

定: 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。

(6) 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: 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。

(7) CXCR4 阻害剤耐性 HIV-1 誘導実験
PM1/CCR5 細胞を標的細胞として、X4 株である NL4-3 をウイルスとして用い、KRH-3955、KRH-3148、AMD3100、AMD070 の 4 薬剤について 2007 年 10 月に開始した。

(倫理面での配慮)
該当事項なし

C. 研究結果

(1) KRH-3955 の抗 HIV-1 活性: KRH-3955 は、用いた X4, R5X4 HIV-1 の活性化 PBMC における複製を EC_{50} : 1-4 nM というごく低濃度で抑制した。一方、JR-CSF など R5 HIV-1 に対しては 200 μ M においても顕著な抗ウイルス活性を示さなかった。また、活性化 PBMC や MT-4 細胞に対して 25 μ M まで顕著な細胞毒性を示さなかった。

(2) KRH-3955 の薬剤耐性 HIV-1 に対する抗ウイルス活性: KRH-3955 は、NRTI、NNRTI、PI 耐性、MDR (NRTI、NNRTI、PI 耐性)、T-20 耐性株のいずれに対しても親株である HXB2、NL4-3 とほぼ同程度の抗ウイルス活性を示した。

(3) hu-PBL-SCID mice を用いた HIV-1 感染モデルにおける抗ウイルス活性: 感染前に単回投与した KRH-3955 は、hu-PBL-SCID mice 腹腔内における NL4-3 の感染・複製をほぼ完全に抑制した。

(4) SDF-1 α 結合阻害活性: コントロールとして使用した CXCR4 阻害剤 AMD3100、とともに検討した。KRH-3955、AMD3100、の SDF-1 α 結合に対する IC_{50} (nM) はそれぞれ、0.8、281.1 であった。KRH-3955 の IC_{50} 値

は、MT-4 細胞に HIV-1IIIIB を感染させる系における化合物の EC_{50} 値によく対応していた。一方、AMD3100 の SDF-1 α 結合阻害活性は HIV-1 複製阻害活性より顕著に弱かった。

(5) 各種抗 CXCR4 抗体結合阻害活性: KRH-3955 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、コントロールとして用いた CXCR4 阻害剤 AMD3100 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、KRH-3955 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。

(6) 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 His²⁸¹ と相互作用すると推定された。一方、AMD3100 は文献で報告されているとおりその相互作用するアミノ酸は Asp¹⁷¹、Asp²⁶²、Glu²⁸⁸ であり KRH-3955 の作用するアミノ酸との重なりは認められなかった。

(7) カニクイサル PBMC への SHIV 感染阻害実験: 2 頭のカニクイサルから調製した

活性化 PBMC への SHIV-KS661c と SHIV-89.6P の in vitro における感染を KRH-3955 が抑制できることが明らかになった。

(8) 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 EC_{50} 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。2009 年 1 月下旬の時点での薬剤濃度は、KRH-3955、KRH-3148、AMD3100、AMD070 でそれぞれ 12.5、500、900、1350 nM である。現在、中程度の耐性が得られた KRH-3148 と AMD070 の耐性ウイルスについてそれらの Env 領域に蓄積した変異を解析している。

D. 考察

KRH-3955 が経口吸収性を有する強力な CXCR4 阻害剤であり、X4 HIV-1 の複製阻害剤として有望であると考えられる。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 AMD3100 と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

経口投与可能な CXCR4 阻害剤 KRH-3955 が抗 HIV-1 剤として有望であることを示すことができた。薬剤としての有効性や CXCR4 への作用様式をさらに明らかにするためまた臨床応用への可能性を評価するため耐性誘導実験を継続中である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 村上 努 HIV の粒子形成のメカニズム - Gag 蛋白に関する最新の知見 - Confronting HIV2009. In press.

2) Iwasaki, Y., H. Akari, T. Murakami, S. Kumakura, Z. Dewan, M. Yanaka, and N. Yamamoto. Cancer Sci. In press.

3) Urano, E., T. Aoki, Y. Futahashi, T. Murakami, Y. Morikawa, N. Yamamoto, and J. Komano. Substitution of the myristoylation signal of human immunodeficiency virus type 1 Pr55^{gag} with the phospholipase C delta 1 pleckstrin homology domain results in infectious pseudovirion production. J. Gen. Virol. 89(Pt 12): 4374-4377, 2008.

4) Tanaka, T., H. Tsutsumi, W. Nomura, Y. Tanabe, N. Ohashi, A. Esaka, C. Ochiai, J. Sato, K. Itotani, T. Murakami, K. Ohba, N. Yamamoto, N. Fujii, and H. Tamamura. Bearing the cyclic pentapeptide scaffold: identification of the new pharmacophore. Org. Biomol. Chem. 6:4374-4377, 2008.

5) T. Murakami. Roles of the interactions between Env and Gag proteins in the HIV-1 replication cycle? Microbiol. Immunol. 52:287-295, 2008.

2. 学会発表

1) T. Aoki, S. Shimizu, U. Emiko, Y. Futahashi, M. Hamatake, K. Terashima, H. Tamamura, T. Murakami, Yuko Morokawa, N. Yamamoto and J. Komano. FUNCTIONAL SUBSTITUTION OF THE MYRISTOYLATION SIGNAL OF HIV-1 GAG WITH PHOSPHOLIPASE C DELTA 1 PLECKSTRIN HOMOLOGY DOMAIN. May 19-24 2008, Retroviruses, Cold Spring Harbor, N. Y., USA.

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

2) 村上 努、大隈 和、田中礼子、濱武牧子、駒野 淳、田中勇悦、山本直樹。KRH-3955: 新規 CXCR4 アンタゴニストは経口投与可能な高活性抗 HIV-1 剤である 第 56 回日本ウイルス学会学術集会・総会、岡山、2008

年10月26-28日

3) 村上 努、大隈 和、田中礼子、仲宗根正、濱武牧子、駒野 淳、谷中幹郎、田中勇悦、山本直樹。KRH-3955 は経口投与可能な高活性抗 X4 HIV-1 剤である。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

4) 宮川 敬、梁 明秀、大庭賢二、村上 努、山本直樹。RING フィンガー蛋白質 BCA2 は HIV-1 粒子産生を阻害する 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

5) 青木 徹、清水佐紀、浦野恵美子、濱武牧子、寺島一夫、玉村啓和、村上 努、森川裕子、山本直樹、駒野 淳。HIV-1Pr55Gag のミリストイル基非依存性ウイルス粒子産生と感染性 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

6) 高橋良明、村上 努、駒野 淳、吉田篤司、田中礼子、山本直樹、田中勇悦。宿主由来

タンパク OX40L、OX40 の HIV-1 感染に与える影響 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

7) T. Aoki, S. Shimizu, U. Emiko, M. Hamatake, K. Terashima, H. Tamamura, T. Murakami, Yuko Morokawa, N. Yamamoto and J. Komano. Substitution of the myristoylation signal of HIV-1 Pr55Gag with PLC DELTA 1 pleckstrin homology domain results on fully infectious pseudovirion production. 第 31 回日本分子生物学会年会、神戸、2008 年12月9-12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。

分担研究報告書 4. Darunavir 耐性機構の研究

Darunavir 耐性誘導と解析

研究分担者 西澤雅子 国立感染症研究所 エイズ研究センター
研究協力者 杉浦 互 国立感染症研究所 エイズ研究センター
研究協力者 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 プロテアーゼ阻害剤(PI)である Lopinavir(LTV/r)、Atazanavir(ATV)、Amprenavir(APV)及び Darnavir(DRV)に対する薬剤耐性変異とその交叉耐性を解析するために、プロテアーゼ(PR)領域に複数の薬剤耐性変異が存在する事がすでに明らかになっている患者の PBMC からウイルス分離を行った。分離した HIV 分離株で感受性検査を行った結果、分離株のうち 1 株が LPV/r、ATV、APV に高度耐性、DRV に低度耐性を示した。この分離株は gag 領域の cleavage site にプロテアーゼ阻害剤(PI)耐性変異とリンクしていると考えられる変異が認められた。この分離株を用いて DRV に対する耐性誘導を行った結果、PR 領域に新たに V32I の変異が認められ、スタンフォード大学の薬剤耐性アルゴリズムで解析した結果、この耐性誘導 HIV は DRV に対して中度耐性を示した。

A. 研究目的

多剤併用療法(HAART)によって HIV 感染症治療は大きく改善した。しかしその一方で薬剤耐性 HIV の出現が抗 HIV 治療を続けていく上で問題となってきた。近年になって薬剤耐性の問題を克服する為に、これまでとは異なる機序を持つ抗 HIV 薬や、多剤耐性 HIV に対しても効果を持つ抗 HIV 薬が新たに開発され臨床応用されるようになり、一定の効果を上げてきている。プロテアーゼ阻害剤(PI)では LPV/r、APV、ATV、DRV といった薬剤が治療に取り入れられ効果を上げている。新規に開発されたこれらの PI は、一つの耐性変異では抗 HIV 効果に大きな影響を及ぼさず、多数の耐性変異が蓄積して初めて HIV はこれらの PI に対する耐性を獲得する。関わる耐性変異の数が多いため、個々の変異が及ぼす耐性への影響や各 PI への交叉耐性といった情報がまだ十分では無い。そこで国立感染症研究所エイズ研究センターで薬剤耐性検査を行った患者検体の中から、PR 領域に複数の薬剤耐性変異を持ち、PI に対して高度耐性を持つと予想される検体を選択してウイルス分離を行い、新規の PI に対して高度耐性を持つ HIV 分離株を得る事を試みた。得られた HIV 分離株

を用いて LPV/r、APV、ATV、DRV に対する耐性度感受性検査によって解析した。また gag 領域の変異について解析を行った。患者 PBMC から DRV に対する高度耐性 HIV を分離する事が出来なかった為、LPV/r、APV、ATV に対して高度耐性を獲得した HIV 分離株を出発点とした DRV 耐性誘導を行って、DRV に対して高度耐性を獲得した HIV を得る試みを行った。

B. 研究方法

1) ウイルス分離

エイズ研究センターで薬剤耐性検査を行った患者検体から、PR 領域に複数の耐性変異が存在し、スタンフォード大学の薬剤耐性アルゴリズム解析から PI に対して高度耐性を持つ事が予想される検体を 16 検体選択した。患者検体から抽出した PBMC 5×10^6 個に、健康人全血から調製し CD8 陽性細胞を除去した PBMC を 5×10^6 個混合して培養した。2-3 日おきに経代し、上清中の逆転写酵素(RT)活性を測定し、RT の活性が一番高いサンプルを保存した。

2) 感受性検査

エイズ研究センターで開発されたレポーター剤である MarBLE 細胞を用い、ウイルス

分離に行って得られた HIV 分離株の感受性検査を行った。100TCID₅₀相当の HIV を 1×10^5 個の MaRBL細胞に感染させ、終濃度 5 μ M から 64pM まで 8 段階に希釈した薬剤を培地に添加した。各薬剤濃度存在下で 7 日間培養した後細胞を回収して Luciferase の活性を測定し、添加した薬剤の、感染させた HIV 分離株に対する IC₅₀ と、HIV 分離株の野生株に対する各薬剤の fold resistance を算出した。

3) gag 領域 cleavage site の解析

HIV 分離株の gag 領域を PCR で増幅しシーケンス解析して、これまでに PR 領域に誘導される PI 耐性変異に関連していると考えられている gag cleavage site のアミノ酸変異について解析した。

4) DRV 耐性誘導

ウイルス分離した HIV の中で、感受性検査の結果から LPV/r、APV、ATV に対して高度耐性を、DRV に対して低度耐性を獲得していた DR5929 株を元にして DRV に対する耐性誘導を行った。感受性検査で野生型 HIV の DRV に対する IC₅₀ は約 2nM であった為、2nM の DRV を含む培地で培養を開始した。耐性誘導には MaRBL細胞を用いた。培養中の細胞に CPE が観察されるかどうかを指標として経代培養を行い、また DRV 存在下でも培養液中の HIV 増殖が見られるようになった場合、DRV の濃度を 2 倍にする方法で耐性誘導を継続した。

C. 研究結果

16 検体から分離した HIV 分離株について MaRBL細胞を用いた感受性検査を行った結果、5 株が LPV/r、APV、ATV に対して高度の耐性を獲得していた。5 株のうち DR5929 株は DRV に対しても弱い耐性を示した。DR5929 株の野生株 HXB2 に対する DRV の fold resistance は約 7 倍だった。LPV/r、APV、ATV に対して高度耐性を獲得した 5 株の gag cleavage site のシーケンス解析を行った結果、これまでに PI 耐性変異とのリンクが報告されている変異が確認できた (図 1)。DRV に対して低度耐性を持っていた DR5929 は cleavage site 付近に複数の PI 耐性変異とのリンクが予想される変異が確認された。野生株を用いて DRV に対する耐性誘導は困

難であると報告があるので、すでに DRV に対して低度耐性を持つ DR5929 株を用いて DRV 耐性誘導を行った。図 2 中の①と②のポイントでそれぞれサンプル回収し、PR 領域のシーケンスを解析した。その結果①のポイントでは耐性誘導を始めた時点での耐性変異と同じであったが、②のポイントでは新たに V32I が誘導されており (図 2)、スタンフォード大学の薬剤耐性アルゴリズムで解析した結果、DRV に対して中度耐性を持つ事が示された。

D. 考察

LPV/r、APV、ATV に対して高度耐性であっても DRV に対して高度耐性を示す分離株は得られなかった。この結果は、DRV が多剤耐性を獲得した HIV に対しても抗 HIV 効果を発揮できるという報告に合致するものであった。また LPV/r、APV、ATV に対して高度耐性を持った HIV 分離株 4 株と、加えて DRV に対して低度耐性を持った 1 株は gag 領域の cleavage site に PI 耐性変異にリンクしていると推測される変異が複数確認された。今後は PR と gag の双方が変異によってどのような構造変化を起こしたのかについての構造解析が重要であると思われる。DRV 耐性誘導を行った結果、V32I が新たに PR 領域に導入された事から、DRV 耐性に V32I が重要である事が予想される。これまでも DRV 治療失敗例で V32I が出現する事がすでに報告されており、V32I が PR の構造にどのような影響を与えているのか解析する必要があると思われる。また gag cleavage site に新たな変異の出現があったかについても今後解析する。DRV 耐性誘導に用いた DR5929 株は、耐性誘導を行う前にすでに M46I、I54V、V82F、L90M といった major mutation を複数持っていたことから、これらの変異による構造変化と、これらに V32I が加わる事による構造変化についても解析する。V32I が導入された HIV について感受性検査も同時に試みる。

E. 結論

LPV/r、APV、ATV に対して高度耐性持つ HIV 分離株 4 株と、これらの高度耐性に加えて DRV に対して低度耐性を持つ 1 株のウイル

ス分離に成功した。これらの分離株は gag cleavage site に PI 耐性変異にリンクしていると考えられる変異が複数確認できた。DRV 低度耐性分離株を用いた DRV 耐性誘導では、誘導後に V32I が新たに PR 領域に導入されていた。

F. 研究危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

1) 論文発表

なし

2) 学会発表

巽 正志、松田昌和、橋本 修、西澤雅子、
石子博昭、杉浦 互、山本直樹. 薬剤耐性

ウイルスの感染性分子クローンを軸にした Genotype と Phenotype をつなぐ実験解析系について. 第 22 回日本エイズ学会 2008 年 11 月.

3) 特許の出願

なし

DR5929株のGag cleavage site 変異部位

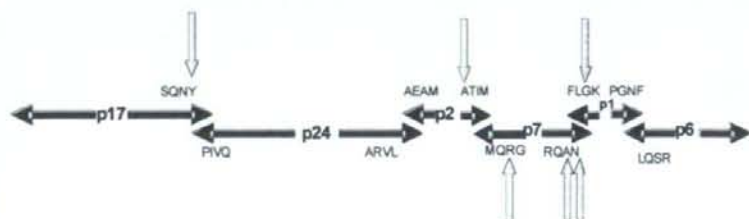


図 1

多剤耐性ウイルス(DR5929)を用いた DRV耐性誘導の試み

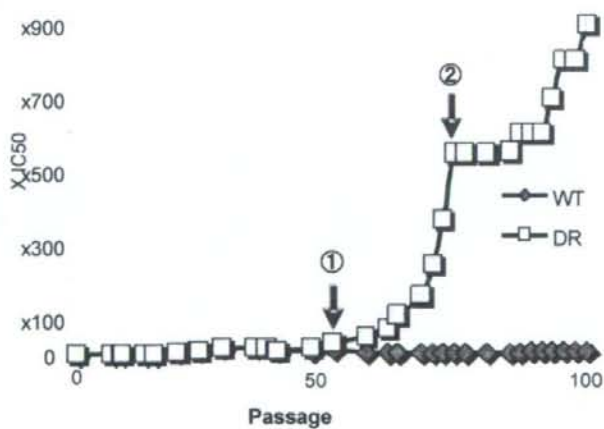


図 2

分担研究報告書：5. HIV準種と薬剤耐性の研究

HIVプロテアーゼ準種を用いた耐性誘導実験系の検討

研究分担者 遊佐敬介 熊本大学大学院 医学薬学研究部 講師

研究要旨 HAART (Highly Active Anti-Retroviral Therapy) によって患者体内のHIV-1をコントロールできるようになったが、治療薬として使える抗ウイルス薬が限られていることから、薬剤耐性ウイルスの出現は、治療上の大きな問題であり続けている。本研究では、耐性ウイルス出現のための治療薬変更の際、事前に治療薬変更後に出現する耐性ウイルスの情報を得ることをめざし *in vitro* における有用な評価系の確立を目的としている。そのために2例の患者体内のウイルスプロテアーゼライブラリーを作製し、試験管内で短期間に変更後の出現耐性ウイルスの予測が可能かどうかを調べた。その結果、1例では *in vitro* で予測した変異パターンと臨床での結果が一致したが、もう1例では一致しなかった。今後は症例を増やしさらに解析を続ける必要がある。

A. 研究目的

薬剤耐性ウイルスの出現は、多様な変異を持つウイルスポピュレーションの中から、抗ウイルス薬に感受性が低いウイルスが選択されてくる現象である。我々は、人工的にプロテアーゼ阻害剤耐性関連変異の異なる組み合わせをもつ混合ウイルスを作製し、そのウイルスを *in vitro* で扱うことにより、薬剤耐性ウイルスの解析に役立つツールを開発してきた。HIV感染者に対する抗ウイルス薬による治療の成績は、強い効果を持つ新規の薬剤開発とその複数の薬剤を組み合わせた強力な抗レトロウイルス療法によってめざましい進歩を遂げた。しかし、現時点の化学療法では、体内からウイルスを一掃することはできない。したがって長期投与による問題として、治療薬剤に対する感受性低下、いわゆる耐性ウイルスの出現の問題は不可避である。

抗ウイルス薬による治療途上に耐性ウイルスが出現し、その治療効果が低下すると新しい薬剤に変更する必要がある。治療薬の変更にあたって考慮されるのは、感染者体内のウイルスの薬剤のターゲットとなる逆転写酵素、プロテアーゼがもつ耐性変異パターンである。しかしその変異パターンはその時点での患者体内の優占種のウイルスの性質を反映したものに過ぎず、感染者体内のHIV-1は均一ではない。感染後、体内では多様な変異をもつヘテロなウイル

スが絶えず生み出され、異なる変異をもつマイナーなウイルスポピュレーションが存在している。耐性変異パターンや感受性試験は、含まれるマイナーウイルスの情報を与えない。得られるのは、あくまでも治療薬変更時の優占種に関する情報に限られる。われわれの研究目的は治療薬変更時に、マイナーな耐性ウイルスの情報を前もって提供するための新しい評価系をつくることにある。

このため感染者の体内のウイルスポピュレーションのプロテアーゼ領域をPCRで増幅し、ウイルスプロテアーゼライブラリーという形で分子クローン HIV-1_{NL4-3}にそのまま写し取り、試験管内で短時間にライブラリーウイルスに含まれている耐性ウイルスに関する変異および感受性を調べる評価系を確立した。

B. 研究方法

(1) 患者データベースの解析分析と感染者プロテアーゼライブラリーウイルスの作製を行った(平成19年度)。患者データベース(Stanford大学)を解析し、プロテアーゼ阻害剤を含む複数の抗ウイルス薬によって治療歴があり、プロテアーゼ阻害剤に対する感受性が低下した患者を選んだ。

(2) 患者の血しょうから、ウイルスプロテアーゼをコードしている領域をふくむ領域をPCRで増幅する。血しょう中のウイルスを遠心で沈降させた後、ウイルスRNAを調製

し、RT-PCRとPCRによってウイルスプロテアーゼ領域を含む 590 bp DNA 断片を得た。そして、このウイルスプロテアーゼを最終的にHVI-1 分子クローン NL4-3 に挿入した。ここで、得られたウイルスライブラリーは、そのサイズが >100,000であった。ウイルスライブラリーDNAを調製し、293T細胞にトランスフェクションし、24 h後その上清に含まれるウイルスを回収し、-80℃に保存した。

(3) ウイルスをプロテアーゼ阻害剤存在下で MT2細胞に感染後、培養し、複製したウイルスを回収した。RT-PCRとPCRによってウイルスプロテアーゼ領域を含む 590 bp DNA 断片を得、シーケンシングを行った。

(倫理面への配慮)

ヒト由来の臨床材料をもちいるのでその扱いには細心の注意を払った。必要に応じて関連機関の倫理審査をうけ、提供者の承諾とプライバシーの保護に努めた。

C. 結果

平成 19 年度は、耐性ウイルスが出現するのを予測できるかどうかを調べるために、モデルとなる患者治療プロフィールを検索し、HIV-1 感染者で数年にわたって逆転写阻害剤、プロテアーゼ阻害剤による多剤併用治療を行っていた患者データから、本研究に適した治療歴と、ウイルスの変異データを比較検討し、うち2名の患者の治療薬の変更前の患者血清を用いて、RT-PCR により protease 領域を増幅し、HIV-1_{NL4-3} に組み込み、その治療時点での患者ウイルスプロテアーゼライブラリーを作製した。得られたウイルスライブラリーはそのサイズが >10⁵ であり、体内のウイルスの多様性を十分反映しているものと考えられた。

治療薬変更前のライブラリーウイルスを *in vitro* で治療薬存在下培養し、1例では、7日ほどで増殖してきたウイルスを回収できた。しかしもう1例では回収できなかった。回収できた例では、治療薬変更後に感染者体内で優占種として増殖してきた耐性ウイルスのもつプロテアーゼ阻害剤耐性関連変異のパターンと一致した。これによって、本手法により治療薬変更後の変異ウイルスのもつ耐性関連変異を予想できること

がわかった。しかしもう1例では耐性ウイルスは得られなかった。

D. 考察

今後は、作製した患者由来のウイルスプロテアーゼライブラリーが臨床での患者体内のウイルス組成を反映しているかどうかについて、解析した。2例の患者体内のウイルスプロテアーゼライブラリーを作製し、試験管内で短期間に変更後の出現耐性ウイルスの予測が可能かどうかを調べた。その結果、1例では *in vitro* で予測した変異パターンと臨床での結果が一致したが、もう1例では一致しなかった。今後は症例を増やしさらに解析を続ける必要がある。こうした手法は、治療薬を変更する際の有用な情報となることが期待される。

E. 結論

患者データベースを解析し、プロテアーゼ阻害剤を含む複数の抗ウイルス薬によって治療歴があり、プロテアーゼ阻害剤に対する感受性が低下した患者を選び、うち2例の患者の治療薬の変更前の患者血清を用いて患者ウイルスプロテアーゼライブラリーを作製し、治療前のウイルスライブラリーをつかて、治療薬変更後の変異パターンを予測することができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Harada S, Monde K, Tanaka Y, Kimura T, Maeda Y, Yusa K. Neutralizing antibodies decrease the envelope fluidity of HIV-1. *Virology*, 370: 142-150, 2008.
- 2) Maeda Y, Yusa K, Harada S. Altered sensitivity of an R5X4 HIV-1 strain 89.6 to coreceptor inhibitors by a single amino acid substitution in the V3 region of gp120. *Antiviral Res.*, 77: 128-135, 2008.

2. 学会発表

Monde, K., Yusa, K., Maeda, Y. and Harada, S. The effect of virion incorporated CCR5 on R5 HIV-1 infectivity. Keystone Symposia (Cell Biology of Virus Entry, Replication and Pathogenesis), Canada, April 13-17, 2008..

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

CTL 選択圧、HIV 準種形成と薬剤耐性の研究

研究分担者 上野貴将 熊本大学エイズ学研究中心 准教授

研究要旨 HIV に対する免疫淘汰圧は、感染個体内のウイルス準種形成と薬剤耐性獲得に影響すると予想されるが、免疫淘汰圧にはいまだ不明な点が多く、詳細は分かっていない。たとえば、ヒト細胞傷害性T細胞(CTL)の抗ウイルス活性は抗原特異性によって大きく異なるが、その要因は不明である。我々は、互いに重複する2つの類似抗原ペプチドを基に、抗原ペプチドのどのような性質が CTL の抗ウイルス活性に影響するか解析した。その結果、HLA クラス I 分子とより長く安定な構造を維持する抗原ペプチドが、CTL に強い抗ウイルス活性を与えることが分かった。また、抗原ペプチド・HLA 複合体の安定性と CTL 活性が抗原の点変異によって大きく変化することは、抗原ペプチドの HLA 分子に対する結合活性が宿主個体内のウイルス準種形成とさまざまな選択圧からの馴化に大きく影響すると示唆された。

A. 研究目的

本研究は、3年間の計画で、ヒト免疫系の選択圧がウイルス準種形成と薬剤耐性 HIV の発生に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、HIV 感染者の検体を用いて、強い抗ウイルス機能を持った CTL を誘導する抗原ペプチドを解析した。

B. 研究方法

さまざまな病態にある HIV 感染者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・岡先生および湯永先生の協力の下）を用いて、HIV 抗原に対して特異的な CTL クローンを樹立した。さらに T 細胞レセプター (TCR) 遺伝子をクローニングして、TCR が欠損した T 細胞に遺伝子導入し、抗原ペプチド、HLA クラス I および TCR の相互作用を詳細に解析した。HIV 感染者の HLA クラス I 遺伝子タイピングを行なって (HLA 研究所)、HLA-B35 を持つ検体のみを用いた。

（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。

C. 研究結果

(1) CTL クロンの抗ウイルス活性

HLA-B35 陽性の HIV 感染者検体を用いて、HIV 特異的な CTL 応答を検索したところ、Nef 特異的 CTL が主要な応答を形成していた（昨年までの報告）。

エピトープを詳しく調べたところ、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。

まず、6人の HIV 感染者検体を用いて、VY8 および RY11 に特異的な CTL クロンの樹立を行った。ウイルス感染細胞に対する細胞傷害活性を解析したところ、Nef 蛋白質を発現するワクシニアウイルスあるいは HIV-

1 どちらを用いた場合も、VY8 特異的 CTL が RY11 特異的 CTL に比べて、より強い傷害活性を示した (図 1)。

(2) T 細胞レセプター再構築と抗原ペプチド・HLA 複合体の安定性

次に、CTL クローンから T 細胞レセプター (TCR) 遺伝子をクローニングし、TCR 欠損 T 細胞ハイブリドーマ (TG40) に導入した。細胞表面上に TCR を強発現する細胞を選択して、HLA テトラマーを用いて抗原特異性を調べたところ、もとの CTL クローンの特異性を反映していた (図 2A)。

そこで、抗原ペプチド、ターゲット細胞および T 細胞を共存させたアッセイ系を用いて TCR 感受性を調べたところ、両特異性の間で際立った違いは認められなかった (図 2B, C)。

しかしながら、抗原ペプチドをターゲット細胞にパルスした後、過剰のペプチドを洗い出すアッセイ方法を試みたところ、VY8 特異的 TCR の方が RY11 特異的 TCR よりも感受性が高いという結果を得た (図 2D)。このことは、TCR の抗原に対する感受性というよりも、むしろ抗原ペプチドと HLA クラス I 分子との相互作用が CTL 機能に大きく影響すると考えられた。実際、抗原ペプチド・HLA 複合体からペプチドが解離する速さを測定したところ、VY8 ペプチドの方がより長く HLA と安定な複合体を形成することが分かった (図 2E)。

(3) 変異抗原の安定性と CTL 活性

さらにペプチド・HLA 複合体の安定性と CTL 活性の関係を解析する目的で、変異ペプチドを合成して HLA 複合体からの解離速度を測定した。興味深いことに、VY8 の 5 番目で、RY11 の 8 番目 (Nef 蛋白質としては同じ位置) のプロリンをアラニンに置換した変異ペプチドでは顕著に HLA 複合体からの解離速度が遅くなった (データ未掲載)。そこで、この変異を導入した nef 遺伝子をターゲット細胞に導入して、CTL の傷害活性を測定した。その結果、アラニン変異体を発現するターゲット細胞の方が、特異性に関係なくどちらの CTL に対しても、より殺されやすくなることが確認された (図 3)。

D. 考察

我々の研究の結果は、CTL の優れた抗ウイルス活性発現には、ターゲットとする抗原ペプチドが HLA クラス I 複合体と安定な複合体を形成し、細胞表面上に長時間にわたって提示されることが重要であることを示している。また、抗原ペプチドがターゲット細胞上の HLA 分子から解離する速さが、CTL のターゲット細胞の認識と細胞傷害活性発現に重要であることが分かった。

一方、抗原ペプチド内の点変異によって、HLA 分子とペプチドの結合力が大きく変化することは、抗原候補ペプチドと HLA 分子との結合力が、選択圧としてはたらき、HIV 感染者個体内のウイルス準種形成に大きく影響することを示唆する。このことは、引いては、薬剤などの他の淘汰圧に対するウイルス馴化に影響を与えているものと示唆された。

E. 結論

抗原ペプチド・HLA クラス I 複合体の安定性が、CTL の抗ウイルス活性に大きな影響を与える一つの重要な要因であることを明らかにした。このことは、抗原候補となるペプチドの HLA クラス I 複合体との結合安定性が個体内のウイルス準種形成とさまざまな選択圧に対するウイルス馴化に影響すると示唆された。

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. Tsukamoto, S. Dohki, T. Ueno, M. Kawada, A. Takeda, M. Yasunami, T. Naruse, A. Kimura, M. Takiguchi, T. Matano (2008) Determination of a major histocompatibility complex class I restricting simian immunodeficiency virus Gag241-249 epitope. *AIDS* 22, 993-994

2. 学会発表

- 1) 本園 千尋、滝口 雅文、上野 貴将：抗原ペプチド・MHC 複合体の安定性は T 細胞の抗ウイルス機能に影響する、ワークショップ「ウイルス感染-2」第 38 回日本免疫学会学術集会、国立京都国際会館、2008 年 12 月 1 日- 3 日
- 2) 本園 千尋、滝口 雅文、上野 貴将：HIV 特異的 T 細胞の抗原特異性と抗原変異に対する交差反応性、一般口演「レンチウイルス、HIV(7)」第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山コンベンションセンター、2008 年 10 月 26 - 28 日
- 3) Chihiro Motozono, Masafumi Takiguchi, Takamasa Ueno: The decay of peptide-MHC complex influences antiviral activity of HIV-specific CTLs. 9th Kumamoto AIDS Seminar, September 18-19, 2008, Grandvrio Hotel, Kumamoto, Japan.
- 4) Chihiro Motozono, Masafumi Takiguchi, Takamasa Ueno: The effect of TCR-peptide-MHC interactions on antiviral activity and cross-reactive capacity of HIV-specific CTLs. Keystone Symposia (HIV vaccine and HIV pathogenesis), March 26-April 1, 2008, Banff, Alberta, Canada.
- 5) Takamasa Ueno: The balance of power: Nef and CTL, Immunology I 9th Kumamoto AIDS Seminar, September 18-19, 2008, Grandvrio Hotel, Kumamoto, Japan.
- 6) 上野 貴将：ヒト免疫監視システムと HIV の適応訓化、シンポジウム 4「ヒトはなぜエイズになるのか」第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会、大阪国際交流センター、2008 年 11 月 26 日- 28 日
- 7) 本園 千尋、滝口 雅文、上野 貴将：抗原ペプチド複合体の内在的安定性は CTL の抗ウイルス活性に影響する、一般口演「0-37) 免疫」第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会、大阪国際交流センター、2008 年 11 月 26 日- 28 日
- 8) Mwimanzi Philip, Mamoru Fujiwara, Masafumi Takiguchi, Takamasa Ueno: The effects of CTL-escape conferring mutations on Nef 's pathogenic functions in primary macrophages, Poster session 9th Kumamoto AIDS Seminar, September 18-19, 2008, Grandvrio Hotel, Kumamoto, Japan.
- 9) Mwimanzi Philip, 藤原 守、滝口 雅文、上野 貴将：The effects of CTL-escape conferring mutations on Nef 's pathogenic functions in primary macrophages、一般口演「0-35) アクセサリー」第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会、大阪国際交流センター、2008 年 11 月 26 日- 28 日

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

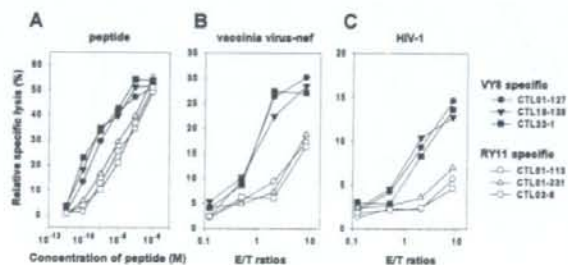


Fig 1. Cytotoxic activity of CTL clones. Primary CD4⁺ cells isolated from an HIV-negative donor were pulsed with various concentrations of VY8 or RY11 peptide (panel A), infected with recombinant vaccinia virus expressing Nef_{5F2} (panel B) or infected with HIV-1 (panel C) were mixed with the indicated CTL clones. To obtain relative specific lysis values, the cytotoxic activity toward the same target cells but pulsed with no peptide, infected with vaccinia virus alone (*i.e.*; lacking *nef* expression) or infected with HIV-1 Δ *nef* variant was determined in parallel. Data presented are means of duplicate assays, and an additional set of experiments using another PBMC donor showed similar results.

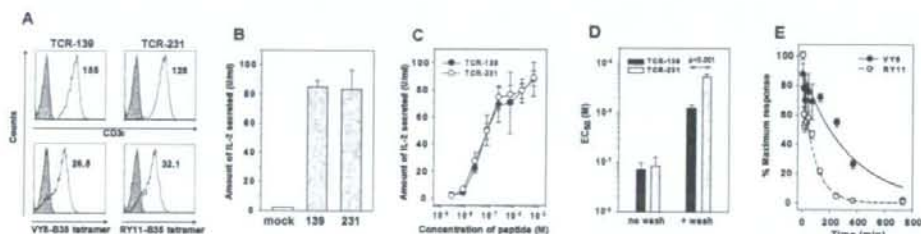


Fig 2. TCR-pMHC interactions on TCR-transduced TG40 cells. (A) TG40 cells alone (shaded areas) or those expressing TCR-139 and -231 (solid lines) were stained with anti-CD3 ϵ mAb and their cognate HLA-B35 tetramers and then analyzed by flow cytometry. The mean fluorescence intensity is indicated in each histogram. (B) IL-2 secretion of TG40 cells transduced with mock, TCR-139 or TCR-231 in response to stimulation with CD3 ϵ mAb. Data are means \pm SD of quadruplicate assays. (C) IL-2 secretion of TG40 cells transduced with TCR-139 and TCR-231 in response to various concentrations of VY8 and RY11, respectively. TG40 cells, C1R-B3501 cells, and the peptide were co-incubated for the duration of the assay. Amounts of IL-2 obtained for the mock-transduced TG40 cells were always <5.0 . Data are means \pm SD of quadruplicate assays. (D) Functional avidity of TG40-139 and -231 cells were dependent on assay conditions. C1R-B3501 cells, the peptide, and TG40 cells were co-incubated for the duration of the assay (no wash). C1R-B3501 cells and the peptide were incubated, washed, and subsequently mixed with the TG40-139 or 231 cells (+ wash). The EC₅₀ values (means \pm SD) were obtained from quadruplicate assays. Statistical analysis was performed by using the two-tailed *t*-test. (E) Kinetic analysis of the peptide dissociation from pMHC. C1R-B3501 cells were pulsed with the VY8 or RY11 peptide (100 μ M) and washed. A portion of the resultant peptide-loaded cells was taken at each indicated time point and then mixed with TG40-139 or -231 cells for the IL-2 secretion assay. Values presented are means \pm SD of triplicate assays expressed relative to the maximum response that was arbitrarily set to 100%. The lines shown are based on a single exponential decay.

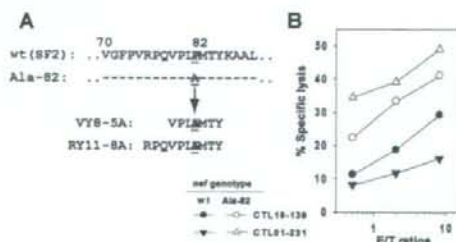


Fig 3. Effect of an amino acid substitution on CTL killing of Nef-expressing cells. Primary CD4⁺ cells isolated from an HIV-negative donor (*HLA-B*3501*) were transfected with a genes encoding GFP alone or wt or Ala-82 mutant of Nef_{5F2}-GFP fusion proteins, and then mixed with CTL 19-139 and 01-231 at the indicated E/T ratios. Transfection efficiency was 60 \pm 5 % as determined by GFP expression. Cytotoxic activity toward cells expressing GFP alone was always $<10\%$. Data are means of duplicate assays, and an independent experiment using another PBMC donor and another set of CTL clones gave similar results.

HIV 種特異性と動物モデルの研究

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

研究要旨 病原性発現機構の実験的解析を目指し、サル細胞での複製・増殖に適化した HIV-1 クローンの分子構築を行なった。カニクイザル細胞 HSC-F での長期培養により、この細胞における増殖効率が著しく向上した MN4 (X4 ウイルス) と MN5 (R5 ウイルス) クローンを得た。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。変異 Env-gp120 の機能・構造解析はこの結果を良く支持していた。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

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) は SIVmac239 の *vif* 遺伝子全部と *gag* 遺伝子のごく一部 (CA helix 4/5 loop に対応) とを持つ。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・増殖できる (PNAS 103:16959-16964, 2006; J Virol 81:11549-11552, 2007; Rev Med Virol 18: 261-275, 2008; 未発表データ)。しかしながら、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、ブタオザルやカニクイ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; 未発表データ)。本年度は、HIV-1/マカクザル感染システムの確立を目指し、細胞馴化により得られサル細胞での増殖効率が飛躍的に向上したウ

イルスクローンの機能・構造解析を中心に研究を行なった。

B. 研究方法

1. ウイルスゲノムの改変は常法に従って行なった。感染細胞からの PCR 法による分子ウイルスクローンの構築も既報の通りである (PNAS 103:16959-16964, 2006)。
2. トランスフェクションには 293T 細胞を用いた。ウイルス感染実験には、ヒト M8166 細胞、カニクイザル HSC-F 細胞、アカゲザル HSR5.4 細胞およびカニクイザル CD8 (-)PBMC を用いた。293T 細胞は 10%FCS 加 MEM 培地で、M8166、HSC-F、HSR5.4 および PBMC は 10%FCS 加 RPMI1640 培地で維持し、サル細胞での感染実験は 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。HSC-F 細胞へのウイルスエントリーの効率は Gag(p24)-ELISA 法を用いて定量した。カニクイザル CD8(-)PBMC を用いた実験は医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センターの明里宏文博士らにより行なわれた。

3. ウイルスゲノムのシークエンスはアブライドバイオシステムのサイクルシークエンスキットを用いて決定した。
4. Env の構造解析は国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センターの佐藤裕徳博士および横山勝博士により行なわれた。

(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なっていない。

C. 研究結果

1. HSC-F 細胞での馴化・適応により増殖効率が向上した HIV-1 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。
2. 構造解析の結果では、MN4 の Env E427K 変異はヒト CD4 との親和性に影響なくカニクイザル CD4 との親和性を増大させると予想される。実際、ヒト細胞でこの変異はウイルス学的意義を持たなかった。
3. MN5 の Env S304G 変異は CCR5 との親和性を増大させると予測される。これに合致して、MN5 の HSC-F 細胞へのエントリー効率は著しく増加し、コレセプターアンタゴニスト TAK-779 に対する感受性が顕著に減少していた。
4. 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 α による増殖抑制を解除できていないため (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。

5. 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低い。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 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 アクセサリー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 および MN5Rh) はこれらの目標に向け極めて有望である。

サル細胞におけるウイルス増殖効率の向上に貢献する変異の同定とその機序の詳細な解析は、基礎研究としての意義だけでなく今後のウイルスゲノムの改良に繋がる情

報をもたらす可能性がある。Env 変異はもちろんであるが、この意味で、別個のウイルスクローンに共通して認められた IN C 末端領域の変異 (N222K および V234I) は大変興味深い。

E. 結論

本研究により、プロトタイプサル指向性 HIV-1 (NL-DT5R クローン) より増殖効率等で格段に優れた分子クローンが確立された。カニクイザルだけでなく、アカゲザル細胞でのウイルス複製に適応したクローン (MN4Rh および MN5Rh) が得られたことは、我々の最終目標達成に向け大きく前進したと考えられる。MNRh クローンに認められた変異のうちサル細胞での増殖効率の向上に貢献しているものを同定することが重要である。その結果、より良いウイルスが得られる情報・可能性が示されれば、速やかにゲノム改変に取り組む。

MN4S/MN5S を用いた本格的なカニクイザル感染実験が医薬基盤研究所・霊長類医学科学研究センターの明里宏文博士らとの共同研究により開始された。これらの結果にもよるが、今後、MN4Rh/MN5Rh とその改良型によるカニクイザル・アカゲザル感染実験も推進して行きたいと考えている。

本研究により、複製抑制がかかる細胞内での HIV-1 変異・適応・進化が系統的かつ実験的に解析できることが明らかになった。本研究で認められた「進化」の再現性を確認するため、カニクイザルとアカゲザル細胞での馴化実験を繰返し行なう予定である。また、HIV-1 感受性に関するサル種間差や個体差も観察されているので、その機構についても詳細に検討したい。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) Yamashita, T., Kamada, K., Hatcho, 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.
- 6) Hatcho, K., Kamada, K., Yamashita, T., Adachi, A., and Nomaguchi, M. 2008. Replication potentials of *vif* variant viruses generated from monkey cell-tropic HIV-1 derivative clones NL-DT5/NL-DT5R. *Microbes and Infection* 10: 1218-1222.
- 7) Fujita, M., Otsuka, M., Nomaguchi, M., and Adachi, A. 2008. Functional region mapping of HIV-2 Vpx protein. *Microbes and Infection* 10: 1387-1392.

- 8) 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.
- 9) Kamada, K., Yamashita, T., Hato, K., Adachi, A., and Nomaguchi, M. Evasion from CypA- and APOBEC-mediated restrictions is insufficient for HIV-1 to efficiently grow in simian cells. *Microbes and Infection*, in press.
- 10) Nagao, T., Hato, K., Doi, N., Fujiwara, S., Adachi, A., and Nomaguchi, M. 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

- 1) Nomaguchi M., Doi, N., and Adachi, A. HIV-1 adapts and evolves to grow efficiently in simian cells. The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Sept. 9, 2008, Awaji, Japan.
- 2) 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。
- 3) 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。
- 4) 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。
- 5) 足立昭夫 アクセサリー蛋白質と抗ウイ

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。

- 6) 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。
- 7) 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。
- 8) 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 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし。
2. 新案登録
なし。
3. その他
なし。

APOBEC3Gの調節過程を標的とする新たなHIV複製制御法の研究

研究分担者 高折晃史 京都大学医学研究科 血液・腫瘍内科学 講師

研究要旨 APOBEC3G/Vif 分子の機能調節に関し、PKA によるリン酸化が APOBEC3G の抗 HIV-1 活性を制御していることおよびその分子機構、新規の Vif の E3 リガーゼとして MDM2 を同定し、MDM2 が Vif を分解する分子機構、さらには HIV-1 複製制御における役割を明らかにした。今後、これら新規の分子による APOBEC3G/Vif システム調節機構のより詳細な分子機構の解析を通じ、これらの科学情報に立脚した新しい HIV 複製制御法を提案したい。

A. 研究目的

本研究では、抗 HIV-1 宿主因子 APOBEC3G とそれに拮抗する HIV-1 Vif 蛋白による HIV-1 の複製制御に関し、これら分子の機能調節に焦点を当てて研究をすすめる。また、得られた科学情報をもとに、新たな HIV-1 複製制御法を提案する。

B. 研究方法

APOBEC3G は新規に同定された抗 HIV-1 宿主因子であり、一方 HIV-1 Vif は本分子をユビキチン-プロテアソーム系を用いて分解、中和することにより HIV-1 複製を助けている。この APOBEC3G/Vif システムによる HIV-1 複製制御に関して、これら分子の機能調節、特に翻訳後修飾に焦点をあてて、下記の2点に関し研究を進めた。

- 1) リン酸化による APOBEC3G の機能調節
- 2) ユビキチン化による Vif の機能調節

(倫理面への配慮)
特に存在しない。

C. 研究結果

(1) リン酸化による APOBEC3G の機能調節：APOBEC3 蛋白ファミリーに属する AID は、Protein Kinase A(PKA)によるリン酸化によりその機能調節がなされていること

が近年報告された (Basu et al. Nature 2005, Pasqualucci et al. PNAS 2006)。APOBEC3G も同様に PKA リン酸化モチーフを有していることから、PKA によるリン酸化がその機能に与える影響に関して検討した。

まず、免疫共沈法により、PKA と APOBEC3G との結合を示した。

②in vitro および in vivo キナーゼアッセイを用いて、PKA が APOBEC3G の Thr32 をリン酸化することを示した。

③このリン酸化により、APOBEC3G は Vif との結合親和性が低下し、Vif によるユビキチン化が阻止されることにより、分解に対して抵抗性になること、結果、野生型 HIV-1 に対する抗ウイルス活性が増強されることを示した。

④APOBEC3G の N 端のコンピューター構造解析により (当研究班の班長である国立感染症研の佐藤裕徳先生との共同研究)、Thr32 のリン酸化は、Thr32-Arg24 間の相互作用に影響を与え、Vif との結合親和性を変えることを示した。

以上より、PKA による APOBEC3G のリン酸化は、Vif との相互作用に影響を与えることにより、抗 HIV-1 活性を制御していることを明らかにした。

(2) ユビキチン化による Vif の機能調節：Vif は、細胞内の Cullin5、ElonginB/C と結合して Vif-BC-Cul5 複合体を形成し、E3 リガーゼ複合体の基質認識サブユニットとし

て APOBEC3G をユビキチン化し分解する。一方、Vif 自身も細胞内においてユビキチン化を受け、急速に分解されているが、その意義や機序は不明であった。そこで、我々は、Vif をユビキチン化する新規の E3 リガーゼの同定を試みた。

データベースサーチよりその候補として MDM2 を同定した。まず MDM2 は、Vif の細胞内レベルを特異的に低下させるが、それは、プロテアソーム依存性分解であることを示した。

次に、MDM2 は、Vif と直接結合し、その結合部位は、中央部の酸性ドメインであることを示した。

in vitro および in vivo ユビキチンアッセイを用いて、MDM2 が Vif をユビキチン化することを示した。

HIV-1 感染に及ぼす影響を検討した。MDM2 の共発現は、Vif 分解を介して APOBEC3G のウイルス粒子中の取り込みを促進し、結果、ウイルスの感染性を低下させた。またマクロファージを用い、MDM2 をノックダウンすると HIV-1 複製が促進した。

MDM2 が、Vif のみを分解し、それに結合する APOBEC3G を逆に安定化させる分子機構として、MDM2 の Vif への結合は、Vif/APOBEC3G 間の結合を阻害することを示した。

以上より MDM2 は Vif の分解を介して HIV-1 複製を負に制御していることを明らかにした。

D. 考察

APOBEC3G/Vif に関する研究は、近年の抗 HIV-1 宿主因子に関する研究の先陣をきるものであり、その科学的な意義はきわめて高い。また、APOBEC3 蛋白による広範な抗ウイルス作用は、新たな抗ウイルス自然免疫の概念をも創出した。APOBEC3G の抗ウイルス活性機構、および Vif による APOBEC3G 中和機構に関しても多くの知見が集積されたが、いまだその詳細な分子機構、とりわけ各分子の機能調節機構に関しては未知な部分が多く残っている。これらの調節機構の解明は、新たな HIV-1 複製制

御法、ひいては、新規抗 HIV-1 薬の開発へとつながると考えられる。

今年度、我々は、リン酸化による APOBEC3G の抗 HIV-1 活性調節機構、およびユビキチン化による Vif 機能の調節機構を明らかにしたが、これらは、今後、新たな HIV-1 複製制御法の開発へ向けた科学情報を提供できたと考えている。今後、これらを標的とした薬剤開発の可能性についても検討を加えていきたい。

E. 結論

APOBEC3G/Vif 分子の機能調節に関する研究が順調に進み、そのより詳細な分子機構を明らかにし、いずれも論文化された。これらは、いずれも我々が、世界に先駆けて提唱した分子機構であり、将来的には、これらの科学情報に立脚した新しい HIV 複製制御法にむけてさらに研究を進めたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Taisuke Izumi, Akifumi Takaori-kondo, Kotaro Shirakawa, Hiroaki Higashitsuji, Katsuhiko Itoh, Katsuhiko Io, Masashi Matsui, Kazuhiro Iwai, Hiroshi Kondoh, Toshihiro Sato, Mitsunori Tomonaga, Satoru Ikeda, Hirofumi Akari, Yoshio Koyanagi, Jun Fujita, and Takashi Uchiyama: MDM2 is a novel E3 ligase for HIV-1 Vif. *Retrovirology* 6(1):1, 2009.

2) Kotaro Shirakawa, Akifumi Takaori-kondo, Masaru Yokoyama, Taisuke Izumi, Masashi Matsui, Katsuhiko Io, Toshihiro Sato, Hironori Sato, and Takashi Uchiyama: Phosphorylation of APOBEC3G by protein kinase A regulates its interaction with HIV-1 Vif. *Nature Structural & Molecular Biology* 15(11):1184-91, 2008.

3) Taisuke Izumi, Kotaro Shirakawa, and Akifumi Takaori-Kondo: Cytidine deaminases as a weapon against retroviruses and a new target for antiviral therapy. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 8(3):231-238, 2008.

4) 高折 晃史: APOBEC3 ファミリー蛋白。「日本エイズ学会誌」第 10 巻 第 1 号 19 項-24 項、2008 年

5) 高折 晃史: APOBEC3G による HIV の感染制御。「血液フロンティア」第 18 巻

2. 学会発表

1) Taisuke Izumi, Akifumi Takaori-Kondo, Kotaro Shirakawa, Kazuhiro Io, Masashi Matsui, and T Uchiyama: HIV-1 Vif Causes G2 Cell Cycle Arrest via the p53 Pathway. 15th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Boston, USA, Feb 3-6, 2008. (Young Investigator Award 受賞)

2) Kotaro Shirakawa, Akifumi Takaori-kondo, Taisuke Izumi, and Takashi Uchiyama: Protein Kinase A-mediated phosphorylation antagonizes APOBEC3G degradation by Vif. 15th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Boston, USA, Feb 3-6, 2008. (Young Investigator Award 受賞)

3) Taisuke Izumi, Akifumi Takaori-Kondo, Kotaro Shirakawa, and T Uchiyama: HIV-1 Vif causes G2 cell cycle Arrest via the p53 Pathway. The 2008 meeting on RETROVIRUSES, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA, May 19-24, 2008.

4) Kotaro Shirakawa, Akifumi Takaori-kondo, Taisuke Izumi, and Takashi Uchiyama: Protein Kinase A-mediated phosphorylation antagonizes the degradation of APOBEC3G by HIV-1 Vif. The 2008 meeting on RETROVIRUSES, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA, May 19-24, 2008.

5) Taisuke Izumi, Akifumi Takaori-Kondo, Kotaro Shirakawa, Masashi Matsui, Katsuhiko Io, and Takashi Uchiyama: HIV-1 Vif causes G2 cell cycle Arrest via the p53 Pathway. The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Hyogo, Japan, September 7-11, 2008.

6) Kotaro Shirakawa, Akifumi Takaori-kondo, Masaru Yokoyama, Taisuke Izumi, Masashi Matsui, Katsuhiko Io, Hironori Sato, and Takashi Uchiyama: Protein Kinase A-mediated phosphorylation regulates the interaction between APOBEC3G and HIV-1 Vif. The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Hyogo, Japan, September 7-11, 2008.

7) 高折 晃史: HIV-1 Vif と p53/MDM2 との機能的相互作用。第 10 回白馬シンポジウム in 金沢、金沢、平成 20 年 2 月 8 日-9 日 (invitation)

8) 泉 泰輔、高折 晃史、白川 康太郎、井尾克宏、松井道志、内山 卓: HIV-1 Vif は p53 依存的経路で感染細胞の細胞周期を G2/M 期に停止させる。第 22 回近畿エイズ研究会学術集会、奈良、平成 20 年 6 月 14 日 (学会賞受賞)

9) 松井道志、白川 康太郎、高折 晃史、泉 泰輔、内山 卓: Protein Kinase A によるリン酸化は APOBEC3G と Vif の相互作用を調節する。第 22 回近畿エイズ研究会学術集会、奈良、平成 20 年 6 月 14 日

10) 高折 晃史: シンポジウム 7 実験室からの発信「APOBEC3G/Vif による HIV-1 複製制御」第 22 回日本エイズ学会学術集会、大阪、平成 20 年 11 月 26-28 日

11) 泉 泰輔、高折 晃史、白川 康太郎、松井 道志、井尾 克宏、内山 卓: HIV-1 Vif は p53 依存的経路で感染細胞の細胞周期を G2/M 期に停止させる。第 22 回日本エイズ学会学術集会、大阪、平成 20 年 11 月 26-28 日

12) 白川 康太郎、高折 晃史、横山 勝、松井 道志、井尾 克宏、泉 泰輔、佐藤 裕徳、内山 卓: Protein Kinase A によるリン酸化は APOBEC3G と Vif の相互作用を調節する。第 22 回日本エイズ学会学術集会、大阪、平成 20 年 11 月 26-28 日

13) 高折 晃史: リン酸化による APOBEC3G の抗 HIV-1 活性制御。第 11 回白馬シンポジウム in 長崎、長崎、平成 20 年 12 月 5-6 日 (invitation)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

なし。