

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4528963号
(P4528963)

(45) 発行日 平成22年8月25日(2010.8.25)

(24) 登録日 平成22年6月18日(2010.6.18)

(51) Int. Cl.		F I	
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q 1/02
G O 1 N	33/15	(2006.01)	G O 1 N 33/15 Z
G O 1 N	33/50	(2006.01)	G O 1 N 33/50 Z
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00 A

請求項の数 6 (全 11 頁)

(21) 出願番号	特願2004-319531 (P2004-319531)	(73) 特許権者	504159235
(22) 出願日	平成16年11月2日 (2004.11.2)		国立大学法人 熊本大学
(65) 公開番号	特開2006-129726 (P2006-129726A)		熊本県熊本市黒髪二丁目39番1号
(43) 公開日	平成18年5月25日 (2006.5.25)	(74) 代理人	110000109
審査請求日	平成19年1月15日 (2007.1.15)		特許業務法人特許事務所サイクス
		(72) 発明者	岡田 誠治
			熊本県熊本市本荘2-2-1 熊本大学エ
			イズ学研究センター内
		(72) 発明者	鈴 伸也
			熊本県熊本市本荘2-2-1 熊本大学エ
			イズ学研究センター内
		審査官	福間 信子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗HIV-1薬剤のスクリーニング系及びスクリーニング方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

M-CSF受容体、及びHIV-1 Nef蛋白質とエストロゲン受容体のホルモン結合領域を融合させたNef-ER融合蛋白質を発現し、M-CSF依存性に増殖するマクロファージ系細胞において、Hckのチロシンリン酸化、又はHckとM-CSF受容体複合体との会合を分析する方法。

【請求項2】

M-CSF依存性に増殖するマクロファージ系細胞が、マクロファージ系細胞にM-CSF受容体遺伝子を導入し、さらにHIV-1 Nef蛋白質とエストロゲン受容体のホルモン結合領域を融合させたNef-ER融合蛋白質をコードする遺伝子を導入して得られる細胞である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

マクロファージ系細胞株がヒトマクロファージ系細胞株であり、M-CSF受容体遺伝子がヒトM-CSF受容体遺伝子である、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

M-CSF受容体、及びHIV-1 Nef蛋白質とエストロゲン受容体のホルモン結合領域を融合させたNef-ER融合蛋白質を発現し、M-CSF依存性に増殖するマクロファージ系細胞を、エストロゲン誘導体、M-CSF及び被験物質の存在下で培養し、Hckのチロシンリン酸化、又はHckとM-CSF受容体複合体との会合を指標として抗HIV-1薬剤のスクリーニングを行う、抗HIV-1薬剤のスクリーニング方法。

【請求項5】

M-CSF依存性に増殖するマクロファージ系細胞が、マクロファージ系細胞にM-CSF受容体遺伝子を導入し、さらにHIV-1 Nef蛋白質とエストロゲン受容体のホルモン結合領域を融合させたNef-ER融合蛋白質をコードする遺伝子を導入して得られる細胞である、請求項4に記載のスクリーニング方法。

【請求項6】

マクロファージ系細胞株がヒトマクロファージ系細胞株であり、M-CSF受容体遺伝子がヒトM-CSF受容体遺伝子である、請求項4又は5に記載のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗HIV-1薬剤の新規なスクリーニング系及びスクリーニング方法に関する。

【背景技術】

【0002】

抗HIV-1薬剤の新規スクリーニング系の必要性

エイズは、原因ウイルスであるヒト免疫不全ウイルス（HIV-1）感染によって引き起こされる重篤な免疫不全症候群である。世界的規模で見ると死亡原因の上位にランクされる、人類にとって深刻な感染症の一つである。現在、逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤による治療が可能となりつつあり、また、ウイルス侵入阻害剤の開発が進行中であり、今後の臨床応用が待たれている。しかし、一方で、これらの薬剤に耐性のウイルスが出現することが深刻な問題となっている。薬剤耐性ウイルスの出現は主に、開発薬剤がウイルスに対して直接的に選択圧を持つものであることが一因となっていると考えられる。従って今後は、新規作用機序、特に、ウイルスに対し直接選択圧をかけない薬剤の開発が望まれている。このためには、薬剤開発の分子標的として「HIV-1感染により特異的に機能が攪乱され、そしてその攪乱がエイズ発症に繋がる宿主側因子群」を同定することが不可欠であり、そしてその宿主側因子群を標的にした抗HIV-1薬剤のスクリーニング系を確立する必要がある。

【0003】

Nefによって障害を受ける宿主側因子Hckが標的となり得る根拠

HIV-1感染によりエイズ発症に至る過程で、HIV-1ゲノムにコードされているアクセサリ-蛋白質の一つであるNefの働きが重要であることがこれ迄に報告されている（非特許文献1及び2）。HIV-1トランスジェニックマウスを用いた、以下の結果がこのことを端的に示している（非特許文献2）。ヒトCD4遺伝子のプロモーター配列の制御下にHIV-1全ゲノムを導入した、HIV-1トランスジェニックマウスはCD4陽性T細胞数の低下等のエイズ様病態を発症する。しかし、Nef遺伝子を欠損したHIV-1ゲノムを導入したトランスジェニックマウスでは、同様の病態を発症するものの、発症までの期間が長くかかる（非特許文献2）。

【0004】

Nefがどのような機構でエイズ発症を規定しているかという点についてであるが、その機構解明の糸口となる研究結果が前述のHIV-1トランスジェニックマウスを用いた実験で報告されている（非特許文献3）。前述のように、HIV-1トランスジェニックマウスはCD4陽性T細胞数の低下等のエイズ様病態を発症する。ところが、同様のトランスジェニックマウスをHck（宿主細胞内に存在する酵素チロシンキナーゼの一つ）欠損マウスで作製した場合、発症までの期間が長くかかる（非特許文献3）。NefがHckと結合し、Hckの酵素活性を増強することは以前より報告されている（非特許文献4）。更に、NefがHckに結合するNef内の配列（非特許文献4）に変異を導入したHIV-1ゲノムを用いて作製したHIV-1トランスジェニックマウスの場合も、同様に発症までの期間が長い（非特許文献3）。HckはHIV-1感染細胞であるCD4陽性T細胞とマクロファージの内、マクロファージのみに存在する酵素であることが良く知られている。従って、以上の結果より、NefがHckへの結合・活性化を通してマクロファージの中で何かしらの非生理的な働きをすることによりエイズ発症を進展させていると考えられる。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 5 】

NefのHckへの結合・活性化を標的としたスクリーニング系の現状

前述のように、NefのHckへの結合・活性化がエイズ発症の一因と考えられることから、実際、これを標的とした抗HIV-1薬剤スクリーニング系が報告されている（非特許文献5）。これは、mammalian two-hybrid系（Clontech社）を応用して、NefとHckの結合を阻害し得る薬剤をスクリーニングしようとするものである。実際には以下の方法が報告されている。先ず、酵母GAL4とNefと融合させたプラスミド、ヘルペスウイルスVP16転写活性化領域をHckと融合させたプラスミドおよびルシフェラーゼをコードするレポータープラスミドを作製する。次に、前日24穴プレートにまいておいたヒト胎児腎臓由来細胞株293T細胞あるいはマウス腺維芽細胞NIH3T3に、これらプラスミドをFuGENE6（Roche社）あるいは lipofectamine（GIBCO社）を用いてトランスフェクションする。2日後にトリプシン処理後で細胞をディッシュよりはがし96穴プレートにまき直し、24時間後に薬剤候補物質を添加する。更に24時間後に細胞を溶解し、PiCaGene Kit（Toyo Inki社）によりルシフェラーゼ活性を測定する。この際、アルカリフォスファターゼをコードするプラスミドをトランスフェクションした細胞も同時に調製しておき、その活性をp-nitrophenyl-phosphateを基質として測定し、トランスフェクションの効率を標準化してルシフェラーゼ活性を算出する（非特許文献5）。

10

【 0 0 0 6 】

上記した方法は、確かにNefとHckの結合を阻害するスクリーニング系としては有効と考えられるが、前述のように極めて煩雑であり、測定に5日間を要し、大規模のスクリーニングを現実的に実施することは困難と考えられる。更に、このスクリーニング系で候補物質が特定されたとしても、NefとHckの結合により、どのような機能変化（エイズ発症の進展を促すような）が宿主細胞、特にマクロファージの中で起きているかが明らかになっていないため、それらの候補物質の中から真の抗HIV-1薬剤を見出すためには、追加のスクリーニングを実施しなければならない。

20

【 0 0 0 7 】

【非特許文献1】Kirchhoff F, Greenough TC, Brettler DB, Sullivan JL, Desrosiers RC. Brief report: absence of intact nef sequences in a long-term survivor with nonprogressive HIV-1 infection. *N Engl J Med.* 1995;332:228-232.

【非特許文献2】Hanna Z, Kay DG, Rebai N, Guimond A, Jothy S, Jolicoeur P. Nef harbors a major determinant of pathogenicity for an AIDS-like disease induced by HIV-1 in transgenic mice. *Cell.* 1998;95:163-175.

30

【非特許文献3】Hanna Z, Weng X, Kay DG, Poudrier J, Lowell C, Jolicoeur P. The pathogenicity of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 Nef in CD4C/HIV transgenic mice is abolished by mutation of its SH3-binding domain, and disease development is delayed in the absence of Hck. *J Virol.* 2001;75:9378-9392.

【非特許文献4】Moarefi I, LaFevre-Bernt M, Sicheri F, et al. Activation of the Src-family tyrosine kinase Hck by SH3 domain displacement. *Nature.* 1997;385:650-653.

【非特許文献5】Murakami Y, Fukazawa H, Kobatake T, et al. A mammalian two-hybrid screening system for inhibitors of interaction between HIV Nef and the cellular tyrosine kinase Hck. *Antiviral Res.* 2002;55:161-168.

40

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 8 】

本発明は上記した問題点を解決することを解決すべき課題とした。即ち、本発明は、操作が簡単で、短時間で測定が可能で、大規模スクリーニングを実施することができ、さらに追加のスクリーニングを実施することなく、抗HIV-1薬剤をスクリーニングすることを可能にする方法を提供することを解決すべき課題とした。

【課題を解決するための手段】

50

【 0 0 0 9 】

前述のように、NefはHckと結合しその酵素活性を増強する。一方で、Hckは、マクロファージ特異的サイトカインであるM-CSF(マクロファージ・コロニー刺激因子)がマクロファージに対して作用(増殖、分化、活性化)を発揮する上で重要な働きをすることがこれまでに報告されている(Alonso G, Koegl M, Mazurenko N, Courtneidge SA. Sequence requirements for binding of Src family kinases to activated growth factor receptors. J Biol Chem. 1995;270:9840-9848; 及びMarks DC, Csar XF, Wilson NJ, et al. Expression of a Y559F mutant CSF-1 receptor in M1 myeloid cells: a role for Src kinases in CSF-1 receptor-mediated differentiation. Mol Cell Biol Res Commun. 1999;1:144-152)。具体的には、M-CSFがマクロファージ表面上にあるM-CSF受容体に結合すると、受容体の二量体化が起き、その後、受容体が内在性に持つチロシンキナーゼ活性が増強し、自己のチロシンリン酸化が起きる。続いて、受容体の細胞質内直下に存在する、リン酸化されたチロシン残基にHck等のSrcファミリーチロシンキナーゼが結合し、これらチロシンキナーゼが活性化し、これが、M-CSFによる細胞増殖および細胞活性化の引き金となる。

10

【 0 0 1 0 】

以上の事実に基づいて、本発明者らは、NefがHckと結合し、Hckを活性化することにより、このM-CSF/M-CSF受容体経路に何かしらの影響を及ぼすのではないかという、これまでは報告されていない仮説を考えた。そしてこの仮説を実証することを目的として、M-CSF受容体と、HIV-1 Nef蛋白質とエストロゲン受容体のホルモン結合領域を融合させたNef-ER融合蛋白質とを発現する細胞培養系を用いて実験を行い、NefがM-CSFの生物活性を抑制することを実証し、この細胞培養系を抗HIV-1薬剤のスクリーニングに応用できることを見出した。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

20

【 0 0 1 1 】

即ち、本発明によれば、M-CSF受容体、及びHIV-1 Nef蛋白質とエストロゲン受容体のホルモン結合領域を融合させたNef-ER融合蛋白質を発現し、M-CSF依存性に増殖するマクロファージ系細胞を、エストロゲン誘導体及びM-CSFの存在下で培養して、細胞増殖を抑制させることを含む、抗HIV-1薬剤のスクリーニング系の製造方法が提供される。

【 0 0 1 2 】

本発明の別の側面によれば、M-CSF受容体、及びHIV-1 Nef蛋白質とエストロゲン受容体のホルモン結合領域を融合させたNef-ER融合蛋白質を発現し、M-CSF依存性に増殖するマクロファージ系細胞を、エストロゲン誘導体及びM-CSFの存在下で培養して細胞増殖を抑制させることにより得られる細胞系から成る、抗HIV-1薬剤のスクリーニング系が提供される。

30

【 0 0 1 3 】

本発明のさらに別の側面によれば、M-CSF受容体、及びHIV-1 Nef蛋白質とエストロゲン受容体のホルモン結合領域を融合させたNef-ER融合蛋白質を発現し、M-CSF依存性に増殖するマクロファージ系細胞を、エストロゲン誘導体、M-CSF及び被験物質の存在下で培養し、被験物質の存在しない場合と比較して細胞増殖を増大させる被験物質を選択することを特徴とする、抗HIV-1薬剤のスクリーニング方法が提供される。

40

【 0 0 1 4 】

好ましくは、M-CSF依存性に増殖するマクロファージ系細胞は、マクロファージ系細胞にM-CSF受容体遺伝子を導入し、さらにHIV-1 Nef蛋白質とエストロゲン受容体のホルモン結合領域を融合させたNef-ER融合蛋白質をコードする遺伝子を導入して得られる細胞である。

【 0 0 1 5 】

好ましくは、マクロファージ系細胞はヒトマクロファージ系細胞であり、M-CSF受容体遺伝子はヒトM-CSF受容体遺伝子である。

【 発明の効果 】

【 0 0 1 6 】

50

本発明によれば、M-CSF受容体、及びHIV-1 Nef蛋白質とエストロゲン受容体のホルモン結合領域を融合させたNef-ER融合蛋白質を発現し、M-CSF依存性に増殖するマクロファージ系細胞の培養系を利用して、新たな抗HIV-1薬剤をスクリーニングすることが可能になった。具体的には、培養開始時に候補薬剤を種々の濃度で添加し、Nefによる細胞増殖低下を回復させる薬剤を見出すことができる。本発明の方法は、従来報告された方法（上記した非特許文献5）と比較して、極めて簡便な方法である。本発明においては、大規模なスクリーニングを更に可能にすることを目的として、血球計算盤による細胞数計測に代えて、より多検体を短期間に処理できるテトラゾリウム塩（TaKaRa社WST-1等）を用いた判定を実施することもできる。

【発明を実施するための最良の形態】

10

【0017】

本発明で用いる細胞培養系は、Nefを活性化するとTF-1-fms-Nef-ER細胞のM-CSF存在下での増殖が低下することを特徴とするものである。本発明者は、実施例3に示した通り、この現象が、NefがHckと結合しHckを活性化させ、そのHckがM-CSF受容体複合体と恒常的に会合をし、その結果、M-CSF反応性のM-CSF受容体の活性化が抑制されたためであることを示唆する実験結果を得た。

【0018】

前記の通り、M-CSF受容体はM-CSFが結合することにより活性化し、自己のチロシンをリン酸化する。このことは、4-HT非添加（Nef非活性化）TF-1-fms-Nef-ER細胞を用いて免疫沈降/Western Blottingを行うことで確認できる（実施例3A、B）。しかしながら、4-HT添加（Nef活性化）TF-1-fms-Nef-ER細胞では、このM-CSF反応性のM-CSF受容体のチロシンリン酸化・活性化が大きく抑制されている（実施例3A、B）。この時、4-HT添加（Nef活性化）TF-1-fms-Nef-ER細胞のM-CSF受容体複合体に、M-CSF刺激以前よりHckが会合していること、Hckがリン酸化されていることが確認される（実施例3C）。この会合は、4-HT非添加（Nef非活性化）TF-1-fms-Nef-ER細胞では全く見られないものであり（実施例3C）、通常、HckはM-CSF刺激後に初めてM-CSF受容体複合体に会合すべき分子である（実施例3C）。従って、Nef活性化TF-1-fms-Nef-ER細胞における、M-CSF受容体複合体とHckの恒常的な会合は、NefによってもたらされたHckの非生理的な挙動である。このNefによってもたらされたHckの非生理的な挙動は、M-CSF反応性のM-CSF受容体活性化を抑制する可能性が極めて高い。従って、本発明で用いる培養系を用いて、Nefが結合し活性化したHckの非生理的な挙動を阻害する薬剤を同定することにより、新たな作用機序を持つ抗HIV-1薬剤が開発することが可能となる。

20

30

【0019】

本発明では、マクロファージ系細胞に、M-CSF受容体、及びHIV-1 Nef蛋白質とエストロゲン受容体のホルモン結合領域を融合させたNef-ER融合蛋白質を発現させることによってM-CSF依存性に増殖するマクロファージ系細胞を作製し、このマクロファージ系細胞をエストロゲン誘導体及びM-CSFの存在下で培養して、細胞増殖を抑制させることによって、抗HIV-1薬剤（又はNef阻害剤）のスクリーニング系を構築することができる。

【0020】

本発明で使用するマクロファージ系細胞は、M-CSF受容体を発現させた際にM-CSF依存性に増殖することができる細胞であれば特に限定されないが、ヒト由来の細胞が好ましい。本発明で使用するマクロファージ系細胞の具体例としては、TF-1細胞（American Type Cell Culture Collection（ATCC# CRL-2003）より入手可能）などが挙げられる。

40

【0021】

マクロファージ系細胞において、組み換えタンパク質（本発明においては、M-CSF受容体、及びHIV-1 Nef蛋白質とエストロゲン受容体のホルモン結合領域を融合させたNef-ER融合蛋白質）を発現させるための発現系は当業者に公知である。即ち、遺伝子組み換え法又はPCR法などにより調製した目的タンパク質をコードするDNAを、宿主であるマクロファージ系細胞中で発現させるためには、まず、該DNAを発現ベクター中のプロモーターの下流に挿入し、次いでこの組み換え発現ベクターを、マクロファージ系細胞中に導

50

入する。発現ベクターは、宿主であるマクロファージ系細胞での発現に適したものを使用する。

【0022】

マクロファージ系細胞などの動物細胞用の発現ベクターとして、例えば、p c D N A I、p c D M 8 (フナコシ社)、p c D N A I / A m P (I n v i t r o g e n 社製)、p R E P 4 (I n v i t r o g e n 社製)などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。マクロファージ系細胞などの動物細胞用の発現ベクターに用いることができるプロモーターとしては、例えば、サイトメガロウイルス(ヒトCMV)のIE(immediate early)遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR プロモーター等を挙げることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

10

【0023】

組換え発現ベクターの宿主への導入方法は、例えば、リン酸カルシウム法、プロトプラスト法、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法、リポフェクション法などが挙げられる。

【0024】

上記のようにして、M-CSF受容体及びNef-ER融合蛋白質を発現させたマクロファージ系細胞は、M-CSF依存性に増殖することができる。

【0025】

本発明では、上記のようにして作製した、M-CSF受容体及びNef-ER融合蛋白質を発現し、M-CSF依存性に増殖するマクロファージ系細胞を、エストロゲン誘導体(例えば、4-hydroxytamoxifenなど)及びM-CSFの存在下で培養して、細胞増殖を抑制させる。即ち、エストロゲン誘導体の存在下で培養することによりNefが活性化し、M-CSF依存性の増殖が抑制されることになる。この知見は本発明により初めて見出されたものである。

20

【0026】

上記のようにしてM-CSF依存性の増殖が抑制された細胞系は、抗HIV-1薬剤(又はNef阻害剤)のスクリーニング系として使用することができる。即ち、被験物質の存在下又は非存在下において、上記したM-CSF依存性の増殖が抑制された細胞系を培養し、被験物質の有無の場合について、細胞増殖の程度を比較することにより、被験物質の存在しない場合と比較して細胞増殖を増大させる被験物質を選択することができる。このようにして選択された被験物質は、M-CSF依存性増殖に対するNefによる抑制効果を阻害する物質(即ち、Nef阻害剤)であり、抗HIV-1薬剤の候補物質となり得るものである。

30

【0027】

本発明で用いる被験物質としては任意の物質を使用することができる。被験物質の種類は特に限定されず、個々の低分子合成化合物でもよいし、天然物抽出物中に存在する化合物でもよく、合成ペプチドでもよい。あるいは、被験化合物はまた、化合物ライブラリー、ファージディスプレイライブラリーもしくはコンビナトリアルライブラリーでもよい。被験物質は、好ましくは低分子化合物であり、低分子化合物の化合物ライブラリーが好ましい。化合物ライブラリーの構築は当業者に公知であり、また市販の化合物ライブラリーを使用することもできる。本発明のスクリーニング方法で選択される薬剤は、例えば、抗HIV薬剤として使用することができる。

40

【0028】

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

【実施例】

【0029】

実施例1：細胞系の樹立

本発明で用いる細胞株は以下の要領で作製した。TF-1-fms細胞はヒトマクロファージ系細胞株TF-1にヒトM-CSF受容体遺伝子(c-fms)を導入して申請者らが樹立したものであり

50

、M-CSF依存性に増殖する細胞である (Suzu S, Kimura F, Ota J, et al. Biologic activity of proteoglycan macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol.* 1997;159:1860-1867)。TF-1細胞はAmerican Type Cell Culture Collection (ATCC# CRL-2003)より入手可能であり、ヒトM-CSF受容体の塩基配列はGenBank (Accession# BC047521)にて公開されている。本発明で用いるTF-1-fms-Nef-ER細胞は、TF-1-fms細胞にNef-ER融合蛋白質 (HIV-1 Nef蛋白質とマウスエストロゲン受容体のホルモン結合領域 (ER) を融合させたもの) を導入して、発明者らが新たに樹立した細胞株である。詳細には、プラスミド pEBB-Nef-ER-IRES-puro (Walk SF, Alexander M, Maier B, Hammarskjold M-L, Rekosh DM, Ravichandran KS. Design and use of an inducibly activated immunodeficiency virus type 1 Nef to study immune modulation. *Journal of Virology.* 2001;75:834-843)、AIDS Research and Reference Reagent Program (# 6454)より入手可能) をTF-1-fms細胞にEffectene (QIAGEN社) を用いて製品添付書の指示に従いトランスフェクションした。具体的には、10%牛胎児血清 (Biosource社) および100ng/mlヒト組換え型M-CSF (森永乳業株式会社) を添加したRPMI1640培地 (Sigma社) (以上、通常培地) にて培養する 1.5×10^6 個のTF-1-fms細胞に、0.8 μ gのpEBB-Nef-ER-IRES-puroおよび40 μ lのEffecteneを加え、6時間37 $^{\circ}$ Cで培養し、その後、通常培地に交換した。トランスフェクション開始24時間後に最終1.5 μ g/mlのpuromycin (Sigma社) を添加し、更に7日間培養し、増えてきたpuromycin耐性細胞を限界希釈法 (96穴プレート1穴当たり1細胞になるように希釈培養) によりクローン化した。これらクローン化した細胞より、1% NP40 (Boehringer Mannheim社) を含む50mM Tris/HCl-150mM NaClを用いて細胞抽出液を調製し (1 $\times 10^6$ 細胞当たり100 μ l加えた)、これらクローンの中から、抗Nef抗体 (AIDS Research and Reference Reagent Program (# 2949)より入手可能) を用いたWestern Blotting法によりクローンを選別した。細胞抽出液をSDS-ポリアクリルアミドゲル (TEFCO社) により分離後、Hybond-P膜 (Amersham Pharmacia社) にTEFCO社Blottingユニットを用いて転写した (180 mA、60分間)。3% bovine serum albumin (BSA; Sigma社) を含む50mM Tris/HCl-150mM NaCl-0.05% Tween 20 (Sigma社) (以上、3% BSA-TBST) で室温30分間、膜をブロッキングし、抗Nef抗体 (3% BSA-TBSTにて5,000倍希釈) に室温3時間反応させ、二次抗体であるHRP標識抗ウサギIgG抗体 (Amersham Pharmacia社、3% BSA-TBSTにて50,000倍希釈) に4 - 晩反応させた。検出はECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham Pharmacia社) を用いて製品添付書の指示に従い、反応液に5分間膜を反応させて行った。その後、オートラジオグラフィフィルムHyperfilm ECL (Amersham Pharmacia社) に感光させフィルムを現像することで、Nef蛋白質を検出した。

【0030】

ERと融合したNef蛋白質は通常、非活性型であり、エストロゲン誘導体、例えば、4-hydroxytamoxifen (4-HT; Sigma社) で活性型へと変換されることが明らかとなっている (Walk SF, Alexander M, Maier B, Hammarskjold M-L, Rekosh DM, Ravichandran KS. Design and use of an inducibly activated immunodeficiency virus type 1 Nef to study immune modulation. *Journal of Virology.* 2001;75:834-843)。この性質を利用し、NefのM-CSF生物活性に及ぼす抑制効果を以下の実施例2により明らかにした。

【0031】

実施例2：M-CSFを介した細胞増殖のNefによる抑制

TF-1-fms細胞 (Parent) およびTF-1-fms-Nef-ER細胞 (Nef-ER) を通常培地を用いて 1×10^4 /mlの密度に調製し、96穴プレートにまいた。更に、4-HT非添加あるいは示した濃度で添加し、2日間あるいは4日間、37 $^{\circ}$ Cで培養し、その後、細胞にトリパンブルー (TOYOBO社) を加え、生細胞数を血球計算盤にて計測した。結果は図1に示すが、2日間および4日間培養のいずれでも、TF-1-fms-Nef-ER細胞のみが4-HTの濃度依存性に増殖低下を示すことが明らかである。この結果は、Nefにより、細胞の増殖というM-CSFの生物活性が阻害されたことを示している。従って、この培養系を応用して、新たな抗HIV-1薬剤をスクリーニングすることができる。

【0032】

実施例3：M-CSF受容体のチロシンリン酸化のNefによる抑制、並びにNefによるHckのチロシンリン酸化とM-CSF受容体複合体との会合

TF-1-fms-Nef-ER細胞をヒト組換え型M-CSFを含まない通常培地にて 5×10^5 /mlの密度に調製し、4-HTを非添加あるいは最終 $1 \mu\text{M}$ で添加し、12時間37℃で培養した。次に、パネルAとBではこれら細胞にM-CSFを非添加、あるいは1、3あるいは10分間M-CSF（最終 100 ng/ml ）M-CSFを加え刺激した。パネルCではM-CSF非添加のみでM-CSFによる刺激は行わず、次の細胞溶解に進んだ。次に、細胞を1%NP40（Boehringer Mannheim社）を含む50mM Tris/HCl-150mM NaClを用いて溶解し（ 1×10^6 細胞当たり $100 \mu\text{l}$ 加えた）、氷上で30分間処理後、細胞抽出液を調製した。溶解液には、蛋白質の分解を抑えるために、1mM EDTA（Sigma社）、1mM PMSF、 $1 \mu\text{g/ml}$ aprotinin、 $1 \mu\text{g/ml}$ leupeptinおよび $1 \mu\text{g/ml}$ pepstatin（以上、Boehringer Mannheim社）を、脱リン酸化反応を抑えるために1mM Na_3VO_4 および1mM NaF（以上、Sigma社）を加えた。

【0033】

（図2のパネルA）

細胞抽出液を実施例1に示したWestern Blotting法により解析した。抗体は抗リン酸化チロシン抗体（Santa Cruz社、Clone# PY99）を $0.5 \mu\text{g/ml}$ の濃度で、二次抗体はHRP標識抗マウスIgG抗体（Amersham Pharmacia社）を50,000倍希釈で用いた。矢印で示したバンドが分子量から考えてM-CSF受容体に相当するバンドと予想され、そのM-CSF反応性のチロシンリン酸化、即ち、活性化が4-HT前処理細胞（Nef活性化細胞）では、抑制されていることが確認される。次に、このことを更に確認するために、パネルBで示す免疫沈降/Western Blottingを行った。

【0034】

（図2のパネルB）

前述のように調製した細胞抽出液 $500 \mu\text{l}$ にアガロースに結合させた抗リン酸化チロシン抗体（Santa Cruz社、#PY99）を $30 \mu\text{l}$ 加え、4℃にて一晩反応させ、その後、前述の1%NP40を含む細胞溶解用液で4回洗浄後、免疫沈降物をSDS-PAGE用サンプル液（TEFCO社）にて回収した。この免疫沈降物をWestern Blotting法により解析した。抗体は抗M-CSF受容体（別名fms）抗体（Santa Cruz社、#SC-692）を $0.5 \mu\text{g/ml}$ の濃度で、二次抗体はHRP標識抗ウサギIgG抗体（Amersham Pharmacia社）を50,000倍希釈で用いた（以上、上段）。前述のように調製した細胞抽出液 $500 \mu\text{l}$ に抗M-CSF抗体（Zymed社、Clone#12-2D6）を $2 \mu\text{g}$ 加え、4℃で4時間反応後、更に、Protein A/G-Plusアガロース（Santa Cruz社）を $30 \mu\text{l}$ 加え、4℃にて一晩反応させ、その後、前述の1%NP40を含む細胞溶解用液で4回洗浄後、免疫沈降物をSDS-PAGE用サンプル液（TEFCO社）にて回収した。この免疫沈降物をWestern Blotting法により解析した。抗体は抗リン酸化チロシン抗体（Santa Cruz社、Clone# PY99）を $0.5 \mu\text{g/ml}$ の濃度で、二次抗体はHRP標識抗マウスIgG抗体（Amersham Pharmacia社）を50,000倍希釈で用いた（以上、中段）。更に、免疫沈降物の量が各サンプル間で同量であることを示すために、同じ免疫沈降物を抗M-CSF受容体抗体（Santa Cruz社、#SC-692、 $0.5 \mu\text{g/ml}$ ）およびHRP標識抗ウサギIgG抗体（Amersham Pharmacia社、50,000倍希釈）を用いたWestern Blottingで解析した（以上、下段）。このパネルBから得られる結論は、M-CSF反応性のM-CSF受容体のチロシンリン酸化、即ち活性化が、4-HT前処理TF-1-fms-Nef-ER細胞（Nef活性化）では、抑制されていることである。次にパネルCで、このM-CSF受容体活性化の抑制とHckの異常な挙動が同時に起きていることを示す。

【0035】

（図2のパネルC）

前述のように調製した細胞抽出液 $500 \mu\text{l}$ に、抗M-CSF受容体抗体（Zymed社、Clone#12-2D6）を $2 \mu\text{g}$ あるいは抗Hck抗体（Santa Cruz社、#SC-72）を $2 \mu\text{g}$ 加え、4℃で4時間反応後、更に、Protein A/G-Plusアガロース（Santa Cruz社）を $30 \mu\text{l}$ 加え、4℃にて一晩反応させ、その後、前述の1%NP40を含む細胞溶解用液で4回洗浄後、免疫沈降物をSDS-PAGE用サンプル液（TEFCO社）にて回収した。これら免疫沈降物をWestern Blotting法により解析した。抗体は抗Hck抗体（Santa Cruz社、#SC-72）を $0.5 \mu\text{g/ml}$ の濃度で、二次抗体はHRP

10

20

30

40

50

標識抗ウサギIgG抗体 (Amersham Pharmacia社) を50,000倍希釈で用いた (以上、1段目)。更に、免疫沈降物の量が各サンプル間で同量であることを示すために、同じ免疫沈降物を抗M-CSF受容体抗体 (Santa Cruz社、#SC-692、0.5 $\mu\text{g/ml}$) およびHRP標識抗ウサギIgG抗体 (Amersham Pharmacia社、50,000倍希釈) を用いたWestern Blottingで解析した (以上、2段目)。また、抗体は抗リン酸化チロシン抗体 (Santa Cruz社、Clone# PY99) を0.5 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で、二次抗体はHRP標識抗マウスIgG抗体 (Amersham Pharmacia社) を50,000倍希釈で用いた (以上、3段目)。更に、免疫沈降物の量が各サンプル間で同量であることを示すために、同じ免疫沈降物を抗Hck抗体 (Transduction Laboratories社、Clone# 18、0.5 $\mu\text{g/ml}$) およびHRP標識抗マウスIgG抗体 (Amersham Pharmacia社、50,000倍希釈) を用いたWestern Blottingで解析した (以上、4段目)。このパネルCから得られる結論は、HckがNef活性化によってチロシンリン酸化され、そして、Nef非活性化では見られない会合、つまり、M-CSF受容体複合体とこのHckが恒常的に会合する、ということである。

10

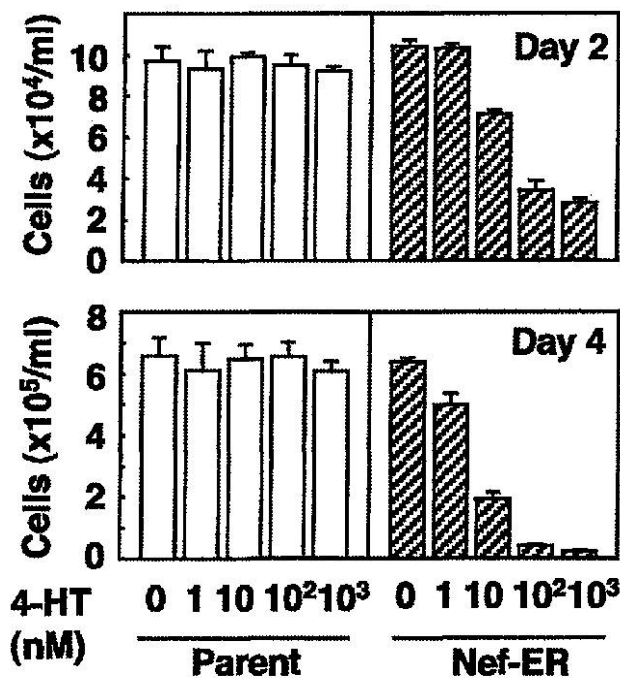
【図面の簡単な説明】

【0036】

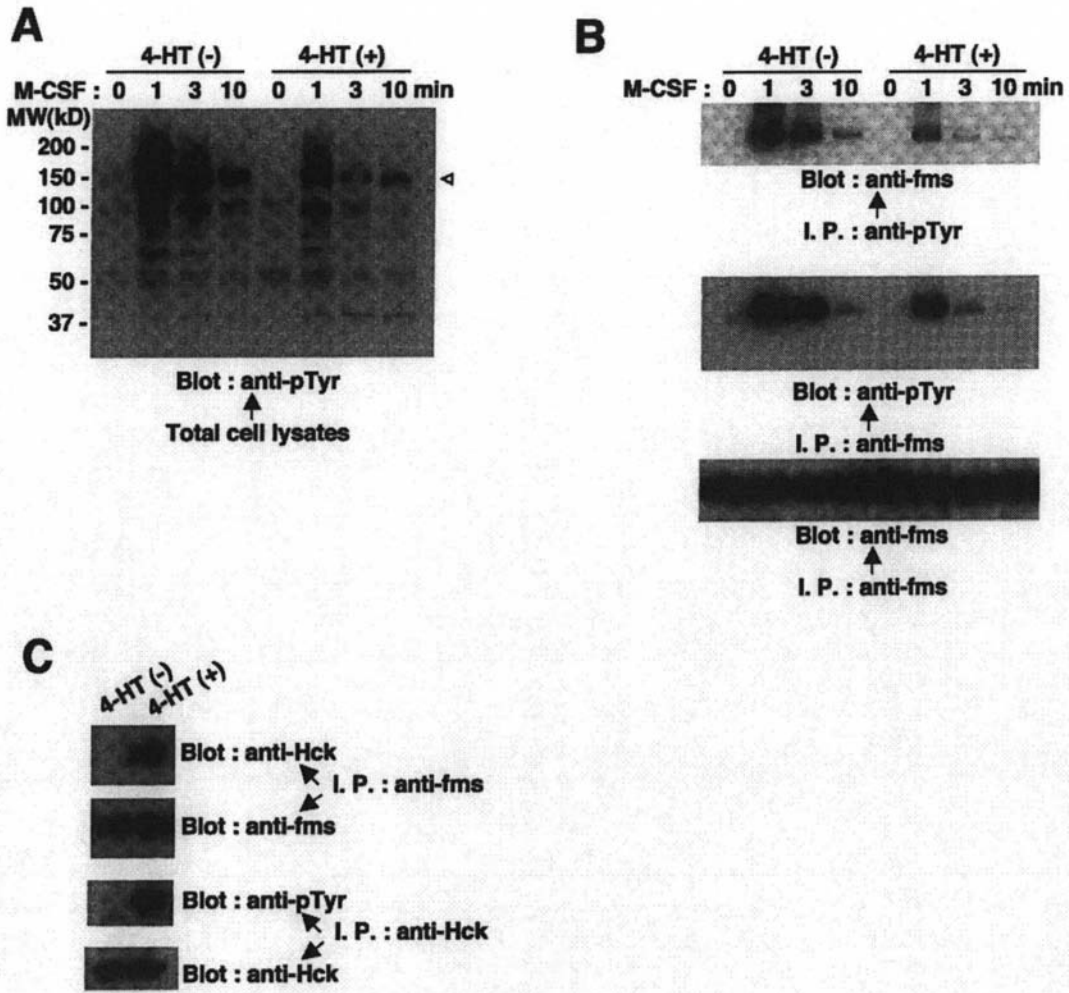
【図1】 図1は、M-CSFを介した細胞増殖のNefによる抑制を示す実験結果である。

【図2】 図2は、M-CSF受容体のチロシンリン酸化のNefによる抑制、並びにNefによるHckのチロシンリン酸化とM-CSF受容体複合体との会合を示す実験である。

【図1】



【 図 2 】



フロントページの続き

(56)参考文献 日本ウイルス学会学術集会プログラム・抄録集, (2004.11.01), vol.52, p.186

J Virol, (2001), vol.75, no.2, p.834-843

Mol Cell Biol Res Commun, (1999), vol.1, no.2, p. 144-152

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/00 - 68

BIOSIS/WPIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus(JDreamII)

PubMed