

し、発現しても他薬剤との交差耐性を有しない新規薬剤の開発は、HIV 感染症患者で長期間ウイルス量を測定感度以下にコントロールし、その結果外来通院による長期加療が更に容易となって、患者の QOL 改善と医療・対費用効果の改善にも大きく貢献すると期待される。

今後も 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、新しい作用機序である 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, -02031, -0216A, -1398A, -0519A といった複数の新規抗 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。

G. 研究発表

1. 論文発表 (2010年度以降)

- Ide K, Aoki M, Amano M, Koh Y, Yedidi RS, Das D, Leschenko S, Chapsal B, Ghosh AK, Mitsuya H (2011) Novel HIV-1 protease inhibitors (PIs) containing a bicyclic P2 functional moiety, tetrahydropyrano-tetrahydrofuran, that are potent against multi-PI-resistant HIV-1 variants. *Antimicrob Agents Chemother*. In press.
- Ghosh AK, Martyr CD, Steffey M, Wang YF, Agniswamy J, Amano M, Weber IT, Mitsuya H. (2011) Design, Synthesis, and X-ray structure of substituted bis-tetrahydrofuran (bis-THF)-derived potent HIV-1 protease inhibitors. *ACS Med Chem Lett*. In press.
- Ghosh AK, Chapsal BD, Baldrige A, Steffey MP, Walters DE, Koh Y, Amano M, Mitsuya H. (2011) Design and synthesis of potent HIV-1 protease inhibitors incorporating Hexahydrofuropyranol-derived high affinity P(2) ligands: structure-activity studies and biological evaluation. *J Med Chem*. 27;54(2):622-634.
- Ghosh AK, Xu CX, Rao KV, Baldrige A, Agniswamy J, Wang YF, Weber IT, Aoki M, Miguel SG, Amano M, Mitsuya H. (2010) Probing multidrug-resistance and protein-ligand interactions with oxatricyclic designed ligands in HIV-1 protease inhibitors. *ChemMedChem*. 5 :1850-1854
- Koh Y, Amano M, Towata T, Danish M, Leshchenko-Yashchuk S, Das D, Nakayama M, Tojo Y, Ghosh AK, Mitsuya H. (2010) In vitro selection of highly darunavir-resistant and replication-competent HIV-1 variants using a mixture of clinical HIV-1 isolates resistant to multiple conventional protease inhibitors. *J Virol*. 84: 11961-11969.
- Tojo Y, Koh Y, Amano M, Aoki M, Das D, Kulkarni S, Anderson DD, Ghosh AK, Mitsuya H. (2010) Novel protease inhibitors (PIs) containing macrocyclic components and 3(R),3a(S),6a(R)-bis-tetrahydro-furanyl - urethane that are potent against multi-PI-resistant HIV-1 variants in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*. 54:3460-3470.
- Ghosh AK, Gemma S, Simoni E, Baldrige A, Walters DE, Ide K, Tojo

Y, Koh Y, Amano M, Mitsuya H. (2010) Synthesis and biological evaluation of novel allophenylnorstatine-based HIV-1 protease inhibitors incorporating high affinity P2-ligands. *Bioorg Med Chem Lett.* 20:1241-1246.

2. 学会発表 (2010年度・国際学会のみ)

1. “The Binary Protease Inhibitor, Darunavir, Has a High Genetic Barrier to the Emergence of Resistant HIV-1 Variants” Yasuhiro Koh, M Aoki, M Amano, H Ogata-Aoki, S Leschenko-Yashchuk, A Ghosh, and H Mitsuya, 17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. February 27 - March 2, 2010 in San Francisco, CA No. p559 (Poster)
2. “Novel HIV-1 protease inhibitors (PIs) containing bis-tetrahydrofuran (*bis*-THF) and a novel polycyclic ligand” Kazuhiko Ide, Manabu Aoki, Yasuhiro Koh, Masayuki Amano, Sarang Kulkarni, David D. Anderson, Bruno Chapsal, Arun K. Ghosh, and Hiroaki Mitsuya, XVIII International AIDS conference, July 18-23, 2010 in Vienna, Austria, No. MOAA0102 (Oral)

H. 知的所有権の出願・登録状況

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-haloadenosine derivative

Date of Issuance: March 4, 2008

US Patent Number: 7,470,506

Erickson; Satoru Kohgo, Kashima-gun (JP); Hiroshi Ohrai, 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

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* スクリーニング—

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 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 プロジェクト研究員

研究要旨：HIV-1 のライフサイクルにおいて，プロウイルス DNA からの転写過程は，ウイルスゲノム RNA が増幅する唯一のステップであり，この過程を阻害する薬剤は，新規の抗エイズ薬になると思われる。そこで，本研究は HIV-1 転写（遺伝子発現）阻害活性を有する新規リード化合物の同定を目的として，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。ドッキングスコアの良好な化合物について，HIV-1 慢性潜伏感染細胞を用いて，それらの抗 HIV-1 活性を評価したところ，2 種類の類似化合物に選択的な抗ウイルス活性を認めた。さらに，データベースの中からこれらの誘導体を選び出し，それらの抗 HIV-1 活性を評価したところ，より強い活性（EC₅₀ 値：160 nM）を示す化合物を得ることに成功した。

A. 研究目的

現在，米国 FDA が認可している抗エイズ治療薬は，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。これらの薬剤を組み合わせたエイズ治療（antiretroviral therapy）により，エイズ患者の予後は著しく改善した。

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，エイズ治療の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，既に臨床で使用されている。

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 RNA が増幅する唯一のステップであり，これは HIV-1 の複製に必須である。これまでに，我々の研究グループや他のいくつかグループにおいて，HIV-1 の転写を標的とした阻害剤開発に関する多くの研究がなされてきたが，未だに治療薬として開発が成功したものはない。

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により開始されるこ

とが知られている。従って、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。昨年度の本研究では、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* スクリーニングを行った結果、HIV-1 の急性感染系で抗 HIV-1 活性を示す3種類の新規薬剤の同定に成功したことを報告した。しかしながら、その抗ウイルス活性は低く、さらにその後の研究から、これらの薬剤は HIV-1 の慢性感染系では活性を示さなかった。このことは、これらの薬剤の作用機序が HIV-1 の転写以外にあることを示唆しており、実際のエイズ治療を考慮すると、これらの薬剤の開発は困難であると判断した。そこで今年度は、cyclin T1 の Tat/TAR RNA 相互作用領域に対する *in silico* スクリーニングで最適なドッキングスコアを示した化合物について、それらの抗ウイルス効果を慢性感染系で評価し、真に HIV-1 転写の過程に働く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* スクリーニングに用いる 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* スクリーニング**：コンピュータソフト 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 HIV-1

Tat/TAR RNA が結合する領域において、低分子化合物が結合すると想定されるポケットを探索し、それに対して先に選別した化合物の *in silico* ドッキングを行った。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。

細胞株：細胞は、HIV-1 慢性感染細胞株である OM-10.1 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、TNF- α 刺激された OM-10.1 細胞のウイルス産生を調べることにより判定した。具体的には、種々の濃度の薬剤存在下で OM-10.1 細胞を培養した。2 時間後、TNF- α を培養液に加え、さらに 24 時間培養した。ウイルス産生量は、培養上清中における HIV-1 p24 を ELISA 法により測定した。また、薬剤の細胞毒性は、生細胞数を色素 (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 と複合体の構築と *in silico* スクリーニングの標的サイト：Cyclin T1 は、CDK9, HIV-1 由来の Tat/TAR RNA と複合体を形成し、HIV-1 の転写を活性化する。従って、cyclin T1 の Tat/TAR RNA 相互作用サイトは、HIV-1 転写阻害剤開発の標的となることが考えられる。Cyclin T1 の Tat/TAR RNA 相互作用サイトに対する低分子化合物の *in silico* スクリーニングを行うために、コンピュータソフト MOE を用いて、Tat/TAR RNA と複合体を形成している際の cyclin T1 のモデル構造を構築した (図 1)。

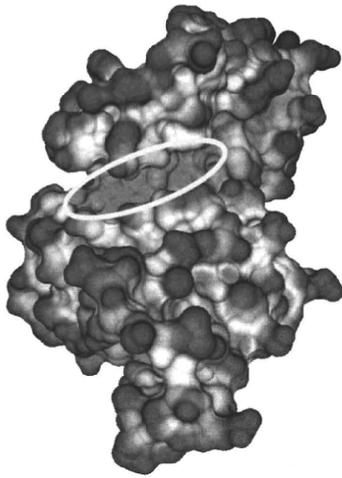
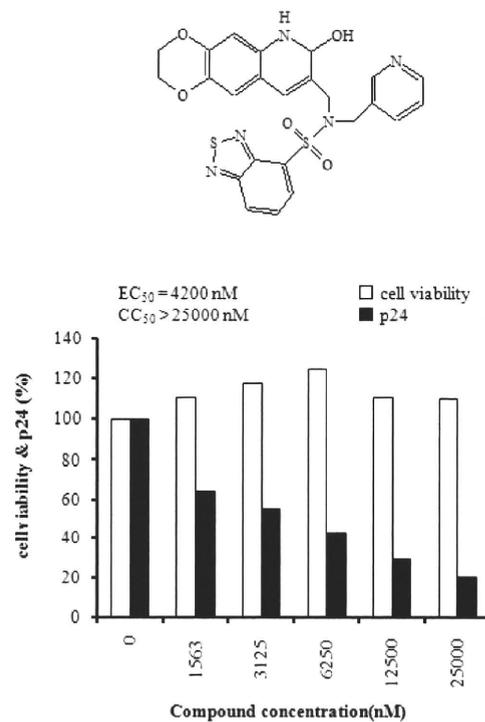


図1. Cyclin T1 のモデル構造と *In silico* スクリーニングの標的サイト (黄色の円内).

さらに, 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の近傍に低分子化合物がはまり込む可能性があるポケットが位置していることを見出した (図1の黄色の円内)。このポケットに結合する薬剤は, cyclin T1 と Tat/TAR RNA との複合体形成を阻害し, HIV-1 転写を阻害すると考えられたので, 本研究では, この領域を標的とした化合物の *in silico* スクリーニングを実施した。3,000,000 化合物のスクリーニング後, 化合物と cyclin T1 間の静電相互作用エネルギー, van der Waals エネルギーと, 化合物の歪みエネルギーの総和で算出されるドッキングスコアが最適な 254 種の化合物の合成を依頼した。

抗 HIV-1 活性: *In silico* スクリーニングの結果, ドッキングスコアが最適であった化合物について, OM-10.1 細胞を用いた HIV-1 慢性感染系を使って, それらの抗 HIV-1 活性を評価した。その結果, 2 種の類似化合物において, 選択的な抗 HIV-1 活性が認められた (図2)。さらに, データベースの中からこれらの誘導体を選び出し, それらの抗 HIV-1 活性を評価したところ, より強い活性 (EC_{50} 値: 160 nM) を示す化合物を得ることに成功した。 (図3)。

(A)



(B)

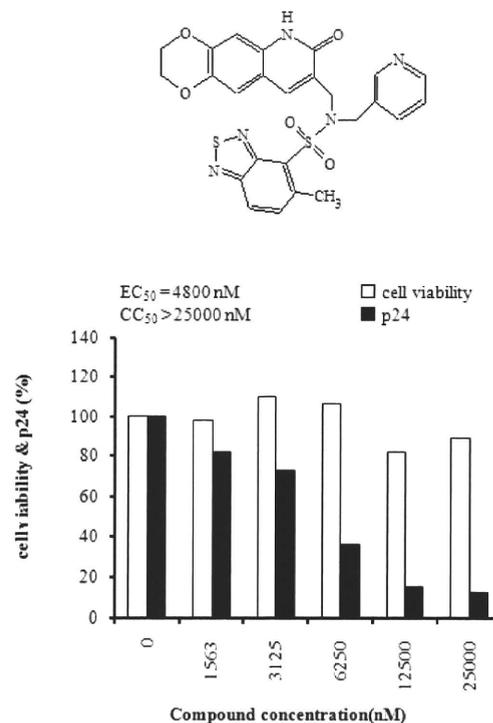


図2. 同定された2薬剤の構造と OM-10.1 細胞における抗 HIV-1 活性.

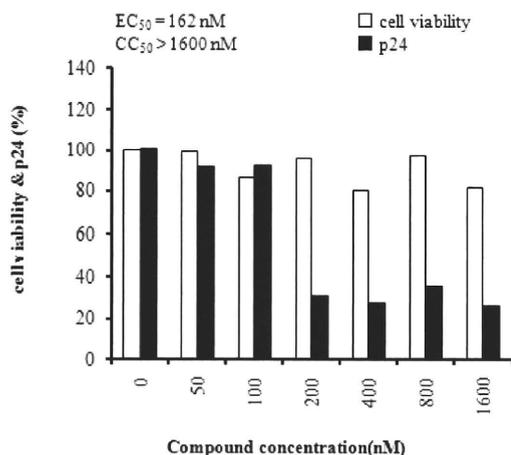
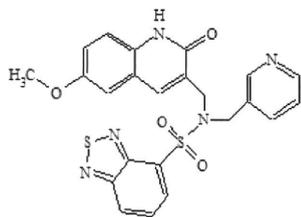


図 3. 活性が増強した薬剤の構造と OM-10.1 細胞における抗 HIV-1 活性。

D. 考察

現在、エイズ治療で用いられている薬剤のほとんどは、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、本研究は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* スクリーニングを行った。

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* スクリーニングを行い、ドッキングスコアの良好な化合物を選び出し、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）。また、

昨年度の報告において、HIV-1 Tat/TAR RNA 結合時の cyclin T1 の構造に対して *in silico* スクリーニングを行った結果、*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。しかしながら、これら 3 種類の薬剤の活性は弱く（ EC_{50} 値：24.5–68.1 μM ）、また、これらの活性は HIV-1_{MB} が感染した CEM 細胞を用いた急性感染系でのみ認められ、慢性感染細胞を用いたアッセイにおいては、見られなかった（data not shown）。そこで、今年度の本研究は、HIV-1 Tat/TAR RNA 結合時の cyclin T1 の構造に対して *in silico* スクリーニングを行うことは、昨年度と同様であるが、その後、最適なドッキングスコアを示した化合物の抗 HIV-1 活性を、急性感染系ではなく慢性感染系の OM10.1 細胞を用いて検証していくことにした。その結果、非常に構造が類似した 2 種類同定することに成功した（ EC_{50} 値：4,200, 4,800 nM）。さらに、化学構造を基に、これらの化合物の構造類似体を再度選び出し、抗 HIV-1 活性を評価したところ、活性が向上した誘導体を新たに 1 つ同定することが出来た（ EC_{50} 値：160 nM）。今後は、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うとともに、これまでに得られている構造活性相関に関する結果（図 4）を参考に、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行く。さらに、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する予定である。

E. 結論

HIV-1 転写阻害薬は HIV-1 ゲノム RNA の増幅を直接抑制する点で、新規の抗エイズ薬の有望な候補であると考えられる。今回、本研究で同定された薬剤は、cyclin T1 の HIV-1 Tat/TAR RNA 相互作用領域を標的とした *in silico* スクリーニングにより発見された薬剤であり、慢性

感染系において抗 HIV-1 活性を示すことから、HIV-1 転写阻害薬のリードとなる可能性を秘めている。今後は、より高い活性と選択性を有

する化合物を求めて、合成展開と作用機序解析を進める必要があると思われる。

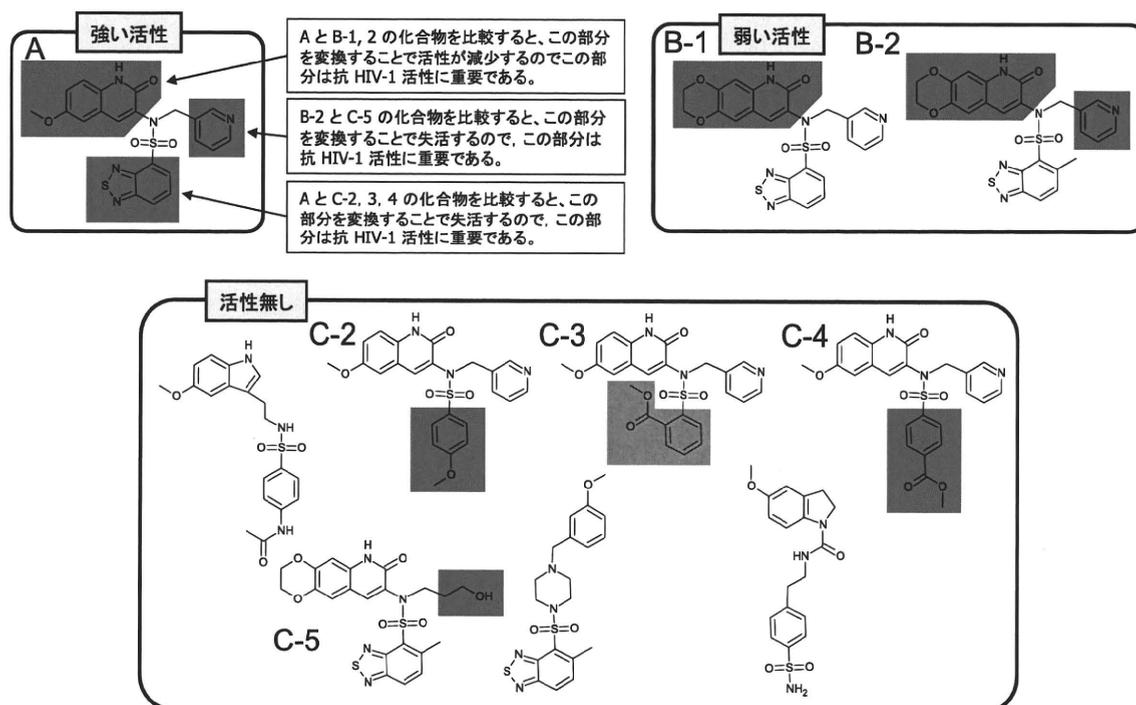


図4. 今年度の本研究で同定されたシリーズの構造活性相関のまとめ

G. 研究発表

(論文発表)

1. Aoyama H, Baba M, Hashimoto Y. Nitrogen-containing fused-heteroaromatic compounds as anti-bovine viral diarrhea (BVDV) agents. *Curr. Bioact. Compd.* **6**: 118-128 (2010).
2. Nakamura M, Aoyama A, Salim MTA, Okamoto M, Baba M, Miyachi H, Hashimoto Y, Aoyama H. Structural development studies of anti-hepatitis C virus agents with a phenanthridinone skeleton. *Bioorg. Ned. Chem.* **18**: 2402-2411 (2010).
3. Salim MTA, Okamoto M, Hosoda S, Aoyama H, Hashimoto Y, Baba M. Anti-bovine viral diarrhea virus activity of novel diphenylmethane derivatives. *Antiviral Chem. Chemother.* **20**: 193-200 (2010).
4. Hamasaki T, Uto T, Akagi T, Akashi M, Baba M. Modulation of gene expression related to Toll-like receptor signaling in dendritic cells by poly(γ -glutamic acid) nanoparticles. *Clin. Vaccine Immunol.* **17**: 748-756 (2010).
5. Himeno A, Akagi T, Uto T, Wang X, Baba M, Ibuki K, Matsuyama M, Horiike M, Igarashi T, Miura T, Akashi M. Evaluation of the immune response and protective effects of rhesus macaques vaccinated with biodegradable nanoparticles carrying gp120 human immunodeficiency virus. *Vaccine* **28**: 5377-5385 (2010).
6. Misawa T, Salim MTA, Okamoto M, Baba M, Aoyama H, Hashimoto Y, Sugita K. Synthesis and anti-hepatitis C virus activity of morpholino triazine derivatives. *Heterocycles* **81**: 1419-1426 (2010).

7. Salim MTA, Goto Y, Hamasaki T, Okamoto M, Aoyama H, Hashimoto Y, Musiu S, Paeshuysse J, Neyts J, Froeyen M, Herdewijn P, Baba M. Highly potent and selective inhibition of bovine viral diarrhoea virus replication by γ -carboline derivatives. *Antiviral Res.* **88**: 263-268 (2010).
 8. 馬場昌範, 中田浩智, 朝光かおり, 駒野 淳, 岡本実佳, 杉浦 互. シンポジウム「これからの抗 HIV 薬研究の進むべき方向」. 日本エイズ学会誌. **12**: 74-80, 2010.
 9. 馬場昌範. HIV 感染症/AIDS 治療の進歩の展望—HIV のアキレス腱は他にもあるか—. 血液フロンティア **20**: 2167-2173 (2010).
- (学会発表)
1. Hamasaki T, Toyama M, Baba M. A novel and selective inhibitor of ATL cells. 5th German-Japanese HIV-Symposium, May 10 2010, Tokyo, Japan.
 2. Ordonez P, Hamasaki T, Isono Y, Ikejiri M, Sakakibara N, Maruyama T, Baba M. Design, synthesis and anti-HIV-1 evaluation of novel substituted uracil derivatives as potent NNRTIs. 5th German-Japanese HIV-Symposium, May 10 2010, Tokyo, Japan.
 3. 馬場昌範. 新しいクラスの逆転写酵素阻害薬 4'-ethynyl-d4T. 第 19 回抗ウイルス療法研究会シンポジウム「HIV 感染症/AIDS 治療の最前線」, 2010 年 5 月 20 日, 熊本.
 4. Ordonez P, Hamasaki T, Isono Y, Ikejiri M, Sakakibara N, Maruyama T, Baba M. Design and synthesis of novel substituted uracil derivatives as potential reverse transcriptase inhibitors for therapy and prevention against HIV-1 infection. *18th International AIDS Congress*. July 19, 2010, Vienna, Austria.
 5. Okamoto M, Chono H, Baba M. Transduction of CD4⁺ T lymphocytes by the retroviral vector expressing an Escherichia coli endoribonuclease MazF induces cellular resistance to HIV-1 replication. *18th International AIDS Congress*. July 19, 2010, Vienna, Austria.
 6. 吉盛利奈, 濱崎隆之, 岡本実佳, 宇都宮 與, 馬場昌範. 第 3 回 HTLV-1 研究会・合同班会議, 2010 年 8 月 27-29 日, 東京.
 7. 外山政明, 濱崎隆之, 馬場昌範. ATL 細胞特異的増殖抑制活性を有する新規化合物. 第 47 回日本ウイルス学会九州支部総会, 2010 年 9 月 4 日, 宮崎.
 8. 外山政明, 濱崎隆之, 岡本実佳, 馬場昌範. 抗 ATL 活性を有する新規薬剤と cepharanthine との併用効果. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 2010 年 11 月 9 日, 徳島.
 9. 濱崎隆之, 外山政明, 岡本実佳, 馬場昌範. HTLV-1 感染細胞の増殖を特異的に抑制する低分子化合物(TMNA)の作用機序解析. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 2010 年 11 月 9 日, 徳島.
 10. 張 旭, 馬場昌範, 有馬直道, 岡本実佳, 若尾雅広, 隅田泰生. アレイ型シュガーチップを用いたウイルスの糖鎖結合性の探索. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 2010 年 11 月 9 日, 徳島.
 11. Ordonez Paula, Takayuki Hamasaki, Masanori Baba, Mika Okamoto. Identification of cellular factors differentially expressed during HIV-1 latency and reactivation. 第 24 回日本エイズ学会学術集会, 2010 年 11 月 25 日, 東京.
 12. 濱崎隆之, 岡本実佳, 馬場昌範. Cyclin T1/Tat/TAR RNA 複合体中の cyclin T1 を標的とした薬剤の *in silico* スクリーニング. 第 24 回日本エイズ学会学術集会, 2010 年 11 月 25 日, 東京.
 13. 岡本実佳, 蝶野英人, 津田大嗣, 井上晃一, 峰野純一, 馬場昌範. HIV-1 感染 RNA 分解酵素 MazF 導入リンパ球の長期継代培養の

解析. 第 24 回日本エイズ学会学術集会,
2010 年 11 月 25 日, 東京.

14. 蝶野英人, 津田大嗣, 井上晃一, 峰野純一,
岡本実佳, 馬場昌範. RNA 分解酵素 MazF
導入リンパ球における HIV-1 感染時の細胞
機能の解析. 第 24 回日本エイズ学会学術
集会, 2010 年 11 月 25 日, 東京.
15. 岡本実佳, 蝶野英人, 津田大嗣, 井上晃一,

峰野純一, 馬場昌範. HIV-1 感染 RNA 分解
酵素 MazF 導入リンパ球の長期継代培養の
解析. 第 24 回日本エイズ学会学術集会,
2010 年 11 月 25 日, 東京.

H. 知的財産権の出願・登録状況

本研究で発見された抗 HIV-1 活性を有する
化合物について, 現在, 特許準備中である。

H I V 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

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。SC34 や SC34EK などの次世代融合阻害剤の耐性プロファイルを解析した結果、これまで特に重要であると考えられてきた gp41 領域内の変異は主に耐性度に関与し、gp120 領域内の変異は複製能の改善に働いていることを明らかにした。

A. 研究目的

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) がコードする外皮糖タンパク質 gp120 および gp41 は、HIV が宿主細胞に感染する際の最初のステップである吸着・融合反応において重要な役割を果たしている。HIV gp120 は、宿主細胞膜上に発現している CD4 を主受容体として認識し、次いで CXCR4 や CCR5 といったケモカイン受容体との相互作用を経て、自身の構造変化が誘導される。その結果、HIV gp41 が露出し、gp41 の N 末端側に位置する疎水性領域が細胞膜を貫通する。HIV と宿主細胞の融合過程では、gp41 の N 末端ヘリックス領域 (N-HR) と C 末端ヘリックス領域 (C-HR) が安定的な六量体を形成することにより HIV エンベロープ (Env) と宿主細胞膜が近接し、膜融合反応が進行すると考えられている。

HIV と宿主細胞との膜融合反応を標的とした融合阻害剤 T-20 は現在臨床応用されている。T-20 は gp41 C-HR のアミノ酸配列に由来するペプチド製剤であり、N-HR と C-HR の相互作用をデコイとして競合することにより膜融合反応を阻害し、抗 HIV 活性を示すと考えられている。しかしながら現在までに融合過程を阻害する薬剤は T-20 のみであることから、長期にわたる使用に

より耐性 HIV が出現した場合は、他のクラスの薬に変更せざるを得ない。このような背景から、T-20 に耐性となった HIV にも効果を示す新規膜融合阻害剤の開発が強く望まれている。

研究分担者らはこれまでに、SC34 や SC34EK といった次世代ペプチド性融合阻害剤を開発してきた。これらの融合阻害剤は優れた抗 HIV-1 活性を示し、T-20 に対する耐性 HIV にも効果を示すことを明らかにしてきた。また、これらの阻害剤耐性に関与する gp41 内の変異を同定した。しかしながら、Env は gp120 と gp41 から構成されるため、融合阻害剤が gp41 だけでなく gp120 にも影響を及ぼしている可能性が考えられる。実際、gp120 内の変異が T-20 感受性に影響を与えるという報告があることから、SC34 や SC34EK 耐性株にも gp120 変異が起こっている可能性が考えられる。本研究では SC34 や SC34EK に対する耐性 HIV における gp120 領域内の耐性変異を明らかにすると共に、それらが薬剤感受性や複製能に与える影響を解析した。

B. 研究方法

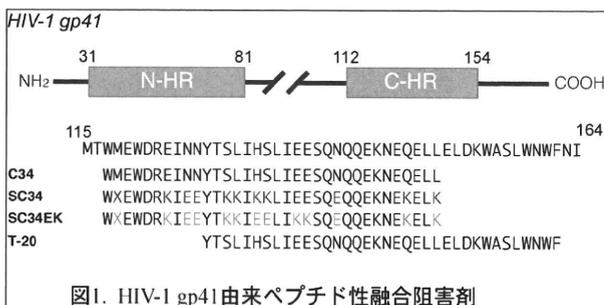
(1) 抗ウイルス剤

図 1 に示す、HIV-1 gp41 C-HR 由来のペプ

チドである T-20、C34、SC34、および SC34EK は化学合成により作製した。

核酸系逆転写酵素阻害剤

2',3'-dideoxycytidine (ddC)は Sigma-Aldrich 社より購入した。



(2) SC34 および SC34EK に対する耐性株における gp120 領域内の変異の同定

SC34 または SC34EK に対する耐性ウイルスの誘導で得られた耐性 HIV を MT-2 細胞に感染させて DNA を抽出し、PCR でウイルスの gp120 領域を増幅し塩基配列を決定した。

(3) HIV env 組換えウイルスの作製

gp120 の組換えには、pNL4-3 の、NdeI サイトを含む EcoRI-NheI 断片 (1,513bp) をクローニングした pBSgp120WT に対して、耐性株由来の NdeI-NheI 断片をサブクローニングした。変異 gp120 を含む pBSgp120 から

EcoRI-NheI 断片を野生型あるいはすでに gp41 の変異を導入した pNL4-3 に戻すことで目的の変異を有する感染性クローンを得た。これらのクローンを 293T 細胞にトランスフェクションし、48 時間後に培養上清を回収し、ウイルス液とした。

(4) 抗 HIV-1 活性の測定

抗 HIV-1 活性の評価には multinuclear activation of a galactosidase indicator (MAGI) 法を用いて、既報に従って行った。

(5) 複製能の解析

MT-2 細胞にそれぞれの HIV-1 クローンを 500 MAGI ユニットで感染させた。4 時間後細胞を洗浄し、培養を開始した。経時的に培養上清を回収し、その中に含まれる感染性ウイルス粒子を MAGI 法にて定量した。

(倫理面への配慮)

基礎的研究であり、該当しない。

G. 研究結果

(1) SC34 および SC34EK に対する耐性ウイルスにおける gp120 領域内に誘導された変異の解析

SC34 および SC34EK に対する耐性誘導により得られた最終継代ウイルス (SC34 は継代数 122[P122]、SC34EK は P120) 感染細胞から DNA を抽出し、gp120 領域の塩基配列

表 1. SC34 および SC34EK により誘導された変異の融合阻害剤感受性

Mutation(s)	EC ₅₀ (nM) ± SD (fold resistance compared to NL4-3)				
	ddC	T-20	C34	SC34	SC34EK
HIV-1 _{NL4-3}	430 ± 121	20 ± 3	3.3 ± 0.6	1.4 ± 0.3	0.7 ± 0.4
<i>gp41</i>					
SC34(P122)gp41 ^b	329 ± 33 (0.8)	1,727 ± 255 (86)	24 ± 4 (7.3)	2,189 ± 287 (1,564)	23 ± 1 (33)
<i>gp120</i>					
SC34(P122)gp120 ^c	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 ^d	542 ± 68 (1.3)	>5,000 (>250)	>1,000 (>303)	2,827 ± 439 (2,019)	33 ± 4 (47)
<i>gp41</i>					
SC34EK(P120)gp41 ^e	536 ± 20 (1.2)	112 ± 38 (5.6)	70 ± 9 (21)	20 ± 1 (14)	75 ± 8 (107)
<i>gp120</i>					
SC34EK(P120)gp120 ^f	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(P120)gp160 ^g	344 ± 42 (0.8)	435 ± 139 (22)	378 ± 133 (115)	5.2 ± 0.5 (3.7)	72 ± 18 (103)

HIV-1_{SC34(P122)gp41} は gp41 に D36G/I37K/R46K/Q52R/Q56R/N126K/S138A/E151K/K154N/N163D/L204I/L210F 変異を含む。
HIV-1_{SC34(P122)gp120} は gp120 に K107Q/S134N/S136G/F147L 変異を含む。
HIV-1_{SC34(P122)gp160} は HIV-1_{SC34(P122)gp41} と HIV-1_{SC34(P122)gp120} の変異を含む。
HIV-1_{SC34EK(P120)gp41} は gp41 に D36G/Q41R/N43K/A96D/N126K/H132Y/V182I/P203S/L204I/S241F/H258Q/A312T 変異を含む。
HIV-1_{SC34EK(P120)gp120} は gp120 に V37A/V59I/S100K/S115N/R138S/D139N/A310T 変異を含む。
HIV-1_{SC34EK(P120)gp160} は HIV-1_{SC34EK(P120)gp41} と HIV-1_{SC34EK(P120)gp120} の変異を含む。

を決定した。その結果、HIV-1_{SC34P122}では、K107K/Q(KとQの混合体)、S134N、S136G、およびF147L変異の導入が明らかになった。一方、HIV-1_{SC34EKp120}では、V37A、V59I、S100K、S115N、R138S、D139N、およびA310Tの変異が導入されていた。

(2) 耐性変異の薬剤感受性への影響

これらの変異を HIV-1 野生株感染性クローン pNL4-3 に導入し、ウイルスを作製して耐性度を解析した。その結果、SC34 の P122 時点での gp120 変異を導入したウイルスである HIV-1_{SC34(P122)gp120} では、野生株と比較して、用いた全てのペプチド性融合阻害剤には耐性を示さず、むしろ感受性の亢進が認められた(表1)。一方、SC34EK の P120 時点での gp120 変異を導入したウイルス、HIV-1_{SC34EK(P120)gp120} では T-20 に対して若干の耐性を示したが、SC34 や SC34EK には耐性を示さなかった。

続いて、これらの gp120 領域内の変異を、すでに gp41 領域の変異を導入した感染性クローン (HIV-1_{SC34(P122)gp41} および HIV-1_{SC34EK(P120)gp41}) に組み込み、HIV-1_{SC34(P122)gp160} および HIV-1_{SC34EK(P120)gp160} を作製し、感受性への影響を評価した(表1)。HIV-1_{SC34(P122)gp160} では HIV-1_{SC34(P122)gp41} と比較して、T-20 および C34 に対する大幅な耐性度の上昇が認められたが、SC34 や SC34EK に対する耐性度には大きな変化が見られなかった。同様に、HIV-1_{SC34EK(P120)gp160} においても HIV-1_{SC34EK(P120)gp41} と比較して、T-20 や C34 に対する耐性度に4倍から5倍程度の上昇が認められたが、SC34 や SC34EK に対してはほとんど影響が認められなかった。

(3) SC34 および SC34EK により誘導された env 領域内の変異が複製能におよぼす影響の解析

HIV-1_{SC34(P122)gp41} においては野生株と比較して、若干の複製能の低下が認められた(図2)。一方、HIV-1_{SC34(P122)gp120} では野生株と同程度の複製能が認められた。

HIV-1_{SC34(P122)gp160} でも野生株と同程度の複

製能が認められたことから、gp41 内の変異により低下した複製能を、gp120 内の変異が改善したと考えられた。

また、HIV-1_{SC34EK(P120)gp41} においては著しい複製能の低下が認められた。

HIV-1_{SC34EK(P120)gp120} では野生株と比較して、若干複製能の低下が認められたが、

HIV-1_{SC34EK(P120)gp160} では、HIV-1_{SC34EK(P120)gp41} よりも複製能が改善したことから、SC34 の場合と同様、gp120 領域内の変異が複製能改善に働いていることが示された。

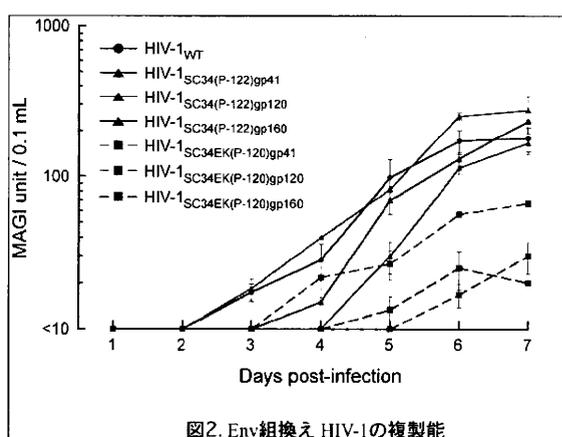


図2. Env組換え HIV-1の複製能

D. 考察

分担研究者らが開発した SC34 や SC34EK は、第一世代の融合阻害剤である T-20 に対する耐性株にも著効を示す次世代融合阻害剤の候補ペプチドである。これらのペプチドは gp41 領域内に導入されるアミノ酸変異が組み合わさることにより薬剤感受性が低下することをこれまでに明らかにした。本研究で解明した gp120 領域内の変異の役割は、多面的であった。すなわち、gp120 領域内の変異は gp41 領域内の変異と組み合わさることで、T-20 や C34 に対する耐性度を増加させたが、SC34 や SC34EK に対しては影響がほとんど見られなかったことから、同じ gp120 内の変異でも薬剤によってその効果が異なることが示された。また、複製能への影響については、gp120 領域内の変異はそれら自身では複製能への影響はほとんど見られなかったが、gp41 領域内の変異と組み合わさることで、複製能の改善が認められたことから、gp120 領域内の変異は複製能

を改善する二次変異であると考えられた。

E. 結論

次世代融合阻害剤の耐性プロファイルについて、これまで特に重要であると考えられてきた gp41 領域内の変異に加えて、gp120 領域内の変異も耐性度や複製能に重要な影響を及ぼすことを明らかにした。

F. 健康危険情報

該当事項無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Izumi K, Nakamura S, Nakano H, Shimura K, Sakagami Y, Oishi S, Uchiyama S, Ohkubo T, Kobayashi Y, Fujii N, Matsuoka M, Kodama E. Characterization of HIV-1 resistance to a fusion inhibitor, N36, derived from the gp41 amino terminal heptad repeat. **Antiviral Res** 87: 179-86, 2010.
2. Shimane K, Kodama EN, Nakase I, Futaki S, Sakurai Y, Sakagami Y, Li X, Hattori T, Sarafianos SG, Matsuoka M. Rev-derived peptides inhibit HIV-1 replication by antagonism of Rev and a co-receptor, CXCR4. **Int J Biochem Cell Biol.** 42:1482-8, 2010.
3. Shimura K, Nameki D, Kajiwara K, Watanabe K, Sakagami Y, Oishi S, Fujii N, Matsuoka M, Sarafianos SG, Kodama E. Resistance profiles of novel electrostatically HIV-1 fusion inhibitors. **J Biol Chem**, 285: 39471-80, 2010.

2. 学会発表

該当事項無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当事項無し

2. 実用新案登録

該当事項無し

3. その他

該当事項無し

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 の中和抵抗性メカニズムとして、エンベロープ蛋白 (ENV) の三量体形成による中和エピトープの構造的遮蔽があるが、その分子メカニズムは十分解明されていない。我々は、gp120 V2 領域の L175P 変異に注目し、中和抵抗性および感受性に及ぼす効果を調べた。抗体パネルを用いた中和感受性と ENV 三量体および gp120 単量体に対する反応性の研究から、L175P 変異は ENV 三量体及び gp120 単量体に CD4 結合に似た立体構造変化をもたらし、様々な抗体に対する中和感受性を飛躍的に増強することを観察した。また、ヘテロ三量体を用いた解析から、V2 領域が Env 三量体内の隣接した分子に作用し、V3 エピトープを露出させることが示唆された。これらより、もともと gp120 単量体はフレキシブルで、liganded form も unliganded form もとりうる状態にあるが、三量体形成の過程で unliganded form に固定され、CD4 結合後でなければコレセプター結合部位が露出しないような構造をとると考えられた。V2 をターゲットにした小分子の開発は、中和抗体を用いた治療開発に役立つと考えられる。

A. 研究目的

HIV-1 の中和抵抗性メカニズムとして、エンベロープ蛋白 (ENV) の三量体形成による中和エピトープの構造的遮蔽があるが、その分子メカニズムは十分解明されていない。我々は、中和エスケープ研究の過程で見出した gp120、V2 領域の変異 (L175P) に注目し、中和抵抗性および感受性メカニズムの解明を目的として、L175P 変異の効果を調べた。

B. 研究方法

175p 変異エンベロープタンパク (Env) 発現ベクターの作成：

JR-FL の wild type のエンベロープ発現ベクター pCXN-JR-FL に Quick Change site-directed mutagenesis kit を用いて、V2 領域の 175 番目のアミノ酸変異を導入した pCXN-FL (L175P)。L175P と V3 領域の変異 (G312E;EPGR) を持ったエンベロープ発現ベクター pCXN-FL (175P+EPGR) も同じ方法を用いた。

pseudotype virus の作製と single-round 中和実験：

293T 細胞に、pSG3^{Δenv}、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。pseudovirus の力価 (TCID₅₀) は TZM-b1 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-b1 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; サンプルの発光強度、c; 細胞のみのバックグラウンド発光強度、n; 抗体無しサンプルの発光強度) で計算した。

エンベロープ発現細胞表面への抗体結合活性の測定：

EnvA および EnvN プライマーで増幅させ、pXL-TOPO ベクターにクローニングした gp160 遺伝子を pDNR-1r (Clontech) の EcoRI サイトへ挿入した。Cre recombinase (Clontech) を使用し、pLP-IRES2-EGFP へ組み換えた。作製したベクターは pLP-EGFP-JRFLwt、pLP-EGFP-JRFL (175P) とした。pRSV-Rev と pLP-EGFP-Env を 293T 細胞にトランスフェクトし、37°C で 36 時間培養した。細胞を 4×10^5 になるように調整し、抗 Env 抗体を 50 μl 加え

インキュベートし、洗浄後 anti-human IgG-PerCP を反応させ FACSCalibur (Beckton-Dickinson) で解析した。

gp120 単量体と中和単クローン抗体の結合実験

gp120-capture ELISA の方法に従って行った。抗 gp120-C5 sheep 抗体 (D7324, Aalto Bioreagents) を coat したプレートに 0.5% NP-40 にて lysis させた pseudotype virus を含んだ培養上清または細胞抽出液を反応させ、希釈した単クローン抗体を加えて室温で 2 時間反応させ、洗浄後、抗ヒト IgG-ALP と反応後 Substrate を用いて発色させた。

(倫理面への配慮)

我々は本年度報告の研究に加え、新規の中和抗体の樹立を行っている。この目的のための HIV 感染症例由来の血液検体を用いたウイルス分離及び塩基配列同定、中和抗体感受性試験などに関しては、臨床研究に関する倫理指針に従い、学内倫理委員会の承認を得た説明と同意書を用いて同意を得たのちに採血した(臨床研究登録 UMIN000004720)。

C. 研究結果

V2(175P)変異を導入した JR-FL 株の抗体パネルに対する中和感受性

HIV-1 の中和抵抗性メカニズムとして、エンベロープ蛋白 (ENV) の三量体形成による中和エピトープの構造的遮蔽があるが、その分子メカニズムは十分解明されていない。我々は、中和エスケープ研究の過程で見出した gp120、V2 領域の変異 (L175P) に注目し、中和抵抗性および感受性メカニズムの解明を目的として、L175P 変異の効果を調べた。中和抗体パネルとしては、我々が作成したものを含めて、5 種類の抗 V3 抗体、5 種類の CD4 結合部位に対する抗体 (CD4bs 抗体) 及び 3 種類の CD4 結合後に露出するエピトープに対する抗体 (CD4i 抗体) を用いた。TZM-bl 細胞を標的細胞として用いる single-round 中和実験にて、V2 変異 (175P 変異) を導入した JR-FL_{175P} 株は、wt に比較して 0.5 γ を含めた 5 種類の V3 抗体に高度感受性になるばかりでなく、b12 以外の CD4bs 抗体

にも CD4i 抗体にも感受性になった。特に、CD4i 抗体は JR-FLwt に対しては全く中和活性を示さないが 175P 変異が導入されると、中和感受性になった。一方、b12 や gp41 に対する抗体、CCR5 inhibitor などに対する中和感受性には影響がなかった。

機能的 ENV 三量体への結合活性と gp120 単量体への結合活性の比較

ENV 発現ベクターを導入した細胞表面に発現する機能的 ENV 三量体への抗体の結合活性を、中和抗体パネルによる細胞表面染色にて比較した。175P 変異を導入した JR-FL_{175P} 株への抗体の結合は pLP-EGFP-JRFL (175P) をトランスフェクトした細胞の FACS 解析にておこなった。JR-FL_{175P} 株への抗体の結合は wt に比較して 0.5 γ を含めた 5 種類の V3 抗体に著名に増強されるばかりでなく、b12 以外の CD4bs 抗体も CD4i 抗体も反応性の増強がみられた。特に、CD4i 抗体はもともと、JR-FLwt に対しての反応は弱いか全くないが、175P 変異株に対しては高度反応性になった。一方、b12 や glycan に対する抗体、2G12 に対する反応性に変化はなかった。次に、pseudovirus または pseudovirus 産生細胞を用いた gp120/160 単量体に対する抗体の結合活性を ELISA で検討した。gp120 単量体への結合活性を比較すると、5 種類の V3 抗体および、b12 以外の CD4bs 抗体では、反応性に違いはなかったが、CD4i 抗体は 175P 変異株に対して反応性は増強された。これらの事実は、175P 変異を導入した JR-FL_{175P} 株は単量体でも三量体でも CD4-bound form をとっている可能性を示唆する。一方、gp120 の unliganded form に affinity が強いと考えられる b12 はむしろ単量体では V2 変異 (175P) を導入した gp120 への反応性が低下している。しかし、FACS で観察した場合、b12 の反応性は wt と変わらないことから、JR-FL_{175P} 株の機能的 ENV 三量体では unliganded form もとりうるのではないかと考えられる。

ヘテロ三量体 gp120 をもった pseudotype virus に対する V3 抗体の中和活性の検討

V2 領域 L175P 変異を持った gp120 が、三量体

内の隣接した gp120 のエピトープの遮蔽に関与しているのかどうか確かめるため、wt と L175P のヘテロ三量体を持った pseudotype virus を作製し、中和感受性を変えるか確かめた。いくつかのグループより 2 種類の Env 発現ベクターを co-transfection することにより、ウイルス表面上にヘテロ三量体を持つ pseudotype virus が産生されることが示されている。この方法を使用した場合、pseudotype virus 上には wt ホモ三量体、L175P ホモ三量体、wt と L175P のヘテロ三量体の 3 種類の三量体 Env が発現することが予想される。L175P 変異がヘテロ三量体内の隣接した gp120 のエピトープへの中和抗体活性に影響を与えるか確かめるため、L175P を含んだ gp120 の中和抗体エピトープに変異を入れ、L175P のホモ三量体には抗体が反応しないようにする必要がある。以前、抗 V3 抗体 0.5 γ で中和抵抗性 JR-FL を誘導した結果、V3-tip のアミノ酸-GPGR が -EPGR に変異したウイルスが出現し、0.5 γ に完全に耐性になることを見出した (data not shown)。この V3 変異体ウイルスは CCR5 阻害薬 TAK-779、抗 CD4 抗体 RPA-T4 に対しても wt と感受性が変わらず、感染性に影響が少ないことが分かっている (data not shown)。そこでこの変異 (G312E) を L175P Env へ導入したベクターを作製し、このベクターと wt の Env 発現ベクターを用いてヘテロ三量体 pseudotype virus を作製して中和実験を行った。その結果、L175P と V3 変異ホモ三量体 pseudotype virus (L175P /V3m) に対しては全く中和感受性を示さなかったが、wt と L175P/V3m のヘテロ三量体 pseudotype virus (wt + L175P/V3m) は、0.5 γ に対して wt より有意に中和感受性となった。447-52D に対しても同様な結果が得られた。以上の結果より、V2 領域 L175P 変異は三量体 Env 内の隣接した gp120 に作用し、V3 エピトープを露出させることが示唆された。

D. 考察

抗体パネルを用いた中和感受性と ENV 三量体および gp120 単量体に対する反応性の研究から、V2 領域の一方所に導入された L175P 変異は、CD4 結合後におこる立体構造変化

(liganded form) に似た構造変化をもたらし、様々な抗体に対する中和感受性を飛躍的に増強すると考えられた。一方、FACS 分析で観察されるように、ENV 三量体では、unliganded form もとりうるのではないかと考えられる。また、ヘテロ三量体を用いた解析から、V2 の 175 番目周辺は、三量体 Env 内の隣接した gp120 に作用し、V3 エピトープを露出させることが示唆された。これらより、もともと gp120 単量体はフレキシブルで、liganded form も unliganded form もとりうる状態にあるが、ENV が三量体を形成する過程で unliganded form に固定され、CD4 結合後でなければコレセプター結合部位が露出しないような構造をとるものと考えられた。V2 のこの領域が V3-tip と直接相互作用するかどうかなど今後の研究が重要である。

E. 結論

ENV の三量体形成による中和抵抗性に V2 領域の変異 (L175P) が重要な役割を果たすことを証明した。V2 をターゲットにした小分子の開発は、中和抗体を用いた治療開発に役立つと考えられる。

F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

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
海外
1. 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. July.18-23, 2010. Vienna, Austria.
 2. Liu, M., Shibata, J., Harada, S., Takehisa, J., Yoshimura, K., Matsushita, S. : Impact of a point mutation V2 (L175P) in neutralization resistance mediated by functional trimer formation of Env. *AIDS Vaccine* 2010, Sep.28-Oct.1, 2010. Atlanta, USA.
- 国内
1. Matsushita, S., Mouri, S., Harada, S., Yamada, Y., Tamamura, H., Yoshimura, K. : Strategy to overcome neutralization of HIV-1 primary isolates. 11th GCOE joint international Symposium Kumamoto AIDS Seminar, Oct.6-8, 2010. Kumamoto.
 2. Harada, S., Hamaji A., Matsushita, S., Yoshimura, K. : Evaluation and selection of the env gene of HIV-1 primary isolates during in vitro selection of raltegravir. 11th GCOE joint international Symposium Kumamoto AIDS Seminar, Oct.6-8, 2010. Kumamoto.
3. 吉村和久、原田恵嘉、濱治有希、松下修三:CCR5 阻害剤 maraviroc (MVC) 耐性誘導による Env の変異が中和抗体感受性に及ぼす影響. 第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2010.11.24 -26. 東京.
 4. 原田恵嘉、濱治有希、松下修三、吉村和久:ラルテグラビルは HIV-1 の in vitro 馴化における Env 選択に影響する. 第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2010.11.24 -26. 東京.
 5. 松下修三:共催シンポジウム2 最新の情報を明日の臨床に生かす-Year in review 2010-「病態の研究と治療薬開発の未来」. 第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2010.11.24 -26. 東京.
 6. 松下修三:共催セミナー8 HIV 陽性者のメンタルヘルスへのアプローチ その2 メンタルヘルス問題の「今」を考える:どのように捉え、どうアプローチすることが可能だろうか?〜うつと依存症(薬物)を中心に. 第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2010.11.24 -26. 東京.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
- なし

NK 細胞受容体を制御する効果的な HIV ペプチド ワクチン開発のための研究

研究分担者 前仲勝実 北海道大学大学院薬学研究院 教授

研究要旨 ヒト主要組織適合性抗原(MHC)であるヒト白血球抗原(HLA)分子を認識するヒトナチュラルキラー(NK)細胞受容体 Killer cell Ig-like receptor (KIR)群はウイルス感染を防御するNK細胞や細胞傷害性T細胞(CTL)に発現し、特に抑制型 KIR 群はこれらの細胞の不活性化に関与すると考えられている。本研究では、HIV-1 gp120 由来ペプチドの変異が抑制型 KIR 群との親和性を変化させ、免疫不全へと導くことを示唆する事実に基づき、HIV 由来ペプチドの同定とその KIR 群に対する親和性を網羅的に検証することにより、KIR 群を正確に制御できる効果的な HIV ペプチド候補分子を見いだすことを目指している。本年度は、HIV ゲノム配列から設計した HLA - C 結合モチーフを持つ 9 アミノ酸ペプチドライブラリーから簡易巻き戻し系と微量ゲルろ過解析法などを組み合わせて、実際に HLA-C に結合する複数の HIV ペプチドを同定した。各ペプチドを提示する HLA - C 分子を作製し、これと NK 細胞受容体 KIR2DL1 (抑制型) と KIR2DS1(活性型)との結合解析を表面プラズモン共鳴法を用いて行った。いずれも抑制型が活性型に比べて結合が強かった。

A. 研究目的

ヒトNK細胞受容体Killer cell Ig-like receptor (KIR)群はHLAを認識し、ウイルス感染を防御するNK細胞や細胞傷害性T細胞(CTL)の制御に関与すると考えられている。これまでに我々は、HIV-1 gp120由来ペプチドの変異が抑制型KIR群との親和性を向上させることに見出し、これが免疫不全を引き起こす一因であることを示唆する事実に基づき、HIVの新規の免疫逃避機構を提唱した (AIDS 2009)。そこで、HIVゲノム配列から結合モチーフ情報を基にバイオインフォマティックの方法により候補ペプチドを絞り、網羅的に合成を行い、HLA分子に提示されるかを実験的に検証する。さらに、提示される場合には、実際にペプチドを提示したHLA分子を用いて抑制型お

よび活性型のKIR群に対する親和性を網羅的に検証することにより、KIR群を適切に制御できる効果的なHIVペプチドワクチン候補分子を見いだすことを目的とする。

B. 研究方法

HIV ゲノム配列から設計した HLA - C 結合モチーフを持つ 80 種類強からなる 9 アミノ酸ペプチドライブラリーを合成する。これらのペプチドを用いて、我々が実績を有する HLA-Cw4 の巻き戻し法により、組換え蛋白質を作成する。これを微量ゲルろ過解析により、少量の巻き戻しサンプルから、正しくペプチドの結合した HLA-Cw4 分子が得られるかどうかを判定することにより、HLA-Cw4 結合ペプチドを同定する。各ペプチド

を提示する組換え HLA-Cw4 分子を利用して、これと NK 細胞受容体 KIR2DL1 (抑制型) と KIR2DS1(活性型)との結合解析を表面プラズモン共鳴法により行う。

(倫理面での配慮)

基礎的研究であり該当しない。

C. 研究結果

簡易巻き戻し系と微量ゲルろ過解析により、HLA-Cw4 に結合する数種類の HIV ペプチドを同定することができた。いずれもこれまでに報告のないペプチド配列であり、新規の HIV ペプチドワクチン候補と言える。次に、これらのペプチドを提示した HLA-Cw4 を作成し、これを表面プラズモン共鳴法による相互作用解析を行うために、チップ状に固定した。このチップの上に、抑制型および活性型の NK 細胞受容体 KIR2D の可溶性分子を流すことにより、結合解析を行った。いずれも μM オーダーの弱い結合であったが、抑制型 KIR と活性型 KIR を比べると、いずれも抑制型 KIR の方が結合が強かった。

D. 考察

HLA-Cw4 結合能を有する HIV 由来ペプチドが 80 種類以上の候補から、ほんの数種類しかえられず、事前の予想よりも少なかった。このため、より広い範囲でペプチドライブラリーの作成が必要であることがわかった。これは今後の課題である。次に、これまでも総じて、抑制型が活性型よりも親和性が高いことが言われてきたが、このペプチドを厳密に調べれば、候補ペプチドを見つけることができることを期待しているが、これ

までの結果から活性型が親和性の強くなるペプチドの存在する確率は多くない事が考えられた。まだ、ほんの数種類程度の結果では結論を出せないで、より広い範囲でのライブラリーの作成を進める必要がある。

E. 結論

(1)HLA に結合する HIV ペプチドの同定方法および、抑制型および活性型の NK 細胞受容体 KIR との結合解析法を確立した。

(2) 予定通り、HLA-Cw4 に結合する HIV ペプチドの初期スクリーニングを完了し、KIR との結合解析も行うことができた。

(3) HIV 感染細胞で提示される HIV ペプチドの種類は多くない可能性が示唆され、ペプチドワクチン開発に重要な知見を得た。

(4) HLA-C 結合能を有する HIV ペプチドをより多く同定するために 10mer や 8mer ライブラリーを作製する必要があることがわかった。

(5)数種類のペプチドに対する KIR 分子の反応性を確認した段階であるが、これまでのところ、抑制型 KIR の方が活性型 KIR よりも強い結合を示すことがわかった。

G. 研究発表

1.論文発表

1. Long-term control of HIV-1 in hemophiliacs carrying slow-progressing allele HLA-B*5101.

Kawashima Y, Kuse N, Gatanaga H, Naruto T, Fujiwara M, Dohki S, Akahoshi T, Maenaka K, Goulder P, Oka S, Takiguchi M.

J Virol. 2010 Jul;84(14):7151-60.

2.学会発表

1. 黒木喜美子、福永裕子、上敷領淳、白石充典、尾瀬農之、前仲勝実。クラス I 認識受容体の構造とリガンド認識。日本組織適合性学会、2010 年、東京。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し