

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 23 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390032

研究課題名(和文) HIV伝播を制御する細胞性因子の探索と薬剤耐性克服を目的とした基盤研究

研究課題名(英文) Exploration of cellular host factor required for HIV-1 infection and approaches to overcome multi-drug resistant HIV-1

研究代表者

三隅 将吾 (Misumi, Shogo)

熊本大学・生命科学研究部・教授

研究者番号：40264311

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：HIV-1に対する現在の薬剤は、ウイルス性酵素の機能を阻害する。これらは、併用療法において特に有効であるが、未だ薬剤耐性は発生する。それ故、HIV-1感染に対するより効果的な治療の方向性は、ウイルスタンパク質のみを標的とした従来の戦略よりはむしろ新たな治療戦略の開発を求めている。HIV-1は感染の際に多くの宿主タンパク質を利用し、このことはウイルス-宿主間の相互作用を阻害することは、抗ウイルス療法の開発のために重要であるかもしれないということを示唆している。このコンセプトで開発された薬剤は、耐性ウイルスの出現を最小に抑える可能性があり、新たな治療法開発に寄与できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Current drugs against HIV-1 inhibit the function of viral enzymes, namely, RT, integrase, and protease. While these are especially proving useful in combination therapy, drug resistance could still be generated. Therefore, future directions towards a more effective therapy for HIV-1 infection will rely on the development of novel therapeutic strategies rather than conventional strategies, which target only viral proteins. HIV-1 exploits multiple host proteins during infection, suggesting that the possibility of interrupting virus-host interactions may be an important pathway for the development of antiviral therapies. In concept, this type of antiviral agent developed through this pathway could minimize the generation of drug-resistant mutants because the virus must maintain the ability to interact with the relatively immutable host proteins. Thus, the interaction between the host and viral proteins may offer some potential applications for therapies against HIV-1.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HIV-1 宿主因子 ウイルス複製 変異 根治療法

1. 研究開始当初の背景

エイズの根治療法は、残念ながら存在しない。多剤併用療法が HIV 感染による死亡率を低下させたことは事実であるが、その恩恵を得るのは容易ではない。治療を始めたら厳格な 95%以上の服薬を一生続けることが求められ、副作用のために服薬中止を余儀なくされる場合や、薬剤耐性を獲得したウイルスの出現も、治療を妨げる大きな問題となってきた。その結果、治療を開始した患者の実に 20~40%が、治療に失敗すると報告されている (*Clin. Infect. Dis.* (2006) 43:939-41.)。

HIV 薬剤耐性獲得能は、逆転写酵素に起因するところが多い。実際、抗 HIV 剤がウイルス性因子に結合し効果を発揮しても、阻害剤とウイルス性因子の結合部位でウイルスが変異を獲得し耐性ウイルスが出現することが知られている。この HIV の易変異原性により生じたウイルス株の多様性は、現在注目されているインフルエンザウイルス株の多様性と比べても比べものにならないくらい大きいことが知られている。つまり、どんな変異を獲得したウイルスにも効果を発揮することが究極の治療法を開発する上では要求される。したがって、申請者は治療標的をあえて HIV が複製する際に利用する細胞性因子に変更することで、細胞性因子であれば逆転写酵素に依存した変異は起こらないため HIV の耐性獲得能に対抗できると考えた。

HIV 感染症において、現行治療法では一端体内に侵入したウイルスを排除することができない。HIV は宿主細胞に潜伏感染できるため、宿主免疫から逃避してしまう。したがって、経腔感染症である HIV 感染を阻止するには、体内にウイルスを侵入させないことが最善策と言える。実際に、HIV ワクチンの最前線でも、HIV 粘膜ワクチンが世界的に注目されている。また、細胞性因子 CCR5 に HIV が結合するのを阻止する microbicide gel を腔内に使用することで、HIV 経腔感染を阻止する治療戦略なども開発されている (*PLoS One.* (2011) 6, e20209)。したがって、申請者は HIV 感染初期過程に必須である細胞性因子を標的とした治療戦略を開発することで、すくなくとも HIV ゲノムを宿主ゲノムに組み込ませないことができれば、経腔感染を防止し HIV 潜伏感染能に対抗できると考え研究を開始することにした。

2. 研究の目的

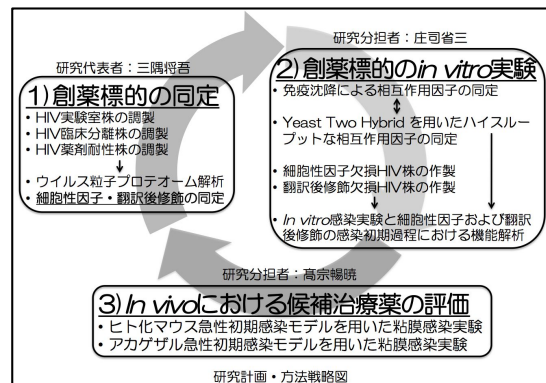
本研究では、現行の多剤併用療法の問題点を改善するために、HIV 伝播を制御する未知の細胞性因子を探索し、HIV 粘膜感染防止のための新規治療標的を選別することで、HIV 粘膜(腔)感染防止を目指した新規治療戦略を提案することを目的とする。なお、具体的には以下の 3 つの目標を設定した。

【研究の具体的な目的】

- (1) HIV 粒子を構成するウイルスポテオームの解析(新規細胞性因子および翻訳後修飾の同定)
- (2) 新規細胞性因子および翻訳後修飾の HIV 感染初期過程における機能解析
- (3) 粘膜感染モデルを用いた細胞性因子を標的とした HIV 粘膜(腔)感染防止効果の検証

3. 研究の方法

下記の研究計画・方法にて研究を実施した。



本研究では、HIV 伝播を制御する未知の細胞性因子を探索し、HIV 粘膜感染防止のための新規治療標的を選別し、HIV 粘膜(腔)感染防止を目指した治療戦略を提案することを目的としているため、下記(1)-(3)を有機的に連結させた研究サイクルを回して研究を行った。

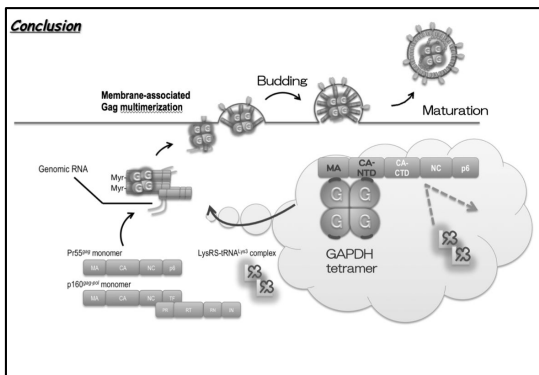
- (1) 感染初期過程に関与する新規細胞性因子および翻訳後修飾の同定 (HIV 粒子プロテオーム解析)
- (2) 新規細胞性因子および翻訳後修飾の HIV 感染初期過程における機能解析
- (3) 粘膜感染モデルを用いた細胞性因子を標的とした HIV 粘膜(腔)感染防止効果の検証

4. 研究成果

感染初期過程に関与する宿主因子として、glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)、extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2)、MAPK/ERK kinase 1/2 (MEK1/2)をプロテオーム解析により明らかにした。以下にそれぞれのタンパク質に関する研究成果を説明する。

- (1) GAPDH をノックダウンした細胞や過剰発現した細胞からウイルスを調製し、HIV-1 感染インジケータ細胞やヒト末梢血単核球に感染させることで HIV-1 複製効率を評価した。さらに、GAPDH と

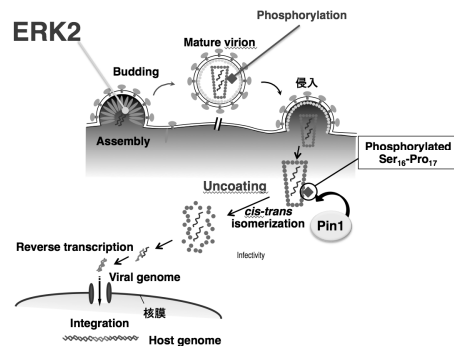
相互作用するウイルス性タンパク質を共免疫沈降法等により評価したところ、ウイルス粒子内に取込まれる GAPDH の量が低下すると HIV 逆転写過程が増強され、感染効率が上昇することを明らかにできた。その原因について詳細に調べたところ、GAPDH の取込み量を減少させたウイルスでは、ウイルス粒子内で開始される逆転写反応のプライマーとなる tRNA^{Lys3} の量が増加していた。tRNA^{Lys3} は lysyl-tRNA synthetase (LysRS) と複合体を形成し、LysRS とウイルス前駆体タンパク質 Pr55^{gag} や p160^{gag-pol} との相互作用を介しウイルス粒子内に取込まれるため、ウイルス粒子内 LysRS の検出を行ったところ、GAPDH の取込み量を減少させたウイルスでは tRNA^{Lys3} と同様に取込まれる LysRS の量も低下していた。一方、GAPDH のウイルス粒子内への取込み量を増加させたウイルスでは、減少させたウイルスとは逆の結果が得られた。本知見は、逆転写反応に必須となるプライマーの取込みを制御する GAPDH とウイルス前駆体タンパク質の相互作用を模倣することで、HIV の持つ異常性に打勝つ新規抗 HIV 薬の開発に寄与できると考えられた。



- (2) 宿主細胞からウイルス粒子内へ取り込まれた ERK2 によって、ウイルスの出芽後の成熟過程において HIV CA Ser₁₆ 残基特異的なリン酸化が生じることが分かった。ERK2 に対する阻害剤を処理することで、ウイルス粒子内の CA Ser₁₆ リン酸化を阻害し、ウイルスの感染性を減少させることができた (Dochi *et al.*, *J. Gen. Virol.* (2014) 95:1156-1166.)。本研究は既存薬のようにウイルスタンパク質を標的とした既存の治療戦略ではなく、宿主-HIV タンパク質間の相互作用を阻害する新規抗 HIV 治療戦略に繋がると考えられる。

次に感染初期過程に関与する新規翻訳後修飾の同定に関しても有用な知見を知見を得ることができた。詳細は、以下の通り。

Antiviral Drug Development: Prolyl Isomerase Pin1 & ERK2, the Next Targets



- (3) HIV ウイルス粒子の 2 次元電気泳動を行い、あらたな CA タンパク質の翻訳後修飾を見いだした(現在投稿論文作成中であるため詳細を表示できない)。その翻訳後修飾部位はこれまで報告のないアミノ酸残基が翻訳後修飾を受けており、その部分に変異を導入したウイルスの感染価が低下することを確認することができた。さらに、ウイルス複製過程の内、逆転写過程が上手く進まないために、感染価が低下することも確認ができています。現在、その翻訳後修飾の意義を詳細に検討するために、脱殻過程における影響などポストエントリーのどの過程で一番影響があるかを明らかにしていく予定にしている。

次に粘膜感染モデルを用いた細胞性因子を標的とした HIV 粘膜(膺)感染防止効果の検証に関しては以下の通り。

- (4) 当初の計画では、本研究の創薬標的として細胞性因子 Pin1 を考えていた。Pin1 阻害剤の探索に関しては、Pin1 inhibitor PiB よりも阻害活性が高く、特異性が高い阻害剤を見出すことが難しい状況にあり、これまでにない方法で阻害剤を探索し、*in vivo* による評価を実施する必要があると感じている。一方、Pin1 がリン酸化 Ser¹⁶-Pro¹⁷ 部分に相互作用するためには、Ser 残基がリン酸化する必要があるため、ERK2 阻害剤や MEK 阻害剤による HIV 脱殻阻害効果を検討しており、すでに FDA に認可を受けている阻害剤が一定の効果を示している点は興味深い。本研究期間中には、*in vivo* モデルによる評価までは行うことが液なかったが、すでに臨床応用が可能な薬剤で、しかも全く作用機構の異なるもので HIV の複製がコントロールできることを示すことができたことは、意味だあると考えている。

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3件)

Dochi T, Nakano T, Inoue M, Takamune N, Shoji S, Sano K, Misumi S. Phosphorylation of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) capsid protein at serine 16, required for peptidyl-prolyl isomerase (Pin1)-dependent uncoating, is mediated by virion-incorporated extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2). 査読有, *J. Gen. Virol.* (2014) 95, 1156-1166, DOI: 10.1099/vir.0.060053-0.

Kishimoto N, Onitsuka A, Sugimoto Y, Takamune N, Shoji S, Misumi S. Human tRNA^{Lys3} incorporation into HIV-1 virions was suppressed by glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. 査読有, *The Journal of AIDS Research* (2013) 15(3): 158-163., http://jaids.umin.ac.jp/journal/journal_vol15_no03_j.html

Kishimoto N, Onitsuka A, Sugimoto Y, Takamune N, Shoji S, Misumi S. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase negatively regulates human immunodeficiency virus type 1 infection. 査読有, *Retrovirology* (2012) 9:107., DOI: 10.1186/1742-4690-9-107.

〔学会発表〕(計10件)

岸本 直樹、鬼塚 彩乃、伊賀 望、高宗 暢暁、庄司 省三、三隅 将吾、宿主因子 GAPDH による tRNA^{Lys3} 取込み阻害機構の解析、第 28 回 日本エイズ学会 学術集会・総会、2014/12/3-5、大阪(大阪国際会議場)

堂地 起生、高宗 暢暁、三隅 将吾、ERK2-HIV capsid タンパク質間相互作用を介する脱殻制御機構と新規抗 HIV 薬の探索、第 28 回 日本エイズ学会学術集会・総会、2014/12/3-5、大阪(大阪国際会議場)

岸本 直樹、鬼塚 彩乃、伊賀 望、高宗 暢暁、庄司 省三、三隅 将吾、Transfer RNA^{Lys3} の HIV-1 粒子内への取込み阻害能を有する GAPDH 分子認識機構と機能発現、第 62 回 日本ウイルス学会学術集会、2014/11/10-12、横浜(パシフィコ横浜)

堂地 起生、高宗 暢暁、三隅 将吾、MAP kinase ERK2 と HIV 脱殻過程の制御、第 62 回 日本ウイルス学会学術集会、2014/11/10-12、横浜(パシフィコ横浜)

堂地 起生、高宗 暢暁、三隅 将吾、リン酸化シグナルが制御する HIV 脱殻機構と新規抗ウイルス療法の開発、第 87 回 日本生化学会大会、

2014/10/15-18 京都(京都国際会議場) 岸本 直樹、鬼塚 彩乃、高宗 暢暁、三隅 将吾、HIV 感染における glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase の負のムーンライト機能、第 13 回 次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム 2014、

2014/9/20-21、富山(富山国際会議場) 岸本 直樹、鬼塚 彩乃、高宗 暢暁、三隅 将吾、宿主細胞は HIV 逆転写反応開始阻害因子として GAPDH を備え持つ、フォーラム 2014 衛生薬学・環境トキシコロジー、2014/9/19-20、つくば(つくば国際会議場)

岸本 直樹、鬼塚 彩乃、高宗 暢暁、三隅 将吾、ムーンライトタンパク質 GAPDH と HIV 前駆体タンパク質の相互作用は HIV 粒子内への逆転写プライマー取込みを競合的に阻害する、第 38 回 タンパク質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム、2014/9/11-13、久山(久山レイクサイドホテル)

岸本 直樹、鬼塚 彩乃、杉本 幸彦、高宗 暢暁、三隅 将吾、ムーンライトタンパク質 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase は HIV-1 複製制御能を発揮する、日本薬学会 第 134 年会、2014/3/27-30、熊本(熊本大学)

堂地 起生、高宗 暢暁、三隅 将吾、HIV 感染症克服に向けた HIV 脱殻素過程を標的とする新規抗 HIV 戦略、日本薬学会 第 134 年会、2014/3/27-30、熊本(熊本大学)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.pharm.kumamoto-u.ac.jp/Labs/enhs/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三隅 将吾 (MISUMI, Shogo)
熊本大学・生命科学研究部・教授
研究者番号: 40264311

(2) 研究分担者

高宗暢暁 (TAKAMUNE, Nobutoki)
熊本大学・イノベーション推進機構・准教授
研究者番号: 60322749

庄司省三 (SHOJI, Shozo)
熊本大学・生命科学研究部・名誉教授

研究者番号：60040317