

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

H I V－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

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 滝口 雅文

平成25（2013）年 3月

目 次

I. 総括研究報告書

- 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……………1
研究代表者 滝口 雅文(熊本大学エイズ学研究センター センター長/教授)

II. 分担研究報告書

1. 細胞性免疫・薬剤による HIV-1 変異選択とその耐性機序の解明……………6
滝口 雅文(熊本大学エイズ学研究センター センター長/教授)
2. CTL 逃避変異が薬剤感受性に与える影響の解析……………10
潟永 博之(国立国際医療センター エイズ治療・研究開発センター 治療開発室医長)
3. HIV の遺伝子発現機構に関与する分子を標的とする新規抗 HIV 薬の開発……………14
- 中和抗体エスケープ変異 HIV-1 の CCR5 阻害薬に対する感受性 -
馬場 昌範(鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 教授)
4. 薬剤による変異性獲得の機序と薬剤抵抗性の研究……………20
松岡 雅雄(京都大学ウイルス研究所 教授)
5. 中和抵抗性の解明と中和抗体を用いた併用療法に関する基礎研究……………23
- CCR5 阻害薬耐性 HIV-1 の中和抗体に対する感受性 -
松下 修三(熊本大学エイズ学研究センター 教授)
6. HIV-1 薬剤耐性発現機序の解明と薬剤耐性に対する強力な抗 HIV 阻害剤の研究開発……………28
天野 将之(熊本大学 エイズ学研究センター COEリサーチ・アソシエイト/
熊本大学大学院生命科学研究部 血液内科学分野)
7. NK 細胞による HIV の認識と免疫逃避変異の認識に与える影響に関する研究……………32
前仲 勝実(北海道大学大学院薬学研究院 教授)

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ……………35

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ……………42

I. 総括研究報告書

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

研究代表者: 滝口 雅文(熊本大学 エイズ学研究センター センター長/教授)

研究分担者: 瀧永 博之(国立国際医療研究センター エイズ治療・研究開発センター 治療開発室医長)

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・アソシエイト)

前仲 勝実(北海道大学 大学院薬学研究院 教授)

薬剤耐性ウイルスや免疫逃避変異ウイルスの蓄積が明らかになっており、薬剤治療やワクチンの開発の大きな壁になっている。これらの課題を解決するため、多剤耐性変異ウイルスに対する新たな薬剤の開発を行うと共に、薬剤治療と免疫治療を融合させる新たな治療法の開発のための基盤的研究を行った。その結果、今年度は強力な新規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を同定しその抗HIV機能の機序を明らかにした。また *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。また日本人患者コホートで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、免疫逃避変異の実態を解明できた。更に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。またCCR5阻害剤と中和抗体の相互効果の研究から、中和抗体への抵抗性とCCR5阻害剤に対する耐性が両立し難いことを示した。

A. 研究目的

HAARTにより、多くのHIV患者の予後は改善されたが、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。

B. 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ル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 (PDIs) 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 [瀧永・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・湯永]。

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。

C. 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 HLA-B*52:01 拘束性 CTL により選択されることを示した (J. Virol 2013)[滝口]。また 430 人の無治療、HIV-1 慢性感染者の Gag, Pol, Nef 領域のシーケンスを解析した結果、それぞれの領域を完全にシーケンスできたのは、397 人(92.3 %), 363 人(84.4 %), 306 人(71.2 %)であった。PhyloD を用いて解析し、q 値<0.2、P 値<0.05 を満たす条件で選定した所、Gag で 94 個、Pol で 86 個、Nef で 104 個、計 284 個の HLA-AP を明らかにした。Gag, Pol, Nef の長さは、2:4:1 であることから、明らかに Nef, Gag, Pol の順で HLA-AP の蓄積がみられると考えられた。一方、各 HLA アリールに相関する HLA-AP は、HLA-A, HLA-B, HLA-C がそれぞれ 78, 140, 66 で、HLA-B に相関する HLA-AP が多いことが明らかになった。

[滝口]。

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ところ、8 種のペプチドのうち、4 種はいずれの KIR にも結合せず、残る 4 種は抑制型の KIR2DL2 と最も強く結合することが分かった [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新に見つけた [滝口・湯永]。

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

HIV-1 臨床分離株に対して強い中和活性を持つ、単クローン抗体 KD-247 からのエスケープ変異株について、各種 CCR5 阻害薬に対する感受性について検討した。その結果、KD-247 に対するエスケープ変異 Ba-L 株は、親株と比較して、TAK-779 とその誘導体である cenicriviric に対する感受性が有意に増加していた。しかし、感受性の増加はそれほど顕著なものではなく、TAK-220 と maraviroc に対しては、有意な感受性の増加は認められなかった[馬場]。

V3, CD4i, CD4bs を標的とする抗体を用いた中和試験の結果、親株 KKwt はどの抗体にも中和抵抗性であったが、cenicriviric 耐性株 KK₆₅₂₋₆₇ は全ての抗

体に対し感受性であることが示された。また、*cenicriviroc* 耐性株 KK₆₅₂₋₆₇ より抗 V3 抗体 1C10 に対する耐性誘導を行い、1C10 に対して中和抵抗性を示すエスケープ変異株を得た。この変異株は *cenicriviroc* に対する感受性が親株 KKwt と同程度に回復していた。これらの結果より、中和抗体への抵抗性と CCR5 阻害薬に対する耐性が両立し難いことを示した[松下]。

D. 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。

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。薬剤耐性変異が免疫認識に与える研究、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、

新たに開始した治療薬と免疫を融合したプロジェクトも極めて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。

E. 結論

- 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、284種類以上明らかにできた。
- 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。
- 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。
- 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。
- 中和抗体への抵抗性とCCR5阻害薬に対する耐性が両立し難いことを示した。

F. 健康危険情報

特筆なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

滝口 雅文

- Ladell K*, Hashimoto M*, Iglesias MC*, Wilmann PG*, McLaren JE, Gras S, Chikata T, Kuse N, Fastenackels S, Gostick E, Bridgeman JS, Venturi V, Arkoub ZA, Agut H, van Bockel DJ, Almeida JR, Douek DC, Meyer L, Venet A, Takiguchi M**, Rossjohn J**, Price DA** and Appay V** (* **Equal contribution) A molecular basis for the control of pre-immune escape variants by HIV-specific CD8⁺ T-cells. *Immunity* In press
- Yagita Y*, Kuse N*, Kuroki K*, Gatanaga H, Carlson J.M, Chikata T, Brumme Z.L., 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. (*Equal contribution) Distinct HIV-1 Escape Patterns Selected by CTLs with Identical Epitope Specificity. *J Virol*. In press
- Matthews PC*, Koyanagi M*, Kløverpris HN*, Harndahl M, Stryhn A, Akahoshi T, Gatanaga H, Oka S, Juarez Molina C, Valenzuela Ponce H,

- Avila Rios S, Cole D, Carlson J, Payne RP, Ogwu A, Bere A, Ndung'u T, Gounder K, Chen F, Riddell L, Luzzi G, Shapiro R, Brander C, Walker B, Sewell AK, Reyes Teran G, Heckerman D, Hunter E, Buus S, Takiguchi M, Goulder PJ. (*Equal contribution) Differential Clade-Specific HLA-B*3501 Association with HIV-1 Disease Outcome Is Linked to Immunogenicity of a Single Gag Epitope. *J Virol.* 86(23):12643-54, 2012.
4. ○ Naruto T, Gatanaga H, Nelson G, Sakai K, Carrington M, Oka S, and 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.
 5. ○ Hashimoto M, Akahoshi T, Murakoshi H, Ishizuka N, Oka S, and Takiguchi M. CTL recognition of HIV-1-infected cells via cross-recognition of multiple overlapping peptides from a single 11-mer Pol sequence. *Eur J Immunol.* 42:2621-2631, 2012
 6. Takata H, Naruto T, and Takiguchi M. Functional heterogeneity of human effector CD8⁺ T cells. *Blood* 119:1390-1398, 2012
 7. ○ Akahoshi T, Chikata T, Tamura Y, Gatanaga H, Oka S, and Takiguchi M. Selection and accumulation of an HIV-1 escape mutant by three types of HIV-1-specific CTLs recognizing wild-type and/or escape mutant epitopes. *J Virol.* 86:1971-1981, 2012
 8. 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 T, Kimura A, Takiguchi M, and Matano T. Impact of vaccination on cytotoxic T lymphocyte immunodominance and cooperation against simian immunodeficiency virus replication in rhesus macaques. *J Virol.* 86:738-745, 2012
 9. Sato Y, Nagata S, and Takiguchi M. Effective elicitation of human effector CD8⁺ T cells in HLA-B*51:01 transgenic humanized mice after infection with HIV-1. *PLoS ONE* 7: e42776, 2012
 10. Sun X, Saito M, Sato Y, Chikata T, Naruto T, Ozawa T, Kobayashi E, Kishi H, Muraguchi A, Takiguchi M. Unbiased analysis of TCR α/β chains at the single-cell level in human CD8⁺ T-cell subsets. *PLoS ONE* 7(7) e40386, 2012
 3. Hamada Y, Nishijima T, Watanabe K, Komatsu H, Tsukada K, Teruya K, Gatanaga H, Kikuchi Y, Oka S. High incidence of ranl stones among HIV-infected patients on ritonavir-boosted atazanavir than in those receiving other protease inhibitor-containing antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* 55:1262-1269, 2012
 4. ○ 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
 5. ○ 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 epitopes. *J. Virol.* 86:1971-1981, 2012
 6. Naruto T, Murakoshi H, Chikata T, Koyanagi M, Kawashima Y, Gatanaga H, Oka S, Takiguchi M. Selection of HLA-B57-associated Gag A146P mutant by HLA-B*48:01-restricted gag140-147-specific CTLs in Chronically HIV-1-infected Japanese. *Microbes Infect* 13:766-770, 2012
 7. Tanuma J, Hachiya A, Ishigaki K, Gatanaga H, Lien NV, Kinh NV, Kaku M, Oka S. Impact of CRF01_AE-specific polymorphic mutations G335D and A371V in the connection subdomain of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase (RT) on susceptibility to nucleoside RT inhibitors. *Microbes Infect* 12:1170-1177, 2012
- 馬場昌範
1. ○ Hamasaki T, Okamoto M, Baba M. Identification of novel inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 replication by in silico screening targeting cyclin T1/Tat interaction. *Antimicrob. Agents Chemother.* in press.
 2. ○ Chande AG, Baba M, and Mukhopadhyaya R. A single step assay for rapid evaluation of inhibitors targeting HIV type 1 Tat mediated long terminal repeat transactivation. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 28: 902-906, 2012.
 3. Sohl CD, Kasiviswanathan R, Kim J, Pradere U, Schinazi RF, Copeland WC, Mitsuya H, Baba M, and Anderson KS. Balancing antiviral potency and host toxicity: identifying a nucleotide inhibitor with an optimal kinetic phenotype for HIV-1 reverse transcriptase. *Mol. Pharmacol.* 82: 125-133, 2012.
 4. Toyama M, Hamasaki T, Uto T, Aoyama H, Okamoto M, Hashimoto Y, and Baba M. Synergistic inhibition of HTLV-1-infected cell proliferation by combination of cepharanthine and a tetramethylnaphthalene derivative. *Anticancer Res.* 32: 2639-2646, 2012.
 5. ○ Ordonez P, Hamasaki T, Isono Y, Sakakibara N, Ikejiri M, Maruyama T, and Baba M. Anti-human immunodeficiency virus type 1 activity of novel 6-substituted 1-benzyl-3-(3,5-dimethylbenzyl)uracil derivatives. *Antimicrob Agents Chemother.* 56: 2582-2589, 2012.
- 湯永博之
1. ○ Matthews PC, Koyanagi M, Kloverpris HN, Harndahl M, Stryhn A, Akahoshi T, Gatanaga H, Oka S, Juarez Molina C, Valenzuela Ponce H, Avila Rios S, Cole D, Carlson J, Payne RP, Ogwu A, Bere A, Ndung'u T, Gounder K, Chen F, Riddell L, Luzzi G, Shapiro R, Brander C, Walker B, Sewell AK, Reyes Teran G, Heckerman D, Hunter E, Buus S, Takiguchi M, Goulder PJ. Differential clade-specific HLA-B*5301 association with HIV-1 disease outcome is linked to immunogenicity of a single gag epitope. *J. Virol.* 86:12643-12654, 2012
 2. 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

松岡雅雄

1. Ma G, Yasunaga J-I, Fan J, Yanagawa S and Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor dysregulates the Wnt pathways to support proliferation and migration of adult T-cell leukemia cells. *Oncogene*. In press.
2. ○ Tanaka G, Nakase I, Fukuda Y, Masuda R, Oishi S, Shimura K, Kawaguchi Y, Takatani-Nakase T, Langel U, Gräslund A, Okawa K, Matsuoka M, Fujii N, Hatanaka Y, Futaki S. CXCR4 Stimulates Macropinocytosis: Implications for Cellular Uptake of Arginine-Rich Cell-Penetrating Peptides and HIV. *Chem Biol*. 19(11):1437-46, 2012.
3. Mizuhara T, Oishi S, Ohno H, Shimura K, Matsuoka M, Fujii N. Structure-activity relationship study of pyrimido[1,2-c][1,3]benzothiazin-6-imine derivatives for potent anti-HIV agents. *Bioorg Med Chem*. 20(21):6434-41, 2012.
4. Mizuhara T, Oishi S, Ohno H, Shimura K, Matsuoka M, Fujii N. Concise synthesis and anti-HIV activity of pyrimido[1,2-c][1,3]benzothiazin-6-imines and related tricyclic heterocycles. *Org Biomol Chem*. 10(33):6792-802, 2012.
5. Sugata K, Satou Y, Yasunaga JI, Hara H, Ohshima K, Utsunomiya A, Mitsuyama M, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor impairs cell-mediated immunity by suppressing production of Th1 cytokines. *Blood* 119:434-44, 2012.

松下修三

1. ○ Harada S, Yoshimura K, Yamaguchi A, Yusa K, Matsushita S. Impact of antiretroviral pressure on selection of primary HIV-1 envelope sequences in vitro. *J. Gen. Virol*. In press.
2. ○ Yokoyama M, Naganawa S, Yoshimura K, Matsushita S, Sato H. Structural Dynamics of HIV-1 Envelope Gp120 Outer Domain with V3 Loop. *PLoS ONE* 7(5): e37530, 2012.

天野将之

1. Masayuki Amano, Yasushi Tojo, Pedro Miguel Salcedo-Gómez, Joseph Richard Campbell, Debananda Das, Manabu Aoki, Chun-Xiao Xu, Kalapala Venkateswara Rao, Arun K. Ghosh, and Hiroaki Mitsuya. (2013) GRL-0519, A Novel Oxatricyclic-Ligand-Containing Nonpeptidic HIV-1 Protease Inhibitor (PI), Potently Suppresses The Replication of a Wide Spectrum of Multi-PI-Resistant HIV-1 Variants In Vitro. *Antimicrob Agents Chemother*. 57:2036-2046.
2. Aoki, M., Danish, M.L., Aoki-Ogata, H., Amano, M., Ide, K., Koh, Y, and Mitsuya, H. (2012) Loss of protease dimerization inhibition activity of tipranavir (TPV) is associated with HIV-1 acquisition of resistance to TPV. *J. Virol*. 86(24):13384-13396.
3. ○ Ghosh AK, Chapsal BD, Steffey M, Agniswamy J, Wang Y-F, Amano M, Weber IT, Mitsuya H. Substituent effects on P2-cyclopentyltetrahydrofuranylethanes: Design, synthesis, and X-ray studies of potent

HIV-1 protease inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 22(6): 2308-2311, 2012

前仲勝実

1. ○ Yagita Y, Kuse N, Kuroki K, Gatanaga H, Carlson J.M, Chikata T, Brumme Z.L., 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 the press.
2. Otsuki N, Sekizuka T, Seki F, Sakai K, Kubota T, Nakatsu Y, Chen S, Fukuhara H, Maenaka K, Yamaguchi R, Kuroda M, Takeda M. Canine distemper virus with the intact C protein has the potential to replicate in human epithelial cells by using human nectin4 as a receptor. *Virology* In the press.
3. Tahara M, Ito Y, Brindley MA, Ma X, He J, Xu S, Fukuhara H, Sakai K, Komase K, Rota PA, Plemper RK, Maenaka K, Takeda M. Functional and structural characterization of neutralizing epitopes of measles virus hemagglutinin protein. *J Virol*. In the press.
4. Pratakipriya W, Seki F, Otsuki N, Sakai K, Fukuhara H, Katamoto H, Hirai T, Maenaka K, Techangamsuwan S, Lan NT, Takeda M, Yamaguchi R. Nectin4 is an epithelial cell receptor for canine distemper virus and involved in neurovirulence. *J Virol*. 86(18):10207-10, 2012
5. Giles J, Shaw J, Piper C, Wong-Baeza I, McHugh K, Ridley A, Li D, Lenart I, Antoniou AN, Digleria K, Kuroki K, Maenaka K, Bowness P, Kollnberger S. HLA-B27 Homodimers and Free H Chains Are Stronger Ligands for Leukocyte Ig-like Receptor B2 than Classical HLA Class I. *J Immunol*. 188(12): 6184-93, 2012
6. Yoshida S, Mohamed RH, Kajikawa M, Koizumi J, Tanaka M, Fugo K, Otsuka N, Maenaka K, Yagita H, Chiba H, Kasahara M. Involvement of an NKG2D Ligand H60c in Epidermal Dendritic T Cell-Mediated Wound Repair. *J Immunol*. 188(8):3972-9, 2012

2. 学会発表
各分担報告書に記載。

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）
該当無し。

Ⅱ. 分担研究報告書

細胞性免疫・薬剤による HIV-1 変異選択とその耐性機序の解明

研究分担者 滝口 雅文 （熊本大学エイズ学研究センター 教授）

研究協力者 久世 望 （熊本大学エイズ学研究センター 研究員）

研究要旨 日本人において CTL から逃避するウイルス変異を網羅的に解析するため、430 人の無治療、HIV-1 慢性感染者を用いた HLA associated polymorphism (HLA-AP)の解析を行い、284 個の HLA-AP を明らかにした。このうち、Pol の HLA-AP 数と VL に負の相関がみられ、日本人では CTL による選択で蓄積される Pol 内の変異がウイルス増殖を低下させていると推定された。薬剤耐性変異が CTL の認識に与える影響の解析では、2種類の Protease 阻害剤変異 (Pro 82)が、HLA-A*0201 拘束性 Pol131-140 特異的 CTL の認識を低下させた。薬剤治療の失敗により蓄積される薬剤耐性変異の蓄積は、HIV-1 の病原性の増大に繋がると考えられる。

A. 研究目的

最近の我々の研究により、いくつかの強いHIV増殖抑制能をもったCTLからの逃避するウイルスの蓄積が世界的レベルで明らかになった。そこで日本人においてCTLから逃避するウイルス変異を網羅的に解析するために、日本人HIV感染者のHIV-1のシーケンス解析を行い、HALアリアルと関連するHIV-1の変異を解析する。これらのうちから実際CTLからの逃避変異になっているものを明らかにする。また、知られた薬剤耐性変異がCTLの認識にどのような影響をうけるかを解析し、薬剤により誘導された耐性変異がどの程度感染者のHIV-1特異的CTLの免疫能に影響を与えるかを明らかにする。

B. 研究方法

1. HLA associated polymorphism (HLA-AP)の解析

2008 年から 2011 年までにリクルートした 430 人の無治療、HIV-1 慢性感染者のGag, Nef, Pol領域のシーケンスを解析、またHLA class Iのアリアルを解析した。これらのデータから、それぞれのHLAアリアルに関連する変異(HLA-AP)をphylogenetically corrected logistic regression model (PhyloD)を用いて、解析し明らかにする。

2. 薬剤耐性変異がCTLの認識に与える影響の解析

報告されている CTL のエピトープ上にある薬剤耐性変異を持った変異エピトープペプチドを作成し、このペプチドに対する CTL の認識を調べる。また、変異を持った HIV-1 ウイルスを作製して、これらの変異ウイルス感染細胞に対する CTL の認識を調べる。

(倫理面への配慮)

患者の血液の使用については、インフォームドコンセントをおこない書面にて承諾を得た。さらに、国立国際医療センターおよび熊本大学の倫理委員会での承認を得た。

C. 研究結果

1. HLA associated polymorphism (HLA-AP)の解析

430 人の無治療、HIV-1 慢性感染者の Gag, Pol, Nef 領域のシーケンスを解析した結果、それぞれの領域を完全にシーケンスできたのは、397 人 (92.3 %), 363 人 (84.4 %), 306 人 (71.2 %)であった。PhyloD を用いて解析し、q値<0.2、P 値<0.05 を満たす条件で選定した所、Gag で 94 個、Pol で 86 個、Nef で 104 個、計 284 個の HLA-AP を明らかにした。Gag, Pol, Nef の長さは、2:4:1 であることから、明らかに Nef, Gag, Pol の順で HLA-AP の蓄積がみられると考えられた。一方、各 HLA アリアルに関連する HLA-AP は、HLA-A, HLA-B, HLA-C がそれぞれ 78, 140, 66 で、HLA-B に関連する HLA-AP が多いことが明らかになった(表 1)。

表 1：日本人 HIV-1 感染者における HLA-AP

Table1. Number of HLA-APs in HIV-1 Gag, Pol, and Nef in the Japanese cohort

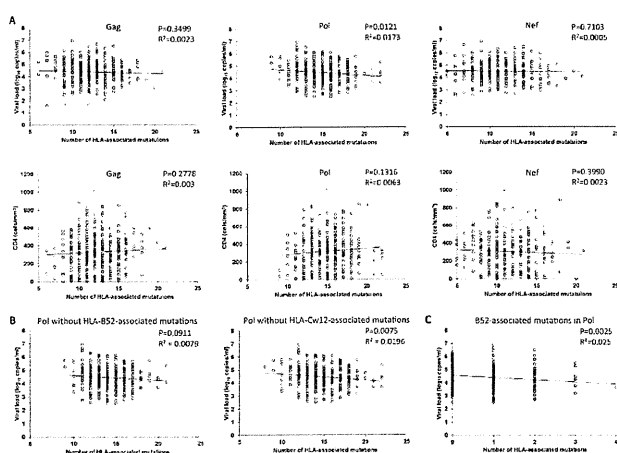
Gene	HLA-A-associated polymorphism		HLA-B-associated polymorphism		HLA-C-associated polymorphism		Total
	Adapted	Nonadapted	Adapted	Nonadapted	Adapted	Nonadapted	
GAG	12	15	26	24	8	9	94
POL	11	8	23	22	14	8	86
NEF	17	15	21	24	11	16	104
Total	40	38	70	70	33	33	284

Adapted: amino acids are abundant in the "presence" of a given HLA allele.

Nonadapted: amino acids are abundant in the "absence" of a given HLA allele.

次に HLA-AP の数と患者のウイルス量(VL)と CD4 との相関を解析した。その結果それぞれの患者が持っている Pol における変異数と VL に有意な逆相関がみられ、また CD4 に対する相関の傾向が見られた(図1A)。我々以前に日本人の HLA と患者の VL, CD4 数との相関に関する解析を行ったところ、HLA-B*67:01 と HLA-B*52:01-Cw*12:02 ハプロタイプは、VL と CD4 数両方で有意な相関がみられ、日本人において予後が良い HLA であることを明らかにした。そこで、Pol 上に見られる HLA-AP でこれらの HLA に相関しているものを調べたところ、HLA-B*67:01 に相関したものは全く見られなかったが、HLA-B*52:01 と HLA-Cw*12:02 に相関したものはそれぞれ4か所、1か所見られた。これらの HLA-AP を除いた解析を行ったところ、Cw*12:02 に相関した HLA-AP を除いても変化が見られなかったが、HLA-B*52:01 に相関した HLA-AP を除いたところ VL と負の相関がみられなくなった(図1B)。これらのことから HLA-B*52:01 に相関した HLA-AP は患者の VL の低下に関与していると考えられた。実際4つの HLA-B*52:01 に相関した HLA-AP は、VL との負の相関があることが明らかになった(図1C)。

図1. HLA-AP と患者の VL, CD4 数との相関



2. 薬剤耐性変異がCTLの認識に与える影響の解析

1つの Integrase 阻害剤耐性変異(Int 92)、1つの Protease 阻害剤変異(Pro 82)、CTL の認識に及ぼす変異を解析した。

Int92 は、HLA-B*40:02 拘束性 Pol 807-817 特異的 CTL エピトープの1番目のアミノ酸がEからQへの変異であり、この変異エピトープペプチドに対する認識を調べたところ、約10倍のペプチド濃度での認識の低下がみられた。この1Q変異を持った変異ウイルス

スを作製し、感染細胞への CTL の認識を調べたところ、軽度の認識の低下がみられた。

次に Pro82 の変異に関して調べた。この場所は、HLA-A*0201 拘束性 Pol131-140 特異的 CTL エピトープの8番目の部位に当たり、Protease 阻害剤に対する3種類のアミノ酸の耐性変異が知られている。この3種類の変異エピトープペプチドに対する HLA-A*0201 拘束性 Pol131-140 特異的 CTL の認識を調べたところ、2つの変異(8T,8S)に対しては明らかな認識の低下がみられた。現在変異ウイルスの作製を行っており、変異ウイルス感染細胞の認識を調べる予定である。

D. 考察

430 人の無治療、HIV-1 慢性感染者を用いた HLA associated polymorphism (HLA-AP)の解析では、初めてアジア人で網羅的に HLA-AP を明らかにすることができた。明らかにした284個の HLA-AP の多くのは、CTL からの逃避変異として報告されておらず、またその部位が相関を示した HLA に拘束するエピトープとしても報告されていず、このことから多くの未知のエピトープが多く存在することが予想される。今後これらのデータを利用して、逃避変異を網羅的に明らかにしていく予定である。

Pol における変異数と VL に有意な逆相関がみられたことから、CTL による選択で蓄積される Pol 内の変異がウイルス増殖を低下させていると推定された。特に4つの HLA-B*52:01 に相関した Pol 内の4つの HLA-AP は、VL との負の相関があるので、ウイルス増殖を低下に関わる重要な変異と考えられる。

Integrase 阻害剤耐性変異(Int 92)と Protease 阻害剤変異(Pro 82)に関して HLA-B*40:02 拘束性 Pol 807-817 特異的 CTL と HLA-A*0201 拘束性 Pol131-140 特異的 CTL の認識に与える影響を調べたが、後者において Indinavir, Nelfinavir, Atazanavir による2種類の耐性変異が Pol131-140 特異的 CTL の認識を低下させることが、明らかになった。今後解析を広げ Reverse Transcriptase 阻害剤耐性変異の解析を、25年度は行う予定である。

E. 結論

1. 430 人の無治療、HIV-1 慢性感染者を用いた HLA associated polymorphism (HLA-AP)の解析で、284 個の HLA-AP を明らかにした。

2. Pol の HLA-AP 数と VL に負の相関がみられ、日本人では CTL による選択で蓄積される Pol 内の変異がウイルス増殖を低下させていると推定された。

3. 2 種類の Protease 阻害剤変異 (Pro 82) が、HLA-A*0201 拘束性 Pol131-140 特異的 CTL の認識を低下させた。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Tomohiro Akahoshi, Takayuki Chikata, Yoshiko Tamura, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka, and **Masafumi Takiguchi**, Selection and accumulation of an HIV-1 escape mutant by three types of HIV-1-specific CTLs recognizing wild-type and/or escape mutant epitopes. **J. Virol.** 86:1971-1981, 2012.

2) Takuya Naruto, Hiroyuki Gatanaga, George Nelson, Keiko Sakai, Mary Carrington, Shinichi Oka, and **Masafumi Takiguchi**, 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

3) Hilippa C. Matthews*, Madoka Koyanagi*, Henrik N. Kløverpris*, Mikkel Harndahl, Anette Stryhn, Tomohiro Akahoshi, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka, Claudia Juarez Molina, Humberto Valenzuela Ponce, Santiago Avila Rios, David Cole, Jonathan Carlson, Rebecca P. Payne, Anthony Ogwu, Alfred Bere, Thumbi Ndung'u, Kamini Gounder, Fabian Chen, Lynn Riddell, Graz Luzzi, Roger Shapiro, Christian Brander, Bruce Walker, Andrew K Sewell, Gustavo Reyes Teran, David Heckerman, Eric Hunter, Søren Buus, **Masafumi Takiguchi**, and Philip J. R. Goulder (*Equal contribution), Differential clade-specific HLA-B*3501 association with HIV-1 disease outcome is linked to immunogenicity of a single Gag epitope, **J. Virol.** 86: 12643-12654, 2012

4) Yuichi Yagita, Nozomi Kuse, Kimiko Kuroki*, Hiroyuki Gatanaga, Jonathan M. Carlson, Takayuki Chikata, Zabrina L. Brumme, Hayato Murakoshi, Tomohiro Akahoshi, Nico Pfeifer, Simon Mallal, Mina John, Toyoyuki Ose, Haruki Matsubara, Ryo Kanda, Yuko Fukunaga, Kazutaka Honda, Yuka Kawashima, Yasuo Ariumi, Shinichi Oka, Katsumi

Maenaka, and **Masafumi Takiguchi**, Distinct HIV-1 Escape Patterns Selected by CTLs with Identical Epitope Specificity, **J. Virol.** 87:2253-2263, 2013

2. 国際学会での発表

1) Yuichi Yagita, Nozomi Kuse, Kimiko Kuroki, Hiroyuki Gatanaga, Jonathan M. Carlson, Takayuki Chikata, Zabrina L. Brumme, Tomohiro Akahoshi, Nico Pfeifer, Simon Mallal, Mina John, Toyoyuki Ose, Haruki Matsubara, Ryo Kanda, Yuko Fukunaga, Yuka Kawashima, Yasuo Ariumi, Shinichi Oka, Katsumi Maenaka, and **Masafumi Takiguchi**, Selection and Accumulation of Distinct HIV-1 Immune Escape Patterns by CTLs with Identical Epitope Specificity but Different HLA class I Restrictions, Cell Symposia Human Immunity (Lisbon, Portugal) August 19-21, 2012

2) Keiko Sakai, Takuya Naruto, Hiroyuki Gatanaga, Mary Carrington, Shinichi Oka, and **Masafumi Takiguchi**, The Impact of HLA-Class-I-Mediated Control of HIV-1 in a Japanese Cohort, Cell Symposia Human Immunity (Lisbon, Portugal) August 19-21, 2012

3) Madoka Koyanagi, Kazutaka Honda, Takayuki Chikata, Tomohiro Akahoshi, Hayato Murakoshi, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka, and **Masafumi Takiguchi**, The impact of HLA-Cw*12:02 on control of HIV-1 infection, AIDS Vaccine 2012 (Boston, USA) September 9-12, 2012

4) Hayato Murakoshi, Madoka Koyanagi, Hiroyuki Gatanaga, Takuya Naruto, Shinichi Oka, and **Masafumi Takiguchi**, Control of HIV-1 by multiple immunodominant HIV-1-specific CD8+ T cells in HIV-1-infected Japanese individuals, AIDS Vaccine 2012 (Boston, USA) September 9-12, 2012

5) Takayuki Chikata, Jonathan M Carlson, Yoshiko Tamura, Zabrina L. Brumme, Takuya Naruto, Masao Hashimoto, Mohamed Ali Borghan, Simon Mallal, Mina John, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka, and **Masafumi Takiguchi**, HLA-Associated Viral Polymorphism in Chronically HIV-1-Infected Japanese Cohort: Analysis of Four-Digit HLA Allele Level, AIDS Vaccine 2012 (Boston, USA) September 9-12, 2012

6) **Masafumi Takiguchi**, Control of HIV-1 by CD8+ T cells in Japanese individuals, 13th KUMAMOTO AIDS Seminar-GCOE Joint International Symposium (Kumamoto, Japan) October 24-26, 2012

7) Keiko Sakai, Takuya Naruto, Hiroyuki Gatanaga, Mary N. Carrington, Shinichi Oka, **Masafumi**

Takiguchi, The Impact of HLA-Class-I-Mediated Control of HIV-1 in a Japanese Cohort, 13th KUMAMOTO AIDS Seminar-GCOE Joint International Symposium (Kumamoto, Japan) October24-26, 2012

8) Madoka Koyanagi, Hayato Murakoshi, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka, and **Masafumi Takiguchi**, The control of HIV-1 by multiple HIV-1 epitope-specific CD8⁺ T cell responses in HLA-B*35:01-positive subjects infected with the clade B virus, 13th KUMAMOTO AIDS Seminar-GCOE Joint International Symposium (Kumamoto, Japan) October24-26, 2012

9) Hayato Murakoshi, Madoka Koyanagi, Hiroyuki Gatanaga, Takuya Naruto, Shinichi Oka, and **Masafumi Takiguchi**, Control of HIV-1 by multiple HIV-1 immunodominant epitope-specific CD8⁺ T cells in HIV-1-infected Japanese individuals, 13th KUMAMOTO AIDS Seminar-GCOE Joint International Symposium (Kumamoto, Japan) October24-26, 2012

10) Yoshinori Sato, Sayaka Nagata, and **Masafumi Takiguchi**, Analysis of human CD8⁺ T cells in HLA-B*51:01 transgenic humanized mice after infection with HIV-1, 13th KUMAMOTO AIDS Seminar-GCOE Joint International Symposium (Kumamoto, Japan) October24-26, 2012

11) Nozomi Kuse, Yuichi Yagita, Kimiko Kuroki, Hiroyuki Gatanaga, Jonathan M. Carlson, Takayuki Chikata, Zabrina L. Brumme, Tomohiro Akahoshi, Nico Pfeifer, Simon Mallal, Mina John, Toyoyuki Ose, Haruki Matsubara, Ryo Kanda, Yuko Fukunaga, Yuka Kawashima, Yasuo Ariumi, Shinichi Oka, Katsumi Maenaka, and **Masafumi Takiguchi**, Distinct HIV-1 Escape Patterns Selected by CTLs with Identical Epitope Specificity, 13th KUMAMOTO AIDS Seminar-GCOE Joint International Symposium (Kumamoto, Japan) October24-26, 2012

12) Xiaoming Sun, Mamoru Fujiwara, Nozomi Kuse, Shinichi Oka, and **Masafumi Takiguchi**, Dual recognition of HIV-1-infective cells and selection of escape mutant virus by Cytotoxic T cells recognizing overlapping 8-mer and 10-mer Nef peptide, 13th KUMAMOTO AIDS Seminar-GCOE Joint International Symposium (Kumamoto, Japan) October24-26, 2012

13) Takayuki Chikata, Jonathan M Carlson, Yoshiko Tamura, Zabrina L. Brumme, Mohamed Ali Borghan, Takuya Naruto, Masao Hashimoto, Simon Mallal, Mina John, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka,

and **Masafumi Takiguchi**, HLA-Associated Viral Polymorphism in Chronically HIV-1-clade B-Infected Japanese Individuals: Analysis of Four-Digit HLA Allele Level, 13th KUMAMOTO AIDS Seminar-GCOE Joint International Symposium (Kumamoto, Japan) October24-26, 2012

H. 知的所有権の出願・取得状況

該当なし

研究分担者：潟永 博之（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 治療開発室医長

研究要旨 近年、HIV-1 Pol 領域に存在する CTL エピトープが次々と明らかになっており、CTL 逃避変異の薬剤感受性に与える影響が注目を浴びてきている。また、新規の非核酸系逆転写酵素阻害薬である rilpivirine が本邦でも臨床導入されたが、ウイルス学的な治療失敗に伴う耐性変異の出現頻度が多いことが注目されているため、以下の二つの項目の研究課題を行った。

① 「HLA-B*51 拘束性 CTL の HIV-1 逆転写酵素領域の逃避変異 I135X の rilpivirine 耐性変異出現への影響の解析」

未治療の日本人感染者に見られる HIV-1 逆転写酵素領域の I135X の中でも特に頻度の多い I135T と I135L について、rilpivirine 耐性変異出現への影響を解析する目的で、rilpivirine 1nM 存在下で I135T、I135L のそれぞれを有する組み替え HIV-1 を MT-2 細胞に感染させ培養を繰り返し、徐々に rilpivirine 濃度を上げ、1000nM に到達させることができた。今後は出現した変異について解析する予定である。

② 「未治療感染者に見られる HIV-1 逆転写酵素領域の多型的変異の rilpivirine 感受性への影響の解析」。

未治療感染者 1107 人の HIV-1 逆転写酵素の 138 番目のアミノ酸を調べたところ、1099 人 (99.28%) で E であったが、E138G が 3 人 (0.27%)、E138A が 3 人 (0.27%)、E138K が 2 人 (0.18%) に見られた。組み替え HIV-1 を作成してこれらの変異の rilpivirine 感受性への影響を調べたところ、E138G が 5.1 倍、E138A が 7.1 倍、E138K が 2.7 倍の耐性を付与していた。今後は、これらの変異と関連する CTL について解析する予定である。

A. 研究目的

HIV-1 は、HLA 拘束性 CTL から逃避する変異を獲得し、CTL の選択圧の下でも増殖し得る。CTL 逃避変異が viral fitness をあまり落とさない場合、その逃避変異は、当該 HLA を持たない宿主に伝播した後も存続し続け、集団内の HLA に適応して広がっていくことが知られている。現在の抗 HIV-1 薬の多くが Pol 蛋白をそのターゲットとしており、また近年、HIV-1 Pol 領域に存在する CTL エピトープが次々と明らかになっており、CTL 逃避変異の薬剤感受性に与える影響が注目を浴びてきている。また、平成 24 年から新規の非核酸系逆転写酵素阻害薬である rilpivirine が本邦でも臨床導入され、その有害事象の少なさから投与症例数が増しているが、同じ非核酸系逆転写酵素阻害薬である efavirenz よりもウイルス学的な治療失敗に伴う耐性変異の出現頻度が多いことが臨床試験で明らかにされており、注意を要するところである。

これらの状況を鑑みて本研究では以下の二つの項目を目標とする。①「HLA-B*51 拘束性 CTL の HIV-1 逆転写酵素領域の逃避変異 I135X の rilpivirine 耐性変異出現への影響の解析」②「未治療感染者に見られる HIV-1 逆転写酵素領域の多型的変異の rilpivirine 感受性への影響の解析」。

B. 研究方法

①「HLA-B*51 拘束性 CTL の HIV-1 逆転写酵素領域の逃避変異 I135X の rilpivirine 耐性変異出現への影響の解析」未治療の日本人感染者に見られる HIV-1 逆転写酵素領域の I135X の中でも特に頻度の多い I135T と I135L について、rilpivirine 耐性変異出現への影響を解析する。rilpivirine 低濃度存在下で I135T、I135L のそれぞれを有する組み替え HIV-1 を MT-2 細胞に感染させ培養を繰り返し、徐々に rilpivirine 濃度を上げ、

rilpivirine 耐性 HIV-1 を in vitro で誘導し、出現する耐性変異を解析する。

③ 「未治療感染者に見られる HIV-1 逆転写酵素領域の多型的変異の rilpivirine 感受性への影響の解析」臨床試験で rilpivirine 治療失敗例には、HIV-1 逆転写酵素領域に E138K が共通して出現することが明らかになっているため、未治療感染者に見られる E138 の variation の頻度、その非核酸系逆転写酵素阻害薬感受性への影響、CTL との関連、について解析する。

（倫理面の配慮）

国立国際医療研究センターの患者の HLA と HIV-1 シークエンスを解析することとなるため、国立国際医療研究センターの倫理委員会において承認を得た。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。個人情報保護のため、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。

C. 研究結果

① 「HLA-B*51 拘束性 CTL の HIV-1 逆転写酵素領域の逃避変異 I135X の rilpivirine 耐性変異出現への影響の解析」I135T、I135L のそれぞれを有する組み替え HIV-1 を rilpivirine 1nM 存在下で triplicate で MT-2 細胞に感染させ培養を繰り返し、徐々に rilpivirine 濃度を上げ、1000nM に到達させることができた。

② 「未治療感染者に見られる HIV-1 逆転写酵素領域の多型的変異の rilpivirine 感受性への影響の解析」未治療感染者 1107 人の HIV-1 逆転写酵素の 138 番目のアミノ酸を調べたところ、1099 人 (99.28%) で E であったが、E138G が 3 人 (0.27%)、E138A が 3 人 (0.27%)、E138K が 2 人 (0.18%) に見られた。組み替え HIV-1 を作成して、rilpivirine 感受性を調べたところ、E138G が 5.1 倍、E138A が 7.1 倍、E138K が 2.7 倍の耐性を付与していた。コンピューターによる構造解析でも、wild-type である E138 の側鎖は、K101 と salt bridge を形成し、安定した rilpivirine との結合を可能にする (図 A) が、E138G や E138A に置換すると salt bridge が形成されず、rilpivirine との間に gap

が生じ、結合を脆弱なものにする (図 B) ため、rilpivirine への感受性を減弱することが示唆された。

D. 考察

HLA-B*51 拘束性 CTL の逃避変異を持つ HIV-1 から rilpivirine 耐性ウイルスを誘導することに成功した。今後、出現した耐性変異とその薬剤感受性に対する影響を解析する予定である。

少ない頻度ではあるが、未治療感染者に、E138G、E138A、E138K の変異を認め、これらは rilpivirine に有意な耐性を付与していた。平成 25 年度は、138 番のアミノ酸変異と CTL の関連について解析する予定である。

E. 結論

「HLA-B*51 拘束性 CTL の HIV-1 逆転写酵素領域の逃避変異 I135X の rilpivirine 耐性変異出現への影響の解析」、「未治療感染者に見られる HIV-1 逆転写酵素領域の多型的変異の rilpivirine 感受性への影響の解析」とともに順調に進展が見られている。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Akahoshi T, Chikata T, Tamura Y, Gatanaga H, Oka S, Takiguchi M. Selection and accumulation of an HIV-1 escape mutant by three types of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes recognizing wild-type and/or escape mutant epitopes. *Journal of Virology* 2012 Vol. 86 (1971-1981)
2. 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. *Biochemical Biophysical Research Communications* 2012 Vol. 421 (291-295)
3. 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. Journal of Virology 2012 Vol. 86 (10870-10872)

4. Matthews PC, Koyanagi M, Kloverpris HN, Harndahl M, Stryhn A, Akahoshi T, Gatanaga H, Oka S, Juarez Molina C, Valenzuela Ponce H, Avila Rios S, Cole D, Carlson J, Payne RP, Ogwu A, Bere A, Ndung'u T, Gounder K, Chen F, Riddell L, Luzzi G, Shapiro R, Brander C, Walker B, Sewell AK, Reyes Teran G, Heckerman D, Hunter E, Buus S, Takiguchi M, Goulder PJ. Differential clade-specific HLA-B*3501 association with HIV-1 disease outcome is linked to immunogenicity of a single Gag epitope. Journal of Virology 2012 Vol. 86 (12643-12654)
5. 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. Journal of Virology 2013 Vol. 87 (2253-2263)

2. 学会発表

1. 湯永博之. HIV 感染症の現状と将来の展望 第 86 回日本感染症学会総会・学術講演会 2012 年 4 月 長崎
2. 湯永博之. HIV 感染症の治療ガイドライン Update—ガイドラインに基づいた治療の実際 第 86 回日本感染症学会総会・学術講演会 2012 年 4 月 長崎
3. 湯永博之. 最新の情報を明日の臨床に活かす—Year in Review 2012— 第 26

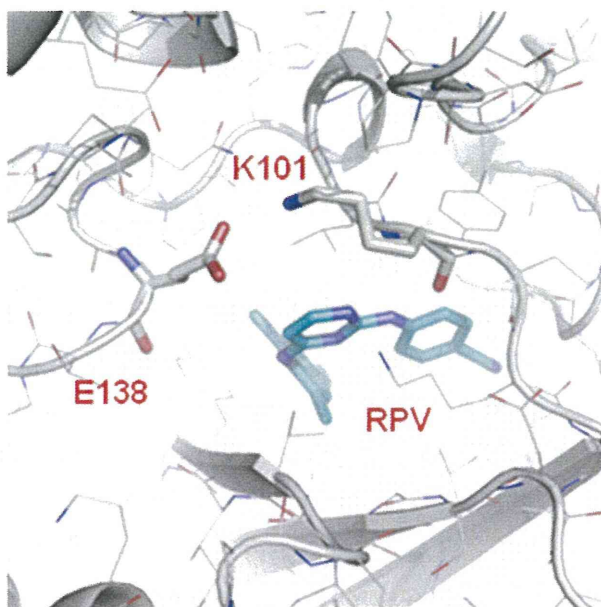
回日本エイズ学会総会・学術集会 2012 年 11 月 横浜

4. 湯永博之. NNRTI—その充実と今後の展望を考える 第 26 回日本エイズ学会総会・学術集会 2012 年 11 月 横浜
5. 小柳円、赤星智寛、Philippa Matthews、Henrik Kloverpris、湯永博之、岡慎一、Philip Goulder、滝口雅文. サブタイプの異なる HIV-1 感染者の予後を左右する細胞障害性 T 細胞の解析 第 26 回日本エイズ学会総会・学術集会 2012 年 11 月 横浜
6. 成戸卓也、湯永博之、Nelson George、阪井恵子、Carrington Mary、岡慎一、滝口雅文. 日本人集団における HLA クラス I アレルの HIV-1 ウイルス制御の解析 第 26 回日本エイズ学会総会・学術集会 2012 年 11 月 横浜
7. 服部純子、湯永博之、渡辺大、長島真美、貞升健志、近藤真規子、南留美、吉田繁、森治代、内田和江、椎野禎一郎、加藤真吾、千葉仁志、佐藤武幸、上田敦久、石ヶ坪良明、古賀一郎、太田康男、山元泰之、福武勝幸、古賀道子、岩本愛吉、西澤雅子、岡慎一、伊部史朗、松田昌和、林田庸総、横幕能行、上田幹夫、大家正義、田邊嘉也、白阪琢磨、小島洋子、藤井輝久、高田昇、山本政弘、松下修三、藤田次郎、健山正男、杉浦互. 新規 HIV/AIDS 診断症例における薬剤耐性 HIV の動向 第 26 回日本エイズ学会総会・学術集会 2012 年 11 月 横浜

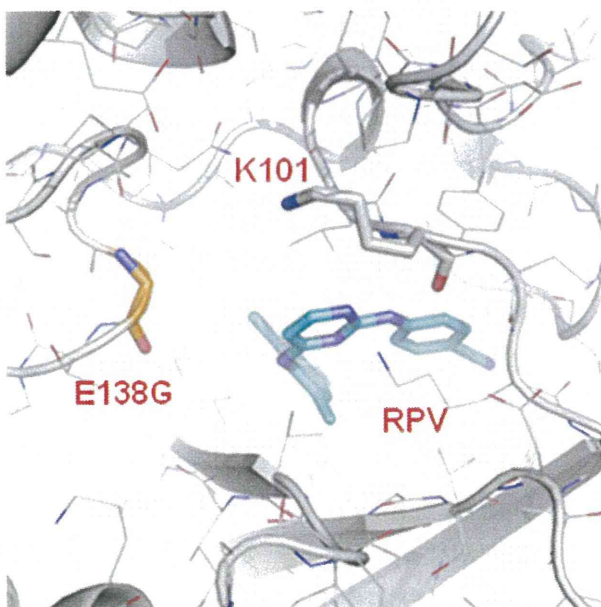
H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

(A)



(B)



中和抗体エスケープ変異 HIV-1 の CCR5 阻害薬に対する感受性

分担研究者 馬場昌範 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 教授

研究協力者 岡本実佳 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 講師

濱崎隆之 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 特任研究員

研究要旨：中和抗体と CCR5 阻害薬の併用による、新たなエイズ治療の可能性を探ることを目的として、HIV-1 臨床分離株に対して強い中和活性を持つ、単クローン抗体 KD-247 からのエスケープ変異株について、各種 CCR5 阻害薬に対する感受性について検討した。その結果、KD-247 に対するエスケープ変異 Ba-L 株は、親株と比較して、TAK-779 とその誘導体である cenicriviric に対する感受性が有意に増加していた。しかし、感受性の増加はそれほど顕著なものではなく、TAK-220 と maraviroc に対しては、有意な感受性の増加は認められなかった。今後は JR-FL 変異株や臨床分離株など、異なる R5 HIV-1 株を用いて同様の実験を行うとともに、cenicriviroc に対する耐性誘導を行い、KD-247 と cenicriviroc の併用による、新たな ART の可能性を明らかにする予定である。

A. 研究目的

これまでの精力的な研究開発により、HIV-1 ライフサイクルの様々なステップで阻害する薬剤の開発に成功し、その結果、現在の抗エイズ療法（antiretroviral therapy ; ART）は、エイズ患者の予後を著しく改善した。一方で、既存の抗エイズ薬は、患者の体内からウイルスを完全に排除できないことから、患者はエイズの発症を防ぐために、一生にわたり服薬を続けなければならない。HIV-1 はそのライフサイクルにおいて高頻度に変異を起こすことから、長期間にわたる治療は、薬剤耐性ウイルスの出現による薬効の減弱が危惧されている。また、ある薬剤に対して耐性を獲得した HIV-1 は、同じカテゴリーに属する他の薬剤に対しても交叉耐性を持つことが多く、この場合は使用可能な薬剤が大幅に制限される。一方、HIV-1 に対するワクチンの開発も精力的に行われているが、有効なワクチンは、未だ確立されていない。

エイズワクチン開発において、HIV-1 に対する有効な中和抗体の誘導が、重要な因子の 1 つであると考えられているが、どのような種類の抗体を誘導すれば、広範囲にわたる臨床分離株を中和することができるかについては、未だ明確な結論が出ていない。このような問題を明らかにするため、本研究班の分担研究者である松下らは、これまでに多くの抗 HIV-1 単クローン抗体を作成し、それらの中和活性について検討している。その中でも KD-247 は HIV-1 の gp120-V3 tip をエピトープとして認識する、ヒト化された単クローン抗体であり、subtype B の HIV-1 臨床分離株に対して強い中和活性を有することが報告されている (*J. Virol.* **80**:5552-5562, 2006)。さらに、KD-247 に対して中和抵抗性を示すウイルス（エスケープ変異株）が、ある種の CCR5 阻害薬に対して高感受性を示すことを報告している (*AIDS* **20**:2065-2073, 2006)。

一方、馬場らは 1999 年に武田薬品工業と共同で、世界で最初に低分子 CCR5 阻害薬 TAK-779 を同定し、これが強い抗 HIV-1 効果を持つことを報告した (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 5698-5703, 1999)。その後、TAK-779 誘導体で、より効果の強い TAK-652 を同定することに成功しており、TAK-652 は現在、米国の製薬企業により、cenicriviroc (TBR-652) として、第 IIb 相臨床試験が行われている。また、馬場らは、*in vitro* 感染実験を行い、TAK-652 に対する薬剤耐性 HIV-1 の分離にしている (*Antimicrob. Agents Chemother.* **51**: 707-715, 2007)。

そこで、本研究においては、松下らの中和抗体に関する研究成果と、馬場らによる CCR5 阻害薬に関する研究成果を融合させることで、中和抗体と CCR5 阻害薬の併用による、新たな抗エイズ治療の可能性を探ることを目的とする。具体的には、KD-247 に対するエスケープ変異株が化学構造の異なる種々の CCR5 拮抗薬に対して、高感受性を示すかどうかを検証するとともに (馬場担当)、逆に CCR5 阻害薬耐性ウイルスが中和抗体に対して高感受性を示すかどうかを検証する (松下担当)。最終的には、これら双方の研究成果を持ち寄ることで、KD-247 と cenicriviroc の併用による新たな ART の確立を目指す。なお、本報告書では、馬場担当部分に関する今年度の研究成果について報告する。

B. 研究方法

ウイルス : R5 HIV-1 の実験室内継代株である Ba-L と、それから誘導された KD-247 に対するエスケープ変異株の Ba-L mt. は、分担研究者の松下 (熊本大学) より分与された。ウイルスの増殖には当研究室で樹立した CCR5 を発現させた MOLT-4 細胞である MOLT-4/CCR5 細胞を用いた。ウイルスストックは、後述の MAGI-CCR5 細胞を用いてタイトレーション

を行い、使用するまで、 -80°C にて保存した。

細胞株 : ウイルスのタイトレーションおよび抗 HIV-1 アッセイには、HeLa 細胞に CCR5 を発現させ、HIV-1 LTR の下流に β -ガラクトシダーゼ遺伝子が組み込まれた MAGI-CCR5 細胞を用いた。細胞は 10% ウシ胎仔血清、抗生物質、0.2 mg/ml G418, 0.1 mg/ml hygromycin, および 1 $\mu\text{g/ml}$ puromycin を添加した DMEM メジウムを用いて維持した。

薬剤 : 本研究には 4 種類の CCR5 阻害薬、TAK-779, cenicriviroc, TAK-220, maraviroc を用いた。薬剤は maraviroc を除き、武田薬品工業から分与された。Maraviroc は Sigma-Aldrich より購入した。TAK-779 は蒸留水で、それ以外の薬剤は DMSO に 20 mM の濃度で融解し、アッセイのときまで -20°C にて保存した。

抗 HIV-1 アッセイ : 中和抗体および薬剤の抗 HIV-1 効果は、感染 MAGI-CCR5 細胞におけるウイルス増殖を調べることににより判定した。具体的には、細胞を 1×10^4 cells/well で 96 穴マイクロプレートに播種し、24 時間後に 100 focus forming units/well のウイルスを感染させ、同時に種々の濃度の薬剤を添加した。これらの細胞を培養し、48 時間後に培養上清を除去し、PBS にて洗浄後、ウイルスの増殖の程度を β -Gal Reporter Gene Assay 試薬 (Roche) を用いて定量した。また、中和抗体および薬剤の細胞毒性は、MTT 法にて生細胞数を測定した。

(倫理面への配慮について)

本研究では、実験室で使用されている細胞株およびウイルスを用いて実施しており、個人が特定出来るようなヒトのサンプルは一切用いていない。

C. 研究結果

ウイルスの中和抗体に対する感受性 : 最初に、エスケープ変異株である Ba-L mt. の KD-247 に対する感受性について検討し、親株 Ba-L のそ

れと比較した。その結果、図 1 に示すように、エスケープ変異株は KD-247 に対して 100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度まで、全く感受性を示さないことが確認された。一方、親株は低い濃度の KD-247 存在下において、増殖が抑制された。

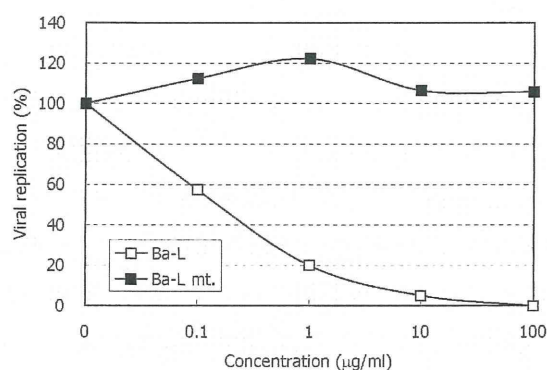


図 1. エスケープ変異株の中和抗体 KD-247 に対する感受性. KD-247 に対するエスケープ変異株 Ba-L mt. と、その親株である Ba-L の、MAGI-CCR5 細胞における増殖を、種々の濃度の KD-247 存在下で比較した。

ウイルスの各種 CCR5 阻害薬に対する感受性：次に、Ba-L mt. の CCR5 阻害薬に対する感受性について検討した。その結果を図 2 – 5 に示す。

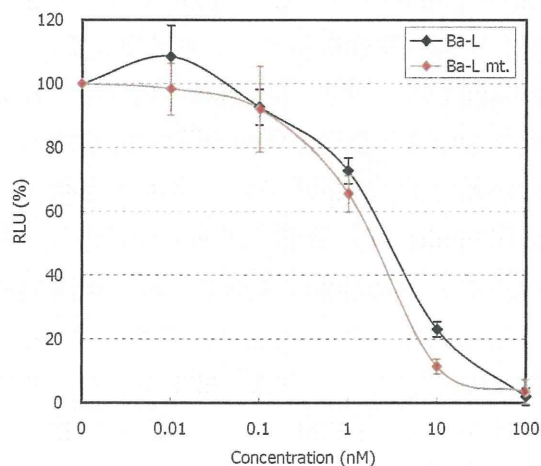


図 2. エスケープ変異株の TAK-779 に対する感受性. KD-247 に対するエスケープ変異株 Ba-L mt. と、その親株である Ba-L の、

MAGI-CCR5 細胞における増殖を、種々の濃度の TAK-779 存在下で比較した。結果は 5 回の実験結果の平均と標準偏差を示す。

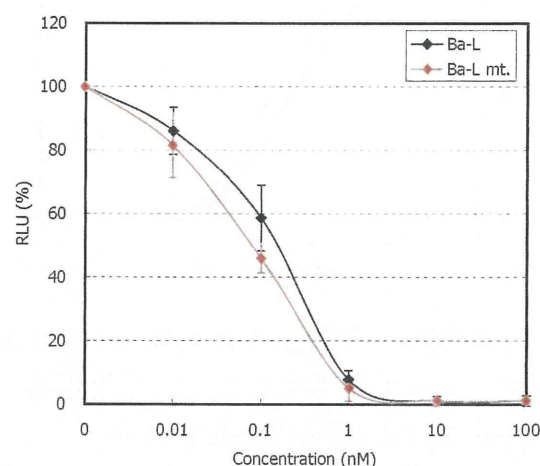


図 3. エスケープ変異株の cenicriviroc に対する感受性. KD-247 に対するエスケープ変異株 Ba-L mt. と、その親株である Ba-L の、MAGI-CCR5 細胞における増殖を、種々の濃度の cenicriviroc 存在下で比較した。結果は 5 回の実験結果の平均と標準偏差を示す。

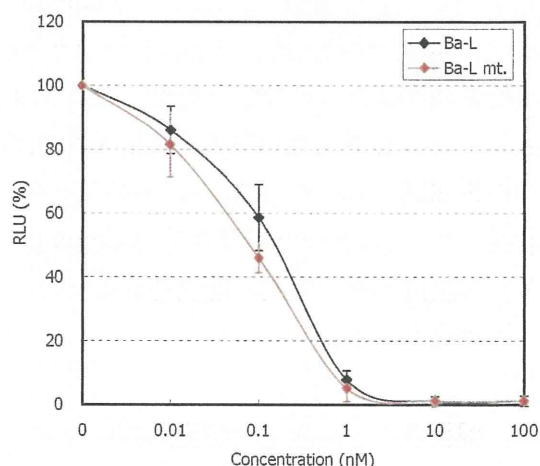


図 4. エスケープ変異株の TAK-220 に対する感受性. KD-247 に対するエスケープ変異株 Ba-L mt. と、その親株である Ba-L の、MAGI-CCR5 細胞における増殖を、種々の濃度の TAK-220 存在下で比較した。結果は 5 回の実験結果の平均と標準偏差を示す。