

201029017A

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

難治性HIV感染症に対する治療法開発の基礎的研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 滝口 雅文

平成23(2011)年 3月

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

難治性HIV感染症に対する治療法開発の基礎的研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 滝口 雅文

平成22(2011)年 3月

目 次

I. 総括研究報告書

- 難治性HIV感染症に対する治療法開発の基礎的研究1
研究代表者 滝口 雅文(熊本大学エイズ学研究センター センター長/教授)

II. 分担研究報告書

1. 細胞傷害性T細胞を用いた逃避ウイルスの抑制をめざした免疫治療の基礎研究.....6
滝口 雅文(熊本大学エイズ学研究センター センター長/教授)
2. 病態に影響を与える HLA 分子の解析10
瀧永 博之(国立国際医療センター エイズ治療・研究開発センター 治療開発室長)
3. HIV の薬剤耐性発現に抵抗する強力な抗 HIV 阻害剤の研究・開発と新しいクラスの
抗 HIV 阻害剤に対する薬剤耐性発現機序の解明.....12
天野 将之(熊本大学 エイズ学研究センター COEリサーチ・アソシエイト)
4. 新規作用機序, 特にウイルス遺伝子発現機構を標的とした抗エイズ薬に関する研究・18
- Cyclin T1 を標的とした抗 HIV-1 阻害剤の *in silico screening* -
馬場 昌範(鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 教授)
5. HIV の薬剤耐性機構.....25
松岡 雅雄(京都大学ウイルス研究所 教授)
6. HIV-1 の中和抵抗性メカニズムの解明とその克服に関する基礎研究.....29
松下 修三(熊本大学エイズ学研究センター 教授)
7. NK 細胞受容体を制御する効果的な HIV ペプチド ワクチン開発のための研究.....33
前仲 勝実(北海道大学大学院薬学研究院 教授)

III. 研究成果の刊行に関する一覧表36

IV. 研究成果の刊行物・別刷別添

I . 総括研究報告書

難治性HIV感染症に対する治療法開発の基礎的研究

研究代表者： 滝口 雅文（熊本大学 エイズ学研究センター センター長／教授）
研究分担者： 鴻永 博之（国立国際医療研究センター エイズ治療・研究開発センター 治療開発室医長）
天野 将之（熊本大学 エイズ学研究センター COE リサーチ・アソシエイト）
馬場 昌範（鹿児島大学 大学院医歯学総合研究科 教授）
松岡 雅雄（京都大学 ウイルス研究所 教授）
松下 修三（熊本大学 エイズ学研究センター 教授）
前仲 勝実（北海道大学 大学院薬学研究院 教授）

研究要旨：耐性ウイルス出現の機序の解明と耐性ウイルスを克服する新規薬剤の開発では、GRL-0519Aを開発し、薬剤耐性ウイルスに対して強い活性を示すことがあきらかになった。また cyclin T1 とのドッキングスコアが最適であると選別された 254 化合物から抗 HIV-1 活性を有する 3 種の化合物を同定した。細胞性免疫治療の研究では、新たに逃避変異ウイルスを認識し、逃避ウイルスに対する増殖抑制能を示す CTL を明らかにした。

A. 研究目的

HAART により、多くの HIV 患者の予後は改善されてきたが、耐性ウイルスの出現など多くの問題が生じており、HAART 療法に抵抗する難治性 HIV 感染症患者の治療が大きな課題になってきている。これらの研究の課題を解決するため、以下のような研究を行う。

柱1：耐性ウイルス出現の機序の解明と耐性ウイルスを克服する新規薬剤の開発

新たに臨床応用された薬剤に対する耐性出現の機序を解明し、さらに耐性ウイルスに対応できるような新規薬剤の開発が必須である。プロテアーゼ二量体阻害剤 darunavir は耐性が出にくいですが、この darunavir や新たな融合阻害剤などに対する耐性獲得の機序を解明する（天野・松岡）。さらにこれらの耐性ウイルスを克服する新たなプロテアーゼ二量体阻害剤や HIV-1 転写阻害活性を有する薬剤の開発を目指す（天野・馬場）。

柱2：免疫療法の開発を目指した基礎研究

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

B. 研究方法

柱1：耐性ウイルス出現の機序の解明と耐性ウイルスを克服する新規薬剤の開発

1) 耐性ウイルス出現の機序の解明：

1. プロテアーゼ阻害剤耐性機構の解明：プロテアーゼ (PR) 重合化に重要とされるアミノ酸、プロテアーゼ阻害剤(PDIs)耐性関連変異アミノ酸の詳細な解析を進め、PR 阻害への新たな機序、結晶構造解析、モデリングの手法を用いた PDIs と PR monomer subunit とを結合様式を明らかにする。

2. 融合阻害剤耐性機構の解明：融合活性を有するペプチド (SC34, SC34EK) に対する耐性 HIV-1 の gp120 領域内の耐性を明らかにし、薬剤感受性、複製能に与える影響を調べ、また次世代融合阻害剤間での交叉耐性を比較した。

2) 新規薬剤の開発：

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

1. 新規プロテアーゼ二量体阻害剤の開発：100 種に及ぶ新規・未報告の PDIs をデザイン・合成・同定しており、そのような PDIs を用いて結晶解析を基礎にした構造学的解析を通して新たな PDIs を合成する。

2. HIV-1 転写阻害活性を有する薬剤の開発：p-TEFb/Tat/TAR RNA が結合する部分に作用する薬剤を in silico による薬剤ライブラリーの中から選択、HIV 慢性感染細胞を用いて抗ウイルス効果を検証するとともに、宿主細胞遺伝子の発現に対する影響を解析した。

柱2：免疫療法の開発を目指した基礎研究

日本人のコホートで、HIV オーバーラップペプチドを用いて、エリスポットアッセイによりCTLの頻度を調べ、ウイルス抑制に関与するCTLとHLAを明らかにする。HIV replication suppression assayを用いて、新たに明らかにしたCTLから強いHIV増殖抑制をするCTLを明らかにする。さらに世界9か所の慢性感染者のコホートで、これらのCTLから免疫逃避する変異とその蓄積を明らかにする。またV3領域に対する中和抗体から逃避する変異エピトープの解析を行う。NK細胞のレセプターであるKIRが認識するHLA-C抗原に結合するHIV-1由来のペプチドを明らかにする。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

柱1：耐性ウイルス出現の機序の解明と耐性ウイルスを克服する新規薬剤の開発

1) 耐性ウイルス出現の機序の解明：

1. HIV-1はプロテアーゼ内部にアミノ酸変異を起こしてプロテアーゼ阻害剤 (PIs) に対する耐性を獲得するが、複数のPI耐性変異体の重感染と遺伝子相同組み換えが起こることで、ダルナビア (DRV) に対する高度耐性を獲得することを示した (天野：*J. Virol* 2010)。また amprenavir (APV) 高度耐性 HIV-1 変異株の Gag 領域に、プロテアーゼの耐性変異獲得と同時に起こったと思われる複数の non-cleavage site 変異を認めしたが、これらの変異はプロテアーゼのPIsに対する耐性獲得に関与していること、しかし複製能は低下していることが明らかになった。

2. 融合阻害剤耐性ウイルスのgp120の変異解析を行い、数種類の変異を明らかにした。これらの変異をpNL4-3およびgp41に変異を導入した感染性クローンに組み込み耐性度を調べた結果、gp41との変異と組み合わせることにより、耐性度が増加し、低下した複製能が改善した。更に次世代融合阻害剤間での交叉耐性を比較した結果、これらの薬剤間には異なる耐性プロファイルが存在することを示唆する結果を得た (松岡)。

2) 新規薬剤の開発：

1. oxatricyclic-THFという全く新しい構造を有し、DRV高度耐性株を含む複数の高度多剤耐性株に対し広いスペクトラムでの極めて高い抗ウイルス活性を維持し、またDRVよりも低濃度でプロテアーゼ二量体化阻害 (PDI) 活性を発揮する新規化合物、GRL-0519Aを開発・同定した (天野：

ChemMedChem, 5:1850-1854, 2010)。

2. *in silico*による薬剤ライブラリーのスクリーニングでドッキングスコアが最適な242種について、*in vitro*での抗HIV-1活性試験を行い、薬剤の抗HIV-1効果を検証した。その結果2種類の化合物に選択的な抗HIV-1活性を認めた。また、HIV-1潜伏感染細胞株とその親細胞株をTNF- α で刺激し、遺伝子発現をマイクロアレイ解析で調べたところ、刺激された潜伏感染細胞株のみで発現が増加する9個の宿主遺伝子を同定した (馬場)。

柱2：免疫療法の開発を目指した基礎研究

1. 強いHIV増殖抑制HLA-B*5101拘束性Pol283特異的CTLの免疫逃避変異を明らかにし、また世界9か所のコホートでこの逃避変異を含めて14種類の逃避変異の蓄積を明らかにした (滝口：*Nature* 2009)。さらに長期生存の血友病患者では、Pol283特異的CTLの逃避変異を認識できるCTLが存在することを示した (滝口：*J. Virol* 2010)。一方、新たに日本人のコホートで数種類の逃避エピトープの出現を確認した (滝口：*EJI* 2011 他)。更に逃避変異エピトープを認識するCTLを明らかにした。

2. 日本人345人の無治療慢性HIV-1感染者におけるHIV-1特異的CTL応答を解析したところ、GagとPolにおける反応性がNefよりも有意に高く、低ウイルス量と高CD4T細胞数に有意に関連していたが、Nefでは相関が見られなかった (瀧永・滝口)。これらのことから、GagとPolに対するCTLが、HIV-1増殖抑制に重要と考えられた。

3. HIV-1BAL株が、抗V3抗体に対する耐性を獲得する過程で変異・糖鎖の付加がおり、この変異ウイルスのfitness低下を伴うため、これを補う新たな変異が選択されることを証明した (松下：*J. General Virol.* 2010)。また非サブタイプBウイルスに反応する中和単クローン抗体を分離した (松下)。

4. HLA-Cに結合する複数のHIVペプチドを同定した。これらのペプチドを結合させたHLA-C抗原は、活性型レセプターより抑制型レセプターに強く結合した (前仲)。

D. 考察

柱1の耐性ウイルス出現の機序の解明では、PR阻害剤と融合阻害剤で新たな耐性機構の解明ができた。一方薬剤開発では、新たにPR阻害剤であるGRL-0519Aを開発できたが、今後動物実験などによる安全性などの検証が前臨床試験として必要である。

柱2では、現在流行しているHIV-1は免疫逃避

変異を蓄積していることを示し、逃避変異ウイルスを認識する CTL の存在とそれによる逃避変異 HIV-1 の増殖抑制を示す CTL の存在を明らかにした。逃避変異ウイルスに対する新たな免疫療法の可能性を示した。今後さらに日本人のコホートを用いて、多数の CTL エピトープの同定、その CTL の HIV 増殖抑制能の解析、免疫逃避変異の解析が必要である。

自己評価

1) 達成度について

耐性ウイルスの出現機序の研究では、Gag 領域変異が、プロテアーゼの PIs に対する耐性獲得に関与していることおよび複製能の低下に関与していることを、また融合阻害剤では耐性獲得に gp120 と gp41 の両方での変異が重要であることを新たに証明し、この分野の研究で大きく進展した。また、新薬開発の分野の研究においても、ダルナビアに続く強力な PI の候補を同定し、大きな成果が得られた。一方、免疫療法の開発の基礎研究では、現在流行している HIV-1 は免疫から逃避するように進化し逃避変異を蓄積していることを示し、更に逃避変異を認識し逃避変異ウイルスの増殖を抑制する CTL の存在を明らかにし、新たな免疫治療法の開発の可能性を示せた。その他の研究についても概ね順調に進んでおり、本研究の全体の進展度としては予想以上のものであった。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

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

3) 今後の展望について

柱1では、新たな薬剤の開発を目指していくつかの候補を同定した。これらは、臨床試験に入る新たな候補薬剤として期待できる。柱2では、CTL から逃避する変異を持ったウイルスが蓄積することを世界的レベルで明らかにし、逃避変異ウイルスを認識できる CTL の存在を明らかにした。多数のコホートを用いた多数の CTL 解析を行い、有益な CTL を同定することにより、これらを用いた新たな治療法の開発が期待できる。

E. 結論

1) Gag 領域変異が、プロテアーゼの PIs に対する耐性獲得と複製能の低下に関与していることを、また融合阻害剤では耐性獲得に gp120 と gp41 の両方での変異が重要であることを示した。

2) 新たに PR 阻害剤である GRL-0519A を開発した。

3) p-TEFb/Tat/TAR RNA 複合体の形成を阻害する薬剤の同定した結果、抗 HIV-1 作用を持った化学構造が全く異なる 2 種類の化合物を同定した。

4) HIV-1 が免疫逃避するように進化していることを明らかにし、一方、免疫逃避ウイルスを抑制する CTL の存在を示した。

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

6) 非サブタイプ B ウイルスに反応する中和単クローン抗体を分離した。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

研究代表者

滝口雅文

- 1) Honda K, Zheng N, Murakoshi H, Hashimoto M, Sakai K, Borghan MA, Chikata T, Koyanagi M, Tamura Y, Gatanaga H, Oka S, Takiguchi M. Selection of escape mutant by HLA-C-restricted HIV-1 Pol-specific cytotoxic T lymphocytes carrying strong ability to suppress HIV-1 replication. *Eur J Immunol*. 41: 97-106, 2011
- 2) Watanabe T, Murakoshi H, Gatanaga H, Koyanagi M, Oka S, Takiguchi M. Effective recognition of HIV-1-infected cells by HIV-1 integrase-specific HLA-B*4002-restricted T cells. *Microbes Infect*. 13: 160-166, 2011
- 3) Gatanaga H, Ode H, Hachiya A, Hayashida T, Sato H, Takiguchi M, Oka S. Impact of human leukocyte antigen-B*51-restricted cytotoxic T-lymphocyte pressure on mutation patterns of nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance. *AIDS*. 24:F15-22, 2010
- 4) Koizumi H, Hashimoto M, Fujiwara M, Murakoshi H, Chikata T, Borghan MA, Hachiya A, Kawashima Y, Takata H, Ueno T, Oka S, Takiguchi M. Different in vivo effects of HIV-1 immunodominant epitope-specific CTLs on selection of escape mutant viruses. *J Virol*. 84:5508-5519, 2010
- 5) Kawashima Y, Kuse N, Gatanaga H, Naruto T, Fujiwara M, Dohki S, Akahoshi T, Maenaka K, Goulder P, Oka S, Takiguchi M. Long-term control of HIV-1 in hemophiliacs carrying slow-progressing allele HLA-B*5101. *J Virol*. 84:7151-7160, 2010
- 6) Hashimoto M, Kitano M, Honda K, Koizumi H, Dohki S, Oka S, Takiguchi M. Selection of escape mutation by Pol154-162-specific cytotoxic T cells among chronically

HIV-1-infected HLA-B*5401-positive individuals.

Hum Immunol. 71:123-127, 2010

研究分担者

瀧永博之

- 1) Watanabe T, Murakoshi H, Gatanaga H, Koyanagi M, Oka S, and Takiguchi M. Effective recognition of HIV-1-infected cells by HIV-1 integrase-specific HLA-B*4002-restricted T cells. *Microbes and Infection* 13: 160-166, 2011
- 2) Gatanaga H, Ode H, Hachiya A, Hayashida T, Sato H, Takiguchi M, Oka S. Impact of human leukocyte antigen-B*51-restricted cytotoxic T-lymphocyte pressure on mutation patterns of nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance. *AIDS*. 24: F15-22, 2010.
- 3) Kawashima Y, Kuse N, Gatanaga H, Naruto T, Fujiwara M, Dohki S, Akahoshi T, Maenaka K, Goulder P, Oka S, Takiguchi M. Long-term control of HIV-1 in hemophiliacs carrying slow-progressing allele HLA-B*5101. *J Virol.* 84:7151-7160, 2010
- 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.* 88: 72-9, 2010
- 5) Tanuma J, Hachiya A, Ishigaki K, Gatanaga H, Lien TT, Hien ND, Kinh NV, Kaku M, Oka S. Impact of CRF01_AE-specific polymorphic mutations G335D and A731V in the connection subdomain of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase (RT) on susceptibility to nucleoside RT inhibitors. *Microbes and Infection* 12: 1170-7, 2010

馬場昌範

- 1) Aoyama H, Baba M, Hashimoto Y. Nitrogen-containing fused-heteroaromatic compounds as anti-bovine viral diarrhoea (BVDV) agents. *Curr. Bioact. Compd.* 6: 118-128 (2010).
- 2) Nakamura M, Aoyama A, Salim MTA, Okamoto M, Baba M, Miyachi H, Hashimoto Y, Aoyama H. Structural development studies of anti-hepatitis C virus agents with a phenanthridinone skeleton. *Bioorg. Ned. Chem.* 18: 2402-2411 (2010).
- 3) Salim MTA, Okamoto M, Hosoda S, Aoyama H, Hashimoto Y, Baba M. Anti-bovine viral diarrhoea virus activity of novel diphenylmethane derivatives. *Antiviral Chem. Chemother.* 20: 193-200 (2010).

- 4) Hamasaki T, Uto T, Akagi T, Akashi M, Baba M. Modulation of gene expression related to Toll-like receptor signaling in dendritic cells by poly(γ -glutamic acid) nanoparticles. *Clin. Vaccine Immunol.* 17: 748-756 (2010).
- 5) Himeno A, Akagi T, Uto T, Wang X, Baba M, Ibuki K, Matsuyama M, Horiike M, Igarashi T, Miura T, Akashi M. Evaluation of the immune response and protective effects of rhesus macaques vaccinated with biodegradable nanoparticles carrying gp120 human immunodeficiency virus. *Vaccine* 28: 5377-5385 (2010).
- 6) Misawa T, Salim MTA, Okamoto M, Baba M, Aoyama H, Hashimoto Y, Sugita K. Synthesis and anti-hepatitis C virus activity of morpholino triazine derivatives. *Heterocycles* 81: 1419-1426 (2010).
- 7) Salim MTA, Goto Y, Hamasaki T, Okamoto M, Aoyama H, Hashimoto Y, Musiu S, Paeshuyse J, Neyts J, Froeyen M, Herdewijn P, Baba M. Highly potent and selective inhibition of bovine viral diarrhoea virus replication by γ -carboline derivatives. *Antiviral Res.* 88: 263-268 (2010).

松岡雅雄

- 1) Izumi K, Nakamura S, Nakano H, Shimura K, Sakagami Y, Oishi S, Uchiyama S, Ohkubo T, Kobayashi Y, Fujii N, Matsuoka M, Kodama E. Characterization of HIV-1 resistance to a fusion inhibitor, N36, derived from the gp41 amino terminal heptad repeat. *Antiviral Res* 87: 179-86, 2010.
- 2) Shimane K, Kodama EN, Nakase I, Futaki S, Sakurai Y, Sakagami Y, Li X, Hattori T, Sarafianos SG, Matsuoka M. Rev-derived peptides inhibit HIV-1 replication by antagonism of Rev and a co-receptor, CXCR4. *Int J Biochem Cell Biol.* 42:1482-8, 2010.
- 3) Shimura K, Nameki D, Kajiwara K, Watanabe K, Sakagami Y, Oishi S, Fujii N, Matsuoka M, Sarafianos SG, Kodama E. Resistance profiles of novel electrostatically HIV-1 fusion inhibitors. *J Biol Chem*, 285: 39471-80, 2010.

松下修三

- 1) Narumi T, Ochiai C, Yoshimura K, Harada S, Tanaka T, Nomura W, Arai H, Ozaki T, Ohashi N, Matsushita S, Tamamura H. CD4mimics targeting the HIV entry mechanism and their hybrid molecules with a CXCR4 antagonist. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20:5853-5858, 2010.
- 2) Yoshimura K, Harada S, Shibata J, Hatada M, Yamada Y, Ochiai C, Tamamura H, Matsushita S. Enhanced exposure of human immunodeficiency virus type 1 primary isolate neutralization epitopes through binding of CD4 mimetic compounds. *J Virol*, 84:7558-7568, 2010.
- 3) Hatada M, Yoshimura K, Harada S, Kawanami Y,

Shibata J, Matsushita S. HIV-1 evasion of a neutralizing anti-V3 antibody involves acquisition of a potential glycosylation site in V2. *J Gen Virol*, 91: 1335-1345, 2010.

- 4) Yamada Y, Ochiai C, Yoshimura K, Tanaka T, Ohashi N, Narumi T, Nomura W, Harada S, Matsushita S, Tamamura H. CD4 mimics targeting the mechanism of HIV entry. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20: 354-358, 2010.

天野将之

- 1) Ide K, Aoki M, Amano M, Koh Y, Yedidi RS, Das D, Leschenko S, Chapsal B, Ghosh AK, Mitsuya H (2011) Novel HIV-1 protease inhibitors (PIs) containing a bicyclic P2 functional moiety, tetrahydropyrano-tetrahydrofuran, that are potent against multi-PI-resistant HIV-1 variants. *Antimicrob Agents Chemother*. In press.
- 2) Ghosh AK, Martyr CD, Steffey M, Wang YF, Agniswamy J, Amano M, Weber IT, Mitsuya H. (2011) Design, Synthesis, and X-ray structure of substituted bis-tetrahydrofuran (bis-THF)-derived potent HIV-1 protease inhibitors. *ACS Med Chem Lett*. In press.
- 3) Ghosh AK, Chapsal BD, Baldrige A, Steffey MP, Walters DE, Koh Y, Amano M, Mitsuya H. (2011) Design and synthesis of potent HIV-1 protease inhibitors incorporating Hexahydrofurofuranol-derived high affinity P(2) ligands: structure-activity studies and biological evaluation. *J Med Chem*. 27;54(2):622-634.
- 4) Ghosh AK, Xu CX, Rao KV, Baldrige A, Agniswamy J, Wang YF, Weber IT, Aoki M, Miguel SG, Amano M, Mitsuya H. (2010) Probing multidrug-resistance and protein-ligand interactions with oxatricyclic designed ligands in HIV-1 protease inhibitors. *ChemMedChem*. 5:1850-1854
- 5) Koh Y, Amano M, Towata T, Danish M, Leshchenko-Yashchuk S, Das D, Nakayama M, Tojo Y, Ghosh AK, Mitsuya H. (2010) In vitro selection of highly darunavir-resistant and replication-competent HIV-1 variants using a mixture of clinical HIV-1 isolates resistant to multiple conventional protease inhibitors. *J Virol*. 84: 11961-11969.
- 6) Tojo Y, Koh Y, Amano M, Aoki M, Das D, Kulkarni S, Anderson DD, Ghosh AK, Mitsuya H. (2010) Novel protease inhibitors (PIs) containing macrocyclic components and 3(R),3a(S),6a(R)-bis-tetrahydro-furanyl-urethane that are potent against multi-PI-resistant HIV-1 variants in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*. 54:3460-3470.
- 7) Ghosh AK, Gemma S, Simoni E, Baldrige A, Walters DE, Ide K, Tojo Y, Koh Y, Amano M, Mitsuya H. (2010) Synthesis and biological

evaluation of novel allophenylnorstatine-based HIV-1 protease inhibitors incorporating high affinity P2-ligands. *Bioorg Med Chem Lett*. 20:1241-1246.

前仲 勝実

- 1) Kawashima Y, Kuse N, Gatanaga H, Naruto T, Fujiwara M, Dohki S, Akahoshi T, Maenaka K, Goulder P, Oka S, Takiguchi M. Long-term control of HIV-1 in hemophiliacs carrying slow-progressing allele HLA-B*5101. *J Virol*. 84, 7151-60, 2010

2. 学会発表

各分担研究報告書に記載

H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得

各分担研究報告書に記載

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し

Ⅱ. 分担研究報告書

細胞傷害性T細胞を用いた逃避ウイルスの抑制をめざした免疫治療の基礎研究

研究分担者 滝口 雅文（熊本大学エイズ学研究センター ウイルス制御分野 教授）

研究協力者 岡 慎一（国立国際医療研究センター エイズ治療・研究開発センター センター長）

研究要旨 HLA-B*24:02 拘束性 Gag28-37 特異的 CTL の逃避変異である Gag28-3R に対して交差反応する CTL が見られたが、WT ウイルスや 3R 変異ウイルスを感染させた細胞に対する細胞傷害活性、ウイルス増殖抑制能は低下していた。一方、HLA-B*48:01 拘束性 Pol154-162 特異的 CTL から逃避するエピトープ（7D）を認識する新たな CTL クローンを樹立した。この CTL クローンが、WT ウイルスや 7D ウイルスの増殖抑制能があることを明らかにした。これらの CTL の患者内での HIV-1 抑制能がある可能性が示唆された。

A. 研究目的

最近の我々の研究により、いくつかの強い HIV 増殖抑制能をもった CTL からの逃避するウイルスの蓄積が世界的レベルで明らかになった。これは、単に HIV-1 の増殖抑制能をもつ CTL では治療法が困難なことを示している。そこで、既に知られている逃避変異エピトープに対する新たな CTL の誘導がどの程度起きているかを調べた。また新たな逃避変異エピトープの同定を試みた。

B. 研究方法

1. HLA-A*24:02 拘束性 Gag28-36 特異的 CTL の逃避変異の解析

HLA-A*24:02 をもった HIV-1 慢性感染患者 PBMC から Gag28-36 ペプチドで特異的 CTL を誘導し、限界希釈法により特異的 CTL クローンを作成する。これらの bulk T 細胞および CTL クローンの抗原特異性を Gag28-36 ペプチドおよび Gag28-3R 変異ペプチドを用いて解析する。さらに Gag28-3R 変異を持った NL-432 ウイルスを作製して、感染細胞に対する細胞傷害活性を調べる。

2. Pol154-162-7D 逃避変異に対する CTL の認識

アジア人特に日本人に多い HLA アリールである HLA-B*54:01 に拘束性するエピトープである Pol154-162 の逃避変異 7D に関して、特異的 CTL の認識を、CTL クローンを作製して調べた。

（倫理面への配慮）

患者の血液の使用については、インフォームドコンセントをおこない書面にて承諾を得た。さらに、国立国際医療センターおよび熊本大学の倫理委員会での承認を得た。

C. 研究結果

1. HLA-A*24:02 拘束性 Gag28-36 特異的 CTL の逃避変異の解析

Gag28-36 の部位がワイルドタイプのウイルスに感染した患者 KI-092 の PBMC から誘導した特異的 CTL は、ワイルドタイプの Gag28-36 ペプチド（WT）をパルスした細胞に対しては強い細胞傷害活性を示したが、逃避変異ペプチドをパルスした細胞に対しては極めて弱い細胞傷害を示した。一方、3R 変異ウイルスに感染した患者 KI-091 からの PBMC から誘導した特異的 CTL は、ワイルドタイプの Gag28-36 ペプチド（WT）をパルスした細胞に対しては同程度の強い細胞傷害活性を示し、また逃避変異ペプチドをパルスした細胞に対しても同程度の細胞傷害を示した（図1）。更にこれらの患者から樹立した CTL クローンを用いて、同様に WT と 3R に対するペプチドをパルスした細胞に対する細胞傷害活性を調べたところ、同様な活性が見られた（図2）。更にこれらの CTL クローンの WT と 3R ウイルスを感染させた細胞に対する細胞傷害活性を調べたところ、KI-092 から確立した CTL クローンは、WT 感染細胞のみに強い細胞傷害活性を示したが、

3R ウイルスを感染させた細胞には細胞傷害活性を示さなかった。一方、KI-091 から確立した CTL クローンは、両方のウイルス感染細胞に対して細胞傷害活性を示した (図 2)。更にこれらの CTL クローンの、HIV-1 増殖抑制能を調べたところ、KI-092 から樹立した CTL クローンは、WT ウイルスに対して強い増殖抑制能を示したが、3R ウイルスに対しては増殖抑制能を示さなかった。一方、KI-091 から樹立した CTL クローンは、WT ウイルスに対して弱い増殖抑制能を示したが、3R ウイルスに対しては増殖抑制能を示さなかった (図 2)。

一方他の HLA-A*24:02 を持ったこのエピトープの認識を調べたところ、3R ウイルスに感染した患者を調べたところ、3名の患者で 3R 特異的 CTL の誘導がされていることが明らかになった。

図 1. Gag28-36 特異的 bulk CTL の 3R 変異 peptide に対する認識

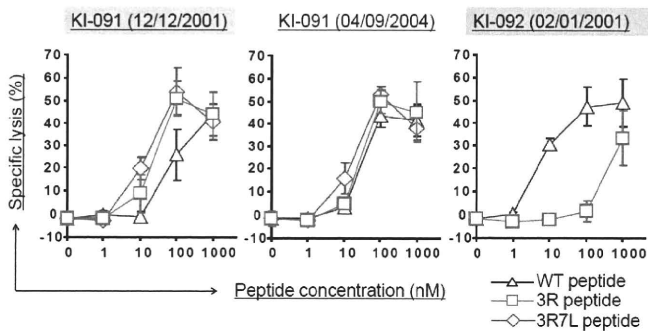
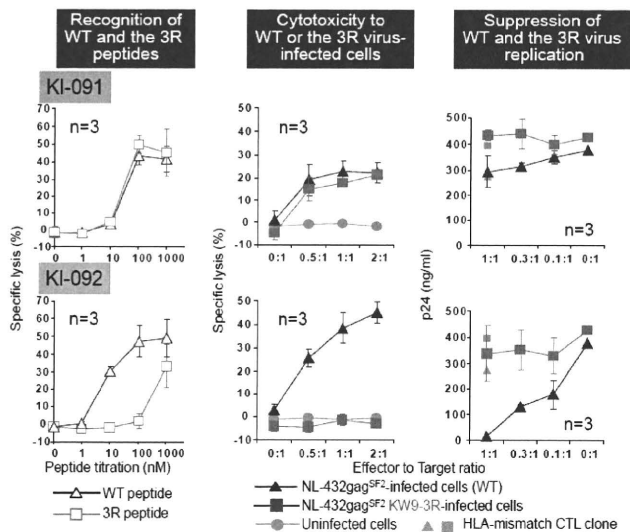


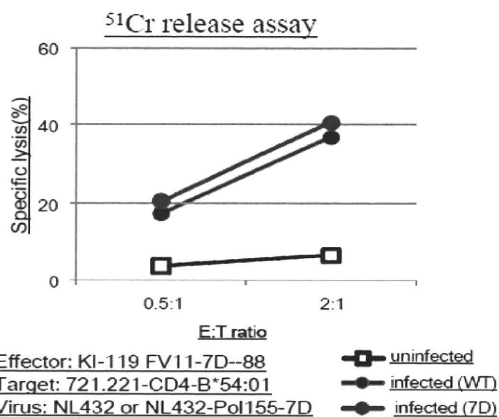
図 2. Gag28-36 特異的 CTL clone の 3R 変異に対する認識



2. HLA-B*54:01 拘束性 Pol154-162-7D 逃避変異エピトープを認識する CTL の解析

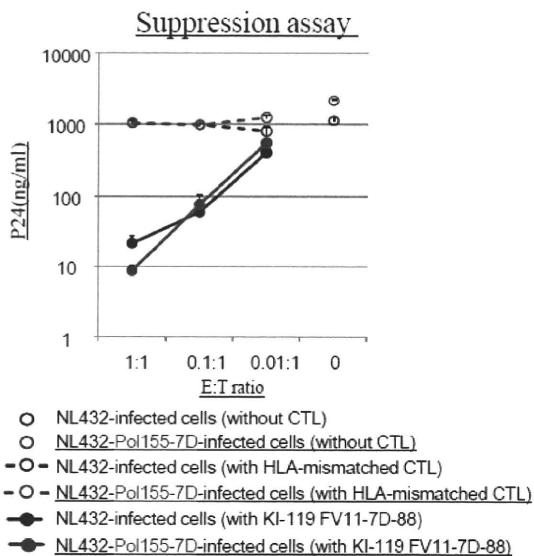
HLA-B*54:01 陽性の患者 (KI-119) から樹立した Pol154-162 特異的 CTL クローンの HIV-1 感染細胞に対する CTL 活性を調べた。様々なパターンのもが見られたが、そのうち KI-119 から樹立したのものには、WT ウイルス感染細胞だけでなく 7D 変異ウイルスに感染細胞の両方を傷害するクローンが見られた (図 3)。

図 3. Pol154-162 特異的 CTL クローンの HIV-1 感染細胞に対する細胞傷害活性



この CTL クローンの HIV-1 増殖抑制能を調べたところ、WT ウイルスおよび 7D ウイルスの増殖抑制能を確認できた。

図 4. Pol154-162 特異的 CTL クローンの HIV-1 増殖抑制



D. 考察

我々は Gag28-36-3R を認識する CTL は、3R 変異ウイルスに対しての細胞傷害活性は認められるも、3R ウイルスのウイルス増殖抑制能を有していないことを明らかにした。この違いは、細胞傷害性活性の測定は HLA-A*24:02 遺伝子を導入した HLA-A*24:02 高発現細胞を標的細胞として用いているが、ウイルス増殖抑制試験は末梢血から分離した HLA クラス I 抗原の低発現である CD4T 細胞を用いたからと考えられる。実際体内の状況を反映しているのは、ウイルス増殖抑制試験の方と考えられることから、この CTL による 3R 逃避変異ウイルスの抑制は有効的なレベルまではおきていないと考えられる。

HLA-B*5401 拘束性 Pol154-162 特異的 CTL クローンの解析で、WT ウイルス感染細胞だけでなく 7D 変異ウイルスに感染細胞にも細胞傷害活性を有するクローンが見られた。このクローンは更に、WT ウイルスおよび 7D ウイルスに対して増殖抑制能を有することが明らかになった。これらの CTL は体内で逃避変異ウイルスを抑制する可能性が示唆された。

E. 結論

1. Gag28-36-3R を認識する CTL は、3R 変異ウイルスに対しての細胞傷害活性は認められるも、3R ウイルスのウイルス増殖抑制能を有していないことが明らかになった。
2. HLA-B*5401 拘束性 Pol154-162 特異的 CTL クローンで、WT ウイルス感染細胞だけでなく 7D 変異ウイルスに感染細胞にも細胞傷害活性を有するクローンが見つかった。

F. 健康危惧情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hashimoto, M., Kitano, M., Honda, K., Koizumi, H., Dohki, S., **Oka, S.**, and **Takiguchi, M.** Selection of escape mutation by Pol154-162-specific cytotoxic T cells among chronically HIV-1-infected HLA-B*5401-positive individuals. **Hum. Immunol.** 71: 123-127, 2010

- 2) Gatanaga, H., Ode, H., Hachiya, A., Hayashida, T., Sato, H., **Takiguchi, M.**, and **Oka, S.** Impact of human leukocyte antigen-B*51-restricted cytotoxic T-lymphocyte pressure on mutation patterns of nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance. **AIDS** 24:F15-22, 2010
- 3) Sakai, K., Gatanaga, H., Takata, H., **Oka, S.**, and **Takiguchi, M.** Comparison of CD4⁺ T-cell-subset distribution in chronically infected HIV⁺ patients with various CD4 nadir counts. **Microbes Infect.** 12:374-381, 2010
- 4) Koizumi, H., Hashimoto, M., Fujiwara, M., Murakoshi, H., Chikata, T., Borghan M. A., Hachiya, A., Kawashima, Y., Takata, H., Ueno, T., **Oka, S.**, and **Takiguchi, M.** Different *in vivo* effects of HIV-1 immunodominant epitope-specific CTLs on selection of escape mutant viruses. **J. Virol.** 84:5508-5519, 2010
- 5) Kawashima, Y., Kuse, N., Gatanaga, H., Naruto, T., Fujiwara, M., Dohki, S., Akahoshi, T., Maenaka, K., Goulder, P., **Oka, S.**, and **Takiguchi, M.** Long-term control of HIV-1 in hemophiliacs carrying slow-progressing allele HLA-B*5101. **J. Virol.** 84:7151-7160, 2010
- 6) Honda, K., Zheng, N., Murakoshi, H., Hashimoto, M., Sakai, K., Borghan, MA., Chikata, T., Koyanagi, M., Tamura, Y., Gatanaga, H., **Oka, S.**, and **Takiguchi, M.** Selection of escape mutant by HLA-C-restricted HIV-1 Pol-specific cytotoxic T lymphocytes carrying strong ability to suppress HIV-1 replication. **Eur. J. Immunol.** 41: 97-106, 2011
- 7) Watanabe, T., Murakoshi, H., Gatanaga, H., Koyanagi, M., **Oka, S.**, and **Takiguchi, M.** Effective recognition of HIV-1-infected cells by HIV-1 integrase-specific HLA-B*4002-restricted T cells. **Microbes and Infection** 13: 160-166, 2011

2. 学会発表 (国際学会のみ記載)
- 1) Kuse, N., Kawashima, Y., Gatanaga, H., Naruto, T., **Oka, S.**, and **Takiguchi, M.** Long term control of HIV-1 replication by Pol283-8-specific CTLs in HLA-B*5101+ solw progressors, 14th International Congress of Immunology (Kobe, Japan) August 22-27, 2010
 - 2) Honda, K., Zheng, N., Hashimoto, M., Sakai, K., Chikata, T., Tamura, Y., Borgham, MA., Gatanaga, H., **Oka, S.**, and **Takiguchi, M.** Selection of escape mutant by HLA-C-restricted HIV-1 Pol-specific cytotoxic T lymphocytes having a strong ability to suppress HIV-1 replication, 14th International Congress of Immunology (Kobe, Japan) August 22-27, 2010
 - 3) Honda, K., Zheng, N., Murakoshi, H., Hashimoto, M., Sakai, K., Koyanagi, M., Chikata, T., Tamura, Y., Borgham MA., Gatanaga, H., **Oka, S.**, and **Takiguchi, M.** Selection of HIV-1 escape mutant by HLA-C-restricted cytotoxic T lymphocytes having a strong ability to suppress HIV-1 replication, AIDS Vaccine 2010 (Atlanta, USA) September 28-October 1, 2010
 - 4) **Takiguchi, M.** AIDS Vaccine Development : The Present and Future The 19th Symposium on the International Medical Cooperation “Vaccine save our century” (Tokyo, Japan), November 19, 2010
 - 5) **Takiguchi, M.** Recognition and selection of HIV-1 escape mutations by CTL, International Symposium “Virus, host, and disease” (Kyoto, Japan), March 11, 2011
 - 6) Murakoshi, M., Gatanaga, H., Koyanagi, M., **Oka, S.**, and **Takiguchi, M.** Comprehensive analysis of HIV-1-specific CD8+ T cell responses in chronically HIV-1-infected Japanese cohort, Keystone symposia – Protection from HIV: Targeted Intervention Strategies (Whistler, Canada) March21-25, 2011
 - 7) Koyanagi, M., Matthews, PC., Gatanaga, H., **Oka, S.**, Harndahl, M., Carlson, J., Payne, RP., Kloverpris, H., Ndung’u, T., Chen, F., Riddell, L., Luzzi, G., Buus, S., Shapiro, R., Heckerman, D., **Takiguchi, M.**, and Goulder, PJR. HLA-B*3501 is associated with different outcomes in HIV-1 according to the clade of infection, Keystone symposia – Protection from HIV: Targeted Intervention Strategies (Whistler, Canada) March21-25, 2011
 - 8) Akahoshi, T., Gatanaga, H., **Oka, S.**, and **Takiguchi, M.** Antiviral activities of HIV-1-specific T lymphocytes cross-recognizing an escape mutation, Keystone symposia – Protection from HIV: Targeted Intervention Strategies (Whistler, Canada) March21-25, 2011
 - 9) Chikata, T., Hashimoto, M., Tamura, Y., Naruto, T., Borghan, MA., Gatanaga, H., **Oka, S.**, and **Takiguchi, M.** HLA-Associated Viral Polymorphism in Chronically HIV-1-Infected Japanese Cohort, Keystone symposia – HIV Evolution, Genomics and Pathogenesis (Whistler, Canada) March21-25, 2011
- H. 知的所有権の出願・取得状況
該当なし

病態に影響を与える HLA 分子の解析

研究分担者 湯永 博之 国立国際医療研究センター エイズ治療・研究開発センター 治療開発室医長
研究協力者 村越 勇人 熊本大学エイズ学研究センター 研究員
小柳 円 熊本大学エイズ学研究センター 特任助教
岡 慎一 国立国際医療研究センター エイズ治療・研究開発センターセンター長
滝口 雅文 熊本大学エイズ学研究センター 教授

研究要旨 細胞傷害性 T 細胞 (CTL) は HIV 感染のコントロールに重要な役割を果たしており、CTL の解析を行うことは AIDS 発症機構の解明や AIDS ワクチンの開発にとってきわめて重要であると考えられる。アジアではこのような解析はまだ行われていない。そこで本研究では、昨年度に引き続き、日本の無治療慢性 HIV-1 感染者における HIV-1 特異的 CTL 応答の magnitude と breadth の解析を行い、345 人の患者データを獲得した。HIV-1 特異的 CTL 反応は、nef、gag、pol 領域を網羅した 11-mer overlapping peptide cocktail に対する CD8T 細胞の反応を IFN- γ ELISPOT assay 法によって測定することで評価した。nef、gag、pol 領域に対する CTL 反応の total magnitude を解析した結果、gag と pol における total magnitude が nef よりも有意に高いことが示された。Pol 特異的および Gag 特異的 CD8 T 細胞反応の total magnitude は、低いウイルス量ならびに高い CD4T 細胞数と有意に相関 ($P < 0.0001$) していた。日本人感染者では Gag および Pol 特異的 CTL が HIV-1 感染のコントロールに大きく影響していると考えられた。

A. 研究目的

細胞傷害性 T 細胞 (CTL) は HIV 感染のコントロールに重要な役割を果たしており、CTL の解析を行うことは AIDS 発症機構の解明や AIDS ワクチンの開発にとってきわめて重要であると考えられる。Philip Goulder らのグループが南アフリカの約 600 人の HIV-1 感染者における HIV-1 特異的 CTL 反応の解析を行った結果、gag に対する反応が最も強く起っており、この反応が HIV-1 増殖抑制に関連していることが示された (Nat. Med. 2007;13 46-53)。しかしながら、アジアではこのような解析はまだ行われていない。そこで本研究では、日本の 345 人の無治療慢性 HIV-1 感染者における HIV-1 特異的 CTL 応答の magnitude と breadth の解析を行った。

B. 研究方法

HIV-1 特異的 CTL 反応は、nef、gag、pol 領域を網羅した 11-mer overlapping peptide cocktail に対す

る CD8T 細胞の反応を IFN- γ ELISPOT assay 法によって測定することで評価した。

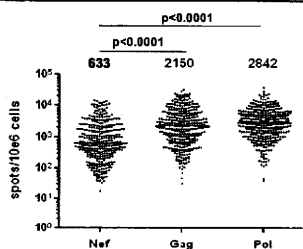
(倫理面への配慮)

国立国際医療センターの症例の CTL 反応を解析した。HLA の解析と CTL 反応の解析について、倫理委員会で承認を得た。患者の理解と協力を得るため、研究の必要性和意義について十分に説明し、それぞれの施設の倫理規定に従い同意書に自筆のサインを得た。サインが得られた同意文書はカルテに綴じ込み保存した。個人情報を守るため、個人を特定できるような情報は外部には出さない。

C. 研究結果

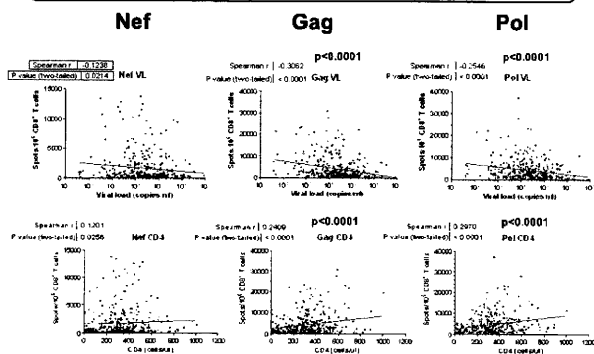
nef、gag、pol 領域に対する CTL 反応の total magnitude を解析した結果、Gag (Median: 2,150 spots/ 10^6 cells、 $p < 0.0001$) と Pol (2,842、 $p < 0.0001$) における total magnitude が Nef (633) よりも有意に高いことが示された (図 1)。

図1 Total magnitudes of CD8T cell responses against peptide cocktails in Nef, Gag, or Pol regions



Pol 特異的 CD8T 細胞反応の total magnitude は低いウイルス量 ($r = -0.254$, $p = 0.0001$) (図 2) ならびに高い CD4T 細胞数 ($r = 0.2970$, $p < 0.0001$) (図 2) と有意に相関していた。また Gag 特異的 CD8T 細胞反応の total magnitude は低いウイルス量 ($r = -0.3062$, $p = 0.0001$) (図 2) ならびに高い CD4T 細胞数 ($r = 0.2409$, $p < 0.0001$) (図 2) と有意に相関していた。一方、Nef 特異的 CD8T 細胞反応は相関がみられなかった。

図2 Correlation between the total magnitude of CD8 T cell responses to Nef, Gag, or Pol cocktails and viral load, CD4 count



D. 考察

これらの結果から、日本人 HIV-1 感染者では Pol および Gag 特異的 CTL が HIV-1 感染のコントロールに大きく影響していると考えられた。

E. 結論

3 年計画の 2 年目であるが、3 4 5 名の患者の解析が終わり、順調な結果が得られていると言える。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kawashima Y*, Kuse N*, Gatanaga H*, Naruto T, Fujiwara M, Dohki S, Akahoshi T, Maenaka K, Goulder P, Oka S, and Takiguchi M. Long-term

control of HIV-1 in hemophiliacs carrying slow-progressing allele HLA-B*5101. *J. Virol.* 84:7151-7160, 2010 (*equally contributed)

- 2) Honda K, Zheng N, Murakoshi H, Hashimoto M, Sakai K, Borghan MA, Chikata T, Koyanagi M, Tamura Y, Gatanaga H, Oka S, and Takiguchi M. Selection of escape mutant by HLA-C-restricted HIV-1 Pol-specific cytotoxic T lymphocytes carrying strong ability to suppress HIV-1 replication. *Eur. J. Immunol.* 41: 97-106, 2011

- 3) Watanabe T, Murakoshi H, Gatanaga H, Koyanagi M, Oka S, and Takiguchi M. Effective recognition of HIV-1-infected cells by HIV-1 integrase-specific HLA-B*4002-restricted T cells. *Microbes and Infection* 13: 160-166, 2011

- 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.* 88: 72-9, 2010

- 5) Tanuma J, Hachiya A, Ishigaki K, Gatanaga H, Lien TT, Hien ND, Kinh NV, Kaku M, Oka S. Impact of CRF01_AE-specific polymorphic mutations G335D and A731V in the connection subdomain of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase (RT) on susceptibility to nucleoside RT inhibitors. *Microbes and Infection* 12: 1170-7, 2010

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
該当なし

HIV の薬剤耐性発現に抵抗する強力な抗 HIV 阻害剤の研究・開発と、 新規抗 HIV 阻害剤に対する薬剤耐性発現機序に関する研究

研究分担者 天野 将之（熊本大学エイズ学研究センター COE リサーチ・アソシエイト
熊本大学生命科学研究部 血液内科学・感染免疫診療部）

研究要旨

我々のグループは HIV-1 が耐性を獲得しにくく、獲得しても他薬剤との交差耐性を有しない新規のプロテアーゼ阻害剤(PIs)の開発を米国の研究グループと共同で続けており、当該年度においても新規の HIV-1 PIs である GRL-216A, GRL-1398A, GRL-0519A 等を開発、これら化合物群における抗 HIV-1 活性発揮の機序や耐性獲得の機序について詳細な検討を行った。また、新規開発中の HIV-1 逆転写酵素阻害剤である 4'-ethynyl-2'-fluoro-2'-deoxyadenosine の抗 HIV 活性について、NOG-SCID マウスや SIV 感染サルを用いて評価を行った。さらに、アミノ酸挿入変異による HIV-1 の構造学的・ウイルス学的特性の変容について詳細な検討を行なった

A. 研究目的

ヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) 感染によって起こる後天性免疫不全症候群 (AIDS) に対する化学療法は長足の進歩を遂げ、かつて「死の病」とされた本疾患は「コントロール可能な慢性感染症」と再定義し得る程となった。この進歩は、逆転写酵素阻害剤 (RTIs) とプロテアーゼ阻害剤 (PIs) を組み合わせた多剤併用療法 (HAART) に負うところが大きい。しかし、HIV-1 が RTIs と PIs の両剤に対して耐性を獲得してその多くが交差耐性であって治療抵抗性となった症例数の増大、また耐性ウイルスによる初感染症例増多の報告が続いており、野生 HIV-1 株と多剤耐性株の双方に強力な活性を発揮し、薬剤耐性を誘導しにくく、副作用が少なく、服用しやすい新規の薬剤の開発

が文字通り急務の課題となっている。本研究では、HIV-1 が耐性を発現しにくい薬剤、発現しても他薬剤との交差耐性を有しない新規の PIs や RTI、新しい機序から HIV-1 の感染を阻害する CCR5 阻害剤の開発を進めるとともに、その基礎となるウイルス学・酵素学・細胞生物学・薬理学・結晶解析学的な基礎研究を進める。

B. 研究方法

1) 検討中の化合物の抗 HIV-1 活性評価及びより有望な化合物の開発・評価：抗 HIV-1 活性の評価には MTT、MAGI アッセイなどを用いるが、有望なものについては耐性株を含む複数のウイルス株での活性を更に検討するため、p24 アッセイを行う。このアッセイには全自動化学発光度測定機：Lumipulse F を用いる。このよう

にして見いだされた、より有望な化合物について前臨床試験の準備を進める。

2) 抗 HIV-1 作用発現のメカニズム解析：PIs がウイルス、あるいは生体（細胞）へ与える変化、それがどのようにして抗 HIV-1 効果をもたらすかについて解析を進める。この研究には多数の HIV-1 クローンの作成・検討が必要で、しかも HIV-1 の広範な遺伝子部分についての検索が必要とされるが、high throughput の DNA sequencer：ABI-3130 を用いるので迅速な実験データの解析が可能となる。

3) 薬剤耐性のメカニズム解析：HIV-1 が極めて高い増殖能を有し、しかも逆転写酵素（RT）が error-prone であるという特性のために、HIV-1 の薬剤耐性発現は不可避である。X 線結晶解析をはじめとするタンパクの微細構造研究の方法論を用いて、多剤耐性 HIV-1 株の発現機序の分子・原子レベルでの解析を行う。

その後、構造を基礎とした高い抗ウイルス活性を有しかつ耐性の発現に抵抗する薬剤のデザイン・再デザインを行う。新規の PI に対して試験管内で耐性 HIV-1 変異株の誘導を試み、更にそのようにして誘導された HIV-1 についてのウイルス学・生化学・遺伝子学的解析や X 線結晶解析を用いて耐性発現のメカニズムの解析を行う。

4) HIV-1 PR 二量体形成 (dimerization) 阻害：我々は CFP/YFP タグ付き PR を有する感染性組み換え HIV-1 クローンと FRET (fluorescence resonance emission transfer) の系を用いて、HIV-1 PR の二量体形成を確認する系を確立した。dimerization に重要とされるアミノ酸 (Asp29、Arg87、Thr26 etc) 置換を有する種々の CFP/YFP タグ付き変異体を多数

作成、FRET の系を用いてこれらのアミノ酸置換が dimerization を阻害することを明らかとした。dimerization に重要とされるアミノ酸の詳細な解析を進め、新たな HIV-1 PR 阻害への機序を明らかにする。

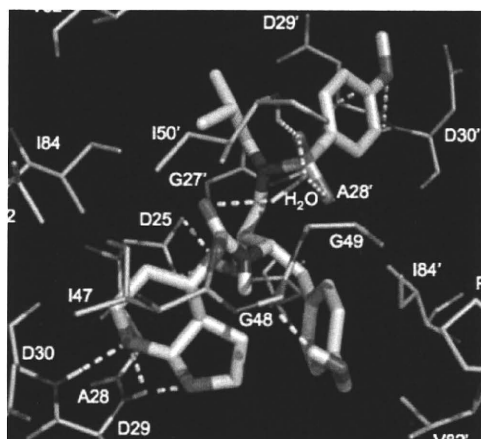
(倫理面への配慮)

開発中の化合物の臨床試験導入に際して、まず動物実験などでその安全性を十分に確認する。さらに医学部・大学内の該当する IRB で倫理面での適合性について許可を申請、認可された後で試験を開始する。

C. 研究結果

広いスペクトラムの薬剤耐性株に高い活性を発揮する PI, TMC114/darunavir (Koh & Mitsuya *et al*, *AAC*. 47: 3123-3129, 2003) を米国 Purdue University の Prof. Ghosh グループとの共同研究で開発、本剤は 2006 年 6 月に米国 FDA にて認可され、Prezista™として本邦でも臨床に供されている。さらに我々のグループは試験管内における DRV の研究を続けており、複数の多剤耐性臨床分離 HIV-1 混合株を開始株とした耐性誘導実験において、複数の PI 耐性変異株の重感染と遺伝子相同組み換えが起こることで、HIV-1 が DRV に対する高度耐性を比較的早期に獲得する可能性があることを報告した (Koh, Amano & Mitsuya *et al*, *J Virol*. 84: 11961-11969, 2010)。また我々は Prof. Ghosh グループと共同で、構造解析学的データに基づき DRV と同様に P2 部位に bis-THF 構造を有し、更に P2' 部位の benzodioxole 構造が HIV-PR の flap 領域と水素結合を持つ新規 PDI、GRL-98065 (Amano, Koh & Mitsuya, *AAC*. 51:2143-55,

2007) や、DRV とは異なる基本骨格である cyclopentanyl- tetrahydrofuran (Cp-THF) を有し、HIV-1 PR の活性中心部位に2つの異なる結合様式 (bimodal binding mode) で結合する新規 PI, GRL-02031 (Koh, Amano & Mitsuya *et al*, *AAC*. 53: 997-1006, 2009)、また macrocyclic 構造を有し、薬剤耐性 HIV に対して高い活性を發揮する一連の低分子化合物、GRL-0216A, -0286A 等の PDIs を同定、詳細な結晶構造解析により同構造が HIV-PR flap 領域に広範に結合する事で強力な活性を發揮する事を報告 (Tojo, Amano & Mitsuya *et al*, *AAC*. 54: 3460-3470, 2010) し、更に tetrahydro pyrano-tetrahydrofuran (Tp-THF) といった bis-THF とは異なる基本骨格を有する PIs である2つの異性体、GRL-1388A, -1398A を同定、DRV 高度耐性株を含む多剤耐性株に対して極めて強力な活性を發揮する事を確認、同化合物群に対する HIV-1 の耐性獲得の機序について詳細に検討し、また結晶構造解析により GRL-1398A は DRV と比較して HIV PR との水素結合や hydrophobic contacts 等の相互作用をより多く有しうる事などを報告した (Ide, Amano & Mitsuya *et al*, *AAC*, *in press*)。



図では Tp-THF 構造を有し、薬剤耐性 HIV に対して高い活性を發揮する新規の低分子化合物、GRL-1398A における HIV-1 PR との結合様式を点線で示す。

GRL-1398A は DRV と同様に HIV PR 活性中心部位である Asp-29, 30 の主鎖と強固に結合する。

更に我々は *oxatricyclic*-THF という全く新しい構造を有し、DRV 高度耐性株を含む複数の高度多剤耐性株に対し広いスペクトラムでの極めて高い抗ウイルス活性を維持、また DRV よりも低濃度でプロテアーゼ二量体化阻害 (PDI) 活性を發揮する新規化合物、GRL-0519A を開発・同定し (Ghosh, Amano & Mitsuya *et al*, *Chem Med Chem*, 5 :1850-1854, 2010)、結晶構造解析を含む同化合物の詳細な検討を行い、*oxatricyclic*-THF 構造において bis-THF 基が DRV 等と同様に PR 活性中心部位のアミノ酸主鎖と強固に結合することに加え、3 番目の THF 基が HIV-1 PR の flap 領域、catalytic core 領域、dimer interface におけるアミノ酸群と更なる相互作用を有しうる事を確認、GRL-0519A の強力な PR 酵素活性阻害能および PR 二量体形成阻害能に寄与するものと解された。これらの複数の PIs は臨床試験移行を前提に更なる検討中である。

更に、我々のグループは PIs 耐性と Gag の遺伝子変異についてのウイルス学的・構造学的検討も推し進めており、APV で耐性誘導した HIV-1 において、PR 領域への APV 耐性関連変異に加え Gag 領域の非開裂部位にアミノ酸変異の蓄積を認め、これら Gag 領域のアミノ酸変異の存在は virus の fitness を改善することにより APV に対する早期の耐性獲得に関与するが、他の PIs に対しては耐性発現が遅延するという異なった影響を及ぼす事を報告した (Aoki & Mitsuya *et al*, *J Virol*. 83:3059-3068, 2009)。また、我々は HIV-1 Gag 領域の開裂部位周辺の挿入変異が Gag 前駆蛋白に対する耐性変異 HIV-1 PR の酵素活性を代償する事を以前報告した

が (Tamiya & Mitsuya, *J Virol.* 78: 12030-40, 2004)、このような挿入変異による代償は完全ではなく、薬剤耐性株の複製能は野生株と比し依然劣ったままである事が多い。このため我々は Gag 挿入変異が Gag 前駆蛋白の processing や変異株の感染性および複製能に対し影響を及ぼし得ると仮定、詳細な解析を行うため Gag 領域の様々な位置にアミノ酸配列を挿入した変異株を多数作成し、挿入変異による HIV-1 の構造学的特性の変容について検討を行なった結果、挿入変異を有する Gag 蛋白自体がその構造学的変化により自壊し易くなっている事が推測された。挿入変異が成熟した Gag 多量体構造に与える影響を詳細に検討する事により、将来的に Gag 構造蛋白の成熟化を阻害し分解方向へと進める新しい HIV-1 複製阻害物質の同定、治療法の開発へと進展し得る可能性が考えられる (Amano & Mitsuya, 投稿準備中)。

他方、新規開発中の「delayed type」HIV-1 RTI である 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine (EFdA) における抗 HIV 活性及び同化合物の細胞内代謝を評価し、ヒト DNA ポリメラーゼに対する影響等を明らかにし (Nakata, Amano & Mitsuya *et al*, *AAC.* 51: 2701-2708, 2007)、EFdA の高い抗 HIV-1 活性を NOG-SCID マウスで証明、更に米国 Pittsburgh University のグループとの共同研究で SIV 感染サルでの実験を進め、サルで 1 日 1 回皮下注による 5 ヶ月連続投与で SIV の増殖を強力に阻止する事を確認、また長期毒性についても検討した結果サルでの安全性が確認された (投稿準備中)。今後も EFdA の臨床開発へ向けた努力を米国のグループと共同で展開していく予定であり、極めて

佳良な準備的データを得ている。

D. 考察

我々は米国の研究グループとの精力的な共同研究を継続しており、当該年度は前述した macrocycle 構造を有する新規 HIV PDI 群である GRL-216A 等や、Tp-THF といった bis-THF とは異なる基本骨格を有する PI である GRL-1398A 等について国際科学雑誌に報告した。現時点においても GRL-0519A 等強力な新規抗 HIV-1 PDI 群について詳細な検討を行なっている。また、成熟 Gag 多量体構造にアミノ酸挿入変異が与える影響に関して詳細な検討を行なった。以上より研究達成度は高いと考えられる。これらの研究の特色として、抗 HIV-1 薬開発に必要なウイルス学的研究手技に加えて、独自の新規低分子化合物の合成や結晶構造解析・コンピューター・モデリングなど、1 研究施設では通常施行困難な多岐にわたる研究領域をカバーする研究体制が、国内外のグループとの共同研究として整えられていることが挙げられる。今後もこれらの研究を継続し、新興再興感染症の予防・治療薬開発を進める。

E. 結論

本計画で得られると思われるデータは、臨床試験段階にある阻害薬の研究成果に耐性発現機序に関わる基礎研究の成果を付与することなどが期待され、新規抗 HIV 剤の骨格のデザイン・再デザイン、酵素学的・ウイルス学的解析が強化・スピードアップされ、国内外の研究者との活発な情報交換と人的交流を通じて新しい世代の抗 HIV 剤の開発が強力に推進されると思われる。HIV の耐性発現に抵抗