

201210006A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

HIV-1 エンベロープ蛋白 (Env) の立体構造変化
誘導剤 (NBD誘導体) の臨床応用に向けた基礎研究

平成24年度総括・分担研究報告書

研究代表者 松下修三

平成25年 3月

目 次

I. 総括研究報告	
HIV-1 エンベロープ蛋白 (Env) の立体構造変化誘導剤 (NBD 誘導体) の臨床応用に向けた基礎研究 -----	1
松下修三 (熊本大学エイズ学研究センター 教授)	
II. 分担研究報告	
1. NBD 誘導体と中和抗体併用の最適化の研究、中和抗体の作成-----	12
松下修三 (熊本大学エイズ学研究センター 教授)	
2. NBD559 及び NBD 誘導体の作成、NBD 誘導体の最適化の研究 -----	18
玉村啓和 (東京医科歯科大学 教授)	
3. NBD 誘導体の効果の動物モデルを用いた研究-----	26
五十嵐樹彦 (京都大学ウイルス研究所 教授)	
4. NBD 誘導体の活性測定、NBD 誘導体の最適化の研究-----	32
吉村和久 (国立感染症研究所エイズセンター第一室 室長)	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	35
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	40

HIV-1 エンベロープ蛋白(Env)の立体構造変化誘導剤(NBD 誘導体)の臨床応用に向けた基礎研究

研究代表者 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 感染細胞や潜伏感染を標的にする新規治療薬の開発が求められている。我々は、HIV-1 エンベロープ蛋白(Env)のCD4 結合部位に作用して Env 三量体構造を変化させ、中和抗体活性を増強する低分子化合物 NBD-556 およびその低毒性誘導体である YYA-021 を同定し、新たな抗ウイルス治療法の確立のための前臨床研究を継続している。我々の中和抗体パネルを用いて、サブタイプ B 標準パネルウイルス(SVPB)について YYA-021 の効果を調べたところ、中和増強効果(2X 以上)は、抗 V3 抗体(5 種類)で、12 株中 4 から 9 種類、CD4i 抗体(3 種類)では、2 から 5 種類に増強がみられた(松下)。また、6 種類の初感染ウイルス(transmitted/founder virus: T/F virus)を用いた検討では、2/6 中和する V3 抗体(1D9)が、YYA-021 の存在下に 4/6 を中和した。また、V3 抗体 16G6 は T/F virus のどれも中和しなかったが、YYA-021 存在下に 3/6 を中和した(松下)。YYA-021 より低濃度で有効で、毒性も少ない化合物の選択のため、本年度は、NBD 誘導体の芳香環部位とオキサミド部位をインドール骨格に置換し、平面構造を付与しつつ、全体としてのエントロピーの減少を目指した NBD 誘導体を中心に約 40 種類の化合物を合成し、ウイルス学的活性の解析を行った。インドール骨格含有化合物群の中で弱いながらも抗 HIV 活性を示す化合物は、5 位に塩素、臭素、またはフッ素原子を有するものであり、昨年度までの構造活性相関と一致した(玉村、吉村)。新たに作成したクローンウイルスを用いて *in vitro* 耐性誘導を試みた結果、NBD 化合物耐性は、(i)V255M 変異、(ii)T375I 変異、または (iii)M426I の 3 通りの変異獲得によることが明らかになった(吉村)。サルを用いた血中濃度測定および薬物動態解析を行った結果、YYA-021 の半減期は、98.4 min であった(玉村、五十嵐)。これまでの *in vitro* および *in vivo* の研究データをもとにプロトコルを作成し、霊長類モデルを用いた POC 試験を抗 V3 中和単クローン抗体 KD-247 と YYA-021 の組み合わせを用いて行った。SHIV KS661 攻撃接種後、KD-247+YYA-021 投与群では 6 頭中 5 頭で血中ウイルス RNA 量をおよそ 2Log のレベルで有意に抑制し、それに伴って末梢血 CD4T 細胞の減少を阻止し、さらに、投与を終了した攻撃接種 15 日後以降もウイルス RNA 量の抑制および CD4T 細胞数が維持されたことは特筆すべき成果といえる。少量で有効性が高く、毒性の少ない NBD 誘導体の検索を続けるとともに、より効率の良い抗体との組み合わせの研究の継続が必要である。本戦略は「治癒に向けた治療法」の開発の一つに位置付けることが可能と考えられる。多くの残された課題があるが、確実に一歩進んだと考えられる。

分担研究者

玉村啓和 東京医科歯科大学
創薬化学・生体材料工学研究所 教授
五十嵐樹彦 京都大学ウイルス研究所 教授
吉村和久 国立感染症研究所エイズ研究センター
第一室 室長

なく、HIV-1 感染細胞や潜伏感染を標的とする新規治療薬の開発が必要である。

我々は、中和抗体の臨床応用に向けた研究の過程で HIV-1 エンベロープ蛋白(Env)の CD4 結合部位に作用して Env 三量体構造を変化させ、中和抗体の反応性及び中和活性を飛躍的に増強する低分子化合物、N-(4-Chlorophenyl)-N-(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-yl)-oxalamide (NBD-556)を同定した(創薬基盤推進、岩本班)。In vivo では、中和抗体の多くは、Env に反応エピトープが保存されているにもかかわらず、中和能が見られない。これは、Env が三量体を形成しその立体構造によりエピトープを遮蔽しているためと考えられている(Kwong P. D., et al., Nature, 420:678-682, 2002)。この立体遮蔽を解除し中和抗体が中和エピトープに到達可能となれば、既に体内に存在する抗体でウイルスを中和できるようになる。NBD-556 は Env と CD4 分子の相互作用を阻害するため、侵入阻害剤候補として開発されたが (Zhao Q,

A. 研究目的

優れた臨床効果を持つ抗ウイルス療法の開発により、HIV-1 感染症の長期間にわたる発症阻止が可能となった。しかし、残存する感染細胞の排除は困難なため、治療薬の慢性毒性が問題となっている。さらに残存するウイルスやウイルス蛋白による慢性炎症が引き起こす「老化」の促進のため、心血管病やこれまで AIDS と関係ないと考えられてきた癌や肝臓病などによる「早期死亡」が目立つようになった。これらの合併症(comorbidity)の出現を阻止するためには、HIV の生活環の阻害ばかりで

et al., *Virology*, 339:213-25, 2005)、有効濃度と細胞毒性の差が小さいため臨床開発は行われてこなかった。本研究班は、多くの誘導体を探索し、より有効な NBD 誘導体を作出することと、このような新しい治療戦略が *in vivo* でも有効かどうか、動物モデルで検証することを目的とする。

B. 研究方法

1) NBD-556 および YYA-021 の臨床分離株に対する交差反応性と交差中和活性の検討

NBD-556 および phenyl ring の p-position に methyl group を持つ誘導体 YYA-021 (NBD-559) は、東京医科歯科大学、玉村教授により合成され供給された。YYA-021 の機能的 Env 三量体に対する結合活性の測定は、HIV-1 感染細胞またはエンベロープ導入細胞を用いて FACS 解析により行った。本年度は特に、サブタイプ A、B、C、AE、からそれぞれ代表する 1、4、3、2 株について、GFP 発現ベクターに組み込んだエンベロープに対する抗体の反応性を CD4i 抗体または交差反応性の V3 抗体について検討した。抗体サンプルは、我々が開発した抗体パネル及び米国で臨床試験中の抗 V3 中和抗体 KD-247 を使い、YYA-021 との相乗効果の検討をおこなった。ウイルス株としては、NIAID の AIDS research reference reagent program (ARRRP) が供給するサブタイプ B 及び C の臨床ウイルス由来のエンベロープパネル (Standard virus panel of subtype B; SVPB, Standard virus panel of subtype C; SVPC)、サブタイプ A および AE の envelope construct を用いて pseudovirus panel を作成した。さらに、ARRRP より感染初期のウイルス (transmitted/founder virus: T/F virus) パネルの供与を受け、これらに対する中和抗体活性並びに YYA-021 の中和増強活性を検討した(松下)。

2) 分子モデリングをもとにした新規骨格の構築

NBD 誘導体は、CD4 分子の 43F と 59R 残基に類似した構造を有し、CD4 と gp120 との相互作用を阻害する。本化合物は、構造上、フェニル部位、オキサミド部位、ピペリジン部位の 3 つの部位に分類可能である(図 1)。NBD 誘導体と gp120 の結合モデルの結果を精査すると、芳香環部位の環の平面性がオキサミド部位まで続いており、NBD 誘導体は高い平面性を保って gp120 と相互作用していることが示唆された。そこで、芳香環とオキサミドの一部をインドール骨格に置換する事で平面性を付与しつつ、分子全体としてのエントロピーの減少を目指し、インドール骨格含有化合物群をデザインした(図 2)。芳香環への塩素原子およびフッ素原子の導入も行い、置換位置とその効果について検討した。また電荷をもった化合物は毒性を示すことが一般的である為、無保護でのインドール上の二級アミンの酸性度に留意し、メチル基で保護したインドール誘導体も合成した。ピペリジン部位にはリード化合物由来の基本骨格や、高活性

を示した上述の疎水性置換基を有する骨格を組み合わせた(玉村)。

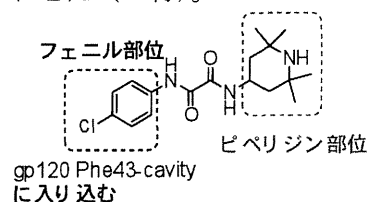


図 1. NBD-556 のピペリジン部位とフェニル部位

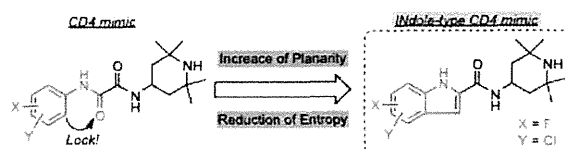


図 2. インドール型 NBD 誘導体のデザイン

3) 候補化合物群の合成および活性の測定

フルオロアニリンを出発原料とし NCS によるクロロ化を行い、次いでアミノ基を Boc 保護することで Boc アニリンへと誘導した。Boc アニリンに対し、ノルマルブチルリチウムとヨウ素を用い位置選択的にヨウ素化を行った後に、Boc を脱保護する事で三置換アニリンへと誘導した。三置換アニリンに酢酸パラジウム触媒のもとでルビン酸と(DABCO): Diazabicyclo[2,2,2]octane: を作用させてインドール合成を行い、インドール-2-カルボン酸誘導体を誘導した。最後にインドール-2-カルボン酸誘導体に HOBt: 1-hydroxybenzotriazole と EDCI: 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide を塩基性条件下で作用させ、そこに一級アミノ基を有する種々のピペリジン部位を加えることでアミド結合を形成させ、インドール型 NBD 誘導体を合成した。

合成した化合物の各種 HIV 株に対する抗ウイルス活性を PM1/CCR5 細胞を用いて WST assay で評価した。また、CD4i 抗体を用いて、NBD 誘導体で処理した JR-FL 慢性感染 PM1 細胞表面における gp120 の構造変化誘起能を評価した。また、細胞毒性を WST assay で調べた。(玉村、吉村)。

4) YYA-021 の *in vivo/in vitro* の薬物動態解析

サルにおける YYA-021 静脈注射後の血中濃度測定および体内薬物動態を解析した。15 mL および 30 mL (70.6 mg in 30 mL $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{NaCl}$ pH 7.4 のうち 15 mL および 30 mL を投与) YYA-021 溶液投与後 (投与量: 35.3 mg および 70.6 mg) 数分、数時間後に採血 3.0 mL (体重: 5.32 kg) し、YYA-021 の血中濃度を測定した(五十嵐、玉村)。また、YYA-021 の血球吸着試験、および血球から血漿への再分布の試験をおこなった。YYA-021 の尿中への速やかな排泄の可能性を検討するため、正常サルに麻酔下で許容量 (2.5 mg/kg) の化合物を静脈内投与し、投与中 (投与開始 10 分後)、投与終了時および投与

終了30分後に採尿し、遠沈後凍結し分析した(五十嵐、玉村)。YYA-021の細胞膜への吸着を検討するため、以下の実験を行った(図3)。正常アカゲザルのEDTA添加血液にYYA-021を加え、37°Cで0, 30, 60分間温浴後血漿および血球に遠心分離し、各画分を凍結し分析した(五十嵐、玉村)。

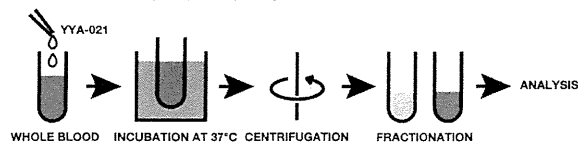


図3. YYA-021の細胞膜への吸着を検討するための実験デザイン

5) YYA-021とKD-247を組み合わせた霊長類に対するPOC試験

1×10^4 TCID₅₀のSHIV KS661を6頭のアカゲザルに静脈内接種し24時間、8日および15日後に16 mg/kgのKD247および6.25 mg/kgのYYA-021を静脈内投与し、血漿中ウイルスRNA量および末梢血CD4陽性T細胞サブセット数の推移を非投与群サル4頭と比較した。抗V3抗体、KD-247は化学及び血清療法研究所より供与いただいた。

(倫理面への配慮)

すでに分離されたウイルスやNIAIDより供与された臨床分離株、作製済みの中和抗体などを用いた研究には倫理的問題は生じない。臨床検体を用いた中和抗体の研究の倫理的妥当性は熊本大学医学部先進医療審査会にて承認されている(松下)。動物実験は、各施設の諸内規や作業方式に従って、動物愛護の精神で動物に与える苦痛の軽減と排除に努めた(玉村)。動物実験に当たっては、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」に基づいた「京都大学における動物実験の実施に関する規定」を遵守する。京都大学ウイルス研究所におけるアカゲザルの飼養については、「特定外来生物による生態系等に係わる被害の防止に関する法律」の規定に基づき、環境大臣より許可を受けている。また、「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」の輸入禁止地域等を定める省令に基づき輸入サル飼育施設の指定を受けている。「動物の愛護及び管理に関する法律」も遵守する。また、組換えSHIV感染実験については第二種使用等をする間に執る拡散防止措置について大臣確認されている(五十嵐)。

C. 研究結果

エンベロープ蛋白(Env)三量体の立体構造を変化させる小分子の同定(NBD誘導体)から始まった本研究班には二つの柱がある。一つは低濃度で、広範囲のウイルスに有効な新規NBD誘導体の探索であり、もう一つは、in vivo投与のためのSHIVモデルの最適化にむけた基礎的研究(in vitro)及び最適化された霊長類モデル

ルでのPOC試験である。昨年度までのNBD誘導体の基本的性質の研究に引き続き、本年度はYYA-021の交差反応性に関する詳細な研究、さらにその問題点を踏まえた新規誘導体の開発、NBD誘導体の動物モデル(in vivo)での予備的実験(急性毒性試験、血中濃度測定)を踏まえたうえで、POC試験の実施に至った。

1. SVPB及びSVPCパネルウイルスに対するYYA-021の中和増強効果

異なるサブタイプのウイルスを含む広範囲の臨床分離株に対するYYA-021の中和増強効果を調べるために、米国NIAIDが供給するサブタイプB及びCの標準パネルウイルス(SVPBまたはSVPC)に対するYYA-021の抗ウイルス効果をTZM-bl細胞を用いたPseudovirus neutralization assayを用いて検討した。昨年度までの検討に加え、5種類の抗V3抗体(0.5γ、KD-247、717G2b、16G6および1D9)、2種類のCD4bs抗体(49G2および82D5)、3種類のCD4i抗体(4E9C、916B2および917B11)についてYYA-021による中和の増強効果を検討した(表1)。YYA-021による中和活性の増強は12種類のSVPB中0.5γに関しては9種類、KD-247に関しては5種類、717G2に関しては6種類、16G6については4種類、1D9については6種類に観察された。一方、CD4i抗体に関しては4E9Cでは5種類、916B2については2種類、917B11では4種類に増強がみられた。CD4bs抗体についてはYYA-021による中和増強は認められなかった。一方、12種類のSVPCと2種類のCRF01_AEウイルスのうち、YYA-021による中和活性の増強が認められたのは、916B2では1種類、917B11では2種類であった。抗V3抗体で、非サブタイプBウイルスに対して中和活性を持つのは16G6のみであるが、YYA-021による増強効果は認められなかった。現在、非サブタイプB感染例からの単クローン抗体の樹立中であり、これらを用いた検討が必要である(松下)。

表1. SVPBパネルウイルスに対するYYA-021の中和増強効果(横は抗体パネル)

	anti-V3										CD4bs			CD4i						
	0.5γ	KD 247	717G2b	16G6	1D9	49G2	82D5	4E9C	916B2	917B11	49G2	82D5	4E9C	916B2	917B11					
SVPBS	25/4	0/0/0	18/7	0/0/4	0/0	0/6	1/3	0/6	25/24	15/12	2/5	0/2/7	4	2/3	18/8	0/16	34/46	1/85	47/49	2/22
6	2/2	15/7	17/8	2/4/8	0/0	4/4	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
8	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
11	0/0	4/9	0/7	2/8	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
12	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
13	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
14	2/6	0/5	2/5	1/1	0/3	2/2	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
15	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
16	0/4	1/5	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
17	1/3	4/5	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
18	0/8	0/3	0/0	4/6	0/3	1/3	1/4	1/4	4/8	4/5	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
19	1/1	0/1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0

+ : YYA-021 10-20 μM 存在下

2. 初感染ウイルス(transmitted/founder virus: T/F virus)に対するYYA-021の中和増強効果

本年度はさらに、感染早期に分離され、実際に人から人へ伝播したウイルスと考えられる初感染ウイルス(transmitted/founder virus: T/F virus)に対するYYA-021の抗ウイルス効果をTZM-bl細胞を用いた中

和試験を用いて検討した。6 種類の T/F virus を用いた検討では、V3 抗体の 1D9 は、YYA-021 非存在下には、6 種類中 2 種類しか中和できないが、YYA-021 存在下には 4/6 を中和した。また、交差反応性の V3 抗体 16G6 は T/F virus のどれも中和しなかったが、YYA-021 存在下に 3/6 を中和した(表 2)。一方、3種類の CD4i 抗体 (4E9C、916B2 および 917B11)は、どのウイルスも中和できないが、YYA-021 存在下に 4E9C および 917B11 に中和活性を認めた。このように、YYA-021 が、多くの臨床分離株で中和エピトープを露出させ中和抗体感受性にするという観察は、中和抗体を用いた治療の開発及びワクチン開発に重要な意味を持つと考えられる。(松下)。

表 2. 初感染ウイルス (transmitted/founder virus: T/F virus) に対する YYA-021 の効果

Virus	Anti V3				CD4i						
	16G6		1D9		916B2		917B11		4E9C		
	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	
pWIT0.c2474 (SVFB15)	NS	160.1 (34.5%)	43.02	19.21	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
pCT1058.c2960	NS	2.39	25.19	0.21	NS	NS	NS	29.23	NS	23.47	
pRHPA.c2635 (SVFB14)	NS	NS	NS (27%)	NS (35%)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
pREJO.c2564 (SVFB16)	NS (25%)	34.77	NS (42%)	11.59	NS	NS	NS	NS (32%)	NS	NS	NS
pTRJO.c2851 (SVFB17)	NA	NA	NS (35%)	105.6	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
pCHI06.c2633	NA	NA	NS (18%)	NS	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

3) インドール型 NBD 誘導体の活性評価と構造活性相関

合成した一連のインドール型化合物の抗 HIV 活性および細胞毒性を評価した(表 3)。化合物 7, 11 で中程度の抗 HIV 活性が見られた。しかしそれらインドールの窒素原子をメチル化した化合物 10, 12 で、抗 HIV 活性が消失した。全体的に活性が見られなかったことと、メチル化体で抗 HIV 活性の消失が起きたことから、もう一度インドール骨格のモデリングを観察した(図 4)。するとリード化合物 NBD-556 とパラ Cl (5-Cl) のインドール体を重ねたモデリング図で塩素原子のズレが見て取れた。この事実は環構造の導入により置換基の配置が固定化され、パラ位の塩素原子のずれや、分子から真横に飛び出す形になるインドール窒素原子のメチル化が、cavity との相互作用の障害になっている可能性を示唆すると考えられる。

表 3. 5-Cl-インドール型 NBD 誘導体の抗 HIV 活性と細胞毒性

NBD-556	R ₂ 0.44 μM CC ₅₀ 70.4 μM	Compd. 5		Compd. 6		Compd. 7	
		IC ₅₀ μM	CC ₅₀ μM	IC ₅₀ μM	CC ₅₀ μM	IC ₅₀ μM	CC ₅₀ μM
		>10.0	19.4	>100	>200	3.6	11.4
		>100	>20	>100	>20	100	13.5
		15.6	31.2
		>100	>20

図 4 の NBD-556 とインドール型誘導体のモデリングによる重ね合わせにより、表 3 の 5-Cl-インドール型誘導体よりも、6-Cl-インドール型のほうが元のリード化合物 NBD-556 に近い構造をとっていると推定されるため、6-Cl-インドール型を合成し、抗 HIV 活性および細胞毒性を評価したが、結果的にこのシリーズには高活性の化合物は見出せなかった(玉村、吉村)。

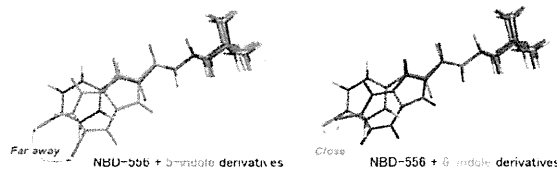


図 4. NBD-556 とインドール型誘導体

4) NBD 誘導体の耐性獲得機序

昨年度行った臨床分離 R5 株 (Y1) を用いた in vitro 耐性誘導実験により、NBD 誘導体の耐性獲得機序には、(i)V255M 変異、(ii)T375I 変異、または (iii)M426I 変異、の 3 通りに大別されることが明らかになった。本年度はさらに、NBD-556 以外に立体構造変化を惹起する 7 個の誘導体を選んで、新たに in vitro 耐性誘導実験を行った。前回はバルクの臨床分離 R5 ウイルス株 (Y1) を用いて実験を行ったが、今回は、de novo 変異をはじめとする耐性変異機序の更なる検討を目的に、臨床分離株 (Y1) の全 env 領域を NL4-3 backbone に組換えたクローンウイルス (Y1c) を用いて行った。

すべての化合物を 5 回パッセージし、最終濃度が 20-100 μM に到達するまで継代した。その結果、今回試した全ての化合物に対する耐性ウイルスを得ることができた。得られたそれぞれの耐性ウイルスは、昨年度のバルクウイルス同様にすべての NBD 誘導体に対して交差耐性を示した。最終パッセージのウイルスの gp120 のシークエンスを比較したところ、de novo 変異として獲得される主要変異が、(i)V255M 変異、(ii)T375I 変異、または (iii)M426I 変異、の 3 通りに大別されることが明らかになった(吉村)。

5) YYA-021 代替化合物の探索

YYA-014, HAR-427 および MTA1-03 の細胞毒性を TZM-bl 細胞を指標に YYA-021 と比較したところ、HAR-427 はより毒性が高く、YYA-014 および MTA1-03 はより毒性が低く両者はほぼ同様であった。また、いずれの化合物もそれ自体では SHIV KS661 に対する複製抑制効果は見られなかった。これら化合物の 5 および 10 μM 存在下に KD-247 を加えると SHIV KS661 の中和感受性はいずれも上昇した。増強効果は HAR-427 で最も大きく、次いで YYA-021, YYA-014/MTA1-03 の順であった(五十嵐、

玉村)。

6) YYA-021 の体内動態解析

静脈注射によるラットの体内半減期は 17.8 分であった(前年度報告)。サルに関して同様な実験を行い 30 min 以降のデータを用いて GraphPad Prism で半減期を計算したところ、98.4 min となった(図 5)。時間が十分経っても血中に残っているということから考えると、組織分布が高いと考えられた。YYA-021 の血球吸着の可逆性、再分布を調べたところ、可逆的であり、また血球から血漿に再分布する可能性が示唆された。(玉村、五十嵐)

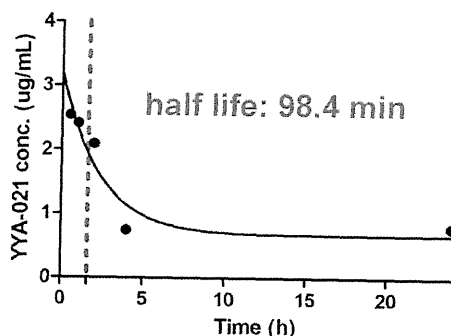


図 5.サルにおける YYA-021 半減期(静脈投与)

7) 霊長類を対象とした POC 試験プロトコル作成および第 1 段階 POC 試験

これまでの *in vitro* および *in vivo* の研究データをもとに霊長類を対象とした POC 試験プロトコルを作成した。基本的に、KD-247 に関して、ヒトを対象に行っている臨床試験に準じた方法で計画した。抗 V3 抗体 KD-247 に感受性があり、しかも *in vitro* で、YYA-021 の中和増強効果が見られる SHIV KS661 を用いて(1×10^4 TCID₅₀) 6 頭のアカゲザルに静脈内接種し 24 時間後、8 日および 15 日後に 16 mg/kg の KD-247 および 6.25 mg/kg の YYA-021 を静脈内投与した。経時的に採血し、血漿中ウイルス RNA 量および末梢血 CD4 陽性 T 細胞サブセット数の推移を非投与群サル 4 頭と比較した。POC 試験は順調で、本プロトコルでの投与は少なくとも 6 頭の被験個体に関して安全に行われた。結果は、6 頭中 5 頭のアカゲザルの血漿中ウイルス RNA 量が非投与対照群と比較して接種 10 日後以降統計的に有意な差を以て抑制された(図 5)。MM540 の血漿中ウイルス RNA 量は非投与対照群と同等であった。

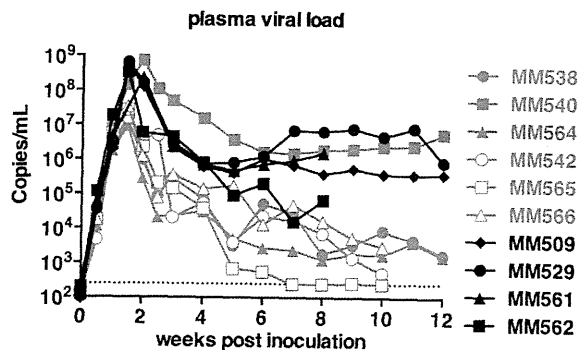


図 6. 霊長類を対象とした POC 試験 KD-247(16mg/kg)+YYA-021 (6.25 mg/kg)を2週にわたり3回投与した。血漿中ウイルス量の経時的变化。投与群(赤)、コントロール群(黒)

末梢血 CD4 T 細胞サブセットは MM540 を除く 5 頭の「治療群」において攻撃接種 4 週以降 2000 細胞/ μ l 血液を維持したが、治療個体 MM540 および非投与対照群では急激でかつ非可逆的な減少を呈し、攻撃接種 4 週以降枯渇状態になった(図 7)。

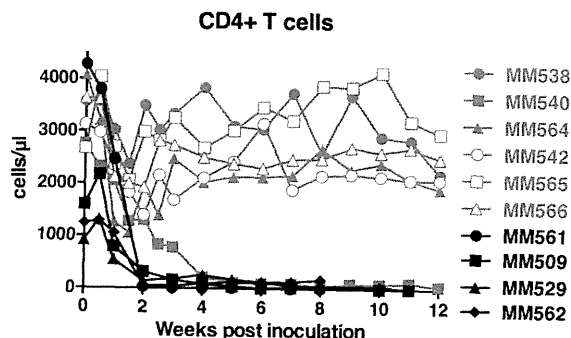


図 7. 霊長類を対象とした POC 試験 KD-247(16mg/kg)+YYA-021 (6.25 mg/kg)を2週にわたり3回投与した。末梢血 CD4+細胞の経時的变化。投与群(赤)、コントロール群(黒)

D. 考察

1. YYA-021 の臨床分離株に対する交差反応性

YYA-021 は primary isolates でも Env 三量体の内部に隠されている中和エピートを外部に露出させ中和抗体感受性に変えることが観察された。特に、サブタイプ B ウイルスに関して交差中和活性を持つ 0.5 γ に関しては 12 種類のパネルウイルスのうち 9 種類に関して中和増強効果を認めた。また、もともと中和能が弱いかほとんど認められない CD4i 抗体について 5 種類のウイルスで中和活性増強がみられている。今年度の研究では、初感染ウイルス(T/F virus)に対しても YYA-021 の中和増強効果が認められたことは重要な点である。YYA-021 非存在下では、中和抵抗性の T/F ウイルスが、YYA-021 存在下では、50%以上が中和感受性になった。一方、非サブタイプ B ウイルスに交差反応する CD4i 抗体である 916B2、917B11 は、15 種類のパネルウイルスのうち 3 種類に関して中和増強効果を認めた。サブタイプ B 感染例から得られた、交差反応性のある抗 V3 抗体 16G6 を用いた解析を行ったが、非サブタイプ B に対する中和活性の増強は明らかではなかった。我々は現在、非サブタイプ B ウイルス感染例より単クローン抗体を樹立であるが、YYA-021 の非サブタイプ B ウイルスに対する効果の判定には、これらの新規抗体を用いた分析が必要と考えられる。

2. 新規 NBD 誘導体の開発と耐性ウイルス

NBD 誘導体の芳香環部位とオキサミド部位の一部を

平面構造に保ちつつ構造固定化によるエントロピーの減少を図るためにインドール骨格をデザインし、化合物群を合成した。今回合成したインドール骨格含有化合物群の中で、弱いながらも抗 HIV 活性を示す化合物はいずれも 5 位に塩素、臭素、またはフッ素原子を有するものであり、昨年度までに得られた芳香環部位誘導体の構造活性相関と一致した。他方、クローンウイルスを用いた *in vitro* 耐性誘導実験により、*de novo* 変異として獲得される主要変異が、(i)V255M 変異、(ii)T375I 変異、または (iii)M426I 変異、の 3 通りに大別されることが明らかになった。これらの結果から、芳香環部位のパラ・メタ位(5・6位)および gp120 の V255, T375, および M426 残基が、どのように感染阻害能や立体構造変化誘導能に関与しているかを詳細に検討することにより、より効果的な低分子化合物の開発につながると考えられる。また、より毒性が低く PK の良い化合物の探索も引き続き行っていく予定である。

3. YYA-021 の体内動態

本化合物はサルに静脈内投与した直後から血中濃度が測定限界以下であったが、体外に(尿中に)排泄されることはなかったため、何らかの形で体内とどまっていると考えられた。試験管内の血液への添加実験から、速やかに液性成分と細胞成分の間で平衡に達することが示されたことから、体内でも血球や血管内皮細胞等に浸透し、体液との間で平衡化することが予想される。化合物が実際に体内にどれくらい存在するか知ることができない問題があるものの、細胞に浸透する事で比較的長期間体内にとどまることが予想される。この性質は薬剤として考えた場合、安全な濃度の範囲内であればむしろ望ましいともいえる。

4. YYA-021 の代替化合物の探索

SHIV KS661 において KD-247 による中和増強効果が YYA-021 より大きかった HAR-427 は細胞毒性も強かったことから、代替化合物としては不相当と考えられた。YYA-014 および MTA1-03 は YYA-021 より細胞毒性が低かったものの、同時に中和増強効果も低かった。YYA-021 は試験管内では予想できない副反応をサルにおいて示したことから、YYA-021 とは分子構造の類似性が比較的低い MTA1-03 を代替化合物候補として選抜した。この化合物に関してもサルを用いて少量からの薬物動態および急性毒性の検討を行い、性状が好ましい(長い血中半減期および低毒性)ものであれば、POC 試験へ応用したい。

5. 第 1 段階 POC 試験

本実験において予想される最善の結果は感染成立の阻止であったが、今回採用したレジメンではそれは達成できなかった。しかし、投与群では 6 頭中 5 頭で血中ウイルス RNA 量を優位に抑制し、それに伴って末梢血 CD4T 細胞の減少を阻止したこと、さらに、投与を終了した攻撃接種 15 日後以降もウイルス RNA 量の抑制およ

び CD4T 細胞数が維持されたことは特筆すべき成果といえる。CXCR4 を共受容体として用いるいわゆる X4-SHIV にあつては急性期のウイルス複製をある程度抑制する事でその後のウイルス複製を効率的に制御できることがすでに知られており、本実験の成果もその一例といえるが、第 1 段階 POC 試験としてはよい結果といえる。本実験では NBD 誘導体を加えたことが得られたウイルス複製抑制に貢献しているか判定ができないため、今後は KD-247 単独投与群においてウイルス RNA 量を比較する必要がある。また、1 頭だけではあるが、ウイルス複製抑制が全く見られない個体がいたことはこのアイディアを押し進めるうえで caveat である。この個体で中和回避突然変異体が急性期に出現した、ヒト抗体である KD-247 を「中和」してしまう抗ヒト IgG 抗体が急性期に誘導された可能性が考えられるため、現在それらについて検討を進めている。

E. 結論

YYA-021 は NBD-556 に比較して、抗ウイルス活性は 1/2~1/4 と劣るが、中和エピトープの露出という意味ではほぼ同等の活性を持ち、細胞毒性は約 1/2 である。YYA-021 はまた、多くの primary isolates で中和エピトープを露出させ、中和抗体感受性に変えることができる。この意味で中和抗体を用いた POC 試験に適した小分子であると考えられる。今回の POC 試験では、時間と資金が限られていたため、KD-247 単独群の結果がないため YYA-021 の効果を純粋に評価することはできないが、これまでの研究では、SHIV 感染後に抗体を投与しても有意な効果は得られていない。また、同じ量の抗体を人に投与した場合の有効率はおよそ 50% であり最大のウイルス量の抑制は約 1Log である。一方、SHIV に投与群では 6 頭中 5 頭で血中ウイルス RNA 量をおよそ 2Log のレベルで有意に抑制し、それに伴って末梢血 CD4T 細胞の減少を阻止したこと、さらに、投与を終了した攻撃接種 15 日後以降もウイルス RNA 量の抑制および CD4T 細胞数が維持されたことは特筆すべき成果といえる。

POC 試験に用いた抗体 KD-247 はサブタイプ B のおよそ 1/3 を中和すると考えられる。少量で有効性が高く毒性のすくない NBD 誘導体(または CD4 ミミック)の探索を続けるとともに、より効率の良い抗体との組み合わせの研究の継続が必要である。本戦略は「治癒に向けた治療法」の開発の一つに位置付けることが可能と考えられる。多くの残された課題があるが、確実に一歩進んだと考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

(論文発表)

1. Yokoyama M, Naganawa S, Yoshimura K, Matsushita S, Sato H. Structural Dynamics of

- HIV-1 Envelope Gp120 Outer Domain with V3 Loop. *PLoS ONE* 7(5): e37530., 2012.
2. Ong YT, Kirby KA, Hachiya A, Chiang LA, Marchand B, Yoshimura K, Murakami T, Singh K, Matsushita S, Sarafianos SG. Preparation of biological active single-chain variable antibody fragments that target the HIV-1 gp120 v3 loop. *Cellular and molecular biology*, 58: 71-79, 2012
 3. The Mind Exchange Working Group (Antinori A, Arendt G, Grant I, JMatsushita, et al.)Assessment, Diagnosis, and Treatment of HIV-Associated Neurocognitive Disorder: A Consensus Report of the Mind Exchange Program. *Clin Infect Dis*. 56(7):1004 -17, 2013
 4. Nishijima T, Takano M, Ishisaka M, Komatsu H, Gatanaga H, Kikuchi Y, Endo T, Horiba M, Kaneda S, Uchiumi H, Koibuchi T, Naito T, Yoshida M, Tachikawa N, Ueda M, Yokomaku Y, Fujii T, Higasa S, Takada K, Yamamoto M, Matsushita S, Tateyama M, Tanabe Y, Mitsuya H, Oka S, on behalf of the Epzicom-Truvada study team: Abacavir/Lamivudine versus Tenofovir/Emtricitabine with Atazanavir/Ritonavir for Treatment-naïve Japanese Patients with HIV-1 Infection: A Randomized Multicenter Trial. *Internal Medicine*, 52: 735-744, 2013.
 5. Harada S, Yoshimura K, Yamaguchi A, Yusa K, Matsushita S. Impact of antiretroviral pressure on selection of primary HIV-1 envelope sequences in vitro. *J. Gen. Virol.* 94:933-943, 2013.
 6. Kuwata T, Takaki K, Yoshimura K, Enomoto I, Wu F, Ourmanov KI, Hirsch VM, Yokoyama M, Sato H, Matsushita S. Conformational Epitope Consisting of the V3 and V4 Loops as a Target for Potent and Broad Neutralization of Simian Immunodeficiency Viruses. *J. Virol.* 87 : 5424-5346, 2013.
 7. Kuwata T, Takaki K, Enomoto I, Kazuhisa Y, and Matsushita S. Increased infectivity in human cells and resistance to antibody-mediated neutralization by truncation of the SIV gp41 cytoplasmic tail. *Frontiers in Microbiology/Virology* 4:1-7, 2013.
 8. 玉村啓和. ケミカルバイオロジーを基盤とした抗 HIV 剤の創製. *薬学雑誌 (日本薬学会)*, 131(1) 巻 頁 69~78、2012 年
 9. Nomura W, Hashimoto C, Ohya A, Miyauchi K, Urano E, Tanaka T, Narumi T, Nakahara T, Komano J, Yamamoto N, Tamamura H. Synthetic C34 Trimer of HIV-1 gp41 Shows Significant Increase of Inhibition Potency. *ChemMedChem* 7 : 205–208, 2012.
 10. Narumi T, Komoriya M, Hashimoto C, Wu H, Nomura W, Suzuki S, Tanaka T, Chiba J, Yamamoto N, Murakami T, Tamamura H. Conjugation of Cell-penetrating Peptides Leads to Identification of Anti-HIV Peptides from Matrix Proteins. *Bioorg Med Chem* 20: 1468-1474, 2012.
 11. Nomura W, Masuda A, Ohba K, Urabe A, Ito N, Ryo A, Yamamoto N, Tamamura H. Effects of DNA Binding of Zinc Finger and Linkers for Domain Fusion on Catalytic Activity of Sequence-Specific Chimeric Recombinases Determined by a Facile Fluorescent System. *Biochemistry*, 51 : 1510–1517, 2012.
 12. Hashimoto C, Nomura W, Ohya A, Urano E, Miyauchi K, Narumi T, Aikawa H, Komano JA, Yamamoto, N, Tamamura, H. Evaluation of a Synthetic C34 Trimer of HIV-1 gp41 as AIDS Vaccines. *Bioorg Med Chem* 20: 3287–3291, 2012.
 13. Narumi T, Tanaka T, Hashimoto C, Nomura W, Aikawa H, Sohma A, Itotani K, Kawamata M, Murakami T, Yamamoto N, Tamamura H. Pharmacophore-based Small Molecule CXCR4 Ligands. *Bioorg Med Chem Lett* 22: 4169-4172, 2012.
 14. Narumi T, Kobayakawa T, Aikawa H, Seike S, Tamamura H. Stereoselective Formation of Trisubstituted (Z)-Chloroalkenes Adjacent to a Tertiary Carbon Stereogenic Center by Organocuprate-Mediated Reduction/Alkylation. *Org Lett* 14: 4490-4493, 2012.
 15. Narumi T, Arai H, Yoshimura K, Harada S, Hirota Y, Ohashi N, Hashimoto C, Nomura W, Matsushita S, Tamamura H. CD4 Mimics as HIV Entry Inhibitors: Lead Optimization Studies of the Aromatic Substituents. *Bioorg Med Chem* 21 2518-2526, 2013.
 16. Iwami, S., Holder, B.P., Beauchemin, C.A., Morita, S., Tada, T., Sato, K., Igarashi, T., and Miura, T. Quantification system for the viral dynamics of a highly pathogenic simian/human immunodeficiency virus based on an in vitro experiment and a mathematical model. *Retrovirology* 9:18, 2012.
 17. Morita, D., Yamamoto, Y., Suzuki, J., Mori, N., Igarashi, T., and Sugita, M. Molecular requirements for T cell recognition of N-myristoylated peptides derived from the simian immunodeficiency virus Nef protein. *J. Virol.* 87:482-8, 2013.
 18. Fujita, Y., Otsuki, H., Watanabe, Y., Yasui, M., Kobayashi, T., Miura, T., and Igarashi, T. Generation of a replication-competent chimeric simian-human immunodeficiency virus carrying env from subtype C clinical isolate through intracellular homologous recombination. *Virology* 436:100-111, 2013.
 19. Takahashi, N., Nomura, T., Takahara, Y., Yamamoto, H., Shiino, T., Takeda, A., Inoue, M., Iida, A., Hara, H., Shu, T., Hasegawa, M., Sakawaki, H., Miura, T., Igarashi, T., Koyanagi, Y., Naruse, T.K., Kimura, A., and Matano, T. A novel protective MHC-I haplotype not associated with dominant Gag-specific CD8+ T-cell responses in SIVmac239 infection of Burmese rhesus macaques. *PLoS ONE* 8:e54300, 2013.

20. Oue, M., Sakabe, S., Horiike, M., Yasui, M., Miura, T., and Igarashi, T. No viral evolution in the lymph nodes of SIV-infected rhesus macaques during combined antiretroviral therapy. *J. Virol.* 87:4749-4793, 2013.

(著書)

1. Nomura W, Tanaka T, Aoki T, Soma A, Aikawa H, Narumi T, and Tamamura H. Development of Designed Bivalent Ligands for CXCR4 and their Function on Receptor Binding. *Peptide Science 2011*, Sakaguchi, K., (Eds.), The Japanese Peptide Society, Sapporo, 79, 2012.
 2. Nomura W, Hashimoto C, Nakahara T, Ohya A, Miyauchi K, Ohba K, Narumi T, Aikawa H, Komano J, Yamamoto N, and Tamamura H. Designed Antigens Based on the Dynamic Structural Changes of GP41 for Development of Effective HIV-1 Vaccines. *Peptide Science 2011*, Sakaguchi, K., (Eds.), The Japanese Peptide Society, Sapporo, 295, 2012.
 3. Nomura W, Tsutsumi H, Abe S, Mori A, Narumi T, Aikawa H, Tamamura H. Intense Blue Fluorescence of Tag-probe Systems Based on a Leucine Zipper Assembly. *Peptide Science 2011*, Sakaguchi, K. (Eds.), The Japanese Peptide Society, Sapporo, 317, 2012.
 4. 野村 渉, 田中智博, 相川春夫, 玉村啓和. 「多価結合型GPCRリガンドの合成とがん細胞イメージングへの応用」, 最新ペプチド合成技術とその創薬研究への応用 (株式会社 メディカルドゥ), 267-273, 2012.
 5. 野村 渉, 田中智博, 玉村啓和. 「HIV阻害剤・腫瘍認識プローブとしてのケモカイン受容体リガンド」, ペプチド医薬の最前線「監修 木曾良明・向井秀仁」(株式会社 シーエムシー出版 東京), 101-107, 2012.
2. 学会発表
1. Maruta Y., Ramirez K., Kuwata T., Matsushita S. :Construction and characterization of neutralizing antibody fragments for efficient access to V3 epitope. *AIDS Vaccine 2012*, September 9-12, 2012, Boston, USA.
 2. Kuwata T., Takaki K., Enomoto, E., Matsushita S: Conformational epitope involving V3 and V4 loops is a major target for antibody-mediated neutralization in SIV smH635-infected macaques. 13th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, 2012.10.25-26, Aso, Kumamoto, Japan.
 3. Maruta Y., Ramirez K., Kuwata T., Suwa Y., Morioka H., Kuwata T, Matsushita S.: Single-chain variable fragment (scFv) of anti-V3 monoclonal antibody efficiently neutralizes HIV-1 in vitro. 13th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, 2012.10.25-26, Aso, Kumamoto, Japan.
 4. Tanaka K., Kuwata T., Maruta Y., Ramirez K., Matsushita S.: Analysis of antibodies to CD4-induced epitope on gp120. 13th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, 2012.10.25-26, Aso, Kumamoto, Japan.
 5. Sonoda T., Boonchawalit S., Gatanaga H., Tanaka K., Maruta Y., Ramirez K., Kuwata T., Matsushita S.:Cross subtype neutralizing activity of plasma antibodies from patients infected with HIV-1 CRF01_AE HIV-1. 13th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, 2012.10.25-26, Aso, Kumamoto, Japan.
 6. 桑田岳夫, 吉村和久, 松下修三 : SIV 感染サルから分離された中和抗体 B404 は V3,V4 ループを含む Env 立体構造を認識する 第26回日本エイズ学会学術集会・総会. 2012.11.24-11.26.横浜.
 7. 園田貴丈, Samatchaya Boonchawalit, 田中和樹, 丸田康広, Kristel Ramirez, 桑田岳夫, 松下修三: CRF01_AE HIV-1 感染症例 IgG の交差中和 活性の解析.第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2012.11.24-11.26. 横浜.
 8. 田中和樹, 桑田岳夫, 丸田泰広, 園田貴丈, Kristel Ramirez, 松下修三.gp120 の CD4-induced epitope に結合する中和抗体の解析. 第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会 . 2012.11.24-11.26. 横浜.
 9. Narumi T, Tanaka T, Nomura W, Aikawa H, Tamamura H. HIV Inhibitors Targeting Entry, Fusion and Integrase. 244th American Chemical Society National Meeting & Exposition Fall 2012, Philadelphia, USA, Aug19-23, 2012.
 10. Nomura W, Tanaka T, Aikawa H, Narumi T, Tamamura H. Bivalent Ligands for the Chemokine Receptor CXCR4 Dimer and Their Function. 32nd European Peptide Symposium 2012, Athens, Greek, Sep2-7, 2012.
 11. Nomura W, Tamamura H. Recognition Probes Specific to Target Proteins. The 14th Akabori Conference: Japanese-German Symposium on Peptide Science. Niseko, Hokkaido, Japan, Sep12-13, 2012.
 12. Nomura W, Masuda A, Kondo A, Ohba K, Yamamoto N, Tamamura H. Studies of Designer Zinc Finger Enzymes and Applications for Genome Editing and Modification. The 26th Annual Symposium of the Protein Society. San Diego, USA, Aug 5-8, 2012.
 13. Nomura W, Kondo A, Masuda A, Ryo A, Tamamura H. Development of zinc finger nucleases targeting Epstein-Barr virus genome for suppression of viral production in B cells. FASEB SRC, Genome Engineering: Research & Applications. Lucca, Italy, Sep 2-7, 2012.

14. Narumi T, Seike S, Aikawa H, Tamamura H. Stereoselective Formation of Trisubstituted (Z)-Chloroalkenes Flanking two Stereogenic Centers by Organocopper-Mediated Reduction/Alkylation of Allylic gem-Dichlorides. 244th American Chemical Society National Meeting & Exposition Fall 2012, Philadelphia, USA, Aug19-23, 2012.
15. Hashimoto C, Nomura W, Komano JA, Tamamura H. An Artificial gp41-C34 Trimer Mimetic Targeting the Membrane Fusion Mechanism of HIV-1. The 13th Kumamoto AIDS Seminar · GCOE Joint International Symposium. Kumamoto, Japan, Oct 24-26, 2012.
16. Aikawa H, Matsumoto D, Nozue A, Urano E, Metifiot M, Maddai K, Nomura W, Narumi T, Komano JA, Murakami T, Pommier Y, Yamamoto N, Tamamura H. Structure-activity Relationship Studies of Peptidic HIV Integrase Inhibitors. The 13th Kumamoto AIDS Seminar · GCOE Joint International Symposium. Kumamoto, Japan, Oct 24-26, 2012.
17. Nomura W, Masuda A, Tamamura H. Development of Zinc Finger Enzymes for Genome Engineering. The First International Symposium on Biofunctional Chemistry. Tokyo, Japan, Nov 28-30, 2012.
18. 鳴海哲夫, 相川春夫, 玉村啓和. 高活性イミダゾールカルベンの創製研究:窒素原子上の置換基と触媒活性の相関. 日本化学会第92春季年会. 横浜, 2012年3月25-28日.
19. 紺野 誠, 野村 渉, 鳴海哲夫, 相川春夫, 田中智博, 橋本知恵, 大橋南美, 尾崎太郎, 相馬 晃, 糸谷恭子, 村上 努, 山本直樹, 玉村啓和. ジピコリルアミンおよびアザマクロサイクル環を有する二核金属錯体型 CXCR4 アンタゴニストの構造活性相関研究. 日本化学会第92春季年会. 横浜, 2012年3月25-28日.
20. 相川春夫, 野村 渉, 鳴海哲夫, 田中智博, 玉村啓和. 長さの調節が可能な二価結合型 CXCR4 リガンドの創製・蛍光ラベル化と応用. 日本化学会第92春季年会. 横浜, 2012年3月25-28日.
21. 橋本知恵, 野村 渉, 鳴海哲夫, 相川春夫, 山本直樹, 玉村啓和. 宿主タンパク質を基にしたエイズワクチン候補の探索. 日本薬学会第132年会. 札幌, 2012年3月28-31日.
22. 野村 渉, 湊 夏来, 奥田善章, 大橋南美, 鳴海哲夫, 相川春夫, 玉村啓和. 蛍光性 DAG lactone 誘導体の合成と PKC リガンドの新規スクリーニング法の開発. 日本薬学会第132年会. 札幌, 2012年3月28-31日.
23. 野村 渉, 近藤麻美, 卜部亜里沙, 大庭賢二, 増田朱美, 山本直樹, 梁 明秀, 玉村啓和. ウイルスゲノムを標的としたジンクフィンガーヌクレアーゼの構築戦略. 日本薬学会第132年会. 札幌, 2012年3月28-31日.
24. 山本 純, 田中智博, 傳田将也, 戎野紘司, 野村 渉, 重永 章, 玉村啓和, 大高 章. フッ化物イオン応答型アミノ酸の開発と標的タンパク質精製ツールへの応用. 日本薬学会第132年会. 札幌, 2012年3月28-31日.
25. 野村 渉, 森 あつみ, 大橋南美, 相川春夫, 鳴海哲夫, 玉村啓和. プローブ導入型タグ付加標的タンパク質融合体による細胞内動態解析方法の開発. 日本ケミカルバイオロジー学会 第7回年会. 京都, 2012年6月7-9日.
26. 野村 渉, 増田朱美, 卜部亜里沙, 玉村啓和. ジンクフィンガー融合型酵素によるゲノム編集法の開発. 日本ケミカルバイオロジー学会 第7回年会. 京都, 2012年6月7-9日.
27. 橋本知恵, 野村 渉, 鈴木貴晴, 大矢亜紀, 浦野恵美子, 鳴海哲夫, 相川春夫, 駒野 淳, 山本直樹, 玉村啓和. HIV 侵入阻害剤としての外被タンパク質 gp41-C34 3量体. 日本ケミカルバイオロジー学会 第7回年会. 京都, 2012年6月7-9日.
28. 鳴海哲夫. 高活性イミダゾールカルベンの創製研究:窒素原子上の置換基と触媒活性の相関. 第一回全体班会議「有機分子触媒による未来型分子変換」. 京都, 2012年6月8-9日.
29. 鳴海哲夫, 相川春夫, 玉村啓和. 高活性イミダゾールカルベンの創製を目指した構造活性相関研究. 第56回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2012年10月13日.
30. 相川春夫, 野村 渉, 玉村啓和. 近赤外蛍光色素でラベル化した二価結合型 CXCR4 アンタゴニストの創製. 第56回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2012年10月13日.
31. 湊 夏来, 野村 渉, 相川春夫, 玉村啓和. PKC リガンドの探索を目的とした蛍光性 DAG ラクトンの創製. 第56回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2012年10月13日.
32. 紺野 誠, 鳴海哲夫, 野村 渉, 玉村啓和. 二核亜鉛錯体型 CXCR4 アンタゴニストの創製. 第56回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2012年10月13日.
33. 鈴木貴晴, 橋本知恵, 野村 渉, 玉村啓和. HIV-gp41 のヘリックスバンドル形成を基にした膜融合阻害作用ペプチドの開発. 第56回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2012年10月13日.
34. 鳴海哲夫, 相川春夫, 玉村啓和. アゾリウム塩によるインドール類の Friedel-Crafts 型共役付加反応. 第5回有機触媒シンポジウム. 東京, 2012年10月26-27日.
35. 野村 渉, 大橋南美, 玉村啓和. ターゲットタンパク質特異的プローブの合成と応用. 第38回反応と合成の進歩シンポジウム. 東京, 2012年11月5-6日.
36. 鳴海哲夫, 相川春夫, 玉村啓和. アゾリウム塩を酸触媒とするインドール類の Friedel-Crafts 型共役付加反応の開発. 第38回反応と合成の進歩シンポジウム. 東京, 2012年11月5-6日.
37. 小早川拓也, 鳴海哲夫, 相川春夫, 玉村啓和. 有機銅試薬によるアリル位アルキル化反応を基軸とする Z 型クロロアルケン骨格の立体選択的合成法の開発. 第38回反応と合成の進歩シンポジウム. 東京, 2012年11月5-6日.
38. 湊 夏来, 野村 渉, 相川春夫, 玉村啓和. 蛍光性 PKC リガンドの合成と新規スクリーニング法の

- 開発. 第 38 回反応と合成の進歩シンポジウム. 東京, 2012 年 11 月 5-6 日.
39. 橋本知恵, 野村 渉, 駒野 淳, 玉村啓和. HIV-1 膜融合阻害剤としての gp41-C34 三量体ミミックの合成. 第 49 回ペプチド討論会. 鹿児島, 2012 年 11 月 7-9 日.
40. 増田朱美, 野村 渉, 玉村啓和. 設計型 DNA 組換え酵素の配列特異的反応に関する定量的解析. 第 49 回ペプチド討論会. 鹿児島, 2012 年 11 月 7-9 日.
41. 野村 渉, 鳴海哲夫, 相川春夫, 玉村啓和. 細胞内でのタンパク質動態イメージングのための細胞膜透過型 ZIP タグープローブシステムの創製. 第 49 回ペプチド討論会. 鹿児島, 2012 年 11 月 7-9 日.
42. 大附寛幸, 一瀬裕太郎, 小林 剛, 原田恵嘉, 吉村和久, 鳴海哲夫, 玉村啓和, 松下修三, 五十嵐樹彦, 三浦智行. 中和感受性を増強する薬剤による抗 HIV-1 治療戦略に向けた新規 SHIV/アカゲザル評価モデルの開発. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会. 大阪, 2012 年 11 月 13-15 日.
43. 村上 努, 高野 皓, 藤野真之, 鳴海哲夫, 相川春夫, 橋本知恵, 野村 渉, 山本直樹, 玉村啓和. HIV-1MA/CA 部分ペプチドの細胞内導入による新規 HIV-1 複製制御法の探索. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会. 大阪, 2012 年 11 月 13-15 日.
44. 廣田雄樹, 鳴海哲夫, 橋本知恵, 吉村和久, 原田恵嘉, 大附寛幸, 三浦智行, 五十嵐樹彦, 相川春夫, 野村 渉, 松下修三, 玉村啓和. HIV 外被タンパク質 gp120 を標的とするインドール型低分子 CD4 ミミックの創製研究. 第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会. 東京, 2012 年 11 月 24-26 日.
45. 相川春夫, 松本大地, 野末愛美, 浦野恵美子, Mathieu Metifiot, Kasthuraiah Maddali, 野村 渉, 鳴海哲夫, 駒野 淳, 村上 努, Yves Pommier, 山本直樹, 玉村啓和. ペプチドミメティック型インテグラーゼ阻害剤の構造活性相関研究. 第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会. 東京, 2012 年 11 月 24-26 日.
46. 高野 皓, 鳴海哲夫, 相川春夫, 橋本知恵, 藤野真之, 野村 渉, 村上 努, 山本直樹, 玉村啓和. HIV-1 MA, CA タンパク質を基にした新規抗 HIV-1 剤の創製研究. 第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会. 東京, 2012 年 11 月 24-26 日.
47. 原田恵嘉, 鳴海哲夫, 玉村啓和, 松下修三, 吉村和久. R5 臨床分離株を用いた CD4 類似低分子化合物誘導体に対する *in vitro* 耐性ウイルス誘導. 第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会. 東京, 2012 年 11 月 24-26 日.
48. 鳴海哲夫, 廣田雄樹, 吉村和久, 原田恵嘉, 橋本知恵, 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. 第 30 回メディシナルケミストリーシンポジウム. 東京, 2012 年 11 月 28-30 日.
49. 松本大地, 相川春夫, 浦野恵美子, 駒野 淳, 村上 努, 野村 渉, 山本直樹, 玉村啓和. インテグラーゼ阻害活性を有するステイプルペプチドの構造活性相関研究. 第 30 回メディシナルケミストリーシンポジウム. 東京, 2012 年 11 月 28-30 日.
50. 小関泰輔, 相川春夫, 野村 渉, 玉村啓和. CXCR4 の多量化状態の解析を目指した多価結合型リガンドの創製研究. 第 30 回メディシナルケミストリーシンポジウム. 東京, 2012 年 11 月 28-30 日.
51. 高野 皓, 鳴海哲夫, 相川春夫, 野村 渉, 玉村啓和. 水性環境下で効率的に反応する 8-アザクマリニルメチル型光分解性保護基の開発. 日本薬学会第 133 年会. 横浜, 2013 年 3 月 27-30 日.
52. 大橋南美, 野村 渉, 湊夏来, 玉村啓和. 蛍光性 PKC リガンドの合成と C1b ドメインへの蛍光基導入研究. 日本薬学会第 133 年会. 横浜, 2013 年 3 月 27-30 日.
53. 小関泰輔, 相川春夫, 野村 渉, 玉村啓和. CXCR4 の多量化状態の解析を目指した多価結合型リガンドの創製研究. 日本薬学会第 133 年会. 横浜, 2013 年 3 月 27-30 日.
54. 相川春夫, 野村 渉, 玉村啓和. 二価結合型 CXCR4 リガンドにおける近赤外蛍光色素導入位置の検討. 日本薬学会第 133 年会. 横浜, 2013 年 3 月 27-30 日.
55. 小早川拓也, 鳴海哲夫, 相川春夫, 玉村啓和. E 型クロロアルケン骨格の立体選択的合成法の開発. 日本薬学会第 133 年会. 横浜, 2013 年 3 月 27-30 日.
56. 鳴海哲夫, 相川春夫, 玉村啓和. 新規アゾリウム塩によるインドール類の Friedel-Crafts 型共役付加反応. 日本薬学会第 133 年会. 横浜, 2013 年 3 月 27-30 日.
57. 廣田雄樹, 鳴海哲夫, 橋本知恵, 吉村和久, 原田恵嘉, 大附寛幸, 三浦智行, 五十嵐樹彦, 相川春夫, 野村 渉, 松下修三, 玉村啓和. HIV 外被タンパク質 gp120 を標的としたインドール型低分子 CD4 ミミックの創製. 日本薬学会第 133 年会. 横浜, 2013 年 3 月 27-30 日.
58. 五十嵐樹彦: 抗 HIV 多剤併用療法に抵抗するウイルスリザーバーの探索 (動物モデルからのアプローチ) 第 27 回中国四国ウイルス研究会, 米子, 2012 年 6 月 23-24 日
59. 五十嵐樹彦: サルから学ぶエイズ 東京大学医科学研究所公開セミナー「ラブラボ」、東京, 2012 年 8 月 20 日
60. Hiroyuki Otsuki, Takeshi Kobayashi, Tatsuhiko Igarashi, Tomoyuki Miura: Generation of monkey-tropic human immunodeficiency virus strains carrying a variety of CCR5-utilizing env genes from HIV-1 subtype C clinical isolates through intracellular homologous recombination 19th East Asia Joint Symposium on Biomedical Research, Seoul, Korea, 2012.8.22-25
61. 三浦智行, 大附寛幸, 米田舞, 一瀬裕太郎, 小林剛, 五十嵐樹彦: 霊長類エイズモデル感染病態に関わるウイルスゲノム基盤に関する研究 第 154 回日本獣医学会, 岩手, 2012 年 9 月 14-16 日
62. 岩見真吾, de Boer Rob, 五十嵐樹彦, 三浦智行: 培養細胞実験と数理モデルによるウイルス感染動態の定量化ーウイルス病原性の解明への応用

- 第 60 回日本ウイルス学会、大阪、2012 年 11 月 13-15 日
63. 大附寛幸、一瀬裕太郎、小林剛、原田恵嘉、吉村和久、鳴海哲夫、玉村啓和、松下修三、五十嵐樹彦、三浦智行：中和感受性を増強する薬剤による抗 HIV-1 治療戦略に向けた新規 SHIV/アカゲザル評価モデルの開発 第 60 回日本ウイルス学会、大阪、2012 年 11 月 13-15 日
 64. 米田舞、一瀬裕太郎、大附寛幸、松田健太、松下修三、五十嵐樹彦、三浦智行：サルに順化した CCR5 指向性 SHIV-MK38 の中和抗体に対する抵抗性 第 60 回日本ウイルス学会、大阪、2012 年 11 月 13-15 日
 65. 渡部 祐司、岩見 真吾、西山 由利子、森 ひろみ、三浦 智行、五十嵐 樹彦：高病原性 SHIV 感染サルにおける感染マクロファージの半減期の推定第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012 年 11 月 13 日-15 日
 66. 岩見真吾、Rob de Boer、三浦智行、西村佳哲、五十嵐樹彦：SHIV 感染アカゲザルにおいて病原性を決定づけるウイルス感染動態の探索—数理モデルによるデータ解析の視点から— 第 26 回日本エイズ学会、神奈川、2012 年 11 月 24-26 日
 67. 大附寛幸、一瀬裕太郎、小林剛、五十嵐樹彦、三浦智行：細胞内相同組換えを利用した CCR5 指向性サブタイプ C HIV-1 由来 env を持つサル指向性 HIV-1 の作出 第 26 回日本エイズ学会、神奈川、2012 年 11 月 24-26 日
 68. 中村碧、高原悠佑、松岡佐織、阪脇廣美、三浦智行、五十嵐樹彦、小柳義夫、成瀬妙子、木村彰方、俣野哲朗：サルエイズモデルにおける抗 HIV 薬投与下の CTL 誘導治療ワクチン接種効果の解析 第 26 回日本エイズ学会、神奈川、2012 年 11 月 24-26 日
 69. 廣田雄樹、鳴海哲夫、橋本知恵、吉村和久、原田恵嘉、大附寛幸、三浦智行、五十嵐樹彦、相川春夫、野村渉、松下修三、玉村啓和：HIV 外被タンパク質 gp120 を標的とするインドール型低分子 CD4 ミミックの創製研究 第 26 回日本エイズ学会、神奈川、2012 年 11 月 24-26 日
 70. 五十嵐樹彦：抗 HIV 多剤併用療法に抵抗するウイルスリザーバーの探索—動物モデルからのアプローチ— 第 8 回霊長類医科学フォーラム、筑波、2012 年 11 月 29 日
 71. 米田舞、大附寛幸、一瀬裕太郎、松田健太、松下修三、五十嵐樹彦、三浦智行：新規 CCR5 指向性 SHIV のサルへの順化と中和抵抗性の解析 第 155 回日本獣医学会、東京、2013 年 3 月 28-30 日
 72. Yoshimura K, Harada S, Boonchawalit S, and Matsushita S. Impact of Maraviroc-resistant and low CCR5-adapted mutations induced in vitro passage on sensitivity to anti-Env neutralizing antibodies. 20th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI 2013), Atlanta, U.S.A., 3.3-6, 2013.
 73. Harada S, Boonchawalit S, Narumi T, Tamamura H, Matsushita S, Yoshimura K. CD4 mimic small compounds, NBD-556 and its analogues bind at three amino acid positions in the gp120 CD4 cavity. 20th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI 2013), Atlanta, U.S.A., 3.3-6, 2013.
 74. Harada S, Boonchawalit S, Narumi T, Tamamura H, Matsushita S, Yoshimura K. In vitro induction of twelve CD4 mimic small compounds, NBD-556 and its analogues, resistant variants using primary R5 HIV-1. 13th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, Kumamoto, Japan, Oct.24-26, 2012.
 75. Harada S, Arai H, Narumi T, Tamamura H, Matsushita S, Yoshimura K. In vitro induction of ten CD4 mimic small compounds, NBD-556 and its analogues, resistant variants using primary R5 HIV-1. 19th International AIDS Conference, Washington, D.C., U.S.A., 7.22-28, 2012.
 76. 原田 恵嘉、鳴海 哲夫、玉村 啓和、松下 修三、吉村 和久. R5 臨床分離株を用いた CD4 類似低分子化合物誘導体に対する in vitro 耐性ウイルス誘導. 第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会、神奈川、2012 年 11 月 24 日-11 月 26 日 [O35-165]
 77. 桑田 岳夫、吉村 和久、松下 修三. SIV 感染サルから分離された中和抗体 B404 は V3,V4 ループを含む Env 立体構造を認識する。第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会、神奈川、2012 年 11 月 24 日-11 月 26 日 [O13-062]
 78. 原田 恵嘉、新井 啓之、鳴海 哲夫、玉村 啓和、松下 修三、吉村 和久. R5 臨床分離株を用いた 10 種の CD4 類似低分子化合物に対する in vitro 耐性ウイルス誘導. 第 14 回白馬シンポジウム、京都、2012.6.7-8.
 79. 吉村 和久. CCR5 阻害剤による耐性変異と中和抗体感受性. 第 14 回白馬シンポジウム、京都、2012.6.7-8.

分担研究報告書

NBD 誘導体と中和抗体併用の最適化の研究、中和抗体の作成

分担研究者 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 エンベロープ蛋白 (Env) の CD4 結合部位に作用して Env 三量体構造を変化させ、中和抗体活性を増強する低分子化合物 NBD-556 を同定し、その低毒性誘導体である YYA-021 (NBD-559) について広範囲の臨床分離株に対する有効性の検討を続けている。サブタイプ A、B、C、AE、からそれぞれ代表的な株について、GFP 発現ベクターに組み込んだエンベロープ発現細胞に対する抗体の反応性を検討した。新規に開発した単クローン抗体を加えた解析で、YYA-021 による反応性増強効果を調べたところ、サブタイプ A 及びサブタイプ C では CD4i の 917B11 の結合活性の増強が見られ、サブタイプ B では CD4i と V3 抗体の両方に活性が見られた。一方、6 種類の初感染ウイルス (transmitted/founder virus: T/F virus) を用いた検討では、V3 抗体の 6 種類中 2 種類しか中和できない 1D9 が、YYA-021 の存在下に 4/6 を中和した。また、交差反応性の V3 抗体 16G6 は T/F virus のどれも中和しなかったが、YYA-021 存在下に 3/6 を中和した。YYA-021 が、多くの臨床分離株で中和エピトープを露出させ中和抗体感受性にするという観察は、中和抗体を用いた治療の開発及びワクチン開発に重要な意味を持つと考えられる。

A. 研究目的

HIV-1 の生活感の様々な標的分子を阻害する抗ウイルス療法の開発により、HIV-1 感染症の長期間にわたる発症阻止が可能となった。しかし、残存する感染細胞の排除は困難なため、治療薬の慢性毒性が問題となっている。さらに残存するウイルスやウイルス蛋白による慢性炎症が引き起こす「老化」の促進のため、心血管病やこれまで AIDS と関係ないと考えられてきた癌や肝臓病などによる「早期死亡」が目立つようになった。これらの合併症 (comorbidity) を阻止するためには、HIV の生活環の阻害ばかりでなく、HIV-1 感染細胞や潜伏感染を標的とする新規治療薬の開発が求められている。

我々は、中和抗体の臨床応用に向けた基礎研究の過程で HIV-1、gp120 の CD4 結合部位に作用してエンベロープ蛋白 (Env) 三量体の立体構造を変化させ、中和抗体の反応性及び中和活性を飛躍的に増強する低分子化合物、NBD-556 を同定した。一連の研究で、NBD-556 の誘導体の一つである YYA-021 (NBD-559) がほぼ同等の活性を持ちなが

ら、低い細胞毒性を示すことを見出した。本年度の研究の目的は、これまで JR-FL やサブタイプ B ウイルス株について行ってきた YYA-021 の抗ウイルス効果に関する基礎的研究を拡大し、異なるサブタイプのウイルスや感染初期のウイルス (transmitted/founder virus) を含む広範囲の臨床分離株に対する効果を検討するところにある。

B. 研究方法

N-(4-Chlorophenyl)-N-(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-yl)-oxalamide (NBD-556) の phenyl ring の p-position に methyl group を持つ誘導体 YYA-021 (NBD-559) は、東京医科歯科大学、玉村教授により合成され供給された。YYA-021 の機能的 Env 三量体に対する結合活性の測定は、HIV-1 感染細胞またはエンベロープ導入細胞を用いて FACS 解析により行った。本年度は特に、サブタイプ A、B、C、AE、からそれぞれ 1、4、3、2 株について、GFP 発現ベクターに組み込ん

だエンベロープに対する抗体の反応性を CD4i 抗体または交差反応性の V3 抗体について検討した。また、gp120 単量体に対する単クローン抗体の反応性の増強に関しては、抗 gp120-C5 抗体を用いた gp120-capture ELISA で調べた。抗体サンプルは、我々が開発した抗体パネル及び米国で臨床試験中の抗 V3 中和抗体 KD-247 を用い、YYA-021 との相乗効果の検討をおこなった。ウイルス株としては、NIAID の AIDS research reference reagent program (ARRRP) が供給するサブタイプ B 及び C の臨床ウイルス由来のエンベロープパネル (Standard virus panel of subtype B; SVPB, Standard virus panel of subtype C; SVPC)、さらに ARRRP より供与されたサブタイプ A および AE の envelope construct を用いて pseudovirus panel を作成した。さらに、ARRRP より感染初期のウイルス (transmitted/founder virus : T/F virus) パネルの供与をいただき、これらに対する中和抗体活性並びに YYA-021 の中和増強活性を検討した。

(倫理面への配慮) 本年度の研究は倫理的問題を含まないものである。

C. 研究結果

新規抗 V3 抗体の作成と交差反応性

我々は昨年までの研究で、YYA-021 や NBD-556 の非サブタイプ B に対する交差中和活性の検討を行う上で、CD4i のみを用いる研究では不十分であることを報告した。本年度は、新たにサブタイプ B の感染症例から、3種類の抗 V3 抗体を作成し、これまでの抗体に加えて検討した。1D9, 19F8, 16G6 はいずれも JR-FL の V3 ペプチドに反応する単クローン抗体である。1D9 と 19F8 は、V3 エピトープの Tip 部分である IGPGRA の 315 がアルギニン (R) でなければ反応できない。一方、16G6 は、R315Q の変異を導入した JR-FL ウイルスにも交差反応性を示し、非サブタイプ B ウイルスの V3-tip の特徴である GPGQ モチーフの V3 にも交差反応することが示された。サブタイ

プ B のパネルウイルス (SVPB) を用いた中和試験で、1D9 は 12 個中 7 種類を中和し、サブタイプ B の中で交差中和活性を示す抗体と考えられるのに対し、19F8 はパネルウイルスの 1 種類に中和活性を示すのみの型特異的抗体である。一方、16G6 は 12 個中 3 種類のウイルスを中和するのみであるが、サブタイプの異なるウイルスに対する交差反応性を示す。16G6 は IGHV usage が 5-51*01 であり、これまで Gorny らが報告してきた交差反応性の抗 V3 抗体の仲間と考えられる。

YYA-021 による Env 発現細胞に対する V3 抗体 (16G6) および CD4i 抗体(916B2、917B11)の反応性増強

サブタイプ A、B、C、AE、からそれぞれ 1、4、3、2 株を選定し、GFP 発現ベクターに組み込み ENV は発現ベクターを作成した。作成したエンブ発現ベクターを用いて、293T 細胞をトランスフォームし、樹立した発現細胞を用いて、CD4i 抗体または交差反応性の V3 抗体の反応性を YYA-021 存在下もしくは非存在下に検討した。CD4i 抗体が反応するエピトープは CD4 が gp120 に結合しなければ Env 三量体の内側に隠されていると考えられている。我々が樹立した CD4i 抗体である 916B2、917B11 は、JR-FLwt の env 導入細胞では、FACS による解析で、平均蛍光強度 (MFI) が 18.2 と 18 と反応性は弱いものであった。しかし、rCD4 の存在下では、反応プロフィールの MFI は 112 及び 24 と著明に右へシフトし、細胞表面の蛍光の増強が検出できた。一方、YYA-021 の存在下では、それぞれの MFI は 37.4 及び 32.7 とシフトが見られた。これらの効果に関して、樹立した ENV 発現細胞での検討を用いて検討すると、917B11 の反応性はサブタイプ B (89.6、SF162, YU2) ばかりでなく、サブタイプ A(92UG037.8)、サブタイプ C(SVPC9,SVPC13, SVPC15)でも観察された。一方、サブタイプ AE(93TH966.8)では、明らかではなかった (Fig. 1)。一方、抗 V3 抗体である 16G6 は、サブタイプ B での増強効果は、SF162, YU2, JR-FLwt でみられるものの、89.6、92UG037.8、93TH966.8

には反応しないと考えられた。一方、サブタイプ C(SVPC9,SVPC13, SVPC15)には、YYA-021 非存在下でも良好な反応を示し、増強効果は明らかでない。これらから、YYA-021 は非サブタイプ B ではサブタイプ B とは異なる反応性を示す可能性が考えられる。また、YYA-021 は、rCD4 に比較すると Env 三量体への効果は部分的ではあるものの、抗体によっては同程度に rCD4 をミミックするのではないかと考えられた。

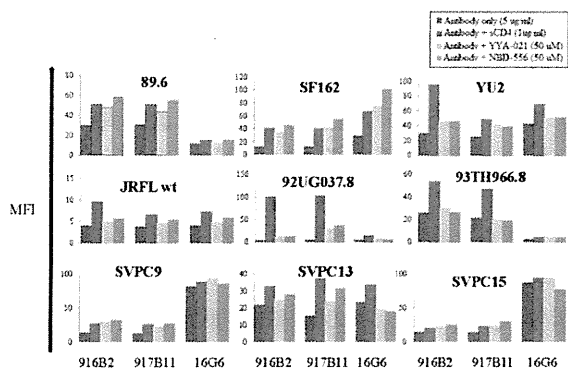


Fig. 1. YYA-021 effect over antibody binding to Env of subtype A,B,C and CRF01_AE

SVPB 及び SVPC パネルウイルスに対する YYA-021 の中和増強効果

異なるサブタイプのウイルスを含む広範囲の臨床分離株に対する YYA-021 の中和増強効果を調べるために、米国 NIAID が供給するサブタイプ B 及び C の標準パネルウイルス (SVPB または SVPC) に対する YYA-021 の抗ウイルス効果を TZM-bl 細胞を用いた Pseudovirus neutralization assay を用いて検討した。昨年度までの検討に加え、5種類の抗 V3 抗体(0.5 γ 、KD-247、717G2b、16G6 および 1D9)、2種類の CD4bs 抗体(49G2 および 82D5)、3種類の CD4i 抗体(4E9C、916B2 および 917B11)について YYA-021 による中和の増強効果を検討した (Table I)。YYA-021 による中和活性の増強は 12種類の SVPB 中 0.5 γ に関しては 9種類、KD-247 に関しては 5種類、717G2b に関しては 6種類、16G6 については 4種類、1D9 については 6種類に観察された。一方、CD4i 抗体に関しては 4E9C では 5種類、916B2 については 2種類、917B11 では 4種類に増強がみられた。CD4bs 抗体については YYA-021 による中和増強は認められな

かった。一方、12種類の SVPC と 2種類の CRF01_AE ウイルスのうち、YYA-021 による中和活性の増強が認められたのは、916B2 では 1種類、917B11 では 2種類であった。抗 V3 抗体で、非サブタイプ B ウイルスに対して中和活性を持つのは 16G6 のみであるが、YYA-021 による増強効果は認められなかった。現在、非サブタイプ B 感染例からの単クローン抗体の樹立中であり、これらを用いた検討が必要である。

Table I. Effect of YYA-021 over the neutralization activity of anti-V3, CD4bs and CD4i antibodies against primary isolates of subtype B

SVPB	0.5 γ	anti-V3												CD4bs						CD4i					
		KD-247		717G2b		16G6		1D9		49G2		82D5		4E9C		916B2		917B11							
		(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)						
5	32.4	32.39	3.87	10.04	4.85	0.46	1.38	0.56	23.34	19.72	2.27	2.17	4	2.3	18.8	0.16	11.46	1.87	17.49	3.22					
6	31	31	17.47	54.8	58.6	44.7	NS	92.1	56.08	7.33	NS	NS	NS	43.3	NS	NS	NS	NS	NS						
8	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS						
11	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS						
12	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS						
13	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS						
14	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS						
15	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS						
16	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS						
17	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS						
18	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS						
19	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS						

初感染ウイルス (transmitted/founder virus: T/F virus) に対する YYA-021 の中和増強効果

本年度はさらに、感染早期に分離され、実際に人から人へ伝播したウイルスと考えられる初感染ウイルス (transmitted/founder virus: T/F virus) に対する YYA-021 の抗ウイルス効果を TZM-bl 細胞を用いた中和試験を用いて検討した。6種類の T/F virus を用いた検討では、V3 抗体の 1D9 は、YYA-021 非存在下には、6種類中 2種類しか中和できないが、YYA-021 存在下には 4/6 を中和した。また、交差反応性の V3 抗体 16G6 は T/F virus のどれも中和しなかったが、YYA-021 存在下に 3/6 を中和した (Table II)。

Table II. Effect of YYA-021 over the neutralization activity of anti-V3 and CD4i antibodies against transmitted/founder virus

Virus	Anti-V3						CD4i					
	16G6		1D9		916B2		917B11		4E9C			
	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)		
pWIFO.c/2474 (SVPB18)	NS (34.5%)	160.1	43.02	19.21	NS	NS	NS	NS	NS	NS		
pC.H058.c/2960	NS	2.39	25.19	0.21	NS	NS	NS	29.23	NS	23.47		
pRHPA.c/2635 (SVPB14)	NS	NS	NS (27%)	NS (35%)	NS	NS	NS	NS	NS	NS		
pRFJO.c/2804 (SVPB16)	NS (25%)	34.77	NS (42%)	11.59	NS	NS	NS	NS (32%)	NS	NS		
pTRJO.c/2851 (SVPB17)	NA	NA	NS (35%)	105.6	NA	NA	NA	NA	NA	NA		
pCHI06.c/2633	NA	NA	NS (18%)	NS	NA	NA	NA	NA	NA	NA		

一方、3種類のCD4i抗体(4E9C、916B2および917B11)は、どのウイルスも中和できないが、YYA-021存在下に4E9Cおよび917B11に中和活性を認めた。このように、YYA-021が、多くの臨床分離株で中和エпитープを露出させ中和抗体感受性にするという観察は、中和抗体を用いた治療の開発及びワクチン開発に重要な意味を持つと考えられる。

霊長類を対象としたPOC試験プロトコル作成および抗体の調整

これまでのin vitroおよびin vivoの研究データをもとに霊長類を対象としたPOC試験プロトコルを作成した。基本的に、KD-247に関して、ヒトを対象にして行っている臨床試験に準じた方法で計画した。五十嵐らの研究により、KD-247に感受性があり、しかもin vitroで、YYA-021の中和増強効果が見られるSHIV KS661を用いて(1×10^4 TCID₅₀) 6頭のアカゲザルに静脈内接種し24時間、8日および15日後に16 mg/kgのKD247および6.25 mg/kgのYYA-021を静脈内投与し、血漿中ウイルスRNA量および末梢血CD4陽性T細胞サブセット数の推移を非投与群サル4頭のそれらパラメータと比較した。結果は、五十嵐の報告に詳しく述べられているが、6頭中5頭のアカゲザルの血漿中ウイルスRNA量が非投与対照群と比較して接種10日後以降統計的に有意な差を以て抑制された。MM540の血漿中ウイルスRNA量は非投与対照群と同等であった。(KD-247は化学及び血清療法研究所より供与いただいた)。

D. 考察

YYA-021はprimary isolatesでもEnv三量体の内部に隠されている中和エпитープを外部に露出させ中和抗体感受性に変えることが観察された。特に、サブタイプBウイルスに関して交差中和活性を持つ0.5 μ gに関しては12種類のパネルウイルスのうち9種類に関して中和増強効果を認めた。また、もともと中和能が弱いかほとんど認められないCD4i抗体について5種類のウイルスで中和活性増強がみられている。今年度の研究

では、初感染ウイルス(T/F virus)に対してもYYA-021の中和増強効果が認められたことは重要な点である。YYA-021非存在下では、中和抵抗性のT/Fウイルスが、YYA-021存在下では、50%以上が中和感受性になった。一方、非サブタイプBウイルスに交差反応するCD4i抗体である916B2、917B11は、15種類のパネルウイルスのうち3種類に関して中和増強効果を認めた。サブタイプB感染例から得られた、交差反応性のある抗V3抗体16G6を用いた解析を行ったが、非サブタイプBに対する中和活性の増強は明らかではなかった。我々は現在、非サブタイプBウイルス感染例より単クローン抗体を樹立であるが、YYA-021の非サブタイプBウイルスに対する効果の判定には、これらの新規抗体を用いた分析が必要と考えられる。

本年度は、これらの結果に加え、抗体によって感染細胞を排除するADCC(antibody mediated cellular cytotoxicity)活性に及ぼすYYA021の効果の検討を行った。HIV-1感染細胞に対するADCC活性の測定は、分離株に関しては可能であったが、臨床株での検討には様々な困難が伴い、(多くの臨床株がADCCの標的細胞であるCEM-NKR細胞に感染しないため)十分な検討に至っていない。我々の抗体パネルの多くが、あるレベルのADCC活性を示す基礎データは得られている。

YYA-021はNBD-556に比較して、抗ウイルス活性は1/2~1/4と劣るが、中和エпитープの露出という意味ではほぼ同等の活性を持ち、細胞毒性は約1/2である。この意味で中和抗体を用いたPOC試験に適した小分子であると考えられるが、臨床応用に向けての課題も明らかとなった。すなわち、これらの解析から中和増強効果はサブタイプBウイルスの50~30%であること、非サブタイプBウイルスでは28%と考えられること、また、細胞毒性は低いものの、10-20 μ Mの高濃度を要することである。これらから、臨床応用に最適な小分子の探索は継続されるべき課題であると考えられる。

E. 結論

YYA-021 は、実験室株ばかりでなく、T/F virus を含む多くの臨床分離株に対して、中和エピトープを露出させる活性を持つことを確認できた。YYA-021 は、レベルや範囲は抗体によって異なるものの、中和抵抗性の臨床分離株を、抗 V3 抗体ばかりでなく CD4i 抗体に対して中和抗体感受性に変えることができる。この意味で中和抗体を用いた POC 試験に適した小分子であると考えられる。これらの観察は中和抗体を用いた治療の開発並びにワクチン開発に重要な意味を持つ。

F. 健康危険情報

(総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

(論文発表)

1. Yokoyama M, Naganawa S, Yoshimura K, Matsushita S, Sato H. Structural Dynamics of HIV-1 Envelope Gp120 Outer Domain with V3 Loop. PLoS ONE 7(5): e37530., 2012.
2. Ong YT, Kirby KA, Hachiya A, Chiang LA, Marchand B, Yoshimura K, Murakami T, Singh K, Matsushita S, Sarafianos SG. Preparation of biological active single-chain variable antibody fragments that target the HIV-1 gp120 v3 loop. Cellular and molecular biology, 58: 71-79, 2012
3. The Mind Exchange Working Group (Antinori A, Arendt G, Grant I, JMatsushita, et al.)Assessment, Diagnosis, and Treatment of HIV-Associated Neurocognitive Disorder: A Consensus Report of the Mind Exchange Program. Clin Infect Dis. 56(7):1004 -17, 2013
4. Nishijima T, Takano M, Ishisaka M, Komatsu H, Gatanaga H, Kikuchi Y, Endo T, Horiba M, Kaneda S, Uchiumi H, Koibuchi T, Naito T, Yoshida M, Tachikawa N, Ueda M, Yokomaku Y, Fujii T, Higasa S, Takada K, Yamamoto M, Matsushita S, Tateyama M, Tanabe Y, Mitsuya H, Oka S, on behalf of the Epzicom-Truvada study team: Abacavir/Lamivudine versus Tenofovir/Emtricitabine with Atazanavir/Ritonavir for Treatment-naive Japanese Patients with HIV-1 Infection: A Randomized Multicenter Trial. Internal Medicine, 52: 735-744, 2013.
5. Harada S, Yoshimura K, Yamaguchi A, Yusa K, Matsushita S. Impact of antiretroviral pressure on selection of primary HIV-1 envelope sequences in vitro. J. Gen. Virol. 94:933-943, 2013.
6. Kuwata T, Takaki K, Yoshimura K, Enomoto I, Wu F, Ourmanov KI, Hirsch VM, Yokoyama M, Sato H, Matsushita S. Conformational Epitope Consisting of the V3 and V4 Loops as a Target for Potent and Broad Neutralization of Simian Immunodeficiency Viruses. J. Virol. 87 : 5424-5346, 2013.
7. Narumi T, Arai H, Yoshimura K, Harada S, Hirota Y, Ohashi N, Hashimoto C, Nomura W, Matsushita S, Tamamura H.: CD4 mimics as HIV entry inhibitors: lead optimization studies of the aromatic substituents. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 21:2518-2526, 2013 .
8. Kuwata T, Takaki K, Enomoto I, Kazuhisa Y, and Matsushita S. Increased infectivity in human cells and resistance to antibody-mediated neutralization by truncation of the SIV gp41 cytoplasmic tail. Frontiers in Microbiology/Virology 4:1-7, 2013.

(学会発表)

1. Harada S., Arai H., Narumi T., Tamamura H., Matsushita S., Yoshimura, K. : In vitro induction of ten CD4 mimic small compounds, NBD-556 and its analogues, resistant variants using primary R5 HIV-1. XIX International AIDS Conference (AIDS 2012), July 22-27, Washington DC, USA.
2. Maruta Y., Ramirez K., Kuwata T., Matsushita S. :Construction and characterization of neutralizing antibody fragments for efficient access to V3 epitope. AIDS Vaccine 2012, September 9-12, 2012, Boston, USA.
3. Kuwata T., Takaki K., Enomoto, E., Matsushita S: Conformational epitope involving V3 and V4 loops is a major target for antibody-mediated neutralization in SIV smH635-infected macaques. 13th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, 2012.10.25-26, Aso, Kumamoto, Japan.
4. Maruta Y., Ramirez K., Kuwata T., Suwa Y., Morioka H., Kuwata T, Matsushita S.: Single-chain variable fragment (scFv) of anti-V3 monoclonal antibody efficiently neutralizes HIV-1 in vitro. 13th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, 2012.10.25-26, Aso, Kumamoto, Japan.
5. Tanaka K., Kuwata T., Maruta Y., Ramirez K., Matsushita S.: Analysis of antibodies to CD4-induced epitope on gp120. 13th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, 2012.10.25-26, Aso, Kumamoto, Japan.
6. Sonoda T., Boonchawalit S., Gatanaga H., Tanaka K., Maruta Y., Ramirez K., Kuwata T., Matsushita S.:Cross subtype neutralizing activity of plasma antibodies from patients infected with HIV-1 CRF01_AE HIV-1. 13th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, 2012.10.25-26, Aso, Kumamoto, Japan.
7. 桑田岳夫、吉村和久、松下修三：SIV感染サルから分離された中和抗体B404はV3,V4ループを含むEnv立体構造を認識する 第26回日本エイズ学会学術集会・総会。2012.11.24-11.26.横浜。
8. 園田貴丈、Samatchaya Boonchawalit、田中和樹、丸田康広、Kristel Ramirez、桑田岳夫、松下修三: CRF01_AE HIV-1感染症例 IgG の交差中和 活性の解析. 第26回日本エイズ学会学術集会・総会. 2012.11.24-11.26. 横浜。
9. 田中和樹、桑田岳夫、丸田泰広、園田貴丈、Kristel Ramirez、松下修三.gp120のCD4-induced epitopeに結合する中和抗体の解析. 第26回日本エイズ学会学術集会・総会。2012.11.24-11.26. 横浜。

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

NBD559 及び NBD 誘導体の作成、NBD 誘導体の最適化の研究

分担研究者 玉村 啓和 東京医科歯科大学生体材料工学研究所教授

研究要旨 NBD-556 や所属研究室で見出した YYA-021 は、HIV 膜タンパク質 gp120 と宿主細胞タンパク質 CD4 の相互作用を標的とする HIV 侵入阻害剤として注目されている。これらの分子は抗 HIV 活性を示し、さらに可溶性 CD4 と同様に gp120 の構造変化を誘起する特性も有していることから、CD4 ミミックと呼ばれている。本研究ではこれら CD4 ミミックのさらなる生物活性の向上を目指し、新規骨格の導入による構造活性相関研究を行った。分子モデリングにより、CD4 ミミックの芳香環部位とオキサミド部位の一部が高い平面性を保ち gp120 と相互作用していることが示唆された。そこで芳香環部位とオキサミド部位に平面構造を付与しつつ構造固定化によるエントロピーの減少を図るためにインドール骨格をデザインし、それらインドール骨格含有化合物群を合成した。また先行研究から生物活性の向上に大きく寄与すると示唆された芳香環パラ位およびメタ位の塩素原子およびフッ素原子の位置とその効果について検討した。また、YYA-021 のラットおよびサルを用いた血中濃度測定および薬物動態解析を行った。

A. 研究目的

AIDS および HIV-1 感染症の治療中断と再開を繰り返す SMART study の失敗から、現在の抗ウイルス薬による治療は一生継続しなければならないものと認識されるようになった (SMART study group, *New Engl. J. Med.*, 355, p2283-2296, 2006)。これらの事実から、HIV 生活環の阻害ばかりでなく、HIV-1 感染細胞や HIV-1 の潜伏感染を標的にする新規治療薬の開発が求められている。

我々は、中和抗体の臨床応用に向けた基礎研究の過程で HIV-1、gp120 の CD4 結合部位に作用して ENV 三量体の立体構造を変化させ、中和抗体の反応性及び中和活性を飛躍的に増強する低分子化合物、NBD-556 を同定し、その基本的性質と効果に焦点を絞って研究してきた (図 1, 2)。NBD-556 は、Env と CD4 分子の相互作用を阻害するため、侵入阻害剤候補として開発された分子である (Zhao Q, et al., *Virology*, 339:213-25, 2005, Schon A, *Biochemistry*, 45:10973-80, 2006) が、有効濃度と細胞毒性の差が小さいため臨床開発は行われてこなかった。我々は、NBD 誘導体を検討し、その一つで

ある YYA-021(NBD-559) (図 3) が NBD-556 とほぼ同等の活性を持ち、細胞毒性が低いことを見出した。本研究班では、さらに多くの誘導体を探索し、より有効な NBD 誘導体を創出することと、このような新しい治療戦略が *in vivo* でも有効性であるかどうか、動物モデルで検証することを目的とした。

研究代表者である松下は、以前から広範囲の分離株を中和する抗体とそのエピトープに関して研究を行い、交差反応性の中和抗体を持つ長期非進行症例から 20 種類の中和抗体パネルを作成してきた。そして、本研究にて、これらの抗体と NBD 誘導体の併用が、どの程度の臨床分離ウイルスに有効かを調べた。我々の、コンセプトは、立体構造変化を起こさせることで、中和抗体の効果を増強させるという、これまでとは異なる発想の戦略であるという点で独創的である。多くの感染者が gp120 単量体に反応する抗体を持っており、ウイルス上の反応エピトープが表出しさえすれば自己のウイルスが中和可能になることや (Decker JM, et al., *J Exp Med*, 201:1407-19, 2005)、中和単クローン抗体 KD-247 の臨床試験が進行中であること (Eda Y,