

20. エイズ研究センター

センター長 山本直樹

概要

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染者とエイズ患者の累積数はこれまで、全世界で 6000 万人にもおよぶと言われる。このうち、サハラ砂漠以南のアフリカ諸国が、2250 万人と圧倒的に多い (2007 年末現在)。しかし新たな感染地域として、AIDS/HIV の魔の手は次第にアジアにも及んできた。アジアの占める割合は、まだ全体の 2% 強を占めるに過ぎないが、中国やインドにおける拡大状況には空恐ろしささえ感じさせられる。我が国でも 2007 年度は感染者の数が過去最高、しかも 4 年連続で 1000 人を超えるなど、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憂慮すべき状況である。

平成 11 年 10 月にいわゆるエイズ予防指針が策定され、わが国のエイズ対策の抜本的見直しと新方針が打ち出された。爾來、当センターはわが国のエイズ対策研究のための中核としての役割を果たしてきた。活動は大きく、施策的なものとワクチン開発や HIV 感染症の特効薬開発という研究要素の強いものに分けられるが、いずれもわが国における HIV 感染者やエイズ患者の QOL の向上、新規感染拡大の防止を第一の、そしてその成果を国際誌上で発信することで世界のエイズ、HIV 問題に貢献することを最大の目標に置いてきた。

HIV の感染予防研究に関しては、とくに BCG 及びワクシニアウイルスをそのベクターとして用いた prime/boost ワクチンに力を注ぐほか、ユニークな糖鎖変異ウイルスによる効果的な生ワクチンを用いて、防御免疫のパラメーターを探り、臨床応用可能なワクチン開発の道を強力に探っている。また HIV の多様性に対応可能な中和抗体の誘導の研究さらには種々のアジュバントを用いた粘膜免疫の誘導の研究に力を傾注している。一方、治療の面からは、HAART の効果には目覚ましいものがあり、感染者に大きな希望を与えている。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、感染予防のためのワクチン研究とともに、感染固体からのその根絶に向けた研究も重要である。このため今までにないような作

用機序、とくに宿主因子を標的とした新たな抗 HIV 薬の開発が待望されている。一方、アジア、とくに中国やインドが AIDS/HIV の感染拡大において中心の場となりつつある現状で、すでに高い評価を受けている当センターのアジアの分子疫学研究を推し進めてきた。

HIV 感染及び診断検査については、方法の標準化とその精度管理において、これまでどおりわが国の中心的役割を果たすことになる。センター独特のウイルス分子クローンはその目的に大きな力となっている。また、感染者の治療については、直接あるいは間接的に感染者に還元できるような研究を推進している。その大きな柱の一つとして HAART を受けている患者の薬剤耐性のモニターがあり、それとともに耐性を出させない治療法についても研究を行っている。

当センターはまた、国際協力機構 (JICA) のアジアやアフリカにおけるエイズプロジェクト等にも積極的に協力してきた。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ており、わが国エイズ研究の中核となっている。

人事では、杉浦 互第 2 研究グループ長が独立行政法人国立病院機構名古屋医療センターに出向 (平成 20 年 4 月 1 日付) (エイズ研究センターに併任)、石川晃一主任研究官が平成 21 年 1 月 1 日より退職した。

当センターの運営に当たっては宮村達男所長、渡邊治雄副所長、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、山口一成血液・安全性研究部長、佐藤裕徳病原体ゲノム解析研究センター第 2 室長、保富康宏医薬基盤研究所霊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悲願のままだ達成されておらず、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

(1) 多コピー変異型プラスミドを用いた抗酸菌での HIV-1 Gag 及び Env 発現系の改良

組換え BCG 構築に用いている pSO246 シャトルプラスミドの *repA* 遺伝子に 1 アミノ酸欠失変異を導入することにより、多コピー型に変換することを試みた。得られた pSO246R は、プラスミドの収量から、*M. smegmatis* で約 5 倍、BCG で約 4 倍にコピー数が増加していた。*M. smegmatis* での HIV-1 Gag 発現レベルは、元の pSO246 を用いた場合の約 10 倍程度増強していた。今後 BCG での Gag あるいは Env 発現の改良に応用する。

[松尾和浩(日本 BCG 研究所)、横溝香里(日本 BCG 研究所)、堀端重男(日本 BCG 研究所)、山本直樹]

(2) 改変型 *env* 遺伝子を用いた抗酸菌分泌シグナル遺伝子の検討

Sec 系シグナル遺伝子 (*alpha* 及び *mpb64*) に改変型 *env* 遺伝子 (*gp140*) を繋いだベクターを BCG に導入した場合、コロニーをほとんど形成せず、形成された少数のコロニーを PCR 法で解析した結果、*env* 遺伝子は検出されなかった。一方、Tat 系シグナル遺伝子 (*blaF*) に *gp140* 遺伝子を繋いだベクターを BCG に導入するとコロニーを多数形成し、形成されたコロニーからは *env* 遺伝子が検出された。*env* 遺伝子が検出された組み換え体を WB 法により解析すると、ほとんどの株が Env 抗原を菌体内で高発現していた。各シグナルに繋いだ *gp140* 遺伝子及び Env 抗原の BCG における安定性は、*blaF* 遺伝子 (Tat 発現系) >*alpha* 及び *mpb64* 遺伝子 (Sec 発現系) であることが考えられる。

[堀端重男 (日本 BCG 研究所)、横溝香里 (日本 BCG 研究所)、松尾和浩 (日本 BCG 研究所)、山本直樹]

(3) Tat 系シグナル *blaF* 遺伝子に繋いだ各種改変型 *env* 遺伝子の検討

各種改変型 *env* 遺伝子を Tat 系シグナル *blaF* 遺伝子に繋いだ場合、どの改変型 *env* 遺伝子が効率よく抗酸菌へ導入され、安定して Env 抗原を高発現するかを検討した。*env* 遺伝子の安定性において、*gp120dV12*、*gp145dV12dCFI* 及び *gp145dCFI* は他の組換え体より、遺伝子の導入効率が悪かった。*gp140* 関連遺伝子については V1、V2 領域を脱落させる事と BCG 菌体内における *env* 遺伝子の安定性については特に相関がなかった。PCR 法による *env* 関

連遺伝子の陽性率は、*gp120*>*gp140* 関連遺伝子>*gp145* 関連遺伝子であることから、BCG 菌体内において *env* 遺伝子の安定性に関わっているのは主に *gp41* の部分である事が示唆された。

[堀端重男 (日本 BCG 研究所)、横溝香里 (日本 BCG 研究所)、松尾和浩 (日本 BCG 研究所)、山本直樹]

(4) 改変型 Env 抗原発現組み換え BCG ワクチンの開発と検討

前述した組み換え BCG (rBCG/blaF140BdV12dCFI) は、Env 抗原を菌体外に分泌しないものの、菌体内では安定して高発現しており、この組み換え BCG を用いてマウスの免疫実験を行った。同 *env* 遺伝子を有する DNA ワクチン群と比較して、Env 特異的細胞性免疫及び液性免疫を評価したが、DNA ワクチン群には及ばなかった。やはり、Env 抗原を菌体外に分泌することは、菌体のストレス軽減や液性免疫の誘導だけでなく、Env 特異的細胞性免疫を効率良く誘導するのに重要であると考えられる。現在は、同実験のフォローアップを行いながら、ベクター改良を含めた発現・分泌系を検討し、Env 抗原分泌 BCG ワクチンの開発に取り組んでいる。

[堀端重男 (日本 BCG 研究所)、横溝香里 (日本 BCG 研究所)、松尾和浩 (日本 BCG 研究所)、山本直樹]

(5) 組換え BCG における HIV-1 Gag 抗原発現の最適化

BCG ベクターにおいて抗原を菌体外へ分泌させることは、菌自身へのストレスを軽減するとともに、免疫原性を高めるために有効と考えられる。そこで、組換え BCG における Gag 抗原分泌発現能の最適化について検討を行った。コドン最適化した *gag* 遺伝子配列を導入した組換え BCG では、コドン不変の配列よりも Gag 分泌発現能が増強した。しかし、コドン不変の配列でも高コピー数変異型プラスミドに組換えることで最適化した配列と同程度に Gag 分泌発現能を向上させることができた。今回得られた株は、Gag 分泌発現株として最適であると考えられた。

[横溝香里(日本 BCG 研究所)、堀端重男(日本 BCG 研究所)、山本直樹、松尾和浩(日本 BCG 研究所)]

2. 高い多様性を持つ HIV-1 に有効なエイズワクチンの開発

HIV ワクチン開発研究には、HIV 多様性に対する有効な防御免疫を明らかにする必要がある。手がかりのひとつは、動物モデルで実証された、生ワクチンが誘導する病原性 SIV に対する防御免疫である。本研究では、糖鎖

修飾変異生ワクチンを用いて、ウイルス多様性に対する有効性の検討と感染防御に働く宿主応答の解明を行う。ウイルス多様性に対する有効性を調べるために、チャレンジウイルスはワクチンとは HIV-1 サブタイプ間の相違性(アミノ酸レベルで 10-30%の違い)を持つ SIVsmE543 を用いた。SIVmac239 の 5 カ所の N 型糖鎖を欠失した 3 種の変異株 (Δ 5G, Δ 5Gver1, Δ 5Gver2)、3 カ所の N 型糖鎖を欠失した Δ 3G をワクチンウイルスとした。生ワクチン感染ザル 11 頭に高容量(1000 TCID₅₀) の SIVsmE543 を静脈内接種した。サブタイプが異なるウイルスチャレンジ感染では、初期感染の制御はすべての動物で確認されたが、慢性感染期において個体間の感染制御の違いが明らかとなった。中和抗体は検出されなかった。しかしアカゲザルの MHC アリル解析から慢性感染期における感染抑制と MHC ハプロタイプとの関連性が明らかになった。ウイルス多様性に有効な宿主応答に影響を与える宿主遺伝的因子の存在が示唆された。

[杉本智恵、森 一泰]

3. 粘膜免疫誘導アジュバントに関する研究

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。昨年度までに同定したキトサン関連物質のうち、キトサン微粒子とカチオン化キトサンを主に使用し、カチオン化度の差異および免疫経路等に関して検討した。マウスにおいて OVA あるいは HIV-1env タンパク質をアジュバント候補と混合し経鼻免疫を行いその抗体反応を解析した。また env タンパク質に対する抗体の中和活性を検討した。またカニクイサルを使用した基礎検討においても副作用を認めず、カチオン化キトサンおよびキトサン微粒子に個体差があるものの経鼻投与によるアジュバント活性を抗体産生能により確認した。今回の研究より、ワクチンアジュバントとしてキトサン誘導体による粘膜免疫誘導が有効である可能性が示された。

[石川晃一、小林丘、福島健司]

II. HIV 感染症の治療と薬剤耐性に関する研究

1. 耐性遺伝子超高感度定量法の開発及び潜在的薬剤耐性 HIV 発掘調査

未治療 HIV 感染者の中にも存在が予想されている薬剤耐性 HIV、すなわち潜在的薬剤耐性 HIV 発掘調査を目的として、昨年度に耐性遺伝子超高感度定量法を開発した。同法を用いて潜在的薬剤耐性 HIV 発掘調査の準備を行った。また、発掘が予想される体内薬剤耐性 HIV の感染性の新規指標確立を目的として、一昨年度までに開発

した超高感度 HIV 逆転写酵素活性定量法を用いて感染者体内の HIV の 1 分子当たりの逆転写酵素活性を測定した。今年度は以下の成果を得た。1)潜在的薬剤耐性 HIV 発掘調査対象として静注薬剤常用者集団と同性性行為集団を対象に選定し、研究倫理面を含めた準備を開始した。2)RNA 1 コピー当たりの逆転写酵素活性 (RT/RNA) が薬剤耐性 HIV を含めて、HIV 感染性の新たな指標となる可能性を確認した。

[仲宗根正、西澤雅子、Sara Palmer (米国 NCI)、杉浦 互]

2. 酵素活性を指標とした新規 HIV プロテアーゼ薬剤耐性検査法基盤技術の開発

HIV 治療における薬剤耐性検査は、患者に対して適切な治療薬を選択する上で欠かせない検査である。しかし、薬剤標的分子である HIV タンパク質の酵素活性に基づいて耐性を評価できる検査法は、現時点において実用化されていない。我々は、コムギ無細胞系と AlphaScreen 系を用いて、HIV プロテアーゼ (PR) の活性を指標とした薬剤耐性検査法の開発に成功した。本法では、サブクローニングすることなく PCR のみで in vitro 転写鑄型の作成が可能であり、これらから 384 種類のタンパク質を一日で全自動合成できる。さらに合成した PR を用いて酵素活性を定量的に測定することに成功し、薬剤耐性 PR を用いたモデル実験結果が、遺伝子型検査法と良く合致することを確認している。本法は、短期間で安価に的確な薬剤耐性情報を提供できるため、患者の利益にかなう有用な検査法になるものと期待される。

[正岡崇志、梁 明秀、杉浦 互、巽 正志、松永智子 (愛媛大学)、澤崎達也 (愛媛大学)、山本直樹]

3. 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 検査を実施してきた。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きた。平成 18 年度末までに参加した施設は 92 施設、解析を行った検体は平成 21 年 3 月の時点で累積 8,150 検体に達している。平成 18 年度からは薬剤耐性遺伝子検査が保険収載されたため、検査は民間の検査会社にゆだねられることになり、我々のところで実施する検体は、精査を目的とするもの、経済的な理由により検査が困難なもの、そして次項に述べる疫学調査を目的としたものに限られるようになった。このため平成 18 年度以降保険収載前と比較して大幅に減少した。保険収載により検査へのアクセスが容

易になったのとは反対に薬剤耐性 HIV の遺伝子情報の収集は困難となり、事実、平成 18 年度は情報が欠落してしまっただけでなく、この点を補うために平成 19 年度より新たにアンケート調査を主体とする情報収集を開始し、わが国における薬剤耐性 HIV の状況把握を開始した。平成 20 年度は各地の拠点病院等における薬剤耐性で治療困難に陥っている症例に関連するアンケート調査を実施した。その結果合計 2715 例の治療患者に対し 51 例の薬剤耐性症例が報告され、わが国における薬剤耐性症例の頻度が 2% 以下であることが明らかになった。薬剤耐性による治療困難症例の多くは 1995 年以前に治療を開始したものが多く、多いことも明らかになった。

[杉浦 互、宮崎菜穂子、三浦秀佳、鈴木寿子、藤野真之、山本直樹、服部純子(名古屋医療センター)、伊部史朗(名古屋医療センター)、藤崎誠一郎(名古屋医療センター)、松田昌和(三菱化学メディエンス株式会社)]

4. 新規 HIV/AIDS 診断患者の動向調査

HAART が普及した今日、HIV/AIDS に新たに感染し、治療前にもかかわらず既に薬剤耐性を獲得している症例が世界各国で報告されており、その頻度は 10-20% ともいわれている。日本では新規 HIV 感染者数およびエイズ患者数報告数が年々記録を更新する勢いで増加しており、また治療を受けている患者数も増加を続けている。このことから本邦においても新規 HIV/AIDS 診断確定未治療患者への薬剤耐性 HIV の拡大が大きな関心をもたれている。我々は 2003 年から 2007 年にかけて全国の治療拠点病院、衛生研究所等の協力のもとに新規 HIV/AIDS 診断患者を対象に耐性検査を実施した。薬剤耐性検査ではプロテアーゼおよび逆転写酵素領域を、サブタイプでは *env* C2/V3 領域を RT-PCR にて増幅し、その配列解析を行った。対象症例は 03 年:288 例、04 年:290 例、05 年:423 例、06 年:457 例、07 年:473 例、08 年:620 例であった。いずれの年においても調査対象となった症例は 30-40 歳代の男性が中心で (>90%)、感染経路は同性間性的接触が 65-72% を占めていた。サブタイプは、いずれの年も 70% 以上が B であり、次いで CRF_01AE であった。また少数ながらサブタイプ A、C、AG、G も観察された。薬剤耐性症例の頻度は 03 年:4.9%、04 年:5.2%、05 年:7.8%、06 年:6.6%、07 年:9.7%、08 年:8.1% と年々増加の傾向が認められている。

[杉浦 互、藤野真之、鈴木寿子、三浦秀佳、西澤雅子、山本直樹、服部純子(名古屋医療センター)、伊部史朗(名古屋医療センター)、藤崎誠一郎(名古屋医療センター) 松田昌和(三菱化学メディエンス株式会社)]

5. 新規抗 HIV 薬の開発に関する研究

既存の抗 HIV 薬に対して耐性を獲得した症例に対して有効な新規薬剤の開発に取り組んでいる。本研究では我々が開発したレポータ細胞を用いて、抗 HIV 活性を指標に低分子化合物ライブラリー (>20000) のスクリーニングを行った。その結果、新薬の候補化合物を複数見出すことに成功した。抗 HIV-1 活性の認められた化合物のうち有望なものについては類縁化合物を合成し、抗 HIV 効果の増強を目指してきたが、その結果、現在では IC₅₀ が既存の薬と同程度もしくはさらに増強した化合物の合成に成功している。候補化合物の作用機所は逆転写後、組み込み前と絞り込まれており、「PIC 機能阻害剤」と呼称することとなった。平成 20 年度は化合物の分子標的の同定、類縁化合物の合成と評価、前臨床試験としての長期毒性評価など実用化に向けた *in vivo* 実験等を実施した。

[三浦秀佳、西澤雅子、村田大悟、杉浦 互、吉居廣朗(名古屋医療センター)、岩谷靖雅(名古屋医療センター)、田中晴雄(北里大学)、野村伸彦(富山化学工業株式会社総合研究所)]

6. タイ流行株 HIV-1 (CRF01_AE) における薬剤耐性変異獲得機序に関する研究

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。我々は、タイ流行株の GPOvir 耐性変異頻度に関するデータをタイ国 NIH と共同で平成 16 年から 17 年にかけてランパンコホートで回収された GPOvir 脱落症例 64 例について Gag, protease, RT 全域の遺伝子配列解析を行い、薬剤耐性遺伝子の獲得パターンについての解析を行った。対象症例中には初回治療症例だけでなく過去に NRTI 単剤投与などの治療履歴をもつ既治療症例が含まれていたが、既知症例では初回治療症例に比して高い頻度で耐性変異が観察された。

[シリバン・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・パチバニッチ(ランパン病院)、吉田レイミント(長崎大学熱帯医学研究所)、有吉紅也(長崎大学熱帯医学研究所)、松田昌和(三菱化学メディエンス株式会社)、杉浦 互]

7. 既存の治療薬がインテグラーゼに及ぼす影響について

新たに登場した新規薬剤インテグラーゼ(IN)阻害剤の導入にあたり、既存の抗 HIV 薬剤に対して薬剤耐性を獲得した症例への有効性を確認・評価を試みた。プロテ

ーゼ阻害剤や逆転写酵素阻害剤の投与がインテグラーゼ分子に及ぼす影響について検討するために多剤耐性変異を獲得した症例を選び、遺伝子配列解析を行った。薬剤耐性症例 93(サブタイプ B : 64, AE : 29)、未治療症例 48(サブタイプ B : 40, AE : 8)の解析を行った結果、薬剤耐性症例の方にインテグラーゼ領域の変異が集積している傾向が見られた。またサブタイプ B の薬剤耐性症例 2 例に IN 阻害剤ラルテグラビルによる耐性変異 E157Q が観察された。しかしその薬剤耐性のレベルは低くラルテグラビルの有効性に影響は無いものと考えられた。つぎに IN に観察された多様性がラルテグラビルの感受性に及ぼす影響を明らかにするために、HIV 多剤耐性患者 3 症例、及び HXB2 のインテグラーゼ遺伝子に、ラルテグラビルに対する耐性変異を導入した。各々 5 種類 (148K, 148R, 148H, 155H, 148K+155H) 作成した。各クローンは 293T にトランスフェクションし、その上清を MT-2 へ感染させ RT 活性により感染性を、シークエンスにより配列を確認した。計 20 クローン中 13 クローンについて感染性を確認したので今後それらのクローンについてラルテグラビルに対する感受性を調べる予定である。

[鈴木寿子、松田昌和(三菱化学メディエンス)、藤野真之、西澤雅子、杉浦 互]

8. 高感度薬剤耐性検査法を用いた微少集族薬剤耐性 HIV 検出の試み

近年、ダイレクトシーケンスでは検出不可能な微少集族として患者血中に存在する薬剤耐性 HIV が将来の抗 HIV 治療に影響を与える可能性が示唆されている。そこで米国疾病対策局(CDC)で開発された定量 PCR を応用した高感度薬剤耐性検査法を日本へ導入し、患者血中に存在する微少集族薬剤耐性 HIV の検出を試みた。CDC で開発された検査法は Subtype B のみが検査対象となっているため、日本で 2 番目に頻度の高い CRF01_AE を対象とした高感度薬剤耐性検査の開発を行い、CRF01_AE で逆転写酵素阻害剤耐性変異の M41L、K70R、K103N、Y181C、M184V、T215Y/F の 7 変異について検出法を確立した。Subtype B については、上記 7 変異に加えて K65R の検出法が確立している。この検査法を用いて、ダイレクトシーケンス法では薬剤耐性が検出されなかった新規感染患者 28 症例 (Subtype B 17 症例、CRF01_AE 11 症例) について解析した結果、2 症例からダイレクトシーケンスでは検出できなかった T215I と K103N を検出した。また Subtype B の治療中患者 11 症例を解析した結果、1 症例からダイレクトシーケンス法では検出されなかった

T215Y を検出した。これらの結果から、ダイレクトシーケンスでは検出されない薬剤耐性 HIV が広く存在している可能性が示唆された。

[西澤雅子、山本直樹、杉浦 互、Jeffery Johnson (米国疾病対策局), Jonathan Lipscomb (米国疾病対策局), Jin-Fen Li (米国疾病対策局), Xierong Wei (米国疾病対策局), Walid Heneine (米国疾病対策局)]

9. プロテアーゼ阻害剤耐性 HIV 株に対するダルナビルの有効性についての解析

薬剤耐性遺伝子検査において既存 PI に対し、抵抗性を示す HIV 臨床分離ウイルス 21 株に対する darunavir(DRV)、atazanavir(ATV)、lopinvir(LPV)、amprenavir(APV)の有効性についての評価を行った。その結果多剤に対して高い耐性を示したウイルスでもダルナビルは最高 7 倍程度の耐性しか示さず、サルヴェージ薬剤としての有効性が期待された。

次に DRV に対して 7 倍の耐性を示した臨床分離株を用いて、DRV に対する更なる薬剤耐性誘導を行った。DRV との共培養開始後 334 日において、IC₅₀ の 4000 倍の濃度においても本臨床分離株は T 細胞株に感染し増殖する事を示した。一方野生型の HIV 株は同時期においても 13 倍の濃度においてのみ増殖する事が可能であった。プロテアーゼ領域の遺伝子解析を行った結果、臨床分離株において新たに V32I の変異を獲得している事が明らかになった。DRV は既存 PI 耐性 HIV に対するサルベージ療法において効果が期待されているため、DRV 耐性ウイルス誘導および解析は特に重要である。今後耐性獲得の機序について更なる解析を行う予定である。

[藤野真之、鈴木寿子、三浦秀佳、杉浦 互]

10. HIV-1 の逆転写酵素が持つ RNase H 活性に対する特異的阻害剤の開発

次世代抗エイズ薬として、RNase H 活性を阻害するエイズ治療薬の開発を試みた。スクリーニングにより、異なる HIV-1 流行株および薬剤耐性 HIV-1 由来の RT に内在する RNase H 活性を特異的に阻害する小分子化合物を複数同定した。5-Nitro-furan-2-carboxylic acid carbamoylmethyl ester(NACME)が酵素活性阻害を示す一連の化合物中に認められ、リード化合物のうち 5-nitro-furan-2-carboxylic acid [[4-(4-bromo-phenyl)-thiazol-2-yl]-(tetrahydro-furan-2-ylmethyl)-carbamoyl]-methyl ester (NBTC) はレトロウイルス逆転写酵素に内在する RNase H 活性を選択的に阻害し HIV-1 複製を阻害する事を証明した。この作用機序は、候補化合物が RNase H の活性中心に位置する保存された

ヒスチジン残基とマグネシウムイオンに配位することによる酵素活性阻害と推測された。電算機を利用した立体構造解析をもとに、これをリード化合物としてRNase Hを標的とした次世代抗エイズ薬を開発中である。

[駒野 淳、浦野恵美子、二橋悠子、辰巳絢子(千葉大学)、藤 秀義(千葉大学)、星野忠次(千葉大学)、山本直樹]

11. In vitro免疫法を用いた完全ヒトモノクローナル抗体産生細胞樹立の高効率化技術の確立

エイズウイルスに対するヒトモノクローナル中和抗体をもとにした抗体医薬は、エイズの動物モデルとヒトにおける治験において治療・予防効果が実験的に証明されている。よって中和抗体研究は技術のノウハウと得られた抗体がエイズワクチンと治療法開発に直結する重要な研究であると考えられる。エイズ治療と予防のための抗体医薬の創製のため、有用なモノクローナル抗体産生能力を有するヒト末梢血由来B細胞株の樹立効率を増大させるための技術開発を行った。in vitro immunization法およびsystematic oligoclonal propagation(SOP)法の併用によるB細胞株の樹立効率を評価した。本法によるB細胞株樹立効率は高く、抗体産生細胞を高い確立で樹立することが出来たが、持続的な抗体産生を維持することが困難であるという問題点があった。抗体遺伝子発現クローニングやヒトハイブリドーマ法等の技術を応用することによりSOP法の改善を行っている。抗体は本来生体分子であるため、マイクロビサイド、受動免疫による感染予防、薬剤耐性ウイルスに対するサルベージ療法としても迅速な臨床応用が期待できる。

[駒野 淳、浦野恵美子、濱武牧子、清水則夫(東京医科歯科大学)、山本直樹]

12. HIV-1 receptor CXCR4のリガンド非依存性多量体化に関する研究

HIV-1 receptorの一つであるCXCR4の機能・発現制御を分子レベルで理解することはHIV-1感染を侵入時にブロックするための方策を与える。CXCR4は多量体化することが知られているが、多くのGPCRと同様に2量体であるか、3量体以上を形成するかは検証されていなかった。また、多量体化の生物学的意義も未だ不明である。我々はCXCR4にmonomeric Kusabira GreenのN末端およびC末端断片を結合した融合タンパク質およびrenilla luciferaseの融合タンパク質を使用してBRET/BiFC系を構築し、CXCR4が2量体であるか、3量体以上を形成するかについて生物物理学的方法による直接的な検証を試みた。CXCR4がCXCR2やCXCR3との相互作用を認めない条件

下で、我々は生細胞からCXCR4のBiFC/BRETシグナルを検出し、CXCR4が3分子以上の高次複合体を形成していることを証明した。多量体化するウイルスレセプターを制御する事によりエイズの新規治療薬開発に結びつく可能性が期待される。

[駒野 淳、浦野恵美子、二橋悠子、青木 徹、濱武牧子、山本直樹]

13. 経口投与可能な CXCR4 阻害剤の研究・開発

CXCR4 は HIV-1 の主要なコレセプターの一つであり、そのアンタゴニストは新しい作用機序を有する抗 HIV-1 剤の候補として期待されている。私達は、新規 CXCR4 アンタゴニスト KRH-3955 が経口投与可能で、in vitro、hu-PBL-SCID マウスモデルの両方で高い抗 HIV-1 活性を示すことを見出した。KRH-3955 は、1) CXCR4 に特異的に結合し、SDF-1 α の結合を強力に阻害した。2) それ自身ではシグナルを入れないレセプターアンタゴニストとして作用した。3) CXCR4 の ECL1、2、3 に対する mAb の結合を阻害したが、N 末端を認識する抗体の結合には影響を与えなかった。4) 臨床分離株、既存の抗 HIV 剤耐性株の X4 HIV-1 に対して強力な抗ウイルス活性を示した (EC₅₀: \sim 1 nM)。で変異型 CXCR4 発現細胞を用いた実験から KRH-3955 と相互作用する CXCR4 のアミノ酸は、His281 と推定され、AMD3100 で報告のある Asp171、Asp262、Asp288 の変異は薬剤と CXCR4 との相互作用に影響を与えなかった。KRH-3955 をラットに 10 mg/kg で経口投与したときの bioavailability は 26% 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自由飲水投与によって X4 HIV-1 感染を顕著に阻害した。以上の結果は、KRH-3955 はエイズに対する臨床応用に向けて有望な、経口投与可能な新規 CXCR4 アンタゴニストであることを示している。なお、現在 KRH-3955、3148 に対する耐性ウイルスの誘導実験を開始しており、耐性ウイルスが取得でき次第その解析を行う予定である。

[村上 努、濱武牧子、駒野 淳、田中勇悦(琉球大学)、田中礼子(琉球大学)、大隈 和、熊倉 成(クレハ)、山崎 徹(クレハ)、谷中 幹郎(クレハ)、前田洋助(熊本大学)、山本直樹]

14. HIV-1 マトリックスタンパク質 (MA) を標的としたペプチド阻害剤の開発

HIV を標的とする薬剤の基礎研究においてカプシドやマトリックスが標的の1つとして注目され、その部分ペプチドの一部が抗ウイルス活性を示すことが報告されて

いる。しかし、ペプチドが細胞内に導入されているかどうかの検討はなされておらず、上記の抗ウイルス活性の作用機序についても十分解析されていない。そこで、細胞透過性を付加した HIV-1MA の部分ペプチドライブラリを合成し、抗ウイルス活性を有する部分ペプチドのスクリーニングを行った。今年度は、また、スクリーニングより見出されたペプチドをリードとして誘導体を設計し、抗 HIV 活性を有する非ペプチド性化合物の創出を試みる。MA の配列(132aa)の N 末端から 5 残基ずつオーバーラップさせた 15mer の部分ペプチドライブラリを合成し、細胞内に導入するため N 末端に Octa-Arg を連結したものを作製し、NL4-3/MT-4 の MTT アッセイによって部分ペプチドの抗ウイルス活性を評価した。Octa-Arg を連結した部分ペプチドのいくつかは抗 HIV-1 活性を示したが、Octa-Arg を連結しないものはいずれも 50 uM でほとんど抗ウイルス活性を示さなかった。今後は、今回抗 HIV-1 活性を示したペプチドについて R5HIV-1 の複製も阻害するか否かの検討などを行う予定である。

[村上 努、堤 浩 (東京医科歯科大学)、小森谷真央 (東京医科歯科大学)、玉村啓和 (東京医科歯科大学)、山本直樹]

III. HIV の分子疫学ならびにウイルス学的研究

1. 我が国における HIV-1 感染症の最新動向: 非大都市圏からみた新発見

1990 年代はじめに多数の外国人感染者が報告された茨城県に注目し、わが国非大都市圏における HIV 感染症の動向の一端を明らかにすることを目的とした。茨城県における遺伝子型分布 (n = 36) は、CRF01_AE (17, 47.2%); B (18, 50%); 不一致例 (CRF01_AE と B 間の組換えあるいは重感染) (1, 2.8%) であった。異性間性接触による感染者 (n=19) では CRF01_AE が全体の 63% (12/19) を占めた。MSM (n=7) では全てサブタイプ B であった。2004 年以前は CRF01_AE が 67% (12/18) を占めていたが、2005 年以降はサブタイプ B が 72% (13/18) に増加した。この地域では、先に解析を行った長野県と同様、東南アジアを起源とする CRF01_AE の異性間感染ルートによる感染の広がりが見られ、サブタイプ B の MSM が圧倒的に優位な大都市圏とは、異なる特徴をもっていた。1990 年代はじめに侵淫をはじめた CRF01_AE が、主に異性間感染のルートによって拡がり、今日に至っている状況を推測させる。しかし、近年、CRF01_AE 優位から大都市圏型のサブタイプ B 優位へ徐々にシフトしつつある傾向が見える。実効的な予防戦略立案のためには、継続的モニタリングと疫学的検討が不可欠であり、流行動態と社会風土

を考慮した地域ごとの戦略が求められる。

[長谷彩希、上西理恵、廖 華南、草川 茂、武部 豊、高山義浩 (長野県エイズ拠点病院ネットワーク)、四本美保子 (長野県エイズ拠点病院ネットワーク)、高橋 央 (長野県エイズ拠点病院ネットワーク)、斎藤 博 (長野県エイズ拠点病院ネットワーク)、人見重美 (筑波大学附属病院感染症科)]

2. アジアでの新しいタイプの組換え型流行株(circulating recombinant form, CRF) の同定とその解析

HIV-1 サブタイプ B' と CRF01_AE は、タイを中心とする東南アジア地域の流行に重要な役割をもっている。両ウイルスは 90 年代初め以来、17 年以上にわたってこれら地域に co-circulate しており、これまでに、両ウイルス間の組換えによる 3 種の組換え型流行株 (CRF) (タイにおける CRF15_01B, CRF34_01B; マレーシアの CRF33_01B) が発見されてきた。今回、われわれは、マラヤ大学との共同研究によって、マレーシア東部の IDU から得た検体 (n=17) を対象とする分子疫学的解析の結果、CRF33_01B (13/17), サブタイプ B' (1/17) の他に、既知のいかなる遺伝子型にも属さない新しいタイプのクラスターを見出し、それが新型 CRF (CRF46_01B) であることを明らかにした。CRF46_01B は、先にマレーシアで同定されていた CRF33_01B と極めて近縁な組換え構造をもち、組換え点の 1 個を共有していた。系統関係および共通祖先年代 (time of the most recent common ancestor, tMRCA) の解析から、CRF46_01B は CRF33_01B を直接の祖先とする第 2 世代の CRF であることが明らかとなった。この地域では、様々な組換えウイルスが生み出されており、継続的なモニタリングの必要がある。

[Yue Li, Kok Keng Tee, 廖 華南、上西理恵、長谷彩希、Xiaojie Li, 草川 茂、武部 豊、Adeeba Kamarulzamen. (マラヤ大学医学部)]

3. ウイルス伝播の時間的・空間的ダイナミクスの可視化

病原体ゲノムの進化と播種の時間的・空間的ダイナミクスの解明は、流行の成り立ちの理解に重要である。われわれは、東南アジアにおける HIV-1 CRF01_AE 流行年代決定に関する解析結果をモデルとして、Lemey による Phylogeography ツールを用いることによって、CRF01_AE の世界伝播の時間的・空間的ダイナミクスの地図上への描出・可視化を試みた。CRF01_AE のほぼ完全長の塩基配列情報に基づく系統関係の解析の結果、世界の CRF01_AE は、タイ株と起源の古いアフリカ株に

大別されるが、ベトナムに分布するウイルス (n=32) はタイ型ウイルスに属する3つのクラスターに分類できることが明らかとなった。この3クラスターは、ほぼ例外なく特定の地域とリスク集団に対応し、クラスター1はベトナム南部の性感染者(13/16)、2は南部のIDU(8/8)、3はベトナム北部および隣接する中国広西省略のIDU(8/8)に由来した。共通祖先年代は、アフリカ株が1968.1(58.0-76.2)、タイ株が1977.9(70.1-83.1)、クラスター1, 2, 3は、それぞれ1983.2(77.9-86.8), 1988.2(84.2-90.8), 1993.2(91.2-94.7)と推定された。これらの事実よりCRF01_AE流行は、異なる地域・リスク集団へのファウンダー株の逐次的な波及によって形成されていることが明らかとなった。新プログラムを用いることで、CRF01_AEの中央アフリカ→タイ→ベトナム南部(Sexual)→南部(IDU)→ベトナム北部/中国広西(IDU)へのウイルス播種の動態を世界地図上に描出・可視化することが可能となった。本新技法は、トリインフルエンザA-H5N1ウイルスのアジアを起点とするウイルス播種の動態解析などに応用されているが、HIV-1を含む病原体の世界伝播の時間的・空間的ダイナミックスの総合的記述を可能とする分子疫学研究の有用な新しいツールとなることが期待される。

[武部 豊、上西理恵、廖 華南、長谷彩希、Pham Hong Thang (ベトナム・国立衛生疫学研究所)、Nguyen tran Hien (ベトナム・国立衛生疫学研究所)、Oliver Pybus (英国・オックスフォード大)、Philippe Lemey (ベルギー・レガ研究所)]

4. 家族内感染例 NH3に見出された高度薬剤耐性の発達機構への組換えの関与

HIV-1のゲノム間に生じる遺伝子組換えは、遺伝子座間の連鎖を解消して新たな組み合わせを生じることで、ウイルスの多様性の増大に寄与していると考えられている。薬剤耐性変異の一部では複数遺伝子座の組み合わせによってfitnessが低下するエピスタシスが予想され、実際に耐性変異の適応進化が組換えによって生じやすくなっている例もある。遺伝子組換えがウイルスゲノムの多様性の形成に果たす役割は明らかであるが、その寄与の程度については情報が少ない。ウイルスの生存を左右する遺伝子型の多様性に対する組換えと突然変異の様々な選択圧における寄与を集団遺伝学的手法で推測し、in vivo, in vitroにおけるそれらの値を比較した。エピスタシスが観察される遺伝子型として、RT領域の41L, 69位挿入変異、210W, 215Yの4つの遺伝子座に注目した。in vivoの観察例として、AZT+ddIによる治療によってこれらの

耐性変異が生じた日本人の感染例(Sato et al 2001)を用いた。また、組換え直前の遺伝子型を持つ患者由来ウイルスの感染性クローンを作成し、薬剤耐性試験と種々のNRTI濃度下におけるin vitro競合感染実験を行った。感染者の各治療時期と競合感染実験の感染後のいくつかの時期に、RT領域の配列クローン(590bp or 626bp)を多数採集し、塩基配列を得た。組換えの存在は、bootscan解析・subregion tree・phylogenetic network解析・IDL検定・およびin vitroにおいては人工的な中立変異の直接観察により行った。In vitro実験では、近接変異座間の組換え価から交叉率を推定した。連鎖の解消が観察される遺伝子座ペアの関係をcoalescentモデルに基づいて解析することで、組換えによって生じた遺伝子型の集団中での生存時間を推測することができる。突然変異の集団中での生存時間も同様に推測可能であり、この2つの推測値の比を求めることで、多様性に関する組換えの寄与を知ることが可能となる(Charpentier et al. 2006)。これらの推定には、LDHatパッケージ中のpairwiseプログラムを用いた。様々な分子進化的解析は、in vitro, in vivo双方で耐性変異座間の組換えの存在を示唆した。in vitro競合感染実験における遺伝子頻度の経時変化から、耐性変異の組み合わせに対する選択圧が確認されたが、個々の耐性変異には強い選択圧が観察されず、エピスタシスの状態にあることが示唆された。多様性に関する組換えと突然変異の寄与は、in vitroでは薬剤環境にかかわらず一定であったが、in vivoでは時期によって組換えの寄与が大きく変化することがわかった。

[椎野禎一郎、保科佳美、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. MDMに感染性を有するHIV-1 CRF08_BC感染性分子クローン

これまでに私たちは、アジアにおいて収集、分離したHIV-1分離株から、地域特異的に流行しているサブタイプ・CRFの感染性分子クローンを樹立してきた。CRF08_BCは中国南西部における主要な流行株である。私たちが分離株HH040から樹立したCRF08_BC感染性分子クローンは、いずれもCCR5をコレセプターとして使用するR5ウイルスであったが、分離株が増殖する末梢血由来マクロファージ(MDM)では増殖できなかった。

そこで、すでに樹立したクローン HH040_22capx4のenv遺伝子を含む、制限酵素PacIとXhoIで認識される領域を、同じテンプレートから新たにPCRによって増幅したフラグメントと置換したクローンを作製し、スクリ

ーニングを行った。その結果、感染性を有する3クローンが得られた。それらはいずれもR5ウイルスであった。MDMに対する感染性を検討したところ、そのうちのひとつが、MDMにおいてわずかに増殖した。その塩基配列を決定し、HH040_22eapx4と比較したところ、envgp120のV5周辺に特徴的な4アミノ酸の変異と1アミノ酸の欠失が見られた。これらの変異が、MDMへのトロピズムに関係している可能性が示唆された。

[草川 茂、武部 豊]

2. 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分子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。HIV-1全長ゲノム増幅に用いるPCR酵素及びPrimer設計をさらに考慮したところ従来よりも迅速に多数の感染性分子クローンを樹立することが可能になった。本年度はこの方法論を本邦新規感染者の多くを占める同性間感染で増加傾向が認められるsubtype Bウイルスとセンター第2研究グループで収集している薬剤耐性ウイルス、日赤から感染研HIVパネル作成のため提供を受けた献血陽性検体由来分離ウイルス及びBBI社より購入したHIV Subtype Infectivity Panel (PRD320)由来ウイルスに応用して感染性分子クローンを樹立した。

(1) PCR酵素選別による感染性クローン樹立の効率化

「HIV Trapping System」により感染性分子クローンが樹立できるようになったが、より効率化を図るため引続き市販されているHigh Fidelity, High Processivity, High YieldのPCR酵素数種類を比較検討している。本年度は新たに市販されたTakaraのPrimeSTAR Max DNA polymeraseを現在までの当室での標準酵素であるTakara社のPrimeSTAR GXL DNA polymeraseを用いた場合と感染性クローン樹立効率を比較したところ、Takara PrimeSTAR MaxはGXLと比較して長鎖の伸展効率が低いが高Fidelityがより高いことからより効率的に感染性分子クローンが得られるウイルスが多いことが判明した。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期待される。

[竹川奈穂、巽 正志]

(2) In-Fusion酵素によるOne-Step HIV-1 Cloning戦略の試み

当室では現在HIV-1ゲノムを上流、下流に区分しOne

Cut制限酵素サイトを含むPrimerで増幅した後繋ぎ合わせるHalf & Half戦略による「HIV Trapping System」を用いて感染性分子クローンを樹立している。現時点で既に主要なsubtype/CRFのクローンが整備されたことから、より効率的な樹立法を確立するため制限酵素による繋ぎ合わせを必要としない方法論としてVaccinia Virus由来の相同組換え酵素を用いた系の感染性分子クローン作成への応用を試みている。この酵素はVectorと組込むInsertに15塩基の相同性を認識して末端同士を結合する。HIV-1のPBS領域と3'LTRのPolyA Signal下流領域の塩基配列は多くのHIV-1 Group Mで保存されている。これらの特徴を利用して求めるHIV-1のsubtype/CRFが判明すれば、現在まで作成した感染性分子クローンから同じsubtype/CRFのクローンを選別し、Vector側をpMT1/pMT4のNot Iサイト側を含むPrimerとPBS側で5'LTRを含むVector片を用意し、標的のHIV-1プロウイルスを15塩基配列が重複したPBS領域配列とPolyA下流領域とVector Not Iサイト領域を含んだPrimer Setで増幅し、両者を相同組換え酵素存在下で反応させる事で全長HIV-1クローンを樹立する方法論である。昨年度はその樹立効率は実用にはまだ低かったが、Primer設計の改善と組換え酵素の安定性が向上したことにより樹立効率が向上した。今後さらにPrimer設計などの実験条件を精査し、実用化を目指す。

[竹川奈穂、巽 正志]

(3) 邦人感染者由来薬剤耐性ウイルス subtype B 感染性分子クローンの樹立と解析

昨年度まで本邦で流行している主要なウイルス株であるHIV-1 subtype BとCRF01_AE組換体のNaïveウイルス由来感染性分子クローンの標準株を整備した。本年度は様々な薬剤耐性プロファイルを呈する耐性ウイルスの感染性分子クローンを整備する目的で、治療中の患者由来で典型的な各種薬剤耐性プロファイルを呈する薬剤耐性ウイルスから引続き標準株クローン樹立を継続している。これらのクローンは薬剤耐性subtype Bの解析と耐性試験標準化に有用であることが期待される。

[竹川奈穂、西澤雅子、杉浦 互、巽 正志]

(4) 未だ整備されていない subtype/CRF HIV 感染性分子クローンの樹立と解析

これまで当室では国内で流通するHIV感染診断キットの性能試験に資するため、著しい多様性を呈するHIV-1グループMの様々なsubtype/CRFウイルスの感染性分子クローンを整備してきた。国内外で流行する主要な

subtype/CRF ウイルスに関しては薬剤耐性ウイルスも含めて複数クローンの樹立が成功しほぼ整備出来た状況であるが、国際交流が益々盛んになるにつれて現在では流行する HIV-1 ウイルスに国境はないものと考えられる。そこで未だ整備されていない subtype/CRF ウイルスの感染性分子クローンを樹立するため、欧米先進国において subtype/CRF の標準株として HIV 感染診断キットの性能試験に頻繁に用いられているウイルスを含む Boston Biomedica Inc. の HIV Subtype Infectivity Panel PRD320 を購入し、未だ整備されていない subtype/CRF と欧米で標準株として用いられているウイルス由来の感染性分子クローンパネルを整備することを昨年度に開始した。PRD320 Panel member 20 株のウイルスの全てについて感染性分子クローンを樹立し、全ゲノムの塩基配列決定によりその帰属を確認したところ、subtype/CRF の標準株として用いられているこれらのウイルスのうち 3 株のウイルスは標記の subtype/CRF と異なることが示された。現在これら異なるゲノム構成の詳細を解析している。
[竹川奈穂、武田 哲、巽 正志]

V. HIV ライフサイクルと宿主因子の研究

1. 宿主微小管ネットワークは SOCS1 による HIV-1 Gag の細胞内輸送に必須である

サイトカインシグナルサブプレッサー SOCS1 は HIV-1 Gag に結合し、Gag の細胞内輸送とウイルス粒子形成を促進する。我々は、SOCS1 を分子プローブとして用いることにより、Gag の細胞内輸送の分子機構の解明を試みた。その結果、SOCS1 は Gag のユビキチン化を促進させることにより、Gag タンパク質と微小管の相互作用を促進することが明らかとなった。また、薬剤を用いて微小管重合を阻害すると、SOCS1 による Gag の細胞膜への輸送が著しく阻害されたことから、Gag のユビキチン化と微小管への結合が、Gag の細胞内輸送とそれに引き続く粒子形成に重要な役割を果たすことが示唆された。

[梁 明秀、西真由子、大庭賢二、山本直樹]

2. OX40L/OX40 システムの HIV-1 感染に与える影響

HIV-1 が宿主細胞に感染後、増殖し、宿主細胞から出芽する際には、様々な宿主由来タンパクをその粒子内に取り込むことが知られており、さらにその取り込まれたタンパクはその後の HIV-1 感染に様々な影響を与える。そこで我々は接着分子としても知られている OX40L 分子と OX40 分子に着目し、これらの HIV-1 感染に与える影響を調べた。まず、それぞれの分子に対するモノクローナル抗体を使った immunocapture 法により、それぞれ

のタンパクが産生されたウイルス粒子に取り込まれているのかを調べたところ、両分子ともに確認された。そこで OX40 分子または OX40L 分子を発現させた細胞 (TZM-bl cells, primary T cells) に、OX40L 分子または OX40 分子を取り込んだ HIV-1 を感染させ、それらの分子の感染効率に与える影響を調べた。その結果、OX40L/OX40 システムが HIV-1 の感染効率を高めることがわかった。これらの結果は、さらなる HIV-1 感染病理、病態の解明に役立つものと思われる。

[高橋良明、村上 努、駒野 淳、山本直樹、田中勇悦 (琉球大学)]

3. 濾胞樹状細胞による PSGL-1 分子を介した HIV-1 複製刺激機構の解明

濾胞樹状細胞 follicular dendritic cell (FDC) は他の樹状細胞と異なり、一次濾胞に存在し、B 細胞とクラスターを形成して B 細胞の活性化に関与することが知られている。我々は FDC を種々の HIV 感染細胞と共培養すると HIV ウイルス産生が顕著に増加することを見出した。この増加は FDC 細胞膜上の P-selectin と、HIV-1 感染細胞膜上の PSGL-1 分子を介した細胞-細胞間相互作用が必須であり、PSGL-1 の細胞内ドメインと相互作用するチロシンキナーゼ Syk の活性化が重要であることが明らかとなった。これらの結果は、FDC と HIV-1 感染細胞による細胞-細胞間分子相互作用が直接的にウイルス増殖を促進することを示し、当該因子が HIV-1/AIDS 治療における新たな分子標的として役立つ可能性があることが示唆された。

[大庭賢二、梁 明秀、西真由子、添田浩美、寺嶋一夫 (東京医科歯科大学)、山本直樹]

4. BCA2/Rabring7 による抗 HIV-1 活性の解明

膜蛋白質 tetherin/CD317/BST-2 は、レトロウイルスやその他のエンベロープウイルス粒子を細胞膜表面に繋留することでウイルス粒子の放出を抑制する。しかし、繋留されたウイルス粒子がいかんして細胞内に取り込まれて消化されるかという詳細な分子機構は未だ明らかになっていない。今回我々は、tetherin と協調する宿主因子として BCA2/Rabring7 を同定した。BCA2 は tetherin と協調して、細胞膜上のウイルス粒子の細胞内への取り込み、およびリソソームでの分解を促進するユニークな抗 HIV-1 因子であると考えられる。

[宮川 敬、梁 明秀、大庭賢二、村上 努、山岡昇司 (東京医科歯科大学)、福田光則 (東北大学)、John Guatelli (カルフォルニア大学)、山本直樹]

5. HIV-1 アクセサリータンパク質 Nef による NF- κ B の活性化機構の解明

HIV-1 のアクセサリータンパク質 Nef は感染細胞における CD4 のダウンレギュレーションに関与することで AIDS/HIV 感染症の病態において重要な役割を果たす。一方で各種のシグナル伝達系を活性化させることにより、HIV の複製を制御することが知られている。今回我々は Nef が Src キナーゼファミリーの Hck と相互作用することで、NF- κ B を活性化することを見出した。Hck は Nef 発現細胞において p65 と結合し、濃度依存的に NF- κ B を活性化させた。一方で、キナーゼ活性を失活させた Hck 変異体ではむしろ NF- κ B の活性化を抑制した。Nef と Hck を細胞に共発現させると、NF- κ B p65 のチロシン残基のリン酸化の度合いが顕著に増加していた。またこの現象は Hck の siRNA により完全にブロックされた。以上の結果より、Nef は宿主チロシンキナーゼ Hck と機能的に相互作用することにより、NF- κ B シグナルを活性化し、HIV の複製を正に制御することが示唆された。

[Jeong Soo-Jin, 梁 明秀、山本直樹]

6. 細胞極性制御キナーゼ aPKC による HIV-1 Gag のリン酸化及びその生理的意義

現在、病原体と宿主因子との機能的相互作用についての解析は、一研究分野を形成するほど様々な局面で押し進められており、HIV-1 についても例外ではない。我々は、その中でも特にリン酸化という翻訳後修飾に着目し、HIV-1 の Gag タンパク質をリン酸化するキナーゼの同定を、コムギ胚芽ハイスループット合成系及び検出系を利用して押し進めた。その結果、我々は、進化的に保存された細胞極性制御キナーゼとして知られる aPKC が、HIV-1 Gag の p6 領域をリン酸化する事を見いだした。MS/MS 解析により当該リン酸化部位を同定したところ、このリン酸化部位は、HIV-1 Vpr と Gag との相互作用部位に含まれていた。当該リン酸化部位の点変異体により Gag と Vpr との結合は抑制され、放出された Virus like particle (VLP) に取り込まれる Vpr の量は減少した。このことは、当該リン酸化によりウイルス粒子に含まれる Vpr の量が正に制御されている事を示唆している。ウイルス粒子における Vpr 含有量が、HIV-1 の病原性にどれほどのインパクトを与えるのかという点について今後解析を進めて行く予定である。

[高濱正吉(愛媛大学)、澤崎達也(愛媛大学)、岡山明子、赤木達也(愛媛大学)、遠藤弥重太(愛媛大学)、山本直樹、梁 明秀]

7. P-TEFb 複合体の活性化を制御する宿主因子 Cyclin K/CPR4 による HIV-1 複製制御

Tat 依存的な転写は HIV-1 の複製を制御する治療の標的のひとつになると考えられている。P-TEFb 複合体は Cyclin T1/T2/K と CDK9 からなる複合体で、HIV-1 の tat が ウイルスプロモーターの転写を活性化するためには Cyclin T1 を含む P-TEFb 複合体の存在が必須である。これに対し、Cyclin K は細胞遺伝子の発現を阻害せず HIV-1 の tat 依存的 LTR 転写を選択的に阻害する活性があると予測されていた。これを実証するために複数のヒト T 細胞株に Cyclin K を導入しウイルス複製をモニターしたところ、Cyclin K の発現は強力に HIV-1 複製を阻害することが示された。この HIV-1 複製阻害は転写を標的にすることが示された。以上の結果は転写の制御が HIV-1 複製を選択的に阻止するために重要な作用点であることを示すと同時に、Cyclin K の発現増加が HIV-1 感染症の病期進行を制御している可能性を示唆する。また、Cyclin K の発現を誘導することが抗 HIV-1 戦略の重要な選択肢であることを示している。

[浦野恵美子、二橋悠子、濱武牧子、山本直樹、駒野 淳]

8. ミリストイル化非依存的な HIV-1 Gag の virus-like particle 産生と感染能の解析

レトロウイルス Gag タンパク質のミリストイル化は Gag の細胞膜 targeting ・ Gag 集合 ・ 細胞表面への輸送 ・ budding ・ 感染初期過程に重要な機能を持つ。しかしミリストイル化の持つ役割についての解析は相同の機能ドメインによる交換ができないことから十分進展していなかった。我々は Gag のミリストイル化シグナルを欠失させ、N 末端にいくつかの異なる細胞膜移行シグナルタンパク質を融合させた。これらを細胞に発現させ、共焦点顕微鏡による細胞内局在、電顕による形態観察、培養上清中の VLP の有無、産生効率、物理的性質、感染能等を解析した。その結果、ミリストイル化は Gag のほぼ全ての機能に関して膜タンパク質やフォスホリパーゼ C ガンマのプレクストリンホモロジドドメインと交換可能であることが判明した。とくにプレクストリンホモロジドドメインを Gag の N 末端に付加した PH-Gag は野生型に対して同様の形質膜 targeting 効率を示し、数倍のウイルス産生増加能を持ち、VSV-G による pseudotyping により調整されたウイルスベクターの感染性は野生型と同様であるという特性を示した。ミリストイル化がなくても感染性ウイルスを産生できることを実証したのは本事例が初めてである。今後さらに PH-Gag を解析することにより

Gagの機能がより深く理解され、Gagを標的とした新たなHIV-1治療薬の開発や、遺伝子治療に応用されているレンチウイルスベクターの改良に結びつけることが出来ると期待される。

[青木 徹、浦野恵美子、二橋悠子、濱武牧子、清水佐紀、村上 努、山本直樹、駒野 淳]

9. T細胞における機能的cDNAライブラリースクリーニングの構築とHIV-1複製阻害因子Brd4 C末端の同定

HIV-1複製には複雑な宿主ウイルス相互作用がある。ゲノムワイドなスクリーニングにより網羅的にウイルス複製を制御する宿主因子を同定するための試みは全世界で行われているが、T細胞を標的として複製可能なHIV-1を使用した網羅的解析はほとんど例がない。我々はヒトT細胞株MT-4にヒトcDNAをレンチウイルスベクターにて導入し、安定に外来遺伝子を発現したT細胞を樹立し、これにHIV-1を感染させ、HIV-1感染が抑制された細胞を選択しHIV-1耐性遺伝子を同定した。その結果、P-TEFb複合体の制御因子として知られる bromodomain containing 4 (Brd4)のC末端断片が同定された。我々はこれをT細胞に再導入してもT細胞の増殖は抑制されず、HIV-1の複製は阻害されることを検証した。本実験系は異種の動物細胞やHIV-1耐性形質を示す細胞からヒトT細胞を使用してHIV-1耐性遺伝子を機能的なスクリーニング方法にて選択し同定することを可能にする可塑性の高い実験系であり、今後の更なるゲノムワイドなHIV-1制御因子探索が期待される。本研究により新たな創薬分子標的が同定され、基礎ウイルス学研究与創薬研究の橋渡しが可能になると期待される。

[浦野恵美子、苅屋祐美、二橋悠子、市川玲子、濱武牧子、森川裕子 (北里大学)、山本直樹、芳田 剛 (京都大学)、小柳 義夫 (京都大学)、駒野 淳]

VI. HIV 感染動物モデルの開発に関する研究

1. サル・エイズモデルを用いた抗HIV候補薬のスクリーニング

ヒト/HIV感染症の動物モデルとしてこれまでに確立したサル・エイズモデルを用いて治療候補薬剤のスクリーニングを始めている。今年度は、昨年度のスクリーニングで感染予防内服剤としての可能性が示唆された薬剤についてさらに検討を加えた。6頭のサルを用いて検討した結果、ウイルス曝露の2週間前、しかも単回内服であってもCD4細胞数の減少を防ぐ例が確認されたことから、少なくとも発症予防あるいは発症遅延効果が期待できた。他の薬剤との併用により感染予防内服剤としての

可能性が期待できることから、今後の検討が必要である。
[仲宗根正、村上 努、山本直樹]

2. Cell-associated virus経粘膜感染によるサル・エイズモデル開発 (ウイルス曝露非感染モデル)

ウイルス曝露非感染サルモデルの重要性は次のようにまとめられる。人類の中にはHIVに濃厚に曝露されるも感染しないヒトが存在する。いわゆるウイルス曝露非感染者である。彼らは理想的な抗HIV免疫を獲得していると考えられているため、特にその粘膜免疫の解析はワクチン開発の重要課題となっている。しかしながら、症例の発掘が困難であり、なおかつ粘膜面の解析にはサンプリング量・回数ともに制限が大きい。また、チャレンジ実験が不可能なことから、その症例が真に抗HIV免疫を獲得しているのかという確認も不可能である。ウイルス曝露非感染サルモデルはそれらの問題を解決し、HIV防御免疫本態の詳細情報を提供すると考えられる。昨年度に得られたウイルス曝露非感染サルモデルと思われる2頭について詳細に検討した結果、1頭はウイルス曝露非感染サルである可能性があるものの、他の1頭は感染成立が確認できたことから、ウイルス曝露非発症サルである可能性が示唆された。現在、その防御免疫について解析中である。

[仲宗根正、梁 明秀、山本直樹、網 康至(動物管理室)]

3. ウイルスの糖鎖修飾と病原性・感染防御免疫誘導との関連性

エイズウイルスは多数の糖鎖に覆われており持続感染、病原性を決定する因子となっている。我々はgp120の5カ所のN結合型糖鎖を欠失した変異株Δ5Gを用いてΔ5Gの低病原性、野生株SIVmac239の病原性を決定する糖鎖の役割について研究を行っている。アカゲザルにSIVmac239、Δ5Gを静脈内接種し、感染後7~21日目に組織を採取し、各組織の免疫組織化学染色により感染組織・細胞を同定し、マルチカラーフローサイトメトリー、セルソーティングにより組織を構成する免疫細胞、感染細胞のサブセットを同定した。腸管粘膜組織における感染：SIVmac239感染では空腸、回腸、結腸において、Δ5G感染では空腸、回腸において多数の感染細胞が確認された。しかし感染部位が異なっていた。SIVmac239感染細胞は孤立リンパ小節に、Δ5G感染細胞は粘膜固有層に局在していた。初期感染における標的細胞であるCD4+T細胞のサブセット解析から、野生株感染ではcentral memory CD4+細胞の減少、Δ5G感染ではeffector memory CD4+CD8+T細胞の減少が明らかとなった。2次リンパ組

織における感染：野生株感染では腸管粘膜と同様に多数の感染が見られたが、 $\Delta 5G$ 感染では、感染細胞の検出は初期感染早期に限られ1/10以下であった。末梢血中の感染CD4+T細胞のレベルにおいても数十分の1以下であり、野生株感染で観察されたCD4+CCR5+T細胞の減少は観察されなかった。野生株の主要感染組織は獲得免疫誘導のための2次リンパ組織であった。ところが $\Delta 5G$ の感染組織は腸管粘膜組織effector部位であった。免疫組織における感染の違いがウイルスの病原性、防御免疫誘導の違いの原因となっていることが推測された。

[杉本智恵、森 一泰]

VII. その他

1. iPS細胞のレトロウイルス研究への応用

(1) 本所におけるヒト iPS細胞培養法の確立

京都大学の山中伸弥教授らのグループによって開発された誘導多能性幹細胞 (iPS細胞) は、再生医療への応用のみならず、感染症領域においてもその活用が期待される。そこで、我々は、マウス肺線維芽細胞をフィーダー細胞として、KS-R 添加 KO-D-MEM 培地を用いて、国立成育医療センターで樹立された、ヒト肺線維芽細胞 (MRC-5)由来 iPS細胞の大量培養を試みた。コラゲナーゼを用いて継代し、培養を行ったところ、多能性を維持した状態で、iPS細胞の大量培養に成功した。今後は本細胞をヒト化マウスへの移植を行い、個体内における分化誘導を行う予定である。

[武田 哲、西真由子、中川洋一、橋本麻衣、梁 明秀、山本直樹]

(2) 各種細胞を用いた iPS細胞樹立法の検討

iPS細胞の樹立法の確立は、多能性化に至る分子機構の解明のみならず、iPS細胞を利用した様々な応用研究の実現のために必須である。我々は、ヒト歯髄細胞およびヒト不死化羊膜細胞にレトロウイルスを用いて3因子 (KLF4、Sox2、Oct3/4) の導入を行い、iPS細胞の樹立を試みた。その結果、各細胞株において、iPS細胞様のコロニーを得る事ができた。また、ヒト不死化羊膜細胞において、プラスミドベクター (Oct3/4) とアデノウイルスベクター (Sox2) 感染による2因子の導入でコロニーの形成を確認した。得られたコロニーに関しては多能性マーカーの免疫染色、RT-PCR、テラトーマ形成などによる解析を行う予定である。

[中川洋一、武田 哲、橋本麻衣、梁 明秀、山本直樹]

(3) ヒト腎上皮細胞からの iPS細胞の作製

エイズの遺伝子治療、例えば、患者より採取した HIV の標的となる細胞に遺伝子操作により HIV 抵抗性を付与し患者体内に戻すような方法は、HIV 非感染幹細胞の量的確保等技術的なハードルが高かった。ところが、2007年に京都大学の山中らによってヒト体細胞からの人工多能性幹細胞 (Induced Pluripotent Stem Cells, iPS細胞) の作製法が開発されたことにより、患者の HIV 非感染体細胞を初期化・遺伝子操作した幹細胞の大量調製の可能性が開けてきた。

本研究では、iPS細胞作製技術の確立と併せてその遺伝子操作法を開発するために、まず、ヒト腎上皮初代培養細胞からの iPS細胞樹立を試みた。その結果、形態的にヒト皮膚線維芽細胞由来の iPS細胞に酷似した細胞株の樹立に成功した。それら細胞株は、アルカリフォスファターゼ染色、未分化細胞特異的抗原の免疫蛍光染色、未分化細胞特異的遺伝子発現の RT-PCR にて、その未分化性を確認できた。

[阪井弘治、武田 哲、梁 明秀、山本直樹、松村隆紀 (首都大学東京)、宮本寛治 (首都大学東京)]

2. プロリルイソメラーゼ Pin1 の HTLV-1 Tax タンパク質安定化に関する研究

ペプチジルプロリルイソメラーゼ Pin1 は多くの癌で高発現し、癌化および悪性化形質の維持に重要な役割を果たすことが知られている。今回我々は、Pin1 が HTLV-1 Tax タンパク質に結合し、そのユビキチン化とタンパク質分解を抑制することにより、Tax の活性化および癌化に寄与することを明らかにした。Pin1 は成人 T 細胞白血病 (ATL) 細胞株で Tax の発現に比例して発現量が増加していた。Pin1 は細胞周期依存的にリン酸化された Tax の Ser160 に結合し、Tax の分解を顕著に抑制した。Pin1 は Tax のユビキチン化も抑制したが、Tax の分解はライソゾーム阻害剤の NH4Cl やクロロキン処理において顕著に抑制された。また、Pin1 は Tax によるマウス T 細胞株 CTLL-2 のトランスフォーメーションを顕著に促進した。以上の結果より、Pin1 は Tax に結合し、安定化させることで、細胞発癌を促進することが示唆された。

[Jeong Soo-Jin, 梁 明秀、正岡崇志、大庭賢二、山本直樹]

3. HIV-1 におけるヒト遺伝子転移 (human sequence transduction)

われわれは、HIV-1 CRF01_AE 感染日本人症例に、逆転写酵素遺伝子のフィンガー領域への 33-ヌクレオチドからなる遺伝子挿入による極めて特殊な高度多剤耐性株を見出したが、この挿入変異がどのような機構で発生し

たか、またその起源は不明であった。この挿入配列の由来を解明するために、全ヒトゲノム配列に対して相同性 (BLAST) 検索を行った結果、ヒト 17 番染色体にはほぼ完全な相同配列が存在することを明らかにした。HIV-1 を含むレトロウイルスでは、染色体にプロウイルスとして組み込まれた場合、約 10% のプロウイルス転写産物は、read-through を起こし、HIV-1 RNA とヒト遺伝子に由来するキメラの転写産物が生成する。このキメラの RNA ゲノムと正常な HIV-1 ゲノムが対合し、逆転写反応が起こった場合、両ゲノムの間で微小な相同配列を利用して鋳型乗り換え (いわゆる microhomology-guided template switch) が起こり、HIV-1 ゲノムにヒトゲノムに由来する遺伝子配列が取り込まれたと考えられる。このような現象の古典的な例は、宿主の増殖・細胞周期関連遺伝子の取り込みによる腫瘍原性レトロウイルス (例: ラウス肉腫ウイルス) の発生である。HIV-1 は、他のレトロウイルスに比しても、より高い変異性 (mutagenicity) と組換え能力 (recombinogenicity) をもち、さらに一日当たり 10^{9-10} に及ぶ高い増殖能力に加え、長期にわたる持続感染を引き起こすことから、そのゲノム多様性は極めて高いレベルにまで達し、薬剤耐性や免疫学的エスケープが容易に起こりやすいなどの際立った性質のウイルス学的基盤となっている。その可塑性が宿主遺伝子の取り込みにまで及ぶことを示した初めての報告であると考えられる。[Alice Telesnitsky (ミシガン大学微生物)、武部 豊]

4. 新規マンノース特異糖鎖結合タンパク質による強力な HCV/HIV-1 エントリー阻害

HIV や HCV などのウイルス粒子表面に存在するエンベロープタンパク質は、高度の糖鎖修飾を受けている。糖鎖修飾はエンベロープタンパク質の適切な folding, assembly, さらにウイルス粒子の感染性獲得に不可欠である。ウイルス・エンベロープには、宿主細胞にはほとんど見いだされない高マンノース型糖鎖が豊富に付加しており、従って、高マンノース型糖鎖に特異的に結合する物質は、特異性の高いウイルス阻害剤としての可能性が期待される。われわれは、比較的最近に同定された 2 種の極めて強力なマンノース糖鎖特異結合タンパク質であるサイトビルン (SVN) とグリフィスシン (GRFT) の抗 HIV-1 および抗 HCV 効果を評価し、その結果、両者は low nM ~ sub nM レベルの極めて強力な HIV-1/HCV 阻害効果を示すことが明らかとなった。特に GRFT の抗 HCV 活性は、これまでに経験した物質の中で最も強力なものであった。両者は、レプリコン・アッセイでは阻害活性が見られないが、HCVpp アッセイを阻害することか

ら、HCV エントリーを阻害することが明らかとなった。SVN, GRFT はウイルスエンベロープタンパク質の高マンノース型糖鎖に結合し、ウイルス粒子の標的細胞表面への非特異的吸着および受容体に対する特異的結合を阻害することによって、抗ウイルス作用を示すものと推定される。エントリーは、HIV に対する治療薬としてその有効性が示されているように、魅力的な治療標的であるが、SVN や GRFT は、特に microbicide、広範囲な病原体に対する吸着除去物質としての利用の可能性が期待される。

[上西理恵、長谷彩希、廖 華南、加藤佳代子、武部 豊、Kirk Gustafson (米国がん研究所 (NCI-Frederick))、James B. McMahon (米国がん研究所 (NCI-Frederick))、Barry G. O'Keefe (米国がん研究所 (NCI-Frederick))]

品質管理に関する業務

I. HIV 感染診断のための標準品整備

1. 日赤献血由来陽性検体からなる国内感染者 HIV 感染研パネル整備

国内で市販される HIV 感染診断キットの公的性能試験を当室は担っている。現在診断キットの性能試験に用いている陽性検体の多くは HIV-1 流行初期の米国血液銀行より入手した血漿を供試している。HIV 感染診断キットの性能も技術革新により年々改良され、現在では第 1 次スクリーニング試験として抗原・抗体同時測定系が推奨され、ウインドウ期を短縮するため HIV-1 p24 gag 抗原検出感度が更に高められた診断キットが欧米先進国において既に市場に導入されている。感染者増加が続く本邦においては、感度と特異性に優れた HIV 感染診断キットの早期の導入は感染者の早期発見と適切な治療の開始のみならず、感染者の増加に歯止めをかけるため第 1 義的に重要であるが、これまで国内感染者検体入手が個人情報保護の側面から困難であったため承認前試験申請に遅延をきたす例が多かった。一方で国内献血における HIV-1 陽性検体数は日本赤十字社の検査目的の献血を防止するキャンペーンにもかかわらず増加し、昨年遂に年間 100 名を越えた陽性献血があった。このような状況の下、ここ数年に渡り日赤、本省医薬食品局審査管理課医療機器審査管理室及び医薬品医療機器総合機構医療機器審査部に承認前試験に供試するため公的な国内感染者検体からなるパネル整備の必要性を説き続けてきた。今年度になり関係各部の協力得て、日赤より 2004 年度から 2006 年度に亘る HIV 陽性 84 検体と陰性 50 検体の譲渡を受けた。これらの検体は全て当室で分子遺伝学的特性付けを行い、また現在 HIV 感染診断キットを販売している主要な数社

の協力を得て全検体の特性を検討した上で選別し、陽性 80 検体及び陰性 20 検体からなる感染研公的 HIV-1 パネルとして運営されるよう、パネル運営委員会規程など公正な運営に必要なシステムを構築しつつある。診断キットメーカからなる臨床診断薬協会を通じた説明会などを開催し平成 21 年度内の運営実用化に向けて努めて行く予定である。

[田角栄二、竹川奈穂、武田 哲、阪井弘治、巽 正志、山本直樹、水落利明（血液・安全性研究部）、山口一成（血液・安全性研究部）、百瀬俊也（日赤血液事業本部中央研究所）、柚木久雄（日赤血液事業本部中央研究所）、日野 学（日赤血液事業本部中央研究所）、田所憲治（日赤血液事業本部中央研究所）]

2. 各種 subtype/CRF 感染性分子クローンを用いた抗原・抗体同時測定系の感度試験用標準パネルの作成

現在、本邦では HIV-1/2 感染診断の 1 次スクリーニング検査は、各保健所などで導入されている即日検査に用いられるイムノクロマト法を除いて、ウインドウ期をより短縮するため抗原・抗体同時測定系が導入されている。各社より各種の検査キットが市販されているが、抗体出現前の抗原陽性期を如何に感度良く検出できるかは多くの場合 Seroconversion Panel を購入して対応しているが、この Panel が由来する HIV-1 subtype は限られており、その数量もまた限度があるなど、その標準抗原が国内外で依然として整備されていなく状況である。我々がこれまで樹立してきた各種 subtype/CRF 感染性分子クローンが、これら抗原・抗体同時測定系における抗原検出の感度試験標準パネルとなりうるか、国内で市販されている検査キットを販売している検査会社の協力を得てその感度測定を行なっている。昨年度のサーベイより subtype/CRF 数を増やし、希釈抗原濃度も各診断キットが公称する感度 10 pg/mL 前後に振り、欧州で HIV-1 抗原測定デフォルトとされる Innotech による測定も行なった。その結果 Innotech による抗原検出は設定抗原濃度 10 pg/mL まで検出していた。この成績は当室が整備した subtype/CRF 感染性分子クローンが偏ったウイルスからなる可能性を否定するものであった。各種抗原抗体同時測定診断キットでこれらのパネルを測定したところ、診断キットにより subtype/CRF により検出感度が大きく異なることが改めて確認された。100 pg/mL の p24 gag 濃度で幾つかのクローンが検出出来ないキットについて、その責任抗原領域を分子モデリングと検出感度の相関を各クローンの p24 gag アミノ酸配列の比較をもとに解析を行っている。今後は更に未だ樹立されていない subtype/CRF の感染性分

子クローンを構築し、抗原検出の標準パネルとして整備に努める。

[竹川奈穂、巽 正志]

国際協力関係業務

I. JICA との共催による HIV-1 診断技術講習「第 1 回診断とモニタリングのための HIV 感染検査マネジメント」 (平成 20 年 6 月 16 日-7 月 18 日)

現在世界的に拡大を続けている HIV-1 感染、AIDS 発症の予防のためには、HIV-1 の蔓延状況の正確な把握が欠かせない。このためには確固とした診断技術に基づいた HIV-1 感染診断が必須である。近年 HIV-1 の感染診断は従来の感染の有無のみを判断する血清学的診断に加えて、感染ウイルスの質、量を知ることができる PCR 法に基づいた診断法が重視されるようになってきている。しかし、現在感染の中心となっている第三世界では必ずしもこれらの診断技術が確立されていないのが現状である。これらの状況に対応するため当センターでは JICA との共催により第三世界の研修員を対象に HIV-1 の感染診断のための技術講習コースを毎年 1 回開催している。過去 3 フェーズ（各フェーズ 5 年）に渡って血清診断を中心とした研修を行ってきた。昨年度までの 5 年間は、近年の核酸に基づいた診断技術への需要に答えて「HIV 感染者のケアとマネジメントのための高度診断技術」と名称を改め PCR や塩基配列解析などを含めた研修を行ってきた。今年度から（各フェーズ 3 年）は、途上国のナショナルレファレンスラボ（またはそれに準ずる組織）に HIV 感染・エイズの診断とモニタリングに必要な理論的背景知識およびそれらの検査技術の普及を図るため、「診断とモニタリングのための HIV 感染検査マネジメント」というコース名で研修を開始した。平成 20 年度は、ボツワナ、インド、マラウイ、ナイジェリア（2 名）、セネガル、スワジランド、ザンビア、ジンバブエ（2 名）の 8 カ国 10 名の研修員を対象に 6 週間にわたって村山分室研修棟を中心として技術研修を行った。研修内容は診断に必要な関連分野の講義、診断技術実習、施設訪問等を組み合わせたもので、実習は 3 つの小グループ制で行った。近い将来核酸技術に基づいた診断方法の導入予定の国が多いが、それを考慮して今年は 3 日間実施した PCR ワークショップが特に研修生から高い評価を得た。

[村上 努、梁 明秀、岡山明子、仲宗根正、杉浦 互、鈴木寿子、藤野真之、武部 豊、椎野禎一郎、草川 茂、巽 正志、阪井弘治、武田 哲、森 一泰、石川晃一、駒野 淳、山本直樹、杉山和良（バイオセーフティ管理室）、横田恭子（免疫部）、岡部信彦（感染症情報センター）、俣野哲

朗（東京大学医科学研究所）、Jintana Ngamvithayapong-Yanai（財団法人結核予防会結核研究所）、若杉なおみ（早稲田大学）、菊池 嘉（国立国際医療センター）、本田美和子（国立国際医療センター）、畢 秀瓊（国立国際医療センター）、増田道明（獨協医科大学）、小柳義夫（京都大学ウイルス研究所）、高梨美乃子（東京都赤十字血液センター）]

II. その他

1. エイズ予防財団「アジア地域エイズ専門家研修」講師（平成 20 年 10 月 17 日）[山本直樹]
2. JICA「感染症のサーベイランスのための検査システムと情報の収集解析システムに関する研修」講師（平成 20 年 12 月 15 日）[山本直樹、巽 正志]

研修業務

1. 薬学系 4 大学学生の見学・研修 講師「HIV/AIDS 研究」（平成 21 年 3 月 24 日）[村上 努]

発表業績一覧

I. 誌上発表

1. 欧文発表
 - 1) Masaoka T, Nishi M, Ryo A, Endo Y, Sawasaki T: The wheat germ cell-free based screening of protein substrates of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II delta. *FEBS Lett* 582(13):1795-1801, 2008.
 - 2) Takeuchi R, Ryo A, Komitsu N, Mikuni-Takagaki Y, Fukui A, Takagi Y, Shiraishi T, Morishita S, Yamazaki Y, Kumagai K, Aoki I, Saito T: Low-intensity pulsed ultrasound activates the PI3K/Akt pathway and stimulates the growth of chondrocytes in 3D-cultures: a basic science study. *Arthritis Res Ther* 10(4):R77, 2008.
 - 3) Yoshino N, Kanekiyo M, Hagiwara Y, Okamura T, Someya K, Matsuo K, Ami Y, Sato S, Yamamoto N, Honda M: Mucosal administration of completely non-replicative vaccinia virus recombinant Dairen I strain elicits effective mucosal and systemic immunity. *Scand J Immunol* 68(5):476-483, 2008.
 - 4) Yajima M, Imadome K, Nakagawa A, Watanabe S, Terashima K, Nakamura H, Ito M, Shimizu N, Honda M, Yamamoto N, Fujiwara S: A new humanized mouse model of Epstein-Barr virus infection that reproduces persistent infection, lymphoproliferative disorder, and cell-mediated and humoral immune responses. *J Infect*

Dis 198(5):673-682, 2008.

- 5) Yamaguchi K, Sugiyama T, Kato S, Kondo Y, Ageyama N, Kanekiyo M, Iwata M, Koyanagi Y, Yamamoto N, Honda M: A novel CD4-conjugated ultraviolet light-activated photocatalyst inactivates HIV-1 and SIV efficiently. *J Med Virol* 80(8):1322-1331, 2008.
- 6) Miyake A, Dewan MZ, Ishida T, Watanabe M, Honda M, Sata T, Yamamoto N, Umezawa K, Watanabe T, Horie R: Induction of apoptosis in Epstein-Barr virus-infected B-lymphocytes by the NF-kappaB inhibitor DHMEQ. *Microbes Infect* 10(7):748-756, 2008.
- 7) Naganawa S, Yokoyama M, Shiino T, Suzuki T, Ishigatsubo Y, Ueda A, Shirai A, Takeno M, Hayakawa S, Sato S, Tochikubo O, Kiyoura S, Sawada K, Ikegami T, Kanda T, Kitamura K, Sato H: Net positive charge of HIV-1 CRF01_AE V3 sequence regulates viral sensitivity to humoral immunity. *PLoS ONE* 3(9):e3206, 2008.
- 8) Nomura W, Tanabe Y, Tsutsumi H, Tanaka T, Ohba K, Yamamoto N, Tamamura H: Fluorophore labeling enables imaging and evaluation of specific CXCR4-ligand interaction at the cell membrane for fluorescence-based screening. *Bioconjug Chem* 19(9):1917-1920, 2008.
- 9) Furuya K, Omura M, Kudo S, Sugiura W, Azuma H: Recognition profiles of microsporidian *Encephalitozoon cuniculi* polar tube protein 1 with human immunoglobulin M antibodies. *Parasite Immunol* 30(1): 13-21, 2008.
- 10) Yoshida S, Gatanaga H, Itoh T, Fujino M, Kondo M, Sadamasu K, Kaneda T, Gejyo F, Shirasaka T, Mori H, Ueda M, Takata N, Minami R, Suigura W and the Japanese Drug Resistance HIV-1 Surveillance Network: Prevalence of drug resistance associated mutations in newly diagnosed HIV/AIDS patients in Japan from 2003-2007. *Antiviral Therapy* 13(3): A162, 2008.
- 11) Okuma K, Tanaka R, Ogura T, Ito M, Kumakura S, Yanaka M, Nishizawa M, Sugiura W, Yamamoto N, Tanaka Y: Interleukin-4-transgenic hu-PBL-SCID mice: a model for the screening of antiviral drugs and immunotherapeutic agents against X4 HIV-1 viruses. *J Infect Dis* 197: 134-141, 2008.
- 12) Bandaranayake RM, Prabu-Jeyabalan M, Kakizawa J, Sugiura W, and Schiffer C: Structural analysis of human immunodeficiency virus type 1 CRF01_AE protease in

- complex with the subtype p1-p6. *J Virol* 82(13):6762-6766, 2008.
- 13) Liu P, Xiang K, Tang H, Zhang W, Wang X, Tong X, Takebe Y, Yang R: Molecular epidemiology of human immunodeficiency virus type 1 and hepatitis C virus in former blood donors in central China. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 24(1): 1-6, 2008.
 - 14) Takebe Y, Uenishi R, and Li XJ: Global molecular epidemiology of HIV: Understanding the genesis of AIDS pandemic. "HIV-1: Molecular biology and pathogenesis" (Kuan Teh Jeang ed), *Advances in Pharmacology* 56, p1-p25, 2008.
 - 15) Xia X, Lu L, Tee KK, Zhao W, Wu J, Yu J, Li X, Lin Y, Mukhtar MM, Hagedorn CH, Takebe Y: The unique HCV genotype distribution and the discovery of a novel subtype 6u among IDUs co-infected with HIV-1 in Yunnan, China. *J Med Virol*. 80(7): 1142-1152, 2008.
 - 16) Shinizu N, Tanaka A, Mori T, Ohtsuki T, Hoque A, Jinno-Oue A, Apichartpiyakul C, Kusagawa S, Takebe Y, Hoshino H: A formylpeptide receptor FPRL1, acts as an efficient coreceptor for primary isolates of human immunodeficiency virus. *Retrovirology* 25(Jun): 5-52, 2008.
 - 17) Tee KK, Pybus OG, Li XJ, Han X, Shang H, Kamarulzaman A, Takebe Y: Temporal and spatial dynamics of human immunodeficiency virus type 1 circulating recombinant forms 08 BC and 07 BC in Asia. *J Virol* 82(18): 9206-9215, 2008.
 - 18) Xia X, Zhao W, Tee KK, Feng Y, Takebe Y, Li Q, Pybus OG, Lu L: Complete genome sequencing and phylogenetic analysis of HCV isolates from China reveals a new subtype designated 6u. *J Med Virol* 80 (10): 1740-1746, 2008.
 - 19) Tee KK, Takebe Y, Kamarulzaman A: Emerging and re-emerging viruses in Malaysia, 1997-2007. *Int J Infect Dis* 13(3): 307-318, 2008.
 - 20) Urano E, Kariya Y, Futahashi Y, Ichikawa R, Hamatake M, Fukazawa H, Morikawa Y, Yoshida T, Koyanagi Y, Yamamoto N, Komano J: Identification of the P-TEFb complex-interacting domain of Brd4 as an inhibitor of HIV-1 replication by functional cDNA library screening in MT-4 cells. *FEBS Lett* 582 (29): 4053-4058, 2008.
 - 21) Hamatake M, Aoki T, Futahashi Y, Urano E, Yamamoto N, Komano J: Ligand-independent higher-order multimerization of CXCR4, a G-protein-coupled chemokine receptor involved in the targeted metastasis. *Cancer Sci* 100(1): 95-102, 2008.
 - 22) Urano E, Aoki T, Futahashi Y, Murakami T, Morikawa Y, Yamamoto N, Komano J: Substitution of the myristoylation signal of human immunodeficiency virus type 1 Pr55Gag with the phospholipase C delta 1 pleckstrin homology domain results in infectious pseudovirus production. *J Gen Virol* 89 (Pt 12): 3144-3149, 2008.
 - 23) Urano E, Shimizu S, Futahashi Y, Hamatake M, Morikawa Y, Takahashi N, Fukazawa H, Yamamoto N, Komano J: Cyclin K/CPR4 inhibits primate lentiviral replication by inactivating Tat/positive transcription elongation factor b-dependent long terminal repeat transcription. *AIDS* 22(9): 1081-1083, 2008.
 - 24) Yoshida T, Kawano Y, Sato K, Ando Y, Aoki J, Miura Y, Komano J, Tanaka Y, Koyanagi Y: A CD63 mutant inhibits T-cell tropic human immunodeficiency virus type 1 entry by disrupting CXCR4 trafficking to the plasma membrane. *Traffic* 9(4): 540-558, 2008.
 - 25) Komano J, Hamatake M, and Yamamoto N: Analyses of long-term surviving HIV-infected Japanese patients with coagulation disorders hint at novel means to prevent and treat HIV/AIDS (review). (Kashiwazaki M ed), *Challenging practices on HIV/AIDS in Japan 2008*, JFAP publications, p97-p99, 2008.
 - 26) Tanaka T, Tsutsumi H, Nomura W, Tanabe Y, Ohashi N, Esaka A, Ochiai C, Sato J, Itotani K, Murakami T, Ohba K, Yamamoto N, Fujii N, and Tamamura H: Structure-activity relationship study of CXCR4 antagonists bearing the cyclic pentapeptide scaffold: identification of the new pharmacophore. *Org Biomol Chem* 6(23): 4374-4377, 2008.
 - 27) Murakami T: Roles of the interactions between Env and Gag proteins in the HIV-1 replication cycle (Review)? *Microbiol Immunol* 52(5): 287-295, 2008.
 - 28) Sugimoto C, Nakayama EE, Shioda T, Villinger F, Ansari AA, Yamamoto N, Suzuki Y, Nagai Y and Mori K: Impact of glycosylation on antigenicity of simian immunodeficiency virus SIV239: induction of rapid V1/V2 specific non-neutralizing antibody and delayed neutralizing antibody following infection with an attenuated deglycosylated Mutant. *J Gen Virol* 89: 554-566, 2008.
 - 29) Xing HQ, Mori K, Sugimoto C, Ono F, Izumo K, Kubota

- R, Izumo S: Impaired astrocytes and diffuse activation of microglia in the cerebral cortex in simian immunodeficiency virus-infected Macaques without simian immunodeficiency virus encephalitis. *J Neuropathol Exp Neurol* 67: 600-611, 2008.
- 30) Onlamoon N, Rogers K, Mayne AE, Pattanapanyasat K, Mori K, Villinger F, and Ansari AA: Soluble PD-1 rescues the proliferative response of simian immunodeficiency virus-specific CD4 and CD8 T cells during chronic infection. *Immunology* 124: 277-293, 2008.
- 31) Dewan MZ, Takamatsu N, Hidaka T, Hatakeyama K, Nakahata S, Fujisawa J, Katano H, Yamamoto N, Morishita K: Critical role of TSLC1 expression in the growth and organ-infiltration of adult T-cell leukemia cells in vivo. *J Virol* 82(23): 11958-11963, 2008.
- 32) Saitoh T, Fujita N, Jang MH, Uematsu S, Yang BG, Satoh T, Omori H, Noda T, Yamamoto N, Komatsu M, Tanaka K, Kawai T, Tsujimura T, Takeuchi O, Yoshimori T and Akira S: Loss of Atg16L1, an autophagy regulator, enhances endotoxin-induced IL-1 β production. *Nature* 456(7219): 264-268, 2008.
- 33) Haga S, Yamamoto N, Nakai-Murakami C, Osawa Y, Tokunaga K, Sata T, Yamamoto N, Sasazuki T, Ishizaka Y: Modulation of TNF-alpha-converting enzyme by the spike protein of SARS-CoV and ACE2 induces TNF-alpha production and facilitates viral entry. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(22): 7809-7814, 2008.
- 34) Saitoh Y, Yamamoto N, Dewan MZ, Sugimoto H, Martinez Bruyn VJ, Iwasaki Y, Matsubara K, Qi X, Saitoh T, Imoto I, Inazawa J, Utsunomiya A, Watanabe T, Masuda T, Yamamoto N, Yamaoka S: Overexpressed NF-kappaB-inducing kinase contributes to the tumorigenesis of adult T-cell leukemia and Hodgkin Reed-Sternberg cells. *Blood* 111(10): 5118-5129, 2008.
- 35) Terunuma H, Deng X, Dewan MZ, Fujimoto S and Yamamoto N: Potential role of NK cells in the induction of immune responses: Implications for NK cell-based immunotherapy for cancers and viral infections. *Int Rev Immunol* 27(3): 93-110, 2008.
- 36) Jeong SJ, Ryo A, Yamamoto N: The prolyl isomerase Pin1 stabilizes the human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) Tax oncoprotein and promotes malignant transformation. *Biochem Biophys Res Commun* 381(2): 294-299, 2009.
- 37) Ryo A, Wulf G, Lee TH, Lu KP: Pinning down HER2-ER crosstalk in SMRT regulation. *Trends Biochem Sci* 34(4): 162-165, 2009.
- 38) Suzuki H, Kidokoro M, Fofana IB, Ohashi T, Okamura T, Matsuo K, Yamamoto N, Shida H: Immunogenicity of newly constructed attenuated vaccinia strain LC16m8Delta that expresses SIV Gag protein. *Vaccine* 27(7): 966-971, 2009.
- 39) Nishi M, Ryo A, Tsurutani N, Ohba K, Sawasaki T, Morishita R, Perrem K, Aoki I, Morikawa Y, Yamamoto N: Requirement for microtubule integrity in the SOCS1-mediated intracellular dynamics of HIV-1 Gag. *FEBS Lett* 583(8): 1243-1250, 2009.
- 40) Ohba K, Ryo A, Dewan MD, Nishi M, Naito T, Qi X, Inagaki Y, Okamoto T, Terashima K, Yamamoto N: Follicular dendritic cells activate HIV-1 replication in monocytes/macrophages through a juxtacrine mechanism mediated by P-selectin glycoprotein ligand-1. *J Immunol* 183(1): 524-532, 2009.
- 41) Liao H, Tee KK, Hase S, Uenishi R, Li XJ, Kusagawa S, Thang PH, Hien NT, Pybus OG, and Takebe Y: Phylodynamic analysis of the dissemination of HIV-1 CRF01_AE in Vietnam. *Virology* 391(1): 51-56, 2009.
- 42) Iwasaki Y, Akari H, Murakami T, Kumakura S, Dewan Z, Yanaka M, and Yamamoto N: Efficient inhibition of SDF-1 α -mediated chemotaxis and HIV-1 infection by novel CXCR4 antagonists. *Cancer Sci* 100: 778-781, 2009.
- 43) Murakami T, Eda Y, Nakasone T, Ami Y, Someya K, Yoshino N, Kaizu M, Izumi Y, Matsui H, Shinohara K, Yamamoto N, Honda M: Postinfection passive transfer of KD-247 protects against simian/human immunodeficiency virus-induced CD4+ T-cell loss in macaque lymphoid tissue. *AIDS* 23(12): 1485-1494, 2009.
- 44) Nonaka M, Uota S, Saitoh Y, Takahashi M, Sugimoto H, Amet T, Arai A, Miura O, Yamamoto N, Yamaoka S: Role for protein geranylgeranylation in adult T-cell leukemia cell survival. *Exp Cell Res* 315(2): 141-150, 2009.
- 45) Dewan MZ, Tomita M, Katano H, Yamamoto N, Ahmed S, Yamamoto M, Sata T, Mori N, Yamamoto N: An HIV protease inhibitor, ritonavir targets the nuclear factor-kappaB and inhibits the tumor growth and infiltration of EBV-positive lymphoblastoid B cells. *Int J*

- Cancer 124(3): 622-629, 2009.
- 46) Barnor JS, Habu Y, Yamamoto N, Miyano-Kurosaki N, Ishikawa K, Yamamoto N, Takaku H: Inhibition of HIV-1 replication by long-term treatment with a chimeric RNA containing shRNA and TAR decoy RNA. *Antiviral Res* 83: 156-164, 2009.
 - 47) Ono Y, Terashima K, Liu A, Yokoyama M, Yokoshima K, Mizukami M, Watanabe K, Mochimaru Y, Furusaka T, Shimizu N, Yamamoto N, Ishiwata T, Sugisaki Y, Yagi T, Naito Z: Follicular dendritic cell sarcoma with microtubuloreticular structure and virus-like particle production in vitro. *Pathol Int* 59(5): 332-344, 2009.
 - 48) Tomita M, Dewan MZ, Yamamoto N, Kikuchi A, Mori N. Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 activates beta-catenin signaling in B lymphocytes. *Cancer Sci* 100(5): 807-812, 2009.
 - 49) Kamiyama H, Yoshii H, Tanaka Y, Sato H, Yamamoto N, Kubo Y: Raft localization of CXCR4 is primarily required for X4-tropic human immunodeficiency virus type 1 infection. *Virology* 386(1): 23-31, 2009.
 - 50) Kobayashi S, Wada A, Shibasaki S, Annaka M, Higuchi H, Adachi K, Mori N, Ishikawa T, Masuda Y, Watanabe H, Yamamoto N, Yamaoka S, Inamatsu T: Spread of a large plasmid carrying the cpe gene and the tcp locus amongst *Clostridium perfringens* isolates from nosocomial outbreaks and sporadic cases of gastroenteritis in a geriatric hospital. *Epidemiol Infect* 137(1): 108-113, 2009.
 - 51) Honda M, Wang R, Kong WP, Kanekiyo M, Akahata W, Xu L, Matsuo K, Natarajan K, Robinson H, Asher TE, Price DA, Douek DC, Margulies DH, Nabel GJ: Different vaccine vectors delivering the same antigen elicit CD8+ T cell responses with distinct clonotype and epitope specificity. *J Immunol* 183(4):2425-2434, 2009.
 - 52) Miyakawa K, Ryo A, Murakami T, Ohba K, Yamaoka S, Fukuda M, Guatelli J, Yamamoto N:BCA2/Rabring7 promotes tetherin-dependent HIV-1 restriction. *PLoS Pathog*, in press.
 - 53) Zhou W, Yang Q, Low CB, Karthik BC, Wang Y, Ryo A, Yao SQ, Yang D, Liou YC: Pin1 catalyzes conformational changes of Thr187 in p27Kip1 and mediates its stability through a poly-ubiquitination process. *J Biol Chem*, in press.
 - 54) Tanaka N, Mamemura T, Abe S, Imabayashi K, Kashiwada Y, Takaishi Y, Suzuki T, Takebe Y, Kubota T, and Kobayashi J: Biyoanthones A-D, prenylated xanthones from roots of hypericum chinense. *Vaccine*, in press.
 - 55) Takebe Y, Liao H, Hase S, Uenishi R, Li Y, Li X-J, Han X, Shang H, Kamarulzaman A, Yamamoto N, Pybus OG, and Tee KK: Reconstructing the epidemic history of HIV-1 circulating recombinant forms CRF07_BC and CRF08_BC in East Asia: the relevance of genetic diversity and phylodynamics for vaccine strategies. *Vaccine*, in press.
 - 56) Fuji H, Urano E, Futahashi Y, Hamatake M, Tatsumi J, Hoshino T, Morikawa Y, Yamamoto N, Komano J: Derivatives of 5-nitro-furan-2-carboxylic acid carbamoylmethyl ester inhibit RNase H activity associated with HIV-1 reverse transcriptase. *J Med Chem*, in press.
 - 57) Xing HQ, Moritoyo T, Mori K, Sugimoto C, Ono F, Izumo S: Expression of proinflammatory cytokines and its relationship with virus infection in the brain of macaques inoculated with macrophage-tropic simian immunodeficiency virus. *Neuropathology*, in press.
 - 58) Yajima M, Imadome K, Nakagawa A, Watanabe S, Terashima K, Nakamura H, Ito M, Shimizu N, Honda M, Yamamoto N, and Fujiwara S: T-cell-mediated control of Epstein-Barr virus infection in humanized mice. *J Inf Dis*, in press.
 - 59) Dewan MZ, Takada M, Terunuma H, Deng X, Ahmed S, Yamamoto N, Toi M: Natural killer activity of peripheral-blood mononuclear cells in breast cancer patients. *Biomed Pharmacother*, in press.
2. 和文発表
 - 1) 梁 明秀 : HIV 感染症における細胞生物学. *細胞* 40(11): 458-461, 2008.
 - 2) 上西理恵、長谷彩希、Liao Huanan、武部 豊 : C 型肝炎ウイルスに対する新規治療薬の開発動向. *Pharm Stage* 8(3):1-5, 2008.
 - 3) 武部 豊、上西理恵 : HCV エントリー・粒子形成阻害剤 : 新規クラス薬剤スクリーニング. *肝胆膵 : 特集 C 型肝炎のすべて* 2008. Vol.57 (Nov.): 1047-1056. 2008.
 - 4) 小杉伊三夫、梁 明秀 : 幹細胞とウイルス感染症. *幹細胞の基礎研究 細胞医療 Update*. *医学のあゆみ*, 229(9): 720-725, 2009.
 - 5) 村上 努 : HIVの粒子形成のメカニズム—Gag蛋白に

関する最新の知見— Confronting HIV2009 35: 5-7, 2009.

II. 学 会 発 表

1. 国際学会

- 1) Tee KK, Pybus O, Parker J, Ng KP, Kamarulzaman A, Takebe Y: Timing of HIV-1 recombination: a novel approach. Keystone Symposia, Apr. 8-13, 2008, USA.
- 2) Yamamoto N: Humanized NOD/SCID/IL2R γ ^{-/-} (NOG) mice models for human retroviral and EBV infection: Studies on persistent infection, lympho-proliferative/degenerative disorders, and immune responses. 2nd Annual Humanized SCID Mouse Models: Stem Cells, Cancer and Viral Pathogenesis, May 14-15, 2008, Geneva, New York, USA.
- 3) Aoki T, Shimizu S, Urano E, Futahashi Y, Hamatake M, Terashima K, Tamamura H, Murakami T, Morikawa Y, Yamamoto N, Komano J: Functional substitution of the myristoylation signal of HIV-1 gag with phospholipase c delta 1 pleckstrin homology domain. CSHL Meeting on Retroviruses, May 19-24, 2008, CSH, NY, USA.
- 4) Urano E, Kariya Y, Futahashi Y, Hamatake M, Morikawa Y, Yoshida T, Koyanagi Y, Yamamoto N, Komano J: Identification of the carboxy-terminal domain of bromodomain containing 4 as a specific silencer of HIV-1 replication. CSHL Meeting on Retroviruses, May 19-24, 2008, CSH, NY, USA.
- 5) Yoshida T, Kawano Y, Ando Y, Sato K, Komano J, Tanaka Y, Koyanagi Y: A CD63 mutant inhibits CXCR4 trafficking to the plasma membrane and blocks X4 HIV-1 entry. CSHL Meeting on Retroviruses, May 19-24, 2008, CSH, NY, USA.
- 6) Takebe Y: Molecular epidemiology of HIV in Asia: understanding the genesis of Asia's expanding AIDS epidemic. 7th Japan-China International Conference of Virology, Jun. 1-3, 2008, Tokyo, Japan.
- 7) Yoshida S, Gatanaga H, Itoh T, Fujino M, Kondo M, Sadamasu K, Kaneda T, Gejyo F, Shirasaka T, Mori H, Ueda M, Takata N, Minami R, Suigura W and the Japanese Drug Resistance HIV-1 Surveillance Network: Prevalence of drug resistance associated mutations in newly diagnosed HIV/AIDS patients in Japan from 2003-2007. 17th International HIV Drug Resistance Workshop, Jun. 10-14, 2008, Sitges, Spain.
- 8) Ohba K, Ryo A, Terashima K, Yamamoto N: Follicular dendritic cells activate HIV-1 replication through a juxtacrine mechanism mediated by P-selectin glycoprotein ligand-1. 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Sep. 7-11, 2008, Hyogo, Japan.
- 9) Urano E, Kariya Y, Hamatake M, Fukazawa H, Morikawa Y, Koyanagi Y, Yamamoto N, Komano: P-TEFb complex-interacting domain of Brd4 inhibits HIV-1 replication through restricting Tat-mediated enhancement of LTR promoter activity. 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity Awaji 2008, Sep. 7-11, 2008, Awaji Island, Hyogo, Japan.
- 10) Aoki T, Shimizu S, Urano E, Hamatake M, Terashima K, Tamamura H, Murakami T, Morikawa Y, Yamamoto N, Komano J: Substitution of the myristoylation signal of HIV-1 Pr55Gag with PLC delta pleckstrin homology domain results in fully infectious pseudovirion production. 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity Awaji 2008, Sep. 7-11, 2008, Awaji Island, Hyogo, Japan.
- 11) Hamatake M, Futahashi Y, Aoki T, Yamamoto N, Komano J: Detection of ligand-independent higher-order oligomerization state of a G-protein-coupled receptor CXCR4 by BiFC/BRET. 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity Awaji 2008, Sep. 7-11, 2008, Awaji Island, Hyogo, Japan.
- 12) Ryo A: Identification of host factors required for HIV-1 Gag trafficking. US-Japan Cooperative Medical Science Program AIDS Panel, Sep. 12, 2008, Tokyo, Japan.
- 13) Yamamoto N: Study of HIV and EBV infection in the humanized NOG mice system. US-Japan Cooperative Medical Science Program AIDS Panel, Sep. 12, 2008, Tokyo, Japan.
- 14) Yamamoto N: Humanized NOG SCID mouse models for HIV/AIDS research. HIV/AIDS Symposium-Where did we start, where are we now, and where are we heading? Sep. 25-26, 2008, Goettingen, Germany.
- 15) Ryo A: Use of cell-free protein synthesis system in HIV/AIDS research. 6th PIM(Protein Island Matsuyama) International Symposium 2008, Sep. 25-27, 2008, Matsuyama, Japan.
- 16) Masaoka T, Sawasaki T, Sugiura W, Endo Y, Yamamoto N, Ryo A: Detection and characterization of HIV-1 resistance by cell-free protein production system. 6th PIM(Protein Island Matsuyama) International

- Symposium 2008, Sep. 25-27, 2008, Matsuyama, Japan.
- 17) Takahama S, Sawasaki T, Akagi T, Endo Y, Yamamoto N, Ryo A: Atypical protein kinase C (aPKC), a cell polarity regulating kinase, phosphorylates HIV-1 Gag. 6th PIM(Protein Island Matsuyama) International Symposium 2008, Sep. 25-27, 2008, Matsuyama, Japan.
 - 18) Ryo A: Detection and Identification of HIV-1 resistance and crucial host factors by cell-free protein production system. 4th International Infection Control Conference of Theodore Bilharz Research Institute (TBRI), Nov. 10-13, 2008, TBRI, Giza, Egypt.
 - 19) Mori K, Sugimoto C, Nakamura, Ono F, Nagai Y, Suzuki Y, and Yamamoto N: Tropism of SIV infection determines pathogenicity and induction of protective response against pathogenic SIV infection. 26th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS. Dec. 9-12, 2008, San Juan, Puerto Rico.
 - 20) Miyakawa K, Ryo A, Ohba K, Yamamoto N: Inhibition of HIV-1 particle production by a tetherin-interacting protein. Keystone Symposia, Mar. 22-27, 2009, Keystone Resort, Colorado, USA.
 - 21) Takahama S, Sawasaki T, Okayama A, Akagi T, Endo Y, Yamamoto N, Ryo A: Atypical protein kinase C (aPKC), a cell polarity regulating kinase, phosphorylates HIV-1 Gag. Keystone Symposia, Mar. 22-27, 2009, Keystone Resort, Colorado, USA.
2. 国内学会
- 1) 武部 豊: HCV エントリー阻害剤の同定とその解析: ポスト-HAART 時代のエイズ治療戦略の開発に向けて. 第 82 回日本感染症学会, 2008 年 4 月 17-18 日, 松江.
 - 2) 武部 豊: CD81 を標的とする HCV エントリー阻害剤候補の同定とその解析. 第 18 回抗ウイルス療法研究会, 2008 年 5 月 23-24, 鹿児島.
 - 3) 西真由子, 山本直樹, 青木一郎, 梁 明秀: SOCS1 は HIV-1 Gag タンパク質の細胞内輸送を促進する. 第 27 回分子病理学研究会, 2008 年 8 月 2-3 日, 神奈川.
 - 4) Ryo A, Yamamoto N: Identification of host factors required for HIV-1 Gag trafficking. 第 9 回熊本エイズセミナー, 2008 年 9 月 18-19 日, 熊本.
 - 5) Ohba K, Ryo A, Terashima K, Yamamoto N: Follicular dendritic cells activate HIV-1 replication through a juxtacrine mechanism mediated by P-selectin glycoprotein ligand-1. 第 9 回熊本エイズセミナー, 2008 年 9 月 18-19 日, 熊本.
 - 6) Takahama S, Sawasaki T, Akagi T, Endo Y, Yamamoto N, Ryo A: Atypical protein kinase C (aPKC), a cell polarity regulating kinase, phosphorylates HIV-1 Gag. 第 9 回熊本エイズセミナー, 2008 年 9 月 18-19 日, 熊本.
 - 7) 岩谷靖雅, 吉居廣朗, 武田 哲, 杉浦 互: HIV-1 Vif 依存的な APOBEC3G のユビキチン化サイトの同定. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会. 2008 年 10 月 26-28 日, 岡山.
 - 8) 廖 華南, Kok Keng Tee, 長谷彩希, 上西理恵, LiXiao-jie, Adeeba Kamarulzaman, 草川 茂, PhamHong Thang, Nguyen tran Hien, Xiaoxu Han, Hong Shang, Pybus Oliver, 武部 豊: HIV-1 組換え型流行株のアジアにおける感染拡大の年代推定. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会. 2008 年 10 月 26-28 日, 岡山.
 - 9) 武部 豊, 上西理恵, 納富香子, 廖 華南, 長谷彩希, 鈴木哲朗, 脇田隆宇, 袴田 航: CD81 を標的とする新しいクラスの低分子性 HCV エントリー阻害剤の同定. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会. 2008 年 10 月 26-28 日, 岡山.
 - 10) 上西理恵, 廖 華南, 袴田 航, 納富香子, 長谷彩希, 赤澤大輔, 鈴木哲朗, 脇田隆宇, 武部 豊: HCV JFH-1 infectivity assay を用いた低分子 HCV 阻害剤の探索とその評価. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会. 2008 年 10 月 26-28 日, 岡山.
 - 11) 駒野 淳, 浦野恵美子, 刈屋祐美, 二橋悠子, 市川玲子, 濱武牧子, 深觸秀輔, 森川裕子, 芳田 剛, 小柳義夫, 山本直樹: T細胞における HIV-1 抵抗性遺伝子のスクリーニング - Brd4 C 末端ドメインの同定とその機能解析. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会. 2008 年 10 月 26-28 日, 岡山.
 - 12) 浦野恵美子, 奥長浩之, 森川裕子, 駒野 淳: DNA J/HSP40 Co-chaperone family による HIV-1 複製抑制. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会. 2008 年 10 月 26-28 日, 岡山.
 - 13) 村上 努, 大隈 和, 田中礼子, 濱武牧子, 駒野 淳, 田中勇悦, 山本直樹: KRH-3955: 新規 CXCR4 アンタゴニストは経口投与可能な高活性抗 HIV-1 剤である. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会. 2008 年 10 月 26-28 日, 岡山.
 - 14) 駒野 淳, 濱武牧子, 青木 徹, 浦野恵美子, 二橋悠子, 山本直樹: BiFC/BRET による癌転移増強分子 CXCR4 の Ligand 非依存的な多量体形成の解析. 第 67 回日本癌学会学術総会, 2008 年 10 月 28-30 日, 名古屋.

- 15) 梁 明秀, 山本直樹: 無細胞タンパク質合成系を用いたHIV/AIDS研究の新たな展開. 第22回日本エイズ学会学術集会・総会, 2008年11月26-28日, 大阪.
- 16) 仲宗根正, 網 康至, 梁 明秀, 山本直樹: ウイルス曝露非感染サルモデル開発の試み. 第22回日本エイズ学会学術集会・総会, 2008年11月26-28日, 大阪.
- 17) 高橋良明, 村上 努, 駒野 淳, 吉田篤司, 田中礼子, 田中勇悦, 山本直樹: 宿主由来タンパクOX40L,OX40のHIV-1感染に与える影響. 第22回日本エイズ学会学術集会・総会, 2008年11月26-28日, 大阪.
- 18) 正岡崇志, 梁 明秀, 巽 正志, 杉浦 互, 森下 了, 澤崎達也, 山本直樹: 酵素活性を指標とした新規HIVプロテアーゼ薬剤耐性検査法の開発. 第22回日本エイズ学会学術集会・総会, 2008年11月26-28日, 大阪.
- 19) 宮川 敬, 梁 明秀, 大庭賢二, 村上 努, 山本直樹: RINGフィンガー蛋白質BCA2はHIV-1粒子産生を阻害する. 第22回日本エイズ学会学術集会・総会, 2008年11月26-28日, 大阪.
- 20) 鈴木 元, 木所 稔, 松尾和浩, 山本直樹, 大橋 貴, 志田壽利: SIV Gag発現ワクシニアm8Δ株の免疫原性の検討. 第22回日本エイズ学会学術集会・総会, 2008年11月26-28日, 大阪.
- 21) 宮崎菜穂子, 松下修三, 藤井 毅, 岩本愛吉, 杉浦 互: 既治療患者における薬剤耐性(多剤耐性) HIV の現状調査. 第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2008年 11 月 26-28 日, 大阪.
- 22) 岩谷靖雅, 吉居廣朗, 武田 哲, 杉浦 互: APOBEC3G の HIV-1 Vif に依存したユビキチン化サイトに関する研究. 第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2008年 11 月 26-28 日, 大阪.
- 23) 柴田潤子, 岩谷靖雅, 任 鳳蓉, 田中 博, 杉浦 互: HIV-1 ゲノム RNA における poly (A) 付加部位に関する研究. 第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2008年 11 月 26-28 日, 大阪.
- 24) 大出裕高, 横山 勝, 佐藤裕徳, 伊部史朗, 藤崎誠一郎, 間宮均人, 濱口元洋, 杉浦 互, 横幕能行: HIV-1 プロテアーゼにおける耐性変異 L89V の立体的影響. 第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2008年 11 月 26-28 日, 大阪.
- 25) 星野忠次, 辰巳絢子, 篠原祐子, 大出裕高, 杉浦 互: コンピューターによる薬剤耐性 HIV-1 に対する薬効予測の試み. 第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2008年 11 月 26-28 日, 大阪.
- 26) 横幕能行, 大出裕高, 間宮均人, 濱口元洋, 伊部史朗, 藤崎誠一郎, 藤崎菜穂子, 金田次弘, 杉浦 互: Enfuvirtide (T-20)+raltegravir (RAL)+darunavir (DRV)+etravirine(TMC125)+lamivudine (3TC) の多剤高度耐性 HIV-1 感染症に対する治療効果. 第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2008年 11 月 26-28 日, 大阪.
- 27) 杉浦 互, 湯永博之, 吉田 繁, 千葉 仁志, 小池隆夫, 伊藤俊広, 原 孝, 佐藤武幸, 石ヶ坪良明, 上田敦久, 近藤真規子, 今井光信, 貞升健志, 長島真美, 福武勝幸, 山本泰之, 田中理恵, 加藤真吾, 宮崎菜穂子, 藤井 毅, 岩本愛吉, 藤野真之, 仲宗根 正, 巽 正志, 椎野禎一郎, 岡 慎一, 林田庸総, 服部純子, 伊部史朗, 藤崎誠一郎, 金田次弘, 濱口元洋, 上田幹夫, 大家正泰, 田邊嘉也, 渡辺香奈子, 渡邊 大, 白阪琢磨, 栗原 健, 森 治代, 小島洋子, 高田 昇, 木村昭郎, 南 留美, 山本政弘, 松下修三, 健山正男, 藤田次郎: 2003-2007 年の新規 HIV-1 感染者における薬剤耐性頻度の動向. 第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2008年 11 月 26-28 日, 大阪.
- 28) 長谷彩希, 上西理恵, 廖 華南, 草川 茂, 人見重美, 武部 豊: 日本における HIV-1 感染症の最近動向: 東関東地域における新知見. 第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2008年 11 月 26-28 日, 大阪.
- 29) 椎野禎一郎, 貞升健志, 長島真美, 杉浦 互: HIV-1 薬剤耐性変異の感染者集団における固定/消失時間の解析. 第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2008年 11 月 26-28 日, 大阪.
- 30) 巽 正志, 梅木優子, 竹川奈穂, 松田昌和, 橋本 修, 西澤雅子, 石古博昭, 杉浦 互, 山本直樹: 薬剤耐性ウイルスの感染性分子クローンを軸にした Genotype と Phenotype をつなぐ実験解析系について. 第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2008年 11 月 26-28 日, 大阪.
- 31) 巽 正志, 柚木久雄, 百瀬俊也, 日野 学, 田所憲治, 山口一成, 水落利男, 山本直樹: 日赤献血由来陽性血漿による感染研 HIV パネル整備. 第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2008年 11 月 26-28 日, 大阪.
- 32) 巽 正志, 梅木優子, 竹川奈穂, 水落利男, 山本直樹: 感染性分子クローンによる第 4 世代抗体・抗原同時測定 HIV 診断キットの抗原検出感度の比較. 第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2008年 11 月 26-28 日, 大阪.
- 33) 小林明子, 芳田 剛, 駒野 淳, 小柳義夫: レンチウイルスベクターを用いた抗HIV因子のスクリーニングとその解析. 第22回日本エイズ学会学術集会・総会, 2008年11月26-28日, 大阪.

- 34) 浦野恵美子, 奥長浩之, 森川裕子, 山本直樹, 駒野淳: Inhibition of HIV-1 replication by co-chaperone DNA J/HSP40 protein family. 第22回日本エイズ学会学術集会・総会, 2008年11月26-28日, 大阪.
- 35) 青木 徹, 清水佐紀, 浦野恵美子, 濱武牧子, 寺嶋一夫, 玉村啓和, 村上 努, 森川裕子, 山本直樹, 駒野淳: HIV-1 Pre55Gagのミリスチル基非依存性ウイルス粒子産生と感染性. 第22回日本エイズ学会学術集会・総会, 2008年11月26-28日, 大阪.
- 36) 村上 努, 大隈 和, 田中礼子, 仲宗根正, 濱武牧子, 駒野 淳, 谷中幹郎, 田中勇悦, 山本直樹: KRH-3955は経口投与可能な高活性抗X4 HIV-1阻害剤である. 第22回日本エイズ学会学術集会・総会, 2008年11月26-28日, 大阪.
- 37) 森 一泰, 杉本智恵, 成瀬妙子, 椎野禎一郎, 武部 豊, 木村彰方, 山本直樹, 永井美之: Heterologous SIV 感染モデルによる多様性ウイルス感染を防御する宿主応答の解析. 第22回日本エイズ学会学術集会・総会, 2008年11月26-28日, 大阪.
- 38) Toru Aoki, Saki Shimizu, Emiko Urano, Makiko Hamatake, Kazuo Terashima, Hirokazu Tamamura, Tsutomu Murakami, Yuko Morikawa, Naoki Yamamoto, Jun Komano: Substitution of the myristoylation signal of HIV-1 Pr55Gag with PLC delta 1 pleckstrin homology domain results in fully infectious pseudovirion production. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会, 2008年12月9-12日, 神戸.
- 39) Emiko Urano, Yumi Kariya, Makiko Hamatake, Hidesuke Fukazawa, Yuko Morikawa, Yoshio Koyanagi, Naoki Yamamoto, Jun Komano: P-TEFb complex-interacting domain of Brd4 inhibits HIV-1 replication through restricting Tat-mediated enhancement of LTR promoter activity. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会, 2008年12月9-12日, 神戸.
- 40) Makiko Hamatake, Yuko Futahashi, Toru Aoki, Naoki Yamamoto, Jun Komano: Detection of ligand-independent higher-order oligomerization state of a G-protein-coupled receptor CXCR4 by BiFC/BRET. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会, 2008年12月9-12日, 神戸.
- 41) 宮本寛治, 橋本麻衣, 中川洋一, 小花祐太, 坪井一輝, 有馬恵里子, 武田 哲, 梁 明秀, 阪井弘治, 山本直樹, 清野 透, 伊藤嘉浩: フィーダーフリーによる不死化したヒト羊膜細胞から iPS 細胞作製. 第8回日本再生医療学会総会, 2009年3月5-6日, 東京.
- 42) 松村隆紀, 高野哲也, 阪井弘治, 武田 哲, 梁 明秀, 宮本寛治, 山本直樹: ヒト腎上皮細胞からの iPS 細胞の樹立. 第8回日本再生医療学会総会, 2009年3月5-6日, 東京.
- 43) 梁 明秀: 宿主因子とHIVの相互作用研究. 第9回プロテオーム医療創薬研究会, 2009年3月6-7日, 神奈川.