

- Network.: Prevalence of drug resistance associated mutations in newly diagnosed HIV/AIDS patients in Japan from 2003-2007. XVII International HIV Drug Resistance Workshop. Jun. 10-14, 2008, Sitges, Spain.
4. Rajintha Bandaranayake, M Prabu-Jeyablab, J Kakizawa, W Sugiura and C Schiffer.: The Effect of Sequence Polymorphisms on CrF01_AE Protease Structure. 15th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Feb.3-6,2008, Boston, USA.
 5. 岩谷靖雅、吉居廣朗、武田 哲、杉浦 互: HIV-1 Vif 依存的な APOBEC3G のユビキチン化サイトの同定. 第56回日本ウイルス学会学術集会. 2008年10月26～28日,岡山
 6. 宮崎菜穂子、松下修三、藤井 毅、岩本愛吉、杉浦 互: 既治療患者における薬剤耐性(多剤耐性) HIV の現状調査. 第22回日本エイズ学会学術集会. 2008年11月26～28日,大阪
 7. 巽 正志、梅木優子、竹川菜穂、松田昌和、橋本修、西澤雅子、石古博昭、杉浦 互、山本直樹: 薬剤耐性ウイルスの感染性分子クローンを軸にした Genotype と Phenotype をつなぐ実験解析系. 第22回日本エイズ学会学術集会. 2008年11月26～28日,大阪
 8. 岩谷靖雅、吉居廣朗、武田 哲、杉浦 互: APOBEC3G の HIV-1 Vif に依存したユビキチン化サイトに関する研究. 第22回日本エイズ学会学術集会. 2008年11月26～28日,大阪
 9. 柴田潤子、岩谷靖雅、任 鳳蓉、田中 博、杉浦 互: HIV-1 ゲノム RNA における poly (A) 付加部位に関する研究. 第22回日本エイズ学会学術集会. 2008年11月26～28日,大阪
 10. 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. 2008年11月26～28日,大阪
 11. 椎野禎一郎、貞升健志、長島真美、杉浦 互: HIV-1 薬剤耐性変異の感染者集団における固定/消失時間の解析. 第22回日本エイズ学会学術集会. 2008年11月26～28日,大阪
 12. 正岡崇志、梁 明秀、巽 正志、杉浦 互、森下了、澤崎達也、山本直樹: 酵素活性を指標とした新規 HIV プロテアーゼ薬剤耐性検査法の開発. 第22回日本エイズ学会学術集会. 2008年11月26～28日,大阪
 13. 星野忠次、辰巳絢子、篠原祐子、大出裕高、杉浦 互: コンピューターによる薬剤耐性 HIV-1 に対する薬効予測の試み. 第22回日本エイズ学会学術集会. 2008年11月26～28日,大阪
 14. 横幕能行、大出裕高、間宮均人、濱口元洋、伊部史朗、藤崎誠一郎、藤崎菜穂子、金田次弘、杉浦 互: Enfuvirtide (T-20) +raltegravir (RAL) +darunavir (DRV) +etravirine (TMC125) +lamivudine (3TC) の多剤高度耐性 HIV-1 感染症に対する治療効果. 第22回日本エイズ学会学術集会. 2008年11月26～28日,大阪
 15. 杉浦 互、濁永博之、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、山本泰之、田中理恵、加藤真吾、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、林田庸経、服部純子、伊部史朗、藤崎誠一郎、金田次弘、濱口元洋、上田幹夫、大家正泰、田邊嘉也、渡辺香奈子、渡辺 大、白阪琢磨、柴原 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. 第22回日本エイズ学会学術集会. 2008年11月26～28日,大阪

II. 知的所有権の出願・取得状況

該当なし



免疫再構築の分子機序の解析

研究分担者

太田 康男 帝京大学医学部内科学講座 教授

研究協力者

北沢 貴利 東京大学医学部附属病院 助教

柳元伸太郎 東京大学大学院総合文化研究科生命科学構造化センター 特任助教

占賀 一郎 帝京大学医学部内科学講座 助教

研究要旨

本研究は、いまだその分子機序が不明のままである免疫再構築症候群の分子機序の一端を解明すること、すなわちHIVと他の病原微生物の共存のもとでの病原微生物の認識機構を解明することを研究の主眼としている。Toll-like receptor (TLR)は、病原微生物の認識にきわめて重要であり、TLR4は主として細菌のリポポリサッカライド (LPS)を認識する。近年細菌感染によるLPSによる繰り返し刺激とHIVの相互作用に関する論文がいくつか公表され、その中でHIV感染によりTLR4の細胞表面発現が抑制される、すなわちその機能が抑制されるという報告がなされた。そこで、本研究ではTLR4が細胞表面発現するための分子機序の解明を試み、最終的にはHIVがどのようにそれを制御するかという分子機序の解明を具体的な目標とした。TLR4の細胞内ドメイン815番のロイシンをアラニンに置換した変異TLR4は、その分布が細胞質内にとどまり、その細胞表面発現が抑制された。また、TLR4リガンド (LPS) 刺激による活性化も認められなかった。また同部位は、TLR4が細胞表面発現するために必須であると考えられているMD-2との会合に重要であることが明らかになった。以上、今年度の研究において、TLR4の細胞内分布およびTLR4を介する活性化を規定する細胞内ドメインを明らかにしたが、これは今後HIVと他の微生物との相互作用を明らかにする上できわめて重要な知見であると考えられる。

A. 研究目的

HIV感染により種々の病原微生物に感染しやすくなるが、逆に抗HIV治療により他の病原微生物の感染が顕著になる現象(免疫再構築症候群)も知られている。これは抗HIV治療を進める上で大きな妨げとなる。本研究は、いまだその分子機序が不明のままである免疫再構築症候群の分子機序の一端を解明すること、すなわちHIVと他の病原微生物の共存のもとでの病原微生物の認識機構を解明することを研究の主眼としている。平成20年度は、特に病原微生物の認識に重要な役割を演じているマクロファージ・樹状細胞に焦点をあてて、それらの細胞における病原微生物の認識に重要なToll-like receptor (TLR)を介する制御機構を明らかにすることを目的とした。

TLR4は、主として細菌のリポポリサッカライド

(LPS)を認識するきわめて重要な受容体である。HIV感染により免疫機能が低下すると、細菌感染を繰り返すようになることは、周知の事実である。一方、近年LPSによる繰り返し刺激により、HIVの転写が制御されるという報告がなされている。さらにごく最近、逆にHIV感染によりTLR4の細胞表面発現が抑制される、すなわちその機能が抑制されるという報告もなされた(J. Virol. 2008, 82, 7790-7798)。このように細菌感染とHIV感染は一見独立した現象のように思われるが、相互に制御し合い、病態の進行を規定していると考えられる。そこで、今年度の研究において、TLR4が細胞表面発現するための分子機序の解明を試み、最終的にはHIVがどのようにそれを制御するかという分子機序の解明を目標とした。

B. 研究方法

まずTLR4のトランケーション変異体を作成した。これらをHEK293細胞にMD-2、CD14とともに発現し、その細胞内分布をGFPを用いた免疫蛍光染色で観察し、合わせてTLR4リガンド(LPS)による活性化をNF- κ Bの活性化を指標に解析した。さらに上記解析により、細胞内分布およびLPSによる活性化を制御する可能性が指摘された領域について、種々の(単)変異体を作成し、同様な方法の解析を行った。これらの一連の解析により同定されたTLR4変異体の表面発現に関しては、ビオチン化抗体を用いたsurface labeling法をも用いて検証した。また従来TLR4の表面発現を規定する可能性が報告されているMD-2との会合をウエスタン法にて解析した。

(倫理面への配慮)

今年度の研究内容においては、特に配慮すべきことはない。

C. 研究結果

826トランケーションTLR4変異体では、野生型と同様に細胞表面ならびにGolgi体と思われる核周囲への分布が認められたが、815トランケーションTLR4変異体より大きなトランケーションを有するTLR4変異体では、細胞質内にびまん性に分布し、細胞表面発現が認められなかった。またLPS刺激によるNF- κ Bの活性化も認めなかった。

そこで、815-826の部位に細胞表面発現とLPS刺激によるNF- κ Bの活性化を規定する部位が存在すると考え、これらの領域のTLR4変異体を作成し同様の解析を行ったところ、L815A(815番目のロイシンをアラニンに置換した)TLR4変異体は、細胞質内にびまん性に分布し、免疫蛍光染色法でもビオチン化抗体を用いたsurface labeling法でも細胞表面発現も認められないことが明らかになった(図1)。またこの変異体は、LPS刺激によるNF- κ Bの活性化も認めなかった(図2)。

最後にTLR4(L815A)変異体の動態を規定する分子機序を解析するため、この変異体とMD-2との会合を検討したが、それらの会合は認められなかった(図3)。

D. 考察

TLR4の細胞内分布を規定する重要な細胞内ドメインのアミノ酸モチーフを世界で初めて解明した。この部位は、少なくともMD-2との会合に重要な部位であると考えられる。今後さらに野生型および変

異体を比較することで、HIVがTLR4の細胞表面発現に作用する機序について解析を行う予定である。

E. 結論

TLR4の815番目のロイシンは、TLR4とMD-2との会合に重要な部位であり、細胞表面発現を規定する重要なアミノ酸モチーフである。

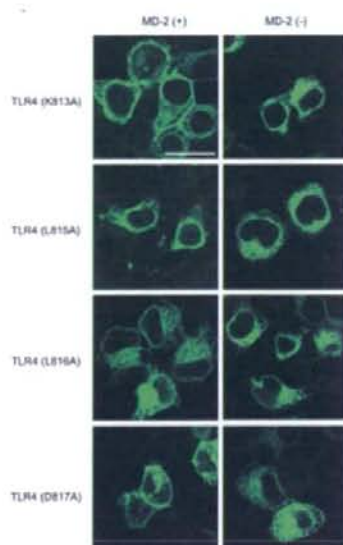


図1

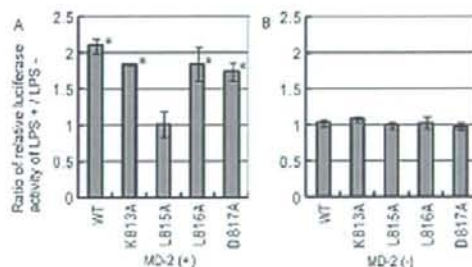


図2

C. immunoprecipitation of WT and mutant TLR4

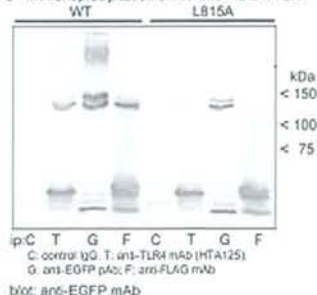


図3

F. 健康危険情報

総括研究報告書参照

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yanagimoto S, Tatsuno K, Okugawa S, Kitazawa T, Tsukada K, Koike K, Kodama T, Kimura S, Shibasaki Y, Ota Y. An essential single amino acid of Toll-like receptor 4 that is pivotal for its signal transduction and subcellular localization. *J. Biol Chem.* *in press* (published on line).
2. Yamamura M, Makimura K, Ota Y. Evaluation of a new rapid molecular diagnostic system for *Plasmodium falciparum* combined with DNA filter paper, loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and melting curve analysis. *Jap. J. Infect. Dis.* *in press*.
3. Okada H, Kitazawa T, Harada S, Itoyama S, Hatakeyama S, Ota Y, Koike K. Combined treatment with oral kanamycin and parenteral antibiotics for a case of persistent bacteremia and intestinal carriage with *Campylobacter coli*. *Intern Med.* 2008; 47:1363-6.

2. 学会発表（国際学会のみ）

1. Yoshino Y, Tatsuno K, Kitazawa T, Koike K, Ota Y. Cryptococcal pleuritis as an initial AIDS-associated opportunistic infection: A case report. 7th International Conference on Cryptococcus, September 11-14, 2008, Nagasaki, Japan.
2. Kitazawa T, Yoshino Y, Tatsuno K, Koike K, Ota Y. Pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis of vancomycin in patients with MRSA bacteremia. 13th International Congress on Infectious Diseases, June 19-22, 2008, Kuala Lumpur, Malaysia

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



融合阻害薬・インテグラーゼ阻害薬の *in vitro* 研究

研究分担者

見玉 栄一 京都大学ウイルス研究所感染免疫研究領域 助教

研究要旨

国内で使用され始めた新規薬剤に対する耐性HIVの簡便な検出法の確立のために、本年度は融合阻害剤の耐性変異の役割を明らかとした。V38AやN43D変異が主に耐性に関与し、2次変異、特にアミノ酸変異を伴わないQ41やL44の複製への寄与を明らかとした。また、耐性変異を有する分子クローンpNL4-3を構築し、コントロールとして各施設間のデータの標準化に役立つ耐性株ライブラリー作成を開始した。

A. 研究目的

抗レトロウイルス剤を多剤併用することにより、HIV感染症は大多数の患者においてコントロール可能な疾患となったが、一度宿主遺伝子内に組み込まれたHIV遺伝子の完全な排除は実現されておらず、長期にわたる治療が必要である。そしてわずかであってもウイルス複製は変異の導入を促し、いったん耐性変異を獲得すると治療成績を大きく減弱させる。HIVは個々の薬剤に対して耐性を獲得するだけでなく、他の薬剤に対し同時に耐性化することもあり(多剤耐性・交差耐性)、治療をより困難とさせる。そのため、これまでの薬剤、逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤にとどまらず、新しい標的に対する薬剤の開発が急がれている。

近年、既存の薬剤とは違うカテゴリーの薬剤、CCR5アンタゴニスト、融合阻害剤、インテグラーゼ阻害剤が開発されてきている。本研究では個人輸入により本邦においてもHIV感染患者に使用されるようになった融合阻害剤enfuvirtide (T-20)と昨年認可され使用が始まったインテグラーゼ阻害剤、raltegravirに対する耐性について解明する。これら新規薬剤の併用により従来の治療薬に抵抗性となった患者において検出限界以下までウイルス量を低下させることが可能であったと報告されているが、一方でHIVはなおも耐性を獲得することが報告されている。本研究では薬剤耐性変異の同定、その変異がもつウイルス学的意義、臨床分離株における耐性の検出法に結びつく基礎的研究を行う。また、この研究を通して耐性機序を明らかとしてそれを克服しうる薬剤の開発にも役立たせたい。

この研究の期待される成果として本邦における新規薬剤に留まらず、欧米で認可され国内認可を待つ間に個人輸入等で治療が開始されている薬剤に対しても耐性検査法等の対応を供給可能とする。一方基礎研究的な意義として耐性ウイルスの性状を検討することができ、そのことは今後の薬剤開発に対して有用な情報を提供すると考えられる。

B. 研究方法

1) 細胞とウイルス

MT-2はRPMI1640培地を用いて培養した。293T細胞、HeLa-CD4/β-galactosidase (MAGI)細胞はDMEM培地を使用した。ウイルスはプラスミドクローンであるpNL4-3とその組替え体を293T細胞に遺伝子導入して作製した。

2) 抗ウイルス剤

ペプチド製剤はFmoc法によって化学合成した。コントロールに用いたzalcitabineはSigma社(St. Louis, MO)から購入した。

3) 耐性変異の導入とプラスミドの作製

Site directed mutagenesisはStratagene社(La Jolla, CA)のキットを用いた。他のプラスミドの作製では一般的な手技、試薬を使用した。

4) 薬剤感受性試験

薬剤感受性はMAGI細胞を用いたsingle round

replicationに対する抗ウイルス活性として測定した。

5) ウイルス複製能

目的の変異を有するウイルスの定量的な複製能は培養上清中に放出されるp24抗原量で検討した。定量的な複製能はcompetitive HIV replication assay (CHRA)を用いて検討した。

(倫理面への配慮)

今年度の研究は、臨床サンプルを解析するためのシステム構築を主とする基礎研究であり、臨床分離株など患者由来の情報は氏名、年齢、性別も含めて一切を研究に利用していないため特に配慮は要らないと考えられた。また、ヒトゲノム・遺伝子解析やヒト幹細胞を用いた実験は行っていない。

C. 研究結果

1) ウイルスクローンライブラリーの作製

これまで欧米で報告されている主な耐性変異をpNL4-3に導入したT-20耐性変異HIVライブラリーを作製した。pNL4-3に存在するユニークサイトには含まれるNheI-BamHI断片(1215 bp, gp120 V4領域からgp41の細胞外domainを含む)をクローニングしたpSLgp41WTを作製した。これに対してsite directed mutagenesisを行い、変異を有するNheI-BamHI断片をpNL4-3に戻すことで目的の変異を有するクローンを作製した。T-20を先行使用している欧米から分離された耐性ウイルスで高頻度に認められるL33S、V38A、N43D、N126K、S138Aを有するウイルスクローンを作製した。これらのウイルスは36番目のアミノ酸がDおよびGの2つのタイプを作製した。

2) D36Gの影響

NL4-3はgp41の36番目のアミノ酸がDであるがほとんどの臨床分離株はGである。この違いがT-20に対する感受性に影響を与えるか、MAGI法で検討したところ、約10倍程度感受性が異なることを明らかとした(表1)。つまり、36Dを有するNL4-3はもともとT-20に対し約10倍程度感受性が低下しており、臨床分離株の感受性を検討するにはD36Gの変異を導入したpNL4-3との比較が適していると考えられた。複製能はD36Gを導入することで改善傾向が認められたが、大きな変化ではなかった。一方以下で述べるが、T-20耐性関連変異を導入した場合、薬剤感受性、複製能両方に大きな影響を及ぼした。これらのことから36番目のアミノ酸は融合阻害剤耐性に

大きな影響を及ぼすと考えられた。

3) 薬剤感受性

表1に示したように海外で報告されたT-20耐性変異を導入することでT-20に対して10倍以上の耐性化が認められた。この中でもN43Dがもっとも強い耐性を付与した。しかし、D36Gを導入することでその耐性は低下し、特にN43Kにおいてはほとんど耐性化していないことがわかった。このことはT-20使用患者においてN43Kの検出例が少ないことと一致する。このN43Kは*in vitro*耐性誘導で見出された変異であり、臨床的には36番目のアミノ酸がDに変異した患者において問題になると考えられた。

4) 複製能

すべてのウイルスでD36G変異を有するウイルスにおいて複製性能が改善していた(表1)。特にN43DはMT-2細胞において複製能が野生型の2%以下に低下しており、syncytium形成性もほとんどなく、感染能の極端な低下が認められたが、D36G導入により改善した。GenBankに登録されているT-20耐性ウイルスの遺伝子変異を解析したところ、興味深いことにほとんどの株でQ41とL44に相当する部位にsilent mutationが導入されていた。この二つの変異はアミノ酸置換を伴わないことからgp41の機能ではなく遺伝子配列に関連した機能を有していると考えられた。このgp41をコードするRNA部位はHIV遺伝子発現調整因子であるRevが結合するRNA配列、Rev responding element (RRE)をもあわせてコードしており(図1A)、Q41-CAA/CAGとL44-UUG/CUGはこのRREの2次構造であるstem loop IIIに相補的に導入されていた(図1A, B)。これらの変異を耐性変異が導入されたプラスミドにお互いに相補的に導入するとほとんどのウイルスにおいて複製能が改善した。このstem loopの構造安定性を熱力学的に計算し推定したところ、その安定性と実際の複製に正の相関が得られた(図1C)。しかし、Q39-CAG/CAAのように相補的ではない部位ではその影響は認められず、逆にL44-UUAのようにstem構造を不安定にするsilent mutationは複製能を大きく低下させた(表1)。これらのsilent mutationはアミノ酸変異を伴わずT-20の感受性には影響を及ぼさなかった(表1)。

5) 耐性ウイルスの構築

上記したとおり、T-20に対する耐性ウイルスの標準株の作成がほぼ完了した。一方でインテグラーゼ阻害剤、raltegravirに対する耐性変異、Q148K/H、

表1 Drug susceptibility and viral replication of HIV-1 clones with primary mutations or synonymous mutations

Mutation(s)	EC ₅₀ ^c (μM)		p24 (%)
	ddC	T-20	
WT ^d	0.51 ± 0.089	0.021 ± 0.0093	100
D36G	0.66 ± 0.22 (1.3) ^e	0.0026 ± 0.0012 (0.1)	95 ± 15
<i>Primary mutations</i>			
V38A	0.65 ± 0.12 (1.3)	> 1.0 (> 48)	3.3 ± 1.7
Q40H	0.47 ± 0.11 (0.9)	0.21 ± 0.087 (10)	31 ± 11
N43D	0.48 ± 0.13 (0.9)	> 1.0 (> 48)	< 2
N43K _{AAA}	0.22 ± 0.005 (0.4)	0.28 ± 0.024 (13)	21 ± 11
N43K _{AAAG}	0.32 ± 0.009 (0.6)	0.11 ± 0.019 (5.4)	30 ± 16
L45M	0.68 ± 0.12 (1.3)	0.27 ± 0.11 (13)	5.4 ± 0.8
Q40H/L45M	0.37 ± 0.2 (0.7)	> 1.0 (> 48)	7.7 ± 3.7
<i>Synonymous mutations</i>			
Q _{CAG} 39Q _{CAA}	0.62 ± 0.077 (1.2)	0.015 ± 0.006 (0.7)	115 ± 16
Q _{CAG} 41Q _{CAA}	0.58 ± 0.13 (1.1)	0.054 ± 0.011 (2.6)	192 ± 53
L _{UUG} 44L _{CUG}	0.62 ± 0.089 (1.2)	0.030 ± 0.018 (1.5)	191 ± 34
L _{UUG} 44L _{UUA}	0.64 ± 0.18 (1.3)	0.014 ± 0.0026 (0.7)	5.9 ± 1.7
<i>N43D series</i>			
N43D ^f	0.48 ± 0.13 (0.9)	> 1.0 (> 48)	< 2
N43D/L44L _{CUG}	0.35 ± 0.050 (0.7)	> 1.0 (> 48)	< 2
Q39Q _{CAA} /N43D	0.34 ± 0.17 (0.7)	> 1.0 (> 48)	< 2
Q41Q _{CAA} /N43D	0.62 ± 0.097 (1.2)	> 1.0 (> 48)	< 2
D36G/N43D	0.56 ± 0.18 (1.1)	0.13 ± 0.056 (6.1)	81 ± 10
D36G/N43D/L44L _{CUG}	0.63 ± 0.19 (1.2)	0.10 ± 0.045 (4.9)	103 ± 34
D36G/Q39Q _{CAA} /N43D	0.76 ± 0.12 (1.5)	0.14 ± 0.057 (6.8)	59 ± 23
D36G/Q41Q _{CAA} /N43D	0.74 ± 0.14 (1.5)	0.14 ± 0.066 (6.8)	67 ± 16
<i>N43K series</i>			
N43K _{AAA} ^f	0.22 ± 0.005 (0.4)	0.28 ± 0.024 (13)	21 ± 11
N43K _{AAAG} ^f	0.32 ± 0.009 (0.6)	0.11 ± 0.019 (5.4)	30 ± 16
N43K _{AAA} /L44L _{CUG}	0.64 ± 0.087 (1.3)	0.22 ± 0.082 (11)	76 ± 18
N43K _{AAAG} /L44L _{CUG}	0.59 ± 0.10 (1.2)	0.12 ± 0.055 (5.9)	37 ± 15
D36G/N43K _{AAA}	0.61 ± 0.086 (1.2)	0.0069 ± 0.0004 (0.3)	26 ± 18
D36G/N43K _{AAAG}	0.60 ± 0.078 (1.2)	0.0087 ± 0.0008 (0.4)	27 ± 12
D36G/N43K _{AAA} /L44L _{CUG}	0.28 ± 0.14 (0.6)	0.0057 ± 0.0016 (0.3)	96 ± 19
D36G/N43K _{AAAG} /L44L _{CUG}	0.69 ± 0.14 (1.4)	0.0069 ± 0.0003 (0.3)	53 ± 8.1

^a Antiviral activity was determined by the MAGI assay. The data shown are mean values and standard deviations obtained from the results of at least three independent experiments.

^b Viral replication was determined by p24 ELISA. The data shown are mean values and standard deviations obtained from the results of at least three independent experiments. Absolute p24 value for HIV-1_{WT} was 1.8 ± 0.2 ng/ml

^c 50% effective concentration was determined with the MAGI assay.

^d HIV-1_{NL4-3} was used as a wild type virus.

^e Fold change in EC₅₀ of the gp41 recombinant molecular clone compared with that of HIV-1_{WT}.

^f Also described in the *primary mutations* section.

^g Only insufficient replication of HIV-1_{N43D} in MT-2 cells was observed. However, we could determine initial titer of the HIV-1_{N43D} obtained from freshly transfected 293T cells in the MAGI cells, since the MAGI assay only detects first round of viral infection up to Tat expression. Therefore, it may be ideal for determination of accurate inhibitory effect compared to other assays that allow multiple replications.

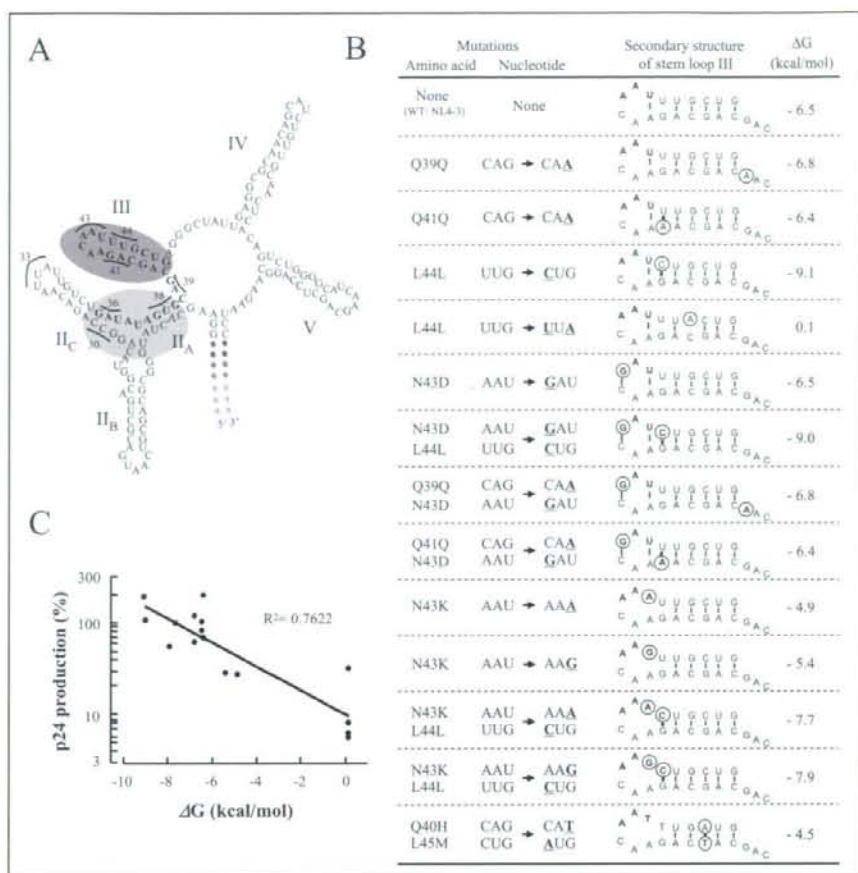
N155H等を作成した。来年度もその作成を続けて重要な変異の標準株を確立させる。

6) 感受性アッセイの構築

本年度は融合阻害剤の耐性機序の解明が中心であったが、来年度にむけ、phenotype assayに必要なベクターの構築に着手し、reporterとしてのluciferaseの発現を確認した。

D. 考察

T-20耐性ウイルスの解析からHIV RNA構造の重要性が明らかとなり、gp41だけでなくRREを含んだassay系が必要であることが明らかとなった。このことはHIVのEnvを標的とする薬剤の耐性株を作成にすにあたりアミノ酸配列だけでなく核酸配列に対しても配慮が必要であることを示す。一方でT-20の治療を中断するとN43D等の変異を有する耐性ウイルスが速やかに血中から消失する理由として、



(A) Secondary structure of RRE depicted based on references (Olsen et al., 1990; Zapp et al., 1989). T-20-resistant mutations are accumulated between amino acid position from 36 to 45 of gp41 and nucleotides coding for these amino acids, are given in bold. Stem loop II (light gray region) was examined as described previously (Nameki et al., 2005) and stem loop III (dark gray region) was analyzed in this study.

(B) Amino acid substitutions in the gp41 with their nucleotide changes and putative secondary structures and their stabilities of stem loop III are shown. Nucleotide substitutions are indicated in bold and circle. Newly generated nucleotide pairs are indicated by the bold line. The stability of stem loop III defined by ΔG value was calculated using the MFold program version 3.2 (Mathews, et al., 1999; Zuker M., 2003).

(C) Correlation of the amounts of p24 production and stability of stem loop III (ΔG value) is shown. Plots of Q41H and L45M were included but that of V38A was excluded since V38A is located in stem IIA. Since replication of N43D containing clones were extremely low, p24 productions obtained from D36G combined N43D or K containing clones, were used. When excluding data of D36G combined with N43D or N43K and including that of N43K without D36G, correlation coefficient (R^2) was 0.72.

図1 Relation of mutations in gp41 and RRE

複製能が著しく低いことがあげられ、T-20非存在下では優位になれないことが考えられた。

初年度においてT-20耐性の耐性変異部位を持つクローンのライブラリーを構築することが可能であった。今後は国内外での耐性ウイルスの情報をさらに集め、主な耐性変異をライブラリー化していこうと考えている。当初は来年度から開始する予定だったIN阻害剤耐性ウイルスの構築を始めることが可能であった。IN阻害剤はT-20と異なり、まだ臨床使用期間、患者数が限られており、耐性情報が少ない状

態であるが、国内での使用が認可されたこともあり、耐性情報の収集に努める。

今後の展望として、上記の研究に合わせ、いまだ確立されていないインテグラーゼに対する phenotypic assay の確立を目指す。新規阻害剤の耐性変異の詳細は未だ明らかとなっておらず、これらを網羅的に解析することは学術的に重要である。そのためにもP3施設を必要としない単一感染による安全な assay 系を確立し、効率的な治療方針決定に貢献したい。

E. 結論

今年度は融合阻害剤T-20に対する耐性ウイルスライブラリーを構築した。IN阻害剤に関しても同様に進めている。単一感染系phenotype法の確立を開始した。

F. 健康危険情報

総括研究報告書参照

G. 研究発表

- Hiroki Nishikawa, Shota Nakamura, Eiichi Kodama, Saori Ito, Keiko Kajiwara, Kazuki Izumi, Yasuko Sakagami, Shinya Oishi, Tadayasu Ohkubo, Yuji Kobayashi, Akira Otaka, Nobutaka Fujii, Masao Matsuoka Electrostatically constrained α -helical peptide inhibits replication of HIV-1 resistant to enfuvirtide. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* (in press)
- Eiichi Kodama, Masaya Orita, Naoyuki Masuda, Osamu Yamamoto, Masahiro Fujii, Tetsuro Ohgami, Shunji Kageyama, Mitsuaki Ohta, Toshifumi Hatta, Hiroshi Inoue, Hiroshi Suzuki, Kenji Sudo, Yasuaki Shimizu, and Masao Matsuoka Binding modes of the novel non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors, YM-215389 and YM-228855, to HIV-1 reverse transcriptase. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 19:133-141, 2008
- Hiroki Nishikawa, Eiichi Kodama, Ayako Sakakibara, Ayako Fukudome, Kazuki Izumi, Shinya Oishi, Nobutaka Fujii, Masao Matsuoka. Novel screening systems for HIV-1 fusion mediated by two extra-virion heptad repeats of gp41. *Antiviral Research* 80:71-76, 2008
- Satoshi Ueda, Manabu Kato, Shinsuke Inuki, Hiroaki Ohno, Barry Evans, Zi-xuan Wang, Stephen C. Peiper, Kazuki Izumi, Eiichi Kodama, Masao Matsuoka, Hideko Nagasawa, Shinya Oishi, Nobutaka Fujii. Identification of novel nonpeptide CXCR4 antagonists by ligand-based design approach. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 18:4124-4129, 2008
- Hiroki Nishikawa; Shinya Oishi; Mizuno Fujita; Kentaro Watanabe; Rei Tokiwa; Hiroaki, Ohno; Eiichi Kodama; Kazuki Izumi; Keiko Kajiwara; Takeshi Naitoh; Masao Matsuoka; Akira Otaka; Nobutaka Fujii Identification of minimal sequence for HIV-1 fusion inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16:9184-9187, 2008
- Atsushi Kawamoto, Eiichi Kodama, Stefan G. Sarafianos, Yasuko Sakagami, Satoru Kohgo, Kenji Kitano, Noriyuki Ashida, Yuko Iwai, Hiroyuki Hayakawa, Hiroto Nakata, Hiroaki Mitsuya, Eddy Arnold, and Masao Matsuoka. 2'-Deoxy-4'-C-ethynyl-2-halo-adenosines active against drug-resistant human immunodeficiency virus type 1 variants. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 40:2410-2420, 2008
- Atsuko Hachiya, Eiichi N. Kodama, Stefan G. Sarafianos, Matthew M. Schuckmann, Yasuko Sakagami, Masao Matsuoka, Masafumi Takiguchi, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka. Amino acid mutation, N348I, in the connection subdomain of HIV-1 Reverse Transcriptase Confers Multi-class Resistance to Nucleoside and Non-nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors. *Journal of Virology* 82: 3261-3270, 2008
- Oishi S, Masuda R, Evans B, Ueda S, Goto Y, Ohno H, Hirasawa A, Tsujimoto G, Wang Z, Peiper SC, Naito T, Kodama E, Matsuoka M, Fujii N. Synthesis and Application of Fluorescein- and Biotin-labeled Molecular Probes for Chemokine Receptor CXCR4. *ChemBioChem* 9:1154-1158, 2008thesis and Application of Fluorescein- and Biotin-labeled Molecular Probes for Chemokine Receptor CXCR4. *ChemBioChem* 9:1154-1158, 2008
- Shimura K, Kodama E, Sakagami Y, Matsuzaki Y, Watanabe W, Yamataka K, Watanabe Y, Ohata Y, Doi S, Sato M, Kano M, Ikeda S, Matsuoka M. Broad Anti-Retroviral activity and Resistance Profile of a Novel Human Immunodeficiency Virus Integrase Inhibitor, Elvitegravir (JTK-303/GS-9137). *Journal of Virology* 82: 764-774, 2008
- Kajiwara K, Kodama E, Sakagami Y, Naito T, Matsuoka M. A Dual-Reporter Phenotypic Assay for Human Immunodeficiency Viruses. *Journal of Clinical Microbiology* 46: 792-795, 2008
- Oishi S, Ito S, Nishikawa H, Watanabe K, Tanaka M, Ohno H, Izumi K, Sakagami Y, Kodama E, Matsuoka M, Fujii N. Design of a Novel HIV-1 Fusion Inhibitor That Displays a Minimal Interface for Binding Affinity. *Journal of Medicinal Chemistry* 51: 388-391, 2008
- Ujike M, Nishikawa H, Otaka A, Yamamoto N, Yamamoto N, Matsuoka M, Kodama E, Fujii N and Taguchi F. Heptad repeat-derived peptides block the protease-mediated direct entry from cell surface of SARS coronavirus but not entry via endosomal pathway. *Journal of Virology* 82: 588-592, 2008



中和抗体の臨床応用に関する研究

研究分担者

吉村 和久 熊本大学エイズ学研究センター病態制御分野 講師

研究要旨

新規CCR5阻害剤であるマラビロック (Maraviroc, MVC) は、わが国でも2009年1月より臨床使用可能となった。これまで臨床試験例における解析では、もともと存在していたX4ウイルスがR5と置き換わって出てくるか、V3領域が投与時点と大きく違っているものが出現するという報告であった。一方で、*in vitro*耐性誘導による詳細な解析の報告はまだ非常に少ない。そこで、我々は、新たに樹立したnon-B subtypeの臨床分離株(KMC1、CRF08_BC)を用いて、MVCに対する*in vitro*耐性誘導を行い、耐性機序の検討を行った。CRF08_BC株に感染している患者さんのPBMCからウイルスを分離し、PM1/CCR5細胞を用いてMVCの濃度を徐々に上げて行き、最終的には10 μ Mまで上げ(19パッセージ)、耐性ウイルスを誘導した。各パッセージの上清を用いて、MVCに対する感受性試験を行ったところ、11パッセージ(500nM)以降は10倍以上MVCに耐性になっていた。シークエンスの結果、gp120のC4 (P417Q)とV4 (I443L)に変異がみられ、V3には変異はみられなかった。これまで行われて来たCCR5阻害剤の耐性変異の報告では、V3に変異が入ることで耐性化することがほとんどであり、C4とV4だけで耐性化する報告はMVCに関しては、初めてである。また、subtype BCを用いた*in vitro* selectionの報告も初めてである。今後我が国でも増加するであろうnon-B subtype (BC株等)の研究は益々重要になってくると考える。

A. 研究目的

現在のHIV感染症に対する治療は、大きな転換期に来ていると言える。既存の薬剤に対する耐性変異ウイルスの蓄積と、長期毒性により治療を継続できない症例の増大という難問をクリアするために、続々と新規薬剤が投入されて来ているからである。特に、国内においても投与が行われ始めた初のCCR5阻害剤マラビロック (Maraviroc, MVC) は、これまでの薬剤と作用点が全く異なることもあり、大きな期待が寄せられている。そこで、この阻害薬を用いた効率的な治療法の確立、および第二世代のCCR5拮抗薬の開発のために、これら第一世代の阻害薬の耐性メカニズムの研究は、大変重要となる。しかしながら、これら阻害剤に対する*in vitro*耐性誘導の知見はまだ非常に限られており、MVCに関しては1-2報しか報告されていない。この研究班の一つの柱である「抗HIV薬適正使用と効果」を知る上においても、新薬の耐性変異についての研究は必要

不可欠であると考えられる。そこで、本研究では、現在中国で急増しており、今後我が国での流行が予想されるnon-B subtypeの一つCRF08_BC株を用いて、MVCに対する*in vitro*耐性誘導を行い、耐性機序についてウイルス学的な検討を行うこととした。

B. 研究方法

これまでは、抗ウイルス薬の臨床応用に際しては、通常*in vitro*で耐性誘導実験を行い、*in vivo*での耐性の予測を行って来た。しかし、その他の薬剤と違い、CCR5阻害剤に対する耐性ウイルス誘導は、CCR5指向性HIV-1 (R5ウイルス)を用いなければならないため、多くの場合PBMCを標的細胞として行われて来た。しかし、逃避ウイルス誘導が非常に煩雑であり、標的細胞が毎回異なることなどから、安定したパッセージが困難であった。そこで、我々はなるべく簡便にR5ウイルスの逃避ウイルス誘導を行うため、CCR5高発現T細胞株であるPM1/CCR5細胞を用い*in*

in vitro R5 ウイルスの MVC からの逃避誘導を試みた。この細胞株は、R5 ウイルスでも感染が成立すると合胞体を形成するため、顕微鏡下に感染の広がり確認できる。この細胞を用いて、我々が感染症例から分離した R5 臨床分離株 (non-B subtype の一つ CRF08_BC 株) を用いて、*in vitro* 逃避ウイルス誘導を行った (図-1)。その結果、得られた逃避ウイルスを用いて、MVC の耐性を PM1/CCR5 細胞を用いた WST-8 assay (細胞傷害阻止試験) により判定する。R5 ウイルスを用いた WST-8 assay はこれまであまり行われていないが、R5 ウイルスの実験室株や臨床分離株においても、WST-8 assay での測定が可能であることは、既に確認済みであり、従来に比べて簡易にウイルスの薬剤に対する耐性を判定できるため、非常に有用である。WST-8 assay により逃避ウイルスの誘導が確認できたところで、これらのウイルスの envelope のシーケンスを行う。シーケンスにより、逃避能付与責任変異部位の特定を行う。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

新規 CCR5 阻害剤のマラビロック (MVC) は、わが国でも 2008 年 12 月に承認され、2009 年 1 月より正式に使用可能となり、副作用や薬剤耐性のために、組み合わせの変更を余儀なくされている多くの感染者の方々に今後投与の機会が増えていくことが予想される。また、世界的に報告が増加して来ている異なった subtype 間の組換えウイルスが、これまでほとんど subtype B と AE だけであった本邦においても増加することは容易に想像できる。実際に、熊本大学や九州医療センターで外来を受診されている症例の中に non-B subtype のウイルスに感染している方の報告が少しずつ増加して来ている。昨年分離した R5 臨床分離株 KMC1 は、gp120 及び pol のシーケンスの結果 CRF08_BC 株であることが判明した (図 2)。このウイルスは、中国の雲南省で初めて確認されてから 1990 年代後半までに中国全土に広がり現在日本でも確認されている。この急激な広がり方から、今後日本でも感染症例が増えていくと考えられる。そこで、今回分離し、PM1/CCR5 細胞での十分な増殖が確認できた KMC1 ウイルスを用いて、MVC 耐性誘導を *in vitro* で行った。MVC の濃度を 0.5 nM から開始し、徐々に上げて行き最終的には 10 μM まで到達した (19 パッセージ)。各パッセージの上清を用いて、MVC に対する感受性試験を行ったところ、8 パッセージ (100 nM) から、コントロールウイルスの

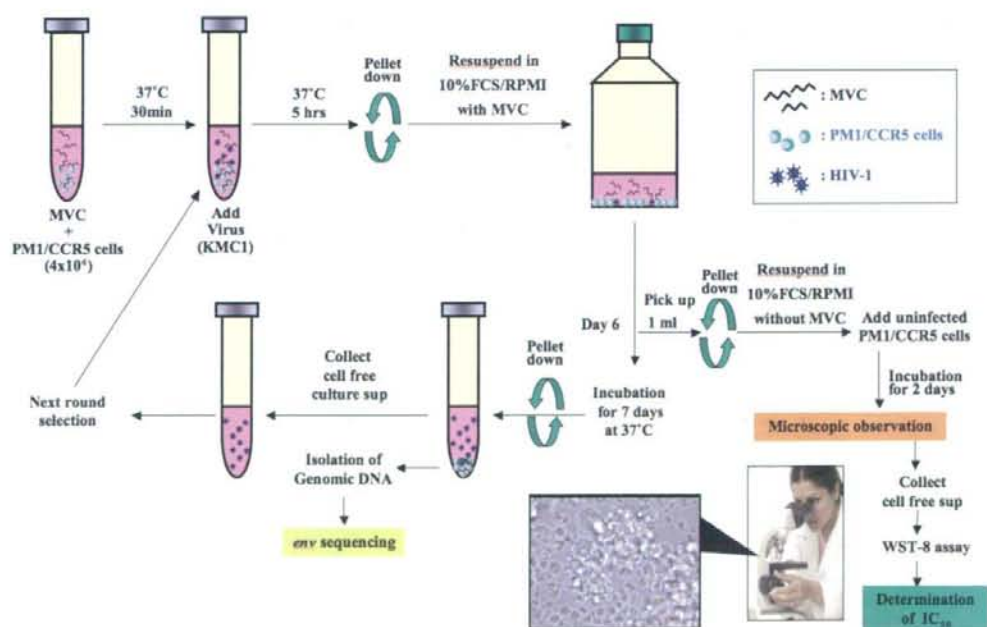


図1 PM1/CCR5細胞を用いた *in vitro* MVC耐性ウイルス誘導の方法

IC₅₀より高くなり始め、11パッセージ(500nM)以降は全ての上清中のウイルスはIC₅₀が200nM以上になっており、MVCに耐性になっていた(図3)。次に、それぞれのパッセージの感染細胞のpDNAを抽出し、シークエンスを行った。その結果、8パッセージ目のgp120 V4領域にP417Q変異が確認され、11パッセージのシークエンスではV4変異に加えてC4(I443L)に変異がみられた。11パッセージ以降MVCの濃度を10 μ Mまで上げたが、この2カ所以外には

V3を含め新たな変異はみられなかった(図4)。V2領域のD173Gの変異も11パッセージ以降100%となるが、コントロールの方にも同じ部位に変異がみられ(D173H/G/Q)ることから、細胞への馴化の変異の可能性が高い。また、MVC耐性ウイルスがその他のCCR5阻害剤に対しても交叉耐性を示すかどうかを検討した。その結果、aplavirocやTAK-779などのMVC以外のCCR5阻害剤に対しても耐性であることが確認できた。

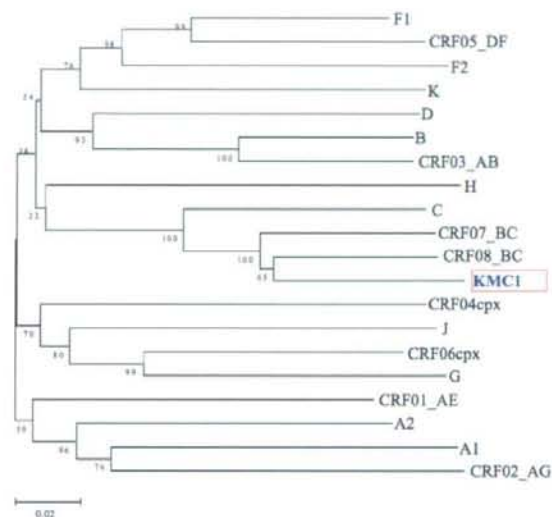


図2 Env gp120のシークエンスの系統樹解析によるKMC1のサブタイプ判定

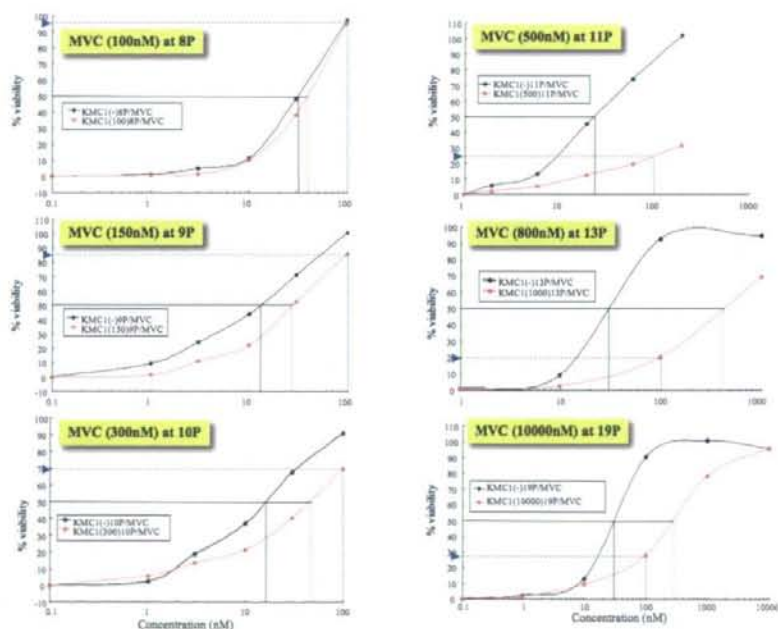


図3 *In vitro*耐性誘導ウイルスのMVCに対する感受性の変化

D. 考察

これまで他の研究室で行われて来たCCR5阻害剤の耐性変異の報告では、V3に変異が入ることで耐性化することがほとんどであり、C4とV4だけで耐性化する報告はMVCに関しては、初めてである。現在、KMCI以外のウイルスにおいてもMVCによる*in vitro*耐性誘導を行っているが、V3に変異が入るウイルスもあるが、V3変異の有無に関わらずV4/C4にかけての変異は出現することから、この領域がCCR5阻害剤の耐性付与に関してきわめて重要な場所であると考えられる。また、BC subtypeウイルスを用いた*in vitro* selectionの報告は世界で初めてであり、2009年の米国レトロウイルス学会(CROI)に演題が採択された。今後我が国でも広がるであろうnon-B subtype(BC株等)の研究は益々重要になってくると考えられ、我々の研究室でもBC以外のウイルスでも耐性誘導をトライしていく予定である。

E. 結論

今後我が国での流行が予想されるnon-B subtypeの一つCRF08_BC株を感染症例より分離し、新規CCR5阻害剤のMVCの*in vitro*耐性誘導を行い、耐性株を誘導した。これまでの耐性誘導の報告とは異なり、V3領域ではなくV4とC4の2カ所の変異で耐性化していることが分かった。この変異は、MVC以外のCCR5阻害剤に対しても交叉耐性を示していた。Non-B subtypeウイルスの耐性動向と、V3領域以外のCCR5阻害剤耐性付与部位(特にV4～C4にかけての領域)のより詳細な検討が今後益々重要となるといえる。

F. 健康危険情報

総括研究報告書参照

G. 研究発表

- 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., and 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.
- Aoki, M., Venzon, D.J., Koh, Y., Aoki-Ogata, H., Miyakawa, T., Yoshimura, K., Maeda, K. and Mitsuya, H. Non-cleavage site gag mutations in amprenavir-resistant HIV-1 predispose HIV-1 to rapid acquisition of amprenavir resistance but delays development of resistance to other protease Inhibitors. J. Virol. 83:3059-3068, 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

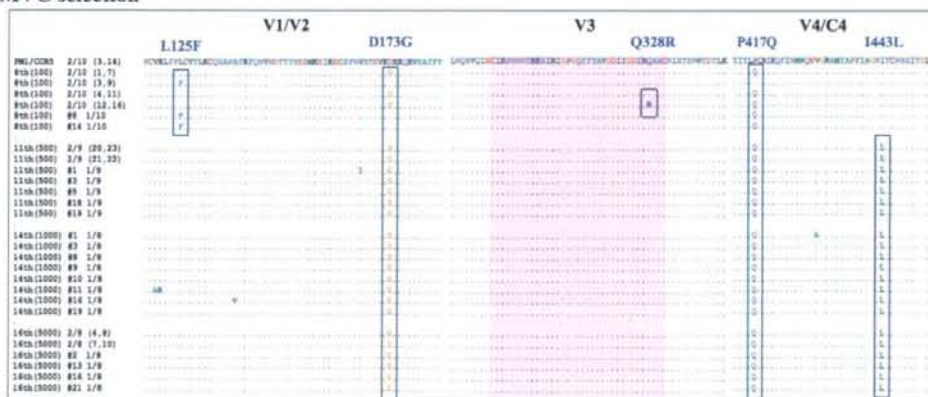
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

MVC selection



Passed control

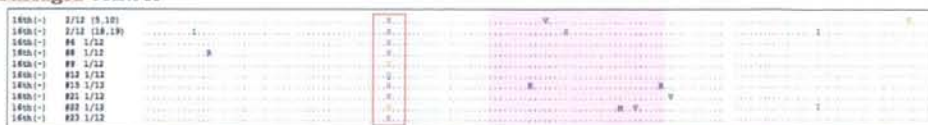


図4 *In vitro*耐性誘導による変異部位の同定

侵入阻害薬の及ぼす分子的な影響の解析

研究分担者

鈴木 康弘 東北大学大学院医学系研究科内科病態学講座感染症病態学分野 講師

研究協力者

Chandra Nath Roy (財)エイズ予防財団 リサーチレジデント

研究要旨

HIV-1の細胞内侵入はgp120が2種類の受容体(CD4とケモカイン受容体)に結合することで開始する。細胞侵入阻害薬の耐性機序を明らかにするためにwildおよび耐性mutation導入gp120を用いて受容体と結合定数またはそれらの動態がどのように変化しているかを明らかにする必要がある。この点について我々はgp120暴露後に細胞膜上でgp120および受容体の動態の詳細を一分子顕微鏡を用いて測定すれば明らかにできると考えている。本年度は受容体と蛍光蛋白を融合させて可視化させる細胞株・レトロウイルスの系を確立すると同時にバキュロウイルスベクター系を用いbiotin-tag蛋白AviTagを付加したHIV-1実験株gp120の組み換え蛋白を迅速に作成し一分子で可視化を可能とする系を確立したので報告する。

A. 研究目的

HIV-1の細胞内侵入は外突起糖蛋白質gp120が2種類の受容体(CD4とケモカイン受容体)に結合することで開始するが、gp120はまずCD4に結合した後に、その構造変化がもたらされてケモカイン受容体に結合する。細胞侵入阻害薬の耐性機序を明らかにするためにはwildおよびmutant導入gp120を用いて2種類の受容体との結合定数が細胞上でどのように変化したかを明らかにする必要がある。この点について我々はgp120暴露後に細胞膜上でgp120および受容体の動態の詳細を一分子顕微鏡を用いて測定すれば明らかにできると考えた。ウイルス受容体は感染実験に用いられる腫瘍細胞上では急速に細胞内に取り込まれてrecycleするために、gp120は受容体結合後、即座に細胞内に取り込まれてしまい結合過程を細胞上で測定することは不可能となる。そこで受容体に変異を入れて細胞内へのエンドサイトーシスを抑制してやるが必要となってくる。本年度は細胞膜上でrecycleできない様な変異を持つ2種類の受容体を作成すると同時に、それらを可視化に必要な蛍光蛋白と融合蛋白として発現させるレトロウイルス、およびトランスフェクションベクター系を確立し、その後、遺伝子を発現させた細胞株を樹立した。同時にバキュロウイルスベクター系をもちいてbiotin-tag蛋白AviTagを付加したHIV-1実験株gp120の組み換え蛋白を迅速作成法を確立しようと考えた。

B. 材料・方法

蛍光蛋白融合ウイルス受容体発現-レトロウイルス、およびトランスフェクションベクター系の作成

ウイルス受容体の中からCD4, CXCR4, CCR5, CXCR7受容体を選択した。これらの遺伝子はcDNA synthesis後、PrimeSTAR MaxDNA polymeraseを用いて各々のspecific primerで増幅後、ZeroBlunt TOPO PCR cloning vectorにsub-cloningし、シークエンスを確認することで得た。その後、これらのcDNAを制限酵素サイトを付加した遺伝子特異的なprimerで増幅しpAcGFP1-Hyg-N1, pDsRed-Monomer-Hyg-N1, pRetroQ-AcGFP1-N1, pRetroQ-DsRed-Monomer-N1 Vectorにそれぞれ組み込み、前2者の発現ベクターはFugeneを用いてHeLa, Hos細胞に直接導入した。それ以外のレトロウイルス発現ベクターはVSV-G発現ベクターとパッケージング細胞にコントランスフェクションし、VSV-Gエンベロープを持つpseudo-typed virusを産生させた後に、培養上清中の組換えウイルスを回収しHeLaやHos細胞に感染させることで、それぞれの受容体を発現する細胞株を樹立した。

蛍光蛋白融合変異受容体のベクター系の作成

ZeroBlunt TOPOにsub-cloningしたそれぞれの受容体を鋳型として、変異導入Tag配列を持つprimerを用いてPrimeSTAR Max DNA polymeraseを用いて

Recombination PCR法を用いて変異受容体を作成、増幅しsub-cloning後、シークエンズを確認後、上記と同様の方法で蛍光蛋白質融合ベクターに挿入した。

biotin-tag蛋白AviTag付加HIV-1-gp120蛋白質の迅速作成法の確立

AviTag配列は合成primerのアニーリングにより作成し一度pColdTF DNA上に組み込んだ(図1)。その後、pNL4-3由来gp120およびgp160配列はrecombination PCR法を用いて、gp120シグナル配列をミツバチ由来のメリチン-シグナル配列(HBM)に置き換えた後に上記のvectorに挿入後、HBM-gp120-AviTagを作成した。このDNAをtransfer vector(pBacPAK8)に組み直して組換えDNAをFlashBAC DNAと共にSF9細胞へlipofectin™を用いてトランスフェクトし、組換えウイルスの作製を行いsf9細胞でウイルスの増幅を行った。回収したウイルスはHigh5細胞に感染させ、無血清培地Express Five™ SFMで27℃、3日間培養後、その上清を回収した。

(倫理面への配慮)

以上のすべての研究は東北大学の安全委員会に組み換え実験計画書を提出し、その承認のもとに行った。

C. 研究結果

図1に示すように、CXCR4については様々な部分に変異を持つ受容体を発現させて細胞上での発現を共焦点レーザー顕微鏡を用いて検討した。CXCR4の発現については細胞内ドメインに変異を入れると発現パターンに変化が認められ、核や細胞内に小胞体を大量に形成するようになった。他方、今日までCXCR4のrecycleに影響を与えるが発現部位に変化を与えないCXCR4-7TM変異の場合細胞膜上にreceptorが発現しrecycleは抑制されるも発現パターンに変化がないことが明らかになった。CCR5とCXCR7でも7TM変異の導入後、発現パターンに変化は認められなかった。CD4 truncatedは発現パターンはCD4と変化がなく、recycleに関してはCD4-truncatedの場合、以前に報告されているようにrecycleをおこさなくなっていた(図2)。以上のことからCXCR4/CXCR4-7TM, CCR5/CCR5-7TM, CXCR7/CXCR7-7TM, CD4/D4 truncatedそれぞれの受容体を用いて研究を行うことに決定した。

HBM-gp120-AviTagを作成に関しては図3に示すようにgp120の作成に成功しておりbiotin-ligaseの存在下ではAviTagにbiotinを付加することに成功したことをwestern blot法で確認した(図1)。

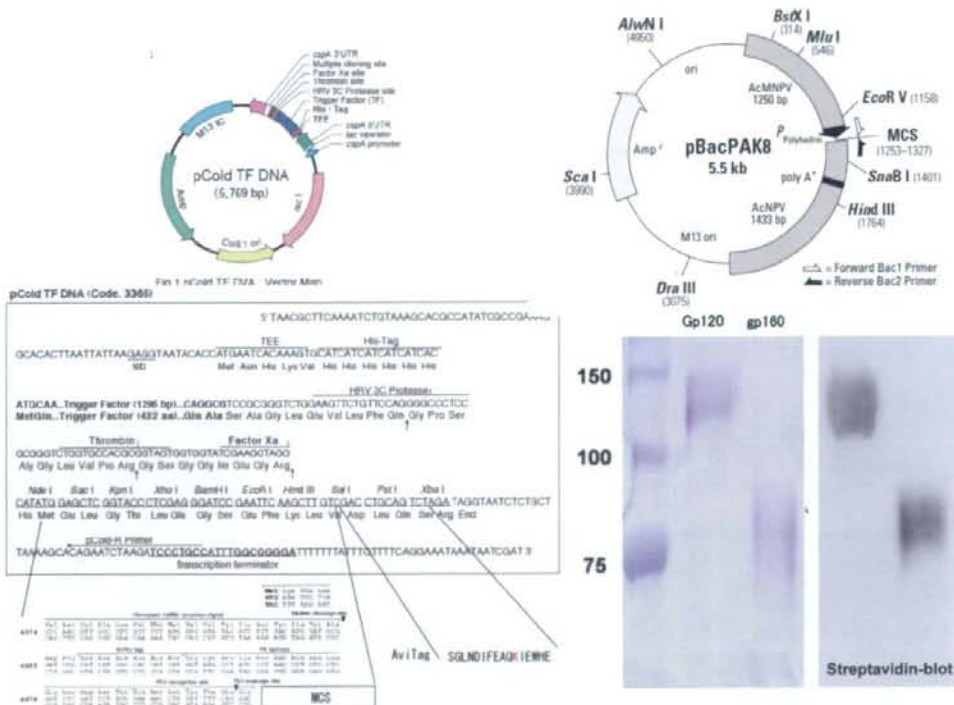


図1 AviTag AviTag-gp120 gp160の発現及びそのコンストラクト

pCold TF DNA上にAviTag-を組み込みgp120/gp160のシグナルシークエンズをメリチンシグナルシークエンズに置き換えた後にpBacPAK8に挿入し、High5細胞に発現させた。上清中の蛋白の存在をゲルで確認し、さらにstreptavidinでblotすることで蛋白にbiotinが付加されているが確認した。

D. 考察

CD4, CXCR4, CCR5, CXCR7受容体の動態を蛍光蛋白と融合蛋白の形で観察することが可能な腫瘍細胞を樹立したとともに、レトロウイルスを用いた発現系も準備しているために、将来的には正常ヒト末梢血由来細胞でのウイルス受容体が観察可能であると考えられる。

HBM-gp120-AviTagを作成したFlashBAC Systemを用いることでバキュロウイルス濃縮が不要なウイルス作成系で短時間で分泌型ビオチンリガーゼ蛋白タグAviTag配列融合gp120の作成が可能となった、さらに改良を加えて、臨床分離HIV-1ウイルスより変異アミノ酸を持つgp120配列から、短期間でビオチンリガーゼ蛋白タグAviTag配列融合gp120の作成ができるようにベクターに更なる改良を行っているところである。

E. 結論

我々は、今後、独自に開発した高速高解像度3次元分子観察顕微鏡を用いることで、上記の組み換えgp120を用いて、生きた細胞膜上でgp120の結合定数の経時的な変化を測定するとともに、臨床分離entry inhibitor変異gp120を用いて様々なentry inhibitor存在下で分子観察を行う予定である。

F. 健康危険情報

総括研究報告書参照

G. 研究発表

1. 論文発表 (欧文)

1. Characterization of a CD4-independent clinical HIV-1 that can efficiently infect human hepatocytes through chemokine (C-X-C motif) receptor 4. Xiao, P., Usami, O., Suzuki, Y., Ling, H., Shimizu, N., Hoshino, H., Zhuang, M., Ashino, Y., Gu, H., Hattori T. AIDS. 22:1749-1757. 2008.
2. High Frequency and Proliferation of CD4⁺FOXP3⁺ Regulatory T Cells in HIV-1 Infected Patients with Low CD4 Count. Bi.X., Suzuki, Y., Gatanaga, H., Oka, S. Eur. J. Immunol. 39:301-309. 2009.

2. 学会発表

1. HIV-1感染過程におけるダイナミンの役割の解析。Promjyonyakul Warunya, 鈴木康弘, 今村淳治, Chandra Nath Roy, 服部俊夫. 第2回リトリート研究発表会 萩ホール 宮城, 2008, Dec.6
2. HIV-1-tat-PTDがmultivalentであることが表面結合とマクロフィノサイトーシス活性に不可欠である。今村淳治, 鈴木康弘, Chandra Nath Roy, Promjyonyakul Warunya, 権田幸祐, 樋口秀男, 服部俊夫. 第31回日本分子生物学会年会・第81

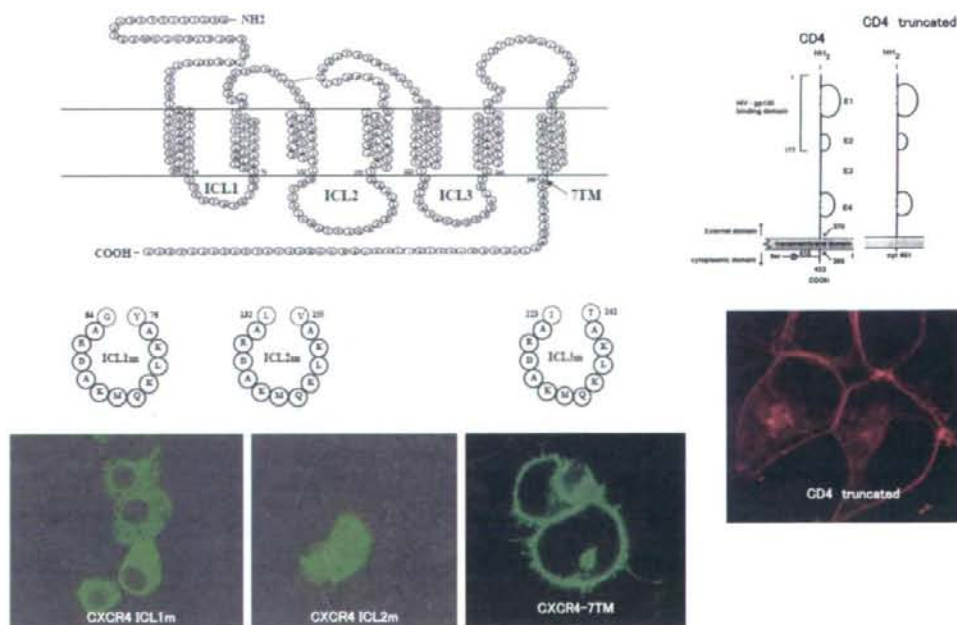


図2 CXCR4 (Wt, ICL1m, ICL2m, ICL3, 7TM, ICL3+7TM), CCR5 (Wt, 7TM), CXCR7 (wt, 7TM), CD4 (wt, truncated) を作成し発現パターン, recycleのレベルの検討を行ったが、細胞膜に発現し recycleが抑制される条件を満たしたのはケモカイン受容体では7TM変異体のみであった。

回日本生化学会大会 合同大会 ワールド記念
ホール、神戸2008, Dec.12

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. HIV-1 脱核過程にかかわる宿主遺伝子の単離および、その抑制small compoundの同定(予定)
2. バキュロウイルスによる迅速ビオチン化・分泌gp120作成法(予定)



新規薬剤の臨床効果の解析

研究分担者

横幕 能行 (独)国立病院機構名古屋医療センター
感染症科・臨床研究センター 医師

研究要旨

高度多剤耐性HIV-1感染症患者に対し、新規薬剤を含む抗HIV療法を試み、その有効性、安全性を検討した。治療変更前、使用する抗HIV剤の標的領域の遺伝子をクローニング、塩基配列解析を行い、enfuvirtide (ENF)+raltegravir (RAL)+etravirine (ETR)+darunavir (DRV)+ritonavir (RTV)+lamivudine (3TC)を用いた治療を開始した。新規治療によりウイルス学的、免疫学的に良好な治療効果が得られ、治療変更前に認められた抗HIV剤による検査異常値や臨床症状の顕著な改善を認めた。新規薬剤の適切な使用により、既存の薬剤では不可能であった高度薬剤耐性HIV-1感染症の安全かつ効果的な治療が可能となった。

A. 研究目的

HIV感染者の予後は適切な抗HIV療法導入と継続により大きく改善された。近年、新規薬剤開発や剤型改善により、服薬継続も容易になり、長期予後の改善も著しい。しかしながら、retrovir (ZDV)単剤投与の時代から抗HIV療法を継続している症例の中には、核酸系逆転写酵素阻害剤(NRTI)、非核酸系逆転写阻害剤(NNRTI)、プロテアーゼ阻害剤(PI)の全クラスの抗HIV剤に対しHIVが耐性化し、既存の抗HIV剤による治療ではHIVの複製制御が困難な例が存在する。

近年、これまでの薬剤に対し耐性化したHIVにも複製制御効果を発揮し得る新規PIのdarunavir (DRV)、新規NNRTIのetravirine (ETV)に加え、新しいクラスの抗HIV剤であるインテグラーゼ阻害剤raltegravir (RAL)、吸着阻害剤maraviroc (MRV)が認可され、海外で既承認の融合阻害剤enfuvirtide (ENF)を加え、高度耐性化したHIV感染症患者の治療の可能性が生まれた。

高度薬剤耐性化症例に対して新規薬剤を加えた抗HIV療法を行う場合、耐性化の要因をウイルス側、宿主側両面から詳細に分析し、適切な治療薬を選択し、治療開始後の抗ウイルス作用および有害事象の評価を詳細に行うことが重要である。

我々は、複数のプロテアーゼ阻害剤を用いた強力な抗HIV療法が無効となった30代男性感染者に対し、ENF+RAL+ETR+DRV+RTV+3TCによる強力な抗HIV療法を試みた。

この研究では、(1)抗HIV療法導入後の治療経過の詳細な解析とプロテアーゼ(PR)、逆転写酵素(RT)領域の遺伝子型解析、(2)治療直前の、新規に使用す

る抗HIV剤の標的領域のクローニング解析と遺伝子型による感受性予測、(3)PI感受性簡易評価系確立、(4)PR立体構造シミュレーションによる多変異蓄積HIV PRの薬剤感受性予測システム構築、(4)エンベロープ(env)表現型解析方法の確立を行い、本症例のデータを用いてその有用性を検証することとした。

平成20年度は、上記項目の(1)、(2)を行った。実際に治療を行い、その有用性を検証し、新規薬剤を含む治療の安全性の評価を行った。

B. 研究方法

対象患者

1995年にニューモシスチス肺炎を発症してHIV感染が判明した30代日本人男性。同性間性交渉による国内での感染。

治療開始前の遺伝子型解析

PR、RT領域については、血漿よりRT-PCR法で増幅した標的領域の塩基配列をdirect sequencingにより決定した。使用した薬剤の履歴を調査し、薬剤耐性関連変異の蓄積の有無の経過を検討した。2006年3月20日、4月21日、2008年6月16日については、それぞれの血漿を用いてPR、RT領域のクローニングを行い、詳細な遺伝子型の解析を行った。

インテグラーゼ(IN)領域およびenv領域については、2008年6月16日の血漿を用いてクローニング解析を行い、それぞれRAL、ENF耐性関連変異の有無を検討した。