

しないと考えられるので、ワクチンが徐々に効かなくなるということがない。しかし、レセプターの生理的な作用をブロックすることによる副作用の可能性に十分注意しなければならない。実際、具体例としてコレセプターであるケモカイン受容体 CXCR4 の細胞外ループ (Ecl1-Ecl2) を取りあげ、環化&構造固定化したペプチドミメティックを合成し、効率的な抗体誘導をはかることにした。2) あまり研究されていなかった標的細胞への HIV の侵入時の立体構造変化に関わる蛋白 gp41 を認識する抗体を作製することにした。従来は、HIV 表面蛋白 gp120 上の表面に露出した領域を抗原としていることが多かった。しかし、ここ数年の HIV の標的細胞への侵入機構、種々の蛋白質が複雑に相互作用する動的超分子機構とよばれるメカニズムが明らかになってきたことにより、立体構造変化を起こす蛋白をターゲットとし、構造変化の中間体を有機化学的に再構成した人工分子を抗原とすることにした。具体的には gp41 の 3 量体ヘリカル構造である。3) 今まで多大な数のワクチンを作製したが、成功しなかった原因のひとつとして、gp120 のある領域の部分ペプチドを抗原として用いていた (中和抗体のエピトープは β -ヘアピンループ構造を取っていることが多い) ために、この部分ペプチドがもとの gp120 上での本来の立体構造を再現できていなかった (もとのヘアピン構造を保持できなかった) ということが考えられる。そこで本研究では、いままで鎖状ペプチドをベースに抗原として使い、鎖状を環状にし、立体構造を固定化したペプチドミメティックを合成した。具体的には、長期未発症の HIV 感染者の間で、CD4 binding/コレセプター-binding 領域が中和抗体のエピトープとして高く保存されている断片ペプチドを取りあげた。また、この領域は β -ヘアピンループ構造にあたる領域であり、これまで鎖状のペプチドでは効率的に抗体が誘導で

きなかったため、 β -ヘアピンループ構造を提示できるように環状構造に固定化したペプチドミメティックを合成した。

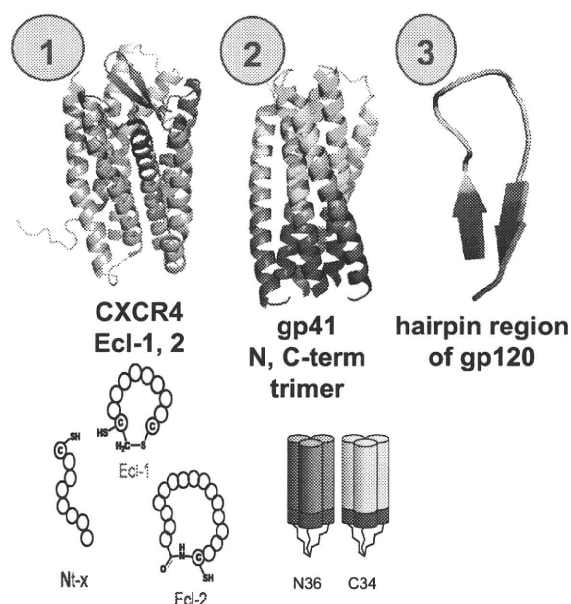


図1 3種のアプローチによるエイズワクチン作製

4) HIV-1 の gp120 が宿主細胞の CD4 と、ケモカインレセプター CCR5 もしくは CXCR4 のいずれかへ結合することにより、HIV は宿主細胞へ侵入する。そこで、CD4 の小分子 mimic 誘導体を合成し、HIV 侵入の動的超分子機構への影響や中和抗体等との併用の効果を検討した。また、CD4 mimic と CXCR4 アンタゴニスト T140 との hybrid を合成した。5) HIV に感染すると数年の無症候状態を経て、体内で徐々にウイルス数が増え、ゆっくり免疫不全を引き起こすので、宿主に寄生している期間が非常に長い。すなわち、HIV 自身の生命システムに、急激なウイルス数の増加を抑制するようなフィードバックシステムが備わっていると考えられる。本来ウイルスを構成する蛋白質にこのような自身の複製を抑制する機能をもった部分ペプチドが内在しているとも考えられる。すなわち、HIV 構成蛋白質全体ではもちろん抗 HIV 活性を持た

ないが、それに含まれる部分ペプチド断片に抗 HIV 活性がある可能性がある。そこで、Vpr 断片から IN 阻害活性を有するペプチドを見出し、活性に必要なアミノ酸を同定する。6) さらに、生体構成蛋白である細胞外マトリックスであるラミニンやフィブリンなどの高分子の蛋白質でも部分ペプチドに親分子とは違う活性があるものが報告されている (Kasai S, et al. *Biochemistry*, 46(13), 3966-3974, 2007)。そこで、Matrix 断片に細胞膜透過性配列を付加したペプチドより抗 HIV 活性を有する配列を探索する。7) 我々が以前から研究しているリード化合物、および既存の低分子アンタゴニストを構造上コンビネーションさせ、より有用な CXCR4 拮抗剤を分子設計する。

以上これら 7 種のアプローチによりワクチン創製および抗 HIV 剤の創製を目標とした。

B. 研究方法

1) コレセプター CXCR4 の細胞外ループ (Ecl1-Ecl2) を基にした抗原分子作製&抗体誘導

コレセプターであるケモカイン受容体 CXCR4 の細胞外ループ (Ecl1-Ecl2) のみを合成し、Ecl1 については環化し、MAP 等に導入する。

Ecl1 に関しては、水溶性の低さを改善するため、図 2 のように親水性領域 Arg-Glu-Arg-Glu を天然型配列の両端に付与した。また、合成法は 2 種の方法を採用した。一つめの方法は、Cys を 2 個導入し、1 個は通常の脱保護条件で切断されないように Acm 基で保護した。N 末端にクロロアセチル基、C 末端に Cys (Trt) を導入する形でペプチド鎖を構築し、脱樹脂と脱保護後、Cys のチオール基とクロロアセチル基の反応により環化し、

AgOTf によりもう 1 個の Cys の Acm 基を脱保護し、チオール基が 1 個フリーの形の環状ペプチドを生成する。これを用いて同様に MAP-テンプレートに導入する。二つめの方法は、Fmoc 固相合成法でペプチド鎖を構築し、脱樹脂後、アミド結合により環化し、側鎖の保護基の脱保護をした。生成した環状ペプチドには、導入しておいた Cys のチオール基があり、これを用いて MAP-テンプレートに導入する。

MAP の各先端のアミノ基にクロロ (ブロモ) アセチル基を導入し、チオール基を有する環状ペプチドを導入する。cyclic Ecl-1, 2 のコントロールとして直鎖ペプチド linear Ecl-1, 2 も合成した (図 3)。そして、それらを用い抗体誘導実験および ELISA を行った (図 4)。

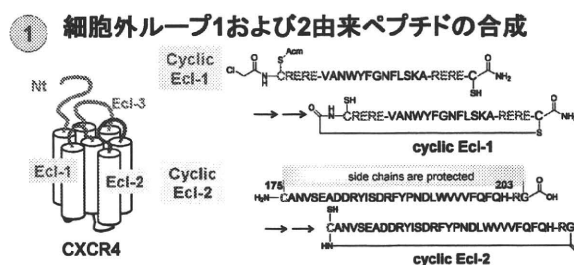


図 2 細胞外ループ 1 および 2 由来ペプチドの合成

Peptide	Amino acid sequence
Linear Ecl-1 (+Acm)	$\text{ClCH}_2\text{CONH-C(Acm)RERE-VANWYFGNFLSKA-RERE-C-CONH}_2$
Cyclic Ecl-1 (+Acm)	$\text{CH}_2\text{CONH-C(Acm)RERE-VANWYFGNFLSKA-RERE-C-CONH}_2$
Cyclic Ecl-1 (-Acm)	$\text{CH}_2\text{CONH-CRERE-VANWYFGNFLSKA-RERE-C-CONH}_2$
Linear Ecl-2	$\text{H}_2\text{N-CANVSEADDRYISDRFYPNDLWVWFQFQH-RG-COOH}$
Cyclic Ecl-2	$\text{NH-CANVSEADDRYISDRFYPNDLWVWFQFQH-RG}$

図 3 cyclic Ecl-1, 2 および linear Ecl-1, 2 のアミノ酸配列

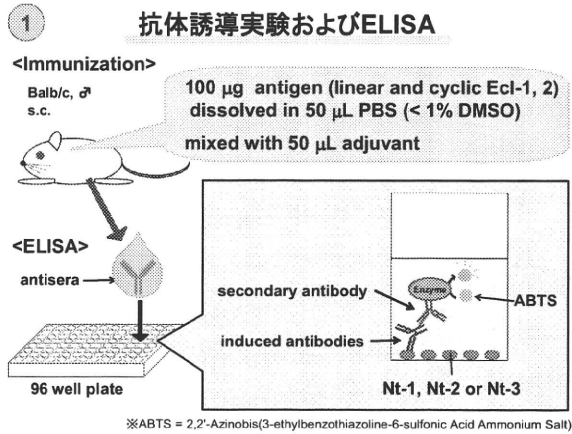


図 4 抗体誘導実験およびELISA

2) gp41 のヘリカル領域の合成ペプチド(N およびC 端側)3 量体の合成と抗体誘導

N 端側 N36 の 3 量体は前年度までに合成を終了している。今年度は gp41 の C 端側に存在するヘリカル領域のペプチド C34 を 3 量体にアッセムリーするための人工テンプレートを作成した(図 5)。また、別に C34 に親水性領域を付加したペプチドを Fmoc 型固相合成法により合成した(図 6)。Native Chemical Ligation 法を用いて 3 個の C34 誘導体を図 2 で合成した C3 対称性テンプレート上に配置し、三量体とし抗原分子とする(図 7、8)。そして、合成した抗原分子を用いてマウスにて抗体誘導を検討する。その血清の抗 HIV 活性を評価する。

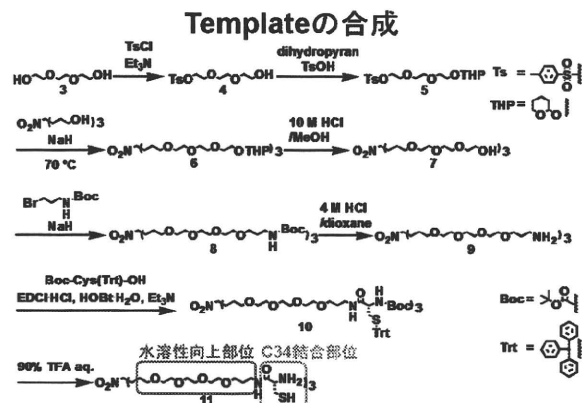


図 5 位相が完全に等価な C34 3 量体アッセムリーのためのテンプレートの合成スキーム

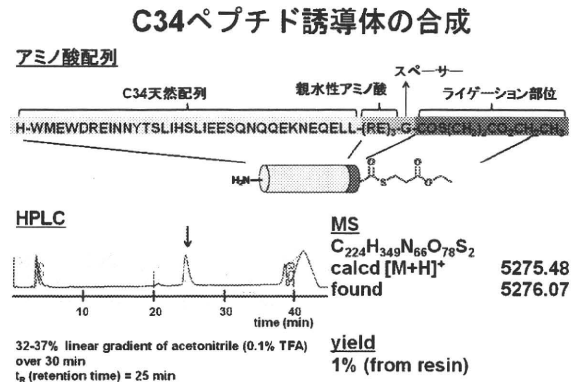


図 6 親水性領域を付加した gp41 の C34 誘導体の合成

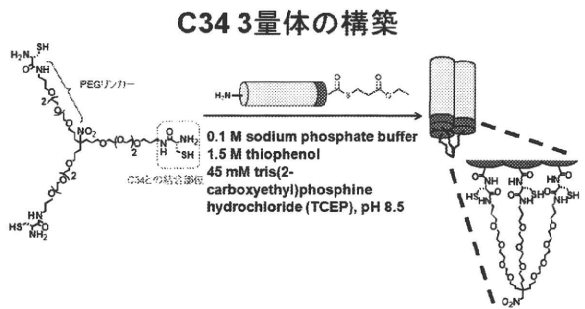


図 7 親水性領域を付加した gp41 の C34 の 3 量体を提示する人工抗原分子の合成

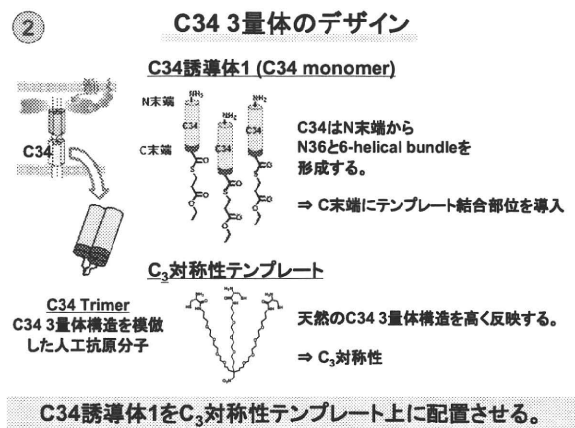


図 8 C34 3 量体のデザイン

3) gp120 の CD4 binding/ コレセプター binding 領域を抗原として抗体誘導の検討

長期末発症の HIV 感染者の間で中和抗体のエピトープとして高く保存されている、gp120 の CD4 binding/コレセプター-binding 領域の

断片ペプチドを、環化と構造固定化のコンセプトを用いて、前年度までに分子設計し、合成した(図 9 右)。コントロールとして鎖状ペプチドも合成し、抗原分子を作製している(図 9 左)。前年度までにマウスおよびウサギを用い、抗体誘導を検討したが、効率よく抗体誘導できなかつた。そこで、この抗原分子に特異的に結合する抗体を得るため、ファージディスプレイライブラリーから *in vitro* アフィニティー選択を行い、得られたクローンをもとにモノクローナル抗体を作製した。

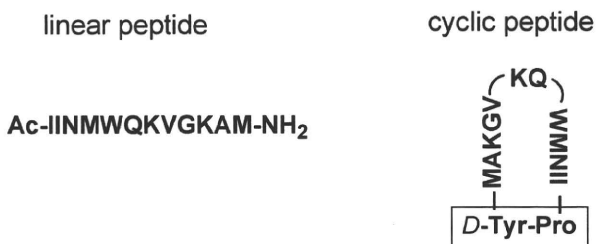


図 9 化学合成した gp120 の CD4 binding/コレプターbinding 領域の鎖状ペプチド(左)とそれを環化した分子構造(右)

4) CD4 mimic 誘導体の合成と抗 HIV 活性の評価および中和抗体等との併用効果

NBD-556 に関して、今年度は 2 級アミンの窒素原子に種々の置換基を導入し、構造活性相関研究を行った(図 10)。合成した化合物の各種 HIV 株に対する抗ウイルス活性を CCR5/PM1 細胞を用いて MTT assay で評価した。FACS 解析により抗 V3 抗体(KD-247)や CD4 induced 抗体の envelope への反応性の変化を sCD4 と NBD-556 で比較した。また、細胞毒性を MTT assay で調べた。

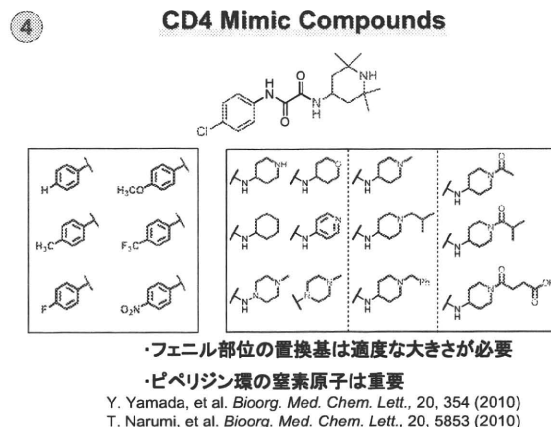


図 10 CD4 ミミックの構造活性相関研究

5) インテグラーゼ阻害剤

HIV の Vif 以外の全構成蛋白質由来の部分ペプチドライブラリー(12-15 残基の長さで、7 残基ずつオーバーラップした、合計で 658 個からなるペプチドライブラリー)を 16 個のペプチドプールに均等に分ける。そのペプチドプールをインテグラーゼの酵素阻害活性でスクリーニングする。活性がヒットしたペプチドプールについて、プールに含まれるペプチドをすべて合成し、1 個ずつアッセイをする。このようにして活性を有するリードのペプチドを見つける。また、阻害活性を有するアミノ酸配列モチーフを探索する。現在、preliminary な結果ではあるが、Vpr 由来の 6 アミノ酸残基配列モチーフを有するリード化合物を得ている。さらに、他の蛋白質由来の部分ペプチド群からも、リード化合物とアミノ酸配列モチーフの探索を進める。見つかったリード化合物については、アラニンスキャン(置換)とアミノ酸削除(deletion)により、活性発現に必須なアミノ酸を同定する。さらに、これらのデータを基に、アミノ酸置換等によりさらなる高活性、かつ低分子のインテグラーゼ阻害剤へ導く。これら合成ペプチドがインテグラーゼの阻害活性を有するかどうか試験する際、インテグラーゼの strand transfer を指標にしたアッセイをする。

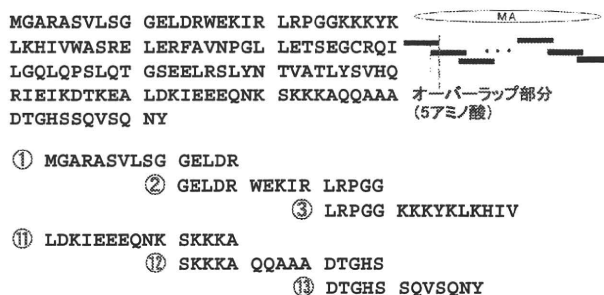
また、細胞膜透過シグナルである Octa-Arg (Arg 8 残基のペプチド、Futaki S, et al. *J. Biol. Chem.*, 276(8), 5836-5840, 2001) を付加した合成ペプチドが細胞内で抗 HIV 活性を有するかどうかを調べる (図 11)。さらに、インテグラーゼ阻害活性と抗 HIV 活性の相関性を検討する。



図 11 細胞膜透過性ペプチドを付与した LQQLLF モチーフペプチド

6) マトリックス蛋白のペプチド断片

マトリックス (MA) 蛋白は、MA 同士の相互作用、あるいは他の蛋白質との相互作用によりウイルス粒子を形成するので、複製をコントロールしていると考えられている (Cannon PM, et al. *J. Virol.*, 71(5), 3474-3483, 1997)。この MA の蛋白質相互作用をターゲットとし、抗 HIV 活性を有するペプチド配列を探索する。MA は 132 個のアミノ酸残基からなる蛋白質であり、主に α -ヘリックス構造から構成されていることから、部分ペプチドは α -ヘリックス構造を保持できるように 15 残基のアミノ酸ごとに分割し、また、分割点に活性モチーフが含まれる可能性を考慮し、部分ペプチドごとに 5 残基のオーバーラップを設け、MA を計 13 個の部分ペプチドとして設計する。さらに、各 MA 部分ペプチドの C 末端に Gly-Cys 配列を追加し、クロロアセチル基を有する細胞膜透過シグナル Octa-Arg を付加し、細胞膜透過性 MA 部分ペプチドライブラリーを構築する (図 12)。

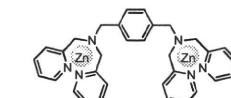
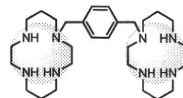
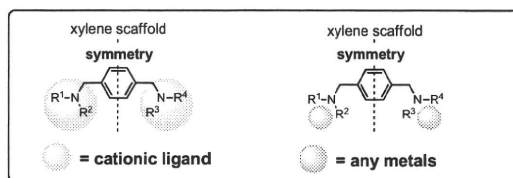


①-⑬ + Gly-Cys → Samples 1-13 → capping peptides C1-13
 Samples 1-13 + ClCH₂CO-(Arg)₈ → MA peptides L1-13

図 12 HIV-1 NL4-3 MA を断片化したオーバーラップペプチドに基づく抗 HIV ペプチドの探索

7) CXCR4 アンタゴニスト

⑦ 低分子 CXCR4 アンタゴニスト



Tamamura, H., et al., *J. Med. Chem.*, 2006, 49, 3412-15.

⑦ *p*-*m*-Xylene scaffold を有する化合物ライブラリーの構築

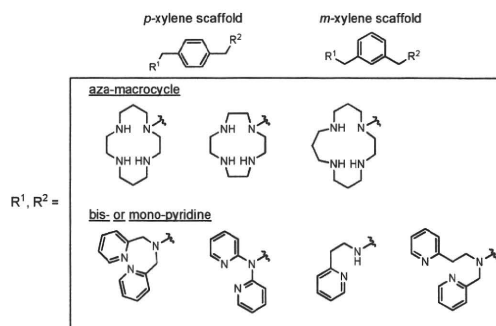


図 13 低分子 CXCR4 アンタゴニストと化合物ライブラリーの構築

図 13 の AMD3100 と二核鉛錯体をリード化合物として、図 13 に示すキシレン骨格をテンプレートと

し含窒素環状構造やピペリジン構造を配位としてライブラリーを構築した。そして、そのライブラリーを用いて抗 HIV 活性を評価する。

(倫理面への配慮)

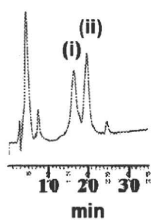
動物実験は、各施設の諸内規や作業方式に従って、動物愛護の精神で動物に与える苦痛の軽減と排除に努めた。

C. 研究結果

1) コレセプター CXCR4 の細胞外ループ (Ecl1-Ecl2) を基にした抗原分子作製&抗体誘導

Ecl1 に関して、水溶性の低さを改善するため、親水性領域 Arg-Glu-Arg-Glu を天然型配列の両端に付与した。研究方法の 1) で述べた、2 種類の合成法を用いて、CXCR4 の細胞外ループを合成し、環化し、エピトープ提示のためのテンプレートへ導入した。それぞれの方法で合成した Ecl 1 & 2 領域の環化ペプチドの HPLC チャートとマススペクトルを図 14 に示した。合成した liner Ecl 1 & 2 ペプチドの HPLC チャートとマススペクトルを図 15 に示した。

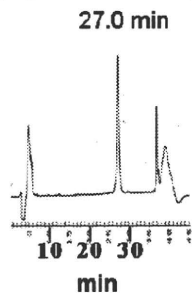
(cyclic Ecl-2)_{3,4}-MAP



30-40% acetonitrile/H₂O,
30 min
(i) (Ecl-2)₃-MAP, 16.8 min
calcd [M+Na]⁺ 13468.5,
found: 13469.1
(ii) (Ecl-2)₄-MAP, 19.8 min
calcd [M+H]⁺: 17257.3,
found: 17263.8

total yield: 12%

(cyclic Ecl-1)₄-MAP

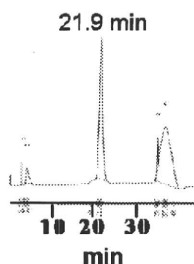


27-36% acetonitrile/H₂O,
30 min
calcd [M+H]⁺: 13551.7
found: 13555.2
yield: 18%

図 14 多価型 Cyclic Ecl & Ecl2 の精製と同

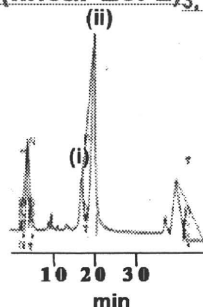
定

(linear Ecl-1)₄-MAP



29-36% acetonitrile/H₂O,
30 min
calcd [M+H]⁺: 13147.7
found: 13150.70
yield: 40%

(linear Ecl-2)_{3,4}-MAP

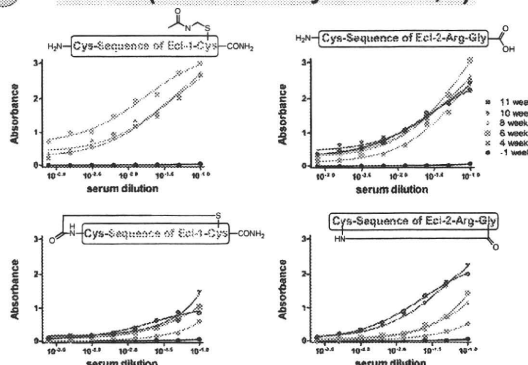


30-40% acetonitrile/H₂O,
30 min
(i) (Ecl-2)₃-MAP, 16.9 min
calcd [M+H]⁺ 13645.5,
found: 13626.4
(ii) (Ecl-2)₄-MAP, 19.4 min
calcd [M+H]⁺: 17493.3,
found: 17497.3

total yield: 32%

図 15 多価型 liner Ecl & Ecl2 の精製と同定

① **ELISA (Linear and Cyclic Ecl-1, 2)**



linear Eclsの方がcyclic Eclsよりも高い抗原性を示した。

図 16 ELISA (Linear and Cyclic Ecl-1, 2)

linear Eclsの方がcyclic Eclsよりも高い抗原性を示した(図 16)。Linear Ecl-1-induced antibodiesp24 assay (western blot) において、4匹のうち2匹のマウス血清が HIV-1 侵入阻害活性を有することを確認した(図 17)。CXCR4 の細胞外領域(Ecl)を合成し、MAP に導入した Ecl-1 が抗体誘導

能を示し、抗体は中和活性を示した。

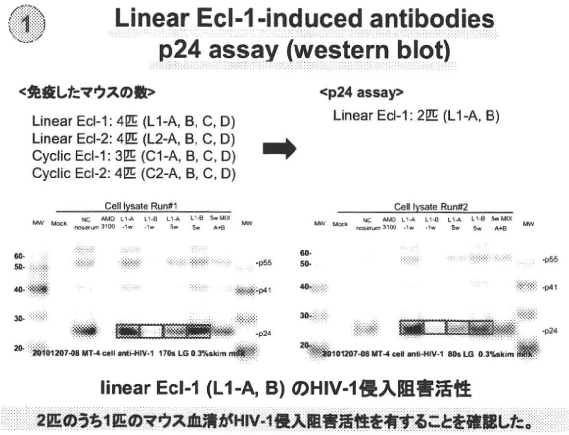


図 17 Linear Ecl-1-induced antibodies p24 assay (western blot)

2) gp41 のヘリカル領域の合成ペプチド(N および C 端側) 3 量体の合成と抗体誘導

N36 の 3 量体は前年度までに合成を終了している。また、マウスで免疫し N36 の 3 量体を認識する抗体が誘導できたことを ELISA で確認し、N36 の 3 量体で免疫して得られた血清は 3 量体を特異的に認識することを見出している。その得られた抗体の中和活性を評価したところ、単量体で免疫して得られた血清と比較したところ、強い中和活性が得られた。gp41-N36 3 量体構造を模倣した抗原分子を HIV 感染モデルラットで免疫し、抗体を誘導した(図 18、19)。

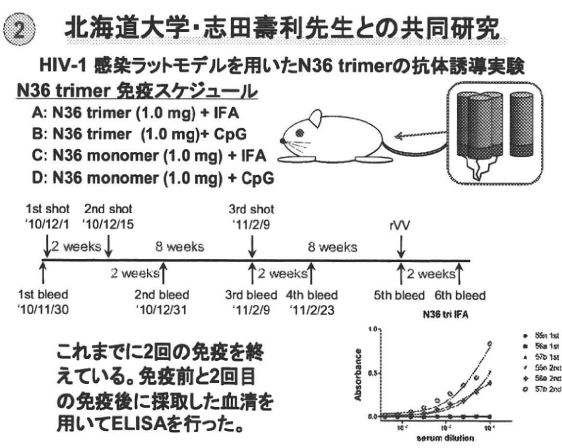


図 18 HIV-1 感染ラットモデルを用いた N36

trimer の抗体誘導実験

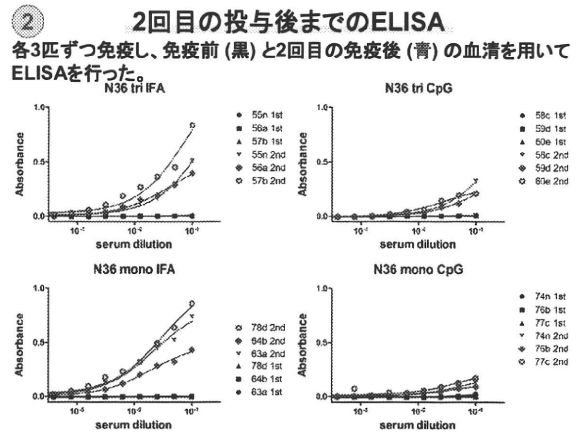


図 19 2 回目の投与後までの ELISA

また、人工テンプレートと親水性領域を付加した gp41 の断片(C 端側)C34 peptide (CysGly-ArgGluArgGluArgGlu-C34) を化学合成し、C34 peptide の 3 量体の構築に成功した。HPLC と MS に導入した抗原分子(三量体形成)を同定した(図 20)。また、CD スペクトルを測定し、テンプレート上に 3 個配置させた C34 ではランダムコイル構造の割合が減少した(図 21)。さらに、N36 peptide 存在下で C34 の 3 量体では 6-helical bundle を形成しにくいことが示唆された(図 22)

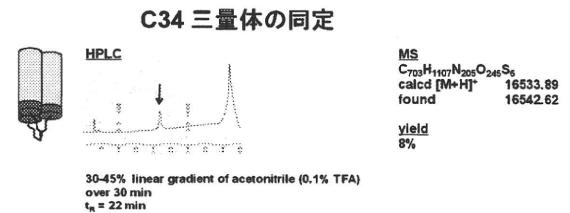


図 20 合成した C34 の 3 量体を提示する人工抗原分子の化合物同定 (HPLC チャートとマスペクトル)

C34 三量体の2次構造解析(CDスペクトル)

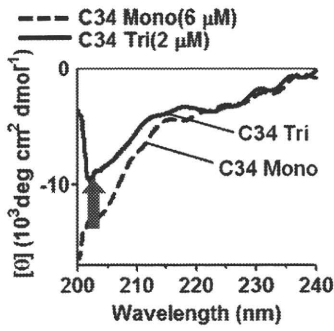


図 21 C34 単量体と C34 3 量体の CD スペクトルの比較

C34 三量体の構造解析(N36との相互作用)

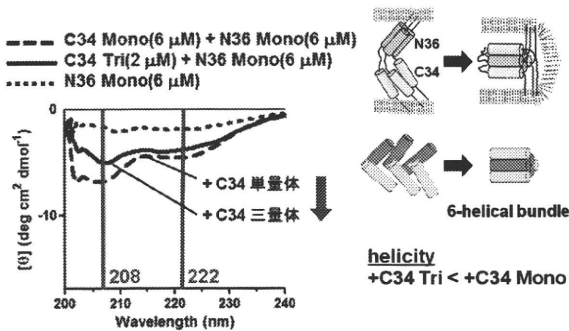


図 22 N36 peptide 存在下での C34 3 量体の CD スペクトル解析

一方、C34 単量体の抗体誘導試験において C34 単量体は十分な抗体誘導能を示した(図 23)。C34 trimer の構造特異的な抗体誘導を確認した(図 24)。また、C34 monomer から誘導された抗体より、C34 trimer から誘導された抗体の方が約 3 倍強い侵入阻害活性を有することが明らかとなった(図 25)。

C34 単量体の抗体誘導試験

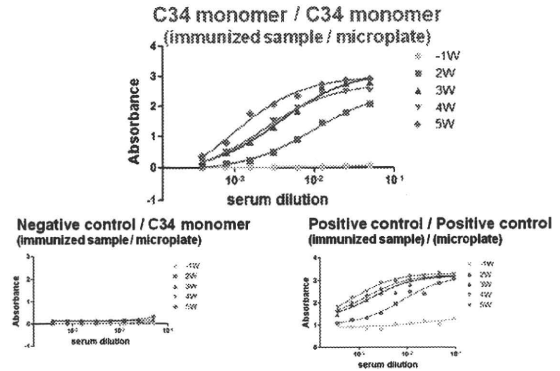


図 23 C34 単量体の抗体誘導試験

② C34 monomer, trimer 交差ELISA

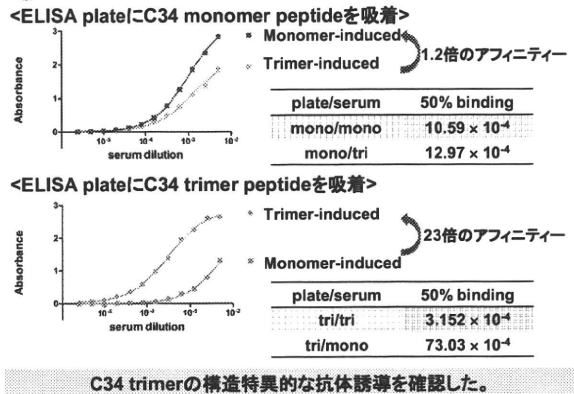


図 24 C34 monomer, trimer 交差 ELISA

	C34	C34 monomer	C34 trimer
IC ₅₀ (nM)	44.4	124	1.30

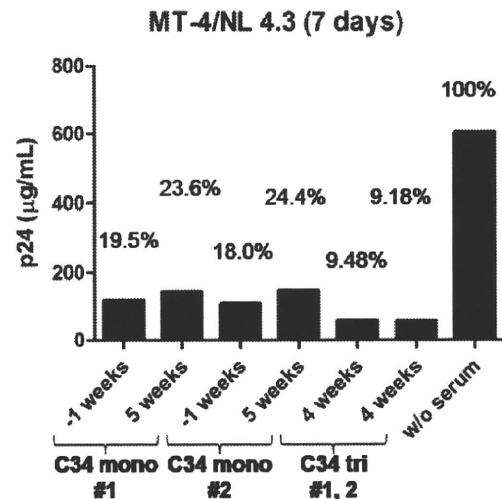


図 25 C34 monomer, trimer 阻害剤・ワクチンとしての活性評価

3) gp120 の CD4 binding/コレセプター binding 領域を抗原として抗体誘導の検討

前年度までに、gp120 の CD4/コレセプター binding 領域の環状ペプチドおよび、コントロールとしての鎖状ペプチドを用いて、抗体誘導能をマウス、およびウサギで評価したが、採取した血清に中和活性が検出できなかった。そこで、別法として、この抗原分子に特異的に結合する抗体を得るため、ファージディスプレイライブラリーから in vitro アフィニティー選択を行った。その結果、アフィニティーを持ったクローンが得られた。また、gp120 のヘアピン領域については Fab ファージディスプレイライブラリーから、これを認識するモノクローナル抗体得た。

4) CD4 mimic 誘導体の合成と抗 HIV 活性の評価および中和抗体等との併用効果および CD4 mimic と T140 との hybrid の合成

CD4 mimic 誘導体に関して、ピペリジン環部のテトラメチル基除去、2 級アミンの窒素原子への種々の置換基の導入による影響を調べた。合成した化合物の FACS 解析により gp120 構造変化誘起能を調べた。その結果、テトラメチル基除去による gp120 構造変化誘起能への影響は見られなかった。

次に、CD4 mimic 誘導体において、ピペリジン環および二級アミンを用いた gp120 構造変化誘起能に関する構造活性相関を調べた。その結果、有意な gp120 構造変化誘起能が見られた誘導体は共通してピペリジン環構造を有していた。ピペリジン環上の窒素原子を修飾したところ、すべてにおいて毒性の低下が見られた。また、窒素原子自体は修飾せず、その周りを嵩高くしたところ、毒性が低下した。よって、窒素原子上の水素原子が、毒性に大きく関与していることが示唆された。

フェニル部位には適度な大きさが必要であ

るが、インドールのような大きな芳香環を持つ化合物では、抗 HIV 活性が低下した。また、フェニル基をピリジニル基に変えても、抗 HIV 活性は大きく低下した。

5) インテグラーゼ阻害剤

細胞膜透過性ペプチドを付与した LQQLLF モチーフペプチドの IN 阻害活性を図 26 に示す。

IN阻害活性

peptide	IC ₅₀ (μM)	
	3'-processing	strand transfer
1	0.006 ± 0.001	0.005 ± 0.002
2	0.004 ± 0.001	0.004 ± 0.001
3	0.83 ± 0.07	0.7 ± 0.06
4	>11.0	6.1 ± 1.1
5	>100	68 ± 1

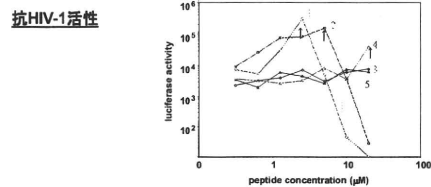


図 26 細胞膜透過性ペプチドを付与した LQQLLF モチーフペプチドの IN 阻害活性

さらに、アラニンスキャンによる IN 阻害活性に重要なアミノ酸残基を同定することにより Phe6, Ile7, Phe9, Ile11 が阻害活性の発現に重要であると考えられる (図 27)。

⑤ インテグラーゼ(IN)阻害ペプチドの創製

Vpr由来でインテグラーゼ阻害活性を有する抗HIV活性ペプチドを見出した。

1 (WT18-R8): Ac-EAIIIRILQQLLFIFHFRIG-RRRRRRRR-NH₂
 2 (WT12-R8): Ac-LQQLLFIFHFRIG-RRRRRRRR-NH₂
 細胞膜透過シグナル

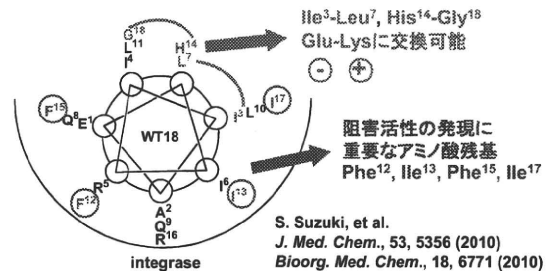


図 27 アラニンスキャンによる IN 阻害活性に重要なアミノ酸残基を同定

6) マトリックス蛋白のペプチド断片

Matrix 断片ペプチドライブラリー (図 28) とそのそれぞれに細胞膜透過性配列を付加したペプチドライブラリー (図 29) の抗 HIV 活性を評価することにより、抗 HIV 活性リードペプチドを見出した。

capping peptide	sequence + CH ₂ CONH ₂ at SH of Cys	MT-4 cell NL4-3	EC ₅₀ (μM)	
			PM1/CCR5 cell NL(AD8)	JR-CSF
C1	H-MGARASVLSGGELDKGC-NH ₂	> 50	ND	ND
C2	Ac-GELDKWEKIRLRPGGGC-NH ₂	> 50	ND	ND
C3	Ac-LRPGGKKQYKLVHIVGC-NH ₂	> 50	ND	ND
C4	Ac-LKHIVWASRELERFAGC-NH ₂	no at 12.5 μM	ND	ND
C5	Ac-LERFAVNPGLLETSEGC-NH ₂	> 50	ND	ND
C6	Ac-LETSEGRQLGQLQGC-NH ₂	49	24% inh. at 6.25 μM	25% inh. at 50 μM
C7	Ac-LGQLQPSLQTGSEELGC-NH ₂	> 50	ND	ND
C8	Ac-GSEELRSLYNTIAVLGC-NH ₂	> 50	ND	ND
C9	Ac-TIAVLYSVHQRIDVKGCNH ₂	30	13	8.1
C10	Ac-RIDVKDTKEALDKIEGC-NH ₂	no at 12.5 μM	ND	ND
C11	Ac-LDKIEEQNKSKKAGC-NH ₂	> 50	ND	ND
C12	Ac-SKKAQAAADTGNNGC-NH ₂	> 50	ND	ND
AZT		0.02	0.46	0.17

図 28 Capping peptides 1-13 の抗 HIV-1 活性

MA peptide	sequence + (CH ₂ CO-R ₆)-NH ₂ at SH of Cys	MT-4 cell NL4-3	EC ₅₀ (μM)	
			PM1/CCR5 cell NL(AD8)	JR-CSF
L1	H-MGARASVLSGGELDKGC-NH ₂	30	30	40
L2	Ac-GELDKWEKIRLRPGGGC-NH ₂	no at 25 μM	ND	ND
L3	Ac-LRPGGKKQYKLVHIVGC-NH ₂	no at 25 μM	ND	ND
L4	Ac-LKHIVWASRELERFAGC-NH ₂	no at 3.1 μM	ND	ND
L5	Ac-LERFAVNPGLLETSEGC-NH ₂	40	42% inh. at 50 μM	42
L6	Ac-LETSEGRQLGQLQGC-NH ₂	33	49% inh. at 50 μM	31
L7	Ac-LGQLQPSLQTGSEELGC-NH ₂	34	37% inh. at 30 μM	35% inh. at 30 μM
L8	Ac-GSEELRSLYNTIAVLGC-NH ₂	2.0	5.8	7.8
L9	Ac-TIAVLYSVHQRIDVKGCNH ₂	2.2	0.43	0.58
L10	Ac-RIDVKDTKEALDKIEGC-NH ₂	37	42% inh. at 50 μM	27
L11	Ac-LDKIEEQNKSKKAGC-NH ₂	15	17% inh. at 25 μM	23
L12	Ac-SKKAQAAADTGNNGC-NH ₂	36	30% inh. at 25 μM	27
L13	Ac-DTGNSQVSNQYGC-NH ₂	18	0.43	11

図 29 膜透過性ペプチド MA peptides の抗 HIV-1 活性

6 MA断片ペプチドSample 9Lの蛍光イメージング

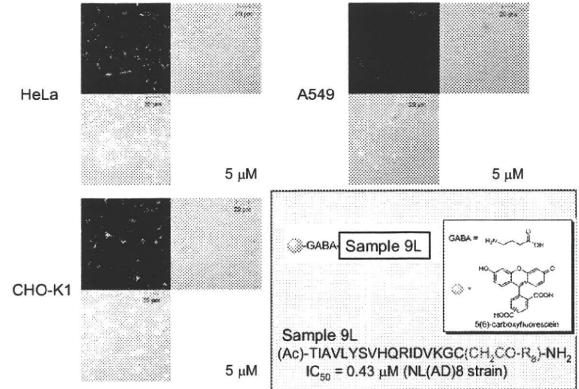


図 30 MA断片ペプチドSample 9Lの蛍光イメージング

蛍光イメージングによる検討により、Oct-Argを付加することでMA部分ペプチドが細胞内導入されていることが明らかとなった(図30)。

このように、HIV-1 MA由来のペプチドは抗 HIV-1 ペプチドのターゲットとして有用であり、これらを基にした抗 HIV 薬の開発が可能であることが示唆された。

7) CXCR4 アンタゴニスト

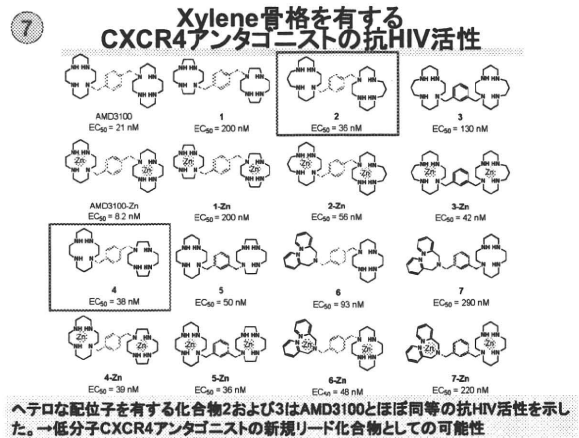


図 31 Xylene 骨格を有する CXCR4 アンタゴニストの抗 HIV 活性

ヘテロな配位子を有する化合物 2 および 3 は AMD3100 とほぼ同等の抗 HIV 活性を示した

(図 31)。低分子 CXCR4 アンタゴニストの新規リード化合物としての可能性が見出せた。

D. 考察

前年度からエイズワクチン開発のためアプローチした 3 種のターゲットはいずれも革新的、斬新なアイデアに基づいている。創薬化学・ペプチド合成の巧みな技術を用い、抗原分子等を順調に合成できた。実際のマウスでの免疫による抗体誘導の実験に加え、ファージディスプレイライブラリーを使った抗体のセレクションも行った。

1) コレセプター CXCR4 の細胞外ループ (Ecl1-Ecl2)

linear Ecls の方が cyclic Ecls よりも高い抗原性を示し、得られた血清が HIV-1 侵入阻害活性を有することを確認した。

2) gp41 のヘリカル領域の合成ペプチド

親水性領域を付加した N36 3 量体および C34 3 量体のマウスでの中和抗体誘導に成功し、今後最適化を検討することにより、有用なワクチンになる可能性がある。現在、gp41-N36 3 量体構造を模倣した抗原分子を HIV 感染モデルラットで免疫している。また、阻害剤として C34 trimer は C34 monomer より強い抗 HIV 活性を有することが明らかとなった。

3) gp120 の CD4 binding/コレセプター binding 領域

gp120 のヘアピン領域については Fab ファージディスプレイライブラリーから、これを認識するモノクローナル抗体を得た。

4) CD4 mimic 誘導体

構造活性相関により、CD4 mimic 誘導体のピペリジン環の窒素原子周辺、およびフェニ

ル部位の構造活性相関を行った。今後の CD4mimic の分子設計に有用な情報を得た。

5) インテグラーゼ阻害剤

Vpr 断片ペプチドから IN 阻害剤を見出し、構造活性相関を展開した。今後ペプチドリード医薬へ展開できる可能性がある。

6) マトリックス蛋白のペプチド断片

Matrix 断片に細胞膜透過性配列を付加したペプチドに、有意な抗 HIV 活性を示すペプチドを見出した。また、蛍光イメージングにより、細胞内導入されていることが明らかとなった。今後、これらを基にした抗 HIV 薬の開発が可能であることが示唆された。

7) CXCR4 アンタゴニスト

Xylene 骨格を有する全く新規な CXCR4 アンタゴニストを見出すことができ、有用な低分子 CXCR4 アンタゴニストの新規リード化合物になると考えられる。

E. 結論

各種のターゲットにおいて、人工抗原分子を順調に合成できた。gp41-N36 の 3 量体および C34 3 量体についてはマウスで中和抗体の創製を確認し、感染モデルラットでも免疫している。コレセプター CXCR4 の N 端、細胞外ループは効率的な合成を行い、マウスでの評価も行い、中和抗体の誘導も確認した。gp120 エピトープもファージでの抗体作製に成功した。また、CD4 mimic 誘導体の抗 HIV 活性および gp120 の構造変化誘起能に関する構造活性相関を行った。これらの結果は今後の HIV 抗体・ワクチン療法の研究において、重要な知見となると思われる。Vpr 断片および Matrix 断片ペプチドより抗 HIV 活性を有する配列を見出し、新規 CXCR4 アンタゴニストも創出した。これら

は新規抗 HIV 剤創製に役立つと思われる。

F. 謝辞

抗体誘導の実験および抗ウイルス活性の測定実験に関して、シンガポール大学、山本直樹教授、大庭賢二博士、国立感染症研究所エイズ研究センター、村上 努主任研究官、駒野 淳主任研究官、北海道大学 遺伝子病制御研究所、志田壽利教授、熊本大学エイズ学研究センター、松下修三教授、吉村和久准教授、原田恵嘉博士にお世話になりました。厚く御礼申し上げます。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tanaka T, Narumi T, Ozaki T, Sohma A, Ohashi N, Hashimoto C, Itotani K, Nomura W, Murakami T, Yamamoto N, Tamamura H. Azamacrocyclic-metal Complexes as CXCR4 Antagonists. *ChemMedChem.*, 2011, *in press*
- 2) Tsutsumi H, Abe S, Mino T, Nomura W, Tamamura H. Intense blue fluorescence in a leucine zipper assembly. *ChemBioChem.*, 2011, *in press*
- 3) Nomura W, Narumi T, Ohashi N, Serizawa Y, Lewin NE, Blumberg PM, Furuta T, Tamamura H. Synthetic Caged DAG-lactones for Photochemically-controlled Activation of Protein Kinase C. *ChemBioChem*, 2011, *in press*
- 4) Ohashi N, Nomura W, Narumi T, Lewin NE, Itotani K, Blumberg PM, Tamamura H. Fluorescent-responsive Synthetic C1b Domains of Protein Kinase C δ as Reporters of Specific High Affinity Ligand Binding. *Bioconjugate Chem.*, 22: 82-87, 2011.
- 5) 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. *Bioorg Med Chem Lett* 20:354-358, 2010.
- 6) Nakahara T, Nomura W, Ohba K, Ohya A, Tanaka T, Hashimoto C, Narumi T, Murakami T, Yamamoto N, Tamamura H. Remodeling of dynamic structures of HIV-1 envelope proteins leads to synthetic antigen molecules inducing neutralizing antibodies. *Bioconjugate Chem* 21(4): 709-714, 2010.
- 7) Melchionna R, Carlo AD, Mori RD, Cappuzzello C, Barberi L, Musarò A, Cencioni

- C, Fujii N, Tamamura H, Crescenzi M, Maurizio C. Napolitano CM, Germani A. Induction of myogenic differentiation by SDF-1 via CXCR4 and CXCR7 receptors. *Muscle Nerve* 41(6): 828-835, 2010.
- 8) 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(15): 7558-7568, 2010.
 - 9) Suzuki S, Urano E, Hashimoto C, Tsutsumi H, Nakahara T, Tanaka T, Nakanishi Y, Maddali K, Han Y, Hamatake M, Miyauchi K, Pommier Y, Beutler JA, Sugiura W, Fuji H, Hoshino T, Itotani K, Wataru W, Narumi T, Yamamoto N, Komano JA, Tamamura H. Peptide HIV-1 integrase inhibitors from HIV-1 gene products. *J Med Chem* 53 (14): 5356-5360, 2010.
 - 10) Suzuki S, Maddali K, Hashimoto C, Urano E, Ohashi N, Tanaka T, Ozaki T, Arai H, Tsutsumi H, Narumi T, Nomura W, Yamamoto N, Pommier Y, Komano JA, Tamamura H. Peptidic HIV integrase inhibitors derived from HIV gene products: Structure-activity relationship studies. *Bioorg Med Chem* 18: 6771-6775, 2010.
 - 11) Narumi T, Ochiai C, Yoshimura K, Harada S, Tanaka T, Nomura W, Arai H, Ozaki T, Ohashi N, Matsushita S, Tamamura H. CD4 mimics targeting the HIV entry mechanism and their hybrid molecules with a CXCR4 antagonist. *Bioorg Med Chem Lett* 20: 5853-5858, 2010.
 - 12) Tanaka T, Nomura W, Narumi T, Masuda A, Tamamura H. Bivalent ligands of CXCR4 with rigid linkers for elucidation of dimerization state in cells. *J Am Chem Soc* 132 (45): 15899-15901, 2010.
 - 13) Nomura W, Mino T, Narumi T, Ohashi N, Masuda A, Hashimoto C, Tsutsumi H, Tamamura H. Development of Crosslink-Type Tag-Probe Pairs for Fluorescent Imaging of Proteins. *Biopolymers: Peptide Science*, 94: 843-852, 2010.
 - 14) Aoki T, Shimizu S, Urano E, Futahashi Y, Hamatake M, Tamamura H, Terashima K, Murakami T, Yamamoto N, Komano J. Improvement of lentiviral vector-mediated gene transduction by genetic engineering of the structural protein Pr55Gag. *Gene Ther* 17(9): 1124-1133, 2010.

著書

- 1) 鳴海哲夫, 玉村啓和. ペプチドミメティックによる創薬研究, 生化学 特集号「ペプチド科学と生化学の接点」(日本生化学会 東京), 82(6): 515 - 523, 2010.

- 2) 野村 渉, 増田朱美, 玉村啓和. エピジェネティックな遺伝子発現制御のための DNA メチル化酵素の創製, 生化学 ミニレビュー(日本生化学会東京), 82(5): 393-397, 2010.
 - 3) Tanaka T, Nomura W, Narumi T, Yoshimura K, Matsushita S, Murakami T, Komano J, Yamamoto N, Tamamura H. From Reverse to Forward Chemical Genomics: Development of Anti-HIV Agent. Peptide Science 2009, Kouji Okamoto (Eds.), The Japanese peptide Society, Osaka, 105-106, 2010.
 - 4) Ohya A, Nakahara T, Nomura W, Ohba K, Tanaka T, Hashimoto C, Narumi T, Murakami T, Yamamoto N, Tamamura H. Synthesis and Evaluation of Artificial Antigen Peptide Based on the Trimeric Form of HIV Fusion Protein. Peptide Science 2009, Kouji Okamoto (Ed.), The Japanese peptide Society, Osaka, 29-32, 2010.
 - 5) Nomura W, Serizawa Y, Ohashi N, Okubo Y, Narumi T, Yoshida K, Furuta T, Tamamura H. Caged DAG-Lactones for Study of Cellular Signaling in a Spatial-and Temporal Specific Manner. Peptide Science 2009, Kouji Okamoto (Ed.), The Japanese peptide Society, Osaka, 347-348, 2010.
 - 6) Ohashi N, Nomura W, Narumi T, Okubo Y, Ikura T, Ito N, Yoshida K, Lewin NE, Blumberg PM, Tamamura H. Fluorescent-Based Orthogonal Sensing Methods for Double Evaluation in PKC Ligands Screening. Peptide Science 2009, Kouji Okamoto (Ed.), The Japanese peptide Society, Osaka, 353-354, 2010.
2. 学会発表
- 1) Tamamura H. Anti-HIV Inhibitors and AIDS Vaccines. International Summer Program 2010. Tokyo, Japan, Sep 6-8, 2010.
 - 2) Tanaka T, Nomura W, Narumi T, Tamamura H. Elucidation of a Dimerization State of a Chemokine Receptor CXCR4 via Chemical Biology Approach Utilizing Novel Bivalent Ligands with Rigid Polyproline Linkers. The 13th Akabori Conference Leipzig 2010: Japanese-German Symposium on Peptide Science. Leipzig, Germany, Sep11-15, 2010.
 - 3) Tamamura H. Peptidic HIV Integrase Inhibitors Derived from HIV Gene Products. 11th KUMAMOTO AIDS Seminer · GCOE Joint International Symposium. Kumamoto, Japan, Oct 6-8, 2010.
 - 4) Hashimoto C, Maddali K, Tanaka T, Narumi T, Nomura W, Yamamoto N, Pommier Y, Komano JA, Tamamura H. Peptidic HIV Integrase Inhibitors Derived from HIV Gene Products. 11th KUMAMOTO AIDS Seminer · GCOE Joint International Symposium. Kumamoto, Japan, Oct 6-8, 2010.
 - 5) Matsushita S, Mouri S, Harada S, Yamada Y, Tamamura H, Yoshimura K. Strategy to Overcome Neutralization Resistance of HIV-1 Primary Isolates. 11th KUMAMOTO AIDS Seminer · GCOE Joint International Symposium. Kumamoto, Japan, Oct 6-8, 2010.
 - 6) Ozaki T, Tanaka T, Narumi T, Arai H, Ohashi N, Hashimoto C, Nomura W, Murakami T, Yamamoto N, Tamamura H. Structure-Activity Relationships of CXCR4 Antagonists Having the Dipicolylamine/Azamacro-Cyclic-Metal Complex Structures. 11th KUMAMOTO AIDS Seminer · GCOE Joint International Symposium. Kumamoto, Japan, Oct 6-8, 2010.
 - 7) Arai H, Narumi T, Ochiai C, Yoshimura K, Harada S, Tanaka T, Nomura W, Ozaki T, Ohashi N, Matsushita S, Tamamura H. Development of Small CD4 Mimic Molecules that Induce Conformational Changes in gp120. 11th KUMAMOTO AIDS Seminer · GCOE Joint International Symposium. Kumamoto, Japan, Oct 6-8, 2010.
 - 8) Masuda A, Nomura W, Urabe A, Tamamura H. Effects of DNA binding and linker length on recombination of artificial zinc-finger recombinase. The 37th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2010. Yokohama, Japan, Nov10-12,2010.
 - 9) Nomura W, Ohashi N, Mori A, Narumi T, Tanaka T, Masuda A, Tsutsumi H, Tamamura H. Novel Tag-probe Pairs for Fluorescent Imaging of Proteins in Living Cells. 5th International Peptide Symposium. Kyoto, Japan, Dec 4-9, 2010.
 - 10) Nomura W, Tanaka T, Masuda A, Narumi T, Tamamura H. Development of a Bivalent Ligand for a Chemokine Receptor CXCR4 by Utilizing Polyproline Helix as a Linker. 5th International Peptide Symposium. Kyoto, Japan, Dec 4-9, 2010.
 - 11) Narumi T, Bode JW. α,α -Dichloroisoxazolidinones for The Synthesis and Chemoselective Peptide Ligation of α -Peptide α -Ketoacids. 5th International Peptide Symposium. Kyoto, Japan, Dec 4-9, 2010.
 - 12) Hashimoto C, Narumi T, Nomura W, Yamamoto N, Tamamura H. Synthesis and Evaluation of CXCR4-derived Peptides Targeting the Development of AIDS Vaccines. 5th International Peptide Symposium. Kyoto, Japan, Dec 4-9, 2010.
 - 13) Nomura W, Masuda A, Okuda T, Barbas III CF, Tamamura H.. Kinetic Analysis of Split DNA

- Methylase in DNA Recognition and Methylation. 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2010). Hawaii, USA, Dec 15-20, 2010.
- 14) 玉村啓和. ペプチド化学を基盤としたケミカル&センシングバイオロジー. 第5回ケミカルバイオロジー・第2回センシングバイオロジーシンポジウム. 東京, 2010年2月23日.
 - 15) 玉村啓和. ケミカルバイオロジーを基盤とした抗HIV剤の創製. 創薬懇話会 2010 in 蔵王. 次世代を担う若手のためのメディシナルケミストリーフォーラム. 宮城, 2010年11月12-13日.
 - 16) 野村 渉. Zinc Finger 融合酵素を用いた革新的ウイルスゲノム改変技術の開発. 第58回日本ウイルス学会学術集会. 徳島, 2010年11月7-9日.
 - 17) 野村 渉, 中原 徹, 大矢亜紀, 大庭賢二, 田中智博, 橋本知恵, 鳴海哲夫, 村上 努, 山本直樹, 玉村啓和. 合成抗原ペプチドによる HIV-1 gp41 の三量体構造を認識する抗体の誘導. 日本薬学会第130年会. 岡山, 2010年3月28-30日.
 - 18) 鳴海哲夫, 落合千裕, 山田裕子, 吉村和久, 原田恵嘉, 大橋南美, 野村 渉, 松下修三, 玉村啓和. HIV-1 外被タンパク質 gp120 の構造変化誘起を指向した低分子 CD4 ミミックの構造活性相関研究. 日本薬学会第130年会. 岡山, 2010年3月28-30日.
 - 19) 鳴海哲夫, 清家俊輔, 野村 渉, 玉村啓和. 新規アミド結合等価体クロロアルケン型ジペプチドイソスターの合成研究. 日本薬学会第130年会. 岡山, 2010年3月28-30日.
 - 20) 大橋南美, 野村 渉, 鳴海哲夫, 奥田善章, 伊倉貞吉, 伊藤暢聡, 吉田清嗣, NE. Lewin, PM. Blumberg, 玉村啓和. 蛍光を用いた PKC リガンド結合評価法の開発. 日本薬学会第130年会. 岡山, 2010年3月28-30日.
 - 21) 田中智博, 野村 渉, 鳴海哲夫, 玉村啓和. 二価型 CXCR4 リガンドの創製と二量体構造解析への応用. 日本薬学会第130年会. 岡山, 2010年3月28-30日.
 - 22) 橋本知恵, 野村 渉, 田中智博, 中原 徹, 鳴海哲夫, 大庭賢二, 村上 努, 山本直樹, 玉村啓和. エイズワクチンを指向した宿主受容体 CXCR4 由来抗原分子の創製. 日本薬学会第130年会. 岡山, 2010年3月28-30日.
 - 23) 増田朱美, 野村 渉, 大庭賢二, 奥田 毅, Barbas, III Carlos F., 山本直樹, 玉村啓和. 標的配列特異的 DNA 組換え酵素の構築を目指した亜鉛フィンガータンパク質の応用. 日本薬学会第130年会. 岡山, 2010年3月28-30日.
 - 24) 野村 渉, 大橋南美, 蓑 友明, 森 あつみ, 鳴海哲夫, 増田朱美, 堤 浩, 玉村啓和. 新規蛍光イメージングツールの創出: クロスリンク型 ZIP タグ-プローブペアの開発. 日本ケミカルバイオロジー学会 第5回年会. 横浜, 2010年5月18-19日.
 - 25) 鳴海哲夫, 清家俊輔, 野村 渉, 玉村啓和. 新規アミド結合等価体の創製研究. クロロアルケン型ジペプチドイソスターの合成研究. 日本ケミカルバイオロジー学会 第5回年会. 横浜, 2010年5月18-19日.
 - 26) 田中智博, 橋本知恵, 小森谷真央, 野村 渉, 鳴海哲夫, 吉村和久, 松下修三, 村上 努, 駒野淳, 大庭賢二, 山本直樹, 玉村啓和. リバースからフォワードへケミカルゲノミクスを活用した抗 HIV 剤の創製. 日本ケミカルバイオロジー学会 第5回年会. 横浜, 2010年5月18-19日.
 - 27) 田中智博, 野村 渉, 鳴海哲夫, 増田朱美, 玉村啓和. 堅固なリンカーを有する二価結合型 CXCR4 リガンドの開発と応用. 日本ケミカルバイオロジー学会 第5回年会. 横浜, 2010年5月18-19日.
 - 28) 橋本知恵, 野村 渉, 中原 徹, 田中智博, 堤浩, 長谷山正樹, 大庭賢二, 鳴海哲夫, 村上 努, 山本直樹, 玉村啓和. HIV 侵入の動的超分子機構を基にしたエイズワクチン開発. 日本ケミカルバイオロジー学会 第5回年会. 横浜, 2010年5月18-19日.
 - 29) 増田朱美, 野村 渉, 奥田 毅, 玉村啓和. 亜鉛フィンガー融合型 DNA 組換え酵素のデザイン. 日本ケミカルバイオロジー学会 第5回年会. 横浜, 2010年5月18-19日.
 - 30) 小森谷真央, 村上 努, 鈴木慎太郎, 鳴海哲夫, 野村 渉, 山本直樹, 玉村啓和. HIV-1 マトリックスタンパク質を基にした新規抗 HIV ペプチドの創出. 日本ケミカルバイオロジー学会 第5回年会. 横浜, 2010年5月18-19日.
 - 31) 田中智博. GPCR 2 量体構造解析を指向したツールの開発. 第9回バイオテクノロジー国際会議. 2010年6月30日.
 - 32) 野村 渉, 田中智博, 増田朱美, 鳴海哲夫, 玉村啓和. 2 価結合型リガンドの新規デザインによる CXCR4 の細胞表面における機能解析. 第4回バイオ関連化学シンポジウム. 大阪, 2010年9月24-26日.
 - 33) 野村 渉, 相馬 晃, 中原 徹, 大庭賢二, 田中智博, 橋本知恵, 鳴海哲夫, 山本直樹, 玉村啓和. HIV-gp41 の三量体構造に特異的な中和抗体を誘導する人工抗原ペプチド. 第54回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2010年10月2日.
 - 34) 鳴海哲夫, 清家俊輔, 野村 渉, 玉村啓和. 新規アミド結合等価体クロロアルケン型ジペプチドイソスターの合成研究. 第54回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2010年10月2日.
 - 35) 鳴海哲夫, 新井啓之, 落合千裕, 尾崎太郎, 吉村和久, 原田恵嘉, 野村 渉, 松下修三, 玉村啓

- 和. HIV 外被タンパク質 gp120 の構造変化誘起を指向した低分子 CD4 ミミックの創製. 第 54 回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2010 年 10 月 2 日.
- 36) 橋本知恵, 鳴海哲夫, 野村 渉, 山本直樹, 玉村啓和. HIV-1 侵入機構を基にした宿主細胞タンパク質由来抗原分子の創製. 第 54 回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2010 年 10 月 2 日.
- 37) 増田朱美, 野村 渉, 卜部亜里沙, 玉村啓和. 亜鉛フィンガー融合酵素による配列特異的 DNA 組換え反応効率の検討. 第 54 回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2010 年 10 月 2 日.
- 38) 小森谷真央, 村上 努, 田中智博, 鈴木慎太郎, 鳴海哲夫, 野村 渉, 山本直樹, 玉村啓和. HIV-1 マトリックスタンパク質を基にした新規抗 HIV ペプチドの創出. 第 54 回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2010 年 10 月 2 日.
- 39) 尾崎太郎, 田中智博, 鳴海哲夫, 新井啓之, 大橋南美, 橋本知恵, 野村 渉, 村上 努, 玉村啓和. 二核亜鉛錯体型 CXCR4 アンタゴニストの構造活性相関研究. 第 54 回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2010 年 10 月 2 日.
- 40) 森 あつみ, 野村 渉, 鳴海哲夫, 大橋南美, 玉村啓和. 細胞内タンパク質の挙動解明を志向したタグ・プローブシステムの開発. 第 54 回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2010 年 10 月 2 日.
- 41) 野村 渉, 中原 徹, 橋本知恵, 大庭賢二, 相馬 晃, 田中智博, 鳴海哲夫, 山本直樹, 玉村啓和. HIV 侵入の動的超分子機構を模倣した立体構造特異的人工抗原分子の創製. 第 36 回反応と合成の進歩シンポジウム. 愛知, 2010 年 11 月 1-2 日.
- 42) 鳴海哲夫, 清家俊輔, 尾崎太郎, 新井啓之, 野村 渉, 玉村啓和. 有機銅試薬によるクロロアルケン型ジペプチドイソスターの合成研究. 第 36 回反応と合成の進歩シンポジウム. 愛知, 2010 年 11 月 1-2 日.
- 43) 小森谷真央, 村上 努, 鳴海哲夫, 野村 渉, 山本直樹, 玉村啓和. マトリックスタンパク質を基にした新規抗 HIV ペプチド. 第 29 回メディシナルケミストリーシンポジウム. 京都, 2010 年 11 月 17-19 日.
- 44) 鳴海哲夫, 新井啓之, 落合千裕, 吉村和久, 原田恵嘉, 野村 渉, 松下修三, 玉村啓和. HIV-1 外被タンパク質 gp120 の構造変化誘起を指向した低分子 CD4 ミミックの構造活性相関研究. 第 29 回メディシナルケミストリーシンポジウム. 京都, 2010 年 11 月 17-19 日.
- 45) 村上 努, 小森谷真央, 鈴木慎太郎, 橋本知恵, 鳴海哲夫, 野村 渉, 山本直樹, 玉村啓和. 細胞膜透過性 MA 部分ペプチドライブラリーを用いた新規抗 HIV-1 ペプチドの探索と創出. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会. 徳島, 2010 年 11 月 7-9 日.
- 46) 近藤麻美, 野村 渉, 玉村啓和, 鈴木陽一, 梁 明秀. 亜鉛フィンガー—LEDGF 融合タンパクを用いた LV ベクターの配列特異的挿入法の開発の試み. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会. 徳島, 2010 年 11 月 7-9 日.
- 47) 橋本知恵, 田中智博, 浦野恵美子, 尾崎太郎, 新井啓之, 鳴海哲夫, 野村 渉, Maddali K, Pommier Y, 山本直樹, 駒野 淳, 玉村啓和. HIV-1 遺伝子産物由来のインテグラーゼ阻害剤の創出. 第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会. 東京, 2010 年 11 月 24-26 日.
- 48) 鳴海哲夫, 新井啓之, 落合千裕, 尾崎太郎, 吉村和久, 原田恵嘉, 野村 渉, 松下修三, 玉村啓和. HIV 外被タンパク質 gp120 の構造変化誘起を指向した低分子 CD4 ミミックの創製. 第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会. 東京, 2010 年 11 月 24-26 日.
- 49) 橋本知恵, 鳴海哲夫, 野村 渉, 中原 徹, 田中智博, 大庭賢二, 相馬 晃, 長谷山正樹, 村上 努, 山本直樹, 玉村啓和. HIV-1 侵入過程の動的超分子機構を基にした新規エイズワクチンの創製. 第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会. 東京, 2010 年 11 月 24-26 日.
- 50) 小森谷真央, 村上 努, 鈴木慎太郎, 鳴海哲夫, 野村 渉, 山本直樹, 玉村啓和. HIV-1 マトリックスタンパク質を基にした新規抗 HIV ペプチドの創出. 第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会. 東京, 2010 年 11 月 24-26 日.
- 51) 尾崎太郎, 田中智博, 宮内浩典, 橋本知恵, 鳴海哲夫, 野村 渉, 山本直樹, 駒野 淳, 玉村啓和. gp120 の CD4 結合サイトを模倣した新規抗原分子の創製. 第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会. 東京, 2010 年 11 月 24-26 日.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

- 1) HIV 立体構造認識抗体誘導ペプチド抗原、及びその合成方法：国際出願番号 PCT/JP2010/003280

厚生労働科学研究費補助金（エイズ研究事業）

分担研究報告書

HIV 感染防止、AIDS 発症防止に関する免疫学的基礎研究

HIV 感染防止粘膜ワクチンの創製

研究分担者 庄司省三 熊本大学名誉教授、熊本保健科学大学 教授

研究要旨 分担研究者は、HIV-1 の粘膜組織を介した伝播の阻止及び腸管関連リンパ組織 (gut-associated lymphatic tissue : GALT)におけるウイルスの増殖を抑えることを視野に入れた粘膜免疫を誘導するワクチンの開発のための基礎研究を行っている。その際、ウイルスが粘膜部位への侵入してきた後に誘導される二次免疫応答よりも速く、ウイルスがスピーディに粘膜面から感染できることに対処する必要がある。本年度は、SIVmac239 外被糖タンパク質 (gp140)、サル CCR5 の UPA に対する自己抗体を誘導する抗原 Rh-cDDR5、M 細胞標的分子 TGDK、及びアジュバンドとして CpG-ODN を結合した Senju vaccine を接種したアカゲザルで誘導された基礎免疫応答が、ある種の交叉抗原(ENV 抗原とは異なるが、構造生物学的にタンパク質としての高次構造が類似している抗原)を接種するだけで基礎免疫により誘導された抗 ENV 抗体を誘導できるという現象を見いだすことができた。さらに誘導された抗体により、SIVmac239 の感染が阻害された。以上の結果から Senju vaccine によって誘導される免疫応答を持続的に誘導させておくことで、ウイルスがスピーディに粘膜面から感染することを阻止する戦略が見い出せた。

A. 研究目的

現行の抗 HIV 療法 (HAART)により、エイズ発症を制御することが可能になったが、ウイルスを完全に排除することができない。HAART を生涯にわたり継続しなければならないことは、患者の心身への大きな負担となるばかりでなく、経済的負担も大きい。このことから、HIV-1 感染後のウイルスの制御のみならず、ワクチンにより HIV-1 感染拡大を防ぐことは、厚生労働行政の観点からも重要になる。

そのような背景から研究分担者は、HIV-1 の伝播阻止と、腸管関連リンパ組織 (GALT)における爆発的なウイルスの増殖を抑えることを視野に入れた粘膜および全身性免疫を誘導する HIV-1 ワクチンの開発を目指している。その際、研究分担者は 1) 初発感染部位である粘膜に特化した粘膜免疫系の賦活、2) 免疫系の破綻の防止、3) 免疫攻撃からの逃避するウイルスへの対応、4) 個体へのスピーディなウイルス感染への対応、の 4 項目を達成することが重要になると考えた。それぞれの課題を達成するために、

1) M 細胞標的分子 TGDK によるワクチン抗原の効率的な GALT への送達、2) Rh-cDDR5 によって誘導される CCR5 の第 2 細胞外ループの前半領域である undecapeptidyl arch (UPA)を認識する抗体による CCR5⁺CD4⁺ リンパ球のウイルスからの保護 3) native な立体構造を保持した 3 量体 gp140 および変性 gp140 による多種多様な抗体の誘導、および 4) 交叉免疫の誘導を利用した抗体価の維持、を手段とすることを考えている。

本年度は、研究分担者が開発している Senju vaccine (Fig. 1)をアカゲザルへ皮下および経口投与し誘導された免疫応答を、交叉免疫抗原によってブーストすることにより、個体へのスピーディなウイルス感染への対応が可能であるかを検討した。

B. 研究方法Senju vaccine の調製

コア抗原（高分子 PEG）に TGDK、Rh-cDDR5、CpG-ODN、SIVmac239 gp140 を共有結合を介してコ

ンジュゲートさせた (Fig. 1)。経口投与させるために、すべてをコンジュゲート後、溶液中に賦形剤として乳糖を加え凍結乾燥し得られた粉末を腸溶性カプセルに封入した。

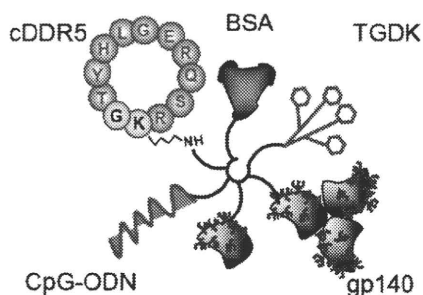


Fig. 1 Senju vaccineのモデル

Senju vaccine、Senju vaccine 誘導體、交叉免疫抗原のアカゲザルへの皮下免疫及び採取したサンプルの調製

抗原の皮下免疫は雌アカゲザルの鼠径部への皮下注射にて行った。対照群として PEG3,500 Da を使用した。

初回免疫前から血清、糞便を回収し、血清は血液を採取後分離し、糞便は約 3 g をアセトンパウダー化しそれぞれ-80°Cで保存した。

ELISA

アカゲザルから回収したサンプルの Rh-cDDR5 及び gp140 に対する抗体の解析は ELISA を用いて行った。ELISA には、一次抗体として採取した血清および糞便抽出液を用いた。

in vitro におけるウイルス感染阻害効果の検討

DEAE dextran を含む SIVmac239 または HIV-1 (JR-FL 株、LAV 株)に、分子量 100,000 cut の透析膜で透析したアカゲザルの血清、Protein A で精製した抗体、または糞便抽出溶液を前処理し、カニクイザル由来 HSC-F 細胞またはインジケーター細胞である MAGIC-5 細胞に接種した。なお、抗 Rh-cDDR5 抗体のみの効果を検討するために gp140 抗原を、一方抗 gp140 抗体のみの効果を検討する場合は Rh-cDDR5

を前処理した。感染阻害の評価は proviral DNA 量を qPCR assay で行う方法と、MAGIC-5 細胞を X-gal で染色してカウントする方法で行った。

(倫理面への配慮) 動物実験は熊本大学実験動物倫理委員会の指針に則って動物愛護の精神で動物に与える苦痛の軽減と排除に最大限努力し行う。

C. 研究結果

交叉免疫によるアカゲザルの血清中の抗 gp140 抗体価の測定

鼠径部へ Senju vaccine を皮下免疫した雌アカゲザルに、交叉免疫抗原を接種し、血清中に誘導された抗 gp140 抗体価の測定を ELISA で行った (Fig. 2)。その結果、交叉免疫後 3 日で抗体価の上昇が観察されはじめ、5 日でピークに達した。

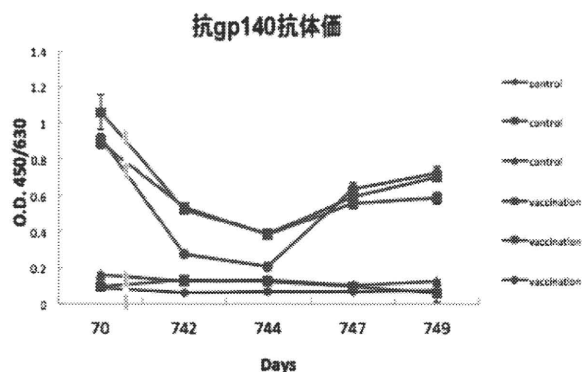


Fig. 2 交叉免疫抗原による抗 gp140 抗体の誘導

交叉免疫抗原を見いだす為に行った実験としては、Fig. 3 ように Senju vaccine のコンポーネント (Senju vaccine 誘導體) を免疫することによって得られた、各種抗血清を用いたプロテオーム解析の結果、分子量約 55 kDa で構造生物学的に HIV-1 ENV glycoprotein と identical part、homologous part、mimic part が多く存在する分子として見いだされたものである。

交叉免疫によって得られた血清中の抗 gp140 抗体

によるウイルス感染阻害効果の検討

交叉免疫抗原を皮下投与した雌アカゲザルの 749 日目の精製抗体により、ウイルス感染阻害効果を検討した。その結果、SIV の数種の株の感染を防止できた。

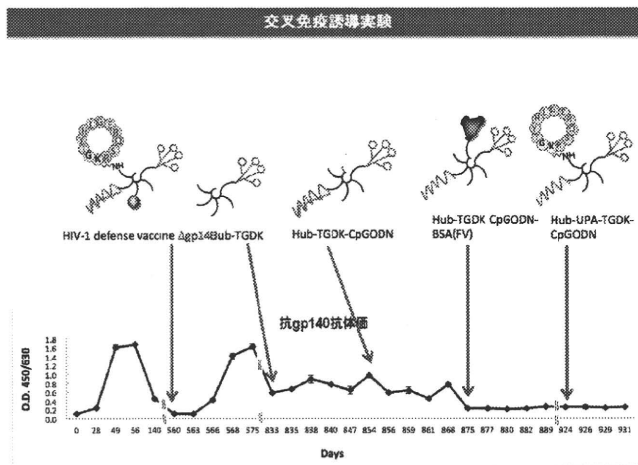


Fig. 3 Senju vaccine 誘導体による交叉免疫

D. 考察

Senju vaccine を皮下投与し、血清および粘液中に誘導された抗体は、ウイルス感染防止効果を示したことから、Senju vaccine は優れた免疫原性を有していることが示唆された。誘導された抗体には、レンチウイルスの外被糖タンパク質に共通の構造を認識する抗体が含まれていると考えられた。これまでに、糖鎖構造を認識する抗体およびタンパク質の高次構造を認識している抗体の両方が誘導されているという実験結果を得ることができた。

一般的に交叉免疫応答とは（特にインフルエンザウイルスの場合の例として）、「一つのウイルス株の接種で誘導した免疫応答が、クレードの異なる他のウイルス株に対しても中和活性を示すこと。」を意味するが、我々が考えている交叉免疫応答とは、「HIV-1 の構成成分の免疫原性 moiety と構造生物学的にほぼ同じ moiety をもつ全く別の抗原タンパク質等により誘導された免疫反応が種々様々な HIV-1 株に対して結合・中和活性を示す。」こと意味している。分担研

究者は、本年度分子量約 55kDa で 3 つの N-linked glycosylation site, と 3 つの O-linked glycosylation site, さらに 4 つの Ser-phosphorylation site を有する交叉免疫抗原を見だし、実際 Senju vaccine によって基礎免疫された個体から抗 gp140 抗体を誘導させることに成功した。さらに、本抗原は安価に入手できることから Senju vaccine を基礎免疫後、ブーストのための抗原として利用できるほか、日常生活の中でも食事等により接種する可能性があることから、HIV が粘膜面に侵入してきた際に、既にウイルスの感染を阻止できるような免疫応答を誘導できていることが可能と思われる。

E. 結論

Senju vaccine のアカゲザルへの免疫によって誘導される抗体には、ウイルス感染防止効果を示すことが明らかになり、優れた免疫原性を有していることが示唆された。

個体へのスピーディなウイルス感染への対応として交叉免疫の誘導を利用した抗体価を維持することが現実的に可能な戦略であることを示すことができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Misumi S, Inoue M, Dochi T, Kishimoto N, Hasegawa N, Takamune N, Shoji S.

Uncoating of human immunodeficiency virus type 1 requires prolyl isomerase Pin1. *J Biol Chem.* (2010) 285(33):25185-95.

- Takamune N, Kuroe T, Tanada N, Shoji S, Misumi S. Suppression of human immunodeficiency virus type-1 production by coexpression of

catalytic-region-deleted N-myristoyltransferase mutants. Biol Pharm Bull. (2010) 33(12):2018-23.

3. Endo M, Gejima S, Endo A, Takamune N, Shoji S, Misumi S. Treatment of breast cancer cells with proteasome inhibitor lactacystin increases the level of sensitivity to cell death induced by human immunodeficiency virus type 1. Biol Pharm Bull. (2010)33(11):1903-6.

2. 学会発表

1. Tetragalloyl-D-Lysine Dendrimer (TGDK)を用いた粘膜ワクチン開発
三隅 将吾¹, 野崎清輝¹, 松本 浩和¹, 甲斐 光¹, 松浦 薫¹, 高橋 義博², 増山 光明¹, 杉本 幸彦¹, 高宗 暢暁¹, 庄司 省三^{*1,3}
¹熊大院医学薬学研究部・薬学生化学分野、²株式会社 新日本科学、³熊本保健科学大学
平成 22 年度 日本生化学会九州支部例会抄録集 p.56
2010/05/22-2010/05/23
2. HIV 感染防止粘膜ワクチンの創製-Absolute rejection vaccine を目指して
三隅将吾¹, 大坪 靖治^{1,2}, 野崎 清輝¹, 八城 勢造¹, 高橋 義博², 増山 光明², 宗岡 篤信², 洲加本 孝幸², 福崎 好一郎, 杉本 幸彦¹, 高宗 暢暁¹, 庄司 省三^{*1,3}
第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集 p.294(86)
2010/11/24-2010/11/26
3. 中国産アカゲザルへの馴化を目的とした SIV の増殖適応変異の解析
工藤康史¹, 城戸啓嗣¹, 大坪靖治², 高橋義博², 増山光明², 宗岡篤信², 杉本幸彦¹, 高宗暢暁¹, 庄司省三^{1,3}, 三隅将吾¹
¹ 熊本大学大学院医学薬学研究部薬学生化学分

野、²株式会社新日本科学、³熊本保健科学大学
第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集 p.437(229)

2010/11/24-2010/11/26

4. HIV defense vaccine により誘導される抗 gp140 抗体の交叉免疫誘導
八城勢造¹, 野崎清輝¹, 三隅将吾², 高橋義博³, 増山光明³, 杉本幸彦², 高宗暢暁², 庄司省三^{2,4}
¹熊大院医学薬学教育部・薬学生化学分野、²熊大院生命科学研究所・薬学生化学分野、³熊本保健科学大学、⁴熊本保健科学大学
第 58 回日本ウイルス学会学術集会抄録集 p.70
2010/11/7-2010/11/9
5. 中国産アカゲザルへの馴化を目的とした SIV の増殖適応変異に関する研究
工藤康史¹, 城戸啓嗣¹, 大坪靖治¹, 杉本幸彦¹, 高宗暢暁¹, 庄司省三^{1,2}, 三隅将吾^{1*}
¹熊本大・薬、²熊本保大
第 27 回日本薬学会九州支部大会抄録集 p.109
2010/12/11-2010/12/12
6. Tetragalloyl-D-Lysine Dendrimer(TGDK)の M 細胞標的能の検討
甲斐光¹, 高宗暢暁¹, 杉本幸彦¹, 庄司省三^{1,2}, 三隅将吾^{*1}
¹熊大院医学薬学研究部・薬学生化学分野、²熊本保健科学大学
第 27 回日本薬学会九州支部大会抄録集 p.108
2010/12/11-2010/12/12
7. M 細胞標的 HIV 粘膜ワクチンの開発のための基礎研究

松浦薫¹、高宗暢暁¹、杉本幸彦¹、庄司省三*^{1,2}、
三隅将吾¹

¹熊大院医学薬学研究部・薬学生化学分野、²熊本保健科学大学

第 27 会日本薬学会九州支部大会講演要旨集

p.110

2010/12/11-2010/12/12

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし