

200830023A

平成20年度 厚生労働科学研究費補助金
エイズ対策研究事業
課題番号 H19- エイズ- 一般- 001

**薬剤耐性 HIV の発生機序とその制御方法
に関する研究**

総括・分担研究報告書

平成21年3月

研究者代表者 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)

平成20年度 厚生労働科学研究費補助金
エイズ対策研究事業
課題番号 H19- エイズ- 一般- 001

薬剤耐性 HIV の発生機序とその制御方法 に関する研究

総括・分担研究報告書

平成21年3月

研究者代表者 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)

研究組織

研究者名	分担	所属	役職
佐藤 裕徳	研究代表者	国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター	室長
潟永 博之	研究分担者	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
村上 努	研究分担者	国立感染症研究所・エイズ研究センター	室長
西澤 雅子	研究分担者	国立感染症研究所・エイズ研究センター	研究官
遊佐 敬介	研究分担者	熊本大学大学院・医学薬学研究部	講師
上野 貴将	研究分担者	熊本大学・エイズ学研究センター	准教授
足立 昭夫	研究分担者	徳島大学大学院・ヘルスバイオサイエンス研究部	教授
高折 晃史	研究分担者	京都大学医学研究科 血液・腫瘍内科学	講師
増田 貴夫	研究分担者	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	研究分担者	名古屋市立大学大学院・医学研究科細胞分子生物学	教授
間 陽子	研究分担者	理化学研究所・分子ウイルス学特別研究ユニット	リーダー
森川 裕子	研究分担者	北里大学・生命科学研究所	教授
櫻木 淳一	研究協力者	大阪大学微生物病研究所・ウイルス感染分野	助教
三隅 将吾	研究協力者	熊本大学大学院 医学薬学研究部薬学生化学分野	准教授
駒野 淳	研究協力者	国立感染症研究所・エイズ研究センター	主任研究官

目 次

I. 総括研究報告書	1
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)	
II. 分担研究報告書	
1. 計算科学の応用研究	5
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)	
柱 1. 薬剤耐性 HIV の発生機序に関する研究	
2. HIV 多型と薬剤耐性の研究	9
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)	
3. CXCR4 阻害剤開発と耐性機構の研究	13
研究分担者：村上 努 (国立感染症研究所・エイズ研究センター)	
4. Darunavir 耐性機構の研究	17
研究分担者：西澤 雅子 (国立感染症研究所・エイズ研究センター)	
5. HIV 準種と薬剤耐性の研究	21
研究分担者：遊佐 敬介 (熊本大学大学院・医学薬学研究部・感染防御学分野)	
6. CTL と薬剤耐性の研究	23
研究分担者：上野 貴将 (熊本大学・エイズ学研究センター)	
柱 2. HIV 感染・増殖制御の研究	
7. HIV 種特異性と動物モデルの研究	27
研究分担者：足立 昭 3 夫 (徳島大学大学院・ヘルスバイオサイエンス研究部)	
8. APOBEC3G 機能制御の研究	31
研究分担者：高折 晃史 (京都大学大学院・医学研究科・血液・腫瘍内科学)	
9. HIV インテグラーゼ機能制御の研究	35
研究分担者：増田 貴夫 (東京医科歯科大学大学院・免疫治療学分野)	
10. HIV プロウイルス転写制御の研究	39
研究分担者：岡本 尚 (名古屋市立大学大学院・医学研究科・細胞分子生物学)	
11. HIV Vpr 機能制御の研究	43
研究分担者：間 陽子 (理化学研究所・分子ウイルス学特別研究ユニット)	
12. HIV Gag/Pol 機能制御の研究	47
研究分担者：森川 裕子 (北里大附生命科学研究所・ウイルス感染制御学教室)	

III. 協力研究報告書	
1. HIV ゲノム二量体化と組換えの研究.....	53
研究協力者：櫻木 淳一（大阪大学微生物病研究所 ウイルス感染制御分野）	
2. HIV 脱殻制御の研究.....	55
研究協力者：三隅 将吾（熊本大学大学院・医学薬学研究部・薬学生化学分野）	
3. 新規抗HIV薬の標的分子の研究.....	59
研究協力者：駒野 淳（国立感染症研究所・エイズ研究センター）	
IV. 業績一覧（2008）	63

I. 総括研究報告書

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）、遊佐敏介（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センター 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）

研究要旨：2つの研究の柱を設定し、分担して薬剤耐性HIVの発生機序とその制御方法に関するウイルス学研究を実施した。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収集・解析し、耐性ウイルスの発生機序の解析を進めた。柱2では、各研究者固有の実験系を用いて細胞でのHIV複製機構を解析し、抗HIV薬開発とHIV/AIDS動物モデルの構築を進めた。研究代表者は、計算科学とゲノム科学の先端技術を活用して蛋白質の立体構造とウイルス準種（感染者のウイルス変異集団）を包括的に解析する方法を研究し、分担研究と国内外の研究に役立てた。

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

研究代表者

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。

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。そこで計算科学の技術を用いて、蛋白質の構造と変化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。

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

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。

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 遺伝的多型の組み合わせによる耐性獲得 (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⁺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。HIV 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。ゲノムシーケ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 α 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 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 か所同定した。

(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 周辺のヒストン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 α 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 α 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 $_{50}$ \leq 0.1 μ 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。

4. 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、欧文論文の報告状況 (*Nat. Struc. Mol. Biol.*, *J. Virol.* など) により自明。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

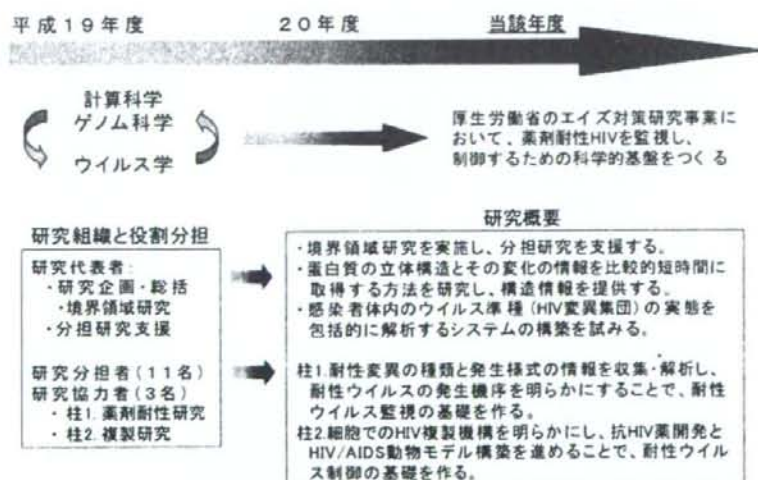
境界領域分野の最新技術をウイルス学研究と関連づけて組織的に HIV/AIDS を研究する枠組みを作った。それぞれが担当する研究は、ほぼ計画通りに進んだ。これにより、薬剤耐性 HIV を監視し、制御するためのウイルス学研究の基盤強化が順調に進んだ。

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)。

薬剤耐性 HIV の発生機序とその制御方法に関する研究

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)



II. 分担研究報告書

分担研究報告書 1. 計算科学の応用研究

立体構造解析とウイルス準種解析

研究分担者 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
研究協力者 横山勝、本村和嗣、大出裕高（同上）

研究要旨 計算科学とゲノム科学の先端技術を研究し、分担研究を支援する。分子シミュレーションの技術を応用して、病原体・宿主分子の構造、および変異や修飾による構造変化を予測した。得られた成果を分担研究と国内外のウイルス学研究に役立てた。ゲノム科学と計算科学の技術を応用して、感染者体内のウイルス変異集団（ウイルス準種）を包括的に解析する方法を研究した。次世代シーケンサーを用いて、臨床試料中のウイルスゲノム情報を網羅的に取得するシステムをつくった。準種の組成、頻度、動態などを解析するプログラムの初版をつくった。

A. 研究目的

研究代表者は、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。

柱1、2の研究には、蛋白質の立体構造情報が重要となる。しかし、実験のみで構造情報を取得するには、膨大な時間がかかる。そこで本研究では、計算科学の手法を用いる立体構造解析により、病原体・宿主分子の構造、および変異や修飾による構造変化を迅速かつ高精度で予測する方法を研究する。得られた構造情報を分担研究に資する（図1）。

柱1、2の研究には、HIV感染者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、膨大な量のウイルス変異集団を包括的に解析する方法は、まだ無い。そこで本研究では、ゲノム科学、計算科学、ウイルス学の技術を応用して、感染者のウイルス準種の組成、動態、特性などを包括的に解析するシステムの構築を進める。

B. 研究方法

(1) **立体構造解析**：高性能解析サーバに設置した立体構造解析用ソフトウェア（MOE, PDFAMS, Amber など）を用い、変異ウイルス分子の立体構造変化や活性修飾の予測法を研究する。特に、ホモロジーモデリング法、結合シミュレーション法、分子動力学法の精度と応用範囲を研究する。必要に応

じて、解析ツールを作製する。主に HIV、宿主分子、カリシウイルスの蛋白質を解析対象とする。共同研究により、構造解析の手法をウイルス分子と宿主分子の構造変化や活性修飾の解析に応用する。

(2) **準種解析**：準種解析環境（実験機器と計算機など）を国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センターの研究施設（村山庁舎）に整備する。HIV および C 型肝炎ウイルス（HCV）の持続感染をモデルとして、血液中のウイルス準種解析法を検討する。①次世代シーケンサー-FLX（ロッシュ）を用いて臨床試料中の RNA ウイルスゲノム情報を網羅的、効率的に取得する方法、②得られた配列情報を基に、計算科学の技術を用いて準種ゲノムのハプロタイプを構築し、それらの組成、頻度、動態などを推測する方法、③ 計算科学の技術を用いて準種の蛋白質の立体構造を迅速に予測する方法、④ 準種の活性の評価法、などを研究する。

（倫理面への配慮）

本研究の準種解析では、HIV-1 感染者、および HCV 感染者の血漿を用いる。血漿は、国立国際医療センター、および昭和大学医学部に通院する感染者からインフォームドコンセントを得て収集し、関連研究機関の倫理審査会の承認を得て行う。

C. 研究結果

(1) 立体構造解析 (表1)

①HIV-1 主要中和エピトープの立体構造解析: HIV-1 外被蛋白質 Gp120 の高度可変領域 V3 は、感染者の中和抗体の主要な標的である。V3 の電荷が+2~+4 であるとき、ウイルスは抗 V3 抗体中和抵抗性となることを見出した。電荷量の変化による V3 構造の変化を分子動力学計算に基づく構造解析により調べた。その結果、V3 の電荷が gp120 単量体における V3 の立体配置を制御することを見出した。中和抵抗性 V3 (荷電量+2~+4) は stem 付近から折れ曲がった構造をとる。このため、中和エピトープが Gp120 三量体では遮蔽されることが予測された (横浜市立大、長縄博士らとの共同研究)。

②APOBEC3G の立体構造解析: APOBEC2 を鋳型として、ホモロジーモデリング法により、APOBEC3G (A3G) N 末端ドメインのモデルを構築した。得られたモデルの 32 番目のアミノ酸 (T32) にリン酸を付加し、エネルギー最小化を行なうことで、リン酸化 A3G の構造を予測した。また、T32A および T32D 変異体も構築した。A3G-野生株、A3G-リン酸化 T32、A3G-T32A 変異体、A3G-T32D 変異体の全体構造はいずれも類似していた。T32 近傍を見てみると、T32 の側鎖と R24 の側鎖の間に形成される水素結合の数の差が見られた。A3G-リン酸化 T32 および A3G-T32D 変異体では水素結合は 2 つ、A3G-野生株は 1 つ、A3G-T32A 変異体では水素結合は形成されない。T32 のリン酸化、あるいは T32D 変異により、32 番目のアミノ酸の側鎖と R24 の相互作用がより強固になり、R24 を含むループ領域の動きが制限される。これにより、Vif などの結合親和性が低下し、Vif による分解中和に抵抗性となると考えられる。

③HIV-2 キャプシド蛋白質の立体構造解析: HIV2 のキャプシド蛋白質の 120 番目のアミノ酸が P の場合(120P)は感受性を示すが、120A 及び 120Q は耐性である。これらの 3 種のキャプシド蛋白質の分子モデルを構築し、比較した。感受性の株では耐性の株に比べ、ヘリックス 6 と 7 の間のループ (L6/7) はヘリックス 4 と 5 の間のループ (L4/5) に接近している。120 番目のア

ミノ酸は L6/7 に存在し、L6/7 の構造と立体配置を制御するアミノ酸であることが予測された (阪大微研、塩田博士らとの共同研究)。

④カリシウイルスプロテアーゼの構造解析: ノロウイルスプロテアーゼを鋳型として、ホモロジーモデリング法により、サボウイルス Mc10 株、ネコカリシウイルス F4 株、ラゴウイルス FRG 株のプロテアーゼ分子の立体構造を構築した。これらのプロテアーゼのアミノ酸配列は 20%以下のホモロジーしかない。しかし、プロテアーゼの基質認識に重要と考えられる溝に位置するアミノ酸群のうち、4つのアミノ酸 (H, E, C, H) の立体配置が 4 種のウイルスで高度に保存されていることを見出した。基質の切断に関与するアミノ酸と推測される (国立感染症研、ウイルス二部との共同研究)。

(2) 準種解析

シーケンシング: FLX を使い、クローニングを経ず、HCV 感染者の血清中 (200 μ l) のゲノム塩基配列情報を網羅的に取得した。1 回のシーケンシングで約 1.7 $\times 10^6$ 塩基の情報を得た (10,620 sequence reads, 平均 180 塩基長/read)。

ハプロタイプ構築プログラムの検証: 平均 180 塩基長の配列情報からゲノムのハプロタイプを構築するプログラムを検証した。FLX を用いて得たシーケンス情報は、しばしばポリヌクレオチド配列でエラーが生じる。このエラーを人為的に発生させたシーケンスセットをつくった。その際、HIV-1 サブタイプ B と AE のゲノムが 9:1 に混合しているシーケンス (サブタイプ B 4,500 sequence reads, サブタイプ AE 500 sequence reads) を発生させた。この配列情報を基に、ShoRAH-0.2 を用いて、ハプロタイプを構築した。その結果、サブタイプ B と AE のハプロタイプが作られ、それぞれの頻度は、それぞれ 90.17%、8.27% と予測された。サブタイプ B のゲノム配列は、本来の配列と 100% 一致したが、サブタイプ AE の配列は、完全には一致しなかった (99.92% 一致)。

D. 考察

我々の構築した立体構造解析法は、高い精度と汎用性をもつことが示された (表1)。

こ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。

我々の準種解析系は、改善の余地がある。シーケンシングについては、現在の10倍の sequence reads の取得をめざす。ハプロタイプ構築プログラムについては、シーケンスの100%一致をめざす。こ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。

E. 結論

計算科学とゲノム科学の最新技術をウイルス学研究に応用する基盤を作った。これらの技術は進展が早い。この進展を取り入れ、立体構造解析と準種解析のシステムを改良していく必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

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*. 2008 May 25;375(1):130-40.

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*. 2008 Sep 12;3(9):e3206.

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.* 2008 Nov. 82:11247-11262.

Shirakawa K, Takaori-kondo A, Yokoyama M, Izumi T, Matsui M, Ito 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.* 2008 Nov;15(11):1184-91.

Kamiyama H, Yoshii H, Tanaka Y, Sato H, Yamamoto N, Kubo Y. Raft localization of CXCR4 is primarily required for X4-tropic human immunodeficiency virus type 1 infection. *Virology accepted*.

2. 学会発表

Ode H, Yokoyama M, and Sato H. Secondary Structure Tendency of Substrate Cleavage Site Influences Substrate Binding of HIV-1 Protease. CBI 学会 2008 年大会. 2008 年 10 月 22 日 (水) - 24 日 (金) 一橋記念講堂.

横山勝、岡智一郎、片山和彦、山本真民、宮下佳奈、神田忠仁、武田直和、佐藤裕徳：サポウイルスプロテアーゼの基質認識に関わるアミノ酸残基の解析. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会、2008 年 10 月 26-28 日 (日-火)、岡山.

横山勝、佐藤裕徳：相互情報量解析による HIV-1 CRF01_AE V3 領域アミノ酸残基の共変異部位の同定. 第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会、2008 年 11 月 26 日 (水) - 28 日 (金)、大阪国際交流センター.

横山勝、白川康太郎、高折晃史、神田忠仁、佐藤裕徳：分子モデリングによるリン酸化 APOBEC3G の構造解析. 第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会、2008 年 11 月 26 日 (水) - 28 日 (金)、大阪国際交流センター.

大出裕高、横山勝、佐藤裕徳、伊部史朗、

藤崎誠一郎、間宮均人、濱口元洋、杉浦互、
 横幕能行：HIV-1 プロテアーゼ における耐
 性変異 L89V の立体的影響。第 22 回日本エ
 イズ学会学術集会・総会，2008 年 11 月 26
 日（水）～28 日（金），大阪国際交流セン
 ター。

横山 勝、岡 智一郎、片山 和彦、山本 真

民、宮下 佳奈、神田 忠仁、武田 直和、
 佐藤 裕徳：カリシウイルスプロテアーゼ
 分子モデルによる基質認識の解析。第 3 1
 回日本分子生物学会年会、2008 年 12 月 9-12
 日（火-金）、神戸ポートアイランド。

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を
 含む。）なし

図 1. 計算科学の応用：蛋白質立体構造解析

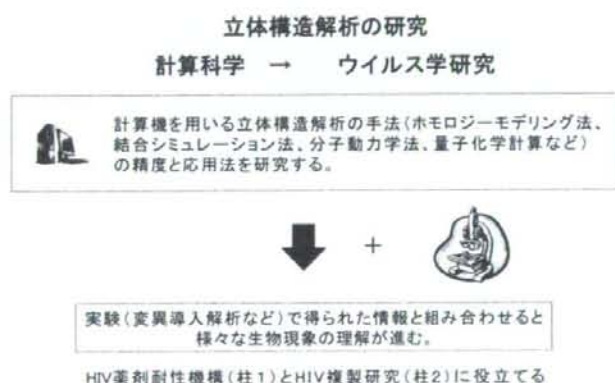


表 1. 立体構造解析の応用例

解析手法	ウイルス	トピック	分子	論文	共同研究者
ホモロジーモデリング法	HIV-1	NRTI多剤耐性	逆転写酵素	J.Virol. 2001.	梅山
	HIV-1	変異率調節	逆転写酵素	J.Virol. 2005.	Mansky
	HIV-1	膜融合能調節	Env Gp41	J.Virol. 2005.	徳永
	HIV-2	種特異性	Gag CA	J.Virol. 2007.	塩田
	サボウイルス	基質選択性	プロテアーゼ	J.Virol. 2007.	武田
	ノロウイルス	周期的流行	キャプシド	J.Virol. 2008.	武田
			自然免疫調節	APOBEC3G	Nat. Struc. Mol. Biol. 2008.
結合シミュレーション法	HIV-1	亜株薬剤感受性	プロテアーゼ	Clin. Infect. Dis. 2005.	徳永
分子動力学法	HIV-1	抗体中和逃避	Env Gp120	PLoS ONE. 2008.	北村

分担研究報告書 2. HIV 多型と薬剤耐性の研究

HIV 多型的変異の薬剤耐性出現に対する影響

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 治療開発室長
研究協力者 蜂谷敦子 国立国際医療センター エイズ治療・研究開発センター 臨床検査技師
林田庸総 国立国際医療センター エイズ治療・研究開発センター リサーチディベント

研究要旨 逆転写酵素の 179 番目のアミノ酸が Val から Asp(V179D)に置換した多型的変異を持つ組換え HIV-1 から、efavirenz(EFV)高度耐性の HIV-1 を誘導したところ、V179D に加えて別の多型的変異である V106I が生じていた(V106I/V179D)。逆に、V106I 変異を持つ HIV-1 から EFV 耐性誘導実験を行うと、V179D が生じた。組換え HIV-1 を作成して薬剤感受性を測定した結果、V106I と V179D は単独では有意な薬剤耐性を賦与しないが、組み合わせると高度な EFV 耐性となることが示された。EFV と HIV-1 逆転写酵素の結合様式をコンピューターモデリングにより解析したところ、V106I は立体障害をもたらす、V179D は電気的な反発をもたらすため、両者の共存により協調的に働き、高度な耐性が生じると考えられる。

A. 研究目的

HIV-1 の遺伝子を調べる薬剤耐性検査 (genotypic assay)は、既知の薬剤耐性変異の有無で判定されるが、未知の耐性変異に対しては無効である。genotypic assay の臨床応用性を高めるためには、未知の耐性変異の同定が必要である。一方、患者体内の HIV-1 は、たとえ未治療であっても、それぞれ固有の変異 (多型的変異) を持ち、通常、それ自身は直接薬剤耐性を齎すことはない。しかし、そこから生じ得る耐性変異の発現パターンには、多型的変異が関与し、未知の耐性変異が生じる可能性が考えられる。

B. 研究方法

昨年度の研究で、未治療患者にも比較的良好に認められる逆転写酵素の多型的変異、179 番目のアミノ酸を Val から Asp に置換する変異 (V179D) を持つ HIV-1 から、非核酸系逆転写酵素阻害薬である efavirenz (EFV) に対する高度耐性 HIV-1 を誘導したところ、3 回中 2 回の実験で、別の多型的変異である V106I が生じた。V106I を持つ HIV-1 から EFV 高度耐性 HIV-1 を誘導したところ、3 回中 1 回の実験で、V179D が生じた。V106I と V179D の組み合わせにより、EFV 高度耐性をもた

らすと考えられるため、組換え HIV-1 を作成して in vitro で解析し、コンピューターモデリングでそのメカニズムを解明する。

C. 研究結果

EFV に対する耐性誘導実験と同じく、NL4-3 株をベースとして、V106I、V179D と、その両方の変異を持つ組換え HIV-1 を作成した。逆転写酵素の 106 番目のアミノ酸は、wild-type が V で、I は未治療患者にも比較的良好に見られる多型的変異であるが、A は非核酸系逆転写酵素である nevirapine (NVP) に高度耐性をもたらすよく知られた変異であるため、reference として、V106A を持つ組換え HIV-1、V106A と V179D の両方を持つ組換え HIV-1 を作成した。薬剤感受性検査には、MAGIC-5 細胞を用いた。

NL4-3 の IC₅₀ との fold resistance で比較すると、V106I のみを持つ HIV-1 は、EFV に対して 1.5 倍、NVP に対して 0.4 倍耐性で、V179D のみを持つ HIV-1 は、EFV に対して 2.0 倍、NVP に対して 2.6 倍耐性、V106I と V179D の両方を持つ HIV-1 は、EFV に対して 15 倍、NVP に対して 7.0 倍耐性であった。多型的変異一つだけでは大きな耐性にはならないが、V106I と V179D の二つを持つと非核酸系逆転写酵素阻害薬に対して高

度耐性となったのである。V106Aのみを持つ HIV-1 は、EFV に対して 1.5 倍、NVP に対して 69 倍、V106A と V179D の両方を持つ HIV-1 は、EFV に対して 15 倍、NVP に対して 7.0 倍耐性であった。V106I と V179D の多型的変異の組み合わせは、既に知られている非核酸系逆転写酵素阻害薬高度耐性変異である V106A よりも、EFV に対して高度耐性となっていた。

D. 考察

EFV と HIV-1 逆転写酵素の結合様式をコンピューターモデリングにより解析したところ、V106I は立体障害をもたらす、V179D は電気的な反発をもたらすため、両者の共存により協調的に働き、高度な耐性が生じると考えられる。

E. 結論

逆転写酵素の 2 つの多型的変異である V106I と V179D の組み合わせは、非核酸系逆転写酵素阻害薬、特に EFV に対して、高度な耐性を賦与することが証明された。今後、NL4-3 をベースにした HIV-1 のみでなく、臨床分離株などにより、一般化できるか確認する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 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 non-nucleoside 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-captured 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, Matusoka S, Yamanaka H, Gatanaga H, Tachikawa N, Kikuchi Y, Takiguchi M, Oka S. HLA-A*2404-restricted HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and escape mutation after AER with structured treatment interruptions. *Microbes Infect.* 10: 689-698, 2008.

2. 学会発表

- 1) 湯永博之, シンポジウム「HIV 感染症治療の最前線」進化した抗 HIV 療法と残された問題 日本感染症学会総会 2008 年 4 月
- 2) 林田庸総, 湯永博之, 田沼順子, 本田元人, 後藤耕司, 菊池嘉, 岡慎一. HIV-1 感染者における BED アッセイに対するウイルス量と抗 HIV-1 治療の影響 日本感染症学会総会 2008 年 4 月
- 3) 田沼順子, 大金美和, 矢崎博久, 本田美和子, 湯永博之, 照屋勝治, 立川夏夫, 菊池嘉, 岡慎一, 瓜生英子, 山中純子, 国方徹也, 宮澤廣文, 松下竹次, 源河いくみ. 当院における HIV 合併妊娠に対する抗レトロウイルス療法 日本感染症学会総会 2008 年 4 月
- 4) 柳沢邦雄, 本田元人, 湯永博之, 仲村秀太, 後藤耕司, 渡辺恒二, 神村麻穂子, 渡辺珠代, 塚田訓久, 田沼順子, 矢崎博久, 本田美和子, 照屋勝治, 立川夏夫, 菊池嘉, 岡慎一. Fluconazole (FLCZ) と Micafungin (MCFG) の併用療法が有効と考えられた HIV 感染者における *Candida albicans* 脊椎炎の一例 日本感染症学会総会 2008 年 4 月
- 5) 周東翔, 原口日和, 湯永博之, 森川裕子. 非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤エファビレンツによる HIV 粒子形成阻害機構 日本ウイルス学会 2008 年 10 月
- 6) 中村春香, 渡辺恒二, 塚田訓久, 矢崎博久, 田沼順子, 本田美和子, 湯永博之, 照屋勝治, 菊池嘉, 岡慎一. 糞線虫症をきたしイベルメクチン内服が奏功した HIV 感染タイ人女性の 1 例 日本感染症

- 学会東日本地方学術集会 2008年10月
- 7) 青木孝弘、塚田訓久、渡辺珠代、本田美和子、照屋勝治、湯永博之、菊池嘉、岡慎一。HAART 開始時よりステロイド併用し PML の免疫再構築に備えた 1 例 日本感染症学会東日本地方学術集会 2008年10月
 - 8) 湯永博之。新規標的に対する抗ウイルス薬の臨床的意義 一日常臨床への新薬導入一 我が国における新薬導入の課題 日本エイズ学会総会 2008年11月
 - 9) 湯永博之。抗 HIV 薬治療の変遷と PI の位置づけ 日本エイズ学会総会 2008年11月
 - 10) 今村顕史、湯永博之、花房秀次、日笠聡。HIV 感染症「治療の手引き 第12版」エキスパートに聞く一処方に対する考え方 日本エイズ学会総会 2008年11月
 - 11) 今村顕史、小田原隆、湯永博之、小島賢一、村松崇、榎谷法生、中田たか志。現在の HIV 診療が抱える他科連携の問題点を総括する 日本エイズ学会総会 2008年11月
 - 12) 本田元人、湯永博之、西島健、青木孝弘、中村春香、田里大輔、柳沢邦雄、渡辺恒二、神村麻穂子、渡辺珠代、塚田訓久、矢崎博久、田沼順子、本田美和子、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一。Warfarin と抗 HIV 薬併用症例の検討 日本エイズ学会総会 2008年11月
 - 13) 田里大輔、中村春香、西島健、青木孝弘、柳沢邦雄、神村麻穂子、渡辺恒二、渡辺珠代、本田元人、塚田訓久、矢崎博久、田沼順子、本田美和子、照屋勝治、湯永博之、菊池嘉、岡慎一。当センターで経験した HAART 時代の AIDS 関連カポジ肉腫 90 例の検討 日本エイズ学会総会 2008年11月
 - 14) 渡辺珠代、安岡彰、中村春香、青木孝弘、西島健、田里大輔、神村麻穂子、渡辺恒二、本田元人、矢崎博久、田沼順子、塚田訓久、本田美和子、湯永博之、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一。当院における HAART 時代の日和見感染症の動向 日本エイズ学会総会 2008年11月
 - 15) 蜂谷敦子、嶋根和毅、児玉栄一、小泉寛和、湯永博之、松岡雅雄、滝口雅文、岡慎一。逆転写酵素 connection と RNase H subdomain の多様性と薬剤感受性に及ぼす影響 日本エイズ学会総会 2008年11月
 - 16) 神村麻穂子、中村春香、西島健、青木孝弘、田里大輔、渡辺恒二、渡辺珠代、本田元人、矢崎博久、塚田訓久、田沼順子、本田美和子、湯永博之、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一。HBs 抗原陽性 HIV 患者に導入した TDF/3TC(FTC) を含む抗 HIV 療法の効果 日本エイズ学会総会 2008年11月
 - 17) 高橋佳子、池田和子、島田恵、今井公文、湯永博之、岡慎一。HIV 感染症患者における非就労の背景要因に関する研究 日本エイズ学会総会 2008年11月
 - 18) 八鉸類子、杉野祐子、島田恵、荒井理那、伊藤紅、石垣今日子、山田由紀、武田謙治、大金美和、池田和子、遠藤貴子、西垣昌和、数間恵子、湯永博之、岡慎一。HIV/AIDS 患者の脂質代謝コントロールのための健康行動支援の検討 日本エイズ学会総会 2008年11月
 - 19) 塚田訓久、青木孝弘、田里大輔、中村春香、西島健、神村麻穂子、柳沢邦雄、渡辺恒二、渡辺珠代、田沼順子、本田元人、矢崎博久、本田美和子、湯永博之、照屋勝治、立川夏夫、菊池嘉、岡慎一。新規抗 HIV 薬の使用経験と有害事象 日本エイズ学会総会 2008年11月
 - 20) 渡辺恒二、中村春香、青木孝弘、西島健、田里大輔、柳沢邦雄、神村麻穂子、渡辺珠代、本田元人、塚田訓久、田沼順子、矢崎博久、本田美和子、湯永博之、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一。当院におけるアタザナビル使用 473 症例の検討 日本エイズ学会総会 2008年11月
 - 21) 矢崎博久、中村春香、青木孝弘、西島健、田里大輔、柳沢邦雄、神村麻穂子、渡辺恒二、渡辺珠代、本田元人、田沼順子、塚田訓久、本田美和子、湯

永博之、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一。当院での新規抗 HIV 薬の変遷と FPV 投与者の経過について（続報）日本エイズ学会総会 2008 年 11 月

- 2 2) 照屋勝治、西島健、中村春香、田里大輔、青木孝弘、渡辺恒二、柳沢邦雄、神村麻穂子、渡辺珠代、塚田訓久、本田元人、矢崎博久、田沼順子、本田美和子、湯永博之、菊池嘉、岡慎一。HIV 合併結核における抗結核薬の有害事象についての検討 日本エイズ学会総会 2008 年 11 月
- 2 3) 林田庸総、湯永博之、菊池嘉、岡慎一。当センターにおける BED アッセイを用いた 2003 年と 2007 年以降の新規患者の解析 日本エイズ学会総会 2008 年 11 月
- 2 4) 杉浦互、湯永博之、吉田繁、千葉仁志、小池隆夫、伊藤俊広、原孝、佐藤武幸、石ヶ坪良明、上田敦久、近藤真

規子、今井光信、貞升健志、長島真美、福武勝幸、山元泰之、田中理恵、加藤信吾、宮崎菜穂子、藤井毅、岩本愛吉、藤野真之、仲宗根正、巽正志、椎野禎一郎、岡慎一、林田庸総、服部純子、伊部史朗、藤崎誠一郎、金田次弘、浜口元洋、上田幹夫、大家正義、田邊嘉也、渡邊香奈子、渡邊大、白阪琢磨、桑原健、森治代、小島洋子、高田昇、木村昭郎、南留美、山本政弘、松下修三、健山正男、藤田次郎。2003・2007 年の新規 HIV-1 感染者における薬剤耐性頻度の動向 日本エイズ学会総会 2008 年 11 月

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

なし。

CXCR4 阻害剤耐性 HIV-1 の誘導と解析

研究分担者 村上 努 国立感染症研究所 エイズ研究センター 室長

研究要旨：本研究の最終目的は、CXCR4 阻害剤を材料として耐性変異のパターンや耐性機構を解析することにより次世代の治療を考慮した耐性変異パターンを予測することである。平成 20 年度は、まず抗 X4HIV-1 活性を有する CXCR4 阻害剤 KRH-3955 についてその抗 HIV-1 活性や CXCR4 への作用点について詳細な解析を加えた。2007 年秋に開始した KRH-3955 と KRH-3148 を用いた PM1/CCR5-NL4-3 の感染系による薬剤耐性誘導実験は KRH-3148 とコントロールの一つ AMD070 で中程度（20~30 倍）の耐性ウイルスが得られ、Env 領域に蓄積した変異を解析している。

A. 研究目的

本研究では、薬剤耐性 HIV の発生機序とその制御方法に関する基礎研究の班において、新しい作用機序を有する HIV 阻害剤として期待される CXCR4 阻害剤に対する耐性 HIV-1 を誘導し、その耐性変異のパターンや耐性機構を解析することによって、次世代の治療を考慮した耐性変異パターンの予測法を研究する。材料としては、共同研究者（株）クレハが開発した経口吸収性を示す 2 種類の高活性 CXCR4 阻害剤 KRH-3955、KRH-3148 を使用する。今年度はまず、抗 X4HIV-1 活性を有する CXCR4 阻害剤 KRH-3955 についてその抗 HIV-1 活性や CXCR4 への作用点について詳細な解析を加えた。また、昨年度に開始した KRH-3955 と KRH-3148 を用いた PM1/CCR5-NL4-3 の感染系による薬剤耐性誘導実験を継続している。

B. 研究方法

(1) 抗 HIV-1 活性測定：固定化抗 CD3 抗体で刺激し、IL-2 存在下で増殖させた PBMC を標的細胞として X4、R5、R5X4 の各種 HIV-1 を MOI=0.001 で感染させ、種々の濃度の薬剤存在下で 7 日から 10 日培養した。

抗 HIV-1 活性は培養上清中の p24 抗原量を市販の ELISA を用いて測定後算出した。

(2) 薬剤耐性 HIV-1 に対する抗ウイルス活性測定：CD4 と CXCR4 を導入した U87 細胞を標的細胞として、HIV-1(HXB2 または NL4-3) Env 発現ベクターと Env 領域に Luciferase 遺伝子を導入した HIV ゲノムベクター（薬剤耐性遺伝子搭載）から作製したシュードタイプウイルスを種々の濃度の薬剤存在下で感染させ、感染させた標的細胞抽出液の Luciferase 活性を測定して抗ウイルス活性を算出した。

(3) hu-PBL-SCID mice を用いた HIV-1 感染モデルにおける抗ウイルス活性測定：感染 2 週間前に KRH-3955 を 10 mg/kg 単回経口投与した。分離したヒト PBMC をマウス腹腔に導入し、1 日後に HIV-1 NL4-3 を感染させた。感染 7 日後にマウス腹腔から PBMC を回収し、IL-2 存在下で 4 日間培養した。抗 HIV-1 活性は培養上清中の p24 抗原量を市販の ELISA を用いて測定後算出した。

(4) SDF-1a 結合阻害活性の測定：CXCR4 を強制発現させた CHO 細胞を用いて薬剤存在、非存在下で細胞に結合した ¹²⁵I-SDF-1a の放射活性を測定した。

(5) 各種抗 CXCR4 抗体結合阻害活性の測