

200932009A

厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業 平成21年度総括・分担研究報告書

抗HIV薬の適正使用と効果・毒性に関する基礎的研究



研究代表者 湯永 博之

国立国際医療センター戸山病院 エイズ治療・研究開発センター

平成22(2010)年3月

平成21年度
厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業

抗HIV薬の適正使用と効果・毒性に関する基礎的研究
—平成21年度 総括・分担研究報告書—

抗HIV薬の適正使用と効果・毒性に関する基礎的研究

研究代表者	湯永 博之	国立国際医療センター戸山病院 エイズ治療・研究開発センター
研究分担者	杉浦 互	独立行政法人国立病院機構名古屋医療センター 臨床研究センター感染・免疫部
研究分担者	太田 康男	帝京大学医学部内科学講座
研究分担者	児玉 栄一	東北大学病院内科感染症科
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
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 感染病態学分野
研究分担者	横幕 能行	独立行政法人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
研究分担者	川村 龍吉	山梨大学医学附属病院皮膚科
研究分担者	塚田 訓久	国立国際医療センター戸山病院 エイズ治療・研究開発センター
研究分担者	本田 元人	国立国際医療センター戸山病院 エイズ治療・研究開発センター

目次

◆総括研究報告書

抗HIV薬の適正使用と効果・毒性に関する基礎的研究	2
渦永 博之 国立国際医療センター戸山病院 エイズ治療・研究開発センター	

◆分担研究報告書

抗HIV薬の適正使用と効果・毒性に関する基礎的研究	8
渦永 博之 国立国際医療センター戸山病院 エイズ治療・研究開発センター	

抗HIV薬の効果に関わる因子の研究	12
杉浦 互 独立行政法人国立病院機構名古屋医療センター 臨床研究センター感染・免疫部	

抗HIV治療薬による副作用発現の分子機序の解析	20
太田 康男 帝京大学医学部 内科学講座	

融合阻害剤・インテグラーゼ阻害剤の <i>in vitro</i> 研究	24
児玉 栄一 東北大学病院 内科感染症科	

侵入阻害薬に対する耐性メカニズムの解析	32
吉村 和久 熊本大学エイズ学研究センター 病態制御分野	

侵入阻害薬の及ぼす分子的影響の解析	38
鈴木 康弘 東北大学大学院医学系研究科 内科病態学講座 感染病態学分野	

新規薬剤の臨床効果の解析	44
横幕 能行 独立行政法人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	

抗HIV薬の感染予防効果の解析	52
川村 龍吉 山梨大学医学附属病院 皮膚科	

抗HIV療法の臨床効果に関する研究	56
塚田 訓久 国立国際医療センター戸山病院 エイズ治療・研究開発センター	

抗HIV薬の副作用・相互作用に関する研究	60
本田 元人 国立国際医療センター戸山病院 エイズ治療・研究開発センター	

研究成果の刊行物に関する一覧.....	64
---------------------	----

I. 総括研究報告書

抗HIV薬の適正使用と効果・毒性に関する基礎的研究

研究代表者

潟永 博之 国立国際医療センター戸山病院 エイズ治療・研究開発センター 治療開発室長

研究分担者

杉浦 亘 独立行政法人国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター感染・免疫部 部長

太田 康男 帝京大学医学部内科学講座 教授

児玉 栄一 東北大学病院内科感染症科 助教

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

鈴木 康弘 東北大学大学院医学系研究科内科病態学講座 感染病態学分野 講師

横幕 能行 独立行政法人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

川村 龍吉 山梨大学医学附属病院 皮膚科 講師

塚田 訓久 国立国際医療センター戸山病院 エイズ治療・研究開発センター 医師

本田 元人 国立国際医療センター戸山病院 エイズ治療・研究開発センター 医師

研究要旨

新規の非核酸系逆転写酵素阻害薬であるetravirine (ETR)、インテグラーゼ阻害薬であるraltegravir (RAL)、融合阻害薬であるenfuvirtide (T-20)、CCR5阻害薬であるmaraviroc (MVC)のそれぞれについて耐性メカニズムの解析や最適化について解析を行った。HLA-B*51 拘束性CTLの逃避変異を持つHIV-1がefavirenz (EFV)やnevirapine (NVP)に対して耐性を獲得した場合、新規の耐性変異パターンが生じ、ETRも効きにくくなることを明らかにした。また、MVC内服前後の健常人からの表皮水疱蓋を用いた解析で、MVCに感染予防効果があることが示唆された。RAL投与後のHIV-1感染日本人における有害事象を解析したところ、欧米の臨床試験よりも高頻度である可能性が示された。プロテアーゼ阻害薬であるlopinavirとritonavirの合剤(LPV/r)は脂質を上昇させることが問題であるが、新規のプロテアーゼ阻害薬であるdarunavir (DRV)に変更すると改善することが示された。このメカニズムにinsulin receptor substrate (IRS)のリン酸化が関連している可能性を見いだした。ワーファリンは抗HIV薬との併用が困難になることが多いが、RALとの併用でコントロールしやすくなることが示された。次々と新薬が導入される現状で抗HIV薬の適正使用・副作用や他剤との併用の問題を解決するために3年計画で立ち上げた研究班であるが、2年目の成果として、ほぼ順当なものが得られている。

A. 研究目的

新規抗HIV薬の適正な使用をガイドするために、臨床と基礎の両面から新薬による治療指針のもとになるデータを提供することを目指す(柱1:新規薬剤の適正使用に関する基礎的研究)。また、治療に伴う毒性や他剤との相互作用を解析し、有害事象を回避するための治療法を探索する(柱2:抗HIV薬の効果と毒性に関する研究)。

B. 研究方法

柱1では、多剤耐性患者から得られた臨床分離株や継代培養で選択された薬剤耐性HIVに対する新規薬剤の効果解析した。また、表皮水疱蓋を用いたex vivo HIV感染モデルを用いて、新規薬剤の感染予防効果を解析した。

柱2では、臨床症例より新規薬剤および既存薬による有害事象の程度・頻度を明らかにし、そのメカ

ニズムを解析した。また、安全な他剤との併用を検討した。

(倫理面への配慮)

国立国際医療センターと国立病院機構名古屋医療センターの症例の臨床経過・HLAの解析およびHIV遺伝子を解析した。臨床経過・HLAの解析と患者HIV遺伝子の解析について、それぞれの施設の倫理委員会で承認を得た。患者の理解と協力を得るため、研究の必要性和意義について十分に説明し、それぞれの施設の倫理規定に従い同意書に自筆のサインを得た。サインが得られた同意文書はカルテに綴じ込み保存した。個人情報と保護するため、個人を特定できるような情報は外部には出さない。健常者からの表皮水疱蓋の採取については、山梨大学の倫理委員会で承認を得た後、同大学病院皮膚科で行った。

C. 研究結果

柱1：①「HLA-B*51拘束性CTLの逃避変異のNNRTI耐性変異パターンへの影響」HIVの逆転写酵素(RT)にはHLA-B*51拘束性CTLのmajor epitope(RT 128-135)が存在し、HLA-B*51陽性の感染者ではほぼ100%、RT135番のアミノ酸が逃避変異(I135X)を起こしていた。最も頻度が高いI135Tを持つHIVを継代培養しefavirenz(EFV)耐性ウイルスを誘導したところ、新たな変異E138Kが出現していた。I135TとE138Kは、それぞれ単独では有意な耐性はもたらさないが、組み合わせるとEFVのみならずnevirapineや新規のNNRTIであるetravirine(ETR)にも耐性となった。②「インテグラーゼの遺伝的多様性のraltegravir(RAL)感受性への影響」未治療患者と既治療患者のHIVインテグラーゼ遺伝子を解析したところ、多剤耐性症例で(インテグラーゼ阻害薬による治療は受けていないが)、インテグラーゼの多様性が高かった。これらの遺伝的多様性のインテグラーゼ阻害薬RALの感受性への影響を調べるため、実験株と多剤耐性症例3例の株にRAL耐性変異Q148K/H/R、N155Hを導入した。いずれの株も148と155を同時に導入した場合、増殖がほとんど観察されなかった。RAL耐性変異を単独で導入した場合、多剤耐性症例由来の3株すべてで実験株よりもRAL耐性度が高かった。③「融合阻害薬の最適化」融合阻害薬であるenfuvirtide(T-20)はgp41のC末側のheptad repeat(C-HR)を模したpeptideであるが、その耐性ウイルスは、N-HRに一次変異、C-HRに二次変異(S138A)を持っていた。この二次変異をT-20に導入したところ、より強力な融合阻害peptideが得られた。④「CCR5阻害薬maraviroc

(MVC)に対する耐性誘導」2つのCCR5-tropicな臨床分離株(CRF08_BCとsubtype C)から、CCR5を導入した浮遊細胞(PM1/CCR5細胞)でMVC耐性を誘導した。いずれの耐性誘導実験でも、V3に変異は生じず、V4とC4に異なる変異が出現した。⑤「MVCによるHIV感染予防効果の解析」MVC内服後の健常者から表皮水疱蓋を採取し、その表面にHIVを接種し、ランゲルハンス細胞の感染を調べた。MVC内服前の表皮水疱蓋には感染が認められたが、内服後のものには認められなかった。また、MVC内服後の健常者の血液と精液のMVC濃度を測定したところ、精液中の濃度は血中のほぼ2倍であった。

柱2：⑥「RALの有害事象」RALが投与された日本人感染者95例について検討したところ、11例で、肝障害、腹部症状・腹膜炎、倦怠感・感覚異常、皮膚搔痒感などの有害事象により投与が中止されていた。うち1例については、CT画像上明らかな肝被膜炎および腹膜炎を起こしていた。⑦「プロテアーゼ阻害薬による脂質異常」LPVからdarunavir(DRV)に変更した7例で、中性脂肪とコレステロール値の改善が見られた。LPVとDRVのインスリン受容体基質(IRS)のリン酸化に対する影響を調べたところ、LPVで強く、DRVで弱くリン酸化が抑制された。⑧「抗HIV療法時のワーファリン併用」ワーファリンは2つの光学異性体よりなり、それぞれが異なるチトクロームP450(CYP)で代謝され、また、それぞれのCYPが薬剤による誘導や阻害を受けやすいため、抗HIV薬と併用する際は投与量調節が重大な問題となる。3例でRALと併用したが通常投与量で適切なINRが得られた。他の1例で、RALとETRと併用したが併用可能であった。

D. 考察

柱1：①I135Xは、HLA-B*51陰性の感染者にも拡がっており、特に日本でその頻度が高い。I135T/E138Kは今後世界的に増えてくる可能性の高い新規のNNRTI耐性変異パターンであり、今までのNNRTI耐性変異と異なりETRでサルベージできない可能性があり注意を要する。CTLと薬剤選択圧が新たな変異パターンを生み出している点でも興味深い。②臨床で実際に観察されるインテグラーゼ遺伝子の多様性がRAL耐性変異獲得後の耐性度に影響を与えていた。RAL投与前のインテグラーゼ遺伝子の解析も重要になる可能性がある。③HIV感染の膜融合の過程で、gp41のN-HRとC-HRの結合が不可欠であるが、T-20耐性ウイルスは、N-HRにT-20との結合を妨げる変異が生じ、C-HRにその変異したN-HRとの結合を助けるための変異が生じると考え

られる。C-HRに生じる二次変異を模すことにより、より強力な融合阻害薬となることを示した。④MVC耐性にはV3以外のenv領域が関わることが示された。株により異なる変異が生じており、遺伝子型によるMVCの耐性検査は極めて困難であると考えられる。⑤表皮水疱蓋を用いた実験で、MVCは血流のない皮膚にも到達し、皮膚内のランゲルハンス細胞の感染を阻止できることが明らかとなった。おそらく健常な粘膜にも十分な濃度で移行していると考えられ、MVCの感染予防薬としての有望性が示された。

柱2：⑥RALの日本人における有害事象は、欧米の臨床試験よりも高頻度である可能性がある。また、腹部症状や腹膜炎など、日本人特有のものもあるかもしれないが、今後の投与に際して注意が必要である。⑦LPVからDRVへ変更すると脂質異常が改善する可能性があることが示された。プロテアーゼ阻害薬は、IRSのリン酸化を抑制し、インスリン抵抗性をもたらし、代謝異常を引き起こすと考えられる。⑧昨年度までの検討で、ワーファリンをプロテアーゼ阻害薬と併用する場合は、ritonavir boostなしのfosamprenavirと併用するとコントロールしやすいことが明らかになっていたが、RALとの併用もコントロールしやすいことが示された。

E. 結論

抗HIV薬の適正な使用をガイドするため、薬剤耐性のメカニズムと日本人における治療に伴う毒性の解析に取り組んでおり、臨床現場で活用可能な成果が得られている。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

各研究分担者の頁参照

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

該当なし

II. 分担研究報告書

抗HIV薬の適正使用と効果・毒性に関する基礎的研究

研究代表者

瀧永 博之 国立国際医療センター戸山病院エイズ治療・研究開発センター
治療開発室長

研究要旨

HIVの逆転写酵素（RT）にはHLA-B*51 拘束性CTLのmajor epitope（RT 128-135）が存在し、HLA-B*51 陽性の感染者ではほぼ100%、RT135番のアミノ酸が逃避変異（I135X）を起こしていた。最も頻度が高いI135Tを持つHIVを継代培養しefavirenz（EFV）耐性ウイルスを誘導したところ、新たな変異E138Kが出現した。I135TとE138Kは、それぞれ単独では有意な耐性はもたらさないが、組み合わせるとEFVのみならずnevirapineや新規のNNRTIであるetravirine（ETR）にも耐性となった。I135Xは、HLA-B*51 陰性の感染者にも広がっており、特に日本でその頻度が高い。I135T/E138Kは今後世界的に増えてくる可能性の高い新規のNNRTI耐性変異パターンであり、今までのNNRTI耐性変異と異なりETRでサルベージできない可能性があり注意を要する。CTLと薬剤選択圧が新たな変異パターンを生み出している点で興味深い。

A. 研究目的

HIVのシーケンスは感染者一人一人において異なり、未治療の患者にも様々な多型的変異が認められる。逆転写酵素やプロテアーゼなどの抗HIV薬のターゲットとなっている酵素にも多型的変異は存在するが、通常、多型的変異そのものは、それだけでは薬剤耐性をもたらさない。しかし、いくつかの多型的変異は、薬剤耐性変異が起こる部位に異なるアミノ酸として存在し、薬剤耐性パターンの出現に影響をもたらすことがある。HLA-B*51は日本人に比較的多いHLAであるが、HLA-B*51 拘束性CTLは、HIVの逆転写酵素の128番から135番のアミノ酸配列をmajor epitopeとして認識し、135番のアミノ酸にescape変異が生じると認識しなくなることが知られている。日本人においては、HLA-B*51 陽性者のほとんどでescape変異が見られるのみならず、HLA-B*51 陰性者においても高率にescape変異が広がっていると報告されている。このescape変異が薬剤耐性出現に与える影響を明らかにする。

B. 研究方法

国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センターを受診したHIV感染者の血漿からRNAを抽出し、RT-PCRに続きnested PCRを行うことにより、

HIV逆転写酵素領域を増幅しシーケンス解析を行い、135番アミノ酸を同定する。これにより、HLA-B*51 拘束性CTLのHIV逆転写酵素135番アミノ酸におけるescape変異の頻度を調べる。

Escape変異の薬剤耐性出現への影響を調べるため、逆転写酵素の135番のアミノ酸に変異を持つ組み換えHIVを作成し、抗HIV薬存在下で培養する。抗HIV薬の濃度を徐々に上げていき、高度耐性HIVを誘導し、その過程で出現した変異を解析する。新たに出現した変異の影響を調べるために、再び組み換えHIVを作成し、薬剤感受性を調べる。

（倫理面への配慮）

国立国際医療センターの症例のHLAの解析およびHIV遺伝子を解析した。HLAの解析と患者HIV遺伝子の解析について、倫理委員会で承認を得た。患者の理解と協力を得るため、研究の必要性と意義について十分に説明し、それぞれの施設の倫理規定に従い同意書に自筆のサインを得た。サインが得られた同意文書はカルテに綴じ込み保存した。個人情報保護のため、個人を特定できるような情報は外部には出さない。

C. 研究結果

2003年と2004年に国立国際医療センターに受診しHIV感染が新規に診断された97人の患者について、HLA-B*51とHIV逆転写酵素135番のアミノ酸の相関について調べた。97人のうち17人がHLA-B*51陽性であったが、そのうち16人(94.1%)は、135番目のアミノ酸がイソロイシン(I)からスレオニン(T)に置換する変異(I135T), I135L, I135Vなどのescape変異が認められ、HLA-B*51陰性の患者よりもescape変異の割合が有意に高かった。しかしながら、HLA-B*51陰性の患者においても、escape変異は62.5%に認められ、escape変異がHLA-B*51陽性の患者から陰性の患者に感染し、しかもHLA-B*51拘束性CTLの選択圧がない状態でも存続し続けていた。結局、escape変異は日本の未治療の感染者に高頻度で見られ、最も多いescape変異はI135T(35.1%)で、野生型のI135(32.0%)よりも高頻度であった。

これらのescape変異の非核酸系逆転写酵素阻害薬に対する耐性変異出現パターンへの影響を調べるため、I135L, I135V, I135T, I135Rのそれぞれのescape変異を持つ組み換えHIVをefavirenz(EFV)存在下で培養し、徐々にEFVの濃度を上げることにより、EFV高度耐性HIVを誘導した。それぞれの組み換えHIVから、3回の誘導実験を行った。I135Lを持つHIVの耐性誘導実験では、K103RとV179D, L100IとV108I, V106AとG190Aの変異の組み合わせが出現した。I135Vを持つHIVの耐性誘導実験では、L100IとE138K, L100IとY188H, L100IとV108Iの組み合わせが出現した。I135Tを持つHIVの耐性誘導実験では、K101EとV108I, V106IとV179D, L100IとV108IとE138Kの組み合わせが出現した。I135Rを持つHIVの耐性誘導実験では、L100IとE138K, V108IとE138KとG190A, L100IとK101Eの組み合わせが出現した。認められた変異のうち、K103RとV179Dの組み合わせ、V106IとV179Dの組み合わせは、非核酸系逆転写酵素阻害薬耐性を賦与すると既に我々は報告している。これら以外の変異は、E138Kを除きすべて、International AIDS Society-USAのmutation tableに非核酸系逆転写酵素阻害薬耐性変異としてリストに挙げられている。138番のアミノ酸は多くの株でグルタミン酸(E)であり、高度に保存されているアミノ酸である。しかし、I135Vを持つHIVの3回の耐性誘導実験のうち1回、I135Tを持つHIVの3回の耐性誘導実験のうち1回、I135Rを持つHIVの3回の耐性誘導実験のうち2回、E138Kが出現している。

E138Kの影響を調べるため、E138Kを単独で持つ組み換えHIVと、上記4種のescape変異のいずれか

とE138Kの両方を持つ組み換えHIVを作成し、EFV・nevirapine(NVP)・etravirine(ETR)の3つの非核酸系逆転写酵素阻害薬に対する感受性を調べた。予想される通り、escape変異のみでは、有意な薬剤感受性の変化は認められなかった。E138K単独でも有意な薬剤感受性の変化は認められなかったが、I135TとE138Kを組み合わせたHIVは、EFVに対して7.0倍、NVPに対して3.8倍、ETRに対して4.2倍と有意な耐性を示した。I135LとE138Kの組み合わせもNVPに4.6倍、I135RとE135Kの組み合わせもETRに3.9倍と、有意な耐性をもたらした。

日本で最も広がっているescape変異であるI135TとE138Kの組み合わせで、非核酸系逆転写酵素阻害薬、特にEFVに対して、有意な耐性をもたらされたため、そのメカニズムを探るため、コンピューターによる構造解析を行った。野生型の逆転写酵素では、138番のグルタミン酸は比較的EFVの近くに位置し、EFVと逆転写酵素との間のファンデルワールス力と電気的相互作用の形成に寄与していると考えられた。I135T単独では、138番のグルタミン酸側鎖の位地に有意な変化はもたらさなかった。E138K単独では、138番のアミノ酸側鎖の位地に有意な変化をもたらすが、ファンデルワールス力は野生型の場合とほぼ同じだった。I135TとE138Kの組み合わせも、138番のアミノ酸側鎖の位地に有意な変化をもたらすが、更に、135番のスレオニンとの相互作用により138番のアミノ酸側鎖の方向がE138K単独の場合と異なっていた。これにより、138番のアミノ酸とEFVの間にギャップが生じ、ファンデルワールス力が有意に減少し、結合に必要な電気的エネルギーが大きくなっていった。以上より、EFVの結合には、138番のアミノ酸の位地が極めて重要で、I135TとE138Kの組み合わせにより、EFVの結合ポケットが阻害されることが示された。

D. 考察

HIV感染の世界的な広がりが拡大するにつれ、ウイルスの遺伝的な多様性は増し、地域により独特な配列も生まれてくる。最近、HIVはそのepitopeにescape変異を獲得することによりCTLに適応し、HLAに応じて集団レベルでescape変異が驚くべき早さで増えていることが報告された。Escape変異が抗HIV薬のターゲット蛋白に起こった場合、その変異自身が薬剤耐性をもたらさなくても、薬剤耐性変異の獲得パターンに影響を与える可能性がある。日本人ではHLA-B*51が比較的多く、HLA-B*51拘束性CTLのescape変異が起こる逆転写酵素の135番のアミノ酸にフォーカスを絞った。135番のアミノ酸に

escape変異を持つHIVを、EFVの存在下で徐々に濃度を上げながら培養したところ、いくつかの培養実験でまだ耐性変異としてリストアップされていないE138Kが出現した。組み換えHIVを作成して解析したところ、E138K単独では薬剤感受性に有意な変化をもたらさないが、E138Kといくつかの135番のescape変異、特に最も頻度が高いI135T、との組み合わせで、非核酸系逆転写酵素阻害薬に有意な耐性をもたらすことが明らかとなった。臨床データのデータベースを調べたところ、非核酸系逆転写酵素阻害薬を含む抗HIV療法の失敗例で、I135TとE138Kの組み合わせがあり、他の知られている非核酸系逆転写酵素阻害薬耐性変異が存在しない症例が数例見つかった。このことは、I135TとE138Kの組み合わせが、実際に臨床的に有意な薬剤耐性をもたらすことを示している。

HIVが感染者の体内でHLAに適応しつつ進化していることを考えると、薬剤耐性変異のパターンは影響を受けて変わっていく可能性がある。耐性変異の解析や新規薬剤の開発を行う際に、10年以上前の臨床分離株由来の実験株のみ使っていると、現在広がっているウイルスには対応できなくなる可能性もある。

E. 結論

抗HIV薬の適正な使用をガイドするため、薬剤耐性のメカニズムと日本人における治療に伴う毒性の解析に取り組んでおり、臨床現場で活用可能な成果が得られている。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kawashima Y, Pfafferott K, Frater J, Matthews P, Payne R, Addo M, Gatanaga H, Fujiwara M, Hachiya A, Koizumi H, Kuse N, Oka S, Duda A, Prendergast A, Crawford H, Leslie A, Brumme Z, Brumme C, Allen T, Brander C, Kaslow R, Tang J, Hunter E, Allen S, Mulenga J, Branch S, Roach T, John M, Mallal S, Ogwu A, Shapiro R, Prado JG, Fidler S, Weber J, Pybus OG, Klenerman P, Ndung'u T, Phillips R, Heckerman D, Harrigan PR, Walker BD, Takiguchi M, Goulder P. Adaptation of HIV-1 to human leukocyte antigen class I. *Nature* 458: 641-645, 2009.
- 2) Hachiya A, Shimane K, Sarafianos SG, Kodama EN, Sakagami Y, Negishi F, Koizumi H, Gatanaga H, Matsuoka M, Takiguchi M, Oka S. Clinical relevance of substitutions in the connection subdomain and RNase H domain of HIV-1 reverse transcriptase

from a cohort of antiretroviral treatment-naïve patients. *Antiviral Res.* 82: 115-121, 2009.

- 3) Davaalkham J, Unenchimeg P, Baigalmaa Ch, Oyunbileg B, Tsuchiya K, Hachiya A, Gatanaga H, Nyamkhuu D, Oka S. High-risk status of HIV-1 infection in the very low epidemic country, Mongolia, 2007. *Int. J. STD AIDS* 20: 391-394, 2009.
- 4) Honda H, Gatanaga H, Matsumura J, Kamimura M, Goto K, Tsukada K, Honda M, Teruya K, Kikuchi Y, Oka S. Favorable use of non-boosted fosamprenavir in patients treated with warfarin. *Int. J. STD AIDS* 20: 441, 2009.
- 5) Watanabe T, Yasuoka A, Honda H, Tanuma J, Yazaki H, Tsukada K, Honda M, Teruya K, Gatanaga H, Kikuchi Y, Oka S. Serum (1→3) beta-D-glucan as a non-invasive useful adjunctive diagnostic marker for *Pneumocystis pneumonia* in patients with human immunodeficiency virus. *Clin. Infect. Dis.* 49: 1128-1131, 2009.
- 6) Tsukada K, Teruya K, Tasato D, Gatanaga H, Kikuchi Y, Oka S. Raltegravir-associated perihepatitis and peritonitis: a single case report. *AIDS* 24: 160-161, 2010.
- 7) Watanabe K, Honda M, Watanabe T, Tsukada K, Teruya K, Kikuchi Y, Oka S, Gatanaga H. Emergence of raltegravir-resistant HIV-1 in the central nervous system. *Int. J. STD AIDS* (in press)

2. 学会発表

- 1) 湯永博之. HIV感染症における tailor-made 治療はどこまでできたか? 日本感染症学会総会 2009年4月
- 2) 井田節子、渡邊珠代、湯永博之、岡慎一. CTLからの逃避と病状の進行—感染から20年を経て急激に病状が進行した患者の解析— 日本感染症学会総会 2009年4月
- 3) 渡辺恒二、照屋勝治、本田美和子、湯永博之、菊池嘉、岡慎一. BCGワクチン皮内誤接種により形成された皮膚潰瘍を抗結核薬とステロイド全身投与により治療した1例 日本感染症学会総会 2009年4月
- 4) 田里大輔、矢崎博久、本田美和子、照屋勝治、湯永博之、菊池嘉、岡慎一. 多彩な皮膚症状が繰り返し出現した急性HIV感染症の1例 日本感染症学会総会 2009年4月
- 5) 湯永博之. HIV/AIDS治療からみた、疾病のコントロール 日本エイズ学会 2009年11月
- 6) 湯永博之. インテグラーゼ阻害薬(raltegravir)の臨床現場における実際と今後の問題 日本エイズ学会 2009年11月
- 7) 湯永博之. Darunavirを中心とした新規薬剤の使用経験 日本エイズ学会 2009年11月
- 8) 服部純子、湯永博之、吉田繁、千葉仁志、小池隆夫、佐々木悟、伊藤俊広、内田和江、原孝、

- 佐藤武幸、上田敦久、石ヶ坪良明、近藤真規子、今井光信、長島真美、貞升健志、古賀一郎、太田康男、山元泰之、福武勝幸、田中理恵、加藤真吾、宮崎菜穂子、藤井毅、岩本愛吉、西澤雅子、仲宗根正、巽正志、椎野禎一郎、林田庸総、岡慎一、伊部史朗、藤崎誠一郎、金田次弘、横幕能行、濱口元洋、上田幹夫、大家正義、田邊嘉也、渡辺香奈子、渡辺大、矢倉裕輝、白阪琢磨、栗原健、小島洋子、森治代、中桐逸博、高田昇、木村昭郎、南留美、山本政弘、松下修三、藤田次郎、健山正男、堀成美、杉浦互。2003-2008年の新規HIV/AIDS診断症例における薬剤耐性頻度の動向 日本エイズ学会 2009年11月
- 9) Davaalkham Jagdagsuren、土屋亮人、湯永博之、岡慎一。Two clusters of HIV-1 subtype B infection in Mongolia 日本エイズ学会 2009年11月
- 10) 塚田訓久、照屋勝治、水島大輔、中村春香、青木孝弘、西島健、柳沢邦雄、渡辺恒二、渡邊珠代、本田元人、田沼順子、矢崎博久、本田美和子、湯永博之、菊池嘉、岡慎一。Raltegravirを含む多剤併用療法の効果と有害事象 日本エイズ学会 2009年11月
- 11) 渡邊珠代、安岡彰、水島大輔、中村春香、西島健、青木孝弘、柳沢邦雄、渡辺恒二、本田元人、矢崎博久、田沼順子、塚田訓久、本田美和子、湯永博之、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一。当院におけるHAART時代のHIV日和見合併症の動向 日本エイズ学会 2009年11月
- 12) 青木孝弘、西島健、中村春香、柳沢邦雄、渡辺恒二、水島大輔、渡邊珠代、本田元人、塚田訓久、矢崎博久、田沼順子、本田美和子、照屋勝治、湯永博之、菊池嘉、岡慎一。ニューモシスチス肺炎108例の治療の検討 日本エイズ学会 2009年11月
- 13) 照屋勝治、水島大輔、西島健、中村春香、青木孝弘、渡辺恒二、柳沢邦雄、渡邊珠代、塚田訓久、本田元人、矢崎博久、田沼順子、本田美和子、湯永博之、菊池嘉、岡慎一。当科におけるHIV合併ノカルジア症の臨床的検討 日本エイズ学会 2009年11月
- 14) 本田美和子、水島大輔、中村春香、西島健、青木孝弘、柳沢邦雄、渡辺恒二、渡邊珠代、本田元人、塚田訓久、田沼順子、矢崎博久、湯永博之、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一。当院における女性HIV感染者の傾向とその背景についての報告 日本エイズ学会 2009年11月
- 15) 田沼順子、水島大輔、中村春香、青木孝弘、西島健、柳沢邦雄、渡辺恒二、渡邊珠代、本田元人、塚田訓久、矢崎博久、本田美和子、湯永博之、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一。HBe抗原陽性HIV感染者に対するHAARTの抗HBV効果について 日本エイズ学会 2009年11月
- 16) 渡辺恒二、水島大輔、中村春香、青木孝弘、西島健、柳沢邦雄、渡邊珠代、本田元人、塚田訓久、田沼順子、矢崎博久、本田美和子、湯永博之、照屋勝治、平林義弘、菊池嘉、岡慎一。当院で経験した赤痢アメーバ症の臨床症状と治療についての検討 日本エイズ学会 2009年11月
- 17) 村越勇人、湯永博之、小柳円、岡慎一、滝口雅文。慢性HIV-1感染者におけるHIV-1 pol特異的CD8T細胞によるHIV-1のコントロール 日本エイズ学会 2009年11月
- 18) 久世望、川島夕佳、湯永博之、岡慎一、滝口雅文。HLA-B*5101拘束性CTLによるHIV-1逃避変異体の選択 日本エイズ学会 2009年11月
- 19) 矢崎博久、水島大輔、中村春香、青木孝弘、西島健、柳沢邦雄、渡辺恒二、渡邊珠代、本田元人、田沼順子、塚田訓久、本田美和子、湯永博之、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一。当院での初回治療で使用された抗HIV薬の変遷とDRV投与者の経過について 日本エイズ学会 2009年11月
- 20) 本田元人、水島大輔、中村春香、青木孝弘、西島健、柳沢邦雄、渡辺恒二、渡邊珠代、塚田訓久、矢崎博久、田沼順子、本田美和子、湯永博之、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一。HIV感染者における高血圧症 日本エイズ学会 2009年11月
- 21) 小澤あかね、池田和子、島田恵、大金美和、武田謙治、山田由紀、石垣今日子、八鍬類子、伊藤紅、徐廷美、三枝政行、芳田玲子、湯永博之、菊池嘉、岡慎一。HIV/AIDS患者の治療を支える医療保障制度の活用及び自立支援に向けての実態調査 日本エイズ学会 2009年11月
- 22) 柳沢邦雄、田沼順子、水島大輔、中村春香、青木孝弘、西島健、渡辺恒二、渡邊珠代、本田元人、矢崎博久、塚田訓久、本田美和子、照屋勝治、湯永博之、菊池嘉、岡慎一、萩原將太郎。当科で経験したAIDS関連悪性リンパ腫56例における神経系病変の検討 日本エイズ学会 2009年11月
- 23) 西島健、水島大輔、中村春香、青木孝弘、柳沢邦雄、渡辺恒二、渡邊珠代、本田元人、矢崎博久、田沼順子、塚田訓久、本田美和子、湯永博之、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一。日本人患者におけるTenofovir disoproxil fumarateによる腎機能障害 日本エイズ学会 2009年11月

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

該当なし

抗HIV薬の効果に関わる因子の研究

研究分担者

杉浦 亙 独立行政法人国立病院機構名古屋医療センター
臨床研究センター感染・免疫研究部 部長

研究協力者

伊部史朗 独立行政法人国立病院機構名古屋医療センター
臨床研究センター感染・免疫研究部 流動研究員

正岡崇志 (財)エイズ予防財団 リサーチレジデント

梁 明秀 横浜市立大学医学部微生物学教室 教授

研究要旨

新規抗HIV薬の耐性獲得に関わるウイルス側および宿主側因子について明らかにするためにインテグラーゼ遺伝子の多様性の解析、インテグラーゼの基質であるウイルスDNAの変異の可能性に着目して、HIVのラルテグラビル耐性獲得機構解明、さらに無細胞反応系を応用したプロテアーゼ阻害剤感受性検査の確立と実用化に取り組んだ。その結果、インテグラーゼが多様性に富む遺伝子であり、また既存の薬剤投与により影響を受けている可能性が明らかになった。またコムギ無細胞系を用いて、安全、簡便かつハイスループットにプロテアーゼ活性を検出する事の出来る新規薬剤耐性検査法の基盤技術の構築に成功した

A. 研究目的

新規抗HIV薬の耐性獲得に関わるウイルス側および宿主側因子について明らかにするために以下の研究に取り組んだ。

a. インテグラーゼ(IN)の多様性の解析とそのウイルス抑制効果に対する効果の評価

未治療症例および既存の薬剤対して薬剤耐性を獲得した症例におけるIN領域の多様性について評価・解析し、それらの変異がIN阻害剤の感受性に及ぼす影響について検討を行う。

b. IN阻害剤の耐性機構の解析

HIVのINを分子標的とする新規薬剤ラルテグラビル(raltegravir, RAL)が、2008年6月に国内で承認され、既存の薬剤ではHIVの増殖抑制ができない多剤耐性症例での治療効果が期待されている。本研究では、IN内に誘導されるアミノ酸変異と共に、INの基質であるHIV-DNA内の変異に着目して、HIVのRAL耐性獲得機構を明らかにすることを目的とする。本

年度は、実際にRAL耐性症例を対象として、HIVゲノムRNA内に惹起した遺伝子変異を全長域にわたって経時的に解析した。

c. 無細胞反応系を応用したプロテアーゼ阻害剤感受性検査の確立と実用化

酵素活性に基づいてHIV-1プロテアーゼの薬剤耐性をハイスループットに評価できる新規*in vitro*スクリーニングシステムを構築する。

B. 研究方法

a. IN遺伝子の多様性の解析とそのウイルス抑制効果に対する効果の評価

INの有する遺伝的多様性がその後のRALの治療効果に及ぼす影響について理解するために、IN内に複数の変異を（特に活性中心近傍に）獲得している多剤耐性3症例(図1a)から増幅したIN配列にRAL耐性変異148K/H/R、155Hを導入したりコンビナント・ウイルスを作成した(図1b)。作成した株の増殖性、RAL感受性を評価した。

b. IN阻害剤の耐性機構の解析

当院のRAL耐性症例1例(図2)を対象に、RAL服用前後の血漿検体を用いて、全長ウイルスゲノムRNAの塩基配列を決定した。具体的には、RT-nested PCR法にて、5'LTRからIN遺伝子を含む前半領域と、IN遺伝子から3'LTRを含む後半領域の2つの遺伝子断片を増幅し、増幅産物の塩基配列を決定した(図3)。

c. 無細胞反応系を応用したプロテアーゼ阻害剤感受性検査の確立と実用化

本年度は、コムギ無細胞系を用いたHIV-1プロテアーゼ薬剤耐性検査法の基礎研究への応用と実用化を目的として研究を行った。まず、本手法から得られる結果の妥当性を検討するため、従来法である免疫染色法及び遺伝子検査法と解析結果を比較した。また、HIVプロテアーゼのプロテアーゼ阻害剤に対する耐性獲得には、基質タンパク質の切断部位周辺

の変異も大きく寄与することが知られている。そこで我々の手法が基質側変異の解析に応用可能であるか検討するため、薬剤耐性分子クローンに由来するプロテアーゼ(G48S/I54V/V82F/L90M)と、対応するp2/p7切断部位の配列をもった人工基質(GST-AQIM*MQKG-biotin)を作成し、DRVあるいはATV存在下にて耐性評価を行った。さらに、実用化に向けた試みとして、サブクローニングすることなく患者血清から直接的にプロテアーゼを合成できる手法を検討した。

(倫理面への配慮)

薬剤耐性検査の実施に当たっては患者の同意を得ている。

C. 研究結果

a. IN遺伝子の多様性の解析とそのウイルス抑制効果に対する効果の評価

IN変異が最も多く観察された3症例(SHIN-1,-2,-3)

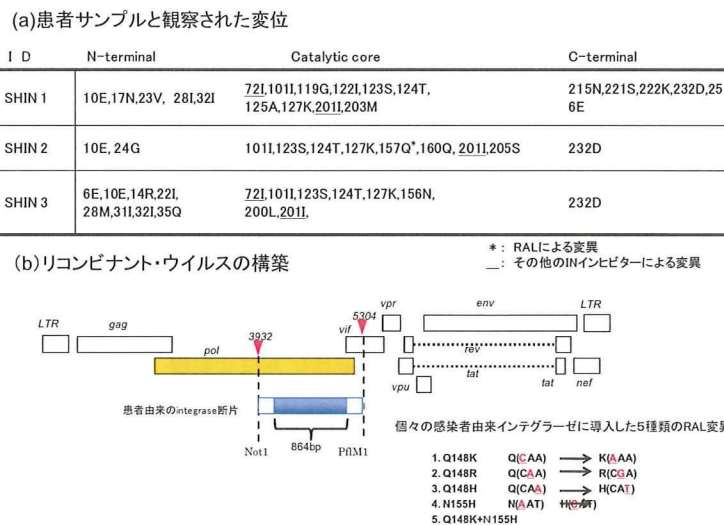


図1 リコンビナント・ウイルスの作成

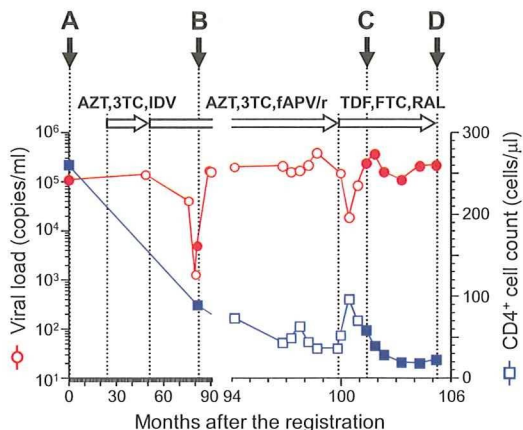


図2 症例 #NMC127の臨床経過

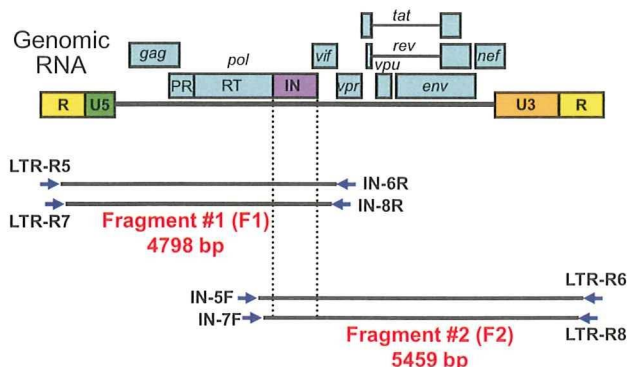


図3 全長ゲノムRNAの塩基配列決定

のIN配列にRAL耐性変異Q148HとN155Hを導入したりコンビナント・ウイルスを作成した。先ず、作成した図に示すようにMT2細胞感染実験においてIN耐性クローンを導入したHXB2およびSHIN1～3株は各々の野生株よりも相対的に増殖能力（RC）の低下が認められた。特に148と155を同時に導入した株はRCが低く増幅がほとんど観察されなかった(図4a)。MaRBLEアッセイを用いてHXB2およびSHIN-2株について導入した変異の感受性に及ぼす影響を評価した。その結果、SHIN-2株のほうがHXB2に変異を入れたものより高い薬剤耐性レベルが観察され(図4b)。このことからIN領域に観察された遺伝的多様性はRALの耐性レベルを引き上げる方向に働くことが示唆された。

b. IN阻害剤の耐性機構の解析

症例#NMC127の臨床経過を図2に示す。本症例はRALを含むHAART (TDF/FTC/RAL) 施行中にもかかわらずHIV-1 viral load (VL)が低下せず、他院より当院へ紹介された症例であった。当院で薬剤耐性検査を実施した結果、IN内にRAL耐性変異の典型的な

組み合わせであるG140SとQ148H変異が検出され、RAL耐性症例であることが確定した(図2、時点C)。本症例では、侵入阻害剤マラビロックを用いたサルベージ治療の準備が整った時点で、TDF/FTC/RALによるHAARTを終了した(図1、時点D)。また、本症例は、未治療時(図2、時点A)と、AZT/3TC/fAPVによるHAART施行時(図、時点B)に1回ずつ当院を受診しており、時点A～Dの計4検体を用いて、ウイルスゲノムRNAに惹起した遺伝子変異を全長域にわたって解析した。

IN内には計15のアミノ酸位置に変異が検出されたが、RAL耐性変異であるG140SとQ148Hだけが、RALを含むHAART施行中に惹起し保持されていることが明らかになった。次に、INの基質であるHIV-DNAの5’LTRと3’LTRに着目して解析を実施した。その結果、5’LTRには一塩基置換と二塩基欠損が、そして、3’LTRにも一塩基置換が、RALを含むHAART施行中に惹起し保持されていることが明らかになった(図5)。

(a) RAL耐性変異を導入したクローンのウイルス増殖能の比較

HXB2: HXB2_{wt}=155H=148R>148H/K>>148K+155H
 SHIN-1: 155H=148R>148H>SHIN1_{wt}>148K>>148K+155H
 SHIN-2: SHIN2_{wt}>148K/R/H=155H>>148K+155H
 SHIN-3: 155H>SHIN3_{wt}>148H/R>148K>>148K+155H

(b) インテグラーゼの多様性がRAL感受性に及ぼす影響

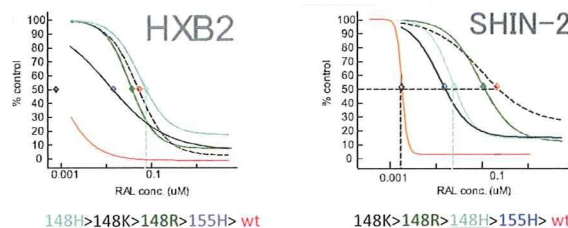


図4 リコンビナント・クローンの解析結果

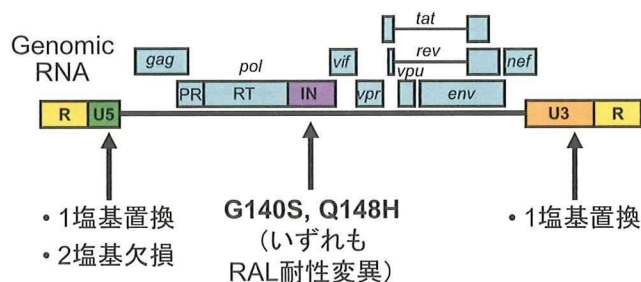


図5 PALを含むHAART旅行中に惹起した変位のまとめ（インテグラーゼ、LTRについて）

c. 無細胞反応系を応用したプロテアーゼ阻害剤感受性検査の確立と実用化

上記研究から以下の結果を得た。(i)本手法により得られた耐性評価が、従来のウエスタンブロット法や遺伝子検査法とよく一致することを確認した(表1)。(ii)野生型基質を用いた場合と比較して、DRVでは基質配列の違いによるIC₅₀への顕著な影響は見られなかったが、興味深いことに用量反応曲線の「傾き」が変化し、薬剤耐性分子クローン由来の基

質を使用した場合にはIC₉₉が高濃度側にシフトした(図6A)。またATVでは、薬剤耐性分子クローンをを用いることで、IC₅₀は低下するものの、DRVと同様に傾きが緩やかになり、野生型基質を使用した場合とほぼ同等のIC₉₉を保持した(図6B)。(iii)PCR法とコムギ系を最大限に活用することで、患者血清由来ウイルスRNAからサブクローニングすることなく活性を保持したプロテアーゼを調製することに成功した。(図7)

表1 薬剤耐性クローンの解析結果
Major Mutations: G48S, I54V, V82F, L90M

PI	Our System		Western Blot		Stanford Score
	IC ₅₀ DR/WT	Fold Resistance	IC ₅₀ DR/WT	Fold Resistance	
ATV	238 nM / 27 nM	8.8	219 nM / 46 nM	4.8	Intermediate
APV	113 nM / 22 nM	5.1	111 nM / 32 nM	3.5	Intermediate
DRV	30 nM / 22 nM	1.4	32 nM / 32 nM	1	Low
IDV	1194 nM / 30 nM	39.8	1534 nM / 47 nM	32.6	High

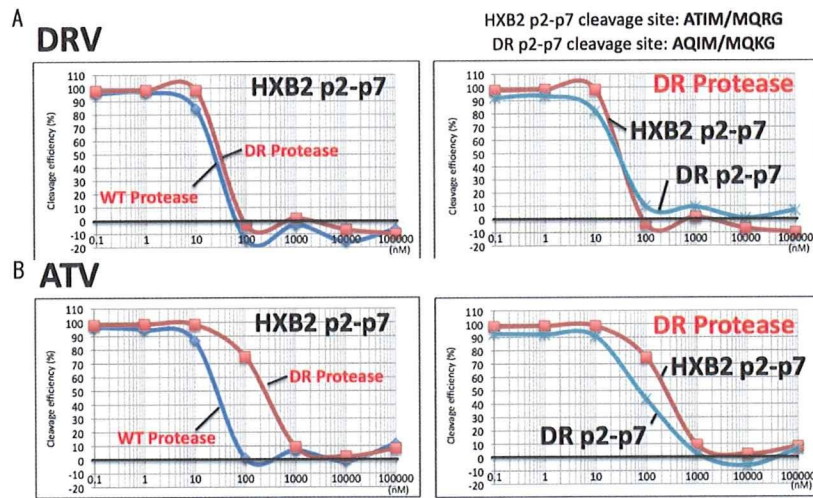


図6 基質配列の用量反応曲線及び薬剤耐性への影響

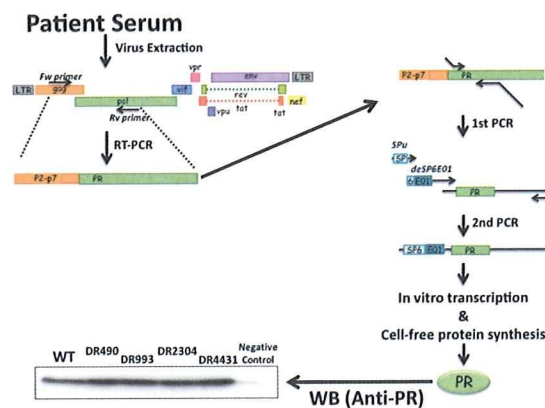


図7 患者血清由来ウイルスRNAからのHIV-1プロテアーゼの発現

D. 考察

a. IN遺伝子の多様性の解析とそのウイルス抑制効果に対する効果の評価

今回の結果からは今後RALを使用する際にあたり、投与前のINの遺伝子配列を調べ、どのような多様性を有しているか確認し、その変異が将来のRA耐性獲得に及ぼす影響を仔細に検討していくことが必要であると考えられた。また今回臨床症例において観察された変異のうち活性中心近傍に位置するものについては、構造学的にRAL耐性獲得に影響を及ぼす可能性も考えられ、今後臨床的および基礎的な視点両方からの詳細な解析が必要と思われる。

b. IN阻害剤の耐性機構の解析

本症例で検出されたIN内のG140SとQ148H変異は、RAL耐性変異の典型的な組み合わせであり、従来の知見とよく合致したものであった。一方、INの基質であるウイルスDNAの5'LTRと3'LTRにもRALを含むHAART施行中に遺伝子変異が検出された点が興味深く、酵素であるINとその基質であるウイルスDNA末端部位が共進化しながらRAL耐性を獲得した可能性を示唆している。次年度は、感染性クローンを用いた*in vitro*実験を実施し、この可能性を検証する予定である

c. 無細胞反応系を応用したプロテアーゼ阻害剤感受性検査の確立と実用化

本手法では、コムギ無細胞系を用いることで、生化学的解析に十分量のプロテアーゼをハイスループットに調製し、未精製のままスクリーニングに用いることに成功しており、従来の*in vitro*アッセイ系と比較してより短時間で薬剤耐性を評価できるものと考えられる。さらに、遺伝子検査結果が類似したクローン間において、薬剤耐性に違いがみられたことから、耐性評価が困難であった変異蓄積型プロテアーゼに対しても、その耐性をよりの確に評価できるものと期待される。これらのことから本法は、プロテアーゼの実際の薬剤耐性を安全、簡便かつ正確に評価できるハイスループットスクリーニング系であり、加えて遺伝子検査法と並行して実施できることから、研究レベルのみならず、臨床検査における実用性も備えているものと期待される。

E. 結論

IN阻害剤の耐性獲得に関わるウイルス側および宿主側因子について明らかにするために、未治療および既治療症例に対して薬剤耐性を獲得した症例の配列情報の収集を行った。

当院のRAL耐性症例を対象として、全長ウイルスゲノムRNAをRAL服用前後にわたり経時的に解析した。その結果、IN内だけでなく、その基質であるウイルスDNA末端(5'LTRと3'LTR)にもRAL服用中に遺伝子変異が誘導されていることが明らかになった。この結果は、INとウイルスDNAが共進化しながらRAL耐性を獲得したことを示唆しており興味深い。次年度は、この可能性を検証するために感染性クローンを用いた*in vitro*実験を実施する予定である。

コムギ無細胞系とAlphaScreen系を用いたHIV-1プロテアーゼ薬剤耐性検査法は、迅速かつ正確に薬剤耐性を評価できるアッセイ系であり、基礎研究分野への応用や臨床検査においても有用なツールとなることが期待される。

またRAL存在下でウイルスゲノムRNA内に蓄積する遺伝子変異をモニターする実験系を立ち上げた。これにより、今後、RAL耐性症例が生じた場合に詳細な解析が可能となった。また、*in vitro*でRAL耐性獲得機構を研究するために必要なウイルスを作成した。さらに、我々はコムギ無細胞系を用いて、安全、簡便かつハイスループットにプロテアーゼ活性を検出する事の出来る新規薬剤耐性検査法の基盤技術の構築に成功した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Shiro Ibe, Yoshiyuki Yokomaku, Teiichiro Shiino, Rie Tanaka, Junko Hattori, Seiichiro Fujisaki, Yasumasa Iwatani, Naoto Mamiya, Makoto Utsumi, Shingo Kato, Motohiro Hamaguchi, and Wataru Sugiura. HIV-2 CRF01_AB: First Circulating Recombinant Form of HIV-2. JAIDS in press
- Matsuyama S, Shimizu A, Ode, H, Hata M, Sugiura W, Hoshino T. Structural and Energetic Analysis on

- the Complexes of Clinically-isolated Subtype C HIV-1 Proteases and Approved Inhibitors by Molecular Dynamics Simulation. *The Journal of Physical Chemistry*. 114(1):521-30
- Land S, Cunningham P, Zhou J, Frost K, Katzenstein D, Kantor R, Chen YM, Oka S, DeLong A, Sayer D, Smith J, Dax EM, Law M; TAQAS Laboratory Network. TREAT Asia Quality Assessment Scheme (TAQAS) to standardize the outcome of HIV genotypic resistance testing in a group of Asian laboratories. *J Virol Methods*. 2009 Aug;159(2):185-93.
 - Hasegawa N, Sugiura W, Shibata J, Matsuda M, Ren F, Tanaka H. Inferring within-patient HIV-1 evolutionary dynamics under anti-HIV therapy using serial virus samples with vSPA. *BMC Bioinformatics*. 2009 Oct 29;10(1):360.
 - Iwatani Y, Chan DS, Liu L, Yoshii H, Shibata J, Yamamoto N, Levin JG, Gronenborn AM, Sugiura W. HIV-1 Vif-mediated ubiquitination/degradation of APOBEC3G involves four critical lysine residues in its C-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Nov 17;106(46):19539-44. Epub 2009 Nov 3.
 - Shiro Ibe, Y Yokomaku, T Shiino, R Tanaka, J Hattori, S Fujisaki, Y Iwatani, S Kato, M Hamaguchi, and W Sugiura. HIV-2 CRF01_AB: First Circulating Recombinant Form of HIV-2. 17thCROI San Francisco, 2010
 - M Fujino, H Miura, J Hattori, S Ibe, S Fujisaki, M Matsuda, M Nishizawa, Y Iwatani and W Sugiura: Mechanism of darunavir resistance acquisition in multi-protease inhibitor resistant HIV-1, XVIII international HIV Drug Resistance Workshop, June 9-13 2009, Fort Myers, Florida
 - Junko Shibata, Fengrong Ren, Yasumasa, Iwatani, Hsiny Tsang, Masakazu Matsuda, Naoki Hasegawa, Hiroshi Tanaka, and Wataru Sugiura : Within-Host Coevolution of Gag P453L and Protease D30N/N88D Demonstrates virological Advantage in a Highly Protease Inhibitor-Exposed HIV-1 Case, 10th Annual symposium on Antiviral Drug Resistance, Nov 15-18 2009, Richmond, VA
 - Iwatani 10th Annual symposium on Antiviral Drug Resistance, Nov 15-18 2009, Richmond, VA
 - Masaoka, 10th Annual symposium on Antiviral Drug Resistance, Nov 15-18 2009, Richmond, VA

国内学会（一般演題）

- 伊部史朗、横幕能行、服部純子、間宮均人、杉浦 互：東海地域における HIV-2 感染疑い症例の遺伝子学的解析、第 83 回日本感染症学会総会、2009 年 4 月 23 日～24 日、東京
- 岩谷靖雅、吉居廣朗、柴田潤子、杉浦 互：APOBEC3G のユビキチン化部位と抗レトロウイルス作用、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 25 日～27 日、東京
- 星野忠次、藍壇 愛、原田壮一郎、杉浦 互：ウイルス酵素の構造変形に関する系統解析、第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会、2009 年 11 月 26 日～28 日、名古屋
- 正岡崇志、梁 明秀、巽 正志、杉浦 互、松永智子、森下 了、澤崎達也、山本直樹：酵素活性を指標とした新規の HIV プロテアーゼ阻害剤耐性検査法の基盤技術の開発、第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会 2009 年 11 月 26 日～28 日、名古屋
- 柴田潤子、杉浦 互、岩谷靖雅、Hsinyi Tsang、松田昌和、長谷川直樹、任 鳳蓉、田中 博：宿主内 HIV-1 の共進化変異の解析：Protease 阻害剤耐性変異 D30N/N88D と p1/p6 切断領域の P453 変異の相互干渉の意義、第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会、2009 年 11 月 26 日～28 日、名古屋

論文発表(和文)

- 杉浦 互：HIV の薬剤耐性獲得の分子機構、日本臨床 Vol.6No1 2009-1
- 服部純子、杉浦 互：薬剤耐性の現状、Pharma Medica Vol.27 No.4 2009
- 宮崎菜穂子、松下修三、藤井 毅、杉浦 互：抗 HIV 療法を受けている患者における薬剤耐性 HIV の現状と問題点、The Journal of AIDS Research Vol.11 No.2 2009

国際学会（一般演題）

- Yasumasa Iwatani, D Chan, L Liu, H Yoshii, J Shibata, J Levin, A Gronenborn, and W Sugiura, Structure-guided Mutagenesis of APOBEC3G Reveals Critical Lysine Residues for HIV-1 Vif-mediated Ubiquitination/Degradation. 17th CROI San Francisco, 2010
- Takashi Masaoka, T Sawasaki, S Matsunaga, W Sugiura, Y Endo, M Tatsumi, N Yamamoto, and A Ryo. Novel High-throughput HIV-1 Protease-resistance Phenotypic Assay Using Cell-free Protein Production System. 17th CROI San Francisco, 2010

6. 鈴木寿子、服部純子、村田大悟、三浦秀佳、伊部史朗、藤野真之、西澤雅子、山本直樹、杉浦 互：インテグラーゼ阻害剤耐性化機序の分子生物学的解析、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
7. 服部純子、潟永博之、吉田 繁、千葉仁志、小池隆夫、佐々木悟、伊藤俊広、内田和江、原孝、佐藤武幸、上田敦久、石ヶ坪良明、近藤真規子、今井光信、長島真美、貞升健志、古賀一郎、太田康男、山元康之、福武勝幸、田中理恵、加藤信吾、宮崎菜穂子、藤井 毅、岩本愛吉、西澤雅子、仲宗根正、巽 正志、椎野禎一郎、林田庸総、岡 慎一、伊部史朗、藤崎誠一郎、金田次弘、横幕能行、濱口元洋、上田幹夫、大家正義、田邊嘉也、渡辺香奈子、渡邊 大、矢倉裕輝、白阪琢磨、栗原 健、小島洋子、中桐、逸博、森 治代、中桐、逸博、高田 昇、木村昭郎、南 留美、山本政弘、松下修三、藤田次郎、健山正男、堀 成美、杉浦 互：003-2008年の新規HIV/AIDS診断症例における薬剤耐性頻度の動向、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
8. 須藤弘二、杉浦 互、加藤真吾：PCR-MS法を用いた新規感染者血漿中の薬剤耐性微小団の定量、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
9. 重見 麗、服部純子、保坂真澄、伊部史朗、藤崎誠一郎、横幕能行、濱口元洋、内海 眞、岩谷靖雅、杉浦 互：BEDアッセイを用いた名古屋医療センターにおける新規HIV感染者の動向調査、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
10. 椎野禎一郎、貞升健志、長島真美、服部純子、杉浦 互：国内感染者集団の大規模塩基配列データから推測されるHIV集団サイズの経時的変化、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
11. 藤崎誠一郎、横幕能行、服部純子、伊部史朗、濱口元洋、岩谷靖雅、杉浦 互：HIV/HBV重複感染者におけるHBV genotype解析および薬剤耐性アミノ酸変異の検出、第23回日本エイズ学会学術集会・総会2009年11月26日～28日、名古屋
12. 伊部史朗、横幕能行、椎野禎一郎、田中理恵、服部純子、藤崎誠一郎、岩谷靖雅、間宮均人、内海 眞、加藤真吾、濱口元洋、杉浦 互：日本におけるHIV-2感染症の分子疫学的解析、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
13. 宮崎菜穂子、松下修三、藤井 毅、岩本愛吉、杉浦 互：多剤耐性症例治療を目的とした新規抗HIV薬使用症例に対する緊急全国調査、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
14. 石川晃一、山本典生、杉浦 互、服部純子、山岡昇司、：ガーナにおける抗レトロウイルス治療（ART）中HIV感染者のウイルス定量と薬剤耐性解析、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
15. 西澤雅子、Jeffery Johnson, Walid Heneine、山本直樹、杉浦 互：高感度薬剤耐性HIV検出法を用いた微小集族薬剤耐性HIVの検出と依存比率に関する研究、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
16. 横幕能行、大出裕高、藤崎誠一郎、服部純子、濱口元洋、杉浦 互：HIVプロテアーゼ阻害剤耐性関連変異蓄積症例の薬剤感受性評価に対するVLP ELISA法およびコンピューターシミュレーション法の有用性の検討、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
17. 岩谷靖雅、吉居廣朗、柴田潤子、杉浦 互：Vif依存的なAPOBEC3Gのユビキチン化部位と抗ウイルス作用、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
18. 吉居廣朗、岩谷靖雅、杉浦 互：抗HIV-1宿主因子APOBEC3Gファミリーの発現調節に関する研究、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋

H. 知的所有権の出願・取得状況

該当なし