

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、脂肪細胞分化培地の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。抗HIVプロテアーゼ阻害薬であるlopinavir、darunavirを48時間処理し、インスリンにて刺激した。刺激後のPTP1Bの発現をウェスタンブロット法にて解析した。

(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。

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PTP1Bの発現の変化をウェスタンブロット法で比較した。PTP1Bはlopinavir、darunavirによる前処理により、無処理と比較し、発現の亢進を認めた。プロテアーゼ阻害薬の処理した細胞、無処理の細胞ともに、インスリン刺激の有無によってPTP1Bの発現の変化は認めなかった(図1)。

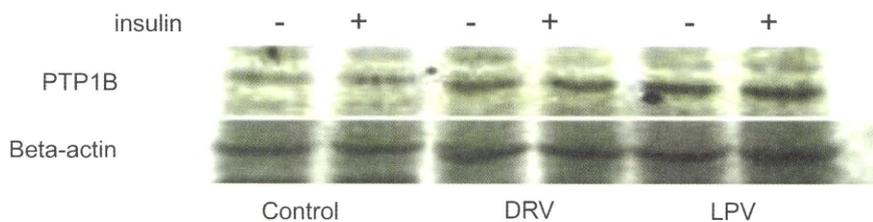


図1 プロテアーゼ阻害薬によるインスリン刺激後のPTP1Bの発現の変化

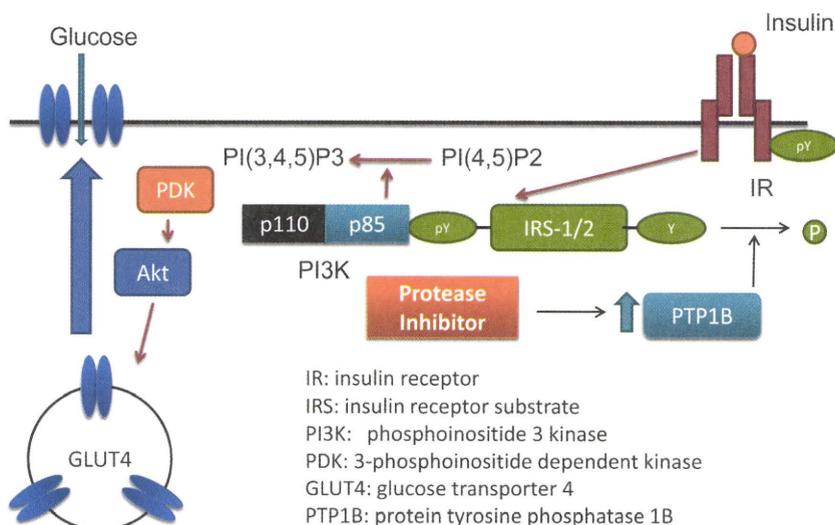


図2 プロテアーゼ阻害薬によるインスリン刺激後のGLUT4の局在の変化

D. 考察

分化脂肪細胞を用いた本研究において、プロテアーゼ阻害薬がIRS1リン酸化の抑制する作用点の解明のために脱リン酸化の機序に注目した結果、IRS1の脱リン酸化酵素であるPTP1Bの発現が亢進しているという結果が示された(図1)。昨年度の報告としてプロテアーゼ阻害薬がIRS1のTyrリン酸化を抑制する点、GLUT4の細胞膜移行性を抑制する点を合わせて検討すると、PTP1Bの発現が下流のインスリンシグナル伝達系を制御している可能性が示唆される(図2)。また薬剤間でのプロテアーゼ阻害薬でのIRS1のリン酸化抑制、インスリン抵抗性の相違を反映した程度で発現に差を認めており、臨床的事実とも合致していた。PTP1Bの制御は糖尿病治療においてもターゲットとして以前より注目されてはいるが、現時点では臨床応用の段階に至っていないのが実状である。プロテアーゼ阻害薬によるPTP1Bの発現亢進が明らかにされたことは、プロテアーゼ阻害薬服用しているHIV感染者の糖尿病の治療にとどまらず、糖尿病治療の新展開を推進させる上でも有益であろうと推察される。現在、基礎的研究から明らかであるPTP1B阻害薬を前処理することで、インスリン抵抗性が制御することができるのか、解析をすすめている。

今回複数のプロテアーゼ阻害薬を研究材料として検討したことにより、従来から指摘されていた、強いインスリン抵抗性の誘導作用を有する lopinavir が、インスリンシグナル伝達系の強い抑制作用を有することが *in vitro* の解析でも明らかとなった。インテグラーゼ阻害薬、CCR5 阻害薬など新規 HIV 治療薬が導入され、多剤併用療法の組み合わせも見直される方向性が高まっているが、プロテアーゼ阻害薬は今後も中心的薬剤の一つとして使用されていくことが予想され、長期使用において忍容されるプロテアーゼ阻害薬の開発は、HIV 薬開発上の重要なテーマと思われる。今後はプロテアーゼ阻害薬による PTP1B 発現の亢進機構についてさらに解析をすすめていく。

E. 結論

プロテアーゼ阻害薬による脂肪細胞のインスリンシグナル伝達系の抑制において、PTP1B の発現が亢進することで、IRS1 の脱リン酸化が亢進するという分子機序が示され、プロテアーゼ阻害薬間でのインスリン抵抗性低下の程度の相違を生じている原因となっている可能性が示唆された。

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, Kamimura M, Tatsuno K, Ota Y, Yotsuyanagi H. *Pseudomonas putida* bacteremia in adult patients: five case reports and a review of the literature. *J Infect Chemother*. 2010 Sep 1. *in press*.
- 2) 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.
- 3) 太田康男、古賀一郎. わが国および帝京大学医学部附属病院における HIV 感染症例の現状. *帝京医学雑誌* 33 巻 4 号 219-224、2010

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) Kamimura, M., Kitazawa, T., Yoshino, Y., Tatsuno, K., and Ota, Y. Delayed removal of catheter deteriorates clinical outcome in patients with catheter-related bloodstream infection due to coagulase-negative staphylococcus. 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. April 10-13, 2010, Vienna.
- 4) 古賀一郎、松永直久、北沢貴利、太田康男. HAART 導入後患者における骨塩量の低下と測定部位別の傾向 第24回日本エイズ学会 (2010年11月24~26日、東京) (日本エイズ学会誌12巻4号 457)
- 5) 服部純子、椎野禎一郎、湯永博之、林田庸総、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、加藤真吾、藤井毅、岩本愛吉、西澤雅子、仲宗根正、岡慎一、伊部史朗、横幕能行、上田幹夫、大家正義、田邊嘉也、渡辺香奈子、渡邊大、白阪琢磨、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、杉浦互. 最近の話題 2003~2009年の新規 HIV/AIDS 診断症例における薬剤耐性頻度の動向、第24回日本エイズ学会 (2010年11月24~26日、東京) (日本エイズ学会誌12巻4号 330)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(なし)



融合阻害薬・インテグラーゼ阻害薬の *in vitro* 研究

研究分担者

児玉 栄一 東北大学病院 内科・感染症科 助教

研究要旨

SC34EKはグルタミン酸とリジン（EとK）を結合に関与しない溶媒面に配置することでヘリックス性を向上させたペプチド性HIV融合阻害剤である。このEKモチーフを導入したペプチド誘導体は融合阻害剤enfuvirtide（T-20）耐性HIVの複製を抑制する。このペプチドに対してHIVが耐性をどのように獲得するか、dose escalating法で検討した。得られた耐性ウイルスのgp41領域には10を超える変異が導入されていたが、個々の変異のみでは耐性を示さなかった。またEKの向きを一か所変えたSC34で耐性が交差しないことも明らかとした。本研究によって耐性獲得抵抗性を有するペプチドデザインに重要な情報を得た。これらの知見をRevに対するペプチド性アンタゴニストの創製に応用した。このペプチドはRev活性を低下させるだけでなく、レセプターの一つであるCXCR4結合阻害や感染性も低下させ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HIV剤を多剤併用することにより、HIV感染症のコントロールは飛躍的に改善されてきている。しかし、HIV感染細胞の完全な排除は実現されておらず、長期にわたる維持治療が必要である。治療による副作用だけでなく、わずかながらのウイルス複製から引き起こされる耐性獲得は治療成績を大きく低下させる。さらにHIVは個々の薬剤に対してだけでなく、他の同クラスの薬剤に対しても交差耐性を獲得することもあり、このような耐性株の出現は治療を困難とさせる。

このため、これまでの治療標的に対する新薬開発にとどまらず、新しい標的に対する薬剤の開発が進められている。事実、新規カテゴリーの薬剤、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や本邦で開発され現在米国で臨床治験第Ⅲ相に進んでいるelvitegravirに対する耐性について解明した。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る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った。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。

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。

研究分担者は平成20年度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い、平成21年度はそれを応用した融合阻害剤T-20_{S138A}の開発と米国で臨床治験中のインテグラーゼ阻害剤elvitegravirについて報告した。平成22年度は、さらなるペプチド性の阻害剤への応用を試みた。

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) 抗ウイルス剤：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zal-citabine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。
- 6) HIVレセプターCXCR4の解析：宿主細胞表面におけるCXCR4発現は単クローン抗体12G5を用いて検討した。蛍光標識された12G5の結合性はサイトフローメーターにて検出した。

(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。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) ペプチドの静電作用を利用したペプチド融合阻害剤の開発

これまで欧米で報告されている主な融合阻害剤は主にgp41領域の変更もしくはアミノ酸配列を他のウ

イルス株から利用することで開発がおこなわれてきたが、T-20耐性ウイルスに対する効果はあまり芳しいものではなかった。そのため我々は、生理的アミノ酸配列をもつペプチドとしては最も効果の強いC34に注目して、有効なペプチド創製を試みた。

ヘリックス性を向上させることで活性が上がることは米国のグループが既に報告していたが、疎水性アミノ酸への置換が必要であった。またC34はもともと水溶性に乏しいことから、我々は逆に親水性アミノ酸をペプチド結合面ではなく、溶媒面に導入することを考えた。これだけではヘリックス性が向上しないため、酸性アミノ酸と塩基性アミノ酸を交互に配置させるような置換を行うことで、お互いに静電相互作用がおこり、それがヘリクスターンごとの安定性、つまりヘリックス性が向上すると考え、グルタミン酸 (E) とリジン (K) を2つずつ交互に配置するようにした (図1)。実際に抗ウイルス活性を測定してみるとT-20と比べ約50倍以上活性が上昇していた (表1)。ヘリックス性の向上も認められた。EKモチーフをすべて一方向にそろえたペプチドSC34EKと1ヶ所生理的な配列を残し、EKモチーフが逆になったSC34の2ペプチドを得た。

2) 耐性誘導

HIV-1_{NL4-3} を使用して、耐性誘導をdose escalating法で行った。SC34EKとSC34どちらの耐性誘導であっても約2年弱の培養によってようやく耐性HIVを誘導することが可能であった (図2)。最終的にはどちらも100倍を超える耐性が獲得されたが、興味深いことに交差耐性はわずかであった。耐性変異は関係が少ないと考えられたgp120領域にも導入されていた。gp41領域ではどちらのペプチドであっても10以上の変異が導入されていた。

3) 薬剤感受性

これらの変異を個別にgp41に導入して感受性を調

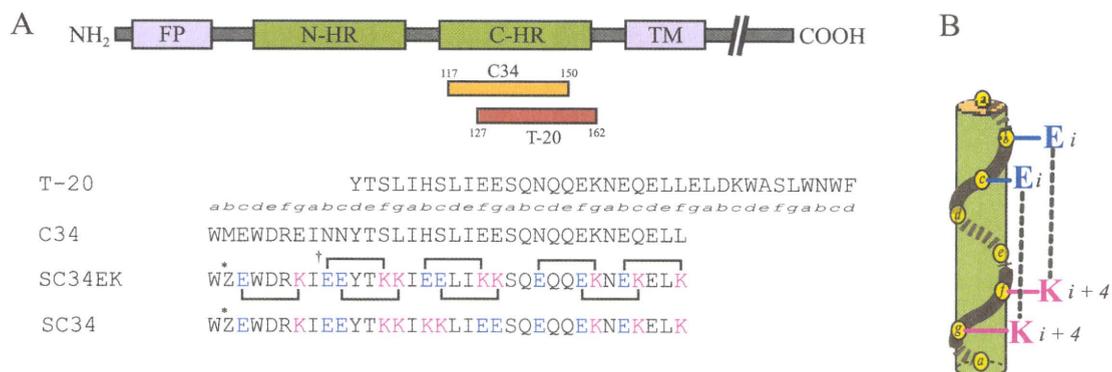


図1

べたが、どの変異を導入しても最大6倍程度の感受性変化しか起こさず、明らかに1次変異と考えられる変異は同定されなかった。よって高度耐性は変異

の蓄積によって引き起こされていることが考えられた。gp120領域の変異は感受性にはほとんど影響がなかった。

表1

Susceptibility of SC34-selected mutation-introduced env-recombinant viruses to fusion inhibitors^a

Mutation(s)	EC ₅₀ (nM)				
	ddC	T-20	C34	SC34	SC34EK
HIV-1 _{NL4-3} ^b	430 ± 121	20 ± 3	3.3 ± 0.6	1.4 ± 0.3	0.7 ± 0.4
Selection with SC34					
<i>gp41</i>					
A30V	213 ± 40 (0.5)	6.4 ± 2.2 (0.3)	7.2 ± 1.6 (2.2)	0.5 ± 0.2 (0.4)	0.8 ± 0.2 (1.1)
D36G	392 ± 93 (0.9)	1.0 ± 0.1 (0.05)	8.1 ± 3.4 (2.5)	0.6 ± 0.2 (0.4)	0.7 ± 0.2 (1.0)
I37K	287 ± 92 (0.7)	2,453 ± 873 (123)	23 ± 3 (7.0)	4.9 ± 0.6 (3.5)	1.0 ± 0.2 (1.4)
I37T	289 ± 30 (0.7)	166 ± 40 (8.3)	20 ± 5 (6.1)	2.3 ± 0.8 (1.6)	0.5 ± 0.1 (0.7)
R46K	572 ± 162 (1.3)	ND	1.3 ± 0.4 (0.4)	0.6 ± 0.1 (0.4)	1.9 ± 0.2 (2.7)
Q52R	415 ± 29 (1.0)	ND	2.9 ± 0.8 (0.9)	1.6 ± 0.5 (1.1)	1.5 ± 0.2 (2.1)
Q56R	300 ± 58 (0.7)	ND	28 ± 6 (8.5)	4.1 ± 1.0 (2.9)	1.0 ± 0.2 (1.4)
N126K	256 ± 18 (0.6)	27 ± 5 (1.4)	8.0 ± 2.9 (2.4)	1.3 ± 0.4 (0.9)	0.4 ± 0.1 (0.6)
S138A	210 ± 64 (0.5)	ND	4.0 ± 0.8 (1.2)	2.3 ± 0.8 (1.6)	0.8 ± 0.2 (1.1)
E151K	277 ± 16 (0.6)	ND	2.3 ± 0.6 (0.7)	1.1 ± 0.02 (0.8)	1.4 ± 0.4 (2.0)
K154N	529 ± 160 (1.2)	ND	2.1 ± 1.7 (0.6)	1.4 ± 0.5 (1.0)	0.4 ± 0.2 (0.6)
N163D	348 ± 33 (0.8)	ND	0.5 ± 0.1 (0.2)	2.5 ± 0.8 (1.8)	0.9 ± 0.7 (1.3)
L204I	226 ± 12 (0.5)	13 ± 4 (0.7)	3.9 ± 0.1 (1.2)	1.5 ± 0.3 (1.1)	0.6 ± 0.1 (0.9)
L210F	556 ± 162 (1.3)	ND	4.1 ± 1.7 (1.2)	0.6 ± 0.1 (0.4)	0.4 ± 0.04 (0.6)
SC34(P-122)gp41 ^c	329 ± 33 (0.8)	1,727 ± 255 (86)	24 ± 4 (7.3)	2,189 ± 287 (1,564)	23 ± 1 (33)
<i>gp120</i>					
SC34(P-122)gp120 ^d	339 ± 95 (0.8)	45 ± 2 (2.3)	0.8 ± 0.3 (0.2)	0.2 ± 0.03 (0.1)	0.2 ± 0.05 (0.3)
<i>gp160</i>					
SC34(P122)gp160 ^e	542 ± 68 (1.3)	>5,000 (>250)	>1,000 (>303)	2,827 ± 439 (2,019)	33 ± 4 (47)
Selection with SC34EK					
<i>gp41</i>					
D36G	392 ± 93 (0.9)	1.0 ± 0.1 (0.05)	8.1 ± 3.4 (2.5)	0.6 ± 0.2 (0.4)	0.7 ± 0.2 (1.0)
Q41R	259 ± 19 (0.6)	ND	125 ± 50 (38)	5.3 ± 0.4 (3.8)	2.3 ± 0.6 (3.3)
N43K	220 ± 5.0 (0.5)	278 ± 24 (14)	180 ± 54 (55)	2.7 ± 0.6 (1.9)	2.3 ± 0.8 (3.3)
A96D	255 ± 13 (0.6)	>1,000 (>50)	12 ± 1 (3.6)	2.8 ± 1.2 (2.0)	4.4 ± 0.9 (6.3)
N126K	256 ± 18 (0.6)	27 ± 5 (1.4)	8.0 ± 2.9 (2.4)	1.3 ± 0.4 (0.9)	0.4 ± 0.1 (0.6)
H132Y	394 ± 83 (0.9)	363 ± 70 (18)	3.6 ± 1.4 (1.1)	2.7 ± 1.3 (1.9)	3.4 ± 0.4 (4.9)
E151K	277 ± 16 (0.6)	ND	2.3 ± 0.6 (0.7)	1.1 ± 0.02 (0.8)	1.4 ± 0.4 (2.0)
V182I	686 ± 181 (1.6)	26 ± 8 (1.3)	4.5 ± 1.2 (1.4)	1.3 ± 0.3 (0.9)	0.7 ± 0.2 (1.0)
P203S	ND	ND	ND	ND	ND
L204I	226 ± 12 (0.5)	13 ± 4 (0.7)	3.9 ± 0.1 (1.2)	1.5 ± 0.3 (1.1)	0.6 ± 0.1 (0.9)
P203S/L204I	646 ± 208 (1.5)	23 ± 5 (1.2)	3.5 ± 0.1 (1.1)	1.6 ± 0.2 (1.1)	1.5 ± 0.2 (2.1)
S241F	420 ± 75 (1.0)	20 ± 3 (1.0)	6.3 ± 0.2 (1.9)	1.6 ± 0.3 (1.1)	0.6 ± 0.1 (0.9)
H258Q	381 ± 25 (0.9)	54 ± 19 (2.7)	13 ± 3 (3.9)	1.8 ± 0.4 (1.3)	0.7 ± 0.4 (1.0)
A312T	ND	ND	ND	ND	ND
H258Q/A312T	633 ± 140 (1.5)	28 ± 5 (1.4)	6.0 ± 0.7 (1.8)	1.3 ± 0.2 (0.9)	0.7 ± 0.2 (1.0)
SC34EK(P-120)gp41 ^f	536 ± 20 (1.2)	112 ± 38 (5.6)	70 ± 9 (21)	20 ± 1 (14)	75 ± 8 (107)
<i>gp120</i>					
SC34EK(P-120)gp120 ^g	399 ± 85 (0.9)	70 ± 16 (3.5)	1.4 ± 0.4 (0.4)	0.2 ± 0.03 (0.1)	0.3 ± 0.1 (0.4)
<i>gp160</i>					
SC34EK(P-120)gp160 ^h	344 ± 42 (0.8)	435 ± 139 (22)	378 ± 133 (115)	5.2 ± 0.5 (3.7)	72 ± 18 (103)

^a Anti-HIV activity was determined using MAGI assay.

Data is shown as means and standard deviations obtained from at least three independent experiments, and resistance (*n*-fold of the EC₅₀) of recombinant viruses, compared to that of parental HIV-1_{NL4-3}, is shown in parentheses. ND, not determined.

^b HIV-1_{NL4-3} was used as wild-type virus.

^c HIV-1_{SC34(P-122)gp41} contains D36G/I37K/R46K/Q52R/Q56R/N126K/S138A/E151K/K154N/N163D/L204I/L210F mutations in gp41-coding region.

^d HIV-1_{SC34(P-122)gp120} contains K107Q/S134N/S136G/F147L mutations in gp120-coding region.

^e HIV-1_{SC34(P-122)gp160} contains K107Q/S134N/S136G/F147L and

D36G/I37K/R46K/Q52R/Q56R/N126K/S138A/E151K/K154N/N163D/L204I/L210F mutations in gp120- and gp41-coding regions, respectively.

^f HIV-1_{SC34EK(P-120)gp41} contains D36G/Q41R/N43K/A96D/N126K/H132Y/V182I/P203S/L204I/S241F/H258Q/A312T mutations in gp41-coding region.

^g HIV-1_{SC34EK(P-120)gp120} contains V37A/V59I/S100K/S115N/R138S/D139N/A310T mutations in gp120-coding region.

^h HIV-1_{SC34EK(P-120)gp160} contains V37A/V59I/S100K/S115N/R138S/D139N/A310T and

D36G/Q41R/N43K/A96D/N126K/H132Y/V182I/P203S/L204I/S241F/H258Q/A312T mutations in gp120- and gp41-coding regions, respectively.

4) 複製能

gp41に導入されていた変異はHIVの複製能を低下させ、逆にgp120に導入されていた変異は複製能を回復させていた。これらのことから、gp120変異は感受性ではなく、複製能の改善目的に導入されたと考えられる(図3)。

5) Revペプチドによる抗HIV効果

Revの34-50番までのアミノ酸からなるペプチドにRevアンタゴニスト活性があることを見いだした(図4)。また、このペプチドで処理したウイルスの感染性を検討したところ、その感染性は減弱しており、p24で検討した結果よりもさらに効果を有する可能性が示唆された(表2)。

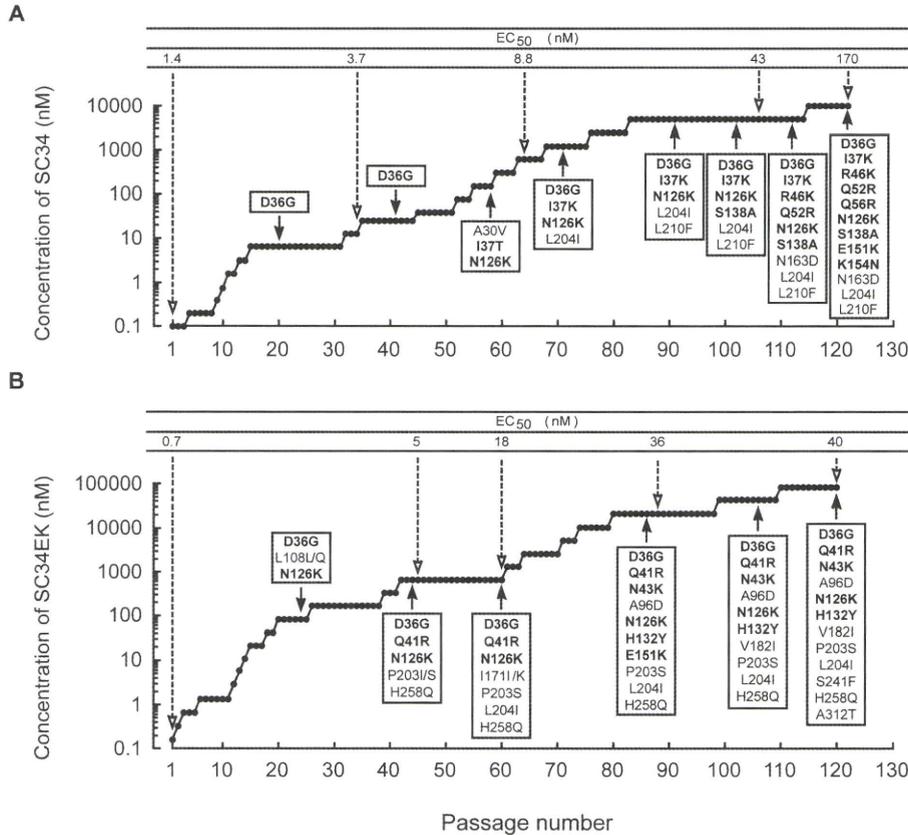


図2

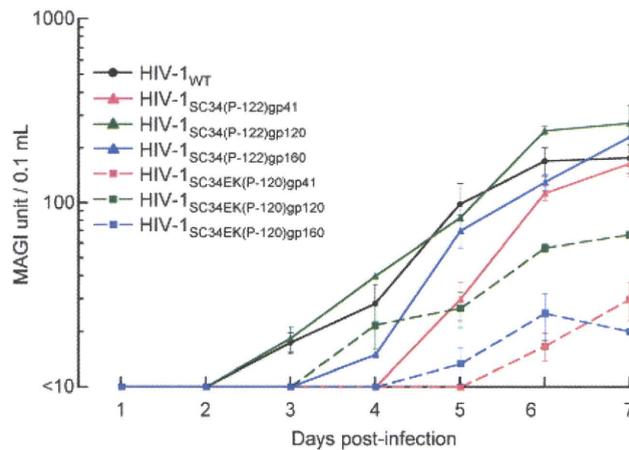
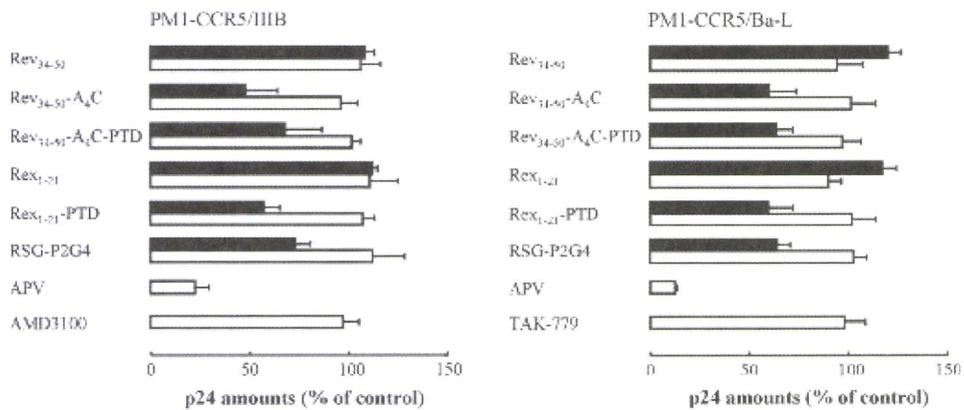


図3



Inhibitory effects of the peptides on p24 production from persistently HIV-1-infected PM1-CCR5 cells. PM1-CCR5 cells persistently infected with HIV-1_{111B} or HIV-1_{Ba-L} (PM1-CCR5/111B or PM1-CCR5/Ba-L cells, respectively) were washed and resuspended at 4×10^4 cells/ml with the peptides (black bars: 10 μ M; white bars: 1 μ M). APV as a positive control or AMD3100, TAK-779 or medium alone (control) as negative controls. After 48h, the amounts of viral p24 in the culture supernatants were measured. The results are expressed as the percentages of p24 relative to that of the control. The data represent the means \pm SD of three independent experiments.

図4

表2

Peptide effect on infectivity of HIV-1_{Ba-L}

Compound	% of non-treated control		Infectivity/p24
	Infectivity	p24	
Rev ₃₄₋₅₀	74 \pm 11	119 \pm 16	0.62
Rev ₃₄₋₅₀ -A ₄ C	24 \pm 1	67 \pm 8	0.36
Rex ₁₋₂₁	121 \pm 43	93 \pm 24	1.3
Rex ₁₋₂₁ -PTD	74 \pm 30	82 \pm 15	0.97
RSG-P2G4	72 \pm 32	92 \pm 5	0.78

Infectivity and amount of p24 in the supernatant of PM1-CCR5/Ba-L cells exposed to peptides (10 μ M) were determined by the MAGI assay and a commercially available p24 kit, respectively. Each value was normalized by that of simultaneously performed non-treated control as 100 %. Data represent the means \pm SD of three independent experiments.

6) RevペプチドのCXCR4のアンタゴニスト活性

Revペプチドはアルギニンが多く、過去の報告でアルギニンが6個以上まとまって導入されているペプチドは、細胞表面上のCXCR4に結合し、HIVの侵入を阻害することが報告されている。そのことから、Revペプチドにも同様の効果があるかをフローサイトメーターを用いて検討した。RevペプチドはCXCR4アンタゴニストのAMD3100と比較して約10倍程度活性は弱かったが、抗CXCR4抗体12G5の結合を阻害した(図5)。しかし、ウイルスの感染阻害効果という面では100倍程度活性が低下していた。

D. 考察

昨年まではT-20耐性ウイルスを解析し、その耐性獲得にはHIV RNA構造が重要であること、耐性変異が融合阻害剤のデザインに応用できること、新しいインテグラーゼ阻害剤elvitegravirの耐性変異などに関する研究を行ってきた。最終年度である本年度はこれまでに得られた知見をさらに応用し、新しい有効な阻害剤の開発、そして副作用が少なくなるようより特異的な標的へのシフトを試みた。

初めに、融合阻害剤ではペプチドの結合面には変化がないように溶媒面にグルタミン酸とリジンを配位したelectrically constrained EK motifを導入したことでペプチドのヘリックス性は非常に安定してい

た。そのため、T-20耐性ウイルスに見られるT-20のヘリックス性を損なわせ、結合力を失わせる変異の影響を全く受けない安定なN-HR結合性を維持したことが活性に貢献したと思われる。また水溶性に富んでおり、以前我々が報告したように血液中タンパクなどとの結合性が低いことから、実質有効薬剤として存在することが予想される。このことは、投与量の削減、投与部位の炎症などの副作用の低下につながり、医療上重要な問題点の解決にもつながろう。

耐性化に試験管内でも長期間を要し、さらに多くの変異を要することから、実際の感染患者内で容易に耐性株は出てこないと予想される。このことは長期に亘る安定的な投与につながり、耐性検査等のコスト削減にも有用である。またT-20_{S138A}同様に、SC34EK耐性変異を導入したペプチドに活性があったことから今後、不幸にも耐性ウイルスが出現してもその救済が比較的容易に行えると考えられる。さらに同様のアミノ酸配列を有するSC34とSC34EKに交差耐性が少ないことは今後のペプチドデザインを考えた上で重要な知見であり、この応用はペプチドデザインを容易にし、開発費のさらなる削減も期待しうる。

REVペプチドは未だ活性的には十分なものではないものの、新規標的をターゲットにしたものであり、今後の展開が期待される。本年度は融合阻害剤で培われた知見を応用し、有効なペプチドが合成できた。例えば、ヘリックス性を向上させるのに4個のアラニン付加、細胞透過性を増すためにHIV-Tatのアルギニンリッチドメインを追加、などその活性を増強させることが可能であった。Revペプチドで処理したウイルス粒子の感染性が低下していたことは特記

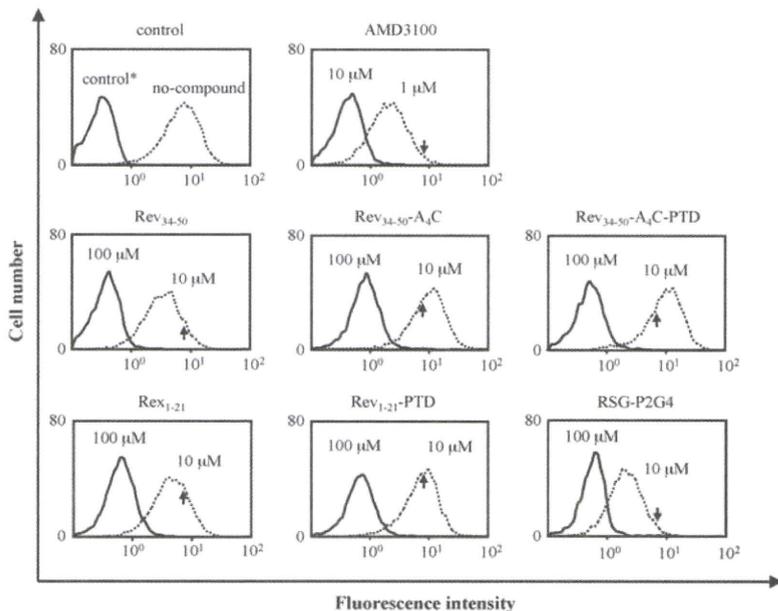
すべきことである。なぜなら非感染性粒子の増加は生体内で抗原として用いられ、ワクチン効果をもたらすことも可能となる。また、阻害点が2つ存在することは、複製阻害という点では大きなメリットである。特に現在CCR5阻害剤が臨床応用されている中で、CXCR4の阻害剤が開発されていないことは、治療において片手おちであるといわざるをえないと思われる。また、本研究では調べていないが、Revペプチドで処理したことでTatとRevの関係が崩れ、Tat優位となることが予想される。Tatが優位になることはゲノムRNAが産生されないことを意味し、ウイルス抗原はつくられるものの、粒子形成には至らない。つまり生体内では感染細胞が、抗原を発現しているのにもかかわらず、粒子が形成されず、絶対好の免疫のターゲットになることも予想される。これは抗ウイルス剤としてだけでなく、免疫活性にも働く新しい薬剤となろう。

E. 結論

今年度はT-20耐性に効果を示す融合阻害剤SC34EKとSC34に対する耐性を誘導し、耐性誘導が獲得されにくい薬剤であることを示した。また2つの誘導體同士の交差耐性ができにくいことも明らかにし、今後のペプチドデザインに有用な知見を加えた。また、Rev阻害剤が開発できたことは今後の発展に有用である。

F. 健康危険情報

総括研究報告書参照



Effects of the peptides on binding of a MAb against CXCR4 expressed on the MT-2 cell surface. MT-2 cells were resuspended in PBS containing 1% FCS and preincubated with the peptides at 4 °C for 30 min. PE-conjugated anti-CXCR4 MAb (12G5) was then added and incubated at 4 °C for a further 30 min. The cells were washed three times, fixed with 1% formaldehyde, and analyzed using a flow cytometer. A CXCR4 antagonist, AMD3100, was used a positive control. The results represent one of three independent experiments. (*) Fluorescence without PE-conjugated 12G5 is shown. Arrowhead indicates the mean fluorescence intensity of the no compound control.

図5

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tetsuo Narumi, Ryoko Hayashi, Kenji Tomita, Kazuya Kobayashi, Noriko Tanahara, Hiroaki Ohno, Takeshi Naito, [Eiichi N. 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
- 2) Kenji Watanabe, Shigeru Negi, Yukio Sugiura, Akiko Kiriyama, 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* 5:825-834, 2010
- 3) Shenwei Li, [Eiichi N. Kodama](#), Yuuki Inoue, Hideki Tani, Yoshiharu Matsuura, Jing Zhang, Takashi Tanaka, Toshio Hattori. Procyanidin B-1 purified from Cinnamomi Cortex suppresses HCV replication. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 20:239-248, 2010
- 4) Kazuki Izumi, Shota Nakamura, Hiroaki Nakano, Kazuya Shimura, Yasuko Sakagami, Shinya Oishi, Susumu Uchiyama, Tadayasu Ohkubo, Yuji Kobayashi, Nobutaka Fujii, Masao Matsuoka, [Eiichi N. Kodama](#). Characterization of HIV-1 resistance to a fusion inhibitor, N36, derived from the gp41 amino terminal heptad repeat. *Antiviral Research* 87:179-186, 2010
- 5) Kazuki Shimane, [Eiichi N. Kodama](#), Ikuhiko Nakase, Shiroh Futaki, Yasuteru Sakurai, Yasuko Sakagami, Xiaoguang Li, Toshio Hattori, Stefan G. Sarafianos, Masao Matsuoka. Rev-derived peptides inhibit HIV-1 replication by antagonism of Rev and a co-receptor, CXCR4. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 42:1482-1488, 2010
- 6) Shinya Oishi, Kentaro Watanabe, Saori Ito, Michinori Tanaka, Hiroki Nishikawa, Hiroaki Ohno, Kazuki Shimane, Kazuki Izumi, Yasuko Sakagami, [Eiichi N. Kodama](#), Masao Matsuoka, Akira Asai and Nobutaka Fujii. Affinity selection and sequence-activity relationships of HIV-1 membrane fusion inhibitors directed at the drug-resistant variants. *Medicinal Chemistry Communications* 1: 276-281, 2010
- 7) Matthew Michael Schuckmann, Bruno Marchand, Atsuko Hachiya, [Eiichi N. Kodama](#), Karen A. Kirby, Kamalendra Singh, Stefan G. Sarafianos. The N348I mutation at the connection subdomain of HIV-1 reverse transcriptase decreases binding to nevirapine. *Journal of Biological Chemistry* 285:38700-38709, 2010
- 8) Kazuya Shimura, Daisuke Nameki, Keiko Kajiwarra, Kentaro Watanabe, Yasuko Sakagami, Shinya Oishi, Nobutaka Fujii, Masao Matsuoka, Stefan G. Sarafianos, [Eiichi N. Kodama](#). Resistance profiles of novel electrostatically constrained HIV-1 fusion inhibitors. *Journal of Biological Chemistry* 285: 39471-39480, 2010
- 9) Atsuko Hachiya, [Eiichi N. Kodama](#), Matthew M. Schuckmann, Karen A. Kirby, Eleftherios Michailidis, Yasuko Sakagami, Shinichi Oka, Kamalendra Singh, Stefan G. Sarafianos. K70Q adds high-level tenofovir resistance to “Q151M complex” HIV reverse transcriptase through the enhanced discrimination mechanism. *PLoS One* 6:e16242, 2011
- 10) Karen A. Kirby, Kamalendra Singh, Eleftherios Michailidis, Bruno Marchand, [Eiichi N. Kodama](#), Noriyuki Ashida, Hiroaki Mitsuya, Michael A. Parniak, Stefan G. Sarafianos. The Sugar Ring Conformation of 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine and its recognition by the polymerase active site of HIV reverse transcriptase. *Cellular and Molecular Biology* 57: 39-44, 2011

2. 学会発表

- 1) [Eiichi N. Kodama](#). Development of HIV-1 fusion inhibitors active to enfuvirtide resistant variants. US-Japan Joint AIDS Panel: Resistance Meeting, Singapore, Dec 8-10, 2010 (Invited)

H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

なし

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 吉村プロジェクト研究室 准教授

研究要旨

前年度まで、我々の研究室で新たに樹立したnon-B subtypeの臨床分離株 (KMC1、CRF08_BCとmYHI、C) 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てきた。誘導した耐性ウイルスのシークエンスの結果、CRF08_BCでは、V3には変異はみられず、C4とV4だけで耐性化していた。また、subtype C株 (mYHI) では、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ていた。

最終年度に当たる平成22年度は、これまでの結果を踏まえて、日本で多いsubtype BによるMVC耐性誘導を行った。その結果、subtype C株で認められたのと同様な低CCR5発現細胞への馴化とCCR5阻害剤への耐性獲得変異が認められた。また、単純な低発現細胞への馴化と詳細に比較することで、ウイルスがMVC耐性変異によってgp120三量体形成に影響を受け、MVC存在下で中和抗体への感受性が上昇することがわかった。

A. 研究目的

昨年度までと同様、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。そこで、昨年度まで使用したnon-B subtypeの臨床分離株 (KMC1、CRF08_BCとmYHI、C) に続いて、今年度は、*in vitro*耐性誘導を、北米や日本を中心として感染が流行しているsubtype B株 (YTA) を用いて試みた。今回は、昨年度に引き続き、CCR5耐性獲得のメカニズムにより踏み込むため、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を同時に調べた。また、中和抗体の感受性の違いもあわせて調べた。

B. 研究方法

(倫理面への配慮)

昨年度までと同様に、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胞体を形成するため、顕微鏡下に感染

の広がり確認できる。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 (subtype B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、同じウイルスを感染させて、cell freeの状態と同じ回数継代した。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) により判定した。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、昨年度まで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細胞により継代したウイルスの低CCR5発現細胞への馴化との比較も同時に行う。また、あわせて各種中和抗体の感受性の違いも、それぞれの継代したウイルスを用いて調べた。

(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hemophiliaの症例から分離されたR5臨床分離株YTAは、gp120のシークエンスの結果、従来報告されてきた典型的なサブタイプB株であった。このウイルス株は、日本におけるHIV-1の中で最も多くの感染者が存在するタイプである。しかし、subtype Bにおけるこれまでの研究は、特に*in vitro*研究においては、研究室株を用いたものがほとんどであり、臨床分離株での研究はほとんどなされていなかったのが現状である。そこで、今回hemophiliaの症例から分離し、PM1/CCR5細胞での十分な増殖が確認できたYTA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1nMから開始し、徐々に上げて行き最終的には10 μ Mまで到達した(48パッセージ)(図2)。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、5パッセージ(20nM)から、コントロールウイルスのIC₅₀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IC₅₀が上昇していき、30パッセージ(5000nM)からは、50%抑制までも到達しなかった。よって、YTA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3)。一方CCR5低発現細胞であるPM1細胞に継代していたウイルスは、14パッセージまでは、MVC存在下のウイルスと同様の耐性度(IC₅₀:100-200nM)を示していた。その後は同程度の耐性度のまま、最後まで続いた。このことは、低CCR5細胞へのウイルスの馴化により、中程度のMVCへの耐性を獲得したことを示している。

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、シークエンスを行った。その結果、MVC耐性誘導ウイルスでは、はじめにクワシスピーシスとして存在していた中から、可変領域の選択が起こり(V1、2、V3、V4)、それに引き続いて定常領域(C1とC3)の選択が起こる。PM1におけるパッセージウイルスとIC₅₀の差が開き

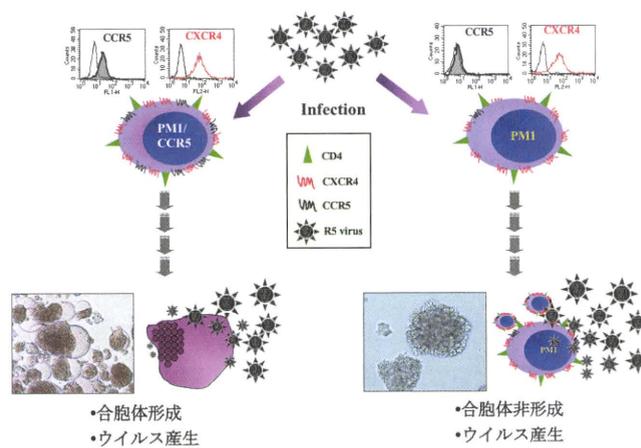


図1 臨床分離R5ウイルスのパッセージに用いたPM1細胞とPM1/CCR5細胞の比較。

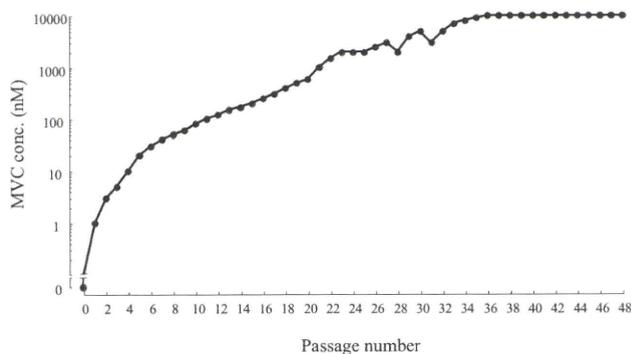


図2 Subtype Bウイルスを用いた*in vitro*耐性誘導のパッセージ回数とMVCの濃度の推移。

始めた17パッセージ以降は、まずV3 (T297I) の変異が出現し、それに引き続きC2とC4に新たな変異の獲得が認められた (V200IとM434I)。41パッセージ以降はV3 (K305R) に新しい変異が確認され、それとともにウイルス抑制試験における最大抑制濃度のプラトーの位置が低下していった (図4)。PM1におけるパッセージウイルスでは、V3にF317LからF317Wへ変化し、それとともにC2にV84I変異が出現した。ほとんどがgp120の可変領域からの選択が中心で (V1~V5)、MVC耐性誘導のウイルスが、保存領域 (C1、C2、C3、C4) を大きく変えることと対照的であった。このことは、薬剤が低濃度の時は、クワシスピーシスからの選択により低CCR5状態に対応するための馴化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、V3領域を中心に高度耐性変異を獲得することを意味している。また、

「可変領域の変異→定常領域の変異」の流れがエンベロープの変異の流れとして存在することも新たな発見であった。

また、MVC耐性YTA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。また、中和抗体やCCR5のN端に対する抗体の反応も、MVC高濃度存在下では感受性になることが確認された。

D. 考察

今回我々が示した結果は、昨年度 subtype C ウイルスで示したのと同様に、subtype Bにおいても、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

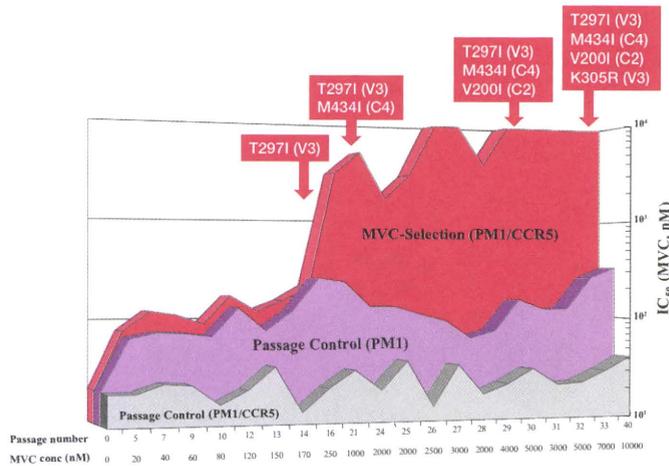


図3 *in vitro*耐性誘導によるサブタイプB 臨床分離ウイルス (YTA)のMVCに対するIC₅₀の変化。

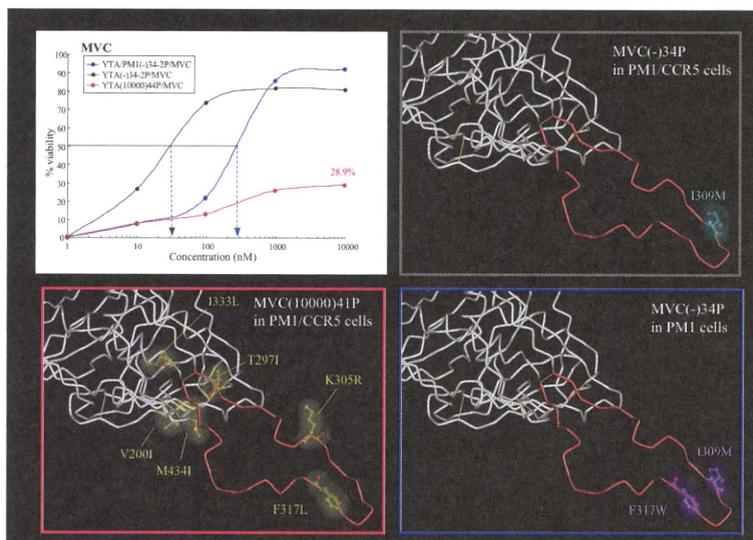


図4 41パッセージのMVC存在下感染細胞と、34パッセージのコントロールPM1/CCR5細胞及びPM1細胞のV3およびCCR5のN端結合部位のシーケンスの比較。MVC耐性ウイルスではN端結合部位に耐性変異が集積している。また、MVCに対する感受性の比較を左上のグラフで表示した。

の変異であることを再度示している。これらの結果は、昨年報告したようにCCR5阻害剤耐性変異獲得の道筋が大きく二つに分けられることを、subtype Bにおいても適応されることを意味する。つまり、HIV-1は既に存在するクワシスピーシスの中からEnvの可変領域の選択をすることで低CCR5細胞へ馴化し、保存領域の変異はその可変領域の選択の後に決定されていると推定される。しかし、MVCに対する高度耐性のためにはV3領域の変異が必要となるが、その結果やはり定常領域の変異獲得が必要となる。このため、それまで存在していない定常領域の変異の誘導と蓄積は、MVC耐性ウイルスが出現している証拠となると考えられる。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、組み替えウイルスの作成や、その他のより多くの臨床分離ウイルスでの検討が必要となるであろう。

E. 結論

現在日本で最も感染者の多い、subtype Bウイルス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昨年のsubtype Cウイルスと同様に示すことができた。すなわち、薬剤が低濃度の時は、低CCR5発現状態の標的細胞へ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subtype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

総括研究報告書参照

G. 研究発表

- 1) Narumi, T., Ochiai, C., **Yoshimura, K.**, Harada, S., Tanaka, T., Nomura, W., Arai, H., Ozaki, T., Ohashi, N., Matsushita, S., Tamamura, H. CD4mimics targeting the HIV entry mechanism and their hybrid molecules with a CXCR4 antagonist. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20:5853-5858, 2010.
- 2) **Yoshimura, K.**, Harada, S., Shibata, J., Hatada, M., Yamada, Y., Ochiai, C., Tamamura, H., Matsushita, S. Enhanced exposure of human immunodeficiency virus type 1 primary isolate neutralization epitopes through binding of CD4 mimetic compounds. *J Virol*, 84:7558-7568, 2010.
- 3) Hatada, M., **Yoshimura, K.**, Harada, S., Kawanami, Y., Shibata, J., Matsushita, S. HIV-1 evasion of a

neutralizing anti-V3 antibody involves acquisition of a potential glycosylation site in V2. *J Gen Virol*, 91: 1335-1345, 2010.

- 4) 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. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20: 354-358, 2010.

2. 学会発表

- 1) Harada S., Hamji A., Matsushita S., and **Yoshimura K.** Evolution and selection of the env gene of HIV-1 primary isolates during *in vitro* selection of raltegravir. 10th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, 2010.10.6-8, Aso, Kumamoto, Japan.
- 2) Liu M., Shibata J., Harada S., Takehisa J., **Yoshimura K.**, Matsushita S. Impact of a point mutation in V2 (L175P) in neutralization resistance mediated by functional trimer formation of Env. AIDS Vaccine 2010, 2010.9.28-10.1, Atlanta, USA.
- 3) Matsushita S., Mouri S., Harada S., Yamada Y., Tamamura H., **Yoshimura K.** CD4 mimetic compound-mediated enhancement of the neutralization activities of anti-V3 and CD4i monoclonal antibodies against the standard panel of primary isolates. XVIII International AIDS conference, 2010.7.18-23, Vienna, Austria.
- 4) Harada S., **Yoshimura K.**, Kawanami Y., Matsushita S. *in vitro* selections of raltegravir resistant variants using diverse primary isolates, subtype B, C, CRF01_AE, and CRF08_BC. 2010 IYIS, 2010.3.4-5, Kumamoto, Japan.
- 5) **Yoshimura K.**, Harada S., Matsushita S. Two step escape pathway of the HIV-1 subtype C primary isolate induced by the *in vitro* selection of Maraviroc. 17h Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI 2010), 2010.2.16-19, San Francisco, USA

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はCD4とケモカイン受容体を利用して宿主細胞へ侵入する。そこでケモカイン受容体を標的とした侵入阻害薬が開発され臨床応用されているが侵入阻害薬のさらなる開発・改良、HIV-1薬剤耐性機序の理解ためには細胞上でのケモカイン受容体の立体構造解明が重要である。ところが、技術上の困難さから今日まで生細胞上でのケモカイン受容体の状態は十分に明らかにされてこなかった。今回、我々は1分子ナノ顕微鏡を用いて生細胞上での蛍光タンパク質ラベルCXCR4の1分子観察に成功した。この結果、CXCR4分子は細胞表面上で基本的には2量体を形成し、その大部分が更なる多量体を形成していることが明らかになった。またCXCR4発現細胞上でリガンドであるCXCL12を結合させて1分子観察した結果、CXCR4-2量体に対してCXCL12-1個が結合することが示唆された。これは1個のCXCL12がCXCR4-1分子と結合するという従来の結晶解析結果と異なるものでケモカイン受容体の立体構造に関して再考を促すものであった。我々の開発した1分子観察法は侵入阻害薬の直接の観察にも利用可能で、今後、侵入阻害薬の細胞動態解析やHIV-1の耐性機序の解明等への活用が期待される。

A. 研究目的

HIV-1はCD4とケモカイン受容体を利用して宿主細胞へ侵入する。そこでケモカイン受容体を標的とした侵入阻害薬が開発され臨床応用されてきたが、この侵入阻害薬の更なる開発・改良、HIV-1の侵入阻害薬耐性機序の理解ためには細胞上でのケモカイン受容体の立体構造解明が重要と考えられている。我々は、昨年、様々なドメインに変異を持つCXCR4に蛍光タンパク質を融合させて、細胞上で動態を解析した。本年度は、蛍光タンパク質融合CXCR4に、我々が開発した1分子顕微鏡可視化法を組み合わせて、ケモカイン受容体の状態を生細胞上で1分子観察すると同時に、CXCR4リガンドCXCL12を量子ドット（蛍光ナノ粒子）でラベルしたトレーサー分子を作成しCXCR4発現生細胞上に結合した後のCXCL12の1分子観察に成功したので報告する。

B. 研究方法

蛍光蛋白質融合ウイルス受容体発現ベクター系の作成— CXCR4 cDNAを、PrimeSTAR MaxDNA polymeraseを用いて各々のspecific primerで増幅後、ZeroBlunt TOPO PCR cloning vectorにsub-cloningし、シーケンスを確認した。その後、これらのシーケンスに制限酵素サイトを付加する遺伝子特異的なprimerを用いてインサートを増幅しpAcGFP1-Hyg-N1, pDsRed-Monomer-Hyg-N1にそれぞれ組み込み、前二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— 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、シーケンスを確認後、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。

—分子顕微鏡の光学システム— 一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。対物レンズは (60×UPlanFLN, 1.30 NA, oil, Olympus) を使用し、視野は green laser (532nm wavelength, 50mW, CrystaLaser) もしくは blue laser で励起した。画像は、SOLISソフト (Andor technology) を用いて撮影、記録した。GFP/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、その光重心は2次元ガウス関数で決定した。ガラス直上のQDのX-およびY-軸方向の位置精度は25msで観察した際、6nm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— 軌跡解析は“ImageJ”のプラグインソフトである、“View5D”を用いて自動で行なった。このソフトは、連続画像の前フレームの座標の近傍にあり、輝度も近い粒子を、次のフレームで同1の粒子として認識する。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。

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

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

D は拡散係数であり、 V は速度を意味する。粒子の速度は下記の式で計算した。

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

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。

細胞膜上での分子の動きは細胞膜直下に横たわるアクチンで細胞が分画化されるために、その拡散が制限されることが明らかになっている。このため、膜貫通蛋白質は、分画の中にしばらく閉じ込められていた後にとりの分画に移動していくという状態を繰り返すことになる。細胞膜が分画化されているために、膜貫通蛋白質の拡散係数はリポソーム膜の1/20程度まで低下している。また分画化の結果、多量体を形成した場合は、その多量体に加わる分子数にある程度比例して、拡散係数が低下する。このように、細胞上の分子の拡散係数を調べることにより細胞膜の正常の変化、及び分子の会合の程度等を観察することが可能である。

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

近年、多くのケモカイン受容体が他種のケモカイン受容体とヘテロ会合を行う可能性が示唆されているが、その全容は明らかにされていない。一般的に培養細胞には様々な種類の内在性のケモカイン受容体が同時に発現しており、このような細胞で研究した場合、得られた観察対象ケモカイン受容体のデータがそれ自身のものなのか、他の内在性分子と会合して引き起こされたものなのかを区別することは出来ない。さらに培養細胞の多くが恒常的に様々なケモカイン分子を分泌しており、この結果、無作為に選択した培養細胞で実験を行うと得られた観察対象のケモカイン受容体分子のデータが内在性のケモカイン/受容体双方の影響を受けている可能性がある。そこで、我々はまず、HOS細胞が内在性のケモカイン受容体非発現細胞であり、さらにCXCR4の唯一のリガンドであるCXCL12の産生も認められない事をRT-PCRで確認した。HOS細胞上でCXCR4の動態を観察すれば、内在性のケモカイン/受容体の影響を避けてCXCR4の動態を観察することができる。そこで、HOS細胞に蛍光蛋白質融合CXCR4野生型 (CXCR4-WT) 及び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たCXCR4変異体を一過性に発現させてCXCR4の分布を共焦点レーザー顕微鏡 (CLM) で検討した。

この結果、CXCR4-7TM変異 (COOH末端細胞内ドメイン欠損蛋白質) ではCXCR4蛋白質合成後、

分泌顆粒から細胞膜表面への輸送が低下し、大部分の蛋白質が膜直下で凝集塊を形成するようになることが明らかになった (図1)。この現象は融合蛍光蛋白質を dsRED、GFP、CFP、YFP と変化させても同様で、CXCR4のCOOH末端の細胞内ドメインに分泌顆粒から細胞表面への輸送を円滑に行わせる機能的なドメインがあることが示唆された。GFP/dsRED蛋白質を融合させたCXCR4-WTを共発現させて細胞表面上の分布を検討するとGFP/dsRED-CXCR4-WT蛋白質の細胞表面分布は完全に一致し (図1)、さらにCFP/YFP蛋白質を融合させたCXCR4-WT共発現させて蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を行ったところCXCR4-WT間にFRETが確認された。そこで、acceptor bleachを行いCXCR4-WT同士の会合を確認したところ細胞質部位でははっきりとしたacceptor bleachが認められCXCR4-WT同士が会合する可能性が示唆された。

次に、CXCR4-7TMとCXCR4-WTを細胞に共発現させCLMを用いて検討したところ、CXCR4-7TMの分泌顆粒から膜表面への輸送がCXCR4-WTの発現量に比例して改善し、特にCXCR4-7TM：CXCR4-WTのモル比が1：3以上になるとほぼ完全にCXCR4-7TM細胞表面への輸送が行われることが明らかになった (図2)。以上のことから分泌顆粒移送以前/中にCXCR4-7TMとCXCR4-WTの会合は起き、その結果、CXCR4-WTが表面へと運搬されるのに合わせてCXCR4-7TMも表面まで運搬されたと考えられた。次にCXCR4-7TMとCXCR4-WTを共発現させた細胞でCXCR4-WTのみにエンドサイトーシスを

起こす刺激を加えて、CXCR4-7TMの分布がどのように変化するかCLMを用いて検討した。PMAで刺激すると刺激後30分前後でCXCR4のエンドサイトーシスが起きる事が知られているが、CXCR4のCOOH末端の³²⁴SSLKIL³²⁹配列が欠損するとPMA刺激によるエンドサイトーシスが抑制されることから、PMAによるCXCR4のエンドサイトーシスにこの配列が不可欠であることが示されていた。このことから、PMA刺激でCXCR4-WTのみにエンドサイトーシスを起こす事が可能と考えられた。そこで、まずCXCR4-WT/7TMをそれぞれ単独で発現させてPMA刺激の影響を検討したところ、予想された様にCXCR4-WTにエンドサイトーシスが認められたのに対して7TMでは発現部位に変化が認められなかった。次にCXCR4-7TM：CXCR4-WTを1：3のモル比で発現させた細胞にPMA刺激を加えたところ細胞表面に分布していたCXCR4-7TMにエンドサイトーシスが認められた。PMA刺激はCD4分子にもエンドサイトーシスを起こすことが知られている。そこで、CD4分子とCXCR4-7TMを共発現させた細胞にPMA刺激を加えたところ、CD4分子にエンドサイトーシスが認められたのに対して、CXCR4-7TMにエンドサイトーシスは認められなかった。以上よりCXCR4-7TMはCXCR4-WTと共発現させるとCXCR4-WTと結合し、その細胞分布を変化させている事が明らかになった。以上よりCXCR4-7TMとCXCR4-WTは細胞中で持続的に会合する事が示唆され、そのモル比が与える影響等から生細胞中では、少なくとも2量体がCXCR4の基本構造であることが

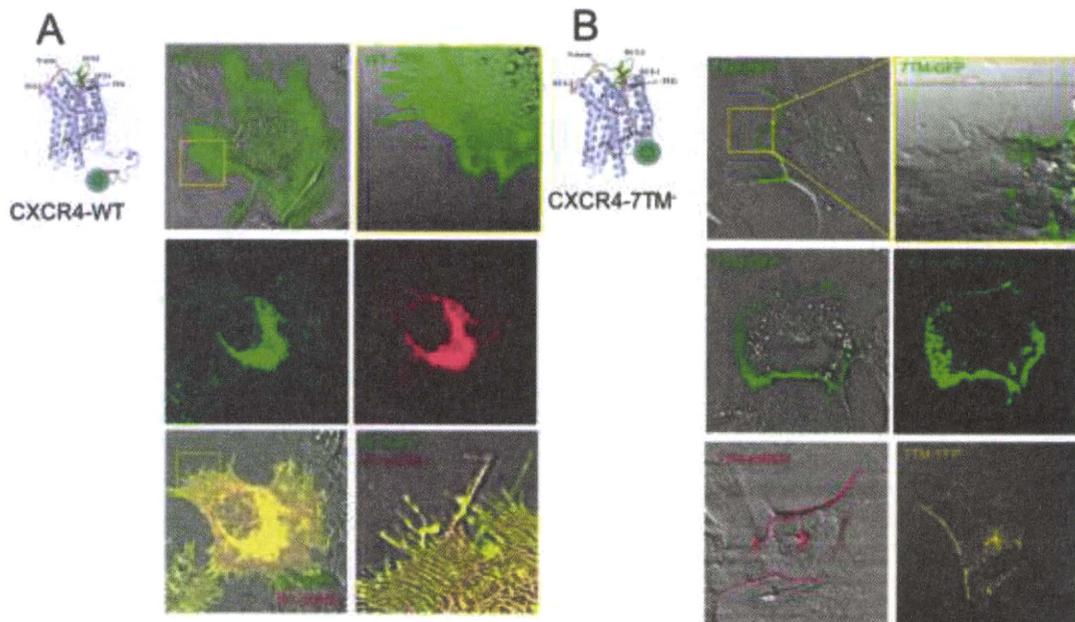


図1 CXCR4-WTとCXCR4-7TMのHOS細胞上での分布 (A) CXCR4-WTは細胞表面に均一に分布する (upper panels)。dsRED monomer/GFP-CXCR4-WTを共発現させると発現させると同一の場所にCXCR4-WTは分布する (middle and lower panels)。 (B) CXCR4-7TMは分泌顆粒から細胞表面への輸送が妨げられる (upper panels)。3次元像 (middle panels)。融合蛍光タンパク質を変えても同様の結果であった (lower panels)。

示唆された（以上、本年度の詳細な検討の結果、昨年の報告書のdataに一部再現性に乏しいデータが含まれていた事が明らかになったために、研究内容が昨年と重なる部分があるが詳解した）。

そこで、CXCR4の2量体形成が細胞表面で起きている事を確定するために、蛍光蛋白質融合CXCR4をHOS生細胞に発現させて、細胞上での動態を1分子観察した。様々な検討の結果、dsRed monomer融合CXCR4が生細胞上での1分子観察に最も優れていることが確認された。そこでdsRed monomer-CXCR4-WTを細胞に発現させて、我々が開発した1分子顕微鏡で100ms/frameで観察を行った。細胞表面には様々な明るさのdsRed monomer-CXCR4-WTのspotが認められた。このspotの明るさ強度を画像から測定し、その強度の分布をmultiガウス解析を行った。この結果、dsRed monomer-CXCR4-WTのspot強度は少なくとも3つのピークが認められ、それぞれの明るさの強度は1番弱いspot強度に対して1、2、4倍の明るさを持つことが明らかになった。そこで、内在性CXCR4高発現細胞のHeLa細胞に同様にdsRed monomer-CXCR4-WTを発現させて同様の解析を行ったところ、新たに1stピークの半分の強度のピークが認められた。これは、蛍光蛋白でラベルされていない内在性のCXCR4とdsRed monomer-CXCR4-WTが2量体を形成し、明るさ強度が半分のspotが出現した可能性を示唆している。2量体が

CXCR4の基本構造であるという以前のデータと合わせると、HOS細胞上でのdsRed monomer-CXCR4-WTの1stピークは2量体に相当し、それ以降のピークはそれぞれ4量体、8量体を表していると考えられた。

細胞膜上の分子の拡散速度は、膜直下に横たわるアクチンで細胞膜が分画化されるために、抑制されることが明らかになっている（膜骨格フェンス、ピケットフェンスによる阻害）。細胞膜の分画の結果、膜上の蛋白質が会合し複合体が生じると、その会合分子数に、比例して、拡散係数が低下することが示され、広く受け入れられている（Oligomerization-induced trapping model）。そこでdsRed monomer-CXCR4-WT spotの拡散係数を測定し、1量体分子であるdsRed monomer-CD4分子のHOS細胞上での拡散係数と比較した。その結果、CD4 spotの拡散係数が0.42mm²/secであるのに対して、CXCR4-WT spotのtotalの拡散係数は0.14mm²/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。以上の拡散係数の解析を含め、CXCR4-WTは基本的に2量体を形成し、それらがさらに会合することで多量体を細胞表面で形成していると我々は結論づけた。

次に、量子ドット（球状の蛍光性ナノ粒子、以下QDと表記）1個にQDCXCL12分子-1個を固定したトレーサーを作成した。このQD-CXCL12を

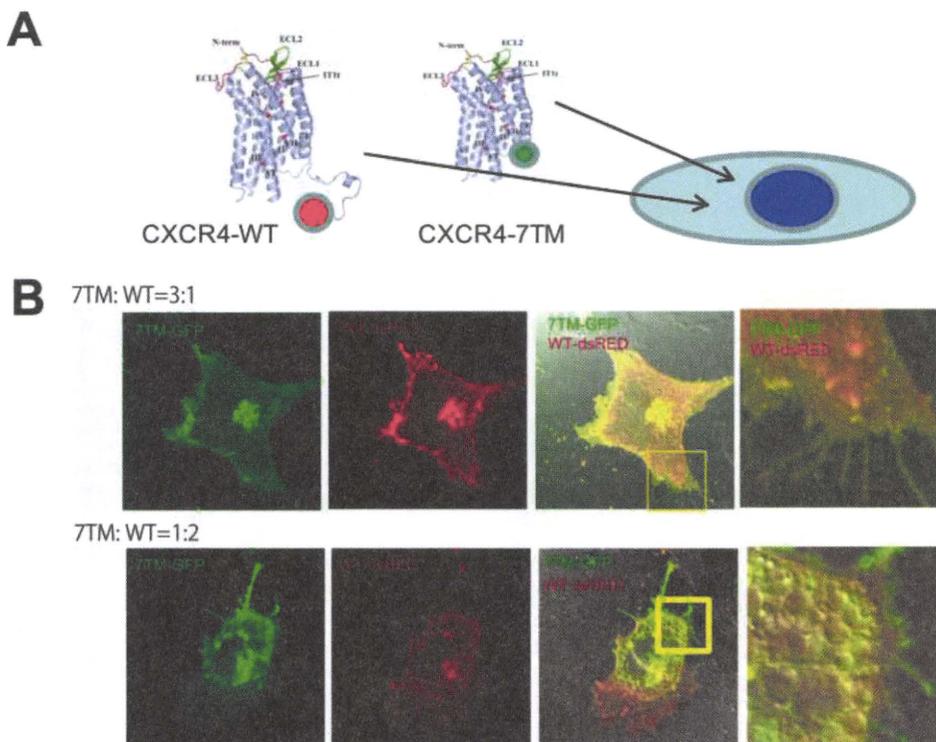


図2 CXCR4-WTとCXCR4-7TMをHOS細胞に共発現させた場合の分布 (A) 実験のスキーム。(B) dsRED monomer-CXCR4-WT /GFP-CXCR4-7TMを共発現させると発現量に合わせてGFP-CXCR4-7TMの分布パターンが顆粒状 (lower panels) から細胞表面分布 (upper panels) へと変化していることがわかる。

CXCR4-WT発現細胞に添加し、QD-CXCL12の細胞表面上で動態を1分子可視化した(図3)。QDのspotが何個の粒子から出来ているか測定するために、凝集していない1粒子のQDを762個の蛍光強度を測定してその平均値をもとめ、それを基準として測定した。その結果、細胞表面に結合しているQD-CXCL12粒子は1、2、4個であることが明らかになった。しかしながら3個もしくは5個以上のQDからなるspotは検出されなかった。CXCR4受容体の基本構造が2量体で、さらに4量体、8量体と多量体を形成している事を考慮すると、以上の結果はCXCR4-2量体に対してQD-CXCL12粒子1個が結合していることが示唆された。さらなる確認のためにdouble viewを用いてCXCR4のspot intensityとQD-CXCL12粒子数の関係を現在、同定中であるが以上の結論は1個のCXCL12がCXCR4-1分子と結合するというこれまでの結晶解析結果と異なるもので、従来のケモカイン受容体の立体構造に関して再考を促すものであった。

D. 結論・考察

CXCR4受容体とそのリガンドCXCL12の1分子観察を世界で初めて、100ms/frameの速度で観察することに成功した。この結果、CXCR4分子は細胞表面上で基本的には2量体を形成し、その大部分が更なる多量体を形成していることが明らかになった。CXCR4発現細胞上でリガンドであるCXCL12を結合させて1分子観察した結果、CXCR4-2量体に対してCXCL12-1個が結合することが示唆された。これは1個のCXCL12がCXCR4-1分子と結合するというこれまでの結晶解析結果と異なるもので、ケモカイン受容体の立体構造に関して再考を促すものであった。我々の開発した1分子観察法は侵入阻害薬の直接の観察にも利用可能で、今後、侵入阻害薬の細胞動態解析やHIV-1の耐性機構の解明等への活用が期待される。

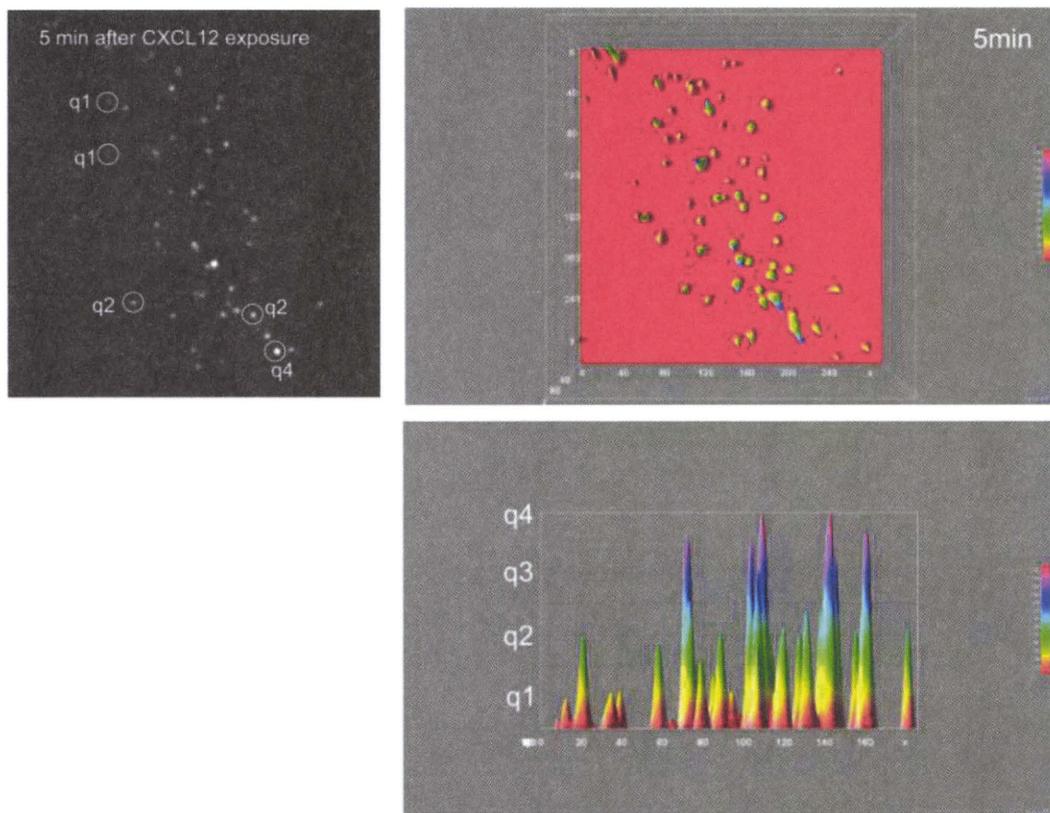


図3 CXCL12-QDをCXCR4-WTを発現HOS細胞に添加した後のCXCL12-QD分布状態 (upper left panel) CXCL12-QDの1分子観察のdata。(upper right panel) 1分子観察のdataをsurface plotした結果。surface plotした結果を水平方向に眺めた像。CXCL12-QDは1、2、4粒子(q、q2、q4と表示)で表面に分布しているが、3粒子もしくは5粒子以上が結合している像は認められない。

E. 健康危険情報

総括研究報告書参照

F. 研究発表

論文発表

(欧文)

- 1) J Imamura, Y Suzuki, K Gonda, C Nath Roy, H Gatanaga, N Ohuchi, and H Higuchi. Single particle tracking confirms that multivalent Tat protein transduction domain-induced heparan sulfate proteoglycan cross-linkage activates Rac1 for internalization *Journal of biological chemistry* VOL. 286, NO. 12, p. 10581-10592 (2011)

学会発表

- 1) Suzuki Y, Gatanag H, Tachikawa N, and Oka S. Prolonged surface retention of gp120 in resting CD4⁺ T cells owing to the slow turnover of HIV-1 receptors causes the surface immune-complexes *in vivo* 14th International Congress of Immunology 2010 Kobe, Japan
- 2) Suzuki Y, Roy C-N, Gonda K, Ohuchi N. Novel live cell imaging reveals that the involvement of intracellular organelle transporting systems in viral envelop induced cell fusion. 第58回 日本ウイルス学会学術集会 2010 徳島
- 3) Suzuki Y, Roy C-N, Gonda K, Ohuchi N. Reorganization of microtubules leads to redistribution of intercellular organelles in cells which induce cell fusion by envelop protein 第24回 日本エイズ学会学術集会 2010 東京
- 4) Roy C-N, Imamura J, Gonda K, Ohuchi N, Suzuki Y. Nano-imaging of CXCR4 and CXCL12 cell surface binding utilizing single molecular microscopy 第24回 日本エイズ学会学術集会 2010 東京
- 5) Roy C-N, Imamura J, Gonda K, H Gatanaga, Ohuchi N, Suzuki Y. CXCR4-CXCL12 multimerizes on the cellular surface: evidences from nano imaging of cell surface binding. 第33回 分子生物学会年会 2010 神戸

G. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

- 1) 新規超高効率蛋白導入ペプチドの創出法について (出願中)
- 2) 蛋白導入ペプチド受容体を用いた高效率蛋白導入法 (予定)

新規薬剤の臨床効果の解析

研究分担者

横幕 能行 (独)国立病院機構名古屋医療センター エイズ診療科 医長

研究要旨

新しいクラスの抗HIV剤であるmaraviroc (MVC) をsalvage療法に用いた3症例の臨床経過を解析した。MVCはアドヒアランス低下につながるような有害事象がなく、現在利用できる感受性検査で有効性が期待できる場合は使用を考慮し得る薬剤と考えられた。今後、初回治療例への適応拡大が予想され、簡易な薬剤耐感受性の評価手法の確立が必要と考えられた。

HIV-1 プロテアーゼ (PR) の簡易活性評価系であるVLP-ELISA法のthreshold valueを設定し、従来法では評価不可能な薬剤耐性関連変異が高度に蓄積した臨床検体由来PRを用いてその妥当性を評価した。臨床経過によく一致した結果を示し、salvage療法時のプロテアーゼ阻害剤の選択に際し有用な手法と考えられた。

A. 研究目的

インテグラーゼ阻害剤 (INSTI) raltegravir (RAL)、プロテアーゼ阻害剤 (PI) darunavir (DRV)、非核酸系逆転写阻害剤 (NNRTI) etravirine (ETR) が臨床現場で使用できるようになり、多剤耐性HIV感染症例に対する有効な抗HIV療法が可能となった。近年、CCR5阻害剤であるmaraviroc (MVC) も治療経験例に対する治療に使用可能となったが、国内において、多剤併用下での有効性、安全性についての知見は限られる。また、MVCなどの新規抗HIV剤を用いたsalvage療法を行う場合、その有効性を維持するために高いgenetic barrierを有するPIを併用することが有効な治療のために重要である。しかしながら、高度薬剤耐性変異蓄積例のPIに対する感受性評価は既存の薬剤耐性検査法ではしばしば困難である。

そこで、本年度は、以下の2項目について検討を行った。

(1) MVCを含む抗HIV療法の有効性、安全性の検討

名古屋医療センターにおけるMVCを含む多剤併用療法を行った3例の臨床経過を検討し、有効性と多剤併用療法時の血中濃度を評価し、安全かつ有効な使用方法の基礎的情報を得る。

(2) VLP ELISA法の有用性の検討

PhenoSense及びStanford HIV Resistance DatabaseのGenotypic susceptibility score (GSS) の両方法で検討が可能であったPRクローンについて、VLP ELISA法による耐性度評価を実施し、妥当性の評価を行う。さらに、HIVの複製過程を必要とする表現系検査が実施できないHIVプロテアーゼ阻害剤耐性関連変異蓄積症例の薬剤感受性評価を実施し、実臨床での有用度について考察する。

B. 研究方法

(1) MVC使用症例の臨床経過の解析

名古屋医療センターに通院中で、核酸系逆転写酵素阻害剤 (NRTI)、NNRTI、PI、INSTIの少なくとも3クラス以上に耐性が考慮され、そのsalvage療法としてMVCを含む多剤併用療法を行った3症例 (男性2例、女性1例) で検討を行った。3例とも、プロテアーゼ (PR)、逆転写酵素 (RT)、インテグラーゼ (IN) 領域のdirect sequencingによる遺伝子型検査を実施した。エンベロップ領域については、表現型検査もしくは遺伝子型検査によってco-receptor usageがR5型であることを確認した。男性2例については、therapeutic drug monitoring (TDM) によりMVCの血中濃度を測定し、投与量の設定を行った。MVCを含む治療の有効性についてはウイルス量の