

201124010A

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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 滝口 雅文

平成24(2012)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23年度 総括・分担研究報告書**

**研究代表者 滝口 雅文**

**平成24(2012)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.....5  
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 .....9  
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 治療開発室医長)
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  
新規抗 HIV 阻害剤に対する薬剤耐性発現機序に関する研究.....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・17  
- Cyclin T1 を標的とした抗 HIV-1 阻害剤の *in silico* スクリーニング -  
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.....23  
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.....28  
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.....32  
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 .....35

### IV. 研究成果の刊行物・別刷 .....42

# I . 総括研究報告書

厚生労働省科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）  
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：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 治療開発室医長）  
天野 将之（熊本大学 エイズ学研究センター COE リーチ・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、3種類のHIV-1転写阻害活性を有する新規薬剤候補を同定し、DRVとSC34EKに対する耐性変異の出現機構を明らかにできた。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。また、日本人HIV-1感染者で、病態進行に関与するHLAを明らかにした。中和抗体の研究では、コレセプター結合部位に対する交差反応性抗体を明らかにし、さらに抗体の小型化による反応性の改善を行った。

#### 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 (DRV)は耐性が出にくい、このDRV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、免疫を基盤とした治療法がある。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(瀧永・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を行う(滝口)。さらに中和抗体を用いた治療法の開発のための基礎研究を行う(松下)。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) 薬剤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の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(SC34EK)に対する耐性HIV-1のCT領域内の変異は、site-directed mutagenesis法により感染性分子クローンpNL4-3に導入し、293FT細胞への遺伝子導入により組換えウイルスを作製した。抗HIV-1活性はMAGI法により測定した。

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・未報告のプロテアーゼ阻害剤(PI)をデザイン・合成・同定しており、そのようなPIを用いて結晶解析を基礎にした構造的解析を通して新たなPI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  
502人の日本人の慢性HIV-1感染症コホートで、HLAとHIV-1ウイルス量（VL）あるいはCD4数との相関を明らかにする。またHLA-Cw\*12:02拘束性のCTLエピトープを同定し、その逃避変異エピトープを明らかにする。更にHLA-A\*24:02拘束性のGag28エピトープの逃避変異を認識できるCTLを同定し、その性格を明らかにする。中和抵抗性を克服するために、scFvなどの遺伝子組み換え抗体断片を作製する。NK細胞のレセプターであるKIRが認識するHLA-Cw\*12:02抗原に結合するHIV-1由来のペプチドを明らかにし、NKレセプターとの結合を調べる。

（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

複数の耐性臨床分離株による耐性誘導により、PI耐性変異株重感染と遺伝子相同組み換えでHIV-1がDRVに高度耐性を獲得し得る事を明らかにした。一方、次世代HIV-1膜融合阻害剤であるSC34EKは、CT領域内にP203S/L204I/S241F/H258Q/A312Tのアミノ酸変異を誘導した。これら5つのアミノ酸変異は、T-20に約3倍の耐性を付与した。また、heptad repeatに導入されるアミノ酸変異を組み込むことで、耐性度は約8倍にまで増加し、またCT領域内の変異はHIV-1の感染性低下を引き起こした。

#### 2) 新規薬剤の開発

1. *oxatricyclic*-THFという全く新しい構造を有し、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（PI）活性を発揮する新規化合物、GRL-0519A等を開発した。更に*macrocyclic*構造を有するGRL-0216A等、*Tp*-THF構造を持つGRL-1398A等を開発した。
2. HIV-1転写阻害活性を有する薬剤の開発のために、3,000,000種類の化合物に対し*in silico*スクリーニングを行い、その結果スコアの良い124種類の化合物について、*in vitro*での抗HIV-1活性を評価したところ、3種類の新規薬剤（Compound 1, 2, 3）を同定した。その中で最も活性の高かったCompound 3は、急性及び潜伏HIV-1感染系でのウイルス産生を阻害し、HIV-1 Tatによる転写活性化を抑制した。さらに、Compound 3はHIV-1転写活性化時に増加するRNAポリメラーゼIIのリン酸化（P-RNAP

II）量を減少させることも分かった。

柱2：免疫療法の開発を目指した基礎研究

1. HLA-Cw\*12:02拘束性の2つの新たなエピトープを同定し、このうち1つのエピトープ上の逃避エピトープの出現を確認した。更にHLA-A\*24:02拘束性のGag28特異的エピトープ上の逃避変異エピトープを認識するCTLを明らかにし、逃避変異エピトープの選択と認識の機序を明らかにした。
2. 未治療・AIDS未発症の日本人慢性HIV-1感染者504人の初診時ウイルス量とCD4数を解析し、ウイルス量とCD4数に相加効果があるHLAクラスIのアレルを見いだした。
3. 中和抵抗性を克服するために、多くのウイルスで保存されているコレセプター結合部位に対する交差反応性抗体の開発を行い、また、抗V3抗体の小型化による反応性の改善などの成果を得た。
4. HLA-Cw\*12:02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用いて、微量巻き戻し法による網羅的スクリーニング条件を決定した。更にHLA-Cw\*12:02に対するNK細胞受容体KIRとの結合を解析した。

### D. 考察

耐性ウイルス出現の機序の解明の研究では、耐性変異が出にくいDRVに対して*in vitro*では耐性変異が誘導できることが明らかになった。一方、SC34EKに対して誘導されるCT領域内の変異は、膜融合反応を含めたHIV細胞侵入過程に影響を及ぼすことで、HIV-1融合阻害剤の感受性を減弱させていると考えられた。新規薬剤の開発では、GRL-0519A等の強力な新規PI候補を明らかにでき、今後DRVに対する耐性変異ウイルスが出現した場合に対する候補薬剤に目途がついた。

免疫療法を目指した研究では、CTLからの逃避変異を明らかにし、更にこれらの逃避変異を認識する新たなCTLを明らかにし、その認識機序を解明した。しかし、逃避変異ウイルスを強く抑制できるCTLを同定することはできなかった。中和抗体の研究では、保存された領域に対する新規単クローン抗体の交差反応性及び組み換え抗体断片の有用性が明らかにされ、NK細胞の研究では、HLA-Cw\*12:02に結合するKIRを解析するシステムが出来上がり、今後結合するペプチドの解析が進むと思われる。

### 自己評価

#### 1) 達成度について

本研究班は本年度が3年目の最終年度であるが、耐性変異出現の機序の解析では、DRVや次世代HIV-1膜融合阻害剤に対する耐性変異とその出現の機序をほぼ完全に解明できた。一方、新規薬剤の開発では新たな強力なPI候補を、またHIV-1

転写阻害活性を有する薬剤の開発では3つの候補薬剤を同定でき、この3年間で大きく進展した。

免疫療法の開発を目指した基盤研究では、この3年間で世界的レベルでのCTLからの逃避変異の蓄積を明らかにし、これらの逃避変異を認識するCTLの解析が進み、大きく進展した。また日本人のコホートで、初めて病態の進行に影響を及ぼすHLAを明らかにでき、ほぼ本研究班の目的を達成できた。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

DRVにより選択される耐性変異に対し効果が見られる新たなPIの候補が明らかになったことは、現在臨床で使われ耐性出現が少ないと高く評価されているDRVの次の世代の薬剤治療に大きな貢献をすると考えられる。また、CTLの逃避変異の解析は、免疫治療やワクチン開発に重要な情報を提供した。

3) 今後の展望について

この3年間の本研究班の研究成果をもとに、新たな治療法とワクチン開発に貢献する研究へと繋がれると考えられる。

## E. 結論

- 1) DRVとSC34EKに対する耐性変異の出現機構を明らかにできた。
- 2) DRV耐性変異ウイルスに効果がある新たなPI候補薬剤候補と3種類のHIV-1転写阻害活性を有する新規薬剤候補を同定した。
- 3) CTLから逃避変異の世界的蓄積を明らかにし、逃避変異を認識するCTLの同定とその認識機序を明らかにした。
- 4) 日本人HIV-1感染者で、病態進行に関与するHLAを明らかにした。
- 5) 中和能をもったコレセプター結合部位に対する交差反応性抗体を明らかにし、さらに抗体の小型化による反応性の改善を行った。
- 6) NK細胞レセプター(KIR)の認識するHLA-C抗原に結合するペプチドを明らかにし、そのKIRとの結合を調べるシステムを開発した。

F. 健康危険情報  
該当無し

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

滝口 雅文

- 1) Akahoshi T, Chikata T, Tamura Y, Gatanaga H, Oka S, Takiguchi M. Selection and accumulation of an HIV-1 escape mutant by three types of HIV-1-specific CTLs recognizing wild-type and/or escape mutant epitopes. *J Virol*. 86:1971-1981,2012.

- 2) Iglesias MC, Almeida JR, Fastenackels S, van Bockel DJ, Hashimoto M, Venturi V, Gostick E, Urrutia A, Wooldridge L, Clement M, Gras S, Wilmann PG, Autran B, Moris A, Rossjohn J, Davenport MP, Takiguchi M, Brander C, Douek DC, Kelleher AD, Price DA, Appay V. Escape from highly effective public CD8+ T cell clonotypes by HIV. *Blood* 118: 2138-2149, 2011.
- 3) Mwimanzani P, Hasan Z, Hassan R, Suzu S, Takiguchi M, Ueno T. Effects of naturally-arising HIV Nef mutations on cytotoxic T lymphocyte recognition and Nef's functionality in primary macrophages. *Retrovirology* 8:50, 2011
- 4) Zhang Y, Peng Y, Yan H, Xu K, Saito M, Wu H, Chen X, Ranasinghe S, Kuse N, Powell T, Zhao Y, Li W, Zhang X, Feng X, Li N, Leligdowicz A, Xu X, John M, Takiguchi M, McMichael A, Rowland-Jones S, Dong T. Multilayered defense in HLA-B51-associated HIV viral control. *J Immunol*. 187:684-91, 2011
- 5) Naruto T, Murakoshi H, Chikata T, Koyanagi M, Kawashima Y, Gatanaga H, Oka S, Takiguchi M. Selection of HLA-B57-associated Gag A146P mutant by HLA-B\*48:01-restricted Gag140-147-specific CTLs in chronically HIV-1-infected Japanese. *Microbes Infect*. 13: 766-770, 2011
- 6) 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

瀧永 博之

- 1) Akahoshi T, Chikata T, Tamura Y, Gatanaga H, Oka S, Takiguchi M. Selection and accumulation of an HIV-1 escape mutant by three types of HIV-1-specific CTLs recognizing wild-type and/or escape mutant epitopes. *J Virol*. 86:1971-1981, 2012.
- 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) 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

天野 将之

- 1) Ghosh AK, Chapsal BD, Parham GL, Steffey M, Agniswamy J, Wang Y-F, Amano M, Weber IT, Mitsuya H. Design of HIV-1 Protease Inhibitors with C3-Substituted Hexahydrocyclopentafuranyl Urethane as P2-Ligands: Synthesis, Biological Evaluations, and Protein-Ligand X-ray Crystal Structure. *Journal of Medicinal Chemistry.* 54(16): 5890-5901, 2011.
- 2) Koh Y, Aoki M, Danish ML, Aoki-Ogata H, Amano M, Das D, Shafer RW, Ghosh AK, Mitsuya H. Loss of Protease Dimerization Inhibition Activity of Durunavir Is Associated with the Acquisition of Resistance to Darunavir by HIV-1. *J Virol.* 85(19): 10079-10089, 2011.
- 3) Ghosh AK, Martyr CD, Steffey M, Wang Y-F, Agniswamy J, Amano M, Weber IT, Mitsuya H. Design of Substituted Bis-tetrahydrofuran (Bis-THF)-Derived Potent HIV-1 Protease Inhibitors, Protein-Ligand X-ray Structure, and Convenient Syntheses of Bis-THF and Substituted Bis-THF Ligands. *ACS Medicinal Chemistry Letters.* 2(4): 298-302, 2011.
- 4) Ide K, Aoki M, Amano M, Koh Y, Yedidi RS, Das D, Leschenko S, Chapsal B, Ghosh AK, Mitsuya H. Novel HIV-1 protease inhibitors (PIs) containing a bicyclic P2 functional moiety, tetrahydropyrano-tetrahydrofuran, that are potent against multi-PI-resistant HIV-1 variants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 55(4): 1717-1727, 2011.
- 5) Ghosh AK, Chapsal BD, Baldrige A, Steffey MP, Walters DE, Koh Y, Amano M, Mitsuya H. Design and Synthesis of Potent HIV-1 Protease Inhibitors Incorporating Hexahydrofuropyranol-Derived High Affinity P2 Ligands: Structure-Activity Studies and Biological Evaluation. *Journal of Medicinal Chemistry.* 54(2): 622-634, 2011.

馬場 昌範

- 1) Chande AG, Baba M, Mukhopadhyaya R. A single step assay for rapid evaluation of inhibitors targeting HIV-1 Tat mediated LTR transactivation. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* in press.
- 2) Sono Y, Sakakibara N, Ordonez P, Hamasaki T,

Baba M, Ikejiri M, Maruyama T. Synthesis of 1-benzyl-3-(3,5-dimethylbenzyl)uracil derivatives with potential anti-HIV activity. *Antiviral Chem. Chemother.* 22: 57-65, 2011.

- 3) Hamasaki T, Toyama M, Aoyama H, White Y, Okamoto M, Arima N, Hashimoto Y, Baba M. Selective inhibition of HTLV-1-infected cell proliferation by a novel tetramethylnaphthalene derivative. *Anticancer Res.* 31: 2241-2248, 2011.

松岡 雅雄

- 1) Inokuchi E, Oishi S, Kubo T, Ohno H, Shimura K, Matsuoka M, Fujii N. Potent CXCR4 antagonists containing amidine type peptide bond isosteres. *ACS Med. Chem. Lett* 2(6):477-80, 2011.
- 2) Izumi K, Watanabe K, Oishi S, Fujii N, Matsuoka M, Sarafianos SG, Kodama EN. Potent anti-HIV-1 activity of N-HR-derived peptides including a deep pocket-forming region without antagonistic effects on T-20. *Antivir. Chem. Chemother* 22(1):51-5, 2011.

前仲 勝実

- 1) Matsushita H, Endo S, Kobayashi E, Sakamoto Y, Kobayashi K, Kitaguchi K, Kuroki K, Söderhäll A, Maenaka K, Nakamura A, Strittmatter SM, Takai T. Differential but competitive binding of Nogo protein and class I major histocompatibility complex (MHCI) to the PIR-B ectodomain provides an inhibition of cells. *J. Biol. Chem.* 286, 25739-47, 2011.

松下 修三

- 1) Narumi T, Arai H, Yoshimura K, Harada S, Nomura W, Matsushita S, Tamamura H. Small molecular CD4 mimics as HIV entry inhibitors. *Bioorg Med Chem.* 19: 6735-6742, 2011.

## 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 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** 感染初期から慢性期にかけて経過観察できた 12 人の HLA-A\*24:02 陽性 HIV-1 感染者を対象に、HLA-A\*24:02 に提示される Gag28-36 (KYKCLKHIVW) エピトープおよびその逃避変異型エピトープ (KYRLKHIVW) を認識する CTL の抗ウイルス機能を解析した。これらの結果から WT ウイルス感染者で誘導されている WT 特異的 CTL と交差反応性 CTL は、WT ウイルスの増殖制御に寄与しているのに対し、3R ウイルス感染者で誘導されている 3R 特異的 CTL と交差反応性 CTL は、両ウイルスの増殖制御に寄与していないことが考えられた。

### 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

感染初期から慢性期にかけて経過観察できた 12 人の HLA-A\*24:02 陽性 HIV-1 感染者を対象に、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、サイトカイン産生アッセイ (ICC) および細胞傷害活性を調べて解析する。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とウイルス増殖抑制能を調べる。同時に、これらの患者の感染初期、慢性期でのこのエピトープ部位のシーケンスを解析する。

(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、国立国際医療研究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. 感染初期から慢性期にかけて経過観察できた 12 人の HLA-A\*24:02 陽性 HIV-1 感染者にシーケンス解析

感染初期の血漿中ウイルスのエピトープシーケンス解析したところ、4 人が野生型 (WT) ウイルスに、8 人がエピトープの 3 番目に R を有する変異型 (3R) ウイルスに感染した。感染慢性期では、WT ウイルス感染者 4 人中 3 人で 3R 変異が選択され、3R ウイルス感染者ではシーケンスに変化はなかった。

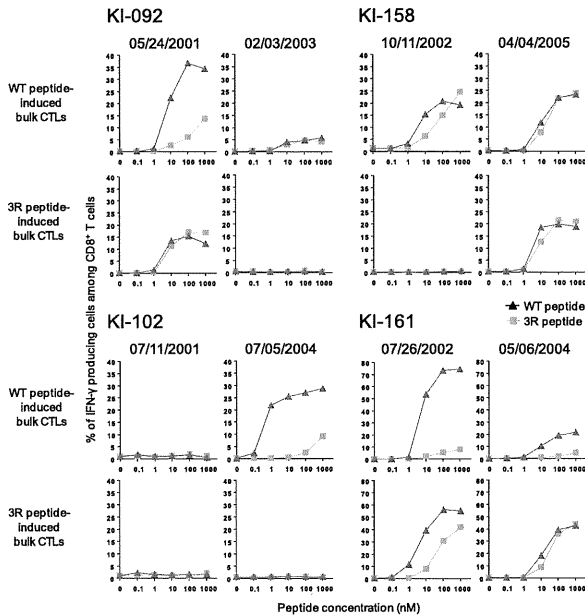
2. 感染初期に野生型ウイルスに感染した 4 人の患者での Gag28-36 特異的 CTL の誘導

感染初期に野生型ウイルスに感染した 4 人の患者の PBMC を、WT のエピトープペプチドで誘導・培養し、WT 及び 3R に対する CTL を ICC アッセイで解析した所、2 名の患者では WT 特異的な CTL が、1 名の患者では 3R と cross-reactive する CTL が、1 名では全く誘導ができなかった。一方、3R ペプチドで誘導した方は、WT ペプチドで WT 特異的 CTL が誘導できた 2 名で、cross-reactive CTL が誘導できた [図1:各患者左側の図]。これらの結果から、感染初期に cross-reactive な CTL の存在が考えられた。

次にこの 4 名の患者のうち 3 名で、3R が出現した後の PBMC を用い、一方 3R の出現が確認でき

なかった患者 KI-102 では、3 年後の PBMC を用いて解析した。その結果、3R が出現した 3 名の患者では、cross-reactive な CTL が優位になり、KI-102 では新たに WT 特異的 CTL の誘導が確認できた [図 1: 各患者の右側の図]。

図 1. 感染初期に野生型ウイルスに感染した 4 人の患者での感染初期と慢性期の Gag28-36 特異的 CTL の誘導



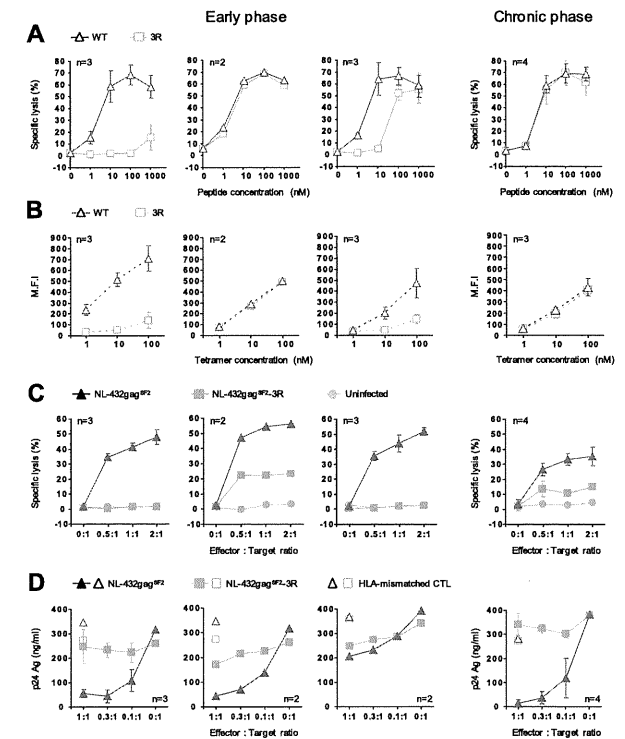
### 3. 感染初期に野生型ウイルスに感染した患者の感染初期と慢性期から作製した CTL クローンの解析

WT に感染した KI-161 の患者の感染初期と慢性期の PBMC から CTL クローンを作製した。CTL クローンは、感染初期のサンプルからは WT ペプチドを用いて、慢性期のサンプルからは 3R ペプチドを用いて作製した。これらのクローンの特異性をペプチドに対する認識と特異的テトラマーに対する結合能で調べたところ、感染初期から樹立したものは、1) WT 特異的、2) WT 優位、3) cross-reactive なものの 3 つにわかれた。一方慢性期から樹立したものは、全て cross-reactive であった (図 2A: ペプチドをパルスした細胞に対する細胞傷害性活性、B: テトラマー結合能)。

これらのクローンの HIV-1 感染細胞に対する細胞傷害性能 (図 2C) と HIV-1 増殖抑制能を調べた (図 2D)。その結果、HIV-1 感染細胞に対する細胞傷害性能では、WT ウイルス感染細胞には、

全ての種類の CTL クローンは細胞傷害性能を示したが、3R 感染細胞では、cross-reactive CTL クローンにのみ示した。一方、HIV-1 増殖抑制能では、WT 優位な CTL クローン以外は、WT ウイルスに対しては強い抑制能を示したが、3R ウイルスに対しては、感染初期のサンプルから樹立した cross-reactive CTL クローンのみが弱い抑制能を示したが、他は抑制を示さなかった。

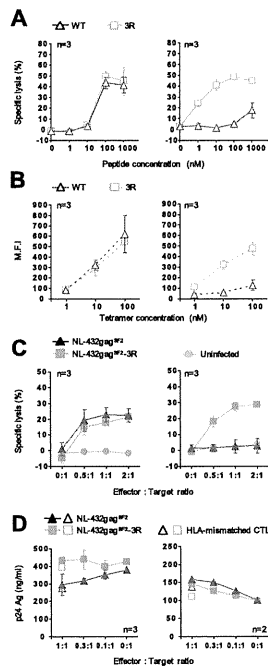
図 2. 感染初期に野生型ウイルスに感染した患者の感染初期と慢性期から作製した CTL クローンのウイルス感染細胞の認識能



### 4. 3R に感染した患者から樹立した CTL クローンの解析

3R に感染した 2 名の患者から 3R ペプチドを用いて CTL クローンを樹立した。KI-091 の患者から樹立した CTL クローンは、cross-reactive な CTL クローンであったが、WT に感染した患者の同じ cross-reactive な CTL クローンとは異なり、HIV-1 増殖抑制能は WT にも 3R に対しても見られなかった [図 3: 左側の図]。もう一人の KI-163 から樹立したクローンは、3R に特異性をもっていたが、これも 3R, WT ウイルスの増殖抑制能は示さなかった [図 3: 右側の図]。

図3. 3R に感染した患者から樹立した CTL クローンのウイルス感染細胞の認識能の解析



#### D. 考察

WT ウイルスに感染した 4 名の患者解析では、1 名のみが感染初期に CTL の誘導ができなかったが、この 1 名は慢性期に誘導が確認できた。この患者では、この間 3R の選択ができないことから、また他の 3 名は感染初期に WT を認識できる CTL が誘導できており、その後 3R 変異ウイルスの出現が見られることから、3R が WT 特異的 CTL により選択されることが明らかである。

非常に興味深いのは、3R がまだ見られていない感染初期に誘導される CTL は、WT だけでなく 3R も認識できる cross-reactive な CTL が含まれている事である。しかしながら、この CTL の 3R ウイルス増殖抑制能は、WT ウイルス増殖抑制能より明らかに低く、このことがこの様な CTL が感染初期に存在しても、3R が選択される理由と考えられる。

一方、初めから 3R ウイルスに感染した患者では、3R エピトープが認識されるが、WT ウイルスに感染した患者と同じように、cross-reactive な CTL が誘導される。しかし、この CTL は 3R ウイルスの増殖抑制をすることはできず、また WT ウイルスの増殖抑制も極めて弱い。すなわち WT ウイルス感染した患者で見られる cross-reactive CTL とは明らかにその機能は異なっていた。同様に 3R 特異的 CTL の誘導が見られたが、WT ウイルス感染し

た患者で見られる WT 特異的 CTL とはその機能は明らかに異なっていた。このことから、3R ウイルス感染細胞は、3R エピトープの提示が WT エピトープと比べて明らかに低いと考えられた。

このように、このエピトープでは逃避変異である 3R エピトープはよく認識され、この逃避変異を認識する CTL が誘導されるが、この逃避変異ウイルスの増殖を抑制する能力が低く、治療には使いくいと考えられる。

#### E. 結論

1. 感染初期から観察ができた 12 名の HLA-A\*24:02 陽性 HIV-1 感染者では、4 名が WT に、8 名が 3R ウイルスに感染していた。
2. WT ウイルス感染者で誘導されている WT 特異的 CTL と交差反応性 CTL は、WT ウイルスの増殖制御に寄与しているのに対し、3R ウイルス感染者で誘導されている 3R 特異的 CTL と交差反応性 CTL は、両ウイルスの増殖制御に寄与していないことが考えられた。

#### F. 健康危機情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Akahoshi T, Chikata T, Tamura Y, Gatanaga H, Oka S, Takiguchi M. Selection and accumulation of an HIV-1 escape mutant by three types of HIV-1-specific CTLs recognizing wild-type and/or escape mutant epitopes. *J Virol*. 86:1971-1981,2012.
- 2) Iglesias MC, Almeida JR, Fastenackels S, van Bockel DJ, Hashimoto M, Venturi V, Gostick E, Urrutia A, Wooldridge L, Clement M, Gras S, Wilmann PG, Autran B, Moris A, Rossjohn J, Davenport MP, Takiguchi M, Brander C, Douek DC, Kelleher AD, Price DA, Appay V. Escape from highly effective public CD8+ T cell clonotypes by HIV. *Blood* 118: 2138-2149, 2011.
- 3) Mwimanzu P, Hasan Z, Hassan R, Suzu S, Takiguchi M, Ueno T. Effects of naturally-arising HIV Nef mutations on cytotoxic T lymphocyte recognition and Nef's

functionality in primary macrophages.  
*Retrovirology* 8:50, 2011

- 4) Zhang Y, Peng Y, Yan H, Xu K, Saito M, Wu H, Chen X, Ranasinghe S, Kuse N, Powell T, Zhao Y, Li W, Zhang X, Feng X, Li N, Leligidowicz A, Xu X, John M, Takiguchi M, McMichael A, Rowland-Jones S, Dong T. Multilayered defense in HLA-B51-associated HIV viral control. *J Immunol.* 187:684-91, 2011
- 5) Naruto T, Murakoshi H, Chikata T, Koyanagi M, Kawashima Y, Gatanaga H, Oka S, Takiguchi M. Selection of HLA-B57-associated Gag A146P mutant by HLA-B\*48:01-restricted Gag140-147-specific CTLs in chronically HIV-1-infected Japanese. *Microbes Infect.* 13: 766-770, 2011
- 6) 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
- 7) 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

## 2. 国際学会での発表

- 1) Hashimoto M, Murakoshi H, Takiguchi M. Impact of CTL escape mutation in immunodominant HIV-1-specific epitope on HIV-1-specific CTL responses, IUMS 2011-XV International Congress of Virology (Sapporo, Japan) September11-16, 2011
- 2) Akahoshi T, Gatanaga H, Oka S, Takiguchi M. HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes cross-recognizing an escape mutation at early phase of HIV-1 infection, AIDS Vaccine 2011 (Bangkok, Thailand) September12-15, 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：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 治療開発室医長）  
研究協力者：成戸 卓也（熊本大学エイズ学研究センター 研究員）  
滝口 雅文（熊本大学エイズ学研究センター 教授）

**研究要旨** AIDS 長期未発症や slow progression に関与すると報告されている HLA-B\*57, -B\*27 が極めて少ない日本人の、未治療・AIDS 未発症の HIV 感染者 504 人の初診時 HIV-1 量と CD4 数を解析した。HIV-1 量と CD4 数の両方で、病気の進行に対して protective なアレルとして、HLA-B\*52:01, -B\*67:01, -C\*12:02 を見出した。Susceptible なアレルとして、HLA-A\*02:07, -B\*35:01 を見出した。これらの中には相加効果が見られた。欧米やアフリカのコホートと比較し、これらのアレルの関与は強くなかった。

A. 研究目的

海外で AIDS 長期未発症や slow progression に関与すると報告されている HLA-B\*57, -B\*27 が極めて少ない日本人の感染者における予後と関連する HLA を同定する。

B. 研究方法

2000 年から 2010 年に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 (ACC) を初診した新規診断未治療 HIV-1 感染症例のうち、臨床的に AIDS 未発症の日本人患者について HLA アレルの頻度を解析し、1%以上存在するアレルを持つ者と持たない者について、Mann-Whitney 検定を行った。

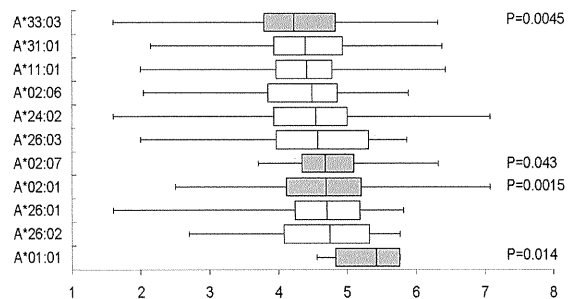
(倫理面への配慮)

HLA 解析について文書同意を患者から得、その臨床データとの関連解析について倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

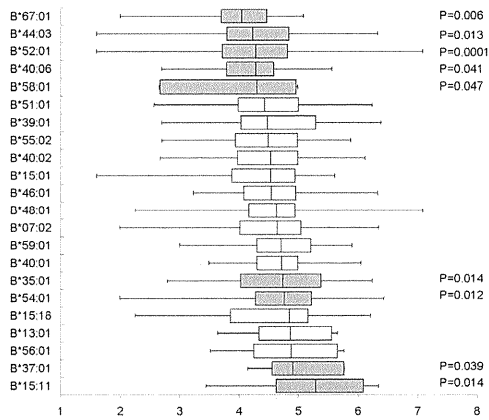
2000 年から 2010 年に 730 人の新規診断 HIV-1 感染者が ACC を初診した。このうち、79 人の外国人を除外した。残りの 651 人の日本人患者について HLA class I を解析した。各 HLA アレルの頻度は、既に報告されている日本人 HLA の割合 (Allele frequencies and haplotypic associations defined by allelic DNA typing at HLA class I

and class II loci in the Japanese population. Tissue Antigens 2000;56:522-529) と比較して有意差はなかった。651 人の日本人患者を、AIDS 患者 147 人と未発症者 504 人に分けて各 HLA の頻度を  $\chi$  二乗テストで検定したが、有意差のある HLA は存在しなかった。AIDS 未発症の 504 人の HLA と初診時の HIV-1 量・CD4 数との関係を解析した。1%未満 (4 人以下) の HLA は解析対象から除外した。高い HIV-1 量と有意に関連している HLA は、A\*02:07, A\*02:01, A\*01:01, B\*35:01, B\*54:01, B\*37:01, B\*15:11, C\*01:02, C\*03:03 であった。低い HIV-1 量と有意に関連しているのは、A\*33:03, B\*67:01, B\*44:03, B\*52:01, B\*40:06, B\*58:01, C\*14:03, C\*12:02 であった (図 1 - 3)。



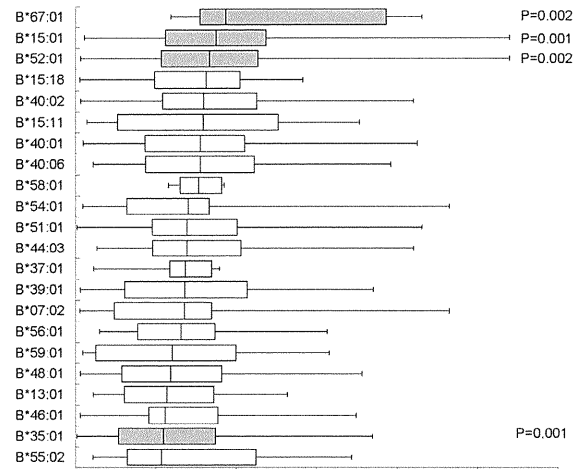
Log viral load (copies/ml)

図 1. HLA-A と viral load



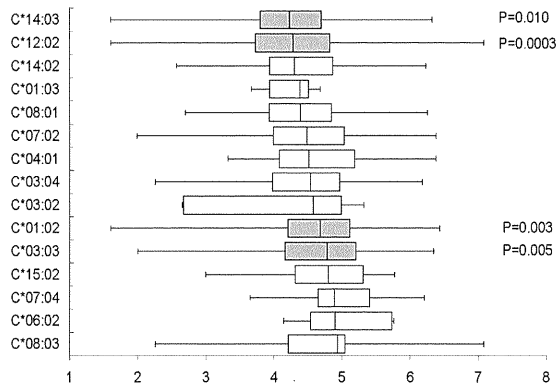
Log viral load (copies/ml)

図 2. HLA-B と viral load



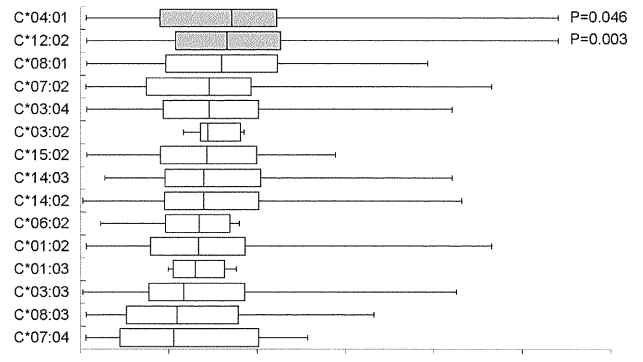
CD4 数 (/μl)

図 5. HLA-B と CD4 数



Log viral load (copies/ml)

図 3. HLA-C と viral load

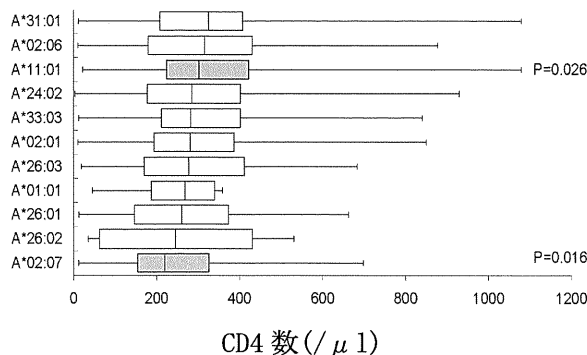


CD4 数 (/μl)

図 6. HLA-C と CD4 数

高い CD4 数と有意に関連している HLA は、A\*11:01, B\*67:01, B\*15:01, B\*52:01, C\*04:01, C\*12:02 であった。低い CD4 数と有意に関連しているのは、A\*02:07, B\*35:01 であった(図 4 - 6)。

HIV-1 量と CD4 数の両面から病態の進行に protective な HLA は、B\*52:01, B\*67:01, C\*12:02、逆に両面から susceptible な HLA は、A\*02:07, B\*35:01 であった。Protective な HLA, susceptible な HLA とともに、HIV-1 量・CD4 数に対して相乗効果が認められた(図 7)。



CD4 数 (/μl)

図 4. HLA-A と CD4 数

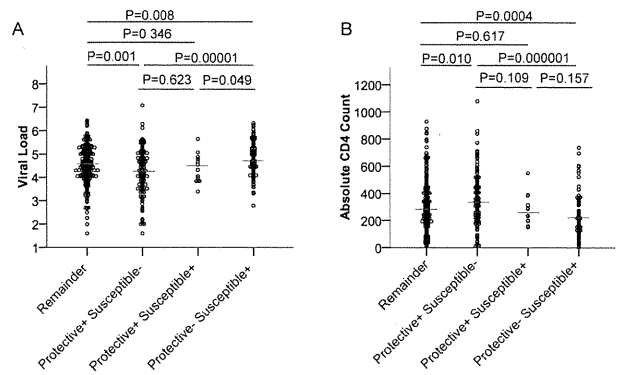


図 7. Protective なアレルと susceptible なアレルの相乗効果

## D. 考察

海外で報告されている HIV 感染症の病態に強く関与する HLA-B\*57, -B\*27 がほとんどいない日本人でも、病態に有意に関与する HLA アレルが存在することが明らかになった。しかし、他のコホートに比較し、これらのアレルの関与は弱かった。

## E. 結論

HLA-B\*57, -B\*27 が極めて少ない日本人の HIV 感染者で、病態に有意に関与する HLA アレルが存在することを示した。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Watanabe K, Gatanaga H, Escueta-de Cadiz A, Tanuma J, Nozaki T, Oka S. Amebiasis in HIV-1-infected Japanese men: clinical features and response to therapy. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(9):e1318. Epub 2011 Sep 13.
2. Nishijima T, Komatsu H, Gatanaga H, Aoki T, Watanabe K, Kinai E, Honda H, Tanuma J, Yazaki H, Tsukada K, Honda M, Teruya K, Kikuchi Y, Oka S. Impact of small body weight on tenofovir-associated renal dysfunction in HIV-infected patients: a retrospective cohort study of Japanese patients. *PLoS One*. 2011;6(7):e22661. Epub 2011 Jul 25.
3. Nakamura H, Teruya K, Takano M, Tsukada K, Tanuma J, Yazaki H, Honda H, Honda M, Gatanaga H, Kikuchi Y, Oka S. Clinical symptoms and courses of primary HIV-1 infection in recent years in Japan. *Intern Med*. 2011;50(2):95-101. Epub 2011 Jan 15.

## 2. 学会発表

1. 潟永博之. 次世代新薬の最新情報—非核酸系逆転写酵素阻害薬: NNRTI 第 25 回日本エイズ学会総会・学術講演会 2011 年 東京
2. 潟永博之. 最新の情報を明日の臨床に活かす - Year in Review 2011- : 難治性合併 B 型肝炎の治療 第 25 回日本エイズ学会総会・学術講演会 2011 年 東京
3. 潟永博之. HIV 診療とウイルス検査の重要性: 診断のタイミングと HIV 診療 第 25 回日本エイズ学会総会・学術講演会 2011 年 東京
4. 潟永博之. 抗 HIV 療法のガイドラインを斬る (backbone 編) 第 25 回日本エイズ学会総会・学術講演会 2011 年 東京
5. 赤星智寛、近田貴敬、田村美子、潟永博之、岡慎一、滝口雅文. HIV-1 特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) による逃避変異の選択と蓄積の機序の解明 第 25 回日本エイズ学会総会・学術講演会 2011 年 東京

## H. 知的財産権の出願・登録状況

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、当該年度において新規の HIV-1 PIs である 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、アミノ酸挿入変異によってもたらされる 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解析を行なった

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<sup>TM</sup> として本邦でも臨床に供されている。当該年度我々は Prof. Ghosh グループと共同で、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発揮する事を確認、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*, 55 : 1717-1727, 2011)。

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, Amano & Mitsuya *et al*, 投稿準備中)、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 (図 1)。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。

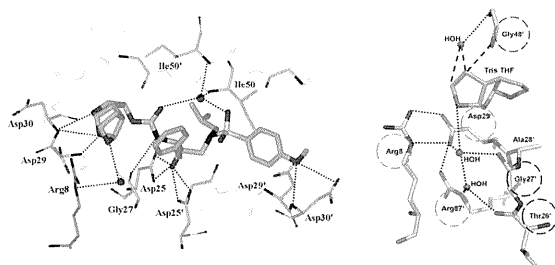


図 1. GRL-0519A と野生型 HIV-1 PR 複合体の詳細な結晶構造解析により、*bis*-THF および sulfonamide 構造が活性中心部のアミノ酸主鎖および flap 領域と強い結合を有する事 (図左) に加え、3 番目の THF 基が HIV-1 PR の flap 領域 (赤丸)、catalytic core 領域 (青丸)、dimer interface (緑丸) におけるアミノ酸群と相互作用を有し得る事が判明した (図右)。

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、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ているが (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と考えられる (Amano & Mitsuya, 投稿準備中)。

#### 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 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 や 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た。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 の耐性発現に抵抗し、発現しても他薬剤との交差耐性を有しない新規薬剤の開発は、HIV 感染症患者で長期間ウイルス量を測定感度以下にコントロールし、その結果外来通院による長期加療が更に容易となって、患者の QOL 改善と医療・対費用効果の改善にも大きく貢献すると期待される。

今後も HIV-1 PR 二量体形成に重要とされるアミノ酸の詳細な解析を進め、新しい作用機序である HIV-1 PR 二量体形成阻害剤の開発・構造解析を米国の研究グループと共同で行っていく。また新規 RTI, CCR5 阻害剤の開発についても同様に米国のグループと共同で継続していく。1 剤で 2 つの作用機序を有する DRV, GRL-1398A, GRL-0519A といった複数の新規抗 HIV 剤への耐性発現の genetic barrier は極めて高く、薬剤耐性 HIV への新たな対応策と考えられる。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表 (2011年度以降)

1. Arun K. Ghosh, Bruno D. Chapsal, Melinda Steffey, Johnson Agniswamy,

Yuan-Fang Wang, Masayuki Amano, Irene T. Weber, Hiroaki Mitsuya. Substituent effects on P2-cyclopentyltetrahydrofuranylethanes: Design, synthesis, and X-ray studies of potent HIV-1 protease inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 22(6): 2308-2311. 2012.

2. Arun K. Ghosh, Bruno D. Chapsal, Garth L. Parham, Melinda Steffey, Johnson Agniswamy, Yuan-Fang Wang, Masayuki Amano, Irene T. Weber, Hiroaki Mitsuya. Design of HIV-1 Protease Inhibitors with C3-Substituted Hexahydrocyclopentafuranylethanes as P2-Ligands: Synthesis, Biological Evaluations, and Protein-Ligand X-ray Crystal Structure. *Journal of Medicinal Chemistry*. 54(16): 5890-5901. 2011.
3. Yasuhiro Koh, Manabu Aoki, Matthew L. Danish, Hiromi Aoki-Ogata, Masayuki Amano, Debananda Das, Robert W. Shafer, Arun K. Ghosh, Hiroaki Mitsuya. Loss of Protease Dimerization Inhibition Activity of Duronavir Is Associated with the Acquisition of Resistance to Darunavir by HIV-1. *Journal of Virology*. 85(19): 10079-10089. 2011
4. Arun K. Ghosh, Cuthbert D. Martyr, Melinda Steffey, Yuan-Fang Wang, Johnson Agniswamy, Masayuki Amano, Irene T. Weber, Hiroaki Mitsuya.