

201124010B

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21年度～23年度 総合研究報告書

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21年度～23年度 総合研究報告書**

**研究代表者 滝口 雅文**

**平成24(2012)年 3月**

# 目 次

## I. 総合報告書

- 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.....9  
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 .....14  
潟永 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.....18  
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・26  
- 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.....35  
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.....46  
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.....58  
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 .....62

## IV. 研究成果の刊行物・別刷 .....72

# I . 総合研究報告書

厚生労働省科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）  
総合研究報告書  
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）  
満屋 裕明（熊本大学大学院生命科学研究部 教授）  
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、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、またコンピューター・モデリングの手法を用いた CCR5 の微細構造学的解析系の確立、CCR5 阻害剤の結合モデル、分子レベルでの機序解析が可能になった。融合阻害剤耐性変異獲得機構の解析では、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(PD)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学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。T20耐性ウイルスにも効果を示す次世代融合阻害剤であるSC34やSC34EKの耐性プロファイルを解析した結果、これまで特に重要であると考えられてきたgp41 C-HRやN-HRに加えて、gp41のよりC末端側に位置するcytoplasmic tail (CT) やgp120領域に変異が導入されていた。耐性度解析の結果、gp41 C-HRやN-HR内の変異は主に耐性度に関与し、gp120領域内の変異は複製能の改善に働いていることを明らかにした。また、CT領域内の変異によりT-20やSC34EKに約3~8倍の耐性を付与する結果が得られたことから、CT変異は直接融合阻害剤の耐性に関与していることが明らかとなった。

## 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立った。

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られると考えられる。

#### E. 結論

- 1) DRVとSC34EKに対する耐性変異の出現機序を明らかにできた。
- 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. 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.
2. 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.
3. Koizumi H, Iwatani T, Tanuma J, Fujiwara M, Izumi T, Oka S, 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.
4. 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.
5. 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
6. 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
  7. Sakai K, Gatanaga H, Takata H, Oka S, Takiguchi M. Comparison of CD4<sup>+</sup> T-cell-subset distribution in chronically infected HIV<sup>+</sup> patients with various CD4 nadir counts. *Microbes Infect.* 12:374-381, 2010
  8. 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
  9. 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
  10. 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
  11. 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
  12. 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
  13. 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, Lelgadowicz 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.* 187:684-691, 2011
  14. 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<sup>+</sup> T cell clonotypes by HIV. *Blood* 118: 2138-2149, 2011.
  15. 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.
- 瀧永 博之
1. Kawashima Y, Pfafferott K, Frater J, Matthews P, Payne R, Addo M, Gatanaga H, Fujiwara M, Hachiya A, Koizumi H, Kuse N, Oka S, Duda A, Prendergast A, Crawford H, Leslie A, Brumme Z, Brumme C, Allen T, Brander C, Kaslow R, Tang J, Hunter E, Allen S, Mulenga J, Branch S, Roach T, John M, Mallal S, Ogwu A, Shapiro R, Prado JG, Fidler S, Weber J, Pybus OG, Klenerman P, Ndung'u T, Phillips R, Heckerman D, Harrigan PR, Walker BD, Takiguchi M, Goulder P. Adaptation of HIV-1 to human leukocyte antigen class I. *Nature* 458: 641-645, 2009.
  2. Tsukada K, Teruya K, Tasato D, Gatanaga H, Kikuchi Y, Oka S. Raltegravir-associated perihepatitis and peritonitis: a single case report. *AIDS* 24: 160-161, 2010.
  3. Watanabe K, Honda M, Watanabe T, Tsukada K, Teruya K, Kikuchi Y, Oka S, Gatanaga H. Emergence of raltegravir-resistant HIV-1 in the central nervous system. *Int J STD AIDS* 21:840-841, 2010.
  4. 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.
  5. Gatanaga H, Ode H, Hachiya A, Hayashida T, Sato H, 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.
  6. 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* 5:e1318, 2011.

7. 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* 6:e22661, 2011.
  8. 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* 50:95-101, 2011.
- 天野 将之  
満屋 裕明
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-cyclopentyltetrahydrofuranyl urethanes: 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 Hexahydrocyclopentafuranyl Urethane 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. 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.
  5. Kazuhiko Ide, Manabu Aoki, Masayuki Amano, Yasuhiro Koh, Ravikiran S. Yedidi, Debananda Das, Sofiya Leschenko, Bruno Chapsal, Arun K. Ghosh, Hiroaki Mitsuya. 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.
  6. Arun K. Ghosh, Bruno D. Chapsal, Abigail Baldrige, Melinda P. Steffey, D. Eric Walters, Yasuhiro Koh, Masayuki Amano, Hiroaki Mitsuya. 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.
  7. Arun K. Ghosh, Chun-Xiao Xu, Kalapala Venkateswara Rao, Abigail Baldrige, Johnson Agniswamy, Yuan-Fang Wang, Irene T. Weber, Manabu Aoki, Salcedo Gomez Pedro Miguel, Masayuki Amano, Hiroaki Mitsuya. Probing Multidrug-Resistance and Protein-Ligand Interactions with Oxatricyclic Designed Ligands in HIV-1 Protease Inhibitors. *ChemMedChem*. 5(11):1850-1854. 2010.
  8. Yasuhiro Koh, Masayuki Amano, Tomomi Towata, Matthew Danish, Sofiya, Leshchenko-Yashchuk, Debananda Das, Maki Nakayama, Yasushi Tojo, Arun K. Ghosh, Hiroaki Mitsuya. 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. *Journal of Virology*. 84(22):11961-11969. 2010.
  9. Yasushi Tojo, Yasuhiro Koh, Masayuki Amano, Manabu Aoki, Debananda Das, Sarang Kulkarni, David D. Anderson, Arun K. Ghosh, Hiroaki Mitsuya. 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. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 54(8):3460-3470. 2010.
  10. Arun K. Ghosh, Sandra Gemma, Elena Simoni, Abigail Baldrige, D. Eric Walters, Kazuhiko Ide, Yasushi Tojo, Yasuhiro Koh, Masayuki Amano, Hiroaki Mitsuya. Synthesis and biological evaluation of novel allophenylnorstatine-based HIV-1 protease

- inhibitors incorporating high affinity P2-ligands. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 20(3):1241-1246. 2010.
11. Arun K. Ghosh, Sarang Kulkarni, David D. Anderson, Lin Hong, Abigail Baldrige, Yuan-Fang Wang, Alexander A. Chumanevich, Andrey Y. Kovalevsky, Yasushi Tojo, Masayuki Amano, Yasuhiro Koh, Jordan Tang, Irene T. Weber, Hiroaki Mitsuya. 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. *Journal of Medicinal Chemistry*. 52(23): 7689-7705. 2009.
  12. Yasuhiro Koh, Debananda Das, Sofiya Leschenko, Hirotomo Nakata, Hiromi Ogata-Aoki, Masayuki Amano, Maki Nakayama, Arun K. Ghosh, Hiroaki Mitsuya. GRL-02031, a novel nonpeptidic protease inhibitor (PI) containing a stereochemically defined fused cyclopentanyltetrahydrofuran potent against multi-PI-resistant human immunodeficiency virus type 1 in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 53(3): 997-1006. 2009.
- 馬場 昌範
1. 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).
  2. Wang X, Tanaka H, Baba M, Cheng Y-C. Study of the retention of metabolites of 4'-Ed4T, a novel anti-HIV-1 thymidine analog, in cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53: 3317-3324 (2009).
  3. Kubota Y, Ishizaki N, Kaneda Y, Haraguchi K, Odanaka Y, Tanaka H, Kato N, Baba M, Balzarini J. Synthesis and antiviral evaluation of 4'-alkoxy analogues of 9-( $\beta$ -D-xylofuranosyl)adenine. *Antiviral Chem. Chemother.* 19: 201-212 (2009).
  4. Yang G, Paintsil E, Dutschman GE, Grill SP, Wang C-J, Wang J, Tanaka H, Hamasaki T, Baba M, Cheng Y-C. Impact of novel human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase mutations P119S and T165A on 4'-ethynylthymidine analog resistance profile. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53: 4640-4646 (2009).
  5. Kumamoto H, Haraguchi K, Ida M, Nakamura KT, Kitagawa Y, Hamasaki T, Baba M, Shimbara-Matsubayashi S, Tanaka H. Synthesis of ( $\pm$ )-4'-ethynyl-5',5'-difluoro-2',3'-dehydro-3'-deoxycarbocyclic thymidine: a difluoromethylidene analogue of promising anti-HIV agent Ed4T. *Tetrahedron* 65: 7630-7636, (2009).
  6. Aoyama H, Sugita K, Nakamura M, Aoyama A, Salim MTA, Okamoto M, Baba M, Hashimoto Y. Fused heterocyclic amino compounds as anti-hepatitis C virus agents. *Bioorg. Med. Chem.* 19:2675-2687 (2011).
  7. 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).
  8. Nishioka H, Uesugi K, Ueda N, Kondo Y, Ysuiji M, Abe H, Harayama T, Hamasaki T, Baba M, Takeuchi Y. Synthesis and anti-human immunodeficiency virus activity of the skeleton isomers of 3',4'-di-(O)-(-)-camphanoyl-(+)-khellactone. *Chem. Pharm. Bull.* 59:1075-1076 (2011).
  9. Haraguchi K, Shimada H, Kimura K, Akutsu G, Tanaka H, Abe H, Hamasaki T, Baba M, Gullen EA, Dutschman GE, Cheng Y-C, Balzarini J. Synthesis of 4'-ethynyl-2'-deoxy-4'-thioribonucleosides and discovery of a highly potent and less toxic NRTI. *ACS Med. Chem. Lett.* 2:692-697 (2011).
  10. Isono 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).
  11. Salim MTA, Aoyama H, Sugita K, Watashi K, Wakita T, Hamasaki T, Okamoto M, Urata Y, Hashimoto Y, Baba M. Potent and selective inhibition of hepatitis C virus replication by novel phenanthridinone derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 415:7140719 (2011).
  12. Ordonez P, Hamasaki T, Isono Y, Sakakibara N, Ikejiri M, Maruyama T, Baba M. Anti-human immunodeficiency virus type 1 activity of novel 6-substituted 1-benzyl-3-(3,5-dimethylbenzyl)uracil derivatives. *Antimicrob Agents Chemother.* in press.
- 松岡 雅雄
1. 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, Matsuoka M. Design of peptide-based inhibitors of HIV-1 strains resistant to T-20. *J. Biol. Chem.* 284(8): 4914-4920, (2009).
  2. Ueno M, Kodama E.N, Shimura, K, Sakurai Y, Kajiwara K, Sakagami, Y, Oishi S, Fujii N, 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(1): 67-72, (2009).
3. Naito T, Izumi K, Kodama E, Sakagami Y, Kajiwara K, Nishikawa H, Watanabe K, Sarafianos S.G, Oishi S, Fujii N, Matsuoka M. SC29EK, a peptide fusion inhibitor with enhanced  $\alpha$ -helicity, inhibits replication of human immunodeficiency virus type 1 mutants resistant to enfuvirtide. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53(3): 1013-1018, (2009).
  4. Michailidis E, Marchand B, Kodama EN, Singh K, Matsuoka M, Kirby KA, Ryan EM, Sawani AM, Nagy E, Ashida N, Mitsuya H, Parniak MA, Sarafianos SG. 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.* 284:35681-32691,(2009).
  5. Nishikawa H, Nakamura S, Kodama E, Ito S, Kajiwara K, Izumi K, Sakagami Y, Oishi S, Ohkubo T, Kobayashi Y, Otaka A, Fujii N, Matsuoka M. Electrostatically constrained alpha-helical peptide inhibits replication of HIV-1 resistant to enfuvirtide. *Int J Biochem Cell Biol.* 41(4): 891-899, (2009).
  6. Oishi S, Ito S, Nishikawa H, Tanaka M, Ohno H, Otaka A, Izumi K, Kodama E, Matsuoka M, Fujii N. Development of a novel fusion inhibitor against T-20-resistant HIV-1. *Adv Exp Med Biol* 611:389-91, (2009).
  7. Oishi S, Kamitani H, Kodera Y, Watanabe K, Kobayashi K, Narumi T, Tomita K, Ohno H, Naito T, Kodama E, Matsuoka M, Fujii N. Peptide bond mimicry by (E)-alkene and (Z)-fluoroalkene peptide isosteres: synthesis and bioevaluation of alpha-helical anti-HIV peptide analogues. *Org Biomol Chem* 7: 2872-7, (2009).
  8. Oishi S, Kodera Y, Nishikawa H, Kamitani H, Watabe T, Ohno H, Tochikura T, Shimane K, Kodama E, Matsuoka M, Mizukoshi F, Tsujimoto H, Fujii N. Design and synthesis of membrane fusion inhibitors against the feline immunodeficiency virus. *Bioorg Med Chem* 17: 4916-4920, (2009).
  9. Watabe T, Terakawa Y, Watanabe K, Ohno H, Nakano H, Nakatsu T, Kato H, Izumi K, Kodama E, Matsuoka M, Kitaura K, Oishi S, Fujii N. X-ray crystallographic study of an HIV-1 fusion inhibitor with the gp41 S138A substitution. *J Mol Biol.* 392: 657-665, (2009).
  10. Kajiwara K, Watanabe K, Tokiwa R, Kurose T, Ohno H, Tsutsumi H, Hata Y, Izumi K, Kodama E, Matsuoka M, Oishi S, Fujii N. Bioorganic synthesis of a recombinant HIV-1 fusion inhibitor, SC35EK, with an N-terminal pyroglutamate capping group. *Bioorg Med Chem.* 17: 7964-7970, (2009).
  11. Tanaka M, Kajiwara K, Tokiwa R, Watanabe K, Ohno H, Tsutsumi H, Hata Y, Izumi K, Kodama E, Matsuoka M, Oishi S, Fujii N. Bioorganic synthesis of end-capped anti-HIV peptides by simultaneous cyanocysteine-mediated cleavages of recombinant proteins. *Bioorg Med Chem.* 17: 7487-7492, (2009).
  12. 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.
  13. 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.
  14. 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.
  15. 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.
  16. 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.
- 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.
  5. 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
  6. Honda M, Ishisaka M, Ishizuka N, Satoshi Kimura S, Oka S and behalf of Japanese Anti-HIV-1 QD Therapy Study Group. Open-Label Randomized Multicenter Selection Study of Once Daily Antiretroviral Treatment Regimen Comparing Ritonavir-Boosted Atazanavir to Efavirenz with Fixed-Dose Abacavir and Lamivudine. *Intern Med* 50: 699-705, 2011

#### 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*. 2010 Jul;84(14):7151-60.
2. Kamishikiryo J, Fukuhara H, Okabe Y, Kuroki K, Maenaka K. Molecular basis for LLT1 protein recognition by human CD161 protein (NKR1A/KLRB1). *J Biol Chem*. 2011 Jul 8;286(27):23823-30.
3. 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.

#### 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 (KYKLVKLVW) 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。一方、HLA-B\*54:01 拘束性 Pol154-162 特異的 CTL クローンは、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にも細胞傷害活性、HIV-1 増殖抑制能を示すことがあきらになった。

### 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. 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。
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

#### I. Gag28-3R 逃避変異の解析

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。

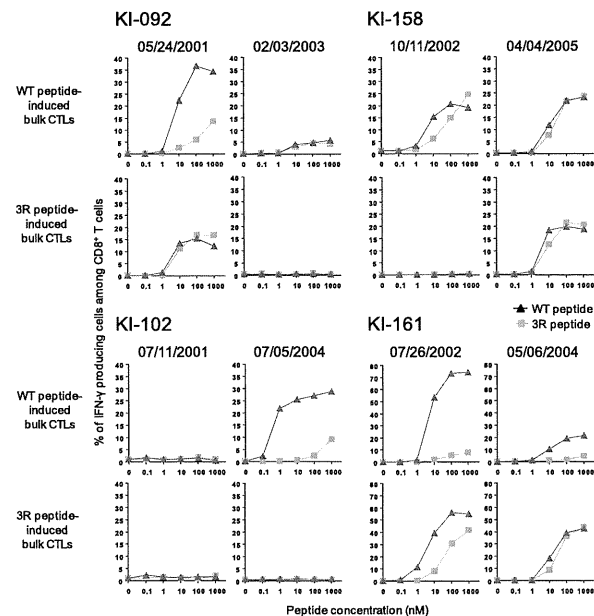
2. 感染初期に野生型ウイルスに感染した 4 人の患者での Gag28-36 特異的 CTL の誘導

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



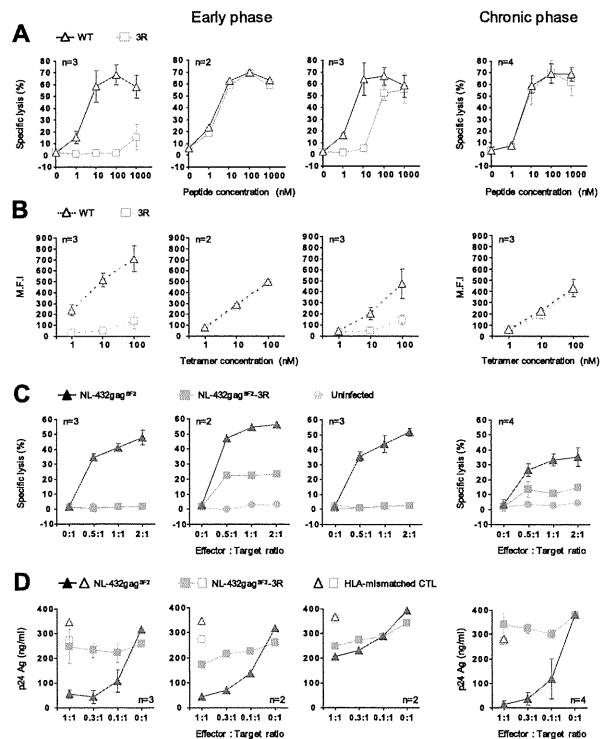
### 3. 感染初期に野生型ウイルスに感染した患者の感染初期と慢性期から作製した CTL クローンの解析

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

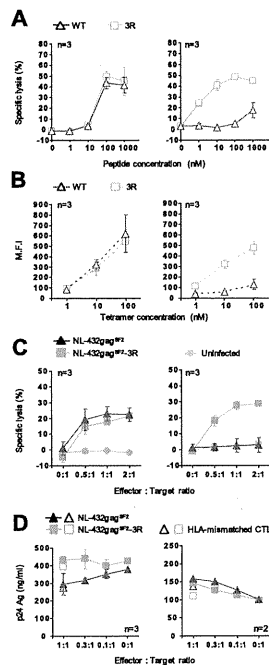


### 4. 3R に感染した患者から樹立した CTL クローンの解析

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]。

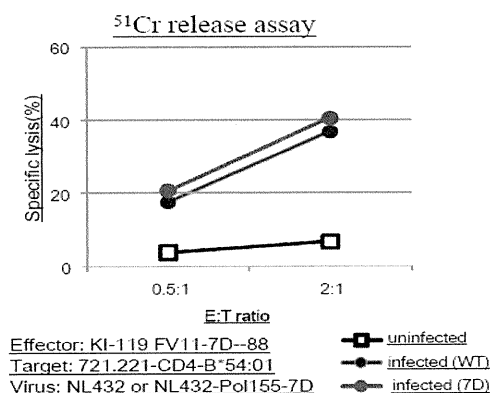
図3. 3R に感染した患者から樹立した CTL クローンのウイルス感染細胞の認識能の解析



## II. Pol154-162-7D 逃避変異の解析

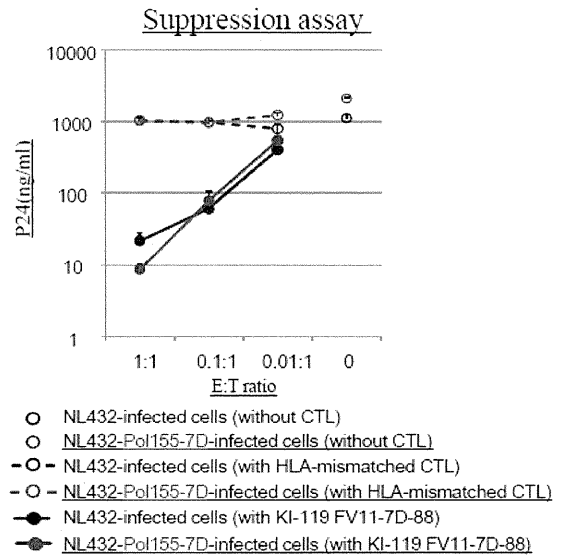
HLA-B\*54:01 陽性の患者(KI-119)から樹立した Pol154-162 特異的 CTL クローンの HIV-1 感染細胞に対する CTL 活性を調べた。様々なパターンのものが見られたが、そのうち KI-119 から樹立したのものには、WT ウイルス感染細胞だけでなく 7D 変異ウイルスに感染細胞の両方を傷害するクローンが見られた(図4)。

図4. 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5. Pol154-162 特異的 CTL クローンの HIV-1 増殖抑制



## 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、治療には使いにくいと考えられる。

#### 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。
3. 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、HIV-1 増殖抑制能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) 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.
- 2) 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.
- 3) Koizumi H, Iwatani T, Tanuma J, Fujiwara M, Izumi T, Oka S, 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.
- 4) 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.

- 5) 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
- 6) 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
- 7) Sakai K, Gatanaga H, Takata H, Oka S, Takiguchi M. Comparison of CD4<sup>+</sup> T-cell-subset distribution in chronically infected HIV<sup>+</sup> patients with various CD4 nadir counts. *Microbes Infect.* 12:374-381, 2010
- 8) 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
- 9) 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
- 10) 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
- 11) 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
- 12) 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
- 13) 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.* 187:684-691, 2011

- 14) 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<sup>+</sup> T cell clonotypes by HIV. *Blood* 118: 2138-2149, 2011.
- 15) 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. 国際学会での発表

多数のため省略

## H. 知的所有権の出願・取得状況

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）  
分担研究報告書

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 研究員）  
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** 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 HIV-1 特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 応答を解析した。また、日本人感染者の予後に関連する HLA を同定した。CTL 応答の解析については、158 人の未治療慢性 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。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- $\gamma$  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 CTL 反応の total magnitude は低い HIV-1 量ならびに高い CD4 数と有意に相関し、さらに、Pol 反応の breadth は低い HIV-1 量と有意に相関していた。日本人感染者では 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。予後に関連する HLA の解析については、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, -B67:01, -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。これらの間には相加効果が見られたが、欧米やアフリカの cohorts 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 HIV-1 特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 応答を解析する。また、日本人感染者の予後に関連する HLA を同定する。

#### B. 研究方法

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) を受診した未治療 HIV-1 感染症例について、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- $\gamma$

ELISPOT assay 法によって測定することで評価した。予後に関連する HLA については、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 解析と CTL 反応の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

158 人の未治療慢性 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。nef、gag、pol 領域に対する CTL 反応の total magnitude を解析した結果、gag (Median: 3,451 spots/10<sup>6</sup> cells、p<0.0001) と pol (3,298、p<0.0001) における total magnitude が nef (804) よりも有意に高いことが示された (図 1)。Pol 特異的 CTL 反応の total magnitude は低い HIV-1 量 (r = -0.175、p = 0.028) (図 2) ならびに高い CD4T 細胞数 (r = 0.184、p = 0.021) (図 3) と有意に相関していたが、gag、nef では相関していなかった。さらに、Pol 反応の breadth は低い HIV-1 量 (r = -0.122、p = 0.026) に有意に相関していた (図 4) が、gag、nef では相関していなかった。

spots/10<sup>6</sup>cells

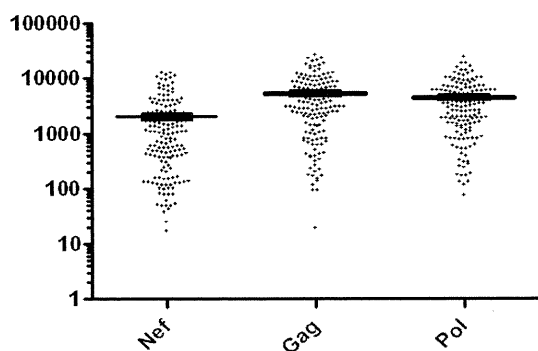


図 1. nef, gag, pol 領域に対する CTL 反応の total magnitude

spots/10<sup>6</sup>cells

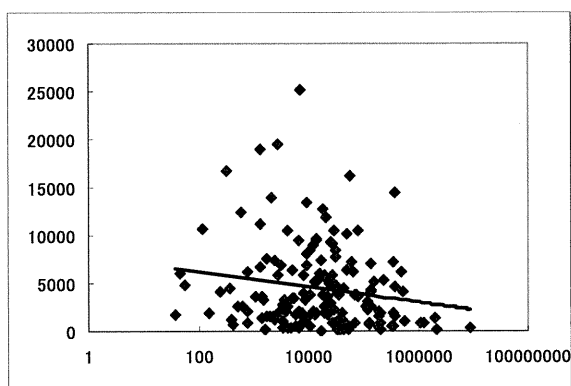
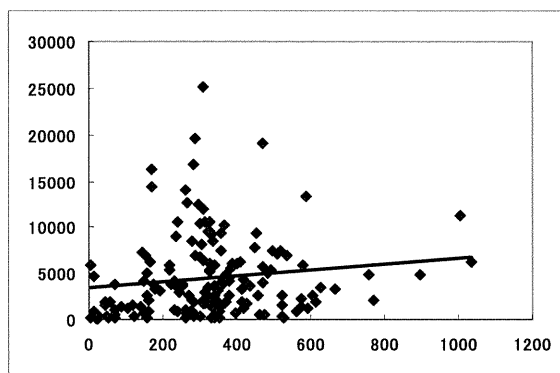


図 2. pol 特異的 CTL の反応の total magnitude と HIV-1 量の相関

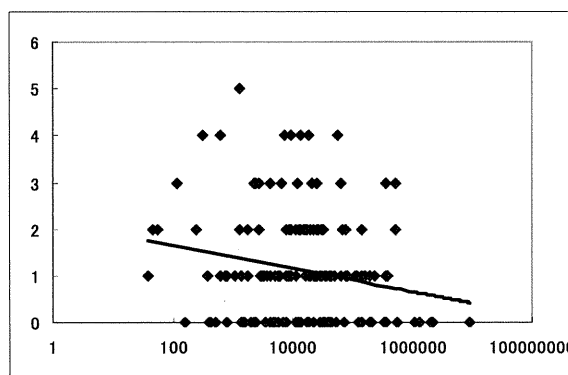
spots/10<sup>6</sup>cells



CD4 (cells/μl)

図 3. pol 特異的 CTL の反応の total magnitude と CD4 数の相関

number of peptide cocktail recognized by CTL



viral load (copies/ml)

図 4. pol 特異的 CTL の反応の breadth と HIV-1 量の相関

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。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。