

る HIV/AIDS 治療薬の開発を検討することにした。まず、PEG 化により AH の活性がどのように変化するかを検討するため、放線菌由来 AH 単量体の PEG 化を行った。PEG は、N 末端アミノ酸のアミノ基に特異的に結合する m-PEG aldehyde (10 kDa 及び 20 kDa) を用いた。PEG 化された AH (10 kDa-PEG-AH 及び 20 kDa-PEG-AH) を ODS カラム及びゲル濾過で単離・精製した。合胞体形成阻害活性を測定したところ、AH の  $IC_{50}$  が 125 nM であるのに対し、10 kDa-PEG-AH は 870 nM、20 kDa-PEG-AH は 1200 nM となった (表 2)。今後は、10 kDa-PEG-AH 及び 20 kDa-PEG-AH をマウスに血中投与することで血中半減期の延長効果及び抗体産生の抑制効果を調べると共に、AH 2 量体の PEG 化も検討する。

PEG 化により、ある程度の活性低下が見られたが、血中半減期の延長効果が認められれば、AH の抗 HIV 作用は十分期待でき、また薬剤の投与間隔が広がることで、患者の負担軽減にも繋がると考えられる。

#### < AH の立体構造 >

数ヶ月かかって得られた結晶の立体構造を解析した結果、図 3 に示すような立体構造が明らかになった。すでにタンパク質モデリングソフト FAMS を用

いる解析から 3 つの糖鎖結合ポケットの配置が推定されていたが、図 3 の結果により、それが証明された。また、糖鎖結合ポケット以外の構造は 3 つ葉のクローバー状に配置された 3 つの糖鎖結合ポケットの立体配置を維持するのに重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

Segment 1 の糖鎖結合ポケット (LD15-QXW35) 内のアミノ酸を Ala に置換した変異 AH の解析により表 3 に示したように、D15A、Y23A、L25A、N28A、Y32A、Q33A が HM 結合に必須であることが示されたが、X 線結晶構造解析により得られた立体構造は、糖鎖結合ポケットの比較的狭い位置に集中していることが明らかになった。今後これらの結果を基に、AH-gp120 結合の選択性についても解析できるものと期待される。なお、すでに AH の活性発現には 3 つのセグメントが必要であることがすでに分かっていたが、3 つのセグメントがそろふことによって糖鎖結合ポケットの構造が維持されていることが図 3 の立体構造から示された。即ち、例えば 2 つのセグメントでは糖鎖結合ポケットは成立しないことが明らかになった。

表 3 AH segment 1 のアミノ酸置換変異体の合胞体形成阻害活性

1 10 20 30 38  
ASVTIRNAQTGRLLDSNYNGNVYTLPA~~NGG~~NYQRW~~TGP~~

Protein	$IC_{50}$ ( $\mu$ M)
His-AH	0.54 ± 0.02
His-AH (D15A)	7.21 ± 0.45
His-AH (N17A)	0.78 ± 0.10
His-AH (Y18A)	0.93 ± 0.09
His-AH (N19A)	0.61 ± 0.13
His-AH (N21A)	0.95 ± 0.20
His-AH (Y23A)	12.2 ± 0.73
His-AH (L25A)	2.32 ± 0.20
His-AH (N28A)	6.32 ± 0.21
His-AH (N31A)	0.74 ± 0.24
His-AH (Y32A)	7.29 ± 0.57
His-AH (Q33A)	9.04 ± 0.81

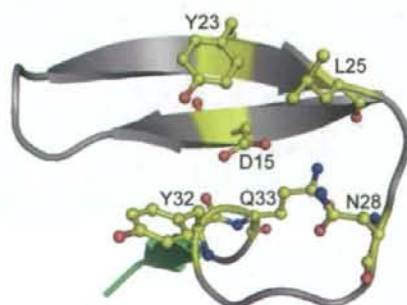


図 4 AH segment 1 の糖鎖結合ポケット内の糖鎖結合に関するアミノ酸の配置

## ■E. 結論

高活性AH変異体、His-TEV-AH dimer/RTB-Lを収率良く生産するためには、宿主細胞の菌体内で不溶性タンパク質として発現されたものを、グアニジン塩酸で可溶化し、Niカラムで精製した後、ODSカラムでグアニジン塩酸を除去するのではなく、30%アセトニトリルを用いる透析法によりグアニジン塩酸を除去するのが良いことが分かった。これにより、どのような宿主を用いようとも再現性のある試料調製が可能であると考えられる。特にHis-TEV-AH dimer/RTB-Lでは、常に20倍の活性を示す試料を得ることができる。このようにして得られた試料を用いることによって、サルによる感染予防実験が可能となった。

PEG化に関しては、PEG-AHをマウスへ血中投与し、抗体産生抑制効果を調べると共に、高活性AH変異体のPEG化も検討し、血中投与可能なHIV/AIDS治療薬としての開発を目指す。

AHの結晶化に成功し、AHの立体構造が解明されたことにより、3つの糖鎖結合ポケットと結合に必須なアミノ酸の配置が明らかとなり、今後さらに抗HIV活性、安定性及び溶解性が改善された変異体のコンピュータグラフィックによるシミュレーションが可能となった。

## ■F. 健康危険情報

該当無し

## ■G. 研究発表

### 1. 論文発表

無し

### 2. 学会発表

- H. Tanaka, H. Chiba, A. Takahashi, J. Inokoshi, A. Murakami, T. Azuma, T. Etoh, M. Hayashi, H. Umeyama, K. Tanno, S. Omura.  
Actinohivin, a novel specific anti-HIV lectin with no adverse side effects.  
Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (Washington, DC, USA) 2008. 10. 25-28. Abstracts p. 74
- M. Tsunoda, K. Suzuki, T. Sagara, A. Takahashi, J. Inokoshi, S. Omura, T. Sekiguchi, A. Takenaka, H. Tanaka. Crystal structure of actinohivin; A novel anti-human immunodeficiency virus protein. 国際結晶学会 2008年(8月28日) P04.01.23 大阪、Acta Cryst. (2008). A64, C237.
- 高橋 淳、佐藤 陽、金 容必、村上 明一、東 隆親、江藤 忠洋、林 正彦、猪腰 淳嗣、大村 智、田中 晴雄 新風放線菌由来の抗HIV レクチン・アクチノヒビンに関する研究

2008年度 日本放線菌学会大会(山梨) 2008. 7. 10-11 2008年度 日本放線菌学会大会講演要旨集 p. 101

## ■H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

- 特願2008-51963  
発明の名称：改変アクチノヒビン、その2量体およびこれを含む抗HIV薬  
発明者：田中 晴雄、東 隆親、村上 明一、高橋 淳、猪腰 淳嗣、丹野 和信、大村 智、(有)キイム・ファーマ・ラボ
- 特願2006-323043  
発明の名称：アクチノヒビン多量体を含む融合タンパク質からなる抗HIV薬、これを構成するポリペプチド、ポリペプチドをコードする遺伝子および抗HIVの製造法  
発明者：田中 晴雄、猪腰 淳嗣、高橋 淳、大村 智、(有)キイム・ファーマ・ラボ
- PCT/JP2005/021981  
発明の名称：抗HIV薬、これを構成するポリペプチド、ポリペプチドをコードする遺伝子、抗HIV薬の製造方法  
発明者：田中 晴雄、猪腰 淳嗣、大村 智、(有)キイム・ファーマ・ラボ
- PCT/JP99/051199 (日本、アメリカ及びオーストラリアで特許取得済み)  
発明の名称：抗ヒト免疫不全ウイルス活性を有するポリペプチド、ポリペプチドをコード化する遺伝子、ポリペプチドの製造方法  
発明者：田中 晴雄、大村 智、(有)キイム・ファーマ・ラボ

## 分担研究課題



## 新規な機序による抗HIV薬剤の合成展開とその実用化

研究分担者

野村 伸彦 富山化学工業株式会社 総合研究所 第三研究部 主幹研究員

ヒット化合物Dについて、他剤との併用効果を検討したところ、既販薬(3TC、EFV及びLPV)との*in vitro*併用効果が確認された。また、ヒット化合物Dの各種動物での体内動態について検討したところ、マウス、ラット及びイヌでの半減期並びに生物学的利用率(Bioavailability)は各々3.8、3.3、8.0 hr及び100、98、48%であった。新たに110化合物を合成、評価したところ、34化合物に強い抗HIV活性( $IC_{50} < 10$  nM)を見出した。

## ■ A. 研究目的

HIV/AIDS症は、HAART療法の確立と近年の新薬の開発により治療可能な慢性疾患と位置付けられつつある。しかし、薬剤の組み合わせやアドヒアランスが悪い場合は容易に耐性ウイルスが出現することに加え、特定の薬剤に耐性となったウイルスは、同系統の薬剤に対しても交差耐性を示すことが多いため、新規な作用機序を有する薬剤の開発が望まれている。

我々は、これまでに新規な作用機序と強い抗HIV活性を有しマウスにおいて経口吸収性を示す化合物を見出している。現在、臨床応用可能な抗HIV剤の開発を目標として様々な検討を行っている。

## ■ B. 研究方法

1) *In vitro* 併用効果

HIV-1感受性リポーター細胞であるR5-MaRBLE細胞にHIV-1(JRCSF)を感染させ、ヒット化合物Dと3TC、EFV及びLPVとの併用効果を、CalcuSynを用いて解析した。本試験は国立感染症研究所にて実施した。

## 2) 各種動物の体内動態

0.5%メチルセルロースに懸濁させた25 mg/kgのヒット化合物Dをマウス(ICR, 6W, ♂)及びラット(SD, 8W, ♂)に、10 mg/kgのヒット化合物Dをイヌ(Beagle, ♀)に単回経口投与し、0.5、1、2、4、6、8及び12時間後に採血した。また、同様にマウス、ラット及びイヌに各々、10、10、1 mg/kgのヒット化合物Dを静脈内投与し採血した。ヒット化合物Dの濃度測

定はHPLCを用いて行った。なお、各PK因子の解析には、WinNonlinを用いた。

## 3) 新規化合物の合成

前年度見出されたヒット化合物を基に合成した。*In vitro*抗HIV活性の評価は、国立感染症研究所にて、HIV-1感受性リポーター細胞であるR5-MaRBLE細胞にHIV-1(JRCSF)を感染させ実施した。

## (倫理面への配慮)

本試験は、富山化学工業株式会社が定めた「実験動物使用管理規定」に従って実施した。

## ■ C. 研究結果

強い抗HIV活性( $IC_{50}$ : 0.3 nM)を示したヒット化合物Dと既販薬である3TC、EFV及びLPVとの併用効果を検討したところ、いずれの薬剤とも併用効果を示した(表1)。

また、ヒット化合物Dの各種動物における体内動態を確認したところ、半減期はマウス、ラット及びイヌで各々3.8、3.3、8.0 hrであった。また、生物学的利用率(Bioavailability)を測定したところ、マウス、ラット及びイヌで各々100、98、48%であり、各種動物で良好な体内動態を示した(表2)。

新たに110化合物を合成、評価したところ、34化合物に強い抗HIV活性( $IC_{50} < 10$  nM)を見出した(表3)。

## ■ D. 結論

既存薬の耐性変異ウイルス株と感受性が交差しな

表1：抗HIV活性を示すヒット化合物Dと既販薬との*in vitro*併用効果

	+ 3TC	+ EFV	+ LPV
ヒット化合物 D	相 乗	相 乗	相加～相乗

表2：抗HIV活性を示すヒット化合物Dの体内動態

	マウス	ラット	イヌ
T <sub>1/2</sub> (hr)	3.8	3.3	8.0
Bioavailability (%)	100	98	48

表3：新規合成化合物の抗HIV活性

IC <sub>50</sub> (nM)	>1000	100～1000	10～100	1～10	1>
化合物数	27	16	33	23	11

い新規な作用機序を有する化合物の合成展開並びに評価を継続してきた結果、強い抗HIV活性に加え、各種既販薬との*in vitro*併用効果を示し、各種動物で優れた体内動態を示すヒット化合物Dを見出した。今後は、各種動物を用いた反復投与毒性試験等を行いながら、抗HIV剤候補化合物としての評価並びに絞り込みを行っていく予定である。

#### ■E. 健康危険情報

特記事項なし

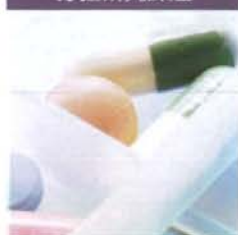
#### ■F. 研究発表

とくに無し

#### ■G. 知的財産権の出願・登録予定

特許出願予定

## 分担研究課題



## HIV-1 各種変異体を用いた 薬剤標的ウイルス蛋白質の解析

研究分担者

足立 昭夫 徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部 教授

研究協力者

野間口雅子 徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部 講師

新しい薬剤標的となり得る HIV-1 アクセサリー蛋白質とその評価システムの確立に向け、(1) HIV-1 のアクセサリー蛋白質 Vif と抗ウイルス細胞因子 APOBEC3G/F との結合部位の同定および (2) サル発症モデルの確立を目指した新しいサル指向性 HIV-1 の構築を行なっている。本年度に得られた成績は以下の通りである。(1) プロウイルスクローンの点変異体解析により、HIV-1 Vif の N 末端側に APOBEC3G/F との結合およびそれらのウイルス粒子からの排除に必須な領域があることが明らかになった。Vif のアミノ酸残基 21-48 は、APOBEC3G との相互作用に、アミノ酸残基 11-17 および 76-79 は、APOBEC3F との相互作用に重要である。(2) Vif のアミノ酸残基 18-45 に対応する三種類の合成ペプチドを用いて Vif/APOBEC3G 結合阻害を試みたが、効果はなかった。(3) カニクイザル細胞 HSC-F で長期培養により取得した、増殖効率が著しく向上した MN4 (X4 ウイルス) および MN5 (R5 ウイルス) クローンを分子遺伝学的に解析した。細胞馴化に伴う変異はゲノム上に 10 (MN4) あるいは 6 (MN5) 個確認されたが、増殖効率の増強に貢献している変異は、それぞれ、Pol-IN と Env-gp120 の一アミノ酸変異の二ヶ所のみであった。この二つのクローンの Gag-CA helix 6/7 loop を SIVmac239 型に置換したクローンを作製したところ (MN4S および MN5S)、カニクイザル PBMC での増殖効率が SIVmac239 に比肩できるほど顕著に向上した。これらのウイルスから、アカゲザル細胞 HSR5.4 に馴化・適応したクローン (MN4Rh および MN5Rh) も得られた。

### ■ A. 研究目的

HIV-1 Vif は自然宿主細胞 (リンパ球およびマクロファージ) でのウイルス複製に必須であり、したがって、エイズ発症にも必須である。新規の抗 HIV-1 創薬研究等に向け、Vif の機能とその責任領域の解明は急務である。Vif の作用機構に関しては、非許容細胞内標的分子 APOBEC3G/F の同定により、分子生物学的理解が飛躍的に進展してきている。本年度は、多数の Vif 変異体の分子生物学的解析を行ない、HIV-1 Vif 内の APOBEC3G/F 結合およびウイルス粒子排除に関わる領域の同定を試みた。さらに、同定された領域に対応する合成ペプチドによる Vif/APOBEC3G 結合阻害の有無を検討した。

我々が世界に先駆けて構築したプロトタイプサル指向性 HIV-1 (NL-DT5R および NL-DT5R5-1) は SIVmac239 の *vif* 遺伝子全部と *gag* 遺伝子のごく一部を持つ。NL-DT5R は種々のサル細胞 (カニクイザル由来 HSC-F 細胞、アカゲザル由来 HSR5.4 細胞、ブタオザル、アカゲザルおよびカニクイザル由来

PBMC) だけでなく、ブタオザルやカニクイザル個体にも感染・増殖した (PNAS 103:16959-16964, 2006; J Virol 81:11549-11552, 2007; Rev Med Virol 18: 261-275, 2008; 未発表データ)。しかし、NL-DT5R はサル病原性標準株である SIVmac239 よりサル細胞での増殖効率が悪く (PNAS 103:16959-16964, 2006)、また、ブタオザル感染個体でのウイルス血症も一過性であった (J Virol 81:11549-11552, 2007)。NL-DT5R5-1 も同様にサル細胞での増殖効率が悪かった。本年度は、HIV-1/マカクザル感染システムの確立を目指し、NL-DT5R および NL-DT5R5-1 のゲノムを改変してウイルス学的性状を改善するための基礎研究を行なった。

### ■ B. 研究方法

1. HIV-1 Vif (NL4-3) の点変異体 (主としてアラニン置換) のうち、H9 細胞に対する感染性が減弱あるいは消失したものをを用い、主として免疫沈降/ウェスタン法により APOBEC3G/F との結合

- 能を解析した (Microbes Infect 10: 1142-1149, 2008)。APOBEC3G/F のウイルス粒子への取り込み量も同様に検討した。さらに、免疫沈降の系 (Vif/APOBEC3G) に合成ペプチド (Vif アミノ酸残基 18-45、26-45 および 31-45 に対応) を加え、結合阻害効果の有無を検証した。
- NL-DT5R (X4 ウイルス) あるいは NL-DT5R5-1 (R5 ウイルス) を感染させた細胞からの PCR 法による分子ウイルスクローンの構築も既報 (PNAS 103:16959-16964, 2006) の通りである。
  - トランスフェクションとウイルス感染実験には、それぞれ 293T 細胞と HSC-F 細胞および HSR5.4 細胞を用いた。HSC-F および HSR5.4 細胞の感染実験は IL-2 存在下で行なった。トランスフェクションにはリン酸カルシウム法を用いた。ウイルス量は培養上清中の逆転写酵素 (RT) 活性あるいは Gag(p24)-ELISA 法により測定した。カニクイザル CD8(-)PBMC を用いた実験は医薬基盤研究所・霊長類医学科学研究センターの明里宏文博士らにより行なわれた。
  - ウイルスゲノムのシーケンスはアプライドバイオシステムのサイクルシーケンスキットを用いて決定した。

#### (倫理面への配慮)

本研究では、動物実験あるいはヒト材料を用いた実験は行っていない。

### ■ C. 研究結果

- Vif 点変異体のうち、12 種が H9 細胞でのウイルス増殖が検出できないかあるいは増殖効率が有意に低下していた。このうち、3 クローンの変異は Cullin 5 結合部位として知られる C 末側の領域にあったが、他の 9 クローンの変異は N 末側に分散して存在した。アミノ酸残基 21-48 は、APOBEC3G 存在下の変異体の MAGI 感染価、変異体ウイルス粒子内の APOBEC3G 量、変異体と APOBEC3G との結合能 (免疫沈降法)、および既報のデータから、APOBEC3G 結合領域と結論した。同様にして、アミノ酸残基 11-17 および 76-79 は APOBEC3F との相互作用に重要であることがわかった。しかし、結合領域に対応する Vif 合成ペプチドによる APOBEC3G 結合阻害効果は全く観察されなかった。
- NL-DT5R あるいは NL-DT5R5-1 を感染させた HSC-F 細胞の長期培養により馴化型ウイルスが得られた。この馴化・適応により増殖効率が向上したクローン MN4 (X4 ウイルス) および MN5

(R5 ウイルス) に存在したゲノム変異を一個づつ親ウイルスクローンに導入し、トランスフェクション・感染実験を行い、有意義のものを検索した。その結果、それぞれ、Pol-1N と Env-gp120 の一アミノ酸変異の二ヶ所のみが重要であった。MN4 の V234I 変異 (Pol-1N) と E427K 変異 (Env-gp120 C4 領域)、および、MN5 の N222K 変異 (Pol-1N) と S304G 変異 (Env-gp120 V3 領域) である。

- 我々が構築したプロトタイプサル指向性 HIV-1 である NL-DT5R はカニクイザル TRIM5 $\alpha$  による増殖抑制を解除できていないため (Kamada, K. et al., Microbes Infect, in press, 2009)、これに関わると予想される Gag-CA helix 6/7 loop 構造 (S 配列) を SIVmac239 の対応領域に置換した MN4S と MN5S を作製した (大阪大学微生物病研究所 塩田達雄教授、中山英美博士らとの共同研究)。親クローンである MN4/MN5 と比較すると、カニクイザル CD8(-) PBMC での増殖効率が顕著に向上していた。
- アカゲザル由来 CD8(-) PBMC でのサル指向性 HIV-1 の増殖効率は極めて悪い。また、上記の S 配列を持つクローンであってもアカゲザル HSR5.4 細胞での増殖効率はさほど良くなかった。そこで、MN4S と MN5S を HSR5.4 細胞に感染させ、長期培養による馴化を試みた。長期培養後に得られたウイルスを分子クローンし、トランスフェクション・感染実験により調べたところ、親クローンより格段に増殖能が向上したウイルスクローンが取得できた (MN5Rh)。このクローンには Gag-CA 領域に三個、Pol-1N 領域に一個の変異が存在するのみであった。MN5Rh より MN4Rh を構築した。

### ■ D. 考察

HIV-1 Vif が抗ウイルス細胞因子 APOBEC3G を中和するメカニズムは既におおよそ明らかにされている。Vif は APOBEC3G と結合してこれを分解し、最終的にウイルス粒子中への APOBEC3G の取り込みを著しく抑制する。実際、この分解に関わる Vif 内の Cullin 5 結合部位 (C 末端側に存在) も明らかにされている。本研究では、詳細な分子遺伝学的解析により、Vif の N 末端側に APOBEC3G/F 結合領域 (G/F で領域が異なる) があることを示した。しかし、合成ペプチドではこの結合は阻害されなかった。APOBEC3G/F の中和活性に必要な Vif の領域は一部異なるが重なっており、Vif と APOBEC3G/F とがどのように複合体を形成するか知るためには更なる解

析が必要である。Vifの立体構造が解明されれば、詳細な分子モデルの構築が可能となるであろう。

HIV-1の基礎・臨床研究を格段に進展させるためには、SIVやSHIVではなくHIV-1そのものを用いたサル感染・発症モデルが必要である。このシステムが確立できれば、長い間不可能であった(1) HIV-1の病原性発現機構の解析、(2) 分子・細胞レベルでは不明の点の多いHIV-1アクセサリ-蛋白質の個体内機能の解析、(3) HIV-1感染症の制御に繋がる新薬/ワクチンの評価・開発研究が実現可能となる。本研究で得られたHIV-1の分子クローンMN4Rh/MN5Rhは極めて有望であると言える。

## E. 結論

本研究により、HIV-1 VifのN末端側に抗ウイルス細胞因子APOBEC3G/Fとの結合領域が存在することが明確に示され、新しい抗HIV-1薬開発の可能性が提示された。さらに、プロトタイプサル指向性HIV-1より増殖効率等で格段に優れた分子クローンが得られたことで、HIV-1/マカクザル感染システムの確立に向け大きく前進したと考えられる。

## F. 健康危険情報

該当事項なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- Nomaguchi, M., Doi, N., Kamada, K., and Adachi, A. 2008. Species barrier of HIV-1 and its jumping by virus engineering. *Reviews in Medical Virology* 18: 261-275.
- Fujita, M., Otsuka, M., Miyoshi, M., Khamsri, B., Nomaguchi, M., and Adachi, A. 2008. Vpx is critical for reverse transcription of the human immunodeficiency virus type 2 genome in macrophages. *Journal of Virology* 82: 7752-7756.
- Yamashita, T., Doi, N., Adachi, A., and Nomaguchi, M. 2008. Growth ability in simian cells of monkey cell-tropic HIV-1 is greatly affected by downstream region of the *vif* gene. *Journal of Medical Investigation* 55: 236-240.
- Nomaguchi, M., Fujita, M., and Adachi, A. 2008. Role of HIV-1 Vpu protein for virus spread and pathogenesis. *Microbes and Infection* 10: 960-967.
- Yamashita, T., Kamada, K., Hachio, K., Adachi, A., and Nomaguchi, M. 2008. Identification of amino acid residues in HIV-1 Vif critical for binding and exclusion of APOBEC3G/F. *Microbes and Infection* 10: 1142-1149.
- Hachio, K., Kamada, K., Yamashita, T., Adachi, A., and Nomaguchi, M. 2008. Replication potentials of *vif* variant viruses generated from monkey cell-tropic

ic HIV-1 derivative clones NL-DT5/NL-DT5R. *Microbes and Infection* 10: 1218-1222.

- Fujita, M., Otsuka, M., Nomaguchi, M., and Adachi, A. 2008. Functional region mapping of HIV-2 Vpx protein. *Microbes and Infection* 10: 1387-1392.
- Morita, D., Katoh, K., Harada, T., Nakagawa, Y., Matsunaga, I., Miura, T., Adachi, A., Igarashi, T., and Sugita, M. 2008. Trans-species activation of human T cells by rhesus macaque CD1b molecules. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 377: 889-893.
- Kamada, K., Yamashita, T., Hachio, K., Adachi, A., and Nomaguchi, M. 2009. Evasion from CypA- and APOBEC-mediated restrictions is insufficient for HIV-1 to efficiently grow in simian cells. *Microbes and Infection*, in press.
- Nagao, T., Hachio, K., Doi, N., Fujiwara, S., Adachi, A., and Nomaguchi, M. 2009. Amino acid alterations in Gag that confer the ability to grow in simian cells on HIV-1 are located at a narrow CA region. *Journal of Medical Investigation*, in press.

### 2. 学会発表

- Nomaguchi M., Doi, N., and Adachi, A. HIV-1 adapts and evolves to grow efficiently in simian cells. The 8<sup>th</sup> Awaji International Forum on Infection and Immunity, Sept. 9, 2008, Awaji, Japan.
- 藤田美歌子、大塚雅巳、野間口雅子、足立昭夫. HIV-2 Vpxの富プロリン領域は蛋白質の安定性に必須である. 第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月26日、岡山.
- 土肥直哉、野間口雅子、山下知輝、足立昭夫. サル細胞で効率よく複製するHIV-1の構築. 第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月26日、岡山.
- 野間口雅子、土肥直哉、足立昭夫. HIV-1 Envの1アミノ酸変異はサル細胞での増殖を著しく増強する. 第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月26日、岡山.
- 足立昭夫. アクセサリ-蛋白質と抗ウイルス細胞因子. 第56回日本ウイルス学会学術集会シンポジウム3 (HIV感染症)、2008年10月27日、岡山.
- 齊藤暁、飯島沙幸、岩崎優紀、海津雅彦、足立昭夫、野間口雅子、俣野哲朗、明里宏文. 新規HIV-1/サルモデルの開発; 新規HIV-1クローンNL-DT5Rはカニクイザル個体内で増殖する. 第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月28日、岡山.
- 野間口雅子. HIV-1の病原性: 細胞から個体へ. 第22回日本エイズ学会学術集会シンポジウム4 (ヒトはなぜエイズになるのか)、2008年11月26日、大阪.
- 海津雅彦、齊藤暁、飯島沙幸、岩崎優紀、足立昭夫、野間口雅子、俣野哲朗、明里宏文. 新規

HIV-1/サルモデルの開発；新規 HIV-1 クローン NL-DT5R はカニクイザル個体内で増殖する。第22回日本エイズ学会学術集会、2008年11月27日、大阪。

9. 野間口雅子、足立昭夫。HIV-1のサル細胞における適応進化。第22回日本エイズ学会学術集会、2008年11月28日、大阪。

## ■ H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし。

### 2. 新案登録

なし。

### 3. その他

なし。



## 分担研究課題

## HIV-1のpol遺伝子を持つ新規SHIVを用いたサルHAARTモデルの開発

研究協力者

井戸 栄治 京都大学ウイルス研究所・新興ウイルス感染症研究センター・准教授



抗HIV薬を前臨床実験として動物を用いた *in vivo* レベルの評価する系を確立することを目的として、薬剤の多くが標的とする pol 遺伝子を HIV-1 由来にした種々の新規 SHIV を作成し、それらのサル感染実験を行った。本年度は、HIV-1 の PR 遺伝子を持つ SHIV-pr と、それとは別に RT と INT 遺伝子が HIV-1 由来になっている SHIV-rti が感染しているアカゲザルが、共に  $10^6$  copies/ml という高い血中ウイルス量を出し続けると共に CD4 陽性細胞数を減少、かつ体重の低下によるエイズ発症に至ることを明らかにした。また PR から INT 遺伝子まで pol 遺伝子の全領域を HIV-1 由来にした SHIV-prti のサル感染実験に関しては、3 代目まで *in vivo* 継代を行なった結果、継代を重ねる毎に感染増殖能を増加することが明らかとなった。

## ■ A. 研究目的

HAART 療法が登場してから 10 年余りが経過、患者の余命の延長には極めて有効であることが証明されているが、一方その反面多剤耐性株出現や長期薬剤服用による副作用など新たな難問が続出している。こうした状況に対処できるよう、新規メカニズムの薬剤による治療法の開拓など抜本的解決策が強く望まれているが、それが新しければそれだけリスクが高いとも言え、動物モデル開発の必要性は増しこそすれ不要となることはない。従来サルに感染するウイルスとしては、SIV もしくは SHIV と呼ばれる HIV-1 と SIV のキメラウイルスが知られている。ところが、これらのウイルスはいずれも pol 遺伝子部分が SIV 由来であり、HIV-1 用に開発された薬剤の多くが標的とする PR や RT、さらには INT の各酵素蛋白質の構造が類似はしているものの HIV-1 とはアミノ酸配列などがかなり異なり、薬剤の直接的評価には適さないという問題が存在していた。我々は、これらの障壁を超えるため、pol 遺伝子中の PR、RT、INT 各遺伝子が HIV-1 由来の一連の新規 SHIV を作成し、そのサル感染実験を行うことにより、抗 HIV 薬のサルを用いた *in vivo* 評価系、いわばサル HAART モデルを確立することを目指している。

## ■ B. 研究方法

我々は以前、本路線の手始めとして先ず PR 遺伝子のみを HIV-1 にした SHIV-pr のアカゲザル感染実験を行なって、それが持続感染すること、また PR 阻害剤であるカレトラ剤の経口投与によって血中ウイルス量が検出限界まで減少することを報告している (Ishimatsu, et al., *Microbes Infection*, 2007)。その時点では持続感染は成立しているものの、明確な病態変化は見られなかったため、この *in vivo* 継代を 5 代まで行なった。その他、HIV-1 の RT と INT 遺伝子を持つ SHIV-rti と、ほぼ pol 遺伝子の全領域 (即ち PR と RT および INT 遺伝子) が HIV-1 由来の SHIV-prti のサル感染実験が進行しており、血中ウイルス量と CD4 細胞数などについて経時的に測定して病態変化を追跡した。

## ■ C. 研究結果

SHIV-pr を接種したサルは 4 代目まで *in vivo* 継代したところでは、血中ウイルス量が  $10^6$  copies/ml 以上に上がってその後も高い値を持続するものの、いずれも特に目立った病態変化の兆候は見られていなかった。5 代目となるサル MM422 と MM424 は約 2 年前に継代されたものであるが、この 2 頭は当初 T リンパ球数が 2200-3000/ $\mu$ l、CD4 比は 60-70% の値を示していたものが、接種後 1 年余りを過ぎて急に変動を見せ始め、それぞれ 800-1400/ $\mu$ l、30% 前後にま

で減少するようになった。またSHIV-rtiの分子クローンが接種されていた初代のサルMM402は、接種後70週目を過ぎてから血中ウイルス量の急激な上昇( $10^5$ - $10^6$  copies/ml)と共にCD4細胞数の顕著な低下を示し、体重減少傾向も明らかであり、最終的に3年と2ヶ月目で死亡した。これらの剖検および組織病理観察の結果、リンパ系臓器の顕著な萎縮が見られ、エイズ発症と考えられた。SHIV-prtiについては、2頭ずつを使い現在3代目まで*in vivo*継代されているが、初代と2代目までは抗体応答もあまり強くない、血中ウイルスも $10^4$  copies/ml程度に留まっていた。しかし、3代目では接種直後のピークが $10^6$  copies/mlを超え、抗体応答もはっきりと上昇を示し、またウイルス再分離の成績も比較的長期間継続している。このシリーズのサルについては現段階では特にCD4細胞数など顕著な病態変化は見られていない。

#### ■ D. 考察

上記の成績より、SHIV-prとSHIV-rtiはサル個体において感染増殖するだけでなく、エイズ発症まで至ることが明らかとなった。このことは我々が作成した新規SHIVによるサルモデルがエイズの病態解明にも利用できることを示したものであり、エイズ治療薬の投与時期に関して、未発症期と病態進行期の比較など広く応用され得る有用な研究材料が提供できたものと考えられた。またどちらのケースも比較的病態変化が急激に現れたので、今後分離ウイルスの遺伝子変異などについても解析する予定である。

#### ■ E. 結論

HIV-1のpol遺伝子を持つ新規SHIVは、サル個体において感染増殖するだけでなく、エイズ発症まで至ったことは、本系が治療薬開発に寄与するばかりでなく、発症機序の解明など将来のエイズ研究において広く貢献できる可能性があることが示されたものと言えよう。今後特に最も広いHIV-1のpol領域を持つSHIV-prtiの研究に力を入れたいと考えている。

#### ■ F. 健康危険情報

本件に該当するものなし。

### ■ G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Akiyama, H., Ishimatsu, M., Miura, T., Hayami, M., Ido, E.: Construction and infection of a new simian/human immunodeficiency chimeric virus (SHIV) containing the integrase gene of the human immunodeficiency virus type 1 genome and analysis of its adaptation to monkey cells. *Microbes Infection*, 10:531-539, 2008.

#### 2. 学会発表

1. Ido, E., Ishimatsu, M., Tada, T., Ibuki, K.: Novel SHIVs that possess HIV-1-derived pol genes can infect rhesus macaques. 26th Annual Symposium on Nonhuman Primate Model for AIDS, San Juan, Puerto Rico, December 9-12, 2008.
2. 井戸栄治、石松美沙、三浦智行、多田哲子、多田秀子、伊吹謙太郎：HIV-1の逆転写酵素とインテグラーゼ遺伝子を持つSHIV-rtiはアカゲザルに持続感染しエイズ様症状を引き起こす、第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山、10月26-28日、2008.
3. 井戸栄治、石松美沙、三浦智行、多田哲子、多田秀子、伊吹謙太郎：HIV-1由来のpol遺伝子を持つSHIV-prtiのアカゲザル*in vivo*継代による感染増殖能の増加、第22回日本エイズ学会学術集会・総会、大阪、11月26-28日、2008.

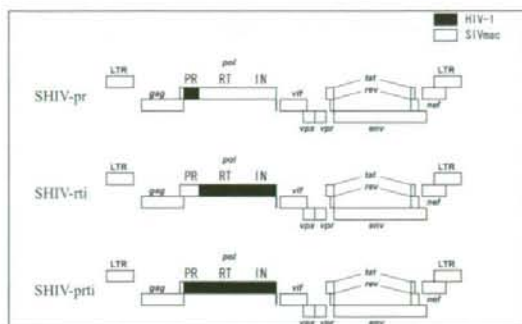
### ■ H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

**研究目的**

抗HIV-1薬剤の複数使用によるHAART療法を臨床適用の前に動物実験レベルで評価できれば、新薬の評価や最適な薬剤の組み合わせの探索など、より良い治療法の開発がヒトに対するリスクを犯すことなく進められる。しかし通常実験動物に用いられるサルにはHIV-1は感染せず、また持続感染することが知られている従来型のSHIVは、抗ウイルス増殖阻害剤が主に標的とするpol遺伝子部分がSIV由来のため、そのような評価には必ずしも適さない。そこで我々は、SIVmacのゲノムにPR、RT、INTの各遺伝子だけをHIV-1由来に置換した一連の新規SHIVを作成し、これによるアカゲサル感染モデル系を確立することを目的とする。

サルを用いたHAARTモデル



MM289から5代目のアカゲサルへin vivo継代

Plasma 1 ml を静脈内接種  
( $2 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>; c.a.  $10^6$  copies/ml)

MM422(Male)とMM424(Male) (いずれも新日本科学より)

接種後3年を経て、どちらのサルもPA抗体価が  $\geq 16384$   
plasma viral loadは  $10^5 \sim 10^6$  copies/mlを維持している

最近CD4細胞数の減少が見られ、特にMM424については  
体重の減少傾向が明らか

→ HAART開始(PR+RT+INT)へ

SHIV-rtiを接種したMM402は、70週目頃よりPA抗体価と  
血中ウイルス量の急激な増加を示した後、ウイルス接種後  
3年と2ヶ月目に減後衰弱により死亡

CD4細胞数の減少は明らかで、エイズ発症と考えられる

もう1頭のMM403は、ウイルス接種後1年と2ヶ月で突然死亡

こちらについてはウイルス増殖を示す指標があまり顕著でなく  
死因は不明

現在、病理学的解析を進めている

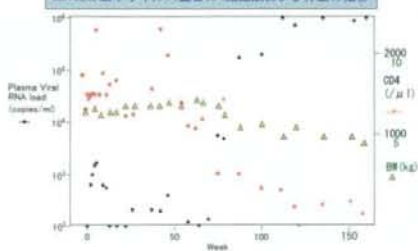
**Virus isolation and PA antibody titers in SHIV-rti  
-infected rhesus monkeys**

Week	0	1	2	3	4	8	10	12	16	21	25	36	41	61	89
Virus isolation															
MM402	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MM403	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PA antibody (Giantella HIV-1/2)															
MM402	<32	<32	<32	<32	<32	<32	32	32	32	32	64	32	32	32	32
MM403	<32	<32	<32	<32	<32	<32	<32	<32	<32	<32	<32	<32	<32	<32	<32

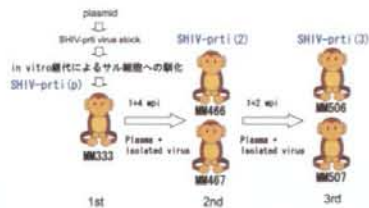
**Plasma viral RNA loads**

Both monkeys maintained with a range of  $10^5 \sim 10^6$  copies/ml at 2 w.p.i. to 4 w.p. and decreased thereafter. However, the viral RNA loads abruptly increased after 70 w.p.i. and reached the high level of  $10^8 \sim 10^9$  copies/ml until thereafter.

**MM402の血中ウイルス量とCD4細胞数および体重の推移**



*In vivo*継代のスケジュール



Virus isolation and PA antibody titers in SHIV-prti(2)-infected rhesus monkeys

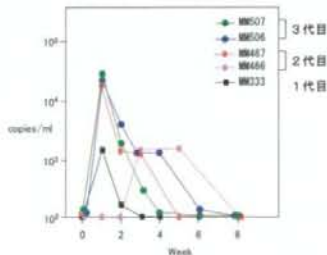
Week	0	1	2	3	6	8	16	28	40	52
Virus isolation										
MM466	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
MM467	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-
PA antibody (Genedia HIV-1/2)										
MM466	<32	<32	<32	<32	ND	<32	32	32	32	32
MM467	<32	<32	<32	<32	ND	128	256	256	512	1024

↓  
3代目へ *in vivo* 継代へ

Virus isolation and PA antibody titers in SHIV-prti(3)-infected rhesus monkeys

Week	0	1	2	3	4	6	8	12	16	21	30
Virus isolation											
MM506	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
MM507	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+
PA antibody (Genedia HIV-1/2)											
MM506	<32	<32	<32	<32	<32	64	128	128	128	256	512
MM507	<32	<32	<32	<32	<32	32	64	2648	1024	2048	1024

Plasma viral RNA load



## 研究成果の刊行物に関する一覧

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Deforche K, Camacho RJ, Grossman Z, Soares MA, Van Laethem K, Katzenstein DA, Harrigan PR, Kantor R, Shafer R, Vandamme AM, non-B Workgroup.	Bayesian network analyses of resistance pathways against efavirenz and nevirapine.	AIDS.	22	2107-15	2008
Furuya K, Omura M, Kudo S, Sugiura W, Azuma H.	Recognition profiles of microsporidian <i>Encephalitozoon cuniculi</i> polar tube protein 1 with human immunoglobulin M antibodies.	Parasite Immunol.	30	13-21	2008
S Yoshida, H Gatanaga, T Itoh, M Fujino, M Kondo, K Sadamasu, T Kaneda, F Gejyo, T Shirasaka, H Mori, M Ueda, N Takata, R Minami, W Sugiura and the Japanese Drug Resistance HIV-1 Surveillance Network.	Prevalence of drug resistance associated mutations in newly diagnosed HIV/AIDS patients in Japan from 2003-2007.	Antiviral Therapy.	13(3)	A162	2008
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.	197	134-41	2008
Rajintha M Bandaranayake, Moses Prabu-Jeyabalan, Junko Kakizawa, Wataru Sugiura, and Celia Schiffer.	Structural Analysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 CRF01_AE Protease in Complex with the Subtype p1-p6.	Journal of Virology.	82	13	2008

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hiyoshi M, Suzu S, Yoshidomi Y, Hassan R, Harada H, Sakashita N, <u>Akari H</u> , Motoyoshi K, Okada S	Interaction between Hck and HIV-1 Nef negatively regulates cell surface expression of M-CSF receptor	Blood	111	243-250	2008
Kawada M, Tsukamoto T, Iwamoto N, Kurihara K, Takeda A, Moriya C, Takeuchi H, <u>Akari H</u> , Matano T	Gag-specific cytotoxic T lymphocyte-based viral containment in a macaque AIDS model	Journal of Virology	82	10199-10206	2008
Izumi T, Takaori-Kondo A, Shirakawa K, Higashitsuji H, Itoh K, Io K, Matsui M, Iwai K, Kondoh H, Sato T, Tomonaga M, Ikeda S, <u>Akari H</u> , Koyanagi Y, Fujita J, Uchiyama T	Mdm2 is a novel E3 ligase for HIV-1 Vif	Retrovirology	6	1	2009
Iwasaki Y, <u>Akari H</u> , Murakami T, Kumakura S, Dewan M Z, Yanaka M, Yamamoto N	Efficient inhibition of SDF-1 $\alpha$ -mediated chemotaxis and HIV-1 infection by novel CXCR4 antagonists	Cancer Science		印刷中	2009

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nomaguchi, M., Doi, N., Kamada, K., and <u>Adachi, A.</u>	Species barrier of HIV-1 and its jumping by virus engineering.	Rev. Med. Virol.	18	261-275	2008
Fujita, M., Otsuka, M., Miyoshi, M., Khamsri, B., Nomaguchi, M., and <u>Adachi, A.</u>	Vpx is critical for reverse transcription of the human immunodeficiency virus type 2 genome in macrophages.	J. Virol.	82	7752-7756	2008
Yamashita, T., Doi, N., <u>Adachi, A.</u> , and Nomaguchi, M.	Growth ability in simian cells of monkey cell-tropic HIV-1 is greatly affected by downstream region of the <i>vif</i> gene. Journal of Medical Investigation.	J. Med. Invest.	55	236-240	2008
Nomaguchi, M., Fujita, M., and <u>Adachi, A.</u>	Role of HIV-1 Vpu protein for virus spread and pathogenesis.	Microbes Infect.	10	960-967	2008
Yamashita, T., Kamada, K., Hatachi, K., <u>Adachi, A.</u> , and Nomaguchi, M.	Identification of amino acid residues in HIV-1 Vif critical for binding and exclusion of APOBEC3G/F.	Microbes Infect.	10	1142-1149	2008
Hatachi, K., Kamada, K., Yamashita, T., <u>Adachi, A.</u> , and Nomaguchi, M.	Replication potentials of <i>vif</i> variant viruses generated from monkey cell-tropic HIV-1 derivative clones NL-DT5/NL-DT5R.	Microbes Infect.	10	1218-1222	2008
Fujita, M., Otsuka, M., Nomaguchi, M., and <u>Adachi, A.</u>	Functional region mapping of HIV-2 Vpx protein.	Microbes Infect.	10	1387-1392	2008
Morita, D., Katoh, K., Harada, T., Nakagawa, Y., Matsunaga, I., Miura, T., <u>Adachi, A.</u> , Igarashi, T., and Sugita, M.	Trans-species activation of human T cells by rhesus macaque CD1b molecules.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	377	889-893	2008



## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Akiyama, H., Ishimatsu, M., Miura, T., Hayami, M., <u>Ido, E.</u>	Construction and infection of a new simian/human immunodeficiency chimeric virus (SHIV) containing the integrase gene of the human immunodeficiency virus type 1 genome and analysis of its adaptation to monkey cells.	Microbes Infection	10	531-539	2008

平成20年度 厚生労働科学研究費補助金創薬基盤推進研究事業  
「薬剤耐性HIV/AIDS症例救済のための  
新規な機序による抗HIV薬剤の開発研究」班  
総括・分担研究報告書

---

発行日 2009年3月31日

発行者 研究代表者 杉浦 互

発行所 研究班事務局  
独立行政法人 国立病院機構  
名古屋医療センター 臨床研究センター  
〒460-0001 名古屋市中区三の丸4丁目1番1号

---