

2010 KALAS international symposium (Korea, Busan) August 19-21, 2010

3. 明里宏文：HCV, HIVの新規霊長類モデル開発
大阪大学微生物病研究所セミナー（大阪）平成
22年8月26日
4. 明里宏文：C型肝炎の新規霊長類モデル開発
第47回日本ウイルス学会九州支部総会（宮崎）
平成22年9月3-4日
5. Hirofumi Akari: A novel monkey-tropic HIV-1:
toward the development of a new non-human pri-
mate model.
11th Kumamoto AIDS seminar (Kumamoto)
October 6-8, 2010
6. 明里宏文：HIV-1感染霊長類モデルの開発
第58回日本ウイルス学会学術集会シンポジウム
（徳島）平成22年11月7-9日
7. 土肥直哉、齊藤暁、明里宏文、藤原佐知、三宅
在子、横山勝、大出裕高、佐藤宏徳、足立昭
夫、野間口雅子：サル指向性HIV-1 CAの1アミ
ノ酸変異はサル細胞での増殖を促進する
第58回日本ウイルス学会学術集会（徳島）平成
22年11月7-9日
8. 齊藤暁、河野健、黒石歩、中山英美、塩田達雄、
足立昭夫、野間口雅子、保富康宏、俣野哲朗、
明里宏文：カニクイザルにおける第3世代サル
指向性HIV-1の増殖の解析
第24回日本エイズ学会学術集会（東京）平成
22年11月24-26日
9. 野間口雅子、齊藤暁、明里宏文、土肥直哉、藤
原佐知、三宅在子、横山勝、大出裕高、佐藤
宏徳、足立昭夫：サル細胞で効率良く増殖する
HIV-1の構築—アカゲザルTRIM5 α とtetherinに
よる抑制の回避—
第24回日本エイズ学会学術集会（東京）平成
22年11月24-26日
10. 齊藤暁、河野健、黒石歩、中山英美、塩田達雄、
足立昭夫、野間口雅子、保富康宏、俣野哲朗、
明里宏文：カニクイザルにおける第3世代サル
指向性HIV-1の増殖の解析
第24回日本エイズ学会学術集会（東京）平成
22年11月24-26日

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

特になし

分担研究課題



抗HIVタンパク質アクチノヒビンの実用化研究

—抗HIVタンパク質の実用化研究—

研究分担者

田中 晴雄 いわき明星大学薬学部薬学科 教授

研究協力者

高橋 淳 いわき明星大学薬学部薬学科 研究助手

抗HIVタンパク質アクチノヒビン (AH) は、114アミノ酸残基で構成され、分子内に3つの糖鎖結合ポケットを持つレクチンである。AHは、HIVエンベロープタンパク質gp120の高マンノース型糖鎖 (HM) と結合することで、HIVの細胞への接着・侵入を低濃度 ($IC_{50}=2-110nM$) で阻止する。AHは、gp120のように多数のHMを持つ糖タンパク質にのみ強い親和性を示すことから、選択性の優れた薬剤として期待できる。AHの抗HIV活性はgp120上の糖鎖数に依存し、低糖鎖数株に対する活性は弱いが、AH二量体 (His-TEV-AHdimer/RTB-L) の抗HIV活性はAHの2~20倍に上昇し、本研究では、AH及び二量体を用いるHIV感染予防薬とHIV/AIDS治療薬の開発を目指して下記の成果を得た。

(1) HPLCを用いるAHの高感度分析方法を確立し、動物実験におけるAHの微量分析が可能となった。(2) 放線菌由来のAHが114アミノ酸の他にシグナルペプチドの一部 (1~16アミノ酸) を含むことが分かったので、培養時間を延長することにより、114アミノ酸のAHを得た。今後これを用いて化学修飾を行い、注射可能な誘導体の調製を実施する。(3) 中性バッファーに高溶解性誘導体の調製に成功し、サルでの感染予防試験の素材が準備できた。(4) ニコチアナ属植物でのAHの発現に成功し、大量生産の可能性が示された。(5) AH耐性株のHM欠失部が確定し、AHの抗HIV活性はHMへの結合によることが裏付けられた。(6) AHはサイトカイン誘導性が低く、安全であることが確認された。

A. 研究目的

新属新種の放線菌 *Longispora albida* が生産するアクチノヒビン (AH, 図1) は、HIV gp120の高マンノース型糖鎖 (HM) と結合することにより、HIVの細胞への接着・侵入を阻害し、逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤耐性株を含む臨床分離HIV株に対して、強い抗HIV活性を示すことが明らかになっている。

AHは114アミノ酸残基で構成されるマンノース結合レクチンの一種であり、分子内に38アミノ酸残基で構成される3つのセグメント (糖鎖結合ポケット) を持つ。昨年度明らかにしたAHの立体構造から、AHはgp120上のHM3本を捕らえることで、gp120と強く結合し、強力な抗HIV活性を示すことが分かっている。AHはgp120のように多数のHMを持つ糖タンパク質のみに作用することから、gp120に対する選択性が非常に優れており、副作用の少ない薬剤として期待できる。また、HIV感染予防薬として期待されているシアノピリン-N (CV-N) はHM1本のみ

でも強い親和性を示すため、CV-NよりAHの方が選択性において遥かに優れていると考えられる。AHの抗HIV活性は、gp120上の糖鎖数に依存する傾向が見られ、低糖鎖数株に対するAHの抗HIV活性は弱いが、AHを二量体 (His-TEV-AH dimer/RTB-L) とすることにより、抗HIV活性を2~20倍上昇させ、AH非感受性株を克服することに成功した。また、AH及び二量体は、ウサギ臍刺激性試験において安全性が確認されている。本年度の研究では、AHをHIV感染予防薬及びHIV/AIDS治療薬として開発することを目的として、動物実験における組織内AHの微量分析法の確立、高溶解性AHの取得、さらには安価なサンプル調製法の確立を目指して、植物でのAHの発現を検討した。

B. 研究方法

〈HPLC〉

ナカライ COSMOSIL 5C₁₈-MS-II (2.0 X 1.5mm) のカラムを用い、移動相として0.01% TFA又は0.01%

蟻酸を含むアセトニトリル溶液を用いてリコンビナントAH (rAH) を分析した。

〈植物によるAH組換え体の発現〉

AH 遺伝子を導入したタバコモザイクウイルス (TMV) 複製系 (magnICON; Icon Genetics GmbH) を用いて *Nicotiana benthamiana* でAHを発現した。

〈高溶解性誘導体の調製〉

PCR法にて各種AH誘導体遺伝子を作成し、大腸菌におけるAH生産系を用いて誘導体を作成した。各種カラムクロマトグラフィーで精製した試料をPBSに溶解させ、BCA法にてタンパク濃度を定量し、10mg/mlを目標として各種誘導体の溶解性向上を評価した。

〈AH耐性HIV-1株の選択と分離〉

CEM細胞にHIV-1(III B) を感染させ、AHの存在下で48穴プレートに接種した。AH濃度はEC50値の1~2倍濃度から始め、4, 5日培養した後に、段階的に1.5倍以下の濃度のAHを添加して、passageを繰り返した。得られた耐性株のproviralDNAをDNeasy tissue kits(Qiagen) を用いて細胞から抽出し、gp120のgenotypeを決定した。

〈各種サイトカイン及びケモカインの産生〉

1.6μM AH存在下でPBMCを培養し、3日後の各種サイトカインの産生をBio-Plex 200 system(Bio-RAD) により調べた。

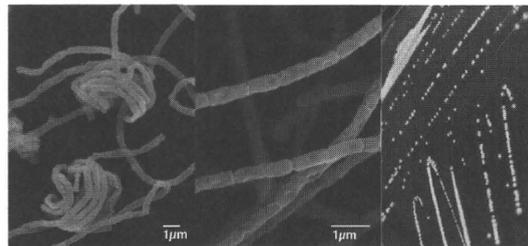
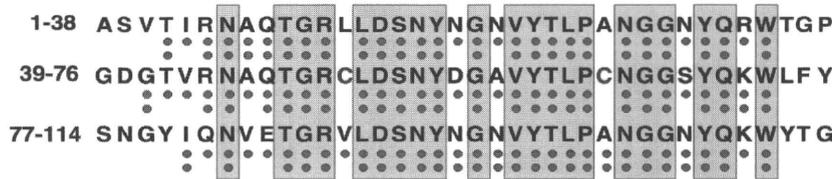
C/D. 研究結果と考察

〈HPLCを用いる高感度AH分析法の確立〉

rAHを上記の条件で分析した場合 (カラム温度、25℃)、2本のピークが観測され、分析に支障をきたしていたが、カラム温度を60℃として分析した場合、1本のピークとなることが分かった。又、2本のピークに分かれる現象は二量体 (His-TEV-AH dimer/RTB-L) でも観測されていたが、カラム温度を60℃とすることにより、1本のピークになることが分かった。さらに、単一の溶離液を用いた蛍光HPLCによる血中AH定量法の開発を試み、AHの励起極大波長は280nm、蛍光極大波長は338nmであることが分かり、溶媒のpHにより蛍光強度が変化し、pH 5付近で最大値を示すことが明らかとなった。さらにBSAの影響等を検討中であるが、このAHの血中定量法の確立により、高感度・高特異性の迅速で簡便な血中AH定量法が完成できるものと期待される。

〈高溶解性AH誘導体の調製〉

AHは強酸性バッファーや有機溶媒系バッファーに対する溶解性は良好であるが、中性バッファーに対する溶解性が悪く、臨床応用が難しいと考えられていた。そこでAHに各種アミノ酸置換を施すことで、AHの溶解性向上を検討した。その結果、PBSに対し10mg/ml以上の濃度で溶解できる誘導体作成に成功した。この誘導体は低nMでも合胞体形成阻害活性を有しており、今後、HIV感染予防薬及びHIV/AIDS治療薬開発への応用が期待できる。



1% Gellum gum-water proline medium

Chemotaxonomic characteristics	
Cell wall amino acid;	meso-DAP, glycine, alanine
Acyl type of peptidoglycan;	glycolyl
Whole-cell sugar;	arabinose, galactose, xylose
Diagnostic phospholipid;	phosphatidylethanolamine (PII type)
Menquinone;	MK-10 (H _{4,6,8})

Matsumoto et al.,
Int J Syst Evol Microbiol,
53: 1553-1559 (2003)

Taxonomic properties of actinohivin producing strain, *Longispora albida* K97-0003†

図1 抗HIVレクチン・アクチノヒビン (actinohivin) の誕生

〈植物によるAH組換え体の発現〉

現在、AHは放線菌で、二量体は大腸菌の発現系を用いて生産しているが、さらに安価な生産法の確立を目指して、米国レイビル大学の的場博士との共同研究で植物を用いる生産方法の検討を進めた。植物での発現に適したコドンに変化させたAH遺伝子を含むTMVを *Nicotiana benthamiana* に感染させ、5日後の植物体からrAHを精製した。(図2) このようにして生産されたrAHも放線菌由来のAHと同等の合胞体形成阻害活性を有することが確認された。今後二量体の生産についても検討する予定である。大量生産法の確立が期待される。植物によるタンパク質の生産は、現在ワクチンの生産についても検討されていて、発熱物質を含まないタンパク質の安価な生産法として注目されている。

〈AH耐性株のgp160のジェノタイプ〉

AH耐性株は容易には得られなかったが、濃度を少しずつ上昇させたAHを含む培地で4、5日間隔で passage を繰り返した後に (図3)、1/2~1/140に感受性が低下した耐性株が得られた。これらの株では、gp120上のHM結合部位である230NKT232、289NOS291、295NCT297、339NNT341、386NST388、392NST394のうち、1~4か所が欠失していた。こ

のことは、AHがHMに結合することにより抗HIV活性を示すことの傍証である。また、AHの高度耐性株が得られなかったことは、HIV-1の細胞への感染にはHMの存在が必須であることを示している。

〈PBMCのサイトカイン及びケモカイン産生に対するAHの影響〉

PBMCによる27種類のサイトカイン/ケモカインの誘導に対する影響を、AHと他の抗HIV活性を有するレクチンで比較した。その結果、表1に示したように、AH (1.6 μ M) はサイトカイン/ケモカインをほとんど誘導しなかったのに対して、PHA (0.016 μ M、サイトカイン誘導コントロール) やシアノピリン-N (0.18 μ M) では各種のサイトカインやケモカインの強力な産生誘導が認められた。シアノピリン-NもAH同様、HMに結合することにより抗HIV活性を示すことが知られているが、1本のみHMを持つRNase Bでも強く結合する。一方、AHは、gp120のように多くのHMを持つ糖タンパク質のみに結合することから、シアノピリン-Nより遥かに選択性が優れていて、サイトカイン/ケモカイン誘導においても大きな差となって現れたものと考えられる。従って、これらの結果は、AHの安全性を裏付けるものとして重要である。

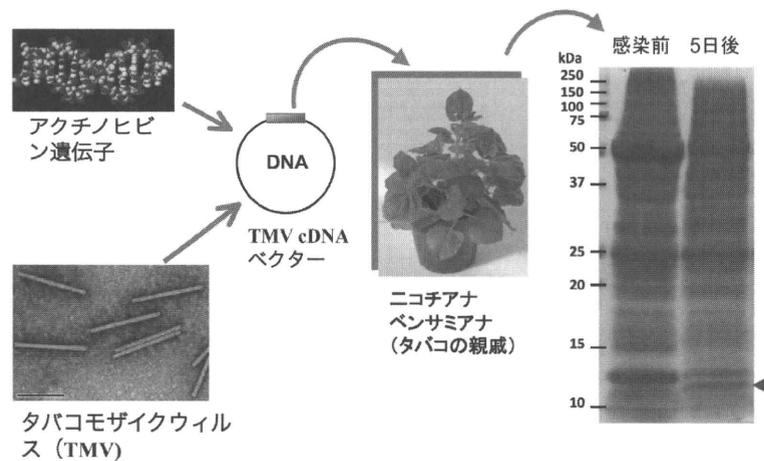


図2 組換えタバコモザイクウイルスを用いたアクチノヒビンの発現

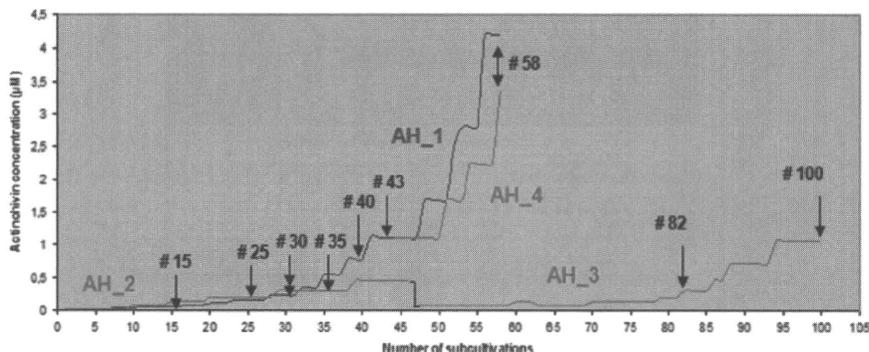


図3 HIV-1 (III B) 感染CEM細胞の段階的濃度上昇AHへの暴露

表1 各種レクチン存在下でのPBMCによる cytokine/chemokine産生の誘導

Cytokine/ chemokine	AH 1.6 μ M	HHA 0.4 μ M	CV-N ^b 0.18 μ M	PHA ^b 0.016 μ M
IL-1beta	ND ^a	1.6 \pm 0.4	100-500	100-500
IL-1ra	2.4 \pm 0.03	1.6 \pm 0.2	10-100	10-100
IL-2	1.4 \pm 0.9	0.58 \pm 0.08	3-10	1-3
IL-4	ND	1.0 \pm 0.2	10-100	3-10
IL-5	ND	0.59 \pm 0.04	> 500	10-100
IL-6	2.52	1.1 \pm 0.1	> 500	> 500
IL-7	ND	1.92	3-10	1-3
IL-8	1.5 \pm 0.02	1.06	100-500	100-500
IL-9	0.9 \pm 0.3	1.1 \pm 0.2	10-100	10-100
IL-10	1.4 \pm 0.0	1.6 \pm 0.3	100-500	10-100
IL-12	ND	4.9	3-10	3-10
IL-13	ND	0.73 \pm 0.46	> 500	100-500
IL-15	0.38	1.5 \pm 0.3	10-100	10-100
IL-17	ND	1.8 \pm 0.02	100-500	10-100
Eotaxin	ND	1.1 \pm 0.1	10-100	3-10
FGF	ND	> 7.9	3-10	1-3
G-CSF	ND	1.1 \pm 0.2	10-100	10-100
GM-CSF	ND	1.1 \pm 0.2	10-100	3-10
IFN-gamma	ND	1.1 \pm 0.3	> 500	10-100
IP-10	4.3 \pm 1.2	0.59 \pm 0.15	3-10	1-3
MCP-1	2.0 \pm 1.3	1.0	100-500	100-500
MIP-1alpha	1.50	1.1 \pm 0.3	> 500	10-100
MIP-1beta	1.1 \pm 0.3	1.1 \pm 0.1	10-100	10-100
PDGF-BB	1.2 \pm 0.1	0.95 \pm 0.07	1-3	1-3
RANTES	0.9 \pm 0.01	0.85 \pm 0.15	10-100	1-3
TNF-alpha	ND	1.2 \pm 0.5	> 500	10-100
VEGF	0.7 \pm 0.4	1.9 \pm 0.8	1-3	1-3

ND：検出限界以下

E. 結論

上記の結果から下記のことが明らかとなった。

- (1) 溶解性の高い誘導体が得られ、高感度のAHの分析法が確立されたことにより、今後の動物実験の実施に有利な条件が整った。
- (2) 植物を用いるAH生産の可能性が示され、大量生産への道が開かれた。
- (3) AH耐性株の解析結果から、これまでに推定されたAHの作用機構が正しかったことが証明された。
- (4) 既に確認されたウサギ臍刺激試験による安全性に加えて、cytokine/chemokineの誘導性が低いことが確認された。

以上の成果を踏まえ、今後のサルを用いる感染予防試験と注射可能な誘導体によるHIV/AIDS治療薬の開発が期待される。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 原著論文

欧文

1. Hoorelbeke B, Huskens D, Férir G, François KO,

Takahashi A, Van Laethem K, Schols D, Tanaka H, Balzarini J: Actinohivin, a broadly neutralizing prokaryotic lectin, inhibits HIV-1 infection by specifically targeting high-mannose-type glycans on the gp120 envelope. *Antimicrob Agents Chemother.* **54**, 3287-3301, 2010

2. Matoba N, Husk AS, Barnett BW, Pickel MM, Arntzen CJ, Montefiori DC, Takahashi A, Tanno K, Omura S, Cao H, Mooney JP, Hanson CV, Tanaka H: HIV-1 neutralization profile and plant-based recombinant expression of actinohivin, an Env glycan-specific lectin devoid of T-cell mitogenic activity. *PLoS One.* **5**, e11143, 2010
3. Takahashi A, Inokoshi J, Tsunoda M, Suzuki K, Takenaka A, Sekiguchi T, Omura S, Tanaka H: Actinohivin: specific amino acid residues essential for anti-HIV activity. *J. Antibiot.* **63**, 661-665, 2010

和文

なし。

2. 口頭発表

海外

Tanaka H, Inokoshi J, Oka S, Murakami A, Azuma T, Tanno K, Omura S, Takahashi A: Actinohivin: derivatives with improved anti-HIV activity and better safety. Antiviral Congress, Amsterdam, Nov. 8, 2010

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

日本特許：No. 3962772（2007年6月）

U.S. Patent：6,482,412B（2002年11月）

Australian patent：750,914（2002年11月）

European Patent：No. 10760658（2008年7月）

発明の名称：抗ヒト免疫不全ウイルス活性を有するポリペプチド、ポリペプチドをコード化する遺伝子、ポリペプチドの製造方法

発明者：田中 晴雄、大村 智

出願人：(有)キイム・ファーマ・ラボ

分担研究課題



新規抗HIV薬剤の合成展開および安全性の評価

研究分担者

野村 伸彦 富山化学工業株式会社総合研究所第三研究部 部長

新しい抗HIV-1剤の創製を目的として、昨年度に引き続きヒット化合物からの誘導体合成・評価を行った。今年度新たに合成した36化合物のうち、9化合物に $IC_{50} < 1nM$ の抗HIV活性が認められた。これらの化合物の中で良好なマウス経口吸収性を示した3化合物につき更なる検討を行ったところ、ラット及びイヌに対し38～約100%の経口吸収率を示し、マウス以外の動物種に対しても良好な経口吸収性を示した。また、ラットを用いてマスバランスについて検討したところ、良好な回収率を示した。ラット及びイヌ血清に対する蛋白結合率は82～92%であった。微生物を用いた復帰突然変異試験及びマウス小核試験並びにhERG電流に及ぼす影響について検討したところ、いずれも陰性であった。今後、更に抗HIV剤としての特性を見極めていく予定である。

A. 研究目的

HIV/AIDS症は、HAART療法の確立と近年の新薬の開発により治療可能な慢性疾患と位置付けられつつある。しかし、薬剤の組み合わせやアドヒランスが悪い場合は容易に耐性ウイルスが出現することに加え、特定の薬剤に耐性となったウイルスは、同系統の薬剤に対しても交差耐性を示すことが多いため、新規な作用機序を有する新薬の開発が望まれている。

我々は、これまでに新規な作用機序と強い抗HIV活性を有し、マウスにおいて経口吸収性を示す化合物を見出している。現在、臨床可能な薬剤の開発を目標として様々な検討を行っている。

B. 研究方法

i) 新規化合物の合成

前年度に見出されたヒット化合物からの誘導体を、有機化学的手法を用いて合成した。

ii) 新規合成化合物の評価

① *In vitro*抗HIV活性の評価

名古屋医療センターにて実施した。

② 経口吸収性の検討

0.5%メチルセルロースに懸濁させた被験物質を6週齢のICR系雄性マウスに25mg/kg単回経口投与し、1、4及び12時間後に採血した。ラットについては

雄7週齢のCrI：CD（SD）を使用し、クレモホールにて溶解した被験物質を経口並びに静脈内投与した。イヌについては、ビーグル犬を用い、ラットと同様に検討した。調製した血清と等量のアセトニトリルとの混合により除蛋白し、その遠心上清中の薬物濃度をHPLC（島津製作所、Prominenceシリーズ、カラム：XTerra RP18 3.5 μ m、4.6 \times 100mm）にて測定した。経口吸収率（BA：%）は、経口投与時のAUC/静脈内投与時のAUCによって算出した。

③ 血清タンパク結合率の検討

ラット及びイヌのPOOL血清と、3 μ g/mLに調製した被験物質を60分以上反応させ、限外濾過法（10000MWCO）にて行った。

④ マスバランスに関する検討

ラットについては雄7週齢のCrI：CD（SD）を、イヌについてはビーグル犬を用いて検討した。各々、被験物質を10mg/kg投与し胆汁及び尿中に存在する被験物質原体及び代謝物量を測定した。尿中及び胆汁中に存在する原体及び代謝物量を投与した被験物質質量の比としてマスバランスを算出した。

⑤ 微生物を用いた復帰突然変異試験（Ames試験）

試験菌株として、*Salmonella typhimurium* TA98を用いた。所定の用量となるように調製した各被験物

質溶液0.1mLを滅菌した小試験管に取り、直接法では0.1mol/Lリン酸緩衝液 (pH 7.4)、代謝活性化法ではS9 mix 0.5mLを加え、さらに前培養した菌液0.1mLを加えて37℃で20分間振盪培養した。次いで、45℃に保温した上層軟寒天培地 (塩化ナトリウム5g/L、Bacto-agar (Difco) 6g/L、0.05mM L-ヒスチジン-0.05mM D-ビオチン) 2mLを加えて混和した後、テスメディアAN培地 (オリエンタル酵母工業) 上に重層した。これを37℃で42時間培養後、実体顕微鏡を用いて試験菌株に対する生育阻害及び肉眼で被験物質の沈殿の有無を調べ、復帰変異コロニー数をコロニーカウンターで測定した。

試験結果の判定に関しては、被験物質の用量にかかわらず復帰変異コロニー数が陰性対照値の2倍未満であった場合に陰性と判定した。

⑥ マウス小核試験

用量設定試験として、0.5%メチルセルロースに懸濁した被験物質を、8週齢のICR系雄性マウスに1日1回2日間経口投与し、生存可能な最大投与量を求めた。次に、この投与量を、1群3匹のマウスに1日1回2日間経口投与し、最終投与24時間後に、頸椎脱臼にて安楽死させたマウスより大腿骨を摘出し

た。摘出した大腿骨より骨髓細胞を牛胎児血清で遠沈管に洗い出し、遠心 (190×g、5min.) 後、骨髓細胞をスライドグラスに塗抹しメタノール固定後、アクリジン・オレンジ染色を行った。

小核の観察は1個体あたり1000個の多染性赤血球について行い、小核を有する多染性赤血球 (micronucleated polychromatic erythrocytes ; MNPCE) の出現率を求めた。被験物質を投与した各マウスの小核を有する多染性赤血球の出現頻度がいずれも0.5%以下の場合を陰性とした。

⑦ hERG電流に及ぼす影響

hERG遺伝子 (human ether-a-go-go related gene) を安定発現させたHEK293細胞を用い、ホールセルパッチクランプ法 (保持電位-80mV、脱分極パルス+20mVで1.5秒間、再分極パルス-50mVで1.5秒間) により化合物添加時のhERG電流を測定した。試験濃度は、*in vitro*抗HIV活性を踏まえて1000nMで実施した。

iii) 倫理面への配慮

試験は、富山化学工業株式会社が定めた「実験動物使用管理規定」に従って実施した。

表1 スクリーニングサンプルの*in vitro*抗HIV活性内訳

IC ₅₀ (nM)	>1000	100 - 1000	10 - 100	1 - 10	1>
化合物数	4	10	8	5	9

表2 抗HIV活性を示す化合物の特性

	化合物 G	化合物 H	化合物 J
抗 HIV 活性 (IC ₅₀ : ng/mL)	0.65	0.96	0.33
経口投与時のマウス血中濃度 (25 mg/kg) (1/4/12 hr : ng/mL)	5600/ 2900 / 800	5800 / 3700 / 800	6200 / 5100 / 1000
経口吸収率 (%) ラット/ イヌ	50/ 60	47 / 38	115 / 112
蛋白結合率(%) ラット/ イヌ	91/ 82	90 / 87	92 / 85
マスバランス (%) ラット (原体+代謝物)	92		113
遺伝毒性 : Ames 試験* / マウス小核試験	陰性 / 陰性	陰性 / 陰性	陰性 / 陰性
hERG 電流阻害 (1000 nM)	陰性	陰性	陰性

**Salmonella typhimurium* TA98

C. 研究結果

今年度新たに合成した36化合物のうち、9化合物に $IC_{50} < 1nM$ の抗HIV活性が認められた。(表1) これらの化合物の中で良好なマウス経口吸収性を示した3化合物につき更なる検討を行ったところ、ラット及びイヌに対し38～約100%の経口吸収率を示し、マウス以外の動物種に対しても良好な経口吸収性を示した。また、ラットを用いてマスバランスについて検討したところ、良好な回収率を示した。ラット及びイヌ血清に対する蛋白結合率は82～92%であった。微生物を用いた復帰突然変異試験及びマウス小核試験並びにhERG電流に及ぼす影響について検討したところ、いずれも陰性であった(表2)。今後、更に抗HIV剤としての特性を見極めていく予定である。

D. 結論

既存薬の耐性変異ウイルス株に感受性を示す新規な作用機序を有する化合物の合成展開並びに評価を継続してきた結果、強い抗HIV活性に加え、体内動態及び安全性面が改善した化合物を見出した。今後は、投与期間の延長並びに別種の動物を用いた反復投与毒性試験等を行いながら、候補化合物の評価並びに絞込みを行っていく予定である。

E. 健康危険情報

特記事項なし

F. 研究発表

特に無し

G. 知的財産権の出願・登録予定

特に無し

分担研究課題



サルモデルを用いた新薬の評価系の構築

研究分担者

足立 昭夫 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 教授

研究協力者

野間口 雅子 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 准教授

新しいエイズ霊長類モデルの構築を目指し、マカク細胞での複製・増殖に適化したHIV-1クローンの作製を試みた。computer-assisted structure-guided mutagenesis等により、カニクイザル細胞HSC-FにおいてSIVmac239と同様な増殖能を示すクローンを得た。これらのウイルスクローン (MN4Rh-4 [X4ウイルス] およびMN5Rh-4 [R5ウイルス]) はプロトタイプクローン (NL-DT5RおよびNL-DT562) と比べ僅か10アミノ酸程度の違いしかないが、カニクイザルおよびアカゲザルTRIM5 α に抵抗性を示し、また、TRIM5 α の抑制回避とは別の機構でも増殖能が向上している。さらに、抗マカクtetherin活性を持つVpuの構築に成功し、このVpuを持つウイルスクローン (MN4Rh-4gT [X4ウイルス] とMN5Rh-4gT [R5ウイルス]) も得た。

本年度に構築した四種のウイルスクローンは、以前報告したMN4Rh-3、MN4SやNL-DT5Rよりマカク細胞での増殖能が著しく向上しているため、HIV-1を用いた新しい霊長類感染モデルの確立に向け大きく前進したと考えられる。

A. 研究目的

我々が世界に先駆けて構築したマカク指向性HIV-1 (NL-DT5R) はSIVmac239の*vif*遺伝子全部と*gag*遺伝子のごく一部 (CA helix 4/5 loopに対応) とを持つ。NL-DT5Rは種々のマカク細胞 (カニクイザル由来HSC-F細胞、アカゲザル由来HSR5.4細胞、ブタオザル、アカゲザルおよびカニクイザル由来PBMC) だけでなく、ブタオザルやカニクイザル個体にも感染・増殖できる (PNAS 103: 16959-16964, 2006; J Virol 81: 11549-11552, 2007; Rev Med Virol 18: 261-275, 2008; Microbes Infect 13: 58-64, 2011)。しかし、NL-DT5Rは病原性標準株であるSIVmac239より増殖効率が顕著に劣り (PNAS 103:16959-16964, 2006)、また、ブタオザルやカニクイザル感染個体でのウイルス血症も一過性であった (J Virol 81:11549-11552, 2007; Microbes Infect 13: 58-64, 2011)。NL-DT5RのGag-CA helix 6/7 loopをSIVmac239型に置換し (Retrovirology 6: 70, 2009)、さらに、HSC-F細胞での適応変異 (Pol-INとEnv-SU内変異) を導入したMN4SクローンはカニクイザルPBMCでの増殖効率が向上し、カニクイザル個体に持続感染を成立させた (Microbes Infect 13: 58-64, 2011)。MN4Rh-3はMN4SのGag-CAに1アミノ

酸置換を導入したもので、カニクイザル細胞と個体においてMN4Sより優れた増殖能を持つ (投稿準備中)。

本年度は、MN4Rh-3を出発材料としてGag-CAの改変を行い、マカク細胞におけるウイルス増殖能の更なる改善を試みた。また、抗マカクtetherin活性を持つHIV-1の構築も試みた。これらにより、エイズ発症霊長類モデル (カニクイザルやアカゲザル) の樹立に向けたインプットウイルスの作製に取り組んだ。

(倫理面への配慮)

本研究では、動物実験あるいはヒト材料を用いた実験は行っていない。

B. 研究方法

1. ウイルスゲノムの試験管内改変は遺伝子工学的手法を用い、全て既報にある定法に従って行なった。
2. トランスフェクションにはヒト293T細胞を用いた。TRIM5 α の抗ウイルス作用の測定には、種々のTRIM5 α 遺伝子が導入されたネコCRFK細胞を用い、ルシフェラーゼ活性で評価した

(Microbes Infect 11: 164-171, 2009; 論文未発表)。同様の手法によりカニクイザルMK.P3 (F) 細胞の抗ウイルス活性も測定した。感染実験には主としてカニクイザルHSC-F細胞とアカゲザルM1.3S細胞を用いた。293T、MK.P3 (F) およびCRFK細胞は10% FCS加MEM培地で、HSC-FとM1.3S細胞は10% FCS加RPMI1640培地で維持し、マカク細胞でのウイルス感染実験はIL-2存在下で行なった。トランスフェクションにはリン酸カルシウム法を用いた。ウイルス量は培養上清中の逆転写酵素 (RT) 活性により測定した。

3. ウイルスゲノムのシーケンスはアプライドバイオシステムのサイクルシーケンスキットを用いて決定した。
4. Computer-assisted structure-guided mutagenesisは国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センターの佐藤裕徳博士および横山勝博士との共同研究として行なわれた。

C. 研究結果

1. 各種TRIM5 α を発現するネコCRFK細胞を用いて解析したところ、MN4Rh-3はカニクイザルTRIM5 α およびTRIMCypにMN4Sと同様の抵抗性を示すが、アカゲザルTRIM5 α の抑制は回避していなかった。一方、MK.P3 (F) 細胞においては、MN4Rh-3はMN4Sより格段に高い感染性を示した。これらの成績等から、MN4Rh-3はTRIM5 α 以外の抗ウイルス因子の抑制を回避していると考えられた。
2. アカゲザルTRIM5 α に抵抗性であるGag-CAを構築するため、computer-assisted structure-guided mutagenesisを行なった。これにより、アカゲザルTRIM5 α の抑制回避に有効なアミノ酸を同定することに成功した。これらの変異導入によりカニクイザルTRIM5 α に対する抵抗性も向上した。このGag-CAを持つウイルスクローン (MN4Rh-4およびMN5Rh-4) はカニクイザルHSC-F細胞においてSIVmac239と同様に効率良く増殖した。また、M1.3S細胞での増殖効率も劇的に改善された。
3. HIV-1のprogenitorであるSIVの中には抗マカクtetherin活性を示すVpuを持つものがある。この情報に基づき、抗マカクtetherin活性を示すMN4Rh-4およびMN5Rh-4の構築に成功し、それぞれMN4Rh-4gT およびMN5Rh-4gTと命名した。

D. 考察

HIV-1の基礎・臨床研究の更なる進展のためには、SIVやSHIVではなくHIV-1そのものを用いた霊長類感染・発症モデルが必要である。このシステムが確立できれば、長い間不可能であった(1) HIV-1の病原性発現機構の解析、(2) HIV-1アクセサリ蛋白質の個体内機能の解析、(3) HIV-1の宿主における変異・進化の系統的解析、(4) HIV-1感染症の制御に繋がる新薬/ワクチンの評価・開発研究が実現可能となる。本年度に得られたHIV-1の分子クローン四種 (MN4Rh-4、MN4Rh-4gT、MN5h-4およびMN5h-4gT) は、これらの目標の実現に向け極めて重要な成果である。

E. 結論

カニクイザル細胞でSIVmac239と同様に効率良く増殖するHIV-1クローンが構築され、本研究の最終目標達成に向け大きく前進した。これらのクローンを用いて大規模なカニクイザル感染実験を実施すれば、不明の点の多かったHIV-1の個体内挙動が明らかにされ、さらに、実践的臨床研究への道も開かれると期待される。本研究で構築したHIV-1クローンはアカゲザルへの感染実験にも有用であると考えられ、種によるウイルス感受性や反応性の相違の分子基盤も研究対象となりつつある。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表

1. 原著論文 欧文

1. Jere A, Fujita M, Adachi A, Nomaguchi M: Role of HIV-1 Nef protein for virus replication *in vitro*. Microbes and Infection 12, 65-70, 2010
2. Yamashita T, Nomaguchi M, Miyake A, Uchiyama T, Adachi A: Status of APOBEC3G/F in cells and progeny virions modulated by Vif determines HIV-1 infectivity. Microbes and Infection 12, 166-171, 2010
3. Nagao T, Yamashita T, Miyake A, Uchiyama T, Nomaguchi M, Adachi A: Different interaction between HIV-1 Vif and its cellular target proteins APOBEC3G/APOBEC3F. Journal of Medical Investigation 57, 89-94, 2010
4. Fujita M, Otsuka M, Nomaguchi M, Adachi A: Multifaceted activity of HIV Vpr/Vpx proteins: the current view of their virological functions. Reviews

- in Medical Virology 20, 68-76, 2010
5. Nomaguchi M, Adachi A: Virology as biosystematics: towards understanding the viral infection biology. *Frontiers in Microbiology* 1. 2. doi: 10.3389/fmicb.2010.00002, 2010
 6. Doi N, Fujiwara S, Adachi A, Nomaguchi M: Growth ability in various macaque cell lines of HIV-1 with simian cell-tropism. *Journal of Medical Investigation* 57, 284-292, 2010
 7. Nomaguchi M, Doi N, Fujiwara S, Fujita M, Adachi A: Site-directed mutagenesis of HIV-1 *vpu* gene demonstrates two clusters of replication-defective mutants with distinct ability to down-modulate cell surface CD4 and tetherin. *Frontiers in Microbiology* 1, 116. doi: 10.3389/fmicb.2010.00116, 2010
 8. Saito A, Nomaguchi M, Iijima S, Kuroishi A, Yoshida T, Lee Y-J, Hayakawa T, Kono K, Nakayama E E, 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
 9. Nomaguchi M, Adachi A: HIV-1 Vpr and G2 cell cycle arrest. *Future Microbiology*, 2011, in press
 10. Nomaguchi M, Adachi A: Macaque-tropic HIV-1 derivatives: a novel experimental approach to understand viral replication and evolution *in vivo*. *HIV-1 Infection/Book 1*, 2011, in press.

和文

なし。

2. 口頭発表

海外

1. Miyake, A., Doi, N., Fujiwara, S., Adachi, A., and Nomaguchi, M. Analysis of growth adaptive mutations in HIV-1 genome identifies a *pol*-integrase region that enhances virion production in a cell-independent and codon triplet-dependent manner. The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Sept. 9, 2010, Awaji, Japan.

国内

1. 三宅在子、土肥直哉、藤原佐知、足立昭夫、野間口雅子 HIV-1 インテグラーゼ(IN)C末端領域(CTD)における1塩基置換によるウイルス増殖促進機構の解析 第58回日本ウイルス学会(徳島)平成22年11月7-9日
2. 土肥直哉、齊藤 暁、明里宏文、藤原佐知、三宅在子、横山 勝、大出裕高、佐藤裕徳、足立

- 昭夫、野間口雅子 サル指向性HIV-1 CAの1アミノ酸変異はサル細胞での増殖を促進する 第58回日本ウイルス学会(徳島)平成22年11月7-9日
3. 野間口雅子、土肥直哉、藤原佐知、三宅在子、横山 勝、大出裕高、佐藤裕徳、足立昭夫 アカゲザルに存在する抗HIV-1因子TRIM5 α とtetherinを回避するサル細胞指向性HIV-1の構築 第58回日本ウイルス学会(徳島)平成22年11月7-9日
4. 三宅在子、土肥直哉、藤原佐知、足立昭夫、野間口雅子 HIV-1増殖過程におけるインテグラーゼ(IN)C末端領域(CTD)の影響(ワークショップ)第24回日本エイズ学会(東京)平成22年11月24-26日
5. 齊藤 暁、河野 健、黒石 歩、中山英美、塩田達雄、足立昭夫、野間口雅子、安富康宏、俣野哲朗、明里宏文 カニクイザルTRIM5 alleleがサル指向性HIV-1の増殖に与えるインパクト 第24回日本エイズ学会(東京)平成22年11月24-26日
6. 野間口雅子、齊藤 暁、明里宏文、土肥直哉、藤原佐知、三宅在子、横山 勝、大出裕高、佐藤裕徳、足立昭夫 サル細胞で効率よく増殖するHIV-1の構築—アカゲザルTRIM5 α とtetherinによる抑制の回避— 第24回日本エイズ学会(東京)平成22年11月24-26日
7. 足立昭夫、野間口雅子 HIV-1宿主域を規定する細胞因子とウイルス蛋白質(シンポジウム4)第24回日本エイズ学会(東京)平成22年11月24-26日

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

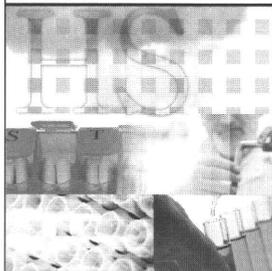
1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

分担研究課題



宿主因子を標的にした新薬開発研究

研究分担者

岩谷 靖雅 名古屋医療センター臨床研究センター感染・免疫研究部 室長

APOBEC3ファミリーはレトロウイルスに対する宿主防御因子で、ヒトでは22番染色体上に連続して7つコード (A、B、C、DE、F、G、H) されている。APOBEC3はHIV感染における感染初期や病態進行に防御的あるいは抑制的に働き、APOBEC3の発現誘導の個体差が病態進行の個人差に影響を及ぼしていると考えられている。本来宿主防御因子として働いているAPOBEC3の発現誘導により、HIVの感染防御や病態進行阻止に利用する新規薬剤を開発することを最終目標として本研究課題を行う。しかし、現在のところ、APOBEC3の発現パターンや発現制御に関して明らかになっていないため、まず発現誘導に関わるサイトカインやマイトジェンの探索を行い、発現制御に関わる機序を解明することから着手した。その結果、APOBEC3はCD14陽性である単球/マクロファージ細胞において恒常的に発現していた。さらに、APOBEC3の発現誘導には、Toll-like Receptorリガンド (TLR) 3と4とインターフェロンが強力な発現誘導物質であり、JAK-STATのシグナル伝達系 (特に、STAT1) が重要な働きをしていることが明らかになった。今後、これらの研究結果を活用して、HIV伝播の抑制や病態進行阻止に向けた研究を行いたいと考えている

A. 研究目的

HIVをはじめとしたレトロウイルスに対する宿主防御因子APOBEC3ファミリーはシチジン脱アミノ酵素である。ヒトでは22番染色体上に連続して7つコード (A、B、C、DE、F、G、H) されている (図1)。APOBEC3は、HIV感染における感染初期や病態進行に防御的あるいは抑制的に働き、特にAPOBEC3FとAPOBEC3GはHIVに対して強力な抑

制効果を示すことが知られている。そのため、APOBEC3の発現誘導の個体差が病態進行の個人差に影響を及ぼしていると考えられている。しかし、APOBEC3の発現パターンや発現制御に関して明らかになっていないため、APOBEC3の発現誘導の個体差がどのような機序で生じているのか不明である。そこで、我々はAPOBEC3ファミリーの細胞腫特異的な発現のパターンと発現制御機構を明らかに

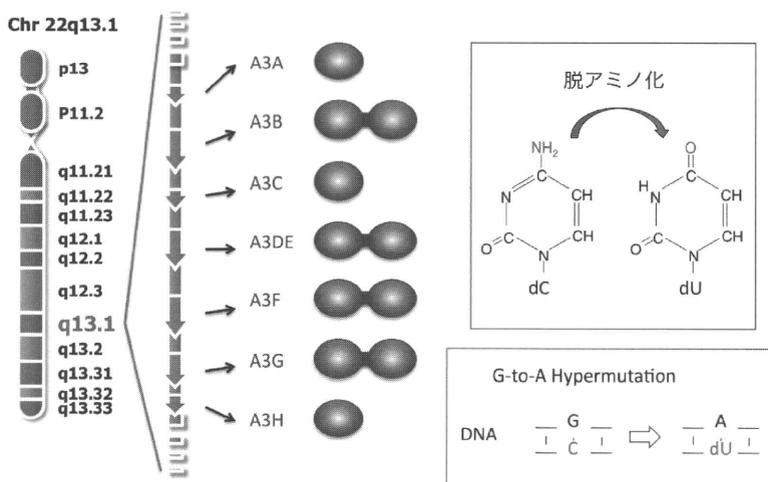


図1 ヒトAPOBEC3ファミリーとCytidine Deaminase (CDA)

し、APOBEC3発現の制御をコントロールできる生体由来分子（サイトカインなど）やミトジェン、化学物質を見出すことを目的とし、最終的にAPOBEC3発現制御薬剤の開発につなげるために研究を行う。

B. 研究方法

APOBEC3ファミリーmRNAの定量方法の確立

リアルタイムPCR法を用いてAPOBEC3ファミリーのmRNA定量系を確立した。PCRに用いたプライマーはそれぞれのAPOBEC3特異的な配列を選び、ゲノムDNA由来の増幅を防ぐ目的でエキソンジャンクションを挟むように設計した。検量線作成に用いるStandardとして、*in vitro*転写で各APOBEC3のORF領域RNAを合成し、吸光度を利用してコピー数を概算して用いた。

APOBEC3発現誘導に関与する生理活性物質の探索とその発現制御機序の解明

血球由来培養細胞株、間質細胞由来培養細胞株およびCD14陽性単球由来マクロファージ（MDM）を用いてAPOBEC3ファミリーのmRNAとタンパク発現量を定量リアルタイムPCR法とウェスタンブロット法でそれぞれ解析した。また、これら細胞にサイトカイン、ミトジェン、TLRリガンドで刺激を与えAPOBEC3ファミリー発現量の変化を解析した。組織特異的発現を確認するために、正常組織由来total RNAパネル（Ambion社）を用いてmRNA定量解析を行った。

C. 研究結果

Real-Time PCR法を用いてAPOBEC3ファミリーのmRNA発現定量系を確立し、様々な細胞を使ったAPOBEC3ファミリーの発現パターンを解析した。まず、組織特異的な発現パターンを正常組織由来

total RNAパネル（Ambion社）を用いてmRNA定量解析を行った。その結果、胸腺および脾臓においてAPOBEC3ファミリーの発現がよく見られた。その他、APOBEC3Aは気道や肺に顕著に発現がみられ、ほかのAPOBEC3ファミリーは生殖組織に発現が認められた（図2）。

次に、培養細胞におけるAPOBEC3ファミリーの発現パターンを測定した。*vif*遺伝子欠損HIV-1の複製を抑制する「非許容細胞」では、抗HIV-1活性が高いAPOBEC3F/Gの発現の他にAPOBEC3B/C/3DE/3HのmRNA発現も「許容細胞」に比べ高いことが確認できた。血球由来培養細胞を用いた実験において、サイトカイン類による発現誘導は見られなかった。肝がん由来細胞株HepG2細胞をIFN- α で処理をすると、APOBEC3F/G mRNAの一過的な発現増加がみられた。一方、血液由来のMDM（CD14陽性細胞分画）を用いて、様々なサイトカインやミトジェンによる刺激し、APOBEC3の発現誘導をReal-time PCRによるAPOBEC3 mRNAを定量することにより、APOBEC3の発現誘導する物質を探索した。Toll-like Receptor（TLR）リガンドとインターフェロンによるAPOBEC3 mRNAの発現誘導が有意に高かった。TLRアゴニスト（9種）をMDMに作用させた実験では、TLR3リガンドで刺激をしたときにAPOBEC3A/DE/F/G/H mRNA発現量の著しい増加がみられた（図3）。

TLR3、4のアゴニスト（それぞれpoly（I：C）、LPS）作用後、経時的に発現パターンを調べたところ、Poly（I：C）刺激によってAPOBEC3A mRNAは24時間後には3000倍以上コピー数が増加していた。TLR3アゴニスト刺激により活性化されるシグナル伝達経路の転写因子（STATとIRF）の発現をリアルタイムPCR法で検出した。この時発現が誘導された転写因子について、リンパ球由来培養細胞株

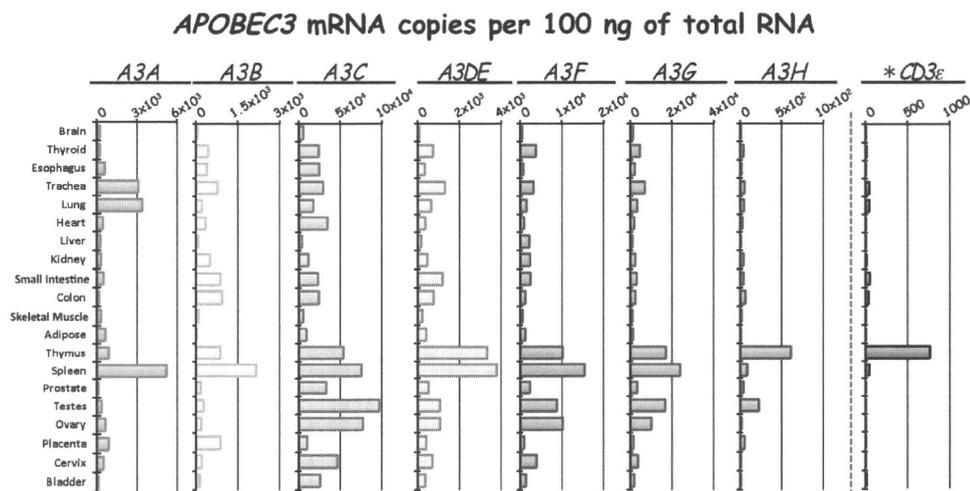


図2 APOBEC3Aは気管支・肺、その他は胸腺・脾臓に高発現している

を用いて解析した結果、「非許容細胞」特異的に転写因子のmRNAおよび活性型タンパクの高発現が確認された。TLR3、4はI型IFNの産生を誘導し免疫応答をすることが知られているため、IFNのシグナル伝達を阻害するJAK inhibitorでMDMを処理した後にpoly (I : C) で刺激を加えるとAPOBEC3ファミリーのmRNA発現増加は起こらなかった。これらの結果から、TLRリガンドによるAPOBEC3 mRNAの発現誘導には、1) JAK-STAT系を介してシグナル伝達系が重要であること、さらに、2) インターフェロン (IFN) を最終的に介していることが考えられた。そこで、IFN- α 、 β 、 γ でMDMを処理すると、いずれもAPOBEC3 mRNAの発現増加が見られたが、それぞれの誘導パターンは異なっていた(図4)。TNF- α でMDMを処理してもAPOBEC3 mRNAの発現は誘導されなかった。

D. 考察

PBMCをPHA/IL-2処理するとAPOBEC3ファミリーのmRNA発現量は増加した。CD4陽性T細胞においては、PHA/IL-2処理によりAPOBEC3AのmRNA発現量の減少がみられた。CD14陽性細胞画分をM-CSFで処理しても、処理前後においてAPOBEC3ファミリーのmRNA発現量に差は見られなかった。しかし、CD14陽性単球由来マクロファージをI型IFNまたはI型IFNの発現を誘導するTLR3、4リガンドで刺激するとAPOBEC3ファミリーのmRNA発現が誘導され、特にAPOBEC3AのmRNA発現量は刺激24時間後までに2500倍以上増加がみられた。細胞外からの刺激に対して細胞毎にAPOBEC3ファミリーの発現量変化が異なることより、それぞれの細胞内におけるAPOBEC3ファミリーの役割が決定していることが示唆された。

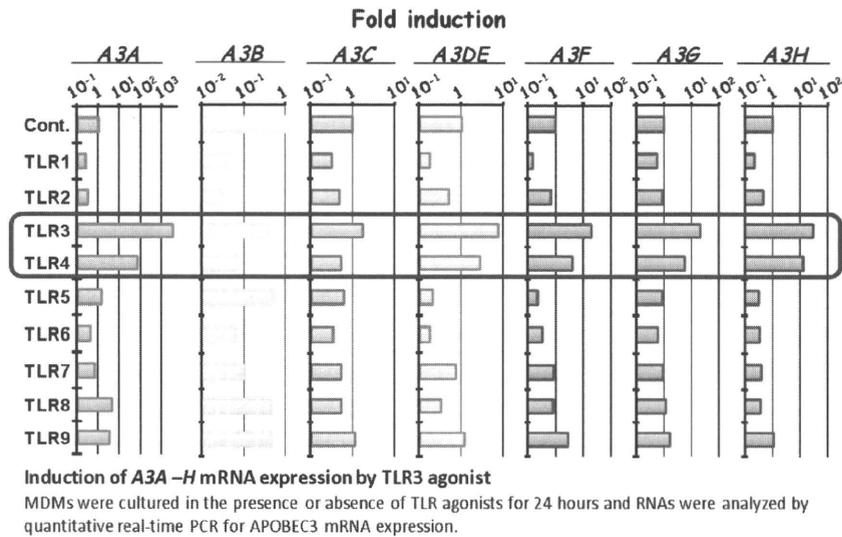


図3 単球由来マクロファージにおいて、TLR3/4刺激によりAPOBEC3の発現が誘導される

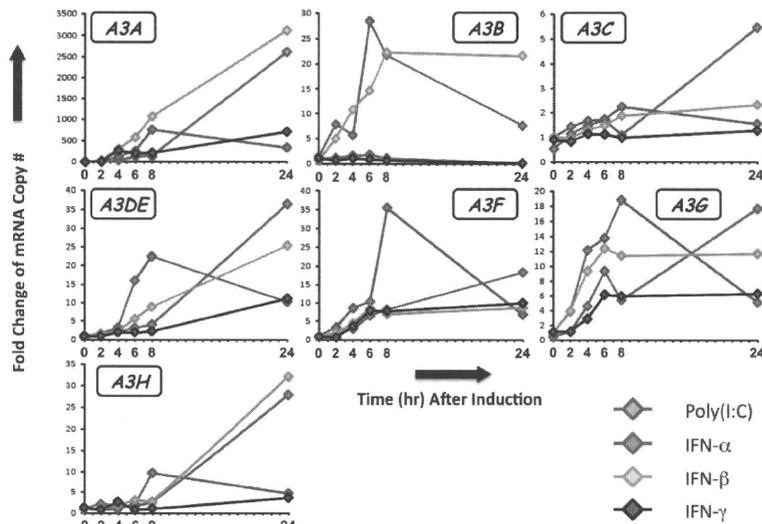


図4 TLR3リガンドとI型IFNによってAPOBEC3 mRNA発現が誘導される

E. 結論

APOBEC3の組織発現パターンは、Tリンパ球やCD14陽性細胞であるMDMが多く存在する組織に高発現していた。また、発現誘導実験の結果として、TLRリガンド3およびインターフェロンが強力な発現を誘導する因子であることが明らかになった。さらに、発現誘導には、JAK-STAT系を介したシグナル伝達系が関与していることが分かった(図5)。今後、インターフェロンの型特異的な発現誘導なども解析し、治療や病態進行阻止に向けた応用を視野に入れ、APOBEC3ファミリーの発現誘導機構をさらに明らかにしたい。

F. 研究発表

1. 原著論文

欧文

- Shibata J, Sugiura W, Ode H, Iwatani Y, Sato H, Tsang H, Matsuda M, Hasegawa N, Ren F, Tanaka H. Within-host co-evolution of Gag P453L and protease D30N/N88D demonstrates virological advantage in a highly protease inhibitor-exposed HIV-1 case. *Antiviral Res.* (2011) *in press*.
- Fujisaki S, Yokomaku Y, Shiino T, Koibuchi T, Hattori J, Ibe S, Iwatani Y, Iwamoto A, Shirasaka T, Hamaguchi M, Sugiura W.: Outbreak of Infections by Hepatitis B Virus Genotype A and Transmission of Genetic Drug Resistance in Patients Coinfected with HIV-1 in Japan. *J Clin Microbiol.* (2011) 49:1017-1024
- 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) 54:241-247

和文

- 松下修三、横山勝、宮内浩典、松田善衛、俣野哲朗、岩谷靖雅. HIV細胞進入とその防御機序. *日本エイズ学会誌* 12 : 67-73, 2010

2. 口頭発表

国際

- Iwatani Y, Chan DSB, Liu L, Yoshii H, Shibata J, Levin JG, Gronenborn AM, Sugiura W Structure-guided mutagenesis of APOBEC3G reveals four lysine residues critical for HIV-1 Vif-mediated ubiquitination/degradation near the C-terminal end. 5TH GERMAN-JAPANESE HIV-SYMPOSIUM (Tokyo, JAPAN) 平成22年5月10-11日

国内

- 岩谷靖雅. 宿主防御因子APOBEC3ファミリーと抗レトロウイルス機序 第58回日本ウイルス学会(徳島)平成22年11月7-9日
- 岩谷靖雅、北村紳悟、吉居廣朗、前島雅美、横幕能行、杉浦互. HIV-1 Vif感受性及びウイルス粒子への取り込みに関するAPOBEC3Cの機能ドメインの探索 第24回日本エイズ学会(東京)平成22年11月24-26日
- 伊部史朗、横幕能行、服部純子、岩谷靖雅、加藤真吾、杉浦互. 抗レトロウイルス療法のモニタリングのためのplasma HIV-2 viral load測定系の確立 第24回日本エイズ学会(東京)平成22年11月24-26日

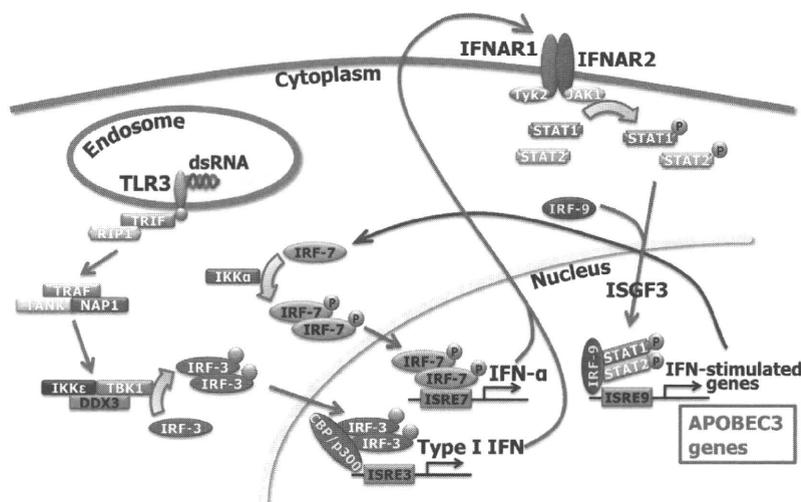


図5 TLR3リガンド刺激と1型IFN産生によるAPOBEC3の発現誘導

研究成果の刊行物に関する一覧

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ohtani H, Nakajima T, Akari H, Ishida T, Kimura A	Molecular evolution of immunoglobulin superfamily genes in primates.	Immunogenetics		(in press)	2011
Ibe S, Sugiura W.	Clinical significance of HIV reverse transcriptase inhibitor-resistant mutations	Future Microbiology	6(3)	295-315	2011
Shibata J, Sugiura W, Ode H, Iwatani Y, Sato H, Tsang H, Matsuda M, Hasegawa N, Ren F, Tanaka H.	Within-host co-evolution of Gag P453L and protease D30N/N88D demonstrates virological advantage in a highly protease inhibitor-exposed HIV-1 case	Antiviral Res	90(1)	33-41	2011
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
Fujisaki S, Yokomaku Y, Shiino T, Koibuchi T, Hattori J, Ibe S, Iwatani Y, Iwamoto A, Shirasaka T, Hamaguchi M, Sugiura W	Outbreak of Infections by Hepatitis B Virus Genotype A and Transmission of Genetic Drug Resistance in Patients Coinfected with HIV-1 in Japan	J Clin Microbiol	49	1017-1024	2011

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	88(1)	72-79	2010
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	33(8)	1426-1429	2010
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	84(19)	9995-10003	2010
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	53(14)	5356-5360	2010

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	54(3)	241-247	2010
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	87(1)	22-29	2010
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	114(1)	521-530	2010
服部純子、杉浦互	薬剤耐性検査の現状と課題	化学療法の領域	27(3)	78-84	2011
伊部史朗、杉浦互	薬剤耐性 HIV の現状と対策	日本臨牀	68(3)	476-79	2010
吉居廣朗、杉浦互	ラルテグラビルの耐性	医薬ジャーナル	46(8)	2054-2058	2010
杉浦互	5th International Workshop on HIV Transmission/ 18th International AIDS Conference	HIV 感染症と AIDS の治療	1(2)	71-73	2010
杉浦互	HIV 感染—最新の疫学・臨床・治療	内科	106(5)	781-787	2010
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	31(8)	232-233	2010
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	31(8)	233-234	2010
Jere A, Fujita M, Adachi A, Nomaguchi M	Role of HIV-1 Nef protein for virus replication <i>in vitro</i> .	Microbes Infect.	12	65-70	2010
Yamashita T, Nomaguchi M, Miyake A, Uchiyama T, Adachi A	Status of APOBEC3G/F in cells and progeny virions modulated by Vif determines HIV-1 infectivity.	Microbes Infect.	12	166-171	2010

Nagao T, Yamashita T, Miyake A, Uchiyama T, Nomaguchi M, Adachi A	Different interaction between HIV-1 Vif and its cellular target proteins APOBEC3G/APOBEC3F.	J. Med. Invest.	57	89-94	2010
Fujita M, Otsuka M, Nomaguchi M, Adachi A	Multifaceted activity of HIV Vpr/Vpx proteins: the current view of their virological functions.	Rev. Med. Virol.	20	68-76	2010
Nomaguchi M, Adachi A	Virology as biosystematics: towards understanding the viral infection biology.	Front. Microbio.	1	2. doi: 10.3389 /fmich.2010.00002	2010
Doi N, Fujiwara S, Adachi A, Nomaguchi M	Growth ability in various macaque cell lines of HIV-1 with simian cell-tropism.	J. Med. Invest.	57	284-292	2010
Nomaguchi M, Doi N, Fujiwara S, Fujita M, Adachi A	Site-directed mutagenesis of HIV-1 <i>vpu</i> gene demonstrates two clusters of replication-defective mutants with distinct ability to down-modulate cell surface CD4 and tetherin.	Front. Microbio.	1	116. doi: 10.3389 /fmich.2010.00116	2010
Bart Hoorelbeke, Dana Huskens, Geoffrey Fe'rir, Katrien O. Francois, Atsushi Takahashi, Kristel Van Laethem, Dominique Schols, Haruo Tanaka and Jan Balzarini	Actinohivin, a Broadly Neutralizing Prokaryotic Lectin, Inhibits HIV-1 Infection by Specifically Targeting High-Mannose-Type Glycans on the gp120 Envelope	Antimicrobial Agents and Chemotherapy	54 (8)	3287-3301	2010
Nobuyuki Matoba, Adam S. Husk, Brian W. Barnett, Michelle M. Pickel, Charles J. Arntzen, David C. Montefiori, Atsushi Takahashi, Kazunobu Tanno, Satoshi Omura, Huyen Cao, Jason P. Mooney, Carl V. Hanson, Haruo Tanaka	HIV-1 Neutralization Profile and Plant-Based Recombinant Expression of Actinohivin, an Env Glycan-Specific Lectin Devoid of T-Cell Mitogenic Activity	PLoS ONE	5 (6)	e11143	2010