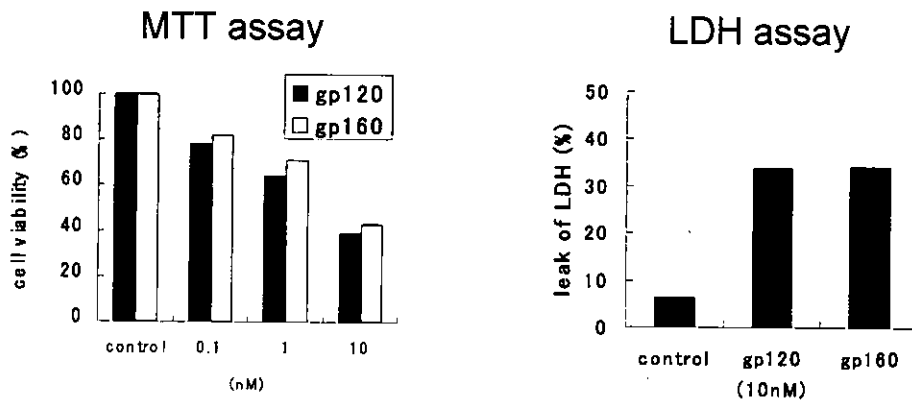


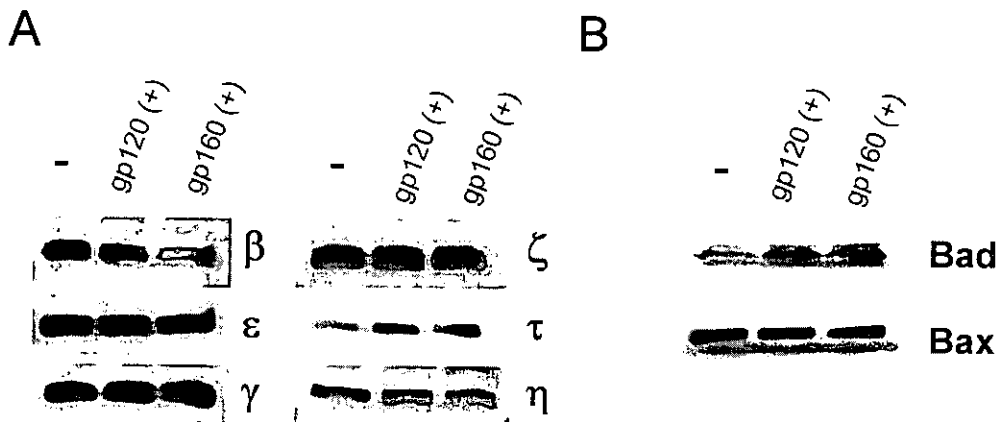
図1



**HIV-1 gp120/160はHUVECの細胞死を誘導する**

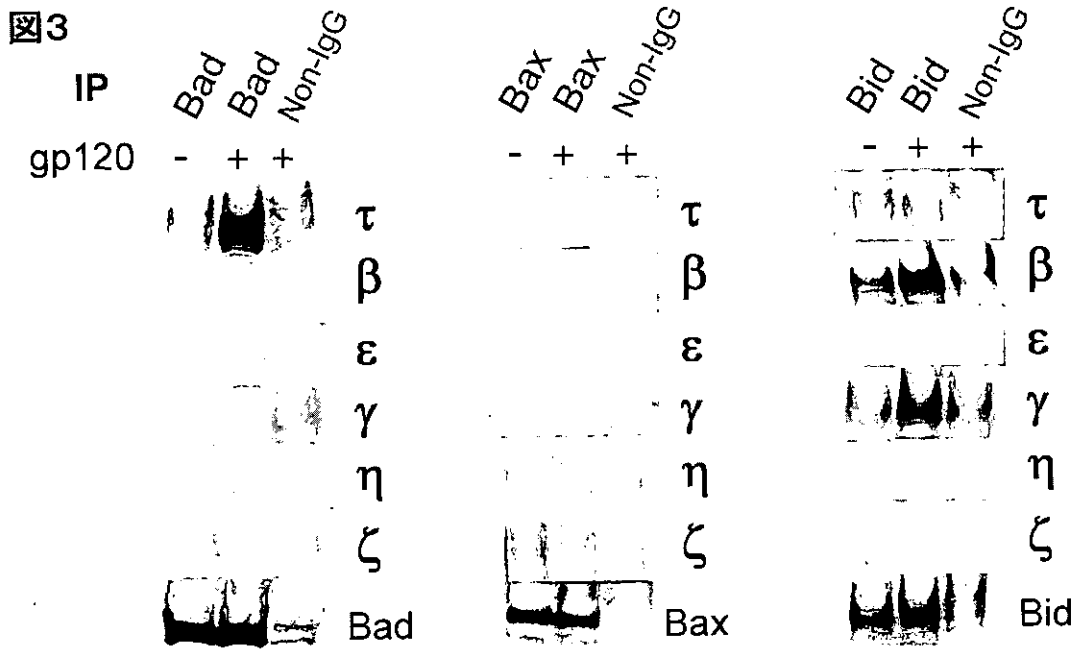
リコンビナント gp120/160をHUVECに追加後、24時間37 °Cで培養を行い、MTT(右)及びLDHアッセイによって定量的に細胞死を測定した。MTT(5 mg/ml)を1/10量加え37 °Cで4時間培養後、570nmの吸光度を測定した。LDHの漏出は、培養上清並びに細胞分画のLDH活性を560nmの吸光度で測定した。

図2



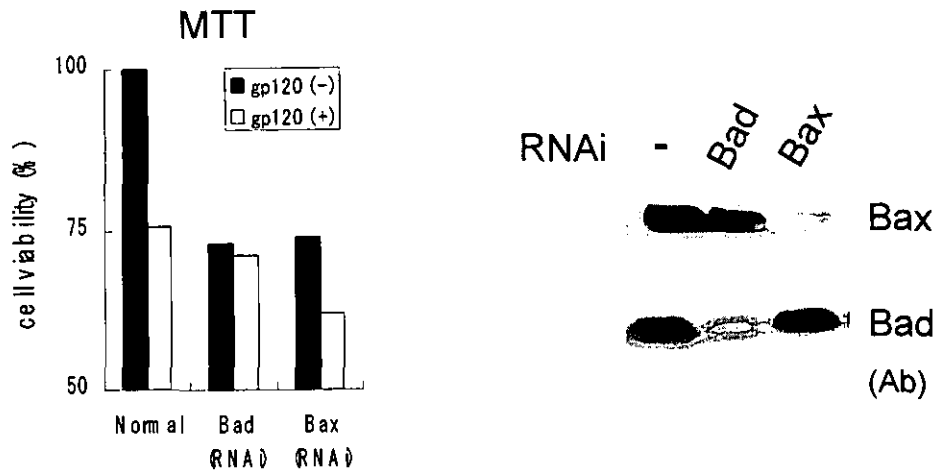
**gp120/160は14-3-3τ及びBadの発現量を増加させる。**

HUVECを10 nMのgp120/160で刺激後、cell lysateを調整し各々の14-3-3アイソマーとBad, Baxの特異抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。図左は14-3-3の発現量、右はBad, Baxの発現量を見たもの。



gp120刺激により、14-3-3蛋白質とpro-apoptotic 蛋白との特異的結合が見られた。  
 10 nM gp120刺激後、cell lysateを調整しBad, Bax, Bidを認識する特異抗体を用いて免疫沈降を行った。  
 終了後、各々の14-3-3アイソマー及びBad, Bax, Bidを認識する特異抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。

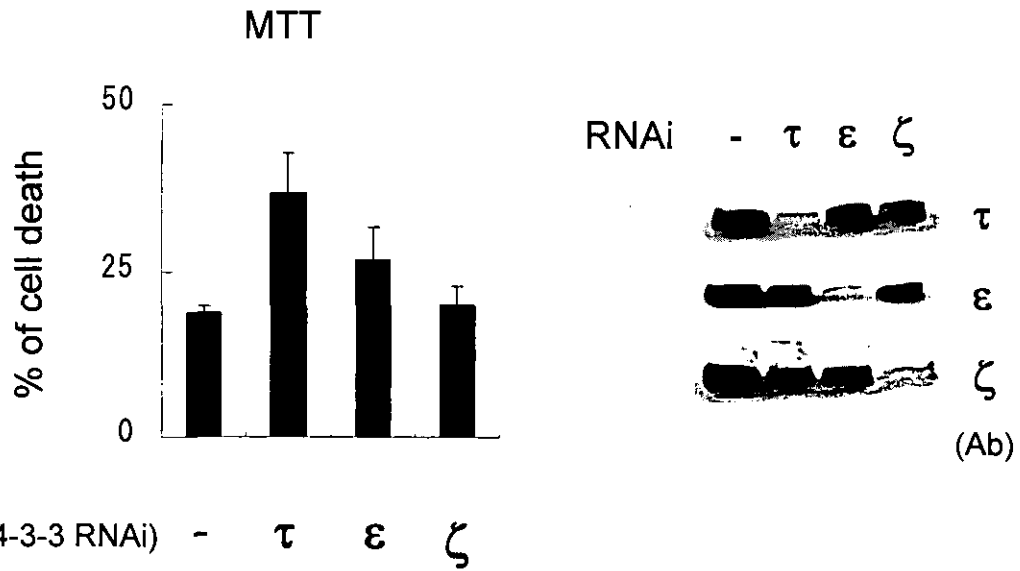
**図4**



Bad RNAiは、gp120によって引き起こされる細胞死を抑制する。

Bad 及び Bax 特異的siRNA(5nM)をトランスフェクション後、72時間培養を行った。10 nM gp120を追加し24時間培養を行いMTTにて定量的に細胞死を測定した。siRNA未処理でしかもgp120で刺激しないHUVECのcell viabilityを100%として計算した。図右は、各々のRNAiのノックダウン効果をウエスタンブロッティングにて解析したもの。

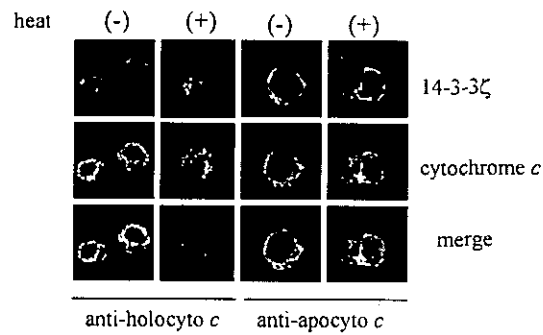
図5



14-3-3τRNAiは、gp120によって引き起こされる細胞死を増強した。

14-3-3τ, ε, ζ 特異的siRNA(1 nM)をトランスフェクション後、72時間培養を行った。10 nM gp120を追加し24時間培養を行いMTTにて定量的に細胞死を測定した。図右は、各々のRNAiのノックダウン効果をウエスタンブロッティングにて解析したもの。

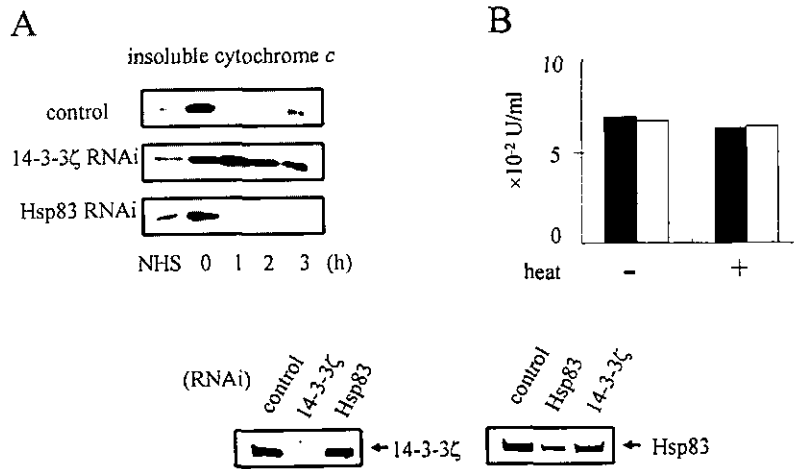
図6



熱ストレス下のS2細胞では、14-3-3ζとapo-cytochrome cの相互作用が見られた。

S2 cellを37°C1時間の熱処理後、HoloもしくはApo-cytochrome cを特異的に認識する抗体と14-3-3ζ特異抗体で免疫蛍光染色を行い、共焦点レーザーにて解析した。

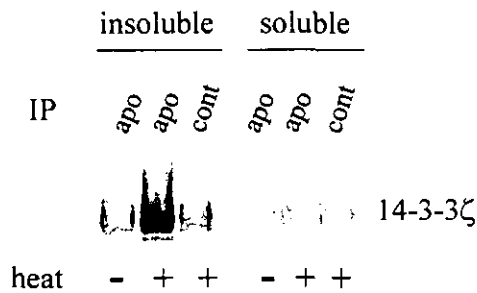
図7



14-3-3 $\zeta$ のRNAiによる発現抑制は、熱凝集したApo-cytochrome cの脱凝集を著しく阻害した。

A. 14-3-3 $\zeta$  もしくは Hsp83 特異的 dsRNAでS2 cellを96時間培養後、37°C1時間熱ストレスを加えた後27°Cにもどし0~3時間培養を行った。各々不溶性分画を調整して、Apo-cytochrome cの発現量をウエスタンにて解析した。NHSは熱未処理を表す。B. 熱処理前、後の細胞よりcell lysateを調整し cytochrome cの酵素活性を測定した。黒は14-3-3 $\zeta$  dsRNA未処理、白は14-3-3 $\zeta$  dsRNA処理細胞を示す。下段パネルは、各々のRNAiの効果をウエスタンにて解析したもの

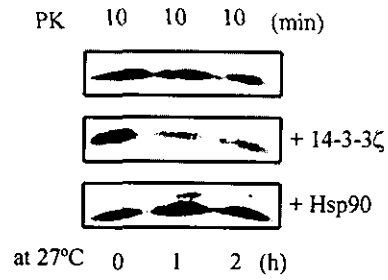
図8



14-3-3 $\zeta$ は不溶性分画でApo-cytochrome cと相互作用を示す。

熱ストレス前、後のS2細胞より不溶性及び可溶性分画を調整し、Apo-cytochrome c特異抗体にて免疫沈降をおこなった。続いて14-3-3 $\zeta$ 特異抗体にてウエスタンブロットを行い相互作用について解析した。Controlはnon-immunize IgGを示す。

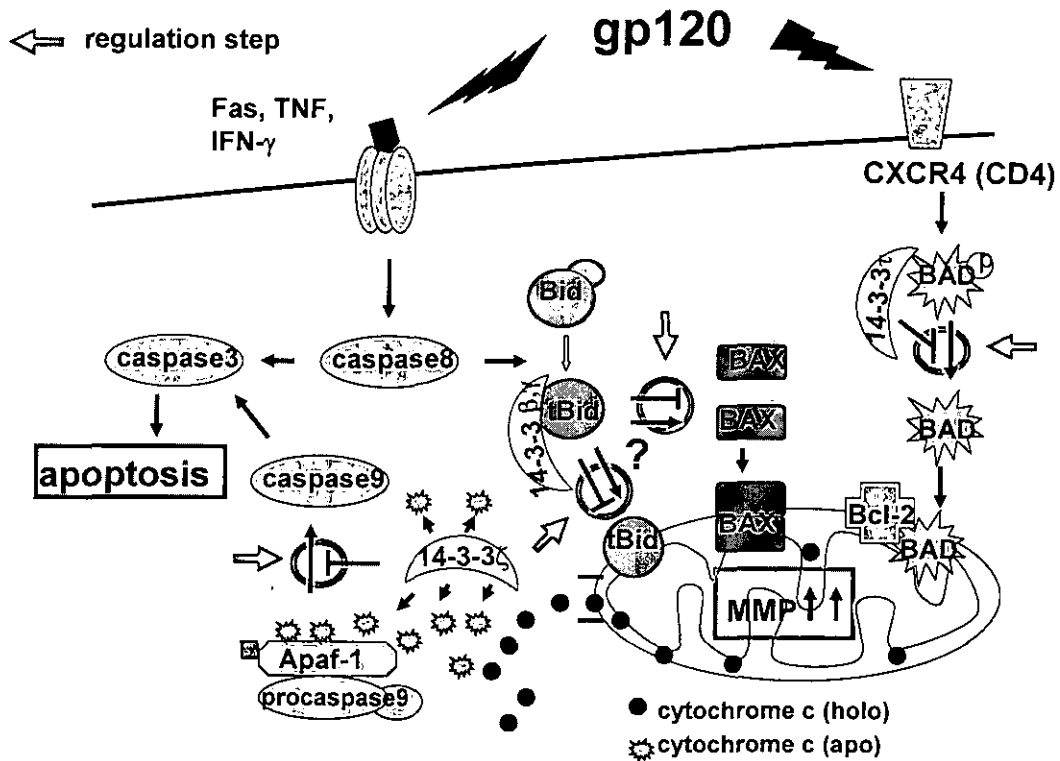
図9



14-3-3 $\zeta$ 蛋白質は、熱凝集したApo-cytochrome cを直接可溶化する。

14-3-3 $\zeta$ RNAi細胞の熱不溶性分画を調整し、リコンビナント14-3-3 $\zeta$  (10  $\mu$ g)を加えて0~2時間室温で培養後、Proteinase K(PK)を10  $\mu$ g/mlで追加して氷柱で10分間反応させた。終了後ウエスタンにてapocytocrome cの発現量を比較した。

図10



厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）  
分担研究報告書

HIV-1 の遺伝子発現を標的とした新規薬剤 JTK-101：  
エイズ脳症治療薬への可能性

分担研究者 馬場昌範 鹿児島大学医学部教授  
研究協力者 岡本実佳 鹿児島大学医学部講師  
王 欣 鹿児島大学医学部非常勤研究員

エイズ脳症治療薬開発を目的として、HIV-1 の遺伝子発現を標的とした新規薬剤の探索を行った結果、慢性感染細胞からのウイルス抗原の産生を、新規ナフトレン誘導体の JTK-101 が、非常に低い濃度で抑制することを見出した。JTK-101 の OM-10.1 および MOLT-4/II<sub>B</sub> 細胞における 50% 有効濃度は、それぞれ 0.0014 および 0.0057  $\mu\text{M}$  であった。一方、JTK-101 の 50% 毒性濃度は、それぞれ 3.8 および 1.3  $\mu\text{M}$  であった。以上のことから、JTK-101 は HIV-1 慢性感染細胞において、非常に強力かつ選択的な抗 HIV-1 効果を有することが証明された。OM-10.1 細胞を TNF- $\alpha$  で刺激した時におこる HIV-1 mRNA 発現に対する JTK-101 の影響を、リアルタイム PCR 法により調べた結果、JTK-101 は HIV-1 mRNA の発現を、0.001  $\mu\text{M}$  の濃度において 50% 以上抑制することが分かった。しかし、JTK-101 は末梢単核球を含む、HIV-1 急性感染細胞においては、きわめて弱い抗 HIV-1 活性しか示さなかった。以上の結果から、JTK-101 は感染細胞（特に慢性感染細胞）において、HIV-1 遺伝子発現に深く関与している何らかの宿主細胞因子に作用していることが示唆された。

#### A. 研究目的

異なる作用機序を有する複数の抗 HIV-1 薬、すなわち逆転写酵素阻害薬とプロテアーゼ阻害薬を併用する、いわゆる highly active antiretroviral therapy (HAART) の進歩によって、エイズ患者の予後は著しく改善した。しかし一方で、薬剤耐性ウイルスの問題と並んで、HIV-1 感染時の重篤な合併症であるエイズ脳症などの中枢神経障害をどのようにして予防あるいは治

療するかということが、未だに解決されていない大きな課題の一つである。HAART は確かにエイズ脳症などの、HIV-1 による中枢神経障害の発生頻度を大幅に低下させると報告されているが、これら既存の薬剤の大部分（特にプロテアーゼ阻害剤）は blood-brain barrier の通過性がきわめて悪く、また HIV-1 による中枢神経障害の発症機構から考えて、予防・治療には現在の HAART では不十分であり、新しい作

用機序を有する薬剤の開発が必要であると思われる。そこで今年度は、HIV-1 の遺伝子発現（転写）の過程を標的とし、脳内における HIV-1 のリザーバーである、慢性感染ミクログリアにも有効な抗エイズ薬の同定を行うことを本研究の目的とした。

## B. 研究方法

(1) 細胞：HIV-1 慢性感染細胞として骨髄系細胞由来の OM-10.1 細胞およびリンパ系細胞由来の MOLT-4/III<sub>B</sub> 細胞を用いた。HIV-1 非感染細胞としては CEM 細胞を用いた。これらの細胞は 10% ウシ胎仔血清 (FBS) および抗生物質添加 RPMI 1640 メジウムを用いて継代維持した。一方、末梢単核細胞 (PBMCs) は健常人の末梢血から分離した後、20% FBS 添加 RPMI 1640 メジウムにて培養した。

(2) 薬剤：今回、抗 HIV-1 効果を検討した薬剤は、HIV-1 の long terminal repeat (LTR) で発現が制御されたレポーター遺伝子を、HeLa 細胞にトランスフェクションすることにより構築されたアッセイ系を用いて、日本たばこ産業株式会社が独自の薬剤ライブラリーの中から、100,000 薬剤以上をスクリーニングした結果、選びだされた新規物質、われわれによって HIV-1 の転写阻害活性が証明されたフルオロキノリン誘導体 K-37、および核酸系逆転写酵素阻害薬の zidovudine (AZT) と lamivudine (3TC) である。全ての薬剤は dimethyl sulfoxide の毒性の影響を除くため、10 mM かそれ以上の濃度

に融解したあと、メジウムを用いて適切な濃度に調整した。

(3) 抗ウイルスアッセイ：薬剤の HIV-1 効果は、慢性感染細胞からの培養上清中への p24 抗原産生の抑制により定量した。すなわち、1 ng/mL の濃度の TNF- $\alpha$  で刺激した OM-10.1 細胞、もしくは未刺激の MOLT-4/III<sub>B</sub> 細胞を  $1 \times 10^5$  cells/mL に調整し、種々の濃度の薬剤とともに 3 日間培養した。その後上清を採取し、その中の p24 抗原量を ELISA 法により定量した。一方、薬剤の細胞毒性は培養 3 日目に生細胞数を MTT 法にて測定することにより調べた。薬剤の抗 HIV-1 効果は、上記の慢性感染細胞株に加えて、T リンパ球系培養細胞株の CEM 細胞と健常人 PBMCs を用いた急性感染系においても評価を行った。CEM 細胞および PBMCs をそれぞれ  $1 \times 10^5$  および  $1 \times 10^6$  cells/mL に調整し、HIV-1 (III<sub>B</sub> 株) を multiplicity of infection = 0.01 で感染させ、途中 4 日目で 5 倍に継代した後、さらに 3 日間培養し、上清中の p24 量と生細胞数を測定した。

(4) リアルタイム定量 RT-PCR 法：OM-10.1 細胞 ( $2 \times 10^5$  cells/mL) を種々の濃度の薬剤とともに 2 時間培養し、1 ng/mL の濃度の TNF- $\alpha$  で刺激後、さらに薬剤とともに 24 時間培養した。その後、細胞より total RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR 装置を用いて、HIV-1 mRNA の定量を行った。用いたプライマーおよびプローブは、HIV-1 の molecular clone である HXB2 の塩基配列を用い、転写開始部位から下流の

部分に設定した。すなわち、F582-605 (5'-TGGTAACTAGAGATCCCTCAG ACC-3'), R662-682 (5'-AGCTCCTCT-GGTTTCCCTTTC-3') をプライマーとして、P619-647 (5'-TGGAAAATCTCT-CTAGCAGTGGCGCCGAAC-3') をプローブとして用いた。

(5) DNA マイクロアレイ分析：同定した薬剤の各種遺伝子の発現に及ぼす影響を調べるため、DNA マイクロアレイを用いて、約2万個の mRNA レベルを定量した。OM-10.1 細胞 ( $2 \times 10^5$  cells/mL) を  $0.1 \mu\text{M}$  の濃度の薬剤存在下において2日間培養した。その後、細胞より total RNA を抽出し、アジレント社製 In-situ オリゴ DNA マイクロアレイキットを用いて、RNA の標識およびハイブリダイゼーションを行うとともに、同社のスキャナーを用いてデータを取得した。

(倫理面への配慮について)

本研究では、健常者から抗 HIV-1 アッセイのために PBMCs の供給を受けたが、その際にはその検体を用いて遺伝子解析に関連する実験は一切行わないことを必ず説明し、提供者からの同意を得た。また、DNA マイクロアレイ実験には、ヒトの樹立された培養細胞株のみを用い、個人を特定できるような初代培養細胞 (例: PBMCs) は用いなかった。

### C. 研究結果

スクリーニングにより、活性が認められた約100種類の新規薬剤について、

OM-10.1 細胞を用いて、慢性感染細胞における抗 HIV-1 効果を検討したところ、それらの中で新規ナフタレン誘導体の JTK-101 (図1) に非常に強力な抗 HIV-1 効果を認めた。

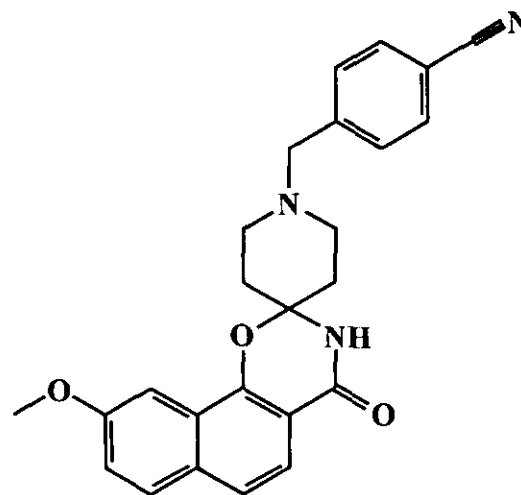


図1. JTK-101 の化学構造

OM-10.1 細胞は通常の標準培養条件では、培養上清中に産生する HIV-1 や p24 抗原はごく僅か ( $1-2 \text{ ng/mL}$ ) であるが、 $1 \text{ ng/mL}$  の TNF- $\alpha$  で刺激すると、短時間で大量 (約  $100 \text{ ng/mL}$ ) の p24 抗原を産生するようになる。このような系において、JTK-101 は約  $16-80 \text{ nM}$  の濃度で、TNF- $\alpha$  刺激による OM-10.1 細胞からの p24 抗原の産生をほぼ完全に抑制した (図2)。一方、OM-10.1 細胞の増殖に対しては、約  $2 \mu\text{M}$  の濃度までほとんど影響を与えなかった。JTK-101 の OM-10.1 細胞における 50% 有効濃度 ( $\text{EC}_{50}$ ) および 50% 細胞毒性濃度 ( $\text{CC}_{50}$ ) の値は、それぞれ  $0.0014 \pm 0.0005$  および  $3.8 \pm 0.2 \mu\text{M}$  であった (表1)。



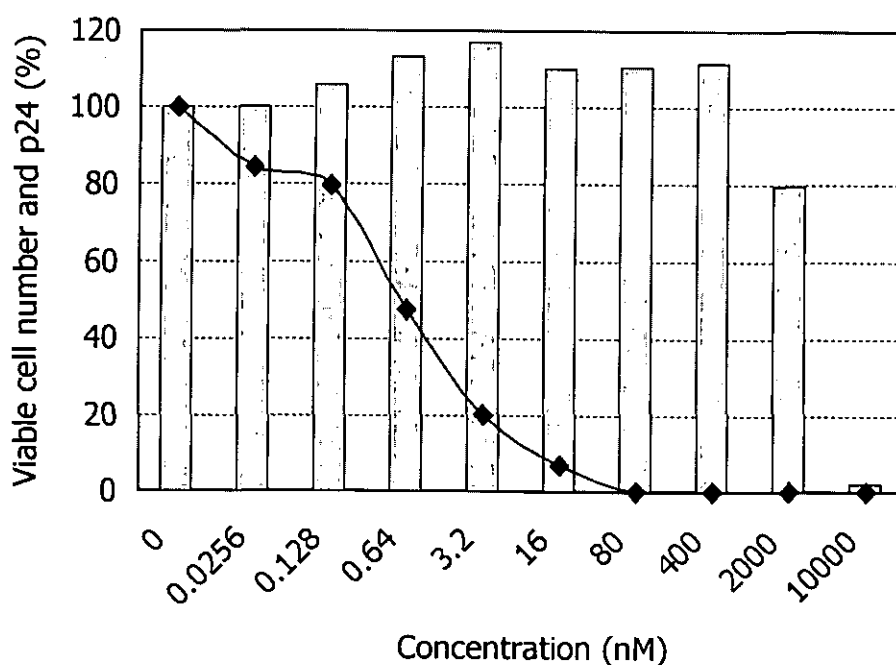


図2. JTK-101 の OM-10.1 細胞における抗 HIV-1 効果. OM-10.1 細胞を種々の濃度の薬剤とともに2時間培養し, 1 ng/mL の濃度の TNF- $\alpha$  で刺激後, さらに薬剤とともに3日間培養した。その後上清を採取し, その中の p24 抗原量を ELISA 法により定量した (折れ線グラフ)。一方, 薬剤の細胞毒性は培養3日目に生細胞数を MTT 法にて測定することにより調べた (棒グラフ)。

一方, HIV-1 の転写過程を強力かつ選択的に阻害するフルオロキノリン誘導体 K-37 について, 同じ条件下で OM-10.1 細胞における抗ウイルス効果について検討したところ,  $EC_{50}$  および  $CC_{50}$  がそれぞれ  $0.033 \pm 0.012$  と  $2.1 \pm 0.3 \mu\text{M}$  という値となった (表1)。これらの結果から, JTK-101 は K-37 よりも強い活性と高い選択性を有する薬剤であることが明らかとなった。

次に, JTK-101 の抗 HIV-1 効果について, 慢性持続性 HIV-1 産生株である MOLT-4/III<sub>B</sub> 細胞を用いて検討した。この細胞は OM-10.1 細胞と異なり,

TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインで刺激しない状態においても, 培養上清中に大量の感染性ウイルス粒子や p24 抗原 (100 ng/mL 以上) を産生する。JTK-101 は MOLT-4/III<sub>B</sub> 細胞においても, ウイルスの増殖を非常に低い濃度で選択的に抑えることが分かった。MOLT-4/III<sub>B</sub> 細胞における JTK-101 および K-37 の  $EC_{50}$  は, それぞれ  $0.0057 \pm 0.0025$  と  $0.074 \pm 0.033 \mu\text{M}$  であった (表1)。一方, コントロールとして用いた核酸系逆転写酵素阻害薬の 3TC は, 全く抗 HIV-1 効果を示さなかった。

表 1. JTK-101 および K-37 の慢性感染細胞における抗 HIV-1 効果

薬剤	細胞	EC <sub>50</sub> (μM)	CC <sub>50</sub> (μM)
JTK-101	OM-10.1	0.0014 ± 0.0005	3.8 ± 0.2
	MOLT-4/III <sub>B</sub>	0.0057 ± 0.0025	1.3 ± 0.4
K-37	OM-10.1	0.033 ± 0.012	2.1 ± 0.3
	MOLT-4/III <sub>B</sub>	0.074 ± 0.033	> 5
3TC	OM-10.1	> 20	> 20
	MOLT-4/III <sub>B</sub>	> 20	> 20

3TC を除き，実験は独立した 3 回の実験結果の mean ± S.D.

EC<sub>50</sub> : 50% 有効濃度.

CC<sub>50</sub> : 50% 細胞毒性濃度.

JTK-101 の急性感染細胞における抗 HIV-1 効果について検討したところ，不思議なことに，JTK-101 は CEM 細胞および PBMCs の何れの細胞においても，慢性感染細胞で認められたような，強力かつ選択的な抗 HIV-1 効果を示さなかった (表 2)。HIV-1 III<sub>B</sub> 株感染 CEM 細胞における JTK-101 の EC<sub>50</sub> および CC<sub>50</sub> は，それぞれ 0.031 ± 0.007 および 1.0 ± 0.5 μM であり，さらに PBMCs における EC<sub>50</sub> および CC<sub>50</sub> は，それぞれ 0.39 ± 0.25 および 1.2 ± 0.9 μM であった。すなわち，細胞毒性も慢性感染細胞におけるそれと比較して，やや強い傾向にあった。ことから，本薬剤は PBMCs の急性感染細胞において，きわめて低い選択性しか示さないことが分かった。

これに対して K-37 は，急性感染細

胞と慢性感染細胞の両方において，ほぼ同等の抗 HIV-1 効果を有していた (表 2)。また，慢性感染細胞と異なり，急性感染細胞においては，逆転写酵素阻害薬は非常に強い抗ウイルス効果を発揮し，例えばコントロールに用いた AZT の CEM 細胞における EC<sub>50</sub> は 0.0026 ± 0.0005 μM であった。

JTK-101 が慢性感染細胞において，非常に強い抗 HIV-1 効果を発揮することから，本薬剤は HIV-1 増殖サイクルの後期課程，すなわち，プロウイルス DNA からの遺伝子発現より後の段階を阻害するものと推察された。そこで，JTK-101 の TNF-α 刺激 OM-10.1 細胞における mRNA の産生 (ウイルス遺伝子の転写過程) に及ぼす影響について，リアルタイム定量 PCR 法を用いて検討した。

表 2. JTK-101 および K-37 の急性感染細胞における抗 HIV-1 効果

薬剤	細胞	EC <sub>50</sub> (μM)	CC <sub>50</sub> (μM)
JTK-101	CEM	0.031 ± 0.007	1.0 ± 0.5
	PBMC	0.39 ± 0.25	1.2 ± 0.9
K-37	CEM	0.11 ± 0.07	1.8 ± 0.6
	PBMC	0.095 ± 0.074	3.2 ± 0.5
AZT	CEM	0.0026 ± 0.0005	> 1

実験は独立した 3 回の実験結果の mean ± S.D.

EC<sub>50</sub> : 50% 有効濃度.

CC<sub>50</sub> : 50% 細胞毒性濃度.

JTK-101 は OM-10.1 細胞において、濃度依存性に HIV-1 mRNA の産生を抑制することが分かった (図 2)。この効果は強く、0.001 μM の濃度においても、薬剤を加えないときと比較して、60% の mRNA 産生を抑制した。一方、JTK-101 はコントロールとして用いた宿主細胞の glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の mRNA レベルに対し、0.1 μM の濃度までほとんど影響を与えなかった。以上の結果から、本薬剤は HIV-1 の遺伝子発現 (転写) の過程を抑制することが明らかとなった。

さらに JTK-101 の各種遺伝子の発現に与える影響を調べるため、OM-10.1 細胞に 0.1 μM の薬剤を作用させ、DNA マイクロアレイを用いて解析を行った。その結果、表 3 に示すように、約 2 万 2 千のヒトの既知および未知の

遺伝子のうち、その発現が再現性を持って 2 倍以上増加したまたは抑制されたものは、それぞれ 14 および 80 であった。特に、80 遺伝子のうち、3 遺伝子は 3.16 (10<sup>0.5</sup>) 倍以下に抑制された。現在、それらの遺伝子について、さらに詳細に解析中である。

表 3. JTK-101 がヒトの遺伝子発現に与える影響

変動	遺伝子数 ( / 22,153 )
> 10	0
> 3.16	0
> 2	14
< 1/2	80
< 1/3.16	3
< 1/10	0

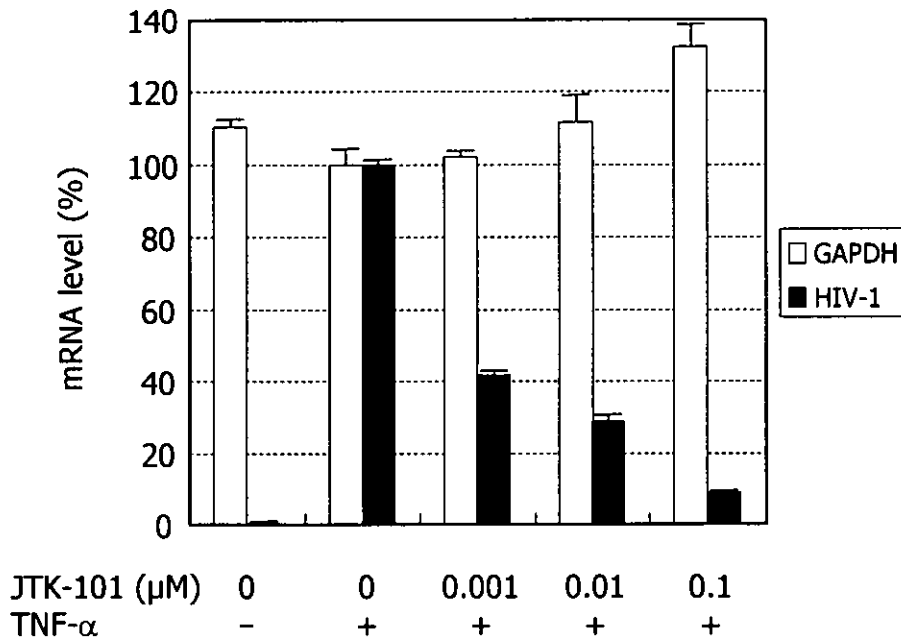


図3. JTK-101 の OM-10.1 細胞における HIV-1 mRNA 産生に与える影響. OM-10.1 細胞を種々の濃度の薬剤とともに 2 時間培養し, 1 ng/mL の濃度の TNF- $\alpha$  で刺激後, さらに薬剤とともに 24 時間培養した。その後, 細胞より total RNA を抽出し, リアルタイム RT-PCR 法により HIV-1 mRNA の定量を行った。GAPDH : glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

#### D. 考察

エイズ脳症の発症とその進行には, CD4<sup>+</sup>T リンパ球以外に単球・マクロファージが重要な役割を演じていると考えられている。特に HIV-1 感染に伴う中枢神経細胞の死滅には, HIV-1 に慢性感染したミクログリアや脳内マクロファージが gp120 などのウイルス抗原や炎症性サイトカインなどを産生し, その近傍にある神経細胞に障害をもたらすことが, 原因の一つであると考えられている。またマクロファージから産生される TNF- $\alpha$  のような炎症性サイトカインの中には, 感染細胞か

らのウイルス遺伝子発現を著しく増加させる作用を有するものがある。そこで, エイズ脳症に対する予防・治療薬としては, HIV-1 慢性感染マクロファージからのウイルス産生を抑制出来るような薬剤が有効であると思われる。この視点から, 本研究においては通常の抗 HIV-1 薬開発とはことなる方法, すなわち慢性感染単球系細胞を用いたアッセイ系を構築し, 有効な薬剤を同定するに至った。

JTK-101 (図1) はナフトレン誘導体に属する新規物質で, 10 万以上の薬剤ライブラリーからレポーターアッ

セイシステムと上記の抗 HIV-1 アッセイを用いて選出された薬剤である。その作用機序は HIV-1 プロウイルスからの遺伝子発現抑制と考えられるが、詳細な標的分子は未だ不明である。Preliminary な実験において、JTK-101 は HIV-1 Tat のコファクターである CDK9 に対する抑制効果を有するという結果を得ている。しかしながら、その 50% 抑制濃度 (IC<sub>50</sub>) は 0.3 μM と、OM-10.1 細胞における抗 HIV-1 効果の EC<sub>50</sub> (0.0014 μM) よりもはるかに高い (data not shown)。また、CDK7 や casein kinase II に対する抑制効果は有しない。以上のことから、JTK-101 の標的分子は HIV-1 の遺伝子発現に深く関与している何らかの宿主細胞因子であると推測される。現在、DNA マイクロアレイを用いて、JTK-101 が宿主細胞の各種遺伝子の発現にどのような影響を与えるかを詳しく検討している。これまでに JTK-101 により発現が影響を受ける遺伝子は、約 2 万のうち 100 近くあることが判明しているが、発現が促進される遺伝子よりも、抑制されるものの方が多い (表 3)。

今後、JTK-101 を抗エイズ薬、およびエイズ脳症に対する予防・治療薬として開発するためには、PBMCs などの急性感染細胞に対する抗 HIV-1 効果を高める必要があると思われる。また、blood-brain barrier を含む in vivo 薬物動態や副作用の問題をクリアしなければならない。現在のところ、JTK-101 はラットにおいては、有効血中濃度を保つことができる程度の経口吸収性

を有していることが明らかにされている (data not shown)。

## E. 結論

- 1) エイズ脳症に対する治療薬の候補物質を同定するため、マクロファージ系の HIV-1 慢性感染細胞株 OM-10.1 を用いて、薬剤の抗ウイルス効果を調べた。
- 2) その結果、新規ナフタレン誘導体 JTK-101 にきわめて強い抗 HIV-1 を見出した。
- 3) 一方で、JTK-101 は HIV-1 急性感染細胞においては抗ウイルス効果が弱く、選択性が劣っていた。
- 4) JTK-101 は非常に低い濃度において、HIV-1 mRNA の産生を抑制することから、ウイルス遺伝子の発現もしくは転写阻害が作用機序として考えられた。
- 5) 現在、DNA マイクロアレイ法を用いて、種々の遺伝子発現に対する影響を検討中である。

## F. 健康危険情報

特に該当するものはない。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表 (英文のみ)

1. Wang X, Furukawa T, Nitanda T, Okamoto M, Sugimoto Y, Akiyama S, **Baba M**. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) induces cellular resistance to HIV-1 nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Mol. Pharmacol.* **63**:65-72 (2003).

2. Akagi T, Kawamura M, Ueno M, Hiraishi K, Adachi M, Serizawa T, Akashi M, **Baba M**. Mucosal immunization with inactivated HIV-1-capturing nanospheres induces a significant HIV-1-specific vaginal antibody response in mice. *J. Med. Virol.* **69**:163-172 (2003).
3. Okamoto M, Wang X, Debyser Z, De Clercq E, **Baba M**. Establishment of an in vitro assay system mimicking human immunodeficiency virus type 1-induced neural cell death and evaluation of inhibitors thereof. *J. Virol. Methods* **108**:195-203 (2003).
4. Sato K, Yamashita N, Yamashita N, **Baba M**, Matsuyama T. Regulatory dendritic cells protect mice from murine acute graft-versus-host disease and leukemia relapse. *Immunity* **18**:1-20, (2003).
5. Sato K, Yamashita N, **Baba M**, Matsuyama T. Modified myeloid dendritic cells act as regulatory dendritic cells to induce anergic and regulatory T cells. *Blood* **101**:3581-3589 (2003).
6. Miyake H, Iizawa Y, **Baba M**. A novel reporter T-cell line highly susceptible to both CCR5- and CXCR4-using human immunodeficiency virus type 1 and its application to drug susceptibility tests. *J. Clin. Microbiol.* **41**:2515-2521 (2003).
7. Miyashita T, **Baba M**, Shigeta S, Mori M, Shinozuka K. Synthesis and anti- HIV-1 activities of novel 10-thiaisoalloxazines, a structural analog of C-5 and/or C-6 substituted pyrimidine acyclonucleoside. *Chem. Pharm. Bull.* **51**:630-634 (2003).
8. Haraguchi K, Takeda S, Tanaka H, Nitanda T, **Baba M**, Dutschman GE, Cheng Y-C. Synthesis of a highly active new anti-HIV agent 2',3'-didehydro-3'-deoxy-4'-ethynylthymidine. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**:3775-3777 (2003).
9. Imamura S, Ishihara Y, Hattori T, Kurasawa O, Matsushita Y, Sugihara Y, Kanzaki N, Iizawa Y, **Baba M**, Hashiguchi S. CCR5 antagonists as anti-HIV-1 agents. 1. Synthesis and biological evaluation of 5-oxopyrrolidine-3-carboxamide derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* **52**: 63-73 (2004).
10. Sawada H, Kawai Y, Kawase T, Inaba Y, Sugiya M, **Baba M**, Tomita T. Synthesis of fluoroalkyl end-capped oligomers containing pendant phosphinic and phosphonic acid segments - application to novel fluorinated bioactive polymers possessing antibacterial and anti-HIV-1 activities. *Int. J. Polym. Mater.* in press.
11. Sawada H, Umedo M, Kawase T, **Baba M**, Tomita T. Synthesis and properties of fluoroalkyl end-capped sulfobetaine polymers. *J. Appl. Polym. Sci.* in press.
12. Haraguchi K, Itoh Y, Takeda S, Honma Y, Tabaka H, Nitanda T, **Baba M**, Dutschman GE, Cheng Y-C. Synthesis and anti-HIV activity of 4'-cyano-2',3'-didehydro-3'-deoxythymidine. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* in press.

13. Dutschman GE, Grill SP, Gullen EA, Haraguchi K, Takeda S, Tanaka H, **Baba M**, Cheng Y-C. A novel 4'-substituted analog with improved anti-HIV activity and decreased cytotoxicity. *Antimicrob. Agents Chemother.* in press.
  15. Miyake A, Akagi T, Enose Y, Ueno M, Kawamura M, Horiuchi R, Hiraishi K, Adachi M, Serizawa T, Narayan O, Akashi M, **Baba M**, Hayami M. Induction of HIV-specific antibody response and protection against vaginal SHIV transmission by intranasal immunization with inactivated SHIV-capturing nanospheres in macaques. *J. Med. Virol.* in press.
  16. **Baba M**. Cellular factors as targets for anti-HIV-1 chemotherapy. In: Butera ST (Ed), *HIV Chemotherapy: A Critical Review*, in press. Horizon Scientific Press/Caister Academic Press, Norfolk, UK (2004).
  17. **Baba M**. Inhibitors of HIV-1 gene expression and transcription. *Curr. Topics Med. Chem.* in press.
2. 学会発表 (招待講演・シンポジウムのみ)
    1. **Baba M**. HIV-1 gene expression and transcription: Is it a possible target indeed for antiretroviral chemotherapy? *2nd Symposium of High Technology Research Center*, January 2003, Narashino, Japan.
    2. 馬場昌範. ナノ粒子を用いた抗エイズワクチンの開発研究. 日本バイオマテリアル学会特別シンポジウム, 2003年1月, 鹿児島.
    3. **Baba M**, Iizawa Y, Kanzaki N, Takashima K, Miyake H, Tagawa Y, Sugihara Y. Anti-HIV-1 activity of TAK-220, a small molecule CCR5 antagonist. *15th Joint Meeting of AIDS Panel, Japan-U.S. Cooperative Medical Science Program*, March 2003, Okinawa, Japan.
    4. 馬場昌範, 平石勝也, 明石 満. ナノ粒子を用いたエイズワクチンの開発. 第26回日本医学会総会シンポジウム「ナノテクノロジーと医療」, 2003年4月, 福岡.
    5. 馬場昌範. TAK-220 存在下における R5 HIV-1 の長期培養と新しい転写阻害薬について. 第6回白馬シンポジウム「最新エイズ研究2003」, 2003年8月, 白馬.
    6. 馬場昌範. 抗ウイルス薬研究最近の進歩: 抗エイズ薬を中心として. 第51回日本ウイルス学会学術集会・総会シンポジウム, 2003年10月, 京都.
    7. 馬場昌範. 抗エイズ薬の現況と今後の展望. 第73回日本感染症学会西日本地方会総会・教育講演, 2003年11月, 鹿児島.
    8. **Baba M**. Anti-HIV-1 agents targeting host cellular factors. *9th International Antiviral Symposium and Workshop*, November 2003, Antalya, Turkey.
- H. 知的所有権の取得状況
- 今年度, 本研究に関するものでは, 取得特許等はない。

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

分担研究報告書

エイズ脳症の発症病態と治療法に関する研究

—細胞外 HIV-1 Tat 抑制による HIV 脳症治療薬の開発—

分担研究者 高宗暢暁 熊本大学大学院医学薬学研究部・薬学生化学 助手  
研究協力者 三隅将吾 熊本大学大学院医学薬学研究部・薬学生化学 助教授  
研究協力者 庄司省三 熊本大学大学院医学薬学研究部・薬学生化学 教授

研究要旨：HIV 脳症進行と密接に関連すると考えられている細胞外 Tat の活性抑制を目指すにあたり、本研究では、Tat 分子内に存在する特徴的な構造の 1 つ、cysteine-rich 領域に着目した。Tat の転写活性に必須であることが知られている本領域の cysteine 残基は、著しく変異原性の高い HIV-1 において高度に保存されている。また亜鉛を結合しうることが知られていたが、細胞外 Tat 活性における亜鉛結合の重要性は明らかではなかった。本研究では、亜鉛を結合した cystein-rich 領域が細胞外 Tat 活性に重要であり、その活性阻害のための有用な分子内標的部位であることを明らかにした。

A. 研究目的

HIV-1 の複製を強力に抑制する多剤併用療法（HAART）の導入により、HIV-1 感染症/AIDS に対する治療効果が著しく向上し、それに伴い HIV 脳症発症率の低下も認められるようになった。しかしながら、生涯続けなければならないと考えられている現行の HAART によって、今後、長期的にみて、この HIV 脳症発症率低下が持続されるかは全く不明である。一方、世界に目を向ければ、十分な HAART を享受できない発展途上国を中心に、HIV 感染者が爆発的に増加している現状である。このような状況から、現在、新たな HIV-1

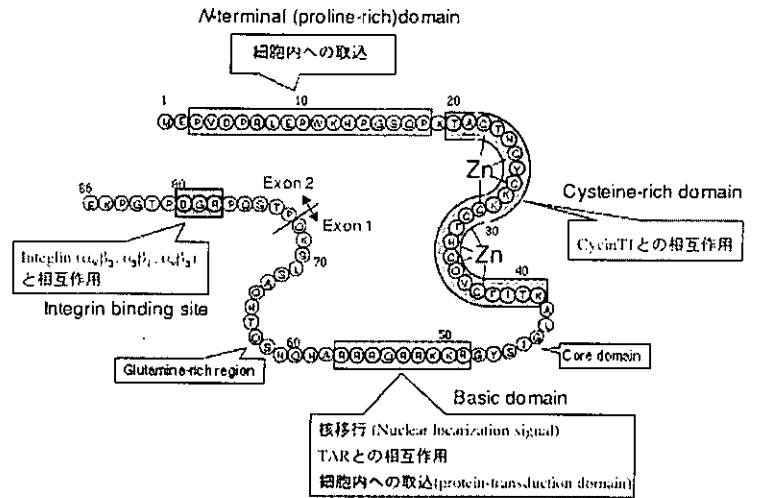
複製阻害薬の開発と並行して、HIV 脳症のメカニズム解明とその発症予防薬・治療薬の開発は必要不可欠であると考えられる。

本研究では、HIV 脳症の進行を増強する原因の 1 つとして考えられている細胞外 Tat の活性を阻害することを目的とした。HIV LTR の *trans*-activation による HIV-1 遺伝子の転写活性化を主な機能とするウイルス性転写因子 HIV-1 Tat は、一方で感染細胞外へと放出され、種々の非感染細胞に作用し HIV-1 感染に伴い発症する免疫不全、カポジ肉腫、そして HIV 脳症を増強する多様な生物活性を有すると考えられている。これらの報告は主に *in vitro* の研究による



ものだが、細胞外Tatの病原性の高さを裏付ける *in vivo* の証拠として、HIV-1陽性の人々において血清中の抗Tat抗体の力価が高い人ほどエイズへの進行が遅い(long term non-progressor)ことが統計学的にも有意であるという疫学的調査結果が多数存在することである (J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol. 10, 408-416. 1995; J. Hum. Virol. 4, 282-292.1996; Clin Diagn Lab Immunol. 3, 230-232. 1996; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 10842-10847. 1999; J. Clin. Virol. 21, 81-89. 2001; Biomed Pharmacother. 57, 4-14. 2003)。以上のことから、血清中の細胞外Tat活性を積極的に阻害することは、HIV 脳症を含めHIV感染症における種症状を抑制・予防することにつながると期待される。そのような細胞外Tat活性抑制を目指すにあたり、本研究では、Tat分子内に存在するいくつかの特徴的な構造の中で、特にcysteine-rich領域に着目した (Fig. 1)。Tatの転写活性に必須であることが知られている本領域のcysteine残基は、著しく変異原性の高いHIV-1において高度に保存されている (Fig. 2)。またcysteine-rich領域の特徴として、亜鉛を2等量結合するという点である。亜鉛の結合によってcysteine-rich領域は大きくコンホーメーション変化を起こすことが示されており (B.B.R.C. 227, 615 1996)、またTatの転写活性に必須とされるTARでのcyclin T1との強固な相互作用に亜鉛が重要であることが知られている

Fig. 1 HIV-1 Tatの構造と各領域の機能



(Genes and Development. 12, 3512-3527 1998)。このようにTatのcysteine-rich領域において亜鉛の結合はその構造と活性(特に転写活性)に重要であることが知られているが、細胞外Tat活性におけるその亜鉛結合の重要性、そして実際にHIV-1感染細胞からリリースされたTatにおいて亜鉛が結合していることを示す報告は存在しない。本研究では、細胞外Tat活性阻害のための分子内

Fig. 2 Alignments of Cysteine-rich Domain of HIV-1 Tat

▼ ▼ ▼ ▼ ▼ ▼ ▼ ▼	
CONSENSUS_A1	TpCskeyCKkCcyhCqvCf1
CONSENSUS_A2	TACnkCYCKkCCYHCQlCF1
CONSENSUS_B	tactnCyCKkCCfHCqvCFt
CONSENSUS_C	taCnkCyCKkesYHClvCFq
CONSENSUS_D	TpCNkCyCKkCCYHCqvCFi
CONSENSUS_F1	TPCtkCYCKrCCFHCQwCFt
CONSENSUS_F2	TPCNkCYCKKCCFHCqLCFt
CONSENSUS_G	TaCnkCyCKvCCWHCQvCFL
CONSENSUS_H	TaCNnCYCKkCcyHCQlCF1
CONSENSUS_O	tPCnkCYCKkCCYHCyvCF1
CONSENSUS_01_AE	TaCskCYCKiCCWHCQlCF1
CONSENSUS_02_AG	TACskCYCKiCCWHCQlCF1
CONSENSUS_03_AB	TaCTNCYcKKCLHCQvCFM
CONSENSUS_04_CPX	TaCnKCFCkCCwHCQvCFL
CONSENSUS_06_CPX	TACTsCYCKkCcYHCpvCFL
CONSENSUS_08_BC	TACNnCYCKrCSYHCLVCFQ
CONSENSUS_10_CD	TpCnkCyCKaCSYHCLVCFQ
CONSENSUS_11_CPX	TACnQCyCKrCcYHCqhCFL
CONSENSUS_12_BF	TPCTkCYCKrCCFHCywCFv
CONSENSUS_14_BG	TACTkCYCKiCCWHCQvCFL
CONSENSUS_CPZ	TaCNnCYCKeCCyHCivCF1

From HIV sequence database of Los Alamos

標的部位として本領域が有用であるかを検討するため、亜鉛結合cystein-rich領域を特異的に認識する単クローン抗体を作出し、細胞外Tat活性に与える影響を検討した。

## B. 研究方法

### ペプチド合成

Fmoc chemistry によって Tat<sub>HXB2</sub> の 20-41 残基の TACTNCYCKKCCFHCQVCFITK、Tat<sub>HXB2</sub> の 20-30 残基 TACTNCYCKKC 及び Tat<sub>HXB2</sub> の 31-41 残基 CFHCQVCFITK を化学合成した。2 等量あるいは 1 等量の ZnCl<sub>2</sub> を加え、凍結乾燥させることで亜鉛を結合させた。合成したペプチドは MALDI-TOF MS により質量数を確認した。また免疫抗原とするため multiple antigen peptide (MAP) に結合させた。抗体の特異性を検討する enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) に用いるため各合成ペプチドをマニュアルに従い Multi-Pin Block (Chiron Technologies, Clayton, Australia) に結合させた。

### 単クローン抗体作出

Galfre and Milstein (*Methods Enzymol.* 73, 3-46.1981) の方法に従い、BALB/C マウスに免疫し、マウス脾細胞とミエローマのハイブリドーマを作成し亜鉛結合ペプチド抗原を特異的に認識する抗体を産生するハイブリドーマをクローニングした。

### 細胞

Molt4/CCR5, HeLa-CD4-LTR/ $\beta$ -gal (MAGI) cell line はそれぞれ *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 16, 935-941.2000 および *J. Virol.* 66, 2232-2239.1992 に従って培養した。Jurkat cell は 10% FCS RPMI1640 培地で培養した。

### MAGI-Tat assay

48-well または 96-well plate に  $0.75 - 1 \times 10^4$  cells per well となるよう MAGI cell を播種し一夜培養後、組換え Tat (Immuno Diagnostics Inc., Woburn, MA, USA) を 60 pmol 加え 48 時間培養後 Emerman M ら (*J. Virol.* 66, 2232-2239.1992) の方法に従い細胞を染色しカウントした。また、を感染させた Molt4/CCR5 cell の培養上清を回収し超遠心処理したものを MAGI cell に加え同様に染色した。

### Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) assay

HIV-1<sub>JRFL</sub> 感染および非感染 Molt4/CCR5 cell を無血清条件下で 24 時間培養し、その培養上清を回収し超遠心処理後 Jurkat cell に加え 24 時間培養した。その後、DeadEnd Fluorometric TUNEL system (Promega Corporation, Madison, WI, USA) のマニュアルに従い TUNEL assay を行った。

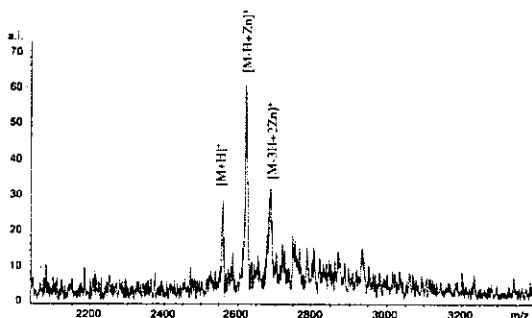
(倫理面への配慮)

本研究においては、動物実験を行わず、株化培養細胞を使用していることから、倫理面の問題はないと考えられる。

### C. 研究結果

Tat の cysteine rich domain に対する抗体を作出するため、Tat<sub>HXB2</sub> の 20-41 残基の TACTNCYCKK CCFHCQVCFITK を Fmoc chemistry にて化学合成し 2 等量の亜鉛を処理したペプチドを MALDI-TOF MS を用いて質量分析することで構造解析を行ったところ、2 個の亜鉛の結合したペプチド、1 個の亜鉛結合したペプチド、およびペプチドのみ質量数に相当する m/z 2672.9, 2609.5 および 2647.3 のピークを検出した(Fig. 3)。

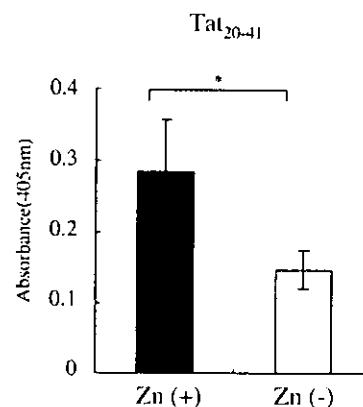
Fig. 3 MALDI-TOF MS Spectrum of Zn-Tat<sub>20-41</sub> Peptide



ペプチドの存在は、測定時に解離したものと考えられた。本法により亜鉛したペプチドを得ることができることが確認されたことから、以下これを免疫抗原として用いることとした。免疫抗原は抗原性を高めるために MAP に結合させたものを用いた。

作製した免疫抗原を用いて、常法に従い BALB/C マウスに免疫し抗原特異的な抗体産生ハイブリドーマ 5A4 を得た。得られた単クローン抗体 MAb 5A4 の特異性を亜鉛処理および未処理 Tat<sub>20-41</sub> を結合させた Multi-Pin Block を使用し enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) によって調べたところ、MAb 5A4 が亜鉛処理 Tat<sub>20-41</sub> を特異的に認識することが示された (Fig. 4)。

Fig. 4 Immunochemical Specificity of MAb 5A4

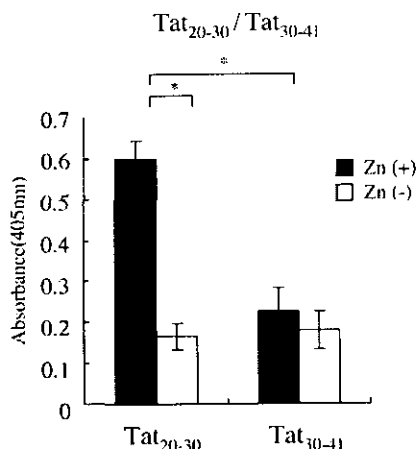


同定する目的で、亜鉛処理および未処理 Tat<sub>20-30</sub> および Tat<sub>31-40</sub> を結合させた Multi-Pin Block を使用し ELISA を行ったところ、MAb 5A4 が亜鉛処理 Tat<sub>20-30</sub> を特異的に認識することが明らかになった (Fig. 5)。

亜鉛結合 cysteine-rich domain を認識する MAb 5A4 が、全長 Tat を認識しその活性を阻害するかどうかを検討した。組み換え Tat を培養している MAGI cell に添加し 48 時間後  $\beta$ -gal 活性を測定した。その結果、MAb 5A4 (0~10  $\mu$ g/ml) の濃度依存的な  $\beta$ -gal 活性の低下が観察された (Fig.

6)。この結果から、培地中の MAb 5A4 が添加した全長 Tat を認識しその HIV-LTR *trans*-activation 活性を阻害したと考えられた。

Fig. 5 Immunochemical Specificity of MAb 5A4



次に、MAb 5A4 が、実際に HIV-1 感染細胞から放出される細胞外 Tat の活性を阻害するかどうかを検討した。超遠心処理した HIV-1<sub>JRFL</sub> 感染 Molt4/CCR5 cell の培養上清を、MAGI cell に処理したところ、用量依存的なβ-gal 活性の上昇が認められた(data not shown)。この条件下に MAb 5A4 を培地に添加したところ、抗体濃度依存的なβ-gal 活性の低下が観察された(Fig. 7)。細胞外 Tat 活性の1つである T 細胞に対する apoptosis 誘導活性に与える本抗体の影響を検討した。標的細胞として T-cell line Jurkat cell を用いた。Apoptosis 細胞は TUNEL 法にて検出した。その結果、コントロールにおいて多数の apoptosis 細胞が検出されたのに対し、MAb 5A4 (1 μg/ml) を添加した場合その apoptosis 細胞数の減少が観察された(Fig. 8)。以上の

結果から、本抗体が HIV-1 感染細胞から放出される native な Tat を認識し、その活性を阻害することが示唆された。

Fig. 6 Inhibitory Activity of MAb 5A4 against *trans*-Activation of HIV-LTR by Extracellular Tat

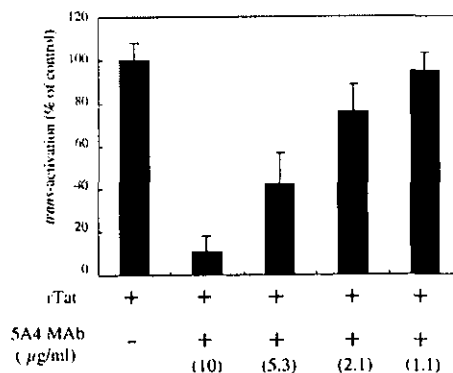
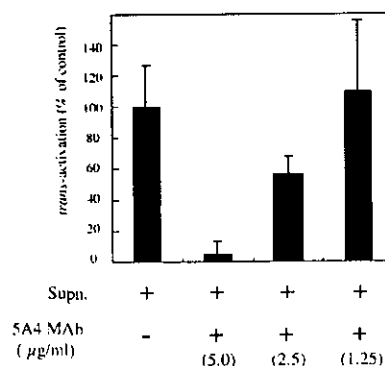


Fig. 7 Inhibitory Activity of MAb 5A4 against *trans*-Activation of HIV-LTR by Extracellular Tat



#### D. 考察

本研究では、HIV 脳症進行との関連性が示唆されている細胞外 Tat 活性の制御を行うにあたり、その cysteine-rich 領域が標的になるかどうかを検討した。これまで細胞外 Tat の cysteine-rich 領域における亜鉛結合の重要性は不明なままであった。我々は細胞外 Tat において、亜鉛が結合し