Escape mutation selected by Gag28-36-specific cytotoxic T cells in HLA-A*2402-positive HIV-1-infected donors. *Microbes and Infection*. In press
- 3) Kitano, M., Kobayashi, N., Kawashima, Y., Akahoshi, T., Nokihara, K., Oka, S., and Takiguchi, M. Identification and characterization of HLA-B*5401-restricted HIV-1-Nef and Pol-specific CTL epitopes. *Microbes and Infection*. 10: 764-772, 2008.
- 4) Tanuma, J., Fujiwara, M., Teruya, K., Matsuoka, S., Yamanaka, H., Gatanaga, H., Tachikawa, N., Kikuchi, Y., Takiguchi, M., and Oka, S. HLA-A*2402-restricted HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and escape mutation after ART with structured treatment interruptions. *Microbes and Infection*. 10: 689-698, 2008.
- 5) Kawashima, Y., Satoh, M., Oka, S., Shirasaka, T., and Takiguchi, M. Different immunodominance of HIV-1-specific CTL epitopes among three subtypes of HLA-A*26 associated with slow progression to AIDS. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 366: 612-616, 2008.
- 6) Ueno, T., Motozono, C., Douki, S., Mwimanzi, P., Rauch, S., Fackler, O.T., Oka, S., and Takiguchi, M. Cytotoxic T lymphocyte-mediated selective pressure influences dynamic evolution and

- pathogenic functions of HIV-1 Nef. *J. Immunol.* 180: 1107-1116, 2008.
- 7) Fujiwara, M., Tanuma, J., Koizumi, H., Kawashima, Y., Honda, K., Mastuoka-Aizawa, S., Dohki, S., Oka, S., and Takiguchi, M. Different Ability of Escape Mutant-Specific Cytotoxic T Cells to Suppress Replication of Escape Mutant and Wild-type HIV-1 in New Hosts. *J. Virol.* 82: 138-147, 2008.
 - 1) 8) Bi, X., Suzuki, Y., Gatanaga, H., and Oka, S. High frequency and proliferation of CD4⁺FOXP3⁺ regulatory T cells in HIV-1 infected patients with low CD4 count. *Eur. J. Immunol.* in press
 - 9) Hayashida, T., Gatanaga, H., Tanuma, J., and Oka, S. Effect of low HIV-1 load and antiretroviral treatment on IgG-capture BED-enzyme immunoassay. *AIDS Res. Hum. Retrovirus.* 24: 495-498, 2008.
 - 10) Koh, Y., Das, D., Leschenko, S., Nakata, H., Ogata-Aoki, H., Amano, M., Nakayama, M., Ghosh, A.K., Mitsuya, H. (2008) GRL-02031: A Novel Nonpeptidic Protease Inhibitor (PI) Containing A Stereochemically Defined Fused Cyclopentanyltetrahydrofuran (Cp-THF) Potent Against Multi-PI-Resistant HIV-1 In Vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* October 2008 [Epub ahead of print]
 - 11) Ghosh, A.K., Chapsal, B.D., Baldrige, A., Ide, K., Koh, Y., Mitsuya, H. Design and Synthesis of Stereochemically Defined Novel Spirocyclic P2-Ligands for HIV-1 Protease Inhibitors. *Org Lett.* 10: 5135-8, 2008.
 - 12) Ghosh, A.K., Gemma, S., Takayama, J., Baldrige, A., Leshchenko-Yashchuk, S., Miller, H.B., Wang, Y.F., Kovalevsky AY, Koh Y, Weber IT, Mitsuya H. Potent HIV-1 protease inhibitors incorporating meso-bicyclic urethanes as P2-ligands: structure-based design, synthesis, biological evaluation and protein-ligand X-ray studies. *Org Biomol Chem.* 6: 3703-13, 2008.
 - 13) Ghosh, A.K., Gemma, S., Baldrige, A., Wang, Y.F., Kovalevsky, A.Y., Koh, Y., Weber, I.T., Mitsuya, H. Flexible cyclic ethers/polyethers as novel P2-ligands for HIV-1 protease inhibitors: design, synthesis, biological evaluation, and protein-ligand X-ray studies. *J Med Chem.* 51: 6021-33, 2008.
 - 14) Maeda, K., Das, D., Yin, P.D., Tsuchiya, K., Ogata-Aoki, H., Nakata, H., Norman, R.B., Hackney, L.A., Takaoka, Y., Mitsuya, H. Involvement of the second extracellular loop and transmembrane residues of CCR5 in inhibitor binding and HIV-1 fusion: insights into the mechanism of allosteric inhibition. *J Mol Biol.* 381: 956-74, 2008.
 - 15) Kawamoto, A., Kodama, E., Sarafianos, S.G., Sakagami, Y., Kohgo, S., Kitano, K., Ashida, N., Iwai, Y., Hayakawa, H., Nakata, H., Mitsuya, H., Arnold, E., Matsuoka, M. 2'-deoxy-4'-C-ethynyl- 2'-halo-adenosines active against drug-resistant human immunodeficiency virus type 1 variants. *Int J Biochem Cell Biol.* 40:2410-20, 2008.
 - 16) Mitsuya, H., Maeda, K., Das, D., Ghosh, A.K. Development of protease inhibitors and the fight with drug-resistant HIV-1 variants. *Adv Pharmacol.* 56: 169-97, 2008.
 - 17) Ghosh, A.K., Chapsal, B.D., Weber, I.T., Mitsuya, H. Design of HIV protease inhibitors targeting protein backbone: an effective strategy for combating drug resistance. *Acc Chem Res.* 41: 78-86, 2008.
 - 18) Kumamoto, H., Haraguchi, K., Ida, M., Tanaka, H., Hamasaki, T., Baba, M. Synthesis and antiviral evaluation of (±)-4'-ethynyl-5'-difluorocarbocyclic-d4T analogue. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 52: 609-610, 2008.
 - 19) Yang, G., Wang, J., Cheng, Y., Dutschman, G.E., Tanala H, Baba M. Cheng Y-C. Mechanism of inhibition of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase by a stavudine analog, 4'-ethynyl stavudine triphosphate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52: 2035-2042, 2008.
 - 20) Haraguchi, K., Shimada, H., Tanaka, H., Hamasaki, T., Baba, M., Gullen, E.A., Dutschman, G.E., Cheng, Y-C. Synthesis, and anti-HIV activity of 4'-substituted 4'-thiothymidines: A new entry based on nucleophilic substitution of 4'-acetoxy group. *J. Med. Chem.* 51: 1885-1893, 2008.
 - 21) Shimura, K., Kodama, E., Sakagami, Y., Matsuzaki, Y., Watanabe, W., Yamataka, K.,

- Watanabe, Y., Ohata, Y., Doi, S., Sato, M., Kano, M., Ikeda, S., and Matsuoka, M. Broad Anti-Retroviral Activity and Resistance Profile of a Novel Human Immunodeficiency Virus Integrase Inhibitor, Elvitegravir (JTK-303/GS-9137). *J. Virol.* 82: 764-774, 2008.
- 22) Kajiwara, K., Kodama, E., Sakagami, Y., Naito, T., Matsuoka M. A Dual-Reporter Phenotypic Assay for Human Immunodeficiency Viruses. *J. Clin. Microbiol.* 46: 792-795, 2008.
- 23) Oishi, S., Ito, S., Nishikawa, H., Watanabe, K., Tanaka, M., Ohno, H., Izumi, K., Sakagami, Y., Kodama, E., Matsuoka, M., Fujii, N. Design of a Novel HIV-1 Fusion Inhibitor That Displays a Minimal Interface for Binding Affinity. *J. Med. Chem.* 51: 388-391. 2008.
- 24) Nishikawa, H., Kodama, E., Sakakibara, A., Fukudome, A., Izumi, K., Oishi, S., Fujii, N., Matsuoka, M. Novel screening systems for HIV-1 fusion mediated by two extra-virion heptad repeats of gp41. *Antiviral Res.* 80: 71-76, 2008.
- 25) Izumi, K., Kodama, E., Shimura, K., Sakagami, Y., Watanabe, K., Ito, S., Watabe, T., Terakawa, Y., Nishikawa, H., Sarafianos, S.G., Kitaura, K., Oishi, S., Fujii, N., Matsuoka M. Design of peptide-based inhibitors for HIV-1 strains resistant to T-20. *J. Biol. Chem.* 2008 Dec 10. [Epub ahead of print]
- 26) Nishikawa, H., Nakamura, S., Kodama, E., Ito, S., Kajiwara, K., Izumi, K., Sakagami, Y., Oishi, S., Ohkubo, T., Kobayashi, Y., Otaka, A., Fujii, N., Matsuoka, M. Electrostatically constrained alpha-helical peptide inhibits replication of HIV-1 resistant to enfuvirtide. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2008 Sep 10. [Epub ahead of print]
- 27) Nishikawa, H., Oishi, S., Fujita, M., Watanabe, K., Tokiwa, R., Ohno, H., Kodama, E., Izumi, K., Kajiwara, K., Naitoh, T., Matsuoka, M., Otaka, A., Fujii, N. Identification of minimal sequence for HIV-1 fusion inhibitors. *Bioorg Med. Chem.* 16:9184-9187, 2008.

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

なし

Ⅱ. 分担研究報告書

細胞性免疫を用いた治療法の研究開発

研究分担者 滝口 雅文 熊本大学エイズ学研究センター ウイルス制御分野 教授

研究協力者 岡 慎一 国立国際医療センター エイズ治療・研究開発センター センター長

研究要旨 強い HIV-1 増殖抑制能を持った Pol283 特異的 CTL の逃避変異の蓄積を世界 9 つのコホートで確認し、14 個の CTL エピトープ解析から免疫逃避変異ウイルスの蓄積が世界レベルで起きていることを明らかにした。このことから、免疫から逃避する HIV-1 が生き残り進化してくると考えられた。

A. 研究目的

薬剤耐性ウイルスの出現というエイズ治療における大きな問題が出現してきた。このため、耐性ウイルスに対応できるような薬剤以外の新たな治療法の開発が強く求められている。そこで強い HIV-1 の増殖抑制能を示す CTL を用いた治療法の開発が考えられる。しかし、これらの CTL から逃避するウイルスの出現が、HIV-1 の増殖抑制能を示す CTL を用いた治療法の開発に障害となる。そこで、Pol283 特異的 CTL の逃避変異の解析を世界 9 か所のコホートで解析した。さらに他の 13 の逃避エピトープの解析し、免疫逃避変異ウイルスの蓄積が世界レベルで起きているかを調べた。

B. 研究方法

Replication suppression assay を使い、強い HIV-1 増殖抑制能を有した Pol283 特異的 CTL の変異 HIV に対する増殖抑制能を同定する。

また 14 種類の逃避エピトープの出現を、世界 9 か所のコホートでシーケンス解析して調べた。

(倫理面への配慮)

患者の血液の使用については、インフォームドコンセントをおこない書面にて承諾を得た。さらに、国立国際医療センターおよび熊本大学の倫理委員会での承認を得た。

C. 研究結果

1. Pol283 変異の解析

この CTL による逃避エピトープの選択の可能性を探るために、2027 人 (B51+213 人、B51- 1994

人) の HIV 感染者のシーケンス解析を行った。その結果、B51 陽性患者では 96% の人で 8 番目に変異エピトープを持っていたが、B51 陰性患者では 29% の人しか保有していなかった (図 1 A)。またアミノ酸は Ile からその約 8 割が Thr に変異しており、その他 Arg, Leu, Val などが見られた (図 1 B)。これらの変異を持ったウイルス (8 T, 8 R, 8 L, 8 V) を作製し、Pol283 特異的 CTL クローンによるウイルス増殖抑制能を調べた結果、8 V に対しては軽度な増殖抑制能の低下がみられたが、8 T, 8 R, 8 L ウイルスに対する増殖抑制能は全く見られなかった (図 2)。これらの結果から、8 T, 8 R, 8 L は Pol283 特異的 CTL からの逃避変異であると考えられた。

さらに、世界 9 か所でのこれらの変異の出現を、B51 を持った人と B51 を持っていない人での調べたところ、B51 が一人しかいない所を除いた 8 か所で、B51 を持っていない人と比べて B51 を持った人でこれらの変異が優位に見られた (図 3 A)。これら 9 か所の HLA-B51 の頻度とそれぞれのコホート全体のこの変異の出現には正の相関がみられたことから (図 3 B)、HLA-B51 を持っている人の中でこの変異が作り出されていることが考えられた。さらに 9 か所の HLA-B51 の頻度とそれぞれのコホートの中で HLA-B51 を持っていない人でのこの変異の出現には正の相関がみられたことから (図 3 C)、これらの変異は各コホートで蓄積されてきていることが明らかになった。

2. 他の 13 種類の CTL エピトープの解析

免疫原性が高い他の12種類のエピトープでの逃避エピトープの出現を、9か所のコホートで解析した。Pol283のエピトープと含めた13種類の解析をしたところ、それぞれの集団全体でのそれぞれのエピトープに拘束している HLA 分子の頻度とそのコホート集団での逃避変異の出現頻度とは強い相関がみられた(図4A)。また、これらの拘束分子をもたない集団でも、これらの逃避変異の出現と逃避変異の出現頻度とは強い相関がみられた(図4B)。これらのことから、逃避変異エピトープの蓄積が、世界的レベルで起きていることが確認できた。

D. 考察

強い HIV-1 増殖抑制能を示す HLA-B5101 拘束性 Pol283 特異的 CTL は、8 番目のアミノ酸が I から T へ逃避変異 (I8T) を選択することを、世界 9 か所のコホートで明らかにした。この変異は Reversion を起こさないため、これらの 9 か所で HLA-B5101 の頻度に比例して蓄積していた。同様に他の 13 種類の逃避変異の解析でも同じように逃避変異の蓄積が世界 9 か所のコホートで確認できた。これらのことから、HIV-1 は免疫から逃避できる変異を獲得したものが生き残り、進化すると考えられた。このように現在流行している HIV-1 は、免疫から逃避する方向に進化したものであり、予防・治療ワクチンの開発にはこのようなウイルスに対するものではなければならない。

E. 結論

1. Pol283 エピトープの逃避変異エピトープが、日本国内はもとより世界的レベルで蓄積が起きていることが確認できた。
2. 他の 13 種類の CTL エピトープの変異エピトープの解析でも、世界的レベルで逃避変異の蓄積が起きていることが確認できた。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Fujiwara, M., Tanuma, J., Koizumi, H., Kawashima, Y., Honda, K., Mastuoka-Aizawa,

S., Dohki, S., Oka, S. and Takiguchi, M. Different Ability of Escape Mutant-Specific Cytotoxic T Cells to Suppress Replication of Escape Mutant and Wild-type HIV-1 in New Hosts, *J. Virol.* 82: 138-147, 2008

2. Kawashima, Y., Satoh, M., Oka, S., Shirasaka, T. and Takiguchi, M. Different immunodominance of HIV-1-specific CTL epitopes among 3 subtypes of HLA-A*26 associated with slow progression to AIDS, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 366: 612-616, 2008

3. Ueno, T., Motozono, C., Douki, S., Mwimanzu, P., Rauch, S., Fackler, O.T., Oka, S. and Takiguchi, M. Cytotoxic T lymphocyte-mediated selective pressure influences dynamic evolution and pathogenic functions of HIV-1 Nef, *J. Immunol.* 180:1107-1116, 2008

4. Kitano, M., Kobayashi, N., Kawashima, Y., Akahoshi, T., Nokihara, K., Oka, S., and Takiguchi, M. Identification and characterization of HLA-B*5401-restricted HIV-1-Nef and Pol-specific CTL epitopes. *Microbes and Infection.* 10: 764-772, 2008.

5. Tanuma, J., Fujiwara, M., Teruya, K., Matsuoka, S., Yamanaka, H., Gatanaga, H., Tachikawa, N., Kikuchi, Y., Takiguchi, M., and Oka, S. HLA-A*2402-restricted HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and escape mutation after ART with structured treatment interruptions. *Microbes and Infection.* 10: 689-698, 2008.

6. Murakoshi, H., Kitano, M., Akahoshi, T., Kawashima, Y., Dohki, S., Oka, S., and Takiguchi, M. Identification and characterization of 2 HIV-1 Gag immunodominant epitopes restricted by Asian HLA allele HLA-B*4801, *Hum. Immunol.* 70:170-174, 2009

7. Kawashima, Y., Pfafferoth, K., Frater, J., Matthews, P., Payne, R., Addo, M., Gatanaga, H., Mamoru, F., Hachiya, A., Koizumi, H., Kuse, N., Oka, S., 他29名, Takiguchi, M.*, and Goulder, P.* (*equally contributed). Adaptation of HIV-1 to human leukocyte antigen class I. *Nature*. In press

8. Koizumi, H., Iwatani, T., Tanuma, J., Fujiwara, M., Izumi, T., Oka, S., and Takiguchi, M. Escape mutation selected by Gag28-36-specific cytotoxic T cells in HLA-A*2402-positive HIV-1-infected donors. *Microbes and Infection.* 11:198-204, 2009

2) 国際学会での発表

1. Chihiro Motozono, Masafumi Takiguchi, and

Takamasa Ueno, The effect of TCR-peptide-MHC interactions on antiviral activity and cross-reactive capacity of HIV-specific CTLs, Keystone Symposia-HIV Pathogenesis- (Banff,Canada) March27-April1, 2008

2. Nan Zheng, Mamoru Fujiwara, **Shinichi Oka** and **Masafumi Takiguchi**, Perforin-dependent killing of HIV-1-infected macrophages by HIV-1 Nef-specific CD4+ CTLs, Keystone Symposia-HIV Pathogenesis- (Banff,Canada) March27-April1, 2008

H. 知的所有権の出願・取得状況
なし

図1: Pol283 の8番目 (I135X) のアミノ酸の変異

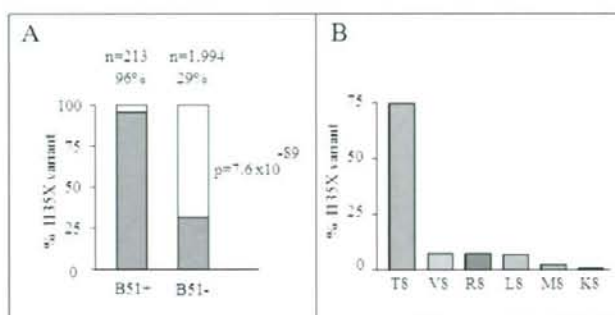


図2: Pol283 変異エピトープの認識

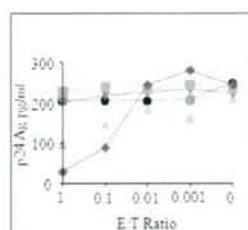


図3: 世界9つのコホートでのI135X変異の出現頻度

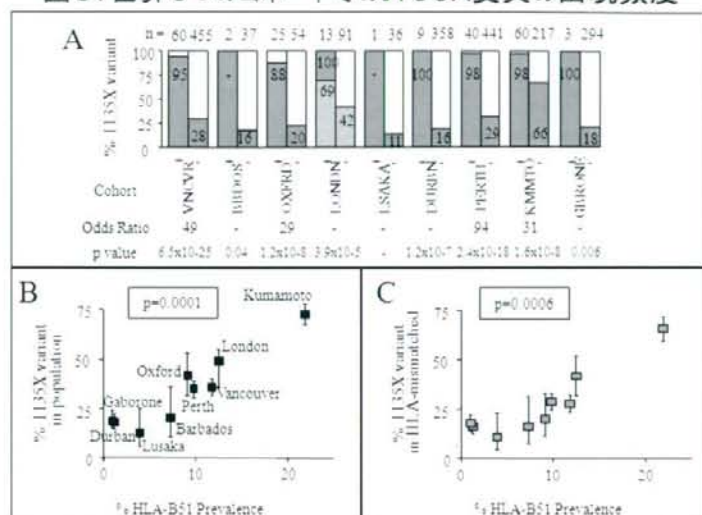
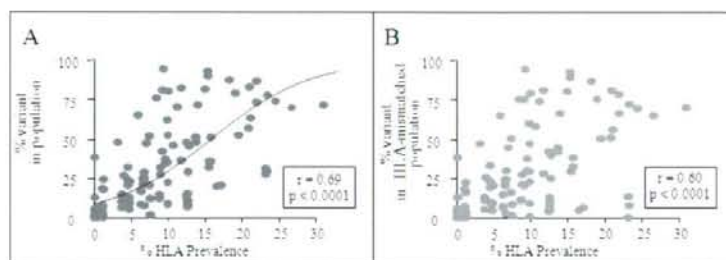


図4: 世界9つのコホートでの14種類のエピトープの変異の出現頻度とHLAとの相関



テーラーメイド治療ワクチンへ向けての基礎的・臨床的検討に関する研究

研究分担者：岡 慎一 国立国際医療センターエイズ治療・研究開発 センター長

研究協力者：井田節子 国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センター

研究要旨 テーラーメイド治療ワクチン開発へ向けての検討として、今年度は、HLA-B51/B61 を保有する長期未発症者で、20 年目に急激に病状が進行した患者の CTL エピトープに関し経時的解析を行い、安定していた 15 年間は、immunodominant epitope は wild type で維持されていたこと、病状悪化の前に escape variant に変異していたことを確認した。Nef に存在するモチーフに関し B61 の immunodominant epitope であるかどうかについては、確定できていない。

A. 研究目的

本研究は、テーラーメイド治療ワクチン開発を目的としている。H20 年度は、もう一度病状コントロールに対する CTL の役割を確認する目的で、長期未発症者で 20 年目に急激に病状が進行した患者の CTL エピトープの経時的解析を行った。また、この患者が持つ HLA B61 と病状の進行が早い患者に多い B60 に関し、nef にある共有エピトープ (KEKGGLEG L) の解析を行った。

B. 研究方法

病状の進行に関連する HLA を選定するために、血友病 96 名について slow progressor とそれ以外の HLA 分布、及びエイズで死亡した患者の HLA 解析を行い対比した。Slow progressor の定義は、1) 98 年まで無治療でかつ 2) 98 年の CD4 数の median が 350/ml 以上で、VL の median が 10⁴/ml 以下とした。

長期未発症者から急激に悪化した患者に関しては経時的な CTL エピトープの解析を行っ

た。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

1. Slow progressor の HLA : 96 名の血友病患者のうち slow progressor は 17 名であった。このうち解析可能な 13 名中 HLA-B51 保有者が 5 名、B61 は 5 名であった。

Nef領域のHLA-B60,61エピトープ

名前	HLA B	発症日	nef seq	発症日	nef seq
slow	HEV B con		KEKGGLEG		
slow		02-35	1998-2	KEKGGLEG	2004-1
slow		02-52	2004-5	KEKGGLEG	2008-2
slow		55-52	1997-8	KEKGGLEG	2008-3
slow		3002-44	1997-9	KEKGGLEG	2008-1
slow		02-44	1997-8	KEKGGLEG	2007-12
slow		54-44	2004-3	KEKGGLEG	2007-8
slow		51-44	1998-11	KEKGGLEG	2007-12
slow		51-35	1997-8	KEKGGLEG	2008-1
slow		51-07	1998-2	KEKGGLEG	nd
slow	血友病	51-01	2005-11	KEKGGLEG	2007-11
slow		44-07	1998-3	KEKGGLEG	2007-12
slow		02-01	1997-12	KEKGGLEG	2004-8
slow		51-01	~2003-6	KEKGGLEG	2004/9
dead		00-50		KEKGGLEG	
dead		01-1501		KEKGGLEG	
dead		51-00		KEKGGLEG	
dead		00-35		KEKGGLEG	
dead		00-35		KEKGGLEG	
dead		00-35		KEKGGLEG	

2. 死亡者の HLA : 6名のエイズによる死亡者の解析では、HLA-B60 が 5名を占めていた。

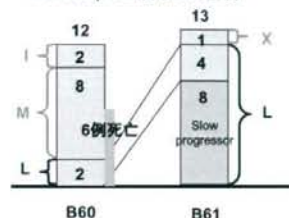
3. Nef sequence : これら患者の nef の共通エピトープである Nef92-100 KEKGGLEGLを見ると、slow progressor では全例 wild type であるが、B60 保有患者では、5例中4例において KEKGGLEGM に変異していた。すなわち、この部位の解析結果をまとめると、

HLA-B60, B61のnef epitopeまとめ

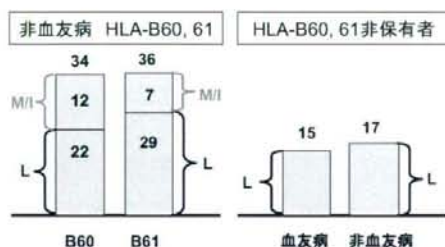
- 1) B61 slow progressorでは KEKGGLEGL (wild type)
- 2) B60 progressorでは KEKGGLEGM/1 (escape ??)

という結果が得られた。そこで、この部位の変異の意味をもう少し詳しく解析するために、血友病で B60 もしくは B61 を保有する 25名、血友病以外の 70名、血友病および非血友病の B60,B61 非保有者 32名についてこの部位の遺伝子解析を行った。血友病患者においては、下図に示すとおりで、B60 には slow progressor は存在せず、12例中6例が死亡、10例が変異ウイルスであった。これに対し、B61 では12例が wild type であり8名が slow progressor であった。非血友病患者においては、B60,B61 共に変異株が存在した。これに対し、B60,B61 非保有者においては、変異株は存在しなかった。このことは、B60 においては、このモチーフは immunodominant epitope であることを強く示唆しているが、B61 における意味づけは明らかではなかった。

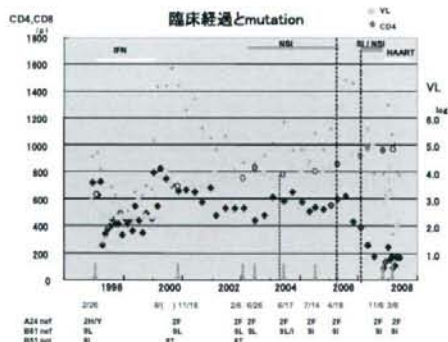
血友病 HLA-B60, 61 epitope (KEKGGLEGL-M/I) のescapeと病状の進行



(KEKGGLEGL-M/I)



4. 長期未発症者で 20年目に急激に病状が進行した患者の CTL エピトープの経時的解析



この患者においては、感染から 15年目までは 3つの epitope とも wild type であったが、肝炎に対する IFN 治療後より徐々に escape mutant が出現、これに相関してウイルス量は徐々に増加した。すべてが escape となった

2006年以降 X4 ウイルスの出現とともに急激に CD4 の低下をみた。

D. 考察

前年度まで検討していた HLA-B51 の pol の CTL epitope は、強力ではあったがすでに slow progressor においてはすべて escape していたため、治療ワクチンの対象にはなりにくいことがわかっていた。今回の検討から、HLA-B51/B61 を持っている患者に slow progressor が多く、死亡者に B60 が多かったことであるが、B61 と B60 は、nef の epitope を共有して B60 でのみ変異ウイルスが見られたことは興味深い。特に、血友病の B60, B61 保有者の対比からは、B60 に関しては、この部位が immunodominant epitope であることを強く示唆している。しかし、B61 に関しては、2つの可能性が残る。一つは、やはりこの部位も強力な immunodominant epitope であり、変異すら抑えている。もう一つは、全く CTL 活性を持たず、escape が起こらない、である。非血友病の B61 患者に変異株が見られることから、変異体が感染した場合には、B61 の immune pressure のためそのまま変異体で存在するが、B60, B61 非保有者には変異株が存在しないことから、この変異体は fitness が悪く wild type に戻ったことが推定される。今後この nef motif が B61 の immunodominant epitope であるかどうかに関し、解析した患者の臨床経過を裏付けるためにも、もう少し詰めていきたい。

E. 結論

今回の解析から、CTL が病状のコントロールに関連していることは明らかである。しかし、なぜ、slow progressor では長期にわたり

escape が出現しないのかを、明らかにしていきたい。この点が明らかになれば、免疫療法への道が開かれてくると期待される。

F. 研究発表

1. Fujiwara M, Tanuma J, Koizumi H, Kawashima Y, Honda K, Matsuoka AS, Dohki S, Oka S, and Takiguchi M. Accumulation of HIV-1 escape mutant by different responses of escape mutant-specific cytotoxic T cells to escape mutant and wild-type HIV-1 in new hosts. *J Virol* 82: 138-147, 2008, Epub 2007 Oct 24.
2. Hayashida T, Gatanaga H, Tanuma J, and Oka S. Effect of low HIV-1 load and antiretroviral treatment on IgG-capture BED-enzyme immunoassay. *AIDS Res Hum Retrovirus* 24: 495-498, 2008.
3. Ueno T, Motozono C, Douki S, Mwimanz, Rauch S, Fackler OT, Oka S, and Takiguchi M. Cytotoxic T lymphocyte-mediated selective pressure influences dynamic evolution and pathogenic functions of HIV-1 Nef. *J Immunol* 180: 1107-16, 2008
4. Kawashima Y, Satoh M, Oka S, Shirasaka T, and Takiguchi M. Different immunodominance of HIV-1-specific CTL epitopes among 3 subtypes of HLA-A*26 associated with slow progression to AIDS. *Biochem Biophys Res Commun* 366: 612-616, 2008.
5. Gatanaga H, Honda H, and Oka S. Pharmacogenetic information derived from analysis of HLA alleles. *Pharmacogenomics (review)* 9: 207-214, 2008.

6. Hachiya A, Kodama E, Sarafianos SG, Schuckmann MM, Matsuoka M, Takiguchi M, Gatanaga H, and **Oka S**. Amino acid mutation, N348I, in the connection subdomain of HIV-1 reverse transcriptase confers multi-class resistance to NRTIs and NNRTIs. *J Virol* 82: 3261-3270, 2008, Epub 2008 Jan 23.
7. Tanuma J, Fujiwara M, Teruya K, Matsuoka S, Yamanaka H, Gatanaga H, Tachikawa N, Kikuchi Y, Takiguchi M, and **Oka S**. HLA-A*2402-restricted HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and escape mutation after ART with structured treatment interruptions. *Microbes Infect* 10: 689-698, 2008, Epub 2008 Mar 29.
8. Kitano M, Kobayashi N, Kawashima Y, Akahoshi T, Nokihara K, **Oka S**, and Takiguchi M. Identification and characterization of HLA-B*5401-restricted HIV-1-Nef and Pol-specific CTL epitopes. *Microbes Infect* 10: 764-772, 2008.
9. The Smart Study Group (**Oka S** as a principal investigator of the Sydney Regional Coordinating Center). Major clinical outcomes in antiretroviral therapy (ART)-naïve participants and in those not receiving ART at baseline in the SMART study. *J Infect Dis* 197: 1133-1144, 2008.
10. The Smart Study Group (**Oka S** as a principal investigator of the Sydney Regional Coordinating Center). Inferior clinical outcome of the CD4+ cell count-guided antiretroviral treatment interruption strategy in the SMART study: Role of CD4+ cell counts and HIV RNA levels during follow-up. *J Infect Dis* 197: 1145-1155, 2008.
11. Gatanaga H and **Oka S**. Successful genotype-tailored treatment with small-dose efavirenz. *AIDS* (correspondence) 23: 433-434, 2009.
12. Gatanaga H, Honda H, Tsukada K, Tanuma J, Yazaki H, Honda M, Teruya K, Kikuchi Y, and **Oka S**. Detection of HIV-1 load by the Roche COBAS TaqMan assay in patients with previously undetectable load by the Roche COBAS Amplicor Monitor. *Clin Infect Dis* (correspondence) 48: 260-262, 2009.
13. Bi X, Suzuki Y, Gatanaga H, and **Oka S**. High frequency and proliferation of CD4⁺FOXP3⁺ regulatory T cells in HIV-1 infected patients with low CD4 count. *Eur J Immunol* 39: 301-309, 2009, Epub 2008 Dec 16.
14. Koizumi H, Iwatani T, Tanuma J, Fujiwara M, Izumi T, **Oka S**, and Takiguchi M. Escape mutation selected by Gag28-36-specific cytotoxic T cells in HLA-A*2402-positive HIV-1-infected donors. *Microbes Infect* Epub 2008 Nov 24.
15. Fox Z, Phillips A, Cohen C, Neuhaus J, Baxter J, Emery S, Hirschel B, Hullsiek KH, Stephan C, Lundgren J; SMART Study Group (**Oka S** as a principal investigator of the Sydney Regional Coordinating Center). Viral resuppression and detection of drug resistance

following interruption of a suppressive non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor-based regimen. *AIDS* 22: 2279-2289, 2008.

16. Murakoshi H, Kitano M, Akahoshi T, Kawashima Y, Dohki S, Oka S, and Takiguchi M. Identification and characterization of 2 HIV-1 Gag immunodominant epitopes restricted by Asian HLA allele HLA-B*4801. *Hum Immunol* Epub 2009 Jan 21.
17. Kawabata KC, Hagiwara S, Takenouchi A, Tanimura A, Tanuma J, Tachikawa N, Miwa A, and Oka S. Autologous stem cell transplantation using MEAM regimen for relapsed AIDS-related lymphoma patients who received highly active anti-retroviral therapy: a report of three cases. *Intern Med* 48: 111-114, 2009, Epub 2009 Jan 15.
18. Zhou J, Li PC, Kumarasamy N, Boyd M, Chen YMA, Sirisanthana T, Sungkanuparph S, Oka S, Tau G, Phanuphak P, Saphonn V, Zhang FJ, Kamarulzaman A, Lee CKC, Ditango R, Merati TP, Lim PL, Choi JY, and Pujari S on behalf of the Treat Asia HIV Observational Database. Deferred modification of antiretroviral regimen following documented treatment failure in Asia: results from The TREAT Asia HIV Observational Database (TAHOD). *Clin Infect Dis* (in press)
19. Ishizaki A, Cuong NH, Thuc PV, Trung NV, Saijoh K, Kageyama S, Ishigaki K, Tanuma J, Oka S, and Ichimura H. 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 Retrovirus* (in press)
20. Davaalkham J, Unenchimeng P, Baigalmaa C, Oyunbileg B, Tsuchiya K, Hachiya A, Gatanaga H, Nyamkhuu D, and Oka S. High risk status of HIV-1 in the very low epidemic country, Mongolia, 2007. *Int J STD AIDS* (in press)
21. Kawashima Y, Pfafferott K, Duda A, Matthews P, Addo M, Gatanaga H, Fujiwara M, Hachiya A, Kizumi H, Kuse N, Oka S, Brumme Z, Brumme C, Brander C, Allen T, Kaslow R, Tang J, Hunter E, Allen S, Mulenga J, Branch S, Roach T, John M, Mallal S, Heckerman D, Frater J, Prendergast A, Crawford H, Leslie A, Prado J, Ndung'u T, Phillips R, Harrigan R, Walker B, Takiguchi M, and Goulder P. Adaptation of HIV-1 to HLA I. *Nature* (in press)

G. 知的財産権の出願・登録状況：なし

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

研究分担者 満屋 裕明 熊本大学医学薬学研究部血液内科学・感染免疫診療部 教授

研究要旨

我々のグループは HIV-1 が耐性を獲得しにくく、獲得しても他薬剤との交差耐性を有しない新規のプロテアーゼ阻害剤(Pis)の開発を米国の研究グループと共同で続けており、新規の HIV-1 PI, GRL-02031 を開発、本剤における抗 HIV-1 活性発揮の機序や耐性獲得の機序について詳細な検討を行った。また、新規開発中の HIV-1 逆転写酵素阻害剤である 4'-Ethinyl-2-Fluoro-2'-Deoxyadenosine の抗 HIV 活性について、NOG-SCID マウスや SIV 感染サルを用いて評価を行った。更に CCR5 の微細構造学的解析系の確立、CCR5 阻害剤の結合モデル、分子レベルでの機序解析の研究も進めており、これらの解析結果を基にして、CCR5 結合能のある新規低分子化合物のモデリングを行い、強力な抗 HIV 活性を有する新しい化合物の設計・同定を続けている。

A. 研究目的

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

の感染を阻害する CCR5 阻害剤の開発を進めるとともに、その基礎となるウイルス学・酵素学・細胞生物学・薬理学・結晶解析学的な基礎研究を進める。

B. 研究方法

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

2) 抗 HIV-1 作用発現のメカニズム解析: Pis がウイルス、あるいは生体 (細胞) へ与える変化、それがどのようにして抗 HIV-1 効果をもたらすかについて解析を進める。この研究には多数の HIV-1 クローンの作成・検討が必