

要で、しかも HIV-1 の広範な遺伝子部分についての検索が必要とされるが、high throughput の DNA sequencer : ABI-3130 を用いるので迅速な実験データの解析が可能となる。

3) 薬剤耐性のメカニズム解析 : HIV-1 が極めて高い増殖能を有し、しかも逆転写酵素 (RT) が error-prone であるという特性のために、HIV-1 の薬剤耐性発現は不可避である。X 線結晶解析をはじめとするタンパクの微細構造研究の方法論を用いて、多剤耐性 HIV-1 株の発現機序の分子・原子レベルでの解析を行う。

その後、構造を基礎とした高い抗ウイルス活性を有しかつ耐性の発現に抵抗する薬剤のデザイン・再デザインを行う。新規の PI に対して試験管内で耐性 HIV-1 変異株の誘導を試み、更にそのようにして誘導された HIV-1 についてのウイルス学・生化学・遺伝子的解析や X 線結晶解析を用いて耐性発現のメカニズムの解析を行う。

4) HIV-1 PR 二量体形成 (dimerization) 阻害 : 我々は CFP/YFP タグ付き PR を有する感染性組み換え HIV-1 クローンと FRET (fluorescence resonance emission transfer) の系を用いて、HIV-1 PR の二量体形成を確認する系を確立した。dimerization に重要とされるアミノ酸 (Asp29, Arg87, Thr26 etc) 置換を有する種々の CFP/YFP タグ付き変異体を多数作成、FRET の系を用いてこれらのアミノ酸置換が dimerization を阻害することを明らかとした。dimerization に重要とされるアミノ酸の詳細な解析を進め、新たな HIV-1 PR 阻害への機序を明らかにする。

5) CCR5 の微細構造学的解析・生理学的解析 : コンピュータモデリングの手法を用いた CCR5 の微細構造学的解析の系を確立、CCR5 と阻害剤の結合モデル、HIV-1 感染 (エンベ

ロープとの結合) と CCR5 の生理作用 (ケモカインによる作用) に重要な構造の解析など行っている。また、電子顕微鏡・蛍光/共焦点顕微鏡を用いた細胞表面の CCR5 の局在性・動態解析も行っている。

(倫理面への配慮)

開発中の化合物の臨床試験導入に際して、まず動物実験などでその安全性を十分に確認する。さらに医学部・大学内の該当する IRB で倫理面での適合性について許可を申請、認可された後で試験を開始する。

### C. 研究結果

広いスペクトラムの薬剤耐性株に高い活性を発揮する PI, TMC114/darunavir (Koh & Mitsuya *et al*, *Antimicrob Agents Chemother*. 47: 3123-3129, 2003)を米国 Purdue University の Dr. Ghosh グループとの共同研究で開発、本剤は 2006 年 6 月に米国 FDA にて認可され、Prezista<sup>TM</sup> として本邦でも臨床に供されることとなった。さらに我々のグループは試験管内における DRV の研究を続けており、複数の多剤耐性臨床分離 HIV-1 混合株を用いた耐性誘導実験において、複数の PI 耐性変異体の重感染と遺伝子相同組み換えが起こることで、HIV-1 が DRV に対する高度耐性を獲得する可能性があることを見出した (Koh, & Mitsuya *et al*, 投稿準備中)。最近では、DRV とは異なる基本骨格である cyclopentanyl-tetrahydrofuran (Cp-THF) を有し、多剤耐性臨床分離 HIV-1 株に対して、野生株と同等 (EC<sub>50</sub> 値で 2 倍以内) の高い活性を発揮する新規 PI, GRL-02031 を開発 (Koh, Deb & Mitsuya *et al*, *Antimicrob Agents Chemother*. 2008, in press)、結晶構造解析を用いた分子

モデリングにて本剤が HIV-1 PR の活性中心部位に 2 つの異なる結合様式 (bimodal binding mode) で結合することを明らかとし、このことが本剤の薬剤耐性 HIV に対して高い活性を発揮する機序の一因と考えられた。

また我々のグループは PIs 耐性と Gag の遺伝子変異についてのウイルス学的・構造学的検討も進めており、APV で耐性誘導した HIV-1 において、PR 領域への APV 耐性関連変異に加え Gag 領域の非開裂部位にアミノ酸変異の蓄積を認め、これら Gag 領域のアミノ酸変異の存在は virus の fitness を改善することにより APV に対する早期の耐性獲得に関与するが、他の PIs に対しては耐性発現が遅延するという異なった影響を及ぼす事を報告した (Aoki & Mitsuya *et al*, *J Virol*. 2009, accepted for publication.)。

また、新規開発中の HIV-1 RTI である 4'-Ethinyl-2-Fluoro-2'-Deoxyadenosine (EFdA) における抗 HIV 活性及び同化合物の細胞内代謝を評価し、ヒト DNA ポリメラーゼに対する影響等を明らかにし (Nakata & Mitsuya *et al*, *Antimicrob Agents Chemother*. 51: 2701-2708, 2007)、EFdA の高い抗 HIV-1 活性を NOG-SCID マウスで証明、更に SIV 感染サルでの実験を進め (米国 Pittsburgh University のグループとの共同研究)、末期 SIV 感染サルで高い抗 SIV 活性を確認、また長期毒性についても検討、サルでの安全性が確認された (投稿準備中)。今後も EFdA の臨床開発へ向けた努力を米国のグループと共同で展開していく予定であり、極めて佳良な準備のデータを得ている。

ケモカイン受容体である CCR5, CXCR4 は HIV-1 のコレセプターとして HIV-1 の細胞侵入過程に重要な役割を持っている。このよう

なウイルスの細胞への侵入過程は既存の主な抗 HIV 剤と作用機序の異なる新たな治療薬のターゲットとしても有望であり、満屋は現在までに米国での臨床試験で強力な抗 HIV-1 効果が確認された CCR5 阻害剤: Aplaviroc (AK602: 肝障害のため第三相臨床試験は休止中) を始め、複数の CCR5 阻害剤の同定に成功している。一方で我々はこれらの阻害剤の作用機序の解明のための研究も進めており、結晶解析・コンピュータモデリングの手法を用いた CCR5 の微細構造学的解析の系を確立、CCR5 と阻害剤の結合モデル、HIV-1 感染 (エンベロープとの結合) と CCR5 の生理作用 (ケモカインによる作用) に重要な構造の解析などを既に報告している (Maeda & Mitsuya *et al*, *J Mol Biol*. 381:956-974, 2008)。

我々はケモカイン受容体阻害剤開発研究の過程で、CCR5 阻害剤分子が細胞表面の CCR5 のすべてに結合しなくても HIV-1 感染がほぼ完全に抑制されるという事象を見いだした。これに類似するデータとして、細胞表面に HIV-1 被感染性の無い (変異) CCR5 が一部 (50%程度) 含まれるだけで HIV-1 感染性が著明に失われることを明らかにしており、これは HIV-1 と細胞の接着・融合の過程で形成される HIV-1 エンベロープ・CD4・ケモカイン受容体 (CCR5) 複合体が正常に形成されないと HIV の侵入・感染が成立しない、という機序を示唆しているものと思われる (Maeda, Nakata & Mitsuya, 投稿準備中)。一方で結晶解析・コンピュータ・モデリングの手法を用いた 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、現在ではこのモデルを応用して CCR5 結合能のある新規の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・同定にも成功している (Yin, Maeda & Mitsuya, 投稿準備中)。今後これらの知見を統合・発展させ、HIV-1 粒子が細胞へ侵入するのに必要な HIV-1 エンベロープ・CD4・CCR5 の量的解析とこれらの結合モデル作成を進めると同時に詳細な CCR5 の微細構造解析を進め、より強力且つ効果的に HIV-1 感染を阻害する低分子化合物の開発を続けていく。

細胞表面の HIV-1 受容体と HIV-1 エンベロープの相互作用と HIV-1 感染の関連をみる手法として、各種画像解析も行っている。具体的には電子顕微鏡・蛍光/共焦点顕微鏡を用いた細胞表面の HIV-1 受容体の局在性・動態解析の手法を確立し、ウイルス接着時のこれらの分子動態を解明することを目標とする。我々は既にレポータータンパク (YFP) を結合させた CCR5 のレーザー顕微鏡での解析により、細胞表面の CCR5 は非常に流動性に富むこと (Nakata & Mitsuya, 投稿準備中)、電子顕微鏡での解析により通常の状態 (HIV-1 感染に関与していない) での CCR5 は細胞表面にクラスターを形成して存在す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。また新規 RTI の開発についても同様に米国のグループと共同で引き続き継続していく。更に 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。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Aoki M, David JV, Koh Y, Aoki-Ogata H, Miyakawa T, Yoshimura K, Maeda K, and Mitsuya H. (2009) Non-cleavage Site Gag Mutations in Amprenavir-resistant HIV-1 Predispose HIV-1 to Rapid Acquisition of Amprenavir Resistance But Delays Development of Resistance to Other Protease Inhibitors. *J Virol.* accepted for publication.
2. Koh Y, Das D, Leschenko S, Nakata H, Ogata-Aoki H, Amano M, Nakayama M, Ghosh AK and Mitsuya H. (2009) GRL-02031: A Novel Nonpeptidic

- Protease Inhibitor (PI) Containing A Stereochemically Defined Fused Cyclopentanyltetrahydrofuran (Cp-THF) Potent Against Multi-PI-Resistant HIV-1 In Vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 53(3): 997-1006.
3. Ghosh AK, Chapsal BD, Baldrige A, Ide K, Koh Y and Mitsuya H. (2008) Design and Synthesis of Stereochemically Defined Novel Spirocyclic P2-Ligands for HIV-1 Protease Inhibitors. *Org Lett.* 10: 5135-8.
  4. Ghosh AK, Gemma S, Takayama J, Baldrige A, Leshchenko-Yashchuk S, Miller HB, Wang YF, Kovalevsky AY, Koh Y, Weber IT and Mitsuya H. (2008) Potent HIV-1 protease inhibitors incorporating meso-bicyclic urethanes as P2-ligands: structure-based design, synthesis, biological evaluation and protein-ligand X-ray studies. *Org Biomol Chem.* 6: 3703-13.
  5. Ghosh AK, Gemma S, Baldrige A, Wang YF, Kovalevsky AY, Koh Y, Weber IT and Mitsuya H. (2008) Flexible cyclic ethers/polyethers as novel P2-ligands for HIV-1 protease inhibitors: design, synthesis, biological evaluation, and protein-ligand X-ray studies. *J Med Chem.* 51: 6021-33.
  6. Maeda K, Das D, Yin PD, Tsuchiya K, Ogata-Aoki H, Nakata H, Norman RB, Hackney LA, Takaoka Y and Mitsuya H. (2008) Involvement of the second extracellular loop and transmembrane residues of CCR5 in inhibitor binding and HIV-1 fusion: insights into the mechanism of allosteric inhibition. *J Mol Biol.* 381: 956-74.
  7. Kawamoto A, Kodama E, Sarafianos SG, Sakagami Y, Kohgo S, Kitano K, Ashida N, Iwai Y, Hayakawa H, Nakata H, Mitsuya H, Arnold E, Matsuoka M. (2008) 2'-deoxy-4'-C-ethynyl-2-halo-adenosines active against drug-resistant human immunodeficiency virus type 1 variants. *Int J Biochem Cell Biol.* 40:2410-20.
  8. Nakata H, Steinberg SM, Koh Y, Maeda K, Takaoka Y, Tamamura H, Fujii N and Mitsuya H. (2008) Potent synergistic anti-human immunodeficiency virus (HIV) effects using combinations of the CCR5 inhibitor aplaviroc with other anti-HIV drugs. *Antimicrob Agents Chemother.* 52: 2111-9.
  9. Mitsuya H, Maeda K, Das D and Ghosh AK. (2008) Development of protease inhibitors and the fight with drug-resistant HIV-1 variants. *Adv Pharmacol.* 56: 169-97.
  10. Ghosh AK, Chapsal BD, Weber IT and Mitsuya H. (2008) Design of HIV protease inhibitors targeting protein backbone: an effective strategy for combating drug resistance. *Acc Chem Res.* 41: 78-86.
2. 学会発表(国際学会のみ)
1. "Involvement of the Second Extracellular Loop (ECL2) and Transmembrane Residues of CCR5 in Inhibitor Binding and HIV-1 Fusion." (H-4041) K. Maeda K, Das D, Yin PD, Tsuchiya K, Ogata-Aoki H, Nakata H, Norman R, 1, L. Hackely L,

- Takaoka Y and Mitsuya H. 48<sup>th</sup> Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC) / 46<sup>th</sup> Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America (IDSA), October, 25-28, 2008, Washington, DC, US.
2. "Study of Cellular CCR5 Dynamics and its Alterations by CCR5 Inhibitors Using YFP-Tagged CCR5-expressing Cells." (H-4043) Nakata H, Kamata W, Ogata-Aoki H, Maeda K and H. Mitsuya H. 48<sup>th</sup> Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC) / 46<sup>th</sup> Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America (IDSA), October, 25-28, 2008, Washington, DC, US.
3. "Bimodal Binding to HIV-1 Protease of GRL-02031 (G31), a Novel Protease Inhibitor (PI) Containing a Cyclopentanyltetrahydrofuran (Cp-THF)." (H-1267), Koh Y, Das D, Leschenko S, Nakata H, Ogata-Aoki H, Amano M, Nakayama M, Ghosh AK and Mitsuya H. 48<sup>th</sup> Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC) / 46<sup>th</sup> Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America (IDSA), October, 25-28, 2008, Washington, DC, US.
4. "Non-peptidyl Small Molecule Protease Dimerization Inhibitors: Molecular and Structural Analysis of Their HIV-1 Inhibition and Interactions with Protease Monomer Subunit." (Poster 733), Koh Y, Matsumi S, Das D, Amano M, Davis DA, Li J, Leschenko S, Baldrige A, Shioda T, Yarchoan R, Ghosh AK, Mitsuya H. 15<sup>th</sup> Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Feb 3-6, 2008. Boston, MA, US.
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）**
- 1. 特許取得**
- (1) The Name of the Patent: Fitness assay and associated methods  
Date of Issuance: December 30, 2008  
US Patent Number: 7,470,506  
Erickson; John W. (Frederick, MD), Gulnik; Sergei V. (Frederick, MD), Mitsuya; Hiroaki (Chevy Chase, MD), Ghosh; Arun K. (River Forest, IL)  
Assignee: The United States of America as represented by the Department of Health and Human Services (Washington, DC) and Board of Trustees of the University of Illinois.  
Appl. No.: 09/720,276  
Filed: June 23, 1999  
PCT Filed: June 23, 1999  
PCT No.: PCT/US99/14119  
371(c)(1),(2),(4) Date: March 07, 2001  
PCT Pub. No.: WO99/67417  
PCT Pub. Date: December 29, 1999
- (2) The Name of the Patent: 4'-C-substituted-2-haloadenosine derivative  
Date of Issuance: March 4, 2008  
US Patent Number: 7,470,506  
Erickson; Satoru Kohgo, Kashima-gun (JP); Hiroshi Ohru, Sendai (JP); Eiichi Kodama, Kyoto (JP); Masao Matsuoka, Otsu (JP); Hiroaki

Mitsuya, Kumamoto (JP)

Assignee: Yamasa Corporation, Chiba (JP)

Appl. No.: 11/087,588

Filed: March 24, 2005

2. 実用新案登録

特になし



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  
“臨床試験中の新規核酸誘導体 4'-ethynyl-d4T に対する耐性ウイルスの解析”

研究分担者 馬場昌範 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 教授

研究協力者 濱崎隆之 エイズ予防財団 リサーチレジデント

研究要旨：欧米で臨床試験が開始された新規核酸系逆転写酵素阻害薬 4'-ethynyl-d4T (4'-Ed4T) について、我々が以前に *in vitro* において分離した、耐性ウイルスの遺伝子変異やウイルス学的性質を詳しく検討したところ、逆転写酵素の polymerase 領域に 3 つのアミノ酸変異 (P119S, T165A, M184V) が存在し、それ以外の connection および RNaseH 領域には変異を持たないことが分かった。また、このウイルスは、4'-Ed4T と類似の化学構造を持つ 4'-EFdA に対し、交叉耐性を有することも明らかとなった。

#### A. 研究目的

既存の核酸系逆転写酵素阻害薬 (NRTIs) における薬剤耐性ウイルスの誘導と慢性毒性の問題を克服し、より有効かつ安全な抗 HIV-1 化学療法を達成するために、我々は種々の核酸誘導体について、それらの抗 HIV-1 効果を検討した結果、これまでに 4'-ethynyl-d4T (4'-Ed4T) を見いだしている。4'-Ed4T はミトコンドリアの DNA 合成に必要な DNA polymerase  $\gamma$  を含む全ての DNA polymerases に対してほとんど影響を与えないことから、*in vivo* においてきわめて安全性が高いと予想されてきた。実際、動物を用いた前臨床毒性試験においても、高い安全性を示したことから、現在は欧米において第 I 相臨床試験が実施されている。

一方、4'-Ed4T は既存の NRTIs とは異なった薬剤耐性プロフィールを示すことが明らかになっている。我々は *in vitro* において、HIV-1 感染細胞を 4'-Ed4T の濃度を徐々に上昇させることで継代を続け、4'-Ed4T に対する耐性ウイルスを分離することに成功している。そこで本研究では、分離した薬剤耐性ウイルスについて、遺伝子変異や他の薬剤との交叉耐性に関し

詳しく検討することで、耐性ウイルスの性質を明らかにすることを目的とした。

#### B. 研究方法

薬剤：4'-Ed4T (図 1) は昭和大学薬学部の田中博道博士により合成された。4'-EFdA (図 1) は本研究班の分担者研究者でもある、熊本大学医学薬学研究科の満屋裕明博士から分与して頂いた。また、lamivudine (3TC) は Sigma より購入した。全ての薬剤は dimethyl sulfoxide の毒性の影響を除くため、20 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。

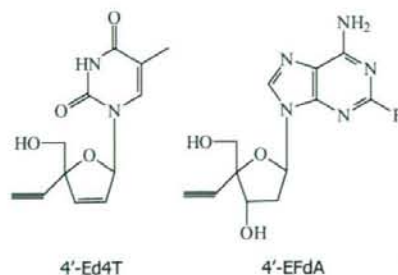


図 1. 薬剤の化学構造

細胞：抗 HIV-1 アッセイ用には、MT-4 細胞を用いた。細胞は 10% ウシ胎仔血清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。

ウイルス：HIV-1 の標準株として III<sub>B</sub> 株を用いた。4'-Ed4T 耐性ウイルスの誘導方法は次の通りである。MT-4 細胞に HIV-1 を感染させ、4'-Ed4T の存在下にて培養した。対照薬剤として 3TC 用いた。感染細胞は 4 日ごとに同じ薬剤を含む新鮮な培養液にて継代を行った。その際、顕微鏡下で感染細胞を観察し、細胞が HIV-1 による細胞変性効果により死滅した場合は、その時の培養上清を採取し、新たな MT-4 細胞に感染させるとともに、薬剤の濃度を上昇させた条件にて培養を続けた。十分な濃度においても、ウイルスの増殖（ブレイクスルーウイルス）が認められるときは、その培養上清を薬剤非存在下において 1 回継代し、上清を採取した。得られたウイルスは、MT-4 細胞にて増殖させ、その培養上清をストックウイルスとして使用した。

抗ウイルスアッセイ：薬剤の抗 HIV-1 効果は、感染細胞における細胞変性効果抑制の有無を調べることにより判定した。すなわち、MT-4 細胞にそれぞれ HIV-1 を感染させ、種々の濃度の薬剤とともに培養した。培養 4 日目に感染細胞の生細胞数を MTT 法にて定量した。

逆転写酵素遺伝子のシーケンス：ブレイクスルーウイルスが得られた感染細胞から DNA を抽出し、polymerase chain reaction (PCR) 法にて逆転写酵素の全領域を増幅した。増幅産物を電気泳動により分離した後、それらの核酸配列を直接シーケンスした。

#### （倫理面への配慮について）

本研究では、個人が特定出来るようなヒトのサンプルは一切用いていない。

### C. 研究結果

耐性ウイルスのアミノ酸変異：薬剤の濃度を徐々に増加させながら、感染細胞の継代培養を続けた結果、培養 29 日目には 3TC の存在下において、4'-Ed4T 存在下においては、26 日および 81 日間の継代培養にてブレイクスルーウイルスを得た（図 2）。これらの逆転写酵素の polymerase 領域の遺伝子変異について検討したところ、3TC 存在下にて誘導されたブレイクスルーウイルスは予想通り、M184V のアミノ酸変異を有していた（表 1）。一方、4'-Ed4T 存在下において 81 日目に得られたウイルスの逆転写酵素には、核酸レベルでは 5 ヶ所に変異が認められたが、アミノ酸レベルでは、M184V に加えて、P119S および T165A という 2 つの変異が存在した（表 1）。

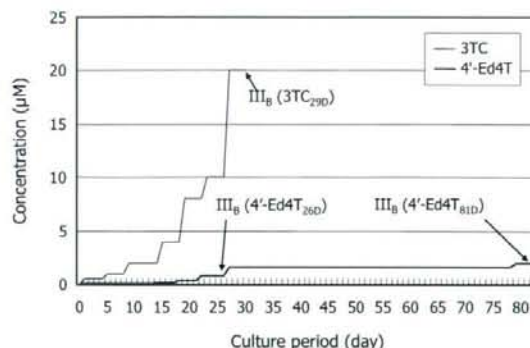


図 2. 4'-Ed4T 耐性ウイルスの誘導



表1. ブレークスルーウイルスにおける逆転写酵素領域の核酸およびアミノ酸変異

	Number of amino acid residue				
	40	119	136	165	184
WT	E (GAA)	P (CCC)	N (AAC)	T (ACA)	M (ATG)
TKD-R	E (GGA) E (GGG)	S (TCC)	N (AAT)	A (GCA)	V (GTG)
3TC-R	E (GGA)	P (CCC)	N (AAC)	T (ACA)	V (GTG)

WT: III<sub>B</sub> (wild type), TKD-R: III<sub>B</sub> (4'-Ed4T<sub>81D</sub>), 3TC-R: III<sub>B</sub> (3TC<sub>29D</sub>).  
Unpublished data.

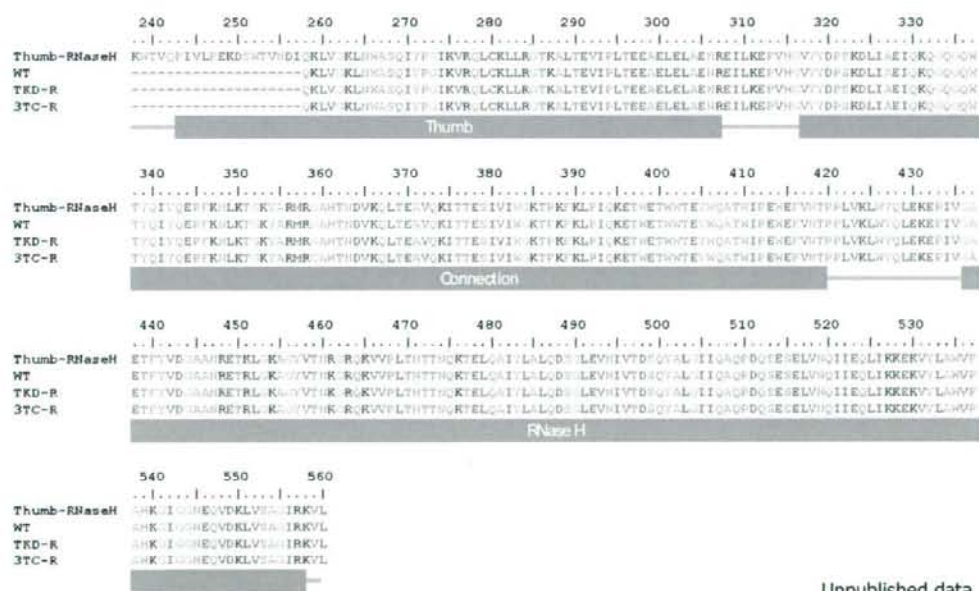


図3. ブレークスルーウイルスの逆転写酵素 connection および RNaseH 領域のアミノ酸変異

P119S, T165A, および M184V のアミノ酸変異は全て逆転写酵素の polymerase 領域に存在する。そこで、それ以外の connection および RNaseH 領域にもアミノ酸変異が存在するか

どうか検討した。その結果、図3に示すように、4'-Ed4T に対して耐性を示すウイルスには、野生型と比較して、この2つの領域にアミノ酸変異を全く認めなかった。

表 2. 耐性 HIV-1 に対する 4'-Ed4T と 4'-EFdA の活性

Strain	EC <sub>50</sub> (μM)		
	4'-Ed4T	4'-EFdA*	3TC
III <sub>B</sub> (wild type)	0.22 ± 0.13	0.0011 ± 0.0003	2.0 ± 0.8
III <sub>B</sub> (3TC <sub>29D</sub> )	0.41 ± 0.08	0.014 ± 0.004	> 20
III <sub>B</sub> (4'-Ed4T <sub>26D</sub> )	0.39 ± 0.13	0.0055 ± 0.0031	> 20
III <sub>B</sub> (4'-Ed4T <sub>81D</sub> )	2.3 ± 1.4	0.028 ± 0.012	> 20
CC <sub>50</sub> (μM)	> 20	8.4 ± 0.9	> 20

EC<sub>50</sub>: 50% effective concentration based on the inhibition of virus-induced cytopathicity in MT-4 cells.

CC<sub>50</sub>: 50% cytotoxic concentration based on the reduction of viable cell number in mock-infected MT-4 cells.

All data represent means±SD for 3 separate experiments.

Unpublished data. \*Nakata et al. Antimicrob. Agents Chemother. 51:2701-2708 (2007).

耐性ウイルスの他の薬剤に対する感受性:誘導された耐性ウイルスの 4'-Ed4T, 4'-EFdA, そして 3TC に対する活性を表 2 に示す。4'-Ed4T 耐性ウイルス [III<sub>B</sub> (4'-Ed4T<sub>81D</sub>)] は野生株 III<sub>B</sub> と比較すると, 4'-Ed4T に対して約 10 倍の感受性低下を示した。一方, 構造が 4'-Ed4T と類似している 4'-EFdA については, 約 25 倍の感受性低下を示した。また, 3TC に対しては 20 μM の濃度まで全く感受性を示さなかった。このことから, 4'-Ed4T 耐性ウイルスは 4'-EFdA および 3TC に対して交叉耐性有することが明らかとなった。4'-Ed4T は M184V の変異のみを持っている III<sub>B</sub> (4'-Ed4T<sub>26D</sub>) と III<sub>B</sub> (3TC<sub>29D</sub>) に対しては, 2 倍程度のわずかな活性低下を示すにとどまった。これらの株に対し, 4'-EFdA は 5 から 12 倍の活性低下, 3TC は無効という結果となった。

#### D. 考察

4'-Ed4T (図 1) は分担研究者が昭和大学薬学部の田中博道博士と米国エール大学医学部

の Yung-Chi Cheng 博士と共同で同定した, NRTI である。通常の NRTIs と異なり 4'位に置換基を有する, ユニークな化学構造を持っている。4'位置換の核酸誘導体については, 今回の研究で使用した 4'-EFdA (図 1) や, 古くは 4'-AZT が強い抗 HIV-1 活性を保持しているが, 何れも 3'位に水酸基がないと活性を示さない。一方で, この水酸基の存在のために, 宿主細胞の DNA polymerases の活性に影響を与える可能性を否定できず, 現在, 満屋裕明博士らによって開発研究が進められている 4'-EFdA を除いては, 何れも毒性のために開発が中止されたという経緯がある。この点において, 4'-Ed4T は 3'位に水酸基を有することなく, 強い抗 HIV-1 効果を示すとともに, 宿主細胞の何れの DNA polymerases の活性にほとんど影響を与えないという, 優れた特徴を持っている。

4'-Ed4T の動物を用いた前臨床薬理および毒性試験では, 優れた薬物動態ときわめて低い毒性を示したため, 現在, 欧米において第 I 相臨床試験が行われている。健常者を対象とした第

Ia 相臨床試験の結果によると、4'-Ed4T の非常に優れた経口吸収性と 900 mg までの高い忍容性が証明されている (data not shown)。この結果を受けて、現在は HIV-1 感染者を対象にした第 Ib 相臨床試験が進行中である。

薬剤耐性ウイルスに関する研究では、4'-Ed4T は既存の NRTIs に対する耐性ウイルスに対しても有効であることが、過去の研究によって明らかにされている。事実、今回の研究では、4'位に置換基を有する NRTIs に耐性を賦与するとされている M184V 変異を有するウイルスに対しても、約 2 倍程度と、わずかな活性の低下しか示さなかった。また、4'-Ed4T に有意な耐性を賦与するためには、M184V に加えて、複数の逆転写酵素領域のアミノ酸変異 (特に T165A) が必要とされているが、この変異を持つウイルスに対しても、活性の低下は 10 倍程度に止まることが分かった。さらに、T165A の変異はウイルスの fitness を低下させることが知られており、この点からも 4'-Ed4T の新しい NRTI としての期待は高い。

## E. 結論

分担研究者らが同定し、研究を続けている新規 NRTI の 4'-Ed4T は、活性、毒性、薬理学的特性、そして薬剤耐性のいずれの点からも、既存の NRTIs と比べて優れており、今後の実用化に向けた研究開発を続ける価値があるものと思われる。

## F. 研究発表 (本研究に直接関係するもの) (論文発表)

1. Kumamoto H, Takahashi N, Shimamura T, Tanaka H, Nakamura KT, Hamasaki T, Baba M, Abe H, Yano M, kato N. Synthesis of ( $\pm$ )-9-[*c*-4, *t*-5-bis(hydroxylmethyl)cyclopent-2-en-*r*-1-yl]-9-*H*-adenine (BCA) derivatives branched at the 4'-position based on intramolecular S<sub>H</sub>2' cyclization. *Tetrahedron* **64**: 1494-1505 (2008).
2. Haraguchi K, Shimada H, Tanaka H, Hamasaki T, Baba M, Gullen EA, Dutschman GE, Cheng Y-C. Synthesis and anti-HIV activity of 4'-substituted 4'-thiothymidines: A new entry based on nucleophilic substitution of 4'-acetoxy group. *J. Med. Chem.* **51**: 1885-1893 (2008).
3. Yang G, Wang J, Cheng Y, Dutschman GE, Tanaka H, Baba M, Cheng Y-C. Mechanism of inhibition of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase by a stavudine analog, 4'-ethynyl stavudine triphosphate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**: 2035-2042 (2008).
4. Kumamoto H, Haraguchi K, Ida M, Tanaka H, Hamasaki T, Baba M. Synthesis and antiviral evaluation of ( $\pm$ )-4'-ethynyl-5'-difluorocarbonyl-cyclic-d4T analogue. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **52**: 609-610 (2008).
5. 馬場昌範 (分担). 抗ウイルス薬. 河野 茂 (編集)「ウイルスハンドブック」pp103-104, 日本医学館 (2008).

## (学会発表)

1. Baba M. Preclinical evaluation of 4'-Ed4T (OBP-601): a novel NRTI under phase I clinical trials. *21th Joint Meeting of AIDS Panel, Japan-U.S. Cooperative Medical Science Program*, September 12, 2008, Tokyo, Japan.
2. 濱崎隆之, 馬場昌範. Cyclin T1 を標的とした薬剤の in silico スクリーニング. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会, 2008 年 10 月 27 日, 岡山.

## G. 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、特許出願および取得はない。



## HIV に対する新規薬剤開発

研究分担者： 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を明らかにした。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、その開発を進めた。

## A. 研究目的

かつては不治の病と恐れられた HIV-1 感染症は複数の抗ウイルス剤を組み合わせた多剤併用療法（highly active anti-retroviral therapy: HAART）の導入により制御可能な感染症へと変貌した。しかし、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障害となってきた。耐性ウイルスの克服のためには新規標的に対する治療薬の開発と共に逆転写酵素やプロテアーゼに対する、より強力な既存の耐性ウイルスに有効な薬剤の開発が必要である。本研究では、新規の抗 HIV 剤を開発し強力な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) 4' エチニル基を有する RT 阻害剤 (4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine: EFdA) に対する耐性機構

4' エチニルデオキシアデノシンに対する耐性ウイルスを dose escalation 法により誘導した。この耐性ウイルス変異を同定し、変異を有する infectious clone を作成した。各薬剤に対する感受性は MAGI assay を用いて解析した。

2) EFdA 代謝経路の解析

EFdA の アデノシンデアミナーゼ (adenosine deaminase: ADA) に対する感受性は HPLC で解析した。AraC 耐性 HT-1080 細胞株 (HT-1080/Ara-C') に CD4, CXCR4 発現ベクターをトランスフェクトし、HIV-1 感受性株を樹立した。ヒト deoxycytidine kinase (dCK) 発現ベクター

を作成し dCK を回復させた。

3) EFdA 耐性機構の解析

3TC 耐性変異である M184V により 2F-EdA に対する耐性上昇が認められたため構造生物学的な解析を行い、その機序解明を目指した。

## (倫理面への配慮)

本研究は試験管内での実験であり、特に必要のないものとする。

## C. 研究結果

1) エチニル核酸化合物の抗 HIV-1 効果

エチニル核酸化合物を合成し、抗 HIV-1 抑制作用を検討したところ、特に 2 位にハロゲン基を有する EFdA, ECl-dA が強い抗 HIV-1 活性を有していた(図 1)。EFdA の EC50 は 0.073 nM と極めて強力な抗 HIV-1 活性を有していた。2-deoxyribose to 2,3-dideoxy- or 2,3-didehydro-2,3-dideoxy-ribose (EFddA or EFd4A) の抗 HIV-1 活性は著しく低下しており活性には 3'-OH が重要であることが示唆された。

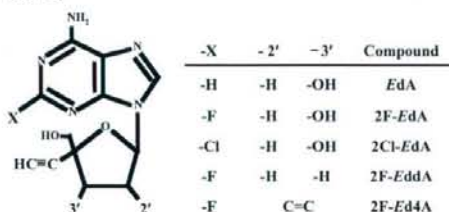


図 1. 4'-Ethynyl-deoxyadenosine誘導体の特徴

2) EFdA のアデノシンデアミナーゼに対する感受性

アデノシンデアミナーゼ (adenosine deaminase: ADA) は dA を dI に変換するためにリン酸化されにくくなり、活性の低下をもたらす。このため EFdA の ADA に対する感受性を解析した。EdA は ADA により 90 分間で、ほぼ完全に脱アミノ化されたのに対して EFdA は全く脱アミノ化されなかった。このことから 2 位にフッ素を付加することによ

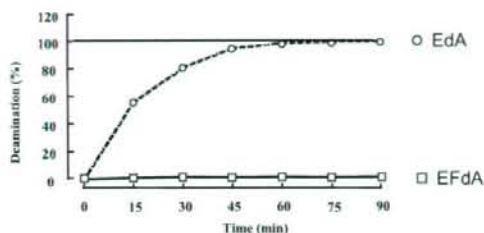


図2. EFdAのADAに対する安定性

り ADA に対する抵抗性が付与されたことが示唆された。

### 3) EFdA のリン酸化

核酸系逆転写酵素阻害剤が効果を発揮するためには 3 リン酸化体になる必要がある。2'-デオキシヌクレオチドの添加による活性阻害をみることで kinase を特定できる。EFdA の抗ウイルス活性は dG, dT, dA では殆ど影響を受けず dC の添加により強く抑制された。

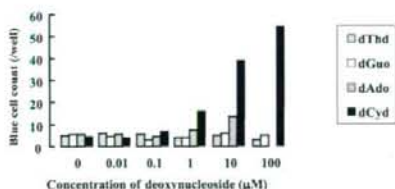


図3. 2'デオキシヌクレオチドによるEFdA抗ウイルス活性の抑制

このことから EFdA は細胞 2'-deoxycytidine kinase (dCK)によりリン酸化されることが予想された。これを確認するために dCK 欠損 HT-1080/Ara-C<sup>r</sup>細胞株と dCK を発現させた細胞株を用いて抗ウイルス活性を測定した。dCK 欠損細胞株では EFdA の抗ウイルス活性は 677 倍低下した。しかし、dCK を発現させた細胞では活性は回復していた。ddC も同様の傾向を示した。以上より EFdA は dCK によ

りリン酸化され強力な抗ウイルス活性を発揮することが明らかとなった。

### 3) EFdA に対する耐性機構

EdA に対する耐性ウイルスを dose escalation 法で誘導した。得られた耐性ウイルスの変異を同定し、I142V/T165R/M184V であることが明らかとなった。またエチニル化合物に対する耐性ウイルスを誘導したグループも同様の耐性変異 (I119S/T165A/M184V) を報告している。T165 を Arg あるいは Ala に変えた変異ウイルスでは M184V と組み合わせることにより EdA, EFdA に対する感受性の低下が認められた。同様の耐性変化は I142V/M184V でも認められた。一方、T165, I142 の変異のみでは耐性には大きな変化は認められなかった。以上より主な耐性変異は M184V であり、これに T165, I142 の変異が加わることで耐性度の上昇が起こること示された。

### 4) 耐性変異の複製へ及ぼす影響

M184V, T165R/M184V, I142V/ T165R/M184V の変異を有する HIV-1 を作成し、複製能への影響をみた。P24 産生でみると M184V はウイルス複製を障害し、T165R あるいは I142V/ T165R は更に複製能を低下させた。Competitive HIV-1 replication assay で解析すると T165R/M184V, I142V/ T165R/M184V では野生型、M184V と比較して著しく複製能が障害されていたが、T165R/M184V と I142V/ T165R/M184V の複製能には大きな違いは認められなかった。

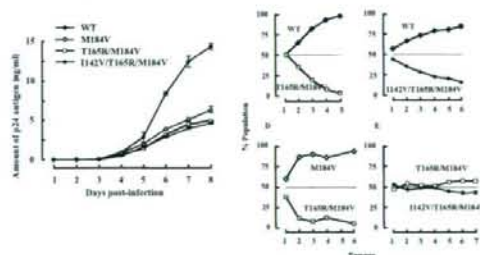


図4. EFdA耐性変異が複製に及ぼす影響

### 5) 耐性機構の立体構造学的解析

耐性変異の立体構造解析から M184V 変異により 3TC に対しては steric hinderance により核酸の侵入が阻害されるのに対して EFdA では steric hinderance の程度が弱いために耐性となりにくいことが示された。3'-OH 基が Q151 と水素結合を形成することによって、このような立体構造となっていることが推測された。また T165R 変異は V184 との水素



結合を失うことで V184 の位置を変化させ耐性に寄与していることが示された。

#### D. 考察

従来の逆転写酵素阻害剤は 3'-OH を欠き chain termination を起こすことによって抗ウイルス効果を発揮する。今回の同定された EFdA は 3'-OH を有しているが 4' に存在するエチニル基によって chain termination を起こす。むしろ 3'-OH を有しないエチニル化合物は抗 HIV-1 活性が低下していたことから 3'-OH の存在が高活性に寄与していることが考えられた。今回同定した中で EFdA は非常に低濃度で効果を発揮していた。この高活性の原因として EdA はアデノシンデアミナーゼによって代謝されるのに対して EFdA は ADA 耐性となっていた。このことが細胞内での長い半減期を可能にしていると考えられる。EFdA のリン酸化に関して dC 添加により活性が阻害された。このことから dCK が EFdA のリン酸化酵素であることが示唆された。3TC 耐性を付与する M184V 耐性変異は EFdA に対しても若干の耐性をもたらすが、T165R により耐性の上昇を認めている。耐性変異の複製に及ぼす影響を解析すると M184V により低下した複製能が T165R, I142V により著明に低下した。このことから EFdA に対する耐性変異はウイルスの複製能を著しく障害するために、その出現が制約されることが期待される。

#### E. 結論

新規逆転写酵素阻害剤 EFdA の抗 HIV-1 活性を証明し、その耐性機序を明らかにした。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

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 Matsuoka M. 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.

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.

Kajiwaru 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.

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.

Hachiya A, Kodama EN, Sarafianos SG, Schuckmann MM, Sakagami Y, Matsuoka M, Takiguchi M, Gatanaga H, Oka S. Amino Acid Mutation N348I in the Connection Subdomain of HIV-1 Reverse Transcriptase Confers Multi-class Resistance to Nucleoside and Non-nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors. *J Virol*. 82: 3261-70, 2008.

Ueda S, Kato M, Inuki S, Ohno H, Evans B, Wang ZX, Peiper SC, Izumi K, Kodama E, Matsuoka M, Nagasawa H, Oishi S, Fujii N. Identification of novel non-peptide CXCR4 antagonists by ligand-based design approach. *Bioorg Med Chem Lett*. 18:4124-4129, 2008.

Oishi S, Masuda R, Evans B, Ueda S, Goto Y, Ohno H, Hirasawa A, Tsujimoto G, Wang Z, Peiper SC, Naito T, Kodama E, Matsuoka M, Fujii N. Synthesis and Application of Fluorescein- and Biotin-Labeled Molecular Probes for the Chemokine Receptor CXCR4. *Chembiochem*, 9: 1154-8115, 2008.

Nishikawa H, Kodama E, Sakakibara A, Fukudome A, Izumi K, Oishi S, Fujii N, Matsuoka M. Novel screening systems for HIV-1 fusion mediated by two extra-virion heptad repeats of gp41. *Antiviral Res*, 80: 71-76, 2008.

Kawamoto A, Kodama E, Sarafianos SG,



- Sakagami Y, Kohgo S, Kitano K, Ashida N, Iwai Y, Hayakawa H, Nakata H, Mitsuya H, Arnold E, Matsuoka M. 2'-Deoxy-4'-C-ethynyl-2-halo-adenosines active against drug-resistant human immunodeficiency virus type 1 variants. **Int J Biochem Cell Biol.** 40: 2410-2420, 2008.
- Yoshida M, Satou Y, Yasunaga J-I, Fujisawa JI, Matsuoka M. Transcriptional control of spliced and unspliced *HTLV-1 bZIP factor* gene. **J Virol**, 82: 9359-9368, 2008.
- Izumi K, Kodama E, Shimura K, Sakagami Y, Watanabe K, Ito S, Watabe T, Terakawa Y, Nishikawa H, Sarafianos SG, Kitaura K, Oishi S, Fujii N, Matsuoka M. Design of peptide-based inhibitors for HIV-1 strains resistant to T-20. **J Biol Chem.** 2008 Dec 10. [Epub ahead of print]
- Nishikawa H, Nakamura S, Kodama E, Ito S, Kajiwara K, Izumi K, Sakagami Y, Oishi S, Ohkubo T, Kobayashi Y, Otaka A, Fujii N, Matsuoka M. Electrostatically constrained alpha-helical peptide inhibits replication of HIV-1 resistant to enfuvirtide. **Int J Biochem Cell Biol.** 2008 Sep 10. [Epub ahead of print]
- Nishikawa H, Oishi S, Fujita M, Watanabe K, Tokiwa R, Ohno H, Kodama E, Izumi K, Kajiwara K, Naitoh T, Matsuoka M, Otaka A, Fujii N. Identification of minimal sequence for HIV-1 fusion inhibitors. **Bioorg Med Chem.** 16:9184-9187, 2008.
- Zhao T, Yasunaga J-I, Satou Y, Nakao M, Takahashi M, Fujii M, Matsuoka M. Human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor selectively suppresses the classical pathway of NF- $\kappa$ B. **Blood**, (in press).
- Yoshida M, Satou Y, Yasunaga J-I, Fujisawa JI, Matsuoka M. Transcriptional control of spliced and unspliced *HTLV-1 bZIP factor* gene. **J Virol**, 82: 9359-9368, 2008.
- immune response. IID 2008 Satellite Workshop "Virus-associated Lymphomas". Kyoto, Japan, May 13, 2008.
- Sakurai Y, Komatsu K and Matsuoka M. Aberrant Sequences in Retrovirus-Host Junctions by Deficiency of DNA Double Strand Break Repair Enzymes. CROI 2009. Montreal, Canada, Feb 8-11, 2009.
- Kazuya Shimura, E Kodama, D Nameki, Y Sakagami, S Oishi, N Fujii, M Matsuoka. Resistant Profile of the Electrostatically Constrained Next-generation HIV-1 Fusion Inhibitors. CROI 2009. Montreal, Canada, Feb 8-11, 2009.
- Marchand B, Michailidis L, Kodama E-I, Ryan E, Matsuoka M, Ashida N, Mitsuya H, Nagy E, Parniak M and Sarafianos S. Mechanisms of Resistance and Hypersusceptibility to Translocation-deficient RTIs. CROI 2009. Montreal, Canada, Feb 8-11, 2009
- 松岡雅雄：ヒトT細胞白血病ウイルス1型の病原性発現機構：第48回日本リンパ網内系学会総会、札幌、2008年6月13-14日
- 吉田美香、佐藤賢文、安永純一郎、藤澤順一、松岡雅雄：HTLV-1 bZIP factor 遺伝子プロモーター領域の同定と解析：第1回 HTLV-1 研究会、東京、2008年8月23-24日
- 趙鉄軍、安永純一郎、中尾光善、藤井雅寛、松岡雅雄：HTLV-1 bZIP factor selectively suppresses classical NF- $\kappa$ B pathway：第1回 HTLV-1 研究会、東京、2008年8月23-24日
- 趙鉄軍、安永純一郎、中尾光善、藤井雅寛、松岡雅雄：HTLV-1 bZIP factor 遺伝子による定型的 NF- $\kappa$ B 経路の選択的抑制：第70回日本血液学会総会、京都、2008年10月10-12日
- 松岡雅雄：ATL, HTLV-1 研究の進歩：第70回日本血液学会総会、京都、2008年10月10-12日

## 2. 学会発表

- Matsuoka M, Sakurai Y, Komatsu K. Lentivirus integration and DNA repair. Ataxia-Telangiectasia Workshop 2008. Otsu, Japan, Apr 22-26, 2008.
- Matsuoka M. Molecular pathogenesis and host

松岡雅雄：ヒト T 細胞白血病ウイルスの病原性発現機構：第 67 回日本癌学会総会、名古屋、2008 年 10 月 28-30 日

田邊順子、宇都宮興、田野崎隆二、鶴池直邦、佐藤賢文、岡村純、松岡雅雄：造血幹細胞移植療法で治療された ATL 患者における HTLV-1 プロウイルスの解析：第 67 回日本癌学会総会、名古屋、2008 年 10 月 28-30 日

嶋根和毅、児玉栄一、松岡雅雄：HIV-1 Rev-derived peptide は Rev と CXCR4 の dual-target inhibitor として作用する：第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会、大阪、2008 年 11 月 26-28 日

蜂谷敦子、嶋根和毅、児玉栄一、小泉寛和、湯永博之、松岡雅雄、滝口雅文、岡慎一：逆転酵素 connection と RNase H subdomain の多様性と薬剤感受性に及ぼす影響：第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会、大阪、2008 年 11 月 26-28 日

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## 中和抗体の治療応用に関する基礎研究

研究分担者: 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、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、非サブタイプ B ウイルスに対しては、CD4bs 抗体と CD4i 抗体の一部が交差中和活性を示した。今回の結果は、有効なワクチンの開発には、これらの様々な特異性を持った抗体を多クローン性に誘導する方法の研究が必要であることを示す。

### A. 研究目的

一般的な HIV-1 感染症例では、臨床分離株に対する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。

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第 3 可変領域(V3)に反応する V3 抗体、CD4 結合部位に対する 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。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 CD8 陽性細胞を除去し、B95-8 の培養上清 50% を含む培地 2ml に浮遊し培養した後、1 well あたり  $1 \times 10^4$  以下となるように、96well culture plate (Falcon) に分注し、さらに 37°C、5% CO<sub>2</sub> 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。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、クローニングを繰り返し行った。

#### (2) gp120-capture ELISA

増殖した B 細胞培養上清の抗 gp120 活性は“gp120-capture ELISA”をもちいて確認した。96well polypropyren plate (Falcon) に gp120-C5 sheep 抗体(D7324, Aalto Bioreagents, Dublin,



Ireland) をコートし、blocking buffer でブロック後 1  $\mu$ g/ml に希釈した単量体(gp120gp120-SF2; Austral Biologicals, San Ramon, California) を 50  $\mu$ l ずつ加えた。2 時間室温に静置した後、ELISA wash buffer で洗浄し、gp120-captured plate とした。抗 gp120 抗体の検出は、gp120-captured plate に B 細胞培養上清を加えて室温で 2 時間反応させた後、wash buffer で洗浄し、抗ヒト IgG-ALP を反応させ、発色後、吸光度(405nm)を測定した。

### (3) 単クローン抗体の分類

gp120 に対する抗体は、CD4bs 抗体、CD4i 抗体、V3 抗体、及びこれらに分類できないもの (other epitopes) の 4 種類に分類可能である。V3 抗体かどうかは JR-FL 株の V3 配列(NNT20; NNTRISIHIGPGRAFVTIGK)をもつ合成ペプチド(NNT20)に反応し、コントロールの HIV-2 のペプチドに反応しないものを陽性と判断した。抗 CD4bs 抗体と抗 CD4i 抗体は gp120-capture ELISA における可溶性 CD4(soluble CD4 (sCD4); R&D Systems, Inc. Minneapolis, MN)の影響が正反対である。CD4bs 抗体は sCD4 存在下に抗体の結合が抑制され、逆に CD4i 抗体の gp120 に対する反応性は sCD4 存在下に増強される。gp120-captured plate を作成し、段階希釈した抗体を sCD4 存在もしくは非存在下に 2 時間反応させ吸光度(405nm)を測定した。

### (4) TZM-bl 細胞を用いた感染抑制の測定

TZM-bl 細胞を平底 96well プレートに 1 well 当たり  $2 \times 10^4$  となるように分注培養した。約 18 時間後に 200TCID<sub>50</sub> の pseudo-typed virus と段階希釈をした抗体をインキュベーション後に TZM-bl 細胞に加え、37°C 5%CO<sub>2</sub> 下で培養した。48 時間後上清を除去し、Galact-star System を用い発色させ、にて測定した。中和活性は、 $\{1 - (t - c) / (n - c)\} \times 100$  (t; サンプルの発光強度、c; 細胞のみのバックグラウンド発光強度、n; 抗体無しサンプルの発光強度)で計算した。臨床分離株の標準化パネル(HIV-1 subtype-B or C standard panel virus; SVPB or SVPC)のエンベロップペクターは、

NIH AIDS Research and Reference Reagent Program (ARRRP) より供給をうけた。これらは、subtype B または subtype C 感染者の血漿 HIV-1 RNA および PBMC DNA から PCR で gp160 全長を増幅しクローニングされたもので、血漿 RNA 由来の産物は pcDNA3.1/His-TOPO (Invitrogen) に、PBMC DNA 由来の産物は pcDNA3.1/V5-His-TOPO (Invitrogen) に TA Cloning で組み込まれている。

(倫理面への配慮)

本研究を行うに当たり該当症例には研究の概要を説明し同意を得た上で採血し、解析した。なお本研究の倫理的・科学的妥当性は熊本大学病院の先進医療審査委員会で審査され、了承されている。

## C. 研究結果

### (1) 単クローン抗体の作製と分類

一人の長期非進行症例より分離した末梢血 B 細胞に EB ウイルスを感染させ、クローニングを繰り返し、抗 gp120 活性をもつ 20 種類の B 細胞クローンを得た。クローンが産生する単クローン抗体について、V3 ペプチドに対する反応性を検討した。抗体の由来する症例のウイルスの V3 配列に最も近い JR-FL 株の V3 配列を用いて、反応性を調べたところ、6 クローン結合活性が認められた。さらに、得られた単クローン抗体の sCD4 存在下、非存在下での gp120 に対する結合活性の変化を測定し、CD4bs 抗体及び CD4i 抗体の分類を行った。その結果 CD4bs 抗体が 5 種類、CD4i 抗体が 4 種類あった。V3-peptide ELIA で反応が見られず、しかも sCD4 の影響も見られないものが 5 種類あり、これらの epitope 特異性は不明である。

### (2) Subtype-B 臨床分離株標準化パネル (Subtype standard virus panel B; SVPB) に対する感染抑制効果

Ming Li らは、HIV に対するワクチン候補が誘導する抗体の、臨床分離株に対する中和活性の評価を標準化するため、Subtype-B standard

panel virus(SVPB)という pseudo-typed virus の標準化パネルを作成した (Li M. et.al, J. Virol. 79, p10108-10125, 2005)。LTNP より、今回樹立した単クローン抗体の、SVPB 標準化パネルに対する交差中和活性を、TZM-bl を標的細胞とした中和アッセイにて検討した。

抗 V3 単クローン抗体の中で実験室株に対して中和活性をもっていた 4 種類の抗体に関して SVPB に対する中和活性を解析した。これらのうち、2F8 と 3E4 には 50  $\mu$ g/ml までの濃度で、パネルウイルスを 50% 感染抑制できるものを認めなかったが、5G2 と 0.5  $\gamma$  では強力な交差中和活性を認めた。とくに、0.5  $\gamma$  は、SVPB5,6,11,14,16,17,18 に対し 0.23 ~ 38  $\mu$ g/ml の IC<sub>50</sub> レベルで中和活性が見られた。SVPB12,13,19 に関しても、80 ~ 110  $\mu$ g/ml の IC<sub>50</sub> レベルで中和活性を示した。このように、12 種類の SVPB のうち、計 10 に対して IC<sub>50</sub> をこえる中和活性が得られた。また、中和抵抗性の SVPB8 に対しても 0.5  $\gamma$  は、150  $\mu$ g/ml の濃度で有意な中和活性を示した。すなわち、V3-tip に、比較的まれな -GPGG- という配列をもつ SVPB15 以外は、必要な濃度に差があるものの、0.5  $\gamma$  は中和活性を持つことがわかった。

抗 CD4bs 抗体である、0.5  $\delta$  (3D6)、42F9、49G2 についても SVPB に対する中和活性を検討した。IC<sub>50</sub> が 50  $\mu$ g/ml までの濃度で検出できたものは、0.5  $\delta$  は 1/12、42F9 が 2/12、49G2 が 3/12 であった。50  $\mu$ g/ml で抑制率 30% 以上の有意な中和活性を認めたものは、0.5  $\delta$  で 2/12、42F9 と 49G2 で 6/12 であった。一方、CD4i 抗体の 4E9C は 3/12 について中和活性を認めた。注目すべきは、0.5  $\gamma$  が全く中和活性を示さない SVPB15 に対して、49G2 と 42F9 が交差中和を示すことである。このように、CD4bs 抗体と V3 抗体は相補的に中和活性を担っていると考えられる。

### (3) Subtype C 臨床分離株標準化パネル (Subtype standard virus panel C; SVPC) を含む非サブタイプ B ウイルスに対する感染抑制効果

抗体パネルはサブタイプ B 感染症例由来であ

るが、Subtype C 臨床分離株標準化パネル (SVPC) を含む非サブタイプ B ウイルスに対する交差中和活性を検討した。サブタイプ A (92UG37.8) が 1 種類、CRF01 (AE) が 2 種類、さらに SVPC が 12 種類のエンベロープベクターを ARRRP より供与いただき、TZM-bl を標的細胞とした中和アッセイにて検討した。V3 抗体は SVPB では広範な中和化性を示したものの、非サブタイプ B のウイルスはどれも中和できなかった。一方、CD4bs 抗体の 0.5  $\delta$  は SVPC3, 5, 6, 13 及び 15 に対して中和活性を示した。他の CD4bs 抗体である 49F9 は SVPC4 および 15、49G2 は SVPC9 と 13 に対して中和活性を示した。CD4i の 4E9C は SVPC4, 9 及び 13 に対して中和活性を示した。CRF01 のウイルス (93TH966.8 と 93TH976.17) に対しては CD4bs の 49G2 と 42F9 が 40% 程度の感染抑制を示すが、中和能は弱いものであった。

### D. 考察

HIV-1 の感染を阻止するワクチンの開発戦略の一つとして、広範な HIV-1 株に対して中和活性を示す抗体がどのようなものか同定することは、重要なことである。今回、一人の LTNP から樹立した単クローン抗体のパネルを用いて交差中和活性を検討した。その中でも、抗 V3 抗体は実験室分離株で比較的中和抵抗性である 89.6 及び JR-FL、さらに感染者自己由来ウイルスに関して、中和活性を示した。さらに、ワクチン開発の標準化のために作成された subtype B パネル (SVPB) に対する交差中和活性の検討から、広範囲の分離株に対して強い中和活性をもつ 0.5  $\gamma$  のような抗 V3 抗体が存在することが明らかとなった。しかし、これら抗 V3 抗体は V3 に変異が入った実験室分離株である III B や、V3-tip が GPGG である SVPB15 に対して中和活性を示さなかった。また、ほとんどの V3-tip 配列が GPGQ である、非サブタイプ B ウイルスは V3 抗体では中和されなかった。一方、



CD4bs 抗体は、中和能は強くないものの、SVPB に対して 2~6/12 株の頻度で中和活性を示した。特に、0.5  $\gamma$  が中和しない III B や SVPB15 に対する中和活性が CD4bs 抗体に見られた。すなわち、同一 subtype 間においては、抗 CD4bs 抗体及び抗 V3 抗体が相補的に働き、広範な臨床分離株に対して交差中和を示すことが示唆された。一方、非サブタイプ B ウイルス、中でもサブタイプ C ウイルスは V3 抗体にはまったく中和されず CD4bs 抗体と CD4i 抗体に中和されるものが 2~5/12 であった。

## E. 結論

長期非進行症例(LTNP)の中には、自己由来のウイルスを含む広範囲の臨床分離株に対して中和抗体活性を有する症例が存在する。このことが病気の進行阻止と関連するかどうかは明らかではないが、十分強い中和抗体があれば、in vivo でもウイルスの増殖抑制効果が期待できると考えられる。今回の、我々の研究は、有効なワクチンの開発には、これらの様々な特異性を持った抗体を多クローン性に誘導する方法の研究が必要であることを示す。

## F. 健康危機情報:なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Ryo, A., Tsurutani, N., Ohba, K., Kimura, R., Komano, J., Nishi, M., Hiromi Soeda1, Shinichiro Hattori2, Perrem, K., Yamamoto, M., Chiba, J., Mimaya, J., Yoshimura, K., Matsushita, S., Honda, M., Yoshimura, A., Sawasaki, T., Aoki, I., Morikawa, Y., and Yamamoto, N. SOCS1 is an inducible host factor during HIV-1 infection and regulates the intracellular trafficking and stability of

HIV-1 Gag. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:294-299, 2008.

2. Ikeda, T., Ohsugi, T., Kimura, T., Matsushita, S., Maeda, Y., Harada, S., Koito, A. The anti-retroviral potency of APOBEC1 deaminase from small animal species. *Nucleic Acids Research*, 36(21): 6859-6871, 2008.
2. 学会発表
  1. Yoshimura, K., Hatada, M., Harada S., Shibata J., Masuo, H., Tamamura, H., Matsushita S.: In vitro induction of human immunodeficiency virus type 1 variants resistant to a low-molecular CD4 mimic compound. 9<sup>th</sup> Kumamoto AIDS Seminar. Sep. 18-19, 2008, Aso, Kumamoto.
  2. Hatada, M., Yoshimura, K., Ishikawa T., Harada S., Matsushita S.: The impact of an N-linked glycosylation site insertion in HIV-1 gp120 region to escape from a potent neutralization anti-V3 monoclonal antibody. 9<sup>th</sup> Kumamoto AIDS Seminar. Sep. 18-19, 2008, Aso, Kumamoto.
  3. Narahara C., Yoshimura, K., Hatada, M., Harada S., Matsushita S.: Different mutation in HIV-1 gp120 V3-tip region for escape from a potent neutralizing anti-V3 monoclonal antibody during in vitro selection with low or high concentration of the Mab. 9<sup>th</sup> Kumamoto AIDS Seminar. Sep. 18-19, 2008, Aso, Kumamoto.
  4. Yoshimura, K., Harada S., Hatada, M., Matsushita S.: Mutations in V4 and C4 regions of the HIV-1 CRF-BC envelope induced by the in vitro selection of Maraviroc Confer cross-resistance to other CCR5 inhibitors. 16<sup>th</sup> Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections