

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

分担研究報告書

CXCR4 阻害剤耐性 HIV-1 の誘導と解析

分担研究者 村上 努 国立感染症研究所 エイズ研究センター 室長

研究要旨: 本研究の最終目的は、CXCR4 阻害剤を材料として耐性変異のパターンや耐性機構を解析することにより次世代の治療を考慮した耐性変異パターンを予測することである。平成 21 年度は、CXCR4 阻害剤 KRH-3955 を用いて異なる Donor からの PBMC への感染防御活性の比較、その持続的阻害活性について検討した。また、カニクイサル AIDS モデルにおいて事前内服による感染予防効果があるか否かについても評価し、KRH-3955 事前内服が末梢血 CD4 陽性細胞数の保持に一定の効果が認められた。平成 18 年秋に開始した KRH-3955 と KRH-3148 を用いた PM1/CCR5-NL4-3 の感染系による薬剤耐性誘導実験はそれぞれ培養開始時の約 5 倍、約 3.5 倍の薬剤耐性ウイルスが得られており、それらの Env 領域に蓄積された変異を解析中である。

A. 研究目的

本研究の目的は、薬剤耐性 HIV の発生機序とその制御方法に関する基礎研究の班において、新しい作用機序を有する HIV 阻害剤として期待される CXCR4 阻害剤に対する耐性 HIV-1 を誘導し、その耐性変異のパターンや耐性機構を解析することによって、次世代の治療を考慮した耐性変異パターンの予測法を研究することである。材料としては、共同研究者（株）クレハが開発した経口吸収性を示す 2 種類の高活性 CXCR4 阻害剤 KRH-3955、KRH-3148 を使用した。また、KRH-3955 と KRH-3148 を用いた PM1/CCR5-NL4-3 の感染系による薬剤耐性誘導実験は、AMD3100、AMD070 を対照薬剤として使用して行い、現在も継続中である。

B. 研究方法

(1) 抗 HIV-1 活性測定：固定化抗 CD3 抗体で刺激し、IL-2 存在下で増殖させた PBMC を標的細胞として HIV-1 を MOI=0.001 で感染させ、種々の濃度の薬剤

存在下で 7 日から 10 日培養した。抗 HIV-1 活性は培養上清中の p24 抗原量を市販の ELISA を用いて測定後算出した。

(2) CCR5 阻害剤との併用効果：KRH-3955 と CCR5 阻害剤 SCH-D の併用によって、PBMC への X4 HIV-1 (NL4-3) と R₅ HIV-1 (JR-CSF) 同時感染を防御できるかを検討した。

(3) 異なる donor からの PBMC への感染防御試験：KRH-3955 が、8 人から分離した PBMC への NL4-3 の感染をばらつきなく抑制するかを検討した。

(4) KRH-3955 による抗 CXCR4 抗体 12G5 結合の持続的阻害活性の測定：Molt-4 細胞を on ice で薬剤処理した後細胞を洗浄し（または洗浄せず）、抗体反応後結合した CXCR4 抗体量を FACS にて定量した。また、薬剤処理した後細胞を洗浄したのち、37℃ で一定時間（0, 3, 6 時間）細胞を静置し、12G5 結合阻害活性を測定した。

(5) 事前内服による感染予防効果の検討（共同研究者：エイズ研究センター仲宗根主任研究官）：カニクイサルに SHIV-KS661_c を感染させる AIDS モデルにおいて

KRH-3955 を 100 mg/kg で感染 24 時間前に投与（対照薬剤：TDF/FTC は、30/20 mg/kg を感染 24 時間前と感染直前の 2 回投与）後、10 AID50 の SHIV-KS661_c を経直腸感染させ、12 週にわたって観察する。主なモニター項目は、CBC、CD4/CD8 細胞数、ウイルス量、などである。

(6) 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、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 薬剤について平成 18 年 10 月に開始した。各薬剤の EC₅₀ 付近の濃度を初発濃度としてウイルス培養を開始し、薬剤耐性ウイルスの出現を CPE や培養上清中の p24 濃度で判断して、添加する薬剤濃度を段階的に増加させる。

(倫理面での配慮)
該当事項なし

C. 研究結果

(1) CCR5 阻害剤との併用効果：4 nM KRH-3955+4 nM SCH-D と 20 nM KRH-3955+20 nM SCH-D の併用によって、PBMC への X4 HIV-1(NL4-3) と R5 HIV-1(JR-CSF) 同時感染(感染価として 1:1)によるウイルス複製は、それぞれ 91%、96%抑制された。

(2) 異なる donor からの PBMC への感染防御試験：KRH-3955 が、8 人から分離した PBMC への NL4-3 の感染をばらつきなく抑制するかを検討した結果、ウイルス複製量(培養上清上の p24 濃度)は、17-120 ng/ml とバラツキが認められたが、KRH-3955 のウイルス複製阻害活性は、EC₅₀ で 0.23-1.3 nM、EC₉₀ で 2.7-3.5 nM といずれの PBMC においても強力な効果を示した(表 1)。

(3) KRH-3955 による抗 CXCR4 抗体 12G5 結合の持続的阻害活性の測定：Molt-4 細胞を on ice で薬剤処理した後細胞を洗浄し(または洗浄せず)、抗体反応後結合した CXCR4 抗体量を FACS にて定量した。図 1 に示すように、KRH-3955 (10 nM)では、

薬剤処理した後細胞を洗浄し、遊離した薬剤を除去した環境においても、12G5 結合を顕著に阻害した。対照的に、AMD3100 では未洗浄ではほぼ完全に抗体結合を阻害した 1000 nM 処理においても細胞の洗浄によってその阻害活性をほぼ失っていた(図 1 a)。そこで次に、KRH-3955 処理した細胞を洗浄後、細胞を薬剤無添加の培地中で 37C にて一定時間(0, 3, 6 時間)細胞を静置し、12G5 結合阻害活性を測定した。その結果、洗浄後 3, 6 時間においてもそれぞれ 50、40%の 12G5 結合阻害活性を保持していた(図 1 b)。

(4) 事前内服による感染予防効果の検討：KRH-3955 を 100 mg/kg で感染 24 時間前に投与した 3 頭の末梢血 CD4 数は、感染後 3 ヶ月経ってもウイルス感染時のレベルを維持していた。一方、対照薬剤の TDF/FTC では、感染後 3 ヶ月において 3 頭中 2 頭の末梢血 CD4 数はウイルス感染時のレベルを維持していたが、1 頭は感染後 1 ヶ月で急激な末梢血 CD4 数の減少を起こした(図 2)。

(5) CXCR4 阻害剤耐性 HIV-1 誘導実験：PM1/CCR5 細胞を標的細胞として、NL4-3 を親株とした薬剤耐性株誘導実験を 2007. 10.11 に開始した。実験開始時の薬剤濃度は EC₅₀ よりやや低い濃度に設定し、ほぼ 4 日おきに 1:5 に培養物を継代した。ウイルス感染による CPE が培養全体に観察されるようになった時点で薬剤濃度を 1.5 倍上昇させた。なお、コントロールとして薬剤無添加での感染細胞の継代培養(この場合は、CPE でほぼ完全に細胞が死滅するので培養上清のみを継代した)も併行して行った。2009 年 12 月下旬の時点での薬剤濃度は、KRH-3955、KRH-3148、AMD3100、AMD070 でそれぞれ 15、750、3000、4500 nM である。現在、それぞれの薬剤に対する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中である。

D. 考察

これまでの実験から、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。今回行った 12G5 結合阻害の持続的効果の結果から、一番よく研究されている CXCR4 阻害剤 AMD3100 とは明らかに CXCR4 への親和性が異なっていた。耐性誘導実験において Env 領域に出現する変異パターンもこの 2 薬剤間では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) 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):3144-3149, 2008.
- 2) 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.
- 3) Iwasaki, Y., H. Akari, T. Murakami, S. Kumakura, Z. Dewan, M. Yanaka, and N. Yamamoto. Efficient inhibition of SDF-1 α -mediated chemotaxis and HIV-1 infection by novel CXCR4 antagonists. *Cancer Sci.* 100:778-781, 2009.
- 4) Murakami, T., S. Kumakura, T. Yamazaki, R. Tanaka, M. Hamatake, K. Okuma, W. Huang, J. Toma, J. Komano, M. Yanaka, Y. Tanaka, and N. Yamamoto. The Novel CXCR4 Antagonist, KRH-3955

Is an Orally Bioavailable and Extremely Potent Inhibitor of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection: Comparative Studies with AMD3100. *Antimicrob. Agents Chemother.*

53:2940-2948, 2009

5) 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 no.35:5-7, 2009.

6) 村上 努: HIV複製を制御する宿主因子の探索

The Journal of AIDS Research 11 (3): 205-209, 2009

2. 学会発表

1) T. Murakami, K. Miyakawa, C. Bucci, J. Komano, and N. Yamamoto. Role of Rab7 and its effector protein in HIV-1 assembly. May 18-23 2009, Retroviruses, Cold Spring Harbor, N. Y., USA.

2) 村上 努、呉 鴻規、富田香織、伯川冬美、駒野 淳、千葉 丈、山本直樹. HIV-1 粒子形成における Rab7 とそのエフェクター蛋白質の役割 第 57 回日本ウイルス学会学術集会・総会、東京、2009 年 10 月 25-27 日

3) 村上 努、呉 鴻規、富田香織、伯川冬美、駒野 淳、千葉 丈、山本直樹. Rab 蛋白質とそのエフェクター蛋白質の HIV-1 粒子形成における役割 (Rab7 を中心に) 第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会、名古屋、2009 年 11 月 26-28 日

4) T. Aoki, S. Shimizu, U. Emiko, M. Hamatake, K. Terashima, H. Tamamura, T. Murakami, N. Yamamoto and J. Komano. Development of 5th generation lentiviral vector. 第 32 回日本分子生物学会年会、横浜、2009 年 12 月 9-12 日

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

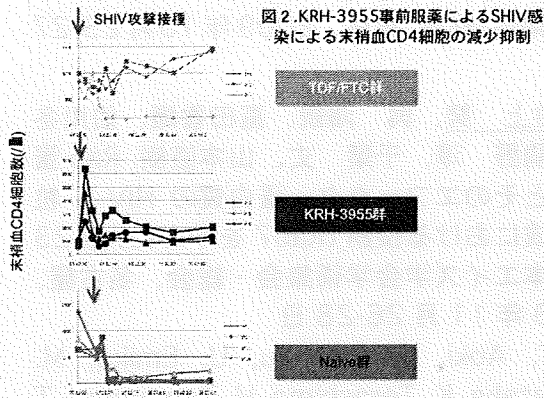
該当事項なし。

表1. 8名のdonorから得られたPBMCへのNL4-3感染に対するKRH-3955の抗ウイルス活性

Donor no.	p24 level (ng/ml)	EC ₅₀ (nM)	EC ₉₀ (nM)
1	31	1.3	3.2
2	25	1.2	3.2
3	17	1.2	3.3
4	40	0.70	2.9
5	120	0.77	2.9
6	58	1.5	3.5
7	49	0.23	2.7
8	53	1.0	3.0
mean	49	0.99	3.1
SD	32	0.40	0.26

*PBMCs from two different donors were used in each assay. The anti-HIV-1 activity was determined by measuring the p24 antigen level in culture supernatants.

図1. KRH-3955による持続的な12GS結合阻害活性



厚生労働科学研究費補助金(エイズ対策研究事業)

分担研究報告書

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

分担研究者 西澤雅子 国立感染症研究所 エイズ研究センター

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

研究要旨

新規プロテアーゼ阻害剤(PI)であるダルナビル(DRV)の耐性機序について解析するために、ロピナビル(LTV/r)、アタザナビル(ATV)、アンブレナビル(APV)に対して耐性を持つ多剤耐性 HIV を基点に DRV 耐性誘導を行い、DRV 高度耐性 HIV(DRV5929)を得た。ダイレクトシーケンス解析の結果、この DRV5929 はプロテアーゼ領域に V111I/V/V32I/L33F/I47V/I50IV/L76VL/L89V の変異を有していた。このウイルスのプロテアーゼ領域を増幅しクローニングした結果、V32I/M46I/I54/V82F/L90M と D30N/M46I/I54V/V82F/L90M の2種類の耐性パターンを持つクローンが得られた。この2種類の DRV 耐性プロテアーゼを大腸菌にクローニングしてタンパク精製し、小麦胚芽発現系を用いて調製した活性型プロテアーゼの基質である Gag^{p55}と混合して反応させた結果、これらの DRV 耐性プロテアーゼには Gag^{p55} 切断活性がある事が確認された。

A. 研究目的

近年新規 PI として開発された DRV は、薬剤耐性獲得症例においても強い HIV 増殖抑制活性を持ち、多剤耐性症例のサルベージ療法に広く使用されるようになった。DRV は多剤耐性 HIV に対して強い抗 HIV 活性を持つ一方で、薬剤耐性を獲得しにくい性質も持っている。この性質から細胞培養系で DRV 耐性誘導を試みても DRV 耐性 HIV を誘導する事が困難であった為、DRV に対する耐性変異の詳細についての解析は進んでいない。DRV 耐性変異について詳細な解析を行うために、患者検体から多剤耐性 HIV を分離し、この多剤耐性 HIV を元にして DRV 高度耐性 HIV 誘導し、どのような耐性変異が誘導されてくるか検討した。また得ら

れた DRV 耐性 HIV のプロテアーゼ領域をクローニングし、その遺伝子配列を解析した。今回得られた2種類のクローンを用いてプロテアーゼのタンパク精製を行い、誘導されてきた耐性変異と DRV 耐性の機序を明らかにするために構造解析を試みた。

B. 研究方法

HXB2 及び APV、LPV、ATV に対して高度耐性を呈する HIV を基点にして、T 細胞系リポーター細胞株の MaRBLE 細胞を用いて DRV の耐性誘導を行った。得られた DRV 耐性 HIV は MaRBLE 細胞を用いた感受性検査で解析し、DRV に対してどれくらいの耐性を獲得したか解析した。また、得られた DRV 耐性 HIV のプロテアーゼ領域を増

幅し pT7Blue-2 T ベクターに挿入後大腸菌 Dh5 α にクローニングし、コロニーを得た。得られたクローンはプロテアーゼ領域の遺伝子解析を行い、プロテアーゼ領域の耐性変異パターンを確認した。各クローンの耐性変異パターンを確認後2種類のクローンを選択し、それぞれについて活性型及び D25N を導入した不活化型のプロテアーゼの発現を大腸菌および小麦胚芽発現系を用いて試みた(図 1)。活性型は DRV と不活化型は基質との結晶化を検討しており発現タンパクのゲル濾過精製を行う。

C. 研究結果

HXB2 野生株および多剤耐性 HIVDRV を基点に DRV 耐性誘導を行った。その結果野生型 HIV(HXB2)ではほとんど DRV の濃度を上げられなかったのに対し、多剤耐性 HIV では DRV の濃度を培養開始時から 500 倍上げても増殖する DRV 耐性 HIV を得ることに成功した。DRV5929 のプロテアーゼ領域のダイレクトシーケンスの結果、V11I/V32I/L33F/I47V/I50IV/L76VL/L89V の変異を確認した。MaRBLE 細胞を用いて DRV に対する感受性試験を行った結果、この耐性 HIV は DRV に対して約 61.5 倍(薬剤非添加のコントロール株に対して)の IC₅₀ 値を示した。感受性検査の結果から、この耐性 HIV 株は APV、LPV、ATV に対しても高度耐性を維持していた。この株のプロテアーゼ領域を増幅、クローニングを行った結果、2 種類のクローンを回収した。2つのクローンは獲得していた主な耐性変異は clone 1:V32I/M46I/I54/V82F/L90M, clone 2: D30N/M46I/I54V/V82F/L90M であった。この2種類のプロテアーゼについて各々活性型と不活性

型(D25N)を準備し、結晶化のための大腸菌での大量発現・精製を行った。また酵素活性を確認するために小麦胚芽発現系を用いて活性型プロテアーゼの基質である Gag^{P55}を発現させた。得られた Gag^{P55}とプロテアーゼを混合し、Gag^{P55}の切断パターンをウェスタンブロットで確認した結果、2種類の DRV 耐性プロテアーゼは切断率は野生型プロテアーゼと比較して低下しているものの、Gag^{P55}切断活性が保持されていることが確認された(図 2)。

D. 考察

DRV 耐性誘導した HIV からプロテアーゼ領域をクローニングして耐性パターンを解析した結果、clone1 には V32I が、clone2 には D30N が認められた。DRV は D30 の主鎖と水素結合を取るよう設計されており、D30N は出現しないと考えられていたが、本研究で D30N を有するクローンが認められたことから、他の耐性変異を多数獲得した事により D30 の主鎖と水素結合を取らなくなった可能性が考えられる。DRV は耐性獲得の genetic barrier が高いとされているが、これは PI に対して耐性を持たないプロテアーゼの場合で、既に PI に対して多剤耐性を獲得したプロテアーゼでは genetic barrier が必ずしも高くない可能性が示唆される。DRV は現在主にサルベージ療法として用いられているが、初回治療での使用がより HIV 抑制効果が高いと考えられる。

E. 結論

DRV 耐性を獲得した HIV からプロテアーゼ領域をクローニングし、2 種類の耐性パターンを確認した。またこの2種類の DRV 耐性プロテアーゼの発

現と精製に成功し、これらのプロテアーゼが基質である Gag^{p55} の切断活性を保っていることを確認した。結晶化には至っていないが、今後結晶化の条件を検討しながら、まず不活性型プロテアーゼの基質との結晶化を優先し、条件を検討しながら結晶化に取り組んでいる。また NL4-3 に今回クローニングした DRV 耐性プロテアーゼを挿入した組換え HIV を作製し、DRV 耐性について解析を行う。

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

1.西澤雅子、Jeffery A. Johnson、Walid Heneine、山本直樹、杉浦互。高感度薬剤耐性 HIV 検出法を用いた微小集族薬剤耐性 HIV の検出と存在比率に関する研究。第 23 回日本エイズ学会、2009、名古屋。

2.服部純子、瀧永博之、吉田 繁、千葉仁志、小池隆夫、佐々木悟、伊藤俊広、内田和江、原 孝、佐藤武幸、上田敦久、石ヶ坪良明、近藤真規子、今井光信、長島真美、貞升健志、古賀一郎、太田康男、山元泰之、福武勝幸、田中理恵、加藤真吾、宮崎菜穂子、藤井 毅、岩本愛吉、西澤雅子、仲宗根正、巽 正志、椎

野禎一郎、林田庸総、岡 慎一、伊部史朗、藤崎誠一郎、金田次弘、横幕能行、濱口元洋、上田幹夫、大家正義、田邊嘉也、渡辺香奈子、渡邊 大、矢倉裕輝、白阪琢磨、桑原 健、小島洋子、森 治代、中桐逸博、高田 昇、木村昭郎、南 留美、山本政弘、松下修三、藤田次郎、健山正男、堀 成美、杉浦 互。2003-2008 年の新規 HIV/AIDS 診断症例における薬剤耐性頻度の動向。第 23 回日本エイズ学会、2009、名古屋。

3.鈴木寿子、服部純子、村田大悟、三浦秀佳、伊部史朗、藤野真之、西澤雅子、山本直樹、杉浦互。インテグラーゼ阻害剤耐性化機序の分子生物学的解析。第 23 回日本エイズ学会、2009、名古屋。

3)特許の出願

なし

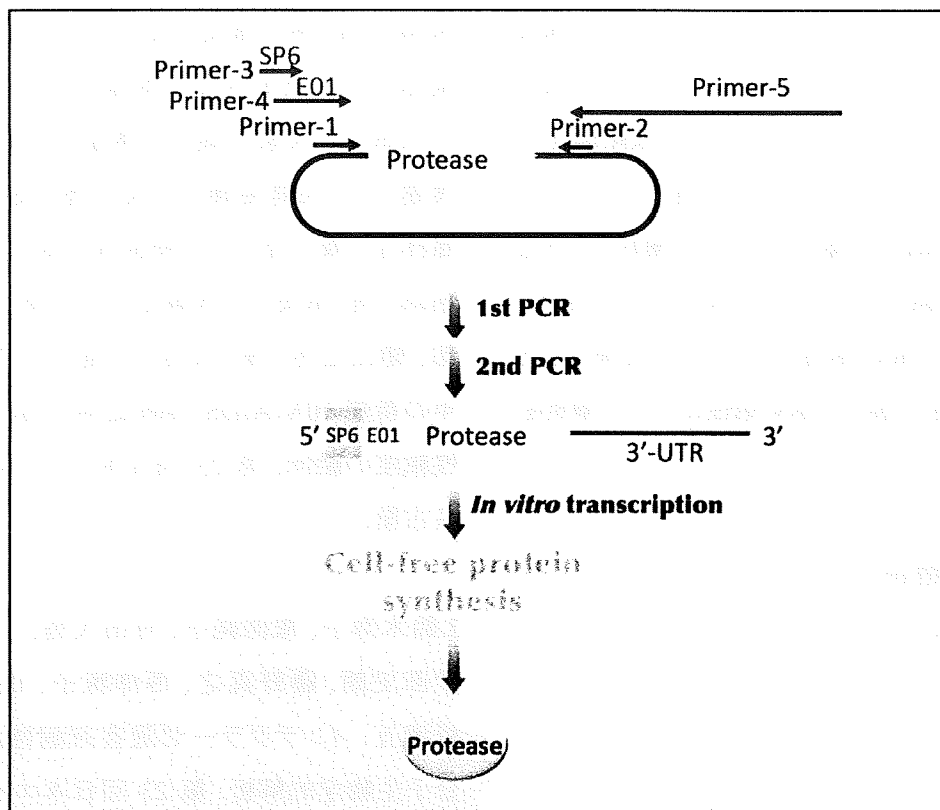


図 1

DRV 高度耐性(61.5 倍耐性)の誘導に成功したプロテアーゼ領域のクローニング

Clone 1: V32I/M46I/I50V/I54V/

Clone 2: D30N/M46I/I54V/V82F/L90M

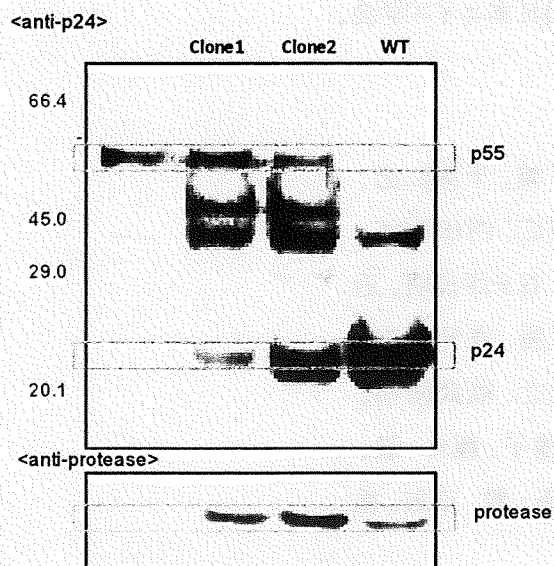


図 2

治療薬変更を考慮した耐性変異パターン予測の研究

分担研究者 遊佐敬介 国立医薬品食品衛生研究所 室長

研究要旨 新たな抗ウイルス効果のある薬剤が次々と開発され、HIVを標的とする化学療法は長足の進歩を遂げた。これによって感染者血中のHIVコピー数をコントロールできるようになった。しかし治療薬として使える抗ウイルス薬に限られることから、薬剤感受性の低い変異ウイルスの出現は、治療上の大きな問題であり続けるものと考えられる。本研究では、治療薬変更の際、治療薬変更後に出現耐性ウイルス予測するための *in vitro* 評価系を作成することを目指した。そのためにHIV感染者体内のウイルスプロテアーゼライブラリーを作製し、短期間で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。前年度までの検討では、症例数が少なかつたことから本年度は、症例数を増やし検討した。5例中1例で、*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、4例では一致はみられなかった。

A. 研究目的

近年、強力な抗ウイルス効果を持つ薬剤の開発により、感染者体内のウイルスコピー数を効果的にコントロールできるようになった。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が、ウイルスのコピー数を低く抑えることができれば、薬剤耐性ウイルスの出現頻度も低く抑えられると考えられる。しかし、長期にわたる薬剤投与による副作用、コンプライアンスなど、課題となる問題点も未だ少なくない。現在の化学療法では、体内からウイルスを完全に除くことはできない。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今後も不可避であろうと考えられる。その際に問題になるのは、あ

る薬剤による効果が、薬剤耐性ウイルスの出現によって低下するケースである。こうしたケースでは、治療効果を保つため、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、薬剤のターゲットとなる感染者体内のウイルスの逆転写酵素、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。しかも感染後、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。我々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。

そのため我々は、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。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HIV-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、シーケンスを行った。

(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受け、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20年度は、さらに 3 例について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た。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、感染者の治療薬変更前の患者血清を用いて、RT-PCR によりプロテアーゼ領域を増幅し、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 >10⁴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、昨年度の例ではでは、増殖してきたウイルスを回収できた。しかし今年度の検体ではウイルスを回収できないものもあ

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。しかし、本年度のものについては、必ずしも予測できないケースがあることが示された。これは、薬剤変更後の変異ウイルスの出現までの時間が2ヶ月を超えるものや、変異を確認するまで投与期間が長いためと考えられた。このほか、ウイルスライブラリー作製時期にはまだ耐性ウイルスが、minor populationとして含まれていなかったケースが考えられる。これはいつ耐性ウイルスが出現するかという問題とも関わっており、必ずしも末梢血中に含まれていないケースが考えられる。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症例は限られると結論された。

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。本研究では、合計5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、4例では一致しなかった。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が、予測できるケースはある程度限られるものと考えられる。

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、5例中1例の感染者の治療薬の変更前の患者血清を用いて感染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って、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

投稿中

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

なし。

分担研究報告書

ヒト免疫系の遺伝的多型を考慮した耐性変異パターン予測法の研究

分担研究者 上野貴将 熊本大学エイズ学研究センター 准教授

研究要旨

HIV は常にヒト免疫系の淘汰圧にさらされている。薬剤耐性と同様に、HIV は細胞傷害性T細胞(CTL)による淘汰圧から変異を獲得して逃避する。多数の日本人 HIV 感染者からウイルスを分離して遺伝子配列を調べたところ、患者の薬剤治療歴は CTL 逃避変異獲得に影響していなかった。したがって、両者は独立の選択圧としてウイルスに働くと考えられた。一方、HIV は T 細胞やマクロファージなどさまざまな細胞に感染して自身を複製する。HIV 準種形成と宿主細胞種の関連を明らかにする目的で、CTL 逃避変異がマクロファージでの HIV 複製に与える影響を解析した。その結果、HIV 感染者で見いだされるある種の CTL 逃避変異は、HIV の複製に T 細胞とマクロファージで異なる影響を与えることを明らかにした。これらの結果は、薬剤耐性を含め、HIV の変異獲得機構に新たな示唆を与えるものである。

A. 研究目的

本研究は、3年間の計画で、HIV 感染者での HIV 準種形成、薬剤耐性の発生とヒト免疫系からの逃避が、相互に与える影響を解析することを目的とする。たとえば、HIV は T 細胞やマクロファージなど性質の異なった細胞に感染し、複製するが、こうした宿主細胞の違いが、生体内での薬剤や免疫淘汰圧からのウイルス適応にどのように関与するか全く分かっていない。本年度の研究では、HIV 感染者で選択されてくる細胞傷害性T細胞(CTL)逃避変異をもとに、変異ウイルスが T 細胞とマクロファージ感染に対して与える影響を解析した。

B. 研究方法

さまざまな病態にある HIV 感染者 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・岡先生および潟永先生の協力の下)から、血漿(ウイルス RNA の抽出)を調製してウイルス遺伝子の解析を行った。HIV 非感染者の末梢 PBMC を調製して HIV 感染を行うとともに、一部の PBMC を用いて CD14 陽性の画分を採取後、M-CSF 存在下で培養して成熟マクロファージを調製した。(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) 薬剤治療歴と CTL 逃避変異

さまざまな病態および薬剤治療下にある HIV 感染者をリクルートして、Pol, Env, Nef 領域の CTL エピトープ周辺の遺伝子配列を解析した(表 1)。その結果、薬剤治療の有無に関わらず、HIV は CTL から逃避する変異を獲得することが分かった。またこの検体群では、CTL 逃避変異と薬剤耐性変異は異なる場所にあり、位置的に重なるような現象は認められなかった。

(2) CTL 逃避変異の経時変化

次に、免疫原性が最も高い Nef 中央領域(75 から 85 番目のアミノ酸)について詳細な解析を行った。データベースで検索すると、

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

HLA-B35陽性者のうち、野生型あるいはR75T、Y85F変異を持つ群についてさらにその特徴を調べたところ、R75T変異は慢性感染者で、Y85F変異は急性期の感染者で有意に多く選択されることが分かった(図1B)。さらに、019患者より長期に渡って経時的に採取した検体を用いて、HIV遺伝子の系統樹解析を行ったところ、R75T変異は、Y85F変異体とは別の系統にある変異群から新たに選択されたことが明らかとなった(図1C)。このことは、これまで考えられていた以上にHIV変異の獲得メカニズムがダイナミックであることを示唆する。

(3) T細胞でのHIV複製

CXCR4をコレセプターとするNL43株のNef領域をSF2株(野生型)および変異型のnef遺伝子と入れ換えたウイルスクローンを作成した。健常者(HIV非感染者)から調製したPBMCにHIVを感染後、PHAでT細胞を活性化させた。培養上清中のp24抗原量を測定して、ウイルス複製能を解析した(図2A)。PBMCドナーによって複製速度に差があったことから、5人のドナーで同一の実験を行って、結果を統計的に解析した(図2B)。その結果、TあるいはFの単独変異ではウイルス複製に顕著な差はなかったが、TFという2つの変異を同時に持つウイルスは、T細胞でのウイルス複製能力が著しく遅れていた。

(4) マクロファージでのHIV複製

次にCCR5をコレセプターとするJRFL株のNef領域を同じくSF2株(野生型)および変異型のnef遺伝子と入れ換えたウイルスクローンを作成した。健常者(HIV非感染者)のPBMCからCD14陽性細胞を採取後、M-CSF存在下で培養して成熟マクロファージを調製した。これに、ウイルスを感染させて、定期的に培養上清を取り、p24抗原量を定量してウイルス複製能を解析した(図3A)。ドナーによるウイルス複製の違いが見られたため、5人のデータを取り統計解析により有意差を検定した。その結果、TFという2つの変異を持つ変異ウイルスでは、T細胞と同様マクロファージにおいてもウイルス複製能が減弱化していた。一方、Tの単独変異は、T細胞のときとは異なり、マクロファージにおいては複製能が減少していた。

D. 考察

ウイルス遺伝子を解析したHIV感染者の検体数が100人程度の規模ではあるが、薬剤耐性とCTL逃避の間に明らかな相互作用は認められなかった。HAART治療下で血中ウイルス量が抑制されている期間においてもCTL逃避変異が獲得されることは、ウイルス複製が少なくとも部分的に持続されていること、CTLがウイルス抑制に補助的にしろ寄与していることを示唆している。慢性感染期になって現れるCTL逃避変異が、HIV複製において、T細胞とマクロファージで異なった影響を受けることは極めて興味深い。選択圧に対するウイルス馴化が、ある特定の細胞あるいは組織で、より高頻度に起きることを示唆しているものと考えられた。ウイルス準種形成の個体内分布を明らかにすることで、HIVの薬剤耐性やCTL逃避の詳細な機構を明らかにできると示唆された。

E. 結論

多数の日本人HIV感染者のウイルス遺伝子を解析することで、抗HIV剤とCTL応答は、ほぼ独立の選択圧としてウイルスに働くことが分かった。また、ウイルス馴化はHIV感染者個体内で局在する(ある特定の細胞種あるいは組織で頻発する)可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Motozono, C., Yanaka, S., Tsumoto, K., Takiguchi, M., and, Ueno, T. Impact of intrinsic cooperative thermodynamics of peptide-MHC complexes on antiviral activity of HIV-specific CTL. *J. Immunol.* 182: 5528-5536, 2009

2) Zheng, N., Fujiwara, M., Ueno, T., Oka, S., and Takiguchi, M. Strong ability of Nef-specific CD4+ cytotoxic T cells to suppress HIV-1 replication in HIV-1-infected CD4+ T cells and macrophages. *J. Virol.* 83:7668-7677, 2009

3) Hassan R, Suzu S, Hiyoshi M, Takahashi-Makise N, Ueno T, Agatsuma T, Akari H, Komano J, Takebe Y, Motoyoshi K, Okada S. Dys-regulated activation of a Src tyrosine kinase Hck at the Golgi disturbs N-glycosylation of a cytokine receptor Fms. *J Cell Physiol* 221:458-468, 2009

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「ウイルス感染に対する獲得免疫」第39回日本免疫学会学術集会、大阪国際会議場、2009年12月2日-4日

2) Chihiro Motozono, Masafumi Takiguchi, Takamasa Ueno: The epitopes dictate the cross reactive capacity of HIV-specific CTLs towards variant antigens, 10th kumamoto AIDS seminar, September 28-29, 2009, Hotel Nikko Kumamoto, Japan

3) Chihiro Motozono, Masafumi Takiguchi, Takamasa Ueno: Cross-reactive capacity of HIV-specific CTLs is dependent on the epitopes, HIV Acute Infection Meeting, September 22-23, 2009, Boston, MA, USA

4) Chihiro Motozono, Masafumi Takiguchi, Takamasa Ueno: Specificity-dependent cross reactive capacity of HIV specific CTLs, 96th Annual meeting the American Association of Immunologists, May 8-12, 2009, Seattle, Washington, USA

5) Chihiro Motozono, Saeko Yanaka, Kouhei Tsumoto, Masafumi Takiguchi, Takamasa Ueno: Antiviral activity of HIV-specific cytotoxic T lymphocytes is influenced by

intrinsic cooperative thermodynamics of peptide MHC complexes, Keystone Symposia (Prevention of HIV/AIDS), March 22-27, Keystone, Colorado, USA

6) Mwimanzhi Philip, 上野 貴将、滝口 雅文：CTL escape Nef variants influence CCR5 down regulation and HIV superinfection susceptibility in primary human macrophages、一般口演「O66 アクセサリー」第23回日本エイズ学会学術集会・総会、11月26日-28日

7) Philip Mwimanzhi, Hassan Ranya, Shinya Suzu, Masafumi Takiguchi, Takamasa Ueno: The effect of CTL-escape conferring mutations on Nef's pathogenic functions in primary macrophages, September 28-29, 2009, Hotel Nikko Kumamoto, Japan

8) Philip Mwimanzhi, Masafumi Takiguchi, Takamasa Ueno: Susceptibility to HIV superinfection is influenced by CTL-mediated selective pressure on Nef. HIV Acute Infection Meeting, September 22-23, 2009, Boston, MA, USA

9) Philip Mwimanzhi, Mamoru Fujiwara, Masafumi Takiguchi, Takamasa Ueno: The effects of CTL-escape conferring mutations on Nef's pathogenic functions in primary macrophages, Keystone Symposia (Prevention of HIV/AIDS), March 22-27, Keystone, Colorado, USA

10) 上野 貴将、本園 千尋、滝口 雅文：CTLのHIV変異体に対する交差反応性、一般口演32「ウイルス(9)」第57回日本ウイルス学会学術集会、都市センターホテル、2009年10月25日-27日

11) Takamasa Ueno: Peptide intrinsic factors that influence CTLs' antiviral activity, 10th kumamoto AIDS seminar, September 28-29, 2009, Hotel Nikko Kumamoto, Japan

12) 谷中 冴子、本園 千尋、工藤 基徳、上野 貴将、津本浩平：HLA-HIV由来抗原ペプチド複合体の熱安定性と抗原性、ワークショップ「HIVと宿主蛋白質との相互作用」第9回日本蛋白質科学学会年会、熊本全日空ホテルニュースカイ、2008年5月20-22日

G. 知的財産権の出願・登録状況なし。

Pt. ID	HLA type	Date	CD4 (mm ³)	VL ^a	Antiviral therapy ^b	Pol448		Env77		Nef75		
						EVIPFEEREL	FDPAEVELEN	PVPEVLRMTYKAL	FRF	FRF	FRF	
Pt-01	A2402/A2603, B3501/B4002	Oct. 1995	47	ND ^c	AZT, ddI	direct ^d	V-	direct	T-----	T-----	T-----	direct
		Apr. 1997	146	4.5	AZT, ddC, IDV	direct	V-	direct	T-----	T-----	T-----	direct
		Sep. 1999	223	3.9	d4T, 3TC, RTV, SQV	direct	V-	direct	T-----	T-----	T-----	direct
Pt-03	A2402/A2601, B3501/B5101	May 1989	480	ND	IFN- α	12/18	V-	14/14	T-----	T-----	T-----	5/15
		Mar. 1993	289	ND	AZT	6/18	V-	direct	T-----	T-----	T-----	10/15
		May 1995	252	ND	AZT, ddI	1/14	V-	direct	T-----	T-----	T-----	1/15
Pt-15	A11/A24, B35/B54	Jul. 1997	320	4.2	AZT, ddI, SQV	13/14	V-	direct	T-----	T-----	T-----	14/15
		Jun. 2002	203	3.1	ABC, TDF, LPV	11/11	V-	direct	T-----	T-----	T-----	12/12
		Jul. 1996	193	3.3	3TC, d4T, NFV	12/12	V-	direct	12/12	T-----	T-----	direct
		Dec. 1998	162	4.6	3TC, d4T, NFV	14/14	V-	direct	direct	T-----	T-----	direct
		Jun. 2001	383	BL ^e	ABC, ERV, LPV	direct	V-	direct	direct	T-----	T-----	direct
Pt-19	A2402/-, B3501/B5201	Jun. 1996	524	4.7	ND	7/12	V-	direct	T-----	T-----	T-----	3/13
		Jul. 1997	714	4.3	ND	5/12	V-	direct	T-----	T-----	T-----	10/13
		Dec. 1999	601	2.8	3TC, d4T, IDV	14/14	V-	direct	direct	T-----	T-----	1/16
Pt-34	A2402/A2601, B3501/B4801	May 2001	1,574	BL	d4T, 3TC, IDV	direct	V-	direct	T-----	T-----	T-----	5/16
		May 1999	393	3.7	d4T, 3TC	direct	V-	direct	direct	T-----	T-----	10/16
		Apr. 2001	201	4.4	ND	direct	V-	direct	direct	T-----	T-----	14/14
Pt-42	A24/A31, B35/B60	Apr. 1999	400	3.5	ND	direct	V-	direct	T-----	T-----	T-----	direct
		Aug. 2001	311	3.8	ND	direct	V-	direct	direct	T-----	T-----	4/12
Pt-46	A2, B35/B61	May 1999	231	BL	AZT, 3TC, IDV	direct	V-	direct	T-----	T-----	T-----	8/12
		Apr. 2001	263	BL	d4T, 3TC, IDV, RTV	direct	V-	direct	direct	T-----	T-----	T-----

^a VL, viral load (log₁₀ copies/ml)

^b AZT, zidovudine; ddI, didanosine; ddC, didescytidine; IDV, indinavir; d4T, didhydrothymidine; 3TC, didescythyridine; RTV, ritonavir; SQV, saquinavir; ABC, abacavir; TDF, tenofovir; LPV, lopinavir; ERV, efavirenz

^c ND, not done.

^d 'direct' indicates that the data were obtained by direct sequencing of PCR-amplified DNA fragments.

^e Numbers in 'Freq' column indicates a clonal frequency of plasmid clones sequenced following cloning of PCR-amplified DNA fragments into plasmid vectors.

^f BL, below detection level.

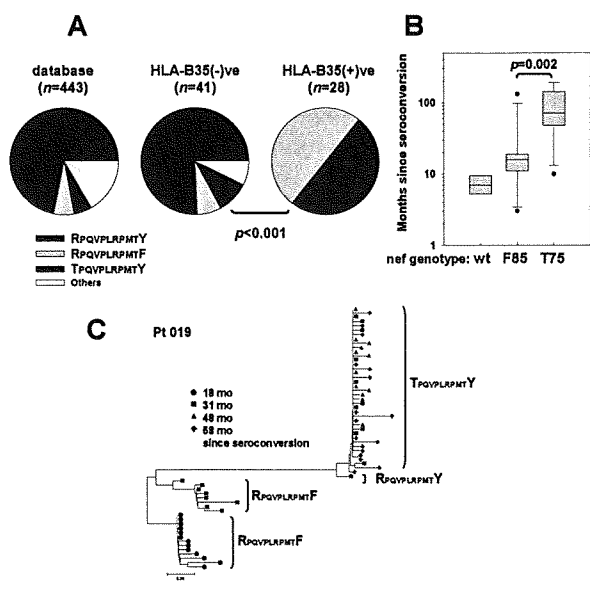


Fig 1. Dynamic evolution of autologous Nef sequences in HIV-infected individuals expressing HLA-B 35.

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

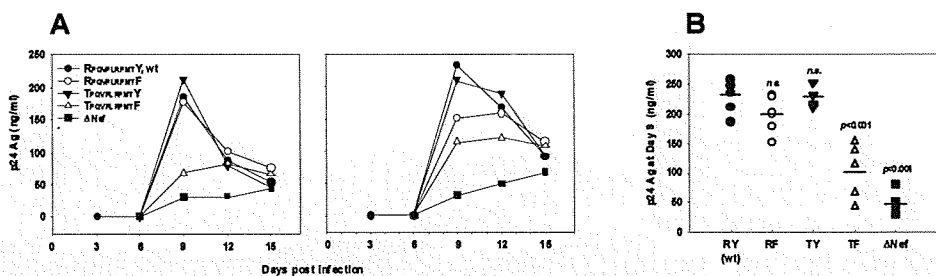


Fig 2. Effects of Nef mutations on X4-tropic viral replication in PBMC.

(A) Freshly isolated PBMC samples from 2 HIV-negative donors were first infected with wild-type or various variant HIV-1s (based on NL43) and 3 days later cells were activated by PHA. For monitoring viral replication, culture supernatants were collected every 3 days and replaced with fresh medium containing rIL-2.

(B) The same experiment as above was done by using 3 additional HIV-negative donors. The level of p24 Ag obtained at Day 9 post infection was plotted and statistically analyzed based on ANOVA with multiple comparisons versus the wild type. n.s., not significant. Horizontal bars indicate means of data obtained for the 5 different PBMC donors.

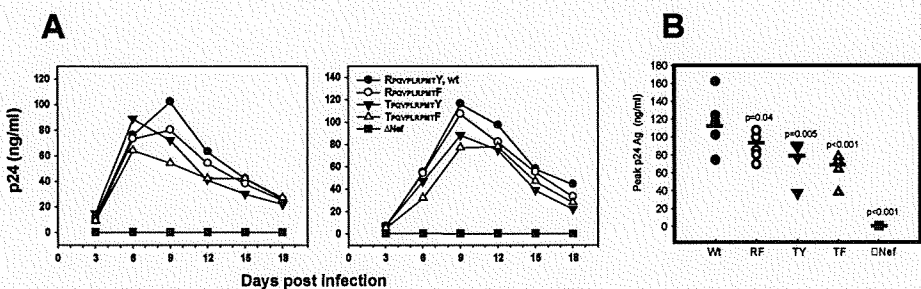


Fig 3. Effects of Nef mutations on R5-tropic viral replication in primary macrophages.

(A) Primary macrophages prepared from 2 HIV-negative donors were first infected with wild-type or various variant HIV-1s (based on JRFL). For monitoring viral replication, culture supernatants were collected every 3 days and replaced with fresh medium.

(B) The same experiment as above was done by using 3 additional HIV-negative donors. The level of p24 Ag at the peak of individual experiments was plotted and statistically analyzed based on ANOVA with multiple comparisons versus the wild type. n.s., not significant. Horizontal bars indicate means of data obtained for the 5 different donors.

分担研究報告書

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 准教授

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 クロンの分子構築を試み、以下の成果を得た。ウイルス蛋白質の機能・構造解析に基づくゲノムの遺伝子工学的改変とサル細胞内複製過程で生ずる適応変異のゲノムへの導入とを適宜組み合わせ、カニクイザルおよびアカゲザル由来細胞株において SIVmac239 に比肩できる増殖能を示す MN4Rh-3 (X4 ウイルス) と MN5Rh-3 (R5 ウイルス) の構築に成功した。これらのクローンでは、Gag-CA (三箇所の小領域) と Vif (全体) をコードするゲノム領域が試験管内で改変され、さらに Pol-IN と Env-SU に適応変異が導入されている。サル細胞で認められる適応変異は Pol-IN の C 末側のごく狭い領域と Env-SU とに集中して起こることが明らかとなった。これらの IN 適応変異はウイルス複製の逆転写および粒子産生過程を増強する。MN4Rh-3 はカニクイザル PBMC で効率良く増殖したが、アカゲザル PBMC ではほとんど増殖しなかった。MN4Rh-3 はカニクイザル TRIM5 α の抗ウイルス作用を回避しているが、アカゲザル TRIM5 α を抑制することができないので、これが原因と考えられる。MN4Rh-3 よりサル細胞での増殖能が劣るウイルスクローン (MN4-5S) であってもカニクイザル個体に持続感染を成立させるため、MN4Rh-3/カニクイザルの実験システムは少なくとも感染急性期における薬剤評価系として充分機能し得ると考えられる。今後、このシステムをさらに発展させるとともにアカゲザル指向性 HIV-1 の分子構築にも取り組む。

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)。NL-DT5R の Gag-CA helix 6/7 loop を SIVmac239 型に置換し (Retrovirology 6:70, 2009)、さらに、HSC-F 細胞での適応変異 (Pol-IN と Env-SU 内変異) を導入した MN4-5S クローンはカニクイザル PBMC での増殖効率が向上し、カニクイザル個体に持続感染を成立させた (論文発表準備中)。

本年度は、種々のサル細胞指向性 HIV-1 の細胞馴化実験と試験管内改変/細胞馴化により新たに得られたウイルスクローン (MN4Rh-3) の機能・構造解析とを中心に研究を行なった。これにより、HIV-1 の示す種特異的増殖の分子基盤を明らかにするとともに HIV-1 感染・発症霊長類モデルの確立に向けた取組みを行なった。

B. 研究方法

1. ウイルスゲノムの改変は通常の遺伝子工学的手法を用いた。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は既報の通りである (PNAS 103:16959-16964, 2006)。定量 PCR も定法に従って行なった。
2. トランスフェクションにはヒト 293T 細胞を用いた。サル TRIM5 α の抗ウイルス作用の測定のために、既報 (Microbes Infect 11: 164-171, 2009) に従いネコ CRFK 細胞に TRIM5 α 遺伝子を導入しクローンを樹立した。ウイルス感染実験には、ヒト MT-4/CCR5 細胞、ヒト M8166 細胞、カニクイザル HSC-F 細胞、アカゲザル HSR5.4 細胞、カニクイザル CD8(-)PBMC およびアカゲザル CD8(-)PBMC を用いた。293T 細胞および CRFK は 10%FCS 加 MEM 培地で、MT-4/CCR5、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。サル PBMC や個体感染実験は京都大学霊長類研究所・人類進化モデル研究センターの明里宏文教授らにより行なわれた。
3. 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なっていない。

C. 研究結果

1. HSC-F 細胞と HSR5.4 細胞を用い、サル細胞指向性ウイルスの馴化実験を繰返し行なった。その結果、増殖能増強に寄与する適応変異は Pol-1N の C 末端ドメイン (CTD) のごく狭い領域と Env-SU とに集中して起こることが明らかとなった。注

目すべきことに、IN の適応変異は CTD の N 末側 13 アミノ酸中の 4 アミノ酸に生じていた。

MN4-5S の HSR5.4 細胞への馴化で得られた Gag-CA 内適応変異を基に、増殖能向上に寄与するアミノ酸残基を予測し、分子クローンを構築した。この CA 内 1 アミノ酸変異を持つウイルス (MN4Rh-3 および MN5Rh-3) は親クローンよりサル細胞 (HSC-F および HSR5.4) での増殖能が格段に向上していた。

2. 定量 PCR およびトランスフェクション法による解析の結果、IN CTD 適応変異はウイルス複製の逆転写および粒子産生過程に関わることが示唆された。ヒトおよびサル細胞でのウイルス感染実験の結果、これらの適応変異はサル細胞トロピズムに直接関与しないが、ウイルスの複製能を有意に向上させていることがわかった。同定された 4 種類の変異アミノ酸のうち二つは HIV/SIV の同部位 (IN CTD のループ構造) に高率に存在している。
3. MN4Rh-3 および MN5Rh-3 は HSC-F 細胞および HSR5.4 細胞で、SIVmac239 と同程度かそれ以上に効率的に増殖する。このデータに合致して、MN4Rh-3 はカニクイザル PBMC で良く増殖する。親株である MN4-5S がカニクイザル個体に持続感染する (未発表) ので、MN4Rh-3 は個体レベルでもそれ以上に良く増殖すると考えられる。しかし、アカゲザル PBMC においては MN4Rh-3 はほとんど増殖できなかった (多数の個体から調製した PBMC を用いた実験結果)。
4. カニクイザルあるいはアカゲザルの TRIM5 α を発現するネコ CRFK 細胞株を樹立した (Microbes Infect 11: 164-171, 2009; 未発表データ)。これらを用いて解析したところ、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ないが、MN4Rh-3 は充分回避していた。しかし、MN4Rh-3 であってもアカゲザル TRIM5 α の抗ウイルス作用は抑制できなかった。これらは上記 3 に記載した PBMC での感染実験の成績に符合する。

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-3 および MN5Rh-3) はこれらの目標に向け極めて有望である。

サル/ヒト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、HIV-1 宿主体や感染能の分子基盤の解明に不可欠である。特に、IN CTD の適応変異については不明な点が多く、極めて重要な検討課題である。ウイルス蛋白質の構造解析に基づく機能予測/機能検証は本研究の目標達成に極めて重要なステップであり、今後も鋭意取り組んでいく。

E. 結論

カニクイザル細胞およびカニクイザル個体で効率よく増殖する HIV-1 クローン MN4Rh-3 が構築され、本研究の最終目標達成に向け大きく前進した。このクローンをを用いた本格的なカニクイザル感染実験が京都大学の明里教授らによりまもなく開始される。一方、アカゲザル指向性を HIV-1 に付与するには Gag-CA の更なる改変が必要であると考えられ、この方向の研究を精力的に行なっている。

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。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する予定である。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nagao, T., Hatcho, 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* 56: 21-25.
- 2) Kamada, K., Yamashita, T., Hatcho, 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* 11: 164-171.
- 3) Kuroishi, A., Saito, A., Shingai, Y., Shioda, T., Nomaguchi, M., Adachi, A., Akari, H., and Nakayama, E.E. 2009. Modification of a loop sequence between α -helices 6 and 7 of virus capsid (CA) protein in a human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) derivative that has simian immunodeficiency virus (SIVmac239) *vif* and CA α -helices 4 and 5 loop improves replication in cynomolgus monkey cells. *Retrovirology* 6: 70.
- 4) Jere, A., Fujita, M., Adachi, A., and Nomaguchi, M. 2010. Role of HIV-1 Nef protein for virus replication *in vitro*. *Microbes and Infection* 12: 65-70.
- 5) Fujita, M., Otsuka, M., Nomaguchi, M., and Adachi, A. 2010. Multifaceted activity of HIV Vpr/Vpx proteins: the current view of their virological functions. *Reviews in Medical Virology*, in press.
- 6) Yamashita, T., Nomaguchi, M., Miyake, A., Uchiyama, T., and Adachi, A. 2010. Status of APOBEC3G/F in cells and progeny virions modulated by Vif

determines HIV-1 infectivity.
Microbes and Infection, in press.

2. 学会発表

- 1) Kuroishi, A., Saito, A., Shingai, Y., Shioda, T., Nomaguchi, M., Adachi, A., Akari, H., and Nakayama, E. E. Modification of a loop between α -helices 6 and 7 of virus capsid protein improves human immunodeficiency virus type 1 replication in cynomolgus monkey cells. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Sept. 10, 2009, Awaji, Japan.
 - 2) 三宅在子、野間口雅子、土肥直哉、藤原佐知、足立昭夫 HIV-1 インテグラーゼ (IN) C 末端領域 (CTD) における 1 アミノ酸変異によるウイルス増殖促進機構の解析. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 25 日、東京.
 - 3) 土肥直哉、野間口雅子、藤原佐知、三宅在子、足立昭夫 サル細胞指向性 HIV-1 の増殖適応変異の解析. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 26 日、東京.
 - 4) 野間口雅子、土肥直哉、藤原佐知、三宅在子、横山 勝、大出裕高、佐藤裕徳、足立昭夫 HIV-1 Env の 1 アミノ酸変異による増殖促進機構の解析. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 26 日、東京.
 - 5) 齊藤 暁、飯島沙幸、岩崎優紀、黒石 歩、中山英美、塩田達雄、足立昭夫、野間口雅子、俣野哲朗、明里宏文 SIV 由来 CA h6/7 loop を持つ第 2 世代サル指向性 HIV-1 クローンはカニクイザル個体で効率よく増殖する. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 26 日、東京.
 - 6) 黒石 歩、齊藤 暁、塩田達雄、野間口雅子、足立昭夫、明里宏文、中山英美 サル指向性 HIV-1 のサル細胞でのウイルス増殖におけるカプシド α -ヘリックス 6-7 間のループの重要性. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 26 日、東京.
 - 7) 横山 勝、大出裕高、野間口雅子、神田忠仁、足立昭夫、佐藤裕徳 HIV-1 Env V3 ループ構造の安定性を制御するアミノ酸. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 27 日、東京.
 - 8) 三宅在子、野間口雅子、土肥直哉、藤原佐知、足立昭夫 HIV-1 増殖過程におけるインテグラーゼ (IN) C 末端領域 (CTD) の影響. 第 23 回日本エイズ学会学術集会、2009 年 11 月 26 日、名古屋.
 - 9) 黒石 歩、齊藤 暁、新開泰宏、塩田達雄、野間口雅子、足立昭夫、明里宏文、中山英美 サル指向性 HIV-1 のサル細胞でのウイルス増殖におけるカプシド α -ヘリックス 6-7 間のループの重要性. 第 23 回日本エイズ学会学術集会、2009 年 11 月 26 日、名古屋.
 - 10) 横山 勝、大出裕高、野間口雅子、神田忠仁、足立昭夫、佐藤裕徳 HIV-1 Env V3 ループ構造の安定性を制御するアミノ酸. 第 23 回日本エイズ学会学術集会、2009 年 11 月 26 日、名古屋.
 - 11) 野間口雅子、土肥直哉、藤原佐知、三宅在子、横山 勝、大出裕高、佐藤裕徳、足立昭夫 サル細胞指向性 HIV-1 の細胞馴化による増殖適応変異の解析. 第 23 回日本エイズ学会学術集会、2009 年 11 月 28 日、名古屋.
 - 12) 齊藤 暁、飯島沙幸、岩崎優紀、黒石 歩、中山英美、塩田達雄、足立昭夫、野間口雅子、俣野哲朗、明里宏文 第 2 世代サル指向性 HIV-1 クローンはカニクイザル個体において効率よく増殖する. 第 23 回日本エイズ学会学術集会、2009 年 11 月 28 日、名古屋.
- 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。