

201004008A

厚生労働科学研究費補助金

地球規模保健課題推進研究事業

(国際医学協力研究事業)

「H I V感染症制圧のためのワクチン及び薬剤開発に関する研究」

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岩本愛吉

平成23年3月

目 次

I. 総括研究報告

H I V感染症制圧のためのワクチン及び薬剤開発に関する研究 ----- 1

研究代表者 岩本愛吉 (東京大学医科学研究所 教授)

II. 分担研究報告

1. H I V特異的細胞性免疫に関する研究 -----13

東京大学医科学研究所 教授 岩本愛吉

2. HIV-1 capsid蛋白 (CA) の挿入変異とCA自壊の分子機構の解明 -----16

熊本大学医学薬学研究部 教授 満屋 裕明

3. サルエイズモデルにおけるCTL逃避変異の解析 -----20

国立感染症研究所 エイズ研究センター長 俣野 哲朗

4. 抗原提示を介したCD4陽性T細胞の分化・活性化と記憶T細胞への潜伏感染に関する研究 -----24

国立感染症研究所 免疫部 第一室長 横田 恭子

5. HIV-2病原性とカプシドタンパク質の構造との相関に関する研究 ----- 29

大阪大学微生物病研究所 教授 塩田 達雄

6. non-Bサブタイプにおけるラルテグラビル耐性に関する研究 ----- 32

国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター 部長 杉浦 互

7. 中和抗体誘導を可能にするHIV-1Env抗原の合成に関する研究 -----38

国立感染症研究所 エイズ研究センター 主任研究官 駒野 淳

8. 選択圧がnon-BサブタイプHIVに与える影響に関する研究 ----- 45

東京大学医科学研究所 准教授 三浦 聡之

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----49

IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----63

平成 22 年度地球規模保健課題推進研究事業（国際医学協力研究事業）
統括研究報告

HIV 感染症制圧のためのワクチン及び薬剤開発に関する研究

研究代表者 岩本 愛吉 東京大学医科学研究所 教授

研究要旨 わが国の研究者が HIV/AIDS 研究・対策で先端を行く米国研究者及びアジア諸国の研究者と HIV/AIDS の予防と治療について、ウイルス学、免疫学、分子生物学及び臨床的研究を推進し、共同研究体制を構築・発展させ、世界の HIV/AIDS を制圧することを目的とした。個々の分担研究においては、ワクチン・新規薬剤開発のための基礎的データが集められ大きな成果があった。本年度は、あわじ感染・免疫フォーラムと合同で US-Japan Cooperative Medical Science Program AIDS panel meeting が開かれ、研究交流をさらに発展させた。12 月にはアジア各国からの参加者を招いてシンガポールにおいて薬剤耐性に関する meeting が開催され、アジア各国における抗 HIV 療法の現状と薬剤耐性ウイルス伝播の広がりについて共通の認識を持つことができた。今後、この研究領域が活性化され、本邦を含めたアジアの HIV 感染症の制圧に大きく貢献することが期待できた。

研究分担者

満屋裕明（熊本大学医学薬学研究部 教授）

侯野哲朗（東京大学医科学研究所 教授）

横田恭子（国立感染症研究所免疫部 室長）

塩田達雄（大阪大学微生物病研究所 教授）

杉浦 互（名古屋医療センター
臨床研究センター 部長）

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）

三浦聡之（東京大学医科学研究所 准教授）

A. 研究目的

HIV/AIDS の世界的流行の中で、その制圧のために国際的な協調が必須となっている。アジアにおける HIV/AIDS 患者の数は、世界の相当数を占めており、この地域の HIV/AIDS 制御に向けて、同地域唯一の先進国である日本が果たす

役割は非常に大きく、アジア各国からの期待も大きい。一方で、世界で最も HIV/AIDS の基礎研究、臨床研究の進んでいるのは米国である。感染症の広がりには国境はなく、米国もグローバルな視点から HIV/AIDS 研究を施行しているが、日米トップクラスの HIV/AIDS 研究者が共同研究・共通の技術基盤を有することにより、アジアのひいては世界の HIV/AIDS 流行の制御を達成することが期待される。本研究では、多方面に渡る HIV/AIDS の問題点の中から、特に大きな柱となるトピックを中心に、米国、アジア各国との共通意識・共通技術基盤・共同研究を持ち、HIV ワクチンの開発の基盤となる細胞性免疫によるコントロール機序の解明、新たな抗 HIV 薬開発を視野に入れた基礎研究を中心課題とし研究を遂行した。

具体的には以下のような研究目的をもった：HIV の自然制御には特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 反応が重要な役割を果たしていることが明らかとなっているが、実際に HIV 複製を制御できる CTL 反応の種類を明らかにすることを試み (1. 岩本愛吉)、抗原提示を介した CD4 陽性 T

細胞の分化・活性化と記憶 T 細胞への潜伏感染に関する研究 (2. 横田恭子) をする。サルエイズモデルにおける CTL 逃避変異の解析 (3. 俣野哲朗)、選択圧がアジアで流行する non-B サブタイプ HIV に与える影響に関する研究 (4. 三浦聡之)。以上の事柄は、HIV 感染の予防及び、免疫による感染個体内ウイルス複製制御に主眼をおいたものであるが、すでに HIV 陽性となった人々のために、副作用が少なく、容易に内服でき、耐性を獲得しにくい薬剤の開発が望まれている。この観点から、HIV-1 capsid 蛋白 (CA) の挿入変異と CA 自壊の分子機構の解明 (5. 満屋裕明)、HIV カプシドタンパク質の構造機能相関に関する研究 (6. 塩田達雄)、Non-B サブタイプの薬剤耐性に関する研究 (7. 杉浦互)、エイズウイルス侵入防御法確立に向けた複製可能なウイルス粒子の可視化に関する研究 (8. 駒野淳)。

さらに本研究では、日米医学協力計画の一環として米国のみならず他のアジア国々の研究者の参加をえて、本邦における研究を一段と発展させ、グローバルに対応する必要のある HIV/AIDS 対策を成功させることを目指した。

B. 研究方法

(1) 岩本：日本人 HIV 感染者において観察される Gag 特異的 CTL 反応のうち、ウイルス複製制御に寄与する Gag 内の領域を同定することを目的とし、未治療の日本人 HIV 感染者 35 名を対象とし、末梢血単核球を用いてインターフェロニン γ ELISpot アッセイを行った。抗原として Gag タンパク質全域をカバーする 115 種類の 12-17 アミノ酸からなる overlapping peptide (OLP) をマトリックス法を用いて使用した。

(2) 横田：抗原提示細胞からの刺激を受け免疫シナプスを介して活性化される T 細胞は、細胞分裂する際に非対称な分裂がおこり、非シナプス側の細胞半分 (娘細胞) は分裂後に活性化に伴う一部の分子を引き継ぐことなく静止状態の memory 細胞となる、という仮説が提唱されている。本研究では DC を介した T 細胞活性

化の系で非対称細胞分裂が検出可能か、また、このような娘細胞が感染した HIV のプロウイルス DNA をもつ静止状態の memory T 細胞として存続しうるのかを検証し、HIV-1 潜伏感染の *in vitro* モデル系を確立することを目的とする。健康人末梢血より PBMC を調整し、CD14 陽性細胞をエンリッチし、IL-4 と GM-CSF の存在下に培養し、単球由来樹状細胞 (MDDC) を得た。また、CD14 陰性細胞より negative selection kit を用いて CD4 陽性 T 細胞を調整した。MDDC に蛍光発色組換え R5 型 HIV-1_{NLAD8-D} を感染させ、非感染あるいは感染 MDDC と CSFE 標識した allogenic CD4⁺ T 細胞を 1:10 の割合で混合培養して、共培養 3 日あるいは 6 日後の細胞を回収し、アロ抗原刺激による活性化と細胞増殖の関係を FACSanto で解析した。

(3) 俣野：SIVmac239 分子クローン DNA、Gag205E の 1 塩基置換を生ずる変異が導入された変異 SIV 分子クローン DNA、さらに Gag312P あるいは Gag340M 置換を生ずる変異が導入された変異 SIV 分子クローン DNA を COS-1 細胞に導入し、野生型 SIVmac239、SIVmac239 Gag 205E、SIVmac239 Gag 205E 312P、SIVmac239 Gag 205E 340M を得て、HSC-F 細胞 (サル T 細胞株) に 2 種のウイルスを共感染させ、6 日後および 18 日後の培養上清中のウイルスゲノムの塩基配列を調べて、どちらのウイルスが優位となっているかを判定した。感染前期過程の解析では、LuSIV 細胞にウイルスを感染させ、1 日後の細胞 lysates を用いて、誘導されるルシフェラーゼ活性を測定した。

(4) 三浦：東京大学医科学研究所附属病院感染免疫内科に通院する未治療 HIV-1 陽性患者 174 人から分離された血漿より RNA を抽出し、RT-PCR 及びシーケンシングにより、gag 領域を増幅し、ウイルスの population sequence を得た。ウイルスのサブタイプは web 上の Rega HIV subtyping tool を用いて決定した。

(5) 満屋：HIV-1 Gag 領域に挿入変異が入ることにより起こる degradation の原因解析、degradation と Gag 挿入変異部位との関連、各 Gag 挿入変異株の感染性や複製能に degradation が及ぼす影響など検討するために、多剤耐性 HIV-1_{NL4-3} を作製し、さらに Gag 領域に人工的

に挿入変異を導入したウイルスを作製し、野生型及び変異 Gag 蛋白 degradation の経時的変化を調べ、挿入変異の場所による各変異株の感染性や複製能への影響を調べた。

(6) 塩田：本邦においては未だ HIV-2 の感染例は少なく、詳細な臨床症状とカプシドタンパク質をコードする遺伝子配列が報告されているのは以下の 2 報に報告されている 5 例のみである (Utsumi et al., AIDS, 2007, 21, 1834-1835. Ibe et al., JAIDS, 2010, 54, 241-247)。これらの 5 例に見られた HIV-2 のカプシドタンパク質のアミノ酸配列を、データベースに登録されている遺伝子配列から推定し、臨床症状との関連を検討した。

(7) 杉浦：2008 年に登場したインテグラーゼ阻害剤ラルテグラビル (RAL) は強力な抗 HIV 効果と副作用が少ないことから、Antiretroviral Therapy の要の薬となりつつある。RAL 耐性に関しては既 Y143C、Q148H、N155H の 3 つの経路が報告されているが、それ以外の変異が耐性の獲得と耐性レベルにどのように関与するか明確ではない。本研究では、CRF01_AE におけるインテグラーゼ領域の多様性とその耐性獲得に及ぼす影響について検討・考察した。患者血液サンプルからウイルスインテグラーゼ領域を増幅し配列を解析した。また、*in vitro* における CRF01_AE の RAL 耐性誘導を行った。

(8) 駒野：中和抗体を誘導するエイズワクチン開発は重要な研究課題である。我々は CD4 が結合する領域を認識する汎 HIV-1 株中和抗体のひとつとして知られる b12 が認識するエピトープに注目した。この中和エピトープは離れた Env 部分が集合して構成する特徴を持つ。そこで CD4 結合部位の一部を自然なエンベロープタンパク質の構造を反映させるようにペプチド工学的に合成し、これをワクチンの免疫源として利用できるかを検討した。HIV-1 Env の CD4 結合部位の一部 (423-434, N-IINMWQKVGKAM-C) を人工合成し、C 末端に Cys を付加してペプチドを環状化させた (Env95C)。Env95C を TRF に結合させたものを標的として 150 億種類のヒト抗体遺伝子のライブラリーからファージディスプレイ法により Env95 反応性抗体の選択を行った。抗原に対

する高い親和性を示す抗体は C 末端に Myc と HIS タグを付加した "mini" Fab 抗体として大腸菌発現系から精製し、抗体の反応特異性を検証した。

これらの研究は、今までに日米医学協力計画により醸成されてきた技術基盤及び、共同研究を通じて行った。

(倫理面への配慮)

本研究は遺伝子組換え実験、病原体の使用、動物実験を用いることから「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」を遵守した。実験計画は研究者が所属する機関の組換え DNA 実験安全委員会、バイオセーフティ委員会、動物実験委員会、医学研究倫理委員会等の承認・認可を得て実験を行なった。また臨床検体の使用を伴う研究では、研究目的等を文書によって患者に説明し、書面でインフォームドコンセントを得、研究内容は各研究機関において倫理審査を受け、承認済みである。また患者情報の保管に関しては個人情報保護法に基づき漏洩のないように管理が徹底された。

C. 研究結果

(1) 岩本：Gag タンパク質のサブドメイン間で、CTL 反応の頻度を比較したところ、p24 領域に対する反応が最も高かった。その中でも、Gag129-185 領域 (p24 の N 末端側) に対する CTL 反応を有するものでは、反応のないものに比べ血中ウイルス量が有意に低いことが判明した ($p=0.004$)。従って、HLA クラス I プロファイルが欧米とは大きく異なった日本人においても、p24 特異的 CTL 反応が感染個体内ウイルス産生コントロールに大きく寄与していることが示され、この領域を標的としたワクチン開発を支持する結果であった。

(2) 横田：HIV 感染した MDDC からアロ T 細胞の活性化に伴うウイルス伝播の系において、活性化後分裂していく T 細胞のなかで HIV 感染細胞がどのように分布し、増殖しているのかを検討したところ、HIV 感染細胞を DsRed 発現を指標に解析すると共培養 3 日後にはまだ分裂を

始めていない CFSE high の細胞集団に検出され、6 日後には高度に分裂した CD11a high の細胞集団に検出された。興味深いことに、活性化された CD11a high の CD4 陽性 T 細胞は CD4 の発現も増強するが、HIV 感染は CD4 発現が低い細胞集団に分布していた。細胞分裂に伴う CD11a 発現強度の解離は、免疫初期分裂において非対称分裂がおこる可能性を示唆している。この非対称分裂の系で HIV がプロウイルスとして静止期娘細胞に引き継がれ、存続しうるならば、memory T 細胞への潜伏感染モデルとして *in vitro* 実験系を構築することが可能であろう。

(3) 俣野：HIV およびサル免疫不全ウイルス (SIV) において、Gag カプシド (CA) 領域における CTL 逃避変異がしばしばウイルス複製能の低下に結びつくことが報告されている。我々は、これまで MHC クラス I ハプロタイプ 90-120-Ia 共有アカゲサルへの二種類のサル免疫不全ウイルス (SIVmac239 および SIVsmE543-3) 感染実験で、CA の 1 アミノ酸 (Gag205) の違いが Gag206-216 エピトープ特異的 CTL による認識の違いに結びつくことを報告した：Gag206-216 特異的 CTL は、Gag205D を有する SIVmac239 を認識できるが Gag205E を有する SIVsmE543-3 を認識することはできない。本研究では、この Gag205 アミノ酸が D から E に置換される変異を有する SIVmac239 (SIVmac239 Gag 205E) の複製能を検討した。Gag205、312、340 のアミノ酸配列は、SIVmac239 は Gag205D、Gag312A、Gag340V、SIVsmE543-3 は Gag205E、Gag312P、Gag340M である。SIVmac239 Gag205E の複製能は野生型と比較して明らかに劣っていた。SIVmac239 Gag 205E 312P と SIVmac239 Gag 205E 340M の複製能は SIVmac239 Gag205E より高く、後者の SIVmac239 Gag 205E 340M の複製能は野生型レベルまで回復していた。感染前期過程の解析でも、SIVmac239 Gag205E の効率は低下していたが、Gag312P あるいは Gag340M 置換が加わるとその効率の回復が認められた。この結果は、SIV Gag CA の N 末端ドメインの Gag205 アミノ酸と C 末端ドメインの Gag312 あるいは Gag340 アミノ酸の相互作用が SIV 複製に重要であることを示唆するものである。本研究は、CA の N

末端ドメインと C 末端ドメイン間の機能的相互作用のための構造上の制約を新たに提示するものとして、ワクチン抗原デザインや抗ウイルス薬開発の観点においても重要である。

(4) 三浦：HIV-1 の配列は流行地域により大きく異なっている。本研究では、最も protective と言われる HLA-B57 が標的とする Gag キャプシド内のエピトープ配列がサブタイプ間でどのように保存されているか検討することを目的とした。REGA HIV subtyping tool による解析で、174 人中 167 人はサブタイプ B に感染していることが判明した。残り 7 人のうち 5 人が CRE01_AE に感染していた。HLA-B57 に拘束される Gag 内の 3 つのエピトープの配列を 5 人の CRF01_AE 感染者で検討したところ、TW10 (TSTLQEIQGW) 内の配列は完全に保存されていたが、他の 2 つにはよく知られた B57 の逃避変異がほぼすべての患者で認められた：抗原プロセッシング変異とされている A146P が 5 人中 4 人の CRF01_AE で認められ、KF11 (KAFSPEVIPMF) でも、HLA-B57 拘束性 CTL 反応からの逃避変異として知られる A163G とその補正変異である S165N が認められ、CRF01_AE の founder virus が HLA-B57 陽性患者から発生してきた可能性が高いと考えられた。CRF01_AE 感染において、HLA-B57 陽性者がウイルス複製をコントロールできるかどうかを調査することで、TW10 の重要性を確認することができるであろう。

(5) 満屋：野生型及び変異 Gag 蛋白の経時的変化を調べた結果、p24 (capsid: CA) 領域に挿入変異を有する変異株において顕著な degradation の経時的進行を認め、野生株と比べ感染性や複製能が著しく損なわれていた。各種阻害剤を用いた詳細な実験の結果、ubiquitin/proteasome 系・autophagy 系・細胞/ウイルス側の protease といった主要な蛋白分解経路及び酵素は Gag degradation へ関与しないことが判明した。また、degradation 産物は CA の C 末端側由来であることが考えられた。培養細胞に野生 HIV-1 株と Gag 挿入変異株を共発現させることで、野生株の発現や複製能への影響を検討したところ、CA 領域に挿入変異を有する変異株を共発現させた検体において特に、ウイルスの発現および複製が著しく抑制されることが判った。

(6) 塩田：TRIM5 α はアカゲザルの抗 HIV 因子として 2004 年に同定された。我々は以前、8 種類の HIV-2 株を用いて、カプシドの 120 番目(株によっては 119 番目)のアミノ酸がプロリンの場合は両 TRIM5 α による感染抑制を受けるが、グルタミンまたはアラニンの場合は感染抑制を受けないことを明らかにしてきた。また、西アフリカの HIV-2 感染者コホートにおいて、プロリンのウイルスに感染している感染者の血中ウイルス量は、プロリン以外のアラニン、グルタミンあるいはグリシンのウイルスに感染している感染者の血中ウイルス量よりも有意に低いことを報告してきた。本研究では、日本において、既に報告されている HIV-2 感染者についても同様の相関関係が観察されるか否かを文献的に検討することを目的とした。Utsumi らが報告した症例は、少なくとも 36 年前に輸血により HIV-2 に感染したものの、70 歳を超える現在でも CD4 数 827 個/ μ l、血中ウイルス量は検出限界以下であって無症候を保ち得ている症例である。この感染者内のウイルスカプシドタンパク質 120 番目のアミノ酸はプロリンであった。一方、Ibe らが報告した 4 例は、いずれも 20 歳代あるいは 30 歳代の若年の感染者であるが、既にエイズを発症しており、ウイルスカプシドタンパク質 120 番目のアミノ酸は、3 例でグリシン、もう一例はグルタミンであった。従って、西アフリカの HIV-2 感染者コホートで観察された HIV-2 感染者の病態進行速度とカプシドタンパク質の構造との相関は、日本における少数の HIV-2 感染例でも明瞭に認められた。

(7) 杉浦：CRF01_AE インテグラーゼの多様性：2008-2010 年にかけて protease-RT 配列から CRF01_AE と判定された症例 78 例についてインテグラーゼ領域の配列解析を行った。subtype B との比較で 2 症例以上に明確に認められた変異を 41 カ所に認め、その内 D10E、T112V、G123S、V201I、N232D は 100% の頻度で観察され、CRF01_AE では consensus 配列と考えられた。興味深いことに RAL 耐性に関連する箇所に変異が観察されており、うち V72I、L74V、は耐性関連変異である。同様に今後登場が予想されている elvitegravir は V72I、L74V いずれも耐性変異である。GSK13496572 では L1001I、T124A、V201I

が耐性変異である。RAL に関しては Y143C、Q148H、N155H など重要な耐性変異は観察されなかったが、この変異が伴う事により、耐性レベルに影響を及ぼす様な変異が多様性の範疇に存在する事が確認された。このような耐性に影響する変異は RAL に限らず、elvitegravir、GSK1349572 という今後登場が予想される薬剤に対しても観察されており、耐性獲得に及ぼす影響について明らかにする事が必要である。

(8) 駒野：Env95C に高い親和性で結合する 11 クロンの独立した特異性の高い抗体クローンが得られた。293T 細胞に FLAG タグを有する全長の Env を発現させ、細胞溶解液に Fab を作用させ、抗 FLAG 抗体により IP を行って Env を収集し、これに Fab が共沈するかを解析したところ、3 つのクローンが Env と強く相互作用することが判明した。5 つのクローンは Env と弱く相互作用した。対照として用いた抗ビメンチン抗体は Env 結合を示さなかった。この研究により、Env95C は HIV-1 Env の native conformation における CD4 結合部位の立体構造の一部を再現できることが証明された。Env95C に結合するが、全長の Env に結合できない抗体クローンは、認識部位が Env の表面ではなく、分子の内側に位置しているために抗体がアクセスできない可能性と、Env が CD4 と結合して現われる立体構造を認識する可能性が考えられる。エピトープを構成するアミノ酸、抗体のウイルス中和能力について現在評価中である。ペプチド合成により新たなエイズワクチンの免疫源が構築できるかもしれない。今回合成した抗原は CD4 結合部位の一部であるが、これを CD4 結合部位のより広い範囲に適応して組み合わせる事により中和抗体誘導が可能になるかもしれない。

これらの研究の基盤となっている技術の多くは、長年にわたる日米医学協力計画のエイズ部会を通じての米国研究者との交流から得られたものである。平成 22 年度は、9 月 9-10 日に第 10 回あわじ感染・免疫フォーラムとの合同開催で、第 23 回 US-Japan Cooperative Medical Science Program AIDS panel meeting が開かれ、日米のトップ研究者が最新の知見を披露し、研究交流をさらに発展させた(写真参照)。さらに、

12月8-10日にアジア各国からの参加者を招いて、シンガポールにおいて薬剤耐性に関するmeetingが初めて開催され、日本からは9人の参加者があった。アジア各国の研究者から、抗HIV療法の現状と薬剤耐性ウイルス伝播の広がりについての報告があり、今後途上国における薬剤耐性ウイルスについて日米の研究者と共通の懸念を持つことができた。これを受けて、この研究領域が活性化され、本邦を含めたアジアのHIV感染症の制圧に大きく貢献することが期待できた。

D. 考察

感染症に国境はなく、アジアの途上国は、世界的流行をもたらす病原体の発生場所として重要視されており、アジア唯一の先進国として、我が国はイニシアチブをとることが期待されている。国境のない感染症の対策には、国際協力が必須である。HIV/AIDSは世界の三大感染症のひとつとして、緊急な対応が迫られていることには何の疑いもなく、日米医学協力計画のエイズ部会を軸とした日本—米国—アジア諸国の緊密な共同研究体制の構築が、他の感染症対策のモデルとなることが期待できた。本年度の個々の分担研究項目における成果が、ワクチン・新規薬剤の開発に重要な知見をもたらしただけでなく、シンガポールでの薬剤耐性に関するmeetingの開催は、非常にタイムリーであり、かつてない程、本分野での日米アジアの交流が深まった。日米医学協力計画の果たす役割は大きく、次年度以降のシンポジウムも、年度ごとに具体的なテーマを持って開催するとより意義深いものになると考えられた。

E. 結論

日米医学協力計画で培った共同研究基盤を軸に、さらにアジアの研究者との協調を推進し、HIV/AIDS制圧の為の研究がなされた。ワクチン・新規薬剤開発に有用な基礎的知見が得られた。また、今後問題となる途上国での薬剤耐性HIVについて、日本—米国—アジア諸国の間で、問題意識の共有と共同研究体制の構築がなされた。今後も、日米医学協力計画を軸にした活発な技術・人材交流の継続・発展が、エイズを

含めた感染症制圧のために必須であることが再認識された。

F. 研究発表

1 論文発表

岩本愛吉

- 1) Nakamura H, Miyazaki N, Hosoya N, Koga M, Odawara T, Kikuchi T, Koibuchi T, Kawana-Tachikawa A, Fujii T, Miura T, Iwamoto A. Long-term successful control of super-multidrug-resistant human immunodeficiency virus type 1 infection by a novel combination therapy of raltegravir, etravirine, and boosted-darunavir. *J Infect Chemother*. 2011 Feb;17(1):105-10.
- 2) Liu J, Wu P, Gao F, Qi J, Kawana-Tachikawa A, Xie J, Vavricka CJ, Iwamoto A, Li T, Gao GF. Novel immunodominant peptide presentation strategy: a featured HLA-A*2402 restricted CTL-epitope stabilized by intra-chain hydrogen-bonds from SARS-CoV nucleocapsid protein. *J Virol*. 84:11849-11857, 2010.
- 3) Zhu D, Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A, Kitamura Y. Influence of polymorphism in dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin-related (DC-SIGNR) gene on HIV-1 trans-infection. *Biochem Biophys Res Commun*, 393:598-602, 2010.
- 4) Koga, M., Kawana-Tachikawa, A., Heckerman, D., Odawara, T., Nakamura, H., Koibuchi, T., Fujii, T., Miura, T., and Iwamoto, A. Change in impact of HLA class I allele expression on HIV-1 plasma virus loads at a population level over time. *Microbiol. Immunol*. 54:196-205, 2010. Apr 2010.
- 5) Sun Y, Liu J, Yang M, Gao F, Zhou J, Kitamura Y, Gao B, Tien P, Shu Y, Iwamoto A, Chen Z, Gao GF. Identification and structural definition of H5-specific CTL epitopes restricted by HLA-A*0201 derived from the H5N1 subtype of influenza A viruses. *J Gen Virol*. 91:919-930, 2010 Apr 2010.

- 6) Kondo, N., Miyauchi, K., Meng, F., Iwamoto, A. and Matsuda, Z. Conformational changes of the HIV-1 envelope protein during membrane fusion were inhibited by the replacement of its membrane-spanning domain. *J. Biol. Chem.* 285:14681-14688, 2010. May 7, 2010.
- 7) Yu, L., Aoki, C., Shimizu, Y., Shimizu, K., Hou, W., Yagyū, F., Wen, X., Oshima, M., Iwamoto, A., Gao, B., Liu, W., Gao, GF., and Kitamura, Y. Development of a simple system for screening anti-hepatitis C virus drugs utilizing mutants capable of vigorous replication. *J. Virol Methods* 169: 380-384, 2010.
- 8) Miyauchi, K., Curran, A.R., Long, Y., Kondo, N., Iwamoto, A., Engelman, D.M., and Matsuda, Z. The membrane-spanning domain of gp41 plays a critical role in intracellular trafficking of the HIV envelope protein. *Retrovirology* 2010, 7:95. doi:10.1186/1742-4690-7-95. E-published, November 13, 2010.
- 9) Liu, S., Kondo, N., Long, Y., Xiao, D., Iwamoto, A., and Matsuda, Z. Membrane topology analysis of HIV-1 envelope glycoprotein gp41. *Retrovirology*. 7:100.

俣野哲朗

- 10) Yamamoto, H., and Matano, T. Neutralizing antibodies in SIV control: co-impact with T cells. *Vaccine* 28S:B13-B17, 2010.
- 11) Iwamoto, N., Tsukamoto, T., Kawada, M., Takeda, A., Yamamoto, H., Takeuchi, H., and Matano, T. Broadening of CD8⁺ cell responses in vaccine-based simian immunodeficiency virus controllers. *AIDS* 24:2777-2787, 2010.
- 12) Inagaki, N., Takeuchi, H., Yokoyama, M., Sato, H., Ryo, A., Yamamoto, H., Kawada, M., and Matano, T. A structural constraint for functional interaction between N-terminal and C-terminal domains in simian immunodeficiency virus capsid proteins. *Retrovirology* 7:90, 2010.

横田恭子

- 13) Tsunetsugu-Yokota, Y. and Yamamoto, T.: Mammalian microRNAs.: post-transcriptional gene regulation in RNA virus infection and therapeutic applications. *Frontiers in Microbiology* 1:1-9, 2010
- 14) Hagiwara, K., Murakami, T., Xue, G., Shimizu, Y., Takeda, E., Hashimoto, Y., Honda, K., Kondoh, Y., Osada, H., Tsunetsugu-Yokota, Y., and Aida, Y.: Identification of a novel Vpr-binding compound that inhibits HIV-1 multiplication in macrophages by chemical array. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 403:40-45, 2010
- 15) Terahara, K., Nochi, T., Yoshida, M., Takahashi, Y., Goto, Y., Hatai, H., Kurokawa, S., Ho Jang, M., Kweon, M-N., Domino, S.E., Hiroi, T., Yuki, Y., Tsunetsugu-Yokota, Y., Kobayashi, K., and Kiyono, H.: Distinct fucosylation of M cells and epithelial cells by Fut1 and Fut2, respectively, in response to intestinal environmental stress. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* in press, 2010

満屋裕明

- 16) Ide K, Aoki M, Amano M, Koh Y, Yedidi RS, Das D, Leschenko S, Chapsal B, Ghosh AK, Mitsuya H (2011) Novel HIV-1 protease inhibitors (PIs) containing a bicyclic P2 functional moiety, tetrahydropyrano-tetrahydrofuran, that are potent against multi-PI-resistant HIV-1 variants. *Antimicrob Agents Chemother.* In press.
- 17) 2 Ghosh AK, Martyr CD, Steffey M, Wang YF, Agniswamy J, Amano M, Weber IT, Mitsuya H. (2011) Design, Synthesis, and X-ray structure of substituted bis-tetrahydrofuran (bis-THF)-derived potent HIV-1 protease inhibitors. *ACS Med Chem Lett.* In press.
- 18) 3. Ghosh AK, Chapsal BD, Baldrige A, Steffey MP, Walters DE, Koh Y, Amano M, Mitsuya H. (2011) Design and synthesis of

- potent HIV-1 protease inhibitors incorporating Hexahydrofurofuranol-derived high affinity P(2) ligands: structure-activity studies and biological evaluation. *J Med Chem.* 27;54(2):622-634.
- 1 9) 4. Ghosh AK, Xu CX, Rao KV, Baldrige A, Agniswamy J, Wang YF, Weber IT, Aoki M, Miguel SG, Amano M, Mitsuya H. (2010) Probing multidrug-resistance and protein-ligand interactions with oxatricyclic designed ligands in HIV-1 protease inhibitors. *ChemMedChem.* 5 :1850-1854
- 2 0) 5. Koh Y, Amano M, Towata T, Danish M, Leshchenko-Yashchuk S, Das D, Nakayama M, Tojo Y, Ghosh AK, Mitsuya H. (2010) In vitro selection of highly darunavir-resistant and replication-competent HIV-1 variants using a mixture of clinical HIV-1 isolates resistant to multiple conventional protease inhibitors. *J Virol.* 84: 11961–11969.
- 2 1) 6. Tojo Y, Koh Y, Amano M, Aoki M, Das D, Kulkarni S, Anderson DD, Ghosh AK, Mitsuya H. (2010) Novel protease inhibitors (PIs) containing macrocyclic components and 3(R),3a(S),6a(R)-bis-tetrahydro-furanyl-urethane that are potent against multi-PI-resistant HIV-1 variants in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 54:3460-3470.
- 2 2) 7. Ghosh AK, Gemma S, Simoni E, Baldrige A, Walters DE, Ide K, Tojo Y, Koh Y, Amano M, Mitsuya H. (2010) Synthesis and biological evaluation of novel allophenylnorstatine-based HIV-1 protease inhibitors incorporating high affinity P2-ligands. *Bioorg Med Chem Lett.* 20:1241-1246.
- 塩田達雄**
- 2 3) Onyango CO, Leligdowicz A, Yokoyama M, Sato H, Song H, Nakayama EE, Shioda T, Silva T, Townend J, Jaye A, Whittle H, Rowland-Jones S, Cotton M. HIV-2 Capsids Distinguish High and Low Virus Load Patients in a West African Community Cohort. *Vaccine.* 28S2:B60-B67,2010
- 2 4) 2) Nakayama EE, Shioda T. Anti-retroviral activity of TRIM5 (alpha). *Reviews in Medical Virology.* 20:77-92,2010
- 2 5) 3) Maegawa H, Miyamoto T, Sakuragi J, Shioda T, Nakayama EE. Contribution of RING domain to retrovirus restriction by TRIM5 α depends on combination of host and Virus. *Virology* 399:212-220, 2010
- 2 6) 4) Wichukchinda N, Nakajima T, Saipradit N, NakayamaEE, Ohtani H, Rojanawiwat A, Pathipvanich P, Ariyoshi K, Sawanpanyalert P, Shioda T, Kimura A. TIM1 haplotype may control the disease progression to AIDS in a HIV-1-infected female cohort in Thailand. *AIDS.* 24:1625-31,2010
- 2 7) 5) Uttayamakul S, Likanonsakul S, Manosuthi W, Wichukchinda N, Kalambhaheti T, Nakayama EE, Shioda T, Khusmith S. Effects of CYP2B6 G516T polymorphisms on plasma efavirenz and nevirapine levels when co-administered with rifampicin in HIV/TB co-infected Thai adults. *AIDS Research and Therapy.*7:8, 2010
- 2 8) 6) Kuroishi A, Bozek K, Shioda T, Nakayama EE. A single amino acid substitution of the human immunodeficiency virus type 1 capsid protein affects viral sensitivity to TRIM5 α . *Retrovirology.* 7(1):58, 2010
- 2 9) 7) Sakuragi JI, Sakuragi S, Ohishi M, Shioda T. Direct correlation between genome dimerization and recombination efficiency of HIV-1. *Microbes Infect.* 12(12-13):1002-11, 2010
- 3 0) 8) Kono K, Song H, Yokoyama M, Sato H, Shioda T, Nakayama EE. Multiple sites in the N-terminal half of simian immunodeficiency virus capsid protein contribute to evasion from rhesus monkey TRIM5 α -mediated restriction. *Retrovirology.* 7(1):72,2010
- 3 1) 9) Saito A, Nomaguchi M, Iijima S, Kuroishi A, Yoshida T, Lee YJ, Hayakawa T, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Yasutomi Y, Adachi A, Matano T, Akari H. Improved capacity of a monkey-tropic HIV-1 derivative to

replicate in cynomolgus monkeys with minimal modifications. *Microbes and Infection*. 13:58-64,2011

- 3 2) 10) Ohishi M, Nakano T, Sakuragi S, Shioda T, Sano K, Sakuragi JI. The relationship between HIV-1 genome RNA dimerization, virion maturation and infectivity. *Nucleic Acids Research*.2011 in press

杉浦 互

- 3 3) Ibe S, Sugiura W. Clinical significance of HIV reverse transcriptase inhibitor-resistant mutations *Future Microbiology*. 2011 (in press)
- 3 4) Junko Shibata, Wataru Sugiura, Hirotaka Ode^c, Yasumasa Iwatani, Hironori Sato, Hsinyi Tsang, Masakazu Matsuda Naoki Hasegawa, Fengrong Ren and Hiroshi Tanaka. Within-host co-evolution of Gag P453L and protease D30 N/N88D demonstrates virological advantage in a highly protease inhibitor-exposed HIV-1 case. *Antiviral Research*. 2011 Feb 04. [Epub ahead of print]
- 3 5) Fujisaki S, Yokomaku Y, Shiino T, Koibuchi T, Hattori J, Ibe S, Iwatani Y, Iwamoto A, Shirasaka T, Hamaguchi M, Sugiura W. Outbreak of hepatitis B virus genotype A and transmission of genetic drug resistance in cases coinfecting with HIV-1 in Japan. *J Clin Microbiol*. 2011 Jan 19. [Epub ahead of print]
- 3 6) Hattori J, Shiino T, Gatanaga H, Yoshida S, Watanabe D, Minami R, Sadamasu K, Kondo M, Mori H, Ueda M, Tateyama M, Ueda A, Kato S, Ito T, Oie M, Takata N, Hayashida T, Nagashima M, Matsuda M, Ibe S, Ota Y, Sasaki S, Ishigatsubo Y, Tanabe Y, Koga I, Kojima Y, Yamamoto M, Fujita J, Yokomaku Y, Koike T, Shirasaka
- 3 7) T, Oka S, Sugiura W. Trends in transmitted drug-resistant HIV-1 and demographic characteristics of newly diagnosed patients: nationwide surveillance from 2003 to 2008 in Japan. *Antiviral Res*. 2010 ; 88(1):72-9.
- 3 8) Hirano A, Takahashi M, Kinoshita E, Shibata M, Nomura T, Yokomaku Y, Hamaguchi M, Sugiura W. High performance liquid chromatography using UV detection for the simultaneous quantification of the new non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor etravirine (TMC-125), and 4 protease inhibitors in human plasma. *Biol Pharm Bull*. 2010 ; 33(8):1426-9.
- 3 9) Bandaranayake RM, Kolli M, King NM, Nalivaika EA, Heroux A, Kakizawa J, Sugiura W, Schiffer CA. The effect of clade-specific sequence polymorphisms on HIV-1 protease activity and inhibitor resistance pathways. *J Virol*. 2010 ; 84(19):9995-10003.
- 4 0) Suzuki S, Urano E, Hashimoto C, Tsutsumi H, Nakahara T, Tanaka T, Nakanishi Y, Maddali K, Han Y, Hamatake M, Miyauchi K, Pommier Y, Beutler JA, Sugiura W, Fuji H, Hoshino T, Itotani K, Nomura W, Narumi T, Yamamoto N, Komano JA, Tamamura H. Peptide HIV-1 integrase inhibitors from HIV-1 gene products. *J Med Chem*. 2010 ; 53(14):5356-60.
- 4 1) Ibe S, Yokomaku Y, Shiino T, Tanaka R, Hattori J, Fujisaki S, Iwatani Y, Mamiya N, Utsumi M, Kato S, Hamaguchi M, Sugiura W. HIV-2 CRF01_AB: first circulating recombinant form of HIV-2. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2010 ; 54(3):241-7.
- 4 2) Saeng-aroon S, Tsuchiya N, Auwanit W, Ayuthaya PI, Pathipvanich P, Sawanpanyalert P, Rojanawiwat A, Kannagi M, Ariyoshi K, Sugiura W. Drug-resistant mutation patterns in CRF01_AE cases that failed d4T+3TC+nevirapine fixed-dosed, combination treatment: Follow-up study from the Lampang cohort. *Antiviral Res*. 2010 ; 87(1):22-9.
- 4 3) Matsuyama S, Aydan A, Ode H, Hata M, Sugiura W, Hoshino T. Structural and energetic analysis on the complexes of clinically isolated subtype C HIV-1 proteases and approved inhibitors by molecular dynamics simulation. *J*

- Phys Chem B. 2010 ; 114(1):521-30.
- 4 4) 伊部史朗、杉浦 互、薬剤耐性 HIV の現状と対策、日本臨牀 2010 ; 68(3): 476-79.
- 4 5) 服部純子、杉浦 互、我が国における薬剤耐性 HIV の現状、感染・炎症・免疫 2010 ; 39(4) : 361-63
- 4 6) 吉居廣朗、杉浦 互、ラルテグラビルの耐性、医薬ジャーナル 2010 ; 46(8) : 2054-58
- 4 7) 杉浦 互、5th International Workshop on HIV Transmission/ 18th International AIDS Conference、メディカルレビュー社 2010 : 1(2) 71-73。
- 4 8) 杉浦 互、HIV 感染—最新の疫学・臨床・治療、内科 2010 ; 106(5) : 781-87
- 4 9) 伊部史郎、横幕能行、杉浦互 本邦における HIV-2 の疫学動向と新たな組換え流行株 CRF01_AB の同定. IASR 2010 ; 31(8):232-233.
- 5 0) 宮崎菜穂子、杉浦 互. わが国における抗 HIV 治療と多剤耐性症例の現状 IASR 2010 ; 31(8):233-234.
- 駒野淳**
- 5 1) Aoki T, Miyauchi K, Urano E, Ichikawa R, Komano J. Protein transduction by pseudotyped lentivirus-like nanoparticles. Gene Ther. In press.
- 5 2) Yanagita H, Urano E, Matsumoto K, Ichikawa R, Takaesu Y, Ogata M, Murakami T, Wu H, Chiba J, Komano J, Hoshino T. Structural and biochemical study on the inhibitory activity of derivatives of 5-nitro-furan-2-carboxylic acid for RNase H function of HIV-1 reverse transcriptase. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2011; 19, 816-25.
- 5 3) Suzuki S, Maddali K, Hashimoto C, Urano E, Ohashi N, Tanaka T, Ozaki T, Arai H, Tsutsumi H, Narumi T, Nomura W, Yamamoto Y, Pommier Y, Komano JA, Tamamura T. Peptidic HIV integrase inhibitors derived from HIV gene products: structure-activity relationship studies. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2010 Sep 15;18(18):6771-5.
- 5 4) Aoki T, Shimizu S, Urano E, Futahashi Y, Hamatake M, Tamamura H, Terashima K, Murakami T, Yamamoto N, Komano J. Improvement of lentiviral vector-mediated gene transduction by genetic engineering of the structural protein Pr55^{Gag}. Gene Therapy. 2010 Sep; 17(9):1124-33.
- 5 5) Suzuki S, Urano E, Hashimoto C, Tsutsumi H, Nakahara T, Tanaka T, Nakanishi Y, Maddali K, Han Y, Hamatake M, Miyauchi K, Pommier Y, Beutler JA, Sugiura W, Fuji H, Hoshino T, Itotani K, Nomura W, Narumi T, Yamamoto N, Komano JA, Tamamura H. Peptide HIV-1 integrase inhibitors from HIV-1 gene products. J Med Chem. 2010 Jul 22;53(14):5356-60.
- 5 6) 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. 2010 May;40(5):1504-1509.
- 5 7) Urano E, Ichikawa R, Morikawa Y, Yoshida T, Koyanagi T, Komano J. T cell-based functional cDNA library screening identified SEC14-like 1a carboxy-terminal domain as a negative regulator of human immunodeficiency virus replication. Vaccine. 2010 May 26;28 Suppl 2:B68-74.
- 5 8) 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. 2010 Apr;101(4):876-81.
- 5 9) 馬場昌範, 中田浩智, 朝光かおり, 駒野淳, 岡本実佳, 杉浦 互. Perspectives of anti-HIV research (Review). The Journal of AIDS Research. 12(2);74-80, 2010

三浦聡之

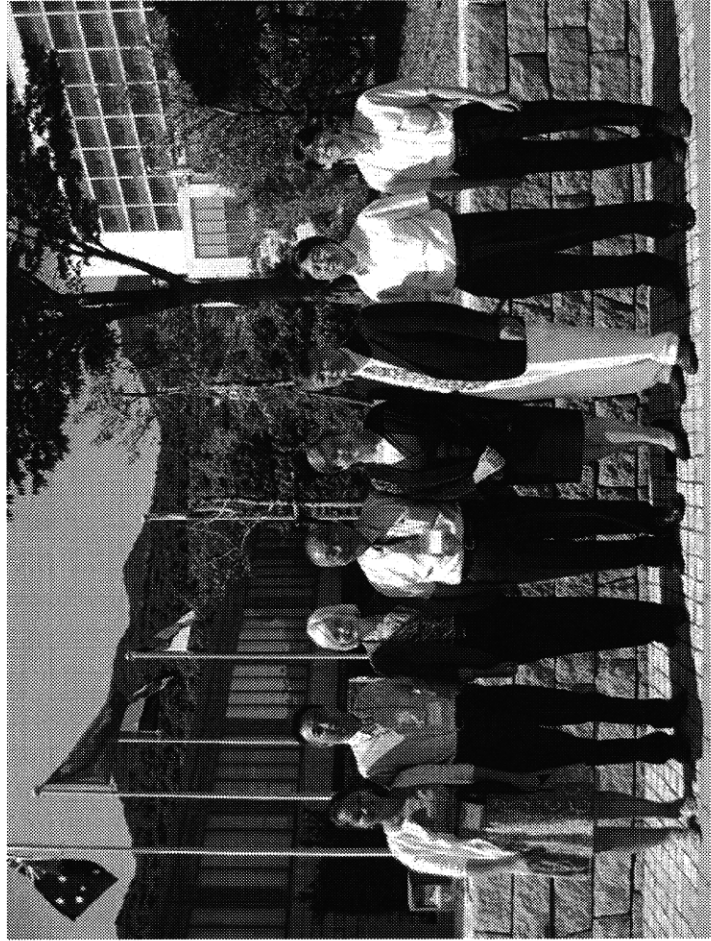
- 6 0) Brumme, ZL., Li, C., Miura, T., Sela, J., Rosato, PC., Brumme, CJ., Markle, T., Martin, E., Block, BL., Trocha, T., Kadie, CM., Allen, TM., Pereyra, F., Heckerman, D., Walker, BD., Brockman, MA. Reduced replication capacity of NL4-3 recombinant viruses encoding RT-Integrase sequences from HIV-1 elite controllers. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome*.56(2), 100-108, 2011.
- 6 1) Nakamura, H., Miyazaki, N., Hosoya, N., Koga, M., Odawara, T., Kikuchi, T., Koibuchi, T., Kawana-Tachikawa, A., Fujii, T., Miura, T., Iwamoto, A. Long-term successful control of super-multidrug-resistant human immunodeficiency virus type 1 infection by a novel combination therapy of raltegravir, etravirine, and boosted-darunavir. *J Infect Chemother*.17(1),105-110, 2011.
- 6 2) Gesprasert G, Wichukchinda N, Mori M, Shiino T, Auwanit W, Sriwanthana B, Pathipvanich P, Sawanpanyalert P, Miura T, Auewarakul P, Thitithanyanont A, Ariyoshi K. HLA-associated immune pressure on Gag protein in CRF01_AE-infected individuals and its association with plasma viral load. *PLoS One*. 5(6):e11179. 2010.
- 6 3) Miura, T., Z. L. Brumme, M. A. Brockman, P. Rosato, J. Sela, C. J. Brumme, F. Pereyra, D. E. Kaufmann, A. Trocha, B. L. Block, E. S. Daar, E. Connick, H. Jessen, A. D. Kelleher, E. Rosenberg, M. Markowitz, K. Schafer, F. Vaida, A. Iwamoto, S. Little, and B. D. Walker. Impaired replication capacity of acute/early viruses in persons who become HIV controllers. *J Virol* 84:7581-91, 2010.
- 6 4) Wright, JK., Brumme, ZL., Carlson, JM., Heckerman, D., Kadie, CM., Brumme, CJ., Wang, B., Losina, E., Miura, T., Chonco, F., van der Stok, M., Mncube, Z., Bishop, K., Goulder, PJ., Walker, BD., Brockman, MA., Ndung'u, T. Gag-protease-mediated replication capacity in HIV-1 subtype C chronic infection: associations with HLA type and clinical parameters. *J Virol* 84:10820-31. 2010.
- 6 5) Julg, B., Pereyra, F., Buzon, MJ., Piechocka-Trocha, A., Clark, MJ., Baker, BM., Lian, J., Miura, T., Martinez-Picado, J., Addo, MM., Walker, BD. Infrequent recovery of HIV from but robust exogenous infection of activated CD4(+) T cells in HIV elite controllers. *Clin Infect Dis* 51:233-8.2010.
- 6 6) Brockman, M. A., Brumme, ZL., Brumme, CJ., Miura, T., Sela, J., Rosato, PC., Kadie, CM., Carlson, JM., Markle, TJ., Streeck, H., Kelleher, AD., Markowitz, M., Jessen, H., Rosenberg, E., Altfeld, M., Harrigan, PR., Heckerman, D., Walker, BD., Allen, TM. Early selection in Gag by protective HLA alleles contributes to reduced HIV-1 replication capacity that may be largely compensated in chronic infection. *J Virol*. 84(22):11937-49. 2010.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

- 1 特許取得
なし。
- 2 実用新案登録
なし。
- 3 その他
なし



第10回あわわじ感染・免疫フォーラムとの合同 meeting



HIV 特異的細胞性免疫に関する研究

研究分担者 岩本 愛吉 東京大学医科学研究所 教授

研究要旨 HIV の感染個体内コントロールには、ウイルス特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が主要な役割を果たしていると考えられている。海外においては以前から Gag タンパク質が CTL の標的として最も重要であると認識されていた。我々は最近、HLA タイプの大きく異なっている日本人 HIV 感染者においても、Gag タンパク特異的 CTL 反応が血中ウイルス量と逆相関することを明らかにした。本研究においては、さらに解析をすすめ、Gag タンパク質内 Capsid 領域の N 末端側に対する CTL 反応が特に強く寄与していることを明らかにした。

A. 研究目的

HIV 特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 応答のうち、Gag タンパク質を標的とするものが最も重要であることは、HLA プロファイルの大きく異なっている日本人においても確認されている。しかしながら、500 あるアミノ酸のうちどの領域がウイルス複製制御に関わっているかは日本人集団においては明らかとなっていない。本研究では、日本人 HIV 感染者において観察される Gag 特異的 CTL 反応のうち、ウイルス複製制御に寄与する Gag 内の領域を同定することを目的とした。

B. 研究方法

未治療の日本人 HIV 感染者 35 名を対象とし、末梢血単核球を用いてインターフェロングamma ELISpot アッセイを行った。抗原として Gag タンパク質全域をカバーする 115 種類の 12-17 アミノ酸からなる overlapping peptide (OLP) をマトリックス法を用いて使用した。

(倫理面への配慮)

研究目的等を文書によって患者に説明し、書面インフォームドコンセントを得た。本研究内容は東京大学医科学研究所倫理委員会による倫理審査を受け、承認済みである。また患者情報の保管に関しては個人情報保護法に基づき漏洩のないように管理が徹底された。

C. 研究結果

Gag タンパク質のサブドメインであるマトリックス (p17)、キャプシド (p24) 及び p15 (p2, NC, p1,

p6) の間で、CTL 反応の頻度を比較したところ、p24 領域に対する反応が最も高かった。その中でも、Gag129-224 及び 261-314 領域に対する反応が日本人では高かった。さらに解析をすすめたところ、Gag129-185 領域 (p24 の N 末端側) に対する CTL 反応を有するものでは、反応のないものに比べ血中ウイルス量が有意に低いことが判明した (p=0.004)。従って、HLA クラス I プロファイルが欧米とは大きく異なった日本人においても、p24 特異的 CTL 反応が感染個体内ウイルス産生コントロールに大きく寄与していることが示された。

D. 考察

感染防御抗体を誘導する予防的ワクチンの開発は非常に難しいため、多くの研究者は特異的細胞傷害性 T 細胞を誘導するためのワクチン開発をすすめている。HLA クラス I の分布が欧米と大きく異なっているにも関わらず、日本人感染者でも、Gag タンパク質のうちキャプシド (p24) が CTL の最も重要な標的であることは、この領域を標的としてワクチン開発を支持する。興味深いことに、欧米において、最も病気の進行遅延と関連すると言われる HLA-B57 は、Gag129-185 内に 2 つのエピトープを持っている。今後は、日本人 HIV 感染者集団において、どの HLA クラス I が同領域を標的とするかを解析していく。

E. 結論

日本人においても、p24 領域が HIV 特異的細胞傷害性 T 細胞の最も重要な標的であることが明らかになった。その防御効果のメカニズムの解明が、HIV の感染個体内コントロールを目指すワクチン

の開発に必要であろう。

F. 研究発表

1 論文発表

1. Nakamura H, Miyazaki N, Hosoya N, Koga M, Odawara T, Kikuchi T, Koibuchi T, Kawana-Tachikawa A, Fujii T, Miura T, Iwamoto A. Long-term successful control of super-multidrug-resistant human immunodeficiency virus type 1 infection by a novel combination therapy of raltegravir, etravirine, and boosted-darunavir. *J Infect Chemother*. 2011 Feb;17(1):105-10.
2. Liu J, Wu P, Gao F, Qi J, Kawana-Tachikawa A, Xie J, Vavricka CJ, Iwamoto A, Li T, Gao GF. Novel immunodominant peptide presentation strategy: a featured HLA-A*2402 restricted CTL-epitope stabilized by intra-chain hydrogen-bonds from SARS-CoV nucleocapsid protein. *J Virol*. 84:11849-11857, 2010.
3. Zhu D, Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A, Kitamura Y. Influence of polymorphism in dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin-related (DC-SIGNR) gene on HIV-1 trans-infection. *Biochem Biophys Res Commun*, 393:598-602, 2010.
4. Koga, M., Kawana-Tachikawa, A., Heckerman, D., Odawara, T., Nakamura, H., Koibuchi, T., Fujii, T., Miura, T., and Iwamoto, A. Change in impact of HLA class I allele expression on HIV-1 plasma virus loads at a population level over time. *Microbiol. Immunol*. 54:196- 205, 2010. Apr 2010.
5. Sun Y, Liu J, Yang M, Gao F, Zhou J, Kitamura Y, Gao B, Tien P, Shu Y, Iwamoto A, Chen Z, Gao GF. Identification and structural definition of H5-specific CTL epitopes restricted by HLA-A*0201 derived from the H5N1 subtype of influenza A viruses. *J Gen Virol*. 91:919-930, 2010 Apr 2010.
6. Kondo, N., Miyauchi, K. Meng, F. Iwamoto, A. and Matsuda, Z. Conformational changes of the HIV-1 envelope protein during membrane fusion were inhibited by the replacement of its membrane-spanning domain. *J. Biol. Chem*. 285:14681-14688, 2010. May 7, 2010.
7. Yu, L., Aoki, C., Shimizu, Y., Shimizu, K., Hou, W., Yagyu, F., Wen, X., Oshima, M., Iwamoto, A., Gao, B., Liu, W., Gao, GF., and Kitamura, Y. Development of a simple system for screening anti-hepatitis C virus drugs utilizing mutants capable of vigorous replication. *J. Virol Methods* 169: 380-384, 2010.
8. Miyauchi, K., Curran, A.R., Long, Y., Kondo, N., Iwamoto, A., Engelman, D.M., and Matsuda, Z. The membrane-spanning domain of gp41 plays a critical role in intracellular trafficking of the HIV envelope protein. *Retrovirology* 2010, 7:95. doi:10.1186/1742-4690-7-95. E- published, November 13, 2010.
9. Liu, S., Kondo, N., Long, Y., Xiao, D., Iwamoto, A., and Matsuda, Z. Membrane topology analysis of HIV-1 envelope glycoprotein gp41. *Retrovirology*. 7:100.

2 学会発表

- 1) 菊地正、堀本研子、藤井毅、安達英輔、今井健太郎、清水少一、古賀道子、中村仁美、鯉渕智彦、立川愛、三浦聡之、河岡義裕、岩本愛吉 HIV感染者における2009パンデミックインフルエンザワ(H1N1)ワクチン接種後の中和抗体価の推移. 第24回日本エイズ学会学術集会 2010年、東京.
- 2) 清水少一、菊地正、古賀道子、安達英輔、今井健太郎、中村仁美、鯉渕智彦、三浦聡之、藤井毅、岩本愛吉 テノホビルの骨代謝に及ぼす影響. 第24回日本エイズ学会学術集会 2010年、東京.
- 3) 菊地正、安達英輔、清水少一、古賀道子、今井健太郎、中村仁美、鯉渕智彦、三浦聡之、藤井毅、岩本愛吉. ART 初回導入後の血清脂質の長期的な変化について. 第24回日本エイズ学会学術集会 2010年、東京
- 4) 安達英輔、清水少一、今井健太郎、鯉渕智彦、古賀道子、中村仁美、三浦聡之、藤井毅、岩本愛吉. ニューモシスチス肺炎治療中に発症した播種性結核のAIDS症例. 第59回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第57回日本化学療法学会東日本支部総会 合同学会(東京) 2010年10月21-22日
- 5) 岩本愛吉. 特別講演「抗HIV療法の進歩とグローバルな課題」第58回日本化学療法学会総会学術講演会(長崎) 2010年6月2-4日
- 6) 菊地正、前田卓哉、坂本勇一、佐藤未光、今井健太郎、古賀道子、中村仁美、鯉渕智彦、三浦聡之、小田原隆、藤井毅、岩本愛吉. 季節性インフルエンザ流行期の発熱小児における急性上気道炎のResPlex法による病原微生物微生物に対する網羅的な遺伝子診断法の検討核酸

増幅検査の検討. 第 58 回日本化学療法学会
総会学術講演会 (長崎) 2010 年 6 月 2-4 日

- 7) 今井健太郎、清水少一、安達英輔、鯉渕智
彦、古賀道子、中村仁美、三浦聡之、藤井毅、
岩本愛吉. AIDS 合併ニューモシスチス肺炎治
療中におけるサイトメガロウイルスアンチ
ゲネミア値の臨床的意義に関する検討. 第 84
回日本感染症学会総会・学術講演会 (京都)
2010 年 4 月 5-6 日

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

- 1 特許取得
なし。
- 2 実用新案登録
なし。
- 3 その他
なし

HIV-1 capsid 蛋白 (CA) の挿入変異と CA 自壊の分子機構の解明

分担研究者 満屋 裕明 (熊本大学医学薬学研究部血液内科学・感染免疫診療部 教授)

研究要旨

我々はこれまでに HIV-1 Gag 領域の変異について精力的な研究を継続して行っており、以前 HIV-1 Gag 領域の HIV-1 protease (PR)による開裂部位周辺に挿入変異が入ることで、薬剤耐性関連変異によって減衰した変異 PR の Gag 前駆蛋白基質に対する酵素活性を代償する事を報告したが、このような挿入変異による代償は完全ではなく、薬剤耐性株の感染性・複製能は野生株と比し依然劣っている。この原因を究明するため、Gag 領域の様々な位置にアミノ酸挿入変異を導入した変異株を多数作成し検討した結果、このような挿入変異を有する変異株では異常な Gag 蛋白の変性によると考えられる Gag degradation (自壊) が引き起こされる事を明らかにした。挿入変異がもたらす Gag 蛋白自壊に起因する HIV-1 の構造学的・ウイルス学的特性の変容について詳細な検討を続けている。

A. 研究目的

ヒト免疫不全ウイルス(HIV-1)感染によって起こる後天性免疫不全症候群(AIDS)に対する化学療法は長足の進歩を遂げ、かつて「死の病」とされた本疾患は「コントロール可能な慢性感染症」と再定義し得る程となった。この進歩は、逆転写酵素阻害剤(RTI)とプロテアーゼ阻害剤(PI)を組み合わせた多剤併用療法(HAART)に負うところが大きい。しかし、HIV-1がRTIとPIの両剤に対して耐性を獲得し、またその多くが交差耐性である故に治療抵抗性となった症例数の増大、また耐性ウイルスによる初感染症例増多の報告が続いており、これらに対応しうる新たな抗ウイルス薬の開発研究に加えて、HIV-1の薬剤耐性獲得機序の検討および薬剤耐性HIV-1感染細胞内における proviral DNAからの耐性ウイルス複製・伝播に至る過程においての詳細な基礎的研究の重要性は増している。

我々はこれまでに HIV-1 Gag 領域の変異に

ついて精力的な研究を継続して行っており (Gatanaga & Mitsuya *et al*, *JBC*. 277: 5952-61, 2002; Tamiya & Mitsuya *et al*, *J Virol*. 78: 12030-40, 2004; Gatanaga & Mitsuya *et al*, *JBC*. 281: 1241-50, 2006; Aoki & Mitsuya *et al*, *J Virol*. 83: 3059-3068, 2009)、長期間の HAART 療法後に治療不応性となった患者由来の多剤耐性臨床分離 HIV-1 株を用いて、Gag 領域の開裂部位周辺に挿入変異が入る事により、薬剤耐性関連変異によって減衰した HIV PR の Gag 前駆蛋白に対する酵素活性が改善する事を以前報告したが (Tamiya & Mitsuya *et al*, *J Virol*. 78: 12030-40, 2004)、このような挿入変異による代償は完全ではなく、薬剤耐性株の複製能は野生株と比し依然劣ったままである事が多い。このため我々は Gag 挿入変異が Gag 前駆蛋白の processing や変異株の感染性および複製能に対し影響を及ぼし得ると仮定、詳細な解析を行うために、Gag 領域の様々な位置にアミノ酸配列 (AA)を挿入した変異株を多数作成し、挿入変

異による HIV-1 の構造学的・ウイルス学的特性の変容について検討した結果、このような挿入変異を有する変異株では異常な Gag 蛋白の変性によると考えられる degradation 産物が出現する事を確認した。この結果より挿入変異を有する Gag 蛋白を分解の方向に進ませる何らかの機序の存在が示唆され、Gag 蛋白自壊に起因する HIV-1 の構造学的・ウイルス学的特性の変容について詳細な検討を行っている。

B. 研究方法

HIV-1 Gag 領域に挿入変異が入ることにより起こる degradation の原因解析、degradation と Gag 挿入変異部位との関連、各 Gag 挿入変異株の感染性や複製能に degradation が及ぼす影響など検討するために、以下に述べる研究方法を用いた。

1) 感染性多剤耐性 HIV-1_{NL4.3} plasmid clone の作成法：多剤耐性臨床分離 HIV-1 株の Gag/PR 領域を PCR 法により増幅し制限酵素で処理した後、野生株 pHIV-1_{NL4.3} に導入することで感染性多剤耐性 HIV-1_{NL4.3} plasmid clone を作製した。

2) Gag 領域に人工的に挿入変異を導入した HIV-1_{NL4.3} plasmid clone の作成法：HIV-1_{NL4.3} の Gag 領域に 19AA をランダムに挿入するために、EPICENTRE Biotechnologies 社の EZ-Tn5TM transposase を使用した。これは transposon の 19AA と EZ-Tn5TM transposase が複合体を形成し、標的 DNA のランダムな部位のリン酸ジエステル backbone を cleavage し、transposon の 3'水酸基末端と標的 DNA の 5'リン酸基末端の結合反応を触媒する作用を利用した。これにより HIV-1_{NL4.3} の Gag 領域に人工的に挿入変異を導入した plasmids を多数作成した。1), 2) で得られた多数の変異株を lipofectamine LTX (invitrogen 社)を用いて COS7 細胞もしくは HEK293 細胞に TF し、以降の実験に用いた。

a) Western blotting (WB) 法による解析：各 Gag 挿入変異株を細胞に transfection (TF)した後、得られた cell/ virion lysate の蛋白濃度で標準化した sampleを用いて SDS-PAGE を行い、transfer 後の nitrocellulose membrane に対し一次抗体に HIV-1 p24 抗体や HIV-1 p17 抗体、HIV-1 gp120 抗体を使用し、二次抗体反応後に富士フィルム社の luminoimage analyzer LAS1000 によって解析を行なった。

b) Gag degradation の経時的変化および Gag 挿入変異株の感染性・複製能の評価：野生株および作成した各変異株を細胞に TF 後の cell/ virion lysates を任意の時間 37°C で定温静置し、富士レビオ社の全自動化学発光酵素免疫測定機 (ルミバルス F) にて lysates 中の p24 抗原量を測定、また p24 抗体を用いた WB を行い、野生型及び変異 Gag 蛋白の経時的変化を調べ、更に TF 後の virion 上清を MT-4 細胞や Magi 細胞に感染させることで、挿入変異の場所による各変異株の感染性や複製能への影響を調べた。

c) 阻害剤を用いた実験：Proteasome 阻害剤・autophagy 阻害剤・細胞内および HIV-1 protease 阻害剤等、各種阻害剤を用いる事で、細胞およびウイルスにおける蛋白分解経路及び酵素の Gag degradation への関与の有無を調べた。

d) Gag degradation の責任領域の同定：異なった epitope を認識する複数の抗 HIV-1 p24 モノクローナル抗体を用いた WB や、N 末端側アミノ酸解析の手法を用いて、Gag degradation の責任領域の同定を試みた。

e) Gag 挿入変異株を共発現させることによる野生株のウイルス学的動態への影響：培養細胞に野生 HIV-1 株と Gag 挿入変異株を共発現させることで、野生株の発現や複製能への影響を検討した。

(倫理面への配慮)

該当しない。

C. 研究結果

作成した各変異株を COS7 細胞や HEK-293 細胞に TF し、得られた cell/ virion lysate を用いて抗 HIV-1 p24 抗体による WB を行った結果、TF に用いる細胞の由来に関わらず Gag degradation は起こり、また cell lysates のみならず、TF 後の上清を 0.22 μm のフィルターで濾過した後に超遠心することで得られた virion lysates においても Gag degradation は認められることが判明した。また HIV-1 p17 抗体や HIV-1 gp120 抗体を使用した場合明らかな degradation 産物は認めないことが判った。また、得られた cell/ virion lysates を任意の時間 37°C で定温静置し、lysates 中の p24 抗原量を測定、また p24 抗体を用いた WB を行い、野生型及び変異 Gag 蛋白の経時的変化を調べた結果、p24 (capsid: CA) 領域に挿入変異を有する変異株において顕著な degradation の経時的進行を認めた。また、このような Gag degradation をきたす変異株では、野生株と比べ感染性や複製能が著しく損なわれていた。各種阻害剤を用いた詳細な実験の結果、ubiquitin/proteasome 系・autophagy 系・細胞/ウイルス側の protease といった主要な蛋白分解経路及び酵素は Gag degradation へ関与しないことが判明した。異なった epitope を認識する複数の抗 HIV-1 p24 モノクローナル抗体を用いた WB の結果、degradation 産物は CA の C 末端側由来であることが考えられた。培養細胞に野生 HIV-1 株と Gag 挿入変異株を共発現させることで、野生株の発現や複製能への影響を検討したところ、CA 領域に挿入変異を有する変異株を共発現させた検体において特に、ウイルスの発現および複製が著しく抑制されることが判った。

D. 考察

本研究は、臨床的もしくは人工的に作成した Gag 挿入変異株における Gag 前駆体の異常な

processing の動態や Gag degradation と Gag 挿入変異部位との関連、各変異株の感染性や複製能に Gag degradation の及ぼす影響、挿入変異を有する Gag 蛋白における構造学的変容、細胞内宿主因子と Gag degradation との関連性などを、Gag p24 抗体を用いた western blotting や各種阻害剤を用いた実験、各種細胞株を用いた感染実験、構造学的解析など多面的に検討するという独創的なものであり、多剤耐性 AIDS 患者において認められる Gag 挿入変異のウイルス学的・生理学的意義を解明するものである。Gag 挿入変異株での degradation の原因解析、degradation と Gag 挿入変異部位との関連、各 Gag 挿入変異株の感染性や複製能に degradation が及ぼす影響など検討を重ねていくことにより、将来的に Gag 構造蛋白の成熟化を阻害し分解方向へ進めることによる新しい HIV-1 複製阻害物質の同定、治療法の開発へとつながる可能性がある。

E. 結論

本研究においては新たな創薬の契機と成り得る Gag 挿入変異が HIV-1 のコンポーネントの自壊（破壊）をもたらす機序の解明を進めている。本研究の対象である HIV-1 コンポーネントの自壊（破壊）という現象は、未だに世界の何れのグループによっても報告されておらず、極めて先駆的・先導的な課題であると断言でき、また申請者のグループがこれまで蓄積してきたウイルス学・構造学的知見に基礎を置いた具体的なアプローチは、複数の薬剤を臨床試験へ進めてきており、大きな成果を期待してよいと思われる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ide K, Aoki M, Amano M, Koh Y, Yedidi RS, Das D, Leschenko S, Chapsal B, Ghosh AK, Mitsuya H (2011) Novel HIV-1 protease