

令和 4 年 10 月 25 日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23802

研究課題名(和文)新規HIV根絶法の開発

研究課題名(英文)Development of the novel HIV eradication method

研究代表者

立石 大(Tateishi, Hiroshi)

熊本大学・大学院生命科学研究部(薬)・特任助教

研究者番号：50846011

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Lock-in and apoptosis法を用いた潜伏感染細胞の除去を目指し、L-HIPPOの結合様式の解明やプロドラッグ化の検討を行なった。まず、結合様式を調べるためL-HIPPOとMA蛋白質との結晶化条件を600種類ほど検討したが、L-HIPPOの結合が観察されなかった。現在、脂質キュービックフェーズ法での結晶化を行うため、ミリストイル化されたMAやGagの精製を検討中である。一方で、プロドラッグ化L-HIPPOを作成し、ウイルス放出抑制効果が確認されたことから、膜透過性の改善に成功した。現在、潜伏感染細胞に対する細胞死誘導能を調査中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多剤併用療法(ART)の導入によりHIV感染症は不治の病からコントロール可能な慢性疾患と捉えられるまでになった。しかしながら、現在の治療法では完治しないため一生薬を飲み続ける必要があり、その結果、副作用や合併症などが見られるようになった。実際に、多施設コホート研究によりHIV感染者でART治療群では、非HIV感染者に比して約4倍糖尿病の罹患率が高くなるという報告もある。HIVの完治が求められているが、本研究にて開発中であるLock-in and apoptosis法は、HIVの根絶に結びつくものと期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to eradicate latently infected cells using the Lock-in and apoptosis method, and investigated the binding form of L-HIPPO and MA domain, and synthesis of prodrug derivative.

First, in order to check the binding form, about 600 types of crystallization conditions were examined by the vapor diffusion method. Although crystals were obtained, no L-HIPPO binding was observed. Currently, due to carry out crystallization by the lipid cubic phase method, purification of myristoylated MA protein (Myr-MA) and Myr-Gag has been started and obtained high-purity protein. On the other hand, we synthesized prodrug L-HIPPO and confirmed the virus release inhibitory effect. we succeeded in improving the membrane permeability. Induction of cell death in latently infected cells is currently confirmed.

研究分野：医歯薬学

キーワード：HIV Gag蛋白質 MAドメイン L-HIPPO Lock-in and apoptosis

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

イノシトールリン脂質およびその類縁体は、脂溶性側鎖の有無やリン酸基の数の違いにより、全く異なる生理活性を示すことが明らかにされてきた。その中で2004年に、HIVとホスファチジルイノシトール(4,5)2リン酸(PIP2)の関わりが示された。すなわち、粒子形成にはウイルスの構成蛋白質であるGag蛋白質のMAドメインと細胞膜上のPIP2の結合が重要であると示され、2006年にその結合様式も解かれた。これらの背景から、Gag蛋白質とPIP2との結合を阻害することが抗HIV薬に発展すると期待されたが、この部分を標的とした薬は存在しなかった。そこで、申請者は新たな作用機序を持つ抗HIV薬の創製を目的として、PIP2の骨格をモチーフとしたGag蛋白質阻害剤の合成および生物活性評価を行ってきた。阻害剤の設計を行うにあたって、表面プラズモン共鳴法(SPR)を用いて、様々なイノシトール誘導体とMA蛋白質との結合強度を測定したところ、結合にはリン酸基の数と脂溶性部位が重要であることが確認された(Anraku, *et. al.*, Biochemistry, 2010)。結果をもとに、イノシトールのすべての水酸基にリン酸を導入したIP6に脂溶性部位を導入した非天然型誘導体を8種類合成したところ、L-HIPPO(KD=0.25 μ M)がMA蛋白質と強く結合することを見出した(Tateishi *et. al.*, Organic & Biomolecular Chemistry, 2014)。次に、L-HIPPOの細胞導入法やGag蛋白質阻害、ウイルス放出阻害効果を確認したところ、 α -CDEを細胞内導入キャリアとして用いた場合に効率の良いGag蛋白質の膜結合やウイルス放出を阻害することが確認された。さらに、LHIPPOによりウイルス放出を阻害すると、HIV感染細胞にアポトーシスを誘導することが確認され、この細胞死誘導機序を“Lock-in and apoptosis”と命名した(Figure 1, Tateishi *et. al.*, Scientific Reports, 2017)。

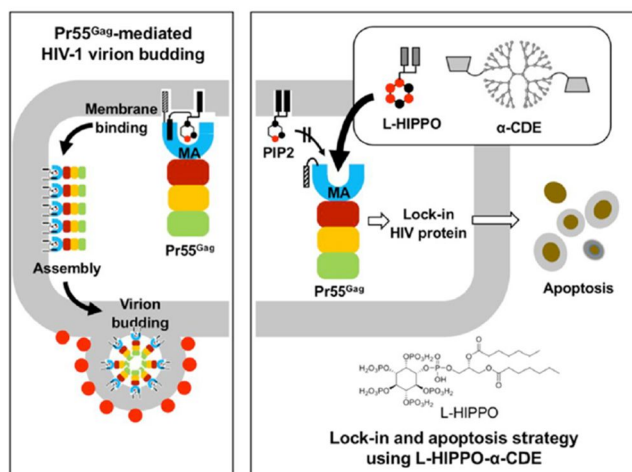


Figure 1. Lock-in and apoptosisの概略図

2. 研究の目的

エイズ治療の最大の目標はいかに潜伏感染細胞を取り除くかということである。そこで、本研究では、Lock-in and apoptosis法を用いた潜伏感染細胞の完全除去を目標とし、L-HIPPOの発展のため以下の検討を行うこととした。

X線結晶構造解析によるMAドメインとL-HIPPOの結合様式の解明およびそれに基づいた構造の改良

細胞導入率の改善を目指したL-HIPPOおよび誘導体のプロドラッグ体の合成
潜伏感染細胞でのアポトーシス誘導実験

3. 研究の方法

X線結晶構造解析によるMAドメインとL-HIPPOの結合様式の解明およびそれに基づいた構造の改良

大腸菌BL21にMA蛋白質発現ベクターを導入し、MA蛋白質の発現を行なった。終夜培養後、破碎して得られた上清をNi-NTAビーズとサイズ排除クロマトグラフィーにより精製した。高純度のMA蛋白質とL-HIPPOを混合し、自動結晶化装置モスキートにより結晶化の条件検討を行なった。Myr-MAまたはMyr-Gagも上記の方法と同様に精製している。L-HIPPOの合成は既に報告している合成法を用いて大量合成を実施した。

細胞導入率の改善を目指したL-HIPPOおよび誘導体のプロドラッグ体の合成

プロドラッグ体の合成は、2019年に報告したプロドラッグ体IP6(Pro-IP6)と同様の方法を用いて合成を行なった。

潜伏感染細胞でのアポトーシス誘導実験

ウイルス放出試験は、HeLa 細胞に感染性ウイルスベクターである pNL4-3 を導入し、評価した。潜伏感染細胞は jurkat 由来である J-Lat 細胞株を用いて評価した。

4. 研究成果

X 線結晶構造解析による MA ドメインと L-HIPPO の結合様式の解明およびそれに基づいた構造の改良

MA 蛋白質の発現・精製を行い、L-HIPPO またはその部分構造をもつ IP6 と混合した後、モスキートを用いて結晶化条件の検討を行なった。その結果、L-HIPPO では 1 条件で、IP6 では 2 条件で微結晶が確認された。結晶のサイズや純度を上げるため、pH や沈澱剤の濃度を細かく変更したところ、Figure 2b に示す結晶を得ることに成功した。これら結晶を高エネルギー加速器研究機構内のフォトンファクトリーにて測定したところ、IP6 と MA との結合は確認されたものの L-HIPPO を混合したサンプルでは、MA 蛋白質のみの結晶であった。

IP6 は MA 蛋白質の Lys や Arg が密集している Highly basic region (HBR) に結合していることが確認された。2006 年に Saad らが報告した di-C₈-PIP2 と MA との NMR 解析データと比較を行なったところ、同じ HBR に付近に結合しているものの、関与しているアミノ酸残基が異なっていた (Figure 2c 論文投稿中)。さらに、IP6 は MA 蛋白質の熱安定性を大幅に上昇することが判明した (Figure 2d)。L-HIPPO においても同様の結合様式が予想されるが、IP6 に脂質を導入した L-HIPPO では、MA との結合力が 100 倍以上強いことから、脂質部位の結合様式の解明が、今後の創薬展開に不可欠である。現在、L-HIPPO との結晶化を成功させるために、脂質キュービックフェーズ法による結晶化を行なっている。作成に必要な Myr-MA や Myr-Gag の精製は終了している。

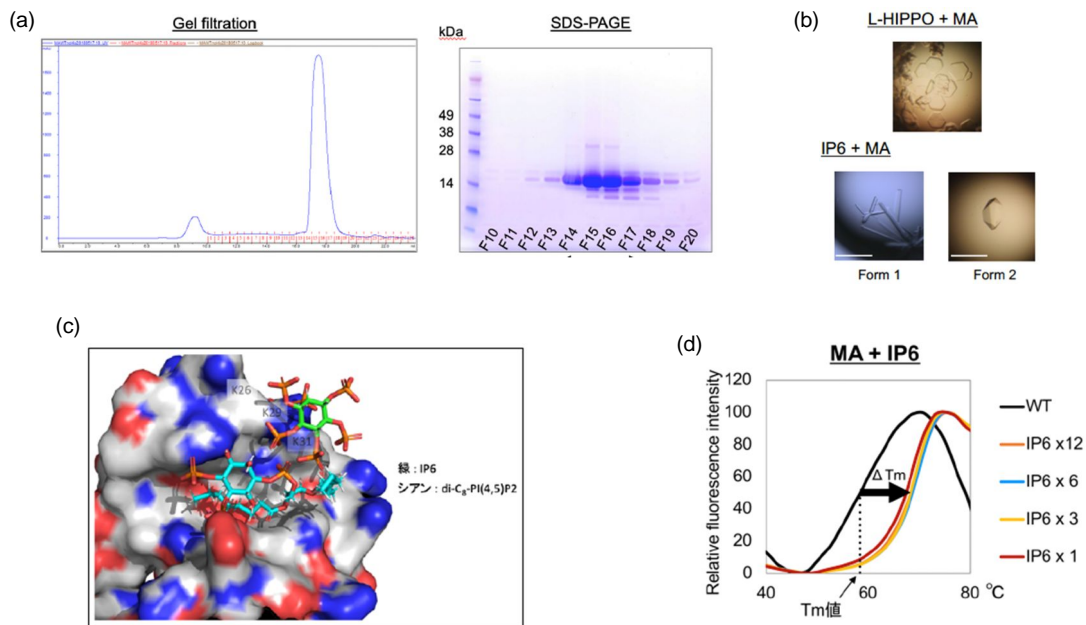


Figure 2. (a) MA 蛋白質の精製 (b) L-HIPPO-MA または IP6-MA の結晶 (c) MA 蛋白質に対する IP6 と PIP2 の結合様式の比較 (d) MA 蛋白質の熱安定性試験

細胞導入率の改善を目指した L-HIPPO および誘導体のプロドラッグ体の合成

結晶化やプロドラッグ化に L-HIPPO が必要であったため、以前報告した方法を用いて L-HIPPO を約 1g ほど合成した。L-HIPPO のプロドラッグ化については、過去に報告した IP6 のプロドラッグ化と同様の方法を用いて、リン酸基ヘプチルオキシメチル基の導入を検討ところ、収率 15% でプロドラッグ化 L-HIPPO (Pro-L-HIPPO) の合成に成功した。収率改善のため、IP6 を用いて反応条件の変更を行なったところ、収率を 60% まで向上し、1g 以上のスケールでも安定した収率で得ることに成功した。

潜伏感染細胞でのアポトーシス誘導実験

まず、今回作成した Pro-L-HIPPO が細胞内導入キャリアーなしに細胞膜を透過可能か、ウイルス放出試験により確認した。HeLa 細胞に感染性ウイルスベクターである pNL4-3 を導入し、25 μM の Pro-L-HIPPO を加えたところ、60% ほどウイルス放出を阻害していた。次に、293T 細胞より作成したシュードウイルスを Jurkat 細胞に感染し、先程と同様に 25 μM の Pro-L-HIPPO を加えたところ、こちらでも 60% のウイルス放出阻害が確認された。これらの結果より、Pro-L-HIPPO の膜透過性を改善することに成功し単剤での使用が可能であると考えられる。さらに、潜伏感染

細胞モデルとして J-Lat 細胞株を用いて、アポトーシスが誘導を検討した。まず、L-HIPPO+ α -CDE(細胞内導入キャリアー)を用いて細胞生存を調べたところ、L-HIPPO を処理した群では有意に細胞数が減少していることが確認された。現在、死細胞の定量法や Pro-L-HIPPO での試験を実施中である。

以上より、Lock-in and apoptosis 法は潜伏感染細胞の除去さらには HIV の根絶につながることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Radwan Mohamed O., Takaya Daisuke, Koga Ryoko, Iwamaru Kana, Tateishi Hiroshi, Ali Taha F.S., Takaori-Kondo Akifumi, Otsuka Masami, Honma Teruki, Fujita Mikako	4. 巻 28
2. 論文標題 Interruption of Vif/Elongin C interaction: In silico and experimental elucidation of the underlying molecular mechanism of benzimidazole-based APOBEC3G stabilizers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 115409 ~ 115409
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2020.115409	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 Ali Taha F.S., Taira Naomi, Iwamaru Kana, Koga Ryoko, Kamo Masahiro, Radwan Mohamed O., Tateishi Hiroshi, Kurosaki Hiromasa, Abdel-Aziz Mohamed, Abu-Rahma Gamal El-Din A.A., Beshr Eman A.M., Otsuka Masami, Fujita Mikako	4. 巻 30
2. 論文標題 HSP70 induction by bleomycin metal core analogs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 127002 ~ 127002
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2020.127002	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 Shida Wataru, Tateishi Hiroshi, Tahara Yurika, Fujita Mikako, Husham Majeed Alsaadi Doaa, Watanabe Masato, Koga Ryoko, Radwan Mohamed O., Ciftci Halil I., Gezici Sevgi, Kurauchi Yuki, Katsuki Hiroshi, Otsuka Masami, Sugimura Koji, Wada Mikiyo, Sekeroglu Nazim, Watanabe Takashi	4. 巻 24
2. 論文標題 Antileukemic Activity of Twig Components of Caucasian Beech in Turkey	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 3850 ~ 3850
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules24213850	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 I. Ciftci Halil, O. Radwan Mohamed, E. Ozturk Safiye, Ulusoy N. Gokce, Sozer Ece, E. Ellakwa Doha, Ocak Zeynep, Can Mustafa, F.S. Ali Taha, I. Abd-Alla Howaida, Yayli Nurettin, Tateishi Hiroshi, Otsuka Masami, Fujita Mikako	4. 巻 24
2. 論文標題 Design, Synthesis and Biological Evaluation of Pentacyclic Triterpene Derivatives: Optimization of Anti-ABL Kinase Activity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 3535 ~ 3535
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules24193535	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 -

1. 著者名 Radwan Mohamed O., Ciftci Halil I., Ali Taha F. S., Ellakwa Doha E., Koga Ryoko, Tateishi Hiroshi, Nakata Akiko, Ito Akihiro, Yoshida Minoru, Okamoto Yoshinari, Fujita Mikako, Otsuka Masami	4. 巻 24
2. 論文標題 Antiproliferative S-Trityl-L-Cysteine -Derived Compounds as SIRT2 Inhibitors: Repurposing and Solubility Enhancement	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 3295 ~ 3295
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules24183295	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 Masunaga Takuya, Murao Naoki, Tateishi Hiroshi, Koga Ryoko, Ohsugi Takeo, Otsuka Masami, Fujita Mikako	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 ~ 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 -

1. 著者名 Radwan Mohamed O., Koga Ryoko, Hida Tomohiro, Ejima Tomohiko, Kanemaru Yosuke, Tateishi Hiroshi, Okamoto Yoshinari, Inoue Jun-ichiro, Fujita Mikako, Otsuka Masami	4. 巻 29
2. 論文標題 Minimum structural requirements for inhibitors of the zinc finger protein TRAF6	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 2162 ~ 2167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2019.06.050	査読の有無 無
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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 立石大
2. 発表標題 人工イノシトールリン脂質誘導体を用いた新規HIV-1根絶法の開発
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第14回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 立石大
2. 発表標題 IP6によるHIV制御メカニズムの解明とその誘導体L-HIPPOを用いたHIV根治薬の開発
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔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