

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。

4. 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ァイルを有しており、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。

5. 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。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。

6. 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。

7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む) なし

研究発表 (2008~in press 本研究班課題に関連したもののみ抜粋)

主任研究者

滝口雅文

- 1) 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 HLA 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., 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.
- 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.

分担研究者

岡 慎一

- 1) 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
- 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) 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.

満屋裕明

- 1) 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]
- 2) 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.
- 3) Ghosh, A.K., Gemma, S., Takayama, J., Baldrige, A., Leshchenko-Yashchuk, S., Miller, H.B., Wang, Y.F., Kovalevsky, A.Y., Koh, Y., Weber, I.T., 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
 - 6) 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.
 - 7) 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.
 - 8) 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.

馬場昌範

- 1) Kumamoto, H., Haraguchi, K., Ida, M., Tanaka, H., Hamasaki, T., Baba, M. Synthesis and antiviral evaluation of (\pm)-4'-ethynyl-5'-difluorocarbocyclic-d4T analogue. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 52: 609-610, 2008.
- 2) 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.
- 3) 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.

松岡雅雄

- 1) 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) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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: 2410-2420, 2008.
- 6) 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]
- 7) 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]
- 8) 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.

研究課題：HAARTの長期的副作用対策・長期予後に関する研究

課題番号：H19-エイズ一般-002

主任研究者：田邊 嘉也（新潟大学医学部総合病院 助教）

分担研究者：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）、安岡 彰（長崎大学医学部・歯学部附属病院感染制御教育センター 教授）、萩原 将太郎（国立国際医療センター血液内科 医長）、立川 夏夫（横浜市立市民病院 感染症内科）

1. 研究目的

今回の班研究では課題を1から4にわけてそれぞれを検討し新たなエビデンスを構築していくために活動していく。Tenofovirを含む抗HIV療法の効果と副作用の評価（課題1）TDFについては特徴的な副作用である腎障害について頻度、程度を評価する。Atazanavirによる高ビリルビン血症に対するウルソデオキシコール酸の効果（課題2）ATVについては合併する高ビリルビン血症がウルソデオキシコール酸で改善するかを明らかにする。ニューモシスチス肺炎治療での減量治療の検討（課題3）HIV感染症の代表的な合併症である軽症から中等度ニューモシスチス肺炎患者がST合剤減量治療で治療可能かどうか明らかにする。エイズ悪性リンパ腫の自己末梢血幹細胞移植を併用したsalvage療法の検討（課題4）AIDS悪性リンパ腫患者において初回の化学療法に失敗した場合に「ESHAP±R後のMEAMによる自己末梢血幹細胞移植」が可能かどうかを明らかにする。

2. 研究方法

（課題1）prospective studyかつ無作為割付、多施設共同試験とした。atazanavir/ritonavirを固定し、tenofovirとabacavirとを比較することで、tenofovirの効果と副作用を検討する方法とした。両群で240例を検討する。すでに全国20施設での倫理委員会の承認を得ており症例登録を継続している。

（課題2）prospective studyかつ多施設共同試験とした。方法としてはatazanavirを1年以上継続している25症例を対象に、ウルソデオキシコール酸600mg/日を3ヶ月投与し、投与前、投与中、投与後の血中総ビリルビン値および抗ウイルス療法の治療効果を観察し、本剤による総ビリルビン低下効果、有害事象発生の有無、抗ウイルス療法に対する影響の有無を検討することとした。4施設において倫理委員会に諮り試験を開始している。

（課題3）Trimethoprim換算で本来のガイドライン15mg/kg/日から12mg/kg/日の段階を経て、10mg/kg/日を試みる2段階方式とすることとした。初年度でプロトコルを確定した。横浜市立市民病院では、プロトコルを倫

理委員会に提出し承認されている。他に国立国際医療センター、新潟大学医学部総合病院、川崎市立病院では、適応患者がいる場合に担当医が適切と判断する場合にST合剤の減量を行う。

（課題4）改良ESHAP±rituximabによるsalvage療法を行い、部分寛解以上の治療効果が得られた症例で、MEAM療法を前処置とした自己末梢血幹細胞移植を行う。Primary endpointは2年生存率。Secondary endpointsは移植後100日目の生存率、各治療段階での寛解率、毒性の評価、採取率、生着率、CD4の数、HIVウイルス量等で判定することとした。初年度での症例登録においての問題点を考慮し本年度は、一部プロトコルの変更を行い、3月に国立国際医療センター倫理委員会の承認を得た

（倫理面への配慮）

文科省・厚労省の疫学倫理ガイドラインに従って全ての研究を行う。研究は参加する全ての医療機関で倫理委員会の承認を得ることとする。また全ての研究結果において、個人が特定できるような情報は省いた。

3. 研究結果

（課題1）2008年12月1日現在の組み入れ数は、68例である。内訳は、国立国際医療センター39例、その他の19施設で29例である。EPZ群から1例グレード4の有害事象報告（脳梗塞にて入院加療）があり、安全性委員会にて検討した。

（課題2）本年からエントリーを進め、これまでに3施設から11人のエントリーが得られた。現在さらに参加者を募集中である。

中間解析は平成21年2月に行う予定であるが、これまでに前値および治療中の3回のデータが得られた6例ではURSO前値の平均が4.35mg/dLに対して、治療中の平均は3.17mg/dLと1.18の減少（ $P=0.054$; paired T）が認められた。特に、URSO前値が5.0mg/dLを超えていた2例では治療により5未満へと低下し、治療の変更を考慮する状況から脱することができていた。

（課題3）倫理委員会に承認を受けた施設が、まだ、1施設のみであるが、非常に興味深い経過が得られている。4

例の症例が検討された。3例は横浜市立市民病院の症例である。この1例は軽症、2例は超軽症であった。

(課題4) 2008年12月までに1名の患者が登録し臨床試験を実施した。初回治療不応例であり、リツキサン併用改良ESHAP療法を施行した。3コース目の改良ESHAP後、病勢増悪のためプロトコルから離脱している。参考であるが、同レジメンをもちいた非登録患者1名を経験した。R-ESHAP3コース後に放射線療法を実施、その後にMEAMを前処置とした造血幹細胞移植療法を実施し完全寛解を維持している。

4. 考察

4つのそれぞれ独立した課題をあげて研究に取り組んでおり、徐々に結果が始まっている。Tenofovirを含む抗HIV療法の効果と副作用の評価については症例登録がやや当初の予定より下回っているため組み入れに対して一層の努力が必要である。

ATVの高ビリルビン血症を改善させる方策は知られていなかったが、現在までの暫定結果では減少傾向が認められている。このままのデータが得られればURSOによりATVの高ビリルビン血症を改善できるとする結論が得られる可能性が高い。

ニューモシスチス肺炎のST合剤減量の可能性についてはまだpilot studyの段階ではあるが、減量しても軽症のニューモシスチス肺炎は管理可能であり、過敏症についても発生率が低下する可能性が高いことが示唆された。

難治性再発性AIDS関連リンパ腫に対するMEAM療法を前処置に用いた自己末梢血幹細胞移植は、国立国際医療センターにおいて5例が実施され、良好な成績を得ている。今後、多施設共同プロトコルへ発展させることにより、本研究の目的である、初回治療抵抗性あるいは再発性AIDS関連リンパ腫に対するサルベージ療法の有効性・安全性の評価を早期に行うことが可能になると考える。

5. 自己評価

1) 達成度について

(課題1) 日本で初めての無作為割り付け非劣勢比較試験が開始できたことは大きい。組み入れ数が当初予定を下回っており、その意味での達成度は不十分と言える。組み入れ数と、各病院の患者数は必ずしも比例しておらず、主治医の臨床試験に対する熱意に依存している部分が多い。症例の組み入れに対する一層の努力が必要である。

(課題2) 本年度臨床試験が開始となり、症例の登録も進んでいる。暫定結果では予想通りの結果が出ておりほぼ予定を達成したものと思われる。ただ、登録症例数につ

いては今後も参加を依頼するよう努力していく。

(課題3) 症例数がなかなか増えないがPilot studyとしての意義は徐々に理解されてきていると考えられ他施設への呼びかけを行っていく予定である。

(課題4) 本年の登録患者数は2008年1月から12月までに0名であり、本試験への参加患者を広く募集する必要がある。本試験適格患者以外の再発性AIDS関連リンパ腫に対する自己末梢血幹細胞移植は1名実施することができた。適格基準に関する再検討も必要である。現時点での本研究の到達度は不十分であると言わざるを得ない。今後はHAART時代の長期予後を脅かす治療抵抗性エイズリンパ腫に関する多面的治療戦略開発に関する研究班(班長: 岡田誠治)との共同研究へ発展させることにより、全国規模での多施設共同臨床試験とし、サルベージ療法を必要とする難治性再発性AIDS関連リンパ腫患者が洩れなく本試験への参加を検討できるようにしたい。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

TDFによる腎障害の全体像が患者・医療者に明確化する。関連があれば腎障害を予見する因子(腎疾患の病歴、体重、併用薬剤、治療開始後4~8週後の尿中 β 2microglobulinやリンに関する Δ TRP)の同定が可能である。

ウルソデオキシコール酸による高ビリルビン血症の正常化が得られることで患者のQOL改善が期待される。

HIV関連ニューモシスチスの治療完遂率が従来より向上することが期待でき、外来治療の可能性と重症ニューモシスチス肺炎患者への適応の可能性が見えてくる。

自己末梢血幹細胞移植を併用したsalvage療法が30%以上で可能であることが期待される。

3) 今後の展望について

症例の組み入れをスムーズに行っていくことが必要であり他の研究班との連携をすすめるなどで症例の参加を広げる努力をしている部分もある。

6. 結論

エイズ分野では、日本で初めての無作為割り付け非劣勢比較試験を開始することなどにより長期的副作用の研究として様々な結果が始まっており、今後も研究を継続していくことが重要である。

7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

今回の内容に関するものはなし

研究発表

田邊嘉也

1. Satoh R, Tsukada H, **Tanabe Y**, Tamura Y, Yamamoto T, Takano M, Ozaki K, Tamura T, Gejyo F. An outbreak and isolation of drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* at Niigata University Hospital, Japan. *J Infect Chemother*. 2008 14(4):325-9.
2. Dohmae S, Okubo T, Higuchi W, Takano T, Isobe H, Baranovich T, Kobayashi S, Uchiyama M, **Tanabe Y**, Itoh M, Yamamoto T. *Bacillus cereus* nosocomial infection from reused towels in Japan. *J. Hosp Infect* 2008 69: 361-367
3. Ota K, Maruyama H, Iino N, Nakamura G, Shimotori M, **Tanabe Y**, Tsukada H, Gejyo F. Rapid detection of causative pathogen of peritonitis using in-situ hybridization in a patient with continuous ambulatory peritoneal dialysis *J. infect Chemother* 2007 13:273-275

岡 慎一

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.
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, Mwimanzi, 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.
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.

立川夏夫

1. Tanuma J, Fujiwara M, Teruya K, Matsuoka S, Yamanaka H, Gatanaga H, Tachikawa N, Kikuchi Y, Takiguchi M, Oka S. HLA-A*2402-restricted HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and escape mutation after ART with structured treatment interruptions. *Microbes Infect.* 2008 May;10(6):689-98. Epub 2008 Mar 29.
2. 立川夏夫. HIV抗体検査と告知について 医薬の門 2008; 48(1): 15-22.
3. 立川夏夫. HIV/AIDS治療の現状と課題 公衆衛生 2008; 72(6): 456-460.

口頭発表

1. 立川夏夫, 倉井華子, 吉村幸治. HIV感染判明時の告知の内容についての検討. 日本エイズ学会学術学会・総会, 2008年11月26日, 大阪, P-044.
2. 立川夏夫, 倉井華子, 吉村幸治. リアルタイムPCR法(TaqMan法)によるHIV-1RNA定量法の治療時の安全域の推定について. 日本エイズ学会学術学会・総会, 2008年11月27日, 大阪, 0-28-116.

安岡 彰

1. 伝染性紅斑. 今日の治療指針 2008. 2008. 163-164.
2. 内科必携画像診断 ニューモシスチス肺炎. 内科. 2008. 101:1395-1397.
3. 第Ⅱ部臓器別のアプローチ感染症 7 届出が必要な感染症. 臨床透析. 2008. 24:1002-1004.
4. HIV(ヒト免疫不全ウイルス). ウイルスハンドブック. 2008. 76-77.
5. ウイルス性肺炎・ニューモシスチス肺炎. 総合臨床. 2008. 57:888-891.

萩原將太郎

原著論文

1) Kawabata, K.C, Hagiwara, S., Takenouchi, A., Tanimura, A., Tanuma, J., Tachikawa, N., Miwa, A., 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. *Internal Med.* (in press)

口頭

- 1) 萩原將太郎. 難治性・再発性 AIDS 関連リンパ腫に対するサルベージ療法. 日本エイズ学会 2008年大阪

研究課題：HIV-1感染のヒト-ラット種間バリアーの解明

課題番号：H19-エイズ-若手-004

主任研究者：張 険峰（北海道大学 遺伝子病制御研究所 助教）

1. 研究目的

エイズの根本的な予防と治療法を開発するために、HIV感染小動物モデルはきわめて有用である。ラットはHIV-1感染の種間バリアーがマウスほど厳密ではないために、良いモデルとなりうる。特に、ラットT細胞株にヒトの受容体およびCRM1、CyclinT1を発現させると、ヒトT細胞株に準じるHIV粒子が生産される。このことは粒子生産については、これらの因子を発現させることによりほぼ解決できることを示している。しかし、感染が広がらないことが分かった。そこで、ウイルス粒子の感染性と侵入過程に関与しているウイルス性、細胞性因子を同定し、ラット感染モデルの作製に資することを本研究の目的とした。昨年、ラットT細胞由来のHIV-1粒子のEnvの機能が低い、もしくは取り込まれたEnvの蛋白質質量が少ないことを見出した。本年度は、①ラットT細胞におけるHIV-1 Envの発現及び粒子内に取り込まれたEnvの性質の解析、②ラットT細胞株、マクロファージ及びprimary T細胞における各種のHIV-1株粒子の感染性の調査、③侵入過程で働くラット因子のクローニングを試みた。

2. 研究方法

1). HIV-1粒子を分析するため、培養上清を20% sucrose層にのせ、超速心によって濃縮した。ウイルス粒子をWestern blottingによってEnvとGag蛋白質を検出した。

2). HIVの感染価を測定するために、回収したウイルスをindicator細胞(TZM-bl)に感染させ、感染に応じて生産されるルシフェラーゼ又はb-ガラクトシダーゼ活性を測定した。

3). 蛋白質の安定性を測定するため、HIV-1ゲノムを導入した細胞を蛋白質合成阻害剤であるcycloheximideで処理し、細胞を経時的に回収した。Cell lysateをWestern blottingによって分析する事によって、ウイルス及び細胞蛋白質を定量した。

4). ラットprimary細胞へHIV-1を導入するため、hCRM1とhCycT1を発現するTgラットからprimary T細胞とマクロファージを精製した。まず、脾臓細胞からナイロンウールカラムでラット primary T細胞を調製した。そして、抗ラットCD3抗体とCD28抗体で活性化し、HIV-1分子クローンをnucleofectionで導入した。マクロファージを調製するため、ラット腹水に含まれるマクロファージを抗ラットCD11b抗体と反応させ、anti-IgA MicroBeadsで分離し、接着培養することによって、精製した。そして、VSV-GでコートしたHIV-1を感染させた。

5). 侵入過程で働くラット因子をクローニングするために、昨年作製した、ラット遺伝子を発現するHeLa細胞に、Venusを発現するHIVシールドウイルスを感染させた。Venus⁺細胞をFACS Vantageで集め、ベクター部分に設計したプライマーを用いてラットcDNAをRT-PCRで増幅して、塩基配列を決定した。

6). 侵入効率に関して両極をなすラットT細胞の発現profileを比較するために、Total RNAを精製し、Agilent社Whole Rat Genome 4x44K(2色法)のマイクロアレイを作製し、GeneSpringGXおよびGenMAPPのソフトウェアで解析した。

(論理面への配慮)

遺伝子組み換え実験は北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規程に沿って許可を得た上、倫理規則を厳守した。HIV-1感染実験はP3実験室で行い、安全の面に十分配慮した。

3. 研究結果

1) ラットT細胞株におけるHIV-1 NL4-3株粒子の感染性減弱機構の解明

昨年本研究の結果から、ラットT細胞由来のHIV-1粒子のEnvの機能が低い、もしくは取り込まれたEnvの蛋白質質量が少ないことが考えられた。そこで、NL4-3株を導入したラットT細胞の培養上清から精製したウイルス粒子をWestern blottingで分析したところ、粒子内に取り込まれたEnv蛋白質の量がラット上皮細胞やヒト細胞由来のHIV-1粒子より少ないことが分かった。さらにラットT細胞内に発現したEnv蛋白質の安定性を調べた結果、Envは不安定で、速やかに分解されることが分かった。他方、ラットT細胞で作られたGag蛋白質は他の細胞のGagと同様な安定性を持つことが分かった。

2) ラットT細胞株由来の種々のHIV-1粒子の感染性上でHIV-1 NL4-3の感染性が低い事を述べた。そこで、さらに種々のHIV株(AD8, JR-CSF, YU-2, 89.6, Lai2等)の感染性を調べた。その結果、ラットT細胞株で作られたAD8, JR-CSF, YU-2等のマクロファージ指向性HIV-1は、ヒトT細胞由来のウイルス粒子と同程度の感染性を持つことが分かった。一方、ラットT細胞株由来のNL4-3, Lai2などのT細胞指向性HIV-1と両指向性の89.6株は感染性が低いことが確認された。

次いで、ラットprimary T細胞にAD8, JR-CSF, NL4-3の分子クローンを導入して子孫ウイルスの感染性を調べたところ、いずれのウイルス粒子もヒトPMBCで生産されたウイルス粒子と同様な感染性があった。

3) ラットマクロファージ由来の種々のHIV-1粒子の感染性

当研究室で作成されたhCRM1とhCycT1を発現するTgラットからマクロファージを調製してGコートNL4-3とAD8を感染させる事により、子孫ウイルスの感染性を調べた。その結果、高感染性のHIV-1がヒト細胞に準じる量生産されることが分かった。さらに、マクロファージにおいては侵入過程、粒子放出過程においても効率が高く、阻害因子が存在しないことが示唆された。

4) HIVの侵入過程で働く阻害因子の同定

レトロベクターを用いてラットcDNAを導入したHIV-1抵抗性のヒト細胞をスクリーニングしたところ、数個のクローンを得た。しかしラット遺伝子を同定できなかった。

ラットT細胞株にはHIV-1の侵入効率の高いものと低いものがある。サイクロフィリンA(CypA)の阻害剤サイクロスポリンA(CsA)を作用させると侵入効率の低いT細胞株への感染効率はヒトT細胞とほぼ同等にまで上がった。侵入効率の高いラットT細胞株では、ヒトT細胞と

同様に感染効率がやや下がった。このことは、ラットT細胞は侵入を支持する因子を欠くのではなく、Trim5a様阻害因子を持つ事を再確認している。

また、各細胞株の遺伝子発現プロファイルを入手し、分析した。その結果、侵入効率の低い細胞株の遺伝子の中で、侵入効率の高い細胞より発現が10倍以上高いものが60個、10倍以上低い遺伝子が125個同定された。現在、その遺伝子のノックダウンの影響を調べているところである。

4. 考察

本年度、ラットT細胞株由来のNL4-3粒子の感染性の低い原因が、細胞内でEnv蛋白質が不安定で、粒子内に取り込まれる量が少ない事にある事を明らかにした。しかし、この現象は、T細胞指向性または両指向性HIV-1株に限られ、マクロファージ指向性HIV-1株はヒト細胞で作られたHIV-1株と同等の感染性を持っていた。さらに、ラット primary T細胞とマクロファージではいずれのHIV-1株も感染性を有することから、ラットでは、HIV-1感染の後期過程において種間バリアーが存在しないと考えられる。また、ラットマクロファージにおいては侵入過程においても効率がよく、阻害因子が存在しないことが示唆された。

HIVの侵入過程で働く阻害因子をクローニングするために、今回はラットprimary T細胞をmRNAのソースとして用いた。しかし、ラットprimary T細胞は、複数細胞サブセットであり、感染にバリアーのないマクロファージやCD8 T細胞が混在している。そこで、より厳密に実験材料を取扱うため、HIV-1侵入効率の低いラットT細胞株から抽出したmRNAを基にレトロベクターcDNAライブラリーを作成する。また、マイクロアレイにより候補遺伝子をしばったので、ノックダウンすることにより感染阻害因子を同定する。

5. 自己評価

1) 達成度について

本研究の出発時点での目的はウイルス粒子の感染性と侵入過程に関与する宿主阻害因子を同定することだったが、本年度の研究結果からラットでは、HIV-1感染性粒子の産生における阻害因子が存在しないことが分かった。従って、この研究の二つの目標の内一つは解明されたと考える。また、HIVの侵入過程で働く阻害因子の同定について、候補遺伝子をしばることができた。

2) 研究成果の学術的、社会的意義について

本研究で同定された阻害因子をノックダウンする事により、HIV感染ラットモデルを作成しうる。新しい治療と予防法開発のために、このラットは特別な技術や設備を持たない研究グループでも利用できる。さらに、本ラットは近交系であるために詳細な免疫学的手法が利用でき、かつ発生工学的手法により免疫系遺伝子等を欠損させることを通じて、HIVの複製/発症に関与する因子の同定にも寄与できる。また、同定された阻害因子がファミリーをなしている可能性も高く、HIVの感染に限らず、他のレンチウイルスの感染抑制への効果も考えられ、げっ歯類がレンチウイルスfreeであることの原因の解明につながる。

3) 今後の展望について

Functional cloning およびマイクロアレイの方法により HIVの侵入過程で働く阻害因子の同定を中心に進める予定である。

6. 結論

結局、ラット細胞、マクロファージ共に感染性ウイルス粒子を生産するとの結論に行き着いた。また、ラットマクロファージにはHIV-1感染の阻害因子がないことが分かった。

7. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

該当なし

8. 研究発表

学会発表

張陔峰 志田壽利 ラットT細胞由来HIV-1粒子の感
染性 56回日本ウイルス学会

論文発表

Hiroyuki Okada, Xianfeng Zhang, Ismael Ben
Fofana, Mika Nagai, Hajime Suzuki, Takashi
Ohashi, and Hisatoshi Shida.

*Synergistic effect of human-CycT1 and -CRM1 on
HIV-1 propagation in rat T cells and
macrophages*

Retrovirology (in revise)

研究課題名：HIV 感染とエイズ発症の阻止および治療に関わる基礎研究

課題番号：H18—エイズ—一般—011

研究代表者：佐多徹太郎（国立感染症研究所感染病理部・部長）

研究分担者：横田恭子（感染免疫部・室長）、田中勇悦（琉球大学医学部・教授）、宮澤正顕（近畿大学医学部・教授）、神奈木真理（東京医科歯科大学医学部・教授）、有吉紅也（長崎大学熱帯医学研究所・教授）、塩田達雄（大阪大学微生物病研究所・教授）、石坂幸人（国立国際医療センター研究所・部長）、徳永研三（感染研感染病理部・主任研究官）、高橋秀宗（感染研感染病理部・室長）、立川愛（東大医科研・助教）、小柳義夫（京大ウイルス研・教授）、梁明秀（感染研エイズ研究センター・グループ長）

1. 研究目的

HIV 感染病態の基礎的な解析に焦点をあて、感染防御免疫機構の増強、HIV 増殖抑制機構、そして抗 HIV 薬剤やワクチン開発に役立てる知見を得ることを目的とし、(1) HIV 感染免疫防御機構、(2) HIV 感染に関わる自然免疫等の宿主因子の解析、(3) HIV 感染病態の解明を研究の3本柱とした。

2. 研究方法

(1) HIV 感染免疫防御機構：DC から T 細胞への感染伝播系でのウイルス増殖を解析し、またバキュロウイルス gp64 との融合蛋白を用いた CD4 細胞標的 HIV 抑制性レンチウイルスを作製する（横田）。成熟 DC を HIV 抗原 peptide でパルスし、HIV 陰性ドナーの PBMC から HIV 特異的 CD8+ 細胞誘導能をみる（田中）。Rac2 イントロンハプロタイプに点変異を導入し、遺伝子発現調節に必要な最小構造とともにこの領域に結合する核内因子を解析する（宮澤）。マクロファージ様の HIV-1 転写レポーター細胞株を作成し、これを用いて種々の TLR ligand および共生微生物を加え HIV-1 転写への影響を調べる（神奈木）。北タイ HIV 感染者から新鮮末梢リンパ球を分離し、北タイ流行株 (CRF01_AE) 由来 Gag 全領域オーバーラッピングペプチドに対する認識を Elispot 法により評価する（有吉）。

(2) HIV 感染に関わる自然免疫等の宿主因子の解析：センダイウイルスベクターを用いて多型の有無による TRIM5a 候補遺伝子産物の活性の違いを検討し、これらの多型が HIV 感染感受性に影響する分子機構の解明を試みる（塩田）。Vpr による IL-6 産生誘導機構について Toll-like receptor に着目した分子生化学的解析を行う。マクロファージ様細胞を用いて人工的に作成した DSB サイトへのウイルス DNA 挿入頻度を nested PCR 法にて DSB の意義について把握する（石坂）。N 末領域で規定されるサブタイプ C-Vif 蛋白の抗 A3G 活性が、Vif 自身のポリユビキチン活性、あるいは A3G・Cullin5・ElonginC との結合活性に規定されるか否かおよび細胞内局在性についてキメラ Vif を用いて検討する（徳永）。HIV-1 様粒子の界面活性剤処理と超遠心により Core-Env 抗原を作製しマウスへ免疫し、血清のウイルス中和能を測定する（高橋）。HIV-1 タンパク質と機能的に相互作用する宿主因子について、小麦胚芽を用いた無細胞タンパク質合成系および化学増幅型ルミネッセンス プロキシミティー ホモジニアスアッセイを用いて同定する。そして機能的役割を果たす有力分子を同定・選別する（梁）。

(3) HIV 感染病態の解明：セットポイントの異なる HIV 感染者群の末梢血単核球を PHA で刺激し、上清中に産生された多数のサイトカイン・ケモカインを測定し、また網羅的遺伝子発現解析を行う（立川）。ラット海馬スライス培養系を用いて、HIV 感染マクロファージが遊離する神経障害因子の細胞障害ならびに再生機能評価実験を行う（小柳）。同一サル胎仔脳から種々の培養細胞系を確立し HIV 感染による影響をウイルス増殖、サイトカイン・ケモカイン産生の経時的変化、プロウイルスの有無、細胞障害性について解析する（佐多）。

倫理面への配慮

遺伝子組み換え、ないしヒトゲノム・遺伝子に関する研究については法律ない倫理指針を遵守する。海外の材料については当該国における指針を遵守する。臨床材料の提供を受ける場合は、倫理委員会による承認を得る。動物実験は各施設の実験動物委員会の承認をうけ、動物に与える苦痛の軽減と排除に努める。

3. 研究結果

HIV 増殖抑制効果のある shRNA 発現レンチウイルスの外被蛋白を改変して CD4 細胞に選択的にとりこまれるレンチウイルスを開発している（横田）。GM-CSF を加えて DC の生存率を高め、この DC を HLA class-I 拘束性合成ペプチドで感作し、in vitro で自家 PBMC と混合培養することにより 3 名中 1 名に env 抗原反応性 CD8+T 細胞の誘導を確認した（田中）。特に最上流の T/C 多型が重要で、この部に結合する核内因子として GATA2 が候補となった（宮澤）。TLR3 および TLR4 リガンドによる刺激が HIV-1 転写を抑制することが分かった。E.Coli は HIV-1 転写を有意に抑制した（神奈木）。ヒト TRIM5a の多型 G110R は日本人 HIV 感染者に見出され、非感染者には見出されなかった。また SeV で発現させたところ、この多型は TRIM5a の抗 HIV 作用を減弱させることが明らかになった（塩田）。コホート患者 150 名を評価、116 名(77%)において Gag ペプチド認識を認め、8 箇所 HLA 拘束性 Gag CTL エピトープを同定した。うち 6 カ所は新し

いものであった(有吉)。rVpr 誘発 IL-6 産生には TLR-4/Myd88 を介した CEBP- β の活性化が関与することを明らかにした。またマクロファージ様細胞への感染の際 DSB を誘導すると DSB サイトにウイルス DNA が挿入され、これが ataxia telangiectasia mutated(ATM)依存的に生じることを証明した(石坂)。C-Vif 及び N 末 C-Vif/C 末 B-Vif の f キメラ Vif 蛋白は、B-Vif と同程度のポリユビキチン活性及び Cullin5、ElonginC 結合活性を示したが、A3G に対しては高い結合活性を示した。また Vif 蛋白は一般的に細胞質局在を示すのに対し、C-Vif 蛋白は例外的に核内に局在した(徳永)。HIV-1 粒子のコア成熟においては酸化により一体となった Gag が収縮していること、envelope が運動していることが判明した。感染実験により、粒子表面の envelope はコアの成熟、収縮に連動して除去されていることが示唆された(高橋)。無細胞タンパク質合成系および化学増幅型ルミネッセンスアッセイを用いたスクリーニングにより、HIV タンパク質群と相互作用するリン酸化酵素やユビキチン関連因子を複数同定した。また、質量分析計を用いた解析も行った(梁)。高 HIV 群と低 HIV 群で産生量に有意差があったのはいずれも Th1 型免疫応答に関与するサイトカイン/ケモカインであり、網羅的遺伝子発現解析で発現量が有意に異なる新たな免疫関連因子を見出した(立川)。HIV 感染マクロファージの培養上清は、脳海馬歯状回顆粒細胞に細胞死を誘導し、さらにこの細胞を補充する神経未分化細胞の分化成熟を阻害することがわかった(小柳)。神経・グリア細胞系での感染は制限されており、サイトカイン・ケモカインの産生もわずかであるが、プロウイルスとして潜伏し、マクロファージ細胞へウイルスを伝播する(佐多)。

4. 考察

それぞれの研究結果により、HIV 感染予防や免疫治療、ワクチン開発、ウイルスの複製阻害や自然免疫を増強する薬剤、遺伝子治療等の開発に治療に役立つ基礎的知見が得られてきた。

5. 自己評価

1) 達成度について 60-80%、

概ね達成されたと考えたいが、進捗遅延の申告や論文発表まで至っていない課題もあった。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

治療やワクチン開発の基盤として、DC を用いた免疫療法の可能性、HIV 曝露非感染者の遺伝的要因のひとつとして Rac2 イントロン結合因子の解明、自然免疫を HIV-1 感染防御へ応用する糸口、タイ型ウイルスの新 CTL エピトープ、ヒト TRIM5 α の抗 HIV 作用、HIV-1 感染と DSB の関連性、サブタイプ C-Vif の高い抗 A3G 活性、マウスで抗 HIV 中和抗体を誘導、HIV による神経細胞再生障害などの新知見を得た。

3) 今後の展望について

本年度に得られた結果をもとにさらに発展させ、感染防御免疫機構の増強、ウイルス増殖抑制、そして抗 HIV 薬剤やワクチン開発に役立てる。

6. 結論

HIV 抑制性レンチウイルスは DC から CD4+T 細胞への HIV 伝播増殖制御が可能で治療法の開発に貢献できる(横田)。IL-4、IFN- β と GM-CSF 培地で短期間刺激培養したユニークな DC が、エイズ抑制効果を持つ CD8+T 細胞を誘導した(田中)。HIV 曝露非感染状態の遺伝的要因の一つ Rac2 イントロン多型は染色体構造に依存し、GATA2 などの核内因子が結合する転写調節領域である(宮澤)。マクロファージへの TLR3、4、の刺激により HIV-1 転写が抑制された。共生微生物の中に同様の抑制効果を持つものが認められ HIV-1 感染防御への応用可能性が示唆された(神奈木)。優勢な CTL エピトープの認識は流行株と宿主集団に特異的であったので、地域に特異的なワクチン抗原の開発も重要である(有吉)。HIV-1 感染感受性と相関するヒト TRIM5 の多型 G110R は TRIM5 α の抗 HIV 作用を減弱させることが明らかになった(塩田)。静止マクロファージへの HIV 感染及び再産生における Vpr の役割がより明確になった(石坂)。HIV-1 サブタイプ C-Vif の高い抗 A3G 活性は A3G との結合活性により規定された(徳永)。マウスへの Core-Env 免疫で HIV-1 の中和抗体を誘導した(高橋)。HIV-1 Gag タンパク質のユビキチン化や宿主微小管の安定性がウイルス粒子形成に必須であることが明らかになった(梁)。セットポイント HIV 量の異なる感染者では Th1 型免疫応答に関連する因子を中心に、免疫学的特性が大きく異なっていることが明らかとなった(立川)。エイズ脳症の治療薬開発の可能性(小柳)。SIV 増殖脳培養細胞系でウイルスと宿主因子の解析が可能となった(佐多)。

7. 知的所有権の出願・取得状況(予定をふくむ)

石坂幸人、長谷川正勝、野原 聡 「新規核移行ペプチド」国立国際医療センター総長、名糖産業株式会社 2008/3/7

梁明秀: A Method for Screening anti-HIV Drugs and a Diagnostic Method of AIDS 出願番号: 12/188,242

研究発表 (32 編ほか 20 編)

研究代表者 (佐多徹太郎)

1. Dewan MZ, Tomita M, Katano H, Yamamoto N, Ahmed S, Yamamoto M, Sata T, Mori N, Yamamoto N. An HIV protease inhibitor, ritonavir targets the nuclear factor-kappaB and inhibits the tumor growth and infiltration of EBV-positive lymphoblastoid B cells. *Int J Cancer*. 2009 Feb 1;124(3):622-9.
2. Seki S, Kawada M, Takeda A, Igarashi H, Sata T, Matano T.: Transmission of simian immunodeficiency virus carrying multiple cytotoxic-T-lymphocyte escape mutations with diminished replicative ability can result in AIDS progression in rhesus macaques. *J Virol*. 2008 Mar 12; [Epub ahead of print]

研究分担者

横田恭子

1. Yamamoto, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Mitsuki, Y-Y, Mizukoshi, F., Terahara, K., Inagaki, Y., Yamamoto, N., Kobayashi, K. and Inoue, J-I.: Selective transmission of R5 HIV-1 over X4 HIV-1 at the dendritic cell-T cell infectious synapse is determined by the T cell activation state. *PLoS Pathogen*, in press.
2. Komuro, I., Sunazuka, T., Akagawa, S.K., Tsunetsugu-Yokota, Y., Iwamoto, A., and Omura, S.: Erythromycin-derivatives inhibit HIV-1 replication in macrophages through modulation of MAPK activity to induce small isoform of C/EBP β . *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105:12509-12514, 2008.
3. Yamamoto, T and Tsunetsugu-Yokota, Y. Prospects for the therapeutic application of lentivirus-mediated gene therapy to HIV-1 infection. *Curr. Gene Therapy* 8:1-8, 2008.

田中勇悦

1. Kondo K., Okuma K., Tanaka R., Matsuzaki G., Ansari A.A. and Tanaka Y.: Rapid induction of OX40 ligand on primary T cells activated under DNA-damaging conditions. *Hum. Immunol.* 2008 69(9), 533-542.
2. Zhang LF, Okuma K, Tanaka R, Kodama A, Kondo K, Ansari AA, Tanaka Y.: Generation of mature dendritic cells with unique phenotype and function by in vitro short-term culture of human monocytes in the presence of interleukin-4 and interferon-beta. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2008 Jun;233(6):721-31.
3. Okuma K, Tanaka R, Ogura T, Ito M, Kumakura S, Yanaka M, Nishizawa M, Sugiura W, Yamamoto N. and Tanaka Y.: The IL-4-Transgenic hu-PBL-SCID Mice: a Model for Screening of Anti-Viral Drugs and Immunotherapeutic Agents against X4 HIV-1 Viruses. *J Infect Dis* 197(1):134-41, 2008.
4. Takahashi Y, Tanaka R, Yamamoto N, and Tanaka Y.: Enhancement of OX40-induced apoptosis by TNF co-activation in OX40-expressing T cell lines in vitro leading to decreased targets for HIV-1 production. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2008 Mar;24(3):423-35..

宮澤正顯

1. Miyazawa M, Lopalco L, Mazzotta F, Lo Caputo S, Veas F, Clerici M.: The "immunologic advantage" of HIV-exposed seronegative individuals. *AIDS* 2008; in press.
2. Takeda E, Tsuji-Kawahara S, Sakamoto M, Langlois MA, Neuberger MS, Rada C, Miyazawa M.: Mouse APOBEC3 restricts Friend leukemia virus infection and pathogenesis in vivo. *J Virol*. 2008 Nov; 82(22): 10998-11008.
3. Miyazawa M, Tsuji-Kawahara S, Kanari Y. Host genetic factors that control immune responses to retrovirus infections. *Vaccine*. 2008 Jun 6; 26(24): 2981-2996.

神奈木真理

1. Saeng-Aroon S, Yoshida LM, Ariyoshi K, Taguchi M, Pathipvanich P, Rojanawiwat A, Matsuda M, Kannagi M, Sawanpanyalert P, Sugiura W, Auwanit W. An efficient tool for surveying CRF01_AE HIV type 1 resistance in Thailand to combined stavudine-lamivudine-nevirapine treatment: mutagenically separated PCR targeting M184I/V. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2007 Dec;23(12):1461-8.

有吉紅也

1. A Rojanawiwat, K Ariyoshi, P Pathipvanich, N Tsuchiya, W Auwanit, P Sawanpanylaert. Substantially exposed but HIV-negative individuals are accumulated in HIV-serology discordant couples diagnosed in a referral hospital in Thailand. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 2009 (in press)
2. N Tsuchiya, P Pathipvanich, T Yasuda, Y Mukoyama, A Rojanawiwat, T Matsubayashi, S Saeng-aroon, W Auwanit, A Matsuyama, P Sawanpanyalert, K Ariyoshi. Demographic, socio-economic, behavioral and clinical factors predicting virologic failure or generic fixed-dose combination antiretroviral therapy before the universal coverage of health insurance in northern Thailand. *South East Asian Journal of Tropical Medicine and Tropical Medicine*. 2009 (in press)

塩田達雄

1. Kono K, Song H, Shingai Y, Shioda T, Nakayama EE. Comparison of anti-viral activity of rhesus monkey and cynomolgus monkey TRIM5alphas against human immunodeficiency virus type 2 infection. *Virology*. 2008;373(2):447-56.

2. Nakayama EE, Shingai Y, Kono K, Shioda T: TRIM5alpha-independent anti-human immunodeficiency virus type 1 activity mediated by cyclophilin A in Old World monkey cells. *Virology*. 2008; 375(2):514-20.
3. Maegawa H, Nakayama EE, Kuroishi A, Shioda T: Silencing of tripartite motif protein (TRIM) 5alpha mediated anti-HIV-1 activity by truncated mutant of TRIM5alpha. *J Virol Methods*. 2008; 151(2):249-56.
4. Wichukchinda N, Nakayama EE, Rojanawiwat A, Pathipvanich P, Auwanit W, Vongsheree S, Ariyoshi K, Sawanpanyalert P, Shioda T: Effects of CCR2 and CCR5 polymorphisms on HIV-1 infection in Thai females. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2008;47(3):293-7.

石坂幸人

1. I. Kitayama H., Miura Y., Ando Y., Hoshino S., Ishizaka Y., and Koyanagi Y. Human Immunodeficiency Virus Type-1 Vpr Inhibits Axonal outgrowth through induction of mitochondrial dysfunction. *J. Virol.* 82(5), 2528-2542, 2008.

徳永研三

1. Utachee, P., Jinnopat, P., Isarangkura-na-ayuthaya, P., Chandimal de Silva, U., Nakamura, S., Siripanyaphinyo, U., Wichukchinda, N., Tokunaga K., Yasunaga, T., Sawanpanyalert, P., Ikuta, K., Auwanit, W., and Kameoka, M. Genotypic Characterization of CRF01_AE env Genes Derived from Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Patients Residing in Central Thailand. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* in press.
2. Kitagawa Y, Kameoka M, Shoji-Kawata S, Iwabu Y, Mizuta H, Tokunaga K, Fujino M, Natori Y, Yura Y, Ikuta K. Inhibitory function of adapter-related protein complex 2 alpha 1 subunit in the process of nuclear translocation of human immunodeficiency virus type 1 genome. *Virology*. 2008 Mar 30;373(1):171-80.

高橋秀宗

1. Takahashi, H. Kitagawa, Y. Maeda-Satoh, M. Hasegawa, H. Sawa, H. Sata, T. Monoclonal antibody and siRNAs for topoisomerase I suppresses telomerase activity. *Hybridoma*, in press. 2009

梁

1. Ryo A. Tsurutani N, Ohba K, Kimura R, Komano J, Nishi M, Soeda H, Hattori S, Perrem K, Yamamoto M, Chiba J, Mimaya J, Yoshimura K, Matsushita S, Honda M, Yoshimura A, Sawasaki T, Aoki I, Morikawa Y, 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*. 2008 Jan 8;105(1):294-9.

立川 愛

1. Mizukoshi F, Yamamoto T, Mitsuki YY, Terahara K, Kawana-Tachikawa A. Kobayashi K, Iwamoto A, Morikawa Y, Tsunetsugu-Yokota Y.: Activation of HIV-1 Gag-specific CD8(+) T cells by yeast-derived VLP-pulsed dendritic cells is influenced by the level of mannose on the VLP antigen. *Microbes Infect*. 2008 Nov 24. [Epub ahead of print]
2. Hosoya N, Miura T, Kawana-Tachikawa A. Koibuchi T, Shioda T, Odawara T, Nakamura T, Kitamura Y, Kano M, Kato A, Hasegawa M, Nagai Y, Iwamoto A.: Comparison between Sendai virus and adenovirus vectors to transduce HIV-1 genes into human dendritic cells. *J Med Virol*. 2008 Mar;80(3):373-82.

小柳義夫

1. Koyanagi Y. Tanaka Y, Ito M, Yamamoto N.: Humanized mice for human retrovirus infection. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008;324:133-48.
2. Kitayama H, Miura Y, Ando Y, Koyanagi Y.: Human immunodeficiency virus type-1 vulnerates nascent neuronal cells. *Microbiol Immunol*. 2008 Feb;52(2):78-88.
3. Kawamura T, Koyanagi Y. Nakamura Y, Ogawa Y, Yamashita A, Iwamoto T, Ito M, Blauvelt A, Shimada S.: Significant virus replication in Langerhans cells following application of HIV to abraded skin: relevance to occupational transmission of HIV. *J Immunol*. 2008 Mar 1;180(5):3297-304.
4. Yoshida T, Kawano Y, Sato K, Ando Y, Aoki J, Miura Y, Komano J, Tanaka Y, Koyanagi Y.: A CD63 mutant inhibits T-cell tropic human immunodeficiency virus type 1 entry by disrupting CXCR4 trafficking to the plasma membrane. *Traffic*. 2008 Apr;9(4):540-58.
5. Sato K, Aoki J, Misawa N, Daikoku E, Sano K, Tanaka Y, Koyanagi Y. Modulation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity through incorporation of tetraspanin proteins. *J Virol*. 2008 Jan;82(2):1021-33. Epub 2007 Nov 7.
6. Yoshida T, Kawano Y, Sato K, Ando Y, Aoki J, Miura Y, Komano J, Tanaka Y, Koyanagi Y. A CD63 mutant inhibits T-cell tropic HIV-1 entry by disrupting CXCR4 trafficking to the plasma membrane. *Traffic* 9: 540-558, 2008.

研究課題：エイズ感染細胞での配列特異的遺伝子組換えによる効率的な HIV 遺伝子除去法の開発

課題番号：H20-エイズ-若手・016

主任研究者：野村 渉（東京医科歯科大学生体材料工学研究所 助教）

1. 研究目的

現在の HIV 感染患者における治療は、多剤併用療法 (HAART: Highly Active Anti-Retroviral Therapy) が主流であり成果を挙げているが、副作用や高額な医療費などが問題点となる。また、長期にわたる投薬も患者の QOL 面から望ましくない。そのため、新たな概念をもった治療法の開発、確立が求められる。本研究においては、亜鉛フィンガータンパク質 (ZFP) の特性を生かした特定の遺伝子配列にのみ働く DNA 組換え酵素を用いることで感染患者の細胞内に組み込まれた HIV 遺伝子の除去を行う新規な治療法の開発に取り組む。

2. 研究方法

保存度の高い *gag-pol* 遺伝子配列から 4~5 対程度の候補配列を選択し、それらの配列に対して特異的に結合する ZFP をデザインする。これらを Maltose Binding Protein (MBP) 融合体として発現し、アフィニティー精製により得られた ZFP の DNA 結合活性を定量的 ELISA 法によって定量する。DNA 組換え酵素ドメインとして高い酵素活性を有する原核細胞由来の Tn3 の 6 アミノ酸に変異を導入した配列を用いて酵素活性(反応効率)の検討を行う。これを基に、*gag* 遺伝子配列に最適化するため、分子進化法を用いる。ランダム化された酵素ドメイン遺伝子配列を発現ベクターに導入し、ベクター上での組換え反応効率を PCR で確認する。PCR の増幅フラグメントには酵素ドメインの遺伝子配列も含まれ、高活性なドメイン配列がセレクションされる。この ZFP 融合型 DNA 組換え酵素を用いて哺乳細胞内での機能評価を行う。用いる細胞株にはレポーターとして蛍光タンパク質 (ZsGreen) 遺伝子(両端に *gag* 遺伝子中の標的配列を導入)を安定的にゲノム配列に導入する。組換え酵素を持つプラスミド遺伝子をトランスフェクションで導入し、反応の進行は組換え反応による ZsGreen 遺伝子の欠損をフローサイトメトリーで検出する。更にフローサイトメトリーによるソーティング(セレクション)を行うことで、哺乳細胞内での反応に最適化された酵素ドメインを得る。また、組換えによる ZsGreen 遺伝子の切除は共焦点レーザー顕微鏡によって視覚的にも評価する。HIV 感染細胞からの HIV プロウイルス遺伝子の除去に関しては NL4.3 株を感染に用いた系を利用する。評価法としては p24 抗

体 ELISA 法, Cell Viability 変化の評価によって行う。

(倫理面への配慮)

動物愛護上の配慮に関して、日本学術会議による動物実験の適切な実施に向けたガイドライン及び厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針を厳密に遵守して、実験計画を綿密に検討し、必要最小限の実験動物で効率的に実験を実施する。

3. 研究結果

gag 遺伝子に対する標的配列として 5 箇所を選択し、その配列に対してデザインした ZFP をドメイン数 4~6 (認識する DNA 配列: 12 塩基~18 塩基対) のバリエーションを持たせて構築した (合計 30 種類の ZFP)。これらの ZFP は MBP 融合体として大腸菌内で発現し、アフィニティー精製を行った。DNA 結合親和性の評価には定量的 ELISA を用い、ドメイン数が 5 および 6 の ZFP について結合親和性として 10nM~400nM という値を得た(表1)。この値は、標的配列に対して特異的に結合するために十分な親和性であると考えられる。

	4F	5F	6F
site1	745	441.4	146.9
site2	655	279.2	175.4
site3	715	305.1	444
site4	15084	365.6	186.7
site5	1498	263.6	25.25
site6	159	124.8	14.68

表1. 構築した ZFP の DNA 結合親和性について (値は全て nM で示す)。4 フィンガー (4F) ドメインは低い活性の ZFP が多いが、5F および 6F は十分な活性を有する。

これらの ZFP を DNA 組換え酵素の DNA 結合ドメインとして用いるために、Tn3 を基に作成された活性の確認されている DNA 組換え酵素ドメインとの融合体を構築した。第1段階として標的配列を GFP 遺伝子の両端に置いたモデル配列をもつプラスミド遺伝子を作製し、それに対する組換え反応を検討した。結果として、50%程度の反応効率を示すことが明かになった(図1)。この結果を受けて、哺乳細胞における反応効率を評価するための哺乳細胞内発現系の構築と標的となる蛍光タンパク質をレポーターとする標的配列を有する細胞株の構築を行った。

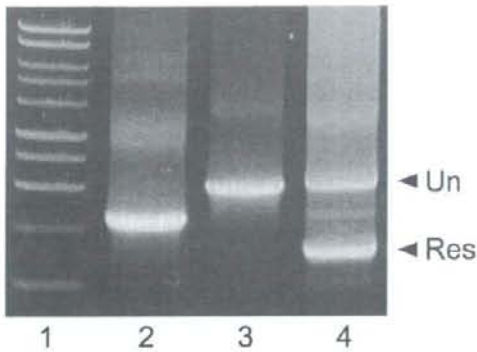


図1. ZFP 融合型 DNA 組換え酵素の反応。
 レーン1: サイズマーカー, レーン2: 組換え酵素導入前のプラスミド遺伝子, レーン3: 活性の低いTn3野生型ドメインの反応, レーン4: 変異型Tn3を用いた反応。
 Un (Unreacted)が反応していないバンドを示し, Res (Resolved)が反応後に生成するバンドを示す。

4. 考察

デザインした ZFP が標的配列に高い結合活性を有することが示されたため, 様々な組み合わせを用いて *gag* 遺伝子配列の除去に最適な標的配列を検討することが可能であると考えられる。DNA 組換え反応で60%程度の反応効率が得られることが示され, 今後の哺乳類細胞内, 感染細胞内での配列特異的な組換え反応にも高い可能性を示唆している。

5. 自己評価

1) 達成度について

gag-pol 領域の標的配列に対して高い結合親和性を有する ZFP の構築と高い反応性を有する組換え酵素ドメインの構築は予定通り達成できた。1つの標的配列において結合する ZFP は2種類必要であり, DNA 組換えは2箇所の標的配列の間が切除される反応であるため, 1つのターゲット遺伝子上に4種類の ZFP が必要となる(図2)。本年度は30種類の ZFP が構築され, それらが DNA 結合活性を有することが示されたことが, 大きなステップと考えられる。また, 構築した ZFP 融合型 DNA 組換え酵素による組換え反応が確認されたことから次年度に向けて良い勢いを付けている。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

HIV 感染細胞からの直接的な HIV 遺伝子の除去という概念はこれまでの HIV 治療法とは異なる戦略に基づくものであり, 新たな治療法の1つとしてブレークスルーをもたらすと期待できる。本研究で得られる成果は, HIV 感染者の完治へ向けた研究への展開が十分に期待されるとともに, 成果を基礎生物化学研究一般に広くアピールする

ことで, 新規の研究者参画を促し, 更なる新規なアイデアに基づく様々な角度からのエイズ対策研究が発展するきっかけの一つになることも期待される。

3) 今後の展望について

gag 遺伝子を標的配列とする ZFP が構築され, その DNA 結合親和性が確認されたことから第一の段階はクリアされた。また, その ZFP を有する DNA 組換え酵素によって組換え反応が行えたことは今後の研究の展開において重要なステップとなった。今後の研究展開において重要になる点として, 1. ZFP を4個用いる組換え反応が効率良く行えるか, 2. 哺乳類細胞内において大腸菌内と同様に反応が進行するか, 3. 感染細胞において潜伏期に密になっている可能性が高いクロマチン構造をもつ標的 DNA 配列に対して ZFP が働くか, ということが挙げられる。これらを1段階ずつクリアし, 遺伝子に着目したエイズ治療法の確立を目指したい。次年度は学会発表, 誌上発表を積極的な発表を行う。

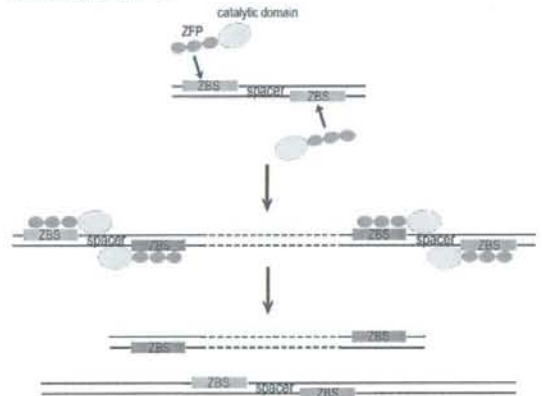


図2. ZFP 融合型 DNA 組換え酵素の反応。现阶段では1段目の1種類の標的配列を用いた反応を検討しているが, 最終的には2,3段目に示す4種類の ZFP を用いる。

6. 結論

人工的な DNA 結合タンパク質として現在, 最も有用性の高い ZFP を用いる DNA 組換え反応は HIV 遺伝子の除去に関しても *gag* 遺伝子を認識するドメインを用いて行える可能性が示唆された。今後は実際の応用へつなげる過程において存在する障壁をクリアするための研究が必要である。

7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

次年度の研究で予定している分子進化法を用いて作製する *gag* 遺伝子標的配列に対して高い特異性で働く DNA 組換え酵素は独自性が高いため特許出願を予定している。

研究発表

主任研究者

野村 渉

原著論文による発表

- 1) Wataru Nomura, Naoki Yamamoto, and Hirokazu Tamamura (他 4 名, 1 番目) Fluorophore Labeling Enables Imaging and Evaluation of Specific CXCR4-Ligand Interaction at the Cell Membrane for Fluorescence-based Screening. *Bioconjugate Chem.* 19: 1917-1920, 2008.
- 2) Tomohiro Tanaka, Hiroshi Tsutsumi, Wataru Nomura, and Hirokazu Tamamura (他 10 名, 3 番目) Structure-activity Relationship Study of CXCR4 Antagonists Bearing the Cyclic Pentapeptide Scaffold: Identification of the New Pharmacophore. *Org. Biomol. Chem.* 6: 4374-4377, 2008.
- 3) Hirokazu Tamamura, Hiroshi Tsutsumi, Wataru Nomura, Tomohiro Tanaka, and Nobutaka Fujii (他 0 名, 3 番目) A Future Perspective on the Development of Chemokine Receptor CXCR4 Antagonists. *Expert Opinion on Drug Discovery* 3: 1155-1166, 2008.
- 4) Hirokazu Tamamura, Hiroshi Tsutsumi, Wataru Nomura, and Nobutaka Fujii (他 0 名, 3 番目) Exploratory Studies on Development of the Chemokine Receptor CXCR4 Antagonists Toward Downsizing. *Perspectives in Medicinal Chemistry* 2: 1-9, 2008.

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

課題番号：H18- エイズ- 若手-003

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

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

1. 研究目的

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

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

2. 研究方法

(1) 酵素阻害活性についての定量：これまで得られた有望なリード化合物における2つ、5-nitro-furan-2-carboxylic acid adamantan-1-carbamoylmethyl ester (NAC)と5-nitro-furan-2-carboxylic acid [[4-(4-bromophenyl)-thiazol-2-yl]-(tetrahydro-furan-2-ylmethyl)-carbamoyl]-methyl ester (NBTC)について HIV-1, MLV, E. coli, human RNase H1 に対する阻害活性を測定し種特異的な阻害活性の有無を評価する。

(2) インテグラーゼ阻害効果：RNase H の活性中心はインテグラーゼの活性中心と構造が似ており、両者を阻害する“double blocker”も報告されていることから、NAC/NBTC におけるインテグラーゼ活性阻害能を評価する。米国 NCI Dr. Y. Pommier らが開発した酵素反応生成物電気泳動法に基づく方法にて IC₅₀ を評価する。

(3) In silico screening による阻害剤候補の同定と評価：これまでに得られたリード化合物と構造予測モデルを駆使し、in silico screening による RNase H 阻害剤の探索を行う。バーチャルスクリーニングの結果得られた候補化合物がもつ RNase H 阻害活性の有無を実測する。

(4) docking simulation による新規 RNase H 阻害剤のデザインと合成：これまでに本研究班により同定されたリード化合物 NAC、NBTC をもとにして、骨格構造を保持し、側鎖を改変することにより、選択性が高く効果の強い RNase H 阻害剤をデザイン・合成してその活性を評価する。

(5) 酵素—阻害剤結合様式の決定：これまでに知られている RNase H 阻害化合物は、ケトン基あるいはヒドロキシル基が隣接して並ぶという特徴を持っている。NAC/NBTC は既存の RNase H 阻害剤と構造が異なっているため作用機序が異なる可能性がある。結合様式の理解は精密な薬物設計を行うために必須であるため、HIV-1 RT の RNaseH ドメインと本研究により見出された新規化合物の共結晶を作成して X 線構造解析を行う。

（倫理面への配慮）

該当せず。

3. 研究結果(太字)

(1) 酵素阻害活性についての定量：NAC/NBTC は HIV-1, MLV の逆転写酵素に内在する RNaseH 活性を阻害しその IC₅₀ は 5-30μM であった。E.coli RNaseH は阻害せず、NBTC のみが約 50μM でヒト由来 RNase H1 阻害活性を示した。

(2) インテグラーゼ阻害効果：HIV-1 RT のもつ strand transfer activity および 3' processing activity に対する阻害活性は検出されず、NAC/NBTC が選択的な RNase H 阻害剤であることが判明した。

(3) In silico screening による阻害剤候補の同定と評価：リード化合物からの派生構造を探索するために、バーチャル化合物ライブラリーを用いた計算機スクリーニングを行った。有望と判断された36候補化合物のうち、3種類について実際に HIV-1 RT-associated RNase H 阻害活性を測定したが、NAC/NBTC より強力な活性を有する化合物は得られていない。

(4) docking simulation による新規 RNase H 阻害剤のデザインと合成：リード化合物に改変を行った幾つかの構造を考案し、ドッキング計算により有望な修飾構造体を選定した。選定された化合物の有機合成を試みているが、一部に不安定な化学構造が含まれているため現時