

研究課題：安全かつ効果的な抗 HIV 療法開発のための研究

課題番号：H23-エイズ一般-001

研究代表者：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）

研究分担者：太田 康男（帝京大学医学部内科学講座 教授）、杉浦 亙（国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター 部長）、吉村 和久（国立感染症研究所エイズ研究センター第一室 室長）、川村 龍吉（山梨大学医学部皮膚科 講師）、児玉 栄一（東北大学医学部内科 助教）、横幕 能行（国立病院機構名古屋医療センターエイズ治療開発センター 医長）、本田 元人（国立国際医療研究センターエイズ治療・研究開発センター 医師）、塚田 訓久（国立国際医療研究センターエイズ治療・研究開発センター 医療情報室医長）

1. 研究目的

抗 HIV 療法は様々な新規薬剤の登場により複雑化している。感染者一人一人の HIV の薬剤感受性状況に基づいて抗 HIV 効果を予測し、生じ得る副作用・併用薬との相互作用などを考慮しながら、最適と思われる組み合わせを選び出すこととなる。複数存在する治療ガイドラインは、主に欧米で行われた臨床試験の結果に基づいており、小柄な日本人にそのまま当てはめられるものではない。本研究の目的は、日本人における副作用症例・薬剤耐性症例などの臨床症例を解析し、その原因となる機序の解明・新たな治療法を開発し、安全で効果的な日本人のための抗 HIV 療法を開発し実践可能にすることである。この目的を達成するため、「柱 1：副作用回避のための研究」、「柱 2：薬剤耐性克服のための研究」を行う。これらの抗 HIV 薬の研究とともに、日本における新規感染者の一方向的増加に歯止めをかけるため、また、現在臨床的に問題となっている HIV 感染者の B 型肝炎ウイルス(HBV)の重複感染を防ぐため、「柱 3：抗 HIV 薬の感染予防効果の解析」を行う。

2. 研究方法

「柱 1：副作用回避のための研究」日本人感染者における副作用の解析・毒性回避法の探索のために、抗 HIV 薬による腎毒性の解析（瀧永）、抗 HIV 薬の骨代謝への毒性メカニズムの解明（太田）、プロテアーゼ阻害薬およびアバカビルの心血管系への影響の評価（本田）、副作用回避のために新規薬剤に治療変更した症例の解析（塚田）に課題を分割して遂行する。

「柱 2：薬剤耐性克服のための研究」感染個体内の進化に伴う薬剤感受性変化の解析（瀧永）、インテグラーゼ阻害薬などの新規薬剤に対する薬剤耐性の解析（杉浦）、マラビロクなどの侵入阻害薬に対する薬剤耐性の解析（吉村）、多剤耐性症例に対する実際の治療戦略の開発（横幕）、耐性 HIV を克服する新薬の開発（児玉）に課題を分割して遂行する。

「柱 3：抗 HIV 薬の感染予防効果の解析」日本における新規 HIV 感染者の増加に歯止めをかけることを目指し

て、抗 HIV 薬による非感染者の HIV 感染予防効果の解析を行う（川村）。また、現在臨床的に問題となっている HIV 感染者の HBV 重複感染を防ぐため、抗 HIV 薬による HBV 感染予防効果を解析する（瀧永）。

（倫理面への配慮）

国立国際医療研究センター、国立病院機構名古屋医療センター、帝京大学医学部付属病院の患者の臨床経過や HIV を解析することとなる。いずれも、それぞれの施設で倫理委員会の承認を得た。患者の理解と協力を得るため、研究の必要性和意義について十分に説明し、それぞれの施設の倫理規定に従い同意書に自筆のサインを得た。サインされた同意文書はカルテに綴じ込み保存している。また、研究への参加の同意・不同意に関わらず、診療上の不利益は被らないように配慮する。個人情報を保護するため、個人を特定できるような情報は外部には出さないこととする。HIV 感染実験のための健常者からの表皮水疱蓋の採取については、山梨大学の倫理委員会で承認を得た。表皮を提供する健常者の理解と協力を得るため、研究の必要性和意義について十分に説明し、山梨大学の倫理規定に従い同意書に自筆のサインを得た。

3. 研究結果

「柱 1：副作用回避のための研究」テノホビルの腎毒性の解析については、低体重がリスク因子として重要であることを明らかにし、アバカビル投与群と比較し有意に eGFR が低下することを報告した（研究発表：瀧永 8）。更に、低体重とは独立した因子として、尿細管トランスポーター遺伝子の SNP が関与している可能性を示した（研究発表：瀧永 5）。テノホビルのみならず、アタザナビルは、腎結石を生じやすいため、腎障害を起こしやすいことを示した（研究発表：瀧永 4）。日本人 HIV 感染者の約 50% が骨減少症、約 10% が骨粗鬆症であり、10 年を超える抗 HIV 療法が骨密度低下のリスクであることを示した（研究発表：太田 1）。ワーファリン投与患者において、ラルテグラビルが抗 HIV 療法のキードラッグとして安全に使用できることを報告した（研究発表：本田 1）。

「柱2:薬剤耐性克服のための研究」逆転写酵素の172RはTAM (thymidine-analogue resistance mutations) の出現と関連し、172Kは151 complex 変異の出現と関連することを報告した(研究発表:児玉2)。強力な抗HIV作用を持つ融合阻害薬の新規デザインについて示した(研究発表:児玉1)。マラビロク感受性を決定するtropismについて、CCR5-tropicからCXCR4-tropicへと変化する際のEnv V3領域に高頻度に見られる変異のパターンを同定した(湯永:論文投稿中)。

「柱3:抗HIV薬の感染予防効果の解析」HSV2はLL-37を介してHIVのランゲルハンス細胞への感染を促進することを示した(研究発表:川村1)。HIVに対する感染予防効果については、健常ボランティアより得た表皮水疱蓋を新規の逆転写酵素阻害薬である4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine (EFdA)と、近年外用マイクロサイドとしての有効性が臨床的に示されたテノホビルを作用しHIVに曝露したところ、EFdAはテノホビルよりもはるかに強力な感染阻止効果を示した。HBVに対する感染予防効果については、HBV血清学的マーカーがすべて陰性のHIV感染男性同性愛患者354人のうち43人で外来フォロー中に陽転化を確認し、抗HBV作用を有する薬剤を含んだ抗HIV療法中の患者には有意にHBVの感染頻度が低いことを見出した。

4. 考察

外来フォロー中に驚くほど多くの患者(12%)がHBVの重複感染を起こしており、不顕性感染が多いことが示唆される。感染したHBVのウイルス学的解析を含めて、更なる解析が必要である。

5. 自己評価

1) 達成度について

いずれの柱もH24年度の目標を達成しており、論文発表も順調に行われている。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

欧米人と日本人で、抗HIV薬の副作用出現頻度が大きく異なることが徐々に明らかになりつつある。欧米で提唱されている治療ガイドラインをそのまま日本人に応用することは困難であり、エビデンスに基づいた日本人のための治療ガイドラインの作成が急務である。本研究の目的とするところは、日本人に起こり得る副作用の頻度、その回避法、薬剤耐性症例の治療法開発など、日本人のための治療ガイドラインを作成する際の基になるデータ・エビデンスを提供することである。日本人のための安全で効果的な

抗HIV療法が開発され実践可能となれば、日本におけるHIVの治療成績が向上し、感染者の服薬アドヒアランスが向上することが期待される。それに伴って、多くの感染者で血中HIV量を検出限界以下にコントロールすることが可能となり、その感染者から新たに感染する確率を著しく低くし、結果として日本におけるHIV感染者の著しい増加傾向に歯止めをかけることが期待される。また本研究では、抗HIV薬の有効性に関する研究の一つとして、そのHIVとHBVの感染予防効果の解析も行う。これらにより、抗HIV薬の内服によるHIV感染予防が可能になれば、更に直接的に新たな感染を防止できる。HBVに関しては、HBV感染予防効果のある治療法を積極的に投与することにより、現在問題となっているHIV・HBVの重複感染症例数を減少させることが期待できる。

3) 今後の展望について

「柱1:副作用回避のための研究」今までの研究で明らかとなったテノホビルによる腎機能障害のリスク因子保持者へは、テノホビルの投与を控え、個々の症例に対する治療薬の選択に応用し、副作用出現頻度の減少が実際に得られるかを調査する。骨密度の低下をもたらし原因となる抗HIV薬を同定し、そのメカニズムの解明を目指す。研究中に得られた副作用のリスク因子などの情報は研究班内で共有し、連携を密にしてメカニズムの解析・副作用回避法の開発などに役立てる。

「柱2:薬剤耐性克服のための研究」得られた知見を薬剤耐性症例の診断・治療に応用し、成果を論文化し報告する。研究中に得られた耐性HIVは研究班内で共有し、協力して解析・データの共有を行う。

「柱3:抗HIV薬の感染予防効果の解析」HIVに対する感染予防効果については、EFdAの効果をもっと詳細に解析し、特にテノホビルとの比較を有効濃度差等によって明示する。HBVに対する感染予防効果については、外来フォロー中にHBV感染した43症例のHBVをウイルス学的に解析し、抗HIV療法との関係を明らかにし、論文発表する。

6. 結論

臨床現場に即座にフィードバックできる研究目標を掲げ、H23-24年度は順当な成果を挙げている。次年度の計画も実現的で「日本人のための治療ガイドライン」作成に大きく資することが期待される。

7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

なし。

研究発表

研究代表者

瀧永 博之

- 1) Yagita Y, Kuse N, Kuroki K, Gatanaga H, Carlson JM, Chikata T, Brumme ZL, Murakoshi H, Akahoshi T, Pfeifer N, Mallal S, John M, Ose T, Matsubara H, Kanda R, Fukunaga Y, Honda K, Kawashima Y, Ariumi Y, Oka S, Maenaka K, Takiguchi M. Distinct HIV-1 escape patterns selected by CTLs with identical epitope specificity. *J. Virol.* (in press)
- 2) Kinai E, Hosokawa S, Gomibuchi H, Gatanaga H, Kikuchi Y, Oka S. Blunted fetal growth by tenofovir in late pregnancy. *AIDS* 26: 2119-2120, 2012.
- 3) Nishijima T, Yazaki H, Hinoshita F, Tasato D, Hoshimoto K, Teruya K, Gatanaga H, Kikuchi Y, Oka S. Drug-induced acute interstitial nephritis mimicking acute tubular necrosis after initiation of tenofovir-containing antiretroviral therapy in patient with HIV-1 infection. *Intern med.* 51: 2469-2471, 2012.
- 4) Hamada Y, Nishijima T, Watanabe K, Komatsu H, Tsukada K, Teruya K, Gatanaga H, Kikuchi Y, Oka S. High incidence of renal stones among HIV-infected patients on ritonavir-boosted atazanavir than in those receiving other protease inhibitor-containing antiretroviral therapy. *Clin. Infect. Dis.* 86: 10870-10872, 2012.
- 5) Nishijima T, Komatsu H, Higasa K, Takano M, Tsuchiya K, Hayashida T, Oka S, Gatanaga H. Single nucleotide polymorphisms in ABCC2 associate with tenofovir-induced kidney tubular dysfunction in Japanese patients with HIV-1 infection: a pharmacogenetic study. *Clin. Infect. Dis* 55: 1558-1567, 2012.
- 6) Naruto T, Gatanaga H, Nelson G, Sakai K, Carrington M, Oka S, Takiguchi M. HLA class I-mediated control of HIV-1 in the Japanese population, in which the protective HLA-B*57 and HLA-B*27 alleles are absent. *J. Virol.* 86:10870-10872, 2012.
- 7) Hasan Z, Carlson JM, Gatanaga H, Le AQ, Brumme CJ, Oka S, Brumme ZL, Ueno T. Minor contribution of HLA class I-associated selective pressure to the variability of HIV-1 accessory protein Vpu. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 421: 291-295, 2012.
- 8) Nishijima T, Gatanaga H, Komatsu H, Tsukada K, Shimbo T, Aoki T, Watanabe K, Kinai E, Honda H, Tanuma J, Yazaki H, Honda M, Teruya K, Kikuchi K, Oka S. Renal function declines more in tenofovir- than abacavir-based antiretroviral therapy in low-body weight treatment-naïve patients with HIV infection. *PLoS One* 7: e29977, 2012.
- 9) Hayashida T, Gatanaga H, Takahashi Y, Negishi F, Kikuchi Y, Oka S. Trends in early and late diagnosis of HIV-1 infections in Tokyoites from 2002 to 2010. *Int. J. Infect. Dis.* 16: e172-177, 2012.
- 10) 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 cytotoxic T lymphocytes recognizing wild-type and/or escape mutant epitopes. *J. Virol.* 86: 1971-1981, 2012.

研究分担者

太田 康男

- 1) Koga I, Yoshino Y, Kitazawa T, Kurahashi K, Ota Y. Prevalence and risk factors for loss of bone mineral density in male Japanese patients with HIV. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 62: e25-27, 2013.
- 2) Yotsumoto M, Hagiwara S, Ajisawa A, Tanuma J, Uehira T, Nagai H, Fujikawa Y, Maeda S, Kitano K, Arima N, Uno K, Iwai T, Hongo I, Ota Y, Fukutake K, Okada S. Clinical characteristics of human immunodeficiency virus-associated Hodgkin lymphoma patients in Japan. *Int. J. Hematol.* 96: 247-253, 2012.

杉浦 互

- 1) Hirano A, Ikemura K, Takahashi M, Shibata M, Amioka K, Nomura T, Yokomaku Y, Sugiura W. Lack of Correlation Between UGT1A1*6, *28 Genotypes, and Plasma Raltegravir Concentrations in Japanese HIV Type 1-Infected Patients. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 28: 776-779, 2012.
- 2) Bunupuradah T, Imahashi M, Iampornsinn T, Matsuoaka K, Iwatani Y, Puthanakit T, Ananworanich J, Sophonphan J, Mahanontharit A, Naoe T, Vonthanak S, Phanuphak P, Sugiura W. Association of APOBEC3G genotypes and CD4 decline in Thai and Cambodian HIV-infected children with moderate immune deficiency. *AIDS Res. Ther.* 9: 34, 2012.

吉村 和久

- 1) Yokoyama M, Nagasawa S, Yoshimura K, Matsushita S, Sato H. Structural dynamics of HIV-1 envelope Gp120 outer domain with V3 loop. *PLoS One* 7: e37530, 2012.

川村 龍吉

- 1) Ogawa Y, Kawamura T, Matsuzawa T, Aoki R, Gee P, Yamashita A, Moriishi K, Yamasaki K, Koyanagi Y, Blauvelt A, Shimada S. Enhancement of HIV infection in Langerhans cells by LL-37 released from HSV-2-infected keratinocytes. *Cell Host Microbe* (in press)
- 2) Kawamura T, Ogawa Y, Nakamura Y, Nakamizo S, Ohta Y, Nakano H, Kabashima K, Katayama I, Koizumi S, Kodama T, Nakao A, Shimada S. Severe dermatitis with loss of epidermal Langerhans cells in human and mouse zinc deficiency. *J. Clin. Invest.* 122: 722-732, 2012.

児玉 栄一

- 1) Miyamoto F, Kodama EN. Development of small molecule HIV-1 fusion inhibitors: linking biology to chemistry. *Curr. Pharm. Des.* (in press)
- 2) Hachiya A, Marchand B, Kirby KA, Michailidis E, Tu X, Palczewski K, Ong YT, Li Z, Griffin DT, Schuckmann MM, Tanuma J, Oka S, Singh K, Kodama EN, Sarafianos SG. HIV-1 reverse transcriptase (RT) polymorphism 172K suppresses the effect of clinically relevant drug resistance mutations too both nucleoside and non-nucleoside RT inhibitors. *J. Biol. Chem.* 287: 29988-29999, 2012.

横幕 能行

- 1) 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 TRIM5a. *PLoS One* 7: e47757, 2012.
- 2) Kitamura S, Ode H, Nakashima M, Imahashi M, Naganawa Y, Kurosawa T, Yokomaku Y, Yamane T, Watanabe N, Suzuki A, Sugiura W, Iwatani Y. The APOBEC3C crystal structure and the interface for HIV-1 vif binding. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19: 1005-1010, 2012.

本田 元人

- 1) Honda H, Gatanaga H, Aoki T, Watanabe K, Yazaki H, Yanuma J, Tsukada K, Honda M, Teruya K, Kikuchi Y, Oka S. Raltegravir can be used safely in HIV-1-infected patients treated with warfarin. *Int. J. STD AIDS* 23: 903-904, 2012.

塚田 訓久

- 1) Nishijima T, Tsukada K, Teruya K, Gatanaga H, Kikuchi K, Oka S. Efficacy and safety of once-daily ritonavir-boosted darunavir and abacavir/lamivudine for treatment-naïve patients: a pilot study. *AIDS* 26:645-651, 2012.

研究課題:エイズ患者におけるカポジ肉腫関連ヘルペスウイルスが原因となる疾患の発症機構の解明と予防および治療法に関する研究

課題番号: H 2 3- エイズ- 一般- 0 0 2

研究代表者: 片野 晴隆 (国立感染症研究所感染病理部 室長)

研究分担者: 上田啓次 (大阪大学大学院医学系研究科ウイルス学 教授)、藤室雅弘 (京都薬科大学薬学部細胞生物学分野教授)、今村顕史 (がん・感染症センター東京都立駒込病院感染症科 医長)、照屋勝治 (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 病棟医長)、上平朝子 (国立病院機構大阪医療センター感染症内科 科長)

1. 研究目的

カポジ肉腫はカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (Kaposi's sarcoma associated herpesvirus, KSHV, または Human herpesvirus 8, HHV-8) が原因となる悪性腫瘍であり、エイズ患者では同性愛男性 (MSM) にほとんど限定して発症する。KSHV はカポジ肉腫以外にも多巣性キャッスルマン病 (MCD) や一部のリンパ腫にも関連する。日本の新規 HIV 感染者の 7 割が男性同性間の性的接触による感染 (MSM) であり、この数年で KSHV 関連疾患は増加傾向にあることから、カポジ肉腫への対策は急務である。皮膚カポジ肉腫の予後は比較的よいが、肺や消化管などの深部臓器に発症した症例は治療困難である。カポジ肉腫に対する治療は抗レトロウイルス療法 (ART) に化学療法 (ドキシル、一般名リポゾーマルドキソルビジン) を併用する方法が標準化されつつあるが、現在のところ、ART を考慮した病期分類や治療ガイドラインがない。また、KSHV には有効なワクチンや確実な発症予測法は開発されていない。カポジ肉腫は危険因子 (MSM) がはっきりしており、早期の治療が功を奏する疾患であるだけに、効果的な新規予防・治療法の開発が望まれる。本研究では以下のアプローチにより日本のカポジ肉腫減少を目指す。

(1) KSHV 関連疾患の発症機構の解明: KSHV の潜伏感染機構の解析から分子標的を絞る (上田、片野)。

(2) ワクチンを含めたカポジ肉腫の新規予防・発症予知法の開発: 粘膜ワクチン開発と分子標的を定めた新規治療薬、発症予測法を確立する (片野、藤室)。

(3) カポジ肉腫・KSHV 感染症の現状把握: 年齢、性別、発症部位、同性愛行為との関連、治療法、他の日和見感染症の合併などを把握する (今村、照屋、上平)。

(4) 治療ガイドラインの作成: ART を考慮した臨床的病期分類、ART の開始時期とリポゾーマルドキソルビジン (ドキシル) の併用などを考慮に入れた治療ガイドラインの作成を行う (今村、照屋、上平)。

日本以外の先進国ではカポジ肉腫は減少傾向にあり、ART を考慮した病期分類や治療ガイドラインは現在のところ存在しない。KSHV の感染、発症機構はいまだに不明

で、KSHV 感染、発症機構の解明ではウイルス発症共通の知見が発見される可能性がある。

2. 研究方法

ウイルスは KSHV、GFP 発現組換え KSHV を用いた。また、KSHV 感染細胞として、TY-1、BCBL-1 を用いた。血清中 HHV-8 抗体検査は ELISA と IFA により検出した。その他、分子生物学的方法を各分担研究の中で目的に応じて使用した。アンケート調査は全国のエイズ拠点病院を対象に書面、またはインターネット (web) 上で行った。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え等の実験に関しては当該研究施設の遺伝子組換え実験倫理委員会の承認を得た上で実験を行った。蛍光色素を発現するウイルスは DNA 組換えウイルスであり、使用に当たり、大臣確認を得た。ヒト検体を用いた研究は当該施設の研究倫理委員会の承認を得て行われた。

3. 研究結果

(1) KSHV 関連疾患の発症機構の解明: KSHV 複製には潜伏感染タンパク LANA が核マトリックスに局在することが重要であることを示した。また Angiopoietin-1 が KSHV 潜伏感染で高発現することを示し、その生理機能を解析した (上田)。次世代シーケンサーにより KSHV 感染臨床検体を解析し、キーとなるウイルス miRNA として miRK3 を同定、その機能を解析した (片野)。PEL 細胞では HSP90 依存的な NF- κ B シグナル伝達の活性化が細胞の生存に必須であることを見いだした (藤室)。

(2) ワクチンを含めたカポジ肉腫の新規予防・発症予知法の開発: GFP 発現組換え KSHV を用いた cell to cell 感染 (細胞間) 実験系を立ち上げ、細胞接触により KSHV が活性化すること、EphA2 が細胞間感染に重要な受容体であることを明らかにした。また、ワクチン候補分子 (K8.1) の有効性の確認を行った (片野)。ピロリジニウム型フラレン誘導体が KSHV 感染 B 細胞リンパ腫特異的にアポトーシスを誘導することを発見した (藤室)。

(3) カポジ肉腫・KSHV 感染症の現状把握: 全国の拠点病院

を対象としたアンケート調査を実施し、1) KS患者の2割およびMCD患者の4割が死亡していること、2) KSでは皮膚病変のみならず予後に影響しうる深部臓器病変が多く見られ、特に消化管病変の合併率が35.4%と高率であること、が明らかとなった(今村、照屋、上平)。ARTにリポゾーマルドキソルピシンを併用しても増悪する難治例においては、パクリタキセルによる治療効果が期待できることも示された(今村、照屋)。また、KSとKSHVの抗体保有率の検討、MCDと血中KSHV量の検討を行った(上平、照屋)。

(4) 治療ガイドラインの作成：上記アンケート調査等の結果を参考に、感染症科、消化器科、皮膚科、病理などの専門家による、ARTを考慮した臨床的病期分類、ARTの開始時期とドキシルの併用などを考慮に入れた「AIDSに合併するカポジ肉腫等のHHV-8 関連疾患における診断と治療の手引き」の作成を行ない、H25年3月に印刷予定である(今村、照屋、上平、片野)。

4. 考察

GFPを用いたKSHV cell to cell 実験系は、現在、適切な動物モデルがない中で、最もヒト感染に近い感染モデルであると考えられる。この系を用いた実験結果から、cell to cell 独自の感染機構があることが示唆され、いくつか同定されているKSHV 受容体の生体内での役割が明らかになることが期待される。また、ワクチン候補であるK8.1分子の感染阻害作用も示され、この系は感染阻害薬のスクリーニングなどにも有効であることが期待される。新たなPEL細胞の細胞死を誘導する薬剤が同定されたが、さらに特異性や安全性の評価が課題である。KSHV 感染症におけるウイルス miRNA の動態、Angiopoietin-1 発現との関連は新たな知見であり、潜伏感染維持の機構や発癌機構の解明につながる可能性を持つ。

臨床研究では、昨年度末に実施したアンケート調査から、日本におけるKSHV 関連疾患の現状が明らかにされた。これらの結果を基に、専門各科により「診断と治療の手引き」が作成された。ART を考慮した本手引きは、一定の診断、治療指針を示すものであり、とくに、症例数の少ない臨床医には有用な情報となることが期待される。一方で、アンケート結果や各院の実態調査では、ドキシル抵抗性の難治例が報告されており、これらの症例に関しては今後、詳細に解析をする必要がある。抗体検査、MCD の病態と血中HHV-8 核酸定量検査の有用性が確認されたことは、カポジ肉腫、MCD の発症予知法としてこれらの検査の有用性を示

すものであり、臨床的にも意義深い。

5. 自己評価

1) 達成度について

GFPを用いた安定した cell to cell 実験系を確立したことで、cell to cell 感染での主要レセプターの同定や、ワクチン候補分子の評価が可能となった点は、大きな進歩と認識している。新たなPEL細胞の細胞死を誘導する薬剤がいくつか同定された点は評価される。臨床的には、アンケート調査、実態調査により、KSHV 感染症の現状把握がなされ、「診断と治療の手引き」の作成まで進んだ点は当初の計画通りであり、2年目までの研究計画はほぼ順調に遂行された。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

GFPを用いたKSHV cell to cell 実験系の報告はこれまでになく、cell to cell での主要受容体の同定は国際的にも意義深い。ドキシルの使用、ART を考慮したカポジ肉腫の診断、治療の手引きは国際的にも他に例がなく、日本における治療の標準を示すことで、広く患者の利益となることが期待される。

3) 今後の展望について

KSHV cell to cell 実験系を用い、細胞間感染のメカニズムを明らかにしていくとともに、この系を使ったワクチン候補の選定を行う。また、感染阻害薬のスクリーニングを大規模に行っている。アンケートで存在が明らかになった難治例の解析を行い、適切な治療法を検討する。「診断と治療の手引き」は継続的に改訂を行い、up-to-date 名情報にしていく必要がある。また、手引きを普及させるためには、配布のみならず、専門誌への投稿、掲載を目指すとともに、相談窓口の開設と周知をはかる。

6. 結論

KSHV 細胞間感染実験系を開発し、細胞間感染のメカニズムに迫った。PEL細胞の細胞死を誘導する薬剤をいくつか同定した。KSHV 感染疾患の全国調査を行い、実態を把握すると共に、「診断と治療の手引き」を作成した。

7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

なし。

研究発表

研究代表者

片野晴隆

1. Shimodaira K, Okubo Y, Ochiai E, Nakayama H, Katano H, Wakayama M, Shinozaki M, Ishiwatari T, Sasai D, Tochigi N, Nemoto T, Saji T, Kamei K, Shibuya K: Gene expression analysis of a murine model with pulmonary vascular remodeling compared to end-stage IPAH lungs. *Respir Res* 13:103, 2012.
2. Ogawa-Goto K, Ueno T, Oshima K, Yamamoto H, Sasaki J, Fujita K, Sata T, Taniguchi S, Kanda Y, Katano H: Detection of active human cytomegalovirus by the promyelocytic leukemia body assay in cultures of PBMCs from patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *J Med Virol* 84:479-486, 2012.
3. Nakano K*, Katano H*, Tadagaki K, Sato Y, Ohsaki E, Mori Y, Yamanishi K, Ueda K: Novel monoclonal antibodies for identification of multicentric Castleman's disease; Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded vMIP-I and vMIP-II. *Virology* 425:95-102, 2012. (*equal contribution)
4. Nakajima N, Sato Y, Katano H, Hasegawa H, Kumasaka T, Hata S, Tanaka S, Amano T, Kasai T, Chong JM, Iiduka T, Nakazato I, Hino Y, Hamamatsu A, Horiguchi H, Tanaka T, Hasagawa A, Kanaya Y, Oku R, Oya T, Sata T: Histopathological and immunohistochemical findings of 20 autopsy cases with 2009 H1N1 virus infection. *Mod Pathol* 25:1-13, 2012.
5. Katano H, Sato S, Sekizuka T, Kinumaki A, Fukumoto H, Sato Y, Hasegawa H, Morikawa S, Saijo M, Mizutani T, Kuroda M: Pathogenic characterization of a cervical lymph node derived from a patient with Kawasaki disease. *Int J Clin Exp Pathol* 5:814-823, 2012.
6. Kamiyama T, Ohshima N, Satoh H, Fukumoto H, Katano H, Imakado S: Metachronous merkel cell carcinoma on both cheeks. *Acta Derm Venereol* 92:54-56, 2012.
7. Goto H, Kariya R, Shimamoto M, Kudo E, Taura M, Katano H, Okada S: Antitumor effect of berberine against primary effusion lymphoma via inhibition of NF-kappaB pathway. *Cancer Sci* 103:775-781, 2012.
8. Ablordey A, Amisah DA, Aboagye IF, Hatano B, Yamazaki T, Sata T, Ishikawa K, Katano H: Detection of *Mycobacterium ulcerans* by the loop mediated isothermal amplification method. *PLoS Negl Trop Dis* 6:e1590, 2012.

研究分担者

上田啓次

1. Noma S, Ohya-Shimada W, Kanai M, Ueda K, Nakamura T, Funakoshi H. Overexpression of HGF attenuates the degeneration of Purkinje cells and Bergmann glia in a knockin mouse model of spinocerebellar ataxia type 7. *Neuroscience Res.* 73(2):115-21.
2. Nakano K*, Katano H*, Tadagaki K, Sato Y, Ohsaki E, Mori Y, Yamanishi K, Ueda K: Novel monoclonal antibodies for identification of multicentric Castleman's disease; Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded vMIP-I and vMIP-II. *Virology* 425:95-102, 2012. (*equal contribution)
3. Ueda K. For the future studies of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. An Editorial. *Frontiers in Virology* 3: 1-2, 2012.
4. Ueda K. Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus Induced Tumorigenesis; how viral oncogenic Insults are Evaded. *J. Blood and Lymph* 2:3, 2012.

藤室雅弘

1. Yamanokuchi R, Imada K, Miyazaki M, Kato H, Watanabe T, Fujimuro M, Saeki Y, Yoshinaga S, Terasawa H,

- Iwasaki N, Rotinsulu H, Losung F, Mangindaan E. P. R, Namikoshi M, Voogd J de Nicole, Yokosawa H, Tsukamoto S. Hyrtioreticulins A-E, Indole alkaloids inhibiting the ubiquitin-activating enzyme from the marine sponge Hyrtios reticulates. *Bioorg Med Chem*, 20, 4437-4442, 2012
2. Nakazawa T, Ohmae T, Fujimuro M, Ito M, Nishinaga T, Iyoda M, Syntheses, molecular structures, and antiviral activities of 1- and 2-(20-deoxy-D-ribofuranosyl)cyclohepta[d][1,2,3]triazol-6(1H)-ones and 1-(20-deoxy-D-ribofuranosyl)cyclohepta[b]pyrrol-8(1H)-one. *Tetrahedron*, 68, 5368-5374, 2012
 3. Higashi C, Saji C, Yamada K, Kagawa H, Ohga R, Taira T, Fujimuro M. The effects of heat shock protein 90 inhibitors on apoptosis and viral replication in primary effusion lymphoma cells. *Biol. Pharm. Bull.*, 35, 725-730, 2012
 4. Ashizawa A, Higashi C, Masuda K, Ohga R, Taira T and Fujimuro M. The ubiquitin system and Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Frontiers in Virology* 3, 66, 2012

今村顕史

1. 今村顕史 (HIV感染症及びその合併症の課題を克服する研究班) 抗HIV薬の副作用. 抗HIV治療ガイドライン2012: 68-74.
2. 加藤博史、柳沢如樹、菅沼明彦、今村顕史、味沢 篤：難治性エイズ関連カポジ肉腫に対してパクリタキセルが奏効した1例, *感染症誌* 86:287-290, 2012

照屋勝治

1. Nagata N, Sekine K, Igari T, Hamada Y, Yazaki H, Ohmagari N, Akiyama J, Shimbo T, Teruya K, Oka S, and Uemura N. False-Negative Results of Endoscopic Biopsy in the Diagnosis of Gastrointestinal Kaposi's Sarcoma in HIV-Infected Patients. *Pathol Res Int* 2012 (2012), Article ID 854146
2. Nagata N, Shimbo T, Yazaki H, Asayama N, Akiyama J, Teruya K, Igari T, Ohmagari N, Oka S, Uemura N. Predictive Clinical Factors in the Diagnosis of Gastrointestinal Kaposi's Sarcoma and Its Endoscopic Severity. *PLoS ONE* 2012 7(11): e46967.

上平朝子

1. Watanabe D, Yoshino M, Yagura H, Hirota K, Yonemoto H, Bando H, Yajima K, Koizumi Y, Otera H, Tominari S, Nishida Y, Kuwahara T, Uehira T, and Shirasaka T. Increase in Serum Mitochondrial Creatine Kinase Levels Induced by Tenofovir Administration. *J Infect Chemother* 2012, 18:675-82.
2. Yoshino M, Yagura H, Kushida H, Yonemoto H, Bando H, Ogawa Y, Yajima K, Kasai D, Taniguchi T, Watanabe D, Nishida Y, Kuwahara T, Uehira T, Shirasaka T: Assessing recovery of renal function after tenofovir isoproxil fumarate discontinuation, *J Infect Chemother* 2012, 18:169-74.

研究課題：HIV-1感染・発症霊長類モデル研究：宿主内因性及び獲得免疫解析に基づく前臨床評価システムの最適化
課題番号：H23・エイズ・一般・003

研究代表者：明里 宏文（京都大学霊長類研究所 教授）

研究分担者：足立 昭夫（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 教授）

高折 晃史（京都大学医学研究科 教授）

中山 英美（大阪大学微生物病研究所 准教授）

松岡 佐織（国立感染症研究所エイズ研究センター 研究員）

1. 研究目的

新規抗 HIV-1 薬やワクチン開発、有効性評価研究において、実験用サル類を用いた前臨床試験は今や不可欠である。しかし HIV-1 は実験用サル類に感染発症しないことから、これまで SIV および SHIV/マカクザル感染発症モデルが汎用されてきた。一方 HIV-1 特異的で SIV, SHIV モデルでは評価困難な新規薬剤や予防治療ワクチンの前臨床評価研究を目的として、実用的な HIV-1 感染霊長類モデルの開発が求められてきた。当該研究課題では、サル類における HIV-1 感染および病態発現の制御に寄与する宿主内因性及び獲得免疫の基礎的解析に基づき、慢性エイズを発症する病原性 HIV-1 感染霊長類モデルを確立し急性・慢性 HIV-1 感染霊長類モデルの前臨床評価システムとしての最適化を目指すものである。平成 24 年度は、これまでの成果を踏まえ、ワクチン開発・評価研究において重要となる R5 指向性 Env を持つ HIV-1mt の作出、評価を重点課題として取り組んだ。またこれと平行して、宿主内因性抗ウイルス免疫因子（以下、宿主免疫因子）と関連ウイルス側因子の機能的解析を行い、宿主因子によるウイルス制御機能をより効率良く回避可能な HIV-1mt 樹立に寄与する基盤情報集積を目指した。

2. 研究方法

- ・MN5Rh-3 は、昨年度までに構築した馴化型 X4 指向性 HIV-1mt クローンである MN4Rh-3 を基に、SF162 由来 R5 指向性 env 遺伝子に置換し、さらにサル細胞株での長期継代により得られた馴化変異を導入されたクローンである。他方、サル個体で病原性を獲得した R5 指向性 SHIV-MK38 株 (SHIV-89.6 の Env V3 領域へのアミノ酸置換変異により R5 指向性を導入したクローン由来再分離株：京都大学ウイルス研究所・三浦先生より分与) より env 領域を PCR 増幅し、MN4Rh-3 バックボーンに細胞内相同組換え法にて挿入することにより HIV-1mt MN38 株を得た。

- ・MN5Rh-3 及び MN38 それぞれ 10ng p24CA 相当のウイルスをカニクイザル（各 3 頭）に経静脈接種し、経時的に血中ウイルス量の推移を検討した。

- ・宿主免疫因子の機能ドメインや制御機構について分子細胞遺伝学的解析を進めるとともに、その結果を基に、サル

細胞株や PBMC における増殖能を評価した。

（倫理面への配慮）

本研究では改正動愛法に基づいた動物福祉規程に則り実験動物の飼育・実験・解剖作業を行うとともに、実験実施機関において実験動物委員会による承認を得た。また用い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申請承認（大臣確認）済みである。

3. 研究結果

サル馴化型 R5 指向性 env を有する HIV-1mt の構築及び in vitro での評価実験

カニクイザル PBMC を用いて MN5Rh-3 の感染実験を行ったところ、X4 指向性 HIV-1mt クローンである MN4Rh-3 と比較して増殖効率が低いことが明らかとなった。そこで、より増殖能の高い R5 指向性 HIV-1mt の作成を目指し、サル個体で高い増殖能と病原性を獲得した R5 指向性 SHIV-MK38 株より env 領域を PCR 増幅した。これを MN4Rh-3 バックボーンとともに R5 発現 C8166 細胞にトランスフェクションし、細胞内相同組換えにて env 組み換えウイルスである HIV-1mt MN38 株を得た。本ウイルス株の env 配列を確認したところ、SHIV-MK38 と同様な heterogeneity が認められた。また MN38 株は R5 発現細胞でのみ増殖し X4 発現細胞では増殖しなかったことから、R5 指向性を保持していることが確認された。そこで、複数のカニクイザル個体由来 PBMC を用いて MN38 株の感染実験を行ったところ、いずれの個体由来 PBMC においても MN5Rh-3 と比較し優れた増殖能を示すことが明らかとなった。

カニクイザルにおける R5 指向性 HIV-1mt 感染実験

次にカニクイザル個体における R5 指向性 HIV-1mt の増殖能を検討するため接種実験を行った。前年度までの研究により、カニクイザルの TRIM5 α 遺伝子には cyclophilin A 遺伝子配列が挿入された変異型アリル (TRIM-Cyp) が高頻度で存在すること、TRIM-Cyp アリル保有カニクイザル個体では TRIM5 α アリル個体と比較して HIV-1mt 感染における血中ウイルス量が約 50 倍高いことを明らかにした。そこで本実験では TRIM-Cyp アリル保有カニクイザルを用いることとした。その結果、

MN5Rh-3 感染における血中ウイルス RNA 量のピーク値は平均約 7×10^3 copies/ml であったのに対し、MN38 感染では平均約 4×10^4 copies/ml と 6 倍程度高い値を示した。このことから、MN38 が有する Env はサル個体でのウイルス増殖において MN5Rh-3 Env と比較し優位である事が示された。一方、どちらのウイルス感染ザルにおいても感染後 8 週で血中ウイルス RNA は検出限界以下となった。そこで、現在 MN38 感染ザルへの CD8 特異抗体投与により CD8 陽性 T 細胞を除去し、ウイルス再活性化を誘導しているところである。今後ウイルス再活性化が認められた場合はウイルスの個体間継代を行い個体内馴化を目指す予定である。

HIV-1mt 複製増殖制御を司る宿主免疫因子の解析

・TRIM5 α /CA: 現在の HIV-1mt はカプシドの α -ヘリックス 4 番目と 5 番目の間のループ(L4/5)と 6 番目と 7 番目の間のループ(L6/7)が SIVmac239 由来のものに置換されている。L6/7 の置換は TRIM5 α からの回避には必須であるが、TRIMCyp からの回避は L4/5 の置換だけで十分であることをこれまでに示している。しかし L4/5 の置換により HIV-1mt の増殖力低下が生じている。そこで L4/5 全体の置換でなく、これまでに CypA との結合に影響を及ぼす可能性のある各種点変異体を作成し、ウイルス増殖能に影響を与えずに TRIMCyp 回避が可能かどうか検討を進めている。他方、細胞馴化およびホモロジーモデリング法による構造解析の情報も加味した遺伝子工学的手法による部位特異的変異導入により、MN4Rh-3 の Gag-CA を改変し MN4/LSDQ を作製した。TRIM5 α ホモカニクイザル個体由来 PBMC における MN4/LSDQ の増殖効率は MN4Rh-3 より著しく向上した。一方、TRIM5 α /TRIMCyp ヘテロ個体由来の PBMC では同程度であった。従って MN4/LSDQ は TRIM5 α の抗ウイルス活性を効率良く回避できているものと考えられた。

・Tetherin/Vpu: 抗サル Tetherin 活性を持つ Vpu の構築を目指し、上述の MN4/LSDQ に SIVgsn Vpu の TM 領域を挿入した MN4/LSDQgtu を作成した。MN4/LSDQ と比較して、サル細胞株での本ウイルス増殖効率は向上したが、カニクイザル PBMC ではあまり影響は認められなかった。

4. 考察

本研究課題の最終目標は、HIV-1 自体を標的としたワクチンや新規抗 HIV 薬の有効性評価が可能となる実用的な HIV-1 感染霊長類モデルの開発である。今年度までの研究により、R5 指向性 HIV-1mt によるカニクイザル急性感染モデルを世界で初めて確立することに成功した。特に臨床分離株である 89.6 をベースとしたサル馴化型 R5 指向性 Env に置換した HIV-1 MN38 株が、SF162 由来 Env

を持つ MN5Rh-3 と比較しサル個体にて優れた増殖能を示したことは特筆すべき成果である。しかし反面、予想に反し MN5Rh-3 および MN38 感染ザルにおけるウイルス増殖は感染後 8 週で検出限界以下となったことから、どちらのウイルスも宿主免疫からの回避機構が不十分であるものと推察される。この対策として、①TRIM-Cyp からの回避の最適化、②Tetherin からの回避能の付与、③Nef による MHC-1 発現抑制機能の最適化、等が考えられる。来年度はこれらの項目についてさらに検証を進める。またこれと平行して、MN38 感染ザルからの個体間継代による個体内馴化を行う。これらにより、持続感染能や病原性を獲得した R5 指向性 HIV-1mt の確立を目指す。

5. 自己評価

1) 達成度について

ワクチン開発・評価研究において重要となる R5 指向性 Env を持つ HIV-1mt の作出、評価を重点課題として取り組み、その結果 R5 指向性 HIV-1mt によるカニクイザル感染モデル確立に成功したことから、今年度の主たる目標は達成したと考えられる。しかし慢性エイズを発症する病原性 HIV-1 感染霊長類モデルの確立に関しては、更なる宿主免疫因子からの回避、最適化などが来年度以降の課題として残されている。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

当該研究の目標に向け、サル個体での増殖能が格段に向上した HIV-1mt 樹立に成功し、特に R5 指向性 HIV-1mt によるカニクイザル感染モデルを世界で初めて確立出来たことは学術的に特筆すべき成果である。さらに抗 HIV-1 薬剤開発における臨床試験への「橋渡し研究」迅速化に向け更なる発展が大いに期待できることから、社会的にもその意義は高い。

3) 今後の展望について

今年度の研究成果を踏まえ、本研究課題期間内に病原性を伴う持続感染 HIV-1mt クローン確立および実用的な HIV-1 感染霊長類モデル開発を推進する。

6. 結論

本研究班におけるサル個体側およびウイルス側の最適化に関する研究成果に基づき、サル個体での増殖能が格段に向上した R5 指向性 HIV-1mt によるカニクイザル感染モデル確立に世界で初めて成功した。

7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

なし

研究発表

研究代表者

明里宏文

- 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 and Infection* 15, 56-65, 2013.
- 2) Kooriyama T, Okamoto M, Yoshida T, Nishida T, Tsubota T, Saito A, Tomonaga M, Matsuzawa T, Akari H, Nishimura H, Miyabe-Nishiwaki T: Epidemiological study of zoonoses derived from humans in captive chimpanzees. *Primates* 54, 89-98, 2013.
- 3) Saito Y, Naruse TK, Akari H, Matano T, Kimura A: Diversity of MHC class I haplotypes in cynomolgus macaques. *Immunogenetics* 64, 131-141, 2012.
- 4) Saito A, Kono K, Nomaguchi M, Yasutomi Y, Adachi A, Shioda T, Akari H, Nakayama EE: Geographic, genetic and functional diversity of antiretroviral host factor TRIMCyp in Cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*). *Journal of General Virology* 93, 594-602, 2012.
- 5) Takeuchi H, Ishii H, Kuwano T, Inagaki N, Akari H, Matano T: Host cell species-specific effect of cyclosporine A on simian immunodeficiency virus replication. *Retrovirology* 9, 3, 2012.
- 6) Iijima S, Lee Y-J, Ode H, Arold ST, Kimura N, Yokoyama M, Sato H, Tanaka Y, Strebel K, Akari H: A non-canonical mu-1A-binding motif in the N-terminus of HIV-1 Nef determines its activity to down-regulate MHC-I in T lymphocytes. *Journal of Virology* 86, 3944-51, 2012.
- 7) Ohtani H, Naruse TK, Iwasaki Y, Akari H, Ishida T, Matano T, Kimura A: Lineage-specific evolution of T-cell immunoglobulin and mucin domain 1 gene in the primates. *Immunogenetics* 64, 669-678, 2012.
- 8) Saito A, Kawamoto Y, Higashino A, Yoshida T, Ikoma T, Suzaki Y, Ami Y, Shioda T, Nakayama EE, Akari H: Allele Frequency of Antiretroviral Host Factor TRIMCyp in Wild-caught Cynomolgus Macaques (*Macaca fascicularis*). *Frontiers in Microbiology* 3, 314, 2012.

研究分担者

足立昭夫

- 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 and Infection* 15, 56-65, 2013.
- 2) Miyakawa K, Sawasaki T, Matsunaga S, Tokarev A, Quinn G, Kimura H, Nomaguchi M, Adachi A, Yamamoto N, Guatelli J, Ryo A: Interferon-induced SCYL2 limits release of HIV-1 by triggering PP2A-mediated dephosphorylation of the viral protein Vpu. *Science Signaling* 5, ra73, 2012.
- 3) Fujita M, Nomaguchi M, Adachi A, Otsuka M: SAMHD1-dependent and -independent functions of HIV-2/SIV Vpx protein. *Frontiers in Microbiology* 3, 297, 2012.
- 4) Nomaguchi M, Fujita M, Miyazaki Y, Adachi A: Viral tropism. *Frontiers in Microbiology* 3, 281, 2012.
- 5) Nomaguchi M, Doi N, Matsumoto Y, Sakai Y, Fujiwara S, Adachi A: Species tropism of HIV-1 modulated by viral accessory proteins. *Frontiers in Microbiology* 3, 267, 2012.
- 6) Saito A, Kono K, Nomaguchi M, Yasutomi Y, Adachi A, Shioda T, Akari H, Nakayama EE: Geographic, genetic and functional diversity of antiretroviral host factor TRIMCyp in Cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*). *Journal of General Virology* 93, 594-602, 2012.
- 7) Miyazaki Y, Fujita M, Nomaguchi M, Adachi A: Structural biology for virus research. *Frontiers in Microbiology* 3, 91, 2012.

高折晃史

- 1) Shinohara M, Io K, Shindo K, Matsui M, Sakamoto T, Tada K, Kobayashi M, Kadowaki N, Takaori-Kondo A: APOBEC3B can impair genomic stability by inducing base substitutions in genomic DNA in human cells. *Scientific Reports* 2, 806, 2012.
- 2) Furukawa A, Okamura H, Morishita R, Matsunaga S, Kobayashi N, Ikegami T, Kodaki T, Takaori-Kondo A, Ryo A, Nagata T, Katahira M: NMR study of xenotropic murine leukemia virus-related virus protease in a complex with amprenavir. *Biochem Biophys Res Commun* 425, 284-289, 2012.
- 3) Matsunaga S, Sawasaki T, Ode H, Morishita R, Furukawa A, Sakuma R, Sugiura W, Sato H, Katahira M, Takaori-Kondo A, Yamamoto N, Ryo A: Molecular and enzymatic characterization of XMRV protease by a cell-free proteolytic analysis. *Journal of Proteomics* 75, 4863-4873, 2012.

中山英美

- 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 and Infection* 15, 56-65, 2013.
- 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*, 29, 142-150, 2013.
- 3) Saito A, Kono K, Nomaguchi M, Yasutomi Y, Adachi A, Shioda T, Akari H, Nakayama EE: Geographic, Genetic and Functional Diversity of Antiretroviral Host Factor TRIMCyp in Cynomolgus Macaque (*Macaca fascicularis*). *Journal of General Virology* 93, 594-602, 2012.
- 4) Bozek K, Nakayama EE, Kono K, Shioda T. Electrostatic potential of human immunodeficiency virus type 2 and rhesus macaque simian immunodeficiency virus capsid proteins. *Frontiers in Microbiology* 3, 206, 2012.
- 5) Saito A, Kawamoto Y, Higashino A, Yoshida T, Ikoma T, Suzaki Y, Ami Y, Shioda T, Nakayama EE, Akari H: Allele Frequency of Antiretroviral Host Factor TRIMCyp in Wild-caught Cynomolgus Macaques (*Macaca fascicularis*). *Frontiers in Microbiology* 3, 314, 2012.
- 6) Nakayama EE, Shioda T. The role of human TRIM5a in intrinsic immunity. *Frontiers in Microbiology* 3, 97, 2012.
- 7) Nakayama EE, Shioda T. TRIM5a and species tropism of HIV/SIV. *Frontiers in Microbiology* 3, 13, 2012.
- 8) 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 cauboxyl-terminus of human immunodeficiency virus type 2 circulating recombinant form 01_AB capsid protein affects sensitivity to human TRIM5a. *PLoS One* 7, e47757, 2012.

松岡佐織

- 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. *Journal of Virology* 86, 6481-6490, 2012.
- 2) Ishii H, Kawada M, Tsukamoto T, Yamamoto H, Matsuoka S, Shiino T, Takeda A, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Naruse TK, Kimura A, Takiguchi M, Matano T. Impact of vaccination on cytotoxic T lymphocyte immunodominance and cooperation against simian immunodeficiency virus replication in rhesus macaques. *Journal of Virology* 86, 738-745, 2012.

研究課題：MSMのHIV感染対策の企画、実施、評価の体制整備に関する研究

課題番号：H23-エイズ一般-006

研究代表者：市川誠一(名古屋市立大学看護学部 教授)

研究分担者：金子典代(名古屋市立大学看護学部 准教授)、伊藤俊広(独・国立病院機構仙台医療センター 医長)、内海眞(独・国立病院機構東名古屋病院 院長)、鬼塚哲郎(京都産業大学文化学部 教授)、山本政弘(独・国立病院機構九州医療センター・AIDS/HIV 総合治療センター 部長)、健山正男(琉球大学大学院医学研究科 准教授)、木村 哲(東京通信病院 院長)、岡 慎一(独・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)、多田有希(国立感染症研究所感染症情報センター 第二室長)、本間隆之(山梨県立大学看護学部 講師)

1. 研究目的

わが国ではMSMを中心にHIV/AIDSの増加が続いている。本研究班は、先行研究で、①MSMのHIV感染者、AIDS患者の推定有病率はMSM以外の男性の96倍、33倍である、②AIDS患者の推定発生率は東京、近畿、東海がほぼ同程度、他の地域も同値に近づきつつある、③ゲイNGOのコミュニティベースの啓発は受検行動、コンドームの使用行動や購入行動を向上させていることを示した。本研究は、MSMへの早期受検の促進によりAIDS患者発生を減少させ、予防行動の向上によりHIV感染の拡大を抑えることを目標とする。そのため、同性間HIV感染対策事業であるコミュニティセンターのNGOと協働し、ソーシャルネットワークを活用したコミュニティベースの介入とその評価研究を行い、自治体へのMSMのHIV感染対策の導入を図る。

2. 研究方法

1) エイズ予防のための戦略研究の効果評価と政策還元(木村哲、岡慎一、金子典代、協力：塩野徳史、高野操、岩橋恒太、他)：戦略研究の介入効果を分析し、有用な手法のマニュアル、MSMのHIV感染対策ガイドライン改定を行う。
2) 地域のMSMにおけるHIV感染対策の企画、実施に関する研究(東北地域/伊藤俊広、やろっこ(協力NGO)；首都圏/市川誠一、荒木順子(akta)、生島嗣(ぶれいす東京)他；東海地域/内海眞、Angel Life Nagoya；近畿地域/鬼塚哲郎、MASH 大阪；福岡地域/山本政弘、Love Act Fukuoka；沖縄地域/健山正男、nankr)：6地域のゲイコミュニティセンターのNGOおよび地方NGO(Haat愛媛)と協働し、MSMネットワークを活用した介入を実施する。保健所等でのMSMの受検環境を整備し、これと連動した検査広報を図る。
3) MSMにおける行動科学調査および介入評価研究：(1)保健所等の受検者調査(金子典代、塩野徳史、岳中美江、佐々木由理、他)6地域の保健所等の受検件数調査および受検者質問紙調査体制を構築し、MSM受検者動向を評価する。(2)MSM集団のインターネット横断調査および追跡パネル調査(金子典代、塩野徳史、岩橋恒太、他)地域NGOと協働したMSM集団の横断調査と追跡パネル調査体制を構築し、プログラム認知、受検行動、予防行動を指標に啓発介入を評価する。(3)啓発プログラムのロジック分析(本間隆之)、(4)層化抽出成人男性インターネット調査分析(塩野徳史、他)、(5)MSMにおけるHIV/STD感染の動向に関する研究(多田有希、塩野徳史)を継続する。
4) 自治体におけるMSMのHIV感染対策構築に関する研究

(協力：中澤よう子、川畑拓也、他)：ゲイNGOと行政の協働によるMSMの早期検査・治療・支援等の施策構築を図る。(倫理面への配慮)

当事者やNGOと調査内容等を検討し、対象者を含めゲイコミュニティへの倫理性を配慮しつつ研究を進める。必要に応じて研究者の所属施設の倫理委員会審査を受ける。

3. 研究結果

1) エイズ予防のための戦略研究の効果評価と政策還元
協力施設別の受検件数および受検者層の動向の分析結果を報告書とし、戦略研究成果概要と共に協力施設に還元した。首都圏のMSMへの受検促進の啓発介入は、定点保健所でのMSM割合を2010年末までに増加させ、エイズ患者報告数を推計値より16.1%減少させた。このため東京の2011年のエイズ患者数は2010年よりもさらに減少していた。首都圏では保健所等でのMSM対応の研修会を継続し、マニュアル作成に向けて検討を進めている。阪神圏ではクリニック検査を事業として継続し、マニュアル化を検討する。
2) 地域のMSMにおけるHIV感染対策の企画、実施に関する研究
(1) 6地域のNGO活動：①自治体・保健所とゲイNGOとの連携交換会、エイズ担当者対象のMSM対応研修会、行政/NGO協働による検査広報、Living TogetherによるHIVのリアリティ向上の啓発イベント、Safer sexキャンペーン等が地域の状況に応じて実施された。地方NGO(Haat愛媛)の啓発活動に首都圏のLiving Together計画が導入された。②首都圏では予防啓発や薬物使用防止の啓発に参加する商業施設とネットワークを構築し、その商業施設と検査施設を掲載する情報資料ヤローページを配布した。阪神圏ではハッテン場と連携し、独自のクリニック検査キャンペーン告知方法を開発・試行した。受検者数は戦略研究(約30件/月)の2倍を超えた。③啓発プログラムをロジック分析し、効果的な取り組みを検討した(東京、福岡、大阪)。
3) MSMにおける行動科学調査および介入評価研究
(1) 保健所等の受検者調査：2011年度開始の沖縄(3保健所)、大阪(11)、東京(19)、愛知(16)に加え、宮城(6施設、9月開始、以下同様)、神奈川(7、4月)、千葉(12、5月)、福岡(2、4月)でも実施、2012年1～9月の間に18,849件を回収した。地域別の受検者像は、初受検割合が55.4(東京)～60.7%(福岡)、24歳未満割合が18.8(宮城)～26.5%(沖縄)、過去6か月間に金銭を払った性経験割合が20.6(沖縄)～31.1%(愛知)、金銭をもらった性経験割合が2.5(神奈川)～7.6%(福岡)、MSM割合が宮城12.7%、南新

宿検査相談室含む東京 19.0%、神奈川 10.8%、千葉 7.2%、愛知 13.6%、大阪 10.6%、福岡 14.2%、沖縄 21.6%であった。郵送検査受検者調査(3,347 件、回収率 31.1%)では初受検割合 66.7%、金銭を払った性経験割合 33.6%、金銭をもらった性経験割合 7.1%、MSM 5.5%で保健所等と異なる。NGO 啓発資材認知率は MSM で高く、14.0(千葉)～46.0%(沖縄)と地域差がある。MSM の再受検者は NGO 資材認知率、過去 6 か月の感染不安を有する割合、周囲に HIV 感染者がいると回答した割合が初受検者より有意に高い。

(2)インターネット横断調査および追跡パネル調査：横断調査から追跡可能な MSM を募集し、継続的に検査行動や予防行動、啓発資材認知等を把握する追跡パネル調査を確立した。①6 地域 NGO と地方 NGO (Haat 愛媛)と協働し、5 月、10 月に横断調査を実施した。5 月調査参加者 3027 名の内 1803 人がパネル調査に同意した。②5 月の横断調査の居住地ブロック別分析から、生涯受検経験率 50.2(中・四国)～64.5%(沖縄)、過去 1 年間の受検経験率 23.6(中・四国)～38.8%(沖縄)、コミュニティセンターに行った割合 16.3(宮城)～36.9%(近畿)、コミュニティペーパーを読んだ割合 16.4(東海)～65.4%(近畿)で、地域間で異なる一方、コンドーム常用率は地域差がなく、彼氏・恋人 38.4%、友達・セフレ 44.7%、その場限りの相手 51.5%であった。③パネル調査参加者には 5 月(1,013 件)、7 月(924 件)、9 月(872 件)、12 月(818 件)と 4 回追跡調査した(4 回継続者 650 件、64.2%)。追跡調査の間に実施された NGO 啓発プログラムや資材の認知、コミュニティセンター訪問、予防行動等の変化について評価(分析中)する。

(3)層化抽出成人男性 40,120 人インターネット調査：①20～59 歳成人男性 39766 人の内 MSM 割合は 4.6%(95%CI、4.4～4.8%)であった。②エイズ発生動向調査に基づく MSM の HIV、AIDS の有病率、発生率(各 10 万対)は、2011 年には東京、近畿、東海、九州がほぼ同程度で、他の地域も上昇傾向にあった。③MSM の内ゲイ商業施設利用割合は 34.6%であるが、予防行動が低く、性感染症既往歴が高く、商業施設を介した啓発の必要性が示された。

(4)MSM における HIV/STD 感染の動向に関する研究：HIV/梅毒等の STI の 2000 年以降の発生動向を MSM と MSM 以外男性に分類し、MSM 人口に基づく罹患率を算出した。出生年代別推定 HIV 発生率は 1970 年代、1960 年代出生群でやや減少傾向だが 1980 年代では著増にある。

4)自治体における MSM の HIV 感染対策構築に関する研究
ゲイ NGO と行政の協働による施策(MSM の早期検査・治療・支援の促進等)を構築するため、行政エイズ担当者と NGO との連携交換会、研修会などの開催を継続した。

4. 考察

成人男性 39766 人の内 MSM は 4.6%、その内商業施設を利用する MSM が 1/3 で、感染リスク行動が高いことから商業施設を介した啓発の重要性が示された。エイズ予防戦略研究から継続発展した保健所等の HIV 検査受検者調査は 6 地域で実施が可能となり、今後 MSM などの受検者像が明らかとなる。調査結果は 3 か月毎に協力機関・自治体に還元

している。エイズ予防戦略研究も協力機関毎の分析結果を各施設に還元した。MSM 対象の横断調査から追跡パネル調査に参加した MSM の 4 回継続率は 60%強と高く、追跡調査手法として有用であった。MSM、性産業従事者、滞日外国人、薬物常用者へのアプローチは当事者層がおかれている社会状況を理解し、信頼関係の下に必要とされるエイズ対策を展開することが望まれる。自治体等にとって、これらの層への取り組みは必ずしも容易ではなく、そのため対策の予算化も難しい面がある。こうした現状を変えるために、本研究班では、これまでの当事者参加型の研究体制に、地域のエイズ担当者を加え、NGO が取り組む検査普及などの広報活動と保健所等での HIV 検査体制の連動、受検者動向調査や MSM 集団対象の調査による分析情報を共有する体制の構築を行い、地域の MSM へのエイズ対策に貢献する。

5. 自己評価

1) 達成度について

保健所等の受検者への質問紙調査が 6 地域で実施が可能となり、MSM をはじめとする受検者の動向を評価する。ゲイコミュニティでの横断調査後に継続調査に参加するパネル調査の実用性を確認した。間歇的に行うパネル調査と NGO の啓発活動を連動させ、啓発の普及効果を評価する。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

戦略研究では当事者 NGO と関係機関が協働する研究体制を構築し、検査普及や予防介入に関する啓発事業と効果評価を行う研究を連動させて取り組むことの有効性を示した。今後のエイズ対策の展開に重要な成果も得られており、社会的意義が大きい。MSM における HIV、AIDS の有病率や発生率は全国的に増加状況にあり、研究班は 6 地域で当事者参加型の研究体制に行政担当者を交え、MSM の HIV 感染対策の企画、実施、評価の体制整備をめざす。

3) 今後の展望について

MSM 集団の横断調査、パネル調査、検査機関等の受検者調査から HIV 感染対策評価に有用な指標を提示する。エイズ予防戦略研究の成果の論文公表、エイズ担当者の MSM 対応研修のマニュアル作成、MSM の HIV 感染対策ガイドライン改定を行い、MSM の HIV 感染対策の自治体への導入を図る。

6. 結論

保健所等の受検者への質問紙調査を 6 地域で実施し、MSM をはじめとする受検者層の動向を把握した。ゲイ NGO の啓発資材認知は MSM で高い一方、地域間差があった。MSM 対象の横断調査後に継続パネル調査を実施し、間歇的に行うパネル調査と NGO の啓発活動を連動させることで、啓発効果が評価できることを確認した。成人男性の MSM 割合は 4.6%で、商業施設利用の MSM は感染リスク行動が高く、商業施設を介した啓発の必要性が示唆された。

7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

なし

研究発表

研究代表者

市川誠一

(○研究班関連発表)

- 1) ○金子典代, 塩野徳史, コーナジェーン, 新ヶ江章友, 市川誠一: 日本人成人男性における生涯での HIV 検査受検経験と関連要因, 日本エイズ学会誌, 2012, 14(2), 99-105
- 2) ○Koerner J, Shiono S, Ichikawa S, Kaneko N, Tsuji H, Machi T, Goto D and Onitsuka T: Factors associated with unprotected anal intercourse and age among men who have sex with men gay bar customers in Osaka, Japan, Sexual Health, 2012, 9, 328-333
- 3) ○市川誠一: 男性同性愛者を対象とした HIV 抗体検査普及の取り組みー「エイズ予防のための戦略研究」後のエイズ発生动向の考察, 病原微生物検出情報, 2012, 33(9), 231-232
- 4) ○金子典代, 大森佐知子, 辻宏幸, 鬼塚哲郎, 市川誠一: ゲイ・バイセクシュアル男性における HIV 感染予防行動のステージと関連要因 大阪市内での商業施設利用者への質問紙調査から, 日本公衆衛生雑誌, 2011, 58(7), 501-514
- 5) ○塩野徳史, 金子典代, 市川誠一: 日本成人男性における HIV および AIDS 感染拡大の状況ーMSM(Men who have sex with men)と MSM 以外の男性との比較ー厚生 の指標, 2011, 58(13), 12-19
- 6) ○Koerner J & Ichikawa S: Testing, treatment and prevention among gay men and other men who have sex with men in Japanー An update, HIV Australia, 2011, 9(3), 40-43
- 7) ○Koerner J & Ichikawa S: The Epidemiology of HIV/AIDS and Gay Men's Community-Based Responses in Japan, Intersections: Gender and Sexuality in Asia and the Pacific, Issue, 26, August 2011
- 8) ○塩野徳史, 市川誠一: MSM の HIV 感染対策におけるコミュニティセンター事業の意義, 病原微生物検出情報, 2010, 31(8), 229-230
- 9) ○市川誠一: MSM における HIV 感染者/AIDS 患者の現状と予防戦略, 特集 再考: HIV/AIDS 予防対策, 公衆衛生, 2010, 74(11), 906-909

研究分担者

金子典代

- 1) ○金子典代, 塩野徳史, コーナジェーン, 新ヶ江章友, 市川誠一: 日本人成人男性における生涯での HIV 検査受検経験と関連要因, 日本エイズ学会誌, 2012, 14(2), 99-105
- 2) ○Koerner J, Shiono S, Ichikawa S, Kaneko N, Tsuji H, Machi T, Goto D and Onitsuka T: Factors associated with unprotected anal intercourse and age among men who have sex with men gay bar customers in Osaka, Japan, Sexual Health, 2012, 9, 328-333
- 3) ○金子典代, 大森佐知子, 辻宏幸, 鬼塚哲郎, 市川誠一: ゲイ・バイセクシュアル男性における HIV 感染予防行動のステージと関連要因 大阪市内での商業施設利用者への質問紙調査から, 日本公衆衛生雑誌, 2011, 58(7), 501-514
- 4) ○塩野徳史, 金子典代, 市川誠一: 日本成人男性における HIV および AIDS 感染拡大の状況ーMSM(Men who have sex with men)と MSM 以外の男性との比較ー厚生 の指標, 2011, 58(13), 12-19

伊藤俊広

- 1) ○Seiichi Ichikawa, Noriyo Kaneko, Jane Koerner, Satoshi Shiono, Akitomo Shingae, and Toshihiro Ito: Survey investigating homosexual behaviour among adult males used to estimate the prevalence of HIV and AIDS among men who have sex with men in Japan, 2010, Sexual Health, 8(1), 123-124.

内海 眞

- 1) Shiro Ibe, Yoshiyuki Yokomaku, Teiichirou Shiino, Rie Tanaka, Junko Hattori Seiichiro Fujisaki, Yasumasa Iwatani, Naoto Mamiya, Makoto Utsumi, Shingo Kato, Motohiro Hamaguchi, and Wataru Sugiura: HIV-2 CRF01_AB: First Circulating Recombinant Form of HIV-2, J Acquir Immune Defic Synd, 2010, 54(3), 241-247 (海外学会)
- 1) ○Akitomo Shingae, Noriyo Kaneko, Satoshi Shiono, Seiichi Ichikawa, Makoto Utsumi :HIV Testing among MSM Attending Community-based HIV Testing Events in Nagoya, Japan from 2008 to 2010, The 10th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific (ICAAP), Busan, Korea, 2011

鬼塚哲郎

- 1) ○Koerner J, Shiono S, Ichikawa S, Kaneko N, Tsuji H, Machi T, Goto D and Onitsuka T: Factors associated with unprotected anal intercourse and age among men who have sex with men gay bar customers in Osaka, Japan, Sexual Health, 2012, 9, 328-333
- 2) ○金子典代, 大森佐知子, 辻宏幸, 鬼塚哲郎, 市川誠一, ゲイ・バイセクシュアル男性における HIV 感染予防行動のステージと関連要因 大阪市内での商業施設利用者への質問紙調査から, 日本公衆衛生雑誌, 58(7), 501-514, 2011 (国内学会)

- 1) ○後藤大輔, 川畑拓也, 岳中美江, 塩野徳史, 萬田和志, 町登志雄, 中村文昭, 鬼塚哲郎, 市川誠一: ゲイ向けクラブイベントにおける郵送検査キットを用いた検査普及プログラムの試行と課題, 第26回日本エイズ学会学術集会・総会, 横浜市, 2012
- 2) ○川畑拓也, 後藤大輔, 町登志雄, 中村文昭, 鬼塚哲郎, 小島洋子, 森治代, 塩野徳史, 岳中美江, 田端運久, 古林敬一, 岩佐厚, 高田昌彦, 菅野展史, 亀岡博, 大里和久, 市川誠一: 診療所を窓口とした個別施策層向け HIV 検査普及プログラムの確立に向けた検討, 第26回日本エイズ学会学術集会・総会, 横浜市, 2012
- 3) ○塩野徳史, 市川誠一, 金子典代, 鬼塚哲郎, 後藤大輔, 町登志雄: MSM 向け予防啓発大規模イベントの継続が大阪の MSM コミュニティに与えた効果, 第53回日本社会医学学会総会, 高槻市, 2012

山本政弘

- 1) Hattori J, Shiino T, Gatanaga H, Yoshida S, Watanabe D, Minami R, Sadamasu K, Kondo M, Mori H, Ueda M, Tateyama M, Ueda A, Kato S, Ito T, Oie M, Takata N, Hayashida T, Nagashima M, Matsuda M, Ibe S, Ota Y, Sasaki S, Ishigatsubo Y, Tanabe Y, Koga I, Kojima Y, Yamamoto M, Fujita J, Yokomaku Y, Koike T, Shirasaka T, Oka S, Sugiura W: Trends in transmitted drug-resistant HIV-1 and demographic characteristics of newly diagnosed patients: nationwide surveillance from 2003 to 2008 in Japan, *Antiviral Res*, 2010, Oct;88(1):72-9.

(国内学会)

- 1) ○牧園祐也, 鷺山和幸, 山本政弘, 北村紀代子, 塩野徳史: MSM 対象の HIV/STI 迅速検査会実施と CBO によるターゲットアプローチの考察, 第26回日本エイズ学会学術集会・総会, 横浜市, 2012
- 2) ○町登志雄, 木南拓也, 藤浦裕二, 牧園祐也, 塩野徳史, 市川誠一: ゲイ・バイセクシュアル男性を対象としたアウトリーチ-アウトリーチ・マニュアル作成を通じて-, 第26回日本エイズ学会学術集会・総会, 横浜市, 2012

健山正男

- 1) Hibiy K, Furugen M, Higa F, Tateyama M, Fujita J.: Pigs as an experimental model for systemic Mycobacterium avium infectious disease, *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2011. 34(6):455-64.
 - 2) Hibiy K, Tateyama M, Teruya H, Nakamura H, Tasato D, Kazumi Y, Hirayasu T, Tamaki Y, Haranaga S, Higa F, Maeda S, Fujita J.: Immunopathological characteristics of immune reconstitution inflammatory syndrome caused by Mycobacterium parascrofulaceum infection in a patient with AIDS., *Pathol Res Pract*. 2011. 207(4):262-70.
- (国内学会)
- 1) ○塩野徳史, 新ヶ江章友, 金子典代, 市川誠一, 山本政弘, 健山正男, 内海眞, 生島嗣, 鬼塚哲郎: ゲイ向け商業施設利用者対象の質問紙調査による地域別予防啓発事業の評価に関する研究, 第25回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京, 2011

木村 哲

- 1) 木村哲: エイズの発見から30年. *BIO Clinica* 27(3): 217, 2012
- 2) 木村哲: エイズ予防指針の見直しの概要. *Confronting HIV* 2012. 41: 10, 2012
- 3) 木村哲: HIV 感染症「治療の手引き」〈第15版〉. *Confronting HIV* 2012. 41: 11-13, 2012

(海外発表)

- 1) ○K. Iwahashi, S. Ichikawa, S. Shiono, N. Kaneko, J. Koerner, Y. Ikushima, J. Araki, K. Shibata, T. Kinami, M. Takano, S. Oka, S. Kimura: The Strategic Research "We can do it! 2010" campaign to promote testing behavior among MSM in the Tokyo region, XIX International AIDS Conference, Washington DC, U.S.A., 2012

岡 慎一

- 1) Hayashida T, Gatanaga H, Takahashi Y, Negishi F, Kikuchi Y, and Oka S. Trends in early identification of HIV-1 infection in Tokyo from 2002 to 2009 analyzed with BED assay. *Int J Infect Dis*, 2012, 16: e172-e177
- 2) Hamada Y, Nagata N, Honda H, Asayama N, Teruya K, Ikari T, Kikuchi Y, and Oka S. Epstein-Barr virus associated colitis in an HIV-infected patient. *AIDS (Correspondence)*, 2012, 26:400-402
- 3) Takano M, Okada M, Oka S, and Wagastuma Y. The relationship between HIV testing and CD4 counts at HIV diagnosis among newly diagnosed HIV-1 patients in Japan. *Int J STD AIDS*, 2012, 23: 262-266

多田有希

- 1) 堀成美, 島田智恵, 多田有希: 若年男性における HIV 感染症の発生動向 2007~2011 年, 病原微生物検出情報, 2012, 33(9), 232-233

本間隆之

(国内学会)

- 1) 日高庸晴, 本間隆之: インターネットによる MSM の行動疫学調査-経年変化分析の結果-, 第25回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京, 2011

研究課題：APOBEC3 分子のタンパク質レベルの機能性多型を基礎とした HIV-1 複製抑制機構の分子基盤の解明

課題番号：H23-エイズ一般-004

研究代表者：宮澤 正顯（近畿大学医学部 教授）

研究分担者：高折 晃史（京都大学大学院医学研究科 教授）、伊藤 暢聡（東京医科歯科大学難治疾患研究所 教授）、有吉 紅也（長崎大学熱帯医学研究所 教授）、木村 彰方（東京医科歯科大学難治疾患研究所 教授）

1. 研究目的

一本鎖 DNA を標的とするシチジンデアミナーゼ APOBEC3 は、レトロウイルスの逆転写過程に働く細胞内複製制限因子である。哺乳類による APOBEC3 獲得後に霊長類に感染するようになったレンチウイルスは、Vif によって APOBEC3 の細胞内分解を促進し、複製阻害を回避している。しかし、自然宿主でないマウスの APOBEC3 は、Vif の有無に関わらず HIV-1 複製を阻害出来る。

申請者らと米国の Greene らは、マウス APOBEC3 が同種由来レトロウイルスに対する生理的抵抗因子であり、自然抵抗性の異なる系統間に機能的な遺伝子多型があることを同時に報告した。多型の分子基盤を exon 2 欠損の有無とした Greene らの報告に再現性はない。一方我々は、1) 抵抗性対立遺伝子産物は高発現で exon 5 を欠くのに対し、2) 感受性対立遺伝子産物は低発現で exon 5 を含むこと、3) 両遺伝子産物はアミノ酸配列が異なり、N-末端側が活性を決めること、4) 抵抗性遺伝子産物による複製抑制はデアミナーゼ非依存的であることを示し、Greene らも我々の記述を追認した。マウス APOBEC3 とヒト APOBEC3G の N-末端側 Z2 ドメインは相同であるから、我々の見出した配列多型と exon 5 の作用機構を明らかにすることで、ヒト APOBEC3G に Vif による阻害を受けない HIV-1 複製抑制能を付与する分子設計の基盤が築けると期待される。

本研究は、マウス APOBEC3 Z2 ドメインを大量発現させ、ウイルス及び細胞タンパク質との相互作用を解析、その結晶化を試みるとともに、構造・機能に対する exon 5 の役割を明らかにし、Z2 ドメインの示すデアミナーゼ非依存性複製抑制の分子基盤を明らかにすることを目的とした。

2. 研究方法

1) マウス APOBEC3 exon 5 がタンパク質発現と機能に与える影響の解析（宮澤）

APOBEC3 mRNA 発現量の差がタンパク質発現量に対応するか否かを Western blot 法で、また exon 5 の有無がタンパク質の安定性に与える影響を *in vitro* 転写翻訳系で検討した。さらに、マウス APOBEC3 各対立遺伝子のゲノムクローンをを用い、site-directed mutagenesis により、exon 5 の発現に関与する遺伝子多型を同定することを試みた。

2) APOBEC3 と相互作用する因子の解析（宮澤、高折）
構築済みのタグ挿入ベクターと、構造遺伝子に改変を加えたレトロウイルス分子クローンを活用し、APOBEC3 対立遺伝子産物及び変異体と結合するマウスレトロウイルス及び HIV-1 構成分子、ならびに細胞側分子の同定を試みた。

3) APOBEC3 Z2 ドメインの大量発現（宮澤・伊藤）

X 線構造解析に必要な N-末端側 Z2 ドメインの結晶化を目指し、マウス APOBEC3 各対立遺伝子 cDNA クローンを大腸菌発現ベクターに移植し、タンパク質発現系を構築した。

4) ヒト APOBEC3G タンパク質発現量及び遺伝子多型が HIV-1 感染病態に与える影響の検討（有吉、木村、宮澤）

タイ・ランパンコホートの HIV-1 曝露非感染者及び感染者の凍結末梢血単核球を活用し、a) APOBEC3G タンパク質発現量に群間較差があるか否かを Western blot 法で、b) APOBEC3 遺伝子発現産物に alternative splicing があるか否かを RT-PCR 法で、c) ゲノム多型の有無を塩基配列決定でそれぞれ解析するとともに、各種ヒト細胞株のプロモーター部位塩基配列を解析して、多型の有無を探った。

（倫理面への配慮）

北タイランパン県の HIV-1 感染者および配偶者コホート検体については、APOBEC3 分子に関する研究を含め、タイ保健省医学研究倫理委員会より 2015 年までの研究承認を受けている。コホート参加者には宿主因子の解析を行うことを書面で説明し、署名による同意を得て採血を行った。また、木村が行うゲノム塩基配列多型の解析については、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に沿って、所属機関におけるゲノム倫理委委員会の許可を得た。

3. 研究結果

1) 宮澤らは、マウス APOBEC3 の抵抗性対立遺伝子産物はタンパク質レベルでも高発現であること、exon 5 の有無はタンパク質分解には影響せず、翻訳効率を変えることを明らかにした。また、スプライシング調節多型の分子実体は intron 4 末端部の TCCT 反復回数と exon 5 内部の G/C 多型であることを明らかにし、多数の野生マウス種におけるゲノム多型と exon 5 発現を比較することで、exon 5 発現による翻訳効率の低下がマウスの進化過程でごく最近に獲得され、広く分布した形質であることを明らかにした。

2) 宮澤らは、マウス APOBEC3 の粒子内取り込みが glycosylated Gag タンパク質により影響されるとの報告を検証する過程で、ウイルスプロテアーゼの活性変異体で APOBEC3 感受性が変化することを発見、プロテアーゼが APOBEC3 と相互作用することを見出した。また、マウス APOBEC3 が Gag タンパク質のプロセッシングと感染細胞からの粒子出芽に影響することを明らかにした。

3) 高折らはヒト APOBEC3B がゲノム DNA に変異を導入出来、発癌にも関与することを発見した

4) 宮澤らは HIV-1 Vpr のユビキチン化に関わる新規の分子間相互作用を見出した。

5) 伊藤は宮澤の提供したプラスミドを用い、二つの対立遺伝子に由来する APOBEC3 Z2 ドメインを可溶化状態で大量に発現することに成功、溶液中での二量体化を観察した。また、精製用の His タグが結晶化の障害になること、アミノ末端部分が二量体界面近傍にあることを見出した。

6) 木村が複数のヒト細胞株で APOBEC3G 発現を解析し、プロモーター領域の新規多型を見出した。また、有吉が宮澤と協力して、タイ・ランパンコホートの凍結細胞検体を用い、IFN- α 刺激培養後の APOBEC3G mRNA 発現を定量する系を確立、APOBEC3G 発現に明らかな個体差を認めた。

4. 考察

マウス *APOBEC3* 遺伝子多型について、これまでは exon 5 を欠く抵抗性対立遺伝子が正の選択を受けてきたと考えられていたが、今回 exon 5 を含み翻訳効率の低い対立遺伝子が最近獲得され、地理的に広く分布していることが明らかとなった。ヒト APOBEC3B がゲノム DNA を修飾し発がんにも結び付くという高折の発見と考え合わせると、APOBEC3 が同種由来レトロウイルスに対する生理的抵抗因子である一方、宿主ゲノムに対する修飾因子として危険性を発揮する「両刃の剣」である可能性を示している。

APOBEC3 と相互作用するウイルス側因子としてプロテアーゼが候補に挙げたことは、高折らが以前に指摘しているウイルスプロテアーゼによる APOBEC3 分解の可能性と符合する。また、ヒト APOBEC3G のプロモーター多型及び発現量の個体差を見出した意義は大きく、今後タンパク質発現量及び病態との相関を解明することが急務である。

5. 自己評価

1) 達成度について

APOBEC3 分子 Z2 ドメインの結晶化と X 線構造解析を目指した研究は、可溶性タンパク質の大量発現に成功し、順調に進行している。また、*APOBEC3* 遺伝子多型がタンパク質発現量に直結していることを明らかにしたことにより、

以前に宮澤らが報告したヒト末梢血単球における APOBEC3G タンパク質発現量と HIV-1 感染抵抗性の関係が、遺伝的制御を受けている可能性が高まった。有吉がランパンコホート検体で IFN- α 刺激培養後の APOBEC3G mRNA 発現量に個体差を見出しており、これが HIV-1 感染病態と相関するかが焦点となる。さらに、APOBEC3 とウイルスプロテアーゼの相互作用が明らかとなり、デアミナーゼ非依存性の複製抑制活性の一部を説明できる他、将来の創薬に繋がる可能性が出て来た。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

APOBEC3 遺伝子多型の進化論的意義を明らかにしたことは学術的に極めて重要であり、国際的にも高く評価された。齧歯類の祖先は元々 exon 5 を欠く機能性の APOBEC3 を発現しており、異種生物がもたらしたレトロウイルスに曝された一群が、N-末端変異とイントロン多型を独立に獲得し、デアミナーゼ非依存性複製抑制機構を強化してこれに対抗したと考えられる。このように進化に裏打ちされ、Vif にも影響されない複製抑制機構の分子基盤を解明することで、HIV-1 の急速な進化に対応出来る感染制御法を開発する基礎が提示出来ると考えられ、ワクチンに依らない HIV-1 感染制御の方策提示に貢献する意義がある。

3) 今後の展望について

APOBEC3 分子 Z2 ドメインの大量発現に成功したので、最終年度はその結晶化と X 線構造解析に邁進するとともに、溶液中での分子間相互作用も定量的に解析する。また、ランパンコホートの凍結末梢血検体を活用して、ヒト APOBEC3 プロモーター領域の塩基配列多型とタンパク質発現量、及び HIV-1 感染病態との相関を明らかにする。

6. 結論

APOBEC3 遺伝子多型がタンパク質発現量の多寡に直結すること、exon 5 の有無が翻訳効率を決定すること、exon 5 の発現は intron 4 及び exon 5 内の塩基配列多型で制御されていることを明らかにし、ウイルス抵抗性因子の分子進化に新しい視点を提供した。また、APOBEC3 と相互作用するウイルス側及び宿主細胞側因子について新発見を得、APOBEC3 がウイルスプロテアーゼと結合して粒子成熟を抑制する可能性を示した。最終年度は Z2 ドメインの結晶化に邁進するとともに、プロモーター多型とタンパク質発現量及び HIV-1 感染病態の関係を明らかにする。

7. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

無し。

研究発表

研究代表者

宮澤正顯

論文による発表

欧文

- 1) Li, J., Y. Hakata, E. Takeda, Q. Liu, Y. Iwatani, C. A. Kozak, and M. Miyazawa. Two genetic determinants acquired late in *Mus* evolution regulate the inclusion of exon 5, which alters mouse APOBEC3 translation efficiency. *PLoS Pathogens* 8: e1002478, 2012.
- 2) Miyazawa, M., K. Okubo, K. Shiraki, M. Maruyama, J. Yamada, and H. Yamada. Immunological approaches for healthy longevity. *Anti-Aging Medicine* 9: 43-50 2012.
- 3) Miyazawa, M., S. Takamura, S. Tsuji-Kawahara, E. Kajiwarra, T. Chikaishi, and M. Kato. A hole in the T-cell repertoire induced after retroviral infection of immunocompetent adult mice. *Retrovirology* 8 (Spl. 2):O30, 2011.
- 4) Sironi, M., F. R. Guerini, C. Agliardi, M. Biasin, R. Cagliani, M. Fumagalli, D. Caputo, A. Cassinotti, S. Ardizzone, M. Zanzottera, E. Bolognesi, S. Riva, Y. Kanari, M. Miyazawa, and M. Clerici. An evolutionary analysis of *RAC2* identifies haplotypes associated with human autoimmune diseases. *Mol. Biol. Evol.* 28: 3319-3329, 2011.
- 5) Ogawa, T., S. Tsuji-Kawahara, T. Yuasa, S. Kinoshita, T. Chikaishi, S. Takamura, H. Matsumura, T. Seya, T. Saga, and M. Miyazawa. Natural killer cells recognize Friend retrovirus-infected erythroid progenitor cells through NKG2D-RAE-1 interactions *in vivo*. *J. Virol.* 85: 5423-5435, 2011.
- 6) Hayasaka, N., K. Aoki, S. Kinoshita, S. Yamaguchi, J. K. Wakefield, S. Tsuji-Kawahara, K. Horikawa, H. Ikegami, S. Wakana, T. Murakami, R. Ramabhadran, M. Miyazawa, and S. Shibata. Attenuated food anticipatory activity and abnormal circadian locomotor rhythms in *Rgs16* knockdown mice. *PLoS One* 6: e17655, 2011.

口頭発表

海外

- 1) Miyazawa, M., M. Kato, Y. Kawasaki, and S. Tsuji-Kawahara. Rapid production of virus-neutralizing IgM antibodies and protection against lethal retroviral infection in mice deficient of activation-induced cytidine deaminase (AID). *The 24th Workshop on Retroviral Pathogenesis*. Oct. 24-27, 2012, Philadelphia, U.S.A.
- 2) Miyazawa, M., S. Tsuji-Kawahara, Y. Hakata, J. Li, E. Takeda, and C. Ishihara. Functional consequences of mouse *APOBEC3* gene polymorphisms and multiple genetic factors that influence the production of virus-neutralizing antibodies in Friend virus-infected mice. *The 23rd Workshop on Retroviral Pathogenesis*. Nov. 2-5, 2011, Montpellier, France.

国内

- 1) Miyazawa, M. Evolution of genetically determined resistance mechanisms to retroviral infections: Are we winners? International Symposium on Basic Research towards HIV Control. 第26回日本エイズ学会学術集会・総会. 2012年、横浜.

研究分担者

高折 晃史

- 1) Shinohara, M., K. Ito, K. Shindo, M. Matsui, T. Sakamoto, K. Tada, M. Kobayashi, N. Kadowaki, and A. Takaori-Kondo. APOBEC3B can impair genomic stability by inducing base substitutions in genomic DNA in human cells. *Sci. Rep.* 2:806, 2012.
- 2) Furukawa, A., H. Okamura, R. Morishita, S. Matsunaga, N. Kobayashi, T. Ikegami, T. Kodaki, A. Takaori-Kondo, A. Ryo, T. Nagata, M. and Katahira. NMR study of xenotropic murine leukemia virus-related virus protease in a complex with amprenavir. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 425: 284-289, 2012.
- 3) Matsunaga, S., T. Sawasaki, H. Ode, R. Morishita, A. Furukawa, R. Sakuma, W. Sugiura, H. Sato, M. Katahira, A. Takaori-Kondo, N. Yamamoto, and A. Ryo. Molecular and enzymatic characterization of XMRV protease by a cell-free proteolytic analysis. *J. Proteomics* 75: 4863-4873, 2012.
- 4) Hirai, M., N. Kadowaki, T. Kitawaki, H. Fujita, A. Takaori-Kondo, R. Fukui, K. Miyake, T. Maeda, S. Kamihira, Y. Miyachi, T. Uchiyama. A proteasome inhibitor bortezomib suppresses immunostimulatory activity of human plasmacytoid dendritic cells by targeting intracellular trafficking of nucleic acid-sensing Toll-like receptors and endoplasmic reticulum homeostasis. *Blood* 117:500-509, 2011.

伊藤 暢聡

- 1) Tamashiro, T., Y. Tanabe, T. Ikura, N. Ito, and M. Oda. Critical roles of Asp₂₇₀ and Trp₂₇₃ in the α -repeat of the carbohydrate-binding module of endo-1,3- β -glucanase for laminarin-binding avidity. *Glycoconj. J.* 29: 77-85, 2012.
- 2) Nomura, W., A. Masuda, K. Ohba, A. Urabe, N. Ito, A. Ryo, N. Yamamoto, and H. Tamamura. Effects of DNA binding of zinc finger and linkers for domain fusion on catalytic activity of sequence-specific chimeric recombinases determined by a facile fluorescent system. *Biochemistry* 51: 1510-1517, 2012.
- 3) Yoshimoto, N., Y. Sakamaki, M. Haeta, A. Kato, Y. Inaba, T. Itoh, M. Nakabayashi, N. Ito, and K. Yamamoto. Butyl pocket formation in the vitamin D receptor strongly affects the agonistic or antagonistic behavior of ligands. *J. Med. Chem.* 55: 4373-4381 2012.
- 4) Nomura, W., N. Ohashi, Y. Okuda, T. Narumi, T. Ikura, N. Ito, and H. Tamamura. Fluorescence-quenching screening of protein kinase C ligands with an environmentally sensitive fluorophore. *Bioconjug. Chem.* 22:923-930, 2011.

有吉 紅也

- 1) Sapsutthipas, S., N. Tsuchiya, P. Pathipavanich, K. Ariyoshi, P. Sawanpanyalert, N. Takeda, P. Isarangkura-na-ayuthaya, and M. Kameoka. 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*, in press, 2012.
- 2) Mori M., K. Matsuki, T. Maekawa, M. Tanaka, B. Sriwanthana, M. Yokoyama, and K. Ariyoshi. Development of a novel *in silico* docking simulation model for the fine HIV-1 cytotoxic T-lymphocyte epitope mapping. *PLoS One* 7:e41703, 2012.
- 3) Sriwanthana B., M. Mori, M. Tanaka, S. Nishimura, T. Miura, P. Pathipvanich, P. Sawanpanyalert, and K. Ariyoshi. The effect of HLA polymorphisms on the recognition of Gag epitopes in HIV-1 CRF01_AE infection. *PLoS One* 7:e41696, 2012.
- 4) Schmidt, W. P., M. Suzuki, V. Dinh Thiem, R. G. White, A. Tsuzuki, L. M. Yoshida, H. Yanai, U. Haque, L. Huu Tho, D. D. Anh, and K. Ariyoshi. Population density, water supply, and the risk of dengue fever in Vietnam: cohort study and spatial analysis. *PLoS Med.* 8:e1001082, 2011.
- 5) Mori, M., B. Sriwanthana, N. Wichukchinda, C. Boonthimat, N. Tsuchiya, T. Miura, P. Pathipvanich, K. Ariyoshi, and P. Sawanpanyalert. Unique CRF01_AE Gag CTL epitopes associated with lower HIV-viral load and delayed disease progression in a cohort of HIV-infected Thais. *PLoS One* 6:e22680, 2011.
- 6) Rojanawiwat, A., N. Tsuchiya, P. Pathipvanich, W. Pumpradit, W. P. Schmidt, S. Honda, W. Auwanit, P. Sawanpanyalert, and K. Ariyoshi. Impact of the national access to antiretroviral program on the incidence of opportunistic infections in Thailand. *International Health* 3:101-107, 2011.

木村 彰方

- 1) Sharma, G., H. Ohtani, G. Kaur, T. K. Naruse, S. K. Sharma, M. Vajpayee, A. Kimura, and N. K. Mehra. Status of TIM-1 exon 4 haplotypes and CD4⁺ T cell counts in HIV-1 seroprevalent North Indians. *Hum. Immunol.*, in press (doi: 10.1016/j.humimm.2012.11.013).
- 2) Ohtani, H., T. K. Naruse, Y. Iwasaki, T. Ishida, H. Akari, T. Matano, and A. Kimura. Lineage-specific evolution of T-cell immunoglobulin and mucin domain 1 gene in the primates. *Immunogenetics* 64: 669-678, 2012.
- 3) Takaki, A., A. Yamazaki, T. Maekawa, H. Shibata, K. Hirayama, A. Kimura, H. Hirai, and M. Yasunami. Positive selection of Toll-like receptor 2 polymorphisms in two closely related old world monkey species, rhesus and Japanese macaques. *Immunogenetics* 64:15-29, 2012.
- 4) Ohtani, H., T. Nakajima, H. Akari, T. Ishida, and A. Kimura. Molecular evolution of immunoglobulin superfamily genes in primates. *Immunogenetics* 63: 417-428, 2011.
- 5) Naruse, T. K., Y. Okuda, K. Mori, H. Akari, T. Matano, and A. Kimura. ULBP4/RAET1E is highly polymorphic in the Old World monkey. *Immunogenetics* 63:501-509, 2011.