

て調べたところ、U937 およびその HIV-1 慢性感染細胞である U937/III_B 細胞において、CDK9 と cyclin T1 とともに、発現レベルが他の細胞と比較して弱いことが明らかとなった。次に PBMCs とマクロファージについて調べたところ、非感染、HIV-1 感染に関わらず、培養マクロファージには CDK9 および cyclin T1 の発現が認められなかった。一方、対照として用いた PBMCs は CDK9 および cyclin T1 の何れの発現も観察された。これに対応するように、HIV-1 感染マクロファージにおいて、JTK-101 は抗ウイルス活性を全く示さなかった。

4'-Ed4T 耐性ウイルスのアミノ酸変異: 薬剤の濃度を徐々に増加させながら、感染細胞の継代培養を続けた結果、培養 29 日目には 3TC の存在下において、4'-Ed4T 存在下においては、26 日および 81 日間の継代培養にてブレイクス

ルーウイルスを得た。これらの逆転写酵素の polymerase 領域の遺伝子変異について検討したところ、3TC 存在下にて誘導されたブレイクスルーウイルスは予想通り、M184V のアミノ酸変異を有していた。一方、4'-Ed4T 存在下において 81 日目に得られたウイルスの逆転写酵素には、核酸レベルでは 5ヶ所に変異が認められたが、アミノ酸レベルでは、M184V に加えて、P119S および T165A という 2つの変異が存在した。P119S, T165A, および M184V のアミノ酸変異は全て逆転写酵素の polymerase 領域に存在する。そこで、それ以外の connection および RNaseH 領域にもアミノ酸変異が存在するかどうか検討した。その結果、4'-Ed4T に対して耐性を示すウイルスには、野生型と比較して、この 2つの領域にアミノ酸変異を全く認めなかった。

Table 2. Inhibitory effects of 4'-Ed4T and its related compounds on resistant strains.

Strain	EC ₅₀ (μM)		
	4'-Ed4T	4'-EFdA*	3TC
III _B (wild type)	0.22 ± 0.13	0.0011 ± 0.0003	2.0 ± 0.8
III _B (3TC _{29D})	0.41 ± 0.08	0.014 ± 0.004	> 20
III _B (4'-Ed4T _{26D})	0.39 ± 0.13	0.0055 ± 0.0031	> 20
III _B (4'-Ed4T _{81D})	2.3 ± 1.4	0.028 ± 0.012	> 20
CC ₅₀ (μM)	> 20	8.4 ± 0.9	> 20

EC₅₀: 50% effective concentration based on the inhibition of virus-induced cytopathicity in MT-4 cells.

CC₅₀: 50% cytotoxic concentration based on the reduction of viable cell number in mock-infected MT-4 cells.

All data represent means ± SD for 3 separate experiments.

Unpublished data. *Nakata et al. Antimicrob. Agents Chemother. 51:2701-2708 (2007).

耐性ウイルスの他の薬剤に対する感受性: 誘導された耐性ウイルスの 4'-Ed4T, 4'-EFdA, そして 3TC に対する活性を **Table 2** に示す。4'-Ed4T 耐性ウイルス [III_B (4'-Ed4T_{81D})] は野生株 III_B と比較すると、4'-Ed4T に対して約 10 倍の感受性低下を示した。一方、構造が

4'-Ed4T と類似している 4'-EFdA については、約 25 倍の感受性低下を示した。また、3TC に対しては 20 μM の濃度まで全く感受性を示さなかった。このことから、4'-Ed4T 耐性ウイルスは 4'-EFdA および 3TC に対して交叉耐性有することが明らかとなった。4'-Ed4T は M184V

の変異のみを持っている III_B (4'-Ed4T_{26D}) と III_B (3TC_{29D}) に対しては、2 倍程度のわずかな活性低下を示すにとどまった。これらの株に対し、4'-EFdA は 5 から 12 倍の活性低下、3TC は無効という結果となった。

D. 考察

CCR5 拮抗薬に対する耐性には *env* 遺伝子における変異が寄与しており、TAK-652 の場合には C2, V3, C4 及び gp41 において変異がみられ、これらの変異が耐性に寄与していると考えられる。現時点では個々の変異と耐性との関連は不明であるが、TAK-652 耐性 HIV-1 においてみられた *env* 遺伝子の変異箇所は、他の化合物とは異なっていた。このことは、こうした薬剤の CCR5 における作用部位が微妙に異なっていることを反映しているのかも知れない。この場合、ある CCR5 拮抗薬に対する耐性ウイルスに対して別の CCR5 拮抗薬が抗 HIV-1 活性を示す可能性がある。今回 TAK-652 とは化学構造が異なる CCR5 拮抗薬 TAK-220 を用いて KK₆₅₂₋₆₇ に対する抗 HIV-1 活性を調べたところ、TAK-220 は KK₆₅₂₋₆₇ に対して KK_{WT} と同様の抗 HIV-1 活性を示した (Table 1)。

HIV-1 遺伝子にエンコードされる Tat は HIV-1 遺伝子の転写産物である TAR (transcriptional response) RNA と相互作用することにより、HIV-1 RNA の伸長を活性化することが知られている。この Tat と TAR 相互作用には、宿主細胞因子である cyclin T1 と CDK9 との相互作用が必要であり、従って、何らかのメカニズムでこれらの相互作用を抑制する物質は、HIV-1 の遺伝子発現や転写を抑制し、結果としてウイルスの増殖が抑えられると考えられる。一方で、HIV-1 のリザーバーである休止期 T リンパ球やマクロファージなど、体内での寿命が長い細胞の存在により、HAART を中断すると、再びウイルスのリバウンドが起るため、有効なワクチンがない現状では、

HIV-1 感染症において、抗ウイルス薬の中断は出来ないとされている。このような状況において、JTK-101 のような、リザーバーからのウイルス産生を抑制するような薬剤があれば、既存の抗 HIV-1 薬と併用することにより、さらに有効な治療が展開できるであろう。残念ながら動物を用いた前臨床安全性試験で、JTK-101 は特にラットに対し、かなりの毒性を有することが判明した。従って、JTK-101 の臨床開発は断念されたが、我々は今後さらに cyclin T1/CDK9 を標的とした抗 HIV-1 療法の可能性を探っていく予定である。

一方、4'-Ed4T は通常の NRTIs と異なり 4' 位に置換基を有する、ユニークな化学構造を持っている。強い抗 HIV-1 効果を示すとともに、宿主細胞の何れの DNA polymerases の活性にほとんど影響を与えないという、優れた特徴を持っている。4'-Ed4T の動物を用いた前臨床薬理および毒性試験では、優れた薬物動態ときわめて低い毒性を示したため、現在、欧米において第 I 相臨床試験が行われている。健常者を対象とした第 Ia 相臨床試験の結果によると、4'-Ed4T の非常に優れた経口吸収性と 900 mg までの高い忍容性が証明されている (data not shown)。この結果を受けて、現在は HIV-1 感染者を対象にした第 Ib 相臨床試験が進行中である。

E. 結論

われわれは 3 年間にわたる本研究において、CCR5 拮抗薬 (TAK-652)、HIV-1 遺伝子発現阻害薬 (JTK-101)、そしてユニークなプロファイルを持った核酸系逆転写酵素阻害薬 (4'-Ed4T) の抗ウイルス効果と薬剤耐性について検討を行ってきた。そのうちの CCR5 拮抗薬と核酸系逆転写酵素阻害薬については、既に臨床試験が開始されている。今後は、新しい HIV-1 遺伝子発現阻害薬の同定を中心に研究を続けて行く予定である。

F. 研究発表(本研究に直接関係する論文発表のみ記載)

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., Shiraiishi 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**: 201-211 (2007).
10. Paintsil E, Dutschman 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_{mac}). *J. Fluorine Chem.* **128**: 1416-1420 (2007).
12. 馬場昌範. 新しい抗 HIV-1 薬開発の展望. 化学療法の領域 **23**:1002-1008 (2007).
13. 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_H2' cyclization. *Tetrahedron* **64**: 1494-1505 (2008).

14. Haraguchi K, Shimada H, Tanaka H, Hamasaki T, Baba M, Gullen EA, Dutschman 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).
 15. Yang G, Wang J, Cheng Y, Dutschman 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).
 16. 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).
 17. 馬場昌範 (分担). 抗ウイルス薬. 河野 茂 (編集) 「ウイルスハンドブック」 pp103-104, 日本医学館 (2008).
- G. 知的財産権の出願・登録状況
当該年度に、本研究に関する特許出願および取得はない。

HIV に対する新規薬剤開発

研究分担者： 松岡 雅雄 京都大学ウイルス研究所 教授

研究要旨

多剤併用療法により HIV 感染者の治療成績は劇的に改善したが耐性ウイルスの出現など克服すべき問題が残されている。耐性ウイルスを克服し HIV 感染者の治療成績向上を目指し新規治療薬の開発を行うと共にその耐性機構の明らかにした。新規薬剤標的として HIV ゲノムの宿主ゲノムへの組み込みを触媒するインテグラーゼを選択し、新規薬剤 Elvitegravir (JT303/GS-9137) を開発しその作用機序や耐性機序を明らかにした。また 4' 位にエチニル基を有し、強力な抗 HIV 作用を有する核酸系逆転写酵素阻害剤、4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine (EFdA) を同定し、その作用機序、耐性機構を明らかにした。

A. 研究目的

かつては不治の病と恐れられた HIV-1 感染症は複数の抗ウイルス剤を組み合わせた多剤併用療法 (highly active anti-retroviral therapy: HAART) の導入により制御可能な感染症へと変貌した。しかし、依然として HIV の駆逐は不可能であり、長期に亘る薬剤の服用により HIV の薬剤耐性獲得が大きな障害となってきた。耐性ウイルスの克服のためには新規標的に対する治療薬の開発と共に逆転写酵素やプロテアーゼに対する、より強力な既存の耐性ウイルスに有効な薬剤の開発が必要である。本研究では、新規の抗 HIV 剤を開発し強力な安全な治療法を可能とすることを目標とした。これらの薬剤に対する耐性ウイルスの研究は、新たな治療戦略構築の上でも必要不可欠である。

B. 研究方法

1) 新規インテグラーゼ阻害剤 Elvitegravir (EVG) (JTK303/GS-9137) の作用機序

吸着阻害剤 dextran sulfate、逆転写酵素阻害剤 AZT、JTK303/GS-9137 を細胞培養液中に添加し HIV-1_{IIIB} を MT-4 細胞に感染させた。その後、逆転写されたプロウイルス、環状化された 2LTR、ゲノムに組み込まれたプロウイルス (Alu-LTR) を半定量的 PCR 法にて解析した。

2) EVG に対する耐性ウイルスの誘導、耐性変異の同定

EVG 存在下で HIV を MT-2 に感染させ、培養液中の薬剤濃度を徐々に上昇させた (dose-escalation method)。68 代継代培養を行い、EC₅₀ が 1000nM に達し、耐性ウイルスが出現した。

3) EVG 耐性変異の同定

得られた変異を *in vitro* mutagenesis 法により NL4-3 に導入し組み換え HIV を作製した。薬剤感受性を MAGI 法により解析した。また複製速度を解析した。

3) EVG のレトロウイルス抑制作用

マウス白血病ウイルスベクターに luciferase 遺伝子を組み込んだベクターを用いて解析を行った。SIV_{mac} は p24 測定により抗ウイルス活性

を測定した。

4) 各種 HIV-1 サブタイプに対する EVG の効果

各種 HIV-1 サブタイプに対する EVG, AZT の効果は p24 の測定により行った。

5) 4' エチニル基を有する RT 阻害剤 (4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine: EFdA) に対する耐性機構

4' エチニルデオキシアデノシンに対する耐性ウイルスを dose escalation 法により誘導した。この耐性ウイルス変異を同定し、変異を有する infectious clone を作成した。各薬剤に対する感受性は MAGI assay を用いて解析した。

6) EFdA 代謝経路の解析

EFdA のアデノシンデアミナーゼ (adenosine deaminase: ADA) に対する感受性は HPLC で解析した。AraC 耐性 HT-1080 細胞株 (HT-1080/Ara-C^r) に CD4, CXCR4 発現ベクターをトランスフェクトし、HIV-1 感受性株を樹立した。ヒト deoxycytidine kiansse (dCK) 発現ベクターを作成し dCK を回復させた。

7) EFdA 耐性機構の解析

3TC 耐性変異である M184V により 2F-EdA に対する耐性上昇が認められたため構造生物学的な解析を行い、その機序解明を目指した。

(倫理面への配慮)

本研究は試験管内での実験であり、特に必要ないものとする。

C. 研究結果

1) 新規インテグラーゼ阻害剤の開発

新規インテグラーゼ阻害剤として Elvitegravir (EVG/JTK303/GS-9137) を開発し (JT との共同研究)、現在、米国 Gilead 社により臨床第三相試験中である。EVG は単剤でウイルス量を 2log 減少させ、強い抗 HIV 活性を示している。プロウイルスの定量により EVG は Alu-PCR により検出される組み込み型プロウイルスを検出感度以下に減少させ、環状型プロウイルス (2LTR) を増加させることが示された (図 1)。従って EVG がインテグレーションのステップを阻害していることが明らかとなった。

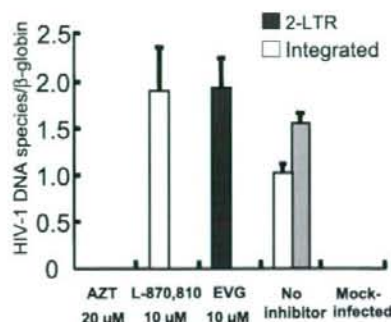


図1. EVGによる抗HIV作用機序

また EVG は野生型 HIV-1, HIV-2 のみならず臨床分離株に対しても優れた抗 HIV 活性を示した (表1)。

表1. EVGの抗HIV作用

laboratory strain (MAGI assay)	EC ₅₀ (nM)		
	EVG	L-870,810	AZT
HIV-1 _{III} B	0.7	6.3	7.1
HIV-2 _{EHO}	2.8	11	22
HIV-2 _{ROD}	1.4	8.6	19
heavily drug experienced clinical isolate (p24 ELISA)			
IVR401	1.0	4.3	871
IVR409	0.16	3.3	234
IVR411	0.28	2.6	38
IVR415	0.47	3.1	84

2) EVG に対する耐性ウイルスの誘導

ETG に対する HIV の耐性機序を解明するために dose escalation 法を用いて EVG に対する耐性ウイルスを誘導した。独立した実験により 2 種類の異なる耐性変異を有するウイルスを同定した (H51Y/E92Q/S147G/E157Q と T66I/Q95K/E138K/Q146P/S147G)。in vitro mutagenesis によりそれぞれ E92Q と T66I が耐性責任変異であることが明らかとなった。

3) 各種 HIV-1 サブタイプに対する EVG の効果

AZT に対してサブタイプ B の IC₅₀ は 1.10–11.7nM であり、サブタイプ F は 25.3nM と大きな差異が存在した。ETG の IC₅₀ は 0.1nM から 1.26nM であり、AZT と比較しサブタイプ間の薬剤感受性の差は少なかった。

4) EVG のレトロウイルス抑制作用

SIV_{mac} に対して IC₅₀ は 0.5nM であり、HIV_{III}B に対する IC₅₀ (0.8nM) と同等であった。加えて MLV に対しても阻害活性を有する (IC₅₀=5.8nM) ことが明らかとなった。

5) エチル核糖化合物の抗 HIV-1 効果

エチル核糖化合物を合成し、抗 HIV-1 抑制作用を検討したところ、特に 2 位にハロゲン

する EFdA, ECIdA が強い抗 HIV-1 活性を有していた (図2)。EFdA の EC₅₀ は 0.073 nM と極めて強力な抗 HIV-1 活性を有していた。2-deoxyribose to 2,3-dideoxy- or 2,3-didehydro-2,3-dideoxy-ribose (EFddA or EFd4A) の抗 HIV-1 活性は著しく低下しており活性には 3'-OH が重要であることが示唆された。

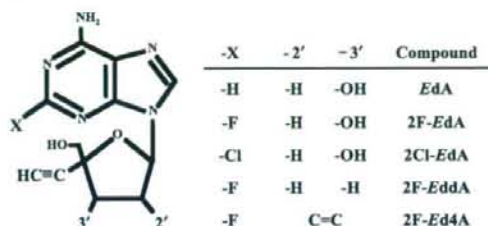


図2. 4'-Ethenyl-deoxyadenosine誘導体の特徴

また、EFdA は野生型のみならず多くの既知の耐性ウイルスに関して優れた抗ウイルス活性を有していた (表2)。3TC 耐性変異である M184V に対しては約 7 倍活性化が低下していたが、依然として強い活性を維持していた。

表2. 耐性ウイルスに対する活性 (MAGI assay)

	EC ₅₀ (nM)						
	WT	K65R	L74V	V75T	M184V	MDR	Insertion
EdA	21	8.2	10	7.5	88	11	18
EFdA	1.1	0.2	0.5	0.7	8.3 (x 7.5)	0.7	6.5 (x 6)
ECIdA	6.4	1.7	1.5	5.0	8.4 (x 13)	5.7	2.5 (x 4)
EFddA	1,200	1,560	2,520	9,130	101,000	1600	ND
EFd4A	350	200	540	950	6,410	460	ND
AZT	15	3.9	1.9	47	2.1	1,800	200

* MDR, A62V/V75I/F77L/F116Y/Q151M

* Insertion, M41L/T69SSG/T215Y

* ND, not determined

2) EFdA のアデノシンデアミナーゼに対する感受性

アデノシンデアミナーゼ (adenosine deaminase: ADA) は dA を dI に変換するためリン酸化されにくくなり、活性の低下をもたらす。このため EFdA の ADA に対する感受性を解析した。EdA は ADA により 90 分間で、ほぼ完全に脱アミノ化されたのに対して EFdA は全く脱アミノ化されなかった (図3)。このことから 2 位にフッ素を付加することにより ADA に対する抵抗性が付与されたことが示唆された。

3) EFdA のリン酸化

核酸逆転写酵素阻害剤が効果を発揮するためには 3 リン酸化体になる必要がある。2'デオキシヌクレオチドの添加による活性阻害をみることで kinase を特定できる。EFdA の抗ウイルス活性は dG, dT, dA では殆ど影響を受けず dC の添加により強く抑制された。

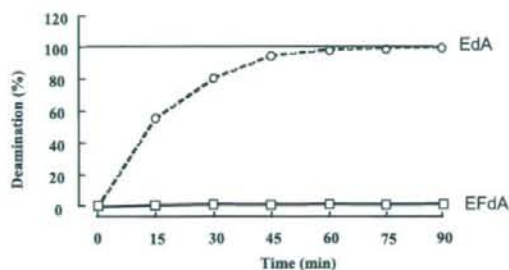


図3. EFdAのADAIに対する安定性

このことから EFdA は細胞 2'-deoxycytidine kinase (dCK)によりリン酸化されることが予想された。これを確認するために dCK 欠損 HT-1080/Ara-C^r 細胞株と dCK を発現させた細胞株を用いて抗ウイルス活性を測定した。dCK 欠損細胞株では EFdA の抗ウイルス活性は 677 倍低下した。しかし、dCK を発現させた細胞では活性は回復していた。ddC も同様の傾向を示した。以上より EFdA は dCK によりリン酸化され強力な抗ウイルス活性を発揮することが明らかとなった。

3) EFdA に対する耐性機構

EdA に対する耐性ウイルスを dose escalation 法で誘導した。得られた耐性ウイルスの変異を同定し、I142V/T165R/M184V であることが明らかとなった。またエチニル化合物に対する耐性ウイルスを誘導したグループも同様の耐性変異 (I119S/T165A/M184V) を報告している。T165 を Arg あるいは Ala に変えた変異ウイルスでは M184V と組み合わせることにより EdA, EFdA に対する感受性の低下が認められた。同様の耐性変化は I142V/M184V でも認められた。一方、T165, I142 の変異のみでは耐性には大きな変化は認められなかった。以上より主な耐性変異は M184V であり、これに T165, I142 の変異が加わることで耐性度の上昇が起こること示された。

4) 耐性変異の複製へ及ぼす影響

M184V, T165R/M184V, I142V/ T165R/M184V の変異を有する HIV-1 を作成し、複製能への影響をみた。P24 産生でみると M184V はウイルス複製を障害し、T165R あるいは I142V/ T165R は更に複製能を低下させた。

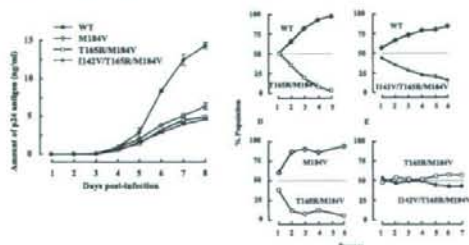


図4. EFdA耐性変異が複製に及ぼす影響

Competitive HIV-1 replication assay で解析すると T165R/M184V, I142V/ T165R/M184V では野生型、M184V と比較して著しく複製能が障害されていたが、T165R/M184V と I142V/ T165R/M184V の複製能には大きな違いは認められなかった (図4)。

5) 耐性機構の立体構造学的解析

耐性変異の立体構造解析から M184V 変異により 3TC に対しては steric hindrance により核酸の侵入が阻害されるのに対して EFdA では steric hindrance の程度が弱いため耐性となりにくいことが示された。3'-OH 基が Q151 と水素結合を形成することによって、このような立体構造となっていることが推測された。また T165R 変異は V184 との水素結合を失うことで V184 の位置を変化させ耐性に寄与していることが示された。

D. 考察

HIV 感染者の治療上、耐性ウイルスの克服は大きな問題となっている。融合阻害剤である Fuzeon (T-20) は耐性ウイルスを有する HIV 感染者の治療上、極めて有効であるが、ペプチド製剤であるため皮下注射が必要であり、また高額であるため使用が限られている。また日本では認可されていない。このため新規標的に対する小分子化合物が臨床開発されることが待ち望まれている。今回、我々が開発した EVG は HIV に対して極めて高い活性を有している ($EC_{50}=0.7nM$)。本薬剤は米国 Gilead 社で臨床開発中であり、第二相試験で単剤投与によりウイルス量を 2log 減少させるという強い抗 HIV 活性が確認されている。本薬剤に対する耐性ウイルスを誘導し解析し、その耐性責任変異を同定できた。これらの耐性変異に実際に EVG の投与を受けた患者から分離された耐性ウイルスにも認められており、我々の研究から得られた成果が耐性機構の解明に資するものであることを示している。耐性変異はインテグラーゼ活性中心近傍に位置しており、本薬剤がインテグラーゼ活性中心に結合しインテグラーゼ活性を阻害する機序が考えられる。また、EVG は HIV-1, 2 のみならず SIV, MLV にも有効であり、これらのレトロウイルスのインテグラーゼに共通する構造に結合することが予想された。

従来の逆転写酵素阻害剤は 3'-OH を欠き chain termination を起こすことによって抗ウイルス効果を発揮する。今回の同定された EFdA は 3'-OH を有しているが 4' に存在するエチニル基によって chain termination を起こす。むしろ 3'-OH を有しないエチニル化合物は抗 HIV-1 活性が低下していたことから 3'-OH の存在が高活性に寄与していることが考えられた。今回同定した中で EFdA は非常に低濃度で効果を発揮していた。この高活性の原因として EdA はアデノシンデアミナーゼによって代謝されるのに対して EFdA は ADA 耐性となっていた。

このことが細胞内での長い半減期を可能にしていると考えられる。EFdA のリン酸化に関して dCK 添加により活性が阻害された。このことから dCK が EFdA のリン酸化酵素であることが示唆された。3TC 耐性を付与する M184V 耐性変異は EFdA に対しても若干の耐性をもたらすが、T165R により耐性の上昇を認めている。耐性変異の複製に及ぼす影響を解析すると M184V により低下した複製能が T165R, I142V により著明に低下した。このことから EFdA に対する耐性変異はウイルスの複製能を著しく障害するために、その出現が制約されることが期待される。

E. 結論

新規インテグラーゼ阻害剤 EVG の抗 HIV-1 活性、耐性機構を明らかにした。また、新規逆転写酵素阻害剤 EFdA の抗 HIV-1 活性を証明し、その耐性機構を明らかにした。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

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.

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.

Ohrui H, Kohgo S, Hayakawa H, Kodama E, Matsuoka M, Nakata T, Mitsuya H. 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.

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.

Satou Y, Yasunaga J-I, Yoshida M, and Matsuoka M. HTLV-I basic leucine zipper factor gene mRNA supports proliferation of adult T cell leukemia cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103: 720-725, 2006.

Miyazato P, Yasunaga J-I, Taniguchi Y, Koyanagi Y, Mitsuya H, and Matsuoka M. De Novo Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Infection of

Human Lymphocytes in NOD-SCID, Common α -Chain Knockout Mice. *J Virol*, 80: 10683-10691, 2006.

Matsuoka M. Human T-cell leukemia virus type I. *The Lymphomas SECOND EDITION*. 464-475, 2006.

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.

Tamaki H, Matsuoka M. Donor-Derived T-cell leukemia after Bone Marrow Transplantation. *N Engl J Med* 354(16):1758-1759, 2006.

Tajima S, Shinohara K, Fukumoto M, Zaitu 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.

Ahsan MK, Yamaguchi Y, Kim Y-C, Nishinaka Y, Maeda M, Yodoi J, Nosaka K, Matsuoka M, Masutani H. Loss of interleukin-2-dependency in HTLV-I-infected T-cells on gene silencing of thioredoxin-binding protein-2. *Oncogene* 25:2181-2191, 2006.

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.

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.

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'-Ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51: 2701-2708, 2007.

Tamaki H, Taniguchi Y, Kikuchi A, Yamagami T, Soma T and Matsuoka M. Development of adult T-cell leukemia in donor-derived human T-cell leukemia virus type I-infected T cells after allogeneic bone marrow transplantation. *Leukemia* 21: 1594-1596, 2007.

Higuchi M, Tsubata C, Kondo R, Yoshida S, Takahashi M, Oie M, Tanaka Y, Mahieux R, Matsuoka M, Fujii M. Cooperation of NF- κ B2/p100 activation and the PDZ domain binding motif signal in human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV) Tax1 but not HTLV-2 Tax2 is crucial for interleukin-2 independent growth

- transformation of a T cell line. **J Virol** 81:11900-11907, 2007.
- Yoshida M, Kuwahara K, Shimasaki T, Nakagata N, Matsuoka M, Sakaguchi N. GANP suppresses DNA recombination, measured by direct-repeat beta-galactosidase gene construct, but does not suppress the type of recombination applying to immunoglobulin genes in mammalian cells. **Genes Cells**. 12:1205-1213, 2007.
- Ujike M, Nishikawa H, Otaka A, Yamamoto N, Yamamoto N, Matsuoka M, Kodama E, Fujii N, and Taguchi F. Heptad repeat-derived peptides block the protease-mediated direct entry from cell surface of SARS coronavirus but not entry via endosomal pathway. **J Virol** 82: 588-592, 2008.
- 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.
- 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.
- 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.
- Zhao T, Yasunaga J-I, Satou Y, Nakao M, Takahashi M, Fujii M, Matsuoka M. Human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor selectively suppresses the classical pathway of NF- κ B. **Blood**, (in press).
- Yoshida M, Satou Y, Yasunaga J-I, Fujisawa JI, Matsuoka M. Transcriptional control of spliced and unspliced *HTLV-1 bZIP factor* gene. **J Virol**, 82: 9359-9368, 2008.
- Yeung ML, Yasunaga J-I, Bennasser Y, Duseti N, Harris D, Ahmad N, Matsuoka M, Jeang K-T. Roles for microRNAs, miR-93 and miR-130b, and TP53INP1 tumor suppressor in cell growth dysregulation by HTLV-1. **Cancer Res**, 68:8976-8985, 2008.
- Takai K, Sakamoto S, Sakai T, Yasunaga J-I, Komatsu K and Matsuoka M, A Potential link between alternative splicing of the *NBS1* gene and the DNA damage/environmental stress. **Radiation Res**, 170:33-40, 2008.
- Tanosaki R, Uike N, Utsunomiya A, Saburi Y, Masuda M, Tomonaga M, Eto T, Hidaka M, Harada M, Choi I, Yamanaka T, Kannagi M, Matsuoka M, and Okamura J. Adult T-cell leukemia/lymphoma; Hematopoietic stem cell transplantation; allogeneic; reduced intensity transplantation; anti-thymocyte globulin; graft-versus-ATLL effect. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, 14: 702-708, 2008.
- 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.

2. 学会発表

- Matsuoka M. Transmission and natural course of HTLV-I infection. THE 19TH INTERNATIONAL SYPOSIUM Infection, Cancer and Prevention. Tokyo, Japan, Feb 21-23, 2006.
- Matsuoka M. Molecular mechanisms of leukemogenesis in HTLV-1 induced adult T-cell leukemia. THE 19TH INTERNATIONAL SYPOSIUM Infection, Cancer and Prevention. Tokyo, Japan, Feb 21-23, 2006.
- Matsuoka M. Molecular mechanisms of oncogenesis by human T-cell leukemia virus type I. FIRST INTERNATIONAL WORKSHOP ON VIRAL ONCOLOGY RESEARCH. Padova, Italy, Apr 27-29, 2006.
- Takai K. Alternative splicing regulates NBS1 expression after DNA break. THE 13TH EAST ASIA JOINT SYMPOSIUM ON BIOMEDICAL RESEARCH. Seoul, Korea, Jul 17-19, 2006.
- Matsuoka M. Oncogenesis by HTLV-I: insight from analyses of ATL cells. IX International Symposium on HTLV in Brasil. Belo Horizonte, Brasil, Sep 19-22, 2006.
- Sakurai Y, Shirakawa M, Komatsu K and Matsuoka M. Critical role of human Artemis gene in integration of HIV-1. The 7th Kumamoto AIDS Seminar. Kumamoto, Japan, Sep 21-22, 2006.
- Kodama E, Shimura K, Sakagami Y, Matsuzaki Y, Watanabe W, Yamataka K, Sato M, Kano M, Ikeda S, Matsuoka M. *In Vitro* Antiviral Activity and Resistance Profile of a Novel HIV Integrase Inhibitor JTK-303/GS-9137. 46th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Francisco, CA, Sep 27-30, 2006.
- Satou Y, Yasunaga J-I, Yoshida M, Ohshima K, and Matsuoka M. *HTLV-1 bZIP Factor* Gene, Encoded by the Minus Strand of HTLV-1 Provirus, Is Critical for Pathogenesis of

- HTLV-I Associated Diseases. The American Society of Hematology 48th Annual Meeting and Exposition. Orlando, Florida, Dec 9-12, 2006.
- 佐藤賢文、安永純一郎、吉田美香、松岡雅雄：ATL 発がんにおける HBZ 遺伝子の役割：第 65 回日本癌学会学術総会、横浜、2006 年 9 月 28-30 日
- 佐藤賢文、安永純一郎、吉田美香、松岡雅雄：HBZ 遺伝子は ATL 細胞の増殖を促進する：第 68 回日本血液学会総会、福岡、2006 年 10 月 8-10 日
- 泉和樹、児玉栄一、藤井信孝、松岡雅雄：膜融合阻害ペプチド N36 に対する耐性 HIV の誘導と解析：第 9 回白馬シンポジウム、京都、2006 年 10 月 12-13 日
- 松岡雅雄：市民公開講座「エイズウイルスの今」：第 54 回日本ウイルス学会学術集会、名古屋、2006 年 11 月 18 日
- Miyazato P, Koyanagi Y, Matsuoka M. : *In vivo* model of primary HTLV-I infection. : 第 54 回日本ウイルス学会学術集会、名古屋、2006 年 11 月 19-21 日
- 櫻井康晃、松岡雅雄：HIV-1 組み込み過程に関する新規細胞側因子 Artemis の同定：第 54 回日本ウイルス学会学術集会、名古屋、2006 年 11 月 19-21 日
- 志村和也、児玉栄一、池田了、松岡雅雄：新規 HIV インテグラーゼ阻害剤 JTK-303/GS-9137 の抗 HIV 活性および耐性機序の解析：第 20 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2006 年 11 月 30 日-12 月 2 日
- 泉和樹、児玉栄一、藤井信孝、松岡雅雄：膜融合阻害ペプチド N36 に対する耐性 HIV の誘導と解析：第 20 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2006 年 11 月 30 日-12 月 2 日
- Hachiya A, Kodama E, Sarafianos SG, Schuckmann M, Matsuoka M, Takiguchi, Gatanaga H, and Oka S. A Novel Mutation, N348I in HIV-1 Reverse Transcriptase Induced by NRTI Treatment, Confers Nevirapine Resistance. 14th conference on retroviruses and opportunistic infections. Los Angeles, CA, Feb 25-28, 2007.
- Matsuoka M. HTLV-I bZIP Facotr Gene and Oncogenesis by HTLV-I. The 13th International Conference on Human Retrovirology. Hakone, Japan. May 22-25, 2007.
- Satou Y, Yasunaga JI, Ohshima K, Miyazato P, Yoshida M, Takai K, Zhao T and Matsuoka M. HBZ transgenic mice mimic skin and lung diseases associated with HTLV-I. The 13th International Conference on Human Retrovirology. Hakone, Japan. May 22-25, 2007.
- Yoshida M. Characterization of the promoter region for *HBZ* gene and functional analyses of spliced and unspliced *HBZ* genes. The 13th International Conference on Human Retrovirology. Hakone, Japan. May 22-25, 2007.
- Kodama E. Retroviral integrase inhibitor, elvitegravir (JTK-303/GS9137): Mechanism of action and resistance. The Korea-Japan Basic Scientific Cooperation Program. Recent Status and Future Prospect of Antiviral Chemotherapy. Jeju, Korea Dec. 5-7, 2007
- 松岡雅雄：HTLV-I による発がん機構と移植：第 29 回日本造血細胞移植学会総会、福岡、2007 年 2 月 16-17 日
- 松岡雅雄：Leukemogenesis associated with HTLV-I bZIP factor gene in ATL：第 66 回日本癌学会学術総会、横浜、2007 年 10 月 3-5 日
- 松岡雅雄：Molecular mechanism of pathogenesis by human T-cell leukemia virus type I：第 12 回慶應医学賞記念シンポジウム、東京、2007 年 12 月 5 日
- 安永純一郎：欠損型プロウイルスの解析からみた発がんにおける HTLV-I bZIP factor の重要性：69 回日本血液学会総会・第 49 回日本臨床血液学会総会、横浜、2007 年 10 月 11 日-13 日
- 安永純一郎：HTLV-I bZIP factor (HBZ) による T 細胞増殖促進の分子機構：第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会、横浜、2007 年 12 月 11 日-15 日
- 佐藤賢文、片桐晃子、ミヤザトバオラ、木梨達雄、松岡雅雄：HTLV-I bZIP factor 遺伝子のトランスジェニックマウスは HTLV-I 関連皮膚疾患、肺疾患に類似した病態を示す：第 37 回日本免疫学会総会、東京、2007 年 11 月 20-22 日
- 佐藤賢文、ミヤザトバオラ、松岡雅雄：HTLV-I 病原性における HBZ 遺伝子の機能解析：第 55 回日本ウイルス学会総会、札幌、2007 年 10 月 21-23 日
- Fan Jun, 麻生範雄、松岡雅雄：Clustering of hypomethylated DNA regions associated with transcriptional changes in B-CLL：第 66 回日本癌学会学術総会、横浜、2007 年 10 月 3-5 日
- 志村和也、児玉栄一、阪上泰子、松崎裕児、渡辺渡、山高一修、佐藤元秀、加納光記、池田了、松岡雅雄：HIV インテグラーゼ阻害剤 Elvitegravir (JTK-303/GS-9137) の抗ウイルス活性および耐性機序の解析：第 17 回抗ウイルス療法研究会、高松、2007 年 5 月 25 日-26 日
- 志村和也、児玉栄一、池田了、松岡雅雄：インテグラーゼ阻害剤に対する耐性 HIV の誘

- 導とその複製能の比較：第21回日本エイズ学会学術集会・総会、広島、2007年11月28日-30日
- 泉和樹、西川裕輝、伊藤紗織、児玉栄一、志村和也、大石真也、藤井信孝、松岡雅雄：T-20 耐性 HIV-1 に対して有効な融合阻害薬の開発：第17回抗ウイルス療法研究会、香川、2007年5月25-26日
- 泉和樹、児玉栄一、志村和也、大石真也、藤井信孝、松岡雅雄：T-20 耐性変異を利用した融合阻害薬の開発：第21回日本エイズ学会学術集会・総会、広島、2007年11月28-30日
- 趙鉄軍、安永純一郎、藤井雅寛、松岡雅雄：HTLV-1 bZIP factor suppresses canonical pathway of NF- κ B by physical interaction with the p65：第66回日本癌学会学術総会、横浜、2007年10月3-5日
- 内藤武志、泉和樹、西川裕輝、児玉栄一、大石真也、藤井信孝、松岡雅雄：C29 水溶性誘導体 SC29EK の抗 HIV 効果：第21回日本エイズ学会学術集会・総会、広島、2007年11月28-30日
- 嶋根和毅、泉和樹、児玉栄一、大石真也、藤井信孝、松岡雅雄：T-20 誘導体の抗 HIV 効果：第21回日本エイズ学会学術集会・総会、広島、2007年11月28-30日
- Matsuoka M, Sakurai Y, Komatsu K. Lentivirus integration and DNA repair. Ataxia-Telangiectasia Workshop 2008. Otsu, Japan, Apr 22-26, 2008.
- Matsuoka M. Molecular pathogenesis and host immune response. IID 2008 Satellite Workshop "Virus-associated Lymphomas". Kyoto, Japan, May 13, 2008.
- Sakurai Y, Komatsu K and Matsuoka M. Aberrant Sequences in Retrovirus-Host Junctions by Deficiency of DNA Double Strand Break Repair Enzymes. CROI 2009. Montreal, Canada, Feb 8-11, 2009.
- Kazuya Shimura, E Kodama, D Nameki, Y Sakagami, S Oishi, N Fujii, M Matsuoka. Resistant Profile of the Electrostatically Constrained Next-generation HIV-1 Fusion Inhibitors. CROI 2009. Montreal, Canada, Feb 8-11, 2009.
- Marchand B, Michailidis L, Kodama E-I, Ryan E, Matsuoka M, Ashida N, Mitsuya H, Nagy E, Parniak M and Sarafianos S. Mechanisms of Resistance and Hypersusceptibility to Translocation-deficient RTIs. CROI 2009. Montreal, Canada, Feb 8-11, 2009
- 松岡雅雄：ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型の病原性発現機構：第48回日本リンパ網内系学会総会、札幌、2008年6月13-14日
- 吉田美香、佐藤賢文、安永純一郎、藤澤順一、松岡雅雄：HTLV-1 bZIP factor 遺伝子プロモーター領域の同定と解析：第1回 HTLV-1 研究会、東京、2008年8月23-24日
- 趙鉄軍、安永純一郎、中尾光善、藤井雅寛、松岡雅雄：HTLV-1 bZIP factor selectively suppresses classical NF- κ B pathway：第1回 HTLV-1 研究会、東京、2008年8月23-24日
- 趙鉄軍、安永純一郎、中尾光善、藤井雅寛、松岡雅雄：HTLV-1 bZIP factor 遺伝子による定型的 NF- κ B 経路の選択的抑制：第70回日本血液学会総会、京都、2008年10月10-12日
- 松岡雅雄：ATL, HTLV-1 研究の進歩：第70回日本血液学会総会、京都、2008年10月10-12日
- 松岡雅雄：ヒト T 細胞白血病ウイルスの病原性発現機構：第67回日本癌学会総会、名古屋、2008年10月28-30日
- 田邊順子、宇都宮興、田野崎隆二、鶴池直邦、佐藤賢文、岡村純、松岡雅雄：造血幹細胞移植療法で治療された ATL 患者における HTLV-1 プロウイルスの解析：第67回日本癌学会総会、名古屋、2008年10月28-30日
- 嶋根和毅、児玉栄一、松岡雅雄：HIV-1 Rev-derived peptide は Rev と CXCR4 の dual-target inhibitor として作用する：第22回日本エイズ学会学術集会・総会、大阪、2008年11月26-28日
- 蜂谷敦子、嶋根和毅、児玉栄一、小泉寛和、瀧永博之、松岡雅雄、滝口雅文、岡慎一：逆転酵素 connection と RNase H subdomain の多様性と薬剤感受性に及ぼす影響：第22回日本エイズ学会学術集会・総会、大阪、2008年11月26-28日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

中和抗体の治療応用に関する基礎研究

研究分担者: 松下修三 (熊本大学エイズ学研究センター 病態制御分野 教授)

研究要旨

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、臨床開発中である。我々は、R5 株である JR-FL または臨床分離株の MOKW を用い、PM1/CCR5 細胞を標的細胞として、KD-247 に対する中和逃避ウイルスの誘導をおこなった。その結果、JR-FL の中和逃避変異ウイルスは CCR5 阻害剤に感受性に变化した。KD-247 と CCR5 阻害剤の併用効果を調べたところ、強力な相乗作用を示した(Yoshimura K et al., AIDS, 20:2065-2073, 2006)。一方、クアシ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 変異が、エンベロープ三量体構造を変えて中和抵抗性を与えることを証明した (Shibata J. et al., J. Virol. 81:3757-3768, 2007)。我々は、一人の HIV 感染・長期非進行症例から 20 種類の中和単クローン抗体を分離した。V3 抗体が 6 種、CD4bs が 5 種類、CD4i が 4 種類、どれも分類されないものが 5 種類であった。これらのうち、広範囲の分離株に反応する V3 抗体がサブタイプ B ウイルスの多くを中和し、CD4bs 抗体が相補的に作用することを見出した。サブタイプ C に対しては CD4bs 抗体と CD4i 抗体の一部が交差中和活性を示した。

A. 研究目的

HIV-1 のエンベロープ蛋白である gp120 は中和抗体の主要な標的である。gp120 に反応する中和抗体はループ構造を作る第 3 可変領域(V3 loop: V3L)に反応する V3 抗体、CD4 結合部位に反応する CD4bs 抗体(CD4 binding site antibody)、可溶性 CD4 分子(soluble CD4:sCD4)存在下に反応性が増強する CD4i 抗体(antibodies to CD4 induced epitope)に分類されている。現在、効果的な中和抗体を誘導することを目的としたワクチン候補の探索が行われているが、いまだに多くの HIV 株に対して中和活性を示す抗体の誘導は報告されていない。そればかりか、どのような中和抗体を誘導すべきかさえいまだ明らかでない状況である。我々は化血研と共同でサブタイプ B ウイルスの47%に反応するヒト型化中和単クローン抗体 KD-247 の臨床応用に向けた基礎研究を展開している。KD-247 は gp120 の V3-tip 部分に反応し、強力な中和活性を持つ単クローン抗体である。

我々は、R5 ウイルス(JR-FL)またはクアシスピーシスが保存されている臨床分離株(MOKW)がどのように中和逃避をおこなうか KD-247 を用いて検討し、中和抵抗性獲得のメカニズムを解析した。

一般的な HIV-1 感染症例では、中和抗体活性は低力価であることが知られているが、長期非進行症例(long-term non-progressors; LTNP)の中には、広範囲のウイルス株に対し強力な中和抗体活性を持つ症例がある。そこで、このような症例から B 細胞を多数樹立し、単クローン抗体を精製しそれらの交差中和活性を検討した。これら抗体の解析を行うことにより、どのような抗体が in vivo での感染抑制機構を担っているか明らかになり、中和抗体誘導型ワクチンの開発を含めた抗体療法の可能性を明らかにできる。

B. 研究方法

(1) 中和逃避ウイルスの in vitro 誘導

KD-247 存在下に、CCR5 高発現 T 細胞株である PM1/CCR5 細胞を用い、CCR5 指向性ウイルス

であるJR-FL株及び、臨床分離株MOKWに逃避ウイルス誘導を試みた。その結果得られた逃避ウイルスを用いた抗体に対する耐性度はMTT assayにより判定した。同時に、得られた逃避ウイルスの各 passage における envelope の sequence を行った。Sequence の結果から、逃避能付与責任変異部位の特定を行い、site-directed mutagenesis 法により変異アミノ酸を導入したエンベロープを持つ pseudotype ウイルスを作製した。この pseudotype ウイルスを GHOST-hi5 細胞に感染させて、様々な抗体濃度でルシフェラーゼ活性を測定した (single-round replication assay)。JR-FL の耐性ウイルスに関しては、プロテアーゼ阻害剤(PI)、核酸系逆転写酵素阻害剤(NRTI)や、CCR5 阻害剤に対する感受性の違いを野生株と逃避ウイルスについて測定した。単量体 gp120 への中和抗体の結合活性はELISAにて、細胞表面発現 gp120(三量体 gp120)への結合活性はフローサイトメーターを用いて測定した。

(2) 中和単クローン抗体の作製

広範囲なウイルス株に対して、中和活性を有する一人の LTNP より、末梢血単核球(peripheral blood mononuclear cell; PBMC)を分離した。得られた PBMC から Dyna-beads イムノマグネットを用いて CD8 陽性細胞を除去した。△CD8 PBMC 5×10^6 に対し、B95-8 の培養上清 50%を含む培地(15%FBS 含有 RPMI1640)2ml に浮遊し、12~18 時間培養した後、1 well あたり 1×10^4 以下となるように分注し、さらに 37°C、5%CO₂ で培養した。7~10 日ごとに培地を交換しながら、B 細胞株を増殖させた。増殖する細胞の培養上清を回収し、後述の“gp120-capture ELISA”にて gp120 特異抗体産生の有無を確認した。スクリーニングで繰り返し陽性と判断されるクローンに関しては、限界希釈法にてクローニングし、抗 gp120 活性をもつ抗体産生細胞を分離した。

(3) gp120-capture ELISA による抗体産生の確認

クローニングにより増殖した抗体産生 B 細胞の抗 gp120 活性を有する抗体の産生の有無を

“gp120-capture ELISA”をもちいて確認した。96well polypropyren plate (Falcon)に gp120-C5 sheep 抗体(D7324, Aalto Bioreagents, Dublin, Ireland) をコートし、blocking buffer でブロック後 $1 \mu\text{g/ml}$ に希釈した単量体(gp120gp120-SF2; Austral Biologicals, San Ramon, California)を $50 \mu\text{l}$ ずつ加えた。2 時間室温に静置した後、ELISA wash buffer で 3 回洗浄し、gp120-captured plate とした。抗 gp120 抗体の検出は、作製した gp120-captured plate に B 細胞培養上清を加えて室温で 2 時間反応させた後、wash buffer で 3 回洗浄し、抗ヒト IgG-ALP を反応させ、発色後、吸光度(405nm)を測定した。

(4) 単クローン抗体の分類

gp120 に対する抗体は反応エピトープによって次の 4 種類に分類可能である。すなわち CD4bs 抗体、CD4i 抗体、V3 抗体、及びこれらに分類できないもの (other epitopes) に分類される。V3L 抗体かどうかは V3L のアミノ酸配列を持つ合成ペプチドを用いた ELISA (V3-peptide ELISA) で判定した。JR-FL 株の V3 配列 (NNT20; NNTRISIHIGPGRAFVTIGK) をもつ合成ペプチド (NNT20) に反応し、コントロールの HIV-2 のペプチドに反応しないものを陽性と判断した。抗 CD4bs 抗体と抗 CD4i 抗体は gp120-capture ELISA における可溶性 CD4(soluble CD4 (sCD4); R&D Systems, Inc. Minneapolis, MN) の影響が正反対である。CD4bs 抗体は sCD4 存在下に抗体の結合が抑制され、逆に CD4i 抗体の gp120 に対する反応性は sCD4 存在下に増強される。gp120-captured plate を作成し、段階希釈した抗体を sCD4 存在もしくは非存在下に 2 時間反応させ吸光度(405nm)を測定し、分類した。

(5) TZM-bl 細胞を用いた感染抑制の測定

TZM-bl 細胞を平底 96well プレートに 1 well 当たり 2×10^4 となるように分注培養した。約 18 時間後に 200TCID₅₀ の pseudo-typed virus と段階希釈をした抗体をインキュベーション後に TZM-bl 細胞に加え、37°C 5%CO₂ 下で培養した。48 時間後

上清を除去し、Galact-star System を用い発色させ、測定した。中和活性は、 $\{1-(t-c)/(n-c)\} \times 100$ (t : サンプルの発光強度、 c : 細胞のみのバックグラウンド発光強度、 n : 抗体無しサンプルの発光強度)で計算した。

(6) HIV-1 subtype B および subtype C 臨床分離株の標準化パネル(HIV-1 subtype-B or C standard panel virus; SVPB or SVPB)の調整;使用したエンベロープベクターは、NIH AIDS Research and Reference Reagent Program(ARRRP)より供給をうけた。HIV-1 subtype B または subtype C 感染者の血漿 HIV-1 RNA および PBMC DNA から PCR で gp160 全長を増幅クローニングされたもので、血漿 HIV-1 RNA 由来の産物は pcDNA3.1/His-TOPO (Invitrogen)に、PBMC DNA 由来の産物は pcDNA3.1/V5-His-TOPO (Invitrogen)に TA Cloning で組み込まれている。

(倫理面への配慮)

本研究を行うに当たり該当症例には研究の概要を説明し同意を得た上で採血し、解析した。なお本研究の倫理的・科学的妥当性は熊本大学病院の先進医療審査委員会にて審査され、了承されている。

C. 研究結果

(1)KD-247 逃避ウイルスの誘導

我々は、R5 ウイルス(JR-FL)がどのように中和逃避をおこなうか KD-247 による *in vitro* 中和逃避ウイルス誘導法を用いて検討した。その結果、JR-FL 株の gp120-V3 の tip 部位の-GPGR-が-GPER-に変異した中和逃避ウイルスが誘導された。これらの中和逃避ウイルスの抗ウイルス薬に対する感受性を調べると、プロテアーゼ阻害剤や逆転写酵素阻害剤に対しては感受性の変化は見られなかったが、CCR5 阻害剤、rsCD4 や抗 CCR5 抗体 (2D7) に対しては、中和逃避ウイルスに有意な感受性の増加が認められた。このことは、V3-tip の 1 アミノ酸変異がエンベロープの三量体

構造を変化させ、CD4 やコレセプターとの相互作用に大きな影響を与えることを示唆する。また、CCR5 阻害剤と抗 V3 抗体はともに膜融合のステップに作用することから、KD-247 と CCR5 阻害剤を組み合わせて、ウイルス抑制効果を調べた。その結果、強力な相乗効果を認め、臨床応用への可能性を示した。一方、臨床分離株でも同様の中和エスケープの誘導を行い、抗体濃度が低いところでは V2/C3 の polymorphism によるエスケープ (R166K/D167N 及び Q352K/H363Q)が起こり高濃度では V3 (P313L)に変異が入る事を見出した。変異エンベロープを持つ pseudotype ウイルスを作製し、どの領域の変異が中和抵抗性に重要であるか調べたところ、低濃度の抗体からの逃避には V2 領域の変異が重要であり、高濃度の抗体からの逃避には V3 領域の変異が重要である事が明らかとなった。また、興味深いことに V2 領域の 1 アミノ酸変異(L175P)により V3 抗体に対する感受性が劇的に変化することが分かった。つまり、ウイルスは KD-247 に対して、175P の時は中和感受性になり、175L では中和抵抗性になるのである。これら V2 領域の変異は、単量体 gp120 への抗 V3 抗体結合には影響を与えないが、細胞膜表面上に発現した三量体 gp120 への結合活性に影響を与えることが明らかとなった。これらの 2 つの耐性誘導の結果から、V3 抗体からの逃避のためにウイルスは、直接抗体の V3 エピトープを変異するか、または V2 領域等を変異して立体構造を変化させることで抗体のエピトープを遮蔽するか、少なくとも 2 つの方法を取りうる事がわかった。

(2)単クローン抗体の作製と分類

我々は、また、広範なウイルス株に対して、中和活性を持つ一人の長期非進行症例より分離した末梢血 B 細胞に EB ウイルスを感染させ、クローニングを繰り返して、抗 gp120 活性をもつ 20 種類の B 細胞クローンを得た。クローンが産生する単クローン抗体について、V3 ペプチドに対する反応性を検討した。抗体の由来する症例のウイルスの V3 配列に最も近い JR-FL 株の V3 配列を用いて、反

応性を調べたところ、6 クローン結合活性が認められた。さらに、得られた単クローン抗体の sCD4 存在下、非存在下での gp120 に対する結合活性の変化を測定し、CD4bs 抗体及び CD4i 抗体の分類を行った。その結果 CD4bs 抗体が 5 種類、CD4i 抗体が 4 種類あった。V3-peptide ELIA で反応が見られず、しかも sCD4 の影響も見られないものが 5 種類あり、これらの epitope 特異性は不明である。

(3) 単クローン抗体の実験室株に対する中和活性

精製した単クローン抗体を用いて、4 種類の HIV-1 株の envelope を用いた pseudo-typed virus に対する中和活性を抗体濃度 10 μ g/ml 及び 2 μ g/ml で検討した。中和感受性が高い株として知られている SF162 株に関してはテストした単クローン抗体のすべてに中和活性を認めた。一方、比較的中和抵抗性である 89.6 及び JR-FL に関しては V3 抗体(0.5 γ と 5G2)には中和活性を認めたものの CD4bs 抗体、CD4i 抗体に関しては、中和活性を認めなかった。一方、V3-tip のアミノ酸配列が他のウイルスと異なる IIIb に関しては、V3 抗体は有効ではなかったが、CD4bs 抗体と CD4i 抗体の一部に中和活性を認めた。

(4) Subtype-B および C 臨床分離株標準化パネル(SVPB or SVPC)に対する感染抑制効果

NIH-ARRRP より HIV に対するワクチン候補が誘導する抗体の中和活性評価の標準化のため、Subtype-B と Subtype C について標準化パネルが供給されている。今回樹立した単クローン抗体の、SVPB パネルに対する交差中和活性を、TZM-bl を標的細胞とした中和アッセイにて検討した。抗 V3 単クローン抗体の中で実験室株に対して中和活性をもっていた 4 種類の抗体に関して SVPB に対する中和活性を解析した。これらのうち、5G2 と 0.5 γ では強力な交差中和活性を認めた。とくに、0.5 γ は、SVPB5,6,11,14,16,17,18 に対し 0.23 ~ 38 μ g/ml の IC₅₀ レベルで中和活性が見られた。SVPB12,13,19 に関しても、80 ~ 110 μ g/ml の IC₅₀ レベルで中和活性を示した。このように、12 種類

の SVPB のうち、計 10 に対して IC₅₀ をこえる中和活性が得られた。また、中和抵抗性の SVPB8 に対しても 0.5 γ は、150 μ g/ml の濃度で有意な中和活性を示した。すなわち、V3-tip に、比較的にまれな-GPGG-という配列をもつ SVPB15 以外は、必要な濃度に差があるものの、0.5 γ は中和活性を持つことがわかった。

抗 CD4bs 抗体である、0.5 δ (3D6)、42F9、49G2 についても SVPB に対する中和活性を検討した。IC₅₀ が 50 μ g/ml までの濃度で検出できたものは、0.5 δ は 1/12、42F9 が 2/12、49G2 が 3/12 であった。50 μ g/ml で抑制率 30% 以上の有意な中和活性を認めたものは、0.5 δ で 2/12、42F9 と 49G2 で 6/12 であった。一方、抗 CD4i 抗体の中では、4E9C が 4/12 に交差中和活性をしめた。注目すべきは、0.5 γ が全く中和活性を示さない SVPB15 に対して、49G2 と 42F9 が交差中和を示すことである。このように、CD4bs 抗体と V3 抗体は相補的に中和活性を担っていると考えられた。一方、非サブタイプ B ウイルスに対しては、V3 抗体はいずれも中和活性を示さず、CD4bs 抗体と CD4i 抗体の一部が交差中和活性を示した。すなわち、0.5 δ ; 5/12、42F9 ; 4/12、49G2 ; 2/12、CD4i の 4E9C が 4/12 であった。

(5) 考察

我々が開発した R5 中和逃避ウイルス誘導システムにより、JR-FL のようなクローン化された R5 ウイルスでは、直接エピトープである V3-tip に耐性変異が入るが、臨床分離株では V2 領域の変異が抗 V3 抗体からの逃避に重要である事を示した。V2 領域の中でも、異なった subtype 間でも保存されている 175 番目のロイシン(L)が gp120 三量体構造に影響を与える重要なアミノ酸であることを明らかにした点は、今後の研究に重要と考えられる。本研究は、抗 V3 抗体が存在する場合、HIV にはケモカインレセプターとの結合に重要な V3 領域を守るため、V2 領域により逃避するメカニズムを持っていることを示した。中和抗体誘導(特に抗 V3 抗体誘導型)ワクチンは、このような V2 領域に影

響されない抗体を誘導する必要がある。

HIV-1 の感染を阻止するワクチンの開発戦略の一つとして、広範な HIV-1 株に対して中和活性を示す抗体がどのようなものか同定することは、重要なことである。今回われわれは、一人の LTNP から多数の単クローン抗体を樹立した。その中でも、抗 V3 抗体は実験室分離株で比較的中和抵抗性である 89.6 及び JR-FL、さらに感染者自己由来ウイルスに関して中和活性を示した。さらに、ワクチン開発の標準化のために作成された subtype B 標準化パネル(SVPB)に対する交差中和活性の検討から、広範囲の分離株に対して強い中和活性をもつ 0.5 γ のような抗 V3 抗体が存在することが明らかとなった。一方、CD4bs 抗体は、中和能は強くないものの、0.5 γ が中和しない III B や SVPB15 に対する中和活性が見られた。すなわち、同一 subtype 間においては、抗 CD4bs 抗体及び抗 V3 抗体が相補的に働き、広範な臨床分離株に対して交差中和を示すことが示唆された。今回の、我々の研究で、このような LTNP では複数の抗体が相補的、相乗的に働き、ウイルスの増殖を抑えている可能性が示唆された。

D. 健康危惧情報:なし

E. 研究発表

1. 論文発表

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+ 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 α show similar anti-human immunodeficiency virus type 1 activity both in vivo and in vitro. *Immunogenetics.*

- 59:511-515, 2007.
7. 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.
 8. Ryo, A., Tsurutani, N., Ohba, K., Kimura, R., Komano, J., Nishi, M., Hiromi Soeda1, Shinichiro Hattori2, 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.
 9. 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.
2. 学会発表
 1. Matsushita S., Shibata J., Honda A., Murakami T, Eda Y, Koito K, Yoshimura. Development of broadly reactive neutralizing monoclonal antibody KD247: implications for passive immunotherapy. AIDS Vaccine 2006 Conference, Amsterdam, the Netherlands, Aug. 29-Sep.1, 2006.
 2. Shibata, J., Yoshimura, K., Honda A., Murakami,T., Koito, A., and Matsushita S.: A Role of Mutations in Non-V3 Envelope Regions for Escape from a Broad Neutralizing Anti-V3 Monoclonal Antibody, KD-247, during *in vitro* Selection. 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Denver, USA, Feb.4-9, 2006.
 3. Yoshimura, K., Shibata, J., Honda A., Murakami,T., Mitsuya,H., Koito, A., and Matsushita S.: Resistance Profile of A Novel Broadly Neutralizing Anti-HIV Monoclonal Antibody, KD-247 That Has Favorable Synergism with Anti-CCR5 Inhibitors *In Vitro*. 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Denver, USA, Feb.4-9, 2006.
 4. Ikeda T, Shibata J, Yoshimura K, Koito A, Matsushita S. Recurrent HIV-1 integration at BACH2 locus in resting CD4+ T cell populations during effective HAART. 7th AIDS Seminar in Kumamoto, Sep 21-22, 2006.
 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. 7th AIDS Seminar in Kumamoto, Sep 21-22, 2006.
 6. Yoshimura K, Shibata J, Honda A, Koito A, Matsushita S. A novel potent neutralizing anti-V3 monoclonal antibody, KD-247, that shows favorable synergism with anti-CCR5 inhibitors *in vitro*. 7th AIDS Seminar in Kumamoto, Sep 21-22, 2006.
 7. 池田輝政、柴田潤二、吉村和久、小糸 厚、松下修三. 長期間 HAART 有効症例における残存 HIV と組込み部位の関連性. 第 54 回日本ウイルス学会総会. 2006. 11. 18-21. 名古屋

8. 柴田潤二、吉村和久、小糸 厚、松下修三. 抗 HIV-1 gp120-V3 抗体より逃避した V2 領域変異ウイルスの中和抵抗性メカニズムの解析. 第 54 回日本ウイルス学会総会. 2006. 11. 18-21. 名古屋
9. 吉村和久、柴田潤二、小糸 厚、松下修三. In vitro における抗 HIV-1 中和単クローン抗体とその他の薬剤との相互作用の研究. 第 20 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2006. 11. 30-12. 2. 東京.
10. 松下修三. シンポジウム 3 「より良い HAART に向けて」-耐性検査の意義とタイミング. 第 20 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2006. 11. 30-12. 2. 東京.
11. Matsushita S., Ikeda, T, Shibata J., Honda A., Koito K, Yoshimura. Persistence of proviral DNA and the integration sites of HIV-1 in patients on prolonged and effective HAART. 4th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. Sydney, Australia. June. 22-25, 2007.
12. Yoshimura, K., Shibata, J., Honda A., Tamamura, H., and Matsushita S.: A potent neutralizing anti-V3 monoclonal antibody, KD-247 shows favorable synergism with other antiretrovirals, sCD4 and CD4 mimic small compound in vitro. 4th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. Sydney, Australia. June. 22-25, 2007.
13. Nishida, Y., Shibata, J., Kazuhisa, Y., and Matsushita, S.: Broad neutralization against the HIV-1 subtype B panel of reference strains by human monoclonal antibodies established from an HIV-1 infected long-term non-progressor. 8th AIDS Seminar in Kumamoto. Sep 13-14, 2007. Aso, Kumamoto.
14. Shibata J, Yoshimura K, Matsushita S. :The single mutation in V2 domain affects quaternary structure of trimer gp120 and dramatically increases the sensitivity of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates to neutralizing antibodies. 8th AIDS Seminar in Kumamoto. Sep 13-14, 2007. Aso, Kumamoto.
15. Hatada, M., Yoshimura K, Shibata J, Matsushita S. HIV-1BaL mutants escaping neutralization from a potent neutralizing anti-V3 monoclonal antibody KD-247. . 8th AIDS Seminar in Kumamoto. Sep 13-14, 2007. Aso, Kumamoto.
16. Yoshimura, K., Shibata, J., Honda A., Tamamura, H., and Matsushita S.: A potent neutralizing anti-V3 monoclonal antibody, KD-247 shows favorable synergism with other antiretrovirals, sCD4 and CD4 mimic small compound in vitro. 8th AIDS Seminar in Kumamoto. Sep 13-14, 2007. Aso, Kumamoto.
17. Matsushita S. : Development of broadly reactive neutralizing monoclonal antibody KD-247: implications for passive immunotherapy. Tentative Program for the 3rd Japan-Germany HIV/AIDS Symposium. Nov. 26, 2007. Hiroshima.
18. 松下修三、西田吉辰、柴田潤二、畑田万紀子、吉村和久、: 長期非進行症例 (LTNP) における交叉中和のメカニズムの研究 I; 中和単クローン抗体の作成と解析. 第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2007. 11. 28-11. 30. 広島.
19. 西田吉辰、柴田潤二、吉村和久、松下修三: 長期非進行症例 (LTNP) における交叉中和のメカニズムの研究 II; 中和単クローン抗体の subtype B panel に対する交差中和活性. 第 21 回日本エイズ学

- 会学術集会・総会. 2007. 11. 28-11. 30. 広島.
20. 畑田万紀子, 吉村和久, 柴田潤二, 松下修三: 強力な抗 HIV-1 gp120-V3 抗体 KD-247 に対する HIV-1BaL の中和逃避のメカニズム解析. 第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2007. 11. 28-11. 30. 広島.
 21. 柴田潤二, 吉村和久, 松下修三: 中和抗体高度抵抗性ウイルスを感受性にする変異は gp120 三量体構造に影響を与える。第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2007. 11. 28-11. 30. 広島.
 22. 吉村和久, 柴田潤二, 畑田万紀子, 山田裕子, 増野弘幸, 玉村啓和, 松下修三: CD4 mimic small compound と anti-HIV monoclonal antibody のウイルス中和における相乗効果。第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2007. 11. 28-11. 30. 広島.
 23. Matsushita S., Nishida, Y., Shibata J., Honda A., Yoshimura, K: Broad cross-neutralization mediated by combination of anti-V3 and CD4 binding site antibodies in an HIV-1 infected patient with long-term non-progressive disease. 15th Conference on Retroviruses and Opportunistic infections. Feb. 3-6, 2008, Boston, USA
 24. 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.
 25. 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.
 26. 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.
 27. 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.
 28. 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). Feb. 8-11, 2009, Montreal, Canada.
 29. 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
 30. 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

31. 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

F. 知的所有権の出願・取得状況（予定含む）
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