

第23回日本エイズ学会シンポジウム記録

シンポジウム「これからの抗 HIV 薬研究の進むべき方向」

Perspectives of Anti-HIV Research

馬場 昌範¹⁾, 中田 浩智²⁾, 朝光かおり³⁾, 駒野 淳⁴⁾, 岡本 実佳¹⁾, 杉浦 互⁵⁾
*Masanori BABA*¹⁾, *Hiroto NAKATA*²⁾, *Kaori ASAMITSU*³⁾, *Atsushi KOMANO*⁴⁾,
*Mika OKAMOTO*¹⁾ and *Wataru SUGIURA*⁵⁾

¹⁾ 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科附属難治ウイルス病態制御研究センター, ²⁾ Experimental Retrovirology Section, Medicine Branch, NCI, NIH, USA, ³⁾ 名古屋市立大学大学院医学研究科細胞分子生物学, ⁴⁾ 国立感染症研究所エイズ研究センター, ⁵⁾ 国立病院機構名古屋医療センター/国立感染症研究所

はじめに (馬場昌範)

1985年に満屋博士らによって、最初の抗 HIV 効果である zidovudine が同定されて以来、核酸系逆転写酵素阻害薬、プロテアーゼ阻害薬、そして非核酸系逆転写酵素阻害薬と、異なる作用機序を持った薬剤が次々と実用化された。複数の抗 HIV 薬が出そろったことにより、これらを組み合わせた多剤併用療法が確立され、エイズは「不治の病」から「制御可能な慢性疾患」へと、その姿を大きく変えるに至った。一方で、種々の薬剤を長期間使用することによる、多剤耐性ウイルス出現や長期毒性などの問題が次第に明らかとなってきた。HIV は変異しやすく、これを阻止するためには服薬アドヒランスを高く保つ必要があり、アドヒランスを高く保つためには、服薬回数が少なくてすみ、長期毒性が低い治療薬であることが求められる。つまり、この2つの問題点はお互いに密接な関係を持って存在している。最近では、これらの欠点を改良した新世代の逆転写酵素阻害薬やプロテアーゼ阻害薬が開発されるとともに、インテグラーゼやウイルス侵入機構を標的とした、新しい抗 HIV 薬も実用化され、臨床の現場で使用されるようになった。このように、成熟期に達した感のある抗 HIV 化学療法であるが、既存の耐性ウイルスに有効な新薬が登場したとしても、それに対する薬剤耐性ウイルスの発生を阻止できないと思われる。つまり、新薬開発と耐性ウイルスのいわゆる「いたちごっこ」は当分の間続くと思われる。そこで、本シンポジウムでは、新しいアプローチに基づく治療法の研究をテーマとして、この分野において精力的に研究活動を行っている若手研究者4名に、それぞれの研究成果について発表をして頂き、これからの抗 HIV 薬研究の

進むべき方向について考えてみた。

新しい抗 HIV 薬の標的分子 (駒野 淳, 馬場昌範)

新しい抗 HIV 薬開発には大別して2つの方向性がある。既存の薬剤と同じ分子を標的とするが、既存の治療薬よりも耐性ウイルスに対する効果の点から優れた薬剤の開発と、新規治療標的分子を狙った薬剤の開発である。前者は新世代の非核酸系逆転写酵素阻害薬である etravirine (TMC125) やプロテアーゼ阻害薬である dolutegravir, 後者は最近我が国でも認可された CCR5 阻害薬がその代表例にあたる。新規標的分子を狙った薬剤の開発を考えた場合、標的分子としてのウイルス遺伝子産物には、逆転写酵素に内在する RNase H ドメイン, Env, Gag, Tat, Rev, Vpr, Nef, Vpu, Vif などがある。RNase H ドメイン以外は酵素活性がない。そのため、阻害薬の作用メカニズムはこれらの標的分子に結合してその分子機能を阻害するか、標的分子が機能を発揮するために相互作用する分子との結合を阻害することを狙った薬剤開発になる。前者の例としては Env 機能阻害薬がある。後者は相互作用パートナーがウイルスか宿主遺伝子産物によってさらに2つに分類される。相互作用パートナーがウイルス遺伝子産物の例として、Gag-Gag, Tat-TAR, Rev-RRE などがある。一方、相互作用パートナーが宿主遺伝子産物の例として、Env-CCR5, Env-CD4, Gag-Tsg101, Tat-Cyclin T1, (CycT1), Rev-CRM1, Vpu-Tetherin/BST-2, Vif-APOBEC3G/F などがある。CCR5 阻害薬はここに分類される。これらの分子間相互作用はウイルス複製にとって必須であるため、相互作用阻害薬には選択的な抗 HIV 効果が期待できる。また、現在の薬剤と作用メカニズムが異なるため、既存の薬剤に対する耐性ウイルスにも効果が期待できる。CCR5 阻害薬の臨床的成功を受けて、今後の新規 HIV 感染症治療薬開発はウイルスと宿主因子の相互作用を断ち切るような薬剤の開発に向かうことが予想される。中でも宿主遺伝子産物に結合する阻害薬への期待は高い。

著者連絡先：馬場昌範 (〒890-8544 鹿児島市桜ヶ丘 8-35-1
 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科附属難治ウイルス病態制御研究センター)

2010年4月19日受付

HIV 感染における CCR5 の挙動 (中田浩智)

CCR5 は 7 回膜貫通型構造の G 蛋白質共役型受容体 (G-protein coupled receptor : GPCR) スーパーファミリーの一員であり、CC ケモカインに対する受容体 (ケモカインレセプター) として機能する一方で、同じく GPCR ファミリーに属する CXCR4 と共に HIV 感染の主要なコレセプターの一つとなっている^{1,2)}。近年、HIV の CCR5 への結合を阻害する抗 HIV 薬 maraviroc が米国食品医薬品局 (FDA) で認可され日本でも臨床に供されるなど³⁾、CCR5 は HIV 感染に関連する重要な宿主因子として、様々な側面から研究がなされている。しかしながら、HIV の侵入・接着のステップにおける CCR5 の詳細な動態については、未だに明らかになっていない部分が多い。我々はアミノ酸置換で HIV に対する感染性が著明に低下する 4 種類の変異型 CCR5 を同定、これらの変異を用いて、変異型 CCR5 と野生型 CCR5 を様々な比率で共発現させた細胞株を作成した。これらの細胞株に CCR5 指向性 HIV を感染させ、変異型 CCR5 の発現比率が細胞株の HIV 感染性に与える影響を調べることで、HIV 感染における CCR5 の動態解明を試みた。まず、野生型 CCR5 のみを発現させた細胞株で、発現している CD4 数または CCR5 数と HIV 感染性の間どのような相関があるかを調べると、我々の感染実験系では CCR5 が十分 (10^4 ABS 以上、ABS : antibody binding site) に発現している細胞株では HIV 感染性は主に CD4 数に依存していることがわかった。そこで、CD4 の発現レベルがほぼ等しく、本来同程度の HIV 感染性が期待される数十種の細胞株を用い、変異型 CCR5 と野生型 CCR5 の発現比率を変化させ、細胞株の HIV 感染性がどのように変化するかを調べた。その結果、いずれの変異型 CCR5 を用いた場合でも、変異型 CCR5 の発現比率の増加に伴い細胞株の HIV 感染性の低下が認められた。HIV 感染性の低下は、野生型 CCR5 数が維持されている (10^4 ABS 以上) 細胞株でも観察され、感染性の低下は、野生型 CCR5 数の減少ではなく変異型 CCR5 の発現比率の増加に起因していると考えられた。特に変異型 CCR5 の比率が 50% 近くまで増加すると、野生型 CCR5 数が十分維持されていても、感染性が変異型 CCR5 のみを発現させた細胞株とほぼ同程度まで低下することが分かった。これらの感染実験の結果を詳細に解析することで、我々は (1) HIV の侵入に複数の CCR5 の関与 (cluster 形成) が必要であることを明らかにし (CCR5 cluster モデルの提唱)、更に (2) CCR5 cluster モデルを基にした数学モデルによる、HIV 感染に要する CCR5 数の推定、(3) CCR5 cluster モデルを応用した CCR5 阻害剤の作用発現機序の解明についても検討を行った (図 1)。今回得られた知見は HIV 感染における CCR5 の動態

解明に有用であるだけでなく、CCR5 阻害剤を始めとする侵入阻害剤の開発にも応用可能であると考えられる。

HIV 転写を標的とした新規治療法の開発 (朝光かおり)

HIV 感染症の治療は、HAART 療法が確立され画期的な進歩を遂げた。現在、治療に用いられている薬剤は、逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤が主流であり、最近ではインテグラーゼ阻害剤も上市され臨床応用が可能となっている。しかしながら、これらの薬剤はウイルスの酵素を標的としているため耐性ウイルスの出現を抑えることができず、またその重篤な副作用などからも依然として新規作用機構を持つ抗 HIV 薬が求められているのが現状である。そこで我々が注目したのが HIV プロウイルスからの遺伝子増幅過程である。HIV のライフサイクルを HIV 遺伝子の増幅過程という観点からみると、HIV-RNA から DNA が合成される逆転写の段階と、DNA に組み込まれた HIV プロウイルスからの転写活性化過程に分けることができる。逆転写の段階では、ウイルス RNA は逆転写酵素のもつ RNase H によってただちに分解されるため遺伝情報量の増大は見られないが、HIV プロウイルスからの転写過程ではウイルスの遺伝情報量は何千倍にも増大されるため、この転写過程がウイルス複製の律速段階となる。このプロウイルス DNA から転写は、宿主内転写因子 NF- κ B とウイルス由来転写活性化因子 Tat の作用により綿密に制御されており、これらの転写因子により HIV はレトロウイルスとしては例外的にきわめて多量のウイルス産生がされる。その結果、HIV は様々な病原性や強い伝播性の獲得、容易な宿主免疫や治療薬への耐性の出現が可能となっている。

HIV プロウイルスからの転写を標的とした抗 HIV 戦略を考えた場合、標的分子としてあげられるのは上記の Tat と NF- κ B であり、それぞれ Tat 阻害剤、NF- κ B 阻害剤と定義することができる。これらを標的とした阻害剤の長所として、(1) 現行の HAART 療法と併用可能であり副作用等の軽減をすることができること、(2) 遺伝子の増幅過程をターゲットとしているため、薬剤耐性ウイルス等の出現を抑えることができることがあげられる。Tat 阻害剤に関する短所としては、有効な化合物が得られていないこと、NF- κ B 阻害剤に関しては NF- κ B の作用が多岐にわたるためしばしば副作用が問題になることがあげられる。我々は、これら Tat 阻害剤、NF- κ B 阻害剤のについて日々研究を行っているが、本稿では以下に Tat 阻害薬について紹介する。

Tat はウイルス mRNA の 5' 端にできる TAR と呼ばれるステム・バルジ・ループ構造に、CycT1 と CDK9 からなる P-TEFb と共に複合体を形成し、HIV 遺伝子の転写伸

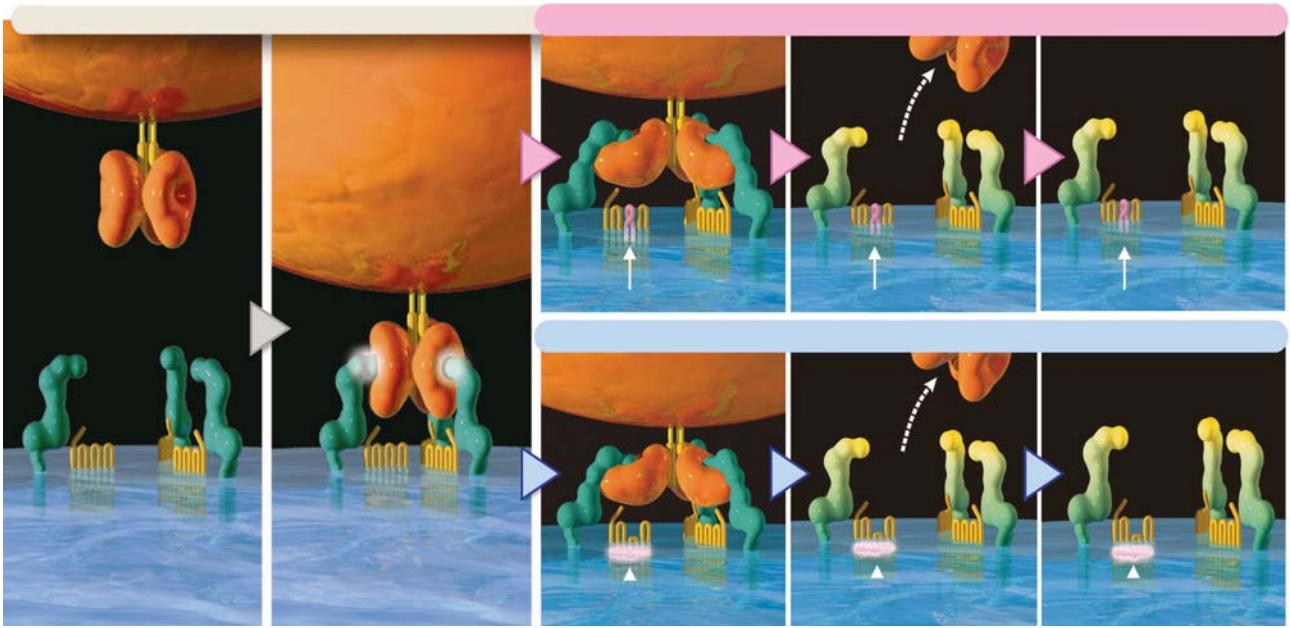


図 1

図 1 CCR5 阻害剤の作用発現機序のモデル。

HIV 感染に関与する複数の CCR5 (CCR5 cluster) の一部に変異型 CCR5 (白矢印) が混入すると、標的細胞の感染に対する感受性が低下する (パネル上段) のと同様に、CCR5 cluster の一部に阻害剤が結合した CCR5 (白矢頭) が存在すると、CCR5 と gp120 との相互作用が阻害され HIV 感染が効果的にブロックされる (パネル下段)。

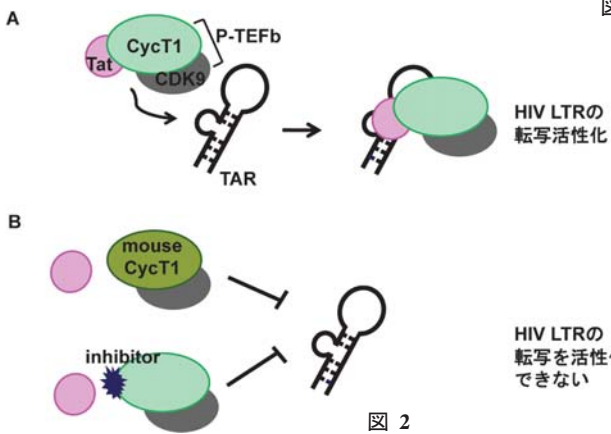


図 2

図 2 Tat による HIV LTR の転写活性化機構。

A) Tat は CycT1 と CDK9 からなる P-TEFb とともに HIV LTR 上の形成される TAR と結合し、HIV 遺伝子の転写を活性化する。B) Tat と結合できないマウス型 CycT1 や、Tat と CycT1 の結合を阻害する阻害剤の存在下では、Tat は TAR と結合できず、従って HIV 遺伝子の転写を活性化できない。

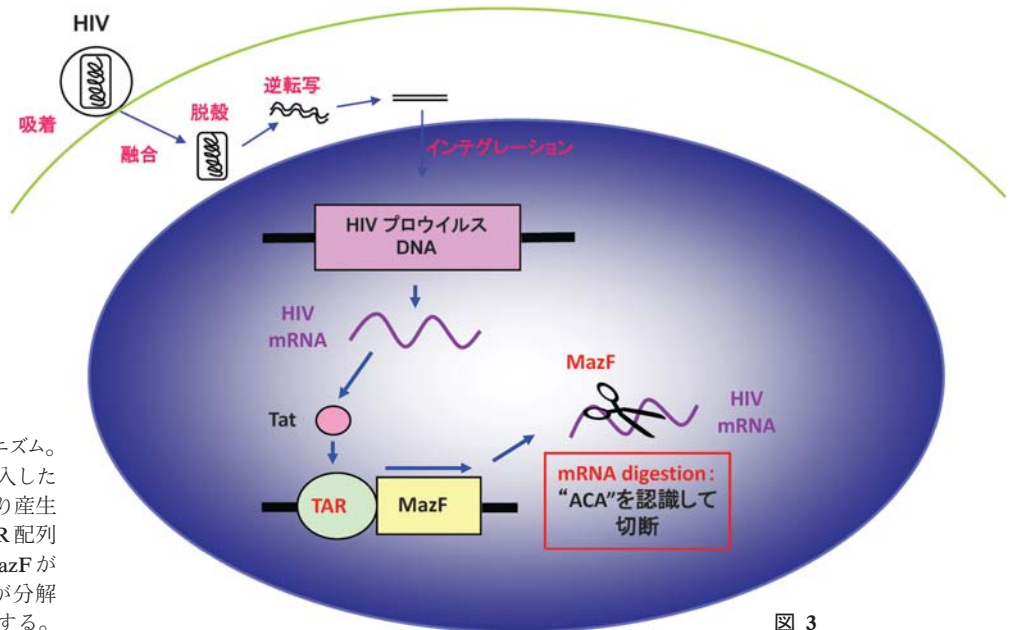


図 3

図 3 MazF の抗 HIV 作用メカニズム。MazF 発現ベクターを導入した細胞では、HIV 感染により産生された Tat 蛋白質が TAR 配列に結合することにより MazF が発現して HIV mRNA が分解され HIV の産生を抑制する。

長レベルで活性化する(図2A)⁴⁾。この複合体の形成には **CycT1** 上の **TRM** と呼ばれる領域が重要であり、この領域に変異があるマウス型 **CycT1** が **Tat** と結合できず、そのため **HIV-LTR** からの転写を誘導できない(図2B)。**Tat** の機能は **CycT1** との結合により初めて発揮されるといえ、この結合を阻害できる薬剤が開発できれば、有効な抗 **HIV** 薬として作用することが期待できる。そこで、**Tat** との結合に必要である **CycT1** のタンパク質立体構造を標的とした *in silico* スクリーニングにより、**CycT1** と **Tat** の相互作用を標的とした抗 **HIV** 薬の開発を試みることにした。現在、活性化化合物を得ており、さらなる検討を行っている。今後、転写を標的とした新規抗 **HIV** 薬の開発を進めることにより、爆発的なウイルス複製を背景に出現する薬剤耐性ウイルスの出現を阻止できるのみならず、**HIV** 潜伏感染細胞からのウイルス再活性化を有効な阻止となることが期待される。

オーミクス解析手法による治療分子標的の同定 (駒野 淳)

宿主因子を標的にする抗レトロウイルス薬の開発は、既知の **HIV** 複製制御因子を対象にした開発研究と、新規の創薬分子標的を同定する研究を並行して行う必要がある。これを基にして次世代、次々世代の抗レトロウイルス薬を開発していくためである。既知の創薬分子標的に関する研究は他項に譲り、ここでは新規創薬分子標的の発掘研究に焦点を当てる。

近年、ヒト全ゲノムが明らかとなり、分子生物学研究法がより一層の進歩を見せ、ゲノムワイドな網羅的研究手法が成熟してきた。これは新規創薬分子標的を同定する研究

に大きな影響を与えている。新しい研究手法は **HIV** 複製制御因子を機能的なアッセイ系を利用してゲノムワイドに探索する「機能的オーミクス研究」である。オーミクス解析は細胞に発現している全てのヒト遺伝子について評価を行うことを意味する。機能的オーミクス研究とはヒト細胞を使用した *cell-based* アッセイに基づいて、ヒト遺伝子発現レベルを増減させたときにウイルス複製に与える影響を直接評価する研究を指す。酵母細胞を利用した *two-hybrid* アッセイを代表とするウイルスタンパク質への結合因子スクリーニングとは「機能的」という意味で一線を画す。全ての研究例を当稿で網羅することは困難であるが、その一部を紹介しつつ機能的オーミクス研究による新たな **HIV** 感染症治療の創薬標的の同定に関する問題点と将来像を展望しよう(表1)。

機能的オーミクス研究は内在性遺伝子発現抑制型と遺伝子強制発現型の2種類に大別される。内在性遺伝子発現抑制型は全てのヒト遺伝子に対する *siRNA/shRNA* を構築し、一つずつ細胞に導入し、ウイルス複製へのインパクトを評価する方法である。このアプローチを用いて **HIV** の複製を制御する候補遺伝子をゲノムワイドに評価した論文が近年3つの研究グループから発表された⁵⁻⁷⁾。それぞれ約100種類程度の宿主因子を **HIV** 複製制御因子として同定している。それらは **HIV** 複製阻害剤の創薬子標的候補に位置づけられる。これらの研究結果は **HIV**-宿主相互作用の全体像を把握するために多くの情報をもたらしてくれる。しかし、問題点も存在する⁸⁾。例えば、3つの報告の **HIV** 複製制御遺伝子の多くは重複していない。また、**HIV** 複製に必須とされる既知の宿主因子が含まれていない。この原因の一つとして指摘されているのは実験条件と使用された細胞

表1 HIV-1 複製制御因子を同定するための代表的な機能的スクリーニング系

実験系の分類		代表例
上皮系細胞	遺伝子発現抑制型 siRNA/shRNA ライブラリー, 一過性発現	Zhou et al., Cell Host Microbe 2008 Brass et al., Science 2008 Konig et al., Cell 2008
	遺伝子発現増強型 cDNA ライブラリー, 恒常的発現	Stremlau et al., Nature 2004 Valente et al., Mol Cell 2006 Valente et al., PNAS 2009
ヒト T 細胞	遺伝子発現増強型 cDNA ライブラリー, 恒常的発現	Kawano et al, J Virol 2004 Yoshida et al., Traffic 2008 Urano et al., FEBS Let 2008 Urano et al., Vaccine, in press

の種類である。遺伝子発現の抑制効率は siRNA/shRNA ライブラリーの質、標的 mRNA の量、半減期、siRNA/shRNA 導入からの時間に大きく左右される。細胞株によっても遺伝子発現抑制の効率は異なる。つまり、それぞれの実験結果は正しいが、それを再現するためには非常に厳密な条件設定を求められるということである。siRNA/shRNA を細胞に効率よく導入するためには上皮系細胞を対象にしなければならないという制約もある。3つの研究で使用されている細胞は上皮系細胞で、本来 HIV が複製増殖する細胞ではないのはこのためである。HIV が主として感染する CD4 陽性 T 細胞の遺伝子発現プロファイルは上皮系細胞とは異なる。そのため、上皮系の細胞で得られた実験結果が CD4 陽性 T 細胞において再現できるのかを改めて評価する必要がある。網羅性についてはどう評価されるのであろうか。siRNA/shRNA による研究アプローチでは、実験に使用する細胞に標的遺伝子発現が認められないと評価できない。CD4 陽性 T 細胞と上皮系細胞の遺伝子発現プロファイルは異なる上、両者に同じ遺伝子が発現していても遺伝子発現レベルや発現制御機構が同じとは限らない。内在性遺伝子発現抑制型アプローチによる HIV 複製制御因子同定研究は、魅力的な反面、潜在的な問題点も多く内包していることがわかる。

一方、遺伝子強制発現型の例としては、全遺伝子の全長 ORF を持つ哺乳類細胞発現ベクターを準備し、一つずつ細胞に導入して、ウイルス複製へのインパクトを評価する方法がある。HSV-1 感染に対する宿主防御応答因子 STING はこのような方法で同定された^{9,10}。同様のアプローチを HIV に対して施行した例はない。より古典的な方法として、哺乳類細胞 cDNA 発現ライブラリーを用いた研究も遺伝子強制発現型に分類される。この研究手法では cDNA ライブラリーの中から HIV 複製過程を最も強く制御する因子を選択して同定する。CXCR4 がウイルスの受容体として同定されたのはこの手法の代表的な研究成果である¹¹。機能的スクリーニングによって cDNA ライブラリーから候補遺伝子を同定する研究手法の問題点は、cDNA ライブラリーの品質 (complexity, 平均鎖長など)、cDNA ライブラリーが由来する細胞/組織によって実験結果が大きく左右されることである。例えば、CD4 陰性の細胞から得られた cDNA ライブラリーを材料に使用すれば、HIV 複製制御因子として CD4 を回収することは不可能である。もう一つの問題点は、この手法では最終的に一握りの候補遺伝子が濃縮されることである。これは大きな特徴である反面、中程度～弱い活性がある遺伝子は見逃されてしまう危険性がある。これらの中にも優れた創薬分子標的がある可能性は否定できない。また、候補遺伝子として選択されなかった遺伝子が HIV 複製と無関係かも厳密には評価で

きない。遺伝子導入が容易であるため多くの研究で上皮系細胞が使われていることも内在性遺伝子発現抑制型アプローチと同じ問題点である。

機能的オーミクス研究を論じるうえで重要な3つの要点、使用する細胞、遺伝的多様性、発現制御の時間的制御についてさらに考察を深めてみよう。本来 HIV が感染し増殖する細胞の背景を用いなければ、真に重要な創薬分子標的を見逃してしまう危険性があることは先に述べた。一方、CD4 陽性 T 細胞を代表とする HIV 感染標的細胞は遺伝子導入が容易ではないため、スクリーニングの使用には適していない。このような背景から、現実的に機能的オーミクス研究に適している研究対象はヒト T 細胞株と考えられる。しかし、ヒト T 細胞株を機能的オーミクス研究に使用している研究グループは世界でも稀である。

次に多様な遺伝子をカバーするためにどのような研究手法が適しているかを考えてみよう。全長 ORF を持つ哺乳類細胞発現ベクターや siRNA/shRNA を使用した研究アプローチでは、遺伝子発現を増減させることが出来る。これに対し、cDNA ライブラリーは遺伝子のドメインだけが発現することにより、遺伝子全長 ORF が発現することで得られる効果とは質的に異なる多様な生物活性を現す。創薬標的を考える上では、遺伝子断片が持つウイルス抵抗性も貴重な情報源となる。その典型的な例が hnRNP U の N 末端断片や Brd4 の C 末端ドメインである^{12,13}。この意味で cDNA ライブラリーによる研究手法は siRNA/shRNA アプローチは全長 ORF 哺乳類細胞発現ベクターにはない優位性がある。

遺伝子発現の時間的制御も研究結果を大きく左右する。一過性の遺伝子発現制御は細胞毒性などのリスクを伴うため、ウイルス複製への影響が特異的かの判断に注意を要する。一方、恒常的な遺伝子発現制御は、細胞増殖に影響を与えない条件下でウイルス複製を評価できる点で、ウイルス複製を特異的に制御する機能分子を得られる可能性が高い。抗レトロウイルス薬の創薬分子標的としては、細胞生理に影響を与えずにウイルス複製を抑制するほうが好ましい。従って、創薬標的の同定を目指すのであれば、恒常的な遺伝子発現制御系の方がより適していると考えられる。

これら全てを勘案し、我々は cDNA ライブラリーを恒常的に発現させたヒト T 細胞株を樹立して、その細胞から HIV 複製制御因子の同定を行っている^{13,14}。恒常的な遺伝子発現を達成するためにレトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターにより cDNA ライブラリーを細胞に送達している。cDNA ライブラリーによるバイアスを軽減するために複数の cDNA ライブラリーを使用し、多様な遺伝子を弱い活性分子も見逃さないために優性形質を与える候補遺伝子が濃縮されないような工夫も行っている。我々はこの

実験系にて DNA J B6/HSP40 B6, bromodomain containing 4 (brd4) の C 末端ドメイン, SEC14-like 1a (SEC14L1a) の C 末端ドメインなどが HIV 複製制御因子であることを同定した。これらは siRNA/shRNA や cDNA ライブラリーを使用した他の研究では同定されていない。これは我々の研究アプローチが他の研究手法を補完する有用なものであることを示している。cDNA ライブラリーの合成, クローニング, ウイルスベクターの構築, ヒト T 細胞株への遺伝子導入を通じて, 特定の cDNA が脱落する可能性は否定できない。このような潜在的な問題点がある一方で, 新しい HIV 複製制御因子が同定されていることを考えると, 我々の実験系には潜在的な問題点を越えた有用性があると思われる。これらが HIV 感染症治療薬の創薬分子標的候補として価値が高いかを判断するための研究を重ねていくのと並行して, 多様な細胞や組織由来の cDNA ライブラリーを用いた新たなスクリーニングを系統的に行う必要もあると考えている。

RNA 分解酵素 MazF を発現する新規レトロウイルスベクターを用いたエイズ遺伝子治療法の開発 (岡本実佳)

多剤耐性 HIV や長期使用による薬剤の慢性毒性の出現などの理由による HAART 療法適合困難症例に対応する治療法の確立を目指し, タカラバイオ社において HIV の転写因子である Tat 依存性に RNA 分解酵素 MazF を発現するレトロウイルスベクターを用いた新規エイズ遺伝子治療法が開発された。

MazF は米国ニュージャージー医科歯科大学の井上正順教授らにより発見された, mRNA の ACA 配列の 5' 末端を特異的に認識して切断する大腸菌由来の RNA 分解酵素である^{15,16)}。ほとんどの細菌はそれらのゲノムにおいて多数の自殺遺伝子あるいは毒素遺伝子を持つ。通常の状態ではそれら毒素は抗毒素と複合体を形成しており毒性は生じないが, 様々なストレス環境下では, 毒素より安定性が低い抗毒素が ATP 依存性セリンプロテアーゼにより分解される結果, 毒素が放出され, ゆくゆくは細菌を殺す。MazF はそのような毒素の一つである。mRNA は切断するが, rRNA や tRNA, 一本鎖 DNA は ACA 配列が存在しても切断しない。また, タンパク合成は阻害するが, DNA あるいは RNA 合成は阻害しない。

タカラバイオ社では, HIV 遺伝子に ACA 配列が 240 箇所以上存在することに着目し, TAR 配列の下流に MazF 遺伝子を導入したレトロウイルスベクターを開発した。このベクターを導入した細胞では, HIV 感染により産生された Tat 蛋白質が TAR 配列に結合することにより MazF が発現して HIV mRNA が分解され HIV の産生を抑制する

ことが期待できる。そこで, MazF 発現ベクター導入細胞における抗 HIV 効果を *in vitro* において検討した。実験の結果, 複数の健康人ドナーから得られた PBMCs, CD4 陽性 T リンパ球いずれにおいても MazF 発現ベクター導入により, 実験室株, 臨床株を含めた HIV の X4, R5, R5X4 株すべてに対して著しい感染抵抗性を示した。さらに, 多剤耐性 HIV 株に対しても同様に強くウイルス産生を抑制した。しかし, MazF 発現ベクター導入自体による生細胞率への影響はなかった。

HIV は遺伝子変異出現頻度が非常に高いことからこれまで化学療法, 遺伝子治療どちらにおいても耐性 HIV の克服は困難であった。しかし, 本法では変異 HIV の mRNA も ACA 配列が存在する限り切断することが可能であるため, 耐性 HIV の出現を限りなく抑制できると考えられる。そこで, HIV 感染 CD4 陽性 T リンパ球と非感染 MazF 発現ベクター導入あるいは非導入 CD4 陽性 T リンパ球の長期共培養実験を行った。その結果, 約 60 日間において MazF 発現ベクター導入 CD4 陽性 T リンパ球との共培養サンプルにおける HIV 産生量は常に非導入 CD4 陽性 T リンパ球との共培養サンプルより低く抑えられた。これらの結果から, この MazF 発現ベクターは導入細胞において細胞毒性を示すことなく, HIV 複製に対して強い阻害効果を持ち, また, かなりの期間, 耐性ウイルスの出現を抑制することが明らかとなった。

遺伝子治療法は高価な治療法であることから, 現実的には多剤耐性 HIV などによる HAART 療法適合困難症例に対応する治療法となり, これからも HIV 感染症治療の第一選択は化学療法であり続けると考えられる。しかし, 本法のような遺伝子治療法によって, 多剤耐性 HIV 感染者の減少を導くことができれば, 結果的に HAART 療法による HIV 根絶推進に大きく寄与すると期待される。(本研究はタカラバイオ株式会社 細胞・遺伝子治療センター 蝶野英人氏らとの共同研究である)

おわりに (杉浦 互)

冒頭にも述べたように, 治療薬の進歩により多くの HIV 感染者は既存の薬剤の組み合わせだけで, 寿命を全う出来るであろう今日, 新薬の開発は何処を目指すべきなのだろうか。忘れてはいけないのは, 私たちは未だにワクチンによる prevention も薬剤による eradication も手にしてはいないことである。HIV は robustness (頑健性) の高い病原体である。しかしその度合いが高いほど, 必ず脆弱な部分を持っているはずである。インテグラーゼ阻害剤ラルテグラビルの登場以降, しばしば eradication という封じられた言葉を耳にするようになった。今回の 4 名の若手研究者のうちどなたが実用化に一番乗りをするのか, そして eradi-

cation の未来へ希望の道をつないでいくのか今後の活躍を期待したい。

文 献

- 1) Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA : CC CKR5 : a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 272 : 1955-1958, 1996.
- 2) Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R, Goedert JJ, Buchbinder SP, Vittinghoff E, Gomperts E, Donfield S, Vlahov D, Kaslow R, Saah A, Rinaldo C, Detels R, O'Brien SJ : Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science* 273 : 1856-1862, 1996.
- 3) Gulick RM, Lalezari J, Goodrich J, Clumeck N, DeJesus E, Horban A, Nadler J, Clotet B, Karlsson A, Wohlfeiler M, Montana JB, McHale M, Sullivan J, Ridgway C, Felstead S, Dunne MW, van der Ryst E, Mayer H : Maraviroc for previously treated patients with R5 HIV-1 infection. *N Engl J Med* 359 : 1429-1441, 2008.
- 4) Karn J : Tackling Tat. *J Mol Biol* 293 : 235-254, 1999.
- 5) Brass AL, Dykxhoorn DM, Benita Y, Yan N, Engelman A, Xavier RJ, Lieberman J, Elledge SJ : Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science* 319 : 921-926, 2008.
- 6) Zhou H, Xu M, Huang Q, Gates AT, Zhang XD, Castle JC, Stec E, Ferrer M, Strulovici B, Hazuda DJ, Espeseth AS : Genome-scale RNAi screen for host factors required for HIV replication. *Cell Host Microbe* 4 : 495-504, 2008.
- 7) Konig R, Zhou Y, Elleder D, Diamond TL, Bonamy GM, Irelan JT, Chiang CY, Tu BP, De Jesus PD, Lilley CE, Seidel S, Opaluch AM, Caldwell JS, Weitzman MD, Kuhlen KL, Bandyopadhyay S, Ideker T, Orth AP, Miraglia LJ, Bushman FD, Young JA, Chanda SK : Global analysis of host-pathogen interactions that regulate early-stage HIV-1 replication. *Cell* 135 : 49-60, 2008.
- 8) Goff SP : Knockdown screens to knockout HIV-1. *Cell* 135 : 417-420, 2008.
- 9) Ishikawa H, Barber GN : STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* 455 : 674-678, 2008.
- 10) Ishikawa H, Ma Z, Barber GN : STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature* 461 : 788-792, 2009.
- 11) Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA : HIV-1 entry cofactor : functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272 : 872-877, 1996.
- 12) Valente ST, Goff SP : Inhibition of HIV-1 gene expression by a fragment of hnRNP U. *Mol Cell* 23 : 597-605, 2006.
- 13) Urano E, Kariya Y, Futahashi Y, Ichikawa R, Hamatake M, Fukazawa H, Morikawa Y, Yoshida T, Koyanagi Y, Yamamoto N, Komano J : Identification of the P-TEFb complex-interacting domain of Brd4 as an inhibitor of HIV-1 replication by functional cDNA library screening in MT-4 cells. *FEBS Lett* 582 : 4053-4058, 2008.
- 14) Urano E, Ichikawa R, Morikawa Y, Yoshida T, Koyanagi T, Komano J : T cell-based functional cDNA library screening identified SEC14-like 1a carboxy-terminal domain as a negative regulator of human immunodeficiency virus replication. *Vaccine*, in press.
- 15) Zhang Y, Zhang J, Hoefflich KP, Ikura M, Qinq G, Inouye M : MazF cleavages cellular mRNAs specifically at ACA to block protein synthesis in *Escherichia coli*. *Mol Cell* 12 : 913-923, 2003.
- 16) Zhang Y, Zhang J, Hara H, Kato I, Inouye M : Insights into the mRNA cleavage mechanism by MazF, an mRNA interferase. *J Biol Chem* 280 : 3140-3150, 2005.