

200904008A

厚生労働科学研究費補助金

地球規模保健課題推進研究事業
(国際医学協力研究事業)

H I V 感染症における免疫応答の解析と その臨床応用に関する研究

平成21年度 総括・分担報告書

研究代表者 岩本 愛吉

平成22年3月

目 次

I. 総括研究報告書

H I V感染症における免疫応答の解析とその臨床応用に関する研究 ----- 1

研究代表者 岩本愛吉 (東京大学医科学研究所 教授)

II. 分担研究報告書

1. H I Vと宿主の免疫応答に関する研究 ----- 9

東京大学医科学研究所 教授 岩本愛吉

2. 組換えBCG/弱毒ワクシニアによる
プライム/ブースト型H I Vワクチンの研究 ----- 12

国立感染症研究所エイズ研究センター エイズ研究センター長 山本直樹

3. 粘膜におけるH I V感染とアジュバントに関する研究 ----- 15

東京大学医科学研究所 教授 清野 宏

4. 新規のエイズの化学療法剤の開発と
それによる免疫応答能の回復に関する研究 ----- 16

熊本大学医学薬学研究部 教授 満屋裕明

5. サルエイズモデルにおける粘膜免疫の解析に関する研究 ----- 20

京都大学ウイルス研究所 名誉教授 速水正憲

6. 粘膜免疫活性化による粘膜棲息型HIV制御法の開発に関する研究 ----- 22

日本医科大学医学部 教授 高橋秀実

7. サルエイズモデルにおける粘膜感染防御反応に関する研究 ----- 28

東京大学医科学研究所 教授 俣野哲朗

8. 汎H I V-1株中和能を有する抗体誘導に関する研究 ----- 31

国立感染症研究所エイズ研究センター 主任研究官 駒野 淳

9. H I Vの免疫コントロールに関わるウイルス及び宿主要因に関する研究----- 36

東京大学医科学研究所 准教授 三浦聡之

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 43

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 53

平成 21 年度厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進研究事業）
総括研究報告書

HIV 感染症における免疫応答の解析とその臨床応用に関する研究

研究代表者 岩本 愛吉 東京大学医科学研究所 教授

研究要旨 本研究では、わが国の研究者が HIV/AIDS 研究・対策で先端を行く米国研究者及びアジア諸国の研究者と HIV/AIDS の予防と治療について、ウイルス学、免疫学、分子生物学及び臨床的研究を推進し、効果的な共同研究体制を構築・発展させ、世界の HIV/AIDS を制圧することを目的とした。個々の分担研究においては、ワクチン・新規薬剤開発のための基礎的データが集められ大きな成果があった。一方、最近になりアジアの途上国にも抗 HIV 薬が行き渡るようになり始め、生命予後の改善とともに、長期副作用、合併するウイルス性肝炎が問題になってくることが予想されている。このような中で、米国オレゴン州ポートランドにおいて、日米医学協力計画の枠組みの中で、ウイルス性肝炎研究者との合同シンポジウムが開催された。アジア各国の研究者から、HIV 感染に合併する B/C 型肝炎ウイルスの現状の疫学的報告を受け、また日米の HIV 及び 肝炎ウイルスの専門家が最新の知見を共有した。これを受けて、HIV/肝炎ウイルス共感染の研究が活性化され、本邦を含めたアジアの HIV 感染症、及びウイルス性肝炎の制圧に大きく貢献することが期待できた。

研究分担者

山本直樹（国立感染症研究所エイズ研究センター長）
満屋裕明（熊本大学医学薬学研究部 教授）
速水正憲（京都大学ウイルス研究所 名誉教授）
俣野哲朗（東京大学医科学研究所 教授）
清野 宏（東京大学医科学研究所 教授）
高橋秀実（日本医科大学 教授）
駒野 淳（国立感染症研究所エイズ研究センター主任研究官）
三浦聡之（東京大学医科学研究所 准教授）

A. 研究目的

HIV/AIDS の世界的流行の中で、その制圧のために国際的な協調が必須となっている。アジアにおける HIV/AIDS 患者の数は、世界の相当数を占めており、この地域の HIV/AIDS 制御に向けて、同地域唯一の先進国である日本が果たす役割は非常に大きく、アジア各国からの期待も大きい。一方で、世界で最も HIV/AIDS の基礎研究、臨床研究の進んでいるのは米国である。感染症の広がりには国境はなく、米国もグローバルな視点から HIV/AIDS 研究を施行しているが、日米トップクラスの HIV/AIDS 研究者が共同研究・共通の技術基盤を有することにより、アジアのひいては世界の HIV/AIDS 流行の制御を達成することが期待される。本研究では、多方面に渡る HIV/AIDS の問題

点の中から、特に大きな柱となるトピックを中心に、米国、アジア各国との共通意識・共通技術基盤・共同研究を持ち、HIV ワクチン(中和抗体誘導型、細胞性免疫誘導型、自然免疫誘導型)の開発及び、その基盤となる HIV 感染の獲得免疫によるコントロール機序の解明、薬剤耐性を含めたウイルス側因子、サル AIDS モデルの開発を中心課題とし研究を遂行した。

具体的には以下のような研究目的をもった：HIV 感染症の病気進行速度には、急性感染期のウイルス学的、免疫学的動態が大きく関与していると考えられてきている。その後の病気進行速度の異なる集団において、急性感染期に分離されるウイルスの特徴を明らかにすることを試みた (1. 三浦聡之)。HIV の自然制御には特異的細胞傷害性 T 細胞(CTL)反応が重要な役割を果たしていることが明らかとなっているが、実際に HIV 複製を制御できる CTL 反応のパラメータを明らかにすることを試みた (2. 岩本愛吉)。また、HIV 複製を抑制する液性免疫の解析のためには、抗体レパートリーの解析が必須となるが、その技術基盤を確立するために、HIV 中和活性をもつと推測される CD4 結合部位を標的とした抗体をモデルに、抗体の遺伝子レベルでの解析を行った (3. 駒野淳)。一方、HIV-1 に類似のサルウイルス(SIV)を用いた研究によりエイズの標的臓器として腸管が重要であることが示されているが、腸管内におけるウイル

ス増殖部位、免疫応答に関しては、未だ不明な点が多い。サルエイズ感染・発症モデル系を用いて、これらの解明を試みた(4. 速水正憲、5. 俣野哲朗)。この粘膜面での HIV コントロールが重要となってくるが、分担研究の一つでは、BCG を用いた腸管粘膜における自然免疫系による HIV 制御法の可能性を検討し(6. 高橋秀実)、もう一つではアジュバンドを必要としない新しい経鼻ワクチンの開発を試みた(7. 清野宏)。獲得免疫の誘導を目指したワクチンに関しては、HIV 特異的細胞性免疫のプライミングを狙い、HIV-Gag を安定的に高発現する組み換え BCG ワクチンの開発を試みた(8. 山本直樹)。以上の事柄は、HIV 感染の予防及び、抗 HIV 薬に頼らないウイルス複製制御に主眼をおいたものであるが、すでに HIV 陽性となった人々のために、副作用が少なく、容易に内服でき、耐性を獲得しにくい薬剤の開発が望まれている。分担研究の一つでは、米国との共同研究により新規開発薬の活性及び耐性獲得機序の解明を目指すとともに、新しいクラスである CCR5 阻害剤の作用機序の解明を行った(9. 満屋裕明)。

さらに本研究では、日米医学協力計画の一環として米国のみならず他のアジア国々の研究者の参加をえて、本邦における研究を一段と発展させ、グローバルに対応する必要のある HIV/AIDS 対策を成功させることを目指した。

B. 研究方法

(1) 三浦：急性期に診断された未治療 HIV 感染者のうち、その後最低一年以上に渡り血漿中ウイルス量が 2,000 RNA コピー/ml 未満だった患者 18 名 (controllers) 及び 80 名の non-controllers の急性感染期から採取された血漿より、ウイルスの gag 及び pol 遺伝子配列を増幅しその配列を比較検討した。また、増幅された gag-protease を実験株に組み込むことによりキメラウイルスを作成し、その複製能力を controllers と non-controllers の間で比較した。

(2) 岩本：未治療の日本人 HIV 感染者 51 名を対象とし、末梢血単核球を用いてインターフェロニン ELISpot アッセイを行った。抗原として Gag, Pol, Env, Nef タンパク質をカバーする overlapping peptide (OLP) を使い、タンパク質毎に OLP を混合した pool を用いた。

(3) 駒野：健常人由来の IgM 由来 CD4 反応性抗体をモデルとして、抗体の遺伝子配列を IgBLAST によって Kabat database に照会し、各抗体クローンの重鎖と軽鎖それぞれについて解

析を行った。

(4) 速水：SIV 非感染サル、無症候な低ウイルス血症サル (Asymptomatic Low Viral Load: Asym LVL)、症状のある LVL サル (Symptomatic Low Viral load: Sym LVL)、高ウイルス血症サル (High Viral Load: HVL) との間で、組織中プロウイルス量、血中 CD4 陽性 T 細胞数を測定し、リンパ組織や腸におけるウイルス感染細胞および免疫細胞マーカーについて免疫組織化学染色を用いて解析した。また、HE 染色標本を用いて腸の絨毛萎縮の有無を検討した。

(5) 俣野：主要組織適合遺伝子複合体クラス I (MHC-I) ハプロタイプ 90-120-Ia を共有する SIV 感染アカゲサル 2 頭を用いた。1 頭 (#1) は、SIV 感染後比較的高い血漿中ウイルス量を維持したサルである。もう 1 頭 (#2) は、ワクチン後の SIV チャレンジ実験でセットポイント期以降約 2 年間ウイルス血症が認められず、その後ウイルス血症の再出現が認められたサルである。これらリンパ組織からリンパ球を分離し、細胞表面免疫マーカー及び、SIV 各抗原に対するインターフェロニン誘導を細胞内免疫染色で解析した。

(6) 高橋：感染性のある生菌 BCG 存在下で樹状細胞を培養し、培養上清中に放出されたサイトカインを ELISA 法により測定し、熱処理により不活化された BCG を用いた場合と比較した。次にクラス I MHC 分子の発現が低下した膀胱癌細胞 T24 の BCG による増殖抑制効果みるため、T24 細胞と Allogeneic-PBMC を BCG 存在下で共培養後、サイミジン (3H-TdR) を加えその up-take 量を追跡した。BCG を取り込んだ DC により Allogeneic-PBMC 中に誘導されてくる T24 細胞を制御する細胞群の種類を、Flow-cytometry で同定し、それらの CTL 活性を測定した。

(7) 清野：ボツリヌス A 型毒素のワクチン候補である組み換え無毒 C 末端ドメイン (BoHc/A) をカチオン型コレステロールプルランによりナノゲル化した cCHP-BpHc/A ワクチンを調整し、10 µg をマウスに一週間ごとに、3 回経鼻免疫した後、抗原特異的免疫応答をしらべた。

(8) 山本：抗酸菌-大腸菌シャトルプラスミド pS0246 から高コピー変異型プラスミドベクターを構築し、同ベクターで HIV-Gag タンパクを BCG に発現させ、その発現レベル及び、組み換えプラスミドの安定性を評価した。

(9) 満屋：多剤耐性 HIV-1 株の発現機序の分子・原子レベルでの解析を行い、その後、構造を基礎とした高い抗ウイルス活性を有しかつ耐性の発現に抵抗する薬剤のデザイン・再デザインを行っ

た。新規の化合物に対して試験管内で耐性 HIV-1 変異株の誘導を試み、耐性発現のメカニズムの解析を行う。コンピュータモデリングの手法を用いて CCR5 と阻害剤の結合の構造解析など行った。

これらの研究は、今までに日米医学協力計画により醸成されてきた技術基盤及び、共同研究を通じて行った。

(倫理面への配慮)

本研究は遺伝子組換え実験、病原体の使用、動物実験を用いることから「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」を遵守した。実験計画は研究者が所属する機関の組換え DNA 実験安全委員会、バイオセーフティ委員会、動物実験委員会、医学研究倫理委員会等の承認・認可を得て実験を行なった。また臨床検体の使用を伴う研究では、研究目的等を文書によって患者に説明し、書面でインフォームドコンセントを得、研究内容は各研究機関において倫理審査を受け、承認済みである。また患者情報の保管に関しては個人情報保護法に基づき漏洩のないように管理が徹底された。

C. 研究結果

(1) 三浦：感染後、血中ウイルス量を自然にコントロールできる患者さんの急性期のウイルス由来の Gag-Protease の機能は、ウイルス量をコントロールできない患者さんに比べて、有意に低下していることが明らかになり、この複製能力の減弱には、薬剤耐性ウイルス、HLA-B57 (最も病気進行遅延と関連する HLA) 陽性者体内で、B57 による CTL 反応からの逃避変異により減弱したウイルスの伝播などが関与している可能性が考えられた。

(2) 岩本：各 HIV タンパク質特異的 CTL の頻度を比較したところ、Gag, Pol 特異的 CTL が Env, Nef 特異的 CTL に比べて有意に高頻度で観察された。特異的 CTL の頻度と血中ウイルス量 (VL) との相関を調べたところ、Gag 特異的 CTL のみ VL と逆相関を示し、欧米と HLA プロファイルが大きく異なった日本人においても、Gag 特異的 CTL 反応がウイルスコントロールに大きく寄与していることが明らかになった。

(3) CD4 反応性 IgM 抗体クローン 3 つの遺伝子解析を行い、平均 14.5 個の somatic hypermutation を認めた。この結果は、HIV に対する液性免疫反応を解析するために必要な抗体

レポトリを遺伝子レベルで解析する技術基盤が構築できたことを示唆し、HIV 予防ワクチンの開発に向けた基盤の整備となる。

(4) 速水：非感染サルや Asym LVL サル群に比較して Sym LVL 群では明らかな腸の絨毛萎縮が認められ、ウイルス増殖を抑制している感染サル個体においても、小腸の CD4 陽性 T 細胞の枯渇や絨毛萎縮等のエイズ病態が進行しうることが明らかになった。

(5) 俣野：サル #2 の SIV 抗原特異的 CTL 反応の解析で、末梢血リンパ球、各リンパ節間で反応に違いがあり、腸管膜リンパ節において特に広範囲の抗原特異的 CTL 反応が検出された。この結果は、SIV 増殖とそれに対する CTL 反応が、腸管膜において最も強く生じており、まだ全身には反映されていないことを示唆している可能性が考えられた。

(6) 高橋：生菌 BCG が感染した DC は、活性化した自然免疫担当細胞である NKT 細胞や γ δ 型 T 細胞を介して抗腫瘍作用を発揮することが明らかとなった。こうした事実は、粘膜内の HIV 感染細胞が Nef 蛋白によりクラス II MHC 分子の発現が低下し CTL が効果を発揮しにくい HIV 感染細胞に対しても、BCG により活性化した自然免疫担当細胞である NKT 細胞や γ δ 型 T 細胞により制御できる可能性を示唆した。

(7) 清野：カチオン型コレステロールプルランによりナノゲル化されたワクチンはアジュバンドを加えなくても、効果的に全身系及び粘膜系防御免疫を誘導することができることが明らかになり、HIV 粘膜ワクチンへの応用が期待できた。

(8) 山本：多コピー変異型プラスミドを用いることにより、安定にかつコドン最適化とほぼ同程度の増強効果で Gag 抗原を高発現できる BCG 株を得ることができた。今後、SIV Gag 発現株の改良に応用し、ワクシニアベクターとのプライムブーストワクチンの、サルエイズモデルでの防御能評価を行う予定である。

(9) 満屋：抗 HIV-1 薬開発に必要なウイルス学的研究手技に加えて、新規(独自)の低分子化合物の合成や結晶構造解析・コンピュータモデリングなど、1 研究施設では通常施行困難な多岐にわたる研究領域をカバーする研究体制が、国内外のグループとの共同研究として整えられ、HIV-1 が耐性を発現しにくい薬の開発を米国グループとの共同研究で継続している。また CCR5 の微細構造学的解析系の確立、CCR5 阻害剤の結合モデル、分子レベルでの機序解析の研究も進めており、これらの解析結果を基にして、CCR5 結合能のある新

規低分子化合物のモデリングを行い、強力な抗 HIV 活性を有する新しい化合物の設計・同定を続けている。

これらの研究の基盤となっている技術の多くは、長年にわたる日米医学協力計画のエイズ部会を通じての米国研究者との交流から得られたものである。平成21年度は、米国オレゴン州ポートランドにおいて、肝炎部会との合同シンポジウムが開催された。HIV 感染症には B 型肝炎/C 型肝炎が合併することが多く、特にアジアの開発途上国ではこの傾向が顕著である。最近、途上国にも抗 HIV 薬が行き渡るようになり始め、生命予後の改善とともに、今後は長期副作用、肝炎の合併が問題になってくることに疑いはない。このような中で、シンポジウムにおいてアジア各国の研究者から、HIV 感染に合併する B/C 型肝炎ウイルスの現状の疫学的報告を受け、また日米の HIV 及び肝炎ウイルスの専門家が最新の知見を共有することができた（写真参照）。これを受けて、この研究領域が活性化され、本邦を含めたアジアの HIV 感染症、ウイルス性肝炎の制圧に大きく貢献することが期待できた。

D. 考察

数年前の SARS、また 2009 年の新型インフルエンザに代表されるように、感染症に国境ない。アジアの途上国は、世界的流行をもたらす病原体の発生場所として重要視されており、アジアの先進国として、我が国はイニシアチブをとることが期待されている。国境のない感染症の対策には、国際協力が必須であり、今後はこの分野においての、より緊密な共同研究・対策を進めることが重要である。HIV/AIDS は世界の三大感染症のひとつとして、緊急な対応が迫られていることには何の疑いもなく、本研究における、日米医学協力計画のエイズ部会を軸とした日本—米国—アジア諸国の緊密な共同研究体制の構築が、他の感染症対策のモデルとなることが期待できた。本年度の個々の分担研究項目における成果が、ワクチン・新規薬剤の開発に重要な知見をもたらしただけでなく、肝炎部会との合同シンポジウムの開催は、非常にタイムリーであり、かつてない程、本分野での日米アジアの交流が深まった。日米医学協力計画の果たす役割は大きく、次年度以降のシンポジウムも、年度ごとに具体的なテーマを持って開催するとより意義深いものになると考えられた。

E. 結論

日米医学協力計画で培った共同研究基盤を軸に、さらにアジアの研究者との協調を推進し、HIV/AIDS 制圧の為の研究がなされた。ワクチン。新規薬剤開発に有用な基礎的知見が得られた。また、今後問題となる HIV 合併ウイルス性肝炎について、日本—米国—アジア諸国の間で、問題意識を共有と共同研究体制の構築がなされた。今後も、日米医学協力計画を軸にした活発な技術・人材交流の継続・発展が、エイズを含めた感染症制圧のために必須であることが再認識された。

F. 研究発表

1 論文発表

岩本愛吉

- 1) Zhu, D., Kawana-Tachikawa, A., Iwamoto, A., Kitamura, Y. Influence of polymorphism in dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin-related (DC-SIGNR) gene on HIV-1 trans-infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, inpress.
- 2) Miyazaki, E., A. Kawana-Tachikawa, M. Tomizawa, J. Nunoya, T. Odawara, T. Fujii, Y. Shi, G. F. Gao, and A. Iwamoto. 2009. Highly restricted T-cell receptor repertoire in the CD8+ T-cell response against an HIV-1 epitope with a stereotypic amino acid substitution. *Aids* 23:651-60.
- 3) Mizutani, T., A. Ishizaka, M. Tomizawa, T. Okazaki, N. Yamamichi, A. Kawana-Tachikawa, A. Iwamoto, and H. Iba. 2009. Loss of the Brm-type SWI/SNF chromatin remodeling complex is a strong barrier to the Tat-independent transcriptional elongation of human immunodeficiency virus type 1 transcripts. *J Virol* 83:11569-80.
- 4) Nunoya, J., T. Nakashima, A. Kawana-Tachikawa, K. Kiyotani, Y. Ito, K. Sugimura, and A. Iwamoto. 2009. Short communication: generation of recombinant monoclonal antibodies against an immunodominant HLA-A*2402-restricted HIV type 1 CTL epitope. *AIDS Res Hum Retroviruses* 25:897-904.
- 5) Wang, J., N. Kondo, Y. Long, A. Iwamoto, and Z. Matsuda. 2009. Monitoring of HIV-1 envelope-mediated membrane fusion using modified split green fluorescent proteins. *J Virol Methods* 161:216-22.

山本直樹

- 6) Suzuki H, Kidokoro M, Fofana IB, Ohashi T, Okamura T, Matsuo K, Yamamoto N, Shida H. Immunogenicity of newly constructed attenuated vaccinia strain LC16m8Delta that expresses SIV

- Gag protein. *Vaccine* 11: 966-971 (2009)
- 7) Murakami T, Eda Y, Nakasone T, Ami Y, Someya K, Yoshino N, Kaizu M, Izumi Y, Matsui H, Shinohara K, Yamamoto N, Honda M. Postinfection passive transfer of KD-247 protects against simian/human immunodeficiency virus-induced CD4⁺ T-cell loss in macaque lymphoid tissue. *AIDS*. 31;23(12):1485-94 (2009).
- 8) Ohba K, Ryo A, Dewan MZ, Nishi M, Naito T, Qi X, Inagaki Y, Nagashima Y, Tanaka Y, Okamoto T, Terashima K, Yamamoto N. Follicular dendritic cells activate HIV-1 replication in monocytes/macrophages through a juxtacrine mechanism mediated by P-selectin glycoprotein ligand 1. *J Immunol*. 183:524-32 (2009).
- 清野宏
- 9) Nochi, T., Yuki, Y., Katakai, Y., Shibata, H., Tokuhara, D., Mejima, M., Kurokawa, S., Takahashi, Y., Nakanishi, U., Ono, F., Mimuro, H., Sasakawa, C., Takaiwa, F., Terao, K., and Kiyono, H. A Rice-Based Oral Cholera Vaccine Induces Macaque-Specific Systemic Neutralizing Antibodies but Does Not Influence Pre-Existing Intestinal Immunity. *J Immunology*, 183: 6538-6544, 2009.
- 10) Yuki, Y. and Kiyono, H. Mucosal vaccines: novel advances in technology and delivery. *Expert Rev. Vaccines* 8: 1083-1097, 2009.
- 11) Yuki, Y., Tokuhara, D., Nochi, T., Yasuda, H., Mejima, M., Kurokawa, S., Takahashi, Y., Kataoka, N., Nakanishi, U., Hagiwara, Y., Fujihashi, K., Takaiwa, F. and Kiyono, H. Oral MucoRice expressing double-mutant cholera toxin A and B subunits induces toxin-specific neutralising immunity. *Vaccines*. 27: 5982-5988.
- 満屋裕明
- 12) Ghosh, AK, Gemma S, Simoni E, Baldrige A, Walters, DE, Ide K, Tojo Y, Koh Y, Amano M, and Mitsuya H. (2010) Synthesis and biological evaluation of novel allophenylnorstatine-based HIV-1 protease inhibitors incorporating high affinity P2-ligands. *Bioorg Med Chem Lett*. 20:1241-6.
- 13) Ghosh AK, Leshchenko-Yashchuk S, Anderson DD, Baldrige A, Noetzel M, Miller HB, Tie Y, Wang YF, Koh Y, Weber IT, Mitsuya H. (2009) Design of HIV-1 protease inhibitors with pyrrolidinones and oxazolidinones as novel P1'-ligands to enhance backbone-binding interactions with protease: synthesis, biological evaluation, and protein-ligand X-ray studies. *J Med Chem*. 52:3902-14.
- 14) Fujimoto H, Higuchi M, Watanabe H, Koh Y, Ghosh AK, Mitsuya H. Tanoue N, Hamada A, and Saito H. (2009) P-glycoprotein mediates efflux transport of darunavir in human intestinal Caco-2 and ABCB1 gene-transfected renal LLC-PK1 cell lines. *Biol. Pharm. Bull.* 32:1588-93.
- 15) Ghosh AK, Sarang Kulkarni S, Anderson DD, Hong L, Baldrige A, Wang Y-F, Chumanevich AA, Kovalevsky AY, Tojo Y, Koh Y, Tang J, Weber IT, and Mitsuya H. (2009) Design, synthesis, protein-ligand X-ray structures and biological evaluation of a series of novel macrocyclic HIV-1 protease inhibitors to combat drug-resistance. *J. Med.Chem.* 52:7689-705.
- 16) Hattori S, Ide K, Nakata H, Harada H, Suzu S, Ashida N, Kohgo S, Hayakawa H, Mitsuya H. and Okada S. (2009) Potent activity of a nucleoside reverse transcriptase inhibitor, 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine, against HIV-1 infection in Hu-PBMC-NOD/SCID/JAK3null (NOJ) mouse model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:3887-93.
- 17) Das D, Koh Y, Tojo Y, Ghosh AK, and Mitsuya H. (2009) Prediction of Potency of Protease Inhibitors Using Free Energy Simulations with Polarizable Quantum Mechanics-Based Ligand Charges and a Hybrid Water Model. *J. Chem. Inf. Model.* 49:2851-62.
- 18) Michailidis E, Bruno Marchand B, Ei-Ichi Kodama E-I, Kamalendra Singh K, Matsuoka M, Ashida N, Kirby K, Ryan EM, Sawani AM, 1, Eva Nagy E, Mitsuya H. Parniak MP, and Sarafianos SG (2009) Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by 4'-ethynyl-2-fluoro-deoxyadenosine triphosphate, a translocation defective reverse transcriptase inhibitor. *J. Biol. Chem.* 284:35681-91.
- 19) Aoki M, Venzon DJ, Koh Y, Aoki-Ogata H, Miyakawa T, Yoshimura K, Maeda K, and Mitsuya H. (2009) 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.* 83:3059-68.
- 2 0) Koh, Y., Das, D., Leschenko, S., Nakata, H., Ogata-Aoki, H., Nakayama, M., Ghosh, A.K., and Mitsuya, H. (2009) GRL-02031: A novel nonpeptidic protease inhibitor (PI) containing a stereochemically defined fused cyclopentanyltetra-hydrofuran (Cp-THF) potent against multi-PI-resistant HIV-1 in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:997-1006.
- 速水正憲**
- 2 1) Inaba, K., Fukazawa, Y., Matsuda, K., Himeno, A., Matsuyama, M., Ibuki, K., Miura, Y., Koyanagi, Y., Nakajima, A., Blumberg, R. S., Takahashi, H., Hayami, M., Igarashi, T., and Miura, T.: Small intestine CD4⁺ cell reduction and enteropathy in SHIV-KS661-infected rhesus macaques in presence of low viral load. *J. Gen. Virol.*, in press.
- 2 2) Matsuda, K., Inaba, K., Fukazawa, Y., Matsuyama, M., Ibuki, K., Horiike, M., Saito, N., Hayami, M., Igarashi, T., and Miura, T.: *In vivo* analysis of a new R5 tropic SHIV generated from the highly pathogenic SHIV-KS661, a derivative of SHIV-89.6. *Virology*, in press.
- 2 3) Fukazawa, Y., Miyake, A., Ibuki, K., Inaba, K., Saito, N., Motohara, M., Horiuchi, R., Himeno, A., Matsuda, K., Matsuyama, M., Takahashi, H., Hayami, M., Igarashi, T., and Miura, T.: Small intestine CD4⁺ T-cells are profoundly depleted during acute infection of simian-human immunodeficiency virus regardless of its pathogenicity. *J. Virol.*, 82: 6039-6044, 2008.
- 高橋秀実**
- 2 4) Fukazawa, Y., Miyake, A., Ibuki, K., Inaba, K., Saito, N., Motohara, M., Horiuchi, R., Himeno, A., Matsuda, K., Matsuyama, M., Takahashi, H., Hayami, M., Igarashi, T., Miura, T. Small intestine CD4⁺ T cells are profoundly depleted during acute simian-human immunodeficiency virus infection, regardless of viral pathogenicity. *J. Virol.* 82:6039-6044, 2009..
- 2 5) Yamashita, T., Tamura, H., Satoh, C., Shinya, E., Takahashi, H., Chen, L., Kondo, A., Tsuji, T., Dan, K., Ogata, K. Functional B7.2 and B7-H2 molecules on myeloma cells are associated with a growth advantage. *Clin. Cancer Res.* 15:770-777, 2009.
- 2 6) Higuchi, T., Shimizu, M., Owaki, A., Takahashi, M., Shinya, E., Nishimura, T., Takahashi, H. A possible mechanism of intravesical BCG therapy for human bladder carcinoma: involvement of innate effector cells for the inhibition of tumor growth. *Cancer Immunol. Immunother.* 58:1245-1255, 2009.
- 2 7) Shinya, E., Owaki, A., Norose, Y., Sato, S., Takahashi, H. Quick methods of multimeric protein production for biologically active substances such as human GM-CSF (hGM-CSF). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 386:40-44, 2009.
- 2 8) Machida, K., Tsukiyama-Kohara, K., Sekiguchi, S., SEike, E., One, S., Hayashi, Y., Tobita, Y., Kasama, Y., Shimizu, M., Takahashi, H., Taya, C., Yonekawa, H., Tanaka, N., Kohara, M. Hepatitis C virus and disrupted interferon signaling promote lymphoproliferation via type. *Gastroenterology*, 137:285-296, 2009.
- 2 9) Inaba, K., Fukazawa, Y., Mutsuda, K., Himeno, A., Matsuyama, M., Ibuki, K., Miura, Y., Koyanagi, Y., Nakajima, A., Blumberg, R.S., Takahashi, H., Hayami, M., Igarashi, T., Miura, T. Small intestine CD4⁺ cell reduction and enteropathy in SHIV-1 KS661-infected rhesus macaques in presence of low viral load. *J. Gen. Virol.* 2009 (in press).
- 3 0) Takeuchi, H., Takahashi, M., Norose, Y., Takeshita, T., Fukunaga, Y., Takahashi, H. Transformation of breast milk macrophages by HTLV-1: implications for HTLV-1 transmission via breastfeeding. *Biomedical Res.*, 2009 (in press).
- 3 1) Takahashi, H. Species-specific CD1-restricted innate immunity for the development of HIV vaccine. *Vaccine*, 2009 (in press).
- 3 2) Yagi, Y., Watanabe, E., Watari, E., Shinya, E., Satomi, M., Takeshita, T., Takahashi, H. Inhibition of DC-SIGN-mediated transmission of HIV-1 by TLR3 signaling in breast milk macrophages. *Immunology*, 2009 (in press).
- 3 3) 高橋秀実: 漢方薬の解表作用: 細胞膜上に局在化した脂質の融解と再分配の誘発. 漢方医学, 33:285-290, 2009.
- 3 4) 高橋秀実: BCGによる自然免疫の活性化. 泌尿器外科, 22(2): 200-202, 2009.
- 3 5) 高橋秀実: 自然免疫システムと生体防御. 炎症と免疫 17(3): 247-249, 2009.
- 3 6) 高橋秀実: 細胞制免疫 (CTL) の誘導と樹状細胞. 臨床粘膜免疫学, 2009 (印刷中)
- 3 7) 高橋秀実: アレルギー疾患における漢方薬の作用機序に関する一考察, 日本小児科学会雑誌, 113(6):897-901, 2009.
- 3 8) 高橋秀実: CD1 分子群によって規定された自然免疫と MHC 分子群によって拘束された

獲得免疫：エイズワクチン開発のための新たな指標，日本エイズ学会誌，11 (3):199-204, 2009.

- 3 9) 矢田純一、高橋秀実 (監訳) : リッピンコット・イラストレイテッド免疫学. 丸善出版, 2009 発刊
俣野哲朗

4 0) Yamamoto T, Iwamoto N, Yamamoto H, Tsukamoto T, Kuwano T, Takeda A, Kawada M, Tsunetsugu-Yokota Y, Matano T. Polyfunctional CD4⁺ T-cell induction in neutralizing antibody-triggered control of simian immunodeficiency virus infection. *J Virol* 83:5514-5524, 2009.

4 1) Tsukamoto T, Takeda A, Yamamoto T, Yamamoto H, Kawada M, Matano T. Impact of cytotoxic-T-lymphocyte memory induction without virus-specific CD4⁺ T-cell help on control of a simian immunodeficiency virus challenge in rhesus macaques. *J Virol* 83:9339-9346, 2009.

駒野淳

4 2) Yumi Kariya, Makiko Hamatake, Emiko Urano, Hironori Yoshiyama, Norio Shimizu, Jun Komano. A dominant-negative derivative of EBNA1 represses EBNA1-mediated transforming gene expression during the acute phase of Epstein-Barr virus infection independent of rapid loss of viral genome. *Cancer Sci*. In press.

4 3) Emiko Urano, Reiko Ichikawa, Yuko Morikawa, Takeshi Yoshida, Yoshio Koyanagi, Jun Komano. T cell-based functional cDNA library screening identified SEC14-like 1a carboxy-terminal domain as a negative regulator of human immunodeficiency virus replication. *Vaccine*. In press.

4 4) Makiko Hamatake, Jun Komano, Emiko Urano, Fumiko Maeda, Yasuko Nagatsuka, Masataka Takekoshi. Inhibition of HIV replication by a CD4-reactive Fab of an IgM clone isolated from a healthy HIV-seronegative individual. *Euro J Immunol*. In press

4 5) Ranya Hassan, Shinya Suzu, Masateru Hiyoshi, Naoko Takahashi-Makise, Takamasa Ueno, Tsutomu Agatsuma, Hirofumi Akari, Jun Komano, Yutaka Takebe, Kazuo Motoyoshi and Seiji Okada.

4 6) Dys-regulated activation of a Src tyrosine kinase Hck at the Golgi disturbs N-glycosylation of a cytokine receptor Fms. *Journal of Cellular Physiology*. 2009 Nov;221(2):458-468.

4 7) Tsutomu Murakami, Sei Kumakura, Toru Yamazaki, Reiko Tanaka, Makiko Hamatake,

Kazu Okuma, Wei Huang, Jonathan Toma, Jun Komano, Mikiro Yanaka, Yuetsu Tanaka, and Naoki Yamamoto. The Novel CXCR4 Antagonist, KRH-3955 Is an Orally Bioavailable and Extremely Potent Inhibitor of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection: Comparative Studies with AMD3100. *Antimicrobe Agents and Chemotherapy*. 2009 Jul;53(7):2940-2948.

三浦聡之

4 8) Koga, M., Tachikawa, A., Heckerman, D., Odawara, T., Nakamura, H., Koibuchi, T., Fujii, T., Miura, T., Iwamoto, A. Transition of impact of HLA class I allele expression on HIV-1 plasma virus loads at a population level over time. *Microbiology and Immunology*, In press

4 9) Oka, Y., Tashiro, H., Mizutani-Noguchi, M., Koga, I., Sugao, Y., Shirasaki, R., Miura, T., Akiyama, N., Kawasugi, K., Fujimori, S., Shirafuji, N. Successful unrelated bone marrow transplantation for a human immunodeficiency virus type-1-seropositive acute myelogenous leukemia patient following HAART. *Int J Hematol*. 91, 140-145, 2010.

5 0) Pereyra, F., Palmer, S., Miura, T., Block, B., Wiegand, A., Rothchild, A., Baker, B., Rosenberg, R., Cutrell, E., Seaman, M., Coffin, J., Walker, B. Persistent low level viremia in HIV-1 elite controllers and relationship to immunologic parameters. *Journal Infect Dis*. 200:984-990, 2009.

5 1) Chen, H., Piechocka-Trocha, A., Miura, T., Brockman, M., Julg, B., Baker, B., Rothchild, A., Block, B., Schneidewind, A., Koibuchi, T., Pereyra, F., Allen, T., Walker, B. Differential neutralization of human immunodeficiency virus (HIV) replication in autologous CD4 T cells by HIV-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Virol* 83:3138-3149, 2009.

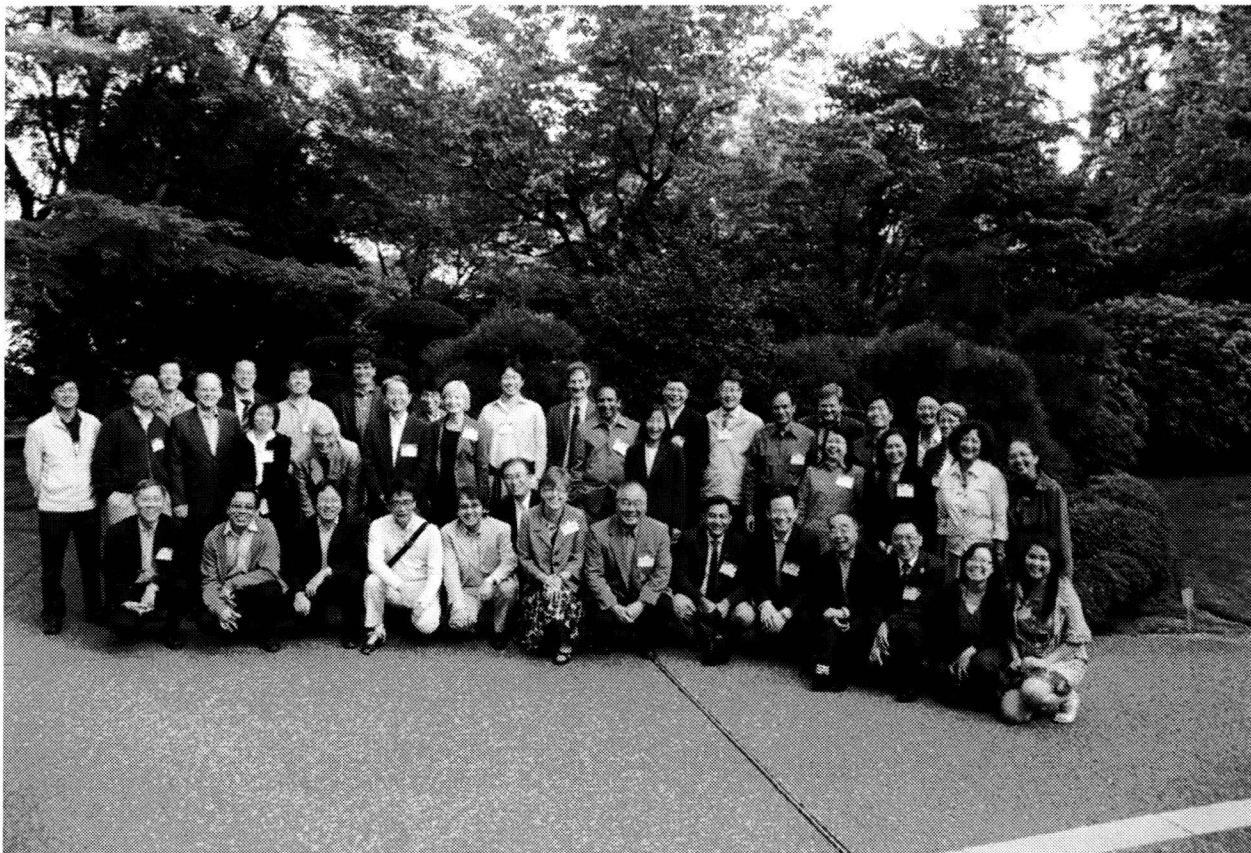
5 2) Miura, T., Brumme, C., Brockman, M., Brumme, Z., Pereyra, F., Block, B., Trocha, A., John, M., Mallal, S., Harrigan, PR., Walker, B. HLA-associated viral mutations are common in human immunodeficiency virus type 1 elite controllers. *J Virol* 83:3407-3412, 2009.

5 3) 三浦 聡之. HIV Elite Controllers -HIV感染症の自然制御-. *感染症*. Vol 39. 219-223. 2009

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

- 1 特許取得
なし。
- 2 実用新案登録
なし。

3 その他
なし



U.S. Japan Joint AIDS-Hepatitis Meeting, Portland, Oregon, Sep 19-21, 2009.

HIV と宿主の免疫応答に関する研究

研究分担者 岩本 愛吉 東京大学医科学研究所 教授

研究要旨 HIV の感染個体内コントロールには、ウイルス特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が主要な役割を果たしていると考えられている。白人・黒人のコホートにおいては、HIV タンパクの内、Gag タンパクが CTL の標的として最も重要であるとの認識が広がっている。CTL 反応は宿主の持つ HLA に拘束されるが、欧米において病気遅延と関連が深いとされる HLA-B27 及び B57 は、確かに Gag タンパク内に標的エピトープを持つ。しかしながら、日本人ではそれら HLA の頻度は極めて低い。日本人 HIV 感染において、どの HIV タンパクが重要な標的かは明らかになっていない。本研究では、日本人 HIV 感染者においても、Gag タンパク特異的 CTL 反応が血中ウイルス量と逆相関することを明らかにした。このことは、人種を問わず、Gag 特異的 CTL を誘導するワクチンが有効となる可能性を示唆した。

A. 研究目的

HIV 特異的細胞性免疫応答は HIV コントロールに重要であると考えられているが、細胞性免疫応答は HLA 拘束性に作用するため、その効果には HLA 遺伝子型が影響を及ぼす。これまでの研究は主にアフリカや欧米でのコホートによるため、本研究では他人種と遺伝的背景の大きく異なる日本人集団における HIV 特異的細胞性免疫応答の役割を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

未治療の日本人 HIV 感染者 51 名を対象とし、末梢血単核球を用いてインターフェロン γ ELISpot アッセイを行った。抗原として Gag, Pol, Env, Nef タンパク質をカバーする 576 種類の 12-17 アミノ酸からなる overlapping peptide (OLP) を使い、タンパク質毎に OLP を混合した pool-OLP に対するインターフェロン γ 産生細胞数を測定した。

(倫理面への配慮)

研究目的等を文書によって患者に説明し、書面でインフォームドコンセントを得た。本研究内容は東京大学医科学研究所倫理委員会による倫理審査を受け、承認済みである。また患者情報の保管に関しては個人情報保護法に基づき漏洩のないように管理が徹底された。

C. 研究結果

各タンパク質特異的 CD8 陽性 T 細胞の頻度を比較したところ、Gag, Pol 特異的 CD8 陽性 T 細胞が Env, Nef 特異的 CD8 陽性 T 細胞に比べて有意に高頻度であった。特異的 CD8 陽性 T 細胞の頻度と血中ウイルス量 (VL) との相関を調べたところ、Gag 特異的 CD8 陽性 T 細胞のみ VL と逆相関を示した ($p=0.0235$)。さらに、HIV 特異的 CD8 陽性 T 細胞の総和 (Gag+Pol+Env+Nef) における各タンパク質特異的 CD8 陽性 T 細胞の占める割合 (%) を解析したところ、Gag 特異的 CD8 陽性 T 細胞 (%) は VL と強い負の相関 ($p<0.0001$) が見られ、Env 特異的 CD8 陽性 T 細胞 (%) は VL と正の相関 (%) が見られた ($p=0.0349$)。

以上まとめると、HLA クラス I プロファイルが欧米とは大きく異なった日本人においても、Gag 特異的 CTL が感染個体内ウイルス産生コントロールに強く寄与していることを示唆した。

D. 考察

感染防御抗体を誘導する予防的ワクチンの開発は非常に難しいため、多くの研究者は特異的細胞傷害性 T 細胞を誘導するためのワクチン開発をすすめている。HLA クラス I の分布が欧米と大きく異なっているにも関わらず、日本人感染者でも、Gag タンパクが CTL の重要な標的であることは、HLA のプロファイルに関わらず Gag 特異的 CTL を誘導するワクチンの開発を支持する。一方で、全

での HIV タンパクの中で、何故 Gag タンパクが最も重要な標的であるのかは明らかになっていない。今後は、そのメカニズムの解明が必要である。

E. 結論

日本人においても、Gag タンパクが HIV 特異的細胞傷害性 T 細胞の最も重要な標的であることが明らかになった。その防御効果のメカニズムの解明が、HIV の感染個体内コントロールを目指すワクチンの開発に必要である。

F. 研究発表

1 論文発表

- 1) Koga, M., Tachikawa, A., Heckerman, D., Odawara, T., Nakamura, H., Koibuchi, T., Fujii, T., Miura, T., Iwamoto, A. Transition of impact of HLA class I allele expression on HIV-1 plasma virus loads at a population level over time. *Microbiology and Immunology*, In press
- 2) Zhu D, Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A, Kitamura Y. Influence of polymorphism in dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin-related (DC-SIGNR) gene on HIV-1 trans-infection. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Feb 10. [Epub ahead of print]
- 3) Miyazaki, E., A. Kawana-Tachikawa, M. Tomizawa, J. Nunoya, T. Odawara, T. Fujii, Y. Shi, G. F. Gao, and A. Iwamoto. 2009. Highly restricted T-cell receptor repertoire in the CD8+ T-cell response against an HIV-1 epitope with a stereotypic amino acid substitution. *Aids* 23:651-60.
- 4) Mizutani, T., A. Ishizaka, M. Tomizawa, T. Okazaki, N. Yamamichi, A. Kawana-Tachikawa, A. Iwamoto, and H. Iba. 2009. Loss of the Brm-type SWI/SNF chromatin remodeling complex is a strong barrier to the Tat-independent transcriptional elongation of human immunodeficiency virus type 1 transcripts. *J Virol* 83:11569-80.
- 5) Nunoya, J., T. Nakashima, A. Kawana-Tachikawa, K. Kiyotani, Y. Ito, K. Sugimura, and A. Iwamoto. 2009. Short communication: generation of recombinant monoclonal antibodies against an immunodominant HLA-A*2402-restricted HIV type 1 CTL epitope. *AIDS Res Hum Retroviruses* 25:897-904.
- 6) Wang, J., N. Kondo, Y. Long, A. Iwamoto, and Z. Matsuda. 2009. Monitoring of HIV-1 envelope-mediated membrane fusion using modified split green fluorescent proteins. *J Virol*

Methods 161:216-22.

2 学会発表

- (1) 鯉渕智彦、今井健太郎、菊地正、古賀道子、中村仁美、三浦聡之、藤井毅、岩本愛吉. HAART 導入一年半後に CD4 数の減少を来たし、diffuse large B-cell lymphoma と診断された一例. 第 23 回日本エイズ学会学術集会、名古屋、11/26-28/2009.
- (2) 菊地正、古賀道子、鯉渕智彦、今井健太郎、中村仁美、三浦聡之、小田原隆、藤井毅、岩本愛吉. ART 初回導入した ABC、TDF 使用症例の血清脂質の経時的変化について. 第 23 回日本エイズ学会学術集会、名古屋、11/26-28/2009.
- (3) 今井健太郎、前田卓也、菊地正、宮崎菜穂子、鯉渕智彦、古賀道子、中村仁美、三浦聡之、藤井毅、岩本愛吉. ペンタミジンによる低血糖が長期間遷延した AIDS 患者の一例. 第 23 回日本エイズ学会学術集会、名古屋、11/26-28/2009.
- (4) 今井健太郎、菊地正、鯉渕智彦、古賀道子、中村仁美、三浦聡之、藤井毅、岩本愛吉. ニューモシスチス肺炎と肺ノカルジア症を合併した AIDS 患者の一例. 第 58 回日本感染症学会東日本地方会学術集会、東京、10/30-31/2009.
- (5) HIV 感染における Gag 特異的細胞性免疫による免疫監視機構の重要性. 立川 (川名) 愛、中山香、古賀道子、鯉渕智彦、小田原隆、藤井毅、岩本愛吉. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会. 東京 2009 年 10 月.
- (6) 血中 HIV 量の異なる慢性期 HIV 感染者における末梢血単核球の液性因子産生能と各細胞分面の性状解析. 中山香、立川 (川名) 愛、藤井毅、鯉渕智彦、小田原隆、岩本愛吉. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会. 東京 2009 年 10 月.
- (7) 日本人集団における HIV 特異的細胞性免疫応答の解析. 立川 (川名) 愛、中山香、古賀道子、鯉渕智彦、小田原隆、藤井毅、岩本愛吉. 第 23 回日本エイズ学会学術集会. 名古屋 2009 年 11 月.
- (8) Koga, M., Tachikawa, A., Heckerman, D., Odawara, T., Nakamura, H., Koibuchi, T., Fujii, T., Miura, T. and Iwamoto, A. The impacts of HLA class I alleles on HIV-1 plasma virus loads in a unique Asian population with a narrow spectrum of HLA, and their changes at

the population level over time. 5th IAS Conference on HIV pathogenesis, Treatment and Prevention, Capetown, South Africa, 19-22 July 2009.

- (9) Miura, T., Brumme, ZL., Brumme, CJ., Block, B., Brockman, MA., Trocha, A., Pereyra, F., Kaufmann, D., Iwamoto, A., Rosenberg, E., Jessen, H., Kelleher, A., Markowitz, M., Little, S., Walker, BD and AIEDRP network: Characterization of HIV-1 from Acute/Early Infection in Individuals who Subsequently become Viremia Controllers. 5th IAS Conference on HIV pathogenesis, Treatment and Prevention, Capetown, South Africa, 19-22 July 2009.

1. Kawana-Tachikawa A, Nakayama K, Odawara T, Fujii T, Iwamoto A. Importance of Gag-specific cellular immunity to control HIV in Japanese population. 5th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. July 2009. Capetown, South-Africa

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

- 1 特許取得
なし。
- 2 実用新案登録
なし。
- 3 その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進研究事業）
分担研究報告書

組換え BCG/弱毒ワクシニアによるプライム/ブースト型 HIV ワクチンの研究

研究分担者 山本 直樹 国立感染症研究所エイズ研究センターセンター長

研究要旨： コドン至適化 SIV gag 遺伝子を発現する rBCG（発現レベルが約 10 倍増強）を用いると、0.1 mg という低用量（人に接種可能）でも、SIV Gag 特異的な細胞性免疫のプライミング効果が顕著であった。しかし、この rBCG 株では、組換えプラスミドが極めて不安定であった。至適化した rBCG/rDIs ワクチンでは、ブースト接種後 3 年においても、SIV Gag 特異的な INF-g 産生細胞が検出され、SIVmac 239 の攻撃に対して、コントロールと比較して、リンパ節における memory T cell の減少を抑制することが可能であった。高コピー変異型プラスミドを用いて HIV Gag 発現ベクターを構築すると、組換え BCG 株での発現レベルが 10 倍程度増強されると同時に、組換えプラスミドが安定に保持されていた。実用化に向けて有用なベクターが開発できた。

A. 研究目的

これまでに開発されて来た HIV 候補ワクチンの多くは、HIV 特異的細胞性免疫（主にキラー T 細胞）の誘導に主眼が置かれたものであったが、2008 年の STEP Study（組換えアデノウイルスワクチン）の失敗によって、その方向性が揺らいでいる。当然ながら、Env 抗原を標的とするウイルス中和抗体産生を目指したワクチンの開発も極めて重要な課題であるが、broad な HIV 中和能を持つヒトモノクローナル抗体が HIV 感染者から分離できるものの、ワクチン接種によってこの種の抗体をドミナントに産生させることは容易ではない。構造生物学的アプローチによる Env 抗原のデザインが多々試みられているが、突破口の糸口も見つかっていないのが現状である。

このような停滞した状況の中での我々が開発した BCG ベクターの位置づけは、より HIV 感染をコントロールするのに有効な細胞性免疫をプライミングできる可能性を持った、人で

試されるべき新規ワクチンベクターということだろう。結核ワクチンとして安全性が担保されていることに加え、マウスやサルなどの実験動物よりも人の方が BCG に対する感受性が高いことから、人で用いてこそそのワクチンベクターである。昨年度までの結果から、コドン至適化を施して抗原発現が約 10 倍増強された rBCG-SIVgag をプライミングに用い、同じ抗原を発現する rVaccinia DIs で 2 回ブーストしたサルは、2 回目のブーストから 3 年後の SIVmac 239 high dose 経粘膜チャレンジに対して顕著な recall response を示し、少なくとも 3 年間はメモリー T 細胞を維持できることが判った。コントロールと比較してセットポイントでの血中ウイルス量は 100 倍弱程度抑制され、リンパ節での effector memory T 細胞の loss も抑制されていたことから、これまでに例を見ない長期間のワクチン効果が確認できた。

しかし、このコドン至適化 BCG-SIVgag では組換えプラスミドが極端に不安定で、初代の液体培養中に速やかに DNA 欠失が起こってしまうため、実用化が難しいと考えられていた。本

研究では、この問題を克服するため、コドン最適化以外の方法で、それに匹敵する HIV Gag 高発現株を得ることを目的とした。

B. 研究方法

(1) 高コピー変異型プラスミドベクターの構築

Mycobacterium fortuitum 由来プラスミド pAL5000のレプリコンを含む抗酸菌-大腸菌シャトルプラスミド pSO246 から 1.4 kbp *BglIII-XbaI*断片を切り出し、pUC系プラスミドにサブクローニングする。このプラスミドの *DraIII-NcoI*小断片を除いたベクターに、*repA*遺伝子中の3塩基(1アミノ酸)の欠失変異を導入した合成 *DraIII-NcoI* DNA断片 (88 bp) を連結する。そのプラスミドから 1.4 kbp *BglIII-XbaI*断片を切り出し、元の pSO246 に戻すことにより、変異型 pSO246R プラスミドを得た。

(2) HIV-1 Gag抗原の発現ベクター構築

*Mycobacterium kansasii*由来 antigen 85Bのプロモーターと分泌シグナル、あるいは *Mycobacterium smegmatis*由来 SP2プロモーターと *blaF*分泌シグナルに HIV-1 *gag*遺伝子(pNL4-3由来の野生型または VRC3900由来のコドン最適型)を繋いだ発現カセットを、pSO246及び pSO246Rにそれぞれ組み込み、種々の発現ベクターを得た。

(3) BCGへの遺伝子導入とGag抗原発現の解析

上記の pSO246 及び変異型の pSO246R をベースとした Gag 発現ベクターを電気穿孔法により BCG 東京株に導入し、カナマイシン (30 µg/ml) 含有 7H10-OADC 寒天培地で 3 週間培養することにより、形質転換体を選択した。コロニーをピックアップして 7H9-ADC 液体培地で 2 週間培養後に集菌し、菌体の超音波破碎により lysate を調製した。SDS-PAGE (4-20% グラデーションゲル) で分画後、PVDF 膜にブロットし、一次抗体として抗 HIV-1 Gag V107 マウスモノクローナル抗体を、二次抗体としてアルカリホスファターゼ標識抗マウス IgG を用いてウエスタンブロット解析を行った。

菌体 lysate (蛋白質量 10 µg 分) あるいは培養

上清の一部を用いて HIV-1 p24 ELISA キット (Zepto Metrix) により Gag 蛋白質の発現・分泌量を定量した。サンプルを Lysing Buffer と混合し、既に抗 HIV-1 p24 抗体がコートされたプレートで反応させた。さらに抗 HIV-1 p24 Detector 抗体、Streptavidin-Peroxidase の順で反応させ、基質液および反応停止液を入れた後、OD₄₅₀ の測定を行った。標準液の値を用いて作成した検量線をもとにサンプルの濃度を算出した。

(4) 組換えプラスミドの抽出と安定性評価

形質転換菌のコロニーを滅菌したガラス棒でピックアップ後、新しい 7H10-OADC 寒天培地に植えつけて一定期間、37°C で培養する。増殖した菌体を遠心分離で集菌後、Tris-EDTA-Glucose 溶液 50 µl に suspend し、20 mg/ml のリゾチーム溶液 50 µl を加えて、37°C で 3 時間インキュベート後、アルカリ SDS 法によりプラスミドを抽出した。各プラスミドは 1% アガロースゲル電気泳動で分析し、明白なバンドが見られないものについては、大腸菌 HB101 コンピテントセルに導入して増幅後に再度、電気泳動で分析した。プラスミドコピー数の比較は、BCG から抽出した DNA を形質転換した大腸菌のコロニー数をカウントすることにより行った。

(5) 倫理面への配慮

遺伝子組換え体の第二種使用における拡散防止措置については、国立感染症研究所の機関承認済みである。

C. 研究結果

(1) 高コピー変異型プラスミドベクターの構築

変異型 pSO246R は、元の pSO246 と比較して、*M. smegmatis* では約 5 倍、BCG では 3-4 倍にコピー数が増加していた。この値は、Bourm らの報告 [Tuberculosis (2007)] にほぼ一致していた。

(2) Gag 発現レベルの比較・検討

細菌には、一般的な Sec 分泌系と twin-arginine translocase (Tat) 分泌系の二種の蛋白質分泌系

が存在する。Sec 分泌系依存性の *M. kansasii* 由来 antigen 85B 分泌シグナル (own promoter) と Tat 分泌系依存性の *blaF* (β ラクタマーゼ遺伝子) シグナル (SP2 promoter) にそれぞれ *gag* 遺伝子を繋いだ発現カセットを構築し、これらを pSO246 及び pSO246R に導入した発現ベクターを保持する BCG 東京株での Gag 発現レベルを、ウエスタンブロットと Gag p24 ELISA 法で比較・検討した。コドンに至適化した *gag* 遺伝子を用いた場合、pSO246 では組換え体が得られたが、pSO246R では得られなかった。pNL4-3 由来の野生型 *gag* 遺伝子を antigen 85B 分泌シグナルに繋いだ場合、pSO246R を用いても組換え体が得られ、pSO246 を用いた場合よりも lysate で約 5 倍、培養上清で約 10 倍の Gag を発現していることがわかった。これは、コドンに至適化による発現増強とほぼ同じレベルであった。

(4) 組換えBCGでのプラスミド安定性評価

Gag 高発現株が得られた pSO-A717N-GagB (*blaF* signal + コドンに至適化 *gag* 遺伝子)、pSO-240S-GagB (antigen 85B signal + コドンに至適化 *gag*) 及び pSOR-240S-NLgag (antigen 85B signal + 野生型 *gag*) の三種の組換え BCG 株での、液体培養時のプラスミドの安定性を調べたところ、pSO-A717N-GagB で欠失が認められたが、他の二種では欠失は見られず、高コピー型プラスミドを用いると、コドンに至適化と同程度の発現レベルが得られるにもかかわらず、組換えプラスミドは安定であることが判った。

C. 考察

コドンに至適化は BCG ベクターの免疫原性を高めるための有効な方法だが、発現レベルが BCG 菌体にとって不都合な程度 (ストレスがかかってしまう) にまで上昇してしまうと、プラスミドを排除してしまう傾向にある。しかし、今回開発した多コピー変異プラスミドを用いると、コドンに至適化に匹敵する Gag 発現増強効果が得られる上に、菌体内でプラスミドベクターも安定に保持されており、実用化上極めて有用なツールになるものと期待される。

E. 結論

多コピー変異型プラスミドを用いることにより、安定にかつコドンに至適化とほぼ同程度の増強効果で Gag 抗原を高発現できる BCG 株を得ることができた。今後、SIV Gag 発現株の改良に応用し、ワクシニアベクターとのプライムブーストワクチンの、サルエイズモデルでの防御能評価を行う予定である。

F. 論文発表

1. Suzuki H, Kidokoro M, Fofana IB, Ohashi T, Okamura T, Matsuo K, Yamamoto N, Shida H. Immunogenicity of newly constructed attenuated vaccinia strain LC16m8Delta that expresses SIV Gag protein. **Vaccine** 11: 966-971 (2009)
2. Murakami T, Eda Y, Nakasone T, Ami Y, Someya K, Yoshino N, Kaizu M, Izumi Y, Matsui H, Shinohara K, Yamamoto N, Honda M. Postinfection passive transfer of KD-247 protects against simian/human immunodeficiency virus-induced CD4+ T-cell loss in macaque lymphoid tissue. **AIDS**. 31;23(12):1485-94 (2009).
3. Ohba K, Ryo A, Dewan MZ, Nishi M, Naito T, Qi X, Inagaki Y, Nagashima Y, Tanaka Y, Okamoto T, Terashima K, Yamamoto N. Follicular dendritic cells activate HIV-1 replication in monocytes/macrophages through a juxtacrine mechanism mediated by P-selectin glycoprotein ligand 1. **J Immunol**. 183:524-32 (2009).

G. 学会発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進研究事業）
分担研究報告書

粘膜におけるHIV感染とアジュバント

研究分担者 清野 宏

研究要旨

カチオン型コレステロールプルランによりナノゲル化されたワクチンをマウスに投与することでアジュバントを加えなくても効果的に全身系及び粘膜系防御免疫を誘導することができることを示した。

清野 宏・東京大学医科学研究所
教授

A. 研究目的

現在、毎年世界で400万人が新たにHIVに感染しているがその65%はSub-Saharan Africaで感染している。このアフリカでの感染の60%以上は女性であり、性交渉によるHIV感染に対する効果的なワクチンの開発が望まれている。HIVの初期伝播が粘膜誘導組織であることから、HIVの粘膜ワクチン開発に期待が寄せられており、特に経鼻投与されたワクチンに対する免疫応答が上気道のみならず、生殖器にも誘導されることから、経鼻ワクチンの開発が注目されている。我々は、球状のナノサイズゲル (Nanogel) にワクチン抗原を被覆することで、アジュバントを必要としない、ナノゲル型経鼻ワクチンを開発した。

B. 研究方法

ボツリヌスA型毒素のワクチン候補である組換え無毒C末端ドメイン (BoHc/A) をカチオン型コレステロールプルランによりナノゲル化したcCHP-BoHc/Aワクチンを調製し、10 μ gをマウスに1週間ごとに、3回経鼻免疫した後、抗原特異的免疫応答を調べた。

C. 研究結果

BoHc/Aをナノゲル化することで、毒素特異的全身系IgG抗体のほか粘膜面にも分泌型IgA抗体が誘導されたが、ナノゲル化しなかったワクチンは両者とも有意な免疫応答は得られなかった。その後腹腔内及び経鼻での毒素攻撃に対しても、ナノゲル化ワクチンのみが防御効果を示した。

D. 考察

カチオン化されていないコレステロールプルラン (CHP) によりナノゲル化されたワクチンを経鼻投与しても、抗原特異的免疫応答が得られないことから、カチオン化されることで効果的に鼻粘膜からワクチンが取り込まれることが示唆された。今後はエイズワクチン抗原での検討を進めていく。

E. 結論

カチオン型コレステロールプルランによりナノゲル化されたワクチンはアジュバントを加えなくても、効果的に全身系及び粘膜系防御免疫を誘導することができる。

F. 健康危険情報

分担研究報告書には記入せず。

G. 研究発表

1. 論文発表

Y. Yuki et al. Vaccine 27: 5982-5988 (2009).

T. Nochi et al. J. Immunol. 183: 1083-1097 (2009)

Y. Yuki, H. Kiyono. Expert. Rev Vaccines. 8: 1083-1097 (2009)

2. 学会発表

Y. Yuki, T. Nochi et. al
A novel Naogel-based Delivery system for Ajuvant-free-intranasal Vaccines
2nd World Congress of Vaccine
Beijing, China March 25, 2010

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

発明の名称：カチオン化ナノゲルを用いる粘膜ワクチン

発明者：幸義和、野地智法、秋吉一成、清野宏

出願番号：PCT/JP2009/068647

出願日：2009年10月30日

厚生労働科学研究費補助金 (地球規模保健課題推進研究事業)
分担研究報告書

新規のエイズの化学療法剤の開発とそれによる免疫応答能の回復

研究分担者 満屋 裕明 (熊本大学医学薬学研究部血液内科学・感染免疫診療部 教授)

研究要旨

我々のグループは、新規開発中の HIV-1 逆転写酵素阻害剤(RTI)である 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine の抗 HIV 活性について、NOG-SCID マウスや SIV 感染サルを用いて評価を行った。更に HIV-1 の細胞侵入時にコレセプターとして機能する CCR5 の微細構造学的解析系の確立、また CCR5 阻害剤の結合モデル、分子レベルでの機序解析の研究も進めており、これらの解析結果を基にして、CCR5 結合能のある新規低分子化合物のモデリングを行い、強力な抗 HIV 活性を有する新しい化合物の設計・同定を続けている。また我々は HIV-1 が耐性を獲得しにくく、獲得しても他薬剤との交差耐性を有しない新規のプロテアーゼ阻害剤(PIs)の開発を米国の研究グループと共同で続けており、新規の HIV-1 PI, GRL-02031 を開発、本剤における抗 HIV-1 活性発揮の機序や耐性獲得の機序について詳細な検討を行った。

A. 研究目的

ヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) の感染によって起こる後天性免疫不全症候群 (AIDS) に対する化学療法は長足の進歩を遂げ、かつて「死の病」とされた本疾患は「コントロール可能な慢性感染症」と再定義し得る程となった。この進歩は、逆転写酵素阻害剤(RTIs)とプロテアーゼ阻害剤(PIs)を組み合わせた多剤併用療法(HAART)に負うところが大きい。しかし、HIV-1 が RTIs と PIs の両剤に対して耐性を獲得して治療抵抗性となった症例数の増大、また耐性ウイルスによる初感染症例増多の報告が続いており、野生 HIV-1 株と多剤耐性株の双方に強力な活性を發揮し、薬剤耐性を誘導しにくく、副作用が少なく、服用しやすい新規の薬剤の開発が文字通り急務の課題となっている。本研究では、HIV-1 が耐性を発現しにくく、発現しても他薬剤との交差耐性を有しない新規の PIs、また新しい機序から HIV-1 の感染を阻害する CCR5 阻害剤の開発を進めるとともに、その基礎となるウイルス学・酵素学・細胞生物学・薬理学・結晶解析学的な基礎研究を進める。

B. 研究方法

1) 化合物の抗HIV-1活性評価：抗HIV-1活性の評価にはMTT、MAGIアッセイなどを用いるが、有望なものについては耐性株を含む複数のウイルス株での活性を更に検討するため、p24アッセイを行う。このアッセイには全自動化学発光光度測定機：Lumipulse Fを用いる。このようにして見いだされた、より有望な化合物について前臨床試験の準備を進める。

2) 抗 HIV-1 作用発現のメカニズム解析：新規に同定された化合物がウイルス、あるいは生体(細胞)へ与える変化、それがどのようにして抗 HIV-1 効果をもたらすかについて解析を進める。この研究には多数の HIV-1 クローンの作成・検討が必要で、しかも HIV-1 の広範な遺伝子部分についての検索が必要とされるが、high throughput の DNA sequencer：ABI-3130 を用いるので迅速な実験データの解析が可能となる。

3) 薬剤耐性のメカニズム解析：HIV-1 が極めて高い増殖能を有し、しかも逆転写酵素(RT)が error-prone であるという特性のために、HIV-1 の薬剤耐性発現は不可避である。X 線結晶解析をはじめとするタンパクの微細構造研究の方法論を用いて、多剤耐性 HIV-1 株の発現機序の分子・原子レベルでの解析を行う。その後、構造を基礎とした高い抗ウイルス活性を有しかつ耐性の発現に抵抗する薬剤のデザイン・再デザインを行う。新規の化合物に対して試験管内で耐性 HIV-1 変異株の誘導を試み、更にそのようにして誘導された HIV-1 についてのウイルス学・生化学・遺伝子の解析や X 線結晶解析を用いて耐性発現のメカニズムの解析を行う。

4) CCR5 の微細構造学的解析・生理学的解析：コンピュータモデリングの手法を用いた CCR5 の微細構造学的解析の系を確立、CCR5 と阻害剤の結合モデル、HIV-1 感染(エンベロープとの結合)と CCR5 の生理作用(ケモカインによる作用)に重要な構造の解析など行っている。また、各種顕微鏡を用いた細胞表面 CCR5 の局在性・動態解析を行う。

5) HIV-1 PR 二量体形成 (dimerization) 阻害：我々は

CFP/YFP タグ付き PR を有する感染性組み換え HIV-1 クローンと FRET (fluorescence resonance emission transfer) の系を用いて、HIV-1 PR dimerization を確認する系を確立した。dimerization に重要とされるアミノ酸(Asp29、Arg87、Thr26 *etc*)置換を有する種々の CFP/YFP タグ付き変異体を多数作成、FRET の系を用いてこれらのアミノ酸置換が dimerization を阻害することを明らかとした。Dimerization に重要とされるアミノ酸の詳細な解析を進め、新たな HIV-1 PR 阻害への機序を明らかにする。

(倫理面への配慮)

開発中の化合物の臨床試験導入に際してまず動物実験などでその安全性を十分に確認する。さらに医学部・大学内の該当する IRB で倫理面での適合性について許可を申請、認可された後で試験を開始する。

C. 研究結果

新規に開発中の HIV-1 RTI である 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine (EFdA) の抗 HIV 活性及び同化合物の細胞内代謝を評価し、ヒト DNA ポリメラーゼに対する影響等を明らかにし (Nakata & Mitsuya *et al*, *Antimicrob Agents Chemother*. 51: 2701-2708, 2007)、EFdA の高い抗 HIV-1 活性を NOG-SCID マウスで証明、更に SIV 感染サルでの実験を進め(米国 Pittsburgh University のグループとの共同研究)、末期 SIV 感染サルで高い抗 SIV 活性を確認、また長期毒性についても検討、サルでの安全性が確認された(投稿準備中)。今後も EFdA の臨床開発へ向けた努力を米国のグループと共同で展開しており、佳良な準備的データを得ている。

ケモカイン受容体である CCR5, CXCR4 は HIV-1 のコレセプターとして HIV-1 の細胞侵入過程に重要な役割を持っている。このようなウイルスの細胞への侵入過程は既存の主な抗 HIV 剤と作用機序の異なる新たな治療薬のターゲットとしても有望であり、満屋は現在までに米国での臨床試験で強力な抗 HIV-1 効果が確認された CCR5 阻害剤: Aplaviroc (AK602: 肝障害のため第三相臨床試験は休止中) を始め、複数の CCR5 阻害剤の同定に成功している。一方で我々はこれらの阻害剤の作用機序の解明のための研究も進めており、結晶解析・コンピュータモデリングの手法を用いた CCR5 の微細構造学的解析の系を確立、CCR5 と阻害剤の結合モデル、HIV-1 感染と CCR5 の生理作用に重要な構造の解析などを既に報告している(Maeda & Mitsuya *et al*, *J Mol Biol*. 381:956-974, 2008)。我々はケモカイン受容体阻害剤開発研究の過程で、CCR5 阻害剤分子が細胞表面の CCR5 の全てに結合しなくても HIV-1 感染がほぼ完

全に抑制されるという事象を見いだした。これに類似するデータとして、細胞表面に HIV-1 被感染性の無い変異 CCR5 が一部含まれるだけで HIV-1 感染性が著明に失われることを明らかにしており、これは HIV-1 と細胞の接着・融合の過程で形成される HIV-1 エンベロップ・CD4・CCR5 複合体が正常に形成されないと HIV の侵入・感染が成立しない、という機序を示唆しているものと思われる (Maeda, Nakata & Mitsuya, 投稿準備中)。一方で結晶解析・コンピュータモデリングの手法を用いた CCR5 の微細構造学的解析系の確立、CCR5 阻害剤の結合モデル、分子レベルでの機序解析の研究も進めており、現在ではこのモデルを応用して CCR5 結合能のある新規の低分子化合物のモデリングを行い、強力な抗 HIV 活性を有する新しい化合物の設計・同定にも成功している (Yin, Maeda & Mitsuya, 投稿準備中)。今後これらの知見を統合・発展させ、HIV-1 粒子が細胞へ侵入するのに必要な HIV-1 エンベロップ・CD4・CCR5 の量的解析とこれらの結合モデル作成を進めると同時に詳細な CCR5 の微細構造解析を進め、より強力且つ効果的に HIV-1 感染を阻害する低分子化合物の開発を続けていく。

細胞表面の HIV-1 受容体と HIV-1 エンベロップの相互作用と HIV-1 感染の関連をみる手法として、各種画像解析も行っている。具体的には電子顕微鏡・蛍光/共焦点顕微鏡を用いた細胞表面の HIV-1 受容体の局在性・動態解析の手法を確立し、ウイルス接着時のこれらの分子動態を解明することを目標とする。我々は既にレポータータンパク(YFP)を結合させた CCR5 のレーザー顕微鏡での解析により、細胞表面の CCR5 は非常に流動性に富むこと (Nakata & Mitsuya, *Antiviral Therapy in press*)、電子顕微鏡での解析により通常の状態(HIV-1 感染に関与していない)での CCR5 は細胞表面にクラスターを形成して存在することを明らかにしている。これらの基礎データ・手法を元にウイルス感染時の各タンパク(エンベロップ・受容体)の動態解析の系の樹立を図る。

また、我々は広いスペクトラムの薬剤耐性株に高い活性を発揮する PI, TMC114/darunavir (Koh & Mitsuya *et al*, *Antimicrob Agents Chemother*. 47: 3123-3129, 2003)を米国 Purdue University の Dr. Ghosh グループとの共同研究で開発、本剤は 2006 年 6 月に米国 FDA にて認可され、Prezista™ として本邦でも臨床に供されることとなった。さらに我々のグループは試験管内における DRV の研究を続けており、複数の多剤耐性臨床分離 HIV-1 混合株を用いた耐性誘導実験において、複数の PI 耐性変異体の重感染と遺伝子相同組み換えが起こることで、HIV-1 が DRV に

対する高度耐性を獲得する可能性があることを見出した (Koh, & Mitsuya *et al*, 投稿中)。さらに我々が開発した FRET HIV-1 expression system による PR dimerization を確認する系により、DRV が HIV-1 プロテアーゼの酵素活性阻止能と共に二量体化阻止能をも併せ持つことを既に見いだしており、これは DRV の高い genetic barrier の要因の一つであると思われる (Koh, & Mitsuya *et al*, *J Biol chem.* 282:28709-28720, 2007)。また試験管内で誘導した DRV 耐性 HIV-1 変異体で認められた変異を導入した感染性組換え HIV-1 を作製し、この system を用いて解析すると、DRV による二量体化阻止能の損失には PR 内部に少なくとも 4 つのアミノ酸置換が必要であることを確認している (Koh, & Mitsuya *et al*, 投稿準備中)。また DRV 以外の既存の PI の中で TPV も二量体化阻止活性を有しているが、TPV では一つのアミノ酸置換によりこの活性が損なわれることを確認しており、DRV がより強力な二量体化阻止活性を有していることが示唆された (Aoki & Mitsuya *et al*, 投稿準備中)。現在、DRV とプロテアーゼモノマーとの結晶構造解析を進めており、詳細な解析により更に genetic barrier の高い薬剤の開発に繋がるものと思われる。また最近では、DRV が有している特徴的な bis-THF 構造と macrocyclic 構造を併せ持つ一連の新規の PI を開発した。その中でも GRL-216 は多剤耐性臨床分離 HIV-1 株におよび試験管内で誘導した既存の PI 耐性 HIV-1 変異体に対して高い活性を発揮し、さらに二量体化阻止活性をも有する。野生株を用いた試験管内での GRL-216 耐性 HIV-1 変異体の誘導では既存の PI と比較し優位な耐性発現の遅延が見られている (Tojo, & Mitsuya *et al*, 投稿中)。

また我々のグループは PIs 耐性と Gag の遺伝子変異についてのウイルス学的・構造学的検討も進めており、試験管内で誘導した APV 耐性 HIV-1 変異体において、PR 領域への APV 耐性関連変異に加え Gag 領域の非開裂部位にアミノ酸変異の蓄積を認め、これら Gag 領域変異は耐性変異を有する virus の fitness を改善し、さらに Gag 領域変異のみを導入した HIV-1 では野生株に比し APV 耐性を早期に獲得、一方で RTV や NFV に対する耐性発現が遅延することを見いだした。また NFV 耐性関連変異が APV に対して感受性を増大させることより APV と NFV による治療レジメンが良好な抗ウイルス効果をもたらす可能性が示唆された (Aoki & Mitsuya *et al*, *J Virol.* 83: 3059-3068, 2009)。

D. 考察

これらの研究の特色として、抗 HIV-1 薬開発に必

要なウイルス学的研究手技に加えて、新規(独自)の低分子化合物の合成や結晶構造解析・コンピューターモデリングなど、1 研究施設では通常施行困難な多岐にわたる研究領域をカバーする研究体制が、国内外のグループとの共同研究として整えられていることが挙げられる。今後もこれらの研究を継続し、新興再興感染症の予防・治療薬開発を進める。

E. 結論

我々のグループは HIV-1 が耐性を発現しにくい薬の RTIs, PIs の開発を米国グループとの共同研究で継続している。また CCR5 の微細構造学的解析系の確立、CCR5 阻害剤の結合モデル、分子レベルでの機序解析の研究も進めており、これらの解析結果を基にして、CCR5 結合能のある新規低分子化合物のモデリングを行い、強力な抗 HIV 活性を有する新しい化合物の設計・同定を続ける。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ghosh, AK, Gemma S, Simoni E, Baldrige A, Walters, DE, Ide K, Tojo Y, Koh Y, Amano M, and Mitsuya H. (2010) Synthesis and biological evaluation of novel allophenylnorstatine-based HIV-1 protease inhibitors incorporating high affinity P2-ligands. *Bioorg Med Chem Lett.* 20:1241-6.
2. Ghosh AK, Leshchenko-Yashchuk S, Anderson DD, Baldrige A, Noetzel M, Miller HB, Tie Y, Wang YF, Koh Y, Weber IT, Mitsuya H. (2009) Design of HIV-1 protease inhibitors with pyrrolidinones and oxazolidinones as novel P1'-ligands to enhance backbone-binding interactions with protease: synthesis, biological evaluation, and protein-ligand X-ray studies. *J Med Chem.* 52:3902-14.
3. Fujimoto H, Higuchi M, Watanabe H, Koh Y, Ghosh AK, Mitsuya H, Tanoue N, Hamada A, and Saito H. (2009) P-glycoprotein mediates efflux transport of darunavir in human intestinal Caco-2 and ABCB1 gene-transfected renal LLC-PK1 cell lines. *Biol. Pharm. Bull.* 32:1588-93.
4. Ghosh AK, Sarang Kulkarni S, Anderson DD, Hong L, Baldrige A, Wang Y-F, Chumanevich AA, Kovalevsky AY, Tojo Y, Koh Y, Tang J, Weber IT, and Mitsuya H. (2009) Design, synthesis, protein-ligand X-ray structures and biological evaluation of a series of novel