

200932026A

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

難治性HIV感染症に対する治療法開発の 基礎的研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 滝口 雅文

平成22(2010)年3月

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

難治性HIV感染症に対する治療法開発の基礎的研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 滝口 雅文

平成22(2010)年3月

目 次

I. 総括研究報告書

- 難治性HIV感染症に対する治療法開発の基礎的研究 1
研究代表者 滝口 雅文(熊本大学エイズ学研究センター センター長/教授)

II. 分担研究報告書

1. 細胞傷害性T細胞を用いた逃避ウイルスの抑制をめざした免疫治療の基礎研究 9
滝口 雅文(熊本大学エイズ学研究センター センター長/教授)
2. 病態に影響を与える HLA 分子の解析 12
瀧永 博之(国立国際医療センター エイズ治療・研究開発センター 治療開発室長)
3. HIV の薬剤耐性発現に抵抗する強力な抗 HIV 阻害剤の研究・開発と新しいクラスの
抗 HIV 阻害剤に対する薬剤耐性発現機序の解明 17
満屋 裕明(熊本大学大学院医学薬学研究部 教授)
研究実施期間:平成 21 年 4 月 1 日～平成 22 年 1 月 31 日
天野 将之(熊本大学 エイズ学研究センター COEリサーチ・アソシエイト)
研究実施期間:平成 22 年 2 月 1 日～平成 22 年 3 月 31 日
4. 新規作用機序, 特にウイルス遺伝子発現機構を標的とした抗エイズ薬に関する研究 23
- Cyclin T1 を標的とした抗 HIV-1 阻害剤の *in silico screening* -
馬場 昌範(鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 教授)
5. HIV の薬剤耐性機構 29
松岡 雅雄(京都大学ウイルス研究所 教授)
6. HIV-1 の中和抵抗性メカニズムの解明とその克服に関する基礎研究 35
松下 修三(熊本大学エイズ学研究センター 教授)

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 51

I . 総括研究報告書

難治性HIV感染症に対する治療法開発の基礎的研究

研究代表者： 滝口 雅文 熊本大学エイズ学研究センター センター長/教授
研究分担者： 湯永 博之 国立国際医療センター エイズ治療・研究開発センター 治療開発室長
満屋 裕明 熊本大学大学院医学薬学研究部 教授
天野 将之 熊本大学 エイズ学研究センター COEリサーチ・アソシエイト
馬場 昌範 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 教授
松岡 雅雄 京都大学ウイルス研究所 教授
松下 修三 熊本大学エイズ学研究センター 教授

研究要旨：耐性ウイルス出現の機序の解明と耐性ウイルスを克服する新規薬剤の開発では、GRL-0216A, -0286A等のPDIが薬剤耐性ウイルスに対して強い活性を示すことがあきらかになった。コンピューター・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が可能になった。さらに *in silico* スクリーニングより cyclin T1 とのドッキングスコアが最適であると選別された254化合物から抗HIV-1活性を有する3種の化合物を同定した。細胞性免疫治療の研究では、新たに逃避変異ウイルスを認識するCTLを明らかにした。

A. 研究目的

HAART療法により、多くのHIV患者の予後は改善されてきたが、HAART療法に抵抗する難治性HIV患者の治療が大きな課題になってきている。これらの研究の課題を解決することを目指す本研究は、2つの研究の柱（柱1：耐性ウイルス出現の機序の解明と耐性ウイルスを克服する新規薬剤の開発と柱2：免疫療法の開発を目指した基礎研究）からなり、柱1は臨床での応用が3-5年後に期待できる成果を目的とした研究であり、柱2は5-10年後に臨床応用が期待できる研究である。

B. 研究方法

1) 柱1：耐性ウイルス出現の機序の解明と耐性ウイルスを克服する新規薬剤の開発

・新規HIV-1 PDI（protease dimerization inhibitors）の開発とPDI耐性機序の解析：蛍光蛋白CFP/YFPタグ付きPRを有する感染性組み換えHIVクローンを用いたFRETの系を用いて、構造学的デザインに基づいた新規PDIの開発を進めた。またPR dimerizationに重要とされるアミノ酸、PDI耐性関連変異アミノ酸の詳細な解析を進め、HIV-1 PR阻害への新たな機序、結晶構造解析、モデリングの手法を用いてPDIとHIV PR monomer subunitとの結合様式を明らかにした。

・CCR5の微細構造学的解析・生理学的解析：コン

ピューター・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を行った。また、電子顕微鏡・蛍光/共焦点顕微鏡を用いた細胞表面のCCR5の局在性・動態解析も行った。

・*in silico* スクリーニングを行い cyclin T1 とのドッキングスコアが最適であった254化合物の抗HIV-1効果は、感染細胞における細胞変性効果抑制の有無を調べることにより判定した。CEMにHIV-1を感染させ、種々の濃度の薬剤存在下で培養した。培養4日目に、培養液を同じ濃度の薬剤を含む新しい培地で継代し、さらに3日間培養後に、感染細胞の生細胞数をMTT法にて定量した

2) 免疫療法の開発を目指した基礎研究

・Gag28-36に対するCTLクローンを樹立し、逃避変異3Rに対する認識を、ペプチドをパルスした細胞に対する細胞傷害性活性を調べることにより解析した。さらに変異ウイルスを作製し、同様の感染細胞に対する認識を調べた。

・日本の158人の無治療慢性HIV-1感染者におけるHIV-1特異的CTL応答のmagnitudeとbreadthの解析を行った。HIV-1特異的CTL反応は、nef、gag、pol領域を網羅した11-mer overlapping peptide cocktail に対するCD8T細胞の反応をIFN- γ ELISPOT assay法によって測定することで

評価した。

・抗 V3 単クローン抗体 KD-247 を用いて高度耐性ウイルスを誘導し、認識部位のシークエンス解析を行った。

(倫理面への配慮)

現時点では柱 2 の免疫療法の開発が対象となるが、既にその一部は各施設の倫理委員会の承認を受けている。患者の血液を用いて行なう研究に関しては、これらの倫理委員会が規定する指針に従っておこなった。

C. 研究結果

1) 柱 1 : 耐性ウイルス出現の機序の解明と耐性ウイルスを克服する新規薬剤の開発

・多剤耐性臨床分離 HIV-1 株に対して野生株と同等 (EC₅₀ 値で 2 倍以内) の高い活性を發揮する新規 PI, GRL-02031 を同定・開発してきたが、更に macrocyclic 構造という特徴的な構造を有し、薬剤耐性 HIV に対して高い活性を發揮する一連の低分子化合物、GRL-0216A, -0286A 等の PDIs を同定、詳細な結晶構造解析により同構造が HIV-PR flap 部位に広範に結合する事で強力な活性を發揮する事を見出した。

・CCR5 阻害剤分子が細胞表面の CCR5 のすべ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 (50%程度) 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 エンベロープ・CD4・ケモカイン受容体 (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。一方で結晶解析・コンピューター・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・同定にも成功した。

・昨年度 cyclin T1 のポケット領域に結合する可能性を有する化合物の *in silico* スクリーニングを行い cyclin T1 とのドッキングスコアが最適であった 254 化合物について、CEM 細胞を用いた *in vitro* における抗 HIV-1 活性を評価した。その結果、3 種の化合物において抗 HIV-1 活性が認められた。

2) 柱 2 : 免疫療法の開発を目指した基礎研究

・患者 KI-092 から確立した CTL クローンは、ワ

イルドタイプの Gag28-36 ペプチド (WT) をパルスした細胞に対しては強い細胞傷害活性を示したが、逃避変異ペプチドをパルスした細胞は全く細胞傷害を示さなかった。一方、患者 KI-091 から確立した CTL クローンは、ワイルドタイプの Gag28-36 ペプチド (WT) をパルスした細胞に対しては同程度の強い細胞傷害活性を示し、また逃避変異ペプチドをパルスした細胞に対しても細胞傷害を示した。WT と 3R ウイルスを感染させた細胞に対する細胞傷害活性を調べたところ、KI-092 から確立した CTL クローンは、WT 感染細胞のみに強い細胞傷害活性を示したが、3R ウイルスを感染させた細胞には細胞傷害活性を示さなかった。一方、KI-091 から確立した CTL クローンは、両方のウイルス感染細胞に対して弱いながらも細胞傷害活性を示した。

・日本の 158 人の無治療慢性 HIV-1 感染者における HIV-1 特異的 CTL 応答の magnitude と breadth の解析を行った。nef、gag、pol 領域に対する CTL 反応の total magnitude を解析した結果、gag と pol における total magnitude が nef よりも有意に高いことが示された。Pol 特異的 CTL 反応の total magnitude は低いウイルス量ならびに高い CD4T 細胞数と有意に相関し、さらに、Pol 反応の breadth は低いウイルス量と有意に相関していた。

・抗 V3 単クローン抗体 KD-247 を用いて高度耐性ウイルスを誘導した。これらの耐性ウイルスは、エピトープ部の変異の他に V2 に PNGS 挿入が見られた。これらの変異は、強いウイルス複製負荷のかかる変異であったが、その他の部位の変異を獲得することによって、複製能力を野生株とほぼ同等に改善させることが出来るようになることがわかった。つまり、中和逃避に関係した変異は、中和抗体の耐性だけでなく、ウイルス増殖を促進させるような変異も併せ持っていることが示唆された。

D. 考察

柱 1 の耐性ウイルスに対する新規薬剤の開発では、満屋によって新たな PI の開発も進んでおり、耐性 HIV に対して高い活性を發揮する一連の低分子化合物、GRL-0216A, -0286A 等の PDIs を同定することができた。また CCR5 阻害剤の開発のための結晶解析・コンピューター・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んだ。一方、馬場により *in silico* スクリーニングより cyclin T1 とのドッキングスコアが最適であると選別された 254 化合物について、CEM 細胞を用いた *in vitro* における抗 HIV-1 活性を評価した結果 3 種の化合物において抗 HIV-1 活性が認められ、新規薬剤の可能性が示唆

された。

柱2では、新たに Gag28-36 に対する CTL の内、逃避変異 3R を認識し 3R 変異ウイルス感染細胞を傷害する CTL が存在することが明らかになった。その活性は必ずしも高くないので、今後治療に使えるか検討する可能性がある。一方、日本人の無治療慢性 HIV-1 感染者において Nef, Pol, Gag に対する HIV-1 特異的 CTL 応答を解析したところ、Pol に対する反応が低いウイルス量ならびに高い CD4T 細胞数と有意に相関していることが明らかになった。他の国のコホートでは Gag に対する反応性が HIV のコントロールに重要であると言われているが、対照的な結果となった。

自己評価

1) 達成度について

柱1は、満屋を中心として順調に新薬開発が展開されており、計画通りの成果が出ている。特の PI の開発分野では臨床試験を検討できるものが出てきそうである。

柱2では、免疫逃避ウイルスを抑制できる CTL の存在が明らかになり、初年度としての成果は上がっている。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

新薬開発の社会的意義は言うまでもない。本研究班の新薬開発は、国際的にみても高いレベルにあり世界をリードしている研究である。

免疫療法の開発はワクチンに開発にもつながる重要な研究である。国際的にも競争が厳しい分野であり、その成果は中期的な視点で治療につながり社会的意義は大きい。

3) 今後の展望について

本研究班によって展開される研究により、今後2-4年間に新規の機序による薬剤の開発が期待される。特にプロテアーゼの二量体形成を阻害する薬剤が開発される可能性があり、これが可能になれば、幅広い耐性ウイルスに効果がある薬剤になると考えられる。

また、免疫療法に関しては、CTL から免疫逃避した HIV-1 を認識する CTL を誘導する治療法の開発や中和抗体の療法などが期待される。

E. 結論

1) 新薬開発では、新規 PI 開発で進展がみられた。特に GRL-0216A, -0286A 等の PDI などの新規薬剤が臨床試験候補として期待される効果を示した。

2) 細胞性免疫治療の研究では、新たに逃避変異ウイルスを認識する CTL が明らかになった。

F. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む) なし

G. 研究発表 (2009 ~ in press 本研究班課題に関連したもののみ掲載)

- 1) Murakoshi, H., Kitano, M., Akahoshi, T., Kawashima, Y., Dohki, S., Oka, S., and **Takiguchi, M.** Identification and characterization of 2 HIV-1 Gag immunodominant epitopes restricted by Asian HLA allele HLA-B*4801. *Hum. Immunol.* 70:170-174 (2009).
- 2) Kawashima, Y., Pfaffert, K., Frater, J., Matthews, P., Payne, R., Addo, M., **Gatanaga, H.**, Fujiwara, M., Hachiya A., Koizumi, H., Kuse, N., Oka, S., 他29名, **Takiguchi, M.***, and Goulder, P.* (*equally contributed). Adaptation of HIV-1 to HLA I. *Nature.* 458: 641-645 (2009).
- 3) Koizumi, H., Iwatani, T., Tanuma, J., Fujiwara, M., Izumi, T., Oka, S., and **Takiguchi, M.** Escape mutation selected by Gag28-36-specific cytotoxic T cells in HLA-A*2402-positive HIV-1-infected donors. *Microbes Infect.* 11:198-204 (2009).
- 4) Zheng, N., Fujiwara, M., Ueno, T., Oka, S., and **Takiguchi, M.** Strong ability of Nef-specific CD4+ cytotoxic T cells to suppress HIV-1 replication in HIV-1-infected CD4+ T cells and macrophages. *J. Virol.* 83: 7668-7677 (2009).
- 5) Motozono, C., Yanaka, S., Tsumoto, K., **Takiguchi, M.**, and Ueno, T. Impacts of intrinsic cooperative thermodynamics of peptide-MHC complexes on antiviral activity of HIV-specific cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.* 182: 5528-5536 (2009).
- 6) Hashimoto, M., Kitano, M., Honda, K., Koizumi, H., Dohki, S., Oka, S., and **Takiguchi, M.** Selection of escape mutation by Pol154-162-specific cytotoxic T cells among chronically HIV-1-infected HLA-B*5401-positive individuals. *Hum. Immunol.* 71: 123-127 (2010).
- 7) **Gatanaga, H.**, Ode, H., Atsuko Hachiya, A., Hayashida, T., Sato, H., **Takiguchi, M.**, and Oka, S. Impact of human leukocyte antigen-B*51-restricted cytotoxic T-lymphocyte

- pressure on mutation patterns of nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance. **AIDS** in press
- 8) Koizumi, H., Hashimoto, M., Fujiwara, M., Murakoshi, H., Chikata, T., Borghan M. A., Hachiya, A., Kawashima, Y., Takata, H., Ueno, T., Oka, S., and **Takiguchi, M.** Different in vivo effects of HIV-1 immunodominant epitope-specific CTLs on selection of escape mutant viruses. **J. Virol.** in press.
 - 9) Nakata, H., Kruhlak, M., Kamata, W., Ogata-Aoki, H., Li, J., Maeda, K., Ghosh, AK., and **Mitsuya, H.** Effects of CCR5 Inhibitors on the Dynamics of CCR5 and CC-chemokine-CCR5 interactions. **Antiviral Therapy.** in press
 - 10) Ghosh AK, Leshchenko-Yashchuk S, Anderson DD, Baldrige A, Noetzel M, Miller HB, Tie Y, Wang YF, Koh Y, Weber IT, **Mitsuya H** 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 (2009).
 - 11) Fujimoto H, Higuchi M, Watanabe H, Koh Y, Ghosh AK, **Mitsuya H**, Tanoue N., Hamada A, and Saito H. 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 (2009).
 - 12) Ghosh, A.K., Gemma, S., Simoni, E., Baldrige, A., Walters, D.E., Ide, K., Tojo, Y., Koh, Y., Amano, M., and **Mitsuya, H.** Synthesis and biological evaluation of novel allophenylnorstatine-based HIV-1 protease inhibitors incorporating high affinity P2-ligands. **J. Med. Chem.** 20: 1241-6 (2009).
 - 13) Michailidis, E., Bruno Marchand, B., Ei-Ichi Kodama, E-I., Kamlendra Singh, K., Matsuoka, M., Ashida, N., Kirby, K., Ryan, E.M., Sawani, A.M., 1, Eva Nagy, E., **Mitsuya, H.**, Parniak, M.P., and Sarafianos, S.G. 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 (2009).
 - 14) Das, D., Koh, Y., Tojo, Y., Ghosh, A.K., and **Mitsuya, H.** 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 (2009).
 - 15) Hattori, S., Ide, K., Nakata, H., Harada, H., Suzu, S., Ashida, N., Kohgo, S., Hayakawa, H., **Mitsuya, H.**, and Okada, S. 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 (2009).
 - 16) Ghosh AK, Kulkarni S, Anderson DD, Hong L, Baldrige A, Wang YF, Chumanovich AA, Kovalevsky AY, Tojo Y, Amano M, Koh Y, Tang J, Weber IT, **Mitsuya H.** Design, Synthesis, Protein-Ligand X-ray Structure, and Biological Evaluation of a Series of Novel Macrocyclic Human Immunodeficiency Virus-1 Protease Inhibitors to Combat Drug Resistance. **J. Med. Chem.** 52: 7689-7705 (2009).
 - 17) Aoki M, David JV, Koh Y, Aoki-Ogata H, Miyakawa T, Yoshimura K, Maeda K, and **Mitsuya H.** Non-cleavage Site Gag Mutations in Amprenavir-resistant HIV-1 Predispose HIV-1 to Rapid Acquisition of Amprenavir Resistance But Delays Development of Resistance to Other Protease Inhibitors. **J Virol.** 83: 3059-3068 (2009).
 - 18) Koh Y, Das D, Leschenko S, Nakata H, Ogata-Aoki H, **Amano M**, Nakayama M, Ghosh AK and **Mitsuya H.** GRL-02031: A Novel Nonpeptidic Protease Inhibitor (PI) Containing A Stereochemically Defined Fused Cyclopentanyltetrahydrofuran (Cp-THF) Potent Against Multi-PI-Resistant HIV-1 In Vitro. **Antimicrob Agents Chemother.** 53: 997-1006 (2009).
 - 19) Nakamura M, Hamasaki T, Tokitou M, **Baba M**, Hashimoto Y, Aoyama H. Discovery of tetrahydrotetramethylnaphthalene analogs as adult T-cell leukemia cell-selective proliferation inhibitors in a small chemical library constructed based on multi-template hypothesis. **Bioorg. Med. Chem.** 17: 4740-4746 (2009).

- 20) Shi M, Wang M, Okamoto M, Takao S, **Baba M**. Inhibition of porcine endogenous retrovirus (PERV) replication by HIV-1 gene expression inhibitors. **Antiviral Res.** 83: 201-204 (2009).
- 21) Wang X, Tanaka H, **Baba M**, Cheng Y-C. Study of the retention of metabolites of 4'-Ed4T, a novel anti-HIV-1 thymidine analog, in cells. **Antimicrob. Agents Chemother.** 53: 3317-3324 (2009).
- 22) Kubota Y, Ishizaki N, Kaneda Y, Haraguchi K, Odanaka Y, Tanaka H, Kato N, **Baba M**, Balzarini J. Synthesis and antiviral evaluation of 4'-alkoxy analogues of 9-(β -D-xylofuranosyl)adenine. **Antiviral Chem. Chemother.** 19: 201-212 (2009).
- 23) Yang G, Paintsil E, Dutschman GE, Grill SP, Wang C-J, Wang J, Tanaka H, Hamasaki T, **Baba M**, Cheng Y-C. Impact of novel human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase mutations P119S and T165A on 4'-ethynylthymidine analog resistance profile. **Antimicrob. Agents Chemother.** 53: 4640-4646 (2009).
- 24) Kumamoto H, Haraguchi K, Ida M, Nakamura KT, Kitagawa Y, Hamasaki T, **Baba M**, Shimbara-Matsubayashi S, Tanaka H. Synthesis of (\pm)-4'-ethynyl-5',5'-difluoro-2',3'-dehydro-3'-deoxycarbocyclic thymidine: a difluoromethylidene analogue of promising anti-HIV agent Ed4T. **Tetrahedron** 65: 7630-7636 (2009).
- 25) Izumi K, Kodama E, Shimura K, Sakagami Y, Watanabe K, Ito S, Watabe T, Terakawa Y, Nishikawa H, Sarafianos S. G, Kitaura K, Oishi S, Fujii N, **Matsuoka M**. Design of peptide-based inhibitors of HIV-1 strains resistant to T-20. **J. Biol. Chem.** 284(8): 4914-4920 (2009).
- 26) Ueno M, Kodama E.N, Shimura, K, Sakurai Y, Kajiwara K, Sakagami, Y, Oishi S, Fujii N, **Matsuoka M**. Synonymous mutations in stem-loop III of Rev responsive elements enhance HIV-1 replication impaired by primary mutations for resistance to enfuvirtide. **Antiviral Res.** 82(1): 67-72 (2009).
- 27) Naito T, Izumi K, Kodama E, Sakagami Y, Kajiwara K, Nishikawa H, Watanabe K, Sarafianos S.G, Oishi S, Fujii N, **Matsuoka M**. SC29EK, a peptide fusion inhibitor with enhanced α -helicity, inhibits replication of human immunodeficiency virus type 1 mutants resistant to enfuvirtide. **Antimicrob. Agents Chemother.** 53(3): 1013-1018 (2009).
- 28) Michailidis E, Marchand B, Kodama EN, Singh K, **Matsuoka M**, Kirby KA, Ryan EM, Sawani AM, Nagy E, Ashida N, Mitsuya H, Parniak MA, Sarafianos SG. Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine triphosphate, a translocation defective reverse transcriptase inhibitor. **J. Biol. Chem.** 284:35681-32691 (2009).
- 29) Nishikawa H, Nakamura S, Kodama E, Ito S, Kajiwara K, Izumi K, Sakagami Y, Oishi S, Ohkubo T, Kobayashi Y, Otaka A, Fujii N, **Matsuoka M**. Electrostatically constrained alpha-helical peptide inhibits replication of HIV-1 resistant to enfuvirtide. **Int J Biochem Cell Biol.** 41(4): 891-899 (2009).
- 30) 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(3): 115-121 (2009).
- 31) Oishi S, Ito S, Nishikawa H, Tanaka M, Ohno H, Otaka A, Izumi K, Kodama E, **Matsuoka M**, Fujii N. Development of a novel fusion inhibitor against T-20-resistant HIV-1. **Adv Exp Med Biol** 611:389-91 (2009).
- 32) Oishi S, Kamitani H, Kodera Y, Watanabe K, Kobayashi K, Narumi T, Tomita K, Ohno H, Naito T, Kodama E, **Matsuoka M**, Fujii N. Peptide bond mimicry by (E)-alkene and (Z)-fluoroalkene peptide isosteres: synthesis and bioevaluation of alpha-helical anti-HIV peptide analogues. **Org Biomol Chem** 7: 2872-7 (2009).
- 33) Oishi S, Kodera Y, Nishikawa H, Kamitani H, Watabe T, Ohno H, Tochikura T, Shimane K, Kodama E, **Matsuoka M**, Mizukoshi F, Tsujimoto H, Fujii N. Design and synthesis of membrane fusion inhibitors against the feline immunodeficiency virus. **Bioorg Med Chem** 17: 4916-4920 (2009).

- 34) Watabe T, Terakawa Y, Watanabe K, Ohno H, Nakano H, Nakatsu T, Kato H, Izumi K, Kodama E, **Matsuoka M**, Kitaura K, Oishi S, Fujii N. X-ray crystallographic study of an HIV-1 fusion inhibitor with the gp41 S138A substitution. **J Mol Biol.** 392: 657-665 (2009).
- 35) Kajiwara K, Watanabe K, Tokiwa R, Kurose T, Ohno H, Tsutsumi H, Hata Y, Izumi K, Kodama E, **Matsuoka M**, Oishi S, Fujii N. Bioorganic synthesis of a recombinant HIV-1 fusion inhibitor, SC35EK, with an N-terminal pyroglutamate capping group. **Bioorg Med Chem.** 17: 7964-7970 (2009).
- 36) Tanaka M, Kajiwara K, Tokiwa R, Watanabe K, Ohno H, Tsutsumi H, Hata Y, Izumi K, Kodama E, **Matsuoka M**, Oishi S, Fujii N. Bioorganic synthesis of end-capped anti-HIV peptides by simultaneous cyanocysteine-mediated cleavages of recombinant proteins. **Bioorg Med Chem.** 17: 7487-7492 (2009).
- 37) 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).
- 38) 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).
- 39) 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).
- 40) 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).
- 41) 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).
- 42) 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
- 43) 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).
- 44) Hatada, M., Yoshimura, K., Harada, S., Kawanami, Y., Shibata, J., and **Matsushita, S.** : HIV-1 evasion of a neutralizing anti-V3 antibody involves acquisition of a potential glycosylation site in V2. **J. Gen. Virol.** in press

Ⅱ. 分担研究報告書

細胞傷害性T細胞を用いた逃避ウイルスの抑制をめざした免疫治療の基礎研究

研究分担者 滝口 雅文 熊本大学エイズ学研究センター ウイルス制御分野 教授

研究協力者 岡 慎一 国立国際医療センター エイズ治療・研究開発センター センター長

研究要旨 Gag28-37 特異的 CTL の逃避変異である Gag28-3R に対して交差反応する CTL が見られたが、WT ウイルスや 3R 変異ウイルスを感染させた細胞に対する認識は低下していた。生体内で 3R 変異ウイルスを排除する力は弱い、逃避変異ウイルスを抑制する可能性は残された。一方、新たに HLA-B*4801 拘束性 CTL から逃避するエピトープを新たに同定した。

A. 研究目的

最近の我々の研究により、いくつかの強い HIV 増殖抑制能をもった CTL からの逃避するウイルスの蓄積が世界的レベルで明らかになった。これは、単に HIV-1 の増殖抑制能をもつ CTL では治療法が困難なことを示している。そこで、既に知られている逃避変異エピトープに対する新たな CTL の誘導がどの程度起きているかを調べた。また新たな逃避変異エピトープの同定を試みた。

B. 研究方法

1. HLA-A*2402 拘束性 Gag28-36 特異的 CTL の逃避変異の解析

HLA-A*2402 をもった HIV-1 慢性感染患者 PBMC から Gag28-36 ペプチドで特異的 CTL を誘導し、限界希釈法により特異的 CTL クローンを作成する。これらの CTL クローンの抗原特異性を Gag28-36 ペプチドおよび Gag28-3R 変異ペプチドを用いて解析する。さらに Gag28-3R 変異を持った NL-432 ウイルスを作製して、感染細胞に対する細胞傷害活性を調べる。

2. 新たな逃避変異の同定

アジア人特に日本人に多い HLA アリールである HLA-B*5401 拘束性エピトープに関して逃避エピトープを調べるために、我々が以前に報告した 5つのエピトープ部位の HIV のシークエンス解析をした。HLA-B*4801 を保有しているか、していないかで、変異の頻度が有意に高いかを調べた。有意に高い変異は、特異的な CTL によって認識され

ないかを、合成ペプチドを作製し調べた。さらに変異が入った HIV を作製し、変異ウイルスを認識できないかあるいは認識が低下するかを調べた。（倫理面への配慮）

患者の血液の使用については、インフォームドコンセントをおこない書面にて承諾を得た。さらに、国立国際医療センターおよび熊本大学の倫理委員会での承認を得た。

C. 研究結果

1. HLA-A*2402 拘束性 Gag28-36 特異的 CTL の逃避変異の解析

患者 KI-092 から確立した CTL クローンは、ワイルドタイプの Gag28-36 ペプチド (WT) をパルスした細胞に対しては強い細胞傷害活性を示したが、逃避変異ペプチドをパルスした細胞は全く細胞傷害を示さなかった。一方、患者 KI-091 から確立した CTL クローンは、ワイルドタイプの Gag28-36 ペプチド (WT) をパルスした細胞に対しては同程度の強い細胞傷害活性を示し、また逃避変異ペプチドをパルスした細胞に対しても細胞傷害を示した。WT と 3R ウイルスを感染させた細胞に対する細胞傷害活性を調べたところ、KI-092 から確立した CTL クローンは、WT 感染細胞のみに強い細胞傷害活性を示したが、3R ウイルスを感染させた細胞には細胞傷害活性を示さなかった。一方、KI-091 から確立した CTL クローンは、両方のウイルス感染細胞に対して弱い細胞傷害活性を示した (図1)。

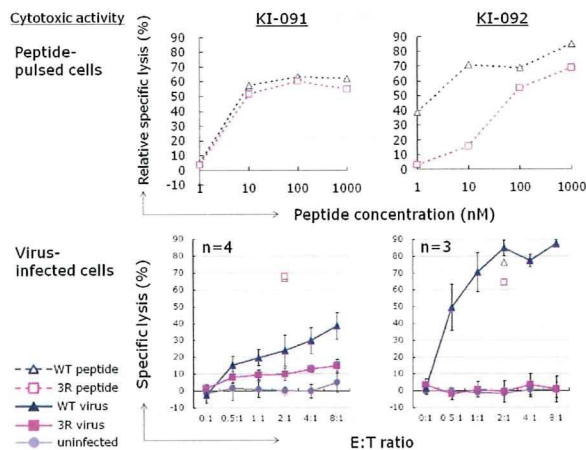


図 1

2. HLA-B*5401 拘束性の逃避変異エピトープの同定

5つの HLA-B*5401 拘束性 CTL エピトープを解析したところ、Pol154-162 のエピトープ部位に HLA-B*5401 を保有している患者と保有していない患者で有意な差が見られた。7番目の位置のアミノ酸がEからDへの変異が見られた(図2)。

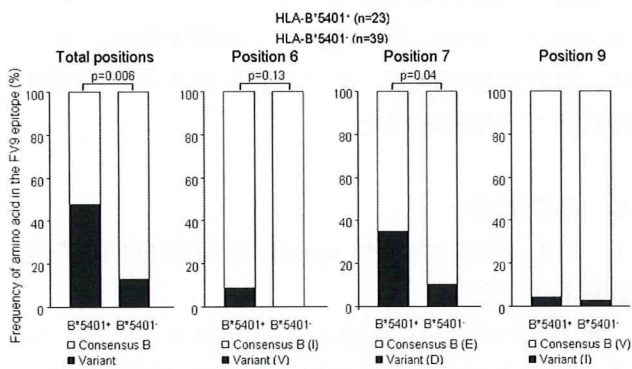


図 2

Pol154-162 特異的 CTL の Pol154-7D ペプチドに対する反応性を調べたところ、WT ペプチドと比べて著しく低下していることが明らかになった(図3)。また、7D の変異を持ったウイルスを作製し、この変異ウイルスを感染させた細胞に対する細

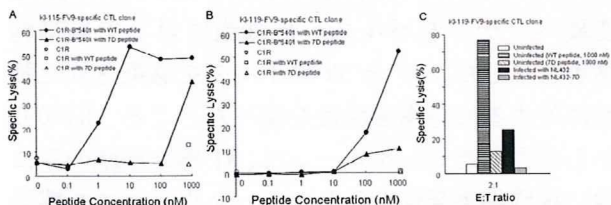


図 3

胞傷害性活性を調べたところ、活性が見られなかった(図3)。

以上の結果から、7D 変異は逃避変異であることが明らかになった。

D. 考察

我々は以前に HLA-A*2402 拘束性 Nef138 特異的 CTL が、9F 逃避変異を誘導し、この逃避変異に対して新たに CTL が誘導されることを明らかにした。しかしこの新たな CTL は、9F 変異ウイルス感染細胞に対して細胞傷害活性は、低下していることが明らかになった。今回の研究で明らかにした Gag28-36 特異的 CTL も同様に、3R 変異ウイルスに対しての細胞傷害活性は認められるも、WT ウイルス感染細胞に対する細胞傷害活性は WT 特異的 CTL 明らかに低下していた。しかしながら、Nef138 特異的 CTL と比べて逃避変異ウイルス感染細胞に対する細胞傷害活性が比較的やや高く、体内である程度働いている可能性も否定できない。細胞傷害活性ではなく、ウイルス増殖抑制能等を検討してみる必要がある。

新たに今回 HLA-B*5401 拘束性 CTL エピトープの一つに逃避変異エピトープを同定した。この逃避変異エピトープに対する CTL の認識を解析している。

E. 結論

- Gag28-3R 逃避変異と Gag28 に交差反応する CTL の HIV-1 感染細胞に対する反応は低下したが、Gag28-3R 感染細胞に対する細胞傷害活性が見られた。
- HLA-B*5401 拘束性エピトープ Pol154-162 の変異エピトープ Pol154-7D (7番目がEからDへの変異) が逃避エピトープと同定された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Murakoshi, H., Kitano, M., Akahoshi, T., Kawashima, Y., Dohki, S., Oka, S., and Takiguchi, M. Identification and characterization of 2 HIV-1 Gag immunodominant epitopes restricted by Asian HLA allele HLA-B*4801. *Hum. Immunol.* 70:170-174, 2009.
- Kawashima, Y., Pfafferott, K., Frater, J., Matthews, P., Payne, R., Addo, M., Gatanaga, H., Fujiwara, M., Hachiya A., Koizumi, H., Kuse, N., Oka, S., 他 29 名, Takiguchi, M.*, and Goulder, P.*

- (*equally contributed). Adaptation of HIV-1 to HLA I. *Nature*. 458: 641-645, 2009.
- 3) Koizumi, H., Iwatani, T., Tanuma, J., Fujiwara, M., Izumi, T., Oka, S., and Takiguchi, M. Escape mutation selected by Gag28-36-specific cytotoxic T cells in HLA-A*2402-positive HIV-1-infected donors. *Microbes Infect.* 11:198-204, 2009.
 - 4) Zheng, N., Fujiwara, M., Ueno, T., Oka, S., and Takiguchi, M. Strong ability of Nef-specific CD4+ cytotoxic T cells to suppress HIV-1 replication in HIV-1-infected CD4+ T cells and macrophages. *J. Virol.* 83: 7668-7677, 2009.
 - 5) Motozono, C., Yanaka, S., Tsumoto, K., Takiguchi, M., and Ueno, T. Impacts of intrinsic cooperative thermodynamics of peptide-MHC complexes on antiviral activity of HIV-specific cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.* 182: 5528-5536, 2009.
 - 6) Hashimoto, M., Kitano, M., Honda, K., Koizumi, H., Dohki, S., Oka, S., and Takiguchi, M. Selection of escape mutation by Pol154-162-specific cytotoxic T cells among chronically HIV-1-infected HLA-B*5401-positive individuals. *Hum. Immunol.* 71: 123-127, 2010
 - 7) Gatanaga, H., Ode, H., Atsuko Hachiya, A., Hayashida, T., Sato, H., Takiguchi, M., and Oka, S. Impact of human leukocyte antigen-B*51-restricted cytotoxic T-lymphocyte pressure on mutation patterns of nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance. *AIDS* in press
 - 8) Sakai, K., Gatanaga, H., Takata, H., Oka, S., and Takiguchi, M. Comparison of CD4+ T-cell-subset distribution in chronically infected HIV+ patients with various CD4 nadir counts. *Microbes Infect.* in press
 - 9) Koizumi, H., Hashimoto, M., Fujiwara, M., Murakoshi, H., Chikata, T., Borghan M. A., Hachiya, A., Kawashima, Y., Takata, H., Ueno, T., Oka, S., and Takiguchi, M. Different *in vivo* effects of HIV-1 immunodominant epitope-specific CTLs on selection of escape mutant viruses. *J. Virol.* in press.
- Pol-specific CD8+ T cells in chronically HIV-1-infected Japanese cohort, 10th Kumamoto AIDS Seminar- GCOE joint International Symposium (Kumamoto, Japan) Sep. 28-29, 2009
- 2) Hashimoto, M., Kitano, M., Honda, H., Koizumi, H., Dohki, S., Oka, S., Takiguchi, M. Selection of escape mutation by Pol154-162-specific cytotoxic T cells among chronically HIV-1-infected HLA-B*5401-positive individuals, 10th Kumamoto AIDS Seminar- GCOE joint International Symposium (Kumamoto, Japan) Sep. 28-29, 2009
 - 3) Takiguchi, M. HLA-B*5101 and HIV infection, 10th Kumamoto AIDS Seminar- GCOE joint International Symposium (Kumamoto, Japan) Sep. 28-29, 2009
 - 4) Murakoshi, H., Gatanaga, H., Koyanagi, M., Oka, S., and Takiguchi, M. Control of HIV-1 by HIV-1 Pol-specific CD8+ T cells in chronically HIV-1-infected Japanese cohort, AIDS Vaccine 2009 (Paris, France) Oct. 19-22, 2009
 - 5) Sakai, K., Gatanaga, H., Oka, S., Takiguchi, M. An impact of nadir CD4 counts on skewed frequency distributions of functional subsets in peripheral CD4+ T cells in patients chronically infected with HIV-1, AIDS Vaccine 2009 (Paris, France) Oct. 19-22, 2009

H. 知的所有権の出願・取得状況

該当なし

2. 国際学会での発表

- 1) Murakoshi, H., Gatanaga, H., Koyanagi, M., Oka, S., and Takiguchi, M. Control of HIV-1 by HIV-1

病態に影響を与える HLA 分子の解析

研究分担者 湯永 博之 国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センター治療開発室長
研究協力者 村越 勇人 熊本大学エイズ学研究センターウイルス制御分野
小柳 円 熊本大学エイズ学研究センターウイルス制御分野
岡 慎一 国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センターセンター長
滝口 雅文 熊本大学エイズ学研究センターウイルス制御分野教授

研究要旨 細胞傷害性 T 細胞 (CTL) は HIV 感染のコントロールに重要な役割を果たしており、CTL の解析を行うことは AIDS 発症機構の解明や AIDS ワクチンの開発にとってきわめて重要であると考えられる。アジアではこのような解析はまだ行われていない。そこで本研究では、日本の 158 人の無治療慢性 HIV-1 感染者における HIV-1 特異的 CTL 応答の magnitude と breadth の解析を行った。HIV-1 特異的 CTL 反応は、nef、gag、pol 領域を網羅した 11-mer overlapping peptide cocktail に対する CD8T 細胞の反応を IFN- γ ELISPOT assay 法によって測定することで評価した。nef、gag、pol 領域に対する CTL 反応の total magnitude を解析した結果、gag と pol における total magnitude が nef よりも有意に高いことが示された。Pol 特異的 CTL 反応の total magnitude は低いウイルス量ならびに高い CD4T 細胞数と有意に相関し、さらに、Pol 反応の breadth は低いウイルス量と有意に相関していた。日本人感染者では pol 特異的 CTL が HIV-1 感染のコントロールに大きく影響していると考えられた。

A. 研究目的

細胞傷害性 T 細胞 (CTL) は HIV 感染のコントロールに重要な役割を果たしており、CTL の解析を行うことは AIDS 発症機構の解明や AIDS ワクチンの開発にとってきわめて重要であると考えられる。Philip Goulder らのグループが南アフリカの約 600 人の HIV-1 感染者における HIV-1 特異的 CTL 反応の解析を行った結果、gag に対する反応が最も強く起っており、この反応が HIV-1 増殖抑制に関連していることが示された (Nat. Med. 2007;13 46-53)。しかしながら、アジアではこのような解析はまだ行われていない。そこで本研究では、日本の 158 人の無治療慢性 HIV-1 感染者における HIV-1 特異的 CTL 応答の magnitude と breadth の解析を行った。

B. 研究方法

HIV-1 特異的 CTL 反応は、nef、gag、pol 領域を網羅した 11-mer overlapping peptide cocktail に対する CD8T 細胞の反応を IFN- γ ELISPOT assay 法に

よって測定することで評価した。

(倫理面への配慮)

国立国際医療センターの症例の CTL 反応を解析した。HLA の解析と CTL 反応の解析について、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。個人情報を守るため、個人を特定できるような情報は外部には出さない。

C. 研究結果

nef、gag、pol 領域に対する CTL 反応の total magnitude を解析した結果、gag (Median: 3,451 spots/ 10^6 cells、 $p < 0.0001$) と pol (3,298、 $p < 0.0001$) における total magnitude が nef (804) よりも有意に高いことが示された (図 1)。Pol 特異的 CTL 反応の total magnitude は低いウイルス量 ($r = -0.175$ 、 $p = 0.028$) (図 2) ならびに高い CD4T 細胞数 ($r =$

0.184, $p = 0.021$) (図 3) と有意に相関していたが、*gag*、*nef* では相関していなかった。さらに、*Pol* 反応の breadth は低いウイルス量 ($r = -0.122$, $p = 0.026$) に有意に相関していた (図 4) が、*gag*、*nef* では相関していなかった。

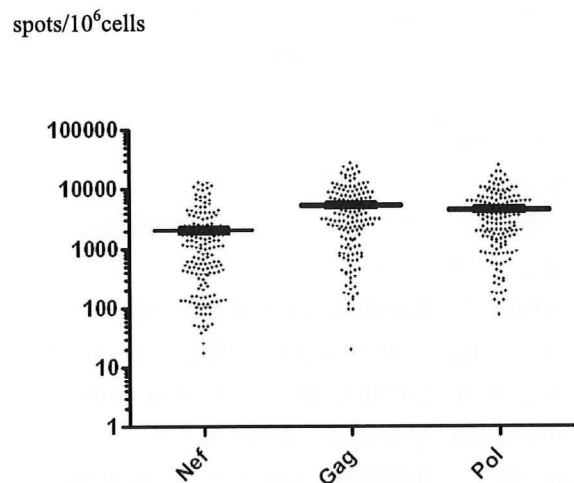


図 1. *nef*, *gag*, *pol* 領域に対する CTL 反応の total magnitude

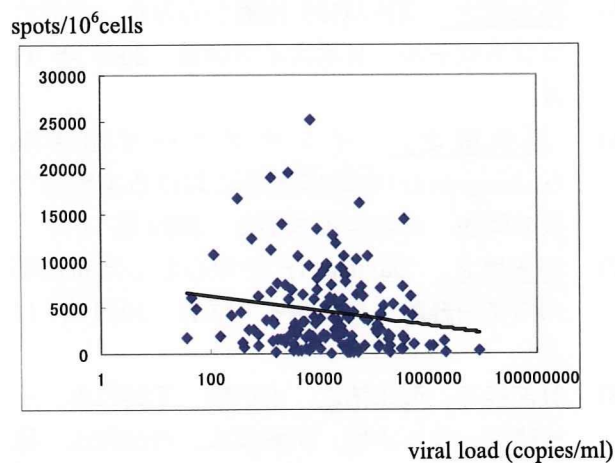


図 2. *pol* 特異的 CTL の反応の total magnitude とウイルス量の相関

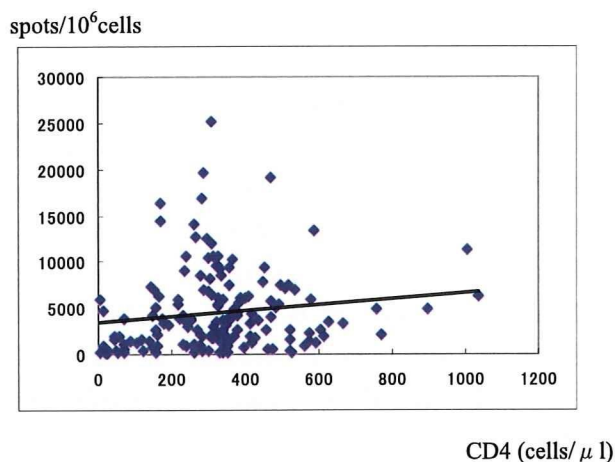


図 3. *pol* 特異的 CTL の反応の total magnitude とウイルス量の相関

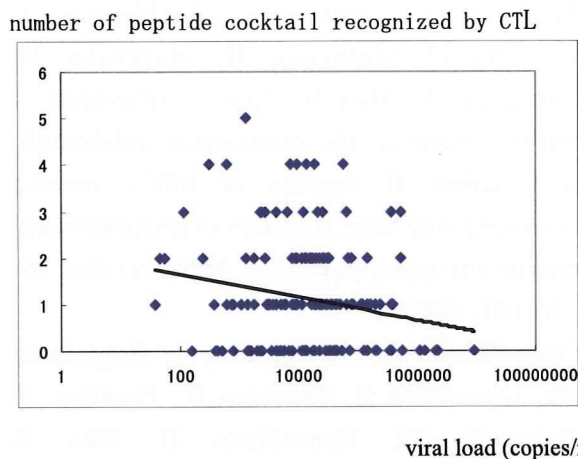


図 4. *pol* 特異的 CTL の反応の breadth とウイルス量の相関

D. 考察

これらの結果から、日本人 HIV-1 感染者では *pol* 特異的 CTL が HIV-1 感染のコントロールに大きく影響していると考えられた。

E. 結論

3 年計画の 1 年目であるが、順調な結果が得られていると言える。

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) 瀧永博之. 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、瀧永博之、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、瀧永博之、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、瀧永博之、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) 瀧永博之. 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) 瀧永博之. 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) 瀧永博之. 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、瀧永博之、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、桑原健、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、瀧永博之、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、瀧永博之、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、瀧永博之、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、瀧永博之、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、瀧永博之、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、瀧永博之、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、瀧永博之、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、瀧永博之、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、瀧永博之、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、瀧永博之、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、瀧永博之、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、瀧永博之、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、瀧永博之、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、瀧永博之、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、
瀧永博之、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

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

分担研究報告書

HIV の薬剤耐性発現に抵抗する強力な抗 HIV 阻害剤の研究・開発と 新しいクラスの抗 HIV 阻害剤に対する薬剤耐性発現機序の解明

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）

研究実施期間：平成 21 年 4 月 1 日～平成 22 年 1 月 31 日

研究分担者 天野 将之（熊本大学 エイズ学研究センター・COE リサーチ・アソシエイト）

研究実施期間：平成 22 年 2 月 1 日～平成 22 年 3 月 31 日

研究要旨

我々のグループは 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-216A, -286A 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。また、新規開発中の HIV-1 逆転写酵素阻害剤である 4'-Ethinyl-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 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。

A. 研究目的

ヒト免疫不全ウイルス（HIV-1）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その多くが交差耐性であっ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発揮し、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い薬剤、発現しても他薬剤との交差耐性を有しない新規の PIs や RTI、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) 検討中の化合物の抗 HIV-1 活性評価及びより有望な化合物の開発・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。