

201421019A

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）

課題番号 H25-エイズ-一般-006

HIV エンベロープの治療標的構造に関する研究

-平成26年度 総括・分担研究報告書-

研究代表者 吉村 和久

平成27（2015）年 3月

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）

課題番号 H25-エイズ-一般-006

HIV エンベロープの治療標的構造に関する研究

-平成26年度 総括・分担研究報告書-

研究代表者 吉村 和久

平成27（2015）年 3月

研究組織

研究者氏名		研究者氏名	職名
吉村 和久	研究代表者	国立感染症研究所 エイズ研究センター	室長
横山 勝	研究分担者	国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター	主任研究官
武内 寛明	研究分担者	東京医科歯科大学 ウイルス制御学分野	助教
細谷 紀彰	研究分担者	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
井上 誠	研究分担者	ダイナベック株式会社	部長・ AOR センター長
鳴海 哲夫	研究分担者	静岡大学大学院工学研究科	准教授
桑田 岳夫	研究分担者	熊本大学エイズ学研究センター	助教

目次

I. 総括研究報告書

- HIV エンベロープの治療標的構造に関する研究..... 1
吉村 和久 国立感染症研究所エイズ研究センター・室長

II. 分担研究報告書

1. Env の薬剤逃避メカニズムと抗体免疫誘導に関する研究..... 5
吉村 和久 (国立感染症研究所 エイズ研究センター・室長)
2. Env の変異が立体構造及び動的性質 (揺らぎ) に与える影響の研究..... 9
横山 勝 (国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター・主任研究官)
3. HIV の吸着・侵入過程を制御する宿主因子の研究..... 15
武内 寛明 (東京医科歯科大学 ウイルス制御学・助教)
4. Env 変異と細胞融合能の変化に関する研究..... 20
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)
5. Env 変異体および変異誘導蛋白の作製に関する研究..... 23
井上 誠 (ダイナベック株式会社 遺伝子創薬事業部・部長, AOR センター長)
6. 新規侵入阻害剤に関する研究..... 25
鳴海 哲夫 (静岡大学大学院工学研究科・准教授)
7. Env の立体構造変化を捉える抗体の研究..... 29
桑田 岳夫 (熊本大学エイズ学研究センター・助教)

III. 研究成果の刊行に関する一覧表..... 35

IV. 研究成果の刊行物・別刷..... 39

I. 総括研究報告書

HIV エンベロープの治療標的構造に関する研究

研究代表者

吉村 和久 国立感染症研究所エイズ研究センター・室長

研究分担者

横山 勝 国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター・主任研究官
武内 寛明 東京医科歯科大学ウイルス制御学分野・助教
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
井上 誠 ディナベック株式会社・遺伝子創薬事業部長・AOR センター長
鳴海 哲夫 静岡大学工学部工学研究科・准教授
桑田 岳夫 熊本大学エイズ学研究センター・助教

研究要旨

本研究班は昨年度に引き続き、Env 三量体の構造変化を制御するケミカルプローブおよびその誘導体を新規に作製し、それらの逃避ウイルスを誘導後（鳴海、桑田、井上、吉村）、逃避変異 Env を持つ多数の感染性クローンを作製し、それぞれの薬剤の耐性責任部位の同定を行った。その結果、化合物の構造と耐性変異の出現部位と順番に関係性があるということがわかった。また、横山らが HIV-1 gp120 の分子動力学計算により得たトラジェクトリーをランダム行列理論により解析すると、V2 と V3 をつなぐアロステリックパスの存在が示唆された。その結果をもとに Env の立体構造および動的性質の影響をコンピュータシミュレーションにより比較し解析を行ったところ、耐性を獲得する順番とそれにより次に出現する変異部位の関係がシミュレーション上でも証明できる事がわかってきた。横山らによるシミュレーションは桑田らによる SIV の Env の中和抗体からの逃避研究でもその整合性が証明されており、耐性変異と構造予測の基礎データを SIV と HIV の両方から現在も解析を進めている。鳴海らは、ベツリン酸から様々なトリテルペン類への誘導体化研究により、ベツリン酸部位をオレアノール酸に置換した誘導体 (OKS2-045) も抗 HIV 活性 ($IC_{50} = 19 \mu M$) を示すことを見出した。さらに、アミノ酸リンカー長の最適化研究により、8-アミノオクタン酸から 5-アミノペンタン酸に置換した誘導体 (OKS4-007) では抗 HIV 活性が 3 倍程度向上することを明らかにした。細谷らは変異 Env と受容体との関係を、迅速かつ様々な組み合わせで調べるため、分割タンパク質を用いた新規アッセイ系を構築し、臨床分離株の Env を用いて多数検討を行った。解析したすべての HIV 感染者 80 検体全例で細胞指向性の決定が可能であった。また同じ V3 であっても細胞指向性が R5、Dual となるクローンが多数検出された。また、武内らは、HIV-1 感染制御候補因子群 8 種のうち 7 種までの評価を完了することが出来、そのなかの 1 種の機能阻害剤が抗 HIV-1 活性を有することが分かった。

A. 研究目的

HIV の同定以来、治療薬の開発は HIV 特異的酵素を標的とするものが主流であった。ところが近年、より感染初期の段階での阻害を目的とする薬剤の開発が進んで来た。また、近年開発が盛んになって来たマイクロビサイドとの関わりも重要といえる。これらのことは、Env の構造を中心とした感染の侵入過程の基礎的研究の遂行が、新たな HIV 治療標的及び免疫原の発見において、また新規治療法の開発において必要不可欠な課題であることを示している。

この研究班では、HIV の侵入を阻害する物質から逃避する過程で誘導される Env の立体構造

が、新たな免疫原として、もしくは薬剤のターゲットとしてどのように形成されているかをウイルス学的側面と構造シミュレーションの面から検討する。また、対応する標的細胞（受容体や膜内因子）からのアプローチもあわせて行い、Env の立体構造上の脆弱性の発見を目指す。

そこで本研究では、(1)変異 Env の立体構造変化と薬剤及び抗体感受性の関係の研究と、(2)変異 Env と受容体の関係を 2 つの柱として研究を進め、相互にデータを参照し、新規治療方法の確立を Env の立体構造のダイナミズムを解き明かしつつ目指す。これまで、それぞれの研究者が、独立して行って来た Env 研究を、吸着・

侵入時の構造変化解析を縦系にし、各自の研究成果を横系に組み合わせて、これまで不明な点が多かった Env 構造変異解析と新たな治療法の開発を進めていく。

B. 研究方法

平成26年度は、柱(1)では新規薬剤開発とそれらの薬剤からの逃避ウイルスを誘導し解析を行った(吉村、鳴海、井上、桑田)。また、逃避変異 Env の立体構造および動的性質の影響を解析するため、HIV-1 gp120全長分子モデルおよびV1/V2を除いたHIV-1 gp120分子モデルを、ホモロジーモデリング法と分子動力学計算を組み合わせるにより構築を試みた(横山)。また、構築したモデルで耐性 Env と gp120 の結合様式をシミュレートした。柱(2)では、変異 Env と受容体との関係を、迅速かつ様々な組み合わせで調べるため、分割タンパク質を用いた新規アッセイ系の構築を行い、それらを用いて臨床ウイルスの Env を組込んで、genotype と phenotype の比較を行った(細谷)。また、受容体の発現や、感染効率を変化させ得る膜近傍細胞内因子を独自の shRNA の系を用いて探索した(武内)。

(倫理面への配慮)

本研究における遺伝子組み換え生物等を用いる実験については、当該研究機関の承認および、必要な場合は文部科学大臣認証を得た上で行われた。ヒト検体を用いた研究は当該施設の研究倫理委員会の承認を得て行われた。

C. 研究結果

(1) 変異 Env の立体構造変化と薬剤及び抗体感受性の関係の研究：これまで我々が行ってきた Env 三量体の構造変化を誘起するケミカルプローブ候補化合物は主に CD4 類似低分子化合物(CD4MC)であり、これらを用いて多くの耐性誘導を行ってきた。その結果、各 CD4MC に共通した3つの耐性変異(V255M, T375I, M426I)が同定できた(吉村、鳴海)。組み換えウイルスの作製により、これらの変異と耐性発現が密接に関与している事が確認された。また、新たに合成された侵入阻害剤が、これらの変異ウイルスに対して交差耐性を持つかどうかを検討した結果、基本骨格を共通に持つ化合物に関しては、ほとんど交差耐性を示した(鳴海、吉村)。耐性誘導により得られたこれらの耐性 Env と CD4MC との結合様式をシミュレートするために、横山らは、Env のゆらぎの変化を調べた。HIV-1 gp120 の分子動力学計算により得られたトラジェクトリーをランダム行列理論により解

析すると、V2 と V3 をつなぐアロステリックパスの存在が示唆された。NBD 耐性変異の gp120 と NBD 誘導体の結合様式への影響を調べると、NBD 耐性変異の結合様式への影響は NBD 誘導体によって異なることが示された(横山)。

CD4MC とは全く構造の異なる Env 三量体の構造変化を誘起するケミカルプローブ候補化合物としてベツリン酸誘導体の IC9564 の構造活性相関及び構造変化誘起能を明らかにした。ベツリン酸から様々なトリテルペン類への誘導体化研究により、ベツリン酸部位をオレアノール酸に置換した誘導体(OKS2-045)も抗 HIV 活性(IC₅₀ = 19 μM)を示すことを見出した。さらに、アミノ酸リンカー長の最適化研究により、8-アミノオクタン酸から 5-アミノペンタン酸に置換した誘導体(OKS4-007)では抗 HIV 活性が3倍程度向上することを明らかにした(鳴海)。また、これまでサブタイプが変わると効果が減少する傾向のあった CD4MC とは異なり、多くの Env に結合可能と考えられている sCD4 domain 1 分子をセンダイウイルスの系で合成し効果を確認した(井上)。

In vivo モデルとしても重要な SIV 感染サルから抗 Env 抗体のスクリーニングを行い、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。SIV に対する強力な中和抗体である B404 から in vivo 継代により逃避ウイルスを分離した。組み換えウイルスを用いた解析により、Env の gp41 の cytoplasmic tail を短くする変異と HR1 領域の V571M 変異が B404 からの逃避に重要であることを示した。また、ヒトの抗体遺伝子をクローニングして組み換え抗体を作成する系を確立し、HIV-1 感染患者から多数の組み替え抗体を作成した。(桑田)。

(2) 変異 Env と受容体に関する研究：解析した HIV 感染者 80 検体全例で細胞指向性の決定が可能であった。また同じ V3 であっても細胞指向性が R5、Dual となるクローンが多数検出された。(細谷)。

武内らが本研究開始時点で探索目標とした細胞膜近傍に局在している HIV-1 感染制御候補因子群 8 種のうち、7 種の候補因子群の HIV-1 感染制御因子としての評価を完了した。その中で、前年度に同定した制御因子 2 種に加え、細胞膜上の受容体である新たな HIV-1 感染制御因子 1 種を見出すことが出来、更にはこの受容体拮抗剤が抗 HIV-1 活性を有することが分かった。(武内)。

D. 考察

(1) 変異 Env の立体構造変化と薬剤及び抗

体感受性の関係の研究：本研究により得られた HIV-1 gp120 全長分子モデルは、最近報告されたクライオ電子顕微鏡の結果や、X 線結晶構造解析の結果とほぼ一致したため、この成果をもとに CD4MC や抗体からの逃避変異の解析を進めていく予定である。オレアノール酸誘導体 OKS2-045 および OKS4-007 では 3 位アセトキシ基およびスタチンの C 末端はエステル基であることが抗 HIV 活性発現に重要である。これはベツリン酸誘導体 IC9564 とは異なる結合様式で Env と相互作用していることを示唆しており、新たなシード化合物を見出したと言える。B404 抗体が結合する Env gp120 ではなく、gp41 の変異により抗体から逃避することがわかった。この結果は、gp41 の変異による Env 三量体の立体構造や翻訳後修飾の変化が、抗体から逃避するメカニズムとして重要であることを示唆している。

(2) 変異 Env と受容体に関する研究：DSP-Pheno assay は P3 や生ウイルスを使用せず安全に最短 5 日で co-receptor usage を測定可能である。この検出系を使用して細胞膜融合を比較した結果、CCR5 に対する細胞融合能に経時的変化は見られなかったのに対し、CXCR4 に対する細胞膜融合能は上昇する傾向が見られた。CXCR4 を使用するウイルスの出現と CD4 の減少は関連するという報告があり、細胞膜融合能の変化も病原性に関与している可能性が考えられる。昨年度に引き続き候補因子の探索を行った結果、新たに 1 種の HIV-1 感染制御因子を見出すことが出来た。この細胞因子は細胞膜上の受容体であり、その受容体に対する特異的拮抗剤が抗 HIV-1 活性を有することが分かったことから、その受容体が新たな治療標的となる可能性が示唆された。

E. 結論

NBD 耐性変異の gp120 と NBD 誘導体の結合様式への影響は、NBD 誘導体によって異なることが示された。今後、多くの逃避ウイルス変異

との比較検討を行う事で、モデリングの精度をより上げて行く事が可能となるといえる。また、Env 三量体の構造変化を制御する新規のケミカルプローブの創製を目指して、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 IC9564 の構造活性相関研究を行い、新たなシード化合物となる OKS2-045 および OKS4-007 を見出した。SIV モデルを用いて gp41 の変異による抗体からの逃避を示すことができた。逃避メカニズムを解析していくことで Env の構造の特徴をあきらかにし、ワクチンや薬剤開発につなげていきたい。HIV で行っている研究との比較により、感染モデルとしてのサルの有効性の議論が可能となるといえる。

新たなフェノタイプ検査系の DSP-Pheno assay により解析した HIV 感染者 40 例 80 検体全例で細胞指向性の決定が可能であった。また、細胞膜上の受容体として機能している宿主因子が、HIV-1 侵入過程を制御する新規細胞因子であることを見出し、その拮抗剤が抗 HIV-1 活性を有することが分かった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

各研究分担者の頁参照

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

1. 特許取得

US patent :

Patent No.; US 8,722,861 B2

Date of Patent; May 13, 2014

Title; Monoclonal antibodies that bind to the V3 loop of HIV-1 gp120.

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

II. 分担研究報告書

Env の薬剤逃避メカニズムと抗体免疫誘導に関する研究

研究代表者 吉村 和久 国立感染症研究所エイズ研究センター 室長

研究要旨

昨年度までに HIV-1 エンベロープの立体構造を変化させて、中和抗体の感受性を増強させる 5 つの CD4 類似低分子化合物(CD4MC) (NBD-556, YYA-021, HAR-171, JRC-II-19, HAR-431)を用いて耐性に関するに研究を行い、誘導された CD4MC 耐性ウイルスの Env gp120 領域のシークエンスの結果をもとに、化合物の構造と結合部位及び活性の相関を調べた。得られたそれぞれの耐性ウイルスは、すべての CD4MC に対して交差耐性を示した。Bulk およびクローン化したウイルスの耐性誘導の結果 3 つのアミノ酸変異 (V255M, T375I, M426I) が耐性付与に重要である事が分かった。本年度はこれらの耐性クローンウイルスを用いて、新たな化合物のなかで耐性ウイルスに効果のあるものを探索した。その結果、いくつかの野生株および耐性ウイルスにも効果のあるリード化合物がいくつか見つかった。今後、これらの化合物をもとにして、より効果的な侵入阻害かつ抗体増強剤の発見に務める。

A. 研究目的

我々は、中和抗体の感受性を増強させる NBD-556 およびその誘導体の研究をこれまで行ってきた。現在、効果を維持しつつ、より細胞毒性の低い低分子化合物の探索をおこなっている。その一方、候補化合物による *in vitro* 耐性誘導をクローンウイルスで行う事により、予想される結合部位と立体構造変化誘導活性の相関を調べ、Env の変異と立体構造の関係を詳細に検討する。

B. 研究方法

東京医科歯科大学生体材料工学研究所機能分子部門分子認識分野の玉村啓和教授および、静岡大学工学部工学研究科の鳴海哲夫准教授に HIV-1 のエンベロープに立体構造変化を起こさせる低分子化合物 (CD4MC) の合成を行っていただいた。それらの化合物で HIV-1 R5 primary isolate (KP-5) の bulk と infectious clone を用いて *in vitro* 耐性誘導を行い、誘導された CD4MC 耐性ウイルスの Env gp120 領域のシークエンスを行い、化合物の構造と結合部位及び活性の相関を検討した。また、得られた耐性クローンを用いて、耐性ウイルスにも有効な化合物の探索も行った。

(倫理面での配慮)

本研究における遺伝子組み換え生物等を用いる実験については、必要に応じた国立感染症研究所の機関承認を既に取得済みである。

C. 研究結果

これまでわれわれが行った研究より、NBD-556 と sCD4 それぞれの耐性誘導で観察された変異部位を gp120 の 3 次元結晶解析図上にプロットすると、NBD-556 の変異部位は sCD4 のそれと非常に似通った部位に集中していることがわかってきている。そこで、われわれは、引き続き玉村啓和教授および鳴海哲夫准教授にお願いして合成していただいた NBD-556 同様に立体構造変化を惹起する可能性のある化合物を 20 以上合成していただき、野生株のウイルスだけでなく、昨年度までの研究で得られた耐性ウイルスクローン (KP-5-V255I, -T375I, -M426I) を用いてスクリーニングを行った。これまでは実験室株の X4 ウイルスである IIIB ウイルス株を用いて実験を行っていたが、今回も *in vivo* に近いウイルスを使用する目的で、感染症例から樹立した臨床分離 R5 ウイルス株 (KP-5) を用いている。

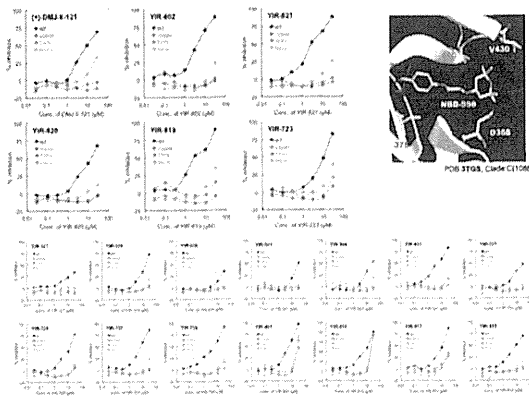


図1. 野生株とCD4MC耐性ウイルスを用いた新規CD4MCsの抗ウイルス活性の測定

これまでに活性が明らかとなっているNBD-556の骨格をベースにして合成をしたCD4MCsを用いて、野生株と3つのNBD-556耐性株に対する抗ウイルス効果を測定した(図1)。ほとんどのものは、野生株に対しては活性を示すものの、耐性株に対しては抗ウイルス効果を認められなかった。特に、NBD-556に高度耐性を示すKP-5-V255I、-T375Iのクローンは、ほとんどの新規化合物に耐性を示した。その中でも、毒性が低く、野生株に対する効果も高く、KP-5-M426Iクローンに対してやや抑制効果を示すもの(YIR-821)が見つかり、今後リードコンパウンドとして有望と考えている。

D. 考察

これまでに確認できた3つの耐性変異のうち、M426IとV255Mについて、昨年に引き続き、本研究班の研究分担者の横山勝博士にお願いし、横山博士が本研究で構築したHIV-1 gp120全長分子モデルを用いてCD4MC耐性EnvとYYA-021との結合様式のシミュレーションを行って頂いた。その結果、それぞれの変異とEnvの構造変化と耐性度の関係が、われわれの行ったin vitroの結果と強い相関を示した(図2)(詳細は横山博士の本年度分担報告参照)。今後、多くの逃避ウイルス変異との比較検討を行う事で、モデリングの精度をより上げて行く事が可能となる事が、示唆される結果と言える。

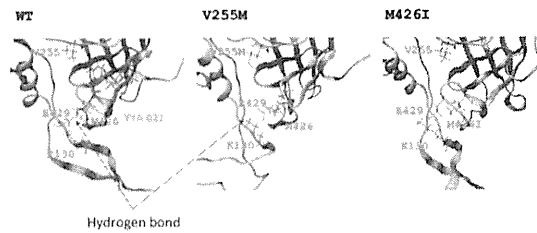


図2. 野生株とCD4MC耐性Envを用いたYYA-021との結合の分子動力学計算による予想図。NBD-556に比較して耐性ウイルスに対して効果が弱いため、M426IのEnvにも結合が出来ない。

E. 結論

CD4MCの新規化合物を合成し、iv vitro耐性誘導によって得られた耐性ウイルスに対するスクリーニングを行った。その結果、耐性ウイルスにも効果的なリードコンパウンドの候補が見つかった。これらの知見をもとに、より立体構造変化誘導能に優れた化合物の開発に努めていきたいと考えている。

G. 研究発表

論文発表 (*corresponding author)

1. Matsushita S, Yoshimura K, Ramirez K-P, Pisupati J, Jenkins J, Murakami T on behalf of the KD-1002 Study Group. 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. Ramirez K-P, Kuwata T, Maruta Y, Tanaka K, Alam M, 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 KA, Ong YT, Hachiya A, Laughlin TG, Chiang LA, Pan Y, Moran JL, Marchand B, Singh K, Gallazzi F, Quinn TP, Yoshimura K, Murakami T, Matsushita S, Sarafianos SG. Structural basis of clade-specific HIV-1 neutralization by humanized anti-V3 monoclonal antibody KD-247.

The FASEB Journal, 25, 70-80, 2015.

- 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. **Journal of General Virology**, 95, 1816-1826, 2014. *Corresponding author † These authors contributed equally.

学会発表

(国際学会)

- Shigeyoshi Harada, Yu Irahara, Samatchaya Boonchawalit, Mai Goryo, Hirokazu Tamamura, Tetsuro Matano, Shuzo Matsushita, Kazuhiisa Yoshimura. Mutations at the bottom of the Phe43 cavity are responsible for cross-resistance to NBD analogues. The annual Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI) 2015, Seattle, USA, 2.23-26, 2015.
- Kazuhiisa Yoshimura. Impact of the Drug-Escaped HIV Envelope Mutations on Susceptibility to Neutralizing Antibodies. 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID), AIDS Panel Meeting, Taipei, Taiwan, 1. 28-29, 2015.
- Shigeyoshi Harada, Masaru Yokoyama, Samatchaya Boonchawalit, Hironori Sato, Shuzo Matsushita, Kazuhiisa Yoshimura. Resistance Profile of CD4 Mimic Small Compounds (CD4MCs) and the Structure Analysis by Molecular Dynamic (MD) Simulation. HIV Research For Prevention (HIVR4P) 2014, Cape Town, South Africa, 10.28-31 2014.
- Shigeyoshi Harada, Masaru Yokoyama, Samatchaya Boonchawalit, Hironori Sato, Shuzo Matsushita, Kazuhiisa Yoshimura. Genetic and

Structure-Function Analyses of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Escape from CD4 Mimic Small Compounds (CD4MCs). 15th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 10.1-3. 2014.

- Samatchaya Boonchawalit, Shigeyoshi Harada, Shuzo Matsushita, Kazuhiisa Yoshimura. Impact of maraviroc (MVC)-resistant mutations in the C1 and C4 regions of gp120 on sensitivity to antibody-mediated neutralization. 15th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 2014.10.1-3.
- Samatchaya Boonchawalit, Shigeyoshi Harada, Shuzo Matsushita, Kazuhiisa Yoshimura. Impact of Maraviroc (MVC)-resistant mutations in C1 and C4 regions of gp120 on sensitivity to antibody-mediated neutralization. 20th International AIDS Conference Melbourne, Australia, 2014.7.20-25.

(国内学会)

- 吉村和久. 代表的な薬剤耐性のメカニズム. 第28回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪, 2014.12.3-5.
- 泉福英信, 有家巧, 富永燦, 丸岡豊, 吉村和久. HIV感染者唾液を用いたに口腔疾患発症予測因子の検討. 第28回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪, 2014.12.3-5.
- Samatchaya Boonchawalit, 原田恵嘉, 松下修三, 吉村和久. Impact of maraviroc (MVC)-resistant mutations in the C1 and C4 regions of gp120 on sensitivity to antibody-mediated neutralization. 第28回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪, 2014.12.3-5.
- 原田恵嘉, 横山勝, Samatchaya Boonchawalit, 佐藤裕徳, 松下修三, 吉村和久. CD4 類似低分子化合物誘導体(CD4MCs)の耐性プロファイルと分子動力的機構解析. 第62回日

本ウイルス学会学術集会，横浜，
2014.11.10-12.

5. 原田恵嘉，横山勝，Samatchaya Boonchawalit，佐藤裕徳，松下修三，吉村和久. 新規エントリー阻害剤の組み合わせによる抗ウイルス効果と耐性変異の解析. 第16回 白馬シンポジウム，熊本，2014.6.13-14.

H. 知的財産権の出願・登録状況

US patent,

Patent No.: US 8,722,861 B2,

Date of Patent: May 13, 2014

"MONOCLONAL ANTIBODIES
THAT BIND TO THE V3 LOOP OF
HIV-1 GP120"

Env の変異が立体構造及び動的性質（揺らぎ）に与える影響の研究

研究分担者 横山 勝 国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター 主任研究官

研究要旨

本研究では、HIV エンベロープ蛋白質（Env）に生じる変異の意味を知るために、変異が Env の立体構造および動的性質に与える影響を調べる。本年度は、HIV-1 gp120 の中和抗体逃避のためのアロステリックパスの推定、および NBD 耐性変異の gp120 と NBD 誘導体の結合様式への影響を調べた。HIV-1 gp120 の分子動力学計算により得られたトラジェクトリーをランダム行列理論により解析すると、V2 と V3 をつなぐアロステリックパスの存在が示唆された。NBD 耐性変異の gp120 と NBD 誘導体の結合様式への影響を調べると、NBD 耐性変異の結合様式への影響は NBD 誘導体によって異なることが示された

A. 研究目的

HIV-1 エンベロープ蛋白質（Env）は感染受容体との結合部位を持つ gp120 と、ウイルスと標的細胞との膜融合に重要な gp41 からなり、gp120 と gp41 のヘテロダイマーが三量体を形成している。Env の gp120 は多くの変異を許容するが機能的に重要な領域を持つ。たとえば、gp120 の V3 は高変異領域として知られるが、感染受容体との相互作用に中心的役割を担う。このように変異を許容するが機能的に重要な領域は、アミノ酸変異による安定性の変化を低減できるループ構造を形成し、機能は動的性質により制御されていると考えられる。

これまで、HIV-1 gp120 の構造は X 線結晶構造解析や NMR により、部分構造でのみ決定され、全長構造は未だ決定されていない。これは、V1/V2 などが大きく揺らいでいることにより、結晶化が困難なためである。最近、クライオ電子顕微鏡（Lyumkis et al. Science, 2013）、X 線結晶構造解析（Julien et al. Science, 2013 ; Pancera et al. Nature, 2014）による Env 三量体モデルが報告された。これらは、変異により三量体構造の安定化を図り、さらに抗体と複合体を形成することにより安定な構造を得ている。そのため、これらの構造は実際に機能する蛋白質よりも揺らぎが小さく抑えられている。しかしながら、蛋白質の機能発現に揺らぎが重要な働きをしている。したがって、これらの構造では、構造と機能と結びつける情報を得ることは困難である。

計算科学は理論、実験に次ぐ第三の科学であり、

実験が難しい現象や紙と鉛筆だけでは理論計算できないような難しい問題を、コンピュータを使って解明する方法である。その計算科学の手法の一つとして、分子動力学計算がある。分子動力学計算は、個々の原子の運動をニュートンの運動方程式を解くことにより、物質の性質や運動を明らかにする。蛋白質は機能発現に最適な温度があることが知られている。温度は物質を構成する分子運動のエネルギーの統計値を表している。ゆえに、蛋白質は最適な温度での分子運動により動的に揺らぎ、この揺らぎが機能発現に重要である。そのため、蛋白質の運動を明らかにする分子動力学計算は、構造と機能を結びつける情報を得ることができる。

本研究では、HIV エンベロープ蛋白質（Env）に生じる変異の意味を知るために、変異が Env の立体構造および動的性質に与える影響を調べる。本年度は、HIV-1 gp120 の中和抗体逃避のためのアロステリックパスの推定、および NBD 耐性変異の gp120 と NBD 誘導体の結合様式への影響を調べた。

B. 研究方法

（1）V1/V2およびV3の配置の推定

HIV-1 gp120全長分子モデルにおけるV1/V2およびV3の配置を知るために、ホモロジーモデリング法と分子動力学計算を行い平衡構造を得た。ホモロジーモデリング法における、ターゲット配列として中和抵抗性株であるJR-FLのアミノ酸配列を用いた。鋳型には以下の複数の構造を用いた：

gp120コア (PDB code: 3JWD)、V1/V2 stem (PDB code: 3IDX)、V1/V2 (PDB code: 3U4E)、V3 (PDB code: 2QAD)、V4 (PDB code: 2B4C)、C5 (PDB code: 1MEQ)。糖鎖は Glycoprotein Builder (<http://glycam.ccruc.uga.edu/ccrc/gp/>) を用いて、High mannose型であるMan₅GlcNAc₂を付加した。得られたgp120分子モデルを初期構造に用いた分子動力学計算により、V1/V2およびV3の配置を決定した。分子動力学計算にはAmber10のpmemdモジュール、力場は蛋白質にはff99SB-ILDN、糖鎖にはGlycam06を用いた。圧力は1atm、温度は310K、塩濃度は150 mM NaCl、シミュレーション時間は50 nsとした。

分子動力学計算により得られたトラジェクトリーを用いて、AmberToolsのptrajモジュールにより、RMSD (root mean square deviation: 平均二乗偏差) を計算し、構造変化を観察した。

(2) HIV-1 gp120の分子動力学計算および解析

HIV-1 gp120全長分子モデルの動的性質を分子動力学計算により調べた。分子動力学計算にはAmber11のpmemdモジュール、力場は蛋白質にはff99SB-ILDN、糖鎖にはGlycam06を用いた。圧力は1atm、温度は310K、塩濃度は150 mM NaCl、シミュレーション時間は150 nsとした。

解析は分子動力学計算により得られたトラジェクトリーを用いて、AmberToolsのptrajモジュールにより、RMSF (root mean square fluctuation: 根平均二乗ゆらぎ)、およびDCCM (Dynamics Cross Correlated Motion: 動的相互相関運動) を計算した。

(3) HIV-1 gp120三量体分子モデルの構築

HIV-1 gp120三量体分子モデルは、gp120全長分子モデルの分子動力学計算により得られた150 nsにおける構造を、クライオ電子顕微鏡法により得られた構造 (PDB code: 3DNN) に重ね合わせることで構築した。

(4) ランダム行列理論によるアロステリックパスの情報の抽出

HIV-1 gp120の分子動力学計算により得られたトラジェクトリーを、ランダム行列理論により解析することで、連動して運動するアミノ酸残基のグループ (セクタ) を推定した。その結果から、中和抗体逃避のためのアロステリックパスの情報を得た。分子動力学計算により得られる動的相互相関行列 $C(i, j)$ は

$$C(i, j) = \frac{\langle \Delta r_i \cdot \Delta r_j \rangle}{\langle \Delta r_i^2 \rangle \langle \Delta r_j^2 \rangle}$$

と表される。ランダム行列理論により、 $C(i, j)$ に含まれるランダム行列の固有値分布 $P(\lambda)$ は、残基数 N 、トラジェクトリー数 L 、 $Q = L/N$ とすると、

$$P(\lambda) = \frac{Q}{2\pi\lambda} \sqrt{(\lambda_+ - \lambda)(\lambda - \lambda_-)}$$

となる。ただし、 λ_+ 、 λ_- はそれぞれランダム行列の最大固有値、最小固有値であり、

$$\lambda_{\pm} = 1 + \frac{1}{Q} \pm 2 \sqrt{\frac{1}{Q}}$$

である。 $C(i, j)$ は λ_+ 、 λ_- を用いて、

$$C(i, j) = \sum_{\lambda_k < \lambda_-} \lambda_k |k\rangle \langle k| + \sum_{\lambda_- < \lambda_k < \lambda_+} \lambda_k |k\rangle \langle k| + \sum_{\lambda_k > \lambda_+} \lambda_k |k\rangle \langle k|$$

と表すことができる。この式の第1項は通常無視できるほど小さく、第2項はノイズに起因する相関であると考えられる。したがって、第3項のみを取り出すことで、ノイズに起因する成分を除いた動的相互相関行列が得られる。第3項に含まれる第1固有ベクトルおよび第2固有ベクトルの成分を比較することで、連動して運動するアミノ酸残基のグループ (セクタ) を推定した。アロステリックパスの情報は、セクタをgp120全長分子モデルに表示することで得た。

(5) NBD 耐性 Env と薬剤との結合様式の解析

HIV-1 gp120 と NBD 誘導体 (NBD-556、JRC-II-191 および YYA-021) の複合体の分子動力学計算を行い、NBD 耐性変異の gp120 と NBD 誘導体の結合様式への影響を調べた。また、HIV-1 gp120 と sCD4 の複合体の分子動力学計算も行い、NBD 誘導体と sCD4 の結合様式の違いを検討した。分子動力学計算に用いる初期構造となる HIV-1 gp120 コアと NBD 誘導体の複合体は、ホモロジーモデリング法により構築した。鋳型には HIV-1 gp120 コアと NBD-556 の複合体構造 (PDB code: 3TGS) を用いた。ターゲット配列には、YTApm48 および YTApm48 の変異株 2 種 (V255M、M426I) を用いた。得られた分子モデルを初期構造に用いて、分子動力学計算を行った。分子動力学計算には Amber11 の pmemd モジュール、力場は蛋白質には ff99SB-ILDN および NBD 誘導体

には GAFF を用いた。圧力は 1atm、温度は 310K、塩濃度は 150 mM NaCl、シミュレーション時間は 50 ns とした。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

(1) V1/V2およびV3の配置の推定

HIV-1 gp120全長分子モデルにおけるV1/V2およびV3の配置を知るために、初期構造をホモロジーモデリング法により構築し、得られたモデルを用いて分子動力学計算を行い、50 nsまで構造変化を観察した。gp120全長分子モデルの初期構造からのRMSDは、約20ns以上ではほぼ一定であることから、平衡構造に達していると考えられる。このとき、V1/V2とV3、V1/V2と β 20/ β 21ループ、V3と β 20/ β 21ループの間の距離を観察すると、10 nsまでにそれらの距離は一度大きく離れた後、再び接近した後ほぼ一定となった。平衡構造ではV1/V2が内側ドメインから外側ドメインに、V3は外側ドメインから内側ドメインに向かって配置された。V1/V2はV3の近傍に配置されている。この平衡構造は、D. Lyumkisら(Science 342:1484-1490, 2013)のクライオ電子顕微鏡、J.P. Julienら(Science 342:1477-1483, 2013)のX線結晶構造解析、およびM. Panceraら(Nature 514:455-461, 2014)のX線結晶構造解析の結果と一致する。

(2) HIV-1 gp120の動的性質および三量体におけるV3の配置

HIV-1 gp120の動的性質を知るためにRMSFを調べた。RMSFが大きい部位はいずれもループであり、特にV3が5Å以上と最も大きい。次に、V3が揺らぐ範囲を知るために、100 nsから150 nsまでの10 nsごとの構造を重ね合わせた。100 nsから150 nsまで間で、V3は大きく揺らいでいるが、gp120コアから離れない。V3の揺らぐ方向が制限されていると考えられる。

このV3が揺らぐ方向が制限される意味を知るために、gp120全長分子モデルを用いてgp120三量体分子モデルを構築した。gp120三量体分子モデルにより、V3は三量体の中心に向かって配置されることが明らかになった。V3が三量体の中心に向かって配置されると、それぞれのgp120単量体が互いに立体障害となり、エピトープであるV3先端への抗V3抗体のアクセスを制限する。V3が揺らぐ方向が制限されると、より効果的に抗V3抗体から逃避できると考えられる。

(3) ランダム行列理論によるアロステリック

パスの情報の抽出

抗V3抗体中和を逃避する分子メカニズムを知るために、ランダム行列理論により動的相互相関行列から、連動して運動するアミノ酸残基のグループ(セクタ)推定すると、gp120には3つのセクタが推定された。(図1(A))それらをgp120全長分子モデルに表示すると(図1(B))、セクタ1はN末端のループ、セクタ2はV2、 β 17、ループF、V3のアミノ酸残基、セクタ3はV3先端近傍であった。これら3つのセクタの配置から、セクタ2が中和抗体逃避のためのアロステリックパスであることが示唆される。

(4) NBD耐性変異のgp120とNBD誘導体の結合様式への影響

NBD耐性変異のgp120とNBD誘導体の結合様式への影響を調べた。野生株であるYTApm48では、NBD誘導体であるNBD-556、JRC-II-191およびYYA-021は、いずれもgp120のPhe43キャビティに結合し、近傍にはCD4結合ループ、 β 20/ β 21ループ、ループBなどがある。 β 20/ β 21ループのE429は β 2のK130と水素結合を形成している。V255M変異株とNBD誘導体の50 nsにおける構造を見ると、NBD-556およびYYA-021ではすでに結合していない。これは、結合親和性が減少しているためであると考えられる。次に、M426I変異株とNBD誘導体の50 nsにおける構造を見ると、YYA-021ではすでに結合していない。これも、結合親和性が減少しているためであると考えられる。NBD-556ではまだ結合しているが、結合位置がYTApm48よりもループBに近い。M426I変異株ではNBD-556、JRC-II-191およびYYA-021のいずれも、E429は β 2のK130と水素結合の数が減少していた。以上の結果から、NBD耐性変異の結合様式への影響はNBD誘導体によって異なると言える。

次に、NBD誘導体とsCD4の結合様式の違いを検討するために、HIV-1 gp120とsCD4の複合体の分子動力学計算も行った。sCD4のPhe43はNB-556よりも7.3Å浅く、Phe43キャビティに結合していた。結合に寄与する相互作用は、NB-556では疎水性相互作用が主であるが、sCD4では水素結合が主であった。以上より、HIV-1 gp120との結合様式がsCD4とNB-556では異なることが確認された。

D. 考察

HIV-1 gp120の分子動力学計算により得られたトラジェクトリーをランダム行列理論により解析すると、V2とV3をつなぐアロステリックパスの存在が示唆された。このアロステリックパスの中和逃避における役割について検討する。V2と

V3をつなぐアロステリックパスはV2、 β 17、ループF、V3のアミノ酸残基により構成され、V2とV3をつなぐ。これはV2の運動がV3の運動に影響を与えることを意味する。V3のRMSFは他の部位より大きい、V3の揺らぐ方向が制限されていた。この揺らぐ方向の制御をV2が行っていると考えられる。ゆえに、V2はアロステリックパスを介してV3の配置を制御することで、V3を三量体において抗体がアクセスできない位置に配置し、抗体から逃れていると考えられる。

次に、このアロステリックパスの機能発現での役割について検討した。このアロステリックパスの近傍にはレセプターであるCD4が結合するPhe43キャビティがある。ゆえに、このキャビティはコレセプターとの相互作用部位をもつV3とアロステリックパスを介して繋がっている。したがって、このアロステリックパスにはCD4結合後のV3の構造変化を導く役割があると考えられる。

最後に、HIV-1 gp120のNBD耐性変異による薬剤耐性の分子メカニズムを検討する。V255MおよびM426Iの位置を確認すると、V255MはPhe43キャビティの奥に位置し、M426IはPhe43キャビティ入口近傍の β 20/ β 21ループに位置する。そのため、V255MはNBD誘導体の結合親和性に直接影響することが考えられるが、M426IがNBD誘導体の結合親和性に直接影響することは考えにくい。そこで、V255MおよびM426Iのどちらにおいても、野生株であるYTApm48と変異によって異なる配置となるアミノ酸残基に注目した。その結果、W427が変異により側鎖の配置が影響することが明らかになった。W427とNBD-556との相互作用を調べた。YTApm48、V255M変異株、およびM426I変異株を重ね合わせた時の、それぞれのW427の側鎖の配置を図2に示す。W427はYTApm48ではNBD-556との間のCH/ π 相互作用が存在するが、変異株では消失している。このため、変異株ではNBD-556はゆらぎにより安定に結合できないと考えられる。ゆえに、NBD耐性変異による薬剤耐性は、W427とNBD-556の間のCH/ π 相互作用の有無により制御されていると考えられる。

E. 結論

HIV-1 gp120の中和抗体逃避のためのアロステリックパスの推定、およびNBD耐性変異のgp120とNBD誘導体の結合様式への影響を調べた。以下の結果が得られた：

(1) HIV-1 gp120に中和抗体逃避のための、V2とV3をつなぐアロステリックパスの存在が示唆された。

(2) NBD耐性変異のgp120とNBD誘導体の結合様式への影響は、NBD誘導体によって異なることが示された。

F. 研究発表

1 論文発表

- (1) Burwitz B, Wu H, Reed J, Hammond K, Newman L, Bimber B, Nimiyongskul 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.*, 88:3598-3604, 2014.
- (2) 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.*, 16:320-327, 2014.
- (3) 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.
- (4) 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.*, 88:4145-4160, 2014.
- (5) Nomaguchi M, Nakayama E.E, Yokoyama M, Doi N, Igarashi T, Shioda T, Sato H, Adachi A. Distinct combinations of amino acid substitutions in N-terminal domain of Gag-capsid afford HIV-1 resistance to rhesus TRIM5 α . *Microbes Infect.*, 16:936-944, 2014.

2 学会発表

- (1) Yokoyama M, Sato H. Structural dynamics and correlated motions of HIV-1 gp120 revealed by molecular dynamics simulation. XVI International Congress of Virology (International Union of Microbiological Societies 2014 Congress), July 27 - August 1, 2014, Montréal, Canada.
- (2) 横山 勝, 佐藤裕徳. HIV-1 gp120における中和逃避のためのアロステリックパス. 第28回日本エイズ学会学術集会・総会、2014、大阪.
- (3) 横山 勝, 佐藤裕徳. ランダム行列理論によるHIV gp120の動的性質の解析. 第37回日本分子生物学会年会、2014、横浜.
- (4) 原田恵嘉, 横山 勝, Boonchawalit Samatchaya, 佐藤裕徳, 松下修三, 吉村和久. CD4類似低分

子化合物誘導体 (CD4MCs) の耐性プロファイルと分子動力的機構解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014、横浜.

(5) 引地優太、横山 勝、竹村太地郎、藤野真之、熊倉 成、山本直樹、佐藤裕徳、俣野哲朗、村上努. 新規 CXCR4 阻害剤 KRH 3955 耐性 HIV 1 の誘導とその解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014、横浜.

(6) 関紗由里、野村拓志、西澤雅子、横山 勝、佐藤裕徳、團塚 愛、三浦智行、小柳義夫、俣野哲朗. SIV の持続感染・伝播における変異蓄積に関する研究. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014、横浜.

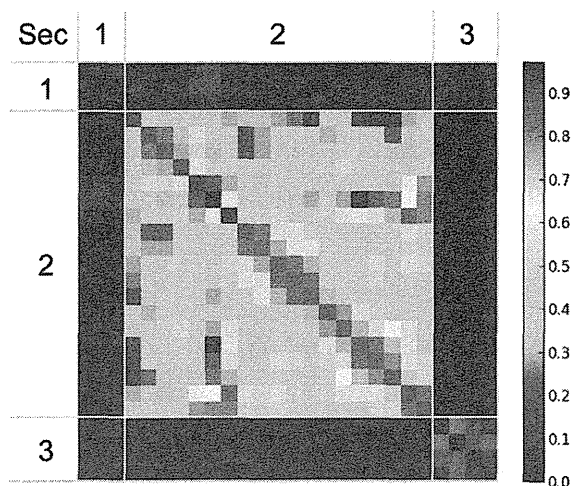
(7) 泉泰輔、横山 勝、白川康太郎、酒井遥介、

宮崎恭行、佐藤裕徳、高折晃史. The Possibility for developing a novel anti HIV-1 Drug targeting APOBEC3G Vif interaction. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014、横浜.

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。

(A)



(B)



図 1. ランダム行列理論による HIV-1 gp120 全長分子モデルのアロステリックパスの情報の抽出。(A) ノイズに起因する成分を取り除いた動的相互相関行列。ただし、3つのセクタを構成するアミノ酸残基のみ表示している。(B) gp120 全長分子モデルに表示した3つのセクタ。セクタ 1 は N 末端のループ、セクタ 2 は V2、 β 17、ループ F、V3 のアミノ酸残基、セクタ 3 は V3 先端近傍に位置する。

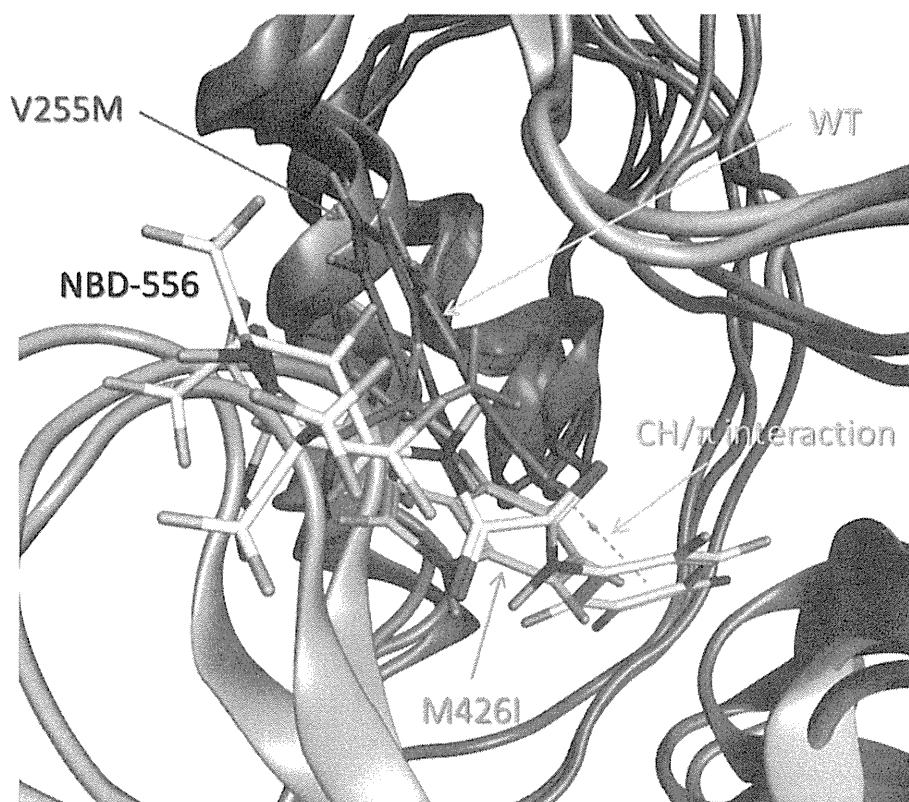


図 2.、HIV-1 gp120 の NBD 耐性変異による薬剤耐性の分子メカニズム。野生株 (YTApm48)、V255M 変異株、および M426I 変異株を重ね合わせ、それぞれの W427 の側鎖を表示している。白いスティックモデルは NBD-556 を示す。野生株では NBD-556 との間に CH/ π 相互作用が形成されている。

HIV の吸着・侵入過程を制御する宿主因子の研究

研究分担者 武内 寛明 東京医科歯科大学 医歯学総合研究科 ウイルス制御学

研究要旨

HIV 感染症に対する薬剤併用化学療法により、効果的な HIV 複製制御が可能となってきたが、この方法をもってしても体内からウイルスを完全に排除することが出来ないのが現状である。このことから、HIV 感染症の予防および治療法を開発するにあたり、個体レベルにおける宿主免疫応答系および細胞レベルでのウイルス増殖機構の更なる解明とその制御法に関わる新たな抗 HIV 剤の開発が急務となっている。本研究では、機能遺伝子発現抑制 T 細胞ライブラリーに HIV を感染させた後に生存した細胞から同定された新規 HIV 感染制御因子群のうち、HIV の吸着・侵入過程を制御する新規宿主因子（群）を同定し、新たな治療標的分子としての評価およびその制御法の基盤確立が目的である。当該年度は（1）昨年度に同定した細胞膜近傍に局在している HIV 感染制御候補因子であるイオンチャネルタンパク質（Ion Channel Protein: ICP）の作用機序が細胞核内である可能性を見出したこと、（2）新たにイオンチャネル型の P2X プリン受容体の一つが HIV 感染制御因子であることが分かった。更には、（3）同定した P2X 受容体特異的拮抗剤が抗 HIV 活性を有していることが分かった。これらの結果は、HIV 感染過程における吸着・侵入過程メカニズムの理解を深めることが可能となるだけでなく、新たな治療標的分子の可能性を示唆するものである。

A. 研究目的

世界的な医療・社会問題であるエイズの原因である HIV が感染伝播するメカニズムについて、未だ解明がなされていない部分が多く、そのため HIV 感染伝播初期における感染免疫メカニズムの詳細も不明な点が多い。また現在までに、薬剤併用化学療法により効果的な HIV 複製制御が可能となってきたが、この方法をもってしても体内からウイルスを完全に排除することが出来ないのが現状である。このことから、HIV 感染症の予防および治療法を開発するにあたり、個体レベルにおける宿主免疫応答系および細胞レベルでのウイルス増殖機構の更なる解明とその制御法に関わる新たな抗 HIV 剤の開発が急務となっている。近年、特異的な細胞間／分子間相互作用を網羅的に解析する方法として、RNA 干渉法を用いたゲノムワイドスクリーニング法が用いられるようになってきた。ウイルス感染症においてもウイルス

と宿主との攻防を網羅的に解析する方法として導入されつつあるが、HIV 感染症も例外ではない。しかしながら、これまでの研究成果は、本来の HIV 感染標的細胞である T リンパ球およびマクロファージ等を用いたものではなく、これらの成果によって得られた HIV 感染制御因子候補群から真の HIV 感染制御因子同定に至るまでに、超えなければいけない山は多い。本研究は、機能遺伝子発現抑制 T 細胞ライブラリーを用いた HIV 感染制御因子群の探索から得られた候補因子群のうち、HIV の吸着・侵入過程を制御する新規宿主因子群を同定し、新たな治療標的分子としての評価およびその制御法の基盤確立が目的である。

B. 研究方法

（1）HIV-1 感染効率の解析：レンチウイルスベクターを用いて樹立した shRNA 安定発現各 T 細胞株に、VSV-G-pseudotyped HIV-1