

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2022

課題番号：17K08862

研究課題名（和文）エイズ根治療法を目指したHIV-1慢性感染細胞を選択的に殺傷する薬剤の開発

研究課題名（英文）The development of compounds that specifically kill chronically infected cells for the curative treatment of HIV-1 infection.

研究代表者

岡本 実佳（Okamoto, Mika）

鹿児島大学・先端科学研究推進センター・特任教授

研究者番号：90336347

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本申請者はこれまでに、*in vitro*スクリーニング方法を発案し、HIV-1慢性感染CD4陽性T細胞を選択的に殺傷する薬剤（薬剤A）を同定した。本研究では、薬剤Aは*in vitro*で感染させたHIV-1慢性感染CD4陽性T細胞、HIV-1感染者由来のCD4陽性T細胞のいずれにおいても、HIV-1抗原発現細胞に特異的にアポトーシスを誘導することが明らかにした。さらに、薬剤Aとプロテアーゼ阻害薬であるDarunavirを*in vitro*で併用投与した結果、薬剤AのHIV-1慢性感染細胞特異的殺傷効果に影響することなく、HIV-1産生を抑制出来ることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果から、*in vitro*において感染させたHIV-1慢性感染CD4陽性T細胞、HIV-1感染者由来のCD4陽性T細胞のいずれにおいても、薬剤AはHIV-1抗原発現細胞特異的にアポトーシスを誘導し、さらにプロテアーゼ阻害薬であるDarunavirとの併用により、薬剤Aの効果に影響することなく、HIV-1産生は抑制されることが明らかになった。これらの結果から、臨床においても、薬剤AとDarunavirの併用投与により、非感染細胞への二次感染を抑制しながら、HIV-1慢性感染CD4陽性T細胞を減らすことで、HIV-1根治療法を確立出来る可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：I have previously developed an *in vitro* screening method and identified a drug (Drug A) that selectively kills HIV-1 chronically infected CD4-positive T cells. In this study, we found that Drug A induced apoptosis specifically in HIV-1 antigen-expressing cells, both in HIV-1 chronically infected CD4-positive T cells infected *in vitro* and in CD4-positive T cells derived from HIV-1 infected individuals. Furthermore, the coadministration of drug A with Darunavir, a protease inhibitor *in vitro*, was shown to inhibit HIV-1 production without affecting the specific killing effect of Drug A on chronically HIV-1-infected cells.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HIV-1 CD4陽性T細胞 慢性感染細胞 根治療法

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在の抗 HIV-1 薬は、主に HIV-1 蛋白をターゲットにして、HIV-1 の増殖を強力に抑制するが、HIV-1 潜伏感染細胞を感染者体内より排除出来ないため、感染者の体内から HIV-1 を完全に排除出来ない。そのため、抗 HIV-1 薬の使用を中断すると、各種刺激によって活性化された潜伏感染細胞から HIV-1 が産生され、ウイルスリバウンドが引き起こされる。従って、感染者は抗 HIV-1 薬の服用を生涯継続しなければならず、長期服用による様々な副作用や服薬率の低下による多剤耐性 HIV-1 発生などが大きな問題となっている。

そこで、本申請者は、活性化された HIV-1 潜伏感染細胞、すなわち慢性感染状態にある HIV-1 感染細胞を特異的に殺傷する低分子化合物を探索するため、HIV-1 感染あるいは偽感染（非感染）させた健常人由来の末梢血単核球または CD4 陽性 T 細胞を用いた、in vitro スクリーニング方法を発案し、HIV-1 慢性感染細胞に対して選択的に殺傷する能力も有する薬剤の同定を試みた（図1）。その結果、ある種の薬剤が単独で、慢性感染状態にある HIV-1 感染細胞に対して特異的な殺傷効果を示すことを明らかにした（図2）。これらの研究成果を基に、特許出願を行った（国内出願：特願 2015-119111、国際出願：PCT/JP2016/051768）。

図1. in vitro スクリーニング試験

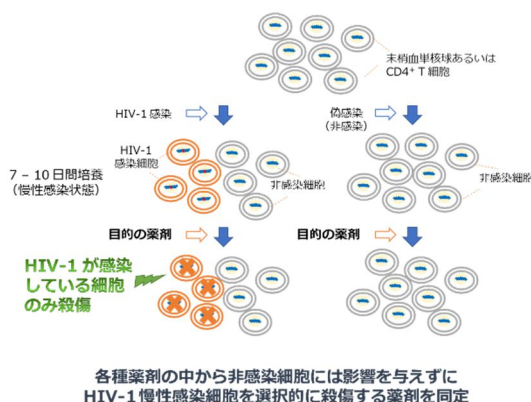
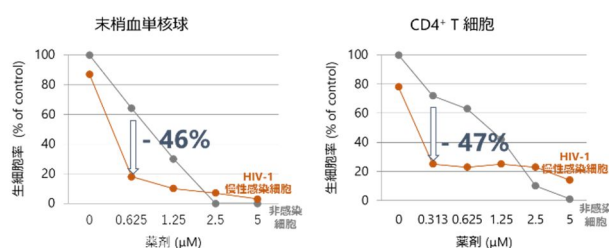


図2. 実験結果



In vitro スクリーニング試験の結果、低濃度において HIV-1 慢性感染細胞を選択的に殺傷する薬剤を見出した。

2. 研究の目的

本研究においては、

- (1) 同定された薬剤の分子メカニズムの解明および HIV-1 潜伏感染メカニズムとの関連の解析、
- (2) (1)で明らかにされた薬剤のターゲット分子に対する阻害剤の探索および探索された阻害剤の HIV-1 慢性感染細胞に対する特異的殺傷効果の解析
- (3) HIV-1 感染者由来の臨床検体を用いた(2)で探索された薬剤の ex vivo における効果の解析を行うことにより、HIV-1 潜伏感染メカニズムの一端を明らかにするとともに、さらに低分子化合物により感染者体内の HIV-1 慢性感染細胞を直接除去する治療法の確立を目指す。

3. 研究の方法

- (1) 薬剤の HIV-1 慢性感染細胞特異的殺傷効果のメカニズムの解明

前述した in vitro スクリーニング試験により同定された薬剤の HIV-1 慢性感染細胞特異的殺傷効果の作用メカニズムを、DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子解析により解明し、さらに HIV-1 潜伏感染メカニズムの一端を明らかにする。

- (2) HIV-1 慢性感染細胞選択的殺傷効果を有する薬剤の ex vivo における効果の解析

HIV-1 感染者より得られた CD4 陽性 T 細胞を用いて、2.で同定された薬剤の ex vivo における HIV-1 慢性感染細胞に対する選択的殺傷効果をフローサイトメトリー法により解析する。具体的には、まず HIV-1 感染者から採血された末梢血より末梢血単核球を分離して CD4 陽性 T 細胞を調製し、2.で同定された薬剤を各濃度で各時間処理する。その後、HIV-1 エンベロープ蛋白質である gp120 に対する抗体、アポトーシスの指標となる cleaved caspase-3 に対する抗体および死細胞に染まる propidium iodide (PI) を用いて染色し、フローサイトメトリーで解析することにより、各薬剤の HIV-1 感染細胞に対する選択的殺傷効果を判定する。

4. 研究成果

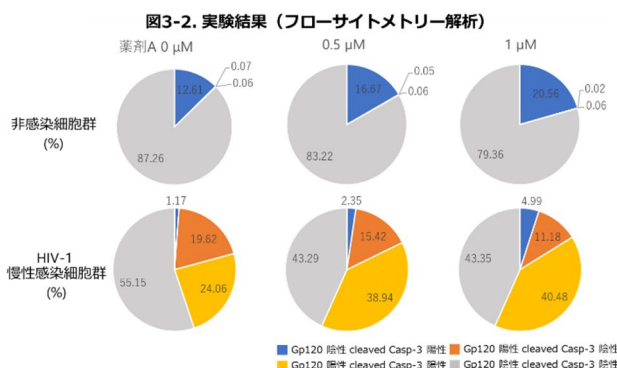
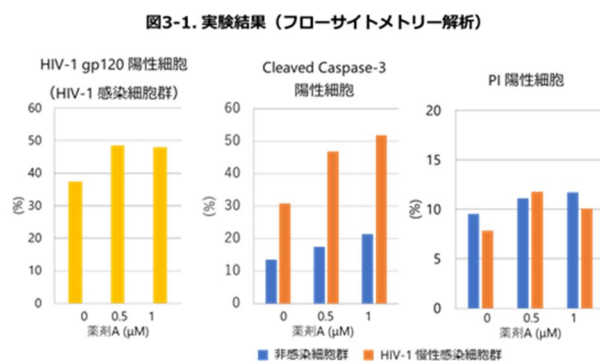
- (1) 網羅的遺伝子解析による薬剤の HIV-1 慢性感染細胞特異的殺傷効果のメカニズムの解明

DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子解析により、本研究で見出した HIV-1 慢性感染細胞特異的殺傷効果を有する薬剤（薬剤 A）の作用メカニズムの解明を試みた。その結果は以下の通りであった。 HIV-1 感染で発現亢進し、薬剤 A 処理で発現低下する遺伝子：Pathway を見ても、明らかな遺伝子の偏りは認められなかった。また、GO 解析においても、有意な変動を示す遺伝子群の偏りは検出されなかった。 HIV-1 感染で発現低下し、薬剤 A 処理で発現が亢進する遺伝子：炎症反応関連では、CXCL10, CCL18, CCR3 などが発現亢進し

ていた。また、細胞死関連では、CRD10, FOXO6 などが発現亢進していた。さらに、プロスタグランジン-D 合成酵素をコードする HPGDS 遺伝子、ヘパラン硫酸分解酵素をコードする HPSE 遺伝子の発現亢進が認められた。Pathway においては、主に Cytokine-Cytokine receptor interaction に遺伝子の偏りが認められた。また、GO 解析においては、細胞運動、免疫システムなどに遺伝子の偏りが認められた。HIV-1 感染で発現亢進し、薬剤 A 処理で発現亢進する遺伝子：クロライドチャンネル蛋白である CLIC6 の他、NXPH4、CFHR3、HOXC4 などが認められた。HIV-1 感染で発現低下し、薬剤 A 処理で発現低下する遺伝子：SSTR2、LIN7A、GFRA2、CTTN、KRT1、SHSA2、CD1A、GCGR などが認められた。

(2) フローサイトメトリー解析による薬剤の HIV-1 慢性感染細胞特異的殺傷効果のメカニズムの解明

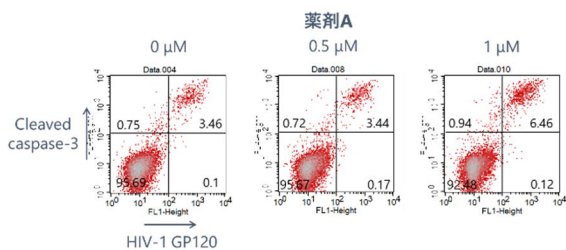
DNA マイクロアレイの結果において、薬剤処理細胞において顕著な発現を示す遺伝子数が多く、薬剤 A のターゲット分子の絞り込みが困難であった。そこで、フローサイトメトリー解析による薬剤 A の作用メカニズムの解明を行った。健康人 CD4 陽性 T 細胞に、*in vitro* において、HIV-1 を感染あるいは偽感染させ、7 日間培養後、薬剤 A で処理し 72 時間後、フローサイトメトリー解析を行った。その結果、薬剤 A の濃度依存性に cleaved caspase-3 陽性細胞が増加した。一方、死細胞を表す propidium iodide 陽性細胞は、薬剤 A の濃度に関わらず、約 10% であった。これらの結果から、薬剤 A は apoptosis を介して HIV-1 慢性感染 CD4 陽性 T 細胞に細胞死を誘導することが示された (図 3-1)。さらに、薬剤 A で処理された HIV-1 慢性感染細胞群において、薬剤 A の濃度依存性に、HIV-1 のエンベロープ蛋白質である gp120、cleaved caspase3 共に陽性の細胞の割合が増加することから、薬剤 A は HIV-1 慢性感染 CD4 陽性 T 細胞の中でも、HIV-1 抗原 (gp120) を発現している細胞に特異的に apoptosis を誘導することが明らかになった (図 3-2)。



(3) HIV-1 感染者から得られた CD4 陽性 T 細胞における、薬剤の HIV-1 感染細胞特異的細胞死誘導効果の検証

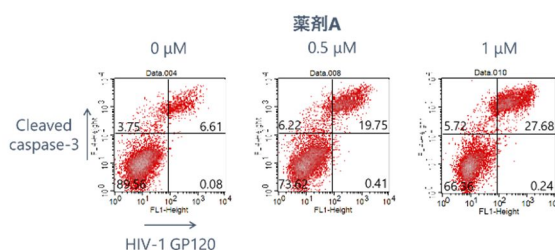
次に、HIV-1 感染者から得られた CD4 陽性 T 細胞を用いて、薬剤 A の HIV-1 感染細胞特異的細胞死誘導効果の検証を行った。HIV-1 感染者の CD4 陽性 T 細胞を 5 日間培養後、各濃度の薬剤 A で 3 日間処理した。その結果、薬剤 A の濃度依存性に、cleaved caspase-3、gp120 共に陽性の細胞が増加することが分かった。これらの結果から、薬剤 A は HIV-1 感染者由来の CD4 陽性 T 細胞においても、HIV-1 抗原を発現している細胞に特異的に apoptosis を誘導することが明らかになった (図 4-1)。さらに、HIV-1 感染者由来の CD4 陽性 T 細胞において、薬剤 A の処理時間を延長させることにより、HIV-1 抗原発現細胞特異的な apoptosis 誘導効果が増強することが明らかになった (図 4-2)。

図4-1. 実験結果 (臨床検体における効果)



Sample : HIV-1感染者 CD4 陽性 T 細胞
5日間培養後、薬剤A処理 (3日間)

図4-2. 実験結果 (臨床検体における効果)



Sample : HIV-1感染者 CD4 陽性 T 細胞
5日間培養後、薬剤A処理 (7日間)

(4) 既存の抗 HIV-1 薬との併用効果の検証

低分子化合物による感染者体内の HIV-1 慢性感染細胞を直接除去する治療法の確立の試みのため、既存の抗 HIV-1 薬との併用効果の検証を行った。健康人由来の末梢単核球に HIV-1 感染あるいは偽感染し、10 日目に薬剤 A と臨床使用されるプロテアーゼ阻害薬の一つである Darunavir (DRV) を併用投与した。その結果、DRV との併用投与は、薬剤 A の HIV-1 慢性感染細胞特異的殺傷効果に影響することなく、HIV-1 産生を抑制出来ることを明らかにした (図 5-1)。

そこで、HIV-1 感染者由来の CD4 陽性 T 細胞を用いて、in vitro において薬剤 A と DRV の併用投与を行い、その効果をフローサイトメトリ法で解析した。その結果、慢性感染 CD4 陽性 T 細胞の時と同様に、薬剤 A と DRV の併用投与により、HIV-1 抗原発現細胞特異的に apoptosis を誘導し (図 5-2)、一方、HIV-1 産生は抑制されることを明らかにした (図 5-3)。

これらの結果から、臨床においても、薬剤 A と DRV の併用投与により、非感染細胞への二次感染を抑制しながら、HIV-1 慢性感染 CD4 陽性 T 細胞を減らすことで、HIV-1 根治療法を確立出来る可能性が示された。

図5-1. 実験結果 (既存の抗HIV-1薬との併用効果)

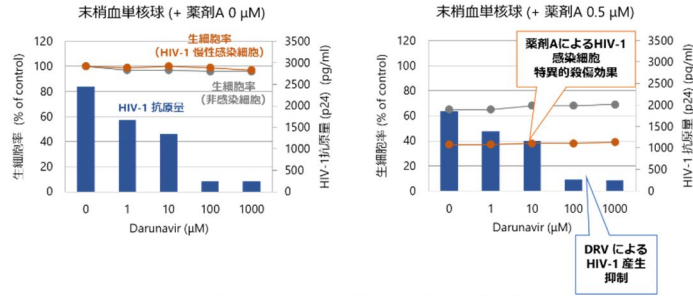


図5-2. 実験結果 (既存の抗HIV-1薬との併用効果)

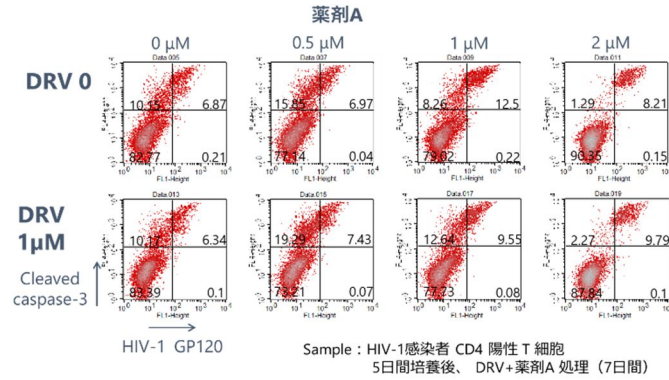
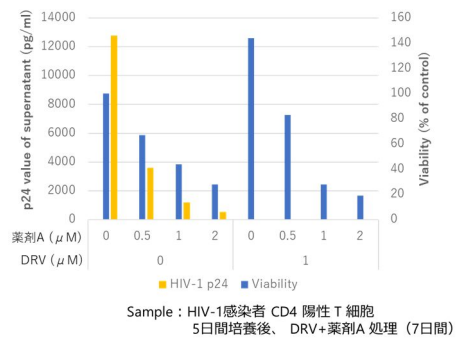


図5-3. 実験結果 (既存の抗HIV-1薬との併用効果)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Baba Masanori, Okamoto Mika, Toyama Masaaki, Sakakibara Norikazu, Shimojima Masayuki, Saijo Masayuki, Niwa Takuro, Yagi Yoshiki	4. 巻 210
2. 論文標題 Amodiaquine derivatives as inhibitors of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus (SFTSV) replication	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Antiviral Research	6. 最初と最後の頁 105479 ~ 105479
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.antiviral.2022.105479	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kajiya Takashi, Sawayama Hayate, Arima Eriko, Okamoto Mika, Baba Masanori, Toyama Masaaki, Okuya Kosuke, Ozawa Makoto, Atsuchi Nobuhiko, Nishi Junichiro, Suda Yasuo	4. 巻 14
2. 論文標題 Novel RT-PCR Using Sugar Chain-Immobilized Gold-Nanoparticles Correlates Patients' Symptoms: The Follow-Up Study of COVID-19 Hospitalized Patients	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 2577 ~ 2577
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v14112577	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Toyama Masaaki, Watashi Koichi, Ikeda Masanori, Yamashita Atsuya, Okamoto Mika, Moriishi Kohji, Muramatsu Masamichi, Wakita Takaji, Sharon Ashoke, Baba Masanori	4. 巻 66
2. 論文標題 Novel Neplanocin A Derivatives as Selective Inhibitors of Hepatitis B Virus with a Unique Mechanism of Action	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Antimicrobial Agents and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 e0207321
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/aac.02073-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 YOKOTA RIRI, HASHIMOTO SHUN, WATANABE IKUKO, KISHIMOTO SATOSHI, TOYAMA MASAOKI, OKAMOTO MIKA, YOSHIMITSU MAKOTO, ISHITSUKA KENJI, ITO YUJI, BABA MASANORI	4. 巻 40
2. 論文標題 Novel Anti-CD70 Antibody Drug Conjugate for the Treatment of Adult T-Cell Leukemia (ATL)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 4471 ~ 4479
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancer.14452	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okamoto Mika, Toyama Masaaki, Baba Masanori	4. 巻 182
2. 論文標題 The chemokine receptor antagonist cenicriviroc inhibits the replication of SARS-CoV-2 in vitro	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Antiviral Research	6. 最初と最後の頁 104902 ~ 104902
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.antiviral.2020.104902	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Okamoto Mika, Chono Hideto, Hidaka Akemi, Toyama Masaaki, Mineno Junichi, Baba Masanori	4. 巻 530
2. 論文標題 Induction of E. coli-derived endonuclease MazF suppresses HIV-1 production and causes apoptosis in latently infected cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 597 ~ 602
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.07.103	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Furukawa Yoshitaka, Hamada Heiichiro, Kamikawaji Kazuto, Unoki Taiji, Inoue Hiromasa, Tashiro Yukie, Okamoto Mika, Baba Masanori, Hashiguchi Teruto	4. 巻 26
2. 論文標題 Successful treatment of an AIDS patient with prolonged Mycobacterium avium bacteremia, high HIV RNA, HBV infection, Kaposi's sarcoma and cytomegalovirus retinitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Infection and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 279 ~ 281
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2019.08.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Toyama Masaaki, Sakakibara Norikazu, Takeda Midori, Okamoto Mika, Watashi Koichi, Wakita Takaji, Sugiyama Masaya, Mizokami Masashi, Ikeda Masanori, Baba Masanori	4. 巻 271
2. 論文標題 Pyrimidotriazine derivatives as selective inhibitors of HBV capsid assembly	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Virus Research	6. 最初と最後の頁 197677 ~ 197677
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.virusres.2019.197677	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Okamoto Mika, Hidaka Akemi, Toyama Masaaki, Baba Masanori	4. 巻 260
2. 論文標題 Galectin-3 is involved in HIV-1 expression through NF- B activation and associated with Tat in latently infected cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Virus Research	6. 最初と最後の頁 86 ~ 93
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.virusres.2018.11.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 岡本実佳, 日高朱美, 外山政明, 古川良尚, 橋口照人, 馬場昌範
2. 発表標題 HIV-1 慢性感染細胞を標的とした治療法に関する研究
3. 学会等名 第 20 回 白馬シンポジウム in 屋久島 2018
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 抗SARS-CoV-2薬	発明者 馬場昌範, 岡本実佳, 外山政明	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-86493	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 抗SARS-CoV-2薬	発明者 馬場昌範, 岡本実佳, 外山政明, 橋本祐一	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-865171	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 抗SARS-CoV-2薬	発明者 馬場昌範, 岡本実佳, 外山政明	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-92322	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 特許権	発明者 Mika Okamoto	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、US 9,839,645	取得年 2017年	国内・外国の別 外国

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	古川 良尚 (Furukawa Yoshitaka) (00359978)	鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・講師 (17701)	
研究分担者	馬場 昌範 (Baba Masanori) (70181039)	鹿児島大学・総合科学域総合研究学系・教授 (17701)	
研究分担者	橋口 照人 (Hashiguchi Teruto) (70250917)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授 (17701)	
研究分担者	外山 政明 (Toyama Masaaki) (80747600)	鹿児島大学・ヒトレトロウイルス学共同研究センター・特任助教 (17701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関