

効率の低下が認められたことから、ABP は HIV-1 吸着・侵入過程に影響をおよぼす宿主因子である可能性が示唆された (図 1)。

また、ABP 発現抑制 T 細胞株の細胞膜表面上の CD4 および CXCR4 分子の発現量は、正常細胞と比較して差異は認められなかったことから、ABP は HIV-1 吸着・侵入過程に特異的に影響をおよぼしている可能性が考えられる。また、ABP 発現抑制 T 細胞株への HIV-1 侵入後に起こるウイルス cDNA 合成効率が顕著に低下していることから、ABP の HIV-1 感染制御作用機序として吸着・侵入過程から逆転写過程で影響をおよぼしている可能性が考えられる (図 2)。更には、ABP 発現抑制 T 細胞株における HIV-1 感染増殖伝播効率が著しく低下していたことから (図 3)、ABP の HIV-1 感染制御メカニズムを詳細に解析することで、新たな HIV-1 感染制御法および治療法につながる可能性が高いと考えられる。

もう 1 つの HIV-1 感染制御候補因子: ICP については、ICP 発現抑制レベルの異なる T 細胞株を 4 種樹立 (ICP-shRNA#1-4) し、HIV-1 感染実験 (single-round infection) を行ったところ、ICP 発現抑制効率が低下するに従い HIV-1 感染効率も低下することから、ICP は HIV-1 感染制御因子である可能性が示唆された (図 4)。また感染実験の結果より、ICP は、HIV-1 吸着・侵入経路に依存せず、細胞侵入以降の HIV-1 感染効率に影響をおよぼす可能性が考えられる (図 4)。

E. 結論

本年度は、ゲノムワイドスクリーニング法により見出された HIV-1 感染制御宿主候補因子群の中で、HIV-1 吸着・侵入過程に影響をおよぼす可能性が考えられる細胞膜近傍に局在している宿主候補因子 2 種 (ABP および ICP) について、HIV-1 感染効率に影響を与える宿主因子であることを明らかにした。特に ABP は、HIV-1 吸着・侵入過程から逆転写過程にかけて影響をおよぼす感染制御因子であることが強く示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sugiyama R., Abe M., Nishitsuji H., Murakami Y., **Takeuchi H.**, and Takaku H. Induction of heat-shock protein 70 by prostaglandin A1 inhibits HIV-1 Vif-mediated

degradation of APOBEC3G. *Antiviral Research* 99(3):307-11. 2013.

- 2) Hori T*., **Takeuchi H.***§, Saito H., Sakuma R., Inagaki Y and Yamaoka S§. A carboxy-terminally truncated human CPSF6 lacking residues encoded by exon 6 inhibits HIV-1 cDNA synthesis and promotes capsid disassembly. *Journal of Virology* 87(13):7726-36. 2013.

* These authors contributed equally to this article

§ Corresponding author

2. 学会発表

- 1) 武内 寛明、山岡 昇司. 機能遺伝子発現抑制 T 細胞ライブラリーから同定した新規 HIV 感染制御因子の解析. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年、神戸.
- 2) 武内 寛明、山岡 昇司. 機能遺伝子発現抑制 T 細胞ライブラリーから同定した新規 HIV 感染必須因子の解析. 第 27 回日本エイズ学会学術集会、2013 年、熊本.

G. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

Env 変異と細胞融合能の変化に関する研究

研究分担者 細谷 紀彰 東京大学医科学研究所 感染症国際研究センター 特任助教

研究要旨

HIV の細胞への吸着およびそれに引き続いておこる膜融合は感染の第一ステップであり、ウイルスライフサイクルに必須のステップである。また、細胞指向性の解析は CCR5 阻害薬の服薬前診断としても重要である。しかし、この細胞指向性および細胞膜融合を迅速に感度よくハイスループットで解析することはこれまで困難であった。本研究では HIV の細胞融合能の変化を解析するために細胞膜融合と二重分割タンパク質 (Dual split protein: DSP) を用いた新規細胞膜融合の検出系 (DSP-Pheno assay) の樹立と DSP-Pheno assay の応用可能範囲の検索を目的とした。その結果、この DSP-Pheno assay を用いて HIV 実験室株および HIV 感染者の血漿から env 遺伝子を増幅し、細胞膜融合および細胞指向性が測定可能であることを明らかにした。さらにこの DSP-Pheno assay を用いて膜融合阻害薬 (CCR5 阻害薬 Maraviroc、CXCR4 阻害薬 AMD3100)、Env タンパク質に対する中和抗体などを用いて、薬剤・抗体への感受性が評価可能であることを明らかにした。

A. 研究目的

HIV-1 は感染に CD4 と CCR5 を必要とする R5 指向性ウイルス (R5)、CD4 と CXCR4 を必要とする X4 指向性ウイルス (X4)、および CD4 と CCR5・CXCR4 のどちらも使用可能な両指向性ウイルス (Dual) に大別される。抗 HIV 薬として臨床現場で使用されている抗 CCR5 阻害薬 (Maraviroc : MVC) は R5 ウイルスの増殖を特異的に抑制するため、服薬前の細胞指向性試験が必須である。細胞指向性の決定系は Env 組換えウイルスを作製する Phenotype 試験 (PTA) と、V3 遺伝子から細胞指向性を予測する Genotype 試験 (GTA) が行われているが、PTA は煩雑で時間がかかる。一方、GAT は迅速な反面アルゴリズムにより正確に細胞指向性を予測することが難しい。そこで我々は細胞融合と二重分割タンパク質 (Dual Split Protein: DSP) を用いた迅速簡便な PTA の作製を行った。この細胞膜融合の検出系を DSP-Pheno assay と呼び、阻害薬や中和抗体の感受性などについて評価可能であるかを HIV 実験株および臨床分離株を用いて調べることを目的とした。

B. 研究方法

DSP タンパク質は蛍光緑色タンパク質 (GFP) とルシフェラーゼ (RL) をどちらも分割し、両タンパク質の N 末端側を融合タンパク質とした DSP₁₋₇ と両 C 末端側を融合させた DSP₈₋₁₁ から構成される。どちらも単独では活性を持たないが

DSP₁₋₇ と DSP₈₋₁₁ が会合する事で活性が復活する。そこで HIV-1 レセプター発現細胞として神経膠腫由来で CD4 と CCR5 を発現する NP2 細胞 (N4R5)、CD4 と CXCR4 を発現する NP2 細胞 (N4X4) の培養細胞株を使用し、レンチウイルスベクターを用いて DSP₁₋₇ 遺伝子を細胞に導入し DSP₁₋₇ 恒常発現細胞株 (N4R5-DSP₁₋₇, N4X4-DSP₁₋₇) をクローニングにより樹立した。また、Env タンパク質発現細胞として 293FT 細胞に DSP₈₋₁₁ 遺伝子、HIV-1 env 遺伝子および遺伝子導入マーカーとして mOrange 蛍光タンパク質を同時発現可能な発現ベクター (pRE11) を構築した。

HIV 実験株として X4 指向性である NL4-3、LAI、HXB2、R5 指向性である BaL、JR-FL、YU2、Dual 指向性である SF2 を用いて Env 発現プラスミド (pRE11-NL4-3, pRE11-LAI, pRE11-HXB2, pRE11-BaL, pRE11-JR-FL, pRE11-YU2, pRE11-YU2, pRE11-SF2) を構築した。Env 発現プラスミドを 293FT 細胞に Fugene6 (Promega 社) を用いて Transfection を行い、2 日後に細胞を懸濁し、N4R5-DSP₁₋₇, N4X4-DSP₁₋₇ と共培養を行い、6 時間後に蛍光顕微鏡にて GFP の蛍光シグナルを、細胞の破壊を必要としない膜透過性のルシフェラーゼ基質 Enduren (Promega 社) を加えた後 90 分後にルミノメーターにてルシフェラーゼを測定した。

CXCR4 阻害薬として AMD3100、CCR5 阻害薬

として Maraviroc、Fusion 阻害薬として T20、中和抗体として 4E10、C2G12、B12、2F5 を用いて DSP-Pheno assay で阻害効果が見られるかを調べた。AMD3100、Maraviroc、T20 は N4R5-DSP₁₋₇、N4X4-DSP₁₋₇ に添加し 90 分反応させた後に Env 発現細胞と共培養を行なった。各中和抗体は Env 発現細胞に加え 60 分後にレセプター発現細胞と共培養をおこなった。

また HIV 感染者の血漿からウイルス RNA を抽出し、逆転写反応および Nested-PCR により env 遺伝子を増幅し、プライマーに付加した制酵酵素により HIV 感染者由来 Env タンパク質発現プラスミドを作製した。

(倫理面への配慮)

使用した臨床検体はインフォームドコンセントを取得し、研究に同意を得られた検体を使用した。また、提供者の個人情報は個人情報保護法に基づき管理をおこなっている。研究内容は東京大学医科学研究所倫理審査委員会により認証されている。遺伝子組み換え生物等を用いる実験については、文部科学大臣の確認認証および東京大学医科学研究所の機関認証されている。

C. 研究結果

HIV-1 の co-receptor usage を迅速簡便に測定可能な細胞膜融合を用いた検出系 (DSP-Pheno assay) を樹立した。HIV 実験室株を用いて、pRE11-NL4-3、LAI、HXB2 を用いた場合には N4X4-DSP₁₋₇ から特異的シグナルを検出し、pRE11-BaL、JR-FL、YU2 を用いた場合には N4R5-DSP₁₋₇ から特異的シグナルを検出し、Dual 指向性である pRE11-SF2 を用いた場合には、N4X4-DSP₁₋₇ および N4R5-DSP₁₋₇ の両方からシグナルを検出した。これまでに報告のあるウイルス粒子を用いた細胞指向性の結果と完全に一致し、非特異的細胞融合などによるシグナルは検出されず、バックグラウンドも低かった。

さらに、R5 細胞および X4 シグナルは AMD3100 および maraviroc を用いて濃度依存的に co-receptor usage 特異的に阻害がみられることを明らかにした。T20、中和抗体においても濃度依存的細胞融合の阻害が観察された。

また HIV 感染者由来の env 遺伝子を用いた場合においても細胞指向性の測定可能であり、阻害薬・抗体での阻害も評価可能であった。

D. 考察

DSP-Pheno assay とこれまでに報告されている細胞指向性の結果と実験株を用いた場合には完全に一致し、MVC、AMD3100 を用いて特異的に阻害が見られた事から、DSP-Pheno assay が Env タンパク質の細胞指向性を解析可能である事が確認された。また、中和抗体などの有効性の評価にも応用可能である事が示唆された。臨床検体を用いた場合にも DSP-Pheno assay を用いて細胞指向性および細胞膜融合は評価可能であったが、一部の感染者由来検体で MVC、AMD3100 に耐性を示すものが確認された。臨床検体は Bulk (様々なポピュレーションが混在する) サンプルを用いて解析を行なったため、検出感度の問題もしくは、検出法の違いによるものかを明らかにする事は現段階では難しい。従って今後耐性がみられたサンプルのクローニングを行ない、env 遺伝子と変異との関係を明らかにしていく予定である。

E. 結論

本研究はこれまでにウイルス粒子を使用し、数週間を要していた PTA に代わる新しい細胞指向性決定系 (DSP-Pheno assay) を確立した。ウイルス粒子を使用しないため P3 施設を必要とせず最短 5 日で安全に細胞指向性を測定可能である。また大量検体を処理可能である事から今後阻害薬などのスクリーニングや中和抗体の評価などにも応用可能であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Teeranaipong P, Hosoya N, Kawana-Tachikawa A, Fujii T, Koibuchi T, Nakamura H, Koga M, Kondo N, Gao GF, Hoshino H, Matsuda Z, Iwamoto A. Development of a rapid cell-fusion-based phenotypic HIV-1 tropism assay. J Int AIDS Soc. Vol. 16, p. 18723, 2013.
- 2) Nomura S, Hosoya N, Brumme ZL, Brockman MA, Kikuchi T, Koga M, Nakamura H, Koibuchi T, Fujii T, Carlson JM, Heckerman D, Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A, Miura T. Significant reductions in Gag-protease-mediated HIV-1 replication capacity during the course of the epidemic in Japan. J Virol, Vol. 87, p. 1465-76, 2013.

2. 学会発表

- 1) 7th IAS Conference on HIV Pathogenesis Treatment and Prevention 「 Phenotypic determination of HIV-1 envelope tropism using Dual Split Protein (DSP) mediated cell fusion assay system」 2013年6月 マレーシア・クアラルンプール (ポスター発表)
- 2) 第61回日本ウイルス学会学術集会「細胞膜融合と二重分割タンパク質 (Dual Split Protein: DSP) を用いた HIV-1 細胞指向性試験の開発」 2013年11月 兵庫県神戸市 (口頭発表)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

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

Env 変異体および変異誘導蛋白の作製に関する研究

分担研究者 井上 誠 ディナベック株式会社・遺伝子創薬事業部長

研究要旨

各サブタイプ Env の結合解析を目的として、sCD4 domain 1 分子 (mD1.22) 発現する F 遺伝子欠損型センダイウイルスベクター (SeV¹⁸⁺mD1.22/ΔF) について、ベクターの調製を行った。精製後、力価測定・配列確認・無菌試験などの QC 試験項目を行う。

A. 研究目的

センダイウイルス (SeV) ベクターは、一本鎖の非分節型マイナス鎖 RNA ベクターであり、目的遺伝子 (GOI) を染色体遺伝子に組み込む恐れなく、細胞質において発現する「細胞質型 RNA ベクター」である。このような特徴のあるベクターの開発にあたって、宿主細胞への侵入にかかわる膜融合蛋白質 F 遺伝子を欠失させることにより、二次感染性のない、非伝播型ベクターへ改良することに成功している (SeV/ΔF)。この F 遺伝子欠失型 SeV ベクターについては、搭載遺伝子の *in vivo* および *in vitro* 解析用にクオリティーの高いベクター製造システムが構築されている。このシステムを用いて、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) Env の結合解析を目的に、sCD4 domain 1 分子 (mD1.22) を高発現する組換え SeV ベクターを調製することを目的とした。

B. 研究方法

(1) 組換え SeV ベクターの調製

sCD4 domain 1 分子 (mD1.22) 遺伝子は、全合成法にて調製した。また、本組換えベクターの調製には F 蛋白質を持続発現するパッケージング細胞株を利用し、再構成は分担研究者による公知の方法 (国際公開第 97/16538 号、国際公開第 97/16539 号) をベースに一部改良して行った。

(2) 組換え SeV ベクターの品質検査

力価測定・配列確認・無菌試験などの QC 試験項目を設定した。

(倫理面への配慮)

SeV は実験室飼育下のネズミから単離されたパラインフルエンザウイルスであり、ヒトへの病原性は知られていない。野生型ウイルスでも文部科

学省の指針ではバイオハザードレベル P2 であり、通常の実験室で使用でき、安全なウイルスと考えられている。さらに実験に使用するベクターは、ウイルスの感染融合に必須の F 蛋白質遺伝子をゲノムから欠失させているため、非伝播型に改良されており、理論的にも実験的にも伝播性が無いことが証明されている。

C. 研究結果

HIV-Env の結合解析用の sCD4 domain 1 分子 (mD1.22) を高発現する組換え SeV ベクター (SeV¹⁸⁺mD1.22/ΔF) をパッケージング細胞株を利用して調製した。最終標品は PBS 溶液に置換し、力価測定・配列確認・無菌試験などの QC 試験を実施する。

D. 考察

HIV-Env の結合解析用の sCD4 domain 1 分子 (mD1.22) を高発現する組換え SeV ベクター (SeV¹⁸⁺mD1.22/ΔF) を当初目的どおり再構成・製造することができ、SeV ベクター系の安定性と再現性が確認された。

E. 結論

「HIV-Env の結合解析用の sCD4 domain 1 分子 (mD1.22) を高発現する組換えベクター (SeV¹⁸⁺mD1.22/ΔF)」の再構成と製造を実施した。精製後、力価測定・配列確認・無菌試験などの QC 試験を実施し、抗原提示解析用ベクターとして、クオリティーの高いベクターを本研究に供給する。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1 論文発表

1) Iwamoto N, Takahashi N, Seki S, Nomura T, Yamamoto H, Inoue M, Shu T, Naruse TK, Kimura A, Matano T. Control of Simian Immunodeficiency Virus Replication by Vaccine-Induced Gag- and Vif-Specific CD8+ T Cells. J Virol. 2014 Jan;88(1):425-33.

2) 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 TK, Kimura A, 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.

2 学会発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

新規侵入阻害剤に関する研究

研究者代表者 鳴海 哲夫 静岡大学大学院工学研究科 准教授

研究要旨

これまでの HIV 細胞侵入過程を標的とした創薬研究で得られた知見をもとに、Env 三量体の構造変化を誘起する新たなケミカルプローブ候補化合物として、ベツリン酸誘導体 IC9564 に着目し、構造活性相関及び構造変化誘起能を明らかにした。IC9564 は大きく分けて三つのフラグメント（ベツリン酸、アミドオクチルリンカー、スタチン）からなり、化学修飾が容易なベツリン酸の 3 位ヒドロキシ基およびスタチンのカルボキシ基について誘導体化研究を行い、抗 HIV 活性、細胞毒性、構造変化誘起能を評価した。その結果、ベツリン酸の 3 位ヒドロキシ基およびスタチンユニットのカルボキシ基は抗 HIV 活性発現に重要であることを明らかにした。これらの成果は、今後の HIV 侵入過程を標的とした創薬研究の進展に資するものである。なお、見出した研究成果を基に更なる構造活性相関研究が進行中である。

A. 研究目的

HIV-1 感染症の有効な治療法として、多剤併用療法が確立されているが、長期投与による毒性の軽減や耐性ウイルス抑制など様々な問題を抱えており、これまでとは異なる新規治療薬の開発が求められている。これまでに研究分担者は、HIV の細胞侵入過程である動的超分子機構を標的とした侵入阻害剤の創製研究を行い、顕著な抗 HIV 活性を示す低分子型 CD4 ミミック誘導体 (HAR-171, HAR-427, HAR-431) を見出している。これら CD4 ミミック誘導体は抗 HIV 活性を示すだけでなく、ウイルス外被タンパク質 gp120 と相互作用することで、gp120 の三量体構造を変化させることで中和抗体との相乗効果を示すことが知られており、立体構造変化誘導剤 (エンベローププロテインオープナー) として新たな治療戦略への応用が期待されている。しかしながら、これまでの構造活性相関研究の結果から、CD4 ミミック誘導体は細胞毒性をはじめ

とする医薬品プロファイルの向上は容易ではなく、新たなケミカルプローブの創製が求められている。

IC9564 は gp120 の V3 ループ領域と相互作用することで様々な株に対し顕著な抗 HIV 活性を示すベツリン酸誘導体である。さらに、他の薬剤 (BMS-378806 や AMD3100、TAK-779) と強力な相乗効果を示すなど興味深い特性を有している。そこで、本研究では IC9564 を用いた構造活性相関研究を行い、その知見に基づいた合理的分子設計により新たなケミカルプローブを合成し、新規 HIV 侵入阻害剤の創製を目的とする。

B. 研究方法

IC9564 は大きく分けて三つのフラグメント（ベツリン酸、アミドオクチルリンカー、スタチン）からなり、ベツリン酸骨格やスタチン構造の詳細な研究はされていない。そこで、これら部位の構造最適化を目指した誘導

体を合成し、それら化合物の生物活性 (抗 HIV 活性、細胞毒性および gp120 の構造変化誘起能) を評価した。

IC9564 および誘導体の生理活性試験

細胞毒性および抗 HIV 活性については WST-8 細胞増殖測定法による評価を行った。96 well round-bottom micro culture plate にて、各 IC9564 誘導体存在下または非存在下で、細胞毒性試験では無感染の PM1/CCR5 細胞 3×10^3 cells を、抗 HIV-1 活性試験では HIV-1 (サブタイプ B-R5 臨床分離株 YTA48P) 感染させた PM1/CCR5 細胞を 37 °C 下で 5 日間培養した。それぞれの well から 100 mL の培養液を取り除き、WST-8 (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitro-phenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium monosodium salt) 溶液 10 mL を加え、37 °C で 3 時間インキュベートした。マイクロプレートリーダーにて吸光度 (450 nm) を測定して、細胞の生存率を算出した。ウイルスによる細胞死を 50% 阻害する濃度を IC₅₀ およびウイルス非存在下での各誘導体による 50% の細胞が傷害される濃度を CC₅₀ とした [吉村和久第一室室長、原田 恵嘉博士 (国立感染症研究所エイズ研究センター)]。

gp120 構造変化誘起能の評価

gp120 の構造変化誘起能は可溶性 CD4 存在下で gp120 に対する結合が増強される CD4i 抗体 (4C11) を用いて、HIV-1 JR-FL 株慢性感染細胞 (PM1/JR-FL) の細胞表面に対する CD4i 抗体の結合活性をフローサイトメーターにて評価した [吉村、原田]。具体的には、HIV-1 に継続感染させた PM1 細胞 1×10^5 cells を、FACS buffer (PBS; 2BSA, 0.2 azide, pH 7.2) 中において IC9564 誘導体 100 μM 存在下または rsCD4 0.5 μg/mL 存在下で、4 °C 下、15 分間攪拌したのち、CD4i 抗体 4C11 (終濃度 3.4-

6.7 μg/mL) を加えて 4 °C 下で 30 分間攪拌した。遠心後 (4 °C, 1200 rpm, 3 分間)、上清を除去し、FACS buffer で細胞を二回洗浄した。そこに fluorescein isothiocyanate (FITC) を結合させたヤギ由来抗ヒト IgG 抗体を加え、4 °C 下で 30 分間染色し、FACS buffer で細胞を二回洗浄した。また、固定化溶液を加え、4 °C 下で 30 分間固定化したのち、FACS buffer で細胞を二回洗浄した。その後、フローサイトメーターにて測定を 2 回以上行った。

(倫理面への配慮)

本研究は HIV 感染症例の血液サンプルを解析する必要があるため、熊本大学大学院生命科学研究部等臨床研究・医療技術倫理委員会により、臨床研究・医療技術承認を受けている。また、個人情報の紛失、漏洩を防ぐため、個人名は全て暗号化し、臨床データ、臨床サンプルを管理保管する。

C. 研究結果

【IC9564 誘導体の合成】

これまでの研究からベツリン酸 28 位の置換基やリンカーの長さやアミド結合の有無が抗 HIV 活性に寄与することは明らかにされている。また、他のベツリン酸誘導体 (例えば、ベツリン酸 3 位にジメチルスクシニルエステル基を有する DSB, アミドオクチルリンカー無しに直接 L-ロイシンとアミド結合で連結した LH-15 やスタチンユニットの代わりにアミノウンデカン酸と結合した LH-55 など) においても、顕著な抗 HIV 活性を示しており、特に LH-55 は IC9564 に比べ約 10 倍以上の強力な抗 HIV 活性を示す。そこで、これらベツリン酸誘導体をさらに誘導体化するために、末端の親水性基の重要性について検討した。具体的には、疎水性ユニットの導入を視野に入れ、IC9564 の 3 位ヒドロキシ基をアセトキシ基へと誘導し、スタチン末端のカルボキシ基を tert-ブチルエステル基とした誘導体の合成研究を行った。

Boc-L-Leu-OH を出発原料として、炭酸水素カリウム存在下、ヨウ化メチルを作用させることでメチルエステル体とした (quant.)。続いて、ジクロロメタン/トルエン混合溶媒下、低温で水素化ジイソブチルアルミニウムを作用させることで、 α -アミノアルデヒド体を系中で生成させ、*tert*-ブチルプロモ酢酸より別途調製した Reformatsky 試薬と反応させることでスタチンの保護体が低収率ながら得られた (10%)。続いて、塩化ビスマス存在下、Boc 基を選択的に脱保護することで、*g*-アミノ基が無保護のスタチン誘導体の合成に成功した (quant.)。

次に、アミドオクタノン酸ユニットを有するベツリン酸誘導体の合成に着手した。市販のベツリン酸に対し、無水酢酸を作用させることで、3位ヒドロキシ基をアセトキシ基へ定量的に誘導し、塩化オキサリルと反応することでベツリン酸クロリド誘導体を合成した。得られたベツリン酸クロリド誘導体に対し、塩化トリメチルシリルで処理した 8-アミノオクタノン酸誘導体を作用させることで、28位にアミドオクタノン酸ユニットを有するベツリン酸誘導体を低収率ながら得られた (18%)。

最後に先に合成した *g*-アミノ基が無保護のスタチン誘導体と 28位にアミドオクタノン酸ユニットを有するベツリン酸誘導体を、常法により縮合することで目的とした IC9564 の 3位ヒドロキシ基をアセトキシ基へと誘導し、スタチン末端のカルボキシ基を *tert*-ブチルエステル基とした誘導体の合成に成功した (55%)。

【IC9564 および誘導体の生物活性評価】

生物活性評価の結果、IC9564 はサブタイプ B (YTA48P) だけでなく、サブタイプ C の複数の株 (ACC4, KMC1, mYHI) に対し顕著な抗 HIV 活性を示したのに対し ($IC_{50} = 0.4\sim 8.3 \mu M$)、今回合成した IC9564 誘導体では評価した全ての株に対し抗 HIV 活性を示さなかった。

また、gp120 の構造変化誘起能について評価したところ、顕著な抗 HIV 活性を示した IC9564 は構造変化を誘起している可能性が示唆された。

D. 考察

疎水性ユニットの導入を指向した IC9564 誘導体は顕著な生物活性を示さなかったことから、ベツリン酸 3位ヒドロキシ基およびスタチンユニットのカルボキシ基は抗 HIV 活性発現に重要であることが明らかになった。このことから今後は親水性官能基を導入した誘導体化を進めることで、有用なケミカルプローブの創製が期待できる。さらに、これまでの研究ではベツリン酸ユニットの構造活性相関はあきらかにされておらず、二つの親水性官能基のリンカーとして機能している可能性もある。そこで、今後はベツリン酸に加え、関連するステロイド骨格を導入した誘導体の検討や、ベツリン酸を直接化学修飾する *late-stage modification* による検討を加えることで、さらに有用な誘導体の創製が可能であると考えられる。

E. 結論

HIV の細胞侵入段階を標的とした HIV 侵入阻害剤の創製を目的として、IC9564 の誘導体化研究を行い、ベツリン酸の 3位ヒドロキシ基およびスタチンのカルボキシ基の構造活性相関を明らかにすることで新たな HIV 侵入阻害剤の創製研究の一步を踏み出した。IC9564 はサブタイプ B だけでなく、サブタイプ C に対しても顕著な抗 HIV 活性を示し、可溶性 CD4 と同様に gp120 の構造変化誘起能を有している可能性が示唆された。これらの結果は今後の HIV 侵入阻害剤の創製研究の進展に資するものである。今後はこれまでの構造活性相関研究に加え、作用機序の異なるケミカルプローブの探索も継続することで、HIV 侵入阻害剤を基盤としたより効果的な治療法の開発に貢献したい。

F. 謝辞

本研究の遂行にあたり、東京医科歯科大学生

体材料工学研究所、玉村啓和教授、高野皓学士に、お世話になりました。厚く御礼申し上げます。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hashimoto C, Narumi T, Yoshimura K, Igarashi T, Matsushita S, Tamamura H, et al. A CD4 Mimic as an HIV Entry Inhibitors: Pharmacokinetics. *Bioorg Med Chem*, 21: 7884-7889, 2013.
- 2) Narumi T, Tamamura H, Matsushita S, Igarashi T, et al. Generation of a Replication-competent Simian-human Immunodeficiency Virus, the Neutralisation Sensitivity of Which can be Enhanced in the Presence of a Small Molecule CD4 Mimic. *J Gen Virol*, 94: 2710-2716, 2013.
- 3) Nomura W, Narumi T, Yamamoto N, Murakami T, Tamamura H, et al. CXCR4-derived Synthetic Peptides Inducing Anti-HIV-1 Antibodies. *Bioorg Med Chem*, 21: 6878-6885, 2013
- 4) Hashimoto C, Nomura W, Narumi T, Yamamoto N, Murakami T, Tamamura H, et al. Anti-HIV-1 Peptide Derivatives Based on the HIV-1 Co-receptor CXCR4. *Chem Med Chem*, 8:1668-1672, 2013.
- 5) Nomura W, Aikawa H, Narumi T, Yamamoto N, Murakami T, Tamamura H, et al. Cell-Permeable Stapled Peptides Based on HIV-1 Integrase Inhibitors Derived from HIV-1 Gene Products. *ACS Chem Biol*, 8: 2235-2244, 2013.
- 6) 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.
- 7) Narumi T, Aikawa H, Tanaka T, Hashimoto C, Ohashi N, Nomura W, Kobayakawa T, Takano H, Hirota Y, Murakami T, Yamamoto N, Tamamura H. Low Molecular Weight CXCR4 Ligands with Variable Spacers. *Chem Med Chem*, 8:118-124, 2013.
- 8) 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.
- 9) Narumi T, Aikawa H, Tanaka T, Hashimoto C, Ohashi N, Nomura W, Kobayakawa T, Takano H, Hirota Y, Murakami T, Yamamoto N, Tamamura H. Low Molecular Weight CXCR4 Ligands with Variable Spacers. *Chem Med Chem*, 8:118-124, 2013.
- 10) Peptide Symposium. Hawaii, USA, June 22-27, 2013.
- 2) Nomura W, Tanaka T, Aoki T, Narumi T, Tamamura H. Biological Effects of Bivalent-Type CXCR4 Ligands with Rigid Linkers. The 6th International Peptide Symposium/the 23rd American Peptide Symposium. Hawaii, USA, June 22-27, 2013.
- 3) Narumi T, Kobayakawa T, Tamamura H. Design and Synthesis of Chloroalkene Dipeptide Isosteres as Ground State Peptidomimetics. The 10th Australian Peptide Conference. Penang, Malaysia, Sep 8 -13, 2013.
- 4) Nomura W, Tanaka T, Narumi T, Tamamura H. Bivalent Ligands Based on 14-mer Peptides for the Chemokine Receptor CXCR4 Dimer. The 2nd Annual Conference of the International Chemical Biology Society. Kyoto, Japan, Oct 7-9, 2013.
- 5) Taketomi S, Konno M, Narumi T, Nomura W, Tamamura H. Structure Activity Relationship Studies on a Spacer Moiety of Small Molecular CXCR4 Antagonists as Potent HIV-1 Entry Inhibitors. The 14th Kumamoto AIDS Seminar. Kumamoto, Japan, Oct 29-31, 2013.
- 6) Hirota Y, Narumi T, Yoshimura K, Harada S, Hashimoto C, Nomura W, Igarashi T, Matsushita S, Tamamura H. Indole-type Small CD4 Mimic Molecules Targeting an HIV Envelope Protein gp120. The 14th Kumamoto AIDS Seminar. Kumamoto, Japan, Oct 29-31, 2013.
- 7) Takano H, Narumi T, Ohashi N, Furuta T, Tamamura H. Development of 8-Azacoumarin-type Photolabile Protecting Groups that Efficiently React under Aqueous Milieu Based on Amide-Alkene Isosterism. The 17th Korean Peptide Protein Society Symposium, Seoul National University, Seoul, Korea, Nov 29, 2013.
- 8) 野村 渉, 田中智博, 青木 徹, 鳴海哲夫, 玉村啓和. 2 価結合型リガンドのケモカインレセプターCXCR4 の発現認識と細胞移動阻害活性に関する研究. 日本ケミカルバイオロジー学会 第 8 回年会. 東京, 2013 年 6 月 19-21 日.
- 9) 鳴海哲夫, 相川春夫, 玉村啓和. カチオン- π 相互作用を利用したインドール類の Friedel-Crafts 型共役付加反応の開発. 日本ケミカルバイオロジー学会 第 8 回年会. 東京, 2013 年 6 月 19-21 日.
- 10) 大橋南美, 野村 渉, 湊 夏来, 相川春夫, 鳴海哲夫, 玉村啓和. FRET を用いた PKC リガンド結合活性評価法の開発研究. 日

2. 学会発表

- 1) Nomura W, Ohashi N, Narumi T, Tamamura H. Tag-Probe System for Imaging of Intracellular Proteins. The 6th International Peptide Symposium/the 23rd American

- 本ケミカルバイオロジー学会 第 8 回年会. 東京, 2013 年 6 月 19-21 日.
- 11) 橋本知恵, 野村 渉, 鈴木貴晴, 鳴海哲夫, 駒野 淳, 村上 努, 山本直樹, 玉村啓和. HIV-1 外被タンパク質 gp41-CHR 三量体構造を模倣した膜融合阻害剤の開発. 日本ケミカルバイオロジー学会 第 8 回年会. 東京, 2013 年 6 月 19-21 日.
 - 12) 小早川拓也, 鳴海哲夫, 相川春夫, 玉村啓和. 有機銅試薬によるクロロアルケン類の立体選択的合成法の開発. 日本ケミカルバイオロジー学会 第 8 回年会. 東京, 2013 年 6 月 19-21 日.
 - 13) 高野 皓, 鳴海哲夫, 野村 渉, 古田寿昭, 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. 日本ケミカルバイオロジー学会 第 8 回年会. 東京, 2013 年 6 月 19-21 日.
 - 14) 廣田雄樹, 鳴海哲夫, 原田恵嘉, 吉村和久, 橋本知恵, 野村 渉, 五十嵐樹彦, 松下修三, 玉村啓和. HIV 外被タンパク質 gp120 を分子標的とするインドール型低分子 CD4 ミミックの構造活性相関研究. 日本ケミカルバイオロジー学会 第 8 回年会. 東京, 2013 年 6 月 19-21 日.
 - 15) 大橋南美, 野村 渉, 湊 夏来, 相川春夫, 鳴海哲夫, 玉村啓和. FRET を基盤とする PKC リガンドスクリーニング法の開発. 第 57 回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2013 年 10 月 26 日.
 - 16) 小早川拓也, 鳴海哲夫, 玉村啓和. クロロアルケン型ジペプチドイソスターのラージスケール合成法の開発. 第 57 回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2013 年 10 月 26 日.
 - 17) 廣田雄樹, 鳴海哲夫, 吉村和久, 原田恵嘉, 橋本知恵, 野村 渉, 五十嵐樹彦, 松下修三, 玉村啓和. 抗 HIV 活性を有する CD4 ミミック誘導体の構造活性相関研究: インドール型誘導体の設計, 合成とその生物活性評価. 第 57 回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2013 年 10 月 26 日.
 - 18) 高野 皓, 鳴海哲夫, 野村 渉, 古田寿昭, 玉村啓和. 水性環境下で効率的に反応するアザクマリン型光感受性保護基の開発. 第 57 回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2013 年 10 月 26 日. 第 57 回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2013 年 10 月 26 日.
 - 19) 野村 渉, 橋本知恵, 鳴海哲夫, 藤野真之, 村上 努, 玉村啓和. HIV-1 外被タンパク質 gp41-CHR の二量体構造を基盤とした膜融合阻害剤の有用性. 第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会. 熊本, 2013 年 11 月 20-22 日.
 - 20) 原田恵嘉, 鳴海哲夫, Samatchaya Boonchawalit, 玉村啓和, 松下修三, 吉村和久. バルクおよびクローンウイルスを用いた 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 27 回日本エイズ学会学術集会・総会. 熊本, 2013 年 11 月 20-22 日.
 - 21) 大附寛幸, 丸田泰広, 橋本知恵, 鳴海哲夫, 廣田雄樹, 原田恵嘉, 三浦智行, 吉村和久, 玉村啓和, 松下修三, 五十嵐樹彦. 抗 V3 抗体および低分子 CD4 ミミック曝露後投与によるアカゲザルでの SHIV 複製抑制. 第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会. 熊本, 2013 年 11 月 20-22 日.
 - 22) 村上 努, 橋本知恵, 鳴海哲夫, 野村 渉, 山本直樹, 玉村啓和. HIV-1 特異的侵入阻害剤として機能する MA 部分ペプチドの抗ウイルス活性作用機序の検討. 第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会. 熊本, 2013 年 11 月 20-22 日.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
- 該当事項なし
- I. 健康危惧情報
- 該当事項なし

Env の立体構造変化を捉える抗体の研究

研究分担者 桑田 岳夫 熊本大学エイズ学研究センター 助教

研究要旨

Env の立体構造上の脆弱性の発見を目的として、新たに抗 Env 中和抗体の検索を行い、SIV に対する抗体としては初めての broadly neutralizing antibody (BNAbs) である B404 を分離した。B404 は Env の V3 及び V4 ループを含む立体構造を認識しており、B404 の Env への結合は、CD4 の結合によって促進された。B404 存在下での継代によって得られた B404 逃避ウイルスは Env gp120 の C2 領域に特徴的な変異があり、gp41 の cytoplasmic tail を短くする変異が B404 抵抗性に重要であった。SIV 感染サルからの BNAbs の分離は、SIV サルモデルを利用した中和抗体の解析にとって多いに有用である。また、B404 の結合する Env 領域は、これまでに報告された BNAbs や CD4、CCR5 等の受容体と結合する部位とは異なっており、Env の機能を阻害して感染を阻止するための、新たな標的部位となる可能性が示された。

A. 研究目的

現在の抗エイズ療法は非常に効果が高いものの、長期間にわたる治療による薬剤耐性ウイルスの出現が危惧されている。このため、HIV-1 増殖の各段階のなかで、既存の薬剤とは異なるステップを阻害する薬剤の開発が求められている。また、より効率的な感染防御効果を得るためには、感染初期の標的細胞への侵入を防ぎ、細胞レベルでの感染を阻止することが重要であると考えられる。これらのことから、ウイルスの細胞への吸着、侵入過程で主要な役割を果たすエンベロープ (Env) の機能を阻害するメカニズムの解明を目指し、中和抗体と Env の解析を行った。

桑田らは、以前より HIV-1 の動物モデルとして使われている SIV 感染サルから新規の抗 SIV 単クローン抗体を分離しており、その一部には SIV に対する強い中和活性が見られた (Kuwata *et al.*, AIDS Res Hum Retroviruses. 27:487-500, 2011)。本研究では、これらの中和抗体に加え、4頭の SIV 感染サルから新規抗

Env 単クローン抗体を分離し、Env の脆弱性を解析するために使用する。具体的には、中和抗体のエピトープの検索と逃避ウイルスの誘導を行い、中和抗体の結合や逃避に重要な Env 部位を決定する。これらの部位の変異による Env の立体構造変化をコンピュータ・シミュレーションによって解析し、ウイルスの中和メカニズムの解明を試みる。これらの結果から、感染防御のための新たな標的を見つけていく。

B. 研究方法

ウイルス：中和試験には、中和抗体への感受性が異なる種々の SIV 分子クローンを使用した。ウイルスは DNA プラスミドを 293T 細胞へトランスフェクションして作製し、2日後の上清をウイルス・ストックとして -80°C にて保存した。

中和抗体：抗 SIV 単クローン抗体は、4頭の SIVsmH635FC 感染アカゲザルからファージ・ディスプレイ法によって分離した Fab クローンをを用いた。Env を抗原とする ELISA によ

って Env 結合活性をもつ Fab クローンを選別し、中和活性と抗体遺伝子の塩基配列を解析した。特に中和活性の高かった B404 は、遺伝子組み換えによって IgG, scFv を作製した。

中和アッセイ: 中和抗体の抗 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と 200 TCID₅₀ のウイルスを加え、1 時間 incubation 後に 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。

抗体結合活性の測定: SIV Env 単量体への抗体結合活性は SIV 感染細胞を抗原とする ELISA によって解析した。Env 三量体への結合活性は、Env 発現プラスミドをトランスフェクトした 293T 細胞への抗体の結合をフローサイトメーターによって検出して決定した。エピトープの決定のため、SIVsmE543-3 Env (wt), V1 (Δ V1), V2 (Δ V2), V3 (Δ V3), V4 (Δ V4) ループ欠失変異株、糖鎖欠損変異株 (Δ Gly; N306A/N316A/N349A)、CD4 結合(CD4bs)部位 (D385R) や CD4-induced (CD4i) 部位 (I434R) の変異株を使用した。

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 SIVmac316 株と 5 ng/ml の B404 Fab 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 B404 Fab を用いて継代を繰り返し、B404 に抵抗性の変異株を誘導した。

Env の遺伝子解析: B404 抵抗性株に感染した細胞から DNA を抽出し、PCR により env 遺伝子を増幅した。PCR 産物を TA cloning kit

(Invitrogen) によってクローニングし、B404 抵抗性株 env 遺伝子の塩基配列を決定した。

Env の分子動力学シミュレーション: SIVmac316 株と B404 抵抗性株にみられた F277V、又は N295S をもつ変異株の Env gp120 の outer domain の分子動力学シミュレーションを行った。各アミノ酸残基の root mean square fluctuation (RMSF) 値を計算し、変異株の Env の構造上の揺らぎを親株の SIVmac316 株と比較した。

(倫理面への配慮について)

本研究では、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、ヒトや動物のサンプルは一切用いていない。

C. 研究結果

様々な SIV に対して強力な中和活性をもつ **B404 抗体**: SIV 感染サルから分離された中和抗体 B404 の中和活性を、中和抗体への感受性が異なり、遺伝的にも多様な 7 株の SIV 株を用いて検討した。その結果、B404 の中和活性は、抗体の中和に抵抗性である SIV 株を含む全ての SIV 株で認められた(図 1)。特に、一本鎖にした抗体の小断片である scFv B404 の中和活性は強力で、非常に中和抵抗性であることで知られる SIVmac239 株の感染を 90% 以上阻害することができた。

遺伝的に多様で中和抵抗性株を含む 7 株の SIV 株を中和したことは、B404 が強力で広いスペクトラムをもった中和抗体、いわゆる broadly neutralizing antibody (BNAbs) であることを示している。このような BNAbs の同定は抗 SIV 中和抗体では初めてであり、現時点で唯一の SIV に対する BNAbs である。

中和抗体 **B404** のエピトープの解析: これまでの研究から、中和抗体 B404 は Env への結合で抗 V3 抗体と競合するが、V3 領域を含

むペプチドには反応しないことが分かっていた。このため、V ループ欠損 Env 等の種々の Env 変異株を作製し、より詳細な B404 結合部位の検索を行った。図 2A に示すように、B404 は V3 及び V4 ループ欠損 Env には全く結合しなかったが、他の V ループや糖鎖の欠損、CD4bs 及び CD4i の変異は B404 結合に影響を与えなかった。B404 の Env 三量体への結合は、CD4i 抗体の K8 や

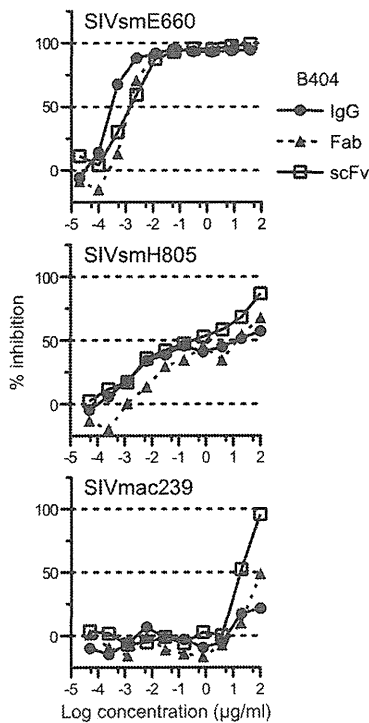


図 1. 単クローン抗体 B404 は種々の SIV 株を中和する。B404 IgG, Fab, scFv の中和活性を TZM-bl 細胞への感染系を用いて評価した。中和抗体への感受性が高い (SIVsmE660)、中程度 (SIVsmH805)、低い (SIVmac239) 3 株の結果を示した。

V3 抗体の KK46 と同様に、sCD4 を加えることで促進された (図 2B)。しかしながら、sCD4 による B404 結合促進効果は、Env 単量体への結合では全くみられなかった (図 2C)。

これらの結果は、B404 が Env の V3 及び V4 ループを含む立体構造を認識していることを示唆している。また、V3 への抗体と類似した sCD4 の結合による Env 三量体への B404 結合

促進は、CD4 結合による Env 三量体の構造変化が B404 エピトープの露出を促進することを示している。

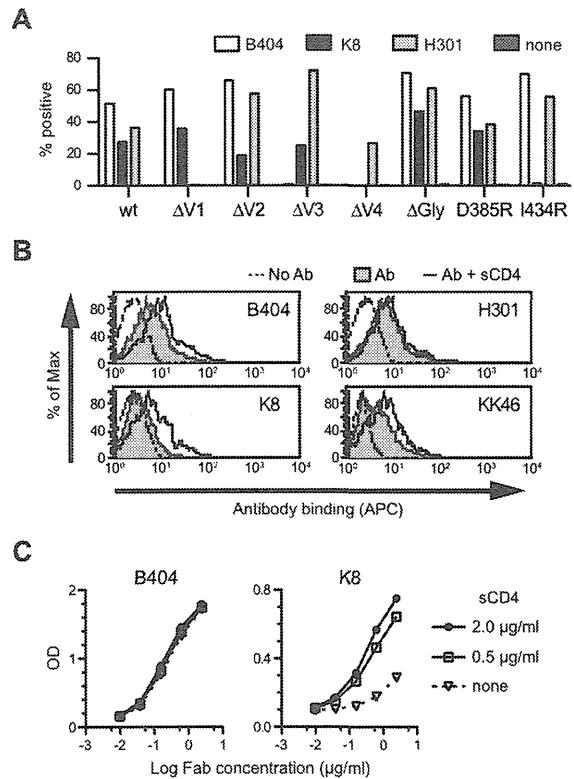


図 2. B404 は V3, V4 ループを含む立体構造を認識し、sCD4 が Env 三量体上のエピトープの露出を促進する。(A) 単クローン抗体 B404, K8 (CD4i), H301 (V1) の Env 変異株への反応性を示す。(B) sCD4 存在、非存在下での B404, K8 (CD4i), H301 (V1), KK46 (V3) の Env 三量体への結合を示す。(C) ELISA による sCD4 存在、非存在下での Env 単量体への B404, K8 (CD4i) の結合を示す。

B404 抵抗性株の解析: B404 による中和に感受性の高かった SIVmac316 株を B404 存在下で継代し、B404 からの逃避ウイルスを分離した。env 遺伝子の解析から、B404 抵抗性株の多くは、C2 領域の F277V 変異や gp41 cytoplasmic tail の欠失等の特徴を持っていた。また、C2 領域に糖鎖修飾部位の欠失を伴う N295S 変異をもつウイルスも少数存在した。これらの B404 抵抗性株の変異を親株の

SIVmac316 株に組み込んだウイルスを作製し、B404 中和抵抗性に寄与している変異の同定を行った (図 3)。その結果、B404 抵抗性株の *env* 遺伝子全体をもつウイルスが

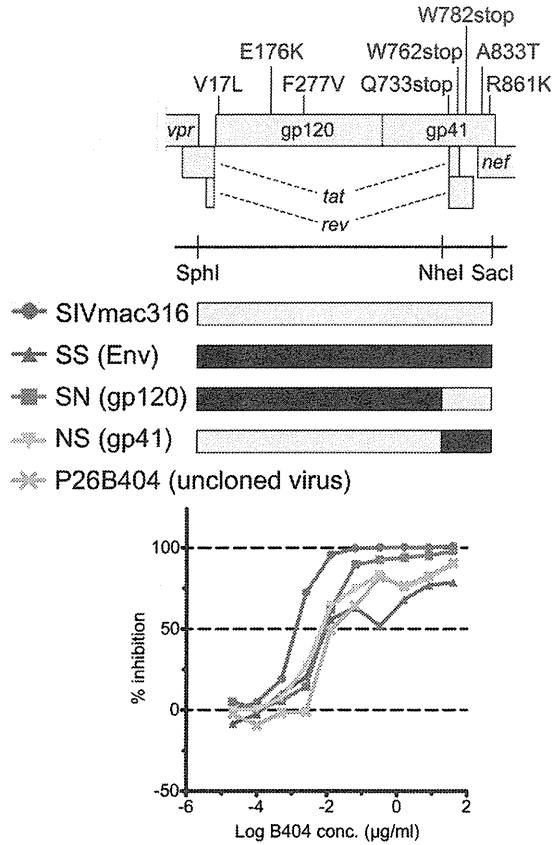


図 3. B404 抵抗性には gp120 の変異に加え、gp41 cytoplasmic tail の欠失が重要な役割を果たしている。親株の SIVmac316 に B404 抵抗性株の *env* 遺伝子全体 (SS)、gp120 (SN)、gp41 (NS) を組み込んだウイルスの B404 への中和感受性を示した。

最も B404 抵抗性であり、gp120、gp41 の両方の変異が抵抗性に関与していることが分かった。また、gp41 を組換えたウイルスの方が gp120 を組換えたウイルスよりも B404 に抵抗性であることから、gp41 の cytoplasmic tail を短くする変異が中和抵抗性に重要であることが示された。

B404 抵抗性の変異をもった Env の分子動力学シミュレーション： B404 に対する中

和抵抗性のメカニズムを調べるため、B404 抵抗性株に特徴的であった C2 領域の F277V 変異と N295S 変異の Env 立体構造への影響を分子動力学シミュレーションによって解析した。その結果、C2 領域の変異は V3/V4 ループとその基部の構造上の揺らぎを大きく変化させるという結果が得られた

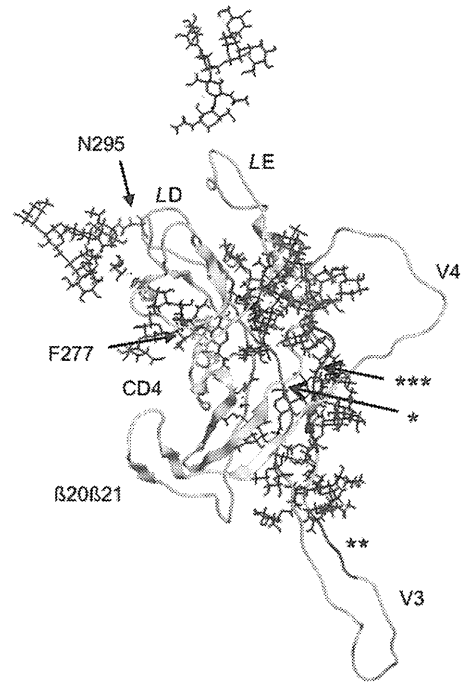


図 4. C2 領域の B404 抵抗性変異は Env の V3, V4 ループとその周辺領域の構造に大きく影響した。gp120 の outer domain の立体構造を示す。V3/V4 の基部で親株の SIVmac316 と構造上の揺らぎが異なる領域 (*, **, ***) を示した。

(図 4)。この結果は、V3/V4 ループを含む立体構造に B404 が結合するというエピトープ解析の結果と一致しており、V3/V4 ループとその周辺が B404 のエピトープであることを強く支持している。

D. 考察

近年、広い範囲の HIV-1 株を中和することができる BNAbs が相次いで分離され、そのエピトープが同定されてきた。この結果、CD4bs、

V1/V2 glycan, V3 glycan 等の領域が多くの HIV-1 の感染を防ぐために有効な Env 領域であることがあきらかとなった。本報告では、抗 SIV 中和抗体としては初めての BNAb である B404 を分離しており、今後の SIV サルモデルを利用した中和抗体の解析に多いに寄与すると考えている。

中和抗体 B404 は、V3/V4 ループを含む立体構造を認識し、CD4 結合に伴う Env 三量体の構造変化によって Env への結合が促進された。また、B404 への抵抗性獲得には、gp120 の変異に加え、gp41 cytoplasmic tail の欠損が重要であった。分子動力学シミュレーションによる解析からも、V3/V4 ループとその基部の構造が B404 抵抗性と関連することが示唆された。このような B404 の性質は、これまでに報告された BNAb とは一致しておらず、B404 がこれまでに同定されていない Env 領域を標的としていることを示唆している。B404 エピトープは CD4 や CCR5 等の受容体と結合する部位とも異なっており、Env の機能を阻害して感染を阻止するための、新たな標的部位となる可能性がある。

本報告では B404 結合に V3/V4 ループが重要であることをあきらかにしたが、B404 が相互作用しているアミノ酸残基等の詳細なエピトープは分かっていない。また、B404 がどのようなメカニズムで感染を阻止しているのかも不明なままである。今後、より詳細な解析を進め、B404 による中和のメカニズムを解明し、Env の構造上の脆弱性をあきらかにしていきたい。

E. 結論

- ・ SIV に対する抗体としては初めての broadly neutralizing antibody である B404 を分離した。
- ・ B404 の Env への結合や B404 からの逃避には Env の V3 及び V4 ループを含む立体構造が重要である。

・ B404 エピトープが Env の機能を阻害して感染を阻止するための新たな標的部位となる可能性を示している。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kuwata, T., Takaki, K., Enomoto, I., Yoshimura, K. and Matsushita, S. Increased infectivity in human cells and resistance to antibody-mediated neutralization by truncation of the SIV gp41 cytoplasmic tail. *Front Microbiol.* 4:117, (2013)
- 2) Kuwata, T., Takaki, K., Yoshimura, K., Enomoto, I., Wu, F., Ourmanov, I., Hirsch, V.M., Yokoyama, M., Sato, H. and 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, (2013)

2. 学会発表

- 1) 桑田岳夫、馬場昌範、松下修三 Cenicriviroc 耐性 HIV-1 株の中和抗体感受性 第 23 回抗ウイルス療法研究会総会 2013 年 6 月 13-14 日 東京
- 2) 桑田岳夫、松下修三 強力な抗 SIV 中和抗体 B404 の結合エピトープと B404 からの逃避機構の解析 第 15 回白馬シンポジウム 2012 年 7 月 19-20 日 名古屋
- 3) Kuwata, T., Takaki, K., Yoshimura, K., Enomoto, I., Wu, F., Ourmanov, I., Hirsch, V.M., Yokoyama, M., Sato, H. and Matsushita, S. Analysis of Env Regions Important for Binding and Resistance to B404, a Potent Neutralizing Antibody Against SIV. *AIDS Vaccine* 2013. October 1-10, 2013. Barcelona, Spain
- 4) Kuwata, T., Takaki, K., Yoshimura, K., Enomoto, I., Wu, F., Ourmanov, I., Hirsch, V.M., Yokoyama, M., Sato, H. and Matsushita, S. Identification of the Env region responsible for the resistance to B404, a potent neutralizing antibody against SIV. 14th Kumamoto AIDS Seminar. October 29-31, 2013. Kumamoto

- 5) Ramirez, K. P. V., Kuwata, T., Maruta, Y., Tanaka, K., Muntasir A., Kumkum R. M., Egami, Y., Kawanami, Y., Enomoto, I., Tamamura, H., Yoshimura, K. and Matsushita, S. Can antibodies contribute to controlling infection with transmitted/founder virus? 14th Kumamoto AIDS Seminar. October 29-31, 2013. Kumamoto
- 6) Muntasir A., Kuwata, T., Ramirez, K. P. V., Enomoto, I., Maruta, Y., Tanaka, K., Kumkum R. M., Egami, Y., Kawanami, Y., Murayama, H., Shimura, K., Matsuoka, M. and Matsushita, S. Effects of Enfuvirtide resistant mutations on the sensitivity to neutralizing antibodies. 14th Kumamoto AIDS Seminar. October 29-31, 2013. Kumamoto
- 7) Tanaka, T., Kuwata, T., Maruta, Y., Ramirez, K. P. V., Enomoto, I., Kawanami, Y. and Matsushita, S. Miniaturization of antibodies against CD4-induced epitope on gp120. 14th Kumamoto AIDS Seminar. October 29-31, 2013. Kumamoto
- 8) Maruta, Y., Kuwata, T., Tanaka, K., Nakahara, Y., Ramirez, K. P. V., Muntasir A., Egami, Y., Suwa, Y., Morioka, H. and Matsushita, S. Post-attachment neutralization as a mechanism of efficient activities of scFv from anti-V3 monoclonal antibody. 14th Kumamoto AIDS Seminar. October 29-31, 2013. Kumamoto
- 9) 桑田岳夫 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 2013 年 11 月 20-22 日 熊本
- 10) Kuwata, T., Isolation of broadly neutralizing antibodies against SIV and their use for vaccine development. 5th JAPAN-KOREA Joint Symposium on HIV/AIDS. December 7, 2013. Soul, Korea

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究業績リスト

研究代表者

吉村 和久

- 1) 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 neutralisation sensitivity of which can be enhanced in the presence of a small molecule CD4 mimic. *J Gen Virol*, 94: 2710-2716, 2013.
- 2) 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.
- 3) Kuwata T, Takaki K, Enomoto I, Yoshimura K, 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.
- 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. *Bioorg Med Chem*, 21:2518-2526, 2013.
- 5) 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: 5424-5436, 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. (§Corresponding author)

研究分担者

横山勝

- 1) Nomaguchi M, Miyake A, Doi N, Fujiwara S, Miyazaki Y, Tsunetsugu-Yokota Y, Yokoyama M, Sato H, Masuda T, Adachi A. Natural single-nucleotide polymorphisms in the 3' region of HIV-1 pol gene modulate viral replication ability. *J. Virol.*, in press.
- 2) Kudoh A, Takahama S, Sawasaki T, Ode H, Yokoyama M, Okayama A, Ishikawa A, Miyakawa K, Matsunaga S, Kimura H, Sugiura W, Sato H, Hirano H, Ohno S, Yamamoto N, Akihide Ryo. The phosphorylation of HIV-1 Gag by atypical protein kinase C facilitates viral infectivity by promoting Vpr incorporation into virions. *Retrovirology*, 11:9, 2014.
- 3) Motozono C, Yokoyama M, Sato H, Ueno T. Cross-reactivity analysis of T cell receptors

specific for overlapping HIV-1 Nef epitopes of different lengths. *Microbes Infect*, in press.

- 4) Burwitz B, Wu H, Reed J, Hammond K, Newman L, Bimber B, Nimiyoungskul F, Leon E, Maness N, Friedrich T, Yokoyama M, Sato H, Matano T, O'Connor D, Sacha J. Tertiary mutations stabilize CD8+ T lymphocyte escape-associated compensatory mutations following transmission of simian immunodeficiency virus. *J Virol*, in press.
- 5) Koyama T, Arias JF, Iwabu Y, Yokoyama M, Fujita H, Sato H, Tokunaga K. APOBEC3G Oligomerization Is Associated with the Inhibition of Both Alu and LINE-1 Retrotransposition. *PLoS ONE*, 8: e84228, 2013.
- 6) Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Doi N, Fujiwara S, Saito A, Akari H, Miyakawa K, Ryo A, Ode H, Iwatani Y, Miura T, Igarashi T, Sato H, Adachi A. Generation of rhesus macaque-tropic HIV-1 clones that are resistant to major anti-HIV-1 restriction factors. *J Virol*, 87: 11447-11461, 2013. (The first two authors contributed equally)
- 7) Yuan Y, Yokoyama M, Maeda Y, Terasawa H, Harada S, Sato H, Yusa K. Structure and dynamics of the gp120 V3 loop that confers noncompetitive resistance in R5 HIV-1 (JR-FL) to maraviroc. *PLoS One*, 8: e65115, 2013.
- 8) Saito A, Nomaguchi M, Kono K, Iwatani Y, Yokoyama M, Yasutomi Y, Sato H, Shioda T, Sugiura W, Matano T, Adachi A, Nakayama EE, Akari H. TRIM5 genotypes in cynomolgus monkeys primarily influence inter-individual diversity in susceptibility to monkey-tropic human immunodeficiency virus type 1. *J Gen Virol*, 94: 1318-1324, 2013.
- 9) 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: 5424-5436, 2013.

武内寛明

- 1) Sugiyama R, Abe M, Nishitsuji H, Murakami Y, Takeuchi H, Takaku H. Induction of heat-shock protein 70 by prostaglandin A₁ inhibits HIV-1 Vif-mediated degradation of APOBEC3G. *Antiviral Res*, 99:307-311, 2013.
- 2) Hori T*, Takeuchi H^{*§}, Saito H, Sakuma R, Inagaki Y, Yamaoka S. A carboxy-terminally truncated human CPSF6 lacking residues encoded by exon 6 inhibits HIV-1 cDNA synthesis and promotes capsid disassembly. *J Virol*, 87: 7726-7736, 2013. (*These authors contributed equally, §Corresponding author)

細谷紀彰

- 1) Teeranaipong P, Hosoya N, Kawana-Tachikawa A, Fujii T, Koibuchi T, Nakamura H, Koga M, Kondo N, Gao GF, Hoshino H, Matsuda Z, Iwamoto A. Development of a rapid