

起し保持されており、この結果は、酵素であるインテグラーゼとその基質であるウイルスDNA末端部位が共進化しながらRAL耐性を獲得した可能性を示唆している。

### c. 無細胞反応系を応用したプロテアーゼ阻害剤感受性検査の確立と実用化

CFBA法による解析結果が従来法とよく一致したことから、我々のアプローチが簡便かつ迅速に薬剤耐性評価を行える優れた手法であると期待される。CFBA法では野生型PRと比した酵素活性を算出できるため、変異パターンやウイルス増殖能との比較解析を行うことで、新たな知見をもたらすものと期待される。

### E. 結論

IN阻害剤の耐性獲得に関わるウイルス側および宿主側因子について明らかにするために、未治療および既治療症例に対して薬剤耐性を獲得した症例の配列情報の収集を行った。3例中2例で、インテグラーゼ内のRAL耐性主要変異の出現と共に基質であるウイルスDNAの5'LTRや3'LTRにも塩基置換等の変異が認められた。これは、酵素であるインテグラーゼとその基質であるウイルスDNA末端部位が共進化しながらRAL耐性を獲得した可能性を示唆しており興味深い。さらに*in vitro*実験を進めることにより、RAL耐性獲得機構の新たな知見が得られる可能性があると考えられる。コムギ無細胞系とAlphaScreen系を用いたHIV-1プロテアーゼ薬剤耐性検査法は、安全・迅速かつ正確に薬剤耐性を評価できる生化学アッセイ系であり、基礎研究分野への応用や臨床検査においても有用なツールとなることが期待される。

### F. 研究発表

#### 1. 原著論文

(欧文)

- 1) Ibe S, Sugiura W. Clinical significance of HIV reverse transcriptase inhibitor-resistant mutations Future Microbiology. 2011 (in press)
- 2) Junko Shibata, Wataru Sugiura, Hirotaka Ode<sup>c</sup>, 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) 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]
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) Land S, Cunningham P, Zhou J, Frost K, Katzenstein D, Kantor R, Chen YM, Oka S, DeLong A, Sayer D, Smith J, Dax EM, Law M; TAQAS Laboratory Network. TREAT Asia Quality Assessment Scheme (TAQAS) to standardize the outcome of HIV genotypic resistance testing in a group of Asian laboratories. *J Virol Methods*. 2009; 159(2):185-93.
  - 12) Hasegawa N, Sugiura W, Shibata J, Matsuda M, Ren F, Tanaka H. Inferring within-patient HIV-1 evolutionary dynamics under anti-HIV therapy using serial virus samples with vSPA. *BMC Bioinformatics*. 2009; 10:360.
  - 13) Iwatani Y, Chan DS, Liu L, Yoshii H, Shibata J, Yamamoto N, Levin JG, Gronenborn AM, Sugiura W. HIV-1 Vif-mediated ubiquitination/ degradation of APOBEC3G involves four critical lysine residues in its C-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106(46): 19539-44.
  - 14) Deforche K, Camacho RJ, Grossman Z, Soares MA, Van Laethem K, Katzenstein DA, Harrigan PR, Kantor R, Shafer R, Vandamme AM: non-B Workgroup. Bayesian network analyses of resistance pathways against efavirenz and nevirapine. *AIDS*. 2008; 18; 22(16): 2107-15.
  - 15) Furuya K, Omura M, Kudo S, Sugiura W, Azuma H.: Recognition profiles of microsporidian *Encephalitozoon cuniculi* polar tube protein 1 with human immunoglobulin M antibodies. *Parasite Immunol*. 2008; Jan;30(1):13-21.
  - 16) S Yoshida, H Gatanaga, T Itoh, M Fujino, M Kondo, K Sadamasu, T Kaneda, F Gejyo, T Shirasaka, H Mori, M Ueda, N Takata, R Minami, W Suigura and the Japanese Drug Resistance HIV-1 Surveillance Network.: Prevalence of drug resistance associated mutations in newly diagnosed HIV/AIDS patients in Japan from 2003-2007. 2008; *Antiviral Therapy*. 13(3): A162.
  - 17) Okuma K, Tanaka R, Ogura T, Ito M, Kumakura S, Yanaka M, Nishizawa M, Sugiura W, Yamamoto N, Tanaka Y.: Interleukin-4-Transgenic hu-PBL-SCID Mice: A Model for the Screening of Antiviral Drugs and Immunotherapeutic Agents against X4 HIV-1 Viruses. *J Infect Dis*. 2008;197(1):134-41.
  - 18) Rajintha M Bandaranayake, Moses Prabu-Jeyabalan, Junko Kakizawa, Wataru Sugiura, and Celia Schiffer. :Structural Analysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 CRF01\_AE Protease in Complex with the Subtype p1-p6. *Journal of Virology*. 2008; 82(13): 6762-66
- (和文)
- 1) 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。2011 ; 27 (3) (in press)
  - 2) 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.
  - 3) 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) : 2054-2058
  - 4) 杉浦互、5th International Workshop on HIV Transmission/ 18th International AIDS Conference、HIV感染症とAIDSの治療。2010 ; 1 (2) : 71-73
  - 5) 杉浦互、HIV感染—最新の疫学・臨床・治療、内科 2010 ; 106 (5) : 781-787
  - 6) 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
  - 7) 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
  - 8) 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。2009 ; 39 (4) : 361-363
  - 9) 杉浦互 : HIVの薬剤耐性獲得の分子機構、日本臨床。2009 ; 67 (1) : 43-51
  - 10) 服部純子、杉浦互 : 薬剤耐性の現状、Pharma Medica 2009 ; 27 (4) : 39-43
  - 11) 宮崎菜穂子、松下修三、藤井毅、杉浦互 : 抗HIV療法を受けている患者における薬剤耐性HIVの現状と問題点、The Journal of AIDS Research. 2009 ; 11 (2) : 72-77
- ## 2. 口頭発表
- (海外)
- 1) 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
  - 2) 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
  - 3) H Suzuki, J Hattori, M Nishizawa, S Ibe, Y Iwantani, Y Yokomaku, W Sugiura. Previous anti-retroviral 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
  - 4) 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
- 5) 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-naïve patients in Japan. The International HIV & Hepatitis Virus Drug Resistance Workshop & Curative Strategies. June 8-12, 2010, Dubrovnik, Croatia
  - 6) 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
  - 7) 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
  - 8) 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
  - 9) 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
  - 10) 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
  - 11) Characteristics of Drug-Resistant Hiv-1 Transmission: Analysis of Drug Resistance in Recently and Not-Recently Infected Treatment-Naïve Patients in Japan
  - 12) 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
  - 13) 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
  - 14) Wataru Sugiura. Characterization and phylodynamic analysis of Drug-Resistant HIV-1 Transmission in Japan. US-Japan Joint AIDS Panel: Resistance Meeting. December 8-9, 2010, Singapore
  - 15) Iwatani Y, Chan D, Liu L, Yoshii H, Shibata J, Levin J, Gronenborn A, Sugiura W. Structure-guided Mutagenesis of APOBEC3G Reveals Critical Lysine Residues for HIV-1 Vif-mediated Ubiquitination/Degradation. 17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI), February 16-19 2010, San Francisco, CA.
  - 16) Ibe S, Yokomaku Y, Shiino T, Tanaka R, Hattori J, Fujisaki S, Iwatani Y, Kato S, Hamaguchi M, Sugiura W. HIV-2 CRF01\_AB: First Circulating Recombinant Form of HIV-2. 17<sup>th</sup> Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI), February 16-19 2010, San Francisco, CA.
  - 17) Masaoka T, Sawasaki T, Matsunaga S, Sugiura W, Endo Y, Tatsumi M, Yamamoto N, Ryo A. Novel High-throughput HIV-1 Protease-resistance Phenotypic Assay Using Cell-free Protein Production System. 17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI), February 16-19 2010, San Francisco, CA.
  - 18) Fujisaki S, Yokomaku Y, Hattori J, Ibe S, Utsumi M, Hamaguchi M, Iwatani Y, Sugiura W. Molecular epidemiology of HBV-HIV-1 coinfection in Japan: viral genotypes and drug resistance. 18th International HIV Drug Resistance Workshop. June 9-13 2009. Fort Myers, FL.
  - 19) Hattori J, Yoshida S, Ito T, Gatanaga H, Kondo M, Sadamasu K, Kato S, Tanabe Y, Ueda M, Shirasaka T, Mori H, Minami R, Sugiura W, and the Japanese Drug Resistance HIV-1 Surveillance Network. 18th International HIV Drug Resistance Workshop. June 9-13 2009. Fort Myers, FL.
  - 20) Bandaranayake RM, Nalivaika E, Kolli M, Kakizawa J, Heroux A, King NM, Sugiura W, Schiffer CA. Structural and biochemical insights into altered drug resistance pathways in non-clade B HIV-1 proteases. 18th International HIV Drug Resistance Workshop. June 9-13 2009. Fort Myers, FL.
  - 21) Fujino M, Miura H, Hattori J, Ibe S, Fujisaki S, Matsuda M, Nishizawa M, Iwatani Y, Sugiura W. Mechanism of darunavir resistance acquisition in multi-protease inhibitor resistant HIV-1. 18th International HIV Drug Resistance Workshop. June

- 9-13 2009, Fort Myers, FL.
- 22) Masaoka T, Sawasaki T, Sugiura W, Endo Y, Tatsumi M, Yamamoto N, Ryo A. Development of Method for Testing HIV-1 Protease Drug-Resistance based on Cell-Free Protein Production System. 10th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance, Nov15-18 2009, Richmond, VA.
  - 23) Shibata J, Ren F, Iwatani Y, Tsang H, Matsuda M, Hasegawa N, Tanaka H, Sugiura W. Within-Host Coevolution of Gag P453L and Protease D30N/N88D Demonstrates virological Advantage in a Highly Protease Inhibitor-Exposed HIV-1 Case. 10th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance, Nov15-18 2009, Richmond, VA.
  - 24) Iwatani Y, Chan DSB, Liu L, Yoshii H, Shibata J, Levin J, Gronenborn AM, Sugiura W. Four Lysine Residues in the APOBEC3G C-Terminal Domain are Critical for HIV-1 Vif-Mediated Ubiquitination/Degradation. 10th Annual symposium on Antiviral Drug Resistance, Nov15-18 2009, Richmond, VA.
  - 25) Junko Hattori, S Yoshida, H Gatanaga, M Kondo, K Sadamasu, T Shirasaka, H Mori, R Minami, W Sugiura, and the Japanese Drug Resistance HIV-1 Surveillance Network. Increasing Prevalence of Drug-resistance Mutations among Treatment-naïve HIV-infected Patients in Japan, 2003 to 2007
  - 26) Seiichiro Fujisaki, Y Yokomaku, J Hattori, S Ibe, M Utsumi, M Hamaguchi, and W Sugiura. New Outbreak of HBV Genotype A in HIV-1-co-infected Cases in Japan.
  - 27) S Yoshida, H Gatanaga, T Itoh, M Fujino, M Kondo, K Sadamasu, T Kaneda, F Gejyo, T Shirasaka, H Mori, M Ueda, N Takata, R Minami, W Suigura and the Japanese Drug Resistance HIV-1 Surveillance Network.:Prevalence of drug resistance associated mutations in newly diagnosed HIV/AIDS patients in Japan from 2003-2007. XVII International HIV Drug Resistance Workshop. Jun. 10-14, 2008, Sitges, Spain.
  - 28) Rajintha Bandaranayake, M Prabu-Jeyablab, J Kakizawa, W Sugiura and C Schiffer.: The Effect of Sequence Polymorphisms on CrF01\_AE Protease Structure. 15th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Feb.3-6,2008, Boston, USA.
- (国内)
- 1) 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
  - 2) 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
  - 3) 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
  - 4) 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
  - 5) 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
  - 6) 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. 14Sept 2010. Awaji, Japan
  - 7) 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-1Vif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
  - 8) 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
  - 9) 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
  - 10) 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
  - 11) 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
  - 12) 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
  - 13) 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の有効例。第24回日本エイズ学会学術集会。東京。2010年11月24日
  - 14) 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

- 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
- 15) 西澤雅子、服部純子、横幕能行、Jeffrey Johnson、Walid Heneine、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
- 16) 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。ペ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
- 17) 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
- 18) 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
- 19) 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
- 20) 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ピズムに関する検討 第24回日本エイズ学会学術集会、東京、2010年11月25日
- 21) 谷 麗君、立川一川名 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 配列特異的オリゴプローブを用いた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
- 22) 木村雄貴、藤野貞之、正岡崇志、服部純子、横幕能行、岩谷靖雅、鈴木淳臣、渡邊信久、杉浦互 HIV-1のダルナビ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
- 23) 伊部史朗、横幕能行、服部純子、間宮均人、杉浦互：東海地域におけるHIV-2感染疑い症例の遺伝子学的解析、第83回日本感染症学会総会、2009年4月23日～24日、東京
- 24) 岩谷靖雅、吉居廣朗、柴田潤子、杉浦互：APOBEC3Gのエピキチン化部位と抗レトロウイルス作用、第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月25日～27日、東京
- 25) 星野忠次、藍壇愛、原田壮一郎、杉浦互：ウイルス酵素の構造変形に関する系統解析、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
- 26) 正岡崇志、梁明秀、巽正志、杉浦互、松永智子、森下了、澤崎達也、山本直樹：酵素活性を指標とした新規のHIVプロテアーゼ阻害剤耐性検査法の基盤技術の開発、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
- 27) 柴田潤子、杉浦互、岩谷靖雅、Hsinyi Tsang、松田昌和、長谷川直樹、任鳳蓉、田中博：宿主内HIV-1の共進化変異の解析：Protease阻害剤耐性変異D30N/N88Dとp1/p6切断領域のP453変異の相互干渉の意義、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
- 28) 鈴木寿子、服部純子、村田大悟、三浦秀佳、伊部史朗、藤野貞之、西澤雅子、山本直樹、杉浦互：インテグラーゼ阻害剤耐性化機序の分子生物学的解析、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
- 29) 服部純子、湯永博之、吉田繁、千葉仁志、小池隆夫、佐々木悟、伊藤俊広、内田和江、原孝、佐藤武幸、上田敦久、石ヶ坪良明、近藤真規子、今井光信、長島真美、貞升健志、古賀一郎、太田康男、山元康之、福武勝幸、田中理恵、加藤信吾、宮崎菜穂子、藤井毅、岩本愛吉、西澤雅子、仲宗根正、巽正志、椎野禎一郎、林田庸総、岡慎一、伊部史朗、藤崎誠一郎、金田次弘、横幕能行、濱口元洋、上田幹夫、大家正義、田邊嘉也、渡辺香奈子、渡邊大、矢倉裕輝、白阪琢磨、栗原健、小島洋子、中桐逸博、森治代、中桐、逸博、高田昇、木村昭郎、南留美、山本政弘、松下修三、藤田次郎、健山正男、堀成美、杉浦互：2003-2008年の新規HIV/AIDS診断症例における薬剤耐性頻度の動向、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
- 30) 須藤弘二、杉浦互、加藤真吾：PCR-MS法を用いた新規感染者血漿中の薬剤耐性微小団の定量、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
- 31) 重見麗、服部純子、保坂真澄、伊部史朗、藤崎誠一郎、横幕能行、濱口元洋、内海真、岩谷靖雅、杉浦互：BEDアッセイを用いた名古屋医療センターにおける新規HIV感染者の動向調査、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
- 32) 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データから推測されるHIV集団サイズの経時的変化、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
- 33) 藤崎誠一郎、横幕能行、服部純子、伊部史朗、濱口元洋、岩谷靖雅、杉浦互：HIV/HBVy重複感染者におけるHBV genotype解析および薬剤耐性アミノ酸変異の検出、第23回日本エイズ学会

- 学術集会・総会2009年11月26日～28日、名古屋
- 34) 伊部史朗、横幕能行、椎野禎一郎、田中理恵、服部純子、藤崎誠一郎、岩谷靖雅、間宮均人、内海眞、加藤真吾、濱口元洋、杉浦互：日本におけるHIV-2感染症の分子疫学的解析、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
  - 35) 宮崎菜穂子、松下修三、藤井毅、岩本愛吉、杉浦互：多剤耐性症例治療を目的とした新規抗HIV薬使用症例に対する緊急全国調査、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
  - 36) 石川晃一、山本典生、杉浦互、服部純子、山岡昇司、：ガーナにおける抗レトロウイルス治療（ART）中HIV感染者のウイルス定量と薬剤耐性解析、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
  - 37) 西澤雅子、Jeffery Johnson、Walid Heneine、山本直樹、杉浦互：高感度薬剤耐性HIV検出法を用いた微少集族薬剤耐性HIVの検出と依存比率に関する研究、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
  - 38) 横幕能行、大出裕高、藤崎誠一郎、服部純子、濱口元洋、杉浦互：HIVプロテアーゼ阻害剤耐性関連変異蓄積症例の薬剤感受性評価に対するVLP ELISA法およびコンピューターシミュレーション法の有用性の検討、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
  - 39) 岩谷靖雅、吉居廣朗、柴田潤子、杉浦互：Vif依存的なAPOBEC3Gのユビキチン化部位と抗ウイルス作用、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
  - 40) 吉居廣朗、岩谷靖雅、杉浦互：抗HIV-1宿主因子APOBEC3Gファミリーの発現調節に関する研究、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
  - 41) 岩谷靖雅、吉居廣朗、武田 哲、杉浦互：HIV-1 Vif依存的なAPOBEC3Gのユビキチン化サイトの同定、第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月26～28日、岡山
  - 42) 宮崎菜穂子、松下修三、藤井毅、岩本愛吉、杉浦互：既治療患者における薬剤耐性（多剤耐性）HIVの現状調査、第22回日本エイズ学会学術集会、2008年11月26～28日、大阪
  - 43) 巽 正志、梅木優子、竹川菜穂、松田昌和、橋本修、西澤雅子、石古博昭、杉浦互、山本直樹：薬剤耐性ウイルスの感染性分子クローンを軸にしたGenotypeとPhenotypeをつなぐ実験解析系、第22回日本エイズ学会学術集会、2008年11月26～28日、大阪
  - 44) 岩谷靖雅、吉居廣朗、武田 哲、杉浦互：APOBEC3GのHIV-1 Vifに依存したユビキチン化サイトに関する研究、第22回日本エイズ学会学術集会、2008年11月26～28日、大阪
  - 45) 柴田潤子、岩谷靖雅、任 鳳蓉、田中 博、杉浦互：HIV-1ゲノムRNAにおけるpoly (A) 付加部位に関する研究、第22回日本エイズ学会学術集会、2008年11月26～28日、大阪
  - 46) 大出裕高、横山 勝、佐藤裕徳、伊部史朗、藤崎誠一郎、間宮均人、濱口元洋、杉浦互、横幕能行：HIV-1プロテアーゼにおける耐性変異L89Vの立体的影響、第22回日本エイズ学会学術集会、2008年11月26～28日、大阪
  - 47) 椎野禎一郎、貞升健志、長島真美、杉浦互：HIV-1薬剤耐性変異の感染者集団における固定/消失時間の解析、第22回日本エイズ学会学術集会、2008年11月26～28日、大阪
  - 48) 正岡崇志、梁 明秀、巽 正志、杉浦互、森下了、澤崎達也、山本直樹：酵素活性を指標とした新規HIVプロテアーゼ薬剤耐性検査法の開発、第22回日本エイズ学会学術集会、2008年11月26～28日、大阪
  - 49) 星野忠次、辰巳絢子、篠原祐子、大出裕高、杉浦互：コンピューターによる薬剤耐性HIV-1に対する薬効予測の試み、第22回日本エイズ学会学術集会、2008年11月26～28日、大阪
  - 50) 横幕能行、大出裕高、間宮均人、濱口元洋、伊部史朗、藤崎誠一郎、藤崎菜恵子、金田次弘、杉浦互：Enfuvirtide (T-20) + raltegravir (RAL) + darunavir (DRV) + etravirine (TMC125) + lamivudine (3TC) の多剤高度耐性HIV-1感染症に対する治療効果、第22回日本エイズ学会学術集会、2008年11月26～28日、大阪
  - 51) 杉浦互、渦永博之、吉田 繁、千葉 仁志、小池隆夫、伊藤俊広、原 孝、佐藤武幸、石ヶ坪良明、上田敦久、近藤真規子、今井光信、貞升健志、長島真美、福武勝幸、山本泰之、田中理恵、加藤真吾、宮崎菜穂子、藤井毅、岩本愛吉、藤野真之、仲宗根 正、巽 正志、椎野禎一郎、岡 慎一、林田庸総、服部純子、伊部史朗、藤崎誠一郎、金田次弘、濱口元洋、上田幹夫、大家正泰、田邊嘉也、渡辺香奈子、渡辺 大、白阪琢磨、栗原健、森 治代、小島洋子、高田 昇、木村昭郎、南 留美、山本政弘、松下修三、健山正男、藤田次郎：2003-2007年の新規HIV-1感染者における薬剤耐性頻度の動向、第22回日本エイズ学会学術集会、2008年11月26～28日、大阪

## G. 知的所有権の出願・取得状況

該当なし

## 免疫再構築の分子機序の解析

(プロテアーゼ阻害薬による糖代謝異常の分子機序の解析)

研究分担者

**太田 康男** 帝京大学医学部 内科学講座 教授

研究協力者

**北沢 貴利** 帝京大学医学部 内科学講座

**吉野 友祐** 東京大学医学部 感染症内科

### 研究要旨

プロテアーゼ阻害薬を用いた長期の抗ウイルス治療により代謝系の機能障害がもたらされることが明らかとなっている。その機序を解明するためプロテアーゼ阻害薬のインスリンシグナル伝達系への関与、制御分子の特定について解析をすすめた。脂肪細胞に分化させた3T3-L1細胞のインスリン刺激ではコントロールとDarunavirに比べLopinavirでIRS1のSer、Tyrのリン酸化が減弱、GLUT4の膜移行性が減少し、プロテアーゼ阻害薬間でインスリンシグナル伝達系への関与に差があり、インスリン抵抗性の差を生じさせている可能性が示唆された。3T3-L1細胞におけるIRS1のTyrのリン酸化の減弱する機序を解明するため、Tyr脱リン酸化酵素であるPTP1Bの発現をコントロール細胞とプロテアーゼ阻害薬の前処理した細胞とで比較したところ、プロテアーゼ阻害薬で処理した細胞においてPTP1Bの発現の亢進を認めた。プロテアーゼ阻害薬によるインスリンシグナル伝達の抑制において、PTP1Bの発現の亢進が作用点になっている可能性が示唆された。

### A. 研究目的

HIV感染に対する抗ウイルス治療は血液中のHIVウイルス量を減少させ、日和見疾患の合併率を下げ、生命予後に大きな改善をもたらした。しかしながら、プロテアーゼ阻害薬を用いた長期の抗ウイルス治療により、インスリン抵抗性の亢進、2型糖尿病の顕性化、末梢性の脂肪萎縮、中心性の脂肪蓄積といった代謝系の機能障害がもたらされることが明らかとなってきた。

プロテアーゼ阻害薬による糖代謝障害機構として、プロテアーゼ阻害薬がグルコース輸送体(Glucose transporter 4; GLUT4)の膜移行性には影響しないが、糖取り込み能を低下させるという報告、lopinavirはインスリン受容体基質(Insulin receptor substrate; IRS)のリン酸化を抑制し、インスリン抵抗性・ERストレスを惹起するという報告などプロテアーゼ阻害薬がインスリン抵抗性を誘導していることは示されつつあるが、その分子作用点に関し詳細は明らかにされていない。

一方で、糖尿病に代表される糖代謝障害が、一種の炎症性疾患であり、その発症機序に炎症の制御システムが関与していることが解明されつつある。炎症の中心的制御分子である炎症性サイトカインのシグナル伝達では、サイトカインにより誘導されるタンパクの中でSH2ドメインをもち、JAKと会合、キナーゼ活性を抑制するタンパクとしてSOCS1がクローニングされ、構造的に類似する遺伝子よりSOCSファミリーを形成することが明らかとなった。SOCS-1、SOCS-3はIRSのリン酸化の抑制を介しインスリン抵抗性を誘導されることが報告されている。

またTyrosineの脱リン酸化の酵素として蛋白質チロシンホスファターゼ群(protein tyrosine phosphatases; PTPs)があり、PTP $\alpha$ 、PTP $\epsilon$ 、PTP-LAR、PTP1B、SHIP-2など100以上存在する。インスリンシグナル伝達系に関与する脱リン酸化酵素では、PTP1Bはインスリンシグナル伝達の負の調節因子となっていることが知られ、代謝系、免疫系、腫瘍系の制御分子として重要な役割を持つ。

本研究の目的は、プロテアーゼ阻害薬によるインスリン受容体を介するシグナル伝達の制御への関与の解析、またSOCSやPTP1Bなどのインスリンシグナル伝達系の制御分子とプロテアーゼ阻害薬との関連を解明することである。

**B. 研究方法**

マウス由来の脂肪前駆細胞の細胞分離株である3T3-L1を脂肪前駆細胞培養培地F-PM-1-L1で培養した後、脂肪細胞分化培地のF-DM-2-L1で分化させ、脂肪細胞培養培地F-AM-1-L1で培養した。抗HIVプロテアーゼ阻害薬であるlopinavir、darunavirを48時間処理し、インスリンにて刺激した。刺激後のIRSの発現、IRSのリン酸化、SOCS、PTP1Bの発現を免疫沈降法およびウェスタンブロット法にて解析した。またGLUT4の膜移行性について免疫染色を用いて解析した。

**(倫理面への配慮)**

今年度の研究内容においては、特に配慮すべきことはない。

**C. 研究結果**

脂肪細胞に分化させた3T3-L1細胞をコントロール、lopinavir、もしくはdarunavirで処理し、インスリン刺激30分後にIRS1の発現の変化およびSer307のリン酸化、Tyrのリン酸化をウェスタンブロット法および免疫沈降法で比較した。IRS1の発現はlopinavir、darunavirによる前処理の有無、インスリン刺激の有無で変化は認めなかった(図1)。IRS1のSer307のリン酸化はインスリン刺激で確認されたが、darunavir前処理ではコントロールと同様に確認されたが、lopinavir前処理ではやや減弱した。IRS1のTyrのリン酸化もインスリン刺激で確認されたが、darunavir前処理ではインスリン刺激によるリン酸化が減弱し、lopinavir前処理では更にリン酸化が減弱した。

次に3T3-L1細胞をインスリン刺激30分後にGLUT4の細胞膜移行性を免疫染色法で比較した。GLUT4はインスリン刺激前には細胞質にびまん性に分布していたが、インスリン刺激により細胞膜に移行している細胞が増加した(図2)。darunavir前処理でも同程度に認められたが、lopinavir前処理ではGLUT4が膜への移行した細胞は減少していた。

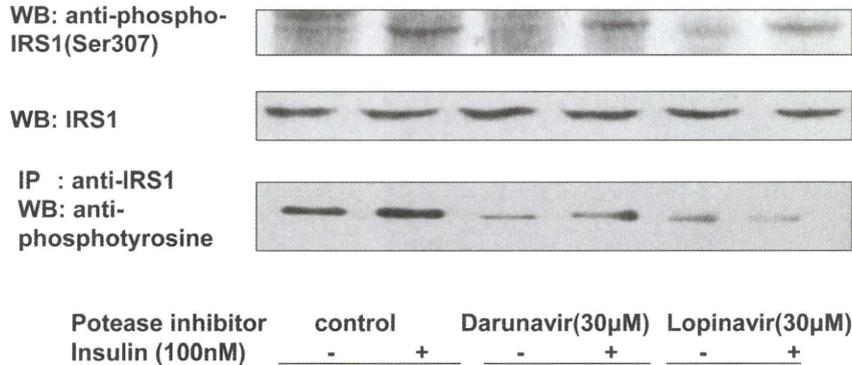


図1 プロテアーゼ阻害薬によるインスリン刺激後のIRSリン酸化

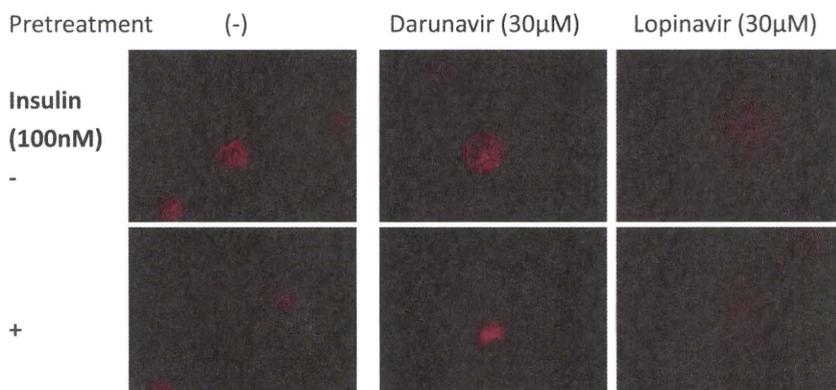


図2 プロテアーゼ阻害薬によるインスリン刺激後のGLUT4の局在の変化

次にSOCS1、SOCS3の発現量の変化をウェスタンブロット法および免疫沈降法で比較した。3T3-L1細胞におけるSOCS1、SOCS3は、lopinavir、darunavirによる前処理の有無、インスリン刺激の有無で変化は認めなかった(図3)。SOCS1、SOCS3のIRS1との会合性を免疫沈降法で比較した。SOCS1、SOCS3は免疫沈降後のウェスタンブロット法で検出されず、IRS1との会合性は確認されなかった。

脂肪細胞に分化させた3T3-L1細胞をコントロール、lopinavir、もしくはdarunavirで処理し、インスリン刺激30分後にPTP1Bの発現の変化をウェスタンブロット法で比較した。PTP1Bはlopinavir、darunavirによる前処理により、無処理と比較し、発現の亢進を認めた。プロテアーゼ阻害薬の処理した細胞、無処理の細胞ともに、インスリン刺激の有無によってPTP1Bの発現の変化は認めなかった(図4)。

### D. 考察

分化脂肪細胞を用いた本研究では、プロテアーゼ阻害薬がIRS1リン酸化の抑制というインスリンシグナル伝達の比較的上流部分に作用し、かつプロテアーゼ阻害薬の間で抑制効果に差があることが示された。プロテアーゼ阻害薬の抗ウイルス活性としては、*pol*遺伝子の産物であるHIVプロテアーゼによる切断を阻害することにあるが、極めて基質特異性の高い薬剤であり、宿主のタンパクに対するプロテアーゼ活性を持たないとされているが、過去の報告ではインスリン抵抗性への関与に関し、複数の作用点の可能性が示されている。今回検討した機序のみでプロテアーゼ阻害薬によるインスリン抵抗性の亢進が説明できるかは明らかでないが、プロテアーゼ阻害薬間の差が、臨床面で指摘されているインスリン抵抗性誘導の強さに合致している点から、分子作

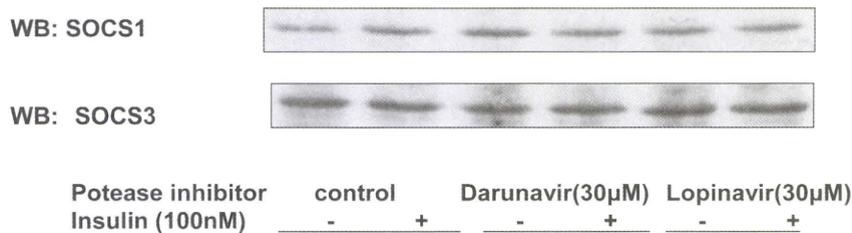


図3 プロテアーゼ阻害薬によるインスリン刺激後のSOCSの発現

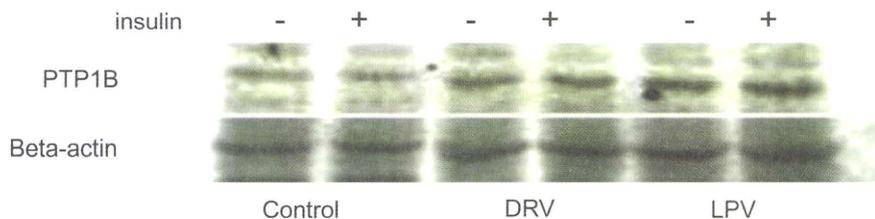


図4 プロテアーゼ阻害薬によるインスリン刺激後のPTP1Bの発現の変化

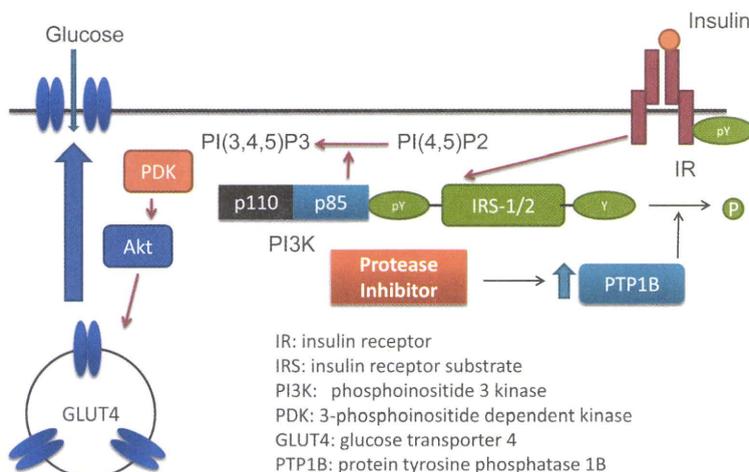


図5 プロテアーゼ阻害薬によるインスリンシグナル伝達の抑制機序

用点としては主要な作用点となっている可能性は考えられる。更に代謝障害誘導性が強いとされる ritonavir でも検証をすすめる予定である。

プロテアーゼ阻害薬が IRS1 リン酸化の抑制する作用点の解明のために脱リン酸化の機序に注目した結果、IRS1 の脱リン酸化酵素である PTP1B の発現が亢進しているという結果が示された。昨年度の報告としてプロテアーゼ阻害薬が IRS1 の Tyr リン酸化を抑制する点、GLUT4 の細胞膜移行性を抑制する点を合わせて検討すると、PTP1B の発現が下流のインスリンシグナル伝達系を制御している可能性が示唆される。また薬剤間でのプロテアーゼ阻害薬での IRS1 のリン酸化抑制、インスリン抵抗性の相違を反映した程度で発現に差を認めており、臨床的事実とも合致していた。PTP1B の制御は糖尿病治療においてもターゲットとして以前より注目されているが、現時点では臨床応用の段階に至っていないのが実状である。プロテアーゼ阻害薬による PTP1B の発現亢進が明らかにされたことは、プロテアーゼ阻害薬服用している HIV 感染者の糖尿病の治療にとどまらず、糖尿病治療の新展開を推進させる上でも有益であろうと推察される。現在、基礎的研究から明らかである PTP1B 阻害薬を前処理することで、インスリン抵抗性が制御することができるのか、解析をすすめている。

今回複数のプロテアーゼ阻害薬を研究材料として検討したことにより、従来から指摘されていた、強いインスリン抵抗性の誘導作用を有する lopinavir が、インスリンシグナル伝達系の強い抑制作用を有することが *in vitro* の解析でも明らかとなった。インテグラーゼ阻害薬、CCR5 阻害薬など新規 HIV 治療薬が導入され、多剤併用療法の組み合わせも見直される方向性が高まっているが、プロテアーゼ阻害薬は今後も中心的薬剤の一つとして使用されていくことが予想され、長期使用において忍容されるプロテアーゼ阻害薬の開発は、HIV 薬開発上の重要なテーマと思われる。今後はプロテアーゼ阻害薬による PTP1B 発現の亢進機構についてさらに解析をすすめていく。

## E. 結論

脂肪細胞のインスリンシグナル伝達系の抑制にプロテアーゼ阻害薬が関与し、プロテアーゼ阻害薬間で差があることが示された。PTP1B の発現が亢進することで、IRS1 の脱リン酸化が亢進するという分子機序が示された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yoshino Y, Kitazawa T, Kamimura M, Tatsuno K, Ota Y, Yotsuyanagi H. Pseudomonas putida bacteremia in adult patients: five case reports and a review of the literature. J Infect Chemother. 2010 Sep 1. *in press*.
- 2) Yoshino, Y., Kitazawa, T., Tatsuno, K., Ota, Y., and Koike, K. Cryptococcal Pleuritis Containing a High Level of Adenosine Deaminase in a Patient with AIDS: A Case Report. Respiration. 79:153-156, 2010.
- 3) Yamamura M, Makimura K, Fujisaki R, Satoh K, Kawakami S, Nishiya H, Ota Y. Polymerase chain reaction assay for specific identification of *Candida guilliermondii* (*Pichia guilliermondii*). J Infect Chemother. 2009 Aug;15(4):214-8.
- 4) Yanagimoto S, Tatsuno K, Okugawa S, Kitazawa T, Tsukada K, Koike K, Kodama T, Kimura S, Shibasaki Y, Ota Y. An essential single amino acid-of Toll-like receptor 4 that is pivotal for its signal transduction and subcellular localization. J. Biol Chem, 2009, 284; 3513-20.
- 5) Yamamura M, Makimura K, Ota Y. Evaluation of a new rapid molecular diagnostic system for *Plasmodium falciparum* combined with DNA filter paper, loop-mediated isothermal amplification, and melting curve analysis. Jpn J Infect Dis. 2009. Jan; 62(1):20-5.
- 6) 太田康男、古賀一郎. わが国および帝京大学医学部附属病院における HIV 感染症例の現状. 帝京医学雑誌 33 巻 4 号 219-224、2010

### 2. 学会発表

- 1) Kitazawa, T., Kamimura, M., Yoshino, Y., Tatsuno, K., and Koike, K. Changes in platelet sizes in fungal and bacterial bloodstream infection. The 14th International Congress on Infectious Diseases. March 9-12, 2010, Miami.
- 2) Kamimura, M., Kitazawa, T., Yoshino, Y., Tatsuno, K., and Koike, K. *Bacillus cereus* as a pathogen and retention of medical devices are risk factors for *Bacillus* bacteremia. The 14th International Congress on Infectious Diseases. March 9-12, 2010, Miami.
- 3) Kamimura, M., Kitazawa, T., Yoshino, Y., Tatsuno, K., and Ota, Y. Delayed removal of catheter deteriorates clinical outcome in patients with catheter-related bloodstream infection due to coagulase-negative staphylococcus. 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. April 10-13, 2010, Vienna.
- 4) Kitazawa, T., Takayama, K., Suzuki R., Suzuki H.,

Moriya K., and Koike, K. Decrease in patients acquiring metallo-beta-lactamase- producing bacteria after introducing mandatory report system of carbapenem use. The 8th East Asian Conference on Infection Control and Prevention. November 12-13, 2009, Tokyo.

(2008年11月26～28日、大阪) (日本エイズ学会誌10巻4号 553)

- 5) Kitazawa, T., Yoshino, Y., Tatsuno, K., Ota, Y., and Koike, K. Changes in platetet sizes as indicators for clinical outcome of bacteremia. 19th European Congress of Clinical Micorbiology and Infectious Diseases, May 16-19, 2009, Helsinki.
- 6) 古賀一郎、松永直久、北沢貴利、太田康男. HAART導入後患者における骨塩量の低下と測定部位別の傾向. 第24回日本エイズ学会 (2010年11月24～26日、東京) (日本エイズ学会誌12巻4号 457)
- 7) 服部純子、椎野禎一郎、渦永博之、林田庸総、吉田繁、千葉仁志、小池隆夫、佐々木悟、伊藤俊広、内田和江、原孝、佐藤武幸、上田敦久、石ヶ坪良明、近藤真規子、今井光信、長島真美、貞升健志、古賀一郎、太田康男、山元泰之、福武勝幸、加藤真吾、藤井毅、岩本愛吉、西澤雅子、仲宗根正、岡慎一、伊部史朗、横幕能行、上田幹夫、大家正義、田邊嘉也、渡辺香奈子、渡邊大、白阪琢磨、小島洋子、森治代、中桐逸博、高田昇、木村昭郎、南留美、山本政弘、松下修三、藤田次郎、健山正男、杉浦互. 最近の話題 2003～2009年の新規HIV/AIDS診断症例における薬剤耐性頻度の動向. 第24回日本エイズ学会 (2010年11月24～26日、東京) (日本エイズ学会誌12巻4号 330)
- 8) 古賀一郎、太田康男. 未治療時の薬剤耐性検査でK65Nを認めた1例のHIV RNA 遺伝子解析 (会議録/症例報告). 第23回日本エイズ学会 (2009年11月26～28日、名古屋) (日本エイズ学会誌11巻4号 446)
- 9) 服部純子、渦永博之、吉田繁、千葉仁志、小池隆夫、佐々木悟、伊藤俊広、内田和江、原孝、佐藤武幸、上田敦久、石ヶ坪良明、近藤真規子、今井光信、長島真美、貞升健志、古賀一郎、太田康男、山元泰之、福武勝幸、田中理恵、加藤真吾、宮崎菜穂子、藤井毅、岩本愛吉、西澤雅子、仲宗根正、巽正志、椎野禎一郎、林田庸総、岡慎一、伊部史朗、藤崎誠一郎、金田次弘、横幕能行、濱口元洋、上田幹夫、大家正義、田邊嘉也、渡辺香奈子、渡邊大、矢倉裕輝、白阪琢磨、桑原健、小島洋子、森治代、中桐逸博、高田昇、木村昭郎、南留美、山本政弘、松下修三、藤田次郎、健山正男、堀成美、杉浦互. 2003-2008年の新規HIV/AIDS診断症例における薬剤耐性頻度の動向 (会議録). 第23回日本エイズ学会 (2009年11月26～28日、名古屋) (日本エイズ学会誌11巻4号 445)
- 10) 古賀一郎、太田康男. 当院における新規HIV感染症患者の傾向と東京都全体の患者構成との乖離について (会議録). 第22回日本エイズ学会

## G. 知的財産権の出願・登録状況

(なし)

## 融合阻害薬・インテグラーゼ阻害薬の *in vitro* 研究

研究分担者

児玉 栄一 東北大学病院 内科・感染症科 助教

### 研究要旨

本研究では、耐性機序を明らかとし、それを利用した耐性克服型薬剤の創製を目的としている。初年度耐性HIVクローンライブラリーを構築し、その後の研究に用いた。融合阻害剤T-20に対する耐性機序から、耐性変異を導入したT-20<sub>S138A</sub>がT-20耐性HIVの複製を抑制することを証明した。高ヘリックス性をもつHIV融合阻害剤SC34EKに対する耐性はgp41領域の10以上の変異によってもたらされたがEKの向きを変えたSC34で耐性は交差しなかった。これらの知見をRevに対するペプチド性アンタゴニストの創製に応用した。このペプチドはRev活性を低下させるだけでなく、レセプターの一つであるCXCR4結合阻害や感染性も低下させた。また、現在米国で臨床治験中のインテグラーゼ阻害剤と認可されたraltegravirの耐性profileが似ていることを明らかとした。今後、これらの知見をさらに応用し、耐性克服型阻害剤の開発に役立たせる。

### A. 研究目的

抗HIV療法は抗レトロウイルス剤の多剤併用により、劇的な改善を認め、HIV感染症は大多数の患者においてコントロール可能な疾患となってきた。良好なウイルス抑制が継続した30代での初感染者では、HIV感染を持たないひとと似たような寿命を全うできそうだという推測まで行われるようになった。しかし、完全にHIVを感染者から排除するには至っておらず、長期にわたる治療が今後も必要である。

一方でわずかであってもHIV複製は耐性HIV出現の可能性を残し、一端耐性を獲得すると治療成績を大きく減弱させる。HIVは個々の薬剤に対して耐性を獲得するだけでなく、複数の薬剤に対し同時に耐性化することもあり、治療をさらに困難とさせる。そのため、これまでの薬剤、逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤の開発にとどまらず、新しい標的に対する薬剤の開発が急がれている。

近年、既存の薬剤とは違うカテゴリーの薬剤、CCR5アンタゴニスト、融合阻害剤、インテグラーゼ阻害剤が開発されてきている。最近、これら新規薬剤の併用により従来の治療薬に抵抗性となった患者において検出限界以下までウイルス量を低下させることが報告されている。本研究では個人輸入により本邦においてもHIV感染患者に使用されるように

なった融合阻害剤enfuvirtide (T-20) と近年使用が始まったインテグラーゼ阻害剤、raltegravirや本邦で開発され現在米国で臨床治験第Ⅲ相に進んでいるelvitegravirに対する耐性についても解明し、その結果を副作用の少ない創薬につなげることを目的とする。具体的には耐性変異の同定、その変異のウイルス学的意義、臨床分離株における耐性の検出法に結びつく基礎的研究を行う。また、この研究を通して耐性機序を明らかとしてそれを克服しうる薬剤の開発にも役立たせたい。

この研究の期待される成果として本邦における新規薬剤、今後導入される薬剤に留まらず、欧米で認可され国内認可を待つ薬剤に関しても実際には個人輸入等で治療が開始されている場合があるため、それらに対しても耐性検査法等の対応が可能である。一方基礎研究的な意義として耐性ウイルスの性状を検討することができ、そのことは今後の薬剤開発に対して有用な情報を提供すると考えられる。

研究分担者は主に初年度である平成20年度に本研究に必要な耐性ウイルス分子クローンの作製を行い、平成21年度はそれを応用した融合阻害剤T-20<sub>S138A</sub>の開発と米国で臨床治験中のインテグラーゼ阻害剤elvitegravir耐性について、平成22年度は、ペプチド性の阻害剤への応用を試みた。

## B. 研究方法

- 1) 細胞とウイルス：MT-2はRPMI1640培地を用いて培養した。293T細胞、HeLa-CD4/ $\beta$ -galactosidase (MAGI)細胞はDMEM培地を使用した。ウイルスはプラスミドクローンであるpNL4-3とその組替え体を293T細胞に遺伝子導入して作製した。
- 2) 抗ウイルス剤：ペプチド製剤はFmoc法によって化学合成した。コントロールに用いたzalcitabineはSigma社 (St. Louis, MO) から購入した。
- 3) 耐性変異の導入とプラスミドの作製：Site directed mutagenesisはStratagene社のキットを用いた。プラスミドの作製では一般的な手技、試薬を使用した。
- 4) 薬剤感受性試験：薬剤感受性はMAGI細胞を用いたsingle round replicationに対する抗ウイルス活性として測定した。
- 5) ウイルス複製能：目的の変異を有するウイルスの定量的な複製能は培養上清中に放出されるp24抗原量で検討した。定性的な複製能はcompetitive HIV replication assay (CHRA)を用いて検討した。
- 6) HIVレセプターCXCR4の解析：宿主細胞表面におけるCXCR4発現は単クローン抗体12G5を用いて検討した。蛍光標識された12G5の結合性はサイトフローメーターにて検出した。

### (倫理面への配慮)

耐性機序の解析と創薬への応用を含めたシステム構築を主とする基礎研究であり、臨床分離株など患者由来の情報は氏名、年齢、性別も含めて一切を研究に利用していないため特に配慮は要らないと考えられた。また、ヒトゲノム・遺伝子解析やヒト幹細胞を用いた実験は行っていない。

## C. 研究結果

### 1) ウイルスクローンライブラリーの作製

これまで欧米で報告されている主な耐性変異をpNL4-3に導入したT-20耐性変異HIVライブラリーを作製した。pNL4-3に存在するユニークサイトには含まれるNheI-BamHI断片(1215 bp、gp120 V4領域からgp41の細胞外domainを含む)をクローニングしたpSLgp41WTを作製した。これに対してsite directed mutagenesisを行い、変異を有するNheI-BamHI断片をpNL4-3に戻すことで目的の変異を有するクローンを作製した。T-20を先行使用している

欧米から分離された耐性ウイルスで高頻度に認められるL33S、V38A、N43D、N126K、S138Aを有するウイルスクローンを作製した。これらのウイルスは36番目のアミノ酸がDおよびGの2つのタイプを作製した。

### 2) D36Gの影響

NL4-3はgp41の36番目のアミノ酸がDであるがほとんどの臨床分離株はGである。この違いがT-20に対する感受性に影響を与えるか検討したところ、約10倍程度感受性が異なっていた。NL4-3はもともとT-20に対し約10倍程度の耐性を有しており、臨床分離株の感受性検討にはD36Gの変異を導入したpNL4-3との比較が適していると考えられた。

### 3) 薬剤感受性

表1に示したようにT-20耐性変異はT-20に対して10倍以上の耐性を付与した。N43Dはもっとも耐性を示したが、D36G存在下ではその耐性は劇的に低下し、特にN43Kにおいてはほとんど耐性化していなかった。このことはT-20使用患者においてN43Kが少ないことと一致する。このN43Kは*in vitro*耐性誘導で見出された変異であり、臨床的には36番目のアミノ酸がDに変異した患者でだけ問題になると考えられた。

### 4) 複製能

D36G変異を有するウイルスは複製性能が改善していた。特にN43DはMT-2細胞において複製能が野生型の2%以下で、syncytium形成性もほとんどなく、感染能の極端な低下が認められた。興味深いことにGenBankに登録されているT-20耐性ウイルスには、Q41とL44に相当する部位に相関するsilent mutationが導入されていた。この部位はgp41をコードするだけでなくHIV遺伝子発現調整因子であるRevが結合するRNA配列、Rev responding element (RRE)をもあわせてコードしており、Q41とL44はこのRREの2次構造であるstem loop IIIに相補的に導入されていた。これらの変異を耐性変異が導入されたプラスミドに導入するとほとんどのウイルスにおいて複製能が改善した。このstem loopの構造安定性を熱力学的に計算し推定したところ、その安定性と複製に正の相関が得られた(表1)。

### 5) T-20耐性変異を利用した融合阻害剤の開発

上記のように欧米で報告されている主な耐性変異をpNL4-3に導入したT-20耐性変異HIVライブラリーを作製し、その性状を検討してきたところ、gp41

C-HR 領域に導入される2次変異S138Aは、1次変異が導入されたN-HR 領域に対して結合能を上昇させることを見出した。このことから、C-HR 由来のT-20にこのS138Aを導入したT-20 (T-20<sub>S138A</sub>)はT-20耐性ウイルスの複製を抑制しうのではないかと考え、ペプチドを合成した。T-20<sub>S138A</sub>はT-20耐性変異、例えばV38AやN43D、を有するウイルス複製を野生型HIVと同様に阻害した。S138Aをアラニンではな

く他のアミノ酸18種類に関して検討したが、高い活性を維持できたものはS138AとS138Mだけであった。

このT-20<sub>S138A</sub>がどのようにして耐性HIVにも効果を示しているかをcircular dichroism (CD)法で解析したところ、変異したN-HRに対する結合性の増加であることが判明した。このCDの結果と抗HIV効果はよく相関した。

表1

**Drug susceptibility<sup>a</sup> and viral replication<sup>b</sup> of HIV-1 clones with primary mutations or synonymous mutations**

Mutation(s)	EC <sub>50</sub> <sup>c</sup> (μM)		p24 (%)
	ddC	T-20	
WT <sup>d</sup>	0.51 ± 0.089	0.021 ± 0.0093	100
D36G	0.66 ± 0.22 (1.3) <sup>e</sup>	0.0026 ± 0.0012 (0.1)	95 ± 15
<i>Primary mutations</i>			
V38A	0.65 ± 0.12 (1.3)	> 1.0 (> 48)	3.3 ± 1.7
Q40H	0.47 ± 0.11 (0.9)	0.21 ± 0.087 (10)	31 ± 11
N43D	0.48 ± 0.13 (0.9)	> 1.0 (> 48)	< 2
N43K <sub>AAA</sub>	0.22 ± 0.005 (0.4)	0.28 ± 0.024 (13)	21 ± 11
N43K <sub>AAG</sub>	0.32 ± 0.009 (0.6)	0.11 ± 0.019 (5.4)	30 ± 16
L45M	0.68 ± 0.12 (1.3)	0.27 ± 0.11 (13)	5.4 ± 0.8
Q40H/L45M	0.37 ± 0.2 (0.7)	> 1.0 (> 48)	7.7 ± 3.7
<i>Synonymous mutations</i>			
Q <sub>CAG</sub> 39Q <sub>CAA</sub>	0.62 ± 0.077 (1.2)	0.015 ± 0.006 (0.7)	115 ± 16
Q <sub>CAG</sub> 41Q <sub>CAA</sub>	0.58 ± 0.13 (1.1)	0.054 ± 0.011 (2.6)	192 ± 53
L <sub>UUG</sub> 44L <sub>CUG</sub>	0.62 ± 0.089 (1.2)	0.030 ± 0.018 (1.5)	191 ± 34
L <sub>UUG</sub> 44L <sub>UUA</sub>	0.64 ± 0.18 (1.3)	0.014 ± 0.0026 (0.7)	5.9 ± 1.7
<i>N43D series</i>			
N43D <sup>f</sup>	0.48 ± 0.13 (0.9)	> 1.0 (> 48)	< 2
N43D/L44L <sub>CUG</sub>	0.35 ± 0.050 (0.7)	> 1.0 (> 48)	< 2
Q39Q <sub>CAA</sub> /N43D	0.34 ± 0.17 (0.7)	> 1.0 (> 48)	< 2
Q41Q <sub>CAA</sub> /N43D	0.62 ± 0.097 (1.2)	> 1.0 (> 48)	< 2
D36G/N43D	0.56 ± 0.18 (1.1)	0.13 ± 0.056 (6.1)	81 ± 10
D36G/N43D/L44L <sub>CUG</sub>	0.63 ± 0.19 (1.2)	0.10 ± 0.045 (4.9)	103 ± 34
D36G/Q39Q <sub>CAA</sub> /N43D	0.76 ± 0.12 (1.5)	0.14 ± 0.057 (6.8)	59 ± 23
D36G/Q41Q <sub>CAA</sub> /N43D	0.74 ± 0.14 (1.5)	0.14 ± 0.066 (6.8)	67 ± 16
<i>N43K series</i>			
N43K <sub>AAA</sub> <sup>f</sup>	0.22 ± 0.005 (0.4)	0.28 ± 0.024 (13)	21 ± 11
N43K <sub>AAG</sub> <sup>f</sup>	0.32 ± 0.009 (0.6)	0.11 ± 0.019 (5.4)	30 ± 16
N43K <sub>AAA</sub> /L44L <sub>CUG</sub>	0.64 ± 0.087 (1.3)	0.22 ± 0.082 (11)	76 ± 18
N43K <sub>AAG</sub> /L44L <sub>CUG</sub>	0.59 ± 0.10 (1.2)	0.12 ± 0.055 (5.9)	37 ± 15
D36G/N43K <sub>AAA</sub>	0.61 ± 0.086 (1.2)	0.0069 ± 0.0004 (0.3)	26 ± 18
D36G/N43K <sub>AAG</sub>	0.60 ± 0.078 (1.2)	0.0087 ± 0.0008 (0.4)	27 ± 12
D36G/N43K <sub>AAA</sub> /L44L <sub>CUG</sub>	0.28 ± 0.14 (0.6)	0.0057 ± 0.0016 (0.3)	96 ± 19
D36G/N43K <sub>AAG</sub> /L44L <sub>CUG</sub>	0.69 ± 0.14 (1.4)	0.0069 ± 0.0003 (0.3)	53 ± 8.1

<sup>a</sup> Antiviral activity was determined by the MAGI assay. The data shown are mean values and standard deviations obtained from the results of at least three independent experiments.

<sup>b</sup> Viral replication was determined by p24 ELISA. The data shown are mean values and standard deviations obtained from the results of at least three independent experiments. Absolute p24 value for HIV-1WT was 1.8 ± 0.2 ng/ml

<sup>c</sup> 50% effective concentration was determined with the MAGI assay (Nameki et al., 2005).

<sup>d</sup> HIV-1<sub>NL4-3</sub> was used as a wild type virus.

<sup>e</sup> Fold change in EC<sub>50</sub> of the gp41 recombinant molecular clone compared with that of HIV-1<sub>WT</sub>.

<sup>f</sup> Also described in the *primary mutations* section of **Table 1**.

<sup>g</sup> Only insufficient replication of HIV-1<sub>N43D</sub> in MT-2 cells was observed. However, we could determine initial titer of the HIV-1<sub>N43D</sub> obtained from freshly transfected 293T cells in the MAGI cells, since the MAGI assay only detects first round of viral infection up to Tat expression. Therefore, it may be ideal for determination of accurate inhibitory effect compared to other assays that allow multiple replications.

同様にC34耐性ウイルスで見られたN126K変異をC34に導入(C34<sub>N126K</sub>)してその効果を調べたところC34に対して約70倍耐性になるC34耐性HIV-1<sub>ΔV4/I37K/N126K/L204I</sub>の複製を完全にブロックできることを見出した。この耐性ウイルスに対する効果増強もCD解析結果とよく相関していた。これらのことからT-20<sub>S138A</sub>とC34<sub>N126K</sub>における抗HIV効果の増強はこれら変異を有するペプチドのN-HRへの結合力の増加であると考えられた。

## 6) T-20<sub>S138A</sub>に対する耐性

T-20<sub>S138A</sub>は野生型およびT-20耐性HIVにも効果を示すが、HIVはさらに変異を導入し耐性化を図ると考えられ、HIV-1<sub>WT</sub>とHIV-1<sub>N43D/S138A</sub>を使用して、耐性誘導をdose escalating法で行った。どちらの誘導であっても約1年程度の培養によって耐性HIVを誘導することが可能であった。HIV-1<sub>WT</sub>を用いた場合、はじめにN-HRにI37N変異が導入され、耐性度がやや上昇したが、約5倍程度で推移した。最終的にL44MとC-HRのN126Kが導入され、100倍程度の高度耐性を獲得した。

一方でHIV-1<sub>N43D/S138A</sub>を用いた場合、はじめにC-HR領域にE137Kが導入され、耐性度が約10倍程度上昇した。その後、L33S、I69Lが追加され、200倍程度の耐性を獲得した。

これらの耐性変異のうち、I37NとI69Lはこれまで報告のない新規耐性変異であった。

## 7) 複製能

上記の実験はペプチドに変異を導入させ検討したが、感染性HIVに上記変異を導入した場合どのような変化が起こるかを検討した。S138は塩基配列TCAによってコードされており、変異しやすい1塩基置換で起こりうるアミノ酸置換、A、L、P、T、

Wに関してその感染性を検討した。S138Pを有するHIVはほとんど複製しなかったが、他のウイルスでは、WT > S138A > S138T > S138L > S138Wの順番で感染性が優れていた。T-20に対する耐性と合わせてS138Aを獲得することがウイルスにとってもっとも合理的な変化であることが示された(図1)。

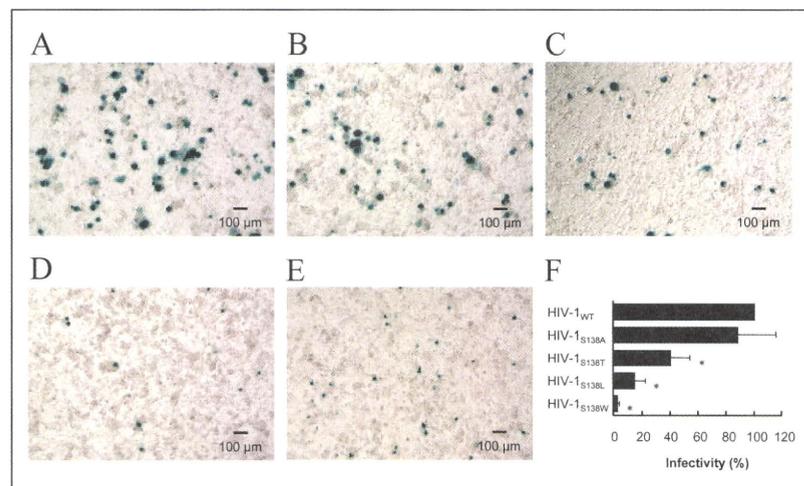
## 8) インテグラーゼ阻害剤elvitegravirの耐性変異

研究分担者が基礎開発に携わった新規インテグラーゼ阻害剤elvitegravirは現在米国でGilead Science社が1日1回の合剤として、テノフォビル、エムトリシタピンの合剤であるツルバタに加えた3合剤の臨床治験第III相に進めている。我々が*in vitro*で誘導したelvitegravir関連耐性変異とこれまでに報告されている*in vivo*変異をraltegravir耐性変異の出現状況と比較した。これらの薬剤の共通耐性変異はインテグラーゼのflexible loopと呼ばれる領域148番目と155番目の変異が同様に検出されることから、その耐性機序が同一であることが予想された。

## 9) 静電作用を利用したペプチド融合阻害剤の開発

これまで報告されている主な融合阻害剤は主にgp41領域の変更もしくはアミノ酸配列を他のウイルス株から利用することで開発がおこなわれてきたが、T-20耐性ウイルスに対する効果はあまり芳しいものではなかった。そのため我々は、生理的アミノ酸配列をもつペプチドとしては最も効果の高かったC34に注目して、有効なペプチド創製を試みた。

まず、ヘリックス性を向上させることで活性が上がることは米国のグループが既に報告していたが、疎水性アミノ酸への置換が必要であった。C34はもともと水溶性に乏しいことから、我々は逆に親水性アミノ酸である酸性アミノ酸と塩基性アミノ酸を交互に配置させるような置換を行い、お互いに静電相



Microscopic images of the MAGI cells infected with S138 substituted HIV-1s (A to E), are shown. MAGI cells in a 12 well plate were infected with (A) HIV-1<sub>WT</sub>, (B) HIV-1<sub>S138A</sub>, (C) HIV-1<sub>S138T</sub>, (D) HIV-1<sub>S138L</sub> and (E) HIV-1<sub>S138W</sub> at 200 BFU. After 72 h cultivation, the cells were fixed and stained with X-Gal as described in the Experimental procedure section. (F) Percentage of p24 antigen normalized infectivity of S138 substituted HIV-1s compared with that of HIV-1<sub>WT</sub> are shown. HIV-1 clones were obtained from freshly transfected 293T cells and determined amount of p24 antigen by a commercially available ELISA kit and infectivity by the MAGI assay. Infectivity (%) was normalized by amount of p24 antigen. Data represent means  $\pm$  error bars obtained from 4 independent experiments. Asterisk indicates significant decrease in the infectivity by Bonferroni multiple comparison test ( $p < 0.05$ ).

図1 S138に1塩基変異を有するウイルスの感染性

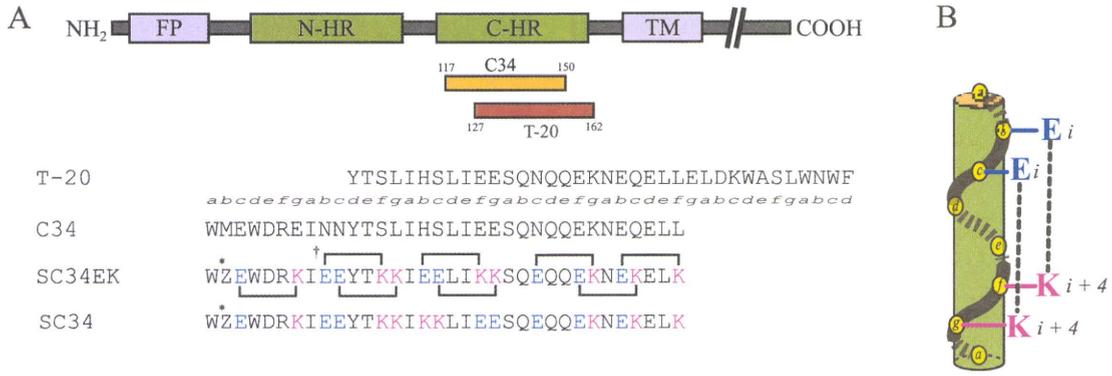


図2

表2

Susceptibility of SC34-selected mutation-introduced env-recombinant viruses to fusion inhibitors<sup>a</sup>

Mutation(s)	EC <sub>50</sub> (nM)				
	ddC	T-20	C34	SC34	SC34EK
HIV-1 <sub>NL4-3</sub> <sup>b</sup>	430 ± 121	20 ± 3	3.3 ± 0.6	1.4 ± 0.3	0.7 ± 0.4
<i>Selection with SC34</i>					
<i>gp41</i>					
A30V	213 ± 40 (0.5)	6.4 ± 2.2 (0.3)	7.2 ± 1.6 (2.2)	0.5 ± 0.2 (0.4)	0.8 ± 0.2 (1.1)
D36G	392 ± 93 (0.9)	1.0 ± 0.1 (0.05)	8.1 ± 3.4 (2.5)	0.6 ± 0.2 (0.4)	0.7 ± 0.2 (1.0)
I37K	287 ± 92 (0.7)	2,453 ± 873 (123)	23 ± 3 (7.0)	4.9 ± 0.6 (3.5)	1.0 ± 0.2 (1.4)
I37T	289 ± 30 (0.7)	166 ± 40 (8.3)	20 ± 5 (6.1)	2.3 ± 0.8 (1.6)	0.5 ± 0.1 (0.7)
R46K	572 ± 162 (1.3)	ND	1.3 ± 0.4 (0.4)	0.6 ± 0.1 (0.4)	1.9 ± 0.2 (2.7)
Q52R	415 ± 29 (1.0)	ND	2.9 ± 0.8 (0.9)	1.6 ± 0.5 (1.1)	1.5 ± 0.2 (2.1)
Q56R	300 ± 58 (0.7)	ND	28 ± 6 (8.5)	4.1 ± 1.0 (2.9)	1.0 ± 0.2 (1.4)
N126K	256 ± 18 (0.6)	27 ± 5 (1.4)	8.0 ± 2.9 (2.4)	1.3 ± 0.4 (0.9)	0.4 ± 0.1 (0.6)
S138A	210 ± 64 (0.5)	ND	4.0 ± 0.8 (1.2)	2.3 ± 0.8 (1.6)	0.8 ± 0.2 (1.1)
E151K	277 ± 16 (0.6)	ND	2.3 ± 0.6 (0.7)	1.1 ± 0.02 (0.8)	1.4 ± 0.4 (2.0)
K154N	529 ± 160 (1.2)	ND	2.1 ± 1.7 (0.6)	1.4 ± 0.5 (1.0)	0.4 ± 0.2 (0.6)
N163D	348 ± 33 (0.8)	ND	0.5 ± 0.1 (0.2)	2.5 ± 0.8 (1.8)	0.9 ± 0.7 (1.3)
L204I	226 ± 12 (0.5)	13 ± 4 (0.7)	3.9 ± 0.1 (1.2)	1.5 ± 0.3 (1.1)	0.6 ± 0.1 (0.9)
L210F	556 ± 162 (1.3)	ND	4.1 ± 1.7 (1.2)	0.6 ± 0.1 (0.4)	0.4 ± 0.04 (0.6)
SC34(P-122)gp41 <sup>c</sup>	329 ± 33 (0.8)	1,727 ± 255 (86)	24 ± 4 (7.3)	2,189 ± 287 (1,564)	23 ± 1 (33)
<i>gp120</i>					
SC34(P-122)gp120 <sup>d</sup>	339 ± 95 (0.8)	45 ± 2 (2.3)	0.8 ± 0.3 (0.2)	0.2 ± 0.03 (0.1)	0.2 ± 0.05 (0.3)
<i>gp160</i>					
SC34(P122)gp160 <sup>e</sup>	542 ± 68 (1.3)	>5,000 (>250)	>1,000 (>303)	2,827 ± 439 (2,019)	33 ± 4 (47)
<i>Selection with SC34EK</i>					
<i>gp41</i>					
D36G	392 ± 93 (0.9)	1.0 ± 0.1 (0.05)	8.1 ± 3.4 (2.5)	0.6 ± 0.2 (0.4)	0.7 ± 0.2 (1.0)
Q41R	259 ± 19 (0.6)	ND	125 ± 50 (38)	5.3 ± 0.4 (3.8)	2.3 ± 0.6 (3.3)
N43K	220 ± 5.0 (0.5)	278 ± 24 (14)	180 ± 54 (55)	2.7 ± 0.6 (1.9)	2.3 ± 0.8 (3.3)
A96D	255 ± 13 (0.6)	>1,000 (>50)	12 ± 1 (3.6)	2.8 ± 1.2 (2.0)	4.4 ± 0.9 (6.3)
N126K	256 ± 18 (0.6)	27 ± 5 (1.4)	8.0 ± 2.9 (2.4)	1.3 ± 0.4 (0.9)	0.4 ± 0.1 (0.6)
H132Y	394 ± 83 (0.9)	363 ± 70 (18)	3.6 ± 1.4 (1.1)	2.7 ± 1.3 (1.9)	3.4 ± 0.4 (4.9)
E151K	277 ± 16 (0.6)	ND	2.3 ± 0.6 (0.7)	1.1 ± 0.02 (0.8)	1.4 ± 0.4 (2.0)
V182I	686 ± 181 (1.6)	26 ± 8 (1.3)	4.5 ± 1.2 (1.4)	1.3 ± 0.3 (0.9)	0.7 ± 0.2 (1.0)
P203S	ND	ND	ND	ND	ND
L204I	226 ± 12 (0.5)	13 ± 4 (0.7)	3.9 ± 0.1 (1.2)	1.5 ± 0.3 (1.1)	0.6 ± 0.1 (0.9)
P203S/L204I	646 ± 208 (1.5)	23 ± 5 (1.2)	3.5 ± 0.1 (1.1)	1.6 ± 0.2 (1.1)	1.5 ± 0.2 (2.1)
S241F	420 ± 75 (1.0)	20 ± 3 (1.0)	6.3 ± 0.2 (1.9)	1.6 ± 0.3 (1.1)	0.6 ± 0.1 (0.9)
H258Q	381 ± 25 (0.9)	54 ± 19 (2.7)	13 ± 3 (3.9)	1.8 ± 0.4 (1.3)	0.7 ± 0.4 (1.0)
A312T	ND	ND	ND	ND	ND
H258Q/A312T	633 ± 140 (1.5)	28 ± 5 (1.4)	6.0 ± 0.7 (1.8)	1.3 ± 0.2 (0.9)	0.7 ± 0.2 (1.0)
SC34EK(P-120)gp41 <sup>f</sup>	536 ± 20 (1.2)	112 ± 38 (5.6)	70 ± 9 (21)	20 ± 1 (14)	75 ± 8 (107)
<i>gp120</i>					
SC34EK(P-120)gp120 <sup>g</sup>	399 ± 85 (0.9)	70 ± 16 (3.5)	1.4 ± 0.4 (0.4)	0.2 ± 0.03 (0.1)	0.3 ± 0.1 (0.4)
<i>gp160</i>					
SC34EK(P-120)gp160 <sup>h</sup>	344 ± 42 (0.8)	435 ± 139 (22)	378 ± 133 (115)	5.2 ± 0.5 (3.7)	72 ± 18 (103)

<sup>a</sup> Anti-HIV activity was determined using MAGI assay.

Data is shown as means and standard deviations obtained from at least three independent experiments, and resistance (*n*-fold of the EC<sub>50</sub>) of recombinant viruses, compared to that of parental HIV-1<sub>NL4-3</sub>, is shown in parentheses. ND, not determined.

<sup>b</sup> HIV-1<sub>NL4-3</sub> was used as wild-type virus.

<sup>c</sup> HIV-1<sub>SC34(P-122)gp41</sub> contains D36G/I37K/R46K/Q52R/Q56R/N126K/S138A/E151K/K154N/N163D/L204I/L210F mutations in gp41-coding region.

<sup>d</sup> HIV-1<sub>SC34(P-122)gp120</sub> contains K107Q/S134N/S136G/F147L mutations in gp120-coding region..

<sup>e</sup> HIV-1<sub>SC34(P-122)gp160</sub> contains K107Q/S134N/S136G/F147L and D36G/I37K/R46K/Q52R/Q56R/N126K/S138A/E151K/K154N/N163D/L204I/L210F mutations in gp120- and gp41-coding regions, respectively.

<sup>f</sup> HIV-1<sub>SC34EK(P-120)gp41</sub> contains D36G/Q41R/N43K/A96D/N126K/H132Y/V182I/P203S/L204I/S241F/H258Q/A312T mutations in gp41-coding region.

<sup>g</sup> HIV-1<sub>SC34EK(P-120)gp120</sub> contains V37A/V59I/S100K/S115N/R138S/D139N/A310T mutations in gp120-coding region.

<sup>h</sup> HIV-1<sub>SC34EK(P-120)gp160</sub> contains V37A/V59I/S100K/S115N/R138S/D139N/A310T and D36G/Q41R/N43K/A96D/N126K/H132Y/V182I/P203S/L204I/S241F/H258Q/A312T mutations in gp120- and gp41-coding regions, respectively.

相互作用によるヘリックスターンごとの安定性、つまりヘリックス性が向上を狙って、グルタミン酸 (E) とリジン (K) を2つずつ交互に配置した (図2)。EKモチーフをすべて一方向にそろえたペプチド SC34EK と1ヶ所生理的な配列を残し、EKモチーフが逆になったSC34の2ペプチドを得た。どちらのペプチドもヘリックス性の向上も認められ、抗ウイルス活性も T-20 と比べ約50倍以上上昇していた (表2)。

10) 耐性誘導

HIV-1<sub>NL4-3</sub> を使用して、耐性誘導を dose escalating 法で行った。SC34EK と SC34 どちらの耐性誘導であっても約2年弱の培養によってようやく耐性 HIV を誘導することが可能であった。最終的にはどちらも100倍を超える耐性が獲得されたが、興味深いことに交差耐性はわずかであった。耐性変異は関係が少

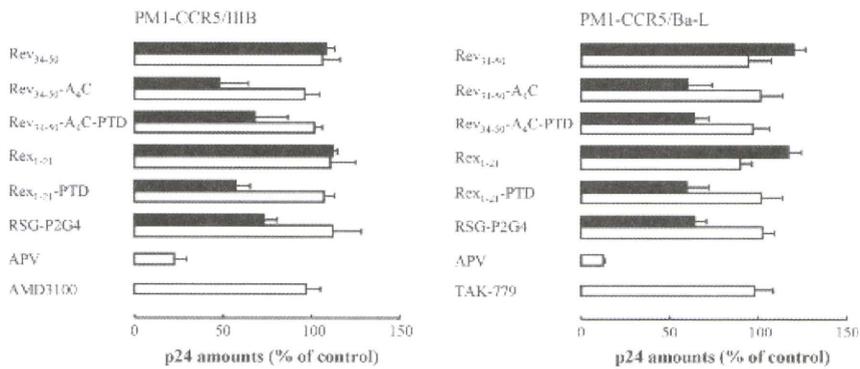
ないと考えられた gp120 領域にも導入されていた。gp41 領域ではどちらのペプチドであっても10以上の変異が導入されていた。

11) 薬剤感受性

これらの変異を個別に gp41 に導入して感受性を調べたが、どの変異を導入しても最大6倍程度の感受性変化しか起こさず、明らかに1次変異と考えられる変異は同定されなかった。よって高度耐性は変異の蓄積によって引き起こされていることが考えられた。gp120 領域の変異は感受性にはほとんど影響がなかった (表2)。

12) 複製能

gp41 に導入されていた変異は HIV の複製能を低下させ、逆に gp120 に導入されていた変異は複製能を回復させていた。これらのことから、gp120 変異は



Inhibitory effects of the peptides on p24 production from persistently HIV-1-infected PM1-CCR5 cells. PM1-CCR5 cells persistently infected with HIV-1<sub>IIIB</sub> or HIV-1<sub>Ba-L</sub> (PM1-CCR5/IIIB or PM1-CCR5/Ba-L cells, respectively) were washed and resuspended at 4 × 10<sup>4</sup> cells/ml with the peptides (black bars: 10 μM; white bars: 1 μM). APV as a positive control or AMD3100, TAK-779 or medium alone (control) as negative controls. After 48h, the amounts of viral p24 in the culture supernatants were measured. The results are expressed as the percentages of p24 relative to that of the control. The data represent the means + SD of three independent experiments.

図3

表3

Peptide effect on infectivity of HIV-1<sub>Ba-L</sub>

Compound	% of non-treated control		
	Infectivity	p24	Infectivity/p24
Rev <sub>34-50</sub>	74 ± 11	119 ± 16	0.62
Rev <sub>34-50</sub> -A <sub>4</sub> C	24 ± 1	67 ± 8	0.36
Rex <sub>1-21</sub>	121 ± 43	93 ± 24	1.3
Rex <sub>1-21</sub> -PTD	74 ± 30	82 ± 15	0.97
RSG-P2G4	72 ± 32	92 ± 5	0.78

Infectivity and amount of p24 in the supernatant of PM1-CCR5/Ba-L cells exposed to peptides (10 μM) were determined by the MAGI assay and a commercially available p24 kit, respectively. Each value was normalized by that of simultaneously performed non-treated control as 100 %. Data represent the means ± SD of three independent experiments.

感受性ではなく、複製能の改善目的に導入されたと考えられる。

### 13) Revペプチドによる抗HIV効果

Revの34-50番までのアミノ酸からなるペプチドにRevアンタゴニスト活性があることを見いだした(図3)。また、このペプチドで処理したウイルスの感染性を検討したところ、その感染性は減弱しており、p24で検討した結果よりもさらに効果を有する可能性が示唆された(表3)。

### 14) RevペプチドのCXCR4のアンタゴニスト活性

Revペプチドはアルギニンが多く、過去の報告でアルギニンが6個以上まとまって導入されているペプチドは、細胞表面上のCXCR4に結合し、HIVの侵入を阻害することが報告されている。そのことから、Revペプチドにも同様の効果があるかをフローサイトメーターを用いて検討した。RevペプチドはCXCR4アンタゴニストのAMD3100と比較して約10倍程度活性は弱かったが、抗CXCR4抗体12G5の結合を阻害した。

## D. 考察

本研究では、耐性HIVクローンライブラリーの構築、そしてそれを応用した融合阻害剤T-20耐性機序の解明、そして耐性克服型薬剤の開発とその応用、さらにインテグラーゼ阻害剤耐性について検討した。

まず、T-20耐性ウイルスを解析し、その耐性獲得にはHIV RNA構造が重要な働きを果たしていることを明らかとし、その耐性変異を融合阻害剤のデザインに応用した。T-20耐性変異として*in vitro*、*in vivo*で耐性関連変異として誘導されるN126KとS138Aは耐性責任変異としてN-HRに導入される変異の影響でウイルスC-HRとの結合性が低下することを防ぐ。そのためこの機序を利用してペプチドを開発すれば基本的には耐性ウイルスを克服できることに繋がると考えられる。現在この仮説を証明すべく、T-20<sub>S138A</sub>で見られた変異を有するT-20ペプチドを作成してその効果を検討中である。この方法では36アミノ酸のうち1-2個程度のアミノ酸置換で済み、*in vivo*等で存在しうる配列であることから、ペプチドの安定性等はT-20とほぼ同等であることが予想される。これまでの逆転写酵素やプロテアーゼ阻害剤ではタンパク立体構造上から化合物構造・結合性を推定、分子設計を施し、その後ウイルスで検討して薬物分子構造を最適化していかなければならないが、この融合阻害ペプチドの場合、耐性変異の意義

を検討すること自体が分子設計につながり、新たな耐性克服型ペプチドの創製が比較的容易であると考えられる。この研究に関しては平成20年度のT-20耐性の耐性変異部位を持つクローンのライブラリーを構築したことによって比較的短期間に結果をだすことが可能となった。

一方でペプチドの結合面には変化がないように溶媒面にグルタミン酸とリジンを配位したelectrically constrained EK motifを導入したことでペプチドのヘリックス性を安定させることに成功した。そのため、T-20耐性ウイルスに見られるT-20のヘリックス性を損なわせ、結合力を失わせる変異の影響を全く受けないことが活性に貢献したと思われる。また水溶性に富んでおり、以前我々が報告したように血液中タンパクなどとの結合性が低いことから、実質有効薬剤として存在することが予想される。このことは、投与量の削減、投与部位の炎症などの副作用の低下につながり、医療上重要な問題点の解決にもつながろう。

耐性化に試験管内でも長期間を要し、さらに多くの変異を要することから、実際の感染患者内で容易に耐性株は出てこないと予想される。このことは長期に亘る安定的な投与につながり、耐性検査等のコスト削減にも有用である。またT-20<sub>S138A</sub>同様、SC34EK耐性変異を導入したペプチドに活性があったことから今後、不幸にも耐性ウイルスが出現してもその救済が比較的容易に行えると考えられる。さらに同様のアミノ酸配列を有するSC34とSC34EKに交差耐性が少ないことは今後のペプチドデザインを考えた上で重要な知見であり、この応用はペプチドデザインを容易にし、開発費のさらなる削減も期待しうる。

最終年度ではこれまでに得られた知見をさらに応用し、新しい有効な阻害剤の開発、そして副作用が少なくなるようより特異的な標的へのシフト、Revペプチドを試みた。Revペプチドは未だ活性的には十分なものではないものの、新規標的をターゲットにしたものであり、今後の展開が期待される。本年度は融合阻害剤で培われた知見を応用し、有効なペプチドが合成できた。例えば、ヘリックス性を向上させるのに4個のアラニン付加、細胞透過性を増すためにHIV-Tatのアルギニンリッチドメインを追加、などその活性を増強させることが可能であった。Revペプチドで処理したウイルス粒子の感染性が低下していたことは特記すべきことである。なぜなら非感染性粒子の増加は生体内で抗原として用いられ、ワクチン効果をもたらすことも可能となる。また、阻害点が2つ存在することは、複製阻害という

点では大きなメリットである。特に現在CCR5阻害剤が臨床応用されている中で、CXCR4の阻害剤が開発されていないことは、治療において片手おちであるといわざるをえないと思われる。また、本研究では調べていないが、Revペプチドで処理したことでTatとRevの関係が崩れ、Tat優位となることが予想される。Tatが優位になることはゲノムRNAが産生されないことを意味し、ウイルス抗原はつくられないものの、粒子形成には至らない。つまり生体内では感染細胞が、抗原を発現しているのにもかかわらず、粒子が形成されず、絶好の免疫のターゲットになることも予想される。これは抗ウイルス剤としてだけでなく、免疫活性にも働く新しい薬剤となろう。

最後に、インテグラーゼ阻害剤は日本で開発されたelvitegravirが臨床治験phase IIIまで進行しているが、先行したMerck社のraltegravirと耐性機序がほとんど同一であることは今後さらなる阻害剤の開発が必要であることを示唆する。しかし、現時点ではraltegravirが1日2回投与であり、elvitegraivirが1回投与で行われていることから、今後、認可されることにより、比較的多くの患者にとって有用な薬剤となることが予想される。

## E. 結論

融合阻害剤T-20に対する耐性HIVライブラリーを構築、phenotype法の確立から新たなペプチドデザインを行った。耐性関連変異を利用し創製されたT-20<sub>S138A</sub>はT-20耐性HIVにも十分な効果を発揮した。一方でT-20耐性に効果を示す融合阻害剤SC34EKとSC34に対する耐性を誘導し、耐性が獲得されにくい薬剤であることを示した。興味深いことに2つの誘導体同士の交差耐性ができにくいことから、今後のペプチドデザインに有用な知見を加えた。また、Rev阻害剤が開発できたことは今後の発展に有用である。インテグラーゼ阻害剤に関しては現在臨床使用されているraltegravirと米国で治験中のelvitegravirで耐性が交差することを明らかとした。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- Ujike M, Nishikawa H, Otaka A, Yamamoto N, Yamamoto N, Matsuoka M, Kodama E, Fujii N and Taguchi F. Heptad repeat-derived peptides block the protease-mediated direct entry from cell surface of SARS coronavirus but not entry via endosomal pathway. *Journal of Virology* 82: 588-592, 2008
- Shimura K, Kodama E, Sakagami Y, Matsuzaki Y, Watanabe W, Yamataka K, Watanabe Y, Ohata Y, Doi S, Sato M, Kano M, Ikeda S, Matsuoka M. Broad Anti-Retroviral activity and Resistance Profile of a Novel Human Immunodeficiency Virus Integrase Inhibitor, Elvitegravir (JTK-303/GS-9137). *Journal of Virology* 82: 764-774, 2008
- Kajiwara K, Kodama E, Sakagami Y, Naito T, Matsuoka M. A Dual-Reporter Phenotypic Assay for Human Immunodeficiency Viruses. *Journal of Clinical Microbiology* 46: 792-795, 2008.
- Oishi S, Ito S, Nishikawa H, Watanabe K, Tanaka M, Ohno H, Izumi K, Sakagami Y, Kodama E, Matsuoka M, Fujii N. Design of a Novel HIV-1 Fusion Inhibitor That Displays a Minimal Interface for Binding Affinity. *Journal of Medicinal Chemistry* 51: 388-391. 2008.
- Atsuko Hachiya, Eiichi N. Kodama, Stefan G. Sarafianos, Matthew M. Schuckmann, Yasuko Sakagami, Masao Matsuoka, Masafumi Takiguchi, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka. Amino acid mutation, N348I, in the connection subdomain of HIV-1 Reverse Transcriptase Confers Multi-class Resistance to Nucleoside and Non-nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors. *Journal of Virology* 82: 3261-70, 2008.
- Atsushi Kawamoto, Eiichi Kodama, Stefan G. Sarafianos, Yasuko Sakagami, Satoru Kohgo, Kenji Kitano, Noriyuki Ashida, Yuko Iwai, Hiroyuki Hayakawa, Hiroto Nakata, Hiroaki Mitsuya, Eddy Arnold, and Masao Matsuoka. 2'-Deoxy-4'-C-ethynyl-2-halo-adenosines active against drug-resistant human immunodeficiency virus type 1 variants. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 40:2410-2420, 2008
- Satoshi Ueda, Manabu Kato, Shinsuke Inuki, Hiroaki Ohno, Barry Evans, Zi-xuan Wang, Stephen C. Peiper, Kazuki Izumi, Eiichi Kodama, Masao Matsuoka, Hideko Nagasawa, Shinya Oishi, Nobutaka Fujii. Identification of novel nonpeptide CXCR4 antagonists by ligand-based design approach. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 18:4124-4129, 2008
- Oishi S, Masuda R, Evans B, Ueda S, Goto Y, Ohno H, Hirasawa A, Tsujimoto G, Wang Z, Peiper SC, Naito T, Kodama E, Matsuoka M, Fujii N. Synthesis and Application of Fluorescein- and Biotin-labeled Molecular Probes for Chemokine Receptor CXCR4. *ChemBioChem* 9:1154-1158, 2008
- Hiroki Nishikawa, Eiichi Kodama, Ayako Sakakibara, Ayako Fukudome, Kazuki Izumi, Shinya Oishi, Nobutaka Fujii, Masao Matsuoka. Novel screening systems for HIV-1 fusion mediated by two extra-virion heptad repeats of gp41. *Antiviral Research* 80:71-76, 2008
- Hiroki Nishikawa; Shinya Oishi; Mizuno Fujita; Kentaro Watanabe; Rei Tokiwa; Hiroaki, Ohno; Eiichi Kodama; Kazuki Izumi; Keiko Kajiwara;

- Takeshi Naitoh; Masao Matsuoka; Akira Otaka; Nobutaka Fujii Identification of minimal sequence for HIV-1 fusion inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16:9184-9187, 2008
- 11) Eiichi Kodama, Masaya Orita, Naoyuki Masuda, Osamu Yamamoto, Masahiro Fujii, Tetsuro Ohgami, Shunji Kageyama, Mitsuaki Ohta, Toshifumi Hatta, Hiroshi Inoue, Hiroshi Suzuki, Kenji Sudo, Yasuaki Shimizu, and Masao Matsuoka Binding modes of the novel non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors, YM-215389 and YM-228855, to HIV-1 reverse transcriptase. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 19:133-141, 2008
  - 12) Hiroki Nishikawa, Shota Nakamura, Eiichi Kodama, Saori Ito, Keiko Kajiwara, Kazuki Izumi, Yasuko Sakagami, Shinya Oishi, Tadayasu Ohkubo, Yuji Kobayashi, Akira Otaka, Nobutaka Fujii, Masao Matsuoka Electrostatically constrained  $\alpha$ -helical peptide inhibits replication of HIV-1 resistant to enfuvirtide. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 41: 891-899, 2009
  - 13) Kazuki Izumi, Eiichi Kodama, Kazuya Shimura, Yasuko Sakagami, Kentaro Watanabe, Saori Ito, Tsuyoshi Watabe, Yukihiro Terakawa, Hiroki Nishikawa, Stefan G. Sarafianos, Kazuo Kitaura, Shinya Oishi, Nobutaka Fujii, Masao Matsuoka. Design of peptide-based inhibitors for HIV-1 strains resistant to T-20. *Journal of Biological Chemistry* 284: 4914-4920, 2009
  - 14) Takeshi Naito, Kazuki Izumi, Eiichi Kodama, Yasuko Sakagami, Keiko Kajiwara, Hiroki Nishikawa, Kentaro Watanabe, Stefan G. Sarafianos, Shinya Oishi, Nobutaka Fujii, Masao Matsuoka. SC29EK, a peptide fusion inhibitor with enhanced  $\alpha$ -helicity, inhibits replication of human immunodeficiency virus type 1 mutants resistant to enfuvirtide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53:1013-1018, 2009
  - 15) Mariko Ueno, Eiichi N. Kodama, Kazuya Shimura, Yasuteru Sakurai, Keiko Kajiwara, Yasuko Sakagami, Shinya Oishi, Nobutaka Fujii, Masao Matsuoka. Synonymous mutations in stem-loop III of Rev responsive elements enhance HIV-1 replication impaired by primary mutations for resistance to enfuvirtide. *Antiviral Research* 82:67-72, 2009
  - 16) Atsuko Hachiya, Kazuki Shimane, Stefan G. Sarafianos, Eiichi N. Kodama, Yasuko Sakagami, Fujie Negishi, Hirokazu Koizumi, Hiroyuki Gatanaga, Masao Matsuoka, Masafumi Takiguchi, Shinichi Oka. Clinical relevance of substitutions in the connection subdomain and RNase H domains of HIV-1 reverse transcriptase from a cohort of anti-retroviral treatment-naïve patients. *Antiviral Research* 82:115-121, 2009
  - 17) Shinya Oishi, Hirotaka Kamitani, Yasuyo Koder, Kentaro Watanabe, Kazuya Kobayashi, Tetsuo Narumi, Kenji Tomita, Hiroaki Ohno, Takeshi Naito, Eiichi Kodama, Masao Matsuoka and Nobutaka Fujii. Peptide bond mimicry by (*E*)-alkene and (*Z*)-fluoroalkene peptide isosteres: synthesis and bioevaluation of alpha-helical anti-HIV peptide analogues. *Organic & Biomolecular Chemistry* 7:2872-2877, 2009
  - 18) Shinya Oishi, Yasuyo Koder, Hiroki Nishikawa, Kamitani H, Tsuyoshi Watabe, Hiroaki Ohno, Tadafumi Tochikura, Kazuki Shimane, Eiichi Kodama, Masao Matsuoka, Fuminori Mizukoshi, Hajime Tsujimoto H, Nobutaka Fujii. Design and synthesis of membrane fusion inhibitors against the feline immunodeficiency virus. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17:4916-4920, 2009
  - 19) Tsuyoshi Watabe, Yukihiro Terakawa, Kentaro Watanabe, Hiroaki Ohno, Hiroaki Nakano, Toru Nakatsu, Hiroaki Kato, Kazuki Izumi, Eiichi Kodama, Masao Matsuoka, Kazuo Kitaura, Shinya Oishi, Nobutaka Fujii. X-ray Crystallographic Study of an HIV-1 Fusion Inhibitor with the gp41 S138A Substitution. *Journal of Molecular Biology* 392:657-665, 2009
  - 20) Michinori Tanaka, Kazumi Kajiwara, Rei Tokiwa, Kentaro Watanabe, Hiroaki Ohno, Hiroko Tsutsumi, Yoji Hata, Kazuki Izumi, Eiichi Kodama, Masao Matsuoka, Shinya Oishi, Nobutaka Fujii. Bioorganic Synthesis of End-capped Anti-HIV Peptides by Simultaneous Cyanocysteine-mediated Cleavages of Recombinant Proteins. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17:7487-7492, 2009
  - 21) Kazumi Kajiwara, Kentaro Watanabe, Rei Tokiwa, Tomoko Kurose, Hiroaki Ohno, Hiroko Tsutsumi, Yoji Hata, Kazuki Izumi, Eiichi Kodama, Masao Matsuoka, Shinya Oishi, and Nobutaka Fujii. Bioorganic Synthesis of a Recombinant HIV-1 Fusion Inhibitor, SC35EK, with an N-Terminal Pyroglutamate Capping Group. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17:7964-7970, 2009
  - 22) Eleftherios Michailidis, Bruno Marchand, Eiichi N. Kodama, Kamendra Singh, Masao Matsuoka, Karen A. Kirby, Emily M. Ryan, Ali M. Sawani, Eva Nagy, Noriyuki Ashida, Hiroaki Mitsuya, Michael A. Parniak, and Stefan G. Sarafianos. Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-doxyadenosine triphosphate, a translocation defective reverse transcriptase inhibitor. *Journal of Biological Chemistry* 284:35681-35691, 2009
  - 23) Tetsuo Narumi, Ryoko Hayashi, Kenji Tomita, Kazuya Kobayashi, Noriko Tanahara, Hiroaki Ohno, Takeshi Naito, Eiichi Kodama, Masao Matsuoka, Shinya Oishi, and Nobutaka Fujii. Synthesis and Biological Evaluation of Selective CXCR4 Antagonists Containing Alkene Dipeptide Isosteres. *Organic & Biomolecular Chemistry* 8:616-621, 2010