

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08458

研究課題名(和文) HIV感染経過におけるADCC作用に関する包括的症例検証およびその発展研究

研究課題名(英文) Comprehensive study on HIV-specific ADCC responses using library clinical isolates

研究代表者

原田 恵嘉 (Shigeyoshi, Harada)

国立感染症研究所・エイズ研究センター・主任研究官

研究者番号：30508643

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、HIV潜伏感染細胞の浄化すなわち治癒を目指した新規治療法戦略に対する基盤研究として、HIV感染者検体を用いて、ADCC活性を包括的に解析することを主目的とする。結果、ADCC活性測定系の構築に成功し、臨床経過とADCC活性の関連性、およびADCC活性とレザボアサイズの関連性の基盤データを取得することができた。加えて、ADCC活性増強を目的とする「抗HIV抗体増強剤ライブラリーの拡充」を展開し、化学構造骨格だけでなく、標的Envに対する結合領域も各々異なる「抗HIV抗体増強剤」カテゴリーおよびファーマコフォアを複数見出すことに成功した。これらは新規治療法開発の一助となると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現行の抗HIV薬は治癒できないため、生涯服薬継続という最大課題を残す。他方、理論上では、有効なADCC抗体を誘導できる感染症例では、感染細胞排除が進み、レザボアサイズが縮小され、それに伴いウイルス抑制効果および抗ウイルス治療効果が向上する可能性が推察される。本研究により「ADCC活性測定系の最適化」、「抗HIV抗体増強剤ライブラリーの拡充」、および「臨床検体に対する各種解析」を進展することができ、臨床検体におけるADCC活性知見およびADCC活性を惹起させる新規治療法開発の基盤データを得ることができた。これらは新規治療法開発の一助となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The main objective of this study was to comprehensively analyze ADCC activity in HIV-infected specimens as a basic research for a novel therapeutic strategy aimed at cure of HIV latently infected cells.

As a result, we succeeded in constructing a system for measuring ADCC activity and obtained basic data on the relationship between clinical course and ADCC activity, as well as the relationship between ADCC activity and reservoir size.

In addition, we developed the "expansion of the anti-HIV antibody enhancer library" for the purpose of enhancing ADCC activity, and succeeded in finding several categories of "anti-HIV antibody enhancers" and pharmacophores that differ not only in their chemical structural framework but also in their binding regions to target Envs. These are expected to contribute to the development of new therapeutic methods.

研究分野：HIV感染症

キーワード：HIV AIDS

1. 研究開始当初の背景

日本および先進諸国において、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)が原因である後天性免疫不全症候群(AIDS)は、抗HIV薬による発症抑制が可能な慢性感染症へ変貌を遂げた。しかし、高額な治療費に加えて、全世界の感染者3,700万人の約半数は未だ服薬がかなわず、依然、年間感染者180万人、年間死亡者100万人を超える最重点国際感染症であることに変わりはない。結果、生涯服薬を続けなければならない本慢性感染症に対しては、治癒を目指した新規治療法の開発が急がれる。

その新規治療法の1つとしてワクチン研究が長年進められており、タイで実施されたRV144ワクチン試験では、31%感染防御という唯一の臨床的有効性が示された(Rerks-Ngarm *N Engl J Med* 2009)。その後、この感染防御機序には、誘導された抗HIV抗体の抗体依存性細胞傷害作用(ADCC, Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity)が大きく関与する可能性が示唆された(Haynes *N Engl J Med* 2012, Horwitz *Cell* 2017)。感染細胞を直接排除するADCC作用は、感染防御だけでなく、病態遅延および治癒への期待が非常に高い。

以前から、HIV感染症例においても、ADCC活性と血漿中ウイルス量が逆相関することが報告されている(Rook *J Immunol* 1987, Nag *J Infect Dis* 2004)。しかし、感染者から分離した結合抗体の解析は、研究室株に対するADCC活性を測定するに留まり、感染ウイルスと誘導抗体の直接的な因果関係、および、それに伴うウイルス複製制御やHIV潜伏感染細胞(レザポア, reservoir)などに対する影響は、未だ明らかでない。

2. 研究の目的

多剤併用療法によりHIV感染症は、慢性感染症へ変貌を遂げた。しかし、HIV潜伏感染細胞の排除はできず、生涯服薬を継続しなければならない現状から、レザポアの浄化すなわち治癒を目指した新規治療法開発が急がれる。現在、その新たな治療戦略の1つとして、抗HIV抗体によるADCC作用が注目されている。本研究は、臨床検体に対して、ウイルス抑制、抗ウイルス治療効果、およびレザポアサイズ等の感染経過に対するADCC活性の影響を包括的に検証し、ADCC活性を惹起させる新規治療法戦略へ繋げる基盤データの取得を試みる。

3. 研究の方法

最初に、感染症例から分離した各抗HIV抗体を用いて、同時期に分離したautologusウイルスに対するADCC活性を評価した。なぜならば、これまでに報告された感染症例におけるADCC活性は、研究室ウイルス株に対する評価に留まり、感染ウイルスと誘導された抗HIV抗体の直接的な因果関係が未だ明らかでないためである。加えて、感染者から分離した殆どの抗HIV中和抗体は、HIVの高い変異性により同時期に分離したautologusウイルスを中和できないことが、既に明らかにされているのも理由の1つである(Wei *Nature* 2003)。そこで、中和抗体と結合抗体(ADCC抗体)の違いも含めて、各症例および各採血点の臨床検体に対して、抗体の標的ウイルス蛋白であるEnvゲノム配列を解析し、誘導された抗HIV抗体の感染ウイルスに対するADCC活性を解析した。

同時に、各臨床検体に対して、臨床経過とADCC活性の関連性を調べ、ADCC活性とレザポアサイズの関連性の基盤データ取得を試みた。

最後に、自然治癒が認められないHIV/AIDS感染症においては、たとえ有効なADCC抗体を誘導する感染者群であっても、体内に存在する全てのレザポアは排除できない。そこで、ADCC活性を惹起し、レザポアの浄化すなわち治癒を目指す新規治療法戦略に繋げる基盤データの取得を試みた。具体的には、本研究で得られる臨床分離ウイルスおよび臨床分離抗HIV抗体を用いて、申請者が現在構築中の約500低分子化合物から成る抗HIV抗体増強剤ライブラリーのADCC増強作用を評価した。本HIV抗体増強剤ライブラリーは、同じ液性免疫である抗HIV中和抗体の活性増強を目的に、抗体の標的ウイルス蛋白であるEnv蛋白のエピトープ遮蔽構造(耐性構造)を解除する特異的構造変化誘導剤ライブラリーとして構築を進めてきたものである。本ライブラリー化合物には、ADCC活性を増強する化合物も見出されており、ADCC活性の惹起候補化合物としての期待も高い。

4. 研究成果

本研究は、HIV潜伏感染細胞の浄化すなわち治癒を目指した新規治療法戦略に対する基盤研究として、HIV感染者検体を用いて、ウイルス抑制、抗ウイルス治療効果、およびレザポアサイズ等の感染経過に対する感染者内在性抗体のADCC活性の影響を包括的に解析することを主目的とする。

最初に、臨床検体から各抗HIV抗体を分離するとともに、同じく各autologusウイルスを分離し、臨床分離株パネルウイルスを構築した。同時に、ADCC活性測定系の最適化および樹立も展開し、最終的に市販キットを応用したNFTA(Nuclear factor of activated T cells)経路を測定するハイスループットバイオアッセイを確立することができた。さらに、NK細胞株を用い

た標的細胞の細胞障害性を測定する系も確立することができた。そして、これら確立した ADCC 活性測定系を用いて、感染症例から分離した各抗 HIV 抗体と、同時期に分離した autologus ウィルスに対する ADCC 活性の解析を展開し、臨床経過と ADCC 活性の関連性、および ADCC 活性とレザボアサイズの関連性の基盤データを取得することができた（投稿準備中）。

他方、ADCC 活性増強を目的とする「抗 HIV 抗体増強剤ライブラリーの拡充」を展開し、化学構造骨格だけでなく、標的 Env に対する結合領域も各々異なる「抗 HIV 抗体増強剤」カテゴリーおよびファーマコフォアを複数見出すことに成功した。中でも活性が顕著であった、CD4 類似低分子化合物（CD4mc）、in silico guided hits、および トリテルペン誘導体、の三カテゴリーに関しては、活性・製造・デリバリーの各最適化を展開することができた（*Sci. Rep.* 2019, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2019, *Bioorg. Med. Chem.* 2018a, *Bioorg. Med. Chem.* 2018b）。そして、これら最適化した ADCC 評価系を用いて、臨床検体由来血清における ADCC 活性、レザボアサイズ、および各種パラメーターの各種解析を進めるとともに、ADCC 活性増強試験を行うこともできた。

以上、構築した ADCC 評価系を用いて、臨床検体に対する ADCC 活性、レザボアサイズ、および各種パラメーターの各種解析を進めるとともに、ADCC 活性増強試験を行うこともできた。本研究課題により「ADCC 活性測定系の最適化」、「抗 HIV 抗体増強剤ライブラリーの拡充」、および「臨床検体に対する各種解析」を進展することができ、臨床検体における ADCC 活性知見および ADCC 活性を惹起させる新規治療法開発の基盤データを得ることができた。これらは新規治療法開発の一助となると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kobayakawa Takuya, Tsuji Kohei, Konno Kiju, Himeno Ai, Masuda Ami, Yang Tingting, Takahashi Kohei, Ishida Yusuke, Ohashi Nami, Kuwata Takeo, Matsumoto Kaho, Yoshimura Kazuhisa, Sakawaki Hiromi, Miura Tomoyuki, Harada Shigeyoshi, Matsushita Shuzo, Tamamura Hirokazu	4. 巻 64
2. 論文標題 Hybrids of Small-Molecule CD4 Mimics with Polyethylene Glycol Units as HIV Entry Inhibitors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 1481~1496
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jmedchem.0c01153	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 Hiroto Nakata, Kenji Maeda, Debananda Das, Simon B. Chang ¹ , Kouki Matsuda, Kalapala Venkateswara Rao, Shigeyoshi Harada, Kazuhisa Yoshimura, Arun K. Ghosh, Hiroaki Mitsuya	4. 巻 18
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 Takuya Kobayakawa, Kiju Konno, Nami Ohashi, Kohei Takahashi, Ami Masuda, Kazuhisa Yoshimura, Shigeyoshi Harada**, Hirokazu Tamamura** **Equal contribution	4. 巻 29
2. 論文標題 Soluble-type small-molecule CD4 mimics as HIV entry inhibitors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medical Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 719-723
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2019.01.011.	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 NAKATA H, MAEDA K, DAS D, CHANG SB, MATSUDA K, RAO KV, HARADA S, YOSHIMURA K, GHOSH AK, MITSUYA H.	4. 巻 18
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) 10.1016/j.bmcl.2019.01.011.	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 KOBAYAKAWA T, KONNO K, OHASHI N, TAKAHASHI K, MASUDA A, YOSHIMURA K, HARADA S, TAMAMURA H	4. 巻 29
2. 論文標題 Soluble-type small-molecule CD4 mimics as HIV entry inhibitors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medical Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 719-723
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2019.01.011.	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 KAWEEWAN I, HEMMI H, KOMAKI H, HARADA S, KODANI S.	4. 巻 26
2. 論文標題 Isolation and structure determination of a new lasso peptide specialicin based on genome mining.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medical Chemistry	6. 最初と最後の頁 6050-6055
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2018.11.007.	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 KOBAYAKAWA T, OHASHI N, HIROTA Y, TAKAHASHI K, YAMADA Y, NARUMI T, YOSHIMURA K, MATSUSHITA S, HARADA S, TAMAMURA H	4. 巻 26
2. 論文標題 Flexibility of small molecular CD4 mimics as HIV entry inhibitors.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medical Chemistry	6. 最初と最後の頁 5664-5671
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2018.10.011.	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

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 原田 患嘉
2. 発表標題 HIV侵入阻害剤の開発
3. 学会等名 第34回日本エイズ学会学術集会・総会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shigeyoshi Harada, Tetsuo Narumi, Tetsuro Matano, Kazuhisa Yoshimura
2. 発表標題 Efficacy of a novel triterpene derivative in combination with neutralizing antibodies against HIV-1 infection
3. 学会等名 2019 Cold Spring Harbor meeting: Retroviruses (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田恵嘉、引地優太、俣野哲朗、吉村和久
2. 発表標題 新規トリテルペン誘導体の抗HIV作用および耐性機序に対する詳細解析
3. 学会等名 第29回 抗ウイルス療法学会学術集会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shigeyoshi Harada, Tetsuo Narumi, Yuta Hikichi, Tetsuro Matano, Kazuhisa Yoshimura
2. 発表標題 Triterpene derivative NAT-078 as a novel bifunctional HIV-1 entry inhibitor
3. 学会等名 10th IAS Conference on HIV Science (IAS 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 HARADA S, HIKICHI Y, NARUMI T, YOSHIMURA K
2. 発表標題 Mutations in the gp41 ectodomain can contribute to HIV-1 resistance to smFIs
3. 学会等名 26th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI 2019) (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 原田恵嘉, 野村渉, 鳴海哲夫, 横山勝, 前田賢次, 竹内怜音, 紺野奇重, 引地優太, 佐藤裕徳, 玉村啓和, 俣野哲朗, 吉村和久
2. 発表標題 網羅的Env標的阻害剤ライブラリーの構築-3
3. 学会等名 第32回 日本エイズ学会学術集会・総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 HARADA S, NARUMI T, HIKICHI Y, MATANO T, YOSHIMURA K
2. 発表標題 Triterpene derivative NAT-078 as a novel bifunctional HIV-1 entry inhibitor
3. 学会等名 第66回 日本ウイルス学会学術集会（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 抗HIV活性を有するCD4ミミック化合物	発明者 松下修三, 吉村和久, 玉村啓和, 原田恵嘉, 他4名	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-195967号	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 オレアノール酸誘導体	発明者 鳴海哲夫, 原田恵嘉, 他4名	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2018/033663	出願年 2018年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------