

機関番号：82603  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20590403  
 研究課題名（和文）沖縄で急増するエイズの防御に向けた新規治療薬創製と  
 ヒト化マウスモデルを用いた評価  
 研究課題名（英文）Development of a novel therapeutic for AIDS rapidly disseminating in  
 Okinawa and evaluation of it using humanized mouse model  
 研究代表者  
 大隈 和（OKUMA KAZU）  
 国立感染症研究所・血液・安全性研究部・室長  
 研究者番号：80315085

研究成果の概要（和文）：エイズ／ヒト免疫不全ウイルス1型(HIV-1)感染症の制御に向けた新規薬剤候補として、HIV-1受容体を発現する組換え水疱性口内炎ウイルス(VSV)とCXCR4アンタゴニストを検討した。*In vitro*や、ヒト末梢血単核球或いはヒト臍帯血由来造血幹細胞を移植した免疫不全マウス（ヒト化マウス）を用いたHIV-1感染実験系で評価したところ、両者の候補とも明らかなHIV-1感染抑制効果を認め、新規治療薬候補としての可能性を有していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：As candidates for novel drugs to control AIDS/human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection, a recombinant vesicular stomatitis virus (VSV) expressing HIV-1 receptors and CXCR4 antagonist were evaluated. *In vitro* and in immunodeficient mice transplanted with human peripheral blood mononuclear cells or with human hematopoietic stem cells (humanized mice), both candidates could inhibit HIV-1 infection definitely, indicating that they have a potentially therapeutic value for AIDS/HIV-1 infection.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	0	1,900,000
2009年度	900,000	0	900,000
2010年度	900,000	0	900,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	0	3,700,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：ヒト免疫不全ウイルス1型、エイズ、新規治療薬、感染実験動物モデル、ヒト化マウス

## 1. 研究開始当初の背景

エイズ／HIV感染症克服のため多剤併用療法HAARTが開始され、この治療法により、エ

イズ発症やHIV感染を抑制することが認められたが、HIV感染者やエイズによる死亡者の増加は世界的には未だ歯止めがかかってい

ない。またそれらの抗 HIV 薬の長期使用に伴う副作用などの様々な弊害も明らかになってきており、特に種々の多剤耐性 (MDR) ウイルス株の出現による治療効果の減弱が新たな脅威となっている。

そこでこれらの薬剤耐性ウイルスに対抗するために、これまでとは作用機序の異なった新たなエイズ医薬品／抗 HIV 療法を早期に開発することが必要不可欠である。

## 2. 研究の目的

本研究課題の目的は、我が国を含めて世界に蔓延するエイズ／HIV 感染症の制圧に貢献することである。特に治療困難な MDR ウイルス感染を効果的に防御しうる新規エイズ医薬品候補を創製し、その実効性をヒト化マウスを用いた感染動物モデルで評価し、これまでとは作用機序の異なる治療法を確立することである。

## 3. 研究の方法

(1) *In vitro* において細胞や、ヒト免疫機構を構築したヒト化マウスに HIV-1 を感染させ、HIV-1 の増殖性・病原性を検討した後、創製された新規エイズ医薬品候補を予防的或いは治療的に投与して、これらの新規エイズ医薬品候補の実効性を評価する。得られたデータを基に、優れた抗 HIV (特に MDR ウイルス) 療法の確立、それら医薬品候補の臨床応用の可能性に向けた研究開発を目指す。

(2) ヒト化マウスは、ヒトの細胞を免疫不全マウス系統に移植して作製されたキメラマウスである。このマウスでは種々の HIV 株が感染増殖し、CD4 陽性ヘルパー T 細胞を枯渇するため、HIV 感染に対する新規薬剤の治療効果を評価することが可能である。これまでに開発されてきたヒト化マウスには 2 系統あり、ヒト末梢血単核球 (PBMC) を移植したマウス及びヒト造血幹細胞を移植したマウスである。前者では HIV の急性感染、後者では HIV の慢性感染が顕著に見られる。

(3) 新規治療薬候補のひとつは、HIV-1 X4 株 (CXCR4 指向性) 或いは R5 株 (CCR5 指向性) の感染細胞を特異的に標的とする組換え VSV である。自己のエンベロープ蛋白を欠損し、代わりに HIV-1 受容体を発現する組換え VSV は、エンベロープ蛋白を細胞表面に発現している HIV-1 感染細胞に、エンベロープ蛋白と受容体との相互作用により、特異的に結合／

重感染し、その細胞をアポトーシスにより死滅させると考えられる。その結果、HIV-1 のリザーバーである感染細胞が次々と破壊されるため、HIV-1 のウイルス量を顕著に減少させることが期待される。

期待した効果が得られない場合、組換え VSV に追加導入する宿主因子を検討する。HIV-1 感染細胞 (活性化 CD4 陽性 T 細胞) に特異的に高発現している強力な接着分子のパートナー (OX40L 等) が候補である。これらの分子の一つを組換え VSV 表面に HIV-1 受容体に加えて発現させれば、それらの接着作用を介して組換え VSV がさらに効率よく HIV-1 感染細胞に結合し、HIV-1 感染細胞殺傷効果を増強できると期待される。

(4) 新規治療薬候補のもうひとつは、HIV-1 X4 株の細胞侵入阻害剤である CXCR4 アンタゴニスト (クレハ生物医学研究所から供与) である。CXCR4 アンタゴニストは、競合的に補助受容体である CXCR4 分子に結合することによって、HIV-1 X4 株の補助受容体への結合を阻止し、宿主細胞内へのエントリーを妨げる新規薬剤候補である。

本研究でまず用いられる CXCR4 アンタゴニスト KRH-1636 は、腹腔内投与のみ可能な原型であるが、期待した効果が得られない場合、その誘導体、特により臨床応用に即した (より投与が平易な) 経口投与が可能な誘導体を作製し、その効果を検討する。

## 4. 研究成果

(1) *In vitro* において、HIV-1 受容体を発現する組換え VSV は HIV-1 持続感染細胞株を特異的に殺傷し、その結果 HIV-1 野生株 (実験室適応株) の感染を抑制した。またこの効果は、接着分子 OX40L を一過性に組換え VSV 表面に取込めると有意に増強された。

(2) HIV-1 受容体を発現する組換え VSV は、*in vitro* において緑色蛍光色素 (EGFP) を発現する組換え HIV-1 X4 株が感染した T 細胞株やヒト PBMC を特異的に殺傷し (EGFP 発現細胞が顕著に減少)、その結果 HIV-1 感染増殖を著明に抑制することができた。またこの効果は、OX40L をコードする遺伝子の VSV ゲノムへの追加挿入により有意に増強された。

(3) EGFP を発現する組換え HIV-1 R5 株が感染した T 細胞株に、HIV-1 受容体を発現する組換え VSV を接種したところ、コントロールよりも EGFP 発現 (HIV-1 感染) 細胞が著明に減

少し、その結果、培養上清中の HIV-1 p24 量が低下し感染増殖が顕著に抑制された。またこの効果は、OX40L をコードする遺伝子の VSV ゲノムへの追加挿入により明らかに増強された。

(4) ヒト PBMC を移植した免疫不全マウス（ヒト化マウス）に HIV-1 の実験室適応野生株を感染させて急性感染モデルを構築し、このマウスに HIV-1 受容体を発現する組換え VSV を投与したところ、マウス内の HIV-1 の感染増殖は顕著に抑制された。

(5) CXCR4 アンタゴニストは、*in vitro* において臨床分離株や MDR ウイルスを含めた種々の HIV-1 X4 株の感染に対し有効性を示した。また、ヒト PBMC を免疫不全マウスに移植しヒト化マウスを構築した後、CXCR4 アンタゴニストを予防的に投与し、HIV-1 野生株（実験室適応株）を感染させたところ、コントロール薬剤に比べ、顕著に感染増殖が抑制されることが分かった。

(6) ヒト臍帯血由来造血幹細胞を免疫不全マウスに移植し、ヒト化マウスを構築した。このヒト化マウスに HIV-1 実験室適応野生株を感染させて、持続感染モデルを作製した。その後、HIV-1 受容体を発現する組換え VSV を接種したところ、効果は限定的であるものの、コントロールに比べ血漿中の HIV-1 ウイルス量、p24 量が低下し感染増殖が抑制された。また、実験観察期間の最終日に脾細胞を採取し、HIV-1 プロウイルス量を測定したところ、同様の効果が認められた。

(7) 本研究で用いられた組換え VSV 及び CXCR4 アンタゴニストは、これまでの薬剤とは異なった作用機序を持ち、上記の結果から、エイズ/HIV-1 (MDR ウイルスを含む) の新規治療薬候補としての可能性を有していることが示唆された。

## 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 2 件)

① Okuma K, Tsuruno C, Takahashi Y, Tanaka R, Tanaka Y, Takahama Y, Hamaguchi Y, Hamaguchi I, Yamaguchi K, A recombinant vesicular stomatitis virus encoding HIV-1 receptors and human OX40 ligand

efficiently eliminates HIV-1-infected CD4-positive T cells expressing OX40, *Human Immunology*, 査読有、72(4)、2011、295-304

② Murakami T, Kumakura S, Yamazaki T, Tanaka R, Hamatake M, Okuma K, Huang W, Toma J, Komano J, Yanaka M, Tanaka Y, Yamamoto N, The novel CXCR4 antagonist, KRH-3955 is an orally bioavailable and extremely potent inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 infection: comparative studies with AMD3100, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 査読有、53(7)、2009、2940-2948

[学会発表] (計 10 件)

① 大隈 和、ヒト化 NOG マウスを用いた X4 HIV-1 標的組換え VSV の治療効果の検討、第 24 回日本エイズ学会学術集会、2010 年 11 月 25 日、東京

② Okuma K、A recombinant vesicular stomatitis virus encoding HIV-1 receptors and OX40 ligand as a novel potential anti-HIV-1 therapeutic agent、XVIII International AIDS Conference、July 19, 2010、Vienna, Austria

③ 大隈 和、新規バイオ治療薬候補のヒト化マウス感染モデルを用いた評価: CCR5 指向性 HIV-1 感染細胞を選択的に破壊する組換えウイルス VSV、第 23 回日本エイズ学会学術集会、2009 年 11 月 28 日、名古屋

④ 大隈 和、R5 HIV-1 感染細胞を標的とし感染を制御する組換えウイルス VSV、第 22 回日本エイズ学会学術集会、2008 年 11 月 27 日、大阪

[その他]

ホームページ

<http://www.nih.go.jp/niid/safety/safety3.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大隈 和 (OKUMA KAZU)

国立感染症研究所・血液・安全性研究部・室長

研究者番号：80315085

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

田中 勇悦 (TANAKA YUETSU)  
琉球大学・免疫学講座・教授  
研究者番号：30163588

藤田 次郎 (FUJITA JIRO)  
琉球大学・感染症態制御学講座・教授  
研究者番号：80209076