

## 抗HIV治療薬による副作用発現の分子機序の解析

分担研究者

**太田 康男** 帝京大学医学部内科学講座 教授

研究協力者

**北沢 貴利** 東京大学医学部附属病院感染制御部

### 研究要旨

プロテアーゼ阻害薬を用いた長期の抗ウイルス治療により代謝系の機能障害がもたらされることが明らかとなっている。その機序を解明するため、プロテアーゼ阻害薬のインスリンシグナル伝達系への関与について解析を行った。脂肪細胞に分化させた3T3-L1細胞におけるインスリン刺激によるIRS1のSer、Tyrのリン酸化は、コントロールと比較するとdarunavirではほぼ同程度であったが、lopinavirで減弱が認められた。またGLUT4の膜移行性も、特にlopinavirで減弱が強く認められた。以上から、脂肪細胞のインスリンシグナル伝達系の抑制にプロテアーゼ阻害薬の関与が示されたが、その抑制の程度はプロテアーゼ阻害薬間で差が認められ、臨床的研究から得られている事実と合致していた。本研究により、プロテアーゼ阻害薬によるインスリンシグナル伝達系への抑制の程度が、インスリン抵抗性の強さを規定している可能性が示唆された。

### A. 研究目的

HIV感染に対する抗ウイルス治療は、HIVウイルス量を減少させ、CD4陽性Tリンパ球を増加させる。その結果、日和見疾患の合併率を下げ、生命予後に大きな改善をもたらした。その一方で、抗HIV薬による副作用も臨床的大きな問題となっている。特にプロテアーゼ阻害薬を用いた長期の抗ウイルス治療により、インスリン抵抗性の亢進、2型糖尿病の顕性化、末梢性の脂肪萎縮、中心性の脂肪蓄積といった代謝系の機能障害がもたらされることが明らかになってきた。

プロテアーゼ阻害薬による糖代謝障害機構として、プロテアーゼ阻害薬はグルコース輸送体(Glucose transporter 4; GLUT4)の膜移行性には影響しないが、糖取り込み能を低下させるという報告がある。またプロテアーゼ阻害薬の一つであるlopinavirは、インスリン受容体基質(Insulin receptor substrate; IRS)のリン酸化を抑制することにより、インスリン抵抗性・ERストレスを惹起するということが報告されている。以上からプロテアーゼ阻害薬がインスリン抵抗性を誘導していることは示されつつあるが、その分子作用点に関し詳細は明らかにされていないのが現状である。

さらに、糖尿病に代表される糖代謝障害は一種の炎症性疾患であり、その発症機序に炎症の制御システムが関与していることが解明されつつある。SH2ドメインをもち、JAKと会合し、そのキナーゼ活性を抑制するタンパクとしてSOCSファミリーが同定されているが、これは炎症の中心的制御分子である炎症性サイトカインのシグナル伝達系において中心的役割を演じている。SOCSファミリーの中で、SOCS-1、SOCS-3はIRSのリン酸化の抑制を介しインスリン抵抗性を誘導されることが報告されている。

以上をふまえ、平成21年度の研究として、プロテアーゼ阻害薬のインスリン受容体を介するシグナル伝達の制御への関与の解析、さらにSOCSタンパクを介した制御機構への関与について解析することを目的とし、一連の研究を行った。

### B. 研究方法

マウス由来の脂肪前駆細胞の細胞分離株である3T3-L1を、脂肪前駆細胞培養培地F-PM-1-L1で培養した後、脂肪細胞分化培地F-DM-2-L1で分化させ、脂肪細胞培養培地F-AM-1-L1で培養した。脂肪細胞に分化させた3T3-L1を、抗HIVプロテアーゼ阻害薬

である lopinavir、darunavir で48時間処理した後、インスリンにて刺激した。インスリン刺激後の IRS の発現、IRS のリン酸化、SOCS の発現を免疫沈降法およびウェスタンブロット法にて解析した。また GLUT4 の膜移行性については、免疫染色を用いて解析した。

**(倫理面への配慮)**

今年度の研究内容においては、特に配慮すべきことはないと考ええる。

**C. 研究結果**

脂肪細胞に分化させた 3T3-L1 細胞をコントロール、lopinavir もしくは darunavir で処理し、インスリン刺激30分後に IRS1 の発現量（発現の変化）および IRS1 の Ser（セリン）307 のリン酸化、Tyr（チロシン）のリン酸化をウェスタンブロット法で比較検討した。インスリン刺激の前後での IRS1 の発現は lopinavir、darunavir による前処理の有無にかかわらず変化は認めなかった(図1)。インスリン刺激によ

り IRS1 の Ser307 はリン酸化されるが、darunavir 前処理では、そのリン酸化の程度はコントロールと同様であった。一方、lopinavir で前処理すると、IRS1 の Ser307 はリン酸化はやや減弱した。インスリン刺激により、IRS1 の Tyr のリン酸化も認められたが、darunavir 前処理を行うとインスリン刺激によるチロシンリン酸化は減弱し、lopinavir 前処理ではチロシンリン酸化がさらに減弱した(図1)。

次に脂肪細胞に分化させた 3T3-L1 細胞において、インスリン刺激30分後における GLUT4 の細胞膜移行性を免疫染色法で比較検討した。GLUT4 は、インスリン刺激前には細胞質にびまん性に分布していたが、インスリン刺激により、多くの細胞において細胞膜に移行することが確認された(図2)。Darunavir による前処理を行った脂肪細胞においても、インスリン刺激後の GLUT4 の細胞膜への移行は、コントロールと比較して同程度に認められたが、lopinavir の前処理を行った脂肪細胞においては、GLUT4 が膜へ移行した細胞は減少していた(図2)。

最後に、SOCS1、SOCS3 の発現量の変化をウェスタンブロット法で比較検討した。インスリン刺激の

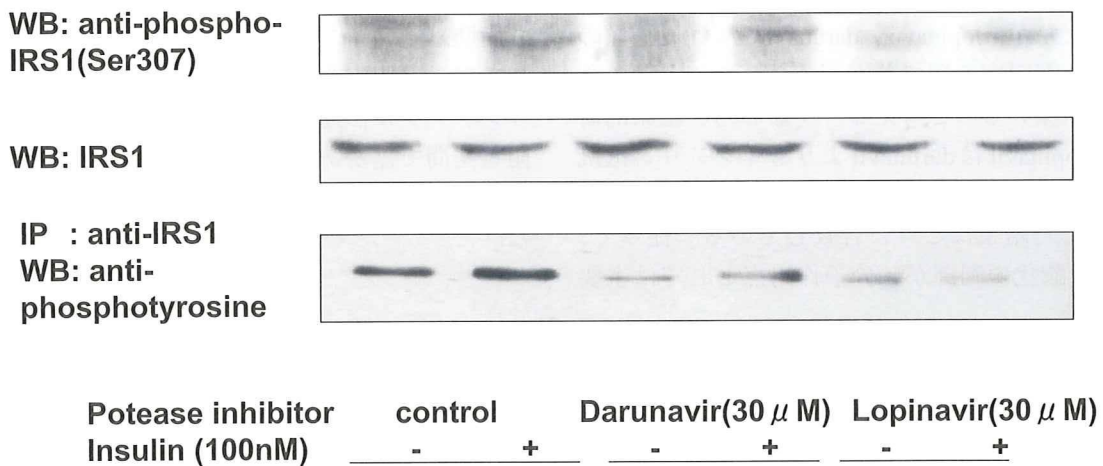


図1 プロテアーゼ阻害薬によるインスリン刺激後のIRSリン酸化

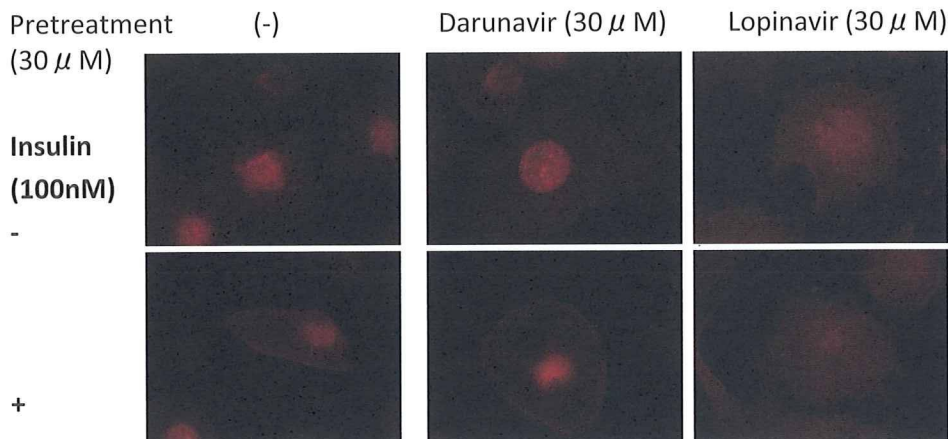


図2 プロテアーゼ阻害薬によるインスリン刺激後のGLUT4の局在の変化



前後での脂肪細胞に分化させた3T3-L1細胞におけるSOCS1、SOCS3の発現量は、lopinavir、darunavirによる前処理の有無にかかわらず変化は認めなかった(図3)。さらに図には示さないが、SOCS1あるいはSOCS3とIRS1との会合性を免疫沈降法で比較したが、SOCS1あるいはSOCS3とIRS1との会合は確認されなかった。

#### D. 考察

分化脂肪細胞を用いた本研究では、プロテアーゼ阻害薬がIRS1リン酸化の抑制というインスリンシグナル伝達の比較的の上流部分に作用し、かつプロテアーゼ阻害薬の間で抑制効果に差があることが示された。プロテアーゼ阻害薬の抗ウイルス活性としては、pol遺伝子の産物であるHIVプロテアーゼによる切断を阻害することにある。プロテアーゼ阻害薬はきわめて基質特異性の高い薬剤であり、宿主のタンパクに対するプロテアーゼ活性を持たないとされているが、過去の報告ではインスリン抵抗性への関与に関し、複数の作用点が存在する可能性が示されている。今回検討した機序のみでプロテアーゼ阻害薬によるインスリン抵抗性の亢進が説明できるかは明らかでないが、lopinavir、darunavirという2種類のプロテアーゼ阻害薬間で差が認められたことは、きわめて興味深いものとする。すなわち、臨床的研究から、lopinavirはdarunavirよりもインスリン抵抗性の誘導能は一般に強いと指摘されているが、今回我々が示した結果はこれに合致している。従って、IRSのリン酸化の制御が、分子作用点としては主要

な作用点となっている可能性は十分に考えられる。今後さらに代謝障害誘導性が強いとされるritonavirでも同様の事実が確認できるかどうか検証をすすめる予定である。

またシグナル伝達系の上流部分での関与から、作用点が限定され、作用分子の制御もしくは下流シグナルの制御により、インスリン抵抗性の亢進を制御できる可能性が示唆された。作用分子の候補として考えられたSOCS1、SOCS3に関して、今回の検討ではインスリン刺激の前後での発現量(の変化)およびIRS1との会合の二つの点においては、プロテアーゼ阻害薬の影響は確認できなかった。ただし、SOCS分子とIRS1との会合に関しては、免疫沈降での検出不能という結果に基づいての分析であり、感度の問題を考慮する必要がある、別のアッセイ系での検証をすすめる必要がある。その上でSOCSが抑制分子として関与していることが示された場合には、siRNAなどで発現抑制することで、プロテアーゼ阻害薬によるインスリンシグナル伝達抑制が回避されるかを解析する予定である。

#### E. 結論

脂肪細胞のインスリンシグナル伝達系の抑制にプロテアーゼ阻害薬の関与が証明された。またインスリンシグナル伝達系の抑制の程度は、プロテアーゼ阻害薬間で差があることが示されたが、その抑制の程度は臨床的研究から得られた事実と合致していた。

WB: SOCS1



WB: SOCS3



Potease inhibitor	control		Darunavir(30 $\mu$ M)		Lopinavir(30 $\mu$ M)	
Insulin (100nM)	-	+	-	+	-	+

図3 プロテアーゼ阻害薬によるインスリン刺激後のSOCSの発現

## F. 健康危険情報

総括研究報告書参照

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Yoshino, Y., Kitazawa, T., Tatsuno, K., Ota, Y., and Koike, K. Cryptococcal Pleuritis Containing a High Level of Adenosine Deaminase in a Patient with AIDS: A Case Report. *Respiration*. 79:153-156, 2010.
2. Polymerase chain reaction assay for specific identification of *Candida guilliermondii* (*Pichia guilliermondii*). Yamamura M, Makimura K, Fujisaki R, Satoh K, Kawakami S, Nishiya H, Ota Y. *J Infect Chemother*. 2009 Aug;15(4):214-8.
3. Yanagimoto S, Tatsuno K, Okugawa S, Kitazawa T, Tsukada K, Koike K, Kodama T, Kimura S, Shibasaki Y, Ota Y. An essential single amino acid of Toll-like receptor 4 that is pivotal for its signal transduction and subcellular localization. *J. Biol Chem*, 2009, 284; 3513-20.
4. Evaluation of a new rapid molecular diagnostic system for *Plasmodium falciparum* combined with DNA filter paper, loop-mediated isothermal amplification, and melting curve analysis. Yamamura M, Makimura K, Ota Y. *Jpn J Infect Dis*. 2009 Jan;62(1):20-5.

### 2. 学会発表

1. Kitazawa, T., Kamimura, M., Yoshino, Y., Tatsuno, K., and Koike, K. Changes in platelet sizes in fungal and bacterial bloodstream infection. The 14th International Congress on Infectious Diseases. March 9-12, 2010, Miami.
2. Kamimura, M., Kitazawa, T., Yoshino, Y., Tatsuno, K., and Koike, K. *Bacillus cereus* as a pathogen and retention of medical devices are risk factors for *Bacillus* bacteremia. The 14th International Congress on Infectious Diseases. March 9-12, 2010, Miami.
3. Kitazawa, T., Takayama, K., Suzuki R., Suzuki H., Moriya K., and Koike, K. Decrease in patients acquiring metallo-beta-lactamase-producing bacteria after introducing mandatory report system of carbapenem use. The 8th East Asian Conference on Infection Control and Prevention. November 12-13, 2009, Tokyo.
4. Kitazawa, T., Yoshino, Y., Tatsuno, K., Ota, Y., and Koike, K. Changes in platelet sizes as indicators for clinical outcome of bacteremia. 19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, May 16-19, 2009, Helsinki.

## 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



## 融合阻害剤・インテグラーゼ阻害剤の *in vitro* 研究

分担研究者

児玉 栄一 東北大学病院内科感染症科 助教

### 研究要旨

融合阻害剤T-20に対する耐性HIVに見られる耐性2次変異S138AがN末およびC末側のheptad repeat間の結合を増強することから、その変異をT-20に導入すればT-20耐性HIVを抑制しうる新規融合阻害剤になりうると仮定した。作製したT-20<sub>S138A</sub>はこれまで報告のあるT-20耐性HIVの複製を抑制することを明らかとした。さらにT-20耐性HIVを用いてT-20<sub>S138A</sub>に対する耐性を誘導したところ、新規変異が導入された。また、現在米国で臨床治験中のインテグラーゼ阻害剤と認可されたraltegravirの耐性profileが似ていることを明らかとした。

### A. 研究目的

逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤に代表される抗レトロウイルス剤を多剤併用することにより、HIV感染症は大多数の患者においてコントロール可能な疾患となったものの、依然HIVの完全な駆逐は実現されておらず、長期にわたる治療が必要である。治療による副作用とともに、わずかながらのウイルス複製からもたらされる耐性ウイルスの出現は治療成績を大きく減弱させる。さらにHIVは個々の薬剤に対してだけでなく、他剤に対し同時に耐性化することもあり、治療を困難とさせる。

このためこれまでの薬剤の開発にとどまらず、新しい標的に対する薬剤の開発が進められている。事実、既存の薬剤とは違うカテゴリーの薬剤、CCR5アンタゴニスト、融合阻害剤、インテグラーゼ阻害剤などが開発されてきている。本研究では個人輸入等により本邦においてもHIV感染患者に使用される融合阻害剤enfuvirtide (T-20)と最近認可され使用されているインテグラーゼ阻害剤、raltegravirに対する耐性について解明していく。最近、これら新規薬剤の併用により従来の治療薬に抵抗性となった患者において検出限界以下までウイルス量を低下させることが可能であったと報告されてはいるが、HIVはなお耐性を獲得する。具体的には耐性変異の同定、その変異のウイルス学的意義、臨床分離株における耐性の検出法に結びつく基礎的研究を行う。また、この研究を通して耐性機序を明らかとしてそれを克服しうる薬剤の開発にも役立たせたい。

この研究の期待される成果として本邦における新規薬剤、今後導入される薬剤に留まらず、欧米で認可され国内認可を待つ薬剤に関しても実際には個人輸入等で治療が開始されている場合があるため、それらに対しても耐性検査法等の対応が可能である。一方基礎研究的な意義として耐性ウイルスの性状を検討することができ、そのことは今後の薬剤開発に対して有用な情報を提供すると考えられる。

研究分担者は昨年度までに本研究を遂行するために必要な耐性ウイルス分子クローンの作製を行っており、本年度はその応用と米国で臨床治験中のインテグラーゼ阻害剤について報告する。

### B. 研究方法

- 1) 細胞とウイルス：MT-2はRPMI1640培地を用いて培養した。293T細胞、HeLa-CD4/β-galactosidase (MAGI)細胞はDMEM培地を使用した。ウイルスはプラスミドクローンであるpNL4-3とその組替え体を293T細胞に遺伝子導入して作製した。
- 2) 坑ウイルス剤：ペプチド製剤はFmoc法によって化学合成した。コントロールに用いたzalcitabineはSigma社 (St. Louis, MO) から購入した。
- 3) 耐性変異の導入とプラスミドの作製：Site directed mutagenesisはStratagene社のキットを用いた。プラスミドの作製では一般的な手技、試薬を使用した。
- 4) 薬剤感受性試験：薬剤感受性はMAGI細胞を用いたsingle round replicationに対する抗ウイルス活

性として測定した。

- 5) ウイルス複製能：目的の変異を有するウイルスの定量的な複製能は培養上清中に放出されるp24抗原量で検討した。定性的な複製能はcompetitive HIV replication assay (CHRA)を用いて検討した。

(倫理面への配慮)

今年度の研究は、臨床サンプルを解析するためのシステム構築を主とする基礎研究であり、臨床分離株など患者由来の情報は氏名、年齢、性別も含めて一切を研究に利用していないため特に配慮は要らないと考えられた。また、ヒトゲノム・遺伝子解析やヒト幹細胞を用いた実験は行っていない。

C. 研究結果

1) T-20耐性変異を利用した融合阻害剤の開発

これまで欧米で報告されている主な耐性変異をpNL4-3に導入したT-20耐性変異HIVライブラリーを作製し、その性状を検討してきたところ、gp41

C-HR領域に導入される2次変異は、1次変異が導入されたN-HR領域に対して結合能を上昇させることを見出した。このことから、C-HR由来のT-20にこの2次変異を導入することでT-20耐性ウイルスのH-HRとも結合できる、つまりT-20耐性ウイルスの複製を抑制するT-20誘導体をデザインするのではないかと考え、変異導入T-20 (T-20<sub>S138A</sub>)を合成した(図1)。このT-20<sub>S138A</sub>はT-20耐性変異、例えばV38AやN43D、を有するウイルス複製を野生型HIVと同様に阻害した。S138Aをアラニンではなく他のアミノ酸18種類についても検討したが、高い活性を維持できたものはS138AとS138Mだけであった。

このT-20<sub>S138A</sub>がどのようにして耐性HIVにも効果を示しているかをcircular dichroism (CD)法で解析したところ、変異したN-HRに対する結合性の増加であることが判明した。このCDの結果と抗HIV効果はよく相関した(図2)。

同様にC34耐性ウイルスで見られたN126K変異をC34に導入(C34<sub>N126K</sub>)してその効果を調べたところC34に対して約70倍耐性になるC34耐性HIV-

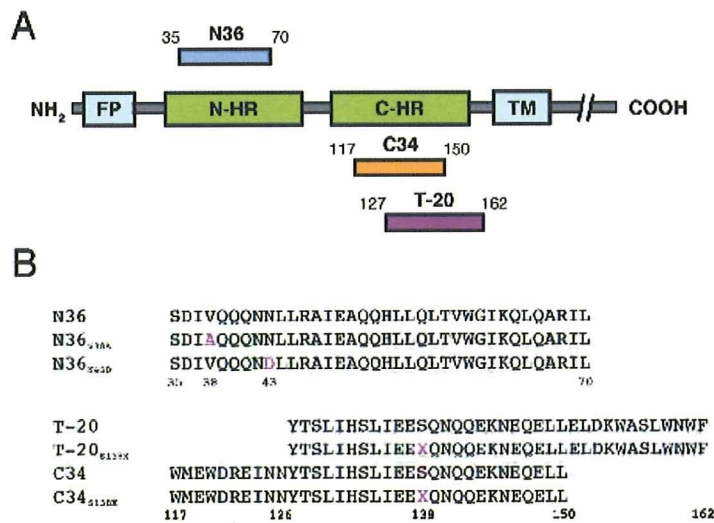


図1 HIV gp41 とペプチド配列

(A) Structure of HIV-1 gp41 and locations of N-HR or C-HR peptides (FP, fusion peptide; TM, transmembrane domain). (B) Amino acid sequences of peptides used in this study. Only amino acid located at S138 was substituted with all physiological amino acids(X), since N126 lies outside of the amino acid sequence of T-20.

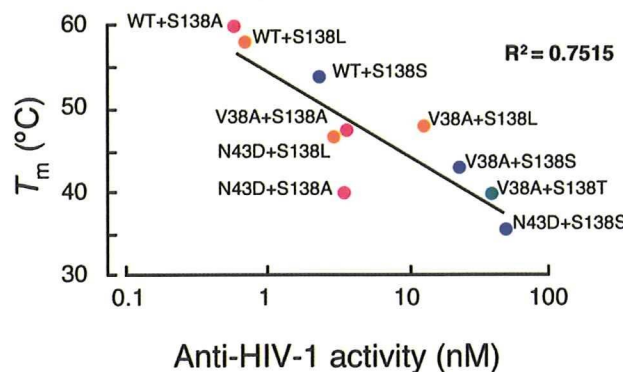


図2 結合性と抗HIV活性の相関

Correlation of  $T_m$  values of complexes formed from N36 and C34 peptides and anti-HIV-1 activities of T-20<sub>S138X</sub>



$I_{\Delta V4/I37K/N126K/L204I}$ の複製を完全にブロックできることを見出した(0.7倍の耐性度)。この耐性ウイルスに対する効果増強もCD解析結果とよく相関していた。これらのことからT-20<sub>S138A</sub>とC34<sub>N126K</sub>における抗HIV効果の増強はこれら変異を有するペプチドのN-HRへの結合力の増加であると考えられた。

## 2) T-20<sub>S138A</sub>に対する耐性

T-20<sub>S138A</sub>は野生型およびT-20耐性HIVにも効果を示すが、HIVはさらに変異を導入し耐性化を図ると考えられ、HIV-1<sub>WT</sub>とHIV-1<sub>N43D/S138A</sub>を使用して、耐性誘導をdose escalating法で行った。どちらの誘導であっても約1年程度の培養によって耐性HIVを誘導することが可能であった(図3)。HIV-1<sub>WT</sub>を用いた場合、はじめにN-HRにI37N変異が導入され、耐性度がやや上昇したが、約5倍程度で推移した。最終的にL44MとC-HRのN126Kが導入され、100倍程度の高度耐性を獲得した。

一方でHIV-1<sub>N43D/S138A</sub>を用いた場合、はじめにC-HR領域にE137Kが導入され、耐性度が約10倍程度上昇した。その後、L33S、I69L、が追加され、200倍程度の耐性を獲得した。

これらの耐性変異のうち、I37NとI69Lはこれまで報告のない新規耐性変異であった。

## 3) 複製能

上記の実験はペプチドに変異を導入させ検討したが、感染性HIVに上記変異を導入した場合どのような変化が起こるかを検討した。S138は塩基配列TCAによってコードされているが、ここから変異しやすい1塩基置換の場合、起こりうるアミノ酸置換、A、L、P、T、Wに関してその感染性を検討した。S138Pを有するHIVはほとんど複製することがなかったが、他のウイルスでは、WT > S138A > S138T > S138L > S138Wの順番で感染性が優れていた。T-20に対する耐性度と合わせてS138Aを獲得することがウイルスにとってもっとも合理的な変化であることが示された(図4)。

## 4) インテグラーゼ阻害剤elvitegravirの耐性変異

研究分担者が基礎開発に携わった新規インテグラーゼ阻害剤elvitegravirは現在米国でGilead Science社がHAART薬の1つとして臨床治験第III相に進んで

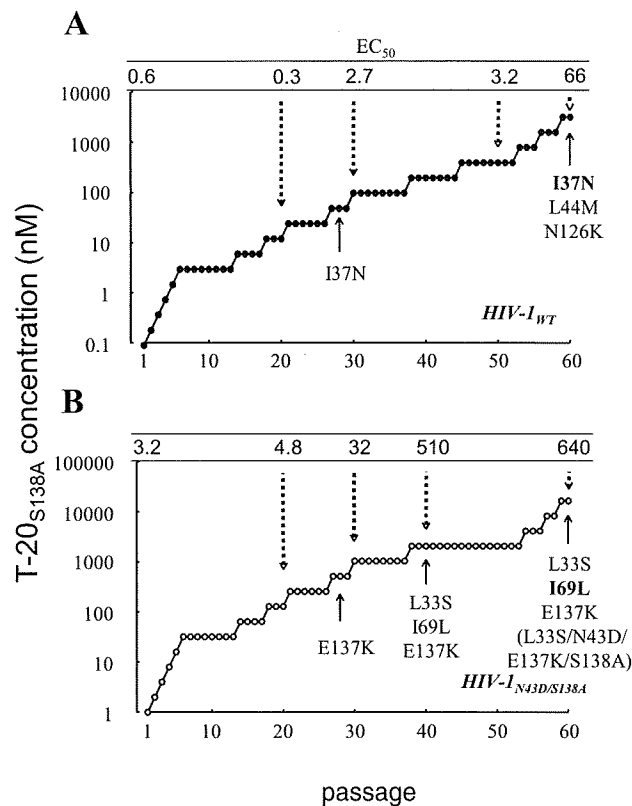


図3 T-20S138Aに対する耐性誘導

Induction of T-20<sub>S138A</sub>-resistant HIV-1 by dose-escalating selection in MT-2 cells. Induction of resistant HIV-1 was carried out for total 60 passages from 0.1 nM and 1 nM of T-20S138A concentration to HIV-1<sub>WT</sub> (A) and HIV-1<sub>N43D/S138A</sub> (B), respectively. At the indicated passages, proviral DNAs were sequenced, and the EC<sub>50</sub>s of the HIV-1 variants were determined with the MAGI assay. To improve the replication kinetics, substitution of D36G was introduced into the NL4-3 background used in this study (wild type virus).

いる。また1日1回の合剤として、テノフォビル、エムトリシタビンの合剤であるツルバタに加える形で3剤合剤形状での臨床治験も第II相に進めている。我々が*in vitro*で誘導したelvitegravir関連耐性変異とこれまでに報告されている*in vivo*変異をraltegravir耐性変異の出現状況と比較した。これらの薬剤の共通耐性変異はインテグラーゼのflexible loopと呼ばれる領域148番目と155番目の変異が同様に検出されることから、その耐性機序が同一であることが予想された。

#### D. 考察

昨年はT-20耐性ウイルスを解析し、その耐性獲得にはHIV RNA構造が重要な働きを果たしていることを明らかとしてきたが、本年度はその耐性変異を融合阻害剤のデザインに応用した。T-20耐性変異として*in vitro*、*in vivo*で耐性関連変異として誘導されるN126KとS138Aは耐性責任変異としてN-HRに導入される変異の影響でウイルスC-HRとの結合性が低下することを防ぐ。そのためこの機序を利用してペプチドを開発すれば基本的には耐性ウイルスを克

服できることに繋がると考えられる。現在この仮説を証明すべく、T-20<sub>S138A</sub>で見られた変異を有するT-20ペプチドを作成してその効果を検討中である。この方法では36アミノ酸のうち1-2個程度のアミノ酸置換で済み、*in vivo*等で存在しうる配列であることから、ペプチドの安定性等はT-20とほぼ同等であることが予想される。これまでの逆転写酵素やプロテアーゼ阻害剤ではタンパク立体構造上から化合物構造・結合性を推定、分子設計を施し、その後ウイルスで検討して薬物分子構造を最適化していかなければならないが、この融合阻害ペプチドの場合、耐性変異の意義を検討すること自体が分子設計につながり、新たな耐性克服型ペプチドの創製が比較的容易であると考えられる。この研究に関しては昨年度のT-20耐性の耐性変異部位を持つクローンのライブラリーを構築したことによって比較的短期間に結果をだすことが可能となった。

一方で、インテグラーゼ阻害剤は日本で開発されたelvitegravirが臨床治験phase IIIまで進行しているが、先行したMerck社のraltegravirと耐性機序がほとんど同一であることは今後さらなる阻害剤の開発が

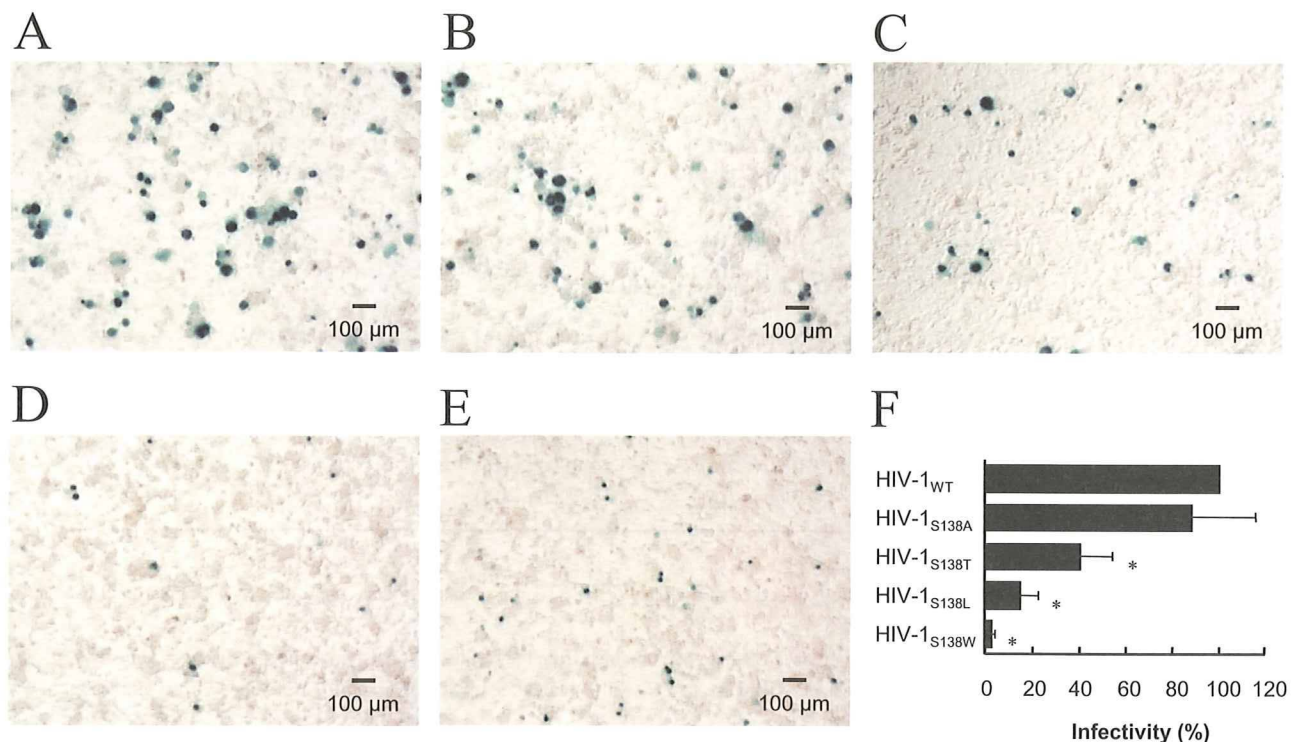


図4 S138に1塩基変異を有するウイルスの感染性

Microscopic images of the MAGI cells infected with S138 substituted HIV-1s (A to E), are shown. MAGI cells in a 12 well plate were infected with (A) HIV-1<sub>WT</sub>, (B) HIV-1<sub>S138A</sub>, (C) HIV-1<sub>S138T</sub>, (D) HIV-1<sub>S138L</sub> and (E) HIV-1<sub>S138W</sub> at 200 BFU. After 72 h cultivation, the cells were fixed and stained with X-Gal as described in the Experimental procedure section. (F) Percentage of p24 antigen normalized infectivity of S138 substituted HIV-1s compared with that of HIV-1<sub>WT</sub> are shown. HIV-1 clones were obtained from freshly transfected 293T cells and determined amount of p24 antigen by a commercially available ELISA kit and infectivity by the MAGI assay. Infectivity (%) was normalized by amount of p24 antigen. Data represent means  $\pm$  error bars obtained from 4 independent experiments. Asterisk indicates significant decrease in the infectivity by Bonferroni multiple comparison test ( $p < 0.05$ ).



必要であることを示唆する。しかし、現時点では raltegravir が1日2回投与であり、elvitegravir が1回投与で行われていることから、今後、認可されることにより、比較的多くの患者にとって有用な薬剤となることが予想される。

## E. 結論

今年度は融合阻害剤 T-20 に対する耐性ウイルスライブラリーを利用し、新たなペプチドデザインを構築した。耐性関連変異を利用し作製された T-20<sub>S138A</sub> は T-20 耐性 HIV にも十分な効果を発揮した。インテグラーゼ阻害剤に関しては現在臨床使用されている raltegravir と米国で治験中の elvitegravir で耐性が交差することを明らかとした。

表1 S138置換T-20由来ペプチドの抗HIV効果

	EC <sub>50</sub> (nM)			
	HIV-1 <sub>WT</sub> *	HIV-1 <sub>V38A</sub>	HIV-1 <sub>N43D</sub>	HIV-1 <sub>N43D/S138A</sub>
T-20	2.4 ± 0.6	23 ± 8.2 (9.6)	49 ± 10 ( <b>20</b> )	84 ± 16 ( <b>35</b> )
<i>small</i>				
T-20 <sub>S138G</sub>	1.3 ± 0.5 (0.5)	65 ± 8.8 ( <b>27</b> )	141 ± 26 ( <b>59</b> )	185 ± 68 ( <b>77</b> )
T-20 <sub>S138A</sub>	0.6 ± 0.1 (0.3)	3.6 ± 1.7 (1.5)	3.5 ± 0.9 (1.5)	3.2 ± 1.0 (1.3)
<i>hydrophobic</i>				
T-20 <sub>S138V</sub>	0.4 ± 0.2 (0.2)	31 ± 14 ( <b>13</b> )	22 ± 3.5 (9.2)	23 ± 5.7 (9.6)
T-20 <sub>S138L</sub>	0.7 ± 0.1 (0.3)	13 ± 6 (5.4)	2.9 ± 0.7 (1.2)	2.2 ± 0.4 (0.9)
T-20 <sub>S138I</sub>	0.5 ± 0.1 (0.2)	4.9 ± 2 (2)	2.9 ± 0.8 (1.2)	2.4 ± 0.6 (1)
T-20 <sub>S138M</sub>	0.7 ± 0.2 (0.3)	4.4 ± 0.1 (1.8)	1.7 ± 0.5 (0.7)	1.2 ± 0.4 (0.5)
T-20 <sub>S138P</sub>	446 ± 167 ( <b>186</b> )	> 1000 (> <b>416</b> )	> 1000 (> <b>416</b> )	> 1000 (> <b>416</b> )
<i>nucleophilic</i>				
T-20 <sub>S138T</sub>	0.9 ± 0.2 (0.4)	39 ± 8.5 ( <b>16</b> )	161 ± 35 ( <b>67</b> )	124 ± 43 ( <b>52</b> )
<i>aromatic</i>				
T-20 <sub>S138F</sub>	9.4 ± 2.6 (4)	203 ± 89 ( <b>85</b> )	393 ± 119 ( <b>164</b> )	478 ± 116 ( <b>200</b> )
T-20 <sub>S138Y</sub>	25 ± 9 ( <b>10</b> )	516 ± 223 ( <b>215</b> )	> 1000 (> <b>416</b> )	> 1000 (> <b>416</b> )
T-20 <sub>S138W</sub>	29 ± 14 ( <b>12</b> )	> 1000 (> <b>416</b> )	> 1000 (> <b>416</b> )	> 1000 (> <b>416</b> )
<i>amide</i>				
T-20 <sub>S138N</sub>	19 ± 4 (8)	> 1000 (> <b>416</b> )	> 1000 (> <b>416</b> )	> 1000 (> <b>416</b> )
T-20 <sub>S138Q</sub>	34 ± 11 ( <b>14</b> )	> 1000 (> <b>416</b> )	> 1000 (> <b>416</b> )	> 1000 (> <b>416</b> )
<i>acidic</i>				
T-20 <sub>S138D</sub>	210 ± 94 ( <b>88</b> )	> 1000 (> <b>416</b> )	> 1000 (> <b>416</b> )	> 1000 (> <b>416</b> )
T-20 <sub>S138E</sub>	283 ± 80 ( <b>118</b> )	> 1000 (> <b>416</b> )	> 1000 (> <b>416</b> )	> 1000 (> <b>416</b> )
<i>basic</i>				
T-20 <sub>S138H</sub>	210 ± 85 ( <b>88</b> )	> 1000 (> <b>416</b> )	> 1000 (> <b>416</b> )	> 1000 (> <b>416</b> )
T-20 <sub>S138K</sub>	708 ± 145 ( <b>295</b> )	> 1000 (> <b>416</b> )	> 1000 (> <b>416</b> )	> 1000 (> <b>416</b> )
T-20 <sub>S138R</sub>	362 ± 114 ( <b>150</b> )	> 1000 (> <b>416</b> )	> 1000 (> <b>416</b> )	> 1000 (> <b>416</b> )

Anti-HIV activity was determined with the MAGI assay.

\*To improve the replication kinetics, D36G mutation, observed in majority of HIV-1 strains, was introduced into the NL4-3 background used in this study (reference virus).

The data shown are mean values and standard deviations (SD) that were obtained from the results of at least three independent experiments.

Shown in parentheses are the fold increase in resistance (increase in EC<sub>50</sub> value) calculated by comparison to a reference virus. Increases of over 10-fold are indicated in bold.

## F. 研究発表

## 1. 論文発表

- 1) Hiroki Nishikawa, Shota Nakamura, Eiichi Kodama, Saori Ito, Keiko Kajiwara, Kazuki Izumi, Yasuko Sakagami, Shinya Oishi, Tadayasu Ohkubo, Yuji Kobayashi, Akira Otaka, Nobutaka Fujii, Masao Matsuoka. Electrostatically constrained  $\alpha$ -helical peptide inhibits replication of HIV-1 resistant to enfuvirtide. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 41: 891-899, 2009
- 2) Kazuki Izumi, Eiichi Kodama, Kazuya Shimura, Yasuko Sakagami, Kentaro Watanabe, Saori Ito, Tsuyoshi Watabe, Yukihiro Terakawa, Hiroki Nishikawa, Stefan G. Sarafianos, Kazuo Kitaura, Shinya Oishi, Nobutaka Fujii, Masao Matsuoka. Design of peptide-based inhibitors for HIV-1 strains resistant to T-20. *Journal of Biological Chemistry* 284: 4914-4920, 2009
- 3) Takeshi Naito, Kazuki Izumi, Eiichi Kodama, Yasuko Sakagami, Keiko Kajiwara, Hiroki Nishikawa, Kentaro Watanabe, Stefan G. Sarafianos, Shinya Oishi, Nobutaka Fujii, Masao Matsuoka. SC29EK, a peptide fusion inhibitor with enhanced  $\alpha$ -helicity, inhibits replication of human immunodeficiency virus type 1 mutants resistant to enfuvirtide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53:1013-1018, 2009
- 4) Mariko Ueno, Eiichi N. Kodama, Kazuya Shimura, Yasuteru Sakurai, Keiko Kajiwara, Yasuko Sakagami, Shinya Oishi, Nobutaka Fujii, Masao Matsuoka. Synonymous mutations in stem-loop III of Rev responsive elements enhance HIV-1 replication impaired by primary mutations for resistance to enfuvirtide. *Antiviral Research* 82:67-72, 2009
- 5) Atsuko Hachiya, Kazuki Shimane, Stefan G. Sarafianos, Eiichi N. Kodama, Yasuko Sakagami, Fujie Negishi, Hirokazu Koizumi, Hiroyuki Gatanaga, Masao Matsuoka, Masafumi Takiguchi, Shinichi Oka. Clinical relevance of substitutions in the connection subdomain and RNase H domains of HIV-1 reverse transcriptase from a cohort of anti-retroviral treatment-naïve patients. *Antiviral Research* 82:115-121, 2009
- 6) Shinya Oishi, Hirotaka Kamitani, Yasuyo Koder, Kentaro Watanabe, Kazuya Kobayashi, Tetsuo Narumi, Kenji Tomita, Hiroaki Ohno, Takeshi Naito, Eiichi Kodama, Masao Matsuoka and Nobutaka Fujii. Peptide bond mimicry by (*E*)-alkene and (*Z*)-fluoroalkene peptide isosteres: synthesis and bioevaluation of alpha-helical anti-HIV peptide analogues. *Organic & Biomolecular Chemistry* 7:2872-2877, 2009
- 7) Shinya Oishi, Yasuyo Koder, Hiroki Nishikawa, Kamitani H, Tsuyoshi Watabe, Hiroaki Ohno, Tadafumi Tochikura, Kazuki Shimane, Eiichi Kodama, Masao Matsuoka, Fuminori Mizukoshi, Hajime Tsujimoto H, Nobutaka Fujii. Design and synthesis of membrane fusion inhibitors against the feline immunodeficiency virus. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17:4916-4920, 2009
- 8) Tsuyoshi Watabe, Yukihiro Terakawa, Kentaro Watanabe, Hiroaki Ohno, Hiroaki Nakano, Toru Nakatsu, Hiroaki Kato, Kazuki Izumi, Eiichi Kodama, Masao Matsuoka, Kazuo Kitaura, Shinya Oishi, Nobutaka Fujii. X-ray Crystallographic Study of an HIV-1 Fusion Inhibitor with the gp41 S138A Substitution. *Journal of Molecular Biology* 392:657-665, 2009
- 9) Michinori Tanaka, Kazumi Kajiwara, Rei Tokiwa, Kentaro Watanabe, Hiroaki Ohno, Hiroko Tsutsumi, Yoji Hata, Kazuki Izumi, Eiichi Kodama, Masao Matsuoka, Shinya Oishi, Nobutaka Fujii. Bioorganic Synthesis of End-capped Anti-HIV Peptides by Simultaneous Cyanocysteine-mediated Cleavages of Recombinant Proteins. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17:7487-7492, 2009
- 10) Kazumi Kajiwara, Kentaro Watanabe, Rei Tokiwa, Tomoko Kurose, Hiroaki Ohno, Hiroko Tsutsumi, Yoji Hata, Kazuki Izumi, Eiichi Kodama, Masao Matsuoka, Shinya Oishi, and Nobutaka Fujii. Bioorganic Synthesis of a Recombinant HIV-1 Fusion Inhibitor, SC35EK, with an N-Terminal Pyroglutamate Capping Group. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17:7964-7970, 2009
- 11) Eleftherios Michailidis, Bruno Marchand, Eiichi N. Kodama, Kamendra Singh, Masao Matsuoka, Karen A. Kirby, Emily M. Ryan, Ali M. Sawani, Eva Nagy, Noriyuki Ashida, Hiroaki Mitsuya, Michael A. Parniak, and Stefan G. Sarafianos. Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by 4'-ethynyl-2'-fluoro-2'-doxyadenosine triphosphate, a translocation defective reverse transcriptase inhibitor. *Journal of Biological Chemistry* 284:35681-35691, 2009
- 12) Tetsuo Narumi, Ryoko Hayashi, Kenji Tomita, Kazuya Kobayashi, Noriko Tanahara, Hiroaki Ohno, Takeshi Naito, Eiichi Kodama, Masao Matsuoka, Shinya Oishi, and Nobutaka Fujii. Synthesis and Biological Evaluation of Selective CXCR4 Antagonists Containing Alkene Dipeptide Isosteres. *Organic & Biomolecular Chemistry* 8:616-621, 2010
- 13) Kenji Watanabe, Shigeru Negi, Yukio Sugiura, Akiko Kiriya, Akino Honbo, Katsumi Iga, Eiichi N. Kodama, Takeshi Naitoh, Masao Matsuoka, and Koji Kano. Binding of Multivalent Anionic Porphyrins to V3 Loop Fragments of HIV-1 gp120 and Their Antiviral Activity. *Chemistry-An Asian Journal* in press.



## 2. 学会発表

- 1) Hiroaki Mitsuya, Stefan G. Sarafianos, Eiichi Kodama, Hiroto Nakata, Seiji Okada, and Michael A. Parniak. 4'-Ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine (EFDA), a translocation defective reverse transcriptase inhibitor with highly potent activity against diverse multi-drug-resistant HIV-1 variants. 10th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance, Richmond, VA, Nov15-18, 2009.
- 2) Matthew Schuckmann, Atsuko Hachiya, Ei-ichi N. Kodama, Bruno Marchand, Eleftherios Michailidis, Kamendra Singh, Yasuko Sakagami, Shinichi Oka, and Stefan G. Sarafianos. Biochemical characterization of the HIV reverse transcriptase connection domain multi-class drug resistance mutation N348I. 10th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance, Richmond, VA, Nov15-18, 2009.
- 3) Yee Tsuey Ong, Eleftherios Michailidis, Bruno Marchand, Matthew S. Schuckmann, Kamendra Singh, Ei-Ichi Kodama, Masao Matsuoka, Hiroaki Mitsuya, Eva Nagy, Michael A. Parniak, and Stefan G. Sarafianos. The NNRTI-resistant Y181C HIV-1 reverse transcriptase is hyper-susceptible to 4'-ethynyl-2-fluoro deoxyadenosine (EFDA). 10th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance, Richmond, VA, Nov15-18, 2009.
- 4) Atsuko Hachiya, Eiichi N. Kodama, Matthew M. Schuckmann, Karen A. Kirby, Eleftherios Michailidis, Yasuko Sakagami, Kamendra Singh, Shinichi Oka, and Stefan G. Sarafianos. K70Q expands multi-drug resistance (MDR) of HIV-1 containing "Q151M complex" reverse transcriptase mutations. 10th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance, Richmond, VA, Nov15-18, 2009.

## G. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

1. PCT/JP2008/0066175 エプスタイン・バーウイルス関連疾患に対する薬剤及びにそのスクリーニング法(Medicinal agent for disease associated with Epstein-Barr virus, and method for screening of the medicinal agent)  
移行国：日本、米国、欧州（全指定）、中国、カナダ

## 侵入阻害薬に対する耐性メカニズムの解析

研究分担者

吉村 和久 熊本大学エイズ学研究センター病態制御分野 講師

### 研究要旨

前年度、我々は、新たに樹立したnon-Bサブタイプの臨床分離株（KMC1、CRF08\_BC）を用いて、MVCに対する*in vitro*耐性誘導を行い、耐性機序の検討を行った。誘導した耐性ウイルスのシークエンスの結果、gp120のC4（P417Q）とV4（I443L）に変異がみられ、V3には変異はみられなかった。C4とV4だけで耐性化する報告はMVCに関しては、初めてでかつ、サブタイプBCを用いた*in vitro* selectionの報告も初めてであった。今年度は、*in vitro*耐性誘導を、アフリカを中心として世界の半数近くに感染が流行しているサブタイプC株（mYHI）を用いて試みた。しかも、今回はPM1/CCR5細胞での*in vitro*耐性誘導と、親株であるCCR5低発現のPM1細胞での持続感染ウイルスとのシークエンスの違いを比較した。その結果、MVCに対する耐性の獲得は、i) 低CCR5発現状態への馴化と、ii) MVC結合CCR5への対応という2段階のステップで行われることがわかった。これまで、低CCR5発現細胞への馴化とCCR5阻害剤への耐性獲得がはっきり区別されてこなかったが、今回の我々の報告は、明らかにその2つは区別できることを示した。

### A. 研究目的

昨年度同様、この研究班の一つの柱である「抗HIV薬適正使用と効果」を知る上において、新薬の耐性変異についての研究は必要不可欠であると考えられる。そこで、昨年度使用したnon-Bサブタイプの一つであるCRF08\_BC株に続いて、今年度は、*in vitro*耐性誘導を、アフリカを中心として世界の半数近くに感染が流行しているSubtype C株（mYHI）を用いて試みた。しかも今回は、CCR5耐性獲得のメカニズムに踏み込むため、細胞表面のCCR5発現量の違いが、ウイルスのMVCの感受性に影響を及ぼすかどうかとも同時に調べた。

### B. 研究方法（倫理面の配慮）

昨年度同様、簡便かつ正確にR5ウイルスの耐性ウイルス誘導を行うため、CCR5高発現T細胞株であるPM1/CCR5細胞を用い*in vitro* R5ウイルスのMVCに対する耐性誘導を試みた。この細胞株は、R5ウイルスでもX4ウイルスと同様に感染が成立すると合体を形成するため、顕微鏡下に感染の広がりが確認できる。この細胞を用いて、我々が感染症

例から分離したR5臨床分離株（non-B subtypeの一つサブタイプC株）を用いて、*in vitro*耐性ウイルス誘導を行った。今回は、同時にPM1/CCR5細胞の親細胞株であるPM1細胞（CCR5発現量がPM1/CCR5細胞に比較して非常に低い、図1）にも、同じウイルスを持続感染させて、同じ回数継代した。得られた継代ウイルスを用いて、MVCに対する耐性度をPM1/CCR5細胞を用いたWST-8 assay（細胞傷害阻止試験）により判定する。R5ウイルスを用いたWST-8 assayはこれまであまり行われていないが、R5ウイルスの実験室株や臨床分離株においても、WST-8 assayでの測定が可能であることは、昨年度の実験で既に確認済みであり、従来に比べて簡易にウイルスの薬剤に対する耐性度を判定できるため、非常に有用である。WST-8 assayにより逃避ウイルスの誘導が確認できたところで、これらのウイルスのenvelopeのシークエンスを行う。シークエンスにより、逃避能付与責任変異部位の特定を行う。また、PM1細胞に持続感染させたウイルスの低CCR5発現細胞への馴化との比較も同時に行う。



(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

近年本研究室で分離されたR5臨床分離株mYHIは、gp120のシークエンスの結果サブタイプC株であることが判明した(図-2)。このウイルスは、HIV-1の中で最も多くの感染者が存在するタイプで、

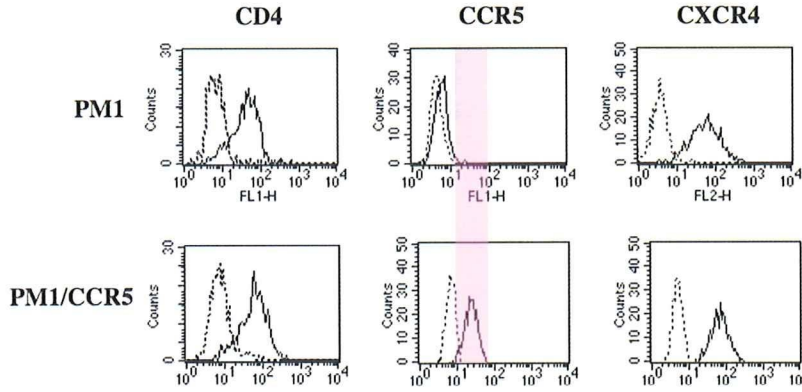


図-1. PM1細胞とPM1/CCR5細胞のCCR5分子の細胞表面発現量の違いをFACS解析により比較。

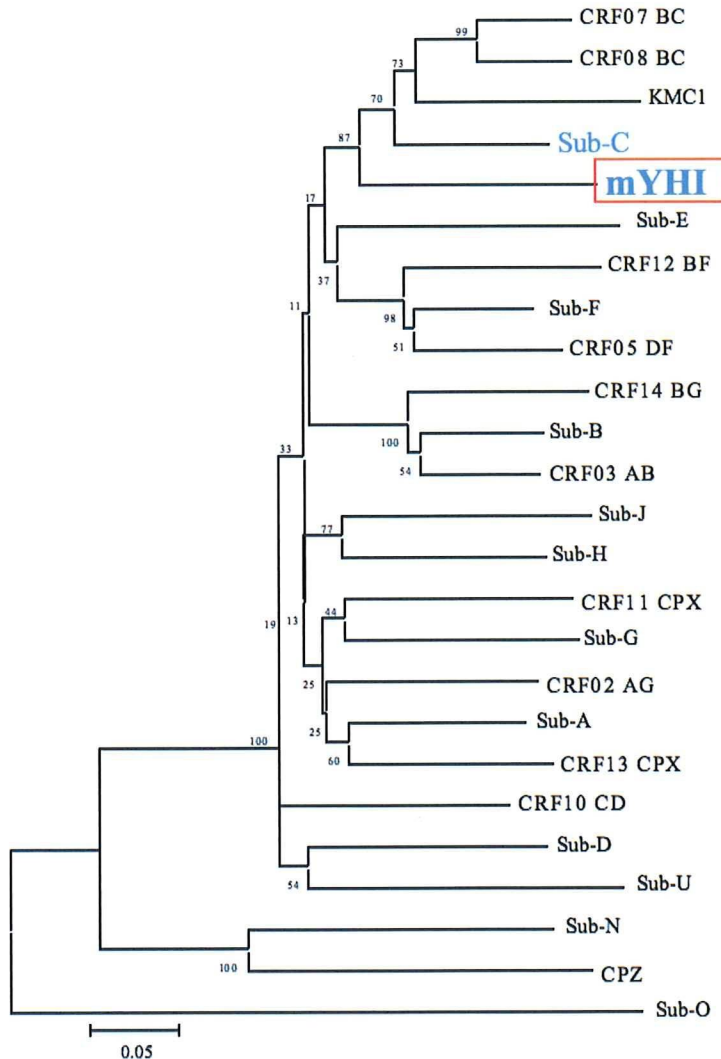


図-2. Env gp120のシークエンスの系統樹解析によるmYHIのサブタイプ判定。

全感染者の五割弱がこのタイプに感染していると考えられている。特にアフリカからインドへかけて感染者が非常に多く、ワクチンのターゲットとして最も求められているものである。そこで、今回分離し、PM1/CCR5細胞での十分な増殖が確認できた、この

mYHI ウイルスを用いて、MVC耐性誘導を *in vitro* で行った。MVCの濃度を1 nMから開始し、徐々に上げて行き最終的には10 $\mu$ Mまで到達した(63パッセージ)(図-3)。各パッセージの上清を用いて、MVCに対する感受性試験を行ったところ、9パッセージ

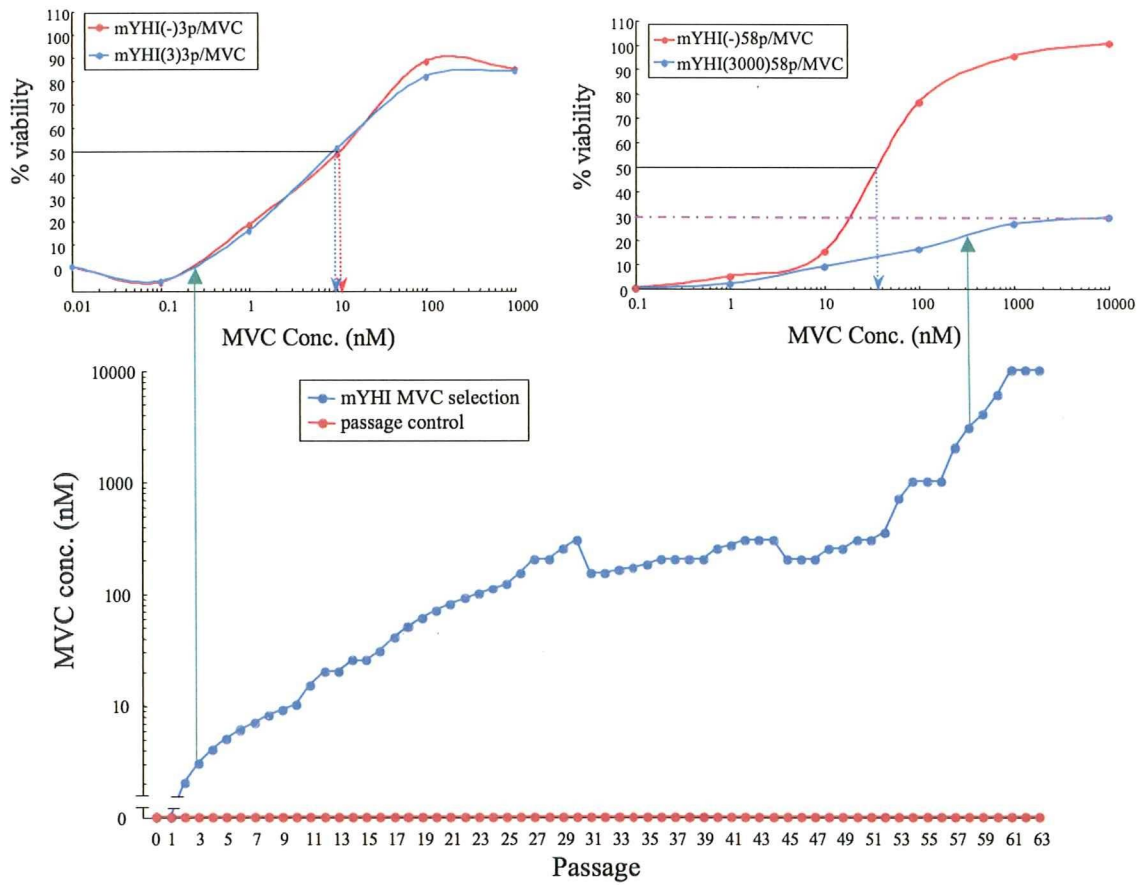


図-3. *In vitro*耐性誘導ウイルスのパッセージ回数とMVCの濃度の推移。  
3パッセージと58パッセージの耐性誘導ウイルスとコントロールパッセージウイルスのMVCに対する感受性の比較。

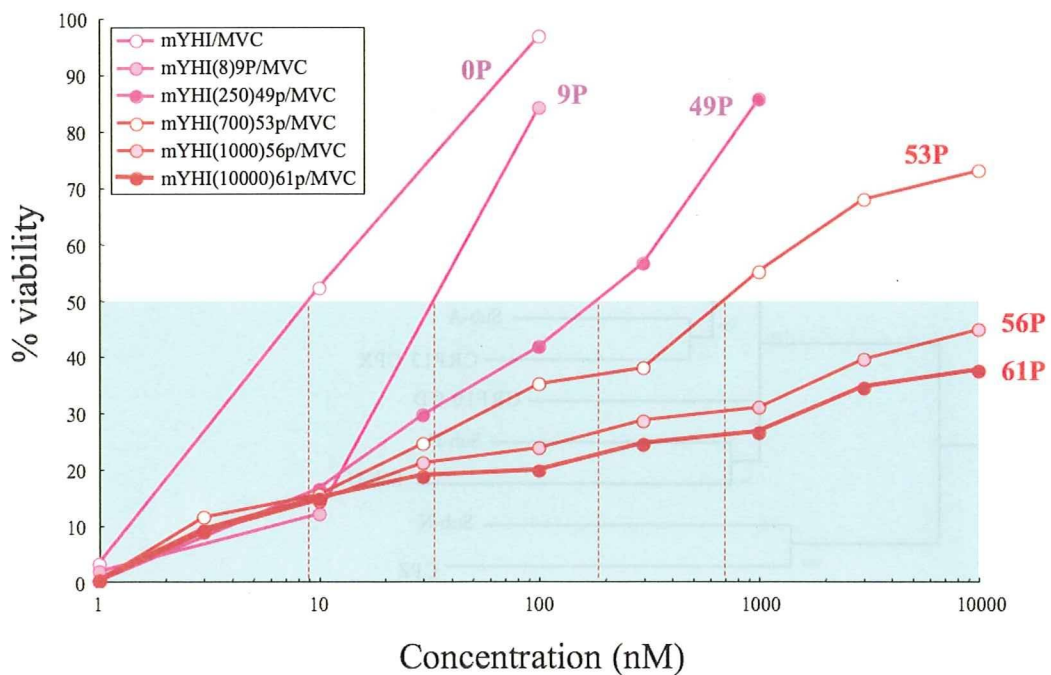


図-4. *In vitro*耐性誘導によるサブタイプC 臨床分離ウイルス(mYHI)のMVCに対するIC<sub>50</sub>の変化。



(8nM) から、コントロールウイルスのIC<sub>50</sub>より高くなり始め、それ以降は全ての上清中のウイルスはIC<sub>50</sub>が上昇していき、56パッセージ(1000nM)からは、50%抑制までも到達しなかった。よって、mYHIウイルスがMVCに高度耐性のフェノタイプになっていることがわかった(図-4)。次に、それぞれのパッセージの感染細胞及びコントロールパッセージ感染細胞(PM1/CCR5及びPM1細胞)からpDNAを抽出し、シーケンスを行った。その結果、16パッセージ目のgp120に見られた変異は、MVC耐性誘導ウイルスとPM1持続感染ウイルスとは同じ場所に存在していることがわかった。ところがそれ以降の変異の蓄積は、PM1持続感染ウイルスでは、gp120の可変領域が中心で(V2及びV4領域)あり、一方、MVC耐性誘導のウイルスは、保存領域(C1、C2、C4)に加えて、V3、V4、V5の可変領域に変異が蓄積することで、MVCに対する高度耐性を獲得していくことが示唆された(表-1)。このことは、薬剤が低濃度の時は、CCR5の発現量が低下した状態と同様の馴化の道筋をウイルスが選択し、中～高濃度の薬剤存在下では、CCR5阻害剤が結合した状態のCCR5に結合できるように、変異することを意味しているといえる。また、MVC耐性mYHIウイルスがその他のCCR5阻害剤に対しても交叉耐性を示すかどうかを検討したところ、MVC以外のCCR5阻害剤に対しても耐性であることが確認できた。

D. 考察

今回我々が示した結果は、MVCへの耐性獲得の道筋として、①CCR5低発現への馴化がまず優先され、その土台の上で②MVCへの耐性変異の獲得へと進んでいくという、two-stepの変異であることを示している。この結果から、これまでの多くの研究で変異の共通項が分かり難かった理由は、CCR5の

発現量がパッセージの都度大きく変わることが予測される、PBMCを継代細胞に用いたことにあるのかもしれない。また、今回の結果により、これまで混沌としていたCCR5阻害剤耐性変異を大きく二つに分けられることが分かった。つまり、Envの可変領域が主に低CCR5への馴化に関わり、一方保存領域はMVC結合CCR5への対応の関与が大きいことである。このことは、既に低発現CCR5細胞に馴化しているウイルスの方が、よりMVCのようなCCR5阻害剤への耐性獲得が早い可能性を示している。今後、我々が発見した耐性メカニズムの更なる検証のため、より多くの臨床分離ウイルスでの検討を計画している。Subtype Cウイルスを用いたMVCの*in vitro* selectionの報告は世界で初めてであり、かつ、新しい二段階耐性獲得理論の提唱により、2010年の米国レトロウイルス学会(CROI)に演題が採択された。

E. 結論

現在世界中で最も感染者の多い、non-Bサブタイプの一つであるサブタイプC株を感染症例より分離し、新規CCR5阻害剤MVCの*in vitro*耐性誘導を行い、耐性株を誘導した。これまでの耐性誘導の報告では示されなかった新たな二段階の耐性獲得のメカニズムを示した。すなわち、薬剤が低濃度の時は、CCR5の発現量が低下した状態と同様の馴化の道筋をウイルスが選択し、中～高濃度の薬剤存在下では、CCR5阻害剤が結合した状態のCCR5に結合できるように、変異することを意味している。様々なサブタイプの臨床分離ウイルスの耐性動向のより詳細な検討が、今後益々重要となるといえる。

F. 健康危険情報

なし

表-1. 58パッセージのMVC存在下感染細胞とコントロールパッセージ感染細胞(PM1/CCR5)及び50パッセージmYHI持続感染PM1細胞のpDNA envシーケンスの比較。黄色：MVC存在下とPM1持続感染で共通で見られる変異。紫：MVC存在下でのみ見られる変異。橙：PM1持続感染でのみ見られる変異。

Passage #	C1			V1		V2			C2	V3			V4			C4		V5				
	44	46	104	136	140	187	190	193	261	322	331	386	397	402	411	413	424	431	464	467	468	
Base line virus	0	V	R	M	E/D	I/M	N	E	L	L	G	Y/H	N	L	D/-	D/I	N/-	V	G	G/S	D/-	N/-
PC	58	V	R	M	E	I	N	E	L	L	G	Y	N	L	-	I	-	V	G	G	D	N
MVC (4000nM)	58	V/I	K	I	D	M	N	E	L	V	D	H	K	L	D	D	N	I	R	S	-	-
PM1-PC	50	V	R	M	D	M	S	N	V	L	G	H	N	I	D	D	N	V	G	G	D	N

## G. 研究発表

- 1) Hatada, M., Yoshimura, K., Harada, S., Kawanami, Y., Shibata, J. and Matsushita S. HIV-1 evasion of a neutralizing anti-V3 antibody involves acquisition of a potential glycosylation site in V2. J. Gen. Virol. 2010. In press.
- 2) Yamada, Y., Ochiai, C., Yoshimura, K., Tanaka, T., Ohashi, N., Narumi, T., Nomura, W., Harada, S., Matsushita, S., Tamamura, H. CD4 mimics targeting the mechanism of HIV entry. Bioorg Med Chem Lett. 2010. 20: 354-358.
- 3) Aoki, M., Venzon, D.J., Koh, Y., Aoki-Ogata, H., Miyakawa, T., Yoshimura, K., Maeda, K. and Mitsuya, H. 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. 83:3059-3068, 2009.

## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし



## 侵入阻害薬の及ぼす分子的影響の解析

研究分担者

鈴木 康弘 東北大学大学院医学系研究科内科病態学講座感染病態学分野 講師

### 研究要旨

HIV-1 外殻突起gp120 はCD4 と結合後、その構造変化が引き起こされてケモカイン受容体に結合可能となる。このようにgp120 の中和エピトープはCD4 結合前には隠されており、結合後にはじめて中和エピトープが形成・暴露される結果、HIV-1 が効果的に免疫中和反応を回避することを可能にすると考えられている。CD4 とケモカイン受容体の2 つの受容体数は細胞上では限られている。ゆえに、もし2 つの分子間距離が近接していない場合はCD4 結合後、HIV-1 は中和エピトープを暴露した状態で細胞表面に留まり中和抗体の標的となると考えられる。そこで、2つの受容体の動態、分子間距離等の細胞膜上での基礎的な状態を明らかにする事は侵入阻害薬やワクチン開発にとってきわめて重要である。今回、生細胞上のCD4 及びCXCR4 の動態を通常の共焦点レーザー顕微鏡と6 nm 以下の位置精度を持つ一分子ナノ顕微を用いて観察したので報告する。

### A. 研究目的

HIV-1 の細胞内侵入は外突起糖蛋白質gp120 が2種類の受容体(CD4 とケモカイン受容体)に結合することで開始するが、gp120 はまずCD4 に結合した後に、その構造変化がもたらされてケモカイン受容体に結合する。細胞侵入阻害薬の耐性機序を明らかにするためにはwild およびmutant 導入gp120 を用いて2種類の受容体との結合定数が細胞上でどのように変化したかを明らかにする必要がある。我々は、昨年、量子ドットでラベルしたTat 蛋白の生細胞表面への結合動態を一分子顕微鏡で観察することでTat の細胞表面への相対的な結合速度を簡単に測定できることを報告した。そこで、同様に一分子顕微鏡を用いることでgp120 の細胞表面上における相対的な結合定数、gp120 がCD4 に結合後、正確には何秒後にケモカイン受容体に結合を開始するのか、またその結合状態へ侵入阻害薬の及ぼす分子的影響を明らかにできると考えている。ウイルス受容体は感染実験に用いられる腫瘍細胞上では細胞内に取り込まれてrecycle する性質を持っている、このためにgp120 がCD4 に結合後すぐに細胞内へ取り込まれてしまうと2種類の受容体への連続的な結合過程を細胞上で測定することは不可能となる。そこで、昨年

は、細胞膜上でrecycle を阻害する変異を持つ2種類の受容体を作成に成功したことを報告した。本年度はこの受容体を発現する細胞を用いて2種類の受容体の動態及びその存在様式について一分子可視化を用いて観察したので報告する。

### B. 材料・方法

#### 蛍光蛋白質融合ウイルス受容体発現

レトロウイルス、およびトランスフェクションベクター系の作成—ウイルス受容体の中からCD4, CXCR4, CCR5, CXCR7 受容体を選択した。これらの遺伝子はcDNA synthesis 後、PrimeSTAR MaxDNA polymerase を用いて各々のspecific primer で増幅後、ZeroBlunt TOPOPCR cloning vector にsub-cloning し、シークエンスを確認することで得た。その後、これらのcDNA を制限酵素サイトを付加した遺伝子特異的なprimer で増幅しpAcGFP1-Hyg-N1,pDsRed-Monomer-Hyg-N1 にそれぞれ組み込み、前2者の発現ベクターはFugene HD を用いてHeLa、Hos 細胞に直接導入した。

## 蛍光蛋白質融合変異受容体のベクター系の作成ー

ZeroBlunt TOPO に sub-cloning したそれぞれの受容体を鋳型として、変異導入 Tag 配列を持つ primer を用いて PrimeSTAR-Max-DNA polymerase を用いて Recombination PCR 法を用いて変異受容体を作成、増幅し sub-cloning 後、シークエンスを確認後、上記と同様の方法で蛍光蛋白質融合ベクターに挿入した。

## ー分子顕微鏡の光学システムー

ー分子観察の光学システムは落射型蛍光顕微鏡 (IX-71, Olympus, Tokyo, Japan) に、Nipkow レンズユニット (CSU10, Yokokawa) と、electron multiplier type charge-coupled device camera (EM-CCD, Ixon DV887, Andor Technology) を組み込んだ。これは、従来の CCD に比べて約 1000 倍の感度を持つ。また、従来の Confocal Scanning Unit (CSU) は単光源による撮影であったが、Nipkow 方式の CSU は、Nipkow 円盤という円盤上に、数万個のピンホールがあり、散乱させたレーザーを円盤を高速で回転させて、多光源に変換する。円盤は二つあり、レーザーはピンホールにはめ込まれたマイクロレンズによりレーザーを収束させて、その利用効率を上げ、二つ目のピンホールを通して、対象物に収束させる事が可能となる。この結果、最大 2000 コマ/秒の速さで画像を撮影可能となった。

対物レンズは (60× UPlanFLN, 1.30 NA, oil, Olympus) を使用し、視野は 50×50 μm<sup>2</sup> で green laser (532 nm wavelength, 50 mW, CrystaLaser) で励起した。Laser で励起された GFP/QD を画像化するために、580 nm long-pass filter (580nm 以上の光を通す) を使用した。画像は、SOLIS ソフト (Andor Technology) を用いて撮影、記録した。GFP/QD の位置は 2D ガウス関数で補正して決定した。ガラス直上の X- および Y- 軸方向の位置精度は 25 ms で観察した際に、6 nm 以下の正確さであった。

## 粒子の個々の軌跡と平均二乗変位量 (MSD) の解析ー

軌跡解析は “ImageJ” のプラグインソフトである、“View5D” を用いて手動、あるいは自動で行った。QD の輝度の分布は、同心円状に減衰するガウス分布に従うため、ガウス補正を行って、QD 重心座標を推定し位置を決定する。この結果、粒子の位置情報は nm レベルとなる。

ビデオ画像の映像では前フレームの座標の近傍にあり、輝度も近い粒子を、次のフレームの QD の重心座標として認識する。このようにして、粒子の軌

跡座標を追跡した。粒子の動きのダイナミクスを調べるために、解析して得られた軌跡の x-y 座標情報から Mean Square Displacement (MSD) を計算した。それぞれの軌跡の MSD は、以下の計算式により定義されている。

$$MSD(n\Delta t) = \frac{1}{N-n} \sum_{i=1}^{N-n} [(x_{i+n} - x_i)^2 + (y_{i+n} - y_i)^2]$$

$x_i$ 、 $y_i$  は frame  $i$  での座標位置を意味し、 $N$  は総フレーム数である。 $t$  は時間で、 $n$  はフレームの位置を示し、 $n\Delta t$  は MSD を計算した時間の長さである。このように、MSD は時間関数である。拡散係数 ( $mD$ ) と速度 ( $V$ ) の情報を得るために、MSD 値は以下の式により補正された。

$$MSD(\Delta t) = 4D\Delta t + V^2 (\Delta t)^2$$

$$\lim_{\Delta t \rightarrow 0} MSD(\Delta t) = 4D\Delta t$$

$D$  は拡散係数であり、 $V$  は速度を意味する。

拡散には正常拡散と異常拡散があるが、正常拡散とは液体中など均一な条件で起こるブラウン運動を意味する。一方、生物学上の拡散は、細胞外マトリックスや細胞膜上、細胞膜直下で、様々な物質が構造を作っているため、ブラウン運動はそれらの条件により干渉される。このような、複雑系の拡散を異常拡散と呼んでいる。

分子の移動しやすさは拡散係数によって規定される。ブラウン運動は熱運動であるため、ひとつひとつの分子の動きはランダムであるが、複数の分子の動きの拡散係数を計算し平均化することにより、粒子の動きやすさ、条件の変化によるその動きの変化を評価が可能となる。

粒子の速度は下記の式で計算した。

$$v = \left\{ \frac{1}{n} \sum_{k=0}^{n-1} \sqrt{(x_{k+1} - x_k)^2 + (y_{k+1} - y_k)^2} \right\} / \text{video rate}$$

## 共焦点レーザー顕微鏡と FRAP 法 (Fluorescence Recovery After Photobleaching) ー

Zeiss LSM 510-meta confocal laser scanning microscope (Carl Zeiss) を使用した。488 nm 543 nm レーザーで励起し画像化した。任意の場所へ 488 nm のレーザー照射後に 1 frame/s で画像を取得した。対物レンズは Plan-Apochromatic 63x 1.4 NA oil-immersion DIC objective (Carl Zeiss) を使用した。細胞は 96-well glass bottom plates に蒔いて、一晚培養し、Phenol-red free X-vivo 培地下に、観察した。



## 倫理面への配慮

以上のすべての研究は東北大学の安全委員会に組み換え実験計画書を提出し、その承認のもとに行った。

## C. 研究結果

蛍光蛋白質融合ウイルス受容体の分布は共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察を行った。FRAP法を用いて解析したところCXCR4、CCR5、CXCR7全てにおいて7TM変異(COOH末端細胞内ドメイン欠損蛋白質)の導入後、発現パターンに変化は認められなかったが、受容体刺激後の細胞内へのエンドサイトーシスの抑制が確認されることが確認され。われわれの予想した性質が付加されていることが明らかになった。同様に、CD4の細胞内ドメイン欠落したCD4 truncatedタンパク質の発現状態は野生型のCD4と変化がないが、以前に報告されているように、エンドサイトーシスの抑制が確認された。以上より、7TM変異細胞内及びCD4 truncatedタンパク質がエンドサイトーシスを抑制し、細胞表面へ正常に発現されるウイルス受容体となる事が確認された。

そこで、さらにCXCR4の細胞内ドメイン3つのループにそれぞれ変異を加えていったところ、一番目の細胞内ループに変異を加えてやる(CXCR4-ICL1m)と細胞表面への輸送が阻害されgolgi-complexのところまで輸送が阻害されることが明らかになった(図1)。

近年、CXCR4は細胞表面上で定常的に2量体を形成しているとする報告が散見される。そこで、dsRED融合-野生型(Wild type:WT)CXCR4とGFP融合-CXCR4-ICL1mを同時に発現させることでCXCR4が2量体を形成しているか否か検討した。

CXCR4-ICL1m発現細胞にdsRED融合-WT-CXCR4を共発現させたところ、CXCR4-ICL1mは細胞表面へ正常に輸送される様になった(図2A)。そこで、さらに蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を用いて調べてやるとdsRED融合-WT-CXCR4とGFP融合-CXCR4-ICL1mの間でFRETが起きることが明らかになった(図2B)。以上のことより、CXCR4-ICL1mとWT-CXCR4蛋白が細胞表面では会合する事が明らかになった。そこで、免疫沈降法を用いてdsRED融合-WT-CXCR4とGFP融合-CXCR4-ICL1mの会合の有無を調べてやるとCXCR4-ICL1mにWT-CXCR4の共沈が認められ逆に、WT-CXCR4にCXCR4-ICL1mが共沈された。以上のことより、細胞ではCXCR4-ICL1mとWT-CXCR4の会合が恒常的に認められ、golgi体でWT-CXCR4がCXCR4-ICL1mと2量体を形成した結果、野生型CXCR4に導かれてCXCR4-ICL1mが細胞表面に輸送されていると考えられた。

すなわち、①CXCR4の一番目の細胞内ループがgolgi-complexからの正常なCXCR4細胞輸送に重要な役割を担っている。②CXCR4は2量体を形成してgolgi-complexから細胞表面に移動するが、一番目の細胞内ループのうち一つでも正常な配列を持って

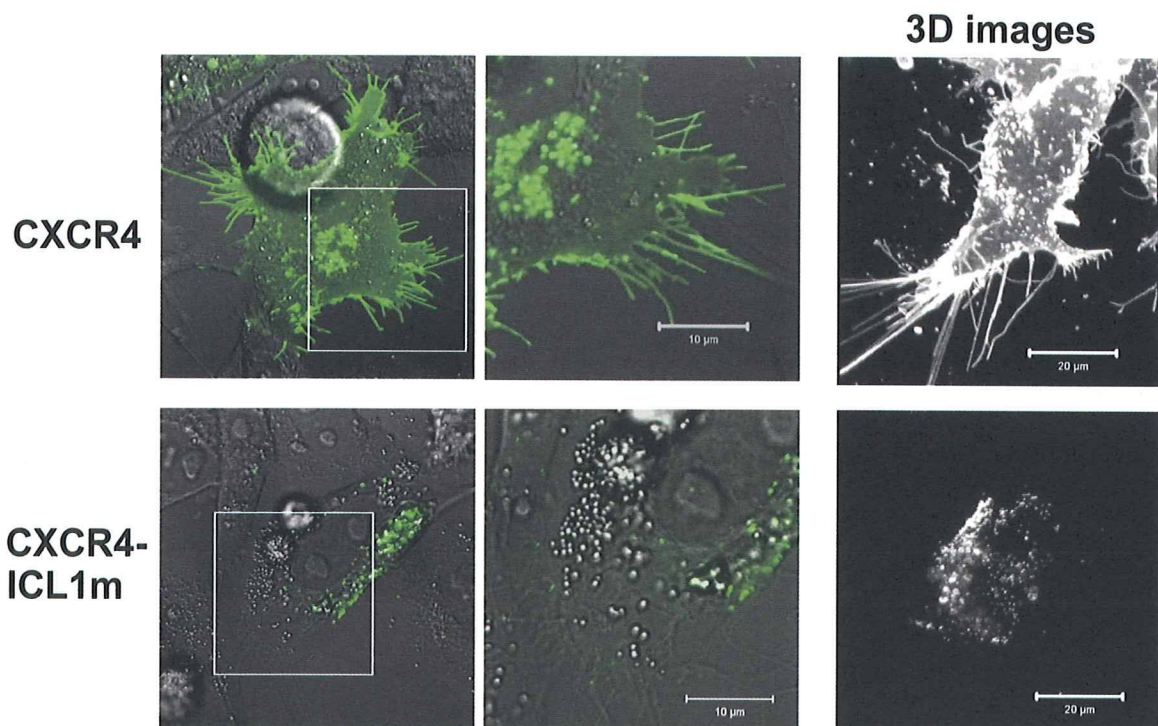


図1



いると細胞表面に輸送される。③2量体形成に一番目の細胞内ループは重要でないということが明らかになった。

そこで、さらに一分子顕微鏡を用いて一分子レベルでのCXCR4、CD4を細胞上の動態を明らかにすることを試みた。我々が用いている顕微鏡は落射型蛍光顕微鏡を基礎として構築されているために、細胞表面のみならず細胞質側に数100nm染み出す光が存在する。このために、GFP/dsREDでラベルしたCXCR4、CD4をそのまま観察しようとする観察時に細胞表面と細胞質側の蛋白を同時に観察してしまう可能性がある。

そこでまず、量子ドットでラベルした抗CD4抗体(OKT4)及び抗CXCR4抗体(4B10)を用いて細胞表面のCXCR4、CD4をラベルし、その直後に観察することで細胞表面の分子の動態のみを明らかにすることを試みた。その結果、我々は、100 ms/frameの速度でCD4、CXCR4の細胞表面上での動態を一分子レベルで観察することに成功した。それぞれのspotの拡散係数を測定してやると、1量体分子の代表であるCD4分子が $0.42\mu\text{m}^2/\text{sec}$ であるのに対して、WT-CXCR4の拡散係数は $0.14\mu\text{m}^2/\text{sec}$ とCD4分子拡散係数の3分の1まで低下していることが明らかになった(図3A)。

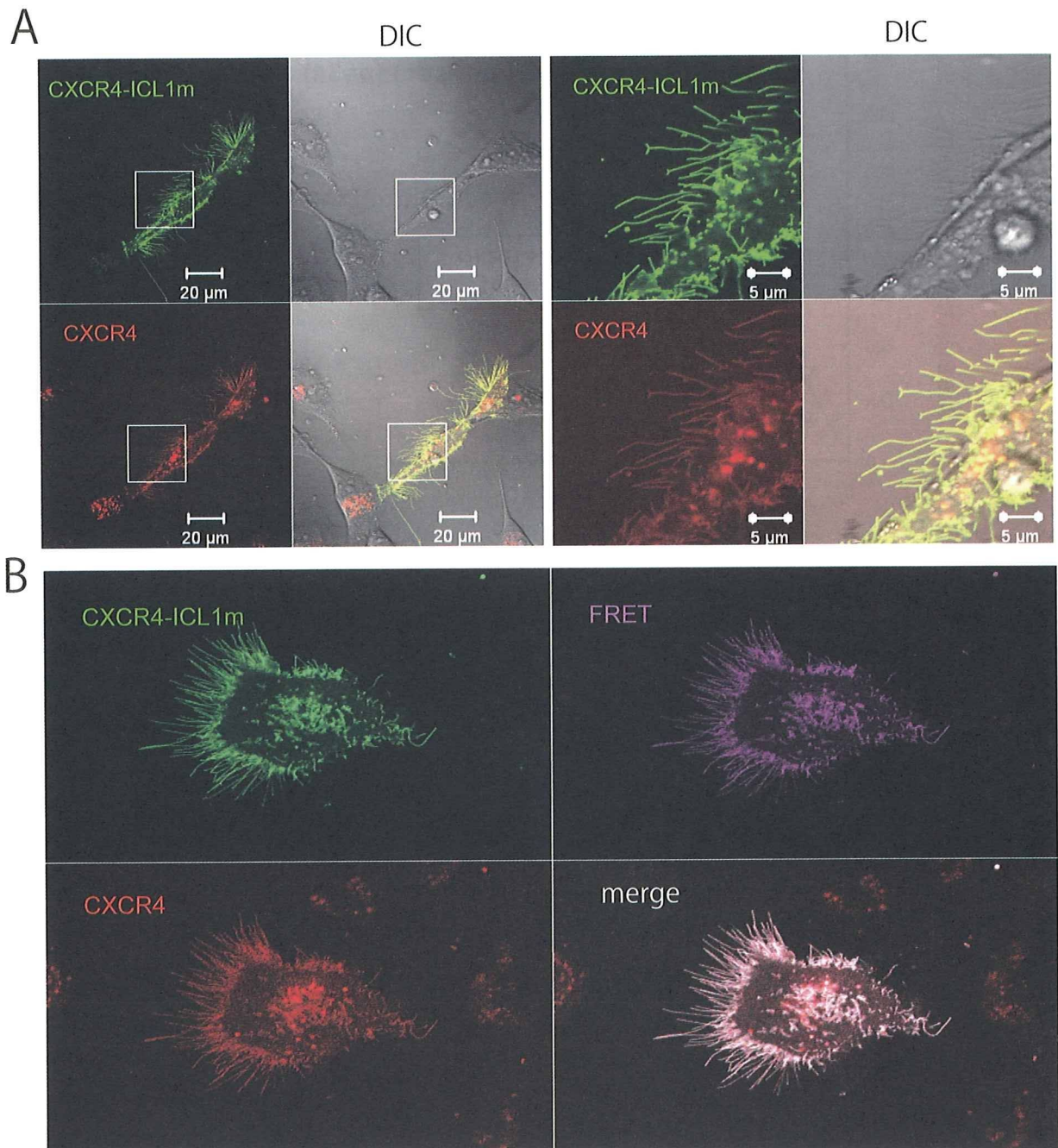


図2