

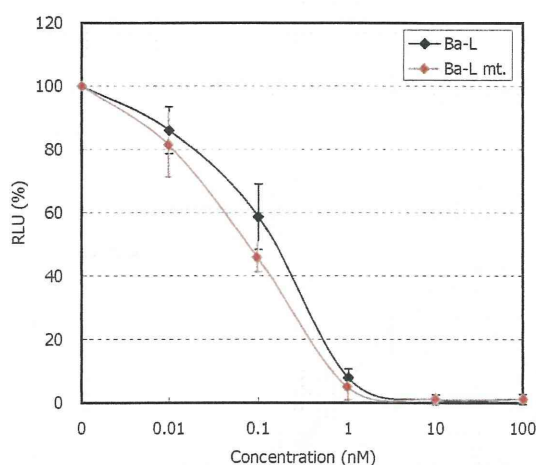


図4. エスケープ変異株の maraviroc に対する感受性. KD-247 に対するエスケープ変異株 Ba-L mt. と、その親株である Ba-L の、MAGI-CCR5 細胞における増殖を、種々の濃度の maraviroc 存在下で比較した。結果は5回の実験結果の平均と標準偏差を示す。

CCR5 阻害薬の親株およびエスケープ変異株に対する増殖抑制効果は、どちらの株に対しても、cenicriviroc が最も強く、次いで maraviroc と TAK-220 がほぼ同等であり、TAK-779 が最も弱かった。また、親株とエスケープ変異株の間では、何れの薬剤に対しても、それほど大きな感受性の差はみられなかったが、TAK-779 と cenicriviroc に対しては統計学的に有意な感受性の差が認められた（表1）。その際、何れの場合でも、エスケープ変異株の方が親株よりこれらの薬剤に対して高い感受性を持っていることが分かった。

表1. 親株およびエスケープ変異株の各種 CCR5 阻害薬に対する感受性

Compound	EC ₅₀ * (nM)		P**
	Ba-L	Ba-L mt.	
TAK-779	2.09 ± 0.19	1.65 ± 0.21	0.028
Cenicriviroc	0.120 ± 0.043	0.068 ± 0.023	0.036
TAK-220	0.198 ± 0.035	0.133 ± 0.077	0.213
Maraviroc	0.157 ± 0.027	0.127 ± 0.063	0.134

* 50% 有効濃度. 全ての値は5回の実験結果の平均値±標準偏差値を示す。

** 親株とエスケープ変異株の EC₅₀ 値に関する統計学的解析は t-test によった。

D. 考察

最初に CCR5 阻害薬として同定された TAK-779 は、強い抗 HIV-1 効果を持ちながらも、経口吸収性がないことから、エイズ治療薬としての臨床開発は行われなかった。そこで、TAK-779 の誘導体の合成展開を精力的に実施し、化学構造の最適化を行った結果、TAK-779 と比較して20倍程度抗 HIV-1 活性が強く、また経口吸収性のある cenicriviroc を同定することに成功した。これとは別に、馬場と武田薬品工業の共同研究グループによって、cenicriviroc とは全く化学構造の異なる CCR5 阻害薬である TAK-220 が、ほぼ同じ時期に同定されている。これまでの研究では、感染細胞の長期継代培養により、cenicriviroc に対する耐性ウイルスを誘導することに成功しており、耐性ウイルスの gp120 に多くの変異を認めている。

松下らは *in vitro* の実験において、KD-247 に中和抵抗性を示すウイルスを誘導することに成功しており、この変異ウイルスが、TAK-779, vicriviroc, apraviroc など、一連の CCR5 阻害薬に対して高感受性を示すことを見出している。本研究班では、今回、免疫機構と抗ウイルス薬を組み合わせた新規治療法の開発を、研究の大きな目標の1つに掲げており、馬場から松下に対して cenicriviroc 耐性ウイルスを提供し、松下らが樹立した各種中和抗体に対する感受性について検討している。その結果、TAK-652 耐性 HIV-1 がいくつかの中和抗体に対して高感受性を示すことを明らかにしている（松下の分担研究報告書参照）。

これとは逆に、馬場は松下から KD-247 に対するエスケープ変異株の分与を受け、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、予想よりはエスケープ変異株の感受性の増加が小さかったが、それでも TAK-779 と cenicriviroc については、有意な感受性の増加を認めた（表 1）。この 2 薬剤はお互いに誘導体の関係にあり、他方、TAK-220 や maraviroc とは化学構造が全く異なっている。馬場らの過去の研究では、cenicriviroc に耐性ウイルスは TAK-220 には全く耐性を示さない（交叉耐性を有しない）ことが分かっており、このことと今回のエスケープ変異体の CCR5 阻害薬に対する感受性との間に、何らかの関係があるかも知れない。今後は引き続き JR-FL 変異株や臨床分離株など、異なるウイルス株を用いて同様の実験を行い、さらにデータを集積するとともに、親株とエスケープ変異株からの cenicriviroc 耐性ウイルス誘導実験を行うことで、KD-247 と cenicriviroc の併用による、新たな組み合わせによる ART の可能性を明らかにする必要があると思われる。

E. 結論

- ・ KD-247 に対するエスケープ変異 Ba-L 株について、4 種類の CCR5 阻害薬に対する感受性を野生株と比較したところ、TAK-779 とその誘導体である TAK-652(cenicriviroc)に対しては、統計学的に有意な感受性の増加が認められた。
- ・ 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。
- ・ 今年度は Ba-L 由来のエスケープ変異株しか検討できなかったが、今後は引き続き 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繰り返すとともに、中和抗体エスケープ変異株と親株からの cenicriviroc 耐性誘導を行い、それらを比較することにより、KD-247 と cenicriviroc の併用による、新たな ART の意義と可能性を明らかにする予定である。

F. 研究発表（本研究に関係するもの）

（論文発表）

1. Ordonez P, Hamasaki T, Isono Y, Sakakibara N, Ikejiri M, Maruyama T, Baba M. Anti-human immunodeficiency virus type 1 activity of novel 6-substituted 1-benzyl-3-(3,5-dimethylbenzyl)uracil derivatives. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**: 2582-2589 (2012).
2. Toyama M, Hamasaki T, Uto T, Aoyama H, Okamoto M, Hashimoto Y, Baba M. Synergistic inhibition of HTLV-1-infected cell proliferation by combination of cepharanthine and a tetramethylnaphthalene derivative. *Anticancer Res.* **32**: 2639-2646 (2012).
3. Sohl CD, Kasiviswanathan R, Kim J, Pradere U, Schinazi RF, Copeland WC, Mitsuya H, Baba M, 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. Chande AG, Baba M, 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).
5. Kumamoto H, Kawahigashi S, Wakabayashi H, Nakano T, Miyaike T, Kitagawa Y, Abe H, Ito M, Haraguchi K, Balzarini J, Baba M, Tanaka H. Tuning efficiency of the 4-exo-trig cyclization by the electronic effect: ring closure of 3,3-difluoro-4-pentenyl carbon radicals and synthesis of a gem-difluorocyclobutane nucleoside. *Chem. Comm.* **48**: 10993-10995 (2012).
6. Nakamura M, Matsumoto Y, Toyama M, Baba M, Hashimoto Y. Organosilicon compounds as adult T-cell leukemia cell proliferation inhibitors. *Chem. Pharm. Bull.* **61**: 237-241 (2013).
7. 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.* **57**: 1323-1331 (2013).
8. Haraguchi K, Takeda S, Kubota Y, Kumamoto H, Tanaka H, Hamasaki T, Baba M, Paintsil E, Cheng Y-C. From the chemistry of epoxy-sugar nucleosides to the discovery of anti-

HIV agent 4'-ethynylstavudine – Festinavir.
Curr. Pharm. Des. **19**: 1880-1897 (2013).

9. Okamoto M, Chono H, Kawano Y, Saito N, Tsuda H, Inoue K, Kato I, Mineno J, Baba M. Sustained inhibition of HIV-1 replication by conditional expression of the *E. coli*-derived endoribonuclease MazF in CD4⁺ T cells. *Hum. Gene. Ther. Methods* in press.

(学会発表)

1. 森園翔一郎, 岡本実佳, 濱崎隆之, 張 旭, 隅田泰生, 馬場昌範. コンドロイチン硫酸の抗 HIV-1 効果について. 第 49 回日本ウイルス学会九州支部総会, 2012 年 8 月 24 日, 那覇.

2. 蝶野英人, 岡本実佳, 井上晃一, 百々克行, 津田大嗣, 川野泰広, 濱崎隆之, 馬場昌範, 峰野純一. RNA 分解酵素 MazF を用いた HIV-1 感染症遺伝子治療法の開発. 第 26 回日本エイズ学会学術集会, 2012 年 11 月 25 日, 横浜.
3. 濱崎隆之, 岡本実佳, 馬場昌範. Tat 依存性の HIV-1 産生を抑制する新規低分子化合物の同定. 第 26 回日本エイズ学会学術集会, 2012 年 11 月 25 日, 横浜.

G. 知的財産権の出願・登録状況

な し

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

薬剤による変異性獲得の機序と薬剤抵抗性の研究

研究分担者 松岡 雅雄 京都大学ウイルス研究所 教授

研究要旨

これまで研究代表者らによって明らかにされた様々な CTL 逃避変異の中からインテグラーゼ領域中に存在する CTL 逃避変異に着目し、インテグラーゼ阻害剤に対する感受性の変化を解析した。その結果、インテグラーゼ領域の 124・203・234 番目のアミノ酸置換を伴う CTL 逃避変異は、インテグラーゼ阻害剤の感受性に影響を与えないことが明らかになった。また、研究分担者らがこれまでに解析した次世代融合阻害剤に対する耐性変異を有する HIV-1 の中和抗体感受性を解析する目的で、感染性クローンの構築を行った。

A. 研究目的

研究代表者らの解析により、様々な CTL 逃避変異が同定されている。本研究課題では、インテグラーゼ領域内の CTL 逃避変異に着目し、これらの変異によるインテグラーゼ阻害剤感受性変化を解析することを目的とした。さらには、研究分担者らがこれまでに報告した次世代融合阻害剤である SC34 や SC34EK などに対する耐性株の中和抗体感受性を、班内研究分担者である松下教授と共同で解析することを目的とした。

B. 研究方法

CTL 逃避変異の導入およびウイルス作製

テンプレートには、HIV-1_{BH10} 由来の pol 領域を有する pNL_{WT} を用いた。本感染性クローンに、site-directed mutagenesis 法を用いて A124N、A124T、I203M および L234I 変異を導入した。これらの組換え感染性クローンを 293FT 細胞へ遺伝子導入し、組換えウイルスを得た。

インテグラーゼ阻害剤

評価対象のインテグラーゼ阻害剤として、現在臨床で用いられている raltegravir (RAL) および elvitegravir (EVG) ならびに次世代の dolutegravir (DTG) および MK-2048 を用いた。対照には核酸系逆転写酵素阻害剤である

AZT を用いた。

抗 HIV 活性の測定

これら抗 HIV 薬の感受性は、NCK 細胞を用いた beta-galactosidase レポーターアッセイにより評価した。

(倫理面への配慮)

基礎的研究であり、該当しない。

C-D. 研究結果・考察

研究代表者らは、これまで多数の CTL 逃避変異を明らかにしてきた。インテグラーゼ領域内における多数の CTL 逃避変異も同定しているが、研究分担者らのこれまでのインテグラーゼ阻害剤耐性に関する研究により、インテグラーゼ耐性変異はインテグラーゼ活性中心部に位置する catalytic core domain (50-212 アミノ酸残基) 内に導入されることが多く認められている。そこで本研究課題では、T124N、I203M および L234I の 3 変異に着目し、解析対象とした。

pNL_{WT} に上記変異を導入し、組換えクローンを作製した。なお、pNL_{WT} のインテグラーゼにおける 124 番目のアミノ酸は A (アラニン) であるため、A124N、I203M および L234I に加えて、A124T 変異体も作製した。これらの感染性クローンを 293FT 細胞に導入して組換えウイルスを得たが、これらの組換え

ウイルスの感染性に関して、野生株との差は認められなかった。

続いて、これらのウイルスを用いてインテグラーゼ阻害剤に対する感受性の変化を解析した（表 1[最終頁]）。初めに、対照として用いた AZT に対する感受性変化を解析したが、CTL 逃避変異を有する全ての組換えウイルスは、野生株と同程度の感受性を示した。本解析に用いたインテグラーゼ阻害剤は、すべて野生株に対して nM レベルの EC₅₀ 値を示した。同様に、A124N、A124T、I203M および L234I 変異体は、すべてのインテグラーゼ阻害剤に感受性を示し、野生株と比較した耐性度の変化は 0.7-1.5 倍であり、CTL 変異によるインテグラーゼ阻害剤感受性への影響は認められなかった。

また、研究分担者らが報告した次世代融合阻害剤である SC34 や SC34EK、現在臨床で用いられている唯一の融合阻害薬である T-20 (enfuvirtide) に対する耐性 HIV-1 の中和抗体感受性の評価に向けて、現在組換え体の構築を行っている。

E. 結論

インテグラーゼ領域内に導入された CTL 逃避変異は、本解析で用いたインテグラーゼ阻害剤に対する感受性に変化を与えなかった。特に DTG や MK-2048 などの次世代インテグラーゼ阻害剤はまだ上市されていないことから、これらの薬剤未経験 HIV 感染者における治療前インテグラーゼ阻害剤耐性変異出現の可能性は低いと推測される。

F. 健康危険情報

該当事項無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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) 1437-1446 (2012)

2. Izumi K, Kawaji K, Miyamoto F, Shimane K, Shimura K, Sakagami Y, Hattori T, Watanabe K, Oishi S, Fujii N, Matsuoka M, Kaku M, Sarafianos SG, Kodama EN. Mechanism of resistance to S138A substituted enfuvirtide and its application to peptide design. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45(4) 908-915 (2013)
3. Togami H, Shimura K, Okamoto M, Yoshikawa R, Miyazawa T, Matsuoka M. Comprehensive in vitro analysis of simian retrovirus type 4 susceptibility to antiretroviral agents. *J. Virol.* 87(8) 4322-4329 (2013)

2. 学会発表

1. 戸上博昭、志村和也、宮沢孝幸、松岡雅雄：ニホンザルより検出された SRV-4 に対する抗 HIV 薬の効果：第 60 回日本ウイルス学会学術集会、グランキューブ大阪（大阪）、2012 年 11 月 13-15 日
2. 志村和也、水原司、大石真也、藤井信孝、松岡雅雄：広範なスペクトルを有する新規 HIV 薬の同定とその開発：第 26 回日本エイズ学会学術集会、慶應義塾大学日吉キャンパス（横浜）、2012 年 11 月 24-26 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当事項無し

2. 実用新案登録

該当事項無し

3. その他

該当事項無し

表 1. CTL 逃避変異によるインテグラーゼ阻害剤感受性比較

	EC ₅₀ (nM) [fold change]				
	AZT	EVG	RAL	DTG	MK-2048
WT	2.33 ± 0.469 [1.0]	0.180 ± 0.0726 [1.0]	17.5 ± 2.40 [1.0]	1.77 ± 0.130 [1.0]	2.62 ± 0.892 [1.0]
A124N	1.99 ± 0.0778 [0.9]	0.238 ± 0.0120 [1.3]	17.7 ± 2.62 [1.0]	1.58 ± 0.622 [0.9]	2.57 ± 0.955 [1.0]
A124T	1.81 ± 0.212 [0.8]	0.206 ± 0.111 [1.1]	19.0 ± 0.778 [1.1]	1.33 ± 0.318 [0.8]	2.92 ± 1.117 [1.1]
I203M	2.53 ± 0.0778 [1.1]	0.270 ± 0.0926 [1.5]	16.0 ± 6.93 [0.9]	1.77 ± 0.0141 [1.0]	2.54 ± 0.849 [1.0]
L234I	2.23 ± 0.0990 [1.0]	0.135 ± 0 [0.8]	12.2 ± 5.46 [0.7]	1.61 ± 0.247 [0.9]	2.01 ± 0.615 [0.8]

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

CCR5 阻害薬耐性 HIV-1 の中和抗体に対する感受性

研究分担者 松下修三 熊本大学エイズ学研究センター 教授

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、CCR5 阻害薬耐性 HIV-1 の中和抗体に対する感受性を検討した。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、cenicriviroc 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。これらの結果は、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ており、中和抗体と CCR5 阻害薬の併用による、新たな ART の可能性を示唆している。

A. 研究目的

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が、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。このため、HIV-1 増殖の各段階のなかで、既存の薬剤とは異なるステップを阻害する薬剤の開発が求められている。本研究班の分担研究者である馬場らは 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）。

一方、松下らは、治療への応用を目指して、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きた。その中でも gp120 の V3 領域をエピトープとして認識する KD-247 は HIV-1 臨床分離株に対して強い中和活性を示し（*J. Virol.* **80**:5552- 5562, 2006）、米国で臨床試験を行っている。また、KD-247 に対して中和抵抗性を示す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た（*AIDS* **20**:2065-2073, 2006）。

本研究では、馬場らによる CCR5 阻害薬に関する研究成果と、松下らの中和抗体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、松下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：HIV-1 の臨床分離株である KK (wt) と、KK より誘導された *cenicriviroc* 耐性株 KK₆₅₂₋₆₇、及び、コントロール継代株 KK_{C-67} は、分担研究者の馬場（鹿児島大学）より分与された。ウイルスの増殖には PM1/CCR5 細胞を用い、培養上清をウイルスストックとして-80°C にて保存した。

中和抗体：抗 V3 抗体、KD247, 1C10, 5G2, 抗 CD4 binding site (CD4bs)抗体 49G2, 抗 CD4-induced (CD4i)抗体 4E9C 等の中和抗体は、Protein A カラムで精製し、-80°C にて保存した。

薬剤：CCR5 阻害薬, TAK-779, *cenicriviroc*, TAK-220 は武田薬品工業から分与された。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、-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、TZM-bl 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、96 穴マイクロプレートに種々の濃度の抗体または薬剤と 200 TCID₅₀ のウイルスを加え、抗体は 1 時間 incubation 後、薬剤は直ちに TZM-bl 細胞細胞を 1×10^4 cells/well で播種した。48 時間後に培養上清を除去し、PBS にて洗浄後、細胞を溶解し、ウイルスの増殖の程度を luciferase assay

system (Promega)を用いて定量した。

中和抗体抵抗性株の誘導：96 穴マイクロプレートを用いて 5,000 TCID₅₀ の *cenicriviroc* 耐性株 KK₆₅₂₋₆₇ と 4 ng/ml の抗 V3 抗体 1C10 を混合して 30 分 incubation し、 1×10^4 cells PM1/CCR5 細胞を加えて、さらに 5 時間培養した。PBS にて洗浄後、細胞を培養フラスコに移して 1 週間培養し、培養上清と細胞を回収して-80°C に保存した。この培養上清の一部とより高い濃度の 1C10 を用いて継代を繰り返し、1C10 に抵抗性の変異株を誘導した。

HIV-1 Env の遺伝子解析：1C10 抵抗性株に感染した細胞から DNA を抽出し、PCR により *env* 遺伝子を増幅した。PCR 産物を TA cloning kit (Invitrogen)によってクローニングし、1C10 抵抗性株 *env* 遺伝子の塩基配列を決定した。

（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、及び CCR5 阻害薬に対する感受性：最初に、*cenicriviroc* 耐性株 KK₆₅₂₋₆₇、及び、コントロール継代株 KK_{C-67} の中和抗体、及び CCR5 阻害薬に対する感受性について検討し、親株 KKwt のそれと比較した。

その結果、親株 KKwt は低濃度の *cenicriviroc* により増殖が完全に阻害されるのに対し、KK₆₅₂₋₆₇ は 20 μ M の高濃度でも増殖が認められ、馬場らによって報告された *cenicriviroc* 耐性が確認された。

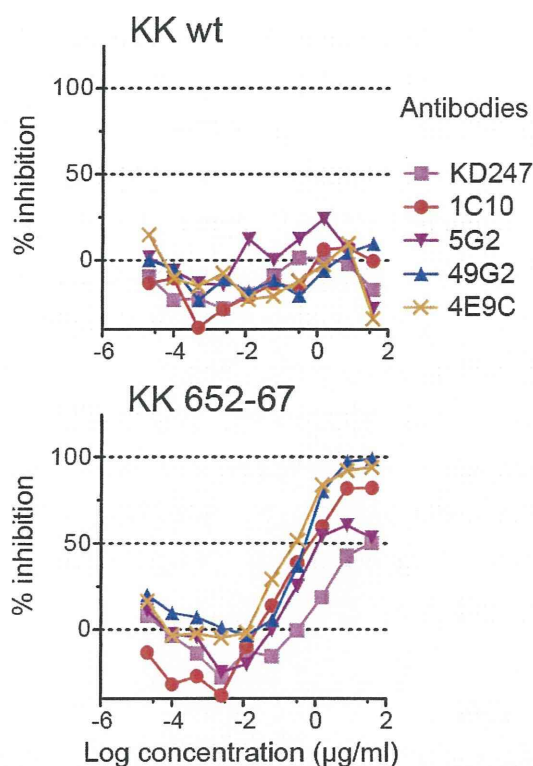


図1. 親株 KKwt 及び *cenicriviroc* 耐性株 KK₆₅₂₋₆₇ の抗体に対する感受性. V3 (KD247, 1C10, 5G2), CD4bs (49G2), CD4i (4E9C) をエピトープとする抗体による中和活性を TZM-bl 細胞への感染により評価した。

V3, CD4bs, CD4i をエピトープとする抗体を用いた中和試験の結果、KKwt は最も高濃度(40 $\mu\text{g/ml}$)の抗体でも全く増殖が阻害されなかったが、KK₆₅₂₋₆₇ は、用いた5種類の抗体全てで中和され、抗体による中和に感受性であることが示された(図1)。コントロール継代株 KK_{C-67} は、高濃度で阻害活性の上昇がみられたが、いずれの抗体も50%以下の阻害効果しか示さなかった。

抗 V3 抗体 1C10 に抵抗性をもつ変異株の分離： 抗体に対して感受性であった *cenicriviroc* 耐性株 KK₆₅₂₋₆₇ を抗 V3 抗体 1C10 存在下で7回継代し、KK_{652-67/1C10-7} を得た。KK₆₅₂₋₆₇ と比較して、この KK_{652-67/1C10-7} は 1C10 に抵抗性 (IC₅₀ 値で約 100 倍) であるが、他のエピトープに対する抗体、49G2,

4E9C に対しては KK₆₅₂₋₆₇ と同程度の感受性を保持していた(図2)。注目すべきことに、KK_{652-67/1C10-7} は KKwt と同程度に *cenicriviroc* に感受性であり、低濃度で完全に増殖が阻害された(図2)。この結果は、中和抗体 1C10 からのエスケープにより、*cenicriviroc* 感受性となったことを示している。

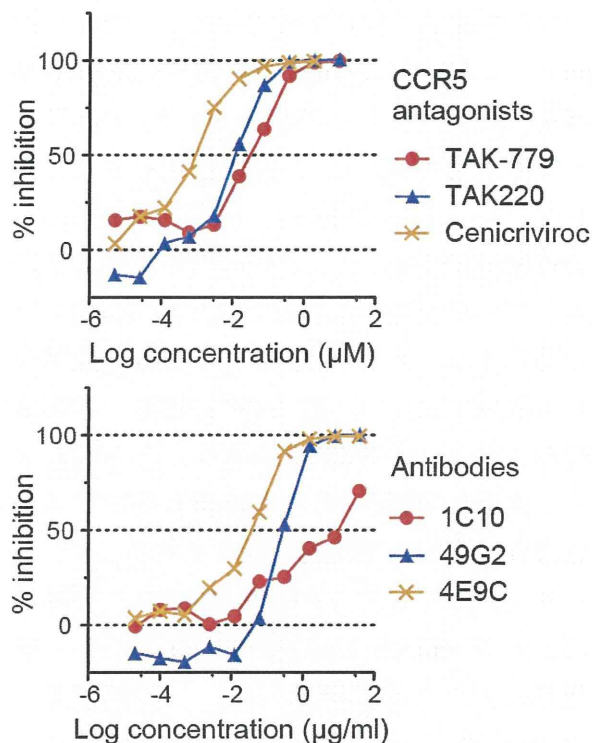


図2. 抗 V3 抗体 1C10 エスケープ変異株の CCR5 阻害薬及び、中和抗体に対する感受性. TZM-bl 細胞における増殖を、種々の濃度の抗体、及び CCR5 阻害薬存在下で比較した。

1C10 抵抗性株の Env 領域にみられる変異： KK_{652-67/1C10-7} の 1C10 抵抗性、及び *cenicriviroc* 感受性に関わる領域を特定するため、env 遺伝子の遺伝子解析を行った。その結果、V2 領域の T163I、V3 領域の R315K 及び G324R、C4 領域の S446T 等の変異が確認された。1C10 は V3 領域を認識する抗体であり、V3 領域の R315K 及び G324R 変異が 1C10 からのエスケープに重要な役割を果たしていると考えられた。

D. 考察

本報告では、CCR5 阻害薬である *cenicriviroc* に耐性をもつ HIV-1 変異株が様々なエピトープを標的とする抗体に感受性であることを示した。この結果は、HIV-1 の Env 構造を変化させて抗体の標的となる領域を露出させることが、*cenicriviroc* 存在下での増殖に有利に働くことを示唆している。本報告で用いた抗体のうち、V3 と CD4i を標的とする抗体は CCR5 との結合に重要な領域をエピトープとしており、V3 や CD4i を露出することで CCR5 との結合効率を上昇させている可能性がある。一方、*cenicriviroc* 耐性株は CD4bs をエピトープとする抗体に対しても感受性となるが、CD4bs は CD4 との結合領域であり、CCR5 との結合に直接関わる領域ではない。抗 CD4bs 抗体への感受性の上昇は、V3 や CD4i を露出したことによる二次的な影響や、CD4 との結合促進による感染性上昇等の可能性が考えられる。

今回、我々は抗 V3 抗体 1C10 からの逃避によって *cenicriviroc* 耐性株が *cenicriviroc* 感受性に変わることを示した。この結果は、CCR5 阻害薬 *cenicriviroc* と抗 V3 抗体 1C10 への耐性が両立し難いことを示唆しており、本研究班の大きな目標の1つとして掲げている、免疫機構と抗ウイルス薬を組み合わせた新規治療法の可能性を示すものである。*cenicriviroc* 耐性株は今回用いた抗 V3 抗体 1C10 以外に、抗 CD4i 抗体 4E9C や抗 CD4bs 抗体 49G2 にも感受性である。今後は、これらの抗体に抵抗性をもつ変異株の誘導によって、V3 以外のエピトープに対する抗体への抵抗性と *cenicriviroc* 耐性との関係についてもあきらかにし、抗体と CCR5 阻害薬の併用効果をあきらかにしていきたい。

本研究班では、今回、免疫機構と抗ウイルス薬を組み合わせた新規治療法の開発を目

標として、松下は馬場から *cenicriviroc* 耐性ウイルスの分与を受け、各種中和抗体に対する感受性についての検討を行った。これとは逆に、松下から馬場に KD-247 に対するエスケープ変異株を提供し、馬場らが各種 CCR5 阻害薬に対する感受性について検討した。その結果、予想よりエスケープ変異株の感受性の増加が小さかったが、それでも TAK-779 と *cenicriviroc* については、有意な感受性の増加が認められた。今後も、これら双方の研究成果を持ち寄ることで、中和抗体と CCR5 阻害薬の併用効果をあきらかにし、新たな ART の確立を目指していく。

E. 結論

- ・ *cenicriviroc* 耐性株は V3, CD4i, CD4bs を標的とする抗体に対し感受性が高く、これらの抗体で容易に中和された。

- ・ 抗 V3 抗体 1C10 からの逃避によって *cenicriviroc* 耐性株が *cenicriviroc* 感受性に変わることを示した。

- ・ これらの結果は、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ており、中和抗体と CCR5 阻害薬の併用による、新たな ART の可能性を示唆している。

F. 研究発表

(論文発表)

1. Yokoyama M, Naganawa S, Yoshimura K, Matsushita S, Sato H . Structural Dynamics of HIV-1 Envelope Gp120 Outer Domain with V3 Loop. PLoS ONE 7(5): e37530., 2012.
2. Ong YT, Kirby KA, Hachiya A, Chiang LA, Marchand B, Yoshimura K, Murakami T, Singh K, Matsushita S, Sarafianos SG. Preparation of biological active single-chain variable antibody fragments that target the HIV-1 gp120 v3 loop.

Cellular and molecular biology, 58: 71-79, 2012

3. Harada S, Yoshimura K, Yamaguchi A, Yusa K, Matsushita S. Impact of antiretroviral pressure on selection of primary HIV-1 envelope sequences in vitro. *J. Gen. Virol.* 94:933-943, 2013.
4. Narumi T, Arai H, Yoshimura K, Harada S, Hirota Y, Ohashi N, Hashimoto C, Nomura W, Matsushita S, Tamamura H.: CD4 mimics as HIV entry inhibitors: lead optimization studies of the aromatic substituents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21, 2518-2526, 2013.
5. Kuwata T, Takaki K, Yoshimura K, Enomoto I, Wu F, Ourmanov KI, Hirsch VM, Yokoyama M, Sato H, Matsushita S. Conformational Epitope Consisting of the V3 and V4 Loops as a Target for Potent and Broad Neutralization of Simian Immunodeficiency Viruses. *J. Virol.* 2013 (in press)

(学会発表)

1. Harada S., Arai H., Narumi T., Tamamura H., Matsushita S., Yoshimura, K. : In vitro induction of ten CD4 mimic small compounds, NBD-556 and its analogues, resistant variants using primary R5 HIV-1. XIX International AIDS Conference (AIDS 2012), July 22-27, Washington DC, USA. (7/24発表)
2. Maruta Y., Ramirez K., Kuwata T., Matsushita S. :Construction and characterization of neutralizing antibody fragments for efficient access to V3 epitope. *AIDS Vaccine* 2012, September 9-12, 2012, Boston, USA.
3. Kuwata T., Takaki K., Enomoto, E., Matsushita S: Conformational epitope involving V3 and V4 loops is a major target for antibody-mediated neutralization in SIV smH635-infected macaques. 13th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, 2012.10.25-26, Aso, Kumamoto, Japan.
4. Maruta Y., Ramirez K., Kuwata T., Suwa Y., Morioka H., Kuwata T, Matsushita S.: Single-chain variable fragment (scFv) of anti-V3 monoclonal antibody efficiently

neutralizes HIV-1 in vitro. 13th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, 2012.10.25-26, Aso, Kumamoto, Japan.

5. Tanaka K., Kuwata T., Maruta Y., Ramirez K., Matsushita S.: Analysis of antibodies to CD4-induced epitope on gp120. 13th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, 2012.10.25-26, Aso, Kumamoto, Japan.
6. Sonoda T., Boonchawalit S., Gatanaga H., Tanaka K., Maruta Y., Ramirez K., Kuwata T., Matsushita S.:Cross subtype neutralizing activity of plasma antibodies from patients infected with HIV-1 CRF01_AE HIV-1. 13th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, 2012.10.25-26, Aso, Kumamoto, Japan.
7. 桑田岳夫、吉村和久、松下修三：SIV感染サルから分離された中和抗体B404はV3,V4ループを含むEnv立体構造を認識する 第26回日本エイズ学会学術集会・総会. 2012.11.24-11.26. (11/24発表) 横浜.

8. 園田貴丈、Samatchaya Boonchawalit、田中和樹、丸田康広、Kristel Ramirez、桑田岳夫、松下修三: CRF01_AE HIV-1 感染症例IgGの交差中和 活性の解析.第26回日本エイズ学会学術集会・総会. 2012.11.24-11.26. (11/24発表) 横浜.
9. 田中和樹、桑田岳夫、丸田泰広、園田貴丈、Kristel Ramirez、松下修三.gp120のCD4-induced epitopeに結合する中和抗体の解析. 第26回日本エイズ学会学術集会・総会. 2012.11.24-11.26. (11/24発表) 横浜.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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

研究分担者 天野 将之 熊本大学エイズ学研究センター COE リサーチ・アリジェイト
(熊本大学大学院生命科学研究部・血液内科学分野)

研究要旨：本研究では、HIV-1 が耐性を発現しにくい薬剤・発現しても他薬剤との交差耐性を有しない新規のプロテアーゼ阻害剤（PI）や、新しい機序から HIV-1 の感染・複製を阻止する阻害剤の開発を進める事を目的とする。当該年度において、広域なスペクトラムで DRV 高度耐性株を含む薬剤耐性 HIV-1 株の増殖を強力に阻害し、HIV-1 の耐性化が極めて生じにくい oxatricyclic 構造を有する GRL-0519 を報告し、また複数の高度多剤耐性臨床分離株に対する抗ウイルス活性が完全に維持される強力な新規 PI, GRL-095-10 を新たに開発・同定し、更に *bis*-THF-difluoride といった新規構造を有する PI 群を新たに同定、*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。また *in silico* screening の手法を用いて、HIV-1 Capsid 阻害という新たな機序で HIV 増殖を抑制し得る化合物の検索を行い、試験管内で HIV-1 阻害活性を有する 29 種類の化合物群を新たに発見した。

A. 研究目的

本研究では、HIV-1 が耐性を発現しにくい薬剤・発現しても他薬剤との交差耐性を有しない新規のプロテアーゼ阻害剤（PI）や新しい機序から HIV-1 の感染を阻止する阻害剤の開発を進めるとともに、その基礎となるウイルス学・酵素学・細胞生物学・薬理学・結晶解析学的な基礎研究を進める。

B. 研究方法

1) 検討中の化合物の抗 HIV-1 活性評価：抗 HIV-1 活性の評価には実験室内野生株である HIV-1_{LAI} 株およびヒト T 細胞由来 MT2 細胞を用いた MTT アッセイ法を用いた。また有望な化合物については MT4 細胞や PBMC

を用いた p24 アッセイにより臨床分離株や多剤耐性株に対する抗ウイルス活性を検討し、更に試験管内で耐性変異株の誘導を試み、誘導された耐性株においてウイルス学・遺伝子学的解析や結晶解析による耐性発現メカニズムの解析を行う。

（倫理面への配慮）

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

C. 研究結果

当該年度において分担研究者は、

oxatricyclic 構造を有する新規 HIV-1 PI, GRL-0519 を米国研究グループと共同開発、同化合物は野生株および darunavir (DRV) 高度耐性株を含む多剤耐性株に対して強力な抗 HIV 活性を発揮、試験管内耐性誘導において HIV-1 の同化合物に対する耐性獲得は著しく遅延し、構造解析の結果、GRL-0519 の 2 つの THF 構造が 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 活性部位の複数の主要アミノ酸群と相互作用を有する事を確認、同化合物の強力な抗 HIV 活性の主因と考えられた (Amano, Mitsuya, AAC, 2013, 図 1)。

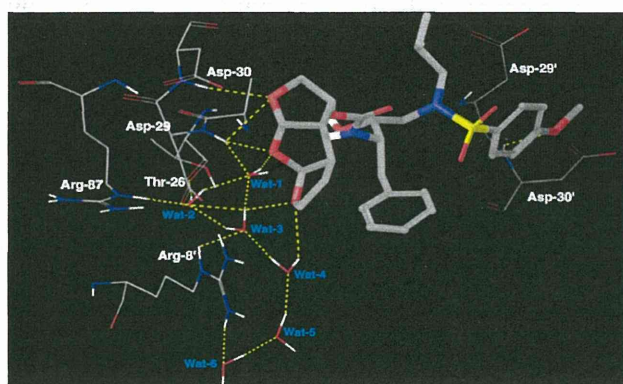


図 1. 結晶構造解析より得られた GRL-0519A と野生型 PR 間の相互作用を黄点線で示す。DRV の *bis*-THF 構造と比べ、GRL-0519A の *tris*-THF 構造は PR 主要アミノ酸群と水を介した相互作用をより多く有する事が判った。

また cyclohexane-*bis*-THF を有する PI, GRL-0739 を同定し、同化合物に対する HIV-1 の耐性化の機序を解明した (Amano, Mitsuya, 論文執筆中)。また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 (野生株と臨床分離野生株に対する EC_{50} 値が変化しない)、強力な新規 PI である GRL-095-10 を新たに同定し、同化合物への HIV の耐性誘導を含めた評価検討を継続した (Amano, Mitsuya, 未発

表データ)。更に *bis*-THF-difluoride といった新規の構造を有する PI 群を新たに同定、*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。この結果は同化合物群が AIDS 脳症の有望な予防/治療薬候補と成り得る可能性を示す (Miguel, Amano, Mitsuya, 投稿準備中)。

更に研究分担者は HIV-1 の構造蛋白である Gag Capsid 領域 (CA) の特定な部位にアミノ酸挿入変異が入る事で、CA の異常な自壊が生じ、変異ウイルスが増殖不能になる事を見出し、本現象について詳細な検討を行っているが (Amano, Mitsuya, 論文執筆中)、そのような CA の特定部位近傍の蛋白表面に低分子化合物が結合し得る十分な空間を有する疎水性 cavity を同定、8,555,483 個の化合物の構造データを用いて、*in silico* flexible docking simulation の手法により各化合物の Capsid 上の標的 cavity との binding score を算定、score の良い化合物に関しては実際に輸入購入し、試験管内での抗 HIV-1 活性の評価を継続して行っている。既に本手法により 29 種類の抗 HIV-1 活性を有する新たな化合物群を発見しており、そのうち 10 種類以上の化合物は DRV を含む既存の抗 HIV-1 剤高度耐性株に対しても有効であった。 (Amano, Mitsuya, 未発表データ/図 2 に *in silico* flexible docking simulation の流れを、図 3 に実際に抗 HIV-1 活性を認めた化合物の Capsid 上標的 cavity との docking simulation の結果を示す)、今後も HIV-1 CA の成熟化を阻害し分解方向へ進める新しい HIV-1 複製阻害物質の同定・開発を継続す

る。

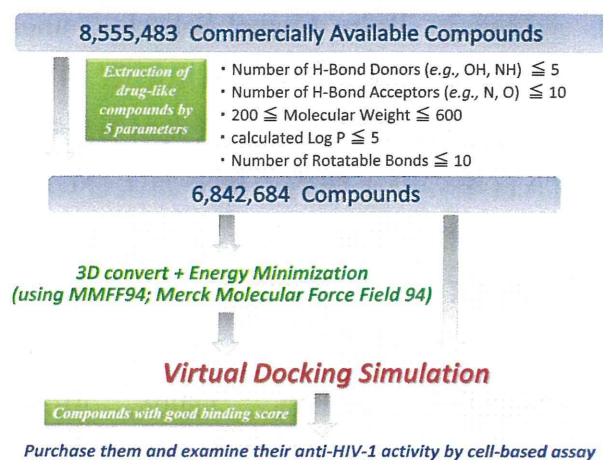


図 2. 実際に購入可能な 8,555,483 個の化合物データより、化合物を経口投与した際に生体内での ADME に影響を及ぼす要素を考慮した上で druggable な 6,842,684 化合物データを抽出、virtual docking simulation を行った後、有望な化合物については実際に試験管内での抗 HIV-1 活性を検討した。

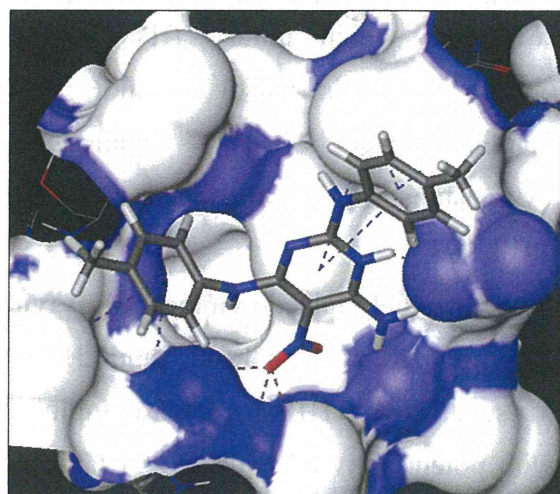


図 3. 試験管内で実際に抗 HIV-1 活性を示した化合物の docking simulation の例。

D. 考察

我々は米国の研究グループと精力的に共同研究を継続しており、前述した GRL-0519 等強力な新規 HIV PI 群について国際科学雑誌に報告した。また、HIV-1 構造蛋白である Gag CA 阻害という新しい戦略の基、800 万以上の化合物データから抗 HIV-1 活性を有する低分子化合物を検索し、約 30 種類の hit 化合物を新たに発見した。これら hit 化

合物については今後構造最適化等を行っていく予定である。本研究において今後も臨床導入を視野におき研究を遂行していく。

本計画で今後得られるデータは、新規阻害薬の研究成果に耐性発現機序に関わる基礎研究成果を付与する事が期待でき、新規抗 HIV 剤のデザインや酵素学的・ウイルス学的解析が強化され、国内外の研究者との人的交流により新世代の抗 HIV 剤の開発が強力に推進されると思われる。

E. 結論

本研究において我々が現在新規に開発中の抗 HIV 化合物群に対するウイルスの耐性発現の genetic barrier は極めて高く、このような化合物の開発は薬剤耐性株への新たな対応策と考えられる。また Gag CA 阻害という新たな機序での抗 HIV 活性を有する化合物の開発も同様に、既存抗 HIV 剤に抵抗する HIV 感染症例に対する有望な治療戦略と考えられる。HIV の耐性発現に抵抗し、発現しても他薬剤との交差耐性を有しない新規薬剤の開発は、HIV 感染症患者で長期間ウイルス量を測定感度以下にコントロールし、その結果外来通院による長期加療が更に容易となり患者の QOL 改善と医療・対費用効果の改善に大きく貢献すると期待される。

F. 研究発表

論文発表（当該年度のみ）

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 YF, **Amano M**, Weber IT, Mitsuya H. (2012) Substituent effects on P2-cyclopentyltetrahydrofuranyl urethanes: Design, synthesis, and X-ray studies of potent HIV-1 protease inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 22(6): 2308-2311.
4. Pedro Miguel Salcedo-Gómez, **Masayuki Amano**, Arun K. Ghosh, and Hiroaki Mitsuya. Novel HIV-1 protease inhibitors with potent antiviral activity and favorable blood brain barrier penetration. 13th Kmamoto AIDS Seminar-GCOE Joint International Symposium, Kumamoto, Japan, Oct 24-26, 2012.
5. **Masayuki Amano**, Pedro Miguel Salcedo-Gómez, Amber R Moore-Arthur, and Hiroaki Mitsuya. Mechanism of spontaneous degradation observed in the insertion-containing HIV-1 Capsid proteins, and a new attempt to discover small compound which induce HIV-1 Capsid protein degradation. 13th Kmamoto AIDS Seminar-GCOE Joint International Symposium, Kumamoto, Japan, Oct 24-26, 2012.
6. **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. A Novel Oxatricyclic-Ligand-Containing Nonpeptidic Protease Inhibitor (PI) GRL-0519A Potent Against Multi-PI-Resistant HIV In Vitro. 25th International Conference on Antiviral Research (ICAR). April 16-19, 2012, Sapporo, Japan.
7. **天野将之**, Pedro Miguel Salcedo-Gómez, Amber R Moore-Arthur, 満屋裕明. HIV-1 capsid蛋白 (CA) の挿入変異がもたらす CA自壊の分子機構の解明およびCA阻害活性を有する化合物の検索. 第26回日本エイズ学会学術集会. 横浜, Nov3-4, 2012.

学会発表（当該年度のみ）

1. **Masayuki Amano**, Y Tojo, M Aoki, S G. Pedro-Miguel, J R. Campbell, A K. Ghosh, H Mitsuya. A Novel Oxatricyclic-Ligand-Containing Nonpeptidic Protease Inhibitor (PI) GRL-0519A Potent Against Multi-PI-Resistant HIV In Vitro. 25th International Conference on Antiviral

G. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし

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

研究分担者 前仲勝実 北海道大学大学院薬学研究院 教授

研究要旨 ヒトナチュラルキラー(NK)細胞受容体 Killer cell Ig-like receptor (KIR)群は、細胞傷害性 T 細胞(CTL)にも発現し、主要組織適合性抗原(MHC)であるヒト白血球抗原(HLA)分子を認識することでウイルス感染に対する防御機構を制御している。抑制型 KIR 群はこれらの細胞の不活性化する機能を有する。そこで、本研究では、各種の HLA 分子に結合する HIV 由来ペプチドの同定を網羅的解析により行い、その KIR 群に対する親和性を検証する。これにより KIR 群を制御できる効果的な HIV ペプチド候補を開発することを目指している。本年度は、これまでに開発してきた簡易巻き戻し系と微量ゲルろ過法などを組み合わせた HIV ペプチドの同定法を発展させ、HLA-Cw12 について系を確立し、スクリーニングを行った。その結果、HLA-Cw12 に提示される HIV 由来ペプチドを同定し、NK 細胞受容体 KIR2DL2、2DL3（抑制型）、2DS2（活性型）との表面プラズモン共鳴法による結合解析を行った。

A. 研究目的

ヒトNK細胞や細胞傷害性T細胞(CTL)に発現する細胞表面受容体Killer cell Ig-like receptor (KIR)群はHLAを認識し、ウイルス感染を防御するNK細胞やCTLの制御に関与すると考えられている。これまでに、HIV-1由来ペプチドの変異が抑制型KIR群の活性を高め、NK細胞やCTLの活性を強く抑え、免疫不全を引き起こすと考えている。CTLだけではないHIVの新規の免疫逃避機構として提唱した (AIDS 2009)。本研究では、結合モチーフ情報を基にHIVゲノム配列から候補ペプチドを同定・合成を行い、HLA分子に提示されるかどうかを実験的に検証する。さらに、提示される場合には、実際にペプチドを提示したHLA分子を用いて抑制型および活性型のKIR群に対する親和性を網羅的に検証することにより、KIR群を適切に制御できる効果的なHIVペプチドワク

ン候補分子を見いだすことを目的とする。

B. 研究方法

アミノ酸ペプチドライブラリーから簡易巻き戻し系と微量ゲルろ過解析法を組み合わせ、HLA-Cw12 結合ペプチドを同定するためのスクリーニング条件を確立し、合成した候補ペプチドライブラリーのスクリーニングを行う。HLA-Cw12 に提示された HIV 由来ペプチドについて、NK 細胞受容体 KIR2DL2、KIR2DL3（抑制型）と KIR2DS2(活性型)との結合解析を表面プラズモン共鳴法により行う。

(倫理面での配慮)

基礎的研究であり該当しない。

C. 研究結果

HLA-Cw12 結合モデルペプチドを用いて、微量

巻き戻し法による網羅的スクリーニングを行う系の確立を目指して、巻き戻しおよびゲル濾過時の溶液条件を pH4.5~11 まで変化させて検討した。その結果、pH8 で巻き戻しを行った後に、pH6 でゲル濾過を行うことによって、HLA-Cw12/β2m/ペプチド複合体を明確に検出することができた。この条件で、結合モチーフ情報を基に合成した HIV 由来ペプチドライブラリー約 140 種についてスクリーニングを行ったところ、8 種のペプチドが HLA-Cw12 上に提示された。これらのペプチドについて、HLA-Cw12 と受容体 KIR2DL2、KIR2DL3 (抑制型)、KIR2DS2 (活性型) との相互作用解析を表面プラズモン共鳴法を用いて行った。各ペプチドを提示させた HLA-Cw12 を固定化したチップの上に、抑制型 KIR2DL1 および活性型 KIR2DS1 の可溶型分子を流すことにより、初期の結合解析を行ったところ、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。

D. 考察

HLA-Cw12 に結合するペプチドの網羅的同定を行った結果、HIV ペプチドワクチン候補となる活性型受容体 KIR2DS2 に優位に結合するペプチドの同定には至らなかった。今後、HLA-Cw12 に提示され、受容体 KIR との結合も示すことが明らかになった 4 種のペプチドを基に、変異を導入することによって、受容体との結合様式が変化するか検討する予定である。また、実際に細胞内でペプチド断片化されて HLA-Cw12 に提示される HIV 由来ペプチドの同定を行うための系も立ち

上げる予定である。

E. 結論

- (1) HLA-Cw12 について、巻き戻し-ゲル濾過条件を検討し、ペプチドスクリーニング法を確立した。
- (2) HLA-Cw12 に結合する HIV 由来ペプチドを同定するために、約 140 種のペプチドについてスクリーニングを行い、うち 8 種類のペプチドが結合することを明らかにした。
- (2) HLA-Cw12 結合ペプチドを用いて、KIR2D の抑制型と活性化型との結合解析を行い、4 種類のペプチドが実際に KIR2D と結合することを明らかにした。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Distinct HIV-1 escape patterns selected by cytotoxic T cells with identical epitope specificity. 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. J Virol. 2013 Feb;87(4):2253-63.

2. Structural and functional mosaic nature of MHC class I molecules in their peptide-free form. Kurimoto E, Kuroki K, Yamaguchi Y, Yagi-Utsumi M, Igaki T, Iguchi T, Maenaka K, Kato K. Mol. Immunol. 2013 In the press.

2. 学会発表

1. Kimiko Kuroki, Haruki Matsubara, Yoichi

Watanabe, Yuko Fukunaga, Ryo Kanda, Jun Kamishikiryo, Hathairat Thananchai, Tariro Makadzange, Tao Dong, Sarah Rowland-Jones, Toyoyuki Ose, and Katsumi Maenaka. Structural basis for immune regulation of cell surface receptors in HIV infection. The 13th Kumamoto AIDS Seminar. Kumamoto, October 25th, 2012.

2. 前仲 勝実、ヒト Killer cell Ig-like receptor 群のNK細胞アロ反応性の構造基盤、第71回日本癌学会学術総会、さっぽろ芸文館（札幌）、2012年9月20日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

研究分担者 滝口 雅文

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tomohiro Akahoshi, Takayuki Chikata, Yoshiko Tamura, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka, and <u>Masafumi Takiguchi</u>	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
Takuya Naruto, Hiroyuki Gatanaga, George Nelson, Keiko Sakai, Mary Carrington, Shinichi Oka, and <u>Masafumi Takiguchi</u>	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
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, <u>Masafumi Takiguchi</u> , 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
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 <u>Masafumi Takiguchi</u>	Distinct HIV-1 Escape Patterns Selected by CTLs with Identical Epitope Specificity	J. Virol.	87	2253-2263	2013