

点で最終設計構造は得られていない。中間体構造については、随時、活性測定を行っている。不安定構造部分を見直した化合物を設計し、平行して合成を進めている。

(5) 酵素—阻害剤結合様式の決定: 逆転写酵素は核酸を捕捉するループ部分の構造的揺らぎが大きく、X線結晶解析の分解能が不十分な場合が多い。分解能を高めるために特定の変異を導入した逆転写酵素の発現ベクターを Rutgers 大学の E. Arnold 教授より分与頂いた。この逆転写酵素を発現し、結晶化レベルまで精製した。発現した逆転写酵素は Polymerase 活性と RNase H 活性を持つことを確認した。得られたリード化合物との共結晶化を試みている。

#### 4. 考察

研究期間3年で RNase H 阻害剤のスクリーニング系を構築し、ランダムケミカルライブラリーから 5-nitro-furan-2-carboxylic acid carbamoylmethyl ester (NACME)を基本骨格構造とする RNase H 特異的阻害剤 NAC/NBTC などを同定することが出来た。これは既存の RNase H 阻害剤とは構造が事なる新規性に富む化学構造であった。NACME 誘導体はレトロウイルスに特異的でヒト細胞における HIV-1 複製を減弱させる活性も検出できた事から新しいエイズ治療薬の開発シードとして大きく期待できる。これを実用化するためには更に改変を繰り返し IC<sub>50</sub> が高く、細胞毒性が低い(therapeutic window が広い)誘導体が求められる。作用機序解析には共結晶構造解析と本剤に対する薬剤耐性ウイルスの選択が必要である。今後、これらの課題を重点的に進めるべきと思われた。

電算機によるバーチャル薬剤デザインと実際のスクリーニングとを協調して行うことにより短期間で効率的に薬剤開発を行うという本研究のコンセプトの潜在性を十分に示せたのではないだろうか。このノウハウを RNase H 阻害剤だけでなく新たな作用機序を持ったエイズ治療薬開発に応用させることが本研究課題の成果を真に生かすことであると信じる。

#### 5. 自己評価

##### 1) 達成度について

実験データと計算機科学を融合させる事により迅速に新規エイズ薬開発を行おうとする研究計画は概ね当初の年度計画通り進行した。リード化合物からよりよい誘導体を得るまでに至らず、他剤との相互作用や既存の多剤耐性ウイルスへの効果への評価や、共結晶による立体構造解析等もあと一歩であった点については今後の研究課

題である。

##### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

新規エイズ治療薬の開発は厚生課題である多剤耐性ウイルスへの対応と HIV 感染者の長期療養の支援策として不可避であり、我が国の厚生科研究で RNase H 阻害剤開発が支援され実用化への道筋を示せたことは社会的に高い貢献度を持つと思われる。RNase H 阻害剤開発の世界的権威である LeGrice、Parniak、Beutler 博士らにも本誘導体開発は高く評価されており、薬剤開発における国際学術雑誌 Journal of Medicinal Chemistry においても論文審査で高く評価された。今後の RNase H 阻害剤開発を促進する上で学術的価値が高いことが指摘できる。海外の学術雑誌より RNase H に関する論文の外部審査員に選ばれることもあり、我々が RNase H 研究グループとして国際的に認知されたことが裏付けられる。RNase H 活性は HIV-1 の複製、病原性、組み換えウイルスの発生、逆転写酵素阻害剤に対する耐性機構に関与している。RNase H 阻害剤はこれら諸問題の対処法を確立するための学術的基盤を与える事も期待できる。

##### 3) 今後の展望について

誘導体 NAC/NBTC 等を核としてさらに特異的かつ強力な RNase H 阻害剤の合成を進めると同時に、既存の抗 HIV-1 薬との相乗効果、本剤に対する薬剤耐性ウイルス発生頻度とその特徴、共結晶立体構造解析に基づく作用機序の分子レベルでの解明を進めたい。

本研究課題の成果は RNase H 阻害剤開発だけではなく立体構造が既知のタンパク質に対する阻害剤開発にも広く適応できると考えられる。我々は本研究で得たノウハウを生かすため、ゲノムワイドな創薬分子標的探索と新規エイズ治療薬開発を橋渡しする事業への応用展開をはかり我が国のエイズ対策事業に貢献したい。

#### 6. 結論

研究期間3年で NACME を基本骨格構造とする RNase H 阻害剤リード化合物の同定に成功した。これは既存の RNase H 阻害剤とは構造が事なる新規性に富む化学構造であり、新規作用機序を持つエイズ治療薬開発のため大きな貢献が期待される。

##### 7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

HIV-1 複製阻害活性を有する新規 RNaseH 阻害剤 NACME 誘導体 (予定)。

## 研究発表

## 主任研究者

駒野 淳

原著論文による発表

英文

- 1) Fuji H, Urano E, Futahashi Y, Hamatake M, Tatsumi J, Hoshino T, Morikawa Y, Yamamoto N, Komano J. Derivatives of 5-nitro-furan-2-carboxylic acid carbamoylmethyl ester inhibit RNase H activity associated with HIV-1 reverse transcriptase. *J Med Chem* (Revision submitted for acceptance)
- 2) Hamatake M, Aoki T, Futahashi Y, Urano E, Yamamoto N, and \*Komano J. Ligand-independent higher-order multimerization of CXCR4, a G-protein-coupled chemokine receptor involved in the targeted metastasis. *Cancer Sci* (in press)
- 3) Urano E, Kariya Y, Futahashi Y, Ichikawa R, Hamatake M, Fukazawa H, Morikawa Y, Yoshida T, Koyanagi Y, Yamamoto N, and \*Komano J. Identification of the P-TEFb complex-interacting domain of Brd4 as an inhibitor of HIV-1 replication by functional cDNA library screening in MT-4 cells. *FEBS Let.* 2008 Dec 10; 582 (29):4053-8
- 4) Urano E, Aoki T, Futahashi Y, Murakami T, Morikawa Y, Yamamoto N, \*Komano J. Substitution of the myristoylation signal of human immunodeficiency virus type 1 Pr55Gag with the phospholipase C delta 1 pleckstrin homology domain results in infectious pseudovirion production. *J Gen Virol.* 2008 Dec; 89 (Pt 12):3144-9
- 5) Urano E, Shimizu S, Futahashi Y, Hamatake M, Morikawa Y, Takahashi N, Fukazawa H, Yamamoto N, \*Komano J. Cyclin K/CPR4 inhibits primate lentiviral replication by inactivating Tat/positive transcription elongation factor b-dependent long terminal repeat transcription. *AIDS.* 2008 May 31;22(9):1081-3.
- 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 human immunodeficiency virus type 1 entry by disrupting CXCR4 trafficking to the plasma membrane. *Traffic.* 2008 Apr;9(4):540-58.

## 分担研究者

星野 忠次

原著論文による発表

英文

- 1) Fuji H, Urano E, Futahashi Y, Hamatake M, Tatsumi J, Hoshino T, Morikawa Y, Yamamoto N, Komano J. Derivatives of 5-nitro-furan-2-carboxylic acid carbamoylmethyl ester inhibit RNase H activity associated with HIV-1 reverse transcriptase. *J Med Chem* (Revision submitted for acceptance)
- 2) Fuji H., Suzuki M., Neya S., Hoshino T. Development of Software Program Predicting the Binding Site and the Binding Mode of Ligands Against a Target Protein. *e-J. Surf. Sci. Nanotech.* 6: 241-245, 2008.
- 3) Hisatomi Y, Katagiri D, Neya S, Hara M, Hoshino T. Analysis of unfolding process of green fluorescent protein by molecular dynamics simulation. *J. Phys. Chem. B.* 112: 8672-8680, 2008.
- 4) Ode H, Matsuo Y, Neya S, Hoshino T. Force Field Parameters for Rotation around chi Torsion Axis in Nucleic Acids. *J Comput Chem.* 29: 2531-2542, 2008.
- 5) Katagiri D, Fuji H, Neya S, Hoshino T. Ab initio Protein Structure Prediction with Force Field Parameters Derived from Water Phase Quantum Chemical Calculation. *J Comput Chem.* 2008 Sep;29(12):1930-44.
- 6) Hoshino T, Iwamoto K., Ode H., Ohdomari I. Accurate evaluation method of molecular binding affinity from fluctuation frequency, *Jpn. J. Appl. Phys.* 47: 3719-3725, 2008.



研究課題：「薬剤耐性 HIV の動向把握のための調査体制確立及びその対策に関する研究」

課題番号：H19-エイズ一般-007

研究代表者：杉浦 互（国立感染症研究所 エイズ研究センター 研究員）

研究分担者：森原 健（国立病院機構南都病棟 薬剤科科長）、加藤真吾（慶應義塾大学医学部微生物免疫学教室 助教）、仲宗根 正（国立感染症研究所 エイズ研究センター 第1研究グループ 主任研究官）、石ヶ坪良明（横浜市立大学医学部医学部 教授）、伊藤俊広（国立病院機構仙台医療センター 血液内科 医長）、湯水博之（国立国際医療センター エイズ治療・研究開発センター 室長）、金田次弘（国立病院機構名古屋医療センター 臨床研究センター 客員研究員）、小池隆夫（北海道大学大学院医学研究科病態制御学講座 教授）、巽 正志（国立感染症研究所 エイズ研究センター 第2室 室長）、藤井 毅（東京大学医学部研究所 先端医療研究センター 助教）、白飯琢磨（国立病院機構大阪医療センター HIV/AIDS 先端医療開発センター センター長）、福武勝幸（東京医科大学医学部臨床検査医学科 教授）、上田幹夫（石川県立中央病院 血液病治療部 部長）、南 留美（国立病院機構九州医療センター 感染症対策室 医師）、田邊嘉也（新潟大学医学部総合病院 第2内科 助教）、貞升健志（東京都健康安全研究センター 微生物部 副参事）、森 治代（大阪府立公衆衛生研究所ウイルス科 主任研究員）、松下修三（熊本大学エイズ学センター 病態制御分野 教授）、近藤真規子（神奈川県衛生研究所微生物部 主任研究員）、佐藤武幸（千葉大学医学部附属病院感染症管理治療部 准教授）、健山正男（琉球大学大学院医学研究科感染症病態制御学講座 准教授）、木村昭郎（広島大学原爆放射線医学研究所ゲノム疾患治療研究部門 血液内科 教授）、原 孝（茨城県衛生研究所 主任研究員）

## 1. 研究目的

本研究は我が国における薬剤耐性 HIV の発生動向の把握とその増加を抑制するために必要な対応を明確にすることを目的とし、その達成のために以下4項目の研究に取り組む。

(1) 薬剤耐性調査研究：これは本邦における新規 HIV/AIDS 診断症例および既治療症例における薬剤耐性 HIV の発生動向の把握と調査体制確立を目標とする研究で、薬剤耐性 HIV の現状を正確に把握するために必要である。(2) 薬剤耐性 HIV 発生機序の解析研究：これは薬剤耐性 HIV の伝播形式などの解明を目標とする研究で、調査情報の質を高め、疫学状況の理解を深めるために必要である。(3) 薬剤耐性検査の質的管理：これは薬剤耐性 HIV 検査の外部精度管理と検査標準化を目標とする研究で、全国同質の薬剤耐性検査の実施を実現するために必要な研究である。(4) 薬剤血中濃度測定研究：これは薬剤耐性血中濃度測定検査の提供と情報発信を目標とする研究で、適切な抗 HIV 療法を実践し、薬剤耐性の発生を抑えるために必要な研究である。

## 2. 研究方法

研究全期間を通じて協力施設を増やし調査対象の拡大を目指し国内を網羅する調査ネットワークの完成を目指していく。研究協力は研究分担者の推薦・紹介を通じて募っていくほか、研究班のホームページ (HP) を開設し、調査情報の発信と協力受付等を行う。収集する疫学情報の質と量を上げてより詳細な実態の把握を目指していく。

(1) 薬剤耐性調査研究：新規診断症例の捕捉とその薬剤耐性検査およびサブタイピングを実施する。薬剤耐性検査については従来のプロテアーゼと逆転写酵素領域に加えて、新薬の標的であるインテグラーゼ領域の解析も実施する。遺伝子解析方法は参加施設毎に若干の相違があるが、いずれの施設も研究班が過去に実施した2回のヴァリデーシオンに参加し、その精度が担保された方法を用いている。治療を受けている症例の薬剤耐性に関しては平成19年度に実施した予備調査に基づき、リストアップされた多剤耐性症例についてより詳細な情報を入手し、多剤耐性にいたる背景、臨床経過、遺伝子配列の変化について解析を進めていく。新規診断症例、耐性症例ともに収集した遺伝子情報を管理するデータベースを完成させる。

(2) 薬剤耐性 HIV 発生機序の解析研究：HIV 感染症は感染成立時に特徴的な自覚兆候がないため感染時期の特定が困難な疾患である。しかし現在発生している新たな感染の状況を理解するには感染時期の特定・推測とその情報が必須である。本研究では米国 CDC が開発した血清中の HIV

特異的 IgG の総量から感染時期を推測する BED アッセイを調査のルーチン検査項目として実施し、捕捉した新規診断症例を最近感染した症例と慢性感染症例に分類して比較する。研究班では主に医療機関で診断の確定した症例を調査対象としているが、一部施設では医療機関に到達するより早いサンプリングポイントである確認検査で陽性となった検体も対象に調査を実施している。これら二つのラインで採取される検体の相違を比較・考察し新規な感染の動向に迫りたい。また通常の薬剤耐性検査法では検出できない、潜在する薬剤耐性ウイルスの検出法を定量 PCR、LC/MS を基盤に開発を進めており、調査項目に加えていく。

(3) 薬剤耐性検査の質的管理：平成19年度に研究班実用校正サンプルとして作製した感染性クローンを用いた薬剤耐性検査実施機関に送付し、其々の施設毎のプロトコルに則って薬剤耐性遺伝子検査を実施してもらう。その結果を元にプロテアーゼ、逆転写酵素、インテグラーゼ各領域の研究班推奨基準測定法の作成を進める。(4) 薬剤血中濃度測定研究：HP を介しての検査受付と情報発信を行う。さらに研究班で提案された非侵襲且つアトピアランスを客観的に評価する毛髪検査、唾液による血中濃度の推定などの新たな技術開発をさらに進める。

(倫理面への配慮)

実施に当たっては疫学研究に関する倫理指針（平成19年8月16日改定）で定めた倫理規定等を遵守すると共に必要に応じて施設毎の倫理委員会の承認を得るものとする。薬剤耐性 HIV の発生機序に関する研究では実施にあたり臨床研究に関する倫理指針（平成16年厚生労働省告示第459号）で定めた倫理規定等を遵守するとともに、必要に応じて施設毎の倫理委員会の承認を得るものとする。本研究は国立感染症研究所倫理委員会の承認を得ている。

## 3. 研究結果

研究班2年目として以下の成果を挙げた。

(1) 薬剤耐性調査研究：平成20年上半期（1月～9月）で新規感染症例371例の薬剤耐性検査を実施した。解析症例のプロファイルは性別（男：353例、女：17例）、感染経路（同性間：194例、異性間：54例、同異性間：6例、不明：23例）、サブタイプ（B：333例、AE：18例、C：4例、AG：5例、その他：3例）であった。薬剤耐性変異に関しては全体29例（7.8%）、NRTI：12例（3.2%）、NNRTI：11例（3.0%）、PI：6例（1.6%）であった。治療症例の薬剤耐性に関しては平成19年度に実施した予備調査をもとに感染研究で過去に薬剤耐性と診断された症例の追跡調査および全国60施設を対象にしたアンケートによる現状調査を実施した。追跡調査では3クラス耐性に陥った症例で

はサルベージ療法の成功率が低いことと、死亡率も高いことが明らかになった。またアンケート調査からは新規薬剤を使用する必要のある薬剤耐性症例の頻度が約 2%であることを明らかにした。

(2) 薬剤耐性 HIV 発生機序の解析研究: 平成 20 年度は 74% の症例に対して BED アッセイを実施した。昨年同様実施検体の 30% 前後の症例が BED 陽性と判定された。潜在的な薬剤耐性ウイルスを検出するために定量 PCR 等を用いた検出法を調査に導入するために昨年度末から本年度上半期にかけて研究協力者一名を米国 CDC に派遣し、共同研究として CRF01\_AE の主要な耐性変異 (PR:L90M, RT:M41L, K65R, K70R, K103N, Y181C, M184V, T215Y/F) を検出する方法を開発した。既に CDC で開発されているサブタイプ B の測定系と合わせて調査への導入を検討している。このほか新たな手法として LC-MS を応用した微小集団の検出法を開発した。PR:L90M, RT:K103N, M184V, T215Y 其々の変異について作成し、0.1~1% 程度の微小集団の検出に成功した。今後二つの方法の比較検討を行い、調査に合致した方法を調査に取り入れていく。

(3) 薬剤耐性検査の質的管理: 平成 19 年度に研究班実用構成サンプルとして作成した感染性クローンを独自の検査プロトコルを持つ薬剤耐性検査実施 4 機関 (公的機関 2 か所、検査会社 2 か所) に送付し、解析結果を比較検討し、研究班推奨基準測定操作法を決定した。

(4) 薬剤血中濃度測定研究: 平成 20 年度 11 月までに 7648 件の HP へのアクセスがあり、また 638 件の検査が行われた。平成 20 年に新たに承認されたインテグラーゼ阻害剤については現在測定法を検討中である。また血中濃度が高く維持されている症例を対象にロピナビル・リトナビル (LPV/r) の服薬を 1 日 2 回、1 回 2 錠投与 (BID) を 1 日 1 回、1 回 4 錠投与 (QD) に切り替えたときの安全性と有効性について検討を行った。その結果 QD に切り替えても安全性と有効性を確認することができた。

#### 4. 考察

欧米各国からの報告では新規 HIV/AIDS 診断症例の 15% 以上に何らかの耐性変異を持つものが認められ、初回治療の薬剤の選択に大きな障害となりつつある。わが国では平成 15 年から新規 HIV/AIDS 診断症例における薬剤耐性変異の全国調査を実施しているが、平成 15 年: 4.9%、16 年: 5.5%、17 年: 6.4%、18 年: 6.6%、19 年: 9.1% とこの 5 年間で観察頻度がほぼ倍増しており、診断時に薬剤耐性検査を実施することの重要性とモニタリングを継続することの必要性について昨年報告した。本年度は本抄録執筆時点で平成 20 年度上半期 380 例の新規感染者のデータを収集しており、最終的には昨年度同様に 500 症例前後の収集が見込まれる。現時点での薬剤耐性変異の観察頻度は 7.8% となっており、昨年度よりは低い頻度となっている。興味深い点としては NNRTI 耐性変異の検出頻度が上がってきていることである。過去 5 年間の調査では耐性変異観察頻度は NRTI>PI>NNRTI の順位で推移しており、このパターンは我が国の特徴でもあった。しかし 2008 年におけるデータでは NRTI>NNRTI>PI と NNRTI と PI の順位が逆転している。当然のことながら治療患者における処方新規感染者で観察される薬剤耐性変異のパターンにも影響を及ぼしているはずで、PI よりも遅く承認された NNRTI の影響が観察される時期に来ていると推測される。感染経路と薬剤耐性の観察頻度であるが、同性間の接触で 2.7%、異性間で 1.1% と今年と同様で多く観察された。昨年度は反対に異性間で多く観察されており、現在までの調査では年によって傾向が異なり、特に薬剤耐性の伝播と強く関連するリスクファクターは明確ではない。薬剤耐性 HIV 発生機序の解析研究が進んでいる BED アッセイは擬陽性が多いため、次年度からは改良版である avidity assay を取り入れ

ることとした。治療中の HIV/AIDS 症例における薬剤耐性 HIV の状況調査からは薬剤耐性が HIV 感染症の予後を決める大きな因子であること、HAART 以前より治療を受けてきた症例で深刻なことが浮き彫りにした。

#### 5. 自己評価

1) 達成度について: 新規診断症例における薬剤耐性 HIV の調査研究および治療患者における薬剤耐性の現状調査は研究班の目標を達成したと考えている。薬剤耐性 HIV 発生機序の解析研究については BED アッセイの実施率が 7 割を超えており、目標は達成したと考えている。また潜在的な薬剤耐性の検出法の開発については CDC が開発した方法の導入や、LC/MS を利用した方法を開発したが、まだ臨床検体での評価には到達しておらず、今年度の目標は完全には達成できなかった。薬剤耐性検査の標準法の策定作業は本年度で検査標準物質と研究班推奨基準測定操作法を決定し、目標は達成した。血中濃度測定研究については昨年度登場したダルナビルの測定法も完成し、臨床現場において十分に活用されており、本研究班の使命は完全に達成したと考えている。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について: 新規 HIV/AIDS 診断症例における薬剤耐性 HIV の頻度を明らかにしたことは HIV/AIDS の疫学動向を理解するうえで学術的に意義がある。また薬剤耐性 HIV 発生機序の解析研究とあわせて増加しつつある HIV/AIDS の予防対策などの戦略を立てる上でも重要な情報であり、その社会的意義は大きい。薬剤耐性検査の質的管理研究は、国内何処でも同質の薬剤耐性検査を受けられることを目指しており、その臨床的・社会的意義は大きい。また他国を見てもこのような取り組みは稀であり他国の範となる仕事である。治療薬剤血中濃度測定は至適治療を行う上での有用な情報として臨床現場で活用されており、その社会的意義は大きい。

3) 今後の展望について: 薬剤耐性調査研究では捕捉集団の偏りが序々に表れてきており、「外国人」と「女性」の捕捉率が動向委員会で報告されている集団より少ない傾向にある。今後は偏りを補正する形で参加施設を充実させたい。近年の動向として、バイセクシュアルが若年者で増えており、今後このリスク集団が同性間の性感染症として推移している我が国の HIV 感染症を女性に繋げてしまう危険がある。その警戒のためにも女性の感染症例の捕捉と感染に至る背景因子を探ることは重要と考えられる。薬剤耐性検査の質的管理では研究班推奨基準測定法が決まったことから今後は外部精度管理の定期的な実施を目指していきたい。

#### 結論

2008 年に新規に HIV/AIDS 診断がなされた 371 例について解析を行った。その結果、7.8% に薬剤耐性 HIV が確認された。平成 19 年の同頻度 9.3% と比較すると低い値だが、まだ上半期の結果であり最終的なものではない。また、アンケート調査からは薬剤耐性 HIV が HIV/AIDS の予後を左右する大きな因子であることが改めて確認され、保険取扱いにより民間検査会社で行われるようになった薬剤耐性検査の結果を効率よく収集し、疫学的研究および予防啓発活動に活用していく体制の構築が重要と考えられた。

#### 7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

##### 特許出願

1) 発明の名称: 遺伝子変異検出システム及び遺伝子変異検出方法。発明者: 加藤真吾、須藤弘二。  
発願年月日: 平成 20 年 5 月 19 日。  
出願番号: 特願 2008-131243 号。

## 研究発表

## 研究代表者

## 杉浦 互

- 1) Harrigan PR, Kantor R, Shafer R, Vandamme AM. non-B Workgroup. Bayesian network analyses of resistance pathways against efavirenz and nevirapine. *AIDS*. Oct 18;22(16):2107-15, 2008.
- 2) Furuya K, Omura M, Kudo S, Sugiura W, Azuma H. Recognition profiles of microsporidian *Encephalitozoon cuniculi* polar tube protein 1 with human immunoglobulin M antibodies. *Parasite Immunol*. Jan;30(1):13-21,2008.
- 3) S Yoshida, H Gatanaga, T Itoh, M Fujino, M Kondo, K Sadamasu, T Kaneda, F Gejyo, T Shirasaka, H Mori, M Ueda, N Takata, R Minami, W Suigura and the Japanese Drug Resistance HIV-1 Surveillance Network. Prevalence of drug resistance associated mutations in newly diagnosed HIV/AIDS patients in Japan from 2003-2007. *Antiviral Therapy*. 13(3):A162, 2008.

## 研究分担者 藤井 毅

- 4) 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*. Mar;80(3):373-82, 2008.

## 栗原 健

- 5) 小田原 隆, 中村哲也, 今村顕史, 湯永博之, 栗原 健, 古西 満, 立川夏夫, 藤井 毅, 白阪琢磨, 平成19年度厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業「抗 HIV 治療ガイドライン」, 2008.

## 湯永博之

- 6) 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 and Infection*. Vol.10 (689-698), 2008.
- 7) Gatanaga H, Honda H, Oka S. Pharmacogenetic information derived from analysis of HLA alleles. *Pharmacogenetics*. Vol.9 (207-214),2008.
- 8) Hayashida T, Gatanaga H, Tanuma J, Oka S. Effects of low HIV-1 load and antiretroviral treatment on IgG-capture BED-enzyme immunoassay. *AIDS Research and Human Retroviruses*. Vol.24 (495-498), 2008.
- 9) Hachiya A, Kodama E, Sarafianos SG, Schuckmann MM, Sakagami Y, Matsuoka M, Takiguchi M, Gatanaga H, Oka S. Amino acid mutation N348I in the connection subdomain of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase confers multiclass resistance to nucleoside and nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Journal of Virology*. Vol.82 (3261-3270),2008.

## 石ヶ坪良明

- 10) Naganawa S, Yokoyama M, Shiino T, Suzuki T, Ishigatsubo Y, Ueda A, Shirai A, Takeno M, Hayakawa S, Sato S, Tochikubo O, Kiyoura S, Sawada K, Ikegami T, Kanda T, Kitamura K, Sato H. Net positive charge of HIV-1 CRF01\_AE V3 sequence regulates viral sensitivity to humoral immunity. *PLoS ONE*. Sep 12;3(9):e3206,2008.

## 南 留美

- 11) Minami R, Takahama S, Ando H, Miyamura T, Suematsu E, and Yamamoto M. Human herpesvirus 8 DNA load in the leukocytes correlates with thrombocytopenia in HIV-1 infected individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses*. (in press)

## 田邊嘉也

- 12) S.Dohmae, T. Okubo, W. Higuchi, T. Takano, H. Isobe, T. Baranovich, S. Kobayashi, M. Uchiyama, Y. Tanabe, M. Itoh, T. Yamamoto: *Bacillus cereus* nosocomial infection from reused towels in Japan. *J. Hosp Infect* 2008 *Journal of Hospital Infection*. 69, 361e367,2008.

## 白阪琢磨

- 13) Kwashima Y, Satoh M, Oka S, Shirasaka T, Takiguchi M. Different immunodominance of HIV-1-specific CTL epitopes among three subtypes of HLA-A 26 associated with slow progression to AIDS. *BBRC* 366:612-616, 2008.
- 14) Kuwahara T, Makie T, Yamamoto Y, Yoshino M, Yagura H, Sano T, Kojima K, Higasa S, Shirasaka T. Burden on AIDS-specialist Hospitals in Japan, Based on the Number of Patients Taking Anti-HIV Drugs. *Pharmaceutical Regulatory Science*. 39(7):421-426, 2008.
- 15) Sasakawa A, Yamamoto Y, Yazima K, Sakai M, Uehira T, Shirasaka T, Makie T. Liposomal amphotericin B for a case of intractable cryptococcal meningoencephalitis and immune reconstitution syndrome, *The Journal of Medical Investigation*. 55(3,4):292-296, 2008.

- 16) Kwashima Y, Satoh M, Oka S, Shirasaka T, Takiguchi M. : Different immunodominance of HIV-1-specific CTL epitopes among three subtypes of HLA-A 26 associated with slow progression to AIDS, *BBRC*366:612-616, 2008.

#### 森 治代

- 17) 森 治代, 小島洋子, 川畑拓也, 後藤哲志. 未治療 HIV-1 感染者に検出された V108I 変異が efavirenz 耐性誘導に及ぼす影響. *日本エイズ学会誌*. 10:184-190,2008.  
 18) Yoko Kojima, Takuya Kawahata, Haruyo Mori, Isao Oishi, Toru Otake, Recent Diversity of HIV-1 in Individuals who visited STI-related clinics in Osaka, Japan, *J. Infect. Chemotherapy*.14:51-55, 2008.

#### 小池隆夫

- 19) Oku K, Atsumi T, Bohgaki M, Amengual O, Kataoka H, Horita T, Yasuda S, Koike T. Complement activation in patients with primary antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis*. (in press)  
 20) Bohgaki T, Atsumi T, Koike T. Autoimmune disease after autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Autoimmun Rev* 7(3):198-203,2008

#### 近藤真規子

- 21) Kondo M, Sudo K, Tanaka R, Sano T, Sagara H, Iwamuro S, Takebe Y, Imai M, Kato S. Quantitation of HIV-1 group M proviral DNA using TaqMan MGB real-time PCR, *J. V. Meth*, in press.

#### 福武勝幸

- 22) Teruya K, Oka S, Fukutake K, Amano K, Furutani S, Hayashi K, Masaki Y, Kimura S. Evaluation of the COBAS ampliprep/COBAS TaqMan system for quantification of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA by real-time PCR. *Kansenshogaku Zasshi*. Jan;82(1):20-5,2008.

#### 松下修三

- 23) 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*.in press, 2008.  
 24) Ryo, A., Tsurutani, N., Ohba, K., Kimura, R., Komano, J., Nishi, M., Hiromi Soeda, 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 the intracellular trafficking and stability of HIV-1 Gag. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:294-299, 2008.

#### 上田幹夫

- 25) 小谷岳春, 青木剛, 上田幹夫, 山田三枝子. B型肝炎急性増悪に対し、TVD/EFVによる HAART が奏功した HIV/HBV 重複感染の一例. *日本エイズ学会誌*. 10 : 520, 2008.  
 26) 杉浦 互, 湯永博之, 吉田 繁, 千葉仁志, 伊藤俊広, 健山正男 他 43 名 2003-2007 年の新規 HIV-1 感染者における薬剤耐性頻度の動向. *日本エイズ学会誌*.10:545, 2008.

#### 健山正男

- 27) 杉浦 互, 湯永博之, 吉田 繁, 千葉仁志, 伊藤俊広, 健山正男 他 43 名 2003-2007 年の新規 HIV-1 感染者における薬剤耐性頻度の動向. *日本エイズ学会誌*.10:545, 2008.

#### 加藤真吾

- 28) Kuji, N., Yoshii, T., Hamatani, T., Hanabusa, H., Yoshimura, Y., and Kato, S. Buoyant density and sedimentation dynamics of HIV-1 in two density-gradient media for semen processing. *Fertil. Steril*. (in press)  
 29) Kondo, M., Sudo, K., Tanaka, R., Sano, T., Sagara, H., Iwamuro, S., Takebe Y., Imai, M., and Kato, S. Quantification of HIV-1 group M proviral DNA using TaqMan MGB real-time PCR. *J. Virol. Methods* (in press)  
 30) Tanaka, R., Hanabusa, H., Kinai, E., Hasegawa, N., Negishi, M., and Kato, S. Intracellular efavirenz levels in peripheral blood mononuclear cells from HIV-infected individuals. *Antimicrob. Agents Chemother*. 52(2):782-785, 2008

#### 佐藤武幸

- 31) 佐藤武幸. 小児科領域の院内感染 HIV/エイズにおける院内感染対策. *小児科* 49 : 733-738, 2008.

## 研究課題：薬剤耐性 HIV の発生機序とその制御方法に関する研究

課題番号：H19-エイズ-一般-001

研究代表者：佐藤裕徳（国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター 室長）

研究分担者：湯永博之（国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センター 室長）、遊佐敬介（熊本大学大学院医学薬学研究部 講師）、上野貴将（熊本大学エイズ学研究中心 准教授）、村上努（国立感染症研究所エイズ研究センター 室長）、西澤雅子（国立感染症研究所エイズ研究センター 研究官）、増田貴夫（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 准教授）、岡本尚（名古屋市立大学医学研究科 教授）、高折晃史（京都大学大学院医学研究科 講師）、足立昭夫（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 教授）、間陽子（理化学研究所 ユニットリーダー）、森川裕子（北里大学北里生命科学研究所 教授）

## 1. 研究目的

薬剤耐性 HIV の発生と蔓延は、世界が共有する重要課題となっている。科学的根拠に立脚した対策を講じるには、薬剤耐性 HIV の臨床、疫学、ウイルス学情報の収集と解析を組織的に進める必要がある。そこで本研究では、ウイルス学研究を担当し、薬剤耐性 HIV の監視と制御の基盤をつくる。

## 2. 研究方法

2つの研究の柱を設定し、12名で分担する。

## 研究代表者

1. 組織的にウイルス学研究を実施する枠組みを作り、まとめる。ウイルス学と他分野との境界領域分野を研究し、分担研究を支援する。
2. 柱1、2の研究には、蛋白質の立体構造の情報が重要となる。しかし、構造情報を実験のみで取得するには、膨大な時間がかかる。そこで計算科学を応用して、蛋白質の変異や修飾による構造変化などの情報を比較的短時間に取得する方法を研究し、分担研究に資する。
3. 柱1、2の研究には、HIV感染者の体内のウイルスの組成と変異の情報が重要となる。しかし、膨大な量の HIV 変異集団（準種）を包括的に解析する方法は、まだ無い。そこでゲノム科学、計算科学、ウイルス学の技術を活用して、感染者のウイルス準種の実態を包括的に解析するシステムの構築を進める。

## 研究分担者（11名）

1. 柱1、2を分担して研究する。主にウイルス学、分子生物学、生化学、細胞生物学の解析技術を用いる。
  2. 柱1では、耐性誘導実験等で耐性変異の種類と発生様式の情報を収集・解析し、耐性ウイルスの発生機序を明らかにすることで、耐性ウイルス監視の基礎を作る（湯永、西澤、村上、遊佐、上野）。
  3. 柱2では、各研究者固有の実験系を用いて細胞での HIV 複製機構を明らかにし、抗 HIV 薬開発と HIV/AIDS 動物モデル構築を進めることで、耐性ウイルス制御の基礎を作る（足立、増田、岡本、高折、間、森川）。
- 研究協力者：柱1と2に関連する研究を実施し、本研究を支援する（櫻木、駒野、三隅）。

## （倫理面への配慮）

ヒト由来臨床材料を使う研究は、関連機関の倫理審査会の承認を得て、提供者本人に十分な説明を行い、承諾を得た上で行う。動物実験は、研究機関の倫理審査会の審議を受け、承認を得て行う。組換え DNA 実験は、実験を実施する研究機関の承認を得て行う。

## 3. 研究結果

## 研究代表者（佐藤）

立体構造解析研究を実施し、HIV とカリシウイルスの研究成果（ウイルス学、蛋白質科学、疫学）、および HIV の共同研究成果[塩田 (Gag CA)、高折 (APOBEC3G)]を論

文に発表した。これにより、計算科学の手法は、病原体分子の構造解析に極めて有用で汎用性が高いことを示した。準種解析を目的として、①臨床試料中のウイルスゲノム情報の網羅的取得法、②準種の組成、頻度、動態などの解析法、③ 準種分子の立体構造の迅速解析法、④ 準種の活性の評価法、などを研究中。最終年度に臨床試料中のウイルス準種の解析を実施する。

## 研究分担者

柱1：HIV 薬剤耐性研究

(1) HIV 遺伝的多型の組合せによる耐性獲得(湯永)：Efavirenz 耐性誘導実験により、HIV-1 の遺伝的多型を併せもつウイルス (V106I/V179D) が出現した。この変異をもつウイルスを作製し、efavirenz と nevirapine 感受性が低下することを確認した。計算機を用いて HIV-1 逆転写酵素の efavirenz 結合部位の立体構造を解析し、この二つの変異が協調的にはたらき、efavirenz の親和性を低下させる可能性が明らかになった（感染研・佐藤らとの共同研究）。HIV は、体内で自然発生する多型を組み合わせて薬剤耐性を獲得する可能性がある。

(2) Darunavir 耐性の誘導(西澤)：Darunavir（多剤耐性症例のサルベージ療法用のプロテアーゼ阻害剤）は、薬剤耐性を誘起しにくい性質をもつ。このため、耐性変異の解析は遅れている。Amprenavir, Lopinavir, Atazanavir の3剤耐性ウイルスを分離し、Darunavir 耐性誘導実験を行ない、4剤耐性株の分離に成功した。この株は、M46I, I54V, V82F, L90M に加えて V32I 変異を獲得していた。

(3) CXCR4 阻害剤耐性の誘導(村上)：KRH3955（経口投与可能で CXCR4 機能を特異的に阻害）を用い、HIV-1 臨床分離株と薬剤耐性株への高い抗ウイルス活性を明らかにした。CXCR4 点変異体を用いて、CXCR4 上の薬剤結合部位を絞り込んだ。KRH-3955 とその誘導体（KRH-3148 など）を用いて耐性ウイルス誘導実験を開始・継続中。2008年12月現在、KRH-3148 については EC50 の10倍以上の濃度まで薬剤濃度を上昇させている。

(4) 治療薬変更後の耐性予測(遊佐)：治療中の HIV 感染者由来のプロテアーゼをもつ HIV ライブラリーを CD4<sup>+</sup>T 細胞に感染させ、プロテアーゼ阻害剤存在下で1週間培養して耐性ウイルスを選択した。ウイルスの配列を解析したところ、二例中一例で、実際の治療の結果生じた変異様式と一致した。治療薬変更後の耐性ウイルスの出現は、事前に *in vitro* で予測できる可能性がある。

(5) CTL の寛容性(上野)：薬剤耐性変異の発生様式を考える上で、変異抗原に対する CTL の寛容性を理解することは重要である。HIV 感染者から、様々な HLA-B35 拘束性抗原に特異的な CTL クローンを樹立し、抗原変異に対する応答を解析した。慢性感染期には、主要な CTL は抗原変異に対して優れた寛容性を示すことが分かった。慢性感染期では、CTL は、耐性変異の発生にも対応できると推察される。CTL を誘導する抗原ペプチド・HLA 複合体が持つ熱力学的特性を明らかにした。



## 柱2: HIV複製研究

(1) HIV種特異性の発現機構(足立): サル細胞で HIV-1 の馴化を進めた。増殖効率が向上したサル指向性 HIV-1 を用い、X4 および R5 ウイルスの分子クローンを樹立した。ゲノムシークエンスと変異導入解析により、増殖能向上に寄与した変異が Pol および Env 領域に生じていることがわかった。さらに、Gag-CA のヘリックス 6/7 ループ (TRIM5 $\alpha$ 認識部位) を SIVmac239 の相同領域と置換したウイルスは、サル細胞での増殖効率が向上した(阪大 微研・塩田教授らとの共同研究)。これらの変異・置換を持つ MN4S と MN5S はカニクイザル CD8(-)PBMC で SIVmac239 と同レベルで増殖した(医薬基盤研・明里博士らとの共同研究)。MN4S あるいは MN5S を感染させたアカゲザル細胞から、増殖効率が格段に向上した馴化型ウイルスクローンを得た。

(2) APOBEC3G 機能の調節機構(高折): APOBEC3G(A3G) のリン酸化による抗 HIV-1 活性調節機構を詳細に解析した。①プロテインキナーゼ A により A3G の Thr32 がリン酸化される、②リン酸化 A3G および偽リン酸化変異体 T32D は Vif による中和に抵抗性で、野生型 HIV-1 に対しても抗ウイルス活性を示す、③T32D が Vif 抵抗性になるのは、Vif との結合親和性が低下し、ユビキチン化を受けにくくなるためである、などを示した。A3G N 末端構造のコンピューターモデル解析と変異導入解析により、Thr32 と Arg24 の相互作用の強弱が Vif 結合能に重要な役割を果たすこと、Thr32 リン酸化は、この相互作用を強めることにより A3G に Vif 抵抗性を付与すること、などが示唆された(感染研・佐藤らとの共同研究)。

(3) HIV ゲノム逆転写の調節機構(増田): HIV-1 インテグラーゼが宿主蛋白質 Gemin2 との相互作用を介してウイルスゲノムの逆転写反応を促進し、ウイルスの複製を制御することを見出した。インテグラーゼと Gemin2 結合様式に関して細胞内発現系と組換え蛋白質を用いて詳細に解析した。その結果、Gemin2 との結合に重要なインテグラーゼのアミノ酸残基を2カ所同定した。

(4) HIV ゲノム情報の転写の調節機構(岡本): 細胞内の HIV プロウイルスを活性化するための要因を探索した。歯周病菌の培養上清中に検出される高濃度の酪酸に着目し、これを HIV 潜伏感染細胞株 OM10.1 (単球・マクロファージ) と ACH2 (T 細胞) に加えると著明なウイルス複製が生じることを見出した。酪酸添加により HIV プロウイルス DNA 周辺のアセチル化が促進され、ウイルス複製が活性化することを示した。HIV 感染者で歯周病の治療を進めることは病態進行の阻止に重要かもしれない。計算化学の手法を用いて Tat-TAR-CyclinT1 の複合体の立体構造を予測し、薬剤開発のための標的構造を推定した。

(5) HIV Vpr 機能の調節機構(間): HIV-1 Vpr が、宿主蛋白質 Imp $\alpha$  との相互作用を介して自身の核移行を促進し、ウイルスの複製を制御することを見出した。Vpr/Imp $\alpha$  相互作用を阻止する低分子化合物は、HIV-1 の複製を阻止することを示した。天然化合物ライブラリーをチップに固定化した化合物アレイを用い、Vpr 機能阻害剤スクリーニング系の構築を進めた。8799 種類の化合物に対して結合試験を行い、合計 16 種類の候補化合物を選定した。

(6) HIV Gag の輸送と膜集合の調節機構(森川): Efavirenz (EFV) には、HIV-1 の成熟 (Gag/Gag-Pol 前駆体蛋白質 processing) の促進活性がある。この作用機序を解析した。EFV は、HeLa 細胞において Gag processing を促進し、粒子産生を低下させた (IC<sub>50</sub>  $\leq$  0.1  $\mu$ M)。EFV 非存在下で Gag/Gag-Pol は形質膜局所に集積し、processing は集積部位でのみ認められた。一方、EFV 存在下では前駆体の processing が形質膜で均一におこり、細胞質でも

観察された。Gag processing 産物の膜結合は弱かった。EFV 存在下では Gag/Gag-Pol が形質膜で粒子に凝集する前に processing がおきたと考えられる。EFV が Gag-Pol 内の逆転写酵素領域に結合し、同分子内のプロテアーゼ領域の立体構造を変化させ、その 2 量体化 (活性化) を促進した可能性がある。研究が進めば、プロテアーゼ活性過剰促進型抗 HIV 薬開発の基礎ができる。

## 3. 考察

本研究は、薬剤耐性 HIV を監視し、制御するための基盤として、特に社会的、行政的に重要な基礎研究である。柱1の研究により、HIV の薬剤耐性変異の種類、発生様式、耐性発現の分子機構などの情報が蓄積する。HIV の薬剤耐性検査、疫学調査、薬剤治療、抗 HIV 薬開発等の実用研究の基礎となる。柱2の研究により、HIV の複製を制御する分子の実体と生化学的性質の情報が蓄積する。耐性 HIV の感染・増殖を阻止する新規抗 HIV 薬の開発研究、および基礎・臨床研究に用いる HIV/AIDS 動物モデル開発の基礎となる。柱1、2と研究代表者の研究を1つの組織で行うことで、薬剤耐性 HIV を監視し、制御するための基盤がより強固なものになる。

本研究により、エイズや C 型肝炎などの慢性持続感染症を研究するための新しい研究戦略の構築が進む。立体構造の迅速解析法の研究が進展すれば、変異による分子構造変化を比較的短時間に解析できるようになる。自然界での病原体の薬剤感受性、抗原性、感染性、増殖能、病原性などの変化を速やかに把握するのに役立つ。HIV 準種解析系の研究が進展すれば、感染者体内のウイルスを包括的に解析できるようになる。ウイルスの持続感染と病原性を理解するための重要な手がかりが得られる可能性がある。

## 5. 自己評価

## 1) 達成度について

計画通り、分担研究者による HIV の薬剤耐性と複製のウイルス学研究、および研究代表者の境界領域研究と分担研究の支援が順調に進行した。

## 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

学術的・国際的意義は、英文論文の報告状況 (*Nat. Struct. Mol. Biol.*, *J. Virol.* など) により自明である。世界的に懸念される公衆衛生問題に関わる基礎研究であることから、社会的、行政的意義も大きい。

## 3) 今後の展望について

最終年度は、引き続き HIV の薬剤耐性研究、複製研究、HIV/AIDS 動物モデル研究、立体構造解析研究を実施し、発展させる。臨床試料中の HIV 準種の解析を開始する。

## 6. 結論

境界領域分野の最新技術をウイルス学研究と関連づけ組織的に HIV/AIDS を研究する枠組みを作った。それぞれが担当する研究は、ほぼ計画通りに進んだ。これにより、薬剤耐性 HIV を監視し、制御するためのウイルス学研究の基盤強化が順調に進んだ。

## 7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

増田貴夫: インテグラーゼ N-末端領域を標的としたウイルス感染阻害剤: 特願 2006-239627、間陽子: ヒト免疫不全ウイルス感染阻害剤およびエイズの治療薬または予防薬: 特願 2008-087297、上野貴将: T 細胞受容体を模倣する抗体断片及びその製造方法: 特願 2008-135007、岡本尚: Tat 阻害剤の開発に関する特許 (申請中)。

## 研究発表

## 研究代表者

## 佐藤裕徳

- 1) Naganawa S, Yokoyama M, Shiino T, Suzuki T, Ishigatsubo Y, Ueda A, Shirai A, Takeno M, Hayakawa S, Sato S, Tochikubo O, Kiyoura S, Sawada K, Ikegami T, Kanda T, Kitamura K, Sato H. Net Positive Charge of HIV-1 CRF01\_AE V3 Sequence Regulates Viral Sensitivity to Humoral Immunity. *PLoS ONE*. 3(9):e3206, 2008.
- 2) Shirakawa K, Takaori-kondo A, Yokoyama M, Izumi T, Matsui M, Io K, Sato T, Sato H, Uchiyama T. Phosphorylation of APOBEC3G by protein kinase A regulates its interaction with HIV-1 Vif. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15:1184-1191, 2008.
- 3) Motomura K, Oka T, Yokoyama M, Nakamura H, Mori H, Ode H, Hansman GS, Katayama K, Kanda T, Tanaka T, Takeda N, Sato H, and the Norovirus Surveillance Group of Japan. Identification of Monomorphic and Divergent Haplotypes in 2006/2007 Norovirus GII/4 Epidemic Population by Genome-wide Tracing of Evolutionary History. *J. Virol.* 82:11247-11262, 2008.
- 4) Kubo Y, Yoshii H, Kamiyama H, Tominaga C, Tanaka Y, Sato H, and Yamamoto N. Ezrin, Radixin, and Moesin (ERM) Proteins Function as Pleiotropic Regulators of Human Immunodeficiency Virus Type 1 infection. *Virology*. 375:130-140, 2008.

## 研究分担者

## 湯永博之

- 1) Hachiya A, Kodama E, Sarafianos SG, Schuckmann MM, Sakagami Y, Matsuoka M, Takiguchi M, Gatanaga H, Oka S. Amino acid mutation N348I in the connection subdomain of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase confers multiclass resistance to nucleoside and nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors. *J. Virol.* 82:3261-3270, 2008.
- 2) Hayashida T, Gatanaga H, Tanuma J, Oka S. Effects of low HIV-1 load and antiretroviral treatment on IgG-capture BED-enzyme immunoassay. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 24: 495-498, 2008.
- 3) Gatanaga H, Honda H, Oka S. Pharmacogenetic information derived from analysis of HLA alleles. *Pharmacogenetics*. 9: 207-214, 2008.
- 4) 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 and Infection*. 10: 689-698, 2008.

## 遊佐敬介

- 1) Maeda Y, Yusa K, Harada S. Altered sensitivity of an R5X4 HIV-1 strain 89.6 to coreceptor inhibitors by a single amino acid substitution in the V3 region of gp120. *Antiviral Res.* 77: 128-135, 2008.

## 上野貴将

- 1) Tsukamoto T, Dohki S, Ueno T, Kawada M, Takeda A, Yasunami M, Naruse T, Kimura A, Takiguchi M, Matano T. Determination of a major histocompatibility complex class I restricting simian immunodeficiency virus Gag241-249 epitope. *AIDS* 22: 993-994, 2008.
- 2) Ueno T, Motozono C, Douki S, Mwimanzu P, Rauch S, Fackler OT, Oka S, and Takiguchi M. CTL-mediated selective pressure influences dynamic evolution and pathogenic functions of HIV-1 Nef. *J. Immunol.* 180: 1107-1116, 2008.

## 村上 努

- 1) Urano E, Aoki T, Futahashi Y, Murakami T, Morikawa Y, Yamamoto N, Komano J. Substitution of the myristoylation signal of human immunodeficiency virus type 1 Pr55Gag with the phospholipase C delta 1 pleckstrin homology domain results in infectious pseudovirion production. *J. Gen. Virol.* In press.
- 2) Tanaka T, Tsutsumi H, Nomura W, Tanabe Y, Ohashi N, Esaka A, Ochiai C, Sato J, Itotani K, Murakami T, Ohba K, Yamamoto N, Fujii N, Tamamura H. Bearing the cyclic pentapeptide scaffold: identification of the new pharmacophore. *Org. Biomol. Chem.* 6: 4374-4377, 2008.
- 3) Murakami T. Roles of the interactions between Env and Gag proteins in the HIV-1 replication cycle. *Microbiol. Immunol.* 52: 287-295, 2008.

## 岡本 尚

- 1) Asamitsu K, Yamaguchi T, Nakata K, Hibi Y, Victoriano A-F B, Imai K, Onozaki K, Kitade Y, Okamoto T. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by blocking Ikb kinase with noraristeromycin. *J. Biochem.* 144: 581-589, 2008.
- 2) Jadowsky K J, Huang Y, Nojima Geyer M, Okamoto T, Fujinaga K. Dominant negative mutant Cyclin T1 proteins inhibit HIV transcription by forming a kinase negative complex with Tat. *J. Gen. Virol.* 89: 2783-2787, 2008.
- 3) Jadowsky K J, Nojima M, Schulte A, Geyer M, Okamoto T, Fujinaga K. Dominant negative mutant Cyclin T1

proteins inhibit HIV transcription by specifically degrading Tat. *Retrovirology* 5 : 63, 2008.

- 4) Rimando M G, Chua M N, Yuson E, de Castro-Bernas G, Okamoto T. Prevalence of *gstm1*, *gstm1* and *nqo1* (609C>T) in filipino children with acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Bioscience Rep* 28 : 117-124, 2008.
- 5) Mitsuhashi S, Kishimoto T, Uraki Y, Okamoto T, Ubukata M. Low molecular weight lignin suppresses activation of NF- $\kappa$ B and HIV-1 promoter. *Bioorg. Med. Chem.* 16 : 2645-2650, 2008.
- 6) Gao N, Asamitsu K, Hibi Y, Ueno T, Okamoto T. AKIP1 enhances NF- $\kappa$ B-dependent gene expression by promoting the nuclear retention and phosphorylation of p65. *J. Biol. Chem.* 283 : 7834-7843, 2008.
- 7) Tomoda K, Takahashi N, Hibi Y, Asamitsu K, Ishida H, Kondo T, Fujii Y, Okamoto T. Molecular docking analysis of the protein-protein interaction between RelA-associated inhibitor (RAI) and tumor suppressor protein p53 and its inhibitory effect on p53 action. *Cancer Science* 99 : 615-622, 2008.

#### 高折晃史

- 1) Izumi T, Shirakawa K, Takaori-Kondo A. Cytidine deaminases as a weapon against retroviruses and a new target for antiviral therapy. *Mini-Reviews in Medical Chemistry* 8 : 231-238, 2008.
- 2) Shirakawa K, Takaori-kondo A, Yokoyama M, Izumi T, Matsui M, Io K, Sato T, Sato H, Uchiyama T. Phosphorylation of APOBEC3G by protein kinase A regulates its interaction with HIV-1 Vif. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15 : 1184-91, 2008.

#### 足立昭夫

- 1) Kamada K, Yamashita T, Hachio K, Adachi A, Nomaguchi M. Evasion from CypA- and APOBEC-mediated restrictions is insufficient for HIV-1 to efficiently grow in simian cells. *Microbes and Infection*. In press.
- 2) Morita D, Katoh K, Harada T, Nakagawa Y, Matsunaga I, Miura T, Adachi A, Igarashi T, Sugita M. Trans-species activation of human T cells by rhesus macaque CD1b molecules. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. In press.
- 3) Fujita M, Otsuka M, Nomaguchi M, Adachi A. Functional region mapping of HIV-2 Vpx protein. *Microbes and Infection* 10 : 1387-1392, 2008.
- 4) Hachio K, Kamada K, Yamashita T, Adachi A, Nomaguchi M. Replication potentials of *vif* variant viruses generated from monkey cell-tropic HIV-1 derivative clones NL-DT5/NL-DT5R. *Microbes and Infection* 10 : 1218-1222, 2008.
- 5) Yamashita T, Kamada K, Hachio K, Adachi A, Nomaguchi M. Identification of amino acid residues in HIV-1 Vif critical for binding and exclusion of APOBEC3G/F. *Microbes and Infection* 10 : 1142-1149, 2008.
- 6) Nomaguchi M, Fujita M, Adachi A. Role of HIV-1 Vpu protein for virus spread and pathogenesis. *Microbes and Infection* 10 : 960-967, 2008.
- 7) Yamashita T, Doi N, Adachi A, Nomaguchi M. Growth ability in simian cells of monkey cell-tropic HIV-1 is greatly affected by downstream region of the *vif* gene. *Journal of Medical Investigation* 55 : 236-240, 2008.
- 8) Fujita M, Otsuka M, Miyoshi M, Khamsri B, Nomaguchi M, Adachi A. Vpx is critical for reverse transcription of the human immunodeficiency virus type 2 genome in macrophages. *J. Virol.* 82 : 7752-7756, 2008.
- 9) Nomaguchi M, Doi N, Kamada K, Adachi A. Species barrier of HIV-1 and its jumping by virus engineering. *Reviews in Medical Virology* 18 : 261-275, 2008.

#### 間 陽子

- 1) Aida Y, Matsuda G. Role of Vpr in HIV-1 nuclear import: therapeutic implications. *Current HIV-1 Research*. In press.
- 2) Zhang X, Aida Y. HIV-1 Vpr: a novel role in regulating RNA splicing. *Current HIV-1 Research*. In press.

#### 森川裕子

- 1) Urano E, Aoki T, Futahashi Y, Murakami T, Morikawa Y, Yamamoto N, Komano J. Substitution of the myristoylation signal of human immunodeficiency virus type 1 Pr55<sup>Gag</sup> with the phospholipase C delta 1 pleckstrin homology domain results in infectious pseudovirus production. *J. Gen. Virol.* In press.
- 2) Kawada S, Goto T, Haraguchi H, Ono A, Morikawa Y. Dominant negative inhibition of human immunodeficiency virus particle production by the non-myristoylated form of Gag. *J. Virol.* 82 : 4384-4399, 2008.
- 3) Urano E, Shimizu S, Futahashi Y, Hamatake M, Morikawa Y, Takahashi N, Fukazawa H, Yamamoto N, Komano J. Cyclin K/CPR4 inhibits primate lentiviral replication by inactivating Tat/P-TEFb-dependent LTR transcription. *AIDS* 22 : 1081-1083, 2008.
- 4) Yamayoshi S, Noda T, Ebihara H, Goto H, Morikawa Y, Lukashevich I S, Neumann G, Feldmann H, Kawaoka Y. Ebola virus matrix VP40 protein uses the COPII transport system for its intracellular transport. *Cell Host Microbe* 3 : 168-177, 2008.
- 5) 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 L, 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. USA* 105 : 294-299, 2008.

研究課題：多剤耐性 HIV における将来的な変異・構造予測と新規抗 HIV 薬開発

課題番号：H19-エイズ-若手-003

主任研究者：川下 理日人（大阪大学大学院薬学研究科 助教）

分担研究者：岡本 晃典（大阪大学大学院薬学研究科 助教）、中村 昇太（大阪大学微生物病研究所 タイ感染症共同研究センター 特任助教）、後藤 直久（大阪大学微生物病研究所附属遺伝情報実験センター 助教）、U. Chandimal de Silva（大阪大学微生物病研究所 タイ感染症共同研究センター 特任研究員）

## 1. 研究目的

HIV は変異速度がきわめて速く、阻害剤耐性株の生じやすいウイルスであるため、多剤耐性ウイルスが出現し、既存の HAART に限界が生じると予想される。そのような状況に対処すべく、既存の抗 HIV 薬の改変や新しい作用機序を有する抗 HIV 薬の開発が急務となっている。

そこで、これらの耐性変異が生じる位置・構造変化を前もって予測することができれば、耐性ウイルス出現時にも速やかに新規阻害剤を設計することが可能となる。また、その耐性を計算科学的に速やかに評価することにより、HAART における薬剤選択にも有用となる。よって、本研究ではそのような背景下、以下の6つの項目に沿って研究を行う。

①耐性ウイルスに対する網羅的配列解析と変異傾向の把握 ②多剤耐性ウイルス蛋白質に対する構造予測および阻害剤予測 ③今後起こりうる耐性変異の予測とそれら変異蛋白質の構造予測 ④構造未知蛋白質の X 線結晶構造解析 ⑤膜融合阻害剤等、新規作用機序を有する抗 HIV 薬の分子設計 ⑥ドッキングスタディを活用した薬剤耐性の評価法確立

本年度は前年度の結果を利用して、CRF01\_AE の薬剤耐性出現の傾向を系統樹解析により調査し、定量的構造活性相関 (QSAR) を用いて、プロテアーゼ阻害剤と薬剤感受性との関連を検討した。また、膜融合阻害剤では、前年度の計算により候補となったペプチドを購入し、実験的な評価を行った。

## 2. 研究方法

<プロテアーゼ阻害剤・系統解析>

前年度に解析を行った HIV-1 CRF01\_AE プロテアーゼ配列のうち、日本とタイ由来の株に着目し、MAFFT によるアライメント後、MEGA 4.0 にて系統樹を作成した。次に、この系統樹上に薬剤耐性データを対応した。

なお、薬剤耐性変異データは Los Alamos HIV Databases 中の Resistance Database および Stanford University による HIV Drug Resistance Database 中の HIVdb program を用いた。

<プロテアーゼ阻害剤・定量的構造活性相関 (QSAR) >

10 種の CRF01\_AE プロテアーゼにおける実験データと、9 種の FDA 認可阻害剤における構造記述子（構造の特性を表す）を用いて QSAR 式（構造と活性の相関を表す）を構築した。構造記述子は二次元記述子・三次元記述子合わせて 232 種類算出し、ここから分散が 0 となるもの、記述子間の相関係数が 0.8 以上かつ実験値との相関性が低いものを除外した。残った記述子を用いて PLS (Partial Least Square) を行い、QSAR 式を構築した。なお、実験データは研究協力者の亀岡正典特任准教授より入手し、QSAR 式の計算には MOE (CCG 社) を用いた。

<膜融合阻害剤>

前年度で得た C-HR 類似ペプチドのうち、既知阻害剤よりエネルギーが安定なものを抽出し、MOE を用いた分子動力学法により N-HR と C-HR との相互作用エネルギーを計算した。次に、相互エネルギーが高いものからランダムに 10 個選択し、合成ペプチドを購入した。

これら 10 種のペプチドと対照ペプチド T-20 を用いて、8 種の CRF01\_AE 型ウイルスに対し、実験的な評価を行った。なお本実験は、研究協力者の亀岡正典特任准教授が行ったものである。

(倫理面への配慮)

配列解析や系統解析、および計算化学的手法を用いた分子設計に関しては、ヒトの遺伝子や個人情報等の利用がないため、考慮する必要はない。もし、研究協力者がウイルス関係の実験を行うに当たって、個人の血液サンプル等を用いる場合は、倫理委員会の規定に則り、担当研究者以外にその個人情報が漏れないよう十分配慮する。

## 3. 研究結果

<プロテアーゼ阻害剤・系統解析>

系統解析の結果、薬剤耐性を有するウイルスは 3 つのクラスターに分類された。また、クラスター中での共通配列を参照配列と比較したところ、2 つのクラスターでそのア

ミノ酸が異なっていることがわかった。

＜プロテアーゼ阻害剤・定量的構造活性相関 (QSAR) ＞

計算された QSAR 式の相関を見たところ、10 種のうち 9 種のウイルス株に対して良好な QSAR 式が得られた。また、ダルナビルは他の阻害剤と異なる作用を有することが報告されているため、これを除外した 8 種の阻害剤を用いて同様の検討を行ったところ、全ウイルス株に対して良好な QSAR 式が得られた。

＜膜融合阻害剤＞

購入した 10 種類のペプチドのうち、6 種に関してはほとんど活性がなかった。しかし、1 種は 2 つのウイルス株に対して、2 種は 4 つのウイルス株に対して T20 と同程度の活性がみられた。さらに、もう 1 種のペプチドでは、全ウイルス株に対して T20 と同程度の活性がみられた。

#### 4. 考察

＜プロテアーゼ阻害剤・系統解析＞

基本的に FDA 承認が古い薬剤ほど薬剤耐性が高かったが、興味深いことにタイではプロテアーゼの利用が少ないにも関わらず、未使用の阻害剤に対する耐性傾向が観測された。このことは、薬剤耐性ウイルスが国外からもたらされたのではないかと示唆される。

＜プロテアーゼ阻害剤・定量的構造活性相関 (QSAR) ＞

上記で得られた QSAR 式を解析した結果、分子の形状、正電荷に関係する構造記述子が重要であることがわかった。これはプロテアーゼ阻害剤に重要となる残基が負電荷をもつアスパラギン酸であることから、妥当であると考えている。

＜膜融合阻害剤＞

最も活性のあるペプチドの配列を調べたところ、ヘリックスの外側部分を中心に改変したものであった。すなわち、ヘリックスをより強固にすることで、内側ヘリックスとの相互作用の際に構造が崩れず、より強い相互作用が維持できるのでは無いかと考えている。

#### 5. 自己評価

##### 1) 達成度について

本年度は前年度に行ったプロテアーゼの配列解析データを利用し、系統樹による薬剤耐性の解析を完了した。これは、耐性変異予測における基盤を構築したこととなる。また、構造活性相関解析でも良好な結果を示した。このことは、薬剤耐性ウイルスに本手法を適用後、その結果を利用することで阻害剤予測の基盤になると考えられる。一方、ドッキングスタディや X 線結晶構造解析に関しては進展しておらず、次年度早急に解決する必要がある。膜融合阻

害剤に関しては、一度目の検討にして T20 と同等の活性を得ることができた。

以上を総合して本年度の達成度を考えると、①、⑤、⑥はほぼ予定通り、②、③、④は若干低いが、それらの基盤となる研究を本年度行ったことにより、次年度これらの課題に取り組み易くなったため、全体の達成度としてはほぼ予定通り進行していると考えている。

##### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

プロテアーゼに関する薬剤耐性情報の蓄積は、今後出現する変異ウイルスの薬剤耐性を見積もる良い指標となると考えられる。本研究では、種々の計算科学的なアプローチを行ってこれらを考慮しており、多方面から早期の治療対策を提示できると考えている。膜融合阻害剤は認可数が少ないため、より強い活性を有し、T20 耐性ウイルスにも有効なペプチドを設計することで、エイズ治療により大きく貢献できると考えている。

##### 3) 今後の展望について

プロテアーゼの系統解析では、選択圧の計算など、より詳細な解析を行うことで、薬剤耐性の鍵となる変異を見出すことができると考えている。さらに、その知見を利用して、将来的な変異予測や阻害剤予測にも展開していきたい。

QSAR 解析では、本年度に得られた知見を薬剤耐性ウイルスにも適用し、構造記述子上でどのような差が見出されるかを検討したい。これらの情報を利用することで、薬剤耐性プロテアーゼに対する阻害剤設計の鍵が見出されたと考えている。

膜融合阻害剤では、今年度の結果を計算機により解析することで、どのような相互作用が重要かを調査し、ヘリックスの内側を修飾したより強力な阻害剤を設計したい。

#### 6. 結論

今回我々は、系統解析・構造活性相関など、計算機を用いた手法を利用して、薬剤耐性プロテアーゼに関する情報を得た。また、膜融合阻害剤に関しては、分子動力学計算で得た結果をもとに設計したペプチドを用いて実験的な評価を行い、T20 と同等程度の活性を得ることができた。

今年度までの検討結果を活用して、薬剤耐性を有するウイルスの情報提供、薬剤耐性を有するウイルスに対抗できる阻害剤の開発を行い、今後もエイズ治療対策への貢献を行っていきたい。

#### 7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

現在のところ、知的所有権の出願・取得予定はない。

## 研究発表

## 主任研究者

川下 理日人

## 原著論文による発表

## 欧文

- 1) Sakudo A., Baba K., Tsukamoto M., Sugimoto A., Okada T., Kobayashi T., Kawashita N., Takagi T., Ikuta K. Anionic polymer, poly(methyl vinyl ether-maleic anhydride)-coated beads-based capture of human influenza A and B virus, *Bioorg. Med. Chem.* in press.
- 2) Ohgaru T., Shimizu R., Okamoto K., Kawashita N., Kawase M., Shirakuni Y., Nishikiori R., Takagi T. Enhancement of Ordinal CoMFA by Ridge Logistic Partial Least Squares. *J. Chem. Inf. Model.* **48**, 910–917, (2008).
- 3) Nishikiori R., Makino Y., Ochi Y., Yamashita N., Okamoto K., Kawashita N., Takahara J.-i., Yasunaga T., Takagi T., Kawase M. Development of Fingerprint Verification Type Self-Organized Map Applied to Profiling Seized Methamphetamine. *J. Comput. Aided Chem.*, **9**, 30–36, (2008)

## 総説・解説

## 和文

- 1) 川下理日人, 目指せ! 第2世代のインテグラーゼ阻害剤, *ファルマシア*, **44**, 1216–1217, (2008).

## 分担研究者

岡本 晃典

## 原著論文による発表

## 欧文

- 1) Kanbayashi Y., Nomura K., Fujimoto Y., Yamashita M., Ohshiro M., Okamoto K., Matsumoto Y., Horiike S., Takagi T., Ishida Y., Taniwaki M. Risk Factors for Infection in Haematology Patients Treated with Rituximab. *European J. Haematology*, **82**, 26–30, (2009).
- 2) Kanbayashi Y., Okamoto K., Ogaru T., Hosokawa T., Takagi T., Statistical validation of the relationships of cancer pain relief with various factors using ordered logistic regression analysis. *Clinical J. Pain*, in press.
- 3) Kanbayashi Y., Nomura K., Fujimoto Y., Shimura K., Shimizu D., Okamoto K., Matsumoto Y., Horiike S., Shimazaki C., Takagi T., Taniwaki M. Population Pharmacokinetics of Itraconazole Solution Used as Prophylaxis for Febrile Neutropenia. *Int. J. Antimicrobial Agents*, **31**, 452–457, (2008).
- 4) Ohgaru T., Shimizu R., Okamoto K., Kawase M., Shirakuni Y., Nishikiori R., Takagi T., Ordinal Classification Using Comparative Molecular Field Analysis *J. Chem. Inf. Model.* **48**, 207–212, (2008).

中村 昇太

## 原著論文による発表

- 1) Lin L., Nakano H., Nakamura S., Uchiyama S., Fujimoto S., Matsunaga S., Kobayashi Y., Ohkubo T., Fukui K. Crystal structure of *Pyrococcus horikoshii* PPC protein at 1.60 Å resolution, *Proteins*, **67**, 505–507, (2007).
- 2) Li S. M., Li G. M., Nakamura S., Ikuta K., Nakaya, T. Reduced incorporation of SARS-CoV spike protein into viral particles due to amino acid substitutions within the receptor binding domain,

*Jpn. J. Infect. Dis.* 61, 123–127, (2008).

- 3) Nakamura S., Maeda N., Miron I. M., Yoh M., Izutsu K., Kataoka C., Honda T., Yasunaga T., Nakaya T., Kawai J., Hayashizaki Y., Horii T., Iida T.  
Metagenomic diagnosis of bacterial infections,  
*Emerg. Infect. Dis.* 14, 1784–1786, (2008).
- 4) 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.* in press.

後藤 直久

原著論文による発表

欧文

- 1) Nakamura S., Yang C.-S., Sakon N., Ueda M., Tougan T., Yamashita A., Goto N., Takahashi K., Yasunaga T., Ikuta K., Mizutani T., Okamoto Y., Tagami M., Morita R., Maeda N., Kawai J., Hayashizaki Y., Nagai Y., Horii T., Iida T., Nakaya T.  
Direct Metagenomic Detection of Viral Pathogens in Nasal and Fecal Specimens using an Unbiased High-throughput Sequencing Approach  
*PLoS ONE*, in press.
- 2) Yamashita A., Goto N., Nishiguchi S., Shimada K., Yamanishi H., Yasunaga T.  
Computational search for over-represented 8-mers within the 5'-regulatory regions of 634 mouse testis-specific genes  
*Gene*, 427, 93–98, (2008).

U. Chandimal de Silva

- 1) Utachee P., Jinnopat P., Isarangkura-na-ayuthaya P., de Silva U. C., Nakamura S., Siripanyaphinyo U., Wichukchinda N., Tokunaga K., Yasunaga T., Sawanpanyalert P., Auwanit W., Ikuta K., Kameoka M.  
Phenotypic studies on recombinant human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) containing CRF01\_AE env gene derived from HIV-1-infected patient residing in central Thailand  
*Microbes Infect.* in press.
- 2) Utachee P., Jinnopat P., Isarangkura-na-ayuthaya P., de Silva U. C., Nakamura S., Siripanyaphinyo U., Wichukchinda N., Tokunaga K., Yasunaga T., Sawanpanyalert P., Auwanit W., Ikuta K., 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.
- 3) Du A., Daidoji T., Koma T., Ibrahim M. S., Nakamura S., de Silva U. C., Ueda M., Yang C., Yasunaga T., Ikuta K., Nakaya T.  
Detection of circulating Asian H5N1 viruses by a newly established monoclonal antibody  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37, 197–202, (2009).

研究課題：Vif/APOBEC3Gの相互作用を標的とした新規抗 HIV-1 薬の開発

課題番号：H20-エイズ一般-004

主任研究者：高折 晃史（京都大学医学研究科 講師）

分担研究者：錦織 桃子（京都大学医学研究科 助教）

## 1. 研究目的

HIV-1 感染は、HAART の出現によりウイルス複製をある程度制御可能になったとはいえ、一方でその長期服用による副作用、また薬剤耐性の出現が大きな問題となっており、これらの克服に向け、新規作用機序の抗 HIV-1 薬の早期開発が待たれている。HIV-1 Vif は、ウイルス複製および AIDS 発症に必須の蛋白であるが、その機能の本態は、本来 HIV-1 の標的細胞が有する抗 HIV-1 宿主因子 APOBEC3G を中和することであることが近年明らかにされた。Vif がウイルス複製にとって必須の蛋白であること、および Vif/APOBEC3G の相互作用の分子機構が詳細に明らかにされたことにより、これらの分子およびその相互作用は、新規の抗 HIV-1 薬の絶好の標的と考えられる。そこで、本研究では、Vif/APOBEC3G 両分子およびその相互作用を標的とした新規抗 HIV-1 の開発を目指した研究を行う。

## 2. 研究方法

本研究の特色は、何よりもまず Vif/APOBEC3G という新規の分子が標的となる創薬研究である点である。またさらに、これら分子に関する申請者ら自身のこれまでの研究により集積された科学情報をもとに、想定可能な複数の標的候補に対し多角的にアプローチを計ることにより、その実現の可能性を高める点が独創的な点である。具体的には、①Vifによる APOBEC3G のユビキチン依存性分解を阻害する化合物

②APOBEC3G の発現および活性を調節する化合物

③Vif のユビキチン依存性分解を促進する化合物に関する複数のスクリーニングを行う。

全体の研究計画としては、上記の課題に対し、

- 1) ハイスクリーンアッセイ系の確立と低分子化合物のスクリーニング
  - 2) リード化合物の選択と二次スクリーニング、in vitro における抗 HIV-1 活性の確認
  - 3) in vivo における抗 HIV-1 活性の確認
- を行う。

（倫理面への配慮）

特に存在しない。

## 3. 研究結果

昨年度の研究結果として、前述の三つの柱のうち特に「①Vifによる APOBEC3G のユビキチン依存性分解を阻害する化合物」にしばって研究を展開した。当初、初年度はスクリーニング系の確立とスクリーニングの施行を目標としていたが、残念ながらスクリーニング系として数種類の安定発現細胞株の樹立、および Kusabira-Green を用いた蛋白質断片コンプリメンテーション法等を試みたが成功しなかった。しかしながら、昨年度、Nathans らが我々と基本的に同様のスクリーニング系を用いて Vif による APOBEC3G の分解を阻害する低分子化合物を同定したことを報告した (*Nat Biotech* 26:1187,2008)。その報告では一過性発現を用いてスクリーニングを行い成功していることから、その系の確立を試み、それに成功した。さらに、低分子化合物ライブラリーを入手し、スクリーニングを開始するところまで来ている。さらに、今回報告された低分子化合物のうち代表的な RN-18 の合成を、京都薬科大学木曾良明先生にお願いし、これを入手した。今後のスクリーニングのコントロールとして使用する予定である。

また、昨年度、我々は、APOBEC3G のリン酸化がその抗 HIV 活性調節に重要な役割を果たしていることを世界に先駆けて報告した (*Shirakawa, Nat Struct Mol Biol* 15:1184, 2008)。従って、APOBEC3G のリン酸化調節を視野にいたしたスクリーニングも計画している。

## 4. 考察

Vif/APOBEC3G の相互作用は、新規の抗 HIV-1 薬の絶好の標的と考え、本研究を提案した。実際、昨年度に我々が計画したのと同様の方法を用いて候補物質が同定され報告された (Nathans, *Nature Biotech* 26:1187,2008) ことは、本アプローチの方向性の妥当性を示しているといえる。残念ながら、当初計画した何種類かのスクリーニング系の確立はならなかったが、同報告と同様の一過性発現を用いたスクリーニング系の樹立に成功し、低分子化合物ライブラリーおよびポジティブコントロールとなる低分子化合物 RN-18 の合成も終了しており、本アッセイ系を用いて候補化合物を同定できると考えている。さらに、それ



以外のアッセイ系の確立も計画しており、よりよりリード化合物の選択に結び付けたいと考えている。

## 5. 自己評価

### 1) 達成度について

前述のごとく、当初の計画から若干の遅れはあるものの、とりあえずアッセイ系の樹立に成功し、スクリーニングを開始できるところまでこぎつけた点は評価できると考えている。さらに、当初の計画とはやや離れるが、昨年度、APOBEC3G のリン酸化がその抗 HIV 活性調節に重要な役割を果たしていることを世界に先駆けて報告した (Shirakawa, *Nat Struct Mol Biol* 15:1184, 2008) ことも、新たな標的を提示した点で重要な成果と考えている。

### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

本研究により、Vif/APOBEC3G の相互作用を標的とした複数のスクリーニングにより、複数の作用機序の低分子化合物が同定されれば、それらをリード化合物として複数の新規抗 HIV-1 薬の候補が同定されるであろう。昨年度の研究成果は、学術的には、リン酸化が APOBEC3G の抗 HIV-1 活性を調節していることを世界に先駆けて示した点が重要であり、*Nat*

*Struct Mol Biol* 誌に掲載され、国際的にも評価された。また、本研究計画のスクリーニングを開始するところまで達成した点は、将来の社会的意義につながる成果であるといえよう。

### 3) 今後の展望について

引き続き、研究計画を遂行し、なんとしてもいくつかの低分子化合物の候補物質にたどりつきたいと考えている。そのため、確立されたアッセイ系にてのスクリーニングを遂行すると同時に、さらに異なるアッセイ系の樹立も目指したい。

## 6. 結論

Vif/APOBEC3G の相互作用を標的とした新規抗 HIV-1 薬の開発に関する研究が順調に進んだ。残り 2 年間で、適当なリード化合物の候補を選択できるところまで、研究を展開したい。

## 7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

特に存在しない。

## 研究発表

## 主任研究者

高折 晃史

原著論文による発表

## 欧文

- 1) K Shirakawa, A Takaori-kondo, M Yokoyama, T Izumi, M Matsui, K Io, T Sato, H Sato, and T Uchiyama: Phosphorylation of APOBEC3G by protein kinase A regulates its interaction with HIV-1 Vif. *Nature Structural & Molecular Biology* 15(11):1184-91, 2008.
- 2) T Izumi, A Takaori-kondo\*, K Shirakawa, H Higashitsuji, K Itoh, K Io, M Matsui, K Iwai, H Kondoh, T Sato, M Tomonaga, S Ikeda, H Akari, Y Koyanagi, J Fujita, and T Uchiyama: MDM2 is a novel E3 ligase for HIV-1 Vif. *Retrovirology in press*, 2009.
- 3) T Izumi, K Shirakawa, and A Takaori-Kondo: Cytidine deaminases as a weapon against retroviruses and a new target for antiviral therapy. *Mini-Reviews in Medical Chemistry* 8(3):231-238, 2008.
- 4) T Miyoshi, K Yamashita, T Ohno, T Izumi, A Takaori-Kondo, M Sasada, and T Uchiyama: Familial Mediterranean Fever Gene as a Possible Modifier of Sweet Syndrome with Chronic Myelogenous Leukemia. *Acta Haematologica* 120(1):57-62, 2008.
- 5) R Yamamoto, A Takaori-Kondo, J Kanda, K Imada, T Ichinohe, T Ishikawa, K Ohmori, and T Uchiyama: Durable remission of large B-cell lymphoma transformed from lymphoplasmacytic lymphoma/Waldenstrom macroglobulinemia successfully treated with sequential immunochemotherapy followed by reduced-intensity allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 41(6):591-3, 2008.

## 口頭発表

## 海外

- 1) T Izumi, A Takaori-Kondo, K Shirakawa, K Io, M Matsui, and T Uchiyama: HIV-1 Vif Causes G2 Cell Cycle Arrest via the p53 Pathway. 15th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Boston, USA, Feb 3-6, 2008. (Young Investigator Award)
- 2) K Shirakawa, A Takaori-kondo, T Izumi, and T Uchiyama: Protein Kinase A-mediated phosphorylation antagonizes APOBEC3G degradation by Vif. 15th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Boston, USA, Feb 3-6, 2008. (Young Investigator Award)
- 3) T Izumi, A Takaori-Kondo, K Shirakawa, and T Uchiyama: HIV-1 Vif causes G2 cell cycle Arrest via the p53 Pathway. The 2008 meeting on RETROVIRUSES, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA, May 19-24, 2008.
- 4) K Shirakawa, A Takaori-kondo, T Izumi, and T Uchiyama: Protein Kinase A-mediated phosphorylation antagonizes the degradation of APOBEC3G by HIV-1 Vif. The 2008 meeting on RETROVIRUSES, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA, May 19-24, 2008.
- 5) T Izumi, A Takaori-Kondo, K Shirakawa, M Matsui, K Io, and T Uchiyama: HIV-1 Vif causes G2 cell cycle Arrest via the p53 Pathway. The 8<sup>th</sup> Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Hyogo, Japan, September 7-11, 2008.
- 6) K Shirakawa, A Takaori-kondo, M Yokoyama, T Izumi, M Matsui, K Io, H Sato, and T Uchiyama: Protein Kinase A-mediated phosphorylation regulates the interaction between APOBEC3G and HIV-1 Vif. The 8<sup>th</sup> Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Hyogo, Japan, September 7-11, 2008.

## 国内

- 1) 高折 晃史: HIV-1 Vif と p53/MDM2 との機能的相互作用。第 10 回白馬シンポジウム in 金沢、金沢、平成 20 年 2 月 8 日・9 日
- 2) 高折 晃史: シンポジウム 7 実験室からの発信「APOBEC3G/Vif による HIV-1 複製制御」第 22 回日本エイズ学会学術集会、大阪、平成 20 年 11 月 26~28 日
- 3) 泉 泰輔、高折 晃史、白川 康太郎、松井 道志、井尾 克宏、内山 卓: HIV-1 Vif は p53 依存的経路で感染細胞の細胞周期を G2/M 期に停止させる。第 22 回日本エイズ学会学術集会、大阪、平成 20 年 11 月 26~28 日
- 4) 白川 康太郎、高折 晃史、横山 勝、松井 道志、井尾 克宏、泉 泰輔、佐藤 裕徳、内山 卓: Protein Kinase A によるリン酸化は APOBEC3G と Vif の相互作用を調節する。第 22 回日本エイズ学会学術集会、大阪、平成 20 年 11 月 26~28 日
- 5) 高折 晃史: リン酸化による APOBEC3G の抗 HIV-1 活性制御。第 11 回白馬シンポジウム in 長崎、長崎、平成 20 年 12 月 5-6 日

#### 分担研究者

錦織 桃子

原著論文による発表

欧文

- 1) Yamamoto R, Nishikori M, Kitawaki T, Sakai T, Hishizawa M, Tashima M, Kondo T, Ohmori K, Kurata M, Hayashi T, Uchiyama T. PD-1-PD-1 ligand interaction contributes to immunosuppressive microenvironment of Hodgkin lymphoma. *Blood* 111(6):3220-4, 2008.
- 2) Yamaguchi M, Nakamura N, Suzuki R, Kagami Y, Okamoto M, Ichinohasama R, Yoshino T, Suzumiya J, Murase T, Miura I, Ohshima K, Nishikori M, Tamaru J, Taniwaki M, Hirano M, Morishima Y, Ueda R, Shiku H, Nakamura S. De novo CD5+ diffuse large B-cell lymphoma: results of a detailed clinicopathological review in 120 patients. *Haematologica* 93(8):1195-202, 2008.

口頭発表

海外

- 1) T Sakai, M Nishikori, T Kitawaki, M Tashima, R Yamamoto, T Uchiyama. Characterizing biological features of B cells carrying *BCL2/IGH* translocation. 10th International Conference on Malignant Lymphoma, Lugano, Switzerland, June 4-7th, 2008.
- 2) T Sakai, M Nishikori, M Tashima, R Yamamoto, T Kitawaki, A Takaori-Kondo, S Tsuzuki, T Uchiyama. B cells with *BCL2/IGH* translocation compose a distinctive cell population that may serve as a reservoir of lymphoma of germinal center B-cell type. 50th Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Francisco, December 5-9th, 2008.

研究課題：抗ウイルス作用をもつ宿主防御因子 APOBEC3G と HIV-1 Vif との結合領域および特性の解明と、その阻害化合物の検索

課題番号：H19 - エイズ - 若手 - 002

主任研究者：武田 哲（国立感染症研究所 エイズ研究センター 第2グループ 研究員）

## 1. 研究目的

HIV-1 感染治療において、多剤併用療法の定着が感染予後の改善に大きな成果を挙げ、HIV 感染症はもはや慢性疾患の範疇に入りつつある時代に突入している。しかし、治療が長期化するが故、薬剤耐性ウイルスの出現の懸念も増大している。世界的には、不適切な薬剤使用のために薬剤耐性ウイルスの出現と伝播が少なくなく大きな社会的不安材料となっている。さらに、すでに薬剤耐性ウイルスに感染している患者を救済することも重要な課題である。このような問題を打破するためにも、より多く選択可能な治療薬を開発することが必要である。さらに、作用点が異なる新規薬剤は併用することにより既存薬の投与量を抑えることができるため、薬剤耐性ウイルス出現のチャンスを低下させることができる。このようなことから、作用機序が既存のメカニズムと異なる新規抗 HIV 薬の開発を強力に推進することは非常に重要であると考えられる。

HIVの宿主であるリンパ球には、本来、レトロウイルスの増殖を抑制する生体宿主因子 APOBEC3G (以下、A3G) が発現している。しかし、HIV-1 は、ウイルスタンパク Vif を感染細胞で発現し、A3G を細胞内より枯渇させ、宿主防御機構から逃れることができる。

本研究では、宿主の A3G の生体防御機構を活用した新たな機序による抗 HIV-1 薬剤を開発するための基礎研究を行う。宿主の抗ウイルス因子である APOBEC3G と HIV-1 Vif タンパクの相互作用に焦点を当て、構造生物学及び生化学的解析により両者の結合特性を解明し、抗 HIV-1 薬剤を開発に結びつくような基礎研究を行うことを目的とする。

## 2. 研究方法

### (1) 一次スクリーニングのための ELISA 法の確立

バキュロウイルスの発現系を利用して、野生型 A3G と Vif に結合しない変異型 A3G (D128K) タンパク、Vif (GST タグつき) タンパクの3種を発現し、精製した。一方、APO3G のC末端17アミノ酸に対する抗ウサギ血清を作製し、精製 IgG を96穴プレートに固着化し、ELISA系を作製した。

APO3G を安定発現する培養細胞の作製には、内在性の APO3G が発現していない HeLa と SupT1 細胞を用いた。APO3G の細胞内発現量を調節するために、Tet-Off の発現調節系を利用した。

### (倫理面への配慮)

当研究は、遺伝子組換え実験を含むので、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」を遵守する。またクラス3の病原体 HIV-1 を用いた実験を含む。このため、実験計画は国立感染症研究所の組換え DNA 実験安全委員会に承認をえて同委員会の認可をえた実験者が同委員会の認定した実験室にて行なう。

## 3. 研究結果

### (1) ライブラリスクリーニング用の *in vitro* 結合実験系の確立とライブラリスクリーニング

昨年度の生化学的な実験の結果を踏まえて、96 穴プレートスケールの ELISA 系を確立した。原理は、固着化した A3G 抗体で APO3G と GST-Vif タンパクの複合体をキャプチャーし、HRP-conjugated 抗 GST 抗体でサンドイッチした後、化学発光を用いて定量する。もし結合阻害化合物が存在する場合、APO3G/GST-Vif 複合体形成が阻害され GST-Vif がプレートにキャプチャーされず、化学発光が認められなくなるという系を確立しました。実際の候補化合物の検索は、低分子化合物および放線菌・真菌ライブラリライブラリを用い、現在準備進行中である。