

- 月 大阪
- 48) 湯永博之. ART の将来展望 ～INSTI based Regimen の臨床的有用性～ 第 28 回日本エイズ学会学術講演会 2014 年 12 月 大阪
- 49) 湯永博之. 抗 HIV 治療のターニングポイント～ドルテグラビルの臨床的位置づけ～ 第 28 回日本エイズ学会学術講演会 2014 年 12 月 大阪
- 50) 椎野禎一郎、服部純子、湯永博之、吉田繁、石ヶ坪良明、近藤真規子、貞升健志、横幕能行、古賀道子、上田幹夫、田邊嘉也、渡辺大、森治代、南留美、健山正男、杉浦互. 国内感染者集団の大規模塩基配列 5 : MSM コミュニティへのサブタイプ B 感染の動態 第 28 回日本エイズ学会学術講演会 2014 年 12 月 大阪
- 51) 仲里愛、木内英、渡邊愛祈、小松賢亮、大金美和、池田和子、小林泰一郎、柳川泰昭、水島大輔、源河いくみ、西島健、青木孝弘、渡辺恒二、本田元人、矢崎博久、田沼順子、照屋勝治、塚田訓久、湯永博之、菊池嘉、岡慎一. 認知機能低下が疑われた患者における認知障害の関連因子の検討 第 28 回日本エイズ学会学術講演会 2014 年 12 月 大阪
- 52) 大岸誠人、四柳宏、堤武也、湯永博之、森屋恭璽、小池和彦. HIV と HCV の重複感染を有する血友病患者における、複数の遺伝子型の HCV バリアントの潜在的な混合感染に関する次世代シーケンサーを用いた検討 第 28 回日本エイズ学会学術講演会 2014 年 12 月 大阪
- 53) 岡崎玲子、蜂谷敦子、服部純子、湯永博之、渡辺大、長島真美、貞升健志、近藤真規子、南留美、吉田繁、森治代、内田和江、椎野禎一郎、加藤真吾、千葉仁志、伊藤俊広、佐藤武幸、上田敦久、石ヶ坪良明、古賀一郎、太田康男、山元泰之、福武勝幸、古賀道子、岩本愛吉、西澤雅子、岡慎一、岩谷靖雅、松田昌和、重見麗、保坂真澄、林田庸総、横幕能行、上田幹夫、大家正義、田邊嘉也、白阪琢磨、小島洋子、藤井輝久、高田昇、山本政弘、松下修三、藤田次郎、健山正男、杉浦互. 新規 HIV/AIDS 診断症例における薬剤耐性 HIV の動
- 向 第 28 回日本エイズ学会学術講演会 2014 年 12 月 大阪
- 54) 青木孝弘、柴田怜、柳川泰昭、小林泰一郎、水島大輔、西島健、木内英、渡辺恒二、本田元人、田沼順子、塚田訓久、照屋勝治、湯永博之、菊池嘉、岡慎一. 当センターにおける Raltegravir の耐性症例の検討 第 28 回日本エイズ学会学術講演会 2014 年 12 月 大阪
- 55) 青木孝弘、柴田怜、柳川泰昭、小林泰一郎、水島大輔、西島健、木内英、渡辺恒二、本田元人、田沼順子、塚田訓久、照屋勝治、湯永博之、菊池嘉、岡慎一. 当センターにおける Rilpivirine 耐性症例の検討 第 28 回日本エイズ学会学術講演会 2014 年 12 月 大阪
- 56) 大木桜子、土屋亮人、林田庸総、増田純一、湯永博之、菊池嘉、和泉啓司郎、岡慎一. 日本人 HIV 感染者におけるラルテグラビル薬物動態の検討 第 28 回日本エイズ学会学術講演会 2014 年 12 月 大阪
- 57) 土屋亮人、林田庸総、濱田哲暢、加藤真吾、菊池嘉、岡慎一、湯永博之. HIV 患者におけるラルテグラビル髄液中濃度と薬物トランスポーターの遺伝子多型についての検討 第 28 回日本エイズ学会学術講演会 2014 年 12 月 大阪
- 58) 塚田訓久、増田純一、赤沢翼、水島大輔、西島健、青木孝弘、木内英、渡辺恒二、本田元人、矢崎博久、源河いくみ、田沼順子、照屋勝治、湯永博之、菊池嘉、岡慎一. 当センターにおける初回抗 HIV 療法の動向と新規インテグラーゼ阻害薬の使用経験 第 28 回日本エイズ学会学術講演会 2014 年 12 月 大阪
- 59) 西島健、田中紀子、松井優作、川崎洋平、古川恵太郎、柴田怜、柳川泰昭、谷崎隆太郎、小林泰一郎、水島大輔、青木孝弘、渡辺恒二、木内英、本田元人、矢崎博久、田沼順子、塚田訓久、照屋勝治、湯永博之、菊池嘉、岡慎一. 尿 $\beta 2$ ミクログロブリンの TDF 腎障害の予測における有用性の検討 第 28 回日本エイズ学会学術講演会 2014 年 12 月 大阪

- 60) 柳川泰昭、田里大輔、照屋勝治、柴田怜、古川恵太郎、谷崎隆太郎、小林泰一郎、水島大輔、西島健、木内英、青木孝弘、渡辺恒二、本田元人、田沼順子、塚田訓久、瀧永博之、菊池嘉、岡慎一。 当院における ART 時代の Kaposi 肉腫症例の治療成績・予後 第 28 回日本エイズ学会学術講演会 2014 年 12 月 大阪
- 61) 柴田怜、青木孝弘、西島健、古川恵太郎、谷崎隆太郎、柳川泰昭、林泰一郎、水島大輔、渡辺恒二、木内英、本田元人、田沼順子、塚田訓久、瀧永博之、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一。 HIV 感染症合併ニューモシスチス肺炎の治療におけるステロイド併用期間の検討 第 28 回日本エイズ学会学術講演会 2014 年 12 月 大阪
- 62) 阪井恵子、近田貴敬、長谷川真理、瀧永博之、岡慎一、滝口雅文。 無治療の日本人 HIV 感染者における Gag-Protease 依存のウイルス増殖能と病態進行性の網羅的解析 第 28 回日本エイズ学会学術講演会 2014 年 12 月 大阪
- 63) 林田庸総、土屋亮人、瀧永博之、菊池嘉、岡慎一。 血友病の HIV slow progressor 6 例を対象とした deep sequencing による tropism 解析 第 28 回日本エイズ学会学術講演会 2014 年 12 月 大阪
- 64) 大金美和、塩田ひとみ、小山美紀、柴山志穂美、久地井寿哉、岩野友里、柿沼章子、大平勝美、池田和子、瀧永博之、岡慎一。 HIV 感染血友病患者の健康関連 QOL の実態調査 第 28 回日本エイズ学会学術講演会 2014 年 12 月 大阪
- 65) 塩田ひとみ、大金美和、渡部恵子、坂本玲子、伊藤ひとみ、川口玲、石塚さゆり、山田三枝子、高山次代、羽柴知恵子、鍵浦文子、木下一枝、長與由紀子、城崎真弓、池田和子、瀧永博之、岡慎一。 HIV 感染血友病患者の医療と福祉の連携へのアプローチ～療養支援アセスメントシートの検討～ 第 28 回日本エイズ学会学術講演会 2014 年 12 月 大阪
- 66) 木内英、加藤真吾、細川真一、田中瑞恵、中西美紗緒、定月みゆき、田沼順子、瀧永博之、矢野哲、菊池嘉、岡慎一。 成人と新生児における AZT リン酸化物細胞内濃度の比較 第 28 回日本エイズ学会学術講演会 2014 年 12 月 大阪
- 67) 水島大輔、田沼順子、瀧永博之、菊池嘉、Nguyen Kinh、岡慎一。 ハノイの腎機能障害を有する HIV 感染者におけるテノフォビル使用による腎機能予後 第 28 回日本エイズ学会学術講演会 2014 年 12 月 大阪
- 68) 木内英、瀧永博之、水島大輔、西島健、渡辺恒二、青木孝弘、矢崎博久、本田元人、田沼順子、源河いくみ、塚田訓久、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一。 プロテアーゼ阻害薬の骨密度低下メカニズムに関する研究 第 28 回日本エイズ学会学術講演会 2014 年 12 月 大阪
- 69) 本田元人、遠藤元誉、古川恵太郎、柴田怜、谷崎隆太郎、柳川泰昭、小林泰一郎、水島大輔、西島健、青木孝弘、木内英、渡辺恒二、矢崎博久、田沼順子、塚田訓久、瀧永博之、照屋勝治、菊池嘉、尾池雄一、岡慎一。 HIV 感染者における新たな慢性炎症マーカーと動脈硬化症 第 28 回日本エイズ学会学術講演会 2014 年 12 月 大阪
- 70) 渡邊愛祈、仲里愛、小松賢亮、高橋卓巳、木内英、大金美和、池田和子、田沼順子、照屋勝治、塚田訓久、瀧永博之、加藤温、関由賀子、今井公文、菊池嘉、岡慎一。 当院の HIV 感染者における適応障害患者の HIV 治療状況とカウンセリング介入についての検討 第 28 回日本エイズ学会学術講演会 2014 年 12 月 大阪
- 71) 小松賢亮、仲里愛、渡邊愛祈、塩田ひとみ、大金美和、西島健、矢崎博久、田沼順子、照屋勝治、塚田訓久、瀧永博之、菊池嘉、岡慎一。 HIV 感染者のターミナルケア —HIV 治療に消極的な感染者との心理面接— 第 28 回日本エイズ学会学術講演会 2014 年 12 月 大阪
- 72) 土屋亮人、瀧永博之、岡慎一。 新規に開発されたイムノクロマトグラフィー法による第 4 世代 HIV 迅速診断試薬の臨床的有用性の検討 第 28 回日本エイズ学会学術講演会 2014 年 12 月 大阪

- 73) 中家奈緒美、小山美紀、木下真里、塩田ひとみ、伊藤紅、杉野祐子、大金美和、池田和子、塚田訓久、田沼順子、照屋勝治、瀧永博之、菊池嘉、岡慎一。 当院における受診を中断した HIV 感染症患者の傾向 第 28 回日本エイズ学会学術講演会 2014 年 12 月 大阪
- 74) 木下真里、池田和子、中家奈緒美、塩田ひとみ、小山美紀、伊藤紅、杉野祐子、大金美和、塚田訓久、田沼順子、照屋勝治、瀧永博之、菊池嘉、岡慎一。 (独) 国立国際医療研究センターエイズ治療・研究開発センターにおける外国人患者対応一初診時のコミュニケーションについて一 第 28 回日本エイズ学会学術講演会 2014 年 12 月 大阪
- 75) 谷崎隆太郎、青木孝弘、西島健、古川恵太郎、柴田怜、柳川泰昭、小林泰一郎、水島大輔、渡辺恒二、木内英、本田元人、田沼順子、塚田訓久、瀧永博之、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一。 HIV 患者の梅毒治療におけるアモキシシリンの治療効果 第 28 回日本エイズ学会学術講演会 2014 年 12 月 大阪
- 76) 渡辺恒二、永田尚義、柳川泰昭、小林泰一郎、水島大輔、西島健、青木孝弘、木内英、本田元人、田沼順子、塚田訓久、瀧永博之、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一。 HIV 感染患者における赤痢アメーバ潜伏感染についての検討 第 28 回日本エイズ学会学術講演会 2014 年 12 月 大阪
- 77) 小林泰一郎、渡辺恒二、古川恵太郎、柴田怜、柳川泰昭、谷崎隆太郎、水島大輔、西島健、青木孝弘、木内英、本田元人、田沼順子、照屋勝治、塚田訓久、瀧永博之、菊池嘉、岡慎一。 HIV 合併アメーバ性肝膿瘍の発症リスクとしての HLA 対立遺伝子の解析 第 28 回日本エイズ学会学術講演会 2014 年 12 月 大阪
- 78) 佐藤麻希、早川史織、増田純一、和泉啓司郎、瀧永博之、菊池嘉、岡慎一。 Dolutegravir と Rilpivirine による Small tablet への剤形変更がアドヒアランスの改善につながった症例 第 28 回日本エイズ学会学術講演会 2014 年 12 月 大阪
- 79) 古川恵太郎、柴田怜、谷崎隆太郎、水島大輔、西島健、渡辺恒二、青木孝弘、本田元人、矢崎博久、田沼順子、塚田訓久、木内英、瀧永博之、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一。 免疫再構築症候群による縦隔リンパ節炎を発症し、気管・食道瘻孔形成を認めたが保存的に治療し得た非結核性抗酸菌症の 1 例 第 28 回日本エイズ学会学術講演会 2014 年 12 月 大阪
- 80) 本田元人、中川堯、山本正也、谷崎隆太郎、柴田怜、古川恵太郎、柳川泰昭、小林泰一郎、水島大輔、西島健、木内英、青木孝弘、渡辺恒二、矢崎博久、田沼順子、塚田訓久、瀧永博之、照屋勝治、菊池嘉、原久男、岡慎一。 血友病 A に合併した狭心症に対し冠動脈形成術後の抗血小板療法 2 剤併用期間短縮を目的として Zotarolimus 薬剤溶出ステントを用いた一例 第 28 回日本エイズ学会学術講演会 2014 年 12 月 大阪
- 81) Rahman Mohammad Arif, Kuse Nozomi, Murakoshi Hayato, Chikata Takayuki, Tran Van Giang, Gatanaga Hiroyuki, Oka Shinichi, Takiguchi Masafumi. Different effects of drug-resistant mutations on CTL recognition between HIV-1 subtype B and subtype A/E infections 第 28 回日本エイズ学会学術講演会 2014 年 12 月 大阪
- G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
1. 特許取得
なし。
 2. 実用新案登録
なし。
 3. その他
なし。

HIV 逆転写酵素 の 138 番アミノ酸	B*18(+) n=19	B*18(-) n=1,088
E138 (wild-type)	15	1,084
E138G	2	1
E138A	1	2
E138K	1	1
E138G/A/K	4 (21.05%)	4 (0.37%)

表 1. HLA-B*18 と HIV 逆転写酵素 138 番アミノ酸

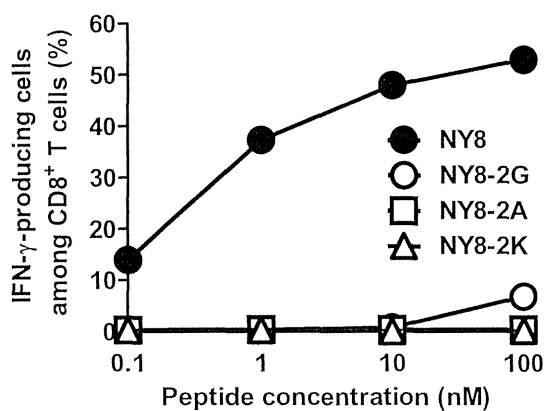


図 1. エピトープペプチドに対する HLA-B*18 拘束性 CTL 活性

HIV 逆転写酵素の 138 番アミノ酸	fold resistance
E138 (wild-type)	1
E138G	5.1
E138A	7.1
E138K	2.7

表 2. 逆転写酵素 138 番アミノ酸の rilpivirine 感受性に対する影響

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 薬の開発と
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

分担研究者 馬場昌範 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 教授
研究協力者 岡本実佳 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 准教授
外山政明 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 研究員
織田隆誠 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 大学院生

研究要旨：薬剤耐性ウイルスに対する新たな治療戦略を確立することを目的として、この3年間、1) Tat/cyclin T1/TAR RNA の相互作用を標的とした新しい薬剤の同定と開発、2) 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の探索の2課題について取り組んだ。1) については、cyclin T1/CDK9/Tat/TAR RNA で構成される複合体の形成に着目し、この複合体の形成を阻害する低分子化合物の同定を試みた結果、HIV-1 産生を選択的に阻害する薬剤 C3 を同定することに成功した。一方、2) に関しては、HIV-1 に対して中和活性を持つ単クローン抗体 KD-247 からの逃避変異株を用いて、CCR5 阻害薬である cenicriviroc (CVC) 存在下での長期培養実験を行い、得られた breakthrough ウイルスの KD-247 に対する感受性について検討した。その結果、breakthrough ウイルスは KD-247 に対する感受性を回復することを明らかにした。

A. 研究目的

副作用が少なく、アドヒアランスが高いインテグラーゼ阻害薬の登場によって、抗エイズ療法 (antiretroviral therapy ; ART) は、エイズ患者の予後を著しく改善し、ほぼ完成の域に達したと考えられている。しかし、既存の抗エイズ薬は、患者の体内からウイルスを完全に排除できないことから、患者はエイズの発症を防ぐために、一生にわたり服薬を続けなければならない。しかしながら、HIV-1 はそのライフサイクルにおいて高頻度に変異を起こすことから、長期間にわたる治療は、薬剤耐性ウイルスの出現による薬効の減弱と、それに伴う病態の進行が危惧されている。また、長期間の服用に伴う薬剤の慢性的な毒性 (副作用) の影響も無視で

きない。

HIV-1 のライフサイクルにおいて、プロウイルス DNA から転写過程は、HIV-1 ゲノム RNA が増幅する唯一のステップであり、ウイルスの増殖には必須のステップの1つである。HIV-1 の転写過程は、宿主細胞因子の cyclin T1/CDK9 と HIV-1 由来の Tat タンパク質が複合体を形成し、その後、この複合体が宿主遺伝子に組み込まれた HIV-1 プロウイルス上の TAR RNA に移行し、RNA ポリメラーゼ II がリン酸化されることで開始される。そこで、われわれは、cyclin T1/CDK9/Tat/TAR RNA で構成される複合体の形成に着目し、3年間の本研究期間に、この複合体の形成を阻害する低分子化合物の同定を試みた。その結果、慢性潜伏感染細胞で

から HIV-1 産生を選択的に阻害する薬剤を同定することに成功した。

一方、本研究班内部での共同研究として、松下(熊本大学)らの中和抗体に関する研究成果と、馬場らによる CCR5 阻害薬に関する研究成果を融合させることで、中和抗体と CCR5 阻害薬との併用による、新たな抗エイズ治療の可能性を探ることを目的とした研究を進めてきた。この 3 年間に、松下らが同定した中和抗体 KD-247 に対するエスケープ変異株が、われわれが同定した CCR5 阻害薬 *cenicriviroc* (CVC) に対して、高感受性を示すかどうかを検証するとともに(馬場担当)、逆に CCR5 阻害薬耐性ウイルスが中和抗体に対して高感受性を示すかどうかを検証する(松下担当)研究を、それぞれのグループが実施してきた。最終的には、これら双方の研究成果を持ち寄ることで、KD-247 と CVC の併用による新たな ART の確立を目指している。

B. 研究方法

ウイルス: R5 HIV-1 の実験室内継代株である JR-FL WT と、それから誘導された KD-247 に対するエスケープ変異株の JR-FL MT は、共同研究者の松下より分与された。ウイルスの増殖と長期継代培養には、当研究室で樹立した CCR5 を発現させた MOLT-4 細胞である MOLT-4/CCR5 細胞を用いた。ウイルスストックは、後述の TZM-bl 細胞を用いてタイトレーションを行い、使用するまで、 -80°C にて保存した。

細胞株: (1) 転写阻害薬の抗 HIV-1 アッセイには、HIV-1 慢性感染細胞株である OM-10.1 および U1 細胞を用いた。(2) KD-247 および CVC の抗 HIV-1 アッセイには、CCR5 を発現し、HIV-1 LTR の下流に β -ガラクトシダーゼおよびルシフェラーゼ遺伝子が組み込まれた TZM-bl 細胞を用いた。

薬剤: (1) 薬剤は cyclin T1 を標的とする *in silico* スクリーニングアッセイ(報告済)で選

び出した。(2) CVC は武田薬品工業から分与された。

抗 HIV-1 アッセイ: (1) 薬剤の抗 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。薬剤の細胞毒性は、MTT 法にて生細胞数を測定した。(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。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

(1) 転写阻害薬の抗 HIV-1 効果: 同定した薬剤 C3 の化学構造を図 1 に、慢性感染細胞における抗 HIV-1 効果を図 2 に示す。

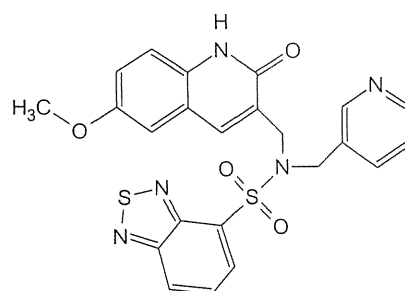


図 1. 同定した薬剤 C3 の化学構造.

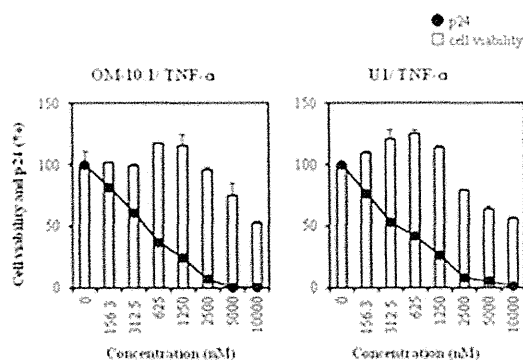


図 2. C3 の抗 HIV-1 効果.

C3 は慢性感染細胞である OM-10.1 および U1 細胞において、TNF- α などの刺激により誘導される HIV-1 の産生を、濃度依存性に強く抑制することが分かった。また、その後のレポーターアッセイなどによる詳細な作用機序の検討およびドッキングポーズの解析から、C3 は図 3 に示すような形で cyclin T1 に結合することで、Tat の cyclin T1 への結合を阻害することが明らかとなった。

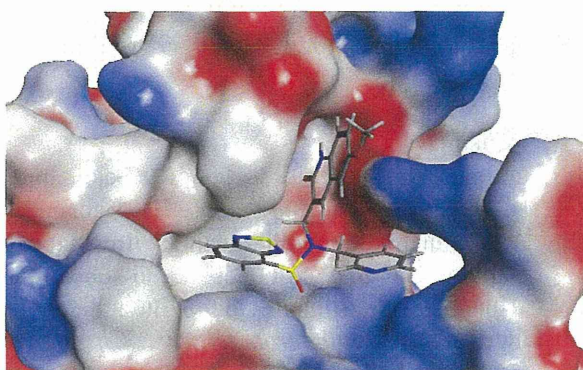


図 3. C3 の cyclin T1 への結合。

(2) 中和抗体逃避変異 HIV-1 の CCR5 阻害薬に対する感受性：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 に対しては、JR-FL MT の方が JR-FL WT よりも高い感受性を示した。そこで、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 (data not shown)。表 1 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。

表 1. 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 \pm 0.20	0.34 \pm 0.15
No compound	2.14 \pm 0.35	1.34 \pm 0.39
CVC	1.07 \pm 0.68	2.16 \pm 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。

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、薬剤なしで、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 2)。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 KD-247 に対する感受性の増加の方が顕著であった。

表 2. 各ウイルスの KD-247 に対する感受性

Virus	EC_{50} (μ g/ml)	
	JR-FL WT	JR-FL MT
Original	11.4 \pm 0.5	> 100
No compound	1.0 \pm 0.1	23.3 \pm 4.1
CVC	1.2 \pm 0.4	6.6 \pm 1.5

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。

D. 考察

現在、抗エイズ治療で用いられている薬剤のほとんどは、耐性ウイルスの出現が不可避であることから、多くの薬剤が開発された今日においても、新たな作用機序を有する薬剤の開発は必要である。そこで、本研究においては、これらの耐性ウイルスにも有効な、新規作用機序を

有する抗エイズ薬を開発するために、HIV-1 の転写機構を標的とする薬剤の開発研究を実施した。その結果、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を明らかにした。今後は C3 の構造最適化を行い、より活性が高く、宿主細胞に対する毒性が低い誘導体を得ることが出来れば、臨床応用の可能な薬剤の開発も可能ではないかと思われる。

次に中和抗体と CCR5 阻害薬の併用に関する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。さらに、われわれは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ない、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いなかった。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 の可能性について追求したい。

E. 結論

HIV-1 の遺伝子発現を阻害する薬剤については、cyclin T1/CDK9/Tat/TAR RNA で構成される複合体の形成を標的とし、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することに成功した。

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先生らのグループが行っている研究の結果と考え合わせると、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 の選択肢としての可能性があると思われた。

F. 研究発表（本研究に関するもの）

（論文発表）

1. Ordonez P, Hamasaki T, Isono Y, Sakakibara N, Ikejiri M, Maruyama T, Baba M. Anti-human immunodeficiency virus type 1 activity of novel 6-substituted 1-benzyl-3-(3,5-dimethylbenzyl)uracil derivatives. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**: 2582-2589 (2012).
2. Toyama M, Hamasaki T, Uto T, Aoyama H, Okamoto M, Hashimoto Y, Baba M. Synergistic inhibition of HTLV-1-infected cell proliferation by combination of cepharanthine and a tetramethylnaphthalene derivative. *Anticancer Res.* **32**: 2639-2646 (2012).
3. Sohl CD, Kasiviswanathan R, Kim J, Pradere U, Schinazi RF, Copeland WC, Mitsuya H, Baba M, Anderson KS. Balancing antiviral potency and host toxicity: identifying a nucleotide inhibitor with an optimal kinetic phenotype for HIV-1 reverse transcriptase. *Mol. Pharmacol.* **82**: 125-133 (2012).
4. Chande AG, Baba M, Mukhopadhyaya R. A single step assay for rapid evaluation of inhibitors targeting HIV type 1 Tat mediated long terminal repeat transactivation. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **28**: 902-906 (2012).
5. Kumamoto H, Kawahigashi S, Wakabayashi H, Nakano T, Miyaike T, Kitagawa Y, Abe H, Ito M, Haraguchi K, Balzarini J, Baba M, Tanaka H. Tuning efficiency of the 4-exo-trig cyclization by the electronic effect: ring closure of 3,3-difluoro-4-pentenyl carbon radicals and synthesis of a gem-difluorocyclobutane nucleoside. *Chem. Comm.* **48**: 10993-10995 (2012).
6. Nakamura M, Matsumoto Y, Toyama M, Baba M, Hashimoto Y. Organosilicon compounds

- as adult T-cell leukemia cell proliferation inhibitors. *Chem. Pharm. Bull.* **61**: 237-241 (2013).
7. Hamasaki T, Okamoto M, Baba M. Identification of novel inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 replication by *in silico* screening targeting cyclin T1/Tat interaction. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**: 1323-1331 (2013).
 8. Haraguchi K, Takeda S, Kubota Y, Kumamoto H, Tanaka H, Hamasaki T, Baba M, Paintsil E, Cheng Y-C. From the chemistry of epoxy-sugar nucleosides to the discovery of anti-HIV agent 4'-ethynylstavudine – Festinavir. *Curr. Pharm. Des.* **19**: 1880-1897 (2013).
 9. 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).
 10. 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).
 11. 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).
 12. 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).
 13. 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).
 14. 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).
 15. 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.
 16. Haraguchi K, Takeda S, Kubota Y, Kumamoto H, Tanaka H, Hamasaki T, Baba M, Paintsil E, Cheng Y-C, Urata Y. Next generation anti-HIV agent 4'-ethynyl-stavudine: from the bench to the clinic. In: Attaur-Rahman (Ed), *Frontiers in Clinical Drug Research: HIV*, in press. Bentham Science Publishers, United Arab Emirates.
- (学会発表)
1. 森園翔一朗, 岡本実佳, 濱崎隆之, 張 旭, 隅田泰生, 馬場昌範. コンドロイチン硫酸の抗 HIV-1 効果について. 第 49 回日本ウイルス学会九州支部総会, 2012 年 8 月 24 日, 那覇.
 2. 蝶野英人, 岡本実佳, 井上晃一, 百々克行, 津田大嗣, 川野泰広, 濱崎隆之, 馬場昌範, 峰野純一. RNA 分解酵素 MazF を用いた HIV-1 感染症遺伝子治療法の開発. 第 26 回日本エイズ学会学術集会, 2012 年 11 月 25 日, 横浜.
 3. 濱崎隆之, 岡本実佳, 馬場昌範. Tat 依存性の HIV-1 産生を抑制する新規低分子化合物の同定. 第 26 回日本エイズ学会学術集会, 2012 年 11 月 25 日, 横浜.
 4. 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.
 5. 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.
 6. Baba M. Discovery and development of novel antiretrovirals: from compound screening to clinical trials. *14th Kumamoto AIDS Seminar*, October 30, 2013, Kumamoto, Japan.
 7. 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.

8. 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
特になし。

研究課題名：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

生体内でのHIV感染細胞は周囲の細胞との相互作用を介して感染の拡大、あるいは宿主免疫による排除・逃避を繰り返しながら持続感染を維持している。本研究課題では細胞障害性T細胞 (CTL) が抗HIV薬の活性に与える影響を解析した。続いて既感染細胞と非感染細胞との細胞間HIV感染経路に着目しウイルス感染経路が抗HIV薬の活性に与える影響を評価した。これらの解析成果は実際の感染状態により近い状況を反映していると考えられる。

A. 研究目的

ヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus: HIV) は、CD4陽性T細胞の減少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薬を組み合わせる抗レトロウイルス療法の確立により、感染者での良好なウイルスコントロールが可能になっている。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。

HIV感染者体内では、宿主免疫機構によるウイルス感染細胞の排除と、これを逃避した感染細胞と周囲の非感染細胞との相互作用による感染の持続・拡大を繰り返しながら感染状態を維持している。ウイルス感染細胞の排除には、細胞障害性T細胞 (CTL) が大きく寄与していることが知られている。一方、感染の拡大においては、既感染細胞と非感染細胞との相互作用による細胞間HIV伝達経路が重要な役割を果たすことが示されている。

そこで、本研究課題では、感染細胞を取り巻く環境に着目した研究を展開した。具体的には、インテグラーゼ領域内のCTL逃避変異に着目し、これらの変異によるインテグラーゼ阻害剤感受性変化を解析した。次にHIV中和抗体耐性株に対する次世代融合阻害剤であるSC34やSC34EKなどの活性を解析し、耐性株の特性を明らかにした。最後に、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。以上の解析により、実際の感染状態をより深く反映した結果が得られると期待される。

B. 研究方法

a. CTL逃避変異によるインテグラーゼ阻害剤感受性解析

(1) CTL 逃避変異の導入およびウイルス作製
テンプレートには、HIV-1_{BH10}由来の pol 領域を有する pNL_{WT} を用いた。本感染性クローンに、site-directed mutagenesis 法を用いて A124N、A124T、I203M および L234I 変異を導入した。これらの組換え感染性クローンを 293FT 細胞へ遺伝子導入し、組換えウイルスを得た。

(2) 抗 HIV 活性の測定

評価対象のインテグラーゼ阻害剤として、現在臨床で用いられている raltegravir (RAL)、elvitegravir (EVG) および dolutegravir (DTG) ならびに次世代の MK-2048 を用いた。対照には核酸系逆転写酵素阻害剤である AZT を用いた。これらの抗 HIV 薬の感受性は、NCK 細胞を用いた beta-galactosidase レポーターアッセイにより評価した。

b. 中和抗体逃避変異株に対する融合阻害剤の活性評価

(1) 抗 HIV 活性の測定

評価対象の中和抗体耐性株として、HIV-1_{JR-FL} の gp120 V3 領域に G314E 変異を有する JR-FL_{G314E} 株と、HIV-1BaL の gp120 V2 領域に potential N-linked glycosylation site の導

入ならびに V3 領域に R315K 変異を有する BaL_{PNGS/K} 株を用いた。評価に供した融合阻害剤は、T-20、C34、SC34 および SC34EK と、対照として核酸系逆転写酵素阻害剤である ddC を用いた。これらの薬剤の感受性は、TZM-bl 細胞を用いた beta-galactosidase レポーターアッセイにより評価した。

c. HIV 感染経路別薬剤活性評価

(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 EC₉₀ 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. 研究結果および考察

a. CTL 逃避変異によるインテグラーゼ阻害剤感受性解析

我々のこれまでのインテグラーゼ阻害剤耐性に関する研究により、インテグラーゼ耐性変異はインテグラーゼ活性中心部に位置する catalytic core domain (50-212 アミノ酸残基) 内に導入されることが多く認められている。そこで本研究課題では、T124N、I203M および L234I の 3 変異に着目し、これらを解析対象とした。

pNL_{WT} に上記変異を導入し、組換えクローンを作製した。なお、pNL_{WT} のインテグラーゼにおける 124 番目のアミノ酸は A (アラニン) であるため、A124N、I203M および L234I に加えて、A124T 変異体も作製した。これらの感染性クローンを 293FT 細胞に導入して組換えウイルスを得たが、これらの組換えウイルスの感染性に関して、野生株との差は認められなかった。

次にこれらのウイルスを用いてインテグラーゼ阻害剤に対する感受性の変化を解析した。初めに、対照として用いた AZT に対する感受性変化を解析したが、CTL 逃避変異を有する全ての組換えウイルスは、野生株と同程度の感受性を示した。本解析に用いたインテグラーゼ阻害剤は、すべて野生株に対して nM レベルの EC₅₀ 値を示した。同様に、A124N、A124T、I203M および L234I 変異体は、評価に供したすべてのインテグラーゼ阻害剤に感受性を示し、野生株と比較した耐性度の変化は 0.7-1.5 倍であり、CTL 変異によるインテグラーゼ阻害剤感受性への影響は認められなかった。

b. 中和抗体逃避変異株に対する融合阻害剤の活性評価

熊本大学エイズ学研究センターの松下教授らが開発した HIV-1 中和抗体である KD-247 に対する逃避ウイルス誘導試験で同定された各変異を、R5 指向性 HIV-1 である JR-FL 株や BaL 株に導入し、融合阻害剤に対する感受性の変化を解析した。その結果、gp120 V3 tip 上に位

置する G314E 変異を導入した JR-FL_{G314E} 株は、各種融合阻害剤 (T-20、C34、SC34、SC34EK) に約 5~10 倍の高感受性を示した。一方、gp120 V2 領域への N 型糖鎖付加配列と V3 tip 上の R315K 変異を導入した BaL_{PNGS/R} 株では上記融合阻害剤に対する感受性に大きな変化は認められなかった、以上の結果から、中和抗体と融合阻害剤の併用療法の有用性が示された。

c. HIV 感染経路別薬剤活性評価

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。両感染経路における抗HIV薬の感受性を比較した。

(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。

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。

(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リー感染系での活性値と比較した結果、全ての薬剤でEC₉₀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。以上の結果はHIV-1感染細胞を介する感染経路は抗ウイルス薬からの逃避という点で有利に作用していると考えられた。

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る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。

また特筆すべきことに感染経路間での抗HIV薬活性差はインテグラーゼ阻害剤で顕著であった。セルフリー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細胞間感染系における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。インテグラーゼ阻害剤により組み込みが阻害されると環状DNAが副産物として産生されウイルス遺伝子が環状DNAから転写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。

(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. 結論

インテグラーゼ領域内に導入された CTL 逃避変異は、本解析で用いたインテグラーゼ阻害剤に対する感受性に変化を与えなかった。特にMK-2048などの次世代インテグラーゼ阻害剤はまだ上市されていないことから、これらの薬

剤未経験 HIV 感染者における治療前インテグラーゼ阻害剤耐性変異出現の可能性は低いと推測される。

HIV-1 JRFL 株の gp120 V3 領域内に導入された中和抗体 KD-247 耐性変異 (G314E) は、融合阻害剤に対する過感受性を付与したことから、中和抗体と融合阻害剤の併用あるいはスイッチ使用が効果的な抗 HIV 療法として考えられる。

核酸系逆転写酵素阻害薬はセルフリー感染に比べ、細胞間感染系において抗ウイルス活性が低下していた。セル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。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Li X, Qian H, Miyamoto F, Naito T, Kawaji K, Kajiwara K, Hattori T, Matsuoka M, Watanabe K, Oishi S, Fujii N, Kodama EN. A simple, rapid, and sensitive system for the evaluation of anti-viral drugs in rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 424 (2) : 257-261, 2012.
2. Mizuhara T, Oishi S, Ohno H, Shimura K, Matsuoka M, Fujii N. Concise synthesis and anti-HIV activity of pyrimido [1, 2-c] [1, 3] benzothiazin-6-imines and related tricyclic heterocycles. *Org Biomol Chem.* 10 (33) : 6792-6802, 2012
3. Mizuhara T, Oishi S, Ohno H, Shimura K, Matsuoka M, Fujii N. Structure-activity relationship study of pyrimido [1, 2-c] [1, 3] benzothiazin-6-imine derivatives for potent anti-HIV agents. *Bioorg Med Chem.* 20 (21) : 6434-6441, 2012
4. Tanaka G, Nakase I, Fukuda Y, Masuda R, Oishi S, Shimura K, Kawaguchi Y, Takatani-Nakase T, Langel U, Gräslund A, Okawa K, Matsuoka M, Fujii N, Hatanaka Y, Futaki S. CXCR4 stimulates macropinocytosis: implications for cellular uptake of arginine-rich cell-penetrating peptides and HIV. *Chem Biol.* 19 (11) : 1437-1446, 2012
5. 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) : 908-915, 2013
6. 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) : 4322-4329, 2013
7. Mizuhara T, Oishi S, Ohno H, Shimura K, Matsuoka M, Fujii N. Design and synthesis of biotin- or alkyne-conjugated photoaffinity probes for studying the target molecules of PD 404182. *Bioorg Med Chem.* 21 (7) : 2079-2087, 2013
8. 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.
9. 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.
10. 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.
 11. 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.
 12. 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.
 13. 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.
 14. 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.
1. 戸上博昭、志村和也、宮沢孝幸、松岡雅雄 : ニホンザルより検出された SRV-4 に対する抗 HIV 薬の効果. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会. 2012 年 11 月 13-15 日、大阪
 2. 志村和也、水原司、大石真也、藤井信孝、松岡雅雄 : 広範なスペクトルを有する新規 HIV 薬の同定とその開発. 第 26 回日本エイズ学会学術集会. 2012 年 11 月 24-26 日、横浜
 3. 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
 4. 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
- F. 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 (PCT) : 新規ケモカイン受容体拮抗剤、松岡雅雄 外 6 名 (PCT/JP2012/055099)
 2. 特許出願 (国内) : 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) .
 3. 特許出願 (国内) : 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) .

2. 学会発表

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）） 分担研究報告書

分担研究課題名：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、ウイルスの中和抵抗性メカニズムの解明に基づき、新たな併用療法に関する基礎研究を行っている。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)薬剤耐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、誘導させた CVC 耐性株 KK₆₅₂₋₆₇ は、全ての抗体に対し感受性となった。一方、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中和エスケープ変異株 KK_{652-67/1C10-7} および 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。多数の組み換えウイルスを用いた解析にて、V3 領域の R315K、G324R と C3 領域の E381K が中和抵抗性と CVC 感受性の回復に重要であることが明らかとなった。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

HIV-1 の生活環に作用する抗ウイルス薬を組み合わせて用いる多剤併用療法 (combination antiretroviral therapy ; cART) の導入により、エイズ患者の予後は著しく改善された。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、世界で最初に低分子 CCR5 阻害薬 TAK-779 を同定し、強力な抗 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)。

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、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)。

中和抗体に対する HIV-1 の感受性/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う目的で、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 耐性と中和感受性との関係を調べた。

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 は中和抗体感受性となる: 馬場らが分離した CVC に対する薬剤耐性 HIV-1、KK₆₅₂₋₆₇ は、ポリクローナルな状態でも種々の中和抗体に対して高感受性であったが、このフェノタイプの変化に関与するアミノ酸の同定のため、クローナルレベルでの解析が必要である。我々は、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、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 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)。

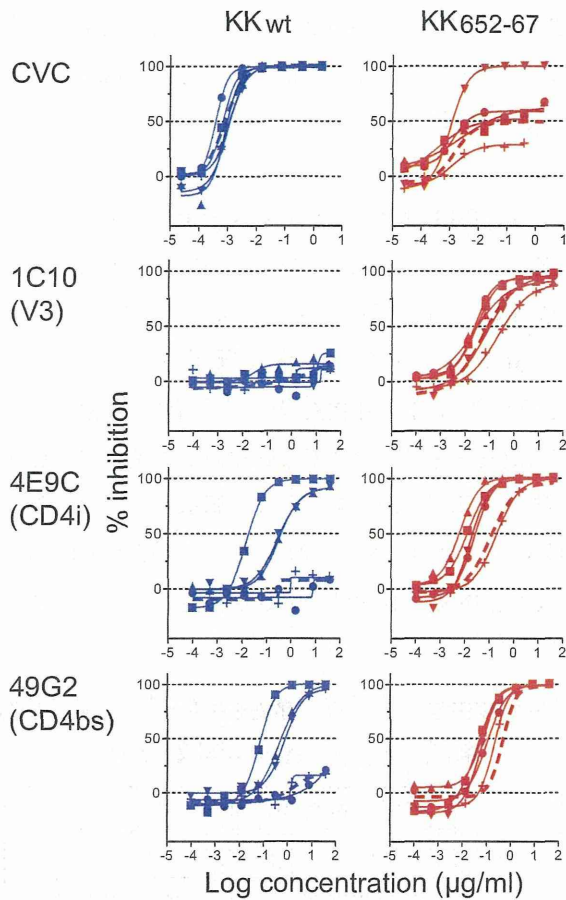


図1. 親株 KKwt 及び CVC 耐性株 KK₆₅₂₋₆₇ 由来の Env を発現するシュードウイルスは種々の抗体に対して感受性である。単クローン抗体 1C10 (V3), 4E9C (CD4i), 49G2 (CD4bs) による中和活性を TZM-bl 細胞への感染により評価した。破線はポリクローナルな感染性ウイルス、実線はシュードウイルス・クローンの結果を示す。

一方、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 KK_{652-67/1C10-7} 及び KK_{652-67/4E9C-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、元の感染性ウイルスと同様に 4E9C 抵抗性であった。

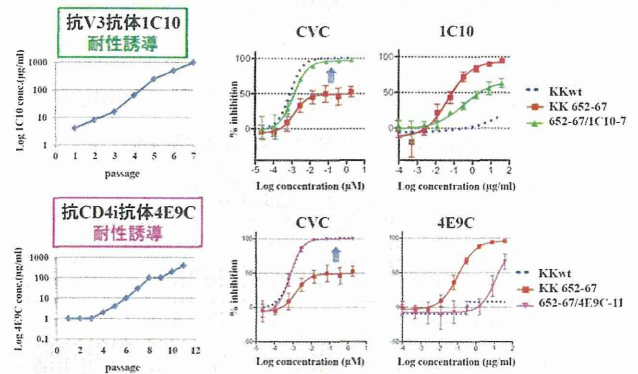


図 2. CVC 耐性株 KK₆₅₂₋₆₇ から誘導した中和抗体 1C10 及び 4E9C 抵抗性株 (KK_{652-67/1C10-7}, KK_{652-67/4E9C-11}) は CVC 感受性を回復した。左のパネルは耐性誘導パッセージと抗体濃度を示す。CVC 及び中和抗体 1C10, 4E9C による中和感受性を TZM-bl 細胞への感染により評価した。破線は KK_{wt}, 赤線は KK₆₅₂₋₆₇, 緑線は、KK_{652-67/1C10-7} 又は KK_{652-67/4E9C-11} を示す。

注目すべきことに、CVC 耐性株 KK₆₅₂₋₆₇ から誘導した中和抗体抵抗性株は、両者とも KKwt 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 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 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ュ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 3)。

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						

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 KK₆₅₂₋₆₇ と 1C10 抵抗性株 KK_{652-67/1C10-7} との組換え Env を作製し、シュウ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。

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 4)。

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、シュウ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。

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 5)。

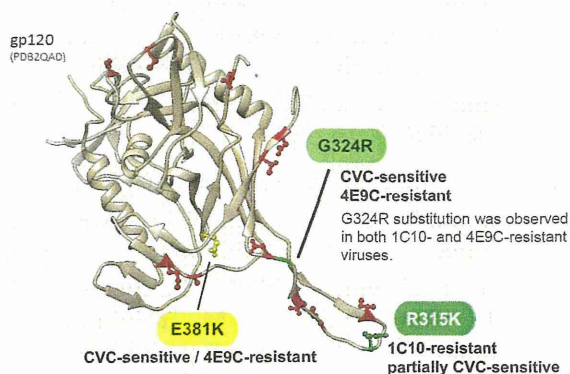


図 5. 中和抵抗性と CVC 感受性回復には V3/C3 領域の変異が重要である。CVC 耐性株 KK₆₅₂₋₆₇ と中和抵抗性株との組換え Env を持つシュードウイルスの中和試験によって V3 領域の R315K、G324R と C3 領域の E381K が中和抵抗性と CVC 感受性の回復に重要であることが示された。

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中和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, 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 結合領域に関連した変異であり、アミノ酸変異レベルで、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できると考えられる。

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 cART 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、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 の可能性を示唆している。