

- 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.
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.
 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 Hexahydrofuropyranol-derived high affinity P(2) ligands: structure-activity studies and biological evaluation. *J Med Chem.* 27;54(2):622-634.
 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
 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.
 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.
 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. *Bio org Med Chem Lett.* 20:1241-1246.
2. 学会発表(国際学会のみ)
特になし
 - H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
 1. 特許取得
特になし
 2. 実用新案登録
特になし

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）
分担研究報告書

サルエイズモデルにおける CTL 逃避変異の解析

研究分担者 俣野 哲朗 国立感染症研究所エイズ研究センター長

研究要旨

HIV 感染症において、ウイルス複製は細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) 反応により抑制を受けるものの持続感染が成立しエイズ発症にいたる。この HIV 持続感染においては、CTL の認識からの逃避変異を有するウイルスの選択が認められるが、そのような変異の中にはウイルス複製能の低下に結びつくものがあることが知られている。本研究では、サルエイズモデルの解析から、サル免疫不全ウイルス Gag CA (カプシド) N 末端ドメイン (NTD) コード領域のある CTL 逃避変異が、SIV 複製能の低下、特に複製前期過程の障害に結びつくことを明らかにした。さらにその複製能の低下が C 末端ドメイン (CTD) コード領域のある変異により回復することを見出しだした。このような CTL 逃避変異によるウイルス複製能低下機序の解析は、保存されるべき HIV 蛋白領域・構造の解明に貢献しうる点で重要である。

A. 研究目的

HIV 感染症においては、細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) 反応がウイルス複製抑制に中心的役割を果たしているが、この CTL 反応にもかかわらず HIV 持続感染が成立しエイズ発症にいたる。この持続感染においては、CTL 認識からの逃避変異を有するウイルスの選択が認められるが、そのような変異の中にはウイルス複製能の低下に結びつくものがあることが知られている。

多様性の高いゲノムを有する 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) をコードするゲノム領域は比較的保存性が高いことが知られており、この領域における 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。

B. 研究方法

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 を得た。

ウイルス複製能の比較実験では、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。

(倫理面への配慮)

動物実験は、独立行政法人医薬基盤研究所および所属機関の動物実験委員会の審査をうけ、その承認を得てから開始した。組換え生物等について

は、第二種使用等拡散防止措置確認申請承認（大臣確認）済みである。

C. 研究結果

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（表1）。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（表1）。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（図1）。

D. 考察

CTL 逃避変異の解析から、SIVmac239 Gag CA において、Gag205D から Gag205E への置換は複製能（特に前期過程効率）の低下をもたらすが、さらに Gag312A から Gag312P への置換あるいは Gag340V から Gag340M への置換が加わると複製能が回復することが明らかとなった。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。HIV と SIV の Gag CA の構造に比較的高い類似性があり、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。

E. 結論

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が示唆された。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である。

F. 研究発表

1 論文発表

- (1) Yamamoto, H., and Matano, T. Neutralizing antibodies in SIV control: co-impact with T cells. Vaccine 28S:B13-B17, 2010.
- (2) 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.
- (3) 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.

2 学会発表

- (1) Matano, T. Vaccine-based SIV control in a group of Burmese rhesus macaques sharing a MHC class I haplotype. 9th International Veterinary Immunology Symposium, Tokyo, Japan, 8/19/2010.
- (2) Matano, T. The effect of CTL memory induction by prophylactic vaccination on CTL dominancy post-SIV exposure. 23rd Joint Meeting of the AIDS panels, United States-Japan Cooperative Medical Science Program, Awaji, Japan, 9/10/2010.
- (3) 稲垣奈都子、武内寛明、横山勝、佐藤裕徳、梁明秀、俣野哲朗. SIV CA の N ドメインと C ドメインの機能的相互作用に関わるアミノ酸残基の同定. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、11/7/2010.

G. 知的財産権の出願・登録状況

無し。

SIVs in competition	Ratio of inoc. titers	Exp. no.	Dominant aa sequences			
			day 6		day 18	
SIV _{mac239} & SIV _{mac239Gag205E}	4:1	#1	205D		205D	
		#2	205D		205D	
	1:1	#1	205D		205D	
		#2	205D		205D	
	1:4	#1	205D		205D	
		#2	205D		205D	
SIV _{mac239} & SIV _{mac239Gag205E312P}	4:1	#1	205D	312A	205D	312A
		#2	205D	312A	205D	312A
	1:1	#1	205D	312A	205D	312A
		#2	205D	312A	205D	312A
	1:4	#1	205D	312A	205D	312A
		#2	205D	312A	205D	312A
SIV _{mac239} & SIV _{mac239Gag205E340M}	4:1	#1	205D	340V	205D	340V
		#2	205D	340V	205D	340V
	1:1	#1	205D/E	340V/M	205E	340M
		#2	205D/E	340V/M	205E	340M
	1:4	#1	205E	340M	205E	340M
		#2	205E	340M	205E	340M
SIV _{mac239Gag205E} & SIV _{mac239Gag205E312P}	4:1	#1	205E	312P	205E	312P
		#2	205E	312P	205E	312P
	1:1	#1	205E	312P	205E	312P
		#2	205E	312P	205E	312P
	1:4	#1	205E	312P	205E	312P
		#2	205E	312P	205E	312P
SIV _{mac239Gag205E} & SIV _{mac239Gag205E340M}	4:1	#1	205E	340M	205E	340M
		#2	205E	340M	205E	340M
	1:1	#1	205E	340M	205E	340M
		#2	205E	340M	205E	340M
	1:4	#1	205E	340M	205E	340M
		#2	205E	340M	205E	340M

表 1. ウイルス複製能の比較実験

HSC-F 細胞に 2 種のウイルスを 4:1、1:1 あるいは 1:4 の比で共感染させ、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。

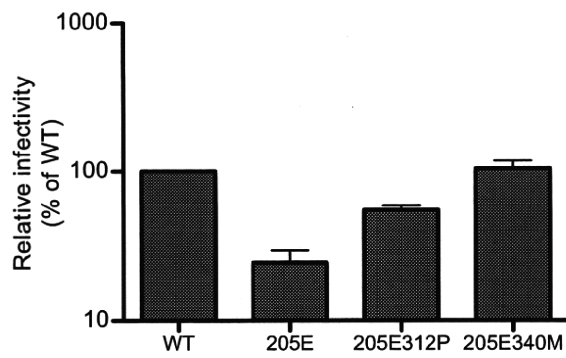


図1. ウイルス感染前期過程効率の比較

LuSIV 細胞に野生型 SIVmac239 (WT)、SIVmac239 Gag 205E (205E)、SIVmac239 Gag 205E 312P (205E312P) あるいは SIVmac239 Gag 205E 340M (205E340M) を感染させ、1 日後に誘導されるルシフェラーゼ活性を測定し、野生型 SIV 感染時の結果との比較 (%) で表示した。3 回の実験の平均を示す。

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

研究分担者 横田 恭子 国立感染症研究所 免疫部 第一室長

研究要旨：免疫シナプスを介して活性化される T 細胞の初回分裂が非対称であることが、静止期の memory T 細胞形成の機構となりうることを検証するため、ヒトの MDDC とアロの CD4 陽性 T 細胞を共培養した。免疫シナプス形成に重要な接着分子 CD11a (LFA-1) は活性化に伴って発現が高まり、分裂初期の CD4 陽性 T 細胞は CD11a high と low の 2 つの細胞集団に分かれた。HIV 感染 MDDC から T 細胞に伝播した HIV 感染細胞の頻度は少ないものの、CD11a high 分裂細胞中の CD4 発現の低い細胞集団に集積していた。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て存続するならば、memory T 細胞への潜伏感染成立モデルとして *in vitro* の実験系が構築可能である。

A. 研究目的

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。

B. 研究方法

1) 細胞の調製

健常人末梢血より PBMC を調整し、CD14 陽性細胞を MACS カラム (Miltenyi Biotec) でエンリッチした。これを IL-4 と GM-CSF の存在下に 7 日間培養し、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(StemCell Tech.)。

2) HIV-1 感染と細胞培養

MDDC に我々の作製した蛍光発色組換え R5 型 HIV-1_{NLAD8-D} を 1×10^6 個の細胞あたり 200 ng Gag p24 量で感染させ、2 回洗浄後一晚培養し

た。翌日回収した MDDC を更に洗浄して細胞数を数え、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 1×10^6 個/well の割合で 96 穴プレートで培養した。必要に応じて共培養 3 日目に 40U/ml の IL-2 を添加し、更に 3 日間培養した。

3) フローサイトメーター解析

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。即ち、T 細胞活性化マーカーとして HLA-DR (PerCP)、CD40L (PE) あるいは CD150 (PE) と CD11a (Alexa 647) を組み合わせる細胞染色し、CD3(PE-Cy7)/CD8 (APC-Cy7)/CD4(Pacific Blue) でゲートをかけた。また、T 細胞は CD45RA (ECD) と CD27(Alexa Fluoro 700) の発現にもとづいて naïve (CD45RA⁺CD27⁺)、early memory (early M: CD45RA⁻CD27⁺)、late memory (late M: CD45RA⁻CD27⁻) に分類した。

健常人 PBMC の利用に関しては感染研医学研究倫理委員会で承認され、インフォームドコンセントを得て献血を実施している。

C. 研究結果

樹状細胞(DC)による抗原提示細胞をうけて活性化された T 細胞は effector 細胞として増殖し、機能発揮後抗原量の低下にともなって消滅し

ていく。この過程で一部の細胞が memory 細胞となり、長期に存続すると考えられている。しかしながら、ヒトの記憶 T 細胞の形成過程を解析する *in vitro* の系は存在せず、memory 細胞がどのようにして分化し維持されるのかに関しては不明な点が多い。HIV 感染においては静止状態の HIV 特異的 memoryCD4 陽性 T 細胞に高率に HIV が潜伏感染していることが示されており、このような潜伏感染細胞は HAART 療法にも抵抗性であることが、エイズ治療の大きな問題である。抗原刺激を受けて活性化される抗原特異的 T 細胞からどのようにして memory T 細胞が分化し、維持されているかはいくつかの仮説があり、多くはマウスモデルで討議されている。Chang らは、抗原刺激により活性化された T 細胞が最初の分裂をおこして 2 つの娘細胞に分かれる際、DC とシナプスを形成する側と反対側で分子の受け継ぎが非対称(asymmetric)となっており、非シナプス形成側の娘細胞は活性化にともなう様々な分子を受け継がずに静止 memory T 細胞となるという興味深い知見を示した(Science 315:1687, 2007)。このような非対称分裂は単純な T 細胞受容体刺激ではおこらず、抗原提示細胞(DC)と免疫シナプスを形成する条件でのみ認められる。そこで、この非対称分裂がヒトの MDDC を抗原提示細胞とする T 細胞活性化の系でも検出されるかどうかを検討した。

MDDC とアロ CD4 陽性 T 細胞を共培養すると、CFSE 標識した T 細胞は活性化され、分裂を始める。図 1 に示すように、アロ抗原刺激の場合共培養後 3 日後の細胞のごく一部が分裂を始める。そのような分裂細胞の分化マーカー及び CD11a、CD40L、HLA-DR 等の活性化マーカーの発現を FACS 解析したところ、(b)にあるように、naïve 細胞では分裂細胞が CD11a high と low の細胞亜集団に分けられることが明らかとなった。一方、CD40L や HLA-DR の発現レベルは一定の傾向を認めなかった(c)。また、分裂細胞が CD11a 発現の高いものと低いものに分かれる減少は、SEB のような強力な抗原刺激を受けた T 細胞では認めなかった。

そこで、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。図 2 の上段は共培養 3 日と 6 日後の分裂と CD11a 発現の経過を示す。CD11a low の分裂初期細胞は 6 日後にはそれ以上増加していない。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。

D. 考察

抗原提示における T 細胞と抗原提示細胞が形成する免疫シナプスは T 細胞受容体に加えて様々な共刺激分子からなる。特に TcR/CD3 complex の近傍の CD11a (LFA-1 α) 分子は ICAM-1 と相互作用してシナプス形成を安定化させることが知られている。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。

HIV 感染 MDDC のウイルス産生レベルは低く、今回感染 T 細胞頻度は少なかったが、T 細胞に先に HIV を感染させれば、検出される HIV の頻度はより高くなることが期待される。通常 T 細胞を強く活性化させると HIV は productive infection となって感染細胞を死滅させる。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。

E. 結論

免疫シナプスを介して活性化される T 細胞の最初の分裂は非対称におこり、シナプス形成の反対極にある活性化分子を保有しない部分の娘細胞が静止 memory 細胞となりうるのかどうか、をヒトの MDDC と CD4 陽性 T 細胞の共培養実験系で検討した。シナプス形成に重要な接着分子である CD11a は、活性化に伴って発現が高くなるが、アロ抗原刺激で分裂を始める CD4 陽性 T 細胞では CD11a high と low の 2 つの細胞集団に分かれることが明らかとなった。

この様な非対称細胞分裂が実際に生体で起

こるならば、MDDC から HIV の感染伝播をうけた CD4 陽性 T 細胞のうち一方の娘細胞は活性化されて高度に HIV 産生細胞として死滅するのに対し、もう一方の娘細胞はそのまま静止 memory 細胞としてプロウイルスを保有しながら存続することになり、潜伏感染細胞成立機構の一つとして作用している可能性が高い。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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
- 2) 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
- 3) 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

2. 学会発表

- 1) Tsunetsugu-Yokota, Y.: The impact of chemokine receptor usage of HIV-1 in the pathogenesis of HIV infection. The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan, September, 2010.
- 2) Terahara, K., Ishige, M., Mitsuki, Y-y, Shibusawa, K., Watanabe, S., Okada, S., Kobayashi, K., Tsunetsugu-Yokota, Y.: Characteristic activation/differentiation phenotype of CD4+ T cells and their distinct susceptibility to X4-type and/or R5-type HIV-1 infection in humanized NOD/SCID/Jak3-null mice. The 14th International Congress of Immunology, Kobe, Japan, August, 2010.
- 3) Shibusawa, K., Mitsuki, Y-y, Terahara, K.,

Yanagi, Y. Kogayashi, K., Tsunetsugu-Yokota, Y.: Inhibition of HIV-1 replication by engineered lentivirus vectors: a potential advantage of SLAM-mediated virus entry. The 14th International Congress of Immunology, Kobe, Japan, August, 2010.

- 4) Mitsuki, Y-y, Shibusawa, K., Tsuchiya, T., Terahara, K., Kobayashi, K., Takeda, M., Yanagi, Y., Tsunetsugu-Yokota, Y.: HIV-1 infection enhances the susceptibility of T cells to measles virus infection by upregulating signaling lymphocyte activation molecule (SLAM) expression. The 14th International Congress of Immunology, Kobe, Japan, August, 2010.
- 5) Tsunetsugu-Yokota, Y. and Terahara, K.: Factors crucial for the preferential propagation of R5-tropic HIV-1 in the early phase of HIV-1 infection. The 5th Japanese-German HIV-Symposium, Tokyo, Japan, May, 2010.
- 6) Shibusawa, K., Mitsuki, Y-y, Terahara, K., Yanagi, Y. Kogayashi, K., Tsunetsugu-Yokota, Y.: Inhibition of HIV-1 replication by engineered lentivirus vectors: a potential advantage of SLAM-mediated virus entry. The 5th Japanese-German HIV-Symposium, Tokyo, Japan, May, 2010.
- 7) Mitsuki, Y-y, Shibusawa, K., Tsuchiya, T., Terahara, K., Kobayashi, K., Takeda, M., Yanagi, Y., Tsunetsugu-Yokota, Y.: HIV-1 infection enhances the susceptibility of T cells to measles virus infection by upregulating signaling lymphocyte activation molecule (SLAM) expression. The 5th Japanese-German HIV-Symposium, Tokyo, Japan, May, 2010.
- 8) 石毛真行、寺原和孝、光木裕也、渋沢謙太郎、小林和夫、岡田誠治、横田(恒次)恭子: HIV-1感染モデルとしてのヒト化マウスの妥当性とX4およびR5 HIV-1感染, 第58回ウイルス学会、徳島、平成21年11月。
- 9) 渋沢謙太郎、光木裕也、寺原和孝、石毛真之、柳雄介、小林和夫、横田(恒次)恭子: 麻疹ウイルスエンベロープを用いたHIV-1増殖抑制性レンチウイルスベクターの開発とその有効性、第58回ウイルス学会、徳島、平成21年11月。

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

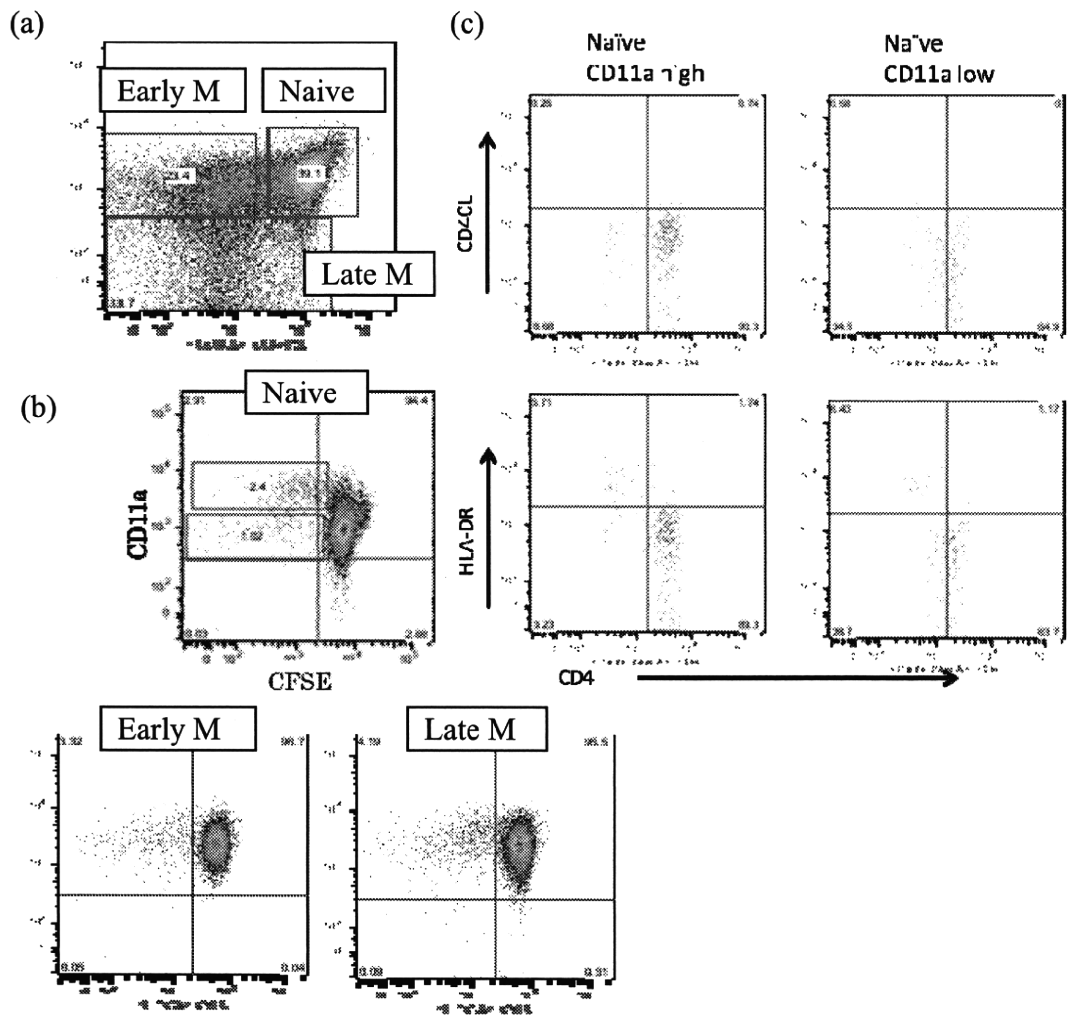


図1. 樹状細胞により活性化されたアロ CD4 陽性 T細胞の分裂は
 ナイーブ細胞でのみ CD11a (LFA-1)high と low に分離する

単球由来樹状細胞とアロ CD4 陽性 T細胞を共培養して3日後の CD4 陽性 T細胞の分裂と活性化マーカーの発現を比較した。(a) CD3 陽性 CD4 陽性 T細胞の分化段階を CD45RA と CD27 の発現で分画した。(b)それぞれの細胞集団の CFSE と CD11a の発現をみると、naïve 細胞で分裂している細胞は CD11a high と low の2つの亜集団に分かれた。(c) CD11a 発現の high (左) と low (右) にゲートをかけた細胞の CD40L (上段) HLA-DR(下段)と CD4 の発現を比較した。

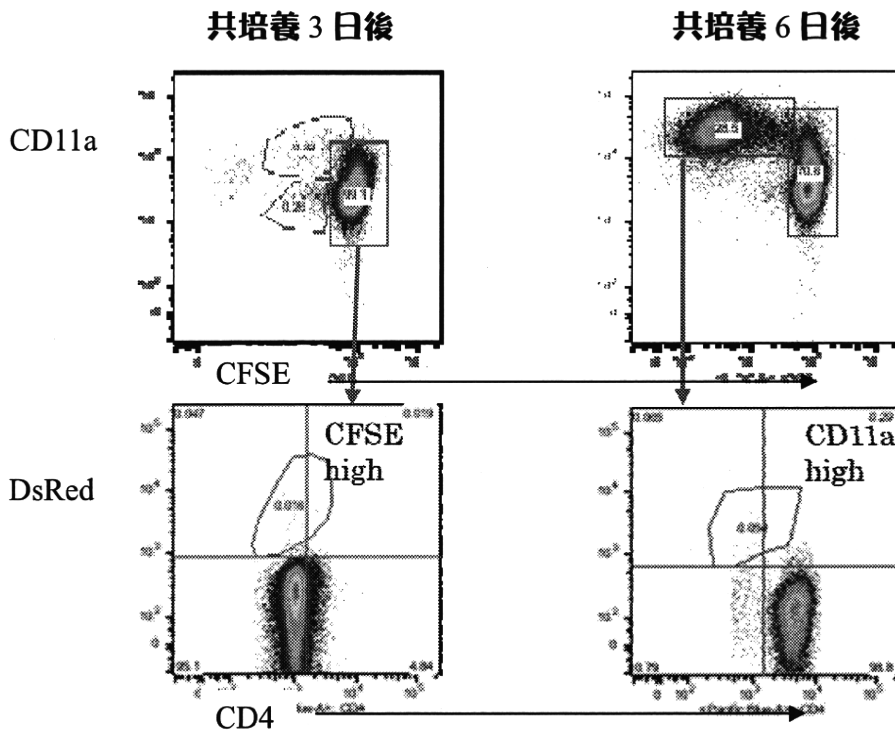


図 2. HIV 感染樹状細胞により活性化されて伝播されたウイルスを発現するアロ CD4 陽性 T 細胞集団の解析

単球由来樹状細胞(MDDC)に HIV-1_{NLAD8-D} を感染させ、翌日アロ CD4 陽性 T 細胞を共培養して 3 日後と 6 日後に細胞を回収した。これらの CD4 陽性 T 細胞の増殖(CFSE)と活性化マーカー(CD11a)の発現を比較した (上段)。培養 3 日目には CFSE 発現非分裂細胞(下段左)、培養 6 日目には強く活性化され、分裂している CD11a high CFSE low (下段右) 細胞の一部に HIV-1 の発現(DsRed)を検出した。静止期 CD4 陽性 T 細胞と比較して活性化され分裂している CD11a high の細胞では CD4 発現が増加している。HIV 感染細胞はこの様な活性化のレベルにかかわらず、CD4 発現が低い細胞集団に存在していた。

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

研究分担者 塩田達雄 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨 HIV-2 は分離株により TRIM5 α 感受性が異なり、カプシド蛋白質 120 番目のアミノ酸がプロリンなら感受性、グルタミンあるいはアラニンなら耐性を示す。また、西アフリカ、ギニアビサウの 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。本研究では、日本において報告されている HIV-2 感染者にお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した。日本での HIV-2 感染報告例は未だ少数であるが、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 5 例について検討したところ、少なくとも 30 年以上無症候を保った一例のウイルスの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が、20-30 歳代の若年であるにも拘らず既にエイズを発症した 4 例ではグルタミンあるいはグリシンであり、上記の西アフリカの HIV-2 感染者コホートで観察された相関は、日本における少数の HIV-2 感染例でも明瞭に認められることが明らかになった。

A. 研究目的

TRIM5 α はアカゲザルの抗 HIV 因子として 2004 年に同定された。レトロウイルスに対する自然免疫を担う重要な因子である。我々は以前、8 種類の HIV-2 株を用いて、カニクイザルならびにヒト TRIM5 α による感染抑制効果を調べ、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、ギニアビサウの 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、西アフリカとはエイズ診療体制の整備が大きく異なる日本において、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。

B. 研究方法

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、臨床症状との相関を検討した。

C. 研究結果

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。データベースに登録されている遺伝子配列から推定され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いた。診断時、症例 1 は CD4 数 241 個/ μ l、ウイルス量 35 万コピーで結核を発症、症例 2 は CD4 数 4 個/ μ l でウイルス量 68 万コピー、症例 3 は CD4 数 1 個/ μ l、ウイルス量 6 万コピーでサイトメガロウイルス感染症を発症、症例 4 は CD4 数 110 個/ μ l でウイルス量 2 万 5 千コ

ピーであった。データベースに登録されている遺伝子配列から推定される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、症例 1、2、4 についてはグリシン、症例 3 について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。

D. 考察

本邦においては未だ HIV-2 の感染例は少ない。しかし、日本とはエイズ診療体制の整備が大きく異なる西アフリカの 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ることが明らかになった。従って、HIV-2 の TRIM5 α 感受性の違いが、このウイルスの病原性に大きく影響している可能性がさらに強まった。特に、HIV-2 のカプシドタンパク質 120 番目のアミノ酸は、感染者の予後診断に有用と考えられる。

E. 結論

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 120 番目のアミノ酸置換との相関は、日本における少数の HIV-2 感染例でも明瞭に認められることが明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Onyango CO, Leligidowicz 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) Nakayama EE, Shioda T. Anti-retroviral activity of TRIM5 (alpha). *Reviews in Medical Virology*. 20:77-92, 2010
- 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
- 4) Wichukchinda N, Nakajima T, Saipradit N, Nakayama EE, 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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

- 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

2. 学会発表等

- 1) 櫻木淳一：ポストバディングに何が起きているか？ 第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010年11月7日
- 2) 中山英美：TRIM5 α とHIV/SIVの種特異性 第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010年11月9日
- 3) 河野健、横山勝、佐藤裕徳、塩田達雄、中山 英美：アカゲザル TRIM5 α はHIV-2/SIVmac キャプシドの複数領域を認識する 第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010年11月8日
- 4) 黒石歩、塩田達雄、中山英美：HIV-1のTRIM5 α 感受性に影響するカプシド内の1アミノ酸置換 第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010年11月9日
- 5) 櫻木淳一、大石真久、中野隆史、櫻木小百合、佐野浩一、塩田達雄：HIV粒子・ゲノムRNAの成熟ステップと感染能獲得との相関 第24回エイズ学会学術集会・総会、東京、2010年11月24日
- 6) 中山英美：HIV感染制御因子TRIM5 α 第24回エイズ学会学術集会・総会、東京、2010年11月24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

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）
分担研究報告書

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

研究分担者 杉浦 亙 名古屋医療センター

研究要旨 インテグラーゼ阻害剤ラルテグラビルの耐性に関しては既 Y143C、Q148H、N155H の 3 つの経路が報告されているが、インテグラーゼは多様性にとんでおり、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に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を解析し、その結果多様性の範疇にラルテグラビル耐性レベルに影響を及ぼす変異が含まれることを明らかにした。

A. 研究目的

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、インテグラーゼは多様性にとんでおり、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に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・考察する。

B. 研究方法

対象：RF01_AE と判定された HIV 感染症例を対称とした。

方法：患者血漿より市販の RNA 精製キットを用いて HIV RNA を抽出し、RT-PCR、nested PCR にて標的領域を増幅。シーケンス反応を行い ABI3730/ABI3130 を用いて解析を行った。

方法：i) CRF01_AE インテグラーゼ配列解析：上記 EDTA 血から分離された末梢血単核球から DNA を抽出し、PCR 及びシーケエンシングにより患者のインテグラーゼ配列を決定した。ii) *in vitro* における CRF01_AE の RAL 耐性誘導：CRF01_AE 感染者より分離・クローン化した感染性クローンを 2 株 (DR5032、DR6824) をもとに *in vitro* における耐性誘導を行った。IC₅₀ の半量より開始し、検鏡による CPE および上清中の p24 の濃度を指標にウイルスを増殖・維持し、徐々に RAL 濃度を上昇させた。

(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

でインフォームドコンセントを得ている。

C. 研究結果

i) 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。図 1 の系統樹に示す様に 78 例全て CRF01_AE と分類され、組換えウイルスは認められなかった。subtype B との比較で 2 症例以上に明確に認められた変異を図 2 にまとめた。41 カ所に変異が認められ、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 (赤三角：#72、#74、#125、#232) が観察されており、棒グラフを赤で示してある箇所の変異、V72I、L74V、は耐性関連変異である。一方、T125K および D232N については耐性変異ではない。同様に今後登場が予想されている elvitegravir (白抜き青三角) は V72I、L74V いずれも耐性変異である。GSK13496572 (緑三角) では L1001I、T124A、V201I が耐性変異である。

ii) CRF01_AE RAL 耐性誘導：

未治療症例から分離・クローン化された DR6824、逆転写酵素阻害剤およびプロテアーゼ阻害剤に対して耐性を獲得した症例から分離・クローン化された DR5032 それぞれを R5 MaRBLE 細胞に感染させ、1-2 ヶ月間薬剤非存在下で培養を続け、十分増幅されるようにしてから、1/2 IC₅₀ 濃度で選択を開始した。10 パッセージ時点で DR6824 は 2IC₅₀、DR5032 は 4IC₅₀ までに到達している。現在も培養は継続している。

D. 考察

CRF01_AE のインテグラーゼ配列解析を行った。その結果、サブタイプ B と比較して 14.2% の違いがある事が明らかになった。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。耐性誘導実験では、未治療のクローンの方が治療を受けていた患者から作成されたウイルスに比べて濃度をあげるスピードが遅い傾向が見られているが、現在も培養を続けており、明確な結論に至っていない。

E. 結論

CRF01_AE におけるインテグラーゼの遺伝的多様性について解析を行った。遺伝的多様性の中に耐性に関連する変異が認められており、CRF01_AE 感染に対するインテグラーゼ阻害剤の効果と耐性獲得に関してさらなる解析が必要である。

F. 研究発表

研究発表

1. 原著論文

欧文

Ibe S, Sugiura W. Clinical significance of HIV reverse transcriptase inhibitor-resistant mutations
Future Microbiology. 2011 (in press)

Junko Shibata, Wataru Sugiura, Hirotaka Ode^o, 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]

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]

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 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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

和文

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.

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

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

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。

杉浦 互、HIV 感染—最新の疫学・臨床・治療、内科 2010; 106(5): 781-87

伊部史朗、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.

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.

2. 口頭発表

海外

Hiroaki Yoshii, Shingo Kitamura, Wataru Sugiura, Yasumasa Iwatani. Constitutive activation of Stat1 causes spontaneous APOBEC3G expression, which determines permissive phenotype against vif-deficient HIV-1 replication in T-cell lines. CSHL RETROVIRUSES. May 24-29, 2010.5.24-29. Cold Spring Harbor Laboratory, USA

Yasumasa Iwatani, LinLiu, Denis S Chan, Hiroaki Yoshii, Judith G Le vin, Angela M Gronenborn, Wataru Sugiura. Structure-guided mutagenesis of APOBEC3G reveals four lysine residues critical for HIV-1 Vif-mediated ubiquitination. CSHL RETROVIRUSES. May 24-29, 2010.5.24-29. Cold Spring Harbor Laboratory, USA

H Suzuki, J Hattori, M Nishizawa, S Ibe, Y Iwantani, Y Yokomaku, W Sugiura.

Previous antiretroviral exposure enhances accumulation of mutations in the integrase region and affects acquisition of raltegravir resistance. The International HIV & Hepatitis Virus Drug Resistance Workshop & Curative Strategies. June 8-12, 2010, Dubrovnik, Croatia

T Masaoka W Sugiura, Y Iwatani, T Sawasaki, S Matsunaga, Y Endo, M Tatsumi, N Yamamoto, A Ryo.

A high-throughput phenotypic assay for HIV-1 protease drug resistance using a wheat cell-free protein production system. The International HIV & Hepatitis Virus Drug Resistance Workshop & Curative Strategies. June 8-12, 2010, Dubrovnik, Croatia

J Hattori, H Gatanaga, M Kondo, K Sadamasu, S Kato, H Mori, R Minami, W Sugiura, the Japanese Drug Resistance HIV-1 Surveillance Network. Characteristics of drug-resistant HIV-1 transmission: analysis of drug resistance in recently and non-recently infected treatment-naive patients in Japan. The International HIV & Hepatitis Virus Drug Resistance Workshop & Curative Strategies. June 8-12, 2010, Dubrovnik, Croatia

S. Ibe, Y. Yokomaku, T. Shiino, R. Tanaka, J. Hattori, S. Fujisaki, Y. Iwatani, N. Mamiya, M. Utsumi, S. Kato, M. Hamaguchi, W. Sugiura. Molecular epidemiology of HIV-2 in Japan: identification of the first circulating recombinant form of HIV-2, CRF01_AB. 5th International Workshop on HIV Transmission. July 15-16 2010, Vienna, Austria

M. Nishizawa, J. Hattori, W. Heneine, J.A. Johnson, W. Sugiura. Sensitive testing identifies a greater prevalence of transmitted HIV drug resistance in Japan. 5th International Workshop on HIV Transmission. July 15-16 2010, Vienna, Austria

W. Sugiura, J. Hattori, S. Yoshida, H. Gatanaga, M. Kondo, K. Sadamasu, T. Shirasaka, H. Mori, R. Minami, M. Tateyama, M. Ueda, S. Kato, T. Ito, M. Oie, A. Ueda. A nationwide surveillance study on the prevalence of drug-resistance mutations among newly diagnosed individuals in Japan from 2003 to 2008. 5th International Workshop on HIV Transmission. 15-16 July 2010, Vienna, Austria

S. Ibe, Y. Yokomaku, R. Tanaka, J. Hattori, S. Fujisaki, Y. Iwatani, S. Kato, M. Hamaguchi, W. Sugiura. Development of a highly sensitive and reproducible plasma HIV-2 RNA copy quantification method for monitoring antiretroviral treatment. XVIII International AIDS Conference. July 18-23 2010. Vienna, Austria

Naoko Miyazaki, Shuzo Matsushita, Takeshi Fujii, Aikichi Iwamoto, Wataru Sugiura, Japanese HIV-MDR Study Group. Drug-Resistant Genotyping to Guide Selection of Etravirine, Darunavir and Raltegravir in Salvage Therapy for Multi-Drug-Resistant Cases Improves Outcomes. XVIII International AIDS Conference. July 18-23 2010. Vienna, Austria

Characteristics of Drug-Resistant Hiv-1 Transmission: Analysis of Drug Resistance in Recently and Not-Recently Infected Treatment-Naïve Patients in Japan

J Hattori, H Gatanaga, M Kondo, K Sadamasu, S Kato, H Mori, R Minami, W Sugiura, and the Japanese Drug Resistance HIV-1 Surveillance Network

11th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance. November 7-10 2010, Hershey PA

First Case of Hiv-2 Crf01_Ab Infection Treated with Combination Antiretroviral Therapy. Shiro Ibe, Yoshiyuki Yokomaku, Junko Hattori, Yasumasa Iwatani and Wataru Sugiura. 11th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance. November 7-10 2010, Hershey PA

Wataru Sugiura

Characterization and phylogenetic analysis of Drug-Resistant HIV-1 Transmission in Japan

US-Japan Joint AIDS Panel: Resistance Meeting. December 8-9, 2010, Singapore

国内

伊部史朗、横幕能行、服部純子、杉浦 互. 定量PCR法を用いた HIV-2 viral load 測定系の確立とその臨床応用. 第84回日本感染症学会総会. 平成22年4月5-6日. 京都

岩谷靖雅、杉浦互. Structure-guided mutagenesis of APOBEC3G reveals four lysine residues critical for HIV-1 Vif-mediated ubiquitination near the C-terminal end. 第5回日独エイズシンポジウム. 平成22年5月10-11日. 東京

吉居廣朗、岩谷靖雅、杉浦互. Spontaneous APOBEC3G expression which determines permissive phenotype against Vif-deficient HIV-1 replication, is caused by constitutive activation of Stat1 in T-cell lines. 第5回日独エイズシンポジウム. 平成22年5月10-11日. 東京

岩谷靖雅、杉浦互. 抗 HIV 宿主因子 APOBEC3G の発現制御と分解

第12回白馬シンポジウム, 徳島 5月14日-5月15日

服部純子、重見 麗、杉浦 互. BEDアッセイを用いた未治療 HIV 感染者の動向調査. 第12回白馬シンポジウム in 徳島～最先端のエイズ研究を徹底討論する～. 平成22年5月14-15日. 徳島

Wataru Sugiura. A Nationwide Surveillance Study on the Prevalence of Drug-Resistance Mutations among Newly Diagnosed Individuals in Japan from 2003 to 2009, Joint Meeting of AIDS Panel for U.S. Japan Cooperative. 14 Sept 2010. Awaji, Japan

北村紳悟、吉居廣朗、前島雅美、横幕能行、杉浦 互、岩谷靖雅

APOBEC3C における HIV-1 Vif に対する感受性を決定する領域の探索

第58回日本ウイルス学会学術集会. 2010年11月7日

正岡崇志、杉浦 互、澤崎達也、松永智子、遠藤弥重太、巽正志、Robert Shafer、山本直樹、梁 明秀. 酵素活性を指標と

した HIV プロテアーゼ薬剤耐性新規検査法の開発
第 58 回日本ウイルス学会学術集会.2010 年 11 月 7 日

吉居廣朗、北村紳悟、前島雅美、杉浦 互、岩谷靖雅
リンパ球由来細胞株における vif 欠損 HIV に対する異なる
感受性は Stat1 活性化状態に関する. 第 58 回日本ウイルス学
会学術集会.2010 年 11 月 9 日

木下枝里、平野淳、柴田雅章、高橋昌明、野村敏治、脇坂達
郎、横幕能行、杉浦 互
リファンピシン併用下におけるインテグラーゼ阻害剤 ラルテグ
ラビルの投与量に関する検討. 第 24 回日本エイズ学会学術
集会. 東京. 2010 年 11 月 24 日

横幕能行、今村淳治、平野淳、伊部史朗、岩谷靖雅、杉浦
互
名古屋医療センターにおける etravirine の使用状況と効果お
よび適応に関する検討
第 24 回日本エイズ学会学術集会. 東京. 2010 年 11 月 24
日

高橋昌明、平野淳、木下枝里、柴田雅章、野村敏治、横幕能
行、杉浦 互
HPLC using UV detectin for the simultaneous quantification of
etravirine(TMC-125),
And 4 protease inhibitors in human plasma. 第 24 回日本エイ
ズ学会学術集会. 東京. 2010 年 11 月 24 日

平野淳、木下枝里、柴田雅章、高橋昌明、野村敏治、横幕能
行、杉浦 互
Tipranavirtide 併用患者に対する TDM の有効効
第 24 回日本エイズ学会学術集会. 東京. 2010 年 11 月 24
日

吉居廣朗、前島雅美、北村紳悟、横幕能行、杉浦 互、岩谷
靖雅
抗 HIV 宿主因子 APOBEC3 ファミリーの細胞依存的な発現調
節機構の解明
第 24 回日本エイズ学会学術集会. 東京. 2010 年 11 月 24
日

西澤雅子、服部純子、横幕能行、Jeffrey Johnson、Walid
Hencine、杉浦 互
高感度薬剤耐性検査法を用いた新規未治療 HIV/AIDS 症例
における微小集族薬剤耐性 HIV 調査研究. 第 24 回日本エイ
ズ学会学術集会. 東京. 2010 年 11 月 25 日
奥村かおる、横幕能行、三和治美、山田由美子、杉浦 互、
岩谷靖雅、平野 淳、木下枝里.ベナンボックス吸入時の苦味
の軽減に対するハッカ飴の使用とその効果 第 2 報-他の有
効な手段を探すためのハッカの有効性の検証-.第 24 回日本

エイズ学会学術集会. 東京. 2010 年 11 月 25 日

柴田雅章、平野 淳、木下枝里、高橋昌明、野村敏治、横幕
能行、杉浦 互
薬剤師のための HIV 研修会開催についての事前アンケート
調査結果
第 24 回日本エイズ学会学術集会. 東京. 2010 年 11 月 25
日

正岡崇志、杉浦 互、澤崎達也、松永智子、遠藤弥重太、巽
正志、Shafer Robert、山本直樹、梁 明秀.コムギ無細胞合成
HIV プロテアーゼを用いた薬剤耐性高速検査法の開発
第 24 回日本エイズ学会学術集会. 東京. 2010 年 11 月 25
日

椎野禎一郎、貞升健志、長島真美、服部純子、杉浦 互
国内感染者集団の大規模塩基配列解析 1: CRF01_AE の動
向と微小系統群の同定
第 24 回日本エイズ学会学術集会. 東京. 2010 年 11 月 25
日

今村淳治、横幕能行、服部純子、岩谷靖雅、杉浦 互
新規 HIV/AIDS 診断症例におけるトロヒ・ス・ムに関する検討
第 24 回日本エイズ学会学術集会. 東京. 2010 年 11 月 25
日

谷 麗君、立川-川名 愛、椎野禎一郎、細谷紀彰、鯉渕智彦、
藤井 毅、三浦聡之、杉浦 互、岩本愛吉 配列特異的オリコ
・フ・ローフ・を用いた HIV-1 薬剤耐性変異検出法の開
発
第 24 回日本エイズ学会学術集会. 東京. 2010 年 11 月 25
日

木村雄貴、藤野真之、正岡崇志、服部純子、横幕能行、岩谷
靖雅、鈴木淳巨、渡邊信久、杉浦 互
HIV-1 のタ・ルナヒ・ル耐性獲得機構の酵素 学的構造学的
解明
第 24 回日本エイズ学会学術集会. 東京. 2010 年 11 月 25
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。

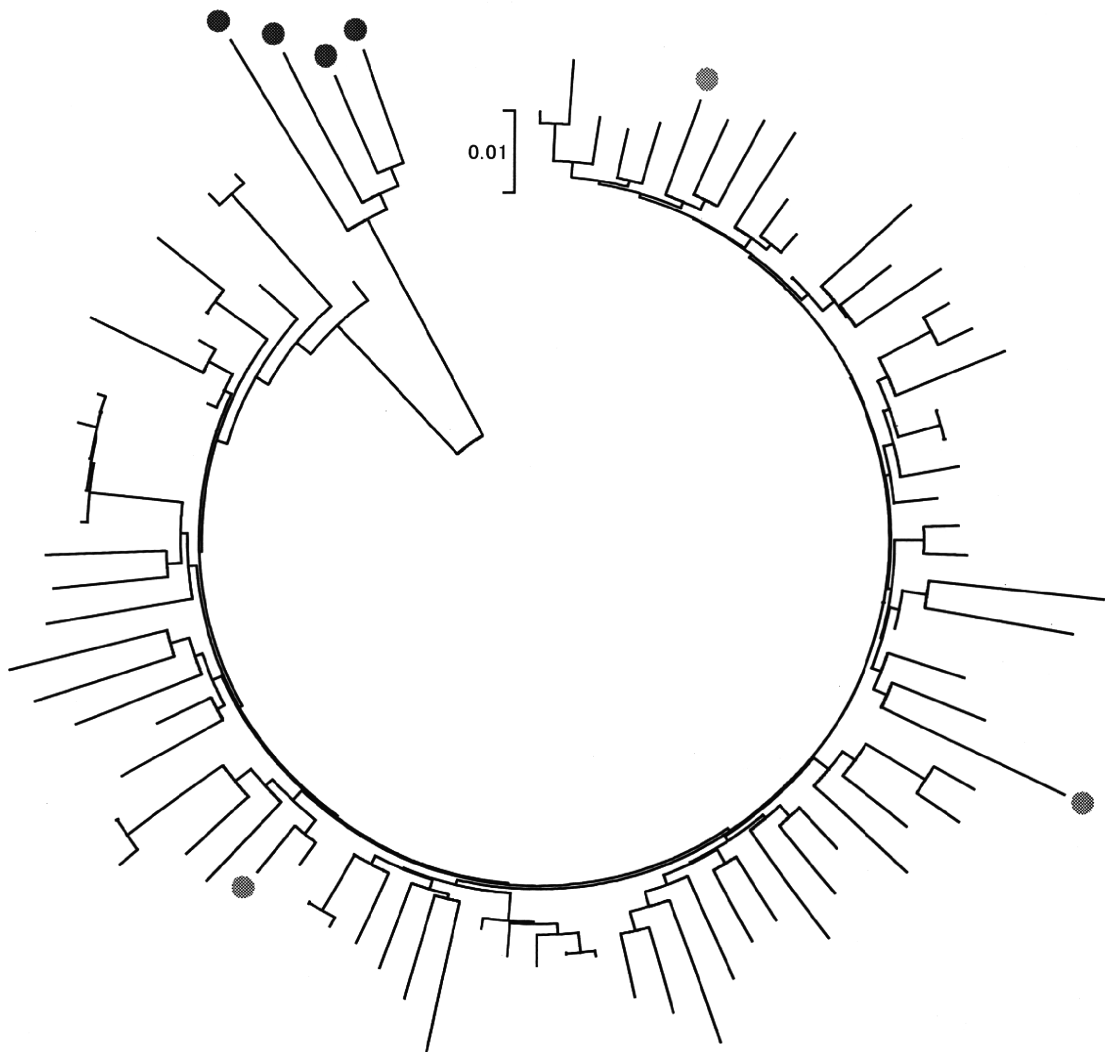


図 1. 配列解析を行った症例の系統樹

解析した 78 症例のインテグラーゼ遺伝子の系統樹を示す。赤が subtype B、緑が CRF01_AE の reference 配列である。系統樹に見る様に 78 例すべて CRF01_AE に属する。

CRF01_AE インテグラーゼに観察される多様性

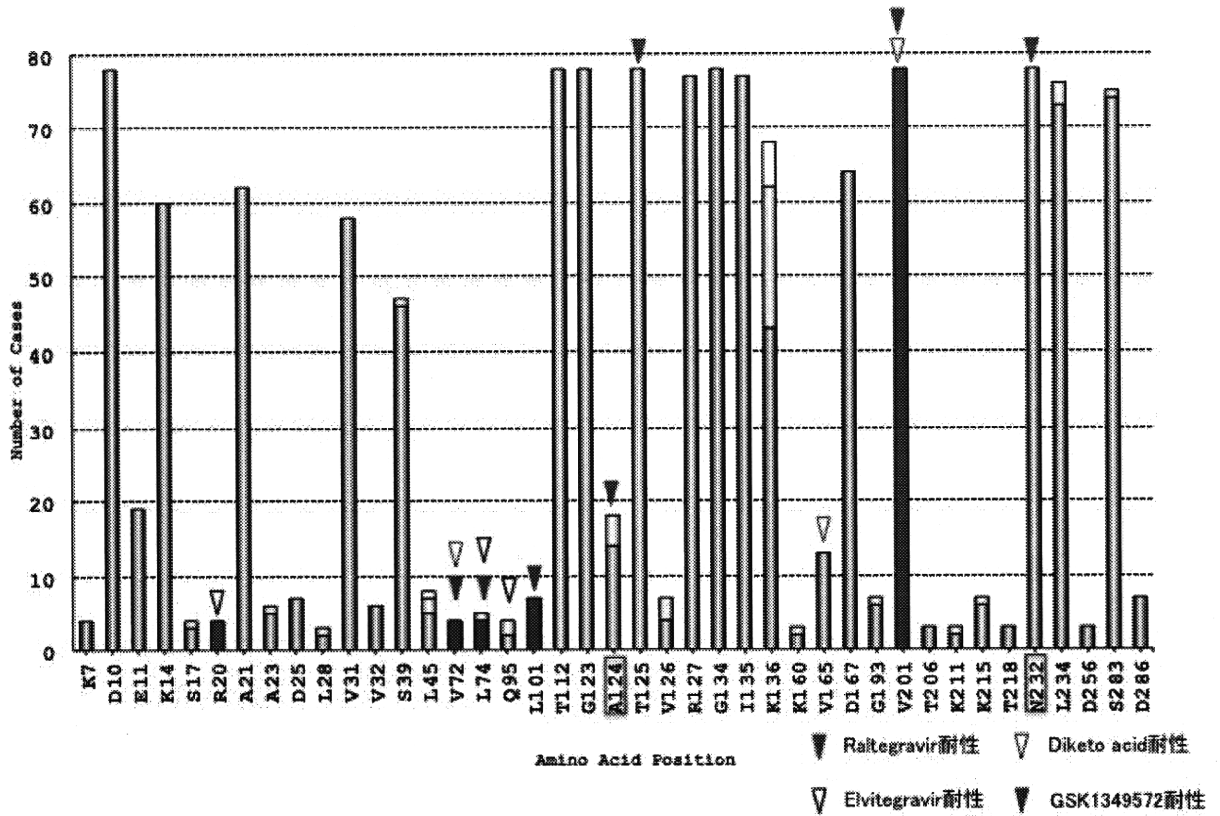


図 2. CRF01_AE に観察されたインテグラーゼの多様性変異。赤▽:raltegravir 耐性関連変異、白抜き青▽:elvitegravir耐性関連変異、緑▽:GSK1349572耐性関連変異、白抜き赤▽:diketo acid耐性関連変異を示す。また赤棒はアミノ酸置換パターンが耐性関連変異であることを示している。赤い四角で囲ってある箇所はCRF01_AEの野生型自体が耐性関連変異のものを示している。

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）
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
分担研究報告書

中和抗体誘導を可能にする HIV-1 Env 抗原の合成に関する研究

研究分担者 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

研究要旨 HIV-1 に対する中和抗体の標的は Env gp120/41 である。多様なウイルス株に効果のある代表的な中和抗体が認識するエピトープに CD4 結合部位があり、抗体誘導型エイズワクチン開発の immunogen の候補として位置づけられている。しかし、CD4 結合部位を認識する中和抗体を人為的に誘導することには成功していない。我々は CD4 結合部位の一部の立体構造を環化ペプチドで再現して、立体構造依存的に CD4 結合部位を認識する抗体の誘導を試みた。この概念を検証するために、我々は環化ペプチド抗原に反応する抗体クローンをヒト抗体遺伝子ライブラリーからファージディスプレイ法を利用して選択した。その結果、HIV-1 Env を認識する抗体クローンを 3 種類選択する事に成功した。これは合成環化ペプチド抗原が Env の立体構造を良く反映している事を示唆する。この技術は中和抗体誘導型エイズワクチン開発の基盤として非常に有用と思われる。

A. 研究目的

HIV-1 感染症は予防法が確立していない。ワクチンは重要な感染症予防法であるが、変異しやすく、多くの亜種が流行している HIV-1 に対して効果的なエイズワクチンの開発は困難を極めている。予防エイズワクチンの誘導すべき免疫因子としては、中和抗体と細胞性免疫が注目されている。中和抗体は non-human primate AIDS model にて SIV や SHIV 感染を完全にブロックすることが証明されている。他のウイルスに対するワクチンも液性免疫を誘導することにより高い成功を収めている。以上の背景から、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。

中和抗体の特性には複数のウイルス株と中和する能力があることが求められている。これが可能であることは、極めて限定された数しか得られていないヒト由来汎 HIV-1 株中和モノクローナル抗体により実証されている。このような中和抗体を誘導すれば液性免疫誘導型エイズワクチンは達成できると期待されるが、これまで成功例は報告されていない。既存のヒト由来汎 HIV-1 株中和モノクローナル抗体エピトープを分析することによりワクチン抗原のデザインが可能になると期待される。

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。なを、本研究は東京医科歯科大玉村教授との共同研究である。

B. 研究方法

HIV-1 Env の CD4 結合部位の一部 (HXB2 Env amino acid coordinate 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た。抗体の反応特異性を検証するための対照として Stat-TRF、Env95-BSA、GST、CD33-His、BSA を使用した。HIV-1 Env に対する反応性を確認するためには、C 末端に FLAG タグを付加した HXB2 由来の Env の発現ベクターを 293T 細胞に導入することにより作出した。免疫共沈法は常法に則り抗 FLAG 抗体で免疫沈降を行い、共沈したタンパク質を SDS-PAGE で展開した後に抗ヒト Fab 抗体にて Western blot 法にて検出を行った。

(倫理面への配慮)

特記すべきことなし。

C. 研究結果