

図2. マウス血漿中HIV-1 RNA量に与えるDrug Xの影響～HIV感染後14日目のHIV-1 RNA量の比較

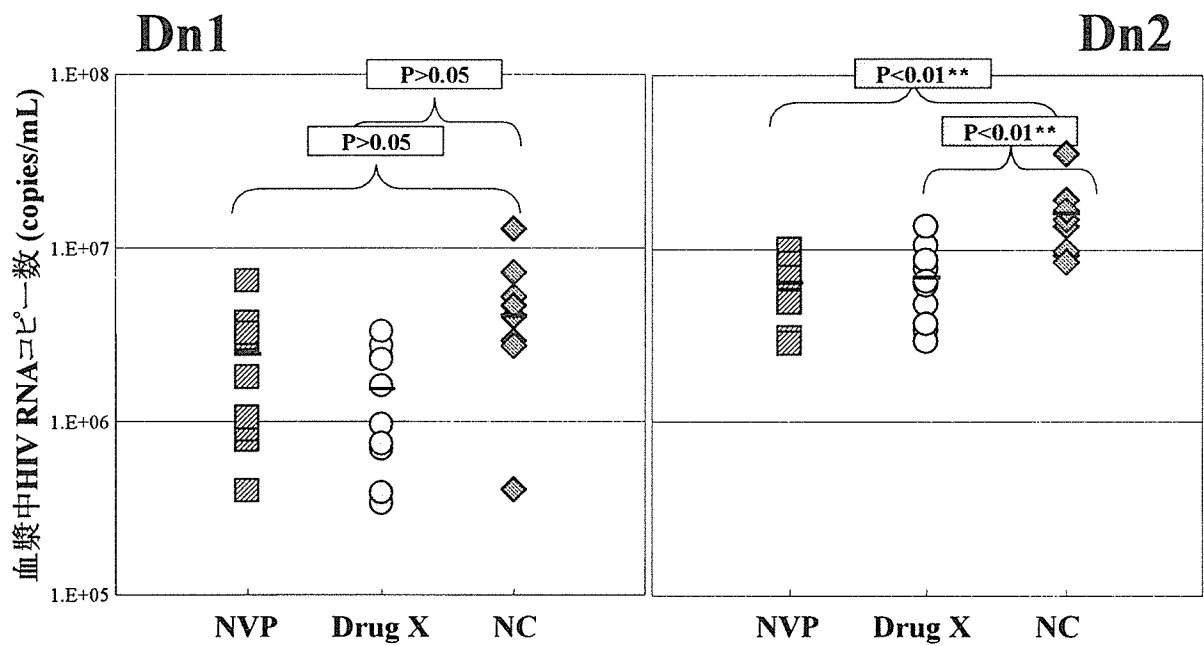
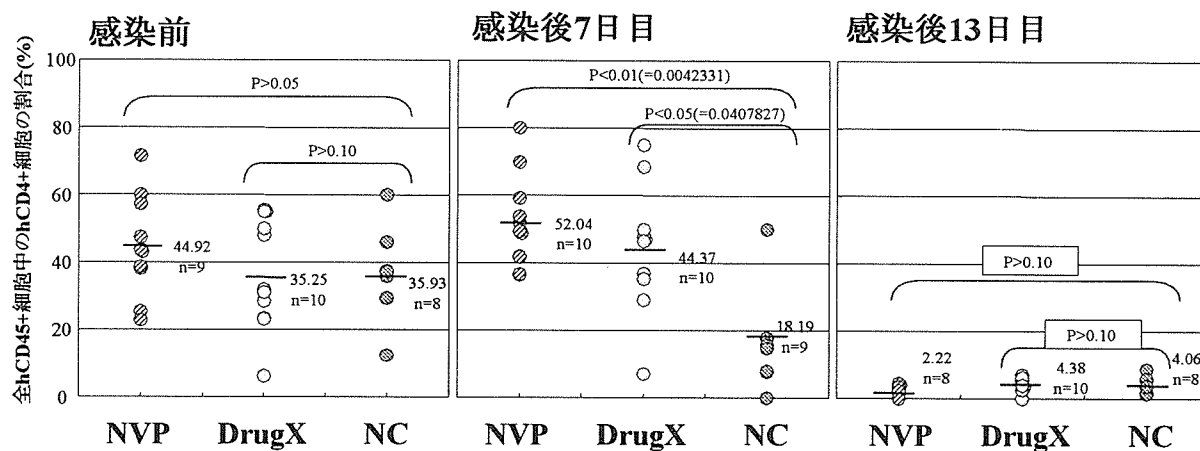


図3. Donor1のPBMCを移植した各hu-PBL SCIDマウスにおける  
hCD4陽性細胞比率の経時変化とDrugXによる影響



Wilcoxonの順位和検定(マン・ホイットニーのU検定)

図4. マウス血漿中HIV-1 RNA量に与えるDrug Yの影響  
 ~HIV感染後7及び14日目の血漿中HIV-1 RNAコピー数の比較

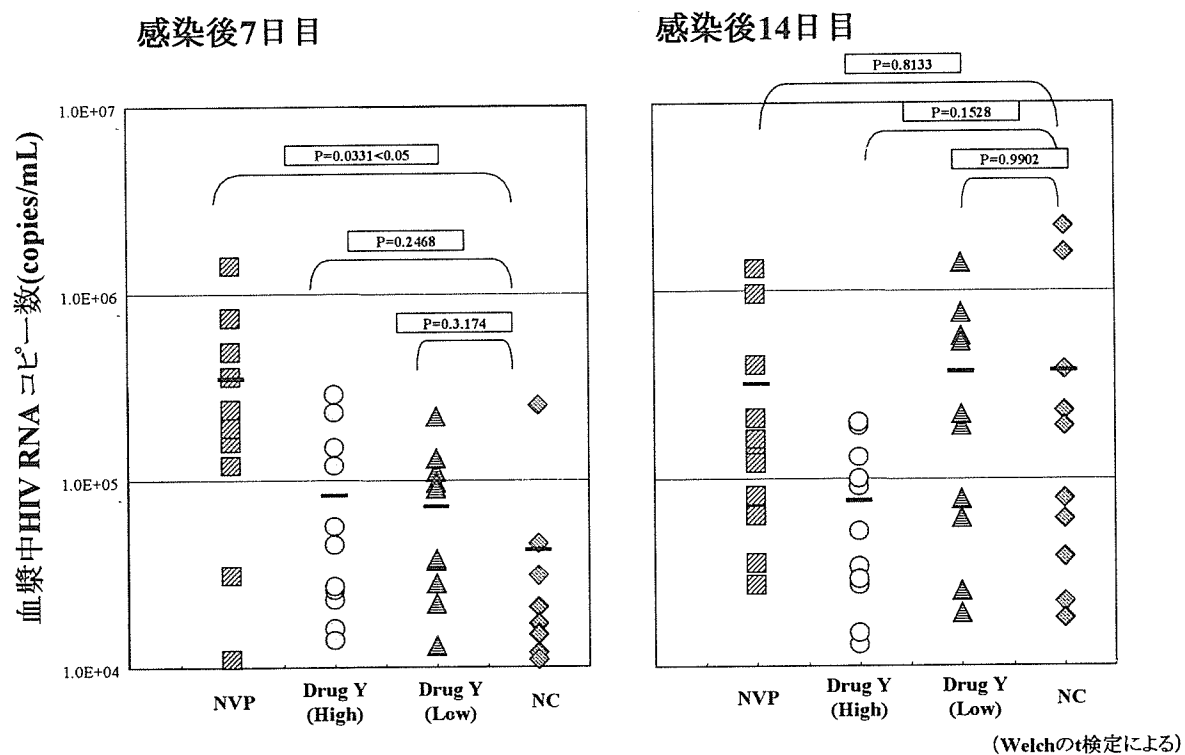
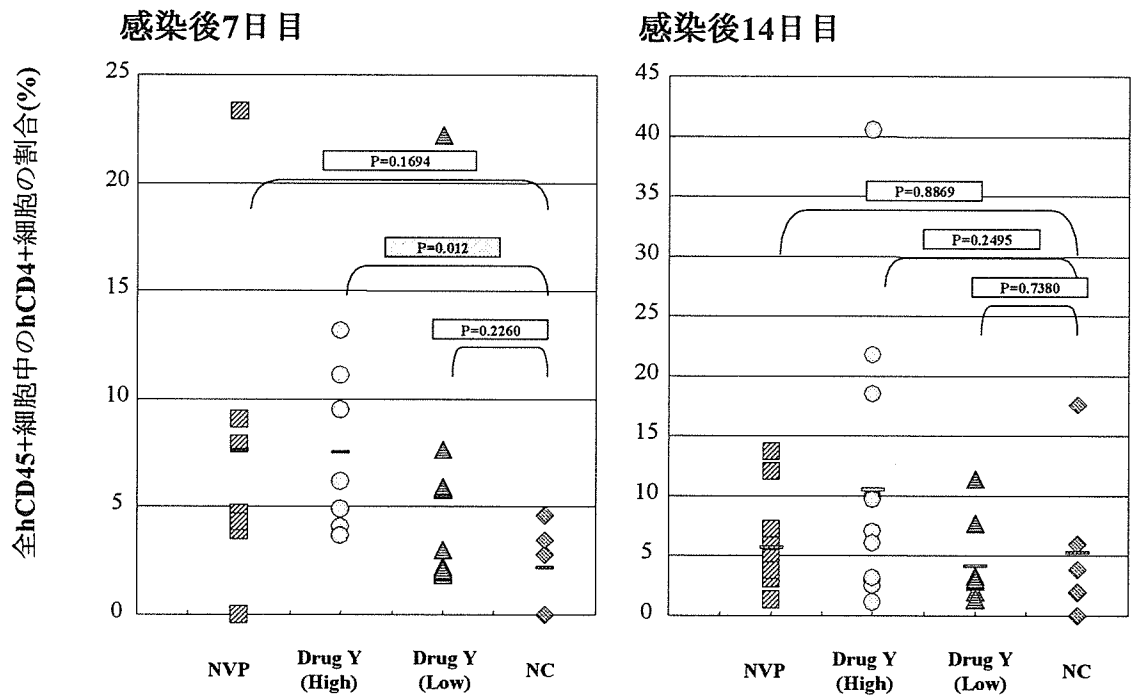


図5. Drug Yの血中hCD45/hCD4陽性細胞数に与える影響

(hCD45陽性細胞比率が1%以下のものを除外して計算)



Vif 機能を応用した新規抗 HIV 薬開発のための基礎研究

分担研究者 明里宏文（医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター リーダー）  
研究協力者 李永仲、飯島沙幸

**研究要旨：** HIV-1 Vif は PBL やマクロファージにおける感染性ウイルス形成に必須の蛋白である。本研究ではウイルス粒子にパッケージされる Vif 蛋白 (v-Vif) による Gag p2/NC プロセシング制御機能をベースとしたウイルス成熟阻害薬への応用のための基盤的解析を行なった。その結果、ウイルス成熟阻害活性が Vif N 末端領域 Trp11 および Gln12 にあること、この活性が抗 APOBEC3 作用とは全く独立した新規 Vif 機能であることが明らかとなった。さらに M-6 変異 (22-25 アミノ残基欠失) により Vif の発現安定化とともにウイルス成熟阻害活性が増強した。本結果は、本来ウイルスが有する機能をベースとした抗エイズ創薬へと繋がるもの

## A. 研究目的

HIV-1 Vif は PBL やマクロファージにおける感染性ウイルス形成に必須の蛋白である。近年の研究で、Vif は用量依存性に宿主抗ウイルス因子 APOBEC3 のウイルス粒子への取り込みを阻害することがよく知られている。

HIV-1 には複数のアクセサリ蛋白が存在するが、いずれも複数の機能がそれぞれの蛋白に組み込まれている。しかし Vif 蛋白では抗 APOBEC 活性以外の機能は未同定であった。我々は、ウイルス粒子に取り込まれる Vif (v-Vif) に着目し研究を行なったところ、v-Vif は用量依存性に Gag p2/NC プロセシングのみを特異的に抑制することでウイルス成熟過程を阻害し、その結果として HIV-1 の感染性を抑制する事を見いだした (Akari et al.: J Biol Chem 279, 12355-62, 2004)。そこで、本研究ではこれまでとは異なる戦略、すなわち Vif 蛋白の本来持つ機能を部分的に負の方向へ拡大し、既存のプロテアーゼ阻害剤とは異なる機序でウイルス成熟を阻害することにより抵抗性変異ウイルスの出現を誘導しにくい新規抗 HIV 薬を開発することを目的とした。

## B. 研究方法

HIV-1 Vif タンパク質発現ベクターである pNLA1-43Vif を基に、site-directed mutagenesis 法により導入した一連の Vif N 末端欠失・点変異

体発現ベクターを作成した。これらを HIV-1 分子クローンである pNL4-3 Δenv もしくは pNL4-3 Δenv Δvif と共に H9 細胞または HeLa 細胞へ遺伝子導入し、ウイルスおよび導入細胞を回収した。ウイルスタンパク質は Western blotting 法により解析を行った。ウイルス感染性は LuSIV 細胞を用いた single-round infectivity assay により評価した。

## C. 研究結果

本研究では、我々が新たに見出した Gag p2/NC プロセシング制御という v-Vif 効果を応用した新規抗 HIV 薬開発の可能性について検討を行なった。特に、(1) v-Vif による Gag プロセシング制御機能の抗 APOBEC 機能との関連性を明確化、(2) 機能ドメインの同定、(3) より本機能を増強することによる、野生型 Vif に対するドミナントネガティブ効果の付与、を目標に検討を行なった。

(1) v-Vif による Gag プロセシング制御機能の抗 APOBEC 機能との関連性について

Vif 発現コンストラクトである pNLA1-43Vif を pNL4-3vif(-) と共に H9 細胞に co-transfect することにより Vif を in-trans で供給すると、最適な Vif 発現量においてウイルス感染性が最高となる。このような条件下で、欠失変異体 (M シリーズ) を H9 細胞に発現させたところ、M-1 を除いた

他の変異体 (6-25 アミノ酸残基までをカバーする 4 アミノ酸残基欠失変異体シリーズ) は感染性増強効果が著しく低下していることが判明した。さらに同様な最適条件下で M-3 領域 (10-13 アミノ酸残基) における各種アラニン点変異体について検討を行なったところ、1 アミノ酸残基置換では数倍程度の感染性増強効果が見られたが、2 アミノ酸残基置換ではどの組み合わせであってもほぼ完全に感染性増強効果を失っていた。

ところで以前、Vif 9 アミノ酸残基のイソロイシンが APOBEC3G との結合に重要であり、アラニンへの置換により結合が欠失するとの実験結果が報告されている (Wichroski et al., J Biol Chem 280, 8387-96, 2005)。そこでこの報告を検証するため、我々の一連の欠失変異体を用いて Vif と APOBEC3G との結合について免疫共沈降法を用いて検討した。その結果、予想に反して全ての Vif 欠失変異体 (M シリーズ) は APOBEC3G と同程度に結合することが明らかとなった。

この結果より、v-Vif 効果を規定する領域と抗 APOBEC3G 効果に関わる領域は独立しており、また Vif N 末端領域は APOBEC3G との結合に関与していないことが示された。

さらに過剰な Vif パッケージングにより感染性を欠失したウイルス粒子を電子顕微鏡にて解析したところ、ドーナツ型の未成熟ウイルス粒子が認められた。この形態は PR 阻害や p2/NC 間の cleavage が傷害される Gag 変異体による欠損型粒子と類似していた。Vif 非存在下で APOBEC3G が HIV-1 粒子中に取り込まれることによって感染性が欠失したウイルス粒子は、形態的に感染性ウイルス粒子と何ら差異が認められないものであることが知られていることから、形態的にも v-Vif 効果による感染性抑制作用は APOBEC3G によるものとは異なることが示された。

## (2) v-Vif 機能ドメインの同定

我々の当初の研究結果より、v-Vif 効果を決定する領域は N 末端領域にあることが予想された (Akari et al.: J Biol Chem 279, 12355-62, 2004)。そこで上述の Vif 欠失変異体 (M シリーズ) を用いて比較検討を行なったところ、10-13 アミノ酸残基に機能領域が存在することが示された。さらにこの領域の各種アラニン変異体を用いた解析を行なった。その結果、どの変異体も細胞内発

現レベルやウイルス粒子内取り込み効率は同程度であるにも関わらず、W11A/Q12A double mutant のみが v-Vif 効果を欠失することが明らかとなった。

## (3) 野生型 Vif に対するドミナントネガティブ活性を有する Vif 変異体の同定

欠失変異体 (M シリーズ) を HIV-1 分子クローンである pNL4-3 と共に non-permissive 細胞である H9 細胞へ遺伝子導入し、得られたウイルスの感染性を測定したところ、22-25 アミノ酸残基の欠失変異 (M-6) では野生型 Vif よりもさらに強い感染性抑制効果が認められた。この現象が細胞依存性をしめすかどうかを検討するため、permissive 細胞である HeLa 細胞を用いて上記と同様に遺伝子導入してウイルスを回収し、その感染性を検討した。その結果、H9 細胞と同様に、M-6 変異体では野生型 Vif よりも強い感染性抑制効果が認められた。

## D. 考察

本研究のコンセプトは、HIV-1 自身が持つアクセサリ蛋白による、HIV-1 のための機能を利用する、いわゆる「毒をもって毒を制す」戦略である。すなわち Vif において新たに見出した、Gag プロセッシング制御機能を拡大応用することで、果たしてウイルス粒子成熟過程を特異的に阻害出来るのかを探ろうとした。

まず v-Vif による Gag プロセッシング制御機能の抗 APOBEC 機能との関連性については、本研究結果よりそれぞれ独立しているものと考えられる。実際 HIV-1 アクセサリ蛋白は、いずれも複数の機能がそれぞれの蛋白に組み込まれており、しかもそれぞれの機能は単独で発現することが明らかとなっていることから、今回の Vif に関する知見も妥当であると考えられる。このことは v-Vif 効果のみを拡大応用した抗 HIV 薬開発において、抗 APOBEC3 活性への関与を憂慮する必要が無いことを意味しており、その意義は大きいと考えられる。

次に v-Vif 効果に関わる機能ドメインについては、今研究より N 末端側の W11/Q12 が v-Vif 効果を規定していることが示された。この部位の近傍は、以前、Vif 9 アミノ酸残基のイソロイシンが APOBEC3G との結合に重要であり、アラニンへの置換により結合が欠失するとの実験結果が報告さ

れている (Wichroski et al., J Biol Chem 280, 8387-96, 2005)。このことから、当初 v-Vif 効果は APOBEC3 結合と何らかの関係があることが想定されたが、我々の実験結果より N 末端 25 アミノ酸残基までの領域は APOBEC3 結合に影響していないことが実証された。従って、W11/Q12 を含む N 末端側ドメインからなる短縮型 Vif が APOBEC3 への影響なしに v-Vif 効果を発揮する可能性が考えられた。

興味深いことに、22-25 アミノ酸残基の欠失変異 (M-6) では野生型 Vif よりもさらに強い感染性抑制効果が認められた。この機序についてはまだ明らかではないが、予備的実験データではウイルス粒子への Vif 取り込み効率が上昇しているようである。

これらの結果を総合すると、W11/Q12 を含み、かつ 22-25 アミノ酸残基を欠失した N 末端側ドメインからなる短縮型 Vif は、新たな抗エイズ薬として有望であると考えられる。特に今回明らかとなった Vif 機能を規定する領域は、Pol-Integrase と遺伝子が重複しており、さらに Integrase C 末端側は機能的にも必須の領域であることから変異が生じ難いため、本効果を応用した新規抗 HIV-1 薬は耐性株の出現を抑える可能性が考えられ意義深いと考えられる。

## E. 結論

本研究成果は、我々が見出した Gag p2/NC プロセシング制御という v-Vif 効果を応用した新規抗 HIV 薬開発の可能性について、新たな道を開いた。今後は本作用の HIV-1 ライフサイクルへの役割と併せて、新規抗 HIV 薬への開発に向けてさらに研究を進めていきたい。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

(1) Nguyen KL, Llano M, Akari M, Miyagi M, Poeschla EM, Strebel K, Bour S: Codon optimization of the HIV-1 *vpu* and *vif* genes stabilizes their messenger RNA and allows for highly efficient Rev- independent expression. Virology 319, 163-175, 2004.

(2) Akari H, Fujita M, Kao S, Khan MA,

Shehu-Xhilaga M, Adachi A, Strebel K: High level expression of Human immunodeficiency virus type 1 Vif inhibits viral infectivity by modulating proteolytic processing of Gag precursor at the p2/NC processing site. Journal of Biological Chemistry 279, 12355-12362, 2004.

(3) Fujita M, Akari H, Sakurai A, Yoshida A, Chiba T, Tanaka K, Strebel K, Adachi A: Expression of the HIV-1 accessory protein Vif is controlled uniquely to be low and optimal by proteasome-degradation. Microbes and Infection 6, 791-798, 2004.

(4) Shirakawa K, Takaori-Kondo A, Kobayashi M, Tomonaga M, Izumi T, Fukunaga K, Sasada A, Abudu A, Miyauchi Y, Akari H, Iwai K, Uchiyama T: Ubiquitination of APOBEC3 proteins by the Vif-Cullin5-ElonginB-ElonginC complex. Virology 344, 263-266, 2006.

### 2. 学会発表

1) 李永仲、飯島沙幸、明里宏文 : HIV-1 Vif 蛋白による Gag p2/NC プロセシング制御に関する解析. 第 18 回日本エイズ学会学術集会、平成 16 年 12 月

2) Young-Jung Lee, Sayuki Iijima, Klaus Strebel, Hirofumi Akari. IDENTIFICATION OF A NEW FUNCTIONAL DOMAIN ON VIF TO MODULATE GAG PROCESSING BY ITS N-TERMINUS. Cold Spring Harbor Meeting on Retroviruses. New York, USA, May 2006.

3) 李永仲、飯島沙幸、明里宏文 : Identification of a new functional domain in the N-terminus of HIV-1 Vif for modulating Gag processing. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会 (平成 18 年 11 月)

4) 李永仲、飯島沙幸、明里宏文 : HIV-1 Vif 蛋白における Gag p2/NC プロセシング制御に関わる新規機能ドメイン. 第 20 回日本エイズ学会学術集会 (平成 18 年 12 月)

### H. 知的所有権の出願、登録状況

なし

分担研究者 木村廣光 国立成育医療センター 研究所・共同研究管理室 室長

研究要旨：ヒト臍帯血樹状前駆細胞、ヒト樹状細胞株、小動物（マウス・ラット）骨髄血液幹細胞並びに、皮膚および皮膚由来樹状細胞株を用いて、HIV-1 ウィルスに対するワクチン治療開発を目的とした、各種ウィルスベクターによる樹状細胞前駆細胞への遺伝子導入効率の検定とその機能解析を行い、樹状細胞が、HIV-1 を含む、ウィルス感染症の第一義的な役割を果たしている事を示した。樹状細胞の純粋培養方法の確立を目指した基盤的研究を行った。

#### A. 研究目的

これまでに報告されている、樹状細胞株（ヒト樹状細胞株：im-NMD、マウス新生児皮膚由来樹状細胞株：XS106）、正常ヒト臍帯血中の CD34 陽性血液幹細胞、CD14 陽性細胞、並びにマウス・ラット骨髄細胞、及び皮膚から、HIV-1 の標的細胞である樹状細胞を、純粋培養・分離する培養精製技術を確立し、更に、同培養法によって得られる樹状細胞のワクチン治療開発へ応用する事を目的として、各種ウィルスベクターの樹状細胞前駆細胞への遺伝子導入の効率の解析とその機能解析を行い、小動物実験系への移植システム応用を確立する事により、抗 HIV-1 薬剤耐性を評価するための実験系を確立する事を目的とする。

#### B. 研究方法

材料：小動物として、近交系 DA、F344 ラット、及び緑色蛍光蛋白発現 DA、F344 ラット。細胞として、ヒト樹状細胞株：im-NMD、ヒト臍帯血から分離精製して得られる、CD34、CD14 陽性細胞、及びマウス新生児皮膚由来樹状細胞株 XS106、正常マウス・ラット骨髄細胞、ラット腹腔マクロファ-

ジを実験材料として用いた。

細胞培養：GIT 培地、各種サイトカイン（Flt3, SCF, IL-6, GM-CSF, IL-4, TNF- $\alpha$ ）を用い  $1 \times 10^5$ /ml にて培養

遺伝子導入システム：緑色蛍光タンパク質（EGFP）を発現系とする従来型アデノウィルスベクター、並びにアデノウィルスのファイバー部にアミノ酸 3 残基 RGD モチーフが挿入されたファイバー改変型アデノウィルスベクター、第三世代型 HIV ウィルスベクター、また、 $\beta$ -Gal を発現系とするリジン 7 残基を含む、K7 モチーフが挿入されたファイバー改変型アデノウィルスベクター

（倫理面への配慮）：

1. ヒト由来細胞は BioWhittaker 社：米国 FDA 認可正常細胞提供プログラムにて調整されたものを実験材料とした。ヒト樹状細胞株は NEMOD Biotherapeutics GmbH & Co. KG（輸入元：フナコシ株）より購入
2. 遺伝子組み替え実験、並びに小動物の取り扱い並びに飼育・実験方法に関しては、国立成育医療センター 研究所・遺伝子組み替え実験委員会、動物委員会、遺伝子組み替え実験指針・動物取り



扱い規則に準じて、実験動物・実験方法に関する申請書を関係する委員会の承諾を得て後、実験を行った。

### C. 研究結果

マウス新生児皮膚由来樹状細胞株 XS106 を標的細胞として、従来型アデノウイルスベクター (Adv/CMV/EGFP) とファイバー改変型アデノウイルスベクター (Adv/CMV/F-RGD/EGFP) による遺伝子導入効率をフローサイトメトリー解析により比較検討。同細胞に対する、従来型のファイバー構造を有するアデノウイルスベクターの遺伝子導入効率がほぼ 50%–70% に達するのに対し、ファイバー改変型では、20%–30% で、しかも発現が従来型に比し、弱い事が判明した。

ヒト慢性骨髄性白血病由来樹状細胞株 im-NMD 細胞に対する同遺伝子ベクター、また HVJ ベクターによる、蛍光蛋白質の遺伝子導入は極めて困難である事が判明した。

一方、対照細胞として用いた、ラット腹腔マクロファージでは、従来型のファイバー構造を有するアデノウイルスベクターによっても、あるいは、ファイバー改変型アデノウイルスベクターによっても、遺伝子導入効率がほぼ 90%–100% に達する事、また発現のレベルも、ほぼ同一レベルであった。

ラット心臓移植モデルを用いた緑色蛍光蛋白に対する感作実験で、樹状細胞、腹腔マクロファージへのアデノウイルスベクターによる遺伝子導入効率と感作状態が、比例する事を証明した。

ヒト Flt3 リガンドと IL-6 の組み合わせのもと、ラット骨髄細胞の長期培養 (3 週間以上) して得られる、樹状細胞は、従来 NK 細胞のマーカーとして知られている、CD161a (NKR-P1A 遺伝子) を表出し、しかも、免疫制御 T 細胞のマスター遺伝子として考えられている、Foxp3 を強発現している

事を発見した。

Foxp3 発現ラット樹状細胞より、Foxp3 遺伝子に関し、三種類の isoform を同定した。

### D. 考察

樹状細胞が、HIV-1 を含めたウイルス抗原情報を、免疫系に提示する第一義的細胞である事が認知され、ワクチン療法の応用研究がなされてきた。特に、マウス及びヒト樹状細胞を標的細胞とする、遺伝子導入システムが、特に、アデノウイルスベクターを中心に報告されてきた。

今日、GM-CSF と IL-4 を主たるサイトカインとして、血液細胞、骨髄細胞から、樹状細胞の培養誘導法が確立され、myeloid DC と称される細胞群として取り扱われている。我々は、樹状細胞の大量培養を目指して、同サイトカインを使った樹状細胞培養法を追試実験して来たが、臨床応用に十分な樹状細胞を得る事は極めて困難であった。

Flt3 と IL-6 の組み合わせで、GM-CSF に依存しない、樹状細胞培養法を確立し、GM-CSF Receptor knockout マウス、並びに GM-CSF knockout マウス骨髄細胞から、樹状細胞を培養誘導出来る事を確認した。同培養方法を、ラットに応用し、ラット骨髄細胞の長期培養法を確立することで、樹状細胞の前駆細胞を増殖・分化させる事により、樹状細胞の大量培養法につながる培養法を示した。こうした GM-CSF 非依存型の樹状細胞は、今日、Plasmacytoid DC と呼ばれ、前述の myeloid DC と区別して扱われる様になり、今日に至っている。GM-CSF に非依存で誘導した、ラット樹状細胞、ヒト血液幹細胞から同様に培養誘導した樹状細胞を標的細胞として、各種遺伝子導入ベクターを用いて、遺伝子導入を試みたが、第三世代 HIV ウイルスベクター以外に、有効な遺伝子発現を確認する事はできなかった。

アデノウイルスの標的細胞への吸着と細胞内

侵入には、ウィルス粒子に表出されたファイバー構造が特に重要と考えられている。従来のアデノウィルスベクターのファイバー構造は、標的細胞のコクサッキー・アデノウィルスリセプター (CAR) が本質的に関わっているとされている。CAR のみならず、CD51, CD61 等のインテグリン分子を標的とした、ファイバー構造の改変が試みられ、特に樹状細胞への遺伝子導入に関しては、ファイバー改変型アデノウィルスベクターが有効であるとの報告がある。しかしながら、ラット樹状細胞を標的細胞とした、研究結果からは、ファイバー改変型の優位性を確認する事は出来なかった。本研究結果は、マウス新生児皮膚由来の樹状細胞株 XS106 を用いた実験結果からも同様であった。

ラット樹状細胞の細胞表面分子の解析から明らかになった、マーカー分子 CD161a を指標とした分離精製過程で、CD161a 陽性樹状細胞が、制御性 T 細胞のマスター遺伝子とされる Foxp3 を強発現している事を発見した。但し樹状細胞における特異的な働きについては、未だ不明であり、ヒト樹状細胞に同遺伝子が強発現しているか否かについては、更に解析を進める必要がある。

樹状細胞が、HIV 感染の primary target として、重要な生物学的意義を有しているのではないかという概念が、多くの研究者によって形成されてはいるが、それはあくまでも推測であり、未だ実証された事実ではないと考える。本研究結果からは、むしろ否定的な結果しか得られなかった。成熟した樹状細胞が、これまで知られた、ウィルスベクターによる遺伝子導入に対し、ことごとく抵抗性を示す事は、樹状細胞が、HIV 感染症の第一義的な標的になっているというより、むしろ HIV 感染症に対する first defense に関わっている事の可能性を強く示唆するものと考えた方が自然であると考えられる。

未だ、樹状細胞の増殖・分化、マクロファージとの関連性には不明の点が多い。マクロファージを遺伝子導入の標的細胞とする場合、遺伝子導入は、比較的容易である事から、樹状細胞とは、本質的な違いを有する、マクロファージ細胞群が、HIV-1 ウィルスの第一義の標的細胞となっている可能性が高い。Innate Immunity という観点からも、樹状細胞における、Toll like receptor の発現パターン、サイトカインプロファイルと HIV 感染性とウィルス増殖の関係を明らかにする事が極めて重要であると考えられた。

#### E. 結論

これまで樹状細胞を標的細胞とする各種遺伝子ベクター、特にアデノウィルスを用いた遺伝子導入・発現システムが有効であるとの報告がなされて来たが、本研究は、これらの報告が、樹状細胞を含むマクロファージ細胞を標的細胞として実験が施行された可能性が高いことを強く示唆する。

免疫系において、HIV を含めたウィルス情報を免疫担当細胞であるリンパ球に最初に提示するのは、樹状細胞であるとされる。同細胞の果たしている免疫学的役割を更に詳細に解析する必要がある。ワクチン療法の観点からも、抗原提示細胞としての樹状細胞を再定義する必要性は明らかであろう。樹状細胞をより厳密に定義する事により、樹状細胞が、HIV 感染の primary target としてよりも、むしろ HIV 感染症に対する first defense に関わっている事の重要性がより一層明らかになるものと考えられる

#### F. 健康危険情報

特記すべき事なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Kitazawa Y, Fujino M, Wang QX, Kimura H, Azuma M, Kubo M, Abe R, Li X-K. Involvement of the PD-1/PD-L1 pathway in CD4+CD25+ regulatory T cells activity to suppress alloimmune responses. Transplantation (in press)

Kawasaki M, Iwasaki M, Koshihara T, Fujino M, Hara Y, Kitazawa Y, Kimura H, Nomura K, Uemoto S, Li X-K\*, Koichi Tanaka. Gene-expression profile analysis of the peripheral blood mononuclear cells from tolerant living donor liver transplanted recipients. Int Surg (in press).

Hara Y, Kitazawa Y, Funeshima N, Kawasaki M, Sato Y, Tezuka K, Kimura H, Hatakeyama K, Li X-K. Anergic lymphocytes generated by blocking CD28 and ICOS pathways in vitro prolong rat cardiac graft survival. Int Immunopharmacol 6(7):1143-51;2006.

Hayakawa K, Guo L, Terentyeva EA, Li X-K, Kimura H, Hirano M, Yoshikawa K, Nagamine T, Katsumata N, Ogata T, Tanaka T. Determination of specific activities and kinetic constants of biotinidase and lipoamidase in LEW rat and Lactobacillus casei (Shirota). J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 5;844(2):240-50; 2006.

Funeshima N, Fujino M, Kitazawa Y, Hara Y, Hayakawa K, Okuyama T, Kimura H, Li XK. Inhibition of allogeneic T-cell responses by dendritic cells expressing transduced

indoleamine 2,3-dioxygenase. J Gene Medicine 2005 May;7(5):565-75

Satoh E, Yan H, Miyagi T, Li XK, Sugiura W, Yamamoto N, Teramoto K, Arie S, Kimura H. Studies on the most efficient vector systems for gene transduction into dendritic cells. Transplant Proc. 2005 Jan-Feb;37(1):12-4.

Katayama H, Hattori Y, Ogata K, Yan H, Satoh E, Teramoto K, Arie S, Kamide R, Nakagawa H, Kimura H. Phenotype and functional identity of GM-CSF-independent dendritic cells generated by long-term propagation of DC progenitor cells in bone marrow cells and skin Langerhans cells.

Transplant Proc. 2005 Jan-Feb;37(1):17-9.

Satoh E, Hattori Y, Guo L, Li XK, Teramoto K, Arie S, Kimura H. Immunosuppressive Effect of Long-Term Drainage of Thoracic Duct on Immunological Memory in Adult Thymectomized Rats. Transplant Proc. 2005 May;37(4):1947-48.

Masui N, Nishikawa T, Takagi Y, Kimura H, Mori M, Yokose S, Asai H, Gonda T, Yanabe M, Sato K. Establishment of a set of combined immunodeficient DA/Slc-Foxn1(rnu) Lyst(bg) congenic rat strains. Exp Anim. 2004 ;53(5):399-407.

Yan H, Miyagi T, Satoh E, Sugiura W, Yamamoto N, Kimura H. Phenotype and function of GM-CSF independent dendritic cells generated by long-term

propagation of rat bone marrow cells. *Cell Immunol.* 2004;229(2):117-29.

Guo L, Li XK, Enosawa S, Funeshima N, Suzuki S, Kimura H, Sugawara Y, Tezuka K, Makuuchi M. Significant enhancement by anti-ICOS antibody of suboptimal tacrolimus immunosuppression in rat liver transplantation. *Liver Transpl.* 2004 June;10(6):743-7.

Fujino M, Kitazawa Y, Kawasaki M, Funeshima N, Kimura H, Nakajima T, Saito H, Li XK. Differences in lymphocyte gene expression between tolerant and syngeneic liver grafted rats. *Liver Transpl.* 2004 Mar;10(3):379-91.

## 2. 学会発表

### 国際学会

Naoko Fuji(Funeshima), Atsushi Tsuji, Li Xiaio-Kang, and Hiromitsu Kimura. High expression of Foxp3 mRNA in rat dendritic cells (DCs) generated from a long-term culture of bone marrow cells (BMC). The 9th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy 2006, Baltimore, MD, May 31-June 4, 2006,

Kitazawa Y, Fujino M, Hara Y, Kimura H, Azuma M, Abe R and Li X-K. Involvement of PD-1/PD-L1 pathway for induction of suppression to alloantigen by CD4+CD25+ regulatory T cell. World Transplant Congress 2006; Boston, July 22-27, 2006.

Kitazawa Y, Fujino M, Hara Y, Kimura H, Abe R, and Li X-K. Selective expansion of functional Foxp3-expressing regulatory T cells with CD28

superagonist allows effective therapy for allograft rejection and GvHD. World Transplant Congress 2006; Boston, July 22-27, 2006.

Hara Y, Funeshima-Fuji N, Tokunaka K, Abe F, Sato Y, Hatakeyama K, Takahara S, Kimura H, and Li X-K. A Novel Chemical Compound NK026680 Targets Dendritic Cell to Prolong Rat Hepatic Graft Survival. World Transplant Congress 2006; Boston, July 22-27, 2006.

Eigo Satoh, Hua Yan, Tohko Miyagi, Xiao-Kang Li, Wataru Sugiura, Naoki Yamamoto, Kenichi Teramoto, Shigeki Arii, Hiromitsu Kimura DETERMINATION OF THE MOST EFFICIENT VECTOR SYSTEMS FOR GENE TRANSDUCTION INTO DENDRITIC CELLS (DC)

8<sup>th</sup> Annual meeting of American Society of Gene Therapy, St. Louis (USA), 2005. 6.1

Eigo Satoh, Hua Yan, Tohko Miyagi, Xiao-Kang Li, Wataru Sugiura, Naoki Yamamoto, Kenichi Teramoto, Shigeki Arii, Hiromitsu Kimura STUDIES ON THE MOST EFFICIENT VECTOR SYSTEMS FOR GENE TRANSDUCTION INTO DENDRITIC CELLS (DC)

XX International Congress of the Transplantation Society, Vienna (Austria), 2004. 9. 8-10

Naoko Fuji-Funeshima, Yoshiaki Hara, Tuhsuke Kitazawa, Kensuke Adachi, Hiromitsu Kimura, Xiao-kang Li Potential Regulatory Function of Dendritic Cells Overexpression Indoleamine 2, 3-Dioxygenase.

3<sup>rd</sup> International Congress on  
Immunosuppression, San Diego (USA),  
2004.12.8-11

Eigo Satoh, Naoko Fuji, Xiao-Kang Li, Kenichi  
Teramoto, Shigeki Arii, Hikomitsu Kimura  
EVALUATION OF THE MOST EFFICIENT VECTOR  
SYSTEMS FOR GENE TRANSDUCTION INTO DENDRITIC  
CELLS (DC)

3<sup>rd</sup> International Congress on  
Immunosuppression, San Diego (USA),  
2004.12.8-11

Eigo Satoh, Yuhichi Hattori, Naoko Fuji,  
Xiao-Kang Li, Kenichi Teramoto, Shigeki Arii,  
Hikomitsu Kimura

IMMUNOSUPPRESSIVE EFFECT OF LONG TERM DRAINAGE  
OF THORACIC DUCT ON IMMUNOLOGICAL MEMORY IN  
ADULT THYMECTOMIZED RATS

3<sup>rd</sup> International Congress on  
Immunosuppression, San Diego (USA),  
2004.12.8-11

#### 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

##### 3. その他

なし

「SIVを用いた新規抗レトロウイルス薬の開発」

分担研究者 駒野 淳 国立感染症研究所 エイズ研究センター 研究員

研究要旨

多剤耐性HIV-1による治療困難症例を克服するためには新規エイズ治療法の開発が重要な位置を占める。本研究では、既存の治療標的とは異なる integrase を阻害するリード化合物となる2種類のペプチドモチーフの同定およびレンチウイルス複製後期過程を阻害するリード化合物を4種類同定した。これらをもとに更なる最適化を行い新規エイズ薬の創製を達成し厚生労働行政およびHIV感染者への成果還元に貢献することが期待される。

A. 研究目的

世界的に蔓延するエイズに対し、実用に足る有効なワクチンの開発は未だ報告されておらず、化学療法は薬剤耐性ウイルスの発生という難題に直面している。したがってエイズの完全抑止には新たな治療標的の探索が必須である。当研究は宿主因子を標的とする抗エイズウイルス薬を探索するものである。これは現存する化学療法（HAART療法）の重大な問題点である薬剤耐性ウイルスの発生を回避できるだけでなく、薬剤耐性ウイルスによる難治症例の治療をも可能にする。

現在市場に流通している抗エイズ薬の標的は逆転写酵素、プロテアーゼ、エンベロープタンパク質などである。未だにインテグラーゼは実用化されていない。また、レンチウイルスの複製後期過程をブロックするものはほとんど知られておらず、作用機序が新しい抗レトロウイルス薬の開発にはこれらを阻害するリードの探索が欠かせない。我々は本研究でこれらのステップを治療標的とする阻害剤開発を繋がる可能性が

ある。

B. 研究方法

- (1) integrase inhibitorの開発：peptide semirandom libraryより杉浦博士（国立感染症研究所エイズ研究センター）らの有するin vitro strand transfer assay系を用いてHIV-1に最も近縁のHIV-2/SIVの中から抗integrase作用を持つペプチドモチーフの同定を試みた。
- (2) HTP SIV阻害剤スクリーニング系の樹立：HIV-1に最も近縁のHIV-2/SIVの中から、最も代表的なクローンであるSIVmac239あるいはSIVagmを選び、感染に際してルシフェラーゼを発現するレポーター細胞LuSIVを用いて安全なレンチウイルス複製阻害剤探索のHTS系を樹立した。
- (3) SIV複製阻害剤の同定：random small molecular weight chemical libraryよりSIVの複製を阻害する小分子化合物をスクリーニングし同定を試みた。リード化合物についてIC<sub>50</sub>の測定および

作用機序解明とHIV-1複製阻害の有無の検索をそれぞれ行った。

(倫理面への配慮)

特記すべきことなし。

### C. 研究結果

(1) integrase inhibitorの開発：我々は最小6アミノ酸からなるintegrase阻害活性を有するペプチドを2つ同定した。これらは塩野義製薬が副作用のため開発を断念したdiketo構造を持つintegrase阻害剤とほぼ同じIC50を有する非常に強いintegrase阻害活性を持っており、peptide mimeticsによるintegrase inhibitor開発に有用であると思われた。

(2) HTP SIV阻害剤スクリーニング系の樹立：感染に際してルシフェラーゼを発現するレポーター細胞LuSIVを用いて安全なレンチウイルス複製阻害剤探索のHTS系を樹立した。本実験系は感染後4日目に培養細胞のluciferase活性を測ることにより、簡便にウイルス複製をモニターすることができる。

(3) SIV複製阻害剤の同定：4,000のランダムな構造を持つ小分子化合物ライブラリーのスクリーニングにより、IC50が380-570nMと低い濃度でSIV複製を抑制する4数種のSIV複製阻害剤を同定した。これらは後期過程を標的とすることが示された。HIV-1に対する抗ウイルス活性は検出されなかった。

### D. 考察

(1) integrase inhibitorの開発：細胞培養レベルでウイルス複製抑制効果を評価するため、電算機的解析を駆使したintegrase—ペプチド相互作用ドメインの解析を行っている。これは、既存のintegrase立体構造とヘリックス構造をとる6アミノ酸モチーフとが最も安定に結合する部位を計算化学的に同定し、これを実験的に検証する試みである。これが妥当なモデルと判明した場合、integraseが6アミノ酸モチーフと結合する分子を同定し、これと結合する非アミノ酸小分子化合物をデザインし、合成し、ウイルス阻害活性およびintegrase阻害活性を探索する。

アミノ酸は細胞膜透過性に乏しいが、化学的な修飾、環化、短鎖化、非天然アミノ酸などの利用により6アミノ酸ペプチド構造を模倣した細胞膜透過性をデザインすることは可能である。今後は培養細胞レベルでの抗ウイルス活性の検出を目指す。

一方、ウイルス学的には6アミノ酸配列の由来となる2つのウイルス遺伝子がintegraseと結合する可能性がある。Envはそもそもその可能性は著しく低い、Vprは6アミノ酸配列を介してintegraseと結合する、あるいは同時にこれを抑制する可能性が考えられる。理研の間には、Vprとintegraseの相互作用を精製蛋白質による免疫沈降法にて証明している。Vprは細胞質内でintegraseを抑制し、ウイルスゲノムによるウイルスゲノムへの”abortive integration”を回避するシステムなのかもしれない。

(2) HTP SIV 阻害剤スクリーニング系の樹立：SIV の感染系は当班研究で得られた抗 HIV 剤候補化合物について実際に前臨床段階としてのサルのエイズモデルで検討するかを決定する際の重要な判定材料を提供する。これは班研究において重要な側面であり、当研究が果たす役割は非常に大きいと考えられる。

(3) SIV 複製阻害剤の同定：本リード化合物は現時点でレンチウイルスのなかでも SIV にしか有効ではないが、作用機序の解明及び最適化によって HIV-1 に有効な新たな作用機序をもつ抗レトロウイルス剤が開発できることが期待される。レンチウイルスの複製後期過程をブロックするものはほとんど知られておらず、宿主因子を標的とした薬剤を含め作用機序が新しい抗レトロウイルス薬の開発に繋がる可能性がある。これら候補化合物の構造は既存の抗レトロウイルス薬とは必ずしも共通する者ではなく、この点においても新規作用機序であることが推測される。本リード化合物が SIV にしか有効でなくても、複製後期過程の分子メカニズムを知る上で有用なツールになることが期待される。

#### E. 結論

既存の治療標的とは異なる integrase を阻害するリード化合物となる 2 種類のペプチドモチーフの同定およびレンチウイルス複製後期過程を阻害するリード化合物を 4 種類同定した。多剤耐性 HIV-1 による治療困難症例を克服するためには新規エイズ治

療法の開発においては非常に大きな進展と考えられる。これらをもとに更なる最適化を行い新規エイズ薬の創製を達成し厚生労働行政および HIV 感染者への成果還元に貢献することが期待される。

#### F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Futahashi Y, \*Komano J, Urano E, Aoki T, Hamatake M, Miyauchi K, Yoshida T, Koyanagi Y, Matsuda Z, Yamamoto N. Separate elements are required for ligand-dependent and -independent internalization of metastatic potentiator CXCR4. *Cancer Science*. 2006. In press.

2) Shimizu S, Urano E, Futahashi Y, Miyauchi K, Isogai M, Matsuda Z, Noh tom i K, Onogi T, Takebe Y, Yamamoto N, Komano J. Inhibiting lentiviral replication by HEXIM1, a cellular inhibitor of cdk9/cyclinI complex. *AIDS*. 2006. In press.

3) Miyauchi K, \*Komano J, Myint L, Futahashi Y, Urano E, Matsuda Z, Chiba T, Miura H, Sugiura W, Yamamoto N. Rapid propagation of low-fitness drug



resistant mutants of human immunodeficiency virus type 1 by a streptococcal metabolite sparsomycin. *Antivir Chem Chemother.* 2006;17(4): 167-174

4) Miyauchi K, Curran R, Matthews E, Komano J, Hoshino T, Engelman DM, \*Matsuda Z. Mutations of conserved glycine residues within the membrane-spanning domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 can inhibit membrane fusion and incorporation of Env onto virions. *Jpn J Infect Dis.* 2006 Apr;59(2):77-84.

5) Miyauchi K, Komano J, Yokomaku Y, Sugiura W, Yamamoto N, Matsuda Z. Role of the specific amino acid sequence of the membrane-spanning domain of human immunodeficiency virus type 1 in membrane fusion. *J Virol.* 2005 Apr; 79(8): 4720-4729

6) Komano J, Futahashi Y, Urano E, Miyauchi K, Murakami T, Matsuda Z, Yamamoto N. The Interaction of HIV-1 with the Host Factors. *Jpn J Infect Dis.* 2005 Jun; 58(3): 125-30.

7) 山本直樹、松田善衛、村上努、駒野 淳  
AIDS の新たな治療標的を求めて : HIV-1  
の宿主因子. *実験医学* Vol.23 No.13

2068-2073 2005

8) Komano J, Miyauchi K, Matsuda Z, Yamamoto N. Inhibiting the Arp2/3 Complex Limits Infection of Both Intracellular Mature Vaccinia Virus and Primate Lentiviruses. *Mol Biol Cell.* 2004 Dec; 15(12): 5197-207. Epub 2004 Sep 22.

## 2. 学会発表(抜粋)

### 国際学会

1) Shimizu S, Urano E, Futahashi Y, Miyauchi K, Isogai M, Matsuda Z, Nohtomi K, Onogi T, Takebe Y, Yamamoto N, Komano J. Inhibiting HIV-1 replication by HEXIM1, a cellular inhibitor of cdk9/cyclinT complex (P-TEFb). May 23-27, 2006. CSH Meeting on Retroviruses, Cold Spring Harbor, NY

2) Shimizu S, Urano E, Futahashi Y, Miyauchi K, Isogai M, Matsuda Z, Nohtomi K, Onogi T, Takebe Y, Yamamoto N, Komano J. Inhibiting HIV-1 replication by HEXIM1, a cellular inhibitor of cdk9/cyclinT complex (P-TEFb), Poster, 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress in conjunction with 79th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society and 29th Annual

Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. Jun 18-23, 2006. Kyoto, Japan.

3) Miyauchi K, Curran R, Mathews E, Komano J, Murakami T, Yamamoto N, Engelman DM, \*Matsuda Z. Alteration of intracellular transport of the envelope protein of HIV-1 by a shift in a helical phase within its membrane-spanning domain. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress in conjunction with 79th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society and 29th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. Jun 18-23, 2006. Kyoto, Japan.

4) Komano J, Futahashi Y, Isogai M, Hamatake M, Matsuda Z, Shiino T, Takebe Y, Sato H, Yamamoto N. Drug Resistance Mutations in the Polymerase Catalytic Domain Negatively Affect the RNase H Activity of HIV-1 Reverse Transcriptase. 7<sup>th</sup> Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance. 2006 Nov 12-15. Chantilly VA, USA

5) Jun Komano. Broadly reactive strong neutralizing antibody against HIV-1 in long-term survivors of HIV-1-infected

haemophiliacs. The US-Japan Cooperative Medical Science Program 19th Joing Meeting of AIDS Panel. Dec 6-7, 2006. Kagoshima, Japan

6) Murakami T, Ablan S, Nagashima K, Komano J, Miyauchi K, Matsuda Z, Freed EO, Yamamoto N. Characterization of HIV-1 matrix mutants-Effects on an early stage of infection. May 24-29, 2006. Cold Spring Harbor Meeting Retroviruses, CSH, NY, USA

7) Jun Komano, Yuko Futahashi, Yasunari, Emiko Urano, Toru Aoki, Kosuke Miyauchi, Takeshi Yoshida, Yoshio Koyanagi, Zene Matsuda, Naoki Yamamoto. Identification of SES as an SDF-1alpha-independent internalization motif of HIV-1 co-receptor CXCR4. Nov 16-17, 2005. 10<sup>th</sup> International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim, Hanoi, Vietnam

8) Kosuke Miyauchi, Jun Komano, Yoshiyuki Yokomaku, Zene Matsuda, The membrane-spanning domain of HIV-1 gp41 is involved in the late steps of the membrane fusion. May 25-30, 2005. Cold Spring Harbor Meeting Retroviruses, CSH, NY, USA

9) Zene Matsuda, Jun Komano, Kosuke Miyauchi, Naoki Yamamoto, Inhibiting Arp2/3 complex limits infection of primate lentiviruses. May 25-30, 2005. Cold Spring Harbor Meeting Retroviruses, CSH, NY, USA

10) Jun Komano, Kosuke Miyauchi, Zene Matsuda, and Naoki Yamamoto, Inhibiting the Arp2/3 Complex Limits Infection of both Intracellular Mature Vaccinia Virus and Primate Lentiviruses. Aug 30-Sep 02, 2005. The 4<sup>th</sup> Awaji International Forum on Infection and Immunity, The Hyogo Prefectural Awaji Yumebutai International Conference Center 1 Yumebutai, Awaji Island, Hyogo

11) Jun Komano, Inhibiting the Arp2/3 complex limits infection of both intracellular mature vaccinia virus and primate lentiviruses. Dec 7-10, 2004. the 40<sup>th</sup> US-Japan Cooperative Medical Science Program, AIDS Panel, Kyoto, Japan  
国内学会

1) 駒野淳, 二橋悠子, 磯貝まや, 濱武牧子, 松田善衛, 佐藤裕徳, 椎野貞一郎, 武部豊, 山本直樹. 挿入変異を伴う多剤耐性 HIV-1 (CRF01\_AE) における薬剤耐性亢進のメカニズム—薬剤耐性獲得における RNase H 活性の関与. 第 5 4 回日本ウイル

ス学会学術集会. Nov 19-21, 2006. 名古屋

2) 駒野淳, 姉崎裕介, 二橋悠子, 磯貝まや, 武部豊, 山本直樹. HIV-1 の逆転写酵素に内在する RNase H 活性阻害薬の開発 (1)—小分子化合物ライブラリーからのスクリーニング. 第 2 0 回日本エイズ学会学術集会. Nov 30-Dec 2, 2006. 東京

3) 清水佐紀, 駒野淳, 浦野恵美子, 二橋悠子, 宮内浩典, 磯貝まや, 松田善衛, 納富香子, 小野木利成, 武部豊, 山本直樹. HIV-1 感染細胞における Tat を介した P-TEFb の活性化を抑制する細胞内因子の解析. Nov 20-22, 2005. 第 5 3 回日本ウイルス学会学術集会、横浜

4) 駒野淳, 二橋悠子, 浦野恵美子, 貝の瀬由成, 青木 徹, 宮内浩典, 磯貝まや, 松田善衛, 山本直樹. The non-tyrosine-based diacidic motif within the cytoplasmic tail regulates the cell surface expression of CXCR4. Nov 20-22, 2005. 第 5 3 回日本ウイルス学会学術集会、横浜

5) 駒野淳, 二橋悠子, 浦野恵美子, 青木 徹, 貝の瀬由成, 宮内浩典, 磯貝まや, 松田善衛, 山本直樹. Cell surface expression of CXCR4 is regulated by a non-tyrosine-based diacidic motif within the cytoplasmic tail. Dec 1-3, 2005. 第 1 9 回日本エイズ学会学術集会、熊本

6) 宮内浩典、駒野淳、村上努、松田善衛. HIV-1 gp41 の膜貫通領域に存在する GGXXG 配列の解析. Dec 7-10, 2005. 第 28 回日本分子生物学会年会、福岡

7) Jun Komano, Emiko Urano, Yuko Futahashi, Kosuke Miyauchi, Zene Matsuda, and Naoki Yamamoto, Restriction of HIV-1 infection at the post-nuclear translocation process in rabbit cell line RK13. Dec 8-11, 2004. the 27th Annual Meeting of the MBSJ, Kobe, Japan

8) 駒野 淳、宮内 浩典、二橋 悠子、浦野 恵美子、松田 善衛、千葉 智子、三浦 秀佳、Lay Myint、杉浦 亙、山本 直樹、ヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) 複製を特異的に増強する小分子化合物 sparsomycin. Nov 21-23, 2004. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会、横浜

9) 駒野 淳、宮内 浩典、松田 善衛、山本 直樹、感染初期過程におけるウイルス種特異的なアクチン利用の相違. Nov 21-23, 2004. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会、横浜

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

Nov 2, US patent #6,811,983

A Method of Identifying Inhibitors of EBNA-1

William M. Sugden, A. Jun Komano,

Gregory D. Kennedy

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし