

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461510

研究課題名(和文) HIV感染におけるケモカイン受容体の挙動及び受容体阻害剤に関する研究

研究課題名(英文) A study of chemokine receptor dynamics and its inhibitor(s) in HIV infection

研究代表者

中田 浩智 (Nakata, Hirotomo)

熊本大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40628492

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：HIV-1に対して被感染性を喪失したCCR5変異と野生型CCR5を共発現させた野生型/変異型CCR5共発現細胞株を作成し感染実験を行った結果、変異型が10%程度混入しただけで野生型のみ発現させた細胞に比べ被感染性が50%近く低下し、変異が50%程度混入すると被感染性はほぼ喪失した。この結果は、HIV-1の感染成立に複数のCCR5が必要であることを強く示唆している。この変異混入の割合の変化と被感染性の変動を基に数理モデルを作成し、感染に要するCCR5の数を算出したところ、感染成立には6-8個のCCR5が必要である可能性が高いという結果が得られ、HIV感染成立のステップの一端が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We constructed wild type CCR5(CCR5-WT) and mutant CCR5(CCR5-MT), which loses susceptibility against HIV, coexpressing cells and tested HIV infectivity using these cells. 10% and 50% levels of CCR5-MT expression reduced the susceptibility against HIV by 50% and almost 100% compared with only CCR5-WT expressing cells, respectively. This result strongly suggested that multiple CCR5 are required for the HIV entry step. Next we developed a mathematical model based on the correlation between the ratio of CCR5-MT expression and HIV susceptibility, and estimated the numbers of CCR5 required for the HIV infection. As a result we quantitatively estimated 6-8 CCR5s are required for gp120 trimer-CCR5 interaction. These data revealed a part of the entry step of HIV infection.

研究分野：感染症

キーワード：HIV感染症 CCR5 侵入阻害薬

1. 研究開始当初の背景

HIV-1 の主要なコレセプターとして CCR5、CXCR4 が同定され、HIV-1 の侵入は HIV-1 の膜蛋白 gp120 が標的細胞表面の CD4 と結合することで開始され、その後構造を変化させた gp120 がコレセプターと結合、その結果、もう一つの HIV-1 膜蛋白である gp41 が構造変化を来し、ウイルス膜と細胞膜の融合が惹起されると考えられる。しかし、実際に HIV-1 感染成立に必要な CD4 やコレセプターの数、gp41 の構造変化の過程など明らかになっていない部分も多い。また、これらのコレセプターが HIV-1 の侵入に重要な役割を果たすことが明らかになってきたことで、コレセプターを標的とした抗 HIV 薬の開発も行われ、2006 年には CCR5 を標的とした最初の抗 HIV-1 薬である maraviroc が米国 FDA により承認されたが、これに続く薬剤の開発は滞っている。

2. 研究の目的

分子学的手法により HIV-1 侵入過程における CCR5、CXCR4 の動態の詳細な解明を試み、最終的にはそのデータをコンピュータモデリングに応用し、今後のケモカイン受容体阻害剤の開発につなげることを目的とした。

3. 研究の方法

1) 野生型・変異型 CCR5 共発現細胞株の作成
HIV-1 に対して被感染性を喪失する変異 CCR5 発現ベクターと野生型 CCR5 発現ベクターを U373-MAGI (UM) 細胞に cotransfection し、限界希釈法でクローニングし共発現細胞株を作成した。

2) 共発現細胞株における野生型・変異型 CCR5 の発現量の確認
共発現細胞株の RNA を抽出、RT-PCR により CCR5 領域を増幅し、TA クローニング実施。このクローニングベクターを transfection し、得られたコロニーを一定数採取、目的の CCR5 領域についてシーケンスを行い、野生型 CCR5 と変異 CCR5 を含むコロニー数の比率をその細胞株における野生型/変異 CCR5 の比とした。

3) 野生型・変異型 CCR5 共発現細胞株を用いた感染実験

作成した CCR5 共発現細胞株に R5 tropic である HIV-1Ba-L を感染させ、各細胞株の被感染性を評価した。UM 細胞は HIV-LTR により β -galactosidase を発現するため、X-gal により発色した細胞数をカウントし、被感染性の指標とした。

4. 研究成果

(1) 予備実験で我々の感染実験系では、ある程度の CCR5 が発現していれば、細胞株の感染性は CD4 発現量に依存していることが分かった。そこで、CD4 発現量を揃えた細胞で、変異 CCR5 を 50% 程度発現させた場合に HIV 被

感染性がどのように変化するかを調べた。その結果、変異が 50% 程度発現すると被感染性がほぼ失われることがわかった(図 1)。

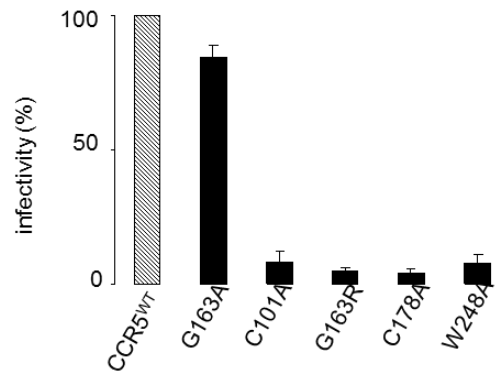


図 1 変異 CCR5 発現の被感染性への影響

被感染性が喪失する変異(C101A、G163R、C178A、W248A)を約 50% 発現させると被感染性は野生型 CCR5 に比べ 10% 以下に低下。被感染性が維持される変異(G162A)では 50% 発現でも被感染性は 80% 程度維持されている。

(2) 変異 CCR5 発現量の変化による被感染性の変化

変異 CCR5 と野生型 CCR5 を様々な比率で発現させた細胞株で被感染性の変化を調べた。その結果、変異 CCR5 が 10% 程度混入すると被感染性は約 50% まで低下し、上述のように 50% の発現で被感染性はほぼ喪失していた。同様の傾向は 4 つの変異 CCR5 すべてで確認された。

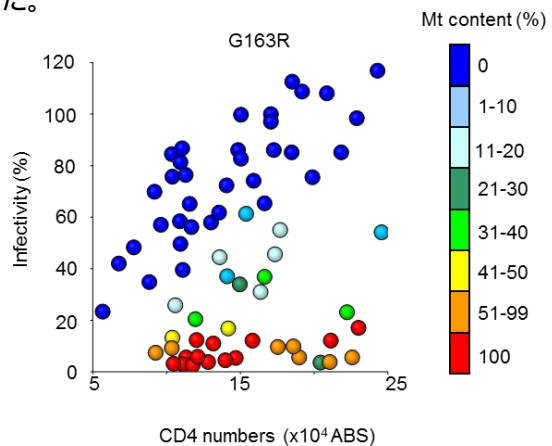


図 2 変異 CCR5 発現量による被感染性の変化
G163R 変異 CCR5 と野生型 CCR5 を様々な比率 (Mt content) で発現させた細胞株で HIV への被感染性を調べた。その結果変異が 10% 発現すると被感染性は野生型のみ (Mt content=0) に比べ 50% 程度に低下。さらに変異が 50% 以上発現すると被感染性は変異型のみ (Mt content=100) と同程度まで低下している。

(3) 数理モデルの構築

上記の結果からは HIV 感染に複数の CCR5 が関係しており、しかもその一部が機能しない CCR5 (変異 CCR5 や阻害剤結合 CCR5) に置き換

わると感染性が著しく低下するという感染モデルが示唆された。これらの実験結果を基に、研究協力者(九州大学 岩見博士)により数理モデルの構築が試みられた。

$$\alpha_m = \sum_{i=m}^3 \binom{3}{i} (1-f)^i f^{3-i}.$$

$$P_{\text{model}} = (\alpha_m)^T.$$

CCR5 の1つのクラスターは3個のCCR5により構成されると仮定し、
 m: 1つのクラスターが機能性を有するために必要な最低限の野生型CCR5の数
 f: 標的細胞上で変異CCR5が発現する率
 T: 感染に必要な機能的クラスターの数
 と定義すると、クラスターが機能的である確率と計算上感染が成立する可能性は上記のような式で表現される。これを実験で得られた実測値と比較し、計算上の推測値と実測値がもっとも近くなるmおよびTを調べた。その結果、m=2.4、T=2.59の時G163Rでは最もフィットすることが分かった。これらの結果から感染成立に必要なCCR5の数は概算で6-7個であった。同様の結果は他の変異CCR5を用いた実験結果でも得られた。すべての変異CCR5での結果を統合すると、感染成立に必要なCCR5の数は6-8個と考えられた。このような数理モデルで得られたHVI感染性の推測値は、CCR5阻害剤のCCR5への結合力(Kd値)と感染阻止力(IC50)の関係も再現できており、CCR5阻害剤が一部のCCR5に結合するだけで強い抗HIV効果を発揮する機序も説明できるものと考えられた。

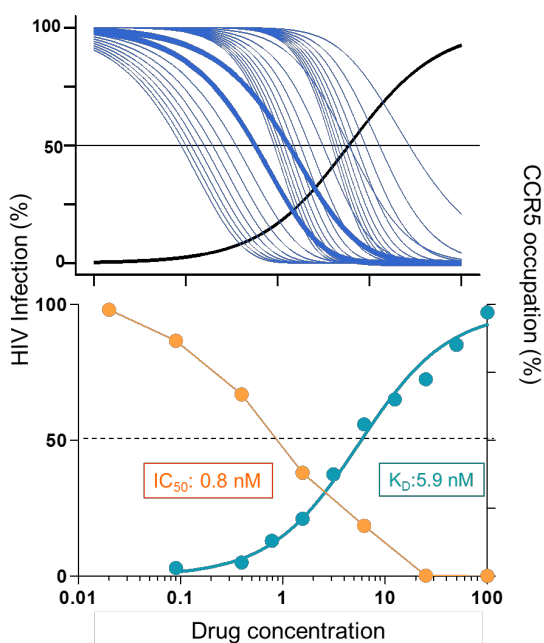


図3 数理モデルにより推測されたIC50値と

実験で求められたKd値、IC50値との比較。様々なm、Tの値を基に推測されたIC50値のラインの中で、m=3、T=2で描いたライン(上パネル太線で描出)は実験で得られたIC50値、Kd値のライン(下パネル)とよく一致していた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3件)

Maeda, K., Desai, D. V., Aoki, M., Nakata, H., Kodama, E. N., Mitsuya, H. Delayed emergence of HIV-1 variants resistant to 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine: comparative sequential passage study with lamivudine, tenofovir, emtricitabine and BMS-986001, *Antivir Ther*, 査読有り, 19, 2014, 179-89
 DOI: 10.3851/IMP2697

Matsuzawa, T., Kawamura, T., Ogawa, Y., Maeda, K., Nakata, H., Moriishi, K., Koyanagi, Y., Gatanaga, H., Shimada, S., Mitsuya, H. EFda, a reverse transcriptase inhibitor, potentially blocks HIV-1 ex vivo infection of Langerhans cells within epithelium, *J Invest Dermatol*, 査読有り 134, 2014, 1158-61
 DOI: 10.1038/jid.2013.467,

Aoki, M., Hayashi, H., Yedidi, R. S., Martyr, C. D., Takamatsu, Y., Aoki-Ogata, H., Nakamura, T., Nakata, H., Das, D., Yamagata, Y., Ghosh, A. K. Mitsuya, H. C-5-Modified Tetrahydropyrano-Tetrahydrofuran-Derived Protease Inhibitors (PIs) Exert Potent Inhibition of the Replication of HIV-1 Variants Highly Resistant to Various PIs, including Darunavir *J Virol*, 査読有り, 90, 2015, 2180-94
 DOI: 10.1128/JVI.01829-15

〔学会発表〕(計 1件)

中田 浩智, Debananda Das, 前田 賢次, Kalapala Venkateswara Rao, Arun K. Ghosh, 満屋 裕明、新規CCR5阻害剤GRL-007の抗HIV活性の検討、2014年12月5日、第28回日本エイズ学会学術集会(大阪)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕なし
 取得状況(計 0件)

〔その他〕
 ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

中田 浩智(Nakata Hirotomo)
 熊本大学 医学部附属病院 講師
 研究者番号: 40628492

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者

前田 賢次(Maeda Kenji)

岩見 真吾(Iwami Shingo)