

(VSV-G/ luciferase-reporter HIV-1) または replication-competent luciferase-reporter HIV-1 (replication-competent HIV-1 の *nef* 遺伝子と luciferase 遺伝子とを同時発現可能な reporter HIV-1) 感染させ、24 時間および 72 時間後の luciferase 活性を測定した。

(2) 目的遺伝子の shRNA による発現制御効率の解析: shRNA 安定発現細胞から total RNA を抽出し、インターカレーター法による定量 RT-PCR 法をおこなった。その際に、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を内在性コントロールとして用いた。

(3) HIV-1 感染細胞内におけるウイルス DNA 合成量の解析: (2) で樹立した各 T 細胞株に HIV-1 (NL4-3 株) を感染させ、24 時間後の感染細胞内で、逆転写反応を経て合成されたウイルス DNA 量については *pol* 領域を、核内移行マーカーとして 2-LTR form を標的としたプライマーおよび加水分解プローブを用いたリアルタイム PCR 法にて測定した。その際に、beta-globin を内在性コントロールとして用いた。

(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、必要に応じた東京医科歯科大学の機関承認 (承認番号: 2013-089C) および文部科学大臣承認 (承認番号: 26 受文科振第 1348 号) を取得した上で行われた。

## C. 研究結果

### 1. HIV 感染制御候補因子の解析 (イオンチャンネルタンパク質: ICP)

昨年度同定した HIV 感染制御因子: ICP について、その作用機序について解析を進めた。昨年度は ICP を標的とする shRNA 発現 T 細胞株を複数樹立し、それらの細胞内における ICP タンパク発現量の制御を認めた。そこで、この発現制御が ICP-mRNA の発現制御によるものかどうかを確認するために、ICP を標的としたリアルタイム RT-PCR 法に

て定量をおこなった (図 1)。その結果、shRNA 発現細胞 2 種において、コントロール細胞 (Non-T) と比較して ICP-mRNA の発現制御が確認された (図 1 A: ICP-shRNA #1 および #2)。次に、HIV 特異的および HIV 非特異的吸着・侵入過程におよぼす影響について、replication-competent reporter-HIV-1 (NL4-3luc-RC) と水疱性口内炎ウイルスエンベロープ糖タンパク質 (VSV-G) を用いて作製したルシフェラーゼ発現レポーター HIV-1 (NL43-luc delta *env/nef*) を用いて検討した。その結果、HIV 特異的吸着・侵入過程に依存せず感染効率に影響をおよぼす可能性が示唆された (図 1 B: NL4-3luc-RC と VSVG/NL4-3luc との比較)。このことは、ICP は、標的細胞への HIV-1 侵入過程後から、ウイルスタンパク翻訳過程までにおいて影響をおよぼしている可能性が考えられる。

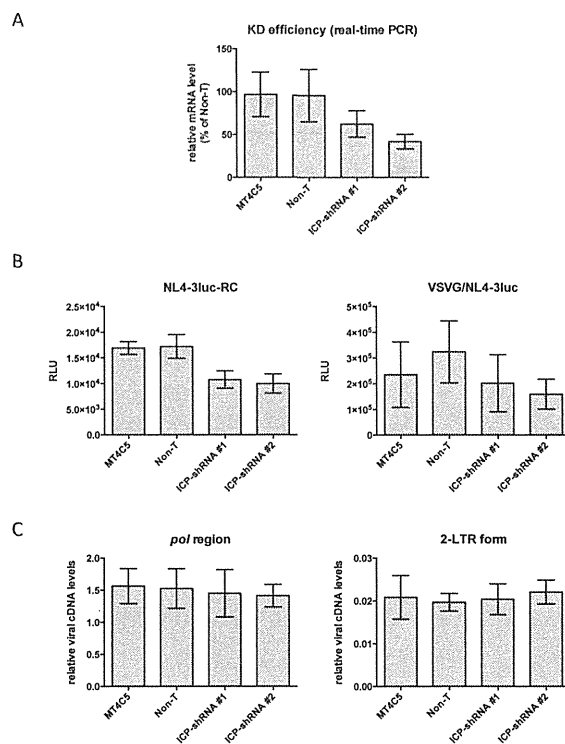


図 1. HIV 感染効率に対する ICP の影響. (A) MT4C5 T 細胞と機能遺伝子を標的としない shRNA 発現細胞 (Non-T)、ICP を標的とした shRNA 発現細胞 (ICP-shRNA #1, #2) から total RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR をおこなった結果. (B) ICP-shRNA 発現 T リンパ球に

NL4-3luc-RC または VSVG/NL4-3luc を感染させ、感染 24 または 72 時間後の感染細胞内のルシフェラーゼ活性を測定する事で感染効率を検討した。

(C) VSVG/NL4-3luc を感染させた ICP 発現抑制細胞内における viral cDNA 合成効率の結果。Total RNA を感染 24 時間後に抽出し、逆転写後期産物量を *pol* 領域特異的プライマーで検出し、ウイルス DNA の核内移行マーカーである 2-LTR form 形成量については、2-LTR form 特異的プライマーで検出した。また beta-globin を内在性コントロールとして標準化をおこなった。グラフは全て 3 回の実験平均と標準誤差を示した。

そこで、ICP が HIV-1 吸着・侵入過程以降の HIV-1 感染過程に影響をおよぼすのか否かについて、HIV-1 が感染標的細胞内に侵入後に起こる逆転写反応過程への影響を解析した。具体的には、リアルタイム PCR 法を用いて逆転写反応によって合成されるウイルス DNA 量を定量することで、この過程への影響を検討した。その結果、ICP-KD 細胞において、ウイルス DNA 合成効率に対する影響は認められなかった(図 1C: *pol* region)。また、ウイルス DNA の核内移行を示すマーカーとして用いられている 2-LTR form についてもリアルタイム PCR を用いた定量 PCR をおこなったところ、2-LTR form についても ICP-KD の影響は認められなかったことから(図 1C: 2-LTR form)、ICP はウイルス DNA の核内移行後の過程であるゲノムへの組み込み過程から転写・翻訳過程に至るまでに影響をおよぼしている可能性が示唆された。

## 2. 細胞膜近傍に局在する HIV 感染制御候補因子の解析 (イオンチャネル型プリン受容体: P2X)

次に、膜近傍部位に局在する新規 HIV 感染制御候補因子: P2X の異なる遺伝子領域を標的とした shRNA を安定発現する T 細胞株を 4 種樹立し、P2X 発現量をタンパク質レベルで確認したところ、その発現レベルが通常細胞と比較して様々な発現レベルであったことから、P2X 遺伝子発現抑制 T 細胞株 (P2X-KD) を樹立することが出来た(図 2A)。

これらの細胞を用いて HIV 特異的および HIV 非特異的吸着・侵入過程におよぼす影響について、replication-competent reporter-HIV-1 (NL4-3luc-RC) と水疱性口内炎ウイルスエンベロップ糖タンパク質 (VSV-G) を用いて作製したルシフェラーゼ発現レポーター HIV-1 (NL43-luc delta *env/nef*) を用いて検討した。その結果、いずれの侵入経路においても影響をおよぼす可能性が示唆された(図 2B)。

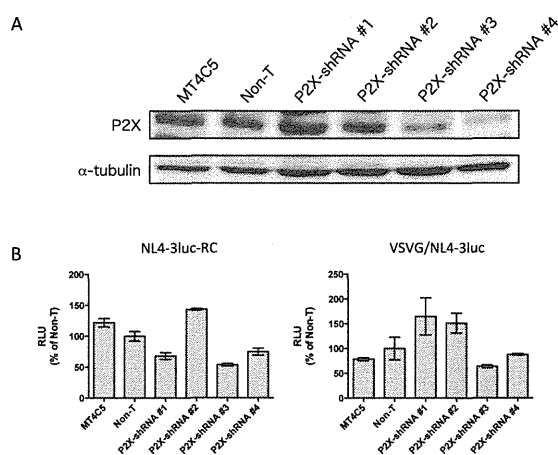
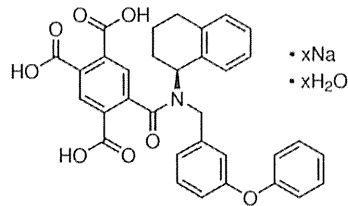


図 2. HIV 感染効率に対する P2X の影響. (A) MT4C5 T 細胞と機能遺伝子を標的としない shRNA 発現細胞 (Non-T)、P2X を標的とした shRNA 発現細胞 (P2X-shRNA #1-4) の細胞溶解液を用いて内在性 P2X タンパクをウエスタンブロットティング (WB) 法にて示した結果。(B) P2X-shRNA 発現 T リンパ球に NL4-3luc-RC または VSVG/NL4-3luc を感染させた。感染後 24 時間または 72 時間後の感染細胞内のルシフェラーゼ活性を測定する事で感染効率を検討した。グラフは全て 3 回の実験平均と標準誤差を示した。

また、P2X 拮抗剤として既に知られている化合物 (A-317491) が抗 HIV 活性を示すかどうかについて検討をおこなった。具体的には、化合物存在下において、T 細胞株である MT4 細胞および HeLa-CD4-LTR-beta-gal 細胞を用いた HIV-1 感染実験をおこない、HIV-1 感染効率におよぼす影響について検討した。その

結果、両方の細胞において A-317491 の抗 HIV 活性を見出すことができた (図 3)。

<A-317491> MW: 565.57 (anhydrous free acid basis)



		A-317491	
		EC50 (μM)	CC50 (μM)
MT-4/MTT assay	1st	12	91
	2nd	34	>100
HeLa-CD4 beta-gal assay	1st	29	>100
	2nd	24	>100

図 3. HIV 感染効率に対する P2X 拮抗剤の影響。(上段) A-317491 の化学構造。(下段) MT4 および HeLa-CD4-LTR-beta-gal 細胞を用いて抗 HIV 活性測定試験をおこなった結果。EC50 および CC50 は、3 回の実験平均を示したものである。

#### D. 考察

現段階において、HIV 感染症に対する治療薬は、HIV 特異的酵素を標的としたものを組み合わせるのが一般的であるが、近年の薬剤開発においては、HIV 感染過程における吸着・侵入過程を標的とした薬剤に焦点が当てられている。しかしながら、HIV 感染吸着・侵入過程メカニズムにおいて、宿主細胞側の要因について不明な点が多いことから、この感染過程における理解をより一層深めることが、新規治療法の開発において必須課題であると考えられる。本研究では、ゲノムワイドスクリーニング法を用いた HIV-1 感染制御宿主因子探索によって同定した HIV-1 感染制御宿主候補因子群の中で、HIV-1 吸着・侵入過程におよぼす細胞膜近傍に局在する候補因子群の機能解析を遂行することを目的としている。本年度は、昨年度に同定した細胞膜近傍局在宿主因子 (ICP) の作用機序の解析、および新規の細胞膜近傍局在宿主因子 (P2X) について HIV-1 感染制御因子として機能するかどうかを検討した。宿主因子: ICP の発現抑制 T 細胞を用いた single-round

および multi-round infection 実験双方の結果から、それらの感染効率の低下が認められたことから、ICP は HIV-1 吸着・侵入過程だけでなく、それ以降の過程に影響をおよぼす宿主因子である可能性が示唆された (図 1 B)。また、ICP 発現抑制 T 細胞株への HIV-1 侵入後に起こるウイルス cDNA 合成効率およびウイルス cDNA の核内移行過程後に見られる 2-LTR form 形成効率について検討したところ、顕著な差異は認められなかったことから、ICP の作用機序はウイルス cDNA のゲノムへの組み込み過程から転写・翻訳過程に影響をおよぼしている可能性が考えられる。

(図 1C)。カリウムチャネル分子が、HIV-1 感染プロセスにおける核内動態に影響をおよぼす可能性については、別の CIP family 分子が HIV-1 DNA の転写制御に影響を及ぼすことが報告されていることから、今後 CIP の局在を解析するとともに、ウイルス DNA 組み込み過程から転写・翻訳過程において影響を及ぼすか否かを解析する必要がある。

もう 1 つの HIV-1 感染制御候補因子: P2X については、P2X 発現抑制レベルの異なる T 細胞株を 4 種樹立し (P2X-shRNA#1-4)、それらを用いた HIV-1 感染実験 (single-round および multi-round infection) を行ったところ、P2X 発現抑制 T 細胞に対する HIV-1 感染効率が低下することから、P2X は HIV-1 感染制御因子である可能性が示唆された (図 2)。また P2X 拮抗剤 (A-317491) の抗 HIV 活性測定実験の結果、その抗 HIV-1 活性を見出すことが出来たことから、P2X 拮抗剤が抗 HIV-1 剤の候補となりうるものと考えられる。(図 3)。

#### E. 結論

本年度は (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 P2X プリン受容体の一つが HIV 感

染制御因子であること、(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の3項目が研究成果として得られた。特に、P2X 受容体の解析は、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、P2X 受容体が新たな治療標的分子となりうる可能性が考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Sukegawa S., Sakuma R., Ohmine S., Takeuchi H., Ikeda Y and Yamaoka S. Suppressor of Cytokine Signaling 1 Counteracts Rhesus Macaque TRIM5a-Induced Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type-1 Production. *PLOS ONE* 9(10) e109640. 2014.

### 2. 学会発表

#### 国際学会（口頭発表：selected talk）

- 1) Takeuchi H., Saito H, Miyamoto T, Yoshinaga T, Ishii H and Yamaoka S. AMPK-RPK is a host essential factor for optimal capsid disassembly to promote viral cDNA synthesis during the early stage of HIV-1 infection. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Retroviruses, New York, USA, 2014.

#### 国内学会（口頭発表）

- 1) 武内 寛明、山岡 昇司. 新規 HIV 感染制御因子 AMPK-RPK による HIV コア構造体崩壊制御機構の解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年、横浜.
- 2) 齊戸 秀樹、武内 寛明、山岡 昇司. 発現クローニング法により同定した HIV-1 感染制御因子の機能解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年、横浜.

- 3) 武内 寛明、山岡 昇司. 新規 HIV 感染制御因子 AMPK-RPK による HIV 感染制御機構の解析. 第 28 回日本エイズ学会学術集会、2014 年、大阪.

## G. 知的財産権の出願・登録状況 該当なし

## Env 変異と細胞融合能の変化に関する研究

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

### 研究要旨：

HIV の細胞への吸着およびそれに引き続いておこる膜融合は感染の第一ステップであり、ウイルスライフサイクルに必須のステップである。我々は細胞膜融合と二重分割タンパク質 (Dual Split Protein: DSP) を用いた迅速で簡便な HIV の細胞指向性の解析系を作製し、昨年報告した (DSP-Pheno assay)。本年度はこの新規に開発した細胞指向性決定系を用いて HIV 感染者の臨床検体を用いて解析を行い、臨床経過における細胞指向性の変化と細胞膜融合能の変化を調べた。解析した HIV 感染者 40 例 80 検体全例 (初診時および治療開始前の検体) で細胞指向性の決定が可能であった。40 例の解析において、2 点間で細胞指向性に変化のなかった 32 例 (R5→R5 の 7 例、Dual→Dual の 25 例) と細胞指向性に変化があった 8 例 (R5→Dual) に分類された。また観察した 2 点間において CCR5 に対する細胞膜融合能に経時的変化は見られなかったが、CXCR4 に対する細胞膜融合能は上昇する傾向がみられた。

### A. 研究目的

HIV-1 は感染に CD4 と CCR5 を必要とする R5 指向性ウイルス (R5)、CD4 と CXCR4 を必要とする X4 指向性ウイルス (X4)、および CD4 と CCR5 および CXCR4 のどちらも使用可能な両指向性ウイルス (Dual) に大別される。抗 HIV 薬として臨床で使用されている抗 CCR5 阻害薬 (Maraviroc : MVC) は R5 ウイルスの増殖を特異的に抑制するが、Dual および X4 ウイルスには効果がないため、服薬前の細胞指向性試験が必須である。また HIV の自然経過において感染初期では R5 ウイルス優位な増殖がみられるのに対し、感染個体の約 50% で臨床経過中に X4 もしくは Dual ウイルスが出現し、その出現は CD4 の急激な減少に関与することが報告されている。このように細胞指向性の解析は、臨床的にも、HIV 感染症の病態を理解する上で重要なテーマである。

我々は細胞膜融合と二重分割タンパク質 (Dual Split Protein: DSP) を用いた迅速で簡便な HIV の細胞指向性の解析系を作製し、昨年報告した (DSP-Pheno assay)。本年度はこの新規に開発した細胞指向性決定系を用いて HIV 感染者の臨床検体を用いて解析を行い、臨床経過における細胞指向性の変化と細胞膜融合能の変化を調べた。

### B. 研究方法

DSP タンパク質は蛍光緑色タンパク質 (GFP) とルシフェラーゼ (RL) をどちらも分割し、両タンパク質の N 末端側を融合タンパク質とした DSP<sub>1-7</sub> と両 C 末端側を融合させた DSP<sub>8-11</sub> から構成される。どちらも単独では活性を持たないが DSP<sub>1-7</sub> と DSP<sub>8-11</sub> が会合する事で活性が復活する。

HIV-1 レセプター発現細胞として神経膠腫由来で CD4 と CCR5 を発現する NP2 細胞 (N4R5)、CD4 と CXCR4 を発現する NP2 細胞 (N4X4) に DSP<sub>1-7</sub> 遺伝子を細胞に導入した DSP<sub>1-7</sub> 恒常発現細胞株 (N4R5-DSP<sub>1-7</sub>, N4X4-DSP<sub>1-7</sub>) を用いた。また、Env タンパク質発現細胞として 293FT 細胞に DSP<sub>8-11</sub> 遺伝子、HIV-1 env 遺伝子および遺伝子導入マーカーとして mOrange 蛍光タンパク質を同時発現可能な発現ベクター (pRE11) を用いた。

HIV 感染者で未治療の 40 例において 2 点間 (初診時および治療開始前の検体：期間の中央値 64 ヶ月) の 80 検体について解析を行った。HIV 感染者の血漿より RNA を抽出し、特異的プライマーを用いて逆転写反応、Nested-PCR を行い、env 遺伝子を増幅した。制限酵素で切断後、発現プラスミドに増幅した env 遺伝子をクローニングし、ポピュレーションを維持したまま plasmid を回収した (pRE11-env/bulk)。クローンの解析は pRE11-env/bulk からクローニングを行い、pRE11-env/clone を分離し DSP-Pheno assay により細胞指向性を解析、シーケンスにより V3 遺伝子の配列を解析した。

Env 発現プラスミドを 293FT 細胞に Fugene6 (Promega 社) を用いて Transfection を行い、2 日後に細胞を懸濁し、N4R5-DSP<sub>1-7</sub>, N4X4-DSP<sub>1-7</sub> とそれぞれ共培養を行い、6 時間後に蛍光顕微鏡にて GFP の蛍光シグナルを、細胞の破壊を必要としない膜透過性のルシフェラーゼ基質 Enduren (Promega 社) を加えた後 90 分後にルミノメーターにてルシフェラーゼ活性を測定した。

(倫理面への配慮)

使用した臨床検体はインフォームドコンセントを取得し、研究に同意を得られたものを使用した。また、提供者の個人情報個人情報保護法に基づき管理を行った。研究内容は東京大学医科学研究所倫理審査委員会により認証済みである。遺伝子組み換え生物等を用いる実験については、東京大学医科学研究所の機関認証および文部科学大臣の認証済みである。

### C. 研究結果

80 検体全例で env 遺伝子の増幅が可能であり、pRE11-env/bulk を用いて細胞指向性の解析が可能であった。80 検体の細胞指向性の解析では R5 : 22 検体、Dual : 58 検体であった。X4 の検体は 0 例であった。この内、細胞指向性の変化について解析を行うと、2 点間で細胞指向性に変化のなかった R5 症例 : 7 例、Dual 症例 : 25 例、R5 から Dual へ変化のあった 8 例に分類された。観察した初診時と治療開始前の 2 点間において CCR5 に対する細胞膜融合能 (CCR5 発現細胞におけるルシフェラーゼ活性) に経時的変化は見られなかったが、CXCR4 に対する細胞膜融合能 (CXCR4 発現細胞におけるルシフェラーゼ活性) は上昇する傾向がみられた。

R5 から Dual へ変化のあった 8 例 (16 検体) からクローンを分離し解析した結果、Bulk でみみられた R5 から Dual への変化は、N4X4 細胞に融合可能なクローンの割合の増加、もしくは N4X4 細胞に強い細胞融合能をもつクローンの出現に分類可能であった。またシーケンス解析の結果、同じ V3 遺伝子配列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。

### D. 考察

DSP-Pheno assay はこれまでの組換えウイルスを用いた細胞指向性試験と異なり、感染後のステップに関与することなく細胞膜融合を測定可能である。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。今後臨

床経過と合わせて詳細に検討を行っていく予定である。

また、同じ V3 遺伝子配列であっても細胞指向性が R5、Dual となり細胞指向性の結果が異なるクローンが多数検出された。今後 env 遺伝子全長の遺伝子解析を行い、V3 以外のどの領域およびどのアミノ酸が細胞指向性の変化に関与しているのかを env 遺伝子の組換え、および点変異の導入などにより明らかにしていく予定である。さらに、クローンの解析により細胞膜融合能の強いクローンから弱いクローン (ルシフェラーゼ活性の高いクローンから弱いクローン) まで様々なクローンを分離することが可能であった。細胞膜融合能とアミノ酸との関連について今後解析を行い、膜融合能に関わるアミノ酸もしくは env 部位を明らかにしていく予定である。

### E. 結論

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。40 例の解析において、2 点間で細胞指向性に変化のなかった 32 例 (R5 → R5 の 7 例、Dual → Dual の 25 例) と細胞指向性に変化があった 8 例 (R5 → Dual) に分類された。また観察した 2 点間において CCR5 に対する細胞膜融合能に経時的変化は見られなかったが、CXCR4 に対する細胞膜融合能は上昇する傾向がみられた。今後はクローンをを用いて env 遺伝子全長のシーケンス解析を行い塩基配列と細胞膜融合能との関連を明らかにする。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Gu L, Kawana-Tachikawa A, Shiino T, Nakamura H, Koga M, Kikuchi T, Adachi E, Koibuchi T, Ishida T, Gao GF, Matsushita M, Sugiura W, Iwamoto A, Hosoya N. Development and customization of a color-coded microbeads-based assay for drug resistance in HIV-1 reverse transcriptase. PLOS One. Vol. 9, e.109823, 2014.
2. Nakayama-Hosoya K, Ishida T, Youngblood B, Nakamura H, Hosoya N, Koga M, Koibuchi T, Iwamoto A, Kawana-Tachikawa A. Epigenetic repression of interleukin-2 expression in senescent CD4+ T cells during chronic human immunodeficiency virus type-1 infection. J Infect Dis. Vol. 211, p.28-39, 2015.

3. Kikuchi T, Iwabu Y, Tada T, Kawana-Tachikawa A, Koga M, Hosoya N, Nomura S, Brumme Z, Jessen H, Pereyra F, Piechocka-Trocha A, Walker BD, Iwamoto A, Tokunaga K, Miura T. Anti-APOBEC3G activity of HIV-1 Vif protein is attenuated in elite controllers. J Virol. in press, 2015.

2. 学会発表  
特になし

**G. 知的財産権の出願・登録状況**

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

厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業（エイズ対策実用化研究事業）  
分担研究報告書

## HIV エンベロープの治療標的構造に関する研究

分担研究者 井上 誠 ディナベック株式会社 取締役

## 研究要旨

各サブタイプ Env の結合解析を目的として製造した sCD4 domain (mD1.22) を発現する F 遺伝子欠損型センダイウイルスベクター (SeV<sup>18+</sup>mD1.22/ΔF) について、力価測定・配列確認・無菌試験を実施し、発現実験に供した。また、抗原遺伝子としての HIV エンベロープ (Env) 蛋白の発現を目的に、Env 三量体を構成する可能性が高く SeV ベクターにより高発現可能な Env 蛋白の発現を検討するとともに、抗体誘導に効果的な抗原蛋白との融合蛋白をデザインした。

## A. 研究目的

HIV-Env の結合解析に利用する機能性蛋白を発現する組換えセンダイウイルス (SeV) ベクターを調製するとともに、HIV-Env などの抗原遺伝子を高発現可能な SeV ベクター或は抗原蛋白によるエイズ治療ワクチン候補を見出すことを目的とした。

## B. 研究方法

## (1) 組換え SeV ベクターの製造と品質検査

sCD4 domain (mD1.22) 遺伝子を搭載する組換え SeV ベクターの調製には、F 蛋白質を持続発現するパッケージング細胞株を利用し、再構成は分担研究者による公知の方法 (国際公開第 97/16538 号、国際公開第 97/16539 号) をベースに一部改良して実施、力価測定・配列確認・無菌試験などの QC 試験を実施した。

## (2) ワクチン候補抗原遺伝子のデザイン

SeV ベクターを用いたワクチン候補としては、HIV-Env の高発現を可能にすることを目的に、また蛋白ベースのワクチンについては、大量調製と免疫惹起を目的として検討を行った。

## (倫理面への配慮)

SeV は実験室飼育下のネズミから単離されたパラインフルエンザウイルスであり、ヒトへの病原性は知られていない。野生型ウイルスでも文部科学省の指針ではバイオハザードレベル P2 であり、通常の実験室で使用でき、安全なウイルスと考えられている。さらに実験に使用するベクターは、ウイルスの感染融合に必須の F 蛋白質遺伝子をゲノムから欠失させているため、非伝播型に改良さ

れており、理論的にも実験的にも伝播性が無いことが証明されている。また、当分担研究では動物等への投与実験は「課題達成上必要最小限」のものに限定し、その際には動物愛護の基準に従うものとする。

## C. 研究結果

sCD4 domain (mD1.22) を搭載した SeV ベクターを構築し、発現実験に供した。また、Env 三量体を構成する可能性が高く SeV ベクターにより高発現可能な Env 蛋白とともに、抗体誘導に効果的な抗原蛋白との融合蛋白をデザインした。

## D. 考察

SeV ベクターは解析用蛋白および抗原蛋白の発現に有効であり、また SeV ベクターそのものにも自然免疫を活性化する機構を有しており、有効なワクチンツールの一つとして期待されている。デザインされた抗原蛋白を SeV ベクターに搭載し、機能解析とともに治療ワクチンとしての評価も重要であると考えられる。

## E. 結論

機能解析用 SeV ベクターの製造に続き、デザインした抗原遺伝子を搭載した SeV ベクター及び抗原候補蛋白をデザインした。これらは、エイズ治療ワクチンとしてのポテンシャルがあるものと考えられ、実際に構築し、機能解析を実施するとともに治療ワクチンとしての評価を行うことが重要である。

## F. 健康危険情報



なし。

G. 研究発表

1 論文発表

- (1) Narusawa M, Inoue H, Sakamoto C, Matsumura Y, Takahashi A, Inoue T, Watanabe A, Miyamoto S, Miura Y, Hijikata Y, Tanaka Y, Inoue M, Takayama K, Okazaki T, Hasegawa M, Nakanishi Y, Tani K., TLR7 ligand augments GM-CSF-initiated antitumor immunity through activation of plasmacytoid dendritic cells. *Cancer Immunol Res.* 2(6):568-80, 2014.
- (2) Matsushita K, Shimada H, Ueda Y, Inoue M, Hasegawa M, Tomonaga T, Matsubara H, Nomura F., Non-transmissible Sendai virus vector encoding c-myc suppressor FBP-interacting repressor for cancer therapy. *World J Gastroenterol.* 20(15):4316-28, 2014.
- (3) Isshiki M, Zhang X, Sato H, Ohashi T, Inoue M, Shida H., Effects of different promoters on the virulence and immunogenicity of a HIV-1 Env-expressing recombinant vaccinia vaccine. *Vaccine.* 32(7):839-45, 2014.
- (4) Kashiwakura Y, Ohmori T, Mimuro J, Madoiwa S, Inoue M, Hasegawa M, Ozawa K, Sakata Y., Production of functional coagulation factor VIII from iPSCs using a lentiviral vector. *Haemophilia.* 20(1):e40-4, 2014.
- (5) Iwamoto N, Takahashi N, Seki S, Nomura T, Yamamoto H, Inoue M, Shu T, Naruse TK, Kimura A, Matano T., Control of simian immunodeficiency virus replication by vaccine-induced Gag- and Vif-specific CD8+ T cells. *J Virol.* 88(1):425-33, 2014.

2 学会発表

- (1) 井上 誠、Sendai virus vector for Gene- and Cell-based therapeutics、第 20 回日本遺伝子治療学会、2014 年 8 月、東京
- (2) 井上 誠、センダイウイルスベクターによる遺伝子医薬（ワクチン）・細胞治療の推進、第 33 回日本認知症学会学術集会、2014 年 11 月、横浜
- (3) 井上 誠、センダイベクターの再生医療への応用とエイズワクチン開発、第 28 回日本エイズ学会学術集会、2014 年 12 月、大阪

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

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

新規侵入阻害剤に関する研究

研究者分担者 鳴海 哲夫 静岡大学大学院工学研究科 准教授

研究要旨

本研究課題ではエンベロープタンパク質の耐性獲得機構を有機化学的に解析する新規ケミカルプローブを創製し、得られた知見をもとにエンベロープタンパク質に結合する新たなリード化合物の創出およびそれらを基盤とした HIV 侵入阻害剤の開発を最終目標とする。平成 25 年度は新たなケミカルプローブ候補化合物として、三つのフラグメント（ベツリン酸、アミドオクチルリンカー、スタチン）からなるベツリン酸誘導体 IC9564 に着目し、3 位ヒドロキシ基およびスタチンのカルボキシル基について誘導体化研究を行い、構造活性相関および構造変化誘起能を明らかにした。平成 26 年度は、100  $\mu\text{M}$  程度で細胞毒性が認められるベツリン酸骨格を 3 種類のトリテルペン類（オレアノール酸、ウルソール酸、グリチルレチン酸）に置換した化合物群を合成し、抗 HIV 活性および細胞毒性を評価することで、より低毒性の化合物を探索した。さら、異なる長さの炭素鎖リンカーを有する化合物群の合成および生物活性評価することで最適リンカー長を精査した。100  $\mu\text{M}$  で細胞毒性が認められず、顕著な抗 HIV 活性 ( $\text{IC}_{50} = 19 \mu\text{M}$ ) を示すオレアノール酸誘導体 (OKS2-045) を見出すことに成功した。OKS2-045 は IC9564 とは異なり、両末端保護体が高活性となったことから、OKS2-045 と IC9564 では結合様式が異なることが示唆された。そこで、様々なリンカー長（炭素数 = 1~11）をもつ誘導体群を合成し、その抗 HIV 活性について評価したところ、オレアノール酸誘導体では炭素鎖 4 のときに抗 HIV 活性が最大となることを明らかにした。これらの成果は、今後の HIV 侵入過程を標的とした創薬研究の進展に資するものである。なお、見出した研究成果を基に更なる構造活性相関研究が進行中である。

A. 研究目的

HIV 感染症の化学療法では、逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤など複数の薬剤を併用する多剤併用療法が有効な治療法として確立されているが、本治療法を満足に受けることができる感染者は限られており、さらに長期投与による毒性や耐性ウイルスの出現が問題となる。また、多剤併用療法による完治は現状では不可能であり、既存薬とは異なる標的・作用機序を有する薬剤や低分子化合物の開発は喫緊かつグローバルな研究課題である。これまでに研究分担者は、HIV の細胞侵入過程を標的とした侵入阻害剤の創製研究を行い、顕著な抗 HIV 活性を示す低分子型 CD4 ミミック誘導体を見出している。しかしながら、これまでの構造活性相関研究の結果から、CD4 ミミック誘導体は細胞毒性をはじめとする医薬品プロファイルの向上は容易ではなく、新たなケミカルプローブの創製が求められている。そこで、研究分担者は、新たなケミカルプローブ候補化合物として、他の薬剤（BMS-378806 や AMD3100、TAK-779）と強

力な相乗効果を示し、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 に着目し、構造活性相関研究に基づいた合理的分子設計により新たなケミカルプローブを合成し、新規 HIV 侵入阻害剤の創製を目指した。

B. 研究方法

IC9564 は大きく分けて三つのフラグメント（ベツリン酸、アミドオクチルリンカー、スタチン）からなる。平成 25 年度の誘導体化研究で、ベツリン酸誘導体は 100  $\mu\text{M}$  程度で細胞毒性が認められたことから、ベツリン酸骨格を 3 種類のトリテルペン類（オレアノール酸、ウルソール酸、グリチルレチン酸）に置換した化合物群を合成し、抗 HIV 活性および細胞毒性を評価することで、より低毒性の化合物を探索した。さらに化合物群の構造活性相関の結果をもとに、種々のリンカー長を有する化合物群の合成および生物活性評価することで最適リンカー長を精査した。

IC9564 および誘導体の生理活性試験

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

#### (倫理面への配慮)

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

### C. 研究結果

#### 【IC9564 のトリテルペン置換体の合成】

トリテルペン類 (オレアノール酸、ウルソール酸、グリチルレチン酸) を出発原料として、無水酢酸中加熱することで、3b-ヒドロキシ基をアセチル化し、続いて塩化オキサリルを作用させることで酸塩化物へと誘導した。これらに対し、アミノオクタン酸に塩化トリメチルシリルを作用させ生成したアミノオクタン酸トリメチルシリルエステルを作用させることで、28 位にアミドオクタノン酸ユニットを有するトリテルペン誘導体へと誘導した。

スタチンは平成 25 年度の研究で用いた第一世代合成法を改良した第二世代合成法を用いて合成した。Boc-L-Leu-OH を出発原料として、CDI を作用させ系中で活性エステル誘導体としたのちに、酢酸 tert-ブチルエステルに LDA を持て生成したリチウムエノラートを作用させることで、b-ケトエステルとした後に、水素化

ホウ素ナトリウムで 3 位カルボニル基を還元し、スタチン保護体をジアステレオ混合物として得た。続いて、塩化ビスマス存在下、Boc 基を選択的に脱保護することで、g-アミノ基が無保護のスタチン誘導体を合成した。

最後に先に合成した 28 位にアミドオクタノン酸ユニットを有するトリテルペン誘導体を g-アミノ基が無保護のスタチン誘導体と、常法により縮合し、アセチル基および tert-ブチル基を脱保護することで目的としたトリテルペン類 (オレアノール酸、ウルソール酸、グリチルレチン酸) に置換した化合物群を合成した。

種々のリンカー長を有する化合物群の合成では、上記合成法のうちアミノオクタン酸の代わりにそれぞれ対応する炭素鎖を有するアミノ酸を用いて合成した。

#### 【IC9564 および誘導体の生物活性評価】

生物活性評価の結果、100 μM で細胞毒性が認められず、顕著な抗 HIV 活性 (IC<sub>50</sub> = 19 μM) を示すオレアノール酸誘導体 OKS2-045 を見出した。OKS2-045 は IC9564 とは異なり、両末端保護体が高活性となったことから、OKS2-045 と IC9564 では結合様式が異なることが示唆された。そこで、様々なリンカー長 (炭素数 = 1~11) をもつ誘導体群を合成し、その抗 HIV 活性について評価したところ、アミノ酸リンカーを 7 炭素から 4 炭素にすることで 3 倍程度抗 HIV 活性が向上した OKS4-007 を見出した。

### D. 考察

IC9564 のベツリン酸の 3b-ヒドロキシ基およびスタチンユニットのカルボキシ基は抗 HIV 活性発現に重要であるのに対し、新たに見出したオレアノール酸誘導体 OKS2-045 は、3b-アセトキシ基、スタチンユニットは tert-ブチル基である。さらに、オレアノール酸誘導体のリンカー長の最適化研究の結果、リンカー長を短くすることで抗 HIV 活性が向上した。これらの結果は IC9564 とオレアノール酸誘導体では結合様式または標的が異なることを示唆している。また、オレアノール酸への誘導体化によって、IC9564 などのベツリン酸誘導体では困難であった疎水性官能基の導入も可能である。このことから、3b-アシル基の最適化およびスタチン末端の誘導体化を進めることで、有用なケミカルプローブの創製が期待できる。今後はオレアノール酸を直接化学修飾する late-stage modification による検討や、

オレアノール酸の簡易合成による検討を加えることで、さらに有用な誘導体の創製が期待される。

## E. 結論

ベツリン酸骨格を3種類のトリテルペン類(オレアノール酸、ウルソール酸、グリチルレチン酸)に置換した化合物群を合成し、抗 HIV 活性を評価することで、より低毒性の化合物を探索し、顕著な抗 HIV 活性を示すオレアノール酸誘導体 OKS2-045 を見出した。さらにリンカー長を最適化することで、リンカーの炭素数を7炭素から4炭素にすることで、3倍程度抗 HIV 活性が向上した OKS4-007 を見出すことに成功した。これらの結果は今後の HIV 侵入阻害剤の創製研究の進展に資するものである。今後はこれまでの構造活性相関研究に加え、臨床分離株を含めた様々なサブタイプでの生理活性評価、他の薬剤との強力な相乗効果の有無、in vitro 耐性誘導実験による耐性機序および結合部位を明らかにし、計算科学的手法を組み合わせることで複数のホットスポットに結合する新規侵入阻害剤の創製へとつなげたい。

## F. 謝辞

本研究の遂行にあたり、静岡大学大学院工学研究科・渡辺修造教授、間瀬暢之教授にお世話になりました。厚く御礼申し上げます。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Takano H, Narumi T, Ohashi N, Suzuki A, Furuta T, Nomura W, Tamamura H. Development of the 8-aza-3-bromo-7-hydroxycoumarin-4-ylmethyl group as a new entry of photolabile protecting groups. *Tetrahedron*, 70: 4400-4404, 2014.
- 2) Narumi T, Takano H, Ohashi N, Suzuki A, Furuta T, Nomura W, Tamamura H. Isostere-Based Design of 8-Azacoumarin-Type Photolabile Protecting Groups: A Hydrophilicity Increasing Strategy for Coumarin-4-ylmethyls. *Org Lett*, 16: 1184-1187, 2014.
- 3) Narumi T, Tsuzuki S, Tamamura H. Imidazolium Salt-Catalyzed Friedel-Crafts-Type Conjugate Addition of

Indoles: Analysis of Indole/Imidazolium Complex by High Level ab Initio Calculations. *Asian J Org Chem*, 3: 497-503, 2014

- 4) Tu V, Watamabe N, Narumi T, Mase N, et al. Synthesis and Characterization of Quantum Dot Nanoparticles Bound to the Plant Volatile Precursor of Hydroxy-apo-10'-carotenal. *J Org Chem*, 79:6808-6815, 2014.
- 5) Mase N, Narumi T, Tanaka F, et al. Fluorogenic aldehydes bearing arylolefinyl groups: turn-on aldol reaction sensors for evaluation of organocatalysis in DMSO. *Tetrahedron Lett*, 55:1946-1949, 2014.

### 2. 学会発表

- 1) 鳴海哲夫, 高野皓, 野村渉, 古田寿昭, 玉村啓和. 構造的等価性に着目した親水性クロモフォアの分子設計: 8-アザクマリニルメチル型光感受性保護基の開発. 第12回次世代を担う有機化学シンポジウム. 東京, 2014年5月23-24日.
- 2) 喜屋武龍二, 間瀬暢之, 渡辺修治, 玉村啓和, 鳴海哲夫. 高活性イミダゾリウムカルベンの創製と NHC 触媒反応への応用. 第4回 CSJ 化学フェスタ, 東京, 2014年10月14-16日.
- 3) 鳴海哲夫, 都築誠二, 玉村啓和. 機能性アゾリウム塩触媒を用いた Friedel-Crafts 型共役付加反応の開発と ab initio 分子軌道法による相互作用解析. 第40回反応と合成の進歩シンポジウム. 仙台, 2014年11月10-11日.
- 4) 松崎祐大, 小早川拓也, 水口貴章, 鳴海哲夫, 大橋南美, 野村渉, 玉村啓和. クロアルケン型ジペプチドイソスターの合成と環状 RGD ペプチドへの導入に関する研究. 第40回反応と合成の進歩シンポジウム. 仙台, 2014年11月10-11日.
- 5) Narumi T, Tsuzuki S, Tamamura H. Imidazolium Salt-Catalyzed Friedel-Crafts-Type Conjugate Addition of Indoles: Analysis of Indole/Imidazolium Complex by High Level ab Initio Calculations. 第2回国際会議(兼)第7回有機触媒シンポジウム. 東京, 2014年11月21-22日.

### 別添 3

- 6) 小早川拓也, 鳴海哲夫, 水口貴章, 野村涉, 玉村啓和. 1,4 遠隔不斉誘起による立体選択的アリル位アルキル化反応の開発. 第 58 回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2014 年 10 月 4 日.
- 7) 高野 皓, 鳴海哲夫, 野村 涉, 古田寿昭, 玉村啓和. 二光子励起かゝ可能な親水性アサゝクマリン型光感受性保護基の開発. 第 58 回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2014 年 10 月 4 日.
- 8) 荻原香澄, 吉村和久, 原田恵嘉, 玉村啓和, 間瀬暢之, 渡辺修治, 鳴海哲夫. 新規 HIV 侵入阻害剤を指向したトリテルペン誘導体の構造活性相関研究. 日本薬学会第 135 年会. 神戸, 2015 年 3 月 25-28 日.
- 9) 喜屋武龍二, 間瀬暢之, 渡辺修治, 鳴海哲夫. キラルリン酸アニオンを有する複合型アゾリウム塩の合成と不斉ラクトン化反応への応用. 日本薬学会 第 135 年会. 神戸, 2015 年 3 月 25-28 日.
- 10) 山口竣, 間瀬暢之, 渡辺修治, 古田寿昭, 鳴海哲夫. オキサアズラノン骨格を有する新規光感受性保護基の創製研究. 日本薬学会 第 135 年会. 神戸, 2015 年 3 月 25-28 日.
- 11) 千葉拓也, 鳴海哲夫, 間瀬暢之, 渡辺修治. o-プレニルフェノール類の酸化的環化反応の開発研究. 日本薬学会 第 135 年会. 神戸, 2015 年 3 月 25-28 日.

#### Ⅱ. 知的財産権の出願・登録状況

該当事項なし

#### Ⅲ. 健康危惧情報

該当事項なし

## Env の立体構造変化を捉える抗体の研究

研究分担者 桑田 岳夫 熊本大学エイズ学研究センター 助教

### 研究要旨

抗 Env 中和抗体の検索によって得られた SIV に対する抗体としては初めての broadly neutralizing antibody (BNAb) である B404 を用い、Env の立体構造上の脆弱性の発見を目的として B404 逃避ウイルスの解析を行った。その結果、B404 からの逃避には gp41 の cytoplasmic tail を短くする変異と HR1 領域の V571M 変異が重要であることがあきらかとなった。B404 が結合する Env gp120 ではなく、gp41 の変異によって B404 から逃避したことは、Env 三量体の立体構造や翻訳後修飾の変化が B404 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。これらの SIV-サルモデル系を用いた研究に加え、ヒトから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換え抗体を作成した。これらの抗体は、今後の HIV-1 Env の解析に有用である。

### A. 研究目的

既存の抗エイズ治療薬は非常に効果が高いものの、長期間にわたる治療による薬剤耐性ウイルスの出現が問題となっている。このため、これまでとは異なるウイルス増殖のステップを阻害する薬剤の開発が求められている。また、より効率的な感染防御のために、感染初期の標的細胞への侵入を防ぎ、細胞レベルでの感染を阻止することができる侵入阻害剤が重要であると考えられる。これらのことから、ウイルスの細胞への吸着、侵入過程で主要な役割を果たすエンベロープ (Env) の機能を阻害するメカニズムの解明を目指し、中和抗体と Env の解析を行った。

桑田らは、これまでに HIV-1 の動物モデルとして使われている SIV 感染サルから SIV に対する抗体としては初めての broadly neutralizing antibody (BNAb) である B404 を分離した (Kuwata *et al.*, *J Virol.* 87: 5424, 2013)。また、B404 存在下でのウイルス継代により、B404 逃避変異株を得た。本年度は、この B404 逃避変異株の逃避に重要な Env 部位を決定し、

B404 からの逃避メカニズムの検討を行った。一方、SIV-サルモデル系を用いた研究に加えて HIV-1 Env に対する抗体を解析するため、HIV-1 感染患者から多数の組み換え抗体を作成した。

### B. 研究方法

ウイルス：B404 逃避変異株は SIVmac316 株を B404 Fab を加えて PM1/CCR5 細胞に感染させ、増殖してきたウイルスを、より高い濃度の B404 Fab を用いて継代を繰り返すことで分離した。B404 逃避変異株と親株の SIVmac316 の Env、またその組み換え Env を発現するベクターと env 欠損 HIV-1 分子クローン pSG3ΔEnv を 293T 細胞へトランスフェクションし、シュードウイルスを作成した。

組み換え env 遺伝子の作成：B404 抵抗性株に感染した細胞から DNA を抽出して PCR により env 遺伝子を増幅し、発現ベクターにクローニングした。得られた B404 抵抗性 Env クローンと親株との組み換え Env を、制限酵素消化とライゲーションによる方法や、GeneArt

Seamless Cloning and Assembly Kit (Invitrogen) による相同組み替えによって作成した。また、変異を含んだプライマーを用いた PCR mutagenesis による変異 Env の作成も行った。

中和抗体：抗 SIV 単クローン抗体、B404, K8 は、SIVsmH635FC 感染アカゲザルからファージ・ディスプレイ法によって分離した (Kuwata *et al.*, AIDS Res Hum Retroviruses. 27:487-500, 2011)。Env V2 をエピトープとする M318T は SIV Env で免疫したマウスから分離された (Matsumi *et al.*, AIDS Res. Hum. Retroviruses 11:501, 1995)。

中和アッセイ：中和抗体の抗 HIV-1 効果は、TZM-bl 細胞におけるウイルス増殖を調べることににより判定した。具体的には、96 穴マイクロプレートに種々の濃度の抗体と 200 TCID<sub>50</sub> のウイルスを加え、1 時間 incubation 後に TZM-bl 細胞細胞を  $1 \times 10^4$  cells/well で播種した。48 時間後に培養上清を除去し、PBS にて洗浄後、細胞を溶解し、ウイルスの増殖の程度を luciferase assay system (Promega) を用いて定量した。

抗 HIV-1 組み替え抗体の作成：HIV-1 感染患者から EBV トランスフォーメーションとスクリーニングによって得られた抗 HIV-1 中和抗体産生 B 細胞株から RNA を抽出し、cDNA を合成した。PCR によって抗体の重鎖、軽鎖遺伝子の可変部位を増幅して PCR 産物を抗体発現用のベクターにクローニングした。組み替え抗体の産生は、293T 細胞へのトランスフェクションによって行った。

(倫理面への配慮について)

SIV と抗 SIV 抗体の研究は、主に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、倫理的な問題は生じない。臨床検体からの組み替え抗体の分離については、熊本大学医学部先進医療審査会にて研究の倫理的妥当性を承認されている。

### C. 研究結果

**B404 抗体逃避変異株**は他のエピトープに対する中和抗体にも抵抗性である：強力な広いスペクトラムをもった中和抗体、いわゆる broadly neutralizing antibody (BNAbs) である B404 からの逃避ウイルスを分離するため、B404 による中和に感受性の高かった SIVmac316 株を B404 存在下で継代し、B404 逃避ウイルスの誘導を行った。26 代継代後に得られた P26B404 株は、B404 への抵抗性を獲得し、B404 の 50% 阻害濃度 (50% inhibitory concentration [IC<sub>50</sub>]) が約 100 倍上昇していた (図 1)。さらに、P26B404 株は、V2 や CD4-induced (CD4i) 領域等の他のエピトープに対する中和抗体に対しても抵抗性を示した。この結果は、B404 からの逃避によって B404 のエピトープを隠すように Env 三量体の構造が変わり、HIV-1 の臨床分離株のような中和抗体抵抗性を獲得したことを示唆している。

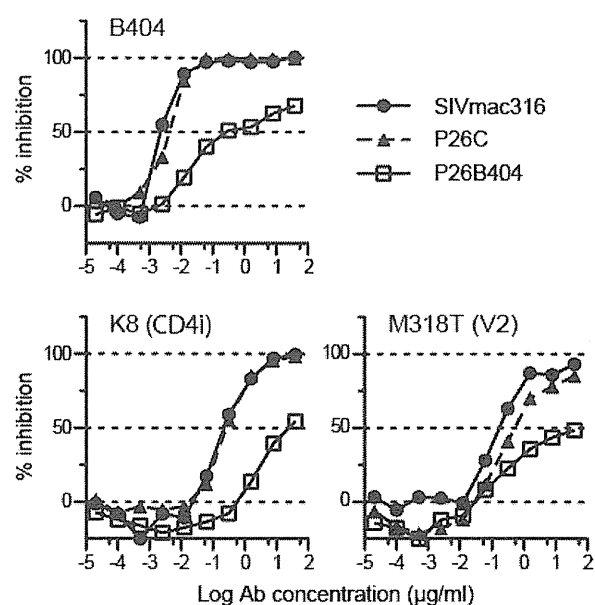


図 1. **B404 逃避変異株**は様々な抗体に抵抗性である B404 逃避変異株 P26B404 の中和抵抗性を、B404、抗 CD4i 抗体 K8、抗 V2 抗体 M318T による中和試験によって評価した。SIVmac316 株は親株、P26C は B404 非存在下で継代したコントロール株である。

中和抗体抵抗性には **gp41** の変異が重要である： 中和抗体抵抗性を決定している *env* 遺伝子の変異を同定するため、B404 逃避変異株から *env* 遺伝子をクローニングし、遺伝子解析を行った。その結果、B404 逃避変異株は、大多数を占める P26I と、少数の P26II の2つのウイルス型に分けられた (図 2A)。この2つのウイルス型は、signal peptide の V17L 変異と gp41 の cytoplasmic tail の欠失を起こす Q733stop 変異が共通で、他に、P26I は E176K と F277V、P26II は T136M、N295S、V571M の変異がみられた。中和抗体への抵抗性は P26II の

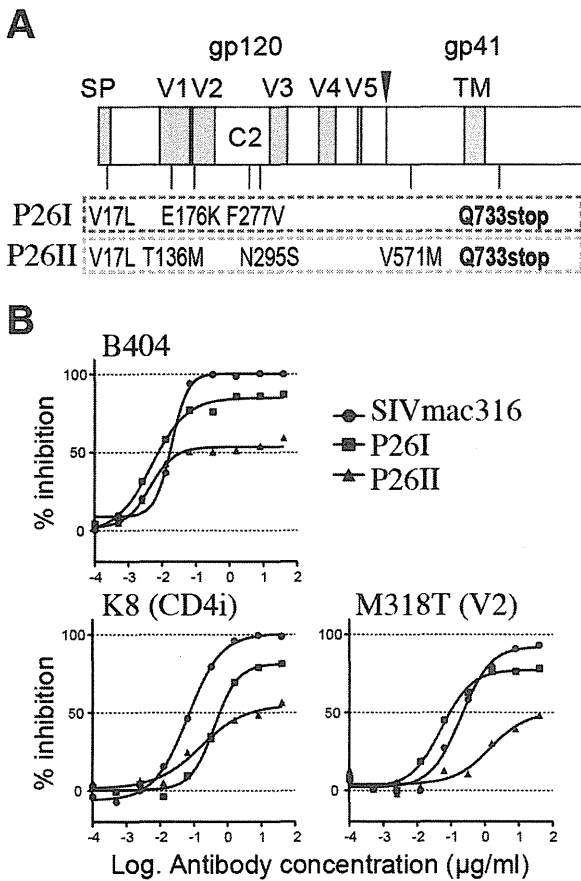


図 2. B404 逃避変異株クローンの Env 変異と中和抗体抵抗性 (A) Env の各領域と B404 逃避変異株 P26I と P26II にみられるアミノ酸変異を示す。 (B) B404 逃避変異株 P26I、P26II と親株 SIVmac316 の Env を持ったシュードウイルスの中和抗体 B404、K8 (CD4i)、M318T (V2) への感受性を中和試験によって評価した。

方が P26I より強く、B404 や CD4i、V2 に対する中和抗体に対し、P26II は強い抵抗性を示した (図 2B)。

より強い中和抗体抵抗性を示した P26II と親株の SIVmac316 株との組み替え Env を作成し、これらの Env を持ったシュードウイルスの中和抵抗性を解析したところ、gp41 の V571M、Q733stop 変異を持つ V571M $\Delta$ CT 株が P26II 株と同レベルの中和抵抗性を示し、gp120 の T136M、N295S 変異を持つ MS 株は親株の SIVmac316 と同様に中和感受性であった (図 3)。この結果は、P26II 株の中和抵抗性は gp41 の変異によって決定されていて、gp120 の変異は中和抵抗性に寄与していないことを示唆している。

さらに、gp41 の V571M と Q733stop 変異を

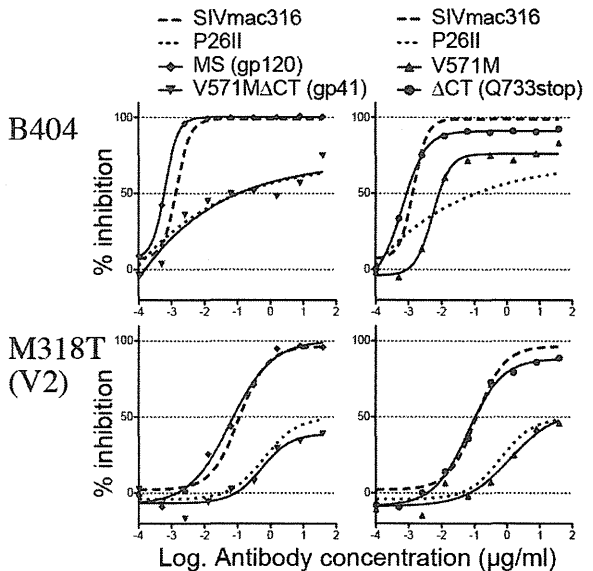


図 3. 中和抗体抵抗性には **gp41** の V571M と Q733stop 変異が重要である 親株の SIVmac316 と B404 抵抗性株 P26II との組み替え Env をもったシュードウイルスの中和抗体 B404、M318T への感受性を中和試験によって評価した。MS 株は gp120 の T136M、N295S 変異、V571M $\Delta$ CT 株は gp41 の V571M、Q733stop 変異を持つ。V571M 株、 $\Delta$ CT 株は親株 SIVmac316 に V571M、Q722stop のそれぞれの変異を挿入した変異 Env である。



もつ Env を作成し、それぞれの中和抵抗性への影響を解析した結果、gp41 の cytoplasmic tail を欠失させる Q733stop 変異は Maximal percent inhibition (MPI) を減少させるが IC<sub>50</sub> には影響がないこと、V571M は MPI の減少と IC<sub>50</sub> の上昇の両方に影響していることが示された (図 3)。V571M 変異の効果は抗 V2 抗体 M318T への抵抗性に特に顕著であり、この変異だけで P26II と同程度の中和抵抗性がみられた。これらの結果は、V571M 変異が様々な中和抗体に抵抗性となるために重要であり、この変異によって Env 三量体構造が大きく変化する可能性を示唆している。

**抗 HIV-1 組み替え中和抗体の作成：**SIV-サルモデル系は、Env と抗体の関係を実験的に解析する上では有用であるが、抗原性の違いから、SIV Env の解析結果を HIV-1 の Env に直接応用することは難しい。HIV-1 の Env を直接解析するために、抗体遺伝子をクローニングし

て組み替え抗体を作成する系を確立し、抗 HIV-1 中和抗体を作成した。

EBV による不死化とスクリーニングによって得られた抗 HIV-1 中和抗体を産生する B 細胞株から RNA を抽出して cDNA を合成し、PCR によって増幅した抗体遺伝子をクローニングした。得られた抗体発現プラスミドを 293T 細胞へトランスフェクションすることで組み替え IgG を産生した (図 4 A)。V3, CD4bs, CD4i をエピトープとする多数の抗体をクローニングし、これらの組み替え抗体が抗 HIV-1 中和活性を示すことを確認した (図 4 B)。これらの抗体は、今後の HIV-1 Env の解析に使用し、HIV-1 の Env の脆弱性の解析に使用する予定である。

#### D. 考察

BNAb は、その強くて広範囲な抗 HIV-1 活性のため、治療への応用や、ワクチンによる誘導が試みられている。本報告では、抗 SIV 中和抗体としては初めての BNAb である B404 からの逃避変異株の解析を行い、SIV サルモデルにおける中和抗体からの逃避メカニズムの検討を行った。

B404 存在下でのウイルス継代によって得られた B404 逃避変異株は、V3/V4 ループをエピトープとする B404 だけでなく、V2 や CD4i エピトープに対する中和抗体に対しても抵抗性となっていた。このように B404 とは異なるエピトープへの中和抗体にも抵抗性となったことは、中和抗体に抵抗性をもつ臨床分離株のように、B404 逃避変異株が中和抗体のエピトープを隠すような Env 三量体構造に変化しているためだと考えられる。また、B404 のエピトープがウイルス増殖に重要な領域であるため変わることができず、他の領域の変化によってエピトープを隠していることも示唆している。

組み替え Env を用いた解析の結果、B404 逃避変異株 P26II 株の中和抵抗性は gp41 によっ

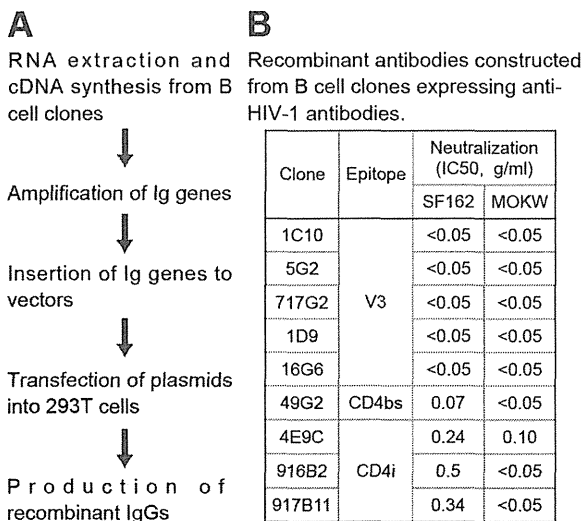


図 4. 抗体遺伝子のクローニングによる抗 HIV-1 組み替え中和抗体の作成 (A) 抗 HIV-1 中和抗体を産生する B 細胞株から組み替え抗体を作成する方法を示す。(B) 作成した組み替え抗体の HIV-1 SF162 株、MOKW 株の Env を持つシュードウイルスに対する中和活性を TZM-bl 細胞への感染阻害によって評価した。

て決定されており、B404 のエピトープがある gp120 の変異は中和抵抗性に寄与していることがあきらかになった。この結果は、B404 逃避変異株が中和抗体のエピトープを隠すような Env 三量体構造に変化しているという仮説を強く支持しており、B404 のエピトープが SIV の脆弱部位であることも強く示唆している。Q733stop 変異は gp41 の cytoplasmic tail を短くする変異であり、昨年度の報告により、この変異によってウイルス粒子への Env の取り込みが促進され、ウイルスの感染性が上昇することが分かっている。V571M は gp41 の HR1 領域の変異であり、この変異が中和抵抗性、特に抗 V2 抗体 M318T への抵抗性を上昇させていた。V571M 変異による gp41 の構造への影響や、それによる Env 三量体構造の変化について、今後、解析を進めていきたい。

これらの SIV サル・モデルを用いた Env と抗体の解析に加え、HIV-1 の V3, CD4bs, CD4i をエピトープとする中和抗体をクローニングし、抗 HIV-1 組み替え中和抗体を作成した。SIV の Env と中和抗体の解析結果を基に HIV-1 Env の解析を進めていく上で、これらの抗体は有用であると考えている。

## E. 結論

- ・B404 逃避変異株は、臨床分離株と同じように、異なるエピトープへの中和抗体にも抵抗性となった。

- ・Env の gp41 の cytoplasmic tail を短くする変異と HR1 領域の V571M 変異が中和抗体からの逃避に重要であった。

- ・組み替え抗体作成系を確立し、多数の抗 HIV-1 組み替え中和抗体を作成した。

## F. 研究発表

### (論文発表)

1. Ramirez Valdez KP, 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

### (学会発表)

1. Maruta Y, Kuwata T, Tanaka K, Nakahara Y, Ramirez Valdez K P, Alam M, Egami Y, Hirata I, Suwa Y, Morioka H and Matsushita S: Post-attachment Neutralization by Single-chain Variable Fragment (scFv) from an Anti-V3 Monoclonal Antibody with Cross-reactivity. January 10, 2015, Kumamoto, Japan
2. Stanoeva K, Fukuda A, Kuwata T, Kawanami Y, Satou Y and Matsushita S: Measuring the HIV reservoir in a cohort of Japanese patients on long-term ART. January 10, 2015, Kumamoto, Japan
3. 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. November 11-14, 2014, Portland, USA
4. Maruta Y, Kuwata T, Tanaka K, Nakahara Y, Ramirez Valdez K P, Alam M, Egami Y, Hirata I, Suwa Y, Morioka H and Matsushita S: Mechanism of post-attachment neutralization of single-chain variable fragment (scFv) from anti-V3 monoclonal antibody against HIV-1. HIV R4P, October 28-31, 2014, Cape Town, South Africa
5. Kuwata T, Enomoto I, Baba M and 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, Japan
6. Ramirez Valdez K P, Kuwata T, Maruta Y, Tanaka K, Alam M, Yoshimura K and 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, Japan
7. Egami Y, Maruta Y, Tanaka K, Alam M, Ramirez Valdez K P, Kuwata T and Matsushita S: Construction of neutralizing antibody fragment against V3 with a broad cross-reactivity. 15th Kumamoto AIDS

Seminar, October 1-3, 2014, Kumamoto, Japan

8. Alam M, Kuwata T, Ramirez Valdez K P, Enomoto I, Maruta Y, Tanaka K, Rahman M K, Egami Y, Kawanami Y, Murayama H, Shimura K, Matsuoka M and 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, Japan
9. Maruta Y, Kuwata T, Tanaka K, Nakahara Y, Ramirez Valdez K P, Alam M, Egami Y, Hirata I, Suwa Y, Morioka H and 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, Japan
10. Tanaka K, Kuwata T, Maruta Y, Ramirez Valdez K P, Alam M, Egami Y, Enomoto I, Kawanami Y and Matsushita S: Improving the neutralizing activities of antibodies targeting CD4i (CD4-induced) epitope by miniaturization. 15th Kumamoto AIDS Seminar, October 1-3, 2014, Kumamoto, Japan
11. 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 3-5 日、大阪
12. 江上由華、丸田泰広、田中和樹、Alam Muntasir、Ramirez Valdez K P、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 3-5 日、大阪
13. 桑田岳夫、馬場昌範、松下修三：中和抗体と抗 CCR5 阻害薬 第 62 回日本化学療法学会西日本支部総会・第 57 回日本感染症学会中日本地方会学術集会・第 84 回日本感染症学会西日本地方会学術集会、2014 年 10 月 23-25 日、岡山
14. 桑田岳夫：SIV サル・モデルを用いた中和抗体の解析 第 17 回日本レトロウイルス研究会夏期セミナー、2014 年 7 月 3-5 日、熱海
15. 桑田岳夫、馬場昌範、松下修三：CCR5 阻害薬 Cenicriviroc への耐性と中和抗体への抵抗性は両立しない 第 16 回白馬シン

ポジウム、2014 年 6 月 13-14 日、熊本

16. 桑田岳夫、馬場昌範、松下修三：HIV-1 の CCR5 阻害薬への耐性と中和抗体への抵抗性は両立しない 第 24 回抗ウイルス療法研究会総会、2014 年 5 月 7-9 日、富士吉田

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表