

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月28日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2011

課題番号：23890091

研究課題名（和文）新たなHIV融合阻害薬耐性化メカニズムの解明と臨床的意義の検討

研究課題名（英文）Identification of novel resistance mechanism of HIV-1 fusion inhibitors

研究代表者

志村 和也 (SHIMURA KAZUYA)

京都大学・ウイルス研究所・助教

研究者番号：90613836

研究成果の概要（和文）：HIV-1 と宿主細胞の膜融合反応を標的とした融合阻害薬 enfuvirtide (fuzeon; T-20) は優れた抗 HIV-1 活性を示すが、長期使用による耐性株の出現も報告されている。本研究課題では T-20 耐性株にも活性を示す次世代ペプチド性融合阻害剤である SC34EK により誘導された gp41 cytoplasmic tail (CT) 領域内の変異に着目し、薬剤感受性や感染性の変化を解析した。SC34EK を用いた耐性株誘導試験により、CT 領域に 5 つのアミノ酸変異が導入され、これらの変異は T-20 や SC34EK に約 3 倍から 8 倍の耐性を付与した。また、CT 変異による HIV-1 感染性への影響を解析した結果、CT 変異を組込んだウイルスでは、野生株の 15% 程度の感染性しか示さなかったため、CT 変異が HIV-1 エンベロープの機能不全を引き起こしていることが示唆された。以上の結果から、CT 変異は膜融合反応を含めた HIV 感染過程に影響を及ぼすことで、膜融合阻害薬の耐性に関与していることが推測された。

研究成果の概要（英文）：Enfuvirtide (fuzeon; also known as T-20), an HIV-1 gp41-derived peptide, efficiently inhibits HIV infection by blocking the membrane fusion step between the virus and host cells. We have developed several potential next-generation fusion inhibitors, such as SC34 and SC34EK, which are active against T-20-resistant HIV-1 strains. SC34EK selected several mutations in gp41, and about half of them were located in the C-terminus of gp41, a region specifically called “cytoplasmic tail”. This region is believed to be essential for efficient viral infection and replication, though there is no report of fusion inhibitors selecting mutations in the cytoplasmic tail so far. We observed that mutations in the cytoplasmic tail conferred resistance to fusion inhibitors including T-20 and SC34EK, and also impaired viral infection. These results indicate that fusion inhibitor-selected mutations in the cytoplasmic tail are involved in drug susceptibility by influencing viral infection steps.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
年度			
総計	1,300,000	390,000	1,690,000

研究分野：ウイルス感染症学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：HIV・融合阻害薬・耐性機序

## 1. 研究開始当初の背景

後天性免疫不全症候群 (AIDS) は、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染により引き起こされる、CD4 陽性 T リンパ球の減少に伴う免疫不全を特徴とする疾患である。HIV 発見当初は、AIDS 発症者の大多数が死亡するというまさしく死の病であった。しかしながら現在までに、多くの優れた抗 HIV 薬が開発され、また、これらを組み合わせて服用する多剤併用療法の確立によって HIV 感染者の死亡率は劇的に低下し、HIV 感染症は制御可能な慢性ウイルス感染症という概念に移行しつつある。一方で、今日の抗 HIV 療法では、体内からの HIV の完全排除は不可能であることから、ウイルス量を検出限界以下に抑えて AIDS 発症を阻止するためには終生にわたる抗 HIV 薬の服用が不可欠である。したがって、長期投与に伴う薬剤耐性 HIV の出現による治療効果の減弱や、副作用による治療薬の変更など、治療上の様々な問題点も露わになってきている。このため、既存の薬剤に対する耐性 HIV を効果的に抑制することが可能な、新規治療標的に作用する抗 HIV 薬の開発が必要となっている。

HIV の糖タンパク質である gp120 および gp41 は、HIV が宿主細胞に感染する初期ステップである吸着・融合反応において重要な役割を果たしている。HIV gp120 は、宿主細胞膜上の CD4 (主受容体) および、CXCR4 もしくは CCR5 (副受容体) との相互作用により自身の構造変化が誘導される。その結果、折りたたまれていた HIV gp41 が露出し、N 末端側の疎水性領域が宿主細胞膜を貫通する。HIV と宿主細胞の膜融合反応においては、gp41 の N 末端ヘリックス領域 (N-HR) と C 末端ヘリックス領域 (C-HR) の三量体同士が安定な六量体を形成することにより HIV エンベロープ (Env) と宿主細胞膜が物理的に近接し、膜融合反応が進行すると考えられている。この膜融合反応を作用点とする融合阻害薬 enfuvirtide (fuzeon; T-20) は新規標的治療薬として優れた抗 HIV-1 活性を有している。T-20 は gp41 C-HR のアミノ酸配列を由来とするペプチド製剤であり、N-HR と C-HR 間の相互作用時に、デコイとしてウイルス C-HR と競合することにより膜融合反応を阻害する。しかしながら臨床で使用されている

膜融合阻害薬は T-20 のみであることから、T-20 耐性 HIV が出現した場合は、他のクラスの薬剤に変更せざるを得ない。したがって、T-20 に耐性を示す変異株にも効果を示す次世代融合阻害薬の開発が強く望まれている。

我々はこれまでに、T-20 耐性 HIV-1 にも効果を示す SC34 や SC34EK といった一連の次世代ペプチド性融合阻害薬を開発・報告してきた。第一世代融合阻害薬の T-20 と次世代融合阻害薬では耐性プロファイルが異なることが推測されるため、*in vitro* における SC34EK に対する耐性誘導試験を行ったところ、ペプチド性融合阻害薬の直接の標的部位である N-HR や C-HR に加えて、より C 末端側に位置する cytoplasmic tail (CT) 領域においても変異が同定されたが、本領域内の変異による融合阻害薬感受性への影響については不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、次世代 HIV-1 融合阻害薬 SC34EK の試験管内耐性誘導により同定された CT 領域内の変異に着目し、これらの変異が融合阻害薬感受性や感染性に与える変化を解析し、HIV-1 融合阻害薬の新規耐性化機構の解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 抗ウイルス剤

HIV-1 gp41 C-HR 由来の抗 HIV-1 活性ペプチドである T-20 および SC34EK は、化学合成法により作製した。対照化合物である核酸系逆転写酵素阻害薬 2',3'-dideoxycytidine (ddC) はシグマアルドリッチ社より購入した。

### (2) SC34EK 耐性株における gp41 領域内の変異解析

ヒト T 細胞株である MT-2 細胞に HIV-1 NL4-3 株を感染させ、SC34EK の濃度を徐々に増加させながら継代を繰り返すことで SC34EK 耐性株を得た。得られた耐性株の塩基配列は、ウイルス感染 MT-2 細胞から DNA を抽出し、PCR で env 領域を増幅した後、ダイレクトシーケンスで塩基配列を決定した。

### (3) HIV-1 env 組換えウイルスの作製

初めに、gp41 HR 領域と CT 領域の組換えを簡便に行うために、両領域間にサイレント

変異を導入することで、制限酵素認識配列 (<sup>8318</sup>CTT-TCT-ATA<sup>8326</sup>→CTA-TCG-ATA: 下線部は ClaI 認識配列) を導入した感染性クローン pNL43C を作製した。このクローンを基に、gp41 HR 領域、N-HR-C-HR 間のヒンジ領域、および transmembrane 領域の組換えには、pNL4-3C の NheI-ClaI サイトを利用してクローニングした。一方、gp41 CT 領域の組換えには、ClaI-XhoI サイトを利用してクローニングした。これらの組換えクローンを 293FT 細胞にトランスフェクションし、48 時間後にウイルスを回収した。

#### (4) 抗 HIV-1 活性の測定

抗 HIV-1 活性の評価には multinuclear activation of a galactosidase indicator (MAGI) assay を用いた。10<sup>4</sup> cells/well の HeLa-CD4/CCR5-LTR-β-galactosidase 細胞を 96 well flat microtiter culture plate で培養し、翌日に HIV-1 クローンと抗 HIV 薬を加えた。ウイルスを加えてから 48 時間培養後、X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) によって感染細胞を染色した。呈色した細胞数を数え、コントロールとの比較によってその濃度における HIV-1 の感染阻害率を求めた。抗 HIV-1 活性は HIV-1 の感染を 50% 阻害する濃度 (EC<sub>50</sub>) を算出し評価した。

#### (5) 感染性の解析

各変異を組込んだエンベロープ発現ベクターを用いて、luciferase を発現する組換えレンチウイルスベクターを作製した。このウイルスベクターを MT-2 細胞に感染させ、48 時間後に細胞を溶解し、luciferase 活性を測定した。測定値は各ウイルスベクターの p24 量で補正した。

## 4. 研究成果

### (1) SC34EK 耐性ウイルスにおける gp41 領域の変異解析

SC34EK に対する試験管内耐性誘導試験において、最終継代ウイルス (継代数 120) 感染細胞から DNA を抽出し、gp41 領域のアミノ酸変異を解析した結果、gp41 N-HR 領域に D36G・Q41R・N43K、ヒンジ領域に A96D、C-HR 領域に N126K・H132Y、transmembrane 領域に V182I、CT 領域に P203S・L204I・S241F・H258Q・A312T 変異が同定された。

### (2) CT 変異による膜融合阻害薬感受性への影響

上記で同定された CT 変異を HIV-1 感染性クローン pNL43C に導入し、ウイルスを作製して耐性を精査した。その結果、5 つの CT 変異全て (P203S・L204I・S241F・H258Q・A312T) を組込んだウイルス NL43C (CT<sup>res</sup>) は、

T-20 に約 3 倍の耐性を示した。また、HR 変異 (D36G・Q41R・N43K・N126K・H132Y) に 5 つの CT 変異を組込んだウイルス NL43C (HR<sup>res</sup> + CT<sup>res</sup>) では、HR 変異単独のウイルス NL43C (HR<sup>res</sup>) と比較して SC34EK に約 3 倍の耐性を示した。

さらに、SC34EK により誘導された全変異について、CT 変異の有無による薬剤感受性の差を解析した結果、CT 変異を有しないウイルス NL43C (HR<sup>res</sup> [A96D/V182I]) に対する T-20 の EC<sub>50</sub> 値は 365 nM であった。一方、CT 変異を有するウイルス NL43C (HR<sup>res</sup> [A96D/V182I] + CT<sup>res</sup>) では、T-20 の EC<sub>50</sub> 値は 3,021 nM であったことから、CT 変異により約 8 倍の T-20 耐性が付与された。以上の結果から、CT 変異は直接融合阻害薬の耐性に関与していることが明らかとなった。

HIV-1 gp41 CT 領域は、他のレトロウイルスに比べて約 5 倍以上のアミノ酸数から構成されている。この HIV 特異的な長い CT 領域は HIV-1 ウイルス粒子の感染性や Env タンパクの内在化などに重要な役割を果たすことが知られており、いくつかの機能ドメインも報告されている。実際、今回同定された 5 つの CT 変異のうち、P203S および L204I は、201<sup>Y</sup>SPL<sup>204</sup> というモチーフ上に導入された変異である。このモチーフは tyrosine-based sorting signal として機能し、ウイルスの感染性などに影響を及ぼしていることが報告されている。P203S および L204I 変異によるシグナル機能への影響は不明なため、機能発揮に必須であるアミノ酸残基 Y201 を置換した不活化変異体を作製し、融合阻害薬感受性を評価した。その結果、Y201 野生体と変異体間では融合阻害薬の感受性に変化は認められなかったことから、本シグナル機能は融合阻害薬耐性化機序へ関与していないことが明らかになった。

### (3) CT 変異による HIV-1 感染性への影響

上述したように、ウイルス複製機構におよぼす CT 領域の機能は多岐にわたることが示唆されている。そこで、Env タンパクの本質的な機能であるウイルス感染段階に着目し、CT 変異がおよぼす影響を解析した。

CT 変異を有するエンベロープでシェードタイプ化した、HIV-1 由来の luciferase 発現レンチウイルスベクターを MT-2 細胞に感染させて luciferase 活性を測定することで、CT 変異による HIV-1 感染性の変化を測定した。その結果、CT 領域以外の変異を組込んだウイルス NL43C (HR<sup>res</sup> [A96D/V182I]) では、野生株 NL43C と比較して、約 4 倍の感染性の増加が認められた。HR 領域内に位置する D36G

変異は膜融合能を増加させることが知られている。従って、今回認められた感染性の増加は、主に D36G 変異が寄与していると考えられる。一方、CT 変異を組み込んだウイルス NL43C (CT<sup>res</sup>)では、野生株の 15%程度の感染性しか示さなかった。しかしながら、全変異を組み込んだウイルス NL43C (HR<sup>res</sup> [A96D/V182I] + CT<sup>res</sup>)では野生株と比較して、約 3 倍の感染性の増加にとどまっていた。以上の結果より、CT 変異が HIV-1 Env の機能不全を引き起こしていることが示唆された。しかしながら、他の gp41 変異がこの機能不全に対して補正的に寄与している事も明らかとなったため、CT 領域の変異による感染性低下は、限定的であると考えられる。

総合すると、CT 変異は膜融合反応を含めた HIV 感染過程に影響を及ぼすことで、融合阻害薬に対する感受性低下に関与していることが推測された。

#### 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 1 件)

志村和也、松岡雅雄、HIV 膜融合阻害薬の開発と耐性獲得機序の解析、遺伝子医学 MOOK ナノバイオ技術と最新創薬応用研究 (メディカルドゥ)、20: 84-88 (2012)  
<http://www.medicaldo.co.jp/gene/mook.no20.html>

[学会発表] (計 1 件)

志村和也、HIV-1 膜融合阻害剤に対する新規耐性メカニズムの解析、第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、2011 年 11 月 30 日-12 月 2 日、ハイアットリージェンシー東京

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
研究室ホームページ

<http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/Lab/matsuoka.html>

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

志村 和也 (SHIMURA KAZUYA)  
京都大学・ウイルス研究所・助教  
研究者番号：90613836

##### (2)研究分担者

なし

##### (3)連携研究者

なし