

## 21. エイズ研究センター

### センター長 山本直樹

#### 概要

2004 年末現在世界の HIV 感染者は累積数で 6,000 万人以上に達している。さらに年間約 500 万人の新規感染者が発生し、290 万人が死亡していると予測されている。当初は欧米が中心であったが、現在では、その増加の大部分（85%）はアフリカとアジアにおける流行によるものである。とりわけインド、中国など我が国をとりまくアジア地域での流行の激化が現実のものとなっている。わが国でも昨年度（2004 年）は感染者の数が一年間ではじめて 1000 人を越えるなど、過去最高の新規感染者数を記録し、今後の感染拡大は大いに警戒すべき状態が続いている。

1995 年ごろから始まった HAART の効果には目覚しいものがある。しかし、そのコスト、慢性毒性、さらには薬剤耐性の獲得による治療困難症例の増加が大きな問題となっている。さらに HAART をもってしても、体内からウイルスを完全に駆逐することは今のところ不可能であり、共存とともにその根絶に向けた研究も重要である。このような状況の下、当センターでは、多数の症例に対し、確認試験、薬剤耐性遺伝子検査を行うとともに、新しい検査法の開発と地方レベルへの技術の普及をはかってきた。また生検、剖検例の病理検査を行い臨床現場での診断及び治療に役立てられている。また HIV を分子生物学的手法によって解析し、その特性などを解明することにより、エイズワクチン開発などの応用に向けた多角的な基礎研究を展開している。中でも、BCG-ワクシニアによるプライムブーストの系、さらに糖鎖変異を導入した弱毒化 SIV が優れた感染防御効果を持つことを明らかにし、注目されている。またアジアに流行する HIV-1 株に関する研究が進展し、多様で複雑な組換え型ウイルスが出現していることを明らかにした。

このように我が国を含むアジアにおける HIV の危機的な流行状況を考えた場合、疫学的、分子疫学的調査研究、HIV-1 ヴァリアントの構造とそのウイルス学的、免

疫学的性質の解明、またそれら基礎研究に基づく、ワクチンを含む感染予防・発症阻止技術の開発、新しい細胞側因子の探索による新規薬剤の開発、効率の良い感染性分子クローンの分離法の開発など、その制圧に向けた重要且つ緊急性の高い課題への取り組みをさらに強力に押し進める必要があると考えられる。これらの業務の遂行と、研究水準の一層の向上をはかっているところである。

当センターはまた、国際協力機構(JICA)のエイズプロジェクト等にも積極的に協力し、「ザンビア国エイズ及び結核対策プロジェクト」を推進している。また、JICAとの協力によりアジア、アフリカ諸国等からの研修員を対象に HIV 診断技術講習を実施しており、多数の研修員を指導してきた。このように、当センターの活動は一層国際的な展開をみせている。一方、厚生労働省、文部科学省、HS 財団等の研究費による班研究等にも多数参加した。

人事では、山本直樹が東京医科歯科大学教授からエイズ研究センター長に転任(平成 16 年 4 月 1 日付)、さらに巽正志獣医科学部主任研究官が第 2 室長に配置換(4 月 1 日付)となった。狩野宗英主任研究官が辞職(9 月 30 日)、村上努博士が琉球大学から主任研究官に採用(10 月 1 日)、武田哲博士が東京医科歯科大学のポストドックから第 2 研究グループ研究員に採用された(平成 17 年 2 月 1 日)。有吉紅也主任研究官がタイ王国国立衛生研究所に派遣、復帰の後 3 月 27 日に長崎大学熱帯医学研究所教授に異動のため辞職(3 月 27 日付)した。

当センターの運営に当たっては倉田毅所長、佐多徹太郎感染病理部長、岡部信彦感染症情報センター長、竹森利忠免疫部長、山口一成血液・安全性研究部長、寺尾憲治医薬基盤研究所長類医科学研究センター長等多くの方の協力を得た。

研究の場に関しては第 3 室の村山から戸山への移転などで多少の改善がみられたものの、研究スペースの確保と統合は依然として最重要課題のひとつとなっている。

## 業績

### 調査・研究

#### I. エイズワクチンの開発

##### 1. BCG/DIs プライムブーストワクチンと中和抗体指向型ワクチン

エイズワクチンの開発をエイズ研究センターの開始から約 18 年にわたって行い、候補ワクチンとしてヒトで既に使用されている生ワクチンの中で安全性と有効性さらには入手性に富む BCG Tokyo 株とワクシニア DIs 株を用いたプライムブーストワクチンを作成した。本年度までの研究により基本的な BCG, DIs プライムブーストワクチンの概念を確立することができた。今後、その実用化のためにワクチン効果をより有効にすべく、ヒトへの投与を考慮に入れて研究を進める。また、第 2 世代ワクチンとして感染防御ワクチンの完成を目指してマルチ Env を組込んだ中和抗体指向型ワクチンの開発を米国 NIH ワクチン開発センターと共同研究の形で進める準備が始まっている。さらに、感染者を対象にしたワクチンとしての治療用ワクチンの可能性についてもサルモデルを用いて検討中である。

##### 組換え BCG ワクチンの改良

##### A. HIV-1 CRF01\_AE 92TH022 株をベースにした候補ワクチン構築

HIV-1 CRF01\_AE のコンセンサスに極めて近い配列を持つ 92TH022 株をベースに、*gag* 及び *env* 遺伝子を組み込んだ BCG の構築を行った。*gag* と *env* (gp120) 遺伝子の両方を *hsp60* プロモーターに繋ぎ同じベクターにクローニングして、BCG に導入することにより、Gag, Env 共発現株を得た。しかし、組み換え菌の生育速度が極めて遅く、Env 発現レベルも低いいため、菌にストレスをかけず、しかも Env 発現レベルを増強するための発現法改良の必要性が示唆された。

[松尾和浩、浜野隆一、堀端重男、本多三男]

##### I. 組換え BCG-および組換え DIs-HIV/SIV ワクチンのサルモデルによる評価

カニクイサルに人投与量の rBCG を接種後、人投与可能量の rDIs を追加接種した。rBCG 接種後、末梢血単核球の ELISPOT 法で Gag 特異的 IFN 産生細胞が検出

され、rDIs 接種後には速やかに増強された。細胞内サイトカイン染色法では、IFN +CD4<sup>+</sup>, IFN +CD8<sup>+</sup>細胞ともに高頻度に観察された。rBCG と rDIs の prime-boost regimen により細胞性免疫は高頻度に誘導可能であった。また、rDIs による免疫増強はコドン非改変型 rBCG 接種群では有意に減弱することより、rBCG において導入遺伝子のコドンを改変することが、rDIs 接種後の免疫応答を左右することが明らかとなった。

[兼清優、網康至(動物管理室)、松尾和浩、染谷健二、須崎百合子(動物管理室)、吉野直人、山本直樹、本多三男]

##### ウ. SIVGag を発現する rBCG の免疫誘導能の持続に関する研究

rBCG を抗エイズ/結核ワクチンとして実用化するためには、親株である BCG-Tokyo の持つ免疫誘導能を維持し、HIV に対する免疫を長期間誘導する能力が必要である。今回、rBCG-SIVGag あるいは BCG-Tokyo をモルモットに 0.1 mg 皮内接種 1 回または 80 mg 経口投与 2 回のいずれかで免疫し、3 年後における免疫反応について解析した。いずれのワクチン接種群においても、同レベルの PPD 特異的 IFN mRNA の発現亢進が観察された。PPD 特異的な IFN, IL-12, IL-10, TGF- $\beta$  の発現パターンは BCG, rBCG 群で同様であった。更に rBCG 接種群では Gag 特異的な IFN mRNA の発現亢進が見られた。また、rBCG 群では高い Gag 特異的血清 IgG 抗体価が検出され、それは IgG2>IgG1 であった。PPD 特異的血清 IgG 抗体価についても IgG2>IgG1 であり、モルモット IgG2 は Th1 型免疫反応の誘導を示すひとつの指標になる可能性が示唆された。以上の結果より、rBCG-SIVGag は BCG-Tokyo と同様の PPD 特異的免疫反応を示し、Gag に対する IFN 反応および抗体反応を 3 年以上維持できることが示された。

[川原守、本多三男]

##### エ. HIV-1 subtypeC をターゲットにした候補ワクチン構築

世界的に最も重要と考えられる HIV-1 subtypeC に対する候補ワクチン構築を継続して行った。ザンビアの HIV-1 感染者由来 subtypeC 分子クローン DB26 株の *gag* 遺伝子を PCR 法で増幅し、*hsp60* プロモーターに繋

いで BCG に導入した。形質転換株での Gag 抗原の発現をウエスタンブロット法で確認し、他のサブタイプと同等に発現する株が得られた。一方ワクシニア DIIs のトランスファーベクターに同じ gag 遺伝子をクローニングし、組み換えウイルスのスクリーニングを行ったが発現株は得られなかったため、gpt セレクションマーカーを用いた新しいベクターに切り替え、トランスファーベクターを構築中である。

[松尾和浩、原敬志、堀端重男、巽正志、本多三男]

#### 組換え DIIs ワクチンの改良

ア . HIV-1 由来 env 遺伝子を発現する組換えワクシニア DIIs 株の構築と同遺伝子をもつ WR 株との比較

HIV-1 89.6 株の env 遺伝子を組み込んだ DIIs の構築を行い、同遺伝子をもつ組換え WR 株との比較を行った。PCR にて増幅した全長 gp160 遺伝子を薬剤耐性 DIIs 組換えベクターに挿入し、DIIs 感染細胞にトランスフェクション後、薬剤含有寒天培地にて組換えウイルスを選択した。得られた各クローンに関して、2F5、2G12 等の envelope 特異的な抗体を用いウエスタンブロット法により確認したところ gp160 を発現した株が得られた。この組換え体(rDIIs/89.6Env)と同じ遺伝子を組み込んだ組換え WR 株を同じ多重感染度で感染させたところ、細胞での発現量は DIIs 株の方が強く、あらためて DIIs の有用性について証明された。現在、中和抗体の誘導を目的とした免疫能の誘導を BALB/c マウスを用いて行っており、血清中での V3 特異的な抗体産生が確認できた。

[堀端重男、松尾和浩、山本直樹、本多三男]

イ . HIV 抗原をコードする複製欠損型ワクチニアウイルス DIIs 株の安全性に関する研究

本研究では、HIV サブタイプ E 型 gag 遺伝子をコードするリコンビナント DIIs 株 (rDIIs)の安全性を Scid マウスモデルで検討した。マウス皮下に rDIIs , 共に HIV サブタイプ B 型 gag pol 遺伝子をコードするリコンビナント MVA 株 (rMVA) と野生株 (vT142 株)を各々1匹あたり 10<sup>8</sup>pfu 接種し経時的に臨床観察をおこなった。vT142 接種群では、接種後 2 週間以内にボックスウイルス特異的な臨床症状が観察され、全マウスが死亡した。rMVA 接種群では、一過性の臨床症状と体重減少が認め

られた。一方、rDIIs 接種群には何ら臨床症状は認められず、体重の増減は PBS(-)を接種した対照群と変わらなかった。この結果から、rDIIs は HIV ワクチンが予防ワクチンのみならず、免疫不全状態にある感染者の治療用ワクチンベクターとしても応用できる可能性が示唆された。[染谷健二、山本直樹、本多三男]

ウ . rDIIsSIV gag/pol の経皮接種による粘膜免疫誘導に関する研究

経皮免疫を行なったマウスでは SIV<sub>p27</sub> 特異抗体が血清中で検出され、さらにマウスの糞抽出液中でも特異抗体が誘導された。SIV<sub>p27</sub> 特異抗体産生細胞は、脾臓、腸管膜リンパ節、小腸の粘膜固有層リンパ球でも ELISPOT 法で検出された。また、ワクチンの製剤を考える上で、生ワクチニアウイルスベクターと不活化ワクチニアウイルスベクターとの比較を行った。その結果、不活化ワクチニアウイルスベクターでは殆ど SIV<sub>p27</sub> 特異抗体産生細胞は検出されず、さらに粘膜アジュバントであるコレラトキシンと不活化ワクチニアウイルスベクターを併用しても同様であった。

[吉野直人、兼清優、染谷健二、松尾和浩、山本直樹、本多三男]

エ . 高発現型ワクチニア Promoter を用いたワクチニア DIIs の至適化

本研究は、高発現が期待されるワクチニア Promoter (MH5 および PSFJ) を用いて、SIVGag 抗原発現ワクチニア DIIs を構築し、従来の rDIIs ( rDIIs/P7.5-SIVGag ) と *in vitro* および *in vivo* の両面で比較し、最も効率の良い Promoter の選択を検討した。抗原の発現量は、ヒトやサル哺乳類細胞株において、MH5、PSFJ を利用した rDIIs で発現量が高いことが確認された。現在、マウスを用いた免疫実験を行っている。

[岡村智崇、松尾和浩、兼清優、堀端重男、泉泰之、染谷健二、志田壽利(北海道大学)、山本直樹、本多三男]

オ . 修飾型 HIV Env 発現ワクチニア DIIs による抗 HIV 抗体誘導について

我々は安全性が極めて高いワクチニア DIIs をワクチンベクターに用いて、Env の可変領域を至適化および gp41

を一部 truncate した修飾型 Env を発現する組み換え DIIs を構築し、その免疫誘導能についてマウスを用いて検討した。これまで、Western blotting 法によって Env の発現が確認され、現在、BALB/c マウスに接種し免疫応答を解析中である。

[岡村智崇、兼清優、杉山高啓、松尾和浩、堀端重男、染谷健二、山本直樹、本多三男]

カ．複製欠損型ワクチニアウイルス DIIs 株と modified vaccinia Ankara (MVA) 株の病体学的特性の比較

HIV-1 候補ワクチンとして開発が進められている HIV-1 gag 遺伝子を組み込んだ複製欠損型ワクチニアウイルス DIIs 株 (rDIIsHIV-1gag) と MVA 株 (MVAHIV-1gag) の病体学的特性の比較を行った。両ウイルスを BALB/c マウスに腹腔内注射し、接種後の末梢血細胞の病体解析を行ったところ、rDIIs 株に対して MVA 株は、細胞数の減少及びアポトーシス細胞の増加が大きい傾向が見られた。さらに追加解析を行う予定だが、以上の結果より DIIs 株は MVA 株と比較して安全性が高く、ベクターとして臨床応用できる可能性が示唆できた。

[太田信頼、染谷健二、山本直樹、本多三男]

#### 中和抗体指向型ワクチン

ア．Multi-Clade ワクチン開発のための HIV-1 Env 抗原発現法の検討

Env 抗原を BCG 菌体内に発現すると、菌にストレスとなり生育が極端に悪化するため、Env 抗原を菌体外に分泌発現させる系を検討した。まず *Mycobacterium kansasii* 由来 抗原遺伝子のプロモーターとシグナルペプチド領域をコードする遺伝子の下流にマルチクローニングサイトを設けた分泌ベクター-pKAH240S を構築し、米国 NIH で作製された subtype B HIV-1 由来修飾型 gp140 遺伝子を導入して BCG に形質転換した。得られた株を調べた所、gp140 抗原の分泌が認められた。菌の生育阻害は認められなかったので、分泌系は env 遺伝子を BCG で発現するのに有効と考えられる。

[松尾和浩、岡村智崇、堀端重男、Gary. J. Nabel(米国 NIH)、本多三男]

イ．in vitro における抗 HIV-1 抗体の比較

現在まで我々は HIV env V3 領域の GPGR エピトープを認識するモノクローナル抗体である KD-247 について HIV-1 抑制の検討してきた。この抗体は T-tropic のみならず M-tropic また TCLA のみならず Primary isolate virus (PI) を有意に中和可能だった。本年度はこの抗体と V3 領域を認識するモノクローナル抗体である 1006-15D、694/98D、gp41 を認識するモノクローナル抗体 1367-D、C5 を認識するモノクローナル抗体 1331-160 の中和力価を比較検討した。用いたウイルスは M-tropic の PI である JRCSF, 92US712, N-NIID, 92TH022, 92TH014, dual tropic である HIV89.6, NIH1054 T-tropic である MN, MNp を用いた。方法は GHOST cell assay を用いた。その結果他の抗体と比較し KD-247 は M-tropic の PI, dual tropic, T-tropic を効率良く中和した。V3 領域を認識するモノクローナル抗体である 1006-15D、694/98 は 92TH014, MN を中和した。Gp41 C5 に対するウイルスである 1367-D、1331-160 はこれらのウイルスには効果がなかった。これらの事から subtype-B において KD-247 は幅広く中和効果が期待される事が示唆された。

[滝澤万里、本多三男]

#### 2．粘膜免疫誘導型 HIV ワクチンの開発

HIV ワクチン開発において粘膜免疫誘導が可能であれば、HIV の主な侵入門である生殖器粘膜での感染阻止が期待される。そこで、昨年度に続き SIVgagDNA、HIVenvDNA と各種アジュバントを用いたマウス動物実験を行った。接種経路は経鼻および経膺で行い、免疫後の血清中および膺洗浄液中の特異的 IgG と IgA の検出を行った。その結果、HVJenv ベクターキットやキットサンに高いアジュバント活性を検出した。また LuSIV 細胞を用いた中和活性の解析では X4 ウイルスに関しては中和活性の測定が可能である事が示唆された。より詳細に本系により誘導される IgA 機能を解析するためにポリメリック Ig レセプターのノックアウトマウスを使用し現在検討中である。

[石川晃一]

3．糖鎖変異ウイルス感染の免疫応答とワクチンへの応用

エイズワクチンに必要な有効な防御免疫は弱毒ウイルス感染により誘導されるがその機序は未解明である。そこで prime-boost Env ワクチンと弱毒性の糖鎖欠失変異ウイルスの免疫応答の比較解析を行っている。Env ワクチンは初期感染抑制効果は弱いが慢性感染を強く抑制した。免疫として Env 特異的な細胞性免疫、抗体の重要性が明らかとなった。ウイルスを再チャレンジ感染を行ったところ感染抑制が見られた。同様の抑制は SIVmac239 長期未発症感染ザル観察された。今後、糖鎖欠失変異ウイルス感染による防御免疫との比較解析を行う。

[杉本智恵、森一泰]

#### 4. 感染抑制における SIV 特異的 CD4 陽性 T リンパ球の役割

エイズウイルスに対する防御免疫は弱毒ウイルス感染、感染後早期治療により誘導される。これらの感染制御ザルではウイルス特異的 CD4 T 細胞が感染抑制された慢性感染期においても検出されることから感染制御、感染防御における役割が推測される。ワクチンへの応用を前提に感染制御ザルに誘導されている SIV 特異的 CD4 T 細胞が認識するエピトープの解析を行った。MHC が異なるにもかかわらず Gag, Env, Nef タンパクにエピトープが高頻度に同定された。今後エピトープ特異的 CD4 T 細胞の役割を明らかにしエイズワクチンへの応用を検討する。

[杉本智恵、森一泰]

#### 5. CD4 T 細胞エピトープを発現するセンダイウイルスベクターの開発

防御免疫におけるウイルス特異的 CD4 T 細胞の役割を明らかにするために CD4 T 細胞エピトープを発現するセンダイウイルスベクターを開発した。エピトープの発現は ovalbumin(OVA)遺伝子内にクローニング部位を挿入しエピトープを OVA とのキメラタンパクとして発現させた。Gag エピトープを発現するベクターは Gag タンパクを発現するセンダイベクター、ワクシニアベクターよりも効率的に Gag 特異的 CD4 T 細胞を活性化した。

[森一泰、中山英美(阪大微研)]

## II. HIV 感染症の治療

### 1. 薬剤耐性 HIV-1

抗 HIV-1 療法を受けている HIV/AIDS 患者の薬剤耐性モニタリング

我々は平成 8 年度より適切な抗 HIV-1 治療実現のための支援事業として、薬剤耐性 HIV-1 検査を実施している。薬剤耐性遺伝子検査の結果は約 3 週間で主治医に報告され、治療薬剤選択の指標として活用されている。平成 16 年 12 月までに参加した施設は 92 施設、解析を行った検体は平成 16 年 12 月の時点で累積 6396 検体、1523 症例に達している。我々の検査は治療支援としてだけでなく、わが国における薬剤耐性 HIV-1 の動向を把握する上でも貴重な疫学情報となっており、今までの検査結果の集計より、わが国において薬剤耐性症例数は年々増加の傾向を示しており、また耐性を獲得した症例の中では多剤耐性化が進んでいることを明らかにしてきた。

[杉浦 互、松田昌和、三浦秀佳、千葉智子、西澤雅子、柿澤淳子、藤野真之]

### 新規感染者における薬剤耐性 HIV-1 のサーベイランス

薬剤耐性 HIV-1 症例の増加に伴い、近年治療を受けている HIV-1 感染者からの薬剤耐性 HIV-1 の感染拡大が危惧されている。新規感染者における薬剤耐性 HIV-1 の出現頻度の疫学的調査研究は欧米各国で行われており、報告されている頻度は数～26%とされている。我々は平成 16 年度より本邦での新規 HIV-1 感染者における薬剤耐性 HIV-1 拡散の状況を把握するために、全国の治療拠点病院、衛生研究所等の協力のもとに新規感染者薬剤耐性調査ネットワークを立ち上げ、全国調査に取り組んでいる。平成 16 年度はエイズ動向委員会で報告された新規感染者の 3 割弱に相当する 278 症例の捕捉に成功し、薬剤の標的であるプロテアーゼおよび逆転写酵素領域について解析を行った。その結果、薬剤耐性による感染が強く疑われる症例の頻度が 5%と現時点では低い水準にあることを明らかにした。

[杉浦 互、松田昌和、三浦秀佳、西澤雅子]

ウイルスの増殖活性が低下したプロテアーゼ阻害剤耐性 HIV-1 の病態解析

## エイズ研究センター

プロテアーゼ阻害剤耐性を獲得した HIV-1 の増殖能力の低下機序について解析を行った。その結果、プロテアーゼの基質である Gag の切断部位変異とそれ以外の部位に集積してくる変異が共同して増殖能力の回復に作用することを明らかにした。さらに、増殖能力の低下が粒子形成に及ぼす影響を形態学的に解析した。その結果、共焦点顕微鏡での観察からは増殖能力の低下した HIV-1 では細胞内における Gag の輸送が障害され、Gag が長く細胞内に貯留することを明らかにした。この事実は RI 標識した Gag の動態によっても確認された。また電子顕微鏡による観察からは出芽したウイルス粒子の多くが未成熟なことを明らかにした。

[レイ・ミント、杉浦 互、佐藤裕徳(遺伝子解析室)、富田康浩(遺伝子解析室)]

### プロテアーゼ阻害剤耐性変異と Gag 変異の連鎖不平衡解析

Pr55Gag タンパクはプロテアーゼ阻害剤耐性変異の獲得に伴い強い 2 次的干渉を受けると考えられている。我々は連鎖不平衡解析を用いた Gag-protease 間の相互干渉の解析を試みた。薬剤耐性遺伝子検査を実施した 134 症例につき、Gag 全領域の遺伝子配列を同定し、プロテアーゼの変異とアミノ酸レベルにおける連鎖不平衡解析を行った。その結果、Gag 基質領域内の Y132F、T375S、A431V、L449V 変異が protease 阻害剤耐性変異と密接な関連があることが示唆された。見いだした Gag 変異の意義を確認するために、リコンビナントウイルスを作成して解析を進めている。

[植田知幸、椎野禎一郎、レイ・ミント、松田昌和、三浦秀佳、杉浦 互]

### CRF01\_AE (サブタイプ E) HIV-1 ウイルスのプロテアーゼの結晶構造解析と数理モデル解析

従来の薬剤耐性研究はサブタイプ B を中心に行われてきたが、これにより得られてきた薬剤耐性に関する知見がそのまま non-B サブタイプにも当てはめることができるのか明確ではない。我々は昨年、サブタイプ E では nelfinavir に対する耐性変異が異なっており、サブタイプ E では D30N を取る確率は低く、代わりに N88S が獲得されることを明らかにした。CRF01\_AE では D30N

が獲得されないのかそのメカニズムを構造科学的に明らかにするために HXB2-D25N, NH1-D25N, NH1-D25N/L10F, NH1-D25N/N88S, NH1-D25N/L10F/N88S 各々のプロテアーゼの精製と結晶化に取り組んでいる。

[柿澤淳子、松田昌和、千葉智子、杉浦 互、セリア・シッファー(Univ. Massachusetts)]

### 薬剤耐性 HIV-1 の分子進化解析

薬剤耐性変異が生体内でどのように選択進化していくか解明することは薬剤耐性の病態を理解するうえで重要である。共同研究者の田中博らは、中立進化的な分子系統樹解析法と異なり、宿主との相互作用による正の淘汰進化の効果を評価でき、ウイルス進化によく認められる準種の絶滅や復帰変異も解析が可能な新たな計算方法「Sequential-linking アルゴリズム」を開発した。この方法をプロテアーゼ耐性変異と逆転写酵素阻害剤の進化解析に適用した結果、HIV-1 配列の間の系統関係を示しただけではなく、薬剤耐性の宿主内進化、薬剤治療との相関、治療により正の淘汰進化が働いた箇所の同定が可能であった。

[杉浦 互、松田昌和、千葉智子、柿澤淳子、田中 博(東京医科歯科情報)、任 鳳蓉(東京医科歯科情報)、柴田潤子(東京医科歯科情報)]

ジェネリック抗 HIV 薬 " GPOvir" のインパクト評価  
平成 15 年 4 月よりタイ国内生産された抗 HIV ジェネリック薬 GPOvir (d4T/3TC/nevirapine 合剤) が急速に普及した。その結果、平成 15 年までの観察期間に 30 / 100 person year-observation (PYO) 前後であった死亡率が、平成 16 年以降 10 / 100PYO 以下へと顕著に低下したことが観察された。本コホート患者における GPOvir 治療成功率は 82% , 薬剤治療歴や特に治療開始直後のアドヘレンスが治療成否に影響を及ぼす主要な因子であることが示された。さらに、患者を取り巻く社会環境、医療従事者や別の患者とのコンタクトと治療失敗との関連を調べている。

[パニータ・パチパニッチ(ランパン県病院)、有吉紅也、安田直史(国立国際医療センター)、パトム・サワンパンヤラート(タイ国立衛生研究所)]

タイ流行株 HIV-1 (CRF01\_AE) の抗エイズ薬耐性に関する研究

タイ政府が生産開始したジェネリック薬 GPOvir (d4T/3TC/nevirapine 合剤)の普及に伴い、耐性 HIV-1 株の流行が憂慮されるが、途上国で薬剤耐性株のモニターを行うことは難しい。そこで我々は、タイ流行株の GPOvir 耐性変異頻度に関するデータをもとに、変異分離型 PCR (MS-PCR) の原理を応用した GPOvir 耐性ウイルス簡便・敏速検出法を開発した。この方法は、従来のシーケンス法と比べ安価で、高度な機材を要しないが、高い検出感度を有することから、今後発展途上国における耐性株の流行モニタリングに寄与することが期待される。

[シリパン・センアローン(タイ国立衛生研究所)、ワタナ・オウワニット(タイ国立衛生研究所)、パニータ・パチパニッチ(ランパン病院)、レイ・ミント、有吉紅也、松田昌和、杉浦 互]

## 2 . 新たな抗 HIV-1 阻害薬剤の開発

この研究では遺伝子組み込み酵素を標的にした増殖阻害物質の開発を目指し、低分子化合物ライブラリーのスクリーニングを行なった。今までに 12000 個の化合物のスクリーニングを行い、diketo acid とは異なる化合物を複数見出すことに成功した。新規阻害物質はカルバゾールを基本骨格にもつ低分子化合物であり、strand transfer 阻害活性を呈した。阻害活性の責任領域を同定するために 23 種類の類縁化合物を新たに合成し、阻害活性の評価を行った結果 R2 位の 2-dimethylaminoethyl 基と R3~R5 のメチル基がインテグラーゼ阻害活性の発現に重要であることを明らかにした。

[蔵 驛、杉浦 互、松田善衛、横幕能行、田中晴雄(北里大学)、千葉治美(北里大学)、野村伸彦(富山化学研究所)]

## 3 . 経口利用可能な CXCR4 阻害剤の開発

我々は、以前報告した低分子 CXCR4 アンタゴニスト KRH-1636 の誘導体の中から、より高い抗 HIV-1 活性を有し経口利用可能な KRH-2731 を見出した。KRH-2731 は活性化 PBMC に対する X4、R5X4 HIV-1 の増殖を低濃度 (EC<sub>50</sub>: 1.0-4.2 nM) で抑制した。本化合物をラッ

トに 10 mg/kg で経口投与したときの bioavailability は 37%に達した。hu-PBL-SCID マウスを用いた HIV-1 感染モデルにおいても 10 mg/kg の飲水投与によって X4 HIV-1 の増殖を顕著に抑制し、同マウスに移植したヒト末梢血単核球による抗原特異的な抗体産生や、細胞性免疫には全く影響を与えなかった。以上の結果は、KRH-2731 がエイズに対する臨床応用に向けて有望な、経口利用可能な新しい CXCR4 アンタゴニストであることを示している。

[村上 努、田中勇悦(琉球大学)、広瀬国孝(呉羽化学)、谷中幹郎(呉羽化学)]

## 4 . MBL (Mannose Binding Lectin)の HIV 抑制効果

Mannose 分子は HIV の外被や PBMC の表面に多く存在する。MBL はこれまで中和されにくいと言われていた M-tropic の PI を PBMC assay にて抑制した事を報告した。これはモノクロナール抗体の抑制機構と異なり HIV の外被にある Mannose に結合する為、モノクロナール抗体よりさらに幅広い抑制効果が期待される。そこで我々は薬剤耐性ウイルスである DR6175(subtypeB)、DR6247(subtypeB)の臨床株を MBL が抑制するかどうか検討した。その結果、DR6175 では 3µg/ml で抑制効果がみられ、DR6247 では高濃度の MBL で抑制効果が見られた。MBL は臨床株における薬剤耐性ウイルスを抑制することにより幅広い抑制効果が示唆された。

[滝澤万里、若宮伸隆(旭川医科大)、杉浦互、西澤雅子、岸雄一郎(扶桑薬品)、本多三男]

## 5 . r-MBL (Recombinant Mannose Binding Lectin)の選択

*in vivo*での実験系を行う為には大量な MBL が必要である。native MBL は大量に精製が難しくそこで、r-MBL (Recombinant Mannose Binding Lectin)を用いる事により大量に産生する事が可能である。しかし native MBL と r-MBL が同様に HIV 抑制効果を示す事が望ましい。そこでわれわれは 12 種類の r-MBL を作成し native MBL と比較検討した。そこでその中で、全く HIV を抑制しない MBL も存在したが 6 種類が native MBL と同様かもしくはそれ以上の HIV 抑制効果がみられた。これらの結果により良い r-MBL を用いて今後 *in vivo*の

実験を行う予定である。

[滝澤万里、若宮伸隆(旭川医大)、鈴木定彦(鳥取大学)、岸雄一郎(扶桑薬品)、本多三男]

### III . HIV の分子疫学研究

#### 1 .日本における感染性 HIV の分離と *env* C2V3 領域の sequence 解析

日本における HIV 抗体陽性者からのウイルス分離を行った。また *env* C2V3 領域に対する PCR 法にて陽性判定の出た血漿中 RNA および細胞中 DNA については、sequence 解析を行い、その塩基配列およびアミノ酸配列を決定した。これらのウイルス分離結果および sequence 解析結果は HIV 感染症統合データベースと供与され、HIV 関連の研究資料として役立てられている。

[服部真一郎、仲宗根正、本多三男]

#### 2 .エチオピア北西部ゴンドルにおける HIV 陽性検体の薬剤耐性およびサブタイプ解析

エチオピア北西部の都市ゴンドル市における HIV 感染症のサブタイプ調査のため、2003 年 1 月から 8 月に同市で採取された男性 48 例、女性 71 例について血中ウイルス量測定、サブタイプの同定、薬剤耐性変異の有無の判定を行った。*Env*, *gag*, *pol* 遺伝子による判定の結果、サブタイプ C 90 例 (98%)、A 1 例 (1%)、そして D 1 例 (1%) であった。薬剤耐性変異の解析では、逆転写酵素領域においてネヴィラピン耐性変異 G190A が 2 例 (2.2%)、ジドブジン耐性変異 E44D が 1 例 (1.1%) に認められた。解析症例はいずれも未治療のため血清中ウイルス量は高く、平均  $10^{5.28}$  copies/ml であった。

[藤野真之、松田昌和、西澤雅子、杉浦 互、太田房雄(徳島大学)、アフワーク・カス(徳島大学)]

#### 3 .北タイにおける HIV コホート研究

国際協力事業団の協力、タイ国立衛生研究所・ランパン病院との共同で、北タイのランパン病院にて HIV 感染者および配偶者を対象にしたコホート研究を運営している。平成 12 年 7 月より平成 16 年 9 月まで感染者 1,219 名、抗 HIV 抗体陰性配偶者 155 名が参加、平成 16 年 10 月 15 日時点の感染者の生存調査では、93% の追跡率が得られ 362 名の死亡が判明、観察期間中の死亡率は

17.4/100person year-observation (PYO) であった。

同コホートは、宿主遺伝子・宿主免疫・ウイルス学等の基礎研究や日和見感染などの臨床研究の基盤として役立っている。また、日・タイ共同研究を促進し、数多くのタイ人研究者育成に貢献している。

[パニータ・パチバニッチ(ランパン県病院)、有吉紅也、パトム・サワンパンヤラート(タイ国立衛生研究所)]

#### 4 .アジアにおける新規組換えウイルス新生地点での HIV-1 共感染の高頻度検出とその生物学的意義に関する研究

われわれは先の研究によって、中国雲南省-ミャンマー地域に、新規組換えウイルスの新生地点の存在することを見出した。これら地域では、組換えウイルス新生の前提として、異なる系統の HIV-1 株の共感染が高頻度に行っていることが予測される。そこでわれわれは、TA クローニング技術を用いたウイルスゲノムのクローナル解析によって、共感染例の検索と、個体内 HIV-1 quasispecies (準種)の構造解析を行った。その結果 中国雲南省からの 26 検体中 2 検体 (7.7%) に CRF07\_BC あるいは CRF08\_BC と CRF01\_AE 間の共感染例を、また、ミャンマー由来の 80 検体中 5 検体 (6.3%) には、サブタイプ B', C および CRF01\_AE の様々な組み合わせの組換えウイルスが共存することを明らかにした。共感染検出方法の技術的限界から、その頻度は本来の頻度の下限値であり、真の頻度はかなり高いレベルにあると考えられる。これまでレトロウイルスでは、共感染 (あるいはスーパー感染) は非常に稀とされてきたが、HIV-1 では、共感染を抑制するメカニズムはほとんど作動しておらず、共感染状態を前提として、組換えウイルスが発生し、virus fitness や 宿主免疫応答を driving force とする個体内進化と選択のメカニズムが進行していくものと推測された。In vivo における HIV-1 組換えの発生・選択・淘汰・定着の過程は、これまでほとんど解明が進んでいない分野である。とりわけ今後のワクチン開発戦略に重要な意義をもつと考えられ、現在長期的なフォローアップ研究が進行中である。

[Xiaojie Li, 保科佳美、横田侑子、Yanling Ma(雲南省 CDC)、Chaojun Yang(雲南省 CDC)、Xueshan Xia(昆明理工大)、Kunlong Ben(昆明動物学研究所)、Min

Thwe(ミャンマー保健省)、 Tin Aung(ミャンマー保健省)、 Kay Thi Aye(ミャンマー保健省)、 Khin Yi Oo(ミャンマー保健省)、 草川 茂、 武部 豊]

#### 5 . ICR (Inter-CRF recombinant): 新しいクラスの HIV-1 組換えウイルスの発見とその意義

アジアにおけるエイズ流行の拡大を背景として、アジアでも、いくつかの地域で様々な新しいタイプの組換えウイルスが同定されている。われわれは、これまでの研究によって、中国雲南省とミャンマーに新規組換えウイルス (URF) が新生している世界的にも類例をみない地点の存在することを明らかにしたが、この地域の流行株の継続的なモニタリングの結果、検出された組換え体の中に、すでに樹立された組換え型流行株 (circulating recombinant form, CRF) の間の遺伝子組換えによって生まれた第 2 世代の組換えウイルス-inter-CRF recombinant (ICR)-が含まれることを明らかにした。第 1 は、中国に流行する 2 種の組換えウイルス (CRF07\_BC, CRF08\_BC) の間の組換えウイルス (ICR01\_0708)、第 2 は、CRF07\_BC とタイに起源をもつ CRF01\_AE 間の組換えウイルス (ICR02\_0701) である。それぞれ雲南省東部およびミャンマーのハイリスク集団に見出された。異なる系統のウイルス株が高リスク集団に cocirculate している状況では、単にサブタイプ間の組換えだけではなく、既に樹立された CRF の間の "第 2 世代" の組換えウイルスも容易に新生しうる。またその背景には多種の HIV-1 株に高度に暴露され、またそのようなウイルスが急速に伝播しうる社会的ネットワークの存在が示唆される。HIV-1 の遺伝学的・構造的多様性は、複製エラーによる連続変異に加えて、遺伝子組換えによる非連続変異によって著しく加速されており、今後のワクチン戦略に新たな困難を生み出す可能性が危惧される。

[Li Xiao-Jie、小野木利成、納富香子、草川茂、Xueshan Xia(昆明理工大)、Min Thwe(ミャンマー保健省)、武部 豊]

#### IV . HIV-1 感染性クローン樹立法ならびに各種研究技術の確立

##### 1 . HIV-RT 薬剤感受性迅速試験法(半日)の開発

1) 昨年度までに開発した逆転写酵素(RT)活性高感度測定系 (RTARTA) を用いて HIV-RT 薬剤感受性迅速試験法を完成させる。2) 実際に HIV 感染者血漿中の HIV-RT 薬剤感受性を測定し、薬剤耐性の新たな指標としての意義を明らかにする。以上を目的として以下を検討した。まず、HIV-RT 薬剤として RT inhibitor の細胞内活性体 AZT-TP、d4T-TP、3TC-TP を用いた。HIV-RT では野生株 HIVmn-RT と変異株 5 株を用いた。これらの HIV-RT と薬剤を用いて RTARTA を応用した HIV-RT 薬剤感受性迅速試験法開発を行った。最後にこの試験法により実際に HIV-1 感染者血漿中の HIV-RT 薬剤感受性を測定した。その結果、AZT-TP と 3TC-TP 耐性が確認できたが、d4T-TP 耐性は確認できなかった。HIV 感染者血漿 8 検体では、3TC-TP に対して非耐性から高度耐性まで様々な感受性を確認した。(HIVmn-RT に比較して 1.4 倍-250 倍以上の IC50) 【結論】簡便で大量検体処理可能な HIV-RT 薬剤感受性迅速試験法が確立された。本法では測定時間が半日(約 7 時間)で、培養を基本とした既存の測定法に比べて迅速である。また、既存の方法が血漿中ウイルスを選別してしまうのに対して、本法では総体として把握する事が可能である。今後、薬剤耐性の有用な指標と成り得るか、さらなる検討が必要である。 [仲宗根正、Walid Heneine(米国 CDC)、杉浦互]

##### 2 . 免疫不全ウイルスの感染における血球細胞の経時的な病的変化の解析

保存血中において、免疫不全ウイルスが時間経過と共に各細胞群にどのような影響を及ぼすかを検討した。まず初めに、健康血での病体変化の動向を確定するため control となる血液での解析を行った。その結果、リンパ球、単球、顆粒球においてアポトーシス細胞の増加、及び機能低下の差が顕著に見受けられた。この系を元にして、引き続き HIV 感染者の血液保存についての病体解析を行う。

[太田信頼、兼清優、相澤志保子、山本直樹、本多三男]

##### 3 . HIV-1 感染力価を迅速に測定する T 細胞系のレポーター細胞株 MaRBLE cell の樹立と実用化

ヒト T 細胞由来の細胞株 HPB-M(a)に LTR 制御のレポーター遺伝子 (EGFP、RFP、firefly luciferase) お

よび CMV 制御の renilla luciferase を組み込み、HIV-1 の力価を定量する新たな細胞株 MaRBLE cell を樹立した。RFP を発する細胞数および firefly luciferase 活性は p24 抗原量で評価したウイルス量と相関した。CMV 制御の renilla luciferase は細胞数を補正する目的で導入し、renilla luciferase 活性は細胞数と高い相関を示した。この細胞を活用した新規薬剤のスクリーニング、薬剤耐性 HIV-1 の感受性評価などを実施している。  
[千葉智子、三浦秀佳、滝澤万里、松田昌和、松田善衛、本多三男、杉浦 互]

#### 4 .細胞内における抗 HIV 薬(プロテアーゼインヒビター)の薬剤濃度のモニタリング

現在薬剤感受性検査には HeLa 細胞を基にしたレポーター細胞が主に使用されているが、このようなレポーター細胞での薬剤の取り込み・代謝が HIV-1 本来の宿主であるリンパ球系細胞と同等であるか明確ではない。我々は細胞内への抗 HIV-1 薬の取り込みおよび細胞内濃度に着目し、T 細胞系細胞株の HPB-M(a)と CEM、上皮細胞系細胞株の HeLa 細胞におけるプロテアーゼ阻害剤の細胞内濃度を HPLC にて測定した。測定を行ったネルフィナビル、サキナビル、ロピナビル及びリトナビル何れの薬剤も細胞内において数～数十倍の濃縮が観察された。全般に HeLa 細胞の方が T 細胞系の細胞よりも高い傾向を示した。  
[西澤雅子、三浦秀佳、藤野真之、杉浦 互、加藤真吾(慶応大)]

#### 5 . Competitive RT-PCR を用いた HIV-1 感染患者血漿中の viral load 測定

発展途上国でのモニタリングシステムとして安価な患者血漿中 viral load の定量の開発・実用化に取り組んだ。共同研究者の加藤等が開発した Competitive RT-PCR による測定法を用いて Amplicor HIV-1 モニター ver1.5 で viral load を測定した患者検体を測定した結果、アンブリコアの定量値と良好な相関性を示した。しかし、一部の検体で定量結果の乖離も認められたことから、今後より広範囲の viral load を検出できるよう Competitive RT-PCR の系を改良し、また non-B サブタイプにも対応した primer の開発についても検討を行っている。

[濱武牧子、西澤雅子、柿澤淳子、杉浦 互、加藤真吾(慶応大)]

#### 6 . より高い増殖能を持つ HIV-1 CRF08\_BC 感染性分子クローンの樹立

中国南西部の広西省および雲南省南部における主要な流行株である CRF08\_BC の分離株 00CN-HH040 から、感染性分子クローン HH040NX4 および NX22 を樹立した。これらのクローンは、分離株同様 CCR5 をコレセプターとして使用した。PBMC では、NX22 の方が早い kinetics で増殖するが、CD4 および CCR5 を発現する NP2 細胞では NX4 の方が高い増殖性を有していた。いずれの細胞でも良く増殖できる有用なクローンを樹立する目的で、これらの特異性を決定しているゲノム上の領域の同定を試みた。その結果その結果、NP2 細胞については、NX4 の pol 遺伝子のインテグラーゼ後半から vpr までの約 1500 bp の領域に、その高い増殖性を決定している領域が存在することが明らかになった。また、pbs からインテグラーゼ前半までの領域を NX22 由来、インテグラーゼ後半から vpr までの領域を NX4 由来の DNA を組み合わせることで、NP2 細胞に対して NX4 よりも高い増殖性が獲得されることなどを見出した。分離後継代数の少ない分離株を鋳型に、分離株と同等のより機能の高いクローンを樹立することは、地域特異的な流行株のウイルス学的研究および将来のワクチン開発のために有用であると考えられる。今回の研究で得られた感染性分子クローンは、中国における HIV-1 の流行株のウイルス学的研究および将来のワクチン開発のために有用であると考えられる。

[草川 茂、武部 豊]

#### 7 . HIV-1 サブタイプ B' の感染性分子クローンのウイルス学的性状の解析

東南アジアにおいて見出される HIV-1 サブタイプ B は、系統進化学的に欧米において流行しているサブタイプ B と区別され、サブタイプ B' と分類される。サブタイプ B' は、タイにおいては感染者数が減少しているものの、ミャンマーにおいては代表的な流行株であり、また中国内陸部の新興流行はサブタイプ B' によるものと報告されており、アジアにおける HIV-1 流行の制御

を考える上で重要なサブタイプである。私たちは、1995年にミャンマーの首都ヤンゴンにおいて収集したサブタイプ B' 分離株 95MM-B106 から、感染性分子クローン B106.22 を樹立した。B106.22 は PHA 刺激 PBMC および CD4 と coreceptor を発現させた NP2 細胞で、分離株と同等の増殖能を示したが、分離株は M-CSF で誘導したマクロファージにも感染性を示すものの、B106.22 は感染性は認めなかった。さらに、T 細胞株 MT2、M8166 に対し、分離株は細胞変性を伴いながら増殖するのにに対し、B106.22 は感染性は認めなかった。B106.22 の tat から env までを AD8 に置換したクローンは M-CSF で誘導したマクロファージにも感染性を示した。同じ領域を NL432 に置換したクローンは T 細胞株に対する感染性を獲得した。このことから、この領域を置換することで、分離株と同等のウイルス学的性質を有する感染性分子クローンが得られる可能性が示唆された。本研究で得られたクローン B106.22 は、サブタイプ B' 特異的なウイルス学的性質の解析にとって重要なクローンであり、さらに tat から env までの領域を置換することで、その有用性が高まることが期待される。また、ミャンマーや中国雲南省において見出されるサブタイプ間組換え体の多くはサブタイプ B' の領域を含んでおり、組換え体の出現機構の解析への応用も期待される。

[草川 茂、武部 豊]

#### 8. 感染性クローンの樹立と方法論の改良

著しい多様性を呈する HIV-1 をその特性を保持したまま迅速に感染性クローンを樹立することを目的に方法論の改良を引き続き試みている。本年度は HIV-1 全長ゲノム増幅に用いる PCR 酵素を選別したところ従来よりも迅速に多数の感染性クローンを樹立することが可能になり、この方法論を本邦異性間感染で増加傾向が認められる CRF01\_AE ウイルスとセンターで収集している薬剤耐性ウイルスに応用し総計 166 個に及ぶ多数の感染性クローンを樹立することが出来た。

[坂本優子、巽 正志]

PCR 酵素選別による感染性クローン樹立の効率化  
既に「HIV Trapping System」により感染性クローン

が樹立できるようになったが、より効率的にするため市販されている High Fidelity, High Processivity, High Yield の PCR 酵素数種類を比較検討したところ、Roche 社の Pwo Master が最も高効率(up to 60%)に感染性クローン樹立に適していた。今後とも PCR 酵素の改良は進むものと期待されることから、Long PCR による「HIV Trapping System」はより有効になりうるものと考えられる。

[坂本優子、巽 正志]

CRF01\_AE 組換え体感染性分子クローンの樹立と解析  
本邦では米国由来の subtype B が主に同性間性感染で感染が拡大しているが、異性間性感染では CRF01\_AE 組換え体が最も多数を占める。しかしながら CRF01\_AE 組換え体の感染性クローンは限られている。今後とも感染拡大の抑制が困難な情勢から、その解析の基本となる数多くのクローン樹立が望まれる。NIH AIDS Reagents and Reference から入手した 1993 年にタイ国で分離された 5 臨床株から総計 61 個の感染性クローンを構築した。各株から 1 クローンを選別してその全塩基配列を決定し、近隣結合法によって分子系統樹を作成しその帰属を決定したところ、全てのクローンは全長にわたり CRF01\_AE にクラスターされた。これらのクローンは今後この組換え体の解析に有用であることが期待される。

[坂本優子、巽 正志]

本邦感染者由来 subtype B 感染性クローンの樹立と解析

本邦で主に同性間性感染により感染が拡大している subtype B ウイルスの感染性クローンは未だ得られていないことから、本センターに薬剤耐性試験を依頼された検体から、未治療で Japan Consensus と考えられる 2 検体を選別し Japan Reference Clone とするべく感染性クローンの樹立を試みた。「HIV Trapping System」により 2 検体より総計 31 クローンを樹立した。そのうち 5 クローンを選別してその全塩基配列を決定し、近隣結合法によって分子系統樹を作成しその帰属を決定したところ、全てのクローンは全長にわたり subtype B にクラスターされた。これらのクローンは今後本邦における subtype B 解析に有用であることが期待される。

[坂本優子、巽 正志、西澤雅子、杉浦 互]

本邦感染者における感染性クローンによる薬剤耐性獲得機序の解析

薬剤耐性ウイルスの出現は HIV 感染症治療における主要な問題であるが、その耐性獲得の機序については不明な点が依然多く残されている。高効率な感染性クローン樹立法を応用し、同一患者からの継時的なウイルス分離株から全長ゲノムを含んだ感染クローンを複数個解析することにより、新たな視野を広げる目的で解析を開始した。本年度は2名の患者から1ポイント総計74の感染性クローンを樹立し、そのうち20クローンの全塩基配列を決定した。両ウイルスともCRF01\_AE組換体であり、そのpol領域の薬剤耐性プロフィールは、予めGenotyping法で予測した耐性変異の様々な組合せの多様性に富むクローンが含まれていた。今後複数時点での継時的に分離されたウイルスの感染性クローンを樹立し、薬剤治療歴と併せて解析しその耐性機序を解明していく予定である。

[坂本優子、巽 正志、松田昌和、西澤雅子、杉浦 互]

Ghanaで流行するHIV-1の感染性クローンの樹立と解析

Ghana国に多剤併用療法を導入するにあたり、現地で現在流行しているHIV-1 subtypeの特性を把握し、より現地のウイルスに則した薬剤感受性試験法開発のための分子基盤としての感染性クローンの樹立を試みた。昨年度報告した計20クローンのうち、7クローンの全塩基配列を決定し、近隣結合法によって分子系統樹を作成しその帰属を決定したところ、うちp04GHNJ175-12はpure subtype Gであることが確認された。またHeteroduplex Mobility Analysis(HMA)でsubtype Aに分類されたクローンはCRF02\_AG組換体であり、HMAは解析する領域を選別することが必要なことが判明した。また今回CRF02\_AG組換体のRT領域前半に新たにsubtype Aが組み合わさったクローンと、さらにenv gp120中間部位に新たにsubtype Dの領域が組込まれた組換体が得られたことから、ガーナでは既に第2次、あるいは第3次の組換体が流行している可能性がある。

[木ノ本正信、徳永研二、N. Nii-Trebi(野口記念医学研究

所、ガーナ)、佐多徹太郎(感染病理)、巽 正志]

9. HIV-1 感染価迅速測定細胞 MAGIC-5/SEAP の樹立と薬剤耐性試験法への応用

HIV 感染価測定細胞株 MAGIC-5A 細胞と MAGIC-5/SEAP 細胞を応用した各種抗 HIV 薬に対する薬剤耐性試験法は患者耐性ウイルスの薬剤耐性を迅速簡便高感度にて測定できる。数年に亘りこの試験法の標準化を行い、JST 委託事業により薬剤耐性 Phenotype 試験法の実用化にむけ体制を整え、来春から実際の臨床応用へ向けて上市する段階になった。今後さらに HIV-1 Full-Genome 感染性クローンの効率的な樹立法と併せて、より進化した GenoPhenotyping 法への道筋を開拓し、今後の薬剤耐性試験の臨床検査実用化がより有効となるよう期待される。

[橋本 修(三菱化学 BCL)、石子博昭(三菱化学 BCL)、蜂谷敦子(国立国際医療センター)、岡 慎一(国立国際医療センター)、巽 正志]

10. エンベロープ膜融合能評価系の構築

新たな抗 HIV-1 薬剤として膜融合阻害剤が開発され臨床使用が開始されているが、他の阻害剤同様耐性株が報告されている。今後のこれらの変異体の表現型評価のため、Env による膜融合の定量的評価系の構築を進めている。

Env 発現ベクター及び受容体発現細胞間の膜融合孔形成によって生じる細胞質交流の際に2細胞間を移動する T7RNA ポリメラーゼによるレポーター遺伝子の活性化による定量評価系を作成した。この方法は定量性には優れるが膜融合イベントからレポーター遺伝子の活性化までの間に十数時間を要することから膜融合の初期過程の評価には不相当であるため、改良を試みている。

[宮内浩典、駒野淳、松田善衛]

11. 迅速な HIV-1 表現型評価系開発に関する研究

HAART の有効性は疑う余地が無い。一方で薬剤の副作用も患者の予後に影響する重要な因子であり、的確な薬剤選択は HAART の成否に大きく影響する。的確な薬剤選択には該当 HIV-1 の細胞培養系における薬剤感受性の評価が一つの根幹をなすが、その際に障害となるの

が薬剤耐性ウイルスの低増殖能である。我々は放線菌由来の代謝産物 Sparsomycin が HIV-1 複製を増強させることを見いだした。この効果は HIV-1 に特異的であり、その作用機序は -1 frameshift を増強するためであることが示唆された。Sparsomycin を利用すると、迅速な HIV-1 表現型評価が可能になるかもしれない。

[駒野 淳、宮内浩典、二橋悠子、浦野恵美子、松田善衛、千葉智子、三浦秀佳、Lay Myint、杉浦 互]

## V. HIV ライフサイクルと宿主因子の研究

### 1. エンペロータンパク質サブユニット gp41 の構造・機能関連

HIV-1 ウイルス感染に際しての膜融合は gp41 部分によって惹起される。われわれは gp41 の膜貫通部分(MSD)が膜融合にも関与することを示してきたが MSD のどの部分が重要な役割を果たしているのかを明らかにするために MSD 全長にわたってアラニン挿入変異体を作成し膜融合を指標に評価を行った。その結果ヘリックス相互作用に関与すると想定される GXXXG モチーフとその下流の保存されたアルギニン残基周辺への挿入変異により膜融合が顕著に低下することが明らかとなった。タンパク質解析によりこれらの変異体では Env のプロセシングに障害が見られることがわかった。MSD は膜への Env の固定や膜融合のみでなく Env の生合成にも寄与することが示唆された。

[宮内浩典、駒野淳、山本直樹、松田善衛]

### 2. Proteomics による HIV-1 複製に関する宿主因子の解析

近年 HIV-1 感染、AIDS 発症への抵抗因子の形で宿主因子の関与が注目されている。われわれは質量分析法を用いたプロテオミクスの手法を用いて HIV-1 複製に影響を与える宿主タンパク質の同定を試みている。われわれはタグを付加したいいくつかの HIV-1 ウイルスタンパク質を発現させ、それぞれのタンパク質と相互作用をする宿主因子を免疫共沈降後の質量分析によって同定し、その HIV-1 複製への影響を探索中である。これらの宿主因子の解析は新たなウイルス増殖阻害手段の開発を含めた治療面への貢献と同時に、より深い HIV-1 遺伝子産物の機能解明に寄与すると考えられる。

[宮内浩典、浦野恵美子、二橋悠子、駒野 淳、松田善衛、高橋信弘(農工大)]

### 3. HIV-1 レセプター分子 CXCR4 の細胞表面への発現制御に関する研究

HIV-1 は CXCR4 をレセプターの一つとして細胞に感染する。レセプターの発現動態を制御すれば、ウイルス感染を抑止することが可能となる。我々は CXCR4 がどのようなメカニズムで細胞内を輸送され、細胞表面に達するのかを解析した。CXCR4 は7つの膜貫通ドメインのうち2つを欠くと細胞表面に到達できないが、homo oligomer や CXCR4 の wild type や mutant 間との hetero oligomer を形成する活性を維持する。この活性は7つの膜貫通ドメインのうち4つを欠いても同様であった。CXCR4 は、多量体を形成することが細胞表面への移送に必須ではないことが示唆された。

[駒野 淳、浦野恵美子、二橋悠子、宮内浩典、松田善衛]

### 4. HIV-1 感染を核内で抑制する機構に関する研究

HIV-1 の感染はごく限られた霊長類由来の細胞に限定される。この現象から宿主内に抗 HIV-1 作用を示す restriction factor の存在が明らかとなってきた。これらを同定することは、HIV-1 複製の分子機構の解明、ひいては複製の制御に大きく貢献することが期待される。ウサギ由来の細胞に対して HIV-1 は感染効率が乏しい。我々はウサギ由来細胞の感染抵抗性がウイルス感染の核内移行後のステップを標的としていることを発見した。この分子機構を解明すると、核移行の後で感染を防ぐ方法が開発できるかもしれない。一方、この抑制を解除することができれば AIDS の小動物モデルが実現可能になるかもしれない。

[駒野 淳、浦野恵美子、二橋悠子、宮内浩典、松田善衛、山本典生(東京医科歯科大)]

### 5. ヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) マトリックスタンパク質のウイルス侵入後の役割の解明

マトリックスタンパク質 (MA) のウイルス侵入後の役割と関連する宿主因子の同定を最終目的として、逆転写の効率と合成された DNA の安定性を低下させる MA の変異とその復帰変異に細胞依存性があるかを種々の T

































