

分担研究報告書

ヒト免疫系の遺伝的多型を考慮した耐性変異パターン予測法の研究

分担研究者 上野貴将 熊本大学エイズ学研究センター 准教授

研究要旨

HIVは常にヒト免疫系の淘汰圧にさらされている。しかしながら、薬剤による淘汰圧と免疫系による淘汰圧の相互の関連性は明らかにされていない。今年度は、細胞傷害性T細胞(CTL)による宿主免疫系が HIV の進化と複製に与える影響を解析した。病原性因子である Nef の機能性領域に対する HLA-B35 拘束性の CTL 応答によって、HLA-B35 を持つ HIV 感染者ではこの領域に CTL から逃避する変異が選択されていた。これらの変異は、Nef による HLA クラス I 分子の発現低下や HIV 複製の増強作用を減弱化させた。以上のことから、ヒト CTL 応答は HIV に強い淘汰圧を与えることが明らかとなった。

A. 研究目的

本研究は、3年間の計画で、薬剤耐性 HIV の発生に対して、ヒト免疫系の選択圧がどのように関わるかを解析することを目的とする。薬剤と免疫系は互いに異なるメカニズムでウイルスに作用する。一方、両者は HIV に対する選択圧として見ると、相互に関連する要因と予想されるが、その詳細は分かっていない。本年度の研究では、細胞傷害性T細胞(CTL)の選択圧の特性を明らかにするために、HIV 感染者の検体を用いて、CTL 応答が HIV の複製と HIV 蛋白質の機能に与える影響を解析した。

B. 研究方法

さまざまな病態にある HIV 感染者（表1）から提供していただいた血液検体（国立国際医療センター・岡先生および瀧永先生の協力の下）から、血漿（ウイルス RNA の抽出）と血球（CTL の解析）を調製した。同時に血球の一部を用いて、HLA クラス I 遺伝子タイピングを行った(HLA 研究所)。

（倫理面への配慮）

HIV 感染者から供与いただいた検体を用いた研究に関しては、関連する機関（熊本大学および国立国際医療センター）の倫理審査会の審議を受け、承認を得ている。また、HLA 遺伝子タイピングについては、ヒト遺伝子解析に関わる研究として、同じく関連機関の倫理審査委員会の審議を受け、承認されている。

どちらの場合も、提供者の文書による承諾と個人情報の保護に万全を期すことを含め、承認を受けた研究計画に厳密にしたがって遂行した。

表1 Summary of HLA-B35⁺ subjects used in this study

Pts	HLA class I allele	Months since seroconversion	Viral load (log ₁₀ IU/ml)	CD4 (mm ³)	Antiretroviral therapy	Nef sequence	PSMTC availability
001	A2402/A2603, B3501/B4002	132	ND	227	+	RPOVFLARHT E	-
		192	3.9	223	+	EPOVFLARHT Y	+
003	A2402/A2601, B3501/B6101	72	ND	480	-	RPOVFLARHT E	-
		144	ND	252	+	EPOVFLARHT Y	+
008	A24/A26, B35/B62	48	ND	102	+	RPOVFLARHT E	-
015	A11/A24, B35/B64	147	BD	383	+	EPOVFLARHT Y	+
016	A26/A33, B35/B44	7	ND	43	-	RPOVFLARHT Y	-
017	A24/A24, B35/B48	192	BD	254	+	EPOVFLARHT Y	-
019	A2402/, B3501/B6201	18	4.7	524	-	RPOVFLARHT E	-
		80	BD	1574	+	EPOVFLARHT Y	+
025	A24/A31, B35	26	ND	50	+	EPOVFLARHT Y	-
027	A24/A26, B35/B44	4	ND	84	+	RPOVFLARHT E	-
033	A2027/A3101, B3501/B4801	72	5.3	326	-	EPOVFLARHT Y	+
034	A2402/A2601, B3501/B4801	48	4.4	201	-	EPOVFLARHT Y	+
042	A24/A31, B35/B60	59	3.8	311	-	RPOVFLARHT Y	+
046	A2, B35/B61	48	BD	263	+	EPOVFLARHT Y	+
069	A2402/, B3501/B61	12	3.9	984	-	RPOVFLARHT E	+
100	A2601/, B3501/B4001	16	5.0	614	-	RPOVFLARHT E	+
102	A2402/A206, B3501/B0702	17	2.8	482	-	RPOVFLARHT E	+
131	A2402/A207, B3501/B4801	10	1.9	563	+	RPOVFLARHT E	+
136	A2402/A2601, B3501/B6201	15	4.4	308	-	RPOVFLARHT E	+
141	A0201/A3101, B3501/B6401	10	5.3	382	-	RPOVFLARHT Y	+
		20	5.1	360	+	RPOVFLARHT E	+
145	A0207/A2601, B3501/B6101	6	BD	645	-	RPOVFLARHT Y	-
		18	4.8	685	-	RPOVFLARHT Y	+
161	A2402/A2601, B3501/B6401	13	2.3	955	-	RPOVFLARHT E	+
168	A2601/, B3501/	5	2.3	408	+	RPOVFLARHT Y	+
178	A2601/A3101, B3501/B4801	8	2.7	568	+	RPOVFLARHT Y	+

ND, not determined; BD, below detection limit

C. 研究結果

(1) 宿主の HLA アリルに関連した HIV 遺伝子変異の検索

CTL 応答は HLA クラス I アリルによって拘束されるため、CTL の選択圧が HIV に働くとすれば、その変異は宿主の HLA-I アリルに依存すると予想される。Nef 中央領域の

免疫原性の高い領域(75から85番目のアミノ酸)を、データベースで検索すると、70%以上は RPQVPLRPMTY という配列(以降、野生型配列と呼ぶ)を持つが、75番がRからT、あるいは85番がYからFとなった変異体がそれぞれ約5%ずつ存在する(図1A)。多くの日本人 HIV 感染者(69サンプル)から分離した HIV の配列を調べたところ、HLA-B35を持たない患者群では、データベースの場合とほぼ同様の HIV 変異分布を示した(図1A)。一方、HLA-B35を持つ患者群では著しく異なった変異分布を示し、R75TあるいはY85F変異がほぼ半数ずつであった(図1A)。興味深いことに、両方の変異を同時に持つ変異型ウイルスは非常に稀であった(データベース上で443個中1クローンのみ)。

HLA-B35陽性者のうち、野生型あるいはR75T、Y85F変異を持つ群についてさらにその特徴を調べたところ、R75T変異は慢性感染者で、Y85F変異は急性期の感染者で有意に多く選択されることが分かった(図1B)。このことは、CTLの選択圧が両群で異なる(あるいは経時的に推移する)ことを示唆している。しかしながら、こうして見出された変異パターンが感染者群の違いという横断的解析結果を表すものなのか、あるいは個々の感染者で経時的に変化する因子を集積した結果を反映しているのか、不明である。この点を明らかにするために、3名の感染者(001, 003, 019)について、HIV遺伝子型を経時的に解析したところ(表1)、個々の個体内でY85FからR75T変異へ推移(2個のアミノ酸変化を伴う)することがわかった。さらに、019患者より長期に渡って経時的に採取した検体を用いて、HIV遺伝子の系統樹解析を行ったところ、R75T変異は、Y85F変異体とは別の系統にある変異群から新たに選択されたことが明らかとなった(図1C)。このことは、これまで考えられていた以上にHIV変異の獲得メカニズムがダイナミックであることを示唆する。すなわち、CTLの選択圧が変化すると、個々のHIV感染者内に蓄積された非常に多くのHIV変異型プールから新しい環境に適した変異株が新たに選択されて増殖すると考えられる。

(2) CTL 応答の解析

HLA-B35陽性のHIV感染者検体を用いて、HLA-B35拘束性、Nef特異的なCTL応答の解析を行った。その結果、互いに相重なる2つの抗原ペプチド{VY8 (VPLRPMTY)とRY11 (RPQVPLRPMTY)}に特異的なCTL応答が、HIV感染者で強く誘導されていることがわかった(データ未掲載)。興味深いことに、VY8特異的CTLは急性感染期の感染者で多く見られるが、逆にRY11特異的CTLは慢性期に認められた。また、変異ペプチドや変異型HIVを用いてCTLの抗原認識を解析したところ、Y85F変異とR75T変異は、それぞれVY8およびRY11特異的CTLから逃避する変異と分かった(データ未掲載)。

(3) CTL によって選択された変異が Nef の機能に与える影響

Y85F変異とR75T変異は、PxxPと呼ばれるNefの機能性領域に位置している。これらの変異がNefの機能に与える影響を解析した。野生型および変異型HIV分子クローンを作成し、HIV陰性のボランティアから調製したCD4陽性T細胞に感染させた。感染4日後に細胞を回収して、表面抗原(CD4とMHCクラスI分子)と細胞内p24Agを染色し、フローサイトメトリーによって解析した(図2A)。同様の実験を4人のHIV陰性ボランティアから調製したCD4陽性T細胞を用いて測定し、その結果を統計学的に評価した(図2B)。その結果、両方の変異を持つNefは明らかにMHC-I発現低下能力が低くなっていた(つまりHIV感染細胞上のMHC-Iが多い)。一方、CD4発現低下能力にはどの変異体でも差が認められなかった。このことは、CD4発現低下に関わる責任領域はPxxPではなく、NefのC末端側にあるというこれまでの報告とよく一致していた。

次にこうしたNef変異体によるMHC-I発現低下作用の差が、実際にHIV感染細胞に対するCTLの認識および細胞殺傷作用の違いとして反映されるか検討した。実験に用いた変異ウイルスは、NefのPxxP領域にのみ変異を持つため、PolやEnv、Nefの他の領域のアミノ酸配列は同一である。そこでPolやEnvあるいは拘束性の異なるNef特異的CTLをエフェクターとして、HIV感染細胞

に対する殺傷力を測定した(図 2 C)。その結果、Nef に Y85F 変異と R75T 変異を持つウイルスに感染した細胞は Pol や Env 特異的 CTL に殺されやすいことが分かった。したがって、この変異体は、生体内では CTL の選択圧に対して不利に働き、淘汰されてしまうと考えられた。

D. 考察

50 人を超える日本人 HIV 感染者から分離した HIV の遺伝子配列を統計学的に解析することによって、Nef 機能性領域の変異が感染者の HLA-I アリル多型性に依存することを見出した。さらに、個々の感染者より経時的に分離した HIV の遺伝子配列解析から、Nef 遺伝子の個体内での経時変化もまた感染者の HLA-I アリルに依存することを明らかにした。個体内あるいはある限られたヒト集団内での HIV の進化を考える上で、HLA-I などのヒトゲノム多型性の寄与を考慮に入れる必要性が改めてクローズアップされる。

HIV に対する CTL 応答がこれまで考えられてきた以上にダイナミックで、HIV 感染症の進行とともに日々変化するものであることが明らかとなった。我々が別の研究として検討した結果では、急性期に現れる VY8 特異的 CTL の方が、慢性期に現れる RY11 特異的 CTL よりも抗ウイルス活性が高いことが分かってきた(未発表データ)。このように、同一個体内においても HIV の進化と複製能、CTL の抗原特異性と抗ウイルス活性はすべて互いに影響しあいながらダイナミックに推移することが分かった。たとえば慢性 HIV 感染者に対する治療ワクチンを考える折には、長期的な視野にたった CTL 活性化と抗原特異性の変化を考慮に入れて行かなければいけない。

Nef に対する CTL 応答が HIV に強い選択圧として働くことから、免疫応答あるいは薬剤によって Nef の機能を抑制することは、新たな HIV 感染制御法となるかもしれない。特に Nef の HLA-I 発現低下作用は生体内で HIV が複製し、感染を維持するために必須な機能であることが分かった。新たな取り組みが期待される。

E. 結論

CTL による選択圧が HIV の進化に大きく寄与することが明らかとなった。CTL 応答は、多型性の HLA クラス I アリルに拘束されていることから、HIV の進化は感染者のゲノム多型性に依存する。もし薬剤選択圧と免疫選択圧に明らかな相互作用あるいは相乗作用があるならば、感染者のゲノム多型性(あるいは日本人などのある限られた集団中の多型性頻度)は薬剤耐性変異の獲得に何らかのインパクトを与えるはずである。この点を来年度以降の課題としたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) T. Ueno, C. Motozono, S. Dohki, P. Mwimanzi, S. Rauch, O. T. Fackler, S. Oka, M. Takiguchi (2008) CTL-mediated selective pressure influences dynamic evolution and pathogenic functions of HIV-1 Nef. *J. Immunol.* 180, 1107-1116

2) T. Ueno, Y. Idegami, C. Motozono, S. Oka, M. Takiguchi (2007) Altering effects of antigenic variations in HIV-1 on antiviral effectiveness of HIV-specific CTLs. *J. Immunol.* 178, 5513-5523

2. 学会発表

1) T. Ueno, C. Motozono, S. Dohki, P. Mwimanzi, S. Rauch, O. T. Fackler, S. Oka, M. Takiguchi: CTL-mediated selective pressure influences dynamic evolution and pathogenic functions of HIV-1 Nef. AIDS Vaccine Conference, Aug. 20-23, 2007, Seattle, WA. U.S.A.

2) 上野貴将、本園千尋、道木佐知、岡慎一、滝口雅文: HIV Nef の病原性機能維持と宿主免疫淘汰圧、ワークショップ「免疫不全とウイルス感染症」第 55 回日本ウイルス学会学術集会、札幌コンベンションセンター、2007 年 10 月 21-23 日

G. 知的財産権の出願・登録状況なし。

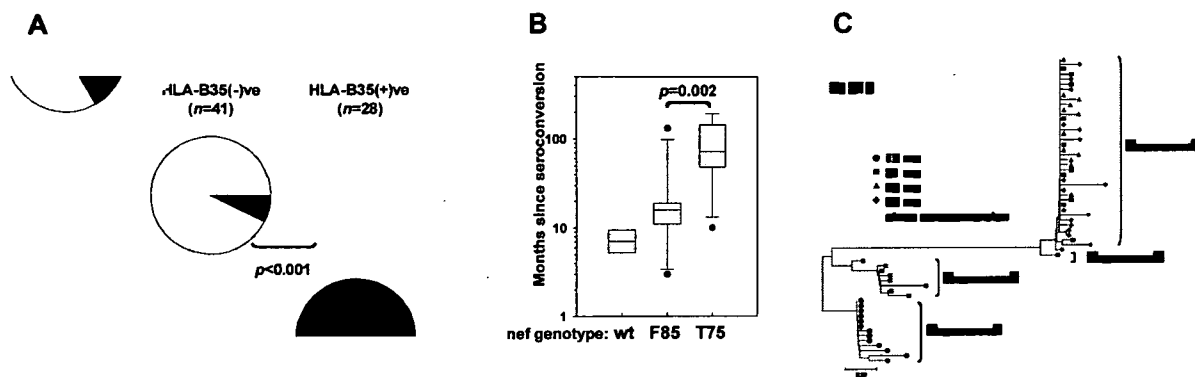


图 1. Dynamic evolution of autologous Nef sequences in HIV-infected individuals expressing HLA-B 35.
(A) Frequency of clones representing the HIV-1 Nef amino acid sequence at the RY11 epitope region as indicated in pie charts, based on the results from the Los Alamos database (left). The frequencies of individuals whose autologous viruses had the Nef amino acid sequences indicated when the plasma samples were collected from HIV-infected individuals negative (middle) or positive (right) for HLA-B*35 are shown. **(B)** Differences in the duration of HIV infection (months since seroconversion) and the autologous nef genotypes, wild type, Tyr85Phe (F85) or Arg75Thr (T75) in HLA-B35⁺ patients. Boxes indicate values between 25th and 75th percentiles. Horizontal lines across boxes indicate the median value \pm SD. Lines extend from the box to the highest and lowest values. Data include outliers (closed circles). Statistical analysis was performed by use of the Mann-Whitney test. **(C)** A neighbor-joining phylogenetic tree analysis of intrahost evolution of autologous nef gene. Plasma HIV-1 RNA samples were collected from Pt-19 at the indicated time points. The nef gene segment was PCR-amplified, cloned into a plasmid, and sequenced ($n=61$). The amino acid sequences of the epitopic region are indicated at the right of the tree.

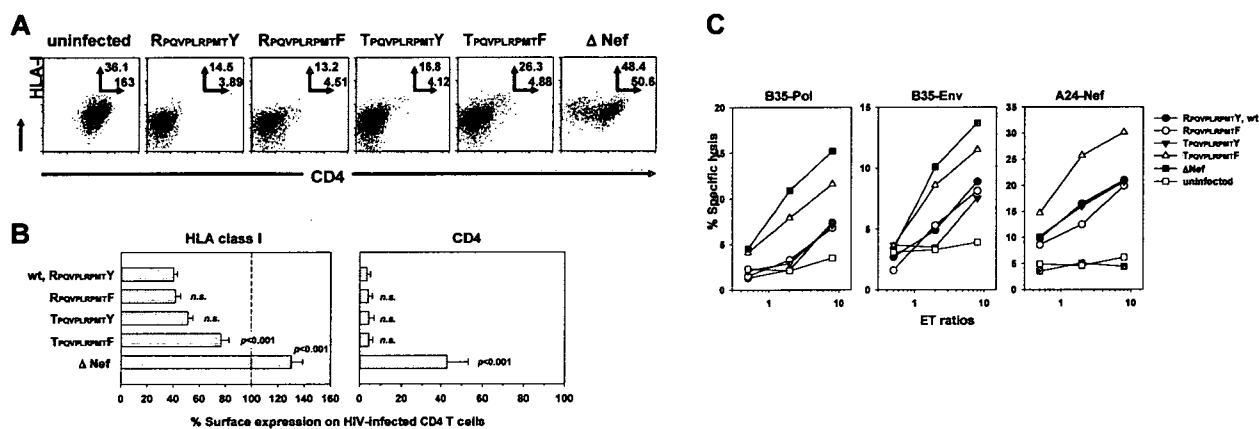


图 2. Functional consequences of CTL escape Nef mutations.
(A) Freshly isolated primary CD4⁺ cells from an HIV-negative donor (HLA-B35⁺) were activated by PHA for 3 days and then infected with wild-type or various variants for 5 days. The cells were stained with anti-HLA-Bw6 mAb (clone: SFR8-B6) and anti-CD4 mAb, and 7-AAD followed by intracellular staining for p24 Ag. In flow cytometric analysis, cells negative for 7-AAD and positive for p24 Ag were gated and analyzed for their fluorescence intensity for HLA-Bw6 and CD4. The frequency of infected cells was 29.6, 34.3, 30.5, 31.9, and 26.2 % for HIV-1 wild type, RF, TY, TF, and DNeF variants, respectively. The MFI values for HLA-Bw6 and CD4 are shown in the right-upper corner of the dot plots. **(B)** The same experiment as above was done by using 3 additional HIV-negative donors. The antibody specific for HLA-I allotypes used was either SFR8-B6 or A11,1M as appropriate for each donor. The MFI level of HLA-I and CD4 on uninfected cells was set to 100% and indicated by the dotted vertical line in the graph. Statistical analysis was performed by ANOVA with multiple comparisons versus wild type. *n.s.*, not significant. **(C)** Primary CD4⁺ cells infected with wild type or various variant HIV-1s (the donor carries both HLA-A*2402 and HLA-B*3501) were used as target cells for cytolysis by CTL clones specific for HLA-B3501-restricted Pol (Pol273-282: VPLDKDFRKY), Env (Env77-85: DPNPQEVVL) or HLA-A2402-restricted Nef epitope (Nef138-147: RYPLTFGWCF). An additional experiment using a different blood donor (positive for both HLA-A*2402 and HLA-B*3501) showed similar results.

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

CXCR4 阻害剤耐性 HIV-1 の誘導と解析

分担研究者 村上 努 国立感染症研究所 エイズ研究センター 室長

研究要旨：CXCR4 阻害剤を材料として耐性変異のパターンや耐性機構を解析することにより次世代の治療を考慮した耐性変異パターンを予測する研究を開始した。初年度である h 1 9 年度は、使用を予定した 2 種類の CXCR4 阻害剤 KRH-3955、KRH-3148 の CXCR4 への作用様式を種々の実験によって検討し、その差異を明らかにした。また、これらの薬剤を用いて PM1/CCR5-NL4-3 の感染系による薬剤耐性誘導実験を開始した。

A. 研究目的

本研究では、薬剤耐性 HIV の発生機序とその制御方法に関する基礎研究の班において、新しい作用機序を有する HIV 阻害剤として期待される CXCR4 阻害剤に対する耐性 HIV-1 を誘導し、その耐性変異のパターンや耐性機構を解析することによって、次世代の治療を考慮した耐性変異パターンの予測法を研究する。材料としては、共同研究者（株）クレハが開発した経口吸収性を示す 2 種類の高活性 CXCR4 阻害剤 KRH-3955、KRH-3148 を使用する。この 2 つの薬剤は今年度の研究結果に示すように、CXCR4 への作用様式がやや異なるため、出現する耐性変異パターンも異なることが予想される。

B. 研究方法

CXCR4 阻害剤の各種抗 CXCR4 抗体結合阻害活性は、Molt-4 細胞を on ice で薬剤処理した後細胞を洗浄し、抗体反応後結合した CXCR4 抗体量を FACS にて定量した。CXCR4 阻害剤の SDF-1 α 結合阻害活性は CXCR4 を強制発現させた CHO 細胞を用いて同様の実験を行い、細胞に結合した ¹²⁵I-SDF-1 α の放射活性を測定した。CXCR4 阻害剤との相互作用に影響を与える CXCR4 中のアミノ酸の同定は、主に酸性アミノ酸をアラニンに置換した CXCR4 点変異体を安定発

現させた 293 細胞を使用し、CXCR4 阻害剤が変異 CXCR4 と抗 CXCR4 抗体 12G5 との結合阻害活性に与える影響を測定することによって、阻害剤と相互作用する CXCR4 中のアミノ酸を推定した。AMD3100 耐性 HIV-1 に対する KRH-3955 の抗 HIV-1 活性は標的細胞として MT-4 細胞を使用し測定した。CXCR4 阻害剤耐性 HIV-1 誘導実験は、PM1/CCR5 細胞を標的細胞として、X4 株である NL4-3 を用いて開始した。

（倫理面での配慮）

該当事項なし

C. 研究結果

（1）KRH-3955、3148 の各種抗 CXCR4 抗体結合阻害活性の検討：

KRH-3955、3148 の CXCR4 に対する作用点を明らかにする実験の一つとして、これらの化合物が、各種抗 CXCR4 モノクローナル抗体の CXCR4 への結合を阻害するかを検討した。CXCR4 の N 末端を認識する抗体（A145）、レセプターの細胞外領域（ECL）1 と 2 を認識する抗体（12G5）、ECL2 を認識する抗体（44717）、ECL3 を認識する抗体（A80）の 4 種類の抗体を用いた。KRH-3955 は N 末端を認識する抗体以外の抗体の CXCR4 発現細胞（Molt-4）への結合を強く阻害した。一方、KRH-3148 とコントロールとして用いた CXCR4 阻害剤 AMD3100、AMD070 は、ECL 1 と

2を認識する抗体である12G5の結合は抑制したが、それ以外の抗体結合の阻害は弱いかほとんど認められなかった。なお、3955、3148でCXCR4発現細胞を処理して37°CでインキュベートしてもA145の結合量が変化しないことから、これらのCXCR4阻害剤にはCXCR4をダウンモジュレートする活性はないことも明らかになった(図1)。

(2) KRH-3955、3148のSDF-1a結合阻害活性の検討:

CXCR4を強制発現させたCHO細胞を用いて¹²⁵I-SDF-1aの結合に対するKRH-3955、KRH-3148の阻害活性をコントロールとして使用したCXCR4阻害剤AMD3100、AMD070とともに検討した。KRH-3955、KRH-3148、AMD3100、AMD070のSDF-1a結合に対するIC₅₀(nM)はそれぞれ、0.8、2.2、281.1、3.7であった。KRH-3955、KRH-3148のIC₅₀値は、MT-4細胞にHIV-1IIIIBを感染させる系における化合物のEC₅₀値によく対応していた。一方、AMD3100のSDF-1a結合阻害活性はHIV-1複製阻害活性より顕著に弱く、AMD070のそれは逆にやや強かった(図2)。

(3) CXCR4阻害剤との相互作用に影響を与えるCXCR4アミノ酸の同定:

CXCR4の細胞外領域、膜貫通領域と推定される中で細胞外領域に近接する領域に存在する主に酸性アミノ酸をアラニンに置換した点変異体を作製し293細胞に導入して安定発現株を樹立した。CXCR4阻害剤が変異CXCR4と抗CXCR4抗体12G5の結合阻害活性に与える影響を測定することによって、阻害剤と相互作用するCXCR4中のアミノ酸を推定した。その結果、KRH-3955はAsp²⁶²、His²⁸¹と、KRH-3148はAsp¹⁷¹、Asp²⁶²、His²⁸¹、Trp²⁸³と相互作用すると推定された(図3)。文献で報告されているAMD3100と相互作用するアミノ酸はAsp¹⁷¹、Asp²⁶²であり、KRH-3955、KRH-3148のそれらと一部重なっていることが判明した。

(4) AMD3100耐性HIV-1に対するKRH-3955の抗HIV-1活性:

鹿児島大・馬場先生より分与していただいたAMD3100耐性HIV-1(JVI, 73, 1719, 1999)を使用して、AMD3100、AMD070、KRH-3955、T22の抗ウイルス活性を比較した。その結果、AMD3100耐性ウイルスはT22の場合とは異なり、KRH-3955に対して部分的に交叉耐性を示した(図4)。この結果は(3)のCXCR4変異体を用いた実験から得られた薬剤と相互作用するレセプターのアミノ酸残基の一部オーバーラップの結果とよく一致している。

(5) CXCR4阻害剤耐性HIV-1誘導実験:

PM1/CCR5細胞(共同研究者 熊本大・前田先生分与)を標的細胞として、NL4-3を親株とした薬剤耐性株誘導実験を2007. 10. 11に開始した。実験開始時の薬剤濃度はEC₅₀よりやや低い濃度に設定し、ほぼ4日おきに1:5に培養物を継代した。ウイルス感染によるCPEが培養全体に観察されるようになった時点で薬剤濃度を1.5倍上昇させた。なお、コントロールとして薬剤無添加での感染細胞の継代培養(この場合は、CPEでほぼ完全に細胞が死滅するので培養上清のみを継代した)も併行して行っている。2008年1月下旬の時点で、各薬剤のEC₅₀の数倍の薬剤濃度においてもCPEが出現し始めている(データ省略)。

D. 考察

KRH-3955、3148はどちらも経口吸収性を有する強力なCXCR4阻害剤であり、X4 HIV-1の複製阻害剤である。SDF-1a結合阻害はどちらの薬剤もその抗HIV-1活性とほぼ同程度の阻害活性を示したが、抗CXCR4抗体の阻害パターンやCXCR4変異体を用いた実験から示された相互作用するCXCR4中のアミノ酸では明らかな差異が認められた。したがって、耐性誘導実験において出現する耐性変異パターンも異なることが予想される。

E. 結論

2種類の CXCR4 阻害剤 KRH-3955、3148 についてその CXCR4 への作用様式を種々の実験によって検討し、その差異を明らかにし、これらの薬剤を用いて耐性誘導実験を開始した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) T. Murakami, and N. Yamamoto. AIDS: How do we overcome this social or biodisaster?

The Journal of Disaster Research 2 (2): 71-80, 2007

2) T. Murakami. Roles of the interactions between Env and Gag proteins in the HIV-1 replication cycle. Microbiol. Immunol. In press.

2. 学会発表

1) K. Miyakawa, T. Murakami, Y. Ohsaki, J. Komano, T. Fujimoto, and N. Yamamoto. Analysis of interaction between HIV-1 Gag and TIP47, and its associated proteins. May 22-27 2007, Retroviruses, Cold Spring Harbor, N. Y., USA.

2) T. Aoki, S. Shimizu, U. Emiko, Y. Futahashi, M. Hamatake, K. Terashima, T. Murakami, N. Yamamoto and J. Komano. Rerouting the plasma membrane targeting of HIV-1 and MLV Gag by replacing myristoylation signal with membrane proteins. May

22-27 2007, Retroviruses, Cold Spring Harbor, N. Y., USA.

3) K. Miyauchi, R. Curran, E. Matthews, J. Komano, T. Murakami, N. Yamamoto, D. M. Engelman, Z. Mastuda The specific phase of membrane-spanning helix of HIV-1 gp41 is critical for intracellular transport of Env. May 22-27 2007, Retroviruses, Cold Spring Harbor, N. Y., USA.

4) 齊 暁華、齊藤達哉、山口一成、内藤誠之郎、吉仲由之、山本典生、村上 努、山岡昇司、山本直樹。Fucoidan activates HIV-1 replication in latently infected cells. 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

5) 青木 徹、清水佐紀、浦野恵美子、二橋悠子、濱武牧子、玉村啓和、寺島一夫、村上 努、山本直樹、駒野 淳。Gag タンパク質の形質膜輸送シグナルがミリストイル化であることのウイルス学的意義について第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会、広島、2007 年 11 月 28-30 日

6) 青木 徹、清水佐紀、浦野恵美子、二橋悠子、濱武牧子、玉村啓和、寺島一夫、村上 努、山本直樹、駒野 淳。レトロウイルス Gag 細胞膜の Vps 依存的ルート変換がもたらすウイルス複製後期過程における Gag 機能への影響: Gag ミリストイル化のウイルス学的意義 第 30 回日本分子生物学会年会、横浜、2008 年 12 月 11-15 日

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

該当事項なし

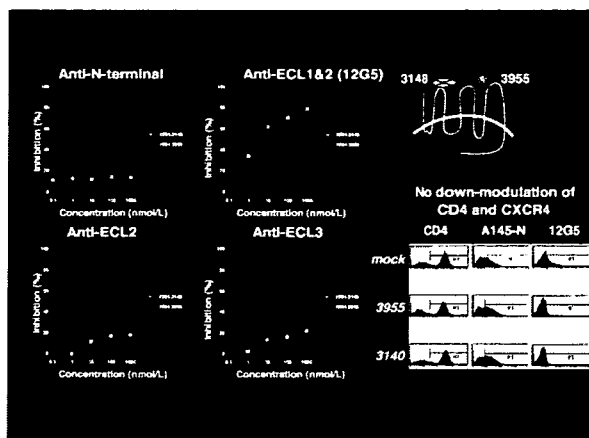
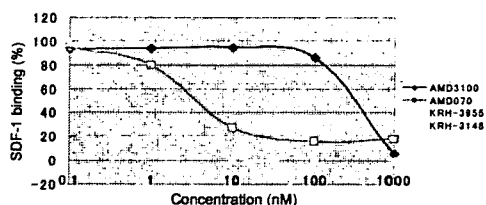


図 1. KRH-3955、3148 の各種抗 CXCR4 抗体結合阻害活性



SDF	AMD3100	AMD070	KRH-3955	KRH-3148
IC50 (nM)	281.1	3.7	0.6	2.2
HIV set-point	AMD3100	AMD070	KRH-3955	KRH-3148
EC50 (nM)	4.5	14.8	0.2	2.2

図 2. KRH-3955、3148 の SDF-1 α 結合阻害活性の検討

	V89A	H112A	D171A	D282A	E277A	H281A	W283A	E288A/L290R
KRH-3955	-	-	-	**	-	**	-	-
KRH-3148	-	-	**	***	-	**	**	-

	V112A	D181A	H203A	E275A	V280A	I284A
KRH-3955	-	-	-	-	-	-
KRH-3148	-	-	-	-	-	-

12G5 inhibitory effect +++ > ++ > + > -

KRH-3955: Asp²⁸², His²⁸¹と相互作用

KRH-3148: Asp²⁸², His²⁸¹, Asp¹⁷¹, Asp¹⁷²と相互作用

AMD3100 : Asp²⁸², Asp¹⁷¹と相互作用 (Mol Pharmacol 66:164-173, 2001)

図 3. CXCR4 阻害剤との相互作用に影響を与える CXCR4 アミノ酸の同定

	EC ₅₀ (nM)		(MT-4)	
	AMD3100	AMD070	KRH-3955	T22
NL4-3	76 (1)	20 (1)	0.74 (1)	158 (1)
AMD3100 ^R HIV-1	2789 (37)	810 (41)	14 (19)	447 (2.8)

AMD3100耐性 HIV-1(鹿児島大・馬場先生)

図 4. AMD3100 耐性 HIV-1 に対する KRH-3955 の抗 HIV-1 活性

分担研究報告書

Atazanavir と lopinavir 治療における耐性変異パターン予測法の研究

分担研究者：西澤雅子（国立感染症研究所 エイズ研究センター）

協力研究者：杉浦 亙（国立感染症研究所 エイズ研究センター）

藤野真之（国立感染症研究所 エイズ研究センター）

研究要旨 atazanavir, lopinavir に対して10倍以上の耐性を獲得していることが予想される症例についてウイルス分離を試みた。その結果、16症例の耐性ウイルスを分離した。これらのウイルスについて atazanavir, lopinavir, amprenavir, darunavir に対する薬剤感受性の評価を行い、測定結果を予測値と比較することにより薬剤耐性の機序について検討を行った。

A. 研究目的

997年に多剤費用療法が行われるようになってから10年経ち使用される治療薬剤は大きく進歩した。長い血中半減期を示し、かつより毒性の低い、耐性変異の獲得しにくいものが開発され切り替わりつつある。本研究では近年用いられるようになったプロテアーゼ阻害剤 atazanavir と lopinavir の薬剤耐性について注目し、その耐性パターンについて解析を計画している。この2剤の薬剤耐性に関しては使用する薬剤耐性評価方法により、その結果が乖離することが知られており、更なる解析が必要である。また両者に対して高度耐性を呈する耐性株の新規薬剤ダルナビルに対する感受性について評価する。

B. 研究方法

①患者HIVの分離培養

国立感染症研究所において薬剤耐性検査を実施した検体のうち、遺伝子検査から atazanavir と lopinavir に対して高度の耐性を示すことが予測されるものを選び出し、ウイルスの分離を行った。予測にはStanford大の薬剤耐性データ・ベースを使用した。ウイルス分離は患者末梢血単各級とPHA刺激正常人末梢血単核球との共培養にて行った。ウイルス分離が成功したウイルスについては感受性検査に持ち込むにあたり再度プロテ

アーゼ領域および逆転写酵素領域の遺伝子配列解析を行い、薬剤耐性変異パターンの確認を行った。

②感受性検査の実施

分離ウイルスの薬剤感受性を独自に開発したレポーター細胞MaRBLE細胞を用いて評価した。MaRBLE細胞 1×10^6 に対して各ウイルス100TCID₅₀相当を感染させ、各薬剤を0.0001～1 μMの濃度で添加し、7日目にレポーターであるfirefly-luciferaseの活性を測定した。atazanavir と lopinavir 以外 amprenavir そして昨年12月に認可された darunavir についても同様に感受性検査を実施した。

（倫理面への配慮）

本研究で実施している薬剤耐性症例の解析は感染症研究所研究倫理委員会において承認されている（平成19年8月21日、受け付け番号121）。また薬剤耐性遺伝子検査および感受性検査の実施について提供者の同意を得ている。

C. 研究結果

ウイルス分離の結果、表1に示す16株の分離に成功した。

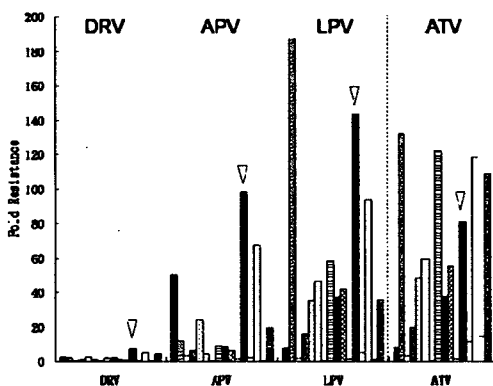
表1. PI耐性HIV臨床分離株一覧

ID	予測感受性レベル			
	DRV	LPV	APV	ATV
795	Low	Intermediate	Intermediate	High
1120	Intermediate	Intermediate	Intermediate	High
1185	Low	Low	Potential Low	Intermediate
1673	Intermediate	Intermediate	High	High
1745	Intermediate	Intermediate	High	High
1762	Low	Intermediate	Intermediate	Intermediate
1777	Low	Low	Intermediate	Intermediate
2510	Low	Intermediate	Intermediate	Intermediate
2523	Intermediate	Intermediate	High	High
2699	Low	Intermediate	Intermediate	Intermediate
2735	Intermediate	Intermediate	High	High
3029	Intermediate	High	High	High
6174	Low	Low	Intermediate	Intermediate
6175	Intermediate	High	High	High
6189	Susceptible	Potential Low	Potential Low	Intermediate
6190	Intermediate	Intermediate	High	High

表1に示す各薬剤の感受性レベルはStanford大学のデータ・ベースを用いて予測したものである。Stanford大学の予測はHigh resistance (H)、Intermediate (I)、Low (L)、Potential Low (PL)、Susceptible (S)の5段階で評価されるが、16症例のatazanavir感受性はH:9例、I:7例、L:0例、P:0例、S:0例、lopinavir感受性はH:2例、I:10例、L:3例、P:1例、S:0例、amprenavir感受性はH:7例、I:7例、L:0例、P:2例、S:0例、darunavir感受性はH:0例、I:8例、L:7例、P:0例、S:1例であった。

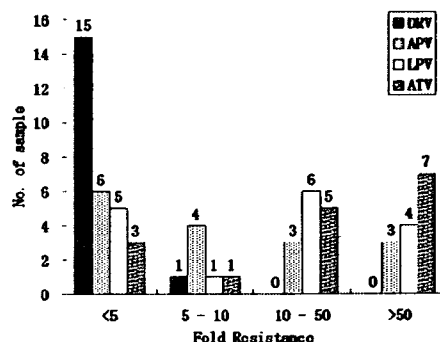
これらについて感受性を評価した結果(図1, 2)、分離した16株のウイルスで5-10、10-50倍、50倍以上の耐性を示した株はATVで1、5、7株、LPVで1、6、4株、APVで4、3、3株そしてDRVでは1、0、0株であった。

図1 臨床分離株の各PIに対する感受性



DRVで5-10倍の耐性を呈した1株(図1▽)はAPV、LPV、ATVに対して高度の耐性を呈した。対照的にAPV、LPV、ATVに対して10倍以上の耐性を示した臨床分離株の其々83%、90%、92%がDRVに対して感受性(5倍以内の耐性)を呈した。

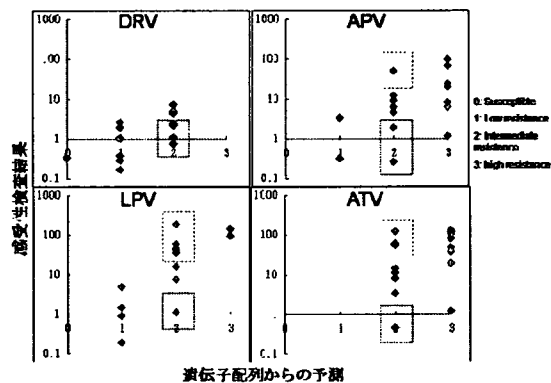
図2 臨床分離株の各PIに対する感受性



D. 考察

感受性検査の結果をStanford大学のデータ・ベースと比較した結果(図3)、概ね一致を示した一方で幾つかの症例はintermediateと評価されながら、実際の測定では高度耐性を呈したもの(破線)、反対に高度あるいは中等度耐性と評価されながら実測では低い耐性度を呈したもの(点線)が認められた。

図3 感受性測定結果と遺伝子配列から予想された感受性レベルとの相関



このうち予測評価より高い耐性度を呈した株については、その機序についてGag、env領域を含めたより詳細な解析が必要であると考えられた。また評価より低い耐性を呈したものについては分離株のクローニングを行い、その多様性を調べ、感受性の低い株の混入の可能性について探る必要があると考えられた。次年度はプロテアーゼの分子内およびプロテアーゼとGagの分子間における相互関係の有意性についてリコンビナントウイルスを作成してin vitroで検証を行うとともに構造学的な視点からも解析を行うことを計画している。今回の解析結果からは新規薬剤ダルナビルが他の3剤に対して耐性を獲得した症例の

90%以上に対して有効であることが明らかになった。

E. 結論

遺伝子解析から得られた薬剤耐性情報と実際の *in vitro* の感受性を比較することにより、atazanavir、lopinavir、amprenavirそして darunavir 各々の薬剤耐性発現機序についての解析に取り組んだ。平成 19 年度は患者ウイルスからの解析検体の分離とその感受性評価に取り組んだ。次年度以降は各ウイルスの Gag 領域等についての解析を行い、薬剤耐性変異を獲得したプロテアーゼとの相互作用についての解析を進めることを計画している。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) J Shibata, F Ren, M Nishizawa, M Fujino, Y Iwatani, M Matsuda, H Miura, H Tanaka and W Sugiura.: Interference between Gag non-cleavage site mutation P453L and HIV-1 protease non-drug resistance mutation E35D. *Antiviral Therapy*. 12(1):S143, 2007
- 2) Okuma K, Tanaka R, Ogura T, Ito M, Kumakura S, Yanaka M, Nishizawa M, Sugiura W, Yamamoto N, Tanaka Y.: Interleukin-4-Transgenic hu-PBL-SCID Mice: A Model for the Screening of Antiviral Drugs and Immunotherapeutic Agents against X4 HIV-1 Viruses. *J Infect Dis*. Jan 1;197(1):134-41, 2008
- 3) Chiba-Mizutani T, Miura H, Matsuda M, Matsuda Z, Yokomaku Y, Miyauchi K, Nishizawa M, Yamamoto N, Sugiura W.: Use of new T-cell-based cell lines expressing two luciferase reporters for accurately evaluating susceptibility to anti-human immunodeficiency virus type 1 drugs. *J Clin Microbiol*. 45(2):477-87, 2007
- 4) Makiko Hamatake, Masako Nishizawa, Naoki Yamamoto, Shingo Kato, Wataru Sugiura.: A simple competitive RT-PCR assay for quantitation of HIV-1 subtype B and non-BRNA in plasma. *J Virol Methods*.142:113-117,2007
- 5) Afework Kassu, Masayuki Fujino,

Masakazu Matsuda, Masako Nishizawa, Fusao Ota, Wataru Sugiura.: Molecular Epidemiology of HIV-1 in Treatment Naïve Patients in North Ethiopia, *AIDS Research and Human Retroviruses*, 23(4):564-568, 2007

6) 西澤雅子、杉浦 互: 薬剤耐性 HIV の抱える諸問題: Considerable Issues of Drug Resistance. *The Journal of AIDS Research*. 9(3):197-201, 2007

2. 学会発表

7) J Shibata, F Ren, M Nishizawa, H Tsang, Y Iwatani, M Matsuda, H Miura, H Tanaka, W Sugiura: Gag and Protease Interference Affect Acquisition and Selection of Resistance Viruses in Antiretroviral Treatment Failure Case. 8th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance. Nov.11-14, 2007, USA.

8) 柿澤淳子、松山 翔、大出裕高、星野忠次、大高泰靖、岩谷靖雅、西澤雅子、Rajintha Bandaranayake、Celia A Sciffer、杉浦 互: CRF01_AE とサブタイプ B のプロテアーゼの構造解析. 第 21 回日本エイズ学会学術集会. 2007.11.28-30, 広島

9) 柴田潤子、任 鳳蓉、西澤雅子、藤野真之、松田昌和、岩谷靖雅、杉浦 互、田中 博: 抗 HIV 薬剤投与下における protease と Gag の共進化に関する研究. 第 21 回日本エイズ学会学術集会. 2007.11.28-30, 広島

10) 吉田いづみ、西澤雅子、藤野真之、仲宗根正、岩谷靖雅、長谷川直紀、柴田潤子、杉浦 互、任 鳳蓉、田中 博: HIV-1 env 遺伝子の多様性進化. 第 21 回日本エイズ学会学術集会. 2007.11.28-30, 広島

11) 藤野真之、三浦秀佳、西澤雅子、松田昌和、鈴木寿子、杉浦 互: プロテアーゼ阻害剤耐性 HIV-1 株に対するダルナビルの有効性についての解析. 第 21 回日本エイズ学会学術集会. 2007.11.28-30, 広島

G. 知的財産権の出願・登録状況

1) 特許取得

該当なし

2) 実用新案登録

該当なし

3) その他 該当なし

平成 19 年度厚生労働省科学研究補助金 エイズ対策研究事業
分担研究報告書

研究課題：HIV-1 ゲノムの逆転写および組み込み過程の新規制御機構

分担研究者：増田貴夫（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・免疫治療学分野・准教授）

研究協力者：西辻裕紀（エイズ予防財団・リサーチレジデント）

研究要旨

本研究では、インテグラーゼの新規機能を探る為の、インテグラーゼと相互作用する宿主因子の機能解析から、作用点今後予想されるインテグラーゼ阻害剤に対する耐性変異の対処法のひとつとして、新規作用点を持つ薬剤開発に向けた基礎研究を展開することを目的とする。我々はこれまでに、HIV-1 インテグラーゼに結合し、逆転写過程をサポートする宿主因子を同定し報告した。本研究では、インテグラーゼ Gemin2 との相互作用に関与するドメインの同定を細胞内発現系により検討した。インテグラーゼは Gemin2 の三種（ α 、 β 、 γ ）のイソフォームと結合しうることから三種の共通領域がインテグラーゼの相互作用に重要であること、また、インテグラーゼの C 末端領域に Gemin2 結合に重要なアミノ酸配列を同定した。

A. 研究目的

2007 年 10 月 16 日、HIV 感染症の治療薬としてインテグラーゼ阻害剤（Raltegravir）がアメリカ食品医薬品局（FDA）により HIV 感染症の治療薬として承認された。これまでの逆転写酵素およびプロテアーゼ阻害剤に加えて、あらたな HAART 治療法に組み込まれ、その効果も期待される。しかしながら、米国において認可された Raltegravir を含む、現在臨床試験段階にある他のインテグラーゼ阻害剤はいずれも作用点がストランドトランスファー活性阻害という点で共通している為、交差耐性変異の出現も否定できない。したがって、インテグラーゼの新たな機能作用点の解明は、今後予想される薬剤耐性変異の対処法としても重要課題といえる。本研究では、新規作用点を持つ薬剤開発に向けた基礎研究を展開することを目的とする。

我々が同定した Gemin2 をはじめとする種々の宿主因子とインテグラーゼの細胞内相互作用とそれらの機能を調べるために HIV-1 インテグラーゼの細胞内発現系を確立し、ウイルス複製における機能不全が明確となったインテグラーゼ変異体と比較解析を行った。

B. 研究方法

1) 種々のプロモーターを持つ発現ベクターにインテグラーゼ遺伝子をクローニングし、

HeLa もしくは 293T 細胞に導入後その発現を検討した。

2) Gemin2 アイソタイプの各発現ベクターを構築し、インテグラーゼ発現ベクターとともに細胞内に導入後、免疫沈降法により相互作用を検討した。

3) 種々のインテグラーゼ欠損変異および点変異体も同様に発現させ、免疫沈降法により Gemin2 との相互作用を解析した。

（倫理面への配慮）

倫理面への配慮：該当事項無し。

C. 研究結果

1) CMV プロモータ下流に β グロビンイントロン配列を挿入することによりインテグラーゼのヒト細胞内発現を 10 倍近く向上させることができた。

2) 3 種の Gemin2 アイソタイプはいずれも細胞内でインテグラーゼと相互作用した（図 1）。

3) endogenous に発現している Gemin2 とインテグラーゼの結合もインテグラーゼの C 末端領域がその責任ドメインであることを確認した（図 2）。

4) C 末端点変異体インテグラーゼの解析により Gemin2 との細胞内相互作用に必須なアミノ酸を同定した。

5) ウイルス複製において逆転写過程に影響および変異体（Y15A, K186Q, Δ KRK）は gemin2 との結合能が失われていた（図 3）。

D. 考察

インテグラーゼ細胞内発現系は、これまで評価の難しかった、多量体形成、局在を評価するさいに有用な実験系であると考えられる。逆転写過程に影響するインテグラーゼ変異体と Gemin2 をノックダウンさせた細胞でのインテグラーゼの安定性の低下の相関を認めたが、このことはインテグラーゼの安定的存在が逆転写過程に重要であることを示唆する。以上、本アッセイ系により、インテグラーゼの新規機能と宿主因子の関与が、より明確になるものと期待される。

E. 結論

Gemin2 との細胞内細胞内相互作用に必須な HIV-1 インテグラーゼのドメインおよびアミノ酸を同定した。さらに逆転写過程に影響を及ぼすインテグラーゼ点変異体も Gemin2 との相互作用が失われることを確認した。これらの変異体は Gemin2 結合モチーフの変異体とはことなることから、インテグラーゼの高次構造も Gemin2 との相互作用に重要であることが示された。

F. 健康危険情報

特記すべきこと無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

無し

2. 学会発表

1) 西辻裕紀, 小櫃冨未, 金平舞, 高津哲, 神奈木真理, 増田貴夫 HIV-1 インテグラーゼ結合宿主因子 Gemin 2 はインテグラーゼの安定性に関与する。第 55 回日本ウイルス学会 2007 (札幌)。

2) 鷲山美樹, 西垣一男, 金原秀一, 神澤範行, 西辻裕紀, 増田貴夫, 神奈木真理. 成人 T 細胞白血病 (ATL) 細胞におけるストレスシグナルを介した HTLV-1 発現誘導の解析. 第 55 回日本ウイルス学会 2007 (札幌)。

3) 高塚奈津子, 清水由紀子, 高森絢子, 増田

貴夫, 天笠光雄, 神奈木真理. HTLV-1 感染ラットから樹立された自己反応性 T 細胞の性状. 第 55 回日本ウイルス学会 2007 (札幌)。

4) 林隆也, 古川裕之, 西辻裕紀 1, 増田貴夫, 神奈木真理. マクロファージの HIV-1 感染に対する自然免疫応答の影響. 第 55 回日本ウイルス学会 2007 (札幌)。

5) 清水由紀子, 高森絢子, 宇都宮與, 山野嘉久, 栗原清, 岡村純, 増田貴夫, 神奈木真理. 無症候 HTLV-I キャリアーにおける T 細胞の低応答性. 第 55 回日本ウイルス学会 2007 (札幌)。

6) 古川裕之, 林隆也, 西辻裕紀 1, 増田貴夫, 神奈木真理. マクロファージの TLR 刺激により HIV-1 転写制御. 第 55 回日本ウイルス学会 2007 (札幌)

7) 西辻裕紀, 小櫃冨未, 金平舞, 高津哲, 神奈木真理, 増田貴夫 HIV-1 インテグラーゼ結合宿主因子 Gemin 2 はインテグラーゼの安定性に関与する. 第 21 回日本エイズ学会 2007 (広島)。

8) 増田貴夫 インテグラーゼと相互作用する宿主因子と HIV 複製制御. 第 21 回日本エイズ学会シンポジウム「HIV 増殖とその制御」2007 (広島)。

H. 知的所有権の出願・登録状況

1) 出願中: インテグラーゼ N-末端領域を標的としたウイルス感染阻害剤 (特願 2006-239627)

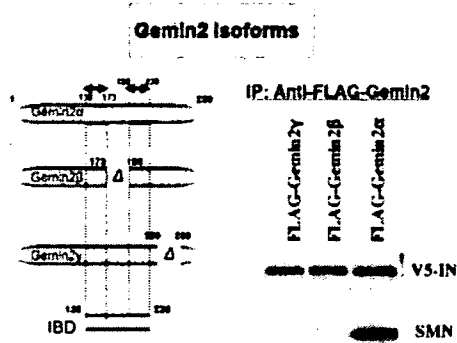


図1 Gemin2 イソフォームとインテグラーゼの相互作用

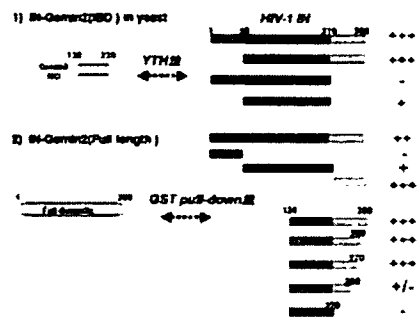


図2 Gemin2とインテグラーゼの相互作用責任ドメインの同定

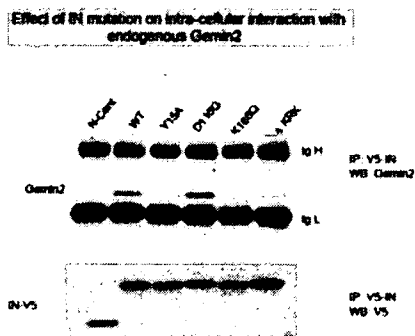


図3 インテグラーゼ変異体と Gemin2 相互作用

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

NF- κ B p65に相互作用する新規蛋白AKIP1の同定とHIV遺伝子発現の促進作用

分担研究者：岡本 尚（名古屋市立大学大学院医学研究科細胞分子生物学）

研究要旨：HIV複製を転写レベルで正に制御する宿主転写因子NF- κ Bは潜伏感染しているプロウイルスからのウイルス複製を促進および誘導ことによってその複製に重要な役割を演じている。NF- κ Bの作用は多数の相互作用因子によって調節もしくは特定の因子と相互作用することによって発揮されており、これらの相互作用因子を同定することによってNF- κ Bの作用と制御の全体像を知ることができる。このことは取りも直さずHIV複製を転写レベルで制御する新しい治療戦略の開発にもつながる。我々は一貫してそのような相互作用因子の同定を進めてきたが、今回はNF- κ Bのp65サブユニットと相互作用するAKIP1を初めて同定した。AKIP1はp65と結合し、そのSer276のリン酸化を促進し、しかもp65およびNF- κ Bの核内での局在を促進し、それらの結果HIVプロウイルスを始めNF- κ B依存性の転写を著しく亢進する。これらの事実は、HIV潜伏感染の維持と破綻の分子機構を解明するための重要な情報を与えた。（本研究内容はGao N., et al.: *J. Biol. Chem.*, 2008.に印刷中である。）

A. 研究目的

これまで我々が主張してきているようにエイズウイルスの複製、特に細胞内に潜伏感染しているプロウイルスからの複製、は宿主の転写制御機構に依存する。潜伏感染細胞からのウイルス複製の活性化には、細胞の転写活性化因子NF- κ Bとウイルスの持つトランス活性化因子Tatによって段階的に制御されている。昨年度の研究では、HIVプロウイルスの潜伏感染の維持に負の転写制御因子AP-4が重要な役割を演じていることを報告した(Imai et al., *J Biol Chem* 281: 12495-12506, 2006)。

今年度は、NF- κ Bの活性を調節している新たな因子AKIP1を発見したので、その詳細を報告する。これまで我々はNF- κ Bのp65サブユニットに相互作用してNF- κ Bの活性を調節している因子の遺伝子クローニングを酵母two-hybrid screeningを用いて進めてきたが、今回の研究では正の調節因子AKIP1を初めて見出した(Gao et al., *J Biol Chem*, 2008, in press)。AKIP1は乳癌や前立腺癌で高発現する蛋白としてすでに見つかっていた(*Biochim Biophys. Acta*, 2004)のものであるが、その後PKAと結合する因子として核に移送させる蛋白であることが分かった(*Proc Natl Acad Sci USA*,

2005)。

他方、NF- κ Bの活性化は細胞内シグナル伝達系によって調節されているが、cAMPによって活性化されるPKAキナーゼはNF- κ B活性化カスケードとは独立した別のシグナル伝達分子である。PKAシグナルによるNF- κ B活性化過程に対する効果としては、相乗的に活性化する(Zhong et al., *Cell* 89: 413-424, 1997; Hayashi et al., *J Biol. Chem* 268: 26790-5, 1993)、あるいは逆に、抑制的に働く(Wang et al., *J Biol Chem* 275: 32592-7, 2000; Takahashi et al. *Eur J Biochem* 269: 4559-65, 2002)という逆の報告が独立にあった。しかし、その理由は不明であり、筆者らもその両方の現象があることを報告している(*J Biol Chem*, 1993; *Eur J Biochem* 2002)。

他方、NF- κ Bの主要サブユニットであるp65がこれらのシグナルによってリン酸化され、転写活性化能が調節されていることが知られている。Zhongら(*Mol Cell* 9: 625-36, 2002)はp65のリン酸化によって転写活性化のコアクチベーターであるp300/CBPがp65と結合して転写活性化が促進されることを提唱し、PKAの触媒サブユニットPKAcがp65と結合することが重要であ

ることを証明している。

我々は p65 と AKIP1 とが結合することを、*in vitro* “pull-down” 法と生細胞内での immuno-precipitation-Western blot 法で証明し、さらに p65 が AKIP1 と結合することにより、NF- κ B の細胞質から核内への移行が促進され、PKAc による p65 の Ser276 のリン酸化が亢進することを明らかにした。また、NF- κ B 依存性転写を行う代表例として HIV-1 LTR を調べたところ、TNF により HIV-1 LTR からの転写が促進する際に AKIP1 を過剰発現させると、その転写がさらに著明に誘導された。しかも、siRNA による AKIP1 ノックダウン実験より、TNF による NF- κ B の活性化に AKIP1 が必要であることを証明した。

(倫理面への配慮)

本研究はすべて培養細胞を用いた実験であり、倫理的規定の対象には該当しない。

B. 方法と結果

1. 酵母 two-hybrid 法 : p65 の N 端の 186 アミノ酸(1-186 aa)領域を Lex A 結合ドメインと融合して“bait”とし、ヒト CD4 陽性 T 細胞 cDNA ライブラリー CEMC7_RP との間で two-hybrid screening を酵母細胞内で行った。対象はおよそ 8000 万個の cDNA クローンであり、その中で 4 個の独立の AKIP1 クローンが見つかった。これらのクローンはいずれも AKIP1 の C 末領域を含むことから、p65 と AKIP1 との結合は p65 の N 末領域と AKIP1 の C 末領域との間で起こることが示唆された。
2. p65 と AKIP1 蛋白との結合 : まず、p65 と AKIP1 との *in vitro* での結合を確認するために、³⁵S-Met 標識した AKIP1 と GST 蛋白または GST 融合 p65N 末(GSTp65N)蛋白を用いた GST pull down アッセイを行った。GSTp65(N)を用いた場合のみバンドが検出され、AKIP1 は p65 と *in vitro* で結合することが確認された。また、N 末もしくは C 末を欠いた AKIP1 の変異体を用いた解析から、AKIP1 は N 末を通じて p65 と結合することが明らかになった。さらに、AKIP1 が *in vivo* でも p65 と結合するかを検討するために、抗 p65 抗体、もしくは抗 FLAG 抗体を用いた IP-Western を行った。AKIP1 は p65 と生細胞内で *in vivo* においても結合し、その結合は PMA 刺激依存性であることが明らかになった。また、その複合体には PKAc も含まれていた。
3. AKIP1 の細胞内局在 : AKIP1 は PKAc と結合し PKAc の核移行を促進することが報告されているため、AKIP1 が p65 に対しても同等の効果を示すかどうか蛍光抗体法を用いて検討した。その結果、PMA 刺激により p65 は核移行するが、AKIP1 強発現により p65 の核内滞留時間が増長し、AKIP1 は p65 の核移行もしくは核排出を調整することが明らかになった。
4. AKIP1 が p65 のリン酸化に与える影響 : AKIP1-p65 の複合体には PKAc が含まれていると示唆されたため、PKAc による p65 Ser-276 のリン酸化に対する AKIP1 の影響を *in vitro* リン酸化アッセイを用いて検討した。基質として GSTp65 (12-317)、もしくは p65 の Ser276 の変異体 GSTp65 (12-317) S276C を用いた。その結果、PKAc による Ser276 のリン酸化は、AKIP1 により増強されることが明らかになった。
5. AKIP が、NF- κ B 依存性の転写活性化に与える影響 : AKIP が、NF- κ B 依存性の転写活性化にどのように影響を与えるか、 κ B 依存性のレポータープラスミドを用いてルシフェラーゼアッセイで検討した。その結果、AKIP1 は PMA 刺激による NF- κ B の転写活性をさらに増強し、また、AKIP1 の発現を特異的に抑制する siRNA の添加により NF- κ B の転写活性が抑制されたことから、AKIP1 は NF- κ B の転写活性を正に制御することが明らかになった。この機能には、AKIP1 分子上の p65 結合部分である N 末だけでは不十分で、C 末も必要であることが示唆された。
6. AKIP が、HIV-1 LTR の転写活性化に与える影響 : AKIP1 が HIV の転写活性化に与える影響を調べるために、HIV-LTR luc プラスミドを用いてルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、AKIP1 は HIV-1 LTR の活性をさらに増強し、HIV の転写活性を正に制御することが明らかになった。

D. 考察

HIV-1 の転写調節は、ウイルス由来の転写活性化因子 Tat と宿主細胞由来の転写因子 NF- κ B によって担われている。今回われわれは、NF- κ B の正の制御因子として AKIP1 を同定し、本分子がその核内滞留時間を増長し、その結果として p65 のリン酸化を増強し HIV-LTR の転写活性化を引き起こすことを明らかにした。

HIV-1 感染者由来の T 細胞においては PKA が活性化されており、PKA のアゴニストにより T 細胞の免疫反応が回復することが報告されている。また IL2 と PKA のアンタゴニストの併用により、HAART 療法耐性患者由来の T 細胞の増殖が増強したという報告がある。従って、PKA が恒常的に活性化されて HIV 感染細胞において、PKAc/AKIP1/p65 の複合体が形成され、p65 の核局在の増長とリン酸化の亢進がされた結果、HIV の転写・複製が増強されている可能性がある。今後、HIV 感染細胞における AKIP1 による p65 のリン酸化に与える影響など検討を進めていく必要がある。

AIDS 治療は HAART 療法により新たな段階を迎えるに至った。しかしながら、耐性ウイルスの出現や副作用の問題から、新たな作用メカニズムの薬剤が求められている。さらなる HIV の転写調節機構解明は、新たな AIDS 治療法の開発につながることを期待できる。

E. 結論

転写因子 NF- κ B の新たな相互作用因子 AKIP1 は PKAc を通じて p65 の局在とリン酸化を調節し、NF- κ B の転写活性を正に制御する。HIV-1 LTR の活性の増強するため、今後 HIV の転写制御を標的とした治療法を開発するための重要な視点を提供する。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Tanaka, K., Hasegawa, J., Asamitsu, K. and Okamoto, T., : Mabnolia ovoata extract and its active component magnolol prevent skin photoaging via inhibition of nuclear factor κ B. Eur. Journal of Pharmacology. 565.212-219.2007

2) Kato, H., Honma, R., Sanda, T., Fujiwara, T., Ito, E., Yanagisawa, Y., Imai, J., Okamoto, T., and Watanabe, S., : knock down of hSNF5/Ini1 causes cell-cycle arrest and apoptosis in a p53-dependent manner. BBRC 361.580-585.2007

3) Sanda, T., Okamoto, T., Uchida, Y., Nakagawa, H., Iida, S., Kayukawa, K., Suzuki, T., Oshizawa, T., Suzuki, T., Miyata, N., and Ueda, R., : Proteome analyses of the growth inhibitory effects of NCH-51, a novel histone deacetylase inhibitor, on lymphoid malignant cells. Leukemia 2007(in press)

4) Enya, K., Hayashi, H., Takii, T., Ohoka, N., Kanata, S., Okamoto, T., and Onozaki, K., : The interaction with Sp1 and reduction in the activity of histone deacetylase 1 are critical for the constitutive gene expression of IL-1 α in human melanoma cells. J. Leuk. Biol. 2007(in press)

5) Fujimoto, K., Kwok-Hung Chan., Takeda, K., Ka-Fai Lo, Raymond, H, K, I., and Okamoto, T., : Sensitive and Specific Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Chemiluminescence for Detection of severe Acute Respiratory Syndrome Viral Infection. J. Clin. Microbiol. 2008(in press)

6) Tomoda, K., Takahashi, N., Hibi, Y., Asamitsu, K., Ishida, H., Kondou, T., Fujii, Y., Okamoto, T., : Molecular docking analysis of the protein-protein interaction between RelA-associated inhibitor (RAI) and tumor suppressor protein p53 and its inhibitory effect on p53 action. Cancer Science. 2008(in press)

7) Nan Gao, Asamitsu, K., Hibi, Y., Ueno, T., and Okamoto, T., : AKIP1 Enhances NF- κ B-dependent Gene Expression by Promoting the Nuclear Retention and Phosphorylation of p65. J. Biol. Chem. 2008(in press)

8) Minekawa, R., Sakata, M., Okamoto, Y., Hayashi, M., Isobe, A., Takeda, T., Yamamoto, T., Koyama, M., Ohmichi, M., Tasaka, K., Imai, K., Okamoto, T., and Murata, Y., : Involvement of RelA-Associated Inhibitor in Regulation of Trophoblast Differentiation via Interaction with Transcriptional Factor Specificity protein-1. Endocrinology. 148(12) .5803-5810.2007

2. 学会発表

1) 岡本 尚. リウマチ性疾患と NF- κ B: 間接リウマチの治療標的として. 第 51 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 第 16 回国際リウマチシンポジウム. パシフィコ横浜(横浜)平成 19 年 4 月 26 日~29 日

2) 金澤 智、水野 智、吉田 俊治、岡本 尚
CIITA トランスジェニックスマウス(D1CC マウス)を用

- いた RA 治療薬の効果. 第 51 回日本リウマチ学会
総会・学術集会. 第 16 回国際リウマチシンポジウム.
パシフィコ横浜(横浜)平成 19 年 4 月 26 日~29 日
- 3)朝光 かおり、田中 清隆、岡本 尚. NF- κ B 転
写機構と疾患制御. 第 14 回日本遺伝子診療学会
大会. 愛媛看護研修センター(愛媛).平成 19 年 7 月
27 日~7 月 28 日
- 4)岡本 尚. NF- κ B 研究と医学研究との間の生物
学のカロス・トーク. 第 28 回日本炎症・再生医学会.
京王プラザホテル(東京). 平成 19 年 8 月 2 日~8 月
3 日
- 5)金澤 智、水野 伸弘、吉田 俊治、岡本 尚. 新
規関節リウマチモデル動物(D1CC マウス)を用いた
抗リウマチ薬の有効性の検討. 第 28 回日本炎症・
再生医学会. 京王プラザホテル(東京).平成 19 年 8
月 2 日~8 月 3 日
- 6)朝光 かおり、田中 清隆、石橋 貴弘、中田 賢
治、岡本 尚. 炭素環ヌクレオシド化合物とセスキテ
ルペン類による抗 NF- κ B 活性の作用機序の解析.
第 28 回日本炎症・再生医学会. 京王プラザホテル
(東京). 平成 19 年 8 月 2 日~8 月 3 日
- 8) Takahsi Okamoto, Kaori Asamitu, Yurina Hibi,
Marni Cueno, Yasuhiro Yasutomi. Anti-Tat Therapy
in HIV/AIDS: Bioinformatic prediction of 3D
structure of Tat/TAR/cyclin T1 complex and drug
screening in silico and (2)Edible Tat vaccine. 第 3
回日独エイズシンポジウム. 広島国際会議場
平成 19 年度 11 月 26 日~11 月 27 日
- 9) Takashi Okamoto, Kaori Asamitsu. Bioinformatic
prediction of Tat/TAR/cyclin T1 complex and drug
screening in silico. 第 30 回日本分子生物学会年会
第 80 回日本生化学大会合同大会. パシフィコ横浜.
平成 19 年 12 月 11 日~15 日
- 10) 今井健一、朝光かおり、岡本 尚. Cyclin T1 は
HIV Tat の安定性に関与する. 第 21 回日本エイズ
学会学術集会. 総会. 広島国際会議場. 平成 19 年
11 月 28 日~30 日
- 11) Satoshi Kanazawa, Shizuka Ishitani, Tohru
Ishitani, Kunihiro Matsumoto, and Takashi
Okamoto. A Novel Transcriptional Regulation of
HIV by MAPK Family Protein, NLK. 第 3 回日独
エイズシンポジウム. 広島国際会議場. 平成 19 年度 1
1 月 26 日~11 月 27 日
- 12) 金澤 智、石谷 閑、石谷 太、松本 邦弘、岡
本 尚. MAPK 様キナーゼ NLK による新規 HIV 転写
調節機構の解析. 第 21 回日本エイズ学会学術集会.
総会. 広島国際会議場. 平成 19 年 11 月 28 日~3
0 日
- 13) 金澤 智、水野伸弘、吉田俊治、岡本 尚
新規関節リウマチモデル動物(D1CCマウス)を用い
た抗リウマチ薬の有効性の検討. 第 30 回日本分子
生物学会年会 第 80 回日本生化学大会合同大会.
パシフィコ横浜. 平成 19 年 12 月 11 日~15 日
- 14) 朝光 かおり、日比 悠里名、岡本 尚.
Tat-TAR-PTEFb(Cyclin1)を標的とした in silico 薬
剤スクリーニング. 第 21 回日本エイズ学会学術集会.
総会. 広島国際会議場. 平成 19 年 11 月 28 日~3
0 日
- 15) Marni Eusebio Cueno¹, Yasuhiro Yasutomi,
Antonio C. Laurena and Takashi Okamoto.
Expression of the HIV-1 Tat Gene in Tomato
Plants. 第 3 回日独エイズシンポジウム. 広島国際
会議場
平成 19 年度 11 月 26 日~11 月 27 日
- 16) Ann Florence B. Victoriano, Takaharu Ueno,
Takayoki Suzuki, Naoki Miyata, and Takashi
Okamoto. Screening of novel histone deacetylase
inhibitors on the HIV-1 replication in latently
infected cells. 第 21 回日本エイズ学会学術集会.
総会. 広島国際会議場. 平成 19 年 11 月 28 日~3
0 日
- 17) Marni Eusebio Cueno, Antonio C. Laurena,
Yasuhiro Yasutomi, Nina Gloriani-Barzaga and
Takashi Okamoto. Production of Immunogenic Tat
Proteins in Tomato Plants. 第 21 回日本エイズ学会
学術集会. 総会. 広島国際会議場. 平成 19 年 11 月
28 日~30 日
- 18) Nan Gao, Kaori Asamitsu, Yurina Hibi, Takashi
Okamoto. 第 30 回日本分子生物学会年会第 80 回
日本生化学大会合同大会. パシフィコ横浜. 平成 19
年 12 月 11 日~15 日
- 19) Marni Eusebio Cueno, Antonio C. Laurena,
Yasuhiro Yasutomi, Nina Gloriani-Barzaga and
Takashi Okamoto. Expression of the HIV-1 Tat
Gene in Tomato Plant. 第 30 回日本分子生物学会
年会 第 80 回日本生化学大会合同大会. パシフィ
コ横浜. 平成 19 年 12 月 11 日~15 日

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を 含む。)

なし。

分担研究報告書

HIV-1Vpr の機能解析と機能を標的にした創薬への取り組み

分担研究者 間陽子 独立行政法人理化学研究所分子ウイルス学特別研究ユニットリーダー

研究要旨 HIV-1Vpr は HIV-1 ゲノムの核移行、細胞周期の G2 期 arrest および apoptosis を引き起こしウイルス複製およびエイズ発症に大きく関与する。これまで、Vpr は核輸送アダプター因子 Importin α (Imp α) との結合を介して核移行する新規核移行能を有すること、Vpr と Imp α の結合がマクロファージへのウイルス複製に必須であることを報告してきた。さらに、Vpr と Imp α との結合を阻害する低分子化合物を同定し、その化合物が Vpr の *in vitro* での核移行およびマクロファージにおけるウイルス複製をも阻害することを報告した。本研究では、同定した低分子化合物が Vpr に結合することで、Vpr の核移行能以外の機能である Apoptosis 誘導能を阻害することを明らかにした。このように、低分子化合物が Vpr の多機能を阻害することは、多剤併用療法と同程度の効果を持つ新たな抗 HIV 薬としての可能性が考えられることから、更なる薬理機構の解明が必要である。

A. 研究目的

HIV-1 の特徴の一つが他のレトロウイルスとは異なりマクロファージなどの非分裂細胞に感染できる点である。それは、HIV-1 アクセサリー蛋白質 Vpr が Pre-integration complex (PIC)を核内に移行させるためと考えられる。

最近我々は、Vpr が核輸送担体 Imp α のみを介して核移行する新規核移行機序を有することを発見した。immunodepletion および siRNA を用いて Vpr の核移行に Imp α が必須である事、Imp α との結合能が消失した Vpr 変異体は核移行能を失い、それを組み込んだウイルスは複製が阻害されることを見出した。以上の結果は、Vpr と Imp α の結合が核移行とウイルス複製に必須であること、そして、その結合を標的とした新規抗 HIV-1 薬の開発への可能性を強く示唆している。そこで、Vpr と Imp α との結合を阻害する低分子化合物の検索を行ったところ、Vpr と Imp α の結合を阻害する低分子化合物 49 種を選択した。その内 11 種の化合物が、Glutathione S Transferase(GST) pull down 法において Vpr と Imp α の結合を、2 種類が *in vitro* 核移行解析において Vpr の核移行を、1 種類がマクロファージにおけるウイルス感染を阻害した。

本研究では HIV-1 感染を阻害する低分子化合物の細胞内動態、特異性および Vpr の核移行以外の機能への効果を解析した。

B. 研究方法

2. 研究方法

GSTとGreen Fluorescence protein(GFP)融合野生型およびSV40 T NLSを用いて、*in vitro*核移行解析を行った。また、GFP融合野生型およびSV40 T NLSを用いて、GST pull-down法を行った。Flag-vpr/pME18neoベクターをHeLa細胞へ導入し、低分子化合物によるVprのアポトーシス誘導能への影響をcaspase-3, 8および9の活性およびヘキスト染色によるアポトーシス小体の有無を指標として、G2 期 arrest への影響を抗 Damage-specific DNA-Binding protein 1 (DDB1)抗体によるウェスタンブロット法により解析した。また、化合物のVprおよびImportin α への結合をBlue-Native PAGE法およびゲル濾過法により解析した。細胞内局在を調べるために低分子化合物のOH基にFuoresceinを導入して合成した。

(倫理面への配慮)

ヒト由来臨床材料を用いていない。

C. 研究結果

Vpr と Imp α の結合を阻害する低分子化合

物の細胞内局在を解析した。阻害化合物には5つのOH基があるので、化学的に反応性が低いOH基に細胞毒性の低いFluoresceinを用いて蛍光標識を導入した。まず、合成した蛍光標識誘導体がVprとImp α との結合阻害活性を維持しているか否かを、GST pull down法で調べたところ、蛍光標識誘導体はVprとImp α との結合をdose-dependentに阻害した。そこで、化合物を100mMの濃度でHeLa細胞の培養上清中に加えて続けて、添加後1、6、18、24時間後にスライドグラスを取り出して良く洗浄して、10%ホルマリンで固定後に共焦点レーザー顕微鏡で観察した。緑色に蛍光標識された化合物が添加後1時間で既に細胞内に取り込まれ、観察した最大の時間である30時間まで、主に細胞内に、そして核内にも観察された。次に、この蛍光標識化合物のVpr発現細胞での局在を調べた。蛍光蛋白Red Fluorescence Protein(RFP)融合VprをHeLa細胞に導入し、導入18時間後に化合物を100mMの濃度で培養上清中に添加して、30分後にスライドグラスを洗浄して再度培地に戻して、培養後1、3、6時間目に10%ホルマリンで固定後に共焦点レーザー顕微鏡で観察した。培養後1時間目に、Vprの核内局在と一致して、緑色の蛍光が核内に認められた。

さらに、化合物がVprと結合するかをBlue NATIVE PAGEを用いて調べた。GST-Vpr-GFPに化合物を終濃度1,10,100 μ M添加し、1時間反応後にPAGEを行い、抗GFP抗体でwestern blotを行った。化合物がVprに結合しスミア状にシフトしていることが確認され、Vprに化合物が結合していることが示された。GST-Vpr-GFPと蛍光標識化合物を混合してゲル濾過を行ない、化合物の吸収波長として450と490nmで、Vpr1781を280nmでモニターしたところ、両ピークの波長が同一の挙動を示すことから化合物がVprと結合していることが確認された。

化合物がVprと結合することが示されたことから、化合物によるVprのapoptosis誘導能への影響を調べた。Vpr発現ベクターを導入した細胞に化合物1,5および10 μ M添加し36時間後にcaspase-3の活性を測定したところ、濃度依存的にcaspase-3活性の低下が認められた。続いて、細胞をヘキスト染色し

てアポトーシス小体の有無を調べた。蛍光蛋白RFP融合Vpr発現細胞において多数認められたapoptosis小体は化合物の濃度依存的に減少が認められた。次に、化合物のcaspase-8およびcaspase-9活性への影響を解析した。化合物は、caspase-8ではなくcaspase-9の活性が軽度ではあったが阻害した。

Actinomycin D誘導性apoptosisに対する化合物の効果を調べた。化合物をHeLa細胞に添加して3時間後にActinomycin D(1 μ g/ml)添加して3時間後にCaspase-3活性測定を調べたが、化合物はActinomycin D誘導性apoptosisに影響を与えなかった。以上の結果から、化合物はVpr特異的に作用することが示唆された。

最近、VprのG2 arrestおよびapoptosis誘導能は、DDB1 adaptor 因子である、VprBP/DCAF1を介した、DDB1 and Cullin4A-containing ubiquitin ligase complexとの相互作用を介して発揮されることが報告された。そこで、化合物によるDDB1の局在変化を調べた。pME発現ベクター導入細胞ではDDB1は核に局在しており、その局在は化合物の添加によって変化が認められなかった。一方、RFP融合Vpr発現細胞では、DDB1の核への局在が弱まり、化合物の添加によって核内への局在が復帰した。このことから、化合物はVprに結合することにより、DDB1に影響を与え、apoptosisを阻害することが示唆された。

D. 考察

VprとImp α の結合を阻害する低分子化合物はVprに結合することで、Vprの核移行能、Apoptosis誘導能、そしてウイルス複製効率の上昇能を阻害した。低分子化合物がVprの多機能を阻害することは、多剤併用療法と同程度の効果を持つ新たな抗HIV薬としての可能性が考えられることから、更なる薬理機構の解明とVprのアポトーシス以外の機能への効果を調べる必要がある。

また、本研究で見出された低分子化合物の最適化を効率的に進めるためには、Vprと化合物の共結晶構造解析が必須であることから、Vprの精製を進めることが急がれる。

本研究で見出された低分子化合物は新た