

創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業
創薬等ヒューマンサイエンス総合研究推進事業

平成17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

財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

平成17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1分野

KA11501	エイズに関連する日和見原虫感染症に対する新規創薬に関する研究	野崎智義 ……	1
KA11502	HIV-1 潜伏感染細胞からのウイルス再産生阻止薬の開発と応用に関する研究（総合研究報告）	石坂幸人 ……	11
KA11502	HIV-1 潜伏感染細胞からのウイルス再産生阻止薬の開発と応用に関する研究（平成17年度報告）	石坂幸人 ……	15

第2分野

課題番号

KA21503	HIV-1 ディフェンスワクチンの創製・開発研究	梅田 衛 ……	21
---------	--------------------------	---------	----

第3分野

KA31504	ヒト型リンパ濾胞を持つエイズモデルマウスの作成とその応用	清水則夫 ……	27
KA31505	HIV-1 およびインフルエンザウイルスのゲノムRNA核外輸送機構の解明に基づく創薬	高橋秀宗 ……	35

国際研究グラント

SA14801	多剤耐性HIV-1 変異株に高い活性を発揮する「新世代のプロテアーゼ阻害剤」の研究・開発	満屋裕明 ……	43
SA14802	酵素との相互作用の解析に基づく耐性克服をめざしたエイズ治療薬の開発	木曾良明 ……	49
SA14803	HIV感染者のエイズ発症抑制に関与する遺伝的・免疫学的素因の解析	横田恭子 ……	59
SA14804	多剤耐性HIV-1 の克服に向けた新規核酸系逆転写酵素阻害薬の開発研究	馬場昌範 ……	67
SA14805	遺伝子発現制御を目的としたエイズ遺伝子治療用ベクターの開発及び実用化に関する研究（総合研究報告）	加藤郁之進 ……	76
SA14805	遺伝子発現制御を目的としたエイズ遺伝子治療用ベクターの開発及び実用化に関する研究（平成17年度報告）	加藤郁之進 ……	81
SA14806	HIV由来nefタンパク質の細胞形質転換作用を抑制する新規なAIDS脳症抑制剤の開発（総合研究報告）	赤川清子 ……	89
SA14806	HIV由来nefタンパク質の細胞形質転換作用を抑制する新規なAIDS脳症抑制剤の開発（平成17年度報告）	赤川清子 ……	96
SA14831	エイズ患者におけるカポジ肉腫、リンパ腫の発症機構の解明とその治療薬開発	片野晴隆 ……	104

SA24807	宿主感染抵抗性遺伝子の分子同定と発現解析によるエイズワクチン戦略の開発	宮澤正顯 …… 109
SA24808	細胞性免疫誘導型エイズワクチン開発の研究	滝口雅文 …… 118
SA24809	細胞性免疫誘導型prime／boostエイズワクチンの臨床評価系の確立	山本直樹 …… 128
SA24810	CD4＋細胞機能を活性化するワクチン、免疫療法の開発	森一泰 …… 137
SA34811	エイズ抗酸菌症治療のための新しい化学療法システムの開発	森亨 …… 144
SA34832	途上国における遺伝子多型に基づいたHIV治療法開発のための基盤整備	岡慎一 …… 148

エイズ医薬品等開発研究

重点研究報告書

第1分野

抗エイズウイルス薬、エイズ付随症状に対する
治療薬の開発に関する研究

HIV-1 潜伏感染細胞からのウイルス再産生阻止薬の 開発と応用に関する研究 (平成17年度報告)

所 属 国立国際医療センター研究所

研究代表者 石坂幸人

研究概要 ウイルス潜伏感染細胞からのウイルス再産生機構を理解し、これを阻害する因子を海洋微生物抽出エキスライブラリーから同定することを目的として開始した。潜伏感染細胞からのウイルス産生誘導因子として知られる Vpr に着目した。Vpr が患者血液中に 10 ng/ml 程度の濃度で存在すること、Vpr の検出がエイズ病態と密接に関連することを見出した。血中で検出された濃度に相当する Vpr の活性を指標に、海洋微生物抽出エキスライブラリーから抗 Vpr 因子の探索を行った。一方、エイズ脳症における Vpr の関与を示唆する所見が得られた。抗 Vpr 活性の再現性を確認しながら、精製/構造決定に向けた微生物の大量培養条件を設定中である。

分担研究者

小柳義夫 京都大学ウイルス研究所 教授
胡桃坂仁志 早稲田大学理工学術院 助教授
山下克美 金沢大学薬学部 助教授
池田和真 岡山大学輸血部 助教授
志村まり 国立国際医療センター 室長
足立恭子 海洋バイオテクノロジー研究所 研究員
前田雅弘 免疫生物研究所 研究員

A. 研究目的

HIV-1 アクセサリー遺伝子 Vpr は 96 個のアミノ酸をコードし、HIV-1 感染者の血中に存在することや、潜伏感染細胞からのウイルスの再産生を誘導することが報告された。

そこで本研究では患者血液中の Vpr の有無とその濃度を明らかにし、これと同程度の濃度の Vpr の機能を明確にしなが、この機能を阻害する因子を海洋微生物抽出エキスライブラリーから同定することを試みる。

一方、Vpr は神経細胞に対してアポトーシスを誘導することや細胞周期異常を誘発することも報告されており、本プロジェクトで同

定される抗 Vpr 因子の応用性を検定するため、神経系細胞のアポトーシス誘導における Vpr の関与を明らかにした。具体的には、HIV 感染による神経組織破壊の動物モデルを開発し、Vpr の関与の有無を明らかにした。

B. 研究方法

a. 血中 Vpr の検出と機能

Vpr に対する単クローン抗体を作成し、認識部位の異なる 2 種類の抗体を用いて免疫沈降-ウェスタン解析を行った。標準サンプルは、Vpr 精製標品を健康人血漿に添加し、同様の解析に供した。

Vpr リコンビナント蛋白質を GST 融合蛋白質として発現した。エンドトキシンフリーの Vpr 標品を種々の濃度で潜伏感染細胞である U1 細胞に添加し、2 日間培養した後、培養上清中の p24 を ELISA 法にて測定した。健康人由来末梢血単核球細胞は、末梢血をリンフォプレップに重層し、遠心後回収した。

c. 抗 Vpr 因子探索

Vpr は二量体を形成し、アミノ酸 60-80 の部分 (LR-20) が結合に関与している。ビオチン化 LR-20 を合成し、精製 Vpr との結合検出

システムを稼働させた。この中に、海洋微生物抽出エキスを添加し、2者の結合を阻害するエキスを同定した。2次スクリーニングとして、Vprにより末梢血細胞から産生されるサイトカイン産生に対する阻害効果を指標に、精製を行った。ヒットを示す検体に関して、海洋バイオテクノロジーに情報を還元し、大量培養と部分精製を行った。精製画分について、同様の解析を行った。

d. 神経細胞に対する Vpr 機能解析

妊娠後期の ICR 妊娠マウスから胎児の脳を回収し、トリプシン処理後に、MPC コーティング低接着プレート上で neurosphere 形成培養用メEDIUMにて継続培養した。一方、生後 7-8 日目の哺乳 Wister Hannover GALAS ラットを断頭し、脳から海馬を回収して McIlwain ティッシュチョッパーにて海馬溝に垂直に 350 μ m の厚さにスライスした。これをあらかじめ準備しておいた 6 ウェル培養プレート内の培養プレートインサート (Millicell-CM:PICM03050, Millipore) 上に 1 ウェルあたり 4-5 枚の密度で培養した。

e. ヒト末梢血単球由来マクロファージ培養系との共培養系

正常人末梢血由来の単核球 (PBMC) よりマクロファージを分離し、さらに分子クローンウイルスである HIV_{JRFL} 株を MOI 1 で感染させ、これと神経系細胞と共培養を行うことにより、ウイルス感染の影響を観察した、

(倫理面への配慮)

臨床検体の解析及び動物実験の施行にあたり各研究施設での倫理委員会及び動物取り扱い規約を遵守しながら行った。また、健常人からの末梢血採取は、実験の内容を十分に説明し、理解が得られることを条件に行った。

f. Vpr による DNA 損傷

Vpr 発現をコントロールできる細胞株、MIT-23 を用いて、DNA 損傷に伴って誘導され

る RAD51、BRCA1 等の遺伝子産物の挙動を解析した。また DNA 損傷の有無をパルスフィールド電気泳動法で解析した。

C. 研究結果

a. 患者血液中に存在する Vpr の検出

2種類の抗体として 8D1 及び C217 を得た。8D1 は Vpr の N 末側を、C217 は Vpr の C 末端を認識する。精製 Vpr を用いた免疫沈降-ウェスタン解析により、健常人血漿に添加された 1 ng/500 μ l の Vpr を検出することが可能であった。患者検体 14 例中、6 検体で、分子量約 14-kDa の位置に明らかなバンドが検出された。その濃度はおよそ 10 ng/ml 程度であった。陽性症例の血中ウイルス価は $158,500 \pm 180,680$ コピー/ mm^3 であった。検出されなかった症例の血中ウイルス価は 1995 ± 3939 コピー/ mm^3 で、2者の間に有意な差が認められた。また白血球数や CD4 陽性細胞数は、Vpr が検出された症例では、有意に低値を示した。一方、60 例以上の健常人検体を解析した結果、いずれの検体にも 14-kDa の蛋白質は検出されなかった。

b. Vpr によるウイルス再産生機序

臨床検体を用いた解析によって、患者血液中には 10 ng/ml 程度の Vpr が存在することが示された。そこで、Vpr を用いた *in vitro* の機能解析において、10 ng/ml 前後の Vpr を用いた。精製 Vpr 標品を潜伏感染細胞株である U1 細胞に添加し、ウイルス産生の有無を調べたところ、10 ng/ml の Vpr 添加群では全くウイルス産生は検出されなかった。さらに Vpr を 1 μ g/ml まで添加しても同様に、ウイルス産生は検出されなかった。

Vpr による間接効果を検定するため、U1 細胞に健常人 PBMC と Vpr を加えて培養した後、ウイルス産生の有無を解析した。その結果、10 ng/ml の Vpr を添加した群で、ウイルス産生が認められた。サイトカインのプロテインアレイ解析を行うことにより、Vpr により末梢血単核球細胞からある種のサイトカインが産生されることが明らかになった。さらに、Vpr に反応してサイトカインを産生する担当細胞は単球/マクロファージであること、また Vpr のサイトカイン産生誘導能は Ik-b のリン酸化蛋白質である IKK が関与していることを見出した。

c. 抗 Vpr 因子の探索

海洋微生物抽出エキス、約 5000 種類から固相法を用いたスクリーニングを行い、一種類の糸状菌由来エキス中に再現良く、Vpr 機能を抑制する活性を見出した。微生物からの因子産生能の再現性を確認するとともに、大量培養の条件検討を行った。

d. Vpr の神経系細胞への影響

1) 神経幹細胞の培養系である Neurosphere 形成培養系を樹立し、これと HIV-1_{JRFL} を感染させたマクロファージを共培養すると neurosphere 内の神経系未分化細胞は著明に減少した。さらに neurosphere から分化誘導実験でも、神経系細胞への分化は著明に抑制された。Vpr 精製蛋白質および抗 Vpr モノクロナール中和抗体を用いて、neurosphere 分化誘導培養系に添加すると、この軸索伸長反応の一部が抑制された。また軸索伸長障害の起こっている神経細胞では JC-1 陽性の particle の移動が少なく、ミトコンドリアの軸索内輸送が阻害されていることが判明した。(図 2c)

e. Vpr による DNA による二重鎖切断

Vpr 発現細胞のゲノム DNA が損傷されていることを認めた。それに伴って、リン酸化 ATM、 γ -H2AX、Rad51 及び BRCA1 のフォーカス形成が認められた。

D. 考察

a. 患者血液中に存在する Vpr の検出

患者血中に Vpr が検出された。これまで、血液中や脳脊髄液中に Vpr が存在するとの報告があったが、実際の濃度に関する報告はなかった。今回 Vpr の濃度が約 10 ng/ml 程度であると判明した。今後の Vpr に関する機能解析を行う際の有力な指標になると思われる。Vpr は、解析した 14 例中 6 例で検出されたが、健常人検体では、検出されなかった。Vpr が認められた症例の血中ウイルス価は高い値を示し、白血球数や CD4 陽性 T 細胞数は低値を示した。今後、解析対象数を増やす一方、同一の症例について、経時的に解析を行うことで、エイズ病態と Vpr 血中濃度の関連性の有無を明かにしたい。一方、Vpr はアミノ酸置換を受けやすい遺伝子産物として知られている。血中 Vpr が検出されなかった症

例で、ウイルス価が高値を示す症例中の vpr 遺伝子を解析したところ、コーディング領域中に 4 塩基の挿入が認められ、その直後でストップコドンにより C 末端を形成することが明らかとなった。

今回の解析に使用した免疫沈降後で使用した 2 種類の単クローン抗体を用いた ELISA を作成中である。以前、C217 の代わりに Vpr に対する家兎 IgG を用いた ELISA を使用して、血中 Vpr の解析を行った。その際、健常人由来検体中に交叉抗原が存在することが判明し、特異的な Vpr の測定は適わなかった。C217 は今回、単クローン抗体を用いることで、交叉抗原の検出を避けることができるものと期待される。

b. Vpr によるウイルス再産生機序

Vpr の機能として、新しい機序明かになった。即ち、これまでは Vpr が直接的に潜伏感染に作用してウイルス産生が誘導されるとされてきたが、今回、Vpr のこのような作用は無く、末梢血細胞を刺激することで、サイトカイン産生を誘導することで、間接的にウイルス産生を誘導することが明確になった。

中村らに依って、Vpr は潜伏感染細胞に TNF- α 産生が誘導され、これが細胞を刺激して、ウイルス産生を誘導するシナリオが提唱された。これまでの解析から Vpr はエンドトキシンと親和性が強く、バクテリアから精製した Vpr は LPS が相当量混入する可能性が危惧されていた。今回、極力エンドトキシンの混入を避け、最も高感度で信頼性の高いシステムを用いて、エンドトキシンの混入の全くない Vpr 標品を調整することに成功した。この Vpr を用いて行った解析の結果、上述の機序を支持する実験結果が得られた。

c. Vpr の神経細胞の分化に対する阻害効果

これまで神経細胞障害に関わる因子は多数報告されているが、未分化神経系細胞の分化障害に関わる因子は全く解っていない。この一つとして HIV-Vpr に分化抑制作用があることが判明した。

d. Vpr による DNA 二重鎖切断の機序と意義

Vpr により誘導されるゲノム DNA 二重鎖切断の機序とウイルス感染における意義は、重要な問題であるが、現在のところいずれも不明である。Vpr がクロマチン上に存在すること、

また DNA 損傷の誘導には Vpr の C 末端領域が関与していることが明らかになっている。今後クロマチン上で、Vpr と結合性を示す蛋白質の同定を行い、Vpr による DNA 損傷の機序を明らかにすることが肝要である。

E. 結語

患者血中に Vpr が存在すること。ウイルス産生は PBMC を介して間接的に誘導されること、ウイルス感染に伴って誘導される神経細胞の分化阻害に Vpr が関与していること、また Vpr により DNA 二重鎖切断が誘導されることが明らかとなった。今後、抗 Vpr 因子化合物を用いることにより、ウイルス再産生やエイズ病態の改善が期待される。

健康危険情報

感染実験、ウイルスの保管は各研究機関の定める感染微生物取り扱い安全管理委員会、組織換え DNA 委員会の規定に基づき行われている。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Tachiwana, T., Shimura, M., Nakai-Murakami, C., Tokunaga, K., Takizawa, Y., Sata, T., Kurumizaka H., and Ishizaka, Y. HIV-1 Vpr induces DNA double-strand breaks. *Cancer Res.*, 66, 627-631, 2006.
2. Mizoguchi, I., Ooe, Y., Hoshino, S., Shimura, M., Kasahara, T., Ohta, T., Kano, S., Takaku, F., Nakayama, Y., and Ishizaka, Y. Improved gene expression in resting macrophages using an oligopeptide derived from Vpr of human immunodeficiency virus type-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 338, 1499-1506, 2005.
3. Shimura, M., Tokunaga, K., Konishi, M., Sato, Y., Kobayashi, C., Sata, T., and Ishizaka, Y. Premature sister chromatid separation in HIV-1-infected peripheral blood lymphocytes. *AIDS* 19, 1434-1438, 2005.

4. Uchida, S., Kubo, A., Kuzu, R., Nakagama, H., Matsunaga, T., Ishizaka, Y., Yamashita, K. Amino acids C-terminal to the 14-3-3 binding motif in CDC25B affect the efficiency of 14-3-3 binding. *J. Biochemistry*, in press.
5. Hoshino, S., Sun, B., Shimura, M., Konishi, M., Taguchi, T., Segawa, T., Hagiwara, Y., Kano, S., Koyanagi, Y., and Ishizaka, Y. Serum Vpr in HIV-1-positive patients is inversely correlated with the CD4⁺ T cell and white blood cell counts. *AIDS*, submitted.
6. Nakata H., Maeda K., Miyakawa T., Shibayama S., Matsuo M., Takaoka Y., Ito M., Koyanagi Y., and Mitsuya H.: Potent Anti-R5-human immunodeficiency virus type 1 effects of a CCR5 antagonist, AK602/ON04128/GW873140, in a novel human peripheral blood mononuclear cell nonobese diabetic-SCID, interleukin 2 receptor g-chain-knocked-out AIDS mouse model. *J. Virol.* 79: 2087-2096, 2005.
7. Miura Y., and Koyanagi Y.: Death ligand-mediated apoptosis in HIV infection. *Rev. Med. Virol.* 15: 169-178, 2005.
8. Matsuura-Sawada R., Murakami T., Ozawa Y., Nabeshima H., Akahira J., Sato Y., Koyanagi Y., Ito M., Terada Y., and Okamura K.: Reproduction of menstrual changes in transplanted human endometrial tissue. *Hum Reprod.* 20:1477-1484, 2005.
9. Ohkura S., Yamashita M., Ishida T., Babu P.G., Koyanagi Y., Yamamoto N., Miura T., and Hayami M.: Phylogenetic heterogeneity of new HTLV type 1 isolates from southern India in subgroup A. *AIDS*

Res Hum Retroviruses. 4:325-330, 2005.
10. Baba S., Takahashi K., Noguchi S., Takaku H., Koyanagi Y., Yamamoto N., and Kawai G.: Solution RNA structures of the HIV-1 dimerization initiation site in the kissing-loop and extended-duplex dimmers. J. Biochem., 138:583-592, 2005.
11. Munakata Y., Saito-Ito T., Kumura-Ishii K., Huang J., Kodera T., Ishii T., Hirabayashi Y., Koyanagi Y., and Sasaki T.: Ku80 autoantigen as a cellular coreceptor for human parvovirus B19 infection. Blood. 106:3449-3456, 2005.

G. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得状況
なし

2. 実用新案登録
なし

3. 出願

発明の名称：遺伝子ベクター

出願番号 特 2005-320952

出願人；国立国際医療センター、
国立循環器病センター、
ブリジストン株式会社

発明人：石坂幸人、中山泰秀、根本 泰

出願日：2005, 11, 4

発明の名称：機能性分子が導入された有
機磁性ナノ複合体

出願番号 特 2006—048576

出願人：国立国際医療センター、
名糖産業名古屋研究所

発明人：石坂幸人、長谷川正勝、野原聡

出願日：2006, 2, 27

平成17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18年7月31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