

学位論文
Doctor's Thesis

LD78 β (ヒト MIP-1 α 変異体) の CCR5 結合と R5
HIV-1 増殖阻害に重要なアミノ酸残基の同定

(Identification of Amino Acid Residues Critical for LD78 β ,
a Variant of Human Macrophage Inflammatory Protein-1 α ,
Binding to CCR5 and Inhibition of R5 Human
Immunodeficiency Virus Type 1 Replication)

宮川 寿一

Toshikazu Miyakawa

指導教官

満屋 裕明 教授

熊本大学医学研究科

脳・免疫統合科学系免疫病態学講座

2002 年 3 月

学 位 論 文
Doctor's Thesis

論文名：LD78 β (ヒト MIP-1 α 変異体) の CCR5 結合と R5
HIV-1 増殖阻害に重要なアミノ酸残基の同定

(Identification of Amino Acid Residues Critical for LD78 β , a Variant of Human Macrophage Inflammatory Protein-1 α , Binding to CCR5 and Inhibition of R5 Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication)

著者名：宮川 寿一 Toshikazu Miyakawa

指導教官：脳・免疫統合科学系免疫病態学講座教授 満屋 裕明

審査委員名： 分子病理学講座担当教授 山本 哲朗

エイズ学研究センター病態制御分野教授 松下 修三

エイズ学研究センターウイルス制御分野教授 滝口 雅文

2002 年 3 月

Table of Contents / 目次

1) 要旨	3, 4
2) 発表論文リスト	5
3) 謝辞	6
4) 略語一覧	7
5) 研究の背景と目的	
5)-1 ケモカインの発見	8
5)-2 ケモカイン分子	9
5)-3 ケモカインレセプター	10
5)-4 ケモカインの作用	10 - 11
5)-5 炎症反応とケモカイン	11 - 12
5)-6 ホーミングとケモカイン	12 - 13
5)-7 後天性免疫不全症候群 (AIDS) とケモカイン	13 - 15
5)-8 HIV-1 の生活環と抗 HIV-1 剤の標的	15 - 16
5)-9 逆転写酵素阻害剤の作用機序	16 - 17
5)-10 プロテアーゼ阻害剤の作用機序	17 - 18
5)-11 薬剤耐性 HIV-1 変異株の出現のメカニズム	18 - 20
5)-12 耐性出現への対応	20 - 22
5)-13 本研究の目的	22 - 24
6) 実験方法	
6)-1 ウイルスと細胞	25
6)-2 CCR5 発現細胞株作成法	25
6)-3 LD78 β 変異体発現ベクター作成法 (recombinant PCR 法)	26 - 29
6)-4 LD78 β 変異体蛋白精製法	29
6)-5 細胞内カルシウム濃度上昇測定法	29 - 30
6)-6 抗 HIV-1 活性測定法	30
6)-7 化学遊走能測定法	30 - 31
6)-8 2D7 を用いた LD78 β 変異体競合結合阻害実験	31
6)-9 ¹²⁵ I-MIP-1 α を用いた LD78 β 変異体競合結合阻害実験	31 - 32
6)-10 CCR5 細胞内移行解析法	32
7) 実験結果	
7)-1 LD78 β 変異体による細胞内カルシウム濃度上昇誘導能	33
7)-2 抗 HIV-1 活性	33 - 34
7)-3 化学遊走誘導能に与える影響	34 - 35
7)-4 CCR5 に対する親和性	35 - 37
7)-5 CCR5 の細胞内移行における効果	37
8) 表および図	38 - 53
9) 考察	54 - 57
10) 結語	58
11) 参考文献	59 - 68

1) 要旨

AIDS 治療薬には、逆転写酵素阻害剤とプロテアーゼ阻害剤の2クラスがあるが、これらの薬剤を組み合わせた多剤併用療法(HAART)の導入によって HIV-1 感染症の病像は大きく変わり、先進工業国での AIDS による死亡者数は激減した。しかし急性、慢性毒性や HIV-1 の薬剤耐性の獲得、また不良なコンプライアンスなどから「治療の失敗」(treatment failure)に帰結する症例が続出し、大きな問題となっている。副作用の少ない、耐性 HIV-1 に対しても抗ウイルス効果を発揮する新しい標的に対する薬剤の開発が急務である。近年、HIV-1 の CD4 陽性細胞への侵入の際に、ケモカインレセプターの CCR5 と CXCR4 が補助受容体(coreceptor)として必要であること、CCR5 のリガンドである MIP-1 α などが CCR5 受容体に結合すると、HIV-1 増殖を阻害することなどが分かり、CCR5 を標的とした薬剤の開発が進められている。しかし、長期にわたる CCR5 を介したケモカインのシグナル伝達の阻害が生体へ与える影響については一部の免疫系への影響の可能性が報告されているものの不明な点が多く、ケモカインとケモカインレセプターとの相互作用についての構造学的な解析が必要とされている。我々は、CCR5 と CCR5 のリガンドで最も強い抗 HIV-1 活性を持つ LD78 β との相互作用のメカニズムについて検討するため、LD78 β の NH₂末端ループ構造のアラニン以外のアミノ酸残基を1アミノ酸ずつアラニンに置換した6つの変異体を作成し、それらの生物学的活性等について解析した。LD78 β 変異体によるシグナル伝達時の細胞内 Ca²⁺濃度上昇誘導能と化学遊走能についての検討では、NH₂末端より9番目のスレオニンを置換した場合、活性の減弱が見られたが、それ以外のアミノ酸残基を置換しても著しい差は認めなかった。HIV-1 増殖阻害活性は NH₂末端より6番目のアスパラギン酸と8番目のプロリンを置換した時に増強し、逆に2番目のプロリンと9番目のスレオニンを置換した場合、著しい減弱が観察された。この LD78 β 変異体による HIV-1 増殖阻害の機序は少なくとも2つ考えられた。1つは LD78 β 変異体が CCR5 に結合し、HIV-1 の結合を阻害する機序、他の一つは CCR5 を細胞内移行させる(CCR5 down-

regulation)機序である。最初に、変異体の CCR5 との結合力を検討したところ、NH₂末端より 6 番目のアスパラギン酸と 8 番目のプロリンを置換した場合増強が起り、逆に 2 番目のプロリンと 9 番目のスレオニンを置換した場合、著しく減弱することが分かった。CCR5 down-regulation 活性を比較した結果、CCR5 への結合の様態とほぼ同様で、NH₂末端より 6、8 番目、アスパラギン酸、プロリンを置換した場合は増強し、逆に 2、9 番目のプロリン、スレオニンを置換した場合、著しく減弱した。

以上のデータより、NH₂末端より 2 番目のプロリン、6 番目のアスパラギン酸、8 番目のプロリン、9 番目のスレオニンが LD78β と CCR5 との結合および HIV-1 増殖阻害に重要であり、シグナル伝達は LD78β の CCR5 への結合力に関わらず、ある程度以上の CCR5 への結合が起れば始まり、その一方でより強力な抗 HIV-1 活性を発揮するためには CCR5 への結合力の増強が必要である事が示唆された。また、LD78β の HIV-1 感染阻止能とシグナル伝達能は異なる分子間相互作用による可能性が考えられた。今回の結果は適切なアミノ酸残基を置換することにより抗 HIV-1 活性のみを増強し、シグナル伝達能は変わらないか、もしくは減弱し、更には生体内のケモカインの作用を阻害しない、ケモカインを基盤とした効果的な抗 HIV-1 剤開発の可能性を示唆するものと思われた。

2) 発表論文リスト

1. Miyakawa, T., Obaru, K., Maeda, K., Harada, S., and Mitsuya, H.
Identification of Amino Acid Residues Critical for LD78 β , a Variant of Human Macrophage Inflammatory Protein-1 α , Binding to CCR5 and Inhibition of R5 Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication.
The Journal of Biological Chemistry, 277, 4649-4655. 2002
2. Maeda, K., Yoshimura, K., Shibayama, S. Habashita, H., Tada, H.,
Sagawa, K., Miyakawa, T., Aoki, M., Fukushima, D., and Mitsuya, H.
Novel Low Molecular Weight Spirodiketopiperazine Derivatives Potently Inhibit R5 HIV-1 Infection through Their Antagonistic Effect on CCR5
The Journal of Biological Chemistry 276, 35194-35200. 2001
3. 宮川寿一, 満屋裕明. 抗 HIV-1 薬の作用機序
Mebio. 18, pp. 22-28, 2001

3) 謝辞

本研究の機会を賜り、御指導御鞭撻を頂きました熊本大学医学部免疫病態学内科学第2講座教授満屋裕明先生に深く感謝いたします。

常に御指導を直接賜りました熊本大学医学部免疫病態学内科学第2講座助手小原健志先生（現託麻台病院）に心より深く感謝いたします。

細胞供与および実験手技について御指導頂きました熊本大学医学部感染防御学講座助教授前田洋助先生に深謝致します。

実験手技について御指導頂きました熊本大学医学部免疫病態学内科学第2講座原田恵嘉先生、前田賢次先生に深謝致します。

優れた実験補助を頂きました、熊本大学医学部免疫病態学内科学第2講座青木学技官、緒方宏美技官に深謝致します。

4) 略語一覽

HIV-1 : human immunodeficiency virus type-1

AIDS : acquired immunodeficiency syndrome

IL-8 : interleukin-8

MCP-1 : monocyte chemotactic protein-1

BLC : B-lymphocyte chemoattractant

SLC : secondary lymphoid-tissue chemokine

SDF-1 : stromal-derived factor-1

MIP-1 α : macrophge inflammatory protein-1 α

MIP-1 β : macrophge inflammatory protein-1 β

RANTES : regulated upon activation, normal T expressed and secreted

LPS : lipopoly saccharide

GPCR : G protein-coupled receptor

GVHD : graft versus host disease

PHA : phytohemagglutinin

PBM : peripheral blood mononuclear cells

FCS : fetal calf serum

HOS : human osteosarcoma

CHO : chinese hamster ovary

PCR : polymerase chain reaction

GST : glutathione-S-transferase

PBS : phosphate-buffered saline

TCID₅₀ : 50% tissue culture infectious doses

BSA : bovine serum albumin

PE : phycoerythrin

5) 研究の背景と目的

5)-1 ではケモカインの発見、5)-2 ではケモカイン分子、5)-3 ではケモカインレセプター、5)-4 ではケモカインの作用、5)-5 では炎症反応とケモカイン、5)-6 ではホーミングとケモカイン、5)-7 では後天性免疫不全症候群 (AIDS) とケモカイン、5)-8 では HIV-1 の生活環と抗 HIV-1 剤の標的について、5)-9 では逆転写酵素阻害剤の作用機序について、5)-10 ではプロテアーゼ阻害剤の作用機序について、5)-11 では薬剤耐性 HIV-1 変異株の出現のメカニズムについて、5)-12 では耐性出現への対応について述べ、5)-13 に本研究の目的を述べる。

5)-1 ケモカインの発見

ケモカインは、まず CXC ケモカインのプロトタイプである IL-8 が 1987 年に発見され (1)、続いて CC ケモカインのプロトタイプである MCP-1 が発見された (2, 3)。そして、これらの分子がそれまで機能が不明であった分泌タンパク質、LD78/MIP-1 α (4) などとともに分子ファミリーを形成することが明らかになり、構造上の特徴がよい指標とされて、次々と新しいケモカインが発見されてきた。そして、主に好中球を遊走させる CXC ケモカインサブファミリーと、主に単球を遊走させる CC ケモカインサブファミリーの存在が明らかになり、それぞれの急性あるいは慢性炎症反応における役割が研究されてきた。さらに、特に CC ケモカインは T 細胞や好酸球などに対しても遊走活性を示すことから、免疫反応やアレルギー反応における役割も研究されている。今日では、ケモカインは白血球の化学遊走、リンパ球新生、血管進展、心血管新生、炎症、免疫反応を含む多種の生物学的作用にて重要な役割を果たしていると考えられている (5-9)。

5)-2 ケモカイン分子

ケモカインは 8~14kDa 程度の分泌タンパク質で、一般に塩基性、ヘパリン結合性である。現在、ケモカインの総数は 30 以上に達している (表 1)。ケモカインには保存された 4 つのシステインが存在し、1 番目と 3 番目および 2 番目と 4 番目の間でジスルフィド結合を形成する。NH₂ 末端側にある 2 アミノ酸の形成するモチーフにより、CXC と CC の 2 つのメジャーなサブファミリーに分類される。CXC 型では 2 つのシステイン間に他のアミノ酸が 1 個介在し、CC 型では 2 つのシステインが連続している。さらに、主にリンパ球や樹状細胞作用する、C ケモカイン (2 番目と 4 番目のシステインのみが存在する) および CX₃C ケモカイン (2 つのシステイン間に 3 つのアミノ酸が介在する) と呼ばれるサブファミリーも存在している。好中球に作用する CXC ケモカインの遺伝子はヒトでは 4 番染色体 q12-13 にクラスターを形成して存在し、一方、単球に作用する CC ケモカインの遺伝子は 17 番染色体 q11.2 にクラスターを形成して存在する。リンパ球や樹状細胞に特異的に作用する CXC、CC、C および CX₃C ケモカインの場合は、ほとんどがこれらのクラスターとは異なる染色体領域にマップされ、生理的役割の違いが進化的距離からも裏付けされている。

ケモカインは互いによく似た立体構造を示す (図 1) (10-13)。短い NH₂ 末端領域は自由な構造をしており、シグナル伝達に重要な部分である。すなわち、ケモカインの NH₂ 末端部分がレセプターの 7 個の膜貫通領域が形成するポケットにはまりこむことによりシグナルが伝達されると考えられる。このため、NH₂ 末端を少しずつ削っていくことで、アンタゴニストになるものも報告されている (14-16)。2 個のジスルフィド結合によって形成されるコアの部分は 2 ないし 3 のアンチパラレルβシートによりなり、レセプターへの高親和性結合に重要であると考えられている。C 末端領域はαヘリックスを形成し、細胞膜や細胞外基質に存在するヘパラン硫酸との結合に関与する (13)。この性質は、細胞表面や細胞間隙におけるケモカインの自由拡散を防ぎ、濃度勾配を形成するために必要と考えられる。

5)-3 ケモカインレセプター

すべてのケモカインは、三量体 G タンパク共役型 7 回膜貫通型レセプター (GPCR) を介して作用する。レセプター遺伝子の場合、CXC ケモカインレセプターは主に 2 番染色体に、また CC ケモカインレセプターは主に 3 番染色体にクラスターを形成して存在する。また、ケモカインレセプターに共通の重要な構造上の特徴として、第 2 細胞内領域に DRY (Asp-Arg-Tyr) モチーフが存在する。このモチーフはケモカインレセプターと三量体 G タンパク質とのカップリングに重要と考えられる。さらに、ケモカインによる細胞遊走や細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は共通して百日咳毒素で抑えられることから、ケモカインレセプターは三量体 G タンパク質のうちでも主に *Gai* クラスと共役すると考えられる (18)。細胞遊走においては、細胞の極性形成、細胞の血管内皮細胞や基質への強固な接着、進行方向への細胞質の伸展と細胞接着の亢進、反対側での細胞質の収縮と接着の解除などの複雑な反応が、時間的、空間的に協調して行われる必要がある。そのため、様々なシグナル伝達系を介して細胞接着分子や細胞骨格系が機能すると考えられるが、そのような複雑なシグナル伝達の詳細についてまだほとんど分かっていない。近年、ノックアウトマウスを用いた実験系において、三量体 G タンパク質に結合する PI_3 キナーゼのアイソフォームである PI_3 キナーゼ γ が細胞遊走に重要な役割を果たすことが示されている (18)。

5)-4 ケモカインの作用

CXC ケモカインは、CXC モチーフの直前に ELR (Glu-Leu-Arg) モチーフが存在するグループと存在しないグループに大別される (表 2)。ELR モチーフを持つ CXC ケモカインは 4 番染色体にマップされ、好中球に対する強力な遊走因子である。これらのケモカインは CXCR1 や CXCR2 を介して作用する (表 1)。一方、ELR モチーフを持たない CXC ケモカインは主にリンパ球を遊走させる。さらに、ELR モチーフを持つ CXC ケモカインは血管新生作用を示し、非 ELR モチーフ CXC ケモカインは血管新生阻止作用を示すことが報告されている。これらのことより、ELR

モチーフケモカインは創傷治癒や癌組織での血管新生にも関与していると考えられる。CC ケモカインは、最もメンバーの多いサブファミリーである。まず、17 番染色体に MCP グループ、RANTES グループ、MIP グループが存在する。これらは主に単球を遊走させるが、リンパ球のサブセットも遊走させる（表 2）。MCP グループは主に CCR2 や CCR3 を介して作用し、MIP グループは CCR1 や CCR5 を介して作用する。また、RANTES グループは CCR1、CCR3、CCR5 などに作用する。CCR3 は好酸球や好塩基球にきわめて選択的に発現しており、eotaxin など特異的リガンドも存在するが、MCP グループや RANTES グループなど多くのケモカインが作用するため、最もリガンドの多いレセプターである（表 2）。このことは、寄生虫感染に対する強力なエフェクター細胞である好酸球の生体防御系における重要性をケモカイン側からも裏付けている。また、近年報告された TARC、ELC、SLC、LARC などの一連の CC ケモカインは、リンパ球や樹状細胞などに作用するケモカインの一群である（表 2）。これらのケモカイン比較的特異的なリガンドとレセプターの関係を示す（表 1）。このことは、これらのケモカインがそれぞれ特定のリンパ球サブセットや樹状細胞サブセットに対して選択的に作用することに関係があると考えられる。また、膜結合型である fractalkine は主に NK 細胞や CD8⁺T 細胞を遊走させ、特異的なレセプター CX₃CR1 を介して作用する（19）。さらに、XCR1 を介して作用する C ケモカインサブファミリーの lymphotactin も NK 細胞や CD8⁺T 細胞を遊走させると報告されている（20, 21）。

5)-5 炎症反応とケモカイン

IL-8 は LPS 誘導性皮膚炎症、LPS/IL-1 誘導性急性関節炎、血清複合体 (serum sickness) による急性腎炎、肺虚血後再灌流傷害、敗血症に伴う二次性急性肺傷害、脳梗塞、遅延型過敏症の各疾患モデルマウスにおいて、好中球の浸潤と活性化に中心的役割を果たすことが明らかとなった。各急性炎症マウスモデルに抗 IL-8 抗体を投与すると、好中球浸潤および組織障害が著明に抑制され（22, 23）、また、マウス

IL-8 レセプターホモログ (CXCR2) ノックアウトマウスでは、急性炎症時の好中球遊走障害が認められることより IL-8 を抑制することにより好中球浸潤を伴う臓器傷害が防止できる (24)。MCP-1 について、ラット馬杉型慢性腎炎に伴う単球浸潤、蛋白尿の出現、半月体形成、腎硬化症による腎不全出現、動脈硬化症のモデルとされる内頸動脈内皮細胞損傷後の内皮の肥厚が、抗 MCP-1 抗体で抑制できることが知られている (25-27)。さらに、IL-8 受容体ホモログや MCP-1、MCP-1 受容体 (CCR2) の遺伝子欠損マウスが作成され、IL-8、MCP-1 などのケモカインが炎症時の特異的白血球浸潤に必須であることが確認されている (24, 28, 29)。また、細菌性肝炎モデルマウスにて大量の CD11c 陽性樹状細胞前駆細胞が出現し、肝類洞における肉芽形成に関与するが、この遊走が LD78/MIP-1 α により制御され、肉芽部位にて活性化、成熟した樹状細胞が門脈領域に移動し最初の免疫応答を誘発するが、この移動は SLC により制御されることが分かっている (30)。また、移植片対宿主病 (GVHD) において、肝傷害は CCR5⁺CD8⁺細胞により引き起こされ、CCR5⁺CD8⁺細胞は LD78/MIP-1 α により肝臓に遊走されることが分かっている (31)。

5)-6 ホーミングとケモカイン

血球細胞は血液中を流れにそって移動している。しかしながら生体内では、流れとは全く関係なく決まった場所に動くことがある。このような現象はホーミングと呼ばれる。リンパ球のみならず発生時の造血幹細胞も動くと言われているが、その機序は不明であった。CXC ケモカイン BLC のレセプターである BLR1 ノックアウトマウスでは鼠径部リンパ節の欠損とパイエル板形成不全があり、成熟 B 細胞の脾臓内濾胞への侵入が障害され、脾臓内で胚中心形成も障害される (32)。同様に T 細胞のホーミング異常がある plt/plt マウスでは、CC ケモカインの SLC 遺伝子座に変異があり、SLC の発現が認められない (33)。加えて、eotaxin ノックアウトマウスでは、末梢血中の好酸球数は 1/3 まで低下し、空腸などの好酸球数も 1/20

に激減する (34)。さらに長澤らによって報告された SDF-1/PBSF ノックアウトマウスは胎性致死であったが、胎仔肝での骨髄系細胞の数は正常にもかかわらず、B リンパ球前駆細胞数は激減し、骨髄では骨髄系細胞がほとんど認められなかった (35)。また、SDF-1 intrakine 発現レトロウイルス感染血液幹細胞移植マウスを用いた、造血および免疫システムの構築についての研究にて、B 細胞、顆粒球の再構築のみならず胸腺の再構築にも異常があることが判明している。これらの結果と SDF-1/PBSF が骨髄造血幹細胞の遊走因子であることより、SDF-1/PBSF が幹細胞ホーミングに関与していると考えられる。これらの事実より、現在ではケモカインは炎症反応時の好中球や単球/マクロファージ、リンパ球、樹状細胞の遊走のみならず、免疫システムの再構築、発生過程の血液前駆細胞や血管内皮細胞の移動に本質的に関与する分子群であると考えられている。

5)-7 後天性免疫不全症候群 (AIDS) とケモカイン

後天性免疫不全症候群 (Acquired Immunodeficiency Syndrome, AIDS) は 1981 年に、今までにない新しいタイプの細胞性免疫不全症候群として初めて報告された。2 年後の 1983 年にはこの新しい病態がヒト免疫不全ウイルス (Human Immunodeficiency Virus type1, HIV-1) という新種のレトロウイルスによるものである事が判明した。HIV は CD4 陽性リンパ球ないし CD4 を持つ他の細胞に感染する。CD4 陽性リンパ球は、ヘルパーT 細胞であり、細胞性免疫の中心的役割を果たし、ウイルスや結核あるいはトキソプラズマなどの細胞内感染を起こす病原体から体を防御する。HIV-1 は HIV-1 自身を含め、本来ウイルス感染を防ぐはずの CD4 陽性リンパ球に感染し、これを破壊するため治療が困難である。HIV-1 は、貪食細胞であるマクロファージにも能動的に感染、あるいは受動的に取り込まれ、その中で、免疫系から逃れて増殖する。また、HIV-1 は骨髄や脳細胞にも感染し、ほぼ全身に広がる。HIV-1 感染の進行とともに (i) リンパ球減少 (ii) CD4 陽性リ

ンパ球の減少および機能不全 (iii) 細胞性免疫不全 (iv) B 細胞の反応制御障害による、多クローン性 B 細胞の活性化障害などが生じる。このような免疫系の破壊とともに、日和見感染症や悪性腫瘍を合併する。

1996 年 HIV-1 は宿主細胞に感染するときが宿主のケモカインレセプターをコレセプターとして用いることが米国の Edward Berger らによって初めて明らかにされた (36)。HIV-1 が感染の際に使用するコレセプターとして最も重要なものが CCR5 と CXCR4 で、HIV-1 は感染の際にいずれのコレセプターを用いるかによって 2 種類に大きく分類されている。CCR5 を用いる HIV-1 は R5 (またはマクロファージ指向性 : M-tropic) HIV-1、CXCR4 を用いるものは X4 (または T 細胞指向性 : T-tropic) HIV-1 と呼称される (図 2)。両方のレセプターを使用する HIV-1 も認められており、これは R5X4 HIV-1 と呼ばれている。さらに、このようなコレセプターは単に細胞指向性決定しているだけでなく、感染抵抗性、病態進行にも深く関わっていることが明らかになった。HIV-1 感染のハイリスクグループに属しながらも HIV-1 に感染しない欧米人の存在が以前より報告されていた。このような曝露非感染 (exposed-uninfected: EU) 群から採取した CD4 陽性 T 細胞およびマクロファージの中には、CXCR4 を利用するウイルス (X4 ウイルス) には感受性を示すが、CCR5 を利用するウイルス (R5 ウイルス) には強い抵抗性を示すものがあった。1996 年、CCR5 が HIV-1 コレセプターであると同定された直後、独立して二つのグループから HIV-1 感染に抵抗性を示す CCR5 の対立遺伝子の存在が報告された (37, 38)。この遺伝子多型は CCR5 の 7 回膜貫通型蛋白の 2 番目の細胞外ループをコードする部分の 32 塩基が欠損していたため (CCR5 Δ 32/ Δ 32 と表記)、フレームシフトと終始コドンの早期出現により正常な CCR5 蛋白質細胞膜表面上に発現されず、その結果 R5 ウイルス感染に抵抗性になっていた。コホート調査では、数千人の HIV-1 感染者にはホモ接合型 (Δ 32/ Δ 32) は全く認めず、逆に EU コホート群中でホモ接合型を有意に認め、そのなかに HIV-1 感染者はいなかった。このことは、R5 ウイルスの感染阻止が HIV-1 感染成立を阻止可能であることを証明し

ている。一方、CXCR4のリガンドであるSDF-1/PBSFのmRNAの3'非翻訳領域の変異がAIDSの進行を遅延させ、未発症者に有意に多いことが示された。この変異は、SDF-1/PBSFの発現を安定化させると考えられている(39)。また、ケモカインによるHIV-1増殖阻害効果についても報告されており、生来のCXCR4のリガンドであるSDF-1、CCR5のリガンドであるMIP-1 α (またはLD78 α と呼ばれる)、MIP-1 β そしてRANTESは特異的にCXCR4ないしCCR5受容体に結合し、X4ないしR5 HIV-1複製を阻害することができる(40-42)。近年、CCR5のリガンドの一つで、MIP-1 α の1変異体であるLD78 β がCCR5のリガンドの中で最も抗HIV-1活性を持つことが報告されている(43-45)。

5)-8 HIV-1の生活環と抗HIV-1剤の標的

HIV-1には主たる宿主細胞として、CD4分子をその表面に有するTリンパ球とマクロファージがある。HIV-1は、細胞表面の主たるレセプターであるCD4分子を認識し、細胞に吸着後、エンベロープと細胞膜の融合により、その内容物を細胞内に侵入させる。そこでウイルスゲノムRNAは逆転写酵素を用いてDNAに逆転写され、このDNAがp17蛋白に誘導されて核内に入り、インテグラーゼ活性により細胞内DNAに組み込まれる。この状態のウイルスDNAをプロウイルスと呼ぶ。このプロウイルスは種々の因子(ウイルス側よりは*tat*、*rev*、*nef* 遺伝子産物、細胞側よりはNF κ Bなどの因子)を介して刺激を受け転写後、さらに翻訳されてウイルス産生へと向かう。その後、*gag*産物はポリプロテインの形を取りウイルスプロテアーゼ活性により切断されて、機能のあるp24、p17、p9となる。また、*env*産物は細胞のプロテアーゼにより2分され、それぞれ糖鎖形成をゴルジ体で行い、gp120、gp41となる。これらの産物は細胞膜表面下に集合し、出芽した後、*gag*産物がプロテアーゼにより切断され、細胞外で成熟粒子となる(図3,4)(46)。

HIV-1の増殖サイクルを、HIVプロウイルスDNAが宿主細胞のDNAに組み込ま

れる前後で、増殖過程前期と後期に二分すると、前期では吸着、融合、侵入、脱殻、逆転写およびインテグレーションなどが、後期では転写、翻訳、プロセッシング、アセンブリー、そして出芽などの各段階が抗 HIV-1 剤開発のターゲットとして考えられる (図 3)。

1980 年中期に、逆転写酵素を阻害するジドブジン (AZT) などのヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤の抗 HIV-1 効果が報告されて以来、既に数百にも及ぶ物質が試験管内で抗 HIV-1 効果を発揮するとされてきた。しかし、その殆どは生体で無効であったり、毒性などのために臨床応用に至っていない。現在臨床で頻用されているのは逆転写酵素阻害剤とプロテアーゼ阻害剤のみである。確かにこの 2 種類の薬剤を使った多剤併用療法いわゆる highly active anti-retroviral therapy (HAART) によって、AIDS は「治療可能な慢性感染性疾患」と定義できるようになった。しかし、薬物投与による急性、慢性毒性や耐性 HIV-1 の出現など、現在の HIV-1 感染症に対する化学療法の有する問題は深刻である。

5)-9 逆転写酵素阻害剤の作用機序

HIV-1 はウイルス自身が持つ逆転写酵素を用いてウイルスの RNA が有する遺伝情報を DNA へと逆転写後、宿主 DNA の中に入って (インテグレーション) 複製サイクルを繰り返す。逆転写酵素はヒトの細胞の中には一般に存在しないと考えられており、そのため、ウイルスに対する特異的阻害効果を発揮する一連の逆転写酵素阻害剤 (RTIs) が最初の抗 HIV-1 薬として開発されている。そうした RTIs は AZT に代表されるヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤 (NRTIs) と nevirapine に代表される非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤 (NNRTIs) に分けられる。NRTIs はいずれも五炭糖の 3'の水酸基 (3'-OH) を欠く構造を有している。このような NRTIs は、経口的に投与されると、消化管から吸収され、血中に移行、HIV-1 の主要な標的細胞 (CD4 陽性細胞など) 内に入って、細胞質内で細胞固有の種々のリン酸化酵素によって最終的に活性型物質の三リン酸体 (TP) へと転化する。NRTI-TP は細

胞質内で HIV-1 の逆転写酵素 (RNA-dependent DNA polymerase) の良好な基質として認識され、逆転写酵素の dNTP 結合部位で、逆転写酵素によってウイルスの RNA から複製され伸長しつつあるウイルスの DNA 鎖に組み込まれるが、3'-OH を欠いているため、DNA 鎖の伸長に必要な、次に結合するはずの三リン酸化ヌクレオシド (incoming 2'-deoxynucleoside-TP ; incoming dNTP) との間でリン酸ジエステル結合が形成されず、NRTI-TP が取り込まれた個所で DNA 鎖の終息 (DNA chain termination) が起こる (図 5) (47)。こうして、ウイルスの DNA 複製は途中で終了し、感染は成立せず、結果的にウイルスの増殖が阻止される。最近になって、incoming dNTP と逆転写酵素、鋳型、プライマーの共結晶化が可能となって、dNTP の逆転写酵素活性部位での挙動の解析が進んできている (48)。逆転写酵素の dNTP 結合部位は 3'ポケットとよばれ、Gln151、Ala114、Tyr115、Phe116 などから構成され、これらのアミノ酸残基が incoming dNTP の 3'-OH を認識、結合すると考えられている。

一方、NNRTIs の構造は、NRTIs がすべて塩基と糖を基本構造とする点で互いに類似しているのと異なり、それぞれ著しく違うものが多い。NNRTIs の RT 活性阻害機序は未だ不明であるが、NNRTIs の逆転写酵素との結合部位は p66 サブユニットの酵素活性部位の近傍に位置しており、活性部位のアスパラギン酸のコンフォメーションに変化を起こすか、palm と thum サブドメインのヒンジ部分の動きに制約をもたらすかによって、抗ウイルス活性を発揮すると考えられている (49)。

5)-10 プロテアーゼ阻害剤の作用機序

HIV-1 プロテアーゼは HIV-1 の *pol* 遺伝子によってコードされており、*gag* 遺伝子産物から p24、p17、p6/7 などのウイルス構成蛋白を切断し、さらに *gag-pol* 遺伝子産物からプロテアーゼ (p11) や逆転写酵素 (p66/p51)、インテグラーゼ (p32) を切断する (図 4)。各蛋白は切断されて初めてそれぞれの機能を完全に発揮するようになるが、HIV-1 プロテアーゼ阻害剤はこの複合蛋白の切断を阻害、ウイルス粒

子の成熟をブロックすることにより抗ウイルス活性を発揮する。HIV-1 プロテアーゼは 99 個のアミノ酸からなり、アスバルティックプロテアーゼに分類され、活性中心に Asp25-Thr26-Gly27 配列を持ち、ホモダイマーを形成する。阻害剤はプロテアーゼの活性部位に基質として捕捉されるが、切断部位 (cleavage site) が加水分解を受けないように修飾されているため、阻害剤はプロテアーゼに結合したままとなり、プロテアーゼは本来の酵素活性を発揮できず、産生されたウイルス蛋白は未熟な蛋白のままとなって、ウイルス粒子が形成されてもそれらは感染性を獲得できない。HIV-1 プロテアーゼの基質切断部位には Phe-Pro および Tyr-Pro 切断部位が含まれ、特に Phe-Pro は HIV-1 の基質に特徴的で、現在臨床に使用されているプロテアーゼ阻害剤の全てが Phe-Pro ペプチド結合のミミック構造を基礎としてデザインされており (図 6) (50)、宿主細胞由来のプロテアーゼ活性に影響を与えずに、HIV-1 プロテアーゼのみを選択的に阻害する。

5)-11 薬剤耐性 HIV-1 変異株の出現のメカニズム

薬剤耐性 HIV-1 変異株の出現に関連する因子は錯綜しているが、HIV-1 の genetic background、個体の HIV-1 に対する免疫応答能、服薬の有無とその種類および服用歴などが変異株の出現パターンを更に修飾する。変異株の出現にそれぞれの関連因子がどれ程のインパクトを持つかについては明らかではないが、複数の因子が互いに関連していることだけは確かである。

HIV-1 RT は error-prone であるという特性のため、1 複製サイクルあたり 3×10^{-5} の頻度で遺伝子変異が起こるとされる。しかも HIV-1 は増殖能が高く、1 日 10^{10} 個前後のウイルスが新たに産生され、単純に計算しても 1 日あたり 3×10^5 個前後の HIV-1 変異株が産生されることとなる (51)。可能な限り強くかつ長くウイルスの増殖を抑制することは、良好な治療効果を得るためにも、薬剤耐性 HIV-1 の出現を阻止するためにも重要となる。実際に HIV-1 RNA 量が 500 コピー/mL 以下に

なると薬剤耐性 HIV-1 の出現の確率は有意に下がり、検出限界以下 (<50 コピー/mL) になればその確率はさらに減少する (52)。

Genetic polymorphisms (遺伝子多型) が耐性変異株の出現に関与することがある。例えば、試験管内での耐性誘導実験によって得られた F-ddA (2'-β-fluoro-2',3'-dideoxyadenosine) 耐性 HIV-1 では、検索したクローン全てに Pro119Ser (P119S) および L214F 置換が見られるが、野性株 HIV-1 クローンの一部に既に P119S (8%) および L214F (54%) 置換が存在する。このような結果は、ある特定の polymorphisms が耐性を付与し、そうしたウイルスは特定の薬剤の存在下において選択的に増殖して、やがて薬剤耐性株となることを示していると思われる (53)。HIV-1 の特性の 1 つである高頻度の homologous recombination (相同時組換え) も、耐性変異株の出現を加速する。例えば、HIV-1RT62/75/77/116/151 は RT に 5 つのアミノ酸置換を含むヌクレオシド系逆転写酵素阻害薬 (NRTIs) に対する多剤耐性株で、AZT (azidothymidine) に対して高度の耐性 (野性株に比して 50 倍以上) を有するが (54)、他方、HIV-1PR32/33/45/84/89 はプロテアーゼに 5 つのアミノ酸置換をもつ変異株で、プロテアーゼ阻害剤 (KNI-272) に対して野性株と比べて 35 倍の薬剤耐性を示す。この HIV-1RT62/75/77/116/151 と HIV-1PR32/33/45/84/89 を細胞に同時に感染させ、野性株の増殖を抑制するのに十分量の AZT、KNI-272 の存在下で培養すると、約 3 週間ほどで活発な HIV-1 増殖が起こる。この両薬剤存在下で増殖してきたのは、HIV-1RT62/75/77/116/151 の変異 RT と HIV-1PR32/33/45/84/89 の変異プロテアーゼを合わせ持つ組換え体 (HIV-1RT62/75/77/116/151 & PR32/33/45/84/89) であった (55)。このようにウイルス集団では不断に遺伝子の組換えが起きており、これが高度の薬剤耐性 HIV-1 変異株出現を加速する。

宿主側の因子が薬剤耐性に関連しているという報告もある。宿主タンパク質の MRP4 (multidrug resistance-associated protein 4) の RNA やタンパク質レベルでの過剰発現が、AZT、3TC (3'-thia-2',3'-dideoxycytidine)、d4T (2',3'-

dideoxy-2'.3'-dideohydrothymidine)、および PMEA [9-(2-phosphonyl-methoxyethyl)adenine] の抗ウイルス効果を著しく損なうという (56)。しかし、これら宿主側因子が、臨床的にどれほど耐性発現に関連しているかは明らかでない。ある薬剤の投与に際して出現する薬剤耐性 HIV-1 の耐性強度や fitness (増殖能) はそれぞれ異なる。薬剤耐性 HIV-1 変異株では、耐性を付与する変異により酵素本来の活性が低下して fitness が損なわれることが多いが、これを修復・補正する付加的な変異により fitness を取り戻すことが知られている。もし、薬剤が存在しなければ、ほとんどの薬剤耐性 HIV-1 は野性株 HIV-1 に比べて fitness が低く、宿主で優位の集属としての存続は難しい。しかし、薬剤存在下という環境によって耐性変異を持つ HIV-1 が選択され、より高い耐性と良好な fitness を持つ変異株が集積し、薬剤耐性が形成されるものと考えられる。

5)-12 耐性出現への対応

NRTIs に対する耐性発現への対応は、新たな NRTIs をデザインおよび試験すると共に、相加的または相乗的となる最も有効な組み合わせを開発することであると要約されるが、NRTIs の場合、宿主のリン酸化酵素により三リン酸化されることや RT に選択的な基質となるという複雑な過程を経ることもあって極めて難しい。ほとんどの NNRTIs 耐性関連置換は NNRTIs 結合部位で起きるために交差耐性が起こる。NNRTIs に対する耐性発現への対応は、試験管内においてこのようなアミノ酸置換をもたらさないと報告されている capravirine (S-1153) (57) のような NNRTIs をデザイン・合成することである。また、EFV (efavirenz) の場合のように、NNRTIs に対する交差耐性が最大の懸念であるが、2 つの NRTIs と組み合わせた臨床試験では比較的長期的で強力な抗ウイルス効果が得られている。

薬剤耐性 HIV-1 変異株の出現への対応の一つは、“鍵”となるアミノ酸変異を特定して、その出現を阻止、または著しく遅延させることであるが、実際は方法論は確立されておらず、しかも試験管内で誘導した HIV-1 変異株が生体内で起こる変

異を反映するという保証はない。事実、IDV (indinavir) に対する耐性株の試験管内での誘導は極めて困難で IDV が耐性の発現に抵抗するものと期待されたが、生体内では早期に変異株が出現し、その臨床効果が早期に失われている。薬剤耐性の発現しにくい PIs のデザインは、標的であるプロテアーゼのフォールディング、安定性などが必ずしも理解されていないうえに、プロテアーゼ独特の構造と機能の点からも様々な制約がある。しかし、たとえば、あるサブサイトのアミノ酸がダイマー構造維持に関与することや、プロテアーゼが Gag タンパクの約 10 箇所の切断部位を認識し切断する酵素活性を維持する必要があることなどは、薬剤耐性の発現しにくい PIs のデザインに応用できるかも知れない。実際に、他種類の PIs に対して高い交差耐性を有する HIV-1 変異株に強い抗ウイルス活性を発揮する JE-2147 (58) や、プロテアーゼの活性部位のアミノ酸の側鎖ではなく主鎖に結合することで耐性が発現しにくく、しかも薬剤耐性 HIV-1 にも強い活性を維持する UIC-94003 (TMC-126) (59, 60) も報告されている。しかし、HIV-1 プロテアーゼで見られる耐性付与アミノ酸置換のかなりの部分が、野性株の HIV-2 や他のレトロウイルスのプロテアーゼで見られる点から考えると、耐性発現に対応する解決策は、本来的に限られたものでしかない可能性もある。

一方接着侵入阻害剤のように、これまでの薬剤とは全く異なる機序で抗 HIV-1 作用を示す薬剤の開発も行われている。たとえば、T-20 や T-1249 は、HIV-1 膜タンパク gp41 に結合することでウイルスの細胞への吸着・侵入の過程を阻害し感染を阻害する (61)。他方、最近、CC ケモカインと CXC ケモカインのいくつかのレセプターが HIV-1 の細胞内への侵入時の coreceptor として働くことが分かり、更には後天性免疫不全症候群または AIDS の病気進行に関係があるといわれている (62-64)。HIV-1 の coreceptor 使用は株特異的であり、マクロファージ指向性 (M-tropic または R5) HIV-1 株は感染時に主として CCR5 を coreceptor として使用し (65, 66)、一方、T 細胞指向性 (T-tropic または X4) HIV-1 株は CXCR4 を介して細胞内に侵入する (36, 40, 62, 67) (図 2)。生来の CXCR4 のリガンドであ

る SDF-1、CCR5 のリガンドである MIP-1 α (または LD78 α と呼称)、MIP-1 β そして RANTES は特異的に CXCR4 ないし CCR5 受容体に結合し、X4 ないし R5 HIV-1 複製を阻害することができることより (40-42)、CCR5 と CXCR4 に対する阻害剤の開発が試みられてきた。CXCR4 の阻害剤として初めて報告されたものにカプトガニの血球中に存在するタキプレシンより分離されたペプチドである T22 とそれより短い 14 アミノ酸からなる T1407 (68, 69)、及び低分子化合物の AMD3100 (70) などがある。一方、CCR5 阻害剤に関しては CCR5 の natural ligand である RANTES の誘導体、AOP-RANTES (71) や低分子化合物である TAK-779 (72)、SCH-C (73)、また、我々が見いだした、CCR5 の extracellular loop 2B に結合することで強い抗 HIV-1 活性を発揮する spiro-diketopiperazine 誘導体である低分子化合物 E913 (Mr. 484) などが報告されている (74)。しかしながら、阻害剤の多くは *in vitro* においては効果が認められるものの、*in vivo* では効果がなかったり、長期投与した場合 CCR5 を介したケモカインのシグナル伝達の阻害が生体へ与える影響については一部の免疫系への影響の可能性が報告されているがまだ不明な点が多いなどの問題がある (75)。

5)-13 本研究の目的

前述したように、AIDS 治療薬は、逆転写酵素阻害剤とプロテアーゼ阻害剤の 2 クラスからなり、これらの薬剤を組み合わせた多剤併用療法(HAART)の導入によって HIV-1 感染症の病像は大きく変わり、死亡者数は激減したが、薬物による急性、慢性毒性や HIV-1 はいずれの薬剤に対しても耐性を獲得し、結果的に治療効果の消失という難題をもたらした。そのため、新しい標的に対する薬剤として CCR5 を標的とした薬剤の開発が進められている。しかし、長期にわたる CCR5 を介したケモカインのシグナル伝達の阻害が生体へ与える影響については一部の免疫系への影響の可能性が報告されているがまだ不明な点が多い。近年 Woitas らは、CCR5 が細

胞表面から完全に欠損している CCR5 遺伝子 32 塩基の欠損 (CCR5 Δ 32) を有する C 型肝炎患者において、CCR5 遺伝子変異を有さない患者と比較し、有意に血中の C 型肝炎ウイルス濃度の上昇を認めたと報告している (76)。したがって、可能な限り生体内のケモカインの作用を阻害せず、その一方で、強力な抗 HIV-1 作用を持つ、接着、侵入阻害剤が必要と考えられる。これらの問題を解決するためには、ケモカインとケモカインレセプターとの相互作用について構造学的により詳細な解析を行うことが不可欠である。

LD78 遺伝子群は 1986 年に小原らにより最初に単離された遺伝子群である (4)。LD78 遺伝子群は MIP-1 α 遺伝子を含んでいるが、個体間で非常に多様性がある。サザンプロット解析にて LD78 は少なくとも 3 つの変異遺伝子があることが判明し、それぞれ LD78 α 、LD78 β 、LD78 γ と呼ばれている (4, 77)。LD78 α 遺伝子はハプロイドゲノム当たり、1 ないし 2~3 遺伝子存在する。一方、LD78 β 遺伝子と LD78 γ 遺伝子コピー数は個体間で異なっている。LD78 α と LD78 β はそれぞれ 92 と 93 アミノ酸をコードしており、シグナル配列切断部位にて切断後、70 アミノ酸の成熟タンパクとなる。LD78 γ 遺伝子はエクソン 1 が欠損した pseudogene である (77)。LD78 成熟タンパクのレセプターは、細胞膜 7 回貫通 G タンパク質共役型受容体 CCR1 と CCR5 であり、LD78 の生理作用としては、単球、リンパ球、樹状細胞の遊走活性、未成熟骨髄系前駆細胞の増殖抑制、破骨細胞の増殖分化誘導および遊走活性などが知られている。近年、LD78 は NH₂ 末端から 2 番目のアミノ酸残基の違い (セリンまたはプロリン) で LD78 α 、 β の 2 群に分けられ、LD78 α は MIP-1 α や MIP-1 α S とも呼ばれる。LD78 β は MIP-1 α に比べ抗 HIV-1 活性、シグナル伝達能及び化学遊走誘導能が 10 倍強いとの報告があり、生来の CCR5 のリガンドで最も強い抗 HIV-1 活性を持つ (43-45)。また、LD78 β によるシグナル伝達開始には、LD78 β の NH₂ 末端と CCR5 細胞外第 2 ループ領域との相互作用が必須であるとされている (図 7) (78)。今回、我々は構造生物学的活性連関および抗 HIV-1 活性に関与するアミノ酸残基の特性等を同定するため、LD78 β の NH₂ 末端からアラニン以外の 1

アミノ酸残基をアラニンに置換した LD78 β 変異体を作成し、それらの生物学的活性等について解析した。

6) 実験方法

6)-1 ウイルスと細胞

R5 HIV-1 株、HIV-1_{Ba-L} (79) と HIV-1_{JRFL} (80) は PHA 刺激した抗 HIV-1 抗体陰性ドナー由来の PBM を用いて増殖させ、使用前まで-80℃にて保存した。CCR5 を強制発現した CD4 陽性 Molt4 細胞 (CCR5-Molt4 細胞 : 熊本大学医学部感染防御学講座助教授、前田洋助先生より供与) (81) は 10% FCS と抗生物質入りの 1640 RPMI 培地にて培養した。CD4 と CCR5 を強制発現させたヒト骨肉腫細胞 (CCR5-HOS 細胞) は AIDS Research and Reference and Reagent Program, National Institute of Allergy and Infectious Disease (Bethesda, MD) より供与を受け、15% FCS、0.1 mg/ml hygromycin B、0.2 mg/ml geneticin と 1 µg/ml puromycin (Sigma, St. Louis, MO) 入りの DMEM 培地にて培養した。CHO 細胞は the American Type Culture Collection (Manassas, VA; ATCC#CRL 9096) から購入し、10% FCS と抗生物質入りの Ham's F-12 培地 (GIBCO BRL, Rockville, MD) にて培養した。

6)-2 CCR5 発現細胞株作成法

ヒト CCR5 cDNA はヒトの胎盤 cDNA ライブラリーを用いて、PCR にて増幅し、哺乳類発現ベクターであり、V5-ヒスチジンタグエピトープが欠如してある pEF6/V5-His (Invitrogen, Carlsbad, CA) にてサブクローニングした。CHO 細胞に DMRIE-C (GIBCO BRL)を用いて、得られた CCR5 プラスミドを形質導入し、5 µg/ml blasticidin S hydrochloride (Kaken Pharmaceutical, Tokyo, Japan)存在下で選択的に培養し、CCR5 を強制発現させた CHO 細胞 (CCR5-CHO 細胞) を得た。

6)-3 LD78 β 変異体発現ベクター作成法

LD78 β と CCR5 との相互作用に重要な役割を担っているアミノ酸残基を同定するために、我々は野生型の LD78 β (LD78 β_{WT}) と NH₂ 末端よりアラニン以外のアミノ酸残基をアラニンに置換した 6 個の LD78 β 変異体を作成し、構造生物学的活性連関に関与しているアミノ酸残基について調べた。

図 8 のように最初の CC モチーフまで (NH₂ 末端ループ構造)、2、3、6、7、8、9 番目のアミノ酸残基をアラニンに置換した 6 種類の LD78 β 変異体を作成し、それぞれ、LD78 β_{P2A} 、LD78 β_{L3A} 、LD78 β_{D6A} 、LD78 β_{T7A} 、LD78 β_{P8A} 、そして LD78 β_{T9A} と名付けた。

野生型の LD78 β (LD78 β_{WT}) と 6 種類の LD78 β 変異体は GST 融合蛋白として発現させた。つまり、LD78 β_{WT} の 70 アミノ酸残基をエンコードしている cDNA クローン pLD78 β (4, 77) を用い、トロンビン切断部位の一部分とエンテロキナーゼ認識部位を含むプライマー-GTHEKAPL (5'-GGA TCC GAC GAT GAC GAT AAG GCA CCA CTT GCT GCT GAC AC-3') と LD78TGAc (5'-CTC AGG CAC TCA GCT CCA GGT-3')を用いて PCR 法にて増幅した。また、pGEX-2T (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) のプロモーター領域、GST およびトロンビン切断部位を、プライマー-PGEX160 (5'-GGC AAA TAT TCT GAA ATG AGC TGT T-3')とエンテロキナーゼ認識部位を含むプライマー-GTHEKc (5'-CTT ATC GTC ATC GTC GGA TCC ACG CGG AAC CAG ATC C-3')を用いて PCR 法にて増幅した。

PCR は以下の条件にて行った。

PCR 条件

(1) 1cycle

94.0°C 3:00

(2) 25cycles

94.0℃ 0:50

53.0℃ 0:50

72.0℃ 1:00

(3) 1cycle

72.0℃ 15:00

これらの2つのPCR産物はプライマーPGEX160とLD78TGAcにて、Hoらが(82)報告している組み換えPCR法(recombinant PCR)を用い、1.1kbの1本のフラグメントに融合した。

組み換えPCRは以下の条件にて行った。

PCR条件：

最初にプライマーは入れずに以下の条件にてPCRを行った。

(1) 25cycles

95.0℃ 2:00

53.0℃ 1:00

72.0℃ 2:00

次に、上記のものに、プライマーPGEX160とLD78TGAcを加え、以下の条件にて再度PCRを行った。

PCR条件：

(1) 1cycle

94.0℃ 3:00

- (2) 25cycles
94.0°C 1:00
53.0°C 1:00
72.0°C 2:00
- (3) 1cycle
72.0°C 15:00

完成した DNA フラグメントは pCRII-TOPO ベクター (Invitrogen) を用いてサブクローニングを行った。6 種類の LD78 β 変異体発現ベクターは、上述した LD78 β_{WT} と同様の方法にて作成したが、用いたプライマーは塩基の置換を含んでいるため、意図するアミノ酸置換が導入されることとなる。6 種類の LD78 β 変異体発現ベクターを作成するためのプライマーは以下のものを用いた。

LD78 β_{P2A} : AP1AAF (5'-GAC CTA GAC GAT AAG GCA GCA CT-3')

AP1AAR (5'-CGT GTC AGC AGC AAG TGC TGC CT-3')

LD78 β_{L3A} : LA7AAF (5'-GAC GAT AAG GCA CCA GCT GCT GC-3')

LA7AAR (5'-GTC GGC GTG TCA GCA GCA GCT GG-3')

LD78 β_{D6A} : AD13AAF (5'-CAC CAC TTG CTG CTG CCA CGC-3')

AD13AAR (5'-CAG GCG GTC GGC GTG GCA GCA-3')

LD78 β_{T7A} : T19AF (5'-ACT TGC TGC TGA CGC GCC GAC-3')

T19AR (5'-GTG CGC GGC TGG CGG ACG AC-3')

LD78 β_{P8A} : P22AF (5'-CTT GCT GCT GAC ACG GCG ACC-3')

P22AR (5'-GTG CCG CTG GCG GAC GAC GA-3')

LD78 β_{T9A} : TA25AAF (5'-TGC TGA CAC GCC GGC CGC CT-3')

TA25AAR (5'-CTG AAG CAG CAG GCG GCC GG-3')

GST 融合蛋白はそれぞれの融合蛋白発現ベクターを形質導入した大腸菌 JM109 (Promega, Madison, WI) を用いて過剰発現させた。それぞれの作成した発現ベクターに意図する置換が存在し、予期しない (PCR エラー等) 置換が入っていないことを核酸シーケンスにて確かめた。

6)-4 LD78 β 変異体蛋白精製法

組み換え融合蛋白を精製し、切断し、LD78 β_{WT} と 6 種類の LD78 β 変異体を作成した。簡単に方法を叙述すると、組み換え融合蛋白を発現している大腸菌の lysate を GS4B (Amersham Pharmacia Biotech AE) と混和し、室温にて 1 時間培養後、PBS にて徹底的に洗浄し、エンテロキナーゼ (Invitrogen) 存在下、37°C にて一晩培養した。エンテロキナーゼは Asp-Asp-Asp-Asp-Lys の直後で切断するため、希望する NH₂ 末端を持つ組み換え LD78 β 蛋白を得ることができる。LD78 β_{WT} と LD78 β 変異体の濃度はヒト MIP-1 α イムノアッセイキット (Amersham Pharmacia Biotech AB) を用いて測定した。

6)-5 細胞内カルシウム濃度上昇測定法

LD78 β_{WT} および LD78 β 変異体による細胞内カルシウム濃度上昇誘導活性について、Grynkiewicz らが提唱した方程式 (83) を用いて測定し計算を行った。つまり、CCR5-HOS 細胞 (5 x 10⁶ cells/ml) を 10 mM INDO-1 AM (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) を含む 15% FCS 入りの DMEM 培地にて浮遊させ、37°C、30 分培養した。その後、細胞をアッセイバッファー (5 mM KCl, 147 mM NaCl, 0.22 mM KH₂PO₄, 1.1 mM Na₂HPO₄, 5.5 mM glucose, 0.3 mM MgSO₄, 1 mM MgCl₂ and 10 mM HEPES, pH 7.4) にて 2 回洗浄し、1 mM CaCl₂ を含むアッセイバッファーで 2 x 10⁶ cells/ml になるように再び浮遊させた (72, 84)。浮遊

させた細胞にケモカインを反応させ、細胞内カルシウム濃度の上昇を F-4500 蛍光分光計 (Hitachi, Tokyo, Japan) を用いて測定した。

6)-6 抗 HIV-1 活性測定法

LD78 β _{WT} と LD78 β 変異体の HIV-1_{Ba-L} および HIV-1_{JRFL} に対する増殖阻害活性は、PHA にて刺激した PBM を用いて、以前に述べられた方法 (54) に若干の修正を加え、ウイルスが産生する p24 抗原量の減少を測定することにより求めた。つまり、PHA にて刺激した PBM (1 x 10⁶ cells/ml) にそれぞれの HIV-1 株の 50TCID₅₀ (TCID₅₀: PHA にて刺激した PBM 2 x 10⁵ cells を含む 200 μ l の培養液の入ったウェルの 50%を感染させることが可能なウイルス量) (85) を曝露し、96-ウェルマイクロタイタープレートにて、さまざまな濃度の LD78 β _{WT} または LD78 β 変異体存在下、および非存在下で培養した。細胞により産生される p24 抗原量は、培養して 7 日後に、測定感度 10-100,000 pg/ml p24 (74) である全自動化学発光酵素免疫定量装置 (Lumipulse F: Fujirebio Inc. Tokyo, Japan) を用いて測定した。50%の p24 Gag 蛋白の産生を抑える LD78 β の濃度 (IC₅₀) は LD78 β 非存在下のコントロール細胞の p24 産生量と比較することにより求めた。すべての測定は 3 重に行い、4 回の独立した実験を行った。

6)-7 化学遊走能測定法

LD78 β _{WT} と LD78 β 変異体による細胞の化学遊走を誘導する活性について、Ebina らが以前述べた方法を参考に (86)、CCR5-Molt4 細胞 (5 x 10⁵ cells/ml) とケモタキセル (Kurabo, Osaka, Japan) を用いて測定した。8- μ m ポアサイズ、ポリカーボネート膜内に移動した細胞を固定後、ヘマトキシリンにて染色し、顕微鏡を使用し、無作為に選んだ 10 カ所の 400 倍拡大像中の細胞を数えた。ケモタキ

シスインデクスは（ケモカイン存在下で膜に移動した細胞数） / （ケモカイン非存在下で膜に移動した細胞数）として求めた。

6)-8 2D7 を用いた LD78 β 変異体競合結合阻害実験

CCR5-Molt4 細胞と CCR5 に対するマウスのモノクローナル抗体で CCR5 のナチュラルリガンドである MIP-1 α 、LD78 β 、MIP-1 β 、RANTES の CCR5 への結合を阻害することが知られている 2D7 (87, 88) を用いて、LD78 β_{WT} および 6 種類の変異体と、2D7 との結合阻害実験を行った。つまり、CCR5-Molt4 細胞 (5×10^5 cells/50 μ l) を 2% BSA (Sigma Chemical Co) を含む PBS に浮遊させ、さまざま濃度の LD78 β_{WT} または LD78 β 変異体と、2D7 (5 μ g/ml) を混合したものを加え、4°C にて 1 時間培養した。その後、アフィニティーカラムにて精製した、PE を結合させたヒツジ由来のマウス IgG F(ab') $_2$ 断片特異的 2 次抗体を加えて、4°C にて 1 時間培養した。染色した細胞は Epics XL 蛍光細胞分析分離装置 (Coulter, Fullerton, CA) を用いて解析した。平均蛍光強度比 (mean fluorescence intensity ratio) は以下の式にて求めた。

$$\frac{[(2D7 \text{ と LD78}\beta \text{ 変異体存在下の平均蛍光強度}) - (2D7 \text{ 非存在下の平均蛍光強度})]}{[(2D7 \text{ 存在下、LD78}\beta \text{非存在下の平均蛍光強度}) - (2D7 \text{ 非存在下の平均蛍光強度})]}$$

6)-9 125 I-MIP-1 α を用いた LD78 β 変異体競合結合阻害実験

CCR5-CHO 細胞 (1.2×10^5 cells/well) を 48-ウエル平底カルチャープレートに播き、18-24 時間培養後、20 mM HEPES と 0.5% BSA を含む Ham's F-12 培地 (pH 7.4) にて一回洗浄した。付着細胞である CCR5-CHO 細胞に 125 I で標識した MIP-1 α (125 I-MIP-1 α) (Amersham Pharmacia Biotech AB) 500 pM と様々な濃度の LD78 β_{WT} と 6 種類の変異体を同時に加え、室温にて 1 時間培養後、冷却

した PBS で徹底的に洗浄し、0.5 ml の 1 N NaOH にて細胞を溶解した。0.5 ml の細胞溶解液中の放射能は ARC-370M Gamma System (Aloka Technical Service Co., Ltd, Tokyo, Japan) にて測定した。 ^{125}I -MIP-1 α の CCR5-CHO 細胞に対する非特異的吸着は 1 μM の非標識 MIP-1 α (Peprotech, Inc., Rocky Hill, NJ) 存在下の細胞に 500 pM ^{125}I -MIP-1 α を加えたときの放射能を基に計算し、放射能の実測値より減じた。 ^{125}I -MIP-1 α の結合の割合 (%) は以下の式にて求めた。

$$\left[(\text{それぞれの濃度の LD78}\beta \text{ 存在下で } ^{125}\text{I-MIP-1 を曝露された細胞の cpm}) - (\text{非特異的に結合した } ^{125}\text{I-MIP-1}\alpha \text{ の cpm}) \right] / \left[(\text{LD78}\beta \text{ 非存在下で } ^{125}\text{I-MIP-1 を曝露された細胞の cpm}) - (\text{非特異的に結合した } ^{125}\text{I-MIP-1}\alpha \text{ の cpm}) \right] \times 100$$

6)-10 CCR5 細胞内移行 (CCR5 down-regulation) 解析法

CCR5 の細胞内移行 (CCR5 down-regulation) を蛍光細胞分析分離法 (FACS) を用いて解析した。つまり、CCR5-Molt4 cells (5 x 10⁵ cells/50 μl) に様々な濃度の LD78 β_{WT} もしくは LD78 β 変異体を加え、37°C にて 2 時間培養し、PBS で一回洗浄した。次に、細胞膜上の CCR5 発現数を正確に評価するため、Aramori らが以前述べた方法に基づき (89)、酸性溶液 (50 mM glycine-HCl, pH 3.0, containing 0.1 M NaCl) にて 1 分洗浄し、CCR5 に結合している LD78 β 分子を除去した。その後、細胞を 2% BSA を含む PBS にて浮遊させ、抗ヒト CCR5 モノクローナル抗体である 2D7 を 40 $\mu\text{g/ml}$ になるように加え、室温にて 1 時間培養した。最後に、細胞を PBS にて洗浄し、アフィニティーカラムにて精製した、PE を結合させたヒツジ由来のマウス IgG F(ab')₂ 断片特異的 2 次抗体を加えて、4°C にて 1 時間培養した。細胞は Epics XL を用いて解析した。

7) 実験結果

7)-1 LD78 β 変異体による細胞内カルシウム濃度上昇誘導活性

LD78 β と CCR5 との相互作用に重要な役割を担っているアミノ酸残基を同定するため、CCR5 との相互作用に重要と考えられている LD78 β NH₂ 末端の 1 アミノ酸残基ずつ、アラニン以外のアミノ酸残基をアラニンに置換した 6 種類の変異体を作成し、生物学的構造活性連関について調べた。図 8 のように最初の CC モチーフまで (NH₂ 末端ループ構造)、2、3、6、7、8、9 番目のアミノ酸残基をアラニンに置換した 6 種類変異体を作成し、それぞれ、LD78 β _{P2A}、LD78 β _{L3A}、LD78 β _{D6A}、LD78 β _{T7A}、LD78 β _{P8A} そして LD78 β _{T9A} と名付けた。

最初に、我々は以前に Menten らが述べた方法を用いて (44)、LD78 β _{WT} と LD78 β 変異体について CCR5-HOS 細胞における細胞内カルシウム濃度上昇誘導能 (シグナル伝達能) の相違があるかどうかについて調べた (図 9)。CCR5-HOS 細胞に生理学的な条件下では中から高濃度である、50、100 または 300 ng/ml の濃度の各 LD78 β 変異体を反応させたところ、LD78 β _{T9A} について、細胞内カルシウム濃度上昇誘導能の減弱を認めた以外、LD78 β _{WT} と他の LD78 β 変異体において、細胞内カルシウム濃度上昇誘導能の程度に大きな差は認めなかった (図 9)。これらのデータは LD78 β の NH₂ 末端の 8 番目までのアミノ酸残基をアラニンに置換しても、少なくとも、シグナル伝達能にほとんど影響を与えないことを示していた。

7)-2 抗 HIV-1 活性

次に、我々は、PHA で刺激した PBM を用いて、p24 Gag 蛋白産生阻害効果を測定することにより、LD78 β _{WT} と LD78 β 変異体が 2 種類の R5 HIV-1 株、HIV-1_{Ba-L} と HIV-1_{JRFL} の感染及び増殖に対する阻害効果について調べた (図 10)。PHA で刺激した 4 人の抗 HIV-1 抗体陰性ドナー由来の PBM に、5 段階の異なる濃度 (0.16, 0.8,

4.20, そして 100 ng/ml) の、LD78 β 変異体存在下、もしくは非存在下で、R5 HIV-1 株 (HIV-1_{Ba-L} と HIV-1_{JRFL}) を感染させた時、LD78 β _{P8A} が最も HIV-1_{Ba-L} および HIV-1_{JRFL} に対する増殖阻害活性が高く、それぞれの R5 HIV-1 株に対する IC₅₀ 値は LD78 β _{WT} が 10.7 ng/ml と 11.2 ng/ml であるのに対し、4.6 ng/ml と 3.8 ng/ml であった (Wilcoxon's signed-ranks test: $p < 0.02$)。LD78 β _{D6A} もまた LD78 β _{WT} と比較し抗 HIV-1 活性の増強を来しており、IC₅₀ 値は LD78 β _{WT} が 10.7 ng/ml と 11.2 ng/ml であるのに対し、6.7 ng/ml と 5.9 ng/ml であった (Wilcoxon's signed-ranks test: $p < 0.02$)。一方、LD78 β _{P2A}、LD78 β _{L3A} そして LD78 β _{T7A} の抗 HIV-1 活性は、LD78 β _{WT} と比較し、それぞれにおいて若干の低下を認めた ($p < 0.05$)。興味深いことに、細胞内カルシウム濃度上昇誘導能の減弱を認めた LD78 β _{T9A} は最も抗 HIV-1 活性の減弱を認めており、HIV-1_{Ba-L} と HIV-1_{JRFL} の増殖に対する阻害効果は、IC₅₀ 値でそれぞれ、39.6 ng/ml と 37.7 ng/ml であった (図 10)。R5 HIV-1 増殖阻害効果について、比較すると以下の順番になった。

LD78 β _{P8A} > LD78 β _{D6A} > LD78 β _{WT}, LD78 β _{L3A} > LD78 β _{T7A}, LD78 β _{P2A} > LD78 β _{T9A}

細胞内カルシウム濃度上昇誘導能 (シグナル伝達能) は、LD78 β _{T9A} 以外の変異体は LD78 β _{WT} とほぼ同様であったことより、これらのデータは、LD78 β の HIV-1 感染阻止能とシグナル伝達能は異なる分子間相互作用による可能性を示唆していた。

7)-3 化学遊走誘導能に与える影響

次に、LD78 β _{WT}、R5 HIV-1 に対する増殖阻害活性の増強が認められた LD78 β _{D6A} と LD78 β _{P8A}、逆に R5 HIV-1 に対する増殖阻害活性の著しい減弱が認められた LD78 β _{T9A} について、Ebina らが以前述べた方法を参考に (86)、CCR5-Molt4 を用い、それぞれの組み換え蛋白の化学遊走能について検討した。細胞内カルシウム濃

度上昇誘導能の減弱を認め、最も抗 HIV-1 活性が減弱していた LD78 β _{T9A} は 10 ng/ml までほとんど化学遊走を誘導しなかった (図 11)。3 種類の組み換え蛋白、LD78 β _{WT}、LD78 β _{D6A} そして LD78 β _{P8A} による CCR5-Molt4 細胞に対する化学遊走誘導活性はほぼ同じであり、図 9 の細胞内カルシウム濃度上昇誘導能測定の結果と同様であった。最も高濃度 (100 ng/ml) において、LD78 β _{WT}、LD78 β _{D6A} そして LD78 β _{P8A} による化学遊走誘導活性は減弱し、この結果は Proost らが以前報告したものと一致していた (90)。一方、LD78 β _{T9A} は、100 ng/ml の濃度にて最も化学遊走を誘導した。これらのデータはさらに、LD78 β _{T9A} の CC ケモカインとしての活性は、今回活性を調べた変異体の中で、最も低下していることを示していた。

7)-4 CCR5 に対する親和性

現在、ケモカインによる HIV-1 増殖阻害作用の機序は少なくとも 2 つ考えられている (91) : (i) ケモカインがケモカインレセプターに結合することにより、レセプターを被覆し、gp120 とケモカインレセプターとの結合を阻害する。(ii) ケモカインとケモカインレセプターとの相互作用にて、ケモカインレセプターを細胞内移行 (CCR5 down-regulation) させ、細胞表面のケモカインレセプター数を減じる。LD78 β は、CCR5 の細胞外第 2 ループ領域の NH₂ 末端側の半分の領域 (CCR5-ECL2A) に結合するモノクローナル抗体 2D7 と競合結合阻害をすることが知られている (87, 92)。この作用を利用し、まず最初に、LD78 β 変異体間での CCR5 への結合力の相違を検討するため、CCR5-Molt4 細胞を用い、LD78 β 変異体と 2D7 との競合結合阻害実験を行った。CCR5-Molt4 細胞に一定の濃度の 2D7 (5 μ g/ml) と様々な濃度の LD78 β _{WT} または LD78 β 変異体の混合物を加え、4°C にて 1 時間培養した。図 12 のように、FACS 解析にて、LD78 β _{WT} は明らかに 2D7 の CCR5-Molt4 細胞への結合と競合し、2 点の濃度 (100 ng/ml と 1,000 ng/ml) において、蛍光強度の減弱を来していた。LD78 β _{D6A} もまた蛍光強度の減弱を認めていたが、その程

度は LD78 β_{WT} より大きく、LD78 β_{WT} において、LD78 β_{WT} 非存在下の平均蛍光強度が 2.0 であるのに対し、1,000 ng/ml の濃度の LD78 β_{WT} 存在下にて 1.3 となり平均蛍光強度比 (mean fluorescence intensity ratio : MFI) が 0.59 となったのに対し、LD78 β_{D6} による平均蛍光強度の変化は 2.0 から 0.8 となり、平均蛍光強度比が 0.29 となった。同様の方法にて、すべての他の変異体と 2D7 との競合結合阻害実験を行った (図 13-A)。LD78 β_{L3A} は LD78 β_{WT} とほぼ同等に 2D7 の結合を阻害した。一方、3 種類の変異体、LD78 β_{T9A} 、LD78 β_{P2A} 、そして LD78 β_{T7A} は LD78 β_{WT} と比較し、結合阻害効果の減弱を認めた。対照的に、LD78 β_{WT} と比較し、LD78 β_{P8A} と LD78 β_{D6A} は明らかに増強した競合結合阻害効果を認めた。

最近、我々が報告した E913 を含む spirodiketopiperazine 誘導体や、他のいくつかの CCR5 に対する低分子拮抗剤が必ずしも 2D7 の結合を阻害しないことが報告されている。したがって、上述した CCR5 特異的モノクローナル抗体を用いた競合結合阻害実験の結果を確認するため、さらに、 ^{125}I を標識したヒト MIP-1 α (^{125}I -MIP-1 α) を用いて、LD78 β_{WT} と 6 種類の LD78 β 変異体について競合結合試験を行った。予想していた通り、図 13-B に示したように、500 ng/ml の LD78 β_{WT} 存在下にて、CCR5-CHO 細胞への ^{125}I -MIP-1 α の結合はほぼ完全に阻害された。5 ng/ml と 50 ng/ml の LD78 β_{WT} 存在下にて、 ^{125}I -MIP-1 α の結合はそれぞれ 39.9 % と 92.4 % まで阻害された。一方、LD78 β_{P8A} と LD78 β_{D6A} は最も効果的に 2D7 の結合の阻害を認めたのだが (図 13-A)、CCR5-CHO 細胞への ^{125}I -MIP-1 α の結合もまた LD78 β_{WT} より強力に阻害した。5 ng/ml の LD78 β_{P8A} または LD78 β_{D6A} 存在下での ^{125}I -MIP-1 α の結合はそれぞれ 68.2 % と 53.7 % まで阻害された。他の 3 種類の変異体、LD78 β_{L3A} 、LD78 β_{T7A} および LD78 β_{T9A} は、LD78 β_{WT} と比較し、競合結合阻害効果は低下していた。その中で、LD78 β_{P2A} による競合結合阻害効果が最も低下していた。これらのデータはほぼ 2D7 を用いた競合結合阻害実験の結果と一致していた。

LD78 β の CCR5 への結合力を比較すると以下の順番になった。

LD78 β_{P8A} , LD78 β_{D6A} > LD78 β_{WT} > LD78 β_{L3A} > LD78 β_{T7A} > LD78 β_{T9A} , LD78 β_{P2A}

7)-5 CCR5 の細胞内移行における効果

CCR5-Molt4 細胞を用いて、LD78 β_{WT} および LD78 β 変異体による CCR5 細胞内移行作用 (CCR5 down-regulation) を比較検討した。CCR5-Molt4 を様々な濃度の LD78 β_{WT} または LD78 β 変異体存在下にて、37°C、2 時間培養し、その後 0.05 M glycine-HCl (pH 3.0) にて洗浄することで、CCR5 に結合している LD78 β 変異体を除去し、1 次抗体 2D7 を反応させ、最後に PE が結合している 2 次抗体に反応させ、蛍光細胞分析分離装置 (FACS) にて解析した。図 14 に示したように、LD78 β_{WT} は最も高濃度の 1,000 ng/ml にて、約 76% の平均蛍光強度の減少を来した (CCR5 down-regulation)。LD78 β_{P2A} と LD78 β_{T9A} は著しく CCR5 down-regulation 活性の低下を認めた。一方、LD78 β_{L3A} と LD78 β_{T7A} は LD78 β_{WT} とほぼ同様の CCR5 down-regulation 活性を認めた。しかしながら、2 種類の変異体 (LD78 β_{D6A} と LD78 β_{P8A}) は LD78 β_{WT} と比較し、CCR5 down-regulation 活性の増強を認めていた。

LD78 β の CCR5 down-rugulation 活性を比較すると以下の順番になった。

LD78 β_{P8A} , LD78 β_{D6A} > LD78 β_{WT} , LD78 β_{L3A} , LD78 β_{T7A} > LD78 β_{P2A} > LD78 β_{T9A}

注目すべき事に、2D7 および ^{125}I -MIP-1 α との競合結合阻害活性と CCR5 down-regulation 誘導活性を比較した順番は、R5 HIV-1 増殖阻害活性を比較した順番とほぼ同様であった。この事は LD78 β 変異体の R5 HIV-1 増殖に対する阻害効果は CCR5 の細胞外第 2 ループ領域 (CCR5-ECL2A) への親和性と CCR5 down-regulation 誘導活性の両者に依存していると考えられた。

8) 表及び図

表1. ケモカインファミリーとレセプター特異性

レセプター	ケモカイン	発現細胞
○ CX ₃ Cサブファミリー		
CXCR1	IL-8, GCP-2	好中球, T細胞, NK細胞
CXCR2	IL-8, GRO, NAP-2, ENA-78	"
CXCR3	IP-10, Mig, I-TAC	活性化Th1細胞
CXCR4	SDF-1/PBSE	ナイーブT細胞, Th2細胞, preB細胞, 単球, 造血幹細胞
CXCR5/BLR1 (レセプター不明) PF4	BLC	B細胞
○ CCサブファミリー		
CCR1	MIP-1 α , RANTES, MCP-2.3, MIP1F-1, Lkn-1, HCC-1	単球, T細胞, 未熟樹状細胞
CCR2	MCAF/MCP-1~4	単球, T細胞, 好塩基球
CCR3	エオタキシン, MCP-2~4, Lkn-1, RANTES, MIPF-2	好酸球, 好塩基球
CCR4	MDC, TARC	Th2細胞
CCR5	MIP-1 α , LD78 β , MIP-1 β , RANTES	単球, Th1細胞
CCR6	LARC	臍帯血幹細胞由来未熟樹状細胞, T細胞, B細胞
CCR7	ELC, SLC	メモリーT細胞, B細胞
CCR8 (レセプター不明) TECK, DC-CK1/PARC, LEC	I-309	T細胞, B細胞
○ Cサブファミリー		
XCR1	Lymphotactin	T細胞, NK細胞
○ CX ₃ Cサブファミリー		
CX ₃ CR1	フラクタルカイン	NK細胞, ニューロン, CD8 ⁺ T細胞, 単球

注: ヘルパーT細胞にはTh1, Th2の2種類が存在し、それぞれ細胞性免疫、液性免疫に関与し互いに機能を調節している。

表2. ケモカインファミリーと細胞特異性

ケモカイン	報告されている主な標的細胞
CXCケモカイン	
ELRモチーフケモカイン	
Gro α	好中球、メモリーT細胞
Gro β	好中球
Gro γ	好中球
ENA-78	好中球
GCP-2	好中球
NAP-2	好中球
IL-8	好中球、NK細胞、メモリーT細胞
非ELRモチーフケモカイン	
PF-4	線維芽細胞、血管内皮細胞
Mig	活性化T細胞
IP-10	活性化T細胞
I-TAC	活性化T細胞
SDF-1	B細胞、T細胞、CD34 ⁺ 前駆細胞
BLC/BCA-1	B細胞
BRAK	B細胞、単球
CXCL16	T細胞、NK細胞
CCケモカイン	
I-309	単球、T細胞
MCP-1	単球、メモリーT細胞、好塩基球
MIP-1 α	単球、メモリーT細胞
MIP-1 β	単球、メモリーT細胞
RANTES	単球、メモリーT細胞、好酸球、好塩基球
MCP-3	単球、メモリーT細胞、好酸球
MCP-2	単球、メモリーT細胞、好酸球
eotaxin	好酸球、好塩基球
MCP-4	単球、T細胞、好酸球
HCC-1	単球
Lkn-1/HCC-2	単球、好中球、リンパ球
LEC/HCC-4	単球、好酸球
MPIF-1	単球、T細胞
eotaxin-2	好酸球、好塩基球、T細胞
eotaxin-3	好酸球、好塩基球
TARC	CD4 ⁺ T細胞
MDC	CD4 ⁺ T細胞
ELC/MIP-3 β	T細胞、B細胞、成熟樹状細胞
SLC/6CKine	T細胞、B細胞、成熟樹状細胞
PARC/DC-CK1	ナイーブT細胞
LARC/MIP-3 α	未熟樹状細胞、T細胞、B細胞
TECK	メモリーT細胞
ILC/CTACK	メモリーT細胞
MEC/CCL28	メモリーT細胞
Cケモカイン	
lymphotactin	T細胞 (?)、B細胞 (?)、NK細胞 (?)
CX ₃ Cケモカイン	
fractalkine	CD8 ⁺ T細胞、NK細胞、単球

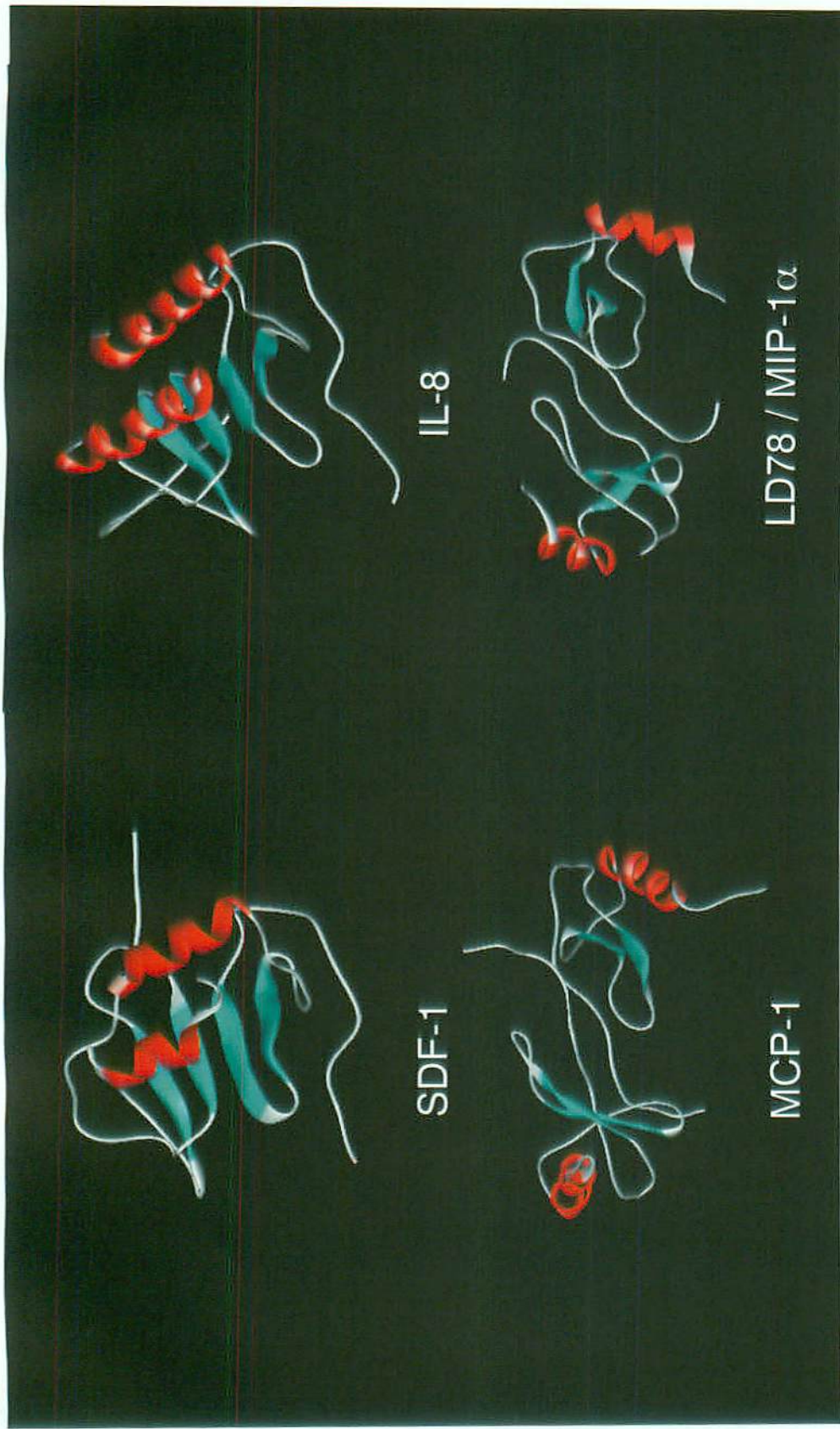


図1. ケモカインの三次元構造

CXCケモカインのSDF-1、IL-8およびCCケモカインのMCP-1、LD78/MIP-1 α の三次元構造を示す。いずれも二量体であり、水色の部分が β シート構造、赤色の部分が α ヘリックス構造を示している。

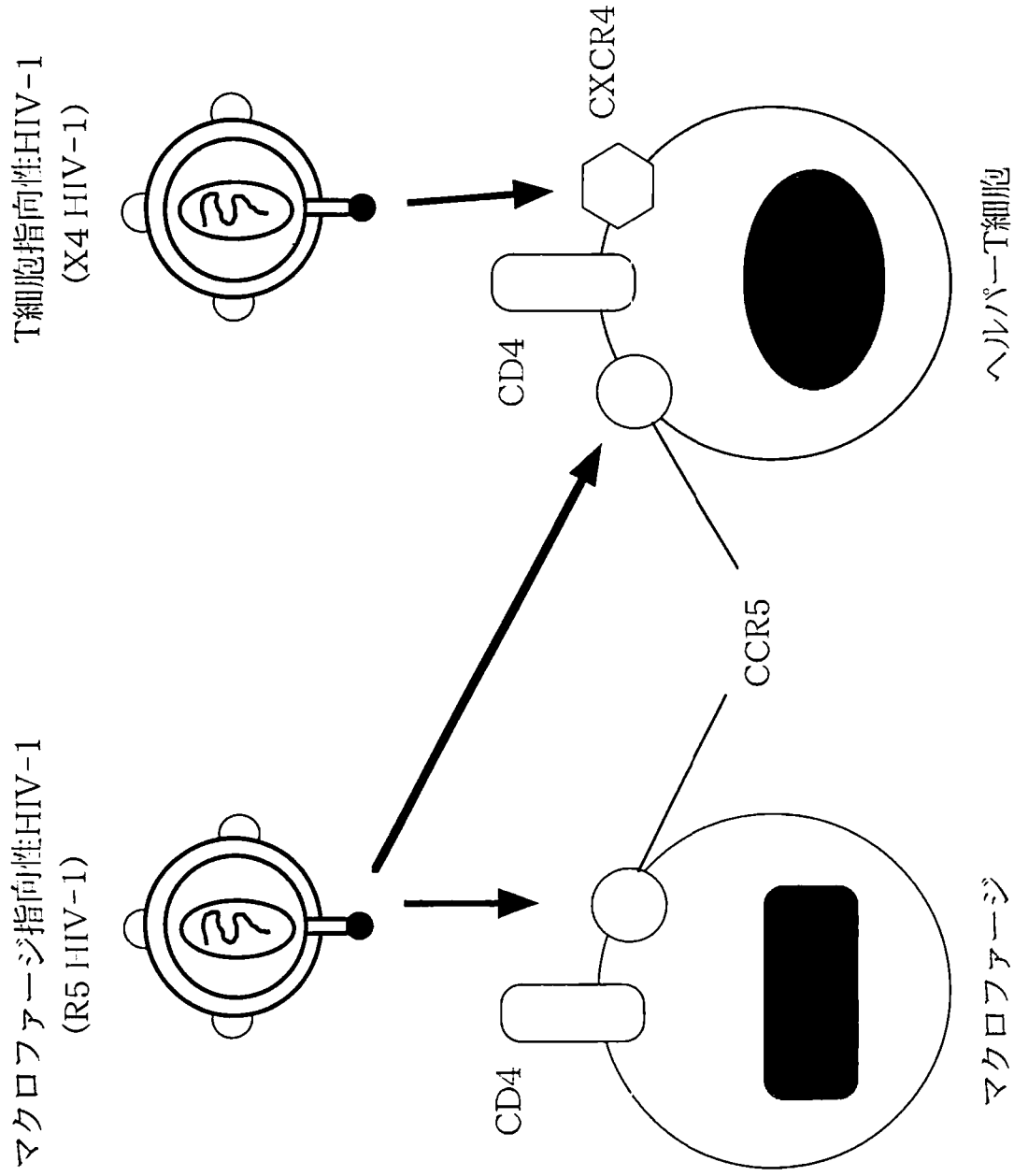


図2. HIV-1感染のコレセプターモデル

マクロファージ指向性HIV-1のコファクターレセプターCCR5とT細胞指向性HIV-1のコレセプターCXCR4がHIV-1感染のコレセプターとしてCD4とともに働く。これらの標的細胞上での発現の有無およびレベルがHIV-1のトロピズムを決定する。

HIV-1の生活環

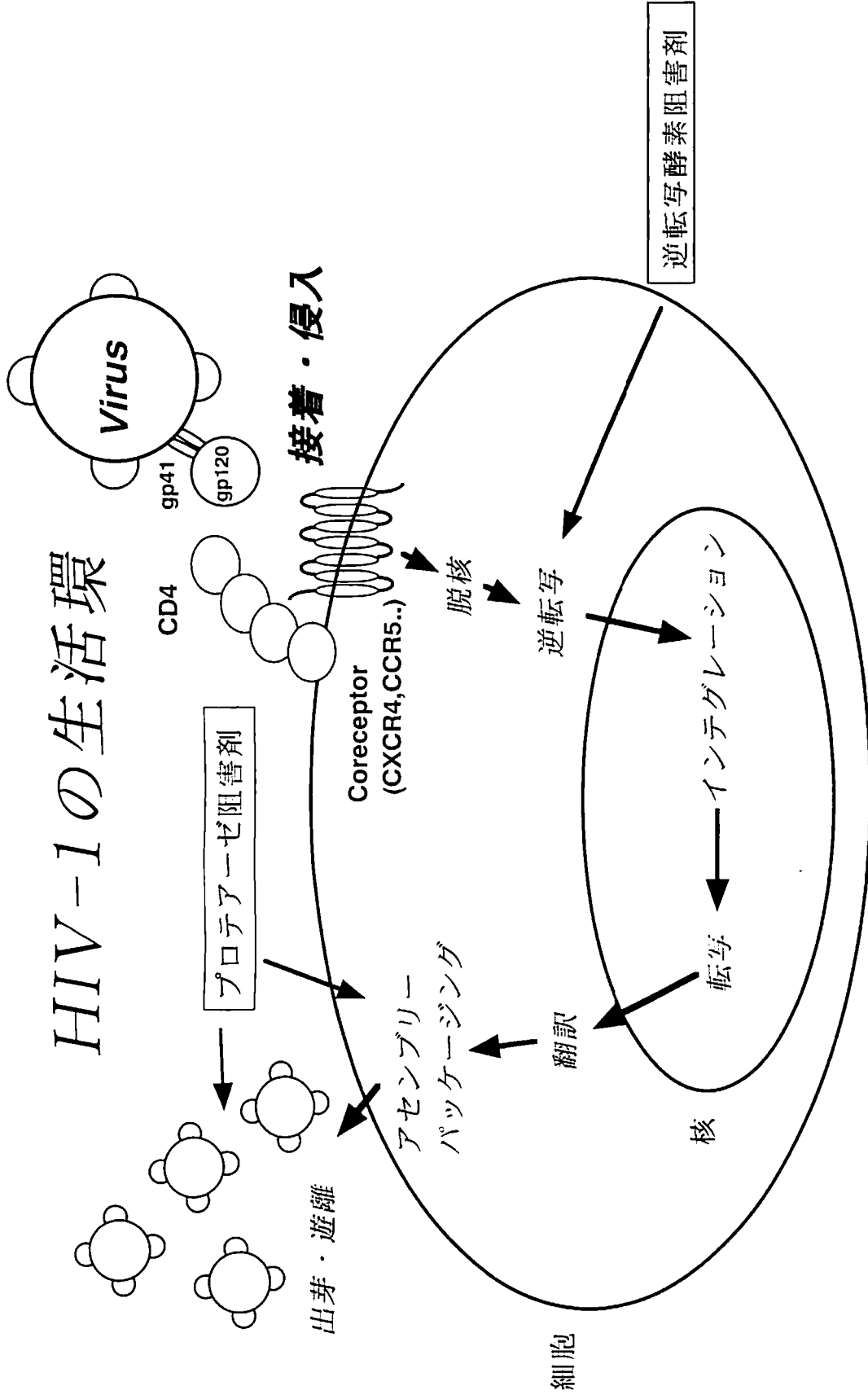


図3. HIV-1生活環

HIV-1の増殖サイクルを、HIVプロウイルスDNAが宿主細胞のDNAに組み込まれる前後で、増殖過程前期と後期に二分すると、前期では吸着、融合、侵入、脱殻、逆転写およびインテグレーション（プロウイルスDNAの細胞遺伝子への組み込み）などが、後期では転写、翻訳、プロセシング、アセンブリー、そして出芽などの各段階が抗HIV-1剤開発のターゲットとして考えられる。現在臨床で使用されているのは逆転写酵素阻害剤とプロテアーゼ阻害剤のみである。

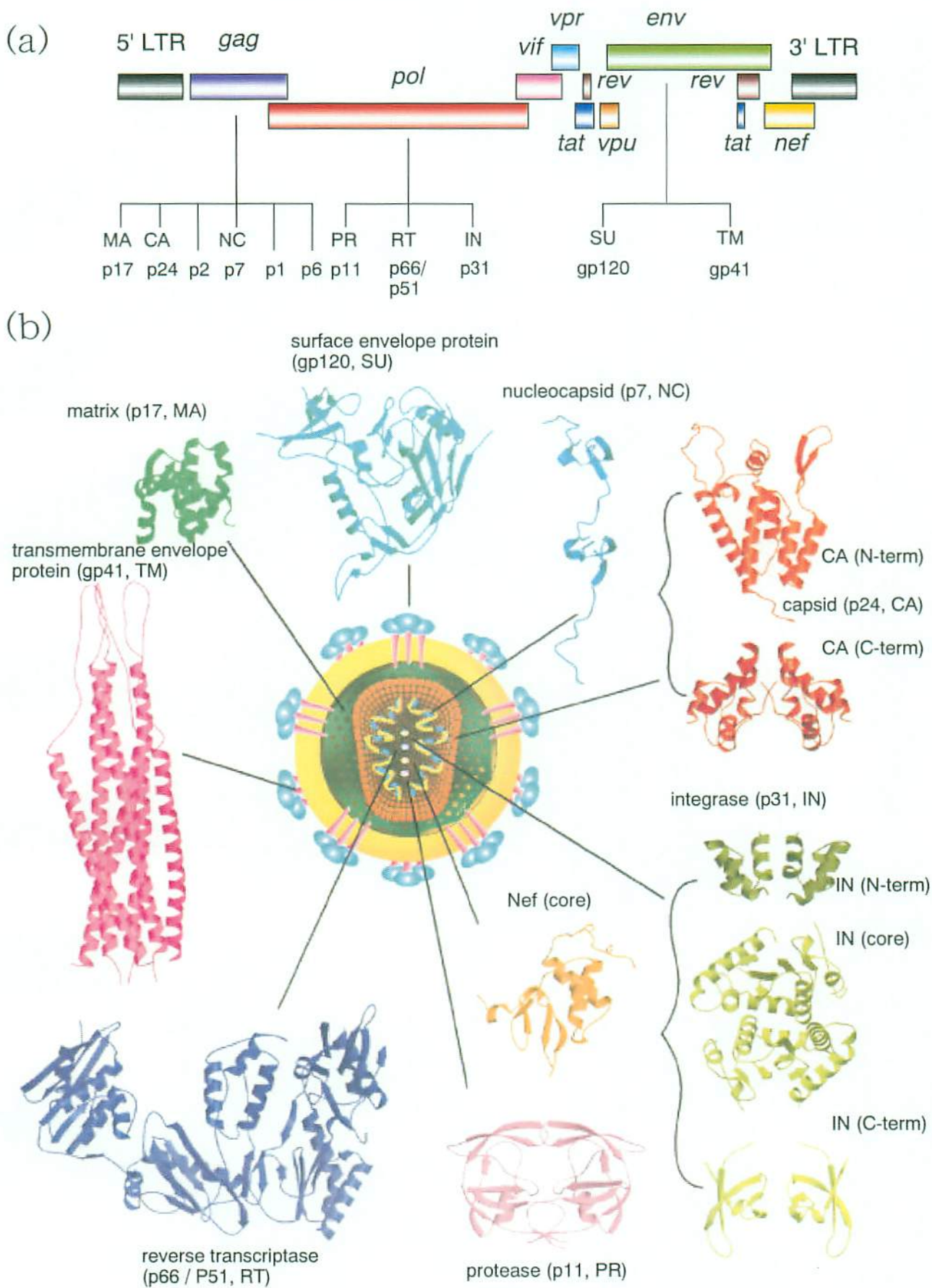
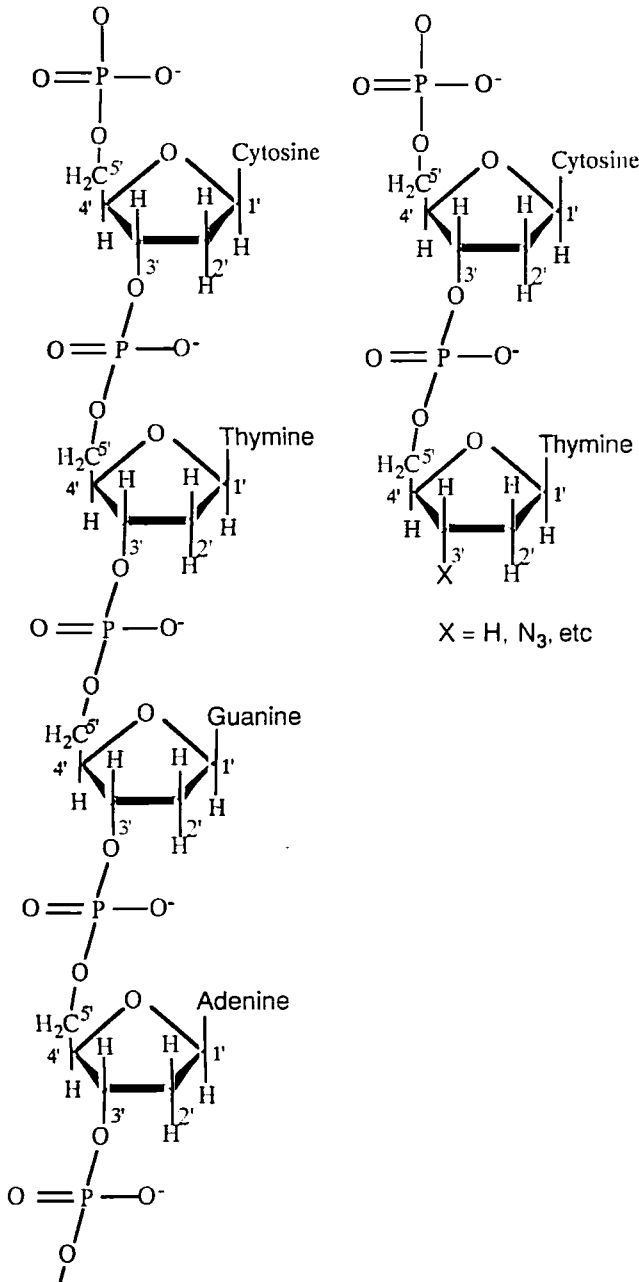


図4. HIV-1の遺伝子構造 (a) とHIV-1の粒子構造 (b)
(文献46より改変引用)

DNA鎖

DNA鎖の終息

図5. ジデオキシヌクレオシド誘導体の抗HIV-1活性の機序



ジデオキシヌクレオシド誘導体は、細胞内に入ると、細胞由来の一連のリン酸化酵素によって三リン酸化される。三リン酸化されたジデオキシヌクレオシド誘導体 [AZTの場合はAZT-TP] はHIV-1の逆転写酵素の良好な基質で、この酵素に媒介されて、HIV-1のRNAゲノムを鋳型として、5'→3'の方向へと伸長しつつあるウイルスDNA鎖にリン酸ジエステル結合を形成して組み込まれる。いったんジデオキシヌクレオシドがDNA鎖内に入ると、ジデオキシヌクレオシドはリボース3'の炭素部分にOH基を欠いているため (図中Xで示す)、次のデオキシヌクレオシド三リン酸とリン酸ジエステル結合を形成できず、ウイルスのDNA合成はここでストップする (DNA chain termination)。鋳型として働いたRNAはRNA-DNAのハイブリッドが形成されると、逆転写酵素自体が併せ持つRNaseH活性により破壊されるため、ウイルスは一度きりのプロウイルスDNA合成のチャンスを失い、結局、DNA chain terminationの起こったウイルスDNA鎖はやがて細胞内で破壊される。他方、細胞増殖の際のDNA合成と損傷修復に関与するDNAポリメラーゼ α はジデオキシヌクレオシドを基質としないため、細胞のDNA鎖には組み込まれることなく、DNA chain terminationは起こらず、ジデオキシヌクレオシド三リン酸の存在下でも細胞増殖が続く。このことは同時に、ジデオキシヌクレオシド誘導体は細胞を新たな感染から防御はするものの、すでに感染してしまった細胞遺伝子内のHIVには何の影響も及ぼさないことを意味する。AZT、ddI、ddCの投与で見られる筋炎、末梢神経障害、肝障害などはAZT、ddI、ddCの三リン酸型が細胞のDNAポリメラーゼ γ の基質となるため、細胞のミトコンドリアDNAに障害がもたらされるためと考えられている。

基質

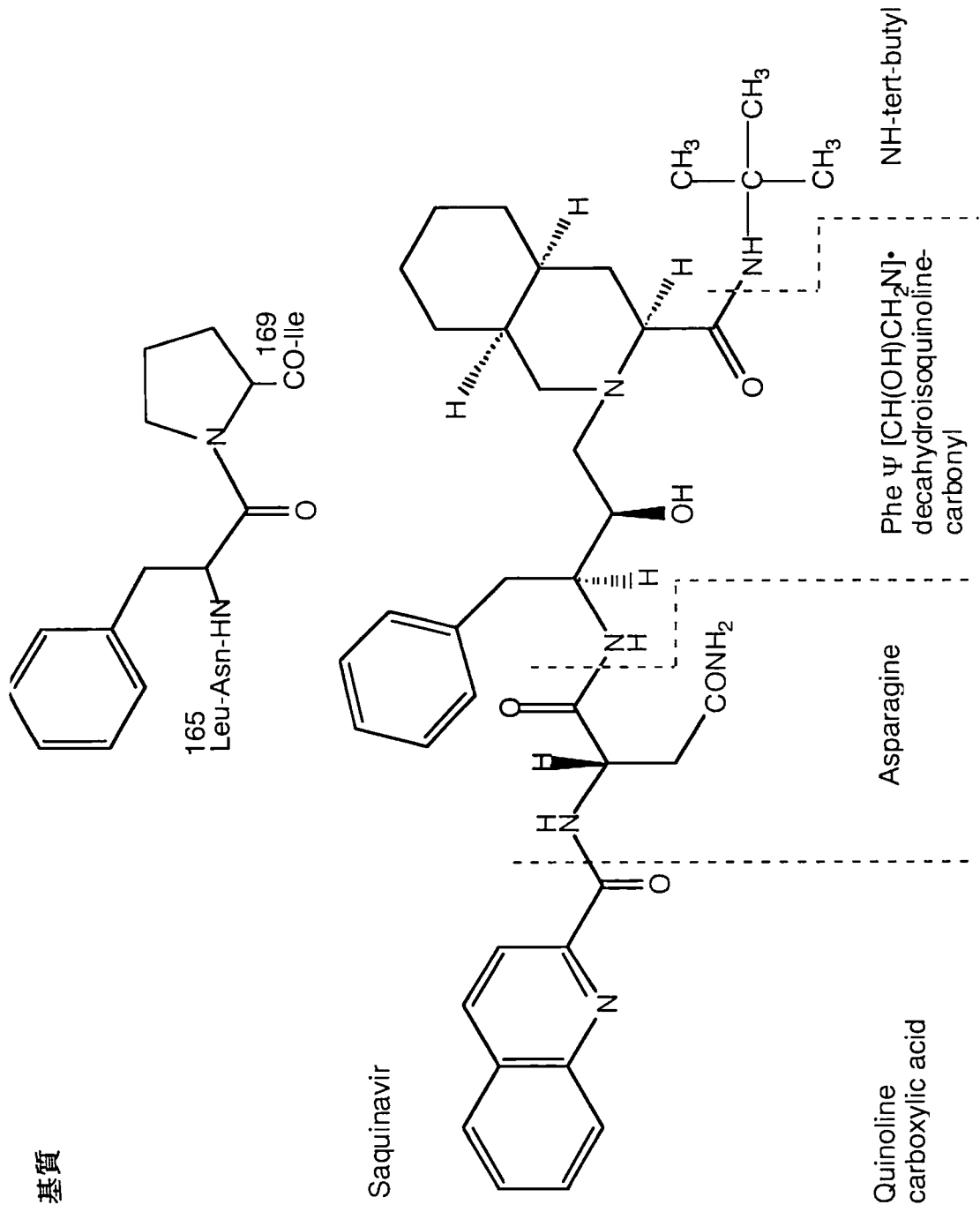
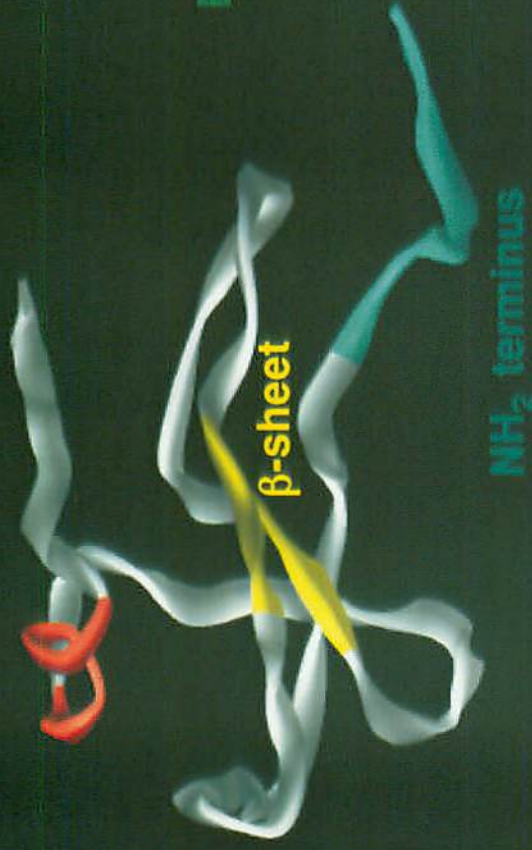


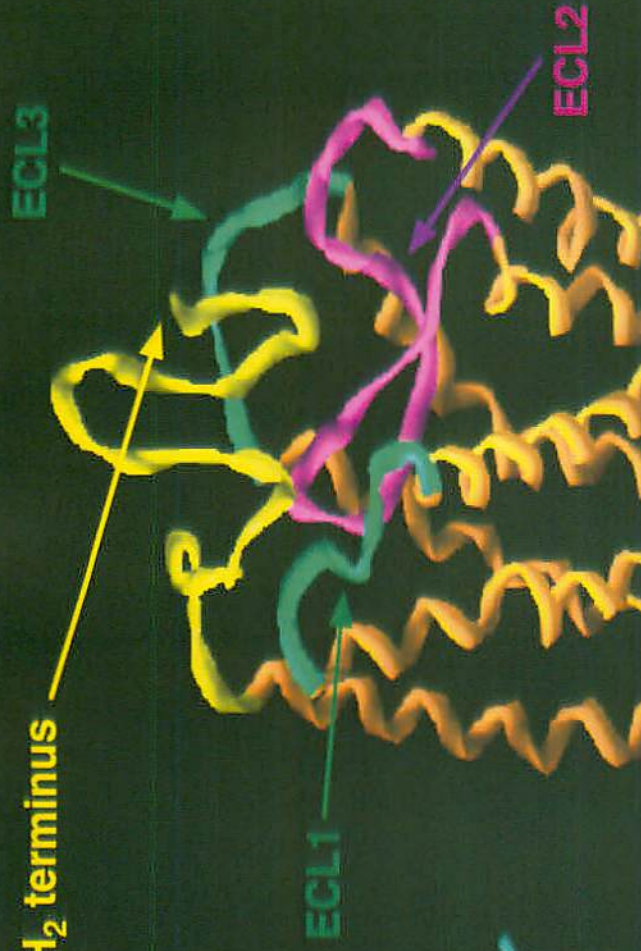
図6. HIV プロテアーゼに対する生理学的基質と基質遷移状態のミミックプロテアーゼ阻害剤saquinavirの構造。

上図にHIV-1プロテアーゼの基質（ポリプロテイン）の一部を示す。HIV-1プロテアーゼはPhe-167とPro-168の間のペプチド結合を加水分解によって切断する。阻害剤（saquinavir）はPhe-Pro切断点にPhe Ψ [CH(OH)CH₂N]• decahydroisoquinoline-carbonylを含んでおり、HIV-1プロテアーゼによる加水分解を受けず、プロテアーゼに結合したままとなる。

A

 α -helix NH_2 terminus

B

 NH_2 terminus

ECL1

ECL3

ECL2

Czaplewski et al. *J. Biol. Chem.* 274, 16077-84, 1999 より改変引用Bourne et al. *Science* 289, 733-4, 2000 より改変引用

図7. LD78 β (A) とCCR5 (B) の三次元構造

CCR5については、三量体Gタンパク共役型7回膜貫通型レセプター (GPCR) の一つであるbovine rhodopsinを基に作成し、その膜貫通領域の一部および細胞外ループ領域を示す。水色の部分がLD78 β の NH_2 末端ループ構造であり、紫色のCCR5の細胞外第二ループ領域 (ECL2) と相互作用する事により、シグナル伝達を来すと考えられている。

LD78 β _{WT}	APLAADTPTACC
LD78 β _{P2A}	-A-----
LD78 β _{L3A}	--A-----
LD78 β _{D6A}	-----A-----
LD78 β _{T7A}	-----A-----
LD78 β _{P8A}	-----A-----
LD78 β _{T9A}	-----A-----

図8. 本実験で作成したLD78 β 変異体のアミノ酸配列

LD78 β _{WT} (最上部に表記) のNH₂末端から最初のCCCモチーフまで (NH₂末端ループ)、それぞれのアミノ酸残基 (アラニン以外) をアラニンに置換した。例えば、NH₂末端から2番目のアミノ酸残基プロリンをアラニンに置換し、LD78 β _{P2A}生成した。ダッシュ (-) はLD78 β _{WT}の対応する部分のアミノ酸残基と比較し、保存されているアミノ酸残基を示した。

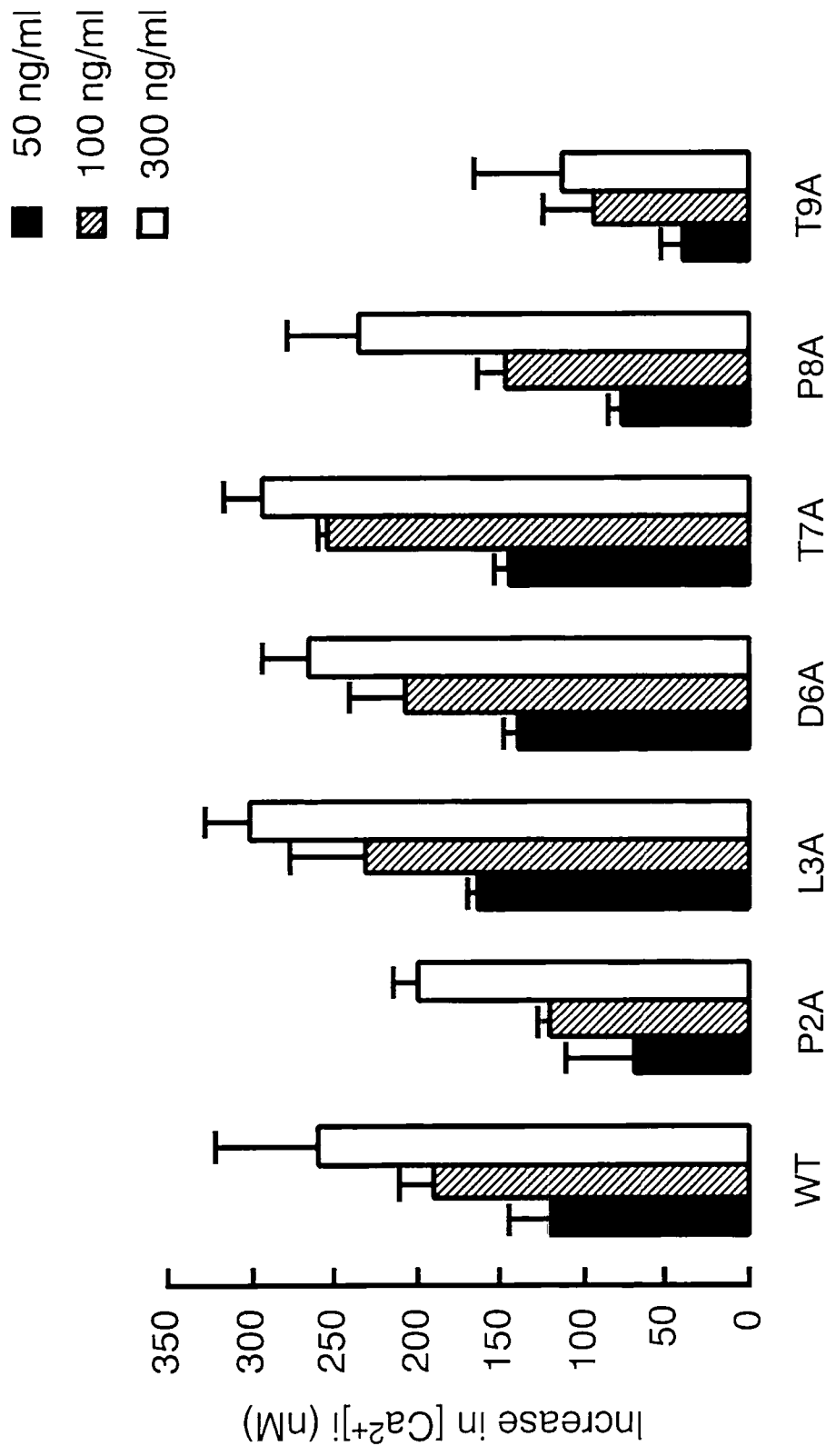


図9. LD78β_{WT}とその変異体による細胞内カルシウム上昇誘導能 (シグナル伝達能)

LD78β_{WT}と6種類の変異体による、細胞内カルシウム流動誘導能 (シグナル伝達能) をCCR5-HOS細胞を用いて測定した。INDO-1 AMを取り込んだCCR5-HOS細胞 (2 x 10⁶ / ml) に、本実験で作成したLD78β変異体を50、100、そして300 ng/mlになるように加えた。結果、LD78β_{T9A}以外のLD78β_{WT}およびLD78β変異体による細胞内カルシウム流動誘導能 (シグナル伝達能) は著明な相違を認めなかった。

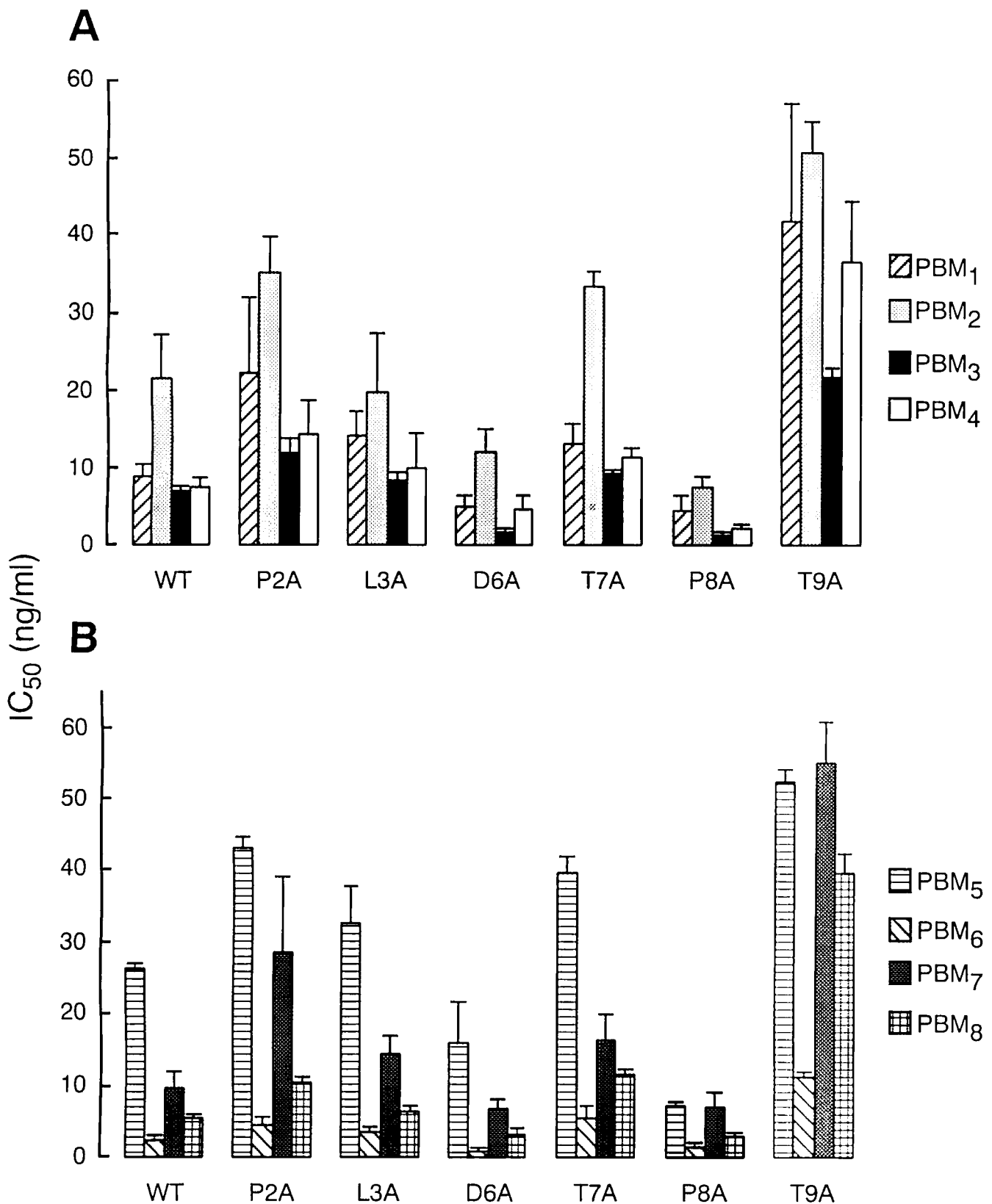


図10. LD78β_{WT}とその変異体による2つのR5 HIV-1株 (HIV-1_{Ba-L}とHIV-1_{JRFL}) に対する増殖阻害効果。

2つのR5 HIV-1株、HIV-1_{Ba-L} (パネルA)とHIV-1_{JRFL} (パネルB)に対する増殖阻害効果を検討するため、PHAで刺激したPBMにウイルスを感染させ、各LD78β変異体存在下でのp24 Gag蛋白産生阻害効果を測定した。4人の抗HIV-1抗体陰性PBMをPHAで刺激し、組み換えLD78β変異体存在下、ないし非存在下にてウイルスを感染させた。p24 Gag蛋白産生を50%抑制するLD78β濃度 (IC₅₀) を示した。3重の測定の平均値 (±1標準偏差) を示した。

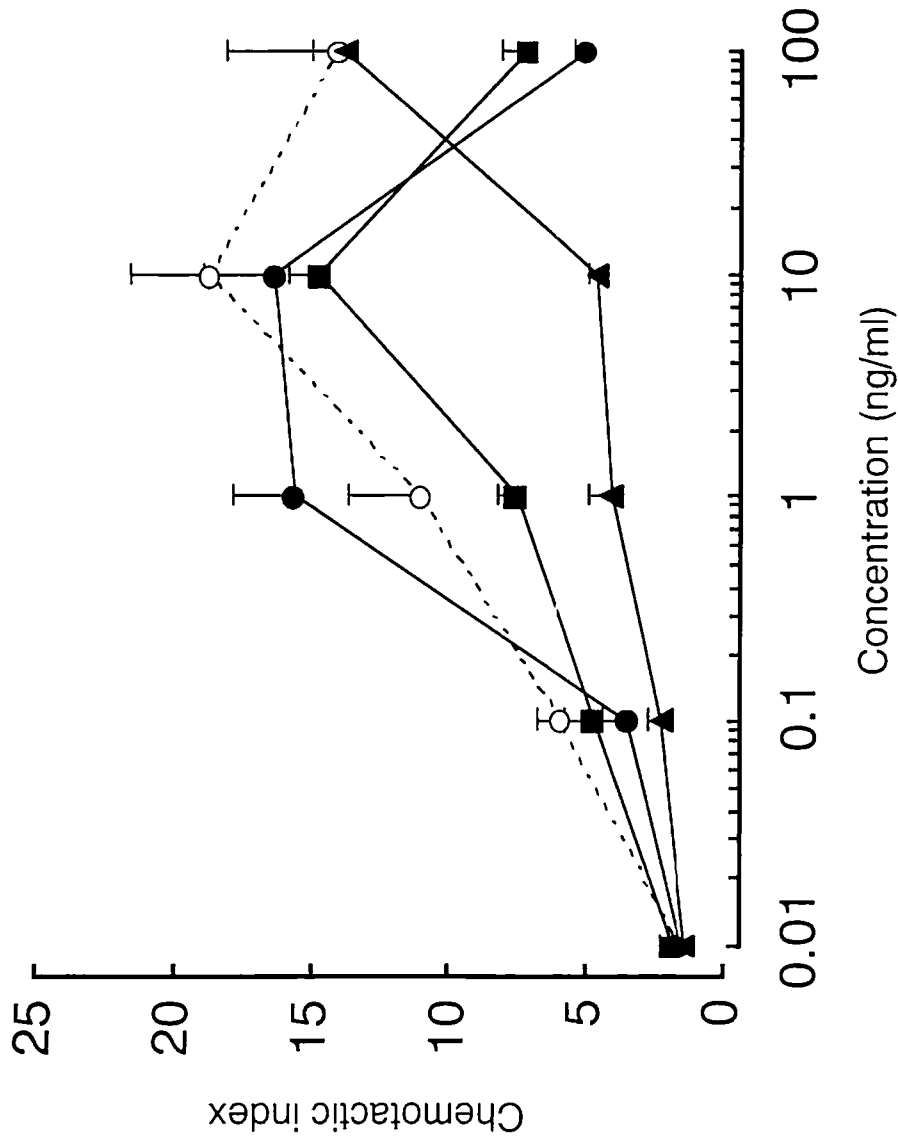
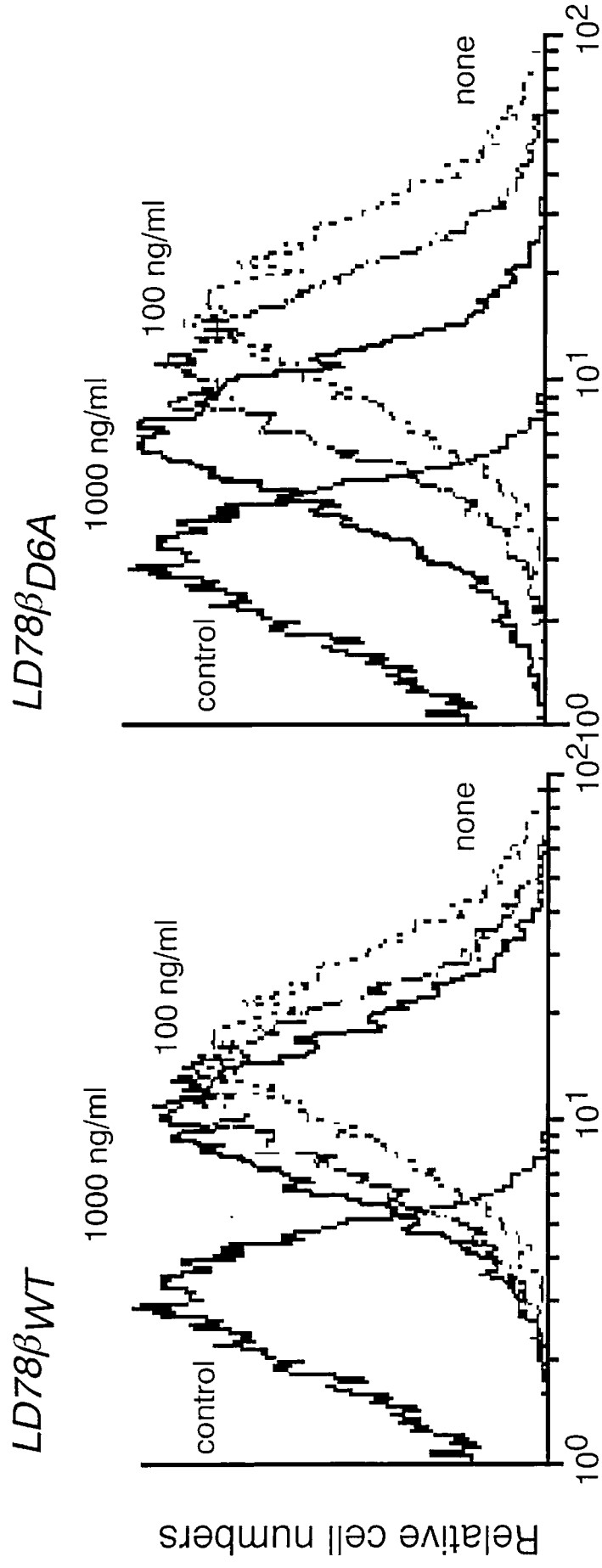


図11. LD78 β ^{WT}、LD78 β ^{D6A}、LD78 β ^{P8A}、そしてLD78 β ^{T9A}による化学遊走能

4種類のLD78 β 変異体：LD78 β ^{WT} (O)、LD78 β ^{D6A} (■)、LD78 β ^{P8A} (●)、そしてLD78 β ^{T9A} (▲) による化学遊走能誘導活性について、ケモタキセルとCCR5-Molt4細胞を用いて測定した。5回の独立した実験を行い、代表的なデータを例示した。3回の測定の平均値 (± 1 標準偏差) を示した。



Relative fluorescence Intensity

図12. LD78β_{D6A}はLD78β_{WT}よりCCR5への結合力が強い。

CCR5-Molt4細胞と、CCケモカインのCCR5への結合を競合的に阻害する単クローン抗体2D7を用いたLD78β_{WT}またはLD78β_{D6A}との競合結合阻害実験を行った。LD78βによる2D7の結合阻害は2D7とPEを結合した2次抗体を用いて染色することで視覚化した。LD78β_{D6A}はLD78β_{WT}より強力に2D7のCCR5への結合を阻害した。

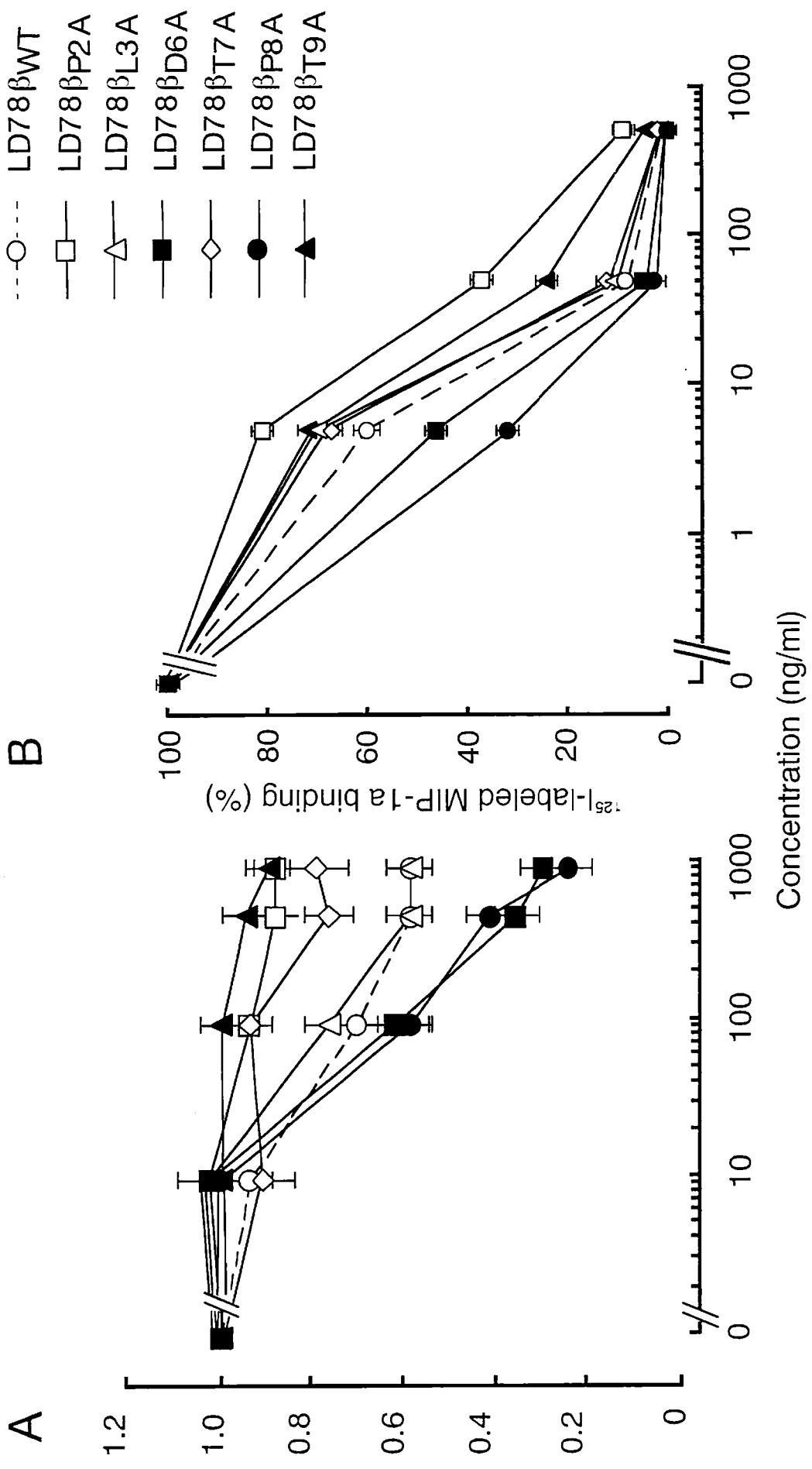


図13. 各LD78 β 変異体のCCR5への結合力の比較検討

LD78 β _{WT}と6種類の変異体による、単クローン抗体2D7との競合結合阻害実験（パネルA）と ^{125}I -MIP-1 α 結合阻害実験（パネルB）を示した。パネルA：CCR5-Molt4細胞にLD78 β と2D7を反応させ、洗浄後、PEが結合している2次抗体を加え、細胞を染色し、解析した。3回の独立した実験を行い、代表的なデータの2重の測定のパラメータを示した。パネルB：CCR5-CHO細胞に様々な濃度のLD78 β 存在下で、 ^{125}I -MIP-1 α を曝露した。データは2重の測定のパラメータを示した。

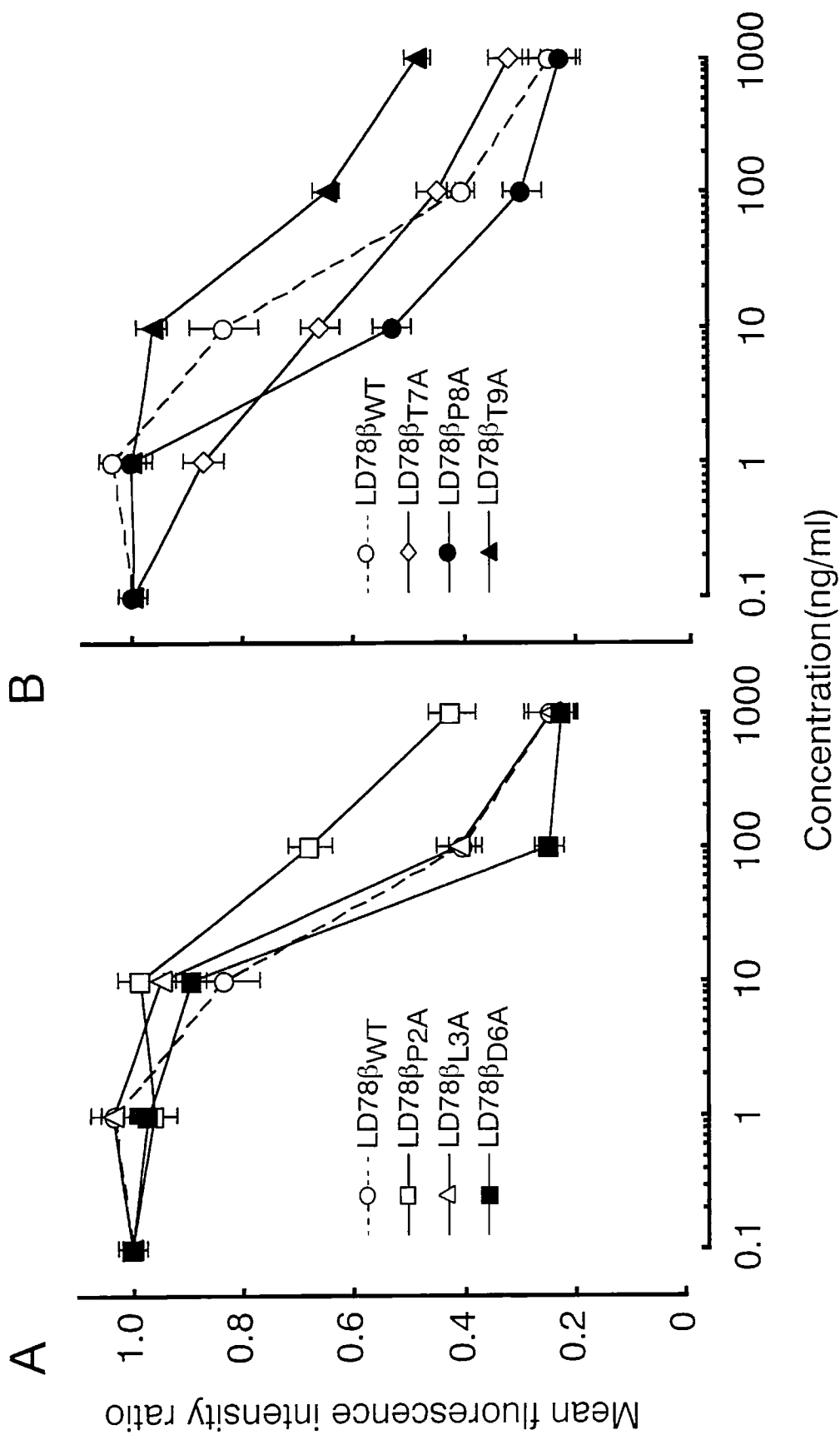


図14. LD78β_{WT}とその変異体によるCCR5細胞内移行 (CCR5 down-regulation) 誘導能

CCR5-Molt4細胞に様々な濃度の (0.1, 1, 10, 100, and 1,000 ng/ml) LD78β_{WT}またはLD78β変異体を、37°C、2時間反応させ、酸溶液 (pH3.0) で洗浄後、2D7を加え、PEが結合している2次抗体にて染色した (パネルA、B)。平均蛍光強度比についてはFigure 6、パネルAの実験方法にて述べた方法を用いた。3回の独立した実験を行い、代表的な結果を例示した。データは2重の測定の平均値 (± 1標準偏差) を示した

9) 考察

本研究では R5 HIV-1 の重要な補助レセプター (coreceptor) の一つであり、MIP-1 α 、MIP-1 β 、RANTES などの CC ケモカインに対するレセプターである CCR5 と、CCR5 に対する生来のリガンドで最も抗 HIV-1 活性が高い LD78 β を用い、相互作用について検討した。CCR5 との相互作用に重要と考えられている LD78 β の NH₂ 末端のアミノ酸残基について詳細な検討を行うため、LD78 β 組み換え蛋白の NH₂ 末端の 1 アミノ酸残基ずつ、アラニン以外のアミノ酸残基をアラニンに置換した 6 種類の変異体を作成し、それらの生物学的活性等について解析した。その結果、NH₂ 末端より 2 番目のプロリン、6 番目のアスパラギン酸、8 番目のプロリン、9 番目のスレオニンが HIV-1 増殖阻害および、LD78 β と CCR5 との結合に重要である事が分かった。今回、注目すべき事として、LD78 β _{T9A} を除くすべての変異体は、細胞内カルシウム濃度上昇誘導 (シグナル伝達能) の程度に大きな差は認めなかったが、一方で R5 HIV-1 増殖阻害活性は著しく異なっていた点がある。この事実より、シグナル伝達誘導能は R5 HIV-1 増殖阻害活性と必ずしも一致しない事が分かった。R5 HIV-1 増殖阻害効果について、比較すると LD78 β _{P8A} > LD78 β _{D6A} > LD78 β _{WT}, LD78 β _{L3A} > LD78 β _{T7A}, LD78 β _{P2A} > LD78 β _{T9A} の順番となった。更に、CCR5-Molt4 細胞と CCR5 の細胞外第 2 ループ領域 (CCR5-ECL2A) に結合するモノクローナル抗体 2D7 を用いて、LD78 β 変異体の CCR5 への結合力を検討するための競合結合阻害実験を行ったところ、2D7 の結合を競合的に阻害する活性の順番は LD78 β _{P8A}, LD78 β _{D6A} > LD78 β _{WT} > LD78 β _{L3A} > LD78 β _{T7A} > LD78 β _{P2A}, LD78 β _{T9A} となった (図 13-A)。R5 HIV-1 増殖阻害効果および 2D7 に対する競合結合阻害能は LD78 β _{WT} とその変異体による ¹²⁵I-MIP-1 α の CCR5 への結合を競合的に阻害する能力と一致していた。これらのデータはさらにシグナル伝達は LD78 β の CCR5 への結合力に関わらず、ある程度以上の CCR5 への結合が起これば始まり、その一方でより強力な抗 HIV-1 活性を発揮するためには CCR5 への結合力の増強が必要であ

ることを示唆していた。この点に関して、MIP-1 α (LD78 α) と LD78 β の HIV-1 増殖阻害活性の解析において、Nibbs らは、最近、CCR5 への結合力と HIV-1 増殖阻害活性の程度が細胞内カルシウム濃度上昇誘導能 (シグナル伝達能) の程度と一致していると報告しているが (43)、彼らの研究では LD78 β の NH₂ 末端から 2 番目のアミノ酸残基であるプロリンをセリンに置換した変異体を LD78 α (または MIP-1 α S と呼称) としており、彼らの LD78 α は LD78 β と比較し、さらに 39 番と 47 番の残基も置換されており、これらの置換がシグナル伝達活性および HIV-1 増殖阻害能影響を与えている可能性がある。近年、Townson らは AOP-MIP-1 α P (LD78 β の NH₂ 末端に aminooxypentane を結合させたもの) は LD78 β と同様の化学遊走能と細胞内カルシウム濃度上昇誘導能 (シグナル伝達能) を有する一方で、増強した HIV-1 増殖阻害活性および CCR5 への結合力を有していたと報告している (93)。Simmons らはまた、別の CC ケモカインである RANTES の NH₂ 末端に aminooxypentane を結合させたもの (AOP-RANTES と呼称) は野生型の RANTES と比較し、抗 HIV-1 活性は増強を認めたが、著しく化学遊走能の減弱を来したと報告している (71)。以上のことを考え合わせると、今回の実験結果は、LD78 β _{D6A} と LD78 β _{P8A} のような適切なアミノ酸残基の置換を加えた LD78 β 変異体は、LD78 β と CCR5 との相互作用は残存した、より効果的なケモカインを基礎とした抗 HIV-1 剤となる可能性を示唆している。さらに、LD78 β の NH₂ 末端の 1 アミノ酸残基ないし、それ以上のアミノ酸残基をアラニン以外のアミノ酸残基に置換した場合、さらに効果的な抗 HIV-1 剤の開発が可能である事を示唆している。

最近、TAK-779 (72) と E913 (74) のように CC ケモカインの作用を阻害し、それら自体ではシグナル伝達を引き起こさないが、*in vitro* では効果的に HIV-1 の増殖を阻害するいくつかの低分子化合物が報告されている。これらの化合物は、CCR5 に結合し、立体構造学的に HIV-1 の gp120 の CCR5 への結合と CC ケモカインの結合を阻害すると考えられている。これらの低分子化合物を HIV-1 感染症の治療薬として今後使用した場合、長期間にわたってケモカインとケモカインレセプ

ターとの相互作用を抑制する事による重大な副作用の出現の有無について懸念されている。実際、近年、CCR5-Δ32 遺伝子変異を有する C 型肝炎感染患者において、CCR5 遺伝子変異を有さない患者と比較し、有意に血中の C 型肝炎ウイルス濃度の上昇を認めたと報告された (76)。この点に関して、我々は E913 を基盤としたいくつかの spirodiketopiperazine 誘導体で、E913 より著しく R5 HIV-1 の増殖を阻害する (1000 倍以上) が CC ケモカインが誘導する細胞内カルシウム流動誘導能 (シグナル伝達能) は阻害しない低分子化合物を見いだしており、このような現象を来す理由として、このような抗 HIV-1 作用を持つ低分子化合物が CCR5 上の CC ケモカイン結合領域と十分に離れた gp120 結合領域に結合することによるか、または低分子化合物が gp120 の結合を阻害する構造学的変化を引き起こすが、CC ケモカインの結合を阻害しないことによると考えているが、未だに確証されていない。したがって、上記した現象を、深く追求するためにも、今回の実験データを基に更に検証を進める必要があると考えている。また、同時に、LD78β_{p8A} と LD78β_{D6A} ようにケモカインとしての機能は維持し、生理学的なシグナル伝達誘導を阻害せず、一方で R5 HIV-1 の増殖をより効果的に抑制する LD78β変異体が抗 HIV-1 剤開発に必要であり、今後の検討課題である。

最後に、以上をまとめると、本研究の結果より NH₂ 末端より 2 番目のプロリン、6 番目のアスパラギン酸、8 番目のプロリン、9 番目のスレオニンが LD78β と CCR5 との結合および HIV-1 増殖阻害に重要であり、シグナル伝達は LD78β の CCR5 への結合力に関わらず、ある程度以上の CCR5 への結合が起これば始まり、その一方でより強力な抗 HIV-1 活性を発揮するためには CCR5 への結合力の増強が必要であることを示唆された。さらに、LD78β の HIV-1 感染阻止能とシグナル伝達能は異なる分子間相互作用による可能性が考えられた。また、今回の結果は適切なアミノ酸残基を置換することにより抗 HIV-1 活性のみを増強し、シグナル伝達能は変わらないか、もしくは減弱し、更には生体内のケモカインの作用を阻害しない、ケモカインを基盤とした効果的な抗 HIV-1 剤開発の可能性を示唆するものと思われた。

実際、NH₂末端からCCモチーフ（NH₂末端ループ）のアミノ酸残基の置換による構造学的な変化の解析にはX線結晶解析ないしNMR解析による結果が待たれるところである。

10) 結語

NH₂末端より2番目のプロリン、6番目のアスパラギン酸、8番目のプロリン、9番目のスレオニンがLD78βとCCR5との結合およびHIV-1増殖阻害に重要であり、シグナル伝達はLD78βのCCR5への結合力に関わらず、ある程度以上のCCR5への結合が起これば始まり、その一方でより強力な抗HIV-1活性を発揮するためにはCCR5への結合力の増強が必要であることを示すと思われた。これらの事から、LD78βのHIV-1感染阻止能とシグナル伝達能は異なる分子間相互作用による可能性が考えられた。また、今回の結果は適切なアミノ酸残基を置換することにより抗HIV-1活性のみを増強し、シグナル伝達能は変わらないか、もしくは減弱し、更には生体内のケモカインの作用を阻害しない、ケモカインを基盤とした効果的な抗HIV-1剤開発の可能性を示唆するものと思われた。

11) 参考文献

1. Yoshimura, T., Matsushima, K., Tanaka, S., Robinson, E. A., Appella, E., Oppenheim, J. J., and Leonard, E. J. : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 9233-7, 1987.
2. Matsushima, K., Larsen, C. G., DuBois, G. C., and Oppenheim, J. J. : *J. Exp. Med.* 169, 1485-90, 1989.
3. Yoshimura, T., Robinson, E. A., Tanaka, S., Appella, E., Kuratsu, J., and Leonard, E. J. : *J. Exp. Med.* 169, 1449-59, 1989.
4. Obaru, K., Fukuda, M., Maeda, S., and Shimada, K. : *J. Biochem. (Tokyo)* 99, 885-94, 1986.
5. Rollins, B. J. : *Blood* 90, 909-28, 1997.
6. Baggiolini, M. : *Nature* 392, 565-8, 1998.
7. Zou, Y. R., Kottmann, A. H., Kuroda, M., Taniuchi, I., and Littman, D. R. : *Nature* 393, 595-9, 1998
8. Ma, Q., Jones, D., Borghesani, P. R., Segal, R. A., Nagasawa, T., Kishimoto, T., Bronson, R. T., and Springer, T. A. : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 9448-53, 1998
9. Suzuki, Y., Rahman, M., and Mitsuya, H. : *J. Immunol.* 167, 3064-73, 2001.
10. Clore, G. M., Appella, E., Yamada, M., Matsushima, K., and Gronenborn, A. M. : *Biochemistry* 29, 1689-96, 1990.
11. Handel, T. M., and Domaille, P. J. : *Biochemistry* 35, 6569-84, 1996.
12. Crump, M. P., Gong, J. H., Loetscher, P., Rajarathnam, K., Amara, A., Arenzana-Seisdedos, F., Virelizier, J. L., Baggiolini, M., Sykes, B. D., and Clark-Lewis, I. : *Embo J* 16, 6996-7007, 1997.

13. Czaplewski, L. G., McKeating, J., Craven, C. J., Higgins, L. D., Appay, V., Brown, A., Dudgeon, T., Howard, L. A., Meyers, T., Owen, J., Palan, S. R., Tan, P., Wilson, G., Woods, N. R., Heyworth, C. M., Lord, B. I., Brotherton, D., Christison, R., Craig, S., Cribbes, S., Edwards, R. M., Evans, S. J., Gilbert, R., Morgan, Randlen, E., Schofieldo, N., Varleyp, P. G., Fisherq, J., Jonathan P. Walthod, J. P., and P., Hunter. M. G. : *J Biol Chem* 274, 16077-84, 1999.
14. Struyf, S., Proost, P., Schols, D., De Clercq, E., Opdenakker, G., Lenaerts, J. P., Detheux, M., Parmentier, M., De Meester, I., Scharpe, S., and Van Damme, J. : *J. Immunol.* 162, 4903-9, 1999.
15. Arenzana-Seisdedos, F., Virelizier, J. L., Rousset, D., Clark-Lewis, I., Loetscher, P., Moser, B., and Baggiolini, M. : *Nature* 383, 400, 1996.
16. Gong, J. H., Ratkay, L. G., Waterfield, J. D., and Clark-Lewis, I. : *J. Exp. Med.* 186, 131-7, 1997.
17. Middleton, J., Neil, S., Wintle, J., Clark-Lewis, I., Moore, H., Lam, C., Auer, M., Hub, E., and Rot, A. : *Cell* 91, 385-95, 1997.
18. Thelen, M. : *Nat. Immunol.* 2, 129-34, 2001.
19. Yoneda, O., Imai, T., Goda, S., Inoue, H., Yamauchi, A., Okazaki, T., Imai, H., Yoshie, O., Bloom, E. T., Domae, N., and Umehara, H. : *J. Immunol.* 164, 4055-62, 2000.
20. Giancarlo, B., Silvano, S., Albert, Z., Mantovani, A., and Allavena, P. : *Eur. J. Immunol.* 26, 3238-41, 1996.
21. Hedrick, J. A., Saylor, V., Figueroa, D., Mizoue, L., Xu, Y., Menon, S., Abrams, J., Handel, T., and Zlotnik, A. : *J. Immunol.* 158, 1533-40, 1997.

22. Harada, A., Mukaida, N., and Matsushima, K. : *Mol. Med. Today* 2. 482-9. 1996.
23. Sekido, N., Mukaida, N., Harada, A., Nakanishi, I., Watanabe, Y., and Matsushima, K. : *Nature* 365. 654-7, 1993.
24. Cacalano, G., Lee, J., Kikly, K., Ryan, A. M., Pitts-Meek, S., Hultgren, B., Wood, W. I., and Moore, M. W. : *Science* 265, 682-4. 1994.
25. Wada, T., Yokoyama, H., Furuichi, K., Kobayashi, K. I., Harada, K., Naruto, M., Su, S. B., Akiyama, M., Mukaida, N., and Matsushima, K. *Faseb. J.* 10. 1418-25, 1996.
26. Chen, S., Bacon, K. B., Li, L., Garcia, G. E., Xia, Y., Lo, D., Thompson, D. A., Siani, M. A., Yamamoto, T., Harrison, J. K., and Feng, L. : *J. Exp. Med.* 188, 193-8. 1998.
27. Furukawa, Y., Matsumori, A., Ohashi, N., Shioi, T., Ono, K., Harada, A., Matsushima, K., and Sasayama, S. : *Circ. Res.* 84, 306-14, 1999.
28. Lu, B., Rutledge, B. J., Gu, L., Fiorillo, J., Lukacs, N. W., Kunkel, S. L., North, R., Gerard, C., and Rollins, B. J. : *J. Exp. Med.* 187, 601-8, 1998.
29. Boring, L., Gosling, J., Cleary, M., and Charo, I. F. : *Nature* 394. 894-7, 1998.
30. Yoneyama, H., Matsuno, K., Zhang, Y., Murai, M., Itakura, M., Ishikawa, S., Hasegawa, G., Naito, M., Asakura, H., and Matsushima, K. : *J. Exp. Med.* 193, 35-49. 2001.
31. Murai, M., Yoneyama, H., Harada, A., Yi, Z., Vestergaard, C., Guo, B., Suzuki, K., Asakura, H., and Matsushima, K. : *J. Clin. Invest.* 104. 49-57, 1999.

32. Forster, R., Mattis, A. E., Kremmer, E., Wolf, E., Brem, G., and Lipp, M. : *Cell* 87, 1037-47, 1996.
33. Vassileva, G., Soto, H., Zlotnik, A., Nakano, H., Kakiuchi, T., Hedrick, J. A., and Lira, S. A. : *J. Exp. Med.* 190, 1183-8, 1999.
34. Rothenberg, M. E., MacLean, J. A., Pearlman, E., Luster, A. D., and Leder, P. : *J. Exp. Med.* 185, 785-90, 1997.
35. Nagasawa, T., Hirota, S., Tachibana, K., Takakura, N., Nishikawa, S., Kitamura, Y., Yoshida, N., Kikutani, H., and Kishimoto, T. : *Nature* 382, 635-8, 1996.
36. Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E., and Berger, E. A. : *Science* 272, 872-7, 1996.
37. Liu, R., Paxton, W. A., Choe, S., Ceradini, D., Martin, S. R., Horuk, R., MacDonald, M. E., Stuhlmann, H., Koup, R. A., and Landau, N. R. : *Cell* 86, 367-77, 1996
38. Samson, M., Libert, F., Doranz, B. J., Rucker, J., Liesnard, C., Farber, C. M., Saragosti, S., Lapoumeroulie, C., Cognaux, J., Forceille, C., Muyldermans, G., Verhofstede, C., Burtonboy, G., Georges, M., Imai, T., Rana, S., Yi, Y., Smyth, R. J., Collman, R. G., Doms, R. W., Vassart, G., and Parmentier, M. : *Nature* 382, 722-5, 1996.
39. Winkler, C., Modi, W., Smith, M. W., Nelson, G. W., Wu, X., Carrington, M., Dean, M., Honjo, T., Tashiro, K., Yabe, D., Buchbinder, S., Vittinghoff, E., Goedert, J. J., O'Brien, T. R., Jacobson, L. P., Detels, R., Donfield, S., Willoughby, A., Gomperts, E., Vlahov, D., Phair, J., and O'Brien, S. J. : *Science* 279, 389-93, 1998.
40. Bleul, C. C., Farzan, M., Choe, H., Parolin, C., Clark-Lewis, I., Sodroski, J., and Springer, T. A. : *Nature* 382, 829-33, 1996.

41. Oberlin, E., Amara, A., Bachelier, F., Bessia, C., Virelizier, J. L., Arenzana Seisdedos, F., Schwartz, O., Heard, J. M., Clark-Lewis, I., Legler, D. F., Loetscher, M., Baggiolini, M., and Moser, B. : *Nature* 382, 833-5, 1996.
42. Cocchi, F., DeVico, A. L., Garzino-Demo, A., Arya, S. K., Gallo, R. C., and Lusso, P. : *Science* 270, 1811-5, 1995.
43. Nibbs, R. J., Yang, J., Landau, N. R., Mao, J. H., and Graham, G. J. : *J. Biol. Chem.* 274, 17478-83, 1999.
44. Menten, P., Struyf, S., Schutyser, E., Wuyts, A., De Clercq, E., Schols, D., Proost, P., and Van Damme, J. : *J. Clin. Invest.* 104, R1-5, 1999.
45. Xin, X., Shioda, T., Kato, A., Liu, H., Sakai, Y., and Nagai, Y. *FEBS Lett.* 457, 219-22, 1999.
46. Turner, B. G., and Summers, M. F. : *J. Mol. Biol.* 285, 1-32, 1999.
47. Mitsuya H, Broder S : *Nature* 325: 773-8, 1987.
48. Huang H, Chopra R, Verdine GL, Harrison SC : *Science* 282: 1669-75, 1998.
49. Arnold, E., Das, K., Ding, J., Yadav, P. N., Hsiou, Y., Boyer, P. L., and Hughes, S. H. : *Drug Des. Discov.* 13, 29-47, 1996.
50. Mitsuya H, Yarchoan R, Broder S : *Science* 249: 1533-44, 1990.
51. Coffin JM: *Science* 267: 483-489, 1995.
52. Drusano, G. L., Bilello, J. A., Stein, D. S., Nessly, M., Meibohm, A., Emini, E. A., Deutsch, P., Condra, J., Chodakewitz, J., and Holder, D. J. : *J. Infect. Dis.* 178, 360-7, 1998.

53. Tanaka, M., Srinivas, R. V., Ueno, T., Kavlick, M. F., Hui, F. K., Fridland, A., Driscoll, J. S., and Mitsuya, H. : *Antimicrob Agents Chemother* 41, 1313-8, 1997.
54. Shirasaka, T., Kavlick, M. F., Ueno, T., Gao, W. Y., Kojima, E., Alcaide, M. L., Choekijchai, S., Roy, B. M., Arnold, E., Yarchoan, R., and Mitsuya, H. : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 2398-402, 1995.
55. Yusa, K., Kavlick, M. F., Kosalaraksa, P., and Mitsuya, H. : *Antiviral Res.* 36, 179-89, 1997.
56. Schuetz, J. D., Connelly, M. C., Sun, D., Paibir, S. G., Flynn, P. M., Srinivas, R. V., Kumar, A., and Fridland, A. : *Nat. Med.* 5, 1048-51, 1999.
57. Fujiwara, T., Sato, A., el-Farrash, M., Miki, S., Abe, K., Isaka, Y., Kodama, M., Wu, Y., Chen, L. B., Harada, H., Sugimoto, H., Hatanaka, M., and Hinuma, Y. : *Antimicrob Agents Chemother* 42, 1340-5, 1998.
58. Yoshimura, K., Kato, R., Yusa, K., Kavlick, M. F., Maroun, V., Nguyen, A., Mimoto, T., Ueno, T., Shintani, M., Falloon, J., Masur, H., Hayashi, H., Erickson, J., and Mitsuya, H. : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 8675-80, 1999.
59. Erickson J, Mitsuya H, et al.: *8th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infection*, Chicago, February 4-8, 2001, (Abstract 12).
60. Yoshimura, K., Kato, R., Kavlick, F. M., Nguyen, A., Maroun, V., Maeda, K., Hussain, A. K., Ghosh, K. A., Gulnik, V. S., Erickson, W. J., and Mitsuya, H.: *J. Virol.* 76, 1349-1358, 2002.

61. Kilby, J. M., Hopkins, S., Venetta, T. M., DiMassimo, B., Cloud, G. A., Lee, J. Y., Alldredge, L., Hunter, E., Lambert, D., Bolognesi, D., Matthews, T., Johnson, M. R., Nowak, M. A., Shaw, G. M., and Saag, M. S. : *Nat. Med.* 4, 1302-7, 1998.
62. Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E., and Berger, E. A. : *Science* 272, 872-7, 1996.
63. Deng, H., Liu, R., Ellmeier, W., Choe, S., Unutmaz, D., Burkhart, M., Di Marzio, P., Marmon, S., Sutton, R. E., Hill, C. M., Davis, C. B., Peiper, S. C., Schall, T. J., Littman, D. R., and Landau, N. R. : *Nature* 381, 661-6, 1996.
64. Dragic, T., Litwin, V., Allaway, G. P., Martin, S. R., Huang, Y., Nagashima, K. A., Cayanan, C., Maddon, P. J., Koup, R. A., Moore, J. P., and Paxton, W. A. : *Nature* 381, 667-73, 1996.
65. Alkhatib, G., Combadiere, C., Broder, C. C., Feng, Y., Kennedy, P. E., Murphy, P. M., and Berger, E. A. : *Science* 272, 1955-8, 1996.
66. Choe, H., Farzan, M., Sun, Y., Sullivan, N., Rollins, B., Ponath, P. D., Wu, L., Mackay, C. R., LaRosa, G., Newman, W., Gerard, N., Gerard, C., and Sodroski, J. : *Cell* 85, 1135-48, 1996.
67. Berson, J. F., Long, D., Doranz, B. J., Rucker, J., Jirik, F. R., and Doms, R. W. : *J. Virol.* 70, 6288-95, 1996.
68. Nakashima, H., Masuda, M., Murakami, T., Koyanagi, Y., Matsumoto, A., Fujii, N., and Yamamoto, N. : *Antimicrob Agents Chemother* 36, 1249-55, 1992.
69. Tamamura, H., Arakaki, R., Funakoshi, H., Imai, M., Otaka, A., Ibuka, T., Nakashima, H., Murakami, T., Waki, M., Matsumoto, A., Yamamoto, N., and Fujii, N. : *Bioorg. Med. Chem.* 6, 231-8, 1998.

70. Schols, D., Struyf, S., Van Damme, J., Este, J. A., Henson, G., and De Clercq, E. : *J. Exp. Med.* 186, 1383-8, 1997.
71. Simmons, G., Clapham, P. R., Picard, L., Offord, R. E., Rosenkilde, M. M., Schwartz, T. W., Buser, R., Wells, T. N., and Proudfoot, A. E. : *Science* 276, 276-9, 1997.
72. Baba, M., Nishimura, O., Kanzaki, N., Okamoto, M., Sawada, H., Iizawa, Y., Shiraishi, M., Aramaki, Y., Okonogi, K., Ogawa, Y., Meguro, K., and Fujino, M. : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 5698-703, 1999.
73. Strizki, J. M., Xu, S., Wagner, N. E., Wojcik, L., Liu, J., Hou, Y., Endres, M., Palani, A., Shapiro, S., Clader, J. W., Greenlee, W. J., Tagat, J. R., McCombie, S., Cox, K., Fawzi, A. B., Chou, C. C., Pugliese-Sivo, C., Davies, L., Moreno, M. E., Ho, D. D., Trkola, A., Stoddart, C. A., Moore, J. P., Reyes, G. R., and Baroudy, B. M. : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 12718-23, 2001.
74. Maeda, K., Yoshimura, K., Shibayama, S., Habashita, H., Tada, H., Sagawa, K., Miyakawa, T., Aoki, M., Fukushima, D., and Mitsuya, H. : *J. Biol. Chem.* 276, 35194-200, 2001.
75. Zhou, Y., Kurihara, T., Ryseck, R. P., Yang, Y., Ryan, C., Loy, J., Warr, G., and Bravo, R. : *J. Immunol.* 160, 4018-25, 1998.
76. Woitas, R. P., Ahlenstiel, G., Brackmann, H. H., Matz, B., Rockstroh, J. K., and Spengler, U. : *The 8th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections*, Chicago, IL., February 4-8, 2001 (Abstract 499)
77. Obaru, K., Hattori, T., Yamamura, Y., Takatsuki, K., Nomiyama, H., Maeda, S., and Shimada, K. : *Mol. Immunol.* 26, 423-6, 1989.

78. Crump. M. P., Gong, J. H., Loetscher, P., Rajarathnam, K., Amara. A., Arenzana-Seisdedos, F., Virelizier, J. L., Baggiolini. M., Sykes, B. D., and Clark-Lewis, I. : *EMBO J.* 16, 6996-7007, 1997.
79. Gartner. S., Markovits, P., Markovitz, D. M., Kaplan, M. H., Gallo, R. C., and Popovic, M. : *Science* 233, 215-9, 1986.
80. Koyanagi, Y., O'Brien, W. A., Zhao, J. Q., Golde, D. W., Gasson, J. C., and Chen, I. S. : *Science* 241, 1673-5, 1988.
81. Maeda, Y., Foda. M., Matsushita, S., and Harada, S. : *J. Virol.* 74, 1787-93, 2000.
82. Ho. S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., and Pease, L. R. : *Gene* 77, 51-9, 1989.
83. Gryniewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R. Y. : *J. Biol. Chem.* 260, 3440-50, 1985.
84. Newton-Nash, D. K., and Newman, P. J. : *J. Immunol.* 163, 682-8, 1999.
85. Leland. D. S., and French, M. L. V. : Virus isolation and identification. Laboratory diagnosis of infectious diseases: Principles and practice. Edited by Lennette, E. H., Halonen. P., Murphy, F.A., Springer-Verlag, New York, 1988.
86. Ebina, T., and Murata. K. : *Jpn. J. Cancer. Res.* 81, 1307-13, 1990.
87. Wu, L., LaRosa, G., Kassam, N., Gordon. C. J., Heath, H., Ruffing, N., Chen, H., Humblis, J., Samson, M., Parmentier. M., Moore, J. P., and Mackay, C. R. : *J. Exp. Med.* 186, 1373-81, 1997.

88. Olson, W. C., Rabut, G. E., Nagashima, K. A., Tran, D. N., Anselma, D. J., Monard, S. P., Segal, J. P., Thompson, D. A., Kajumo, F., Guo, Y., Moore, J. P., Maddon, P. J., and Dragic, T. : *J. Virol.* 73, 4145-55, 1999.
89. Aramori, I., Ferguson, S. S., Bieniasz, P. D., Zhang, J., Cullen, B., and Cullen, M. G. : *EMBO J.* 16, 4606-16, 1997.
90. Proost, P., Menten, P., Struyf, S., Schutyser, E., De Meester, I., and Van Damme, J. : *Blood* 96, 1674-80, 2000.
91. Berger, E. A., Murphy, P. M., and Farber, J. M. : *Annu. Rev. Immunol.* 17, 657-700, 1999.
92. Lee, B., Sharron, M., Blanpain, C., Doranz, B. J., Vakili, J., Setoh, P., Berg, E., Liu, G., Guy, H. R., Durell, S. R., Parmentier, M., Chang, C. N., Price, K., Tsang, M., and Doms, R. W. : *J. Biol. Chem.* 274, 9617-26, 1999.
93. Townson, J. R., Graham, G. J., Landau, N. R., Rasala, B., and Nibbs, R. J. : *J. Biol. Chem.* 275, 39254-61, 2000.