

201204008A

厚生労働科学研究費補助金

地球規模保健課題推進研究事業

(国際医学協力研究事業)

日米医学協力を基軸としたHIV/AIDSの研究とアジアとの連携

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岩本愛吉

平成25(2013)年3月

## 目 次

I. 総括研究報告	
日米医学協力を基軸としたHIV/AIDSの研究とアジアとの連携 -----	1
研究代表者 岩本愛吉 (東京大学医科学研究所 教授)	
II. 分担研究報告	
1. HIVに対する免疫応答の研究 -----	7
東京大学医科学研究所 教授 岩本愛吉	
2. 質量分析を通じたプロテアーゼの二量体化のダイナミクスの研究と 新規の二量体化阻害剤の開発 -----	10
熊本大学 生命科学研究部 教授 満屋 裕明	
3. SIVのCTL逃避変異の解析 -----	13
国立感染症研究所 エイズ研究センター長 俣野 哲朗	
4. 東南アジアにおけるHIVコホート研究 -----	15
長崎大学 熱帯医学研究所 教授 有吉 紅也	
5. TRIM5 $\alpha$ の抗HIV作用の分子機構の解析 -----	19
大阪大学 微生物病研究所 教授 塩田 達雄	
6. 粘膜自然免疫を標的としたHIVの感染伝播とその制御 -----	22
日本医科大学 微生物学免疫学教室 教授 高橋 秀実	
7. 中和抗体反応の研究 -----	29
熊本大学 エイズ学研究センター 教授 松下 修三	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	33
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	43

研究要旨：

個別研究においては、分担研究者がそれぞれワクチンや抗 HIV 薬開発のために役立つ基礎的な研究成果を挙げた。2013年3月シンガポールのマンダリン・オリエンタルホテルにおいて、EID シンポジウムが開催される機会に日米エイズパネル合同会議を開催し、研究成果、等につき情報交換を行った。日本側からは、岩本、俣野、松下、高橋等の班員が参加した。米国からは、Alan Shultz 博士 (NIH/NIAID)、James Mullins 教授 (ワシントン大学)、Tom Hope 教授 (ノースウェスタン大学) 等の参加を得、アジアからも劉煥亮教授 (中山大学)、李洪教授 (雲南 CDC) や若手研究者、学生等が参加した。

研究分担者 満屋裕明 熊本大学 教授  
研究分担者 俣野哲朗 国立感染症研究所  
エイズ研究センター長  
研究分担者 松下修三 熊本大学 教授  
研究分担者 有吉紅也 長崎大学教授  
研究分担者 高橋秀実 日本医科大学 教授  
研究分担者 塩田達雄 大阪大学 教授

A. 研究目的

巨大な人口を擁するアジアにおける HIV/AIDS (エイズ) 対策は、極めて重要な課題である。アジア随一の先進国として、世界の最先端を走る米国の研究者と密な情報交換を行い、エイズの予防や治療等に関するウイルス学、免疫学、臨床的研究を推進する。米国の研究者との協力を基盤に、ネットワークを通じてアジアの研究者を介して、感染症対策に貢献する。

B. 研究方法

○個別分担研究

(岩本愛吉)

HLA-A\*2402 (HLA-A24) 陽性 HIV 感染者の末梢血中単核球 (PBMC) を Nef134-10 (Nef 遺伝子内の CTL エピトープ) 由来のペプチドで刺激し、in vitro で培養の後、CTL 株を樹立した。CTL 株から TCR 遺伝子をクローニングした。TCR と MHC クラス I 分子は、大腸菌で封入体として発現させ、変性剤により可溶化した後、それぞれリフォールディングし、精製した。分子間相互作用測定装置 Biacore を用いて TCR と pMHC 分子間での相互作用を測定した。次に TCR 単体、pMHC 単体または、TCR と pMHC との複合体を結晶化し、X線回析測定をおこなった。

(俣野哲朗)

MHC-I ハプロタイプ D を共有する SIVmac239 感染アカゲサル 9 頭より得られ保存された凍結血漿を用いた。感染後おおよそ 1 ヶ月目、3 ヶ月目、1 年目および 2 年目に得られた血漿より、RNA を分離し、ウイルスゲノム cDNA を増幅した。この MHC-I ハプロタイプ D 共有サル群では、Nef 特異的 CTL 反応が優位に誘導されることが判明して

いたことから、nef 領域の塩基配列解析を行った。また、変異がみられた領域付近における CTL エピトープの検索を行った。

(松下修三)

HIV-1 CRF01\_AE 感染症例 20 人、subtype B 感染症例 21 人の血漿から Protein A column を用いて IgG 抗体を精製した。pseudovirus 用いた中和試験によって 50 % inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) を決定し、IgG サンプルの中和活性の検討を行った。さらに、変異 virus を用いた中和試験を行い、中和活性に重要なエピトープの解析を行った。

(有吉紅也)

タイ、ベトナム、フィリピン、日本の 4 か国における HIV・エイズ拠点病院において ART を開始した HIV 感染・エイズ患者を対象にした後ろ向き臨床疫学研究を行った。

(高橋秀実)

トランスジェニックマウスなどを用いた HIV 感染症のモデル実感において、CTL の機能抑制機序や免疫抑制剤の及ぼす影響について、解析した。

(塩田達雄)

TRIM5 $\alpha$  は多量体を形成して始めて抗 HIV 活性を発揮する。また、HIV-2 型 (HIV-2) は株により TRIM5 $\alpha$  感受性が異なるため、TRIM5 $\alpha$  感受性株と TRIM5 $\alpha$  耐性株の分子クローンを混合してトランスフェクションし、感受性株のカプシド蛋白質と耐性株のカプシド蛋白質からなるキメラカプシドを持つ HIV-2 を作成し、そのキメラウイルスの TRIM5 $\alpha$  感受性を評価した。

(倫理面への配慮)

臨床検体については、研究者の所属する機関の倫理委員会の承認を得ている。外国機関との研究の場合には、相手機関の倫理委員会や所管機関の承認を得た。研究内容を説明の上、患者から書面で同意書を得た。研究に関連するガイドラインを遵守した。

C. 研究結果

## ○個別分担研究

(岩本愛吉)

試験管内で再構成した TCR と pHLA の結合は、それぞれの TCR が由来する CTL 株の細胞傷害試験結果とほぼ同様の特異性を示した。HIV nef 遺伝子でコードされる Nef134-10 エピトープで見られる逃避変異体と TCR について、結晶構造レベルでの相互作用を確認した。

(俣野哲朗)

MHC-I ハプロタイプ D 共有サル全 9 頭において、SIV 感染後、SIV Nef36-44 をコードする領域にアミノ酸置換を生ずる変異の選択が認められた。このような変異は、MHC-I ハプロタイプ D 陰性サルではごく低頻度でしか認められなかった。さらなる検索から、MHC-I ハプロタイプ D 共有サル群の多くでは、Nef35-49 に相当するペプチド特異的な CTL 反応が、SIV 感染の比較的早期から誘導されることが判明した。

(松下修三)

CRF01\_AE 感染症例は、20 例中 4 例 (20%) が 2 株の CRF01\_AE の両方を中和し、subtype B 感染症例は、21 例中 3 例 (約 14%) が 3 株の subtype B を中和した。これらの cross-subtype 中和活性を検討した結果、CRF01\_AE 感染症例の KI-610 と KU-NSI が cross-subtype 中和活性を持つこと確認された。KI-610 が KU-NSI よりも強い中和活性を持っていることが示された。変異 virus を用いた中和試験から、V2 ループ内の N160K (27.1 倍) と I165A (11 倍)、及び、V3 基部の N295A (33.6 倍) と N334A (33.6 倍) の変異が、KI-610 に対する中和抵抗性をもたらした。また、KU-NSI による中和活性も、N160K (2.5 倍) と N295A (3.5 倍) 変異の影響を受けた。これらの結果から、V2 及び V3 のエピトープが CRF01\_AE 症例の中和活性に重要であることが示唆された。

(有吉紅也)

性別については、フィリピン総合病院 (PGH) と名古屋における男性の割合が、それぞれ 94.4%、93.4% と男性が圧倒的に多かったのに対し、バクマイは、63.6% と男性の方がやや多かった。一方、ランパンでは 47.8% と男女比は 1:1 であった。PGH と名古屋では同性愛者 (MSM) 間性的交渉が、81.2%、81.2% と大半を占め、バクマイ病院では、注射麻薬使用者が 34.3% と多く、ランパンとバクマイでは、異性愛者間性交がそれぞれ、89.2%、60.7% であった。ニューモシスティス肺炎については、低 CD4 値 (51-200、50 以下/u1) で、リスクがそれぞれ 10.5、36.3 倍に上昇するに対して、タイ・ベトナム居住者のリスクは、81%-91% 減少した。

(高橋秀実)

CTL の TCR 遺伝子を導入発現したトランスジェニックマウスを用いて解析した結果、個体内でウイルス感染細胞によって活性化された CTL がその認識ペプチドとの遭遇を介して細胞傷害性の低下ならびに Apoptosis に陥ることを確認した。また、cyclosporin A や tacrolimus はこのような apoptosis を抑制すること、CTL の細胞傷害性

の低下も防ぐことを証明した。

(塩田達雄)

カプシド内の少なくとも半数のカプシド蛋白質が TRIM5 $\alpha$  に感受性であれば、そのキメラカプシドは TRIM5 $\alpha$  に感受性を示すことを明らかにした。

(満屋裕明)

HIV プロテアーゼに V32I/L33F/I54M/I84V の変異を全て有する HIV は、これまでに開発されたほとんどのプロテアーゼ阻害薬に対して強い耐性を示す強力な耐性ウイルスであることを見いだした。しかし、この HIV 変異株に対しても阻害効果を発揮する複数の新規化合物の同定に成功した。これらの新規化合物と変異 HIV 由来のプロテアーゼとの複合体の結晶構造解析に成功した。

## ○日米合同エイズパネル会議の開催

2013 年 3 月シンガポールのマンダリン・オリエンタルホテルにおいて、EID シンポジウムが開催される機会に日米エイズパネル合同会議を開催し、研究成果、等につき情報交換を行った。日本側からは、岩本、俣野、松下、高橋等の班員が参加した。米国からは、Alan Shultz 博士 (NIH/NIAID)、James Mullins 教授 (ワシントン大学)、Tom Hope 教授 (ノースウェスタン大学) 等の参加を得、アジアからも劉煥亮教授 (中山大学)、李洪教授 (雲南 CDC) や若手研究者、学生等が参加した。

### D. 考察

個別研究においては、分担研究者がそれぞれワクチンや抗 HIV 薬開発のために役立つ基礎的な研究成果を挙げた。

エモリー大学で開催されたシンポジウムにおいては、日本側部会長の岩本と米国側部会長の Ruth Ruprecht ハーバード大学教授が開会宣言をし、James Curran エモリー大学公衆衛生学部長と山本直樹教授 (前エイズ部会代表) が基調講演を行った。米国側からは、Guido Silvestri エモリー大学教授、Satya Dandekar カリフォルニア大学教授、Aftab Ansari エモリー大学教授、Raymond Schinazi エモリー大学教授、Mario Stevenson マイアミ大学教授、Steven Deeks カリフォルニア大学教授、Myron Cohen ノースカロライナ大学教授、Dan Kuritzkes ハーバード大学教授を含む世界最先端の研究を行う研究者が全米から参加し、基礎、動物モデル、臨床、疫学、公衆衛生対策など広範囲な講演が行われた。シンポジウムは、エモリー大学の学生や若手研究者にも公開されており、アジアからの留学生を含むエモリー大学及び近隣のエイズ研究のための人材育成にも貢献した。

### E. 結論

地球規模で見ると、アフリカが現在最も深刻なエイズ問題を抱えている。しかし、アジアにはすでにアフリカに次ぐ感染者数が存在し、アジアの巨大な人口を考えると、アジアにおけるエイズは

ゆゆしき課題である。アジアには深刻なエイズ問題を抱えながらも、経済発展しつつある国が多く、単なる支援・援助を越えて、アジアの国々における研究活性化にも大きな意義がある。その点日米医学協力は、今後とも大きく貢献できる可能性がある。平成22年度は、合同部会が米国で開催されたこともあり、アジア地域への還元が十分できなかった。

F. 健康危険情報  
該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

(岩本愛吉)

- 1) Onoe T, Honda M, Matsuo K, Sasaki H, Sawamura M, Onoe Y, Iwamoto A, Onodera S, Kawana T, Tada Y, Nimura M, Nakagawa H. Examination of the correlation between the manual and automated serological testing methods for syphilis. *J Dermatol.* 39(4):355-61, 2012 Apr.
- 2) Kikuchi T, Iwatsuki-Horimoto K, Adachi E, Koga M, Nakamura H, Hosoya N, Kawana-Tachikawa A, Koibuchi T, Miura T, Fujii T, Kawaoka Y, Iwamoto A. Improved neutralizing antibody response in the second season after a single dose of pandemic (H1N1) 2009 influenza vaccine in HIV-1-positive adults. *Vaccine.* 30(26):3819-23, 2012.
- 3) Nakayama, K., Nakamura, H., Koga, M., Koibuchi, T., Fujii, T., Miura, T., Iwamoto, A., and Kawana-Tachikawa, A. Imbalanced Production Of Cytokines By T Cells Associates With The Activation/Exhaustion Status Of Memory T Cells In Chronic HIV-1 Infection. *AIDS Research and Human Retroviruses.* 28(7):702-14, 2012.
- 4) Adachi E, Koibuchi T, Imai K, Kikuchi T, Koga M, Nakamura H, Miura T, Iwamoto A, Fujii T. Favourable outcome of progressive multifocal leukoencephalopathy with mefloquine treatment in combination with antiretroviral therapy in an HIV-infected patient. *Int J STD AIDS.* 23(8):603-5, 2012.
- 5) Adachi E, Koibuchi T, Okame M, Sato H, Kikuchi T, Koga M, Nakamura H, Iwamoto A, Fujii T. Liver dysfunction in patients with early syphilis: a retrospective study. *J Infect Chemother.* 19(1):180-2, 2013.
- 6) Nomura S, Hosoya N, Brumme ZL, Brockman MA, Kikuchi T, Koga M, Nakamura H, Koibuchi T, Fujii T, Carlson JM,

Heckerman D, Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A, Miura T. Significant reductions in Gag-protease-mediated HIV-1 replication capacity during the course of the epidemic in Japan. *J Virol.* 87(3):1465-76, 2013.

- 7) Adachi E, Koibuchi T, Imai K, Kikuchi T, Shimizu S, Koga M, Nakamura H, Iwamoto A, Fujii T. Hemophagocytic syndrome in an acute human immunodeficiency virus infection. *Intern Med.* 52(5):629-32. Epub 2013 Mar 1, 2013.

(俣野哲朗)

- 1) Nomura T, Yamamoto H, Shiino T, Takahashi N, Nakane T, Iwamoto N, Ishii H, Tsukamoto T, Kawada M, Matsuoka S, Takeda A, Terahara K, Tsunetsugu-Yokota Y, Iwata-Yoshikawa N, Hasegawa H, Sata T, Naruse TK, Kimura A, Matano T. Association of major histocompatibility complex class I haplotypes with disease progression after simian immunodeficiency virus challenge in Burmese rhesus macaques. *J Virol* 86:6481-6490, 2012.
- 2) Takahashi N, Nomura T, Takahara Y, Yamamoto H, Shiino T, Takeda A, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Sakawaki H, Miura T, Igarashi T, Koyanagi Y, Naruse TK, Kimura A, Matano T. A novel protective MHC-I haplotype not associated with dominant Gag-specific CD8+ T-cell responses in SIVmac239 infection of Burmese rhesus macaques. *PLoS ONE* 8:e54300, 2013.

(松下修三)

- 1) Yokoyama M, Naganawa S, Yoshimura K, Matsushita S, Sato H. Structural Dynamics of HIV-1 Envelope Gp120 Outer Domain with V3 Loop. *PLoS ONE* 7(5): e37530, 2012.
- 2) Ong Y T, Kirby K A, Hachiya A, Chiang L A, Marchand B, Yoshimura K, Murakami T, Singh K, Matsushita S, Sarafianos, S G. Preparation of biological active single-chain variable antibody fragments that target the HIV-1 gp120 v3 loop. *Cellular and molecular biology*, 58: 71-79, 2012
- 3) Harada S., Yoshimura K., Yamaguchi A., Yusa K., Matsushita S. Impact of antiretroviral pressure on selection of primary HIV-1 envelope sequences in vitro. (*J. Gen. Virol.* In press)
- 4) Kuwata T., Takaki K., Yoshimura K., Enomoto I., Wu F., Hirsch V.M., Yokoyama M., Sato H., Matsushita S. Conformational epitope consisting of the V3 and V4 loops is a target for potent and broad neutralization of simian

- immunodeficiency viruses. *J. Virol.* (2013) in press.
- 5) 5. Narumi T, Arai H, Yoshimura K, Harada S, Hirota Y, Ohashi N, Hashimoto C, Nomura W, Matsushita S, Tamamura H. CD4 mimics as HIV entry inhibitors: lead optimization studies of the aromatic substituents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* (2013) in press.  
(有吉紅也)
  - 1) Sapsutthipas S, Tsuchiya N, Pathipavanich P, Ariyoshi K, Sawanpanyalert P, Takeda N, Isarangkura-na-ayuthaya P, Kameoka M. CRF01\_AE-specific neutralizing activity observed in plasma derived from HIV-1-infected Thai patients residing in northern Thailand: comparison of neutralizing breadth and potency between plasma derived from rapid and slow progressors. *PLoS One* 2013;8(1):e53920
  - 2) Mori M, Matsuki K, Maekawa T, Tanaka M, Sriwanthana B, Yokoyama M, Ariyoshi K. Development of a novel in silico docking simulation model for the fine HIV-1 cytotoxic T lymphocyte epitope mapping. *PLoS One.* 2012;7(7):e41703.
  - 3) Sriwanthana B, Mori M, Tanaka M, Nishimura S, Miura T, Pathipvanich P, Sawanpanyalert P, Ariyoshi K. The effect of HLA polymorphisms on the recognition of Gag epitopes in HIV-1 CRF01\_AE infection. *PLoS One.* 2012;7(7):e41696.
  - 4) Tsuchiya N, Pathipvanich P, Rojanawiwat A, Wichukchinda N, Koga I, Koga M, Auwanit W, Kilgore PE, Ariyoshi K, Sawanpanyalert P. Chronic hepatitis B and C co-infection increased all-cause mortality in HAART-naive HIV patients in northern Thailand. *Epidemiol Infect.* 2012 Nov 1:1-9.  
(高橋秀実)
  - 1) Kobayashi, T., Nakatsuka, K., Shimizu, M., Tamura, H., Shinya, E., Atsukawa, M., Harimoto, H., Takahashi, H. and Sakamoto, C. Ribavirin modulates the conversion of human CD4(+) CD25(-) T cell to CD4(+) CD25(+) FOXP3(+) T cell via suppressing interleukin-10-producing regulatory T cell. *Immunology*, 137(3); 259-270, 2012.
  - 2) Nakagawa, Y., Shimizu, M., Norose, Y., Takahashi, M., and Takahashi, H. Induction of rapid apoptosis for class I MHC molecule-restricted CD8+ HIV-1 gp160-specific murine activated CTLs by free antigenic peptide in vivo. *Int. Immunol.* 25(1):11-24, 2013.
  - 3) Mayumi, N., Watanabe, E., Norose, Y., Watari, E., Kawana, S., Geijtenbeek, T. B., and Takahashi, H. E-cadherin interactions are required for Langerhans cell differentiation. *Eur. J. Immunol.*, 43(1): 270-280, 2013.
  - 4) Takaku, S., Nakagawa, Y., Owaki, A., Shimizu, M., Takahashi, M., and Takahashi, H. Induction of apoptosis-resistant and TGF- $\beta$ -insensitive murine CD8<sup>+</sup> CTLs specific for HIV-1 gp160. *Cell. Immunol.*, 2013 (in press).
  - 5) Takahashi, H., Mayumi, N., and Watanabe, E. Requirement of E-cadherin interactions for Langerhans cell differentiation. *J. Nippon Medical School*, 2013 (in press).
  - 6) 村上努, 高橋秀実: HIV と闘う宿主防御因子 日本エイズ学会誌 14(2):1-3, 2012.
  - 7) 新谷英滋, 高橋秀実: ヒト免疫不全ウイルス HIV-1 の Nef による樹状細胞 CD1 脂質抗原提示機能の低下. *臨床免疫・アレルギー科*, 57(2):269-274, 2012.
  - 8) 高橋秀実: HIV ワクチン開発のための新たな指標. *セフィーロ* 5:1-8, 2012.  
(塩田達雄)
  - 1) Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Saito A, Akari H, Yasutomi Y, Matano T, Sato H, Adachi A. Gag-CA Q110D mutation elicits TRIM5-independent enhancement of HIV-1mt replication in macaque cells. *Microbes Infect.* 2013;15(1):56-65.
  - 2) Likanonsakul S, Rattanatham T, Feangvad S, Uttayamakul S, Prasithsirikul W, Srisopha S, Nitiyanontakij R, Tengtrakulcharoen P, Tarkowski M, Riva A, Nakayama EE, Shioda T. Polymorphisms in Fas gene is associated with HIV-related lipodystrophy in Thai patients. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2013;29(1):142-50.
  - 3) Zhang X, Sobue T, Isshiki M, Makino S, Inoue M, Kato K, Shioda T, Ohashi T, Sato H, Komano J, Hanabusa H, Shida H. Elicitation of Both Anti HIV-1 Env Humoral and Cellular Immunities by Replicating Vaccinia Prime Sendai Virus Boost Regimen and Boosting by CD40Lm. *PLoS One.* 2012;7(12):e51633.
  - 4) Miyamoto T, Nakayama EE, Yokoyama M, Ibe S, Takehara S, Kono K, Yokomaku Y, Pizzato M, Luban J, Sugiura W, Sato H, Shioda T. The carboxyl-terminus of human immunodeficiency virus type 2 circulating recombinant form 01\_AB capsid protein affects sensitivity to human TRIM5 $\alpha$ . *PLOS ONE.* 2012;7(10):e47757

- 5) Saito A, Kawamoto Y, Higashino A, Yoshida T, Ikoma T, Suzuki Y, Ami Y, Shioda T, Nakayama EE, Akari H. Allele Frequency of Antiretroviral Host Factor TRIMCyp in Wild-caught Cynomolgus Macaques (*Macaca fascicularis*). *Front. Microbio.* 2012 3:314.
- 6) Bozek K, Nakayama EE, Kono K, Shioda T. Electrostatic potential of human immunodeficiency virus type 2 and rhesus macaque simian immunodeficiency virus capsid proteins. *Front Microbiol.* 2012;3:206.
2. 学会発表  
(岩本愛吉)
- 1) Long, Y., Meng, F., Kondo, N., Iwamoto, A., and Matsuda, Z. A highly conserved arginine residue in the membrane-spanning domain of HIV-1 gp41 is required for an efficient membrane fusion. *Retroviruses*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, USA. May 23-28, 2011.
- 2) Nomura, S., Kikuchi, T., Hosoya, N., Koga, M., Nakamura, H., Koibuchi, T., Fujii, T., Kawana-Tachikawa, A., Iwamoto, A., and Miura, T. Replication capacities of chimeric NL4-3 encoding gag-protease from modern HIV-1 isolates are significantly reduced compared to those derived from isolates in the early days of epidemic in Japan. 6<sup>th</sup> IAS Conference of HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. Rome, Italy. July 17-20, 2011.
- 3) Kikuchi, T., Iwatsuki-Horimoto, K. Adachi, E., Imai, K., Shimizu, S., Miyazaki, N., Koga, M., Nakamura, H., Kawana-Tachikawa, A., Koibuchi, T., Miura, T., Fujii, T., Iwamoto, A. Induction and maintenance of neutralizing antibodies after single dose of non-adjuvanted split 2009 pandemic H1N1 influenza A vaccine in HIV-1 positive population. 6<sup>th</sup> IAS Conference of HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. Rome, Italy. July 17-20, 2011.
- 4) Ishikawa, H., Kondo, N., Long, Y., Miyauchi, K., Meng, F., Iwamoto, A., and Matsuda, Z. Improvement of Novel Dual Functional Reporter for Analysis of Membrane Fusion. 25<sup>th</sup> Anniversary Symposium of the Protein Society. Boston, USA. July 23-27, 2011.
- 5) Iwatsuki-Horimoto, K., Horimoto, T., Tamura, D., Kiso, M., Kawakami, E., Hatakeyama, S., Ebihara, Y., Koibuchi, T., Fujii, T., Takahashi, K., Shimojima, M., Sakai-Tagawa Y., Ito, M., Sakabe, S., Iwasa, A., Takahashi, K., Ishii, T., Gorai, T., Tsuji, K., Iwamoto, A., and Kawaoka, Y. Sero-prevalence of Pandemic (H1N1) 2009 Influenza A Virus among Schoolchildren and Their Parents in Tokyo, Japan. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo, Japan. September 6-16, 2011.
- 6) Ishikawa, H., Kondo, N., Long, Y., Miyauchi, K., Meng, F., Iwamoto, A., and Matsuda, Z. Designing new split proteins by using GFP as "beta-tweezers". 17<sup>th</sup> International Biophysics Congress (IUPAB). Beijing, China. October 30-November 3, 2011.  
(俣野哲朗)
- 1) 高橋尚史、野村拓志、高原悠佑、山本浩之、成瀬妙子、木村彰方、俣野哲朗. サルエイズモデルにおける Gag 以外のウイルス抗原特異的 CTL 反応が関与する SIV 複製抑制機序. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、11/13/2012.
- 2) 高橋尚史、山本浩之、成瀬妙子、木村彰方、俣野哲朗. サルエイズモデルにおける Nef 抗原特異的細胞傷害性 T リンパ球反応が関与するウイルス複製制御機序に関する研究. 第 26 回日本エイズ学会学術集会、東京、11/24/2012.
- 3) Matano T. Viral control mechanisms in a macaque AIDS model. US-Japan Cooperative Medical Science Program, Joint Meeting of the AIDS Panels, Singapore, Singapore, 3/13/2013.  
(松下修三)
- 1) Harada S., Arai H., Narumi T., Tamamura H., Matsushita S., Yoshimura, K. : In vitro induction of ten CD4 mimic small compounds, NBD-556 and its analogues, resistant variants using primary R5 HIV-1. XIX International AIDS Conference (AIDS 2012), July 22-27, Washington DC, USA.
- 2) Maruta Y., Ramirez K., Kuwata T., Matsushita S. : Construction and characterization of neutralizing antibody fragments for efficient access to V3 epitope. AIDS Vaccine 2012, September 9-12, 2012, Boston, USA.
- 3) Kuwata T., Takaki K., Enomoto, E., Matsushita S. : Conformational epitope involving V3 and V4 loops is a major target for antibody-mediated neutralization in SIV smH635-infected macaques. 13th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, 2012.10.25-26, Aso, Kumamoto, Japan.
- 4) Maruta Y., Ramirez K., Kuwata T., Suwa Y.,

Morioka H., Kuwata T, Matsushita S.: Single-chain variable fragment (scFv) of anti-V3 monoclonal antibody efficiently neutralizes HIV-1 in vitro. 13th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, 2012.10.25-26, Aso, Kumamoto, Japan.

5) Tanaka K., Kuwata T., Maruta Y., Ramirez K., Matsushita S.: Analysis of antibodies to CD4-induced epitope on gp120. 13th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, 2012.10.25-26, Aso, Kumamoto, Japan.

6) Sonoda T., Boonchawalit S., Gatanaga H., Tanaka K., Maruta Y., Ramirez K., Kuwata T., Matsushita S.: Cross subtype neutralizing activity of plasma antibodies from patients infected with HIV-1 CRF01\_AE HIV-1. 13th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, 2012.10.25-26, Aso, Kumamoto, Japan.

(有吉紅也)

1) 安波道郎、有吉紅也。東南アジアの臨床疫学フィールドから学ぶウイルス感染症学。シンポジウム2「熱帯感染症」S2-5。第60回日本ウイルス学会学術集会2012年11月13日、大阪(口演)

(高橋秀実)

1) Shinya, E., Owaki, A., Shimizu, M., Matsumura, J., Takahashi, H.: HIV-1 Nef interferes with CD1a Ag presentation in immature dendritic cells: possible involvement of hematopoietic cell kinase (HCK). 第41回日本免疫学会学術集会 一般講演 2012年12月5-7日(神戸)。

2) Takaku, S., Nakagawa, Y., Owaki, A., Shimizu, M., Takahashi, M., Takahashi, H.: Induction of apoptosis-resistant and TGF- $\beta$ -insensitive murine CD8+ CTLs specific for HIV-1 gp160. 第41回日本免疫学会学術集会 一般講演 2012年12月5-7日(神戸)。

3) Takahashi, H.: In vivo inhibition of HIV-1-specific apoptosis induced by brief exposure to viral epitope. Japan-US Cooperative Medical Science Program: The 26th Joint Scientific Meeting of AIDS Panels. March 11-13, 2013 (Singapore).

4) Takahashi, H.: ISuppression of virus replication within HIV-1-infected mucosal innate immuno-competent cells. Japan-US Cooperative Medical Science Program: The 26th Joint Scientific Meeting of AIDS Panels. March 11-13, 2013 (Singapore).

(塩田達雄)

1) E Nakayama, T Nakajima, G Kaur, H Terunuma,

J-I Mimaya, H Ohtani, N Mehra, A Kimura, Tatsuo Shioda : A Naturally Occurring Single Amino Acid Substitution in Human TRIM5 $\alpha$  Linker Region Affects Its Anti-HIV-1 Activity and Susceptibility to HIV-1 Infection. Cold Spring Harbor Laboratory (Retroviruses)2012. May 21-26, 2012, Seattle (USA).

2) 塩田達雄: HIV感染症に関わる宿主因子。第14回白馬シンポジウムin京都。2012年6月7-8日、京都。

3) Emi Nakayama, Toshiaki Nakajima, Gurrinder Kaur, Jun-ich Mimaya, Hiroshi Terunuma, Narinder Mehra, Akinori Kimura, Tatsuo Shioda : A naturally occurring single amino acid substitution in human TRIM5 $\alpha$  linker region affects its anti-HIV-1 activity and susceptibility to HIV-1 infection. 第11回あわじしま感染症・免疫フォーラム。2012年9月11-14日、淡路島

4) 櫻木淳一、大出裕高、櫻木小百合、塩田達雄、佐藤裕徳: HIVゲノムRNA二量体化シグナルの新規構造モデル。第60回日本ウイルス学会学術集会。2012年11月13-15日、大阪。

5) 中山英美、中島敏晶、Gurrinder Kaur、三間屋純一、照沼 裕、Narinder Mehra、木村彰方、塩田達雄: ヒトTRIM5 $\alpha$  リンカー領域の多型の抗HIV-1活性に及ぼす影響。第26回エイズ学会学術集会・総会。2012年11月24-26日、横浜。

6) 櫻木淳一、櫻木小百合、塩田達雄: SL1 REVISITED: FUNCTIONAL ANALYSIS OF THE STRUCTURE AND CONFORMATION OF HIV-1 GENOME RNA. 第26回エイズ学会学術集会・総会。2012年11月24-26日、横浜。

7) 塩田達雄: HIV感染症に関わる宿主因子。大阪大学GCOEオルガネラネットワーク医学創成プログラム成果報告会。2012年12月25-26日、淡路島

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得  
該当無し
2. 実用新案登録  
該当無し
3. その他  
(高橋秀実)

1) ランゲルハンス細胞の調製方法(住友ベークライト社と共同特許出願中)



厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進研究事業（国際医学協力研究事業））

分担研究報告書

HIV に対する免疫応答の研究

研究分担者 岩本 愛吉 東京大学医科学研究所 教授

研究要旨：

日本人で頻度の高い HLA-A\*2402 により細胞傷害性 T 細胞 (CTL) に提示される HIV エピトープ Nef134-10 の野性型と変異型について、T 細胞受容体 (TCR) とペプチド-HLA クラス I 分子複合体 (pMHC) を試験管内で再構成し、分子間相互作用と結晶構造を解明した。シンガポールで開催された日米エイズ合同部会において成果を発表し、米国やアジアの研究者と密な情報交換を行った。

A. 研究目的

細胞傷害性 T 細胞 (CTL) は、T 細胞受容体 (T cell receptor, TCR) を介してエピトープと呼ばれる抗原ペプチドと主要組織適合抗原 (ヒトでは Human Leukocyte Antigen: HLA) クラス I 分子の複合体 (pHLA) を認識し、ウイルスを攻撃する。HIV nef 遺伝子でコードされる Nef134-10 ペプチド (HIV 株 HXB2 の配列番号による) は、日本人で頻度の高い HLA-A\*2402 で提示される CTL エピトープの一つである。Nef134-10 の野性型アミノ酸配列 (RYPLTFGWCF) は免疫原性が高く、それを持つウイルスは感染後急速に血中から排除され、2 番目のチロシン (Y) がフェニルアラニン (F) に置換したペプチド (Nef134-10 (2F)) を持つ HIV に置き換わる。興味深いことに、HLA-A24 陽性の患者において、Nef134-10 (wt) あるいは Nef134-10 (2F) 特異的な CTL を持つ患者は一部であるにもかかわらず、双方を認識できる (dual-specific) CTL がほぼ全ての患者において存在する。またごく一部であるが、2 番目ではなく 6 番目の F がロイシン (L) に置換した変異体 Nef124-10 (6L) が増殖する症例もある。本研究では、患者から分離された抗原認識特性の異なる CTL 株由来の TCR と pMHC の結合を分子構造のレベルで検討することを目的とした。

B. 研究方法

HLA-A\*2402 (HLA-A24) 陽性 HIV 感染者の末梢血中単核球 (PBMC) を Nef134-10 (Nef 遺伝子内の CTL エピトープ) 由来のペプチドで刺激し、in vitro で培養の後、CTL 株を樹立した。CTL 株から TCR 遺伝子をクローニングした。TCR と MHC クラス I 分子は、大腸菌で封入体として発現させ、変性剤により可溶化した後、それぞれリフォールディングし、イオン交換クロマトグラフィーとゲルろ過クロマトグラフィーをおこない精製した。そして分子間相互作用測定装置 Biacore を用いて TCR と pMHC 分子間での相互作用を測定した。次に TCR 単体、pMHC 単体または、TCR と pMHC との複合体を結晶化し、X 線回析測定をおこなった。得られた回析データを用いて分子置換法により

構造を決定した。本研究は中国科学院の高福教授、カナダの ZL Brumme 教授、東京大学の深井准教授、山形助教との共同研究である。

(倫理面への配慮)

臨床材料を用いる研究においては、該当する指針に従い、東京大学医科学研究所の該当する委員会の承認を得ている。病原体の解析研究 (承認番号: 20-31)、ヒトゲノム研究 (承認番号: 20-47)。協力の意志のある患者には研究の概要説明の上、書面で同意を得ている。海外の臨床検体は用いていない。

C. 研究結果

Wt-specific TCR、2F-specific TCR、dual-specific TCR について、全てリフォールディングに成功した。ついで、HLA-A24 (A24/Nef134-10 (wt)、A24/Nef134-10 (2F)、A24/Nef134-10 (6L) 分子と各 TCR の結合を Biacore 解析により確認し、解離定数を算出した。その結果、試験管内で再構成した TCR と pHLA の結合は、それぞれの TCR が由来する CTL 株の細胞傷害試験結果とほぼ同様の特異性を示した。

pMHC における結晶構造解析の結果、HLA-A24 分子によって提示された Nef134-10 エピトープの 4 番目のロイシンと 6 番目のフェニルアラニンは HLA-A24 の結合溝から突出しており、明らかに TCR との結合に重要であると考えられた。また Nef134-10 (wt) と Nef134-10 (2F) エピトープのペプチド構造は非常に類似しており、重ねあわせの程度を示す RMSD (root mean square deviation) の値は 0.24 であった。HLA-A24 においてエピトープとなる 2 番目のアミノ酸はアンカー残基として HLA-A24 と結合することが知られており、タイロシンである場合にはその水酸基と HLA-A24 の 70 番目のヒスチジンが水素結合を形成するのに対し、A24/Nef134-10 (2F) の場合にはフェニルアラニンであるためタイロシンと比較し、水酸基が存在しないため、水素結合は形成されていなかった。しかしペプチド構造や HLA-A24 において大きな構造変化はなかった。

次に TCR-pMHC 間での解析をおこなった。その

結果、wt TCR は A24/Nef134-10(wt) に対してエピトープの 6 番目のアミノ酸であるフェニルアラニンの側鎖を囲むように、TCR が形成するポケットに収容されていた。しかし結合能の低い A24/Nef134-10(6L) との複合体においてペプチドの 6 番目のアミノ酸はロイシンであり、フェニルアラニンに比べ、側鎖が小さいため TCR によって形成されるポケットに隙間が生じていた。

2F TCR は A24/Nef134-10(wt) よりも A24/Nef134-10(2F) との結合においてより多くの水素結合が確認されたが、両者とも MHC の結合溝に埋もれているエピトープの 8 番目のトリプトファンを持ち上げるという特殊な結合様式が確認された。

2F TCR はアンカー部位が水素結合により固定化されている Nef134-10(wt) よりも Nef134-10(2F) を TCR 側に近接させることでより多くの水素結合を獲得しているのではないかと考えられる。

dual TCR は A24/Nef134-10(2F) との複合体しか構造を解くことが出来なかったが、この TCR は A24/Nef134-10(2F) のペプチド N 末端側を主に  $\alpha$  鎖を用いて認識していた。そして  $\beta$  鎖はペプチドとの結合に関与するものの、MHC にはほとんど結合していないことが判明した。また、A24/Nef134-10(2F) のペプチド構造変化は dual TCR との結合前と結合後とでは wt TCR や 2F TCR のときと比べて小さかった。つまり dual TCR は Nef134-10 ペプチドの中央部分よりも N 末端側を主として認識し、ペプチドの構造変化を抑えることで A24/Nef134-10(wt) と A24/Nef134-10(2F) とでは結合能に大きな差がないのだろうと考えられた。

#### D. 考察

本研究では HLA-A\*2402 によって提示された野生型と変異型の Nef134-10 エピトープに対してそれぞれ特異的な CTL 及び、双方に対して特異性を示す CTL 由来の TCR 分子を大腸菌により作製し、再構成した。Nef134-10 エピトープを提示する HLA-A\*2402 分子と TCR の相互作用解析と結晶構造解析をおこない、HLA-A\*2402 分子における TCR との複合体構造を初めて報告した。さらに、変異する頻度が高い HIV において、その野生型と変異型とのエピトープに同程度の結合能を有する TCR と pMHC との初の構造解析例でもある。

現在 HLA-A\*2402 陽性の HIV 感染者固体内では Nef134-10(2F) の配列を持つウイルスがエスケープ変異体として A24 陽性者間で蔓延している。

その理由として Nef134-10(wt) に対して Nef134-10(2F) エピトープはほとんど細胞表面上で抗原提示されないことが報告されている。しかし、感染者の中には Nef134-10(2F) を認識する TCR を発現した CTL が存在する。N134-10(2F) エピトープは再構成可能であり、特異的な TCR と分子レベルで相互作用することを、相互作用解析と結晶構造解析により証明した。つまり、生体内においては、A24/N134-10(2F) が感染細胞で提示されていなくても、Professional な抗原提示細胞

により、この変異エピトープが提示されているため、野生型、変異型双方を認識できる

(dual-specific) CTL が維持される可能性がある。おそらくアポトーシスやネクロトーシスに陥った感染細胞または HIV 粒子などを樹状細胞などの抗原提示細胞が取り込み、外来性抗原としてクロスプレゼンテーション経路により細胞表面へと抗原提示されているのではないかと示唆される。

#### E. 結論

相互作用解析と結晶構造解析から実際に N134-10(2F) エピトープが HLA-A24 によって提示され、TCR と分子レベルで相互作用することを証明した。ウイルス蛋白質の細胞内プロセッシングを変化させることが出来れば、プロセッシング変異体を感染細胞表面に発現させ、CTL の機能を活かすことが出来るかもしれない。

#### F. 健康危険情報

該当無し

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Onoe T, Honda M, Matsuo K, Sasaki H, Sawamura M, Onoe Y, Iwamoto A, Onodera S, Kawana T, Tada Y, Nimura M, Nakagawa H. Examination of the correlation between the manual and automated serological testing methods for syphilis. *J Dermatol.* 39(4):355-61, 2012 Apr.
- 2) Kikuchi T, Iwatsuki-Horimoto K, Adachi E, Koga M, Nakamura H, Hosoya N, Kawana-Tachikawa A, Koibuchi T, Miura T, Fujii T, Kawaoka Y, Iwamoto A. Improved neutralizing antibody response in the second season after a single dose of pandemic (H1N1) 2009 influenza vaccine in HIV-1-positive adults. *Vaccine.* 30(26):3819-23, 2012.
- 3) Nakayama, K., Nakamura, H., Koga, M., Koibuchi, T., Fujii, T., Miura, T., Iwamoto, A., and Kawana-Tachikawa, A. Imbalanced Production Of Cytokines By T Cells Associates With The Activation/Exhaustion Status Of Memory T Cells In Chronic HIV-1 Infection. *AIDS Research and Human Retroviruses.* 28(7):702-14, 2012.
- 4) Adachi E, Koibuchi T, Imai K, Kikuchi T, Koga M, Nakamura H, Miura T, Iwamoto A, Fujii T. Favourable outcome of progressive multifocal leukoencephalopathy with mefloquine treatment in combination with antiretroviral therapy in an HIV-infected patient. *Int J STD AIDS.* 23(8):603-5, 2012.
- 5) Adachi E, Koibuchi T, Okame M, Sato H,

- Kikuchi T, Koga M, Nakamura H, Iwamoto A, Fujii T. Liver dysfunction in patients with early syphilis: a retrospective study. *J Infect Chemother.* 19(1):180-2, 2013.
- 6) Nomura S, Hosoya N, Brumme ZL, Brockman MA, Kikuchi T, Koga M, Nakamura H, Koibuchi T, Fujii T, Carlson JM, Heckerman D, Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A, Miura T. Significant reductions in Gag-protease-mediated HIV-1 replication capacity during the course of the epidemic in Japan. *J Virol.* 87(3):1465-76, 2013.
- 7) Adachi E, Koibuchi T, Imai K, Kikuchi T, Shimizu S, Koga M, Nakamura H, Iwamoto A, Fujii T. Hemophagocytic syndrome in an acute human immunodeficiency virus infection. *Intern Med.* 52(5):629-32. Epub 2013 Mar 1, 2013.
2. 学会発表
- 1) Kondo, N., Hosoya, N., Iwamoto, A., and Melikyan, G.B. Differential role of actin remodeling in HIV-cell fusion and in cell-cell fusion mediated by viral particles. Cold Spring Harbor Meeting on Retroviruses 2012. May 21-26 2012. Cold Spring Harbor Laboratory, NY, USA.
- 2) Kikuchi, T., Iwabu, Y., Kawana-Tachikawa, A., Koga, M., Hosoya, N., Nomura, S., Brumme, Z.L., Jessen, H., Kelleher, A., Markowitz, M., Pereyra, F., Trocha, A., Walker, B.D., Iwamoto, A., Tokunaga, K., and Miura, T. Anti-APOBEC3G activity of HIV-1 Vif protein from elite controllers is attenuated compared to those from untreated chronic progressors or those from individuals with acute infection. The XIX International AIDS Conference (AIDS 2012). July 22 - 27, 2012. Washington D.C., USA.
- 3) Koga, M., Kikuchi, T., Nomura, S., Hosoya, N., Koibuchi, T., Fujii, T., Kawana-Tachikawa, A., Iwamoto, A., and Miura, T. A combinational mutation of K65R/M184V/K103N/Y181C mutations that makes HIV-1 highly resistant to TDF/FTC/EFV therapy significantly reduces viral replication capacity, and which might be contributing to keep viremia at low-level in a patient with virological failure. The XIX International AIDS Conference (AIDS 2012). July 22 - 27, 2012. Washington D.C., USA.
- 4) Wang, H., Li, X., Iwamoto, A., and Matsuda, Z. Tethered expression of neutralizing scFV with HIV-1 Envelope blocks syncytia formation in CD4-positive cells. The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity, September 11-14, 2012, Awaji, Japan.
- 5) Hosoya, N., Teeranaipong, P., Heinz, S., Kashi, Y., Kawana-Tachikawa, A., Kondo, N., Hoshino, H., Matsuda, Z., and Iwamoto, A. Phenotypic determination of HIV-1 envelope tropism using Dual Split Protein (DSP) mediated cell fusion assay system. The Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections. January 23-24, 2013, Tokyo, Japan.
- 6) Shimizu, A., Kawana-Tachikawa, A., Yamagata, A., Han, C., Zhu, D., Nakamura, H., Koibuchi, T., Carlson, J., Martin, E., Brumme, C.J., Yi, S., Gao, G.F., Brumme, Z.L., Fukai, S., Iwamoto, A. Structural analysis of TCR recognition of HIV-derived antigens. The Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections. January 23-24, 2013, Tokyo, Japan.
- 7) Han, C., Shimizu, A., Zhu, D., Kawana-Tachikawa, A., and Iwamoto, A. Impact of an Amino Acid Change within Overlapping CTL Epitopes in HIV-1 Infection. February 10-15, 2013. Colorado, USA.
- 8) Iwamoto, A. Structural analysis on CTL response to an HIV-1 epitope. AIDS Panel Meeting, US-Japan Cooperative Medical Sciences Program. March 13, 2013. Singapore.
- 9) Iwamoto, A. Development of cell-fusion based HIV-1 tropism assay and its application. AIDS Panel Meeting, US-Japan Cooperative Medical Sciences Program. March 13, 2013. Singapore.
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)
1. 特許取得  
該当無し
2. 実用新案登録  
該当無し
3. その他  
該当無し

質量分析を通じたプロテアーゼの二量体化のダイナミクスの研究と  
新規の二量体化阻害剤の開発

分担研究者 満屋 裕明 (熊本大学生命科学研究部血液内科学・感染免疫診療部 教授)

**研究要旨**

HIV プロテアーゼ (PR) の 2 量体形成はウイルスの増殖に必須であり、2 量体形成は新規の抗 HIV 剤開発の標的となる。本研究では X 線結晶構造解析や質量分析、FRET (fluorescence resonance energy transfer) といった手法を用いて PR の 2 量体化阻止の態様や HIV の薬剤耐性獲得のメカニズムについて分子・原子レベルで解析を進め、これらの結果を基に米国 Purdue University の Dr. Ghosh グループと共同して、1 剤で PR の酵素活性と二量体化を阻害する bi-functional な新規化合物のデザイン・合成・同定を試みた。

**A. 研究目的**

ヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) 感染に対する化学療法 (ART) 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。しかし、複数の抗 HIV 剤に対して耐性を獲得した多剤耐性ウイルスの出現により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が問題視されており、これらに対応しうる新たな抗 HIV 薬の開発が急務となっている。

我々が米国グループと開発した darunavir (DRV) は HIV 感染症に対する first-line 治療薬として汎用されている。我々は過去に DRV が HIV プロテアーゼ (PR) の酵素活性だけでなく、二量体化をも阻害する事を明らかにしてきた。更に、我々はこの DRV の誘導体群から、多剤耐性ウイルスを強力に阻害する新規化合物の同定に成功した。本研究では、これら新規化合物の作用機序と HIV が薬剤耐性を獲得するメカニズムを解明し、より強力な抗 HIV 剤のデザイン・構築を試みる。

**B. 研究方法**

- 1) 多剤耐性 HIV 変異体に対する抗 HIV 活性の評価：初期スクリーニングとして野生株の HIV-1 を用いて MTT、MAGI アッセイなどによる抗 HIV 活性の評価を行い、有望なものについては耐性株を含む複数のウイルス株を用いて、p24 アッセイを行う。P24 アッセイは全自動化学発光測定機：Lumipulse F を用いる。
- 2) 新規化合物が示す抗 HIV 効果の作用機序の解明：新規化合物が HIV 野生株及び多剤耐性変異株のプロテアーゼに、どのような相互作用形式で結合しているのかを X 線結晶構造解析を用いて分子・原子レベルで解明する。得られた三次元構造及び相互作用形式を既存の薬剤と比較して、薬剤耐性 HIV 変異株に効果を発揮する為に重要となる相互作用部位を明らかにする。
- 3) HIV-1 が薬剤耐性を獲得するメカニズムの解析：過去に我々は、DRV について試験管内耐性誘導実験を行い DRV に対して高い耐性を有する HIV-1 変異株 ( $\text{HIV}_{\text{DRV}}^{\text{R}}_{\text{P20}}$ ,  $\text{HIV}_{\text{DRV}}^{\text{R}}_{\text{P30}}$  及び

HIV<sub>DRV</sub><sup>R</sup><sub>P51</sub>) の誘導に成功している。特に HIV<sub>DRV</sub><sup>R</sup><sub>P51</sub> は ART に使用されるほとんどのプロテアーゼ阻害剤に対し耐性を示す事が明らかとなっている (Koh & Mitsuya *et al*, *J Virol*. 84: 11961–11969, 2010)。この DRV 耐性 HIV 株に由来するプロテアーゼ変異体と DRV の複合体を結晶化し、X 線結晶構造解析を行うことで、HIV-1 がどのようにして DRV に対する耐性を獲得するかを構造的に明らかにする。2)と 3)で得られる結晶構造を基礎として高い抗ウイルス活性を有しかつ耐性の発現に抵抗する新規薬剤をデザイン・同定する。

4) HIV-1 プロテアーゼの 2 量体形成阻害剤の開発：HIV PR の 2 量体化は HIV-1 の増殖に必須であり、新規薬剤の標的となり得る。DRV の持つ二量体化阻害能を詳細に解析し、結晶構造解析等によるタンパクの分子・原子レベルでの分子間の相互作用を検討することで新しい作用機序を持つ抗 HIV 薬開発の可能性が考えられる。我々は、過去に構築した FRET (fluorescence resonance emission transfer) を用いたアッセイ系の他に、ESI-MS (electrospray ionization mass spectrometry) という質量分析装置を用いた解析手法を新たに導入する事で、DRV の二量体阻害メカニズム及びプロテアーゼ二量体化機構のより詳細な解析を試みる。分子生物学的手法を用いてプロテアーゼに導入した変異や新規化合物がプロテアーゼの 2 量体形成に与える影響などを検討、それら変異プロテアーゼと新規化合物との相互作用をウイルス学的・結晶学的・構造的に解析、臨床開発へと進める。

(倫理面への配慮)

開発した化合物の臨床試験導入に際し動物実験でその安全性を確認する。医学部内の IRB で倫理適合性の許可を申請し認可後試験を開始する。

## C. 研究結果

これまでに我々の研究グループは、米国 Purdue University の Dr. Ghosh グループとの共同研究により既に米国 FDA に認可、本邦でも臨床に供されているプロテアーゼ阻害剤 (PI), darunavir/Prezista<sup>®</sup> (DRV) の初期開発に成功、更に GRL-0216A, -0286A, -1388A, -1398, -0519A などの薬剤候補化合物の同定に成功した (Koh & Mitsuya *et al*, *Antimicrob Agents Chemother*. 47: 3123-29, 2003; Tojo & Mitsuya *et al*, *Antimicrob Agents Chemother*. 54: 3460-70, 2010; Ide & Mitsuya *et al*, *Antimicrob Agents Chemother*. 55: 1717-27, 2010)。特に、GRL-0519A は DRV を超える PR 酵素活性阻害と二量体形成阻害を示す強力な bi-functional PI である (Ghosh, Amano & Mitsuya, *ChemMedChem*. 5: 1850-54, 2010)。

また、我々のグループは、試験管内での DRV 耐性誘導実験によって誘導した HIV<sub>DRV</sub><sup>R</sup><sub>P20</sub>, HIV<sub>DRV</sub><sup>R</sup><sub>P30</sub> 及び HIV<sub>DRV</sub><sup>R</sup><sub>P51</sub> の配列解析を行い、HIV PR が DRV を耐性獲得する為の重要な変異 (V32I, L33F, I54M 及び I84V) の特定を行った (Koh & Mitsuya *et al*, *J Virol*. 84: 11961–11969, 2010; Koh & Mitsuya *et al*, *J Virol*. 85: 10079-10089, 2011)。V32I/L33F/I54M/I84V の変異を全て有する HIV<sub>DRV</sub><sup>R</sup><sub>P51</sub> は ART に使用される PI や我々が同定した薬剤候補化合物のほとんどに対して強い耐性を示す強力な耐性ウイルスであった。また、我々は、これ等の変異が DRV による治療に不応性となった臨床症例においても認められることを確認した。

近年我々は、Dr. Ghosh グループと共同して、これら強力な薬剤耐性を有する HIV 変異株に対しても阻害効果を発揮する GRL-015-11A, -085-11A といった複数の新規化合物の同定に成功した。特に GRL-085-11A は HIV<sub>DRV</sub><sup>R</sup><sub>P51</sub> に対しても阻害効果を示す強力な PI である。加えて、我々はこの新規化合物群と HIV<sub>DRV</sub><sup>R</sup><sub>P20</sub>,

HIV<sub>DRV</sub><sup>R</sup><sub>P30</sub> 及び HIV<sub>DRV</sub><sup>R</sup><sub>P51</sub> に由来する PR 変異体(PR<sup>P20</sup>, PR<sup>P30</sup>, PR<sup>P51</sup>)から成る複合体の結晶化に成功しており、兵庫県播磨市にある放射光施設 SPring-8 を利用して X 線回析を行った。得られた X 線回析画像は、PR の 3 次元構造を算出する為に米国 NCI にある申請者の研究室で解析が行われおり、既に得られた 3 次元構造から、GRL-015-11A 及び GRL-085-11A とともに PR の flap と呼ばれる部分構造と水素結合を形成している事が明らかとなった。その他のデータに関しても現在解析を継続して行っている。

他方、我々は過去に構築した FRET システムに加え、新たに ESI-MS を用いた質量分析手法を導入することで、DRV の持つ PR の二量体形成阻害機構及び PR の二量体化機構に関する詳細な解析を行った。ESI-MS による解析結果から、DRV が PR のモノマーサブユニットに対して結合する事で PR の二量体化を阻害している事を明らかにした。また、PR の二量体形成過程に関する解析では、PR が二量体を形成する為には 1) PR の活性中心近傍での分子間相互作用による不安定な二量体形成と、2) PR の末端領域の相互作用の形成による二量体の安定化という 2 ステップを必要とする事を示唆するデータを得た。更に、FRET システムによって二量体形成に関与する事が示唆されていた変異 T26A, D29N 及び R87K を有する PR 変異体 (PR<sup>T26A/R87K</sup> 及び PR<sup>T26A/D29N/R87K</sup>) が DRV とモノマー状態でのみ結合する事が明らかとなった事から、現在これら変異を含む PR 変異体と DRV の複合体の結晶化を試みている。

#### D. 考察

本計画では、HIV の薬剤耐性発現機構の解明、HIV PR の多量体形成過程での詳細な分子機構の解析及びそれらを阻害する薬剤の分子メカニズムの解明を目的とし、これら多方面から得られた基礎データに基づいた新たな新規化合物の開発同定、治療法の確立を目指している。HIV の増殖、複製に必須である HIV PR の 2 量

体化を検出できる FRET システムに加え、阻害剤と PR モノマーの結合を検出する ESI-MS を用いた実験手法を用いて、DRV の二量体化阻害メカニズム及び HIV PR の多量体形成過関にする新たな知見を得ることが出来た。加えて、Dr. Ghosh グループとの共同研究により多剤耐性 HIV に対して強い阻害効果を持つ多数の新規化合物の開発・同定に成功し、それら化合物と薬剤耐性 PR の結晶化に成功した。本研究で得られる知見は、より強力で、薬剤耐性の発現に抵抗性を示す薬剤や新規な阻害機構を有する薬剤のデザイン・合成・同定に重要な基盤となる事が強く期待される。

#### E. 結論

本研究では、DRV に対しても耐性を示す多剤耐性 HIV に対して効果を発揮する複数の新規化合物の同定の成功し、その化合物と PR 変異体の複合体を結晶化する事に成功した。更に、ESI-MS を用いることで、PR の 2 量体形成過程に関する新たな知見を得ることができ、DRV が他の PI とは異なり PR のモノマーに結合する事を明らかにした。加えて、モノマー状態でしか DRV に結合しない PR 変異体の同定にも成功した。1 剤で 2 つの作用機序を有する新規抗 HIV 剤は、薬剤耐性 HIV への新たな対応策と考えられるが、このような薬剤のデザイン・同定には薬剤と PR の相互作用、HIV の薬剤耐性発現機構に対する分子・原子レベルでの理解が必須である。

今後は得られた結晶構造の解析やこれまで得られた薬剤に対する耐性誘導試験などを行い、薬剤耐性発現機構を詳細に解析すると共に DRV の PR モノマーサブユニットへの結合様式の解明を行い、より強力な新規薬剤の開発・同定を進めていく予定である。

厚生労働科学研究費補助金  
地球規模保健課題推進研究事業（国際医学協力研究事業）  
分担研究報告書

SIV の CTL 逃避変異の解析

研究分担者 俣野 哲朗 国立感染症研究所エイズ研究センター長

研究要旨

HIV 感染症において、細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) 反応はウイルス複製抑制に中心的役割を担っている。CTL の標的となるエピトープは MHC クラス I (MHC-I) によって提示されることから、MHC-I 遺伝子型は HIV 感染病態に大きく影響し、その遺伝子型に特有のウイルスゲノム変異は CTL 反応からの逃避に結びつく変異 (CTL 逃避変異) を反映するものが多いことが知られている。SIV 感染サルエイズモデルにおいて、我々は最近、防御的な MHC-I ハプロタイプを見出したことから、本研究では、この MHC-I ハプロタイプを有する個体群において特有の変異を検索した。その結果、Nef のある領域に特有の変異を見出した。さらなる解析から、これらの変異は、この個体群に共通してみられる CTL 反応の標的領域にあることが判明し、CTL 逃避変異を反映している可能性が強く示唆された。

A. 研究目的

HIV 感染症においては、細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) 反応がウイルス複製抑制に中心的役割を果たしているが、この CTL 反応にもかかわらず HIV 持続感染が成立しエイズ発症にいたる。CTL 認識からの逃避に結びつく変異 (CTL 逃避変異) を有するウイルスの選択はしばしば認められるところである。CTL 逃避変異の解析は、CTL の抑制圧の理解に結びつくことから、本研究では、CTL 反応とウイルス変異選択の解析を進めることとした。

CTL の標的となるエピトープは主要組織適合遺伝子複合体クラス I (MHC-I) によって提示されることから、MHC-I 遺伝子型は HIV 感染病態に大きく影響し、その遺伝子型に特有のウイルスゲノム変異は CTL 反応からの逃避に結びつく変異 (CTL 逃避変異) を反映するものが多いことが知られている。サル免疫不全ウイルス (SIV) 感染サルエイズモデルにおいて、我々は最近、防御的な MHC-I ハプロタイプ 90-010-Id (D) を見出したことから、本研究では、この MHC-I ハプロ

タイプ D を有する個体群において特有の変異を検索した。

B. 研究方法

以前の実験で MHC-I ハプロタイプ D を共有する SIVmac239 感染アカゲサル 9 頭より得られ保存された凍結血漿を用いた。感染後おおよそ 1 ヶ月目、3 ヶ月目、1 年目および 2 年目に得られた血漿より、RNA を分離し、ウイルスゲノム cDNA を増幅した。この MHC-I ハプロタイプ D 共有サル群では、Nef 特異的 CTL 反応が優位に誘導されることが判明していたことから、nef 領域の塩基配列解析を行った。また、変異がみられた領域付近における CTL エピトープの検索を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験については、医薬基盤研究所、京都大学ウイルス研究所および所属機関の動物実験委員会の審査をうけ、その承認を得てから開始した。組換え生物等については、第二種使用等拡散防止措置確認 (大臣確認) および機関承認済みである。

### C. 研究結果

MHC-I ハプロタイプ D 共有サル全 9 頭において、SIV 感染後、SIV Nef36-44 をコードする領域にアミノ酸置換を生ずる変異の選択が認められた (図 1)。このような変異は、MHC-I ハプロタイプ D 陰性サルではごく低頻度でしか認められなかった。さらなる検索から、MHC-I ハプロタイプ D 共有サル群の多くでは、Nef35-49 に相当するペプチド特異的な CTL 反応が、SIV 感染の比較的早期から誘導されることが判明した。

### D. 考察

本研究で見出した SIV Nef36-44 をコードする領域にアミノ酸置換を生ずる変異は、MHC-I ハプロタイプ D と関連する変異であることが示された。この領域が、MHC-I ハプロタイプ D 共有サル群で誘導される CTL の標的領域 Nef35-49 に含まれることから、この CTL 反応からの逃避変異であることが強く示唆され、この Nef35-49 特異的 CTL 反応の強い SIV 複製抑制圧を反映するものであると考えられた。本研究結果は、サルエイズモデルにおける SIV 複製抑制機序の一つの解明に結びつくものである。

### E. 結論

SIV 感染サルエイズモデルにおいて、防御的な MHC-I ハプロタイプ D に関連する SIV nef 領域の変異を見出した。MHC-I ハプロタイプ D 共有群において、この領域を標的とする CTL 反応も認められ、この Nef 領域特異的 CTL 反応の強い SIV 複製抑制圧を反映するものであると考えられた。

### G. 研究発表

#### 1 論文発表

- 1) Nomura T, Yamamoto H, Shiino T, Takahashi N, Nakane T, Iwamoto N, Ishii H, Tsukamoto T, Kawada M, Matsuoka S,

Takeda A, Terahara K, Tsunetsugu-Yokota Y, Iwata-Yoshikawa N, Hasegawa H, Sata T, Naruse TK, Kimura A, Matano T. Association of major histocompatibility complex class I haplotypes with disease progression after simian immunodeficiency virus challenge in Burmese rhesus macaques. *J Virol* 86:6481-6490, 2012.

- 2) Takahashi N, Nomura T, Takahara Y, Yamamoto H, Shiino T, Takeda A, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Sakawaki H, Miura T, Igarashi T, Koyanagi Y, Naruse TK, Kimura A, Matano T. A novel protective MHC-I haplotype not associated with dominant Gag-specific CD8+ T-cell responses in SIVmac239 infection of Burmese rhesus macaques. *PLoS ONE* 8:e54300, 2013.

#### 2 学会発表

- 1) 高橋尚史、野村拓志、高原悠佑、山本浩之、成瀬妙子、木村彰方、俣野哲朗。サルエイズモデルにおける Gag 以外のウイルス抗原特異的 CTL 反応が関与する SIV 複製抑制機序。第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、11/13/2012.
- 2) 高橋尚史、山本浩之、成瀬妙子、木村彰方、俣野哲朗。サルエイズモデルにおける Nef 抗原特異的細胞傷害性 T リンパ球反応が関与するウイルス複製制御機序に関する研究。第 26 回日本エイズ学会学術集会、東京、11/24/2012.
- 3) Matano T. Viral control mechanisms in a macaque AIDS model. US-Japan Cooperative Medical Science Program, Joint Meeting of the AIDS Panels, Singapore, Singapore, 3/13/2013.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
無し。



厚生労働科学研究費補助金  
地球規模保健課題推進研究事業（国際医学協力研究事業）  
分担研究報告書

東南アジアにおけるHIVコホート研究

研究分担者 有吉 紅也 長崎大学熱帯医学研究所

研究要旨 本分担研究では、日本と東南アジア3国のエイズ拠点病院において、抗HIV治療開始までの未治療期間に罹患したHIV関連症状・エイズ指標疾患の頻度を比較し、東南アジアにおけるHIV・エイズ患者の臨床疫学像を明らかにすることを目的とした。本研究により日本、東南アジア諸国間におけるHIV流行様式およびエイズ臨床像の多様性が明らかになった。さらに結核およびPCPにおいて、罹患リスク因子が明らかになった。

A. 研究目的

アジアにおけるHIVの公衆衛生対策や医療の向上に役立て、国際的に通用する若手研究者の人材育成を行うことは、本体研究の大目標のひとつである。文化・経済・政治・民族的に多様性に満ちている東南アジアの諸国においては、HIV流行は複雑性を増しており、各国の現状に応じた多様な公衆衛生対策や治療方針が必要である。世界のHIV・エイズ医薬品開発の最前線にある米国において新たな抗HIV薬が開発されたとしても、その成果を東南アジアの途上国において十分行かすためには、各国の現状を正確に理解することが重要である。しかし、東南アジアのHIV/エイズ患者の臨床疫学像を科学的に比較し、その特徴を明らかにした論文はない。そこで、本分担研究では、分担研究者である有吉が長年共同研究により、信頼関係を築いてきた北タイランパン病院、ベトナム北部ハノイにあるバクマイ病院、フィリピンマニラにあるフィリピン総合病院(Philippine General Hospital, PGH)において、抗HIV治療(ART)患者を対象に、ART開始までの未治療期間に罹患したHIV関連症状・エイズ指標疾患の頻度を、日本国内(協力研究者:名古屋医療センター、杉浦互部長、横幕能行博士)のHIV・エイズ患者像と比較し、これらの疾患罹患リスク因子を解析することにより、東南アジアにおけるHIV・エイズ患者の実態を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

タイ、ベトナム、フィリピン、日本の4か国におけるHIV・エイズ拠点病院においてARTを開始したHIV感染・エイズ患者を対象にした後ろ向き臨床疫学研究である。具体的には、2003年1月から2010年12月までに北タイランパン総合病院HIV外来においてARTを開始した患者、2009年10月から2010年10月までに北部ベトナムバクマイ病院HIV外来においてARTを開始した患者、1995年9月から2011年12月までにPGHのHIV外来にて

ARTを開始した患者および2008年10月から2011年11月までの間に名古屋医療センターHIV外来を受診した患者(すべて18歳以上の成人)を対象に、患者基礎情報(性別、年齢、感染ルートなど)および臨床情報(日和見感染症、CD4値など)を標準化した情報シートを用いて病院カルテより収集した。これらの情報をコンピューターでデータ入力後に、STATAを用いて統計解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、実施機関である長崎大学熱帯医学研究所、また、海外の共同研究相手期間であるバクマイ病院、PGH、名古屋医療センターおよびタイ保健省の当該倫理審査委員会の承認を得て行っている。本件由来の臨床情報は、個人情報と連結不可能な状態で解析を行っている。

C. 研究結果

本研究により、ランパン病院、バクマイ病院、名古屋医療センターより、それぞれ、406名、321名、414名、319名、合計1640名の患者情報が収集された。平均年齢、性別、感染ルート、CD4値、初診時の症状の有無について、まとめた(表1)。平均年齢は、33.8歳、最小平均年齢29.8歳のPGHから、最高平均年齢39.2歳まで、9.4歳の開きがあった。性別については、PGHと名古屋における男性の割合が、それぞれ94.4%、93.4%と男性が圧倒的に多かったのに対し、バクマイは、63.6%と男性の方がやや多かった。一方、ランパンでは47.8%と男女比は1:1であった。これらの男女比の差は、PGHと名古屋の感染ルートが同性愛者(MSM)間性交が、81.2%、81.2%と大半を占めているのに対し、バクマイ病院では、注射麻薬使用者が34.3%と、日本・タイ・フィリピンに比べ圧倒的に多いのに対し、ランパンとバクマイ

では、異性愛者間性交がそれぞれ、89.2%、60.7%であった。

表2は、日和見感染症・HIV関連症状の頻度を示したものである。これらを比較検討したところ、バクマイ、ランパン、PGHでは、結核が圧倒的に最も頻度の高い日和見感染症(13.5~24.2%)であるのに対し、名古屋では1.3%であった。一方、名古屋ではPCPが21.9%であるのに対し、バクマイ、ランパンでは、それぞれ3.4%、8.4%であった。また、地域が限定されるペニシリオーシスは北タイのランパン病院と北ベトナムバクマイ病院においてのみ、それぞれ2.7%、10.3%と稀ではないが、フィリピンPGHと名古屋では、診断されていない。

これらの主要な日和見感染症について、罹患リスクをロジスティック解析したところ、結核については、東南アジア居住HIV感染者の罹患リスクが日本に比べて、7~37倍(多重解析)上昇するのに加えて、低CD4値、注射麻薬使用がそれぞれ、3.11~4.21、2.20上昇することが判明した。

PCPについては、低CD4値(51~200、50以下/u1)が、リスクがそれぞれ10.5、36.3倍に上昇するに対して、タイ・ベトナム居住者のリスクは、81%~91%減少する。

#### D. 考察

各国の男女比の差は、感染ルートと強い相関がある。ベトナムの男性の割合は、現在6割と女性に比べてやや多いが、これは、注射麻薬使用者のほとんどが男性であることに起因すると考えられる。我々の北ベトナムにおけるHIVカップルコホートによると注射麻薬使用者における性的活動は、非注射麻薬使用者と差がなく、注射麻薬使用者においても性的パートナーが存在していることから、性的接触を通じて女性にHIVが伝播することは容易に予想され、この男女差は、流行の時間的経過により縮まると予想される。

予想どおり、日本国内のHIV・エイズ患者における結核罹患率と東南アジアにおけるそれとの差は明らかであった。また、東南アジア国間においても、タイ・ベトナムに比べフィリピンの結核罹患リスクが、約4倍であった点は興味深い。また、多重解析においても、注射麻薬使用者において結核罹患リスクは、異性愛者に比べ2倍高かった。一方、低CD4値のリスクは、結核において3~4倍程度であるが、PCPにおいては、10~36倍と極端にリスクが上昇することがわかった。さらに、PCPの罹患リスクが、日本とフィリピンで差がないにもかかわらず、タイとベトナムで有意に低いことが興味深い。今後、さらに文献検索を加え、論文化する予定である。

#### E. 結論

本研究において、日本と東南アジア諸国、また、東南アジア諸国間におけるHIV流行様式およびエイズ臨床像の多様性が明らかになった。さらに、最も罹患率の高った結核およびPCPにおいて、リスク因子が明らかになった。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Sapsutthipas S, Tsuchiya N, Pathipavani ch P, Ariyoshi K, Sawanpanyalert P, Takeda N, Isarangkura-na-ayuthaya P, Kameoka M. CRF01\_AE-specific neutralizing activity observed in plasma derived from HIV-1-infected Thai patients residing in northern Thailand: comparison of neutralizing breadth and potency between plasma derived from rapid and slow progressors. PLoS One 2013;8(1):e53920

Mori M, Matsuki K, Maekawa T, Tanaka M, Sriwanthana B, Yokoyama M, Ariyoshi K. Development of a novel in silico docking simulation model for the fine HIV-1 cytotoxic T lymphocyte epitope mapping. PLoS One. 2012;7(7):e41703.

Sriwanthana B, Mori M, Tanaka M, Nishimura S, Miura T, Pathipvanich P, Sawanpanyalert P, Ariyoshi K. The effect of HLA polymorphisms on the recognition of Gag epitopes in HIV-1 CRF01\_AE infection. PLoS One. 2012;7(7):e41696.

Tsuchiya N, Pathipvanich P, Rojanawiwat A, Wichukchinda N, Koga I, Koga M, Auwanit W, Kilgore PE, Ariyoshi K, Sawanpanyalert P. Chronic hepatitis B and C co-infection increased all-cause mortality in HAART-naive HIV patients in northern Thailand. Epidemiol Infect. 2012 Nov 1:1-9.

##### 2. 学会発表

安波道郎、有吉紅也. 東南アジアの臨床疫学フィールドから学ぶウイルス感染症学. シンポジウム2「熱帯感染症」S2-5. 第60回日本ウイルス学会学術集会2012年11月13日、大阪(口演)

Mori M, Wichukchinda N, Miyahara R, Yasunami M, Pathipvanich P, Ariyoshi K, Sawanpanyalerti P. Viral adaptation against KIR2D-associated Gag immune pressure & their effect on clinical outcome among HIV-1 CRF01\_AE-infected Thais. 19th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI). Seattle, United States. March 5-9, 2012  
(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得  
該当なし
2. 実用新案登録  
該当なし
3. その他

表 1 北タイランパン病院、北ベトナムバクマイ病院、フィリピン総合病院、名古屋医療センターの未治療 HIV 患者における臨床疫学的背景

	Bach Mai		Lampang		PGH		Nagoya		Total	
Number of patients	321		406		414		319		1460	
Period of data collection	Oct 2009-Sept 2010		Jan 2003-Dec 2010		Sept 1995-Dec 2011		Oct 2008-Nov 2011			
Mean Age (Standard Deviation)	33 (7.9)		34.6 (8.3)		29.8 (7.2)		39.3 (12.1)		33.8 (9.5)	
age >=35	98	30.5%	188	46.3%	85	20.5%	191	59.9%	562	38.5%
Male	204	63.6	194	47.8	391	94.4	298	93.4	1087	74.5
Female	117	36.4	212	52.2	23	5.6	21	6.6	373	25.5
<b>Mode of Transmission</b>										
Heterosexual	195	60.7	362	89.2	52	12.6	54	16.9	663	45.4
MSM	3	0.9	13	3.2	336	81.2	259	81.2	611	41.8
IDU	110	34.3	10	2.5	3	0.7	8	2.5	131	9.0
unknown or multiple transmission	13	4.0	21	5.2	23	5.6	0	0.0	57	3.9
<b>Mean initial CD4</b>										
Mean initial CD4	206.4		243.8		279.4		230.6		240.1	
Range	1 to 1274		0 to 1000		1 to 1529		1 to 1116		0 to 1529	
<b>Initial CD4 range(cells/mm<sup>3</sup>)</b>										
cd4 < 500	45	14.0	54	13.3	44	10.6	27	8.5	170	11.6
cd 350 to 500	31	9.7	76	18.7	58	14.0	53	16.6	218	14.9

表 2 北タイランパン病院、北ベトナムバクマイ病院、フィリピン総合病院、名古屋医療センターの未治療 HIV 患者における日和見感染症罹患頻度

	Bach Mai		Lampang		PGH		Nagoya		Total	
	N=321	N%	N=406	N%	N=414	N%	N=319	N%	N=1460	N%
Mycobacterium tuberculosis	65	20.2	55	13.5	100	24.2	4	1.3	224	15.3
Pulmonary tuberculosis	37	11.5	38	9.4	66	15.9	1	0.3	142	9.7
Extrapulmonary tuberculosis	28	8.7	17	4.2	34	8.2	3	0.9	82	5.6
Pneumocystis jirovecii pneumonia	11	3.4	34	8.4	51	12.3	70	21.9	166	11.4
Oral candidiasis	30	9.3	46	11.3	2	0.5	19	6.0	97	6.6
Cytomegalovirus infection	2	0.6	3	0.7	8	1.9	39	12.2	52	3.6
Esophageal candidiasis	15	4.7	2	0.5	1	0.2	34	10.7	52	3.6
Varicella zoster	8	2.5	21	5.2	11	2.7	9	2.8	49	3.4
Penicilliosis	33	10.3	11	2.7	0	0.0	0	0.0	44	3.0
Cryptococcosis	4	1.2	21	5.2	0	0.0	6	1.9	31	2.1
Mycobacterium avium complex	12	3.7	0	0.0	0	0.0	5	1.6	17	1.2
Toxoplasmosis	10	3.1	1	0.2	4	1.0	1	0.3	16	1.1
severe bacterial infections, unspecified	12	3.7	0	0.0	1	0.2	0	0.0	13	0.9
unspecified oral ulcer, recurrent	8	2.5	0	0.0	2	0.5	0	0.0	10	0.7
Kaposi sarcoma	0	0.0	0	0.0	2	0.5	7	2.2	9	0.6
unspecified pneumonia	0	0.0	8	2.0	0	0.0	0	0.0	8	0.5

表 3 北タイランパン病院、北ベトナムバクマイ病院、フィリピン総合病院、名古屋医療センターの未治療 HIV 患者における結核およびニューモシスチス肺炎の罹患に関するリスク因子解析

Clinical and Demographic Characteristics	Tuberculosis <sup>a</sup>		Pneumocystis pneumonia	
	Univariate	Multivariate	Univariate	Multivariate
Age > 35 years old	0.82 [1.01-1.24]	1.59 [1.04-2.44]	1.45 [1.03-2.04]	1.3 [0.78-2.03]
Male sex	1.82 [1.20-2.75]	1.15 [0.68-1.95]	2.03 [1.3-3.18]	0.99 [0.55-1.77]
<b>Transmission route</b>				
Heterosexual	Ref	Ref	Ref	Ref
Men having sex with men	1.21 [0.84-1.76]	0.97 [0.48-1.96]	1.8 [1.27-2.55]	0.83 [0.44-1.56]
Injecting Drug Use	3.21 [1.98-5.21]	2.2 [1.18-4.10]	0.24 [0.07-0.78]	0.39 [0.10-1.45]
Unknown	3.38 [1.77-6.44]	2.25 [1.08-4.69]	0.92 [0.35-2.39]	0.4 [0.14-1.19]
<b>Country of Origin</b>				
Japan	Ref	Ref	Ref	Ref
Philippines	24.9 [8.99-69.1]	37.08 [12.96-106.07]	0.54 [0.35-0.82]	0.65 [0.38-1.09]
Thailand	8.18 [2.89-23.16]	7.06 [2.22-22.48]	0.33 [0.21-0.51]	0.19 [0.09-0.37]
Vietnam	16.05 [5.73-44.9]	11.87 [3.56-39.53]	0.13 [0.07-0.25]	0.09 [0.03-0.22]
<b>CD4 T-lymphocyte level (cells/microliter)</b>				
>200	Ref	Ref	Ref	Ref
51 to 200	3.05 [1.97-4.70]	3.11 [1.95-4.97]	8.25 [4.13-16.5]	10.52 [5.19-21.34]
≤50	3.75 [2.52-5.57]	4.21 [2.73-6.50]	24.22 [12.83-45.72]	36.3 [18.8-70.1]

<sup>a</sup>combined pulmonary and extrapulmonary tuberculosis <sup>b</sup>odds ratio with confidence interval enclosed in brackets [ ]