

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 15 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791021

研究課題名(和文) ヒト免疫不全ウイルスの細胞間感染による薬剤感受性・ウイルス複製動態への影響

研究課題名(英文) Impact of HIV infection pathway on the potency of antiviral agents

研究代表者

志村 和也 (Shimura, Kazuya)

京都大学・ウイルス研究所・助教

研究者番号：90613836

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：HIVは、細胞外環境中のウイルス粒子によるセルフリー感染経路あるいは感染細胞からの細胞間感染伝播経路で標的細胞に感染する。本研究課題では、HIVの各複製ステップを標的とする種々の抗HIV薬を用いて、両感染経路における薬剤感受性の解析を目的とした。本解析では、蛍光タンパクを組み込んだHIV-1および細胞標識色素を用いることで、経路特異的に感染細胞の割合を定量可能な評価系を構築した。本評価系を用いて解析を進めた結果、評価に用いた抗HIV薬全てにおいて、細胞間感染経路における低感受性が認められた。以上の結果は、HIVの感染経路は抗HIV薬の活性に重要な役割を果たしていることを示している。

研究成果の概要(英文)：HIV infects target cells by two pathways, cell-free infection and cell-to-cell transmission. In cell-free infection, HIV virions present in the intercellular space infect target cells, while in cell-to-cell transmission, HIV is transmitted from infected to uninfected cells through cellular gap. To analyze the effect of infection pathways on drug susceptibility, we established an assay system, in which HIV-1 carrying a fluorescent protein gene, and a cell-labeling dye were utilized for precise quantification of HIV-1-infected cells under cell-free infection and cell-to-cell transmission separately. Using this system, inhibitory activity of anti-HIV drugs targeting several replication steps was evaluated. Overall, weak anti-HIV activity of tested drugs under the cell-to-cell pathway compared to the cell-free pathway with several-fold ranges, was observed. Taken together, infection pathway of HIV affects the activity of anti-HIV drugs.

研究分野：ウイルス感染症学

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 抗ウイルス薬

1. 研究開始当初の背景

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) は、CD4 陽性 T 細胞の減少を誘導し、後天性免疫不全症候群 (AIDS) を引き起こす。ウイルスが発見された当初は、HIV 感染および AIDS 発症は致死的な疾患であった。しかしながら、現在まで続く優れた活性を有する様々な抗 HIV 薬の開発および臨床応用は、HIV 感染症の概念を慢性ウイルス感染症と再定義し、実際に、AIDS 発症の遅延や AIDS 患者の死亡率低減に大きく寄与し続けている。

現在臨床で使用されている抗 HIV 薬は、その標的分子/機構として、細胞侵入、膜融合反応、逆転写酵素、インテグラーゼ、およびプロテアーゼを阻害する。これらを多数組み合わせる多剤併用療法は、HIV 感染者における血中ウイルス量を持続的に低下させるが、感染者体内からのウイルス完全排除は不可能である。この理由の一つとして、ウイルスが持続感染している休止期リンパ球の存在があげられる。これらの細胞は間欠的に活性化を繰り返し、ウイルスを産生する。この結果、検出限界以下のウイルス血症が引き起こされ、抗 HIV 療法下においてもウイルス感染状態が持続する。また、抗 HIV 療法を中断すればそれまで抑えられていた活性化 CD4 陽性 T 細胞への新規感染が起こるため、終生にわたる治療の継続が必要である。

HIV が細胞に感染する経路は、細胞外環境中に存在するウイルス粒子が関与するセelfリー感染系と、感染細胞と非感染細胞間の物理的接触を介した感染伝播が関与する細胞間感染系に大別される。近年、細胞間感染系において抗 HIV 薬存在下でもウイルス複製が起こることが報告され、これが間欠的なウイルス産生の主体である可能性が示唆されている。このように、HIV の細胞間感染による感染拡大や薬剤抵抗性など、HIV 感染経路の重要性が指摘されている。

2. 研究の目的

本研究課題では、HIV の感染経路の違いが薬剤感受性に与える影響を主眼に解析を行い、得られた成果からレトロウイルス複製動態の解明を図る。

3. 研究の方法

(1) 評価系の構築

セelfリー感染経路と細胞間感染経路を

区別して、ターゲット細胞における HIV 感染率を定量するため、種々の細胞・分子生物学的手法を駆使して評価系の構築を行った。

(2) 抗 HIV 薬の活性評価

上記で構築した評価系を用いて、HIV 感染経路別に種々の抗 HIV 薬の活性を評価した。

4. 研究成果

(1) 評価系の構築

はじめに、ドナー細胞およびターゲット細胞の種類ならびに検出法の検討を行った。ドナー細胞とターゲット細胞を区別するため、細胞を蛍光標識することでこれを可能にした。具体的には、ドナー細胞にはヒト T 細胞株である MT-2 あるいは MT-4 細胞に BFP 蛍光タンパクを恒常的に発現するように改変した MT-2/BFP あるいは MT-4/BFP 細胞を用いた。ターゲット細胞には、HIV 感染により GFP 蛍光タンパクが発現する Rev-CEM レポーター細胞を用いた。また、検出法には、HIV 感染を効率的に感度よく測定するためにフローサイトメトリー法を採用した。

細胞間感染系では、ドナー細胞である MT-2/BFP あるいは MT-4/BFP 細胞に HIV-1_{NL4-3} を感染させ、3 日間培養後にターゲット細胞である Rev-CEM 細胞と共培養した。さらに 2 日間培養した後、ターゲット細胞における HIV 感染率 (BFP 陰性かつ GFP 陽性) をフローサイトメーターで定量した。セelfリー感染系では、HIV-1 非感染 MT-2/BFP あるいは MT-4/BFP 細胞と Rev-CEM 細胞を予め混合し、HIV-1_{NL4-3} を感染させた。感染 48 時間後に同様の方法で感染率を定量した。

解析の結果、BFP 陰性かつ GFP 陽性細胞の割合 (HIV-1 感染ターゲット細胞) は約 1% 程度であった。これは抗 HIV 薬非存在下における数値であり、実際の抗 HIV 薬活性評価時にはさらに感染率が低下するため、評価が困難になる可能性がある。そこで、評価系の改良を行った。

(2) 評価系の改良

当初樹立した評価系では、HIV の感染をレポーター細胞で評価した。そこで改良点として、HIV-1 に蛍光タンパクを組み込んだレポーターウイルスを用いることで評価系の改善を図った。具体的には HIV-1_{NL4-3} の nef 領域に BFP 遺伝子を、IRES 配列を介して (BFP-IRES-nef) 組み込んだ感染性クローン pNL-BFP を作製した。細胞間感染系では本ク

ローンをドナー細胞であるヒト T 細胞株 Jurkat 細胞に遺伝子導入し、昼夜培養した後、予め Cell Proliferation Dye (CPD) eFluor 670 あるいは CFSE で標識したターゲット MT-4 細胞と共培養し、30 時間後にターゲット細胞における HIV 感染率 (CPD eFluor 670 陽性かつ BFP 陽性) をフローサイトメーターで定量した。解析の結果、CPD eFluor 670 陽性かつ BFP 陽性 (HIV-1 感染ターゲット細胞) は 10%以上にまで増加し、安定した評価が可能になった。そこで、改良した本評価系を用いて、抗 HIV 薬の活性評価を進めた。

(3) 薬剤の抗 HIV 活性評価

本評価では、CXCR4 特異的侵入阻害剤、融合阻害剤、逆転写酵素阻害剤およびインテグラーゼ阻害剤の各種抗 HIV 薬の活性を HIV 両感染経路で比較した。その結果、評価に供したすべての抗 HIV 薬で、細胞間感染系における低活性が認められた。また、この傾向は特にインテグラーゼ阻害剤で顕著であった。セルフ感染をほぼ完全に阻害する高濃度のインテグラーゼ阻害剤処理でも、細胞間感染系では約 3 割のターゲット細胞で BFP 陽性が認められた。

(4) 細胞間感染系におけるインテグラーゼ阻害剤処理による HIV DNA 量の変化

細胞間感染系においてインテグラーゼ阻害剤処理あるいは未処理のサンプルからセルソーターを用いて CFSE 陽性かつ BFP 陽性の細胞を分取し、DNA を抽出後、リアルタイム PCR にて HIV DNA 量の定量を行った。その結果、インテグラーゼ阻害剤処理により組み込み型 HIV DNA 量は数十倍低下していた。一方で、非組み込み型 HIV DNA である 1-LTR は約 3-5 倍程度、2-LTR 量は約 15-30 倍程度インテグラーゼ阻害剤処理により増加した。この結果より、インテグラーゼ阻害剤処理による細胞間感染系で認められたターゲット細胞での BFP 発現は、非組み込み環状 HIV DNA に由来することが判明した。

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 8 件)

1. Mizuhara T, Kato T, Hirai A, Kurihara H, Shimada Y, Taniguchi M, Maeta H, Togami H, Shimura K, Matsuoka M,

- Okazaki S, Takeuchi T, Ohno H, Oishi S, Fujii N. Structure-activity relationship study of phenylpyrazole derivatives as a novel class of anti-HIV agents. *Bioorg Med Chem Lett*. 査読有, 23(16):4557-61, 2013. doi:10.1016/j.bmcl.2013.06.026.
2. Shimane K, Kawaji K, Miyamoto F, Oishi S, Watanabe K, Sakagami Y, Fujii N, Shimura K, Matsuoka M, Kaku M, Sarafianos SG, Kodama EN. HIV-1 resistance mechanism to an electrostatically constrained peptide fusion inhibitor that is active against T-20-resistant strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 査読有, 57(8):4035-8, 2013. doi:10.1128/AAC.00237-13.
3. Mizuhara T, Oishi S, Ohno H, Shimura K, Matsuoka M, Fujii N. Design and synthesis of biotin- or alkyne-conjugated photoaffinity probes for studying the target molecules of PD 404182. *Bioorg Med Chem*. 査読有, 21(7):2079-87, 2013. doi:10.1016/j.bmc.2013.01.016.
4. Togami H, Shimura K, Okamoto M, Yoshikawa R, Miyazawa T, Matsuoka M. Comprehensive in vitro analysis of simian retrovirus type 4 susceptibility to antiretroviral agents. *J Virol*. 査読有, 87(8):4322-9, 2013. doi:10.1128/JVI.03208-12.
5. Izumi K, Kawaji K, Miyamoto F, Shimane K, Shimura K, Sakagami Y, Hattori T, Watanabe K, Oishi S, Fujii N, Matsuoka M, Kaku M, Sarafianos SG, Kodama EN. Mechanism of resistance to S138A substituted enfuvirtide and its application to peptide design. *Int J Biochem Cell Biol*. 査読有, 45(4):908-15, 2013. doi:10.1016/j.biocel.2013.01.015.
6. Tanaka G, Nakase I, Fukuda Y, Masuda R, Oishi S, Shimura K, Kawaguchi Y, Takatani-Nakase T, Langel U, Gräslund A, Okawa K, Matsuoka M, Fujii N, Hatanaka Y, Futaki S. CXCR4

stimulates macropinocytosis:
implications for cellular uptake of
arginine-rich cell-penetrating
peptides and HIV. Chem Biol. 査読有,
19(11):1437-46, 2012.

doi:10.1016/j.chembiol.2012.09.011.

7. Mizuhara T, Oishi S, Ohno H, Shimura K, Matsuoka M, Fujii N. Structure-activity relationship study of pyrimido[1,2-c][1,3]benzothiazin-6-imine derivatives for potent anti-HIV agents. Bioorg Med Chem. 査読有, 20(21):6434-41, 2012.
doi:10.1016/j.bmc.2012.08.030.
8. Mizuhara T, Oishi S, Ohno H, Shimura K, Matsuoka M, Fujii N. Concise synthesis and anti-HIV activity of pyrimido[1,2-c][1,3]benzothiazin-6-imines and related tricyclic heterocycles. Org Biomol Chem. 査読有, 10(33):6792-802, 2012
doi:10.1039/c2ob25904d.

〔学会発表〕(計3件)

1. 志村和也、大石真也、藤井信孝、松岡雅雄、抗ウイルス薬感受性に対する HIV 感染経路の影響、第 27 回日本エイズ学会学術集会、2013 年 11 月 20 日-22 日、熊本.
2. 志村和也、水原司、大石真也、藤井信孝、松岡雅雄、広範なスペクトルを有する新規抗 HIV 薬の同定とその開発、第 26 回日本エイズ学会学術集会、2012 年 11 月 24 日-26 日、横浜.
3. 戸上博昭、志村和也、宮沢孝幸、松岡雅雄、ニホンザルより検出された SRV-4 に対する抗 HIV 薬の効果、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月 13 日-15 日、大阪.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

1. 名称:ピラゾール誘導体またはその塩ならびにそれらを含む医薬組成物
発明者:加藤貴之、平井敦、松岡雅雄、志村和也
権利者:富士フィルム株式会社、国立大学法人京都大学

種類:特許

番号:特願 2013-092023

出願年月日:2013 年 4 月 25 日

国内外の別:国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/Lab/VirusControl/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

志村 和也 (SHIMURA Kazuya)

京都大学・ウイルス研究所・助教

研究者番号:90613836