

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 21 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591485

研究課題名(和文) Non-B HIV-1のEnv立体構造に影響を与える新規侵入阻害剤の開発

研究課題名(英文) Development of novel entry inhibitors with inducing conformational change of Non-B HIV-1 envelope.

研究代表者

吉村 和久 (Yoshimura, Kazuhisa)

国立感染症研究所・その他部局等・その他

研究者番号：60315306

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：HIV-1 Subtype Non-B株のCD4 cavityに結合し、侵入を阻害するだけでなく立体構造変化を惹起する可能性の高い低分子化合物の設計、合成を行うことを主たる目的として研究を継続して行った。Envに結合し侵入阻害および構造変化を起こす化合物の候補としてベツリン酸誘導体(BA誘導体)を試し、Subtype B同様、C及びBCの感染阻害効果が認められるBA誘導体(IC9564)を確認できた。これらの結果は、この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)：We found many novel entry inhibitors (Betulinic acid analogues) that could inhibit infection of HIV-1. We also found that combinations of the Betulinic acid analogues with anti-gp120 MAbs showed synergistic interactions against HIV-1 not only subtype B but also subtype non-B. These findings suggest that small compounds such as Betulinic acid analogues may enhance the neutralizing activities of CD4i and anti-V3 Abs in vivo.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HIV-1 entry inhibitors Betulinic acid envelope

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。これまで我々は、HIV-1 の Subtype B においては CD4mimic の NBD 誘導体を用いることで中和抗体感受性に変更できることを報告してきた。この研究では、non B においても同様の化合物を開発していきたいと考えた。

2. 研究の目的

In vivo において、HIV-1 に対する抗体の多くは、エンベロープ (Env) 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、Env が三量体を形成しその立体構造によりエピトープを遮蔽しているためと考えられている。つまり、この立体遮蔽を解除できれば多くの抗体がウイルスを中和できるようになる。平成 20-22 年度の科学研究費補助金基盤研究 (C) (課題番号: 20591206) で、Subtype B の HIV-1 の Env に立体構造変化を起こさせ、抗体の HIV 中和感受性を増強させる低分子化合物 (NBD-556) を発見して報告した (Yoshimura et al., *JV*, 2010, 84:7558-68)。今回、この NBD-556 をもとに、現在世界中で広がりを見せる Non-B (特に Subtype C) HIV-1 にも効果的な低分子化合物の開発を目指す。

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を見つけるため、多くのベツリン酸誘導体の合成を行い、抗ウイルス効果と抗体の反応性の変化を TZM-bl assay で解析した。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) を用いて、この抗体の中和感受性の増強効果を確認した。

4. 研究成果

HIV-1 Subtype Non-B 株の CD4 cavity に結合し、侵入を阻害するだけでなく立体構造変化を惹起する可能性の高い低分子化合物の設計、合成を行うことを主たる目的として研究を開始した。多くの NBD 誘導体 (Subtype B の立体構造変化を惹起する CD4 mimic 低分子化合物) をスクリーニングしたが、Non-B (特に Sub C) を B と同等に侵入阻害する誘導体はこれまでまだ見つかっていない。そこで、NBD 骨格ではないが Env に結合し同様に侵入阻害および構造変化を起こす化合物の候補としてベツリン酸誘導体 (BA 誘導体) を試した。その結果、Subtype B 同様、C 及び BC の感染阻害効果が認められる BA 誘導体 (IC9564) を確認できた。また、FACS 解析の結果少なくとも Subtype B の構造変化を起こしている事も分かった。一方で、Subtype non-B の HIV-1 株を臨床サンプルから分離する試みを進行させている。申請者らは、簡便にしかも確実に R5 ウイルスを分離するために、CCR5 高発現 T 細胞株である PM1/CCR5 細胞を用いてウイルス分離を行う方法を確立している。このウイルス分離の系を用いて、現在まで 60 以上の subtype B 及び non-B の臨床分離株を樹立してきた。今後も広範囲の Subtype non-B の HIV-1 臨床分離株を樹立し、広い範囲の臨床分離ウイルスパネルを構築することを引き続き行っていく。今後これらのパネルウイルスを用いて、合成した新規 CD4 mimic 低分子化合物に対する感受性を比較検討し、より広範囲な Subtype non-B 株に反応する化合物の選定を行うことが可能となる。

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 11 件)

1. Matsushita S, Yoshimura K, Ramirez K-P, Pisupati J, Jenkins J, Murakami T on behalf of the KD-1002 Study Group. Passive transfer of neutralizing monoclonal antibody KD-247 reduces plasma viral load in patients chronically infected with HIV-1. *AIDS*, 29, 453-462, 2015.

2. Ramirez K-P, Kuwata T, Maruta Y, Tanaka K, Alam M, Yoshimura K, Matsushita S. Complementary and synergistic activities of anti-V3, CD4bs and CD4i antibodies derived from a single individual can cover a wide range of HIV-1 strains. *Virology*, 475, 187-203, 2015.
 3. Kirby KA, Ong YT, Hachiya A, Laughlin TG, Chiang LA, Pan Y, Moran JL, Marchand B, Singh K, Gallazzi F, Quinn TP, Yoshimura K, Murakami T, Matsushita S, Sarafianos SG. Structural basis of clade-specific HIV-1 neutralization by humanized anti-V3 monoclonal antibody KD-247. *The FASEB Journal*, 25, 70-80, 2015.
 4. Yoshimura K^{†*}, Harada S[†], Boonchawalit S, Kawanami Y, Matsushita S*. Impact of maraviroc-resistant and low-CCR5-adapted mutations induced by in vitro passage on sensitivity to anti-envelope neutralizing antibodies. *Journal of General Virology*, 95, 1816-1826, 2014. *Corresponding author † These authors contributed equally.
 5. Chie Hashimoto, Tetsuo Narumi, Hiroyuki Otsuki, Yuki Hirota, Hiroshi Arai, Kazuhisa Yoshimura, Shigeyoshi Harada, Nami Ohashi, Wataru Nomura, Tomoyuki Miura, Tatsuhiko Igarashi, Shuzo Matsushita, and Hirokazu Tamamura. A CD4 mimic as an HIV entry inhibitor: *Pharmacokinetics. Bioorganic & Medical Chemistry*, 21, 7884-7889, 2013. 査読有り。
 6. Hiroyuki Otsuki, Takayuki Hishiki, Tomoyuki Miura, Chie Hashimoto, Tetsuo Narumi, Hirokazu Tamamura, Kazuhisa Yoshimura, Shuzo Matsushita, and Tatsuhiko Igarashi. Generation of a replication-competent simian-human immunodeficiency virus, the neutralisation sensitivity of which can be enhanced in the presence of a small molecule CD4 mimic. *Journal of General Virology*, 94, 2710-2716, 2013. 査読有り。
 7. Takeo Kuwata, Kaori Takaki, Ikumi Enomoto, Kazuhisa Yoshimura, and Shuzo Matsushita. Increased infectivity in human cells and resistance to antibody-mediated neutralization by truncation of the SIV gp41 cytoplasmic tail. *Front. Microbiol.*, 4, 117, 2013. 査読有り。
 8. Takeo Kuwata, Kaori Takaki, Kazuhisa Yoshimura, Ikumi Enomoto, Fan Wu, Ilnour Ourmanov, Vanessa M. Hirsch, Masaru Yokoyama, Hironori Sato, and Shuzo Matsushita. Conformational epitope consisting of the V3 and V4 loops as a target for potent and broad neutralization of simian immunodeficiency viruses. *J. Virol.*, 87, 5424-5436, 2013. 査読有り。
 9. Tetsuo Narumi, Hiroshi Arai, Kazuhisa Yoshimura, Shigeyoshi Harada, Yuki Hirota, Nami Ohashi, Chie Hashimoto, Wataru Nomura, Shuzo Matsushita, and Hirokazu Tamamura. CD4 mimics as HIV entry inhibitors: Lead optimization studies of the aromatic substituents. *Bioorganic & Medical Chemistry*, 21, 2518-2526, 2013. 査読有り。
 10. Shigeyoshi Harada, Kazuhisa Yoshimura, Aki Yamaguchi, Samatchaya Boonchawalit, Keisuke Yusa, and Shuzo Matsushita. Impact of antiretroviral pressure on selection of primary human immunodeficiency virus type 1 envelope sequences in vitro. *Journal of General Virology*, 94, 933-943, 2013. 査読有り。
 11. Masaru Yokoyama, Satoshi Naganawa, Kazuhisa Yoshimura, Shuzo Matsushita, and Hironori Sato. Structural Dynamics of HIV-1 Envelope Gp120 Outer Domain with V3 Loop. *PLoS ONE*, 7: e37530, 2012. 査読有り。
- 〔学会発表〕(計 18件)
1. Shigeyoshi Harada, Yu Irahara, Samatchaya Boonchawalit, Mai Goryo, Hirokazu Tamamura, Tetsuro Matano, Shuzo Matsushita, Kazuhisa Yoshimura. Mutations at the bottom of the Phe43 cavity are responsible for cross-resistance to NBD analogues. The annual Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI) 2015, Seattle, USA, 2.23-26, 2015.
 2. Kazuhisa Yoshimura. Impact of the Drug-Escaped HIV Envelope Mutations on Susceptibility to Neutralizing Antibodies. 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID), AIDS Panel Meeting, Taipei, Taiwan, 1. 28-29, 2015.
 3. Shigeyoshi Harada, Masaru Yokoyama, Samatchaya Boonchawalit, Hironori Sato, Shuzo Matsushita, Kazuhisa Yoshimura. Resistance Profile of CD4

- Mimic Small Compounds (CD4MCs) and the Structure Analysis by Molecular Dynamic (MD) Simulation. HIV Research For Prevention (HIVR4P) 2014, Cape Town, South Africa, 10.28-31 2014.
4. Shigeyoshi Harada, Masaru Yokoyama, Samatchaya Boonchawalit, Hironori Sato, Shuzo Matsushita, Kazuhiya Yoshimura. Genetic and Structure-Function Analyses of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Escape from CD4 Mimic Small Compounds (CD4MCs). 15th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 10.1-3. 2014.
 5. Samatchaya Boonchawalit, Shigeyoshi Harada, Shuzo Matsushita, Kazuhiya Yoshimura. Impact of maraviroc (MVC)-resistant mutations in the C1 and C4 regions of gp120 on sensitivity to antibody-mediated neutralization. 15th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 2014.10.1-3.
 6. Samatchaya Boonchawalit, Shigeyoshi Harada, Shuzo Matsushita, Kazuhiya Yoshimura. Impact of Maraviroc (MVC)-resistant mutations in C1 and C4 regions of gp120 on sensitivity to antibody-mediated neutralization. 20th International AIDS Conference Melbourne, Australia, 2014.7.20-25.
 7. Shigeyoshi Harada, Samatchaya Boonchawalit, Tetsuo Narumi, Hirokazu Tamamura, Shuzo Matsushita, Kazuhiya Yoshimura. Impact of CD4 mimetics-resistant mutations on susceptibilities to anti-Env nMAbs. 21th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI2014), Boston, MA, U.S.A., 2014.
 8. Shigeyoshi Harada, Samatchaya Boonchawalit, Tetsuo Narumi, Hirokazu Tamamura, Shuzo Matsushita, Kazuhiya Yoshimura. In vitro selection of bifunctional CD4 mimic small compounds (NBD analogues) using bulk and cloned primary isolates. 14th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 2013.
 9. Samatchaya Boonchawalit, Shigeyoshi Harada, Shuzo Matsushita, Kazuhiya Yoshimura. Analysis of relationships between Maraviroc (MVC) resistant mutations and sensitivity to antibody-mediated neutralization. 14th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 2013.
 10. Yuki Hirota, Tetsuo Narumi, Kazuhiya Yoshimura, Shigeyoshi Harada, Chie Hashimoto, Wataru Nomura, Tatsuhiko Igarashi, Shuzo Matsushita, Hirokazu Tamamura. Indole-type small CD4 mimic molecules targeting an HIV envelope protein gp120. 14th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 2013.
 11. Shigeyoshi Harada, Samatchaya Boonchawalit, Shuzo Matsushita, Kazuhiya Yoshimura. Analysis of interaction between gp120 and CD4 mimic small compounds that enhance the activity of anti-HIV neutralizing antibodies. AIDS Vaccine 2013, Barcelona, Spain, 2013.
 12. Samatchaya Boonchawalit, Shigeyoshi Harada, Shuzo Matsushita, Kazuhiya Yoshimura. Characterization of highly neutralizing antibody sensitive HIV-1 gp120 induced under high concentrations of maraviroc (MVC) in vitro. AIDS Vaccine 2013, Barcelona, Spain, 2013.
 13. Shigeyoshi Harada, Samatchaya Boonchawalit, Tetsuo Narumi, Hirokazu Tamamura, Shuzo Matsushita, Kazuhiya Yoshimura. CD4 mimic small compounds, NBD-556 and its analogues bind at 3 amino acid positions in the gp120 CD4 cavity. 20th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI 2013), Atlanta, GA, U.S.A., 2013.
 14. Kazuhiya Yoshimura, Shigeyoshi Harada, Samatchaya Boonchawalit, Shuzo Matsushita. Impact of maraviroc-resistant and low CCR5-adapted mutations induced in vitro passage on sensitivity to anti-Env neutralizing antibodies. 20th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI 2013), Atlanta, GA, U.S.A., 2013.
 15. Yoshimura K, Harada S, Boonchawalit S, and Matsushita S. Impact of Maraviroc-resistant and low CCR5-adapted mutations induced in vitro passage on sensitivity to anti-Env neutralizing antibodies. 20th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI 2013), Atlanta, U.S.A., 3.3-6, 2013.

16. Harada S, Boonchawalit S, Narumi T, Tamamura H, Matsushita S, Yoshimura K. CD4 mimic small compounds, NBD-556 and its analogues bind at three amino acid positions in the gp120 CD4 cavity. 20th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI 2013), Atlanta, U.S.A., 3.3-6, 2013.
17. Harada S, Boonchawalit S, Narumi T, Tamamura H, Matsushita S, Yoshimura K. In vitro induction of twelve CD4 mimic small compounds, NBD-556 and its analogues, resistant variants using primary R5 HIV-1. 13th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, Kumamoto, Japan, Oct.24-26, 2012.
18. Harada S, Arai H, Narumi T, Tamamura H, Matsushita S, Yoshimura K. In vitro induction of ten CD4 mimic small compounds, NBD-556 and its analogues, resistant variants using primary R5 HIV-1. 19th International AIDS Conference, Washington, D.C., U.S.A., 7.22-28, 2012.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www0.nih.go.jp/niid/arc-11/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉村和久(ヨシムラカズヒサ)

研究者番号: 60315306