

機関番号：17401  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20591206  
 研究課題名（和文）新規低分子化合物による抗 HIV - 1 中和抗体感受性の特異的増強とメカニズムの解析  
 研究課題名（英文） Analysis for a mechanism of anti-HIV-1 neutralizing antibody enhancement by a novel low molecular weight compound.  
 研究代表者  
 吉村 和久（YOSHIMURA KAZUHISA）  
 熊本大学・エイズ学研究センター・准教授  
 研究者番号：60315306

研究成果の概要（和文）：低分子化合物 NBD-556 は、CD4 が結合したときと同様に gp120 の立体構造を大きく変化させ、中和単クローン抗体の反応性を著しく増強することをこの基盤研究により証明した。NBD-556 存在下では、中和単クローン抗体だけでなく、患者血清 IgG で同時期に分離されたウイルスを中和できるようになる。これらの結果は、この NBD 化合物が免疫増強作用を持つ低分子化合物として、新しい抗 HIV 治療の道を開くことが期待される。

研究成果の概要（英文）： Combinations of NBD-556 with anti-gp120 MAbs showed highly synergistic interactions against HIV-1. We further found that after enhancing the neutralizing activity by adding NBD-556, the contemporaneous virus became highly sensitive to antibodies in the patient's plasma. These findings suggest that small compounds such as NBDs may enhance the neutralizing activities of CD4i and anti-V3 Abs in vivo.

#### 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：HIV-1、中和抗体、低分子化合物、NBD-556、gp120、中和抗体増強剤

#### 1. 研究開始当初の背景

HIV-1 の Env の立体構造を変化させるものとして CD4 分子が知られている。HIV-1 の gp120 は細胞表面に存在する CD4 分子に結合した後、形を変え（CD4 cavity の形成）、V3 loop が露出し、co-receptor である CCR5 もしくは CXCR4 に結合した後、gp41 が標的細胞に刺入され膜融合が起りウイルスゲノムが細胞内に放出される。このような一連の吸着・侵入の過程において、ウイルスの Env は劇的に立体構造を変化させていくが、一方で、この間はそれまでエピトープを中和抗体か

ら守っていた三量体による立体遮蔽を一時的に解除することになる。つまり、それまで抵抗性であった抗体に対して感受性になることを意味する。最も端的な例は、CD4 誘導エピトープ抗体（CD4i Ab）で、この種類の抗体は、可溶性 CD4 分子（sCD4）が存在する時のみ強い中和活性を示す。また、ある種の抗 V3 抗体も、sCD4 存在下で中和感受性が増強することが知られている。ただし、実際の感染では、このような脆弱な状態が維持される時間は短く、細胞表面とも近接しているため、中和抗体が反応するために必要な物理的空

間を確保することは困難と考えられている。そのため実際の感染の場では大きな問題とはならないが、細胞表面以外でこのような無防備な構造を惹起できれば中和抗体に感受性ウイルスに変えることができるといえる。

## 2. 研究の目的

In vivo に存在する中和抗体の多くは、エンベロープに反応エピトープが保存されているにもかかわらず、中和能がほとんど見られない。これは、HIV-1 のエンベロープが三量体を形成しエピトープを遮蔽しているためと考えられている。この立体遮蔽を解除し中和抗体が中和エピトープに到達可能となれば、既に体内に存在する多くの抗体でウイルスを中和できるようになる。そのような作用を持つ化合物を開発できれば、ウイルスの中和抗体からの逃避メカニズムを知る上でも重要なツールになる。また、治療用抗 HIV-1 抗体との併用薬剤としても有望となる。このように HIV-1 のエンベロープに立体構造変化を起こさせる低分子化合物を見つけることで、ウイルスがより中和抗体感受性となるようにできれば、新たな HIV 治療の方向性を見出すことが可能となるであろう。

## 3. 研究の方法

HIV-1 のエンベロープに立体構造変化を起こさせる低分子化合物(NBD-556)の合成を行い、抗ウイルス効果と抗体の反応性の変化を MTT assay と FACS で解析した。PM1/CCR5 細胞に NBD-556 または sCD4 存在下で 11IB ウイルスを感染させ、NBD-556 は 50mM (21 passage)、sCD4 は 20mg/ml (5 passage) まで培養を続け、耐性ウイルスを誘導した。また、耐性変異アミノ酸を持った pseudovirus を作製し、NBD-556 と sCD4 に対する感受性を野生株のエンベロープを持つものと比較検討した。広範囲ウイルス中和抗体 KD-247(抗 V3 抗体)や 4E9C (CD4i 抗体)を用いて、この抗体の中和感受性の増強効果を確認した。また、感染症例からウイルスと血清 IgG を分離精製し、中和実験を行った。

## 4. 研究成果

低分子化合物 NBD-556 が gp120 の立体構造を大きく変化させ、中和抗体の反応性を増強することを証明し、この化合物が非常に有望な HIV のエンベロープ構造変化誘導物質であることを示した。また、NBD-556 の in vitro 耐性誘導により、その結合部位が sCD4 の場所に非常に近いこともわかった (図-1)。

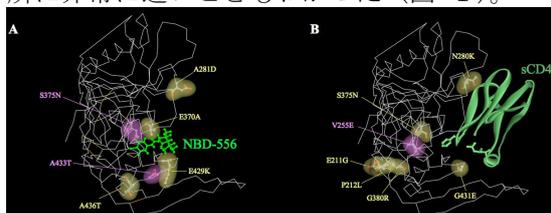


図-1 NBD-556(A) と sCD4(B) の耐性誘導の結果認められたアミノ酸変異部位。

次に、実際にどのような抗体の中和感受性を増強するのかを各種の中和抗体と感染症例の血清から精製した IgG を用いて検討した。治療用抗 HIV-1 抗体として開発が進んでいる広範囲ウイルス中和抗体 KD-247(抗 V3 抗体)や熊本大学エイズ学研究センター(松下プロジェクト研究室)で樹立された 4E9C (CD4i 抗体)を用いて、NBD-556 存在下における中和感受性の増強効果を検討した。その結果、NBD-556 非存在下では、全く中和しなかった両抗体が、NBD-556 を 5 $\mu$ M 加えただけで、IC<sub>50</sub> がそれぞれ KD-247 は 10 $\mu$ g/ml、4E9C は 20 $\mu$ g/ml で中和するようになった。次に、我々が分離した臨床ウイルスの中で、同じ症例から精製した血清 IgG に対して中和抵抗性のウイルスでかつ、NBD-556 存在下では中和されるようなウイルスがあるかどうかを調べた。今回使用した臨床分離ウイルスは、同時期の血清 IgG が 200 $\mu$ g/ml 存在していても中和されなかった。しかし NBD-556 が 4 $\mu$ M 存在すれば、血清 IgG が 20 $\mu$ g/ml でも 50%以上の抑制が見られるようになった(図-2)。このことは、ウイルスと同時期に存在する血中の抗体は、中和エピトープが変異しているために中和できなくなっているのではなく、エンベロープの三量体構造の中にエピトープが隠されているためであることを示している。

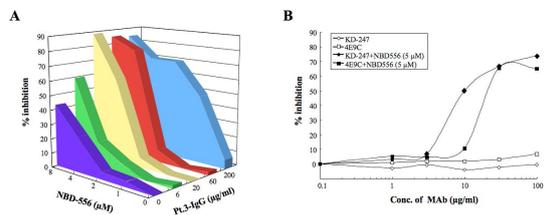


図-2 NBD-556 による中和活性増強効果。

A. 感染症例 (Pt. 3) から精製した血清 IgG が、同時期に同じ症例から分離したウイルス (HIV-1<sub>Pt. 3</sub>) に対し、NBD-556 を加えることで中和できるようになった。B. KD-247(抗 V3 MAb) と 4E9C (CD4i MAb) は、NBD-556 を 5 $\mu$ M 加えることにより、臨床分離ウイルスを中和できるようになった。

## 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 6 件)

- ① Narumi, T., Ochiai, C., Yoshimura, K., Harada, S., Tanaka, T., Nomura, W., Arai, H., Ozaki, T., Ohashi, N.,

- Matsushita, S., Tamamura, H. CD4mimics targeting the HIV entry mechanism and their hybrid molecules with a CXCR4 antagonist. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20:5853-5858, 2010. 査読有
- ② Yoshimura, K., Harada, S., Shibata, J., Hatada, M., Yamada, Y., Ochiai, C., Tamamura, H., Matsushita, S. Enhanced exposure of human immunodeficiency virus type 1 primary isolate neutralization epitopes through binding of CD4 mimetic compounds. *J Virol*, 84:7558-7568, 2010. 査読有
- ③ Hatada, M., Yoshimura, K., Harada, S., Kawanami, Y., Shibata, J., Matsushita, S. HIV-1 evasion of a neutralizing anti-V3 antibody involves acquisition of a potential glycosylation site in V2. *J Gen Virol*, 91: 1335-1345, 2010. 査読有
- ④ Yamada, Y., Ochiai, C., Yoshimura, K., Tanaka, T., Ohashi, N., Narumi, T., Nomura, W., Harada, S., Matsushita, S., Tamamura, H. CD4 mimics targeting the mechanism of HIV entry. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20: 354-358, 2010. 査読有
- ⑤ Aoki, M., Venzon, D.J., Koh, Y., Aoki-Ogata, H., Miyakawa, T., Yoshimura, K., Maeda, K. and Mitsuya, H. Non-cleavage site gag mutations in amprenavir-resistant HIV-1 predispose HIV-1 to rapid acquisition of amprenavir resistance but delays development of resistance to other protease Inhibitors. *J. Virol.* 83:3059-3068, 2009. 査読有
- ⑥ Ryo, A., Tsurutani, N., Ohba, K., Kimura, R., Komano, J., Nishi, M., Soeda, H., Hattori, S., Perrem, K., Yamamoto, M., Chiba, J., Mimaya, J., Yoshimura, K., Matsushita, S., Honda, M., Yoshimura, A., Sawasaki, T., Aoki, I., Morikawa, Y., and Yamamoto, N. SOCS1 is an inducible host factor during HIV-1 infection the intracellular trafficking and stability of HIV-1 Gag. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105:294-299, 2008. 査読有
- [学会発表] (計 17 件)
- ① Harada S., Hamji A., Matsushita S., and Yoshimura K. Evolution and selection of the env gene of HIV-1 primary isolates during in vitro selection of raltegravir. 10th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, 2010.10.6-8, Aso Resort Grandvrio Hotel, Kumamoto, Japan.
- ② Liu M., Shibata J., Harada S., Takehisa J., Yoshimura K., Matsushita S. Impact of a point mutation in V2 (L175P) in neutralization resistance mediated by functional trimer formation of Env. AIDS Vaccine 2010, 2010.9.28-10.1, The Omni Hotel at CNN Center, Atlanta, USA.
- ③ Matsushita S., Mouri S., Harada S., Yamada Y., Tamamura H., Yoshimura K. CD4 mimetic compound-mediated enhancement of the neutralization activities of anti-V3 and CD4i monoclonal antibodies against the standard panel of primary isolates. XVIII International AIDS conference, 2010.7.18-23, The Reed Messe Wien, Vienna, Austria.
- ④ Harada S., Yoshimura K., Kawanami Y., Matsushita S. In vitro selections of raltegravir resistant variants using diverse primary isolates, subtype B, C, CRF01\_AE, and CRF08\_BC. 2010 IYIS, 2010.3.4-5, The Center for AIDS Research, Kumamoto, Japan.
- ⑤ Yoshimura K., Harada S., Matsushita S. Two step escape pathway of the HIV-1 subtype C primary isolate induced by the in vitro selection of Maraviroc. 17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI 2010), 2010.2.16-19, Moscone Center West, San Francisco, USA.
- ⑥ Narahara C., Hatada M., Harada S., Yoshimura K., Matsushita S. A primary R5 isolate undergoes different escape pathway during in vitro selection with low or high concentration of an anti-V3 monoclonal antibody. AIDS Vaccine 2009 Conference, 2009.10.19-22, Marriott Rive Gauche Conference Center, Paris, France.

- ⑦ Yoshimura K., Matsushita S. In vitro induction of HIV-1 resistant to a CCR5. Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium- Satellite Symposium, 2009.9.30, Aso Resort Grandvrio Hotel, Kumamoto, Japan.
- ⑧ Matsushita S., Narahara C., Nishida Y., Honda A., Harada S., Yoshimura K. Mechanism of maintaining a glycan-insertion in HIV-1 gp120 V2 region under pressure of a potent neutralizing antibody in vitro. 10th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, 2009.9.28-29, Hotel Nikko Kumamoto, Japan.
- ⑨ Hatada M., Yoshimura K., Harada S., Matsushita S. Mechanism of maintaining a glycan-insertion in HIV-1 gp120 V2 region under pressure of a potent neutralizing antibody in vitro. 10th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, 2009.9.28-29, Hotel Nikko Kumamoto, Japan.
- ⑩ Ishikawa T., Yoshimura K., Hatada M., Harada S., Matsushita S. Mutations in gp120 of R5 HIV-1 laboratory isolate induced by the in vitro selection of maraviroc confer highly sensitive to anti-V3 monoclonal antibody. 10th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, 2009.9.28-29, Hotel Nikko Kumamoto, Japan.
- ⑪ Yoshimura K., Harada S., Hatada M., Matsushita S. In vitro induction of HIV-1 resistant to a CCR5 antagonist maraviroc. 10th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, 2009.9.28-29, Hotel Nikko Kumamoto, Japan.
- ⑫ Harada S., Yoshimura K., and Matsushita S. Generation of an integrase inhibitor raltegravir resistant variants using recent primary isolates, X4, R5 and dual/mix HIV-1. 10th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, 2009.9.28-29, Hotel Nikko Kumamoto, Japan.
- ⑬ Matsushita S., Narahara C., Morizono M., Nishida Y., Honda-Shibata A., Harada S., Yoshimura, K. Polyclonal antibody response against gp120 including antibodies to V3, CD4bs and CD4i epitopes account for broad neutralization. 5th Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention, 2009.7.19-22, The Cape Town International Convention Centre, Cape Town, South Africa.
- ⑭ Yoshimura K., Harada S., Hatada M., Matsushita S. Mutations in V4 and C4 regions of the HIV-1 CRF08-BC envelope induced by the in vitro selection of Maraviroc Confer cross-resistance to other CCR5 inhibitors. 16th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI 2009), 2009.2.8-11, Palais des Congres de Montreal, Montreal, Canada.
- ⑮ Narahara C., Yoshimura K., Hatada M., Harada S., Matsushita S. Different mutation in HIV-1 gp120 V3-tip region for escape from a potent neutralizing anti-V3 monoclonal antibody during in vitro selection with low or high concentration of the Mab. 9th Kumamoto AIDS Seminar, 2008.9.18-19, Aso Resort Grandvrio Hotel, Kumamoto, Japan.
- ⑯ Hatada M., Yoshimura K., Ishikawa T., Harada S., Matsushita S. The impact of an N-linked glycosylation site insertion in HIV-1 gp120 region to escape from a potent neutralization anti-V3 monoclonal antibody. 9th Kumamoto AIDS Seminar, 2008.9.18-19, Aso Resort Grandvrio Hotel Kumamoto, Japan.
- ⑰ Yoshimura K., Hatada M., Harada S., Shibata J., Masuno H., Tamamura H., Matsushita S. In vitro induction of human immunodeficiency virus type 1 variants resistant to a low-molecular CD4 mimic compound. 9th Kumamoto AIDS Seminar, 2008.9.18-19, Aso Resort Grandvrio Hotel, Kumamoto, Japan.

[その他]  
ホームページ等  
<http://yoshimura-project.pl.bindsite.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉村 和久 (YOSHIMURA KAZUHISA)

熊本大学・エイズ学研究センター・准教授

研究者番号：60315306