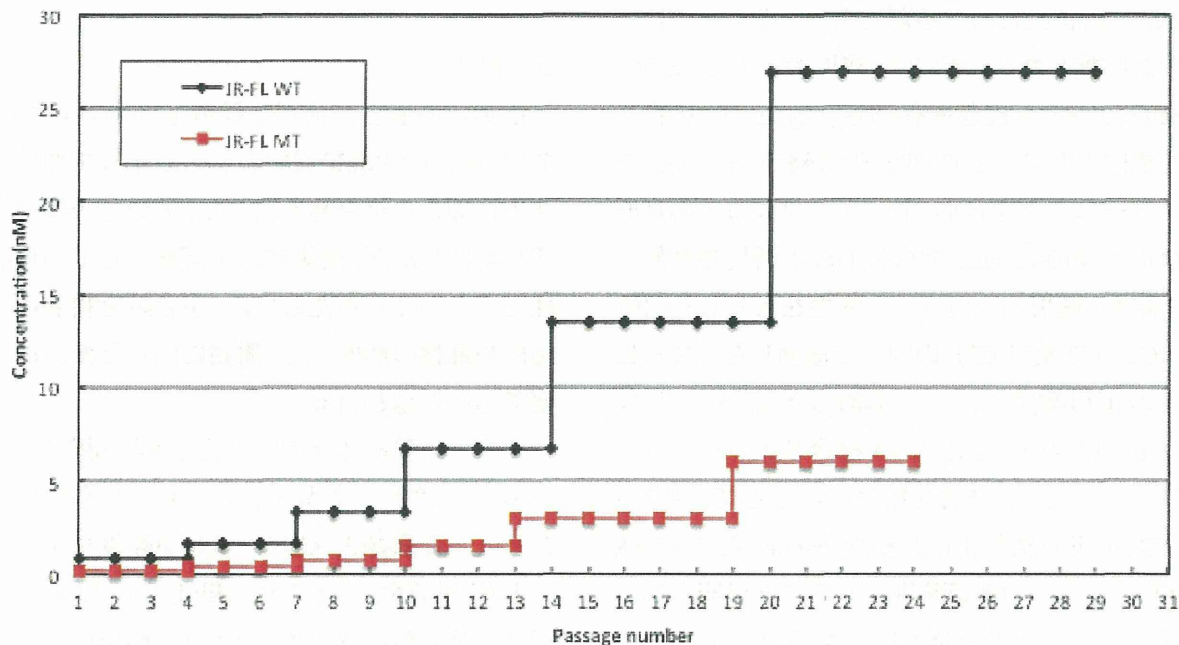


スの継代培養を開始し、徐々に薬剤の濃度を上昇させる実験を開始した。図3にその途中経過を示す。現時点で、*cenicriviroc* および *maraviroc*

の何れの薬剤についても、それぞれの EC_{50} 値の64倍の濃度の存在下においても、ウイルスの増殖が確認されている。

A



B

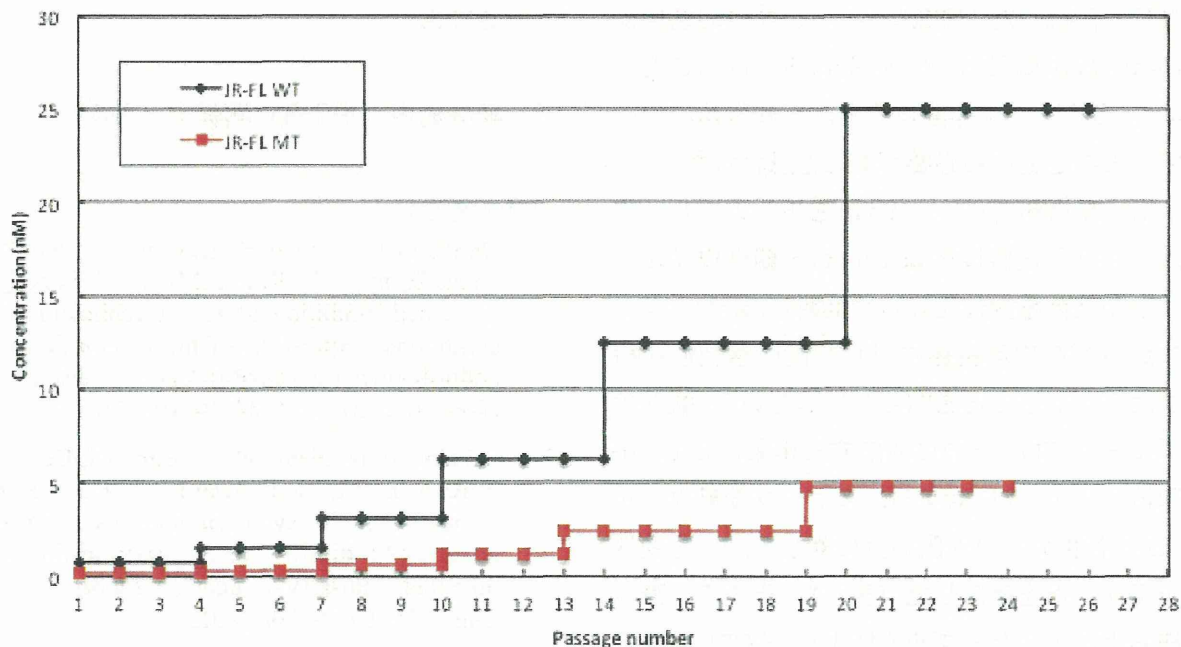


図3. JR-FL 親株 (JR-FL WT) およびエスケープ変異株 (JR-FL MT) の (A) *maraviroc*, (B) *cenicriviroc* 存在下における長期継代培養. ウイルスを MOLT-4/CCR5 細胞に感染させ、 EC_{50} の濃度の薬剤存在下にて4日ごとに継代培養した。細胞にウイルスによるCPEが広がったら、培養上清を採取し、改めて非感染 MOLT-4/CCR5 細胞にその上清中のウイルスを感染させた。その際に薬剤の濃度を2倍に上げて、培養を続けることを繰り返した。

D. 考察

本年度も昨年度に引き続き、個別研究として「HIV の遺伝子発現機構に関与する分子を標的とする新規抗 HIV 薬の開発」を、融合研究として「中和抗体逃避 HIV-1 変異株からの CCR5 阻害薬に対する耐性誘導」をテーマに研究を実施した。前者では、昨年度までに、HIV-1 Tat/TAR RNA 複合体形成時の cyclin T1 の構造を標的として、3,000,000 化合物の *in silico* スクリーニングを行い、ドッキングスコアの良好な化合物の *in vitro* での抗 HIV-1 活性を評価した結果、選択的な抗 HIV-1 活性を有する化合物 (C1, C2 及び C3) の同定に成功した。さらにその作用機序を詳しく検討した結果、C3 は cyclin T1 の Tat/TAR RNA 結合サイトにドッキングし、Tat の結合を阻害することで、HIV-1 LTR の転写活性化に必要な cyclin T1/Tat/TAR RNA 複合体の形成を抑制することが明らかとなった。そこで今年度は C3 をリードとする種々の C3 誘導体について、それらの抗 HIV-1 効果を評価した。残念ながら、いずれの誘導体の抗 HIV-1 効果も、C3 のそれを上回ることがなく (図 2)、来年度はさらなる誘導体について、検討を進める必要があると思われた。

次に融合研究については、松下らのグループが、我々が提供した cenicriviroc 耐性ウイルスの中和抗体感受性を詳しく検討し、耐性ウイルスが各種の中和抗体に対して高い感受性を持つようになることを明らかにしている。我々のグループでは、それに対応する現象として、中和抗体 KD-247 に対するエスケープ変異ウイルスが、各種の CCR5 阻害薬に対して高い感受性を示すことを確認した (表 1)。そこで、野生株およびエスケープ変異株より、CCR5 阻害薬に対する耐性ウイルスの誘導を行うべく、感染細胞の長期継代培養を開始した。現在、多いもので、約 30 代まで継代が進んでおり、各薬剤の EC₅₀ 値の 64 倍の濃度でも、ウイルスの増殖が認められている。そこで、来年度はこれらの

breakthrough ウイルスについて、中和抗体と薬剤に対する感受性を詳しく検討し、当初の目的である KD-247 と CCR5 阻害薬、特に cenicriviroc との併用による、新たな ART の可能性について明らかにしたい。

E. 結論

HIV-1 の遺伝子発現を阻害する薬剤については、慢性潜伏感染細胞からのウイルス増殖を強力に抑える化合物を同定し、その分子機構を明らかにしたが、新規抗エイズ薬としての可能性を明らかにするためには、引き続き構造活性相関や毒性の解明など、開発に向けた検討が必要であると思われる。

一方、中和抗体と CCR5 阻害薬の併用では、*in vitro* における結果ではあるが、中和抗体エスケープ変異株と CCR5 阻害薬耐性ウイルスのどちらの側からみても、野生株と比較して、増殖が強く阻害されることから、臨床的にも新しい ART の選択肢として、その可能性を追求すべきであろう。

F. 研究発表 (本研究に関係するもの)

(論文発表)

1. Okamoto M, Chono H, Kawano Y, Saito N, Tsuda H, Inoue K, Kato I, Mineno J, Baba M. Sustained inhibition of HIV-1 replication by conditional expression of the *E. coli*-derived endoribonuclease MazF in CD4⁺ T cells. *Hum. Gene. Ther. Methods* **24**: 94-103 (2013).
2. Sakakibara N, Hamasaki T, Baba M, Demizu Y, Kurihara M, Irie K, Iwai M, Asada E, Kato Y, Maruyama T. Synthesis and evaluation of novel 3-(3,5-dimethylbenzyl)uracil analogs as potential anti-HIV-1 agents. *Bioorg. Med. Chem.* **21**: 5900-5906 (2013).
3. Iijima K, Okudaira N, Tamura M, Doi A, Saito Y, Shimura M, Goto M, Matsunaga A, Kawamura YI, Otsubo T, Dohi T, Hoshino S, Kano S, Hagiwara S, Tanuma J, Gatanaga H, Baba M, Iguchi T, Yanagida M, Oka S, Okamura T, Ishizaka Y. Viral protein R of human immunodeficiency virus type-1

- induces retrotransposition of long interspersed element-1. *Retrovirology* **10**: 83, (2013).
4. Raina S, Chande AG, Baba M, Mukhopadhyaya R. A reporter based single step assay for evaluation of inhibitors targeting HIV-1 Rev-RRE interaction. *Indian J. Virol.* **25**: 101-106 (2014).
 5. Toyama M, Aoyama H, Mukai R, Nakamura M, Yoshimura K, Okamoto M, Ohshima T, Hashimoto Y, Baba M. A novel tetramethyl-naphthalene derivative selectively inhibits adult T-cell leukemia (ATL) cells in vitro. *Anticancer Res.* **34**: 1771-1778 (2014).
- (学会発表)
1. Okamoto M, Hidaka A, Hamasaki T, Toyama M, Baba M. Galectin-3 promotes HIV-1 expression in latently infected cells through NF- κ B activation. *26th International Conference on Antiviral Research*, May 12, 2013, San Francisco, USA.
 2. Toyama M, Takiguchi J, Aoyama H, Yoshimura K, Nakamura M, Hashimoto K, Baba M. A novel tetrahydrotetramethylbenzophenanthridinone derivative inhibits ATL cell proliferation. *16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and related viruses*, June 29, 2013, Montreal, Canada.
 3. Baba M. Discovery and development of novel antiretrovirals: from compound screening to clinical trials. *14th Kumamoto AIDS Seminar*, October 30, 2013, Kumamoto, Japan.
 4. Baba M. Investigations of novel antiretrovirals: from discovery of compounds to their clinical trials. *International Symposium on Prevention and Control of Viral Diseases*, December 12, 2013, Daejeon, South Korea.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
今年度は特になし。

薬剤による変異性獲得の機序と薬剤抵抗性の研究

研究分担者：松岡雅雄 京都大学ウイルス研究所 教授

研究要旨

HIVの感染経路は、細胞外環境中に存在するウイルス粒子が標的細胞に感染するcell-free感染系と、感染細胞と非感染細胞間の物理的接触によりウイルスが伝播するcell-to-cell感染系に大別される。従来より、抗ウイルス薬の活性は主にcell-free感染系で評価されてきたが、近年、HIV感染における感染経路の重要性が指摘され、抗ウイルス薬感受性への影響も着目されつつある。本研究課題では、cell-free感染系とcell-to-cell感染系を区別して抗ウイルス薬の活性が評価可能な系を確立し、様々な抗HIV薬の活性を評価した。その結果、評価に供した抗HIV薬全般でcell-to-cell感染系での活性低下が認められた。

A. 研究目的

ヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus: HIV) は、CD4陽性T細胞の枯渇により後天性免疫不全症候群 (acquired immunodeficiency syndrome: AIDS) を引き起こす。現在では、複数の抗HIV薬を組み合わせて服用する抗レトロウイルス療法の確立により、AIDSは制御可能な慢性疾患に変貌してきた。しかしながら、感染者体内からウイルスを完全に排除することは不可能であり、終生にわたる服薬の必要がある。これは主に、ウイルスが持続感染した休止期リンパ球がウイルスリザーバーとして存在するためである。これらの細胞は、抗HIV療法下においても間欠的にウイルスを産生し、検出限界以下のウイルス血症を引き起こすことが知られている。

HIVが標的細胞に感染する経路には、細胞外環境中に拡散するウイルス粒子が関与するcell-free感染様式と、ウイルス感染細胞と非感染細胞との間での物理的ウイルス伝播によるcell-to-cell感染様式が存在する。従来より、cell-free感染系に比べて、cell-to-cell感染系での感染効率の高さが報告されていたが、近年の解析により、cell-to-cell感染系では単位標的細胞あたりに伝達されるウイルス量がcell-free感染系より格段に多いことが示された。このように、HIV感染における感染経路の重要性が指摘されてきているが、抗ウイルス薬感受性への影響についてはあまり解析されていない。そこで本研究課題では、cell-free感染とcell-to-cell感染を厳密に区別して抗ウイルス薬の活性を評価することを目的とした。

B. 研究方法

(1) 評価系の構築

抗ウイルス薬の評価には、pNL4-3ベースの組み換えウイルスであるpNL-BFPを用いた。本ウイルスは、nef遺伝子の前に青色蛍光タンパク (blue fluorescent protein: BFP) 遺伝子をI

RES配列を介して導入 (BFP-IRES-nef) したレポーターHIVである。Cell-free感染系では、本クローンから得られた組み換えHIVを標的細胞であるMT-4細胞に感染させ、48時間後にフローサイトメトリーで感染細胞数の割合をBFPを指標に定量した。Cell-to-cell感染系では、Jurkat細胞にpNL-BFPを遺伝子導入し、昼夜培養後、予め蛍光色素 (eFluor670もしくはCFSE) で標識したMT-4細胞と共培養し、6時間後にHIV-1 Gag transferを抗Gag抗体を用いた細胞内染色により得られた蛍光シグナルを指標に、30時間後にHIV-1 transmissionをBFPを指標に、それぞれMT-4細胞における陽性率をフローサイトメトリーで定量した。

(2) 抗ウイルス薬の活性評価

上記で樹立した評価系を用いて、種々の抗HIV薬の活性を感染経路別に評価した。評価に供した抗HIV薬は、吸着阻害剤 (DS5000)、侵入阻害剤 (FC131およびTF14016)、融合阻害剤 (T-20、SC34およびSC34EK)、逆転写酵素阻害剤 (AZT、ABC、TDF、NVPおよびEFV)、インテグラーゼ阻害剤 (RAL、EVGおよびDTG) であり、評価の指標としてEC₅₀値を用いた

(倫理面への配慮)

基礎的研究であり、該当しない。

C. 研究結果

(1) HIV-1 Gag transfer

Cell-to-cell感染系において共培養6時間後に観察されるHIV-1負荷Jurkat細胞からMT-4細胞へのGag伝達を、各種抗HIV-1薬存在下で解析した。その結果、逆転写酵素阻害剤であるTDFやインテグラーゼ阻害剤であるRALでは高濃度においても標的細胞におけるGag陽性率に変化は与えなかった。一方、融合阻害剤であるT-20や、侵入阻害剤であるCXCR4拮抗剤FC131処理により、Gag陽性率は減少した。しかしながら、両薬剤ともさらに濃度を増加させても陽性率の減少は約50%にとどまった。

(2) Cell-to-cell感染に対する抗HIV薬の効果
 Cell-to-cell感染系において共培養30時間後に観察されるHIV-1負荷Jurkat細胞からMT-4細胞へのHIV-1伝播に対する各種抗HIV薬による影響を、BFP陽性率を指標に解析した。得られた結果をcell-free感染系での活性値と比較した。その結果、すべての薬剤でEC₅₀値で約2~20倍程度、cell-to-cell感染系での低活性が認められた。また、特筆すべきことに、この現象はインテグラーゼ阻害剤で顕著であった。Cell-free感染をほぼ完全に抑制する高濃度のインテグラーゼ阻害剤の存在下においても、cell-to-cell感染系におけるMT-4細胞でのBFP陽性率は約3割残存した。さらにこのBFPシグナルの蛍光強度を解析した結果、インテグラーゼ阻害剤処理により、弱いBFPシグナルが確認された。

D. 考察

HIV-1 Gag transferにおいては、膜融合段階以前のステップを阻害する薬剤処理によりGag transferが阻害されたことから、これらの経路が必須であることが判明した。しかしながら、膜融合 (T-20) およびケモカイン (FC131) に作用する薬剤を別々に高濃度で処理しても完全にGag transferが抑制されなかったことから、これらの経路のうち、片方があればtransferが起こる (代償性) 可能性、あるいは全く別の経路が関与している可能性が考えられた。

一方、cell-to-cell感染でのHIV-1 transmissionにおいて、抗HIV薬の低感受性が評価に用いたすべての薬剤で認められた。これはHIV-1の感染拡大におけるcell-to-cell感染系の有利性が、複製効率の面からだけでなく、抗ウイルス薬の圧力から逃れる意味でも有益であることが示された。

インテグラーゼ阻害剤によりインテグレーションが阻害されると、非組み込み環状DNAが副産物として産生されることが知られており、いくつかのウイルス遺伝子が環状DNAから産生されることが報告されている。従って、今回の研究で認められたインテグラーゼ阻害剤により残存する弱いBFPシグナルは、インテグレーション阻害により生成した非組み込み環状ウイルスDNAに由来すると推測された。

E. 結論

Cell-free感染系に比べて、cell-to-cell感染系では単位細胞あたりに伝播するウイルス量の多さが特徴の一つとして報告されている。本研究から、cell-to-cell感染系では抗ウイルス薬の活性が十分発揮されないことが明らかになったことから、このcell-to-cell感染の特徴が抗ウイルス薬に対する抵抗性としても機能していると考えられた。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Shimane K, Kawaji K, Miyamoto F, Oishi S, Watanabe K, Sakagami Y, Fujii N, Shimura K, Matsuoka M, Kaku M, Sarafianos SG, Kodama EN. HIV-1 resistance mechanism to an electrostatically constrained peptide fusion inhibitor that is active against T-20-resistant strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 57 (8) :4035-8, 2013.
2. Mizuhara T, Kato T, Hirai A, Kurihara H, Shimada Y, Taniguchi M, Maeta H, Togami H, Shimura K, Matsuoka M, Okazaki S, Takeuchi T, Ohno H, Oishi S, Fujii N. Structure-activity relationship study of phenylpyrazole derivatives as a novel class of anti-HIV agents. *Bioorg Med Chem Lett.* 23 (16) :4557-61, 2013.
3. Sato K, Misawa N, Iwami S, Satou Y, Matsuoka M, Ishizaka Y, Ito M, Aihara K, An DS, Koyanagi Y. HIV-1 Vpr accelerates viral replication during acute infection by exploitation of proliferating CD4+ T cells in vivo. *PLoS Pathog.* 9 (12) :e1003812, 2013.
4. Miura M, Yasunaga J, Tanabe J, Sugata K, Zhao T, Ma G, Miyazato P, Ohshima K, Kaneko A, Watanabe A, Saito A, Akari H, Matsuoka M. Characterization of simian T-cell leukemia virus type 1 in naturally infected Japanese macaques as a model of HTLV-1 infection. *Retrovirology.* 10:118, 2013.
5. Togami H, Shimura K, Okamoto M, Yoshikawa R, Miyazawa T, Matsuoka M. Comprehensive in vitro analysis of simian retrovirus type 4 susceptibility to antiretroviral agents. *J Virol.* 87 (8) :4322-9, 2013.
6. Izumi K, Kawaji K, Miyamoto F, Shimane K, Shimura K, Sakagami Y, Hattori T, Watanabe K, Oishi S, Fujii N, Matsuoka M, Kaku M, Sarafianos SG, Kodama EN. Mechanism of resistance to S138A substituted enfuvirtide and its application to peptide design. *Int J Biochem Cell Biol.* 45 (4) :908-15, 2013.

2. 学会発表

1. 志村和也、大石真也、藤井信孝、松岡雅雄：抗ウイルス薬感受性に対するHIV感染経路の影響. 第27回日本エイズ学会学術

集会: 2013年11月20-22日、熊本

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

特許出願: ピラゾール誘導体またはその塩ならびにそれらを含む医薬組成物、松岡雅雄外3名 (特願 2013-092023) .

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

中和抵抗性の解明と中和抗体を用いた併用療法に関する基礎研究

研究分担者 松下修三 熊本大学エイズ学研究センター 教授

研究要旨:我々は、中和抗体に対するウイルスの中和抵抗性の解明に基づき、新たな併用療法に関する基礎研究を行っている。具体的には、中和抵抗性を克服するための組み換え抗体の作成や新規抗体の開発、さらに CCR5 阻害剤との併用に関する基礎研究である。中和抗体と CCR5 阻害薬の併用による、新たなエイズ治療の可能性を探ることを目的として、CCR5 阻害薬 cenicriviroc (CVC) への抵抗性と種々の中和抗体に対する感受性との相関を検討した。HIV-1 臨床株 KKwt は V3, CD4i, CD4bs を標的とする抗体に中和抵抗性であったが、CVC 耐性株 KK₆₅₂₋₆₇ は全ての抗体に対し感受性であった。KK₆₅₂₋₆₇ を抗 V3 抗体 1C10、抗 CD4i 抗体 4E9C 存在下で継代して得られた KK_{652-67/1C10-7}、KK_{652-67/4E9C-11} は、それぞれの中和抗体へ耐性となったが、CVC に対する感受性が親株 KKwt と同程度に回復した。中和抗体への抵抗性と CVC 感受性の回復には、CCR5 と相互作用する V3-C3 領域の変異が重要であった。これらの結果は、中和抗体への抵抗性と CCR5 阻害薬に対する耐性が両立し難いことを示しており、中和抗体と CCR5 阻害薬の併用による、新たな治療法開発の可能性を示唆する。

A. 研究目的

ウイルスの生活環に作用する抗ウイルス薬を組み合わせる多剤併用療法 (combination antiretroviral therapy ; cART) の導入により、エイズ患者の予後を著しく改善された。一方、cART は一生継続する必要がある、薬剤耐性ウイルスの出現や「老化」と関連した慢性合併症など、新たな問題点も明らかとなり、新たな治療法の開発が望まれている

我々は、中和抗体に対するウイルスの中和抵抗性の解明に基づき、中和抗体を用いた新たな併用療法に関する基礎研究を行っている。具体的には、中和抵抗性を克服するための組み換え抗体の作成や非サブタイプ B 感染例からの新規抗体の開発、さらに CCR5 阻害剤などとの併用療法に関する基礎研究である。

本研究班の分担研究者である馬場らは、既存の薬剤とは異なるステップを阻害する薬剤として、世界で最初に低分子 CCR5 阻害薬 TAK-779 を同定し、これが強い抗 HIV-1 効果を持つことを報告した (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 5698-5703, 1999)。その後、TAK-779 誘導体で、より効果の強い TAK-652 を同定し、米国の製薬企業により、cenicriviroc (TBR-652, CVC) として第 IIb 相臨床試験が行われた。また、馬場らは CVC に対する薬剤耐性 HIV-1 を分離した (*Antimicrob. Agents Chemother.* **51**: 707-715, 2007)。

一方、我々は、治療への応用を目指した抗 HIV-1 単クローン抗体の作成を行ってきた。その中でも HIV-1 臨床分離株に対して強い中和活性を示した KD-247 (*J. Virol.* **80**:5552-5562, 2006) は、米国での第 I 相臨床試験が終了し、HIV-1 感染患者での血漿ウイルス量

の減少が確認された。また、KD-247 に対して中和抵抗性を示すエスケープ変異株が、ある種の CCR5 阻害薬に対して高感受性を示すことを報告した (*AIDS* **20**:2065-2073, 2006)。

本年度の研究としては、中和抵抗性を克服するための組み換え抗体の研究として、2 種類

の抗 V3 抗体から作成した single chain variable fragment (scFv) が、吸着後中和によって広範な中和活性を示すデータが得られた。また、CCR5 阻害薬に関する研究成果と、中和抗体に関する研究成果の融合研究として Env 発現クローン作製による詳細な中和抗体感受性の解析を行い、CVC 耐性と中和抗体感受性との関係を調べた。さらに、組換えウイルスの作製により、CVC と中和抗体感受性に関わる Env のアミノ酸残基の同定を行った。融合研究の進展が著しいことから、これに重点を置いて報告する。

B. 研究方法

ウイルス： HIV-1 の臨床分離株である KKwt と、KK より誘導された CVC 耐性株 KK₆₅₂₋₆₇、及び、コントロール継代株 KK_{C-67} は、分担研究者の馬場 (鹿児島大学) より分与された。ウイルスの増殖には PM1/CCR5 細胞を用い、培養上清をウイルスストックとして -80°C にて保存した。

中和抗体： 抗 V3 抗体、KD247, 1C10, 5G2, 抗 CD4 binding site (CD4bs) 抗体 49G2, 抗 CD4-induced (CD4i) 抗体 4E9C 等の中和抗体は、Protein A カラムで精製し、-80°C にて保存した。

薬剤： CCR5 阻害薬、TAK-779, CVC, TAK-220 は武田薬品工業から分与された。TAK-779 は蒸留水で、それ以外の薬剤は DMSO に 20 mM の濃度で融解し、-80°C にて保存した。

抗 HIV-1 アッセイ： 中和抗体および薬剤

の抗 HIV-1 効果は、TZM-bl 細胞におけるウイルス増殖を調べることにより判定した。具体的には、96 穴マイクロプレートに種々の濃度の抗体または薬剤と 200 TCID₅₀ のウイルスを加え、抗体は 1 時間 incubation 後、薬剤は直ちに TZM-bl 細胞細胞を 1×10^4 cells/well で播種した。48 時間後に培養上清を除去し、PBS にて洗浄後、細胞を溶解し、ウイルスの増殖の程度を luciferase assay system (Promega) を用いて定量した。

中和抗体抵抗性株の誘導： 96 穴マイクロプレートを用いて 5,000 TCID₅₀ の CVC 耐性株 KK₆₅₂₋₆₇ と抗 V3 抗体 1C10、または抗 CD4i 抗体 4E9C を混合して 30 分 incubation し、 1×10^4 cells PM1/CCR5 細胞を加えて、さらに 5 時間培養した。PBS にて洗浄後、細胞を培養フラスコに移して 1 週間培養し、培養上清と細胞を回収して -80°C に保存した。この培養上清の一部とより高い濃度の抗体を用いて継代を繰り返し、中和抗体抵抗性の変異株を誘導した。

HIV-1 Env のクローニング： 各ウイルス株に感染した細胞から DNA を抽出し、PCR により env 遺伝子を増幅して発現ベクターにクローニングした。また、これらの Env の組換え体や点変異株を作製した。これらの Env 発現プラスミドと Env 欠損 HIV-1 プロウイルス・プラスミド pSG3ΔEnv の 293T 細胞へのトランスフェクションによって各ウイルス株の Env をもったシュードウイルスを作製し、中和抗体や CCR5 阻害薬への感受性試験に使用した。

(倫理面への配慮について)

本年度の研究では、実験室で使用されている細胞株およびウイルスを用いて実施しており、個人が特定出来るようなヒトのサンプルは用いていない。

C. 研究結果

CVC 耐性ウイルスのクローンは中和抗体に対して感受性が高い： 昨年度の報告では、ポリクローナルな CVC 耐性ウイルスが種々の中和抗体に対して高感受性であることを示した。本年度は、親株 KKwt と CVC 耐性ウイルス KK₆₅₂₋₆₇ から Env クローンを作製してシュードウイルスによる中和試験を行い、クローン・レベルでの抗体感受性の解析を行った。

その結果、親株 KKwt から作製した 5 クローンのシュードウイルスは低濃度の

な感染性ウイルス、実線はシュードウイルス・クローンの結果を示す。

CVC により増殖が完全に阻害されるのに対し、CVC 耐性株 KK₆₅₂₋₆₇ から作製した 5 クローンのシュードウイルスは、1 クローンを除いて CVC への耐性を示した (図 1)。

V3 をエピトープとする 1C10 抗体を用いた中和試験の結果、KKwt の全 5 クローンが抵抗性であったが、KK₆₅₂₋₆₇ の全 5 クローンは感受性であり、ポリクローナルなウイルス株と同様の傾向を示した。CD4i, CD4bs に対する抗体、4E9C, 49G2 には、KKwt の 5 クローン中 2 クローンが抵抗性であり、ポリクローナルなウイルス株には感受性のウイルスも含まれていることが示された。KK₆₅₂₋₆₇ の全 5 クローンは 4E9C, 49G2 に高感受性であった。

これらの結果は、クローン・レベルでも CVC 耐性ウイルスが種々の抗体に感受性になっていることを示している。

中和抗体への抵抗性の獲得によって CVC への感受性が回復する： 抗体に対して感受性であった CVC 耐性株 KK₆₅₂₋₆₇ を中和抗体 1C10 (V3), 又は 4E9C (CD4i) 存在下で継代し、それぞれの抗体に抵抗性の KK₆₅₂₋₆₇/1C10-7 及び KK₆₅₂₋₆₇/4E9C-11 を得た (図 2)。1C10 抵抗性株から作製したシュードウイルス 5 クローンのうち、3 クローンは 1C10 に感受性で、2 クローンは抵抗性であり、元の感染性ウイルスに感受性株と抵抗性株が混在していることが分かった。フローサイトメトリーによる解析により、抵抗性の 2 クローンは 1C10 に全く結合しないことが示された。4E9C 抵抗性株は、1C10 抵抗性株よりも遺伝的に均一な集団で、得られたクローンのほとんどが同じ塩基配列をもち、感染性のシュードウイルスは 2 種類だけであった。この 2 クローンは、

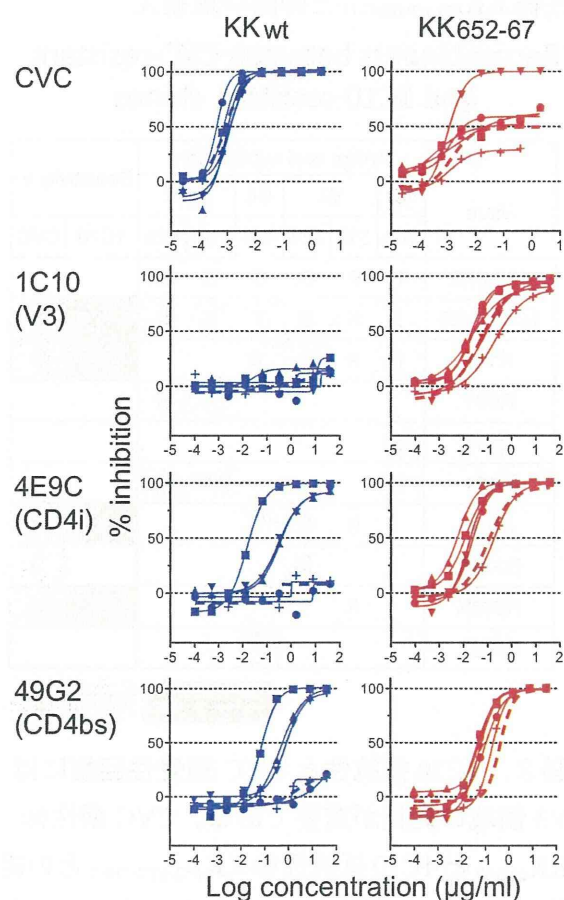


図 1. 親株 KKwt 及び CVC 耐性株 KK₆₅₂₋₆₇ 由来の Env を発現するシュードウイルスは種々の抗体に対して感受性である。単クローン抗体 1C10 (V3), 4E9C (CD4i), 49G2 (CD4bs) による中和活性を TZM-bl 細胞への感染により評価した。破線はポリクローナル

元の感染性ウイルスと同様に 4E9C 抵抗性であった。

注目すべきことに、CVC 耐性株 KK_{652-67} から誘導した 2 種類の中和抗体抵抗性株は KK_{wt} と同程度に CVC に感受性であった(図 2)。また、この CVC 感受性の回復は、抗体への感受性に関係なく、中和抗体抵抗性株から得られた全てのクローンで確認された。この結果は、V3 や CD4i を標的とする中和抗体からの逃避変異が、CVC 感受性を回復させることを示しており、中和抗体への抵抗性と

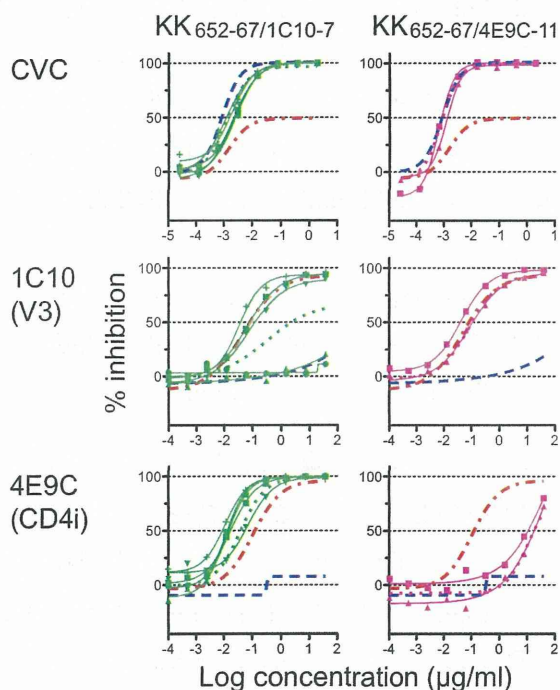


図 2. CVC 耐性株 KK_{652-67} から誘導した中和抗体 1C10 及び 4E9C 抵抗性株株 ($KK_{652-67/1C10-7}$, $KK_{652-67/4E9C-11}$)は CVC 感受性を回復していた。CVC 及び中和抗体 1C10, 4E9C による中和活性を TZM-bl 細胞への感染により評価した。破線(KK_{wt})、一点鎖線(KK_{652-67})、点線($KK_{652-67/1C10-7}$, 又は $KK_{652-67/4E9C-11}$)はポリクローナルな感染性ウイルス、実線はシュードウイルス・クローンの結果を示す。CVC 感受性が相関していることを示唆して

いる。

CVC 耐性と中和抗体抵抗性に重要な変異の同定: CVC 耐性株 KK_{652-67} と 1C10 抵抗性株 $KK_{652-67/1C10-7}$ の *env* 遺伝子を組換えた変異株を作製し、その 1C10 抵抗性と CVC 感受性の回復に関わる領域を特定した。その結果、V3 領域の R315K 及び G324R の変異が重要であることが示された(図 3)。これらの変異のうち、1C10 からの逃避には R315K、CVC 感受性回復には G324R が主要な役割を果たしていた。

同様に、CVC 耐性株 KK_{652-67} と 4E9C 抵抗性株 $KK_{652-67/4E9C-11}$ との間の組換え

Recombinants between CVC-resistant and 1C10-resistant clones

Virus	Amino acid substitution						Sensitivity to		
	V2		V3		C4		gp41	1C10	CVC
	163	315	324	446	735	828			
652-67C	T	R	G	S	E	R			
1C10-7#89	I	K	R	T	K	K	R	S	
R116	I	K	R	T			R	S	
R661					K	K			
R166	I								
R161	I				K	K			
R616		K	R	T			R	S	
G324R			R					S	
R315K		K					R	S	
S446T				T					

Resistant Sensitive

図 3. 1C10 抵抗性と CVC 感受性回復には V3 領域の変異が重要である。CVC 耐性株 KK_{652-67} と 1C10 抵抗性株 $KK_{652-67/1C10-7}$ との組換え Env を作製し、シュードウイルスの中和試験によって CVC と 1C10 への感受性を評価した。1C10 抵抗性株クローンのアミノ酸置換と 1C10 抵抗性、CVC 感受性を示した。体を作製し、その 4E9C 抵抗性と CVC 感受性の回復に関わる領域を特定した。その結果、V3 領域の G324R と C3 領域の E381K の 2 つ

の変異が 4E9C からの逃避と CVC 感受性回復に重要であることが示された (図 4)。

これらの逃避変異のうち、G324R は 1C10 と 4E9C の両方の逃避で観察されたことから、中和抗体からの逃避と CVC への感受性回復のメカニズムにおいて大きな役割を果たしている可能性が示唆された。

Recombinants between CVC-resistant and 4E9C-resistant clones

Virus	Amino acid substitution					Sensitivity to	
	V2	V3	C3	gp41		4E9C	CVC
	163	324	381	615	775		
652-67C	T	G	E	S	L		
4E9C-11	I	R	K	N	F	R	S
R446	I	R	K			R	S
R664				N	F		
R166	I						
R464	I			N	F	R	
R646		R	K			R	S
G324R		R					S
E381K			K			R	S

Resistant
Sensitive

図 4. 4E9C 抵抗性と CVC 感受性回復には V3/C3 領域の変異が重要である。CVC 耐性株 KK₆₅₂₋₆₇ と 4E9C 抵抗性株 KK_{652-67/4E9C-11} との組換え Env を作製し、シュードウイルスの中和試験によって CVC と 4E9C への感受性を評価した。4E9C 抵抗性株クローンのアミノ酸置換と 4E9C 抵抗性、CVC 感受性を示した。

D. 考察

本報告では、CCR5 阻害薬である CVC に耐性をもつ HIV-1 変異株が様々なエピトープを標的とする抗体に感受性であることを示し、さらに、中和抗体からの逃避によって、

CVC への感受性が回復することをあきらかにした。この結果は、HIV-1 の Env 構造を変化させて抗体の標的となる領域を露出させることが、CVC 存在下での増殖に有利に働くことを示唆している。本報告で用いた中和抗体は、HIV-1 のコレセプターである CCR5 との結合に重要な V3, CD4i を標的としており、これらの領域を露出することで CCR5 との結合効率を上昇させて CVC へ耐性となっている可能性がある。逆に、中和抗体からの逃避のためには V3, CD4i 領域を Env 三量体内部に隠す必要があり、CCR5 との結合効率が低下して CVC に感受性となっていると考えられる。

CVC 耐性株と中和抗体抵抗性株との組換え体を用いた解析の結果、抗 V3 抗体 1C10 抵抗性株では V3 の R315K と G324R, 4E9C 抵抗性株では V3 の G324R と C3 の E381K が重要であることが示された。これらの変異は、いずれも CCR5 結合領域の変異であり、アミノ酸変異レベルでも中和抗体への耐性獲得と CVC 感受性の回復が強く相関していることが示された。特に、G324R は両方の抵抗性株でみられたことから、CVC 感受性回復の鍵となる役割を果たしていると考えられた。今後、このアミノ酸置換が Env 構造に与える影響を解析し、CVC 感受性のメカニズムを解明していきたい。

今回得られた結果は、中和抗体への抵抗性と CCR5 阻害薬に対する耐性が両立し難いことを示しており、中和抗体と CCR5 阻害薬の併用による、新たな ART の可能性を示唆している。これは、本研究班の大きな目標の 1 つとして掲げている、免疫機構と抗ウイルス薬を組み合わせた新規治療法の可能性を示すものである。今後も、中和抗体と CCR5 阻害薬の併用効果をあきらかにし、新たな抗ウイルス併用療法を目指す。

E. 結論

- ・CVC 耐性株は種々のエピトープを標的とする抗体に対し感受性が高く、これらの抗体で容易に中和された。
- ・V3 及び CD4i 抗体からの逃避によって CVC 耐性株が CVC 感受性に回復する。
- ・CCR5 と相互作用する V3-C3 領域のアミノ酸置換が中和抗体からの逃避と CVC 感受性の回復に重要である。
- ・これらの結果は、中和抗体への抵抗性と CCR5 阻害薬に対する耐性が両立し難いことを示しており、中和抗体と CCR5 阻害薬の併用による、新たな ART の可能性を示唆している。

F. 研究発表

(論文発表)

1. Hashimoto, C., Narumi, T., Otsuki, H., Hirota, Y., Arai, H., Yoshimura, K., Harada, S., Ohashi, N., Nomura, W., Miura, T., Igarashi, T., Matsushita, S., Tamamura, H. A CD4 mimic as an HIV entry inhibitor: Pharmacokinetics. *Bioorg. Med. Chem.* 21: 7884-7889, 2013.
2. Otsuki, H., Hishiki, T., Miura, T., Hashimoto, C., Narumi, T., Tamamura, H., Yoshimura, K., Matsushita, S., Igarashi, T. Generation of a replication-competent simian-human immunodeficiency virus, the neutralization sensitivity of which can be enhanced in the presence of a small-molecule CD4 mimic. *J. Gen. Virol.* 94: 2710-2716, 2013.
3. Nishijima, T., Takano, M., Ishisaka, M., Komatsu, H., Gatanaga, H., Kikuchi, Y., Endo, T., Horiba, M., Kaneda, S., Uchiyama, 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.

4. 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.
5. Kuwata, T., Takaki, K., Yoshimura, K., Enomoto, I., Wu, F., Ourmanov, K.I., Hirsch, V.M., 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.
6. 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.
7. Kuwata, T., Takaki, K., Enomoto, I., Kazuhisa, Y., 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. Mind Exchange Working Group (Antinori A, Arendt G, Grant I, Letendre S, Matsushita S, et al.). Assessment, Diagnosis, and Treatment of HIV-Associated Neurocognitive Disorder: A Consensus Report of the Mind Exchange Program. *Clin. Infect. Dis.* 56:1004 -1017, 2013.

(学会発表)

1. Matsushita S, Yoshimura K, Maeda T, Murakami T. KD-1002 Principal Investigators and The Protocol Team of Quintiles. Passive transfer of neutralizing monoclonal antibody KD-247 reduces plasma viral load in patients chronically infected with HIV-1: a phase-1b clinical study of a humanized monoclonal antibody KD-247 (KD-1002). 7th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention (IAS 2013) 30 June -3 July 2013, Kuala Lumpur,

- Malaysia.
2. Matsushita S. Passive transfer of neutralizing monoclonal antibody KD-247 reduces plasma viral load in patients chronically infected with HIV-1 : A Phase-1b clinical study of a humanized monoclonal antibody KD-247 (KD-1002). IAS Towards an HIV Cure Symposium. 29th-30th June 2013, Kuala Lumpur, Malaysia.
 3. Kuwata T, Takaki K, Yoshimura K, Enomoto I, Wu F, Ourmanov I, Hirsch VM, Yokoyama M, Sato H, Matsushita S. Analysis of Env regions important for binding and resistance to B404, a potent neutralizing antibody against SIV. AIDS Vaccine 2013. 7-10 October 2013. Barcelona, Spain.
 4. Ramirez K, Kuwata T, Maruta Y, Tanaka K, Alam M, Rahman K, Kawanami Y, Enomoto I, Tamamura H, Yoshimura K, Matsushita S. Improving the brodality and potency of neutralizing anti-HIV-1 antibodies with a CD4 mimetic compound. AIDS Vaccine 2013. 7-10 October 2013. Barcelona, Spain.
 5. Kuwata T, Takaki K, Yoshimura K, Enomoto I, Wu F, Ourmanov I, Hirsch VM, Yokoyama M, Sato H, Matsushita S. Identification of the Env region responsible for the resistance to B404, a potent neutralizing antibody against SIV. 14th Kumamoto AIDS Seminar. 29-31 October 2013, Kumamoto.
 6. Ramirez K, Kuwata T, Maruta Y, Tanaka K, Alam M, Rahman K, Egami Y, Kawanami Y, Enomoto I, Tamamura H, Yoshimura K, Matsushita S. Can antibodies contribute to controlling infection with transmitted/founder virus? 14th Kumamoto AIDS Seminar. 29-31 October 2013, Kumamoto.
 7. Tanaka K, Kuwata T, Maruta Y, Ramirez K, Kawanami Y, Enomoto I, Matsushita S. Miniaturization of antibodies against CD4-induced epitope on gp120. 14th Kumamoto AIDS Seminar. 29-31 October 2013, Kumamoto.
 8. Maruta Y, Kuwata T, Tanaka K, Nakahara Y, Ramirez K, Alam M, Egami Y, Suwa Y, Morioka H, Matsushita S. Post-attachment neutralization as a mechanism of efficient activities of scFv from anti-V3 monoclonal antibody. 14th Kumamoto AIDS Seminar. 29-31 October 2013, Kumamoto.
 9. Alam M, Kuwata T, Ramirez K, Enomoto I, Maruta Y, Tanaka K, Rahman K, Egami Y, Kawanami Y, Murayama H, Shimura K, Matsuoka M, Matsushita S. Effects of Enfuvirtide resistant mutations on the sensitivity to neutralizing antibodies. 14th Kumamoto AIDS Seminar. 29-31 October 2013, Kumamoto.
 10. 松下修三, 大類 論, Post F, Winston J, Hendry B, Gazzard B, Molina J, Liu HC, Piontkowsky D, Cheng AK, Rhee MS, Szwarcberg J. EVG/COBI/FTC/TDF 第 III 相臨床試験における腎機能に関連する安全性の評価(投与 96 週時点) -アジア人についての層別集計結果を含む-. 第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2013 年 11 月 20 日-22 日, 熊本.
 11. 桑田岳夫. シンポジウム 6 -中和抗体と抗 CCR5 阻害薬(Env). 第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2013 年 11 月 20 日-22 日, 熊本.
 12. Ramirez K, Kuwata T, Maruta Y, Tanaka K, Alam M, Kawanami Y, Enomoto I, Tamamura H, Yoshimura K, Matsushita S. Combination of anti-V3 antibodies as a possible strategy for controllingtransmitted/founder virus. 第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2013 年 11 月 20 日-22 日, 熊本.
 13. 丸田泰広, 桑田岳夫, 田中和樹, Ramirez K, Alam M, 江上由華, 中原悠介, 諏訪喜昭, 森岡弘志, 松下修三. 抗 V3 抗体の小型化による CD4 結合後の HIV-1 中和活性の増進. 第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2013 年 11 月 20 日-22 日, 熊本.
 14. Alam M, Kuwata T, Ramirez K, Enomoto I, Maruta Y, Tanaka K, Rahman K, Egami Y, Kawanami Y, Murayama H, Shimura K, Matsuoka M, Matsushita S. Enfuvirtide resistant mutation N43Dis associated with the enhancedneutralization by 10E8, a broadlyneutralizing antibody against gp41

MPER. 第27回日本エイズ学会学術集会・総会. 2013年11月20日-22日, 熊本.

15. 田中和樹, 桑田岳夫, 丸田泰広, Ramirez K, 松下修三. gp120 の CD4-induced epitope に結合する中和抗体の小型化とその特性の検討. 第27回日本エイズ学会学術集会・総会. 2013年11月20日-22日, 熊本.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

HIV-1 薬剤耐性発現機序の解明と薬剤耐性に対する強力な抗 HIV 阻害剤の研究開発

研究分担者 中田 浩智 熊本大学医学部附属病院感染免疫診療部 講師
研究協力者 天野 将之 熊本大学医学部附属病院血液内科 研究員(特任助教)

研究要旨

HIV-1 感染症・AIDS 治療に対する多剤併用療法は一定の効果を上げているが、治療の長期化が薬剤耐性株の出現や薬剤の副作用の問題をより深刻なものとしており、新規の作用機序を有する薬剤や薬剤耐性株に有効な薬剤の開発は常なる課題となっている。本研究は HIV-1 が耐性を発現しにくい薬剤・発現しても他薬剤との交差耐性を有しない新規のプロテアーゼ阻害剤 (PI) や、新しい機序から HIV-1 の感染・複製を阻止する阻害剤の開発及びその基礎となるウイルス学・酵素学・細胞生物学・薬理学・結晶解析学的な基礎研究を目的として行った。その結果、oxatricyclic 構造を有する新規 HIV-1 PI, GRL-0519 を同定し、強力な抗 HIV 活性(IC₅₀: 0.5~0.7 nM)、耐性発現の遅延について報告した (Amano, Mitsuya, *AAC*. 2013)。更に cyclohexyl-bis-THF という新たな構造を有する新規 PI, GRL-0739 や、複数の高度多剤耐性臨床分離株に対して抗ウイルス活性を高度に維持する強力な新規 PI, GRL-09510 を同定し、これらの化合物の詳細な検討を行った。また、新規の作用機序を有する薬剤としては、HIV Capsid 領域 (CA) の特定の領域に結合する薬剤を docking simulation の手法により同定し、3 化合物が実際に HIV-1 CA の著明な自己崩壊を誘導する事を証明した (Amano, Mitsuya, 投稿準備中)。このような作用を有する化合物は現在までに報告が無く、全く新しい HIV-1 増殖阻害機序と考えられる。

A. 研究目的

研究分担者は熊本大学満屋教授の下、AIDS に対する治療法の研究開発を続けている。本研究では米国研究グループと共同開発したユニークな構造を有する複数の新規 HIV-1 PI について、抗 HIV 活性や耐性発現について前臨床的なデータの確認を行った。同時に構造モデリングの手法を用い、これらの薬剤の作用発現機序について検討するなどの基礎研究も行った。また、新規の作用機序を有する薬剤として、研究協力者らが見出した HIV-1 の構造蛋白である Gag Capsid 領域 (CA) の特定部位にアミノ酸挿入変異が入る事で、CA の異常な自己崩壊が生じ、変異ウイルスが増殖不能になるという現象 (Amano, Mitsuya, 投稿準備中) を基に、そのような CA の特定部位近傍の蛋白表面に結合しうる低分子化合物を同定することで、HIV-1 の CA の自己崩壊を誘導する薬剤の開発を目標として研究を行った。

B. 研究方法

①野生株及び多剤耐性株に対する抗 HIV 活性は *in vitro* のアッセイシステム(MTT

アッセイ、p24 アッセイ等)を用いて検討した。

②試験管内での薬剤耐性 HIV-1 株の誘導は、低濃度の薬剤存在下で野生型 HIV-1 を感染させた MT2 細胞を培養し、継代を重ねながら薬剤濃度を徐々に増加させ、最終的に高濃度の薬剤存在下でも増殖可能な HIV-1 株を誘導した。

③構造モデリングは Maestro version 9.3 (Schrödinger 社)を用い、HIV プロテアーゼと薬剤との相互作用について検討した。

④*in silico* flexible docking simulation の手法により HIV-1 CA の特定の cavity に結合する低分子化合物を同定し、それらの化合物について、抗 HIV 活性を調べた。

(倫理面への配慮)

当該研究は試験管内での細胞及び HIV-1 実験室株を用いた研究となっており、現時点では倫理面に問題はないと考えられる。Volunteers からの PBMC 採取のための採血については考えられる副作用の危険性について十分な説明を行い、承諾が得られた後に行った。

C. 研究結果

当該年度において研究分担者らは、oxatricyclic 構造を有する新規 HIV-1 PI, GRL-0519 を米国研究グループと共同開発、同化合物は野生株および高度多剤耐性株に対して非常に強力な抗 HIV 活性を発揮、試験管内耐性誘導では HIV-1 の同化合物に対する耐性獲得は著しく遅延することを明らかにした。また構造解析により、GRL-0519 の強力な抗 HIV 活性の機序として、2つの THF 構造が HIV-1 プロテアーゼ (PR) 活性中心部位のアミノ酸主鎖と強固に結合する事に加え、3つ目の THF 環が PR の主要アミノ酸群と複数の相互作用を有する事を確認しこれを報告した (Amano, Mitsuya, *AAC*. 2013)。更に cyclohexyl-*bis*-THF という新たな構造を有する新規 PI, GRL-0739 を同定し、同化合物の詳細な検討を行った (Amano, Mitsuya, 投稿準備中)。また複数の高度多剤耐性臨床分離株に対して抗ウイルス活性が完全に維持される (臨床分離野生株に対する活性値と同等)、強力な新規 PI である GRL-09510 (図 1) を新たに同定し、同化合物への HIV の耐性誘導を含めた評価検討を行った (Amano, Nakata, 投稿準備中)。

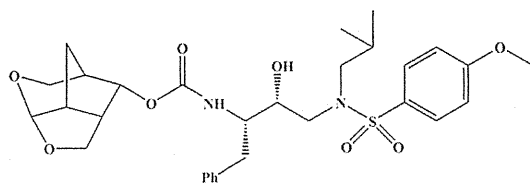


図 1.新規に合成した GRL-09510 の構造

CA の自己崩壊を誘導する薬剤の開発については、CA の特定部位近傍の蛋白表面に低分子化合物が結合し得る十分な空間を有する疎水性 cavity を同定、8,555,483 個の化合物の構造データを用いて、*in silico* flexible docking simulation の手法により各化合物の CA 上の標的 cavity との結合スコアを算定、スコアのよい化合物に関しては実際に輸入購入し、試験管内での抗 HIV-1 活性の評価を行った。その結果、40 種類の抗 HIV-1 活性を有する新たな化合物群を同定しており、そのうち 3 化合物が実際に HIV-1 CA の著明な自己崩壊を誘導

する事を証明した (Amano, Mitsuya, 投稿準備中)。

D. 考察

本研究で同定された 3 つの新規 PIs はいずれも *in vitro* で強力な抗 HIV 活性と良好な耐性プロファイルを有しており、今後はヒト PBMC 移植マウスなどを用いた *in vivo* の系での活性を検討し、臨床試験につながる基礎データの蓄積を図る方針である。一方、CA の自己崩壊誘導低分子化合物は、これまでに報告のない全く新しい作用機序の薬剤であり、既存の薬剤と交叉耐性がなく、ウイルスの蛋白のみを標的とした副作用の少ない薬剤の開発が期待される。しかしながら、現時点では薬剤の抗 HIV 活性は既存の薬剤に比べ弱いため、今後はこれら化合物をリードとして合成展開を行うことで最適化を進めていく。また、本手法は他のウイルス蛋白と結合する低分子化合物の同定にも応用できるため、更なる新規作用機序の薬剤開発も期待される。

E. 結論

本研究では新規 PI 及び CA 崩壊誘導薬について、基礎的な生物学的活性を明らかにするとともに、その効果発現機序についても検討を行った。現在同定されている薬剤の *in vivo* での研究データの蓄積や、構造モデリングの手法を用いた最適化により、臨床試験への橋渡しとなる研究を進めて行く。

G. 研究発表

論文発表

1. Maeda K, Desai D, Aoki M, Nakata H, Kodama E, Mitsuya H. Delayed emergence of HIV-1 variants resistant to 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine: comparative sequential passage study with lamivudine, tenofovir, emtricitabine and BMS-986001, *Antivir Ther.* 19(2): 179-89, 2014
2. Matsuzawa T, Kawamura T, Ogawa Y, Nakata H, Maeda K, Moriishi K, Koyanagi Y, Gatanaga H, Shimada S, Mitsuya H. 4'-Ethynyl-2-Fluoro-2'-Deoxyadenosine, an HIV-1 Reverse

- Blocks HIV-1 ex vivo Infection of Langerhans Cells within Epithelium, *Journal of Investigative Dermatology*, 134(4):1158-61, 2014
3. Pedro Miguel Salcedo Gómez, Masayuki Amano, Sofiya Yashchuk, Akira Mizuno, Debananda Das, Arun K. Ghosh, and Hiroaki Mitsuya. GRL-04810 and GRL-05010, Difluoride-Containing Nonpeptidic HIV-1 Protease Inhibitors (PIs) That Inhibit the Replication of Multi-PI-Resistant HIV-1 In Vitro and Possess Favorable Lipophilicity That May Allow Blood-Brain Barrier Penetration. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013. 57(12):6110-6121.
 4. Taura M, Kariya R, Kudo E, Goto H, Iwawaki T, Amano M, Ann Suico M, Kai H, Mitsuya H, Okada S. Comparative analysis of ER stress response into HIV protease inhibitors: Lopinavir but not Darunavir induces potent ER stress response via ROS/JNK pathway. *Free Radic Biol Med.* 2013. 65C:778-788.
 5. Arun K. Ghosh, Garth L. Parham, Cuthbert D. Martyr, Prasanth R. Nyalapatla, Heather L. Osswald, Johnson Agniswamy, Yuan-Fang Wang, Masayuki Amano, Irene T. Weber, and Hiroaki Mitsuya. Highly Potent HIV - 1 Protease Inhibitors with Novel Tricyclic P2 Ligands: Design, Synthesis, and Protein-Ligand X - ray Studies. *J Med Chem.* 2013. 56(17):6792-802.
 6. Masayuki Amano, Yasushi Tojo, Pedro Miguel Salcedo-Gómez, Joseph Richard Campbell, Debananda Das, Manabu Aoki, Chun-Xiao Xu, Kalapala Venkateswara Rao, Arun K. Ghosh, and Hiroaki Mitsuya. GRL-0519, A Novel Oxatricyclic-Ligand-Containing Nonpeptidic HIV-1 Protease Inhibitor (PI), Potently Suppresses The Replication of a Wide Spectrum of Multi-PI-Resistant HIV-1 Variants In Vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013. 57:2036-2046.
- 候群(IRIS)で治療に難渋した2症例、2013年11月20日、第27回日本エイズ学会学術集会(熊本)
2. 天野将之、満屋裕明、HIV-1 Capsid 蛋白(CA)の挿入変異がもたらすCA自己崩壊の分子機構の解明およびCA阻害活性を有する低分子化合物の検索・同定、2013年11月22日、第27回日本エイズ学会学術集会(熊本)
 3. 天野将之、満屋裕明、高い中枢神経系(CNS)移行性と強力な抗HIV-1活性を有する新規HIV関連神経認知障害(HAND)予防/治療薬の開発、2014年5月8日、第24回抗ウイルス療法研究会総会(山梨)

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

学会発表

1. 中田浩智、満屋裕明、非MACの非定型抗酸菌感染による免疫再構築症

NK 細胞による HIV の認識と免疫逃避変異の認識に与える影響に関する研究

研究分担者 前仲勝実 北海道大学大学院薬学研究院 教授

研究要旨 ヒトナチュラルキラー(NK)細胞受容体 Killer cell Ig-like receptor (KIR)群は、細胞傷害性 T 細胞(CTL)にも発現し、主要組織適合性抗原(MHC)であるヒト白血球抗原(HLA)分子を認識することでウイルス感染に対する防御機構を制御している。抑制型 KIR 群はこれらの細胞の不活性化する機能を有する。そこで、本研究では、各種の HLA 分子に結合する HIV 由来ペプチドの同定を網羅的解析により行い、その KIR 群に対する親和性を検証する。これにより KIR 群を制御できる効果的な HIV ペプチド候補を開発することを目指している。本年度は、昨年度 HLA-Cw12 に提示される HIV 由来ペプチドスクリーニングにより同定された新規ペプチドについて、実際に提示されているか質量分析法により確認を行った。また、実際に細胞内でペプチド断片化されて HLA-Cw12 に提示される HIV 由来ペプチドの同定を行うためのスクリーニング系の確立に向けた条件検討を行った。

A. 研究目的

ヒトNK細胞や細胞傷害性T細胞(CTL)に発現する細胞表面受容体Killer cell Ig-like receptor (KIR)群はHLAを認識し、ウイルス感染を防御するNK細胞やCTLの制御に関与すると考えられている。これまでに、HIV-1由来ペプチドの変異が抑制型KIR群の活性を高め、NK細胞やCTLの活性を強く抑え、免疫不全を引き起こすと考えている。CTLだけではないHIVの新規の免疫逃避機構として提唱した (AIDS 2009)。本研究では、結合モチーフ情報を基にHIVゲノム配列から候補ペプチドを同定・合成を行い、HLA分子に提示されるかどうかを実験的に検証する。さらに、提示される場合には、実際にペプチドを提示したHLA分子を用いて抑制型および活性型のKIR群に対する親和性を網羅的に検証することにより、KIR群を適切に制御できる効果的なHIVペプチドワクチ

ン候補分子を見いだすことを目的とする。

B. 研究方法

昨年度 HIV 由来ペプチドライブラリーから同定した新規の HLA-Cw12 提示ペプチドについて、スケールを拡大して調製し、質量分析法により、実際に調製した HLA-Cw12 にペプチドが結合しているか確認した。また、細胞内でペプチド断片化されて HLA-Cw12 に提示される HIV 由来ペプチドの同定を行うために、HEK293 細胞に HLA-Cw12、ヒトβ2m、HIV 由来遺伝子をそれぞれ導入することによって、HLA-Cw12 分子を分泌発現させ、質量分析法によって提示されたペプチドを同定するスクリーニング系の確立を目指した。

(倫理面での配慮)

基礎的研究であり該当しない。

C. 研究結果

昨年度 HLA-Cw12 結合モデルペプチドを用いて、微量巻き戻し法による網羅的スクリーニングを行い同定した 8 種のペプチドのうち、巻き戻しスケールを拡大し、精製後に質量分析法によって目的のペプチド結合の有無を確認したところ、実際に提示されていたのは 1 種類のみだった。KIR との結合能があるにも関わらず、ペプチド結合が認められなかったペプチド 3 種類に関しては、ペプチドを合成しなおして再実験する必要があると考えている。

また、HEK293 細胞を用いた実際に細胞内で消化され、HLA-Cw12 に提示されるペプチド同定スクリーニング法の確立に向けて、まず、HEK293 細胞での HLA-Cw12 分泌発現の系を確立した。その結果、HEK293 細胞に、HLA-Cw12 のみ遺伝子導入した場合には分泌発現せず、ヒトβ2m を一緒に導入した場合のみ HLA-Cw12 の分泌発現が認められた。分泌発現系が確立したため、次に、HIV 由来ペプチドを同定するために、HIV 各遺伝子断片 (Env については膜貫通領域を除く) をクローニングし、HLA-Cw12、ヒトβ2m、HIV 遺伝子をすべて HEK293 細胞に導入した。分泌発現した HLA-Cw12 の一部はヒトβ2m、ペプチドと会合していない重鎖のみで存在していたため、構造を認識する W6/32 モノクローナル抗体を用いてペプチドを提示している HLA-Cw12 のみを精製し、質量分析法によりペプチド同定を試みた。その結果、所属研究院にある質量分析器での同定にはタンパク量が不足しており、同定には至らなかったが、組換え蛋白質を用いた標準実験で同定に必要な蛋白質量を見積もることができた。今

後は、HEK293 細胞の培養スケールを拡大し、精製タンパク質量を増やすことで、同定を目指す。

D. 考察

昨年度スクリーニングすることによって得られた HIV 由来 HLA-Cw12 結合ペプチド 8 種類のうち、KIR と結合したものは 4 種類だったが、今回質量分析法により実際に結合を確認できたものは 1 種類のみだった。この 1 種類については、今後立体構造解析も行う予定である。残る 3 種類については、ペプチドの劣化も考えられるため、再度検討する予定である。また、実際に細胞内でペプチド断片化されて HLA-Cw12 に提示される HIV 由来ペプチドの同定を行うための系の確立に向けて、HEK293 細胞を用いた HLA-Cw12 の分泌発現を行うことで、ペプチドを同定できる目途が立った。今後、調製スケールを拡大し、実際にどのようなペプチドが提示されているか、その中に HIV 由来のペプチドが含まれているか検討する予定である。

E. 結論

- (1) HLA-Cw12 の巻き戻し-ゲル濾過クロマトグラフィーペプチドスクリーニング法により同定されたペプチドのうち、1 種類について、実際に提示されていることを確認できた。
- (2) 細胞内消化により HLA-Cw12 に提示されるペプチド同定法の確立に向けて、HEK293 細胞での分泌発現-W6/32 抗体による精製-質量分析法によるペプチド同定のスクリーニング系確立の目途が立った。

G. 研究発表

1.論文発表

1. Structural analysis for glycolipid recognition by the C-type lectins Mincle and MCL. Furukawa A, Kamishikiryo J, Mori D, Toyonaga K, Okabe Y, Toji A, Kanda R, Miyake Y, Ose T, Yamasaki S, Maenaka K.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Oct 22; 110(43): 17438-43.

2.学会発表

1. 渡邊洋介、黒木喜美子、小柳円、滝口雅文、前仲勝実

HIV 由来ペプチドライブラリーを用いた HLA-Cw12 拘束性免疫制御ペプチドの同定. 第 36 回日本分子生物学会. 神戸. 2013 年 12 月 5 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し