

200830011B

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18年度～20年度 総合研究報告書

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18年度～20年度 総合研究報告書

研究代表者 滝口 雅文

平成21年(2009)年 3月

## 目 次

### I. 総合研究報告書

- HIV 感染症の治療開発に関する研究 ----- 3  
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 ----- 15  
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 ----- 21  
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 ----- 25  
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 ----- 34  
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 ----- 44  
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 ----- 51  
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 ----- 63

### IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 67

## I . 総合研究報告書

## 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) 4'-Ed4Tは米国において第一相の臨床試験が開始され、その安全性と高い吸収が確認された。また、In vitro で耐性変異の誘導に成功した。4) 強いHIV-1増殖抑制能を持っているHLA-A\*2402拘束性Nef138特異的CTLは、Nef138-2F逃避変異を選択すること、さらに患者体内に出現したNef138-2F逃避変異に対してあたらなCTLが誘導できることが明らかになった。5) 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。6) KD-247中和抗体の臨床試験を開始し、またCCR5阻害剤との相乗効果を明らかにした。

### 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 s (protease dimerization inhibitors) の開発とPDI s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 sの開発を進めた。またPR dimerizationに重要とされるアミノ酸、PDI s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 s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、耐性機序を解析する。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、長期毒性についても検討した。

・核酸系逆転写酵素阻害薬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の転写阻害薬を同定する目的で、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。また逃避変異に対して新たな CTL の誘導がされているかを、特異的テトラマーを用いて解析した。

・ L T N P より中和単抗体を作成し、その様々なウイルスに対する交差反応性を明らかにした。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。抗 V3 抗体である KD-247 と CCR5 阻害剤の相乗効果を検討した。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、実用化に成功した。また 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-fluoro-adenosine (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。

・ 4'-Ed4T は米国において第一相の臨床試験が

開始され、その安全性と高い吸収が確認された。

・ 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。

・ Nef138 特異的 CTL から逃避する変異ウイルスに対して、変異特異的 CTL が新たに作り出されることが明らかになった。

・ HIV-1 subtype B の 47% に反応する抗 gp120 中和単クローン抗体、KD-247 は、現在米国での臨床試験を開始した。

・ 抗 V3 抗体である KD-247 と CCR5 阻害剤は膜融合ステップにかかわるウイルス側と宿主側のそれぞれに作用することから、これらの併用効果を調べたところ、強力な相乗作用を見いだした。

・ クアンスピーシスで存在する臨床分離株 MOKW の中和逃避ウイルスは、抗体濃度が比較的低濃度の時は、V2 の変異により中和抗体から逃避し、高濃度になると V3-tip に変異が入る事がわかった。V2 領域の P175L という変異が、エンベロープ三量体構造を変えることにより、中和抵抗性を与えることを証明した。

## 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。また満屋により開発した CCR5 阻害剤は米国において第3相の臨床試験まで実施したが、強い

副作用の出現により中止となった。現在CCR5阻害剤の機序を解明する研究を行うとともに、新たなCCR5開発の検討をしている。

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。

さらにNef138変異エピトープに対する特異的CTLが患者で誘導されていることが確認できた。しかしながらそのCTLの逃避変異ウイルスに対する増殖抑制能は、ワイルドタイプほど強くなく、今後の検討が必要である。

## 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の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。逃避変異に対する新たなCTLが患者体内で誘導されることが確認できたことから、逃避変異をターゲットとする新たなCTLの誘導を行う治療法の可能性が出てきた。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。また逃避変異に関する新たなCTLの誘導が確認できた。

**F. 研究発表** (2005~in press 本研究班課題に関連したもののみ掲載)

滝口雅文

1. Fujiwara, M., Takata, H., **Oka, S.**, Tomiyama, H., and **Takiguchi, M.** Patterns of cytokine production in HIV-1-specific human CD8+ T cells after stimulation with HIV-1-infected CD4+ T cells, **J. Virol.** **79: 12536-12543, 2005.**
2. Tomiyama, H., Fujiwara, M., **Oka, S.**, and **Takiguchi, M.** Cutting Edge: Epitope-dependent effect of Nef-mediated HLA class I down-regulation on ability of HIV-1-specific CTLs to suppress HIV-1 replication. **J. Immunol.** **174: 36-40, 2005.**
3. Bolesta, E., Kowalczyk, A., Wierzbicki, A., Eppolito, C., Kaneko, Y., **Takiguchi, M.**, Shrikant, P.A., and Kozbor, D. Increased Level and Longevity of Protective Immune Responses Induced by DNA Vaccine Expressing the HIV-1 Env Glycoprotein when Combined with of IL-21 and IL-15 Gene Delivery, **J. Immunol.** **177:177-191, 2006.**
4. **Takiguchi, M.**, Effects of Pathogens on the Immune Response: HIV. In Immunodominance: The Choice of the Immune System (J. A. Frelinger ed.) Wiley-VCH 209-231, 2006.
5. Kawada, M., Igarashi, H., Takeda, A., Tsukamoto, T., Yamamoto, H., Dohki, S., **Takiguchi, M.** and Matano, T. Involvement of multiple epitope-specific cytotoxic T lymphocyte responses in vaccine-based control of simian immunodeficiency virus replication in rhesus macaques. **J. Virol.** **80: 1949-1958, 2006.**
6. Ueno, T., Idegami, Y., Motozono, C., **Oka, S.** and **Takiguchi, M.** Altering effects of antigenic variations in HIV-1 on antiviral effectiveness of HIV-specific CTLs **J. Immunol.** **178: 5513-5523, 2007**
7. Fujiwara, M. and **Takiguchi, M.** HIV-1-Specific CTLs Effectively Suppress Replication of HIV-1 in HIV-1-infected Macrophages, **Blood** **109:4832-4838, 2007**
8. 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**
9. 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**
10. Ueno, T., Motozono, C., Douki, S., Mwimanzi, P., Rauch, S., Fackler, OT., **Oka, S.** and **Takiguchi, M.** Cytotoxic T lymphocyte-mediated selective pressure influences dynamic evolution and pathogenic functions of HIV-1 Nef, **J. Immunol.** **180:1107-1116, 2008**
11. 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.**
12. 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.**
13. 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

14. 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
15. 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

#### 岡慎一

1. 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.
2. 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.
3. 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)
4. Bi X, Suzuki Y, Gatanaga H, and Oka S. High frequency and proliferation of CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in HIV-1 infected patients with low CD4 count. *Eur J Immunol* 39: 301-309, 2009, Epub 2008 Dec 16.

#### 松下修三

1. Eda, Y., Takizawa, M., Murakami, T., Maeda, H., Kimachi, K., Yonemura, H., Koyanagi, S., Shiosaki, K., Higuchi, H., Makizumi, K., Nakashima, T., Osatomi, K., Tokiyoshi, S., Matsushita, S., Yamamoto, N. and Honda, M. Sequential immunization with V3 peptides from primary HIV-1 produces cross-neutralizing antibodies against primary isolates with matching narrow neutralization sequence motif. *J. Virol.* 80 : 5552-5562, 2006.
2. 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, S., Yamamoto, N. and 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. *J. Virol.* 80 : 5563-5570, 2006
3. Yoshimura, K., Shibata, J., Kimura, T., Honda, A., Maeda, Y., Koito, A., Murakami, T., Mitsuya, H., Matsushita, S. Resistance profile of a novel broadly neutralizing anti-HIV monoclonal antibody, KD-247, that shows favorable synergism with anti-CCR5 inhibitors in vitro. *AIDS*, 20:2065-2073, 2006.
4. Ikeda, T., Shibata, J., Yoshimura, K., Koito, K., Matsushita, S. Recurrent HIV-1 integration at the BACH2 locus in resting CD4<sup>+</sup> T cell populations during effective HAART. *J. Infect. Dis.* 195, 716-725, 2007.
5. 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
6. Nakayama E.E., Carpentier W, Costagliola D., Shioda T., Iwamoto A., Debre P, Yoshimura K, Autran B, Matsushita S. Theodorou I. Wild type and H43Y variant

- of human TRIM5 $\alpha$  show similar anti-human immunodeficiency virus type 1 activity both in vivo and in vitro. **Immunogenetics**. 59:511-515, 2007.
- Gatanaga H, Hayashida T, Tsuchiya K, Yoshino M, Kuwahara T, Tsukada H, Fujimoto K, Sato I, Ueda M, Horiba M, Hamaguchi M, Yamamoto M, Takata N, Kimura A, Koike T, Gejyo F, **Matsushita M**, Shirasaka T, Kimura S, **Oka S**.: Successful efavirenz dose reduction in HIV-1-infected individuals with cytochrome P450 2B6\*6 and \*26. **Clin Infect Dis**.45: 1230-1237, 2007.
  - Ryo, A., Tsurutani, N., Ohba, K., Kimura, R., Komano, J., Nishi, M., Hiromi Soedal, Shinichiro Hattori<sup>2</sup>, 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 and regulates the intracellular trafficking and stability of HIV-1 Gag. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 105:294-299, 2008.
  - 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.
- 満屋裕明
- Aoki M, David JV, Koh Y, Aoki-Ogata H, Miyakawa T, Yoshimura K, Maeda K, and **Mitsuya H**. (2009) Non-cleavage Site Gag Mutations in Amprenavir-resistant HIV-1 Predispose HIV-1 to Rapid Acquisition of Amprenavir Resistance But Delays Development of Resistance to Other Protease Inhibitors. **J Virol**. accepted for publication.
  - Koh Y, Das D, Leschenko S, Nakata H, Ogata-Aoki H, Amano M, Nakayama M, Ghosh AK and **Mitsuya H**. 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**. accepted for publication. **Antimicrob Agents Chemother**. 53(3): 997-1006,2009
  - Ghosh AK, Chapsal BD, Baldrige A, Ide K, Koh Y and **Mitsuya H**. Design and Synthesis of Stereochemically Defined Novel Spirocyclic P2-Ligands for HIV-1 Protease Inhibitors. **Org Lett**. 10: 5135-8,2008
  - Ghosh AK, Gemma S, Takayama J, Baldrige A, Leshchenko-Yashchuk S, Miller HB, Wang YF, Kovalevsky AY, Koh Y, Weber IT and **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
  - Ghosh AK, Gemma S, Baldrige A, Wang YF, Kovalevsky AY, Koh Y, Weber IT and **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
  - Maeda K, Das D, Yin PD, Tsuchiya K, Ogata-Aoki H, Nakata H, Norman RB, Hackney LA, Takaoka Y and **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
  - Kawamoto A, Kodama E, Sarafianos SG, 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
  - Nakata H, Steinberg SM, Koh Y, Maeda K, Takaoka Y, Tamamura H, Fujii N and **Mitsuya H**. Potent synergistic anti-human immunodeficiency virus (HIV) effects using combinations of the CCR5 inhibitor aplaviroc with other anti-HIV drugs. **Antimicrob Agents Chemother**. 52: 2111-9,2008
  - Mitsuya H**, Maeda K, Das D and Ghosh AK.

- Development of protease inhibitors and the fight with drug-resistant HIV-1 variants. *Adv Pharmacol.* 56: 169-97, 2008.
10. Ghosh AK, Chapsal BD, Weber IT and Mitsuva H. Design of HIV protease inhibitors targeting protein backbone: an effective strategy for combating drug resistance. *Acc Chem Res.* 41: 78-86, 2008.
  11. Koh Y, Matsumi S, Das D, Amano M, Davis DA, Li J, Leschenko S, Baldrige A, Shioda T, Yarchoan R, Ghosh AK, Mitsuva H. Potent Inhibition of HIV-1 Replication by Novel Non-peptidyl Small Molecule Inhibitors of Protease Dimerization. *J Biol Chem.* 282: 28709-28720, 2007.
  12. Nakata H, Amano M, Koh Y, Kodama E, Yang G, Bailey CM, Kohgo S, Hayakawa H, Matsuoka M, Anderson KS, Cheng YC, Mitsuva H. Activity against human immunodeficiency virus type 1, intracellular metabolism, and effects on human DNA polymerases of 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine. *Antimicrob Agents Chemother.* 51: 2701-2708, 2007.
  13. Harada S, Hazra R, Tamiya S, Zeichner SL, Mitsuva H. Emergence of human immunodeficiency virus type 1 variants containing the Q151M complex in children receiving long-term antiretroviral chemotherapy. *Antiviral Res.* 75: 159-166, 2007.
  14. Amano M, Koh Y, Das D, Li J, Leschenko S, Wang YF, Boross PI, Weber IT, Ghosh AK, Mitsuva H. A novel bis-tetrahydrofuranylethane-containing nonpeptidic protease inhibitor (PI), GRL-98065, is potent against multiple-PI-resistant human immunodeficiency virus in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 51: 2143-2155, 2007.
  15. Nishizawa R, Nishiyama T, Hisaichi K, Matsunaga N, Minamoto C, Habashita H, Takaoka Y, Toda M, Shibayama S, Tada H, Sagawa K, Fukushima D, Maeda K, Mitsuva H. Spirodiketopiperazine-based CCR5 antagonists: Lead optimization from biologically active metabolite. *Bioorg Med Chem Lett.* 17: 727-731, 2007.
  16. Ohru H, Kohgo S, Hayakawa H, Kodama E, Matsuoka M, Nakata T, Mitsuva H. 2'-deoxy-4'-C-ethynyl-2-fluoro-adenosine: a nucleoside reverse transcriptase inhibitor with highly potent activity against wide spectrum of HIV-1 strains, favorable toxic profiles, and stability in plasma. *Nucleotides Nucleic Acids.* 26(10-12): 1543-6, 2007.
  17. Ghosh AK, Dawson ZL, Mitsuva H. Darunavir, a conceptually new HIV-1 protease inhibitor for the treatment of drug-resistant HIV. *Bioorg Med Chem.* 15(24): 7576-80, 2007
  18. Gatanaga H, Das D, Suzuki Y, Yeh DD, Hussain KA, Ghosh AK, and Mitsuva H. Altered HIV-1 Gag Protein Interactions with Cyclophilin A(CypA) on the Acquisition of H219Q and H219P Substitutions in the CypA Binding Loop. *J Biol Chem.* 281: 1241-1250, 2006 .
  19. Maeda K, Das D, Ogata-Aoki H, Nakata H, Miyakawa T, Tojo Y, Norman R, Takaoka Y, Ding J, Arnold GF, Arnold E, and Mitsuva H. Structural and molecular interactions of CCR5 inhibitors with CCR5. *J Biol Chem.* 281: 12688-12698, 2006.
  20. Ohru H, Kohgo S, Hayakawa H, Kodama E, Matsuoka M, Nakata T, and Mitsuva H. Activity of 2'-Deoxy-4'-C-ethynyl-2-fluoro-adenosine: A nucleoside reverse transcriptase inhibitor with highly potent activity against all HIV-1 strains, favorable toxic profiles and stability in plasma. *Nucleic Acids Symposium Series.* 50: 1-2, 2006
  21. Davis DA, Brown CA, Wang V, Singer KE, Kaufman J, Stahl SJ, Wingfield P, Maeda K, Harada S, Yoshimura K, Kosalaraksa P, Mitsuva H. and Yarchoan R. (2006) Inhibition of HIV-1 replication by a peptide dimerization inhibitor of HIV-1 protease. *Antiviral Res.* 72: 89-99.
  22. Ghosh AK, Schiltz G, Perali RS, Leshchenko S, Kay S, Walters DE, Koh Y, Maeda K, Mitsuva H. Design and synthesis of novel HIV-1 protease inhibitors incorporating oxyindoles as the P2'-ligands. *Bioorg Med Chem Lett.* 16: 1869-1873, 2006.

23. Yin PD, Das D, and **Mitsuva H**. Overcoming HIV Drug Resistance through Rational Drug Design Based on Molecular, Biochemical, and Structural Profiles of HIV Resistance. *Cell Mol Life Sci*. 63: 1706-1724, 2006
24. Habashita H, Kokubo M, Hamano S, Hamanaka N, Toda M, Shibayama S, Tada H, Sagawa K, Fukushima D, Maeda K, and **Mitsuva H**. Design, synthesis and biological evaluation of combinatorial library with new spirodiketopiperazine scaffold. Discovery of novel, potent and selective low-molecular weight CCR5 antagonists. *J Med Chem*. 49: 4140-4152, 2006
25. Ghosh AK, Sridhar P.R, Hussain AK, Leshchenko S, Li J, Kovalevsky AY, Walters DE, Wedekind JE, Tokars VL, Das D, Koh Y, Maeda K, Gatanaga H, Weber IT, and **Mitsuva H**. Structure-Based Design of HIV-1 Protease Inhibitors to Combat Drug Resistance. *J Med Chem*. 49: 5252-5261, 2006.
26. Zhou S, Kern ER, Gullen E, Cheng YC, Drach JC, Tamiya S, **Mitsuva H**, and Zemlicka J. (2006) 9-[[3-Fluoro-2 (hydroxymethyl)cyclopropylidene] methyl] adenines and guanines. Synthesis and Antiviral of All Stereoisomers. *J Med Chem*. 49: 6120-6128
27. Yoshimura K, Shibata J, Kimura T, Honda A, Maeda Y, Koito A, Murakami T, **Mitsuva H**, and **Matsushita S**. Resistance profile of a novel broadly neutralizing anti-HIV monoclonal antibody, KD-247, that shows favorable synergism with anti-CCR5 inhibitors. *AIDS*. 20: 2065-2073, 2006
28. Ghosh AK, Sridhar PR, Kumaragurubaran N, Koh Y, Weber IT, and **Mitsuva H**. Bis-Tetrahydrofuran: A Privileged Ligand for Darunavir and a New Generation of HIV-Protease Inhibitors That Combat Drug Resistance. *Chem Med Chem*. 1: 939-950, 2006
1. **Baba M**. Recent status of HIV-1 gene expression inhibitors. *Antiviral Res*. 71: 301-306 (2006).
2. **Baba M**. Recent advances of CCR5 antagonists. *Curr. Opinion HIV AIDS* 1: 367-372 (2006).
3. Imamura S, Ichikawa T, Nishikawa Y, Kanzaki N, Takashima K, Niwa S, Iizawa Y, **Baba M**, Sugihara Y. Discovery of a piperidine-4-carboxamide CCR5 antagonist (TAK-220) with highly potent anti-HIV-1 activity. *J. Med. Chem*. 49: 2784-2793 (2006).
4. Seto M, Aikawa K, Miyamoto N, Aramaki Y, Kanzaki N, Kuze Y, Takashima K, Iizawa Y, **Baba M**, Shiraishi M. Highly potent and orally active CCR5 antagonist as anti-HIV-1 agents: Synthesis and biological activities of 1-benzazocine derivatives containing a sulfide moiety. *J. Med. Chem*. 49: 2037-2048 (2006).
5. **Baba M**, Miyake H, Wang X, Okamoto M, Takashima K. Isolation and characterization of human immunodeficiency virus type 1 resistant to the small-molecule CCR5 antagonist TAK-652. *Antimicrob. Agents Chemother*. 51:707-715 (2007).
6. Yang G, Dutschman GE, Wang CJ, Tanaka H, **Baba M**, Anderson KS, Cheng Y-C. Highly selective action of triphosphate metabolite of 4'-ethynyl D4T: A novel anti-HIV compound against HIV-1 RT. *Antiviral Res*. 73: 185-191 (2007).
7. Hsu C-H, Hu R, Dutschman GE, Yang G, Krishnan P, Tanaka H, **Baba M**, Cheng Y-C. Comparison of phosphorylation of 4'-ethynyl 2',3'-dihydro-3'-deoxythymidine with that of other anti-human immunodeficiency virus thymidine analogs. *Antimicrob. Agents Chemother*. 51: 1687-1693 (2007).
8. Shi M, Wang X, De Clercq E, Takao S, **Baba M**. Selective inhibition of porcine endogenous retrovirus (PERV) replication in human cells by acyclic nucleoside phosphonates. *Antimicrob. Agents Chemother*. 51: 2600-2604 (2007).
9. Wang X, Yamataka K, Okamoto M, Ikeda S, **Baba M**. Potent and selective inhibition of Tat-dependent HIV-1 replication in chronically infected cells by a novel naphthalene derivative JTK-101. *Antiviral Chem. Chemother*. 18:

馬場昌範

- 201-211 (2007).
10. Paintsil E, Dutchman GE, Hu R, Grill S, Lam W, **Baba M**, Tanaka H, Cheng Y-C. Intracellular metabolism and persistence of the anti-human immunodeficiency virus activity of 2',3'-didehydro-3'-deoxy-4'-ethynylthymidine, a novel thymidine analog. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**: 3870-3879 (2007).
  11. Sawada H, Narumi T, Kiyohara M, **Baba M**. Preparation of fluoroalkyl end-capped cooligomers/silica nanoparticles: a new approach to fluorinated nanoparticle inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus (SIV<sub>mac</sub>). *J. Fluorine Chem.* **128**: 1416-1420 (2007).
  12. Kumamoto H, Takahashi N, Shimamura T, Tanaka H, Nakamura KT, Hamasaki T, **Baba M**, Abe H, Yano M, Kato N. Synthesis of (±)-9-[c-4,t-5-bis(hydroxymethyl)cyclopent-2-en-r-1-yl]-9H-adenine (BCA) derivatives branched at the 4'-position based on intramolecular S<sub>N</sub>2' cyclization. *Tetrahedron* **64**: 1494-1505 (2008).
  13. Haraguchi K, Shimada H, Tanaka H, Hamasaki T, **Baba M**, Gullen EA, Dutchman GE, 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).
  14. Yang G, Wang J, Cheng Y, Dutchman GE, Tanaka 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).
  15. Kumamoto H, Haraguchi K, Ida M, Tanaka H, **Hamasaki T**, **Baba M**. Synthesis and antiviral evaluation of (±)-4'-ethynyl-5'-difluorocarbonyl-d4T analogue. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **52**: 609-610 (2008).
- 松岡雅雄
1. Sato M, Motomura T, Aramaki H, Matsuda T, Yamashita M, Ito Y, Kawakami H, Matsuzaki Y, Watanabe W, Yamataka K, Ikeda S, Kodama E, **Matsuoka M**, and Shinkai H. Novel HIV-1 Integrase Inhibitors Derived from Quinolone Antibiotics. *J. Med. Chem.* **49**(5) 1506-1508, 2006.
  2. Saita Y, Kodama E, Orita M, Kondo M, Miyazaki T, Sudo K, Kajiwara K, **Matsuoka M**, Shimizu Y. Structural Basis for the Interaction of CCR5 with a Small Molecule, Functionally Selective CCR5 Agonist. *Journal of Immunology*, **177**: 3116-3122, 2006.
  3. Ohri H, Kohgo S, Hayakawa H, Kodama E, **Matsuoka M**, Nakata T, Mitsuya H. 2'-Deoxy-4'-C-ethynyl-2-fluoroadenosine: a nucleoside reverse transcriptase inhibitor with highly potent activity against all HIV-1 strains, favorable toxic profiles and stability in plasma. *Nucleic Acids Symposium Series* **50**:1-2, 2006.
  4. Kajiwara K, Kodama E, **Matsuoka M**. A novel colorimetric assay for CXCR4 and CCR5 tropic human immunodeficiency viruses. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* **17**: 215-223, 2006.
  5. Hino S, Akasaka K, and **Matsuoka M**. Sea Urchin Arylsulfatase Insulator Exerts its Anti-silencing Effect without Interacting with the Nuclear Matrix. *J. Mol. Biol.* **357**, 18-27, 2006.
  6. Tajima S, Shinohara K, Fukumoto M, Zaito R, Miyagawa J, Hino S, Fan J, Akasaka K and **Matsuoka M**. Ars Insulator Identified in Sea Urchin Possesses an Activity to Ensure the Transgene Expression in Mouse Cells. *Journal of Biochemistry* **139**(4):705-714, 2006.
  7. Mitchell MS, Bodine ET, Hill S, Princler G, Lloyd P, Mitsuya H, **Matsuoka M**, Derse D. Phenotypic and genotypic comparison of human T-cell leukemia virus type 1 reverse transcriptase from infected T-cell lines and patient samples. *J Virol*, **81**: 4422-4428, 2007.
  8. Miyazaki M, Yasunaga J-I, Taniguchi Y, Tamiya S, Nakahata T, and **Matsuoka M**. Preferential Selection of HTLV-1 Provirus Lacking the 5'LTR during Oncogenesis. *J Virol*, **81**:

- 5714-5723, 2007.
9. Nakata H, Amano M, Koh Y, Kodama E, Yang G, Bailey CM, Kohgo S, Hayakawa H, **Matsuoka M**, Anderson KS, Cheng Y-C, Mitsuya H. Antiviral Activity against HIV-1, Intracellular Metabolism, and Effects on Human DNA Polymerases of 4'-Ethylnyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine. **Antimicrob. Agents Chemother.** 51: 2701-2708, 2007.
  10. 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 **Masao Matsuoka**. 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.
  11. 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.
  12. 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.

G. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

松下修三

特許出願；1件；発明の名称 「抗 HIV モノクローナル抗体」、整理番号；A71717A, 平成 19 年 11 月 19 日

## 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中心・ウイルス制御分野・教授）

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

**研究要旨** CTLによる免疫圧により HIV-1 の増殖は抑制されるが、一方、逃避変異ウイルスが選択されることにもなる。この逃避変異ウイルスが一度出現するとこの変異を認識する CTL は新たな誘導されないと考えられ、免疫治療を考える上で大きな問題となる。HIV-1 感染者の経過を長期観察し、感染1年ほどして出現してから、強い HIV-1 増殖抑制能を持った CTL の逃避変異は出現し、この変異エピトープに対して特異性をもったあらたな CTL が誘導されることを明らかにした。しかしこの逃避変異エピトープ特異的 CTL の変異ウイルスの増殖抑制能は、このワイルドタイプ (WT) に対する CTL の WT ウイルスの増殖抑制能と比べて低下しており、体内での変異ウイルスの抑制力は弱いと考えられた。一方、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、現在流行しているウイルスは、免疫から逃避したものであると考えられ、これらのウイルスに対する免疫治療法の確立が重要である。

### A. 研究目的

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

また、強い HIV 増殖抑制能をしめした 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 CTL を同定する。この

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

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. Nef138 特異的 CTL による HIV-1 増殖抑制能と変異エピトープの選択

4種類の HLA-A\*2402 拘束性 CTL エピトープに特異的な CTL クローンを用いて、HIV-1 の増殖抑制能を調べた。その結果、Nef138 特



異的 CTL のみが、HIV-1 感染 CD4T 細胞を用いた場合強い HIV-1 増殖抑制能があることが明らかになった。

この CTL による逃避エピトープの選択の可能性を探るために、このエピトープ部位のシーケンスをし、HLA-A\*2402 を持っている患者と持っていない患者で差がでないか検討した。その結果、エピトープの 2 番目の Thy から Phe に変異している場合が HLA-A\*2402 を持っている患者に有意に多いことが明らかになった。このためこの 2F 変異が逃避エピトープである可能性が示唆された(図 1)。

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

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

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

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

## 3. 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 3A)。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 4B)。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 5)。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 6A)。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 6B)、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 6C)、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。

## 4. 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 7A)。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 7B)。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。

Nef138 の変異エピトープに対する新たな CTL の誘導が確認できたことは、逃避エピトープに対する CTL を用いた治療法の可能性がまだ残されていることを示している。しかし、今研究でも示したように、WT 特異的 CTL が WT ウイルスの増殖を抑制する能力と比べて、逃避変異エピトープ特異的 CTL が逃避変異ウイルスの増殖を抑制する能力は明らかかの低下していたことは、これらの患者では 2F ウイルスが増殖するとウイルス量が増加する傾向があることからでも明らかのように、逃避変異エピトープ特異的 CTL では逃避変異エピトープ特異的 CTL では体内でのウイルス増殖を抑制できないことを意味している。今後、これらの逃避エピトープに対して強い認識を示す CTL の誘導方法の検討が、今後の免疫療法の開発には重要である。

#### E. 結論

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

選択された。

2. 患者体内に出現した Nef138-2F 逃避変異に対してあらたな CTL が誘導できることが明らかになった。この Nef138-2F 特異的 CTL は Nef138-2F 逃避変異ウイルスの増殖を部分的に抑制した。
3. 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。
4. 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. 研究発表

##### 1) 論文発表

1. Fujiwara, M., Takata, H., Oka, S., Tomiyama, H., and Takiguchi, M. Patterns of cytokine production in HIV-1-specific human CD8+ T cells after stimulation with HIV-1-infected CD4+ T cells, *J. Virol.* **79**: 12536-12543, 2005.
2. Tomiyama, H., Fujiwara, M., Oka, S., and Takiguchi, M. Cutting Edge: Epitope-dependent effect of Nef-mediated HLA class I down-regulation on ability of HIV-1-specific CTLs to suppress HIV-1 replication. *J. Immunol.* **174**: 36-40, 2005.
3. Bolesta, E., Kowalczyk, A., Wierzbicki, A., Eppolito, C., Kaneko, Y., Takiguchi, M., Shrikant, P.A., and Kozbor, D. Increased Level and Longevity of Protective Immune Responses Induced by DNA Vaccine Expressing the HIV-1 Env Glycoprotein when Combined with of IL-21 and IL-15 Gene Delivery, *J. Immunol.* **177**:177-191, 2006.
4. Takiguchi, M. Effects of Pathogens on the Immune Response: HIV. In Immunodominance: The Choice of the Immune System (J. A. Frelinger ed.) Wiley-VCH 209-231, 2006.
5. Kawada, M., Igarashi, H., Takeda, A., Tsukamoto, T., Yamamoto, H., Dohki, S., Takiguchi, M. and Matano, T. Involvement of multiple epitope-specific cytotoxic T lymphocyte responses in vaccine-based control of simian immunodeficiency virus replication in rhesus macaques. *J. Virol.* **80**: 1949-1958, 2006.
6. Ueno, T., Idegami, Y., Motozono, C., Oka, S. and Takiguchi, M. Altering effects of antigenic variations in HIV-1 on antiviral

- effectiveness of HIV-specific CTLs **J. Immunol.** 178: 5513-5523, 2007
7. Fujiwara, M. and Takiguchi, M. HIV-1-Specific CTLs Effectively Suppress Replication of HIV-1 in HIV-1-infected Macrophages, **Blood** 109:4832-4838, 2007
  8. 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
  9. 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
  10. Ueno, T., Motozono, C., Douki, S., Mwimanzu, P., Rauch, S., Fackler, OT., Oka, S. and Takiguchi, M. Cytotoxic T lymphocyte-mediated selective pressure influences dynamic evolution and pathogenic functions of HIV-1 Nef, **J. Immunol.** 180:1107-1116, 2008
  11. 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.
  12. 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.
  13. 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
  14. 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
  15. 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 (省略)
- G. 知的所有権の出願・取得状況  
なし

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

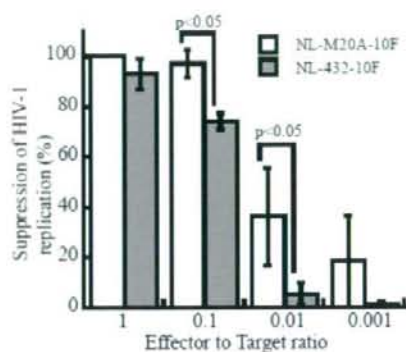


図 2: WT ウイルスに感染した患者 KI-092 での Nef138 および Nef138-2F 特異的

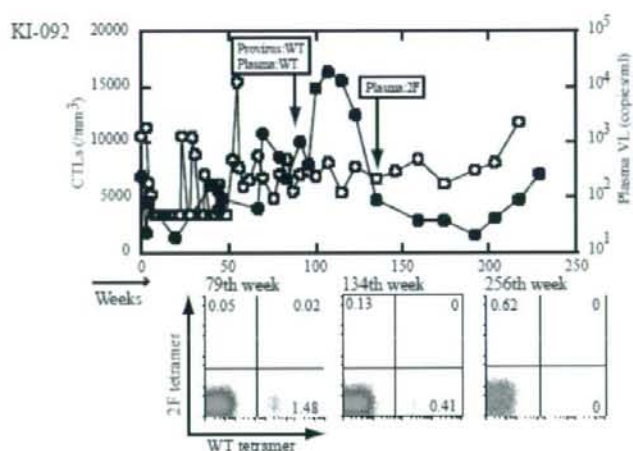


図 3: Pol283 の 8 番目 (I135X) のアミノ酸の変異

