

平成15年度

エイズ医薬品等開発研究

重点研究報告書

国際研究グラント事業 研究報告書

# 目 次

## 重点研究

### 第2分野

#### 課題番号

文献 No 20030989A KA21501	HIV-1ディフェンスワクチンの創製・開発研究	梅田 衛	……	1
KA21502 990A	潜伏HIV-1の再活性化に関わるアクセサリ-遺伝子を標的としたエイズ発症阻止技術の開発	間 陽子	……	6

### 第3分野

KA31503 2003991A	新規HIV感染価測定細胞株に基づく迅速簡便な実用的薬剤耐性試験法の確立	巽 正志	……	13
---------------------	-------------------------------------	------	----	----

## 国際研究グラント

SA14711	エイズ遺伝子治療法に関する研究：遺伝子治療臨床研究用ベクター製造およびEx vivo遺伝子導入プロトコールの開発に関する研究	加藤郁之進	……	21
SA14712	翻訳フレームシフトを標的とした抗HIV薬の開発	松 藤 千 弥	……	27
SA14718	新規デザインに基づいた次世代の核酸系逆転写酵素阻害薬の開発研究	馬 場 昌 範	……	32
SA14719	HIV感染動物モデルを用いた遺伝子治療用核酸の抗ウイルス機能と免疫応答に関する研究	山 本 博 一	……	37
SA14720	エイズ発症を抑制する宿主因子の遺伝的および免疫学的解析	横 田 恭 子	……	49
SA14721	HIV潜伏感染の維持と破綻の分子メカニズムに関する研究	岡 本 尚	……	57
SA24713	新しいエイズワクチン開発の研究	奥 田 研 爾	……	69
SA24714	エイズ発症防止ワクチン開発のための細胞性免疫因子の解明とその活性化に関する研究	滝 口 雅 文	……	74
SA24715	ゲノム改変サル・ヒト免疫不全キメラウイルスを用いた弱毒性ワクチンと半生ワクチンの開発	速 水 正 憲	……	82
SA24716	リコンビナントタイプHIVワクチンの標的集団の解析とパイロットプロダクションの可能性の検討	仲 宗 根 正	……	88
SA24717	HIV亜種解析によるHIVワクチンの開発	石 川 晃 一	……	100
SA24722	細胞性免疫誘導型プライムブーストエイズワクチンの臨床評価系の確立	山 本 直 樹	……	106
SA24723	HIV特異的免疫療法開発に関する基礎研究	岩 本 愛 吉	……	111
SA24724	HIV感染抵抗性を決定する新規宿主遺伝子の同定によるワクチン戦略の開発	宮 澤 正 顯	……	116

エイズ医薬品等開発研究

重点研究報告書

## 第2分野

エイズワクチン等エイズ発症防止薬の  
開発に関する研究

## HIV-1ディフェンスワクチンの創製・開発研究

所属 日水製薬株式会社

イノベーションリサーチセンター

研究者 梅田 衛

研究要旨 HIV-1の coreceptor (CXCR4, CCR5)のウイルスの吸着・侵入に必須なドメイン(Undcapeptidyl Arch, UPA : CXCR4、N<sub>176</sub>VSEADDRYIC ; CCR5、R<sub>169</sub>SQKEGLHYTC)に基づく環状キメラ dodecapeptide (cCD) 抗原は種々様々な HIV-1 亜種に適応する抗体を誘導し、その抗体は HIV 感染を防止した。

### 分担研究者

- (1) 国立感染症研究所 向井鎌三郎 室長
- (2) 熊本大学大学院医学薬学研究部庄司省三 教授
- (3) 熊本大学大学院医学薬学研究部三隅将吾助教授
- (4) 熊本大学大学院医学薬学研究部高宗暢暁 助手
- (5) 国立感染症研究所 石川晃一 主任研究官

### A. 研究の目的

2001年2月にヒトのゲノム分析が終了し、解読、解析が始まり、生命情報(バイオインフォマテクス)が刻々と蓄積してヒト生命現象が克明に解き明かされ始めている、にもかかわらず、エイズワクチンの開発の困難さが改めて再認識されている。そこで主任研究者らは、ワクチンの基本的な理論を逸脱し、生体の守りを固め、ウイルス侵入を防止する手段を特殊抗体に求めた。HIV-1の coreceptor (CXCR4, CCR5)を基礎に、HIV-1感染防止に有効な HIV-1 ディフェンスワクチンを考案・提案し、HIV-1の感染防止を目的とする。

### B. 研究方法

(1) ワクチンとしての HIV-1 coreceptor由来の特殊立体構造の構築・解析  
ペプチドは Fmoc Chemistryによって、化学的に合成し、得られたペプチドのアミノ末端とカルボキシ末端を酸アミド結合を介して環状化し、特殊立体構造を構築する。これらペプチドを質量化学・計算化学的に特殊立体構造を解析する。

- 1) CXCR4 UPAのポリペプチド鎖 (N<sub>176</sub>VSEA<sub>180</sub>DDRYI<sub>186</sub>) にスペーサーアームペプチド(Gly-Asp)を挿入して環状構造化
  - 2) CCR5 UPAのポリペプチド鎖(R<sub>169</sub>SQ<sub>170</sub>KEGLHYT<sub>177</sub>) にスペーサーアームペプチド(Gly-Asp)を挿入し環状構造化
  - 3) CXCR4-UPAおよびCCR5-UPAの主エピトープと考えられるそれぞれ5アミノ酸残基(CXCR4:EADDR; CCR5:SQKEG) スペーサーアームペプチド(Gly-Asp)を挿入したCXCR4-CCR5キメラUPA構造の構築
  - 4) 免疫抗原 これらのペプチドはポリリジン(MAP: multi antigen peptide)をcarrierとし、MAP-樹脂を用いて結合させ、脱保護、脱樹脂を行い、環状ペプチドMAPとして免疫抗原として調製する。また、環状ペプチドをマルチピンに結合させ、assay抗原としてELISA法によって抗体価を求める。  
(2) これら環状ペプチドおよびこれら抗原から産生された単クローン抗体の作出および生物活性  
抗体の免疫化学的性質
- 1) 作出された単クローン抗体の免疫化学的性質のうち、抗体の抗原特異性については、それぞれの抗原の直鎖状ペプチドおよび環状ペプチドを用いて、競合実験を行い測定はELISA法およびBIACORE法による。

2) 作出された単クローン抗体のreceptor特異性の測定は、CXCR4, CCR5を発現している細胞(NP2/CD4/CXCR4, NP2/CD4/CCR5, NP2/CD4)を用いてフローサイトメータによった。

### (3) 抗体の生物活性

- 1) 抗HIV活性: MAGIC-5, MAGI-CCR5 cellを用い、HIV-1感染によって生じるブルーセルを顕微鏡下計測して抗HIV活性を求める。
- 2) ケモタキシス活性の測定: トランスウエルを用い、上層wellにエフェクターセル(Molt4#8, THP-1)を入れ、ケモカインにより誘導される化学走性に対する本抗体の効果について調べる。
- 3) Ca<sup>2+</sup>流入活性の測定: ケモカインによって誘導される細胞内Ca<sup>2+</sup>流入に対する本抗体の効果を、蛍光Ca試薬Fluo3AMおよびフローサイトメーターを用いて検出する。

### (倫理面への配慮)

- (1) 日本製薬において実験動物倫理会の規則に従い、動物愛護上の諸問題に配慮して行う。
- (2) 熊本大学において熊本大学実験動物倫理会の規則に従い、動物愛護上の諸問題に配慮して行う。
- (3) ハムリー株式会社において、同社内に設置されてある実験動物倫理委員会の規則に従ってサルに対する実験を行う。

## C. 研究結果

(1) HIV-1 coreceptor由来の特殊立体構造ペプチドの構造解析

1) CXCR4, CCR5 の UPA 由来の環状 peptide の質量分析: CXCR4, CCR5 の UPA 由来の環状 peptide のうち、cCDpeptide の MALDI-TOF MS の結果、直鎖状 DSKQKEGEADDRG peptide のアミ末端およびカルボ

キシル末端が酸アミド結合を介して環状化が確認された。

2) 3種の環状 peptide の立体構造の予測の結果: 3種の環状 peptide の立体構造は intact な構造を取りうることがわかった。

(2) これら環状ペプチドおよびこれら抗原から産生された単出および生物活性

1) 抗体の免疫化学的性質: 作出された単クローン抗体の免疫化学的性質のうち、抗体の抗原特異性については、それぞれの抗原の直鎖状ペプチドおよび環状ペプチドを用いて、競合実験を行い、ELISA 法の結果、本抗体は環状ペプチドと反応し、直鎖状ペプチドとは反応しなかった。また、本抗体は CXCR4 および CCR5 を発現している細胞 (NP2/CD4/CXCR4, NP2/CD4/CCR5, NP2/CD4) に反応することがフローサイトメータによって確認された。

2) 抗体の生物活性: 抗 HIV 活性を MAGIC-5 および MAGI-CCR5 cell を用い、HIV-1 感染によって生じるブルーセルを顕微鏡下計測して抗 HIV 活性を求めた結果、本抗体は種々 (X4, R5, R5/X4 virus) HIV-1 株に有効で、濃度依存的にこれら HIV-1 の感染を防止した。

3) 本抗体の HIV-1 の組み込みおよびケモタキシス活性並びに Ca<sup>2+</sup>流入に対する効果: 本抗体が HIV-1 の感染を防止する濃度で HIV-1 の宿主遺伝子への組み込みを PCR 法で調べた結果、本抗体は感染を防止濃度で HIV-1 の宿主遺伝子への組み込みをほぼ完全に阻止した。ケモカインにより誘導される化学走性に対する本抗体の効果について調べた結果、本抗体はケモカインにより誘導される化学走性を阻害しなかった。ケモカインによって誘導される細胞内 Ca<sup>2+</sup>流入に対する本抗体の効果を、蛍光 Ca 試薬 Fluo3AM およびフローサイトメーターを用いて調べた結果、本抗体はケ

モカインによって誘導される細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  流入を阻害しなかった。

#### D. 考察

HIV-1 の coreceptor (CXCR4, CCR5) の第 2 細胞外ループ (ECL-2) の特異的立体構造ドメイン (Undcapeptidyl Arch、UPA : CXCR4、 $\text{N}_{176}\text{VSEADDRYIC}$ ; CCR5、 $\text{R}_{169}\text{SQKEGLHYTC}$ ) の立体化学的基礎に立脚して、酸アミド結合を介して環ポリペプチド cDDX4 および cDDR5 を、また、両 UPA の各々 5 アミノ酸残基 (CXCR4: EADDR; CCR5: SQKEG) およびスペーサーアームジペプチドからなる特異的立体超構造を有するキメラ環状ポリペプチド、cCD を得た。これら環状化ポリペプチド (cDDX4、cDDR5、cCD) およびこれらペプチドを multiantigen peptide (MAP) に結合させた免疫抗原 (cDDX4-MAP、cDDR5-MAP、cCD-MAP) の質量数をレーザー質量分析装置 (MALDI-TOF-MS) を用いて、解析し、本精製抗原の化学的根拠を明確にした。

HIV-1 の coreceptor (CXCR4, CCR5) の UPA および UPA をミミクした免疫抗原の立体構造を構造モデル法あるいは化学計算法により求めた結果、UPA と UPA をミミクした環状 peptides 構造のグルタミン酸残基の  $\gamma$ -カルボキシル基、アスパラギン酸残基の  $\beta$ -カルボキシル基、あるいはリジン残基の  $\epsilon$ -アミノ基の立体的配位は非常によく一致した。このことは環状 peptide-MAP 抗原は HIV-1 の coreceptor (CXCR4, CCR5) の UPA に対する抗体調製に有効であると考えられる。

3 種の免疫抗原のうち、まずはじめに、cCD-MAP に対する 7 種の単クローン抗体 (CPMab-I-VII) を作出した。これら 7 種の単クローン抗体は濃度依存的に cCD-MAP 抗原と反応し、Flow cytometry 分析の結果、7 種の単クローン抗体は細胞表面に発現している CXCR4 および CCR5 と反応することが確認された。

MAGIC-5 assay 法により、これら 7 種の単クローン抗体の HIV-1 (clade-B R5 and X4 of laboratory strain: nono-clade B of primary isolates) の感染防止作用を調べた結果、CPMab-I 及び-II は濃度依存的に clade-B R5 および X4 の laboratory strain 株の HIV-1 の感染を強力に防止したが、primary isolates には同じ効果が認められなかった。また、CPMab-III および-VI は clade-B R5 laboratory strain 株のみに有効であり、数種の primary isolate、特に、CPMab-VI は R5 clade A, C, X4 A, C, E の感染を防止した。CPMab-IV および-V は laboratory strain 株の感染を全く防止しなかったが、驚いたことに、CPMab-IV は R5 clade C, E、CPMab-V は R5 A, E, X4 primary isolates に極めて有効であった。さらに、CPMab-VII は laboratory strains 株に対しそれほど有効ではないが、R5 clade A, E および X4 A, C primary isolates の感染を強力に阻害した。

#### E. 結論

HIV-1 の吸着・侵入に critical であると考えられている HIV-1 の coreceptor (CXCR4, CCR5) の特異的立体構造ドメイン (Undcapeptidyl Arch、UPA: CXCR4、 $\text{N}_{176}\text{VSEADDRYIC}$ ; CCR5、 $\text{R}_{169}\text{SQKEGLHYTC}$ ) に基づく環状キメラ環状 dodecapeptide (cCD) を合成し、multiantigen peptide (MAP) に結合させた免疫抗原 (cCD-MAP) を調製した。これら環状免疫抗原 peptides は intact の UPA の構造を反映していることを明らかにした。最初に作出した cCD-MAP に対する単クローン抗体群 (CPMab-I-VII) は立体構造を認識する抗体で、濃度依存的に種々様々な HIV-1 (clade-B R5 and X4 of laboratory strain: nono-clade B of primary isolates) の感染をそれぞれ、特徴的に防止した。分担研究者 Dr. 向井の結果等から、カニクイサルに免疫し得られた抗血清は単クローン抗体を用いて得られた結果とほぼ等しく、

HIV-1 の coreceptors (CXCR4, CCR5) の両 UPA5 残基からなるキメラ抗原 cCD-MAP は生体内で種々様々な HIV のサブクラスに適応する抗体を誘導し HIV 感染を防止していると考えられる。

## F. 研究発表

### 論文

1. Misumi, S., Nakayama, D., Mukai, R., Tachibana, K., Umeda, M., Shibata, H., Takamune, N., and Shoji, S. Multiflex antibodies-mediated immune strategy for blockade of multi-clade R5 and X4 HIV-1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* Submission
2. Misumi, S., Morikawa, Y., Tomonaga, M., Ohkuma, K., Takamune, N., and Shoji, S. Blocking of Human Immunodeficiency Virus Type-1 Virion Autolysis by Autologous p2gag Peptide. *J. Biochem.* in press (2004)
3. Misumi, S., Takamune, N., Ohtsubo, Y., Waniguchi, K., and Shoji, S. Zn<sup>2+</sup> binding to cysteine-rich domain of extracellular human Immunodeficiency virus type-1 Tat protein is associated with Tat protein-induced apoptosis. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 20: 297-304, (2004)
4. Misumi, S., Endo, M., Mukai, R., Tachibana, K., Umeda, M., Honda, T., Takamune, N., and Shoji, S. A novel cyclic peptide immunization strategy for preventing HIV-1/AIDS infection and progression. *J. Biol. Chem.* 278:32335-32343. (2003)
5. 三隅将吾、高宗暢暁、庄司省三 HIV-1 感染および病態進行を阻止する新規環状ペプチドワクチンの開発に向かって —HIV-1 コレセプターに対する自己抗体誘導による HIV-1 感染阻害—*医学のあゆみ* 207: 67-72. (2003)
6. Misumi, S., Takamune, N., and Shoji, S. Proteomics of HIV-1 virion. *BIOMEDICAL AND PHARMACEUTICAL APPLICATIONS OF PROTEOMICS* (Editor H. Hondemareck) Kluwer Academic Publisher, The Netherland. Chapter 14 (2003)
7. Shogo Misumi, Masafumi Endo, Daisuke, Nakayama, Ryozauro Mukai, Kuniomi Tachibana, Mamoru Umeda, Tetsuro Honda, Nobutoki Takamune, Shozo Shoji Novel cyclic peptide immunization strategies for preventing HIV-1/AIDS infection and progression *The awaji international forum in infection and immunity*, August 25<sup>th</sup>-18<sup>th</sup>, 2003
8. Shogo Misumi, Takashi Fuchigami, Nobutoki Takamune, Ichiro Takahashi, Michiho Takama, and Shozo Shoji. Three isoforms of cyclophilin A associated with human immunodeficiency virus type 1 were found by proteomics using two-dimensional gel electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry. *J. Virol.* 76, 10000-10008. (2002)
9. Nobutoki Takamune, Hirotoshi Hamada, Hideki Sugawara, Shogo Misumi, and Shozo Shoji. Development of enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of activity of myristoyl Coenzyme A: protein N-myristoyltransferase. *Anal. Biochem.* 309, 137-142 (2002)
10. Nobutoki Takamune, Hirotoshi Hamada,

- Shogo Misumi, and Shozo Shoji. Novel strategy for anti-HIV-1 action: selective cytotoxic effect of N-myristoyltransferase inhibitor on HIV-1-infected cells. *FEBS Lett.* 527, 138-142 (2002)
- 1 1. Takashi Fuchigami, Shogo Misumi, Nobutoki Takamune, Ichiro Takahashi, Michiho Takama, and Shozo Shoji. Acid-labile formylation of amino terminal proline of human immunodeficiency virus type 1 p24gag was found by proteomics using two-dimensional gel electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of flight mass spectrometry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293, 1107-1113 (2002)
- 1 2. 庄司省三、三隅将吾. HIV-1 粒子のプロテオーム解析. *日本臨床* 60 卷 4 号、636-640 (2002)
- 1 3. Shogo Misumi, Nobuoki Takamune, Yasuhide Ido, Shinichiro Hayashi, Masafumi Endo, Ryouzaburou Mukai, Kuniomi Tachibana, Mamoru Umeda, and Shozo Shoji, Evidence as a HIV-1 self-defense vaccine of cyclic chimeric dodecapeptide warped from undecapeptidyl arch of extracellular loop 2 in both CCR5 and CXCR4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285(5), 1309-1316 (2001)
- 1 4. Shogo Misumi, Reina Nakajima, Nobuoki Takamune, and Shozo Shoji, A cyclic dodecapeptide-multiple-antigen-peptide-conjugate from undecapeptidyl arch (from Arg168 to Cys178) of extracellular loop2 in CCR5 as a novel HIV-1 vaccine. *J. Virol.* 75, 11614-11620 (2001)
- 1 5. Nobutoki Takamune, Tadahiro Tanaka, Hiroki Takeuchi, Shogo Misumi, and Shozo Shoji, Down-regulation of N-myristoyl transferase expression in human T-cell line CEM by human immunodeficiency virus type-1 infection. *FEBS Lett.* 506, 81-84 (2001).
- 1 6. Shiraishi T, Misumi S, Takama M, Takahashi I, and Shoji S. Myristoylation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 gag Protein Is Required for Efficient env Protein Transportation to the Surface of Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282, 1201-1205 (2001)
- G. 知的所有権の取得状況
- (1). 特許出願中
- 出願番号：wo00/47609, 出願日：1999 年 2 月 10 日
- Title:Cyclic peptides and AIDS vaccines
- 発明者：庄司省三
- 出願人：日水製薬株式会社

---

平成15年度

エイズ医薬品等開発研究  
重点研究報告書  
国際研究グラント事業 研究報告書

平成16年9月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号  
共同ビル（小伝馬町駅前）4F  
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社