

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08436

研究課題名（和文）ケモカイン受容体多量体形成阻害機構解明によるHIV感染の病態解明と治療への応用

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of HIV entry step and the development of novel anti-HIV drug through the analysis of the inhibitory effects on the oligomerization of the chemokine receptors

研究代表者

中田 浩智（Nakata, Hirotomo）

熊本大学・病院・准教授

研究者番号：40628492

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：構造解析からCXCR4の多量体形成に影響を与えると考えられる部位に変異を導入したCXCR4発現プラスミドを作成し、変異型CXCR4の発現が多量体形成に与える影響とその結果HIV感染性がどのように変化するかを複数のアッセイで解析した。その結果CXCR4多量体形成を阻害するいくつかの部位が同定され、それらの変異を有するCXCR4ではHIV感染性が低下する傾向が示された。これらの結果はケモカイン受容体の多量体形成がHIV感染において好ましい状態であることを示唆している。これらの結果は更なるHIV感染のメカニズム解明や今後の薬剤開発につながるものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HIV感染にはCD4と共にCXCR4・CCR5などのケモカイン受容体がコレセプターとして必要であるが、感染が成立する際のこれらの受容体の詳細な動態は解明されていない。今回CXCR4に多量体形成を阻害する変異を導入したところ、多量体形成阻害によりHIV感染性が低下する傾向が示された。この結果はHIV感染にCXCR4の多量体が必要であることを示しており、このケモカイン受容体の動態の更なる解析はHIVの感染が成立するメカニズムを明らかにし、新規作用機序の薬剤開発につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Based on the analysis of the crystal structure of CXCR4, we identified several residues that are assumed to be key residues for CXCR4 oligomerization. Then we introduced mutations to these residues, and investigated the influence of these substitution on the CXCR4 oligomerization through several assays. We also tested how the CXCR4 mutations affect the HIV infectivity. We found that the mutation(s), which disrupted the CXCR4 oligomerization, also reduced the HIV infectivity against these CXCR4 expressed cell. These results suggested that the state of CXCR4 oligomerization is favorable for HIV entry to host cells. Further research will lead us to clarify the mechanism of HIV entry step in detail and the development of novel anti-HIV medicine.

研究分野：感染症

キーワード：HIV感染 ケモカイン受容体 CXCR4 CCR5 抗HIV薬

#### 1. 研究開始当初の背景

本邦における新規 HIV-1/AIDS 患者数は近年 1500 人を下回りわずかに減少傾向にあるが、それでも世界的には年間約 170 万人の新規感染者が発生しており予防及び治療のための新たな治療法の開発が求められている。1990 年代に HIV-1 の主要なコレセプターとして CCR5、CXCR4 が同定され、その後種々の研究により HIV-1 の侵入過程が徐々に明らかになってきたが、実際の侵入過程におけるコレセプターの挙動については不明な点も多い。また、これらのコレセプターが HIV-1 の侵入に重要な役割を果たすことが明らかになってきたことで、コレセプターを標的とした抗 HIV 薬の開発も行われ、2006 年には CCR5 を標的とした最初の抗 HIV 薬である maraviroc が米国 FDA により承認された。しかしながら、これに続く薬剤の開発は滞っており、CXCR4 阻害薬は未だ臨床応用に至っておらず、新たな作用機序の薬剤開発が待ち望まれている。

#### 2. 研究の目的

ケモカイン受容体の多量体形成に重要と考えられるアミノ酸に変異を導入することで多量体形成を阻害或いは増強させ、この効果が HIV-1 感染に及ぼす影響について解析を行う。この結果は HIV-1 感染に適したケモカイン受容体の構造を明らかにし、HIV-1 感染成立の過程の一端を明らかにするものである。さらにその結果を基にコンピューターモデリングにより従来のケモカイン受容体阻害剤とは異なった作用機序、すなわち多量体形成阻害(増強)を介した HIV-1 感染阻害という新たな作用機序の抗 HIV 薬開発を目指す。このような HIV-1 侵入過程に作用する薬剤は HIV-1 感染症の治療だけでなく、予防薬としてもその効果が期待される。また、HIV 以外にもケモカイン受容体を介する免疫疾患は多く存在し、それらの疾患の病態解明にも寄与する可能性がある。

#### 3. 研究の方法

**1)多量体形成に重要と考えられる CCR5・CXCR4 アミノ酸残基の同定と変異プラスミドの作成**：報告された結晶構造(Wu et al. science 330:1066-71、2010)を基に dimer 形成に重要と考えられる部位のコンピューターモデリングによる推定を行い、多量体形成に重要と考えられる部位を数か所同定した。これらの部位を Ala に置換した変異 CXCR4 のプラスミドを作成した。これを用い HIV fusion assay・replication assay を行い、HIV 感染性に与える影響を評価した。

\* HIV fusion assay : HIV-env と Tat を transfection した細胞(effector cell)をケモカインレセプターと luciferase を transfection した CD4 陽性細胞(target cell)と反応させ、細胞融合による Tat の流入をレポーターとして luc 活性を測定する系

\* replication assay: CXCR4 が発現していない NP2 細胞に変異 CXCR4 を発現させ、HIV を感染させ情勢中の p24 値を測定し、感染性を評価した。

#### 2)western blotting や FRET を用いた CXCR4/CCR5 多量体の確認

膜蛋白の分画を収集し、western blotting(WB)により CXCR4/CCR5 が単量体あるいは多量体として存在しているかを確認する。また、FRET を用いた系での多量体形成の評価系を構築する。変異 CXCR4 の C 末端に GFP・CFP をそれぞれ発現させ、近接した場合 FRET が確認できることを用いて多量体形成の確認を行った。

#### 3)多量体形成を阻害する化合物の同定

各種実験から多量体形成、HIV 感染に重要な CXCR4/CCR5 の部位を同定し、in silico でこれらの部位に作用する低分子化合物をライブラリから抽出する。結合部位として想定される部位としてはケモカイン阻害剤の多くが結合する extracellular loop 2 下部のポケットもしくは dimer interaction の interface が挙げられ、前者は構造変化による多量体形成阻害、後者は直接的な結合阻害が想定される。ライブラリから選択された候補化合物については細胞株を用いた感染実験系での抗 HIV 活性、ケモカインを用いた binding assay などにより、ケモカインレセプターに対する影響を確認する。リード化合物が同定された後は、最適化を行っていく。

#### 4. 研究成果

##### (1)変異 CXCR4 導入による HIV 感染性への影響

結晶構造から CXCR4 が多量体を形成する際の interface に位置すると考えられるアミノ酸を選択し変異導入の標的とした。これらのアミノ酸は主に CXCR4 の膜貫通の上部に

位置するアミノ酸(upper)と膜貫通部位に位置するアミノ酸(middle)に大別された。これらの変異を導入した CXCR4 を発現させた細胞を用いて fusion assay と replication assay で評価したところ、ほぼ同様の傾向を示した。いずれの変異 CXCR4 もフローサイトメトリーで細胞表面への発現は確認できており、発現の差は被感染性に影響していないと考えられた。膜貫通している CXCR4 の細胞外ドメイン付近の上部(upper)に位置する変異は被感染性を低下させる傾向を認め(■)。一方膜貫通領域(middle)の変異は感染増強につながるものと感染低下につながるものが認められた(□) (図 1)。

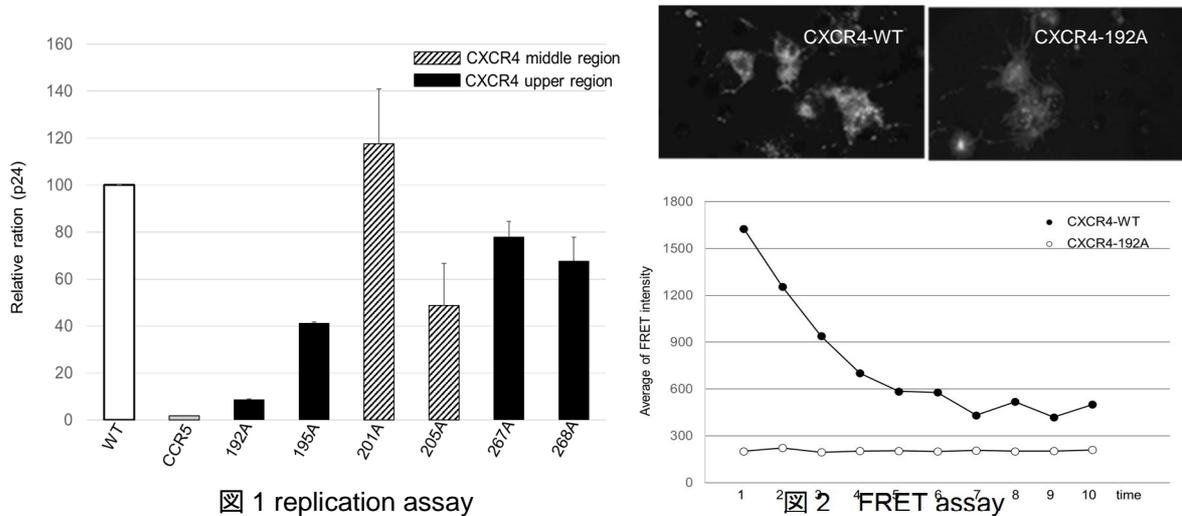


図 1 replication assay

図 2 FRET assay

## (2)FRET assay による CXCR4 多量体形成の評価

FRET の系を用いて変異 CXCR4 が多量体形成に与える影響を評価した。多量体が形成された場合には CXCR4-GFP・CXCR4-CFP がそれぞれ近接することから、FRET が確認された場合多量体形成が起こっていると判断した。その結果、CXCR4-WT では FRET が確認できたのに対し、CXCR4-192A では FRET ratio に変化がみられず、多量体形成が阻害されている可能性が示唆された(図 2)。このように多量体形成を阻害すると考えられる変異は複数個認められた。その他の系でも多量体形成の阻害・促進を確認するため、WB 法でも確認を行っている。また複数の変異を導入した場合の効果についても検討を行っている。

## (3)多量体形成が HIV 感染性に与える影響についての評価

(1)、(2)の結果から、192A など FRET assay で FRET ratio に変化を起こさないいくつかの変異では、HIV 感染性が低下する傾向があることを確認した。この結果は、HIV 感染にはケモカイン受容体の多量体形成が必要であり、多量体形成を阻害する変異では感染性が低下・喪失する可能性が示唆される。一方で upper に位置する変異はでは、CXCR4 と HIV の膜タンパクである gp120 との結合も阻害される可能性があり、複数の実験での確認が必要である。また、多量体形成阻害が本来のリガンドであるケモカインの作用にどのように影響するかも評価を行っている途中である。

## (4)薬剤スクリーニング

本研究から派生した薬剤のスクリーニングとして、CXCR4 と同様に主要なコレセプターである CCR5 に作用する薬剤を同定、報告した。一連の薬剤は CCR5 の extracellular loop 2 (ECL2)との直接的な作用が主要な抗 HIV 活性のメカニズムと考えられた。一方でこれらの薬剤は本研究で変異を導入した upper の部位に位置するアミノ酸との相互作用が考えられることから、ケモカイン受容体の多量体形成を介した抗 HIV 活性も有する可能性があるため、薬剤存在下での FRET assay や WB 法での多量体形成に与える影響についても評価を行っている。

## < 引用文献 >

Wu et al. science 330:1066-71、2010

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hiroto Nakata, Kenji Maeda, Debananda Das, Simon B. Chang, Kouki Matsuda, Kalapala Venkateswara Rao, Shigeyoshi Harada, Kazuhisa Yoshimura, Arun K. Ghosh & Hiroaki Mitsuya	4. 巻 9
2. 論文標題 Activity and structural analysis of GRL-117C: a novel small molecule CCR5 inhibitor active against R5-tropic HIV-1s	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4828
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-41080-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 Nakamura Tomofumi, Nakamura Teruya, Amano Masayuki, Miyakawa Toshikazu, Yamagata Yuriko, Matsuoka Masao, Nakata Hiroto	4. 巻 94
2. 論文標題 A Conformational Escape Reaction of HIV-1 against an Allosteric Integrase Inhibitor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.00486-20	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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------