

電子顕微鏡での解析により通常の状態 (HIV 感染に関与していない) での CCR5 は細胞表面に複数が集まって (クラスター形成) 存在していることを明らかにしている。これらの基礎データ・手法を元にウイルス感染時の各タンパク (エンベロープ・受容体) の動態解析の系の樹立を図る。

D. 考察

これらの研究の特色として、抗 HIV-1 薬開発に必要なウイルス学的研究手技に加えて、新規 (独自) の低分子化合物の合成や結晶構造解析、コンピューター・モデリングなど 1 研究施設では通常施行困難な多岐にわたる研究領域をカバーする研究体制が国内外のグループとの共同研究として整えられていることが挙げられる。今後もこれらの研究を継続し、新興再興感染症の予防・治療薬開発を進める。

E. 結論

我々のグループは HIV-1 が耐性を発現しにくい薬剤、発現しても他薬剤との交差耐性を有しない新規の PIs の開発を米国グループとの共同研究で継続しているが、さらに HIV-1 PR 二量体形成に重要とされるアミノ酸の詳細な解析を進め、新規の機序である HIV-1 PR 二量体形成阻害剤の開発・構造解析を米国の研究グループと共同で行っていく。また CCR5 の微細構造学的解析系の確立、CCR5 阻害剤の結合モデル、分子レベルでの機序解析の研究も進めており、これらの解析結果を基にして、CCR5 結合能のある新規低分子化合物のモデリングを行い、強力な抗 HIV 活性を有する新しい化合物の設計・同定を続ける。

F. 健康危険情報

現在のところ特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Koh Y, Matsumi S, Das D, Amano M, Davis DA, Li J, Leschenko S, Baldrige A, Shioda T, Yarchoan R, Ghosh AK, Mitsuya H. (2007) Potent Inhibition of HIV-1 Replication by Novel Non-peptidyl Small Molecule Inhibitors of Protease Dimerization. *J Biol Chem.* 282: 28709-28720.
2. Nakata H, Amano M, Koh Y, Kodama E, Yang G, Bailey CM, Kohgo S, Hayakawa H, Matsuoka M, Anderson KS, Cheng YC, Mitsuya H. (2007) Activity against human immunodeficiency virus type 1, intracellular metabolism, and effects on human DNA polymerases of 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine. *Antimicrob Agents Chemother.* 51: 2701-2708.
3. Harada S, Hazra R, Tamiya S, Zeichner SL, Mitsuya H. (2007) Emergence of human immunodeficiency virus type 1 variants containing the Q151M complex in children receiving long-term antiretroviral chemotherapy. *Antiviral Res.* 75: 159-166.
4. Amano M, Koh Y, Das D, Li J, Leschenko S, Wang YF, Boross PI, Weber IT, Ghosh AK, Mitsuya H. (2007) A novel bis-tetrahydrofuranylurethane-containing nonpeptidic protease inhibitor (PI),

- GRL-98065, is potent against multiple-PI-resistant human immunodeficiency virus in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 51: 2143-2155.
5. Nishizawa R, Nishiyama T, Hisaichi K, Matsunaga N, Minamoto C, Habashita H, Takaoka Y, Toda M, Shibayama S, Tada H, Sagawa K, Fukushima D, Maeda K, Mitsuya H. (2007) Spirodiketopiperazine-based CCR5 antagonists: Lead optimization from biologically active metabolite. *Bioorg Med Chem Lett.* 17: 727-731.
 6. Mitchell MS, Bodine ET, Hill S, Princler G, Lloyd P, Mitsuya H, Matsuoka M, Derse D. (2007) Phenotypic and genotypic comparisons of human T-cell leukemia virus type 1 reverse transcriptases from infected T-cell lines and patient samples. *J Virol.* 81: 4422-4428.
 7. Ohru H, Kohgo S, Hayakawa H, Kodama E, Matsuoka M, Nakata T, Mitsuya H. (2007) 2'-deoxy-4'-C-ethynyl-2-fluoroadenosine: a nucleoside reverse transcriptase inhibitor with highly potent activity against wide spectrum of HIV-1 strains, favorable toxic profiles, and stability in plasma. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 26(10-12): 1543-6.
 8. Ghosh AK, Dawson ZL, Mitsuya H. (2007) Darunavir, a conceptually new HIV-1 protease inhibitor for the treatment of drug-resistant HIV. *Bioorg Med Chem.* 15(24): 7576-80.
 9. Maeda K, Mitsuya H. (2007) Development of therapeutics for AIDS: structure-based molecular targeting. *Tuberculosis (Edinb).* 87 Suppl 1: S31-4.
 10. 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 *J Biol Chem* 281: 1241-1250.
 11. Maeda, K., Das, D., Ogata-Aoki, H., Nakata, H., Miyakawa, T., Tojo, Y., Norman, R., Takaoka, Y., Ding, J., Arnord, GF., Arnold, E., and Mitsuya, H. (2006) Structural and molecular interactions of CCR5 inhibitors with CCR5. *J. Biol. Chem.* 281: 12688-12698.
 12. Ohru, H., Kohgo, S., Hayakawa, H., Kodama, E., Matsuoka, M., Nakata, T., and Mitsuya, H. (2006) 2'-Deoxy-4'-C-ethynyl-2-fluoroadenosine: A nucleoside reverse transcriptase inhibitor with highly potent activity against all HIV-1 strains, favorable toxic profiles and stability in plasma. *Nucleic Acids Symposium Series.* 50: 1-2
 13. Miyazato, P., Yasunaga, J., Taniguchi, Y., Koyanagi, Y., Mitsuya, H., and Matsuoka, M. (2006) De novo Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Infection of Human Lymphocytes in NOD-SCID, Common γ -Chain Knockout Mice. *J*

- Virology*. 80:10683-10691.
14. Davis, D.A., Brown, C.A., Wang, V., Singer, K.E., Kaufman, J., Stahl, S.J., Wingfield, P., Maeda K., Harada, S., Yoshimura, K., Kosalaraksa, P., Mitsuya, H., and Yarchoan, R. (2006) Inhibition of HIV-1 replication by a peptide dimerization inhibitor of HIV-1 protease. *Antiviral Res.* 72: 89-99.
 15. 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.* 16: 1869-1873.
 16. 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.* 63: 1706-1724
 17. Habashita, H., Kokubo, M., Hamano, S., Hamanaka, N., Toda, M., Shibayama, S., Tada, H., Sagawa, K., Fukushima, D., Maeda, K., and Mitsuya, H. (2006) Design, synthesis and biological evaluation of combinatorial library with new spirodiketopiperazine scaffold. Discovery of novel, potent and selective low-molecular weight CCR5 antagonists. *J. Med. Chem.* 49: 4140-4152
 18. Ghosh, A.K., Sridhar, P.R., Hussain, A.K., Leshchenko, S., Li, J., Kovalevsky, A.Y., Walters, D.E., Wedekind, J.E., Tokars, V.L., Das, D., Koh, Y., Maeda, K., Gatanaga, H., Weber, I.T., and Mitsuya, H. (2006) Structure-Based Design of HIV-1 Protease Inhibitors to Combat Drug Resistance. *J. Med. Chem.* 49: 5252-5261.
 19. Zhou, S., Kern, E.R., Gullen, E., Cheng, Y.-C., Drach, J.C., Tamiya, S., Mitsuya, H., and Zemlicka, J. (2006) 9-{{[3-Fluoro-2 (hydroxymethyl)cyclopropylidene] methyl} adenines and guanines. Synthesis and Antiviral Activity of All Stereoisomers. *J. Med. Chem.* 49: 6120-6128
 20. Yoshimura, K., Shibata, J., Kimura, T., Honda, A., Maeda, Y., Koito, A., Murakami, T., Mitsuya, H., and Matsushita, S. (2006) Resistance profile of a novel broadly neutralizing anti-HIV monoclonal antibody, KD-247, that shows favorable synergism with anti-CCR5 inhibitors. *AIDS* 20: 2065-2073
 21. Ghosh, A.K., Sridhar, P.R., Kumaragurubaran, N., Koh, Y., Weber, I.T., and Mitsuya, H. (2006) Bis-Tetrahydrofuran: A Privileged Ligand for Darunavir and a New Generation of HIV-Protease Inhibitors That Combat Drug Resistance. *Chem. Med. Chem.* 1: 939-950
2. 学会発表(国際学会のみ)
 1. "Study of Dynamics of Cellular CCR5 and Its Alterations by CCR5 Inhibitors Using YFP-tagged CCR5-expressing

- Cells” Hiroto Nakata, W Kamata1, H Ogata-Aoki1, K Maeda, and H Mitsuya, 14th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. February 25-28, 2007 L.A., California, US
Program and abstracts CROI 2007 p494
2. “Structural/Molecular Analysis of HIV Inhibition by Small Molecule CCR5 Inhibitors” Kenji Maeda, D Das, K Tsuchiya, P Yin, H Ogata-Aoki, H Nakata, H Nakata, R Norman, Y Takaoka, and H Mitsuya, 14th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. February 25-28, 2007 L.A., California, US
Program and abstracts CROI 2007 p493
 3. “In-vitro Selection of HIV-1 Variants Highly Resistant to Darunavir (DRV) Using a Mixture of HIV-1 Isolates Resistant to Multiple Protease Inhibitors (PIs)” Yasuhiro Koh, T Towata, A Ghosh, and H Mitsuya, 14th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. February 25-28, 2007 L.A., California, US
Program and abstracts CROI 2007 p606
 4. “A Novel bis-Tetrahydrofranylurethane -Containing Nonpeptidic Protease Inhibitor (PI) GRL-98065 Potent Against Multi-PI-Resistant HIV In Vitro.” Masayuki Amano, Y Koh, A Ghosh, and H Mitsuya, 14th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. February 25-28, 2007 L.A., California, US
Program and abstracts CROI 2007 p492
 5. “TTNTRNS: An aminoacid insert near the p17/p24 Gag cleavage site associated with resistance to protease inhibitors” Manabu Aoki, H Aoki, T Miyakawa, and H Mitsuya, 14th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. February 25-28, 2007 L.A., California, US
Program and abstracts CROI 2007 p601
 6. “Potent Inhibition of HIV-1 Replication By Novel Non-peptidyl Small Molecule Protease Dimerization Inhibitors” Koh Y., Matsumi S., Amano M., Das D., Davis D.A., Li J., Leschenko S., Baldrige A., Shioda T., Yarchoan R., Ghosh A.K., Mitsuya H. 4th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention July 22-25, 2007, Sydney, Australia
Abstract No. MOPDX04
- H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)
1. 特許取得 特になし
 2. 実用新案登録 特になし

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

逆転写酵素およびプロテアーゼ以外を標的とする新規抗エイズ薬の研究
—新規ナフタレン誘導体のウイルス遺伝子発現阻害を介した抗 HIV-1 効果—

分担研究者 馬場昌範（鹿児島大学大学院医歯学総合研究科教授）

研究要旨： HIV-1 のライフサイクルの中で、プロウイルス DNA からの遺伝子発現と転写は、ウイルス増殖にとって不可欠であり、この過程を選択的に阻害する薬剤は新しい抗エイズ薬の候補になると思われる。そこで、本研究では新たに同定されたナフタレン誘導体 JTK-101 の抗 HIV-1 効果とその作用機序について検討した。その結果、JTK-101 は HIV-1 潜伏感染細胞や慢性持続感染細胞からウイルス産生を強力に抑制した。しかし、その効果は、急性感染細胞や単球由来の慢性感染細胞では弱かった。JTK-101 は潜伏感染細胞において、TNF- α によって誘導される HIV-1 RNA の合成を濃度依存的に阻害した。さらに、JTK-101 は Tat によって誘導される遺伝子発現に対して、強い抑制効果を示すことが分かった。また、その標的分子は Cyclin T1/CDK9 か、あるいはそれらの cofactor であると思われた。

A. 研究目的

HIV-1 は転写される DNA 10,000 塩基当たり 3 個と非常に高頻度で変異を起こすことから、薬剤耐性ウイルスの早期出現が highly active antiretroviral therapy (HAART) が確立された現在においても、治療失敗の大きな原因となっている。そこで、既存の抗エイズ薬、すなわち逆転写酵素阻害薬やプロテアーゼ阻害薬以外の作用機序を有する薬剤の開発研究が精力的に行われており、最近では HIV-1 のコレセプターである CCR5 を標的とした侵入阻害薬と、逆転写によって作られたプロウイルス DNA の宿主細胞の DNA へ

の組み込みを阻害するインテグラーゼ阻害薬が相次いで認可された。

一方、HIV-1 のライフサイクルの中で、宿主細胞に組み込まれたウイルス DNA からの遺伝子発現と転写は、ウイルス増殖にとって不可欠である。また、HIV-1 の遺伝子発現を阻害する薬剤は、ウイルスのリザーバーである単球/マクロファージやメモリーT細胞の潜伏ウイルスからの遺伝子発現を抑制することができると考えられる。我々は過去に 100,000 以上の薬剤について、HIV-1 LTR で遺伝子発現がドライブされるレポーター細胞によるスクリーニングを行い、新規ナフタレン

誘導体に強い遺伝子発現の抑制を認めている。さらにその中の代表化合物である JTK-101 については、*in vitro* における強い抗 HIV-1 効果について報告してきた。そこで、今年度の本研究では、JTK-101 について、詳細な抗 HIV-1 効果とその作用機序について検討した。

B. 研究方法

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 JTK-101 (図 1)、我々によって 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。

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_B 細胞、単球系細胞由来の U937/III_B 細胞を用いた。HIV-1 非感染細胞としてはリンパ系細胞由来の CEM 細胞および単球系細胞由来の U937 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) は健康人の末梢血から分離した後、5 µg/ml の phytohemagglutinin (PHA) を含む 20% ウシ胎仔血清 (FBS)、100 U/ml recombinant human interleukin-2 (IL-2)、100 U/ml penicillin G、および 100 µg/ml streptomycin を添加した RPMI 1640 培地中で 3 日間培養した。PHA を除いた培地を薬剤の抗 HIV-1 アッセイ試験に用いた。ヒト初代培養マクロファージは、PBMCs から単球を分離し、それを 10% FBS および 10% ヒト AB 血清を添加した RPMI 1640 メジウムにて 7 日間培養し、マクロファージへと分化させたものを実験に用いた。また、W-3 および KM-3 細胞は HIV-1 LTR にて発現が制御された分泌型アルカリホスファターゼ (SEAP) 遺伝子が安定的に組み込まれている CEM 細胞のクローンである。

ウイルス：コレセプターとして CCR5 あるいは CXCR4 を用いる HIV-1 として、それぞれ Ba-L および III_B 株を感染実験に用いた。

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 の濃度の腫瘍壊死因子 (TNF) -α で刺激した OM-10.1 細胞、もしくは未刺激の MOLT-4/III_B および U937/III_B 細胞を 1×10^5 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。また、慢性感染マクロファージにおけるアッセイでは、7日間培養し、分化したマクロファージに HIV-1 を感染させ (10 ng of p24 per 5×10^4 cells), 24 時間後に細胞を洗浄し、さらに 9 日間培養した。その後、種々の濃度の薬剤とともに 4 日間培養した後、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 4 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 1×10^5 および 1×10^6 cells/mL に調整し、HIV-1 (III_B 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。

リアルタイム定量 RT-PCR 法 : OM-10.1 細胞 (2×10^5 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- α 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'-AGCTCCTCTGGTTCCCTTTC-3') をプライマーとして、P619-647 (5'-TGGAAAATCTCTCTAGCAGTGGCGCCGAAC-3') をプローブとして用いた。また、対照として GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) mRNA 量の定量も同時に行った。

レポーター細胞アッセイ : W-3 および KM-3 細胞に対し、10 ng/mL の濃度の TNF- α を添加、もしくは 1 μ g の Tat 発現プラスミドをトランスフェクションし、種々の濃度の薬剤とともに 2 日間培養した後、培養上清中の SEAP 活性を定量した。

イムノプロット法 : 種々の細胞を溶解し、タンパク量を定量した後、10% sodium dodecyl sulfate (SDS) ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った。次に、抗 CDK9 抗体および抗 cyclin T 抗体と反応させ、ケミルミネッセンス法にて、細胞中の CDK9 および cyclin T1 を同定した。

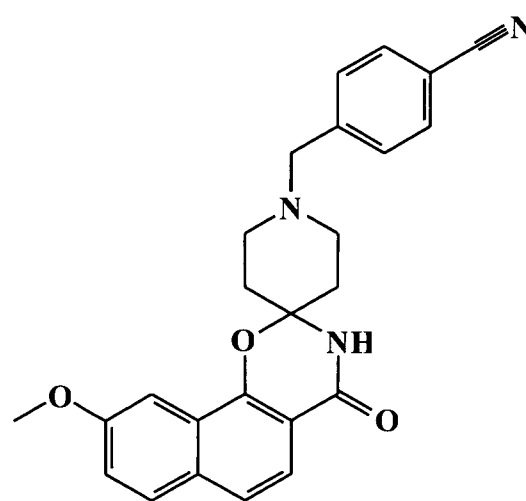


Figure 1. Structure of JTK-101

(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。

C. 研究結果

抗 HIV-1 活性: 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 ng/mL) であるが、1 ng/mL の TNF- α で刺激すると、短時間で大量 (約 100 ng/mL) の p24 抗原を産生するようになる。我々は、これまでの研究において、JTK-101 が約 16-80 nM の濃度で、TNF- α 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することを明らかにしている。JTK-101 の OM-10.1 細胞における 50% 有効濃度 (EC₅₀) および 50%細胞毒性濃度 (CC₅₀) の値は、それぞれ 0.0014 \pm 0.0005 および 3.8 \pm 0.2 μ M であった。これは K-37 の OM-10.1 細胞における EC₅₀ 値である 0.033 \pm 0.012 μ M よりもはるかに強い活性である。当然ながら、逆転写酵素阻害薬の 3TC は、この系において全く抗 HIV-1 効果を示さなかった。

次に、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。HIV-1 III_B 株感染 CEM 細胞における JTK-101 の EC₅₀ および CC₅₀ は、それぞれ 0.031 \pm 0.007 および 1.0 \pm 0.5 μ M であり、さらに PBMCs における EC₅₀ および CC₅₀ は、それぞれ 0.39 \pm 0.25 および 1.2 \pm 0.9 μ M 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、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。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 EC₅₀ は 0.0026 \pm 0.0005 μ M であった。

遺伝子発現効果: 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。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 μ M 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 GAPDH mRNA レベルに対し、0.1 μ M 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。

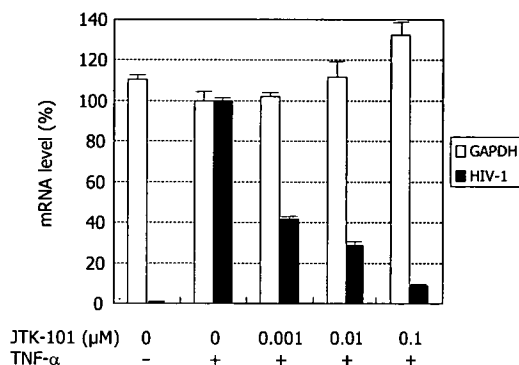


Figure 2. Inhibitory effects of JTK-101 on HIV-1 mRNA synthesis in OM-10.1 cells. The cells were incubated with the compound for 2 h, stimulated (+) with TNF- α (1 ng/ml), and further incubated. After 24-h incubation, total RNA was extracted from the cells, and quantitative RT-PCR for HIV-1 mRNA was performed. The cytotoxic effects of the test compound on host cellular mRNA synthesis were determined by quantitative RT-PCR for GAPDH mRNA.

TNF- α もしくは Tat による **trans-activation** に対する抑制効果: JTK-101 の遺伝子発現抑制効果のメカニズムを検討するため、レポーター細胞 W-3 および KM-3 細胞を用いて、TNF- α もしくは Tat による transactivation に対する抑制効果について調べた。KM-3 は HIV-1 LTR の NF- κ B 結合領域が2つと

も変異しており、Tat により SEAP 遺伝子の発現が誘導されるが、TNF- α などによる NF- κ B を介したレポーター遺伝子の発現は誘導されない。このような系において、JTK-101 は W-3 および KM-3 のいずれの細胞においても、Tat による SEAP の発現を濃度依存的に抑制した (図3)。また、この抑制効果は KM-3 細胞において、より顕著であった。一方、JTK-101 は W-3 細胞における TNF- α の刺激による SEAP の発現を弱いながらも抑制することが分かった。対照的に K-37 は W-3 および KM-3 細胞いずれにおいても、Tat による SEAP の発現を同様に抑制したが、TNF- α の刺激による SEAP の発現は全く抑制しなかった (data not shown)。このことから、JTK-101 と K-37 はともに HIV-1 LTR を介した遺伝子発現を抑制するが、そのメカニズムは異なると推察された。

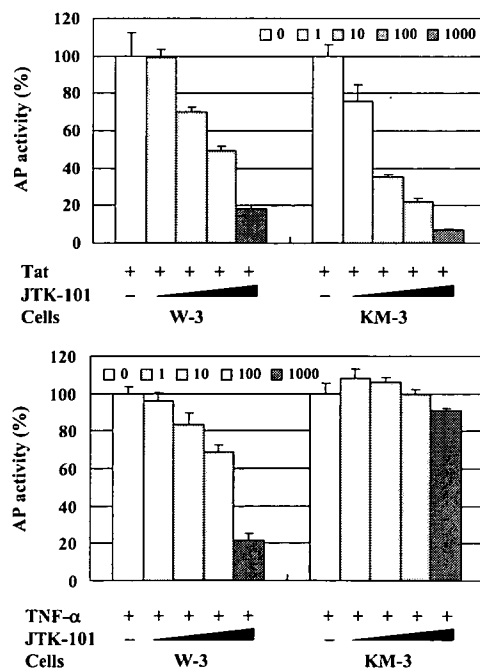


Figure 3. Inhibitory effects of JTK-101 on HIV-1 Tat- or TNF- α -induced transactivation in W-3 and KM-3 cells. For HIV-1 Tat-induced transactivation, W-3 and KM-3 cells were transfected with Tat expression plasmid (1 μ g) (upper panel). For TNF- α -induced transactivation, W-3 and KM-3 cells were treated with or without TNF- α (10 ng/ml) (lower panel). The cells were cultured in the presence of various concentrations of the compound. After 2-day incubation, the culture supernatants were collected and examined for their SEAP levels. At the same time, the number of viable cells was determined by the MTT methods. Transfection with the Tat expression plasmid induced 8.8- and 6.3-fold increase of SEAP production in W-3 and KM-3 cells, respectively. On the other hand, TNF- α -stimulation induced 3.5- and 0.9-fold increase of SEAP production in W-3 and KM-3 cells. All experiments were carried out in duplicate and expressed as means \pm ranges.

CDK9/cyclin T1 と JTK-101 の活性との関係 : JTK-101 は MOLT-4/III_B 細胞では強い抗 HIV-1 効果を示すが, 単球系細胞由来の U937/IIIB 細胞では弱い活性しか示さない (図 4)。

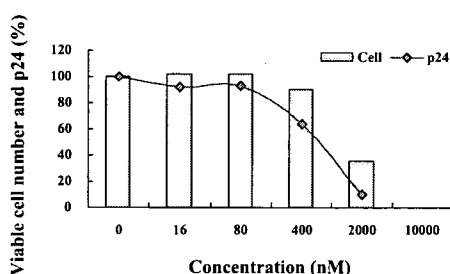


Figure 4. Inhibitory effects of JTK-101 on HIV-1 replication in U937/III_B cells. The cells were cultured in the absence or presence of the test compounds without any stimuli. After 3-day incubation, the p24 antigen levels of culture supernatants (lines) were measured by antigen ELISA. At the same time, the number of viable cell was determined by the MTT method (columns).

そこで, 種々の細胞における CDK9 と cyclin T1 の発現レベルをウエスタンブロット法を用いて調べたところ, U937 およびその HIV-1 慢性感染細胞である U937/III_B 細胞において, CDK9 と cyclin T1 とともに, 発現レベルが他の細胞に比較して弱いことが明らかとなった (図 5)。

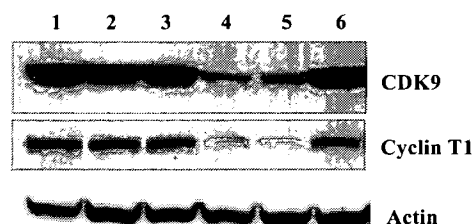


Figure 5. Western blot analysis for CDK9 and Cyclin T1 expression in various cell lines. Whole cell-lysates were fractionated by 10% SDS-polyacrylamide gels, and Western blot analysis was performed with anti-CDK9, anti-cyclin T1 or anti-actin polyclonal antibodies. The analyzed cells were CEM (lane 1), MOLT-4 (lane 2), MOLT-4/III_B (lane 3), U937 (lane 4), U937/III_B (lane 5), and OM-10.1 (lane 6).

次に PBMCs とマクロファージについて調べたところ、驚いたことに、非感染、HIV-1 感染に関わらず、培養マクロファージには CDK9 および cyclin T1 の発現が認められなかった(図 6)。一方、対照として用いた PBMCs は CDK9 および cyclin T1 の何れの発現も観察された。これに対応するように、HIV-1 感染マクロファージにおいて、JTK-101 は抗ウイルス活性を全く示さなかった。

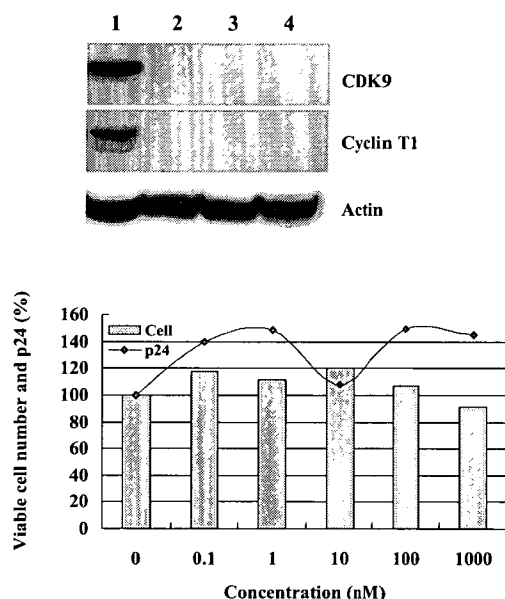


Figure 6. CDK9 and cyclin T1 expression in chronically infected M/Ms and anti-HIV-1 activity of JTK-101. Upper panel: The isolated macrophages were kept uninfected (lane 2) or infected with HIV-1_{Ba-L} on day 2 (lane 3) or day 7 (lane 4). After 24-h incubation, the cells were washed and further incubated. On day 17, the cells were harvested for cell extracts preparation. Western blot analysis was performed. The culture supernatants were also collected on day 17 for p24 antigen

detection. Their p24 levels of infected macrophages on days 2 and 7 were 221.5 and 27.3 ng/ml, respectively. As a control, PBMCs from same donors stimulated with PHA for 3 days were also examined (lane 1). Lower panel: Inhibitory effects of JTK-101 on HIV-1 replication in chronically infected macrophages. The isolated macrophages were cultured for 7 days and infected with HIV-1_{Ba-L}. After 24-h incubation, the cells were washed and cultured for further 9 days. After extensive washing, chronically infected macrophages were cultured in the presence of various concentrations of JTK-101. After 4-day incubation, the p24 antigen levels of culture supernatants (lines) were measured by ELISA. At the same time, the number of viable cell was determined by the MTT method (columns).

D. 考 察

HIV-1 遺伝子にエンコードされる Tat は HIV-1 遺伝子の転写産物である TAR (transcriptional response) RNA と相互作用することにより、HIV-1 RNA の伸長を活性化することが知られている。この Tat と TAR 相互作用には、宿主細胞因子である cyclin T1 と CDK9 との相互作用が必要であり、従って、何らかのメカニズムでこれらの相互作用を抑制する物質は、HIV-1 の遺伝子発現や転写を抑制し、結果としてウイルスの増殖が抑えられると考えられる。一方で、HIV-1 のリザーバーである休止期 T リンパ球やマクロファージなど、体内での寿命が長い細胞の

存在により、HAART を中断すると、再びウイルスのリバウンドが起こるため、有効なワクチンがない現状下では、HIV-1 感染症において、抗ウイルス薬の中断は出来ないとされている。このような状況において、リザーバーからのウイルス産生を抑制するような薬剤があれば、既存の抗 HIV-1 薬と併用することにより、さらに有効な治療が展開できるであろう。

われわれは過去に、レポーター細胞を用いて選び出された新規ナフタレン誘導体 JTK-101 が HIV-1 慢性感染細胞において強力な抗ウイルス効果を発揮することを報告したが、その作用機序は不明であった。本研究において、JTK-101 の抗 HIV-1 活性はインテグレートされた HIV-1 DNA からのウイルス遺伝子発現の段階を阻害すること、また、その効果は宿主細胞の Cyclin T1 と CDK9 の発現に依存することを見出した。特に、培養マクロファージでは Cyclin T1 と CDK9 の発現が認められず、JTK-101 は抗 HIV-1 効果を全く示さなかった。以上の結果から、本薬剤は少なくとも Cyclin T1 もしくは CDK9 を介して、Tat による HIV-1 の遺伝子発現を抑制する可能性が高いと思われる。しかし、JTK-101 がこれらの分子を直接標的としているかどうかについては、更なる検討が必要である。

一方、残念ながら動物を用いた前臨床安全性試験で、JTK-101 は特にラットに対し、かなりの毒性を有することが判明した。従って、JTK-101 の臨床開発は断念されたが、これをもって

cyclin T1 や CDK9 が抗 HIV-1 薬の標的分子として適切でないとは言えない。つまり、JTK-101 の毒性の原因が、Cyclin T1 や CDK9 の抑制に依るものではなく、他の宿主細胞因子の阻害作用に依る可能性も否定できない。最近、cyclin T1/CDK9 を特異的に阻害するデコイが、正常な T リンパ球の生存と増殖に影響を与えずに、HIV-1 の増殖を抑制したとの報告もあり、われわれは今後さらに cyclin T1/CDK9 を標的とした抗 HIV-1 療法の可能性を探っていく予定である。

E. 結論

HIV-1 遺伝子発現および転写阻害薬は、新しい抗エイズ薬としての可能性を秘めている。その中で Tat の cofactor である cyclin T1/CDK9 が標的分子になる可能性を有しているが、宿主に対する毒性を回避するためには、さらに選択性を高める必要があると思われた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表（本研究に直接関係するもの）

1. 論文発表

1. Yang G, Dutschman GE, Wang CJ, Tanaka H, Baba M, Anderson KS, Cheng Y-C. Highly selective action of triphosphate metabolite of 4'-ethynyl D4T: A novel anti-HIV compound against HIV-1 RT.

- Antiviral Res.* **73**: 185-191 (2007).
2. Hsu C-H, Hu R, Dutschman GE, Yang G, Krishnan P, Tanaka H, Baba M, Cheng Y-C. Comparison of phosphorylation of 4'-ethynyl 2',3'-dihydro-3'-deoxythymidine with that of other anti-human immunodeficiency virus thymidine analogs. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**: 1687-1693 (2007).
 3. Shi M, Wang X, De Clercq E, Takao S, Baba M. Selective inhibition of porcine endogenous retrovirus (PERV) replication in human cells by acyclic nucleoside phosphonates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**: 2600-2604 (2007).
 4. Wang X, Yamataka K, Okamoto M, Ikeda S, Baba M. Potent and selective inhibition of Tat-dependent HIV-1 replication in chronically infected cells by a novel naphthalene derivative JTK-101. *Antiviral Chem. Chemother.* **18**: 201-211 (2007).
 5. Painsil E, Dutchman GE, Hu R, Grill S, Lam W, Baba M, Tanaka H, Cheng Y-C. Intracellular metabolism and persistence of the anti-human immunodeficiency virus activity of 2',3'-didehydro-3'-deoxy-4'-ethynylthymidine, a novel thymidine analog. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**: 3870-3879 (2007).
 6. Sawada H, Narumi T, Kiyohara M, Baba M. Preparation of fluoroalkyl end-capped cooligomers/silica nanoparticles: a new approach to fluorinated nanoparticle inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus (SIV_{mac}). *J. Fluorine Chem.* **128**: 1416-1420 (2007).
 7. 馬場昌範. 新しい抗 HIV-1 薬開発の展望. 化学療法の領域 **23**:1002-1008 (2007).
2. 学会発表
1. Shi M, Wang X, De Clercq E, Takao S, Baba M. Antiviral activity of reverse transcriptase inhibitors against porcine endogenous retroviruses (PERV). *20th International Conference on Antiviral Research*, April 30, 2007, Palm Springs, USA. *20th International Conference on Antiviral Research*, April 30, 2007, Palm Springs, USA.
 2. Wang X, Shi M, Fujisawa J, Tanaka Y, Izumo S, Ikeda S, Baba M. Inhibition of the Tax-dependent human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) replication in persistently infected cells by the naphthalene derivative JTK-101. *20th International Conference on Antiviral Research*, April 30, 2007, Palm Springs, USA. *20th International Conference on Antiviral Research*, May 2, 2007, Palm Springs, USA.

3. Shi M, Wang X, De Clercq E, Takao S, Baba M. Antiviral activity of anti-HIV-1 nucleoside reverse transcriptase inhibitors against porcine endogenous retrovirus (PERV) replication in human cells. 第 17 回抗ウイルス療法研究会, 2007 年 5 月 25 日, 高松市.
4. 馬場昌範, 王 欣, 施 敏イ, 岡本実佳, 藤澤順一, 田中勇悦, 出雲周二, 池田 了. HTLV-1 持続感染細胞におけるナフタレン誘導体 JTK-101 の Tax 依存性ウイルス複製の抑制. 第 44 回日本ウイルス学会九州支部総会, 2007 年 10 月 12 日, 長崎市.

H. 知的財産権の出願・登録状況

今年度, 本研究に関するものでは, 出願および取得特許はない。

HIV に対する新規薬剤開発

分担研究者：松岡 雅雄（京都大学ウイルス研究所 教授）

研究要旨

多剤併用療法により HIV 感染者の予後は劇的に改善したが HIV の根絶は達成されず、長期に渡る治療により耐性ウイルスの出現が大きな問題となっている。耐性ウイルスを克服し HIV 感染者の治療を改善するために新規治療薬の開発を行う。新規インテグラーゼ阻害剤の開発に成功しており、その作用機序や耐性機構の解明を行う。また 4'位にエチニル基を有し、強力な抗 HIV 作用を有する核酸系逆転写酵素阻害剤を同定しており、その開発を進める。

A. 研究目的

多剤併用療法（highly active anti-retroviral therapy: HAART）が導入され、HIV 感染者の治療成績は劇的に改善されたが、依然として HIV の駆逐は不可能であり、長期に亘る薬剤の服用により HIV の薬剤耐性獲得が大きな問題となっている。耐性克服には、逆転写酵素やプロテアーゼなどに対する、より強力な阻害剤の開発と共に新規標的に対する薬剤の開発が必要である。本研究では、新規の抗 HIV 剤を開発し強力で安全な治療法を可能とすることを目標とする。また、これらの薬剤に対する耐性ウイルスの研究は、新たな治療戦略構築の上でも必要不可欠である。

B. 研究方法

1) 新規インテグラーゼ阻害剤 (Elvitegravir (EVG): JTK303/GS-9137) に対する耐性ウイルスの誘導

EVG 存在下で HIV を MT-2 に感染させ、培養液中の薬剤濃度を徐々に上昇させ (dose-escalation method) 継代培養を行い耐性ウイルスを誘導した。各継代時に回収したウイルスの塩基配列を決定し、耐性変異を推測した。

2) EVG 耐性変異の同定

得られた変異を *in vitro* mutagenesis 法により NL4-3 に導入し組み換え HIV を作製した。薬剤感受性を MAGI 法により解析した。また複製速度を解析した。

3) EVG のレトロウイルス抑制作用

マウス白血病ウイルスベクターに luciferase 遺伝子を組み込んだベクターを用いて解析を行った。SIV_{mac} は p24 測定により抗ウイルス活性を測定した。

4) 各種 HIV-1 サブタイプに対する EVG の効果

各種 HIV-1 サブタイプに対する EVG, AZT の効果は p24 の測定により行った。

(倫理面への配慮)

本研究は試験管内での実験であり、特に必要ないものとする。

C. 研究結果

1) 新規インテグラーゼ阻害剤の開発
新規インテグラーゼ阻害剤として EVG を開発し (JT との共同研究)、現在、米国 Gilead 社により臨床第三相試験中である。EVG は試験管内で強力に HIV-1_{IIIb} の複製を抑制する (IC₅₀=0.7nM) だけでなく、臨床分離株の複製も同様に抑制した。

2) 各種 HIV-1 サブタイプに対する EVG の効果

AZT に対してサブタイプ B の IC₅₀ は 1.10~11.7nM であり、サブタイプ F は 25.3nM と大きな差異が存在した。ETG の IC₅₀ は 0.1nM から 1.26nM であり、AZT と比較しサブタイプ間の薬剤感受性の差は少なかった。

3) EVG に対する耐性ウイルスの誘導

ETG に対する HIV の耐性機序を解明するために dose escalation 法を用いて EVG に対する耐性ウイルスを誘導した。独立した実験により 2 種類の異なる耐性変異を有するウイルスを同定した

(H51Y/E92Q/S147G/E157Q と

T66I/Q95K/E138K/Q146P/S147G)。in vitro

mutagenesisによりそれぞれE92QとT66Iが耐性責任変異であることが明らかとなった。

4) EVGのレトロウイルス抑制作用

SIV_{mac}に対してIC₅₀は0.5nMであり、HIVIIIIBに対するIC₅₀(0.8nM)と同等であった。MLVに対しても阻害活性を有する(IC₅₀=5.8nM)ことが明らかとなった。

D. 考察

HIV感染者の予後はHAARTの導入により著しく改善されたが、ウイルスの駆逐が不可能な現状では長期の薬剤服用が不可欠である。定期的に薬剤を中断するstructural therapeutic interruptionは薬剤の副作用を低減しつつ治療効果があると期待されたが、むしろ死亡率が増加することが明らかとなった。このため継続した薬剤治療によりウイルス量を抑えることがHIV-1感染症治療の根本であるが、耐性ウイルスの出現が治療上、大きな脅威となっている。耐性ウイルス克服のためには新規標的に対する薬剤は極めて有効であり、我々はインテグラーゼ阻害剤、EVGの開発を進めてきた。EVGはHIV-1に対して極めて高い活性を有しており、本薬剤は米国Gilead社により現在、臨床第三相試験中である。本研究ではEVG耐性ウイルスの誘導により異なる耐性変異を有するウイルスが誘導された。その耐性変異の解析から様々なレトロウイルスで保存されたアミノ酸部位に耐性責任変異があることが示された。このことからEVGがレトロウイルス間で保存された活性部位を介して抗ウイルス効果を発揮することが推測され、様々なレトロウイルスの複製を阻害することが予想された。本研究で確かにSIV_{mac}、MLVの複製を抑制することが確認された。EVGに対する耐性ウイルスはdiketo構造を有するL-870,810に対しても耐性であり、インテグラーゼ阻害剤間の交叉耐性が存在するものと考えられる。インテグラーゼ阻害剤としてはメルク社のraltegravirが承認され臨床で使用されているが、EVG使用中に耐性ウイルスの出現した患者でraltegravirを使用しても有効性がなく、交叉耐性の存在が示されている。今後は、これまでと作用機序の異なるインテグラーゼ阻害剤の開発が必要となってくるものと考えられる。

E. 結論

新規標的であるインテグラーゼに対する阻害剤を開発し、その耐性変異機構を明らかにした。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Mitchell MS, Bodine ET, Hill S, Princler G, Lloyd P, Mitsuya H, Matsuoka M, Derse D. Phenotypic and genotypic comparison of human T-cell leukemia virus type 1 reverse transcriptase from infected T-cell lines and patient samples. **J Virol**, 81: 4422-4428, 2007.
2. Miyazaki M, Yasunaga J-I, Taniguchi Y, Tamiya S, Nakahata T, and Matsuoka M. Preferential Selection of HTLV-1 Provirus Lacking the 5'LTR during Oncogenesis. **J Virol**, 81: 5714-5723, 2007.
3. Nakata H, Amano M, Koh Y, Kodama E, Yang G, Bailey CM, Kohgo S, Hayakawa H, Matsuoka M, Anderson KS, Cheng Y-C, Mitsuya H. Antiviral Activity against HIV-1, Intracellular Metabolism, and Effects on Human DNA Polymerases of 4'-Ethylnyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine. **Antimicrob. Agents Chemother.** 51: 2701-2708, 2007.
4. Tamaki H, Taniguchi Y, Kikuchi A, Yamagami T, Soma T and Matsuoka M. Development of adult T-cell leukemia in donor-derived human T-cell leukemia virus type I-infected T cells after allogeneic bone marrow transplantation. **Leukemia** 21: 1594-1596, 2007.
5. Higuchi M, Tsubata C, Kondo R, Yoshida S, Takahashi M, Oie M, Tanaka Y, Mahieux R, Matsuoka M, Fujii M.

- Cooperation of NF- κ B2/p100 activation and the PDZ domain binding motif signal in human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV) Tax1 but not HTLV-2 Tax2 is crucial for interleukin-2 independent growth transformation of a T cell line. **J Virol** 81:11900-11907, 2007.
6. Yoshida M, Kuwahara K, Shimasaki T, Nakagata N, Matsuoka M, Sakaguchi N. GANP suppresses DNA recombination, measured by direct-repeat beta-galactosidase gene construct, but does not suppress the type of recombination applying to immunoglobulin genes in mammalian cells. **Genes Cells**. 12:1205-1213, 2007.
 7. Ujike M, Nishikawa H, Otaka A, Yamamoto N, Yamamoto N, Matsuoka M, Kodama E, Fujii N, and Taguchi F. Heptad repeat-derived peptides block the protease-mediated direct entry from cell surface of SARS coronavirus but not entry via endosomal pathway. **J Virol** 82: 588-592, 2008.
 8. Shimura K, Kodama E, Sakagami Y, Matsuzaki Y, Watanabe W, Yamataka K, Watanabe Y, Ohata Y, Doi S, Sato M, Kano M, Ikeda S, and Masao Matsuoka. Broad Anti-Retroviral Activity and Resistance Profile of a Novel Human Immunodeficiency Virus Integrase Inhibitor, Elvitegravir (JTK-303/GS-9137). **J Virol**. 82: 764-774, 2008.
 9. Kajiwara K, Kodama E, Sakagami Y, Naito T, Matsuoka M. A Dual-Reporter Phenotypic Assay for Human Immunodeficiency Viruses. **J Clin Microbiol**. 46: 792-795, 2008.
 10. Oishi S, Ito S, Nishikawa H, Watanabe K, Tanaka M, Ohno H, Izumi K, Sakagami Y, Kodama E, Matsuoka M, Fujii N. Design of a Novel HIV-1 Fusion Inhibitor That Displays a Minimal Interface for Binding Affinity. **J Med Chem**. 51: 388-391. 2008.
- 2) 学会発表
1. Hachiya A, Kodama E, Sarafianos SG, Schuckmann M, Matsuoka M, Takiguchi, Gatanaga H, and Oka S. A Novel Mutation, N348I in HIV-1 Reverse Transcriptase Induced by NRTI Treatment, Confers Nevirapine Resistance. 14th conference on retroviruses and opportunistic infections. Los Angeles, CA, Feb 25-28, 2007.
 2. Matsuoka M. HTLV-I bZIP Facotr Gene and Oncogenesis by HTLV-I. The 13th International Conference on Human Retrovirology. Hakone, Japan. May 22-25, 2007.
 3. Satou Y, Yasunaga JI, Ohshima K, Miyazato P, Yoshida M, Takai K, Zhao T and Matsuoka M. HBZ transgenic mice mimic skin and lung diseases associated with HTLV-I. The 13th International Conference on Human Retrovirology. Hakone, Japan. May 22-25, 2007.
 4. Yoshida M. Characterization of the promoter region for *HBZ* gene and functional analyses of spliced and unspliced *HBZ* genes. The 13th International Conference on Human Retrovirology. Hakone, Japan. May 22-25, 2007.
 5. Kodama E. Retroviral integrase inhibitor, elvitegravir (JTK-303/GS9137): Mechanism of action and resistance. The Korea-Japan Basic Scientific Cooperation Program.

- Recent Status and Future Prospect of Antiviral Chemotherapy. Jeju, Korea Dec. 5-7, 2007
6. 松岡雅雄：HTLV-Iによる発がん機構と移植：第29回日本造血細胞移植学会総会、福岡、2007年2月16-17日
 7. 松岡雅雄：Leukemogenesis associated with HTLV-I bZIP factor gene in ATL：第66回日本癌学会学術総会、横浜、2007年10月3-5日
 8. 松岡雅雄：Molecular mechanism of pathogenesis by human T-cell leukemia virus type I：第12回慶應医学賞記念シンポジウム、東京、2007年12月5日
 9. 安永純一郎：欠損型プロウイルスの解析からみた発がんにおける HTLV-I bZIP factor の重要性：69回日本血液学会総会・第49回日本臨床血液学会総会、横浜、2007年10月11日-13日
 10. 安永純一郎：HTLV-I bZIP factor (HBZ) による T 細胞増殖促進の分子機構：第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会、横浜、2007年12月11日-15日
 11. 佐藤賢文、片桐晃子、ミヤザトパオラ、木梨達雄、松岡雅雄：HTLV-I bZIP factor 遺伝子のトランスジェニックマウスは HTLV-I 関連皮膚疾患、肺疾患に類似した病態を示す：第37回日本免疫学会総会、東京、2007年11月20-22日
 12. 佐藤賢文、ミヤザトパオラ、松岡雅雄：HTLV-I 病原性における HBZ 遺伝子の機能解析：第55回日本ウイルス学会総会、札幌、2007年10月21-23日
 13. Fan Jun、麻生範雄、松岡雅雄：Clustering of hypomethylated DNA regions associated with transcriptional changes in B-CLL：第66回日本癌学会学術総会、横浜、2007年10月3-5日
 14. 志村和也、児玉栄一、阪上泰子、松崎裕児、渡辺渡、山高一修、佐藤元秀、加納光記、池田了、松岡雅雄：HIV インテグラーゼ阻害剤 Elvitegravir (JTK-303/GS-9137)の抗ウイルス活性および耐性機序の解析：第17回抗ウイルス療法研究会、高松、2007年5月25日-26日
 15. 志村和也、児玉栄一、池田了、松岡雅雄：インテグラーゼ阻害剤に対する耐性 HIV の誘導とその複製能の比較：第21回日本エイズ学会学術集会・総会、広島、2007年11月28日-30日
 16. 泉和樹、西川裕輝、伊藤紗織、児玉栄一、志村和也、大石真也、藤井信孝、松岡雅雄：T-20 耐性 HIV-1 に対して有効な融合阻害薬の開発：第17回抗ウイルス療法研究会、香川、2007年5月25-26日
 17. 泉和樹、児玉栄一、志村和也、大石真也、藤井信孝、松岡雅雄：T-20 耐性変異を利用した融合阻害薬の開発：第21回日本エイズ学会学術集会・総会、広島、2007年11月28-30日
 18. 趙鉄軍、安永純一郎、藤井雅寛、松岡雅雄：HTLV-1 bZIP factor suppresses canonical pathway of NF- κ B by physical interaction with the p65：第66回日本癌学会学術総会、横浜、2007年10月3-5日
 19. 内藤武志、泉和樹、西川裕輝、児玉栄一、大石真也、藤井信孝、松岡雅雄：C29 水溶性誘導體 SC29EK の抗 HIV 効果：第21回日本エイズ学会学術集会・総会、広島、2007年11月28-30日
 20. 嶋根和毅、泉和樹、児玉栄一、大石真也、藤井信孝、松岡雅雄：T-20 誘導體の抗 HIV 効果：第21回日本エイズ学会学術集会・総会、広島、2007年11

月 28-30 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

「中和抗体の治療応用に関する基礎研究」

分担研究者: 松下修三(熊本大学エイズ学研究センター 病態制御分野 教授)

研究要旨

我々は、臨床開発中の単クローン抗体 KD-247 を用いて、臨床分離株に中和エスケープ変異を導入し、gp120 の V2 の変異が、抗 V3 抗体の中和抵抗性に関与することを報告した(Shibata J. et al., J. Virol. 81:3757-3768,2007)。我々は、また、一人の HIV 感染・長期非進行症例から 20 種類の中和単クローン抗体を分離した。V3 抗体が 6 種、CD4bs が 5 種類、CD4i が 4 種類、どれにも分類されないものが 5 種類であった。これらのうち、実験室株に対して中和活性を示すものについて、臨床分離株やワクチン開発のスタンダードパネルに対する活性を調べた結果、広範囲の分離株に反応する V3 抗体と CD4bs 抗体が相補的に作用することを見出した。一方、V3 抗体と CD4bs 抗体は、相乗的に JR-FL 株の増殖を抑えた。

A. 研究目的

HIV-1 のエンベロープ蛋白である gp120 は中和抗体の主要な標的である。gp120 に反応する中和抗体はループ構造を作る第 3 可変領域(V3 loop: V3L)に反応する V3 抗体、CD4 結合部位に反応する CD4bs 抗体(CD4 binding site antibody)、可溶性 CD4 分子(soluble CD4:sCD4)存在下に反応性が増強する CD4i 抗体(antibodies to CD4 induced epitope)に分類されている。現在、効果的な中和抗体を誘導することを目的としたワクチン候補の探索が行われているが、いまだに多くの HIV 株に対して中和活性を示す抗体の誘導は報告されていない。そればかりか、どのような中和抗体を誘導すべきかさえいまだ明らかでない状況である。一方、一般的な HIV-1 感染症例では、中和抗体活性は低力価であることが知られているが、長期非進行症例(long-term non-progressors; LTNP)の中には、広範囲のウイルス株に対し強力な中和抗体活性を持つ症例がある。今回我々はこのような症例から多数の B 細胞を樹立し、単クローン抗体を精製しそれらの交差中和活性を検討した。これら抗体の解析を行うことにより、どのような抗体が in vivo での感染抑制機構を担ってい

るか明らかになり、中和抗体誘導型ワクチンの開発を含めた抗体療法の可能性を明らかにできる。

B. 研究方法

(1)中和単クローン抗体の作製

広範囲なウイルス株に対して、中和活性を有する一人の LTNP より、末梢血単核球(peripheral blood mononuclear cell; PBMC)を分離した。得られた PBMC から Dyna-beads イムノマグネットを用いて CD8 陽性細胞を除去した。△CD8 PBMC 5×10^6 に対し、B95-8 の培養上清 50%を含む培地(15%FBS 含有 RPMI1640)2ml に浮遊し、12~18 時間培養した後、1 well あたり 1×10^4 以下となるように、96well culture plate (Falcon) に分注し、さらに 37°C、5%CO₂ で培養した。7~10 日ごとに培地を交換しながら、B 細胞株を増殖させた。増殖する細胞の培養上清を回収し、後述の“gp120-capture ELISA”にて gp120 特異抗体産生の有無を確認した。スクリーニングで繰り返し陽性と判断されるクローンに関しては、正常人の PBMC に X 線照射した細胞をフィーダーとして、限界希釈法にてクローニングし、抗 gp120 活性をもつ抗体産生細胞を分離した。必要であればクロー