

$10^3 \sim 10^5$ copies/ μ g 総 RNA のシグナルが検出された。

4) ウイルス産生細胞の同定

最もウイルス RNA 量が高かったリンパ系組織に関して免疫組織化学染色を行った。短期治療群では非常に低い頻度で、消化管付随リンパ節の、主に濾胞に Nef 抗原陽性細胞が検出され、それらは CD3 陽性であった。長期治療群ではリンパ節髄質に大型の Nef 陽性細胞が検出され、マクロファージマーカー (HAM56) 陽性であった。現在、さらに多くの切片を検索している。

4. 考察

長期間の治療が成功している感染者においても residual viremia が報告されており、多剤併用療法下でのウイルス複製が示されているが、本研究ではそのウイルスは主にエフェクターサイトとリンパ系組織で産生されている事、さらにマクロファージがウイルス産生をしている事を、サルエイズモデルを用いた一年間にわたる多剤併用療法から明らかにした。このモデル系において血中薬物濃度のトラフ値は感染者で推奨されている量の約 10 倍であり、投薬量が不足していた可能性は排除できる。耐性ウイルスの出現の可能性に関しては現在ウイルスの塩基配列を検索している。感染マクロファージの半減期は 2 週間ほどと見積もられている事から、今回検出した Nef 陽性マクロファージは治療下での新規感染を示すものと考えられる。短期治療群では T 細胞が、長期治療群ではマクロファージがウイルス抗原陽性細胞として同定されてきたことから、マクロファージには治療下でもウイルス感染が拡大しうる可能性が考えられる。多剤併用療法により、一般に新規感染阻止が不可能なのか、マクロファージへの新規感染が特に抑制困難か明らかにする必要がある。

5. 自己評価

1) 達成度について

当初掲げていた最終目標はリザーバーを選択的に傷害する方法を試みる事であったので、達成できていない。しかし、多剤併用療法下における新規感染の進行がマクロフ

ァージで起こっていることを示唆できたことは評価できる。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

本研究が開始されてから、サルエイズモデルで本格的な多剤併用療法を行う報告が数報出たが、ウイルス産生細胞の同定に至ったものはなく、その点で本研究は学術的意義がある。また、現行の多剤併用療法では新規感染が阻止できないこと、マクロファージで感染が拡大しうることを示唆したことから、現行の治療の限界を示唆し、薬剤開発の際にマクロファージにおける抗ウイルス効果の検討の必要を促した点で意義がある。

3) 今後の展望について

ウイルスリザーバーとしてマクロファージが同定されたので、この細胞を選択的に傷害する方法を考案し、多剤併用療法と組み合わせることでウイルス抑制効果を増強し、体内からのウイルス駆逐の可能性を検討したい。

6. 結論

サルエイズモデルにおいて長期間投与可能な多剤併用療法レジメンを開発した。このレジメンにより SIV 感染サル血中のウイルス量を速やかに検出限界以下に抑制することに成功した。投薬中止後速やかに血中ウイルス量が復元したことからサルエイズモデルにおいても多剤併用療法に抵抗するウイルスリザーバーの存在を確認した。一年間にわたる多剤併用療法によって血中ウイルスは完全に抑制されたにもかかわらず、エフェクターサイトおよびリンパ系組織ではウイルス RNA 発現があり、リンパ節のマクロファージでウイルス抗原の発現が検出された。以上のことから多剤併用療法中のウイルスリザーバーの少なくとも一つとしてマクロファージが同定された。感染マクロファージの寿命から考えて、多剤併用療法下でも新規感染が起こっていることが示唆された。

7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

該当なし。

研究発表

研究代表者

五十嵐 樹彦

- 1) Nishimura, Y. Shingai, M. Willey, R. Sadjadpour, R. Lee, W. R. Brown, C. R. Brenchley, J. M. Buckler-White, A. Petros, R. Eckhaus, M. Hoffman, V. Igarashi, T. and Martin, M. A. Generation of the Pathogenic R5-Tropic SHIV AD8 by Serial Passaging in Rhesus Macaques. *J. Virol.* 84:4769-4781, 2010.
- 2) Matsuda, K. Inaba, K. Fukazawa, Y. Matsuyama, M. Ibuki, K. Horiike, M. Saito, N. Hayami, M. Igarashi, T. and Miura, T. In vivo analysis of a new R5 tropic SHIV generated from the highly pathogenic SHIV-KS661, a derivative of SHIV-89.6. *Virology.* 399:134-43, 2010.

研究課題：HIV-1 ゲノム産物の翻訳後修飾とその機能に関する研究

課題番号：H21- エイズ- 若手- 020

研究代表者：高宗 暢暁（熊本大学生命科学研究部 助教）

1. 研究目的

抗 HIV 薬に対する薬剤耐性ウイルスの出現は、HIV 感染症治療の長期療養が与える最大の課題の一つであり、この主要な原因は HIV-1 の易変異原性の形質である。薬剤耐性ウイルス出現を出来るだけ回避しうる新しい作用機序に基づく HIV-1 制御法開発は急務である。本研究では、翻訳後修飾という観点で HIV ゲノム産物に着目し、HIV-1 複製に必須の翻訳後修飾を探索し、その翻訳後修飾に関わる宿主因子を標的とした、薬剤耐性出現を回避しうる新しい治療戦略を開拓することを目的とする。

2. 研究方法

本研究の対象とする HIV-1 遺伝子として、ウイルス複製に必須の遺伝子や病原性と密接に関連する *gag* 及び *nef* 遺伝子産物に重点を置いた。また複製に重要な翻訳後修飾である Gag 及び Nef の N-ミリスチル化を担う宿主因子 N-ミリスチルトランスフェラーゼ (NMT) に着目した。研究方法の概要は以下の通りである。主として HIV-1_{NL4-3} 株のウイルスゲノムを用いたが、研究の展開上、適宜、HIV-1_{NL4-3} 株以外の HIV-1 株や近縁のレンチウイルスである SIV 等も利用する。

ウイルス性タンパク質の翻訳後修飾の解析方法の主流として、HIV 研究で一般的に用いられるヒト胚腎由来細胞 HEK293 細胞等に発現ベクターを導入し HIV-1 ウイルスタンパク質安定高発現細胞株を樹立し、本細胞からウイルス性タンパク質を分離して翻訳後修飾解析等を行う。また HIV-1 持続産生細胞から産生される感染性 HIV-1 を回収してウイルス性タンパク質の翻訳後修飾解析等を行う。

同定した翻訳後修飾の HIV-1 複製における意義を明らかにするために、翻訳後修飾部位に各種変異を導入した HIV-1_{NL4-3} 発現ベクターを構築し、野生株と変異株間の表現系の比較を行う。表現系の内容としては、第一にウイルス複製能力の差異を解析する。次に注目するウイルス遺伝子産物の各種機能・注目する特徴の評価を適宜おこなう。各種翻訳後修飾に関わる宿主性酵素の同定を siRNA、阻害剤、ドミナントネガティブ変異体等を利用し行う。

（倫理面への配慮）

本研究で行った実験については、倫理面への配慮を必要としないものであった。

3. 研究結果

(1) 本研究で、発現レベルが相対的に著しく高い HIV-1_{JR-CSF} 由来 Nef_{JR-CSF} と相対的に著しく低発現である Nef_{NL4-3} (等) の存在を明らかにした。その両者間のレベルの差は 10 倍以上であった。その低発現レベルは少なくともプロテアソームを介するタンパク質の易分解性が起因し、転写効率や mRNA の安定性が原因ではなかった。現在まで、Nef_{NL4-3} の C 末端側 (AA129-206) にその易分解性と関連する領域 (Nef degradation sequence (NDS) と名付け特許出願、平成 22 年 10 月 15 日優先権主張出願：特願 2009-239220) が含まれていることを明らかにしている。また低発現を示す Nef_{NL4-3} に限らず、高発現である Nef_{JR-CSF} においても、その NDS 相当領域は融合によって任意タンパク質に易分解性を付与できることが明らかになった (以上投稿中)。Nef は少なくともポリユビキチン化を受けていることが示唆されたが、その低発現性との関連は不明である。現在 Nef の著しい低発現性と関連するユビキチン化を含む翻訳後修飾の解析を進めている。また、興味深いことに比較的発現レベルが高い Nef に易分解性を付与しても、ウイルスの感染性増強作用が保持されていた。

(2) Gag と Nef に共通の翻訳後修飾であり HIV-1 複製に重要な N-ミリスチル化は、NMT によって行われる。NMT の触媒活性の阻害では、様々な細胞内のオルガネラに局在している全ての NMT の機能を完全に阻害しうることから細胞への障害が大きいと予想される。本研究では、HIV-1 複製と関連する NMT 分子種の機能阻害という観点で研究を行っている。NMT の触媒活性には必要とされないが、NMT のミリスチル化が行われるリポゾームへの局在に重要な NMT のアミノ末端領域からなる変異体 (NMTΔC 変異体) の発現は、HIV-1 の産生を抑制することが明らかになった。この作用機序として NMTΔC 変異体による内在性 NMT のリポゾーム局在の阻害と関連していることが示唆された (Takamune et al, *Biol. Pharm. Bull.*, 2010)。

(3) HIV-1 Gag タンパク質の中で、ウイルスコアを形成するキャプシド (CA) タンパク質は、ウイルス出芽後にウイルス粒子内でその Ser¹⁶-Pro¹⁷ motif の Ser¹⁶ がリン酸化を受けていることが明らかになった。S16A/P17A mutant HIV-1 は著しくその複製能力が低下した。また宿主因子 peptidyl prolyl isomerase Pin1 はリン酸化 Ser¹⁶-Pro¹⁷ motif を認識し、ウイルスコアの uncoating 過程に寄与し

ていることが明らかとなった (Misumi, Takamune et al *J. Biol. Chem.* 2010)。

4. 考察

NDS がどのようにして急激なタンパク質分解を導いているのか不明なままであるが、ユビキチン化が重要であれば関連する E3 リガーゼの認識部位として NDS が機能するか、または NDS そのものがプロテアソームへのターゲティング機能を有している可能性が考えられる。HIV-1 全ての株の Nef が低発現を示すわけではないようだが、潜在的に低発現性の特性を有している可能性がある。Nef の低発現性の特徴を論ずるには、より多くの Nef variants について検証する必要があるだろう。また Nef の低発現性は感染性増強作用と関連している可能性が考えられた。この Nef の低発現性の機能的意義については今後さらに検証していく必要がある。

NMT のリボゾーム局在は Gag 及び Nef の翻訳時のミリストイル化に重要であると考えられる。NMT のリボゾーム局在の阻害法の構築は、翻訳後修飾の阻害を介した新しい HIV-1 複製阻害法の構築につながると考えられる。

Pin1 は細胞内で様々なタンパク質に対して機能している。特異性向上の観点から、今後 uncoating に関与する他の分子、例えば CA Ser16 のリン酸化に関わるリン酸化酵素の同定等の uncoating の詳細を明らかにした上で、本プロセスを標的とする HIV-1 複製阻害戦略をデザインする必要がある。

5. 自己評価

1) 達成度について

昨年度および本年度の研究によって得られた結果が論文および特許としてまとめることができた (以下)。次年度も引き続き努力したい。

Nef に関しては、その新しい特性として著しく不安定なタンパク質であることを明らかにし、タンパク質の不安定性を誘導するために必要十分となる NDS の同定とこれに関する特許の優先権主張出願 (平成 22 年 10 月 15 日) を行った。またこれに関連する論文を投稿中であり、平成 23 年度中には論文として完成させる必要がある。

HIV-1 タンパク質の翻訳後修飾に関わる宿主因子の一つである NMT のリボゾーム局在を阻害することが、HIV-1 複製制御につながる可能性を提案した論文を *Biol. Pharm. Bull* に掲載することができた。

ウイルスコアを形成する CA の Ser16 のリン酸化が宿主因子 Pin1 によって認識され、結果として uncoating に寄与していることを明らかにした知見を *J. Biol. Chem* に

掲載することができた。

HIV-1 Gag MA の Myristoyl 化を質量分析的に確認した結果を含む論文を *Biochemistry* に掲載することができた。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

HIV-1 複製に極めて重要な翻訳後修飾の阻害によるウイルス複製制御法は、薬剤耐性ウイルス出現を最小化する HIV/エイズ治療戦略の方向性の一つになると考える。本研究はその端緒になる重要な基礎研究としての位置にある。

3) 今後の展望について

Nef の低発現性・易分解性と直接関連する翻訳後修飾 (ユビキチン化等) の探索を鋭意進行中である。Nef の低発現性の意義について、ウイルス感染性増強作用の観点から検討する。また、低・高発現 Nef の存在について、多くの Nef variants を用いて検証する必要がある。

HIV-1 複製と関連すると考えられるリボゾーム局在型の NMT に関する理解を深めることが重要である。NMT がどのようにしてリボゾームへ局在するのかその機構の解明は新しい HIV-1 制御法の立案につながると考えられる。

HIV-1 の複製制御につながる可能性がある HIV-1 CA Ser16 のリン酸化の機構について解明することが重要になる。

6. 結論

Nef には低発現性を示すクローンが存在し、それはタンパク質の易分解性によることが明らかになった。またその特性は HIV-1 感染性増強と関連する可能性が示唆された。

HIV-1 複製に必須の翻訳後修飾であるミリストイル化を担う NMT の機能を阻害するにあたり、HIV-1 に対する特異性向上の観点から HIV-1 複製と関連すると考えられるリボゾーム局在型 NMT を限定的に標的とすることは重要であると考えられた。

ウイルスコアを形成する CA の Ser16 のリン酸化は、uncoating のステップに重要であることが明らかになった。

7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

1. 高宗暢暁、三隅将吾、入坂由香梨; 「タンパク質低発現化ペプチドをコードする遺伝子およびその使用方法」; 出願人: 国立大学法人 熊本大学; 特願 2009-239220; 平成 21 年 10 月 16 日出願、平成 22 年 10 月 15 日優先権主張出願。

研究発表

研究代表者

高宗暢暁

原著論文による発表

- 1) Takamune N, Kuroe T, Tanada N, Shoji S, and Misumi S. Suppression of human immunodeficiency virus type-1 production by coexpression of catalytic-region-deleted N-myristoyltransferase mutants. *Biol. Pharm. Bull.*, 33: 2018-2023, 2010.
- 2) Misumi S, Inoue M, Dochi T, Kishimoto N, Hasegawa N, Takamune N, Shoji S. Uncoating of human immunodeficiency virus type 1 requires prolyl isomerase PIN1. *J Biol Chem.* 285: 25185-25195, 2010.
- 3) Anraku K, Fukuda R, Takamune N, Misumi S, Okamoto Y, Otsuka M, Fujita M. Highly sensitive analysis of the interaction between HIV-1 Gag and phosphoinositide derivatives based on surface plasmon resonance. *Biochemistry* 49: 5109-5115, 2010.
- 4) Endo M, Gejima S, Endo A, Takamune N, Shoji S, and Misumi S. Treatment of breast cancer cells with proteasome inhibitor lactacystin increases the level of sensitivity to cell death induced by Human immunodeficiency virus type 1. *Biol. Pharm. Bull.*, 33:1903-1906, 2010.

口頭発表

国内

- 1) 高宗暢暁、山本充奈美、入坂由香梨、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾、HIV-1 Nef タンパク質の低発現性に関する研究 第 34 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム、2010、福岡
- 2) Takamune N, Yamamoto M, Harada K, Irisaka Y, Shoji S, and Misumi S. Potential low protein expression property of Nef. The 11th Kumamoto AIDS Seminar, 2010, 熊本
- 3) 原田圭輔、入坂由香梨、山本充奈美、三隅将吾、杉本幸彦、庄司省三、高宗暢暁、HIV-1 及び SIV Nef の低発現性がウイルスの感染性増強に与える影響、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010、徳島
- 4) 原田圭輔、入坂由香梨、山本充奈美、三隅将吾、杉本幸彦、庄司省三、高宗暢暁、HIV/SIV アクセサリータンパク質 Nef の低発現性と機能発現の関連性に関する解析 BMB2010, 2010, 神戸
- 5) 岸本直樹、井上睦美、高宗暢暁、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾、HIV-1 preintegration complex 構成因子である integrase を標的としたプロテオーム解析、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010、徳島
- 6) 堂地赳生、井上睦美、高宗暢暁、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾、HIV カプシドタンパク質の Ser16 のウイルス粒子内のリン酸化に関する研究 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010、徳島
- 7) 井上睦美、岸本直樹、堂地赳生、高宗暢暁、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾、HIV カプシドタンパク質の Ser16 のウイルス粒子内のリン酸化に関する研究 SIV 感染におけるプロリルイソメラーゼ Pin1 依存性脱殻機構の寄与 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010、徳島
- 8) 原田 圭輔、入坂 由香梨、山本 充奈美、三隅 将吾、杉本 幸彦、庄司 省三、高宗 暢暁、 HIV/SIV アクセサリータンパク質 Nef の低発現性と機能発現に関する基礎研究、日本薬学会九州支部大会、2010、長崎
- 9) 小川 実菜子、高宗 暢暁、杉本 幸彦、庄司 省三、三隅 将吾、HIV-1 p2 peptide のポストエントリー過程における役割に関する基礎研究、日本薬学会九州支部大会、2010、長崎

研究課題：高感度薬剤耐性 HIV 検出法を用いた微小集族薬剤耐性 HIV の動態と HAART 治療効果との相関についての研究

課題番号：H21-エイズ-若手-019

研究代表者：西澤 雅子（国立感染症研究所 エイズ研究センター 研究員）

研究分担者：杉浦 互（（独）国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター 感染・免疫研究部 部長）

1. 研究目的

抗 HIV 薬剤の投与を受けている HIV/AIDS 患者血中では quasi-species の一部に minority population（微小集族）として薬剤耐性 HIV が潜在している可能性が知られている。近年、検出技術の進歩とともにこの微小集族として存在する薬剤耐性 HIV が HAART による薬剤耐性の選択と治療の転機に影響を及ぼしている可能性が示唆されるようになった。本研究では 20%以下の比率で存在する薬剤耐性 HIV を検出可能な高感度薬剤耐性 HIV 検出法（高感度法）を用いて HAART を受けている患者検体からの微小な薬剤耐性 HIV 検出を試み、至適治療を進める上での臨床的有用性について検討する。

2. 研究方法

平成 21 年度研究で確立した、定量 PCR を応用した高感度薬剤耐性 HIV 検出法（高感度法）によって微小集族薬剤耐性変異の検出を試みた。検出する耐性変異としてサブタイプ B では核酸系逆転写酵素阻害剤(NRTI)に対する耐性変異 M41L, K65R, K70R, M184V, T215F/Y、非核酸系逆転写酵素阻害剤に対する耐性変異 K103N, Y181C の計 8 変異を検査対象とした。またサブタイプ B のみだがプロテアーゼ阻害剤(PI)耐性変異である L90M と M46I/L を検査対象とし、検査系の確立を試みた。

解析対象として、長期間（5年以上）に渡って HAART を受け、治療途中で薬剤変更と薬剤耐性変異のパターンに変化が見られた症例を 10 症例選択した。その中から

1. 採血ポイントが 20 点以上
2. 各採血ポイントの間隔がほぼ半年以内
3. 治療途中で薬剤の変更がある

の条件を満たした 3 症例を選択し、微小集族薬剤耐性変異の検出・経時的変化について解析した。またダイレクトシーケンス法で得られた薬剤耐性変異のデータと高感度法の結果を比較し、微小集族薬剤耐性変異の検出パターンとの比較を行った。

高感度法で T215F/Y を検出する際に得られる定量 PCR amplicon が、RT のアミノ酸番号 105～215 までを増幅できる性質を利用して、微小集族薬剤耐性変異として検出される T215F/Y が治療経過のどの時点で出現したのか、ダ

イレクトシーケンス法で得られた RT 領域の塩基配列と T215F/Y amplicon の塩基配列とを系統樹解析で比較し推定を試みた。また T215F/Y の耐性変異と他の薬剤耐性変異の連鎖関係について T215F/Y amplicon の塩基配列を解析した。

（倫理面への配慮）

本研究では感染者血漿を使用するため、国立感染症研究所の医学研究倫理審査委員会へ倫理審査を申請しその承認を得た。また薬剤耐性変異を組み込んだベクターの作製で組換え DNA 実験を行うので、組換え DNA 実験安全委員会に実験申請を行いその許可を得た。

3. 研究結果

平成 21 年度に解析したサンプル A、B、C に加えサンプル D（採血ポイント 35 点、解析対象期間約 8 年 2 カ月）、サンプル E（採血ポイント 28 点、解析対象期間約 7 年 1 カ月）、サンプル F（採血ポイント 25 点、解析対象期間約 8 年 6 カ月）を解析した。その結果その結果サンプル D ではダイレクトシーケンス法と高感度法の薬剤耐性変異の結果に乖離は見られなかったが、サンプル E、F でダイレクトシーケンス法では検出できなかった微小集族薬剤耐性変異を検出した。またサンプル E では、HAART を AZT/3TC/IDV→3TC/EFV/TDF に変更した 2005 年 2 月以降速やかにダイレクトシーケンスで K103N が検出されたが、高感度法による検査から、約 3 年前の 2002 年 1 月の検体から K103N が検出された。また同じくサンプル E で 2005 年 7 月以降から T215I がダイレクトシーケンス法で検出されているが、高感度法ではその 1 年以上前の 2004 年 3 月(E-1)と 2004 年 10 月(E-2)の時点から T215I が検出された。E-1、E-2 の 2 検体の T215I 高感度法 amplicon の塩基配列と、サンプル E の各採血ポイントのダイレクトシーケンス法により得られた RT 領域塩基配列とを合わせて系統樹解析を行った結果、E-1 と E-2 で検出された T215I amplicon 配列は系統樹上 2005 年 8 月以降の RT 配列の近傍に位置し、T215I がダイレクトシーケンス法で初めて検出された 2005 年 7 月よりも 1 年以上前から既に微小集族として患者血中に存在しており、HAART 変更によって血中での比率が増加しダイレクト

シーケンス法でも検出できるようになった可能性が示唆された。また平成21年度に解析したサンプルAについて、サンプルEで行ったのと同様に高感度法のT215Y ampliconの塩基配列解析を行い、ダイレクトシーケンス法で検出したRT領域の薬剤耐性変異とT215Y ampliconから検出される、T215Yと連鎖して存在する薬剤耐性変異を比較した結果、ダイレクトシーケンス法では検出されていたV108IとL210WがT215Y ampliconからは検出されず、T215Yとは連鎖せずに患者血中に存在している可能性が示された。

CDCで開発されたプロテアーゼ阻害剤(PI)耐性変異のL90M及びM46I/L検出系を検討した結果、L90M検出系は日本の患者検体のL90Mを検出可能な事が確認できた。しかしM46I/L検出系は十分な感度が得られなかった。

4. 考察

平成21年度の解析で治療中患者3症例中2症例から微小集族薬剤耐性変異を検出したが、本年度も3症例中2症例から微小集族薬剤耐性変異が検出され、治療中の患者では治療期間中に何らかの微小な薬剤耐性変異が普遍的に存在する可能性が高いと考えられる。サンプルEで検出された微小集族T215Iの系統樹解析から、高感度法による微小集族薬剤耐性変異の検出を行うことで将来出現する薬剤耐性変異を予め予測できる可能性が示唆された。またT215F/Y ampliconの塩基配列を解析することによって、連鎖する耐性変異を調べることが可能だった。

CDCで開発されたPI耐性変異検出系のうちM46I/L検出系は、プライマーの配列が日本人の患者検体の配列との一致率が一部低いことが原因で感度が低く改良が必要だった。現在改良を加えて感度を上昇させることに成功したが、多検体に応用できるようプライマーの改良をさらに重ねる必要があると思われる。

5. 自己評価

1) 達成度について

平成22年度の解析から、当初解析予定としていた採血ポイントが5点~10点、採血間隔が1年以上空いた症例では高感度法による解析で微小集族薬剤耐性変異を検出することが難しい可能性が示唆されたため、本年度は採血ポイントが20点以上の症例を解析対象とした。そのため目標とした症例数は解析できなかったが、高感度法によって検出された微小集族のT215F/Y ampliconを系統樹解析することによって耐性変異の出現時期を推定できたことは、高感度法による解析で将来出現する薬剤耐性変異を予測できる可能性を示し、年度当初には予定していなかつ

た新しい成果と考える。PI検出系の確立までは至らなかったがプライマーの改良は進んでおり、確立達成の目処を立てることができた。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

患者血中に存在する微小集族の薬剤耐性HIVがHAART治療の転機に関与する可能性が近年報告されており、本研究は高感度法の臨床的意義について結論を出したと考えている。本年度の成果として、次年度に引き続き治療変更後に薬剤耐性変異が微小集族として長期間持続感染している事実を捉えた。これに加えて薬剤変更後にダイレクトシーケンス法で検出された薬剤耐性変異が、その1年以上前から既に血中に存在していた事を示した。これは薬剤を切り替える際に影響する重要な情報であり、臨床的・社会的意義があると思われる。

3) 今後の展望について

現在進行中のPI耐性変異M46I/Lの検出系の確立を引き続き行う。本年度検討できなかったインテグラーゼ阻害剤(IND)に対する耐性変異(Q148H/K/R、N155H、Y143R/H/C)に対する検出系の確立を行う。微小集族薬剤耐性変異の出現時期の推定に関する解析については、症例数をさらに増やして解析を試みる。来年度も引き続き長期間のHAARTを受けた症例について微小集族薬剤耐性変異の動態を解析するため目標解析症例数は5例程度とし、長期間に渡り30点以上の採血ポイントがある症例について引き続き解析する。また微小集族薬剤耐性変異が持続する機序についても解析を試みる。

6. 結論

平成22年度に引き続き、高感度法による微小集族薬剤耐性変異の検出を試み、3症例中2症例から微小集族で存在する薬剤耐性変異を検出した。高感度法で得られるT215F/Y ampliconの塩基配列解析・系統樹解析から、微小集族薬剤耐性変異がダイレクトシーケンス法で検出されるよりも前から患者血中に存在している可能性を示した。またT215Y/Fと連鎖しない耐性変異の存在を示唆するデータを得た。PI耐性変異検出系は、L90Mに関しては確立しM46I/Lに関しては引き続き検出系の確立を試みる。高感度法の臨床的有用性の評価は今後の課題である。

7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

なし。

研究発表

研究代表者

西澤 雅子

口頭発表

海外

- 1) Masako Nishizawa, Junko Hattori, Walid Heneine, Jeffrey A. Johnson and Wataru Sugiura. Sensitive testing identifies a greater prevalence of transmitted HIV drug resistance in Japan. 5th International Workshop on HIV Transmission, 2010年7月、ウイーン.

国内

- 1) 西澤雅子、服部純子、横幕 能行、Jeffrey A. 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、2010年11月、東京.
- 2) 服部純子、椎野禎一郎、瀧永博之、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. 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、東京.
- 3) Masako Nishizawa, Jeffery A. Johnson, Walid Heneine, Naoki Yamamoto and Wataru Sugiura. Analyses of minority drug-resistant populations in newly-diagnosed HIV/AIDS patients in Japan using highly sensitive allele-specific PCR. 1st International Young Investigator Symposium, 2010年3月、熊本.
- 4) 西澤雅子、Jeffery A. Johnson、Walid Heneine、山本直樹、杉浦互. 高感度薬剤耐性 HIV 検出法を用いた微小集族薬剤耐性 HIV の検出と存在比率に関する研究. 第23回日本エイズ学会、2009年11月、名古屋.
- 5) 服部純子、瀧永博之、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. 第23回日本エイズ学会、2009年11月、名古屋.
- 6) 鈴木寿子、服部純子、村田大悟、三浦秀佳、伊部史朗、藤野真之、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、2009年11月、名古屋.

研究分担者

杉浦 互

原著論文による発表

欧文

1. 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 Oct;88(1):72-9.
2. Hirano A, Takahashi M, Kinoshita E, Shibata M, Nomura T, Yokomaku Y, Hamaguchi M, Sugiura W. High

- performance liquid chromatography using UV detection for the simultaneous quantification of the new non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor etravirine (TMC-125), and 4 protease inhibitors in human plasma. *Biol Pharm Bull.* 2010;33(8):1426-9.
3. 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 Oct;84(19):9995-10003.
 4. Suzuki S, Urano E, Hashimoto C, Tsutsumi H, Nakahara T, Tanaka T, Nakanishi Y, Maddali K, Han Y, Hamatake M, Miyauchi K, Pommier Y, Beutler JA, Sugiura W, Fuji H, Hoshino T, Itotani K, Nomura W, Narumi T, Yamamoto N, Komano JA, Tamamura H. Peptide HIV-1 integrase inhibitors from HIV-1 gene products. *J Med Chem.* 2010 Jul 22;53(14):5356-60.
 5. 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 Jul 1;54(3):241-7.
 6. 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 Jul;87(1):22-9.
 7. 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 Jan 14;114(1):521-30.
 8. Matsuyama S, Shimizu 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. *The Journal of Physical Chemistry.* in press
 9. 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 Aug;159(2):185-93.
 10. 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 Oct 29;10(1):360.
 11. 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 U S A.* 2009 Nov 17;106(46):19539-44. Epub 2009 Nov 3.

研究課題：難治性HIV感染症に対する治療法開発の基礎的研究

課題番号：H21-エイズ一般-010

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：潟永 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）

1. 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、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（潟永・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を用いた治療法開発の基礎研究（滝口）と中和抗体を用いた治療法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）。

2. 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序の解明：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. 融合阻害剤耐性機序の解明：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。

3. 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）。

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（湯永・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・糖鎖の付加がおこり、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）。

4. 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。

5. 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、新たな免疫療法の開発の可能性を示せた。その他の研究に関し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。

6. 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。

7. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

該当なし

研究発表 (2009-2010年度で本研究に関連した論文発表のみを抜粋)

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*. In press
- 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
- 7) Roshorm Y, Hong JP, Kobayashi N, McMichael AJ, Volsky DJ, Potash MJ, Takiguchi M, Hanke T. Novel HIV-1 clade B candidate vaccine designed for HLA-B*5101+ patients protected mice against chimaeric EcoHIV challenge. *Eur J Immunol*. 39:1831-1840, 2009
- 8) Zheng N, Fujiwara M, Ueno T, Oka S, Takiguchi M. Strong ability of Nef-specific CD4+ cytotoxic T cells to suppress HIV-1 replication in HIV-1-infected CD4+ T cells and macrophages. *J Virol*. 83:7668-7677, 2009
- 9) Motozono C, Yanaka S, Tsumoto K, Takiguchi M, Ueno T. Impacts of intrinsic cooperative thermodynamics of peptide-MHC complexes on antiviral activity of HIV-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol*. 182:5528-5536, 2009
- 10) Kawashima Y, Pfafferott K, Frater J, Matthews P, Payne R, Addo M, Gatanaga H, Fujiwara M, Hachiya A, Koizumi H, Kuse N, Oka S, 他29名, Takiguchi M*, Goulder P* (*equally contributed). Adaptation of HIV-1 to HLA I. *Nature*. 458:641-645, 2009
- 11) Murakoshi H, Kitano M, Akahoshi T, Kawashima Y, Dohki S, Oka S, Takiguchi M. Identification and characterization of 2 HIV-1 Gag immunodominant epitopes restricted by Asian HLA allele HLA-B*4801. *Hum Immunol*. 70:170-174, 2009
- 12) Koizumi H, Iwatani T, Tanuma J, Fujiwara M, Izumi T, Oka S, and Takiguchi M. Escape mutation selected by Gag28-36-specific cytotoxic T cells in HLA-A*2402-positive HIV-1-infected donors. *Microbes Infect*. 11:198-204, 2009

研究分担者

瀧永博之

- 1) 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.
- 2) 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
- 3) Kawashima Y, Pfafferott K, Frater J, Matthews P, Payne R, Addo M, Gatanaga H, Fujiwara M, Hachiya A, Koizumi H, Kuse N, Oka S, 他 29 名, Takiguchi M.*, Goulder, P.* (*equally contributed). Adaptation of HIV-1 to HLA I. *Nature*. 458: 641-645, 2009.

馬場昌範

- 1) 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
- 2) Baba, M. Entry inhibitors of human immunodeficiency virus. In: LaFemina RL (Ed), *Antiviral Research: Strategies in Antiviral Drug Discovery*, pp.19-32, ASM Press, Washington, DC, 2009
- 3) Shi, M., Wang, M., Okamoto, M., Takao, S., and Baba, M. Inhibition of porcine endogenous retrovirus (PERV) replication by HIV-1 gene expression inhibitors. *Antiviral Res*. 83: 201-204, 2009

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) 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.

- 3) Michailidis, E., Marchand, B., Kodama, E.N., Singh, K., Matsuoka, M., Kirby, K.A., Ryan, E.M., Sawani, A.M., Nagy, E., Ashida, N., Mitsuya, H., Parniak, M.A., and Sarafianos, S.G. Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine triphosphate, a translocation defective reverse transcriptase inhibitor. *J Biol Chem.* 284:35681-91, 2009.
- 4) Ueno, M., Kodama, E.N., Shimura, K., Sakurai, Y., Kajiwara, K., Sakagami, Y., Oishi, S., Fujii, N., and Matsuoka, M. Synonymous mutations in stem-loop III of Rev responsive elements enhance HIV-1 replication impaired by primary mutations for resistance to enfuvirtide. *Antiviral Res.* 82: 67-72, 2009.
- 5) Izumi, K., Kodama, E., Shimura, K., Sakagami, Y., Watanabe, K., Ito, S., Watabe, T., Terakawa, Y., Nishikawa, H., Sarafianos, S.G., Kitaura, K., Oishi, S., Fujii, N., and Matsuoka, M. Design of peptide-based inhibitors for HIV-1 strains resistant to T-20. *J Biol Chem.* 53: 1013-1018, 2009.

松下修三

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.

天野将之

- 1) Ghosh AK, Xu CX, Rao KV, Baldrige A, Agniswamy J, Wang YF, Weber IT, Aoki M, Miguel SG, Amano M, Mitsuya H. Probing multidrug-resistance and protein-ligand interactions with oxatricyclic designed ligands in HIV-1 protease inhibitors. *ChemMedChem.* 5 :1850-1854, 2010
- 2) Koh Y, Amano M, Towata T, Danish M, Leshchenko-Yashchuk S, Das D, Nakayama M, Tojo Y, Ghosh AK, Mitsuya H. 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, 2010
- 3) Tojo Y, Koh Y, Amano M, Aoki M, Das D, Kulkarni S, Anderson DD, Ghosh AK, Mitsuya H. Novel protease inhibitors (PIs) containing macrocyclic components and 3(R),3a(S),6a(R)-bis-tetrahydrofuranylurethane that are potent against multi-PI-resistant HIV-1 variants in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 54:3460-347, 2010
- 4) Ghosh AK, Gemma S, Simoni E, Baldrige A, Walters DE, Ide K, Tojo Y, Koh Y, Amano M, Mitsuya H. Synthesis and biological evaluation of novel allophenylnorstatine-based HIV-1 protease inhibitors incorporating high affinity P2-ligands. *Bioorg Med Chem Lett.* 20:1241-6, 2010
- 5) Koh Y, Das D, Leschenko S, Nakata H, Ogata-Aoki H, Amano M, Nakayama M, Ghosh AK, Mitsuya H. GRL-02031: A Novel Nonpeptidic Protease Inhibitor (PI) Containing A Stereochemically Defined Fused Cyclopentanyltetrahydrofuran (Cp-THF) Potent Against Multi-PI-Resistant HIV-1 In Vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 53: 997-1006, 2009.
- 6) Ghosh AK, Kulkarni S, Anderson DD, Hong L, Baldrige A, Wang YF, Chumanevich AA, Kovalevsky AY, Tojo Y, Amano M, Koh Y, Tang J, Weber IT, Mitsuya H. Design, Synthesis, Protein-Ligand X-ray Structure, and Biological Evaluation of a Series of Novel Macrocyclic Human Immunodeficiency Virus-1 Protease Inhibitors to Combat Drug Resistance. *J. Med. Chem.* 52:7689-7705, 2009

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) Sasaki K, Kajikawa M, Kuroki K, Motohashi T, Shimojima T, Park EY, Kondo S, Yagi H, Kato K, Maenaka K. Silkworm expression and sugar profiling of human immune cell surface receptor, KIR2DL1. *BBRC* 387: 575-580, 2009.
- 3) Thananchai H, Makadzange T, Maenaka K, Kuroki K, Peng Y, Conlon C, Rowland-Jones S, Dong T. Reciprocal recognition of an HLA-Cw4 restricted HIV-1 gp120 epitope by CD8+ T cells and NK cells. *AIDS* 23: 189-193, 2009.

研究課題：抗 HIV 薬の適正使用と効果・毒性に関する基礎的研究

課題番号：H20-エイズ-一般-002

主任研究者：瀧永 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 治療開発室長）

分担研究者：杉浦 互（国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター 部長）、太田 康男（帝京大学医学部 教授）、児玉 栄一（東北大学医学部 助教）、吉村 和久（熊本大学エイズ学研究センター 准教授）、鈴木 康弘（東北大学大学院医学系研究科 講師）、横幕 能行（国立病院機構名古屋医療センターエイズ診療科 医長）、川村 龍吉（山梨大学医学部 講師）、塚田 訓久（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 医療情報室長）、本田 元人（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 医師）

1. 研究目的

新規抗 HIV 薬の適正な使用をガイドするために、臨床と基礎の両面から新薬による治療指針のもとになるデータを提供することを目指す（柱1：新規薬剤の適正使用に関する基礎的研究）。また、治療に伴う毒性や他剤との相互作用を解析し、有害事象を回避するための治療法を探索する（柱2：抗 HIV 薬の効果と毒性に関する研究）。

2. 研究方法

柱1では、多剤耐性患者から得られた臨床分離株や継代培養で選択された薬剤耐性 HIV に対する新規薬剤の効果解析した。また、表皮水疱蓋を用いた *ex vivo* HIV 感染モデルを用いて、新規薬剤の感染予防効果を解析した。

柱2では、臨床症例より新規薬剤および既存薬による有害事象の程度・頻度を明らかにし、そのメカニズムを解析した。また、安全な他剤との併用を検討した。

（倫理面への配慮）

国立国際医療研究センターと国立病院機構名古屋医療センターの症例の臨床経過・HLA の解析および HIV 遺伝子を解析した。臨床経過・HLA の解析と患者 HIV 遺伝子の解析について、それぞれの施設の倫理委員会で承認を得た。患者の理解と協力を得るため、研究の必要性と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。個人情報保護のため、個人を特定できるような情報は外部には出さない。健常者からの表皮水疱蓋の採取については、山梨大学の倫理委員会で承認を得た後、同大病院皮膚科で行った。

3. 研究結果

柱1：①「etravirine (ETR) の耐性 HIV-1 への効果」次世代型の非核酸系逆転写酵素阻害薬 (NNRTI) である ETR は、efavirenz (EFV) や nevirapine (NVP) に高度耐性となった臨床分離株に対しても十分な抗 HIV-1 効果を示した。逆転写酵素 (RT) の二つの多型的変異 V106I,

V179D を持つ HIV-1 は、EFV と NVP に対し有意な耐性を示したが、ETR には感受性だった。in silico の構造解析から、ETR は EFV や NVP と異なり flexible な構造をもつため、種々の変異を持つ RT の binding pocket に結合できると考えられた。②「CTL 逃避変異の薬剤耐性への影響」RT には HLA-B*51 拘束性 CTL の major epitope (RT 128-135) が存在し、HLA-B*51 陽性の感染者ではほぼ 100%、RT135 番のアミノ酸が逃避変異 (I135X) を起こしていた。最も頻度が高い I135T を持つ HIV-1 を継代培養し EFV 耐性ウイルスを誘導したところ、新たな変異 E138K が出現した。I135T と E138K は、それぞれ単独では有意な耐性をもたらさないが、組み合わせると EFV・NVP のみならず、ETR に対しても耐性をもたらした。I135T は、HLA-B*51 陰性の感染者にも拡がっており、特に日本でその頻度が高い。I135T/E138K は今後世界的に増えてくる可能性の高い新規の NNRTI 耐性変異パターンであり、今までの NNRTI 耐性変異と異なり ETR や rilpivirine (RPV) でサルベージできない可能性があり注意を要する。③「raltegravir (RAL) 耐性変異の影響」インテグラーゼの遺伝的多様性の RAL 感受性への影響を調べるため、実験株 (HXB2) と多剤耐性症例由来株に RAL 耐性変異 Q148K/H/R・N155H を導入した。RAL 耐性変異を単独で導入した場合、多剤耐性症例由来の株で実験株よりも RAL 耐性度が高かった。いずれの株も 148 と 155 を同時に導入した場合、増殖がほとんど観察されなかった。また、Q148H 変異は増殖能を著しく落とすが、G140S が加わることによりほぼ回復した。インテグラーゼ遺伝子の多様性が RAL 耐性変異獲得後の耐性度に影響を与えていた。実際に RAL 投与症例では、G140S と Q148H の組み合わせがよく見られ、Q148H と K155H の組み合わせは見られないが、増殖能の点から説明できることが明らかとなった。④「maraviroc (MVC) に対する耐性誘導」三つの CCR5-tropic な臨床分離株 (CRF08_BC、subtype C、B) から、CCR5 を導入した浮遊細胞 (PM1/CCR5 細胞) で MVC 耐性を誘導したところ、いずれも異なる変異が出

現し、共通したものはなかった。株により異なる変異が生じており、耐性メカニズムも異なる可能性がある。遺伝子型による MVC の耐性検査は極めて困難であると考えられた。⑤「MVC による HIV 感染予防効果の解析」MVC 内服前後の健常者から表皮水疱蓋を採取し、その表面に HIV を接種し、ランゲルハンス細胞の感染を調べた。MVC 内服前の表皮水疱蓋には感染が認められたが、内服後のものには認められなかった。また、MVC 内服後の精液中の MVC 濃度は、血液中と同等かそれ以上であった。MVC 内服は、非感染者が自らの感染を防止するためにも、男性感染者がパートナーの感染を防止するためにも、いずれにも有望であることが示された。

柱2：⑥「tenofovir (TDF) 腎障害の解析」腎障害による TDF の中止率はほぼ 5%であり、欧米の報告よりも多く、低体重がリスク因子の一つであると考えられた。TDF は、欧米のガイドラインで、不可欠な第一選択と位置づけられているが、今後、体重のより軽いアジア人への投与が本格化した際に、腎障害が問題になる可能性がある。⑦「プロテアーゼ阻害薬 (PI) による脂質異常」lopinavir (LPV) 導入症例では、中性脂肪が平均して導入前の 2 倍になり、総コレステロールが 36%増加した。LPV から darunavir (DRV) に変更した 7 例で、中性脂肪とコレステロール値の改善が見られた。LPV は特に中性脂肪を上昇させ、DRV へ変更すると脂質異常が改善する可能性があることが示された。⑧「PI による代謝異常のメカニズム解析」LPV と DRV は protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) の発現を増加させ、インスリン受容体基質 1 (IRS-1) のリン酸化を抑制し、glucose transporter 4 (GLUT4) の細胞膜上への発現を抑制した。その程度は LPV のほうが強かった。PTP1B 阻害薬は、まだ臨床投与されていないが、PI によるインスリン抵抗性を改善する可能性が示された。⑨「抗 HIV 療法時のワーファリン併用」ワーファリンは 2 つの光学異性体よりなり、それぞれが異なるチトクローム P450 (CYP) で代謝され、また、それぞれの CYP が薬剤による誘導や阻害を別々に受けるため、抗 HIV 薬と併用する際は投与量調節が重大な問題となる。LPV 投与中にワーファリゼーションが困難だった例で ritonavir (RTV) boost をしない fosamprenavir (fAPV) に変更したところ、PT-INR が安定した。RAL に変更しても適切な PT-INR が得られた。他の 2 例で、RAL と併用したが良好なコントロールが可能であった。ワーファリンが必要な症例で抗 HIV 療法を行う際は、RTV boost をしない fAPV か、RAL を key drug とするとコントロールしやすいことが示された。⑩「RAL の有害事象」RAL

が投与された感染者 200 例について検討したところ、16 例で肝障害、4 例で皮膚掻痒感、1 例で CT 画像上明らかな腹膜炎を起こした。RAL の日本人における有害事象は、欧米の臨床試験よりも高頻度である可能性がある。また、腹部症状や腹膜炎など、日本人特有のものもあるかもしれない。今後の投与に際して注意が必要である。

4. 考察

抗 HIV 薬の効果と毒性に関して、いくつかの重要な知見が得られた。特に、欧米人よりも日本人・アジア人特有と思われる問題も見いだされており、欧米のガイドラインを適用する際に留意すべき注意点を示すことができた。

5. 自己評価

1) 達成度について

柱1・柱2ともに、計画は概ね達成した。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

CTL の逃避変異と薬剤耐性の関係、インテグラーゼ遺伝子の多様性と RAL 耐性、MVC の耐性、MVC の感染予防効果、日本人における RAL の有害事象、抗 HIV 薬とワーファリンの併用、PI による脂質異常とインスリン抵抗性のメカニズムなど、いずれもその解決は臨床現場で喫緊に求められており、研究成果はそのまま臨床応用できるものもある。学術的な面のみならず、臨床面における国際的・社会的なニーズも高い。

3) 今後の展望について

今後更に臨床現場に登場する新規の抗 HIV 薬について、日本人における効果・安全性について検証する。インテグラーゼの遺伝的多様性と RAL 耐性の影響については、今後症例数を増やして、より具体的な多型的変異と耐性の関係について明らかにする。抗 HIV 薬の感染予防効果については、MVC 以外の抗 HIV 薬についても検討する。PI によるインスリン抵抗性については、PTP1B 発現増加のメカニズムについて探る。

6. 結論

抗 HIV 薬の適正な使用をガイドするため、薬剤耐性のメカニズムと日本人における治療に伴う毒性の解析に取り組み、臨床現場で活用可能な成果が得られた。

7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

なし。

研究発表

研究代表者

潟永 博之

- 1) 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:FastTrack15-22, 2010.
- 2) Gatanaga, H., Ode, H., Hachiya, A., Hayashida, T., Sato, H., and Oka S. Combination of V106I and V179D polymorphic mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase confer resistance to efavirenz and nevirapine but no to etravirine. *Antimicrob Agents Chemother* 54:1596-1602, 2010.
- 3) Gatanaga, H., Oowa, M., and Oka, S. Introduction of TaqMan HIV-1 assay increased unnecessary drug resistance testing. *AIDS Patient Care STDS* 24:203-204, 2010.
- 4) 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.
- 5) Kawashima, Y., Kuse, N., Gatanaga, H., Naruto, T., Fujiwara, M., Dohki, S., Akahoshi, T., Maenaka, K., Goulder, P., and 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) Tanuma, J., Hachiya, A., Ishigaki, K., Gatanaga, H., Lien, T.T., Hien, N.D., Kinh, N.V., Kaku, M., and Oka, S. Impact of CRF01_AE-specific polymorphic mutations G335D and A371V in the connection subdomain of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase (RT) on susceptibility to nucleoside RT inhibitors. *Microbes Infect* 12:1170-1177, 2010.
- 7) Mwimanzu, P., Hasan, Z., Tokunaga, M., Gatanaga, H., Oka, S., and Ueno, T. Naturally arising HIV-1 Nef variants conferring escape from cytotoxic T lymphocytes influence viral entry co-receptor expression and susceptibility to superinfection. *Biochem Biophys Res Commun* 403:422-427, 2010.
- 8) Honda, K., Zheng, N., Murakoshi, H., Hashimoto, M., Sakai, K., Borghan, M.A., 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, 2010.

研究分担者

杉浦 亙

- 1) Matsuyama, S., Aydan, A., Ode, H., Hata, M., Sugiura, W., and Hoshino, T. Structural and energetic analysis on the complexes of clinically isolated subtype C HIV-1 proteases and approved inhibitors by molecular dynamics simulation. *J Phys Chem B* 114:521-530, 2010.
- 2) Bandaranayake, R.M., Kolli, M., King, N.M., Nalivaika, E.A., Heroux, A., Kakizawa, J., Sugiura, W., and Schiffer, C.A. The effect of clade-specific sequence polymorphisms on HIV-1 protease activity and inhibitor resistance pathways. *J Virol* 84:9995-10003, 2010.
- 3) Saeng-aroon, S., Tsuchiya, N., Auwanit, W., Ayuthaya, P. I., Pathipvanich, P., Sawanpanyalert, P., Rojanawiwat, A., Kannagi, M., Ariyoshi, K., and Sugiura, W. Drug-resistant mutation patterns in CRF01_AE cases that failed d4T+3TC+nevirapine fixed-dosed combination treatment: Follow-up study from the Lampang cohort. *Antiviral Res* 87:22-29, 2010.
- 4) Suzuki, S., Urano, E., Hashimoto, C., Tsutsumi, H., Nakahara, T., Tanaka, T., Nakanishi, Y., Maddali, K., Han, Y., Hamatame, M., Miyauchi, K., Pommier, Y., Beutler, J. A., Sugiura, W., Fuji, H., Hoshino, T., Itotani, K., Nomura, W., Narumi, T., Yamamoto, N., Komano, J. A., and Tamamura, H. Peptide HIV-1 integrase inhibitors from HIV-1 gene products. *J Med Chem* 53:5356-5360, 2010.

太田 康男

- 1) 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.
- 2) 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., and 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* 88:72-79, 2010.

児玉 栄一

- 1) Watanabe, K., Negi, S., Sugiura, Y., Kiriya, A., Honbo, A., Iga, K., Kodama, EN., Naitoh, T., Matsuoka, M., and Kano, K. Binding of multivalent anionic porphyrins to V3 loop fragments of HIV-1 envelope and their

antiviral activity. *Chem Asian J* 5:825-834, 2010.

- 2) Narumi, T., Hayashi, R., Tomita, K., Kobayashi, K., Tanahara, N., Ohno, H., Naito, T., Kodama, E., Matsuoka, M., Oishi, S., and Fujii, N. Synthesis and biological evaluation of selective CXCR4 antagonists containing alkene dipeptide isosteres. *Org Biomol Chem* 8:616-621, 2010.
- 3) Izumi, K., Nakamura, S., Nakano, H., Shimura, K., Sakagami, Y., Oishi, S., Uchiyama, S., Ohkubo, T., Kobayashi, Y., Fujii, N., Matsuoka, M., and Kodama, E.N. Characterization of HIV-1 resistance to a fusion inhibitor, N36, derived from the gp41 amino-terminal heptad repeat. *Antiviral Res* 87:179-186, 2010.
- 4) Shimane, K., Kodama, E.N., Nakase, I., Futaki, S., Sakurai, Y., Sakagami, Y., Li, X., Hattori, T., Sarafianos, S.G., and Matsuoka, M. Rev-derived peptides inhibit HIV-1 replication by antagonism of Rev and a co-receptor, CXCR4. *Int J Biochem Cell Biol* 42:1482-1488, 2010.
- 5) Schuckmann, M.M., Marchand, B., Hachiya, A., Kodama, E.N., Kirby, K.A., Singh, K., and Sarafianos, S.G. The N348I mutation at the connection subdomain of HIV-1 reverse transcriptase decreases binding to nevirapine. *J Biol Chem* 285:38700-38709, 2010.
- 6) Shimura K, Nameki, D., Kajiwara, K., Watanabe, K., Sakagami, Y., Oishi, S., Fujii, N., Matsuoka, M., Sarafianos, S.G., and Kodama, E.N. Resistance profiles of novel electrostatically constrained HIV-1 fusion inhibitors. *J Biol Chem* 285:39471-39480, 2010.

吉村 和久

- 1) Hatada, M., Yoshimura, K., Harada, S., Kawanami, Y., Shibata, J. and Matsushita, S. Human immunodeficiency virus type 1 evasion of a neutralizing anti-V3 antibody involves acquisition of a potential glycosylation site in V2. *J Gen Virol* 91:1335-1345, 2010.
- 2) Yamada, Y., Ochiai, C., Yoshimura, K., Tanaka, T., Ohashi, N., Narumi, T., Nomura, W., Harada, S., Matsushita, S., and Tamamura, H. CD4 mimics targeting the mechanism of HIV entry. *Bioorg Med Chem Lett* 20:354-358, 2010.
- 3) Yoshimura, K., Harada, S., Shibata, J., Hatada, M., Yamada, Y., Ochiai, C., Tamamura, H., and 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.
- 4) Narumi, T., Ochiai, C., Yoshimura, K., Harada, S., Tanaka, T., Nomura, W., Arai, H., Ozaki, T., Ohashi, N., Matsushita, S., and Tamamura, H. CD4 mimics targeting the HIV entry mechanism and their hybrid molecules with a CXCR4 antagonist. *Bioorg Med Chem Lett* 20:5853-5858, 2010.

鈴木 康弘

- 1) Imamura, J., Suzuki, Y., Gonda, K., Roy, C.N., Gatanaga, H., Ohuchi, N., and Higuchi, H. Single-particle tracking confirms that multivalent Tat-protein transduction domain induced Heparan-sulfate Proteoglycan (HSPG) cross-linkage activates Rac1 for internalization. *J Biol Chem* (in press)

横幕 能行

- 1) Ibe, S., Yokomaku, Y., Shiino, T., Tanaka, R., Hattori, J., Fujisaki, S., Iwatani, Y., Mamiya, N., Utsumi, M., Kato, S., Hamaguchi, M., and Sugiura, W. HIV-2 CRF01_AB: first circulating recombinant form of HIV-2. *J Acquir Immune Defic Syndr* 54:241-247, 2010.
- 2) Hirano, A., Takahashi, M., Kinoshita, E., Shibata, M., Nomura, T., Yokomaku, Y., hamaguchi, M., and Sugiura, W. High performance liquid chromatography using UV detection for the simultaneous quantification of the new non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor etravirine (TMC-125), and 4 protease inhibitors in human plasma. *Biol Pharm Bull* 33:1426-1429, 2010.

川村 龍吉

- 1) Yamaguchi, M., Harada, K., Ando, N., Kawamura, T., Shibagaki, N., and Shimada, S. Marked response to imatinib mesylate in metastatic acral lentiginous melanoma on the thumb. *Clin Exp Dermatol* e377-378, 2009.
- 2) Aoki, R., Mitsui, H., Harada, K., Kawamura, T., Shibagaki, N., Tsukamoto, K., Murata, S., and Shimada, S. A case of lymphoepithelioma-like carcinoma of the skin associated with Epstein-Barr virus infection. *J Am Acad Dermatol* 62:681-684, 2010.

塚田 訓久

- 1) Tsukada, K., Teruya, K., Tasato, D., Gatanaga, H., Kikuchi, Y., and Oka, S. Raltegravir-associated perihepatitis and peritonitis: a single case report. *AIDS* 24: 160-161, 2010.
- 2) Takarabe, D., Rokukawa, Y., Takahashi, Y., Goto, A., Takaichi, M., Okamoto, M., Tsujimoto, T., Noto, H., Kishimoto, M., Kaburagi, Y., Yasuda, K., Yamamoto-Honda, R., Tsukada, K., Honda, M., Teruya, K., Kajio, H., Kikuchi, Y., Oka, S., and Noda, M. Autoimmune diabetes in HIV-infected patients on high active antiretroviral therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 95:4056-4060, 2010.

研究課題：血友病とその治療に伴う合併症の克服に関する研究

課題番号：H21-エイズ一般-001

研究代表者：坂田 洋一（自治医科大学医学部分子病態治療研究センター分子病態研究部 教授）

研究分担者：小澤 敬也（自治医科大学医学部分子病態治療研究センター遺伝子治療研究部 教授）、嶋 緑倫（奈良県立医科大学小児科学教室 教授）、長谷川 護（ディナベック株式会社 代表取締役社長）、稲葉 浩（東京医科大学臨床検査医学講座 講師）、高橋 将文（自治医科大学医学部分子病態治療研究センターバイオイメージング研究部 教授）、竹谷 英之（東京大学医科学研究所 講師）、瀧 正志（聖マリアンナ医科大学 教授） 柿沼 章子（社会福祉法人はばたき福祉事業団 事務局長）大橋 一夫（東京女子医科大学先端生命医科学研究所 准教授）

1. 研究目的

血友病は血液凝固因子第VIII(FVIII)、或いはIX(FIX)遺伝子異常による先天性出血性疾患である。治療は出血時因子製剤補充療法が中心で、不慮の致死性出血の予防は不可能である。HIVやHCV感染の原因となった因子製剤は改良されたが、インヒビタ出現はなお重要な課題である。血友病患者に対する社会的偏見は感染被害後顕著になった。これらを克服するために、以下の研究を進める。

I. 遺伝子治療：次年度の8型アデノ随伴ウイルスベクター(AAV8V)を用いた血友病B遺伝子治療臨床研究を視野に計画を遂行する。まず、FIX遺伝子導入・発現の安全と効率改善を目指す。抗AAV8中和抗体測定感度を高める。ヒト投与可能(GMPレベル)AAV8V作製を中国VGT社に委託製作する。血友病Aではサルでの発現因子測定系確立と、血友病Aクローンブタを作製する。さらに半永久的遺伝子治療を目指して、染色体組み込み型改変SIVベクター利用を間葉系幹細胞シートと、インシュレータという安全のためのキーワードを基礎に検討する。**II. インヒビタ対策**は、血友病Aマウス免疫寛容誘導モデルやインヒビタ患者血液を用いた基礎解析、及び、インヒビタの後方視的解析を基盤に前方視的調査解析によりインヒビタ発症要因を検討する。患者データベース構築や、インヒビタ測定法改善も目指す。**III. 社会的QOL改善研究**では患者中心二次アンケート回収と解析に向けた準備をする。また、薬害HIV感染血友病患者の問題解決のために、患者家族や専門家の聞き取り調査を中心に解析を進め、具体的解決策を提案する。

2. 研究方法

I. 遺伝子治療：**1. 血友病B遺伝子治療**：サルには血友病は確認されていない。ヒトとサルのFIX相同性は97%以上ある。我々の確立した両者識別可能測定系（世界唯一）を用いて遺伝子導入で発現したFIXを定量した。AAV既感染による中和抗体がAAV8V感染効率を左右することから、抗AAV中和抗体測定感度を高める検討をした。末梢血管からFIX遺伝子投与した抗体陰性サルの発現効果持続と安全性を観察した。抗体陽性サルにバルーン付きマイクロカテーテルを用いて、局所血液を駆血・洗浄後、肝臓にAAV8V-FIX遺伝子を投与し検討した。サル、健常人、血友病患者における抗AAV8中和抗体価を測定した。ヒト投与可能(GMPレベル)AAV8V-FIX作製をディナベック関連のVector Gene Technology Company (VGT)に委託した。**2. 血友病A遺伝子治療**：FVIIIは、サルとヒトの相同性は98%以上ある。自作・購入モノクロナル抗体を組み合わせで識別可能な測定系樹立を進めた。血友病Aクローンブタ作製を進めた。**3. 遺伝子導入細胞移植**：改変SIVベクター(SIVV)を用いて、体外で血友病Aマウス自己間葉系幹細胞(MSC)にFVIII遺伝子導入した。細胞シートを作製し、除去可能な皮膚、腹腔内に貼り付けて、FVIII発現を観察した。更にMSCに山中4因子を加えiPS細胞を樹立し、候補細胞として検討開始した。**II. インヒビタ対策**：頻回FVIII投与で作製したITI成熟血友病Aマウスモデルの脾臓とリンパ節由来細胞を用いて寛容誘導機作解析を進めた。バイパス療法不応患者血液を用いてその原因を検

討した。インヒビタ測定系改善も進めた。インヒビタ症例の前方視的解析による要因解析を進めた。インヒビタ患者の血友病因子、及びサイトカイン遺伝子解析のための倫理審査を準備した。**III. 社会的QOL向上のための研究**：二次アンケート回収と、解析システム作りを進めた。薬害HIV感染血友病患者と非感染血友病患者に共通する問題を解析した。遺伝、父親、家族の役割などを、専門家を含めた聞き取り調査や勉強会を行った。（倫理面への配慮）

遺伝子治療は、非病原性改変ウイルスベクターを利用した遺伝子導入法開発と応用を目指したもので、周辺環境及び実験従事者の安全性に関して倫理的問題が生ずることはないと考えている。動物実験は、厚労省基本指針と各大学動物実験指針規定に沿って行い、独立行政法人医薬基盤研究所霊長類医科学研究所センターで実施するサルの実験では、基盤研究所のガイドライン、及び実験遂行方針を遵守した。臨床研究は、最新の厚労省倫理指針に従って進める。特に遺伝子解析に関しては、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する各省庁の倫理指針を遵守し、学内、必要な場合は国の審査を経た上で実施する。疫学調査は疫学研究に関する倫理指針を遵守する。

3. 研究結果

I. 遺伝子治療 **1. 血友病B遺伝子治療**：抗AAV中和抗体測定感度を世界標準レベルの数百倍高めた。末梢静脈からAAV投与した抗体陰性サルに3年近く10-30%FIX発現持続が得られている。バルーンカテーテル利用抗体回避ベクター投与方法により、抗体陽性サルにも5-10%の発現を維持出来た。サル188頭、健常人58人、血友病患者43人の抗AAV中和抗体を測定した。サルで約72%、人では約半数が陽性であり、患者が有意に高くはなかった。ベクター作製委託したVGTの定法であるヘルペスウイルス利用ヘルパー法ではGMPレベルAAV8Vの生産効率が悪いことが明らかになった。ディナベックと自治医大グループが複数回訪中し、プラスミドトランスフェクション法の技術指導し、年度内ベクター納入のめどが立った。**2. 血友病A遺伝子治療**：発現ヒトFVIIIをサルFVIIIと識別測定可能な系が確立できた。血友病Aクローンブタ作製に成功し、特許申請中である。**3. 遺伝子導入細胞移植**：体外でFVIII遺伝子搭載改変SIVVをMSCに導入し、作製した細胞シート懸置上清を血友病Aマウスに投与し、活性上昇を得た。ルシフェラーゼ発現シートを用いて腹腔内貼り付け細胞シート可視化にも成功した。血友病AマウスMSCに山中4因子を導入しiPS細胞を樹立した。脂肪組織からも幹細胞を樹立し、細胞シート作製に成功した。**II. インヒビタ対策**：寛容誘導マウスではIgG2aおよびIgG2bの有意な低下が見られ、単離リンパ球で有意なCD4+T細胞増殖活性低下が確認できた。インヒビタに対するAPCCによるバイパス療法不応は製剤混入の外因系インヒビタ集積によることを解明した。後方視的解析により得られた重症度、家族内発生などインヒビタ発生要因を、前方視的解析で検討を進めつつある。患者サイトカイン、血友病因子遺伝子解析は奈良県立、名古屋大、東京医大で倫理審査の承認を受けた。インヒビタ測定法は、国際的推奨のNijmegen法を簡便化したTokyo変法を検討した。

III.社会的QOL向上研究:QOLを左右する関節障害に対して、小児の慢性滑膜炎治療、成人における関節置換治療に広く整形外科医の関心を高める方策を検討した。また、二次アンケートを回収し、患者代表の参加も含めた解析システムを構築した。薬害 HIV 感染血友病患者にも血友病患者一般の問題があり、聞き取り調査から、血友病遺伝相談体制の不備と血友病遺伝とは関係のない父親と家族の役割に、解決すべき多くの問題があることが明らかになった。

4. 考察

I.遺伝子治療: AAV8V を用いたサル肝臓を標的にした血友病 B 遺伝子導入は、高感度抗 AAV 抗体測定法開発、及び、抗体陽性個体に遺伝子導入可能な技術開発したことから、技術的には世界最先端に達した。実績・低予算等も考慮し、中国企業に GMP レベル FIX 搭載 AAV8V を作製委託した。しかし、企業定法では作製効率が悪く、班員が当地に赴いての技術指導などによりベクターの本年度納入の目安がついた。次年度はベクターの品質検定を第三者企業に依頼し、サルで効果を確認の上臨床研究に入る。臨床プロトコール作成は自治医大で先行するパーキンソン病遺伝子治療を参考に効率よく進める予定である。FVIII については、サルと血友病 A ブタで実験を施行する。AAV は治療量では殆ど染色体に組み込まれないため、細胞分裂により効果が希釈されていく。染色体に組み込まれる改変 SIVV も、国内外で臨床研究予定されるまで安全性は向上している。ex vivo で自己細胞に SIVV を利用して FVIII 遺伝子を導入し、安全担保の為の仕組みを組み込んで利用する方法は長期安全かつ効果持続遺伝子治療として期待できる。II.インヒビタ対策: ITI 誘導血友病マウスの免疫組織解析により寛容誘導メカニズムの一端が明らかになることが期待される。インヒビタ患者の遺伝子解析は発症誘因解明に大きな意味がある。また患者の前方視的解析は、インヒビタ発生要因解明だけでなく、患者データベース作成に資するところも大である。III.社会的 QOL 向上: 患者視点二次アンケートは回収率の悪さが問題ではあるが、次年度の解析による課題提出と政策提言に期待したい。聞き取り調査により、薬害 HIV 感染血友病患者家族と非感染患者家族に共通の問題が明らかになった。血友病遺伝に関わる母を昨年、関与しない父に本年度聞き取り調査を行ったことは家族問題を考える上での新視点として評価できる。血友病遺伝に関しては極めて関心が高く、早急に相談体制を確立する必要性が実感された。次年度は HIV 感染特有の問題への切り込みが期待される。

5. 自己評価

1) 達成度について

AAV8V を用いた肝臓への FIX 遺伝子導入とその発現は、技術的には世界最先端にあり、次年度、ヒト臨床研究開始可能レベルを達成した。AAV 中和抗体陽性サルにも遺伝子導入技術をほぼ確立した。患者選択、プロトコール作成など臨床研究開始に向けたスケジュールは順調に進んでいる。GMP レベルベクター作製は欧米企業に依頼すれば数億円を要する。低予算でベクター作製を委託した中国企業については、肝心な時期に尖閣問題が勃発、さらに技術的にも不安感はずきまとうが、ディナベックと自治医大グループが訪申して技術指導し、本年度中納入めどは立った。長期発現を目指した改変 SIVV を用いた細胞移植型遺伝子治療も、長足の進歩が得られた。血友病 A クローンブタ作製は世界の注目を浴びつつある。血友病インヒビタ対策として、ITI モデルマウスの解析に一定の成果がみられた。インヒビタ患者調査解析も遺伝情報を含む前方視的解析が始まり、今後の展開が期待される。薬害 HIV 感染血友病患者とその家族の面接・聞き取り調査により、遺伝の悩み、父親の役割など血友病

共通の問題が明らかになり、次年度の感染被害者に特有な問題解析の基盤形成が出来た。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

委託作製のヒト投与可能ベクター品質に臨床研究成果は左右されるが、遺伝子導入のキーとなる抗 AAV 抗体高感度測定技術と、抗体回避遺伝子導入法の確立は世界に冠たるものである。遺伝子治療成功は、患者及び家族の社会的問題を含めた QOL を著しく高める。製剤使用量も減り経済的にも資するところ大である。SIVV を利用して血友病遺伝子を導入した自己間葉系幹細胞から細胞シート作製、体内移植・血友病因子発現技術の開発は、効果の長期持続と、除去可能であるという安全性も期待できる。遺伝子治療全般に及ぼす学術的影響は極めて大きい。血友病 A クローンブタ(世界初)は既に製薬会社数社から引き合いがある。ITI メカニズムの解析は、一人数億円もかかることのあるインヒビタ対策に資する。前方視的解析は、時間のかかる息の長い仕事になるが、インヒビタ発生要因解析のみならず、統計解析基盤になる日本における正確な血友病患者データベース構築に資する。患者参加型・多視点のアンケートは世界に類をみないものである。聞き取り調査という手法で、薬害 HIV 感染血友病患者とその家族を含めた調査研究は、より具体的に患者の問題点を明らかにし、血の通った政策提言と達成プログラム作成に結びつくことが期待される。

3) 今後の展望について

血友病 B 遺伝子治療臨床研究開始には GMP レベル AAVV 作製が不可欠である。予算が左右するが、スケジュール通り次年度には臨床研究開始が可能と考える。サルを用いた安全性担保のための最小必要ベクター量確認や投与方法検討などはさらに必要である。また、染色体組み込み型ベクターを利用した安全で治療効果長期維持のための基礎的検討も不可欠と考える。ITI メカニズム解析は、治療効率改善のためにも叡智を集積して進める必要がある。遺伝情報まで含めたインヒビタ発生要因の調査研究は、不可欠なものである。また日本での血友病患者データベースは患者治療と QOL 向上のために作成しなければならないと考えている。個人情報絡む聞き取り調査は介入研究を含め、患者や家族の視点と利益を踏まえて、注意深く、しかし大胆に取り組む必要がある。

6. 結論

AAVV を用いた血友病 B 遺伝子治療は、技術的には世界最先端に達し、臨床研究開始可能と考える。最小必要ベクター量検討など安全性担保はさらに必要である。染色体組み込み型改変 SIVV を用いた遺伝子治療も次の一手として重要である。血友病マウスモデルを用いたインヒビタ基礎研究も期待できる。インヒビタ前方視的調査により、具体的インヒビタ発生要因が絞り込まれる可能性は高い。患者参加型多視点のアンケート解析から有益な情報が得られている。HIV 感染血友病患者を含む血友病患者家族に対する聞き取り調査は、十分な個人情報配慮は必要であるが、患者の直接的・具体的状況が把握できる有用な解析方法である。血友病遺伝相談体制を早急に確立する必要がある。

7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

「血友病 A モデルブタの作出」出願番号:特願 2010-102569 出願済み。

研究発表

研究代表者

坂田 洋一

- 1) Ohmori, T., Madoiwa, S., Mimuro, J., Sakata, Y.: Development of platelet-directed gene modification by lentiviral vector. *Rinsho Ketsueki*. 51(8):625-31, 2010.
- 2) Ishiwata A, Mimuro J, Mizukami H, Kashiwakura Y, Yasumoto A, Sakata A, Ohmori T, Madoiwa S, Ono F, Shima M, Yoshioka A, Ozawa K, Sakata Y.: Mutant macaque factor IX T262A: a tool for hemophilia B gene therapy studies in macaques. *Thromb Res*. 125(6):533-537, 2010.
- 3) Mimuro J, Mizuta K, Kawano Y, Hishikawa S, Hamano A, Kashiwakura Y, Ishiwata A, Ohmori T, Madoiwa S, Kawarasaki H, Sakata Y.: Impact of acute cellular rejection on coagulation and fibrinolysis biomarkers within the immediate post-operative period in pediatric liver transplantation. *Pediatr Transplant*. 14(3):369-376, 2010.
- 4) Ohmori, T., Kashiwakura, T., Ishiwata, A., Madoiwa, S., Mimuro, J., Honda, S., Miyata, T., Sakata, Y.: Vinculin activates inside-out signaling of integrin α IIb β 3 in Chinese hamster ovary cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 400(3) 323-328, 2010
- 5) Ohmori, T., Kashiwakura, Y., Ishiwata, A., Madoiwa, S., Mimuro, J., Furukawa, Y., Sakata, Y.: Vinculin is indispensable for repopulation by hematopoietic stem cells, independent of integrin function. *J Biol Chem*. 285(41)31763-31773, 2010.

口頭発表

- 1) 窓岩清治、小林英司、石渡 彰、柏倉裕志、大森 司、三室 淳、坂田洋一：マイクロポット植え込み成体血友病 A マウスを用いた持続的 VIII 因子刺激に対する免疫応答能の解析 第 72 回日本血液学会学術集会 2010.9/24-26 横浜.
- 2) Jun Mimuro, Yoichi Sakata: Hemophilia gene therapy study with mice and non-human primates. 第 72 回日本血液学会学術集会 2010.9/24-26 横浜.
- 3) 大森 司、窓岩清治、三室 淳、坂田洋一：レンチウイルスベクターを用いた血小板標的遺伝子導入法の開発 (シンポジウム) 第 72 回日本血液学会学術集会 2010.9/24-26 横浜.
- 4) Jun Mimuro, Akira Ishiwata, Hiroaki Mizukami, Yuji Kashiwakura, Katsuhiko Takano, Tsukasa Ohmori, Seiji Madoiwa, Keiya Ozawa, Yoichi Sakata: Liver-restricted expression of the canine factor VIII gene facilitates prevention of inhibitor formation in factor VIII-deficient mice. 第 16 回日本遺伝子治療学会学術集会 2010.7/1-3 宇都宮.
- 5) Tsukasa Ohmori, Yuji Kashiwakura, Akira Ishiwata, Seiji Madoiwa, Eiji Akiba, Mamoru Hasegawa, Jun Mimuro, Keiya Ozawa, Yoichi Sakata: The chicken hypersensitive site-4 chromatin insulator sequence protects clonal domains of hematopoietic stem cells transduced with a self-inactivating SIV vector in platelet-directed gene therapy. 第 16 回日本遺伝子治療学会学術集会 2010.7/1-3 宇都宮.
- 6) Tsukasa Ohmori, Yuji Kashiwakura, Akira Ishiwata, Seiji Madoiwa, Jun Mimuro, Yoichi Sakata: Silencing of A targeted protein in platelets using A lentiviral vector delivering short hairpin RNA sequence. 第 16 回日本遺伝子治療学会学術集会 2010.7/1-3 宇都宮.
- 7) 柏倉裕志、三室 淳、石渡 彰、安本篤史、坂田飛鳥、大森 司、窓岩清治、水上浩明、小野文子、小澤敬也、坂田洋一：非ヒト霊長類を用いた血友病 A 遺伝子治療研究に向けたヒト BDDFVIII 特異的検出法の確立 第 33 回日本血栓止血学会学術集会 2010.4/22-24 鹿児島.
- 8) 石渡 彰、三室 淳、水上浩明、小野文子、安本篤史、坂田飛鳥、柏倉裕志、大森 司、窓岩清治、久米晃啓、保富康宏、小澤敬也、坂田洋一：非ヒト霊長類を用いた血友病 B 遺伝子治療研究：末梢静脈投与 AAV8 ベクターによる第 IX 因子遺伝子導入 第 33 回日本血栓止血学会学術集会 2010.4/22-24 鹿児島.

研究分担者

小澤 敬也

- 1) Muramatsu S, Fujimoto K, Kato S, Mizukami H, Asari S, Ikeguchi K, Kawakami T, Urabe M, Kume A, Sato T, Watanabe E, Ozawa K, Nakano I.: A phase I study of aromatic L-amino acid decarboxylase gene therapy for Parkinson's disease. *Mol Ther* 18:1731-5, 2010.
- 2) Lock M, McGorray S, Auricchio A, Ayuso E, Beecham EJ, Blouin V, Bosch F, Bose M, Byrne B, Caton T, Chiorini J, Chtarto A, Clark KR, Conlon T, Darmon C, Doria M, Douar AM, Flotte TR, Francis J, Francois A, Giacca M, Korn M, Korytov I, Leon X, Leuchs B, Lux G, Melas C, Mizukami H, Moullier P, Muller M, Ozawa K, Philipsberg T, Poulard K, Raupp C, Riviere C, Roosendaal S, Samulski RJ, Soltys S, Surosky R, Tenenbaum L, Thomas DL, van Montfort B, Veres G, Wright JF, Xu Y, Zelenia O, Zentilin L, Snyder RO.: Characterization of a Recombinant Adeno-Associated Virus Type 2 Reference Standard Material. *Human Gene Therapy*, 21:1723-85, 2010.

口頭発表

- 1) Hiroaki Mizukami, Jun Mimuro, Akira Ishiwata, Hiroya Yagi, Tsukasa Ohmori, Masashi Urabe, Akihiro Kume, Yoichi Sakata, Keiya Ozawa: Successful factor IX expression by IV administration of AAV8 vectors in macaques. 第 16 回日本遺伝子治療学会学術集会 2010.7/1-3 宇都宮.
- 2) Akihiro Kume, Hiroya Yagi, Hiroaki Mizukami, Masashi Urabe, Tomonori Tsukahara, Akira Ishiwata, Jun Mimuro, Seiji Madoiwa, Tsukasa Ohmori, Yoichi Sakata, Keiya Ozawa: Choice of small-sized promoter for AAV-mediated factor IX expression in skeletal muscle. 第 16 回日本遺伝子治療学会学術集会 2010.7/1-3 宇都宮.

嶋 緑倫

- 1) Takeyama M, Nogami K, Matsumoto T, Soeda T, Suzuki T, Hattori K, Shima M. Characterisation of an antibody specific for coagulation factor VIII that enhances factor VIII activity. *Thromb Haemost*. 103: 94-102, 2010.
- 2) Soeda T, Nogami K, Matsumoto T, Ogiwara K, Shima M. Mechanisms of factor VIIa-catalyzed activation of factor VIII. *J*