

別紙
研究発表

研究代表者

塚原優己

- 1) 和田裕一、塚原優己、吉野直人. HIV 母子感染防止とその限界. 臨床とウイルス. 40 (1) : 14-19, 2012
- 2) 塚原優己. (セミナー 7) HIV 感染妊娠および出生児の全国調査から見てきたもの～臨床的・社会的問題への対応～. 第 26 回日本エイズ学会学術集会、2012 年 11 月、横浜.
- 3) 谷口晴記、塚原優己. (セミナー 7) HIV 感染妊娠および出生児の全国調査から見てきたもの～臨床的・社会的問題への対応～ 2. 妊婦 HIV 検査と偽陽性. 第 26 回日本エイズ学会学術集会、2012 年 11 月、横浜.
- 4) 平成 24 年度厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業「HIV 母子感染の疫学調査と予防対策および女性・小児感染者支援に関する研究」班. +の女性も-の女性も?の女性も?! . 第 19 回 AIDS 文化フォーラム in 横浜、2012 年 8 月、横浜.

研究分担者

喜多恒和

- 1) 喜多恒和. (セミナー 7) HIV 感染妊娠および出生児の全国調査から見てきたもの～臨床的・社会的問題への対応～ 3. 産婦人科・小児科全国調査の推移. 第 26 回日本エイズ学会学術集会、2012 年 11 月、横浜.
- 2) 喜多恒和、中西美紗緒、箕浦茂樹、松田秀雄、高野政志、岩田みさ子、小林裕幸、佐久本 薫、石橋理子、杉浦 敦、藤田 綾、吉野直人、外川正生、戸谷良造、稲葉憲之、和田裕一、塚原優己. HIV 感染妊婦の動向と母子感染予防対策. 第 26 回日本エイズ学会学術集会、2012 年 11 月、横浜.
- 3) 喜多恒和、中西美紗緒、箕浦茂樹、松田秀雄、高野政志、瀬戸 裕、大井理恵、佐久本薫、太田 寛、塚原優己、稲葉憲之、和田裕一. わが国の HIV 感染妊婦と母子感染予防対策の現状. 第 64 回日本産婦人科学会学術講演会、2012 年 4 月、神戸.

外川正生

- 1) 亀田和明、白野倫徳、後藤哲志、天羽清子、外川正生. 当院での HIV 陽性妊婦からの出生児 14 例に関する検討. 第 26 回日本エイズ学会学術集会、2012 年 11 月、横浜.
- 2) 辻麻理子、外川正生、井村弘子、國方徹也、齋藤昭彦、田中瑞恵、細川真一、前田尚子、榎本てる子、葛西健郎、山中純子、木内 英、尾崎由和、市場博幸、天羽清子、青田順子、和田裕一、塚原優己. HIV 陽性児への告知支援パンフレット「この子の明日の健康のために子どもの HIV 感染について告知と支援を考える」の作成について. 第 26 回日本エイズ学会学術集会、2012 年 11 月、横浜.
- 3) 辻麻理子、外川正生. (セミナー 7) HIV 感染妊娠および出生児の全国調査から見てきたもの～臨床的・社会的問題への対応～ 4. HIV 陽性妊婦から生まれた児への心理社会的支援の構築. 第 26 回日本エイズ学会学術集会、2012 年 11 月、横浜

吉野直人

- 1) 伊藤由子、吉野直人、高橋尚子、喜多恒和、外川正生、塚原優己、戸谷良造、稲葉憲之、和田裕一. 妊婦の HIV 感染確認と HIV 感染妊婦に対する意識に関する全国助産所調査. 日本エイズ学会誌(印刷中)
- 2) 吉野直人、喜多恒和、伊藤由子、杉山 徹、高橋尚子、外川正生、戸谷良造、稲葉憲之、和田裕一、塚原優己. 日本における HIV 母子感染と妊婦 HIV スクリーニング検査実施率の変遷. 第 25 回日本性感染症学会、2012 年 12 月、岐阜.
- 3) 吉野直人. (セミナー 7) HIV 感染妊娠および出生児の全国調査から見てきたもの～臨床的・社会的問題への対応～ 1. 妊婦 HIV スクリーニング検査実施率の推移と新たな課題. 第 26 回日本エイズ学会、2012 年 11 月、横浜.

- 4) 吉野直人、喜多恒和、伊藤由子、杉山 徹、高橋尚子、外川正生、戸谷良造、稲葉憲之、和田裕一、塚原優己. 妊婦 HIV スクリーニング検査実施率の変遷. 第 26 回日本エイズ学会、2012 年 11 月、横浜.

明城光三

- 1) 蓮尾泰之、明城光三、和田裕一、吉野直人、林 公一、喜多恒和、塚原優己、外川正生、稲葉憲之. Human Immunodeficiency Virus(HIV)陽性妊婦への医療側の対応・HIV 母子感染予防における HIV 拠点病院の現状. 医療. 66 (2) : 49-54, 2012
- 2) Kozo Akagi, Takashi Shibutani, Yusuke Shibuya, Takashi Shima, Nobuko Ishigaki, Atsushi Hayasaka, Hiromitsu Makino, Ko Asano and Yuichi Wada, Risk-adjusted Cesarean delivery rate as obstetric clinical indicator. 39th Annual meeting of the Fetal and Neonatal Physiological Society. July 8-11, 2012, Utrecht, The Netherlands.
- 3) 明城光三、菊地正子、大沢昌二、栗原 勉、佐々木恵利奈、小野寺淳子、斉藤泰紀. 医療情報システム構築に病院職員が費やす時間に関する調査. 第 66 回国立病院総合医学会、2012 年 11 月、神戸.

研究課題：ART 早期化と長期化に伴う日和見感染症への対処に関する研究

課題番号：H24-エイズ一般-003

研究代表者：安岡 彰（長崎大学病院 教授）

研究分担者：照屋 勝治（国立国際医療研究センター 医長）、片野 晴隆（国立感染症研究所感染病理部 室長）、山本 政弘（国立病院機構九州医療センター 部長）、古西 満（奈良県立医科大学 臨床教授）、永井 英明（国立病院機構東京病院 部長）

1. 研究目的

本研究は抗 HIV 療法 (Anti-retroviral Therapy; ART) がより早期に導入され、また ART 治療中の患者が長期にわたって治療を受けるようになってきた近年の日和見合併症の特徴を明らかにするとともに、非指標悪性腫瘍など関連する疾患の特徴や頻度を明らかにし、最新の診断・治療についても検討する事を目的としている。具体的には疫学調査とともに HIV 合併結核、ニューモシスチス肺炎、サイトメガロウイルス感染症、非結核抗酸菌症など主要な疾患の診断治療法、特に免疫再構築症候群 (IRIS) との関連と対処法について発症早期からの ART 導入の是非や対処法との関連を含めて検討を行う。また、重篤でない合併症を契機とした HIV 感染者の早期診断法についてもあわせて研究する。

2. 研究方法

2012 年度の研究は次の点を中心として行った。

1) 日和見合併症の動向調査

(1) 全国調査

2011 年分の日和見感染症の発生動向を調査して 1995 年以降の集積データとともに解析を行った。HIV 感染者に見られる非指標悪性腫瘍のデータも収集し、疾患頻度や罹患率等について比較検討を行った。(安岡)

(2) 剖検例調査

エイズ剖検例における日和見感染症および腫瘍の実態を明らかにする目的で、東京および大阪のエイズ拠点病院主要 4 施設の 225 例のエイズ剖検例を対象に調査を行った。(片野)

2) 日和見感染症の診断・治療法の開発

(1) 唾液を用いたニューモシスチス肺炎 (PCP) 診断唾液検体を用いた定量的 RT-PCR 法によるニューモシスチス肺炎と *Pneumocystis jirovecii* 定着の鑑別の可能性について検討した。(照屋)

(2) HIV 感染者のアメーバ抗体測定

HIV 感染者に対する赤痢アメーバ抗体測定の意義について検討した。(照屋)

(3) 進行性多巣性白質脳症 (PML) の予後

進行性多巣性白質脳症 22 例の予後について後向きに解析した。(照屋)

(4) HIV 感染者の *Helicobacter pylori* 感染

HIV 感染者の *Helicobacter pylori* 感染について 358 例を前向きに検討した。(照屋)

(5) HIV 感染者における潜在性結核感染 (LTBI) の

早期発見および治療についての研究

新しい結核診断法である IGRAs が陽転した HIV 感染者への対応について検討した。(永井)

3) 免疫再構築症候群の適切な対応

(1) Th1/Th2 バランスの意義

IRIS の発症機序における Th1/Th2 バランスの意義について検討した。(古西)

(2) PCP 発症後の ART 開始時期

PCP 発症後の ART 開始時期と免疫再構築症候群の発症頻度について検討した。(照屋)

4) 病院における HIV 検査の推進のための日和見合併症の特徴

(1) 新規 HIV 感染者の感染判明契機の解析

九州医療センターにおける新規 HIV 感染者のうち、感染判明契機としての STD を過去 7 年間調査した。(山本)

(2) 歯科医における HIV 診断に関する意識調査

免疫不全が疑われるような口腔内病変診断時の HIV 検査について調査した。(山本)

(倫理面への配慮)

HIV 感染症ではプライバシー漏洩が重大な人権侵害につながることから、患者のプライバシー保護には特段の注意を払い、必要な研究では研究者の施設での倫理審査を経て実施した。

3. 研究成果

1) 日和見合併症の動向調査

(1) 全国調査

2010 年のデータでは症例経験病院は 40.6 % と増加し、総数は 588 回と過去最高となった。発症疾患はニューモシスチス肺炎 (PCP) が最多であった。指標疾患以外の悪性腫瘍調査では 43 例と急増していた。罹患率は人口 10 万対 230.0 となり、年齢調整罹患率は 615.4 で一般人口の 1.87 倍であった。これまでの日和見合併症の集計データから、CD4 数が 350 未満では日和見感染症の発症リスクが高くなることが明らかになった。2011 年データは現在集計中である。

(2) 剖検例調査

病理学的に確認された感染症で最も頻度の高いものはサイトメガロウイルス感染症で 63 % の症例にみられた。以下、ニューモシスチス肺炎 (29 %)、非定型抗酸菌症 (14 %)、カンジダ症 (11 %) と続く。ART が導入された 1997 年の前後で比較すると、カンジダ症、C 型肝炎

炎、B型肝炎などは1998年以降の症例で頻度が増加していた。腫瘍性疾患では悪性リンパ腫は32%、カポジ肉腫は17%のエイズ剖検例に認められたほか、肺癌、肝癌、胃癌、などの非エイズ指標悪性腫瘍が9%の頻度でみられた。肺癌、肝癌は1998年以降の症例で発症頻度が有意に上昇していた。

2) 日和見感染症の診断・治療法の開発

(1) 唾液を用いたニューモシスチス肺炎(PCP)診断15例の定着例と18例のPCP例を検出。Cut offを2500copies/mlとした場合に感度、特異度ともに100%でPCPの診断に有用であった。

(2) HIV感染者のアメーバ抗体測定
その後の侵襲性アメーバ症の発症について検討したところ、抗体価が400倍以上の場合には200倍以下と比べて2年以内の発症率が高かった($p < 0.001$)。

(3) 進行性多巣性白質脳症(PML)の予後
死亡率は22.7%。機能的予後については5例(22.7%)がベッド上寝たきりの状態、2例(10%)が日中の50%以上をベッドか椅子で過ごす重度の機能障害を残していた。機能的に全く問題のなかったのは3例(13.6%)のみであった。14例(63.6%)でART後のIRISが見られ機能障害を悪化させていた。

(4) HIV感染者の *Helicobacter pylori* 感染
リクルート時に非感染であった234例から観察中に2例の新規感染が判明した(罹患率0.22/100person-year)。また感染が判明し上部消化管内視鏡検査を実施した61例のうち、4例で早期胃癌が診断された。

(5) HIV感染者におけるLTBIの早期発見および治療についての研究

症例30例を対象としたところ、結核の既往がない症例で初回IGRAs陽性5例や結核の既往がない症例で経過中にIGRAs陽性4例などが認められた。活動性結核の発症は見られていないが、今後の調査が重要と考えられた。

3) 免疫再構築症候群の適切な対応

(1) Th1/Th2 バランスの意義
Th1/Th2 バランスの平均値は、IRIS未発症例の27例でART開始時17.8、ART1ヵ月後11.5、3ヵ月後11.8と有意な変化は認めなかった。治療開始後に非結核性抗酸菌症と結核症を発症した例ではART開始時に比べ発症時に増加していた。抗酸菌によるIRISでは発症時にTh1/Th2 バランスが増加する可能性が示唆された。

(2) PCP発症後のART開始時期
IRISおよび日和見疾患の発症頻度の解析からPCP治療終了後2~4週目のART実施が最適であると結論した。

4) 病院におけるHIV検査の推進のための日和見合併症の特徴

(1) 新規HIV感染者の感染判明契機の解析
新規HIV感染者のうちSTDを契機に感染が判明した例数は22%であった。

内訳として、梅毒、クラミジア尿道炎、B型肝炎、帯状疱疹、単純ヘルペス、淋菌性尿道炎、好酸球性毛嚢炎の順であった。

(2) 歯科医におけるHIV診断に関する意識調査
免疫不全の疑い:130名、口腔内カンジダ症:107名、壊死性歯肉周囲炎:13名、カポジ肉腫:0名、ヘルペス・梅毒:113名、その他:6名であった。実際にHIV検査を勧めた人数は、1名にすぎなかった。

4. 考察

日和見感染症の動向が明らかになるとともに、CD4低下にともなう日和見合併症発症のリスクも明らかとなった。またHIV患者の発症についても日本の全体像を示す唯一のデータが得られた。

PCPの診断やアメーバ抗体測定の意義、HIV感染者における *Helicobacter pylori* 感染がより問題となりうること、PMLの予後に関する詳細データやHIV感染者での結核感染のリスクなどが明らかとなった。

免疫再構築症候群(IRIS)にの発症機序/マーカーとしてのTh1/Th2バランスの可能性やART開始時期に関する知見についての端緒となるデータも得られつつある。

HIV患者早期診断のためのSTDの頻度や歯科領域におけるHIV感染症の認知度の問題が明らかとなりつつある。これらは、日本における日和見合併症や関連感染症に関する貴重なデータであり、今後さらに解析を進めていきたい。

5. 自己評価

1) 達成度について

初年度として、研究の基盤と方法を確立し、疫学データでは順調にデータが集積されてきている。また診断・治療やHIV感染者の発見に関しても研究が遂行できており、当初予定していた研究を達成できる見込みである。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

諸外国と異なる日本の日和見感染症の特徴を明らかにでき、臨床医への貴重な情報となるとともに、海外との比較が可能な日本の日和見合併症の全体像を示すことができる見込みである。

3) 今後の展望について

次年度、最終年度に向けて、研究データを蓄積し、ARTの現状に合わせた日和見感染症の対処方法についての提言をまとめていきたい。

6. 結論

日本におけるHIV関連日和見合併症と悪性腫瘍の動向及び新しい診断と治療、合併感染症を端緒とするHIV感染者の発見についてのデータをARTの現状と比較しながら解析した。

7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

特記事項なし。

研究発表

研究代表者

安岡 彰

1. Tashiro M, Izumikawa K, Hirano K, Ide S, Mihara T, Hosogaya N, Takazono T, Morinaga Y, Nakamura S, Kurihara S, Imamura Y, Miyazaki T, Nishino T, Tsukamoto M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Yasuoka A, Tashiro T, Kohno S. Correlation between triazole treatment history and susceptibility in clinically isolated *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 56:4870-4875.
2. Yamamoto Y, Izumikawa K, Hosogaya N, Morinaga Y, Nakamura S, Imamura Y, Miyazaki T, Sakamoto N, Ishimatu Y, Kakeya H, Yanagihara K, Yasuoka A, Kohno S. A case of refractory chronic respiratory tract infection due to *Pseudomonas aeruginosa* successfully controlled by combination of clarithromycin and azithromycin. *Intern Med*. 2012 51:1383-1386.
3. Izumikawa K, Yamamoto Y, Mihara T, Takazono T, Morinaga Y, Kurihara S, Nakamura S, Imamura Y, Miyazaki T, Nishino T, Tsukamoto M, Kakeya H, Yanagihara K, Mine M, Yasuoka A, Tashiro T, Kohno S. Bronchoalveolar lavage galactomannan for the diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis. *Med Mycol*. 2012 50:811-817.
4. Izumikawa K, Yamamoto Y, Mihara T, Takazono T, Morinaga Y, Kurihara S, Nakamura S, Imamura Y, Miyazaki T, Nishino T, Tsukamoto M, Kakeya H, Yanagihara K, Mine M, Yasuoka A, Tashiro T, Kohno S. Bronchoalveolar lavage galactomannan for the diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis. *Med Mycol*. 2012 50:811-7.
5. Izumikawa K, Yamamoto Y, Yanagihara K, Kiya T, Matsuda J, Morinaga Y, Kurihara S, Nakamura S, Imamura Y, Miyazaki T, Nishino T, Tsukamoto M, Kakeya H, Yasuoka A, Tashiro T, Kamihira S, Kohno S. Active surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with the BD GeneOhm MRSA assay in a respiratory ward in Nagasaki, Japan. *Jpn J Infect Dis*. 2012 65:33-36.
- 6. 安岡 彰. 抗サイトメガロウイルス薬 日本臨床 2012 70:564-7.
- 7. 安岡 彰 B型肝炎ワクチン *Infection Control* 2012 21:1153-1154.

研究分担者

照屋勝治

1. Watanabe K, Gatanaga H, Escueta-de Cadiz A. et al. Amebiasis in HIV-1-infected Japanese men: clinical features and response to therapy. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011 Sep;5:e1318..

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, Van Tin N, Sato Y, Thach HN, Katano H, Diep PH, Kumasaka T, Thuy NT, Hasegawa H, San LT, Kawachi S, Liem NT, Suzuki K, Sata T: Pathological study of archival lung tissues from five fatal cases of avian H5N1 influenza in Vietnam. *Mod Pathol (in press)*, 2012.
5. Nakajima N, Sato Y, Katano H, Hasegawa H, Kumasaka T, Hata S, Tanaka S, Amano T, Kasai T, Chong JM, Iduka 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.
6. 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 lymphnode derived from a patient with Kawasaki disease. *Int J Clin Exp Pathol* 5:814-823, 2012.
7. 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.
8. Ishiwada N, Takada N, Okunushi T, Hishiki H, Katano H, Nakajima N, Kohno Y: Rhabdomyolysis associated with influenza A/H1N1 2009 infection in a pediatric patient. *Pediatr Int* 54:703-705, 2012.
9. 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.
10. Ablordey A, Amisssah 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.

山本 政弘

1. 大石裕樹, 安藤仁, 高橋昌明, 高濱宗一郎, 喜安純一, 南留美, 石橋誠, 山本政弘. エファビレンツ、テノホビル/エムトリシタビンを大量服用した症例の血中濃度推移について. *日本エイズ学会誌* 2012 14:42-45.

古西 満

1. 古西 満, 片浪雄一, 忽那賢志, 宇野健司, 三笠桂一: 免疫再構築症候群として発症した Graves 病の 1 例. *内科*, 2012 109: 525 - 527.

研究課題：血友病とその治療に伴う合併症の克服に関する研究

課題番号：H24・エイズ一般-004

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

研究分担者：三室 淳（自治医科大学医学部分子病態治療研究センター分子病態研究部 准教授）、窓岩 清治（自治医科大学医学部分子病態治療研究センター分子病態研究部 講師）、大森 司（自治医科大学医学部分子病態治療研究センター分子病態研究部 講師）、小澤 敬也（自治医科大学医学部分子病態治療研究センター遺伝子治療研究部 教授）、水上 浩明（自治医科大学医学部分子病態治療研究センター遺伝子治療研究部 准教授）、嶋 緑倫（奈良県立医科大学小児科学教室 教授）、長谷川 護（ディナベック株式会社 代表取締役社長）、稲葉 浩（東京医科大学臨床検査医学講座 講師）、菱川 修司（自治医科大学医学部先端医療技術開発センター医療技術トレーニング部門 准教授）、竹谷 英之（東京大学医科学研究所 講師）、瀧 正志（聖マリアンナ医科大学 教授）柿沼 章子（社会福祉法人はばたき福祉事業団 事務局長）大橋 一夫（東京女子医科大学先端生命医学研究所 准教授）

1. 研究目的

血友病は血液凝固第 VIII (FVIII)、或いは第 IX 因子(FIX)遺伝子異常による先天性出血性疾患である。治療は高額な因子製剤投与が中心であるが、製剤で多くの患者が HIV や HCV に感染し、患者と家族に対する社会的偏見を生んだ。製剤は改良されたが、インヒビター出現は、尚、重要な課題である。これらを克服するために以下の 3 研究を進める。I. 血友病遺伝子治療：サルと、ヒトの FIX は 97%以上相同性がある。血友病のいないサルで導入遺伝子由来ヒト FIX 発現量定量は世界唯一の識別抗体を持つ我々のみが可能で詳細な検討もできる。我々は、アデノ随伴ウイルス 8 型(AAV8)ベクターを用いて、サルでは血友病 B 遺伝子治療技術をほぼ確立した。標的臓器への遺伝子導入は既感染による血中抗 AAV8 中和抗体の有無に左右される(数 10%陽性)。欧米では、抗体陰性ヒトのみで血友病 B 遺伝子治療臨床研究を開始し、約 1 年の発現維持を得ている。我々は高感度抗体測定系を開発し、陽性例に抗体回避遺伝子導入法をサルで検討し、その技術の確立を図る。ブタでのシミュレーションも実行する。中国企業を指導し、GMP レベル AAV8 ベクターも作製し、品質管理検査契約も整った。作製したベクターの安全性・発現効率をサルで確認するとともに、臨床研究プロトコルを作成し、大学倫理委員会や国の許可取得にむけた手続きを進める。また、FVIII 遺伝子を導入した間葉系幹細胞(FVIII MSC)から作製した細胞ナノシートの移植効果や、細胞の関節内注入による関節出血抑制持続効果を検討する。血友病 A マウス由来 iPS 細胞も確立する。II. インヒビター対策：血友病 A マウスを用いた寛容誘導基礎検討や、患者に生じたインヒビターエピトープ解析と、インヒビター測定法改善などの研究を進める。また患者遺伝子や、製剤種類によるインヒビター産生の違いなどを、前方視的に本邦血友病患者データベース構築を図りながら解析する。III. 患者 QOL 向上を目指す調査研究は、HIV 感染被害血友病患者とその家族を中心に、聞き取り調査により必要な支援課題検索や遺伝相談支援などを展開する。また SF-36 を用いて他の疾患や本邦と他国の血友病患者 QOL などを客観的に比較する。

2. 研究方法

I. 遺伝子治療：当班の 100%指導により中国で作製した FIX 遺伝子搭載 GMP レベル AAV8 ベクターを抗 AAV8 中和抗体陰性サルに静注し、FIX 発現維持を観察する。第 3 者機関に委託して、ベクターの毒性、物性など品質管理検査を進める。必要な倫理規定を織り込み、血友病 B 遺伝子治療臨床研究プロトコルを作成する。また、抗 AAV 中和抗体陽性サルでバルーンカテーテル法による肝臓内遺伝子導入最適化を図り、ヒトに近い大動物、ブタでも検証する。また、FVIII 遺伝子を染色体組み込み型改変 SIV ベクターで導入した自己間葉系幹細胞(FVIII MSC)、或いは、血友病 A マウスより iPS 細胞を作製してその利用を図る。これらの細胞からナノシートを作製し、臓器貼り付けなど

の細胞治療を検討する。さらに、細胞を関節内注入して関節内出血予防する技術の安全性と効果持続の検討をする。II. インヒビター対策：インヒビター症例血液より抗 FVIII 同種抗体のエピトープを同定する。また、インヒビター測定法の標準化を図る。前方視的解析により、インヒビター発生に関わる内因子：血友病遺伝子、サイトカイン遺伝子など、また外因子として製剤種類や投与方法などを検討する。並行して全国血友病患者データベース作成を試みる。III. QOL 向上のための調査研究：HIV 感染被害血友病患者とその家族や、医療関係者の参加するアクションリサーチ法により、当事者ニーズ・提案を研究に取りこむ。そして血友病ファクトシート改訂に取り組む。また、遺伝相談システムを改善し、遺伝問題解決支援を進める。SF-36 を用いて、我が国血友病患者 QOL の 8 個の下位尺度と PCS、PMS のサマリースコアを算出する為のアンケート用紙を作成配布する。(倫理面への配慮)

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

3. 研究結果

中国 Vector Gene Technology(VGT) 社で作製した GMP レベル AAV8/FIX ベクターのサルを用いた発現効率は期待通りで、副作用もなく毒性他品質試験も問題なく終了した。しかし、欧米での血友病 B 遺伝子治療臨床研究では、10 の 15 乗 vg の AAV8 ベクター製造が必要であったと報告された。サルでの試算の 10 倍量以上だが、尖閣問題が勃発し、中国 VGT 社からのベクター供給追加は不可能となった。急遽、日本タカラバイオへ研究班参加と協力依頼を試み、日本製 GMP レベルベクター作製が約束された。サルでの抗体回避遺伝子投与実験は 6 頭全頭遺伝子由来 FIX の治療量発現が確認され、副作用も見られなかった(論文受理)。ブタでのシミュレーションでも肝容量 25%相当量ベクター溶液門脈急速注入では循環障害などを惹起しなかった。バルーンカテ法で門脈左枝とその分岐内に 1 分以上造影剤を停留させる技術も確立した。臨床研究プロトコル作成は自治医大パーキンソン病遺伝子治療に関わった医師を中心に開始している。世界で初めて血友病 A ブタ作製も成功した(論文受理)。また、血友病 A マウス関節内へ FVIII MSC を注入することで、長期に関節出血予防可能な技術を確立した(論文受理)。血友病 A マウス由来線維芽細胞から iPS

細胞の樹立に成功し、遺伝子治療・インヒビター研究への応用可能となった。インヒビター発症予防のための患者遺伝子解析と血友病患者データベース化(151例)を中心とする前方視的解析は順調に進んでいる。東京変法インヒビター測定法の開発など診断の標準化を目指した研究も一定の成果を上げた。血友病Aマウスにプラスミノゲンアクトベータインヒビター1をノックアウトしたダブルノックアウトマウスはFVIII投与に対し免疫寛容を示したが、そのメカニズムを解析した。薬害 HIV感染被害者とその家族5件に聞き取り調査し、分析討論会を通して、課題克服に向けた理論化と実践への示唆を得た。SF-36を主体とした患者QOL調査表を作成し、配布した。

4. 考察

I. 遺伝子治療：英国グループから報告されたAAV8ベクターによる血友病B遺伝子治療臨床研究では抗AAV中和抗体陰性患者のみに効果が見られている。サルとヒトFIXを識別可能な抗体を有する我々のみが、サルで信頼度の高い研究を遂行できる。まず、世界最高感度の抗AAV8抗体測定系を確立した。陽性サルにベクターを投与する技術もほぼ確立し、我々がサル遺伝子治療では世界最先端にある。サルは体重が5kg位であるために、ヒトとの体重差を考慮してブタでの実験も進んでいる。作製した世界初の血友病Aブタもこれに寄与することが期待される。AAVベクターは染色体に組み込まれないために数年先に効果減弱が危惧される。抗体陽性個体を遺伝子治療できることは、AAVベクター遺伝子治療を繰り返し施行可能であることを意味しその意義は大きい。中国で作製したGMPレベルAAV8FIXベクターは、精製度も高く、サルでの発現効率も十分で、品質検査でも問題のないことが明らかになった。だが、欧米での臨床研究では、サルでの試算の10倍量以上のベクターが必要であった。尖閣問題のために、中国企業からのベクター供給追加は不可能となったが、タカラバイオの研究班参加とベクター作製協力約束をとりつけたことにより、安全・高効率・高純度の日本製GMPレベルベクターの利用が可能となった。準備が整えば臨床研究開始可能である。改変SIVベクターを利用してFVIII遺伝子を導入したFVIII MSCの関節腔内投与による長期にわたる血友病関節症予防は細胞が関節内にとどまる優れた治療法であり、サルで効果と安全性が確認でき次第臨床応用可能と考える。II. インヒビター対策：前方視的遺伝子解析などによる内的・外的要因解析は、インヒビター発症予防につながる可能性が高い。また患者データベース構築は日本における血友病のすべての調査解析の基盤になる。測定法の標準化も診断と解析における意義は大きい。III. QOL向上のための調査研究：客観的指標としてSF-36を利用したQOL調査研究により諸外国の血友病患者や他の疾患との比較や、重症度、HIV・HCV感染などがQOLに影響しているかを明らかに出来る。面接による聞き取り調査研究で、薬害HIV感染被害血友病患者家族の持つ多くの問題が明らかにされた。血友病患者全体の抱える遺伝問題相談を含めた、支援研究などの展開は効果的解決に向けた一歩と考える。

5. 自己評価

1) 達成度について

我々は、ヒトでは試すことの出来ない十分な基礎検討をサルで進めて、臨床研究へ歩を進めるというストラテジーで、血友病遺伝子治療研究を進めてきている。サルでのAAV8FIXベクターを用いた血友病B遺伝子治療技術は、抗AAV抗体陽性例治療技術の確立も考慮すれば世界最先端にある。安全なAAVベクターを用いた繰り返し治療可能性を示唆できた意義は極めて大きい。尖閣問題のために中国からのGMPレベルAAV8FIXベクターの追加不可能となり、計画の若干の遅れは予測されるが、

悲願の日本製ベクター作製にこぎ着けたことの意義も大きい。ヒト臨床研究開始に向けた基礎的準備はほぼ整ったと考える。遺伝子解析を含むインヒビター前方視的解析にリンクさせた患者データベース構築も順調に進みつつある。エピトープ解析や寛容誘導などの基礎検討は、世界に注目される業績を発表しつつある。SF-36解析に必要な独立・従属変数も決めアンケート表作成配布までこぎ着けた。HIV感染被害血友病患者やその家族を中心とした聞き取り調査を含むアンケート調査は、医師サイドからは把握できない支援問題を提起し得た。また、母親と父親の遺伝問題支援の重要性を明らかにし、その具体的対策が稼働し始めている。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

抗AAV中和抗体測定技術、および、抗体を含む血液を回避して遺伝子投与を可能にした我々の技術は、AAVベクターを用いた遺伝子治療効果の長期持続性を担保し得たという意味で世界に冠たるものとする。遺伝子治療は患者・患者家族、及び、保因者の社会的QOLを著しく高め、製剤使用量も減らし、経済的にも資するところ大である。FVIII MSCを利用した血友病関節症治療技術は独創的なものであり、関節内出血に対する臨床応用可能な画期的治療になり得る。世界でのインヒビター調査研究において、前方視的調査解析は、我が国独自のものである。遺伝子解析などで、内的・外的発生要因が明らかになれば、発生抑制が期待できる。診断の標準化は、すべてのインヒビター研究を進めるために不可欠である。患者データベースの確立は彼我の比較を含めた統計解析の基盤となる。効率的免疫寛容誘導法が確立出来ればその経済効果は大きい。聞き取り調査を中心とした調査解析は、個人情報保護には配慮が必要であるが、世界でも珍しく、患者視点の具体的支援策確立に有効な手段である。

3) 今後の展望について

AAV8ベクターを利用した血友病B遺伝子治療は、抗AAV中和抗体回避技術をサル・ブタを利用してさらに安全と効率の向上をはかり、信頼度を高める。これまでのノウハウを生かし、速やかに日本製GMPレベルAAV8FIXベクターを作製する、臨床研究に向けて、プロトコール作成と学内倫理委員会承認、そして厚労省承認に必要な事務的手続きを効率よく進める。血友病A遺伝子治療については、まず、細胞治療を併用した関節内出血予防技術の臨床応用へ向けたレベルアップを図る。インヒビター対策としての調査解析は、データベース構築とリンクしながら息の長い前方視的研究を持続させる必要がある。QOLを高めるための調査解析は、具体的支援策を計画・実行し、フィードバックしながらより効果的な対策に結びつけたい。

6. 結論

我々のAAV8ベクターを用いた血友病B遺伝子治療技術は世界最先端にあり、日本製GMPレベルベクター調達の目処も立った。技術的にはヒト臨床研究へ歩を進めるレベルに達した。血友病A遺伝子治療についても歩を進めつつある。インヒビター対策も調査解析、基礎検討ともに極めて順調に研究が進みつつある。QOL調査解析でHIV被害血友病患者・家族などとの直接面談による問題把握とその支援対策の構築は極めて独創的で有用である。

7. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

「VSV-G シュードタイプ化サル免疫不全ウイルスベクターを用いた霊長類胚性幹細胞への遺伝子導入」(D3-A0103)出願番号：特願 2003-503807 (2001/6/8) 審査請求済み、「血友病Aモデルブタの作出」出願番号：特願 2010-102569 出願済み

研究発表

研究代表者

坂田 洋一

研究分担者

三室 淳、窓岩清治、大森 司

- 1) Mimuro J, Mizukami H, Hishikawa S, Ikemoto T, Ishiwata A, Sakata A, Ohmori T, Madoiwa S, Ono F, Ozawa K, Sakata Y. Minimizing the Inhibitory Effect of Neutralizing Antibody for Efficient Gene Expression in the Liver with Adeno-associated Virus 8 Vectors. *Molecular Therapy* (in press)
- 2) Kashiwakura Y, Mimuro J, Onishi A, Iwamoto M, Madoiwa S, Fuchimoto D, Suzuki S, Misae M, Sembon S, Ishiwata A, Yasumoto A, Sakata A, Ohmori T, Hashimoto M, Yazaki S, Sakata Y. Porcine Model of Hemophilia A. *PLoS One* (in press)
- 3) Makino N, Madoiwa S, Ohmori T, Katoh K, Ookawara S, Kanazawa T, Matsuo O, Ichikawa M, Mimuro J, Ichimura K, Sakata Y. Tissue plasminogen activator deficiency promotes early phase regeneration in the olfactory epithelium after bulbegotomy. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2012 Nov 28. doi: 10.1002/alr.21124. [Epub ahead of print]
- 4) Kashiwakura Y, Ohmori T, Mimuro J, Yasumoto A, Ishiwata A, Sakata A, Madoiwa S, Inoue M, Hasegawa M, Ozawa K, Sakata Y. Intra-articular injection of mesenchymal stem cells expressing coagulation factor ameliorates hemophilic arthropathy in factor VIII-deficient mice. *J Thromb Haemost.* 10(9):1802-13, 2012.
- 5) Madoiwa S, Kobayashi E, Kashiwakura Y, Sakata A, Yasumoto A, Ohmori T, Mimuro J, Sakata Y. Immune response against serial infusion of factor VIII antigen through an implantable venous-access device system in haemophilia A mice. *Haemophilia.* 18(3):e323-30, 2012.
- 6) Suzuki S, Iwamoto M, Saito Y, Fuchimoto D, Sembon S, Suzuki M, Mikawa S, Hashimoto M, Aoki Y, Najima Y, Takagi S, Suzuki N, Suzuki E, Kubo M, Mimuro J, Kashiwakura Y, Madoiwa S, Sakata Y, Perry AC, Ishikawa F, Onishi A. Il2rg gene-targeted severe combined immunodeficiency pigs. *Cell Stem Cell.* 14; 10(6):753-8, 2012.
- 7) Makino N, Ookawara S, Madoiwa S, Ohta Y, Ishikawa T, Katoh K, Takigami S, Kanazawa T, Matsuo O, Ichikawa M, Mimuro J, Sakata Y, Ichimura K. Morphological assessment of the luminal surface of olfactory epithelium in mice deficient in tissue plasminogen activator following bullectomy. *Laryngol Otol.* 126(11):1114-20, 2012.
- 8) Norimatsu Y, Ohmori T, Kimura A, Madoiwa S, Mimuro J, Seichi A, Yatomi Y, Hoshino Y, Sakata Y. FTY720 improves functional recovery after spinal cord injury by primarily nonimmunomodulatory mechanisms. *Am J Pathol.* 180(4):1625-35, 2012.
- 9) Ohmori T, Yano Y, Sakata A, Ikemoto T, Shimpo M, Madoiwa S, Katsuki T, Mimuro J, Shimada K, Kario K, Sakata Y. Lack of association between serum paraoxonase-1 activity and residual platelet aggregation during dual anti-platelet therapy. *Thromb Res.* 129(4):e36-40, 2012.
- 10) 窓岩清治、小林英司、坂田飛鳥、大森 司、三室 淳、坂田洋一：第 VIII 因子感作血友病 A マウスにおけるマイクロポートを用いた連続的抗原投与モデルの構築 23 (2) p197 日本血栓止血学会誌.2012.
- 11) 柏倉裕志、大森 司、三室 淳、安本篤志、石渡 彰、坂田飛鳥、窓岩清治、井上 誠、長谷川 護、小澤敬也、坂田洋一：FVIII 遺伝子導入 MSC の関節内移植は血友病 A マウスの血友病性関節症を改善する 23 (2) p198 日本血栓止血学会誌.2012.

研究分担者

小澤 敬也、水上 浩明

- 1) Uchibori R, Tsukahara T, Mizuguchi H, Saga Y, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Ozawa K. NF- κ B activity regulates mesenchymal stem cell accumulation at tumor sites. *Cancer Res.* 2012 Oct 12. [Epub ahead of print]
- 2) Ogura M, Urabe M, Akimoto T, Onishi A, Ito C, Ito T, Tsukahara T, Mizukami H, Kume A, Muto S, Kusano E, Ozawa K. Interleukin-10 expression induced by adeno-associated virus vector suppresses proteinuria in Zucker obese rats. *Gene Ther.* 19:476-82, 2012.
- 3) Yagi H, Sanechika S, Ichinose H, Sumi-Ichinose C, Mizukami H, Urabe M, Ozawa K, Kume A. Recovery of neurogenic amines in phenylketonuria mice following liver-targeted gene therapy. *Neuroreport.* 23: 30-4, 2012.
- 4) Sato N, Saga Y, Mizukami H, Wang D, Takahashi S, Nonaka H, Fujiwara H, Takei Y, Machida S, Takikawa O, Ozawa K, Suzuki M. Downregulation of indoleamine-2, 3-dioxygenase in cervical cancer cells suppresses tumor growth by promoting natural killer cell accumulation. *Oncol Rep.* 28:1574-8, 2012.
- 5) Sato N, Saga Y, Mizukami H, Wang D, Fujiwara H, Takei Y, Machida S, Ozawa K, Suzuki M. Cetuximab inhibits the growth of mucinous ovarian carcinoma tumor cells lacking KRAS gene mutations. *Oncol Rep.* 27:1336-40, 2012.
- 6) Wang D, Saga Y, Mizukami H, Sato N, Nonaka H, Fujiwara H, Takei Y, Machida S, Takikawa O, Ozawa K, Suzuki M. Indoleamine-2,3-dioxygenase, an immunosuppressive enzyme that inhibits natural killer cell function, as a useful target for ovarian cancer therapy. *Int J Oncol.* 40:929-34, 2012.

嶋 緑倫

- 1) Shima M. Overview of current treatment for hemophilia: needs of tailor-made treatment. *Rinsho Ketsueki.* 53(10):1737-44, 2012.
- 2) Kitazawa T, Igawa T, Sampei Z, Muto A, Kojima T, Soeda T, Yoshihashi K, Okuyama-Nishida Y, Saito H, Tsunoda H, Suzuki T, Adachi H, Miyazaki T, Ishii S, Kamata-Sakurai M, Iida T, Harada A, Esaki K, Funaki M, Moriyama C, Tanaka E, Kikuchi Y, Wakabayashi T, Wada M, Goto M, Toyoda T, Ueyama A, Suzuki S, Haraya K, Tachibana T, Kawabe Y, Shima M, Yoshioka A, Hattori K. A bispecific antibody to factors IXa and X restores factor VIII hemostatic activity in a hemophilia A model. *Nat Med.* 18(10):1570-4, 2012.
- 3) Dargaud Y, Sorensen B, Shima M, Hayward C, Srivastava A, Negrier C. Global haemostasis and point of care testing. *Haemophilia.* 4:81-8, 2012.
- 4) Matsumoto T, Nogami K, Ogiwara K, Shima M. A putative inhibitory mechanism in the tenase complex responsible for loss of coagulation function in acquired haemophilia A patients with anti-C2 autoantibodies. *Thromb Haemost.* 107(2):288-301, 2012.
- 5) Shibata M, Nakagawa T, Akioka S, Giddings JC, Kanehiro H, Matsumoto T, Ogiwara K, Yada K, Shima M. Hemostatic treatment using factor VIII concentrates for neutralizing high-responding inhibitors prior to CVAD insertion for immune-tolerance induction therapy. *Clin Appl Thromb Hemost.* 18(1):66-71, 2012.

長谷川 護

- 1) Griesenbach U, Inoue M, Meng C, Farley R, Chan M, Newman NK, Brum A, You J, Kerton A, Shoemark A, Boyd AC, Davies JC, Higgins TE, Gill DR, Hyde SC, Innes JA, Porteous DJ, Hasegawa M, Alton EW. Assessment of F/HN-Pseudotyped Lentivirus as a Clinically Relevant Vector for Lung Gene Therapy. *Am J Respir Crit Care Med*. 186(9):846-56, 2012.

稲葉 浩

- 1) Inaba H, Koyama T, Shinozawa K, Amano K, Fukutake K. Identification and characterization of an adenine to guanine transition within intron 10 of the factor VIII gene as a causative mutation in a patient with mild haemophilia A. *Haemophilia*. 2012 Jul 9. doi: 10.1111/j.1365-2516.2012.02906.x. [Epub ahead of print]
- 2) 鈴木隆史、天野景裕、清田育男、村松 崇、稲葉 浩、福武勝幸 重症型血友病 A の成人患者に発生した高力価インヒビターに対する免疫寛容導入療法 日本血栓止血学会誌 23 (2) : 226 2012.
- 3) 稲葉 浩、篠澤圭子、天野景裕、福武勝幸 血友病 A の病因遺伝子変異はイントロンの深部にも隠れている 日本血栓止血学会誌 23 巻 2 号 Page223 2012.
- 4) 天野景裕、近澤悠志、篠澤圭子、村松 崇、清田育男、大瀧 学、尾形享一、萩原 剛、鈴木隆史、稲葉 浩、福武勝幸 血友病 A インヒビターの免疫寛容療法に活性型第 VII 因子製剤定期投与併用で出血頻度が低下した 1 例 日本血栓止血学会誌 23 (2) : 180 2012.
- 5) 稲葉 浩、篠澤圭子、大瀧 学、天野景裕、福武勝幸 血友病 A 患者の第 VIII 因子遺伝子イントロン 16 内で検出された LINE-1 挿入変異 臨床血液 53 (9) : 1388 2012.
- 6) 近澤悠志、篠澤圭子、天野景裕、清田育男、大瀧 学、尾形享一、萩原 剛、鈴木隆史、稲葉 浩、福武勝幸 血友病 B 患者で同定した 3 つの遺伝子変異 臨床病理 60 (補) : 288 2012.
- 7) Inaba H, Shinozawa K, Hagiwara T, Suzuki T, Yamamoto Y, Amano K, Fukutake K. The feature of factor VIII haplotype in Japanese patients is very similar to that of Caucasians. *Haemophilia*. 18(2):e43-4, 2012.

瀧 正志

- 1) 山下敦己、長江千愛、足利朋子、武藤真二、瀧 正志 : 治療歴のある血友病 B 患者における血漿由来血液凝固第 IX 因子製剤 (ノバクト[®] M 静注用) の生体内回収率、新薬と臨床、61(10):1972-1978, 2012.
- 2) 山下敦己、瀧 正志 : 日常生活における管理・指導 凝固異常症 (血友病、先天性血栓性疾患)、小児科臨床、65 (4) : 808-812, 2012.
- 3) 瀧 正志 : 血友病治療の現状と今後の展望、日本医事新報、No.4596, 69-74, 2012.

柿沼 章子

- 1) 柿沼章子、久地井寿哉、井上佳世、玉井真理子、大平勝美、薬害 H I V 感染被害者・家族の支援環境構築 (第一報) ~ 自立と意思決定に関する課題 : 第 53 回日本社会医学会特別号(0910-9919)2012page111-112(2012.07)
- 2) 久地井寿哉、柿沼章子、井上佳世、玉井真理子、大平勝美 : 薬害 H I V 感染被害者・家族の支援環境構築 (第二報) ~ 情報支援と F A C T アプローチ : 第 53 回日本社会医学会特別号(0910-9919)2012page113-114(2012.07)
- 3) 井上佳世、玉井真理子、久地井寿哉、柿沼章子、大平勝美薬害 H I V 感染被害者・家族の支援環境構築 (第三報) ~ 遺伝性疾患であることの課題と支援 : 第 53 回日本社会医学会特別号(0910-9919)2012page115-116(2012.07)
- 4) Kakinuma A , Kuchii T, Seki Y, Inoue Y, Kitamura Y, Kitamura Y, Tamai M, Inoue K, Ohira K: Restructuring and improving QOL in Japanese HIV victims with hemophilia and their families: How do we rebuild our life with effective support? : WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA, WFH 2012 World Congress, 8-12 July, 2012, Paris, FRANCE.
- 5) Seki Y, Kakinuma A, Tamai M, Kitamura Y, Inoue Y, Kuchii T, Inoue K, Ohira K: Difficulties faced by haemophilic students in Japan : Yukiko Seki (Saitama University): WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA, WFH 2012 World Congress, 8-12 July, 2012, Paris, FRANCE.
- 6) Kitamura Y, Kakinuma A, Kuchii T, Seki Y, Inoue Y, Kitamura Y, Tamai M, Inoue K, Ohira K: Feelings, Experiences on the Sibling Relationship and the Perception of Heredity on Hemophilia by Patients and Siblings. WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA, WFH 2012 World Congress, 8-12 July, 2012, Paris, FRANCE.
- 7) Mizukoshi E, Kakinuma A, Sugwara Y, Oka S, Ohira K: 10-year follow up of an HIV/HCV co-infected hemophilia A after living donor liver transplantation: WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA, WFH 2012 World Congress, 8-12 July, 2012, Paris, FRANCE.

大橋 一夫

- 1) Watanabe N, Ohashi K, Tatsumi K, Utoh R, Kanegae K, Kashiwakura Y, Ohmori T, Sakata Y, Inoue M, Hasegawa M, Okano T. Potential of lentiviral transduced adipose tissue-derived stem/stromal cells for gene and cell therapies toward hemophilia B. *Hum Gene Ther*, in press.
- 2) Ohashi K, Tatsumi K, Tateno C, Kataoka M, Utoh R, Yoshizato K, Okano T. Liver tissue engineering utilizing hepatocyte propagated in mouse livers in vivo. *Cell Transplantation*, 21: 429-436, 2012.
- 3) Kim-K, Ohashi K, Utoh R, Kano K, Okano T. Preserved liver-specific functions of hepatocytes in 3D co-culture with endothelial cell sheets. *Biomaterials*, 33:1406-1413, 2012.
- 4) Tatsumi K, Ohashi K, Mukobata S, Kubo A, Koyama F, Nakajima Y, Shima M, Okano T. Hepatocyte is a sole cell type responsible for the production of coagulation factor IX in vivo. *Cell Medicine*, 3: 25-31, 2012.
- 5) Tatsumi K, Ohashi K, Tateno C, Yoshizato K, Yoshioka A, Shima M, Okano T. Human hepatocyte propagation system in the mouse livers: functional maintenance of the production of coagulation and anti-coagulation factors. *Cell Transplantation*, 21: 437-445, 2012.
- 6) Saito T, Ohashi K, Utoh R, Shimizu H, Ise K, Suzuki H, Yamato M, Okano T, Gotoh M. Reversal of diabetes by the creation of neo-islet tissues into a subcutaneous site using islet cell sheets. *Transplantation*, 15: 92(11):1231-6, 2012.
- 7) Nagamoto Y, Tashiro K, Takayama K, Ohashi K, Kawabata K, Sakurai F, Tachibana M, Hayakawa T, Furue MK, Mizuguchi H. The promotion of hepatic maturation of human pluripotent stem cells in 3D co-culture using type I collagen and Swiss 3T3 cell sheets. *Biomaterials* 33: 4526-4534, 2012.

研究課題：抗ウイルス宿主因子を基盤とする新規抗 HIV 戦略の開発・確立に向けた系統的研究

課題番号：H24-エイズ一般-005

研究代表者：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）

研究分担者：岩谷 靖雅（(独)国立病院機構 名古屋医療センター 室長）、大塚 雅巳（熊本大学大学院生命科学研究部 教授）、徳永 研三（国立感染症研究所 主任研究官）、中山 英美（大阪大学微生物病研究所 准教授）、藤田 美歌子（熊本大学薬学部 准教授）

1. 研究目的

多剤併用療法の進歩によって HIV 感染者の予後は改善されつつある。しかし、未だ根治(eradication)には至っておらず終生にわたって服薬を継続しなければならない。HIV 感染治療が長期化するが故の懸念も増大している。これらを克服するためには、根治に繋がる戦略を見出さなければならない。既存の抗 HIV 薬はウイルスの複製を阻害するものであり、体内からウイルスは駆逐されない。特に、HIV のように慢性に持続感染するウイルスの eradication は、最終的には免疫系などの宿主のシステムに頼らざるを得ない。しかし、従来のワクチンあるいは免疫学的治療概念では、この問題をクリアすることは非常に困難であると考えられている。最近、レトロウイルスに対する細胞内宿主因子が次々と同定され、ヒトは進化の過程で多くのレトロウイルスを排除してきたという証拠が見出されている。一方で、HIV はこれらの宿主防御因子の働きを解除する遺伝子産物をコードしている。そこで、本研究班では、宿主防御因子を活用した治療戦略への基盤を創出することを目的とし、HIV 感染・増殖に関与する宿主防御因子(SAMHD1、BST-2/tetherin、TRIM5、APOBEC3、未同定因子)の抗 HIV 作用機序とウイルス遺伝子産物による解除機構の分子基盤を明らかにする研究に取り組む。これにより、従来の免疫学とは異なる抗 HIV 防御システムの全体像を明らかにし、宿主因子を利用した次世代型治療戦略や病態解明への新たな知見が輩出できると考えられる。

2. 研究方法

3年間の計画で宿主因子を利用した治療法の開発や病態解明につながる新たな知見を輩出する。三つの主軸に沿って各研究分担者が各論を展開し、成果や手法を共有することで研究班全体として研究を強力に推進していく。研究目的により各種の研究手法(ウイルス学、分子生物学、生化学、有機化学、計算科学、構造生物学等)を用いる。(1) 宿主因子とウイルスの増殖阻止の分子機序を明らかにする。(2) 抗ウイルス宿主因子の発現制御機構と分解機構について解明し、ウイルス感染による変化もしくは個体差

に関する研究を行う。(3) 抗ウイルス宿主因子/解除因子の相互作用を阻害、あるいは抗ウイルス宿主因子の発現制御をコントロールする分子モジュレータや低分子化合物を探索する。さらに、各研究者の知識・経験あるいは研究材料及び班研究のメリットを最大限に生かすため、研究代表者のもとで積極的な議論を重ねるインターラクティブな研究体制をとる。

(倫理面への配慮)

本研究は、遺伝子組換え実験を含むため「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」を遵守する。また、クラス3の病原体 HIV を用いた実験を含むため、実験を実施する研究機関の承認を得て行う。ヒト由来臨床材料を使う研究が行われる場合は、関連機関の倫理審査会の承認を得て、提供者本人に十分な説明を行い、承諾を得た上で行う。

3. 研究結果

研究代表者及び研究分担者は緊密な協力関係のもとに研究を行った。初年度の研究は順調かつ着実に進捗し、主要な成果として要約以下の成績を得た。(1) 既報の宿主因子(SAMHD1及びAPOBEC3A)以外にもHIV-2 Vpxの標的分子があることを分子遺伝学的解析から明らかにした。マイクロアレー法などにより、その候補を15に絞り、候補分子の発現細胞を用いて効果を検証中である。また、Vpxの発現調節に重要なモチーフ(poly-proline motif: PPM)を同定し、その機構を解明した(翻訳過程の促進)。(2) APOBEC3の立体構造の解明に成功し、Vifとの相互作用部位を同定した。これにより新たな抗HIV薬開発への道が拓かれた。また、定量RT-PCR法によりAPOBEC3(A、B、C、DE、F、G及びHの7種類)の発現量を増加させるモジュレータを複数同定した(1型インターフェロン等)。(3) Vpuに作用しBST-2/tetherinの抗ウイルス活性を増強させる宿主因子SCYL2を同定した。これとは逆に、Vpuと結合しその機能を補助する宿主因子の候補として、HaloLink Resin免疫沈降法を用いて3種類の細胞因子を同定した。ジーンサイレンシング実験によりその効果

を検証中である。(4) カニクイザルにおけるTRIM5 遺伝子型の分布や抗ウイルス機能について明らかにした。また、TRIM5とは無関係にウイルス増殖を増強するHIV Gag-CA変異を同定した。さらに、センダイウイルスベクターを用いたTRIM5評価系を確立し、HIV Gag-CAの試験管内アセンブリー系の構築にも成功した。センダイウイルスの系を用いて低分子化合物ライブラリーをスクリーニングしたところ、50%以上の感染阻止効果を示す化合物が複数あった。(5) TRIM5機能を擬似化する化合物BMMPを合成し、抗HIV-1活性を持つことを確認した。また、APOBEC3の発現量を有意に増加させる低分子化合物SN-2を得た。

4. 考察

本研究の目標を達成するためには、宿主細胞内防御因子(抗 HIV 因子)とこれを無効にするウイルス解除因子(HIV がコードする Gag、Vif、Vpx 及び Vpu)との相互作用を分子レベルで詳細に解析・解明する必要がある。また、ウイルス複製に関与する未同定因子についての探索も活発に行う必要がある。これらに鑑みると、本年度の研究により各ウイルス解除因子とその標的である宿主防御因子について、重要な学術的知見が蓄積しつつあることがわかる。HIV の複製や感染病態における宿主因子の重要性は明らかであるので、治療戦略の基盤を構成するウイルス蛋白質との相互作用機序の分子レベルでの解析を継続していく必要がある。具体的には次のようにまとめられる。

(1) 15 種類の候補分子から Vpx の細胞内標的因子(SAMHD1 と APOBEC3A 以外)を同定する。Vpx PPM に結合する細胞因子を同定する。(2) APOBEC3 の発現調節ではインターフェロン刺激を中心とした JAK-STAT 系の活性化が深く関与することが明らかになった。APOBEC3 の過剰発現が HIV 複製にどの程度の抑制効果を持つか検証する。(3) Vpu 機能を補助する細胞因子を同定する。(4) 試験管内 HIV Gag-CA アセンブリー系やセンダイウイルスベクター系を用い、微弱なヒト TRIM5 活性を増強させる低分子化合物を探索する。(5) BMMP 及び SN-2 の作用機序を解明し、これに基づいて nM オーダーの活性を持つ選択的な HIV 阻害剤の創製を試みる。

5. 自己評価

1) 達成度について

班研究を効果的・効率的に進めるために初年度は班会議を二回開催し、充分時間をかけて研究計画と研究成果の共有を図った。これにより、研究代表者及び研究分担者間の有機的な協力体制(共同研究等)が構築され、予想以上

の成果が得られた。研究班の成立時に想定していた研究テーマの全てについて明確な進展が見られ、さらなる発展を目指した実験計画が具体的に策定可能となった。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

Eradication を目標とした次世代型治療戦略に宿主細胞因子を総合的に活用するというアプローチは世界的にも極めてユニークである。この目標の基盤をなす宿主因子・ウイルス蛋白質相互作用の分子機序の解明には様々な先端的研究手法や先駆的情報が必須である。それぞれの研究テーマの目標は世界的にも高レベルに設定されている。したがって、本研究の学術的・国際的・社会的意義は明らかであり、当初の方向性に基づいて着実に研究を進展させることが肝要であると思われる。

3) 今後の展望について

既知の宿主防御因子 (TRIM5、APOBEC3、BST-2/tetherin 及び SAMHD1) とウイルス解除因子(Gag、Vif、Vpx 及び Vpu) については本研究班においても精力的に研究が行われ顕著な成果が得られている。これらの研究課題の目標遂行に努めるとともに、今後は、未同定宿主防御因子及び未同定宿主補助因子(既知の宿主防御因子とウイルス解除因子の相互作用に関与する未同定の宿主因子)の探索も極めて重要であると考えられる。これに関しては、本年度の成果により具体的な課題設定が可能となったので、実験解析による検証作業を行っていく。

6. 結論

HIV感染・増殖に関与する宿主細胞防御因子の抗ウイルス作用機序とウイルス遺伝子産物による解除機構の解明に取り組み、新たな学術的知見を得た。同定した因子や因子内領域は、Vpx の発現増強に関わる Vpx 内 PPM (poly-proline motif) 配列、APOBEC3 と Vif の相互作用部位、APOBEC3 の発現量を増加させるモジュレータ及び BST-2/tetherin の抗ウイルス活性を増強させる宿主因子 SCYL2 である。探索中の宿主因子は、Vpx の標的分子(15 種類)及び Vpu 機能補助因子(3 種類)である。構築した評価系は TRIM5 の標的である Gag-CA の試験管内アセンブリー系である。この他、創薬に繋がり得る抗ウイルス宿主因子を擬似・制御する低分子化合物として、TRIM5 機能を擬似化する BMMP 及び APOBEC3 の発現量を有意に増加させる SN-2 を得た。

7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

該当事項なし。

研究発表

研究代表者

足立昭夫

- 1) Nomaguchi, M., Yokoyama, M., Kono, K., Nakayama, E.E., Shioda, T., Saito, A., Akari, H., Yasutomi, Y., Matano, T., Sato, H., and 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., and 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., and 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., and Adachi, A. Viral tropism. *Frontiers in Microbiology* 3: 281, 2012.
- 5) Nomaguchi, M., Doi, N., Matsumoto, Y., Sakai, Y., Fujiwara, S., and Adachi, A. Species tropism of HIV-1 modulated by viral accessory proteins. *Frontiers in Microbiology* 3: 267, 2012.

研究分担者

岩谷靖雅

- 1) Hergott, C.B., Mitra, M., Guo, J., Wu, T., Miller, J.T., Iwatani, Y., Gorelick, R.J., and Levin, J.G. Zinc finger function of HIV-1 nucleocapsid protein is required for removal of 5'-terminal genomic RNA fragments: A paradigm for RNA removal reactions in HIV-1 reverse transcription. *Virus Research*, in press.
- 2) Jahanbakhsh, F., Ibe, S., Hattori, J., Monavari, S.H.R., Matsuda, M., Maejima, M., Iwatani, Y., Memarnejadian, A., Keyvani, H., Azadmanesh, K., and Sugiura, W. Molecular epidemiology of HIV-1 infection in Iran: genomic evidence of CRF35_AD predominance and CRF01_AE infection among individuals associated with injection drug use. *AIDS Research and Human Retroviruses*, in press.
- 3) Bunupuradah, T., Imahashi, M., Iampornsin, T., Matsuoka, K., Iwatani, Y., Puthanakit, T., Ananworanich, J., Sophonphan, J., Mahanontharit, A., Naoe, T., Vonthanak, S., Phanuphak, P., and Sugiura, W. On behalf of the predict study team. Association of APOBEC3G genotypes and CD4 decline in Thai and Cambodian HIV-infected children with moderate immune deficiency. *AIDS Research and Therapy* 9: 34, 2012
- 4) Kitamura, S., Ode, H., Nakashima, M., Imahashi, M., Naganawa, Y., Kurosawa, T., Yokomaku, Y., Yamane, T., Watanabe, N., Suzuki, A., Sugiura, W., and Iwatani, Y. The APOBEC3C crystal structure and the interface for HIV-1 Vif binding. *Nature Structural & Molecular Biology* 19: 1005-1010, 2012
- 5) Imahashi, M., Nakashima, M., and Iwatani, Y. Antiviral mechanism and biochemical basis of the human APOBEC3 family. *Frontiers in Microbiology* 3: 250, 2012

大塚雅巳

- 1) Yamakawa, N., Suemasu, S., Watanabe, H., Tahara, K., Tanaka, K.I., Okamoto, Y., Otsuka, M., Maruyama, T., and Mizushima, T. Comparison of pharmacokinetics between loxoprofen and its derivative with lower ulcerogenic activity, fluoro-loxoprofen. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, in press.
- 2) Suemasu, S., Yamakawa, N., Ishihara, T., Asano, T., Tahara, K., Tanaka, K., Matsui, H., Okamoto, Y., Otsuka, M., Takeuchi, K., Suzuki, H., and Mizushima, T. Identification of a unique nsaid, fluoro-loxoprofen with gastroprotective activity. *Biochemical Pharmacology* 84: 1470-1481, 2012.
- 3) Abe, M., Eto, M., Yamaguchi, K., Yamasaki, M., Misawa, J., Yoshitake, Y., Otsuka, M., and Harano, K. Clathrate formation of Diels-Alder adduct of phencyclone and acenaphthylene. Key role of CH/ π and bidentate CH/O

- interactions of the phenanthrene ring in construction of host framework. *Tetrahedron* 68: 3566-3576, 2012.
- 4) Yamakawa, N., Suemasu, S., Okamoto, Y., Tanaka, K., Ishihara, T., Asano, T., Miyata, K., Otsuka, M., and Mizushima, T. Synthesis and biological evaluation of derivatives of 2-(2-fluoro-4-[(2-oxocyclophenyl)methyl]phenyl)propanoic acid: nonsteroidal anti-inflammatory drugs with low gastric ulcerogenic activity. *Journal of Medicinal Chemistry* 55: 5143-5150, 2012.
 - 5) Masuda, T., Anraku, K., Kimura, M., Sato, K., Okamoto, Y., and Otsuka, M. A versatile intermediate for the systematic synthesis of all regioisomers of *myo*-inositol phosphates. *Synthesis* 44: 909-919, 2012.

徳永研三

- 1) Zheng, Y.-H., Jeang, K.-T., and Tokunaga, K. Host restriction factors in retroviral infection: promises in virus-host interaction. *Retrovirology*, in press.
- 2) Chutiwitoonchai, N., Hiyoshi, M., Hiyoshi-Yoshidomi, Y., Hashimoto, M., Tokunaga, K., and Suzu, S. Characteristics of IFITM, the newly identified IFN-inducible anti-HIV-1 family proteins. *Microbes and Infection*, in press.
- 3) Arias, J.F., Koyama, T., Kinomoto, M., and Tokunaga, K. Retroelements versus APOBEC3 family proteins: No great escape from the magnificent seven. *Frontiers in Microbiology* 3: 275, 2012.
- 4) Fujita, H., Fujimoto, K., Tokunaga, K., and Tanaka, Y. Intracellular logistics of BST-2/tetherin. *Current HIV Research* 10: 321-326, 2012.
- 5) Arias, J.F., Iwabu, Y., and Tokunaga, K. Sites of action of HIV-1 Vpu in BST-2/tetherin downregulation. *Current HIV Research* 10: 283-291, 2012.
- 6) Tokunaga, K. HIV-1 Vpu and BST-2/tetherin: enemies at the gates. *Current HIV Research* 10: 275-276, 2012.

中山英美

- 1) Likanonsakul, S., Rattanatham, T., Feangvad, S., Uttayamakul, S., Prasithsirikul, W., Srisopha, S., Nitiyanontakij, R., Tengtrakulcharoen, P., Tarkowski, M., Riva, A., Nakayama, E.E., and Shioda, T. Polymorphisms in *Fas* gene is associated with HIV-related lipodystrophy in Thai patients. *AIDS Research and Human Retroviruses*, in press.
- 2) Nomaguchi, M., Yokoyama, M., Kono, K., Nakayama, E.E., Shioda, T., Saito, A., Akari, H., Yasutomi, Y., Matano, T., Sato, H., and Adachi, A. Gag-CA Q110D mutation elicits TRIM5-independent enhancement of HIV-1mt replication in macaque cells. *Microbes and Infection* 15: 56-65, 2013.
- 3) Miyamoto, T., Nakayama, E.E., Yokoyama, M., Ibe, S., Takehara, S., Kono, K., Yokomaku, Y., Pizzato, M., Luban, J., Sugiura, W., Sato, H., and Shioda, T. The cauboxyl-terminus of human immunodeficiency virus type 2 circulating recombinant form 01_AB capsid protein affects sensitivity to human TRIM5 α . *PLoS One* 7: e47757, 2012
- 4) Saito, A., Kawamoto, Y., Higashino, A., Yoshida, T., Ikoma, T., Suzaki, Y., Ami, Y., Shioda, T., Nakayama, E.E., and Akari, H. Allele Frequency of Antiretroviral Host Factor TRIMCyp in Wild-caught Cynomolgus Macaques (*Macaca fascicularis*). *Frontiers in Microbiology* 3: 314, 2012
- 5) Bozek, K., Nakayama, E.E., Kono, K., and Shioda, T. Electrostatic potential of human immunodeficiency virus type 2 and rhesus macaque simian immunodeficiency virus capsid proteins. *Frontiers in Microbiology* 3: 206, 2012

藤田美歌子

- 1) Fujita, M., Nomaguchi, M., Adachi, A., and Otsuka, M. SAMHD1-dependent and -independent functions of HIV-2/SIV Vpx protein. *Frontiers in Microbiology* 3: 297, 2012.
- 2) Nomaguchi, M., Fujita, M., Miyazaki, Y., and Adachi, A. Viral tropism. *Frontiers in Microbiology* 3: 281, 2012.

研究課題：HIV 持続感染成立機構とその防御機序に関する研究

課題番号：H24-エイズ-一般-006

研究代表者：俣野 哲朗（国立感染症研究所エイズ研究センター センター長）

研究分担者：保富 康宏（医薬基盤研究所霊長類医科学研究センター センター長）、森川 裕子（北里大学北里生命科学研究所 教授）、高折 晃史（京都大学大学院医学研究科 教授）、吉村 和久（国立感染症研究所エイズ研究センター 室長）、横山 勝（国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター 主任研究官）、寺原 和孝（国立感染症研究所免疫部 主任研究官）

1. 研究目的

世界の HIV 感染拡大は未だ深刻な状況にあり、本邦においても感染者数の増大が続いている。HIV 感染症克服にはグローバルな視点での感染拡大抑制に向けた取り組みが必要であり、感染病態の解明に加え、感染拡大抑制の切り札となるワクチンの開発は最重要課題である。本研究は、HIV 持続感染成立機構とその防御機序の解明を目的とし、予防エイズワクチン開発に結びつけることを目指すものである。HIV 感染抑制には細胞傷害性 T リンパ球（CTL）反応が中心的役割を担っているが、自然感染では持続感染成立に至る。我々はこれまで MHC-I 共有サル群の樹立を進めるとともに、優れた CTL 誘導能を有するセンドライウイルス（SeV）ベクターワクチン開発研究を展開し、サル免疫不全ウイルス（SIV）感染サルエイズモデルにて予防ワクチンが曝露後の有効な CTL 誘導に結びつけば持続感染阻止に至ることを示してきた。また、受動免疫実験にて急性期の中和抗体反応の有効性を明らかにした。そこで本研究では、(1) HIV 持続感染成立機構とその防御機序の解明を目的として、各種 MHC-I ハプロタイプ共有サル群の SIV 感染動態情報を蓄積し、複製制御に結びつく因子の同定、特に有効な CTL の標的抗原同定を進めることとした。さらに(2) HIV 感染防御免疫誘導法の開発を目的とし、CTL と中和抗体誘導に関する研究を展開した。

2. 研究方法

(1) HIV 持続感染防御機序に関する研究

(1-1) MHC-I ハプロタイプ A・E・B・J を各々共有するビルマ産アカゲサル 4 群（計 20 頭）の SIV_{mac239} 感染経過を解析し、血漿中ウイルス量、末梢血 CD4 陽性 T リンパ球数、病態進行、SIV 特異的 CTL 反応を比較検討した。（俣野）

(1-2) 抗原特異的 CD107a・MIP-1beta・TNF-alpha・IFN-gamma・IL-2 誘導の測定により、SIV 感染急性期の SIV 特異的 CD4 陽性 T リンパ球反応を解析した。（寺原）

(2) HIV 感染防御免疫誘導に関する研究

(2-1) MHC-I ハプロタイプ D 共有群の SIV 感染免疫動態を解析し、非 Gag 抗原特異的 CTL 反応が SIV 複製におよぼす影響を検討した。（俣野）

(2-2) Gag 抗原分解に関する知見を得るために、MA 膜結合領域の塩基性アミノ酸、CA 二量体形成領域のアミノ酸を置換した HIV Gag 蛋白を作製し、細胞内局在と分解を解析した。（森川）

(2-3) Vif 抗原に着目し、抗リン酸化セリン TP53 特異抗

体を用いたイムノプロット法により TP53 のリン酸化を解析した。（高折）

(2-4) SeV ベクターワクチン接種プロトコール最適化に向け、短期間隔での複数回接種の試みとして、アカゲサル 4 頭に非複製型 Gag 発現 SeV ベクターを 3 週間隔で 3 回接種し、CTL 反応を解析した。（俣野）

(2-5) プライム法の検討目的で、HIV-Gag DNA/Env-HEV-VLP ワクチンをカニクイサルに 2 週間隔で 3 回経口投与し、HIV Env および HEV-VLP 特異的免疫誘導を解析した。（保富）

(2-6) 薬剤耐性 HIV env 変異が中和抗体感受性におよぼす影響を知る目的で、CCR5 阻害剤耐性誘導により得られた変異 env を pNL43 分子クローンに組込み作製した組換えパネルウイルスの抗体感受性を検討した。（吉村）

(2-7) 中和抵抗性である HIV JR-FL 株 Env gp120 全長の糖鎖付単量体分子モデルを *in silico* で構築し、得られた単量体平衡構造を用いて三量体モデルも構築した。（横山）

（倫理面への配慮）

遺伝子組換え生物等を用いる実験については、実施機関の承認あるいは文部科学大臣の確認を得ている。動物実験については、実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針を遵守し、実施機関の動物実験委員会の承認を得てから開始した。ヒトサンプルを用いる研究については、該当する倫理指針を遵守し、実施機関の倫理委員会の承認を得てから開始した。

3. 研究結果

(1-1) MHC-I ハプロタイプ A・E・B・J を各々共有する 4 群における SIV 感染後の血漿中ウイルス量、末梢血 CD4 陽性 T リンパ球数、病態進行等について多群比較により有意差を明らかにした。各群の SIV 抗原特異的 CTL 誘導パターンを把握し、病態進行が遅い A 群と速い J 群を見出した。

(1-2) 1 週目の血中ウイルス量と CD4 T リンパ球の SIV 特異的 MIP-1beta・IFN-gamma・IL-2 反応との間に有意な逆相関が認められた。

(2-1) D 陽性群 5 頭では、SIV 感染後半年の血中ウイルス量が、過去の D 陰性群 20 頭のデータと比較して有意に低値を示した。一般に強い抑制能を有する Gag 特異的 CTL 誘導は認められず、Nef 特異的 CTL 反応が全頭で認められ、SIV 複製抑制に貢献していることが示唆された。

(2-2) Gag MA の膜結合領域 26, 27, 30, 32 位アミノ酸 K を E に置換した Gag 蛋白は細胞質内の膜小器官に局在

し、野生型 Gag より効率良くプロテアソーム経路で分解されることが判明した。一方、CA の二量体形成領域 184, 185 位アミノ酸置換ではその効果は認められなかった。

(2-3) Vif は TP53 の Ser¹⁵、Ser²⁰、Ser³⁷ および Ser⁴⁶ のリン酸化を増強することを見出した。

(2-4) 単回接種では誘導される Gag 特異的 CTL 反応が 1 週後をピークとして減弱するが、本実験では SeV 特異的免疫反応の誘導にもかかわらず 2 回目・3 回目の接種で Gag 特異的 CTL 反応の維持・増強が認められた。

(2-5) ワクチン後、HEV-VLP 特異的な反応については、抗体誘導、IFN-gamma 産生細胞誘導とも確認された。HIV Env 特異的な反応については、IFN-gamma 産生細胞誘導のみで、抗体誘導は検出されなかった。有害事象は生じなかった。

(2-6) Env V3 領域を中心とした複数の R5 耐性変異が、V3 のみならず CD4bs や CD4i を認識する抗体への感受性獲得に結びつくことが判明した。

(2-7) gp120 全長単量体モデルでは、V1/V2 ループ、V3 ループ等の間に相関した運動が観察された。三量体モデルでは、V3 先端が三量体の中心に向かって配置され、抗 V3 抗体の結合が困難であることが示唆された。

4. 考察

SIV 感染サルエイズモデルにおいて、MHC-I ハプロタイプと病態進行の相関を明らかにした。本結果およびこのモデルを用いた CTL 反応・CD4 T 反応の解析系は、複製制御に結びつく因子の同定に向けた今後の防御免疫機序解明のための解析基盤として非常に重要である。

本研究で初めて見出された protective MHC-I ハプロタイプ D を共有するサル群の解析は、一般に強い HIV/SIV 複製抑制能を有する Gag 特異的 CTL 反応以外で複製抑制に貢献する抗原特異的 CTL 反応の同定に結びつくものとして意義がある。CTL 標的抗原の解析では、Gag および Vif に関して新たな知見が得られ、特にプロテアソーム経路で効率良く分解される Gag 蛋白変異体を設計することができた。ワクチンデリバリーシステムの最適化研究では、SeV ベクターの短期間隔複数回接種が、抗原特異的 CTL 反応の維持・増強に有用であることを示した。プライム候補となりうる HEV-VLP については、細胞性免疫誘導能は確認できたが、抗体誘導能を示すためには抗原取込み量の改善の必要性が考えられた。

中和抗体に関する研究では、R5 阻害剤耐性変異が中和感受性に及ぼす影響について新たな知見を得た。また、in silico で gp120 三量体モデルを構築した。本研究の進展によって中和抗体標的に関する情報蓄積に結びつくことが期待される。

5. 自己評価

1) 達成度について

基本的に研究計画に沿い目指したレベルの成果を得た。本研究で得られたサルエイズモデルにおける MHC-I ハプロタイプと感染免疫病態進行の相関に関する成果は、今後の HIV 感染防御免疫機序の解明および防御免疫誘導法の開発に結びつくものとして極めて重要である。また、SeV ベクターワクチン接種プロトコル最適化に関する研究、CTL 標的抗原候補の Gag・Vif 蛋白の動態解析および中和抗体標的に関する研究で、着実な成果が得られている。なお、新規の protective MHC-I ハプロタイプ D を見出したことは想定以上の成果である。これらは、予防エイズワクチン最適化に結びつく成果として高く評価できる。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

本研究の MHC-I ハプロタイプ A・E・B・J 各々を共有するサル群の SIV 感染動態解析結果は、HIV 感染免疫学的解析ならびにエイズワクチン開発における、この独自のサルエイズモデルの有用性を示すものであり、学術的・国際的にも重要な成果である。その他、SeV ベクターワクチン接種プロトコル最適化に関する研究、CTL 標的抗原候補の Gag・Vif 蛋白の動態解析および中和抗体標的に関する研究で得られた成果も含め、学術的・国際的意義は高く、予防エイズワクチン開発を加速するものとして社会的意義も極めて高い。

3) 今後の展望について

本研究で得られた成果をもとに HIV 感染防御免疫機序の解明を進め、CTL 誘導予防エイズワクチンのデリバリーシステム最適化・至適抗原選択に結びつけるとともに、中和抗体誘導機序解明に向けた研究を展開する。

6. 結論

各種 MHC-I ハプロタイプ共有サル群の SIV 感染免疫動態の解析を進め、MHC-I ハプロタイプと病態進行の相関を明らかにした。本結果およびこのモデルを用いた解析系は、今後の HIV 感染防御免疫機序解明に向けた解析基盤として重要である。また、新規の protective MHC-I ハプロタイプを見出した。さらに、SeV ベクターワクチンの短期間隔複数回接種の有効性を示す結果を得るとともに、CTL 標的抗原候補の Gag・Vif 蛋白の動態解析および中和抗体標的に関する解析で新たな知見を得た。本研究は予防エイズワクチン開発を加速するものとして進展が期待される。

7. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

特に無し。

別紙
研究発表

研究代表者

俣野哲朗

- 1) 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, T.K., Kimura, A., and 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, in press.
- 2) Nomaguchi, M., Yokoyama, M., Kono, K., Nakayama, E.E., Shioda, T., Saito, A., Akari, H., Yasutomi, Y., Matano, T., Sato, H., and Adachi, A. Gag-CA Q110D mutation elicits TRIM5-independent enhancement of HIV-1mt replication in macaque cells. Microbes Infect., in press.
- 3) Kurihara, K., Takahara, Y., Nomura, T., Ishii, H., Iwamoto, N., Takahashi, N., Inoue, M., Iida, A., Hara, H., Shu, T., Hasegawa, M., Moriya, C., and Matano, T. Immunogenicity of repeated Sendai viral vector vaccination in macaques. Microbes Infect. 14:1169-1176, 2012.
- 4) Nomura, T., and Matano, T. Association of MHC-I genotypes with disease progression in HIV/SIV infections. Front. Microbiol. 3:234, 2012.
- 5) Ohtani, H., Naruse, T. K., Iwasaki, Y., Akari, H., Ishida, T., Matano, T., and Kimura, A. Lineage-specific evolution of T-cell immunoglobulin and mucin domain 1 gene in the primates. Immunogenetics 64:669-678, 2012.
- 6) 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, T. K., Kimura, A., and 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.

研究分担者

保富康宏

- 1) Yoshida, T., Omatsu, T., Saito, A., Katakai, Y., Iwasaki, Y., Kurosawa, T., Hamano, M., Higashimo, A., Nakamura, S., Takasaki, T., Yasutomi, Y., Kurane, I., and Akari, H. Dynamics of cellular immune responses in the acute phase of dengue virus infection. Arch. Virol., in press.
- 2) Tougan, T., Aoshi, T., Coban, C., Katakai, Y., Kai, C., Yasutomi, Y., Ishii, K.J., and Horii, T. TLR9 adjuvants enhance immunogenicity and protective efficacy of the SE36/AHG malaria vaccine in nonhuman primate models. Hum.Vaccin. Immunother., in press.
- 3) Nomaguchi, M., Yokoyama, M., Kono, K., Nakayama, E. E., Shioda, T., Saito, A., Akari, H., Yasutomi, Y., Matano, T., Sato, H., and Adachi, A. Gag-CA Q110D mutation elicits TRIM5-independent enhancement of HIV-1mt replication in macaque cells. Microbes Infect., in press.
- 4) Karamatsu, K., Matsuo, K., Inada, H., Tsujimura, Y., Shiogama, Y., Matsubara, A., Kawano, M., and Yasutomi, Y. Single systemic administration of Ag85B of mycobacteria DNA inhibits allergic airway inflammation in a mouse model of asthma. J. Asthma Allergy 5:71-79, 2012.
- 5) Tajiri, K., Imanaka-Yoshida, K., Matsubara, A., Tsujimura, Y., Hiroe, M., Naka, T., Shimojo, N., Sakai, S., Aonuma, K., and Yasutomi, Y. Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) DNA administration inhibits inflammatory and pathogenic responses in autoimmune myocarditis. J. Immunol. 189:2043-2053, 2012.
- 6) Higashino, A., Sakate, R., Kameoka, Y., Takahashi, I., Hirata, M., Tanuma, R., Masui, T., Yasutomi, Y., and Osada, N. Whole-genome sequencing and analysis of the Malaysian cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*) genome. Genome Biol. 13:R58, 2012.
- 7) Tachibana, S., Sullivan, S.A., Kawai, S., Nakamura, S., Goto, N., Arisue, N., Palacpac, N.M.Q., Honma, H., Yagi, M., Tougan, T., Katakai, Y., Kaneko, O., Mita, T., Kita, K., Yasutomi, Y., Kim, H.R., Sutton, P.L., Shakhbatyan, R., Horii, T., Yasunaga, T., Bamwell, J.W., Escalante, A.A., Carlton, J.M., and Tanabe, K. *Plasmodium cynomolgi* genome sequences provide insight into *Plasmodium vivax* and the monkey malaria clade. Nat. Genet. 44:1051-1055, 2012.

森川裕子

- 1) Haraguchi, H., Noda, T., Kawaoka, Y., and Morikawa, Y. A large extension to HIV-1 Gag, like Pol, has negative impacts on virion assembly. PLoS One 7: e47828, 2012.
- 2) Mitsuki, Y., Terahara, K., Shibusawa, K., Yamamoto, T., Tsuchiya, T., Ishige, M., Kobayashi, K., Morikawa, Y., Nakayama T., Takeda, M., Yanagi, Y., and Tsunetsugu-Yokota, Y. HIV-1 infection ex vivo accelerates measles virus infection by upregulating signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) in CD4+ T cells. J. Virol. 86: 7227-7234, 2012.

高折晃史

- 1) Chonabayashi, K., Hishizawa, M., Kawamata, S., Nagai, Y., Ohno, T., Ishikawa, T., Uchiyama, T., and Takaori-Kondo, A. Direct binding of Grb2 plays important roles in development of myeloproliferative disease induced by ETV6/FLT3. *Leukemia*, in press.
- 2) Fujita, H., Kitawaki, T., Sato, T., Maeda, T., Kamihira, S., Takaori-Kondo, A., and Kadowaki, N. The tyrosine kinase inhibitor dasatinib suppresses cytokine production by plasmacytoid dendritic cells by targeting endosomal transport of CpG DNA. *Eur. J. Immunol.*, in press.
- 3) Furukawa, A., Okamura, H., Morishita, R., Matsunaga, S., Kobayashi, N., Ikegami, T., Kodaki, T., Takaori-Kondo, A., Ryo, A., Nagata, T., and 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.
- 4) Matsunaga, S., Sawasaki, T., Ode, H., Morishita, R., Furukawa, A., Sakuma, R., Sugiura, W., Sato, H., Katahira, M., Takaori-Kondo, A., Yamamoto, N., and Ryo, A. Molecular and enzymatic characterization of XMRV protease by a cell-free proteolytic analysis. *J. Proteomics* 75:4863-73, 2012.
- 5) Mizumoto, C., Kawabata, H., Uchiyama, T., Sakamoto, S., Kanda, J., Tomosugi, N., and Takaori-Kondo, A. Acidic milieu augments the expression of hepcidin, the central regulator of iron homeostasis. *Int. J. Hematol.* 96:701-709, 2012.
- 6) Shinohara, M., Io, K., Shindo, K., Matsui, M., Sakamoto, T., Tada, K., Kobayashi, M., Kadowaki, N., and Takaori-Kondo, A. APOBEC3B can impair genomic stability by inducing base substitutions in genomic DNA in human cells. *Sci. Rep.* 2:806, 2012.

吉村和久

- 1) Harada, S., Yoshimura, K., Yamaguchi, A., Boonchawalit, S., Yusa, K., and Matsushita, S. Impact of antiretroviral pressure on selection of primary HIV-1 envelope sequences in vitro. *J. Gen. Virol.*, in press.
- 2) Yokoyama, M., Naganawa, S., Yoshimura, K., Matsushita, S., and Sato, H. Structural Dynamics of HIV-1 Envelope Gp120 Outer Domain with V3 Loop. *PLoS ONE* 7: e37530, 2012.

横山 勝

- 1) Nomaguchi, M., Yokoyama, M., Kono, K., Nakayama, E. E., Shioda, T., Saito, A., Akari, H., Yasutomi, Y., Matano, T., Sato, H., and Adachi, A. Gag-CA Q110D mutation elicits TRIM5-independent enhancement of HIV-1mt replication in macaque cells. *Microbes Infect.*, in press. (The first two authors contributed equally)
- 2) Miyamoto, T., Nakayama, E.E., Yokoyama, M., Ibe, S., Takehara, S., Kono, K., Yokomaku, Y., Pizzato, M., Luban, J., Sugiura, W., Sato, H., and Shioda, T. The carboxyl-terminus of human immunodeficiency virus type 2 circulating recombinant form 01_AB capsid protein affects sensitivity to human TRIM5 α . *PLoS ONE* 7: e47757, 2012.
- 3) Mori, M., Matsuki, K., Maekawa, T., Tanaka, M., Sriwanthana, B., Yokoyama, M., and Ariyoshi, K. Development of a Novel In Silico Docking Simulation Model for the Fine HIV-1 Cytotoxic T Lymphocyte Epitope Mapping. *PLoS ONE* 7: e41703, 2012.
- 4) Yokoyama, M., Naganawa, S., Yoshimura, K., Matsushita, S., and Sato, H. Structural Dynamics of HIV-1 Envelope 1 Gp120 Outer Domain with V3 Loop. *PLoS ONE*, 7: e37530, 2012.

寺原和孝

- 1) Terahara, K., Ishige, M., Ikeno, S., Mitsuki, Y.y., Okada, S., Kobayashi, K., and Tsunetsugu-Yokota, Y. Expansion of activated memory CD4⁺ T cells affects infectivity of CCR5-tropic HIV-1 in humanized NOD/SCID/JAK3^{null} mice. *PLoS One.*, in press.
- 2) 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, T., Kimura, A., and 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.

研究課題：HIV-1 の薬剤・免疫耐性変異獲得機序の解明と新規治療法を目指した基盤的研究

課題番号：H24-エイズ一般-007

研究代表者：滝口 雅文（熊本大学 エイズ学研究センター センター長／教授）

研究分担者：鴻永 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）

馬場 昌範（鹿児島大学 大学院医歯学総合研究科 教授）

松岡 雅雄（京都大学 ウイルス研究所 教授）

松下 修三（熊本大学 エイズ学研究センター 教授）

天野 将之（熊本大学 エイズ学研究センター COE リサーチ・アシスト）

前仲 勝実（北海道大学 大学院薬学研究院 教授）

1. 研究目的

HAARTにより、多くのHIV患者の予後は改善されてきたが、薬剤耐性変異を持った耐性ウイルスの出現など多くの問題が生じており、HAART療法に抵抗する難治性HIV感染症患者の治療が大きな課題になってきている。また、免疫から逃避する変異をもったHIV-1の蓄積も明らかになっており、ワクチンや免疫治療の確立を困難にしている。これらの研究の課題を解決するため、以下のような研究を行う。

柱1：変異獲得の機序と変異による免疫および薬剤抵抗性獲得機序の解明

まだ明らかにされていないCTLや中和抗体の逃避変異の同定、その変異による免疫抵抗性の機序の解明を行う。さらに、薬剤耐性変異を明らかにし、その耐性獲得機序・多剤耐性効果を明らかにする。また、免疫により獲得した変異が薬剤の効果に及ぼす効果、あるいは薬剤が選択した変異が免疫に与える効果を明らかにする。

柱2：耐性ウイルスに対する新たな治療法・予防法を開発するための基盤的研究

新規プロテアーゼ二量体阻害剤および HIV の遺伝子発現機構に関与する分子を標的とする新規抗 HIV 薬の候補を同定する。また、単クローン抗体と抗ウイルス薬の併用療法の可能性を明らかにする。

2. 研究方法

柱1：変異獲得の機序と変異による免疫および薬剤抵抗性獲得機序の解明

1) 免疫系による変異獲得の機序と免疫抵抗性の研究

日本人慢性HIV-1感染者のHLAと相関を示すHIV-1の変異を明らかにし、その変異部位を認識する特異的CTLを用いて同定し、そのCTLを用いて逃避変異であることを明らかにする。すでに知られている逃避変異に対するCTLに認識を解析し、逃避変異出現によるCTLのHIV-1増殖抑制能の変化を調べる。またNK細胞が認識するHIV-1由来のペプチドを明らかにし、変異がNK細胞の認識に与える影響を明らかにする。

2) 薬剤による変異性獲得の機序と薬剤抵抗性の研究

細胞間感染経路およびセリフリー感染経路における抗 HIV 薬に対する感受性を、野生株ならびに薬剤耐性株を用いて比較し、感染経路依存的な薬剤感受性の差を明らかにする [松岡]。プロテアーゼの二量体化阻害剤 (PDI) に対する耐性変異の薬剤耐性の機序を、結晶解析・質量分析学的方法を含めた多面的方法により明らかにする [天野]。

3) 免疫系が獲得する変異による薬剤抵抗性の研究及び薬剤耐性変異が免疫認識に与える研究

CTL が選択する逆転写酵素、プロテアーゼ、インテグラーゼ内の逃避変異に関して、逃避変異 HIV-1 を作製し、これらの変異が薬剤耐性に与える影響を明らかにする [鴻永・滝口・松岡・馬場]。その逆に、これらの蛋白内に存在する薬剤逃避変異がCTLの認識に与える影響を明らかにする [滝口・鴻永]。

柱2：耐性ウイルスに対する新たな治療法・予防法を開発するための基盤的研究

1) 耐性ウイルスに対する新規薬剤の開発

新規 PDI を開発するため、新規骨格を有する PDI 候補化合物のスクリーニングを進め、活性を有するものについて構造学的評価を行い、より強力な活性を有する化合物の合成をする [天野]。一方、Tat/TAR RNA と Cyclin T1/CDK9 の複合体形成を標的として HIV の増殖を選択的に阻害する薬剤の開発を行う。既に新規化合物を同定することに成功しているが、同定されたリード化合物について化学構造の最適化を行い、活性と選択性の高い薬剤を得る。HIV 潜伏感染細胞を用いて、抗ウイルス効果を検証する [馬場]。

2) 免疫と薬剤を組み合わせた治療法の開発

中和抗体抵抗性ウイルスを用いて、C34（融合阻害剤）などのエンベロープを標的とする抗ウイルス薬への感受性の変化を調べる。また、融合阻害剤に抵抗性のウイルスの選択を行い、変異ウイルスの中和抗体感受性に関する検討を行う [松下・松岡]。

（倫理面への配慮）

患者の血液を用いて行なう研究に関しては、各施設の倫理委員会の承認を受け、その規定する指針に従っておこなった。

3. 研究結果

柱1：変異獲得の機序と変異による免疫および薬剤抵抗性獲得機序の解明

1) 免疫系による変異獲得の機序と免疫抵抗性の研究

HLA-A*24:02 拘束性の Gag 28 エピトープとその変異に対する3つのタイプのCTLが、Gag 逃避変異の選択に関与していることを明らかにした (J. Virol 2012) [滝口]。さらに HLA-B*51:01 拘束性 CTL により選択される RT135 の変異が、同じエピトープを認識する B*52:01 拘束性 CTL により選択されることを示した (J. Virol In press) [滝口]。また430人のHIV-1感染日本人のHIV-1遺伝子を解析し HLA と相関する 284 種類の変異

(HLA-associated mutations)を同定した[滝口]。さらに Cw12:02 結合ペプチドを多数同定し、CTL エピトープの同定と、NK レセプターの結合を明らかにした[滝口・前仲]

2) 薬剤による変異性獲得の機序と薬剤抵抗性の研究：

感染経路依存的な薬剤感受性の差を明らかにするために、蛍光タンパクを組み込んだNL4-3の感染性HIV-1を用いた評価系を樹立した[松岡]。

複数の高度多剤耐性臨床分離株に対しての抗ウイルス活性が完全に維持される、強力な新規PIであるGRL-095-10を新たに同定、検討を行った。さらに *tris*-THF構造を有する新規PIであるGRL-0519において、2つのTHF環がPR活性中心部位のアミノ酸主鎖と強固に結合することに加え、3つ目のTHF環がPR活性中心部位、flap領域、dimer interfaceのアミノ酸群と複数の相互作用を有する事を確認、同化合物の強力な抗HIV活性の主因であることが明らかにした。[天野]

3) 免疫系が獲得する変異による薬剤抵抗性の研究及び薬剤耐性変異が免疫認識に与える研究：

知られている6種類の薬剤耐性変異が、その変異部分を含めたHIV-1エピトープを認識するCTLの認識を障害することをあらたに見つけた。現在CTLが認識できなくなる機序を解析している[滝口・潟永]。

柱2：耐性ウイルスに対する新たな治療法・予防法を開発するための基盤的研究

1) 耐性ウイルスに対する新規薬剤の開発：

bis-THF-difluorideといった新規の構造を有するPI群を新たに同定し、*in vitro*での脳血管関門(BBB)再構築システムを用いて、同化合物群がDRVを含む既存の抗HIV-1剤群と比較して著しく良好なBBB透過性を有し得る事を見出した[天野]。

Tat/TAR RNAとcyclin T1/CDK9の相互作用を標的とする薬剤開発で、HIV-1急性感染系で非常に強い抗HIV-1活性を示す薬剤を明らかにした[馬場]。

2) 免疫と薬剤を組み合わせた治療法の開発：

CCR5阻害剤に対する耐性獲得の過程で、競合阻害による耐性変異では、CD4-induced epitope に対する抗体に中和感受性となり、さらに非競合耐性の獲得によってV3抗体にも感受性になることを明らかにした[松下]。

4. 考察

今年度からのこの研究班では、免疫系と抗HIV薬を融合させた研究を加えた。薬剤耐性変異がCTLの認識に影響を与える研究では、6種類の変異がHIV-1特異的CTLの認識を障害することを明らかにした。今後さらに解析数を増やし、薬剤耐性変異がどの様にHIVのCTLの認識に与える全体像を明らかにする予定である。また逆にCTLが選択する逃避変異が抗HIV薬に与える影響や薬剤耐性変異が抗体の認識に与える影響も現在解析している。

昨年度の班から継続している薬剤の開発の研究では、GRL-095-10や *bis*-THF-difluorideを有する化合物群を同定し、その活性機序を明らかにすることができた。Tat/TAR RNAとcyclin T1/CDK9の相互作用を標的とする薬剤開発の研究でも、強い抗HIV-1活性を示す薬剤を明らかにでき、今後臨床試験を目指した研究に進んでいく予定である。

5. 自己評価

1) 達成度について

本研究班は本年度が1年目であり、前年度までの3年間の班と比べて新たに多くの研究内容が加わっている。免疫系による変異獲得と抵抗性の研究では、CTLによる逃避変異の選択と新たな認識に関する時間的な解析がなされ、新たな変異抗原認識機序を明らかにすることができた。また日本人感染者のコホートで、CTLによる選択された可能性がある変異(HLA-associated mutations)を多数同定することができ、予定通りの研究の進展が見られた。さらに、薬剤による変異性獲得の機序と薬剤抵抗性の研究では、強力な新規PIであるGRL-0519のHIV-1阻害機序を解明でき大きな進展が見られた。免疫系が獲得する変異による薬剤抵抗性の研究は、今年度から開始した新規プロジェクトである。既に1年目で、6種類の薬剤耐性変異が、HIV-1特異的CTLの認識を障害することを見つけた。今後さらに多くのケースを明らかにし、薬剤耐性変異がCTLにより認識に与える全体像を明らかにできると考えられる。

新規薬剤の開発の研究では、*bis*-THF-difluorideといった新規の構造を有するPI群を新たに同定することができ、大きな進展が見られた。免疫と薬剤を組み合わせた治療法の開発の研究では、CCR5阻害剤と中和抗体を組み合わせた研究で成果が見られた。

以上のように1年目としては十分な成果が得られ、新たに開始したプロジェクトの順調に動き出している。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

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

3) 今後の展望について

以上に述べたように、1年目の班としては既に十分な成果が出ており、研究計画も順調にこなしており、2年目にはさらに多くの成果が期待できる。

6. 結論

- 1) CTLによる逃避変異の選択に関する新たな機序を明らかにできた。また、CTLが選択する逃避変異の候補を、200種類以上明らかにできた。
- 2) 強力な新規PIであるGRL-0519のHIV-1阻害機序を解明し、更に新規PI, GRL-095-10を同定、解析を行った。
- 3) 6種類の薬剤耐性変異が、HIV-1特異的CTLの認識を障害することを明らかにした。
- 4) *bis*-THF-difluorideといった新規の構造を有するPI群を新たに同定することができた。

7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む) 該当無し