

# 分担研究報告書

## A. 抗 HIV 薬の開発および治療成績



## 薬剤耐性HIV-1変異株の発現様式と フィットネスの解析

満屋 裕明、吉村 和久

熊本大学医学部内科学 第二講座

### 研究要旨

この数年、AIDS及びHIV-1感染症の治療は長足の進歩を遂げた。プロテアーゼ阻害剤 (protease inhibitors, PIs)とヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤 (nucleoside reverse transcriptase inhibitors, NRTIs)や非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤 (non- nucleoside reverse transcriptase inhibitors, NNRTIs)を組み合わせた、多剤併用療法 (highly active anti-retroviral therapy, HAART)の登場により、AIDSによる死亡者数の減少が各国で報告されている。しかし、一方で、HIV-1がこれらの薬剤に対して耐性を獲得し、しかもその多くが交叉耐性を示しているため、治療抵抗となる症例が増えてきている。しかも耐性を獲得したウイルスが伝播し、初感染にも関わらず耐性ウイルス株を保有する感染者が増加してきている。治療開始や変更時には、詳細なウイルスシーケンスの情報が臨床上有用であるとの報告も増加していると同時に、それらの変異を持つウイルスのフェノタイプの検索の必要性も増してきている。そこで我々は、HIV-1競合阻害試験(competitive HIV-1 replication assay, CHRA)を開発し、2種類の感染性HIV-1クローンを競合的に増殖させ、いずれのクローンが優勢になるかを検討することで、増殖能 (fitness)とアミノ酸変異との詳細な分析を可能にした。今回、我々は新規のRTIであるQYL-685は2,6-diaminopurineにphenylphosphoralaninate (PPA)を持つ特異な構造をしており、HIV-1や、HIV-2に対して強い抗ウイルス効果を示すだけでなく、AZT耐性HIV-1に対しても活性を保持していることを明らかにした。QYL-685の存在下にHIV-1を培養し、徐々に薬剤の濃度を上げていき cell freeで継代していくとQYL-685に対して耐性を示すウイルスが得られた。これらのウイルスは3TCの耐性ウイルスに見られる M184Iの変異が調べた全クローンでみられた(14/14)。CHRAを用いた検討により、薬剤の存在下では野生株のウイルスより184番に変異を持つウイルスの方が明らかに増殖能がよいことが確認され、184の変異がQYL-685の耐性に関与した変異であることが証明された。

分担研究者：満屋裕明

研究協力者：吉村和久

### Emergence of Drug-resistant HIV-1 Variants and the Fitness of such variants

Hiroaki Mitsuya and Kazuhisa Yoshimura

*Department of Immunopathophysiology and Internal MedicineII, Kumamoto University School of Medicine*

## 目的

現在HIV-1感染症患者の治療は多剤併用療法の導入に伴い著しい進歩を見ているが、臨床経過において薬剤の急性及び慢性毒性、薬剤耐性株の出現、延命に伴う悪性腫瘍の好発といった解決しなければならない多くの問題点がある。その中でも薬剤耐性化HIV-1変異株の出現は治療上最も深刻な問題となっている。耐性の出現は薬剤の効果を減弱し臨床経過を悪化させるためその多剤耐性の出現状況の解析が強く求められている。我々は抗ウイルス治療を受けている患者からHIV-1変異株を分離あるいは、新規の薬剤から *in vitro* で耐性変異ウイルスを誘導し、それらのアミノ酸変異を解析し、それぞれの薬剤の耐性付与に関連した変異を持つ感染性クローンを作成した。それぞれの変異クローンを用いて従来どうり薬剤に対する感受性を調べるだけでなく、CHRAなどにより細かい解析を行うことで、抗ウイルス剤による治療の順番や組み合わせの適正化と、新規の抗ウイルス剤開発の基礎を構築することを目指す。

## 方法

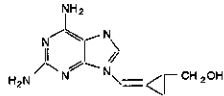
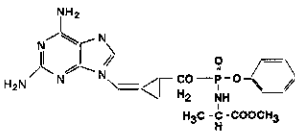
我々が、見出した新規のRTIである QYL-685 の存在下に HIV-1 を培養し、徐々に薬剤の濃度を上げていき cell free で継代していくと QYL-685 に対して耐性となるウイルスが得られる。これらのウイルスのシーケンスを調べ、耐性付与に関与す

るアミノ酸変異を同定し、Site-directed mutagenesis 法を用いて QYL-685 耐性を付与する *pol* 遺伝子の変異を持つレコンビナント感染性クローンを作製して野生株と薬剤耐性変異株の性状について HIV-1 競合阻害試験(CHRA)等により、ウイルス学的検討を加えた。

## 結果

2,6-diaminopurine に PPA を持つ QYL-685 は、PPA を持たない parent compound (QYL-546) にくらべると 50% ウイルス抑制薬剤濃度 ( $IC_{50}$ ) が  $4.1\mu\text{M}$  から  $0.04\mu\text{M}$  と約 100 分の 1 に改善された(表1)。そこでこの QYL-685 を用いて、*in vitro* で耐性誘導を行った。QYL-685 の濃度を  $0.5\mu\text{M}$  から徐々に上げていき、 $4\mu\text{M}$  まで上げたところで RT 領域のシーケンスを行ったところ、184 番の M が I に変異していた。その後継続して  $8\mu\text{M}$  まで濃度を上げていき (16 継代目, HIV-1<sub>P16</sub>)、その時の proviral DNA をクローニングして、シーケンスしたところ、すべてのクローンの 184 番の M が I に変異したままであった(14 クローン中 14 全部、図1)。この耐性誘導により得られた HIV-1<sub>P16</sub> の QYL-685 に対する感受性を調べると、野生株にくらべると  $IC_{50}$  が  $0.047\mu\text{M}$  から  $4.9\mu\text{M}$  と 100 倍になっていた。また、従来いわれていたように 3TC に対しても、 $0.91\mu\text{M}$  から  $>1,000\mu\text{M}$  と完全耐性になっていた(表2)。そこで M184I と M184V の 2 種類の変異レコンビナント感染性クローンを作成し薬剤耐性変異と増殖能

表1 Structure and anti-HIV activity of QYL-685

Compound	Structure	$IC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	$CC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
QYL-546		$4.1 \pm 2.0$	$>100$
QYL-685		$0.04 \pm 0.02$	$20.9 \pm 4.7$

\*Compounds were tested against HIV-1<sub>LAI</sub> in MT-2 cells.

に関して検討してみた。その結果、M184I/V株は野生株の感染性クローンと比較して高度の QYL-685 耐性となった。このことより 184 番の変異が QYL-685 の耐性付与に関与している可能性が強く示唆された(表3)。さらに、CHRAにより野生株と

M184I/V変異株の増殖能を比較すると、薬剤非存在下では野生株の増殖はM184I/V変異株のそれを明らかに凌駕するが、QYL-685(4μM)を培養液中に添加するとすみやかに逆転し、1~2週のうちに変異株が野生株に 100% 置き換わった(図2)。

	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	
HIV-1 <sub>LAI</sub>	MEKEGKISKI	GPENPYNTPV	FAIKKKDSTK	WRKLVDFREL	NKRTQDFNEV	QLGIPHPAGL	KKKSKVTVLD	VGDAlPSVPL	DEDPRKITAP	TIPSIINNETP	
HIV-1 <sub>P16</sub>								D			
				G	E						
				P							
									K	H	

	150	160	170	180	190	200	210	220	225	Fraction of clones
HIV-1 <sub>LAI</sub>	GIRYQINVLP	QGNGKSPAIP	QSSMTKILEP	FRKQNPDIIV	IQYMDLIVG	SDLEIGQHRT	KIBELRQHLL	RMGLTTPDKK	HQKEP	
HIV-1 <sub>P16</sub>					I					7/14
					I					1/14
					I					1/14
				I			N			1/14
			V							1/14
					I					1/14
					I	R				1/14
					I		T			1/14

図1 Sequence analysis of the RT-encoding regions of molecular clones derived from HIV-1<sub>P16</sub>

表2 Sensitivity to ddNs or QYL-685 of HIV-1<sub>LAI</sub> and HIV-1<sub>P16</sub>

Drug	EC <sub>50</sub> (μM) against		CC <sub>50</sub> (μM)
	HIV-1 <sub>LAI</sub>	HIV-1 <sub>P16</sub>	
AZT	0.028 ±0.005	0.02±0.007 (1x)	>100
ddl	3.9 ±1.0	5.7 ±1.3 (2x)	59 ±4.3
3TC	0.91 ±0.34	>1000 (>1100x)	>1000
QYL-685	0.047 ±0.014	4.9 ±1.3 (104x)	28 ± 1.4

表3 Sensitivity to ddNs or QYL-685 of infectious HIV-1 clones

Drug	EC <sub>50</sub> (μM) against			CC <sub>50</sub> (μM)
	HIV-1 <sub>wt</sub>	HIV-1 <sub>M184I</sub>	HIV-1 <sub>M184V</sub>	
AZT	0.04 ±0.001	0.008±0.002 (0.4x)	0.006±0.001 (0.2x)	>100
ddl	3.0 ±0.6	2.3 ±0.5 (0.8x)	4.5 ±1.1 (2x)	62 ±19
3TC	1.7 ±0.2	>1000 (>590x)	>1000 (>590x)	>1000
QYL-685	0.29 ±0.03	2.6 ±0.5 (9x)	3.1 ±0.5 (11x)	23 ± 1.3

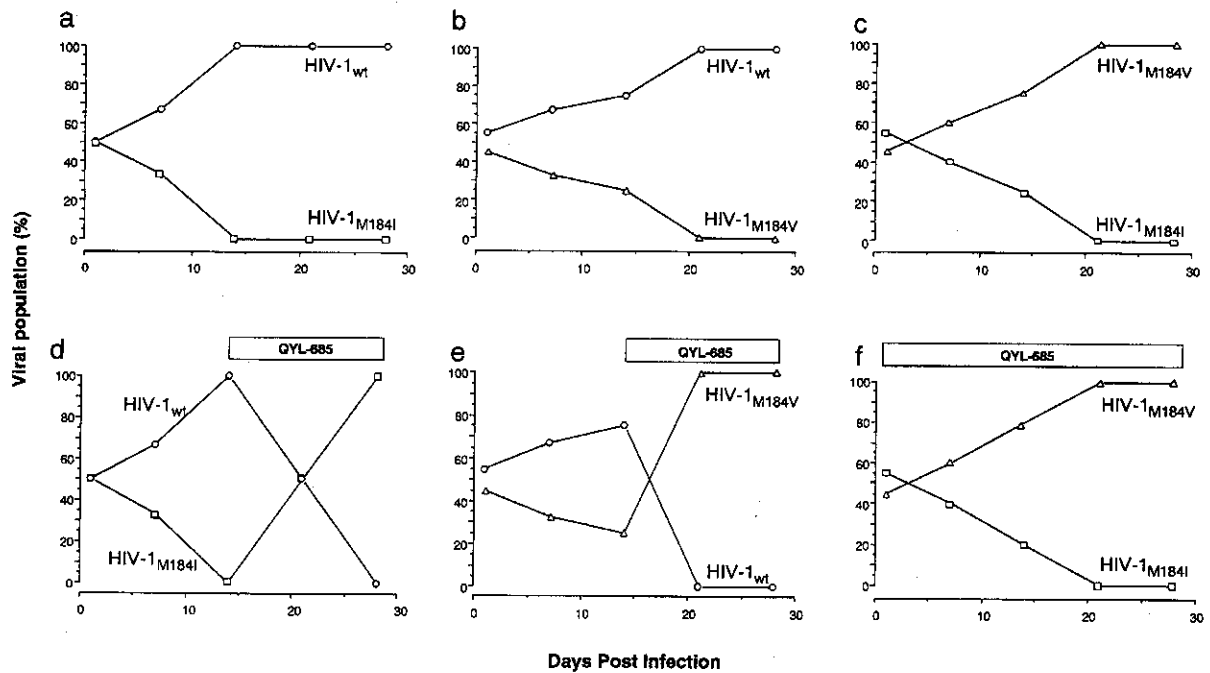


図2 Replication profiles of HIV-1<sub>wt</sub>, HIV-1<sub>M184V</sub>, and HIV-1<sub>M184I</sub> in CHRA

## 考察

本研究において、我々は新規のヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤であるQYL-685に対する耐性獲得の機序を調べた。QYL-685の*in vitro*耐性誘導の結果、RT領域の184番目のアミノ酸がMetからIleに変異した耐性変異ウイルスを得た。この変異が初めて出現するのは7継代目であり、3TCと比較すると耐性変異の出現は、明らかに遅延していた。これまで報告された、3TCによる耐性変異ウイルスの研究によると、まず初めに3TC単独での治療開始後M184Iの変異が2-3週で出現し、続いてM184V変異に置き換わることが知られている。このため、QYL-685に関しても同様にM184V変異ウイルスが出現してくる可能性があると考えて、16継代(8 $\mu$ M)まで続けたがM184Iのみであった。結局10 $\mu$ Mまで濃度を上げたが、やはり184Vは出現しなかった。それ以上の濃度では、細胞毒性に近くなるため継代は行わなかった。QYL-685と3TCは、構造的に見てもかなり異なっており、同じ184番の変異により耐性となるとはいえ、耐性に至る機序に違いがある可能性も十分あり、今後検討を重ねる必要がある。とはいえ、PPAというユニ-

クな構造を持つ一連のZ-methylenecyclopropane誘導体は、RTIの有望な候補薬剤のひとつとして、期待される。

## 結論

我々の開発したHIV-1競合阻害試験(CHRA)は、それぞれの薬剤耐性変異ウイルスの特性を比較検討するのに有効な手段の一つであるといえる。今回報告した新規のRTIであるQYL-685における耐性変異の検討においても非常に有用であった。現在主流となって行われているHAART(多剤併用療法)により、今後出現してくる薬剤耐性ウイルスは今までとは異なる耐性変異を持っている可能性もある。そのため我々の行っているCHRAのような検索手段が今後ますます重要となってくると思われる。

## 参考文献

- 1) Maeda, Y. and Mitsuya, H. :Altered drug sensitivity and fitness of HIV-1 with pol gene mutations conferring multi-dideoxynucleoside resistance. *J. Infect. Dis.* 177:1207-1213, 1998

- 2) Uchida, H., Eiich, N. K., Yoshimura, K., Maeda, Y., Kosalaraksa, P., Maroun, V., Qui, Y-L., Zemlicka, J. and Mitsuya, H.: *In vitro* anti-human immunodeficiency virus activities of Z- and E-methylenecyclopropane nucleoside analogues and their phosphoro-L-alaninate diesters. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 1487-1490, 1999
- 3) Kosalaraksa, P., Kavlick, M. F., Maroun, V., Le, R., and Mitsuya, H.: Comparative fitness of multi-dideoxynucleoside-resistant (MDR)-HIV 1 in an *in vitro* competitive HIV-1 replication assay. *J. Virol.* 73: 5356-5363, 1999
- 4) Yoshimura, K., Kato, R., Yusa, K., Kavlick, M. F., Maroun V., Nguyen, A., Mimoto, T., Ueno, T., Shintani, M., Falloon, J., Masur, H., Hayashi, H., Erickson, J. and Mitsuya, H.: JE-2147: a dipeptide protease inhibitor (PI) that potently inhibits multi-PI resistant HIV-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 8675-8680, 1999
- 5) Yoshimura, K., Feldman, R., Kodama, N. E., Kavlick, M. F., Qui, Y-L., Zemlicka, J. and Mitsuya, H.: *In vitro* induction of human immunodeficiency virus type 1 variants resistant to phosphoralaninate prodrug of Z-methylenecyclopropane nucleoside analogues. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 2479-2483, 1999



## HIV-1 エントリーインヒビターの 分子設計の基礎的研究

杉村 和久<sup>1)</sup>、伊東 祐二<sup>1)</sup>、中島 秀喜<sup>2)</sup>、西本 憲弘<sup>3)</sup>、吉崎 和幸<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>鹿児島大学工学部 生体工学科

<sup>2)</sup>鹿児島大学歯学部 細菌学

<sup>3)</sup>大阪大学健康体育部

### 研究要旨

本研究では私どもが考案した3D分子設計のアプローチを用い、ケモカインレセプターの結合部位を塞ぐようなケモカイン様モチーフとして、Monocyte Chemoattractant Protein (MCP-1) ミミックのファージクローンを2種(C27 およびG25)を単離し、これらのクローンの性状を検討した。その結果、1) このモチーフを有するファージクローンは、MCP-1 レセプターであるCCR2 陽性 THP-1 細胞に特異的に結合すること、2) MCP-1 によるヒト末梢血リンパ球細胞 (PBMC) の Chemotaxis を非常に強力に阻害すること、3) モチーフ配列のみを化学合成した 19mer の C27 および G25 ペプチド(sC27 および sG25) は、抗MCP-1 抗体に認識されること、4) これらのペプチドはファージクローンで認められたと同様に、MCP-1 による PBMC の Chemotaxis を阻害することを明らかにした。さらに、5) いずれのモチーフも2つのシステインを有しており、この部位をセリンに置換した誘導体は3)及び4)の活性を失うことより、ジスルフィド結合によって形成されるループ構造の重要性が示唆された。また、6) C27 および G25 モチーフと MCP-1 の 1 次配列のホモロジーは認められなかった。7) Chemotaxis の阻害活性について、5 nM の MCP-1 を用いた系での IC<sub>50</sub> は、C27 で 4 mM, G25 で 500 μM であった。

分担研究者：吉崎和幸

研究協力者：杉村和久、伊東祐二、中島秀喜、西本憲弘

### Peptide mimic of HIV-1 entry inhibitors

Kazuhisa Sugimura<sup>1)</sup>, Yuji Ito<sup>1)</sup>, Hideki Nakashima<sup>2)</sup>, Kazuyuki Yoshizaki<sup>3)</sup> and Norihiro Nishimoto<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Bioengineering, Faculty of Engineering, Kagoshima University, <sup>2)</sup>Department of Microbiology and Immunology, Kagoshima University Dental School, <sup>3)</sup>Department of Medical Science I, School of Health and Sports Science, Osaka University,

## 目 的

HIV(Human Immunodeficiency Virus) が AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome) の原因ウイルスとして発見されて以来、その重要性からレセプターとなる分子の特定が進められてきた。1984年にCD4の関与が報告され、1996年になってケモカインレセプターのCXCR4とCCR5がコレセプターであることが多くのグループにより明らかにされた<sup>1)</sup>。1998年、W. A. HendricksonのグループがHIV-1感染に関わる分子複合体のX線結晶構造解析をおこない、HIV-1gp120とCD4分子との結合部位およびgp120とケモカインレセプターとの結合部位のモチーフについて分子レベルで明らかにした<sup>2)</sup>。

HIV-1感染防御の手段として、逆転写酵素の阻害、HIV-1特異的プロテアーゼの阻害があるが、この感染複合体の形成阻害も、第3の効果的且つ新しい手段であると考えられる。しかし最近、ケモカイン自身を用いた感染阻害についての研究から、これらの分子はレセプターの結合部位を塞ぐと同時に細胞内にシグナルを送り、その結果、トロピズム(指向性)の異なるHIV-1の株の感染を逆に促進してしまうことが明らかとなってきた。したがって、ケモカインレセプターには特異的に結合はするが、シグナルを送ることのない「結合モチーフのミミック分子」の重要性が示唆され、結合モチーフのより詳細な解析結果が期待されるようになってきている。

リセプターとリガンドの結合は生体反応の要である。多くの場合、結合部位はペプチド鎖の折り畳まれた結果できる3次構造で規定され、結合に直接関与するアミノ酸は1次構造配列の各所に分散している。私どもはこの結合部分の3次構造を認識するモノクローナル抗体を用いてファージライブラリーを探索し、この抗体に結合するファージクローンを単離すれば、抗体が鋳型として働き、リセプターとリガンドの結合部位の3次構造を直接コピーする可能性を検討してきた<sup>2,3)</sup>。

この観点から平成10年度に、M-tropic HIV-1の感染でcoreceptorとして機能するCCR5のmimeticsを試み、抗CCR5抗体(2D7)用い、BiopanningによりM23クローンを単離した。このクローンはM-

tropic HIV-1感染を特異的に60%阻害し、T-tropic HIV-1感染には影響せず、また、ELISAにより、M23はMIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ およびRANTESと結合すること、しかしCCR2のリガンドであるMCP-1には結合しないことを明らかにした<sup>4,5)</sup>。その後の解析により、M23ファージクローンより単離精製したM23-g3p分子はM23と同様の活性を示すが、モチーフのみの合成ペプチド(23mer)ではHIV-1の感染阻害活性が消失することが明らかとなった。このため平成11年度では、MCP-1を標的分子として、合成ペプチドでリセプターとリガンドの結合部位の3次構造を直接コピーする可能性を検討した<sup>6)</sup>。Monocyte Chemoattractant Protein (MCP)-1はCCR1、CCR2、CCR4に結合し単球遊走活性を有し、慢性関節リウマチ、多発性硬化症、腎炎などの慢性炎症性疾患、粥状動脈硬化症等の重要な因子である<sup>7-9)</sup>。またCCR2を介したHIV-1感染ではMCP-1の感染阻害活性が報告されている<sup>10)</sup>。

## 方 法

### 1. 抗体およびケモカイン

マウス抗ヒトMCP-1モノクローナル抗体として、24822.111 (R&D System) およびF9 (Dr. T. Yoshimura, National Cancer Institute-Frederick Cancer and Development Center)を用いた<sup>11)</sup>。MCP-1はPepro Tech Inc.(Rocky Hill, NJ)より購入した。アルカリフォスファターゼ(AP)標識ウサギ抗マウスIgG抗体 (Zymed Lab., San Francisco, CA)、AP標識ストレプトアビジン (Vector Lab., Burlingame, CA)はそれぞれ購入した。リコンビナントヒトMIP-1 $\alpha$ は化血研(熊本)より恵与された。

### 2. 合成ペプチド

ペプチド合成はPerseptive 9050 plus (Millipore, Bedford, MA)を用い、Fmoc法による固相合成で行った。合成ペプチド(19mer)は15アミノ酸からなるモチーフのC末端にg3pの4アミノ酸の配列を付加して調整した。凍結乾燥ペプチドは0.5M Tris-HCl/4M 尿素に溶解し、空気酸化により disulfide bondが形成された酸化型ペプチドを逆相HPLCにて分離精製した。アミノ酸配列はModel 473A プロテインシーケンサー(Applied Biosystem, Foster



City, CA)にて確認した。

### 3. ファージライブラリー

西(熊大・脳神経外科)らにより構築されたファージディスプレイライブラリーを用いた<sup>2)</sup>。このライブラリーを作製したfUSE5ベクターのgene 3 (g3)には、そのアミノ酸配列のN末端から5番目の位置に15残基のランダムなアミノ酸シーケンスが挿入されている。

### 4. バイオパンニング

抗MCP-1抗体を用い、Fukumotoらの方法に従って行った<sup>2)</sup>。

### 5. DNAシーケンス

ファージのgene 3 protein (g3p)に組み込まれた15残基のアミノ酸シーケンスは、プリズム仕様書(Applied Biosystem)にしたがって行った。即ち、ファージのsingle-strand DNAに相補的なプライマー(5'-TGAATTTTCTGTATGAGG-3')を用い、ABI DNA Sequencer 373A-36S(アプライドバイオシステムズ)によって塩基配列を決定した<sup>2)</sup>。

### 6. SDS-PAGE

Laemmliの方法にしたがって行った<sup>2)</sup>。

### 7. ELISA

Fukumotoらの方法に従った<sup>2)</sup>。すなわち、96穴イムノプレート(Nunc, Roskilde, Denmark)に抗MCP-1抗体あるいはそのコントロール抗体(mouse IgG1)を80 ng/40  $\mu$ l/wellにて一晚コートし、1% BSAでブロック後、ファージクローン( $4 \times 10^9$  TU/40  $\mu$ l/well)を反応させた。結合ファージはビオチン化抗M13抗体(40 ng/40  $\mu$ l/well, Pharmacia, CA)とAP標識ストレプトアビジン(Vector Lab., CA)で検出した。測定にはマイクロプレートリーダー(日本インターメッド、東京)を用い、405 nmでの吸光度を測定した。

### 8. フローサイトメトリー解析

Fukumotoらの方法に従った。すなわち、CCR2陽性細胞としてTHP-1細胞を用い、抗CCR2抗体はR&D System, Incより購入した。FITC標識スト

レプトアビジンはVector, Buringama, CAから購入し、Coulter EPICS XL (Coulter, Corp., Miami, FL)を用いて解析した。

### 9. Chemotaxis assay

PBMCは常法により調製し、アッセイは常法に従った<sup>9)</sup>。すなわち、5  $\mu$ m pore size polycarbonate filter membraneで仕切られた48-well micro chemotaxis chamber (Neuroprove, Cabin John, MD)を用いた。37度、90分インキュベーションの後、フィルター上の非遊走細胞を拭い去り、風乾後、Diff-Quickで染色した。結果はコントロール群(5 nM MCP-1 alone)での遊走細胞数に対する%で示した。

## 結果

### 1. 抗MCP-1抗体の性状

図1AにMCP-1を非還元/還元状態で、SDS-PAGEを行った結果を示す。MCP-1は両状態で、8.5 KDaの位置に泳動された。

図1Bは、この非還元、還元状態のMCP-1を2種のMCP-1抗体でWestern blottingを行った結果を示す。24822.111抗体は還元および非還元処理をしたMCP-1に結合活性を示した。一方、F9は還元状態のMCP-1を認識しなかった。この結果は、24822.111抗体はMCP-1の一次配列を認識する抗体であり、F9はMCP-1のジスルフィド結合で構築された構造を認識する抗体であることが明らかとなった。バイオパンニングは特性の異なるこれら2種類の抗体を用いて行った。

### 2. バイオパンニング

24822.111抗体のバイオパンニングでは25クローン、F9抗体のバイオパンニングでは42クローンについて、DNA sequencingにより挿入モチーフのアミノ酸配列を決定した。その結果を図2に示した。24822.111およびF9で、それぞれ3種類のモチーフに分類されることが明らかとなった。24822.111で得られた3つのモチーフのアミノ酸配列には相同性は認められなかったが、F9で得られた3つのモチーフには2つのシステイン間にWYおよびPWYSがコンセンサス配列として認められた。

また、これら6つのモチーフのすべてに2つのシステイン残基が存在することより、ジスルフィド結合によるループ構造がこれらの抗MCP-1抗体との結合に重要であることが示唆された。さらに、これら6つのペプチドモチーフと MCP-1 のアミノ酸配列との相同性について Gene Works (帝人、東京) またはインターネット上の解析ソフト PIMA を用いて行った結果、C27 モチーフについては MCP-1 のN末に非常に弱いアミノ酸配列上の相同性が認められたが、その他のモチーフに関しては相同性は認められなかった。

図 2B では各モチーフを有するファージクローンと抗体との ELISA を示している。いずれのクローンもパンニングに用いた抗体に特異的な結合活性を示した。

特に、2つのモチーフ C27 と G25 は高い結合活性を示し MCP-1 様モチーフとして機能することが

示唆された。

### 3. フローサイトメーター解析

単球系腫瘍細胞株の THP-1 を用いて、C27 ファージと G25 ファージの MCP-1 レセプターへの特異的結合活性を FACS で調べた (図 3)。

THP-1 細胞は抗CCR2抗体で認識され、CCR2を発現している (図 3A)。この THP-1 細胞への C27 あるいは G25 ファージの結合を調べたところ、図 3C および D に見られるように、これらのファージがこの細胞に結合することが明らかとなった。無作為に選別されたコントロールの L4 ファージクローンには THP-1 への結合活性は認められなかった (図 3B)。この C27 と G25 ファージの結合の特異性を検討するため、THP-1 細胞を前もって MCP-1 で前処理し、その後これらのファージを反

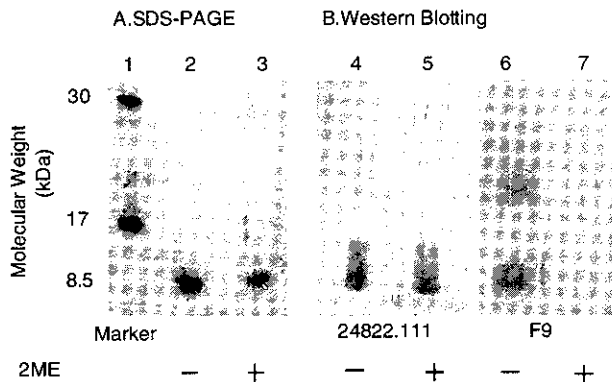


Figure 1. Characterization of anti-MCP-1 mAbs (24822.111 and F9). (A) SDS-PAGE analysis of MCP-1 in the presence (lane 3) or absence (lane 2) of the reducing agent 2-mercaptoethanol (2ME). (B) Immunoblot analysis of MCP-1 with 24822.111 and F9 under reducing (lane 5,7) and non-reducing (lane 4,6) conditions.

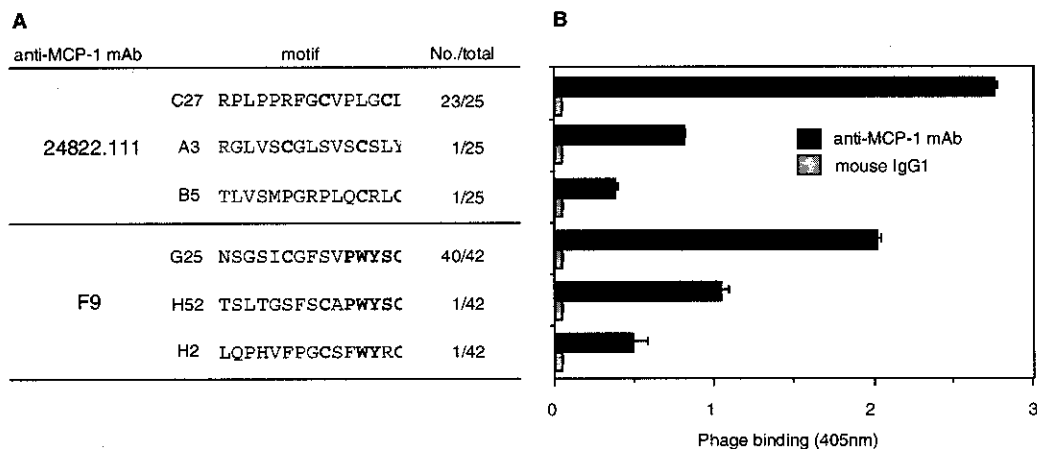


Figure 2. Phage motifs binding to anti-MCP-1 mAbs (24822.111 and F9). (A) Two cysteines and amino acid residues that are characteristic for F9 binding sequences are shown bold. (B) The motifs recognized with anti-MCP-1 mAb are determined by ELISA.

応させたところ、C27 (図 3C) および G25 (図 3D) のいずれにおいても、ファージの結合が消失することから、これらのファージとこの細胞は MCP-1 レセプターを介した特異的結合であることが明らかとなった。

#### 4. ファージクローンによる 単球遊走阻害活性

つぎに、PBMC ( $4 \times 10^4$ ) に対する 5 nM MCP-1 の遊走活性を見る実験系に、C27 あるいは G25 ク

ローンを加え、その影響について検討した。結果を図 4 に示す。

図 4A の横軸は添加したファージの濃度を、縦軸には % of control を示した。

図 4A に示すように、 $1 \times 10^5$  TU/ml のファージ濃度から遊走活性の阻害が認められ、 $1 \times 10^8$  TU/ml で 80% 以上の強い阻害活性を示した。一方、無作為に単離したコントロールクローンの L4 は全く阻害活性を示さなかった (図 4B)。

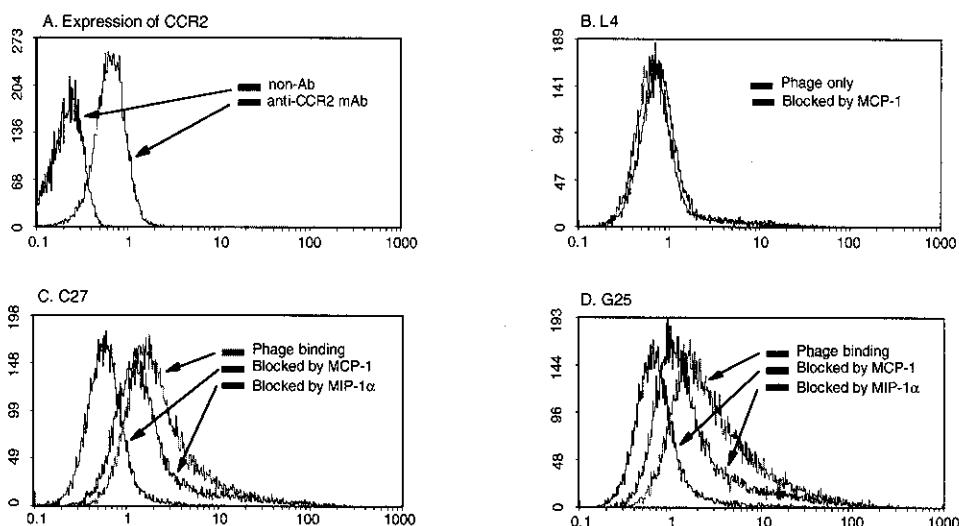


Figure 3. FACS analysis of C27 or G25 binding to MCP-1 receptor. (A) Expression of CCR2 on THP-1. (C, D) Overlays of three histograms that illustrate avidin-FITC-biotinylated anti-M13 mAb-phage binding to THP-1. ■, non blocking; ■, preincubated by MCP-1; ■, preincubated by MIP-1 $\alpha$ . (B) overlays of two histograms. L4 is a control phage clone. ■, non blocking; ■, preincubated by MCP-1.

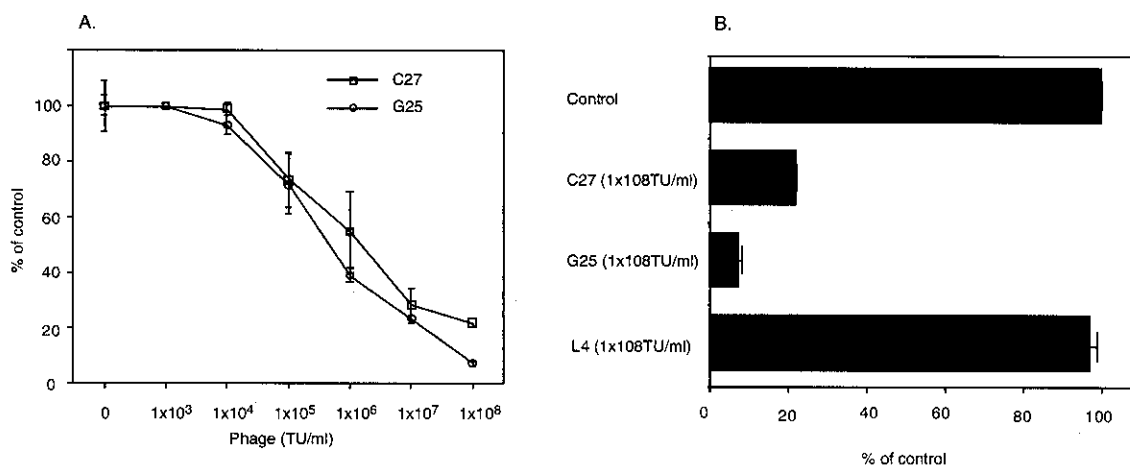


Figure 4. (A) Effect of C27 and G25 on MCP-1 induced chemotaxis of human monocytes. (B) L4 is a control phage clone. Control: chemotaxis by 5nM MCP-1 alone (100%).

### 5. 抗MCP-1抗体とC27/G25ファージクローンの結合に対する合成ペプチドモチーフの阻害活性

C27 および G25 ファージに呈示されている 15 mer のアミノ酸のC末側に GAAG のスペーサーペプチドを付加した 19mer の合成ペプチド、C27 およびG25 ペプチドを作製した。コントロールペプチドとしてC27 およびG25 ペプチド内のこの2つのシステインをセリンに変換したペプチド誘導体を用いた。分子内のジスルフィド結合の形成は、空気酸化にて行い、逆相 HPLC にて精製した。

まず、これらの合成ペプチドが抗MCP-1抗体に認識される分子構造を有するかをELISAにて検討した。図5に見られるように、C27 およびG25 ペ

プチドはともに濃度依存的にファージとの結合を阻害し、500 $\mu$ MでC27では約80%、G25では100%の阻害活性を示した。一方、セリン誘導体は全く阻害活性を示さず、このことから、2つの合成ペプチド内の2つのシステイン残基によるジスルフィド結合は抗体への結合活性に重要であることが明らかとなった。

### 6. 合成ペプチドモチーフによる単球遊走阻害活性

次にMCP-1 による単球遊走活性に対する、この合成ペプチドの阻害活性について検討した。図4と同様の実験系で C27 および G25 ペプチド(sC27 とsG25)を添加すると、濃度依存的に遊走阻害が

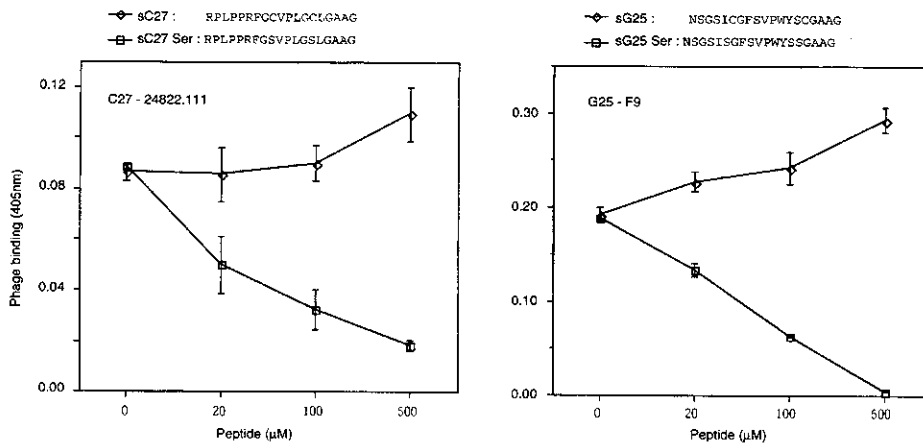


Figure 5. Inhibition of the phage binding by the peptide. Measuring of sC27 versus sC27 Ser in inhibiting C27 binding to 24822.111 (A) and sG25 versus sG25 in inhibiting G25 binding to F9 (B) are done using ELISA. The sC27 and sG25 peptide are chemically synthesized. sC27 Ser and sG25 Ser peptides are serine derivatives whose cysteines were replaced to serine.

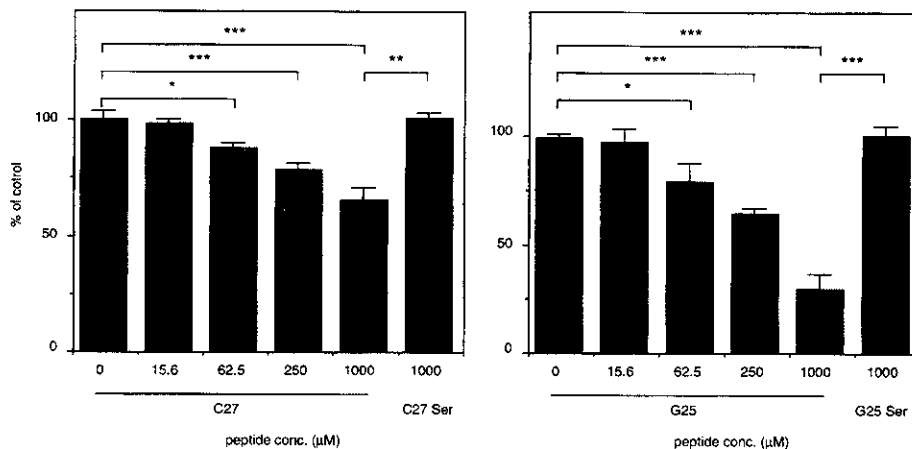


Figure 6. Effect of sC27 and sG25 on MCP-1 induced chemotaxis of human monocytes. sC27 Ser and sG25 Ser are used for control peptides. Statistical analysis were performed by unpaired T-test or ANOVA. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001

認められた(図6)。この活性でも sG25 のほうが sC27 より若干強い活性を示した。阻害活性について、5nM の MCP-1 に対する  $IC_{50}$  は C27 ペプチドで約 4nM、G25 ペプチドで約 500nM と評価された。

## 結 論

1. Phage display peptide library と 2 種の抗 MCP-1 モノクローナル抗体とを用いた panning により、これらの抗体に特異的に結合する 6 つの phage clone を単離した。

2. これらの phage clone のうち 2 つの phage clone: C27 phage と G25 phage、およびこれらから得られた 2 つの合成 peptide: sC27 と sG25 は MCP-1 レセプターに対する特異的な結合活性を有し、MCP-1 に誘起される遊走活性を阻害した。

以上の成果により、更なる高親和性 MCP-1 ミミック誘導体の開発が可能になるとともに、モチーフが組み込まれているファージ分子 g3p の X 線結晶解析にもとづく分子デザインの手法が導入可能となった<sup>12,13)</sup>。これらの結果は、単クローン抗体を鋳型として標的分子の結合部位を直接コピーする手法は、アンタゴニストとなりうる小分子をデザインする方法として有用であることを示した。

## おわりに

HIV-1 感染のメカニズムの一部が X 線結晶解析のレベルで理解できるようになり、その感染初期の結合に関与する分子構造が議論できるようになってきた。感染に関わるケモカインレセプターも CCR5 や CXCR4 のほかにも見いだされつつある。ペプチドや、低分子量の合成化合物で、このステップの結合を特異的に阻害できるモチーフの開発は、逆転写酵素の阻害剤やプロテアーゼ阻害剤とは作用機序の異なる第 3 の新しい AIDS の治療薬の開発につながるという意味で魅力的である。

分子生物学の発展により、病態の分子レベルの理解が進み、標的分子の同定が容易になってきている。しかし未だに戦略的にかつ容易に分子デザ

インを達成する方法論が明らかになっていないため、分子生物学の成果を十分に生かすことができていない。また、ペプチドミミックの方法論は、標的分子を絞り、戦略的に標的分子のミミックを分子設計するためには、今後開拓しなければならない研究課題であるが、生体内に投与後の生分解や有効濃度の維持の問題などで克服されるべきステップが多くある。X 線結晶解析の成果から、論理的にこれらの結合モチーフをデザインできればいいが、現実には、この成果からアンタゴニストのデザインまでは距離がありすぎというのが現状である。しかし最近、これまでは予想もされなかった「蛋白分子のリガンドの特異性を保持した低分子合成分子」の発見が、エリスロポエチン、インスリン、G-CSF、VEGF 等で報告されるようになり、新しい小分子のデザインが可能になりつつある<sup>14)</sup>。High-throughput 法を駆使して宝くじを当てるような現況の医薬品開発の手法を越えて、いっそう論理的かつ戦略的な分子設計の方法の道筋が開拓されることを期待したい。

## 参考文献

- 1) 鳥越直彦、米田明宏、杉村和久：HIV-1 gp120 とケモカインレセプターの結合にかかわるモチーフ、Annual Review 免疫2000、250-259、1999。
- 2) Fukumoto, T., Torigoe, N., Kawabata, S., et al., Peptide mimics of the CTLA4-binding domain stimulate T-cell proliferation, Nature biotechnology, 16, 267-270, 1998.
- 3) Fukumoto, T., Torigoe, N., Ito, Y., T cell proliferation-augmenting activities of the gene 3 protein derived from a phage library clone with CD80-binding activity. J. Immunol. 161, 6622-6628, 1998.
- 4) Meta, A., Torigoe, N., Ito, Y., Arakaki, R., Nakashima, H., Sugimura, K., Inhibition of M-tropic HIV-1 infection by the fd phage-gene 3 protein with MIP-1a-binding activity, Mol. Immunol. in press.
- 5) 杉村和久、伊東祐二、中島秀喜、西本憲弘、吉崎和幸：CCR5 結合ドメインのペプチドミミックとその機能、HIV 感染症に関する臨床研究、厚生科学研究費補助金エイズ対策研究事業 平成10年度研究報告書 215-223頁、1999。

- 6) Sugimura, K., Kaji, M., Hashiguchi, S., Ito, Y., Yoshimura, T., Kuratsu, J., Analysis of peptide motifs recognized with anti-MCP-1 monoclonal antibody, Gordon Conference of Peptide, Chemistry & Biology, February, 2000
- 7) Luster-AD, Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N-Engl-J-Med.* 338: 436-45, 1998.
- 8) Kuratsu, J., et al., (1989) *J. Natl. Cancer. inst.*, 81: 347. Kuratsu-J; Leonard-EJ; Yoshimura-T, Production and characterization of human glioma cell-derived monocyte chemotactic factor. *J-Natl-Cancer-Inst.*, 81: 347-51, 1989.
- 9) Yoshimura, T., et al., *J. Exp. Med.* 169: 1449, 1989. Yoshimura-T; Robinson-EA; Tanaka-S; Appella-E; Kuratsu-J; Leonard-EJ, Purification and amino acid analysis of two human glioma-derived monocyte chemoattractants. *J-Exp-Med.*, 169: 1449-59, 1989.
- 10) Frade-JMR; Llorente-M; Mellado-M; Alcamí-J; Gutierrez-Ramos-JC; Zaballos-A; Real-G; Martínez-A-C, The amino-terminal domain of the CCR2 chemokine receptor acts as coreceptor for HIV-1 infection. *J-Clin-Invest.*, 100: 497-502, 1997.
- 11) Yoshimura-T; Takeya-M; Takahashi-K; Kuratsu-J; Leonard-EJ, Production and characterization of mouse monoclonal antibodies against human monocyte chemoattractant protein-1. *J-Immunol.*, 147: 2229-2233, 1991.
- 12) 伊東 祐二, 杉村 和久: CTLA-4の生物活性とその構造, *免疫 Immunology Frontier*, 9: 42-46, 1999
- 13) Lubkowski, J., Hennecke, F., Pluckthun, A., et al., The structural basis of phage display elucidated by the crystal structure of the N-terminal domains of g3p. *Nature Struct. Biol.* 5: 140-147, 1998.



## HIV 転写制御剤の開発のための 細胞性転写制御因子の解析

河野 茂<sup>1)</sup>、小林 信之<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>長崎大学医学部 第二内科

<sup>2)</sup>長崎大学薬学部 医療薬剤学講座

### 研究要旨

HIVの複製は宿主染色体に挿入されたHIVプロウイルス5'領域に存在するLTR部位に様々な宿主因子およびHIVtat遺伝子産物が作用して行われる。すなわちHIV-LTR領域へのこれら因子の作用がHIV複製効率を規定している。今日HIV感染からAIDS発症の過程で血液中に検出されるウイルス量が究めて密接に関連していることが示されており、AIDS発症を阻止するためには血中ウイルス量を抑え込む必要があると考えられている。このことからHIV-LTR領域に作用する宿主因子を標的とした抗HIV剤の開発の可能性が考えられる。HIV-LTRからのHIV複製を最も大きく増強させるのはHIV-LTR領域中のEHN領域であり、この領域に結合する細胞性因子NF- $\kappa$ Bが見い出されている。HIV感染細胞にTNF(腫瘍壊死因子)や様々な刺激が作用すると、NF- $\kappa$ B活性化されその結果としてHIVの複製が数百倍に増強することが知られている。しかしながらNF- $\kappa$ BはHIV-LTRのみならず宿主細胞の多くの遺伝子の転写に密接に関与しているため、HIV特的な阻害剤の標的とすることは困難であると予想される。一方われわれはすでにHIV-LTR ENH領域の上流にENH活性を制御する領域UREを見い出している(J.Virol.65,6334,1991)。このURE結合蛋白欠損時にはENH活性もほぼ完全に阻害されることから、新規の抗HIV剤開発のターゲットとして究めて有効であることが期待される。本研究ではURE結合タンパク質の種々ヒト細胞株での存在の確認とその部分精製を行った。精製は比活性の上昇を指針に各種クロマトグラフィー法によって行い細胞核抽出液からスタートして約600倍の比活性上昇した標品を得たが、現段階ではSDS電気泳動法による単一のバンドを得るまでには至らなかった。今後数ステップの精製を進めURE結合蛋白の遺伝子クローニングを行って行く計画である。

分担研究者：河野 茂

研究協力者：小林信之

### Analysis of cellular factor which control transcription of HIV gene

Shigeru Kohno<sup>1)</sup> and Nobuyuki Kobayashi<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>The Second Department of Internal Medicine, Nagasaki University, <sup>2)</sup> Department of Clinical Pharmaceutics, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki University

## 目 的

抗HIV剤の開発は従来からそのほとんどがHIV特異的酵素を標的として行われてきており、現在までHIV逆転写酵素阻害剤、HIVgag蛋白質分解酵素阻害剤が開発されてきた。このようなウイルス特異的酵素阻害剤を治療薬として開発することは細菌に対する抗生物質の開発同様、より宿主に副作用のない治療薬の開発が期待できるという利点を有しており、抗ウイルス薬開発の第一の選択肢である。しかしながらHIVは究めて変異を起こしやすいため、これら抗HIV剤に対する耐性株が容易に出現し、今日これら耐性株出現に対応するために多剤併用療法が行われるようになってきている。多剤併用、取り分け今日HAART(Highly active anti-retroviral therapy)として行われているものはそれまでの単剤による治療法に比べ画期的な効果を表わしているが、HIV感染症は他の多くのウイルス感染症と異なり、感染ウイルス遺伝子が宿主遺伝子に入り込んでしまうため、完全にウイルスを生体から排除することは究めて困難である。そのため抗ウイルス剤の投与は長期に渡っており、多剤併用による副作用の問題は究めて深刻である。またこのような療法に於いても最近の報告では血中ウイルスコピー数は依然として有為に残存していることが明かとなっている。そこで本研究はHAART法の欠点を少しでも補うために従来開発されていない新しい抗HIV薬の開発を行うことを目的として、取り分けHIV転写制御薬の開発を目指している。

## 方 法

各種ヒト株化細胞より核抽出液を調整し、*in vitro*における放射標識合成UREオリゴヌクレオチドに対する蛋白の特異的結合活性をゲルシフト法により検出し、この活性を指標にURE結合蛋白の精製を行った。

## 結 果

図1にすでに我々が報告したHIV LTR URE領域を模式的に示した。図1bに示すURE合成オリゴ

ヌクレオチドをプローブとしてヒトT細胞株MOLT4の核抽出液をもちいてのゲルシフト法による解析結果は図2に示す。図2よりMOLT4細胞核抽出液中には2本の特異的バンドが検出された(upper band, lower band)。そこで各種細胞株核抽出液におけるURE結合蛋白の存在を調べたのが図3である。図から調べた全ての細胞にURE結合蛋白が強弱の差があるものの存在することが明かとなった。表1にそれぞれの細胞核抽出液でのURE結合蛋白の強度を定量した結果をまとめた。この結果からヒトT細胞株H9, 174xcCEMおよびB細胞株BALLに強いURE結合活性が存在することが明かとなった。しかしながら各細胞抽出液中のURE結合タンパク質は共通してMOLT-4細胞の核抽出液に見られるUpper bandと同じ位置に極めて強い活性が見られるものの、Lower bandは細胞ごとに異なった位置に検出されることがわかった。そこで本研究ではMOLT-4細胞抽出液を用いてUpper bandの精製をまず行うこととした。精製はMOLT-4細胞培養約20L分より行い、核抽出液、DE-52, MonoQ, Superose6の各カラムで行った。URE結合活性は1pgのDNAをシフトさせる活性を1Unitと定義しておこなった。その結果の一部を表2にまとめた。核抽出液にくらべ約600倍の比活性の上昇が見られたが、各サンプルをSDS電気泳動で検定したところ図4に示すごとく単一なバンドを示す標品はまだ得られていない。



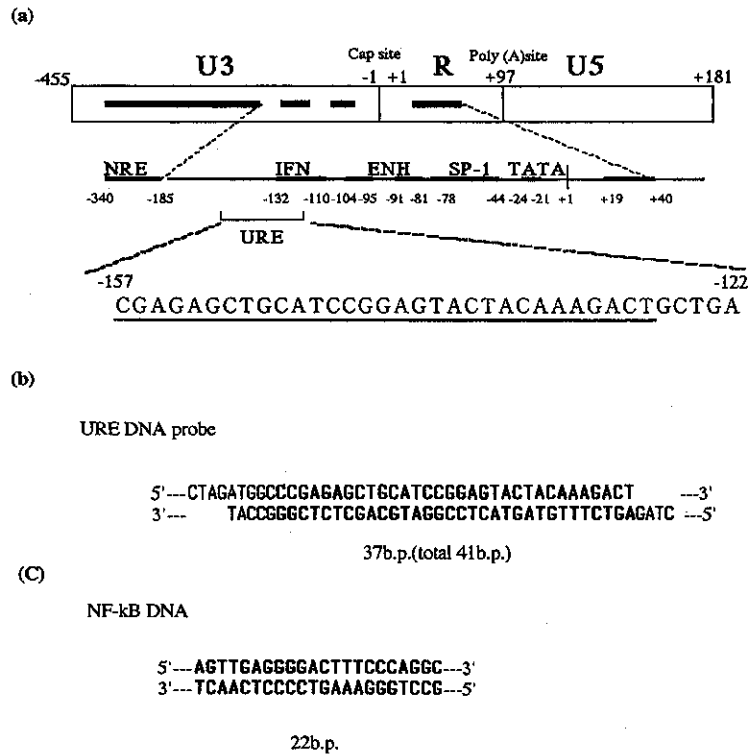


Fig. 1 HIV URE

(a)HIVの構造とUREの配列。(b)URE DNAプローブとして用いているoligonucleotideの配列。page精製されたsingle strand DNAをアニーリングさせたdouble strand DNAをプローブとして用いている。(c)NF-κBの結合するDNA配列。これはNF-κB結合能を有するDNAであり、ゲルシフト法の中ではコンペティターとして用いている。

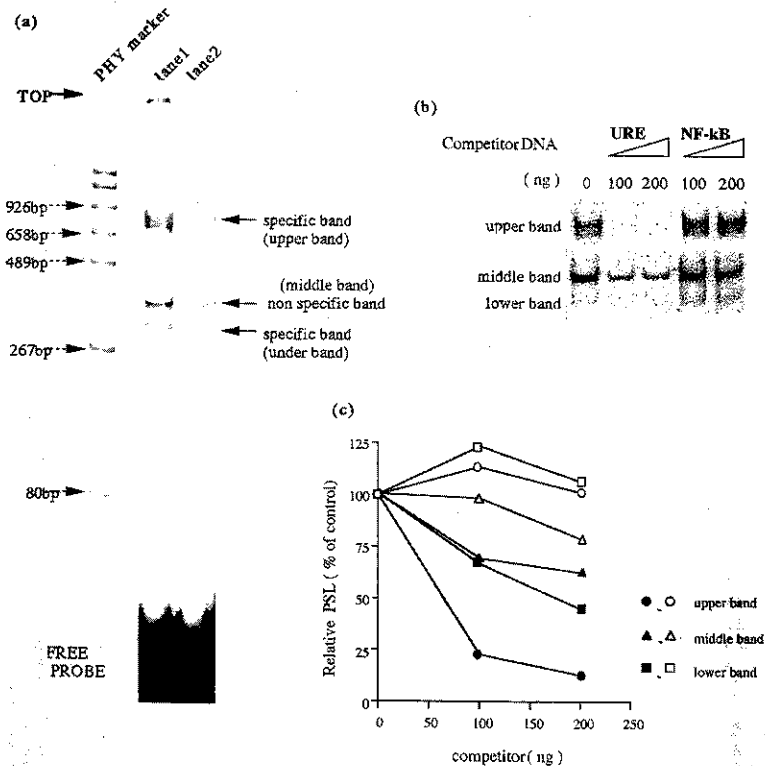


Fig. 2 URE DNA への特異的結合活性の検出

(a)MOLT-4の核抽出液を用いたゲルシフト法による検出液のURE結合活性の同定。ラベルした<sup>32</sup>P-URE probeは1ng加えており、lane2は competitorとして200ng non-label probeを加えている。reaction mixtureは30℃で10minインキュベートした後、0.25xTBE bufferで4%polyacrylamide電気泳動をした。左にはPHYマーカーを示してる。(b)同量の核抽出液に対して2種類の competitor: URE, NF-κBを用いた実験結果。(c)(b)の結果をFuji MacBasを用いてバンド強度を定量したグラフ。

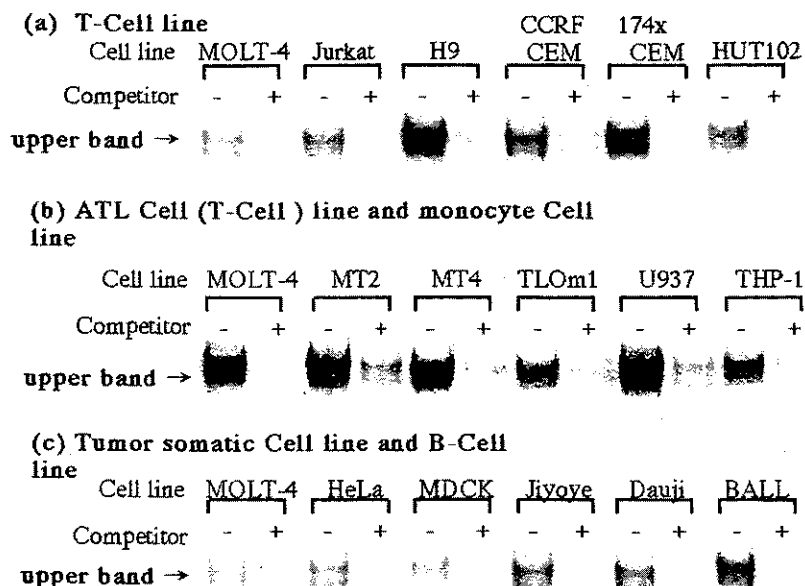


Fig. 3 Table 1 各種培養細胞における、URE-BP活性の検出

Fig.3(a)T細胞、(b)ATL感染細胞、単球マクロファージ系細胞、(c)B細胞、組織細胞株を用いた。いずれも、ゲルシフト法によるupper bandの検出を示している。コントロールをMOLT-4細胞とし、特異的な結合性を示すために各々competitorを加えた(200倍)。Table1はupper bandのバンド強度をMacBassで解析し、コントロールに対する相対強度を示した。

Table 1 MOLT-4 と他の培養細胞核抽出液の upper band 形成能の比較

Cell line	/ MOLT-4	Cell line	/ MOLT-4
<b>T Cell</b>		<b>B Cell</b>	
MOLT-4	1.00	Jiyoye	1.49
Jurkat	1.37	Dauji	1.53
H9	2.99	BALL	2.12
CCRF CEM	1.50	<b>Monocyte Cell</b>	
174xcCAM	2.31	U937	1.37
HUT102	1.28	THP-1	0.50
<b>ATL Cell (T Cell)</b>		<b>Tumor somatic Cell</b>	
MT2	1.22	HeLa	1.13
MT4	1.05	MDCK	0.81
TLOm1	0.59		

核抽出液のタンパク量をそろえてゲルシフトアッセイを行い、MOLT-4細胞のupper bandのバンド強度と種々の培養細胞でのupper bandのバンド強度を比較した結果。MOLT-4細胞のタンパク当たりのバンド強度(PSL/band/protein)を1としたときの、相対値を示している。

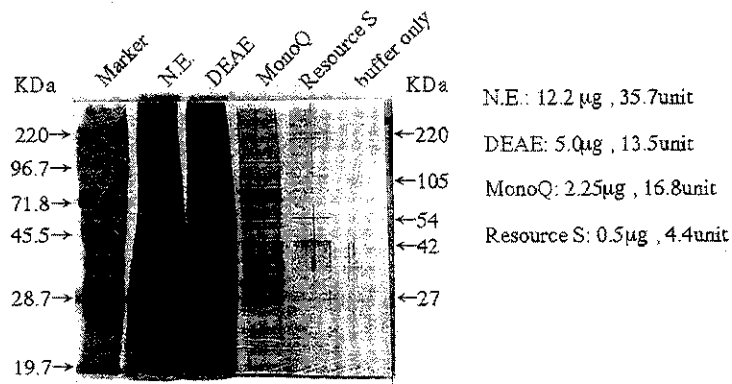


Fig. 4 SDS-PAGE

各精製段階で pool した fraction に含まれるタンパク質を視覚化するために、SDS-PAGE にかけたした結果は銀染色している。

Table 2 Purification table of URE binding protein

## 2nd Purification Table of URE binding protein

	Protein (mg)	Total Activity ( $\times 10^4$ units)	Specific Activity (units/ $\mu$ g)	Recovery (%)	Carrier DNA( $\mu$ g)
N.E.	240	3.46	0.144	100	5.0
DEAE	13.2	9.02	6.83	261	5.0
Superose 6	1.1	9.68	87.96	280	0.5

MOLT-4細胞核抽出液を数段階カラムにかけ、その過程における目的タンパクの精製結果を示した。目的タンパクの URE 領域結合活性の検出をゲルシフトアッセイで行い、1unit を 1pg の DNA をシフトさせる活性と定義した。

## 結論と考察

今回我々は HIV-LTR URE 領域結合蛋白出の検出と精製を試みた。その結果 URE 結合活性は用いた細胞株すべてに見い出され。しかしながら MOLT-4 細胞に見られた活性のうち最も強い Upper band は各細胞株で共通に検出されるものの、Lower band は細胞株ごとに異なっていた。Lower band は細胞特異性を示す可能性がかんがえられ今後この観点から Lower band の解析をすすめていきたいと考えている。本研究ではその活性の強さから MOLT-4 細胞より Upper band の精製をおこなった。その結果数種類のカラムクロマトグラフィーを経て比活性の上昇が約 600 倍の標品を得たがま

だ SDS 電気泳動で単一の標品には至っていない。今後 South western 法等を併用することにより URE 結合蛋白の同定と精製をさらに進め、その遺伝子クローニングをすすめる計画である。



## HIV 感染症患者に対するアダカラムを用いた単球・顆粒球吸着療法の効果に関する臨床研究

下山 孝<sup>1)</sup>、澤田 康史<sup>1)</sup>、白阪 琢磨<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>兵庫医科大学 第4内科

<sup>2)</sup>国立大阪病院 臨床研究部 ウイルス研究

### 研究要旨

単球・顆粒球吸着療法が、HAART 治療に十分反応しない HIV 感染患者の HIV ウイルス量を下げ、CD4陽性T細胞数を上昇させる治療効果を持っているかを探る目的で、酢酸セルロースビーズを充填したアダカラムを用いた単球・顆粒球吸着療法 (M-GCAP)をHAART治療に併用したHIV感染患者の白血球、(特にHIV感染単球と感染CD4陽性T細胞を含めた白血球)を体外循環技術を用い体外に選択的に除去し、HIV ウイルス量、CD4陽性T細胞数の変化を見た。M-GCAPをHAART治療に併用した群 (M-GCAP併用群)とHAART単独治療群に分け、HIV感染患者のHIVウイルス量、CD4陽性T細胞数検討した。HIV感染患者末梢血単核球中のHIV-DNA量は、M-GCAP治療併用群で5例中4例に低下したが、HAART単独治療群では全例低下しなかった。治療経過に伴う末梢血中CD4<sup>+</sup>Tリンパ球数の変化を見たところ、治療経過に伴いM-GCAP併用群ではCD4<sup>+</sup>Tリンパ球数が明らかに上昇し、M-GCAPが終了した後約8週間後においてもその傾向は継続していた。しかし、HAART単独治療群ではこのような変化は認めなかった。末梢血CD45RA<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> (Naive)T cells%は、M-GCAP治療併用群で治療とともに上昇したが、HAART単独治療群ではこの変化はなかった。

分担研究者：下山 孝

研究協力者：澤田康史、白阪琢磨

**Clinical study of the effect of monocyte-granulocytapheresis with Adacolumn for HIV infected patients**

Takashi Shimoyama<sup>1)</sup>, Koji Sawada<sup>1)</sup> and Takuma Shirasaka<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Internal Medicine IV, Hyogo College of Medicine, <sup>2)</sup> Osaka National Hospital, Clinical Research Center, Osaka AIDS Center