

平成 30 年 6 月 23 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08125

研究課題名(和文) グローバル臨床分離株ライブラリー構築を主軸としたHIV Env多様性対策研究

研究課題名(英文) Countermeasure study on HIV Env diversity using library clinical isolates

研究代表者

原田 恵嘉 (Harada, Shigeyoshi)

国立感染症研究所・エイズ研究センター・主任研究官

研究者番号：30508643

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、「グローバル臨床分離ウイルスライブラリー」、「侵入阻害剤ライブラリー」および「in vitro耐性誘導システム」を用いて、HIV-1 Env多様性への対策を試みることを主目的として行った。結果、新たなEnv共通性領域として、Env gp120-Env gp41境界領域を明らかにすることができた。加えて、これら新規阻害剤の選択圧により、Envの画一化が進むことも認められた。さらに、Envを追い込むための、阻害剤の至適ペア解析に加えて、抗HIV中和抗体も含めた網羅的な至適ペアの解析も進めることもできた。

研究成果の概要(英文)：The aim of study was to develop novel countermeasures against HIV-1 Env diversity using library for HIV-1 clinical isolates, chemical library for HIV-1 entry inhibitors, and in vitro selection system. We determined that the region of the HIV-1 gp120-gp41 quaternary interface that is a novel target for HIV-1 Env inhibitors. In addition, the Env diversity was decreased within clinical isolates when passaged in the presence of novel inhibitors during in vitro selection. Furthermore, we determined that combination strategies containing entry inhibitors and NAbs are likely to be efficient weapons against HIV-1. These findings can provide useful data to support the design and the development of new HIV-1 entry inhibitors against HIV-1 Env diversity.

研究分野：HIV感染症

キーワード：HIV AIDS

1. 研究開始当初の背景

コントロール可能な慢性感染症へと変化した HIV 感染症において、治療の長期化に伴う副作用、薬剤耐性、および治療費の問題は避けて通ることのできない最重要課題であり、その解決策として新規阻害剤および新規治療法の開発は続けなければならない。その中で、ウイルス膜表面蛋白 (Env) を標的 (間接的にも含む) とする侵入阻害剤は (1) 新規作用機序および (2) 曝露前予防薬 (PrEP) の点からも期待が大きい。同じく Env 領域を標的とする抗 HIV 抗体に関しても RV144 ワクチン臨床試験で一定の感染頻度低下が示されたことにより、重要性が増している。しかしながら、世界的に進められている侵入阻害剤開発および抗体誘導研究の大きな障壁として「Env 多様性」への対策が挙げられる。なぜならば Env に限れば、HIV は変異しやすい (耐性を獲得しやすい) ウイルスではなく、既に変異した (耐性化した) ウイルス集団にほかならないからである。

2. 研究の目的

Env 多様性対策研究にはクワシスピースを有する臨床分離株群の重要性が高い。そこで、本邦感染者臨床分離株の主流を占めるサブタイプ B に加え、世界的に主流を占める各サブタイプ臨床分離株を追加した「グローバル臨床分離ウイルスライブラリー」を構築し、独自に保有する侵入阻害剤ライブラリーおよび *in vitro* 耐性誘導システムを用いて、「共通性を見いだす」・「画一化させる」・「侵入阻害剤の組み合わせ」の三本の矢により「Env 多様性」への対策を試みる。

3. 研究の方法

本邦感染者臨床分離株の主流を占めるサブタイプ B に、現在実際に患者間で伝搬している世界的に主流となる各サブタイプ臨床分離株を追加した「グローバル臨床分離ウイルスライブラリー」の構築を進めた。次に、得られた「グローバル臨床分離ウイルスライブラリー」、「侵入阻害剤ライブラリー」、および「*in vitro* 耐性誘導システム」を用いて、「Env 多様性」への対策研究を進めた。具体的には、感染者検体からウイルスを分離し、Env シークエンス、サブタイプ解析、トロピズム解析、糖鎖解析、Env 領域 diversity 解析に加えて、申請者が保有するエントリー阻害剤ライブラリーおよび中和抗体パネルに対する各感受性試験を行った。主目的の「Env 多様性」への対策としては、(1)「共通性を見いだす」戦略として、各ライブラリーウイルスに対してブロード阻害効果を示す侵入阻害剤の同定、および侵入阻害剤の結合部位から推察される共通性領域の同定を行った。また (2)「画一化させる」戦略として、既存抗 HIV 阻害剤または侵入阻害剤ライブラリーを用いた *in vitro* 耐性誘導による Env 領域の diversity 低下誘導を行い、Env 画一化に

対する阻害剤の有効性を検証した、最後に、(3)「侵入阻害剤の組み合わせ」戦略として、侵入阻害剤を組み合わせる薬剤感受性試験を行い、相乗効果に関する侵入阻害剤の組み合わせを検討した。

4. 研究成果

最初に、主軸となる「グローバル臨床分離ウイルスライブラリー」の構築を行うため、本研究課題期間に、実際に患者間で伝搬している各種臨床株の分離を展開した。結果、本邦感染者臨床分離株の主流を占めるサブタイプ B に加え、サブタイプ A、サブタイプ C、サブタイプ G、CRF01_AE、CRF02_AG、および CRF08_BC から成る臨床分離ウイルスライブラリーの構築が進み、各ウイルスストックにおける Env 領域遺伝子配列、トロピズム、糖鎖数、および Env 領域 diversity を同定することができた。

同時に、これら「グローバル臨床分離ウイルスライブラリー」に対する「共通性」、「画一化」、「阻害剤組み合わせ」から成る多様性対策研究の基軸となる「抗 HIV 阻害剤」に関しては、侵入阻害剤を中心に約 500 種類の化合物ライブラリーの構築を進めることが出来た (Chem Med Chem 2016, Bioorg Med Chem Lett 2016)。

そこで、「グローバル臨床分離ウイルスライブラリー」に対して、各ライブラリー化合物の薬剤感受性試験およびブロード能解析を進めたところ、Env 二次構造だけでなく、Env 三次構造においても「共通性」である新たな領域として、Env gp120-Env gp41 境界領域が明らかになった。加えて、多様性 Env の中で「共通性」が極めて高い (A) 主要レセプター-CD4 結合領域、(2) コレセプター結合領域、および (3) Env gp120-gp41 境界領域、を各々標的とする「新規 Env 標的阻害剤」を評価することができた。その中から、Env 高次構造を変化させる作用を有し、Env の「画一化」に繋がる有用候補化合物を見出すこともできた (Chem Med Chem 2016, Bioorg Med Chem Lett 2016)。続いて、「画一化」を目的として、各グローバル臨床分離株を用いて「新規 Env gp120-Env gp41 標的阻害剤」誘導體群に対して *in vitro* 耐性誘導を試みたところ、主要耐性変異は、各誘導體および各分離株に共通して gp41 ectodomain に生じ、同時に Env の画一化も進むことが示された。最後に、今回新たに見出した、「新規 Env 標的阻害剤」を加えることで、多様性対策を念頭にした「阻害剤組み合わせ」の至適ペアの同定をさらに進めることができた (J Virol Methods 2016, Jpn J Infect Dis 2016)。特に、阻害剤同士の組み合わせだけに留まらず、抗 HIV 中和抗体も含めた網羅的な至適ペアの解析を進めることもできた。

以上、構築した「グローバル臨床分離ウイルスライブラリー」および「新規侵入阻害剤ライブラリー」を用いた、三つの「Env 多様

性」対策研究(共通性・画一化・阻害剤組み合わせ)で有用データが得られ、各観点における Env 多様性対策有用候補化合物を同定することができた。これらは新規治療法開発の一助となると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8 件)

HARADA S, YOSHIMURA K. Driving HIV-1 into a vulnerable corner by taking advantage of viral adaptation and evolution. *Front. Microbiol.* 2017, 8, 390, doi: 10.3389/fmicb.2017.00390.

原田恵嘉, 吉村和久. HIV エンベロープの治療標的構造研究:新規治療法における侵入阻害剤と中和抗体の関係. *日本エイズ学会誌.* 2017, 19, 1-8.

ISEDA S, TAKAHASHI N, POPLIMONT H, NOMURA T, SEKI S, NAKANE T, NAKAMURA M, SHI S, ISHII H, FURUKAWA S, HARADA S, NARUSE TK, KIMURA A, MATANO T, YAMAMOTO H. Biphasic CD8+ T-cell defense in simian immunodeficiency virus control by acute-phase passive neutralizing antibody immunization. *J. Virol.* 2016, 90, 6276-90, doi:10.1128/JVI.00557-16.

MITSUMI YY, YAMAMOTO T, MIZUKOSHI F, MOMOTA M, TERAHARA K, YOSHIMURA K, HARADA S**, TSUNETSUGU-YOKOTA Y** A novel dual luciferase assay for the simultaneous monitoring of HIV infection and cell viability. *J. Virol. Methods.* 2016, 231, 25-33, doi: 10.1016/j.jviromet.2016.02.006, (**Equal contribution).

OHASHI N*, HARADA S*, MIZUGUCHI T., IRAHARA Y, YAMADA Y, KOTANI M, NOMURA W, MATSUSHITA S, YOSHIMURA K, TAMAMURA H. Small-molecule CD4 mimics containing mono-cyclohexyl moieties as HIV entry inhibitors. *Chem Med Chem.* 2016, 11, 940-6, doi: 10.1002/cmdc.201500590, (*Equal contribution).

MIZUGUCHI T*, HARADA S*, MIURA T, OHASHI N, NARUMI T, MORI H, IRAHARA Y, YAMADA Y, NOMURA W, MATSUSHITA S, YOSHIMURA K, TAMAMURA H. A minimally cytotoxic CD4 mimic as an HIV entry inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2016, 26, 397-400, doi: 10.1016/j.bmcl.2015.11.103, (*Equal contribution).

BOONCHAWALIT S, HARADA S, SHIRAI N, GATANAGA H, OKA S, MATSUSHITA S, YOSHIMURA K. Impact of maraviroc-resistant mutation M434I in the C4 region of HIV-1 gp120 on sensitivity to antibody-mediated neutralization. *Jpn.*

J. Infect. Dis. 2016, 69, 236-43, doi: 10.7883/yoken.JJID.2015.310.

Hashimoto M, Nasser H, Bhuyan F, Kuse N, Satou Y, Harada S, Yoshimura K, Sakuragi J, Monde K, Maeda Y, Welbourn S, Strebek K, Abd El-Wahab EW, Miyazaki M, Hattori S, Chutiwitoonchai N, Hiyoshi M, Oka S, Takiguchi M, Suzu S. Fibrocytes differ from macrophages but can be infected with HIV-1. *J. Immunol.* 2015, 195, 4341-50, doi: 10.4049/jimmunol.1500955.

[学会発表](計 24 件)

Synergistic anti-HIV effect of combination of a novel entry inhibitor and NAbs, HARADA S, MATANO T, YOSHIMURA K, 20th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim and Meetings of the AIDS (Joint with Immunology Board), Shenzhen, China, 2018/1/10.

網羅的 Env 標的阻害剤ライブラリーの構築-2, 原田恵嘉, 野村渉, 鳴海哲夫, 横山勝, 前田賢次, 林宏典, 紺野奇重, 引地優太, 佐藤裕徳, 玉村啓和, 俣野哲朗, 吉村和久, 第 31 回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京, 2017/11/24.

Identification of novel HIV-1 Env inhibitors by structure-based in silico screening, HARADA S, YOKOYAMA M, OGIHARA K, HIKICHI Y, SATO H, NARUMI T, MATANO T, YOSHIMURA K, 18th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, 2017/11/1.

Discovery of novel bifunctional HIV-1 entry inhibitors using structure-based in silico screening, HARADA S, YOKOYAMA M, OGIHARA K, HIKICHI Y, SATO H, NARUMI T, MATANO T, YOSHIMURA K, The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Osaka, 2017/10/25.

Bi-functional entry inhibitors sensitize macaque-tropic human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1mt) to antibodies generated in HIV-1mt-infected macaques, HARADA S, HIKICHI Y, SEKI Y, SAITO A, YOSHIDA T, ODE H, IWATANI Y, YASUTOMI Y, MIURA T, MATANO T, AKARI H, YOSHIMURA K, 35th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS (NHP2017), Madison, USA, 2017/8/23.

Synthesis and properties of novel soluble bifunctional CD4-mimetic small molecules containing pyridine moiety, HARADA S, KONNO K, HIKICHI Y, MATSUOKA S, MATANO T, TAMAMURA H, YOSHIMURA K, 9th IAS Conference on HIV Science (IAS 2017), Paris, France, 2017/7/26.

Identification of novel HIV-1 gp120 CD4

binding site inhibitors using structure-based in silico screening, HARADA S, YOKOYAMA M, OGIHARA K, HIKICHI Y, SATO H, NARUMI T, MATANO T, YOSHIMURA K, 42nd Annual Meeting of Cold Spring Harbor Laboratory on Retroviruses, New York, USA, 2017/5/23.

Bifunctional 抗 HIV 侵入阻害剤ライブラリーの構築およびその最新知見, 原田恵嘉, 引地優太, 俣野哲朗, 吉村和久, 第 19 回 白馬シンポジウム, 仙台市, 2017/7/15.

Structure-based virtual screening による新規 bifunctional 抗 HIV 侵入阻害剤の探索, 原田恵嘉, 荻原香澄, 横山勝, 引地優太, 佐藤裕徳, 俣野哲朗, 鳴海哲夫, 吉村和久, 第 27 回 抗ウイルス療法学会総会, 熊本市, 2017/5/18.

Oleanolic acid derivative OKS3-019 as a novel bifunctional HIV-1 entry inhibitor, HARADA S, OGIHARA K, HIKICHI Y, MATANO T, NARUMI T, YOSHIMURA K, 24th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI 2016), Seattle, USA, 2017/2/14.

網羅的 Env 標的阻害剤ライブラリーの構築-1, 原田恵嘉, 野村渉, 鳴海哲夫, 横山勝, 前田賢次, 林宏典, 荻原香澄, 石田有佑, 引地優太, 佐藤裕徳, 玉村啓和, 俣野哲朗, 吉村和久, 第 30 回日本エイズ学会学術集会・総会, 鹿児島市, 2016/11/26.

Detection of potency and breadth of anti-HIV-1 neutralizing antibodies in two macaque-tropic HIV-1 infected cynomolgus monkeys that were different response by CD8 depletion, HARADA S, SAITO A, SEKI Y, YASUTOMI Y, MIURA T, MATANO T, AKARI H, YOSHIMURA K, 2nd Kumamoto IRCMS International Symposium and 17th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, 2016/10/31.

Development of novel bifunctional entry inhibitors that target non-CD4-binding site of HIV-1, HARADA S, OGIHARA K, HIKICHI Y, MATANO T, NARUMI T, YOSHIMURA K, The 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Sapporo, 2016/10/25.

Design, Synthesis, and Antiviral Activity of Novel Bifunctional CD4-Mimetic Small Molecules Containing Mono-Cyclohexyl Moieties, YIR-819 and YIR-821, HARADA S, IRAHARA Y, HIKICHI Y, OHASHI N, NOMURA W, MATSUSHITA S, MATANO T, TAMAMURA H, YOSHIMURA K, HIVR4P 2016, Chicago, USA, 2016/10/19.

Comparison of plasma neutralizing antibodies in two macaque-tropic HIV-1 infected macaques that were different

response by CD8 depletion, HARADA S, SEKI Y, YASUTOMI Y, MIURA T, MATANO T, AKARI H, YOSHIMURA K, 34th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS (NHP2016), New Orleans, USA, 2016/10/12.

作用部位の異なる Env 標的阻害剤ライブラリーの構築およびその最新知見, 原田恵嘉, 引地優太, 俣野哲朗, 吉村和久, 第 18 回 白馬シンポジウム, 山梨県北杜市, 2016/10/7.

CD4 mimic と結合領域が異なる新規 bifunctional 抗 HIV 侵入阻害剤の開発, 原田恵嘉, 荻原香澄, 俣野哲朗, 鳴海哲夫, 吉村和久, 第 26 回 抗ウイルス療法学会総会, 名古屋市, 2016/5/14, 国内. CD4 類似低分子化合物誘導体 (CD4MCs) の耐性機序解析, 原田恵嘉, 横山勝, 佐藤裕徳, 松下修三, 俣野哲朗, 玉村啓和, 吉村和久, 第 29 回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京, 2015/11/30.

Design, synthesis and virological evaluation of novel CD4-mimetic small molecules, HARADA S, IRAHARA Y, TAMAMURA H, MATSUSHITA S, MATANO T, YOSHIMURA K, The 63rd Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Fukuoka, 2015/11/22.

Detection of potency and breadth of HIV-1 neutralizing antibodies in macaque-tropic HIV-1 infected cynomolgus monkeys using novel test panel viruses, HARADA S, SAITO A, YOSHIDA T, SEKI Y, WATANABE Y, IWATANI Y, YASUTOMI Y, MIURA T, MATANO T, AKARI H, YOSHIMURA K, 33rd Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS (NHP 2015), Monterey, CA, USA, 2015/10/14.

⑳ Genetic and molecular dynamics studies of the NBD-556, YYA-021 and JRC-II-191 binding to the wild type and mutant HIV-1 gp120, HARADA S, YOKOYAMA M, MATSUSHITA S, SATO H, YOSHIMURA K, 16th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, 2015/10/9.

㉑ Novel CD4-mimetic small molecules show enhancement of the neutralization activity of anti-cryptic V3 neutralizing antibody, KD-247, HARADA S, IRAHARA Y, TAMAMURA H, MATANO T, MATSUSHITA S, YOSHIMURA K, 8th IAS Conference on HIV Pathogenesis Treatment and Prevention (IAS 2015), Vancouver, Canada, 2015/7/22.

㉒ Asp368 および Val430 と相互作用を有する新規 CD4 類似低分子化合物の開発, 原田恵嘉, 苛原優, 玉村啓和, 俣野哲朗, 吉村和久, 第 17 回 白馬シンポジウム, 米子市, 2015/6/20.

㉓ 新規 mono-cyclohexyl 型 CD4 類似低分子化

合物の抗HIV活性および抗HIV中和抗体活性増強能の検討, 原田恵嘉, 苛原優, 玉村啓和, 吉村和久, 第25回抗ウイルス療法学会総会, 東京, 2016/5/14, 国内. 第25回抗ウイルス療法学会総会, 東京, 2015/5/24.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 恵嘉 (SHIGEYOSHI HARADA)

国立感染症研究所 エイズ研究センター

主任研究官

研究者番号: 30508643