

させるためにレトロウイルスおよびアデノウイルスベクターを用いる方法をとることにした。現在、ベクターの構築は終了し、ウイルス力価の最適化などを行っている。

4. 考察

細胞内における酵素の反応効率についてモデル反応系において 10%程度と活性はそれほど高くないことを示している。この原因として、酵素活性ドメインの最適化の必要性が第一に挙げられる。一般に原核生物由来の酵素を哺乳類細胞で用いる場合、活性の低下が顕著に見られる場合が多い。その原因について多くは明らかにされていないが、翻訳後修飾が要因となっている可能性が示唆される。つまり、原核細胞中では受けない化学的修飾をタンパク質が受けることで活性が低くなる。現在用いている Tn3 も原核生物由来の酵素ドメインである。従って、このような翻訳後修飾について確認する必要がある。また、DNA 結合タンパク質については標的配列周辺のクロマチン構造が結合の障壁になる可能性が考えられる。現在、この可能性を排除するために ChIP アッセイに取り組んでいる。酵素活性に及ぼす負の効果は上記の 2 要素が大きいと考えられる。今後の研究においてこれらの影響が見られない場合は酵素ドメイン自体の活性が低いためであると考えられるため、分子進化法によってアミノ酸配列を最適化した高い活性を持つ酵素ドメインを見出すことが重要になると考えられる。

5. 自己評価

1) 達成度について

当初の研究計画と比較して進んでいる点としてレポーター細胞および感染細胞を用いた評価系が迅速に構築できたこと、*gag*配列以外に LTR 配列を新たな標的として見出せたことが挙げられる。分子進化法を用いた酵素活性の向上について本年度は成果が挙げられなかったが、現状で我々が有する酵素ドメインでもある程度の酵素活性を確認できたため、より高活性なドメインを見出すことでより良い結果を得られると考えている。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

本研究計画で提案している感染細胞からの直接的な HIV プロウイルス遺伝子の除去という概念はこれまでのエイズ治療法とは異なる戦略に基づくものであり、新たな治療法の一つとしてブレークスルーをもたらすと期待できる。現在の HIV 感染症に対する主な治療法として行われている核酸系逆転写酵素阻害剤、非核酸系逆転写酵素阻害剤、プロテアーゼ阻害剤の組み合わせによる多剤併用療

法において問題となる (1) 長期にわたる薬剤の服用による副作用、(2) 薬剤耐性株の出現、(3) 高額な薬剤費用といった多様な問題点がこの治療法の成功によって克服することが可能であると考えられる。本研究で得られる成果は、エイズの根治へ向けた治療法の展開、もしくは感染細胞が大幅に減少することで体内ウイルス量が劇的に減少する可能性も期待され、阻害剤との併用療法を行う場合も薬剤の利用が大幅に減少する治療法の展開が十分に期待される。以上のことより、厚生労働行政が課題として掲げる医療費抑制目標に貢献することが期待される。また、本研究で確立する遺伝子を標的とした治療法は遺伝子に関係する様々な疾病に対して応用が可能であるため、先端的医療の発展として医療・福祉の向上に寄与すると期待できる。

3) 今後の展望について

組み換え反応による感染細胞からのプロウイルス遺伝子の切除を評価するために必要な実験系は本年度までに全て構築されたため、最終年度においては酵素ドメインの活性向上に焦点を絞って研究を進めることで当初の研究計画の目的を達成できると考えられる。将来的な実用に向けた視点に立った場合、遺伝子のデリバリー方法などの点で解決すべき課題がある。

6. 結論

本年度の取り組みとして実験系を大腸菌内から哺乳類細胞へと拡張できた点で大きな進展があった。今後は哺乳類細胞における反応効率に影響を与えている要素を同定する、もしくはより活性の高い酵素ドメインを見出すことで酵素活性の向上が望めると考えられる。

7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

1.

出願： 2009 年 5 月 18 日 番号 特願 2009-120352
名称：HIV 立体構造認識抗体誘導ペプチド抗原、及びその合成方法

発明人：玉村啓和、中原徹、野村渉

出願人：国立大学法人東京医科歯科大学

2.

出願： 2009 年 7 月 6 日 番号 特願 2009-159771
名称：ケモカインレセプター CXCR4 の二価型アンタゴニストの創製とがん細胞のイメージング方法の開発

発明人：玉村啓和、野村渉、鳴海哲夫、田中智博

出願人：国立大学法人東京医科歯科大学

研究発表

研究代表者

野村 渉

- 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. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20: 354-358, 2010.
- 2) Tsutsumi, H., Nomura, W., Yamamoto, Y., Tamamura, H. (11名中 2番目) Fluorogenically Active Leucine Zipper Peptides as New Tag-Probe Pairs for Protein Imaging in Living Cells. *Angew. Chem., Int. Ed.* 48: 9164-9166, 2009.
- 3) Tanaka, T., Nomura, W., Fujii, N., Tamamura, H. (12名中 2番目) Structure-activity relationship study on artificial CXCR4 ligands possessing the cyclic pentapeptide scaffold: the exploration of amino acid residues of pentapeptides by substitutions of several aromatic amino acids. *Org. Biomol. Chem.* 7: 3805-3809, 2009.
- 4) Ohashi, N., Nomura, W., Kato, M., Narumi, T., Lewin, N. E., Blumberg, P. M., Tamamura, H. Synthesis of protein kinase C delta C1b domain by native chemical ligation methodology and characterization of its folding and ligand binding. *J. Pept. Sci.* 15: 642-646, 2009.

研究課題:「薬剤耐性 HIV の動向把握のための調査体制確立及びその対策に関する研究」

課題番号:H19-エイズ一般-007

研究代表者:杉浦 互(国立感染症研究所 エイズ研究センター 研究員)

研究分担者:石ヶ坪良明(横浜市立大学医学部医学部 教授)、伊藤俊広((独)国立病院機構仙台医療センター 血液内科 医長)、上田幹夫(石川県立中央病院 血液病治療部 部長)、内田和江(埼玉県衛生研究所 専門研究員)、太田康男(帝京大学医学部 内科学講座)、加藤真吾(慶應義塾大学医学部微生物免疫学教室 助教)、鴻永博之(国立国際医療センター エイズ治療・研究開発センター 室長)、木村昭郎(広島大学原爆放射線医学研究所ゲノム疾患治療研究部門 血液内科 教授)、栗原 健((独)国立病院機構南京都病院 薬剤科科長)、小池隆夫(北海道大学大学院医学研究科病態制御学講座 教授)、近藤真規子(神奈川県衛生研究所 微生物部 主任研究員)、貞升健志(東京都健康安全研究センター 微生物部 副参事)、佐藤武幸(千葉大学医学部附属病院感染症管理治療部 准教授)、白坂琢磨((独)国立病院機構大阪医療センター HIV/AIDS 先端医療開発センター センター長)、巽 正志(国立感染症研究所 エイズ研究センター 第2室 室長)、健山正男(琉球大学大学院医学研究科感染症制御学講座 准教授)、田邊嘉也(新潟大学医学部総合病院 第2内科 助教)、仲宗根 正(国立感染症研究所 エイズ研究センター 第1研究グループ 主任研究員)、西澤雅子(国立感染症研究所 エイズ研究センター 第2研究グループ 研究員)、福武勝幸(東京医科大学医学部臨床検査医学科 教授)、藤井 毅(東京大学医学研究所 先端医療研究センター 助教)、堀成美(聖路加看護大学、講師)、松下修三(熊本大学エイズ学研究会 病態制御分野 教授)、南 留美((独)国立病院機構九州医療センター 感染症対策室 医師)、森 治代(大阪府立公衆衛生研究所ウイルス科 主任研究員)

1. 研究目的

本研究班は我が国における薬剤耐性 HIV の発生動向の把握とその増加を抑制するために必要な対応を明確にすることを目的とし、その達成のために以下4項目の研究に取り組む。

(1) 薬剤耐性調査研究:これは本邦における新規 HIV/AIDS 診断症例および既治療症例における薬剤耐性 HIV の発生動向の把握と調査体制確立を目標とする研究で、薬剤耐性 HIV の現状を正確に把握するために必要である。(2) 薬剤耐性 HIV 発生機序の解析研究:これは薬剤耐性 HIV の伝播形式などの解明を目標とする研究で、調査情報の質を高め、疫学状況の理解を深めるために必要である。(3) 薬剤耐性検査の質的管理:これは薬剤耐性 HIV 検査の外部精度管理と検査標準化を目標とする研究で、全国同質の薬剤耐性検査の実施を実現するために必要な研究である。(4) 薬剤血中濃度測定研究:これは薬剤耐性血中濃度測定検査の提供と情報発信を目標とする研究で、適切な抗 HIV 療法を実践し、薬剤耐性の発生を抑えるために必要な研究である。

2. 研究方法

研究全期間を通じて協力施設を増やし調査対象の拡大を目指し、国内を網羅する調査ネットワークの完成を目指す。研究協力は研究分担者の推薦・紹介を通じて募っていく。また本研究班のホームページ(HP)を開設し、調査情報の発信と協力受付等を行う。収集する疫学情報の質と量を上げてより詳細な実態の把握を目指していく。

(1) 薬剤耐性調査研究:新規診断症例の捕捉とその薬剤耐性検査およびサブタイプピングを実施する。薬剤耐性検査については従来のプロテアーゼ(PR)と逆転写酵素(RT)領域に加えて、新薬の標的であるインテグラーゼ(IN)領域の解析も実施する。遺伝子解析方法は参加施設毎に若干の相違があるが、いずれの施設も研究班が過去に実施した2回のヴァリデーションに参加し、その精度が担保された方法を用いている。治療を受けている症例の薬剤耐性に関しては平成20年～21年にかけて新たに承認された新薬、インテグラーゼ阻害剤(INI)ラルテグラビル、プロテアーゼ阻害剤(PI)ダルナビル、非核酸系 RT 阻害剤(NNRTI)エトラビルンそして CCR5 阻害剤マラビロックの使用状況に関する調査を実施した。調査協力依頼については研究班の紹介のために開設した HP (<http://www.hiv-resistance.jp/>)にも掲載する。

(2) 薬剤耐性 HIV 発生機序の解析研究:薬剤耐性 HIV の伝播の背景を探るために、収集した症例情報(国籍、性別、感染経路、ウイルスサブタイプ、BED アッセイの結果)

を元に統計学的解析を行う。H20 年度までに開発した通常の薬剤耐性検査法では検出できない潜在する薬剤耐性ウイルスの検出法(定量 PCR 法あるいは LC/MS 法)を用いて平成20年度に新規に HIV/AIDS と診断された症例の解析を行う。通常の薬剤耐性検査(通常法)、定量 PCR 法と LC/MS 法の三法による結果を比較し、検査法の精度と潜在する薬剤耐性 HIV を検出する意義について検討する。

(3) 薬剤耐性検査の質的管理:平成20年度に研究班実用校正サンプルとして作製した感染性クローン3サンプル程度を薬剤耐性検査実施機関に送付し、其々の施設毎のプロトコルに則って薬剤耐性遺伝子検査を実施してもらう。その結果を元に平成20年度より検討して来た PR、RT、IN 領域の遺伝子配列解析の研究班推奨基準測定法の決定を行う。

(4) 薬剤血中濃度測定研究:HP(<http://www.psj.com/>)を介しての検査受付と情報発信を行う。さらに平成20年以降に承認された新規抗 HIV 薬剤の血中濃度測定法の開発と検査体制の確立を行う。その他至適治療実践のための血中濃度測定に関する臨床研究を実施する。

(倫理面への配慮)

薬剤耐性調査研究では全ての検体が匿名化されるため、万が一の情報漏えいの事態においても個人情報の流出は起こりえない。また実施に当たっては疫学研究に関する倫理指針(平成19年8月16日改定)で定めた倫理規定等を遵守すると共に必要に応じて施設ごとの倫理委員会の承認を得るものとする。薬剤耐性 HIV の発生機序に関する研究では実施にあたり臨床研究に関する倫理指針(平成16年厚生労働省告示第459号)で定めた倫理規定等を遵守するとともに、必要に応じて施設ごとの倫理委員会の承認を得るものとする。本体研究は国立感染症研究所の倫理委員会の承認を得ている。

3. 研究結果

研究班3年目として以下の成果を挙げた。

(1) 薬剤耐性調査研究:平成21年上半年期(1月～9月)で新規感染症例381例を捕捉し、そのうち44例(11.5%)の薬剤耐性症例が同定された。薬剤クラス別内訳は核酸系 RT 阻害剤(NRTI):27例(7.1%)、NNRTI:11例(2.9%)、PI:15例(3.9%)、INI:0例(0%)であった。新規薬剤の使用状況に関しては全国377施設を対象に郵送アンケートによる調査を実施し203施設7692症例について回答を得た。その結果5474症例が現在 HAART を受けており、そのうち260症例に新規薬剤が使用されていることが明らかになった。新薬使用理由としては副作用による事例が114症例と最も多く、次いで薬剤耐性による効果不良が85症例

であった。従って $85 \div 5474 = 1.6\%$ が薬剤耐性症例であることが明らかになった。この値は平成 20 年度に行った治療患者における薬剤耐性 HIV 調査結果 1.9%未満と合致するものであった。

(2)薬剤耐性 HIV 発生機序の解析研究: 集積した調査情報より本邦における薬剤耐性 HIV 伝播の背景について解析を行った。その結果、薬剤耐性 HIV の伝播はサブタイプ B 感染症例に有意に多い事が明らかになった ($p < 0.01$)。個別の耐性変異を見ていくと NRTI 耐性変異 T215X, M184V/I, NNRTI 耐性変異 K103N, PI 耐性変異 M46I/L は毎年継続的に検出されており、流行する薬剤耐性株として既に定着していると推測される。

潜在する薬剤耐性ウイルスの検出法の確立とその意義を検討するために、名古屋医療センターで平成 20 年に新規に HIV/AIDS と診断された症例 105 例について、通常法、定量 PCR 法、LC/MS 法の 3 法間の比較を行った。その結果、定量 PCR 法では 4 例 (K65R:1 例、K70R:1 例、K103N:1 例、T215X:1 例)、LC/MS 法では 11 例 (K103N:1 例、M184V:2 例、T215X:7 例、PR L90M:1 例) 通常法で検出できなかった薬剤耐性変異を同定した (下線は当該手法のみで実施)。反対に通常法のみで確認された変異は無かった。

(3)薬剤耐性検査の質的管理: 研究班実用構成サンプルとして作成した感染性クローン 3 検体を先ず、主要な薬剤耐性検査実施 4 機関 (公的機関 2 か所、検査会社 2 か所) に送付して確認後、薬剤耐性検査を自施設で実施している機関に送付した (本抄録執筆時点で外部精度管理実施中。平成 22 年 1 月中に終了予定)。

(4)薬剤血中濃度測定研究: 平成 21 年度 11 月までに 10507 件の HP へのアクセスがあり、パスワード取得者は 189 名になった。また平成 21 年度は 408 件の検査が行われた。平成 20 年に新たに承認された INI ラルテグラビルについては平成 21 年 12 月から、新規 NNRTI であるエトラピリンについては 21 年 9 月からそれぞれ測定体制が整い検査の受付を行っている。またエファビレンツの剤型がカプセルから錠剤に変更された事から、それに伴う血中濃度の動態の変化と有害事象について検討を行い、日本人における安全性を確認した。

4. 考察

HAART を受けている症例において選択・誘導された薬剤耐性 HIV による新たな感染が問題となっている。欧米諸国では新規 HIV/AIDS 症例の 10~15% に薬剤耐性変異が報告されている。我が国では平成 15 年より新規 HIV/AIDS 診断症例における薬剤耐性 HIV の動向調査を実施しているが、その結果、平成 15 年:4.9%、16 年:5.2%、17 年:7.8%、18 年:6.6%、19 年:9.7%、20 年:8.1%、21 年:11.5% と 6 年間で薬剤耐性 HIV が観察される頻度がほぼ倍増している。薬剤耐性変異には毎年一定の頻度で継続的に検出されるものがあり、このような耐性 HIV 株は既に流行株の一つとして定着したと考えられる。流行株として定着したと推測される変異 M184V は 3TC/FTC に、K103N はエファビレンツに対して高度耐性を呈する事から、初回治療前に薬剤耐性検査を実施してその有無を判定することは重要である。さらに、高感度薬剤耐性変異検出法では M184V と K103N とともに微少集族中に潜在している症例が同定されることから、流行株としての定着が疑われる耐性変異に関しては高感度法の適応についても今後その有効性を検討する必要がある。

薬剤耐性 HIV 伝播の背景因子についてはサブタイプ B 感染との有意の関連が見いだされたが、BED アッセイの結果、国籍、感染経路等では差が認められず、薬剤耐性 HIV による伝播、感染が幅広く様々な感染経路で発生している事が推測された。注目すべきは、検出される耐性変異の種類が

HAART 初期に用いられた抗 HIV 薬剤に対するものが多く、現在使用されている新規薬剤に対する耐性変異は殆どない事である。治療症例における薬剤耐性の発生頻度が 1.6% と低い我々の調査結果が示す様に、現在使用されている抗 HIV 薬剤は強力な抗 HIV 活性と薬剤耐性を獲得しにくい特性を有しており、今後治療症例における薬剤耐性症例の減少が新規診断症例における薬剤耐性にどのように影響するのか今後の動向が注目される。

5. 自己評価

1)達成度について: 新規診断症例における薬剤耐性 HIV の調査研究は、高い捕捉率により本邦の動向を正確に把握しており、調査体制の確立とともに目的を達成した。治療中の HIV/AIDS 症例における薬剤耐性の状況については、HIV/AIDS の診療に携わる医療機関の約半数の協力により、薬剤耐性 HIV による治療困難症例の頻度を正確に割り出す事に成功した。薬剤耐性 HIV の薬剤耐性 HIV 発生機序の解析研究については BED アッセイの実施率が 7 割を超えており、目標は達成したと考えている。また潜在的な薬剤耐性の検出法の開発については CDC が開発した方法の導入や、LC/MS を利用した方法を開発したが、まだ臨床検体での評価には到達しておらず、今年度の目標は完全には達成できなかった。薬剤耐性検査の標準化作業では検査標準物質と研究班推称基準測定操作法を決定し、目標は達成した。血中濃度測定研究については新規薬剤の測定法が全て完成し、臨床現場においても活用されており目的は達成した。以上本研究班の目的は完全に達成していると考えている。

2)研究成果の学術的・国際的・社会的意義について: 新規 HIV/AIDS 診断症例における薬剤耐性 HIV 調査は各国で行われているが、捕捉率が半数近くに達するような調査研究は我々の研究班のみである。HIV 感染症の伝播病態等を理解し、感染モデルの構築、病原性等の変化について研究するうえで学術的に貴重な情報である。また HIV 感染症の拡大予防対策などの戦略を立てる上でも重要な情報であり、その社会的意義は大きい。薬剤耐性検査の質的管理研究は、国内何処でも同質の薬剤耐性検査を受けられる検査耐性を実現させ、その臨床的・社会的意義は大きい。治療薬剤血中濃度測定はアドヒアランスを維持し至適治療を行う上での有用な情報として臨床現場で活用されており、その社会的意義は大きい。

3)今後の展望について: 薬剤耐性調査研究では「外国人」と「女性」の捕捉率が動向委員会で報告されている集団より少ない傾向にある。今後はこのような偏りを補正する形で参加・協力施設を充実させたい。平成 20 年度にはインテグラーゼ阻害剤など多くの新規薬剤が承認された。我々の調査では新薬の処方数は急速に増えており、今後これら新規薬剤に対する薬剤耐性の動向を監視する事が重要である。薬剤耐性 HIV や血中濃度測定などの治療を進める上で有益な情報をホームページ上で引き続き発信していきたい。

6. 結論

新規 HIV/AIDS 診断症例および治療中の症例の薬剤耐性の調査を実施した。薬剤耐性検査の標準化作業を完成させた。血中濃度測定に関しては検査の受付と HP での情報公開を行った。

7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む) 該当なし

研究発表

研究代表者

杉浦 互

- 1) 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*. 10(1): 360, 2009
- 2) 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*. 106(46): 19539-44, 2009
- *3) Hattori, J., S. Yoshida, H Gatanaga, M Kondo, K Sadamasu, T Shirasaka, H Mori, R Minami, W Sugiura, the Japanese Drug Resistance HIV-1 Surveillance Network. Increasing Prevalence of Drug-resistance Mutations among Treatment-naïve HIV-infected Patients in Japan, 2003 to 2007. The 16th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Montreal, Canada, 2009
- *4) 服部純子、潟永博之、杉浦互 他 53名 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. 第23回日本エイズ学会学術総会, 2009年、名古屋
- 5) 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 薬使用に関する緊急全国調査. 第23回日本エイズ学会学術総会, 2009年、名古屋

*班員全員が共著者となっている。

研究分担者

石ヶ坪良明

- 1) 須田昭子、上田敦久、安達理恵、竹林早苗、小田みどり、松山奈央、筑丸寛、白井輝、石ヶ坪良明
当院における新規未治療感染者における BED assay 解析結果の検討. 第23回日本エイズ学会学術総会, 2009年、名古屋

伊藤俊広

- 1) 伊藤俊広、佐藤功、三浦明、浅黄司、佐藤麻希、佐藤ともみ. Integrase inhibitor: Raltegravir の使用で HAART が成功している多剤耐性 HIV 感染症の2例. 第23回日本エイズ学会学術総会, 2009年、名古屋

上田幹生

- 1) 上田幹生、宮田勝、小谷岳春、山下博子、安田明子、村田秀治、原田範子、片田圭一、山下美津江、山田三枝子、北志保里、辻範子、浅井いづみ、木越安奈. 北陸ブロック「職種別 HIV/AIDS 連絡・研修会」の現状と問題点

内田和江

- 1) 服部純子、潟永博之、内田和江、杉浦互 他 52名 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. 第23回日本エイズ学会学術総会, 2009年、名古屋

太田康男

- 1) Yoshino Y, Kitazawa T, Tatsuno K, Ota Y, Koike K. : Cryptococcal Pleuritis Containing a High Level of Adenosine Deaminase in a Patient with AIDS: A Case Report. *Respiration*. 79(2):153-156, 2010.
- 2) Yanagimoto S, Tatsuno K, Okugawa S, Kitazawa T, Tsukada K, Koike K, Kodama T, Kimura S, Shibasaki Y, Ota Y. An essential single amino acid of Toll-like receptor 4 that is pivotal for its signal transduction and subcellular localization. *J. Biol Chem*. 284:3513-20, 2009.

加藤真吾

- 1) Kondo, M., Sudo, K., Tanaka, R., Sano, T., Sagara, H., Iwamuro, S., Takebe Y., Imai, M., and Kato, S. Quantification of HIV-1 group M proviral DNA using TaqMan MGB real-time PCR. *J. Virol. Methods* 157(2):141-146, 2009

潟永博之

- 1) Gatanaga H, Tsukada K, Honda H, Tanuma J, Yazaki H, Watanabe T, Honda M, Teruya K, Kikuchi Y, Oka S. Detection of HIV type 1 load by the Roche Cobas TaqMan Assay in patients with viral loads previously undetectable by the Roche Cobas Amplicor Monitor. *Clinical Infectious Diseases*. Vol.48: 260-262, 2009

木村昭郎

- 1) 斉藤誠司、鍵浦文子、小川良子、藤井輝久、高田昇、木村昭郎. HIV/HBV 重複感染症における HBV に対する治療経験とその考察. 第23回日本エイズ学会学術総会, 2009年、名古屋

栗原 健

- 1) 吉野宗宏、矢倉裕輝、栗原健、坂東裕基、小川吉彦、矢嶋敬史郎、谷口智宏、大谷成人、富成伸次郎、渡邊大、上平朝子、白阪琢磨. 硫酸アタザナビルの中濃度が高値の患者を対象とした、ATV/r から ATV400 へのスイッチ臨床試験結果. *日本エイズ学会誌*, 11, 50-53, 2009.
- 2) 吉野宗宏、矢倉裕輝、栗原健、坂東裕基、小川吉彦、矢嶋敬史郎、谷口智宏、大谷成人、富成伸次郎、渡邊大、西田恭治、上平朝子、白阪琢磨. ロビナビル・リトナビル配合剤(LPV/r)の1日2回から1日1回投与へのスイッチ臨床試験結果. *日本エイズ学会誌*, 11, 250-254, 2009.

小池隆夫

- 1) Endo T, Fujimoto K, Nishio M, Yamamoto S, Obara M, Sato N, Koike T. Case report: clearance of hepatitis C virus after changing the HAART regimen in a patient infected with hepatitis C virus and the human immunodeficiency virus. *J Med Virol*. 81(6):979-82. 2009

近藤真規子

- 1) Kondo, M., Sudo, K., Tanaka, R., Sano, T., Sagara, H., Iwamuro, S., Takebe Y., Imai, M., and Kato, S. :Quantification of HIV-1 group M proviral DNA using TaqMan MGB real-time PCR, *J. Virol. Methods*. *J. Virol. Methods*, 157:146-141, 2009.

貞升健志

- 1) 貞升健志、長島真美、新開敬行、尾形和恵、仲真晶子、矢野一好: 東京都における 2007 年 HIV 検査陽性例の遺伝子学的、血清学的解析、日本エイズ学会誌、11, 27-33, 2009
- 2) 貞升健志、HIV ジェノタイプ薬剤耐性検査、医学書院、臨床検査データブック 2009-2010、551-553、2009
- 3) Akase, S., Uchitani, Y., Sohmura, Y., Tatsuta, K., Sadamasu, K., Adachi, Y., Application of Real Time PCR for diagnosis of swine dysentery, J. Vet. Med. Sci. 71: 359-362, 2009

佐藤武幸

- 1) 服部純子、湯永博之、佐藤武幸、杉浦互 他 52 名 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、第 23 回日本エイズ学会学術総会、2009 年、名古屋

白阪琢磨

- 1) 吉野宗宏、矢倉裕輝、栗原健、坂東裕基、小川吉彦、矢嶋敬史郎、谷口智宏、大谷成人、富成伸次郎、渡邊大、上平朝子、白阪琢磨: 硫酸アタザナビル血中濃度が高値の患者を対象とした、ATV/r から ATV400 へのスイッチ臨床試験結果
- 2) 白阪琢磨: HIV 感染症・エイズ治療の現状と課題、薬事日報 17-18、2009 年 7 月 6 日
- 3) 中川正法、上平朝子、橋本里奈、岸田修二、三浦義治、邢惠琴、出雲周二: HAART と NeuroAIDS、日本エイズ学会誌 11(2):81-91、2009
- 4) 今中愛子、小澤健太郎、野口史人、岡田明子、笹川淳、上平朝子、白阪琢磨、田所丈嗣: AIDS 発症と同時に顔面に出現した Chronic Ulcerative Herpes Simplex の 1 例、皮膚科の臨床、51(7):915-919、2009

巽正志

- 1) 正岡崇志、梁明秀、巽正志、杉浦互、松永智子、森下了、沢崎達也、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の基盤技術の開発、第 23 回日本エイズ学会学術総会、2009 年、名古屋

健山正男

- 1) Satoshi Toma¹, Tsuyoshi Yamashiro, Shingo Arakaki¹, Joji Shiroma¹, Tatsuji Maeshiro¹, Kenji Hibiya¹, Naoya Sakamoto³, Fukunori Kinjo⁴, Masao Tateyama¹, and Jiro Fujita¹. Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by nelfinavir and synergistic effect with interferon- α . J Viral Hepat. 16(7):506-12. 2009.
- 2) Hideta Nakamura, Masao Tateyama, Daisuke Tasato, Syusaku Haranaga, Satomi Yara, Futoshi Higa, Yuji Ohtsuki, Jiro Fujita. Clinical utility of serum β -D-glucan and KL-6 levels in Pneumocystis jirovecii pneumonia. Internal Medicine. 48, 2009.

田邊嘉也

- 1) 村山正晃、池野良、児玉泰光、川口玲、田邊嘉也、加藤真吾、高木律男. 唾液中 HIV-1 濃度が血液中よりも高かった 3 症例、第 23 回日本エイズ学会学術総会、2009 年、名古屋

福武勝幸

- 1) Central nervous system T-cell lymphoma in acquired immunodeficiency syndrome. Yotsumoto M, Funato K, Hashimoto Y, Fujimoto H, Fukutake K. Br J Haematol. Nov 13. [Epub ahead of print], 2009

藤井 毅

- 1) Miyazaki E, Kawana-Tachikawa A, Tomizawa M, Nunoya J, Odawara T, Fujii T, Shi Y, Gao GF, Iwamoto A. Highly restricted T-cell receptor repertoire in the CD8⁺ T-cell response against an HIV-1 epitope with a stereotypic amino acid substitution. AIDS. 23(6):651-60, 2009.

仲宗根 正

- 1) Murakami T, Eda Y, Nakasone T, Ami Y, Someya K, Yoshino N, Kaizu M, Izumi Y, Matsui H, Shinohara K, Yamamoto N, Honda M. Postinfection passive transfer of KD-247 protects against simian/human immunodeficiency virus-induced CD4⁺ T-cell loss in macaque lymphoid tissue. AIDS. 23:1485-94, 2009.

西澤雅子

- 1) 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簇薬剤耐性 HIV の検出と存在比率に関する研究、第 23 回日本エイズ学会学術総会、2009 年、名古屋.

松下修三

- 1) Yamada, Y., Ochiai, C., Yoshimura, K., Tanaka, T., Ohashi, N., Narumi T., Nomura, W., Harada, S., Matsushita, S. and Tamamura, H. CD4 mimics targeting the mechanism of HIV entry. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. in press.

南 留美

- 1) Minami R, Yamamoto M, Takahama S, Ando H, Miyamura T, Suematsu E. High molecular weight form of 1 adiponectin in antiretroviral drug-induced dyslipidemia in HIV-infected Japanese individuals based on in vivo and in vitro analyses. Intern Med. 48(20):1799-875, 2009
- 2) Minami R, Yamamoto M, Takahama S, Ando H, Miyamura T, Suematsu E. Human herpesvirus 8 DNA load in the leukocytes correlates with the platelet counts in HIV type 1-infected individuals. AIDS Res Hum Retroviruses. 25(1):1-8, 2009.
- 3) 南留美、高濱宗一郎、安藤仁、山本政弘. 治療後ウエスタンプロット法にて抗 HIV 抗体が陰性化し持続している HIV-1 感染症の一例 日本感染症学誌 83 巻 3 号、251-5, 2009.

森 治代

- 1) Yoko Kojima, Takuya Kawahata and Haruyo Mori, Cases of HIV type 1 acute infection at STI-related clinics in Osaka, AIDS Research and Human Retroviruses. 25 : 717-719, 2009.

研究課題：薬剤耐性 HIV の発生機序とその制御方法に関する研究

課題番号：H19- エイズ- 一般- 001

研究代表者：佐藤裕徳（国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター 室長）

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 室長）、遊佐敬介（熊本大学大学院医学薬学研究部 講師）、上野貴将（熊本大学エイズ学研究センター 准教授）、村上努（国立感染症研究所エイズ研究センター 室長）、西澤雅子（国立感染症研究所エイズ研究センター 研究官）、増田貴夫（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 准教授）、岡本尚（名古屋市立大学医学研究科 教授）、高折晃史（京都大学大学院医学研究科 講師）、足立昭夫（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 教授）、間陽子（理化学研究所 ユニットリーダー）、森川裕子（北里大学北里生命科学研究所 教授）

1. 研究目的

薬剤耐性 HIV の発生と蔓延は、HARRT の効果を減弱させる。科学的根拠に立脚した対策を講じるには、薬剤耐性 HIV に関する情報の収集と解析が不可欠である。本研究では、薬剤耐性 HIV の発生機序とその制御方法に関する情報の収集と解析を行なう。

2. 研究方法

2つの研究の柱（柱1. 薬剤耐性HIVの発生機構の研究と柱2. 薬剤耐性HIVの制御の研究）を設定し、12名で分担して情報の収集と解析を行なう。

研究代表者（佐藤）

次世代の解析手法を当該研究に応用する。

1. コンピュータを用いた計算科学の技術を用いて蛋白質の立体構造情報を収集し、分担研究を支援する。構造を基に HIV の薬剤耐性を予測する方法を研究する。

2. 次世代シーケンサーを用いたゲノム科学の技術を用い、感染者体内の HIV 変異集団（準種）を包括的に解析する方法を研究する。

研究分担者（11名）

1. 柱1では、耐性誘導実験や感染者体内の HIV の遺伝子解析等で新たな耐性変異の情報を収集する。耐性 HIV の発生機序を明らかにする。薬剤耐性 HIV の検出、治療薬選択の最適化、新たな治療薬の設計等に資する。（湯永、西澤、村上、遊佐、上野）。

2. 柱2では、最新の手法で HIV 増殖の分子機構を明らかにする。HIV/AIDS のサルモデルを構築する。耐性 HIV の感染・増殖を阻害する新たな抗 HIV 薬の開発と評価に資する（足立、増田、岡本、高折、間、森川）。

（倫理面への配慮）

ヒト由来臨床材料を使う研究は、関連機関の倫理審査会の承認を得て、提供者本人に十分な説明を行い、承諾を得た上で行った。動物実験は、研究機関の倫理審査会の審議を受け、承認を得て行った。組換え DNA 実験は、実験を実施する研究機関の承認を得て行った。

3. 研究結果

研究代表者（佐藤）

（1）耐性予測：薬剤耐性 HIV の多くは、ゲノム変異により薬剤標的分子（逆転写酵素とプロテアーゼ）の構造が変化し、薬剤親和性が低下して発生すると推察される。そこで、湯永と共同で、構造解析に基づく耐性度の予測法を検討した。コンピュータを用いて種々の変異をもつ逆転写酵素と非核酸系逆転写酵素阻害剤（NNRTI）との複合体構造を作り、結合エネルギーを求めた。結合エネルギーの予測値は、実験で求めたウイルスの NNRTI 耐性度と逆相関することを見出した。得られた複合体構造を用いて、耐性発現の分子メカニズムを明らかにした。すなわち、変異の種類によっては、薬剤結合部位での薬剤への静電的斥力および立体障害が昂進し、薬剤親和性が低下して耐性になるこ

とを明らかにした。

（2）準種解析：次世代シーケンサー（ロッシュ社 FLX 454）を用い、血液試料等より、1回のシーケンシングで〜3億塩基のウイルスゲノム情報を取得するシステムを作った。主に資金的な問題で、感染者の HIV 準種の検討には至らなかった。

研究分担者

1. 薬剤耐性 HIV の発生機構の研究（柱1）

（1）HIV 遺伝的多型の組み合わせによる耐性獲得（湯永）：未治療感染者体内に出現する変異の組み合わせで耐性が発生することを見出した。逆転写酵素の多型的変異 V106I または V179D は、単独では耐性に関与しない。どちらかの変異を持つ HIV-1 を efavirenz 存在下で増殖させ、耐性を誘導した。V106I を持つ HIV-1 から V179D が、V179D を持つ HIV-1 から V106I が出現した。V106I と V179D の両方を持つ HIV-1 は第1世代 NNRTI (efavirenz と nevirapine) に耐性を示した。一方、第2世代 NNRTI の etravirine には感受性であった。構造解析により理由を明らかにした。すなわち、etravirine は変異に応じて自身の構造を柔軟に変化させて結合親和性を維持できた。薬剤構造の柔軟性はウイルス変異に対処するための有力な物性と考えられる。

（2）Darunavir 耐性の誘導（西澤）：サルベージ療法用のプロテアーゼ阻害剤 Darunavir は、*in vitro* での耐性誘導が難しく、耐性変異の情報が少ない。M46I, I54V, V82F, L90M 変異を持ち Amprenavir, Lopinavir, Atazanavir 3 剤に耐性を示す HIV 株を用いて Darunavir の耐性誘導を行い、4 剤全てに耐性を示す株を得た。この株は、プロテアーゼ領域に新たに V32I または D30N 変異を持っていた。

（3）CXCR4 阻害剤耐性の誘導（村上）：経口投与可能で CXCR4 機能を特異的に阻害する活性を持つ KRH3955 の抗 HIV 作用を調べた。CXCR4 の変異導入解析等により、KRH3955 は、AMD3100 とは異なる部位に結合すると推察された。KRH3955 は、HIV-1 の臨床分離株と既知の薬剤耐性株に高い抗ウイルス活性を示した。

（4）治療薬変更時の HIV 準種（遊佐）：治療変更前の HIV 感染者由来のプロテアーゼを網羅的にクローニングし、HI ウイルスライブラリーを作った。これを CD4⁺T 細胞に感染させ、プロテアーゼ阻害剤存在下で1週間培養して耐性ウイルスを選択した。二例中一例で、実際の治療の結果生じた変異の種類と一致した。治療薬変更前に耐性ウイルスがマイナー準種として存在し、薬剤の選択圧下で優勢になったと推察できる。

（5）薬剤治療が CTL 逃避変異獲得に及ぼす影響（上野）：約100名の HIV 感染者（未治療および HAART、経時的）の血漿注の HIV 遺伝子配列を解析した。ウイルス蛋白質で認められた変異、感染者の HLA クラス I アリル、CTL 応答、薬剤投与歴との関連を解析した。薬剤耐性変異として知られている部位と CTL 逃避変異が直接的に重なり合う結果は観察できなかった。薬剤治療の有無で、CTL 逃避変異パターンに大きな差が認められなかったことから、CTL 逃避変異獲得に薬剤治療は影響しないものと考えられた。

2. 薬剤耐性 HIV の制御の研究 (柱 2)

新たな抗 HIV 薬の開発と評価に不可欠な HIV 増殖機構の新知見を収集し、動物モデルの開発を進めた。

(1) HIV 種特異性の発現機構 (足立) : HIV-1 は極めて宿主域が狭く、感染・発症動物モデルがない。霊長類の HIV-1 感染モデルの開発と実用化をめざす。昨年度に報告したサル指向性 HIV-1 を試験管内改変または細胞馴化により改良した。Vif とキャプシドの人為的改変により、カニクイザル個体に持続感染する能力を持つウイルス (CXCR4 指向性 MN4-5S) を得た。さらに、キャプシド内に変異をもち増殖能が昂進した CXCR4 指向性 MN4Rh-3、および CCR5 指向性株 MN5Rh-3 を得た。HIV-1 の宿主域を決定する主要なウイルス因子はキャプシドと Vif であることが明確となった。HIV-1 ゲノム改変を行いつつ、MN4Rh-3 のカニクイザルへの感染実験を実施する予定である。

(2) APOBEC3G 機能の調節機構 (高折) : 細胞の抗ウイルス蛋白質 APOBEC3G (A3G) は、シトシンをウラシルに変換してウイルスゲノム情報を攪乱し、感染性粒子の産生を阻害する。HIV の Vif 蛋白質はヒト A3G に結合して分解を促すため、HIV はヒトで増殖できる。しかし、A3G は、Thr32 のリン酸化で Vif 耐性となり、抗ウイルス活性を維持することを見出した。In silico 構造解析により、Thr32 リン酸化で Thr32 と Arg24 の側鎖間の静電的引力が増強し、Vif 結合表面の柔軟性が減じることがわかった。即ち、リン酸化による蛋白質表面の柔軟性の低下で Vif 結合能が減弱し、Vif 耐性になると推察された。この知見は、変異導入解析の結果と良く一致した。

(3) HIV ゲノム逆転写の調節機構 (増田) : HIV-1 インテグラーゼが宿主蛋白質 Gemin2 との相互作用を介してウイルスゲノムの逆転写反応を促進し、ウイルスの複製を制御することを見出した。Gemin2 は逆転写酵素とウイルス RNA の結合安定性を増強した。インテグラーゼと Gemin2 の結合を阻害するインテグラーゼ配列由来の合成ペプチドは、逆転写反応を濃度依存的に阻害し、HIV-1 複製も抑制した。

(4) HIV ゲノム情報の転写の調節機構 (岡本) : HIV の転写は Tat による正の転写制御以外に、宿主由来の複数の転写調節因子によって正負両方向に制御されている。HIV プロウイルス LTR TATA ボックスのすぐ下流に転写因子 AP-4 の結合部位を見いだした。AP-4 は TATA ボックスへの TBP (TFIID) の結合を抑制し HDAC をリクルートすることによって HIV 転写を抑制することを示した。歯周病菌起因菌 Porphyromonas gingivalis が HDAC 阻害活性のある酪酸を産生し、複数の HIV 潜伏感染細胞株からの HIV 産生を誘導することを見出した。酪酸は腸内細菌で産生されることから、体内の HIV の増殖の場と推察される消化管で HIV 複製の活性化がおきている可能性がある。

(5) HIV Vpr 機能の調節機構 (間) : HIV-1 Vpr が、宿主蛋白質 Imp α との相互作用を介して自身の核移行を促進し、ウイルスの複製を制御することを見出した。Vpr と Imp α の結合能を定量的に測定する ELISA 法を作り、天然化合物ライブラリーの約 2000 種類の化合物に対して結合阻害試験を行い、49 種の結合阻害分子を得た。このうち 1 種は細胞毒性が低く、かつ HIV-1 のマクロファージでの複製を阻害した。これをリード化合物として構造改変を行ない、マクロファージでの HIV-1 複製の IC₅₀ が 1nM の化合物を得ることに成功した。

(6) HIV Gag の輸送と膜集合の調節機構 (森川) : Efavirenz (EFV) には、HIV-1 の成熟を促進する活性がある。この作用機序を解析した。EFV は Pol 前駆体とそのプロセシング産物 (RT, PR-RT, Pol) の二量体化を促進した。FRET 解析により、GagPol 蛋白質の二量体化は主に形質膜でおこること、EFV によりその二量体化が増強することが明

らかとなった。EFV は GagPol 蛋白質の二量体化を促進するため、PR の二量体化促進、プロセシング促進につながると推測される。PR や GagPol の二量体化を促進は、非感染性ウイルスの産生につながる。二量体化を促進する化合物にも抗 HIV 活性が期待できる。

4. 考察

コンピュータを用いた構造解析は、ウイルスの性質 (薬剤逃避能、感染力、増殖能、細胞指向性、免疫逃避能等) を支える分子構造、並びに変異・修飾による構造変化を迅速に特定する上で極めて有用であることがわかった。自然界で出現する変異ウイルスの表現型 (形と性質) の変化を速やかに把握する際に不可欠の解析手法となると考えている。

現行の薬剤耐性 HIV の検出法には一定の限界がある。HIV 遺伝子の一次配列情報を基に耐性変異を検出する手法 (genotype assay) は、既知の耐性変異しか検出できない。このため体内の HIV のゲノムに絶えず出現する未報告の変異の影響はわからない。また、HIV 薬剤感受性を直接測定する手法 (phenotype assay) は、時間、労力、費用がかかる。本研究で、薬剤標的分子の構造情報に基づく予測法を検討した。その結果、未報告の変異による NNRTI 耐性の発生とその分子機序を迅速に予測することができた。NNRTI については、ゲノム情報を入手すれば、任意のウイルスの耐性を概ね予測できると考えている。現行の薬剤耐性 HIV の検出法を補完するのに役立つ。NNRTI 以外の耐性予測は今後の課題として残された。

5. 自己評価

1) 達成度について

60-90%の達成度。予算減のもと概ね達成された。研究代表者の準種解析、柱 1、柱 2 の分担研究の一部は、到達目標を達成できなかった。研究費の削減が一因となっている。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

学術的・国際的意義は、欧文論文の報告状況により自明。成果は薬剤耐性の検出、治療薬選択の最適化、新たな治療薬の設計等に役立ち、社会に貢献する。

3) 今後の展望について

本研究で新たに得られた情報 (耐性変異、耐性機構、複製機構等の新知見) は、薬剤耐性の検出、治療薬選択の最適化、新たな治療薬の設計等に役立っている。コンピュータを用いた構造解析は汎用性が高く、疫学やウイルス学研究に応用する。HIV 準種の解析は、今後の課題とする。

6. 結論

未報告の薬剤耐性変異を複数見つけた。コンピュータを用いた次世代の解析手法を応用して、①任意のウイルスの NNRTI 耐性を予測するシステム、および②変異や修飾による蛋白質の構造変化を特定するシステムを作った。血液より、1 回のシーケンシングで ~300 億塩基のウイルスゲノム情報を取得するシステムを作った。HIV 増殖の制御機構に関する新知見を収集した。HIV/AIDS のサルモデルの構築が順調に進んだ。研究の一部は、主に資金的な問題で到達目標を達成できなかった。薬剤耐性 HIV の監視と制御に不可欠なウイルス学研究の国内基盤が概ねできた。

7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

岡本 尚 : HIV 増殖抑制剤、特願 2009-254740

間陽子 : ①ヒト免疫不全ウイルス感染阻害剤およびエイズの治療薬または予防薬、特願 2008-087297、②Vpr タンパク質の検出方法及び検出用試薬、特願 2009-158179

研究発表

研究代表者

佐藤裕徳

- 1) Yokoyama M, Mori H, Sato H. Allosteric Regulation of HIV-1 Reverse Transcriptase by ATP for Nucleotide Selection. *PLOS One* (*accepted*).
- 2) Onyango C, Leligidowicz A, Yokoyama M, Sato H, Song H, Nakayama EE, Shioda T, de Silva T, Townend J, Jaye A, Whittle H, Rowland-Jones S and Cotton M. HIV-2 Capsids Distinguish High and Low Virus Load Patients in a West African Community Cohort. *Vaccine* (*in press*).
- 3) Oka T, Yokoyama M, Katayama K, Tsunemitsu H, Yamamoto M, Miyashita K, Ogawa S, Motomura K, Mori H, Nakamura H, Wakita T, Takeda N, Sato H. Structural and biological constraints on diversity of regions immediately upstream of cleavage sites in calicivirus precursor proteins. *Virology*. 394:119-29, 2009.
- 4) Sahbandar IN, Takahashi K, Djoerban Z, Firmansyah I, Naganawa S, Motomura K, Sato H, Kitamura K, Pohan HT, Sato S. Current HIV type 1 molecular epidemiology profile and identification of unique recombinant forms in Jakarta, Indonesia. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 25:637-46, 2009.
- 5) Kamiyama H, Yoshii H, Tanaka Y, Sato H, Yamamoto N, Kubo Y. Raft localization of CXCR4 is primarily required for X4-tropic human immunodeficiency virus type 1 infection. *Virology*. 386:23-31, 2009.

研究分担者

瀧永博之

- 1) 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 Research* 82:115-121, 2009.

上野貴将

- 1) Motozono, C., Yanaka, S., Tsumoto, K., Takiguchi, M., and, Ueno, T. Impact of intrinsic cooperative thermodynamics of peptide-MHC complexes on antiviral activity of HIV-specific CTL. *J. Immunol.* 182: 5528-5536, 2009
- 2) 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

村上 努

- 1) Murakami, T., S. Kumakura, T. Yamazaki, R. Tanaka, M. Hamatake, K. Okuma, W. Huang, J. Toma, J. Komano, M. Yanaka, Y. Tanaka, and N. Yamamoto. The novel CXCR4 antagonist, KRH-3955 is an orally bioavailable and extremely potent inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 infection: comparative studies with AMD3100. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:2940-2948, 2009
- 2) Iwasaki, Y., H. Akari, T. Murakami, S. Kumakura, Z. Dewan, M. Yanaka, and N. Yamamoto. Efficient inhibition of SDF-1 α -mediated chemotaxis and HIV-1 infection by novel CXCR4 antagonists. *Cancer Sci.* 100:778-781, 2009

岡本 尚

- 1) Imai, K., Asamitsu, K., Victoriano, A-F, B., Fujinaga, K., and Okamoto, T.: Involvement of Cyclin T1 in the protein stability of HIV-1 Tat. *FEBS J.* (*in press*).
- 2) Kawaguchi, A., Orba, Y., Kimura, T., Iha, H., Ogata, M., Tsuji, T., Aina, A., Sata, T., Okamoto, T., Hall, W. W., Sawa, H., and Hasegawa, H.: Inhibition of the SDF-1-CXCR4 axis by the CXCR4 antagonist AMD3100 suppresses the migration of cultured cells from ATL patients and murine lymphoblastoid cells from HTLV-I Tax transgenic mice. *Blood.* (*in press*).
- 3) Imai, K., Ochiai, K., and Okamoto, T.: Reactivation of latent HIV-1 infection by the periodontopathic bacterium *Porphyromonas gingivalis* involves histone modification. *J. Immunol.* 182: 3688-3695, 2009.
- 4) Ohba, K., Ryo, A., Dewan, Md. Z., Nishi, M., Naito, T., Qi, X., Inagaki, Y., Nagashima, Y., Tanaka, Y., Okamoto, T., Terashima, K., and Yamamoto, N. Follicular dendritic cells activate HIV-1 replication in monocytes/macrophages through a juxtacrine mechanism mediated by P-selectin glycoprotein ligand-1. *J. Immunol.* 183: 524-532, 2009.

高折晃史

- 1) Izumi T, A Takaori-kondo, K Shirakawa, H Higashitsuji, K Itoh, K Io, M Matsui, K Iwai, H Kondoh, T Sato, M Tomonaga, S Ikeda, H Akari, Y Koyanagi, J Fujita, and T Uchiyama: MDM2 is a novel E3 ligase for HIV-1 Vif. *Retrovirology* 6(1):1, 2009.

足立昭夫

- 1) Yamashita T, Nomaguchi M, Miyake A, Uchiyama T, Adachi A. Status of APOBEC3G/F in cells and progeny virions modulated by Vif determines HIV-1 infectivity. *Microbes and Infection*. (*in press*).
- 2) Fujita M, Otsuka M, Nomaguchi M, Adachi A. Multifaceted activity of HIV Vpr/Vpx proteins: the current view of their virological functions. *Reviews in Medical Virology*. (*in press*).
- 3) Jere A, Fujita M, Adachi A, Nomaguchi M. Role of HIV-1 Nef protein for virus replication *in vitro*. *Microbes and Infection*. (*in press*).
- 4) Kuroishi A, Saito A, Shingai Y, Shioda T, Nomaguchi M, Adachi A, Akari H, Nakayama E E. Modification of a loop sequence between α -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 α -helices 4 and 5 loop improves replication in cynomolgus monkey cells. *Retrovirology*, 6:70, 2009.
- 5) Kamada K, Yamashita T, Hachio K, Adachi A, Nomaguchi M. Evasion from CypA⁻ and APOBEC-mediated restrictions is insufficient for HIV-1 to efficiently grow in simian cells. *Microbes and Infection*, 11:164-171, 2009.
- 6) Nagao T, Hachio K, Doi N, Fujiwara S, Adachi A, Nomaguchi M. Amino acid alterations in Gag that confer the ability to grow in simian cells on HIV-1 are located at a narrow CA region. *Journal of Medical Investigation*, 56:21-25, 2009.

増田貴夫

- 1) Nishitsuji, H., Hayashi, T., Takahashi, T., Miyano, Kannagi, M. & Masuda, T. Augmentation of reverse transcription by integrase through an interaction with host factor, SIP1/Gemin2 is critical for HIV-1 infection. *PLOS One* 4 (11): e7825, 2009.

間 陽子

- 1) Suzuki T, Yamamoto N., Nonaka M., Takeshima S., Hashimoto Y., Matsuda G., Matsuyama M., Igarashi T., Miura T., Tanaka R., Kato S., and Aida Y. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) nuclear import via Vpr-Importin α interactions as a novel HIV-1 therapy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 380:838-843, 2009.
- 2) Nonaka M., Hashimoto Y., Takeshima S., and Aida Y. The human immunodeficiency virus type 1 Vpr protein and its carboxy-terminally truncated form induce apoptosis in tumor cells. *Cancer cell international*, 9:20. 2009.
- 3) Aida Y and Matsuda G. Role of Vpr in HIV-1 nuclear import: therapeutic implications, *Current HIV-1 Research*, 7(2) 136-143, 2009
- 4) Zhang X and Aida Y. HIV-1 Vpr: a novel role in regulating RNA splicing, *Current HIV-1 Research*, 7(2), 163-168, 2009.

森川裕子

- 1) Suyama M, Daikoku E, Goto T, Sano K, and Morikawa Y. Reactivation from latency displays HIV particle budding at plasma membrane, accompanying CD44 upregulation and recruitment. *Retrovirology* 6: 63, 2009
- 2) Nishi M, Ryo A, Tsurutani N, Ohba K, Sawasaki T, Morishita R, Perrem K, Aoki I, Morikawa Y, and Yamamoto N. Requirement for microtubule integrity in the SOCS1-mediated intracellular dynamics of HIV-1 Gag. *FEBS Let* 585: 1243-1250, 2009.
- 3) Fujii H, Urano E, Futahashi Y, Hamatake M, Tatsumi J, Hoshino T, Morikawa Y, Yamamoto N, and Komano J. Derivatives of 5-nitro-furan-2-carboxylic acid carbamylmethyl ester inhibit RNaseH activity associated with HIV-1 reverse transcriptase. *J. Med. Chem.* 52: 1380-1387, 2009.
- 4) Mizukoshi F, Yamamoto T, Mitsuki Y, Terahara K, Kawana-Tachikawa A, Kobayashi K, Iwamoto A, Morikawa Y, and 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 Infect.* 11: 191-197, 2009

研究課題：多剤耐性 HIV における将来的な変異・構造予測と新規抗 HIV 薬開発

課題番号：H19-エイズ-若手-003

研究代表者：川下 理日人（大阪大学大学院薬学研究科 助教）

研究分担者：岡本 晃典（大阪大学大学院薬学研究科 助教）

1. 研究目的

HIV は変異速度がきわめて速く、阻害剤耐性株の生じやすいウイルスであるため、多剤耐性ウイルスが出現し、既存の HAART に限界が生じると予想される。そのような状況に対処すべく、既存の抗 HIV 薬の改変や新しい作用機序を有する抗 HIV 薬の開発が急務となっている。

そこで、計算科学的な手法を用いて、これらの耐性変異が生じる位置・構造変化を前もって予測することができれば、耐性ウイルス出現時にも速やかに新規阻害剤を設計することが可能となる。また、その耐性を計算科学的に速やかに評価することにより、HAART における薬剤選択にも有用となる。

このような背景下、本年度は以下の項目を中心に検討を行った。

- 1) 多次元尺度構成法 (MDS) を利用したプロテアーゼ薬剤耐性出現傾向の検討およびプロテアーゼの系統解析による選択圧の抽出
- 2) T20 耐性ウイルスにも有効な膜融合阻害剤の設計

2. 研究方法

<多次元尺度構成法 (MDS) を利用したプロテアーゼ薬剤耐性出現傾向の検討およびプロテアーゼの系統解析による選択圧の抽出>

LosAlamos の HIV databases より、SIV、B 型のプロテアーゼリファレンス配列および CRF01_AE プロテアーゼの塩基配列を取得した。このうち配列が全く同じ株を除いた 297 株に対して mafft でアライメントを行い、MEGA による距離マトリックスの作成後、距離データを用い R で多次元尺度構成法 (MDS) を用いて各株を三次元空間にプロットした。また、Stanford University HIV Drug Resistance Database の HIVdb program を用いて各プロテアーゼ阻害剤に対する耐性予測を行い、その強度によってさらに 4 つのレベルに分類した。

また、アライメントを行ったデータセットを用いて、MP 系統樹を作成し、宮田・安永らの方法 (sqdif) により K_s/K_a を求め、 $K_s/K_a > 1$ の組み合わせを抽出した。さらに、正の選択の有無を、MEGA の codon-based z-test で検定し、どちらの手法でも正の選択が起こっているとされるものがあるか確認した。

<膜融合阻害剤>

前年度に設計した 10 種のペプチド中、2 種に T-20 と同等の活性を有するものが見出された。今回、さらなる活性向上および T20 耐性ウイルスへの適用を目指し、コンピュータによる知見に基づき、いくつかの領域を改変したペプチドをさらに 10 種設計した。これらと対照ペプチド T-20 を用いて、8 種の CRF01_AE、B、C 型ウイルスおよび T20 耐性ウイルス (B 型) に対し、実験的な評価を行った。なお本実験は、研究協力者の亀岡正典特任准教授が行ったものである。

(倫理面への配慮)

計算科学的な検討では、ヒトの遺伝子や個人情報等の利用がないため、考慮する必要はない。もし、研究協力者がウイルス関係の実験を行うに当たって、個人の血液サンプル等を用いる場合は、倫理委員会の規定に則り、担当研究者以外にその個人情報漏れないよう十分配慮する。

3. 研究結果

<多次元尺度構成法 (MDS) を利用したプロテアーゼ薬剤耐性出現傾向の検討およびプロテアーゼの系統解析による選択圧の抽出>

MDS を行った結果、取得した株は大きく分けて 2 つの領域にプロットされた。しかし、これらは薬剤耐性の強度では分かれておらず、引き続き検討が必要である。

また、選択圧の抽出に関しては、Sqdif と z-test の両方で正の選択が起こっているとされたものは 180 通りあった。これらを系統樹上で詳細に確認したところ、これらは系統樹上で遠い位置にある組み合わせばかりであり、正の選択が起こっているといえる組み合わせは得られなかった。

<膜融合阻害剤>

前年度に T20 と同様の活性を示した 2 種のペプチドは、いずれも T20 耐性ウイルスに活性を示さなかったが、新規に購入したペプチドのうち、5 種は耐性ウイルスにも活性を示し、そのうち 3 種は耐性株感受性株サブタイプに関わらず、強力な活性を有することがわかった。

4. 考察

＜多次元尺度構成法（MDS）を利用したプロテアーゼ薬剤耐性出現傾向の検討およびプロテアーゼの系統解析による選択圧の抽出＞

MDS でプロットされた株のうち、B型リファレンス配列および CRF01_AE 9 株の合計 10 株からなるクラスターは、系統樹上でも他の株と離れた位置に分類されているが、MDS の結果の方がよりはっきりと離れている。両者の解析結果から、CRF01_AE の中でもこれら 9 株とそれ以外の株では変異傾向が異なることが考えられる。

＜膜融合阻害剤＞

今回は内部の疎水性相互作用を向上させるため、内部に存在する親水性残基を疎水性残基への変異を行い、さらに元の残基と大きさの類似した残基へと変異させたため、一部で活性が向上したものと考えられる。なお、前回設計したペプチドでは溶解性に問題があったが、今回は溶媒接触面に親水性の残基を配置したため、溶解性も向上した。

5. 自己評価

1) 達成度について

全体の研究計画であげた項目は以下の通りである。

①耐性ウイルスに対する網羅的配列解析と変異傾向の把握

本年度は前年度に行ったプロテアーゼの配列解析データを利用し、MDS を用いて変異傾向の解析を行ったが、変異傾向の把握には至っていない。しかしながら、本手法を用いることにより、視覚的に変異傾向を推測できるため、本手法を用いた検討は変異傾向解析の一つとして期待できると考えている。

②ドッキングスタディ・構造活性相関を活用した薬剤耐性の評価法確立

本件に関しては、前年度からの進展はみられなかったが、現在別の系において、ドッキングスタディを用いた薬剤耐性評価法の開発を行っており、この適用を考えている。

③今後起こりうる耐性変異の予測とそれら変異蛋白質の構造予測

①の研究が完了後、遂行予定であったが、①が未完了のため、現在も検討段階である。

④構造未知蛋白質の X 線結晶構造解析

本年度は予算の都合上遂行不可能であった。

⑤膜融合阻害剤等、新規作用機序を有する抗 HIV 薬の分子設計

本件に関しては、前年度設計したものを改変することにより、T-20 耐性ウイルスにも有効なペプチドを設計する

ことができたため、前年度以上の成果が得られたと考えている。

以上を総合して達成度を考えると、⑤に関しては予定以上の成果が得られたと考えている。また、①、②に関してはほぼ予定通りであるが、③、④に関しては進展がみられなかった。全体として、⑤に関する一定以上の成果が得られたことから、まずまずの達成度を示したと考えられるが、進展の少ない分野に関しては、研究計画・体制等の再点検を行い、今後の研究遂行に活かしたい。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

プロテアーゼに関する薬剤耐性情報の蓄積は、今後出現する変異ウイルスの薬剤耐性を見積もる良い指標となると考えられる。膜融合阻害剤はコンピュータを用いた分子設計により、T-20 耐性ウイルスにも有効なペプチドを設計したことから、今後、毒性等の検討を加えることで、エイズ治療の臨床利用に近づくものと考えている。

3) 今後の展望について

プロテアーゼの系統解析では、MDS の導入により、系統樹による解析よりも視覚的に変異傾向を辿ることができるため、今後これを発展させると共に、起こりうる耐性変異の推測へと展開したい。

また、ドッキングスタディを用いた薬剤耐性評価は、現在開発中の手法を HIV 阻害剤の系にも適用予定であり、その有用性が期待される。

膜融合阻害剤に関しては、一定の成果をあげることができたため、今後は毒性や溶解性などの問題に取り組むと共に、本情報を利用して、低分子膜融合阻害剤の設計にも取り組んでいきたいと考えている。

6. 結論

今回我々は、系統解析などの計算科学的手法により、薬剤耐性プロテアーゼに関する情報を得た。また、膜融合阻害剤に関しては、分子動力学計算で得た結果をもとに設計したペプチドを用いて実験的な評価を行い、T-20 耐性ウイルスにも有効な阻害剤が設計できた。

今後は本研究での結果をさらに発展すべく、薬剤耐性を有するウイルスの情報提供、薬剤耐性を有するウイルスに対抗できる阻害剤の開発を行い、今後のエイズ治療へ貢献したい。

7. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

より強力で新規性の高い膜融合阻害剤が見出された場合には、知的所有権を出願する予定である。

研究発表

研究代表者

原著論文による発表

欧文

- 1) Sakudo, A., Xue, G., Kawashita, N., Ano, Y., Takagi, T., Shintani, H., Tanaka, Y., Onodera, T., Ikuta, K.
Structure of the prion protein and its gene: an analysis using bioinformatics and computer simulation.
Curr. Protein Pept. Sci., in press.
- 2) Shirakuni, Y., Okamoto, K., Kawashita, N., Yasunaga, T., Takagi, T.
Signal Detection of Drug Complications Applying Association Rule Learning for Stevens-Johnson Syndrome.
J. Comput. Aided Chem., 10, 118–127, (2009)
- 3) Sakudo A., Baba K., Tsukamoto M., Sugimoto A., Okada T., Kobayashi T., Kawashita N., Takagi T., Ikuta K.
Anionic polymer, poly(methyl vinyl ether–maleic anhydride)-coated beads-based capture of human influenza A and B virus.
Bioorg. Med. Chem., 17, 752–757, (2009)
- 4) Ohgaru T., Shimizu R., Okamoto K., Kawashita N., Kawase M., Shirakuni Y., Nishikiori R., Takagi T.
Enhancement of Ordinal CoMFA by Ridge Logistic Partial Least Squares.
J. Chem. Inf. Model., 48, 910–917, (2008).
- 5) Nishikiori R., Makino Y., Ochi Y., Yamashita N., Okamoto K., Kawashita N., Takahara J.-i., Yasunaga T., Takagi T., Kawase M.
Development of Fingerprint Verification Type Self-Organized Map Applied to Profiling Seized Methamphetamine.
J. Comput. Aided Chem., 9, 30–36, (2008).
- 6) Nishikiori R., Yamaguchi M., Takano K., Enatsu T., Tani M., U. Chandimal de Silva, Kawashita N., Takagi T., Morimoto S., Hangyo M., Kawase M.
Application of Partial Least Square on Quantitative Analysis of L-, D-, and DL-Tartaric Acid by Terahertz Absorption Spectra.
Chem. Pharm. Bull., 56, 305–307, (2008).

総説・解説

和文

- 1) 川下理目人, 目指せ！第2世代のインテグラーゼ阻害剤, *ファルマシア*, 44, 1216–1217, (2008).

研究分担者

岡本 晃典

原著論文による発表

欧文

- 1) Shirakuni, Y., Okamoto, K., Kawashita, N., Yasunaga, T., Takagi, T.
Signal Detection of Drug Complications Applying Association Rule Learning for Stevens-Johnson Syndrome.
J. Comput. Aided Chem., 10, 118–127 (2009).
- 2) Ohgaru, T., Shimizu, R., Okamoto, K., Kawashita, N., Kawase, M., Shirakuni, Y., Nishikiori, R., Takagi, T.
Enhancement of Ordinal CoMFA by Ridge Logistic Partial Least Squares.
J. Chem. Inf. Model., 48, 910–917, (2008).
- 3) Nishikiori, R., Makino, Y., Ochi, Y., Yamashita, N., Okamoto, K., Kawashita, N., Takahara, J.-i., Yasunaga, T.,

- Takagi, T., Kawase, M.
Development of Fingerprint Verification Type Self-Organized Map Applied to Profiling Seized Methamphetamine.
J. Comput. Aided Chem., 9, 30–36, (2008)
- 4) Takeuchi, M., Okamoto, K., Takagi, T., Ishii, H.
Ethnic difference in patients with type 2 diabetes mellitus in inter-East Asian populations: A systematic review and meta-analysis focusing on gene polymorphism.
J. Diabetes, 1, 255–262, (2009).
- 5) Hiromatsu K., Takahara J., Nishihara T., Okamoto K., Yasunaga T., Ohmayu Y., Takagi T., Nakazono K.
Prediction for Biodegradability of Chemicals by Kernel Partial Least Squares.
J. Comput. Aided Chem., 10, 1–9, (2009).
- 7) Kanbayashi, Y., Okamoto, K., Ogaru, T., Hosokawa, T., Takagi, T.
Statistical validation of the relationships of cancer pain relief with various factors using ordered logistic regression analysis.
Clinical J. Pain, 25, 65–72, (2009).
- 8) Kanbayashi, Y., Nomura, K., Fujimoto, Y., Yamashita, M., Ohshiro, M., Okamoto, K., Matsumoto, Y., Horiike, S., Takagi, T., Ishida, Y., Taniwaki, M.
Risk Factors for Infection in Haematology Patients Treated with Rituximab.
European J. Haematology, 82, 26–30, (2009).
- 9) Takeuchi, M., Okamoto, K., Takagi, T., Ishii, H.
Ethnic difference in inter-East Asian subjects with normal glucose tolerance and impaired glucose regulation: A systematic review and meta-analysis focusing on fasting serum insulin.
Diabetes Res. Clinical Practice, 82, 383–390, (2008).
- 10) Takeuchi, M., Okamoto, K., Takagi, T., Ishii, H.
Ethnic difference in patients with type 2 diabetes mellitus in inter-East Asian populations: A systematic review and meta-analysis focusing on fasting serum insulin.
Diabetes Res. Clinical Practice, 81, 370–376, (2008).
- 11) Kanbayashi, Y., Nomura, K., Fujimoto, Y., Shimura, K., Shimizu, D., Okamoto, K., Matsumoto, Y., Horiike, S., Shimazaki, C., Takagi, T., Taniwaki, M.
Population Pharmacokinetics of Itraconazole Solution Used as Prophylaxis for Febrile Neutropenia.
Int. J. Antimicrobial Agents, 31, 452–457, (2008).
- 12) Ohgaru, T., Shimizu, R., Okamoto, K., Kawase, M., Shirakuni, Y., Nishikiori, R., Takagi, T.
Ordinal Classification Using Comparative Molecular Field Analysis.,
J. Chem. Inf. Model., 48, 207–212, (2008).
- 13) Wu, X., Iguchi, T., Itoh, N., Okamoto, K., Takagi, T., Tanaka, K., Nakanishi, T.
Ascorbic acid transported by sodium-dependent vitamin C transporter 2 stimulates steroidogenesis in human choriocarcinoma cells.
Endocrinology, 149, 73–83, (2008).

和文

- 1) 岡本晃典, 山口進康, 馬場貴志, 高木達也, 那須正夫, 細菌数測定法における誤差分布の推定,
医薬品研究, 40, 1–8, (2009).

研究課題：Vif/APOBEC3Gの相互作用を標的とした新規抗 HIV-1 薬の開発

課題番号：H20-エイズ一般-004

主任研究者：高折 晃史（京都大学医学研究科 講師）

分担研究者：錦織 桃子（京都大学医学研究科 助教）、梁 明秀（横浜市立大学 教授）、木曾 良明（京都薬科大学 教授）、小林 正行（京都大学医学研究科 助教）

1. 研究目的

HIV-1 感染は、HAART の出現によりウイルス複製をある程度制御可能になったとはいえ、一方でその長期服用による副作用、また薬剤耐性の出現が大きな問題となっており、これらの克服に向け、新規作用機序の抗 HIV-1 薬の早期開発が待たれている。HIV-1 Vif は、ウイルス複製および AIDS 発症に必須の蛋白であるが、その機能の本態は、本来 HIV-1 の標的細胞が有する抗 HIV-1 宿主因子 APOBEC3G を中和することであることが近年明らかにされた。Vif がウイルス複製にとって必須の蛋白であること、および Vif/APOBEC3G の相互作用の分子機構が詳細に明らかにされたことにより、これらの分子およびその相互作用は、新規の抗 HIV-1 薬の絶好の標的と考えられる。そこで、本研究では、Vif/APOBEC3G 両分子およびその相互作用を標的とした新規抗 HIV-1 の開発を目指した研究を行う。

2. 研究方法

本研究の特色は、何よりもまず Vif/APOBEC3G という新規の分子が標的となる創薬研究である点である。またさらに、これら分子に関する申請者ら自身のこれまでの研究により集積された科学情報をもとに、想定可能な複数の標的候補に対し多角的にアプローチを計ることにより、その実現の可能性を高める点が独創的な点である。具体的には、①VifによるAPOBEC3Gのユビキチン依存性分解を阻害する化合物
②APOBEC3Gの発現および活性を調節する化合物
③Vifのユビキチン依存性分解を促進する化合物に関する複数のスクリーニングを行う。

全体の研究計画としては、上記の課題に対し、

- 1) ハイスループットアッセイ系の確立と低分子化合物のスクリーニング
- 2) リード化合物の選択と二次スクリーニング、in vitro における抗 HIV-1 活性の確認
- 3) in vivo における抗 HIV-1 活性の確認

（倫理面への配慮）

特に存在しない。

3. 研究結果

本年度の研究結果として、前述の三つの柱のうち特に「①VifによるAPOBEC3Gのユビキチン依存性分解を阻害する化合物」に関して研究の進展がみられた。昨年度に確立した一過性発現系を用いてのスクリーニングを行い、現時点で17280化合物の一次スクリーニングを終了し、314個の候補化合物を同定した。これらの候補化合物は、確認試験において37個、さらにウエスタン法を用いた二次スクリーニングにおいて、24個にしぼられている。また、これら化合物の骨格構造に関して、分担研究者木曾らによりコンピューターシミュレーションを用いて、共通の化合物構造等を解析中である。

また本年度、分担研究者梁らにより、独自の蛋白結合阻害スクリーニング系を樹立、それを用いて約1万の化合物の一次スクリーニングを施行し、253個の候補化合物を同定した。

4. 考察

Vif/APOBEC3Gの相互作用は、新規の抗 HIV-1 薬の絶好の標的と考え、本研究を提案した。実際、昨年度に我々が計画したのと同様の方法を用いて候補物質が同定され報告された(Nathans, *Nature Biotech* 26:1187,2008)ことは、本アプローチの方向性の妥当性を示しているといえる。本年度は、昨年度確立した一過性発現系を用いて、実際に一次スクリーニングをスタートし、複数の候補化合物を得ることができた。さらに、分担研究者の梁により新たなアッセイ系も確立され、その一次スクリーニングも進んでいる。今後は、これらの候補化合物をもとにさらに研究を進展させたい。

5. 自己評価

1) 達成度について

前述のごとく、第一の系を用いて一次スクリーニングを開始し、すでに複数の候補化合物が同定されている点は非常に評価できると考えている。さらに、異なる新たなスク

リーニング系も確立し、同様に候補化合物を得ており、おおむね研究は順調に進展していると考えている。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

本研究により、Vif/APOBEC3G の相互作用を標的とした複数のスクリーニングにより、複数の作用機序の低分子化合物が同定されれば、それらをリード化合物として複数の新規抗 HIV-1 薬の候補が同定されるであろう。本年度の研究成果は、実施に一次スクリーニングを開始し、複数の候補化合物を同定するところまで達成した点は、将来の社会的意義につながる成果であるといえよう。

3) 今後の展望について

引き続き、研究計画を遂行し、複数のスクリーニング系を同時に走らせるのみならず、これまでに同定された候補物質のさらなるしぼりこみや、その作用機序の解析を行っていききたい。

6. 結論

Vif/APOBEC3G の相互作用を標的とした新規抗 HIV-1 薬の開発に関する研究が順調に進んだ。残り 1 年間で、適当なリード化合物の候補を選択できるところまで、研究を展開したい。

7. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

特に存在しない。

研究発表

主任研究者

高折 晃史

原著論文による発表

- 1) Sakai T, Nishikori M, Tashima M, Yamamoto R, Kitawaki T, Takaori-Kondo A, Suzuki T, Tsuzuki S, and Uchiyama T: Distinctive cell properties of B cells carrying the BCL2 translocation and their potential roles in the development of lymphoma of germinal center type. *Cancer science in press*.
- 2) Yamamoto R, Nishikori M, Tashima M, Sakai T, Ichinohe T, Takaori-Kondo A, Ohmori K, and Uchiyama T: B7-H1 expression is regulated by MEK/ERK signaling pathway in anaplastic large cell lymphoma and Hodgkin lymphoma. *Cancer science* 100(11):2093-100, 2009.
- 3) T Izumi, A Takaori-kondo, K Shirakawa, H Higashitsuji, K Itoh, K Io, M Matsui, K Iwai, H Kondoh, T Sato, M Tomonaga, S Ikeda, H Akari, Y Koyanagi, J Fujita, and T Uchiyama: MDM2 is a novel E3 ligase for HIV-1 Vif. *Retrovirology* 6(1):1, 2009.
- 4) K Shirakawa, A Takaori-kondo, M Yokoyama, T Izumi, M Matsui, K Io, T Sato, H Sato, and T Uchiyama: Phosphorylation of APOBEC3G by protein kinase A regulates its interaction with HIV-1 Vif. *Nature Structural & Molecular Biology* 15(11):1184-91, 2008.

口頭発表

海外

- 1) T Izumi, A Takaori-Kondo, M Matsui, K Io, and T Uchiyama: HIV-1 Vif Causes G2 Cell Cycle Arrest and Apoptosis via the p53 Pathway. 16th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Montreal, Canada, Feb 8-11, 2009. (Young Investigator Award)
- 2) K Shirakawa, A Takaori-Kondo, M Yokoyama, T Izumi, M Matsui, K Io, H Sato, and T Uchiyama: P Phosphorylation of APOBEC3G by Protein Kinase A Regulates its Interaction with HIV-1 Vif. 16th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Montreal, Canada, Feb 8-11, 2009. (Young Investigator Award)

国内

- 1) T Izumi, K Shirakawa, M Matsui, K Io, T Uchiyama, and A Takaori-Kondo: HIV-1 Vif causes G2 cell cycle Arrest and apoptosis via the p53 Pathway. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Hyogo, Japan, September 8-11, 2009.
- 2) 泉 泰輔、白川 康太郎、松井 道志、井尾 克宏、篠原 正信、内山 卓、高折 晃史: HIV-1 Vif は p53 を介してその機能を発揮する。第 23 回日本エイズ学会学術集会、名古屋、平成 21 年 11 月 26~28 日

分担研究者

錦織 桃子

原著論文による発表

- 1) Sakai T, Nishikori M, Tashima M, Yamamoto R, Kitawaki T, Takaori-Kondo A, Suzuki T, Tsuzuki S, Uchiyama T. Distinctive cell properties of B cells carrying the BCL2 translocation and their potential roles in the development of lymphoma of germinal center type. *Cancer Sci.* 2009 in press.
- 2) Yamamoto R, Nishikori M, Tashima M, Sakai T, Ichinohe T, Takaori-Kondo A, Ohmori K, Uchiyama T. B7-H1 expression is regulated by MEK/ERK signaling pathway in anaplastic large cell lymphoma and Hodgkin lymphoma. *Cancer Sci.* 2009;100(11):2093-100.
- 3) Minato H, Nishikori M, Tanioka M, Miyachi Y, Utani A. Scleredema with diffuse pigmentation. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2009 in press.

- 4) Ohno H, Nishikori M, Haga H, Isoda K. Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma carrying a t(9;14)(p13;q32) translocation. *Int J Hematol.* 2009;89(5):704-8.
- 5) 錦織 桃子 低悪性度リンパ腫の病態と治療—濾胞性リンパ腫と辺縁帯リンパ腫—. 臨床血液、2009;50(10):1332-41.
- 6) 錦織 桃子 EBウイルス陽性T細胞リンパ腫。血液・腫瘍科 2009;58(6):655-659.

梁 明秀

原著論文による発表

- 1) Miyakawa K, Ryo A, Murakami T, Ohba K, Yamaoka S, Fukuda M, Guatelli J, Yamamoto N. BCA2/Rabring7 promotes tetherin-dependent HIV-1 restriction. *PLoS Pathogens*, 2009 Dec;5(12).
- 2) Matsuura I, Chiang KN, Lai CY, He D, Wang G, Ramkumar R, Uchida T, Ryo A, Lu KP, Liu F. Pin1 Promotes TGF- β -induced Migration and Invasion. *J Biol. Chem.*, 2009 Nov 17.
- 3) Zhou W, Yang Q, Low CB, Karthik BC, Wang Y, Ryo A, Yao SQ, Yang D, Liou YC: Pin1 catalyzes conformational changes of Thr187 in p27Kip1 and mediates its stability through a poly-ubiquitination process. *J Biol Chem.* 2009 Sep 4;284(36):23980-8.
- 4) Ohba K, Ryo A, Dewan MZ, Nishi M, Naito T, Qi X, Inagaki Y, Nagashima Y, Tanaka Y, Okamoto T, Terashima K, Yamamoto N: Follicular dendritic cells activate HIV-1 replication in monocytes/macrophages through a juxtacrine mechanism mediated by P-selectin glycoprotein ligand 1. *J Immunol.* 2009 Jul 1;183(1):524-32.
- 5) Jeong SJ, Ryo A, Yamamoto N: The prolyl isomerase Pin1 stabilizes the human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) Tax oncoprotein and promotes malignant transformation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Apr 3;381(2):294-9.
- 6) Nishi M, Ryo A, Tsurutani N, Ohba K, Sawasaki T, Morishita R, Perrem K, Aoki I, Morikawa Y, Yamamoto N: Requirement for microtubule integrity in the SOCS1-mediated intracellular dynamics of HIV-1 Gag. *FEBS Lett.* 2009 Apr 17;583(8):1243-50.
- 7) Ryo A, Wulf G, Lee TH, Lu KP: Pinning down HER2-ER crosstalk in SMRT regulation. *Trends Biochem Sci.* 2009 Apr;34(4):162-5

木曾 良明

原著論文による発表

- 1) Koushi Hidaka, Tooru Kimura, Hamdy M. Abdel-Rahman, Jeffrey-Tri Nguyen, Keith F. McDaniel, William E. Kohlbrenner, Akhteruzzaman Molla, Motoyasu Adachi, Taro Tamada, Ryota Kuroki, Noriko Katsuki, Yoshiaki Tanaka, Hikaru Matsumoto, Jun Wang, Yoshio Hayashi, Dale J. Kempf and Yoshiaki Kiso: Small-Sized Human Immunodeficiency Virus Type-1 Protease Inhibitors Containing Allophenylnorstatine to Explore the S2' Pocket. *J. Med. Chem.*, 52 (23), 7604–7617 (2009).
- 2) Jeffrey-Tri Nguyen, Yoshiaki Kiso: Rational drug design of HTLV-I protease inhibitors. *Proteases in Biology and Disease. Vol. 8. Viral Proteases and Antiviral Protease Inhibitor Therapy.* (U. Lendeckel, N. M. Hooper, Eds.) Springer, pp.83-100 (2009).
- 3) Motoyasu Adachi, Takashi Ohhara, Kazuo Kurihara, Taro Tamada, Eijiro Honjo, Nobuo Okazaki, Shigeki Arai, Yoshinari Shoyama, Kaname Kimura, Hiroyoshi Matsumura, Shigeru Sugiyama, Hiroaki Adachi, Kazufumi Takano, Yusuke Mori, Koushi Hidaka, Tooru Kimura, Yoshio Hayashi, Yoshiaki Kiso, Ryota Kuroki: Structure of HIV-1 protease in complex with potent inhibitor KNI-272 determined by high-resolution X-ray and neutron crystallography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106 (12), 4641-4646 (2009).

研究課題：抗ウイルス作用をもつ宿主防御因子 APOBEC3G と HIV-1 Vif との結合領域および特性の解明と、その阻害化合物の検索

課題番号：H19 - エイズ - 若手 - 002

主任研究者：武田 哲（国立感染症研究所 エイズ研究センター 第2グループ 研究員）

1. 研究目的

HIV-1 感染治療において、多剤併用療法の定着が感染予後の改善に大きな成果を挙げ、HIV 感染症はもはや慢性疾患の範疇に入りつつある時代に突入している。しかし、治療が長期化するが故、薬剤耐性ウイルスの出現の懸念も増大している。世界的には、不適切な薬剤使用のために薬剤耐性ウイルスの出現と伝播が少なくなく大きな社会的不安材料となっている。さらに、すでに薬剤耐性ウイルスに感染している患者を救済することも重要な課題である。このような問題を打破するためにも、より広く選択可能な治療薬を開発することが必要である。さらに、作用点が異なる新規薬剤は併用することにより既存薬の投与量を抑えることができるため、薬剤耐性ウイルス出現のチャンスを低下させることができる。このようなことから、作用機序が既存のメカニズムと異なる新規抗 HIV 薬の開発を強力に推進することは重要であると考えられる。

HIVの宿主であるリンパ球には、本来、レトロウイルスの増殖を抑制する生体宿主因子 APOBEC3G（以下、A3G）が発現している。しかし、HIV-1は、ウイルスタンパク Vif を感染細胞で発現し、A3G を細胞内より分解除去させ、宿主防御機構から逃れることができる。

本研究では、宿主の A3G の生体防御機構を活用した新たな機序による抗 HIV-1 薬剤を開発するための基礎研究を行う。宿主の抗ウイルス因子である A3G と HIV-1 Vif タンパクの相互作用に焦点を当て、生化学的解析により両者の結合特性を解明し、新たな抗 HIV-1 薬剤を開発の結びつくような基礎研究を行うことを目的とする。また、根治をめざし、iPS細胞に変異型A3Gを導入することによる遺伝子治療の可能性の検討を開始した。

2. 研究方法

(1) A3G と Vif タンパクの結合阻害剤スクリーニング系の構築

バキュロウイルスの発現系を利用して、野生型 A3G と Vif に結合しない変異型 A3G (D128K) タンパク、Vif (GST タグつき) タンパクの3種を発現し、精製した。一方、A3G の C 末端 17 アミノ酸に対する抗ウサギ血清を作製し、アフィニティーカラムにより抗 A3G IgG 抗体を精製・濃縮を行った。精製した抗 A3G 抗体を 96 穴プレートに固着化し、

ELISA 系を作製した。A3G に結合した GST-Vif の検出は、HRP conjugated 抗 GST-Tag mAb を用いて 化学発光により定量化した。

(2) A3G/Vif発現細胞を用いたスクリーニング系の確立
細胞を用いたVif阻害剤をスクリーニングする系は、内在性のA3Gが発現していない HeLa細胞をもとに作製した。まず、A3G を安定発現する細胞クローンを作製し、さらに HIV-1 vif 遺伝子を導入して Vif タンパクも安定発現する細胞株を作製した。Vif の発現に関しては、細胞内発現量を調節する目的で Tet-Off (Retro-X Tet-Off Advanced Inducible Expression System, Invitrogen) を使い、安定クローンの選別中は Doxycycline を添加し Vif の発現を抑制した。

(3) 変異型A3G(D128K)を導入したiPS細胞の樹立
遺伝子組換えレンチウイルスを用い、iPS細胞に変異型A3Gを導入する。変異型A3Gを発現するiPS細胞を作製し、*in vivo*および*in vitro*でリンパ球あるいは樹状細胞に分化させ、HIV-1に対して抵抗性を獲得するか確認する。

(倫理面への配慮)

当研究は、遺伝子組換え実験を含むので、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」を遵守する。またクラス3の病原体 HIV-1 を用いた実験を含む。このため、実験計画は国立感染症研究所の組換え DNA 実験安全委員会に承認をえて同委員会の認可をえた実験者が同委員会の認定した実験室にて行う。

3. 研究結果

(1) A3G と Vif の *in vitro* 結合 ELISA 系の確立とライブラリースクリーニング

生化学的な実験の結果を踏まえて、96 穴プレートスケールの ELISA 系を改良し確立した。原理は、固着化した A3G 抗体で A3G と GST-Vif タンパクの複合体をキャプチャーし、Horse Radish Peroxidase (HRP)-conjugated 抗 GST 抗体でサンドイッチした後、化学発光を用いて定量する。もし、結合を阻害する化合物が存在する場合、A3G/GST-Vif 複合体形成が阻害され GST-Vif がプレートにキャプチャーされず、化学発光量の減少が認められると

いう系を確立した。現在、低分子化合物および放線菌・真菌ライブラリーを用い、候補化合物を検索中である。

(2) A3G と Vif の発現細胞系を用いた候補化合物の検索

A3G と Vif を発現する培養細胞系を確立した。まず、ドキシサイクリン(Dox)を細胞培養液に添加することにより、濃度依存的に HIV-1 Vif 発現量が調節し、かつ A3G (恒常的に発現)を同時に発現する細胞クローンを作製した。細胞クローン樹立中に添加していた Dox を除くことにより、経時的に Vif の発現が上昇し、A3G の発現の減少することがウエスタンブロットにより確認された。現在、このスクリーニング系(論文投稿準備中)を用いて候補化合物を検索中である。

(3) 変異型 A3G 発現 iPS 細胞の樹立

レンチウイルスベクターに変異型 A3G、IRES 配列および puromycin 耐性遺伝子を導入した物を作製した。このプラスミドを 293T 細胞に HIV の gag/pol 発現プラスミド、及び Rev 発現プラスミド、VSV-G 発現プラスミドとともに遺伝子導入し遺伝子組換えレンチウイルスを作製した。現在、iPS 細胞の準備ができ次第、感染させる予定である。

4. 考察

in vitro の結合実験系に関しては、使用する Vif の調製ロット間の違いが問題となったことが判明した。このため、単一ロットの Vif タンパク大量発現・精製の必要性が生じ、候補化合物のスクリーニング実験が遅延した。ロット間の反応性の違いは、精製の際混在してくる微量の核酸断片(OD260/280 がロットごとに違っていた根拠から)などが原因であると考察された。細胞ベースのスクリーニング系に関しては、独創的な系を構築することに成功した。これらの系を用いて、低分子化合物および放線菌・真菌ライブラリーから候補化合物を見つけ出したいと考えている。また、変異型 A3G を導入した iPS 細胞の HIV-1 抵抗性についても検討したいと考えている。

5. 自己評価

1) 達成度について

A3G と Vif 阻害剤探索にむけて、生化学的な実験結果を踏まえ、新規薬剤をスクリーニングするシステムに必要な ELISA 系と細胞ベースの系の2つを確立した点に関しては、目標は概ね達成した。現在進行中である候補化合物のスクリーニングは完結したいと考えている。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

本研究を行うことにより A3G と Vif の構造学的/生化学的な相互作用が明らかになると期待される。また、構造学的/生化学的な理解の深まりは両者を標的とした新薬開

発に大きく貢献することが期待される。宿主因子を基盤とした新規作用機序による抗 HIV 薬剤の実用化は、耐性ウイルスの出現がより生じにくい事が期待されるとともに、既存の抗 HIV 薬剤に対して多剤耐性 HIV を獲得した治療困難症例を救済することにつながると思われる。多剤耐性症例だけでなく、新たな薬剤の登場は薬の選択肢を増やすため、副作用を回避できるチャンスも高くなり薬剤治療者の負担軽減が期待される。さらに、従来の抗ウイルス剤にはない、宿主の生体防御機構を活用した作用機序をもつ薬剤開発という新たな分野にも道を広げることが期待できる。

3) 今後の展望について

本研究目標である Vif の A3G 結合阻害剤の探索は、治療という実益面で有用なだけでなく、学問的にもウイルス複製と宿主との相互作用を理解するうえでも重要な知見が得られたと考えられる。さらに、細胞をベースとした独創的なスクリーニング系が確立したことから、今後より多くの低分子化合物をスクリーニングし候補化合物を見出したいと考えている。

変異型 A3G を導入した iPS 細胞については、*in vivo* および *in vitro* で HIV-1 が感染できる細胞へ分化させ、HIV-1 に抵抗性を獲得するかどうか評価したいと考えている。

6. 結論

ウイルスの構成因子(逆転写酵素など)やその複製に必須の生体因子(ケモカインレセプターなど)を阻害する既存の抗 HIV-1 薬剤とは全く異なり、生体防御機構を活用した、新たな機序による抗 HIV-1 薬剤を開発するための基礎研究を行った。宿主の抗ウイルス因子である A3G と HIV-1 Vif タンパクの相互作用に焦点を当て、構造生物学及び生化学的解析により両者の結合特性を解明し、新規抗 HIV-1 薬剤開発への新たな道を模索している。平成 21 年度は 3 期目として、A3G と Vif との結合阻害剤スクリーニングに向けた 2 種のスクリーニング系の確立を行った。さらに、現在進行中のケミカルスクリーニングを完結したいと考えている。また、遺伝子導入した iPS 細胞の樹立、評価を引き続き行いたいと考えている。

7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

なし

8. 研究発表

なし