

201421022A

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)

中和抗体を用いたHIV感染症の「機能的治癒」を
めざす新規治療法の開発

平成26年度総括・分担研究報告書

研究代表者 松下修三

平成27年 3月

目 次

I. 総括研究報告	
中和抗体を用いた HIV 感染症の「機能的治癒」をめざす新規治療法の開発 ……	1
松下 修三 (熊本大学エイズ学研究センター 教授)	
II. 分担研究報告	
1. 臨床研究のインフラ整備、臨床プロトコルの作成 ……	8
松下 修三 (熊本大学エイズ学研究センター 教授)	
2. 中和抗体の効果を高める CD4 mimic の開発 ……	13
玉村 啓和 (東京医科歯科大学 教授)	
3. NBD 誘導体の動物モデルを用いた in vivo 試験 ……	18
五十嵐樹彦 (京都大学ウイルス研究所 教授)	
三浦 智行 (京都大学ウイルス研究所 准教授)	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ……	22
IV. 研究成果の刊行物・別刷 ……	26

総合研究報告書

中和抗体を用いた HIV 感染症の「機能的治癒」をめざす新規治療法の開発

研究代表者 松下 修三 熊本大学エイズ学研究センター・教授

研究要旨

KD-247 の臨床試験で観察された長期効果には、抗体の中和能に加えて、Fc 部分を介した慢性 HIV 感染細胞に対する効果が考えられるため、ADCC 活性と ADCVI 活性を検討した。実験室株に加え、臨床株 (T/F virus) を感染させた CEM.NKr-CCR5 細胞を標的細胞として解析したところ、KD-247 を含む中和抗体パネルは、これらのウイルス感染細胞に対して ADCC 活性を示した。KD-247 は、感染細胞を標的とした ADCVI 試験においても、 $0.2 \mu\text{g/ml}$ の濃度でウイルスの増殖を 80% 以上抑制した。平成 26 年度までに行った KD-247 と CD4-mimic (YYA-021) を併用する霊長類モデルでの POC 試験にて、KD-247 の抗ウイルス効果は認められたが、YYA-021 の併用による増強効果は、薬物動態の問題から、明らかではなかった。この結果を踏まえ、新規 CD4-mimic 化合物から、MTA-103 を第二世代のリード化合物に選定し、大量に合成し、霊長類モデルでの安全性と薬物動態の解析をおこなっている。一方、霊長類モデルでは、高病原性 X4 指向性 SHIV-KS661 のアミノ酸置換により、R5 指向性に変化させた SHIV-MK1、その継代によってアカゲザルに順化させた SHIV-MK38 を分離し、中和感受性を比較した。MK1、KS661 は、中和感受性であったが、MK38 は KD-247 中和抵抗性となった。MK38 は、非ヒト霊長類モデルを用いた HIV-1 の中和抗体抵抗性の解析に役立つ可能性がある。

分担研究者

玉村啓和 東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 教授

五十嵐樹彦 京都大学ウイルス研究所 教授

三浦 智行 京都大学ウイルス研究所 准教授

B. 研究方法

1) 感染細胞を攻撃する抗体の Fc-receptor を介する機能の測定：

antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) 活性は、2 種類の蛍光色素で標的細胞を染色する RFADCC 方を用いた。HIV-1 感染または gp120-coated cells (CEM.NKr.CCR5) を標的細胞とし NK-enriched fraction をエフェクター細胞として用いた。標的細胞を抗体と 1 時間室温で反応させ、エフェクター細胞を加え 6 時間インキュベートし FACSCalibur で ADCC 活性を算出した。antibody-dependent cell-mediated virus inhibition (ADCVI) 活性の測定では、HIV-1_{Bal} を MOI 0.05 で CEM.NKr-CCR5 に感染させ、48 時間後に洗浄して free virus を除いて標的細胞を準備する。健常者の末梢血をエフェクター細胞として、KD-247 または コントロール抗体の存在下に E:T ratio 10:1 で培養する。7 日後に培養上清中の p24 濃度を測定し抑制率を計算した。

2) KD-247 と YYA-021 を用いた霊長類モデルでの POC 第一段階試験：

KD-247 の効果を増強する CD4-mimic (YYA-021) の研究及びこれを抗体と併用する霊長類モデルでの POC 試験を継続した。YYA-021 を低濃度から投与することによって霊長類に対する毒性を評価した。POC 試験では、KD-247 単独または KD-247+YYA-021 投与個体のウイルス学的効果とともに KD-247 と YYA021 の薬物動態

A. 研究目的

本研究の最終目的は、中和抗体を用いた HIV-1 感染症の「機能的治癒」をめざした治療法の開発である。抗ウイルス療法 (cART) の進歩により、HIV-1 感染症の予後は著名に改善したが、長期治療の過程で様々な慢性合併症が起こる。その病態には、残存するウイルス増殖と慢性炎症の関与が考えられ、残存ウイルスの排除をめざす「治癒に向けた研究」は本領域で最も重要な研究である。我々は、HIV-1 の V3-tip に対するヒト型単クローン抗体 KD-247 の第 I 相 B 臨床試験を行い、ヒトにおける安全性と有効性を確認した。注目すべきは KD-247 の投与が終了し、血中濃度低下後も HIV-RNA のリバウンドが見られない症例が観察された点で、KD-247 は HIV の中和ばかりでなく、慢性感染細胞を排除し、セットポイントを下げた可能性が示唆された。本研究班では、臨床試験で示唆された KD-247 の感染細胞に対する機能を明らかにするとともに、問題点として明らかになった研究課題に取り組み、真に革新的な治療法に近づけるための非臨床研究を行う。その一つは、抗体の必要量を減らすことであり、もう一つは耐性ウイルス出現の抑制である。

(pharmacokinetics:PK) の解析、抗 idiotypic 抗体の検出などを行った。

3) 第二世代リード化合物 MTA-103 の大量合成：第二世代の CD4 ミミックのリード化合物である MTA-103 は、YYA-021 よりも抗 HIV 活性は劣るものの、細胞毒性が試験範囲内では検出されないという低毒性化合物として注目される。また、物性上 YYA-021 よりも親水性が高いと推定される。YYA-021 がサルモデルで組織移行性等の原因により、効果が十分でなかったことより、YYA-021 よりも親水性が高い MTA-103 は in vivo への応用に期待できる。そこで、MTA-103 の大量合成を進めた。

4) 次世代のリード化合物の創製：MTA-103 よりもさらに有用な化合物の開発を進める。具体的には、これまでに得られた構造活性相関の情報を基に、芳香環部位とピペリジン環部位を最適化する。

5) SHIV の工夫による、霊長類モデルの改良：SHIV 感染の霊長類モデルを人の HIV 感染臨床モデルに近づける目的で、CCR5 指向性臨床株由来の ENV を持つ SHIV(SHIV-MNA)の作成や X4R5 の SHIV-KS661 の env 遺伝子の V3 領域の 5 アミノ酸を置換することにより CCR5 指向性に変化させたウイルス(SHIV-MK1)を作成、これらを動物に継代し、アカゲザルに順化させ、増殖性の良いウイルスを分離する。

(倫理面への配慮)

HIV 感染症例由来の血液検体に関しては、学内倫理委員会の承認を得た説明と同意書を用いて同意を得て採血した(臨床研究登録 UMIN000004720)。動物の飼養および動物実験には、「京都大学における動物実験の実施に関する規程」を遵守した。アカゲザルの飼養に関し、環境大臣より許可を受けている。また、輸入サル飼育施設の指定を受けている。遺伝子組み換え生物第二種使用等にかかる拡散防止措置について大臣確認されている。

C. 研究結果

KD-247 の臨床試験でみられた長期効果は、抗体の中和能に加えて、Fc-receptor を介した HIV 感染細胞に対する効果が考えられるため、KD-247 及び我々が作成した中和抗体パネルを用いて ADCC 活性と ADCVI 活性を in vitro で検討した。KD-247 は gp120 coated 細胞を標的とした場合、0.2 μ g/ml の低濃度で 43% の細胞傷害性を示した(図 1a)。また、HIV-1_{BaL} や HIV-1_{YU2} などの実験室株ばかりでなく、THRO, CH040, CH058 などの臨床株の感染細胞に対しても ADCC 活性を認めた(図 1b)。

これらの臨床分離 T/F 株に対する ADCC 活性に関して、我々が作成した 12 種類の抗体パネルについて詳細に検討した。5 種類の T/F ウイルス(THRO, CH040, CH058, REJO, CH106)を増殖させ、持続

感染細胞を作成して標的細胞とし、ADCC 活性を検討した(図 2)。KD-247 はこのうち 3 種類(THRO, CH040, CH058)に対して活性を示した。他の V3 抗体はいずれも 5 種類中 3 種類のウイルスに対して ADCC 活性を示した。一方、CD4bs 抗体、CD4i 抗体の中には 5 種類中 4 種類の T/F ウイルスに対して活性を持つものがあり、全体では 5 種類の T/F ウイルス感染細胞に対して、これらのうちのどれか一つ以上が必ず ADCC 活性を示した。

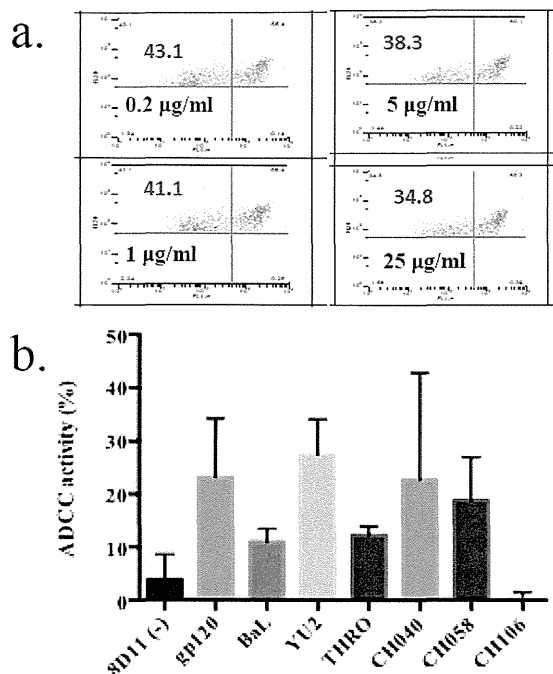


図1. KD-247 は強力なADCC activityを示す。
a. gp120_{SF2} coated target cellsを用いたADCC試験。b. 各ウイルス感染細胞を標的としたADCC試験。

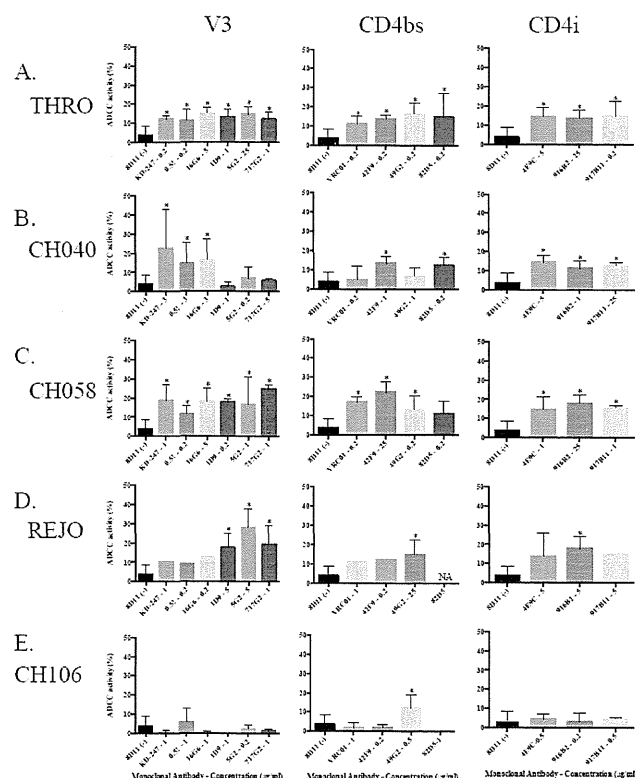


図2. T/Fウイルス感染細胞に対する抗体パネルの ADCC 活性

一方、ADCVI 活性の評価は、HIV-1_{BaL} 感染細胞に関して行った。HIV-1_{BaL} を MOI 0.05 で CEM.NKr-CCR5 に感染させ、48 時間後に洗浄して free virus を除いて標的細胞を準備した。健常者の末梢血をエフェクター細胞として、KD-247 またはコントロール抗体の存在下に E:T ratio 10:1 で共培養した。7 日後に培養上清中の p24 濃度を測定し抑制率を計算した。KD-247 は 0.2 μg/ml の濃度でウイルスの増殖を 80% 以上抑制した (図 3)

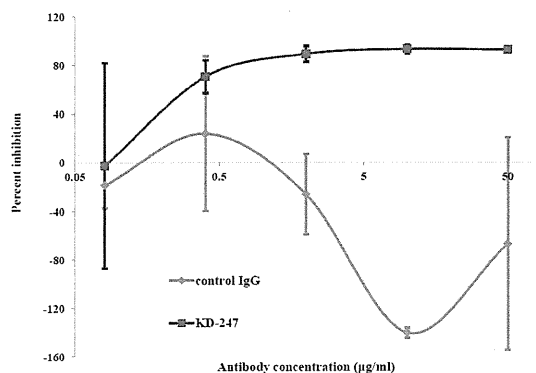


図3. KD-247のADCVI活性

高病原性 SHIV KS661 株に対する KD-247 の中和活性が YYA-021 により増強される事を試験管内で明らかにした。本増強効果を個体レベル感染で検証する第一段階の POC 試験は平成 26 年度までに終了した (図 4)。

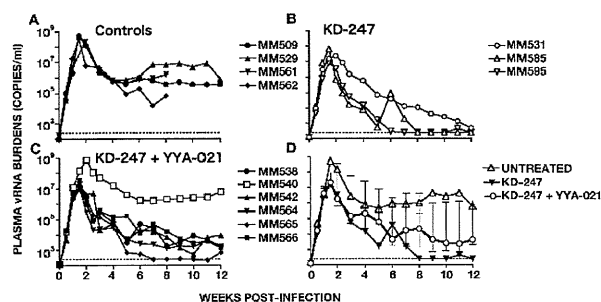


図4. KD-247とYYA-021を用いた霊長類モデルでのPOC第一段階試験

SHIV KS661 感染アカゲザルに感染 24 時間、8 日および 15 日後に KD-247 (16 mg/kg) および YYA-021 (6.25 mg/kg) を静脈内投与した所、非投与群 (図 4A) と比較して血漿ウイルス RNA 量を有意に抑制した (図 4C)。KD-247 単独投与群においても同様の抑制が見られたことから (図 4B)、今回用いた量の YYA-021 では個体レベルでの中和活性増強は明らかにできなかった (図 4D)。KD-247 投与

個体の KD-247 の血中濃度を測定した。ヒトと同等の PK profile を検出したが、ピアコアを用いた方法で、6 頭中 1 頭に抗 idotype 抗体の出現が認められた。これまでの検討から YYA-021 を 12.5 mg/ml の濃度で用いた場合、致死的ではないものの、徐脈などの急性毒性を認めたため、6.25 mg/kg を用いたが、この濃度は in vitro では有効性を認めるものの、in vivo では、YYA-021 の急速な組織移行性のため、十分な効果を認められなかったと考えられる。

この結果を踏まえ、これまで検討してきた CD4mimic 化合物の中から in vitro での有効性と安全性が同等で、YYA-021 とは構造の異なる新規化合物 MTA-103 を同定し、安全性試験を行っている (図 5)。

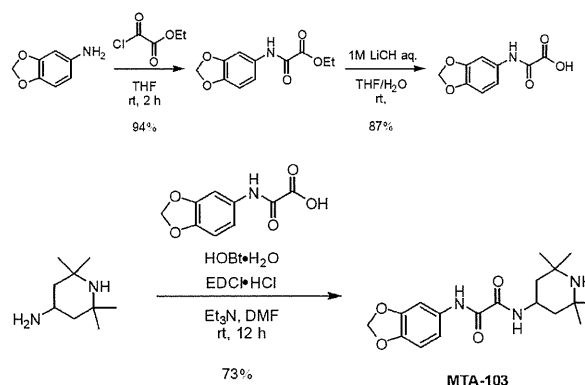


図5. 第二世代リード化合物MTA-103の大量合成

一方、現在の霊長類モデルは、X4R5 ウイルスを用いており、R5 ウイルスを用いたものは少ない、我々は霊長類モデルをヒトでの感染モデルに近づけるため、臨床分離株からエンベロープをクローニングし SHIV 化して霊長類で経代した。また、SHIV-KS661 の env 遺伝子の V3 領域の 5 アミノ酸を置換することにより CCR5 指向性に変化させた SHIV-MK1 を作成し、アカゲザルに順化させた SHIV-MK38 を分離した。SHIV-MK1 は、SHIV-KS661 と同様に KD-247 に対し中和感受性 (Tier1B 相当) であり、YYA-021 による中和増強効果もみられたが、SHIV-MK1 をアカゲザルに順化した SHIV-MK38 は、KD-247 中和抵抗性となり、YYA-021 による中和増強効果もみられなかった (図 6)。

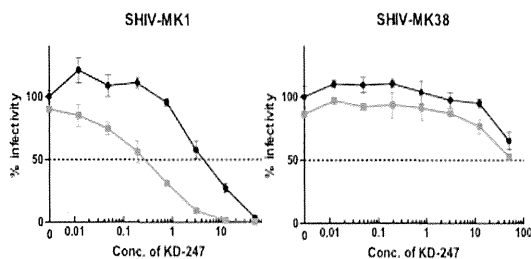


図6. CCR5指向性SHIV-MK1及びSHIV-MK38のKD-247中和感受性試験。●:KD-247 alone, ■:KD-247+YYA-021

D. 考察

本研究班の研究の目的は、KD-247 の臨床試験で明らかになった課題に取り組み、真に革新的な治療法に近づけるための非臨床研究を行うことである。臨床試験でみられた KD-247 の長期効果、すなわち、KD-247 の投与が終了し、血中濃度低下後も HIV-RNA のリバウンドが見られない症例が観察された点に関して、Fc-receptor を介した HIV 感染細胞に対する効果が考えられた。本年度の研究で、HIV-1 感染細胞を攻撃する抗体の機能として KD-247 を含む中和抗体パネルの ADCC と ADCVI の機能を証明した。これらの機能を in vivo で証明することは困難だが、KD-247 の臨床試験で示唆された、個体レベルでウイルスのセットポイントを下げる可能性に関与すると考えられた。特筆すべきは、臨床分離株に対する ADCC 活性を調べると、我々が作成した 12 種類の抗体パネルのどれかが必ず ADCC 活性を示した点で、二つ以上の抗体の組み合わせを用いて広範囲のウイルスをカバーできる可能性が示唆された。

一方、臨床試験で明らかになった課題として、抗体の必要量を減らすことと、耐性ウイルス出現の抑制がある。CD4-mimic 小分子は、KD-247 の中和能を増強するが、これまで開発してきた YYA-021 は、in vitro では、著名な中和増強効果を示すものの、個体内での薬物動態に問題があり、投与した条件では in vivo 効果を確認できなかった。この結果を踏まえ、これまで検討してきた新規 CD4-mimic 化合物の中から、MTA-103 を第二世代のリード化合物に選定し、大量合成し、霊長類モデルでの安全性と薬物動態の解析をおこなっている。一方、霊長類モデルでは、高病原性 X4 指向性 SHIV-KS661 のアミノ酸置換により、R5 指向性に変化させた SHIV-MK1、この継代によってアカゲザルに順化させた SHIV-MK38 を分離し、中和感受性を比較した。MK1、KS661 は、中和感受性であったが、MK38 は KD-247 中和抵抗性となった。MK38 は、非ヒト霊長類モデルを用いた HIV-1 の中和抗体抵抗性の解析に役立つものと期待される。

E. 結論

cART の進歩により、AIDS の発症阻止が可能となった。しかし、残存する HIV-1 感染細胞の排除は困難なため、治療は一生継続される必要がある。従来の抗ウイルス薬とは異なり、中和抗体とその効果を増強する小分子の併用では、HIV-1 感染細胞を標的とする効果が期待できる。すなわち、ウイルスリザーバーを減少させ、結果的に治療を中断できる可能性がある。これにより、治療期間を短縮し、HIV/AIDS 治療にかかわる医療費の削減につながる。抗体を用いた新規治療法の開発は、in vitro の研究から人への臨床応用を目指した臨床試験の段階にあるが、in vivo で最大の効果を得るためには、様々な可能性を動物モデルでの検証する必要がある。これには、多くのハードルが存在するが、「機能的治癒」をもたらす治療戦略が現実のものになれば、我が国ばかりか、世界の保険、医療、福祉の向上に役立つ成果が期待できる。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表 (論文発表)

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

- C Ligands Using Fluorescence Resonance Energy Transfer. *Chem Pharm Bull* 62(10): 1019–1025, 2014.
6. Masyuk M, Abduekmula A, Morosan-Puopolo G, Ödemis V, Rehim R, Khalida N, Yusuf F, Engele J, Tamamura H, Theiss C, Brand-Saberi B. Retrograde Migration of Pectoral Girdle Muscle Precursors Depends on CXCR4/SDF-1 Signaling. *Histochem Cell Biol* 142(5): 473–488, 2014.
 7. Yamamoto J, Maeda N, Komiya C, Tanaka T, Denda M, Ebisuno K, Nomura W, Tamamura H, Sato Y, Yamauchi A, Shigenaga A, Otaka A. Development of a Fluoride-responsive Amide Bond Cleavage Device that is Potentially Applicable to a Traceable Linker. *Tetrahedron* 70(34): 5122–5127, 2014.
 8. 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(29): 4400–4404, 2014.
 9. Yamamoto J, Denda M, Maeda N, Kita M, Komiya C, Tanaka T, Nomura W, Tamamura H, Sato Y, Yamauchi A, Shigenaga A, Otaka A. Development of a Traceable Linker Containing a Thiol-responsive Amino Acid for the Enrichment and Selective Labelling of Target Proteins. *Org Biomol Chem* 12(23): 3821–3826, 2014.
 10. 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(4): 497–503, 2014.
 11. Narumi T, Takano H, Ohashi N, Suzuki A, Furuta T, Tamamura H. Isostere-Based Design of 8-Azacoumarin-type Photolabile Protecting Groups: A Hydrophilicity Increasing Strategy for Coumarin-4-ylmethyls. *Org Lett* 16(4): 1184–1187, 2014.
 12. 野村 渉, 玉村 啓和. ターゲットタンパク質を特異的に認識するプローブ. 化学工業 特集「ペプチド化学の新潮流(I)」, 化学工業社, 川崎, 65(11): 8-14, 2014.
 13. 玉村 啓和. ペプチドミメティックスを活用した抗 HIV 剤の創製. *MEDCHEM NEWS*, 日本薬学会 医薬化学部会, 東京, 24(1): 14-19, 2014.
 14. Otsuki, H., Yoneda, M., Igarashi, T., and Miura, T.: Generation of a monkey-tropic human immunodeficiency virus type 1 carrying env from a CCR5-tropic subtype C clinical isolate. *Virology*, 460-461: 1-10, 2014.
 15. Adach, A. and Miura, T.: Animal model studies on viral infections. *Frontiers in Microbiology*, 5: Article 672, 2014.
- (学会発表)
1. Boonchawalit, S., Harada, S., Matsushita, S., Yoshimura, K.: Impact of Maraviroc (MCV)-resistant mutations in C1 and C4 regions of gp120 on sensitivity to antibody-mediated neutralization. 20th International AIDS Conference. Melbourne, Australia. July 20-25, 2014.
 2. Matsushita, S., Ramírez, K.P., Maruta, Y., Tanaka, K., Muntasir, A., Kuwata, T., Pisupait, J., Murakami, T., Yoshimura, K. Therapeutic application of neutralizing antibodies based on the recent data on complementary and synergistic activities against a wide range of HIV-1 strains. 15th Kumamoto AIDS Seminar. October 1-3, 2014. Kumamoto.
 3. Kuwata, T., Enomoto, I., Baba, M., Matsushita, S. Acquisition of resistance to the CCR5 antagonist cenicriviroc renders HIV-1 sensitive to neutralizing antibodies. 15th Kumamoto AIDS Seminar. October 1-3, 2014. Kumamoto.
 4. Ramírez, K.P., Kuwata, T., Maruta, Y., Tanaka K., Muntasir, A., Yoshimura, K., Matsushita, S. Evaluation of complementarity and synergy of conventional anti-HIV-1 antibodies derived from a single individual, 15th Kumamoto AIDS Seminar. October 1-3, 2014. Kumamoto.
 5. Muntasir, A., Kuwata, T., Ramirez, K., Enomoto, I., Maruta, Y., Tanaka K., Rahman K., Nakahara, Y., Egami, Y., Kawanami, Y., Murayama, H., Shimura, K., Matsuoka, M., Matsushita, S. Mutations in gp41 that confer resistance to fusion inhibitors enhance the neutralization sensitivity to antibodies against both gp41 and gp120. 15th Kumamoto AIDS Seminar. October 1-3, 2014. Kumamoto.
 6. Maruta, Y., Kuwata, T., Tanaka K., Nakahara, Y., Ramirez, K., Alam, M., Egami, Y., Hirata I., Suwa, Y., Morioka, H., Matsushita, S. Mechanism of post-attachment neutralization of single-chain variable fragment (scFv) from anti-V3 monoclonal antibody against HIV-1.

- 15th Kumamoto AIDS Seminar. October 1-3, 2014. Kumamoto.
7. Tanaka K., Kuwata, T., Maruta, Y., Ramirez, K., Muntasir, A., Egami, Y., Enomoto, I., Kawanami, Y., Matsushita, S. Construction of neutralizing antibody fragment against V3 with a broad cross-reactivity. 15th Kumamoto AIDS Seminar. October 1-3, 2014. Kumamoto.
 8. Maruta, Y., Kuwata, T., Tanaka K., Nakahara, Y., Ramirez, K., Alam, M., Egami, Y., Hirata, I., Suwa, Y., Morioka, H., Matsushita, S. Mechanism of post-attachment neutralization of single-chain variable fragment (scFv) from anti-V3 monoclonal antibody against HIV-1. HIV R4P 2014. October 28-31, 2014. Cape Town, South Africa.
 9. Kuwata, T., Yoshimura, K., Wu, F., Ourmanov, I., Hirsch, V.M., Yokoyama, M., Sato, H., and Matsushita, S. Mutations in gp41 is Critical to Escape from B404, a Broad Neutralizing Antibody Against SIV, Which Recognizes a V3/V4 Conformational Epitope. 32nd Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS. November 11 - 14, 2014. Portland, Oregon, USA.
 10. Matsushita, S., Ramirez, K.P., Maruta, Y., Tanaka, K., Muntasir, A., Kuwata, T., Pisupait, J., Murakami, T., Yoshimura, K. Therapeutic application of neutralizing antibodies based on the recent data on complementary and synergistic activities against a wide range of HIV-1 strains. the 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) Emerging Infectious Diseases Meeting Jan. 26-27, 2015. Taipei, Taiwan
 11. Maruta, Y., Kuwata, T., Tanaka, K., Nakahara, Y., Ramirez, K., Alam, M., Egami, Y., Hirata, I., Suwa, Y., Morioka, H., Matsushita, S. Mechanism of post-attachment neutralization of single-chain variable fragment (scFv) from anti-V3 monoclonal antibody with cross-reactivity. Korea-Japan Joint Seminar on HIV/AIDS. Jan 10, 2015. Kumamoto.
 12. Stanoeva, K., Fukuda, A., Kuwata, T., Kawanami, Y., Satou, Y., Matsushita, S. Measuring the HIV reservoir in a cohort of Japanese patients on long-term ART. Korea-Japan Joint Seminar on HIV/AIDS. Jan 10, 2015. Kumamoto.
 13. Muntasir, A., Kuwata, T., Ramirez, K., Maruta, Y., Tanaka K., Shimura, K., Oishi, S., Fujii, N., Matsuoka, M., Matsushita, S. Enhanced Neutralization of HIV-1 with Fusion Inhibitor Resistant Mutations. The annual Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI 2015). February 23-26, 2015. Seattle, Washington, USA.
 14. Ramirez, K.P., Kuwata, T., Maruta, Y., Tanaka K., Muntasir, A., Yoshimura, K., Matsushita, S. Complementary effect of anti-V3, CD4bs and CD4i antibodies accounts for cross-neutralizing and non-neutralizing activities against HIV-1. 第28回日本エイズ学会学術集会・総会. 2014年12月3日-5日, 大阪.
 15. 江上由華, 丸田泰広, 田中和樹, Muntasir A., Ramirez K., 桑田岳夫, 松下修三. V3 エピトープへの交叉反応性をもつ中和抗体の遺伝子組み換えによる小型化の試み. 第28回日本エイズ学会学術集会・総会. 2014年12月3日-5日, 大阪.
 16. 桑田岳夫, 松下修三. 強力な抗SIV中和抗体B404からの逃避メカニズムの解析. 第28回日本エイズ学会学術集会・総会. 2014年12月3日-5日, 大阪.
 17. Tamamura H. Development of peptide-lead anti-HIV agents. The 15th Akabori Conference 2014: Japanese-German Symposium on Peptide Science, Boppard, Germany, Sep 7-9, 2014.
 18. Tamamura H. Chemical Biology Studies on the Elucidation of a Dimerization State of a GPCR CXCR4 and the Development of Recognition Probes for Cancerous Cells. Seminar in University of Cologne, Cologne, Germany, Sep 11, 2014.
 19. Nomura W, Hashimoto C, Fujino M, Murakami T, Ohashi N, Tamamura H. Multimerized Peptides Derived from the C-Terminal Region of HIV-1 gp41 as Fusion Inhibitors. The 33rd European Peptide Society Symposium. Sofia, Bulgaria, Aug 31-Sep 5, 2014.
 20. Nomura W, Métifiot M, Ohashi N, Fujino M, Mizuguchi T, Yamamoto N, Pommier Y, Komano JA, Murakami T, Tamamura H. Cell-permeable Stapled Peptides with Integrase Inhibitory Activity Derived from HIV Gene Products. The 15h Kumamoto AIDS Seminar. Kumamoto, Japan, Oct 1-3, 2014.
 21. Yamada Y, Hashimoto C, Otsuki H, Hirota Y, Yoshimura K, Harada S, Ohashi N, Mizuguchi T, Nomura W, Miura T, Igarashi T, Matsushita S, Tamamura H. A CD4 Mimic as an HIV Entry Inhibitor: Pharmacokinetics. The 15h Kumamoto AIDS Seminar. Kumamoto, Japan, Oct 1-3, 2014.
 22. Irahara Y, Kotani M, Harada S, Narumi T, Yamada Y, Hirota Y, Ohashi N, Mizuguchi T, Nomura W, Matsushita S, Yoshimura K, Tamamura H. A New Type of Small CD4

- Mimic Molecules Targeting an HIV Envelope Protein gp120. The 15th Kumamoto AIDS Seminar. Kumamoto, Japan, Oct 1-3, 2014.
23. Kotani M, Hirota Y, Irahara Y, Harada S, Yamada Y, Ohashi N, Mizuguchi T, Nomura W, Matsushita S, Yoshimura K, Tamamura H. Structure-activity Relationship Studies of CD4 Mimic Molecules. The 15th Kumamoto AIDS Seminar. Kumamoto, Japan, Oct 1-3, 2014.
 24. 玉村啓和. ペプチドを基盤とする中分子創薬研究—抗 HIV 剤の創製—. 東京薬科大学大学院公開講義 (講演). 東京, 2014 年 6 月 6 日.
 25. 玉村啓和. エイズ発症防止と疾患予防科学. 東京医科歯科大学大学院 生命理工学系専攻「疾患予防科学コース」ミニシンポジウム「疾患予防科学で何を学ぶのか」疾患予防のための理工学: その魅力と大学院キャリアセミナー「研究紹介セミナー」. 東京, 2014 年 7 月 19 日.
 26. 玉村啓和. 25 年間ペプチドサイエンスを研究して. 第 46 回若手ペプチド夏の勉強会 特別講演. 宮津, 2014 年 8 月 3 日..
 27. 野村 渉, 小関泰輔, 武富昇平, 玉村啓和. CXCR4 多量化解析のための 3 価結合型リガンドの創製. 日本ケミカルバイオロジー学会第 9 回年会. 大阪, 2014 年 6 月 11-13 日..
 28. 本田柚子奈, 野村 渉, 武富昇平, 大橋南美, 橋本知恵, 玉村啓和. HIV-gp41 の膜融合阻害ペプチドの二量体化を基にした誘導体の創製研究. 第 58 回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2014 年 10 月 4 日.
 29. Nomura W, Koseki T, Mizuguchi T, Tamamura H. Design and Synthesis of Trivalent CXCR4 Ligands Utilizing Polyproline Linkers. 第 51 回ペプチド討論会. 徳島, 2014 年 10 月 22-24 日.
 30. Honda Y, Mizuguchi T, Nomura W, Tamamura H. Development of Dimeric Peptide Derivatives Based on gp41 Fragments as HIV-1 Fusion Inhibitors. 第 51 回ペプチド討論会. 徳島, 2014 年 10 月 22-24 日.
 31. 野村 渉, 大橋南美, 水口貴章, Mathieu Metifiot, 藤野真之, Yves Pommier, 村上 努, 玉村啓和. ステープルペプチドを活用した HIV-1 遺伝子産物由来のインテグラーゼ阻害剤の創出. 第 32 回メディシナルケミストリーシンポジウム. 神戸, 2014 年 11 月 26-28 日.
 32. 野村 渉, 水口貴章, 大橋南美, Mathieu Metifiot, 藤野真之, Yves Pommier, 駒野 淳, 村上 努, 玉村啓和. HIV-1 遺伝子産物由来のインテグラーゼ阻害活性を持ったステープルペプチド. 第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会. 大阪, 2014 年 12 月 3-5 日.
 33. 中村朋文, Joseph R. Campbell, 相川春夫, 玉村啓和, 満屋裕明. 細胞内の HIV-1 pol polyprotein (pol) のダイナミクスと二量体化の制御に関する薬剤の解析. 第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会. 大阪, 2014 年 12 月 3-5 日.
 34. Saito, A., Matsuoka, K., Ode, H., Otsuki, H., Yoshida, T., Iwatani, Y., Sugiura, W., Matano, T., Miura, T., and Akari, H.: A novel HIV-1mt encoding CCR5-tropic Env established persistent infection in Cynomolgus macaques. 2014 Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Boston, March 3-6, 2014.
 35. 米田舞、大附寛幸、松下修三、日紫喜隆行、五十嵐樹彦、三浦智行：新規 CCR5 指向性サルヒト免疫不全ウイルスのサルへの順化における env 遺伝子変異と中和抗体抵抗性の解析、日本動物遺伝育種学会第 15 回大会、和光、2014 年 10 月 31 日-11 月 1 日
 36. 三浦智行、米田舞、大附寛幸、松下修三、日紫喜隆行、五十嵐樹彦：新規 CCR5 指向性 SHIV のサルへの順化と中和抗体抵抗性の解析、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月 10-12 日
 37. 渡部祐司、岩見真吾、森ひろみ、松浦嘉奈子、石田裕樹、日紫喜隆行、三浦智行、五十嵐樹彦：高病原性 SHIV 感染サルにおける感染マクロファージは感染リンパ球と同程度の半減期を示す、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月 10-12 日
 38. 芳田剛、齋藤暁、松岡和弘、大出裕高、岩谷靖雅、杉浦互、保富康宏、俣野哲朗、三浦智行、明里宏文：サル個体におけるサル指向性 HIV-1 の増殖効率を上昇させる要因、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月 10-12 日
 39. 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、横浜、2014 年 11 月 10-12 日
 40. 中村碧、高原悠佑、松岡佐織、三浦智行、小柳義夫、成瀬妙子、木村彰方、俣野哲朗：抗 HIV 薬投与下の治療ワクチン接種により誘導される CD8 陽性 T 細胞の SIV 複製抑制能の解析、第 28 回日本エイズ学会学術集会、大阪、2014 年 12 月 3-5 日

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許

1) 出願予定

発明者：玉村啓和、廣田雄樹、苛原 優、野村渉、鳴海哲夫、松下修三、吉村和久、原田恵嘉
 発明の名称：抗 HIV 活性を有する低分子 CD4 mimic の開発

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

臨床研究のインフラ整備、臨床プロトコルの作成

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：

ヒト型化抗 V3 抗体である KD-247 の臨床試験で明らかになった課題に取り組み、中和抗体を用いた治療法を、真に革新的な治療法に近づけるための非臨床研究を行う。KD-247 の臨床試験で観察された長期効果は、抗体の中和能に加えて、Fc 部分を介した HIV 感染細胞に対する効果が考えられるため、KD-247 及び我々が作成した中和抗体パネルを用いて、慢性感染細胞を攻撃する antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) 活性と antibody-dependent cell-mediated virus inhibition (ADCVI) 活性を検討した。標的細胞としては、gp120 coated cell に加えて、HIV-1_{SF2}, HIV-1_{BaL}, HIV-1_{YU2} などの実験室株や 5 種類の初感染臨床株 (T/F virus) を感染させた CEM.NK_r-CCR5 cells を用いた。KD-247 を含む中和抗体パネルを用いると、これらのウイルス感染細胞の多くは ADCC 感受性であった。一方、HIV-1_{BaL} 感染細胞を用いた ADCVI 試験で、KD-247 は、0.2µg/ml の濃度でウイルスの増殖を 80% 以上抑制した。これらの観察は、今後の抗体を用いた治療法の開発を促進するものである。

A. 研究目的

本研究の最終目的は、中和抗体を用いた HIV 感染症の「機能的治癒」をめざした治療法の開発である。抗ウイルス療法 (cART) の進歩により、HIV-1 感染症の予後は著名に改善したが、長期治療の過程で様々な慢性合併症が起こる。その病態には、残存するウイルス増殖と慢性炎症の関与が考えられ、残存ウイルスの排除をめざす「治癒に向けた研究」は本領域で最も重要な研究である (Deeks S. et al., Nat. Rev. Immunol.12, p607, 2012)。我々は、化血研と共同で、HIV-1 の V3-tip に対するヒト型単クローン抗体 KD-247 の第 I 相 B 臨床試験 (NCT00917813) を行い、ヒトにおける安全性と有効性を確認した。すなわち、16mg/kg 投与の 6 例中 2 例で 1log 以上、4 例で 0.45log 以上のウイルス量の低下が認められた。注目すべきは KD-247 の投与が終了し、血中濃度低下後も

HIV-RNA のリバウンドが見られない症例が観察された点で、KD-247 は HIV の中和ばかりでなく、慢性感染細胞を排除し、セットポイントを下げた可能性が示唆された。本研究班では、臨床試験で示唆された KD-247 の感染細胞に対する機能を明らかにするとともに、臨床試験で明らかになった課題に取り組み、真に革新的な治療法に近づけるための非臨床研究を行う。その一つは、抗体の必要量を減らすことであり、もう一つは耐性ウイルス出現の抑制である。

B. 研究方法

HIV 感染症例より分離した PBMC から、DNA を分離し、nested-PCR にてエンベロープをクローニングし、臨床分離ウイルスの遺伝子配列を解析した。また、N-(4-Chlorophenyl)-N'-(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-yl)-oxalamide (NBD-556) の phenyl ring の p-position に

methyl group を持つ誘導体 YYA-021 (NBD-559)は、共同研究者の東京医科歯科大学、玉村教授により合成され供給された。YYA-021の機能的 Env 三量体に対する結合活性の測定は、HIV-1 感染細胞またはエンベロープ導入細胞を用いて FACS 解析により行った。ウイルス株としては、NIAID の AIDS research reference reagent program (ARRRP)が供給する subtype B ウイルスのエンベロープパネル (Standard virus panel of subtype B; SVPB)、感染初期のウイルス (transmitted/founder virus: T/F virus)パネルを用いて検討した。

Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) 活性は、2 種類の蛍光色素で標的細胞を染色する RFADCC 方を用いた。HIV-1 感染または gp120-coated cells (CEM.NKr.CCR5)を標的細胞とし NK-enriched fraction をエフェクター細胞として用いた。標的細胞を抗体と 1 時間室温で反応させ、エフェクター細胞を加え 6 時間インキュベートし FACSCalibur で ADCC 活性を算出した。HIV-1_{SF2}, HIV-1_{BaL}, HIV-1_{YU2}など研究室で用いられる株ばかりでなく、5 種類の T/F virusを用い spinoculation という方法で、CEM.NKr-CCR5 cells に感染させ標的細胞とした。抗体は、KD-247 に加えてサブタイプ B 感染例由来の中和抗体パネルを用いた。

Antibody-dependent cell-mediated virus inhibition (ADCVI) 活性は、CEM.NKr-CCR5 cellsを標的細胞として spinoculation で HIV-1_{BaL} を感染させ 48 時間培養、cell-free virus を除去後に 10 倍量のエフェクター細胞と中和抗体を加えて、さらに 7 日間培養し、ウイルス産生量を上清中の p24 抗原濃度で判定し、コントロール培養に比較して抑制率を算出した。

(倫理面への配慮) HIV 感染症例由来の血液検体を用いたウイルス分離及び塩基配列同定、中和抗体感受性試験などに関しては、臨

床研究に関する倫理指針に従い、学内倫理委員会の承認を得た説明と同意書を用いて同意を得たのちに採血した (臨床研究登録 UMIN000004720)。

C. 研究結果

KD-247 の臨床試験でみられた長期効果は、抗体の中和能に加えて、Fc-receptor を介した HIV 感染細胞に対する効果が考えられるため、KD-247 及び我々が作成した中和抗体パネルを用いて ADCC 活性と ADCVI 活性を検討した。KD-247 は gp120 coated 細胞を標的とした場合、0.2µg/ml の低濃度で 43%の細胞傷害性を示した (図 1a)。また、HIV-1_{BaL} や HIV-1_{YU2} などの実験室株ばかりでなく、THRO, CH040, CH058 などの臨床株の感染細胞に対しても ADCC 活性を認めた (図 1b)。

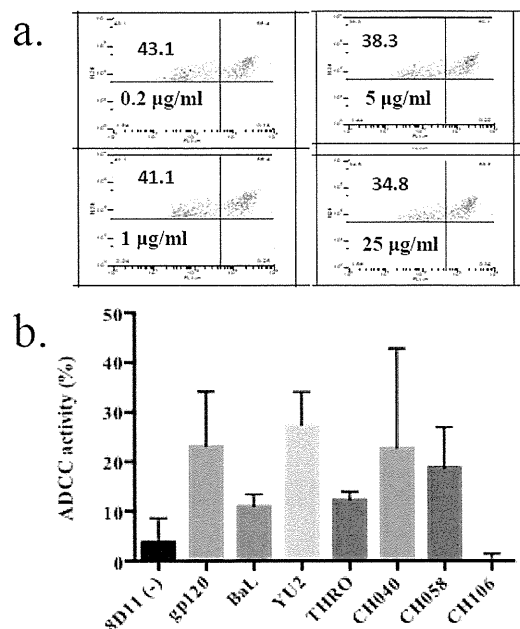


図1. KD-247 は強力なADCC activityを示す。
a. gp120_{SF2}coated target cellsを用いたADCC試験。b. 各ウイルス感染細胞を標的としたADCC試験。

これらの臨床分離 T/F 株に対する ADCC 活性に関して、我々が作成した 12 種類の抗体パネルについて詳細に検討した。5 種類の T/F ウ

イルス (THRO, CH040, CH058, REJO, CH106) を増殖させ、持続感染細胞を作成して標的細胞とし、ADCC 活性を検討した (図 2)。KD-247 はこのうち 3 種類 (THRO, CH040, CH058) に対して活性を示した。他の V3 抗体はいずれも 5 種類中 3 種類のウイルスに対して ADCC 活性を示した。一方、CD4bs 抗体、CD4i 抗体の中には 5 種類中 4 種類の T/F ウイルスに対して活性を持つものがあり、全体では 5 種類の T/F ウイルス感染細胞に対して、これらのうちのどれか一つ以上が必ず ADCC 活性を示した。

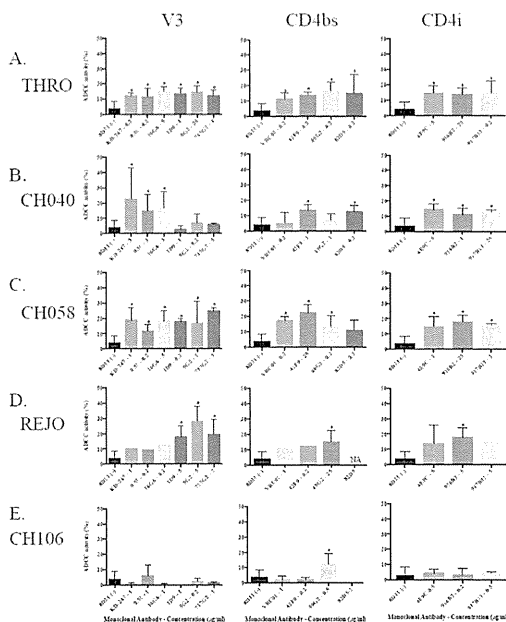


図2. T/Fウイルス感染細胞に対する抗体パネルのADCC活性
*p<0.05

一方、ADCVI 活性の評価は、HIV-1_{BaL} 感染細胞に関して行った。HIV-1_{BaL} を MOI 0.05 で CEM.NKr-CCR5 に感染させ、48 時間後に洗浄して free virus を除いて標的細胞を準備した。健常者の末梢血をエフェクター細胞として、KD-247 または コントロール抗体の存在下に E:T ratio 10:1 で共培養した。7 日後に培養上清中の p24 濃度を測定し抑制率を計算した。KD-247 は 0.2 μ g/ml の濃度でウイルスの増殖を 80% 以上抑制した (図 3)。

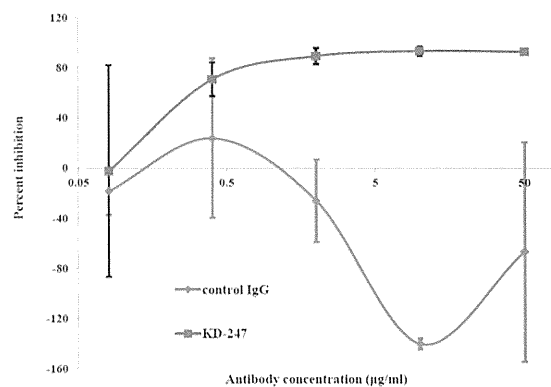


図3. KD-247のADCVI活性

D. 考察

本研究班の研究の目的は、KD-247 の臨床試験で明らかになった課題に取り組み、真に革新的な治療法に近づけるための非臨床研究を行うことである。臨床試験でみられた KD-247 の長期効果、すなわち、KD-247 の投与が終了し、血中濃度低下後も HIV-RNA のリバウンドが見られない症例が観察された点に関して、Fc-receptor を介した HIV 感染細胞に対する効果が考えられた。本年度の研究で、HIV-1 感染細胞を攻撃する抗体の機能として KD-247 を含む中和抗体パネルの ADCC と ADCVI の機能を証明した。これらの機能を in vivo で証明することは困難だが、KD-247 の臨床試験で示唆された、個体レベルでウイルスのセットポイントを下げることに関与すると考えられた。特筆すべきは、臨床分離株に対する ADCC 活性を調べると、我々が作成した 12 種類の抗体パネルのどれかが必ず ADCC 活性を示した点で、二つ以上の抗体の組み合わせを用いて広範囲のウイルスをカバーできる可能性が示唆された。

一方、臨床試験で明らかになった課題として、抗体の必要量を減らすことと、耐性ウイルス出現の抑制がある。CD4-mimic 小分子は、KD-247 の中和能を増強するが、臨床応用のためには、より最適化された小分子の開発が必要である。

E. 結論

KD-247 を含む抗体パネルを CD4-mimic と併用する戦略を臨床応用するためには、我が国における臨床分離株パネルを作成し、中和抗体パネルの中和活性や ADCC 活性を評価する必要がある。さらに、霊長類を用いた *in vivo* (POC)試験を最適化するために抗ウイルス薬や異なる特異性を持った抗体との組み合わせを検証する必要がある。

G. 研究発表

(論文発表)

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

(学会発表)

1. Boonchawalit, S., Harada, S., Matsushita, S., Yoshimura, K.: Impact of Maraviroc (MCV)-resistant mutations in C1 and C4

regions of gp120 on sensitivity to antibody-mediated neutralization. 20th International AIDS Conference. Melbourne, Australia. July 20-25, 2014.

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

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

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)
分担研究報告書

中和抗体を用いた HIV 感染症の「機能的治癒」をめざす新規治療法の開発
分担研究課題名 中和抗体の効果を高める CD4 mimic の開発

分担研究者 玉村 啓和 東京医科歯科大学生体材料工学研究所教授

研究要旨 HIV-1 の中和抗体 KD-247 は、慢性感染細胞を排除し、HIV のリザーバーを減少できる可能性がある。本研究では、この抗体 KD-247 の投与量を減らすために、KD-247 の効果を増強する CD4 mimic の創製を行っている。これまでに、CD4 mimic として YYA-021 がリード化合物として登場しているが、薬物動態等の問題からサルモデルで十分な効果が得られなかった。この結果、第二世代のリード化合物である MTA-103 を大量合成し、サルモデルでの薬物動態の解析、および KD-247 との併用の有用性を検討する。さらに、次世代のリード化合物の創製を行い、より有用な化合物の開発を進める。

A. 研究目的

HIV 感染症の治療においては、複製阻害だけでなく、HIV-1 感染細胞や HIV-1 の潜伏感染を標的にする新規治療薬の開発が求められている。我々がここ数年来進めている中和抗体の臨床応用に向けた研究の過程で、HIV-1 gp120 の CD4 結合部位に作用し、立体構造を変化させ、中和抗体の反応性を飛躍的に増強する低分子 CD4 ミミックを創製し、その効果に関する研究を行ってきた(図 1, 2)。最初に報告された CD4 ミミック NBD-556 は、Env と CD4 分子の相互作用を阻害する侵入阻害剤候補として開発された分子である (Zhao Q., et al., Virology,

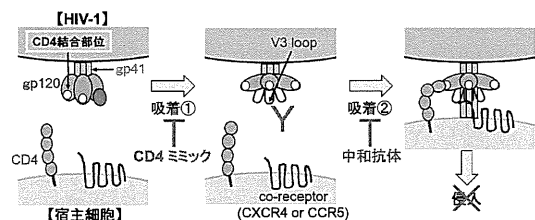


図 2 HIV-1 の 侵入機構

339:213-25, 2005, Schon A, Biochemistry, 45: 10973-80, 2006)。NBD-556 は細胞毒性が高いという欠点があったので、我々は細胞毒性が低い YYA-021(NBD-559) (図 1) 等を見出した。本研究班では、さらに有用な誘導体を創製し、中和抗体と併用する機能的治癒という新しい治療戦略が動物モデルでも有効性であるかどうかを検証することを目的とした。立体構造変化を起こすことで、中和抗体の効果を増強するという、これまでにはない発想に基づくという点で、我々の戦略は独創的であると思われる。背景には、多くの感染者が gp120 単量体に反応する抗体を持っており、ウイルス上の反応エピトープが露出さえすれば中和可能になることや (Decker J.M., et al., J. Exp. Med., 201: 1407-19, 2005)、中和抗体 KD-247 の臨床試験が進行していること (Eda Y., et al., J. Virol. 80: 5563-5570, 2006)がある。

これまでに我々が創製した CD4 ミミックとし

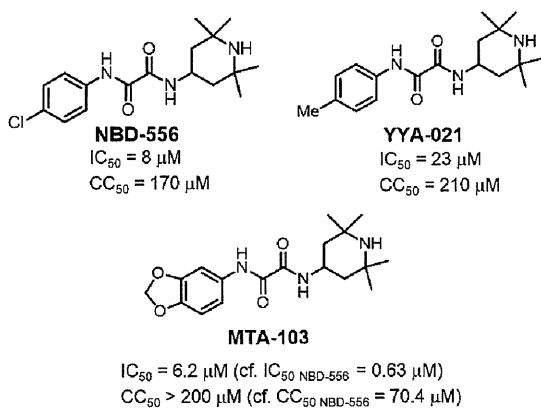


図 1 CD4 ミミック NBD-556、YYA-021、MTA-003

様式 A (8)

別紙 3

てYYA-021が登場しているが、in vivoの薬物動態等の問題からサルモデルで十分な効果が得られなかった。そこで、第二世代のリード化合物であるMTA-103(図 1)を大量合成し、サルモデルでの薬物動態の解析、およびKD-247との併用の有用性を検討することを目指した。

B. 研究方法

1) 第二世代リード化合物 MTA-103 の大量合成
第二世代の CD4 ミミックのリード化合物である MTA-103 は、YYA-021 よりも抗 HIV 活性は劣るものの、細胞毒性が試験範囲内では検出されないという低毒性化合物として注目されている。また、物性上 YYA-021 よりも親水性が高いと推定される。以前、YYA-021 がサルモデルで組織移行性等の原因により、効果が十分でなかったことより、YYA-021 よりも親水性が高い MTA-103 は in vivo への応用に期待できる。そこで、MTA-103 の大量合成を進めた。

2) MTA-103 の検量線の作成

サルモデルの血漿サンプル中に含まれる MTA-103 を HPLC 測定にて定量し、静脈内投与後の MTA-103 の血中濃度推移を調査する。まずは、前例の YYA-021 での実験に従い、既知濃度の MTA-103 溶液を HPLC に供し、MTA-103 とフェノール(内部標準)のピーク面積の比を基にした検量線を作成した。

3) 次世代のリード化合物の創製

今後のことを考え、MTA-103 よりもさらに有用な化合物の開発を進める。具体的には、これまでに得られた構造活性相関の情報を基に、芳香環部位とピペリジン環部位を最適化する。

(倫理面への配慮)

今年度の分担者の研究においては、該当事項はなかった。

C. 研究結果

1) 第二世代リード化合物 MTA-103 の大量合成

MTA-103 をサルモデルで評価するため、大量合成を行った。結果的に、図 3 のような合成スキームにより、2 g 以上の MTA-103 を準備することができた。

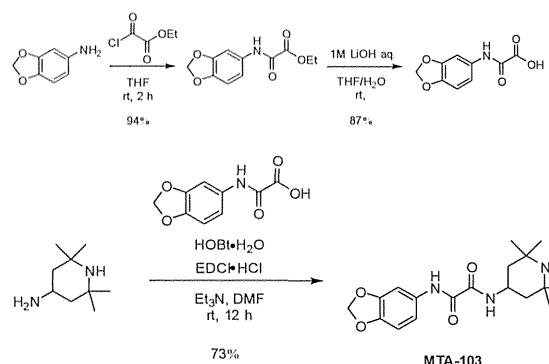


図 3 第二世代リード化合物 MTA-103 の大量合成スキーム

2) MTA-103 の検量線の作成

既知濃度(15.6, 31.3, 62.5, 125, 250, 500 μM)の MTA-103 溶液(塩酸塩として)を HPLC に供し、MTA-103 とフェノール(内部標準)のピーク面積の比を基にした検量線を作成した(図 4)。今後、本検量線を基に、サルモデルの血漿サンプル中の MTA-103 濃度を算出する予定である。

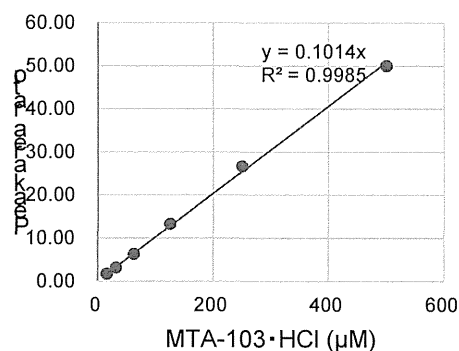


図 4 MTA-103 の検量線

3) 次世代のリード化合物の創製

YYA-021 等のリード化合物を基にして、芳香環部位とピペリジン環部位を変換し、より有用な化合物を探索した。その結果、図 5 のような新規化合物を得ることができた。

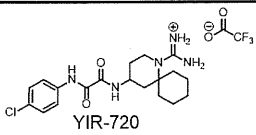
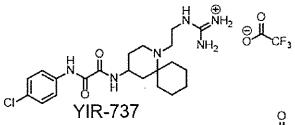
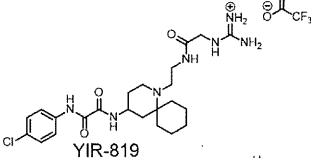
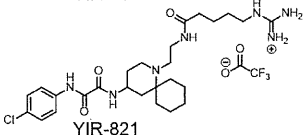
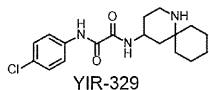
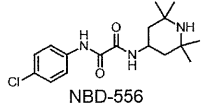
Compound	IC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)
 YIR-720	13	16
 YIR-737	6.8	64
 YIR-819	2.6	21
 YIR-821	2.8	>300
 YIR-329	14	213
 NBD-556	8.1	62

図 5 新規化合物の構造、抗 HIV 活性と細胞毒性

D. 考察

第二世代のリード化合物である MTA-103 を大量合成し、本化合物の定量のための検量線を作成した。さらに、次世代のリード化合物の創製を行い、より有用な化合物の開発を進めた。

E. 結論

MTA-103 の大量合成と検量線の作成により、サルモデルの薬物動態解析、および中和抗体 KD-247 との併用の有用性の検討実験の準備ができた。創製したさらに有用な CD4 ミミックを今後の応用実験に展開する。

F. 謝辞

熊本大学エイズ学研究センター、松下修三教授、国立感染症研究所エイズ研究センター、吉村和久室長、原田恵嘉博士、京都大学ウイルス研究所、三浦智行准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) Ohashi N, Nomura W, Minato N, Tamamura H. Screening for Protein Kinase C Ligands Using Fluorescence Resonance Energy Transfer. *Chem Pharm Bull* 62(10): 1019–1025, 2014.
- 2) Masyuk M, Abdulmulla A, Morosan-Puopolo G, Ödemis V, Rehim R, Khalida N, Yusuf F, Engele J, Tamamura H, Theiss C, Brand-Saber B. Retrograde Migration of Pectoral Girdle Muscle Precursors Depends on CXCR4/SDF-1 Signaling. *Histochem Cell Biol* 142(5): 473–488, 2014.
- 3) Yamamoto J, Maeda N, Komiya C, Tanaka T, Denda M, Ebisuno K, Nomura W, Tamamura H, Sato Y, Yamauchi A, Shigenaga A, Otaka A. Development of a Fluoride-responsive Amide Bond Cleavage Device that is Potentially Applicable to a Traceable Linker. *Tetrahedron* 70(34): 5122–5127, 2014.
- 4) Takano H, Narumi T, Ohashi N, Suzuki A, Furuta T, Nomura W, Tamamura H. Development of the 8-Aza-3-bromo-7-hydroxycoumarin-4-yl methyl Group as a New Entry of Photolabile Protecting Groups. *Tetrahedron* 70(29): 4400–4404, 2014.
- 5) Yamamoto J, Denda M, Maeda N, Kita M, Komiya C, Tanaka T, Nomura W, Tamamura H, Sato Y, Yamauchi A, Shigenaga A, Otaka A. Development of a Traceable Linker Containing a Thiol-responsive Amino Acid for the Enrichment and Selective Labelling of Target Proteins. *Org Biomol Chem* 12(23): 3821–3826, 2014.
- 6) 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(4): 497–503, 2014.
- 7) Narumi T, Takano H, Ohashi N, Suzuki A, Furuta T, Tamamura H. Isostere-Based Design of 8-Azacoumarin-type

- Photolabile Protecting Groups: A Hydrophilicity Increasing Strategy for Coumarin-4-ylmethyls. *Org Lett* 16(4): 1184–1187, 2014.
- 8) 野村 渉, 玉村啓和. ターゲットタンパク質を特異的に認識するプローブ. 化学工業特集「ペプチド化学の新潮流(I)」, 化学工業社, 川崎, 65(11): 8-14, 2014.
- 9) 玉村啓和. ペプチドミメティックスを活用した抗 HIV 剤の創製. *MEDCHEM NEWS*, 日本薬学会 医薬化学部会, 東京, 24(1): 14-19, 2014.
2. 学会発表等
- 1) Tamamura H. Development of peptide-lead anti-HIV agents. The 15th Akabori Conference 2014: Japanese-German Symposium on Peptide Science, Boppard, Germany, Sep 7-9, 2014.
- 2) Tamamura H. Chemical Biology Studies on the Elucidation of a Dimerization State of a GPCR CXCR4 and the Development of Recognition Probes for Cancerous Cells. Seminar in University of Cologne, Cologne, Germany, Sep 11, 2014.
- 3) Nomura W, Hashimoto C, Fujino M, Murakami T, Ohashi N, Tamamura H. Multimerized Peptides Derived from the C-Terminal Region of HIV-1 gp41 as Fusion Inhibitors. The 33rd European Peptide Society Symposium. Sofia, Bulgaria, Aug 31-Sep 5, 2014.
- 4) Nomura W, Métifiot M, Ohashi N, Fujino M, Mizuguchi T, Yamamoto N, Pommier Y, Komano JA, Murakami T, Tamamura H. Cell-permeable Stapled Peptides with Integrase Inhibitory Activity Derived from HIV Gene Products. The 15h Kumamoto AIDS Seminar. Kumamoto, Japan, Oct 1-3, 2014.
- 5) Yamada Y, Hashimoto C, Otsuki H, Hirota Y, Yoshimura K, Harada S, Ohashi N, Mizuguchi T, Nomura W, Miura T, Igarashi T, Matsushita S, Tamamura H. A CD4 Mimic as an HIV Entry Inhibitor: Pharmacokinetics. The 15h Kumamoto AIDS Seminar. Kumamoto, Japan, Oct 1-3, 2014.
- 6) Irahara Y, Kotani M, Harada S, Narumi T, Yamada Y, Hirota Y, Ohashi N, Mizuguchi T, Nomura W, Matsushita S, Yoshimura K, Tamamura H. A New Type of Small CD4 Mimic Molecules Targeting an HIV Envelope Protein gp120. The 15h Kumamoto AIDS Seminar. Kumamoto, Japan, Oct 1-3, 2014.
- 7) Kotani M, Hirota Y, Irahara Y, Harada S, Yamada Y, Ohashi N, Mizuguchi T, Nomura W, Matsushita S, Yoshimura K, Tamamura H. Structure-activity Relationship Studies of CD4 Mimic Molecules. The 15h Kumamoto AIDS Seminar. Kumamoto, Japan, Oct 1-3, 2014.
- 8) 玉村啓和. ペプチドを基盤とする中分子創薬研究—抗 HIV 剤の創製—. 東京薬科大学大学院公開講義(講演). 東京, 2014 年 6 月 6 日.
- 9) 玉村啓和. エイズ発症防止と疾患予防科学. 東京医科歯科大学大学院 生命理工学系専攻「疾患予防科学コース」ミニシンポジウム「疾患予防科学で何を学ぶのか」疾患予防のための理工学: その魅力と大学院キャリアセミナー「研究紹介セミナー」. 東京, 2014 年 7 月 19 日.
- 10) 玉村啓和. 25 年間ペプチドサイエンスを研究して. 第 46 回若手ペプチド夏の勉強会特別講演. 宮津, 2014 年 8 月 3 日.
- 11) 野村 渉, 小関泰輔, 武富昇平, 玉村啓和. CXCR4 多量化解析のための 3 価結合型リガンドの創製. 日本ケミカルバイオロジー学会 第 9 回年会. 大阪, 2014 年 6 月 11-13 日.
- 12) 本田柚子奈, 野村 渉, 武富昇平, 大橋南美, 橋本知恵, 玉村啓和. HIV-gp41 の膜融合阻害ペプチドの二量体化を基にした誘導体の創製研究. 第 58 回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2014 年 10 月 4 日.
- 13) Nomura W, Koseki T, Mizuguchi T, Tamamura H. Design and Synthesis of Trivalent CXCR4 Ligands Utilizing Polyproline Linkers. 第 51 回ペプチド討論会. 徳島, 2014 年 10 月 22-24 日.
- 14) Honda Y, Mizuguchi T, Nomura W, Tamamura H. Development of Dimeric Peptide Derivatives Based on gp41 Fragments as HIV-1 Fusion Inhibitors. 第 51

様式 A (8)

別紙 3

回ペプチド討論会. 徳島, 2014 年 10 月 22-24 日.

- 15) 野村 渉, 大橋南美, 水口貴章, Mathieu Metifiot, 藤野真之, Yves Pommier, 村上努, 玉村啓和. ステープルペプチドを活用した HIV-1 遺伝子産物由来のインテグラーゼ阻害剤の創出. 第 32 回メディシナルケミストリーシンポジウム. 神戸, 2014 年 11 月 26-28 日.
- 16) 野村 渉, 水口貴章, 大橋南美, Mathieu Metifiot, 藤野真之, Yves Pommier, 駒野淳, 村上 努, 玉村啓和. HIV-1 遺伝子産物由来のインテグラーゼ阻害活性を持ったステープルペプチド. 第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会. 大阪, 2014 年 12 月 3-5 日.
- 17) 中村朋文, Joseph R. Campbell, 相川春夫, 玉村啓和, 満屋裕明. 細胞内の HIV-1 pol polyprotein (pol) のダイナミクスと二量体化の制御に関する薬剤の解析. 第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会. 大阪, 2014 年 12 月 3-5 日.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許

1) 出願予定

発明者: 玉村啓和、廣田雄樹、苛原 優、野村渉、鳴海哲夫、松下修三
発明の名称: 抗 HIV 活性を有する低分子 CD4 mimic の開発

厚生労働科学研究費補助金 (エイズ対策研究事業)
分担研究報告書

NBD誘導体の動物モデルを用いたin vivo試験

研究分担者 五十嵐 樹彦 京都大学ウイルス研究所 教授

研究分担者 三浦 智行 京都大学ウイルス研究所 准教授

研究要旨

高病原性CXCR4指向性SHIV-KS661のenv遺伝子のV3領域の5アミノ酸を置換することによりCCR5指向性に変化させ(SHIV-MK1)、動物継代によってアカゲザルに順化させた(SHIV-MK38)。SHIV-MK1は、SHIV-KS661と同様に中和モノクローナル抗体KD-247に対しある程度中和感受性(Tier1B相当)であり、低分子CD4 mimic YYA-021による中和増強効果もみられた。しかし、SHIV-MK1をアカゲザルに順化したSHIV-MK38は、KD-247中和抵抗性となり、YYA-021による中和増強効果もみられなくなった。SHIV-MK38は、非ヒト霊長類モデルを用いたHIV-1の中和抗体抵抗性の解析に役立つものと期待される。

A. 研究目的

HIV 感染症は多剤併用療法の確立により不治の病から制御可能な慢性感染症に変容した。しかし、既存薬剤の長期投与により派生する種々の解決すべき問題が顕在化している事からも、服薬せずウイルスを生涯制御する、「機能的治癒」が治療における目標となっている。

研究代表者は、中和抗体の臨床応用に向けた研究の過程で HIV-1 gp120 の CD4 結合部位に作用して Env 三量体の立体構造を変化させ、中和抗体の反応性及び中和活性を飛躍的に増強する低分子化合物、NBD-556 を同定した。感染者が誘導する中和抗体の多くは感染ウイルスのエピトープが保存されているにもかかわらず、中和活性が見られない。これは、Env がウイルス粒子上で三量体を形成し、その立体構造によりエピトープを遮蔽しているためと考えられている。この立体遮蔽を解除し中和抗体が中和

エピトープに到達可能となれば、感染者体内で誘導された抗体によるウイルス中和が期待される。

中和抗体はウイルス膜上の機能的 Env に結合するばかりでなく、Env を発現する感染細胞の表面に結合し、ADCC などの機構でこれを攻撃する。これらの効果が in vivo で実証できれば、体内の感染細胞を減少させることが可能となり、現在の抗ウイルス療法との併用により機能的治癒への道が開かれる。本分担研究では、このような新しい治療戦略の in vivo における有効性をエイズ霊長類モデルで検証することを目的とする。

B. 研究方法

SIV/SHIV とアカゲザルを用いた感染モデル系のウイルス感染動態と免疫細胞応答について、統合的な解析を行うことにより感染病態形