

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390254

研究課題名(和文) 免疫淘汰圧に相乗効果を示す抗ウイルス剤の開発

研究課題名(英文) Development of anti-HIV agents that exert synergism with host immune pressure

研究代表者

児玉 栄一 (Kodama, Eiichi)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：50271151

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：HIVの宿主免疫を回避する機能を解明・阻害するために、免疫機能に重要なシグナル伝達を阻害するHIVアクセサリタンパクNefに注目し、免疫回避に重要な部位の新規同定、詳細な機能解析と免疫回避機能を阻害する創薬研究を行った。また免疫不全が進行しない患者におけるNef機能が、通常の患者のそれとは異なることを示した。これまで融合することがなかった免疫学と創薬科学、そして構造生物学知見を加えた融合研究領域の提案から臨床応用への橋渡しを目指す基礎研究成果を得た。

研究成果の概要(英文)：Treatment of HIV, so far, remains to be insufficient. Therefore, development of efficient and safe therapy for HIV infection is urgently needed. Here, we focus on one of essential accessory viral proteins, Nef that has pivotal role in escape from host immune system, through immunological, rational drug design, and structural features. We newly identified novel domains for down regulation of MHC class I, and HIV receptors CD4 and CCR5, and established a screening system for Nef antagonists. Furthermore, we revealed impaired Nef functions in the elite controllers. Our findings will provide insights into further successful therapies and development of effective vaccines.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HIV 抗ウイルス剤 免疫淘汰 スクリーニング アクセサリタンパク

1. 研究開始当初の背景

HIV 感染症は、他の先進国において横ばいもしくは減少傾向がみられる一方で、日本では依然、増加傾向が続いている。幸いにも多剤併用が功をなして感染者の予後は保たれているが、長年にわたる治療、それに伴う治療費の増大や副作用の問題などが大きいのしかかっている。研究代表者は耐性 HIV に効果を有する複数の薬剤を開発してきた。そのうち日本たばこ産業株式会社と共同開発したインテグラーゼ阻害剤エルビテグラビルは純粋に日本で開発された薬剤であり、平成 25 年から本邦でも認可されている。一方で研究分担者の上野は、200 例を超える日本人 HIV 感染者検体の nef 遺伝子、感染者ヒト白血球抗原 (HLA) アリル、細胞障害性 T 細胞 (CTL) 応答の解析を通して、Nef の機能性領域に認められる CTL 逃避変異が Nef の主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) や HIV レセプターである CCR5 の発現抑制作用、ウイルス複製能を減弱化させることを見出ししている。さらに急性感染者や無治療でウイルス複製が制御されている elite controller の Nef の機能と CTL 応答の解析から、種々の Nef 機能制御領域と変異可塑性の特性を明らかにしつつある。

Nef は多機能ウイルスタンパクであり、HIV レセプター・MHC の発現抑制やシグナル伝達リン酸化酵素と相互作用することが知られている。特記すべきは、Nef 遺伝子導入のマウスでのみ AIDS 様免疫不全病態が再現されたことである。しかし、これまで AIDS 様症状に結びつく Nef 機能は明らかとされていないだけでなく、阻害剤も開発されていないことから学術的介入意義がある。

我々は既存の抗ウイルス剤と異なる宿主の免疫淘汰圧を考慮に入れた標的部位の探索創薬を試みることを計画した。宿主免疫回避を担う主要なウイルス因子 Nef の機能阻害は、直接的抗ウイルス作用と免疫系による HIV 排除、薬剤耐性や免疫逃避変異によるウイルス弱毒化を介した相乗効果が期待できる。代表者児玉のこれまでの創薬実績とその耐性、分担研究者上野の Nef 機能に関する研究実績を併せ、構造生物学的アプローチを研究協力者 Sarafianos 博士に依頼する異種分野融合型新規研究領域を提案する。

2. 研究の目的

インフルエンザなど、治療薬もしくは有効なワクチンが開発されたウイルス感染症と異なり、HIV 感染症は未だ治癒や予防が望め

ない。本研究は、安全かつ確実な治療効果を得るために HIV の宿主免疫回避機能を解明・阻害することを目指す新規学術的基礎研究である。宿主細胞における免疫機能に重要なシグナル伝達の阻害、CD4 や MHC などの発現阻害を起こす HIV アクセサリータンパク Nef に注目し、免疫回避に重要な部位の詳細な機能解析と免疫回避機能を阻害しうる創薬研究を行う。これまで融合することがなかった免疫学と創薬科学、そして構造生物学知見を加えた融合研究領域を提案し、臨床応用への橋渡しできる成果を得る。

3. 研究の方法

(1) アッセイ系の確立と発現細胞の選択

Nef のレセプター発現抑制活性を分泌型アルカリフォスファターゼ (SEAP) 活性によって検出するアッセイ系構築のためにベクターを作製し、細胞に遺伝子導入した。スクリーニング系の効率化を図るために、培養期間、使用薬剤量、SEAP 測定用サンプル量などを最適化させた。細胞外分泌シグナルを欠失させた SEAP 変異体では SEAP が細胞内にとどまり、それを Triton-X100 添加で検出できることを予備実験で明らかとした。コンピューターシミュレーションを使用した in silico 解析を可能とさせるために臨床サンプルやこれまでの優勢阻害 (dominant negative) 体の解析を通して、Nef における重要な部位の解析を行った。

(2) Nef dominant negative vector 作製

Nef 変異体を部位特異的変異導入法で作製し、変異体 Nef 発現ベクターと pNL4-3 を用いた分子クローンウイルスを作製し、これらのベクターもしくは組換えウイルスを遺伝子導入または感染させ、宿主細胞表面におけるレセプター発現状況を検討した。併せて、スクリーニングで用いるアッセイ系を用いて定量化を試みた。

(3) 臨床分離株の Nef 機能解析

日本で流行している Nef の遺伝子配列を解析し、HLA 拘束性 CTL 応答が Nef 変異に与える影響の定量的解析した。急性期、慢性期、血友病関連の検体をにおける Nef 機能と病態との関連性を解析した。薬剤スクリーニングにおいて実験室株特異的に効果を示す薬剤を同定する可能性は、臨床分離株パネルを用いることにより克服した。さらに治療によって免疫機能が改善された患者での Nef 機能の変化を明らかにした。これら情報をすべて含

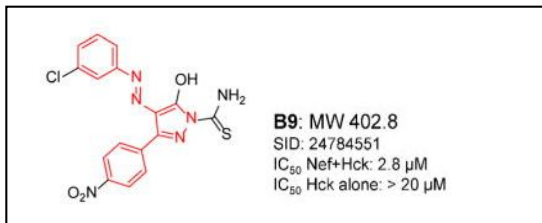
めた上でスクリーニングする対象を戦略的に構築した。

4. 研究成果

(1) 抗 Nef 化合物アッセイ

確立させた抗 Nef 化合物を検出するアッセイ系を用いてスクリーニングを行ったが、保有もしくは購入した化合物は Nef 阻害活性を示さなかった。Nef は様々な宿主リン酸化酵素によって修飾を受けることから、リン酸化酵素阻害剤を検討したが、有望な化合物を見出すことができない状態にある。今後も新しい化合物のスクリーニングを継続する予定である。

一方で、陽性コントロールとしてに米国のグループが報告した化合物 B9 (Emert-Sedlak et al, Chem Biol 20:82-91, 2013) を国内で受託合成し、解析を進めている。



(2) Nef dominant negative の影響

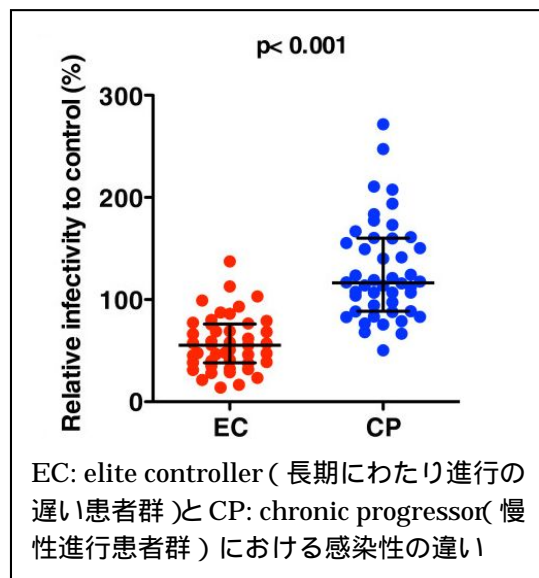
Nef 変異体を組み込んだ真核細胞発現ベクターを遺伝子導入した細胞では一部が感染性やウイルス放出の低下を示した。一方、CD4 発現抑制機能を有する Nef 変異体はそれ自体で、HIV の感染性をほぼ完全に抑制できたが、複製能には大きな影響を及ぼさなかった。

(3) 臨床分離株の Nef 機能解析

Nef の Met-20 などいくつかの極めて保存された領域が、HLA 発現低下機能を担っている。しかし、Nef は変異性が著しく、こうした保存領域にもアミノ酸多型が存在することが知られている。そこで国内の未治療 HIV-1 感染者 654 例から検体を収拾し、HLA 発現低下機能を担う領域の多型を解析した。約 17%の感染者に由来する HIV-1 が Met-20 変異を有していた。感染者の病態マーカーである CD4 数と血中ウイルス量について Nef アミノ酸多型との関連を調べたところ、20 番目のアミノ酸に変異を有する検体では、有意にウイルス量が多いことが明らかとなった(p=0.009)。このことから、Nef の良く保存された機能性領域のアミノ酸多型は、感染者の病態に影響することを示した。

さらにさまざまな病態にある 91 名の HIV

慢性感染者由来の Nef を用いて CD4 と CCR5 の発現抑制作用を測定し、感染者由来 Nef での両機能の関係、および Nef 多型性と各機能の関連を解析した。その結果、感染者由来 Nef では、CD4 と CCR5 の発現低下活性が非常に強い正の相関を示した。CD4 発現抑制機能を失う代わりに CCR5 抑制機能を得るなどという代償的な傾向は見られず、ウイルスレセプター発現抑制という機能として選択圧を受けていると示唆された。次に、生体内でどのように両機能が制御されているかを明らかにするため、Nef 機能が特に低下している 3 クローンに着目して、機能と変異を詳細に解析した。SF2 株の Nef と感染者由来 Nef とのキメラを作ることにより、各機能を回復させる責任領域をマッピングした。その結果、一つの Nef クローンは、CD4 発現抑制機能は N および C 末端のどちらを入れ替えても回復されなかったが、CCR5 発現抑制機能は C 末端側のみを入れ替えることで回復した。また、別の Nef クローンは、C 末端に位置する特定のアミノ酸変異を元に戻すことで両機能が回復した。こうしたことから、生体内では、さまざまな変異を組み合わせることにより、Nef の CD4 および CCR5 発現抑制機能を状況に応じて維持または変化させることで、生体内での環境に適応しているものと示唆された。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 26 件)

Jingyan Chen, Nadine Tibroni, Daniel Sauter, Johanna Galaski, Toshiyuki Miura, Galit Alter, Birthe Mueller, Claudia Haller, Bruce D. Walker,

Frank Kirchhoff, Zabrina L. Brumme, Takamasa Ueno, Oliver T. Fackler. Modest Attenuation of HIV-1 Vpu Alleles Derived from Elite Controller Plasma. *PLoS ONE* **10**:e0120434, 2015. 査読有, doi: 10.1371/journal.pone.0120434.

Chihiro Motozono, John S. Bridgeman, David A. Price, Andrew K. Sewell and Takamasa Ueno. Clonotypically similar hybrid $\alpha\beta$ TCRs can exhibit markedly different surface expression, antigen specificity and cross-reactivity. *Clinical & Experimental Immunology* In printing. 査読有, doi: 10.1111/cei.12610

Saeko Yanaka, Takamasa Ueno, Yi Shi, Jianxun Qi, George F. Gao, Kouhei Tsumoto and Kenji Sugase. Peptide-dependent Conformational Fluctuation Determines the Stability of the Human Leukocyte Antigen Class I Complex. *Journal of Biological Chemistry* **289**:24680-90.2014. 査読有, doi: 10.1074/jbc.M114.566174

Kenji Maeda, Darshan V Desai, Manabu Aoki, Hiroto Nakata, Eiichi N Kodama, Hiroaki Mitsuya. Delayed emergence of HIV-1 variants resistant to 4'-ethynyl-2'-fluoro-2'-deoxy-adenosine: comparative sequential passage study with lamivudine, tenofovir, emtricitabine and BMS-986001. *Antiviral Therapy* **19**:179-89, 2014. 査読有, doi:10.3851/IMP2697

Eleftherios Michailidis, Andrew D. Huber, Emily M. Ryan, Yee T. Ong, Maxwell D. Leslie, Kayla B. Matzek, Kamalendra Singh, Bruno Marchand, Ariel N. Hagedorn, Karen A. Kirby, Lisa C. Rohan, Eiichi N. Kodama, Hiroaki Mitsuya, Michael A. Parniak, and Stefan G. Sarafianos. 4'-Ethynyl-2'-fluoro-2'-deoxy-adenosine (EFdA) inhibits HIV-1 reverse transcriptase with multiple mechanisms. *Journal of Biological Chemistry* **289**:24533-48, 2014. 査読有, doi:10.1074/jbc.M114.562694.

Nozomi Kuse, Tomohiro Akahoshi, Hiroyuki Gatanaga, Takamasa Ueno, Shinichi Oka, Masafumi Takiguchi. Selection of T18-8V mutant associated with long-term control of HIV-1 by cross-reactive HLA-B*51:01-restricted cytotoxic T cells. *Journal of Immunology* **193**:4814-4822, 2014. 査読有, doi:10.4049/jimmunol.1401419

Xiaomei Kuang, Xiaoguang Li, Gursev Anmole, Philip Mwimanzi, Aniqah Shahid, Anh Le, Louise Chong, Hua Qian, Toshiyuki Miura, Tristan Markle, Bemuluyigza Baraki, Elizabeth Connick, Eric Daar, Heiko Jessen, Anthony Kelleher, Susan Little, Martin Markowitz, Florencia Pereyra, Eric S. Rosenberg, Bruce Walker,

Takamasa Ueno, Zabrina Brumme, and Mark Brockman. Impaired Nef function is associated with early control of HIV-1 viremia. *Journal of Virology* **88**:10200-10213, 2014. 査読有, doi:10.1128/JVI.01334-14

Philip Mwimanzi, Tristan J Markle, Yoko Ogata, Eric Martin, Michiyo Tokunaga, Macdonald Mahiti, Xiaomei T Kuang, Bruce D Walker, Zabrina L Brumme, Mark A Brockman and Takamasa Ueno Dynamic range of Nef functions in chronic HIV-1 infection. *Virology* **439**:74-80, 2013. 査読有, doi:10.1016/j.virol.2013.02.005

Kazuki Izumi, Kumi Kawaji, Fusako Miyamoto, Kazuki Shimane, Kazuya Shimura, Yasuko Sakagami, Toshio Hattori, Kentaro Watanabe, Shinya Oishi, Nobutaka Fujii, Masao Matsuoka, Mitsuo Kaku, Stefan G. Sarafianos, and Eiichi N. Kodama. Mechanism of Resistance to S138A Substituted Enfuvirtide and its Application to Peptide Design. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **45**:908-915, 2013. 査読有, doi:10.1016/j.biocel.2013.01.015

Kazuki Shimane, Kumi Kawaji, Fusako Miyamoto, Shinya Oishi, Kentaro Watanabe, Yasuko Sakagami, Nobutaka Fujii, Kazuya Shimura, Masao Matsuoka, Mitsuo Kaku, Stefan Sarafianos, and Eiichi Kodama. HIV-1 resistance mechanism to an electrostatically constrained peptide fusion inhibitor that is active against T-20-resistant strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **57**:4035-4038, 2013. 査読有, doi:10.1128/AAC.00237-13

Eleftherios Michailidis, Emily M Ryan, Atsuko Hachiya, Karen A Kirby, Bruno Marchand, Maxwell D Leslie, Andrew D Huber, Yee T Ong, Jacob C Jackson, Kamalendra Singh, Eiichi N Kodama, Hiroaki Mitsuya, Michael A Parniak and Stefan G Sarafianos. Hypersusceptibility Mechanism of Tenofovir-Resistant HIV to EFdA. *Retrovirology* **10**:65, 2013. 査読有, doi:10.1186/1742-4690-10-65

Atsuko Hachiya, Aaron Reeve, Bruno Marchand, Eleftherios Michailidis, Yee Ong, Karen Kirby, Maxwell Leslie, Shinichi Oka, Eiichi Kodama, Lisa Rohan, Hiroaki Mitsuya, Michael Parniak, and Stefan Sarafianos. Evaluation of combinations of 4'-ethynyl-2'-fluoro-2'-deoxyadenosine with clinically used antiretroviral drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **57**: 4554-4558, 2013. 査読有, doi:10.1128/AAC.000083-13

〔学会発表〕(計 26 件)

Zhe Li, Karen Kirby, Bruno Marchand, Michailidis Eleftherios, Eiichi Kodama, Hiroaki Mitsuya, Michael Parniak, Stefan Sarafianos. Structural Basis of Inhibition and Resistance Mechanism to EFdA, a Highly Potent NRTI. The annual Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Seattle, WA(United States), Feb. 23-26, 2015

Kamori D, Murakami T, Hasan Z, Meribe S, Carlson J, Siarot L, Miura T, Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A, Gatanaga H, Oka S, Aida Y, Ueno T. Effects of natural variability of Vpr on immunological footprints and protein functions. Keystone Symposia HIV Vaccines (X5), Banff, Alberta(Canada), March 22-27, 2015.

Mahiti M, Jia X, Toyoda M, Mwimanzzi F, Walker BD, Brumme ZL, Brockman MA, Xiong Y, Ueno T. Differential down-regulation of the HLA class I allotypes by HIV-1 Nef primary isolate. The annual Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI). Seattle, WA(United States), Feb 23-26, 2015

Toyoda M, Ogata Y, Mahiti M, Pereyra F, Miura T, Walker BD, Brumme ZL, Brockman MA, Ueno T. Dynamic range of down-regulation of HIV-1 entry receptors by primary Nef isolates. The annual Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI). Seattle, WA(United States), Feb 23-26, 2015

Stanley C. Meribe, Zafrul Hasan, Hiroyuki Gatanaga, Toshiyuki Miura, Ai Kawana-Tachikawa, Aikichi Iwamoto, Shinichi Oka, Takamasa Ueno. Linkage between disease status and a naturally-arising mutation in functional region of HIV-1 Nef. The 21st Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI 2014), Boston, MA (United States), March 3-6, 2014.

X. Kuang, A Le, P Mwimanzzi, T Markle, R Danroth, T Ueno, T Miura, B Walker, Z Brumme, M Brockman, and the Acute HIV and International HIV Controllers study group. Reduced HIV-1 Nef Function in Acute/Early Individuals who become Viremic Controllers. 20th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI), Georgia World Congress Center, Atlanta, GA (United States). March 3-6, 2013.

Macdonald Mahiti, Philip Mwimanzzi, Yoko Ogata, Michiyo Tokunaga, Bruce Walker, Zabrina Brumme, Mark Brockman, Takamasa Ueno. Naturally-arising amino acid polymorphisms of

HIV-1 Nef that differentially modulate downregulation of HLA-A and HLA-B molecules. Frontiers of Retrovirology conference, at Churchill College, Cambridge(UK). September 16th -18th 2013

6 . 研究組織

(1)研究代表者

児玉 栄一 (KODAMA, Eiichi)
東北大学大学院医学系研究科・講師
研究者番号：50271151

(2)研究分担者

上野 貴将 (UENO, Takamasa)
熊本大学エイズ学研究センター・准教授
研究者番号: 10322314