

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08861

研究課題名(和文) 感染細胞に閉じ込めたエイズウイルスによるアポトーシス誘導法の開発

研究課題名(英文) Development of a method to induce apoptosis by HIV locked in a cell

研究代表者

藤田 美歌子 (Fujita, Mikako)

熊本大学・大学院生命科学研究部(薬)・特任教授

研究者番号：00322256

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：現在のエイズ治療の最大の目標は、HIV潜伏感染細胞の感染者体内からの除去である。これまで藤田らは、HIV放出抑制剤L-HIPPOを創った。さらにこれが細胞にHIV蛋白質を蓄積して細胞死を誘導することを見出し、これを“lock-in and apoptosis”と名付けた。この方法を発展させればエイズ根治が可能となるため、改良に取り組んだ。すなわち負電荷を多く持つL-HIPPOを細胞内に効率良く運ぶため、プロドラッグ体を合成した。現在、最終段階の精製を行っている。また、L-HIPPOと標的蛋白質MAの結合様式を知るため、L-HIPPOの部分構造IP6とMAのX線結晶解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、世界では3000万人以上のHIV感染者がいることが知られる。適切に抗HIV剤が投与されていれば、彼らは健康人とほぼ同じように生活することができる。しかし、HIV潜伏感染細胞が残ったままで、抗HIV剤の投与を中断するとHIVはすぐに体内で増える。本研究を発展させれば、このHIV潜伏感染細胞を感染者体内から除去することに繋がるはずである。この「ウイルスを細胞内に閉じ込めて細胞を殺す」という概念は新しく、HIVのみならず様々な抗ウイルス戦略に応用できるはずである。また、L-HIPPOのような非天然型イノシトールリン脂質誘導体を薬に発展させるという考え方も新しい。

研究成果の概要(英文)：The biggest goal of remedy of AIDS at the moment is removal of HIV reservoir from the patients, that is cure. We already developed an inhibitor of HIV release named L-HIPPO. It was further found that this compound causes accumulation of HIV proteins causing cellular death, and we named this phenomenon “lock-in and apoptosis”. This would lead to cure of AIDS in near future. Herein we tried to improve this method. For example, we synthesized prodrug of L-HIPPO to carry a highly negatively charged compound inside of a cell. It is under the final purification now. X-ray crystallographic study of IP6, a part of L-HIPPO, and its target protein MA was also performed to understand how L-HIPPO interacts with the MA.

研究分野：ウイルス学と創薬科学

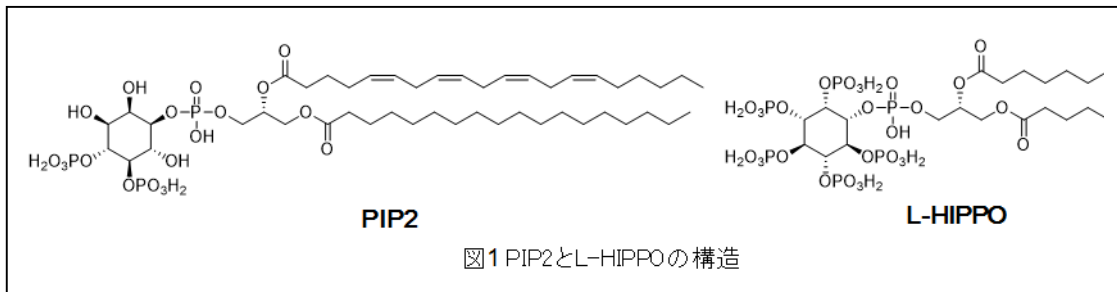
キーワード：エイズ完治 HIV 潜伏感染細胞 イノシトールリン脂質 アポトーシス プロドラッグ体 X線結晶解析
フィチン酸

1. 研究開始当初の背景

1980年代にエイズの世界的流行が始まった。その頃、エイズは死の病であった。その後エイズの原因ウイルス HIV の研究は進展し、多くの抗 HIV 薬が開発された。近年では、違った種類の薬を組み合わせると、感染者体内での HIV 増殖を抑え込みエイズ発症を抑制できる。しかし、この治療法によって HIV 感染細胞を体内から完全に除去することはできず、HIV 潜伏感染細胞 (リザーバー) が残る。この潜伏感染細胞は主にメモリーCD4陽性 T 細胞であり、ヒトゲノムに組み込まれた HIV DNA からの転写が非常に低いレベルに抑制されている。しかし抗エイズ薬の投与を中断すると、この細胞から HIV が産生され再び増殖する。HIV 潜伏感染細胞の体内からの除去 (完全治癒) は、現在のエイズ治療における最大の目標である。

これまで HIV の完全治癒を目指し、いくつかの方法が提唱されてきた。そのうち最も実用化に近いと考えられるのが、“kick and kill”法である。この方法では、ヒストンデアセチラーゼ (HDAC) 阻害剤などにより HIV の転写を活性化してウイルスを増殖させる (kick)。その結果、免疫の活性化や細胞障害による細胞死 (kill) が期待される。実際、基礎研究を経て、近年いくつかの臨床試験も行われた。しかし、その結果は十分に成功したと言えるものではなかった。潜伏感染細胞からの HIV の転写活性化は多くの試験において観察された。しかし、この感染細胞を減らせなかった。“kick and kill”のうち、“kill”に成功していない。今後の課題は、転写活性化した HIV 潜伏感染細胞に効率良く細胞死を誘導する方法を開発することである。

HIV 産生細胞からウイルスが放出される際、HIV の持つ Gag 蛋白質が細胞膜に結合する。この結合には、細胞膜に存在するイノシトールリン脂質 PIP2 (図 1) が必要であることが示された (Ono *et al.*, 2004)。研究代表者らは PIP2 の構造に基づいて PIP2 よりも強く Gag 蛋白質に結合する化合物を創り、新規な HIV 放出抑制剤に発展させることを目指してきた。その結果、L-HIPPO と名付けた非天然型イノシトールリン脂質誘導体 (図 1) に辿り着いた。L-HIPPO は、同じ長さの脂質部位を持つ PIP2 類縁体と比べ、90 倍強く Gag の N 末端ドメイン MA に結合する。さらに細胞導入キャリア α -CDE を用いて L-HIPPO を細胞内に導入したところ、HIV 蛋白質存在下でアポトーシスが惹起されることを見出した。これは、異常に蓄積したウイルス蛋白質によると考えられる。この L-HIPPO によりエイズウイルスを細胞に閉じ込めアポトーシスを誘導する方法を“lock-in and apoptosis”法と名付けた。この方法を発展させ HIV の転写活性化を組み合わせることで、HIV 感染細胞の体内からの除去が可能となるはずである。



2. 研究の目的

上述した“lock-in and apoptosis”法において、L-HIPPO により閉じ込められたウイルス蛋白質がアポトーシスを誘導する機序を解明する。その結果も踏まえながら L-HIPPO を改良してこの方法を発展させ、最終的にはエイズの完全治癒のための臨床応用が可能となるようにする。

3. 研究の方法

細胞生物学的手法、ウイルス学的手法を用いて、化合物の活性評価やアポトーシス誘導メカニズムの解明を行う。有機合成化学的手法を用いて L-HIPPO 誘導体の合成を行い、蛋白質科学的手法により標的蛋白質 MA との相互作用を明らかにする。

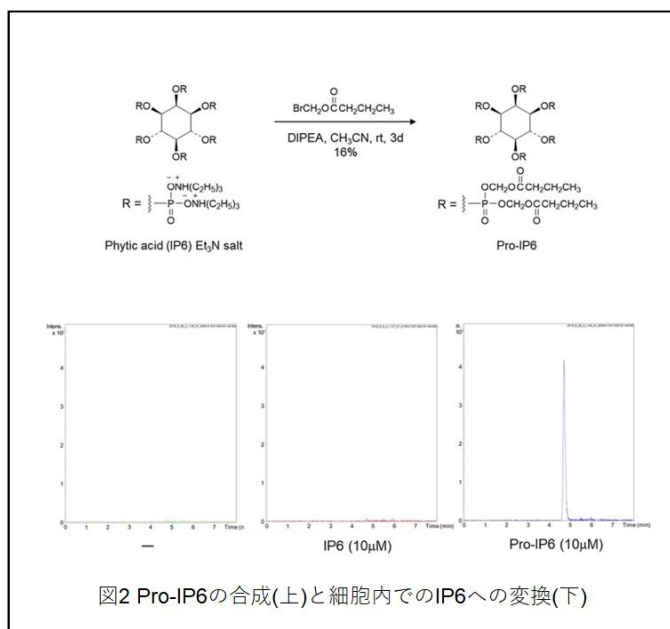
4. 研究成果

- (1) L-HIPPO による“lock-in and apoptosis”法については 2016 年度から論文投稿を行っていたが、2017 年 8 月に Scientific Reports に掲載された。この論文の反響は非常に大きく、このジャーナルの 2017 年に最も多くダウンロードされた論文 100 報の中に入った。また熊本大学でプレスリリースされたところ、朝日新聞や熊本県の地方新聞である熊本日日

新聞、さらに国内外の科学サイトに掲載された。これを見た国内外の多くのエイズ患者からメールが来て、この薬を使いたいとの要請を受けた。これらの患者さんには、まだ実用化段階にはないことを説明した。

- (2) (1)で述べたように Scientific Reports に論文が受理されたが、その過程で T 細胞でも“lock-in and apoptosis”が起こることを示すように要求され、2017 年度の初めはこの実験に時間を費やした。結局は T 細胞株である Jurkat 細胞で“lock-in and apoptosis”を示したが、アポトーシスに至る細胞の割合は HeLa 細胞に比べて少ないことがわかった。HeLa 細胞と T 細胞株ではアポトーシスの誘導メカニズムが異なることが予想され、T 細胞株を用いてそのメカニズムを調べることにした。L-HIPPO は多くの負電荷を持つため、そのままでは細胞膜を透過しづらい。そこで細胞導入キャリア α -CDE を用いて HeLa 細胞に L-HIPPO を入れたが、この方法で T 細胞株に効率良く L-HIPPO を導入できるかどうか明らかでない。そこで確実に L-HIPPO を導入するため、L-HIPPO のプロドラッグ体を合成することにした。またそれと同時に、細胞内の L-HIPPO を LC/MS を用いて定量する方法を開発しようと考えた。
- (3) (2)で述べた L-HIPPO のプロドラッグ体の合成に先立ち、予備実験も兼ねて L-HIPPO の部分構造であるイノシトール 6 リン酸 (IP6) のプロドラッグ体 Pro-IP6 の合成を行うことにした。IP6 はフィチン酸とも呼ばれ、穀物や豆類に含まれる栄養素であるとともに細胞内で生合成されることも知られる。抗癌活性が広く調べられている。合成したプロモメチルブチレートと IP6 のトリエチルアミン塩との反応により、12 個のブチリルオキシメチル基を持つ Pro-IP6 を合成した (図 2)。また、細胞内で生成した IP6 をトリメチルシリルジアゾメタンによりメチル化し、LC/MS で観察することができた。この方法により、確かに Pro-IP6 は細胞内で IP6 を放出すること、同じ濃度の IP6 を加えても細胞内に IP6 が観察されないことを示した (図 2)。さらに Pro-IP6 は IP6 よりも低い濃度で抗癌活性を発現することを、細胞やマウスを用いた実験で示した。これらの研究内容を含む論文は、2019 年 8 月に Bioorganic Chemistry に受理された。

- (4) (3)で述べたように Pro-IP6 が細胞内で IP6 を放出する時、プロドラッグ基から毒性物質であるホルムアルデヒドが生成する。このようなプロドラッグ基は市販の医薬品にも使われているが、より安全性の高いプロドラッグ基が望ましい。そこで、別のプロドラッグ基を導入した Pro-IP6 を現在合成中である。また、(3)で述べた細胞内 IP6 の検出法では IP6 をまずメチル化するが、このような段階が含まれるため定量には適しない。現在、直接 IP6 を LC/MS により検出する方法を検討している。



- (5) (3)と(4)の実験を踏まえ、L-HIPPO にプロドラッグ基を導入したものの合成を現在行っている。そのために必要な L-HIPPO は、十分量を合成した。プロドラッグ化反応の生成物は複雑であったが、目的物の存在は MS で確認している。現在、精製中である。
- (6) L-HIPPO の構造を今後改変するにあたり、L-HIPPO が HIV Gag の MA ドメインにどのように結合しているのか知りたい。MA タンパク質の大腸菌からの発現、精製を検討し、高濃度の蛋白質を得ることに成功した。そこで、MA と L-HIPPO 複合体の X 線結晶解析を行うために、様々な条件での結晶化を試みたが、解析可能な結晶を得ることはできなかった。一方、L-HIPPO の部分構造である IP6 と MA の X 線結晶解析には成功した (論文準備中)。この構造が妥当であることは、MA 変異体と IP6 との DSF アッセイの結果からも裏付けられている。また、SACLA の施設を用いて MA-IP6 の XFEL 解析も行った (回析データのみは International Journal of Molecular Sciences に 2019 年 4 月に掲載された)。このデータは現在、解析中である。MA-IP6 の複合体構造から、MA-L-HIPPO の構造が推定できると考えている。

- (7) IP6 存在下での MA 蛋白質の DSF アッセイにおいては T_m 値が上昇し、IP6 が MA 蛋白質を安定化することが示された。一方、L-HIPPO 存在下では逆に T_m 値が下がり、MA 蛋白質を不安定化することが示唆された。不安定な蛋白質の蓄積によるストレスが細胞内にアポトーシスを誘導する可能性があると考えており、今後調べていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件/うち国際共著 8件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Ciftci H.I., Sierra R.G., Yoon C.H., Su Z., Tateishi, H., Koga, R., Koiwai, K., Yumoto, F., Senda T., Liang M., Wakatsuki S., Otsuka M., Fujita M., and DeMirici H.	4. 巻 20
2. 論文標題 Serial Femtosecond X-Ray Diffraction of HIV-1 Gag MA-IP6 Microcrystals at Ambient Temperature	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1675
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20071675	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 該当する

1. 著者名 Tateishi, H., Monde, K., Anraku, K., Koga, R., Hayashi, Y., Ciftci, H.I., DeMirici, H., Higashi, T., Motoyama, K., Arima, H., Otsuka, M., and Fujita, M.	4. 巻 7
2. 論文標題 A clue to unprecedented strategy to HIV eradication: "Lock-in and apoptosis".	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8957
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-09129-w	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 該当する

1. 著者名 Masunaga, T., Murao, N., Tateishi, H., Koga, R., Ohsugi, T., Otsuka, M., and Fujita, M.	4. 巻 92
2. 論文標題 Anti-cancer activity of the cell membrane-permeable phytic acid prodrug.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorganic Chemistry	6. 最初と最後の頁 103240
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bioorg.2019.103240	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 -

〔学会発表〕 計24件（うち招待講演 0件/うち国際学会 7件）

1. 発表者名 立石 大、安楽健作、古賀涼子、チッフチ ハリル イブラヒム、大塚雅巳、藤田美歌子
2. 発表標題 HIV根絶を目指した人工イノシトールリン脂質誘導体の開発
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会第13回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroshi Tateishi, Halil Ibrahim Ciftci, Ryoko Koga, Kazuaki Monde, Kensaku Anraku, Kotaro Koiwai, Fumiaki Yumoto, Toshiya Senda, Masami Otsuka, Mikako Fujita
2. 発表標題 Development of a novel method for HIV eradication: “lock-in and apoptosis”
3. 学会等名 Frontiers in Retrovirology Conference 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安楽健作、立石 大、古賀涼子、福田亮太、坂本亜里紗、大塚雅巳、藤田美歌子
2. 発表標題 創薬を目指したHIV-1 Gag MAドメインとカルジオリピンとの結合解析
3. 学会等名 第32回日本エイズ学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 増永 拓弥、立石 大、村尾 直樹、古賀 涼子、藤田 美歌子、大塚 雅巳
2. 発表標題 細胞膜透過性を向上したIP6誘導体の合成と活性評価
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Halil Ibrahim Ciftci, Hiroshi Tateishi, Kotaro Koiwai, Ryoko Koga, Fumiaki Yumoto, Toshiya Senda, Masami Otsuka, Mikako Fujita
2. 発表標題 Structural Basis of Targeting HIV-Gag Matrix. Towards Finding a Cure for HIV Infection.
3. 学会等名 The Second Japan-Turkey International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Sciences (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名	Halilibrahim Ciftci, Hiroshi Tateishi, Kotaro Koiwai, Ryoko Koga, Masami Otsuka, Mikako Fujita, Fumiaki Yumoto, Toshiya Senda
2. 発表標題	Structural Basis of the Interaction between HIV-1 Gag Matrix and IP6. Toward the Development of IP6 Derivative.
3. 学会等名	第65回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年	2017年

1. 発表者名	立石大、門出和精、古賀涼子、林祐也、東大志、本山敬一、有馬英俊、安楽健作、藤田美歌子、大塚雅巳
2. 発表標題	ウイルス蛋白質蓄積によりアポトーシスを誘導する新規抗HIV薬の創製
3. 学会等名	第35回メディシナルケミストリーシンポジウム
4. 発表年	2017年

1. 発表者名	Halil I. Ciftci, Hiroshi Tateishi, Kotaro Koiwai, Ryoko Koga, Masami Otsuka, Fumiaki Yumoto, Toshiya Senda
2. 発表標題	Structural Basis of HIV-1 Gag Matrix Targeting by IP6 Derivative.
3. 学会等名	第31回日本エイズ学会学術集会
4. 発表年	2017年

1. 発表者名	Halilibrahim Ciftci, Hiroshi Tateishi, Kotaro Koiwai, Ryoko Koga, Masami Otsuka, Mikako Fujita, Fumiaki Yumoto, Toshiya Senda
2. 発表標題	Structural basis of inositol phosphates recognition in the HIV-1 gag matrix.
3. 学会等名	第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年	2017年

1. 発表者名 Mikako Fujita
2. 発表標題 HIV study aiming at elucidation of viral evolution tactics and development of a way for eradication.
3. 学会等名 The 4th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Sciences (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 増永 拓弥、立石 大、石橋 拓朗、村尾 直樹、古賀 涼子、大杉 剛生、大塚 雅巳、藤田美歌子
2. 発表標題 フィチン酸プロドラッグ体の合成と機能解析
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 フィチン酸エステル誘導体	発明者 藤田美歌子、大塚雅巳、立石大、村尾直樹、増永拓弥、大杉	権利者 サイエンスファーム株式会社
産業財産権の種類、番号 特許、2018-161944	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<p>今までにないエイズウイルス感染細胞除去法の開発 エイズ完治への第一歩 https://www.kumamoto-u.ac.jp/whatsnew/seimei/20170822 立石大学院生の論文がプレスリリース及び熊本日日新聞に掲載されました http://www.pharm.kumamoto-u.ac.jp/Labs/bunsiougouseiHP/research/symposium.html</p>
--

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	大塚 雅巳 (Otsuka Masami) (40126008)	熊本大学・大学院生命科学研究部(薬)・客員教授 (17401)	