

平成10年度

課題番号：H10-特別-027

厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）
総括研究報告書

ウイルス及び宿主由来転写活性化因子の共働阻害剤
によるエイズ発症制御に関する研究

熊本大学薬学部助手 古石 和親

厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）
総括研究報告書

ウイルス及び宿主由来転写活性化因子の共働阻害剤によるエイズ発症制御に関する研究

主任研究者 古石 和親 熊本大学薬学部助手

研究要旨

HIV-1 ウイルスにおいてウイルス DNA の転写を司る細胞性転写因子 (NF- κ B) 及びウイルス性転写因子 (HIV-1 Tat) の転写活性は、それぞれ両転写因子のレドックス制御及び Zn-finger 構造形成により発揮される。両者において、構造上鍵となるのがチオール基あるいはジスルフィド基である。申請者は、両転写因子に共通な構造である活性チオール基に着目し、o,o'-bismyristoyl thiamine disulfide (BMT) を創製し、その抗 HIV 活性測定、詳細な作用機序の解明をおこなった。また、臨床応用を指向して、HIV-1 臨床単離株に対する抗 HIV 活性の測定を行った。その結果 1) BMT は、HIV-1 及び SIV 持続感染細胞から産生される、培養上清中のウイルス感染価を著しく減少させた 2) 細胞指向性の異なる HIV-1 ウイルス株に対し、BMT は HIV-1 X4 実験室株 (HTLV-IIIB, MN) 及び臨床単離株 (KMT) に対し、それぞれ最小有効濃度 1 μ M, 12.5 μ M, 25 μ M において抗 HIV 作用を示した。HIV-1 R5 実験室株 (JRFL) に対し抗 HIV 作用を示した 3) BMT の作用機構は、細胞性転写活性化因子 NF- κ B の核移行阻害及び HIV-1 転写活性化因子 Tat の転写活性阻害による HIV-1 転写活性化の抑制であった。臨床実験の前段階として、AIDS 動物モデル (SIV 感染アカゲザル) を用いた *in vivo* 実験を国立感染症研究所との共同研究により、現在進行中である。これまで得られた結果では、BMT を AIDS 発症サルに皮下注射 (32 mg/kg, 1 日 2 回接種) 投与した結果、投与 2 週間後から CD4 陽性細胞の増加と血液中のウイルス量の著しい低下が認められ、投与後 3 週間目からウイルスは検出限界以下に低下したことから、サルエイズに対して有効であることが示唆された。以上のことから、BMT は、Tat 及び NF- κ B 構造内の高度に保存された機能領域であるチオール基を標的とした難薬剤耐性抗 HIV 剤になり得ることが示唆された。

A. 研究目的

作用機構の異なる抗 HIV 剤の多剤併用療法により、ウイルス抗原消失、エイズ発症の抑制・遅延が報告されているが、根治療法ではなく最終的に多剤耐性ウイルスの出現が予想されており、また、治療薬が高価なため、多くのエイズ患者を抱えた発展途上国では適用

・されるのは困難である。
・ エイズウイルスの爆発的な転写はウイルス由来転写活性化因子 HIV-1 Tat 及び細胞由来転写活性化因子 NF- κ B によって営まれ、一日に約数百億個のウイルス粒子が産生されている。この爆発的なウイルス産生を抑えるためには、HIV-1 Tat 及び

NF-κB を同時に阻害することが極めて重要で、かつ耐性獲得防止のために変異原性がないこと、あるいはその変異を利用して、本来の機能を喪失させることが重要なポイントになる。

申請者は、ウイルス転写活性化因子HIV-1 Tat及び細胞の転写活性化因子NF-κBを同時に阻害し、エイズ発症を制御することを目的として、両タンパク質の活性チオール基に注目した。HIV-1 Tatタンパク質のシステインリッチ構造のチオール基はZnと配位し、Znフィンガー構造を形成し核酸に結合する。HIV-1 Tatはウイルス遺伝子支配であるので、他の抗HIV剤同様、耐性を獲得することが推定されが、もし、システイン残基が他のアミノ酸に変異すれば、核酸と結合する能力を消失する。この変異した遺伝子を取り込んだHIV-1プロウイルスがNF-κBの作用で転写されても、変異HIV-1 Tatのため、爆発的な転写は起こらず、エイズ発症を抑制することができる。一方NF-κBは細胞の遺伝子支配で変異は受けにくく、還元され、活性化して核へ移行する。HIV-1 geneの5'上流のプロモーターサイトにNF-κBの結合活性チオール基を介して結合し、HIV-1 Tatと共働的転写を爆発的に促進する。たとえNF-κBの作用で発現したとしても、変異Tatタンパク質でチオール基を有せず、HIV-1転写を活性化することができない。変異Tat geneを取り込んだHIV-1プロウ

イルスは、転写が促進されず、プロウイルスとして封じ込むこと可能になる。多剤耐性ウイルスの出現が懸念される現在、本研究は、エイズ治療薬開発領域の新たな分野を開拓し、さらなる有効なエイズ治療方法を見出すための基礎研究として、極めて重要であると考える。

B. 研究方法

1) BMTのHIV-1臨床単離株に対する抗HIV効果

HIV-1臨床単離株(T-リンパ球指向性株及びマクロファージ指向性株)は、熊本大学エイズ学研究センター 松下修三教授より恵与頂いた。健常人末梢血リンパ球(PBMC)を常法に従い調製後、3日間PHAまたは抗CD3抗体存在下培養した細胞を感染実験に用いた。HIV-1臨床単離株(p24量500 pg/ml相当ウイルス量)を、あらかじめBMT存在下37°C、30分間インキュベーション後、PHA刺激PBMC(4 x 10⁴ cells/ml)に感染させた。37°C、4-14日間培養後、巨細胞形成、間接蛍光抗体法、p24抗原量、逆転写酵素活性を測定し、ウイルス産生阻害活性を測定した。

2) 細胞性転写活性化因子NF-κBに対するBMTの影響

感染細胞核内タンパク質を抽出後、核内NF- κ Bをウエスタンブロット分析及びNF- κ B結合モチーフを持つオリゴヌクレオチドを用いたElectro mobility shift assayによりDNA結合活性を測定し、NF- κ B阻害活性を測定した。

3) ウイルス性転写活性化因子 HIV-1 Tat に対する BMT の影響

COS-7細胞にアクティベーター (pBC12/HIV/Tat) 及びリポーター (pBC12/HIV/SeAP) 両プラスミドをLipofection法によりトランスフェクションし、HIV-1 Tatの転写活性を評価する、分泌型アルカリホスファターゼ (secreted alkaline phosphatase, SeAP) 活性を測定した。

4) BMT の薬剤学的所見検討

雄性DDYマウス (体重25~30g) に対し、BMTを腹腔内投与し、投与後7日間観察し、LD₅₀を算出する。また、マウス及びラットに1/40LD₅₀のBMTを腹腔投与し、有効血中濃度、有効リンパ液中濃度を測定する。

5) サルエイズに対する BMT の抗エイズ効果

国立予研筑波霊長類研究センター 向井鎌三郎博士の協力により、SIV感染アカゲザルに対するBMTの抗エイズ作用を判定する。BMT (LD₅₀の1/40量) を24時間毎に皮下注射し、3日毎に採血して、血中ウイルス量、CD4-リンパ球数、サル血液の生化学的検査を

行い、抗エイズ作用を判定した。

C. 研究結果

BMT の HIV-1 臨床単離株 に対する 抗 HIV 効果

各種 HIV-1 ウイルス実験室株に対する BMT の抗 HIV 作用を、ウイルス感染価及び p24 抗原定量により測定した。その結果、CEM/LAV-1 細胞から産生される娘ウイルスの感染価 (50 % tissue culture infectious dose, TCID₅₀) は、コントロール群において 1×10^6 TCID₅₀/ml であるのに対し、BMT 処理群では、ウイルス感染価は著しく減少し ($100 \mu\text{M}$, 5.0×10^2 TCID₅₀/ml)、最小有効濃度は $1 \mu\text{M}$ であった。また、simian immunodeficiency virus (SIV) 持続感染細胞 Hut78/SIVmac251 細胞 (コントロール, 1×10^4 TCID₅₀/ml) においても同様に、ウイルス感染価は著しく減少した ($100 \mu\text{M}$, 5.0×10^2 TCID₅₀/ml)。また、BMT は、SIV 持続感染細胞 CEM174/SIVmac251 においても、抗ウイルス活性を示し、その 50 % 阻害濃度 (IC₅₀) は $26.4 \mu\text{M}$ であった。

HIV-1 臨床単離株 X4 ウイルス (KMT) 及び R5 ウイルス (KMO) に対する BMT の抗 HIV 活性を健常人ヒト抹消血単核球細胞 (peripheral blood mononuclear cell,

PBMC) を標的細胞に用い、p24 抗原量を指標に測定した。比較対照として、HIV-1 実験室株 X4 (MN 株) 及び R5 ウイルス (JRFL 株) についても同様に行った。その結果、KMT 株を BMT 存在下 PBMC に m.o.i (multiplicity of infection) = 0.1 または 0.5 にて感染させた結果、

最小有効濃度 25 μ M で多核巨細胞形成を阻害した。また、同様に MN 株を BMT 存在下 PBMC に m.o.i = 0.1 または 1.5 にて感染させた結果、最小有効濃度 12.5 μ M で多核巨細胞形成を阻害した。

KMO 株及び JRFL 株を BMT 存在下 PBMC に感染させ、ウイルス産生量 (HIV-1 p24 抗原量) を指標として抗 HIV 効果を検討した結果、KMO 株は、primary isolate でありウイルス産生量が少ないため p24 抗原量に有意な差が認められなかった。JRFL 株では、p24 抗原量の顕著な減少を示し、その IC₅₀ は、14.7 μ M であった。

NF- κ B 活性に対する BMT 影響

HIV-1 潜伏感染細胞 ACH-2 細胞 (5.0 x 10⁵ cells/ml) を BMT (12.5 μ M) 存在下 3 時間処理後、PMA (1 ng/ml) にて刺激を加え、NF- κ B の活性化・核移行への BMT の影響を抗 NF- κ B 抗体を用いた間接蛍光抗体法及び LSC (OLYMPUS LSC 101) により観察した。その結果、PMA 刺激以前の細胞において、細胞質全体に NF- κ B が局在している形態が観察された。非処理 ACH-2 細胞において、PMA 刺激 4

時間後の細胞で、NF- κ B が核に局在している形態が確認された。これに対し、BMT 処理 ACH-2 細胞では、PMA 刺激 4 時間において核ではなく細胞質、細胞膜近傍に NF- κ B が局在している形態が観察された。

さらに、Electro mobility shift assay により、BMT 処理した HIV-1 持続感染細胞 CEM/LAV-1 の核タンパク質中に含まれる NF- κ B の DNA 結合活性を測定した。その結果、BMT 処理細胞から得られた核タンパク質の NF- κ B プローブに対する結合活性は、濃度依存的に有意な減少が認められ、500 μ M 以上の濃度では完全に阻害した。一方、HIV-1 Tat の転写活性阻害作用を有する TDS は、NF- κ B の DNA 結合活性に影響を及ぼさなかった。また、核タンパク質中の NF- κ B に対する BMT の直接的な作用を調べた結果、有意な阻害は認められなかった。

ウイルス性転写活性化因子 Tat タンパク質に対する BMT の影響

HIV-1 Tat 転写活性を SeAP 法により測定した結果、BMT は、Tat の転写活性化能を 100 μ M において 44.9 %、250 μ M において 95.1 % 阻害した。Tat タンパク質発現 COS-7 細胞内の Tat タンパク質を検出した結果、BMT 処理群、コントロー

ル群においてTatタンパク質が検出され、発現量は差は認められなかった。間接蛍光抗体法を用い、Tatタンパク質の細胞内局在をLSC分析した結果、コントロール群ではTatタンパク質が核に局在する形態が観察されるのに対し、BMT処理群では、Tatタンパク質が核に局在する形態は全く観察されなかった。

BMTの薬剤学的所見検討

雄性DDYマウス（体重25~30g）に対し、BMTを腹腔内投与し、投与後7日間観察し、LD₅₀を算出した結果、LD₅₀は、630mg/kg i.p.、信頼限界は、496~800mg/kg (p=0.05)であった。マウス及びラットに1/40LD₅₀のBMTを腹腔投与し、血中濃度及びリンパ液中濃度を測定した結果、ともに投与後4時間で最大値を示し、濃度はそれぞれ1.31μM及び2.82μMであった。

サルエイズに対するBMTの抗エイズ効果

臨床実験の前段階として、AIDS動物モデル（SIV感染アカゲザル）を用いた*in vivo*実験を国立感染症研究所との共同研究により、現在進行中である。これまで得られた結果では、BMTをAIDS発症サルに皮下注射（32mg/kg、1日2回接種）投与した結果、投与2週間後からCD4陽性細胞の増加と血液中のウイルス量の著しい低下が認められ、投与後3週間目から

ウイルスは検出限界以下に低下したことから、サルエイズに対して有効であることが示唆された。

D. 考察

NF-κBはp65とp50のヘテロダイマーであり、休止期の細胞では細胞質に、抑制性タンパク質IκBとの複合体として不活性な状態で存在する。細胞質におけるNF-κB・IκB複合体に対して細胞外からの様々なシグナルが作用し、NF-κBはIκBから遊離し、核内へと移行する。これらの結果から、BMT非処理群において、形態学的にも、またLSC分析によっても、ACH-2細胞内のNF-κBがPMA刺激により核に局在するのに対し、BMT処理群においては、NF-κBの核への局在が確認されず、BMTがNF-κBの活性化・核移行を阻害していることが明らかとなった。NF-κBの活性化が抗酸化剤であるα-lipoic acidやN-acetylcysteineにより阻害されることから活性酸素がシグナル伝達にメディエーターとして存在することが考えられている。活性酸素などの酸化ストレスは、NF-κB活性化過程（レドックス制御）の担い手であるチオレドキシン/NADPH/チオレドキシ還元酵素からなるチオレドキシン系を誘導する。NF-κB p50の61番目のシステイン残基

は、チオレドキシシンにより還元されてDNA結合活性を増強する。 HIV 発現を抑えることで二次感染を防止

BMTは、すでに医薬品として承認されている Thiamine disulfide にミリスチン酸2分子を導入した化合物で、スーパーコンピューターを用いた MOPAC PM3 法による立体構造解析の結果、TDS のジスルフィド結合が、trans form であるのに対し、BMT では、90度ねじれた cis form をとっていることが予測された。この立体構造により、BMT の酸化還元電位は、NADPH, グルタチオン (GSH), α -lipoic acid よりも高いことが明らかとなっており、ジスルフィド基がより活性の高い状態であると考

えられる。従って、BMT は、その活性の高いジスルフィド結合により、チオレドキシシンによる NF- κ B のレドックス制御、あるいは直接 NF- κ B の機能領域にあるシステイン残基に作用し、NF- κ B p50 のシステイン残基の還元を阻害し、核移行、DNA 結合を抑制すると考

えられる。細胞に潜伏感染している HIV プロウイルスからの転写の誘導は、まず細胞外からのさまざまな刺激が複数のシグナル伝達経路を経て、転写活性化因子 NF- κ B へと伝えられることにより引き金が引かれると考えられており、BMT が、NF- κ B の活性化を阻害することにより HIV-1 プロウイルスからの HIV の発

現を抑え、潜伏感染状態のまま AIDS 発症を抑え得ると考える。また、生体内において、HIV の感染する CD4 陽性細胞は、常にターンオーバーを繰り返しており、HIV 感染細胞からの

抗 HIV 剤として、現在、種々の逆転写酵素阻害剤、プロテアーゼ阻害剤が臨床において投与されているが、耐性ウイルスの出現が懸念される。BMT は、上記のように Tat タンパク質の Zn-finger 領域のシステイン残基を標的としており、変異株が出現したとしても、この領域のシステイン残基の置換変異は、Tat の転写活性化能の減少をもたらすことが報告されて

いる。BMTのようなTatタンパク質の機能領域であるZn-finger領域システイン残基のチオール基を標的とする化合物は、耐性出現を許容しない難耐性抗HIV剤として期待される。

E. 結論

作用機構の異なる抗HIV剤の多剤併用療法により、ウイルス抗原消失、エイズ発症の抑制・遅延が報告されているが、根治療法ではなく最終的に多剤耐性ウイルスの出現が予想されており、また、治療薬が高価なため、多くのエイズ患者を抱えた発展途上国では適用されるのは困難である。

エイズウイルスの爆発的な転写はウイルス由来転写活性化因子HIV-1Tat及び細胞由来転写活性化因子NF- κ Bによって営まれ、一日に約数百億個のウイルス粒子が産生されている。この爆発的なウイルス産生を抑えるためには、HIV-1Tat及びNF- κ Bを同時に阻害することが極めて重要で、かつ耐性獲得防止のために変異原性がないこと、あるいはその変異を利用して、本来の機能を喪失させることが重要なポイントになる。

このような背景のもと、ウイルス転写活性化因子HIV-1 Tat及び細胞の転写活性化因子NF- κ Bを同時に阻害し、エイズ発症を制御することを目的として創製したo,o'-bismyristoyl thiamine disulfide (BMT)は、細胞性転写活性化因子NF- κ Bの核移行阻害及びHIV-1転写活

性化因子Tatの転写活性阻害によりHIV-1プロウイルスの転写を抑制し、種々のHIV-1ウイルス株に対し抗HIV作用を示した。また、臨床実験の前段階として、AIDS動物モデル(SIV感染アカゲザル)を用いた*in vivo*実験により、臨床応用が可能であることが示唆された。しかしながら、本剤は、水に対し不溶性であるため、臨床使用されている他の抗HIV剤と比較して、最小有効濃度が高いことが指摘される。現在、溶解補助剤として、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油(60)を使用しているが、有効濃度を低下させるためには、溶解補助剤の検討ならびに新規BMT誘導体の開発を進める必要があると考えられる。また、他の抗HIV剤との併用による相加的・相乗的な抗HIV作用の検討も、今後の重要な課題である。多剤耐性ウイルスの出現が懸念される現在、本研究で得られた成果は、エイズ治療薬開発領域の新たな分野を開拓し、さらなる有効なエイズ治療方法を見出すための基礎研究として、極めて重要であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Biochem. Biophys. Res. Commun., 249, 745-753 (1998).

Shozo Shoji, Kazuchika Furuishi, Akihito

Ogata, Kazunobu Yamataka, Kuniomi :
Tachibana, Ryozauro Mukai, Akihiko Uda, :
Kazunobu Harano, Shuzo Matsushita, and :
Shogo Misumi.

An allosteric drug, o,o'-bismyristoyl thiamine :
disulfide, suppressed HIV-1 replication through :
prevention of nuclear translocation of both HIV- :
1 Tat and NF-kB.

2. 学会発表

o,o'-Bismyristoyl thiamine disulfide (BMT) の抗 :
HIV-1 作用及びその作用機序

山口雅典, 緒方昭仁, 橋岡臣, 古石和親, 三隅 :
将吾, 松下修三, 向井鎌三郎, 庄司省三

第71回日本生化学会大会(名古屋国際会議場, :
平成10年10月14日~17日)

G. 知的所有権の取得状況

該当なし

19980059

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
下記の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

「研究成果の刊行に関する一覧表」

An allosteric drug, o,o'-bismyristoyl thiamine disulfide, suppresses HIV-1 replication through prevention of nuclear translocation of both HIV-1 Tat and NF-kappa B.

Shoji S, Furuishi K, Ogata A, Yamataka K, Tachibana K, Mukai R, Uda A, Harano K, Matsushita S, Misumi S.

Biochem Biophys Res Commun. 1998 Aug 28;249(3):745-53.