

図 健常者と違いHIV感染者ではANGPTL2とBMIは相関しない

感染者においてはANGPTL2と肥満（BMI）との相関はみられなかった（図）。HIV感染者でのANGPTL2の上昇のメカニズムは脂肪組織以外のところに主座があり、HIVは血管内皮細胞に感染することから感染による慢性炎症で上昇しているものと推察される。

E. 結論

血中HIV-RNA陽性例で血清ANGPTL2値が高く、血中HIV-RNA量は血清ANGPTL2値と相関した。また血中HIV-RNA陽性例において動脈硬化ありの例では動脈硬化なしの例よりも血清ANGPTL2値が高かった。HIV感染者においてはANGPTL2と肥満（BMI）との相関はなく、HIV感染者でのANGPTL2の上昇のメカニズムはnon-HIVとは違い脂肪組織以外のところに主座があり、HIVによる慢性炎症で上昇しているものと推察された。

F. 研究発表

1. 論文発表

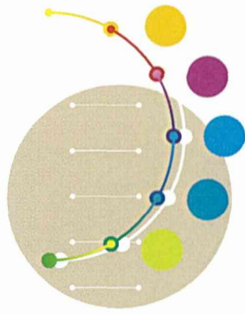
なし

2. 学会発表

- 1) 本田元人：HIV感染者における新たな慢性炎症マーカーと動脈硬化症 第28回日本エイズ学会 2013 大阪

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



効果的な治療法開発のための研究 抗HIV薬の感受性評価の研究

担当責任者

杉浦 互 (独) 国立病院機構名古屋医療センター 臨床研究センター
感染・免疫研究部 部長

研究要旨

我が国ではsubtype Bに次いでCRF01_AEの遺伝子型指向性検査の評価アルゴリズムについて検討を行い、Geno2Pheno NGS-Sangerの適用が有効である可能性を明らかにした。感受性検査による確認と更なる改良が必要と考えられた。また、次世代シーケンサによるHIVゲノム解析法の確立を行い、本法が微小集族における薬剤耐性の動的解析に有用であることを示した臨床的な意義については更に症例を増やして検討することが必要である。

A. 研究目的

我が国ではsubtype Bが主要な流行株であるが、次いでCRF01_AE感染症例が多い事が知られている。

今日使用されている抗HIV薬剤の有効性にsubtypeによる差は無いが、CCR5阻害剤Maravirocの使用においては、その有効性を判定する遺伝子型指向性検査の評価アルゴリズムにsubtypeによる違いが指摘されている。今日指向性遺伝子型検査ではHIV envelopeのV3領域のアミノ酸配列から、指向性を推測するGeno2PhenoというアルゴリズムがEUあるいは日本のガイドラインで推奨されて用いられているが、CRF01_AEでは他のsubtypeに比して有意に高い頻度でCXCR4 (X4) 指向性と判定される傾向が指摘されている。本研究ではCRF01_AEにおける指向性遺伝子解析法の問題点の確認および評価法の改良に取り組む。更に、本研究では近年登場してきた次世代シーケンサによるHIVゲノム解析法の確立に取り組む。微小集族における薬剤耐性の動的解析と臨床的意義の解明、さらにはHIV quasispeciesの評価法の検討を行う。

B. 研究方法

(i). HIV指向性の遺伝子解析法の確立

名古屋医療センターに於いてenvelopeの配列解析を行ったCRF01_AE 356例とSubtype B 324例につい

て2つの異なるアルゴリズムGeno2Pheno co-receptorとNGS-Sangerによる解析を行った。

(ii). 次世代シーケンサーによる微小集族の解析

HIV感染者体内における微小集族の網羅的解析を行うためにIllumina MiSeqによるHIVゲノム配列の解析系の構築を目指す。Reference株としてpNL4-3あるいは患者由来HIV-1 RNAについて、Illumina MiSeqによる全長配列解析(LTR領域を除く)を行った。

C. 研究結果

(i). HIV指向性の遺伝子解析法の確立

CRF01_AE、subtype BそれぞれをGeno2Pheno Co-receptorで解析した結果、図1に示す様にCRF01_AE、はどのFPR値においてもsubtype Bに比して高い頻度でX4指向性を示した。これらの配列を新しい評価アルゴリズムNGS-Sanger (50%cut off) で解析した結果、図2に示す様にCRF01_AEのX4指向性の比率が53.9%から13.8%に低下した。

(ii). 次世代シーケンサーによる微小集族の解析

pNL4-3の配列情報を基に、1%以上の変異をエラー塩基と区別できる独自のエラー補正法を構築した(図3)。また、患者由来HIV-1 RNAの目的領域の

PCR増幅を、サブタイプにはほぼ依存せず、低コピー数であっても可能にするプライマーセットをデザインした。これら補正法とプライマーを用いて、インテグラーゼ阻害剤耐性症例を後方視的、経時的にサンプリングし、耐性変異 (Y143C/S/A) の経時的変化の観察を行った結果、5%前後の変異はSanger法では観察できなかったポイントで次世代シーケンサ

では耐性変異を捉える事が出来ていたことが明らかになった。その後この症例はより高度な耐性変異に変わっていったが、次世代シーケンサで捉えられていた時点で治療薬剤を変えていれば、あるいは服薬指導を徹底していれば高度耐性への変換を防ぐ事が出来たと推測される (図4)。

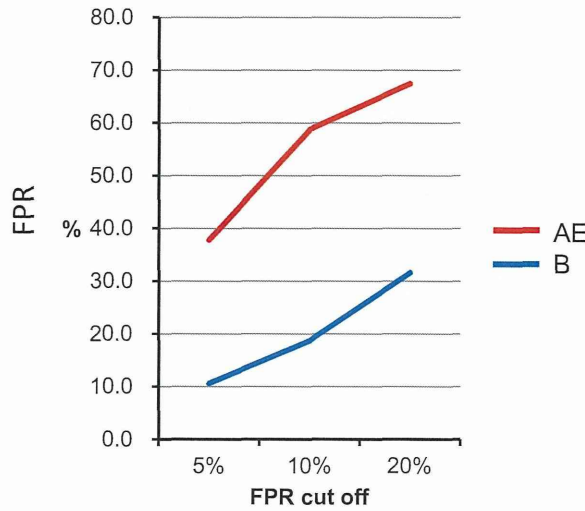


図1 CRF01_AEは有意に高くCXCR4指向性と判定される

CRF01_AE (n=356)				Subtype B (n=324)					
Co-receptor		NGS Sanger				NGS Sanger			
		X4	R5			X4	R5		
Co-receptor	X4	35	157	192 (53.9%)	Co-receptor	X4	4	45	49 (15.1%)
	R5	14	150	164 (46.1%)		R5	7	268	275 (84.8%)
		49 (13.8%)	307 (86.2%)			11 (3.4%)	313 (96.6%)		

図2 CRF01_AEはNGS Sanger を用いるとCXCR4指向性がsubtype Bと同レベルまで改善される

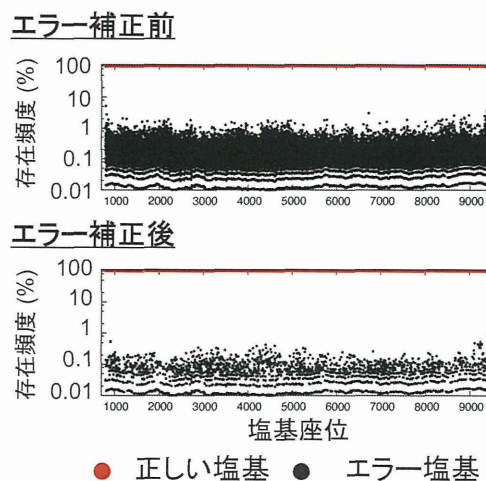


図3 エラー塩基の存在頻度
独自のエラー補正法による処理前後の結果を示す

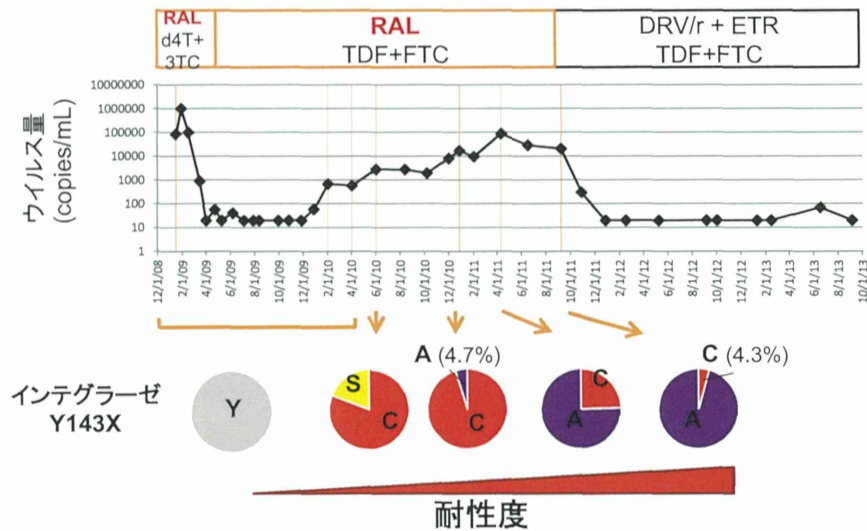


図4 インテグラーゼ阻害薬耐性症例における耐性変異(Y143C/S/A)の経時的変化の観察
5%前後の変異はSanger法では観察できなかった

D. 考察

(i). HIV指向性の遺伝子解析法の確立

新しいアルゴリズムを適用する事によりCRF01_AEにおける過度のX4指向性判定は改善されたが、同時にsubtype BにおいてもX4判定比率の低下が認められた。subtype Bの場合は臨床試験等でGeno2Pheno Co-receptorの精度が確認されている事を鑑みると、subtype BではR5指向性に傾いた可能性も考えられる。より評価アルゴリズムの精度を高める為には実際に感受性検査による指向性検査を行い、プログラムの改良が必要と思われる。

(ii). 次世代シーケンサーによる微小集簇の解析

本手法により、患者内でのHIV-1の変化をより詳細に理解できるものと考えられるが、その臨床的な位置づけは更に解析症例を増やして、意義と有効性について検討するがあると考えられた。

E. 結論

CRF01_AEが指向性遺伝子検査で過度にX4指向性と判定される問題について、名古屋医療センターの症例で確認するとともに、新しいアルゴリズムの活用が問題を解決する可能性があることを明らかにした。次世代シーケンサーに関してはHIV-1の全長解析プロトコルを完成させた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakurai, D., Iwatani, Y., Ohtani, H., Naruse, T., Terunuma, H., Sugiura, W., Kimura, A. APOBEC3H polymorphisms associated with the susceptibility to HIV-1 infection and AIDS progression in Japanese. Immunogenetics, in press.
- 2) Yoshida S, Hattori J, Matsuda M, Okada K, Kazuyama Y, Hashimoto O, Ibe S, Fujisawa SI, Chiba H, Tatsumi M, Kato S, Sugiura W. Japanese External Quality Assessment Program to Standardize HIV-1 Drug-Resistance Testing (JEQS2010 Program) Using In Vitro Transcribed RNA as Reference Material. AIDS research and human retroviruses. 2015. (in press)
- 3) Watanabe T, Hamada-Tsutsumi S, Yokomaku Y, Imamura J, Sugiura W, Tanaka Y. Post-Exposure Prophylactic Effect of HBV-active Antiretroviral Therapy Against Hepatitis B Virus Infection. Antimicrobial agents and chemotherapy. 59(2):1292-8. 2015.
- 4) Shiino T, Hattori J, Yokomaku Y, Iwatani Y, Sugiura W. Phylodynamic Analysis Reveals CRF01_AE Dissemination between Japan and Neighboring Asian Countries and the Role of Intravenous Drug Use in Transmission. PloS one. 9(7):e102633. 2014.
- 5) Kudoh A, Takahama S, Sawasaki T, Ode H, Yokoyama M, Okayama A, Ishikawa A, Miyakawa K, Matsunaga S, Kimura H, Sugiura W, Sato H, Hirano H, Ohno S, Yamamoto N, Ryo A. The phosphorylation of HIV-1 Gag by atypical protein kinase C facilitates viral infectivity by promoting Vpr incorporation into virions. Retrovirology. 11:9.

- 2014.
- 6) Imahashi M, Izumi T, Watanabe D, Imamura J, Matsuoka K, Ode H, Masaoka T, Sato K, Kaneko N, Ichikawa S, Koyanagi Y, Takaori-Kondo A, Utsumi M, Yokomaku Y, Shirasaka T, Sugiura W, Iwatani Y, Naoe T. Lack of Association between Intact/Deletion Polymorphisms of the APOBEC3B Gene and HIV-1 Risk. *PloS one*. 9(3):e92861. 2014.
 - 7) Gu L, Kawana-Tachikawa A, Shiino T, Nakamura H, Koga M, Kikuchi T, Adachi E, Koibuchi T, Ishida T, Gao GF, Matsushita M, Sugiura W, Iwamoto A, Hosoya N. Development and Customization of a Color-Coded Microbeads-Based Assay for Drug Resistance in HIV-1 Reverse Transcriptase. *PloS one*. 9(10):e109823. 2014.

2. 学会発表

海外

- 1) Wataru Sugiura, Séverine Louvel, Nico Pfeifer, Masakazu Matsuda, Yoshiyuki Yokomaku, Rolf Kaiser, Thomas Klimkait. Discordant Tropism Determination For HIV-1 Isolates Of CRF01_AE From Asia. 14th International HIV Drug Resistance Workshop. 2015 Seattle, USA, February 21-22
- 2) Shiino T, Sadamasu K, Nagashima M, Hattori J, Hachiya A, Sugiura W. Phylodynamic analysis of HIV-1 subtype B population in Japan: Identification of large transmission clusters and their network structure. 9th HIV Transmission Workshop 2014 Cape Town, South Africa, Oct 25-26, 2014.
- 3) Nemoto M, Iwatani Y, Maeda N, Horibe K, Sugiura W. Exome Sequencing Identified a Novel TYK2 Compound Heterozygous Mutation in 2 Siblings with Primary Immunodeficiency Joint Meeting of the 1st Africa International Biotechnology & Biomedical Conference and the 8th International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis, Nairobi, Kenya, Sep 10-12, 2014.
- 4) Nakashima M, Kitamura S, Kurosawa T, Ode H, Kawamura T, Imahashi M, Yokomaku Y, Watanabe N, Sugiura W, Iwatani Y. Crystal structure of the Vif-interaction domain of the anti-viral APOBEC3F. 23rd Congress of the International Union of Crystallography (IUCr2014), Montreal, Canada, Aug 5-12, 2014.
- 5) Yokomaku Y, Kito Y, Matsuoka K, Ode H, Matsuda M, Shimizu N, Iwatani Y, Sugiura W. CCR3 and CCR5 Dual tropic HIV-1 is a Possible Major Escape Mechanism From maraviroc-Containing Antiretroviral Therapy. International Workshop on Antiviral Drug Resistance(Meeting the Global Challenge), Berlin, Germany, Jun 3-7, 2014.
- 6) Ode H, Matsuoka K, Matsuda M, Hachiya A, Hattori J, Yokomaku Y, Iwatani Y, Sugiura W. HIV-1 Near Full-Length Genome Analysis by Next-Generation Sequencing: Evaluation of Quasispecies and Minority Drug Resistance. International Workshop on Antiviral Drug Resistance(Meeting the Global Challenge), Berlin, Germany, Jun 3-7, 2014.
- 7) Hattori J, Shiino T, Sugiura W, Japanese Drug Resistance HIV-1 Surveillance Network Molecular Epidemiology of Recent Seroconverters and Drug-Resistant HIV-1 Transmission Networks in Japan. International Workshop on Antiviral Drug Resistance(Meeting the Global Challenge), Berlin, Germany, Jun 3-7, 2014.
- 8) Imahashi M, Izumi T, Imamura J, Matsuoka K, Ode H, Masaoka T, Sato K, Koyanagi Y, Takaori-Kondo A, Yokomaku Y, Sugiura W, Iwatani Y. Lack of Association between Intact/Deletion Polymorphisms of the APOBEC3B Gene and HIV-1 Risk. Cold Spring Harbor Laboratory Meetings & Courses Program, New York, USA, May 19-24, 2014.
- 9) Nakashima M, Kitamura S, Kurosawa T, Ode H, Kawamura T, Mano Y, Naganawa Y, Yokomaku Y, Watanabe N, Sugiura W, Iwatani Y. Fine-tuned HIV-1 Vif-interaction Interface of Anti-retroviral Cytidine Deaminase APOBEC3F. Cold Spring Harbor Laboratory Meetings & Courses Program, New York, USA, May 19-24, 2014.

国内

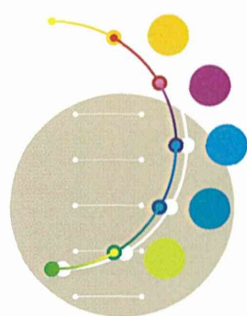
- 1) 魚田 慎、今村淳治、古川聡美、大出裕高、横幕能行、杉浦 互. 次世代シーケンサを用いた Human Papillomavirus の検出及び解析方法の開発. 第28回日本エイズ学会学術集会・総会、大阪、2014年12月3-5日.
- 2) 重見麗、蜂谷敦子、松田昌和、今村淳治、渡邊綱正、横幕能行、岩谷靖雅、杉浦 互. HIV-1感染急性期におけるHIV特異的な病態バイオマーカーの探索について. 第28回日本エイズ学会学術集会・総会、大阪、2014年12月3-5日.
- 3) 芳田 剛、齋藤 暁、松岡和弘、大出裕高、岩谷靖雅、保富康宏、俣野哲朗、三浦智行、杉浦 互、明里宏文. サル指向性HIV-1の感染個体における増殖効率を上昇させる要因. 第28回日本エイズ学会学術集会・総会、大阪、2014年12月3-5日.
- 4) 松田昌和、大出裕高、松岡和弘、蜂谷敦子、横幕能行、岩谷靖雅、杉浦 互. Illumina MiSeqを用いたHIV-1近全長遺伝子配列解析の試み. 第28回日本エイズ学会学術集会・総会、大阪、2014年12月3-5日.
- 5) 岡崎玲子、蜂谷敦子、服部純子、湯永博之、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、佐藤武幸、上田敦久、石ヶ坪良明、古賀一郎、太田康男、山元泰之、福武勝幸、古賀道子、岩本愛吉、西澤雅子、岡 慎一、岩谷靖雅、松田昌和、重見

- 麗、保坂真澄、林田庸総、横幕能行、上田幹夫、大家正義、田邊嘉也、白阪琢磨、小島洋子、藤井輝久、高田昇、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28回日本エイズ学会学術集会・総会、大阪、2014年12月3-5日。
- 6) 大出裕高、中島雅晶、河村高志、北村紳悟、長縄由里子、黒澤哲平、真野由有、粟津宏昭、松岡和弘、横幕能行、渡邊信久、杉浦互、岩谷靖雅。HIV-1 VifにおけるAPOBEC3C/F結合インターフェース。第28回日本エイズ学会学術集会・総会、大阪、2014年12月3-5日。
- 7) 杉浦互。フローサイトメトリー検査における5-color解析法の導入による影響。第68回国立病院総合医学会、横浜、2014年11月14-15日。
- 8) 東濃篤徳、鈴木紗織、森健一、大出裕高、松岡和弘、片貝祐子、岡林佐知、横昇、岩谷靖雅、杉浦互、明里宏文。小型霊長類において持続感染したGBV-Bの変異解析。第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月10-12日。
- 9) 芳田剛、齋藤暁、松岡和弘、大出裕高、岩谷靖雅、杉浦互、保富康宏、俣野哲朗、三浦智行、明里宏文。In vivoにおけるサル指向性HIV-1の増殖効率を上昇させる要因。第62回日本ウイルス学会学術集会、2014年11月10-12日。
- 10) 本村和嗣、飯塚節子、中村昇太、元岡大祐、大出裕高、杉浦互、佐藤裕徳、田中智之、武田直和。ノロウイルス集団食中毒事例における混合感染の解析。第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月10-12日。
- 11) 中島雅晶、大出裕高、河村高志、北村紳悟、長縄由里子、黒澤哲平、真野由有、粟津宏昭、松岡和弘、横幕能行、渡邊信久、杉浦互、岩谷靖雅。空間的に異なるAPOBEC3結合インターフェースをもつHIV-1 Vif。第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月10-12日。
- 12) 大出裕高、松岡和弘、松田昌和、蜂谷敦子、横幕能行、岩谷靖雅、杉浦互。Deep sequencingによるHIV-1臨床検体の近全長ゲノム配列解析系の構築。第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月10-12日。
- 13) 大出裕高、松岡和弘、松田昌和、蜂谷敦子、服部純子、横幕能行、岩谷靖雅、杉浦互。Deep Sequencingによる近全長HIV-1ゲノムのQuasispecies解析と微小薬剤耐性変異の検出。第16回白馬シンポジウム、熊本、2014年6月13-14日。

3. その他
なし

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



効果的な治療法開発のための研究

新規抗HIV薬の開発

一耐性HIVを克服する新規薬剤の開発に関する研究一

担当責任者

児玉 栄一

東北大学大学院医学系研究科・宮城地域医療支援寄附講座・講師

東北大学病院・内科総合感染症科・講師

東北大学メディカルメガバンク機構・地域医療支援部門・講師

研究要旨

本研究は耐性HIVを克服するための新規創薬とその耐性機序解明を目的としている。平成26年度は、東北大で分離精製された化合物ライブラリーより約5000化合物を入手し、その抗HIV活性スクリーニングを開始するべく、準備を行うとともに、epigenome modulatorを応用して新規天然物を分離・精製し、その抗HIV活性を検討した。後者においては、これまでに約70化合物をスクリーニングし、そのうち1化合物に新たな抗HIV活性があることを見出している。今後、この作用機序の解明とともに、5000化合物のスクリーニングを行う予定である。

A. 研究目的

多剤併用療法が普及してHIV感染症は慢性感染症のひとつといわれるまでになったが、薬剤耐性の問題は依然解決されていない。HIVは個々の薬剤に対して耐性を獲得するだけでなく、複数の薬剤に対し同時に耐性化することがある。この多剤耐性株の出現は、使用歴のない薬剤に対しても交差耐性を起こすため、治療薬の選択を大幅に狭めてしまう。現在、使用されている薬剤に対する耐性を獲得するとそれ以前の薬剤に対しても交差耐性を持つてしまうことがほとんどである。しかし、新しい作用機序を有する薬剤は、理論上、これまでの薬剤と交差耐性ないと考えられる。事実、我々が開発に関与したelvitegravirは新しい阻害標的であるインテグラーゼを阻害することで耐性ウイルスを抑制することが可能であった。インテグラーゼはHIV複製に必須の酵素であり、この阻害はウイルス量を劇的に減少させ、治療成績、ひいては患者QOLに貢献している。

このような薬剤は新しい標的を見出し、構造学的、構造活性相関などを用いて開発されるため効率よい開発が可能であるが、想定外の機序をもつ薬剤のスクリーニングは行えなくなる。これまで我々も含めて標的指向性スクリーニングを行ってきたが、一方でもう一度ランダムスクリーニングを見直し、今年

度から取り組んでいる。特に東北大学は創薬基盤プラットフォーム推進事業（文部科学省）の7拠点大学に指定されており、学内で合成・分離・精製された化合物がライブラリー化されつつある。本年度はまずこれらの多数検体をアッセイするための384ウェルプレートを用いたウイルス感染スクリーニングで幅広く化合物をスクリーニングする準備を行った。高cytopathic effectウイルスであるHIV-1_{ms}を用いたMTT法を応用し、ウイルス複製を数サイクル行うことで、ほぼすべての複製ステップの阻害剤のスクリーニングを可能とした。

植物・微生物等抽出物からこれまで有用な薬効を示す化合物が多数同定されてきている。その中にはビンプラスチン、ペニシリン、タクロリムス(FK506)のように実際に臨床応用されたものが含まれる。スタチンは抽出化合物を化学修飾したものである。アスピリンの基本骨格はヤナギ成分から抽出され、現在ではさらなる改変を介して強力な薬効と安全性を確保した抗炎症剤がいくつも開発・実用化されている。抗インフルエンザ薬のタミフルも八角から抽出されるシキミ酸を化学修飾して2009年から製造されている。驚くべきことにこれまで臨床応用された薬剤の4割程度が何らかの形で天然物に由来する化合物である。植物・微生物等は化学合成では作製困難な複雑な化合物を合成することができるこ

とからも天然化合物は有用な化合物資源である。

天然化合物は主だった植物・微生物からは抽出されつくされつつあり、新規化合物は以前よりも減少してきている。しかしながら生物活性物質がそれを産生する植物等においても効果を示す場合、平常時には産生が制限されているもしくはされていない可能性があるかと仮定した。動物細胞と同様に植物・真菌等の細胞においてもそのゲノムに含まれる半数以上の遺伝子は通常時はサイレンシングされ、それらは成長の一過程もしくはなんらかの異常時（例えば感染）に発現し、個体にとって有利となるように導くと考えられている。つまりサイレンシングされている遺伝子群を活性化させることによってより重要な生物活性を有する天然化合物の分離・同定の確率をあげることが可能である。事実、共同研究者の東北大学大学院薬学研究科の浅井博士らの研究によってこれまでの通常栽培・培養条件において微量の産生されていないことから抽出が困難であった化合物の回収が可能となっただけでなく、新規骨格を有する化合物も同定されてきている。

我々は、植物真菌等のエピゲノム制御の阻害剤を用いて、新規もしくはこれまで微量のため精製できなかった天然化合物を抽出し、これらのなかから抗HIV効果を有するヒット化合物を見出すことを目的として研究を開始した。最終的にはこれまでの薬剤とは一線を画す新規作用機序をもつ化合物ヒットを同定し、ケミカルバイオロジーを利用し、医薬品に導くことを目指す。

本研究は、東北大学薬学研究科大島吉輝教授、浅井禎吾助教との共同で行った。

B. 研究方法

1. 細胞とウイルス

MT-2、MT-4、RPMI8226細胞はRPMI1640培地を用いて培養した。HeLa-CD4/ β -galactosidase (MAGI)細胞はDMEM培地を使用した。ウイルスはHIV-1_{ms}株を用いた。耐性変異を有するHIV-1_{NL4.3}株はsite directed mutagenesis法によって構築した。プラスミドの作製では一般的な手技、試薬を使用した。これらのウイルスはそれぞれMT-2細胞で継代し、使用するまで-80℃で保存した。Herpes simplex virus type 1はRPMI8226細胞で継代し、使用するまで-80℃で保存した。

2. 抗ウイルス剤

吸着阻害剤であるDS5000、AZT抗ヘルペス剤アシクロビル等のコントロール薬剤はSigma社から購入

した。非核酸系逆転写酵素阻害剤はNIH AIDS Research and Reference Reagent Programから分与を受けた。

3. 合胞体形成阻害試験

HIV-1_{ms}株が持続感染しているPM-1_{ms}とMT-2細胞を 4×10^5 /mLで調整し、それぞれを薬剤存在下で共培養し、24時間後に形成された合胞体を観察した。

(倫理面への配慮)

創薬応用を主とする基礎研究であり、臨床分離株など患者由来の情報は氏名、年齢、性別も含めて一切を研究に利用していないため特に配慮は要らないと考えられた。臨床分離株の塩基配列情報は、国立国際医療研究センターの倫理指針に基づいて解析された。また、ヒトゲノム・遺伝子解析やヒト幹細胞を用いた実験は行っていない。

C. 研究結果

1. サイレンシング解除剤の影響

Epigenome modulatorの添加によって微生物から生合成される化合物のプロファイルが変わることが明らかとなった（図1）。糸状菌をニコチンアミド存在下で培養すると、図に矢印で示した天然物の生合成が増加もしくは新規に蓄積されることが認められた。これらのピークを基に新規化合物を分離・精製し、その構造を決定した。

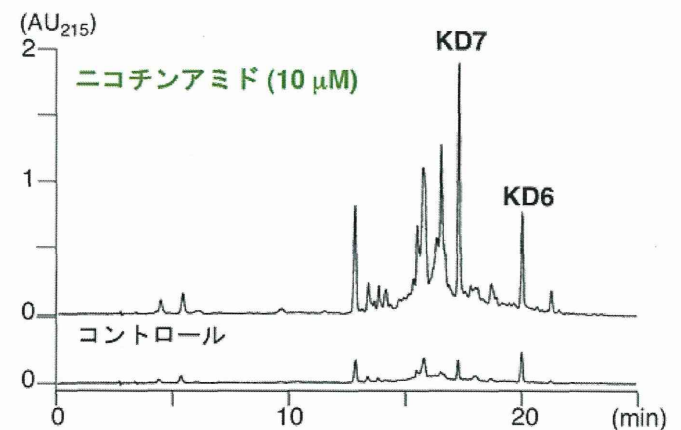


図1 ニコチンアミド存在下での天然物合成

ニコチンアミド10 μ M糸状菌を培養し、その抽出物をHPLCで解析した。全体的に天然物合成が促進され、新たなピークが得られている。新規ピークはこれまで分離・同定されていない天然物である可能性がある。この抽出物から得られたKD-6は抗HIV活性を有していた

2. MAGI細胞を用いたスクリーニング

今回新規に分離された化合物を検討したところ、その半数以上が新規骨格を有するものであった。抗HIV活性を測定したところ、数剤に効果が認められたが、現在のところnMオーダーに達する薬剤は見出されていない(表1)。

3. 作用機序の同定

スクリーニングでヒットした化合物の一部の作用機序を検討した。まずはMAGIによるtime of addition実験で検討したところ、その作用点はHIV-1細胞侵入過程を阻害するDS5000と似ており、吸着阻害剤であることが示唆された。Flow cytometerを用いてPM-1_{III}へのHIV-1 Env-V3抗体の結合性阻害を検討したが有意な差が認められなかった(data not shown)。そのため合胞体形成を阻害するかを検討したところ、弱いながら100 μMで合胞体形成を阻害することを明らかとした(図2)。

D. 考察

本研究は耐性HIVを克服するための新薬の創製を目的としており、本年度はこれまでの標的・特異的薬剤開発からランダムスクリーニングに方向転換を行い、新たな作用機序を有する薬剤開発を目指した。単にランダムスクリーニングを行うのであれば、これまでに行われてきていない化合物ライブラリーが必要である。例えば、コマーシャルベースで購入可能な化合物ライブラリーの場合、新規ライブラリーであろうともそのほとんどは誰かが既に抗HIV活性を測定していることが容易に予想される。今回使用したライブラリーを形成する微生物はおそらくはこれまで誰かがスクリーニングした可能性が高い。しかし、これらの微生物にエピゲノム制御の阻害剤を加えて培養し、ストレス等がかかった時にしか発現しない遺伝子が発現され、新たな物質が生合成される可能性が高い。さらにストレス応答は、感染などによっても惹起されるものであるため、抗菌活性、抗ウイルス活性をもつ天然物を生成する可能性が高

表1 分離精製された天然物の抗HIV活性

	EC ₅₀ (μM)			
	KD-6	KD-30	KD-33	AZT
HIV-1 _{III}	11.3 ± 3.9	32.6 ± 0.9	17.0 ± 6.1	0.0069 ± 0.0001
HIV-1 _{Ba-L}	33.7 ± 33.5	ND	ND	ND

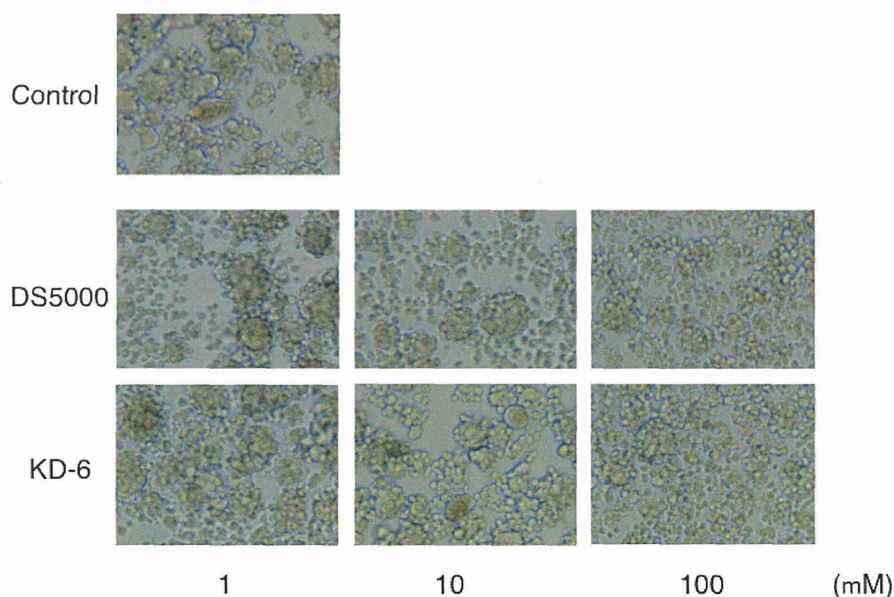


図2 合胞体形成阻害

HIV-1_{III}株が持続感染しているPM-1_{III}とMT-2細胞を 4×10^5 /mLで調整し、それぞれを薬剤存在下で共培養し、24時間後に形成された合胞体を観察した。DS5000は10 μMから、KD-6は100 μMから合胞体の数・大きさが減少した。

い。事実、本年度でも活性自体は低いもののヒット化合物を複数個拾い上げてきている。来年度以降、これらのヒット化合物を増やすこと、一部の作用機序を明らかとすることを含めた研究を継続し、新たな作用機序をもち、これまでの化合物と交差耐性のない新規抗HIV剤の開発に役立つリード化合物の検索を行う。

E. 結論

耐性HIVを克服するための新薬の創製を目的とし、本年度はエピゲノム制御の阻害剤を用いた天然物ライブラリーから新規抗HIV阻害剤が含まれていないか評価した。この方法を日本発の創薬に役立たせたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

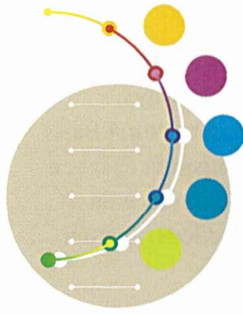
- 1) Kenji Maeda, Darshan V Desai, Manabu Aoki, Hirotomo Nakata, Eiichi N Kodama, Hiroaki Mitsuya. Delayed emergence of HIV-1 variants resistant to 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine: comparative sequential passage study with lamivudine, tenofovir, emtricitabine and BMS-986001. *Antiviral Therapy* 19:179-189, 2014.
- 2) Eleftherios Michailidis, Andrew D. Huber, Emily M. Ryan, Yee T. Ong, Maxwell D. Leslie, Kayla B. Matzek, Kamalendra Singh, Bruno Marchand, Ariel N. Hagedorn, Karen A. Kirby, Lisa C. Rohan, Eiichi N. Kodama, Hiroaki Mitsuya, Michael A. Parniak, and Stefan G. Sarafianos. 4'-Ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine (EFdA) inhibits HIV-1 reverse transcriptase with multiple mechanisms. *Journal of Biological Chemistry* 289:24533-24548, 2014
- 3) Shigeyoshi Fujiwara, Hiroshi Kimura, Ken-ichi Imadome, Ayako Arai, Eiichi Kodama, Tomohiro Morio, Norio Shimizu, Hiroshi Wakiguchi. Current Studies on Chronic Active Epstein-Barr virus Infection in Japan. *Pediatrics International*, 54: 159-166, 2014
- 4) Tetsuro Hisayoshi, Mayu Shinomura, Kanta Yokokawa, Ikumi Kuze, Atsushi Konishi, Kumi Kawaji, Eiichi N. Kodama, Keishi Hata, Saori Takahashi, Satoru Nirasawa, Kiyoshi Yasukawa. Inhibition of the DNA polymerase and RNase H activities of HIV-1 reverse transcriptase and HIV-1 replication by *Brasenia schreberi* (Junsai) and *Petasites japonicus* (Fuki) components. *Journal of Natural Medicines*, in printing 2015

2. 学会発表

- 1) Zhe Li, Karen Kirby, Bruno Marchand, Michailidis Eleftherios, Eiichi Kodama, Hiroaki Mitsuya, Michael Parniak, Stefan Sarafianos. Structural Basis of Inhibition and Resistance Mechanism to EFdA, a Highly Potent NRTI. The annual Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Seattle, Washington, Feb. 23-26, 2015

G. 知的所有権の出願・取得状況（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



感染予防法開発のための研究

担当責任者

川村 龍吉

山梨大学大学院総合研究部 医学域 臨床医学系 皮膚科学講座 准教授

研究要旨

世界における新たなHIV感染者数は現在でも年間約250万人に上り、その約90%が性行為による感染である。世界的なHIVの流行を阻止すべく、HIV感染者との性行為後に感染の成立を阻止できるような予防法（Post-Exposure prophylaxis; PEP）の開発が求められている。性行為HIV感染において、HIVは主に粘膜・皮膚上皮内ランゲルハンス細胞の感染を介して生体内に侵入するが、今回の我々の研究結果から、新規逆転写酵素阻害薬：EFdAおよびインテグラーゼ阻害薬：Raltegravirがランゲルハンス細胞のHIV感染およびCD4陽性T細胞へのHIV伝播を強力に抑制することが明らかとなり、これらの薬剤が性行為HIV感染におけるPEPに有用であることが示唆された。

A. 研究目的

HIV感染症は世界で毎年約250万人もの新規感染者が発生しており、その約90%が性行為による感染である。世界的なHIVの流行を阻止すべく、コンドーム以外の方法で性行為HIV感染を防ぐHIV侵入阻害外用剤（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いる。一方、最近WHOおよびUNAIDSはレイプを含めた女性への性暴力がサハラ以南のアフリカにおけるエイズ蔓延の最大の原因であると言及しており、マイクロビサイド等によるPre-Exposure Prophylaxis; PrEPに加えて、HIV感染者との性行為後に女性が自分自身でHIV感染の成立を阻止できるような予防法（Post-Exposure prophylaxis; PEP）の開発が求められている。

異性間性行為においてHIV感染者の精液・膣分泌液中に含まれるHIVがパートナーの外陰部・性器に曝露される際、HIVは粘膜・皮膚上皮から侵入後、所属リンパ節に運ばれて宿主での永久的な感染を成立させる。近年、異性間性行為におけるHIVの生体内メカニズムとして、「HIVは粘膜・皮膚表皮内ランゲルハンス細胞（Langerhans cells; 以下LCs）の感染を介して生体内に侵入し、LCsは感染局所から所属リンパ節へのウイルスの輸送・播種にも重要な役割を果たす」という説が世界的に支持されつつある

（Ogawa Y. *et al. Cell Host Microbe*. 13(1): 77-86, 2013）。これまで我々は、ヒトLCsとCD4陽性T細胞を共培養する実験系を用いて、新規NRTI：EFdAがマイクロビサイドとして優れた感染抑制効果を持つ可能性や（Matsuzawa T. *et al. J Invest Dermatol*. 134(4):1158-61, 2014）、CCR5阻害薬：Maravirocの内服により性行為HIV感染が予防できる可能性（Matsuzawa T. *et al. J Invest Dermatol*. 133(12): 2803-5, 2013）などを明らかにしてきたが、特にCCR5阻害薬内服によるPrEPのコンセプトは "New Morning-Before Pill"として注目されている（Piguet V. *J Invest Dermatol*. 133(12): 2662-3, 2013）。

本研究の目的は、各種抗HIV薬によるLCsのHIV感染阻害（PrEP）効果を比較検討するとともに、これらの薬剤のPEP効果を検討することにある。

B. 研究方法

まず、健常ボランティアの末梢血から得た単球をGM-CSF/IL-4/TGF- β 存在下で一週間培養することで単球由来ランゲルハンス細胞（monocyte-derived LCs; mLCs）を作製した。次に、mLCsに① NRTI; Tenofovir (TDF)および4'-ethynyl-2'-fluoro-2'-deoxyadenosine (EFdA)、② NNRTI; Rilpivirine (RPV)、③ 侵入阻害薬; Maraviroc (MVC)、④ プロテアーゼ

阻害薬; Darnavir (DRV)、⑤ インテグラーゼ阻害薬; Raltegravir (RAL)それぞれを10nM, 100nM, 1000nMにて30分間incubateした後、HIV_{Bal} (R5 HIV)をTCID₅₀=10⁵/mlにて曝露し、2時間後にmLCsを3回PBSにて洗浄後培養した。HIV曝露7日後にmLCsを回収し、PE標識抗 langerin抗体およびAPC標識抗CD11c抗体(ともに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mLCsのHIV感染率を比較解析した。

次に、前述の如く *in vitro*でmLCsにHIV_{Bal}を曝露し (TCID₅₀ = 10⁵/ml)、2時間後にmLCsを3回PBSにて洗浄後、別の健常ボランティアから得たCD4陽性T細胞と共培養 (mLCs : CD4⁺ T細胞 = 1 : 50) した。この際、共培養開始6, 12, 24, 48, 72時間後に上記①~⑤の各種抗HIV薬をそれぞれ10nM, 100nM, 1000nMにて添加して、培養7日後の培養上清中の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mLCs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)

本研究において用いられる血液は、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、健常ボランティアから採取した血液を用いたHIV感染実験は山梨大学倫理委員会の了承を得ている (承認番号 598)。

C. 研究結果

まず、上記①~⑤の各種抗HIV薬のマイクロビサイドとしての有用性を比較するため、R5HIVをLCsに曝露する前に各薬剤を前処置して一週間培養後のLCsの感染抑制率を比較した (図1)。図1AにFACSデータを示す。これまでの我々の報告 (*J Invest Dermatol.* 2014) に合致して、EFdA前処置は10-1000nMのそれぞれの濃度においてmLCsのHIV感染を他剤と比較して最も強力に抑制したが、TDFによる感染抑制効果は1000 nMでも約50%と低値であった。(図1 A, B)。また、DRVおよびRALは10-100 nMの比較的低濃度でもmLCsのHIV感染を有意に抑制した。MVCおよびRPVは1000 nMでmLCsのHIV感染を有意に抑制するものの、予想に反して低濃度での感染抑制効果は限定的であった (図1A, B)。

次に、HIV感染者との性行為後に抗HIV薬を内服して感染の成立 (所属リンパ節内でのT細胞の感染成立) を阻止 (PEP) する状況を想定して、HIV感染mLCsと非感染アロCD4陽性T細胞を共培養する系に様々なタイミングで抗HIV薬を添加した。TDF

以外の各薬剤はいずれも濃度依存性に培養上清中のHIV p24産生 (HIV感染mLCsからT細胞へのHIV伝播およびHIV感染T細胞のHIV replicationを反映) を抑制し、また抗HIV薬の添加が培養開始から時間を経るほどその抑制効果は低下することが明らかとなった (図2A, B, C)。興味深いことに、suboptimal dose ; 10 nMでの感染成立予防効果は、6-72時間後添加群のいずれにおいても、EFdAおよびRALが他剤と比較して最も高く、100 nMではEFdA, RALに加えてMVCおよびDRVが優れた予防効果を示した (図2A, B)。高濃度1000 nMではTDF以外の薬剤はすべて優れた感染成立予防効果を示したが、いずれにおいても48-72時間後添加ではその効果は限定的であった。

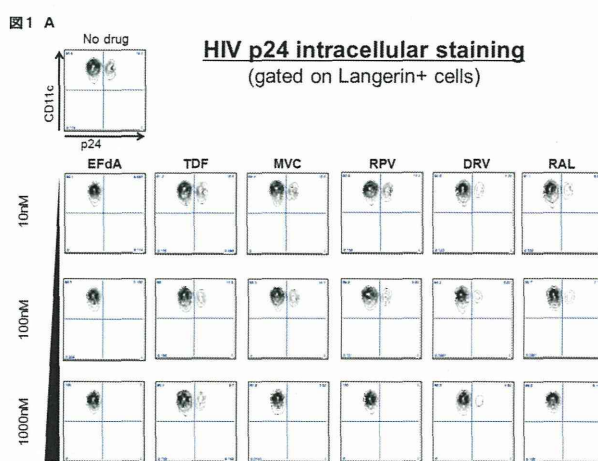


図1A

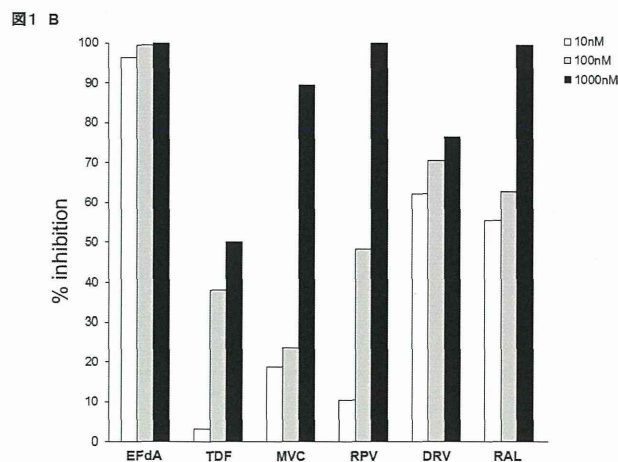


図1B

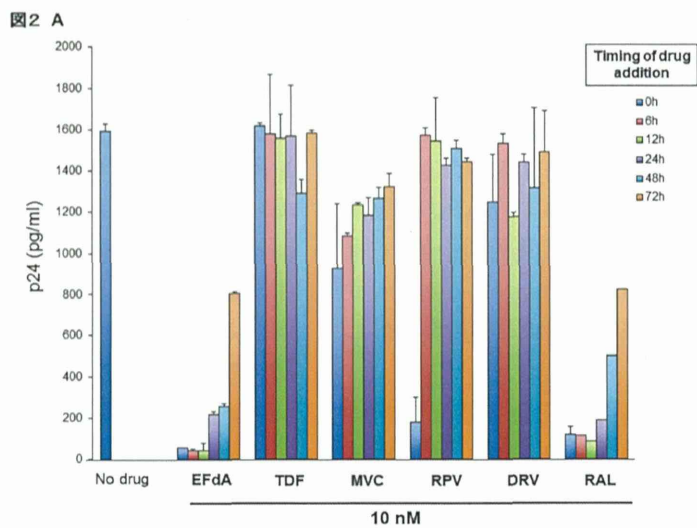


図2A

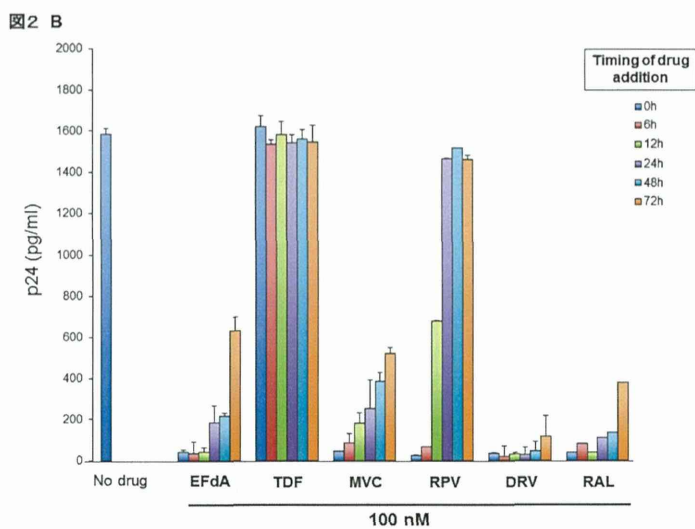


図2B

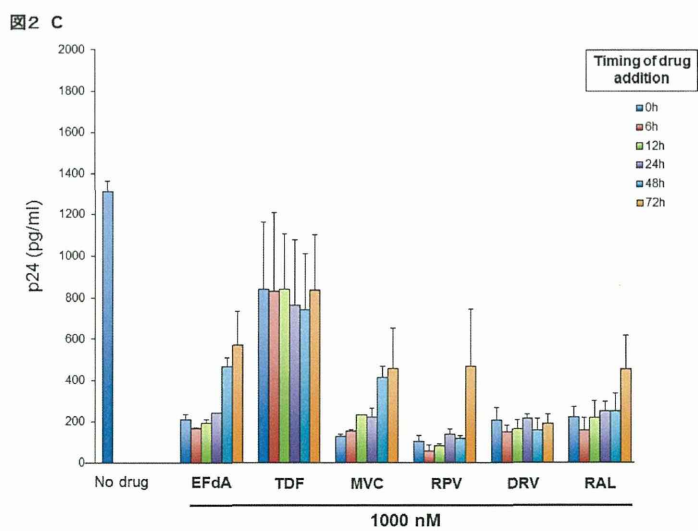


図2C

D. 考察

これまでのヒト皮膚あるいは包皮の上皮内LCsを用いた *ex vivo* HIV感染モデルにおいて、LCsはHIV曝露後1時間以内に感染し、HIVに感染したLCs (HIV-LCs) は隣接するCD4陽性T細胞と infectious synapse を形成して複製したHIVを伝播することが明らかになっている (Ahmed Z et al. J Invest Dermatol. In press)。したがって、今回の HIV-LCs/T細胞共培養後に抗HIV薬を添加する実験系においては、各薬剤は HIV-LCs の HIV replication あるいは T細胞への HIV entry/replication に主に作用したと考えられ、すべての抗HIV薬でその感染成立予防効果に薬剤濃度依存性および薬剤作用時間依存性が認められたことより、性行為後にできるだけ早く、かつ十分量の抗HIV薬を内服することの重要性が改めて示された。今回の実験結果で EFdA および RAL が低濃度 (10 nM) でも mLCs の HIV 感染および CD4 陽性 T細胞への HIV 伝播を強力に抑制することが明らかとなり (図1、図2A)、これらの薬剤がマイクロビサイドとしてのみではなく、性行為 HIV 感染後の PEP にも有用であることが示唆された。さらに、EFdA、RAL に加えて、MVC および DRV も suboptimal dose (100 nM) で優れた感染成立予防効果を示した。EFdA、RAL、MVC、DRV 4剤は HIV-1 cycle に対する作用点が異なることから、これらの複数を併用することによってさらなる相加・相乗効果が期待される (combination antiretroviral prophylaxis: cARP)。今後、これら4剤の様々な組み合わせによる感染成立予防効果を比較し、より確実な PEP の実現に向けて、有効な cARP を検討する必要がある。

E. 結論

EFdA および RAL は、マイクロビサイドとしてのみではなく、望まない HIV 感染者との性行為後に女性自身が HIV 感染成立を阻止するために用いる PEP にも有用であることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kawamura T, Ogawa Y, Aoki R, Shimada S. Innate and intrinsic antiviral immunity in skin. J Dermatol Sci. 75(3):159-66. 2014
- 2) Matsuzawa T, Kawamura T, Ogawa Y, Maeda K, Nakata H, Moriishi K, Koyanagi Y, Gatanaga H, Shimada S, Mitsuya H. EFdA, a reverse transcriptase inhibitor, potently blocks HIV-1 *ex vivo* infection of Langerhans cells within epithelium. J Invest Dermatol. 134(4):1158-61, 2014

- 3) Ahmed Z, Kawamura T, Shimada S, Piguet V. The role of human dendritic cells in HIV-1 infection. J Invest Dermatol. In press.

2. 学会発表

- 1) 川村龍吉：CCR5阻害薬 Maraviroc 内服による表皮内ランゲルハンス細胞の HIV-1 感染性への影響 第24回抗ウイルス療法研究会総会、富士吉田市、2014、5/7
- 2) 川村龍吉：HIV感染初期におけるランゲルハンス細胞の免疫学的役割 第16回白馬シンポジウム in 熊本、熊本市、2014、6/14
- 3) 川村龍吉：Langerhans細胞における感染 第28回日本 AIDS 学会、大阪、2014、12/3
- 4) 川村龍吉：The Role of Langerhans Cells in Acrodermatitis Enteropathica and HIV Infection. 第39回日本研究皮膚科学会、大阪、2014、12/12

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

III. 学会等発表実績

様式第19

学会等発表実績

委託業務題目「 適正な抗HIV療法開発のための研究 」

機関名 (独)国立国際医療研究センター

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
CCR5阻害薬Maraviroc内服による表皮内ランゲルハンス細胞のHIV-1感染性への影響・口頭	川村龍吉	第24回抗ウイルス療法研究会総会	2014年5月	国内
HIV/HBV共感染におけるTDFを含むARTの意義・口頭	潟永博之	第88回日本感染症学会, 福岡	2014年6月	国内
臨床医が知っておきたいHIV感染症の治療・口頭	潟永博之	第88回日本感染症学会, 福岡	2014年6月	国内
播種性ノカルジア症とPMLが疑われたAIDSの一例・口頭	石金正裕、青木孝弘、潟永博之、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一。	第88回日本感染症学会, 福岡	2014年6月	国内
新たなC型肝炎感染が注射薬物を使用しないHIV感染男性同性愛者で増加・口頭	西島健、潟永博之、柳川泰昭、水島大輔、青木孝弘、渡辺恒二、本田元人、矢崎博久、田沼順子、塚田訓久、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一。	第88回日本感染症学会, 福岡	2014年6月	国内
当院で経験したHIV感染合併原発性滲出性リンパ腫の4例・ポスター	柳川泰昭、田沼順子、照屋勝治、塚田訓久、潟永博之、菊池嘉、岡慎一、片野晴隆。	第88回日本感染症学会, 福岡	2014年6月	国内
MRIにて異常を認めたエイズ脳症11例に関する臨床的検討・ポスター	水島大輔、西島健、青木孝弘、渡辺恒二、矢崎博久、田沼順子、塚田訓久、照屋勝治、潟永博之、菊池嘉、岡慎一。	第88回日本感染症学会, 福岡	2014年6月	国内
当センターにおけるElvitegravir/Cobicistat/Tenofovir / Emtricitabine配合錠の使用成績・ポスター	塚田訓久、潟永博之、水島大輔、西島健、青木孝弘、源河いくみ、渡辺恒二、矢崎博久、田沼順子、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一。	第88回日本感染症学会, 福岡	2014年6月	国内
HIV感染症患者に認めた脆弱性骨折とその対策の検討・口頭	古賀 一郎、妹尾 和憲、若林 義賢、鈴木 智史、吉野 友祐、北沢 貴利、太田康男	第88回日本感染症学会, 福岡	2014年6月	国内
Deep Sequencing による近全長HIV-1ゲノムのQuasispecies 解析と最少薬剤耐性変異の検出	大出裕高、松岡和弘、松田昌和、蜂谷敦子、服部純子、横幕能行、岩谷靖雅、杉浦互	第16回白馬シンポジウム, 熊本	2014年6月	国内

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
HIV感染初期におけるランゲルハンス細胞の免疫学的役割 口頭	川村龍吉	第16回白馬シンポジウム, 熊本	2014年6月	国内
小型霊長類において持続感染したGBV-Bの変異解析	東濃篤徳, 鈴木紗織, 森健一, 大出裕高, 松岡和弘, 片貝祐子, 岡林佐知, 榎昇, 岩谷靖雅, 杉浦亙, 明里宏文	第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜	2014年11月	国内
ノロウイルス集団食中毒事例における混合感染の解析	本村和嗣, 飯塚節子, 中村昇太, 元岡大祐, 大出裕高, 杉浦亙, 佐藤裕徳, 田中智之, 武田直和	第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜	2014年11月	国内
空間的に異なるAPOBEC3結合インターフェースをもつ HIV-1 Vif	中島雅晶, 大出裕高, 河村高志, 北村紳悟, 長縄由里子, 黒澤哲平, 真野由有, 粟津宏昭, 松岡和弘, 横幕能行, 渡邊信久, 杉浦亙, 岩谷靖雅	第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜	2014年11月	国内
Deep sequencingによるHIV-1臨床検体の近全長ゲノム配列解析系の構築	大出裕高, 松岡和弘, 松田昌和, 蜂谷敦子, 横幕能行, 岩谷靖雅, 杉浦亙.	第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜	2014年11月	国内
Regimen変更時の留意点と変更後のFollow-up・口頭	瀧永博之	第28回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪	2014年12月	国内
Agingと長期合併症「高齢化の現状と長期治療の問題点」・口頭	瀧永博之	第28回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪	2014年12月	国内
ARTの将来展望～INSTI based Regimenの臨床的有用性～・口頭	瀧永博之	第28回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪	2014年12月	国内
抗HIV治療のターニングポイント～ドルテグラビルの臨床的位置づけ～・口頭	瀧永博之	第28回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪	2014年12月	国内
国内感染者集団の大規模塩基配列5 : MSMコミュニティへのサブタイプB感染の動態・口頭	椎野禎一郎, 服部純子, 瀧永博之, 吉田繁, 石ヶ坪良明, 近藤真規子, 貞升健志, 横幕能行, 古賀道子, 上田幹夫, 田邊嘉也, 渡辺大, 森治代, 南留美, 健山正男, 杉浦亙.	第28回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪	2014年12月	国内
認知機能低下が疑われた患者における認知障害の関連因子の検討・口頭	仲里愛, 木内英, 渡邊愛祈, 小松賢亮, 大金美和, 池田和子, 小林泰一郎, 柳川泰昭, 水島大輔, 源河いくみ, 西島健, 青木孝弘, 渡辺恒二, 本田元人, 矢崎博久, 田沼順子, 照屋勝治, 塚田訓久, 瀧永博之, 菊池嘉, 岡慎一.	第28回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪	2014年12月	国内

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
HIVとHCVの重複感染を有する血友病患者における、複数の遺伝子型のHCVバリエーションの潜在的な混合感染に関する次世代シーケンサーを用いた検討・口頭	大岸誠人、四柳宏、堤武也、湯永博之、森屋恭聖、小池和彦。	第28回日本エイズ学会学術集会・総会、大阪	2014年12月	国内
新規HIV/AIDS診断症例における薬剤耐性HIVの動向・口頭	岡崎玲子、蜂谷敦子、服部純子、湯永博之、渡辺大、長島真美、貞升健志、近藤真規子、南留美、吉田繁、森治代、内田和江、椎野禎一郎、加藤真吾、千葉仁志、伊藤俊広、佐藤武幸、上田敦久、石ヶ坪良明、古賀一郎、太田康男、山元泰之、福武勝幸、古賀道子、岩本愛吉、西澤雅子、岡慎一、岩谷靖雅、松田昌和、重見麗、保坂真澄、林田庸総、横幕能行、上田幹夫、大家正義、田邊嘉也、白阪琢磨、小島洋子、藤井輝久、高田昇、山本政弘、松下修三、藤田次郎、健山正男、杉浦互。	第28回日本エイズ学会学術集会・総会、大阪	2014年12月	国内
尿β2ミクログロブリンのTDF腎障害の予測における有用性の検討・口頭	西島健、田中紀子、松井優作、川崎洋平、古川恵太郎、柴田怜、柳川泰昭、谷崎隆太郎、小林泰一郎、水島大輔、青木孝弘、渡辺恒二、木内英、本田元人、矢崎博久、田沼順子、塚田訓久、照屋勝治、湯永博之、菊池嘉、岡慎一。	第28回日本エイズ学会学術集会・総会、大阪	2014年12月	国内
当院におけるART時代のKaposi肉腫症例の治療成績・予後 第28回日本エイズ学会学術講演会・口頭	柳川泰昭、田里大輔、照屋勝治、柴田怜、古川恵太郎、谷崎隆太郎、小林泰一郎、水島大輔、西島健、木内英、青木孝弘、渡辺恒二、本田元人、田沼順子、塚田訓久、湯永博之、菊池嘉、岡慎一。	第28回日本エイズ学会学術集会・総会、大阪	2014年12月	国内
HIV感染症合併ニューモシスチス肺炎の治療におけるステロイド併用期間の検討・口頭	怜、青木孝弘、西島健、古川恵太郎、谷崎隆太郎、柳川泰昭、林泰一郎、水島大輔、渡辺恒二、木内英、本田元人、田沼順子、塚田訓久、湯永博之、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一。	第28回日本エイズ学会学術集会・総会、大阪	2014年12月	国内