

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

①論文発表

なし

②学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし



## ケモカインレセプターに影響しない侵入阻害薬の開発

分担研究者：満屋 裕明（熊本大学医学部免疫病態学内科学第二 教授）

### 研究要旨

AIDS に対する化学療法は近年長足の進歩を遂げたが、薬剤耐性 HIV の出現が大きな問題となっている。我々は薬剤耐性変異株にも強力な活性を示し、かつ薬剤耐性発現の起こりにくい新規の薬剤開発の一例として CD4 と共に HIV のレセプターとして機能するケモカインレセプター (CCR5) に対するアンタゴニストの研究を進めており、その 1 つである AK602/ONO4128 は本年度に臨床第 2 相試験が予定されている。しかし CCR5 阻害剤が宿主（生体）側因子である CCR5 を阻害することによる長期的な生体への影響については現在のところ未知である。そこで本研究では CCR5 阻害剤が CCR5 を介したケモカインの作用に与える影響とその機序を中心に検討した。AK602 は CCR5 をコレセプターとして用いる R5 HIV-1 の増殖を試験管内 ( $IC_{50}$ : 0.2 nM) および動物モデルの系で強力に抑制した。アイソトープでラベルした AK602 は非常に強力な CCR5 に対する結合親和性 ( $K_D$  値:  $\sim 3$  nM) を持ちながら、ケモカイン (RANTES) の CCR5 への結合にはわずかしき影響を与えず、RANTES が CCR5 を介してもたらす生理的作用 (chemotaxis や CCR5 の internalization) についても完全には阻害しないことが分かった。AK602 と CCR5 の構造学的解析により AK602 が既存の CCR5 阻害剤の結合部位と異なる部位に結合、その中でも extracellular loop 2 の両端に位置するアミノ酸 (G163 と K191) が結合に重要であることを見出した。これらの結果は今後、ケモカインの作用に影響せずに抗 HIV 活性を発揮する新しい CCR5 阻害剤の開発に向けた有用な知見となり得る。

### A. 研究目的

分担研究者（満屋）は一貫して AIDS に対する治療法の研究開発を続けているが、最近満屋が蓄積してきた AIDS 治療薬開発の手法に細胞側の分子標的を対象にした基礎的アプローチを組み合わせた研究を進めている。その一例として細胞側因子であるケモカインレセプター (CCR5) に対する一群のアンタゴニスト (spirodiketopiperazine 誘導体) の研究を開始 (Maeda & Mitsuya, *JBC* 276:35194-200, 2001 でプロトタイプを発表)、最近同定した AK602/ONO4128 は 2003 年米国で健常者での初期安全性試験 (Phase 1) が終了、重篤な副作用は認められず、本年初頭第 2 相試験が開始される予定であ

る。しかし宿主（生体）側因子である CCR5 を阻害することが生体にどのような影響をもたらすかについては現在のところ未知である。満屋は CCR5 とそのリガンドである CC ケモカインとの相互作用・作用機序の解析も進めており (Miyakawa & Mitsuya, *JBC* 277:4649-55, 2002)、今回は AK602 と一連の誘導体を用いて CCR5 を介した HIV 感染を阻害する具体的なメカニズム、CCR5 阻害剤・ケモカインとレセプター (CCR5) の相互作用などの基礎的研究を進め、ケモカインレセプターの本来的作用であるケモカインを介した各種の生理作用に影響を与えにくい/与えない CCR5 阻害剤の開発を最終目標として研究を行った。

## B. 研究方法

1) 新規化合物の抗 HIV 活性評価には試験管内での評価 (p24 アッセイ・MTT アッセイ・MAGI アッセイ) に加え、SCID-hu マウス AIDS モデルを用いた評価法を用いた。

2) CCR5 阻害剤の作用機序の解析を目的として CCR5 阻害剤の  $^3\text{H}$  ラベル体作製および CCR5 の各ドメインに変異を加えた変異 CCR5 発現細胞株を多数作製、更に  $^{125}\text{I}$  ラベル化されたケモカイン (RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ ) を用いて野生株・変異 CCR5 との結合能や CCR5 阻害剤とケモカインとの相互作用の検討を行なった。

3) 分子構造解析機器 (SYBYL) を用いた構造モデリングの手法を用いて CCR5 の構造学的解析を行う。更に変異 CCR5 とケモカイン・CCR5 阻害剤との結合能の変化のデータを元に、これらと CCR5 との結合様式の解析を進めた。

### (倫理面への配慮)

開発中の化合物の臨床試験導入に際しては、動物実験などでその安全性を十分に確認した。さらに volunteers については医学部・大学内の該当する IRB で倫理面での適合性について許可を申請、認可された後で、臨床試験の具体的な内容、及び考えられる副作用の危険性について十分な説明を行い、承諾が得られた後に試験を開始する。

## C. 研究結果

ケモカインレセプター (CCR5) に対する一群のアンタゴニストは CCR5 をコレセプターとして用いる R5 HIV-1 の抑制効果を示した。特に AK602 (図 1) は試験管内で強力な活性を示し (IC<sub>50</sub>:0.2nM)、既存の抗 HIV 剤 [逆転写酵素阻害剤 (RTIs), プロテアーゼ阻害剤 (PIs)] と全く交差耐性を認めず、動物モデル (huPBL-NOD-SCID マウス) の系でも強力な抗 HIV 活性 (血中ウイルスレベルが 2 log 減少) と CD4 陽性細胞数の減少を有意に抑制した。

$^3\text{H}$ -ラベル化合物を用いて各種の CCR5 阻害剤 (AK602, SCH-C, TAK-779) と CCR5 の結合親和性解析を行った。その結果、AK602 は非常に強力な CCR5 に対する結合親和性 (K<sub>D</sub> 値: ~3 nM) を持ちながら、CCR5 のリガンドの 1 つである CC ケモカイン/RANTES の CCR5 への結合にはわずかしこ影響を与えず、RANTES が CCR5 を介してもたらす生理的作用 (chemotaxis や CCR5 の internalization) についても完全には阻害しないことが分かった。それに対して SCH-C と TAK-779 は RANTES と CCR5 の結合を高濃度で完全に阻害した (図 2)。また CCR5 のその他のリガンドである MIP-1  $\beta$  についても AK602 は CCR5 との結合を完全には阻害しなかったが MIP-1 $\alpha$  に対しては SCH-C や TAK779 同様に完全にその結合を阻害した。

このように CCR5 阻害剤がケモカインに与える影響は、化合物によりそれぞれ異なることが明らかとなったが、AK602 のこのような特性を構造学的に解析するために各種の CCR5 阻害剤の  $^3\text{H}$  ラベル体・ラベル化ケモカインと多数の変異 CCR5 発現細胞株を用いて結合能解析実験を行った。その結果、

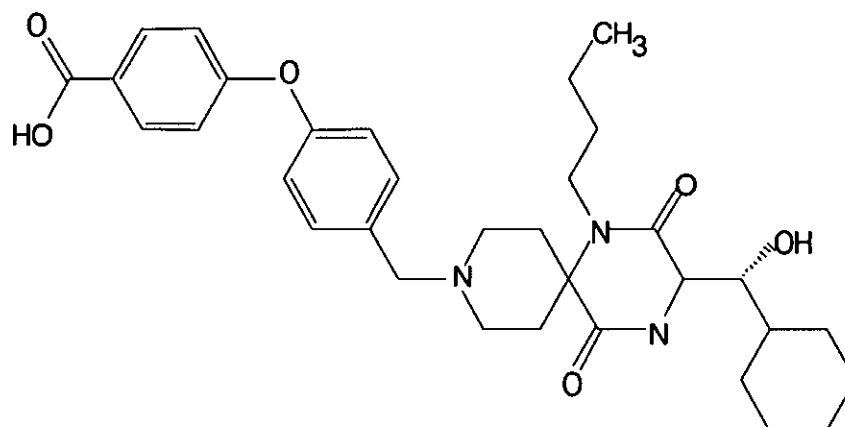


図 1. AK602/ONO4128 の構造

AK602 は SCH-C や TAK-779 (CCR5 の膜貫通ドメインの中心に結合) とは異なる部位に結合、その中でも extracellular loop 2 の両端に位置するアミノ酸 (G163 と K191) が結合に重要であることを示した (図 3)。

#### D. 考察

分担研究者 (満屋) は上記の通り、抗 AIDS 薬の研究・開発および耐性発現メカニズムの解析に早い時期から精力的に取り組んできたが、今回の CCR5 をターゲットとした抗 HIV 剤開発もその一つである。しかし今までの既存の薬剤 (RTIs, PIs) とは異なり、CCR5 阻害剤が宿主側因子を標的としているため長期間、CCR5 を阻害することによる生体への

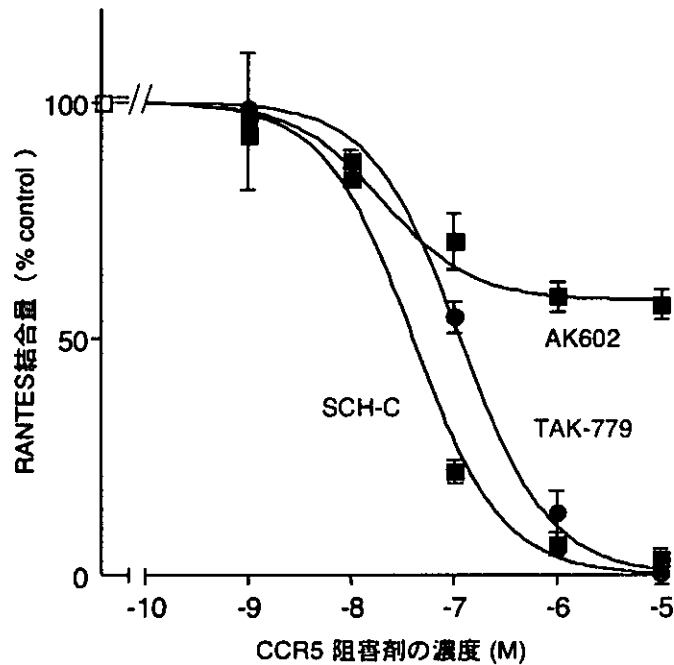


図 2. AK602 は CCR5 と RANTES の結合を軽度しか阻害しない

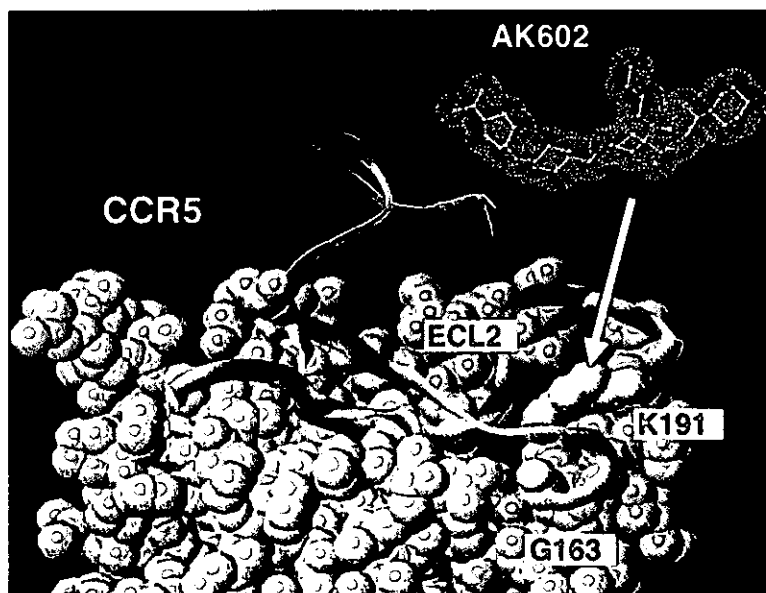


図 3. AK602 と CCR5 の結合

AK602 が CCR5 の台細胞外ドメイン (ECL2: magenta) の両起始部である G163 と K191 (both in red) の置換で CCR5 への結合を完全に失うことから、AK602 は ECL2 に強固に ( $K_D$ : 2.9nM) 結合すると思われる。

影響については注意深く検討する必要がある。その一方で、CCR5 を介した生理的作用への影響の少ない CCR5 阻害剤の開発を目指すことは非常に意義のあることと思われる。本研究の大きな成果として、既に臨床試験段階にある CCR5 阻害剤 (AK602) の基礎的研究の中から生体への影響の少ない薬剤開発に繋がるデータが得られたことが挙げられる。特に多数のアイソトープラベル体や変異 CCR5 株を用いた研究データは、構造学的モデリングの手法 (米国 Rutgers University の Edward Arnold 教授と既に共同研究を進めている) とより深く融合させることで、より詳細な情報を得ることができると期待される。

## E. 結論

本研究では CCR5 阻害剤 (AK602) の基礎的な生物学的活性を詳細に明らかにすると共に、特に CCR5 阻害剤の抗 HIV 活性とケモカイン阻害作用との関連を検討した。今回得られた結果を元に今後、CCR5 のどの様な部位 (構造) が HIV 感染に特異的に重要であるか、さらにはどのような特徴 (構造) を有する化合物がケモカインの作用に影響せず HIV のみを阻害できるか (HIV 特異的 CCR5 阻害剤) を検討するための研究を進めていく。

## G. 研究発表

### (発表論文)

1. Kohgo S, Yamada K, Kitano K, Sakata S, Hayakawa H, Nameki D, Kodama E, Matsuoka M, Mitsuya H, Ohru H. Synthesis of 4'-C-ethynyl and 4'-C-cyano purine nucleosides from natural nucleosides and their anti-HIV activity. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2003;22:887-889.
2. Chen X, Matsumi S, Mitsuya H, Zemlickal J. Synthesis of (Z)-(2,3-bis-hydroxymethyl) methylenecyclopropane analogues of purine nucleosides. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2003;22:265-274.
3. Matsuno N, Osato M, Yamashita N, Yanagida M, Nanri T, Fukushima T, Motoji T, Kusumoto S, Towatari M, Suzuki R, Naoe T, Nishi K, Shigesada K, Ohno R, Mitsuya H, Ito Y, Asou N. Dual mutations in the AML1 and FLT3 genes are associated with leukemogenesis in acute myeloblastic leukemia of the M0 subtype. *Leukemia*. 2003;17:2492-2499.

4. Matsumi, S., Kosalaraksa, P., Hsinyi Tsang, H., Kavlick, M.F., Harada, S., and Mitsuya, H. Pathways for the emergence of multi-dideoxynucleoside-resistant human immunodeficiency virus type 1 variants. *AIDS*. 2003; 17:1-11.
5. Koh, Y., Nakata, H., Maeda, K., Ogata, H., Bilcer, G., Devasamudram, T., Kincaid, J.F., Harrison, R.W., Weber, I.T., Ghosh, A.K., Mitsuya, H. Novel bis-tetrahydro-furanylurethane-containing nonpeptidic protease inhibitor (PI) UIC-94017 (TMC114) with potent activity against multi-PI-resistant human immunodeficiency virus in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003;47: 3123-3129.
6. Yoshimura K, Ido E, Akiyama H, Kimura T, Aoki M, Suzuki H, Mitsuya H, Hayami M, Matsushita S. The impact of highly active antiretroviral therapy by the oral route on the CD8 subset in monkeys infected chronically with SHIV 89.6P. *J. Virol. Methods*. 2003;112:121-128.
7. Choi Y, George C, Comin MJ, Barchi JJ Jr, Kim HS, Jacobson KA, Balzarini J, Mitsuya H, Boyer PL, Hughes SH, Marquez VE. A conformationally locked analogue of the anti-HIV agent stavudine. An important correlation between pseudorotation and maximum amplitude. *J. Med. Chem.* 2003;46:3292-3299.
8. Uneda, S., Hata, H., Matsuno, F., Nagasaki, A., Harada, N., Mitsuya, Y., Matsuzaki, H., and Mitsuya, H. A nitric oxide synthase inhibitor, N(G)-nitro-L-arginine-methyl-ester, exerts potent antiangiogenic effects on plasmacytoma in a newly established multiple myeloma severe combined immunodeficient mouse model. *Brit. J. Haematol.* 2003;120:396-404.
9. Uneda, S., Hata, H., Matsuno, F., Harada, N., Mitsuya, Y., Kawano, F., and Mitsuya, H. Macrophage inflammatory protein-1 alpha is produced by human multiple myeloma (MM) cells and its expression correlates with bone lesions in patients with MM. *Brit. J. Haematol.* 2003;120:53-55.
10. Kawamura T, Gatanaga H, Boriis DL, Connors M, Mitsuya H, Blauvelt A. Decreased stimulation of CD4+ T cell proliferation and IL-2 production by highly enriched populations of HIV-infected dendritic cells. *J Immunol.* 2003;170:4260-4266.

11. Little, R.F., Pittaluga, S., Grant, N., Steinberg, S.M., Kavlick, M.F., Mitsuya, H., Franchini, G., Gutierrez, M., Raffeld, M., Jaffe, E.S., Shearer, G., Yarchoan, R., and Wilson, W.H. Highly effective treatment of acquired immunodeficiency syndrome-related lymphoma with dose-adjusted EPOCH: impact of antiretroviral therapy suspension and tumor biology. *Blood*. 2003;101(12): 4653-4659.
12. Tamamura, H., Koh, Y., Ueda, S., Sasaki, Y., Yamasaki, T., Aoki, M., Maeda, K., Warai, Y., Arikuni, H., Otaka, A., Mitsuya, H., and Fujii, N. Reduction of peptide character of HIV protease inhibitors that exhibit nanomolar potency against multi-drug resistant HIV-1 strains. *J. Med. Chem.* 2003;46: 1764-1768.
13. Wang R, Harada S, Mitsuya H. and Zemlicka J. Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Reverse Transcriptase by Synadenol Triphosphate and Its E-Isomer. *J. Med. Chem.* 2003;46:4799-4802.
4. Maeda, K., Ogata, H., Harada, S., Tojo, Y., Miyakawa, T., Nakata, H., Koh, Y., Shibayama, S., Sagawa, K., Takaoka, Y., Fukushima, D., Moravek, J., Arnold, E., and Mitsuya, H. Determination of Binding Sites of a Unique CCR5 Inhibitor AK602 on Human CCR5. 11th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Abstract 540, Feb 8-11, 2004. San Francisco, CA.
5. Koh, Y., Aoki, M., Ogata, H., Yoshimura, K., and Mitsuya, H. Role of Gag Mutations in HIV in Its Replication Fitness and Acquisition of Resistance to Protease Inhibitors. 11th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Abstract 634, Feb 8-11, 2004. San Francisco, CA.
6. Mitsuya, H., Maeda, K., Nakata, H., Miyakawa, T., Ogata, H., Koh, Y., Shibayama, S., Sagawa, K., Takaoka, Y., Moravek, J., and Koyanagi, Y. AK602/ONO4128/GW873140, a novel HIV-specific spirodiketopiperazine CCR5 inhibitor potent against a wide spectrum of R5-HIV. Japan-US Cooperative Medical Science Program 16<sup>th</sup> Joint Meeting of AIDS Panels. Mar 7-12, 2004. Nashville,

#### 学会発表 (国際学会のみ)

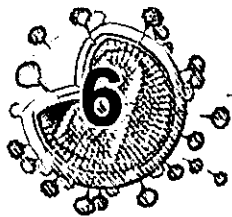
1. Maeda, K, Nakata, H., Miyakawa, T., Ogata, H., Koh, Y., Shibayama, S., Sagawa, K., Takaoka, Y., Moravek, J., Koyanagi, Y., and Mitsuya, H. CCR5 Binding Profiles of AK602/ONO-4128, A Novel HIV Specific And Potent Anti-HIV Spirodiketopiperazine (SDP) Derivative, Differ From Those of Other Existing CCR5 Inhibitors. 2nd IAS Conference on HIV Pathogenesis and Treatment. Abstract 531, July 13-16, 2003. Paris, France.
2. Harada, S., Matsumi, S., Ueno, T., and Mitsuya, H. Enzymatic Study of the Mechanism of the Emergence of HIV-1 Variants Resistant to Multiple Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors. 2nd IAS Conference on HIV Pathogenesis and Treatment. Abstract 531, July 13-16, 2003. Paris, France.
3. Tamiya, M., Sek, M.F., Kavlick, H., and Mitsuya, H. Amino Acid Insertions in the Proximity of Gag Cleavage Sites which Restore the Otherwise Compromised Replication of HIV Variants Highly Resistant to Multiple Protease Inhibitors (PI). Abstract H-808, September 14-17, 2003. Chicago, IL.
7. TN.Tamiya, S., Matsumi, S., Sek, M., Kavlick, M.F., and Mitsuya, H. Two new mechanisms of development of HIV-1 highly resistant to multiple protease inhibitors. Japan-US Cooperative Medical Science Program 16<sup>th</sup> Joint Meeting of AIDS Panels. Mar 7-12, 2004. Nashville, TN.

#### H. 知的所有権の出願・登録状況

日本国内：

1. 特願 2000-137975 整理番号 YP2000-007 (平成 12 年) 4'-C-エチニルピリミジンヌクレオシド化合物
2. 特願 2001-079611 整理番号 ONP3741 (平成 13 年) トリアザスピロ [5, 5] ウンデカン誘導体を有効成分とする HIV 感染の予防および/または治療剤





## ケモカインレセプターによる免疫応答に関する解析

分担研究者：森内 浩幸（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・教授）

研究協力者：森内 昌子（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科）

### 研究要旨

従来の治療法の限界（薬剤耐性ウイルスの出現や許容し難い副反応）を打開するための新たな治療戦略として、ケモカイン・レセプター、特に CCR5 をターゲットとした治療薬が注目されている。しかしこの新たな治療法が有効かつ安全に行えるために明らかにしておくべき事がある。第一に、CCR5 の発現には個人差があり、また様々な刺激により変動するため、治療効果を最大限に発揮させるためには、CCR5 の発現とその制御についての情報を得る事が望ましい。第二に、開発される薬剤が CCR5 に結合するケモカインの作用を阻害するか、逆にケモカイン類似の作用（細胞の遊走・活性化）をもたらすのであれば、免疫のバランスを崩し逆に HIV 感染者にとって不利な状況をもたらす恐れもある。本研究はこれらの課題を追求するものであるが、本年度は“CCR5 の発現とその制御機序”に関する研究では、①急性 EB ウイルス感染症に伴い CD4<sup>+</sup>T 細胞の CCR5 発現が亢進し、HIV 感染を促進することと、②CCR5 の発現がおそらく DBP（日内変動の影響を受ける転写因子）による CCR5 プロモーターの活性化を通じて概日リズムを取ることを明らかにした。“CCR5 ligands が HIV 感染に与える影響”に関する研究では、①RANTES (CCR5 agonist)+抗 CD3 抗体の刺激が HARRT でウイルスが検出限界以下となった患者の末梢血単核細胞からのウイルス発現を促すことと、② $\alpha$ -フェトプロテイン (CCR5 antagonist) は in vitro の HIV 感染を entry と post-entry の双方のステップで抑制することを示す。

#### A. 研究目的

従来の治療法の限界（薬剤耐性ウイルスの出現や許容し難い副反応）を打開するための新たな治療戦略として、ケモカイン・レセプター、特に CCR5 をターゲットとした治療薬が注目されている。しかしこの新たな治療法が有効かつ安全に行えるために明らかにしておくべき事がある。第一に、CCR5 の発現には個人差があり、また様々な刺激により変動するため、治療効果を最大限に発揮させるためには、CCR5 の発現とその制御についての情報を得る事が望ましい。第二に、開発される薬剤が CCR5 に結合するケモカインの作用を阻害するか、逆にケモカイン類似の作用（細胞の遊走・活性化）をもたらすの

であれば、免疫のバランスを崩し逆に HIV 感染者にとって不利な状況をもたらす恐れもある。本研究はこれらの課題を追求するものである。

#### B. 研究方法

##### 1) CCR5 の発現とその制御機序

①感染症併発：急性 EB ウイルス感染症の患者 6 名にインフォームド・コンセントを得た上で急性期と回復期の 2 回採血し、全血のまま CD4 と CCR5 の二重染色を行うとともに、末梢血単核球(PBMC)を分離し冷凍保存した。後日同時に興した PBMC



を無刺激のまま HIV 感染(R5-HIV-1 の ADA8 および X4-HIV-1 の NL4-3 を用いた)に供した。ウイルスの増殖は RT assay で評価した。

②日内変動：インフォームド・コンセントを得た上で HIV 非感染者から 6 時、12 時、18 時、そして 24 時に採血し PBMC を採取した。CCR5 の細胞表面への発現に関しては定量的フローサイトメトリーを用いて、また CCR5 mRNA の発現レベルについてはリアルタイム RT-PCR を用いて定量した。また 6 時と 18 時に採血し分離した PBMC から細胞核抽出液を調整し、これを用いて gel shift assay を施行した。CCR5 プロモーター/ルシフェラーゼ・レポーターの DBP 結合部位は site-directed mutagenesis を行い、DBP (日内変動の影響を受ける転写因子) expression vector のトランスフェクションにより強制発現させ、レポーター活性を luciferase assay で決定した。

## 2) CCR5 ligands が HIV 感染に与える影響

①特異的 CCR5 ligands：インフォームド・コンセントを得た上で HARRT によりウイルスが検出限界以下となった患者から採血し、PBMC 培養において RANTES (CCR5 agonist)+少量の抗 CD3 抗体の刺激がウイルス発現を促すかどうか RT assay で評価した。

②非特異的 CCR5 ligands：急性 HIV 感染実験では  $\alpha$ -フェトプロテイン (CCR5 antagonist) の添加の有無で HIV-1 を感染させ、ウイルス増殖を RT assay で評価した。また HARRT によりウイルスが検出限界以下となった患者の PBMC または CD8 抜去 PBMC 培養において、 $\alpha$ -フェトプロテイン (CCR5 antagonist) の添加の有無でのウイルス増殖を RT

assay で評価した。

## 研究結果

### 1) CCR5 の発現とその制御機序

①感染症併発：急性 EB ウイルス感染症に伴い CD4<sup>+</sup>T 細胞の CCR5 発現が亢進し (図 1)、R5-HIV-1 感染を促進した (図 2)。一方急性 EB ウイルス感染症は CXCR4 の発現には殆ど影響を及ぼさず、X4-HIV-1 感染への作用も認めなかった (data not shown)。

②日内変動：CCR5 の発現は朝低く夜高い概日リズムの傾向が認められ、これは転写のレベルでも細胞表面への発現のレベルでも現れていた (図 3・4)。転写因子 DBP の PBMC における発現も朝低く夜高い概日リズムが明らかに認められた (図 5)。DBP は CCR5 プロモーターに結合し (図 6) その活性を亢進させるが、DBP 結合部位を変異させるとその効果はなくなった (図 7)。

### 2) CCR5 ligands が HIV 感染に与える影響

①特異的 CCR5 ligands：HARRT でウイルスが検出限界以下となった患者の末梢血単核細胞からのウイルス発現は刺激なしでは起こらないし、少量の抗 CD3 抗体の刺激だけでは多くの場合不十分であった。しかし RANTES (CCR5 agonist)+少量の抗 CD3 抗体の刺激は、抑制されていたウイルスの再増殖を促した (図 8)。

②非特異的 CCR5 ligands： $\alpha$ -フェトプロテイン (CCR5 antagonist) は in vitro の HIV 急性感染を抑制した (図 9)。HARRT でウイルスが検出限界以下と

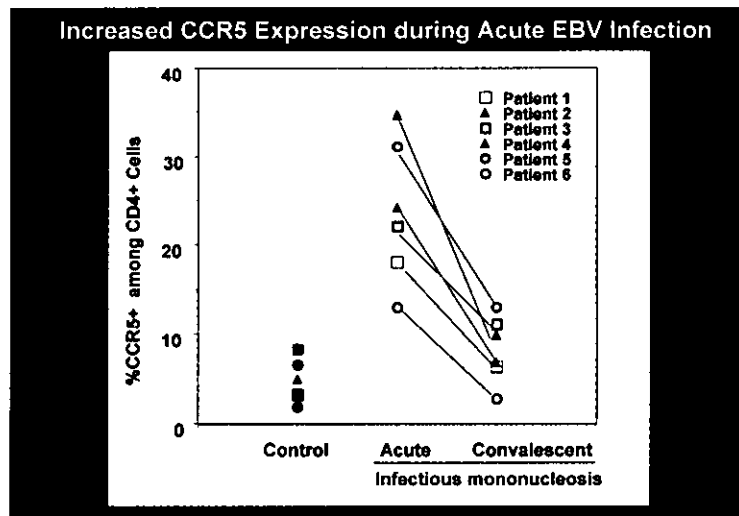


図 1.

なった患者の PBMC から抗 CD3 抗体の刺激によりウイルス発現を誘導する際に、 $\alpha$ -フェトプロテインは抑制的に作用した (図 10)。しかしこの PBMC

から CD8 陽性細胞を除去して同様の実験を行うと、逆に  $\alpha$ -フェトプロテインはウイルスの発現を促す場合もあった (図 11)。

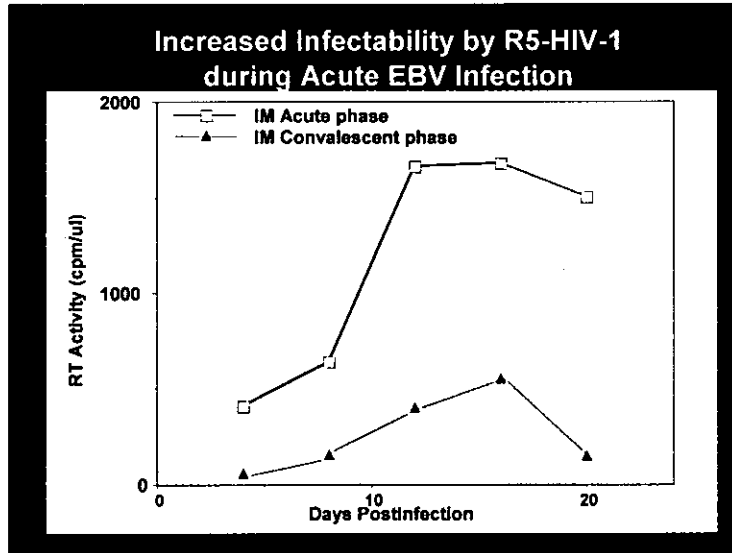


図 2.

### CCR5 mRNA Expression at 6:00 and 18:00

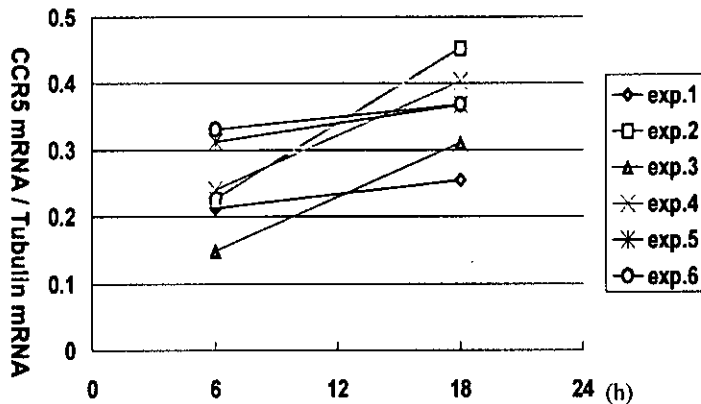


図 3.

### Circadian Rhythm of CCR5 Expression on CD4 T Cells

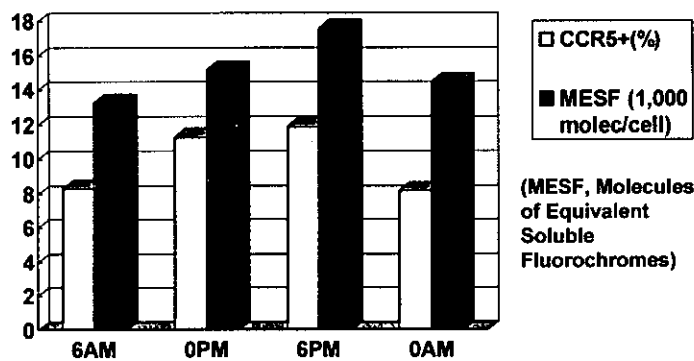


図 4.

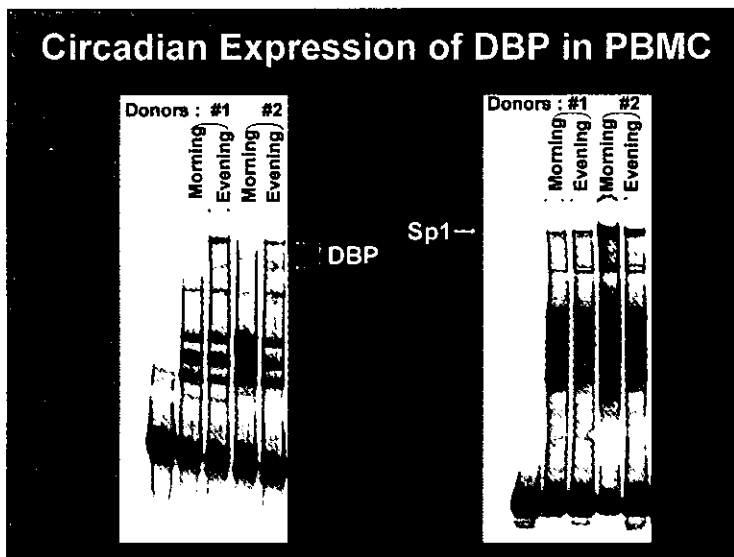


図 5.

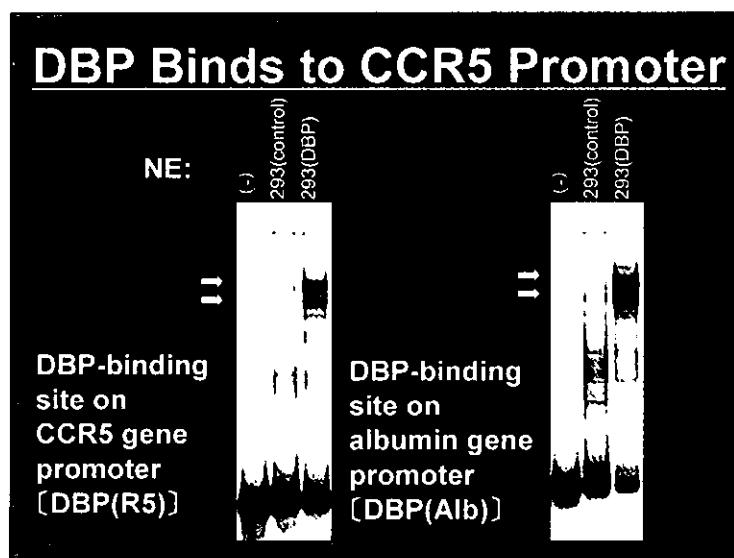


図 6.

### DBP Transactivates CCR5 Promoter

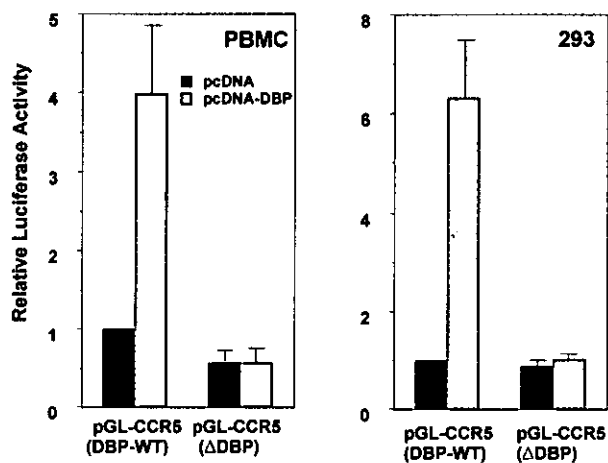


図 7.

## RANTES as a Co-Stimulator of T Cells Can Induce HIV-1 Infection

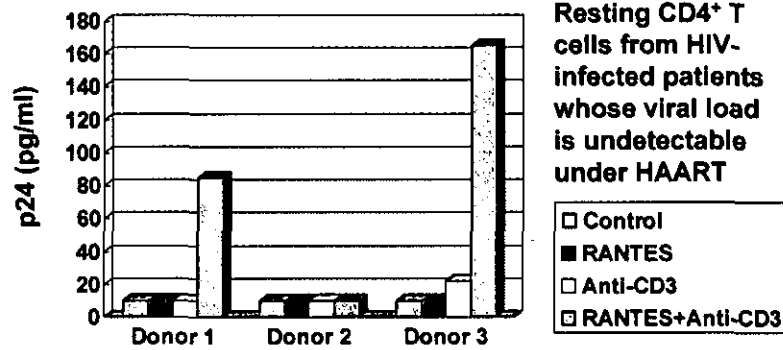


図 8.

## AFP Suppresses HIV-1 Infection

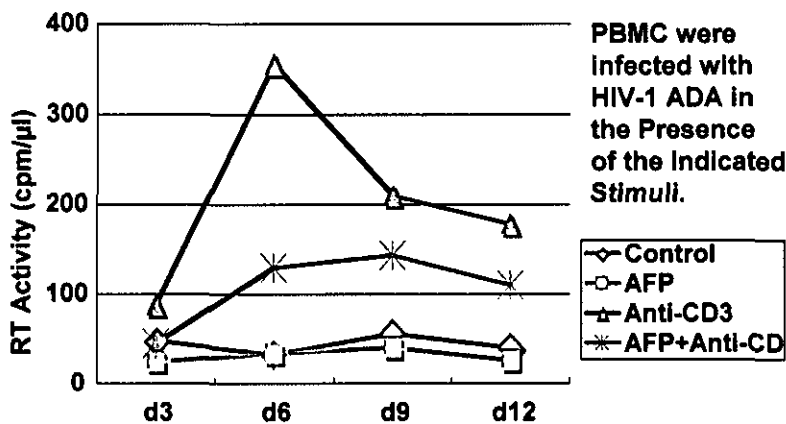


図 9.

AFPはウイルスが検出限界未満に抑えられた患者の未分画PBMCにおけるHIV-1増殖を誘導する？

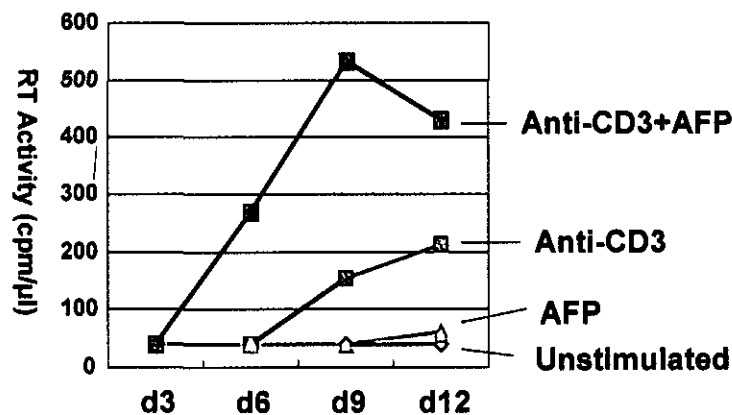


図 10

## AFPはウイルスが検出限界未満に抑えられた患者のCD8抜去PBMCにおけるHIV-1増殖を抑える？

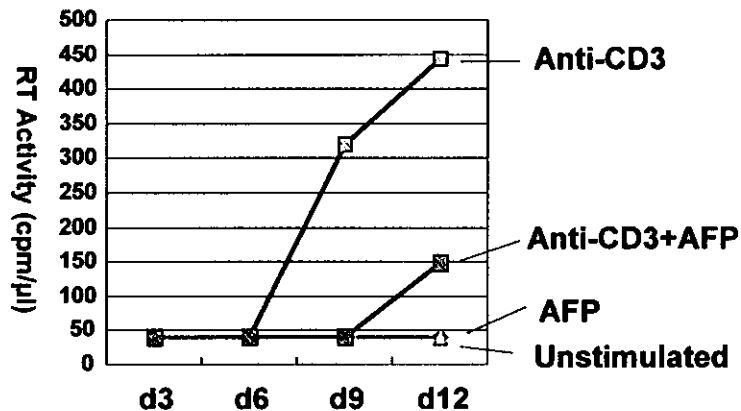


図 11.

### D. 考察

#### 1) CCR5 の発現とその制御機序

CCR5 の発現に元々大きな個人差が認められており、その発現度が感染者の予後に直接影響していることが示されている。さらに私達は同じ個人であっても、概日リズムやある種の感染症の併発によって CCR5 の発現が変動しうることを示した。このような CCR5 の発現とその制御についての情報は、この分子を標的とする治療法の投与量や投与計画を立案するに際して有用な情報となるかも知れない。

#### 2) CCR5 ligands が HIV 感染に与える影響

CCR5 をターゲットとする治療薬がこのレセプターからの刺激を惹起する場合、いったん HIV 感染が成立した細胞ではその発現を促してしまう恐れがある。また逆に CCR5 からの刺激を抑制してしまう場合には免疫（特に細胞性免疫）を減弱させる可能性もあり、やはり状況によっては感染者にとって不利益となりうる。

### E. 結論

CCR5 の発現や機能を解析する事は、HIV 感染の病態生理の理解を深めるだけでなく、これをターゲットとする治療の効果を高め、副反応を軽減するためにも不可欠である。

### F. 健康危険情報

### G. 研究発表

#### ①論文発表

1. Moriuchi, M., and Moriuchi, H. YY1 transcription factor downregulates the expression of CCR5, a co-receptor for HIV-1 entry. *J. Biol. Chem.* 278:13003-7 (2003).
2. Moriuchi, M., Tamura, A., and Moriuchi, H. In vitro reactivation of HIV-1 upon stimulation with scrub typhus rickettsial infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 68:557-61 (2003).
3. Moriuchi, M., and Moriuchi, H. Increased infectivity by HIV-1 of peripheral blood lymphocytes in acute infection with Epstein-Barr virus. *J. Med. Virol.* 71:343-346 (2003).

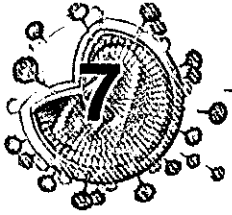
#### ②学会発表

1. Moriuchi, M. and Moriuchi, H. YY1 transcription factor down-regulates expression of CCR5, a major co-receptor for HIV-1. Keystone symposium "Twenty Years of HIV Research: From Discovery to Understanding". Banff, Alberta, Canada. March 29-April 4, 2003.
2. Moriuchi, M. and Moriuchi, H. Increased infectability by HIV-1 of peripheral blood lymphocytes from acutely Epstein-Barr virus infected individuals. 103rd American Society for Microbiology General Meeting, Washington DC, USA. May 18-22, 2003.

3. Moriuchi, M. and Moriuchi, H. HTLV-I Tax trans-activation of lactoferrin promoter. 11<sup>th</sup> International Conference on Human Retrovirology:HTLV and Related Viruses. San Francisco, CA, USA. June 9-12, 2003.
4. Moriuchi, H. and Moriuchi, M. Seminal fluid enhances replication of HTLV-I: implications for male-to-female transmission. 11<sup>th</sup> International Conference on Human Retrovirology:HTLV and Related Viruses. San Francisco, CA, USA. June 9-12, 2003.
5. Moriuchi, H. and Moriuchi, M. Possible role of GATA-3 in downregulation of CCR5 expression in Th2 lymphocytes. The Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji, Hyogo, Japan. August 25-28, 2003.

H. 知的所有権の出願・登録状況：該当なし。





## HAART 下における抗 HIV 免疫再構築に関する臨床研究

分担研究者：松下 修三（熊本大学エイズ学研究センター病態制御分野 教授）

研究協力者：木村 哲也（熊本大学エイズ学研究センター病態制御分野）

### 研究要旨

長期非進行症例の中には HIV に対する細胞性・液性の免疫応答が保たれ、ウイルスの増殖が制御されていると考えられる症例が存在する。我々は長期間 HAART が有効な症例に自己由来の分離株に対する中和抗体が再構築される症例があることを報告してきた。今回このような症例における HIV 特異的ヘルパー T 細胞反応の再構築を検討した。長期にわたり HAART 療法下にある 27 症例中 8 例に、自己のウイルスに対する有意な中和活性の増加を認めた。これらの症例では中和抗体に変化のみられない症例に比較して、HIV 抗原に反応して IL2 や IFN- $\gamma$  を産生する T 細胞の数が有意に増加していた。今回の我々の研究で、有効な HAART 療法の継続により、細胞性・液性の免疫応答が回復する症例があることを示した。このような症例は少数であるが、免疫療法の開発に貴重な示唆を与えられる。

#### A. 研究目的

強力な抗ウイルス剤の多剤併用療法 HAART (highly active antiretroviral therapy; HAART) の導入により、感染者の臨床経過は大きく改善した。しかし、長期間潜伏感染細胞が存在することが証明され、現在使用可能な抗ウイルス剤では治癒は不可能と言う認識となった。さらに、薬剤耐性ウイルスの出現、ミトコンドリア障害やリポストロフィーなどの薬剤の長期毒性も出現し、最新の治療ガイドラインでは治療開始をできるだけ遅らせて、「長期間の良好なコントロールを得る (long-term control)」ことを目標とするようになった。このような状況のなかで、免疫療法開発に期待が寄せられているが、新たな治療戦略を構築するためには、HAART 導入後の病態を詳細に検討する必要がある。我々は HAART 開始前に分離した自己由来の HIV に対する中和抗体活性を経時的に調べることにより、HIV 特異的免疫反応の再構築を解析し、少数ながら自己由来の分離株に対する中和抗体が再構築される症例があることを報告した。一方、細胞性免疫について

は、慢性感染症例では HIV 特異的ヘルパー T 細胞の反応が欠如しており、HAART が開始されると CTL 活性も減弱すると報告されているが、長期間 HAART が有効な症例に関して HIV に対する細胞性免疫の再構築に関する報告はほとんどない。今回我々は、症例数を増やし、自己の分離株に対する中和抗体の再構築に関して 2 年以上の観察を行い、さらに特異的な細胞性免疫の再構築を検討した。

#### B. 研究方法

(倫理面への配慮) ; 27 例の HIV 慢性感染症例を対象とした。臨床分離株 ; HAART 開始前の血液から末梢血単核球分画を分離し、CD8<sup>+</sup> 細胞を免疫ビーズ法にて除去したあとに抗 CD3 抗体で刺激し、IL2 含有 15% FCS 加 RPMI1640 培地にて 7-10 日培養した細胞培養上澄を臨床分離株として用いた。ウイルス感染価が十分でない場合、健常人由来の CD8<sup>+</sup> 細胞を除去した活性化末梢血単核球細胞を用いて感染価を増強した。分離したウイルスが末梢血クワン



スピーシスの代表かどうか調べるため、エンベロープ V3 の塩基配列を決定した。中和活性の測定;経時的に採取した患者血漿から精製した IgG を用いて、中和活性を測定した。50  $\mu$  l の分離ウイルス (500TCID<sub>50</sub>) を 50  $\mu$  l の IgG サンプル (1mg/ml) と混合し、標的細胞である、MAGI/CCR5 細胞に加え、48 時間培養後、beta-galactosidase 活性を galactostar system を用いた測定した。それぞれの実験で 5 種類の健常人由来の IgG サンプルをコントロールとして用い、有意差を検定した。実験の概略について図 1 に示す。HIV 特異的 T 細胞反応の測定; 抹消血単核球を HIV 抗原または CMV 抗原刺激後 20 時間培養し、細胞内に産生される IL2, IL4, IFN- $\gamma$  rIFN を FACS で解析した。

(倫理面への配慮)

本研究を行うに当たり各症例には研究の概要を説明し同意を得た上で採血し解析した。なお本研究の

倫理的・科学的妥当性は熊本大学付属病院の先進医療審査委員会で審査され、了承されている。

### C. 研究結果

我々は、自己由来臨床分離株に対する、血漿 IgG による中和活性の、HAART 療法開始前後における変動について検討した。27 例中 4 例では、HAART 開始時から有意な中和活性を認め、治療中も高い中和活性が保たれた。残りの 23 例中 16 例はでは IgG 濃度 500mg/500  $\mu$  g/ml の濃度で、有意ではあるが弱い中和活性が観察された。これらの症例の中から 2 年以上の有効な治療経過の中で、5 例に自己由来の分離株に対する中和活性の増強が認められた。一方、7 例では HAART 開始時点で中和活性を認めなかったが、そのうち 3 例では HAART 開始 12 ヶ月以降で有意な中和活性の上昇が認められた。これらの結果を表 1 に示す。このように、観察期間を延長

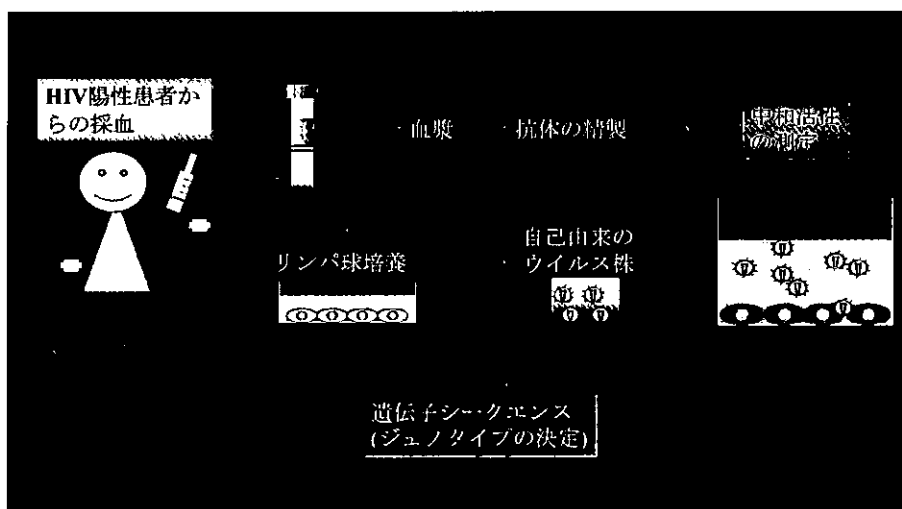


図 1. 自己由来ウイルス株中和実験の手順

表 1. HAART 療法下における自己由来の HIV 株に対する中和抗体活性の再構築

Base line		During HAART	
High	4/27 (15%)	High	4/4 (100%)
Low	16/27 (59%)	Low	11/16 (69%)
		Increased	5/16 (31%)
No activity	7/27 (26%)	No	4/7 (57%)
		Increased	3/7 (43%)

することにより、自己由来 HIV に対する液性免疫応答が回復する症例が増加した。我々は以前の報告で HIV に対する中和抗体活性が増加してくる症例では HAART 開始時の CD4 細胞数が少なく (<200/mm<sup>3</sup>), 低いレベルの HIV-RNA リバウンド (blips) がみられる症例が多い傾向があると報告した。今回、中和抗体の増強がみられた 8 例の中にも同様の症例が存在したが、コントロール群に比較した場合、有意な差としては認められなかった。

これらの症例の臨床経過を詳細に解析すると、HIV に対する免疫応答の再構築がみられた症例の中には HAART 開始時の CD4<sup>+</sup> 細胞数が低く (<200/mm<sup>3</sup>) と低いレベルの HIV-RNA の blips がみられる症例があった。我々はこれらの症例の HIV 特異的ヘルパー T 細胞反応を検討した。中和抗体が弱いか検出されない 23 例の中から中和抗体が再構築された 8 例と再構築が認められない 15 例を比較し

た。HIV 感染症由来の抹消血単核球を HIV 抗原または CMV 抗原刺激後 20 時間培養し、細胞内に産生される IL2 および rIFN- $\gamma$  を FACS で解析したところ、HIV 抗原で刺激した場合、中和抗体が再構築された 8 例ではコントロール群に比べて特異的ヘルパー T 細胞が有意に増加していた。一方、CMV 抗原に対する反応は両群間に差がなかった。代表的な症例のデータを図 2 に示す。# 17 の症例では HIV 抗原に反応して IL2 および IFN- $\gamma$  rIFN を産生する細胞が出現するが、# 14 の症例では反応がみられない。一方、CMV 抗原で刺激した場合、両者とも同様の反応が観察された。また、中和抗体活性の増強が見られた症例 (REC 群) と見られなかった症例 (CTRL 群 CTRL 群) の抗原刺激下におけるサイトカイン産生の違いに関して IL2 と IFN- $\gamma$  rIFN の両者を産生する細胞の頻度のを統計学的に比較をした (図 3) にしめた。HIV 抗原刺激では REC 群に

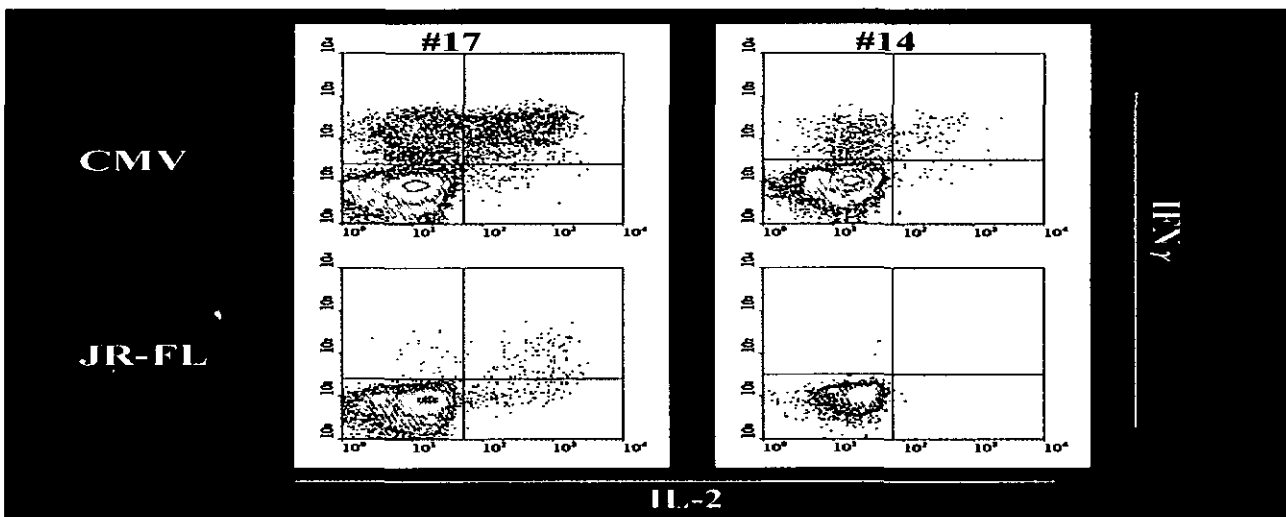


図 2. 抗原特異的 CD4<sup>+</sup>T 細胞反応の FACS による検出

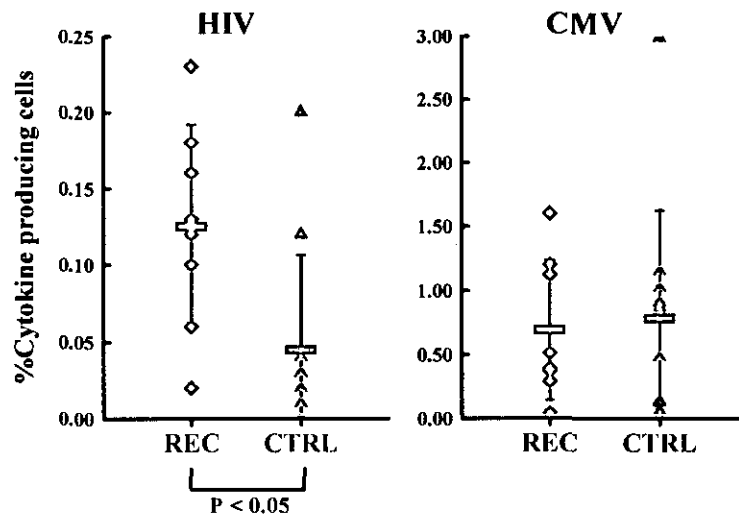


図 3. 抗原特異的に IFN- $\gamma$  と IL-2 を産生する CD4<sup>+</sup>T 細胞の頻度

IL2 および IFN- $\gamma$  rIFN を産生する細胞が有意に出現するが、CMV 抗原で刺激した場合、両者に有意差は認められない。これらのデータは、一部の症例では、有効な HAART の継続によって、HIV に対する中和抗体と HIV 特異的ヘルパー T 細胞の再構築がおこることを示すと考えられる。

#### D. 考察

我々は HAART 開始後に自己由来の分離株に対する中和抗体が再構築されうることが報告してきた。一方、細胞性免疫については、慢性感染例では HIV 特異的ヘルパー T 細胞の反応が欠如しており、HAART が開始されると CTL 活性も減弱すると報告され、長期間 HAART が有効な症例に関して HIV に対する細胞性免疫の再構築に関する報告はほとんどなかった。今回の我々は、HAART 療法のみにて、細胞性および液性の免疫再構築が起こることを初めて示した。今回我々が示した症例における HIV 特異的細胞性および液性の免疫が、今後強化維持されるかどうか、またどのような条件で誘導されるかの検討が重要である。

#### E. 結論

我々は、HAART 療法のみにて、HIV に対する細胞性および液性の免疫再構築が起こることを初めて示した。このような症例は少数であるが、多くの症例に必要と考えられる免疫療法の開発に貴重な示唆を与えらると思われる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### ①論文発表

1. Yoshimura, K., Ido, E., Akiyama, H., Kimura, T., Aoki, M., Suzuki, H., Mitsuya, H., Hayami, M., Matsushita, S. The impact of highly active anti-retroviral therapy by the oral route on the CD8 subset in monkeys infected chronically with SHIV<sub>89.6P</sub>. *J. Virological Methods*. 112:121-128, 2003.

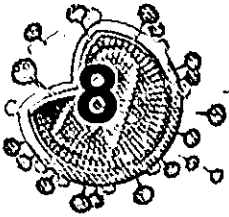
2. Koito A, Kameyama Y, Cheng-Mayer C, Matsushita S. Susceptibility of mink (Mustelavision)-derived cells to replication by human immunodeficiency virus type-1. *J. Virol.*, 77:5109-5117, 2003.
3. Koito, A., Shigekane, H., and Matsushita, S. Ability of small animal cells to support the postintegration phase of human immunodeficiency virus type-1 replication. *Virology*, 305:181-191, 2003.

##### ②学会発表

1. Matsushita S., Kimura T., Shirai N., Koito A., Yoshimura K.: Evaluation of residual viral replication for optimization of HAART. 1<sup>st</sup> International Workshop on HIV Persistence during Therapy. 12.10-12, 2003, Saint Martin, FWI.
2. Yoshimura K, Kimura T, Matsushita S: Proviral DNA (pDNA) and turn over levels in HIV-1-positive long-term non-progressors (LTNPs). 2003 International Meeting of the Institute of Human Virology. 9.29-10.3 2003, Baltimore, U.S.A.
3. Matsushita S. Status of HIV/AIDS in Japan. International Symposium of the Foundation of East Asia Network on HIV. 9.26, 2003, Seoul, Korea.
4. Matsushita S.: Anti-HIV immunity of patients with long-term viral suppression by HAART. U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program 15<sup>th</sup> Joint Meeting of the AIDS Panels, 3.5-7, 2003, Okinawa.
5. 吉村和久、木村哲也、松下修三: Proviral DNA (pDNA) and turn over levels in HIV-1-positive long-term non-progressors (LTNPs). 第 17 回日本エイズ学会学術集会・総会、11.27-29, 2003, 神戸
6. 木村哲也、吉村和久、祁内 梓、小糸 厚、松下修三: HIV エンベロープ C3 変異による抗 HIV 中和抗体からの逃避. 第 17 回日本エイズ学会学術集会・総会、11.27-29, 2003, 神戸
7. 祁内 梓、木村哲也、吉村和久、小糸 厚、松下修三: HIV-nef 融合蛋白を用いた細胞性・液性免疫の誘導. 第 17 回日本エイズ学会学術集会・総会、11.27-29, 2003, 神戸

#### H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

なし



## Structured Treatment Interruptions (STI) による免疫療法

分担研究者：岡 慎一（国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センター 部長）

研究協力者：田沼 順子<sup>1</sup>、木村 哲<sup>1</sup>、菊池 嘉<sup>1</sup>、立川 夏夫<sup>1</sup>、  
照屋 勝治<sup>1</sup>、源河いくみ<sup>1</sup>、瀧永 博之<sup>1</sup>、山中ひかる<sup>2</sup>、  
土屋 亮人<sup>2</sup>

（<sup>1</sup>国立国際医療センターエイズ治療・開発センター、<sup>2</sup>(財)エイズ  
予防財団リサーチレジデント）

### 研究要旨

Structured Treatment Interruptions (以下 STI) は、HAART を計画的に中止・再開し小規模なウイルス血症をおこして HIV 特異的免疫の活性化を目的とした治療である。当院を受診した急性 HIV 感染者に対して同治療を実施し、臨床経過・効果等を評価した。2000 年 11 月 1 日から 2002 年 12 月 31 日に、26 例 (M:F=24 : 2) が本治療に entry した。平均年齢 36 (21-56) 歳、治療前の平均 CD4 数は 479 (49-4459) / $\mu$ l、HIV-RNA 5.33 (3.26-6.91) log /ml であった。①経時的な Western Blot 法での band 増加、②6 ヶ月以内の抗体陽転化、③抗体陰性かつ HIV-RNA 陽性のいずれかで急性 HIV 感染と診断した。原則 d4T/3TC/IDV/RTV を使用し、3 週間の休薬を、計 5 回挿入した。休薬は、HIV-RNA が 50copies/ml 未満に達し CD4 数 300/ $\mu$ l 以上であることを確認してから行った。また、最初の休薬は、3 ヶ月以上かつ HIV-RNA 50copies/ml 未満に達し 1 ヶ月治療を行った後に行った。2004 年 1 月 23 日現在、26 例中 14 例が全治療過程を終了した。6 例は主に患者本人の希望で治療が中断された。4 例は CD4 数が低く治療継続が必要であった。残り 2 例は、治療進行中である。休薬回数や治療期間を問わず、治療終了後、12 ヶ月以上観察期間を経ている者は 17 例で、その治療終了後 6 ~ 12 ヶ月後の平均 HIV-RNA 10,000copies/ml 未満を有効、それ以上を無効、治療継続を必要とした者を脱落とすると、「有効」4 例、「無効」9 例、「脱落」4 例であった。今後、薬剤耐性の有無や、より多くの無治療群との比較を行う予定である。

### A. 研究目的

HIV 感染症は宿主の CD4 細胞数を減少させ、進行性の免疫不全を引き起こす。多剤併用による強力な抗ウイルス療法：HAART (highly active anti-retroviral therapy) は、HIV の増殖を抑制し、免疫不全の進行をくい止め、予後を劇的に改善させた。

以前の抗 HIV 療法は、「Hit Early and Hard」とよ

ばれ、早くから強力な治療を導入するのがよいとされてきた。しかし、HIV を体内から根絶するのは、事実上不可能であることが分かり、長期的な副作用が問題となってきたため、最近の治療開始は、より遅くなっている。CD4 数が 200/ $\mu$ l 以下になると、様々な日和見感染症のリスクが高まることから、CD4 数が 200/ $\mu$ l に達する前に導入するのが望まし