

に対する耐性株の誘導試験を行い、得られた変異の機能や意義の解析を通じて、次世代融合阻害剤に対する耐性獲得機序の確立を目的とした。

## B. 研究方法

### 細胞

HeLa-CD4/CCR5-LTR- $\beta$ -galactosidase (MAGI) 細胞は 10% 熱不活化牛胎児血清 (FCS)、0.2 mg/ml G418、0.1 mg/ml ハイグロマイシンを含む Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) で培養した。MT-2 細胞は 10%FCS を含む RPMI1640 培地で培養した。293FT 細胞は 0.5 mg/mL G418 を含む 10%FCS/DMEM で培養した。

### 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 は化学合成法により作製した。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。

### SC34 および SC34EK に対する耐性ウイルスの誘導

耐性誘導に使用した野生型ウイルス NL4-3 は、HIV-1 molecular clone pNL4-3 を 293T 細胞にトランスフェクトして作成した。SC34 および SC34EK はそれぞれ 0.1 nM および 0.15 nM を初期濃度として培養液に加え、その状態で MT-2 細胞にウイルスを感染させ、繰り返し継代を行った。細胞変性効果が十分に見られるようになった場合、培養液に加える薬剤濃度を 2 倍に増加させ、さらに培養を続ける (dose escalating method)。ある一定濃度を超える濃度でもウイルスが十分複製してくるようになったら、感染細胞の一部を回収し、DNA を抽出、PCR 法でウイルスのエンベロップ領域 (gp120 および gp41) を増幅し、その塩基配列を決定した。

### エンベロップ組換えウイルスの作製

HIV-1 gp41 の組換えには、pNL4-3 に存在するユニークサイトには含まれる NheI-BamHI 断片 (1,215 bp、gp120 V4 領域から gp41 の細胞外 domain を含む) をクロ

ーニングした pSLgp41WT を作製した。これに対して site directed mutagenesis を行い、変異を有する NheI-BamHI 断片を pNL4-3 に戻すことで目的の変異を有するクローンを作製した。

HIV-1 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。

CT 領域に導入された変異の解析においては、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 (<sup>8318</sup>CTT-TCT-ATA<sup>8326</sup>→

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。

これらのクローンを 293FT 細胞に遺伝子導入し、48 時間後にウイルスを回収した。

### 抗 HIV-1 活性の評価

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

HIV-1 の複製を 50%阻害する濃度 (EC<sub>50</sub>)を算出し評価した。

### Circular Dichroism スペクトルの測定

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

### 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。

### 感染性の解析

それぞれの変異を組み込んだエンベロープ発現ベクターを、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  $\Delta$  8/9 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

### SC34 および SC34EK 耐性ウイルスの誘導

#### ①-1 gp41 領域の変異

SC34 に対する耐性ウイルスの誘導は 0.1 nM の濃度から開始した。20 継代目 (P20) において gp41 の 36 番目のアミノ酸である

アスパラギン酸 (D) からグリシン (G) への置換が認められた。続いて、P58 で新たに A30V、I37T、N126K の置換が導入された。その後、L210 置換が P91 で、S138A 置換が P102 で認められた。その後も継代を繰り返して、R46K、Q52R、Q56R、E151K、K154N、および N163D 置換が順次導入された。なお、アミノ酸置換の導入につれて、SC34 の EC<sub>50</sub> 値も増加し、最終のウイルスでは 170 nM を示した (図 2A)。

同様に SC34EK に対する耐性ウイルスも誘導した。P20 において D36G および N126K 置換が認められた。その後も Q41R、P203S、および H258Q が P44 で、I171K および L204I が P45 で、N43K、A96D、H132Y、および E151K (P86)、V182I (P106)、S241F および A312T (P120) のアミノ酸置換が順次導入された。P120 における SC34EK の EC<sub>50</sub> は 40 nM を示した。まとめると、SC34EK に対する耐性誘導により得られた最終継代ウイルス

(P120) において、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 (図 2B)。

#### ①-2 gp41 変異による薬剤感受性への影響

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

#### ②-1 gp120 領域の変異

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

を決定した。その結果、HIV-1<sub>SC34P122</sub>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<sub>SC34EKP120</sub>では、V37A、V59I、S100K、S115N、R138S、D139N、およびA310Tの変異が導入された(図2)。

## ②-2 gp120 変異による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調べた。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<sub>SC34(P122)gp120</sub> 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。一方、SC34EK の P120 時点での gp120 変異を導入したウイルス、HIV-1<sub>SC34EK(P120)gp120</sub> 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(表1)。

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<sub>SC34(P122)gp41</sub> および HIV-1<sub>SC34EK(P120)gp41</sub>) に組み込み、HIV-1<sub>SC34(P122)gp160</sub> および HIV-1<sub>SC34EK(P120)gp160</sub> を作製し、感受性への影響を評価した(表1)。HIV-1<sub>SC34(P122)gp160</sub> では HIV-1<sub>SC34(P122)gp41</sub> 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<sub>SC34EK(P120)gp160</sub> においても HIV-1<sub>SC34EK(P120)gp41</sub> 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(表1)。

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

SC34 および SC34EK を用いた耐性誘導において、N-HR および C-HR 内にもいくつかのアミノ酸変異が導入された。これらの変異が N-HR:C-HR の結合性に与える影響を調

べるために、circular dichroism (CD)により検討した。N-HR 由来の典型的なペプチドとして用いた N36 に対しては、SC34 および SC34EK は、C34 と比べて強固な結合安定性を示した。しかし、SC34 および SC34EK で誘導された C-HR 内アミノ酸置換を C34 に導入[それぞれ C34 (SC34<sup>res</sup>) および C34 (SC34EK<sup>res</sup>)]すると、親和性は低下した。また、SC34 で誘導された N-HR 内アミノ酸置換を N36 に導入したペプチド N36 (SC34<sup>res</sup>) に対する結合親和性を測定すると、SC34 はもはや安定な結合性を示さなかった。一方、C34 (SC34<sup>res</sup>) では結合親和性の回復が認められた。同様の結果は N36 (SC34EK<sup>res</sup>) と C34 (SC34EK<sup>res</sup>) との間にも認められた(図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<sub>SC34(P122)gp41</sub> 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。一方、HIV-1<sub>SC34(P122)gp120</sub> では野生株と同程度の複製能が認められた。HIV-1<sub>SC34(P122)gp160</sub> 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(図4)。

また、HIV-1<sub>SC34EK(P120)gp41</sub> においては著しい複製能の低下が認められた。HIV-1<sub>SC34EK(P120)gp120</sub> 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<sub>SC34EK(P120)gp160</sub> では、HIV-1<sub>SC34EK(P120)gp41</sub> 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4)。

## 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度を調べた。その結果、5 つの CT 変異全てを組み込んだウイルス

NL43C (CT<sup>res</sup>)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<sup>res</sup> + CT<sup>res</sup>)では、HR 変異単独のウイルス NL43C (HR<sup>res</sup>)と比較して SC34EK に約 3 倍の耐性 (EC<sub>50</sub> 値 (nM):168 vs. 60) を示した (表 2)。

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<sup>res</sup> [A96D/V182I])に対する T-20 の EC<sub>50</sub> 値 365 ± 36 nM に対して、CT 変異を有するウイルス NL43C (HR<sup>res</sup> [A96D/V182I]) + CT<sup>res</sup> では、3,021 ± 651 nM を示したことから、CT 変異により約 8 倍の T-20 耐性が付与された (表 2)。

#### 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プタンパクの内在化、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研究を行った。

CT 変異を有するエンベロ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<sup>res</sup> [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<sup>res</sup>)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<sup>res</sup> [A96D/V182I]) + CT<sup>res</sup> 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 5)。

#### **D. 考察**

第一世代の融合阻害剤である T-20 は臨床においても、優れた抗 HIV-1 効果を示している。しかしながら長期にわたる薬剤投与は薬剤耐性化の問題につながり、実際、T-20 耐性ウイルスの出現が報告されている。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が、薬剤の詳細な作用機序および耐性獲得機序の解明に必要となる耐性プロファイルは現時点では殆ど明らかになっていない。そこで我々は dose escalating method で SC34 および SC34EK に対する耐性ウイルスを誘導し、詳細に耐性化のメカニズムを解析した。その結果、多くのアミノ酸変異が gp41 および gp120 領域内に導入された。続いてそれぞれのアミノ酸変異が耐性化にどの程度寄与するかを確認したところ、gp41 領域内の単一のアミノ酸置換では薬剤感受性に大きな変化は与えなかった。一方、gp41 変異全てを導入した変異体は高度耐性化を示した。この結果は、SC34 および SC34EK に対する耐性化には単独のアミノ酸変異だけでは不十分であり、多くのアミノ酸置換の蓄積が耐性化には必要であることを示している。

また、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せることで、T-20 や C34 に対する耐性度を増加させたが、SC34 や SC34EK に対しては影響が殆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。

これまでのペプチド創製では、多数のアミノ酸を変更する必要があった。我々が以前報告した SC34EK や T-20EK では N-HR と

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

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せることで、複製能の改善が認められたことから、gp120 領域内の変異は二次変異として振る舞うと考えられた。

さらに、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 gp41 CT 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を解析したところ、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 エンベロープの機能不全を

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り、このため、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

次世代融合阻害剤である SC34 や SC34EK の耐性化には、多数のアミノ酸置換の蓄積が必要であることから、genetic barrier の高さが推測された。また、単一のアミノ酸置換で高度耐性化を示す T-20 とは大きく耐性プロファイルが異なっていた。さらには、これまで特に重要であると考えられてきた gp41 N-HR や C-HR に加えて、gp41 CT や gp120 領域内の変異も耐性度や複製能、あるいは感染性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, Kodama E, Shimura K, Sakagami Y, Watanabe K, Ito S, Watabe T, Terakawa Y, Nishikawa H, Sarafianos S. G, Kitaura K, Oishi S, Fujii N, Matsuoka M. Design of peptide-based inhibitors of HIV-1 strains resistant to T-20. *J. Biol. Chem.* 284(8): 4914-4920, (2009).
2. Ueno M, Kodama E.N, Shimura, K, Sakurai Y, Kajiwara K, Sakagami, Y, Oishi S, Fujii N, Matsuoka M. Synonymous mutations in stem-loop III of Rev responsive elements enhance HIV-1 replication impaired by primary mutations for resistance to enfuvirtide. *Antiviral Res.* 82(1): 67-72, (2009).
3. Naito T, Izumi K, Kodama E, Sakagami Y, Kajiwara K, Nishikawa H, Watanabe K, Sarafianos S.G, Oishi S, Fujii N,

- Matsuoka M. SC29EK, a peptide fusion inhibitor with enhanced  $\alpha$ -helicity, inhibits replication of human immunodeficiency virus type 1 mutants resistant to enfuvirtide. **Antimicrob. Agents Chemother.** 53(3): 1013-1018, (2009).
4. Michailidis E, Marchand B, Kodama EN, Singh K, Matsuoka M, Kirby KA, Ryan EM, Sawani AM, Nagy E, Ashida N, Mitsuya H, Parniak MA, Sarafianos SG. Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by 4'-ethynyl-2'-deoxyadenosine triphosphate, a translocation defective reverse transcriptase inhibitor. **J. Biol. Chem.** 284:35681-32691,(2009).
  5. Nishikawa H, Nakamura S, Kodama E, Ito S, Kajiwara K, Izumi K, Sakagami Y, Oishi S, Ohkubo T, Kobayashi Y, Otaka A, Fujii N, Matsuoka M. Electrostatically constrained alpha-helical peptide inhibits replication of HIV-1 resistant to enfuvirtide. **Int J Biochem Cell Biol.** 41(4): 891-899, (2009).
  6. Zhao T, Yasunaga J, Satou Y, Nakao M, Takahashi M, Fujii M, Matsuoka M. Human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor selectively suppresses the classical pathway of NF- $\kappa$ B. **Blood.** 113(12): 2755-2764, (2009).
  7. Oishi S, Ito S, Nishikawa H, Tanaka M, Ohno H, Otaka A, Izumi K, Kodama E, Matsuoka M, Fujii N. Development of a novel fusion inhibitor against T-20-resistant HIV-1. **Adv Exp Med Biol** 611:389-91, (2009).
  8. Oishi S, Kamitani H, Kodera Y, Watanabe K, Kobayashi K, Narumi T, Tomita K, Ohno H, Naito T, Kodama E, Matsuoka M, Fujii N. Peptide bond mimicry by (E)-alkene and (Z)-fluoroalkene peptide isosteres: synthesis and bioevaluation of alpha-helical anti-HIV peptide analogues. **Org Biomol Chem** 7: 2872-7, (2009).
  9. Oishi S, Kodera Y, Nishikawa H, Kamitani H, Watabe T, Ohno H, Tochikura T, Shimane K, Kodama E, Matsuoka M, Mizukoshi F, Tsujimoto H, Fujii N. Design and synthesis of membrane fusion inhibitors against the feline immunodeficiency virus. **Bioorg Med Chem** 17: 4916-4920, (2009).
  10. Watabe T, Terakawa Y, Watanabe K, Ohno H, Nakano H, Nakatsu T, Kato H, Izumi K, Kodama E, Matsuoka M, Kitaura K, Oishi S, Fujii N. X-ray crystallographic study of an HIV-1 fusion inhibitor with the gp41 S138A substitution. **J Mol Biol.** 392: 657-665, (2009).
  11. Kajiwara K, Watanabe K, Tokiwa R, Kurose T, Ohno H, Tsutsumi H, Hata Y, Izumi K, Kodama E, Matsuoka M, Oishi S, Fujii N. Bioorganic synthesis of a recombinant HIV-1 fusion inhibitor, SC35EK, with an N-terminal pyroglutamate capping group. **Bioorg Med Chem.** 17: 7964-7970, (2009).
  12. Tanaka M, Kajiwara K, Tokiwa R, Watanabe K, Ohno H, Tsutsumi H, Hata Y, Izumi K, Kodama E, Matsuoka M, Oishi S, Fujii N. Bioorganic synthesis of end-capped anti-HIV peptides by simultaneous cyanocysteine-mediated cleavages of recombinant proteins. **Bioorg Med Chem.** 17: 7487-7492, (2009).
  13. 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.

14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. Zhao T, Satou Y, Sugata K, Miyazato P, Green PL, Imamura T, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor enhances TGF- $\beta$  signaling through p300 coactivator. *Blood* 118; 1865-1876, 2011.
- Nakao M. HTLV-1 bZIP factor selectively suppresses the classical pathway of NF- $\kappa$ B. The 16<sup>th</sup> East Asia Joint Conference on Biomedical Research. Kyoto, Japan. September, 13-14, 2009.
2. 櫻井康晃、小松賢志、上松一永、松岡雅雄：レトロウイルス感染における DNA 修復酵素の新たな役割：第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月 25-27 日
3. 菅田謙治、佐藤賢文、原英樹、光山正雄、松岡雅雄：CD 4 陽性 T 細胞での HBZ 発現は IFN- $\gamma$  産生を抑制し、Listeria monocytogenes 感染に対する細胞性免疫を障害する：第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月 25-27 日
4. 櫻井康晃、小松賢志、上松一永、松岡雅雄：HIV 感染過程における DNA 修復酵素の役割：第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会、名古屋、2009 年 11 月 26 日-28 日
5. 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: 15<sup>th</sup> INTERNATIONAL CONFERENCE ON HUMAN RETROVIROLOGY HTLV AND RELATED VIRUSES. Leuven, Belgium. June 4-8, 2011.
6. Tiejun Zhao, Yorifumi Satou, Kenji Sugata, Patrick L Green, Takeshi Imamura, Masao Matsuoka. HTLV-1 bZIP factor enhances TGF- $\beta$  signaling through p300 coactivator: 15<sup>th</sup> INTERNATIONAL CONFERENCE ON HUMAN RETROVIROLOGY HTLV AND RELATED VIRUSES. Leuven, Belgium. June 4-8, 2011.

## 2. 学会発表

1. Zhao T, Yasunaga J, Fuji M, Matsuoka M,

7. 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. Sappaoro, Japan. September 11-16, 2011.
8. 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



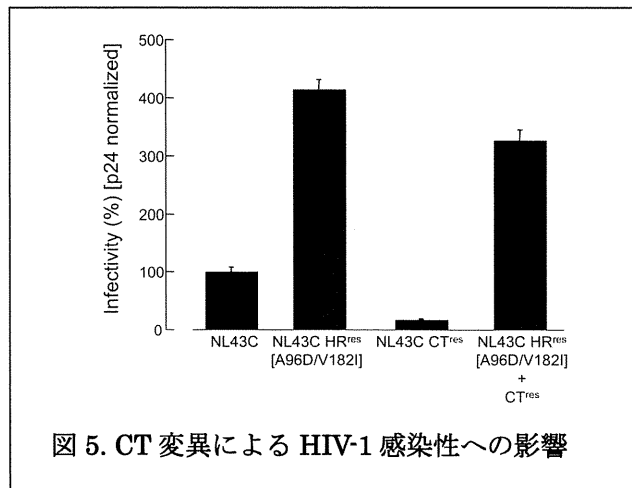
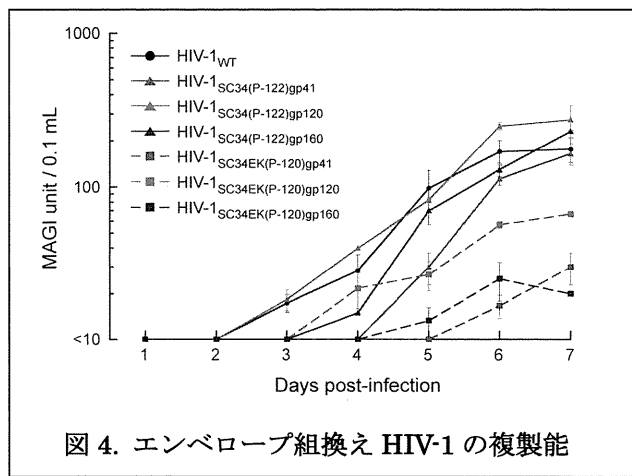
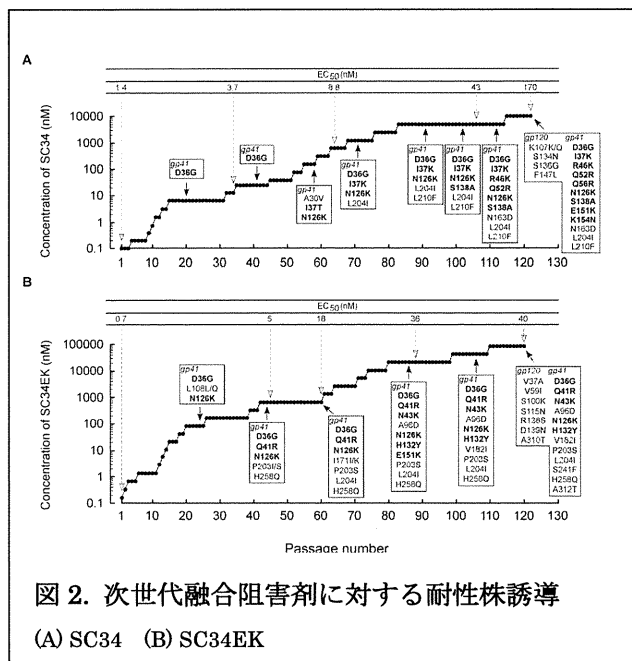
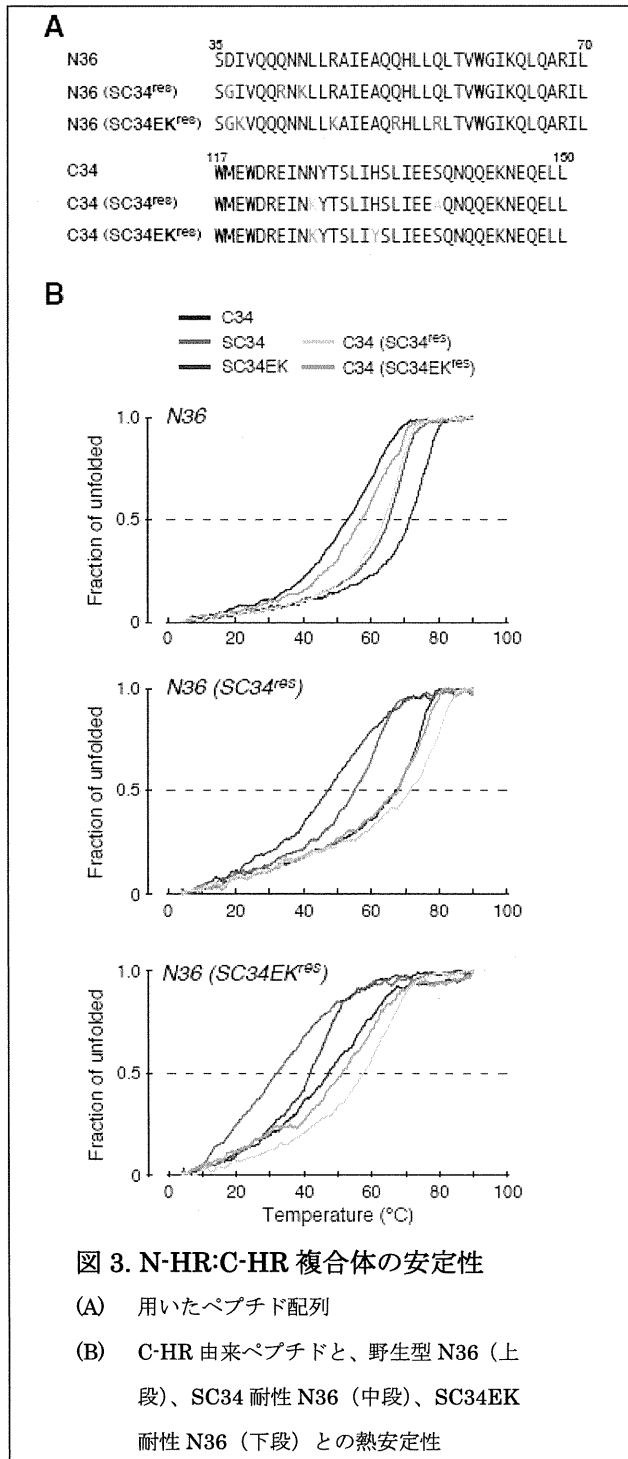
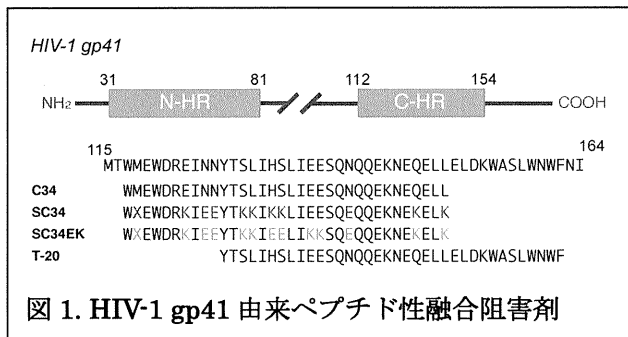


表 1. SC34 および SC34EK により誘導された変異の融合阻害剤感受性への影響

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

HIV-1<sub>SC34(P122)gp41</sub> は gp41 に D36G/I37K/R46K/Q52R/Q56R/N126K/S138A/E151K/K154N/N163D/L204I/L210F 変異を含む。

HIV-1<sub>SC34(P122)gp120</sub> は gp120 に K107Q/S134N/S136G/F147L 変異を含む。

HIV-1<sub>SC34(P122)gp160</sub> は HIV-1<sub>SC34(P122)gp41</sub> と HIV-1<sub>SC34(P122)gp120</sub> の変異を含む。

HIV-1<sub>SC34EK(P120)gp41</sub> は gp41 に D36G/Q41R/N43K/A96D/N126K/H132Y/V182I/P203S/L204I/S241F/H258Q/A312T 変異を含む。

HIV-1<sub>SC34EK(P120)gp120</sub> は gp120 に V37A/V59I/S100K/S115N/R138S/D139N/A310T 変異を含む。

HIV-1<sub>SC34EK(P120)gp160</sub> は HIV-1<sub>SC34EK(P120)gp41</sub> と HIV-1<sub>SC34EK(P120)gp120</sub> の変異を含む。

表 2. SC34EK により誘導された CT 変異による融合阻害剤感受性への影響

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

NL43C (CT<sup>res</sup>) は gp41 P203S/L204I/S241F/H258Q/A312T 変異を有する。

NL43C (HR<sup>res</sup>) は gp41 D36G/Q41R/N43K/N126K/H132Y 変異を有する。

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）  
分担研究報告書

HIV-1 の中和抵抗性メカニズムの解明とその克服に関する研究

研究分担者 松下修三 熊本大学エイズ学研究センター 教授

研究要旨

HIV-1 慢性感染症例では、エンベロープ（Env）領域のアミノ酸変異や糖鎖（glycan）挿入が経過とともに蓄積することが知られているが、これらが中和抗体からの逃避にどのような役割を果たしているか明らかではなかった。我々は、中和抵抗性メカニズムの解明を目指した研究として、*in vitro* で中和抗体逃避ウイルスを誘導し、gp120 の糖鎖付加（PNGS）が、他の変異と共同して、中和抗体高度耐性に関与するが、ウイルスの増殖能を低下させることを報告した。我々は、さらに、中和抵抗性・感受性に著しく関与する gp120・V2 の L175P 変異を見出した(>2258x)。一方、中和抵抗性の克服をめざした研究として、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や、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。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

HIV-1 に対する中和抗体は、急性感染期にはウイルスの強力な選択圧になっていると報告されている。一方、慢性感染期では、ほとんどの症例で自己由来のウイルスを中和できない。これは、中和エスケープ変異株の蓄積によるものと考えられ、多くの臨床分離株が中和抵抗性であることに一致している。しかし、そのメカニズムに関しては十分解明されないままである。中和抗体を用いた治療法の開発に関しても、有効なワクチンの開発においても、この中和抵抗性メカニズムの解明が必要不可欠である。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。

B. 研究方法

中和抗体逃避ウイルスの誘導及び耐性関連変

異の同定：PM1/CCR5 細胞に、CCR5 指向性 (R5)ウイルス HIV-1<sub>BaL</sub> を感染させ、KD-247 の濃度を段階的に上げることでKD-247 耐性ウイルスを誘導した。具体的には、KD-247 と HIV-1<sub>BaL</sub> (500 TCID<sub>50</sub>)を 30 分間反応させ、 $4 \times 10^4$  の PM1/CCR5 に曝露し 5 時間感染させた。その後、上清を取り除き、沈殿した細胞を培地に懸濁し、培養フラスコにて 37°C で培養した。感染細胞よりプロウイルス DNA を分離し、シーケンス解析に用いた。上清ウイルスは、中和感受性試験に用いた。得られた耐性ウイルスの gp120 領域のシーケンスを行い、中和逃避に関与する変異部位を同定した。また、これらの変異を持つ組み換えウイルスを作製し、中和感受性や複製能に与える影響を調べた。培養細胞から、プロウイルス DNA を精製した。得られた DNA を鋳型にして、以下に示すプライマーを用い、Nested PCR 法にて gp120 の C1-C4 領域を増幅させた。

1st step: 1B

(5'-AGAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGA-3')

H (5'-TAGTGCTTCCTGCTGCTCCCAAGAACCC-3')

2nd step: 2B

(5'-AGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGA-3')

F (5'-ATATAATTCACCTTCTCCAATTGTCCTCAT-3')

増幅して得られた gp120 C1-C4 領域 DNA 断片のシーケンスを行った。耐性誘導で得られた培養上清ウイルスの中和感受性は、TZM-bl 細胞を用いて行った。

**変異エンベロープタンパク (Env) 発現ベクターの作成**：培養細胞から、プロウイルス DNA を精製した。得られた DNA を鋳型にして、LA *taq* (Takara) と以下に示すプライマーを用い、HIV-1<sub>BaL</sub> の gp160 領域を増幅した。

ENVA

(5'-GGCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAA-3')、

ENVN

(5'-CTGCCAATCAGGGAAGTAGCCTTGTGT-3')。

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

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

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

Env003A (5'-AGcAGAAGAcAGTGGcAATG-3')、

EnvF02 (5'-ATGGTAGAACAGATGCATGA-3')、

EB2 (5'-TCAACTCAACTGCTGTrAAAT-3')、

EC2F (5'-CCTCAGGAGGGGACCCAGAAATT-3')、

EnvF03 (5'-TAGCACCCACCAGGGCAAAGA-3')、

Nef005B (5'-TTTGACCACTTGCCACCC-3')

をプライマーとし、BigDye Terminator を用いてシーケンスを行った。pCR-XL-BaL-WT は、HIV-1<sub>BaL</sub> (0) p0 の env の配列でもっとも頻度が高いものを選んだ。Env に変異を持つキメラウイルスは、HIV-1<sub>BaL</sub> (200) p5 (pCR-XL-BaL-p5) や HIV-1<sub>BaL</sub> (1000) p13 (pCR-XL-BaL-p13) の最も出現頻度の高いクローンを用いて、pCR-XL-BaL-WT の gp120 上の共通制限酵素部位 (*NdeI*, *StuI* and *ScaI*) を利用し、それらの部位を組み換えることで作製した。**pseudotype virus の作製と Single-round 中和実験**：前日に準備した 293T 細胞に、pSG3<sup>env</sup>、

各エンベロープ発現ベクター (pCXN<sub>2</sub>) および pRSV-Rev ベクターをトランスフェクトし、24-36 時間後に上清を回収した。シュードウイルスの力価 (TCID<sub>50</sub>) は TZM-bl 細胞を用いて定量した。300TCID<sub>50</sub> 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% CO<sub>2</sub> にて 2 日間培養した。中和活性は、Galacto-Star (Applied Biosystems) を用い、 $\{1-(t-c)/(n-c)\} \times 100$  (t; サンプルの蛍光強度、c; 細胞のみのバックグラウンド蛍光強度、n; 抗体無しサンプルの蛍光強度) で計算した。

**pWT/BaL env キメラ感染性ウイルスの作製とウイルス複製動態解析**：キメラのプロウイルスは、pWT/BaL プロウイルスプラスミドに変異株のエンベロープ部をサブクローニングすることによって作成した。3×10<sup>4</sup> 個の PM1/CCR5 細胞と 10ng の p24 量に相当する pWT/BaL キメラウイルスを混ぜ、37°C で 4 時間培養した。培養後、遠心分離して上清を取り除いた。3ml の 10%FCS を含んだ RPMI1640 に再懸濁し、12 well plate (Falcon) にて 6 日間培養した。ウイルス増殖は p24 抗原量を測定することにより比べた。

**175p 変異エンベロープタンパク (Env) 発現ベクターの作成**：JR-FLwild 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。

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<sub>wt</sub> 及び JR-FL<sub>175p</sub> 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  $4 \times 10^5$  になるように調整し、抗 Env 抗体を 50  $\mu$ l 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。

**新規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。 $\Delta$ CD8 PBMC  $5 \times 10^6$  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  $1 \times 10^4$  以下となるように分注し、さらに 37°C、5%CO<sub>2</sub> 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。

**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 Bio-reagents) をコートし、ブロック後 1 $\mu$ g/ml に希釈した単量体 (gp120gp120-SF2; Austral Biologicals) を 50 $\mu$ l ずつ加えた。2 時間室温に静置した後、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、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抗体と定義した。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。

**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。

**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 Buster Reagent (Novagen) により可溶性タンパク質を抽出した。Fab, scFv は His タグを用いて His 60 Ni Superflow<sup>TM</sup> Resin にて精製した。さらに scFv と Fab は 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 ペプチドカラムを用いてさらに精製した。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<sub>JR-FLwt</sub> 及び HIV-1<sub>JR-FLL175P</sub> 変異株を用い、TZM-bl assay にて測定した。

(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

### I. HIV-1 の中和抵抗性メカニズムの研究

**CCR5 指向性 (R5 ウイルス) HIV-1<sub>BaL</sub> を用いた KD-247 耐性誘導実験** : PM1/CCR5 細胞に HIV-1<sub>BaL</sub> を感染させる実験系で、KD-247 耐性ウイルスを誘導した。コントロールとして、PM1/CCR5 細胞を用いて KD-247 非存在下で HIV-1<sub>BaL</sub> 株を培養した。(passage control)。耐性誘導は、5 µg/ml からスタートし、段階的に濃度を上げて、最終的には KD-247 濃度を 2000 µg/ml まで上げた。5 パッセージ (以下 HIV-1<sub>BaL</sub> (200) p5) は、KD-247 濃度 200 µg/ml で増殖したウイルスを示す。コントロールウイルス HIV-1<sub>BaL</sub> (0) p0 と HIV-1<sub>BaL</sub> (0) p10 と、耐性誘導で得られた 6 点の上清 (p2、p5、p6、p7、p10、p16) を回収し、KD-247 の感受性を評価した。HIV-1<sub>BaL</sub> (0) p0、HIV-1<sub>BaL</sub> (200) p5、HIV-1<sub>BaL</sub> (300) p6 と HIV-1<sub>BaL</sub> (2000) p16 の KD-247 の IC<sub>50</sub> 値はそれぞれ、0.32±0.20 µg/ml、5.68±1.48 µg/ml、>100 µg/ml と >100 µg/ml となった。これらの結果は、in vitro の耐性誘導で HIV-1<sub>BaL</sub> が耐性を獲得したことを示す。5 パッセージ目で中程度耐性ウイルスが誘導でき、6 パッセージ以降、高度耐性ウイルスが誘導された。

耐性ウイルス株の *env* 領域のシーケンス解析 : HIV-1<sub>BaL</sub> の KD-247 耐性に関与している遺伝子を決定するために、感染細胞のプロウイルスを DNA 抽出し、*env* 遺伝子の C1 から C4 ま

で増幅した。得られた PCR 産物をクローニングし、シーケンス解析を行った。中程度の KD-247 耐性が得られた 5 パッセージまでは、V3 領域の 319 番目にアラニン (A) を持つウイルス (319A) が主にみられるようになった (95 %)。319A のウイルスは、スタート時 HIV-1<sub>BaL</sub> ですで見られるウイルスであった (37.7 %)。しかし、KD-247 の濃度を上げていくと、319A の頻度は徐々に減少した。この結果から、KD-247 の低濃度存在下では、すでに存在しているウイルスの中から、抗 V3 抗体に対し耐性の傾向をもつウイルス株が選択されて出現したことが示唆された。KD-247 300 µg/ml 存在下で培養した 6 パッセージ目で、V2 領域の 186 番目に PNGS の挿入と gp120 の V3-tip のアミノ酸置換 (R315K) が見られた。6 パッセージ以降、V2 と V3 の変化の割合は徐々に増加した。スタート時の HIV-1<sub>BaL</sub> のウイルスのレパートリーの中に V2 の PNGS の挿入が見られるかを確認するために、61 クローンの gp120 領域のシーケンス解析を行ったが、186 番目に PNGS を持つウイルスは見られなかった。

5 パッセージ目で見られた 319A を持つウイルスの KD-247 の耐性メカニズムを確認するために、我々は、SwissPdb Viewer program version 3.9 (SPdbViewer) と ViewerLite version 5.0 (Accelrys Inc., San Diego, CA, USA) を用いて、V3 の構造のシミュレーションを行った。V3 を含む gp120 の結晶構造の分子モデルは、Protein Data Bank (PDB) (accession number: 2B4C) を用いた。5 パッセージ目で見られた 315R/317F/319A の 315 番目のアルギニン (R) の側鎖は、野生株で見られる 315R/317F/319T と比較すると、C 末端側に折れ曲がった構造をとり、KD-247 がエピトープ部にアクセスしにくい構造になる可能性がある。

**KD-247 耐性の HIV-1<sub>BaL</sub> エンベロープを持つ シュードタイプウイルスの中和感受性** : KD-247 耐性に寄与するアミノ酸変異部位を決定するために、我々は、HIV-1<sub>BaL</sub> (200) p5 (BaL-STA) と HIV-1<sub>BaL</sub> (1000) p13

(BaL-PNSG/SKL と BaL-SKL)のエンベロープを用いてシュードタイプウイルスを作成した。KD-247のエピトープである V3-tip に変異を持つシュードウイルス (BaL-SKL と BaL-PNSG/SKL) は、KD-247 に対し高度耐性を示した (それぞれ、BaL-WT に対し >2500 と >5500 倍耐性)。一方、5 パッセージで確認された、C2 と V3 変異を持つシュードウイルス (BaL-STA) は、BaL-WT と比較して、約 25 倍以上耐性を示した。一方、V2 に PNGS 挿入のみをもつシュードウイルス (BaL-PNGS) は、KD-247 に対し、BaL-WT とほぼ同じ中和感受性を保持していた。これらの結果は、PNGS 挿入単独では KD-247 に対し耐性にはならないが、V3-tip の変異と同時に存在することで、V3-tip 変異単独よりも、より強い KD-247 耐性を持つことが示唆された。

変異エンベロープを持つ感染性クローンウイルスの複製動態解析：V2 の PNGS 挿入単独では、KD-247 の感受性に影響を与えなかったことから、なぜ抗 V3-MAb 高濃度存在下でエピトープ部の V3-tip 変異に加えて V2 に PNGS の挿入の頻度が増加したのか明らかではない。中和耐性誘導の過程で得られた PNGS 挿入の役割を明らかにするために、我々は、V2 の PNGS 挿入や C2、V3 変異を持つ感染性クローンウイルスを作製した。キメラウイルス (pBaL-WT、pBaL-STA、pBaL-PNSG/SKL、pBaL-SKL) は耐性誘導で得られた HIV-1<sub>BaL</sub> エンベロープを組み換えた後、pWT/BaL の *env* 領域に挿入した。これらの KD-247 耐性をエンベロープに持つ感染性クローンウイルスを用いて、KD-247 非存在下でウイルスの複製動態を比較した。PNGS 挿入単独のウイルス (HX-BaL-PNGS) は、野生株 HX-BaL-WT と比較して 6 日目の p24 量が明らかに低かった。一方、V2 の PNGS の挿入に加え、C2 と V3 に変異を持つウイルスは、感染 6 日目の時点で、HX-BaL-WT や HX-BaL-PNSG/SKL とほぼ同等の複製能力を持っていた。次に、KD-247 低、中および高濃度存在下でウイルスの複製動態を確認した。感染 6 日目で、高濃度 KD-247 存在下 (2000  $\mu$ /ml)

では、V2 の PNGS 挿入と V3 変異の両方を持つウイルス (HX-BaL-PNSG/SKL) は、V2 挿入を持たないウイルス (HX-BaL-SKL) よりも複製能力が高かった。また、低濃度 KD-247 存在下 (5  $\mu$ g/ml) では、PNGS 挿入単独が、野生株よりも複製能力が高かった。一方、中濃度存在下 (50 $\mu$ g/ml) で両者を比較すると、複製能力に差はなかった。これらの結果から、KD-247 低濃度存在下で選択された V2 の PNGS 挿入が、一旦は単独での耐性度と増殖能の低さのため割合が減少するものの、高濃度存在下で、V3 の耐性変異と同時に存在することで増殖可能になったことが示唆された。

次に、PNGS 挿入で起こった複製能力の低下を補っているアミノ酸変異を同定するために、我々は、PNGS 挿入に C2 や V3 部の変異を個々に、点突然変異法を用いて、アミノ酸変異を導入し、感染性クローンウイルスを作製した。PNGS と F317L を同時に持つウイルス (HX-BaL-PNGS/L) は、PNGS 単独のものに比べ明らかに増殖能が良かった。PNGS と T240S の変異を持つウイルス (HX-BaL-PNGS/S) の複製能は、PNGS 単独のウイルスよりも同等もしくは、やや低下傾向であった。PNGS と V3-tip 変異を持つウイルス (HX-BaL-PNGS/K) は、複製能力の低下が著しかった。しかし、このウイルスの複製能力の低下は、C2 変異 (T240S) や V3stem (F317L) の変異を獲得することで改善された (HX-BaL-PNGS/SKL)。

一方、耐性誘導スタート時の HIV-1<sub>BaL</sub> gp120 のシーケンスの結果、T240S (67.2 %) と F317L (29.5 %) は両方とも既に存在していたことがわかった。抗体存在下では T240S の割合は、7 passage 以降 100% になり 14 passage 目まではそれを持続した。しかし、抗体非存在下で培養を続けたコントロールウイルスでは、C2 の T240S の割合は 9 passage 目で一旦 0% になり、最終 16 パッセージ目で、スタート時と同等の存在比に戻った (61.5 %)。一方、F317L は、パッセージコントロール中では、徐々にその割合を増加させ、16 パッセージ目で 90% を越えた。これらの結果から、C2 の T240S は、

PM1/CCR5 細胞への適応にはそれほど関与しておらず、KD-247 耐性で誘導された V3 変化で引き起こされた複製能力の低下を補うために必要であると考えられ、クローンウイルスでの結果もこれを支持していた。また、V3 の F317L は PM1/CCR5 細胞への適応のためだけの変異ではなく、V2 の PNGS 挿入変異による複製能力の低下を補う役割も兼ねることが考えられた。

**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<sub>175P</sub> 株は、wt に比較して 0.5 $\gamma$  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<sub>175P</sub> 株への抗体の結合は pLP-EGFP-JRFL(175P)を導入した細胞の FACS 解析にておこなった。JR-FL<sub>175P</sub> 株への抗体の結合は wt に比較して 0.5 $\gamma$  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もしくは全くないが、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<sub>175P</sub> 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<sub>175P</sub> 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 $\mu$ g 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 $\mu$ g 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 $\mu$ g 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。

## II. HIV-1 の中和抵抗性の克服に関する研究

**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<sub>wt</sub> や JRFL<sub>175p</sub> 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。

**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 を用いて抗体遺伝子の V 領域に特異的なプライマーで 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 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<sub>JR-FL</sub> の WT 株と 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、scFv L4、S5 は、JR-FL 株に対して強い中和活性を示した。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

HIV-1 感染初期に、液性免疫からの逃避に関連した HIV-1 の進化が見られることが報告されている。しかしながら、これらの報告は、臨床検体から示唆されたものであり、多様性に富んだウイルスと中和抗体が含まれているため、個々の変異や PNGS の挿入が中和逃避とどのように関係しているかは明らかではなかった。今回の研究で、我々は、臨床応用が期待されている抗-V3 単クローン抗体の耐性誘導実験で HIV-1<sub>BaL</sub> を用いて中和抵抗性ウイルスを分離し、試験管内でその変異の機能的役割について詳細に検討した。

KD-247 低濃度存在下において、C2 と V3 領域に 3 つのアミノ酸変化 (T240S/I283T/T319A) が見られた。これらのウイルスは、すでに耐性誘導前に見られたウイルスの 1 つから増殖し

たものであった。また、高濃度存在下において、C2 (T240S) と V3 (R315K/F317L) に加えて V2 領域に糖鎖付加したウイルスが見られるようになった。V2 に PNGS の挿入のみを持つ HIV-1<sub>BaL</sub> (BaL-PNGS) は、KD-247 に対し感受性を維持していたが、V3 の変異と V2 の糖鎖挿入を両方持つウイルスの KD-247 に対して V3 変異単独よりも耐性に傾くことが確認された。増殖動態の比較の結果、R315K や V2 の PNGS 挿入は、単独では増殖能の著しい低下を招き、PNGS 挿入だけでは耐性化も非常に弱かった。しかし、これらの耐性変異が同時に存在しても、C2 (240S) や V3 (F317L) 変異を伴うことにより、野生株と同等の増殖能を示すことがわかった。これらの結果から、ウイルスの複製動態に影響を与える変異や挿入が、他の部位の変異を獲得することで野生株と同等のウイルス複製を持つようになり、ウイルスのレパートリーの中で主要なウイルスになり得たことが示唆された。

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、V2 領域の一か所に導入された 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。

これらの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は、ある程度の交差反応性を示すもの約 30% であり、抗体遺伝子をクローニングし、さらに解析中である。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 miss-folding 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、scFv は大量に作成できる必要がある。

#### E. 結論

我々は、抗 V3 単クローン抗体 KD-247 を用いて高度耐性ウイルスを誘導した。これらの耐性ウイルスは、エピトープ部の変異の他に V2 に PNGS 挿入が見られた。これらの変異は、強いウイルス複製負荷のかかる変異であったが、その他の部位の変異を獲得することによって、複製能力を野生株とほぼ同等に改善させることがわかった。つまり、中和逃避に関係した変異は、中和抗体抵抗性だけでなく、ウイルス増殖を促進させるような機能も併せ持っていることが示唆された。また、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。一方、我々の最近の研究結果から、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。中和抵抗性の解明とその克服は HIV

ワクチンの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

特になし

#### 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.
5. 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

6. 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. Matsushita S, Narahara C, Morizono M, Nishida Y, Honda –Shibata A, Harada S., Yoshimura, K.,: Polyclonal antibody response against gp120 including antibodies to V3, CD4bs and CD4i epitopes account for broad neutralization. 5th Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. 2009.7.19-22, Cape Town, South Africa.
  2. Narahara C, Hatada M, Harada S., Yoshimura, K., Matsushita S, : A primary R5 isolate undergoes different escape pathway during in vitro selection with low or high concentration of an anti-V3 monoclonal antibody. AIDS Vaccine 2009, 2009.10.19-22, Paris.
  3. Matsushita, S., Mouri, S., Harada, S., Yamada, Y., Tamamura, H., Yoshimura, K.: CD4 mimetic compound-mediated enhancement of the neutralization activities of anti-V3 and CD4i monoclonal antibodies against the standard panel of primary isolates. XVIII International AIDS Conference. July.18-23, 2010. Vienna, Austria.
  4. 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.
  5. 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.
  6. Yoshimura K, Harada S, Hamaji 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.
  7. 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. 松下修三: HIV-1 に対する中和単クローン抗体の治療応用に向けた基礎研究. 第9回日本蛋白質化学学会 2009.5.20-22. 熊本.
  2. Harada S, Yoshimura K., and Matsushita S.: Generation of an integrase inhibitor raltegravir resistant variants using recent primary isolates, X4, R5 and dual/mix HIV-1. 10th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium. 2009.9.28-29, Kumamoto
  3. Yoshimura K., Harada S, Hatada M. and Matsushita S.: In vitro induction of HIV-1 resistant to a CCR5 antagonist maraviroc. 10th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium. 2009.9.28-29, Kumamoto
  4. Ishikawa T., Yoshimura K., Hatada M. Harada S, and Matsushita S.: Mutations in gp120 of R5 HIV-1 laboratory isolate induced by the in vitro selection of maraviroc