

2) 抗 HIV-1 作用発現のメカニズム解析：PIs がウイルス、あるいは生体（細胞）へ与える変化、それがどのようにして抗 HIV-1 効果をもたらすかについて解析を進める。この研究には多数の HIV-1 クローンの作成・検討が必要で、しかも HIV-1 の広範な遺伝子部分についての検索が必要とされるが、high throughput の DNA sequencer：ABI-3130 を用いるので迅速な実験データの解析が可能となる。

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

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

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

5) CCR5 の微細構造学的解析・生理学的解析：コンピューター・モデリングの手法を用いた

CCR5 の微細構造学的解析の系を確立、CCR5 と阻害剤の結合モデル、HIV-1 感染（エンベロープとの結合）と CCR5 の生理作用（ケモカインによる作用）に重要な構造の解析など行っている。また、電子顕微鏡・蛍光/共焦点顕微鏡を用いた細胞表面の CCR5 の局在性・動態解析も行っている。

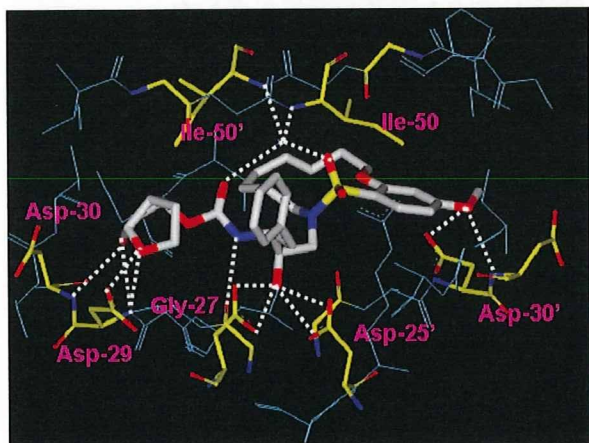
（倫理面への配慮）

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

C. 研究結果

広いスペクトラムの薬剤耐性株に高い活性を発揮する PI, TMC114/darunavir (Koh & Mitsuya *et al*, *Antimicrob Agents Chemother.* 47: 3123-3129, 2003)を米国 Purdue University の Dr. Ghosh グループとの共同研究で開発、本剤は 2006 年 6 月に米国 FDA にて認可され、PrezistaTM として本邦でも臨床に供されることとなった。さらに我々のグループは試験管内における DRV の研究を続けており、複数の多剤耐性臨床分離 HIV-1 混合株を用いた耐性誘導実験において、複数の PI 耐性変異体の重感染と遺伝子相同組み換えが起こることで、HIV-1 が DRV に対する高度耐性を獲得する可能性があることを見出した (Koh, & Mitsuya *et al*, under revision)。また我々は海外研究者と共同で、構造解析学的データに基づき DRV と同様に P2 部位に bis-THF 構造を有し、更に P2'部位の benzodioxole 構造が HIV-PR の flap 領域と水素結合を持つ事で薬剤の結合を安定化させ、多剤耐性株に対して強力な活性を発揮する新規 PDI、GRL-98065 (Amano & Mitsuya, *Antimicrob. Agents Chmeother.* 51:2143-55,

2007) や、DRV とは異なる基本骨格である cyclopentanyl-tetrahydrofuran (Cp-THF) を有し、HIV-1 PR の活性中心部位に 2 つの異なる結合様式 (bimodal binding mode) で結合することにより、多剤耐性臨床分離 HIV-1 株に対して野生株と同等 (EC₅₀ 値で 2 倍以内) の高い活性を發揮する新規 PI, GRL-02031 (Koh & Mitsuya *et al*, *Antimicrob Agents Chemother.* 53: 997-1006, 2009) を同定・開発してきたが、更に macrocyclic 構造という特徴的な構造を有し、薬剤耐性 HIV に対して高い活性を發揮する一連の低分子化合物、GRL-0216A, -0286A 等の PDIs を同定、詳細な結晶構造解析により同構造が HIV-PR flap 部位に広範に結合する事で強力な活性を發揮する事を見出した (Tojo & Mitsuya *et al*, under revision)。



図は macrocyclic 構造を有し、薬剤耐性 HIV に対して高い活性を發揮する新規の低分子化合物、GRL-0216A における HIV-1 PR との結合様式を示す。GRL-0216A は HIV PR 活性中心部位である Asp-29, 30 の主鎖に加えて、flap 部位の Ile-50 と水素結合を有する

また我々のグループは PIs 耐性と Gag の遺伝子変異についてのウイルス学的・構造学的検討も進めており、APV で耐性誘導した HIV-1 において、PR 領域への APV 耐性関連変異に加え Gag 領域の非開裂部位にアミノ酸変異の蓄積を認め、これら Gag 領域のアミノ酸変異の存在は virus の fitness を改善することにより APV に対する早期の耐性獲得に関与するが、他の

PIs に対しては耐性発現が遅延するという異なった影響を及ぼす事を報告した (Aoki & Mitsuya *et al*, *J Virol.* 83:3059-3068, 2009)。

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

ケモカイン受容体である CCR5, CXCR4 は HIV-1 のコレセプターとして HIV-1 の細胞侵入過程に重要な役割を持っている。このようなウイルスの細胞への侵入過程は既存の主な抗 HIV 剤と作用機序の異なる新たな治療薬のターゲットとしても有望であり、満屋は現在までに米国での臨床試験で強力な抗 HIV-1 効果が確認された CCR5 阻害剤: Aplaviroc (AK602: 肝障害のため第三相臨床試験は休止中) を始め、複数の CCR5 阻害剤の同定に成功している。一方で我々はこれらの阻害剤の作用機序の解明のための研究も進めており、結晶解析・コンピューター・モデリングの手法を用いた CCR5 の微細構造学的解析の系を確立、CCR5 と阻害剤の結合モデル、HIV-1 感染 (エンベロップとの結合) と CCR5 の生理作用 (ケモカインによる作用) に重要な構造の解析などを既に報告している (Maeda & Mitsuya *et al*, *J Mol Biol.* 381:956-974, 2008)。

我々はケモカイン受容体阻害剤開発研究の

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

細胞表面の HIV-1 受容体と HIV-1 エンベロープの相互作用と HIV-1 感染の関連をみる手法として、各種画像解析も行っている。具体的には電子顕微鏡・蛍光/共焦点顕微鏡を用いた細胞表面の HIV-1 受容体の局在性・動態解析の手法を確立し、ウイルス接着時のこれらの分子動態を解明することを目指す。我々は既にレポータータンパク (YFP) を結合させた CCR5 のレーザー顕微鏡での解析により、細胞表面の CCR5 は非常に流動性に富むこと (Nakata & Mitsuya, 投稿準備中)、電子顕微鏡での解析に

より通常の状態 (HIV-1 感染に関与していない) での CCR5 は細胞表面にクラスターを形成して存在することを明らかにしている。これらの基礎データ・手法を元にウイルス感染時の各タンパク (エンベロープ・受容体) の動態解析の系の樹立を図る。

D. 考察

これらの研究の特色として、抗 HIV-1 薬開発に必要なウイルス学的研究手技に加えて、独自の新規低分子化合物の合成や結晶構造解析・コンピューター・モデリングなど、1 研究施設では通常施行困難な多岐にわたる研究領域をカバーする研究体制が、国内外のグループとの共同研究として整えられていることが挙げられる。今後もこれらの研究を継続し、新興再興感染症の予防・治療薬開発を進める。

E. 結論

我々のグループは HIV-1 が耐性を発現しにくい薬剤、発現しても他薬剤との交差耐性を有しない新規の PIs の開発を米国グループとの共同研究で継続しているが、さらに HIV-1 PR 二量体形成に重要とされるアミノ酸の詳細な解析を進め、新規の機序である HIV-1 PR 二量体形成阻害剤の開発・構造解析を米国の研究グループと共同で行っていく。また新規 RTI の開発についても同様に米国のグループと共同で継続していく。1 剤で 2 つの作用機序を有する DRV, GRL-98065, GRL-02031, GRL-0216A, -0286A といった複数の抗 HIV 効果を発揮する新規抗 HIV 剤への耐性発現の genetic barrier は極めて高く、薬剤耐性 HIV への新たな対応策と考えられる。更に CCR5 の微細構造学的解析系の確立、CCR5 阻害剤の結合モデル、分子レベルでの機序解析の研究も進めており、これらの解析結果を基にして、CCR5 結合能のある新規低分子化合物のモデリングを行い、強力な抗

HIV 活性を有する新しい化合物の設計・同定を続ける。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakata, H., Kruhlak, M., Kamata, W., Ogata-Aoki, H., Li, J., Maeda, K., Ghosh, A.K., and Mitsuya, H. (2009) Effects of CCR5 Inhibitors on the Dynamics of CCR5 and CC-chemokine-CCR5 interactions. *Antiviral Therapy* (in press)
2. Ghosh AK, Leshchenko-Yashchuk S, Anderson DD, Baldrige A, Noetzel M, Miller HB, Tie Y, Wang YF, Koh Y, Weber IT, Mitsuya H (2009) Design of HIV-1 protease inhibitors with pyrrolidinones and oxazolidinones as novel P1'- ligands to enhance backbone- binding interactions with protease: synthesis, biological evaluation, and protein-ligand X-ray studies. *J. Med. Chem.* 52: 3902-14.
3. Fujimoto H, Higuchi M, Watanabe H, Koh Y, Ghosh AK, Mitsuya H, Tanoue N., Hamada A, and Saito H. (2009) P-glycoprotein mediates efflux transport of darunavir in human intestinal Caco-2 and ABCB1 gene-transfected renal LLC-PK1 cell lines. *Biol. Pharm. Bull.* 32: 1588-93
4. Ghosh, A.K., Gemma, S., Simoni, E., Baldrige, A., Walters, D.E., Ide, K., Tojo, Y., Koh, Y., Amano, M., and Mitsuya, H. (2009) Synthesis and biological evaluation of novel allophenylnorstatine-based HIV-1 protease inhibitors incorporating high affinity P2-ligands. *J. Med. Chem.* 20: 1241-6.
5. Michailidis, E., Bruno Marchand, B., Ei-Ichi Kodama, E-I., Kamalendra Singh, K., Matsuoka, M., Ashida, N., Kirby, K., Ryan, E.M., Sawani, A.M., 1, Eva Nagy, E., Mitsuya, H., Parniak, M.P., and Sarafianos, S.G. (2009) Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by 4' -ethynyl-2-fluoro-deoxyadenosine triphosphate, a translocation defective reverse transcriptase inhibitor. *J. Biol. Chem.* 284: 35681-91.
6. Das, D., Koh, Y., Tojo, Y., Ghosh, A.K., and Mitsuya, H. (2009) Prediction of Potency of Protease Inhibitors Using Free Energy Simulations with Polarizable Quantum Mechanics-Based Ligand Charges and a Hybrid Water Model. *J. Chem. Inf. Model.* 49: 2851-62.
7. Hattori, S., Ide, K., Nakata, H., Harada, H., Suzu, S., Ashida, N., Kohgo, S., Hayakawa, H., Mitsuya, H., and Okada, S. (2009) Potent activity of a nucleoside reverse transcriptase inhibitor, 4' -ethynyl-2-fluoro-2' -deoxyadenosine, against HIV-1 infection in Hu-PBMC-NOD/SCID/JAK3null (NOJ) mouse model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53: 3887-93.
8. Ghosh AK, Kulkarni S, Anderson DD, Hong L, Baldrige A, Wang YF, Chumanevich AA, Kovalevsky AY, Tojo Y, Amano M, Koh Y, Tang J, Weber IT, Mitsuya H. (2009) Design, Synthesis, Protein-Ligand X-ray Structure, and Biological Evaluation of a Series of Novel Macrocyclic Human Immunodeficiency Virus-1 Protease Inhibitors to Combat Drug Resistance. *J. Med. Chem.* 52: 7689-7705.
9. Aoki M, David JV, Koh Y, Aoki-Ogata H, Miyakawa T, Yoshimura K, Maeda K, and Mitsuya H. (2009) Non-cleavage Site Gag Mutations in Amprenavir-resistant HIV-1 Predispose HIV-1 to Rapid Acquisition of

Amprenavir Resistance But Delays Development of Resistance to Other Protease Inhibitors. *J Virol.* 83: 3059-3068.

10. Koh Y, Das D, Leschenko S, Nakata H, Ogata-Aoki H, Amano M, Nakayama M, Ghosh AK and Mitsuya H. (2009) GRL-02031: A Novel Nonpeptidic Protease Inhibitor (PI) Containing A Stereochemically Defined Fused Cyclopentanyltetrahydrofuran (Cp-THF) Potent Against Multi-PI-Resistant HIV-1 In Vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 53: 997-1006.

2. 学会発表(国際学会のみ)

1. "The binary mechanism of HIV-1 resistance to tipranavir (TPV): Loss of inhibition of protease catalytic activity and protease dimerization" Manabu Aoki, Yasuhiro Koh, Kazuhiko Ide, Matthew L. Danish, Hiromi Aoki-Ogata, & Hiroaki Mitsuya. 49th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), September, 12-15, 2009, San Francisco, CA, US.
2. "Degradation of Gag Proteins in Multi-drug-resistant HIV Variants Containing Insertions in Gag Proteins" Masayuki Amano, Yasuhiro Koh, Sadahiro Tamiya & Hiroaki Mitsuya. 49th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), September, 12-15, 2009, San Francisco, CA, US.
3. "Macrocyclic Component-containing Protease Inhibitors (PIs) Active Against Multi-PI-Resistant HIV-1 In Vitro" Yasushi Tojo, Yasuhiro Koh, Debananda Das, Masayuki Amano, Sarang Kulkarni, David Anderson, Arun K. Ghosh, and Hiroaki Mitsuya. 49th Annual Interscience Conference on

Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), September, 12-15, 2009, San Francisco, CA, US.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

(1) The Name of the Patent: Fitness assay and associated methods

Date of Issuance: December 30, 2008

US Patent Number: 7,470,506

Erickson; John W. (Frederick, MD), Gulnik; Sergei V. (Frederick, MD), Mitsuya; Hiroaki (Chevy Chase, MD), Ghosh; Arun K. (River Forest, IL)

Assignee: The United States of America as represented by the Department of Health and Human Services (Washington, DC) and Board of Trustees of the University of Illinois.

Appl. No.: 09/720,276

Filed: June 23, 1999

PCT Filed: June 23, 1999

PCT No.: PCT/US99/14119

371(c)(1),(2),(4) Date: March 07, 2001

PCT Pub. No.: WO99/67417

PCT Pub. Date: December 29, 1999

(2) The Name of the Patent: 4'-C-substituted-2-halo-adenosine derivative

Date of Issuance: March 4, 2008

US Patent Number: 7,470,506

Erickson; Satoru Kohgo, Kashima-gun (JP); Hiroshi Ohru, Sendai (JP); Eiichi Kodama, Kyoto (JP); Masao Matsuoka, Otsu (JP); Hiroaki Mitsuya, Kumamoto (JP)

Assignee: Yamasa Corporation, Chiba (JP)

Appl. No.: 11/087,588

Filed: March 24, 2005

2. 実用新案登録 特になし

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

新規作用機序，特にウイルス遺伝子発現機構を標的とした抗エイズ薬に関する研究

—Cyclin T1 を標的とした抗 HIV-1 阻害剤の *in silico* screening—

研究分担者 馬場昌範 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 教授

研究協力者 濱崎隆之 エイズ予防財団 リサーチレジデント

研究要旨：HIV-1 の複製過程において，プロウイルス DNA からの転写は，ウイルスゲノムが増幅する唯一のステップであり，この過程を選択的に阻害する薬剤は，新規の抗エイズ薬になると考えられる。そこで，本研究では HIV-1 転写阻害活性を有するリード化合物を得ることを目的として，転写過程に関わる宿主細胞因子 cyclin T1 を標的とした，化合物の *in silico* screening を実施した。さらに，高いスコアが得られた化合物について，それらの *in vitro* における抗 HIV-1 活性を評価したところ，3 種類の化合物が選択的な抗ウイルス活性を示した。

A. 研究目的

HIV-1 は，その転写過程において高頻度に変異を起こすことから，薬剤耐性ウイルスの出現が，highly active antiretroviral therapy (HAART) 失敗の大きな原因となっている。一般的に，ある薬剤に対して耐性を獲得した HIV-1 は，同じカテゴリーに属する他の薬剤に対しても耐性を示す（交叉耐性を持つ）ことが多く，複数のカテゴリーにわたって，多くの薬剤に耐性を示す，いわゆる multi-drug resistant (MDR) ウイルスも報告されている。この問題を解決する手段として，新たな作用機序を標的とする薬剤の開発が精力的に行われている。近年になり，新たな薬剤として，HIV-1 の侵入を阻害する CCR5 阻害薬や，HIV-1 プロウイルス DNA の染色体 DNA への組み込みを阻害するインテグラーゼ阻害薬が認可され，臨床的に使用となった。

HIV-1 の転写過程は，プロウイルス DNA からウイルスゲノム RNA が増幅するステップであり，これは HIV-1 の複製に必須である。しかしながら，この過程を阻害する薬剤はまだ開発

されていない。HIV-1 の転写過程は，宿主細胞因子の cyclin T1/CDK9 とウイルス由来の Tat，そして TAR RNA で構成される複合体形成が必要であり，この複合体の形成を阻害することにより，HIV-1 転写を制御することが可能であると考えられる。しかしながら，cyclin T1/CDK9 は HIV-1 遺伝子の転写以外に，宿主細胞における遺伝子発現の調節において重要な働きをしていると考えられ，毒性を回避する意味からも，これに影響を与えずに，HIV-1 の転写のみを抑制するような薬剤の同定が必要である。そこで今年度の本研究においては，新規の HIV-1 転写阻害活性を有する薬剤を開発することを目的として，cyclin T1 の Tat/TAR RNA 相互作用領域に着目し，この領域を標的とした化合物の *in silico* screening を行うことにより，新しい薬剤の同定を試みた。

B. 研究方法

ヒト cyclin T1 のモデルの構築：*in silico* screening に用いる cyclin T1 の構造は，cyclin T1 が HIV-1 Tat/TAR RNA と複合体を形成した状

態を考慮し, equine cyclin T1/equine infectious anemia virus (EIAV) Tat/EIAV TAR RNA 複合体の結晶構造 [Protein Data Bank (PDB) #: 2w2h] を基に, ホモロジー・モデリングを行うことにより構築した。モデリングは, 統合計算化学システム Molecular Operating Environment (MOE, Chemical Computing Group Inc.) を用いて実施した。

In silico screening : MOE を用いて 3,000,000 化合物のデータベースから, 薬剤として好ましい条件 (分子量 : 350-600, 水素結合数 : < 13, 回転可能な結合数 : < 7, logP : 0-6) を有する化合物を選別した。宿主細胞因子 cyclin T1 モデル構造の表面を解析し, cyclin T1 とウイルス由来の Tat/TAR RNA が相互作用する領域において, 低分子化合物が結合すると想定されるインターフェイスを探索し, それに対して先に選別した薬剤の *in silico screening* を行った。高いドッキングスコアが得られた化合物について, それらの *in vitro* における抗 HIV-1 活性を評価した。

ウイルスおよび細胞 : HIV-1 として III_B 株を用いた。細胞は CEM 細胞を用いた。細胞は 10% ウシ胎仔血清 (FBS) および抗生物質添加 RPMI 1640 メジウムを用いて継代維持した。

抗 HIV-1 アッセイ : 薬剤の抗 HIV-1 効果は, 感染細胞における細胞変性効果抑制の有無を調べることにより判定した。CEM に HIV-1 を感染させ, 種々の濃度の薬剤存在下で培養した。培養 4 日目に, 培養液を同じ濃度の薬剤を含む新しい培地で継代し, さらに 3 日間培養後に, 感染細胞の生細胞数を MTT 法にて定量した。

(倫理面への配慮について)

本研究では, 個人が特定出来るようなヒトのサンプルは一切用いていない。

C. 研究結果

Cyclin T1/HIV-1 Tat/TAR RNA と複合体の

構築 : Cyclin T1 は, HIV-1 由来の Tat/TRA RNA と複合体を形成し, HIV-1 の転写を活性化する。*In silico screening* に用いる cyclin T1 の構造を最適化するために, HIV-1 Tat/TAR RNA と複合体を形成している際の cyclin T1 のモデル構造を作製し, 複合体を形成していない cyclin T1 の構造と比較した (図 1)。

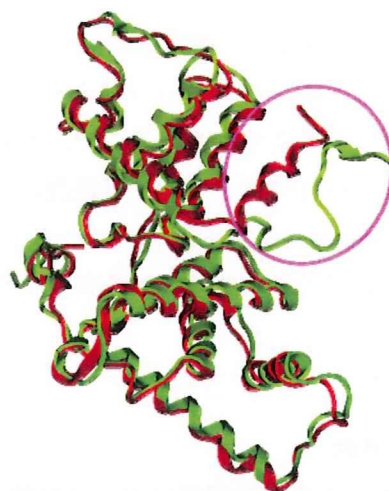


図 1 . HIV-1 Tat/ TAR RNA と複合体を形成している時の cyclin T1 の構造 (赤色) と形成していない時の cyclin T1 構造の (緑色)。

この図の円 (ピンク色) で示すように, cyclin T1 の構造は, HIV-1 Tat/TAR RNA が結合することにより, 複合体非形成時の α -helix 構造 (赤色) から大きく変化した構造 (緑色) をとることが明らかとなった。この領域は, 本研究の *in silico screening* の標的サイトに含まれると考えられる。

Cyclin T1 の HIV-1 Tat/ TAR RNA 相互作用領域を標的とした薬剤の *in silico screening* : MOE を用いて, cyclin T1 表面を解析した結果, HIV-1 Tat/TAR RNA が相互作用するインターフェイスに低分子化合物がはまり込む可能性があるポケットがあることが明らかとなった (図 2)。このポケットには結合する薬剤は, cyclin T1 と HIV-1 Tat/TAR RNA との複合体形

成を阻害し、HIV-1 転写を阻害することが考えられたので、本研究では、この領域（図2の黄色の円内）を標的とした化合物の *in silico* screening を実施した。3,000,000 化合物のスクリーニング後、それぞれの化合物と cyclin T1 の相互作用を推測したところ、選別された化合物は、Tat/TAR RNA と相互作用する cyclin T1 のアミノ酸残基（Asn250 : Tat 相互作用アミノ酸残基, Arg251, Arg254 : TAR RNA 相互作用アミノ酸残基）と相互作用することが明らかとなった（表1）。

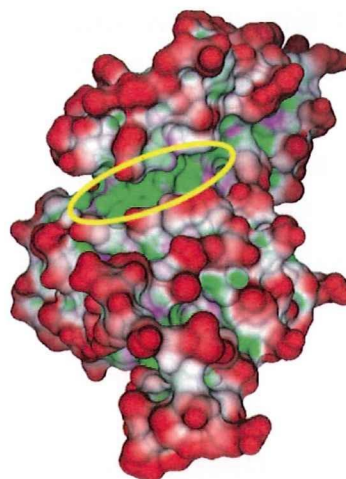


図2. *In silico* screening の標的サイト（黄色の円内）。

表1. Cyclin T1 アミノ酸残基と選別された化合物の相互作用解析

Asp47	Gln50	Phe176	Lys247	Thr248	Asn250	Arg251	Arg254
---	--	-	-	-	C	----C	AAC
--C	--	-	-	-	C	----C	AA-
---	---	-	-	-	C	AAIIC	AA-
---	--	-	-	-	C	-----	---
---	--	-	-	C	C	AA--C	---
---	--	-	-	-	C	A---C	AA-
DD-	--	-	-	-	C	AA--C	A-C
---	--	-	-	-	C	----C	---
DDC	--	-	-	-	C	AA--C	AAC
DDC	DD	-	-	C	C	AA--C	AA-
---	--	-	-	-	C	----C	---
DDC	D-	C	-	-	C	AA--C	AA-
--C	--	-	-	-	C	A---C	AA-
---	--	-	-	-	C	----C	---
---	--	-	-	-	C	-----	--C
DDC	--	-	-	-	C	AA--C	A--
DD-	--	-	C	C	C	AA--C	---
DDC	DD	-	-	C	C	AA--C	AAC
DDC	--	-	-	C	C	AA--C	AA-
DDC	--	-	-	C	C	----C	AA-

U_dock = Uele + Uvdw + Ustrain

D/ A: donor/ acceptor of hydrogen bond (side chain)

d/ a: donor/ acceptor of hydrogen bond (backbone)

I: ionic bond

C: contact surface

抗 HIV-1 活性 : *In silico* screening の結果, cyclin T1 とのドッキングスコアが最適であった 254 化合物について, CEM 細胞を用いた HIV-1 急性感染系により, これらの薬剤の *in vitro* における抗 HIV-1 活性を評価した。その結果, 3 種の化合物において抗 HIV-1 活性が認められた。それらのデータを図 3 に示す。

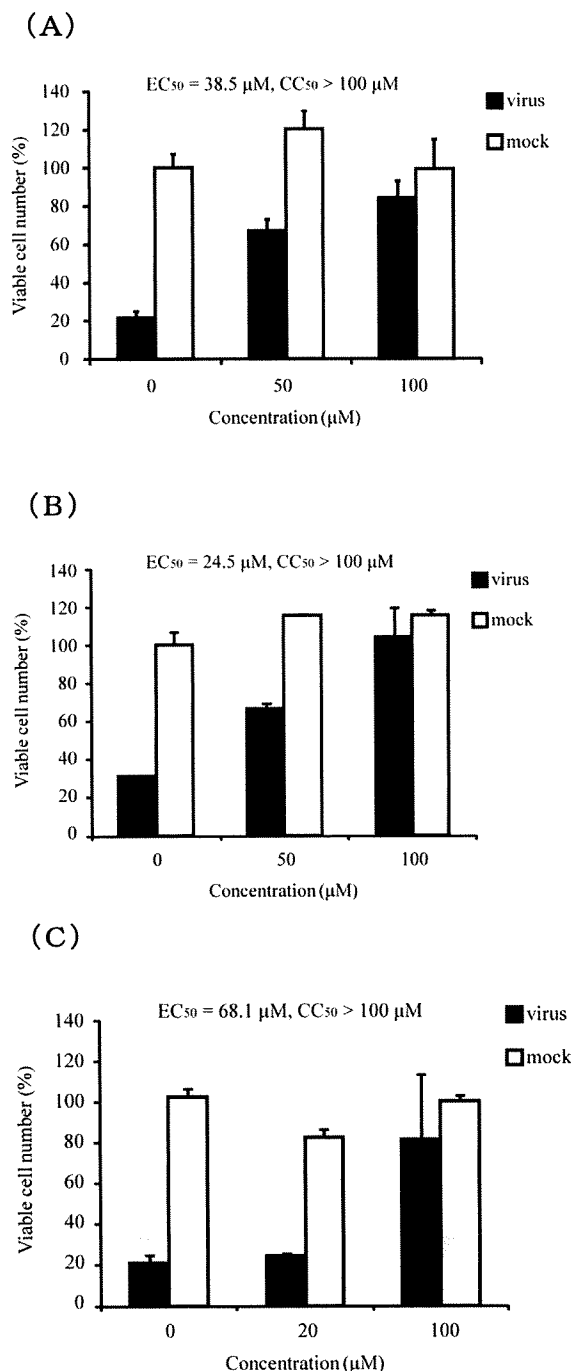


図3. 同定された3薬剤のCEM細胞における抗 HIV-1 活性。

なお, これらの薬剤に関しては, 特許未出願であるため, 本報告書において化学構造を開示することは控えたい。

D. 考察

現在, 米国 FDA が認可している抗エイズ薬は, 合剤を除いても, 侵入阻害薬 2 剤, 核酸系逆転写酵素阻害薬 7 剤, 非核酸系逆転写酵素阻害薬 4 剤, プロテアーゼ阻害薬 10 剤, そしてインテグラーゼ阻害薬 1 剤の合計 24 剤に達する。わが国でもほぼ同様の数の薬剤が臨床使用可能である。これら既存の薬剤のほとんどは, ウイルス遺伝子由来の酵素を標的としており, ウイルス遺伝子の変異による耐性ウイルスの出現の問題が不可避である。そこで, これらの耐性ウイルスにも有効な, 新しい作用機序 (標的分子) を持った抗エイズ薬を開発することを最終目標に, そのための基礎的研究を行うことを本研究の目的としている。今年度は HIV-1 の転写に関与する宿主遺伝子 cyclin T1 を標的として, *in silico* screening を行った。

これまでの研究において, HIV-1 Tat/TAR RNA 非結合時の cyclin T1 の構造に対して, 3,000,000 化合物の *in silico* screening を行い, ドッキングスコアの良い化合物を選び出し, それらの *in vitro* での抗 HIV-1 活性を評価したが, 残念ながら選択的な活性のある薬剤は発見されなかった (data not shown)。そこで, 今回は HIV-1 Tat/TAR RNA 結合時の cyclin T1 の構造に対して *in silico* screening を行った結果, 弱いながらも *in vitro* において選択的な抗 HIV-1 活性を有する化合物を 3 種類同定することに成功した。このことは, cyclin T1 を標的とした薬剤を同定するには, 本研究において構築した HIV-1 Tat/TAR RNA 結合時の cyclin T1 の構造を用いる必要があることを示唆している。今後は, この cyclin T1 の構造と得られた化合物の結合様式を基にして, 化合物の化学構造の最適化を行い, より活性および選択性の高い抗

HIV-1 転写阻害剤を同定していくとともに、生化学的実験によって、得られた薬剤が実際に HIV-1 遺伝子からの転写機構を抑制しているかどうかを検証していく予定である。

E. 結論

HIV-1 転写阻害薬は HIV-1 ウイルス RNA の増幅を直接抑制する点で、新しい抗エイズ薬の有望な候補であると考えられる。しかしながら、HIV-1 遺伝子の転写機構は宿主細胞遺伝子の転写機構と多くの部分を共有しているため、選択性を確保し、細胞毒性を回避することが難しい。本研究で同定された薬剤は、HIV-1 転写阻害薬のリードとなる可能性を有しているが、より高い活性と選択性を有する化合物を求めて、合成展開を進める必要があると思われる。

F. 研究発表 (本研究に関係するもの)

(論文発表)

1. Baba M. Entry inhibitors of human immunodeficiency virus. In: LaFemina RL (Ed), *Antiviral Research: Strategies in Antiviral Drug Discovery*, pp. 19-32, ASM Press, Washington, DC (2009).
2. Nakamura M, Hamasaki T, Tokitou M, Baba M, Hashimoto Y, Aoyama H. Discovery of tetrahydrotetramethylnaphthalene analogs as adult T-cell leukemia cell-selective proliferation inhibitors in a small chemical library constructed based on multi-template hypothesis. *Bioorg. Med. Chem.* **17**: 4740-4746 (2009).
3. Shi M, Wang M, Okamoto M, Takao S, Baba M. Inhibition of porcine endogenous retrovirus (PERV) replication by HIV-1 gene expression inhibitors. *Antiviral Res.* **83**: 201-204 (2009).
4. Wang X, Tanaka H, Baba M, Cheng Y-C. Study of the retention of metabolites of 4'-Ed4T, a novel anti-HIV-1 thymidine analog, in cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**: 3317-3324

(2009).

5. Kubota Y, Ishizaki N, Kaneda Y, Haraguchi K, Odanaka Y, Tanaka H, Kato N, Baba M, Balzarini J. Synthesis and antiviral evaluation of 4'-alkoxy analogues of 9-(β -D-xylofuranosyl)adenine. *Antiviral Chem. Chemother.* **19**: 201-212 (2009).
6. Yang G, Paintsil E, Dutschman GE, Grill SP, Wang C-J, Wang J, Tanaka H, Hamasaki T, Baba M, Cheng Y-C. Impact of novel human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase mutations P119S and T165A on 4'-ethynylthymidine analog resistance profile. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**: 4640-4646 (2009).
7. Kumamoto H, Haraguchi K, Ida M, Nakamura KT, Kitagawa Y, Hamasaki T, Baba M, Shimbara-Matsubayashi S, Tanaka H. Synthesis of (\pm)-4'-ethynyl-5',5'-difluoro-2',3'-dehydro-3'-deoxycarbocyclic thymidine: a difluoromethylidene analogue of promising anti-HIV agent Ed4T. *Tetrahedron* **65**: 7630-7636, (2009).
8. 馬場昌範. 逆転写酵素阻害薬とプロテアーゼ阻害薬. 満屋裕明 (編集)「HIV 感染症と AIDS」pp141-148, 最新医学別冊 (2010).
9. 馬場昌範. 新薬の開発状況. 特集「エイズの現状 ; 社会的影響への考察も含めて」. *Pharma Medica* **27**: 45-49 (2009).

(学会発表)

1. 原口一広, 島田 央, 阿久津源太, 木村圭吾, 田中博道, 濱崎隆之, 馬場昌範, Gullen EA, Dutschman GE, Cheng Y-C, Balzarini J. 4'-C-エチニル-2'-デオキシ-4'-チオヌクレオシドの合成とその抗 HIV 活性. 第 19 回抗ウイルス療法研究会, 2009 年 6 月 4 日, 東京.
2. 濱崎隆之, 外山政明, 有馬直道, 橋本祐一, 馬場昌範. 抗 ATL 作用を有する新規化合物

- の活性と作用機序解析. 第 2 回 HTLV-1 研究会・合同班会議, 2009 年 8 月 29 日, 東京.
3. Hamasaki T, Baba M. In silico screening for anti-HIV-1 compounds targeting cyclin T1. *49th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, September 15, 2009, San Francisco, USA.
 4. Baba M, Wang X, Cheng Y-C, Matsuda T, Urata Y, Tanaka H. 4'-Ethinyl-d4T (4'-Ed4T), a nucleoside reverse transcriptase inhibitor with favorable safety and pharmacokinetic profiles in vitro and in vivo. *10th Kumamoto AIDS Seminar, GCOE Joint International Symposium*, September 28, 2009, Kumamoto, Japan.
 5. 濱崎隆之, 馬場昌範. Cyclin T1 を標的とした HIV-1 転写阻害剤のスクリーニング. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 2009 年 10 月 26 日, 東京.
 6. 岡本実佳, 蝶野英人, 馬場昌範. RNA 分解酵素 MazF を発現する新規レトロウイルスベクターを用いたエイズ遺伝子治療法の開発. 第 23 回日本エイズ学会学術集会シンポジウム, 2009 年 11 月 27 日, 名古屋.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
- 今年度, 本研究に関するもので, 特許出願および取得はない。

HIV の薬剤耐性機構

研究分担者 松岡 雅雄 京都大学ウイルス研究所 教授

研究要旨

これまで HIV に対する薬剤として逆転写酵素阻害剤、プロテアーゼ阻害剤、インテグラーゼ阻害剤、融合阻害剤が開発され、治療成績は大きく向上した。しかし長期に渡る薬剤の服用は、耐性ウイルスの出現を招き治療上の大きな障害となっている。T20 を含む融合阻害剤に対する耐性機序は、融合阻害活性を有するペプチドの gp41 への結合阻害が、その機序とされているが、T20 に対する耐性機序に関しても不明な点が多く残されている。本年度は耐性変異を誘導し、耐性獲得機序の解明を行った。

A. 研究目的

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) のエンベロープタンパクである gp120 と gp41 はウイルスの宿主細胞への吸着・侵入において重要な役割を果たしている。gp120 は細胞表面上の CD4 レセプター、続いて CXCR4 や CCR5 等のコレセプターと結合することにより構造変化を起こし、それによって gp41 が活性化され N 末端の疎水性アミノ酸部位が細胞膜に貫通する。融合の過程で、gp41 の N 末端側ヘリックス(HR1)と C 末端側ヘリックス(HR2)が相互作用し六量体を形成することでウイルスと細胞膜を接近させ、膜融合を起こすと考えられている。

融合阻害剤としては gp41 に由来するペプチドである T-20 (Fuzeon) が臨床応用されて大きな効果を発揮しているが、耐性ウイルスが出現し、治療上の障害となっている。C-HR 由来のペプチドの一つである C34 は *in vitro* において T-20 より効果的にウイルスの融合を阻害することが知られており、我々は C34 をアミノ酸置換することによって高親水性で高活性の誘導体を作製することに成功した (SC34EK)。また、他のグループからも近年、C34 を改変した次世代融合阻害剤の報告されている。

今年度は融合阻害剤に対する耐性ウイルスを誘導し耐性プロファイルの解析することで耐性獲得化機序の解明を行った。

B. 研究方法

細胞

HeLa-CD4/CCR5-LTR-β-galactosidase (MAGI) 細胞は 10% 熱不活化牛胎児血清(FCS)、0.2 mg/ml G418、0.1 mg/ml ハイグロマイシンを含む Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) で培養した。MT-2 細胞は 10%FCS を含む RPMI1640 培地で培養した。293T 細胞は 10%FCS を含む DMEM で培養した。

抗ウイルス剤

gp41 HR2 由来のペプチドである T-20、C34、SC34EK およびそれらの誘導体は化学合成により作製した。ddC は Sigma-Aldrich 社より購入した。

SC34 および SC34EK に対する耐性ウイルスの誘導

耐性誘導に使用した野生型ウイルス NL4-3 は、HIV-1 molecular clone pNL4-3 を 293T 細胞にトランスフェクトして作成した。SC34 および SC34EK はそれぞれ 0.1 nM および 0.15 nM を初期濃度として培養液に加え、その状態で MT-2 細胞にウイルスを感染させ、繰り返し継代を行った。細胞変性効果が十分に見られるようになった場合、培養液に加える薬剤濃度を 2 倍に増加させ、さらに培養を続ける (dose escalating method)。ある一定濃度を超える濃度でもウイルスが十分複製してくるようになったら、感染細胞の一部を回収し、DNA を抽出、PCR 法でウイルスのエンベロープ領域を増幅し、その塩基配列を決定した。

変異が導入されていた場合、その感受性の変化、および上記と同様に pNL4-3 にその変異を site directed mutagenesis 法で導入し、感受性変化から、変異の意義を同定した。

SC34 および SC34EK 耐性ウイルスの作製

pNL4-3 に存在するユニークサイトには含まれる NheI-BamHI 断片 (1215 bp、gp120 V4 領域から gp41 の細胞外 domain を含む) をクローニングした pSLgp41WT を作製した。これに対して site directed mutagenesis を行い、変異を有する NheI-BamHI 断片を pNL4-3 に戻すことで目的の変異を有するクローンを作製した。これらクローンを 293T 細胞に遺伝子導入し、48 時間後にウイルスを回収した。

抗 HIV-1 活性の評価

抗 HIV-1 活性の評価には multinuclear activation of a galactosidase indicator (MAGI) assay を用いた。 10^4 cells/well の HeLa-CD4/CCR5-LTR- β -galactosidase (MAGI) 細胞を 96 well flat microtiter culture plate で培養し、翌日に HIV-1 クローンと抗ウイルス剤を加える。ウイルスを加えてから 48 時間培養後、X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) によって感染細胞を染色した。呈色した細胞数を数えコントロールとの比較によってその濃度における HIV-1 の細胞への感染阻害率を求めた。抗 HIV-1 活性は HIV-1 の複製を 50% 阻害する濃度 (EC_{50}) を算出し評価した。

Circular Dichroism スペクトルの測定

C34 と N-HR 由来のペプチド N36 との結合親和性は circular dichroism (CD) に検討した。CD スペクトルはペプチド(等モルの C 末端側ヘリックスと N 末端側ヘリックス)を HEPES 緩衝液に溶かし、分光計で測定した。HEPES 緩衝液のみのモル楕円率の波長 $[\theta]$ を基準として、各複合体の $[\theta]$ は 25°C において測定した。結合したペプチドの熱安定性は 222 nm における CD スペクトルの変化を見ることで評価した。0.5°C 刻みに測定し、熱変性過程の中間値を融解温度 T_m として求めた。SC34 および SC34EK の耐性誘導で得られた変異を C34 および N36 に導入し、それらの結合親和性も同様に測定した。

(倫理面への配慮)

基礎的研究であり該当しない

C. 研究結果

SC34 および SC34EK 耐性ウイルスの誘導

SC34 に対する耐性ウイルスの誘導は 0.1 nM の濃度から開始した。20 継代目 (P20) において gp41 の 36 番目のアミノ酸であるアスパラギン酸 (D) からグリシン (G) への置換が認められた。続いて、P58 で新たに A30V、I37T、N126K の置換が導入された。その後、L210 置換が P91 で、S138A 置換が P102 で認められた。その後も継代を繰り返し、R46K、Q52R、Q56R、E151K、K154N、および N163D 置換が順次導入された。なお、アミノ酸置換の導入につれて、SC34 の EC_{50} 値も増加し、最終のウイルスでは 170 nM を示した。

同様に SC34EK に対する耐性ウイルスも誘導した。P20 において D36G および N126K 置換が認められた。その後も Q41R、P203S、および H258Q が P44 で、I171K および L204I が P45 で、N43K、A96D、H132Y、および E151K (P86)、V182I (P106)、S241F および A312T (P120) のアミノ酸置換が順次導入された。P120 における SC34EK の EC_{50} は 40 nM を示した。

耐性変異の薬剤感受性への影響

SC34 および SC34EK に対する耐性誘導で認められたアミノ酸置換を導入した各種変異 HIV-1 の薬剤感受性の変化を MAGI assay により評価した。なお、HIV-1_{WT} として NL4-3 を用いた。アミノ酸置換をそれぞれ単独で導入した変異 HIV-1 に対しては、SC34 および SC34EK とともに大きな薬剤感受性の低下は認められなかった。一方で、耐性誘導で得られた全アミノ酸置換を導入したウイルスでは SC34 に対し 700 倍以上、SC34EK に対し 100 倍以上の高度耐性を示した。

SC34 および SC34EK に対する耐性変異の HR1 に対する結合性に与える影響

SC34 および SC34EK を用いた耐性誘導において、HR1 および HR2 内にもいくつかのアミノ酸変異が導入された。これらの変異が gp41

HR1:HR2 の結合性に与える影響を調べるために、circular dichroism (CD)により検討した。HR1由来の典型的なペプチドとして用いた N36 に対しては、SC34 および SC34EK は、C34 と比べて強固な結合安定性を示した (Figure2)。しかし、SC34 および SC34EK で誘導された HR2 内アミノ酸置換を C34 に導入[それぞれ C34 (SC34^{res}) および C34 (SC34EK^{res})]すると、親和性は低下した。また、SC34 で誘導された HR1 内アミノ酸置換を N36 に導入したペプチド N36 (SC34^{res}) に対する結合親和性を測定すると、SC34 はもはや安定な結合性を示さなかった。一方、C34 (SC34^{res}) では結合親和性の回復が認められた。同様の結果は N36 (SC34EK^{res}) と C34 (SC34EK^{res}) との間にも認められた。

D. 考察

第一世代の融合阻害剤である T-20 は臨床で使用されると、優れた抗 HIV-1 効果を示した。しかしながら長期にわたる薬剤投与は薬剤耐性化の問題につながり、実際、T-20 耐性ウイルスの出現が報告されている。我々は T-20 耐性ウイルスにも効果を示す C34 誘導体の SC34 および SC34EK をこれまで報告してきた。また、他のグループからも独自に開発した次世代融合阻害剤が報告されている。しかしながら、薬剤の詳細な作用機序および耐性獲得機序の解明に必要な耐性プロファイルは現時点ではほとんど明らかになっていない。そこで我々は dose escalating method で SC34 および SC34EK に対する耐性ウイルスを誘導し、詳細に耐性化のメカニズムを解析した。その結果、多くのアミノ酸変異が gp41 領域内に導入された。続いてそれぞれのアミノ酸変異が耐性化にどの程度寄与するかを確認したところ、単一のアミノ酸置換では薬剤感受性に大きな変化は与えなかった。一方、同定されたアミノ酸変異全てを導入した変異体は高度耐性化を示した。この結果は、SC34 および SC34EK に対する耐性化には単独のアミノ酸変異だけでは不十分であり、多くのアミノ酸置換の蓄積が耐性化には必要であることを示

している。

これまでのペプチド創製では、多数のアミノ酸を変更する必要があった。我々が以前報告した SC34EK や T-20EK では HR1 との相互作用にとって必要ではない溶媒接触面のアミノ酸残基をグルタミン酸 (E) とリジン (K) に置換させている。これらの置換は C34 のアミノ酸配列の i と i+4 の位置にあり、それにより XEEXXKK(X は置換されていないアミノ酸)モチーフの繰り返しとなっている。SC34EK は 2 個の完全な XEEXXKK モチーフと 3 個の不完全な XEEXXKK モチーフを持ち、元の配列である C34 と比べて抗 HIV-1 活性が増強されていた。この活性増加の理由として α -helicity の強化が挙げられる。実際 CD 解析により HR1 との結合安定性の増大が認められ、一方で、耐性誘導により得られた変異を HR2 に導入すると親和性が低下することから、SC34 および SC34EK の耐性化には HR1:HR2 の結合親和性の低下が一つの要因として考えられた。

E. 結論

本年度、SC34 および SC34EK の耐性獲得機序を明らかにした。これらの薬剤に対する耐性は多くのアミノ酸置換の蓄積が必要であることがわかり、耐性獲得には比較的時間がかかると推測される。また、単一のアミノ酸置換で高度耐性化を示す T-20 とは耐性プロファイルは異なっていた。融合阻害剤に対する耐性獲得機序を詳細に解析することにより、さらに genetic barrier の高い薬剤の開発に繋がることが期待される。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Izumi K, Kodama E, Shimura K, Sakagami Y, Watanabe K, Ito S, Watabe T, Terakawa Y, Nishikawa H, Sarafianos S. G, Kitaura K, Oishi S, Fujii N, Matsuoka M. Design of peptide-based inhibitors of HIV-1 strains resistant to T-20. *J. Biol. Chem.*

- 284(8): 4914-4920, (2009).
2. Ueno M, Kodama E.N, Shimura, K, Sakurai Y, Kajiwara K, Sakagami, Y, Oishi S, Fujii N, Matsuoka M. Synonymous mutations in stem-loop III of Rev responsive elements enhance HIV-1 replication impaired by primary mutations for resistance to enfuvirtide. **Antiviral Res.** 82(1): 67-72, (2009).
 3. Naito T, Izumi K, Kodama E, Sakagami Y, Kajiwara K, Nishikawa H, Watanabe K, Sarafianos S.G, Oishi S, Fujii N, Matsuoka M. SC29EK, a peptide fusion inhibitor with enhanced α -helicity, inhibits replication of human immunodeficiency virus type 1 mutants resistant to enfuvirtide. **Antimicrob. Agents Chemother.** 53(3): 1013-1018, (2009).
 4. Michailidis E, Marchand B, Kodama EN, Singh K, Matsuoka M, Kirby KA, Ryan EM, Sawani AM, Nagy E, Ashida N, Mitsuya H, Parniak MA, Sarafianos SG. Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by 4'-ethynyl-2'-fluoro-2'-deoxyadenosine triphosphate, a translocation defective reverse transcriptase inhibitor. **J. Biol. Chem.** 284:35681-32691,(2009).
 5. Nishikawa H, Nakamura S, Kodama E, Ito S, Kajiwara K, Izumi K, Sakagami Y, Oishi S, Ohkubo T, Kobayashi Y, Otaka A, Fujii N, Matsuoka M. Electrostatically constrained alpha-helical peptide inhibits replication of HIV-1 resistant to enfuvirtide. **Int J Biochem Cell Biol.** 41(4): 891-899, (2009).
 6. Hachiya A, Shimane K, Sarafianos SG, Kodama EN, Sakagami Y, Negishi F, Koizumi H, Gatanaga H, Matsuoka M, Takiguchi M, Oka S. Clinical relevance of substitutions in the connection subdomain and RNase H domain of HIV-1 reverse transcriptase from a cohort of antiretroviral treatment-naïve patients. **Antiviral Res** 82(3): 115-121, (2009).
 7. Zhao T, Yasunaga J, Satou Y, Nakao M, Takahashi M, Fujii M, Matsuoka M. Human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor selectively suppresses the classical pathway of NF- κ B. **Blood.** 113(12): 2755-2764, (2009).
 8. Takahata M, Inoue Y, Tsuda H, Imoto I, Koinuma D, Hayashi M, Ichikura T, Yamori T, Nagasaki K, Yoshida M, Matsuoka M, Morishita K, Yuki K, Hanyu A, Miyazawa K, Inazawa J, Miyazono K, Imamura T. SKI and MEL1 cooperate to inhibit transforming growth factor- β signal in gastric cancer cells. **J Biol Chem** 284: 3334-3344,(2009).
 9. Saito M, Matsuzaki T, Satou Y, Yasunaga J-I, Saito K, Arimura K, Matsuoka M, Ohara Y. In vivo expression of the HBZ gene of HTLV-1 correlates with proviral load, inflammatory markers and disease severity in HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). **Retrovirology** 6:19, (2009).
 10. Oishi S, Ito S, Nishikawa H, Tanaka M, Ohno H, Otaka A, Izumi K, Kodama E, Matsuoka M, Fujii N. Development of a novel fusion inhibitor against T-20-resistant HIV-1. **Adv Exp Med Biol** 611:389-91, (2009).
 11. Oishi S, Kamitani H, Koder Y, Watanabe K, Kobayashi K, Narumi T, Tomita K, Ohno H, Naito T, Kodama E, Matsuoka M, Fujii N. Peptide bond mimicry by (E)-alkene and (Z)-fluoroalkene peptide isosteres: synthesis and bioevaluation of alpha-helical anti-HIV peptide analogues. **Org Biomol Chem** 7: 2872-7, (2009).
 12. Oishi S, Koder Y, Nishikawa H, Kamitani H, Watabe T, Ohno H, Tochikura T, Shimane K, Kodama E,

- Matsuoka M, Mizukoshi F, Tsujimoto H, Fujii N. Design and synthesis of membrane fusion inhibitors against the feline immunodeficiency virus. **Bioorg Med Chem** 17: 4916-4920, (2009).
13. Watabe T, Terakawa Y, Watanabe K, Ohno H, Nakano H, Nakatsu T, Kato H, Izumi K, Kodama E, Matsuoka M, Kitaura K, Oishi S, Fujii N. X-ray crystallographic study of an HIV-1 fusion inhibitor with the gp41 S138A substitution. **J Mol Biol.** 392: 657-665, (2009).
 14. Kajiwaru K, Watanabe K, Tokiwa R, Kurose T, Ohno H, Tsutsumi H, Hata Y, Izumi K, Kodama E, Matsuoka M, Oishi S, Fujii N. Bioorganic synthesis of a recombinant HIV-1 fusion inhibitor, SC35EK, with an N-terminal pyroglutamate capping group. **Bioorg Med Chem.** 17: 7964-7970, (2009).
 15. Tanaka M, Kajiwaru K, Tokiwa R, Watanabe K, Ohno H, Tsutsumi H, Hata Y, Izumi K, Kodama E, Matsuoka M, Oishi S, Fujii N. Bioorganic synthesis of end-capped anti-HIV peptides by simultaneous cyanocysteine-mediated cleavages of recombinant proteins. **Bioorg Med Chem.** 17: 7487-7492, (2009).
- ## 2. 学会発表
1. Matsuoka M. The Roles of HTLV-1 bZIP Factor Gene in Oncogenesis. The 14th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and related retroviruses. Salvador, Brazil, July 1-4, 2009.
 2. Zhao T, Yasunaga J, Fuji M, Matsuoka M, Nakao M. HTLV-1 bZIP factor selectively suppresses the classical pathway of NF- κ B. The 16th East Asia Joint Conference on Biomedical Research. Kyoto, Japan. September, 13-14, 2009.
 3. 松岡雅雄: ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型の病原性発現機構: 第 49 回日本リンパ網内系学会総会、兵庫県淡路市、2009 年 7 月 9-11 日
 4. 松岡雅雄: ヒト T 細胞白血病ウイルスによる病原性発現機構: 第 7 回 HAM 治療研究会、大阪、2009 年 7 月 31 日
 5. 松岡雅雄: ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型による病原性発現機構: 第 76 回発生工学・疾患モデル研究会例会、東京、2009 年 9 月 17 日
 6. 松岡雅雄: HTLV-1 bZIP factor 遺伝子による発がん機構: 第 68 回日本癌学会学術総会、横浜、2009 年 10 月 1-3 日
 7. 萩屋啓太、佐藤賢文、安永純一郎、松岡雅雄: ATF3 は HTLV-1 bZIP factor と相互作用し、ATL 細胞の増殖に寄与する: 第 68 回日本癌学会学術総会、横浜、2009 年 10 月 1-3 日
 8. 松岡雅雄: ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型による発がん: 第 14 回遺伝子実験施設セミナー、熊本、2009 年 10 月 16 日
 9. 佐藤賢文、安永純一郎、吉田美香、宮里パオラ、趙鉄軍、高井健、清水桂、大島孝一、山口智之、小野昌弘、坂口志文、松岡雅雄: HTLV-1 bZIP Factor (HBZ) 遺伝子トランスジェニックマウスは慢性炎症疾患、T 細胞リンパ腫を発症する: 第 71 回日本血液学会学術集会、京都、2009 年 10 月 23-25 日
 10. 櫻井康晃、小松賢志、上松一永、松岡雅雄: レトロウイルス感染における DNA 修復酵素の新たな役割: 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月 25-27 日
 11. 菅田謙治、佐藤賢文、原英樹、光山正雄、松岡雅雄: CD4 陽性 T 細胞での HBZ 発現は IFN- γ 産生を抑制し、Listeria monocytogenes 感染に対する細胞性免疫を障害する: 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月 25-27 日
 12. 田口奈々絵、佐藤賢文、Paola Miyazato、片桐晃子、木梨達雄、松岡雅雄: HTLV-1

bZIP factor トランスジェニックマウスにおける炎症性疾患の解析：第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月 25-27 日

13. 櫻井康晃、小松賢志、上松一永、松岡雅雄：HIV 感染過程における DNA 修復酵素の役割：第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会、名古屋、2009 年 11 月 26 日-28 日
14. 佐藤賢文、MIYAZATO Paola、山口智之、小野昌弘、坂口志文、松岡雅雄：HTLV-1 bZIP Factor(HBZ)遺伝子トランスジェニックマウスは Foxp3+制御性 T 細胞の機能及びホメオスタシスの異常を示し、慢性炎症疾患、T 細胞リンパ腫を発症する：第 39 回日本免疫学会総会・学術集会、大阪、2009 年 12 月 2 日-4 日
15. 松岡雅雄：HTLV-1 は何故、病気を起こすのか：平成 21 年度文部科学省特別教育経費「研究推進（大学間連携経費）」HTLV-1 関連疾患に対する発症予防と治療法確立に関する研究（研究成果発表会および一般向け講演会）、鹿児島、2010 年 1 月 22 日
16. Matsuoka M. Molecular mechanisms of oncogenesis by human T-cell leukemia virus type 1: T-CELL LYMPHOMA FORUM. Maui, Hawaii, January 28-30,2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

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

HIV-1 の中和抵抗性メカニズムの解明とその克服に関する基礎研究

研究分担者 松下修三 熊本大学エイズ学研究センター 教授

研究要旨：

HIV-1 慢性感染症例では、エンベロープ (Env) 領域のアミノ酸変異や糖鎖 (glycan) 挿入が経過とともに蓄積することが知られているが、これらが中和抗体逃避にどのような役割を果たしているか明らかではなかった。我々は、*in vitro* で中和抗体逃避ウイルスを誘導し、変異と耐性の関連を詳細に検討した。抗 V3 中和単クローン抗体 KD-247 からの中和逃避において、抗体が比較的低濃度のときは、Env V3 に 319A を持つウイルスが、既存のレパートリーから選択され増殖し、抗体濃度が高くなると、中和エピトープ部位である V3-tip に新たな変異 (R315K) を持つウイルスが出現することが分かった。より高濃度の抗体存在下で培養を続けると、R315K に加えて V2 領域に糖鎖付加部位 (PNGS) の挿入変異が蓄積した。組換えウイルスを作製し、中和感受性及び増殖動態を比較検討した結果、R315K や PNGS 挿入は、単独では増殖能の低下を招いたが、C2 (240S) や V3 (F317L) 変異を伴うことにより、野生株と同等の増殖能を示した。V2 の PNGS 挿入は、単独では抗 V3 抗体に対して中和抵抗性を示さなかったが、高濃度の中和抗体存在下では V3 変異と同時に存在することで高度耐性能を付与することがわかった。これらの結果は、HIV-1 が複製能と耐性のバランスをとりながらエンベロープ領域の特定の変異や挿入を獲得し、それらを維持したまま、感染を継続することを示唆する。

A. 研究目的

HIV-1 に対する中和抗体は、急性感染期にはウイルスの強力な選択圧になっていると報告されている。一方、慢性感染期では、ほとんどの症例で自己由来のウイルスを中和できない。これは、中和エスケープ変異株の蓄積によるものと考えられ、多くの臨床分離株が中和抵抗性であることに一致している。しかし、そのメカニズムに関しては十分解明されないままである。中和抗体を用いた治療法の開発に関しても、有効なワクチンの開発においても、この中和抵抗性メカニズムの解明が必要不可欠である。我々は、臨床試験中の抗 V3 単クローン抗体 KD-247 ばかりでなく、臨床分離株にも有効な中和単クローン抗体のパネルを作成した。また、技術的問題でこれまでほとんど報告のなかった、R5 臨床分離株の中和逃避変異株を、標的細胞の工夫などによって、次々と作成することが可能となった。本研究では、これらの新規技術を用いて、実際に臨床分離株がどのようにして中和抵抗性を獲得するのかを解明し、これを克服する戦略を開発することを目的とする。

B. 研究方法

中和抗体逃避ウイルスの誘導及び耐性関連変異の同定

T細胞株のPM1/CCR5細胞に、CCR5指向性 (R5)ウイルス HIV-1_{BaL} を感染させ、KD-247の濃度を段階的に上げることでKD-247抵抗性ウイルスを誘導した。具体的には、KD-247とHIV-1_{BaL} (500 TCID₅₀)を30分間反応させ、 4×10^4 のPM1/CCR5に曝露し5時間感染させた。その後、上清を取り除き、沈殿した細胞を培地に懸濁し、培養フラスコにて37°Cで培養した。感染細胞よりプロウイルスDNAを分離し、シーケンス解析に用いた。上清ウイルスは、中和感受性試験に用いた。得られた耐性ウイルスのgp120領域のシーケンスを行い、中和逃避に関与する変異部位を同定した。また、これらの変異を持つ組み換えウイルスを作製し、中和感受性や複製能に与える影響を調べた。培養細胞から、プロウイルスDNAを精製した。得られたDNAを鋳型にして、以下に示すプライマーを用い、Nested PCR法にてgp120のC1-C4領域を増幅させた。

1st step: 1B (5'-AGAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAA TGA-3')

H (5'-TAGTGCTTCCTGCTGCTCCCAAGAACCC-3')

2nd step: 2B (5'-AGCAGAAGACAGTGGCAATGAGATGA-3')

F (5'-ATATAATTCACCTTCTCCAATTGTCCTCAT-3')

増幅して得られたgp120 C1-C4領域DNA断片のシーケンスを行った。耐性誘導で得られた培養上清ウイル

スの中和感受性試験は、300TCID₅₀のvirusについて、TZM-bl細胞を標的として行った。

変異エンベロープタンパク (Env) 発現ベクターの作成

培養細胞から、プロウイルスDNAを精製した。得られたDNAを鋳型にして、LA *taq* (Takara) と以下に示すプライマーを用い、HIV-1_{BaL}のgp160領域を増幅した。

ENVA (5'-GGCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGA-3')、

ENVN (5'-CTGCCAATCAGGGAAGTAGCCTTGTGT-3')。

増幅して得られたDNA断片は、pCR-XL-TOPO vector (Invitrogen) に挿入し、クローニングを行った。個々のクローンについて、

M13 Reverse (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3')、

M13(-20)Forward (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3')、

Env003A (5'-AGcAGAAGAcAGTGGcAATG-3')、

EnvF02 (5'-ATGGTAGAACAGATGCATGA-3')、

EB2 (5'-TCAACTCAACTGCTGTAAAT-3')、

EC2F (5'-CCTCAGGAGGGGACCCAGAAATT-3')、

EnvF03 (5'-TAGCACCCACCAGGGCAAAGA-3')、

Nef005B (5'-TTTGACCACTTGCCACCC-3')

をプライマーとし、BigDye Terminatorを用いてシーケンスを行った。pCR-XL-BaL-WTは、HIV-1_{BaL} (0) p0のenvの配列でもっとも頻度が高いものを選んだ。Envに変異を持つキメラウイルスは、HIV-1_{BaL} (200) p5 (pCR-XL-BaL-p5) やHIV-1_{BaL} (1000) p13 (pCR-XL-BaL-p13) の最も出現頻度の高いクローンを用いて、pCR-XL-BaL-WTのgp120上の共通制限酵素部位 (*NdeI*, *StuI* and *ScaI*) を利用し、それらの部位を組み換えることで作製した。

pseudotype virusの作製とSingle-round中和実験

前日に準備した293T細胞に、pSG3^{env}、各エンベロープ発現ベクター (pCXN₂) およびpRSV-Revベクターをトランスフェクトし、24-36時間後に上清を回収した。シュードウイルスの力価 (TCID₅₀) はTZM-bl細胞を用いたβ-ガラクトシダーゼ定量システムを用いて定量した。300TCID₅₀のウイルスと各濃度の抗体や薬剤を混合し、30分間preincubationした後TZM-bl細胞を加え、37°C、5% CO₂にて2日間培養した。中和活性は、Galacto-Star (Applied Biosystems)を用い、 $\{1-(t-c)/(n-c)\} \times 100$ (t; サンプルの蛍光強度、c; 細胞のみのバックグラウンド蛍光強度、n; 抗体無しサンプルの蛍光強度) で計算した。

pWT/BaL envキメラ感染性ウイルスの作製とウイルス複製動態解析

キメラのプロウイルスは、pWT/BaLプロウイルスプラスミドに変異株のエンベロープ部をサブクローニング

することによって作成した。3×10⁴個のPM1/CCR5細胞と10ngのp24量に相当するpWT/BaLキメラウイルスを混ぜ、37°Cで4時間培養した。培養後、遠心分離して上清を取り除いた。3mlの10%FCSを含んだRPMI1640に再懸濁し、12 well plate (Falcon) にて6日間培養した。ウイルス増殖はp24抗原量を測定することにより比べた。

(倫理面への配慮)

本年度の研究には該当しない。米国NIHのARRRPより供給されたウイルスを用いて単クローン抗体での選択を行った結果である。

C. 研究結果

1. CCR5指向性 (R5ウイルス) HIV-1_{BaL}を用いたKD-247耐性誘導実験

PM1/CCR5細胞にHIV-1_{BaL}を感染させる実験系で、段階的にKD-247の濃度を上げることでKD-247耐性ウイルスを誘導した。コントロールとして、PM1/CCR5細胞で長期培養することで起こるウイルスの遺伝子変化を確認するために、KD-247非存在下でHIV-1_{BaL}株を培養した。(passage control)。耐性ウイルス誘導は、5 μg/mlのKD-247からスタートした。合胞体形成が十分に確認された後、段階的に濃度を上げていき、最終的にはKD-247濃度を2000 μg/mlまで上げた。5パッセージ (以下HIV-1_{BaL} (200) p5) は、KD-247濃度200 μg/mlで増殖したウイルスを示す。我々は、コントロールウイルスHIV-1_{BaL} (0) p0とHIV-1_{BaL} (0) p10と、耐性誘導で得られた6点の上清 (p2, p5, p6, p7, p10, p16) を回収し、KD-247の感受性を評価した。HIV-1_{BaL} (0) p0、HIV-1_{BaL} (200) p5、HIV-1_{BaL} (300) p6とHIV-1_{BaL} (2000) p16のKD-247のIC₅₀値はそれぞれ、0.32±0.20 μg/ml、5.68±1.48 μg/ml、>100 μg/mlと>100 μg/mlとなった。これらの結果は、in vitroでの耐性誘導でHIV-1_{BaL}が耐性を獲得したことを示す。今回の耐性誘導では、5パッセージ目で中程度耐性ウイルスが誘導でき、6パッセージ以降、高度耐性ウイルスが誘導された。

2. 耐性ウイルス株のenv領域のシーケンス解析

HIV-1_{BaL}のKD-247耐性に関与している遺伝子を決定するために、感染細胞のプロウイルスをDNA抽出し、env遺伝子のC1からC4まで増幅した。得られたPCR産物をクローニングし、シーケンス解析を行った。中程度のKD-247耐性が得られた5パッセージまでは、V3領域の319番目にアラニン (A) を持つウイルス (319A) が主にみられるようになった (95%)。319Aのウイルスは、スタート時HIV

-1_{BaL}ですで見られるウイルスであった (37.7 %)。しかし、KD-247の濃度を上げていくと、319Aの頻度は徐々に減少した。この結果から、KD-247の低濃度存在下では、すでに存在しているウイルスの中から、抗V3抗体に対し耐性の傾向をもつウイルス株が選択されて出現したことが示唆された。

KD-247 300 µg/ml存在下で培養した6パッセージ目で、V2領域の186番目にPNGSの挿入とgp120のV3-tipのアミノ酸置換 (R315K) が見られた。6パッセージ以降、V2とV3の変化の割合は徐々に増加した。スタート時のHIV-1_{BaL}のウイルスのレパートリーの中にV2のPNGSの挿入が見られるかを確認するために、61クローンのgp120領域のシーケンス解析を行ったが、186番目にPNGSを持つウイルスは見られなかった。Los Alamos databaseでいくつか報告されているHIV-1_{BaL}のenv領域の中には、V2の186番目にPNGSを持つものが存在することから、抗体などプレッシャーがないin vitroで長期間培養が繰り返されたこと等により、V2の186番目にPNGSを持たないウイルスが増殖した可能性がある。5パッセージ目で見られた319Aを持つウイルスのKD-247の耐性メカニズムを確認するために、我々は、SwissPdb Viewer program version 3.9 (SPdbViewer) とViewerLite version 5.0 (Accelrys Inc., San Diego, CA, USA) を用いて、V3の構造のシミュレーションを行った。V3を含むgp120の結晶構造の分子モデルは、Protein Data Bank (PDB) (accession number: 2B4C)を用いた。5パッセージ目で見られた315R/317F/319Aの315番目のアルギニン (R)の側鎖は、野生株で見られる315R/317F/319Tと比較すると、C末端側に折れ曲がった構造をとり、KD-247がエピトープ部にアクセスしにくい構造になっている可能性がある。

3. KD-247耐性のHIV-1_{BaL}エンベロープを持つシュードタイプウイルスの中和感受性

KD-247耐性に寄与するアミノ酸変異部位を決定するために、我々は、HIV-1_{BaL} (200) p5 (BaL-STA) とHIV-1_{BaL} (1000) p13 (BaL-PNSG/SKLとBaL-SKL)のエンベロープを用いてシュードタイプウイルスを作成した。KD-247のエピトープであるV3-tipに変異を持つシュードウイルス (BaL-SKLとBaL-PNSG/SKL) は、KD-247に対し高度耐性を示した (それぞれ、BaL-WTに対し>2500 と >5500倍耐性)。一方、5パッセージで確認された、C2とV3変異を持つシュードウイルス (BaL-STA) は、BaL-WTと比較して、約25倍以上耐性を示した。一方、V2にPNGS挿入のみをもつシュードウイルス (BaL-PNGS) は、KD-247に対し、BaL-WTとほぼ同じ中和感

受性を保持していた。これらの結果は、PNGS挿入単独ではKD-247に対し耐性にはならないが、V3-tipの変異と同時に存在することで、V3-tip変異単独よりも、より強いKD-247耐性を持つことが示唆された。

中和抗体により誘導された耐性ウイルスは、侵入阻害剤や他の部位にエピトープを持つ中和抗体の感受性に影響を与えることが報告されている。そこで、我々は、CCR5阻害剤のmaraviroc (MVC) と、rsCD4や2D7 (抗CCR5抗体) を用いて、同じようにシュードウイルスの感受性を評価したが、これらの侵入阻害剤に対するIC₅₀はBaL-WTと比較してほぼ同等であった。

4. 変異エンベロープを持つ感染性クローンウイルスの複製動態解析

V2のPNGS挿入単独では、KD-247の感受性に影響を与えなかったことから、なぜ抗V3-MAb高濃度存在下でエピトープ部のV3-tip変異に加えてV2にPNGSの挿入の頻度が増加したのか明らかではない。中和耐性誘導の過程で得られたPNGS挿入の役割を明らかにするために、我々は、V2のPNGS挿入やC2、V3変異を持つ感染性クローンウイルスを作製した。キメラウイルス (pBaL-WT、pBaL-STA、pBaL-PNSG/SKL、pBaL-SKL) は耐性誘導で得られたHIV-1_{BaL}エンベロープを組み換えた後、pWT/BaLのenv領域に挿入した。その他のウイルスは、点突然変異法を用いて作製した。こうして作製された複製能力を持つクローンウイルスは、HX-BaL-Xsとした (例; HX-BaL-WT、HX-BaL-PNSG/SKLなど)。これらのKD-247耐性をエンベロープに持つ感染性クローンウイルスを用いて、我々は、KD-247非存在下でウイルスの複製動態を比較した。PNGS挿入単独のウイルス (HX-BaL-PNSG) は、野生株HX-BaL-WTと比較して6日目のp24量が明らかに低かった。一方、V2のPNGSの挿入に加え、C2とV3に変異を持つウイルスは、感染6日目の時点で、HX-BaL-WT やHX-BaL-PNSG/SKLとほぼ同等の複製能力を持っていた。次に、KD-247低、中および高濃度存在下でウイルスの複製動態を確認した。感染6日目で、高濃度KD-247存在下 (2000 µg/ml) では、V2のPNGS挿入とV3変異の両方を持つウイルス (HX-BaL-PNSG/SKL) は、V2挿入を持たないウイルス (HX-BaL-SKL) よりも複製能力が高かった。また、低濃度KD-247存在下 (5 µg/ml) では、PNGS挿入単独が、野生株よりも複製能力が高かった。一方、中濃度存在下 (50µg/ml) で両者を比較すると、複製能力に差はなかった。これらの結果から、KD-247低濃度存在下で選択されたV2のPNGS挿入