

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

2. その他

なし





## 3 免疫療法による各種ウイルスに対する細胞性免疫応答の解析

分担研究者：滝口 雅文（熊本大学エイズ学研究センター ウイルス制御分野  
教授）

研究協力者：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）

### 研究要旨

HIV-1 感染患者における EB ウイルス (EBV) および HIV-1 に対する細胞性免疫を調べ、療法の可能性を検討した。AIDS に合併した EBV リンパ腫患者の一卵性双生児 (HIV-1 非感染者) から誘導した EBV 特異的 CD8T 細胞を、2 人の患者への移入をおこなうと共に、DC を用いた誘導を試みた。これらの患者体内の末梢血中の EBV 特異的 CD8T 細胞を、テトラマーを用いて検出した結果、それぞれ二つの EBV エピトープに対して特異的 CD8T 細胞が検出でき、特に一人の患者では長期間、特異的 CD8T 細胞を確認できた。一方、HLA-B\*5101 を持った無治療血友病 HIV-1 感染者において、4 つの B\*5101 拘束性 CTL エピトープ特異的 CD8T 細胞をテトラマーを用いて検出した。その結果、長期未発症者 (LTNP) おいて、非常に強い HIV-1 感染 CD4T 細胞に細胞傷害活性と HIV-1 増殖抑制能を持った 2 つの Pol 特異的 CD8T 細胞が検出できた。HLA-B\*5101 抗原をもった人が、LTNP に高頻度に見られることから、これらの 2 つの CTL が、患者体内で HIV-1 の増殖抑制に関与していると推測された。

### A. 研究目的

HIV-1 感染者では、免疫不全が進行するにしたがって EB ウイルス (EBV) によるリンパ腫が発症する患者が日本ではよく見られ、患者の予後に重大な影響を及ぼす。そこで、EBV 特異的 CD8T 細胞の用いた免疫療法をおこない、患者体内での EBV 特異的 CD8T 細胞の誘導を解析し、その効果を検討する。さらに新たな HIV-1 に対する免疫療法の基盤を確立するために、LTNP に高頻度に見られる HLA-B\*5101 が提示する 4 つの HIV-1 エピトープ特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の誘導を、20 年間以上無治療で経過した血友病患者で明らかにする。

### B. 研究方法

#### 1. EBV 特異的 CD8T 細胞の解析

EBV 特異的 CD8T 細胞を解析するために、EBV 特異的 CD8T 細胞を検出する HLA クラス I テトラマー (2 種類の EBV エピト-プペプチドを結合した HLA-A\*1101 テトラマー、および 2 種類の EBV エピト-プペプチドを結合させた HLA-A\*2402 テトラマー) を作製した。これを用いて、患者末梢血中の EBV 特異的 CD8T 細胞を検出した。

#### 2. 4 つの HLA-B\*5101 拘束性 HIV-1 特異的 CD8T 細胞の無治療血友病患者での検出

HLA-B\*5101 を持った感染者で高頻度に見られる 4 つの HLA-B\*5101 拘束性 CTL を検出するために、これらのエピトープを結合させた HLA-B\*5101 テトラマーを作製し、これらのテトラマーと抗 CD8 抗

体を用いて、7名のHLA-B\*5101を持った血友病患者での特異的CD8T細胞の数をフローサイトメトリーで解析した。

(倫理面への配慮)

患者及びその兄弟の血液の使用については、インフォームド Consentをおこない書面にて承諾を得た。さらに、国立国際医療センターの倫理委員会での承認を得た。これらの患者のHLAのタイピングは、熊本大学の倫理委員会での承認を得た。

## C. 研究結果

### 1. 悪性リンパ腫が発症したHIV-1患者に対する免疫誘導療法におけるEBV特異的CD8T細胞の解析

昨年度に引き続き、EBV特異的T細胞レセプター(TCR)を認識できるテトラマーを用いて、2例目(KI-185)のEBV特異的CD8T細胞を誘導する免疫療法(HIV-1非感染の一卵性双生児の兄弟の末梢血からペプチドで刺激して誘導したEBV特異的CD8T細胞の移入およびペプチドをパルスした樹状細胞の投与)を受けた患者の末梢血中を解析し、特異的CD8T細胞が検出できるかを調べた。その結果、特異的細胞性免疫誘導療法を開始する以前には、ほとんど末梢血には特異的なCD8T細胞の検出はされなかったが、治療開始後、2つのエピトープに特異的なCD8T細胞の誘導が確認された、現時点まで2年以上EBV特異的CD8T細胞の誘導が維持された(図1)。

### 2. 4つのHLA-B\*5101拘束性HIV-1特異的CD8T細胞の無治療血友病患者での解析

まず、4つのHLA-B\*5101拘束性CTLエピトープ(Pol 743, Pol 283, Gag 327, Rev71)特異的B\*5101テトラマーを作製し、特異的CTLクローンを用いて特異性を調べた。

次に、*In vitro*で強いHIV-1増殖抑制を示した2つのPol特異的CTLと、弱いHIV-1増殖抑制を示したRev及びGagに対するCTLが無治療血友病患者でどの程度誘導されているか調べるために、このテトラマーを用いて、患者末梢血でのそれぞれに特異的なCD8T細胞の検出をおこなった。その結果、3人のLTNPでは、2つのPolに対する特異的CD8T細胞が検出できた。特に2人のLTNPでは、ほとんどウイルスがされないにもかかわらず、2つのPolに対する特異的CD8T細胞が調べたどの時点でも検出できた(Fig2)。しかし、4人の発症遅延者では、ウイルス量が最も低い一人は、Pol283とPol743に対して特異的CD8T細胞が検出できたが、他の3人はPol743に対しては検出がまったくできなかった。

またGag327特異的CD8T細胞に対しては、約半数に検出できたが、臨床経過とは相関が見られず、またRev特異的CD8T細胞は、ほとんどの検出できなかった。以上のことから、この2つのPol特異的CD8T細胞が、患者体内でHIV-1の増殖抑制に強く関与していると考えられた。

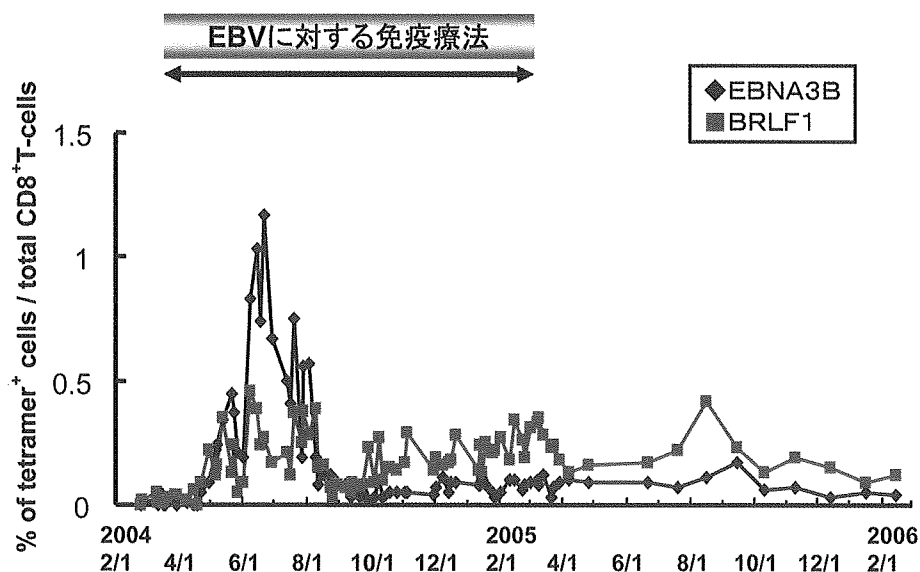


図1. KI-185におけるEBV特異的CD8+T細胞の変動

D. 考察

昨年度、2人の悪性リンパ腫患者に、HIV-1非感染の一卵性双生児の兄弟の末梢血からペプチドで刺激して誘導したEBV特異的CD8T細胞の移入およびペプチドをパルスした樹上細胞の投与をした結果、それぞれ2つのEBVエピトープに対して特異的CD8T細胞の増加が認められたことを明らかにした。今年度は、さらに2例目の患者がどの程度これらの特異的CD8T細胞の誘導を維持できるかを検討したが、治療開始後約2年にわたり末梢血中に特異的CD8T細胞検出できた。この患者ではDCによって特異的なT細胞が誘導できたことに加え、ARTによりHIV-1の増殖抑制が制御され免疫能が回復したため、EBV特異的CTLが維持され、また良好な臨床経過を得たと考えられた。

昨年度我々は、2つのHLA-B\*5101拘束性のPol特異的CTLは、NefによるHLA class Iのdownregulationの影響を受けず、強いHIV-1増殖抑制能と強いHIV-1感染CD4T細胞に対する細胞傷害活性を示すことを明らかにし、これらのCTLはHIV-1感染者体内でHIV-1の増殖抑制に関与していることを示唆した。そこで今年度は、7名のHLA-B\*5101を持った血友病患者の解析をおこなった。これらの患者はすべて無治療であり、そのうち3名は、LTNPであった。この3名のLTNPとウイルス量が最も少なかった1名は、2つのPol特異的CD8T細胞が検出できたことから、これらの2種類のCD8T細胞により、HIV-1の増殖が抑制されていると考えられた。

HLA-B\*5101はエイズ発症遅延に関与したHLA抗原として知られている。今回の結果から、HLA-B\*5101を持った患者では、HIV-1の増殖を強力に抑制するCTL誘導されやすく、その結果エイズ発症遅延に及ぶと考えられた。

今後、このような体内でHIV-1の増殖を抑制するCTLの誘導する治療法の開発が期待できる。

E. 結論

1. 2人の悪性リンパ腫患者に、HIV-1非感染の一卵性双生児の兄弟の末梢血からペプチドで刺激して誘導したEBV特異的CD8T細胞の移入およびペプチドをパルスした樹上細胞の投与をした臨床試験で、2例目の患者では2年以上にわたり2つのEBVエピトープに対して特異的CD8T細胞の増加と維持が認められた。これらの免疫療法による抗EBV細胞性免疫の誘導は可能性が示唆された。
2. HLA-B\*5101を持った7名の無治療血友病患者中、3名のLTNPとウイルス量が最も少ない患者で、HIV-1増殖抑制能が非常に強い2つのPol特異的CD8T細胞が検出できた。これらの2つのCTLが両方存在することで、体内でHIV-1の増殖が抑えられると考えられた。このようなCTLを誘導する新たな治療法の開発が考えられた。

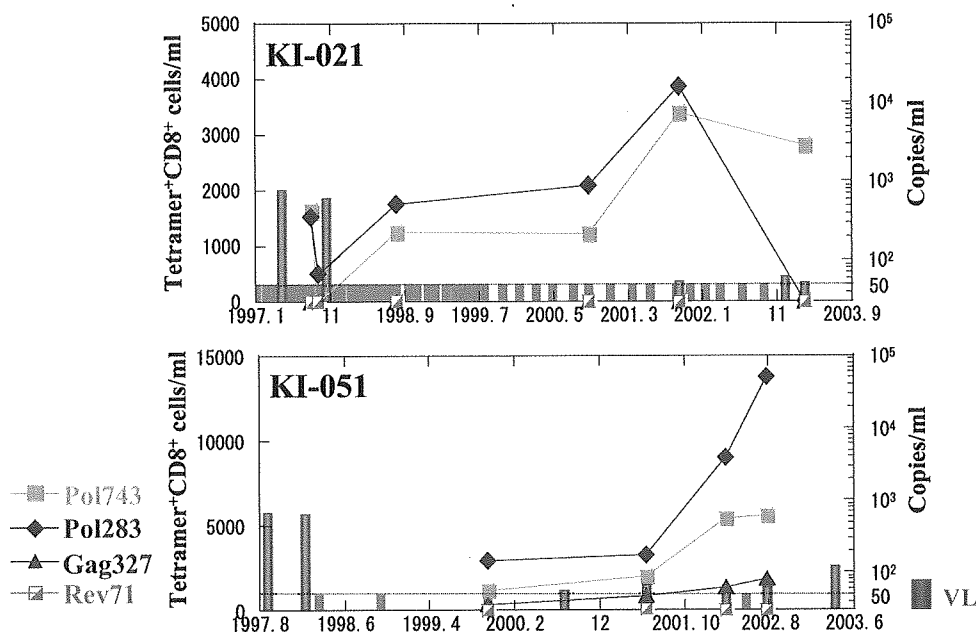


図2. 2人のLTNPでのHIV-1特異的CD8T細胞数の変移

## F. 研究発表

## 論文発表

1. Tomiyama, H., Fujiwara, M., Oka, S. and Takiguchi, M.: Cutting Edge: Epitope-dependent effect of Nef-mediated HLA class I down-regulation on ability of HIV-1-specific CTLs to suppress HIV-1 replication. *J. Immunol.* 174: 36-40, 2005.
2. Satoh, M., Takamiya, Y., Oka, S., Tokunaga, K. and Takiguchi, M.: Identification and characterization of HIV-1-specific CD8+ T cell epitopes presented by HLA-A\*2601. *Vaccine.* 23: 3783-3790, 2005.
3. Fujiwara, M., Takata, H., Oka, S., Tomiyama, H. and Takiguchi, M.: Patterns of cytokine production in HIV-1-specific human CD8+ T cells after stimulation with HIV-1-infected CD4+ T cells. *J. Virol.* 79: 12536-12543, 2005
4. Borghan, MA., Oka, S. and Takiguchi, M.: Identification of HLA-A\*3101-restricted cytotoxic T lymphocyte response to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in patients with chronic HIV-1 infection. *Tissue Antigens.* 66:305-313. 2005
5. Kawashima, Y., Satoh, M., Oka, S. and Takiguchi, M.: Identification and characterization of HIV-1 epitopes presented by HLA-A\*2603: Comparison between HIV-1 epitopes presented by A\*2601 and A\*2603. *Human Immunol.* In press

## 学会発表

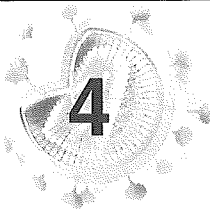
1. Ueno, T., Tomiyama, H., Fujiwara, M., Oka, S. and Takiguchi, M.: Impaired responsiveness of HIV-specific CD8 T lymphocytes caused by high-affinity T cell receptor-ligand interactions. 12th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (Boston MA, USA), Feb. 22-25, 2005
2. Fujiwara, M., Takiguchi, M.: Different cytokine production patterns in CD8+ T cells specific for the same and different HIV-1 epitopes. Keystone symposia HIV Pathogenesis (Keystone, Canada) April 9-15, 2005
3. Kawashima, Y., Satoh, M., Oka, S. and Takiguchi, M.: Identification of HIV-1-specific CTL epitopes presented by HLA-A\*2603. Seventh International Congress on AIDS in Asia and the Pacific (Kobe, Japan) July 1-5, 2005
4. Koizumi, H., Fujiwara, M., Ueno, T., Oka, S. and Takiguchi, M.: Escape of HIV-1 from A\*1101-restricted Nef-84-specific CTL. Seventh International Congress on AIDS in Asia and the Pacific (Kobe, Japan) July 1-5, 2005

5. Takata, H. and Takiguchi, M.: Expression pattern of effector molecules in human CD8+ T cells during peripheral differentiation, Gordon Research Conference on Immunochemistry and Immunobiology (Oxford, UK) August 7-12, 2005
6. Takiguchi, M.: Effective suppression of HIV-1 replication by HIV-1-specific CTLs in long-term non-progressors and slow progressors, International Symposium -The Cooperative Research Project on Clinical and Epidemiological Studies of Emerging and Re-emerging Infectious Diseases (Kumamoto, Japan) September 16, 2005
7. Takata, H. and Takiguchi, M.: Expression pattern of effector molecules in human CD8+ T cells during peripheral differentiation, International Symposium -The Cooperative Research Project on Clinical and Epidemiological Studies of Emerging and Re-emerging Infectious Diseases (Kumamoto, Japan) September 16, 2005
8. Koizumi, H., Fujiwara, M., Ueno, T., Ariumi, Y., Oka, S. and Takiguchi, M.: Effect of two HLA-A\*1101-restricted Nef-specific CTLs on HIV-1 evolution, International Symposium -The Cooperative Research Project on Clinical and Epidemiological Studies of Emerging and Re-emerging Infectious Diseases (Kumamoto, Japan) September 16, 2005
9. Kawashima, Y., Fujiwara, M., Satoh, M., Oka, S. and Takiguchi, M.: Analysis of two immunodominant Pol epitopes presented by HLA-A\*51 associated with slow progression to AIDS: speculation of mechanisms for suppression of viral replication in HLA-B\*5101-positive LTNP, International Symposium -The Cooperative Research Project on Clinical and Epidemiological Studies of Emerging and Re-emerging Infectious Diseases (Kumamoto, Japan) September 16, 2005
10. Borghan, MA., Oka, S. and Takiguchi, M.: Identification of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific HLA-A\*3101-restricted cytotoxic T lymphocyte epitopes, International Symposium -The Cooperative Research Project on Clinical and Epidemiological Studies of Emerging and Re-emerging Infectious Diseases (Kumamoto, Japan) September 16, 2005
11. 滝口雅文 (2005) 免疫療法ーエイズ患者に対する細胞性免疫療法の将来ー。第46回日本臨床ウイルス学会 (福岡) 平成 17 年 6 月 3 日-4 日
12. 本園千尋、上野貴将、井手上結香、滝口雅文 (2005) 可変領域に Vδ1 を有す αβ 型 T 細胞レセプターの抗原認識機構 第 5 回日本蛋白質科学会年会 (福岡) 平成 17 年 6 月 30 日~7 月 2 日

13. 滝口雅文 (2005) HIV-1 の細胞傷害性 T 細胞からの逃避機構。第 16 回日本生体防御学会 (東京) 平成 17 年 8 月 4 日～6 日
  14. 上野貴将、井手上結香、岡 慎一、滝口雅文 (2005) HIV の抗原変異に対する細胞傷害性 T 細胞応答の解析 第 6 回熊本エイズセミナー (熊本) 平成 17 年 9 月 15 日
  15. 藤原 守、高田比呂志、岡 慎一、滝口雅文 (2005) HIV-1 特異的 CD8+T 細胞による HIV-1 感染 CD4+T 細胞認識とサイトカイン産生 第 6 回熊本エイズセミナー (熊本) 平成 17 年 9 月 15 日
  16. 滝口雅文 (2005) HIV-1 の細胞傷害性 T 細胞からの逃避機構。第 14 回日本組織適合性学会 (熊本) 平成 17 年 10 月 2 日-10 月 4 日
  17. 上野貴将、井手上結香、岡 慎一、滝口雅文 (2005) HIV の CTL エスケープ変異体に対する CTL の応答 第 53 回日本ウイルス学会学術集会 (横浜) 平成 17 年 11 月 20 日～22 日
  18. 小泉寛和、藤原 守、川島夕佳、有海康雄、上野貴将、岡 慎一、滝口雅文 (2005) 2 つの HLA-A\*1101 拘束性 Nef 特異的 CTL によるウイルス増殖抑制とウイルス変異の誘導 第 53 回日本ウイルス学会学術集会 (横浜) 平成 17 年 11 月 20 日～22 日
  19. 川島夕佳、藤原 守、佐藤愛美、岡 慎一、滝口雅文 (2005) HLA-B\*5101 拘束性 HIV-1 Pol 特異的 CTL のエイズ発症遅延における役割 第 53 回日本ウイルス学会学術集会 (横浜) 平成 17 年 11 月 20 日～22 日
  20. Borghan, MA., Oka, S. and Takiguchi, M.: (2005) Identification of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific HLA-A\*3101-restricted cytotoxic T lymphocyte epitopes 第 53 回日本ウイルス学会学術集会 (横浜) 平成 17 年 11 月 20 日～22 日
  21. 藤原 守、滝口雅文 (2005) HIV-1 感染初期における免疫誘導の解析: HIV-1 感染マクロファージに対する HIV-1 特異的 CD8+T 細胞応答 第 53 回日本ウイルス学会学術集会 (横浜) 平成 17 年 11 月 20 日～22 日
  22. 上野貴将、井手上結香、岡 慎一、滝口雅文 (2005) 抗 HIV 活性を喪失した HIV 特異的な細胞傷害性 T 細胞の解析 第 19 回日本エイズ学会学術集会 (熊本) 12 月 1 日～3 日
  23. 小泉寛和、藤原 守、川島夕佳、有海康雄、上野貴将、岡 慎一、滝口雅文 (2005) 2 つの HLA-A\*1101 拘束性 Nef 特異的 CTL による HIV-1 の排除と変異の誘導 第 19 回日本エイズ学会学術集会 (熊本) 12 月 1 日～3 日
  24. 川島夕佳、藤原 守、佐藤愛美、岡 慎一、滝口雅文 (2005) HLA-B\*5101 を持つ長期未発症者における HIV-1 Pol 特異的 CTL の役割 第 19 回日本エイズ学会学術集会 (熊本) 12 月 1 日～3 日
  25. 藤原 守、高田比呂志、岡 慎一、滝口雅文 (2005) HIV-1 特異的 CD8<SUP>+</SUP>T 細胞による HIV-1 感染 CD4<SUP>+</SUP>T 細胞認識とサイトカイン産生 第 19 回日本エイズ学会学術集会 (熊本) 12 月 1 日～3 日
  26. 本園千尋、上野貴将、滝口雅文 (2005) 可変領域に Vδ1 を有する αβ 型 T 細胞レセプター構成蛋白質の HIV 抗原に対する相互作用解析 第 35 回日本免疫学会学術集会 (横浜) 12 月 13 日～15 日
  27. Kondo, T., Takata, H. and Takiguchi, M. (2005) Selective expression of CCR6 chemokine receptors on a subset of human memory CD8+ T cells having ability to produce multiple cytokines 第 35 回日本免疫学会学術集会 (横浜) 12 月 13 日～15 日
  28. Takata, H. and Takiguchi, M.: (2005) Multi-color flowcytometric analysis of effector molecule expression in human CD8+ T cells during peripheral differentiation 第 35 回日本免疫学会学術集会 (横浜) 12 月 13 日～15 日
  29. 上野貴将、滝口雅文 (2005) HIV の CTL エスケープ変異と変異体に対するヒト CTL 応答の解析 第 35 回日本免疫学会学術集会 (横浜) 12 月 13 日～15 日
  30. 本園千尋、滝口雅文、上野貴将 (2005) HIV 抗原と T 細胞レセプターの相互作用による T 細胞の抗ウイルス機能制御 (Control of T cell Antiviral function by T cell receptor recognition of HIV-1-derived peptides) 第 6 回日本蛋白質科学会 (京都) 4 月 24 日～26 日
- G. 知的財産権の出願・登録状況  
該当なし







## 4 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）

研究協力者：塩田 達雄<sup>1</sup>、松岡 雅雄<sup>2</sup>、関 康博<sup>3</sup>

（<sup>1</sup>大阪大学微生物病研究所 教授、<sup>2</sup>京都大学ウイルス研究所 教授、  
<sup>3</sup>熊本大学医学部 免疫病態学内科学第二）

### 研究要旨

AIDS に対する化学療法では薬剤耐性 HIV に対する治療法の確立が最も重要な問題の一つとなって久しい。本研究では宿主（細胞側）因子であるケモカインレセプター（CCR5）に作用し既存の抗 HIV 剤に耐性のウイルスに対しても活性を示す AK602/aplaviroc（AVC）の開発を進めると共に AVC の作用機序解析を進め、CCR5 を介したケモカイン本来の生理作用に影響を与えない新しい抗 HIV 剤の開発を目指した。平成 16 年度までに AVC が多剤耐性株を含む R5-HIV-1 の感染・増殖を試験管内で強力に抑制、動物モデル（NOG-SCID マウス）の系でも強力な抗ウイルス活性を発揮する一方で、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 の CCR5 を介した生理的作用を部分的にしか阻害しないこと、AVC のこのような特徴を構造学的に解析するために CCR5 と CCR5 阻害剤の結合モデルの構築を進めていることを報告した。これらの研究から我々は AVC が CCR5 の細胞外ドメインと上部膜貫通ドメインで形成される疎水性ポケットに結合し、その結合様式は他の構造を有する CCR5 阻害剤（SCH-C, TAK-779）といくつかの点で異なっていることを見出した。更に CCR5 の AVC 結合ポケットの一部（第 4-5 膜貫通ドメイン近傍）に HIV 感染に重要でありながら、ケモカイン作用へはほとんど影響しない領域があることを明らかにし、HIV 感染のみに重要な構造をターゲットとした低分子化合物をデザインすることで、ケモカインレセプターの生理的作用を阻害しない抗 HIV 薬のモデリングが可能である事を示した。今回の研究成果は既存の抗 HIV 剤との交差耐性を有せず、かつ抗 HIV 作用に特化した新しい治療薬/治療法の開発に繋がる有用な所見と考えられる。

### A. 研究目的

AIDS に対する HAART 療法（多剤併用療法）を主とした化学療法は一定の成果を挙げているが、副作用、薬剤耐性変異株の出現、アドヒアランスの低下などクリアすべき課題が山積している。分担研究者（満屋）は最近、多剤耐性 HIV にも有効な抗 HIV 薬開発の一環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

ストの研究を進めてきたが、本研究では *in vitro/in vivo* で強力な活性を有する AK602/ GW873140/ aplaviroc（AVC）と一連の誘導体を用いて 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 CCR5 の相互作用などの基礎的研究を進め、ケモカインを介した免疫系など各種の生理作用に影響を与えない CCR5 阻害剤の開発を進めた。

## B. 研究方法

- 1) 抗 HIV 化合物の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系を用いた。
- 2) CCR5 阻害剤の  $^3\text{H}$  ラベル体作成および複数の変異 CCR5 発現細胞株を作成、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) ウシロドプシン結晶構造を基に CCR5 の構造学的解析を行なった。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基に 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、試験を開始した。

## C. 研究結果

分担研究者は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を同定 (Maeda & Mitsuya, *J Biol Chem.* 276:35194-200, 2001)、平成 15/16 年度にはその 1 つである AK602/aplaviroc (AVC) (図 1) が試験管内で強力な活性を示し (IC<sub>50</sub>: 0.2 nM)、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 (Maeda & Mitsuya, *J. Virol.* 78: 8654, 2004)、動物モデル (huPBL-NOG-SCID マウス) の系でも強力な抗 HIV 活性を示すこと (Nakata & Mitsuya, *J. Virol.* 79:2087, 2005) を報告した。

本年度の研究成果として分担研究者のグループは AVC が逆転写酵素阻害剤 (AZT、NVP)、プロテアーゼ阻害剤 (IDV)、侵入阻害剤 (AMD3100、sCD4)、融合阻害剤 (T-20) などとの併用で多くの薬剤との強い相乗効果を認め、CCR5 阻害剤が多剤併用療法で有効な効果を持つ事を示した (Nakata & Mitsuya, 投稿準備中)。

一方で AVC は CCR5 に対する強力な結合親和性 (K<sub>D</sub> 値: ~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 を介してもたらず生理的作用についても完全には阻害しないこと (Maeda & Mitsuya, *J. Virol.* 78: 8654, 2004)、更に AVC のこのような特徴を構造学的に解析するために  $^3\text{H}$  ラベル CCR5 阻害剤と変異 CCR5 発現細胞株を用いた生物学的結合能解析実験系に CCR5・CCR5 阻害剤のコンピューターモデリングの手法を組み合わせた構造解析系を用いた解析を進めていることを以前に報告したが、本年度の詳細な解析により、AVC は CCR5 (図 2) の細胞外ドメインと上部膜貫通ドメインで形成される疎水性ポケットに結合しており (赤矢印)、その結合部位は他の構造を有する CCR5 阻害剤 (SCH-C, TAK-779) ともおおよそ一致するもののいくつかの領域でその結合様式が異なっていることを見出した (図 3)。既に複数の CCR5 阻害剤の詳細な結合様式解析 (ドッキングモデリング作成) を終了 (Maeda & Mitsuya, *J Biol Chem.*, Published on-line; Feb, 13, 2006) 現在、より詳細なモデル構築を進めている。

更に AVC を含む CCR5 阻害剤の結合に重要な CCR5 のポケットがケモカイン作用および HIV 感染に与える影響についてアミノ酸レベルでの詳細な検討も行った。その結果、ポケットの一部 (第 4-5 膜貫通ドメイン近傍) に HIV 感染に重要でありながらケモカイン作用へはほとんど影響しない領域があることを明らかにし (図 3; Gly163, Ile198 など)、このような HIV 感染のみに重要な構造をターゲットとした低分子化合物をデザインすることでケモカインレセプターの生理的作用を阻害しない抗 HIV 薬のモデリングが可能である事を示した (Maeda & Mitsuya, *J Biol Chem.* Published on-line; Feb. 13, 2006)。

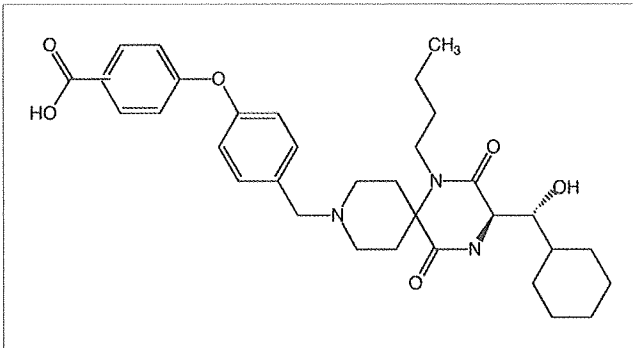


図 1 Aplaviroc (AVC)の構造

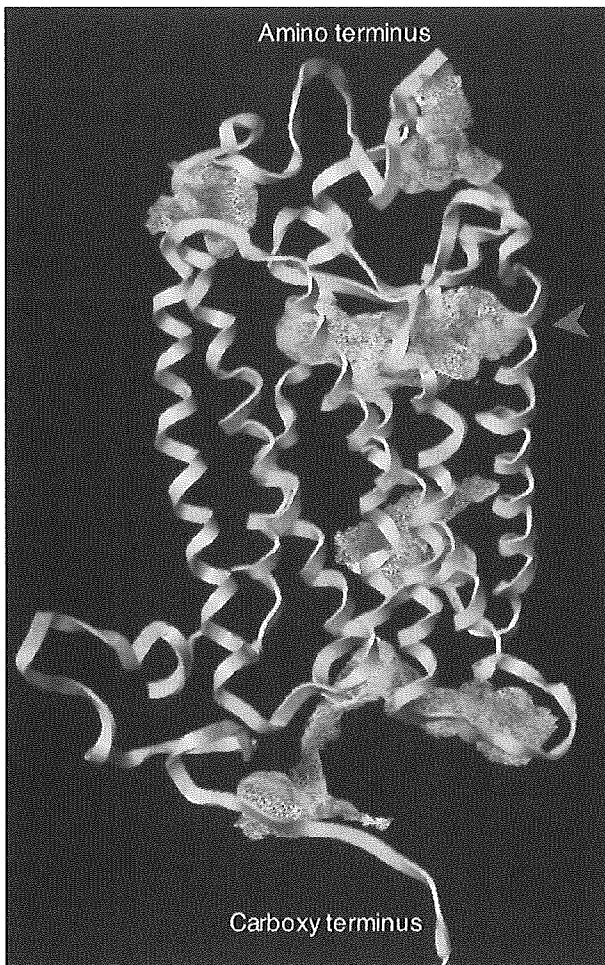


図 2 ウシロドプシンの結晶構造を基にした CCR5 の構造

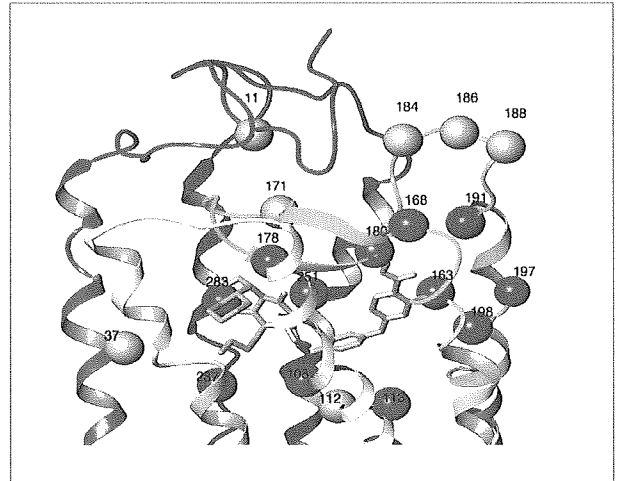


図 3-A

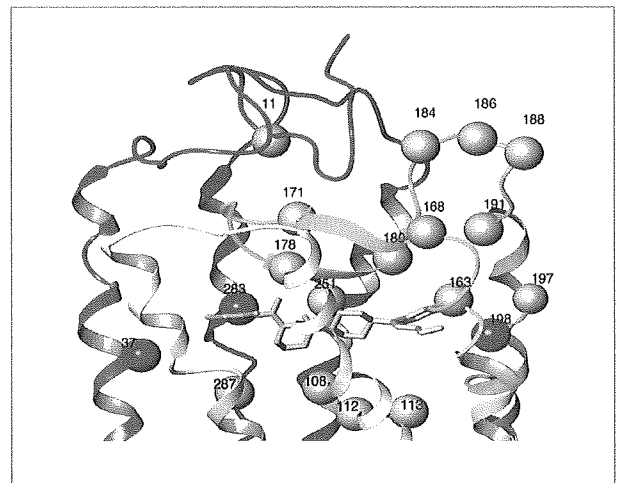


図 3-B

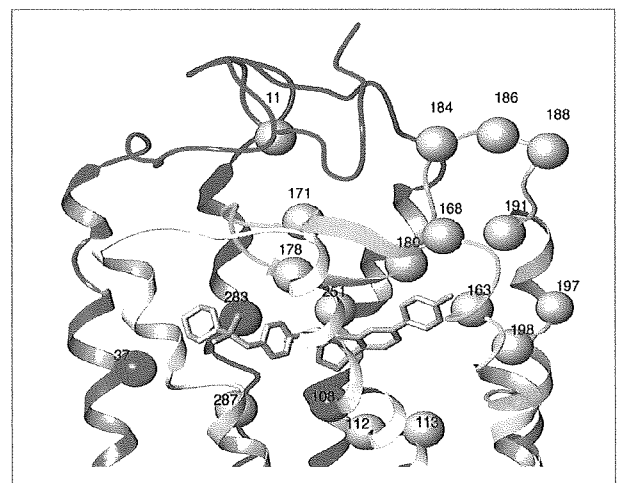


図 3-C

図 3  
異なる CCR5 阻害剤の CCR5 との結合モデル。AVC (図 3-A)、SCH-C (図 3-B)、TAK-779 (図 3-C) のいずれも共通のポケットに結合するが、結合に重要なアミノ酸は異なる (赤：結合に非常に重要なアミノ酸、ピンク：結合に重要なアミノ酸)。一方でポケットの一部にケモカインへの影響が少なく HIV のみに重要な部位 (Gly163、Ile198 など) が存在することが分かった。

## D. 考察

分担研究者（満屋）は抗 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 1 つである。ケモカインレセプター阻害剤は既存の抗 HIV 薬と異なり生体（細胞）の分子を標的とした薬剤であるため、長期に亘りケモカイン作用を阻害する事による生体への影響は否定できない。実際に CCR5 を含むケモカインレセプターが各種感染症に対する免疫応答や移植片拒絶反応に関与しているという報告がされている。今回の研究成果は薬剤の作用機序の詳細な構造学的解析により免疫系を含む生体への影響の少ない新規薬剤の計画的デザインの可能性を示唆するものである。AVC は米国での臨床試験（第 3 相試験）で AIDS 患者に単剤および併用で投与されて、強力な抗 HIV 活性を発揮することが示されたが、不測の肝障害が一部の患者で見られて臨床試験への新しい患者の enrollment は中断（2005 年 12 月現在）、現在我々が検討した多数の類似体（congeners）の中から back-up の SDP 誘導体を選定中である。一方で、上述の通り分担研究者はこれ迄に蓄積した生物学的・構造学的解析結果を基に信頼性の高い CCR5 と低分子化合物の構造モデルの構築を終えており、既にこのモデルを用いて新たな化合物のデザインを始めている。このように実証的データに基づいた新規化合物のデザインが有望な薬剤の開発に繋がる可能性は高いと期待できる。

## E. 結論

本研究は構造学的データから、より特異的・選択的な薬剤のデザインを図るという最近の分子標的のアプローチに即した研究といえる。今回の研究成果がより新しい、免疫系を含む生体への影響の少ない抗 HIV 作用に特化した新しい治療薬の同定、開発へとつながる可能性は高いと評価してよいと思われる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 論文発表

1. Nakata, H., Maeda, K., Miyakawa, T., Shibayama, S., Matsuo, M., Takaoka, Y., Ito, M., Koyanagi, Y., and Mitsuya, H. (2005) Potent anti-R5 human immunodeficiency virus type 1 effects of a CCR5 antagonist, AK602/ONO4128/GW873140, in a novel human peripheral blood mononuclear cell nonobese diabetic-SCID, interleukin-2 receptor  $\gamma$ -chain-knocked-out AIDS mouse model. *J. Virol.* 79: 2087-2096.
2. Ghosh, A.K., Swanson, L.M., Cho, H., Leshchenko, S., Hussain, K.A., Kay, S., Wlaters, D.E., Koh, Y., and Mitsuya, H. (2005) Structure-Based Design: Synthesis and biological evaluation of a series of novel cycloamide-derived HIV-1 protease inhibitors. *J Med Chem* 48:3576-3585.
3. Matsushita, S., Yoshimura, K., Kimura, T., Kamihira, A., Takano, M., Etoh, K., Shirasaka, T., Mitsuya, H., and Oka, S. (2005) Spontaneous recovery of hemoglobin and neutrophil levels in Japanese patients on a long-term Combivir® containing regimen. *J. Clin. Virol.* 33:188-193.
4. Depboylu, C., Schafer, M.K., Schwaeble, W.J., Reinhart, T.A., Maeda, H., Mitsuya, H., Damadzic, R., Rausch, D.M., Eiden, L.E., and Weihe, E. (2005) Increase of C1q biosynthesis in brain microglia and macrophages during lentivirus infection in the rhesus macaque is sensitive to antiretroviral treatment with 6-chloro-2', 3' dideoxyguanosine. *Neurobiol Dis* 20:12-26.
5. Gatanaga, H., Das, D., Suzuki, Y., Yeh, D.D., Hussain, K.A., Ghosh, A.K., and Mitsuya, H. (2006) Altered HIV-1 gag protein interactions with cyclophilin A (CypA) on the acquisition of H219Q and H219P substitutions in the CypA binding loop. (2006) *J. Biol. Chem.* 281, 1241-1250.
6. Maeda, K., Das, D., Ogata-Aoki, H., Nakata, H., Miyakawa, T., Tojo, Y., Norman, R., Takaoka, Y., Ding, J., Arnold, E., and Mitsuya, H. (2006) Structural and molecular interactions of CCR5 inhibitors with CCR5. *J. Biol. Chem.* Published online on February 13, 2006.
7. Ghosh, A.K., Schiltz, G., Perali, R. S., Leshchenko, S., Kay, S., Walters, D. E., Koh, Y., Maeda, K., Mitsuya, H. (2006) Design and synthesis of novel HIV-1 protease inhibitors incorporating oxyindoles as the P2'-ligands. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 76: 1869-1873.

8. Yin, P.D., Das, D., and Mitsuya, H. (2006) Overcoming HIV Drug Resistance through Rational Drug Design Based on Molecular, Biochemical, and Structural Profiles of HIV Resistance. *Cell Mol Life Sci.* (In press)

学会発表（国際学会のみ）

1. Hirotomoto Nakata, Y Koh, E Kodama, G Yang, S Kohgo, H Hayakawa, H Ohrui, M Matsuoka, Y C Chen and H Mitsuya
2. Intracellular metabolism of 2'-deoxy-4'-c-ethynyl-s-fluoroadenosine, a novel 4'-c-ethynyl nucleoside analog potent against multidrug-resistant HIV-1 variants. The 13<sup>th</sup> conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Denver, Colorado, Feb.5-8, 2006
3. Yasuhiro Koh, H Nakata, H Ogata-Aoki, M Nakayama, S Leschenko, A Ghosh and H Mitsuya
4. Determination of resistance profile of GRL-02031, a novel nonpeptidic protease inhibitor containing a cyclopentanyltetrahydrofuran moiety. The 13<sup>th</sup> conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Denver, Colorado, Feb. 5-8, 2006
5. Manabu Aoki, H Aoki and H Mitsuya TTNTRNS: An amino acid insert near the p17/p24 Gag cleavage site associated with resistance to protease inhibitors. The 13<sup>th</sup> conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Denver, Colorado, Feb.5-8, 2006

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

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

2. 実用新案登録           なし

3. その他           なし





## 5 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 新興感染疾病病態制御学系 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・助手）

### 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るが、この治療法の有効性と安全性の確保の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が求められる。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）を及ぼすのであれば、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り、本年度は“CCR5 の発現とその制御機序”に関する研究では、精液や alpha-fetoprotein (AFP) が CCR5 の発現を低下させる機序について、そしてその他の宿主因子として母乳成分や catecholamines (CA)（ストレス関連神経伝達物質）が CCR5 の発現や HIV 感染に及ぼす影響について報告する。“CCR5 ligands が HIV 感染に与える影響”に関する研究では、CCR5 ligands の存在下で潜伏した HIV の再活性化の際に他の刺激によって再活性化した場合とは異なる quasispecies が出現する可能性に言及する。

#### 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精液や AFP が CCR5 の発現を低下させる機序および HIV-1 感染への影響：

健康成人から末梢血単核球(PBMC)を分離し、さらに Auto-MACS (Miltenyi Biotec)を用いて T 細胞 (CD3-positive)と単球 (CD14-positive)の 2 分画を採取した。後者は 7 日間の培養の後に monocyte-derived macrophages (MDM)として実験に供与した。また

monocyte-derived dendritic cells (MDDC)への分化は GM-CSF と IL-4 を添加して 7 日間培養することによって誘導した。精漿(semenal fluid, SF)は健康成人男子から採取した精液を遠心し、その上清を用いた。実験によっては SF に加熱処理、proteinase K (PK)処理、または抗 prostaglandin E2 (PG-E2)抗体処理を行った。PG-E2 は Sigma より購入した。AFP は臍帯血から抽出したもので Calbiochem から購入した。

CCR5 mRNA level の定量は、細胞から total RNA を QIAamp RNA Kit により抽出し iCycler iQ™ Real-Time Detection System (Bio-Rad)を用いた real time RT-PCR (primers: 5' -CAAAAAGAAGGTCTTCAT-TACACC-3' および 5' -CCTGTGCCTCTTCTTCT-CATTTCG-3' )。同時に定量した tubulin mRNA copy 数を元に細胞あたりの CCR5 mRNA copy 数を算定した。またモノクローナル抗 CCR5 抗体 (2D7) で細胞表面および細胞内を染色し flow cytometry によって CCR5 の発現を調べた。細胞内染色には Cytofix/Cytoperm (PharMingen)を用いた。

MDDC から T 細胞への HIV-1 transmission 実験は以下のように行った。まず MDDC を ZDV によって前処理し、ウイルスの吸着や侵入はおこってもそれ以降の逆転写の過程には進まないようにした。この際に SF を加えたもの加えないものを並べて行うようにした。その上で MDDC を AD8 (R5-HIV-1)でパルスし、1 時間後に細胞を徹底的に洗浄し、その後 T 細胞と共培養し、2 日後に細胞から DNA を抽出して proviral load を real time PCR で定量した。

②母乳成分や CA が CCR5 発現および HIV 感染に及ぼす影響：

乳清(milk whey, MW)は健康授乳婦の母乳を遠心し、その上清を用いた。牛乳由来の sialyl lactose (SL)および lactoperoxidase (LPO)は川上浩博士(雪印乳業株式会社技術研究所)より供与された。Norepinephrine (NE)は Sigma から購入した。これらの因子の影響は主に臍帯血単核球(CBMC)もしくはそれから分離した MDM を用いて調べた。

HIV 感染実験および entry assay は平成 16 年度報告書で述べた方法で行った。

## 2) CCR5 ligands が HIV 感染に与える影響

① CCR5 ligands が潜伏した HIV の再活性化に及ぼす影響：

HARTT によりウイルスが検出限界以下となった患者からインフォームド・コンセントを得た上で採血し、CD8-depleted PBMC 培養において 1) control,

2) PHA + IL-2, 3) IL-7, 4) LPS, 5) 抗 CD3 抗体 + RANTES (CCR5 agonist), そして 6) 抗 CD3 抗体を添加し、1 週間毎に健康成人由来の CD8-depleted PBMC を補充しながら 6 週間まで培養を続け、この間 1 週間毎に培養上清を採取した。ウイルスの増殖は培養上清中の p24 抗原を ELISA で定量することによって評価した。

さらに p24 が検出された検体については、HIV-1 Env gene の C2V3 領域を PCR で増幅後に塩基配列を決定し、系統樹解析を行った。

## C. 研究結果

### 1) CCR5 の発現とその制御機序

①精液や AFP が CCR5 の発現を低下させる機序および HIV-1 感染への影響：

既に私達は SF 存在下で MDM の CCR5 発現が減少することを示している。この作用は SF の加熱処理や PK 処理には殆ど影響されなかったが、抗 PG-E2 抗体処理によって中和された。また SF の代わりに PG-E2 のみを加えても CCR5 の発現を減少させることができた(表 1)。以上より、SF による CCR5 発現減少をおこす主たる因子は PG-E2 であることが判明した。

SF が性行為感染に及ぼす効果をさらに調べるために、MDDC から T 細胞へウイルスが伝播される過程でどのように作用するのかを確かめたところ、SF 処理によって MDDC の CCR5 発現は減少したものの、T 細胞へのウイルスの伝播はむしろ促進することがわかった(図 1)。この作用は抗 DC-SIGN 抗体の添加によって著明に中和されることから(図 2)、この状況でも DC-T 細胞の相互作用にこの分子が必要であることが示唆される。

また既に私達は AFP 存在下で培養した MDM と T 細胞の CCR5 発現が低下していることを示していたが、この作用は MDM では overnight 処理でも認められたが、T 細胞においては短期間(2~3 日以内)では明らかでなく、比較的長期間(2~3 週間)の培養によって顕著となった(図 3)。AFP の添加は CD69 や HLA-DR のような活性化マーカーの発現度には殆ど影響を及ぼさなかった(data not shown)

SF や AFP がどのステップで CCR5 の発現を抑えているのかを調べるために、CCR5 mRNA レベルを real time RT-PCR で定量し、また CCR5 の発現を細胞内と細胞表面のそれぞれで flow cytometry で評価



表 1

**Seminal fluid-mediated downregulation of CCR5 expression on MDM**

	Donor #1	Donor #2	Donor #3
Control	5.2%	12.1%	8.3%
SF: untreated	1.0%	3.2%	3.7%
heated	1.1%	3.8%	3.2%
PK-treated	1.2%	2.5%	3.3%
anti-PG-E2	3.8%	8.8%	7.2%
PG-E2	0.9%	4.2%	2.5%

**Seminal Fluid Decreases CCR5 Expression on MDDC but Increases MDDC-T Cell Transmission of HIV-1**

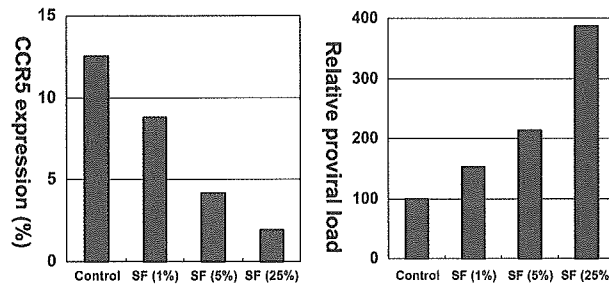


図 1

**Anti-DC-SIGN, but not AOP-RANTES, Inhibits Seminal Fluid-Induced MDDC-T Cell Transmission of HIV-1**

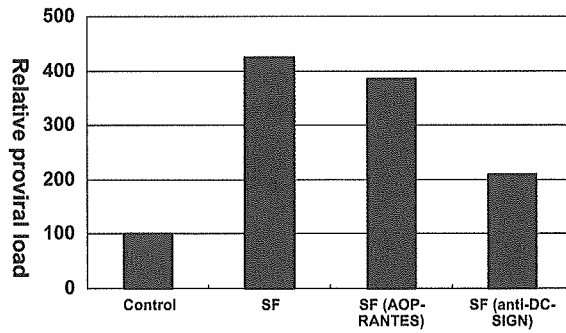


図 2

**Downregulation of CCR5 Expression on T Cells by AFP**

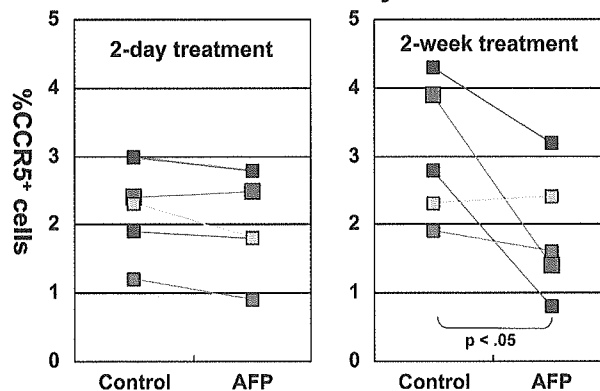


図 3

した。MDM において SF や AFP は CCR5 mRNA や細胞内での CCR5 の発現レベルには大きな影響を及ぼさず、主に細胞表面における発現のみを抑えていた (表 2)。

②母乳成分や CA が CCR5 発現および HIV 感染に及ぼす影響：

MW の存在下で MDM を培養すると CCR5 の発現が亢進することが分かった (図 4)。この効果は T 細胞では明らかでなかった。MW のこの効果はミルク成分の一つである SL でも認められ (図 4)、少なくとも MW の作用の一部を担っているものと思われる。現在これらの因子の刺激を受けた MDM の HIV-1 への感染性について調べているところである。Preliminary な結果として、MW や SL や LPO は短期間の前処理ではむしろ HIV-1 感染を抑制することが示されている (data not shown)。

CA の代表的なものである NE は、ホルモンとして血中に 10 nM レベルまで検出され、神経伝達物質としてリンパ節を支配する神経の末端から  $\mu\text{M}$  レベルでも放出される。血中の生理学的レベルでも NE は HIV-1 の増殖を抑制することを明らかにした (図 5)。この機序として CCR5 の発現に及ぼす影響を調べてみたが、そこへは殆ど作用せず (data not shown)。

表 2

Seminal fluid- or AFP-mediated downregulation of CCR5 expression on MDM at post-translational level

	% Cell surface / intracellular CCR5+ cells (Flow cytometry)	CCR5 mRNA levels (Real-time PCR)
SF	23 / 96	97
AFP	32 / 77	92

(shown as levels relative to those in untreated MDM)

Induction of CCR5 Expression on MDM by Milk Whey or Sialyl Lactose

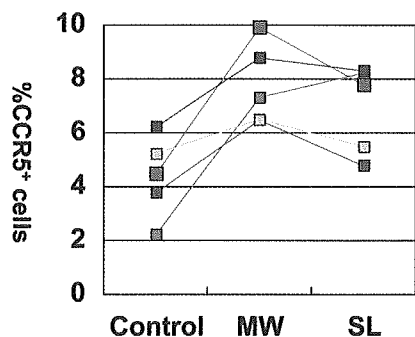


図 4

抗 HIV 効果は主に NF- $\kappa$ B の活動性の抑制を通じて HIV-1 LTR の活性を下げることにあると思われる (図 6, 7)。

2) CCR5 ligands が HIV 感染に与える影響

① CCR5 ligands が潜伏した HIV の再活性化に及ぼす影響：

HARTT により潜伏状態にある HIV は CD8-depleted PBMC への様々な ex vivo の刺激を加え、かつ allo の CD8-depleted PBMC との共培養によって再増殖を促すことができる。この際に出現するウイルスの C2V3 領域の塩基配列から quasispecies の系統樹解析を行ったところ、異なった刺激では少し異なる quasispecies を検出した (図 8)。興味深いことに RANTES (CCR5 ligand) の存在下で出現したウイルスは LPS (グラム陰性桿菌細胞壁成分) の刺激で出現するウイルスに類似していた。

Suppression of HIV-1 Infection by Norepinephrine

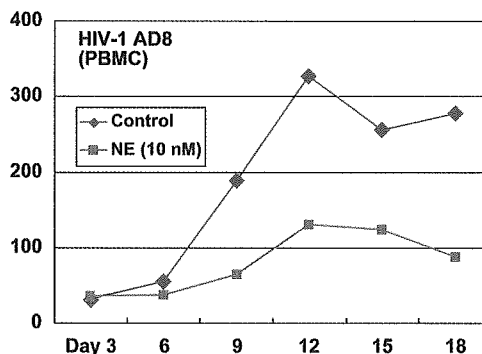


図 5

Norepinephrine (NE) Decreases Binding of NF- $\kappa$ B, but not of Sp1, to HIV-1 LTR Promoter

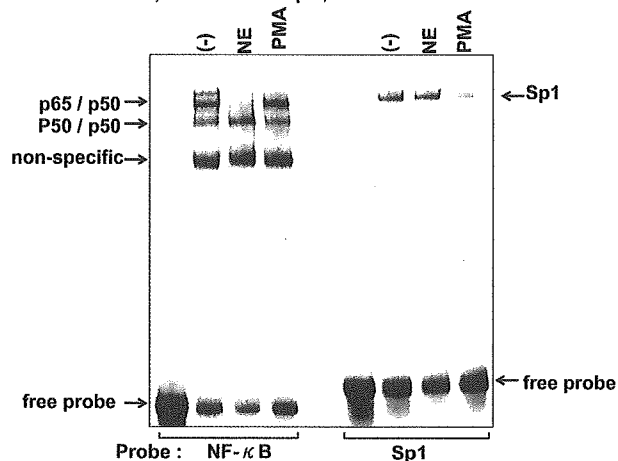


図 6

D. 考察

1) CCR5 の発現とその制御機序

性行為感染や母子感染が生じる環境下で、SF や MW に含まれる宿主因子や胎児・新生児血液中に大量に含まれる AFP によって CCR5 の発現が調整されることを示した。CCR5 を標的とする治療法は、患者本人の生命予後や QOL の改善のためだけではなく、その患者から他の人へのウイルスの伝播を防ぐ効果も期待されるが、このような伝播の場所となる compartment における CCR5 の発現のコントロールはそのような効果に影響を及ぼすかも知れない。ただし上記の宿主因子が HIV-1 感染に与える影響は複雑である。例えば私達の実験により、SF は CCR5 を介した HIV-1 感染の効率を下げると一方で、MDDC から T 細胞へのウイルス伝播は促進する可能性が示された。また CCR5 を介した感染初期過程のみでなく、ウイルス転写の過程にも細胞によって様々な影

響をもたらす場合がある。このような状況全てを考察することが、HIV-1 の pathogenesis をさらによく理解することに繋がるものと思われる。

2) CCR5 ligands が HIV 感染に与える影響

CCR5 を標的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ことを示したが、その場合特に R5-HIV-1 よりも X4-HIV-1 の出現を促しやすい可能性が示された。以前に私達は LPS のような微生物刺激は CCR5 を利用するウイルス(R5-HIV-1)から CXCR4 を利用するウイルス(X4-HIV-1)への phenotypical transition を促す可能性を示唆してきたが、この結果はそれを裏付けるものであるかも知れない。後者のウイルスがより病原性が強いのかどうかは明らかではないが、後者のウイルスの出現は HIV disease の進行に伴って起こることから注意が必要である。

Downregulation of HIV-LTR Promoter Activity by Norepinephrine

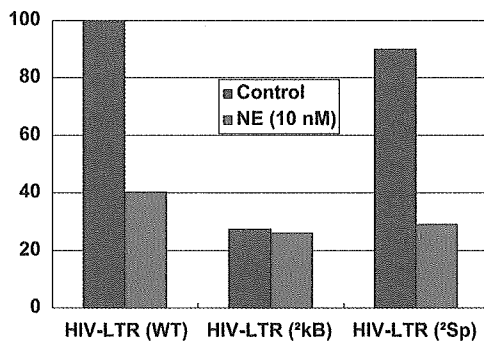


図 7

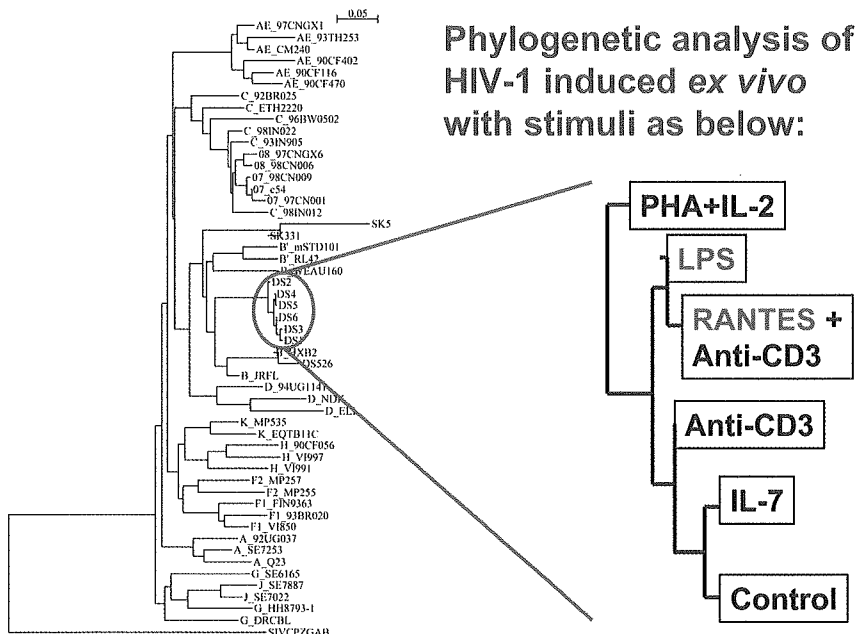


図 8

## 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

### 論文発表

1. Moriuchi M, Yoshimine H, Oishi K, Moriuchi H. Norepinephrine inhibits human immunodeficiency virus type-1 infection through the NF-kappaB inactivation. *Virology*. 345:167-173 (2006).

### 学会発表

1. Moriuchi M, Moriuchi H. Dichotomous Effects of Seminal Fluid on HIV-1 Infection of Macrophages. Keystone symposium "HIV Pathogenesis/HIV Vaccines". Banff, Alberta, Canada. April 9-15, 2005.
2. Moriuchi M, Moriuchi H. Dichotomous effects of alpha-fetoprotein on HTLV-I infection: Implications for mother-to-child transmission. 12<sup>th</sup> International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses. Half Moon, Jamaica. June 21-25, 2005.
3. Moriuchi M, Moriuchi H, Kawakami H. Suppression of HIV-1 infection by breast milk constituents, lactoperoxidase or sialyl lactose. 7<sup>th</sup> International Congress on AIDS in Asia and the Pacific. Kobe, Japan. July 1-5, 2005.
4. Moriuchi M, Moriuchi H. Alpha-fetoprotein inhibits HIV-1 infection: Implications for mother-to-child transmission. 1<sup>st</sup> Congress of Asian Society for Pediatric Research. Tokyo, Japan. November 24-26, 2005.

## H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 乳清由来 lactoperoxidase および sialyl lactose の「HIV 感染抑制効果」について、共同研究施設である雪印乳業株式会社より特許申請中。