

Design of Substituted Bis-tetrahydrofuran (Bis-THF)- Derived Potent HIV-1 Protease Inhibitors, Protein-Ligand X-ray Structure, and Convenient Syntheses of Bis-THF and Substituted Bis-THF Ligands. *ACS Medicinal Chemistry Letters*. 2(4): 298-302. 2011.

5. Kazuhiko Ide, Manabu Aoki, Masayuki Amano, Yasuhiro Koh, Ravikiran S. Yedidi, Debananda Das, Sofiya Leschenko, Bruno Chapsal, Arun K. Ghosh, Hiroaki Mitsuya. Novel HIV-1 protease inhibitors (PIs) containing a bicyclic P2 functional moiety, tetrahydropyrano-tetrahydrofuran, that are potent against multi-PI-resistant HIV-1 variants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 55(4): 1717-1727. 2011.
6. Arun K. Ghosh, Bruno D. Chapsal, Abigail Baldrige, Melinda P. Steffey, D. Eric Walters, Yasuhiro Koh, Masayuki Amano, Hiroaki Mitsuya. Design and Synthesis of Potent HIV-1 Protease Inhibitors Incorporating Hexahydrofuropyranol -Derived High Affinity P2 Ligands: Structure-Activity Studies and Biological Evaluation. *Journal of Medicinal Chemistry*. 54(2): 622-634. 2011.

2. 学会発表 (2011年度以降・国際学会のみ)
該当なし

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 Ohruai, 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

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 の転写過程は，プロウイルス DNA からウイルスゲノム RNA が増幅する唯一のステップであり，このステップは，HIV-1 の Tat タンパク質により活性化される。この過程を阻害する薬剤の同定は，新規の抗エイズ治療の開発になることから，われわれはこれまでに転写に関与する宿主遺伝子 cyclin T1 の Tat/TAR RNA 結合サイトに対する *in silico* スクリーニングを行い，OM-10.1 細胞からの HIV-1 産生を抑制する 3 種の化合物の同定に成功した。本年度の研究において，3 種の中で最も強い活性を有する化合物 3 は，慢性感染系である U1 細胞からの HIV-1 産生も同様に抑制し，Tat による HIV-1 の LTR の転写活性化を阻害することが示した。さらに，化合物 3 とそれらの類似体の構造活性相関から，化合物 3 のドッキングポーズが示された。以上の結果は，HIV-1 転写阻害剤を開発する分子基盤を与えており，新規作用機序を有する抗エイズ療法の開発に寄与するものと思われる。

A. 研究目的

これまでの精力的な研究開発により，HIV-1 ライフサイクルの様々なステップで阻害する薬剤の開発に成功し，その結果，現在の抗エイズ療法は，エイズ患者の予後を著しく改善した。一方で，既存の抗エイズ薬は，患者の体内から HIV-1 を完全に排除するものではないことから，患者はエイズの発症を防ぐために，一生涯にわたり服薬を続けなければならない。

しかしながら，HIV-1 はそのライフサイクルにおいて高頻度に変異を起こすことから，長期間にわたる治療は，薬剤耐性ウイルスの出現による薬効の減弱が危惧されている。また，ある薬剤に対して耐性を獲得した HIV-1 は，同じカテゴリに属する他の薬剤に対しても交叉耐性を持つことが多く，この場合は使用可能な薬剤が大幅に制限される。一方で，HIV-1 に対す

るワクチンの開発も精力的に行われているが，有効なワクチンは，未だ確立されていない。このような問題を解決するために，新たな作用機序を有する薬剤の開発が必要であると考えられており，新規薬剤として，HIV-1 のコレセプターである CCR5 を阻害する薬剤や，プロウイルス DNA の宿主染色体 DNA への組み込みを阻害するインテグラーゼ阻害薬が開発され，新たな抗エイズ療法として注目されている。しかし，これらの新規薬剤に対しても既に耐性ウイルスの出現が報告されており，今後のエイズ治療に備えるために，さらに新たな作用機序を有する，新規抗 HIV-1 薬の開発が必要とされている。

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，HIV-1 ゲノム RNA が増幅する唯一のステップであり，HIV-1

のライフサイクルにおいて重要なステップの1つである。従って、このステップを阻害する薬剤の開発は、われわれの研究グループをはじめ、多くのグループが研究を続けているが、未だに治療薬として認可されたものはない。

HIV-1 の転写過程は、宿主細胞因子の cyclin T1/CDK9 と HIV-1 由来の Tat タンパク質が複合体を形成し、その後、この複合体が宿主遺伝子に組み込まれた HIV-1 プロウイルス上の TAR RNA に移行し、RNA ポリメラーゼ II がリン酸化されることで開始される。従って、cyclin T1/CDK9/Tat/TAR RNA で構成される複合体の形成阻害は、HIV-1 転写阻害剤を開発するうえで重要な標的の1つである。近年、この宿主因子とウイルス因子から成る複合体の構造が解明され、それらの相互作用面が分子レベルで明らかされた。昨年度、本研究は、cyclin T1 の Tat/TAR RNA 相互作用領域を標的とした化合物の *in silico* スクリーニングを行い、慢性感染細胞である OM-10.1 細胞からの HIV-1 産生を阻害する3種の化合物(化合物1, 2, および3)の同定について報告した。そこで、今年度はこれらの化合物の中で最も強い活性を有する化合物3について、HIV-1 産生阻害のメカニズム解析を試みた。

B. 研究方法

細胞株: 抗 HIV-1 アッセイには、HIV-1 慢性感染細胞株である OM-10.1 と U1 細胞を用い、レポーターアッセイには、W-3 細胞と KM-3 細胞を用いた。W-3 細胞と KM-3 細胞は、HIV-1 LTR の下流に分泌型アルカリフォスファターゼをもつレポーター遺伝子が組み込まれている、CEM 由来の細胞である。W-3 細胞の LTR 上の NF- κ B 結合サイトは野生型であるが、KM-3 細胞のそれは変異している。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 で刺激した OM-10.1 細胞と U1 細胞から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これらの細胞を培養し、24 時間後に TNF- α を培養液に加えた。さらに 72 時間培養した後、培養上清を採取し、その中の HIV-1 p24 量を 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。

レポーターアッセイ: 薬剤の HIV-1 転写活性化に与える影響は、TNF- α 刺激または Tat 発現プラスミドを導入した W-3 と KM-3 細胞におけるレポーター遺伝子の発現を調べることにより判定した。具体的には、TNF- α 刺激または Tat 発現プラスミドを導入した W-3 と KM-3 細胞を、種々の濃度の薬剤存在下で培養し、24 時間後に培養上清中のアルカリフォスファターゼ活性を化学発光法により定量した。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。

ヒト cyclin T1 のモデル構造とドッキングポーズ解析: ヒト 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法を用いて構築した。分子モデリングは、コンピュータソフトの Molecular Operating Environment (MOE, Chemical Computing Group Inc.) を用いて実施した。さらに、化合物 1-10 の配座解析を行い、cyclin T1 の Tat/TAR RNA 結合サイトを標的とする docking study を行い、結合エネルギーを算出した。統計学的な解析は、Student t-test により p 値を算出した。

(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

In silico スクリーニングから得られた化合物の化学構造と U1 細胞における抗 HIV-1 活性：これまでに cyclin T1 の Tat/TAR RNA 結合サイトを標的とした *in silico* スクリーニングにより、OM-10.1 細胞からの HIV-1 産生に対し中程度の阻害活性を有する 2 種類の化合物 (化合物 1, 2) と強い阻害活性を有する 1 種類の化合物 (化合物 3) の同定について報告した (図 1)。一方で、7 種類の類似化合物 (化合物 4-10) は、抗 HIV-1 活性を示さなかった。さらに、本年度、慢性感染細胞 U1 細胞における HIV-1 産生について検討したところ、化合物 3 は、OM-10.1 細胞と同様に U1 細胞からの HIV-1 産生を強く抑制することが明らかとなった (図 2)。

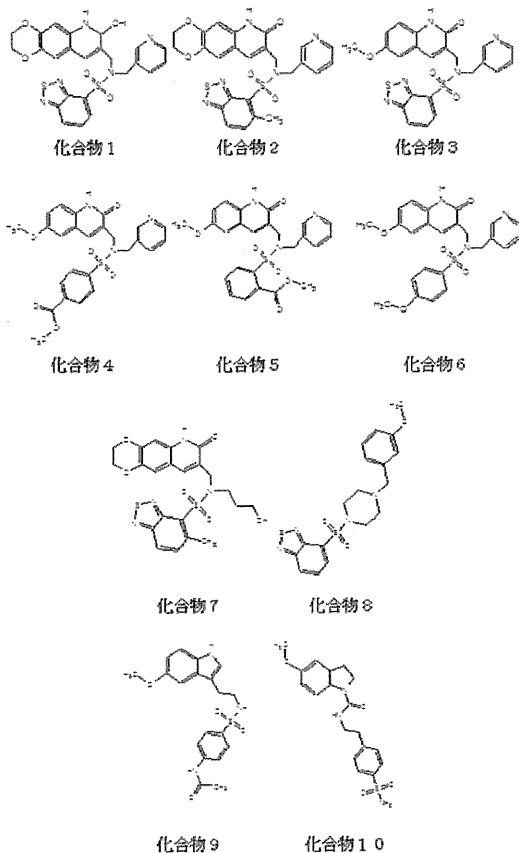


図 1. 抗 HIV-1 活性を有する化合物とその類似体の化学構造

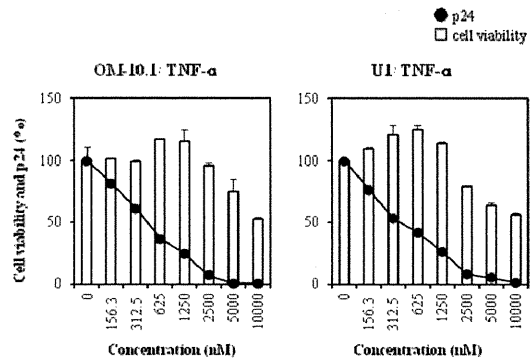


図 2. 化合物 3 の抗 HIV-1 活性

HIV-1 転写活性化における化合物 3 の阻害効果：化合物 3 は cyclin T1 の Tat/ TAR RNA 結合サイトを標的とした *in silico* スクリーニングにより同定された化合物である。このことを確認するために、化合物 3 が HIV-1 の転写活性化を阻害するかどうかについて、LTR の下流に分泌型アルカリフォスファターゼ遺伝子を組み込んだレポーター遺伝子を持つ W-3 細胞と KM-3 細胞を用いて調べた。その結果、化合物 3 は TNF- α 処理された W-3 細胞と KM-3 細胞におけるアルカリフォスファターゼ活性に全く影響を与えなかった。一方で、化合物 3 は、Tat 発現プラスミドが導入された W-3 細胞と KM-3 細胞におけるアルカリフォスファターゼ活性を強く阻害した (図 3)。これらの結果は、化合物 3 が TNF- α ではなく Tat により活性化される LTR の転写活性化を阻害していることを示唆している。また、LTR 上の NF- κ B 結合サイトに変異を有する KM-3 細胞においてもアルカリフォスファターゼ活性が阻害されたことから、化合物 3 が Tat 選択的な HIV-1 転写の阻害剤であることが示された。以上の結果は、*in silico* スクリーニングの標的が cyclin T1 の Tat/TAR RNA 結合サイトであることと一致しており、化合物 3 の作用機序として、cyclin T1 の Tat/ TAR RNA 結合サイトに結合し、Tat の機能を阻害することが示唆された。

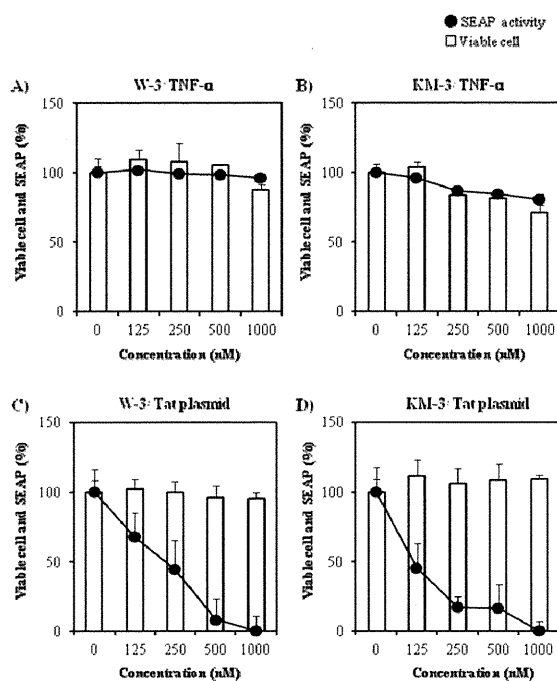


図3. 化合物3のHIV-1 LTR転写活性に対する阻害効果

化合物3のドッキングポーズ解析: 化合物3とcyclin T1のドッキングポーズ解析をコンピュータソフトMOEにより行った結果, 化合物3はcyclin T1と2種類のドッキングポーズ(ドッキングポーズ1と2, 図4A)で結合することが示唆された。ドッキングポーズ1では, 化合物3のmethoxyquinolin基, pyridine基とbenzothiadiazole基が, それぞれcyclin T1のSite1, 2と3に位置した。一方, ドッキングポーズ2では, 化合物3のpyridine基, benzothiadiazole基とmethoxyquinolin基が, それぞれcyclin T1のSite1, 2と3に位置した(図4A, B)。抗HIV-1活性がともに中程度であった化合物1と2のドッキング解析をこれらのドッキングポーズで行ったところ, ドッキングポーズ1では, 化合物3と化合物1または2の間に結合エネルギーに有意差が見られたが, 化合物1と2の間では有意差は見られなかった(図4C)。この結果は, *in vitro*における化合物の抗HIV-1活性と一致する。さらに, 抗HIV-1活性を示さ

なかった化合物4-10をドッキングポーズ1で結合させたところ, これらの化合物は*in silico*においてcyclin T1との結合を示さなかった。一方で, ドッキングポーズ2においては, 化合物3と化合物1または2の間に結合エネルギーに有意差が見られたが, 化合物1と2の間にも有意差が見られた(図4C)。この結果は, *in vitro*のデータと一致しないことから, 化合物Cはドッキングポーズ1で結合すると思われる。

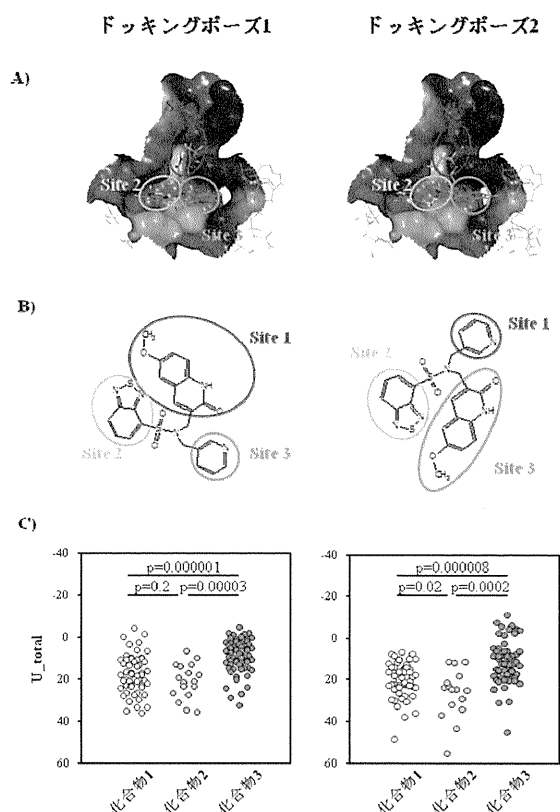


図4. 化合物3とcyclinT1のドッキングポーズ

D. 考察

現在, 抗エイズ治療で用いられている薬剤のほとんどは, 耐性ウイルスの出現が不可避であることから, 今後の抗エイズ治療において新たな作用機序を有する薬剤の開発は必要である。そこで, 本研究は, これらの耐性ウイルスにも有効な, 新規作用機序を有する抗エイズ薬を開

発するために、HIV-1 の転写機構を標的とする薬剤開発の基礎研究を行うことを目的としている。

これまでの研究において、HIV-1 Tat/TAR RNA 複合体形成時の cyclin T1 の構造を標的として、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の *in vitro* での抗 HIV-1 活性を評価した結果、選択的な抗 HIV-1 活性を有する化合物を 3 種類 (化合物 1, 2 及び 3) 同定した。そこで、本年度は、化合物 3 がどのようなメカニズムで、HIV-1 産生を抑制しているかを調べるために、HIV-1 LTR の転写活性化に与える影響を調べた。HIV-1 LTR の下流に分泌型アルカリフォスファターゼを含むレポーター遺伝子が組み込まれた W-3 細胞と KM-3 細胞を用いて調べた結果、化合物 3 は、TNF- α により誘導されるアルカリフォスファターゼ活性の増加には影響を与えず、Tat により誘導されるアルカリフォスファターゼ活性の増加を抑制した。これらの結果は、化合物 3 が、TNF- α ではなく Tat による HIV-1 LTR 転写活性化を選択的に阻害することを示している。これらの結果と *in silico* スクリーニングの標的サイトが cyclin T1 の Tat/TAR RNA 結合サイトであることを考慮すると、化合物 3 は cyclin T1 の Tat/TAR RNA 結合サイトにドッキングし、Tat の結合を阻害することで、HIV-1 LTR の転写活性化に必要な cyclin T1/Tat/TAR RNA 複合体の形成を抑制すると考えられる。さらに、本研究において用いられた化合物 (化合物 1-10) の *in silico* における結合エネルギーと *in vitro* における抗 HIV-1 活性から、ドッキングポーズ 1 (図 4 A) で、化合物 3 は cyclin T1 と結合することが示された。また、ドッキングポーズ 1 において化合物 3 は、cyclin T1 の V199, L203, F241, K253 と R259 と直接相互作用し、cyclin T1 の Q172 と F176 のアミノ酸残基表面を覆うことも確認された。Cyclin T1 と Tat の複合体解析において、

cyclin T1 の Q172, F176 と R259 は、Tat と直接相互作用することが知られており、化合物 3 は Tat と cyclin T1 の相互作用を阻止していると考えられる。また、昨年度は化合物 3 とその類似体の抗 HIV-1 活性から構造活性相関について報告したが、今年度の本研究において明らかになった化合物 3 と cyclin T1 のドッキングポーズのデータは、HIV-1 転写阻害剤をより合理的に開発するための立体的な構造情報を分子レベルで与えると思われる。

E. 結論

HIV-1 転写阻害薬は HIV-1 RNA の増幅を直接抑制する点で、新規の抗エイズ薬として有望な候補であると考えられる。これまでに本研究で同定された化合物 3 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、今年度の本研究において、化合物 3 は HIV-1 Tat の転写活性化を選択的に阻害することが示された。さらに、*in silico* docking study から、化合物 3 は Tat と結合する cyclin T1 のアミノ酸残基と相互作用することが示唆された。以上の結果から、化合物 3 は、HIV-1 転写阻害薬のリードとなる可能性を秘めており、今後の新規抗エイズ治療の開発に貢献すると考えられる。

F. 研究発表

(論文発表)

1. Aoyama H, Sugita K, Nakamura M, Aoyama A, Salim MTA, Okamoto M, Baba M, Hashimoto Y. Fused heterocyclic amino compounds as anti-hepatitis C virus agents. *Bioorg. Med. Chem.* 19:2675-2687 (2011).
2. Hamasaki T, Toyama M, Aoyama H, White Y, Okamoto M, Arima N, Hashimoto Y, Baba M.

- Selective inhibition of HTLV-1-infected cell proliferation by a novel tetramethyl-naphthalene derivative. *Anticancer Res.* 31:2241-2248 (2011).
3. Nishioka H, Uesugi K, Ueda N, Kondo Y, Ysuiji M, Abe H, Harayama T, Hamasaki T, Baba M, Takeuchi Y. Synthesis and anti-human immunodeficiency virus activity of the skeleton isomers of 3',4'-di-(O)-(-)-camphanoyl-(+)-khellactone. *Chem. Pharm. Bull.* 59:1075-1076 (2011).
 4. Haraguchi K, Shimada H, Kimura K, Akutsu G, Tanaka H, Abe H, Hamasaki T, Baba M, Gullen EA, Dutschman GE, Cheng Y-C, Balzarini J. Synthesis of 4'-ethynyl-2'-deoxy-4'-thioribonucleosides and discovery of a highly potent and less toxic NRTI. *ACS Med. Chem. Lett.* 2:692-697 (2011).
 5. Isono Y, Sakakibara N, Ordonez P, Hamasaki T, Baba M, Ikejiri M, Maruyama T. Synthesis of 1-benzyl-3-(3,5-dimethylbenzyl)uracil derivatives with potential anti-HIV activity. *Antiviral Chem. Chemother.* 22: 57-65 (2011).
 6. Salim MTA, Aoyama H, Sugita K, Watashi K, Wakita T, Hamasaki T, Okamoto M, Urata Y, Hashimoto Y, Baba M. Potent and selective inhibition of hepatitis C virus replication by novel phenanthridinone derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 415:7140719 (2011).
 7. Ordonez P, Hamasaki T, Isono Y, Sakakibara N, Ikejiri M, Maruyama T, Baba M. Anti-human immunodeficiency virus type 1 activity of novel 6-substituted 1-benzyl-3-(3,5-dimethylbenzyl)uracil derivatives. *Antimicrob Agents Chemother.* in press.
- cyclin T1 and in vitro evaluation of their anti-HIV-1 activity. *24th International Conference on Antiviral Research*, May 9, 2011, Sofia, Bulgaria.
2. Okamoto M, Chono H, Tsuda H, Inoue K, Mineno J, Baba M. Long-Term Inhibition of HIV-1 Replication in CD4⁺ T cells transduced with a retroviral vector conditionally expressing the *Escherichia Coli* endoribonuclease MazF. *24th International Conference on Antiviral Research*, May 9, 2011, Sofia, Bulgaria.
 3. Ordonez P, Hamasaki T, Baba M, Okamoto M. Differential expression of host cellular factors upon HIV-1 reactivation. *24th International Conference on Antiviral Research*, May 9, 2011, Sofia, Bulgaria.
 4. 蝶野英人, 岡本実佳, 井上晃一, 津田大嗣, 百々克行, 川野泰広, 馬場昌範, 峰野純一. RNA分解酵素MazFを用いたHIV感染症遺伝子治療法の開発. 第25回日本エイズ学会学術集会, 2011年11月30日, 東京.
 5. 岡本実佳, 張旭, 濱崎隆之, 外山政明, 隅田泰生, 馬場昌範. 糖固定化金ナノ粒子技術を用いたHIV-1感染症新規予防法および早期診断法の開発. 第25回日本エイズ学会学術集会, 2011年11月30日, 東京.
 6. 馬場昌範. 核酸系逆転写酵素阻害薬フェスティナビル. 第25回日本エイズ学会学術集会, 2011年12月2日, 東京.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 馬場昌範, 濱崎隆之. 抗 HIV 薬とその用途. 出願人: 鹿児島大学, 特願 2011-07084, 2011年2月28日出願.

(学会発表)

1. Hamasaki T, Okamoto M, Baba M. *In silico* screening of compounds targeting human

HIV の薬剤耐性機構

研究分担者 松岡 雅雄 京都大学ウイルス研究所 教授

研究要旨

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、アミノ酸変異は直接の作用機序と考えられる gp41 領域の N-terminal heptad repeat (H-HR) や C-terminal heptad repeat (C-HR) に加えて、gp41 の、より C 末端側に位置する cytoplasmic tail (CT) 領域に導入されていた。融合阻害剤による CT 領域への変異誘導はこれまで報告がなく、耐性への関与も不明である。誘導された変異を組込んだ感染性クローンを作製し、薬剤感受性を調べたところ、変異ウイルスは SC34EK や T-20 に耐性を示した。また、これらの変異ウイルスは著しい感染性の低下を示した。以上の結果から、CT 変異は、膜融合反応を含めた HIV 感染前期過程に影響を及ぼすことで、膜融合阻害剤の耐性に関与していることが示唆された。

A. 研究目的

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) の糖タンパク質である gp120 および gp41 は、HIV が細胞に感染する初期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、標的細胞膜上の CD4 (主受容体) および CXCR4 もしくは CCR5 (副受容体) との相互作用の結果、自身の構造変化が誘導される。その結果、折りたたまれていた HIV gp41 が露出し、N 末端側の疎水性領域が細胞膜を貫通する。HIV と標的細胞の膜融合反応においては、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) と宿主細胞膜が物理的に近接して膜融合反応が進行すると考えられている。

HIV-1 と標的細胞との膜融合反応を作用点とした融合阻害剤 enfuvirtide (T-20) は抗 HIV-1 薬として臨床において用いられている。T-20 は gp41 C-HR のアミノ酸配列を由来とするペプチド製剤であり、N-HR と C-HR 間の相互作用時に、ウイルス C-HR と T-20 が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。しかしながら臨床で使用されている膜融合阻害剤は T-20 の

1 剤のみであることから、T-20 耐性 HIV が出現した場合は、融合阻害剤での選択肢はない。従って、T-20 に耐性を示す変異ウイルスにも効果を示す次世代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 といった一連の次世代ペプチド性融合阻害剤を開発・報告し、これらの融合阻害剤は T-20 耐性 HIV にも活性を示すことを明らかにしてきた。この結果から、第一世代融合阻害剤の T-20 と、SC34 や SC34EK では耐性プロファイルが異なることが推測される。*in vitro* における耐性誘導試験を行ったところ、ペプチド性融合阻害剤の直接の標的部位である N-HR や C-HR に加えて、さらに C 末端側に位置する cytoplasmic tail (CT) 領域においても変異が同定された。本研究では、SC34EK により誘導された本領域内の変異に着目し、CT 領域内の変異による薬剤感受性や感染性の変化を解析した。

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 SC34EK および T-20 は化学合成法により作製した。

対照化合物として用い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) SC34EK に対する耐性株における gp41 領域内の変異の同定

MT-2 細胞に HIV-1 NL4-3 株を感染させ、SC34EK の濃度を徐々に増加させながら継代を繰り返すことで得られた SC34EK 耐性株の塩基配列は、ウイルス感染細胞から DNA を抽出し、PCR 法でエンベロップ領域を増幅して塩基配列を決定した。

(3) HIV-1 env 組換えウイルスの作製

初めに、gp41 HR 領域と CT 領域の組換えを簡便に行うために、両領域間にサイレント変異を導入することで、制限酵素認識配列 (⁸³¹⁸CTT-TCT-ATA⁸³²⁶→CTA-TCG-ATA : 下線部は ClaI 認識配列) を導入した感染性クローン pNL4-3C を作製した。

gp41 HR 領域、N-HR-C-HR 間のヒンジ領域、および transmembrane 領域の組換えには、pNL4-3C の NheI-ClaI サイトを利用してクローニングした。一方、gp41 CT 領域の組換えには、ClaI-XhoI サイトを利用してクローニングした。これらの組換えクローンを 293FT 細胞にトランスフェクションし、48 時間後にウイルスを回収した。

(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) 感染性の解析

それぞれの変異を組み込んだエンベロップ発現ベクターを、トランスファーベクター CSII-CMV-Luc、パッケージングベクター Δ8/9 と共に 293FT 細胞にトランスフェクションすることで、組換えレンチウイルスベクターを作製した。このウイルスベクターを MT-2 細胞に感染させ、48 時間後に細胞を溶解し、溶解液中の luciferase 活性を測定した。測定値は各ウイルスベクターの p24 量で補正した。

(倫理面への配慮)

基礎的研究であり、該当しない。

C. 研究結果

(1) SC34EK に対する耐性ウイルスにおける gp41 領域内の変異解析

SC34EK に対する耐性誘導により得られた最終継代ウイルス (継代数 120) 感染細胞から DNA を抽出し、gp41 領域のアミノ酸変異を解析した結果、gp41 N-HR 領域に D36G・Q41R・N43K、ヒンジ領域に A96D、C-HR 領域に N126K・H132Y、transmembrane 領域に V182I、CT 領域に P203S・L204I・S241F・H258Q・A312T 変異が同定された。

(2) CT 変異による膜融合阻害剤感受性への影響

上記の解析で同定された CT 変異を HIV-1 感染性クローン pNL4-3C に導入し、ウイルスを作製して耐性を調べた。その結果、5 つの CT 変異全てを組み込んだウイルス NL43C (CT^{res}) は、T-20 に約 3 倍の耐性を示した。また、HR 変異に CT 変異を組み込んだウイルス NL43C (HR^{res} + CT^{res}) では、HR 変異単独のウイルス NL43C (HR^{res}) と比較して SC34EK に約 3 倍の耐性 (平均 EC₅₀ 値 : 168 nM vs. 60 nM) を示した (表 1)。

さらに、SC34EK により誘導された全変異について、CT 変異の有無による薬剤感受性の差を解析した結果、CT 変異を有しないウイルス NL43C (HR^{res} [A96D/V182I]) に対する T-20 の EC₅₀ 値 365 ± 36 nM に対して、CT 変異を有するウイルス NL43C (HR^{res} [A96D/V182I]) + CT^{res} では、3,021 ± 651 nM であったことから、CT 変異により約 8 倍の T-20 耐性が付与された。

(3) CT 領域内の変異が HIV-1 感染性におよぼす影響の解析

HIV-1 gp41 CT 領域は、他のレトロウイルスに比べて約 5 倍以上のアミノ酸数から構成されている。この HIV 特異的な長い CT 領域は HIV-1 ウイルス粒子の感染性やエンベロップタンパクの内化、ウイルス粒子の出芽極性などに重要な役割を果たすことから、ウイルス複製機構におよぼす CT 領域の機能は多岐にわたることが示唆される。

そこで、SC34EKにより誘導されたCT変異によるウイルス複製の各ステップに与える影響を調べることを目的とし、本年度はウイルスエンベロップの本質的な機能である、ウイルス感染段階に焦点を当てて解析を行った。

CT変異を有するエンベロップでシュードタイプ化した、HIV-1由来の luciferase 発現レンチウイルスベクターをMT-2細胞に感染させて luciferase 活性を測定することで、CT変異によるHIV-1感染性の変化を測定した。その結果、CT領域以外の変異を組み込んだウイルスNL43C (HR^{res} [A96D/V182I])では、野生株NL43Cと比較して、約4倍の感染性の増加が認められた。一方、CT変異を組み込んだウイルスNL43C (CT^{res})では、野生株の15%程度の感染性しか示さなかった。しかしながら、全変異を組み込んだウイルスNL43C (HR^{res} [A96D/V182I]) + CT^{res}では野生株と比較して、約3倍の感染性の増加にとどまっていた(図2)。

D. 考察

分担研究者らは、これまで次世代の融合阻害剤であるSC34やSC34EKなど報告してきた。SC34EKはT-20耐性ウイルスにも効果を示すことから、両薬剤の耐性プロファイルは異なることが予想され、実際、SC34EK耐性には多数の変異の蓄積が重要であることを報告した。本年度は、耐性機序解析の過程において、SC34EKで誘導された変異の約半数がgp41CT領域に導入されている事実に着目し、これらの変異による融合阻害剤耐性への関与解明を中心として研究を行った。CT変異によりT-20やSC34EKに約3~8倍の耐性を付与する結果が得られたことから、CT変異は直接融合阻害剤の耐性に関与していることが明らかとなった。これまでに融合阻害剤により、CT領域に耐性が誘導された報告はない。T-20感受性に関する薬剤耐性遺伝子型検査では、CT領域の変異は重要視されておらず、T-20耐性を示すHIV-1感染者由来のウイルスに

についても解析されていない。従って、臨床におけるCT領域の変異の有無についても解析する必要があると考えられる。

また、CT領域の変異により、HIV-1の感染性が著しく低下した。この結果により、CT変異がHIV-1エンベロップの機能不全を引き起こしていることが示唆された。しかしながら、他のgp41変異がこの機能不全を補正している事も明らかとなったため、CT領域の変異による感染性低下は、限定的であると考えられる。

E. 結論

次世代融合阻害剤SC34EKにより誘導されたgp41CT領域内の変異は、直接膜融合阻害剤耐性に寄与する事を明らかにした。また、CT変異はHIV-1感染性の減弱を引き起こした。以上の結果から、CT変異は膜融合反応を含めたHIV細胞侵入過程に影響を及ぼすことで、膜融合阻害剤の耐性に関与していることが推測された。

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, Watanabe K, Oishi S, Fujii N, Matsuoka M, Sarafianos SG, Kodama EN. Potent anti-HIV-1 activity of N-HR-derived peptides including a deep pocket-forming region without antagonistic effects on T-20. *Antivir. Chem. Chemother* 22(1):51-5, 2011.
2. Sugata K, Satou Y, Yasunaga JI, Hara H, Ohshima K, Utsunomiya A, Mitsuyama M, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor impairs cell-mediated immunity by suppressing production of Th1 cytokines. *Blood* 119(2):434-444, 2011.
3. Inokuchi E, Oishi S, Kubo T, Ohno

H, Shimura K, Matsuoka M, Fujii N. Potent CXCR4 antagonists containing amidine type peptide bond isosteres. *ACS Med. Chem. Lett* 2(6):477-80, 2011.

4. Zhao T, Satou Y, Sugata K, Miyazato P, Green PL, Imamura T, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor enhances TGF- β signaling through p300 coactivator. *Blood* 118; 1865-1876, 2011.
2. 学会発表
 1. Kenji Sugata, Yorifumi Satou, Jun-ichirou Yasunaga, Kisato Nosaka, Masao Matsuoka. HTLV-1 bZIP factor perturbs immune response to the pathogens in vivo by inhibiting IFN-gamma production: 15th INTERNATIONAL CONFERENCE ON HUMAN RETROVIROLOGY HTLV AND RELATED VIRUSES. Leuven, Belgium. June 4-8, 2011.
 2. Tiejun Zhao, Yorifumi Satou, Kenji Sugata, Patrick L Green, Takeshi Imamura, Masao Matsuoka. HTLV-1 bZIP factor enhances TGF-beta signaling through p300 coactivator: 15th INTERNATIONAL CONFERENCE ON HUMAN RETROVIROLOGY HTLV AND RELATED VIRUSES. Leuven, Belgium. June 4-8, 2011.
 3. Yasuteru Sakurai, Fumiaki Sato, Takeshi Fujiwara, Chizuko Hirano, Gozoh Tsujimoto, Kenshi Komatsu, Masao Matsuoka. A DNA REPAIR PROTEIN NBS1 REGULATES MLV INTEGRATION SITE SELECTION: International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo, Japan.

September 11-16, 2011.

4. 志村和也、大石真也、藤井信孝、松岡雅雄: HIV-1 膜融合阻害剤に対する新規耐性メカニズムの解析: 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2011 年 11 月 30 日 - 12 月 2 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

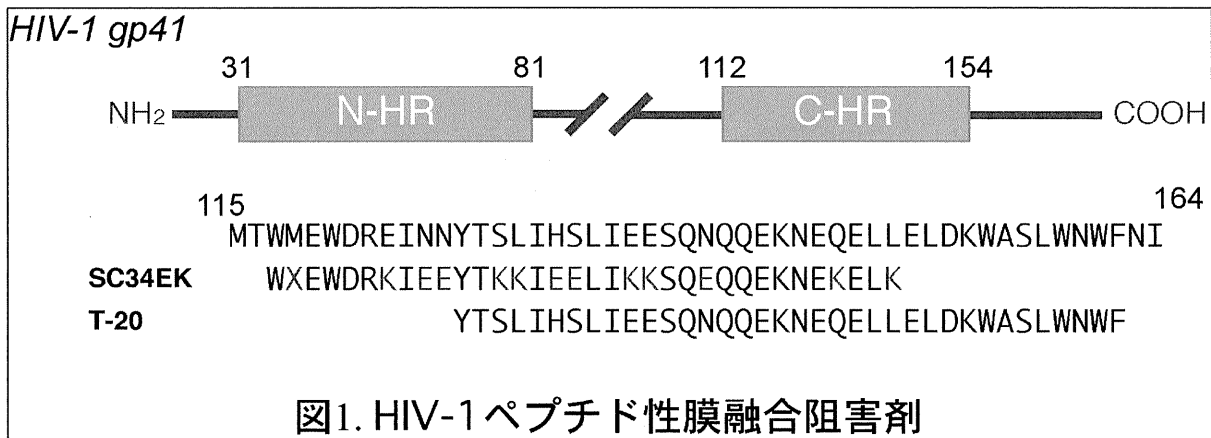


表 1. SC34EK により誘導された CT 変異による融合阻害剤感受性変化

Variant(s)	EC ₅₀ (nM) ± SD		(fold resistance compared to NL4-3C)			
	ddC	T-20	SC34EK			
HIV-1 _{NL43C}	414 ± 98	(1.0)	59 ± 4.8	(1.0)	0.25 ± 0.09	(1.0)
NL43C (CT ^{res})	457 ± 137	(1.1)	150 ± 6.9	(2.5)	0.21 ± 0.05	(0.8)
NL43C (HR ^{res})	252 ± 55	(0.6)	468 ± 60	(7.9)	15 ± 5	(60)
NL43C (HR ^{res} + CT ^{res})	364 ± 91	(1.4)	682 ± 116	(12)	42 ± 5	(168)
NL43C (HR ^{res} [A96D])	380 ± 48	(0.9)	334 ± 107	(5.7)	22 ± 3	(88)
NL43C (HR ^{res} [A96D] + CT ^{res})	425 ± 47	(1.0)	544 ± 136	(9.2)	36 ± 6	(144)
NL43C (HR ^{res} [V182I])	428 ± 99	(1.0)	414 ± 126	(7.0)	36 ± 11	(144)
NL43C (HR ^{res} [V182I] + CT ^{res})	438 ± 65	(1.1)	679 ± 183	(12)	43 ± 7	(172)
NL43C (HR ^{res} [A96D/V182I])	408 ± 38	(1.0)	365 ± 36	(6.2)	44 ± 4	(176)
NL43C (HR ^{res} [A96D/V182I] + CT ^{res})	368 ± 75	(0.9)	3,021 ± 651	(51)	48 ± 7	(192)

NL43C (CT^{res}) は gp41 P203S/L204I/S241F/H258Q/A312T 変異を有する。

NL43C (HR^{res}) は gp41 D36G/Q41R/N43K/N126K/H132Y 変異を有する。

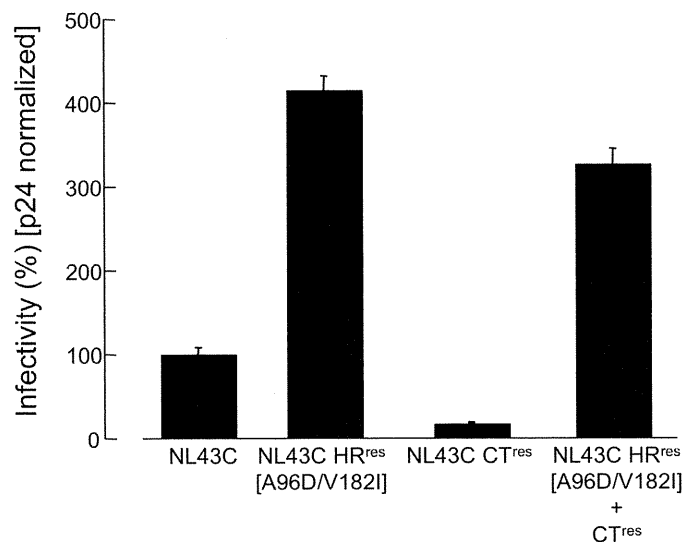


図2. CT変異によるHIV-1感染性への影響

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-1 の中和抵抗性メカニズムの解明とその克服に関する研究

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

我々は、昨年度までの研究で gp120 V2 領域の L175P 変異が、エンベロープ蛋白 (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増強することを観察した。本年度は、中和抵抗性を克服するために、多くのウイルスで保存されている gp120 のコレセプター結合部位に対する交差反応性抗体の開発を行った。二つの単クローン抗体が (916B2、917B11) がクレイド B, C, AE に交差反応し、中和活性 (30 株中 10 株及び 13 株) を示した。我々はまた、抗 V3 単クローン抗体 (5G2) より抗体遺伝子を単離し、組み換え抗体小分子である Fab (antigen binding fragment) 及び scFv (Single chain variable fragment) を構築した。FACS 解析及び TZM-bl を用いた中和試験で比較すると、Fab は IgG と同等の活性を示したが、scFvL4(long linker)、scFvS5 (short linker) は、JR-FL 株に対して強い反応性及び中和活性を示した。糖鎖や、V1/2 領域のエピトープ遮蔽による中和抵抗性は、抗体の小分子化によって克服可能であることが示唆された。

A. 研究目的

本研究の目的は、HIV-1 臨床分離株の中和抵抗性のメカニズムを解明し、これを克服する戦略によって、新たな治療法や有効なワクチンの開発を目指すものである。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。我々は昨年までに、その分子メカニズムとして、gp120 の V2 領域の変異 (L175P) の影響を報告した。本年度は、中和抵抗性克服のために、保存されているコレセプター結合部位に対する交差反応性抗体の開発と V2 で遮蔽されても到達可能な抗体小分子の開発を行った。

B. 研究方法

(1) 中和単クローン抗体の作製

広範囲なウイルス株に対して、交差反応する中和単クローン抗体を得るため、HIV-1 感染症例由来の末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cell; PBMC) を分離し、イムノマグネットを用いて CD8 陽性細胞を除去した。△ CD8 PBMC 5×10^6 に対し、B95-8 の培養上清 50% を含む培地 (15% FBS 含有 RPMI1640) 2ml に浮遊し、12~18 時間培養した後、1 well あたり 1×10^4 以下となるように分注し、さらに 37°C、5% CO₂ で培養した。7~10 日ごとに培地

を交換しながら、B 細胞株を増殖させた。増殖する細胞の培養上清を回収し、後述の “gp120-capture ELISA” にて gp120 特異抗体産生の有無を確認した。スクリーニングで繰り返し陽性と判断されるクローンに関しては、限界希釈法にてクローニングし、抗 gp120 活性をもつ抗体産生細胞を分離した。

(2) gp120-capture ELISA による抗体産生クローンの確認

増殖した抗体産生 B 細胞の抗 gp120 活性は “gp120-capture ELISA” にて検討した。96well polypropyren plate (Falcon) に gp120-C5 sheep 抗体 (D7324, Aalto Bioreagents, Dublin, Ireland) をコートし、blocking buffer でブロック後 $1 \mu\text{g/ml}$ に希釈した単量体 (gp120gp120-SF2; Austral Biologicals, San Ramon, California) を $50 \mu\text{l}$ ずつ加えた。2 時間室温に静置した後、3 回洗浄し、gp120-captured plate とした。抗 gp120 抗体の検出は、作製した gp120-captured plate に B 細胞培養上清を加えて室温で 2 時間反応させた後、抗ヒト IgG-ALP を反応させ、発色後、吸光度 (405nm) を測定した。CD4i 抗体は gp120-capture ELISA において、可溶性 CD4 {soluble CD4 (sCD4): R&D Systems, Inc. Minneapolis, MN} 存在下に反応性が增強される。gp120-captured plate を作成し、段階希釈した抗体を sCD4 存在もしくは非存在下に 2 時間反応させ吸光度 (405nm)

を測定し同定した。

(3) 遺伝子組み換え抗体断片の作成

抗 V3 モノクローナル抗体 5G2 を産生する細胞から RNA を分離し、逆転写酵素を用いて cDNA を合成した。得られた cDNA を鋳型として PCR を行い、抗体の軽鎖、重鎖の可変部位を増幅した。重複 PCR によってリンカーによる軽鎖、重鎖遺伝子の結合や、免疫グロブリン定常部位を結合後、pComb3X ベクターに挿入して scFv 及び Fab 発現プラスミドを作製した。5G2 の Fab, scFv を挿入したプラスミド DNA をケミカルコンピテントセル Top 10 F' に形質導入し、カルベニシリン含有 SB 培地で培養後、0.5 M IPTG を加えさらに一晩培養した。培養した大腸菌から Bug bustar Protein Extraction Reagent (Novagen) により可溶性タンパク質を抽出した。Fab, scFv には His タグが付いているので His 60 Ni Superflow™ Resin(タカラバイオ)と混合、Ni-NTA Wash buffer(Novagen)で洗浄し、Ni-NTA Elute buffer にて抽出することで Fab, scFv を精製した。さらに His タグを用いて精製した scFv と Fab を、5G2 のエピトープである V3 ペプチドを担体として用いた V3 ペプチドカラムに結合させ、リン酸緩衝液(PBS)で洗浄し、グリシンバッファー(pH.2.3)で抽出することにより精製した。

scFv 及び Fab 抗体の結合活性は、V3 領域のペプチドを抗原とする ELISA によって決定した。中和活性は HIV-1_{JR-FL_{wt}} 及び HIV-1_{JR-FL_{L175P}} 変異株を用い、TZM-bl assay にて測定した。

(4) HIV-1 subtype B および subtype C 臨床分離株の標準化パネル(HIV-1 subtype-B or C standard panel virus; SVPB or SVPB) の調整 ; 使用したエンベロープベクターは、NIH AIDS Research and Reference Reagent Program(ARRRP) より供給をうけた。HIV-1 subtype B または subtype C 感染者の血漿 HIV-1 RNA および PBMC DNA から PCR で gp160 全長を増幅しクローニングされたもので、血漿 HIV-1 RNA 由来の産物は pcDNA3.1/His-TOPO (Invitrogen) に、PBMC DNA 由来の産物は pcDNA3.1/V5-His-TOPO (Invitrogen) に TA Cloning で組み込まれている。

(5) TZM-bl 細胞を用いた 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-bl 細胞を用いた β-ガラクトシダーゼ定量システムを用いて定量した。300TCID₅₀ のウ

イルスと各濃度の抗体や薬剤を混合し、30 分間 preincubation した後 TZM-bl 細胞を加え、37°C、5% CO₂ にて 2 日間培養した。中和活性は、Galacto-Star (Applied Biosystems)を用い、 $\{1-(t-c)/(n-c)\} \times 100$ (t; サンプルの発光強度、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。

(6) エンベロープ発現細胞表面への抗体結合活性の測定 : 従来から用いている subtype B の JR-FL_{wt} 及び JR-FL_{L175P} に加え、89.6、SF-162、NL-43、のエンベロープ 3 量体、CRF01_AE の臨床分離株 (93TH966.8) さらに subtype C より、SVPC13,15 から 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 pRSV-Rev と 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。

(倫理面への配慮)

新規の中和抗体の樹立の目的のための 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

我々は、昨年までに中和抵抗性のメカニズムとして、エピトープの変異や糖鎖の付加を解明、さらに、ENV 三量体構造によるエピトープマスキングに V2 (L175P mutation) が関与することを明らかにした。本年度は、中和抵抗性を克服するために、多くのウイルスで保存されているコレセプター結合部位に対する交差反応性抗体の開発を行い、また、抗 V3 抗体の小型化による反応性の改善などの成果を得た。

I. 新規中和単クローン抗体の開発

HIV-1 の subtype B に感染しているが、長期にわたり、無治療にて免疫不全の進行が見られない症例より B 細胞を分離し、EBV でトランスフォーム後、クローニングし、中和単クローン抗体の樹立を行った。作成したクローンの中で、安定して大量の抗体を産生する細胞株の中に、gp120 のコレセプター結合部位に対する抗体産

生クローンを同定した。二つの単クローン抗体 (916B2 及び 917B11) は、gp120 単量体を用いた “gp120-capture ELISA” の系で、sCD4 の存在下に反応性が増加し、CD4 induced epitope に対する抗体であることが確かめられた。さらに、ENV 三量体を形成すると考えられる細胞表面においても、subtype B の JR-FL_{wt} や JRFL_{175p} に加えて、89.6、SF-162、NL-43 のエンベロープ及び、subtype AE の 93TH966.8、subtype C の SVPC13 及び 15 に対する交差反応性も解析した。916B2 は、これらすべてに交差反応したが、917B11 は SVPC15 には反応できなかった。

一方、エンベロープパネルウイルスを用いた中和活性の研究では、15 種類の subtype B ウイルス、12 種類の subtype C ウイルスパネルを用い、さらに subtype A 一種類、CRF01_AE の 2 株を用いてシュウドウイルスを作成し、中和活性を測定した。916B2 は、subtype B の中から 5 種類、subtype C の中から 3 種類、subtype A と CRF01_AE から各 1 種類に活性を示した (10/30)。一方、917B11 は subtype B の中から 8 種類、subtype C の中から 2 種類、subtype A と CRF01_AE から 3 種類に活性を示した (13/30) を示した。全体で言うと 1/3 の株に何らかの感受性が認められた。エピトープがどのように保存されているか、中和抵抗性のメカニズムに関してなど、さらに検討する必要がある。

II. 遺伝子組み換え抗体小分子による中和抵抗性の克服

長期未発症症例由来の抗 V3 単クローン抗体 (5G2) より抗体遺伝子を単離し、組み換え抗体小分子である Fab (antigen binding fragment) 及び scFv (Single chain variable fragment, (scFvL4:long linker, scFvS5:short linker) を構築した。5G2 抗体産生細胞 RNA から合成した cDNA から抗体遺伝子の V 領域に特異的なプライマーを用いて PCR を行うと、およそ 400 bp の VH 及び VL が確認できた。精製した DNA(VH,VL)を PCR 操作で繋ぎ、およそ 800 bp の scFv を含むバンドが確認された。Fab は VH と CH1 及び VL と CL を繋げ、およそ 800 bp であった。さらに Fab の重鎖 (VH+CH1) と軽鎖 (VL+CL) を繋げ、およそ 1,600 bp のバンドが確認された。VH と VL の PCR 産物を pComb3XSS ベクターにクローニングし、得られたクローンの塩基配列を決定した。5G2 の Fab, scFv を挿入したプラスミド DNA で大腸菌を形質転換し、IPTG 誘導によって scFv 及び Fab を発現させ、付加した His タグを用いてニッケルカラムにより精製した。精製した抗体フラグメントを SDS-PAGE で解析した。Fab はダイマーを形成

し、重鎖および軽鎖に相当する 2 本のバンド 30.5 kDa 及び 25.5 kDa が確認できた (Fab は 2 量体で 56.1 kDa)。scFv は単量体で 26.6 kDa であり、遺伝子組換えにより発現した抗体フラグメントが IgG より小型であることが確認できた。抗体の ENV 三量体へ結合活性をフローサイトメーターによって解析した。解析には HIV-1_{JR-FL} の WT 株と JR-FL の V2 に L175P 変異を持ち V3 が露出していると考えられる L175P 変異株の 2 種の Env 発現細胞を用いた。WT 株への結合は分子量が最も小さい scFv L4 (26.6 kDa) が Fab (56.1 kDa) よりも MFU で比較すると約 2 倍強かった。一方、単量体もしくは 2 量体で結合すると考えられる scFv S5 (53.2 又は 26.6 kDa) はその中間の結合活性を示した。L175P 株に対する結合活性は scFv L4 が最も強く Fab, scFv S5 の順番であった。この結果は、抗体の小型化によって WT 株への結合活性が増強されている可能性を示す。TZM-bl を用いた中和試験で比較すると、Fab は IgG と同等の活性を示したが、scFvL4(long linker)、S5(short linker) は、JR-FL 株に対して強い反応性及び中和活性を示した。糖鎖や、V1/2 領域のエピトープ遮蔽による中和抵抗性は、抗体の小分子化によって克服可能であることが示唆された。

D. 考察

中和抵抗性メカニズムの解明に基づき、これを克服する研究として、保存された領域に対する新規単クローン抗体の交差反応性及び組み換え抗体断片の有用性を検討した。二つの CD4 induced epitope に対する単クローン抗体に関しては、抗体遺伝子をクローニングし、解析中である。抗原結合部位の CDRH3 の反応特異性などの研究を進める中から、抗体の一部のみでも活性を持つ可能性が考えられ、これらを用いた中和抵抗性を克服する分子の設計が期待できる。

一方、組み換え抗体のほうは順調に研究が進んできたが、精製の段階で、大腸菌で作成した scFv の中には missfolding を起こしているものが多く混在しているという問題が明らかとなった。また、scFv の立体構造は酸性の環境下に変性し、中性に戻しても、活性がもとにもどりにくいことが分かった。現在、in vitro での unfolding 及び refolding の条件検討を行っているところである。中和抵抗性を克服する可能性のある新規単クローン抗体や遺伝子組み換えによる抗体断片の解析は多くの臨床分離株で行う必要があることから、大量に作成できるものである必要がある。

E. 結論

中和抵抗性の解明とその克服は HIV ワクチン開発ばかりでなく中和抗体を用いた治療法の開発に重要であり継続的な研究が重要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Narumi T, Arai H, Yoshimura K, Harada S, Nomura W, Matsushita S, Tamamura H. Small molecular CD4 mimics as HIV entry inhibitors. *Bioorg Med Chem*, 19: 6735-6742, 2011
2. Honda M, Ishisaka M, Ishizuka N, Satoshi Kimura S, Oka S and behalf of Japanese Anti-HIV-1 QD Therapy Study Group. Open-Label Randomized Multicenter Selection Study of Once Daily Antiretroviral Treatment Regimen Comparing Ritonavir-Boosted Atazanavir to Efavirenz with Fixed-Dose Abacavir and Lamivudine. *Intern Med* 50: 699-705, 2011

2. 学会発表

海外

1. Kuwata T, Igarashi T, Matsushita S. Isolation of potent neutralizing monoclonal antibodies against V3 loop from SIV-infected macaques. *AIDS Vaccine* 2011, 9.12-9.15. Bangkok, Thailand, USA.
2. Yoshimura K, Harada S, Hamji A, Matsushita S. Maraviroc-resistant subtype B primary HIV-1 induced in vitro selection became highly sensitive to anti-gp120 neutralizing antibodies and autologous plasma IgG under high concentrations of the CCR5 inhibitor. 6th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. 2011.7.17-20, Roma, Italy.
3. Harada S., Ishikawa T., Hamaji A., Matsushita S., Yoshimura K. Impact of raltegravir pressure on the selection of HIV-1 envelope sequences in vitro. 6th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. 2011.7.17-20, Roma, Italy.

国内

1. Yoshimura K., Harada S., Hamji A., Matsushita S. Two-step escape pathway of the HIV-1 primary isolates induced by the in vitro selection of maraviroc. 12th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International

Symposium, 2011.10.19-21, Aso, Kumamoto, Japan.

2. Harada S., Ishikawa T., Hamji A., Matsushita S., Yoshimura K. Impact of raltegravir pressure on the selection of HIV-1 envelope sequences in vitro. 12th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, 2011.10.19-21, Aso, Kumamoto, Japan.
3. Maruta, S, Ramirez, K, Kuwata, T., Matsushita, S. : Construction of neutralizing antibody fragments for efficient access to V3 epitope. 12th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, 2011.10.19-21, Aso, Kumamoto, Japan.
4. Ramirez, K, Maruta, Y., Kuwata, T., Yoshimura, K, Tamamura, H., Matsushita, S : Novel CD4-induced monoclonal antibodies (MAbs) with cross-neutralizing activity against primary isolates of HIV-1 B and C subtypes. 12th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, 2011.10.19-21, Aso, Kumamoto, Japan.
5. Kuwata, T, Takaki, K., Matsushita, S: Biased induction of neutralizing antibodies with particular specificity and gene usage in SIVsmH635FC-infected macaques. 12th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, 2011.10.19-21, Aso, Kumamoto, Japan.
6. 桑田岳夫: SIVsmH635FC 感染サルにおける特定のエピトープと遺伝子に偏った中和抗体の誘導. 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2011.11.30-12.2. 東京.
7. Ramirez, K, Maruta, Y., Kuwata, T., Yoshimura, K, Tamamura, H., Matsushita, S : Cross-reactivity and cross-neutralizing activity of monoclonal antibody(MAbs) to CD4-induced epitope of gp120 against HIV-1B, C, CRF_01 subtype viruses. 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2011.11.30-12.2. 東京.
8. 丸田泰広、桑田岳夫、クリステル・パオラ・ラミレス・バルデス、松下修三: HIV-1 の V3 領域に結合する中和抗体の遺伝子組換えによる小型化の試み. 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2011.11.30-12.2. 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、これまでに開発してきた簡易巻き戻し系と微量ゲルろ過法などを組み合わせた HLA-Cw4 結合 HIV ペプチドの同定法を発展させ、HLA-Cw12 について同じ系へ応用するために条件検討を行った。その結果、HLA-Cw12 は巻き戻し効率が悪く、HLA-Cw4 よりもペプチド量を上げて分析する必要があることがわかった。他方、HLA-Cw12 結合ペプチドを用いて、HLA-Cw12 と NK 細胞受容体 KIR2DL1 (抑制型) と KIR2DS1(活性型)との表面プラズモン共鳴法による結合解析を行った。

A. 研究目的

ヒトNK細胞に発現する細胞表面受容体 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スの手法を用いて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

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を組み合わせ、HLA-Cw12 結合ペプチドを同定するためのスクリーニング条件を同定済み結合モデルペプチドを用いて検討する。また、同定済みのペプチドを提示する HLA - Cw12 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

同定済みの HLA-Cw12 結合モデルペプチドを用いて、微量巻き戻し法による網羅的スクリーニング条件を決定した。HLA-Cw4 と同様の条件で行ったところ、巻き戻し効率が低く、ペプチドの量が多く必要であることがわかった。また、ゲルろ過分析には、通常の溶出条件では判定が難しく、工夫が欠かせないことも明らかとなった。これらの条件検討の結果を基に、HLA-Cw12 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った。HLA-Cw12 を固定化したチップの上に、抑制型 KIR2DL1 および活性型 KIR2DS1 の可溶性分子を流すことにより、初期の結合解析を行った。いずれも通常の KIR-HLA の相互作用の中では、比較的弱い結合にあたるようであった。

D. 考察

HLA-Cw1202 に結合するペプチドの網羅的同定に向けたスクリーニングの目処がある程度ついた。さらなる条件検討を行い、より効率の良いスクリーニング系に改良する方が望ましいので、条件検討を継続しながら、網羅的解析も平行して進める予定である。また、NK 細胞受容体 KIR2D の活性化型と抑制化型との相互作用解析の一部を進めた。前年度に主に解析を進めた HLA-Cw4 との違いを明らかにすることで、HLA ごとの NK 細胞制御の特徴を見いだせる状況が整ったと言える。

E. 結論

(1) HLA-Cw12 について、巻き戻し条件を検討したが、HLA-Cw4 に比べ、ペプチド量を増やす必要があった。これにより、結合する HIV ペプチドのスクリーニング法としてある程度利用できる目処がついた。

(2) HLA-Cw12 結合モデルペプチドを用いて、KIR2D の抑制型と活性化型との初期の結合解析を行った。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Molecular basis for LLT1 protein recognition by human CD161 protein (NKRP1A/KLRB1). Kamishikiryo J, Fukuhara H, Okabe Y, Kuroki K, Maenaka K. J Biol Chem. 2011 Jul 8;286(27):23823-30.

2. Differential but competitive binding of Nogo protein and class I major histocompatibility complex (MHCI) to the PIR-B ectodomain provides an inhibition of cells.

Matsushita H, Endo S, Kobayashi E, Sakamoto Y, Kobayashi K, Kitaguchi K, Kuroki K, Söderhäll A, Maenaka K, Nakamura A, Strittmatter SM, Takai T. J Biol Chem. 2011 Jul 22;286(29):25739-47.

3. Molecular basis for herpesvirus entry mediator recognition by the human immune inhibitory receptor CD160 and its relationship to the cosignaling molecules BTLA and LIGHT. Kojima R, Kajikawa M, Shiroishi M, Kuroki K, Maenaka K.

J Mol Biol. 2011 Nov 4;413(4):762-72.

4. 黒木喜美子、北辻千展、前仲勝実 NK レセプターと HLA の最前線 MHC 18(3), 1-19.

2.学会発表

1. 前仲勝実 表面タンパク質の不安定な複合体の分子解析、日本蛋白質科学会・ワークショップ、招待講演 大阪 2011.6

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

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表