

下した ($p < 0.05$)。一方、IRIS を発症した 1 例では治療開始時が 8.9 から治療 1 ヶ月後 (IRIS 発症時) が 46.1 と著明に上昇したことから、IRIS の発症時には Th1/Th2 バランスが著明に上昇する可能性が示唆された

(2) ニューモシスチス肺炎 (PCP) の治療

ST 合剤治療では 21 日間の治療完遂率は 21% であった。中止の原因となった有害事象は皮疹が 52 例 (48.1%) と最頻であった。ペントタミジン変更 81 例中、治療を完遂できたのは 38 例 (46.9%) であった。中止の原因は薬剤熱が 18 例 (42%) と最頻であった。経過中にアトバコンに治療が変更された 36 例では 33 例 (94%) が治療を完遂できていた。3 ヶ月以内の死亡率は 2.7% (3/108) であった。

(3) HIV 合併ノカルジア症

2004 年以降に増加傾向がみられた。全例肺病変を認め、4 例が播種性病変であった。7 例中 5 例は PCP との合併例であった。ST 合剤 MINO、AMK などによる治療が有効であったが、ST 合剤は 7 例中 4 例でアレルギーなどの有害事象が見られた。

(4) カポジ肉腫

KS 68 例の内訳は、エイズ関連 KS が 53 例 (平均 45.8 歳)、非エイズ関連 KS が 13 例 (平均 71.8 歳) であり、発症年齢に有意差が認められた。エイズ関連 KS は全例男性であるのに対し、非エイズ関連 KS では女性が 54% を占めていた。HHV-8 の遺伝子型はエイズ関連 KS で A と C が、非エイズ関連 KS で A と C と D が認められた。

(5) HIV 合併結核

HIV 合併結核患者でも QFT-2G はツベルクリン検査 (PPD) と比較して結核診断に有用であった。エリスポット法はさらに感度が高かった。

3) 病院における HIV 検査の推進のための日和見合併症の特徴

(1) STD の罹患歴

STD を契機に感染が判明した例数は 10–30% であり、梅毒、尖圭コンジローマ、赤痢アメーバ症、クラミジア・淋菌感染の順で頻度が高かった。

(2) STD 患者における HIV 検査の実態調査

年間 STD 患者受診数は平均 151 人、HIV 検査を勧めた例数は平均 17 例であった。

(3) HIV 感染者の早期発見に寄与する検査値異常の解析

高 γ グロブリン血症 ($\geq 20\%$) と血小板減少 ($\leq 15 \times 10^4 / \mu\text{l}$) を認めた患者では HHV-8 陽性率は 57.5%、80% であり、全患者での HHV-8 陽性率

(28.8%) と比べて有意に高かった。

4. 考 察

日和見感染症の動向は明らかになるとともに、疾患様相が年々変化していることも明らかとなり、我が国唯一の疫学データとして貴重な成果が得られた。また HIV 患者の発癌についても初めてのデータが得られた。

免疫再構築症候群発症時の指標となるデータや PCP 治療薬の有用性や副作用、HIV 合併ノカルジア症の病態や治療成績について明らかにすることができた。また、カポジ肉腫の特徴や HHV-8 の遺伝子型の特徴、結核症診断の QFT の HIV 感染者での有用性も明らかになった。

HIV 患者早期診断のための STD の頻度や検査の実態、検査値異常についてもデータが得られた。

5. 自己評価

1) 達成度について

日和見感染症に関してはこれまでの成果に上積みができたこと、悪性腫瘍の累積データを解析し罹患率を一般人口との比較を行ったことなど予定の研究を遂行した。日和見感染症の早期発見、新しい診断法や治療法の開発、免疫再構築症候群への対処などについても、研究成果が明らかとなったり研究の方向性が定まり、当初計画した目標をほぼ達成したと考えている。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

諸外国と異なる日和見感染症の特徴を明らかにでき、世界の中での日本の特徴を明らかにする上で非常に有意義と考えている。また増加しつつある日和見感染症への対処についての政策決定にも有用なデータとなる。

3) 今後の展望について

さらにデータを蓄積するとともに、2 年目に向けて研究を推進していく。

6. 結 論

日本における HIV 関連日和見感染症と悪性腫瘍の動向及び新しい診断と治療、合併感染症を端緒とする HIV 感染者の発見についてのデータを集積した。

7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

特記事項なし。

研究発表

研究代表者

安岡 彰

1. Watanabe T, Yasuoka A, Tanuma J, Yazaki H, Honda H, Tsukada K, Honda M, Gatanaga H, Teruya K, Kikuchi Y, Oka S. Serum (1→3) β -D-glucan as a noninvasive adjunct marker for the diagnosis of Pneumocystis pneumonia in patients with AIDS. Clin Infect Dis. 2009, 49:1128-31.
2. Narukawa M, Yasuoka A, Note R, Funada H. Sequence-based spa typing as a rapid screening method for the areal and nosocomial outbreaks of MRSA. Tohoku J Exp Med. 2009, 218:207-13.
3. 安岡 彰. 呼吸器感染症の院内感染予防策とは. 呼吸器感染症のすべて 南江堂 2009. pp205-206.
4. 安岡 彰 免疫不全症で問題となる真菌症とは. 深在性真菌症 Q&A. 医薬ジャーナル社 2009. pp19-21.
5. 安岡 彰 口腔・食道カンジダ症の治療法は. 深在性真菌症 Q&A. 医薬ジャーナル社 2009. pp165-167.
6. 安岡 彰. 【医療・福祉施設における感染制御と臨床検査】 各論 微生物別の種類別にみた施設内感染制御 真菌 ニューモシスチス・イロベツィ 臨床検査 2009, 53:1391-1394.

研究分担者

照屋勝治

1. 照屋勝治、HIV 感染症における結核と非結核性抗酸菌症の特徴と治療法、化学療法の領域、25(4)、60-611、2009.
2. 照屋勝治、針刺し事故の HIV 感染リスクは?、Q&A でわかる肥満と糖尿病、8(4)、572-573、2009.
3. 照屋勝治、白血球中サイトメガロウイルス pp65 抗原、診断と治療、97(9)、1720-1724、2009.
4. 照屋勝治、微生物の種類別にみた施設内感染制御、HIV、臨床検査、53(11)、1427-1430、2009.
5. 照屋勝治、HIV 合併キャッスルマン病、日本エイズ学会誌、22(3)、184-191、2009.
6. 照屋勝治、特集「話題の感染症」HIV、Medico、41(1)、12-16、2010.

片野晴隆

1. Ueno T, Kaneko K, Katano H, Sato Y, Mazitschek R, Tanaka K, Hattori S, Irie S, Sata T, Ogawa-Goto K: Expansion of the trans-Golgi network following activated collagen secretion is supported by a coiled-coil microtubule-bundling protein, p180, on the ER, Exp Cell Res 2010, (in press)
2. Nakamura T, Sato Y, Watanabe D, Ito H, Shimonohara N, Tsuji T, Nakajima N, Suzuki Y, Matsuo K, Nakagawa H, Sata T, Katano H: Nuclear localization of Merkel cell polyomavirus large T antigen in Merkel cell carcinoma, Virology 2010, (in press)
3. Kanno T, Sato Y, Nakamura T, Sakamoto K, Sata T, Katano H: Genotypic and clinico-pathological characterization of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection in Japan, J Med Virol 2010, (in press)

山本 政弘

1. Minami R, Yamamoto M, Takahama S, Ando H, Miyamura T, Suematsu E. High molecular weight form of adiponectin in antiretroviral drug-induced dyslipidemia in HIV-infected Japanese individuals based on in vivo and in vitro analyses. Intern Med. 2009;48(20):1799-875. Epub 2009 Oct 15.
2. Minami R, Takahama S, Ando H, Miyamura T, Suematsu E, and Yamamoto M. Human herpesvirus 8 DNA load in the leukocytes correlates with thrombocytopenia in HIV-1 infected individuals." AIDS Res Hum Retroviruses. 25(1), 1-8, 2009
3. 治療後ウエスタンブロット法にて抗 HIV 抗体が陰性化し持続している HIV 感染症の一例 南留美, 高濱

宗一郎, 安藤仁, 山本政弘 感染症学会雑誌. 2009, 83:251-255.

古西 満

1. 古西 満, 宇野健司: 抗 HIV 療法後にみられる免疫再構築症候群, *BIO Clinica* : 24 : 625-629, 2009.
2. 古西 満, 善本英一郎, 宇野健司, 小川 拓, 忽那賢志, 中川智代, 米川真輔, 笠原 敬, 前田光一, 三笠桂一: HAART 時代における HIV 感染者の Th1/Th2 バランス. *総合臨牀*, 56 : 1474-1477, 2009.
3. 善本英一郎, 古西 満, 宇野健司, 米川真輔, 中川智代, 笠原 敬, 前田光一, 三笠桂一, 若月幸平, 中島祥介: HAART 開始後短期間に急性虫垂炎を発症した HIV 感染者の 1 例. *総合臨牀*, 58 : 531-534, 2009.

永井英明

1. 永井英明. 微生物の種類別にみた施設内感染制御 2) 結核菌. *臨床検査*. 2009, 53:1367-1370.
2. 永井英明. インターフェロン γ 応答測定法による結核感染の診断. *感染症*. 2009, 39:103-106.
3. 永井英明. 新しい結核診断技術 インターフェロン γ 応答測定法. *日本胸部臨床*. 2009, 68:417-424.
4. 永井英明. TB/HIV(結核/HIV の二重感染)の現在と将来 HIV 感染症合併結核の臨床像. *結核*. 2009,84:204-207.
5. 永井英明. 結核 QuantiFERON-TB 第 2 世代(QFT-2G)の現状と注意点. *Medicina*. 2009, 46:583-585.
6. 永井英明. 結核 一般医家の診療上の pitfall. *Medicina*. 2009, 46:580-582.
7. 永井英明. リファブチンの臨床的意義. *化学療法の領域*. 2009, 25:571-577.
8. 永井英明. 呼吸器疾患の新治療 ミコブティンカプセル. *呼吸*. 2009, 28:151-155.

研究課題：HIV 感染防御免疫誘導に関する研究

課題番号：H21-エイズ一般-007

研究代表者：俣野 哲朗（東京大学医科学研究所 教授）

研究分担者：保富 康宏（独立行政法人医薬基盤研究所長類医科学研究センター センター長）、三浦 聡之（東京大学医科学研究所 准教授）、森川 裕子（北里大学北里生命科学研究所 教授）、寺原 和孝（国立感染症研究所免疫部 研究員）、横山 勝（国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター 研究員）

1. 研究目的

HIV 感染者数の増大は、特にアフリカ等の流行地域において極めて深刻な状況にある。流行地域での感染拡大は、HIV に増殖・変異の場を与えることから、宿主免疫反応による抑制をよりうけにくい HIV 変異株や抗 HIV 薬耐性変異株の出現に結びつく可能性が考えられ、免疫不全傾向にある HIV 感染者数の増加を介した新興再興感染症出現促進に結びつく可能性も危惧されている。したがって、HIV 感染拡大は、流行地域だけではなくグローバルな視点で取り組み克服すべき国際的重要課題である。本研究は、この問題解決に必要な予防エイズワクチン開発を目指すものである。

HIV は感染後誘導される適応免疫によっても排除されきらず持続感染に至るため、エイズワクチン開発には、自然感染の模倣を基本とする従来のワクチンを超えた新たな戦略が必要となる。特に、HIV 感染標的が免疫担当細胞であるため、免疫活性化が必ずしも HIV 複製抑制に結びつかず、逆に複製促進に結びつく可能性がある。そこで本研究は、HIV 複製抑制に結びつく防御免疫反応を選択的に誘導する予防エイズワクチン開発を目的とする。

我々が開発したセンダイウイルス (SeV) ベクターを用いた細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) 誘導エイズワクチンは、サルエイズモデルで初めて有効性を示した点 (J Exp Med 199:1709) で注目され、接種者全員への効果は期待できないものの集団での HIV 感染拡大抑制効果を期待した第 1 世代ワクチンとして、国際エイズワクチン推進構想 (IAVI) との国際共同臨床試験計画が米国にて進展中である。本研究では、この第 1 世代ワクチンの有効性確立に向けた研究を進展させるとともに、接種者全員への感染発症防御効果を有する第 2 世代エイズワクチン開発に向け、HIV 複製抑制に結びつく CTL の選択的誘導に関する研究を開始した。一方、我々は近年、中和抗体受動免疫が機能的 T 細胞反応誘導を促進する可能性を示したが (Rev Med Virol 18:293)、この抗体と T 細胞の協調作用を期待して中和抗体誘導に関する研究を開始した。

具体的には、サル免疫不全ウイルス (SIV) 感染サルエイズモデルにおいて、ワクチンによる各種免疫誘導が SIV 曝露後の SIV 複製に与える影響を検証することとした。特に (i) ウイルス多様性に対応した CTL 誘導の効果、(ii) ワクチンによるヘルパー T リンパ球 (HTL) 誘導の影響、(iii) 中和抗体と T 細胞の協調作用等に主眼をおき、以下のような研究を進め、HIV 複製抑制に結びつく免疫誘導法を選別して有効な感染防御免疫を選択的に誘導する予防エイズワクチン確立への進展を企図している。

1. CTL 誘導ワクチンのデリバリーシステムの研究

1-1. SeV ベクターワクチンシステムの最適化 (俣野)

1-2. 併用プライム法の開発 (保富)

2. CTL 誘導ワクチンの抗原選択法の研究

2-1. 抗原提示効率に基づく有効な CTL 抗原選択 (森川)

2-2. CTL 逃避変異の解析 (三浦)

2-3. 多様な SIV に対する CTL 誘導効果の解析 (俣野)

3. HTL 反応と中和抗体反応についての研究

3-1. SIV に対する HTL 誘導効果の解析 (寺原・俣野)

3-2. 抗原構造推定に基づく中和抗体誘導法の開発 (横山)

平成 21 年度は以下の研究を進展させた。

1-1. SeV ベクターワクチン接種量・回数の検討 (俣野)

1-2. E 型肝炎ウイルス様粒子 (HEV-VLP) を用いた SIV 抗原発現 DNA ワクチンの作製 (保富)

2-1. 細胞内および HIV 粒子内の Gag 蛋白定量 (森川)

2-2. HIV 特異的 CTL 逃避変異の同定 (三浦)

2-3. ワクチン誘導 CTL の SIV 曝露後の 2 次反応の解析 (俣野)

3-1. SIV 特異的 HTL 反応解析系の確立 (寺原)

3-2. HIV Env gp120 構造計算 (横山)

2. 研究方法

(1-1) SIV Gag 発現 SeV (SeV-Gag) ベクターワクチンの接種量を従来の 1/10 の 6×10^8 CIU とし、その経鼻接種後に誘導される Gag 特異的 CTL レベルを解析した。さらに、9 週間を隔てた 2 回目の接種により誘導される Gag 特異的 CTL レベルを解析し、血漿中に検出される抗 SeV 中和抗体反応の影響を調べた。

(1-2) 経口投与可能な HEV の VLP に HIV Env エピトープを組み込んだキメラ VLP (VLP-HIVenv) ベクターを作製し、さらに SIV gag cDNA を封入したワクチン作製を試み、その DNA 封入効率を測定した。

(2-1) MG132 処理でプロテアソーム分解を、クロロキン処理でエンドソーム分解を阻害し、細胞内 Gag 蛋白を定量的に解析した。GFP を指標とした Gag 蛋白定量のために GagGFP/pNL を構築した。細胞内の Gag:GagPol 発現比率と粒子内の比率を測定した。

(2-2) 未治療日本人 HIV 感染者について、HLA アリル特異的な HIV Gag アミノ酸変異 (推定的 CTL 逃避変異) を統計学的手法により同定するため、HLA クラス I 遺伝子型およびウイルス Gag アミノ酸配列を決定した。

(2-3) 主要組織適合遺伝子複合体クラス I (MHC-I) ハプロタイプ 90120-1a 共有サル群での単独 Gag241-249 エピトープ特異的 CTL 誘導ワクチン接種後の SIVmac239 チャレンジ実験で、感染急性期の CTL 反応を解析した。

(3-1) SIV 特異的 HTL 反応について、抗原特異的サイトカイン・細胞傷害性顆粒産生能を指標とした高感度の解析系の確立を進めた。SIV 感染慢性期のサル末梢血リンパ球を用い、VSV-G シュードタイプ SIV を感染させた同一個体の B lymphoblastoid cell line との共培養 (抗原刺激) 後、CD4 陽性 T リンパ球中の MIP-1 β 、IL-2、TNF- α 、INF- γ 、CD107 a の誘導を細胞内免疫染色により解析した。

(3-2) ホモロジーモデリング法および分子動力学計算により HIV Env gp120 分子モデルを構築し、V3 配列の荷電量の影響を調べた。多様性解析においては、公共データベースに登録されている HIV Env アミノ酸配列情報を用いてエントロピーを求めた。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え生物等を用いる実験については、実施機関の承認あるいは文部科学大臣の確認を得ている。動物実験については、実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針を遵守し、実施機関の動物実験委員会の承認を得てから開始した。ヒトサンプルを用いる研究については、該当する倫理指針を遵守し、実施機関の倫理委員会の承認

を得てから開始した。

3. 研究結果

(1-1) 従来の 1/10 の接種量でも、SeV-Gag 経鼻接種により効率よい Gag 特異的 CTL 誘導が認められた。2 回目の接種時には、比較的低レベル (1:100 以下) ではあるものの抗 SeV 中和抗体反応が検出されたが、SeV-Gag 経鼻接種により効率よい Gag 特異的 CTL 誘導が認められた。

(1-2) VLP-HIVenv への SIV gag cDNA 封入効率の検討では、0.35 mg の DNA が 1 mg の VLP に封入されていた。この SIV gag cDNA 封入 VLP を用い、in vitro で培養細胞に遺伝子導入を試みたところ、SIV gag cDNA の細胞内への導入が確認された。

(2-1) MG132 処理およびクロロキン処理のいずれの場合も、細胞内 Gag 蛋白量が顕著な差はなかった。細胞内の Gag:GagPol 発現比率は 10-20:1 であったが、粒子内の比率は 5-10:1 であった。

(2-2) 約 180 名の未治療日本人 HIV 感染者において HLA クラス I アリルおよび Gag アミノ酸配列を決定した。内 169 名が HIV サブタイプ B に感染していた。現在、統計学的手法による HLA 関連変異 (推定的 CTL 逃避変異) の同定を進展中である。

(2-3) 非ワクチン接種 90120-Ia 共有サル群では、SIV 感染急性期に Gag206-216 特異的 CTL と Gag241-249 特異的 CTL の両者の誘導がみられたが、単独 Gag241-249 特異的 CTL 誘導ワクチン接種 90120-Ia 共有サル群では、SIV チャレンジ後の急性期に Gag206-216 特異的 CTL の誘導がほとんど見られず、Gag241-249 特異的 CTL がドミナントに高レベルに誘導されていた。

(3-1) VSV-G シュードタイプ SIV 感染 2 日目に SIV Gag CA (p27) 発現を確認した。DNA プライム・SeV-Gag ブーストワクチン後の SIVmac239 チャレンジで、SIV 複製が制御されたサルの慢性期のリンパ球を用いた解析では、CD4 陽性 T リンパ球中の各種サイトカイン・CD107a の SIV 特異的誘導が検出された。

(3-2) HIV Env V3 配列の荷電量が +7 の gp120 は、+3 の gp120 よりも CD4 結合部位が広いことが示された。多様性解析により、荷電量 +7 では +3 よりも CD4 結合ループ周辺のアミノ酸がより多様であることが判明した。

4. 考察

(1-1) DNA プライム・SeV ブーストワクチンにおいて、従来の 1/10 の SeV-Gag 接種量でも効率よい Gag 特異的 CTL 誘導能を有することが示されたが、低接種量による臨床応用は、安全性および実用性の面で有利であると考えられる。さらに、SeV ベクター 2 回接種の有効性が示されたが、2 回接種は、ブースター効果の点で有利であるだけでなく、異なる抗原を用いることにより、より広範な CTL 誘導に結びつく可能性が考えられる。

(1-2) SIV gag cDNA を封入した VLP-HIVenv は、HIV Env および SIV Gag 特異的免疫誘導を企図したワクチンである。HEV の VLP は経口投与で小腸粘膜まで到達することが確認されていることから、このシステムによる粘膜免疫誘導の可能性が期待される。

(2-1) (少なくとも PR[-]では) GagPol は Gag より効率よく粒子に取り込まれることが示された。現在、プロテアソームやエンドソームの阻害における Gag 蛋白のプロセシングと細胞内局在を検討中である。

(2-2) 今回得られた HLA クラス I 遺伝子型と HIV Gag アミノ酸配列から、日本人で流行している HIV 株における推定的な CTL 逃避変異が同定され、その変異が HIV 複製能に与える影響の解析が可能となることが期待される。

(2-3) ワクチン接種により HIV 曝露後に誘導される CTL のドミナンス・パターンが変わる可能性が示された。この CTL のドミナンス・パターンを検討することにより、曝露後に有効な CTL がドミナントに誘導されること、あるいは広範な CTL が誘導されることを企図して、ワクチンにより誘導する CTL を選択する戦略が考えられる。

(3-1) 機能的 SIV 特異的 HTL 反応解析系を確立することができた。今回の解析では、ワクチンにより SIV 複製制御に至ったサルの慢性期には、機能的な SIV 特異的 HTL 反応が誘導されていることが示唆された。

(3-2) HIV Env gp120 は、V3 配列の荷電量が大きくなると CD4 結合部位が広がったことから、荷電量が大きいと CD4 結合部位を認識する中和抗体による感受性が大きいと考えられる。多様性解析結果も、CD4 結合ループ周辺のアミノ酸が抗体による選択圧をうけていることを示唆しており、上記の結果を支持している。

5. 自己評価

1) 達成度について

研究費削減により HTL 反応解析等のためのサンプル数確保が十分でなかったものの、研究計画に沿って実な成果が得られている。特に CTL のドミナンスに関する知見は、有効な CTL 誘導法あるいは広範な CTL 誘導法の開発に方向性を与える極めて重要かつ斬新な成果であり、今後の研究進展を加速するものとして評価できる。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

特に、CTL のドミナンスに関する知見および HIV Env V3 の荷電量に関する知見は、感染免疫学への貢献も大きく、学術的・国際的意義は高い。各々の研究結果は、第 1 世代エイズワクチン有効性の確立および有効な免疫反応を選択的に誘導する第 2 世代エイズワクチン開発に結びつくものであり、社会的意義も極めて高い。

3) 今後の展望について

平成 21 年度に得られた結果をもとに、CTL 誘導ワクチンのデリバリーシステム最適化と抗原選択法の樹立、および中和抗体誘導抗原獲得に向けた研究を進めることができる。その成果に基づき、HIV 複製抑制に結びつく感染防御免疫誘導法の確立研究を推進する。

6. 結論

CTL 誘導ワクチンのデリバリーシステム最適化に向け、SeV ベクターワクチンの 2 回接種が有効であることを明らかにした。併用プライム法候補としては、HEV-VLP を用いた DNA ワクチンを構築した。CTL 誘導抗原選択法の樹立に向け、抗原提示効率測定のためとなる細胞内および HIV 粒子内の Gag 定量を行った。また、HIV 感染者における CTL 逃避変異同定のため、HLA 遺伝子型および gag 塩基配列決定を行った。サルエイズモデルでは、ワクチン接種によりウイルス曝露後に誘導される CTL のドミナンス・パターンが変わりうるという重要な知見を得た。HTL 反応については解析系を確立した。中和抗体誘導法の樹立に向け、HIV gp120 の構造計算を進め、V3 配列の荷電量の CD4 結合領域への影響を見出した。これらの結果は、第 1 世代エイズワクチン有効性の確立および有効な免疫反応を選択的に誘導する第 2 世代エイズワクチン開発に結びつく重要な成果である。

7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

特になし。

研究発表

研究代表者

侯野 哲朗

- 1) Yamamoto, H., and Matano, T. Neutralizing antibodies in SIV control: Co-impact with T cells. Vaccine, in press.
- 2) Tsukamoto, T., Takeda, A., Yamamoto, T., Yamamoto, H., Kawada, M., and Matano, T. Impact of cytotoxic-T-lymphocyte memory induction without virus-specific CD4⁺ T-cell help on control of a simian immunodeficiency virus challenge in rhesus macaques. J. Virol. 83: 9339-9346, 2009.
- 3) Yamamoto, T., Iwamoto, N., Yamamoto, H., Tsukamoto, T., Kuwano, T., Takeda, A., Kawada, M., Tsunetsugu-Yokota, Y., and Matano, T. Polyfunctional CD4⁺ Tcell induction in neutralizing antibody-triggered control of simian immunodeficiency virus infection. J. Virol. 83: 5514-5524, 2009.

研究分担者

保富 康宏

- 1) Fujimoto, K., Takano, J., Narita, T., Hanari, K., Shimozawa, N., Sankai, T., Yoshida, T., Terao, K., Kurata, T., and Yasutomi, Y. Simian retrovirus type D infection in a colony of cynomolgus monkeys. Comp. Med., in press.
- 2) Yasutomi, Y. Establishment of specific pathogen-free macaque colonies in Tsukuba Primate Research Center of Japan for AIDS research. Vaccine, in press.
- 3) Mori, H., Yamanaka, K., Matsuo, K., Yasutomi, Y., and Mizutani, H. Administration of Ag85B showed therapeutic effects to Th2-type cytokine-mediated acute phase atopic dermatitis by inducing regulatory T cells. Arch. Dermatol. Res. 301: 151-157, 2009.
- 4) Okabayashi, S., Ohnao, C., and Yasutomi, Y. Acute megakaryocytic leukemia (AMKL)-like disease in a cynomolgus monkey (macaca fascicularis). J. Comp. Pathol. 140: 212-216, 2009.
- 5) Morioka, K., Yamanaka, K., Mori, H., Omoto, Y., Tokime, K., Kakeda, M., Kurokawa, I., Gabazza, E., Tsubura, A., and Yasutomi, Y., Mizutani H. IL-4/IL-13 antagonist DNA vaccination successfully suppresses Th2 type chronic dermatitis. Br. J. Dermatol. 160: 1172-1179, 2009.
- 6) Takano, J.I., Tachibana, H., Kato, M., Narita, T., Yanagi, T., Yasutomi, Y., and Fujimoto, K. DNA characterization of simian Entamoeba histolytica-like strains to differentiate them from Entamoeba histolytica. Parasitol. Res. 105: 929-937, 2009.

三浦 聡之

- 1) Pereyra, F., Palmer, S., Miura, T., Block, B., Wiegand, A., Rothchild, A., Baker, B., Rosenberg, R., Cutrell, E., Seaman, M., Coffin, J., Walker, B. Persistent low level viremia in HIV-1 elite controllers and relationship to immunologic parameters. J. Infect. Dis. 200:984-990, 2009.
- 2) Chen, H., Piechocka-Trocha, A., Miura, T., Brockman, M., Julg, B., Baker, B., Rothchild, A., Block, B., Schneidewind, A., Koibuchi, T., Pereyra, F., Allen, T., Walker, B. Differential neutralization of human immunodeficiency virus (HIV) replication in autologous CD4 T cells by HIV-specific cytotoxic T lymphocytes. J. Virol. 83: 3138-3149, 2009.
- 3) Miura, T., Brumme, C., Brockman, M., Brumme, Z., Pereyra, F., Block, B., Trocha, A., John, M., Mallal, S., Harrigan, P.R., Walker, B. HLA-associated viral mutations are common in human immunodeficiency virus type 1 elite controllers. J. Virol. 83: 3407-3412, 2009.

森川 裕子

- 1) Urano, E., Ichikawa, R., Morikawa, Y., Yoshida, T., Koyanagi Y., and Komano, J. T cell-based functional cdNA library screening identified SEC13-like 1a carboxy-terminal domain as a negative regulator of human immunodeficiency virus replication. Vaccine, in press.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.

寺原 和孝

- 1) Yamamoto, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Mitsuki, Y.Y., Mizukoshi, F., Tsuchiya, T., Terahara, K., Inagaki, Y., Yamamoto, N., Kobayashi, K., and Inoue, J.I. Selective transmission of R5 HIV-1 over X4 HIV-1 at the dendritic cell-T cell infectious synapse is determined by the T cell activation state. PLoS Pathogens 5: e1000279, 2009.

横山 勝

- 1) Onyango, C., Leligdowicz, A., Yokoyama, M., Sato, H., Song, H., Nakayama, E.E., 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.

研究課題： HIV の感染防止、AIDS 発症防止に関する免疫学的基礎研究

課題番号： H21-エイズ一般-008

研究代表者：森 一泰（国立感染症研究所エイズ研究センター 主任研究官）

研究分担者：山本直樹（国立感染症研究所エイズ研究センター センター長）、駒野 淳（国立感染症研究所エイズ研究センター 主任研究官）、庄司省三（熊本大学薬学部 名誉教授）、玉村啓和（東京医科歯科大学生体材料工学研究所 メディシナルケミストリー分野 教授）、志田壽利（北海道大学遺伝子病制御研究所 感染病態分野 教授）、三浦智行（京都大学ウイルス研究所 感染症モデル研究センター 准教授）、守屋智草（東京大学医科学研究所 特任研究員）、保富康宏（医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター センター長）、高橋秀実（日本医科大学 微生物学免疫学教室 教授）、高久 洋（千葉工業大学工学部 教授）

1. 研究目的

包括的なエイズ対策において、エイズワクチンの開発は根本的な解決法であり、不可欠である。本研究では、細胞性免疫とともに液性免疫を志向した特異的免疫、さらには自然免疫の概念まで加え、ワクチンによる包括的なHIV感染予防の道を探ることを目的とする。

2. 研究方法

(1) 粘膜 カニクイサルに SeV-Gag 経鼻接種後、鼻腔粘膜周辺の顎下リンパ節、さらには扁桃を採取し、リンパ球を分離して、Gag 特異的インターフェロン γ 誘導を細胞内免疫染色により検出することにより、Gag 特異的 T リンパ球レベルを調べた(守屋)。(2) ベクター HIV-1 Env を標的とした組換え BCG (rBCG)/組換えアデノウイルス5型 (rAd5) プライムブーストワクチン後の Env 特異的細胞性免疫誘導能を、テトラマーアッセイにより解析し、DNA プライム-rAd5 ブーストワクチンと比較した。また BCG ベクターの免疫原性向上のための改良に向け、リステリオライシン O (LLO) 変異型遺伝子を作製し、菌体及び培養上清中の蛋白質をウェスタンブロットにより解析した(山本)。SIV の gag と Ag85B の共発現、Ag85B 単独発現、HIV Env と CD40Lm 共発現、CD40Lm 単独発現する各種組み換え VV $m8\Delta$ を作製した。上記 rVV を種々の組み合わせでマウスに DNA ワクチンと prime/boost 法で免疫し、IFN- γ ELISPOT, FACS による分析、細胞障害活性、シュードウイルスの系を用いて抗 HIV 中和抗体の誘導を測定した(志田)。(3) 免疫原デザイン Senju vaccine の免疫原性の確認を行うためアカゲザル(♀)鼠頸部皮下に multiple antigen を注射により投与するか、もしくは腸溶カプセルに封入後経口投与し、血清、糞便、および陰分泌液中の抗体価をモニターした(庄司)。gp41 の N 末側と C 末側の合成ペプチド断片の三量体を人工テンプレート上に構築した分子、コレセプター CXCR4 の N 末端領域と細胞外ループを合成し人工レセプター上に構築した分子、さらに、gp120 のヘアピン領域を環状化した分子を作製し、抗体誘導を検討した。また、gp120 の構造変化誘起能をもつ CD4 ミミック等を合成し、抗 V3 抗体との併用を調べた(玉村)。(4) 弱毒生ワクチン 糖鎖変異生ワクチン投与ザル、nef 遺伝子欠損生ワクチン投与ザル、対照群に SIVmac239 による静脈内接種によるチャレンジ感染実験を行い、感染防御効果を血漿中ウイルス量測定により調べた。また感染防御に働く宿主応答 Immune correlates のひとつとして血漿中の抗体力価、細胞性免疫(末梢血の ELISPOT 法による IFN- γ 産生)、NK 細胞/エフェクター T 細胞 (IFN- γ 産生、CD107a 発現) の測定系を確立し、チャレンジ後の動物で測定した(森)。ゲノム改変により種々の病態を呈する SIV/SHIV を得る。霊長類モデル系の感染実験により粘膜部位における防御効果や治療効果の評価基準を確立する(三浦)。(5) アジュバント・自然免疫 SHIV の nef 欠損ウイルス (SHIV Δ nef) に抗酸菌分泌抗原

Ag85B を組み込み SHIV-Ag85B を作製した。また、Ag85B 遺伝子の発現と分泌を増強する目的でヒト組織プラスミノゲンアクチベーター(tPA)分泌シグナルを上流に挿入した SHIV-tPA-Ag85B ウイルスも同様に作製した(保富)。HAART 療法により末梢血液中のウイルス量が検出感度以下となった症例において、回腸末端部の生検組織より細胞を分離採取し、その粘膜組織における HIV 感染の実体を調べると共に、粘膜に潜伏するウイルスの実体について遺伝子レベルでの解析を試みた(高橋)。HIV-1 gag 遺伝子およびピューロマイシン耐性遺伝子を導入した組み換えバキュロウイルスを MDDC へ感染させ、ピューロマイシンで薬剤セレクションを行った後、Gag の発現、MDDC の活性化マーカー (MHC 分子および共刺激分子) の発現、サイトカイン産生 (IL-12、IL-15、IFN- α および IFN- γ)、抗ウイルス因子である APOBEC3F および 3G の発現確認を行った(高久)。(6) 液性免疫 Env V3 領域の GPGR motif を標的エピトープとする中和抗体 KD-247 をモデルに HIV-1 中和抗体の感受性を規定する Env アミノ酸残基を網羅的に解析することにより Env 構造と機能に対する理解の深化を試みた(駒野)。(倫理面への配慮)

人材料の取り扱いに関しては、各研究施設の倫理委員会における指針をもとに研究を行う。動物実験は、各施設の諸内規や作業方式に従って、動物愛護の精神で動物に与える苦痛の軽減と排除に勤める。

3. 研究結果

SeV-Gag ベクターワクチン経鼻接種後、顎下リンパ節および扁桃中に、Gag 特異的 T リンパ球レベルを確認することができ、粘膜免疫反応誘導の可能性が示唆された(守屋)。プライミングを DNA ワクチンで行った場合と rBCG で行った場合で、誘導される CTL の clonotype が異なることがわかった。rBCG と rAd5 のプライムブーストワクチンの CTL 誘導能は強力ではなかった。BCG ベクターの免疫原性改良を目的として、変異型 LLO 遺伝子 (E247M, D320K) 分泌発現ベクターを BCG 東京株へ導入したところ、目的の LLO が分泌発現していることがわかった(山本)。組換え m8 Δ は SIV gag、Ag85B、HIV Env、CD40Lm を全て計画通り発現していた。そして、マウスに Env 特異的 IFN- γ 産生細胞を誘導した。それは主に CD8+ T 細胞だった。現在詳細な解析を進めている(志田)。Senju vaccine の免疫原性の確認をアカゲザル(♀)にて行った結果、gp140 および CCR5 に対する抗体の誘導が確認できた。また得られた抗血清は SIVmac239 の感染を阻害した。さらに multiple antigen を経口免疫することにより粘膜面に CCR5 に対する IgA を誘導でき、その IgA は SIVmac239 の感染を阻害した(庄司)。gp41 の N 末側と C 末側の合成ペプチド断片の三量体を人工テンプレート上に構築した分子の合成に成功した。また、CXCR4 の N 末端領域と細胞外ループを合成し、テンプレートへ導入し

た。また、gp120の中和抗体エピトープ提示のための環状ペプチドを合成し、マウス、ウサギで抗体誘導を調べた。種々のCD4ミミック等を合成し、抗V3抗体の認識を増強させることを見出した(玉村)。SIV239は高い中和抗体抵抗性のため、有意の抗体価は検出されなかったが、ウイルスタンパク結合抗体と感染制御との関連を示唆する結果が得られた。対象群の長期感染ザル、一部の生ワクチン感作ザルで高力価(>10⁴)と相関があった。細胞性免疫:SIV特異的T細胞の頻度は個体間の違いが大きく、感染制御との相関は見られなかった。細胞傷害活性の調節因子の一つであるIL-15に反応性の細胞傷害活性をNK細胞、T細胞において測定する系を確立し感染制御との関連が明らかとなった(森)。CXCR4指向性強毒SHIV-KS661のV3領域に変異を導入しCCR5指向性に改変することに成功した。この変異体ウイルスをアカゲザルに静脈内接種したところ4頭中1頭のサルで10の3乗~4乗copies/ml程度のウイルスRNA量を維持した。ウイルスRNA量を維持したサルから別のサルへウイルスの継代を行ったところ、3代目のサルで安定して血中ウイルスRNA量を維持し、メモリーT細胞の割合が多い小腸で著しいCD4陽性T細胞の減少が観察された(三浦)。SHIV-Ag85BおよびSHIV-tPA-Ag85Bにおけるウイルス増殖性を検討したところ両者には差がないが、Ag85Bの細胞内発現ではSHIV-Ag85Bの発現が強く、ワクチン利用にはSHIV-Ag85Bが適していると考えられた(保富)。HAART治療により血液中のHIV粒子が消失した状態においても、小腸粘膜組織では獲得免疫を構築する、従来のCD4陽性T細胞ではなく、自然免疫を担うCD4陽性樹状細胞やNKT細胞にHIV粒子(P24)を確認することができた。また、このウイルス粒子におけるV3領域を検索したところ、CCR5感受性を有するR5-type粒子のみならずCXCR4感受性を有するX4-typeの粒子が確認された(高橋)。Gag発現パキキュロウイルスに感染したMDDCは活性化マーカーであるMHC I、II、CD80およびCD86の発現上昇、IL-12、IL-15、IFN- α およびIFN- γ を産生した。また、抗ウイルス因子であるAPOBEC3Fおよび3Gの発現を確認した。さらに、HIV-1(JR-CSF)の複製阻害効果も認められた(高久)。KD-247感受性を規定するエピトープ外アミノ酸残基をV1/V2領域からgp41領域まで広範囲に同定され、エピトープ外変異の集積により1万倍以上の中和感受性変化をもたらすこと、V3領域がEnv各ドメインと密接な構造的繋がりがあることが示された(駒野)。

4. 考察

とくにHIVの易変異性とウイルス間の高いリコンビネーションの確率から、エイズワクチンの実現にはすくなくならぬ困難が待ち構えている。ただ分担研究者の個々のプロジェクトはそれぞれユニークなものであり、今後のワクチン開発にとって、貴重な研究資料となるであろう。

5. 自己評価

1) 達成度について

SeV-Gagベクターワクチン経鼻接種による粘膜免疫反応誘導の可能性について、第一段階(鼻腔周辺)の検証を行うことができた(守屋)。Gagを標的とする細胞性免疫誘導型rBCG/rDisワクチンの評価は、その至適化により実用を視野にいれたhuman doseにおける免疫原性・持続性を確認できた(山本)。CD40LmとAg85Bの共発現rVVの作製は順調に行われた。現在、免疫誘起効果をマウスで検討中であり、年度末までには結果を出せる予定である

(志田)。粘膜面にCCR5に対するIgAを誘導できたことにより、TGDKを介したM細胞標的抗原デリバリーシステムが飲むエイズワクチン開発に向けた有効な手段になり得ることを示すことができた(庄司)。昨年度に引き続き、4種の抗体誘導のアプローチをすすめており、いずれの研究も順調に推移している(玉村)。Immune correlatesとして中和抗体以外の抗体の役割、感染制御状態について示唆しているNK細胞/エフェクターT細胞の役割について示唆する結果が得られた。また個体差から種々の宿主応答が感染制御に働いていることを示唆する結果が得られた。計画はほぼ達成された(森)。新規CCR5指向性SHIVを作製し、アカゲザルへの順化を行うことができた。よりよいワクチン評価系の確立に向けてよいスタートができたことから初年度の目的はある程度達成できたものと考えられる(三浦)。アジュバント活性を持つ異種タンパクを発現するウイルスはエイズウイルスのみならず他のウイルスでの報告もない。その意味でこの様なウイルスが作製されたことは極めて興味深いことである。今後このウイルスの生体内での動向を検討していく(保富)。当初より予想していた粘膜組織におけるHIV感染自然免疫担当細胞群を制圧することの重要性を示唆しており、本知見は当初の予測が正しいことを裏付ける結果であった(高橋)。HIV-1Gagを持続的に発現するMDDCを樹立した。Gag発現パキキュロウイルスに感染したMDDCは活性化マーカーであるMHC I、II、CD80およびCD86の発現上昇、IL-12、IL-15、IFN- α およびIFN- γ を産生した。また、抗ウイルス因子であるAPOBEC3Fおよび3Gの発現を確認した。さらに、HIV-1(JR-CSF)の複製阻害効果も認められた(高久)。多様なウイルスと中和抗体の組み合わせで中和感受性を規定するエピトープ外アミノ酸変異の同定を行うことによりEnv構造・機能の核となる領域を同定することが出来るかもしれない。この情報はワクチン開発の基盤情報に繋がると期待される(駒野)。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

現在、抗レトロウイルス薬の役割に大きな関心が向けられているが、エイズの世界的な蔓延をもっとも効率よく防ぐにはワクチンしかない。本研究班からのユニークな研究が、真の感染予防ワクチン開発につながることを期待される。

3) 今後の展望について

これまでのエイズワクチンの開発では、細胞性免疫誘導を目的とした細胞性免疫志向ワクチンの開発が行われてきた。しかし、将来のエイズワクチン開発が目指すものは、他のワクチンの場合と同じように、HIVウイルスからの感染を防ぐ事である。そのためには、HIV Env蛋白の極度の多様性と中和抗体などの液性免疫からの逃避機構まで考慮に入れた対応が求められている。

6. 結論

班員の密な協力と情報交換のもと、HIV感染予防ワクチンの開発研究を総合的に行った。とくにプライムブースト、新規ベクター開発、免疫原デザイン、弱毒生ワクチン、アジュバント、自然免疫の研究を精力的に行い、有用な結果が得られた。

7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

特許 玉村啓和 1件、高久 洋 1件、駒野 淳 1件

研究発表

研究代表者

森 一泰

- 1) Pereira LE, Onlamoon N, Wang X, Wang R, Li J, Reimann KA, Villinger F, Pattanapanyasat K, Mori K, Ansari AA: Preliminary in vivo efficacy studies of a recombinant rhesus anti-alpha(4)beta(7) monoclonal antibody. *Cell Immunol.* 259,165-176, 2009.

研究分担者

志田壽利

- 1) Takayanagi R, Ohashi T, Shida H: Functional analysis of Foxp3 and CTLA-4 expressing HTLV-1-infected cells in a rat model. *Microbes and Infection* 12:964-972, 2009.
- 2) Okada H, Zhang X, Fofana IB, Nagai M, Suzuki H, Ohashi T and Shida H: Synergistic effect of human Cyt1 and CRM1 on HIV-1 propagation in rat T cells and macrophages. *Retrovirology* 6:43, 2009.
- 3) Suzuki H, Kidokoro M, Fofana IB, Ohashi T, Okamura T, Matsuo K, Yamamoto N, Shida H: Immunogenicity of newly constructed attenuated vaccinia strain LC16m8Δ that expresses SIV Gag protein. *Vaccine* 27:966-971, 2009.

庄司省三

- 1) Misumi S, Masuyama M, Takamune N, Nakayama D, Mitsumata R, Matsumoto H, Urata N, Takahashi Y, Muneoka A, Sukamoto T, Fukuzaki K, and Shoji S: Targeted delivery of immunogen to primate m cells with tetragalloyl lysine dendrimer. *J Immunol.* 182:6061-6070, 2009.

玉村啓和

- 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 . *Bioorg. Med. Chem. Lett* doi:10.1016/j.bmcl.2009.10.098.
- 2) Mizukoshi F, Baba K, Goto-Koshino Y, Setoguchi-Mukai A, Fujino Y, Ohno K, Tamamura H, Oishi S, Fujii N, Tsujimoto H: Inhibitory effect of newly developed CXC-chemokine receptor 4 antagonists on the infection with feline immunodeficiency virus. *J. Vet. Med. Sci.* 71(1):121-124, 2009.
- 3) Tanaka T, Nomura W, Narumi T, Esaka A, Oishi S, Ohashi N, Itotani K, Evans BJ, Wang Z, Peiper SC, Fujii N, Tamamura H: 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.

三浦智行

- 1) Inaba K, Fukazawa Y, Matsuda K, Himeno A, Matsuyama M, Ibuki K, Miura Y, Koyanagi Y, Nakajima A, Blumberg RS, Takahashi H, Hayami M, Igarashi T, Miura T: Small intestine CD4+ cell reduction and enteropathy in SHIV-KS661-infected rhesus macaques in presence of low viral load. *J. Gen. Virol.*, in press.
- 2) Iwami S, Nakaoka S, Takeuchi Y, Miura Y, and Miura T: Immune impairment thresholds in HIV infection. *Immunol. Lett.*, 123: 149-154, 2009.
- 3) Suzuki T, Yamamoto N, Nonaka M, Hashimoto Y, Matsuda G, Takeshima SN, 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 alpha interactions as a novel HIV-1 therapy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 380: 838-843, 2009.

保富康宏

- 1) Yasutomi Y: Establishment of specific pathogen-free macaque colonies in Tsukuba Primate Research Center of Japan for AIDS research. *Vaccine* 2009, in press.
- 2) Fujimoto K, Takano J, Narita T, Hanari K, Shimozawa N, Sankai T, Yoshida T, Terao K, Kurata T. and Yasutomi Y: Simian Retrovirus type D infection in a colony of cynomolgus monkeys. *Comp. Med.* 2009, in press.
- 3) Morioka T, Yamanaka K, Mori H, Omoto Y, Tokime K, Kakeda M, Kurokawa I, Gabazza E, Tsubura A, Yasutomi Y and Mizutani H: IL-4/IL-13 antagonist DNA vaccination successfully suppresses Th2 type chronic dermatitis. *Br.J.Dermatol.* 160:1172-1179, 2009.

高橋秀実

- 1) Takahashi H: Species-specific CD1-restricted innate immunity for the development of HIV vaccine. *Vaccine* 2009, in press.

- 2) Shinya E, Owaki A, Norose Y, Sato S, Takahashi H: Quick methods of multimeric protein production for biologically active substances such as human GM-CSF (hGM-CSF). *BBRC* 386:40-44, 2009.
- 3) Higuchi T, Shimizu M, Owaki A, Takahashi M, Shinya E, Nishimura T, Takahashi H: A possible mechanism of intravesical BCG therapy for human bladder carcinoma: involvement of innate effector cells for the inhibition of tumor growth. *Cancer Immunol. Immunother.* 58:1245-1255, 2009.

高久 洋

- 1) Suzui T, Chang Oo M, Kitajima, M, Takaku H: Baculovirus activates murine dendritic cells and induces non-specific NK cell and T cell immune responses. *Cellular Immunology*, in press.
- 2) Furukawa A, Nagata T, Matsugami A, Habu Y, Sugiyama R, Hayashi F, Kobayashi N, Yokoyama S, Takaku H, and Katahira M: Structure, interaction and real-time monitoring of the enzymatic reaction of wild-type APOBEC3G. *EMBO J.* 28: 440-451, 2009.
- 3) Barnor JS, Habu Y, Yamamoto N, Miyano-Kurosaki N, Ishikawa H, Yamamoto N, and Takaku H: Inhibition of HIV-1 replication by long-term treatment with a chimeric RNA containing shRNA and TAR decoy RNA. *Antiviral Res.* 83:156-164, 2009.

駒野 淳

- 1) Hamatake M, Komano J, Urano E, Maeda F, Nagatsuka Y, Takekoshi M: Inhibition of HIV replication by a CD4-reactive Fab of an IgM clone isolated from a healthy HIV-seronegative individual. *Euro J Immunol.* Revision submitted for publication.
- 2) Kariya Y, Hamatake M, Urano E, Yoshiyama H, Shimizu N, Komano J: A dominant-negative derivative of EBNA1 represses EBNA1-mediated transforming gene expression during the acute phase of Epstein-Barr virus infection independent of rapid loss of viral genome. *Cancer Sci*, in press.
- 3) Urano E, Ichikawa R, Morikawa Y, Yoshida T, Koyanagi T, Komano J. T cell-based functional cDNA library screening for cellular regulatory genes of human immunodeficiency virus replication. *Vaccine*, in press.

山本直樹

- 1) Ohba K, Ryo A, Dewan MZ, Nishi M, Naito T, Qi X, Inagaki Y, Nagashima Y, Tanaka Y, Okamoto T, Terashima K, Yamamoto N: Follicular dendritic cells activate HIV-1 replication in monocytes/macrophages through a juxtacrine mechanism mediated by P-selectin glycoprotein ligand 1. *J Immunol.* 183:524-532, 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.* 106:19539-19544, 2009.
- 3) 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 Pathog.* 5:e1000700, 2009.
- 4) Suzuki H, Kidokoro M, Fofana IB, Ohashi T, Okamura T, Matsuo K, Yamamoto N, Shida H: Immunogenicity of newly constructed attenuated vaccinia strain LC16m8Delta that expresses SIV Gag protein. *Vaccine* 11: 966-971, 2009.
- 5) Honda M, Wang R, Kong W-P, Kanekiyo M, Akahata W, Xu L, Matsuo K, Natarajan K, Robinson H, Asher TE, Price DA, Douek DC, Margulies DH, Nabel GJ: Different vaccine vectors delivering the same antigen elicit CD8+ T cell responses with distinct clonotype and epitope specificity. *J. Immunol.* 183: 2425-34, 2009.
- 6) Promkhatkaew D, Matsuo K, Pinyosukhee N, Thongdeejaroen W, Leang-Aramgul P, Sawanpanyalert P, Warachit P: Prime-boost vaccination using recombinant *Mycobacterium bovis* BCG and recombinant vaccinia virus DIs harboring HIV-1 CRF01_AE gag in mice: influence of immunization routes. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 40: 273-81, 2009.

研究課題：HIV感染病態に関わる宿主因子および免疫応答の解明

課題番号：H21-エイズ-一般-009

研究代表者：横田 恭子（国立感染症研究所 免疫部長）

研究分担者：徳永 研三（国立感染症研究所感染病理部 主任研究官）、石坂 幸人（国立国際医療センター研究所難治性疾患研究部 部長）、梁 明秀（横浜市立大学医学部 教授）、小柳 義夫（京都大学ウイルス研究所ウイルス病態研究領域 教授）、宮澤 正顕（近畿大学医学部 教授）、田中勇悦（琉球大学医学部教授）、神奈木真理（東京医科歯科大学 大学院歯学総合研究科 免疫治療学分野、教授）、立川 愛（東京大学医科学研究所先端医療研究センター感染症分野 助教）、有吉 紅也（長崎大学熱帯医学研究所 教授）、高橋秀宗（国立感染症研究所 感染病理部 室長）

1. 研究目的

制御不能な HIV 増殖と潜伏感染リザーバーの存在はエイズ病態形成の主たる要因である。本研究班では、ウイルス制御に関わる宿主因子の同定とその作用機構の解明、HIV 感染後の病態形成に重要な役割を果たす多様な抗 HIV 免疫応答の解析を2本の柱とし、宿主因子を利用したウイルス増殖制御と有効な抗 HIV 免疫応答誘導による感染拡大・潜伏化の阻止をめざす。

2. 研究方法

宿主因子によるウイルス制御:1) ヒト宿主因子 BST-2/Tetherin の抗ウイルス機能と Vpu との相互作用、Vpu が BST-2/Tetherin を標的とする細胞内部位、細胞内分解経路を解析した。2) THP-1 細胞にヒトゲノムに存在しない I-SceI 認識サイトを導入して作製した DNA 損傷(DSB)部位への HIV-1 感染によるウイルス DNA の挿入頻度を定量 PCR で検定し、ウイルス挿入部位を決定した。Vpr-GST 融合蛋白に結合する宿主側蛋白を網羅的に解析した。3) TRIM5α の霊長類種間多型と抗 HIV 作用を解析し、TRIM5α の大量発現系を構築した。4) TAP (Tandem affinity purification) 法により HIV-1 Gag 結合精製タンパク質を同定し、無細胞タンパク質合成系とホモジニアスプロキシミティアッセイ・アルファスクリーンを用いてその結合を確認した。5) cDNA ライブラリ発現レンチウイルスベクターを用いて、新規 HIV 抑制宿主分子の単離同定を行った。6) *Rac2* 遺伝子の機能的イントロン多型を同定し、発現調節領域のコア配列部分断片の導入と変異導入、siRNA による *Rac2* 発現抑制効果を解析した。

抗 HIV 免疫応答の解析:1) 赤色蛍光を発する HIV-1 と緑色蛍光を発する野生型麻疹ウイルスの PBMC 感染後の相互作用をフローサイトメーターで解析した。2) PBMC を固相化抗 CD3 抗体で活性化し、R5 型 JR-FL を感染させて、OX40L 発現細胞や組換え OX40L (R&D 製) 添加した培養上清中の HIV-1 増殖とサイトカイン定量を行った。3) 正常ラットの脾臓 T 細胞を自己抗原で刺激し、自己応答性 CD4 陽性 T 細胞株を樹立した。4) 血中 HIV 量の異なる慢性 HIV 感染者の MIP-1α, MIP-1β, RANTES(β

ケモカイン) 産生細胞を特定し、分化段階を表す表面抗原 (CD45RA, CCR7)、活性化や疲弊状態を表す抗原 (CD38, Ki67, PD-1, CTLA-4) の発現を解析した。5) 北タイ長期未発症者コホートを拡大させ、CRF01_AE Gag のオーバーラッピングペプチドを抗原とする ELISpot アッセイを実施し、臨床経過と比較検討した。6) 精製 HIV-1 様粒子からデタージェントにより脂質二重膜を取り除いた抗原とオリゴ DNA アジュバントでマウスを免疫した。得られた抗体の env 蛋白への結合性や HIV-1 中和能を計測した。

(倫理面への配慮)

該当する実験は各施設の医学研究倫理委員会による倫理審査を受けて承認を得、個人情報保護法に基づいて患者情報の徹底管理下を実施される。動物実験は各施設の実験動物委員会の承認を得、動物愛護の精神に則り、動物に与える苦痛の軽減と排除に勤める。

3. 研究結果

宿主因子によるウイルス制御:1) Vpu は BST-2 と膜貫通領域で相互作用し、一部宿主因子 TrCP に依存して細胞表面上の BST-2 を細胞内に internalize させ、ライソゾーム分解へと導くことを明らかにした。2) DSB 部位へのウイルス挿入はインテグラーゼの catalytic activity を必要としない。HeLa 細胞の核抽出液中に GST-Vpr の DSB 作用に関与すると思われる蛋白を見出した。3) 種特異的な HIV-2 感染阻害はアカゲザル TRIM5α の 339 から 341 番目までの3つのアミノ酸 TFP によって決定された。また、カニクイザル TRIM5α の HIV-Gag カプシドを認識する SPRY 領域と多量体形成に関わる coiled-coil 領域からなる蛋白の精製系を確立した。4) 新規 Gag 結合蛋白質として、RNA 結合およびスプライシング関連因子 Dynein 1 や中間系フィラメント、PIM-1, AKT などの宿主キナーゼを同定した。AKT および PIM-1 は Gag の MA 領域を直接リン酸化し HIV-1 の粒子産生を増加させた。5) RNA の成熟に関わる CPSF6 の欠損変異体はウイルス前期課程を強く抑制し、その両端を欠く中央部 182 個のアミノ酸によりウイルス抑制が得

られた。6)曝露非感染者ゲノムに特徴的な *Rac2* のイントロン5領域を絞込み、rs2284037(T/C)とrs4140870(A/G)を同定した。この多型による高 *Rac2* 発現を抑制するとCCR5の発現増加・ β ケモカインの mRNA の短寿命化が誘導され、CCR5 指向性 HIV-1 に対する複製抑制効果が失われた。

抗 HIV 免疫応答の解析: 1)健康人 PBMC における野生型麻疹ウイルス受容体 SLAM の発現は HIV-1 感染によって増大し、この誘導に HIV-1 の外皮は関与していないことが示された。2)OX40/OX40L 刺激は活性化 PBMC において β ケモカイン産生を介して R5 型 HIV-1 の感染増殖を抑制した。3)誘導型の調節性 T 細胞と考えられるラット CD4 陽性 T 細胞を確立した。4)高血中ウイルス慢性感染者群 PBMC において産生低下が見られた β ケモカインは CD4 及び CD8 陽性 T 細胞によって産生され、活性化(CD38+/Ki67+)し疲弊状態に陥った(PD-1+) T 細胞が有意に高頻度であった。5)HIV 感染者のフィールド研究活動拠点を北タイで拡大させた。139名の HIV 感染者の CRF01_AE Gag で少なくとも18か所の新しい CTL エピトープが判明し、認識幅と強度が CD4 値およびウイルス量と有意に相関した。6)抗血清による 50% HIV-1 感染阻害 (ID50) が 100 倍程度の希釈で可能であった。Env の膜貫通領域に近いエピトープを認識し中和能を有するモノクローナル抗体をいくつか得た。

4. 考察

宿主因子に関しては Vpu と BST-2 相互作用に関する詳細な知見が得られ、Vpr の静止マクロファージへの感染効率と DSB の関与等、ウイルス蛋白と細胞内蛋白との相互作用の詳細が明らかになってきている。サル TRIM5 α の重要な機能領域の多型と HIV-2 感染阻害能との関係も明らかとなり、確立された精製 TRIM5 α 蛋白の結晶構造解析が期待される。その他にも新規細胞内蛋白とウイルス蛋白の相互作用が次々に見出され、HIV-1Gag をリン酸化する宿主キナーゼは直接 Gag タンパク質をリン酸化して Gag タンパク質の細胞膜への輸送や重合化を促進する可能性が示唆された。ウイルスベクター法で見出されたウイルス抑制性宿主蛋白はそのまま遺伝子治療ベクターとしての応用も可能である。また、曝露非感染者の感染抵抗性を賦与すると考えられる *Rac2* の高発現が CCR5 指向性 HIV-1 の複製を抑制する機構も明らかになりつつある。

免疫応答の解析においては、ワクチン候補としての Gag 発現麻疹ウイルスや麻疹外皮被覆抗 HIV レンチウイルスベク

ター応用にむけた基礎的段階として、麻疹ウイルスと HIV-1 の相互作用は重要である。抗原提示細胞と T 細胞の免疫シナプスを介する刺激の一つ OX40/OX40L シグナルが β ケモカインの産生を促進して R5 HIV-1 感染拡大を抑制するという知見は新しい OX40L の免疫機能である。また、調節性 T 細胞と思われる細胞株は、今後の HIV-1 潜在感染に関する研究の有用なツールとなる。臨床的には β ケモカインの産生低下は慢性的活性化と疲弊に伴う T 細胞機能低下によることが示された。従ってこの班研究で共通して β ケモカインの病態形成における役割、即ち R5 型 HIV-1 の感染を制御することの重要性が再確認された。また、アジア特有の CRF01_AE 株感染で Gag 領域に対する CTL 認識の幅と強度が臨床経過と相関するという結果は B 株と同様 CTL による Gag 認識の重要性を示唆している。このような細胞性抗 HIV 免疫に加え、中和活性のある特異的抗体誘導をめざしたワクチン開発の可能性が示された。

5. 自己評価

1) 達成度について

2本の柱において概ね計画通りに進行している。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

既に、インパクトのある雑誌に掲載されて国際的評価を得た成果も出始めている。本研究班の成果は日本のエイズ研究を基礎から支え、新たな治療法やワクチン開発の基盤となることが期待される。

3) 今後の展望について

本研究班によって新たに明らかとなった宿主因子とウイルス蛋白の相互作用および抗 HIV 免疫応答に関する分子レベルの機能解析を更に進める。また、これらの要因の生体における役割について、班員相互の共同研究を更に拡大し、ヒト化マウスや臨床検体等を用いて生体における作用、効果を実証していく必要があると考える。

6. 結論

宿主因子と抗 HIV 免疫応答の2本の柱においていくつかの新規分子の同定や病態に関わる要因が発見された。

7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

なし。

研究発表

研究代表者

横田恭子

- 1) Yamamoto, T., Samri, A., Mitsuki, Y-Y., Mizukoshi, F., Kobayashi, K., Inoue, J.-I., Autran, B. and Tsunetsugu-Yokota, Y.: siRNA inhibiting HIV-1 reactivation restores function of HIV-specific CD4+ T cells in chronically HIV-infected individuals. *AIDS* 23:2265-2275, 2009.
- 2) Yamamoto T, Tsunetsugu-Yokota Y, Mitsuki YY, Mizukoshi F, Tsuchiya T, Terahara K, Inagaki Y, Yamamoto N, Kobayashi K, Inoue J.: Selective transmission of R5 HIV-1 over X4 HIV-1 at the dendritic cell-T cell infectious synapse is determined by the T cell activation state. *PLoS Pathog* 5:e1000279, 2009.
- 3) Mizukoshi F, Yamamoto T, Mitsuki YY, Terahara K, Kawana-Tachikawa A, Kobayashi K, Iwamoto A, Morikawa Y, Tsunetsugu-Yokota Y.: Activation of HIV-1 Gag-specific CD8+ T cells by yeast-derived VLP-pulsed dendritic cells is influenced by the level of mannose on the VLP antigen. *Microbes Infect* 11:191-197, 2009.
- 4) Yamamoto T, Iwamoto N, Yamamoto H, Tsukamoto T, Kuwano T, Takeda A, Kawada M, Tsunetsugu-Yokota Y, Matano T.: Polyfunctional CD4+ T-cell induction in neutralizing antibody-triggered control of simian immunodeficiency virus infection. *J Virol* 83:5514-24, 2009.

研究分担者

徳永研三

- 1) Iwabu, Y., Fujita, H., Kinomoto, M., Kaneko, K., Ishizaka, Y., Tanaka, Y., Sata, T., and Tokunaga, K. HIV-1 accessory protein Vpu internalizes cell-surface BST-2/tetherin through transmembrane interactions leading to lysosomes. *J. Biol. Chem.* 284:35060-35072. 2009.
- 2) Jinnopat, P., Isarangkura-na-ayuthaya, P., Utachee, P., Kitagawa, Y., Chandimal de Silva, U., Siripanyaphinyo, U., Kameoka, Y., Tokunaga, K., Sawanpanyalert, P., Ikuta, K., Auwanit, W., and Kameoka, M. Impact of Amino Acid Variations in Gag and Protease of Human Immunodeficiency Virus Type 1 CRF01_AE strains on Drug Susceptibility of Virus to Protease Inhibitors. *J. AIDS.* 52: 320-328. 2009.
- 3) Utachee, P., Jinnopat, P., Isarangkura-na-ayuthaya, P., Chandimal de Silva, U., Nakamura, S., Siripanyaphinyo, U., Wichukchinda, N., Tokunaga, K., Yasunaga, T., Sawanpanyalert, P., Ikuta, K., Auwanit, W., and Kameoka, M. Genotypic Characterization of CRF01_AE env Genes Derived from Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Patients Residing in Central Thailand. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 25: 229-236, 2009.

田中勇悦

- 1) Nie C, Sato K, Misawa N, Kitayama H, Fujino H, Hiramatsu H, Heike T, Nakahata T, Tanaka Y, Ito M, Koyanagi Y. Selective infection of CD4+ effector memory T lymphocytes leads to preferential depletion of memory T lymphocytes in R5 HIV-1-infected humanized NOD/SCID/IL-2Rgammanull mice. *Virology.* 394(1):64-72. 2009
- 2) Ohba K, Ryo A, Dewan MZ, Nishi M, Naito T, Qi X, Inagaki Y, Nagashima Y, Tanaka Y, Okamoto T, Terashima K, Yamamoto N. Follicular dendritic cells activate HIV-1 replication in monocytes/macrophages through a juxtacrine mechanism mediated by P-selectin glycoprotein ligand 1. *J Immunol.* 183(1):524-32, 2009.
- 3) Murakami T, Kumakura S, Yamazaki T, Tanaka R, Hamatake M, Okuma K, Huang W, Toma J, Komano J, Yanaka M, Tanaka Y, Yamamoto N 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(7):2940-8, 2009

宮澤 正顕

- 1) Miyazawa, M., Tsuji-Kawahara, S., Chikaishi, T., Kato, M., and Takamura, S. Mouse APOBEC3 affects the production of virus-neutralizing antibodies by restricting early retroviral replication, not by altering the B-cell repertoire. *Retrovirology* 6: 09, 2009.
- 2) Miyazawa, M., and Clerici, M. Replies: The 'immunologic advantages' of HIV-exposed seronegative individuals. *AIDS* 23:1612, 2009.
- 3) Miyazawa M., Lopalco, L., Mazzotta, F., Lo Caputo, S., Veas, F., and Clerici, M. The "immunologic advantage" of HIV-exposed seronegative individuals. *AIDS* 23:161-175, 2009.

神奈木真理

- 1) Nishitsuji, H., Hayashi, T., Takahashi, T., Miyano, M., Kannagi, M., and 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:e7825, 2009.

塩田達雄

- 1) Onyango CO., Leligdowicz A., Yokoyama M., Sato H., Song H., Nakayama EE., Shioda T., Silva T., Townend J., Jaye A., Whittle H., Rowland-Jones S., and Cotton M. HIV-2 Capsids Distinguish High and Low Virus Load Patients in a West African Community Cohort. *Vaccine*. 2009. in press
- 2) Nakayama EE., and Shioda T. Anti-retroviral activity of TRIM5 (alpha). *Reviews in Medical Virology*. 2009. in press
- 3) Kuroishi A., Saito A., Shingai Y., Shioda T., Nomaguchi M., Adachi A., Akari H., and Nakayama EE. Modification of a loop sequence between alpha-helices 6 and 7 of virus capsid (CA) protein in a human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) derivative that has simian immunodeficiency virus (SIVmac239) vif and CA alpha-helices 4 and 5 loop improves replication in cynomolgus monkey cells. *Retrovirology*. 6:70, 2009.
- 4) Kono K., Bozek K., Domingues FS., Shioda T., and Nakayama EE. Impact of a single amino acid in the variable region 2 of the Old World monkey TRIM5alpha SPRY (B30.2) domain on anti-human immunodeficiency virus type 2 activity. *Virology*. 388:160-8, 2009.

石坂幸人

- 1) Shimura, M., Toyoda, Y., Kinomoto, M., Tokunaga, K., Yoda, K., Yanagida, M., Sata, T., Ishizaka, Y. HIV-1 Vpr induces defective chromatid cohesion and kinetochore organization via mislocalization of HP1 α and HP1 β depending on p300. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press.
- 2) Hoshino, S., Konishi, M., Mori, M., Shimura, M., Nishitani, C., Kuroki, Y., Koyanagi, Y., Kano, S., Itabe, H. and Ishizaka, Y. HIV-1 Vpr induces TLR4/MyD88-mediated IL-6 production and reactivates viral production from latency. *J. Leukocyte Biol.*, in press.

高橋秀宗

- 1) Takahashi, H., Kitagawa, Y., Maeda-Satoh, M., Hasegawa, H., Sawa, H., Sata, T. Monoclonal antibody and siRNAs for topoisomerase I suppresses telomerase activity. *Hybridoma*, 28(1): 63-65, 2009.
- 2) Kitagawa, Y., Maeda-Sato, M., Tanaka, K., Tobiume, M., Sawa, H., Hasegawa, H., Kojima, A., Hall, W.W., Kurata, T., Sata, T., Takahashi, H. Covalent bonded Gag multimers in human immunodeficiency virus type-1 particles. *Microbiol Immunol*. 53(11):609-620, 2009.

立川 愛

- 1) Nunoya J, Nakashima T, Kawana-Tachikawa A, Kiyotani K, Ito Y, Sugimura K, Iwamoto A. Generation of recombinant monoclonal antibodies against an immunodominant HLA-A*2402-restricted HIV type 1 CTL epitope. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 25: 897-904, 2009.
- 2) 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: 651-660, 2009.
- 3) Mizukoshi F, Yamamoto T, Mitsuki YY, Terahara K, Kawana-Tachikawa A, Kobayashi K, Iwamoto A, Morikawa Y, Tsunetsugu-Yokota Y. Activation of HIV-1 Gag-specific CD8+ T cells by yeast-derived VLP-pulsed dendritic cells is influenced by the level of mannose on the VLP antigen. *Microbes Infect*. 11: 191-7, 2009.

小柳義夫

- 1) Sato K, Yamamoto SP, Misawa N, Yoshida T, Miyazawa T, Koyanagi Y. Comparative study on the effect of human BST-2/Tetherin on HIV-1 release in cells of various species. *Retrovirology*, 6: 53, 2009.
- 2) Shinoda Y, Hieda K, Koyanagi Y, Suzuki Y. Efficient transduction of cytotoxic and anti-HIV-1 genes by a gene-regulatable lentiviral vector. *Virus Genes*. 25: 165-175, 2009.
- 3) Nie C, Sato K, Misawa N, Kitayama H, Fujino H, Hiramatsu H, Heike T, Nakahata T, Tanaka Y, Ito M, Koyanagi Y. HIV-1 productive infection in CD4+ effector memory T lymphocytes and CD4+ T lymphocyte depletion in humanized NOD/SCID/IL2R γ null mice. *Virology* 394:64-72, 2009.
- 4) Sato K, Nie C, Misawa N, Tanaka Y, Ito M, Koyanagi Y. Dynamics of memory and naive CD8+ T lymphocytes in humanized NOD/SCID/IL-2R γ null mice infected with CCR5-tropic HIV-1. *Vaccine*, in press.

梁 明秀

- 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*, in press
- 2) 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*. 17:583:1243-50, 2009.
- 3) Ryo A, Wulf G, Lee TH, Lu KP: Pinning down HER2-ER crosstalk in SMRT regulation. *Trends Biochem Sci*. 34:162-5, 2009.

研究課題：難治性HIV感染症に対する治療法開発の基礎的研究

課題番号：H21-エイズ一般-010

研究代表者：滝口 雅文（熊本大学エイズ学研究中心 センター長／教授）

研究分担者：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）、満屋 裕明（熊本大学大学院医学薬学研究部 教授）、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附属エイズ研究施設 教授）、松下 修三（熊本大学エイズ学研究中心 教授）

1. 研究目的

HAARTにより、多くのHIV患者の予後は改善されてきたが、耐性ウイルスの出現など多くの問題が生じており、HAART療法に抵抗する難治性HIV感染症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ため、以下のような研究を行う。

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

患者の予後をさらに改善するには、新たに臨床応用された薬剤に対する耐性出現の機序を解明し、さらに耐性ウイルスに対応できるような新規薬剤の開発が必須である。満屋により開発され実用化されたプロテアーゼ二量体阻害剤 darunavir は耐性が出にくい、この darunavir や新たな融合阻害剤などに対する耐性獲得の機序を解明する（満屋・松岡）。さらにこれらの耐性ウイルスを克服する新たなプロテアーゼ二量体阻害剤やHIV遺伝子発現機構を抑制する薬剤の開発を目指す（満屋・馬場）。

柱2：免疫療法の開発を目指した基礎研究

HAART療法に抵抗する難治性HIV患者の治療法としては、薬剤以外のものが望まれている。本研究では、日本人のコホートでのHIV-1感染者のウイルス抑制に関与するHLA抗原を明らかにし（瀧永）、これらの情報をもとに強いHIV-1の増殖抑制をする細胞性免疫や、細胞性免疫から逃避するHIV-1を新たに認識する細胞傷害性T細胞(CTL)を同定し、これを用いた治療法の開発の基礎研究（滝口）、中和抗体を用いた治療法の開発のための基礎研究（松下）をおこなう。

2. 研究方法

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

1) 耐性ウイルス出現の機序の解明：

1. プロテアーゼ阻害剤耐性機構の解明：プロテアーゼ(PR)重合化に重要とされるアミノ酸、プロテアーゼ阻害剤(PDIs)耐性関連変異アミノ酸の詳細な解析を進め、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たPDIsとPR monomer subunitとを結合様式を明らかにする。

2. 融合阻害剤耐性機構の解明：これまで明らかにした融合活性を有する様々なペプチドを用いて耐性ウイルスを誘導する。耐性ウイルスにおける変異を同定し、in vitro mutagenesis で責任変異を明らかにすると共に、耐性機序の解明を行う。

2) 新規薬剤の開発：耐性ウイルスを克服する新たなプロテアーゼ二量体阻害剤やHIV遺伝子発現機構を抑制する薬剤の開発を目指す。

1. 新規プロテアーゼ二量体阻害剤の開発：100種に及

ぶ新規・未報告のPDIsをデザイン・合成・同定しており、そのようなPDIsを用いて結晶解析を基礎にした構造学的解析を通して新たなPDIsを合成する。

2. HIV-1の遺伝子発現を抑制する薬剤開発：Tat/TAR RNAが結合する部分に作用する薬剤をシミュレーションによって薬剤ライブラリーの中から選択、HIV慢性感染細胞を用いて抗ウイルス効果を検証するとともに、宿主細胞遺伝子の発現に対する影響を解析する。

柱2：免疫療法の開発を目指した基礎研究

日本人のコホートで、HIVオーバーラップペプチドを用いて、エリスポットアッセイによりCTLの頻度を調べ、ウイルス抑制に関与するCTLとHLAを明らかにする。新たに明らかにしたCTLから強いHIV増殖抑制をするCTLを、HIV replication suppression assayを用いて明らかにする。さらに世界9か所の慢性感染者のコホートで、これらのCTLから免疫逃避する変異とその蓄積を明らかにする。またV3領域に対する中和抗体から逃避する変異エピトープの解析を行う。

（倫理面への配慮）

患者の血液を用いて行なう研究に関しては、各施設の倫理委員会の承認を受け、その規定する指針に従っておこなった。

3. 研究結果

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

1) 耐性ウイルス出現の機序の解明：

1. HIV-1はプロテアーゼ内部にアミノ酸変異を起こしてプロテアーゼ阻害剤(Pis)に対する耐性を獲得するが、しばしばfitness(増殖能)が低下する。In vitroで誘導したamprenavir(APV)高度耐性HIV-1変異株のGag領域に、プロテアーゼの耐性変異獲得と同時に起こった(あるいは先行した)と思われる複数のnon-cleavage site変異を認めたが、これらの変異はプロテアーゼのPisに対する耐性獲得に関与していることを明らかにした(満屋)。

1. 2. C-HR由来のペプチドの一つであるgp41由来ペプチドC34を改変したSC34、SC34EKに対する耐性プロファイルの解析を行い、SC34に対して誘導した耐性ウイルスはD36K、I37K、R46K、Q52R、Q56R、N126K、S138A、E151K、K154N、N163D、L210F置換が、SC34EKに対する耐性ウイルス誘導ではD36G、Q41R、N43K、A96D、N126K、H132Y、V182I、P203S、L204I、S241F、H258Q、A312T置換が認められた。単一のアミノ酸置換では薬剤感受性に大きな変化は与えなかったが、同定されたアミノ酸変異全てを導入した変異体は高度耐性化を示したことから、SC34およびSC34EKに対する耐性化には単独のA

ミノ酸変異だけでは不十分であり、多くのアミノ酸置換の蓄積が必要であることを明らかにした（松岡）。

2) 新規薬剤の開発：

1. 二つのbinding configurationでプロテアーゼに結合野生株と多剤耐性HIV変異株に対して、強力な活性を發揮するcyclopentanyltetra-hydrofuran (Cp-THF)を有するGRL-02031を同定した（満屋）。またpyrrolidinonesとoxazolidinonesを有する複数のプロテアーゼ阻害剤をデザイン・合成・同定するとともに、macrocyclesを有する強力なPIsを複数合成・同定、さらにllophenylnorstatineを有するPIsも合成・同定した（満屋）。Polarizable Quantum Mechanics-Based Ligand Charges and a Hybrid Water Modelを用いてPIsの実際のIC₅₀値に基づいて、自由エネルギーを算出して、PIsの抗HIV活性を予測する系の確立に努めた（満屋）。

2. p-TEFb/Tat/TAR RNA 複合体の形成を阻害する薬剤の同定を行うべく、in silicoによる薬剤ライブラリーのスクリーニングを、3,000,000化合物のデータベースを使い、この標的サイトに順次ドッキングさせることにより行った。ドッキングスコアの最適な242種について、in vitroでの抗HIV-1活性試験を行い、薬剤の抗HIV-1効果を検証した。その結果、化学構造が全く異なる2種類の化合物に選択的な抗HIV-1活性を認めた（馬場）。

柱2：免疫療法の開発を目指した基礎研究

1. 強いHIV増殖抑制HLA-B5101拘束性Pol283特異的CTLが認識するエピトープ部位の8番目のアミノ酸の置換が、免疫逃避変異であることを証明した。また世界9か所のコホートでこの逃避変異の蓄積を明らかにした。さらに他の13種類の免疫逃避変異の蓄積を証明し、HIV-1が免疫逃避しやすいように進化していることを明らかにした（滝口：Nature 2009）。一方、新たに日本人のコホートでHLA-B5401拘束性エピトープを新たに同定し、そのうち1つのエピトープで新たな逃避エピトープの出現を確認した（滝口）。

2. 日本人158人の無治療慢性HIV-1感染者におけるHIV-1特異的CTL応答を解析したところ、GagとPolにおける反応性がNefよりも有意に高かった。また、Pol及びGag特異的CTL反応の強さは、低いウイルス量に有意に関連していたが、Nefでは関連していなかった（湯永・滝口）。

3. HIV-1BAL株が、抗V3単クローン抗体に対する耐性を獲得する過程で、エピトープの変異や糖鎖の付加が起こり、これらの変異はウイルスのfitness-lossを伴うため、これを補う新たな変異が選択されることを証明した（松下）。

4. 考察

柱1：耐性ウイルス出現の機序の解明では、Gag領域の変異がPIsに対する耐性獲得に関与していることを初めて明らかにしたが、新たなPIsの耐性獲得機序を示したものであり、今後より詳細な機序の解明が重要である。薬剤開発では、新たに強力なPIs候補が同定できたが、今後動物実験などによる安全性などの検証が前臨床試験として必要である。

柱2では、現在流行しているHIV-1は免疫逃避変異を蓄積していることを示したが、このようなウイルスに対す

る新たな免疫療法の基本的戦略が必要になると考えられる。今後多数のCTLエピトープの同定、そのCTLのHIV増殖抑制能の解析、免疫逃避変異の解析が必要である。

5. 自己評価

1) 達成度について

耐性ウイルスの出現機序の研究では、Gag領域変異が、プロテアーゼのPIsに対する耐性獲得に関与していることを初めて明らかにし、耐性ウイルスの出現に関する分野の研究で大きな成果がえられた。また新薬開発の分野の研究においても、ダルナビアに続く強力なPIの候補を同定し、大きな成果が得られた。一方、免疫療法の開発の基礎研究では、現在流行しているHIV-1は免疫から逃避するように進化していることを示した。このようなウイルスを抑制する新たな免疫治療法の開発の必要異性を示すことができた。その他の研究についても概ね順調に進んでおり、本研究の全体の進展度としては予想以上のものであった。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

本研究の耐性機構の成果とHIVの免疫逃避の蓄積に関する成果は、学術的にも国際的に高く評価されている。またこれらの成果は新薬開発における基盤的成果として重要であり、新薬開発につながるものであることから、社会的意義は大きい。

3) 今後の展望について

柱1では、新たな薬剤の開発を目指していくつかの候補を同定した。これらは、臨床試験に入る新たな候補薬剤として期待できる。柱2では、CTLから逃避する変異を持ったウイルスが蓄積することを世界的レベルで明らかにし、今後の治療・ワクチン開発研究の方向性を示した。本研究の後半2年は、新たな戦略の開発が重要と考えられる。多数のコホートを用いた多数のCTL解析を行い、有益なCTLを同定することにより、これらを用いた新たな治療法の開発が期待できる。

6. 結論

1) Gag領域の複数のnon-cleavage site変異は、プロテアーゼのPIsに対する耐性獲得に関与していることを明らかにした。

2) 多剤耐性HIV変異株に対して、強力な活性を發揮するCp-THFを有するGRL-02031を同定した。

3) macrocyclesを有する強力なPIs、またallophenylnorstatineを有するPIsを合成・同定した。

4) p-TEFb/Tat/TAR RNA複合体の形成を阻害する薬剤の同定した結果、化学構造が全く異なる2種類の化合物を同定した。

5) HIV-1が免疫逃避するように進化していることを明らかにした。

6) 日本人の患者では、GagおよびPol特異的CTLがウイルスの抑制に関与することを明らかにした。

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

(2009年度で本研究に関連した論文発表に限定する)

研究代表者

滝口雅文

- 1) 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.* (in press)
- 2) Roshorn, Y., Hong, J.P., Kobayashi, N., McMichael, A.J., Volsky, A.J., Potash, M.J., Takiguchi, M., and Hanke, T. Protection of mice against chimaeric human immunodeficiency virus type 1 challenge by clade B vaccine designed for HLA-B*5101+ patients. *Eur. J. Immunol.* 39:1831-1840, 2009.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.

研究分担者

瀧永博之

- 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., 他 29 名, Takiguchi, M.* , and Goulder, P.* (* equally contributed) . Adaptation of HIV-1 to HLA I. *Nature.* 458: 641-645, 2009.

満屋裕明

- 1) 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.* (in press)
- 2) 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)
- 3) Ghosh, A.K., Sarang Kulkarni, S., Anderson, D.D., Hong, L., Baldrige, A., Wang, Y.-F., Chumanovich, A.A., Kovalevsky, A.Y., Tojo, Y., Koh, Y., Tang, J., Weber, I.T., and Mitsuya, H. Design, synthesis, protein-ligand X-ray structures and biological evaluation of a series of novel macrocyclic HIV-1 protease inhibitors to combat drug-resistance. *J. Med. Chem.* (in press)
- 4) 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.* (in press)
- 5) 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.* (in press)
 - 6) Ghosh, A.K., Anderson, D.D., Baldrige, A., Heather, B., Miller, H.B., Tie, Y., Wang, Y.F., Koh, Y., Weber, I.T., and 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.* 52:3902-3914, 2009.
 - 7) Aoki, M., Venzon, D.J., 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.
 - 8) Koh, Y., Das, D., Leschenko, S., Nakata, H., Ogata-Aoki, H., Nakayama, M., Ghosh, A.K., and Mitsuya, H. GRL-02031: A novel nonpeptidic protease inhibitor (PI) containing a stereochemically defined fused cyclopentanyltetra-hydrofuran (Cp-THF) potent against multi-PI-resistant HIV-1 in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:997-1006, 2009.

馬場昌範

- 1) Baba, M. Entry inhibitors of human immunodeficiency virus. In: LaFemina RL (Ed), *Antiviral Research: Strategies in Antiviral Drug Discovery*, 2009, pp.19-32, ASM Press, Washington, DC.
- 2) Shi, M., Wang, M., Okamoto, M., Takao, S., and Baba, M. Inhibition of porcine endogenous retrovirus (PERV) replication by HIV-1 gene expression inhibitors. *Antiviral Res.* 83: 201-204, 2009.

松岡雅雄

- 1) Michailidis, E., Marchand, B., Kodama, E.N., Singh, K., Matsuoka, M., Kirby, K.A., Ryan, E.M., Sawani, A.M., Nagy, E., Ashida, N., Mitsuya, H., Parniak, M.A., and Sarafianos, S.G. 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.* 284:35681-91, 2009.
- 2) Ueno, M., Kodama, E.N., Shimura, K., Sakurai, Y., Kajiwara, K., Sakagami, Y., Oishi, S., Fujii, N., and 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: 67-72, 2009.
- 3) 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., and Matsuoka, M. Design of peptide-based inhibitors for HIV-1 strains resistant to T-20. *J. Biol. Chem.* 53: 1013-1018, 2009.

松下修三

- 1) Hatada, M., Yoshimura, K., Harada, S., Kawanami, Y., Shibata J., 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).
- 2) 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.

研究課題：国内外の HIV 感染症の流行動向及びリスク関連情報の戦略的収集と統合的分析に関する研究

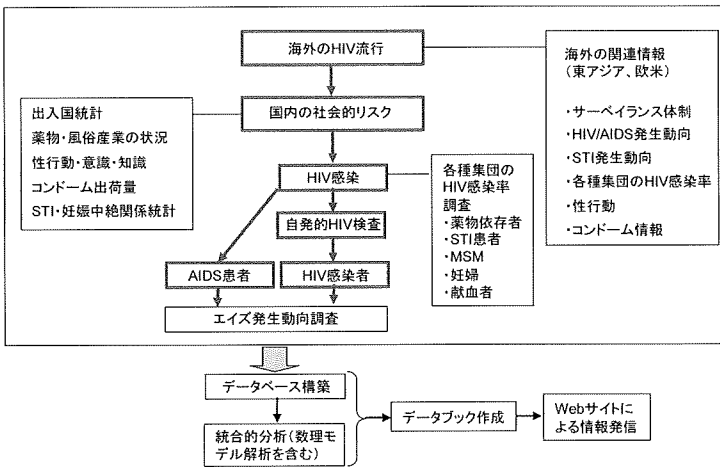
課題番号：H21-エイズ一般-011

主任研究者：木原正博（京都大学大学院医学研究科社会健康医学系専攻社会疫学分野 教授）

分担研究者：和田 清（国立精神・神経センター精神保健研究所 薬物依存研究部長）、小野寺昭一（東京慈恵会医科大学医学部感染制御部 教授）、中村亮介（東京都立松沢病院精神科 医長）

1.研究目的

2000 年代以降、HIV 流行は東アジアで急拡大、欧米諸国で再燃が始まり、その影響がわが国に及ぶ危険が高まっているが、国民の HIV 性感染症（STI）関連知識の低迷、HIV 感染者の増加、先進国として異例なエイズ患者数増加に示されるように、未だ有効な啓発普及や施策形成が実現していない。その主因の1つに、必要な内外の HIV 流行の動向や関連情報が系統的かつ利用しやすい形で政策的に整備・公開されてこなかったことがある。こうした情報の継続的かつ系統的収集分析（数理予測を含む）は、流行の現状や展望への社会的理解を深め、合理的で有効な施策形成の上で不可欠である。そこで、本研究では、①HIV/STI 流行やそれに関連する内外の二次・一次データの網羅的な収集によるデータベースの構築と分析、②流行の推計・予測に関する数理モデルの構築、③Web サイトによる情報公開・発信を通して、わが国における効果的かつ効率的なエイズ施策の形成・普及啓発に資することを目的とする（図）。



2.研究方法と 3.研究結果（本年度）

1)内外の HIV/STI 流行及び関連情報の集約的分析に関する研究（木原）

A.二次データの継続収集と動向分析

【方法】以下の情報を継続収集し、内外の HIV 流行を巡る最新動向を分析した。①日本の行政統計情報：HIV/AIDS 発生動向情報、STI サーベイランス情報、母子保健統計、保健所等 HIV 検査・相談統計、薬事工業生産動態統計、出入国管理統計、警察関係統計、②日本の各種

文献・調査報告書の情報：全国住民の HIV/STI 関連知識・意識、妊婦の感染率、若者の性行動、MSM（男性とセックスをする男性）の HIV 感染率・行動等、③海外の行政統計情報：主要先進国（米、英、仏、独、加、豪）及び近隣地域（中国、台湾、韓国、香港）の HIV/STI サーベイランス情報（年齢、性別、感染経路別）、④海外の各種文献報告書の情報：PubMed や関連情報サイトからの欧米の HIV/STI 疫学関連研究文献の収集。

【結果】日本、欧米、近隣諸国の関連情報を予定通り収集し、データベースを最新化し（注：台湾、香港については、保健省より最新データを入手したが、中国、韓国は交渉中、欧米の一部は 1 月の公表後に収集）、以下の動向を確認した：①主要先進国では、最近、同性間及び異性間感染による HIV 感染者報告数が大きく増加しはじめ、STI もほぼ同時に増加し始めた（クラミジア[男女]、淋病[男女]、梅毒[主に男性]）。文献的には、この背景に HAART 普及後の予防施策の低迷、社会的危機感の低下、バイアグラ、出会い

系サイトの影響が指摘されている。②近隣諸国で HIV 流行が急増し始めたが、感染経路は多様で、STI の動向とは並行していない。2008 年の単位人口当たりの HIV 感染者報告数は、台湾>香港>中国>韓国>日本であった。③近年わが国の性関連現象が解釈の難しい複雑な変化を続けている（梅毒上昇、梅毒以外の STI 低下、妊娠中絶低下、コンドーム出荷量減少）、④日本の高校生で性行動の安全化（性経験率低下、コンドーム使用率上昇、相手数減少）が進んでいる可能性が示唆された。⑤性産業の構造変化・肥大化と麻薬の蔓延が進んでいる、⑥HIV 流行が流入しやすい出入国動向が進行している。

B. 二次データの統合的解析

【方法】(1)一般女性の STI 感染リスクに関するケースコントロール研究：1999 年に実施された全国国民性行動調査と全国 STI 患者性行動調査のデータベースを統合して、population-based case-control study（患者=145、対照=956）を実施した。

(2)数理モデルを用いた MSM の流行予測に関する研究：HIV/AIDS 報告数、MSM の感染率データ、生存期間、性行動データ、推定人口など、2009 年までに入手可能な最新