

## 研究発表

## 研究代表者

市川誠一

(○研究班関連発表)

(論文発表)

- 1) ○塩野徳史, 金子典代, 市川誠一, 山本政弘, 健山正男, 内海眞, 木村哲, 生島嗣, 鬼塚哲郎: MSM (Men who have sex with men) における HIV 抗体検査受検行動と受検意図の促進要因に関する研究, 日本公衆衛生学雑誌, 2013, 60 卷(10 号), 639-650
- 2) H. Katano, Y. Yokomaku, H. Fukumoto, T. Kanno, T. Nakayama, A. Shingae, W. Sugiura, S. Ichikawa, and A. Yasuoka: Seroprevalence of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Among Men Who Have Sex With Men in Japan, Journal of Medical Virology, 2013, 85, 1046-1052
- 3) ○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, 2013, 15(2), 119-127
- 4) 堀希好, 金子典代, 市川誠一: 養護教諭が生徒から受ける同性への性的指向の相談の実態と対応に関する研究, 思春期学, 2013, 31(1), 167-174
- 5) ○市川誠一: 男性同性愛者を対象とした HIV 抗体検査普及の取り組みー「エイズ予防のための戦略研究」後のエイズ発生動向の考察, 病原微生物検出情報, 2012, 33(9), 231-232
- 6) ○J. Koerner, S. Shiono, S. Ichikawa, N. Kaneko, H. Tsuji, T. Machi, D. Goto and T. Onitsuka: Factors associated with unprotected anal intercourse and age among men who have sex with men who are gay bar customers in Osaka, Japan, Sexual Health, 2012, 9(4), 328-333
- 7) ○金子典代, 塩野徳史, コーナ・ジェーン, 新ヶ江章友, 市川誠一: 日本人成人男性における生涯での HIV 検査受検経験と関連要因, 日本エイズ学会誌, 2012, 日本エイズ学会誌, 14, 99-105
- 8) ○金子典代, 大森佐知子, 辻宏幸, 鬼塚哲郎, 市川誠一: ゲイ・バイセクシュアル男性における HIV 感染予防行動のステージと関連要因ー大阪市内での商業施設利用者への質問紙調査から, 日本公衆衛生雑誌, 2011, 58(7), 501-514
- 9) ○塩野徳史, 金子典代, 市川誠一: 日本成人男性における HIV および AIDS 感染拡大の状況ーMSM(Men who have sex with men) と MSM 以外の男性との比較ー厚生省の指標, 2011, 58(13), 12-19
- 10) ○J. Koerner, S. Ichikawa: Testing, treatment and prevention among gay men and other men who have sex with men in Japan-An update, HIV Australia, 2011, 9(3), 40-43
- 11) ○J. Koerner, S. Ichikawa: The Epidemiology of HIV/AIDS and Gay Men's Community-Based Responses in Japan, Intersections: Gender and Sexuality in Asia and the Pacific, Issue, 26, August 2011 (海外学会)
- 1) D. Dorjgotov, S. Oka, S. Ichikawa, E. Gombo, D. Jagdagsuren, S. Shiono, N. Galsanjamts: Effect of the activities of non-governmental organizations (NGOs) on men who have sex with men (MSM) in Mongolia, the 11th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific, Bangkok, Thailand, 2013
- 2) N. Galsanjamts, M. Dorjgotov, E. Gombo, D. Jagdagsuren, S. Shiono, N. Kaneko, S. Oka, S. Ichikawa: Development & implementation of the project "We are Living Under the Same Sky", the 11th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific, Bangkok, Thailand, 2013
- 3) O.S. Shiono, S. Ichikawa, Y. Tada: Trends in the incidence of HIV and AIDS by decade of birth among MSM of Japanese nationality, the 11th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific, Bangkok, Thailand, 2013

## 研究分担者

金子典代

(論文発表)

- 1) ○塩野徳史, 金子典代, 市川誠一, 山本政弘, 健山正男, 内海眞, 木村哲, 生島嗣, 鬼塚哲郎: MSM (Men who have sex with men) における HIV 抗体検査受検行動と受検意図の促進要因に関する研究, 日本公衆衛生学雑誌, 2013, 60 卷(10 号), 639-650
- 2) 堀希好, 金子典代, 市川誠一: 養護教諭が生徒から受ける同性への性的指向の相談の実態と対応に関する研究, 思春期学, 2013, 31(1), 167-174
- 3) ○J. Koerner, S. Shiono, S. Ichikawa, N. Kaneko, H. Tsuji, T. Machi, D. Goto and T. Onitsuka: Factors associated with unprotected anal intercourse and age among men who have sex with men who are gay bar customers in Osaka, Japan, Sexual Health, 2012, 9(4), 328-333
- 4) ○金子典代, 塩野徳史, コーナ・ジェーン, 新ヶ江章友, 市川誠一, 日本人成人男性における生涯での HIV 検査受検経験と関連要因, 日本エイズ学会誌, 2012, 日本エイズ学会誌, 14, 99-105
- 5) ○金子典代, 大森佐知子, 辻宏幸, 鬼塚哲郎, 市川誠一: ゲイ・バイセクシュアル男性における HIV 感染予防行動のステージと関連要因ー大阪市内での商業施設利用者への質問紙調査から, 日本公衆衛生雑誌, 2011, 58(7), 501-514
- 6) ○塩野徳史, 金子典代, 市川誠一: 日本成人男性における HIV および AIDS 感染拡大の状況ーMSM(Men who have sex with men) と MSM 以外の男性との比較ー厚生省の指標, 2011, 58(13), 12-19

## 伊藤俊広

(論文発表)

- 1) O.S. Ichikawa, N. Kaneko, J. Koerner, S. Shiono, A. Shingae, and T. Ito: Survey investigating homosexual behaviour among adult males used to estimate the prevalence of HIV and AIDS among men who have sex with men in Japan, 2010, Sexual Health, 8(1), 123-124.

(国内学会)

- 1) ○金子典代, 塩野徳史, 健山正男, 山本政弘, 鬼塚哲郎, 内海眞, 伊藤俊弘, 岩橋恒太, 市川誠一: MSM向けインターネット横断調査に続く追跡パネル調査法の妥当性の検討, 第27回日本エイズ学会学術集会・総会, 熊本市, 2013年11月

#### 内海 眞

(論文発表)

- 1) ○塩野徳史, 金子典代, 市川誠一, 山本政弘, 健山正男, 内海眞, 木村哲, 生島嗣, 鬼塚哲郎: MSM (Men who have sex with men) における HIV 抗体検査受検行動と受検意図の促進要因に関する研究, 日本公衆衛生学雑誌, 2013, 60 卷(10 号), 639-650 (海外学会)
- 1) ○A. Shingae, N. Kaneko, S. Shiono, S. Ichikawa, M. Utsumi :HIV Testing among MSM Attending Community-based HIV Testing Events in Nagoya, Japan from 2008 to 2010, The 10th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific (ICAAP), Busan, Korea, 2011

#### 鬼塚哲郎

(論文発表)

- 1) ○塩野徳史, 金子典代, 市川誠一, 山本政弘, 健山正男, 内海眞, 木村哲, 生島嗣, 鬼塚哲郎: MSM (Men who have sex with men) における HIV 抗体検査受検行動と受検意図の促進要因に関する研究, 日本公衆衛生学雑誌, 2013, 60 卷(10 号), 639-650
- 2) ○J. Koerner, S. Shiono, S. Ichikawa, N. Kaneko, H. Tsuji, T. Machi, D. Goto and T. Onitsuka: Factors associated with unprotected anal intercourse and age among men who have sex with men who are gay bar customers in Osaka, Japan, Sexual Health, 2012, 9(4), 328-333
- 3) ○金子典代, 大森佐知子, 辻宏幸, 鬼塚哲郎, 市川誠一, ゲイ・バイセクシュアル男性における HIV 感染予防行動のステージと関連要因 大阪市内での商業施設利用者への質問紙調査から, 日本公衆衛生雑誌, 58(7), 501-514, 2011 (海外学会)
- 1) ○D. Goto, S. Shiono, T. Machi, T. Onitsuka, N. Kaneko, S. Ichikawa: Effectiveness of preventive intervention related to condom use among MSM in the Kinki area, the 11th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific, Bangkok, Thailand, 2013 (国内学会)
- 1) ○町登志雄, 後藤大輔, 鬼塚哲郎, 川畑拓也, 塩野徳史, 市川誠一: MSM 向け HIV 検査普及プログラム「クリニック検査 1000 円キャンペーン」広報についての考察, 第27回日本エイズ学会学術集会・総会, 熊本市, 2013年11月
- 2) ○川畑拓也, 後藤大輔, 町登志雄, 鬼塚哲郎, 塩野徳史, 市川誠一, 岳中美江, 岩佐厚, 亀岡博, 菅野展史, 高田昌彦, 田端運久, 中村幸生, 古林敬一, 小島洋子, 森治代: 診療所を窓口とした MSM 向け HIV 検査普及プログラムの改良に向けた検討, 第27回日本エイズ学会学術集会・総会, 熊本市, 2013年11月

#### 山本政弘

(論文発表)

- 1) ○塩野徳史, 金子典代, 市川誠一, 山本政弘, 健山正男, 内海眞, 木村哲, 生島嗣, 鬼塚哲郎: MSM (Men who have sex with men) における HIV 抗体検査受検行動と受検意図の促進要因に関する研究, 日本公衆衛生学雑誌, 2013, 60 卷(10 号), 639-650
- 2) 須貝恵, 鈴木智子, センテノ田村恵子, 辻典子, 井内亜紀子, 濱本京子, 吉用緑, 山本政弘: 活用状況を考慮した「拠点病院診療案内」のあり方についての検討—拠点病院診療案内の活用に関するアンケート調査より—, 日本エイズ学会雑誌, 2013, 15(3), 199-200
- 3) 須貝恵, 辻典子, 吉用緑, センテノ田村恵子, 鈴木智子, 井内亜紀子, 濱本京子, 山本政弘: 拠点病院の患者紹介現状から考える医療体制の課題—拠点病院から拠点病院以外の医療機関への患者紹介実績調査より—, 日本エイズ学会雑誌, 2013, 15(3), 201-203 (国内学会)
- 1) ○牧園裕也, 荒木順子, 石田敏彦, 太田貴, 金城健, 後藤大輔, 伊藤俊広, 内海眞, 鬼塚哲郎, 山本政弘, 健山正男, 塩野徳史, 金子典代, 市川誠一: MSM 向けエイズ対策としてのコミュニティセンターの意義と妥当性の検討, 第27回日本エイズ学会学術集会・総会, 熊本市, 2013年11月

#### 健山正男

(論文発表)

- 1) ○塩野徳史, 金子典代, 市川誠一, 山本政弘, 健山正男, 内海眞, 木村哲, 生島嗣, 鬼塚哲郎: MSM (Men who have sex with men) における HIV 抗体検査受検行動と受検意図の促進要因に関する研究, 日本公衆衛生学雑誌, 2013, 60 卷(10 号), 639-650
- 2) 健山正男, 比嘉太, 藤田次郎: 我が国における AIDS 発症動向—「いきなり AIDS」の問題, 日本医事新報, 2013, 4676, 25-30
- 3) K. Hibiya, M. Tateyama, K. Teruya, M. Mochizuki, H. Nakamura, D. Tasato, M. Furugen, F. Higa, H. Endo, Y. Kikuchi, S. Oka, J. Fujita: Depression of Local Cell-mediated Immunity and Histological Characteristics of Disseminated AIDS-related Mycobacterium avium Infection after the Initiation of Antiretroviral Therapy, Intern Med, 2013, 52(16), 1793-1803
- 4) K. Hibiya, K. Teruya, M. Tateyama, S. Oka, J. Fujita: Enteral entrance of Mycobacterium avium in patients with disseminated mycobacterial disease. International Journal of Mycobacteriology, 2013, 121-122 (国内学会)
- 1) ○金子典代, 塩野徳史, 健山正男, 山本政弘, 鬼塚哲郎, 内海眞, 伊藤俊弘, 岩橋恒太, 市川誠一: MSM 向けインターネット横断調査に続く追跡パネル調査法の妥当性の検討, 第27回日本エイズ学会学術集会・総会, 熊本市, 2013年11月

#### 本間隆之

(論文発表)

- 1) 松高由佳, 古谷野淳子, 桑野真澄, 橋本充代, 本間隆之, 山崎浩司, 横山葉子, 日高庸晴: Men who have Sex with Men (MSM) における感染予防行動を妨げる認知に関する検討, 日本エイズ学会誌, 2013, 15(2), 134-140

研究課題：HIV 母子感染の疫学調査と予防対策および女性・小児感染者支援に関する研究

課題番号：H24-エイズ一般-002

研究代表者：塚原 優己（独立行政法人国立成育医療研究センター周産期・母性診療センター 医長）

研究分担者：喜多 恒和（奈良県立奈良病院周産期母子医療センター センター長兼産婦人科部長）

外川 正生（大阪市立総合医療センター小児医療センター 部長）

吉野 直人（岩手医科大学医学部 准教授） 大島 教子（獨協医科大学医学部 講師）

明城 光三（国立病院機構仙台医療センター 部長）、

## 1. 研究目的

わが国の HIV 感染妊娠症例の掌握、予防対策の充実とその周知徹底による母子感染の完全阻止、HIV 感染妊婦・出生児の支援体制の整備などが研究の主な目的である。

## 2. 研究方法

1) HIV 感染妊婦とその出生児の動向および妊婦 HIV 検査実施率に関する全国調査(吉野班):①全国産婦人科標榜病院施設を対象に、妊婦 HIV 検査実施率と HIV 感染妊婦の診療経験の有無などを調査する。(産婦人科 1 次調査) ②全国小児科標榜病院施設を対象に、感染妊婦より出生した児の診療経験の有無を調査する。(小児科 1 次調査) 2) HIV 感染妊婦とその児に関する臨床データの集積および HIV 感染妊婦データの解析(喜多班): ①24 年度に更新した産婦人科小児科統合データベースに、24 年度全国調査による新規報告症例を追加する。(外川班と共同研究)②吉野班調査で HIV 感染妊婦の診療経験ありと回答した産婦人科診療施設から HIV 感染妊婦の疫学的・臨床的情報を集積する。(産婦人科 2 次調査) ③HIV 感染判明後の複数回妊娠例について、妊娠転帰と社会・経済環境との関係等を解析する。3) HIV 感染妊婦から出生した児の実態調査と健康発達支援に関する研究(外川班): ①前述。②吉野班調査で HIV 感染妊婦より出生した児の診療経験ありと回答した小児科診療施設から母児の臨床情報を集積する。

(小児科 2 次調査) ③妊婦・新生児に投与された抗ウイルス薬の児に及ぼす影響につき集積症例の長期予後調査を行う。4) わが国独自の HIV 母子感染予防対策マニュアルの作成・改訂及びその啓発・普及に関する研究(塚原班): ①24 年度に収集した HIV 感染妊娠に関わる最新情報を基に、25 年度に「HIV 母子感染予防対策マニュアル」を改訂(第 7 版)発刊する。②一般妊婦・HIV 感染女性・支援者・それぞれを対象とした解説冊子類を、最新情報を基に逐次改訂し、広く国民に対し HIV 母子感染予防の啓発・普及を行う。5) HIV 感染妊婦の診療体制整備(地域連携)に関する研究(明城班): ①全国の分娩取扱いエイズ拠点病院と総合および地域周産期母子医療センターを対象とし、

HIV 感染妊婦受け入れ実績、受け入れの可否、受け入れ可能な妊娠週数、受け入れ不可能であれば受け入れ可能施設との連携状況などについて調査を行う。②地域医療として HIV 診療体制と周産期医療体制の効率的かつ実効性を伴う協調のあり方について検討を加える。6) HIV 妊婦スクリーニングの問題解消と伝搬性遅発性疾患母子感染予防対策の比較に関する研究(大島・塚原班): ①妊婦 HIV スクリーニング偽陽性について、平成 16 年の偽陽性率・陽性的中率の調査、および 19 年の陽性妊婦の心理的不安に関する調査を再度行い、現状を再評価する。②栃木方式の全国普及に向け、全国の利用状況を調査し本法の有効性を検証し、普及に向けた問題点とその対策を検討する。③他の母子感染予防対策との比較検討を行い、本邦における伝搬性遅発性疾患の母子感染予防対策の有効性を検証する。

(倫理面への配慮)

調査研究に関しては、個人情報の守秘を遵守する。必要に応じて所属施設等で倫理委員会審査を受けた。

## 3. 研究結果

1) 吉野班:①産婦人科 1 次調査では、有効回答率 70.9% (前年度比 1.8%減)、今年度の HIV 感染妊娠はのべ 45 症例(前年度比 2 例増)、未報告例はのべ 32 例だった。妊婦 HIV 検査実施率は全国平均 99.7%(前年比 0.3%減)だった。妊婦全例に HIV 検査を行わない理由等に関して解析中である。②小児科 1 次調査では、有効回答率 57.2% (前年度比 1.4%増)、今年度 HIV 感染妊婦より出生した小児症例数はのべ 31 症例(前年度比 5 例増)、未報告例はのべ 12 例だった。2) 喜多班:①産婦人科小児科統合データベース更新の結果、24 年 12 月までに妊娠転帰が明らかとなった HIV 感染妊娠は 803 例で出生児数は 550 児。24 年は 33 例で 20 年以降年間 30 例以上が続き、大きな変動はない。東京都 197 例、千葉県 82 例、愛知県 75 例、神奈川県 71 例、大阪府 56 例と大都市圏に多い。母子感染報告は 52 例で、21 世紀に入り平成 14 年、17 年、18 年、20 年、21 年に各 1 例、22 年に 2 例と散発的であった。

HAART+経膈分娩の症例は 4 例(3 例は母子感染なし、1 例は不明)。2000 年以降の母子感染率は、選択的帝切+抗ウイルス薬群 0.4%、選択的帝切のみ群 5.8%、抗ウイルス薬のみ群 0.0%、いずれもなし群は 20.0%だった。最近 5 年間(20 年~24 年)の特徴は、約半数(81 例 46.8%)が日本人妊婦、緊急帝切の増加(ほとんどが産科適応)、3 例以外が拠点病院で管理等である。②産婦人科 2 次調査: 1 次調査報告症例は 75 例。うち 24 年以前の妊娠転帰症例で未報告症例 17 例、25 年妊娠転帰症例 25 例、妊娠中の症例 9 例、当班に既に報告されている症例 20 例、転帰不明 4 例だった。現在調査結果を解析中である。③HIV 感染判明後の妊娠回数別の分娩に至った症例の割合をこの 5 年間で比較すると、妊娠後の HIV 感染判明 70.4%(38/54)に対し、感染が判明した妊娠後の初回妊娠 50.7%(34/67)、2 回目妊娠以降 46.9%(23/49)と低下し、逆に人工妊娠中絶率は、各々 7.4%(4/54)、20.9%(14/67)、28.6%(14/49)と増加していた。3) 外川班: ①前述。②小児科 2 次調査で臨床情報が得られた 29 例(非感染 15 例、未確定 14 例、感染例なし)について解析。出生年は平成 25 年 14 例、24 年 11 例、23 年 3 例、21 年 1 例。東京都が多く 10 例。母親国籍は、日本が多数を占め 17 例。父親国籍と父親の感染状況は、日本が半数以上の 18 例(うち 6%が感染)。全例が抗ウイルス薬を服薬(妊娠前から 15 例、妊娠中開始 13 例)し、帝王切開分娩(予定 27 例、陣発による緊急 2 例)で、母乳は禁止し、新生児に抗ウイルス薬を投与していた。奇形報告はなし。貧血は 21 例。神経運動発達異常やミオパチー、高乳酸血症、突然死などの報告なし。③現在勤務中の小児科医が HIV 感染女性から生まれた子どもの診療経験ありと回答した 38 施設の 271 例を対象に、発育発達を中心とした長期予後調査が進行中である。4)塚原班: ①「HIV 母子感染予防対策マニュアル」改訂(第 7 版)は 3 月発刊予定。②「第 20 回 AIDS 文化フォーラム in 横浜」「第 3 回 AIDS 文化フォーラム in 京都」にて市民公開講座を開催した。5)明城班: 総合周産期母子医療センターの多くはエイズ拠点病院機能も有していた。しかし地域差があり、総合周産期母子医療センターでかつエイズ拠点病院の割合は、全国で 81%、北海道、北陸、四国は 100%、近畿 40%、九州 66.7%、総合周産期母子医療センターがエイズ拠点病院機能も担うためには、これまで以上のインセンティブが必要かもしれない。6)大島班・塚原班: スクリーニング偽陽性調査の結果、現行の抗原抗体同時検査法の偽陽性率(0.097%)、陽性的中率(6.5%)で 16 年調査とほぼ同等。スクリーニング陽性受け入れ施設からの妊婦の動揺の報告も減少している印象を受ける。

#### 4. 考察

ほぼ全例の妊婦が HIV 検査受検するようになったと考えられ、今後は未受検の原因とその対策の検討が望まれる。HIV 感染妊娠は数年来年間 30 例程度で母子感染は散発的という現状に変化はない。経膈分娩の妥当性については世界的にも結論が得られていない。既に HIV 陽性と診断を受けている女性の妊娠例が増加しており、この群で中絶率が高いことも問題である。抗ウイルス薬の影響による児の異常を示唆する報告はなかった。

#### 5. 自己評価

##### 1) 達成度について

各分担研究班とも概ね計画通りに研究が進んでいる。現時点までに得られると予測した成果は着実にあげられている。HIV 母子感染予防対策マニュアル改訂第 7 版は 3 月頃発刊の見通しで、妊婦 HIV スクリーニング偽陽性に関する調査も完了した。小児科 2 次調査は現在まとめの段階、産婦人科 2 次調査も結果解析中である。抗ウイルス薬の児に及ぼす長期予後調査も 2 次調査の回収中である。今年度の研究計画は、ほぼ達成可能と考えられる

##### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

当研究班が有する統合データベースは、10 年以上前より継続している全国規模疫学調査に基づいたわが国で唯一、各症例の臨床的・社会的情報が集積されたデータベースであり、かつ本分野では世界に類のない高質のデータベースである。女性及び小児は感染者が少数であるゆえに、社会的支援に滞りを来すことが多い。その問題点の洗い出しと対策の立案が必要である。

##### 3) 今後の展望について

今後も HIV 感染妊娠に関する全国調査を継続することは必須である。女性・小児感染者の支援について今後も具体策の拡充をめざすこと、そして HIV 母子感染に関する国民の関心・理解の高揚に向け活発な啓発活動が展開されることが望まれる。

#### 6. 結論

わが国の周産期および小児 HIV 感染症の臨床疫学調査を行い、産科・小児科統合データベースを更新した。わが国の周産期 HIV 医療の問題及び女性・小児感染者支援に関する問題に関する対策を模索した。

#### 7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

なし

別紙

研究発表

研究代表者

塚原優己

原著論文による発表

- 1) 塚原優己, 喜多恒和, 外川正生, 吉野直人, 谷口晴記: 特集: 女性と感染 up to date 9. HIV 感染症. 産婦人科の実際 2014 ; 81 : in press
- 2) 塚原優己: 読み方がわかる! 説明できる! 産科の臨床検査ディクショナリー 血液検査 HIV 抗体. ペリネイタルケア 2014 年新春増刊 2014 ; :44-47
- 8) 谷口晴記, 塚原優己, 山田里佳, 田中浩彦, 伊藤譲子, 鳥田部邦明, 千田時弘, 小林良成, 井澤美穂, 朝倉徹夫, 吉野直人, 外川正生, 喜多恒和, 稲葉憲之, 和田裕一: 本邦における HIV 母子感染予防対策について. 日本産婦人科・新生児血液学会誌 2013 ; 22 (2) : 69-73.
- 10) 塚原優己, 喜多恒和, 外川正生, 吉野直人, 谷口晴記: 特集: 母子感染 up to date: HIV 感染症. 産婦人科の実際 2013 ; 62 : 1473-1480
- 11) 塚原優己: 日本産婦人科医会共同プログラム 1. 産科医療補償制度: 事例から見た脳性まひ発症の原因と予防対策 3. 分娩中の発熱に関連した脳性まひ. 日産婦誌 2013 ; 65 (10) : N221-N224, 2013.
- 12) 塚原優己: シーンで学ぶ産婦人科診療ガイドライン 2011. CQ612. 妊娠中に HTLV-1 抗体陽性が判明した場合は?. ペリネイタルケア 2013 ; 32 (1) : 72-74.

口頭発表

- 1) 山田里佳, 谷口晴記, 千田時広, 矢永由里子, 佐野貴子, 喜多恒和, 外川正生, 吉野直人, 大島教子, 塚原優己: 妊婦 HIV スクリーニング検査の偽陽性に関する調査-2004 年調査と比較して-. 第 26 回日本性感染症学会, 2013 年 岐阜.
- 2) 山田里佳, 谷口晴記, 千田時広, 矢永由里子, 佐野貴子, 明城光三, 喜多恒和, 外川正生, 吉野直人, 大島教子, 和田裕一, 稲葉憲之, 塚原優己: 妊婦 HIV スクリーニング検査の偽陽性に関する調査-2004 年調査と比較して-. 第 27 回日本エイズ学会, 2013 年, 熊本.
- 3) 矢永由里子, 山田里佳, 谷口晴記, 千田時広, 佐野貴子, 喜多恒和, 外川正生, 吉野直人, 大島教子, 明城光三, 稲葉憲之, 和田裕一, 塚原優己: 妊婦 HIV スクリーニング検査の調査による検査時対応の現状と課題の検討. 第 27 回日本エイズ学会, 2013 年, 熊本.

研究分担者

喜多恒和

原著論文による発表

- 1) 伊藤由子, 吉野直人, 高橋尚子, 喜多恒和, 外川正生, 塚原優己, 戸谷良造, 稲葉憲之, 和田裕一. 妊婦の HIV 感染確認と HIV 感染妊婦に対する意識に関する全国助産所調査. 日本エイズ学会誌. 15 (1) : 18-24, 2013.

口頭発表

- 2) 喜多恒和. (特別講演) わが国の HIV 感染妊娠の現状と他の感染症について. 平成 24 年度兵庫県医師会感染症研修会, 2013 年, 神戸.
- 3) 喜多恒和. (研修会) エイズ, 過去・現在・未来~HIV 母子感染予防の歴史~. HIV/AIDS 研修会, 2013 年, 下関.
- 4) 喜多恒和: (ミートザエキスパート) HIV 感染妊娠の現状と問題点. 第 30 回日本産婦人科感染症研究会, 2013 年, 東京.
- 5) 喜多恒和. わが国の HIV 母子感染に関する全国調査報告. 奈良県産婦人科医会学術講演会, 2013 年, 奈良.
- 6) 喜多恒和, 吉野直人, 外川正生, 稲葉憲之, 和田裕一, 塚原優己. (シンポジウム) わが国における HIV 感染妊娠の動向と近年の特徴. 第 27 回日本エイズ学会学術集会, 2013 年, 熊本.

## 外川正生

## 原著論文による発表

## 英文

- 1) Aoki H, Shiomi M, Ikeda T, Ishii T, Shimizu N, Togawa M, Okamoto N, Kadoya M, Wada Y. Decreased sialylation of IgA1 O-glycans associated with pneumococcal hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Int.* 2013 Dec;55(6):e143-5.

## 和文

- 1) 外川正生. HIV 感染女性から出生した子どもの実態調査と子どもの健康と発達支援. 2012 (平成 24) 年度厚生労働科学研究費補助金 (エイズ対策研究事業) 「HIV 母子感染の疫学調査と予防対策および女性・小児感染者支援に関する研究」班研究分担報告書. 2013 年 4 月
- 2) 外川正生. Guideline 抗 HIV 治療ガイドライン XIV 小児、青少年期における抗 HIV 療法. 平成 24 年度厚生労働科学研究費補助金 (エイズ対策研究事業) HIV 感染症及びその合併症の課題を克服する研究班. 2013 年 3 月

## 吉野直人

## 原著論文による発表

- 1) 吉野直人、高橋尚子、伊藤由子、竹下亮輔、杉山徹、喜多恒和、外川正生、戸谷良造、稲葉憲之、和田裕一、塚原優己：診療所と病院における妊婦 HIV スクリーニング検査の比較. *日本エイズ学会誌* in press.

## 口頭発表

- 2) 吉野直人、喜多恒和、高橋尚子、伊藤由子、杉山徹、竹下亮輔、外川正生、戸谷良造、稲葉憲之、和田裕一、塚原優己：病院及び診療所における妊婦 HIV スクリーニング検査実施率の推移. 第 27 回日本エイズ学会 (2013. 11 熊本)
- 3) 吉野直人、喜多恒和、外川正生、稲葉憲之、和田裕一、塚原優己：妊婦 HIV 検査の現状と課題. 第 27 回日本エイズ学会シンポジウム (2013. 11 熊本)

## 明城光三

## 原著論文による発表

- 1) 明城光三、和田裕一、五味淵秀人、蓮尾泰之、吉野直人、喜多恒和、外川正生、稲葉憲之、塚原優己. HIV 母子感染. 別冊日本臨床 感染症症候群 (第 2 版) 一症候群から感染性単一疾患までを含めて一 下 臓器別感染症編. :703-707, 2013
- 2) 明城光三、和田裕一. HIV 母子感染について. *仙台医療センター医学雑誌*. 2:2-9, 2013

## 口頭発表

- 1) 明城光三、大沢昌二、鈴木智子、蓮尾泰之、林 公一、塚原優己、和田裕一. 東北地方における早産 HIV 感染妊婦に対する地域連携体制に関する研究. 国立病院総合医学会、2013 年、金沢.
- 2) 明城光三、和田裕一、五味淵秀人、蓮尾泰之、林 公一、谷口晴記、喜多恒和、大島教子、稲葉憲之、塚原優己. 東京都における早産 HIV 感染妊婦の診療体制に関する調査. 日本産科婦人科学会、2013 年、札幌.

## 大島教子

## 原著論文による発表

- 1) 稲葉憲之、大島教子、稲葉未知世、伊藤志峯、岡崎隆行、西川正能、渡辺 博、深澤一雄、吉野直人、喜多恒和、外川正生、明城光三、和田裕一、塚原優己：性感染症と母子感染 -最新の診断と管理-母子感染 HIV/AIDS. *臨床婦人科産科* 2013 ; 67(1) 163-170,

## 口頭発表

- 1) 稲葉憲之、塚原優己、吉野直人、喜多恒和、外川正生、明城光三、大島教子、和田裕一、戸谷良造：HIV 母子感染対策におけるわが国の努力とその成果- 諸外国の実状と比較して-. 第 27 回日本エイズ学会会長招請プレナリーセッション、2013 年、熊本.

研究課題：血友病とその治療に伴う合併症の克服に関する研究

課題番号：H24-エイズ一般-004

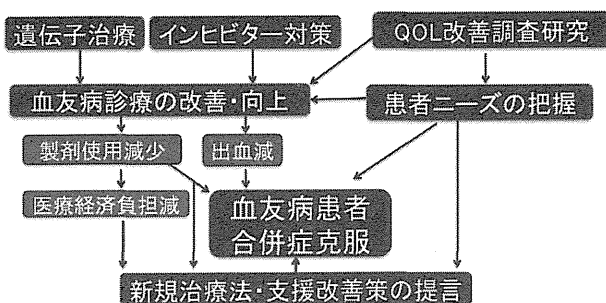
研究代表者：坂田 洋一（自治医科大学医学部分子病態治療研究センター分子病態研究部 客員・名誉教授）

研究分担者：窓岩 清治（自治医科大学医学部分子病態治療研究センター分子病態研究部 講師）、大森 司（同 講師）、小澤 敬也（自治医科大学医学部分子病態治療研究センター遺伝子治療研究部 教授）、水上 浩明（同 准教授）、嶋 緑倫（奈良県立医科大学小児科学教室 教授）、長谷川 護（ディナベック株式会社 代表取締役社長）、稲葉 浩（東京医科大学臨床検査医学講座 講師）、菱川 修司（自治医科大学医学部先端医療技術開発センター医療技術トレーニング部門 准教授）、竹谷 英之（東京大学医学研究所 講師）、瀧 正志（聖マリアンナ医科大学 教授）柿沼 章子（社会福祉法人はばたき福祉事業団 事務局長）、村松 慎一（自治医科大学医学部神経内科 特命教授）、峰野 純一（タカラバイオ株式会社 細胞・遺伝子治療センター センター長）

## 1. 研究目的

血友病は血液凝固第 VIII 因子 (FVIII)、または第 IX 因子 (FIX)異常による遺伝性出血性疾患である。治療に用いられた凝固因子製剤に起因する HIV や HCV 感染により、患者健康は著しく阻害された。本研究は血友病患者の合併症を克服するために、製剤投与に頼らない新規治療（遺伝子治療）の開発を行う。さらに治療を阻害する凝固因子インヒビターの発症要因の同定とその対策を講じ、本研究の双方向性を担保するための QOL 調査研究、および聞き取り調査により患者支援ニーズを抽出する（図）。

図 本研究の目的と意義



## 2. 研究方法

研究を 3 つの柱に分けるが、各班員が情報を共有し、密に連携することで効率よく目的を達成するよう研究を進める。

①遺伝子治療：これまでにアデノ随伴ウイルス (AAV) 8 型ベクターによる血友病 B 遺伝子治療技術を確立した。本遺伝子治療は 1 回の末梢静脈からのベクター投与により、ほぼ永続的に凝固因子産生部位の肝臓から凝固因子産生が可能となる。平成 25 年度はヒト臨床試験を想定した日本製ベクターを作製する。作製ベクターをサルに静注し、治療凝固因子レベルを定量する。本遺伝子治療の成功には、血中の抗 AAV 抗体が存在しないことが肝要である。この抗 AAV 抗体の保有率を実際の血友病患者で検討する。我々は過去に、バルーンカテーテルを用いて経門脈的に AAV ベクターを投与することで、抗 AAV 抗体陽性サルにおいても治療を可能とする技術を世界に先駆けて開発した。本年は、実験ブタを用いてこのバルーンカテーテルによる抗体回避遺伝子導入法の循環動態・肝障害への影響を評価する。これらの治療法を患者数の多い血友病 A に適応するため、サルに対してヒト FVIII を免疫し、サル体内でヒト FVIII を特異的に検出する抗体を作製する。

過去の QOL 調査から血友病患者 QOL を阻害する因子として、繰り返す関節内出血による血友病性関節障害が重要であった。本研究班で開発した血友病関節障害に対する FVIII 遺伝子導入間葉系幹細胞の関節内投与法の効果・安全性を確立する。

②インヒビター対策：血友病患者の 20-30% に凝固因子インヒビター（阻害抗体）が生じ、治療抵抗性となる。過去に線溶抑制因子 PAI-1 が免疫に関与することを明らかにしたが、PAI-1 制御によるインヒビター抑制効果をマウスモデルで検討する。さらに凝固因子発現 iPS 由来胸腺上皮細胞を作成し、その胸腺投与による凝固因子インヒビター発生率を検討する。実際の患者インヒビターのエピトープ、その凝固阻害機構を同定し、インヒビター活性測定法の標準化を進める。実臨床では、我が国初めての全国的な血友病患者を対象とした前方視的コホートへの患者登録を進め、その解析から、インヒビター発生とその消長に関わる患者関連要因、及び製剤種類や投与方法など治療関連要因の解明を全国的規模で展開する。

③QOL 向上のための調査研究：実際の患者ニーズを抽出すべく、血友病患者に配布した QOL 評価表 SF-36 を用いたアンケートを回収し、本邦の患者 QOL を阻害する因子を抽出する。HIV 感染被害血友病患者とその家族参加型のアクションリサーチを施行し、ファクトシート改訂や遺伝相談を展開する。これにより支援経験評価、遺伝に関する心理検査に関する分析を実施する。

（倫理面への配慮）

遺伝子治療開発、動物実験は国の法律・指針と各大学・施設の規定を遵守する。臨床研究は最新の各省庁の倫理指針を遵守し、学内、必要な場合は国の審査を経た上で実施する。特に聞き取り調査では個人情報保護に格段の注意を払う。

## 3. 研究結果

常法により血友病 B 用 GMP レベル AAV ベクターを作製し、サルで長期に治療効果が得られたが、同作製法でヒトでの必要量を概算すると粗ウイルス調製で 4 ヶ月以上、コストも消耗品で数千万円を超えた。より実現可能な製造システムを目指し、より安価に必要な量を生産できる新たなバキュロウイルスによる AAV ベクター製造システムを開発した。本治療の成功の鍵となる抗 AAV 中和抗体は患者の 3-4 割に陽性であった（論文受理）。抗 AAV 中和抗体陽性サルへの門脈内ベクター投与法を世界に先駆けて開発し（論文受理）、実験ブタのシミュレーションで循環動態や肝機能障害への影響はなかった。サルでヒト FVIII（サ

ルと 98%以上相同性) を認識する特異的抗体を作製し、血友病 A に対する同遺伝子治療をサルで検討する目処がついた。細胞治療法として、ヒト間葉系幹細胞や iPS 細胞からの凝固因子の発現、治療効果を確認した(一部論文受理)。PAI-1 ノックアウトマウスでは FVIII に対するインヒビターが減じ、PAI-1 抑制薬によるインヒビター制御法の可能性を見出した(投稿中)。抗 FVIII-A2 ドメイン抗体が存在すると重症血友病 A よりも凝固能が阻害されること、バイパス製剤 APCC が微量の FVIII を限定分解し初期の凝固促進に寄与することを示した(論文受理)。インヒビター測定標準血漿を作製し検査手法の確立に近づいた。新規血友病患者に関するコホートは 40 施設 219 例の登録を完了し、臨床的情報と分子生物学的情報の 2 つの側面から検討を開始した。SF-36 を用いた QOL 調査票の回収を終え、一次解析を開始し、定期補充療法群では出血、及びインヒビター発症が少ないことが判明した。計 39 件の薬害 HIV 感染被害者・家族等に面接調査・集合調査、及び 30 件の質問紙調査を実施し、準備性指標を評価することで保因者の支援経験に関するニーズを予測するモデルを作成した。保因者の支援経験や健康予防行動に個人差があり、個別支援の必要性が明らかとなった。

#### 4. 考察

血友病 B は GMP グレード AAV ベクターが作製し得れば臨床試験を開始できる。一見遠回りだが、バキュロウイルスを用いた新規 AAV ベクター作製法を開発したことは、高品質ベクターの安定した供給体制を自国で整備する意義として大きい。この遺伝子治療の特徴は 1 回の投与で長期に効果が得られる点である。ベクター感染を阻害する抗 AAV 抗体は 6-7 割の患者で陰性であり(特に若年者に陰性が多い)、多くの患者に本治療の効果が期待できる。残りの 3-4 割でも本研究班により開発された抗体回避法の安全性が確認され、臨床応用可能なレベルに近づいた。さらに、血友病 A の前臨床試験を前提としてサル体内でのヒト FVIII 検出系を確立した。QOL 阻害因子である関節障害に対する細胞治療法も、ヒト間葉系幹細胞による凝固因子発現を確認したため、安全性が担保されれば臨床試験が可能である。インヒビター治療法の開発や、データベースを用いた我国のインヒビター発症要因の解明は、今後の実臨床におけるインヒビター対策に寄与すると考えられる。今回の SF-36 調査票は過去よりも多い患者より解答が得られた。個別調査の結果も併せ、解析により新たな支援法の提言に結びつく。さらに、アクションリサーチによる調査では、現行の遺伝相談が血友病家系の遺伝、ならびに保因者の健康を含む相談の機会となっておらず、さらに詳細な個別調査の重要性が認識された。以上より、本研究の 3 つの柱から、我が国において、総合的に血友病患者の合併症を克服するための基盤・体制が構築されつつある。

#### 5. 自己評価

##### 1) 達成度について

GMP グレードの AAV ベクターを年度中に作製予定であったが、より現実的な新規作製技術を開発し、持続的な遺伝子治療の提供に対する基盤が得られた。また、患者数が多い血友病 A の遺伝子治療基礎検討が非ヒト霊長類で行える抗ヒト FVIII 抗体の作製の意義も大きい。今後、

より多くの患者を対象とした治療への提言が行えると考えている。インヒビター制御手法の開発、ならびにインヒビターの内的・外的要因を同定するための前向きデータベース作製、SF-36 を用いた QOL 調査票の登録・回収も予定通り進んでおり、来年度にはさらに患者に対して有益な新たな知見が得られると考えている。以上より、本年度は十分な成果が得られており、プロジェクトは目的に向かって順調に進んでいる。

##### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

遺伝子治療により、血友病患者の製剤投与による苦痛・感染リスクは回避され、患者 QOL は著明に改善する。種々の難治性疾患に応用可能な遺伝子治療のプラットフォームとなる高品質なベクターの安定的な供給体制・基盤を自国で独自に開発し整備する意義も大きい。さらに疾患の治療に結びつく遺伝子治療、及びインヒビター制御は出血合併症を減じ、かつ医療費の削減に結びつき、製剤混入異物障害のリスクを減じる。さらに QOL 調査で直接患者ニーズを拾い出すことにより研究の双方向性が担保され、国民への還元を考慮した方法・政策を提言することができる(図)。

##### 3) 今後の展望について

今回開発したバキュロウイルス作製法による GMP グレード AAV ベクターの精製、並びにヒト遺伝子治療臨床研究の院内倫理委員会への申請を行うことで、血友病 B 遺伝子治療臨床試験へ歩を進める。さらにサルや我々が開発した血友病 A プタを用い、患者数の多い血友病 A に本手法・細胞治療法を適応するための技術開発を行う。我国のデータベース構築では登録をさらに増やし、インヒビター発症要因を明らかにし、新規治療や患者支援に結びつける。QOL 調査 SF-36 を用いたアンケート解析、さらに聞き取り調査によって、我国の特異的 patient ニーズの抽出に務める。さらに保因者、及びその家族に対して、遺伝問題克服の準備性に対する社会的診断を行い、準備性向上の連携モデルの提案を目指し、支援ツールの作製を行う。最終的には、これらを統合することで本研究目標を実現する。

#### 6. 結論

血友病 B を対象とした AAV ベクター臨床研究の基礎的技術、ならびにベクター大量作製の効率化技術の開発に成功した。今後、本技術を用いて血友病 B 臨床研究を行う。さらに、より多くの患者が恩恵を受けられるよう、本治療の血友病 A へ応用、並びに、関節局所を標的とした細胞治療の開発を継続する。これら遺伝子細胞治療だけでなく、凝固因子インヒビター発症の機序解明・制御手法の開発、さらに調査研究による患者自身のニーズ抽出という、3 つの研究結果を有機的に統合することで、日本における血友病患者・HIV 薬害患者を取り巻く環境を改善し、合併症の克服に結びつけるように研究を継続させる。

#### 7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

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



## 研究発表

## 研究代表者

坂田 洋一

## 研究分担者

窓岩 清治、大森 司

- 1) Sakata A, Ohmori T, Nishimura N, Suzuki H, Madoiwa S, Mimuro J, Kario K, Sakata Y. Paxillin is an intrinsic negative regulator of platelet activation in mice. *Thromb J.* (in press)
- 2) Mimuro J, Mizukami H, Shima M, Matsushita T, Taki M, Muto S, Higasa S, Sakai M, Ohmori T, Madoiwa S, Ozawa, K, Sakata Y. The prevalence of neutralizing antibodies against adeno-associated virus capsids is reduced in young Japanese individuals. *J Med Virol.* (in press)
- 3) Kashiwakura Y, Ohmori T, Mimuro J, Madoiwa S, Inoue M, Hasegawa M, Ozawa K, Sakata Y. Production of functional coagulation factor VIII from iPSCs using a lentiviral vector. *Haemophilia* 20:e40-44, 2014.
- 4) Yasumoto, A, Madoiwa S, Kashiwakura, Y, Ishiwata, A, Ohmori T, Mizukami H, Ozawa K, Sakata Y, Mimuro, J. Overexpression of factor VII ameliorates bleeding diathesis of factor VIII-deficient mice with inhibitors. *Thromb Res.* 131:444-449, 2013.
- 5) Mimuro J, Mizukami H, Hishikawa S, Ikemoto T, Ishiwata A, Sakata A, Ohmori T, Madoiwa S, Ono F, Ozawa K, Sakata Y: Minimizing the Inhibitory effect of neutralizing antibody for efficient gene expression in the liver with adeno-associated virus 8 vectors. *Mol Ther.* 21:318-323, 2013.
- 6) Madoiwa S, Kitajima I, Ohmori T, Sakata Y, Mimuro J. Distinct reactivity of the commercially available monoclonal antibodies of D-dimer and plasma FDP testing to the molecular variants of fibrin degradation products. *Thromb Res.* 132: 457-464, 2013.
- 7) Watanabe N, Ohashi K, Tatsumi K, Utoh R, Shim I, K Kanegae K, Kashiwakura Y, Ohmori T, Sakata Y, Inoue M, Hasegawa M, Okano T. Genetically modified adipose tissue-derived stem/stromal cells, using simian immunodeficiency virus-based lentiviral vectors, in the treatment of hemophilia B. *Hum Gene Ther.* 24: 283-294, 2013.
- 8) Koyama K, Madoiwa S, Tanaka S, Koinuma T, Wada M, Sakata A, Ohmori T, Mimuro J, Nunomiya S, Sakata Y. Evaluation of hemostatic biomarker abnormalities that precede platelet count decline in critically ill patients with sepsis. *J Crit Care.* 28: 556-563, 2013.
- 9) 坂田洋一. 血友病 遺伝子治療のもたらすパラダイムシフト 日本における血友病遺伝子治療 出口を求めて(解説). *先端医薬年報.* (14):4-7, 2013.

## 研究分担者

小澤 敬也、水上 浩明

- 1) Hata K, Mizukami H, Sadakane O, Watakabe A, Ohtsuka M, Takaji M, Kinoshita M, Isa T, Ozawa K, Yamamori T. DNA methylation and methyl-binding proteins control differential gene expression in distinct cortical areas of macaque monkey. *J Neurosci.* (in press)
- 2) Uehara T, Kanazawa, T Mizukami H, Uchibori R, Tsukahara T, Urabe M, Kume A, Misawa K, Carey T.E, Suzuki M, Ichimura K, Ozawa K. Novel anti-tumor mechanism of galanin receptor type 2 in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Cancer Sci.* (in press)
- 3) Kasahara Y, Sato K, Takayanagi Y, Mizukami H, Ozawa K, Hidema S, So K-H, Kawada T, Inoue N, Ikeda I, Roh S-G, Itoi K, Nishimori K. Oxytocin receptor in the hypothalamus is sufficient to rescue normal thermoregulatory function in male oxytocin receptor knockout mice. *Endocrinology.* 154:4305-15, 2013.
- 4) Shimada M, Abe S, Takahashi T, Shiozaki K, Okuda M, Mizukami H, Klinman D.M, Ozawa K, Okuda K. Prophylaxis and treatment of Alzheimer's disease by delivery of an adeno-associated virus encoding a monoclonal antibody targeting the amyloid Beta protein. *PLoS One.* 8:e57606, 2013.
- 5) Uchibori R, Tsukahara T, Mizuguchi H, Saga Y, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Ozawa K. NF- $\kappa$ B activity regulates mesenchymal stem cell accumulation at tumor sites. *Cancer Res.* 73:364-372, 2013.

## 嶋 緑倫

- 1) Matsumoto T, Nogami K, Shima M. Simultaneous measurement of thrombin and plasmin generation to assess the interplay between coagulation and fibrinolysis. *Thromb Haemost.*110:761-768, 2013.
- 2) Yada K, Nogami K, Shima M. Different factor VIII neutralizing effects on anti-factor VIII inhibitor antibodies associated with epitope specificity and von Willebrand factor. *Br J Haematol.* 163:104-111, 2013.
- 3) Yada K, Nogami K, Wakabayashi H, Fay PJ, Shima M. The mild phenotype in severe hemophilia A with Arg1781His mutation is associated with enhanced binding affinity of factor VIII for factor X. *Thromb Haemost.* 109:1007-1015, 2013.
- 4) Shirahata A, Fukutake K, Takamatsu J, Shima M, Hanabusa H, Mugishima H, Amano K, Takedani H, Tamashima S, Matsushita T, Tawa A, Tanaka I, Higasa S, Kosaka Y, Fujii T, Sakai M, Migita M, Kawakami K, Ohashi Y, Saito H. A Phase II clinical trial of a mixture of plasma-derived factor VIIa and factor X (MC710) in haemophilia patients with inhibitors: haemostatic efficacy, safety and pharmacokinetics/pharmacodynamics. *Haemophilia.* 19:853-860, 2013.
- 5) Shima M, Thachil J, Nair SC, Srivastava A. Towards standardization of clot waveform analysis and recommendations for its clinical applications. *J Thromb Haemost.* 11:1417-1420, 2013.

- 6) Shirahata A, Fukutake K, Mimaya J, Takamatsu J, Shima M, Hanabusa H, Takedani H, Takashima Y, Matsushita T, Tawa A, Higasa S, Takata N, Sakai M, Kawakami K, Ohashi Y, Saito H. Results of clot waveform analysis and thrombin generation test for a plasma-derived factor VIIa and X mixture (MC710) in haemophilia patients with inhibitors-phase I trial: 2nd report. *Haemophilia*. 19:330-337, 2013.

## 長谷川 護

- 1) Kashiwakura Y, Ohmori T, Mimuro J, Madoiwa S, Inoue M, Hasegawa M, Ozawa K, Sakata Y. Production of functional coagulation factor VIII from iPSCs using a lentiviral vector. *Haemophilia*. 20:e40-44, 2014.

## 稲葉 浩

- 1) Inaba H, Shinozawa K, Seita I, Otaki M, Suzuki T, Hagiwara T, Amano K, Fukutake K. Genotypic and phenotypic features of Japanese patients with mild to moderate hemophilia A. *Int J Hematol*. 97:758-764, 2013.
- 2) Inaba H, Koyama T, Shinozawa K, Amano K, Fukutake K. Identification and characterization of an adenine to guanine transition within intron 10 of the factor VIII gene as a causative mutation in a patient with mild haemophilia A. *Haemophilia*. 19:100-105, 2013.

## 菱川 修司

- 1) Mimuro J, Mizukami H, Hishikawa S, Ikemoto T, Ishiwata A, Sakata A, Ohmori T, Madoiwa S, Ono F, Ozawa K, Sakata Y: Minimizing the Inhibitory effect of neutralizing antibody for efficient gene expression in the liver with adeno-associated virus 8 vectors. *Mol Ther*. 21:318-323, 2013.

## 竹谷 英之

- 1) Hirose J, Takedani H, Koibuchi T. The risk of elective orthopaedic surgery for haemophilia patients: Japanese single-centre experience. *Haemophilia*. 19:951-955, 2013.

## 瀧 正志

- 1) Imamura H, Akioka Y, Taki M, Terasawa F, Okumura N, Hattori M. Successful living-related kidney transplantation in a boy with inherited dysfibrinogenemia. *Pediatric Nephrology*. 17: e161-164, 2013.
- 2) Ohga S, Ishiguro A, Takahashi Y, Shima M, Taki M, Kaneko M, Fukushima K, Kang D, Hara T, Japan Childhood Thrombophilia Study Group. Protein C deficiency as the major cause of thrombophilias in childhood. *Pediatr Int*. 55:267-271, 2013.

## 柿沼 章子

- 1) 柿沼章子、久地井寿哉、岩野友里、藤谷順子、大平勝美、HIV/HCV重複感染患者の支援特性(第1報) ICF(国際生活機能分類)に基づく生活機能尺度の開発。第27回日本エイズ学会学術集会・総会、2013年11月、熊本。
- 2) 柿沼章子、久地井寿哉、井上佳世、大平勝美、血友病保因者の遺伝に関する支援ニーズの検討(第一報)―薬害HIV感染被害者・家族を事例としたパイロット調査について。第54回日本社会医学会総会、2013年7月、東京。
- 3) 井上佳世、柿沼章子、久地井寿哉、大平勝美、血友病家系女性の心理社会的課題と健康状況の調査研究報告 血友病保因者の遺伝に関する支援ニーズ検討(第三報)。第54回日本社会医学会総会、2013年7月、東京。
- 4) 柿沼章子、久地井寿哉、小俣智子、西牧謙吾、大平勝美、小児がん患者等の多職種協働による病気を持つ子どもの自立を実現するための教育支援システム分析。第22回日本健康教育学会学術大会、2013年6月、千葉。
- 5) 柿沼章子、久地井寿哉、井上佳世、大平勝美、血友病保因者の遺伝に関する支援課題の検討(第一報) 薬害HIV感染被害者・家族を事例としたパイロットスタディ。第39回日本保健医療社会学会、2013年5月、埼玉。

## 村松 慎一

- 1) Iwata N, Sekiguchi M, Hattori Y, Takahashi A, Asai M, Ji B, Higuchi M, Staufenbiel M, Muramatsu S, Saido TC. Global brain delivery of neprilysin gene by intravascular administration of AAV vector in mice. *Sci Rep*. 3:1472, 2013.
- 2) Iida A, Takino N, Miyauchi H, Shimazaki K, Muramatsu S. Systemic delivery of tyrosine-mutant AAV vectors results in robust transduction of neurons in adult mice. *Bio Med Res Int*. 974819, 2013.
- 3) Yamashita T, Chai HL, Teramoto S, Tsuji S, Shimazaki K, Muramatsu S, Kwak S. Rescue of amyotrophic lateral sclerosis phenotype in a mouse model by intravenous AAV9-*ADAR2* delivery to motor neurons. *EMBO Mol Med*. 5:1-10, 2013.
- 4) Hwu WL, Lee NC, Chien YH, Muramatsu S and Ichinose H: AADC deficiency: occurring in humans, modeled in rodents. *Adv Pharmacol*. 68:273-284, 2013.

## 峰野 純一

- 1) Miyazaki Y, Fujiwara H, Asai H, Ochi F, Ochi T, Azuma T, Ishida T, Okamoto S, Mineno J, Kuzushima K, Shiku H, Yasukawa M. Development of a novel redirected T cell-based adoptive immunotherapy targeting human telomerase reverse transcriptase for adult T-cell leukemia. *Blood*. 121:4894-4901, 2013.
- 2) Tsukahara T, Ohmine K, Yamamoto C, Uchibori R, Ido H, Teruya T, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Nakamura M, Mineno J, Takesako K, Riviere I, Sadelain M, Brentjens R, Ozawa K. CD19 target-engineered T-cells accumulate at tumor lesions in human B-cell lymphoma xenograft mouse models. *Biochem Biophys Res Commun*. 438:84-89, 2013.

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

課題番号：H24-エイズ一般-005

研究代表者：足立 昭夫（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 教授）

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

## 1. 研究目的

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

## 2. 研究方法

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

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

（倫理面への配慮）

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

## 3. 研究結果

研究代表者及び研究分担者は緊密な協力関係のもとに研究を行った。研究は順調かつ着実に進捗し、主要な成果として要約以下の成績を得た。（1）既報の宿主因子 (SAMHD1 及び APOBEC3A) 以外にも HIV-2 Vpx の標的分子があることを分子遺伝学的解析から明らかにした。また、Vpx の発現調節に重要なモチーフ (poly-proline motif; PPM) を同定し、その機構を解明した（翻訳過程の促進）。（2）APOBEC3 の立体構造の解明に成功し、Vif との相互作用部位を同定した。さらに、APOBEC3F の C 末側ドメインの分子構造を決定した。これらにより、阻害化合物のデザインの基礎を構築した。また、定量 RT-PCR 法により APOBEC3 (A、B、C、DE、F、G 及び H の 7 種類) の発現量を増加させるモジュレータを複数同定した (1 型インターフェロン等)。（3）Vpu に作用し BST-2/tetherin の抗ウイルス活性を増強させる宿主因子 SCYL2 を同定した。（4）強い抗 HIV-1 活性を示す新規抗ウイルス因子 MARCH 8 を同定した。MARCH 8 はウイルスの細胞へのエントリー段階で働くと考えられ、現在、その詳細を解析中である。（5）カニクイザルにおけ

る TRIM5 遺伝子型の分布や抗ウイルス機能について明らかにした。また、TRIM5 とは無関係にウイルス増殖を増強する HIV Gag-CA 変異を同定した。さらに、センダイウイルスベクターを用いた TRIM5 評価系を確立し、HIV Gag-CA の試験管内アセンブリー系の構築にも成功した。現在、抗 HIV-1 活性を示す三つの低分子化合物を詳細に検討中である。(6) TRIM5 機能を擬似化する化合物 BMMP を合成し、抗 HIV-1 活性を持つことを確認した。また、APOBEC3 の発現量を有意に増加させる低分子化合物 SN-2 を得た。

#### 4. 考察

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

(1) Vpx の細胞内標的因子 (SAMHD1 と APOBEC3A 以外) を同定する。Vpx PPM に結合する細胞因子を同定する。(2) APOBEC3 の発現調節ではインターフェロン刺激を中心とした JAK-STAT 系の活性化が深く関与することが明らかになった。APOBEC3 の過剰発現が HIV 複製にどの程度の抑制効果を持つか検証する。(3) APOBEC3 の立体構造解析が進展し、Vif との結合部位の詳細が明らかになりつつある。今後はその阻害化合物の創製が重要である。(4) MARCH 8 の作用機構の詳細を解明し、その作用を増強する戦略を構築する。(5) 試験管内 HIV Gag-CA アセンブリー系やセンダイウイルスベクター系を用い、微弱なヒト TRIM5 活性を増強させる低分子化合物を探索する。(6) BMMP 及び SN-2 の作用機序を解明し、これに基づいて nM オーダーの活性を持つ選択的な HIV 阻害剤の創製を試みる。

#### 5. 自己評価

##### 1) 達成度について

班研究を効果的・効率的に進めるために、班会議では充分時間をかけて研究計画と研究成果の共有化を図った。これにより、研究代表者及び研究分担者間の有機的な協力を

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

##### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

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

##### 3) 今後の展望について

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

#### 6. 結論

HIV 感染・増殖に関与する宿主細胞防御因子の抗ウイルス作用機序とウイルス遺伝子産物による解除機構の解明に取組み、新たな学術的知見を得た。これまでに同定した因子や因子内領域は、Vpx の発現増強に関わる Vpx 内 PPM (poly-proline motif) 配列、APOBEC3 と Vif の相互作用部位、APOBEC3 の発現量を増加させるモジュレーター、新規抗 HIV-1 因子 MARCH 8 及び BST-2/tetherin の抗ウイルス活性を増強させる宿主因子 SCYL2 である。構築した評価系は TRIM5 の標的である Gag-CA の試験管内アセンブリー系である。この他、創薬に繋がり得る抗ウイルス宿主因子を擬似・制御する低分子化合物として、TRIM5 機能を擬似化する BMMP 及び APOBEC3 の発現量を有意に増加させる SN-2 を得た。

#### 7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

該当事項なし。

## 別紙

## 研究代表者

## 足立昭夫

- 1) Nomaguchi, M., Miyake, A., Doi, N., Fujiwara, S., Miyazaki, Y., Yokoyama, M., Tsunetsugu-Yokota, Y., Sato, H., Masuda, T., and Adachi, A. Natural single-nucleotide polymorphisms in the 3' region of HIV-1 *pol* gene modulate viral replication potential. *Journal of Virology*, 2014, in press.
- 2) Miyake, A., Miyazaki, Y., Fujita, M., Nomaguchi, M., and Adachi, A. Role of poly-proline motif in HIV-2 Vpx expression. *Frontiers in Microbiology* 5: 24, 2014.
- 3) Miyake, A., Fujita, M., Fujino, H., Koga, R., Kawamura, S., Otsuka, M., Ode, H., Iwatani, Y., Sakai, Y., Doi, N., Nomaguchi, M., Adachi, A., and Miyazaki, Y. Poly-proline motif in HIV-2 Vpx is critical for its efficient translation. *Journal of General Virology* 95: 179-189, 2014.
- 4) Nomaguchi, M., Yokoyama, M., Kono, K., Nakayama, E.E., Shioda, T., Doi, N., Fujiwara, S., Saito, A., Akari, H., Miyakawa, K., Ryo, A., Ode, H., Iwatani, Y., Miura, T., Igarashi, T., Sato, H., and Adachi, A. Generation of rhesus macaque-tropic HIV-1 clones that are resistant to major anti-HIV-1 restriction factors. *Journal of Virology* 87: 11447-11461, 2013.
- 5) Doi, N., Okubo, A., Yamane, M., Sakai, Y., Adachi, A., Nomaguchi, M. Growth potentials of CCR5-tropic/CXCR4-tropic HIV-1mt clones in macaque cells. *Frontiers in Microbiology* 4: 218, 2013.
- 6) Saito, A., Nomaguchi, M., Kono, K., Iwatani, Y., Yokoyama, M., Yasutomi, Y., Sato, H., Shioda, T., Sugiura, W., Matano, T., Adachi, A., Nakayama, E.E., and Akari, H. TRIM5 genotypes in cynomolgus monkeys primarily influence inter-individual diversity in susceptibility to monkey-tropic human immunodeficiency virus type 1. *Journal of General Virology* 94: 1318-1324, 2013.
- 7) Nomaguchi, M., Doi, N., Fujiwara, S., Saito, A., Akari, H., Nakayama, E.E., Shioda, T., Yokoyama, M., Sato, H., Adachi, A. Systemic biological analysis of the mutations in two distinct HIV-1mt genomes occurred during replication in macaque cells. *Microbes and Infection* 15: 319-328, 2013.

## 研究分担者

## 岩谷靖雅

- 1) 岩谷靖雅、渡邊信久. 新規抗HIV薬の開発に向けて. 新分子・新材料によるメディカルエンジニアリング. 2014 (製本中).
- 2) Chaurasiya, K.R., McCauley, M.J., Wang, W., Qualley, D.F., Wu, T., Kitamura, S., Geertsema, H., Chan, D.S.B., Hertz, A., Iwatani, Y., Levin, J.G., Musier-Forsyth, K., Rouzina, I., and Williams, M.C. Oligomerization transforms human APOBEC3G from an efficient enzyme to a slowly dissociating nucleic acid binding protein. *Nature Chemistry* 6: 28-33, 2014.
- 3) Miyake, A., Fujita, M., Fujino, H., Koga, R., Kawamura, S., Otsuka, M., Ode, H., Iwatani, Y., Sakai, Y., Doi, N., Nomaguchi, M., Adachi, A., and Miyazaki, Y. Poly-proline motif in HIV-2 Vpx is critical for its efficient translation. *Journal of General Virology* 95: 179-189, 2014.
- 4) Tu, E., Swenson, L.C., Land, S., Pett, S., Emery, S., Marks, K., Kelleher, A.D., Kaye, S., Kaiser, R., Schuelter, E., Harrigan, R. on behalf of the MARCH Laboratory Group and the MARCH Study Group. Results of external quality assessment for proviral DNA testing of HIV tropism in the Maraviroc Switch collaborative study. *Journal of Clinical Microbiology* 51: 2063-2071, 2013.
- 5) Saito, A., Nomaguchi, M., Kono, K., Iwatani, Y., Yokoyama, M., Yasutomi, Y., Sato, H., Shioda, T., Sugiura, W., Matano, T., Adachi, A., Nakayama, E.E., and Akari, H. TRIM5 genotypes in cynomolgus monkeys primarily influence inter-individual diversity in susceptibility to monkey-tropic human immunodeficiency virus type 1. *Journal of General Virology* 94: 1318-1324, 2013.
- 6) Nomaguchi, M., Yokoyama, M., Kono, K., Nakayama, E.E., Shioda, T., Doi, N., Fujiwara, S., Saito, A., Akari, H., Miyakawa, K., Ryo, A., Ode, H., Iwatani, Y., Miura, T., Igarashi, T., Sato, H., and Adachi, A. Generation of rhesus macaque-tropic HIV-1 clones that are resistant to major anti-HIV-1 restriction factors. *Journal of Virology* 87: 11447-11461, 2013.
- 7) 北村紳悟、岩谷靖雅. HIV アクセサリータンパク質の機能. *ウイルス* 63: 187-198, 2013.

## 大塚雅巳

- 1) Miyake, A., Fujita, M., Fujino, H., Koga, R., Kawamura, S., Otsuka, M., Ode, H., Iwatani, Y., Sakai, Y., Doi, N., Nomaguchi, M., Adachi, A., and Miyazaki, Y. Poly-proline motif in HIV-2 Vpx is critical for its efficient

- translation. *Journal of General Virology* 95: 179-189, 2014.
- 2) Anraku, K., Fujita, M., Morii, T., Mori, Y., Okamoto, Y., and Otsuka, M. Design and synthesis of biotinylated inositol phosphates: application to the inositol phosphate-protein binding analysis. *In Inositol: Synthesis, Functions and Clinical Implications*, Nova Science Publishers, New York, pp. 193-214, 2013.
  - 3) Ashizawa, T., Miyata, H., Iizuka, A., Komiyama, N., Oshita, C., Kume, A., Nogami, M., Yagoto, M., Ito, I., Oishi, T., Watanabe, R., Mitsuya, K., Matsuno, K., Furuya, T., Okawara, T., Otsuka, M., Ogo, N., Asai, A., Nakasu, Y., Yamaguchi, K., and Akiyama, Y. Effect of the STAT3 inhibitor STX-0119 on the proliferation of cancer stem-like cells derived from recurrent glioblastoma. *International Journal of Oncology* 43: 219-217, 2013.
  - 4) Sharma, R.K., Otsuka, M., Gaba, G., Mehta, S. Inhibitors of transcription factor nuclear factor-kappa beta (NF- $\kappa$ B)-DNA binding. *RSC Advances* 3: 1282-1296, 2013.

## 徳永研三

- 1) Koyama, T., Arias, J.F., Iwabu, Y., Yokoyama, M., Fujita, H., Sato, H., and Tokunaga, K. APOBEC3G oligomerization is associated with the inhibition of both Alu and LINE-1 retrotransposition. *PLoS One* 8: e84228, 2013.
- 2) Tada, T., Kadoki, M., Liu, Y., Tokunaga, K., and Iwakura, Y. Transgenic expression of the human LEDGF/p75 gene relieves the species barrier against HIV-1 infection in mouse cells. *Frontiers in Microbiology* 4: 377, 2013.
- 3) Chutiwitoonchai, N., Hiyoshi, M., Hiyoshi-Yoshidomi, Y., Hashimoto, M., Tokunaga, K., and Suzu, S. Characteristics of IFITM, the newly identified IFN-inducible anti-HIV-1 family proteins. *Microbes and Infection* 15: 280-90, 2013.
- 4) Fujita, H., Iwabu, Y., Tokunaga, K., and Tanaka, Y. Membrane-associated RING-CH (MARCH) 8 mediates the ubiquitination and lysosomal degradation of the transferrin receptor. *Journal of Cell Science* 126: 2798-809, 2013.
- 5) Koyama, T., Sun, B., Tokunaga, K., Tatsumi, M., and Ishizaka, Y. DNA damage aids HIV-1 infection of macrophages by overcoming integrase inhibition. *Retrovirology* 10: 21, 2013.

## 中山英美

- 1) Nomaguchi, M., Yokoyama, M., Kono, K., Nakayama, E.E., Shioda, T., Doi, N., Fujiwara, S., Saito, A., Akari, H., Miyakawa, K., Ryo, A., Ode, H., Iwatani, Y., Miura, T., Igarashi, T., Sato, H., and Adachi, A. Generation of rhesus macaque-tropic HIV-1 clones that are resistant to major anti-HIV-1 restriction factors. *Journal of Virology* 87: 11447-11461, 2013.
- 2) Kono, K., Takeda, E., Tsutsui, H., Kuroishi, A., Hulme, A.E., Hope, T.J., Nakayama, E.E., and Shioda, T. Slower uncoating is associated with impaired replicative capability of simian-tropic HIV-1. *PLoS One* 8: e72531, 2013.
- 3) Saito, A., Nomaguchi, M., Kono, K., Iwatani, Y., Yokoyama, M., Yasutomi, Y., Sato, H., Shioda, T., Sugiura, W., Matano, T., Adachi, A., Nakayama, E.E., and Akari, H. TRIM5 genotypes in cynomolgus monkeys primarily influence inter-individual diversity in susceptibility to monkey-tropic human immunodeficiency virus type 1. *Journal of General Virology* 94: 1318-1324, 2013.
- 4) Nomaguchi, M., Doi, N., Fujiwara, S., Saito, A., Akari, H., Nakayama, E.E., Shioda, T., Yokoyama, M., Sato, H., and Adachi, A. Systemic biological analysis of the mutations in two distinct HIV-1mt genomes occurred during replication in macaque cells. *Microbes and Infection* 15: 319-328, 2013.
- 5) Nakayama, E.E., Nakajima, T., Kaur, G., Mimaya, J.I., Terunuma, H., Mehra, N., Kimura, A., and Shioda, T. A naturally occurring single amino acid substitution in human TRIM5 $\alpha$  linker region affects its anti-HIV-1 activity and susceptibility to HIV-1 infection. *AIDS Research and Human Retroviruses* 29: 919-924, 2013.

## 藤田美歌子

- 1) Miyake, A., Fujita, M., Fujino, H., Koga, R., Kawamura, S., Otsuka, M., Ode, H., Iwatani, Y., Sakai, Y., Doi, N., Nomaguchi, M., Adachi, A., and Miyazaki, Y. Poly-proline motif in HIV-2 Vpx is critical for its efficient translation. *Journal of General Virology* 95: 179-189, 2014.
- 2) Anraku, K., Fujita, M., Morii, T., Mori, Y., Okamoto, Y., and Otsuka, M. Design and synthesis of biotinylated inositol phosphates: application to the inositol phosphate-protein binding analysis. *In Inositol: Synthesis, Functions and Clinical Implications*, Nova Science Publishers, New York, pp. 193-214, 2013.
- 3) 藤田美歌子 エイズウイルスタンパク質の分子機能に関する研究. *薬学雑誌* 133: 1103-1111, 2013.

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

課題番号：H24-エイズ一般-007

研究代表者：滝口 雅文（熊本大学 エイズ学研究センター センター長／教授）

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

馬場 昌範（鹿児島大学 大学院医歯学総合研究科 教授）

松岡 雅雄（京都大学 ウイルス研究所 教授）

松下 修三（熊本大学 エイズ学研究センター 教授）

中田 浩智（熊本大学 生命科学研究部 感染症内科学 講師）

前仲 勝実（北海道大学 大学院薬学研究院 教授）

## 1. 研究目的

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

柱1：変異獲得の機序と変異による免疫および薬剤抵抗性獲得機序の解明

まだ明らかにされていないCTLや中和抗体の逃避変異の同定、その変異による免疫抵抗性の機序の解明を行う。さらに薬剤による耐性変異獲得機序・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

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

## 2. 研究方法

柱1：変異獲得の機序と変異による免疫および薬剤抵抗性獲得機序の解明

1) 免疫系による変異獲得の機序と免疫抵抗性の研究

日本人慢性HIV-1感染者のHLAと相関を示すHIV-1の変異を明らかにし、その変異部位を認識する特異的CTLを用いて逃避変異であることを明らかにする[滝口]。すでに知られている逃避変異に対するCTLの認識を解析し、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[滝口]。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[前仲・滝口]。

2) 薬剤による変異性獲得の機序と薬剤抵抗性の研究

ART療法で排除できないHIV感染細胞から細胞間感染によるHIVの伝搬を明らかにし、細胞間経路およびセルフリー感染経路における抗HIV薬に対する感受性の差を明らかにする[松岡]。プロテアーゼの二量体化阻害剤 (PDI) に対する耐性変異の薬剤耐性の機序を、結晶解析・質量分析学的方法を含めた多面的方法により明らかにする[中田]。

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

CTL が選択する逆転写酵素、プロテアーゼ、インテグラーゼ内の逃避変異に関して、逃避変異 HIV-1 を作製

し、これらの変異が薬剤耐性に与える影響を明らかにする[鴻永・滝口]。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]。また抗体あるいは薬剤が選択する逃避・耐性変異がそれぞれ薬剤の感受性、抗体の認識に与える影響をしらべる[松岡・馬場]。

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 PI 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[中田]。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[馬場]。

2) 抗体と薬剤を組み合わせた治療法の開発

現在米国で臨床試験中のCCR5阻害剤である cenicriviroc (CVC) を用いて誘導した耐性ウイルス (KK<sub>652-67</sub>) を用いて、抗体パネルで中和感受性の比較を行い、抗体と薬剤の併用療法の可能性を検討する[松下・馬場]。(倫理面への配慮)

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

## 3. 研究結果

柱1：変異獲得の機序と変異による免疫および薬剤抵抗性獲得機序の解明

1) 免疫系による変異獲得の機序と免疫抵抗性の研究：

HLA-A\*24:02 拘束性の Gag 28 エピトープとその変異に対する3つのタイプのCTLが、Gag 逃避変異の選択に関与していることを明らかにした (J. Virol 2012)。さらに HLA-B\*51:01 拘束性 CTL により選択される RT135 の変異が、同じエピトープを認識する B\*52:01 拘束性 CTL により選択されることを示した (J. Virol 2013) [滝口]。

430 人の HIV-1 感染日本人の Gag, Pol, Nef 遺伝子を解析し HLA と相関する 284 種類の変異 (HLA-associated mutations) を同定し、Pol 領域の HLA-associated mutation と患者のウイルス量との間に負の相関がみられ、Pol 領域の変異獲得あるいは CTL の抗ウイルス効果により、HIV の増殖が抑制されている可能性が示唆された[滝口]。さらに HLA-Cw12:02 結合 HIV ペプチドを同定し、NK レセプターの結合を明らかにした[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：

蛍光蛋白を組み込んだNL4-3の感染性HIV-1を用いた評価系を樹立し、これを用いて細胞間感染に対する薬剤の抗HIV効果を検証した。その結果、調べたすべての抗HIV薬に関して、細胞間感染でその効果が減弱していた[松岡]。

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：

一部のガイドラインでは第一選択のキードラッグとして位置付けられている新規の非核酸逆転写酵素阻害薬 Rilpivirine (RPV)の主要な耐性変異である RTの138番目の E が K へ置換する変異(E138K)が、未治療の患者にも見つかることが報告されている。一方、RT138 番の近傍の部位は、HLA-B\*18 拘束性 CTL のエピトープになっており、138 番の変異が免疫逃避変異になっている可能性がある。そこで未治療の感染者 1107 人の HLA と 138 番のアミノ酸を調べたところ、HLA-B\*18(-)の感染者では 0.4%しかこの変異が見つからないが、HLA-B\*18(+)の感染者では 21%に変異が見つかった ( $p=4.9 \times 10^{-25}$ )。また未治療患者に認められた変異(E138G, E138A, E138K)のいずれもが、HLA-B\*18 拘束性 CTL の逃避変異であることを確認した。これらの逃避変異が、それぞれ RPV 耐性をもたらすことを確認し、免疫により選択される変異が薬剤治療に影響を与えることを明らかにした(Clin. Infect. Dis. 2013) [瀧永・滝口]。

2種類の PI と Integrase inhibitor 耐性変異が、CTL の認識を障害することを明らかにした[滝口・瀧永]。

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：

Oxatricyclic構造を有する新規PI, GRL-0519を開発した。同化合物は高度多剤耐性株に対しても非常に強力な抗 HIV活性を発揮し、試験管内耐性誘導では HIV-1 の耐性獲得は著しく遅延することを明らかにした。構造解析では、GRL-0519の2つの THF構造が HIV-1 プロテアーゼ (PR) 活性中心部位のアミノ酸主鎖と強固に結合する事に加え、3つ目の THF環が PR の主要アミノ酸群と複数の相互作用を有する事を明らかにし、その強力な抗 HIV活性の機序を明らかにした。更に複数の高度多剤耐性臨床分離株に対して抗ウイルス活性が完全に維持される新規PIである GRL-0739 と tricycle 構造を有する強力な新規 PI、GRL-0739を同定した [中田・天野]。

Tat/TAR RNA と cyclin T1/CDK9 の相互作用を標的とする新規薬剤の同定のため、*in silico*スクリーニングを用いて選り出した候補化合物について、*in vitro*抗 HIV-1 活性試験を行ったところ、強い抗 HIV-1 活性を有するリード化合物を得ることに成功した。そのうち1つの化合物 (C3) が HIV-1 Tat によって誘導される遺伝子発現を強力に抑制すること、また宿主細胞の RNA polymerase II のリン酸化を抑制すること、さらに Tat と cyclin T1 の相互作用を阻害することを明らかにした [馬場]。

2) 免疫と薬剤を組み合わせた治療法の開発：

CVC に対する耐性株、KK<sub>652-67</sub> では明らかな中和感受性の増強が、3種類の特異性の抗体、すなわち抗 V3 抗体 (1C10, 5G2, KD-247)、CD4 結合部位に対する抗体 (CD4bs:49G2, VRC01)、CD4 induced epitope に対する抗体 (CD4i: 4E9C) で観察された。KK<sub>652-67</sub> を 1C10 の選択圧のもとに培養すると、抗体に対するエスケープ変異株は、新たな変異を獲得し CVC 感受性となった。これらから、CVC 耐性と中和抗体抵抗性は両立できない可能性が考えられた。これらの結果は、CCR5 阻害薬 CVC と中和抗体との併用療法の可能性を示した[松下・馬場]。

#### 4. 考察

免疫系が獲得する変異による薬剤抵抗性の研究では、

HLA-B\*18 拘束性 CTL の逃避変異である RT138 の変異が、RPV に耐性をもたらしていることを明らかにした。このことは、HLA-B\*18 を持った患者では、治療しなくても RT138 の変異を獲得して RPV に対して抵抗性を示す可能性があるため、RPV による治療を再検討する必要がある。今後 RPV の治療のガイドラインに、HLA-B\*18 を対象としないことを入れる必要があると考えられる。

薬剤の開発の研究では、GRL-09510、GRL-0739、GRL-0519 を開発できた。GRL-0519 は分子構造上での HIV 活性阻害機構を明らかにできたが、さらに今後 GRL-0739 と GRL-09510 の HIV 活性阻害機構を明らかにしていく予定である。

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を 284 種類同定することができた。今後このうち CTL の逃避変異として報告されていない変異に関して、CTL からの逃避変異かを明らかにし更にその変異が及ぼす機能 (ウイルス増殖能、CTL 認識) を明らかにしていく。

#### 5. 自己評価

1) 達成度について

柱 1 では、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 284 種類同定し、日本における細胞性免疫が獲得する変異の全体像を明らかにできた。さらに HIV 進化が白人や黒人と違うことを初めて明らかにした。また HLA-B\*18 拘束性 CTL の逃避変異である 138 番の変異が、RPV に耐性をもたらしていることを明らかにした。免疫による変異の獲得が、抗 HIV 薬に対する耐性を生じさせる機序を世界で初めて明らかにした。このように、極めてインパクトが高い成果を出すことができた。

柱 2 では、高度多剤耐性株に対して非常に強力な抗 HIV 活性を発揮する 3 つの新規 PI の開発ができ、さらに Tat/TAR RNA と cyclin T1/CDK9 の相互作用を標的とする新規薬剤の同定が 1 種類でき、大きな進展が見られた。また CCR5 阻害薬 CVC と中和抗体を組み合わせた併用療法の可能性を示す成果が得られた。

以上のように 2 年間で予想を上回る成果が得られた。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

免疫逃避変異が抗 HIV 薬の耐性となることを世界で初めて明らかにでき、284 種類の HLA-associated mutations を同定し、HIV の進化が白人や黒人と違うことを初めて明らかにした。また薬剤開発では、4 種類の薬剤の候補を同定し、今後の臨床試験への導出の可能性が出てきた。これらの成果は、国際的に来ても学術的にも、エイズの治療という社会的意義においても、極めて高いものである。

3) 今後の展望について

既に予想以上の成果をあげており、3 年目は具体的成果がさらに出せる課題も多く、目的の達成は可能である。

#### 6. 結論

日本における細胞性免疫が獲得する変異の全体像を明らかにし、CTL により獲得した変異が抗 HIV 薬に対する耐性を生じさせる機序を世界で初めて明らかにした。4 種類の臨床試験への導出可能な薬剤候補を開発し、CCR5 阻害薬 CVC と中和抗体との併用療法の可能性を示す成果を得られた。

#### 7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

該当無し。



別紙  
研究発表

## 研究代表者

## 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<sup>+</sup> T-cells. *Immunity* 38:425-436, 2013
- 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.* 87:2253-2263, 2013
- Kløverpris HN, Payne RP, Sacha JB, Rasaiyaah JT, Chen F, Takiguchi M, Yang OO, Towers GJ, Goulder P, and Prado JG. Early antigen presentation of protective HIV-1 KF11<sub>Gag</sub> and KK10<sub>Gag</sub> epitopes from incoming viral particles facilitates rapid recognition of infected cells by specific CD8<sup>+</sup> T cells, *J Virol.* 87: 2628-2638, 2013
- 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
- Naruto T, Gatanaga H, Nelson G, Sakai K, Carrington M, Oka S, and Takiguchi M. HLA class I mediated control of HIV-1 in Japanese, where the protective HLA-B\*57 and -B\*27 are absent. *J Virol.* 86:10870-10872, 2012
- 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
- 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

## 研究分担者

## 鴻永博之

- 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. *Clin Infect Dis* 2013;57(7):1051-5
- 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.* 87:2253-2263, 2013
- 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. 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
- Naruto T, Gatanaga H, Nelson G, Sakai K, Carrington M, Oka S, Takiguchi M. HLA class 1-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
- 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
- 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

## 馬場昌範

- 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<sup>+</sup> T cells. *Hum. Gene. Ther. Methods* 24: 94-103, 2013.
- 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

3. ○ 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.
4. 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.
5. 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.
6. ○ 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.

#### 松岡雅雄

1. ○ Mizuhara T, Kato T, Hirai A, Kurihara H, Shimada Y, Taniguchi M, Maeta H, Togami H, Shimura K, Matsuoka M, Okazaki S, Takeuchi T, Ohno H, Oishi S, and Fujii N. Structure-activity relationship study of phenylpyrazole derivatives as a novel class of anti-HIV agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23:4557-4561, 2013
2. ○ Togami H, Shimura K, Okamoto M, Yoshikawa R, Miyazawa T, and Matsuoka M. Comprehensive in vitro analysis of simian retrovirus type 4 susceptibility to antiretroviral agents. *J. Virol.* 87:4322-4329, 2013
3. ○ 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.
4. 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.
5. 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.

#### 松下修三

1. ○ Kuwata T, Takaki K., Yoshimura K., Enomoto I., Wu F., Ourmanov K.I., Hirsch V.M., 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.* 87:5424-5346, 2013.
2. ○ 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.* 4:933-94, 2013.
3. ○ 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.

#### 中田 浩智 (天野将之)

1. ○ Maeda K, Desai D, Aoki M, Nakata H, Kodama E, Mitsuya H. Delayed emergence of HIV-1 variants resistant to 4'-ethynyl-2'-fluoro-2'-deoxyadenosine: comparative sequential passage study with lamivudine, tenofovir, emtricitabine and BMS-986001, *Antivir Ther.*, 2013, *in press*
2. ○ Matsuzawa T, Kawamura T, Ogawa Y, Nakata H, Maeda K, Moriishi K, Koyanagi Y, Gatanaga H, Shimada S, Mitsuya H. 4'-Ethynyl-2'-Fluoro-2'-Deoxyadenosine, an HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitor, Potently Blocks HIV-1 ex vivo Infection of Langerhans Cells within Epithelium, *Journal of Investigative Dermatology*, 2013, *in press*
3. ○ Amano M, Tojo Y, Salcedo-Gómez PM, Campbell JR, Das D, Aoki M, Xu C-X, Rao KV, Ghosh AK, and Mitsuya H. 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.* 2013. 57:2036-2046

#### 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.* 87:2253-2263, 2013.
2. Pratakipiriya 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
3. 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

研究課題：HIV の潜伏・再活性化および慢性的免疫活性化を左右する細胞因子・免疫応答の解明とその制御

課題番号：H24-エイズ- 一般-008

研究代表者：横田 恭子（国立感染症研究所 免疫部 室長）

研究分担者：徳永 研三（国立感染症研究所 感染病理部 主任研究官）、渡邊俊樹（東京大学 ウイルス腫瘍学 教授）、立川 愛（東京大学医科学研究所 先端医療研究センター 准教授）、田中 勇悦（琉球大学大学院 医学研究科 教授）、小柳 義夫（京都大学ウイルス研究所 教授）、山本浩之（国立感染症研究所エイズ研究センター 研究員）、五十嵐樹彦（京都大学ウイルス研究所 教授）、上野 貴将（熊本大学エイズ学研究センター 准教授）

## 1. 研究目的

HIV の潜伏感染とウイルス再活性化および慢性的免疫活性化による T 細胞の疲弊化を左右する細胞内因子および免疫学的要因を明らかにすることにより、エイズ病態を制御する新規治療戦略のための基盤を確立する。本研究では、latent reservoir（潜伏感染）と active reservoir（再活性化・持続感染）に関し、主として動物モデルを用いた解析を行う。

## 2. 研究方法

サルモデル：1)SIV の初期感染制御サルを刺激培養して再活性化するプロウイルス配列と Gag 特異的 CTL 応答を解析（山本）、2)非病原性 SIVmac 1A11 株 ( $1.0 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>) を経直腸的に中国産アカゲザルに接種し、組織化学的にウイルス感染細胞の同定を行った（五十嵐）。一部の個体で CD8<sup>+</sup>細胞枯渇実験を行った。

ヒト化マウスモデル：1)異なる蛍光発現 X4 型と R5 型 HIV-1 を同時に感染させた時のウイルス感染細胞の分布・ウイルス量の変化（横田）、2) HIV-1 vpr 変異株と野生株を感染させた時の Treg 細胞や活性化メモリー T 細胞 (Tm) の動態（小柳）をフローサイトメーターで解析した。

培養系モデル：感染細胞を可視化する新規レポーターウイルスを感染させ、1) CD4 陽性 T 細胞を IL-7 と IL-15 存在下で培養維持（Homeostatic proliferation: HP 培養）して細胞増殖とウイルス発現をフローサイトメーターで解析し（横田）、2) T 細胞株において初期及び持続感染時における LTR のエピジェネティック変化と再活性化シグナルに対する感受性（渡邊）を検討した。また、3) 健常人由来マクロファージ及び樹状細胞における IFN- $\alpha$  処理後の ISG 群の mRNA の発現変動を real-time RT-PCR により検討し（徳永）、IFN 処理で発現レベルの差が大きい ISG の過剰発現による HIV-1 感染抑制効果を検証した。4) 慢性期 HIV 感染者の CD4<sup>+</sup>・CD8<sup>+</sup>T 細胞を用い、IL-2 発現、ゲノム DNA における IL-2 遺伝子の DNA メチル化、フローサイトメーターによる T 細胞の性状を解析した（立川）。5) HIV 感染完全制御者と慢性感染者の検体から nef 遺伝子を増幅して、遺

伝子配列と Nef の機能、遺伝子系統樹解析や医学統計学的手法による対照群間の差を解析した（上野）。6) HTLV-I で不死化した自家 T 細胞株の OX40L 発現による HIV-1 抑制作用、抗 CXCR4 単クローン抗体(A120)の T 細胞活性化に対する影響を検討し（田中）。

（倫理面への配慮）

臨床材料や血液の提供を受ける場合には、各施設の医学研究倫理委員会の承認を得、書面による同意確認と提供者の個人情報の保管管理を徹底しつつ実施する。動物実験の実施に当たっては当該委員会の承認を得、動物愛護の精神に則って動物に与える苦痛の軽減・排除に努める。

## 3. 研究結果

サルモデル：1)SIV 感染後 1 年以降 2 年目までの間に Gag 特異的 CTL エスケープ変異蓄積の有る群と無い群に 2 分され、前者では高率に血中ウイルスの再出現、Gag 特異的 CTL 応答の低下を認めた。後者個体の CD8<sup>+</sup>細胞を枯渇させると、末梢中にエスケープ変異体ウイルスが急速に出現した。2)非病原性 SIV を直腸内接種した全てのサルで一過性の低力価ウイルス血症を示した。CD8<sup>+</sup>細胞枯渇後のリンパ節でウイルス抗原陽性 CD4<sup>+</sup>細胞を検出した。

ヒト化マウスモデル：1)同時感染 X4 と R5 型 HIV-1 は個々の感染と異なり、特に X4 型の CCR5 陽性 Tm への感染頻度が低下し、血中からも早期に消失した。2)アクセサリ蛋白質 Vpr は細胞周期 G2 期停止とアポトーシスの効率的誘導機能により選択的に Treg を枯渇させ、その結果 Tm が活性化され、ウイルス増殖が促進されることが示された。培養系モデル：1) HP 培養 CD4<sup>+</sup> T 細胞はゆっくり増殖し、2 週間後の非増殖細胞集団にプロウイルス DNA が検出され、一部はウイルス由来 GFP を発現すること、2) 感染初期に LTR が急激に不活性化する T 細胞株集団と、時間依存的に潜伏化していく 2 集団が存在し、両者は LTR 上のヒストン修飾や再活性化シグナルに対する感受性が異なることを明らかにした。3) IFN 処理により SAMHD1 の発現は殆ど変化しなかったが、ISG の中には 50-1,000 倍の発現上昇が認められるものもあり、それら ISG の過剰発現

による抗 HIV-1 抑制効果を認めた。4)高 HIV 量の病態進行の早い感染者の CD4<sup>+</sup>T 細胞において *IL-2* 遺伝子が高度にメチル化され、その頻度は *IL-2* 発現量と逆相関を、老化のマーカー CD57 の発現とは正の相関を示した。5)HIV 感染完全制御者では、免疫活性化と関連する Nef の機能が減弱化していたが、両群の遺伝子配列解析に著明な差は認められなかった。6) OX40L と OX40 を同時発現する HTLV-I 不死化細胞株では、OX40L のみが  $\beta$  ケモカインの産生を促すことにより R5 HIV-1 感染を効率良く抑制した。A120 存在下で抗 CD3 抗体刺激による T 細胞活性化が抑制された。

#### 4. 考察

SIV 初期制御後の病態進行が末梢血 CTL 応答群の推移で予測可能である。制御持続群の reservoir 内では、野生型ウイルスは不活化されて Gag 変異ウイルスの増殖が CD8<sup>+</sup> 細胞により制御されていると考えられ、即ち、変異体の蓄積スピードと病態制御の持続とが関連する可能性が示唆された。非病原性 SIV は比較的短期間に潜伏と再活性化が誘導可能なサルモデルとして今後の解析に有用であろう。ヒト化マウスでは高度に活性化された CCR5 発現細胞が多いため、R5 型 HIV-1 の増殖が良い。一方、X4 型 HIV-1 の感染標的は主として naïve T 細胞であることを考えると、この細胞に感染した HIV が生体内でどのくらい長く存続しうるか明らかにする必要がある。また、HIV 感染初期に Vpr 蛋白質が Treg への感染促進作用を有することは、ヒト化マウスで初めて明らかになった現象であるが、病状が進行した慢性期においても同様なのか検討を要する。今後、IFN 処理マクロファージや樹状細胞の HIV-1 感染前段階抑制分子としての新規 ISG が発見され、我々独自の *in vitro* 潜伏感染・再活性化モデルにおいて新規のエピジェネティック調節因子が明らかになれば、OX40 や A120 抗体と共に今後のエイズ治療開発のために有用である。

#### 5. 自己評価

##### 1) 達成度について

全体としてはおおむね順調に進展しており、総じて 70% の達成度と考える。特に、サルやヒト化マウス、培養系での新たな潜伏・再活性化モデルが確立でき、研究の方向性も的が絞られてきたことは評価できる。

##### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

2つの SIV 感染モデルやヒト化マウスの実験系、*in vitro* 潜伏感染モデル系はそれぞれ独創的で、今後の潜伏化研究に対して大きなインパクトを与え、学術的・国際的意義は

高く、将来的に遺伝子治療、ワクチンや薬剤の標的と成り得る新たな細胞因子を同定できる可能性がある。

##### 3) 今後の展望について

潜伏 SIV の人工的動態攪乱後、体内ウイルス量・CTL 応答修飾 (特異的 CTL レパトワ)、組織における無症候感染期のウイルス学的現象を解析し、腸管内で reservoir となりうる細胞や、持続的な HIV/SIV 制御に結び付く CTL 応答の解明をめざす。また、再活性化細胞における CTL への抗原提示の動態解析系を新たに確立することにより、潜伏感染細胞内での HIV 発現様式を明らかにすることが可能となる。更に、エピジェネティックな不均一性を決定する宿主因子や、Tat と潜伏化に関する更なる理解、抗 HIV-1 活性を持つ新規 ISG の同定、ウイルス蛋白質の機能の減弱化に関わる免疫応答や宿主因子などを明らかにすることにより、新たな HIV 制御の方向性を見出す。

本研究で得られる基礎科学的知見を集約し、具体的なエイズ治療法の開発の方向へと進めていく。

#### 6. 結論

2種類の SIV 感染サルモデルが確立できた。SIV 初期制御群の病態進行は感染後 1-2 年時点でのプロウイルスの Gag 特異的 CTL エスケープ変異の蓄積の有無で大別され、CTL 主体のエイズウイルス制御を目標とする場合には群の単位で特異的 CTL 応答を設計する必要がある。ヒト化マウスモデルでは、Vpr が Treg への感染性促進因子であることが示され、X4 型 HIV-1 の潜伏感染が成立する条件が確立された。また、培養系モデルでは独自のレポーターウイルス感染潜伏感染細胞が作製され、それらが異なるメカニズムを経た不均一な集団であること、宿主エピジェネティック因子群がこれらの制御に関わることが明らかにされた。更に、慢性 HIV 感染者における T 細胞機能不全の要因の一つとして CD4<sup>+</sup>T 細胞の老化と *IL-2* 遺伝子の DNA メチル化というエピジェネティックな変化があること、免疫活性化に関連するウイルス蛋白質 Nef の機能、マクロファージ及び樹状細胞において SAMHD1 非依存的な HIV-1 感染抑制を担う ISG が複数存在する可能性が示唆された。また、自家 HTLV-I 不死化細胞株の OX40L が R5 HIV-1 感染を効率良く抑制し、A120 抗体が抗 CD3 抗体で刺激による T 細胞活性化を抑制することが明らかとなり、新たな治療法開発への知見が数多く蓄積された。

#### 7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

なし