

た。

抗 HIV-1 アッセイ:(1) ペプチドの抗 HIV-1 効果は, TNF- α で刺激した OM-10.1 細胞からのウイルス産生を調べることにより判定した。具体的には, 種々の濃度の薬剤存在下で細胞を培養し, 24 時間後に TNF- α を培養液に加えた。さらに 72 時間培養した後, 培養上清を採取し, その中の HIV-1 p24 量を ELISA 法により測定した。また, 薬剤の細胞毒性は, 生細胞数を色素 (MTT) 法にて定量した。(2) 中和抗体および薬剤の抗 HIV-1 効果は, 感染 TZM-bl 細胞を用いて, ウイルスの増殖を調べることにより判定した。具体的には, 細胞を 1×10^4 cells/well で 96 穴マイクロプレートに播種し, 24 時間後に 100 focus forming units/well のウイルスを感染させ, 同時に種々の濃度の薬剤を添加した。これらの細胞を培養し, 48 時間後に培養上清を除去し, PBS にて洗浄後, ウイルスの増殖の程度を β -Gal Reporter Gene Assay 試薬 (Roche)

を用いて定量した。また, 中和抗体および薬剤の細胞毒性は, MTT 法にて生細胞数を測定した。

(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, 個人が特定出来るようなヒトのサンプルは一切用いていない。

C. 研究結果

ペプチドの抗 HIV-1 効果:HIV-1 の TAR RNA に結合するペプチドの構造を図 1 に示す。これらのペプチドの中で, LK-3 および LK-4 は TAR RNA に対する親和性が LK-1 や LK-2 と比較して非常に強いだけでなく, 細胞内にもより効率的に取り込まれることが分かっている (data not shown)。

Peptide	Sequence	K_d (nM)
LK-1	LKKLLKLLKKLLKLAG	63
LK-2	LKKLCKLLKKLCKLAG	9.6
LK-3	LKKLCKLLKKLCKLAG	0.061
	⋮ ⋮ LKKLCKLLKKLCKLAG	
LK-4	LKKLCKLLKKLCKLAG	0.059
	 LKKLCKLLKKLCKLAG	
R9	RRRRRRRRR	N.D.

— Disulfide linker, N,N'-Phenylenedimaleimide linker

図 1. 今回テストしたペプチドの構造. K_d は TAR RNA に対する解離定数.

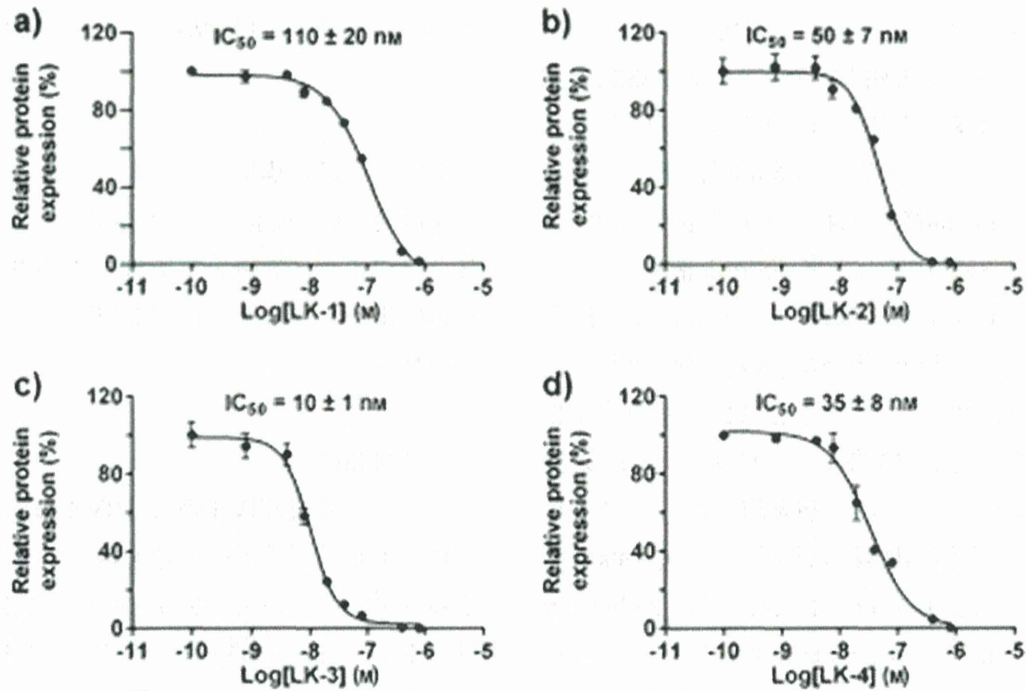


図2. HIV-1 LTR による遺伝子発現に対するペプチドの効果. HeLa 細胞に HIV-1 LTR-Luc 発現プラスミドと HIV-1 Tat 発現プラスミドを cotransfection し, 種々の濃度のペプチド存在下で培養, 12 時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。

図2に示すように, 今回アッセイを行った4種類のペプチドのいずれも, Tat によるレポーター遺伝子発現を濃度依存性に抑制することが分かった。またその効果は LK-3 が最も強かった。そこで, OM-10.1 細胞を用いて, LK-3 の抗 HIV-1 効果について調べたところ, 図3に示すように, 5 μ M の濃度では HIV-1 の産生を抑制するものの, 細胞毒性も認められ, 明らかな抗 HIV-1 効果を示さなかった。

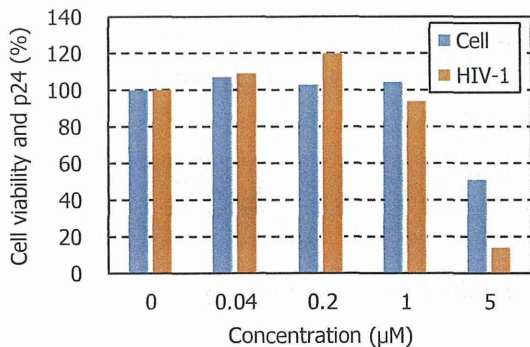


図3. LK-3 の OM-10.1 細胞における抗 HIV-1

中和抗体逃避変異 HIV-1 の CCR5 阻害薬に対する感受性: 昨年度の融合研究において, 親株の JR-FL WT, および KD-247 中和逃避変異株の JR-FL MT の各種 CCR5 阻害薬に対する感受性について比較検討したところ, CVC を含むいずれの薬剤に対しても, JR-FL MT の方が JR-FL WT よりも高い感受性を示した。特に, CVC および maraviroc に対しては統計学的な有意差が認められた。

そこで, 次に JR-FL WT および JR-FL MT から CVC に対して耐性を示す変異株を誘導する目的で, それぞれの薬剤の 50% 有効濃度 (EC_{50}) の存在下にて, ウイル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行ったところ, 最終的に CVC の EC_{50} 値の 128 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た。この継代培養の過程を図3に示す。

効果.

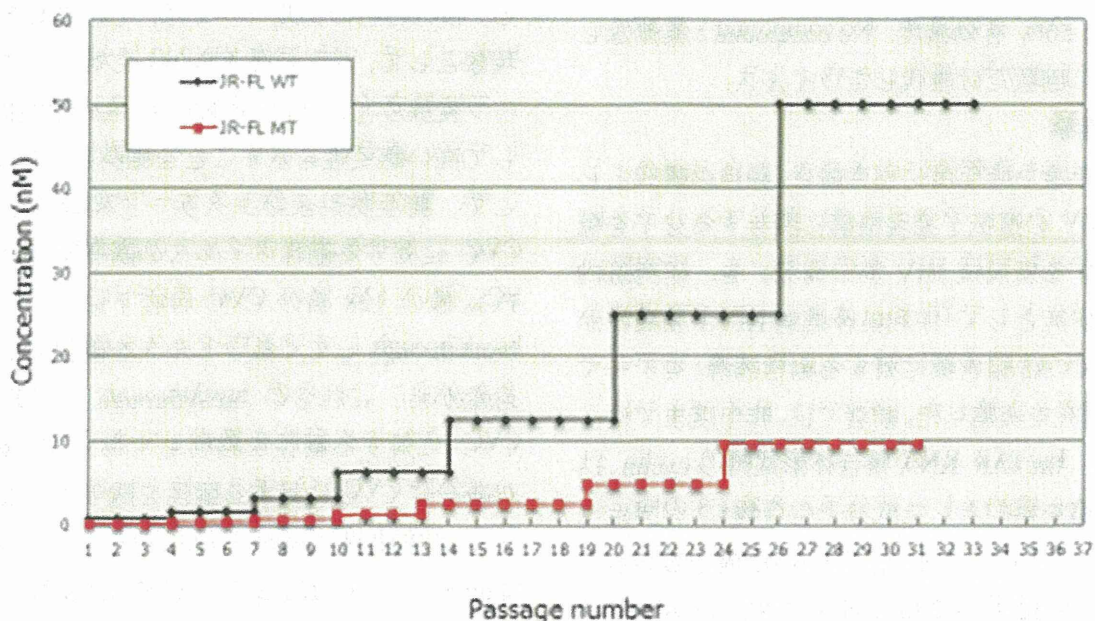


図3. JR-FL 親株 (JR-FL WT) およびエスケープ変異株 (JR-FL MT) の CVC 存在下における長期継代培養. ウイルスを MOLT-4/CCR5 細胞に感染させ, EC_{50} の濃度の薬剤存在下にて4日ごとに継代培養した. 細胞にウイルスによる CPE が広がったら, 培養上清を採取し, 改めて非感染 MOLT-4/CCR5 細胞にその上清中のウイルスを感染させた. その際に薬剤の濃度を2倍に上げて, 培養を続けることを繰り返した.

表2. 各ウイルスの CVC に対する感受性

Virus	EC_{50} (nM)	
	JR-FL WT	JR-FL MT
Original	1.05 ± 0.20	0.34 ± 0.15
No compound	2.14 ± 0.35	1.34 ± 0.39
CVC	1.07 ± 0.68	2.16 ± 0.55

EC_{50} : 50% 有効濃度. No compound: 薬剤なしに同じ回数だけ継代したウイルス.

表2に継代培養の結果得られたウイルスの CVC に対する感受性を示す. 今回の実験では, JR-FL WT および JR-FL MT の両方とも, CVC 存在下における breakthrough ウイルスについては CVC に対する優位な感受性低下は認められなかった.

次に, これらのウイルスについて, KD-247

に対する感受性を調べたところ, JR-FL WT においては, 薬剤なし, あるいは CVC の存在下で長期継代培養を行ったときのウイルスに, KD-247 に対する感受性の増加が認められた (表3). しかしながら, JR-FL MT においては, 薬剤なしで長期継代培養を行ったときのウイルスにも KD-247 に対する感受性の増加は認められるものの, CVC の存在下で長期継代培養を行ったときの breakthrough ウイルスの方が KD-247 に対する感受性の増加の方が顕著であった.

表3. 各ウイルスの KD-247 に対する感受性

Virus	EC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	
	JR-FL WT	JR-FL MT
Original	11.4 ± 0.5	> 100
No compound	1.0 ± 0.1	23.3 ± 4.1

CVC	1.2 ± 0.4	6.6 ± 1.5
-----	-----------	-----------

EC₅₀: 50% 有効濃度. No compound: 薬剤なし
に同じ回数だけ継代したウイルス.

D. 考察

今年度も昨年度に引き続き、独自の研究として「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、研究班内共同研究として「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 の構造を標的とした低分子化合物 C3 の同定に成功している。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を明らかにした。

そこで、今年度は C3 とは異なるメカニズムで HIV-1 の遺伝子発現を抑制する薬剤の同定を目指して、ソウル大学と TAR RNA を標的とするペプチドに関する共同研究を実施した。その結果、TAR RNA に強い親和性を有し、レポーター細胞を使った *in vitro* アッセイにおいて、HIV-1 LTR によって誘導されるレポーター遺伝子発現を強力に抑制する LK-3 ペプチドを同定した。しかしながら、LK-3 は HIV-1 慢性潜伏感染細胞からのウイルスの産生を選択的に抑える効果がほとんどなかった。この理由として、OM-10.1 細胞を初めとする慢性潜伏感染細胞では、TNF- α などの刺激によって、細胞内に大量の Tat 蛋白が誘導されることなどが考えられる。今後さらなるペプチドの改良など、検討を進める必要があると思われる。

次に研究班内の共同研究については、松下らのグループが、われわれが提供した CVC 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。われわれのグループでは、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ている。そこで、野生株およびエスケープ変異株より、CVC に対する耐性ウイルスの誘導を行ない、EC₅₀ 値の 128 倍の CVC 存在下においても、breakthrough してくるウイルスを確認した。残念ながら、これらの breakthrough ウイルスは CVC に対する耐性を獲得しておらず、gp120 の部分に CVC に対する耐性を賦与するようなアミノ酸変異は認められなかった (data not shown)。一方、KD-247 に対する感受性については、中和逃避変異株に CVC 存在下で長期継代培養を行った株で感受性の上昇が認められた。KD-247 に対する感受性の上昇は、薬剤なしで同じ期間だけ継代培養したウイルスにも認められているが、それと比較してもより高い感受性の上昇が認められた。今後は KD-247 中和逃避株より CVC 耐性ウイルスを得るために、さらなる継代培養を行い、得られたウイルスを詳細に解析することで、当初の目的である KD-247 と CCR5 阻害薬、特に CVC 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、TAR RNA を標的とし、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、その分子機構を解析することで、新規抗エイズ薬としての可能性を明らかにする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、共同研究者である松下らのグループが行っている研究の結果を待つ必要があるものの、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、ウイルスの増殖が強く阻害されることから、臨床的にも新しい ART の選択肢としての可能性があると思われた。

F. 研究発表（本研究に関係するもの）

（論文発表）

1. 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).
2. Toyama M, Aoyama H, Mukai R, Nakamura M, Yoshimura K, Okamoto M, Ohshima T, Hashimoto Y, Baba M. A novel tetramethylnaphthalene derivative selectively inhibits adult T-cell leukemia (ATL) cells in vitro. *Anticancer Res.* **34**: 1771-1778 (2014).
3. Jan S, Hyun S, Kim S, Lee S, Lee I-S, Baba M, Lee Y, Yu J. Cell penetrating, dimeric α -helical peptides are nanomolar inhibitors of HIV-1 transcription. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**: 10086-10089 (2014).

4. Sakakibara N, Baba M, Okamoto M, Toyama M, Demizu Y, Misawa T, Kurihara M, Irie K, Kato Y, Maruyama T. Design, synthesis, and anti-HIV-1 activity of 1-aromatic methyl-substituted 3-(3,5-dimethylbenzyl)uracil and N-3,5-dimethyl-benzyl-substituted urea derivatives. *Antiviral Chem. Chemother.* in press.
5. Haraguchi K, Takeda S, Kubota Y, Kumamoto H, Tanaka H, Hamasaki T, Baba M, Painsil E, Cheng Y-C, Urata Y. Next generation anti-HIV agent 4'-ethynyl-stavudine: from the bench to the clinic. In: Atta-ur-Rahman (Ed), *Frontiers in Clinical Drug Research: HIV*, in press. Bentham Science Publishers, United Arab Emirates.

（学会発表）

1. Okamoto M, Hidaka A, Toyama M, Baba M. Galectin-3 is involved in HIV-1 expression in latently infected cells through NF- κ B activation and the interaction with Tat. 16th International Congress of Virology, July 31, 2014, Montreal, Canada.

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：京都大学 ウイルス研究所 教授 松岡雅雄

研究要旨

HIVは細胞外環境中のウイルス粒子が介するセルフリー感染と既感染細胞と非感染細胞間のウイルス学的シナプス形成によるウイルス伝播を介する細胞間感染という2つの大きく異なる感染経路により標的細胞へ感染する。近年、HIV感染における感染経路の重要性がウイルス病原性、免疫逃避、および薬剤感受性の観点から着目されている。本研究課題では、HIVの感染経路別に抗HIV薬の感受性を比較し、薬剤活性に与える感染経路の特異性について解析を進めた。その結果、細胞間感染系における抗HIV薬の抗ウイルス活性低下を明らかにした。

A. 研究目的

HIVが標的細胞であるCD4陽性Tリンパ球へ感染する経路には、細胞外環境中に拡散するウイルス粒子が関与するセルフリー感染様式と、ウイルス感染細胞と非感染細胞との間でのウイルス伝播による細胞間感染様式が存在する。従来より、セルフリー感染に比べて、細胞間感染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、細胞間感染では標的細胞あたりに伝達されるウイルス量がセルフリー感染より格段に多いことが示されている。HIVの感染経路は生体内におけるウイルス感染の拡大や病原性、あるいは免疫圧からの逃避に重要な役割を担っている。本研究課題では、セルフリー感染と細胞間感染を区別して抗ウイルス薬の活性を評価し、感染経路の特異性を明らかに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IRES配列を介して導入 (BFP-IRES-nef) したレポーターHIVである。セルフリー感染系では、本クローンから得られた組み換えHIV-1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。細胞間感染系では、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) で標識した標的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)、核酸系逆転写酵素阻害剤 (AZT、3TC、ddI、TDFおよびABC)、非核酸系逆転写酵素阻害剤 (NVPおよびEFV)、および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値およびinstantaneous inhibitory potential (IIP) を用いた。

また、抗HIV薬感受性に対するmultiplicity of infection (moi) の影響を明らかにするために、共培養時のドナー細胞とターゲット細胞の細胞数を変化させて解析を行った。

(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

細胞間感染系において共培養6時間後に観察さ

れるHIV-1導入Jurkat細胞からMT-4細胞へのGagタンパクの伝達性に対する影響を各種抗HIV薬存在下で解析した。その結果、核酸系逆転写酵素阻害剤や非核酸系逆転写酵素阻害剤、あるいはインテグラーゼ阻害剤の存在下では、標的細胞におけるGag陽性率に変化は認められなかった。一方、吸着阻害剤や融合阻害剤、CXCR4特異的侵入阻害剤により、標的細胞のGag陽性率は減少した。

(2) 細胞間感染に対する抗HIV薬の効果

細胞間感染系におけるHIV-1導入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、共培養30時間後に標的細胞中のBFP陽性率を指標に解析した。得られた数値をセルフフリー感染系での活性値と比較した結果、全ての薬剤でEC₅₀値が約2倍から100倍以上細胞間感染系で上昇していた。用量反応曲線よりIIPを算出して抗HIV薬の作用機序カテゴリー間で活性差を比較すると、核酸系逆転写酵素阻害剤に対する感受性が最も低下していた。

(3) 細胞間感染におけるウイルス負荷量 (moi) と抗HIV薬感受性の関係性

本解析では、細胞間感染系において、HIV-1導入Jurkat細胞と標的MT-4細胞の細胞比を1:1、5:1、20:1と変化させ、CXCR4拮抗剤であるTF14016に対する感受性を評価した。その結果、Gag伝達性を指標としたHIV-1 transferならびにBFP陽性率を指標とした細胞間感染のどちらにおいても、moiが増加するに従って、TF14016の抑制活性は減少した。

D. 考察

HIV-1 Gag transferにおいては、吸着・侵入・膜融合反応を阻害する薬剤により標的細胞におけるGag陽性率が減少したことからウイルス粒子と標的細胞との物理的接触とその後の融合反応が必須であることが判明した。一方で、逆転写反応以後のステップはGag transferには関与しないことが示唆された。本機序においてはエンドサイトーシスによるウイルス粒子の取り込みが関与すると推測されているが、HIV-1のウイルス複製を伴う感染 (productive infection) におけるエンドサイトーシスの寄与については未だに明確にはなっていない。本成

果はHIVのライフサイクルにおけるエンドサイトーシスの役割解明に資すると考えられる。

細胞間感染系における核酸系逆転写酵素阻害剤の低活性については薬剤の性質が一つの要因として考えられる。核酸系逆転写酵素阻害剤は2あるいは3段階のリン酸化を経て活性化体へと変換されたため細胞間感染での活性化体の低下あるいはリン酸化反応の遅延などが原因として考えられる。

E. 結論

セルフフリー感染に比べて、細胞間感染では1細胞あたりに伝播するウイルス量が多いことが特徴の一つとして報告されている。本研究では、この特性が薬剤感受性に影響を与えることを感染経路別薬効評価ならびにmoi依存性を通じて明らかにした。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tanaka PY, Oshima K, Matsuoka M, Sabino EC, Ferreira SC, Nishya AS, de Oliveira Costa R, Calore EE, Perez, NM, and Pereira J. Epstein-Barr viral load is associated to response in AIDS-related lymphomas. *Indian J Hematol Blood Transf.* 30 (3) :191-194, 2014.
2. Okazaki S, Mizuhara T, Shimura K, Murayama H, Ohno H, Oishi S, Matsuoka M, Fujii N. Identification of anti-HIV agents with a novel benzo [4, 5] isothiazolo [2, 3-a] pyrimidine scaffold. *Bioorg Med Chem.* 23 (7) :1447-1452, 2015.
3. Okazaki S, Mizuhara T, Shimura K, Murayama H, Ohno H, Oishi S, Matsuoka M, Fujii N. Investigations of possible prodrug structures for 2-(2-mercaptophenyl) tetrahydropyrimidines: reductive conversion from anti-HIV agents with pyrimidobenzothiazine and isothiazolopyrimidine scaffolds. *Org Biomol Chem.* In press.

2. 学会発表

1. 志村和也、松岡雅雄：HIV感染経路が抗ウイルス薬感受性とウイルス産生に与える影響. 第28回日本エイズ学会学術集会. 2014年12月3-5日、大阪

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

1. 特許出願：ベンゾイソチアゾロピリミジン誘導体またはその塩、およびウイルス感染症阻害剤ならびに医薬品、松岡雅雄外6名（特願 2014-206613）。

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業（エイズ対策実用化研究事業））
平成 26 年度 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、昨年までに、HIV-1 の CCR5 阻害薬 cenicriviroc (CVC)への耐性獲得が、種々の中和抗体に対する感受性に及ぼす影響を検討した。HIV-1 臨床株 KK_{wt} は、V3, CD4i, CD4bs を標的とする抗体に中和抵抗性であったが、in vitro で誘導した CVC 耐性株 KK₆₅₂₋₆₇ は、全ての抗体に対し感受性となった。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耐性株 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 KK_{wt} と同程度に回復した。本年度は、これらの CVC 耐性と中和抗体感受性にかかわる変異を詳細に検討した。CVC 耐性株 KK₆₅₂₋₆₇ と 1C10 逃避株 KK_{652-67/1C10-7} を組換えて検討した結果、V3 領域の R315K が、1C10 中和抵抗性に関連し、G324R が CVC 感受性の回復に重要であることが明らかとなった。一方、CVC 耐性株 KK₆₅₂₋₆₇ と 4E9C 抵抗性株 KK_{652-67/4E9C-11} の組換え変異体の解析では、V3 領域の G324R と C3 領域の E381K が 4E9C からの逃避と CVC 感受性回復に重要であることが判明した。これらの変異のうち、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 への感受性回復に重要な変異であると考えられた。

A. 研究目的

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 (*AIDS* **29**: 453-462, 2015)。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、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)。

我々は、昨年までに、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 KK_{wt} は、もともと V3, CD4i, CD4bs

を標的とする抗体に中和抵抗性であったが、*in vitro* で誘導した 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 KK_{wt} と同程度に回復した。

本年度は、CVC 耐性と中和感受性の分子メカニズムに加えて、中和エスケープ変異と CVC 感受性にかかわる変異の解析のため、様々な変異 Env 発現クローンを作製し、中和抗体からの逃避と CVC への感受性回復に重要な変異を調べた。

B. 研究方法

ウイルス: HIV-1 の臨床分離株である KK_{wt} 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で判定した。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 KK₆₅₂₋₆₇ のクローン解析と耐性誘導: 昨年度までの報告で、CVC 耐性ウイルス KK₆₅₂₋₆₇ 及び、親株 KK_{wt} から Env クローンを作製し、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を比較した。その結果、親株 KK_{wt} 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 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 から作製したシュードウイルスは、CVC への耐性を示した。一方、V3 をエピトープとする抗体

(1C10)を用いた中和試験の結果、KK_{wt}のクローンはすべて中和抵抗性であったが、KK₆₅₂₋₆₇は感受性であった。CD4i, CD4bs に対する抗体、4E9C, 49G2 には、KK_{wt}の5クローン中2クローンは抵抗性であり、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のクローンはすべて4E9C, 49G2に高感受性であった。これらの基礎データから、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変異株誘導した(図1)。

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: KK₆₅₂₋₆₇を中和抗体1C10又は4E9C存在下で継代し、誘導したエスケープ変異株KK_{652-67/1C10-7}及びKK_{652-67/4E9C-11}は、それぞれの抗体に抵抗性であった(図1)。

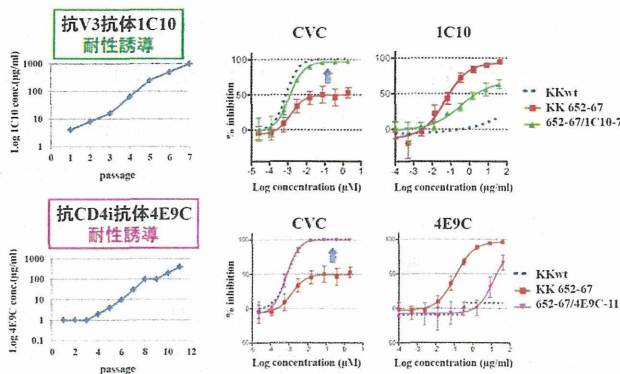


図1. CVC耐性株KK₆₅₂₋₆₇から誘導した中和抗体1C10及び4E9C抵抗性株(KK_{652-67/1C10-7}, KK_{652-67/4E9C-11})はCVC感受性を回復した。左のパネルは耐性誘導パッセージと抗体濃度を示す。CVC及び中和抗体1C10, 4E9Cによる中和感受性をTZM-bl細胞への感染により評価した。破線はKK_{wt}, 赤線はKK₆₅₂₋₆₇, 緑線はKK_{652-67/1C10-7}, 赤紫の線はKK_{652-67/4E9C-11}を示す。

1C10抵抗性株KK_{652-67/1C10-7}は、KK_{wt}と同等のCVC感受性を示した。1C10による選択圧で、

KK_{652-67/1C10-7}のエンベロープには、6か所の変異が入っていた。一方、4E9C抵抗性株KK_{652-67/4E9C-11}は、4E9Cを含むCD4i抗体には交差耐性となったが、KK_{wt}と同等のCVC感受性を示した。4E9Cによる選択圧で、エンベロープに5か所の変異が導入されたが、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持っていた。注目すべきことに、CVC耐性株KK₆₅₂₋₆₇から誘導した2種類の中和抗体抵抗性株は、共通の変異を含み、KK_{wt}と同程度にCVCに感受性であった(図1)。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CVC感受性が関連す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KK₆₅₂₋₆₇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。合計6か所のアミノ酸変異が同定された。すなわち、V2のT163I, V3のR315K及びG324R, C4のS446T, さらにgp41のE735KとR828Kである。これらの単独及び組み合わせたシユウドウイルスを作成し、中和感受性を調べた。その結果、V3領域のR315Kが、1C10への中和抵抗性に関連し、G324Rの変異がCVC感受性の回復に重要であることが示された(図2)。

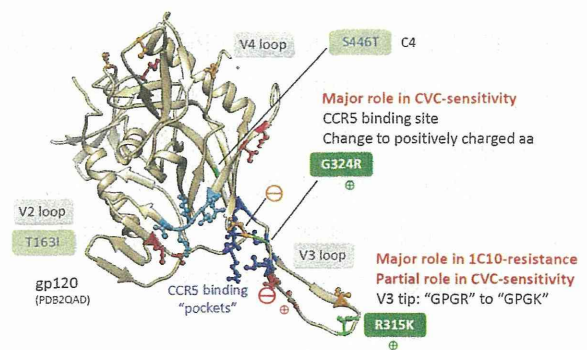


図2. 1C10抵抗性株KK_{652-67/1C10-7}に同定されたgp120中の4か所の変異。V3領域のR315Kが、

1C10 への中和抵抗性に関連し、G324R の変異が CVC 感受性の回復に重要であることが明らかとなった。

一方、CVC 耐性株 KK₆₅₂₋₆₇ と 4E9C 抵抗性株 KK_{652-67/4E9C-11} との間には、V2 に T163I、V3 に G324R、C3 に E381K さらに gp41 に S615N と L775L の 5 か所のアミノ酸変異がある。これらの単独及び組み合わせた組換え変異体を作製し、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 3)。

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。

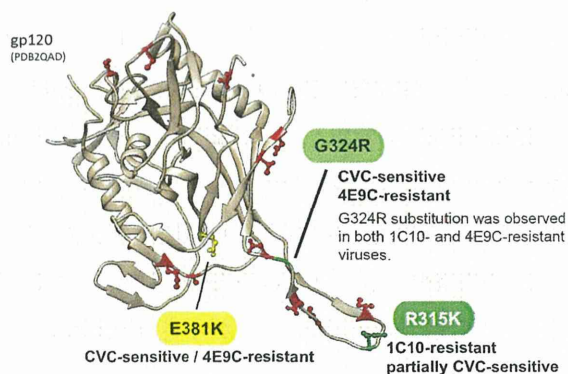


図 3. CVC 耐性株 KK₆₅₂₋₆₇ に誘導された中和抗体からのエスケープ変異: CVC 耐性株と中和抗体抵抗性株との組換え体を用いた解析の結果、抗 V3 抗体 1C10 抵抗性株では V3 の R315K と G324R、4E9C 抵抗性株では V3 の G324R と C3 の E381K が重要であることが示された。

D. 考察

我々は、昨年までに CCR5 阻害薬である CVC

に耐性となった 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となることを示し、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明らかにした。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 及び 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中和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、特に V3 の R315K と G324R, C3 の E381K 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 cART の可能性を示唆する。

F. 研究発表

(論文発表)

1) 原著論文

1. Matsushita, S., Yoshimura, K., Ramirez, K.P., Pisupati, J., Murakami, T. Passive transfer of neutralizing monoclonal antibody KD-247 reduces plasma viral load in patients chronically infected with HIV-1. *AIDS*, 29: 453-462, 2015.
2. Ramírez, K.P., Kuwata, T., Maruta, Y., Tanaka K., Muntasir, A., Yoshimura, K., Matsushita, S. Complementary and synergistic activities of anti-V3, CD4bs and CD4i antibodies derived from a single individual can cover a wide range of HIV-1 strains. *Virology*, 475:187-203, 2015.
3. Kirby, K.A., Ong Y.T., Hachiya, A., Laughlin, T.G., Chiang, L.A., Pan Y., Moran, J.L., Marchand, B., Singh, K., Gallazzi, F., Quinn, T.P., Yoshimura, K., Murakami, T., Matsushita S., Sarafianos, S.G. Structural basis of clade-specific HIV-1 neutralization by humanized anti-V3 monoclonal antibody KD-247. *The FASEB Journal*, 29:1-11, 2015.
4. Yoshimura, K., Harada, S., Boonchawalit, S., Kawanami, Y., Matsushita, S. Impact of maraviroc-resistant and low-CCR5-adapted mutations induced by in vitro passage on sensitivity to anti-envelope neutralizing antibodies. *J. Gen. Virol.* 95: 1816-1826, 2014.

(学会発表)

1. Boonchawalit, S., Harada, S., Matsushita, S., Yoshimura, K.: Impact of Maraviroc (MCV)-resistant mutations in C1 and C4 regions of gp120 on sensitivity to antibody-mediated neutralization. 20th International AIDS Conference. Melbourne, Australia. July 20-25, 2014.
2. Matsushita, S., Ramírez, K.P., Maruta, Y., Tanaka, K., Muntasir, A., Kuwata, T., Pisupati, J., Murakami, T., Yoshimura, K. Therapeutic application of neutralizing antibodies based on the recent data on complementary and synergistic activities against a wide range of HIV-1 strains. 15th Kumamoto AIDS Seminar. October 1-3, 2014. Kumamoto.
3. Kuwata, T., Enomoto, I., Baba, M., Matsushita, S. Acquisition of resistance to the CCR5 antagonist cenicriviroc renders HIV-1 sensitive to neutralizing antibodies. 15th Kumamoto AIDS Seminar. October 1-3, 2014. Kumamoto.
4. Ramírez, K.P., Kuwata, T., Maruta, Y., Tanaka K., Muntasir, A., Yoshimura, K., Matsushita, S. Evaluation of complementarity and synergy of conventional anti-HIV-1 antibodies derived from a single individual, 15th Kumamoto AIDS Seminar. October 1-3, 2014. Kumamoto.
5. Muntasir, A., Kuwata, T., Ramirez, K., Enomoto, I., Maruta, Y., Tanaka K., Rahman K., Nakahara, Y., Egami, Y., Kawanami, Y., Murayama, H., Shimura, K., Matsuoka, M., Matsushita, S. Mutations in gp41 that confer resistance to fusion inhibitors enhance the neutralization sensitivity to antibodies against both gp41 and gp120. 15th Kumamoto AIDS Seminar. October 1-3, 2014. Kumamoto.
6. Maruta, Y., Kuwata, T., Tanaka K., Nakahara, Y., Ramirez, K., Alam, M., Egami, Y., Hirata I., Suwa, Y., Morioka, H., Matsushita, S. Mechanism of post-attachment neutralization of single-chain variable fragment (scFv) from anti-V3 monoclonal antibody against HIV-1. 15th Kumamoto AIDS Seminar. October 1-3, 2014. Kumamoto.

7. Tanaka K., Kuwata, T., Maruta, Y., Ramirez, K., Muntasir, A., Egami, Y., Enomoto, I., Kawanami, Y., Matsushita, S. Construction of neutralizing antibody fragment against V3 with a broad cross-reactivity. 15th Kumamoto AIDS Seminar. October 1-3, 2014. Kumamoto.
8. Maruta, Y., Kuwata, T., Tanaka K., Nakahara, Y., Ramirez, K., Alam, M., Egami, Y., Hirata, I., Suwa, Y., Morioka, H., Matsushita, S. Mechanism of post-attachment neutralization of single-chain variable fragment (scFv) from anti-V3 monoclonal antibody against HIV-1. HIV R4P 2014 . October 28-31,2014. Cape Town, South Africa.
9. Kuwata, T., Yoshimura, K., Wu, F., Ourmanov, I., Hirsch, V.M., Yokoyama, M., Sato, H., and Matsushita, S. Mutations in gp41 is Critical to Escape from B404, a Broad Neutralizing Antibody Against SIV, Which Recognizes a V3/V4 Conformational Epitope. 32nd Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS. November 11 - 14, 2014. Portland, Oregon, USA.
10. Matsushita, S., Ramírez, K.P., Maruta, Y., Tanaka, K., Muntasir, A., Kuwata, T., Pisupait, J., Murakami, T., Yoshimura, K. Therapeutic application of neutralizing antibodies based on the recent data on complementary and synergistic activities against a wide range of HIV-1 strains. the 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) Emerging Infectious Diseases Meeting Jan. 26-27, 2015. Taipei, Taiwan
11. Maruta, Y., Kuwata, T., Tanaka, K., Nakahara, Y., Ramirez, K., Alam, M., Egami, Y., Hirata, I., Suwa, Y., Morioka, H., Matsushita, S. Mechanism of post-attachment neutralization of single-chain variable fragment (scFv) from anti-V3 monoclonal antibody with cross-reactivity. Korea-Japan Joint Seminar on HIV/AIDS. Jan 10, 2015. Kumamoto.
12. Stanoeva, K., Fukuda, A., Kuwata, T., Kawanami, Y., Satou, Y., Matsushita, S. Measuring the HIV reservoir in a cohort of Japanese patients on long-term ART. Korea-Japan Joint Seminar on HIV/AIDS. Jan 10, 2015. Kumamoto.
13. Muntasir, A., Kuwata, T., Ramirez, K., Maruta, Y., Tanaka K., Shimura, K., Oishi, S., Fujii, N., Matsuoka, M., Matsushita, S. Enhanced Neutralization of HIV-1 with Fusion Inhibitor Resistant Mutations. The annual Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI 2015). February 23-26, 2015. Seattle, Washington, USA.
14. Ramírez, K.P., Kuwata, T., Maruta, Y., Tanaka K., Muntasir, A., Yoshimura, K., Matsushita, S. Complementary effect of anti-V3, CD4bs and CD4i antibodies accounts for cross-neutralizing and non-neutralizing activities against HIV-1. 第28回日本エイズ学会学術集会・総会. 2014年12月3日-5日, 大阪.
15. 江上由華、丸田泰広、田中和樹、Muntasir A., Ramirez K., 桑田岳夫、松下修三. V3 エピトープへの交叉反応性をもつ中和抗体の遺伝子組み換えによる小型化の試み. 第28回日本エイズ学会学術集会・総会. 2014年12月3日-5日, 大阪.
16. 桑田岳夫、松下修三. 強力な抗 SIV 中和抗体 B404 からの逃避メカニズムの解析. 第28回日本エイズ学会学術集会・総会. 2014年12月3日-5日, 大阪.

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 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 血液内科学・膠原病内科学・感染免疫診療部 特任助教

研究要旨

HIV 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、新規薬剤の開発は常なる課題となっている。本研究は HIV が耐性化しにくい・耐性化しても他薬剤との交差耐性を有しない薬剤や、新規の作用機序で HIV の感染・複製を阻止する阻害剤の開発、及びウイルス学・細胞生物学・結晶解析学的手法を駆使し開発の基礎となる前臨床的データの蓄積を目的として行った。その結果、当該年度において cyclohexyl-*bis*-THF という新たな構造を有する有望な新規プロテアーゼ阻害剤(PI), GRL-0739 を同定開発し、国際誌において報告した。更に特徴的な polycycle 構造を有し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 GRL-09510、また methoxy-chloro-benzene 構造を P2 部位に有し、強力な抗 HIV 活性及び HIV の同化合物に対する耐性獲得に著しい抵抗性を示す GRL-10413 といった新規化合物を同定、そ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 CA の著明な自己崩壊を誘導する事を証明した。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 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、HIV 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 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 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 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株の誘導は、低濃度の薬剤存在下で野生型 HIV 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 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 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 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。ボランティアからの 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、cyclohexyl-*bis*-THF という新たな構造を有し、野生株および高度多剤耐性株に対して強力な抗 HIV 活性を発揮する新規 PI, GRL-0739 を米国研究グループと共同開発、結晶構造解析を含めた同化合物の詳細な検討を行った (Amano, Mitsuya, AAC, 2015)。また特徴的な polycycle 構造を有し、複数の高度多剤耐性臨床分離株に対しても抗ウイルス活性を完全に維持している強力な新規 PI である

GRL-09510 を同定し、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)。また methoxy-chloro-benzene 構造を P2 部位に有し、強力な抗 HIV 活性及び HIV の耐性獲得に著しい抵抗性を示す GRL-10413 を同定し、その詳細な検討を行った。

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、スコアの良い化合物は実際に試験管内での抗 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、その内 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。

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. Masayuki Amano, Yasushi Tojo, Pedro Miguel Salcedo-Gómez, Garth L. Parham, Debananda Das, Arun K.

Ghosh, and Hiroaki Mitsuya. A Novel Tricyclic Ligand-Containing Nonpeptidic HIV-1 Protease Inhibitor, GRL-0739, Effectively Inhibits The Replication of Multi-Drug-Resistant HIV-1 Variants and Has a Desirable Central Nervous System (CNS) Penetration Property *In Vitro*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015. Feb-17.

2. 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
3. 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 Transcriptase Inhibitor, Potently Blocks HIV-1 *ex vivo* Infection of Langerhans Cells within Epithelium, *Journal of Investigative Dermatology*, 134(4):1158-61, 2014

学会発表

1. 中田浩智, Debananda Das, 前田賢次, Kalapala Venkateswara Rao, Arun K. Ghosh, 満屋裕明、新規 CCR5 阻害剤 GRL-007 の抗 HIV 活性の検討、2014 年 12 月 5 日、第 28 回日本エイズ学会学術集会 (大阪)
2. 天野将之、Pedro Miguel Salcedo-Gomez、満屋裕明、HIV-1 Capsid 蛋白の自己崩壊誘導作用を有する低分子化合物 (HIV-1 CA decomposer) の同定、2014 年 12 月 5 日、第 28 回日本エイズ学会学術集会 (大阪)
3. 天野将之、Pedro Miguel Salcedo-Gomez、Arun K. Ghosh、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

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、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。また、既知の HLA 由来ペプチドを結合した HLA-Cw12 の X 線結晶構造解析を行い、構造決定に成功した。

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、細胞内消化過程を介してHLA-Cw12に提示されるHIV由来ペプチドの同定を行い、同定したペプチドについては、それらを提示した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

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行った。

また、ペプチドワクチン設計に向けて、原子レベルの構造情報を得るために、HLA-Cw12 の X 線結晶構造解析を行った。

(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、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確立した

HEK293 細胞での HLA-Cw12 分泌発現の系を用いて、スクリーニングを実際に開始した。HLA-Cw12 分泌発現-W6/32 抗体による精製の系を基に、測定に十分な量の Cw12 を得るために、条件検討を行った。その結果、大量培養条件を決定し、測定可能なペプチド量を得ることが可能となった。実際に、MALDI-TOF-MS によって目的の分子量（8～10 アミノ酸程度を想定）付近にシグナルが確認できたため、さらにペプチドを濃縮し、LC-MS/MS で配列を同定する条件を詰めている。

また、HLA-Cw12 の結晶構造解析については、分解能 2.5 Å で構造決定することができた。

D. 考察

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に向けて、HEK293 細胞を用いた HLA-Cw12 の分泌発現・精製条件が確立し、結合ペプチドを同定できる目途が立った。随時、各 HIV 蛋白質をコードする遺伝子を Cw12 と強発現させ、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しい、配列を同定していく予定である。また、HLA-Cw12 の立体構造を明らかにしたことで、HLA-Cw12 は比較的長いペプチド（11 アミノ酸残基）でも、中央部が外側に露出し、両端でペプチド溝に結合することによって、機能的に提示されることがわかった。結合ペプチドスクリーニングの際には、想定よりも分子量の大きいところまで解析する必要があることがわかった。

E. 結論

(1) 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。

(2) HLA-Cw12 の X 線結晶構造解析に成功し、ペプチドワクチン設計に向けて原子レベルの構造情報を得ることができた。

G. 研究発表

1. 論文発表

無し

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

HEK293 細胞を用いた HLA-Cw12 拘束性 HIV-1 由来免疫制御ペプチドの探索. 第 37 回日本分子生物学会. 横浜. 2013 年 12 月 5 日

2. 阪田竜馬、黒木喜美子、前仲勝実

合理的 HIV ワクチン設計のための gp120 エピトープ探索系の確立に向けて. 第 37 回日本分生生物学会. 横浜. 2014 年 11 月 25 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

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Chikata T, Carlson JM, Tamura Y, Borghan MA, Naruto T, Hashimoto M, Murakoshi H, Le AQ, Mallal S, John M, Gatanaga H, Oka S, Brumme ZL, Takiguchi M.	Host-specific adaptation of HIV-1 subtype B in the Japanese population.	Journal of Virology.	88(9)	4764-4775.	2014
Rahman MA, Kuse N, Murakoshi H, Chikata T, Gatanaga H, Oka S, Takiguchi M.	Raltegravir and elvitegravir-resistance mutation E92Q affects HLA-B*40:02-restricted HIV-1-specific CTL recognition.	Microbes and Infection.	16(5)	434-438	2014
Kuse N, Akahoshi T, Gatanaga H, Ueno T, Oka S, Takiguchi M.	Selection of TI8-8V mutant associated with long-term control of HIV-1 by cross-reactive HLA-B*51:01-restricted cytotoxic T cells.	Journal of Immunology.	193(10)	4814-4822	2014
Sun X, Fujiwara M, Shi Y, Kuse N, Gatanaga H, Appay V, Gao GF, Oka S, Takiguchi M.	Superimposed epitopes restricted by the same HLA molecule drive distinct HIV-specific CD8+ T cell repertoires.	Journal of Immunology.	193(1)	77-84.	2014
Tanuma J, Quang VM, Hachiya A, Joya A, Watanabe K, Gatanaga H, Van Vinh Chau N, Chinh NT, Oka S.	Low prevalence of transmitted drug resistance of HIV-1 during 2008-2012 antiretroviral therapy scaling up in Southern Vietnam.	Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes.	66(4)	358-364.	2014
Jan S, Hyun S, Kim S, Lee S, Lee I-S, Baba M, Lee Y, Yu J.	Cell penetrating, dimeric α -helical peptides are nanomolar inhibitors of HIV-1 transcription.	Angew. Chem. Int. Ed.	53	10086-10089	2014
Tanaka PY, Ohshima K, Matsuoka M, Sabino EC, Ferreira SC, Nishya AS, de Oliveira Costa R, Calore EE, Perez NM, Pereira J.	Epstein-Barr Viral Load is Associated to Response in AIDS-Related Lymphomas.	Indian J Hematol Blood Transfus	30 (3)	191-194	2014
Okazaki S, Mizuhara T, Shimura K, Murayama H, Ohno H, Oishi S, Matsuoka M, Fujii N.	Identification of anti-HIV agents with a novel benzo[4,5]isothiazolo[2,3-a]pyrimidine scaffold.	Bioorg Med Chem	23 (7)	1447-1452	2015