

200908004A

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

宿主側及びウイルス側要因からみた
H I V感染症の病態解明と
新規医薬品・診断薬品の開発による
エイズ発症防止の研究

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

宿主側及びウイルス側要因からみた HIV 感染症の病態解明と
新規医薬品・診断薬品の開発によるエイズ発症防止の研究----- 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

1. HIV 感染症の病態進行を左右する宿主因子の探索に関する研究 ----- 9

大阪大学微生物病研究所 教授 塩田達雄

2. 中和抗体によるエイズ発症阻止の研究 ----- 14

熊本大学エイズ学研究センター 教授 松下修三

3. 非 B 型 HIV-1 感染小児のエイズ発症に影響を及ぼす因子に関する研究 ----- 18

金沢大学大学院医学系研究科 教授 市村 宏

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 25

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 33

宿主側及びウイルス側要因からみた HIV 感染症の病態解明と
新規医薬品・診断薬品の開発によるエイズ発症防止の研究

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

タイにおけるHIV感染者のコホート研究から、細胞死を起こす遺伝子Fasの多型がリポアトロフィーあるいはリポディストロフィー発症に関わることが示唆された。ケニアの小児HIV感染者コホート研究により、途上国においても薬剤耐性の検査や研究が重要であることが示された。gp120に結合し、中和単クローン抗体の反応性を増強する低分子化合物NBD-556存在下で、患者由来の血清IgGにより当該患者の同時期のウイルスを中和できた。免疫増強作用を持つ低分子化合物として期待が持てる。試験管内で精製した抗原とTCRによりCTLの抗原認識を再現できた。X線結晶構造解析によりHIVのエスケープ機構の解析する基盤ができた。

分担研究者

塩田達雄 大阪大学微生物病研究所・教授

松下修三 熊本大学エイズ学研究センター
教授

市村 宏 金沢大学大学院・教授

詳細な解析とその応用、(3) ケニアやタイ、日本などの臨床現場と直結した国際的なウイルスと宿主の研究である、ことを特徴とする。以下、平成 21 年度の研究に関してより具体的にのべる。

タイにおいて独自に設立した治療を開始した HIV-1 感染者のコホートにおいて、ART の副作用の一つであるリポアトロフィーあるいはリポディストロフィー発症と細胞のアポトーシスを引き起こす遺伝子 Fas の多型 (Fas-670) の関連性について研究することを目的とした (塩田)。ケニアの小児に対する ART の有効性と治療失敗例における薬剤耐性変異の出現パターンを明らかにすること、病態進行と HLA 型の関連性を明らかにすることを目的とした (市村)。gp120 に結合し中和単クローン抗体の反応性を増強する低分子化合物 NBD-556 が、患者血清の中和活性を増強するか否かを検討した (松下)。HLA-A24 に提示される HIV-1 Nef タンパク質由来の CTL エピトープ、

A. 研究目的

疾患としての AIDS が報告されて 4 半世紀が過ぎたが、まだ有効なワクチンは開発されていない。先進工業国においては抗レトロウイルス療法 (ART) が普及し、HIV 感染者の予後は著しく改善したが、薬剤耐性や長期服用による毒性が大きな問題である。ART は高価で途上国では負担が大きい一方、薬剤耐性も大きな問題となりつつある。以上から、国際的な立場に立って、新たな治療標的の発見、ワクチンや免疫療法の開発に直結する研究を推進することが急務である。本研究は (1) 網羅的ゲノム解析を用いた感染病態に関与する宿主因子の解明、(2) 抗 HIV 効果のある細胞性及び液性免疫の

Nef138-10(wt) (RYPLTFGWCF)では、2番目のタイロシン (Y) がフェニルアラニン (F) に置換したアミノ酸配列 RFPLTFGWCF (Nef138-10(2F)) を持つエスケープ変異体が発見することが知られている。野性型 Nef138-10(wt) と変異型 Nef138-10(2F) をほぼ同程度に認識する CTL クローン C1-28 と野性型に対する傷害活性の強い CTL クローン S19-2 について、抗原である HLA-A24 とペプチドの複合体 (pMHC) とこれらのクローンの T 受容体 (TCR) の結合性を試験管内で確認することを目的とした (岩本)。

B. 研究方法

タイにおいて ART を受けた患者 800 名についてリポアトロフィーあるいはリポディストロフィー発症の有無を調査した。Fas -670 の遺伝子多型は、制限酵素切断断片の電気泳動パターンの相違により決定した (塩田)。ケニア国ナイロビ市 HIV 感染小児約 100 名について、病歴調査と凍結された血漿中の HIV-1 *pol*-PR/RT 領域を RT-PCR で増幅し、シーケンシングにより薬剤耐性変異の有無を解析した。また、末梢血リンパ球 DNA を用いて SBT (sequence based typing) 法により HLA 型を決定した (市村)。感染症例 (Pt. 3) からウイルスと血清 IgG を分離精製し、中和実験を行った (松下)。C1-28 と S19-2 から単離された TCR α 鎖、 β 鎖遺伝子の細胞外領域の C 末端にヘテロダイマーの形成促進のため、ロイシンジッパー領域をコードする遺伝子を付加した。さらに α 鎖にはヒスチジンタグ、 β 鎖にはビオチン付加配列 (BSP 配列) を付加した。これらの TCR 遺伝子を有する組換えバキュロウイルスを作製し昆虫細胞 (High Five) に感染後、その培養上清を回収し多段階精製を行った。また、大腸菌の発現系により Nef138-10(wt)、Nef138-10(2F) を提示する可溶性 HLA-A24 分子 (HLA-A24/Nef138-10(wt) 及び、HLA-A24/Nef138-10(2F)) を作製した。Biacore

により、分子間相互作用の解析を行った (岩本)。
(倫理面への配慮)

各分担研究者が所属する機関の倫理委員会や相手国の研究機関で承認を受けた。検体の提供者には遺伝子解析を行うことを含めて十分に説明を行い、書面による同意を得られた場合のみ解析の対象とした。検体は匿名化後に研究に用いた。

C. 研究結果

タイにおいて ART を受けた 800 名の調査により、治療開始後平均 4.8 年の観察期間中 270 名がリポアトロフィーあるいはリポディストロフィーを発症した。リポアトロフィーあるいはリポディストロフィーの発症は、女性であること ($P < 0.0001$)、初回治療時に核酸系逆転写酵素阻害剤 D4T を含む処方を受けたこと

($P = 0.0012$) と有意に関連していた。270 名の発症者と対照群 270 名では、A アリルの頻度および AA のホモ接合者の数ともに発症者群で有意に多かった (塩田)。ART を受けた 84 名の小児のうち 68 名 (81%) において、治療開始後 24 ヶ月の血中ウイルス量が検出限界以下であった。治療が失敗した 16 名 (19%) のうち 4 名では、治療開始前から薬剤耐性ウイルスに感染していた。これらの 4 名を除外した 12 名中 4 名の小児ではチミジン誘導体関連変異 (TAM) が、また他の 4 名のウイルスでは M184V が耐性変異として検出された。残りの 4 名の児では M184V と TAM が同時に検出された。エイズ遅発症群はその他の児に比べ、HLA A74 及び B72 の頻度が多かった (市村)。臨床分離ウイルスの HIV-1_{Pt.3} は、同時期の患者血清中の IgG が 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 存在していても中和されなかった。しかし、1 μM の NBD-556 で血清 IgG 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 存在下で約 50%、2 μM では 70% 以上、4 μM では 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の血清 IgG で 50% 以上の抑制が見られた (松下)。HLA-A24/Nef138-10(wt)、HLA-A24/Nef138-10(2F) に対する C1-28TCR の

乖離定数は、それぞれ $1.26 \pm 0.03 \mu\text{M}$ 、 $0.941 \pm 0.07 \mu\text{M}$ であった。一方、S19-2TCR の乖離定数は、それぞれ $0.782 \pm 0.02 \mu\text{M}$ 、 $26.1 \pm 4.1 \mu\text{M}$ であった (岩本)。

D. 考察

アジア人におけるリポアトロフィーあるいはリポディストロフィーの発症頻度は、報告されているイタリアの LipoCoNa コホートと同程度であり、人種を越えて同様に認められた。Fas -670 の遺伝子多型は、A アリルの頻度および AA のホモ接合者の数が発症者で有意に多く、Fas 遺伝子の多型がリポアトロフィーあるいはリポディストロフィー発症に関わることが示唆された (塩田)。アフリカにおける HIV 母子感染小児における ART 開始前の HIV-1 薬剤耐性検査の重要性が明らかとなった。従来エイズ発症遅延に関与することが知られていない HLA A74 と B72 が病態進行に関連する可能性が示唆された (市村)。NBD-556 が血中抗体の中和感受性を増強する可能性が示された。このようなエンベロープに立体構造変化を誘導する化合物が、既存の血中抗体の中和感受性を増強するのみならず、治療用の抗 HIV 抗体の作用を増強する可能性がある (松下)。今回精製した抗原 pMHC と TCR の反応性により、CTL クローン C1-28 と S19-2 の細胞傷害性試験の成績を忠実に再現できた。今後は結晶構造解析を行い、C1-28TCR、S19-2TCR の抗原認識の相違を明らかにしたい (岩本)。

E. 結論

細胞死を起こす遺伝子 Fas の多型がリポアトロフィーあるいはリポディストロフィー発症に関わることが示唆された (塩田)。途上国においても薬剤耐性検査の重要性が示された (市村)。NBD-556 存在下で血清 IgG により同時期のウイルスを中和できることから、免疫増強作用を持つ低分子化合物として期待が持てる。今後、

毒性が低くより効果の強い誘導体の開発を目指していく (松下)。試験管内で精製した抗原と TCR により CTL の抗原認識を再現できたことから、構造解析により HIV のエスケープ機構の解析する基盤ができた (岩本)。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kono K, Bozek K, Domingues FS, Shioda T, Nakayama EE. Impact of a single amino acid in the variable region 2 of the old world monkey TRIM5a SPRY (B30.2) domain on anti-human immunodeficiency virus type 2 activity. *Virology* 388(1):160-8, 2009
- 2) Kuroishi A, Saito A, Shingai Y, Shioda T, Nomaguchi M, Adachi A, Akari H, Nakayama EE. Modification of a loop sequence between alpha-helices 6 and 7 of virus capsid (CA) protein in a human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) derivative that has simian immunodeficiency virus (SIVmac239) vif and CA alpha-helices 4 and 5 loop improves replication in cynomolgus monkey cells. *Retrovirology* 6:70, 2009.
- 3) Nakajima T, Nakayama EE, Kaur G, Terunuma H, Mimaya JI, Ohtani H, Mehra N, Shioda T, Kimura A. Impact of novel TRIM5alpha variants, Gly110Arg and G176del, on the anti-HIV-1 activity and the susceptibility to HIV-1 infection. *AIDS* 3(16):2091-100, 2009.
- 4) Likansakul S, Rattanatham T, Feangvad S, Uttayamakul S, Prasithsirikul W, Tunthanathip P, Nakayama EE, Shioda T.

- HLA-Cw*04 allele associated with nevirapine-induced rash in HIV-infected Thai patients. *AIDS Research and Therapy* 6(1):22, 2009.
- 5) Onyango CO, Leligdowicz A, Yokoyama M, Sato H, Song H, Nakayama EE, Shioda T, Silva T, Townend J, Jaye A, Whittle H, Rowland-Jones S, Cotton M. HIV-2 Capsids Distinguish High and Low Virus Load Patients in a West African Community Cohort. *Vaccine* 2009. in press.
 - 6) Nakayama EE, Shioda T. Anti-retroviral activity of TRIM5 (alpha). *Reviews in Medical Virology*. 2009. in press.
 - 7) Maegawa H, Miyamoto T, Sakuragi J, Shioda T, Nakayama EE. Contribution of RING domain to retrovirus restriction by TRIM5 α depends on combination of host and Virus. *Virology* 2010. in press.
 - 8) Tanimoto T, Ichimura H, et al. : Multiple routes of hepatitis C virus transmission among injection drug users in Hai Phong, Northern Vietnam. *J Med Virol* (in press).
 - 9) Phan TTC, Ichimura H, et al. : Characterization of HIV-1 Genotypes and Drug Resistance Mutations among Drug-Naïve HIV-1-Infected Patients in Northern Vietnam. *AIDS Res Hum Retroviruses*. in press.
 - 10) Agdamag DM, Ichimura H, et al. : Prediction of Response to Pegylated Interferon Treatment of Chronic Hepatitis B in the Philippines. *J Med Virol* 82(2): 213-219, 2010.
 - 11) Lhihana RW, Ichimura H, et al. : HIV-1 subtype diversity and drug resistance among HIV-1-infected Kenyan patients initiating antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 25(12):1211-1217, 2009.
 - 12) Kageyama S, Ichimura H, et al. : Tracking the entry routes of hepatitis C virus as a surrogate of HIV in an HIV-low prevalence country, the Philippines. *J Med Virol* 81(7):1157-62, 2009.
 - 13) Mwangi J, Ichimura H, et al. : Molecular Genetic Diversity of Hepatitis B Virus in Kenya. *Intervirology* 51(6):417-421, 2009.
 - 14) Hosaka N, Ichimura H, et al. : Rapid Detection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 group M by a Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay. *J Virol Methods* 157(2):195-199, 2009.
 - 15) Miyashita M, Ichimura H, et al. : High-risk HPV types for uterine abnormal cervixes of female commercial sex workers in the Philippines. *J Med Virol* 81(3):545-551, 2009.
 - 16) Ishizaki A, Ichimura H, et al. : Profile of HIV-1 infection and genotypic resistance mutations to antiretroviral drugs in treatment-naïve HIV-1-infected individuals in Hai Phong, Viet Nam. *AIDS Res Hum Retroviruses* 25(2):175-182, 2009.
 - 17) Lwembe R, Ichimura H, et al. : Changes in the HIV-1 envelope gene from non-subtype B HIV-1-infected children in Kenya. *AIDS Res Hum Retroviruses* 25(2):141-147, 2009.
 - 18) 市村宏: ヒト免疫不全ウイルス. *臨床と微生物* 37(2), 2010 (発行予定).
 - 19) Yamada, Y., Ochiai, C., Yoshimura, K., Tanaka, T., Ohashi, N., Narumi T.,

- Nomura, W., Harada, S., Matsushita, S., Tamamura, H. CD4 mimics targeting the mechanism of HIV entry. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 20: 354-358, 2010.
- 20) Makiko Hatada, Kazuhisa Yoshimura, Shigeyoshi Harada, Yoko Kawanami, Junji Shibata and Shuzo Matsushita : HIV-1 evasion of a neutralizing anti-V3 antibody involves acquisition of a potential glycosylation site in V2. *J. Gen. Virol.* 2010. in press.
- 21) Zong, L., Chen, Y., Peng, H., Gao, F., Iwamoto, A., and Gao, GF. Rhesus macaque: a tight homodimeric CD8alpha/alpha. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics* 75: 241-244, 2009.
- 22) Kondo, N., Ebihara, A., Ru, H., Kuramitsu, S., Iwamoto, A., Rao, Z., and Matsuda, Z. Thermus thermophilus-derived protein tags that aid in preparation of insoluble viral proteins. *Anal Biochem*, 385: 278-285, 2009.
- 23) Mizukoshi, F., Yamamoto, T., Mitsuki, Y., Terahara, K., Kawana-Tachikawa, A., Kobayashi, K., Iwamoto, A., Morikawa, Y. Tsunetsugu-Yokota, Y. Activation of HIV-1 Gag-specific CD8+ T cells by yeast-derived VLP-pulsed dendritic cells is influenced by the level of mannose on the VLP antigen. *Microbes and Infection* 11: 191-197, 2009.
- 24) Miyazaki, E., Kawana-Tachikawa, A., Tomizawa, M., Nunoya, J., Odawara, T., Fujii, T., Shi, Y., Gao, G.F., and Iwamoto, A. Highly restricted TCR repertoire in the CD8-positive T cell response against an HIV-1 epitope with a stereotypic amino acid substitution. *AIDS* 23:651-660, 2009.
- 25) Nunoya, J., Nakashima, T., Kawana-Tachikawa, A., Kiyotani, K., Ito, Y., Sugimura, K., and Iwamoto, A. Generation of recombinant monoclonal antibodies against an immunodominant HLA-A*2402-restricted HIV-1 CTL epitope. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 25:897-904, 2009.
- 26) Wang, J., Kondo, N., Long, Y., Iwamoto, A., and Matsuda, Z. Monitoring of HIV-1 envelope-mediated membrane fusion using modified split green fluorescent proteins. *J. Virol. Methods*. 161:216-222, 2009.
- 27) Koga, M., Kawana-Tachikawa, A., Heckerman, D., Odawara, T., Nakamura, H., Koibuchi, T., Fujii, T., Miura, T., and Iwamoto, A. Transition of impact of HLA class I allele expression on HIV-1 plasma virus loads at a population level over time. *Microbiol. Immunol.* 2010. in press
- 28) Zhu, D., Kawana-Tachikawa, A., Iwamoto, A., and 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. in press.
- 29) Kondo, N., Miyauchi, K. Meng, F. Iwamoto, A. and Matsuda, Z. Conformational changes of the HIV-1 envelope protein during membrane fusion were inhibited by the replacement of its membrane-spanning domain. *J. Biol.*

- Chem., 2010. in press
2. 学会発表
- 1) Tatsuo Shioda A single amino acid of the human immunodeficiency virus type 2 capsid affects its replication in the presence of TRIM5 α . The 21st Retroviral Pathogenesis Workshop 2009年9月14日 Il Ciocco Hotel and Resort (イタリア)
 - 2) 中山英美、前川彦一郎、宮本 直、塩田達雄 HIV 感染抑制因子 TRIM5 α の感染抑制機構の解析 第57回日本ウイルス学会学術集会 2009年10月25日 都市センターホテル (東京都)
 - 3) 河野 健、塩田達雄、中山英美 旧世界ザル抗HIV因子 TRIM5 α の種決定領域の解析 第57回日本ウイルス学会学術集会 2009年10月26日 都市センターホテル (東京都)
 - 4) 黒石 歩、齊藤 暁、塩田達雄、野間口雅子、足立昭夫、明里宏文、中山英美 サル指向性 HIV-1 のサル細胞でのウイルス増殖におけるカプシド α -ヘリックス6-7間のループの重要性 第57回日本ウイルス学会学術集会 2009年10月26日 都市センターホテル (東京都)
 - 5) 宮本 直、塩田達雄、中山英美 HIV-2 カプシドの1アミノ酸変異がもたらすウイルス増殖への影響 第57回日本ウイルス学会学術集会 2009年10月26日 都市センターホテル (東京都)
 - 6) 櫻木淳一、大石真久、中野隆史、櫻木小百合、佐野浩一、塩田達雄 HIV-1 ゲノム二量体化と粒子成熟ステップの相関 第57回日本ウイルス学会学術集会 2009年10月27日 都市センターホテル(東京都)
 - 7) 櫻木淳一、大石真久、中野隆史、櫻木小百合、佐野浩一、塩田達雄 HIV-1 ゲノム二量体化と粒子成熟ステップの相関 第23回日本エイズ学会学術集会・総会 2009年11月26日 名古屋国際会議場(愛知県)
 - 8) 黒石 歩、齊藤 暁、新開泰宏、塩田達雄、野間口雅子、足立昭夫、明里宏文、中山英美 サル指向性 HIV-1 のサル細胞でのウイルス増殖におけるカプシド α -ヘリックス6-7間のループの重要性 第23回日本エイズ学会学術集会・総会 2009年11月26日 名古屋国際会議場 (愛知県)
 - 9) 中山英美、前川彦一郎、宮本 直、塩田達雄 HIV 感染抑制因子 TRIM5 α の感染抑制機構の解析 第23回日本エイズ学会学術集会・総会 2009年11月28日 名古屋国際会議場 (愛知県)
 - 10) 宮本 直、塩田達雄、中山英美 HIV-2 カプシドの1アミノ酸変異がもたらすウイルス増殖への影響 第23回日本エイズ学会学術集会・総会 2009年11月28日 名古屋国際会議場 (愛知県)
 - 11) HIV-1 subtype diversity and drug resistance among HIV-1-infected Kenyan patients initiating antiretroviral therapy. Lihana R, 市村宏、他. 第23回日本エイズ学会学術集会. 2009. 11, 名古屋.
 - 12) Genotypic resistance mutations to antiretrovirals among treatment-naïve HIV-1-infected individuals in Northern Vietman. Pham TTC, 市村 宏、他. 第23回日本エイズ学会学術集会. 2009. 11, 名古屋.
 - 13) Non-B Subtype HIV-1 Drug Resistance-associated Mutations among Vertically-infected Kenyan Children on ART. Ichimura H. et al., 5th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention 19-22 July 2009, Cape Town, South Africa.

- 14) 松下修三: HIV-1 に対する中和単クローン抗体の治療応用に向けた基礎研究. 第9回日本蛋白質化学学会 2009. 5. 20-22. 熊本.
- 15) 畑田万紀子、吉村和久、原田恵嘉、松下修三: 抗 HIV-1V3 抗体からの逃避過程で挿入される V2 領域の糖鎖が保存されるメカニズム-HIV-1 の進化における耐性度と増殖能のバランスに関する考察- 第 57 回日本ウイルス学会学術集会. 2009. 10. 25-27 東京.
- 16) 松下修三: エンベロープの進化と中和抗体. シンポジウム HIV 細胞侵入とその防御機構. 第 23 回に本エイズ学会学術集会・総会. 2009. 11. 26-28 名古屋.
- 17) 吉村和久: ケモカインレセプター阻害剤の臨床的研究-臨床分離株を用いたマラビロック耐性誘導-. 第 23 回に本エイズ学会学術集会・総会. 2009. 11. 26-28 名古屋.
- 18) 原田 恵嘉, 吉村和久, 松下修三: 最近分離した 7 種の臨床 HIV-1 株を用いた *in vitro* ラルテグラビル耐性ウイルス誘導. 第 23 回に本エイズ学会学術集会・総会. 2009. 11. 26-28 名古屋.
- 19) 石川哲也, 畑田万紀子, 原田 恵嘉, 吉村和久, 松下修三: 実験室 HIV-1 R5 株を用いた *in vitro* CCR5 阻害薬 (maraviroc) 耐性ウイルス誘導の試み第 23 回に本エイズ学会学術集会・総会. 2009. 11. 26-28 名古屋.
- 20) Matsushita S, Narahara C, Morizono M, Nishida Y, Honda -Shibata A, Harada S., Yoshimura, K.: Polyclonal antibody response against gp120 including antibodies to V3, CD4bs and CD4i epitopes account or broad neutralization. 5th Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. 2009. 7. 19-22, Cape Town, South Africa.
- 21) Harada S, Yoshimura K., and Matsushita S.: Generation of an integrase inhibitor raltegravir resistant variants using recent primary isolates, X4, R5 and dual/mix HIV-1. 10th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium. 2009. 9. 28-29, Kumamoto
- 22) Yoshimura K., Harada S, Hatada M. and Matsushita S.: In vitro induction of HIV-1 resistant to a CCR5 antagonist maraviroc. 10th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium. 2009. 9. 28-29, Kumamoto
- 23) Ishikawa T., Yoshimura K., Hatada M. Harada S, and Matsushita S.: Mutations in gp120 of R5 HIV-1 laboratory isolate induced by the *in vitro* selection of maraviroc confer highly sensitive to anti-V3 monoclonal antibody. 10th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium. 2009. 9. 28-29, Kumamoto
- 24) Hatada M. Yoshimura K., Harada S, and Matsushita S.: Mechanism of maintaining a glycan-insertion in HIV-1 gp120 V2 region under pressure of a potent neutralizing antibody *in vitro*. 10th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium. 2009. 9. 28-29, Kumamoto.
- 25) Matsushita S. Narahara C, Nishida Y, Honda A., Harada S., Yoshimura K.: Mechanism of maintaining a glycan-insertion in HIV-1 gp120 V2 region under pressure of a potent neutralizing antibody *in vitro*. 10th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium.

2009. 9. 28-29, Kumamoto.
- 26) Yoshimura K, Matsushita S: In vitro induction of HIV-1 resistant to a CCR5. Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium- Satellite Symposium. 2009. 9. 30, Aso, Kumamoto.
- 27) Matsushita S: Accumulation of multiple functional mutations in HIV-1 gp120 is involved in the development of neutralization escape under pressure of neutralizing antibody in vitro. Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium- Satellite Symposium, 2009. 9. 30, Aso, Kumamoto.
- 28) Narahara C, Hatada M, Harada S., Yoshimura, K., Matsushita S, : A primary R5 isolate undergoes different escape pathway during in vitro selection with low or high concentration of an anti-V3 monoclonal antibody. AIDS Vaccine 2009, 2009. 10. 19-22, Paris.
- 29) Koga, M., Kawana-Tachikawa, A., Heckerman, D., Odawara, T., Nakamura, H., Koibuchi, T., T., Fujii, T., Miura, T., and Iwamoto, A. The impacts of HLA class I alleles on HIV-1 plasma viral loads in a unique 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. July 19-22, 2009. Cape Town, South Africa.
- 39) Kawana-Tachikawa, A., Nakayama, K., Odawara, T., Fujii, T., and Iwamoto, A. Importance of Gag-specific cellular immunity to control HIV in Japanese population. 5th IAS Conference on HIV

Pathogenesis, Treatment and Prevention. July 19-22, 2009. Cape Town, South Africa.

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

HIV 感染症の病態進行を左右する宿主因子の探索

研究分担者 塩田 達雄 (大阪大学微生物病研究所教授)

研究要旨

タイにおいて3剤の抗レトロウイルス剤の併用療法を開始したHIV-1感染者800名について、抗レトロウイルス剤の副作用であるリポアτροφイーあるいはリポディストロフィーの発症頻度を調査した。治療開始後平均4.8年の観察期間中、270名がリポアτροφイーあるいはリポディストロフィーを発症し、100 person-yearあたりの発症頻度は6.86回であった。女性であることの相対危険度は1.66、初回治療時にD4Tを含む処方を受けた感染者の相対危険度は1.73であり、リポアτροφイーあるいはリポディストロフィーが女性やD4T服用者に多いことがタイにおいても改めて確認された。270名の発症者と性別、初回治療時の処方ならびに観察期間を一致させた270名の未発症者のFas -670の遺伝子多型を検討したところ、Aアリの頻度(P=0.0168)およびAAのホモ接合者の数(P=0.0119)は発症者で有意に多く、Fas遺伝子の多型がリポアτροφイーあるいはリポディストロフィー発症に関わることが示唆された。

A. 研究目的

エイズの病態ならびに進行速度は感染者ごとに大きく異なり、感染後急激にCD4陽性細胞数の減少をみる感染者から10年以上発症しない感染者まで様々である。また、HIV-1感染感受性自体にも個人差が存在する。本研究は、多数のHIV-1感染者および非感染者について、HIV-1の生活環に関わる様々な宿主因子の遺伝的多型を検討し、病態進行やHIV-1感染感受性の違いを決定する宿主側の因子を明らかにすることを目的とする。また抗HIV薬の有効性や副作用の個人差を決定する宿主因子の同定も重要な課題である。本年度は、本研究分担者らがタイにおいて独自に設立した治療を開始したHIV-1感染者のコホートにおいて、抗レトロウイルス剤の副作用

の一つであるリポアτροφイーあるいはリポディストロフィー発症に関わる因子を明らかにすることを具体的な研究目的とした。

B. 研究方法

タイにおいて3剤の抗レトロウイルス剤併用療法を開始したHIV-1感染者800名をretrospectiveに追跡し、リポアτροφイーあるいはリポディストロフィー発症の有無を調査した。Fas -670の遺伝子多型は、制限酵素切断断片の電気泳動パターンの多型を解析することにより、決定した。

(倫理面への配慮)

HIV-1感染者ならびに非感染者の検体を使用するにあたって、検体の提供者には遺伝子解析を行うことを含めて十分に説明を行い、書面による同

意を得られた場合のみを解析の対象とし、検体は匿名化して個人情報特定できないようにして扱った。HIV-1感染者の遺伝子解析は平成13年に大阪大学研究倫理審査委員会の承認を得た。

C. 研究結果

タイにおいて非核酸系逆転写酵素阻害剤 nevirapine あるいは efavirenz を中心とした3剤の抗レトロウイルス剤併用療法を開始した HIV-1 感染者 800 名を retrospective に追跡し、リポアトロフィーあるいはリポディストロフィー発症の有無を調査した。治療開始後平均 4.8 年の観察期間中、270 名がリポアトロフィーあるいはリポディストロフィーを発症し、発症者は発症まで治療開始後平均 3.0 年を要していた。また 100 person-year あたりの発症頻度は 6.86 回であった。

リポアトロフィーあるいはリポディストロフィー発症を end point とした種々の因子の影響を Kaplan-Meyer 法で検討したところ、女性は男性に比してリポアトロフィーあるいはリポディストロフィーを発症しやすく ($P < 0.0001$)、また初回治療時に核酸系逆転写酵素阻害剤 D4T を含む処方を受けた感染者は、D4T を含まない処方を受けた感染者と比して発症しやすい ($P = 0.0012$) ことが明らかになった。一方、感染者の年齢、治療開始時の CD4 陽性 T 細胞数、ならびにステロイド剤使用歴の有無は、リポアトロフィーあるいはリポディストロフィー発症には影響しなかった。欧米でも女性や D4T の使用はリポアトロフィーあるいはリポディストロフィー発症頻度を増やすことが報告されており、タイにおいても同様であることが確認された。Cox のハザードモデルにより計算される相対危険度 (Hazard ratio) は、女性においては 1.66、初回治療時に

D4T を含む処方を受けた感染者においては 1.73 であり、それぞれで補正しても相対危険度は変化せず、性別と D4T は全く独立にリポアトロフィーあるいはリポディストロフィー発症に影響することが確認された。

270 名の発症者と性別、初回治療時の処方ならびに観察期間を一致させた 270 名の未発症者の Fas -670 の遺伝子多型を検討したところ、A アリルの頻度は、発症者においては 0.48、未発症者においては 0.40 であり、危険率 0.0168 を持って発症者で多かった。また、AA のホモ接合者の数は発症者では 70 名、未発症者では 46 名であり危険率 0.0119 を持って発症者で多かった。従って Fas 遺伝子の多型がリポアトロフィーあるいはリポディストロフィー発症に関わることが示唆された。

D. 考察

タイにおいて3剤の抗レトロウイルス剤の併用療法を開始した HIV-1 感染者 800 名について、抗レトロウイルス剤の副作用であるリポアトロフィーあるいはリポディストロフィーの発症頻度を調査したところ、観察期間中に 270 名がリポアトロフィーあるいはリポディストロフィーを発症し、100 person-year あたりの発症頻度は 6.86 回であった。この頻度はイタリアの LipoCoNa コホートにおける発症頻度 7.1 と同程度であり、抗レトロウイルス剤は人種を越えて同様にリポアトロフィーあるいはリポディストロフィーを引き起こすことが示唆された。

270 名の発症者と 270 名の未発症者の Fas -670 の遺伝子多型を検討したところ、A アリルの頻度および AA のホモ接合者の数は発症者で有意に多く、Fas 遺伝子の多型がリポアトロフィーあるいはリポディストロフィー発症に関わることが示唆さ

れた。Fasはアポトーシスを引き起こす遺伝子であり、もし、Fas -670の多型が細胞のアポトーシス感受性に直接影響するのなら、その効果は脂質代謝に関わる細胞種においてより顕著に認められるのかもしれない。

E. 結論

タイにおいて3剤の抗レトロウイルス剤の併用療法を開始したHIV-1感染者800名について、抗レトロウイルス剤の副作用であるリポアτροφイーあるいはリポディストロフィーの発症頻度を調査したところ、観察期間中に270名がリポアτροφイーあるいはリポディストロフィーを発症した。270名の発症者と270名の未発症者のFas -670の遺伝子多型を検討したところ、Aアレルの頻度およびAAのホモ接合者の数ともに発症者群で有意に多く、Fas遺伝子の多型がリポアτροφイーあるいはリポディストロフィー発症に関わることが示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kono K, Bozek K, Domingues FS, Shioda T, Nakayama EE. Impact of a single amino acid in the variable region 2 of the old world monkey TRIM5a SPRY (B30.2) domain on anti-human immunodeficiency virus type 2 activity. *Virology*.2009; 388(1):160-8.

Kuroishi A, Saito A, Shingai Y, Shioda T, Nomaguchi M, Adachi A, Akari H, Nakayama

EE. Modification of a loop sequence between alpha-helices 6 and 7 of virus capsid (CA) protein in a human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) derivative that has simian immunodeficiency virus (SIVmac239) vif and CA alpha-helices 4 and 5 loop improves replication in cynomolgus monkey cells. *Retrovirology*. 2009; 6:70.

Nakajima T, Nakayama EE, Kaur G, Terunuma H, Mimaya JI, Ohtani H, Mehra N, Shioda T, Kimura A. Impact of novel TRIM5alpha variants, Gly110Arg and G176del, on the anti-HIV-1 activity and the susceptibility to HIV-1 infection. *AIDS*. 2009; 23(16);2091-100

Likanonsakul S, Rattanatham T, Feangvad S, Uttayamakul S, Prasithsirikul W, Tunthanathip P, Nakayama EE, Shioda T. HLA-Cw*04 allele associated with nevirapine-induced rash in HIV-infected Thai patients. *AIDS Research and Therapy*. 2009;6(1);22

Onyango CO, Leligdowicz A, Yokoyama M, Sato H, Song H, Nakayama EE, Shioda T, Silva T, Townend J, Jaye A, Whittle H, Rowland-Jones S, Cotton M. HIV-2 Capsids Distinguish High and Low Virus Load Patients in a West African Community Cohort. *Vaccine*. 2009. in press

Nakayama EE, Shioda T. Anti-retroviral activity of TRIM5 (alpha). Reviews in Medical Virology. 2009. in press

Maegawa H, Miyamoto T, Sakuragi J, Shioda T, Nakayama EE. Contribution of RING domain to retrovirus restriction by TRIM5 α depends on combination of host and Virus. Virology 2010. in press

2. 学会発表

Tatsuo Shioda A single amino acid of the human immunodeficiency virus type 2 capsid affects its replication in the presence of TRIM5 α . The 21st Retroviral Pathogenesis Workshop 2009 年9月14日 Il Ciocco Hotel and Resort (イタリア)

中山英美、前川彦一郎、宮本直、塩田達雄 HIV感染抑制因子TRIM5 α の感染抑制機構の解析 第57回日本ウイルス学会学術集会 2009年10月25日 都市センターホテル(東京都)

河野健、塩田達雄、中山英美 旧世界ザル抗HIV因子TRIM5 α の種決定領域の解析 第57回日本ウイルス学会学術集会 2009年10月26日 都市センターホテル(東京都)

黒石歩、齊藤暁、塩田達雄、野間口雅子、足立昭夫、明里宏文、中山英美 サル指向性HIV-1のサル細胞でのウイルス増殖におけ

るカプシド α -ヘリックス6-7間のループの重要性 第57回日本ウイルス学会学術集会 2009年10月26日 都市センターホテル(東京都)

宮本直、塩田達雄、中山英美 HIV-2カプシドの1アミノ酸変異がもたらすウイルス増殖への影響 第57回日本ウイルス学会学術集会 2009年10月26日 都市センターホテル(東京都)

櫻木淳一、大石真久、中野隆史、櫻木小百合、佐野浩一、塩田達雄 HIV-1ゲノム二量体化と粒子成熟ステップの相関 第57回日本ウイルス学会学術集会 2009年10月27日 都市センターホテル(東京都)

櫻木淳一、大石真久、中野隆史、櫻木小百合、佐野浩一、塩田達雄 HIV-1ゲノム二量体化と粒子成熟ステップの相関 第23回日本エイズ学会学術集会・総会 2009年11月26日 名古屋国際会議場(愛知県)

黒石歩、齊藤暁、新開泰宏、塩田達雄、野間口雅子、足立昭夫、明里宏文、中山英美 サル指向性HIV-1のサル細胞でのウイルス増殖におけるカプシド α -ヘリックス6-7間のループの重要性 第23回日本エイズ学会学術集会・総会 2009年11月26日 名古屋国際会議場(愛知県)

中山英美、前川彦一郎、宮本直、塩田達雄

HIV 感染抑制因子 TRIM5 α の感染抑制機構の
解析 第 23 回日本エイズ学会学術集会・総
会 2009 年 11 月 28 日 名古屋国際
会議場 (愛知県)

宮本 直、塩田達雄、中山英美 HIV-2 カプシ
ドの 1 アミノ酸変異がもたらすウイルス増
殖への影響 第 23 回日本エイズ学会学術
集会・総会 2009 年 11 月 28 日 名
古屋国際会議場 (愛知県)

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

中和抗体によるエイズ発症阻止の研究

研究分担者 松下修三 熊本大学エイズ学研究センター 教授

研究要旨：

平成 21 年度も、HIV-1 エンベロープの 3 量体構造を変化させ、中和抗体の感受性を増強させる低分子化合物 (NBD-556) に関する研究を引き続き行った。前年度までの研究により、この低分子化合物が CD4 cavity に結合し gp120 の立体構造変化を起こしていることが強く示唆されたため、実際にどのような抗体の中和感受性を増強するのかを検討した。その結果、治療用抗 HIV-1 中和抗体 KD-247 のみならず、我々の研究室で樹立した CD4i 抗体の中和活性も NBD-556 の添加により著しく増強することがわかった。また、感染者から分離したウイルスに対する同時期の血清 IgG による中和は、一般的にはほとんど認められないが、NBD-556 存在下では中和できるようになることが確認できた。このことは、既に存在している血清中の抗体の中和能を NBD のような低分子化合物により単独でも増強できる可能性を示唆している。今後も、より低濃度で、強力に中和抗体の感受性を増強し、細胞毒性も低い低分子化合物の検索を引き続き行う予定である。

A. 研究目的

昨年度までの研究成果として、我々は、低分子化合物 NBD-556 が gp120 の立体構造を大きく変化させ、中和抗体の反応性を増強することを証明し、この化合物とその誘導体が非常に有望な HIV のエンベロープ構造変化誘導物質であることを示した。また、NBD-556 が gp120 のどの部位と結合しているかを *in vitro* 耐性誘導により調べた結果、sCD4 の結合部位と非常に近いこともわかった。そこで、本年度は実際にどのような抗体の中和感受性を増強するのかを各種の中和抗体と感染症例の血清から精製した IgG を用いて検討した。

B. 研究方法

東京医科歯科大学生体材料工学研究所機能分子部門分子認識分野の玉村啓和教授との共同研究で HIV-1 のエンベロープに立体構造変化を起こさせる低分子化合物およびその誘導体の合成を行い、抗ウイルス効果と抗体の反応性の変化を MTT assay と FACS で解析した。また、広範囲ウイルス中和抗体 KD-247(抗 V3 抗体)や当研究室で樹立した 4E9C (CD4i 抗体)を用いて、この抗体の中和感受性の増強効果を確認した。また、感染症例(Pt.3)からウイルスと血清 IgG を分離精製し、中和実験に用いた。

(倫理面での配慮)

研究の倫理的妥当性は熊本大学医学部先進医療審査会、倫理委員会にて承認されている。

C. 研究結果

昨年度までに、FACS解析でNBD-556がsCD4と同様にCD4i抗体の結合を増強することを確認し報告した。また、このHIV-1のエンベロープに立体構造変化を起こさせる低分子化合物NBD-556が、gp120のどの部位と結合しているかを知るために、我々が新規に樹立した*in vitro*耐性誘導システムを用いて、この化合物に耐性のウイルスをとり、sCD4の耐性ウイルスとシークエンスを比較検討した。その結果、それぞれの耐性誘導で得られた変異部位を比較すると、NBD-556は50 μ M存在下でEnvのC3領域(S375N)とC4領域(A433T)に変異がみられた。一方、sCD4による耐性誘導では、経過中gp120に7つの変異が確認でき(F211G、P212L、V255E、N280K、S375N、G380R、G431E)、最終的に20 μ M存在下でV255E、G380R、G431Eの3つが残った。それぞれの変異部位をgp120の3次元結晶解析図上にプロットすると、NBD-556とsCD4の変異部位がそれぞれの結合部位を取り巻くように位置していることがわかった(図-1)。次に、NBD-556により誘導された変異が、CD4が結合する前の状態ではgp120のどこに相当するのかを見るために、SIVのgp120のコア部分の結晶解析のデータに基づいてプロットし比較した(図-2)。その結果、NBD-556に対する耐性変異は、CD4結合サイトに集中していることが確認できた。このことは、この化合物がCD4結合サイト近辺に特異的に結合し、ウイルスの侵入を阻害し、かつ、立体構造変化を起こしていることを意味している。

一般的に、HIV感染症例においては、血中のウイ

ルスに対する同時期の抗体には、ほとんど中和活性が見られないことが知られている。実際、今回使用した臨床分離ウイルスのHIV-1_{pt.3}も同時期の血清IgGが200 μ g/ml存在していても中和されなかった。しかし、NBD-556が1 μ Mでも存在すると、血清IgG 200 μ g/mlで50%近いウイルス感染の抑制が見られ、2 μ Mでは70%以上の抑制が認められた。NBD-556が4 μ M存在すれば、血清IgGが20 μ g/mlでも50%以上の抑制が見られるようになった(図-3)。このことは、ウイルスと同時期に存在する血中の抗体は、中和エピトープが変異しているために中和できなくなっているのではなく、エンベロープの三量体構造の中にエピトープが隠されているためであることを示している。次に、同じウイルスを使って、広範囲ウイルス中和単クローン抗体KD-247(抗V3抗体)や当研究室で樹立した4E9C(CD4i抗体)を用いて、抗体の中和感受性のNBD-556による増強効果を調べた。その結果、NBD-556非存在下では、100 μ g/mlまで濃度を上げてても全く中和しなかった両抗体が、NBD-556を5 μ M加えただけで、IC₅₀がそれぞれKD-247は10 μ g/ml、4E9Cは20 μ g/mlと中和するようになった。このように、CD4i抗体や抗V3抗体が血中に存在している場合、NBD-556のようなエンベロープの立体構造変化を誘発するような化合物を加えるだけで、それまで中和抵抗性であったウイルスを感受性に変えることが可能となることが示された。

D. 考察

抗V3中和抗体やCD4i抗体等の抗ウイルス効果を増強するような立体構造変化を引き起こす機能を持つ分子量350前後の低分子化合物NBD-556は、CD4の結合部位に近い場所に結合しており、そのためCD4結合時と非常に類似した構造変化をgp120に誘導することが確認できた。また、感染症例から分離したウイルスと血清IgGの中和実験から、実際の感染症例でもNBD-556が血中抗体の中和感受性を増強する可能性が期待できることが示唆された。このことは、このようなエンベロープに立体構造変化を誘導する化合物が侵入阻害剤だけでなく、既存の血中抗体の中和感受性を増強するのみならず、治療用の抗HIV抗体の増強をも可能性とすることを意味している。現在20以上のNBD誘導体を今回の結果をもとに合成している。今後、これらの中からより低濃度で、強力に中和抗体の感受性を増強し、細胞毒性も低いものを追求していく努力を続けていく。

E. 結論

NBD-556存在下では血清IgGで同時期のウイルスを中和できるようになり、免疫増強作用を持つ低分子化合物として、新しい働きの抗HIV治療の道を開くものとして、今後期待が持てると言える。今後、毒性が低くより効果の強い誘導体の開発を目指していく。

F. 健康危険情報:なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamada, Y., Ochiai, C., Yoshimura, K., Tanaka, T., Ohashi, N., Narumi T., Nomura, W., Harada, S., Matsushita, S., Tamamura, H. CD4 mimics targeting the mechanism of HIV entry. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 20: 354–358, 2010.
2. Makiko Hatada, Kazuhisa Yoshimura, Shigeyoshi Harada, Yoko Kawanami, Junji Shibata and Shuzo Matsushita : HIV-1 evasion of a neutralizing anti-V3 antibody involves acquisition of a potential glycosylation site in V2. *J. Gen. Virol.* 2010 (in press)

2. 学会発表

(国内学会)

1. 松下修三: HIV-1 に対する中和単クローン抗体の治療応用に向けた基礎研究. 第9回日本蛋白質化学学会 2009.5.20-22. 熊本.
2. 畑田万紀子, 吉村和久, 原田恵嘉, 松下修三: 抗 HIV-1V3 抗体からの逃避過程で挿入される V2 領域の糖鎖が保存されるメカニズム-HIV-1 の進化における耐性度と増殖能のバランスに関する考察- 第 57 回日本ウイルス学会学術集会. 2009.10.25-27 東京.
3. 松下修三: エンベロープの進化と中和抗体. シンポジウム HIV 細胞侵入とその防御機構. 第 23 回に本エイズ学会学術集会・総会. 2009.11.26-28 名古屋.
4. 吉村和久: ケモカインレセプター阻害剤の臨床的研究ー臨床分離株を用いたマラビロック耐性誘導ー. 第 23 回に本エイズ学会学術集会・総会. 2009.11.26-28 名古屋.
5. 原田 恵嘉, 吉村和久, 松下修三: 最近分離した 7 種の臨床 HIV-1 株を用いた in vitro ラルテグラビル耐性ウイルス誘導. 第 23 回に本エイズ学会学術集会・総会.

2009.11.26-28 名古屋.

6. 石川哲也, 畑田万紀子, 原田 恵嘉, 吉村和久, 松下修三: 実験室 HIV-1 R5 株を用いた in vitro CCR5 阻害薬 (maraviroc) 耐性ウイルス誘導の試み第 23 回に本エイズ学会学術集会・総会. 2009.11.26-28 名古屋.

(国際学会)

1. Matsushita S, Narahara C, Morizono M, Nishida Y, Honda -Shibata A, Harada S., Yoshimura, K.: Polyclonal antibody response against gp120 including antibodies to V3, CD4bs and CD4i epitopes account or broad neutralization. 5th Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. 2009.7.19-22, Cape Town, South Africa.
2. Harada S, Yoshimura K., and Matsushita S.: Generation of an integrase inhibitor raltegravir resistant variants using recent primary isolates, X4, R5 and dual/mix HIV-1. 10th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium. 2009.9.28-29, Kumamoto
3. Yoshimura K., Harada S, Hatada M. and Matsushita S.: In vitro induction of HIV-1 resistant to a CCR5 antagonist maraviroc. 10th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium. 2009.9.28-29, Kumamoto
4. Ishikawa T., Yoshimura K., Hatada M. Harada S, and Matsushita S.: Mutations in gp120 of R5 HIV-1 laboratory isolate induced by the in vitro selection of maraviroc confer highly sensitive to anti-V3 monoclonal antibody. 10th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium. 2009.9.28-29, Kumamoto
5. Hatada M. Yoshimura K., Harada S, and

Matsushita S.: Mechanism of maintaining a glycan-insertion in HIV-1 gp120 V2 region under pressure of a potent neutralizing antibody in vitro. 10th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium. 2009.9.28-29, Kumamoto.

6. Matsushita S. Narahara C, Nishida Y, Honda A., Harada S., Yoshimura K.: Mechanism of maintaining a glycan-insertion in HIV-1 gp120 V2 region under pressure of a potent neutralizing antibody in vitro. 10th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium. 2009.9.28-29, Kumamoto.
7. Yoshimura K, Matsushita S: In vitro induction of HIV-1 resistant to a CCR5. Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium- Satellite Symposium. 2009.9.30, Aso, Kumamoto.
8. Matsushita S: Accumulation of multiple functional mutations in HIV-1 gp120 is involved in the development of neutralization escape under pressure of neutralizing antibody in vitro. Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium- Satellite Symposium, 2009.9.30, Aso, Kumamoto.
9. Narahara C, Hatada M, Harada S., Yoshimura, K., Matsushita S, : A primary R5 isolate undergoes different escape pathway during in vitro selection with low or high concentration of an anti-V3 monoclonal antibody. AIDS Vaccine 2009, 2009.10.19-22, Paris.

H.知的財産権の出願・登録状況(予定を含む);なし

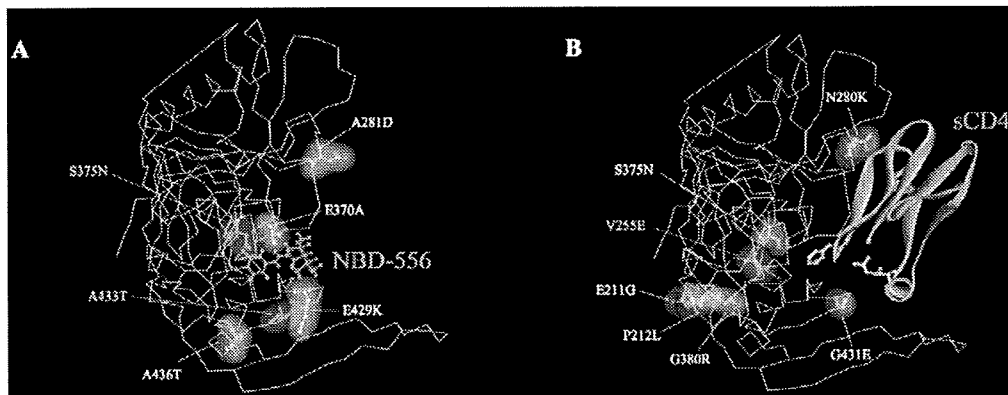


図-1 NBD-556(A)と sCD4(B)の耐性誘導の結果認められたアミノ酸変異部位。
赤字は、最終的に dominant となった変異部位。両者とも CD4 cavity 内側に沿って変異部位が並んでいることがわかる。

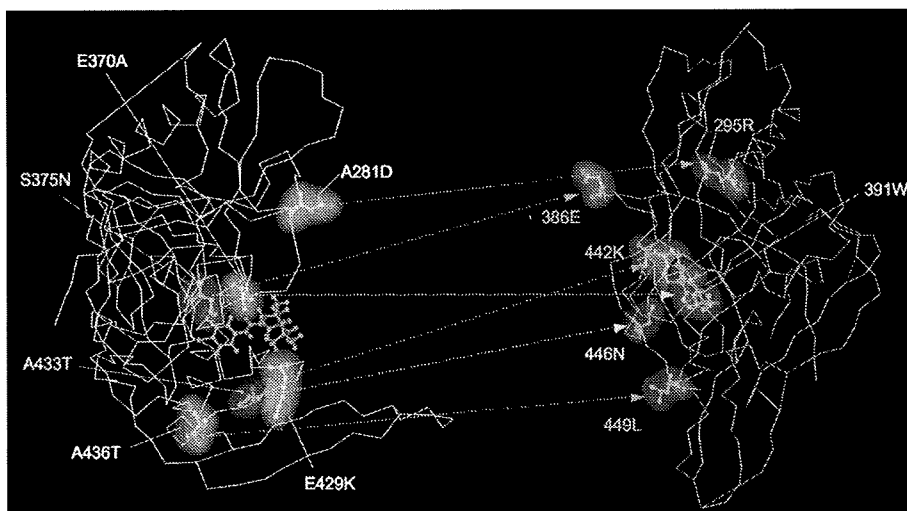


図-2 HIV-1 gp120 の NBD-556 耐性変異部位の、gp120-CD4 結合状態(左側)と非結合状態(右側、SIV の Core 構造を使用)時との比較。非結合状態の時は変異部位が CD4 結合部位のある側面に集中していることがわかる。

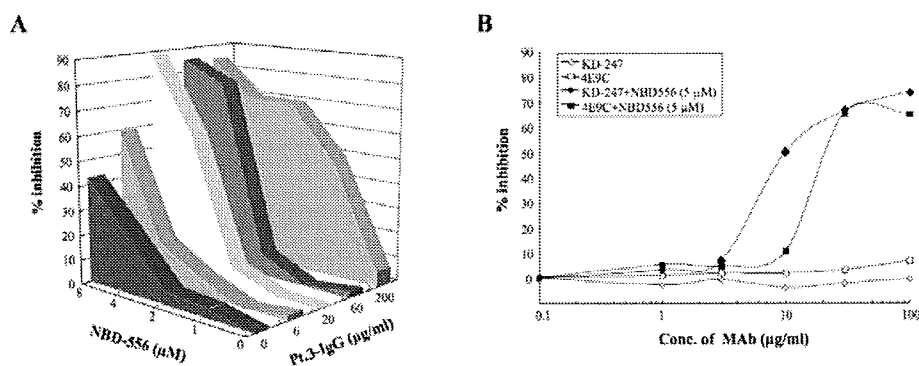


図-3 NBD-556 による中和活性増強効果。
(A) 感染症例(Pt.3)から精製した血清 IgG が、同時期に同じ症例から分離したウイルス(HIV-1Pt.3)に対し、NBD-556 を加えることで中和できるようになった。(B) KD-247(anti-V3 MAb)と 4E9C(CD4i MAb)は、NBD-556 を 5μM 加えることにより、臨床分離ウイルスを中和できるようになった。

厚生労働科学研究費補助金（創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業）
分担研究報告書

非 B 型 HIV-1 感染小児のエイズ発症に影響を及ぼす因子に関する研究
-ケニアの HIV 母子感染児における ART の有効率と薬剤耐性変異の出現-
-長期未発症者における-

研究分担者 市村 宏
研究協力者 R. リハナ

金沢大学大学院医学系研究科・教授
同上
・大学院生

研究要旨

分担研究者らは、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) が蔓延しているサハラ砂漠以南アフリカの国の一つ、ケニアにおいて HIV 感染児を追跡調査している。本研究では、これらの児を対象に、第一次選択抗レトロウイルス剤による治療 (ART) 開始 24 ヶ月時点での有効性を明らかにすること、そして治療失敗例における薬剤耐性変異の出現パターンを明らかにすることを目的とした。また、病態進行と HLA 型の関連も併せて検討した。追跡調査されている児 100 名中の 84 名が ART を受けており、68 名 (81%) は治療開始 24 ヶ月の時点で血中ウイルス量 (VL) が検出限界以下であった。尤も、その内 10 名では VL が検出限界以下になるのに長期間 (18 ヶ月以上) を要した。16 名 (19%) では ART が無効であったが、そのうち 4 名は治療開始前から薬剤耐性ウイルスを有していた。4 名の児に感染している HIV-1 では、チミジン誘導体関連変異 (TAM) が、また他の 4 名のウイルスでは M184V が最初の NRTI 耐性変異として検出された。残りの 4 名の児では M184V と TAM が同時に検出された。NNRTI 耐性変異では、K103N と G190A が共通してみられた。これらの結果から、HIV 母子感染児における治療開始前の HIV-1 薬剤耐性検査が臨床的予後に重要であること、そして非 B サブタイプと B サブタイプ HIV-1 では、NRTI 耐性変異の出現過程が異なっていることが示唆された。追跡調査している HIV 感染児の中のエイズ長期未発症群/遅発症群の児 (30 例) は早期発症群の児 (17 例) に比較し、HLA クラス I の A74 と B72 をより高率に保有することが明らかとなった。

A. 研究目的

途上国においても薬剤耐性 HIV が大きな問題となってきた。サブタイプ B 以外の HIV 母子感染児における薬剤耐性ウイルスの特徴が判明すれば、世界の小児エイズに対する予防・治療戦略上重要なデータとなる。本研究では、(1) 第一次選択抗レトロウイルス剤による治療 (ART) の開始 24 ヶ月以内の有効性を明らかにすること、ならびに、治療失敗例における薬剤耐性変異の出現パターンを明らかにすること、(2)

病態進行と HLA 型の関連性を明らかにすること、を目的とした。

B. 研究方法

(1) 本研究の対象となる HIV 感染小児約 100 名は、ケニア国ナイロビ市で医療チームの管理のもとで生活している。定期的な血中ウイルス量 (VL) や CD4⁺T リンパ球数などのデータとともに血漿検体が 2001 年より凍結保存されている。これらの経時的に採取された血漿中の HIV-1 *pol*-PR/RT 領