

研究課題：霊長類ゲノム情報を利用した抗エイズウイルス自然免疫因子の探索およびその新規エイズ治療法への応用

課題番号：H22-エイズ-若手-007

研究代表者：武内 寛明（東京医科歯科大学ウイルス制御学分野 助教）

研究分担者：なし

1. 研究目的

世界的に流行しているエイズの原因であるヒトエイズウイルス（HIV）は、サルエイズウイルス（SIV）が「種の壁」を乗り越え病原性を示す HIV へと変貌を遂げた歴史的背景が明らかとなってきた。しかしながら、SIV がヒトに感染し病原性を示すようになった原因は、未だ解明がなされていない部分が多い。当該研究では、SIV が「種の壁」を乗り越えてヒトへ感染伝播する際に関わる自然免疫因子（群）および HIV 感染制御ヒト宿主因子（群）を同定することにより、新規エイズ治療法に向けての基盤確立に寄与すること、および今後の新興感染症に対するヒト宿主防御機構に対する理解を深めることが目的である。

2. 研究方法

（1）宿主機能遺伝子発現抑制 T 細胞ライブラリーの樹立および HIV/SIV 感染制御宿主因子群の探索：宿主遺伝子（約 1 万 5 千遺伝子）を標的とした short hairpin RNA (shRNA) ライブラリーを発現するカセットを T 細胞ゲノムへ組み込むことで、shRNA ライブラリー安定発現 T 細胞株を樹立した。次に、これら T 細胞ライブラリーを用いて、HIV および SIV 感染耐性 T 細胞群（semi-clonal population）を選択した。その後、各々の細胞群が保持している shRNA 配列（群）を解析し、shRNA 配列が標的としている宿主機能遺伝子を同定した。

（2）単独 shRNA 発現 T 細胞株の樹立：HIV 感染増殖効率が著しく低下している細胞群（semi-clonal population）の中で、6 種の shRNA が混在している細胞群について、各々の shRNA 単独発現 T 細胞株を樹立した。

（3）HIV-1 感染効率の解析：（2）で樹立した各 T 細胞株に、HIV-1_{IIIB} env-pseudotyped HIV-1 (IIIBenv/luciferase-reporter HIV-1) または VSVG-pseudotyped HIV-1 (VSVG/ luciferase-reporter HIV-1) を感染させ、24 時間後の luciferase 活性を測定した。

（4）HIV-1 増殖能の解析：各 T 細胞株に、HIV-1 を感染させた。その後継時的に培養上清を回収し、それらに含まれるウイルス由来の逆転写酵素（RT）活性を測定した。

（5）HIV-1 感染細胞内におけるウイルス DNA 合成量の解析：（2）で樹立した各 T 細胞株に HIV-1 (NL4-3 株) を感

染させ、24 時間後の感染細胞内で、逆転写反応を経て合成されたウイルス DNA 量について、*pol* および *env* の各領域におけるリアルタイム PCR 法にて測定した。

（倫理面への配慮）

本研究における遺伝子組み換え生物等を用いる実験については、必要に応じた東京医科歯科大学の機関承認および文部科学大臣承認を既に取得済みである。

3. 研究結果

HIV 感染耐性 T 細胞ライブラリーを希釈して再培養を行った後に得られた細胞集団（semi-clonal cell population）のウイルス既感染の有無、および shRNA の off-target 効果によるウイルス感染必須レセプターである CD4/CXCR4/CCR5 の細胞膜表面発現レベルへの影響について、正常 MT-4/CCR5 細胞とともに比較検討を行った結果、HIV 感染耐性細胞は HIV 非感染細胞であり、かつ HIV 感染標的細胞としての性状を維持していることが判明した。これら各細胞集団に含まれる shRNA の配列は、4〜8 種類含まれており、複数の shRNA 発現細胞が混在していると考えられる。そこで、HIV 感染増殖効率が著しく低下している細胞群の中で、6 種の shRNA が混在している細胞群について、各々の shRNA 単独発現 T 細胞株を樹立した。

次に、shRNA 単独発現 T 細胞株を用いて HIV-1 感染実験（single-round infection）を行った結果、6 種類のうち 2 種類の shRNA 単独発現 T 細胞株において感染効率の顕著な低下が認められた。また、それ以外の 4 種についても、感染効率が 50% 以上低下することが明らかとなった。そこで、まずこの 2 種の shRNA が標的としている宿主因子の作用機序について解析を進めたところ、1 つは HIV-1 の細胞侵入時に影響を及ぼし、もう 1 つは HIV-1 の細胞侵入後の逆転写反応に影響をおよぼすことが明らかとなった。更には、HIV-1 感染実験（multi-round infection）において、双方共に大元の HIV 感染抑制細胞群と同等の感染増殖効率の低下が認められた。

4. 考察

現在までに、ヒトゲノム情報に立脚したエイズウイルス制御宿主因子探索は既に幾つかの成果が報告されているが、エイズウイルス標的細胞を用いたものではなく、そ

のため自然感染におけるエイズウイルス感染伝播での役割については不明な点が多い。そこで当該研究では、エイズウイルス標的細胞である T リンパ球を用いた機能遺伝子発現抑制ヒト T 細胞ライブラリーを樹立し、HIV 感染制御因子群の探索および同定をおこない、その候補因子群の HIV 感染に及ぼす影響を解析したところ、HIV 細胞侵入時および逆転写反応過程に影響を及ぼす宿主因子群を見出すことが出来た。これらは、既知の HIV 感染制御因子群とは異なる作用機序で HIV 感染制御に関わることが示唆されており、新たなエイズ治療法開発に寄与する可能性が考えられる。

5. 自己評価

1) 達成度について

平成 22 年度は、RNA 干渉法 (shRNA) を用いたヒトおよびサル機能遺伝子発現抑制 T 細胞ライブラリーの樹立に成功し、HIV-1 および SIV 感染制御宿主因子候補群を多数得ることが出来た。平成 23 年度は、前年度に得られた HIV-1 感染制御宿主因子候補群の機能解析を進めた。具体的な進捗状況を下記に記す。

(1) HIV-1 感染制御因子候補群から単一機能遺伝子発現抑制 T 細胞株の樹立 HIV 感染増殖効率が著しく低下している複数の細胞群 (semi-clonal population) の中で、6 種の shRNA が混在している細胞群について、単一 shRNA 発現 T 細胞株を 6 種樹立した。

(2) (1) で樹立した shRNA 発現 T 細胞株を用いて HIV-1 感染実験 (single-round infection) を行った結果、6 種類のうち 2 種類の T 細胞株において感染効率の顕著な低下が認められた。この 2 種の宿主因子の作用機序について解析を進めたところ、1 つは HIV-1 の細胞侵入時に影響を及ぼし、もう 1 つは HIV-1 の細胞侵入後の逆転写反応に影響をおよぼすことが明らかとなった。更には、HIV-1 感染実験 (multi-round infection) の結果、この 2 つの遺伝子発現抑制 T 細胞株は、大元の semi-clonal population と同等の感染増殖効率の低下が認められた。また、その他の HIV-1 感染増殖効率低下が認められた T 細胞群については、その中に混在している shRNA の単独発現 T 細胞株を順次樹立して解析を進めているところである。

これらの結果は、当初の研究計画の 2 年目に予定していた研究進捗度と同程度の進捗状況であり、当該研究事業 2 年目の目標をほぼ予定通り達成出来たと考えられる。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

近年、インフルエンザの異種間感染や SARS による人的被害の状況を踏まえ、新興・再興および人獣共通感染症に

対する適切な予防策を一刻も早く講じる必要性が急務となっており、このことは厚生労働行政の最重要課題の一つであると考えられる。当該研究から同定された宿主制御因子群を公表することで、これらを「バイオロジカルプローブ」として用いた新たなエイズ治療法の確立に寄与する事が出来、この治療法を薬剤併用化学療法と併用することで、薬剤耐性株への効果的な治療法の確立に向けた具体的な議論が可能となる。これらの成果は、様々な病原体に対する種間感染の発展的な解析が可能になるだけでなく、それらの新規予防・治療法の開発に大きく寄与することが予想される。よって当該研究を遂行することは、薬剤耐性株を含む変異株に対する新規エイズ治療法開発のみならず、今後の新興感染症対策に対して、非常に価値のある研究と考えられる。

3) 今後の展望について

前年度に同定した 2 種の宿主因子について重点的に詳細な解析をすすめていくと共に、HIV-1 感染耐性 shRNA 発現 T 細胞株からの HIV-1 感染制御宿主因子群の同定作業を順次すすめていく。具体的には、HIV-1 の細胞侵入過程に影響をおよぼす宿主因子については、HIV-1 と細胞膜との融合過程の詳細な解析をおこなう。また、逆転写反応過程に影響をおよぼす宿主因子については、逆転写反応に必要な HIV-1 CA core の安定性を、当該事業初年度に手法を確立した viral core binding assay 等を用いて解析をおこなっていく。また、新たな単独 shRNA 発現 T 細胞株の評価方法として、ウイルス感染前期過程においては、luciferase 発現 HIV-1 を用いて luc 活性を見極める。また後期過程については、ウイルス蛋白合成効率およびウイルス産生効率とを、ウイルス蛋白を ELISA 法、RT 活性もしくは western blotting 法にて検討する。さらにウイルスと宿主因子との相互作用については、免疫沈降法および免疫染色法にて検討する。当該研究を 3 年間遂行することで、エイズウイルス感染制御宿主因子を利用した新たなエイズ治療法の基盤確立に向けた情報を集積することが出来る。

6. 結論

当該研究事業を 2 年間遂行した結果、機能遺伝子発現抑制 T 細胞ライブラリーの樹立に成功し、HIV 感染制御宿主因子候補群を多数見出す事が出来た。その中で新たな HIV 感染制御機構を持つ宿主因子の存在を見出す事が出来た。

7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

特に無し。

研究発表

研究代表者

武内寛明

- 1) Takeuchi H*, Ishii H., Kuwano T., Inagaki N., Akari H., and Matano T. Host cell species-specific effect of cyclosporine A on simian immunodeficiency virus replication. *Retrovirology*; *in press*.
- 2) Sakuma R and Takeuchi H*. Retroviral Host Cell Factors: APOBEC3G, TRIM5, and Cyclophilins. *HIV and AIDS - Updates on Biology, Immunology, Epidemiology and Treatment Strategies* ISBN 978-953-307-665-2:183-196. 2011.
- 3) Sugiyama R., Nishitsuji H., Furukawa A., Katahira M., Habu Y., Takeuchi H., Ryo A., and Takaku H. Heat shock protein 70 inhibits HIV-1 Vif-mediated ubiquitination and degradation of APOBEC3G. *Journal of Biological Chemistry* 286(12):10051-7. 2011.
- 4) Ohmine S., Sakuma R., Sakuma T., Thatava T., Takeuchi H., and Ikeda Y. The antiviral spectra of TRIM5α orthologues and human TRIM family proteins against lentiviral production. *PLoS ONE* 6(1) e16121. 2011.

*Corresponding author

研究分担者

なし

研究課題：HIV-1 ゲノム産物の翻訳後修飾とその機能に関する研究

課題番号：H21- エイズ- 若手- 020

研究代表者：高宗 暢暁（熊本大学生命科学研究部 助教）

1. 研究目的

抗 HIV 薬に対する薬剤耐性ウイルスの出現は、HIV 感染症治療の長期療養が与える最大の課題の一つであり、この主要な原因は HIV-1 の易変異原性の形質である。薬剤耐性ウイルス出現を出来るだけ回避しうる新しい作用機序に基づく HIV-1 制御法開発は急務である。本研究では、翻訳後修飾という観点で HIV ゲノム産物に着目し、HIV-1 複製に必須の翻訳後修飾を探索し、その翻訳後修飾に関わる宿主因子を標的とした、薬剤耐性出現を回避しうる新しい治療戦略を開拓することを目的とする。

2. 研究方法

本研究の対象とする HIV-1 遺伝子として、ウイルス複製に必須の遺伝子や病原性と密接に関連する *gag* 及び *nef* 遺伝子産物に重点を置いた。また複製に重要な翻訳後修飾である Gag 及び Nef の N-ミリスチル化を担う宿主因子 N-ミリスチルトランスフェラーゼ (NMT) に着目した。研究方法の概要は以下の通りである。主として HIV-1_{NL4-3} 株のウイルスゲノムを用いたが、研究の展開上、適宜、HIV-1_{NL4-3} 株以外の HIV-1 株や近縁のレンチウイルスである SIV 等も利用する。

ウイルス性タンパク質の翻訳後修飾の解析方法の主流として、HIV 研究で一般的に用いられるヒト胚腎由来細胞 HEK293 細胞等に発現ベクターを導入し HIV-1 ウイルスタンパク質安定高発現細胞株を樹立し、本細胞からウイルス性タンパク質を分離して翻訳後修飾解析等を行う。また HIV-1 持続産生細胞から産生される感染性 HIV-1 を回収してウイルス性タンパク質の翻訳後修飾解析等を行う。翻訳後修飾解析は 2 次元電気泳動法や質量分析装置を利用して行う。

同定した翻訳後修飾の HIV-1 複製における意義を明らかにするために、翻訳後修飾部位に各種変異を導入した HIV-1_{NL4-3} 発現ベクターを構築し、野生株と変異株間の表現系の比較を行う。表現系の内容としては、第一にウイルス複製能力の差異を解析する。次に注目するウイルス遺伝子産物の各種機能・注目する特徴の評価を適宜おこなう。各種翻訳後修飾に関わる宿主性酵素の同定を siRNA、阻害剤、ドミナントネガティブ変異体等を利用して行う。

(倫理面への配慮)

本研究で行った実験については、倫理面への配慮を必要

としないものであった。

3. 研究結果

(1) タンパク質の機能調節に関わる普遍的な翻訳後修飾であるリン酸化に着目し、Nef のリン酸化の解析を行った。T 細胞が活性化する際に protein kinase C (PKC) が活性化することから、JR-CSF 株由来 Nef (Nef_{JR-CSF}) 発現 HEK293 細胞を PKC 活性化剤であるホルボールエステル (PMA) で処理した。細胞より得たタンパク質可溶性サンプルを 2 次元電気泳動法に供し、ウェスタンブロット法にて Nef を検出した。その結果、PMA 処理により Nef_{JR-CSF} は等電点の異なる主要な 5 つのスポットで検出された。これらスポットは PMA 未処理時に観察された等電点のスポットに加え更に酸性側に位置するスポットとして検出された。この複数の等電点で存在する Nef_{JR-CSF} を脱リン酸化処理すると、最も塩基性側の主要な 1 つのスポットに収れんした。以上の結果から Nef_{JR-CSF} は少なくとも 4 つのリン酸化サイトが存在することが示唆された。

Nef はアミノ末端が N-ミリスチル化され、この翻訳後修飾は Nef のもつ全ての機能に必須であることが知られている。ここで N-ミリスチル化を受けない Nef_{JR-CSF} 変異体 (Nef_{JR-CSF}G2A 変異体) のリン酸化の解析を行った。その結果、Nef_{JR-CSF}G2A 変異体は 1 つのスポットとして検出された。

Nef のリン酸化サイトの同定を行うために、野生型 Nef_{JR-CSF}、PMA 処理細胞由来の野生型 Nef_{JR-CSF}、及び Nef_{JR-CSF}G2A 変異体を免疫沈降により回収し、SDS-PAGE 後、Nef タンパク質を含むゲルを切り出しトリプシンによる限定分解を行い得られたペプチドフラグメントを質量分析に供した。現在までに、ホルボールエステル処理 Nef_{JR-CSF} において特異的に観察されるピークの特徴を見いだしており、この結果をもとに Nef のリン酸化サイトの同定を行っている。

(2) Gag と Nef に共通の翻訳後修飾であり HIV-1 複製に重要な N-ミリスチル化は、NMT によって行われる。NMT の触媒活性の阻害では、様々な細胞内のオルガネラに局在している全ての NMT の機能を完全に阻害しうる。本研究では、HIV-1 複製と関連する NMT 分子種の機能阻害構築という観点で研究を行っている。NMT の触媒活性には必要とされないが、NMT の N-ミリスチル化が行われるリボゾーム

への局在に重要な NMT のアミノ末端領域からなる変異体 (NMTΔC) の発現は、HIV-1 の産生を抑制することが明らかになった。この作用機序として NMTΔC 変異体による内在性 NMT のリボゾーム局在の阻害と関連していることが示唆された (Takamune et al, *Biol. Pharm. Bull.*, 2010)。現在までに、NMTΔC と結合するタンパク質の候補分子を特定するまでに至っており、その検証を行っている段階である。

(3) HIV-1 Gag タンパク質の中で、ウイルスコアを形成するキャプシド (CA) タンパク質は、ウイルス出芽後にウイルス粒子内でその Ser¹⁶-Pro¹⁷ motif の Ser¹⁶ がリン酸化を受けていることが明らかになった。S16A/P17A mutant HIV-1 は著しくその複製能力が低下した。また宿主因子 peptidyl prolyl isomerase Pin1 はリン酸化 Ser¹⁶-Pro¹⁷ motif を認識し、ウイルスコアの uncoating 過程に寄与していることが明らかとなった (Misumi, Takamune et al *J. Biol. Chem.* 2010)。現在までに、CA の Ser¹⁶-Pro¹⁷ motif の Ser¹⁶ リン酸化に関わるリン酸化酵素の探索をおこなっており、候補分子を特定するまでに至っている。

4. 考察

Nef は PKC 依存的に複数の部位でリン酸化を受けることが示唆された。また Nef のリン酸化はその N-ミリスチル化依存的であることが示唆された。今後 Nef のリン酸化サイトが特定できれば、Nef のリン酸化の意義解明に展開できる。

NMT のリボゾーム局在は Gag 及び Nef の翻訳時の N-ミリスチル化に重要であると考えられる。NMT のリボゾーム局在の阻害法の構築は、翻訳後修飾の阻害を介した新しい HIV-1 複製阻害法の構築につながると考えられる。NMTΔC 変異体に結合する候補分子が NMT のリボゾーム局在能に関与するか検討する必要がある。

Pin1 は細胞内で様々なタンパク質に対して機能している。特異性向上の観点から、今後 uncoating に関与する他の分子、例えば CA Ser¹⁶ のリン酸化に関わるリン酸化酵素の同定等の uncoating の詳細を明らかにした上で、本プロセスを標的とする HIV-1 複製阻害戦略をデザインする必要がある。

5. 自己評価

1) 達成度について

昨年度までの結果を踏まえ本年度は新たな展開を試みた (以下)。

Nef に関しては、これまでに知られていなかった新規のリン酸化サイトの存在が示されたことは評価できる。しかし現在までそのリン酸化サイトの同定とその意義の解明

に至っていない点は不十分である。

HIV-1 複製抑制のためにリボゾーム局在型 NMT を標的とすることが重要であることを示したことは評価できる。NMT のリボゾーム局在機構の解明のため、関連しうる候補分子を特定するまでに至ったが、詳細な解明までに至っていない点は不十分である。

ウイルスコアを形成する CA の Ser¹⁶ のリン酸化が宿主因子 Pin1 によって認識され、結果として uncoating に寄与していることを明らかにした点は評価できる。また Ser¹⁶ のリン酸化に関わる酵素の候補分子を特定するまでに至った。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

HIV-1 複製に極めて重要な翻訳後修飾の阻害によるウイルス複製制御法は、薬剤耐性ウイルス出現を最小化する HIV/エイズ治療戦略の方向性の一つになると考える。本研究はその端緒になる重要な基礎研究としての位置にある。

3) 今後の展望について

Nef の新規リン酸化サイトの同定を鋭意行っている。リン酸化サイトが明らかになれば Nef 機能におけるリン酸化の意義解明が可能となり、さらには Nef の機能阻害のための新しい戦略を構築できる可能性がある。

HIV-1 複製と関連すると考えられるリボゾーム局在型の NMT に関する理解を深めることが重要である。これまでに特定した NMT 結合タンパク質が NMT のリボゾーム結合や機能発現に関与するか検討する。

HIV-1 の複製制御につながる可能性がある HIV-1 CA Ser¹⁶ のリン酸化の機構の詳細について解明することが重要になる。

6. 結論

Nef において、これまでに知られていなかった新規の N-ミリスチル化依存的なリン酸化サイトが存在することが示唆された。

HIV-1 に対する特異性向上の観点から HIV-1 複製と関連すると考えられるリボゾーム局在型 NMT を限定的に標的とすることは重要であると考えられた。NMT がリボゾーム局在に重要な NMT のアミノ末端領域と結合する候補分子を特定した。

HIV の感染初期過程の uncoating の CA の Ser¹⁶ のリン酸化に関わるリン酸化酵素の候補分子を特定した。

7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

該当なし

研究発表

研究代表者

高宗暢暁

国内

- 1) 高宗暢暁、原田圭輔、山本充奈美、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾、HIV-1 Nefの低発現性の特徴とその機能との関連、平成23年度日本生化学会九州支部例会、2011、福岡
- 2) 三隅将吾、井上睦美、堂地起生、岸本直樹、高宗暢暁、杉本幸彦、庄司省三、HIV-1脱殻プロセスに関する研究、平成23年度日本生化学会九州支部例会、2011、福岡
- 3) 高宗暢暁、黒江徹也、棚田訓彰、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾、N-myristoyltransferase触媒領域欠損変異体によるHIV産生の抑制、第84回日本生化学会大会、2011、京都
- 4) 三隅将吾、井上睦美、堂地起生、岸本直樹、高宗暢暁、杉本幸彦、庄司省三、宿主因子によるHIV-1脱殻過程の制御、第84回日本生化学会大会、2011、京都
- 5) 岸本直樹、鬼塚彩乃、高宗暢暁、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾、HIV粒子プロテオーム解析に基づいた感染初期過程を制御する宿主因子の探索とIntegraseの翻訳後修飾、第25回日本エイズ学会学術集会、2011、東京
- 6) 堂地起生、高宗暢暁、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾、HIVキャプシドのSer16リン酸化による脱殻制御機構に関する解析、第25回日本エイズ学会学術集会、2011、東京
- 7) 原田圭輔、高宗暢暁、山本充奈美、入坂由香梨、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾、HIV-1及びSIV Nefの発現量がウイルス感染性増強作用に与える影響、原田圭輔、高宗暢暁、山本充奈美、入坂由香梨、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾、2011、第25回日本エイズ学会学術集会、2011、東京
- 8) 山本充奈美、原田圭輔、高宗暢暁、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾、HIV-1アクセサリタンパク質Nefの発現特性、平成23年度日本薬学会九州支部大会、2011、福岡
- 9) 八城勢造、三隅将吾、高橋義博、大坪靖治、増山光明、杉本幸彦、高宗暢暁、庄司省三、HIV感染抵抗者から学ぶHIVワクチン創製、平成23年度日本薬学会九州支部大会、2011、福岡
- 10) 堂地起生、高宗暢暁、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾、HIV脱殻制御機構に関する解析、平成23年度日本薬学会九州支部大会、2011、福岡
- 11) 岸本直樹、鬼塚彩乃、高宗暢暁、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾、HIV粒子プロテオーム解析に基づいた感染初期過程を制御する因子の探索、平成23年度日本薬学会九州支部大会、2011、福岡

研究課題：HIV 侵入の動的超分子機構を標的とするケミカルバイオロジー創薬研究

課題番号：H22-エイズ-若手-008

研究代表者：鳴海 哲夫（東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 助教）

研究分担者：なし

1. 研究目的

多剤併用療法や AIDS ワクチン研究が抱える課題の解決には、HIV の侵入から出芽に至る生命現象をこれまでとは異なる角度から改めて解析し、既存の情報を再構築する必要がある。本研究の目的は HIV 側および宿主側タンパク質の機能を模倣した有機分子を創製し、それらを用いて HIV 外被タンパク質と細胞表面タンパク質の相互作用様式を両方向から解析し、その知見に基づいた合理的分子設計により新規 HIV 侵入阻害剤の創製することである。

2. 研究方法

【CD4 ミミック誘導体の構造活性相関研究】

平成 22 年度に引き続き CD4 ミミック誘導体の構造活性相関研究を進めた。これまでの結果から、芳香環部位のクロロアニリン、ピペリジン環部位の嵩高い置換基が生物活性発現に重要であることが明らかにしている。そこで、平成 22 度の研究によって見出した HAR-171 をリード化合物として、高活性化および低毒性など医薬品プロフィールを目指し、新規 CD4 ミミック誘導体を合成し、それら化合物の生物活性（抗 HIV 活性、細胞毒性、gp120 の構造変化誘起能）を評価した。

【V3 loop 領域を模倣した V3 loop ミミックの創製】

HIV 側タンパク質から宿主側への機能解析として、コレセプターとの相互作用に重要な役割を担う V3 loop 領域を模倣した V3 loop ペプチドをリード化合物として、部分ペプチドライブラリーを構築し、ウィルス視点でのコレセプターの機能解析を行い、CXCR4 結合活性を評価した。

（倫理面への配慮）

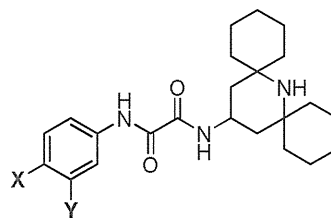
実験動物に対する動物愛護上の配慮に関しては、日本学術会議による動物実験の適切な実施に向けたガイドライン及び厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針を厳密に遵守して、実験計画を綿密に検討した上で必要最小限の実験動物を用いて効率的に実験を実施した。

3. 研究結果

【低分子CD4ミミックの構造活性相関研究】

初年度に見出した HAR-171 をリード化合物として、gp120 との相互作用に重要と示唆されている芳香環部位

について、様々なヘテロ原子や置換基を配置した化合物群を合成した。生物活性評価の結果、芳香環パラ位の塩素原子に加え、メタ位にフッ素原子を導入することで、HAR-171 ($IC_{50} = 0.43 \mu M$) の 2 倍程度の抗 HIV 活性および 1.5 倍程度の gp120 構造変化誘起能を有する HAR-431 を見出した ($IC_{50} = 0.23 \mu M$)。また、芳香環パラ位の塩素原子をメチル基に置換し、メタ位にフッ素原子を導入した誘導体 HAR-427 も同様に顕著な抗 HIV 活性を示し ($IC_{50} = 0.54 \mu M$)、gp120 構造変化誘起能を維持していた。さらに、分子モデリングによる解析も行い、CD4 ミミックは gp120 の Phe43 cavity 近傍の 6 個のアミノ酸 (Val255, Asp368, Ser375, Met426, Trp427, Val430) との相互作用が重要であることを明らかにした。



HAR-171 (X = Cl, Y = H)
HAR-427 (X = Cl, Y = F)
HAR-431 (X = Me, Y = F)

【V3 loop 領域を模倣した V3 loop ミミックの創製】

V3 loop は 1) ジスルフィド結合を含む逆平行 鎖の base 領域、2) 構造的に自由度が高い stem 領域、3) 高度に保存された tip 領域の 3 つのフラグメントに別けられ、base 領域はコレセプターの N 末端と相互作用し、tip および stem 領域はコレセプターの body と相互作用することが示唆されている。そこで、X4 指向性ウィルスの V3 loop 領域由来の部分ペプチドおよびそれらを組み合わせたシャッフルペプチド、ヘリックス領域を安定化する非天然アミノ酸を導入したペプチドミメティックを合成した。CXCR4 の天然リガンドである SDF-1 α との競合阻害実験によって CXCR4 結合活性を評価したところ、部分ペプチドやシャッフルペプチドはほとんど活性を示さなかったのに対し、base, stem, tip の全ての領域を含み、N 末端と C 末端をジスルフィド結合で環化した環状ペプチド TOZP-022 において顕著な CXCR4 結合活性が見られた。さらに、V3 loop の C 末端のヘリックス構造をより高度に再現するために 33 残基目のアラニンを非天然アミノ酸である α -アミノイソブタン酸 (Aib) に置換したペプチド

TOZP-029ではCXCR4結合活性が向上することを明らかにした。

4. 考察

平成22年度からの継続している宿主側タンパク質CD4の機能を模倣した低分子型CD4ミミックの構造活性相関研究により、リード化合物と同等の構造変化誘起能を有し、低毒性かつ顕著な抗HIV活性を有するHAR-171やHAR-427を見出し、さらなる構造最適化によりHAR-171の2倍程度強力な抗HIV活性を有するHAR-431を見出すことに成功した。HAR-427およびHAR-431ではメタ位のフッ素原子の導入が効果的に働いたものと推定される。分子モデリングによるリガンド結合部位および相互作用様式の解析から、メタ位のフッ素原子はgp120のSer375との水素結合に寄与しているものと考えられる。また、これら誘導体は顕著なgp120の構造変化誘起能を有していることから、メタ位のフッ素原子の導入は抗HIV活性だけでなく種々の生物活性に寄与することが示唆された。

gp120のV3 loop領域を模倣したV3 loopミミックの創製研究では、V3 loopのbase, stem, tipなどの部分ペプチドやそれらを組み合わせたシャッフルペプチドでは、CXCR4結合活性および抗HIV活性を示さなかったのに対し、全ての領域を含む環状ペプチドではCXCR4結合活性が見られたことから、V3 loop領域とコレセプターの相互作用はペプチドの配列だけでなく構造的な要因が大きいことが示唆された。さらに、C末端のヘリックス構造を誘起するためにAibを導入したペプチドにおいて、CXCR4結合活性が向上したことからV3 loopの構造が重要であることを示唆している。また、V3 loopの保存領域であるGPGR配列を含む部分ペプチドはCXCR4結合活性を維持していなかったことや先に述べたペプチド構造の重要性から、GPGR配列はV3 loop領域の環構造の保持に重要な役割を果たしていることを示唆している。

5. 自己評価

1) 達成度について

宿主側タンパク質CD4の機能を模倣した低分子型CD4ミミックの構造活性相関研究では、新規リガンドとしてHAR-427やHAR-431など顕著な抗HIV活性を有する新規リガンドを見出した。また相互作用様式について重要な知見を得たことから、CD4ミミックを基盤とする創薬研究において大きく進展した。また、gp120のV3 loop領域を模倣したV3 loopミミックの創製研究でもTOZP-029を見出し、V3 loopとコレセプターの相互作用様式に関し

て化学的手法による解析を行い、構造の重要性を明らかにした。以上のことから、本研究は概ね順調に進行している。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

本研究課題では、有機合成化学の特長を活かして新たな機能性分子を創製し、それらを用いてHIVの細胞侵入に関わるタンパク質の機能解析を行った。これにより、HIVの細胞侵入時のHIV外被タンパク質と細胞表面タンパク質の相互作用様式に関して従来法では達成困難な分子レベルでの知見を提供した。これら知見は新規HIV侵入阻害剤の開発へとつながる重要な情報であり、社会的意義は大きい。

3) 今後の展望について

これまでの研究で得られたHIV外被タンパク質と細胞表面タンパク質の相互作用様式に関する知見を基に、標的タンパク質の機能を制御するCD4ミミック誘導体の構造活性相関研究を進めることで、新規HIV侵入阻害剤の創製が期待できる。また、可溶性CD4と同様にgp120の構造変化を誘起するCD4ミミックは、Envelope Protein Openerとして応用でき、現在HIVワクチン研究が直面している「有効なエピトープの枯渇」という問題に対して、重要なヒントを与えるものと考えられる。このように本研究課題で得られる研究成果は、新規治療薬の開発からHIV感染予防や治療へ向けた創薬研究への展開が十分に期待され、多剤併用療法が抱える課題の克服へとつながるものである。

6. 結論

HIVの細胞侵入の第一段階であるgp120とCD4の相互作用様式の解析を目的として、gp120の構造変化を誘起するCD4ミミック誘導体のさらなる構造最適化を行い、平成22年度に報告者らが見出したHAR-171よりさらに強力な抗HIV活性を有するHAR-431を見出した。また、コレセプターCCR5/CXCR4との相互作用に重要な役割を担うV3 loop領域を模倣したV3 loopミミックの創製研究において、V3 loopとコレセプターの相互作用様式を化学的手法により解析することで、TOZP-029を見出し、配列だけでなく構造の重要性を明らかにした。これらの結果は今後のHIV侵入阻害剤の開発研究において、重要な基礎的知見を与えるものと思われる。

7. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

該当なし

研究発表

研究代表者

鳴海哲夫

- 1) Tetsuo Narumi, Hiroshi Arai, Kazuhisa Yoshimura, Shigeyoshi Harada, Wataru Nomura, Shuzo Matsushita, Hirokazu Tamamura. Small Molecular CD4 Mimics as HIV Entry Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, 19: 6735-6742, 2011.
- 2) Chie Hashimoto, Tomohiro Tanaka, Tetsuo Narumi, Wataru Nomura, Hirokazu Tamamura. The Success and Failures of HIV Drug Discovery. *Expert Opin. Drug Discovery*, 6: 1067-1090, 2011
- 3) Wataru Nomura, Nami Ohashi, Yoshiaki Okuda, Tetsuo Narumi, Teikichi Ikura, Nobutoshi Ito, Hirokazu Tamamura. Fluorescence-Quenching Screening of Protein Kinase C Ligands with an Environmentally Sensitive Fluorophore. *Bioconjugate Chem.*, 22: 923-930, 2011
- 4) Tomohiro Tanaka, Tetsuo Narumi, Taro Ozaki, Akira Sohma, Nami Ohashi, Chie Hashimoto, Kyoko Itotani, Wataru Nomura, Tsutomu Murakami, Naoki Yamamoto, Hirokazu Tamamura. Azamacrocyclic-metal Complexes as CXCR4 Antagonists. *ChemMedChem*, 6: 834-839, 2011
- 5) Nami Ohashi, Wataru Nomura, Tetsuo Narumi, Nancy E. Lewin, Kyoko Itotani, Peter M. Blumberg, Hirokazu Tamamura. Fluorescent-responsive Synthetic C1b Domains of Protein Kinase C δ as Reporters of Specific High Affinity Ligand Binding. *Bioconjugate Chem.*, 22: 82-87, 2011
- 6) Wataru Nomura, Tetsuo Narumi, Nami Ohashi, Yuki Serizawa, Nancy E. Lewin, Peter M. Blumberg, Toshiaki Furuta, Hirokazu Tamamura. Synthetic Caged DAG-lactones for Photochemically-controlled Activation of Protein Kinase C. *ChemBioChem*, 12: 535-539, 2011
- 7) Tetsuo Narumi, Jeffrey W. Bode. α,α -Dichloroisoxazolidinones for The Synthesis and Chemoselective Peptide Ligation of α -Peptide α -Ketoacids. *Heterocycles*, 82: 1515-1525, 2011

研究分担者

該当なし

口頭発表

- 1) 鳴海哲夫、新井啓之、吉村和久、原田恵嘉、野村渉、松下修三、玉村啓和。低分子型 CD4 ミミック : HIV 外被タンパク質の構造変化を促す HIV 侵入阻害剤。日本エイズ学会、2011 年、東京
- 2) 新井啓之、鳴海哲夫、吉村和久、原田恵嘉、野村渉、松下修三、玉村啓和。HIV 外被タンパク質 gp120 の構造変化誘起を指向した低分子 CD4 ミミックの構造活性相関研究。日本エイズ学会、2011 年、東京
- 3) 橋本知恵、鳴海哲夫、野村 渉、村上 努、山本直樹、玉村啓和。HIV-1 第二受容体 CXCR4 の細胞外ドメインを基にしたエイズワクチンの開発研究。日本エイズ学会、2011 年、東京

研究課題：難治性HIV感染症に対する治療法開発の基礎的研究

課題番号：H21-エイズ-一般-010

研究代表者：滝口 雅文（熊本大学 エイズ学研究センター センター長・教授）

研究分担者：瀧永 博之（国立国際医療研究センター エイズ治療・研究開発センター 治療開発室医長）、馬場 昌範（鹿児島大学 大学院歯学総合研究科 教授）、松岡 雅雄（京都大学 ウイルス研究所 教授）、松下 修三（熊本大学 エイズ学研究センター 教授）、天野 将之（熊本大学 エイズ学研究センター COEリサーチ・アソシエイト）、前仲 勝実（北海道大学 大学院薬学研究院 教授）

1. 研究目的

HAARTにより、多くのHIV患者の予後は改善されてきたが、耐性ウイルスの出現など多くの問題が生じており、HAART療法に抵抗する難治性HIV感染症患者の治療が大きな課題になってきている。これらの研究の課題を解決するため、以下のような研究を行う。

柱1：耐性ウイルス出現の機序の解明と耐性ウイルスを克服する新規薬剤の開発

新たに臨床応用された薬剤に対する耐性出現の機序を解明し、さらに耐性ウイルスに対応できるような新規薬剤の開発が必須である。プロテアーゼ二量体阻害剤 darunavir (DRV)は耐性が出にくい、このDRVや新たな融合阻害剤などに対する耐性獲得の機序を解明する（天野・松岡）。さらにこれらの耐性ウイルスを克服する新たなプロテアーゼ二量体阻害剤やHIV-1転写阻害活性を有する薬剤の開発を目指す（天野・馬場）。

柱2：免疫療法の開発を目指した基礎研究

HAART療法に抵抗する難治性HIV患者の治療法として、免疫を基盤とした治療法がある。本研究では、日本人のコホートでのHIV-1感染者のウイルス抑制に関与するHLA抗原を明らかにし（瀧永・滝口）、これらの情報をもとに強いHIV-1の増殖抑制をする細胞性免疫や、細胞性免疫から逃避するHIV-1を新たに認識する細胞傷害性T細胞(CTL)を同定し、CTLを用いた治療法の開発の基礎研究を行う（滝口）。さらに中和抗体を用いた治療法の開発のための基礎研究を行う（松下）。また、最近HIV-1の増殖抑制への関与が議論されているNK細胞のHIV-1のペプチド認識の機序を解明する（前仲）。

2. 研究方法

柱1：耐性ウイルス出現の機序の解明と耐性ウイルスを克服する新規薬剤の開発

1) 薬剤耐性ウイルス出現の機序の解明

1. プロテアーゼ阻害剤耐性機構の解明：プロテアーゼ(PR)重合化に重要とされるアミノ酸、プロテアーゼ阻害剤(PDIs)耐性関連変異アミノ酸の詳細な解析を進め、PR阻害への新たな機序の結合様式を明らかにする。

2. 融合阻害剤耐性機構の解明：融合活性を有するペプチド(SC34EK)に対する耐性HIV-1のCT領域内の変異は、site-directed mutagenesis法により感染性分子クローンpNL4-3に導入し、293FT細胞への遺伝子導入により組換えウイルスを作製した。抗HIV-1活性はMAGI法により測定した。

2) 新規薬剤の開発

耐性ウイルスを克服する新たなプロテアーゼ二量体阻害剤やHIV遺伝子発現機構を抑制する薬剤の開発を目指す。

1. 新規プロテアーゼ二量体阻害剤の開発：100種に及ぶ新規・未報告のプロテアーゼ阻害剤(PI)をデザイン・合成・同定しており、そのようなPIを用いて結晶解析を基礎にした構造学的解析を通して新たなPIを合成する。
2. HIV-1転写阻害活性を有する薬剤の開発：p-TEFb/Tat/TAR RNAが結合する部分に作用する薬剤をin silicoによる薬剤ライブラリーの中から選択、HIV慢性感染細胞を用いて抗ウイルス効果を検証するとともに、宿主細胞遺伝子の発現に対する影響を解析した。

柱2：免疫療法の開発を目指した基礎研究

502人の日本人の慢性HIV-1感染症コホートで、HLAとHIV-1ウイルス量(VL)あるいはCD4数との相関を明らかにする。またHLA-Cw*12:02拘束性のCTLエピトープを同定し、その逃避変異エピトープを明らかにする。更にHLA-A*24:02拘束性のGag28エピトープの逃避変異を認識できるCTLを同定し、その性格を明らかにする。中和抵抗性を克服するために、scFvなどの遺伝子組み換え抗体断片を作製する。NK細胞のレセプターであるKIRが認識するHLA-Cw*12:02抗原に結合するHIV-1由来のペプチドを明らかにし、NKレセプターとの結合を調べる。（倫理面への配慮）

患者の血液を用いて行なう研究に関しては、各施設の倫理委員会の承認を受け、その規定する指針に従っておこなった。

3. 研究結果

柱1：耐性ウイルス出現の機序の解明と耐性ウイルスを克服する新規薬剤の開発

1) 耐性ウイルス出現の機序の解明

複数の耐性臨床分離株による耐性誘導により、PI耐性変異株重感染と遺伝子相同組み換えでHIV-1がDRVに高度耐性を獲得し得る事を明らかにした。一方、次世代HIV-1膜融合阻害剤であるSC34EKは、CT領域内にP203S/L204I/S241F/H258Q/A312Tのアミノ酸変異を誘導した。これら5つのアミノ酸変異は、T-20に約3倍の耐性を付与した。また、heptad repeatに導入されるアミノ酸変異を組み込むことで、耐性は約8倍にまで増加し、またCT領域内の変異はHIV-1の感染性低下を引き起こした。

2) 新規薬剤の開発

1. *oxatricyclic*-THFという全く新しい構造を有し、複数の高度多剤耐性株に対し広いスペクトラムでの極めて高い抗ウイルス活性を維持し、またDRVよりも低濃度でプロテアーゼ二量体化阻害 (PI) 活性を發揮する新規化合物、GRL-0519A等を開発した。更に*macrocyclic*構造を有するGRL-0216A等、*Tp*-THF構造を持つGRL-1398A等を開発した。
2. HIV-1転写阻害活性を有する薬剤の開発のために、3,000,000種類の化合物に対し*in silico*スクリーニングを行い、その結果スコアの良い124種類の化合物について、*in vitro*での抗HIV-1活性を評価したところ、3種類の新規薬剤(Compound 1, 2, 3)を同定した。その中で最も活性の高かったCompound 3は、急性及び潜伏HIV-1感染系でのウイルス産生を阻害し、HIV-1 Tatによる転写活性化を抑制した。さらに、Compound 3はHIV-1転写活性化時に増加するRNAポリメラーゼIIのリン酸化(P-RNAP II)量を減少させることも分かった。

柱2：免疫療法の開発を目指した基礎研究

1. HLA-Cw*12:02拘束性の2つの新たなエピトープを同定し、このうち1つのエピトープ上の逃避エピトープの出現を確認した。更にHLA-A*24:02拘束性のGag28特異的エピトープ上の逃避変異エピトープを認識するCTLを明らかにし、逃避変異エピトープの選択と認識の機序を明らかにした。
2. 未治療・AIDS未発症の日本人慢性HIV-1感染者504人の初診時ウイルス量とCD4数を解析し、ウイルス量とCD4数に相加効果があるHLAクラスIのアレルを見いだした。
3. 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。
4. HLA-Cw*12:02に結合する複数のHIVペプチドを同定した。これらのペプチドを用いて、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。更にHLA-Cw*12:02に対するNK細胞受容体KIRとの結合を解析した。

4. 考察

耐性ウイルス出現の機序の解明の研究では、耐性変異が出にくいDRVに対して*in vitro*では耐性変異が誘導できることが明らかになった。一方、SC34EKに対して誘導されるCT領域内の変異は、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、HIV-1融合阻害剤の感受性を減弱させていると考えられた。新規薬剤の開発では、GRL-0519A等の強力な新規PI候補を明らかにでき、今後DRVに対する耐性変異ウイルスが出現した場合に対する候補薬剤に目途が立った。

免疫療法を目指した研究では、CTLからの逃避変異を明らかにし、更にこれらの逃避変異を認識する新たなCTLを明らかにし、その認識機序を解明した。しかし、逃避変異ウイルスを強く抑制できるCTLを同定することはできなかった。中和抗体の研究では、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が明らかにされ、NK細胞の研究では、

HLA-Cw*12:02に結合するKIRを解析するシステムが出来上がり、今後結合するペプチドの解析が進むと思われる。

5. 自己評価

1) 達成度について

本研究班は本年度が3年目の最終年度であるが、耐性変異出現の機序の解析では、DRVや次世代HIV-1膜融合阻害剤に対する耐性変異とその出現の機序をほぼ完全に解明できた。一方、新規薬剤の開発では新たな強力なPI候補を、またHIV-1転写阻害活性を有する薬剤の開発では3つの候補薬剤を同定でき、この3年間で大きく進展した。

免疫療法の開発を目指した基盤研究では、この3年間で世界的レベルでのCTLからの逃避変異の蓄積を明らかにし、これらの逃避変異を認識するCTLの解析が進み、大きく進展した。また日本人のコホートで、初めて病態の進行に影響を及ぼすHLAを明らかにでき、ほぼ本研究班の目的を達成できた。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

DRVにより選択される耐性変異に対し効果が見られる新たなPIの候補が明らかになったことは、現在臨床で使われ耐性出現が少ないと高く評価されているDRVの次の世代の薬剤治療に大きな貢献をすると考えられる。また、CTLの逃避変異の解析は、免疫治療やワクチン開発に重要な情報を提供した。

3) 今後の展望について

この3年間の本研究班の研究成果をもとに、新たな治療法とワクチン開発に貢献する研究へと繋がられると考えられる。

6. 結論

1) DRVとSC34EKに対する耐性変異の出現機序を明らかにできた。

2) DRV耐性変異ウイルスに効果がある新たなPI候補薬剤候補と3種類のHIV-1転写阻害活性を有する新規薬剤候補を同定した。

3) CTLから逃避変異の世界的蓄積を明らかにし、逃避変異を認識するCTLの同定とその認識機序を明らかにした。

4) 日本人HIV-1感染者で、病態進行に関与するHLAを明らかにした。

5) 中和能をもったコレセプター結合部位に対する交差反応性抗体を明らかにし、さらに抗体の小型化による反応性の改善を行った。

6) NK細胞レセプター(KIR)の認識するHLA-C抗原に結合するペプチドを明らかにし、そのKIRとの結合を調べるシステムを開発した。

7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む) (特許出願)

- ・ピリミドベンゾチアジン6-イミン誘導体またはその塩を含有するウイルス感染症の治療および/または予防のための薬剤、出願番号：特願2011-105642 (松岡)
- ・新規ケモカイン受容体拮抗剤、出願番号：特願2011-044035 (松岡)
- ・抗HIV薬とその用途、特願2011-07084 (馬場)

研究発表（本研究班の研究に関連した2011年に発表したかIn pressの論文）

研究代表者

滝口 雅文

- 1) Akahoshi T, Chikata T, Tamura Y, Gatanaga H, Oka S, Takiguchi M. Selection and accumulation of an HIV-1 escape mutant by three types of HIV-1-specific CTLs recognizing wild-type and/or escape mutant epitopes. *J Virol*. In press.
- 2) Iglesias MC, Almeida JR, Fastenackels S, van Bockel DJ, Hashimoto M, Venturi V, Gostick E, Urrutia A, Wooldridge L, Clement M, Gras S, Wilmann PG, Autran B, Moris A, Rossjohn J, Davenport MP, Takiguchi M, Brander C, Douek DC, Kelleher AD, Price DA, Appay V. Escape from highly effective public CD8+ T cell clonotypes by HIV. *Blood* 118: 2138-2149, 2011.
- 3) Mwimanzi P, Hasan Z, Hassan R, Suzu S, Takiguchi M, Ueno T. Effects of naturally-arising HIV Nef mutations on cytotoxic T lymphocyte recognition and Nef's functionality in primary macrophages. *Retrovirology* 8:50, 2011
- 4) Zhang Y, Peng Y, Yan H, Xu K, Saito M, Wu H, Chen X, Ranasinghe S, Kuse N, Powell T, Zhao Y, Li W, Zhang X, Feng X, Li N, Leligdowicz A, Xu X, John M, Takiguchi M, McMichael A, Rowland-Jones S, Dong T. Multilayered defense in HLA-B51-associated HIV viral control. *J Immunol*. 187:684-91, 2011
- 5) Naruto T, Murakoshi H, Chikata T, Koyanagi M, Kawashima Y, Gatanaga H, Oka S, Takiguchi M. Selection of HLA-B57-associated Gag A146P mutant by HLA-B*48:01-restricted Gag140-147-specific CTLs in chronically HIV-1-infected Japanese. *Microbes Infect*. 13: 766-770, 2011
- 6) Honda K, Zheng N, Murakoshi H, Hashimoto M, Sakai K, Borghan MA, Chikata T, Koyanagi M, Tamura Y, Gatanaga H, Oka S, Takiguchi M. Selection of escape mutant by HLA-C-restricted HIV-1 Pol-specific cytotoxic T lymphocytes carrying strong ability to suppress HIV-1 replication. *Eur J Immunol*. 41: 97-106, 2011

研究分担者

瀧永 博之

- 1) Akahoshi T, Chikata T, Tamura Y, Gatanaga H, Oka S, Takiguchi M. Selection and accumulation of an HIV-1 escape mutant by three types of HIV-1-specific CTLs recognizing wild-type and/or escape mutant epitopes. *J Virol*. In press.
- 2) Watanabe T, Murakoshi H, Gatanaga H, Koyanagi M, Oka S, Takiguchi M. Effective recognition of HIV-1-infected cells by HIV-1 integrase-specific HLA-B*4002-restricted T cells. *Microbes Infect*. 13: 160-166, 2011
- 3) Honda K, Zheng N, Murakoshi H, Hashimoto M, Sakai K, Borghan MA, Chikata T, Koyanagi M, Tamura Y, Gatanaga H, Oka S, Takiguchi M. Selection of escape mutant by HLA-C-restricted HIV-1 Pol-specific cytotoxic T lymphocytes carrying strong ability to suppress HIV-1 replication. *Eur J Immunol*. 41: 97-106, 2011

馬場 昌範

- 1) Chande AG, Baba M, Mukhopadhyaya R. A single step assay for rapid evaluation of inhibitors targeting HIV-1 Tat mediated LTR transactivation. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* in press.
- 2) Sono 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.
- 3) 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 tetramethylnaphthalene derivative. *Anticancer Res*. 31: 2241-2248, 2011.

松岡 雅雄

- 1) 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.
- 2) 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.

天野 将之

- 1) Ghosh AK, Chapsal BD, Parham GL, Steffey M, Agniswamy J, Wang Y-F, Amano M, Weber IT, Mitsuya H. Design of HIV-1 Protease Inhibitors with C3-Substituted Hexahydrocyclopentafuranyl Urethane as P2-Ligands: Synthesis, Biological Evaluations, and Protein-Ligand X-ray Crystal Structure. *Journal of Medicinal Chemistry*. 54(16): 5890-5901, 2011.
- 2) Koh Y, Aoki M, Danish ML, Aoki-Ogata H, Amano M, Das D, Shafer RW, Ghosh AK, Mitsuya H. Loss of Protease Dimerization Inhibition Activity of Duronavir Is Associated with the Acquisition of Resistance to Darunavir by HIV-1. *J Virol*. 85(19): 10079-10089, 2011.
- 3) Ghosh AK, Martyr CD, Steffey M, Wang Y-F, Agniswamy J, Amano M, Weber IT, Mitsuya H. 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.
- 4) Ide K, Aoki M, Amano M, Koh Y, Yedidi RS, Das D, Leschenko S, Chapsal B, Ghosh AK, Mitsuya H. 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.
- 5) Ghosh AK, Chapsal BD, Baldrige A, Steffey MP, Walters DE, Koh Y, Amano M, Mitsuya H. 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.

前仲 勝実

- 1) Matsushita H, Endo S, Kobayashi E, Sakamoto Y, Kobayashi K, Kitaguchi K, Kuroki K, Söderhäll A, Maenaka K, Nakamura A, Strittmatter SM, Takai T. Differential but competitive binding of Nogo protein and class I major histocompatibility complex (MHCI) to the PIR-B ectodomain provides an inhibition of cells. *J. Biol. Chem*. 286, 25739-47, 2011.

松下 修三

- 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.

1 年目研究班



研究課題：安全かつ効果的な抗 HIV 療法開発のための研究

課題番号：H23-エイズ一般-001

研究代表者：瀧永 博之（国立国際医療研究センターエイズ治療・研究開発センター 治療開発室医長）

研究分担者：太田 康男（帝京大学医学部内科学講座 教授）、杉浦 互（国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター 部長）、吉村 和久（熊本大学エイズ学研究センター 准教授）、川村 龍吉（山梨大学医学部皮膚科 講師）、児玉 栄一（東北大学医学部内科 助教）、横幕 能行（国立病院機構名古屋医療センターエイズ治療開発センター 医長）、本田 元人（国立国際医療研究センターエイズ治療・研究開発センター 医師）、塚田 訓久（国立国際医療研究センターエイズ治療・研究開発センター 医療情報室医長）

1. 研究目的

抗 HIV 療法は様々な新規薬剤の登場により複雑化している。感染者一人一人の HIV の薬剤感受性状況に基づいて抗 HIV 効果を予測し、生じ得る副作用・併用薬との相互作用などを考慮しながら、最適と思われる組み合わせを選び出すこととなる。複数存在する治療ガイドラインは、主に欧米で行われた臨床試験の結果に基づいており、小柄な日本人にそのまま当てはめられるものではない。本研究の目的は、日本人における副作用症例・薬剤耐性症例などの臨床症例を解析し、その原因となる機序の解明・新たな治療法を開発し、安全で効果的な日本人のための抗 HIV 療法を開発し実践可能にすることである。この目的を達成するため、「柱1：副作用回避のための研究」、「柱2：薬剤耐性克服のための研究」を行う。これらの抗 HIV 薬の研究とともに、日本における新規感染者の一時的な増加に歯止めをかけるため、また、現在臨床的に問題となっている HIV 感染者の B 型肝炎ウイルス(HBV)の重複感染を防ぐため、「柱3：抗 HIV 薬の感染予防効果の解析」を行う。

2. 研究方法

「柱1：副作用回避のための研究」日本人感染者における副作用の解析・毒性回避法の探索のために、テノホビルの腎毒性の解析（瀧永）、プロテアーゼ阻害薬の糖・脂質代謝・骨代謝への毒性メカニズムの解明（太田）、プロテアーゼ阻害薬およびアバカビルの心血管系への影響の評価（本田）、副作用回避のために新規薬剤に治療変更した症例の解析（塚田）に課題を分割して遂行する。

「柱2：薬剤耐性克服のための研究」感染個体内の進化に伴う薬剤感受性変化の解析（瀧永）、インテグラーゼ阻害薬などの新規薬剤に対する薬剤耐性の解析（杉浦）、マラビロクなどの侵入阻害薬に対する薬剤耐性の解析（吉村）、多剤耐性症例に対する実際の治療戦略の開発（横幕）、耐性 HIV を克服する新薬の開発（児玉）に課題を分割して遂行する。

「柱3：抗 HIV 薬の感染予防効果の解析」日本における新規 HIV 感染者の増加に歯止めをかけることを目指し

て、抗 HIV 薬による非感染者の HIV 感染予防効果の解析を行う（川村）。また、現在臨床的に問題となっている HIV 感染者の HBV 重複感染を防ぐため、抗 HIV 薬による HBV 感染予防効果を解析する（瀧永）。

（倫理面への配慮）

国立国際医療研究センター、国立病院機構名古屋医療センター、帝京大学医学部付属病院の患者の臨床経過や HIV を解析することとなる。いずれも、それぞれの施設で倫理委員会の承認を得た。患者の理解と協力を得るため、研究の必要性と意義について十分に説明し、それぞれの施設の倫理規定に従い同意書に自筆のサインを得た。サインされた同意文書はカルテに綴じ込み保存している。また、研究への参加の同意・不同意に関わらず、診療上の不利益は被らないように配慮する。個人情報保護のため、個人を特定できるような情報は外部には出さないこととする。HIV 感染実験のための健常者からの表皮水疱蓋の採取については、山梨大学の倫理委員会で承認を得た。表皮を提供する健常者の理解と協力を得るため、研究の必要性と意義について十分に説明し、山梨大学の倫理規定に従い同意書に自筆のサインを得た。

3. 研究結果

「柱1：副作用回避のための研究」テノホビルの腎毒性の解析については、低体重がリスク因子として重要であることを明らかにし、また、アバカビル投与群と比較し、有意に eGFR が低下することを報告した（発表業績：瀧永 1, 2）。プロテアーゼ阻害薬による糖代謝異常の分子機序については、インスリン受容体直下の IRS-1 が主たる標的であることを示した（現在論文投稿中）。心血管系評価については、201 人の HIV 感染者に頸動脈エコーを行い、80 人に血管壁肥厚等の所見を認めた。H24-25 年度は、経時的変化の追跡とリスク因子の解析を行う。

「柱2：薬剤耐性克服のための研究」in vitro の継代培養によるマラビロク耐性選択実験により、HIV のサブタイプによらず、CCR5 低発現細胞への馴化の後、高度耐性変異の獲得が起こることを示した（発表業績：吉村 1）。

強力な抗 HIV 作用を持つ融合阻害薬の新規デザインについて示した（発表業績：児玉 3）。HIV-1 の多剤耐性臨床症例・HIV-2 の治療失敗症例については、それぞれの耐性 HIV の molecular clone を作成した。いずれも H24・25 年度は、薬剤感受性試験を行う。

「柱 3：抗 HIV 薬の感染予防効果の解析」HIV に対する感染予防効果については、健常ボランティアより得た表皮水疱蓋を *in vitro* でマラビロクに暴露した後、更に HIV に暴露する系において、マラビロクは濃度依存的に HIV 感染阻害効果を示した。HBV に対する感染予防効果については、HBe 抗体を含む HBV 血清学的マーカーがすべて陰性の HIV 感染男性同性愛患者 357 人について、その後の HBV マーカーを調べたところ、44 人で陽転化していることを見いだした。H24・25 年度は、抗 HIV 薬による治療との相関を解析する。

4. 考察

頸動脈エコー検査により、予想外に多くの患者 (39.8%) で血管壁肥厚などの異常所見を認めており、より積極的な介入が必要かもしれない、今後の更なる解析が急務である。また、観察期間中に驚くほど多くの患者 (12.3%) が HBV の重複感染を起こしており、不顕性感染が多いことが示唆される。これについても更なる解析が必要である。

5. 自己評価

1) 達成度について

いずれの柱も H23 年度の目標を達成しており、論文発表も順調に行われている。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

欧米人と日本人で、抗 HIV 薬の副作用出現頻度が大きく異なることが徐々に明らかになりつつある。欧米で提唱されている治療ガイドラインをそのまま日本人に応用することは困難であり、エビデンスに基づいた日本人のための治療ガイドラインの作成が急務である。本研究の目的とするところは、日本人に起こり得る副作用の頻度、その回避法、薬剤耐性症例の治療法開発など、日本人のための治療ガイドラインを作成する際の基になるデータ・エビデンスを提供することである。日本人のための安全で効果的な抗 HIV 療法が開発され実践可能となれば、日本における HIV の治療成績が向上し、感染者の服薬アドヒアランスが向上することが期待される。それに伴って、多くの感染者で血中 HIV 量を検出限界以下にコントロールすることが可能となり、その感染者から新たに感染する確率を著しく低くし、結果として日本における HIV 感染者の著しい

増加傾向に歯止めをかけることが期待される。また本研究では、抗 HIV 薬の有効性に関する研究の一つとして、その HIV と HBV の感染予防効果の解析も行う。これらにより、抗 HIV 薬の内服による HIV 感染予防が可能になれば、更に直接的に新たな感染を防止できる。HBV に関しては、HBV 感染予防効果のある治療法を積極的に投与することにより、現在問題となっている HIV・HBV の重複感染症例数を減少させることが期待できる。

3) 今後の展望について

「柱 1：副作用回避のための研究」H24 年度は、腎機能の変化・糖脂質代謝の変化・骨代謝の状態・心血管への影響を解析し、リスク因子と経時的変化への影響を解析する。H25 年度は、明らかとなったリスク因子保持者へは、当該薬剤の投与を控えるなどし、個々の症例に対する治療薬の選択に応用し、副作用出現頻度の減少が実際に得られるかを調査する。研究中に得られた副作用のリスク因子などの情報は研究班内で共有し、連携を密にしてメカニズムの解析・副作用回避法の開発などに役立てる。

「柱 2：薬剤耐性克服のための研究」H24 年度は、HIV-1 の多剤耐性臨床症例・HIV-2 の治療失敗症例について、molecular clone を作成しウイルス学的に解析を進める。得られた耐性 HIV の薬剤耐性の原因となる変異や複製を補足する変異などを推測し、組み換え HIV を作成・解析することにより明らかにする。H25 年度は、得られた知見を薬剤耐性症例の診断・治療に応用し、成果を報告する。研究中に得られた耐性 HIV は研究班内で共有し、協力して解析・データの共有を行う。

「柱 3：抗 HIV 薬の感染予防効果の解析」HIV に対する感染予防効果については、H24 年度は、内服による感染予防効果を解析するため、マラビロクを内服した健常者から表皮水疱蓋を作成し、*ex vivo* 感染実験を行う。H25 年度は、得られた知見を学会・論文発表などにより報告する。HBV に対する感染予防効果については、H24・25 年度には HBV 感染歴と抗 HIV 薬による治療との相関性を解析する。

6. 結論

臨床現場に即座にフィードバックできる研究目標を掲げ、初年度は順当な成果を挙げている。次年度以降の計画も具体的で実現性があり、「日本人のための治療ガイドライン」作成時に大きく資することが期待される。

7. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）なし。

研究発表

研究代表者

潟永 博之

- 1) Nishijima T, Gatanaga H, Komatsu H, Tsukada K, Shimbo T, Aoki T, Watanabe K, Kinai E, Honda H, Tanuma J, Yazaki H, Honda M, Teruya K, Kikuchi Y, Oka S. Renal function declines more in tenofovir- than abacavir-based antiretroviral therapy in low-body-weight treatment-naïve patients with HIV infection. *PLoS One* (in press).
- 2) Nishijima T, Komatsu H, Gatanaga H, Aoki T, Watanabe K, Kinai E, Honda H, Tanuma J, Yazaki H, Tsukada K, Honda M, Teruya K, Kikuchi Y, Oka S. Impact of small body weight on tenofovir-associated renal dysfunction in HIV-infected patients: a retrospective cohort study of Japanese patients. *PLoS One* 6:e22661, 2011.

研究分担者

杉浦 互

- 1) Hirano A, Ikemura K, Takahashi M, Shibata M, Amioka K, Nomura T, Yokomaku Y, Sugiura W. Lack of Correlation Between UGT1A1*6, *28 Genotypes, and Plasma Raltegravir Concentrations in Japanese HIV Type 1-Infected Patients. *AIDS Research & Human Retroviruses* (in press)
- 2) Shibata J, Sugiura W, Ode H, Iwatani Y, Sato H, Tsang H, Matsuda M, Hasegawa N, Ren F, Tanaka H. Within-host co-evolution of Gag P453L and protease D30N/N88D demonstrates virological advantage in a highly protease inhibitor-exposed HIV-1 case. *Antiviral Research* 90:33-41, 2011.

吉村 和久

- 1) Maeda, Y., Yoshimura, K., Kodama, E., Miyamoto, F., Harada, S., Yuan, Y., Harada, S., Yusa, K. Acquisition of resistance to HIV-1 entry inhibitors in vitro and in vivo. *Journal of AIDS & Clinical Research* (in press)

川村 龍吉

- 1) Kawamura T, Ogawa Y, Nakamura Y, Nakamizo S, Ohta Y, Nakano H, Kabashima K, Katayama I, Koizumi S, Kodama T, Nakao A, Shimada S. Severe dermatitis with loss of epidermal Langerhans cells in human and mouse zinc deficiency. *Journal of Clinical Investigation* (in press)

児玉 栄一

- 1) Hachiya A, Kodama EN, Schuckmann MM, Kirby KA, Michailidis E, Sakagami Y, Oka S, Singh K, Sarafianos SG. K70Q adds high-level tenofovir resistance to “Q151M complex” HIV reverse transcriptase through the enhanced discrimination mechanism. *PLoS One* 6:e16242, 2011.
- 2) Kirby KA, Singh K, Michailidis E, Marchand B, Kodama EN, Ashida N, Mitsuya H, Parniak MA, Sarafianos SG. The sugar ring conformation of 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine and its recognition by the polymerase active site of HIV reverse transcriptase. *Cellular and Molecular Biology* 57:39-44, 2011.
- 3) 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 effect on T-20. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 22:51-55, 2011.

横幕 能行

- 1) Fujisaki S, Yokomaku Y, Shiino T, Koibuchi T, Hattori J, Ibe S, Iwatani Y, Iwamoto A, Shirasaka T, Hamaguchi M, Sugiura W. Outbreak of infections by hepatitis B virus genotype A and transmission of genetic drug resistance in patients coinfecting with HIV-1 in Japan. *Journal of Clinical Microbiology* 49:1017-1024, 2011.