

## b. HIV-2感染疑い症例の精査

22症例のHIV-1/HIV-2重複感染疑義症例のうち、21症例がウエスタンブロットでHIV-2陽性を示し、16症例がセロディア1,2においてHIV-2陽性を示した。一方、ペプチラブ1,2、遺伝子学的精査の結果は全てHIV-2陰性を示した。ウエスタンブロットにおいてHIV-2陽性となった症例では主にHIV-2のgp105, p26, Polタンパク質に対する抗体が検出された。6症例のHIV-2単独感染疑義症例の精査の結果、1症例のみ血清学的精査、遺伝子学的精査ともにHIV-2陽性を示した。HIV-2陽性検体から増幅した*env*, *gag*, *pol*遺伝子の系統樹解析から、HIV-2 Group Bに属するウイルスに感染していることが示された。

## D. 考察

### a. HIV-1 臨床分離株を用いたNNRTIに対する交差耐性変異に関する酵素学的な解析

近年新たに登場した非核酸系逆転写酵素阻害剤(NNRTI)であるRPV及びETRは、構造学的な研究からNNRTI結合ポケット内で同様の結合様式であることが明らかになっている。一方で、RPVとETRの薬剤耐性変異パターンが異なることが報告されてきており、それらの耐性メカニズムは明らかになっていない。本研究により、薬剤耐性変異の組み合わせによってはDdDp活性とRdDp活性で、これらNNRTIの薬剤感受性が異なる可能性が強く示唆された。今後、RNAとDNAの鋳型の違いで薬剤感受性が異なる理由について、より詳細な解析を行い、その原因を追求することを計画している。

### b. HIV-2感染疑い症例の精査

HIV-1/HIV-2重複感染が疑われた22症例は、血清学的精査および遺伝子学的精査の結果から、全てHIV-1の単独感染であることが示唆された。上記症例においては、抗HIV-1抗体がHIV-2タンパク質に交差反応した可能性が示唆された。一方で、ウイルスタンパク質の合成ペプチドを利用したイムノブロット法や遺伝子学的精査法はHIV-1/HIV-2感染を識別する方法として有用であることが示された。今後、抗HIV-1抗体が交差反応するHIV-2抗原のエピトープを特定した上で、血清学的精査方法のさらなる改良の必要性があると考えられた。本研究で同定した一例の新規HIV-2感染症例の治療方針を決定する上で、前年度までの研究から得られたHIV-2の薬剤感受性プロファイルおよび既に抗HIV療法を行っている

るHIV-2 CRF01\_ABの臨床経験を有効に活用していく予定である。

## E. 結論

コムギ無細胞系を用いた新規逆転写酵素阻害剤耐性検査法の妥当性について既存の感受性検査法、遺伝子学的検査評価アルゴリズムとの比較検討を行い、高い一致率を示す事を確認した。HIV-2感染が疑われた28症例の精査を実施し、HIV-1/HIV-2重複感染が疑われた症例は全てHIV-1の単独感染である可能性が高いことを明らかにした。また、HIV-2単独感染疑義症例のうち、一例がHIV-2 groupBに属するウイルスに感染していることを示した。IN阻害剤耐性に近傍の多様性が及ぼす影響について解析し、薬剤耐性レベルよりもウイルス増殖能力に影響する事を明らかにした。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

欧文

- 1) Ayumi Kudoh, Shoukichi Takahama, Tatsuya Sawasaki, Hirotaka Ode, Masaru Yokoyama, Akiko Okayama, Akiyo Ishikawa, Kei Miyakawa, Satoko Matsunaga, Hirokazu Kimura, Wataru Sugiura, Hironori Sato, Hisashi Hirano, Shigeo Ohno, Naoki Yamamoto and Akihide Ryo. The phosphorylation of HIV-1 Gag by atypical protein kinase C facilitates viral infectivity by promoting Vpr incorporation into virions. *Retrovirology*. 11(1):9. 2014.
- 2) Nishizawa M, Hattori J, Shiino T, Matano T, Heneine W, Johnson JA, Sugiura W. Highly-Sensitive Allele-Specific PCR Testing Identifies a Greater Prevalence of Transmitted HIV Drug Resistance in Japan. *PLoS One*. 8(12):e83150. 2013.
- 3) Shibata M, Takahashi M, Yoshino M, Kuwahara T, Nomura T, Yokomaku Y, Sugiura W. Development and application of a simple LC-MS method for the determination of plasma rilpivirine (TMC-278) concentrations. *The journal of medical investigation : JMI*. 60(1-2):35-40. 2013.
- 4) Saito A, Nomaguchi M, Kono K, Iwatani Y, Yokoyama M, Yasutomi Y, Sato H, Shioda T, Sugiura W, Matano T, Adachi A, Nakayama EE, Akari H. TRIM5 genotypes in cynomolgus monkeys primarily influence inter-individual diversity in susceptibility to monkey-tropic human immunodeficiency virus type 1. *The Journal of general virology*. 94(Pt 6):1318-1324. 2013.
- 5) Nii-Trebi NI, Ibe S, Barnor JS, Ishikawa K, Brandful JA, Ofori SB, Yamaoka S, Ampofo WK,

Sugiura W. HIV-1 Drug-Resistance Surveillance among Treatment-Experienced and -Naïve Patients after the Implementation of Antiretroviral Therapy in Ghana. *PloS one*. 8(8):e71972. 2013.

- 6) Katano H, Yokomaku Y, Fukumoto H, Kanno T, Nakayama T, Shingae A, Sugiura W, Ichikawa S, Yasuoka A. Seroprevalence of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus among men who have sex with men in Japan. *Journal of medical virology*. 85(6):1046-1052. 2013.
- 7) Jahanbakhsh F, Ibe S, Hattori J, Monavari SH, Matsuda M, Maejima M, Iwatani Y, Memarnejadian A, Keyvani H, Azadmanesh K, Sugiura W. Molecular epidemiology of HIV type 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*. 29(1):198-203. 2013.
- 8) Jahanbakhsh F, Hattori J, Matsuda M, Ibe S, Monavari SH, Memarnejadian A, Aghasadeghi MR, Mostafavi E, Mohraz M, Jabbari H, Kamali K, Keyvani H, Azadmanesh K, Sugiura W. Prevalence of transmitted HIV drug resistance in Iran between 2010 and 2011. *PloS one*. 8(4):e61864. 2013.
- 9) Gatanaga H, Murakoshi H, Hachiya A, Hayashida T, Chikata T, Ode H, Tsuchiya K, Sugiura W, Takiguchi M, Oka S. Naturally Selected Rilpivirine-Resistant HIV-1 Variants by Host Cellular Immunity. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 57(7):1051-1055. 2013.

## 和文

- 1) 福山由美、市川誠一、大林由美子、杉浦 互、横幕能行. 愛知県におけるエイズ診療拠点病院初診患者の受診遅れと検査遅れに関連する要因. *日本エイズ学会誌*, 15(2):119-127. 2013.
- 2) 平野 淳、高橋昌明、柴田雅章、野村敏治、横幕能行、杉浦 互. 結核を合併した日本人HIV感染症例に対するラルテグラビルカリウムとリファンピシン併用に関する検討. *日本エイズ学会誌* 15(1):36-39. 2013.

## 2. 学会発表

### 海外

- 1) Sugiura W. HIV Drug Resistance. Korea, Sep 24-25, 2013.
- 2) Shiino T, Sadamasu K, Nagashima M, Hattori J, Iwatani Y, Yokomaku Y, Sugiura W. Nationwide HIV-1 transmission dynamics estimated by molecular evolutionary analysis in Japan. 8<sup>th</sup> International Workshop on HIV Transmission-Principles of Intervention. Barcelona, Spain, Oct 4-5, 2013.
- 3) Kitamura S, Ode H, Nakashima M, Imahashi M, Naganawa Y, Kurosawa T, Yokomaku Y, Yamane

T, Watanabe N, Suzuki A, Sugiura W, & Iwatani Y. Crystal structure of human APOBEC3C and HIV-1 Vif-binding interface. American Crystallographic Association Annual Meeting. Hawaii, USA, July 20-24, 2013.

- 4) Imahashi M, Izumi T, Imamura J, Matsuoka K, Koyanagi Y, Takaori-Kondo A, Yokomaku Y, Naoe T, Sugiura W, Iwatani Y. A population-based matched-cohort study on insertion/deletion polymorphism of the APOBEC3B gene and risk of HIV-1. 7<sup>th</sup> IAS Conference on HIV Pathogenesis. Treatment and Prevention. Kuala Lumpur, Malaysia, June 30-July 3, 2013.
- 5) Hattori J, Gatanaga H, Kondo M, Sadamasu K, Kato S, Mori H, Minami R, Uchida K, Yokomaku Y, Sugiura W. Japanese Drug Resistance HIV-1 Surveillance Network. Comparison of patient characteristics and trends of transmitted drug resistant HIV between recent and long-term infection among treatment-naïve HIV-1-infected populations in Japan. 7<sup>th</sup> IAS Conference on HIV Pathogenesis. Treatment and Prevention. Kuala Lumpur, Malaysia, June 30-July 3, 2013.
- 6) Shiino T, Sadamasu K, Hattori J, Nagashima M, Iwatani Y, Yokomaku Y, Sugiura W. Molecular phylogenetic analysis of drug resistance transmissions in HIV-1 subtype B in Japan. International Workshop on HIV & Hepatitis Virus Drug Resistance and Curative Strategies. Toronto, Canada, June 4-8, 2013.
- 7) Matsuoka K, Tanabe F, Shigemitsu U, Hattori J, Ode H, Masaoka T, Morishita R, Sawasaki T, Yokomaku Y, Iwatani Y, Sugiura W. Complexity of cross-resistance mutation patterns in dihydropyrimidine non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors rilpivirine and etravirine in clinical isolates. International Workshop on HIV & Hepatitis Virus Drug Resistance and Curative Strategies. Toronto, Canada, June 4-8, 2013.
- 8) 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 crystal structure of APOBEC3C including HIV-1 Vif-binding interface. 4<sup>th</sup> International Symposium on Diffraction Structural Biology. Nagoya, May 26-29, 2013.

### 国内

- 1) 根本理子、伊部史朗、今橋真弓、今村淳治、岩谷靖雅、横幕能行、味澤 篤、杉浦 互. 本邦におけるHIV-2感染疑い症例の実情と問題点. 第27回日本エイズ学会学術集会・総会、熊本、2013年11月.
- 2) 細羽恵理子、鈴木匡弘、杉浦 互. 国内で分離された *Acinetobacter baumannii* の MLST による系統

- 解析. 第25回日本臨床微生物学会、名古屋、2014年2月1-2日.
- 3) 中島雅晶、北村紳悟、黒沢哲平、大出裕高、河村高志、真野由有、今橋真弓、長縄由里子、横幕能行、渡邊信久、杉浦 互、岩谷靖雅. APOBEC3Fタンパク質上のHIV-1 Vif結合領域の同定と構造学的解析. 第36回日本分子生物学会、神戸、2013年12月3-6日.
  - 4) 北村紳悟、中島雅晶、黒沢哲平、大出裕高、河村高志、今橋真弓、長縄由里子、真野由有、横幕能行、渡邊信久、杉浦 互、岩谷靖雅. 抗HIV-1宿主因子APOBEC3FのVif結合領域に関する構造学的解析. 第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013年11月10-12日.
  - 5) 大出裕高、松岡和弘、松田昌和、根本理子、蜂谷敦子、横幕能行、岩谷靖雅、杉浦 互. 次世代シーケンサー Illumina MiSeqによる微小集族薬剤耐性HIVの網羅的検出システムの構築. 第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013年11月10-12日17.
  - 6) 蜂谷敦子、Christie Pautler、Jennifer Moran、Sanath Janaka、Karen A. Kirby、Eleftherios Michailidis、Yee Tsuey Ong、岡 慎一、Michael A. Parniak、前島雅美、松岡和弘、岩谷靖雅、KyeongEun Lee、Vineet N. Kewal Ramani、Kamalendra Singh、杉浦 互、Stefan G. Sarafianos. カプシドと核膜移行を標的とした低分子化合物の開発とその作用機序の解明. 第27回日本エイズ学会学術集会・総会、熊本、2013年11月20-22日.
  - 7) 重見 麗、服部純子、蜂谷敦子、瀧永博之、渡邊大、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、伊藤俊広、古賀道子、岩本愛吉、西澤雅子、岡 慎一、松田昌和、林田庸絵、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、高田清式、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27回日本エイズ学会学術集会・総会、熊本、2013年11月20-22日.
  - 8) 保坂真澄、藤崎誠一郎、服部純子、椎野禎一郎、松田昌和、蜂谷敦子、重見 麗、岡崎玲子、岩谷靖雅、濱口元洋、横幕能行、杉浦 互. 東海地域で見いだされた新たなCRF01\_AE/BリコンビナントHIV-1株. 第27回日本エイズ学会学術集会・総会、熊本、2013年11月20-22日.
  - 9) 中島雅晶、北村紳悟、大出裕高、河村高志、今橋真弓、長縄由里子、黒沢哲平、横幕能行、渡邊信久、杉浦 互、岩谷靖雅. APOBEC3F C末端側ドメインの構造解析とHIV-1 Vif結合インターフェイス. 第27回日本エイズ学会学術集会・総会、熊本、2013年11月20-22日.
  - 10) 齊藤 暁、大附寛幸、東濃篤徳、鈴木紗織、松田健太、高橋尚史、松岡佐織、岩谷靖雅、杉浦 互、野間口雅子、足立昭夫、保富康宏、俣野哲朗、三浦智行、明里宏文. CCR5指向性を示す新規サル指向性HIV-1はサル個体に持続感染する. 第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013年11月10-12日.
  - 11) 今橋真弓、泉 泰輔、渡邊 大、今村淳治、松岡和弘、正岡崇志、佐藤 桂、金子典代、市川誠一、小柳義夫、高折晃史、内海 眞、横幕能行、白阪琢磨、直江知樹、杉浦 互、岩谷靖雅. 宿主防御因子APOBEC3Bの遺伝子欠損によるHIV-1感染伝播・病勢への影響に関する研究. 第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013年11月10-12日.
  - 12) Michailidis、Yee Tsuey Ong、岡 慎一、Michael A. Parniak、前島雅美、松岡和弘、岩谷靖雅、KyeongEun Lee、Vineet N. KewalRamani、Kamalendra Singh、杉浦 互、Stefan G. Sarafianos. カプシドと核膜移行を標的とした低分子化合物の開発とその作用機序の解明. 第27回日本エイズ学会学術集会・総会、熊本、2013年11月20-22日.
  - 13) 大出裕高、松岡和弘、松田昌和、根本理子、蜂谷敦子、横幕能行、岩谷靖雅、杉浦 互. 次世代シーケンサー Illumina MiSeqによるHIVゲノム配列の網羅的解析システムの構築. 第27回日本エイズ学会学術集会・総会、熊本、2013年11月20-22日.
  - 14) 齊藤 暁、大附寛幸、東濃篤徳、鈴木紗織、松田健太、高橋尚史、松岡佐織、岩谷靖雅、杉浦 互、野間口雅子、足立昭夫、保富康宏、俣野哲朗、三浦智行、明里宏文. CCR5指向性を示す新規サル指向性HIV-1はサル個体に持続感染する. 第27回日本エイズ学会学術集会・総会、熊本、2013年11月20-22日.
  - 15) 今橋真弓、泉 泰輔、渡邊 大、今村淳治、松岡和弘、佐藤 桂、金子典代、市川誠一、小柳義夫、高折晃史、内海 眞、横幕能行、白阪琢磨、直江知樹、岩谷靖雅、杉浦 互. HIV-1感染伝播・病勢に対するAPOBEC3B遺伝子型の影響に関する解析. 第67回国立病院総合医学会、金沢、2013年11月8-9日.
  - 16) Ode H, Sugiura W, Yokomaku Y. Molecular dynamics simulations of HIV-1 protease-inhibitor complex with modified charges for catalytic aspartate. 第51回日本生物物理学会年会、京都、2013年10月28-30日.
  - 17) 中島雅晶、北村紳悟、黒沢哲平、大出裕高、河村高志、今橋真弓、長縄由里子、横幕能行、渡邊信久、杉浦 互、岩谷靖雅. HIV-1 Vif結合領域を持つAPOBEC3F C末端側ドメインの構造解析. 第15回白馬シンポジウム、名古屋、2013年7月19-20日.
  - 18) 松岡和弘、重見 麗、大出裕高、蜂谷敦子、服部純子、森下了、澤崎達也、横幕能行、岩谷靖雅、杉浦 互. HIV-1臨床分離株を用いたRalpivirine及びEtravirineに対する交差耐性変異に関する酵素学的な解析. 第15回白馬シンポジウム、名古屋

屋、2013年7月19-20日。

- 19) 大出裕高、松岡和弘、松田昌和、根本理子、蜂谷敦子、横幕能行、岩谷靖雅、杉浦 互。次世代シーケンサーIllumina MiSeqによるHIVゲノム解析系の構築。第15回白馬シンポジウム、名古屋、2013年7月19-20日。
- 20) 今橋真弓、泉 泰輔、渡邊 大、今村淳治、松岡和弘、佐藤 佳、小柳義夫、高折晃史、横幕能行、白阪琢磨、杉浦 互、岩谷靖雅、直江知樹。HIV-1感染伝播・病勢に対するAPOBEC3B遺伝子型の影響に関する解析。第15回白馬シンポジウム、名古屋、2013年7月19-20日。
- 21) 北村紳悟、大出裕高、中島雅晶、今橋真弓、長縄由里子、黒沢哲平、横幕能行、山根 隆、渡邊信久、鈴木淳巨、杉浦 互、岩谷靖雅。ヒト抗レトロウイルス因子APOBEC3ファミリー間におけるHIV-1 Vif結合インターフェイスの構造比較。第13回日本蛋白質科学会年会、鳥取、2013年6月12-14日。
- 22) 杉浦 互。「HIV治療の進歩と薬剤耐性HIVの動向」。大阪、2013年6月1日。

#### G. 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

## 侵入阻害薬に対する耐性機構の解明

研究分担者

吉村 和久 国立感染症研究所エイズ研究センター 室長

### 研究要旨

今年度は、前年度に引き続き、*in vitro*で誘導したY1 (subtype B) ウイルスのmaraviroc (MVC) 高度耐性ウイルスのEnv組換えウイルスを作製し、詳細にgp120の変異とMVC耐性の関連性を調べた。これまでに、コントロールウイルスは、CD4bs抗体に対してのみ中等度感受性だが、V3やCD4i抗体に対しては高度耐性であった。一方、高度MVC耐性変異Envウイルスは、V3中和抗体を含む全ての中和抗体に、高度感受性へと変化した。このことは、HIVがMVCから逃避する変異を獲得することにより、それまで耐性であった自己の抗体に対しても感受性へと変化する可能性を示唆している。そこで、より細かなMVC耐性変異ウイルスクローンを作製し、各種抗体の感受性と耐性変異の相関を詳細に検討した。

### A. 研究目的

新規の作用点を持つ薬剤 (coreceptor結合阻害剤、CCR5阻害剤のMVCなど) の耐性変異に関する研究は、これまでの薬剤耐性とは全く様相を異にする。なぜなら、これらはHIVではなく宿主の受容体に作用する抗HIV薬だからである。そこで、昨年度に引き続き、*in vitro*誘導を行ったMVC耐性subtype B臨床分離株 (Y1) を用いて組換えウイルスを作製し、MVCのみならず、種々の抗Env中和単クローン抗体や、ウイルスを分離した症例から得た血清IgGに対する感受性の変化を調べる。また、治療中の症例のウイルスの変異と抗体感受性の関係も調べる。

### B. 研究方法

R5ウイルスの耐性ウイルス誘導を行うため、CCR5高発現T細胞株であるPM1/CCR5細胞と親細胞株であるPM1細胞 (CCR5発現量がPM1/CCR5細胞に比較して非常に低い) を用い*in vitro* R5ウイルスのMVCに対する耐性誘導を試み、得られたそれぞれの継代ウイルスを用いて、MVCに対する耐性をPM1/CCR5細胞を用いたWST-8 assay (細胞傷

害阻止試験) により判定した。WST-8 assayにより逃避ウイルスの誘導が確認できたところで、これらのウイルスのenvelopeのシークエンスを行い、耐性能付与責任変異部位を特定した。MVC耐性変異を持つウイルスのEnvをpNL43ベースのplasmidに組み込み、感染性クローンウイルスを作製する。それをもとに、site-directed mutagenesis法を用いて、耐性変異部位と予測されるアミノ酸部位を一つずつ組み込んだクローンを作成し、中和抗体感受性の異なる感染性クローンパネルを構築する。また、抗Env中和タンクローン抗体の中和感受性を組換えウイルスを用いて調べる。

### (倫理面への配慮)

本研究を行うに当たり該当症例には研究の概要を説明し同意を得た上で採血し、解析した。なお本研究の倫理的・科学的妥当性は熊本大学附属病院の先進医療審査委員会で審査され、了承されている。また、遺伝子組換え生物等を用いる実験については、必要に応じた国立感染症研究所の機関承認を取得済みである。

### C. 研究結果

昨年度より引き続き使用しているR5臨床分離株Y1は、2009年にhemophiliaの症例から分離された臨床株で、典型的なサブタイプB株である。簡単に*in vitro*耐性誘導の方法を述べると、まずMVCの濃度を1 nMから開始し、徐々に薬剤濃度を上げて行き、最終的には10 $\mu$ Mまで上げる(48パッセージ)。

次に、それぞれのパッセージウイルスのEnvシーケンスを行い、比較検討した。その結果、MVC耐性誘導ウイルスのC2, V3及びC4領域に新たに認められた、V200I, T297I, K305R, M434Iの耐性変異であった。これにより樹立された、MVC高度耐性ウイルス、およびコントロールウイルスのEnvをpNL43ベースのplasmidに組み込み、それぞれの感染性クローンウイルスを作製した。これらの組換えウイルスを用いて、gp120の変異と中和抗体感受性との関連性を調べた結果、高度MVC耐性変異Envを持つウイルスは、低CCR5馴化Envを持つウイルスよりもCD4bsとCD4i抗体に対してより感受性になっただけでなく、抗V3中和抗体に対しても高度感受性へと変化する事が分かった。

そこで、キー変異と考えられる4つの変異(V200I, T297I, K305R, M434I)を順番に抜いていった組換えウイルスと、単独で持っているウイルスの作製を試み、それぞれの耐性変異と各種抗HIV-1

Env中和単クローン抗体の感受性との関係を検討した。

その結果、MVC高濃度存在下でselectされたT297I+M434Iが中和抗体感受性付与に重要な場所である事が分かった。この変異を持つ組換えウイルスは、テストした全ての中和抗体に対して高度感受性を示した(図1)。

一方、MVC治療下で分離されてくるウイルスが、治療開始後1年7ヶ月でこれまで全く耐性だった自己の血清IgGにやや感受性に変化した。このことは、MVCのプレッシャーにより影響を受けたEnvの変異が抗体感受性へと移行した可能性を示している(図2)。

### D. 考察

今回、MVC高度耐性ウイルス、およびコントロールウイルスのEnvをpNL43ベースのplasmidに組み込み、感染性クローンウイルスを作製し、種々の抗体に対するアッセイを行った。その結果、MVCに高度耐性を付与するEnvの変異がEnv全体の3量体での立体構造を変化させて、特にV3に対する中和抗体のアクセスを良くすることが示唆された。このことは、血中抗体価が高い患者にMVCを使用することで耐性変異株の出現を抑制でき、治療効果が長続きする可能性を示唆している。

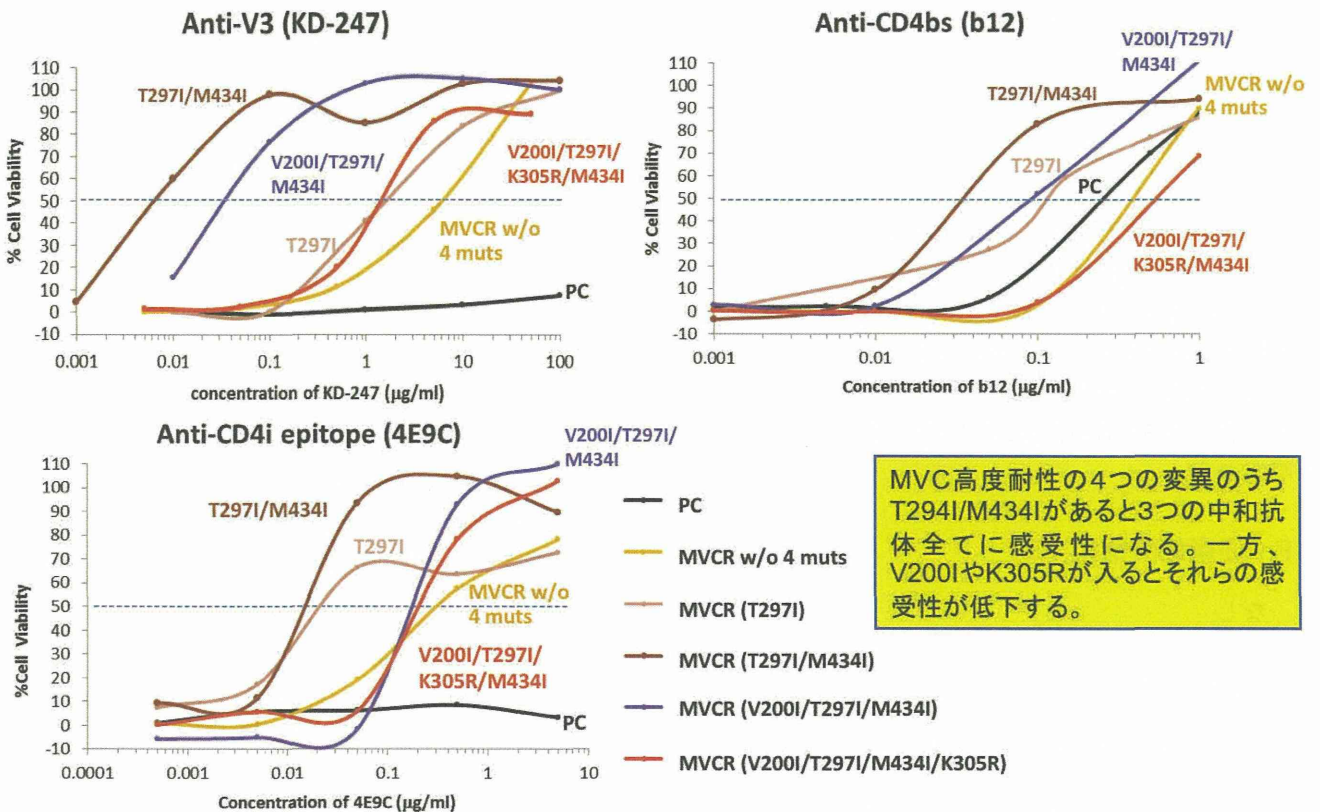


図1 MVC高度耐性変異を持つウイルスクローンの3種の中和単クローン抗体への感受性の比較

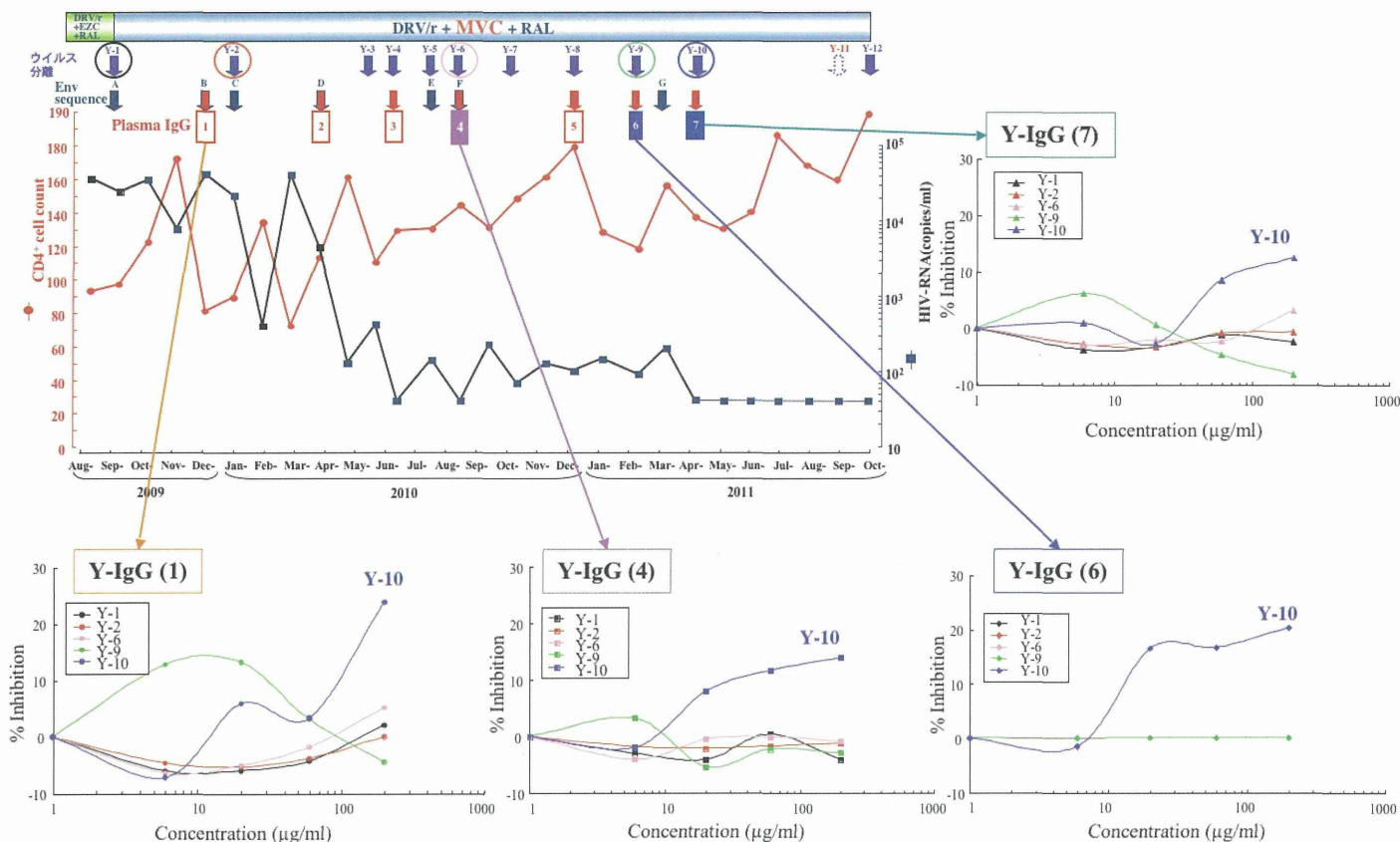


図2 MVC長期投与による抗体感受性ウイルスの出現

また、このMVC治療中の症例から経時的に分離されてくるウイルスが、1年7ヶ月後に自己の抗体に対して感受性が増した事から、*in vivo*においてもMVCと抗体感受性の間に何らかの関係性が示唆された。

**E. 結論**

MVC高濃度存在下でselectされたT297I+M434Iが中和抗体感受性付与に重要な場所である事が分った。MVC治療下で分離されてくるウイルスが、治療開始後1年7ヶ月でこれまで全く耐性だった自己の血清IgGや中和抗体に感受性に变化した。MVC治療が自己の中和抗体の活性化に寄与する可能性が示唆された。

**F. 健康危険情報**

なし

**G. 研究発表**

**1. 論文発表 (\*corresponding author)**

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, 94:933-943, 2013.

2) 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, 87: 5424-5436, 2013.

3) 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. Bioorg Med Chem, 21:2518-2526, 2013.

4) Kuwata T, Takaki K, Enomoto I, Yoshimura K, Matsushita S. Increased infectivity in human cells and resistance to antibody-mediated neutralization by truncation of the SIV gp41 cytoplasmic tail. Frontiers in Microbiology/Virology, 4:1-7, 2013.

5) Hashimoto C, Narumi T, Otsuki H, Hirota Y, Arai H, Yoshimura K, Harada S, Ohashi N, Nomura W, Miura T, Igarashi T, Matsushita S, and Tamamura H. A CD4 mimic as an HIV entry inhibitor: Pharmacokinetics. Bioorg Med Chem, 21: 7884-7889, 2013.

6) Otsuki H, Hishiki T, Miura T, Hashimoto C, Narumi T, Tamamura H, Yoshimura K, Matsushita S, and

Igarashi T. Generation of a replication-competent simian human immunodeficiency virus, the neutralisation sensitivity of which can be enhanced in the presence of a small molecule CD4 mimic. *J Gen Virol*, 94: 2710-2716, 2013.

## 2. 学会発表

### 国際学会

- 1) Shigeyoshi Harada, Samatchaya Boonchawalit, Tetsuo Narumi, Hirokazu Tamamura, Shuzo Matsushita, Kazuhisa Yoshimura. Impact of CD4 mimetics-resistant mutations on susceptibilities to anti-Env nMAbs. 21<sup>st</sup> Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI2014), Boston, MA, U.S.A., 2014.
- 2) Shigeyoshi Harada, Samatchaya Boonchawalit, Tetsuo Narumi, Hirokazu Tamamura, Shuzo Matsushita, Kazuhisa Yoshimura. In vitro selection of bifunctional CD4 mimic small compounds (NBD analogues) using bulk and cloned primary isolates. 14<sup>th</sup> Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 2013.
- 3) Samatchaya Boonchawalit, Shigeyoshi Harada, Shuzo Matsushita, Kazuhisa Yoshimura. Analysis of relationships between Maraviroc (MVC) resistant mutations and sensitivity to antibody-mediated neutralization. 14<sup>th</sup> Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 2013.
- 4) Yuki Hirota, Tetsuo Narumi, Kazuhisa Yoshimura, Shigeyoshi Harada, Chie Hashimoto, Wataru Nomura, Tatsuhiko Igarashi, Shuzo Matsushita, Hirokazu Tamamura. Indole-type small CD4 mimic molecules targeting an HIV envelope protein gp120. 14<sup>th</sup> Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 2013.
- 5) Shigeyoshi Harada, Samatchaya Boonchawalit, Shuzo Matsushita, Kazuhisa Yoshimura. Analysis of interaction between gp120 and CD4 mimic small compounds that enhance the activity of anti-HIV neutralizing antibodies. AIDS Vaccine 2013, Barcelona, Spain, 2013.
- 6) Samatchaya Boonchawalit, Shigeyoshi Harada, Shuzo Matsushita, Kazuhisa Yoshimura. Characterization of highly neutralizing antibody sensitive HIV-1 gp120 induced under high concentrations of maraviroc (MVC) *in vitro*. AIDS Vaccine 2013, Barcelona, Spain, 2013.
- 7) Shigeyoshi Harada, Samatchaya Boonchawalit, Tetsuo Narumi, Hirokazu Tamamura, Shuzo Matsushita, Kazuhisa Yoshimura. CD4 mimic small compounds, NBD-556 and its analogues bind at 3 amino acid positions in the gp120 CD4 cavity. 20<sup>th</sup> Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI 2013), Atlanta, GA, U.S.A., 2013.
- 8) Kazuhisa Yoshimura, Shigeyoshi Harada,

Samatchaya Boonchawalit, Shuzo Matsushita. Impact of maraviroc-resistant and low CCR5-adapted mutations induced *in vitro* passage on sensitivity to anti-Env neutralizing antibodies. 20<sup>th</sup> Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI 2013), Atlanta, GA, U.S.A., 2013.

### 国内学会

- 1) 原田恵嘉、鳴海哲夫、Samatchaya Boonchawalit、玉村啓和、松下修三、吉村和久。バルクおよびクロンウイルスを用いたCD4類似低分子化合物誘導体に対する *in vitro* 耐性ウイルス誘導。第27回日本エイズ学会学術集会・総会、熊本、2013。
- 2) 大附寛幸、丸田泰広、橋本智恵、鳴海哲夫、廣田雄樹、原田恵嘉、三浦智行、吉村和久、玉村啓和、松下修三、五十嵐樹彦。抗V3抗体および低分子CD4ミミック曝露後投与によるアカゲザルでのSHIV複製抑制。第27回日本エイズ学会学術集会・総会、熊本、2013。
- 3) Samatchaya Boonchawalit、原田恵嘉、松下修三、吉村和久。Analysis of relationships between Maraviroc (MVC) resistant mutations and sensitivity to antibody-mediated neutralization. 第27回日本エイズ学会学術集会・総会、熊本、2013。
- 4) 五領舞衣、原田恵嘉、石井洋、吉村和久、俣野哲朗。細胞内ドメイン欠損Envを有するHV/SIV粒子の作製。第27回日本エイズ学会学術集会・総会、熊本、2013。
- 5) 原田恵嘉、Samatchaya Boonchawalit、松下修三、吉村和久。インテグラーゼ阻害剤ラルテグラビルがMVC耐性HIV-1 Env領域に与える影響。第60回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013。
- 6) 原田恵嘉、Samatchaya Boonchawalit、松下修三、吉村和久。In vitro selection of bifunctional CD4 mimic small compounds (NBD analogues) using bulk and cloned primary isolates. 第15回白馬シンポジウム、名古屋、2013。
- 7) 五領舞衣、原田恵嘉、石井洋、俣野哲朗、吉村和久。Impact of deletion in cytoplasmic tail on Env incorporation into HIV/SIV particles. 第15回白馬シンポジウム、名古屋、2013。

## 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



## 抗HIV薬の感染予防効果の解析

研究分担者

川村 龍吉 山梨大学医学部附属病院 皮膚科 講師

### 研究要旨

HIVの世界的流行を阻止すべく、性行為HIV感染を予防する新たな外用剤（マイクロビサイド）の開発が世界中で精力的に行われている。HIVは主に粘膜ランゲルハンス細胞の感染を介して生体内に侵入する。今回の我々の研究結果から、新規NRTI：EFdAおよびCCR阻害薬：Maravirocの併用がランゲルハンス細胞のHIV感染をより強力に抑制することが明らかとなった。新たな性行為HIV感染阻害方法として異なるマイクロビサイドの併用が有用である可能性が示唆された。

### A. 研究目的

世界的なHIVの流行を阻止すべく、新たなマイクロビサイドの開発が全世界で精力的に推し進められてきた。昨年度までの我々の研究結果から、HIVの生体内侵入における最も重要な感染ターゲットである表皮内ランゲルハンス細胞（以下LCs）を *ex vivo* あるいは *in vitro* で高濃度R5HIVに曝露する実験系において、新規抗HIV薬：EFdAあるいはCCR阻害薬：MVCがそれぞれ単独でマイクロビサイドとしての優れた感染予防効果を持つことが示された（論文発表1, 2）。本年度の研究目的は、上記のLCsの *ex vivo* / *in vitro* HIV感染実験系を用いて、EFdAとMVCの併用による阻害効果を検討し、マイクロビサイド併用療法（ARP；Anti-Retroviral Prophylaxis）が性行為HIV感染に対する新たな予防法として臨床応用可能であるかを検討することにある。

### B. 研究方法

異性間性行為HIV感染において、皮膚・粘膜表皮LCsは最も重要な初期感染ターゲットであり、HIV侵入後の生体内ウイルス播種においても中心的な役割を果たすと考えられている。そこで、単球由来ランゲルハンス細胞（mLC；monocyte-derived LC）のを *in vitro* HIV感染実験系を用いて、抗HIV薬：EFdA、新規CCR5阻害剤：Maraviroc（MVC）、お

び両薬剤併用による *in vitro* でのHIV感染阻害効果を比較検討した。まず、健常ボランティアから末梢血を採取して、単球をGM-CSF/IL-4/TGF- $\beta$ 存在下で一週間培養することでmLCを作製した。次にmLCをEFdA（0.1-100 nM）、MVC（1-5000 nM）、あるいはEFdA + MVCで30分間前処置し、各々のmLCにHIV BaL（R5 HIV）を曝露した。2時間後にmLCを3回PBSにて洗浄し、7日間培養した。HIV曝露7日後にmLCを回収し、PE標識抗langerin抗体およびAPC標識抗CD11c抗体（LCマーカー）で染色後、FITC標識抗HIVp24抗体でintracellular stainingし、フローサイトメトリーにてmLCのHIV感染率を比較解析した。さらに、同一ボランティアから得た末梢血よりCD4陽性T細胞を調整し、それぞれのDrug/HIV曝露後mLCと共培養し（mLC：CD4<sup>+</sup> T cells = 1：100）、培養上製中のHIVp24をELISAにて定量し、CD4陽性T細胞からのHIV産生量、すなわちHIV感染mLCからCD4陽性T細胞へのHIV播種能を比較検討した。

### （倫理面への配慮）

健常ボランティアから採取した血液を用いる研究は山梨大学倫理委員会の了承を得ている（承認番号：598）。本研究において用いられるmLCは、ボランティア本人のインフォームドコンセントを得てから使用している。また、ヒト皮膚を用いた *ex vivo*

HIV感染に関しても、同倫理委員会の手承を得ている（承認番号：237）。

### C. 研究結果

図1に示す如く、EFdA、MVCの前処置は、濃度依存性にそれぞれmLCのHIV感染を抑制した。さらに、subeffective doseのEFdAにMVCを1-5000nMを加えると、MVCの濃度依存性にEFdAによる抑制効果のさらなる抑制増強効果が観察された。この薬剤前処置によるmLCのHIV感染効果はHIV感染mLCからCD4陽性T細胞へのHIV播種能との相関が認められ、図2に示す如くEFdA（0.1 nM）およびMVC（10 nM）の併用は単剤群に比べて有意な抑制増強効果が認められた。

### D. 考察

今回の研究結果は、mLCのHIV感染抑制実験において、EFdAとMVC併用が両薬剤単剤群に比べて有意に優れた抑制効果を持つことを示唆している。性行為HIV感染において性器粘膜内LCがHIV侵入の重要なターゲットであることより、今回の結果は作用機序の異なるEFdAとMVCをマイクロビサイドとして併用することによって、性行為HIV感染をより確実に予防できる可能性を示唆している。

### E. 結論

AIDS治療における現行の多剤併用療法（ART; Anti-Retroviral Therapy）同様、性行為HIV感染予防においてもマイクロビサイド併用療法（ARP; Anti-Retroviral Prophylaxis）が有用であることが示唆された。

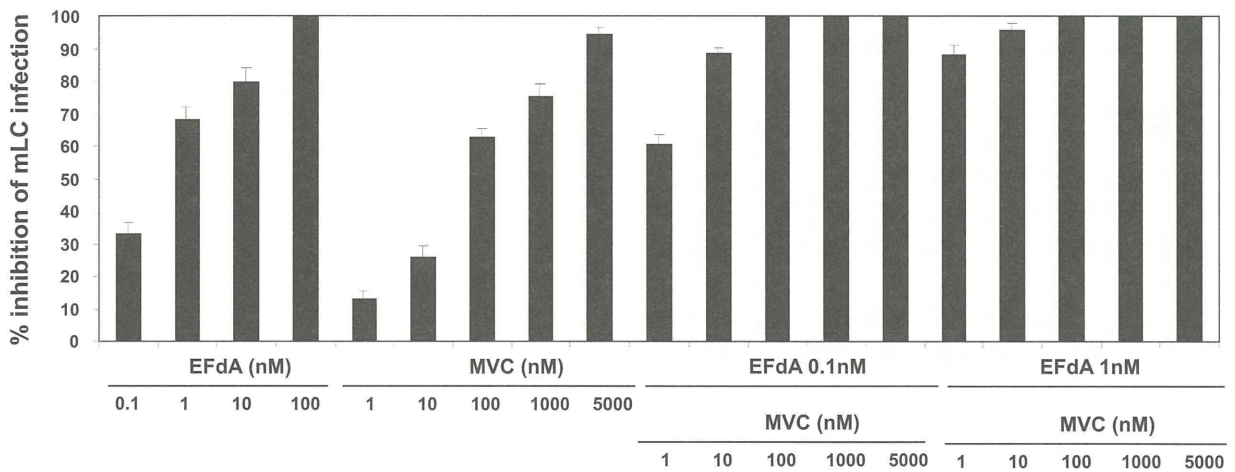


図1 EFdAおよびMVCによるmLCのHIV感染抑制

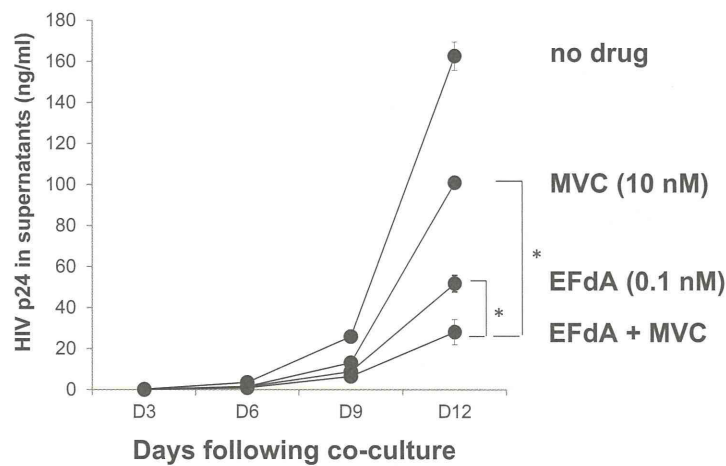


図2 EFdAおよびMVCによるHIV感染mLCから非感染T細胞へのHIV播種抑制効果