

2000/034 ~ 1050

創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業

平成12年度

# エイズ医薬品等開発研究

## 研究報告書

財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

平成12年度

# エイズ医薬品等開発研究

## 研究報告書

# 目 次

課題番号

## 第1分野 抗エイズウイルス薬、エイズ不随症状に対する治療薬の開発に関する研究

10101	国内未承認エイズ治療薬等を用いたHIV感染症治療薬及びHIV感染症至適治療法の開発に係る応用研究	福武 勝幸	……	1
10102	エイズ医薬品候補物質のスクリーニング研究	棚元 憲一	……	13
10103	HIV第二受容体拮抗剤を基盤分子とする戦略的抗エイズ剤の創製と実用化	藤井 信孝	……	16
10104	HIVインテグラーゼおよび複製を制御する蛋白質を標的とする抗ウイルス剤の開発	藤原 民雄	……	22
10105	アポトーシス抑制作用を有する新規抗エイズ薬の開発	吉野公一郎	……	28
10106	細胞性因子を標的にした抗HIV薬の開発研究	金岡 昌治	……	35
10107	カリニ肺炎のゲノム創薬研究	西村 暹	……	46
10108	逆転写酵素阻害剤の併用療法に関する研究	湯浅 聡	……	51
10109	難薬剤耐性且つ多機能を指向した抗エイズ薬の開発及び抗CCR5-CXCR4キメラ環状テトラデカペプチド抗体による感染防御	加藤 英夫	……	61
10110	遺伝子発現制御機能を持つ亜鉛サイクレン錯体による抗エイズ薬の研究	山本 直彦	……	72
10111	HIV-1の細胞侵入機構の解析による抗エイズウイルス薬の開発	鈴木 達夫	……	77
10113	新規クロニング翻訳調節蛋白やIL-15、IL-16、CD26阻害剤によるエイズおよびエイズ付随症状の治療・診断研究	岩倉洋一郎	……	88

## 第2分野 エイズワクチン等エイズ発症防止薬の開発に関する研究

10201	HIV日本人株及び東南アジア株に対するワクチンの開発とAIDS予防法に関する研究	小室 勝利	……	99
10202	HIV-1vpr遺伝子を用いたHIV感染細胞のアポトーシスによる排除技術の開発	森田 裕	……	115
10204	HIVによる免疫機能不全を治療・予防する新規ワクチンの開発	金子有太郎	……	121

## 第3分野 抗エイズ薬開発のための基盤技術の開発等に関する研究

10301	エイズ治療薬開発のための評価スクリーニング系の開発	永井 美之	……	133
10303	HIVの病原性遺伝子Nefを標的とした抗AIDS薬開発のための基盤研究	松田 道行	……	144

## 第1分野

抗エイズウイルス薬、エイズ不随症状  
に対する治療薬の開発に関する研究

## アポトーシス抑制作用を有する新規抗エイズ薬の開発

所 属：日本オルガノン株式会社・医薬研究所  
主任研究者：所長 吉野公一郎

### 要 旨

これまでの研究で、SIV感染サルでのCD4<sup>+</sup>T細胞の減少に、可溶性 Fas リガンド (sFasL) を介するアポトーシスが関与していることを明らかにしてきた。本年度の研究では、野生型 FasL, sFasL, ncFasL (切断部位を除き膜から切り出されないようにした FasL) をトランスフェクトした細胞を用いて sFasL が機能的な蛋白であることを証明した。さらに、新規 FasL shedding 阻害薬約 100 化合物を合成、評価して経口投与可能な阻害薬 OJ-R8898 を選び、SIV 感染サルに 10mg/kg の割合で 2 週間連続経口投与して、血中の sFasL 量、CD4<sup>+</sup>T 細胞数に与える影響を評価した。その結果、sFasL の低下にともなって CD4<sup>+</sup>T 細胞レベルの上昇が認められた。これら増加する CD4<sup>+</sup>T 細胞の表面マーカーを解析すると、Fas または CD29 陽性の CD4<sup>+</sup>T 細胞が増加していることが明らかとなった。この結果、FasL shedding 阻害薬が、HIV 感染者の免疫能を保つ新しいエイズ治療薬となる可能性が示唆された。一方、この数年の間に、細胞膜からの蛋白の切り出し (shedding) に関する知見が急速に集積され、FasL のような TNF ファミリーサイトカインのみならず、接着分子や増殖因子など多くの膜タンパクが、似たような酵素により shedding を受けることが明らかとなり、FasL shedding 酵素阻害薬を安全に用いるためには、FasL shedding 酵素を選択的に阻害する薬物を見出すことが重要であることが益々確かとなると同時に、選択的な阻害薬を見いだすことは、当初予想されていたよりも遙かに難しい課題であることも明らかになってきた。実際、私たちが今回の検討に用いた阻害薬 OJ-R8898 も、FasL のみならず、接着分子や増殖因子など多くの膜タンパク shedding を阻害する。ブロードスペクトル阻害薬が生体のどのような機能を抑制し、どのような副作用を発現するのか現時点では全く不明である。しかしながら、この点が今後実用的な FasL shedding 阻害薬を早期に開発する際のポイントとなる。そこで、阻害薬のグローバルな副作用を簡便に評価する系として、ADAM 型メタロプロテアーゼが発生時に重要な役割を演じているショウジョウバエを用いる評価系を確立した。今後、本プロジェクトで蓄積された知見、開発されたハイスループットスクリーニング系、副作用評価システムを活用して、早期に実用的な FasL shedding 阻害薬が開発されることを期待する。

### 1. 研究組織

- (1) 日本オルガノン株式会社 医薬研究所 吉野公一郎 所長、近藤裕郷 室長、桐井康行 主任研究員、大本 弘志 主任研究員
- (2) 鐘紡株式会社 基礎科学研究所 井上紳太郎 副所長、杉山義宜 研究員、青 裕子 研究員
- (3) 順天堂大学 医学部 榎垣伸彦 助手
- (4) 国立感染症研究所 筑波医学実験用霊長類センター 寺尾恵治 室長、
- (5) 大阪大学 医学部 東山繁樹 助教授
- (6) 東京理科大学 基礎工学部 生物工学科 松野健二 助教授

### 2. 研究目的

エイズ患者は HIV ウィルス感染後、CD4 陽性 T (CD4<sup>+</sup>T) 細胞が特異的に減少し、免疫不全となり感染症により死亡する。従って CD4<sup>+</sup>T 細胞の減少を止めることができれば病態の進行を阻止できる可能性がある。CD4<sup>+</sup>T 細胞の減少は HIV ウィルスが直接 CD4<sup>+</sup>T 細胞を破壊するのではなく、何らかの因子を介したバイスタンダー効果によるものと想定されていた。本研究者等は、これまでの研究で、SIV 感染サルでの CD4<sup>+</sup>T 細胞の減少に可溶性 Fas リガンド (sFasL) を介するアポトーシスが関与していることを明らかにしてきた。しかしながら、sFasL の機能に関しては、アポトーシスや炎症を惹起す

る機能的な蛋白である説がある一方、正常細胞に対するアポトーシス惹起能が弱いので、アポトーシスを防御する機能を担っているとする説があり、これまで不明確であった。そこで本研究では野生型 FasL, sFasL, ncFasL (切断部位を除き膜から切り出されないようにした FasL) をトランスフェクトした細胞を作製し、機能解析を行った。FasL は、T 細胞やマクロファージ等からメタロプロテアーゼで可溶化されることがわかっており、本研究では、このメタロプロテアーゼをクローニングするとともに、有効な阻害薬を見だしその効果を SIV 感染サルで証明することを目的としている。本研究者がこれまで仮説の検証に用いてきた FasL shedding 酵素阻害を示す MMP 阻害薬は、阻害スペクトラムが広く、類似化合物が抗腫瘍薬として臨床試験に供されているが、筋肉痛をはじめとする多くの副作用が認められている。また、これまでに評価してきた化合物は、経口吸収性が無く水に対する溶解度も低い、等の問題を有しており実用的な化合物ではなかった。一方、この数年の間に、細胞膜からの蛋白の切り出し (shedding) に関する知見が急速に集積され、FasL のような TNF ファミリーサイトカインのみならず、接着分子や増殖因子など多くの膜タンパクが、似たような酵素により shedding を受けることが明らかとなり、FasL shedding 酵素阻害薬を安全に用いるためには、FasL shedding 酵素を選択的に阻害する薬物を見出すことが重要であることが益々確かとなると同時に、選択的な阻害薬を見出すことは、当初予想されていたよりも遙かに難しい課題であることも明らかになってきた。本研究グループは、選択的な化合物を見出すために、MMP 阻害作用、TNF ファミリー、EGF ファミリー-shedding 阻害を評価するハイスループットスクリーニング系を確立し、多数の化合物を評価しながら構造活性相関を明らかにし、選択性、物性の優れた実用レベルの化合物の創製を目指した。さらに、現時点ではブロードスペクトルを有する MMP 阻害薬の筋肉痛をはじめとする多くの副作用が、MMP の阻害に基づくのかあるいは膜タンパクの切り出しによるのか不明であり、安全に使用できる抑制薬の持つべきプロファイルが不明である。そこで、阻害薬のグローバルな副作用を簡便に評価する系として、ADAM 型メタロプロテアーゼが発生時に重要な役割を演じているショウジョウバエを用いる評価系を検討した。

### 3. 研究方法

#### (1) 化合物の合成およびスクリーニング

本年度は、昨年度までに蓄積された知見をもとに約 100 化合物のドラッグデザイン、合成を行った。FasL の shedding 阻害作用は、FasL/BHK-21 トランスフェクタント上清中の sFasL を ELISA で定量することにより行った。TNF- $\alpha$  の shedding 阻害作用は、THP-1 細胞を LPS で刺激し上清中に遊離される TNF- $\alpha$  を ELISA で定量することにより検討した。EGF ファミリー (HB-EGF, AR, EPR, TGF- $\alpha$ ) shedding 阻害作用は昨年度の本研究で報告した、ヒト胎盤由来、熱耐性型アルカリフォスファターゼ (AP) 遺伝子をレポーター遺伝子として用いる膜蛋白質 shedding のハイスループット評価系により行った。MMP に対する阻害活性の測定は、各 MMP をヒト細胞株よりクローニングし、大腸菌で発現させた酵素を精製して用いた。阻害活性は、MMP, DMSO に溶解した化合物溶液を反応緩衝液にて適宜希釈したもの、および市販消光蛍光性ペプチド基質を混合し、37°C にて一定時間反応させることで生じた蛍光強度の上昇をコントロールの蛍光強度の上昇と比較することで測定した。

#### (2) 化合物のショウジョウバエ発生に与える影響

Kuz/ADAM10 に突然変異を有するショウジョウバエでは、Notch 受容体前駆体の shedding、および、Delta の切断が起こらない。その結果、Notch 情報伝達系が機能せず、kuz 突然変異体は、Notch や Delta の突然変異体と同様な表現型を示す。ショウジョウバエ初期胚において、Notch 情報伝達系が機能しないと、神経細胞の過形成が起こる。この表現型は、ショウジョウバエの神経細胞を特異的に染色する抗体を用いて、ショウジョウバエ胚を染色することで、容易に解析できる。ショウジョウバエの受精卵に、マイクロ・マニピレーターを用いて、MMP および ADAM ファミリー・メタロプロテアーゼ阻害剤 KB-R7785 及び KB-R8301 を微量注入し、in vivo における Kuz への阻害効果を検証した。もし、KB-R7785 及び KB-R8301 が Kuz を阻害すれば、Notch 情報伝達系が機能できなくなるので、神経系の過形成が起こるはずである。

#### (3) SHIV モデルにおける sFasL の解析

国立感染症研究所・筑波医学実験用霊長類センターで繁殖、育成されたカニクイザルで、ヘルペス

Bウイルスおよびサルレトロウイルスに感染していない5~6歳齢の雄力ニクイザル2頭に、サル免疫不全ウイルス病原株であるSIVmac239を100TCID50静脈内接種した。ウイルス接種後300日を経過し、末梢血中のCD4レベルからAC期と判定された1頭(#042)とARC期と判定された1頭(#075)にバナナペーストに混入したOJ-R8898を午前と午後の2回それぞれ50mg/Kg量を接種させた。経口投与は連日14日間行った。採血は接種1週間前、投与開始直前および投与後7、14、21、28日目に行い、5mlのクエン酸添加血液を採取した。遠心分離により得た血漿は直ちに-80℃で凍結した。血漿分離後の血球をPBSに浮遊させ、定法に従って比重遠心法で分離したリンパ球を、CD3、CD20、CD4、CD8およびCD95 (Fas)に対するヒトモノクローナル抗体で染色し、1%ホルマリン-PBSで固定後、各細胞表面マーカー陽性細胞のレベルをFACSにより測定した。血漿中のsFasLレベルはヒトのFasL測定用ELISAキットで測定し、タンパク量が既知のリコンビナント力ニクイザルFasLを標準として定量した。

回復したCD4細胞の機能を評価する目的で、PWMで誘導される*in vitro*でのIgG産生能を調査した。分離した末梢リンパ球 $2 \times 10^6$ /mlを最終濃度10ug/mlのPWM存在下で6日間培養し、培養上清を回収した。培養上清中のIgG量は抗サルIgG抗体を用いたELISA法で測定し、精製サルIgGで標準化した。

#### (4) sFasLの機能解析

完全長FasL発現ベクターhFasL/pMKITNeo cDNAのアミノ酸残基110-134に対応する塩基配列をrecombinant PCR法を用いて、除去した(hFasL $\Delta$ 110-134/pMKITNeo)。また、同様に、FasLの切断部から細胞外を含む領域をIL-6由来のシグナル配列下流につなぎ、可溶性FasL発現ベクターを作成した(IL-6 SP-hFasL/pMKITNeo)。hFasL/pMKITNeo、hFasL $\Delta$ 110-134/pMKITNeo、および、IL-6 SP-hFasL/pMKITNeoを各々、B16細胞にエレクトロポレーションにより導入し、各トランスフェクタントをG418にて選別した。各トランスフェクタント培養上清中のFasL濃度を抗ヒトFasL抗体NOK1およびNOK2を用いたELISAにて、その細胞傷害活性をhFasL/WRを用いたalar blue法にて評価した。各トランスフェクタント $10^6$ 個をC57BL6マウスの皮下に移入し、経時的に腫瘍径を測定した。

#### (5) FasL shedding 酵素のクローニング

FasLshedding酵素阻害作用を有するMMP阻害薬をプローブとしてフォトアフィニティーラベル法により、FasLshedding酵素のクローニングを検討した結果、Dipeptidyl Peptidase III(DPPⅢ)がその候補の酵素である可能性が示唆された(昨年度報告)。

本年度の研究では、DPPⅢのwild type(wt)およびdominant negative(450H $\rightarrow$ A, 451E $\rightarrow$ A)を、発現ベクターpcDNA3.1/Hygro(+)に組み込み、FasL/BHK-21トランスフェクタントに遺伝子導入して、トランスフェクション後の培養上清中のsFasL量をELISAにて測定した。さらに、DPPⅢのwtおよびdominant negativeを遺伝子導入したFasL/BHK-21トランスフェクタントのcell lysateを調製し、還元条件でSDS-PAGEを行い、ニトロセルロース膜にトランスブロットした後、ウサギ抗DPPⅢ抗体を用いて、ウエスタンブロットを行った。また、cell lysateにおける、Arg-Arg-MCAを基質とするexopeptidase活性をPolarStar(偏光蛍光プレートリーダー)により測定した。

## 4. 研究成果

### (1) 化合物の合成およびスクリーニング

新たに合成された100化合物の多くが、FasLのsheddingを抑制した。様々な阻害パターンを示す化合物が得られたが、この中で十分な経口吸収性を示すのは化合物OJ-R8898のみであった。そこで、この化合物の大量合成を行いサルSIVモデルに投与し、CD4<sup>+</sup>T細胞減少抑制作用を検討した。

### (2) 化合物のショウジョウバエ発生に与える影響

MMPおよびADAMファミリー・メタロプロテアーゼ阻害作用を有するKB-R7785及びKB-R8301の、*in vivo*におけるNotch情報伝達系に対する抑制効果を検討した。マイクロマニピュレーターと微小ガラス注射針を用いて、ショウジョウバエ受精卵にKB-R7785及びKB-R8301を注入するシステムを確立した。分化した神経細胞で特異的に発現するELAV遺伝子プロモーターの制御下でGFP(グリーン蛍光タンパク質)を発現しているショウジョウバエ系統を作出した。この系統を用いることで、蛍光顕微鏡下において、生きたままの胚の神経細胞を観察できる。この胚に、マイクロマニピュレーターを用いてKB-R7785を微量注入した。Kuz/ADAM10の機能が阻害されると、Notch情報伝達系が

機能しないために、神経細胞が過剰に形成されるはずである。10 $\mu$ M KB-R7785 (0.1%DMSO に溶解)を微量注入(注入量は測定していない)すると、約半数の胚において、神経細胞の過剰形成が観察された。このような胚は、0.1%DMSO を同様に注入しても観察されたが、KB-R7785 を注入した場合と比較して、低頻度であった。この結果は、KB-R7785 が *iv vivo* で Notch 情報伝達系を抑制していることを示唆しており、ヒトに投与された KB-R7785 関連化合物が、ヒト Notch 情報伝達系を抑制する可能性がある。逆に、本研究の成果を応用すれば、Notch 情報伝達系の阻害に付随した副作用を示す化学物質をある程度予見できると考えられた。

### (3) SIV 感染サルにおける sFasL の解析

AC 期 (#042) および ARC 期 (#075) の 2 頭の SIV 感染カニクイザルに MMPI (OJ-R8898) を 14 日間連続で 10mg/kg の割合で経口投与した場合の血中 OJ-R8898 濃度と可溶性 FasL (sFasL) 濃度の変化を検討した。#042 では血中 OJ-R8898 濃度がほとんど上昇せず、sFasL も変化しなかった。一方、#075 では #042 の 8 倍程度に血中 OJ-R8898 濃度が上昇し、それに伴って、sFasL 濃度の低下が認められた。OJ-R8898 投与にともなう末梢血 CD4<sup>+</sup>T 細胞レベルの変化は sFasL の変化を検討したところ、sFasL 濃度が増えなかった #042 では CD4<sup>+</sup>T 細胞レベルはほとんど変化せず、むしろ低下する傾向が認められた。これに対して、sFasL が低下した #075 では、sFasL の低下にともなって CD4<sup>+</sup>T 細胞レベルの上昇が認められた。これら増加する CD4<sup>+</sup>T 細胞の表面マーカーを解析すると、Fas または CD29 陽性の CD4<sup>+</sup>T 細胞が増加していることが明らかとなった。

次に、これらアポトーシスをまぬがれた CD4<sup>+</sup>T 細胞が正常な機能を有するか否かが問題となる。OJ-R8898 を投与した 2 頭のサルの末梢リンパ球を PWM で刺激し、PWM で誘導される *in vitro* の IgG 産生能と末梢 CD4<sup>+</sup>T 細胞レベルの変化とを対応させて比較した。一般に PWM で誘導される B 細胞の IgG 産生には CD4<sup>+</sup>T 細胞の介助が必要であり、IgG 産生量は介助する CD4<sup>+</sup>T 細胞数に依存することが知られている。MMPI 投与により増加した CD4<sup>+</sup>T 細胞が B 細胞の IgG 産生をヘルプする機能を有しているとすれば、IgG 産生量が増加するはずであるが、今回の実験では OJ-R8898 投与により CD4<sup>+</sup>T が増加した #075 でも顕著な IgG 産生能の増加はみられなかった。

以上要約すると、

1) 新しく合成された可溶性の MMPI (OJ-R8898) を経口投与することにより、不溶性 MMPI (KB-R7785) を筋注した場合と同様に、サル免疫不全ウイルスを感染させた ARC 期のカニクイザルで血中 MMPI 濃度の上昇にともない sFasL 濃度の低下が認められた。

2) sFasL 濃度の低下に伴い、末梢血中の成熟・記憶 T 細胞とみられる Fas 陽性 CD4<sup>+</sup>T 細胞および CD29 陽性の CD4<sup>+</sup>T 細胞の増加が認められた。

3) 全リンパ球を用いた PWM 刺激での IgG 産生量は CD4<sup>+</sup>T 細胞が増加しても変化しなかったが、これは抑制性 CD8<sup>+</sup>T 細胞の混在により評価不能であった可能性も考えられる。

4) AC 期のカニクイザルでは血中 OJ-R8898 濃度の顕著な上昇が見られず、sFasL および CD4<sup>+</sup>T 細胞レベルにもほとんど変化がなかった。これは経口投与した OJ-R8898 の腸管からの吸収効率に個体差があり、このサルでは吸収効率が悪かったことが考えられる。

5) 今回合成された可溶性 MMPI (OJ-R8898) を経口投与することにより、CD4<sup>+</sup>T 細胞のアポトーシスが抑制される可能性が高く、今後は新規のエイズ治療薬として吸収性、持続性に優れた治療薬の開発が急務である。

### (4) sFasL の機能解析

recombinant PCR 法にて full length human FasL、可溶性 FasL のみをコードする IL-6 signal sequence/human extracellular FasL (IL-6-FasL)、および MMP によって切断される部位を欠くため膜型 FasL のみをコードする FasL ( $\Delta$ 110-134 FasL) を各々増幅し、発現ベクター-pMKITNeo にサブクローニングした。C57BL/6 マウス由来メラノーマ B16 に上記 cDNA を各々トランスフェクション後、G418 を用いて発現細胞を選別し、細胞表面上の FasL の発現について FACS を用いて解析した結果、完全長 FasL/B16 細胞上にはこれまでの報告同様、MMP 阻害剤 (BB94) 非存在下では FasL の発現は僅かなものであったが、MMP 阻害剤 BB94 を添加することにより発現上昇が認められた。また、予想通り、B16/ $\Delta$ 110-134 FasL の細胞表面には BB94 非存在下でも強い FasL の発現が認められ、可溶性 FasL のみをコードする B16/IL-6-FasL の細胞表面上には FasL の発現は全く認められなかった。また、各トランス



フェクタントの培養上清中の FasL 濃度について解析したところ、B16/FasL (20 ng/ml)、B16/ $\Delta$ 110-134 FasL (0.15 ng/ml)、B16/IL-6-FasL (36 ng/ml) の可溶性 FasL が検出され、細胞表面上の FasL 量と負の相関関係が認められ、アミノ酸 110-134 の除去により FasL の shedding がほぼ完全に阻害されていることが確認された。

前年度までに我々は、完全長 FasL を強制発現させた腫瘍細胞をマウスの皮下に移入すると好中球を介した激しい炎症反応を惹起させ、やがて腫瘍細胞は退縮し、拒絶されることを報告した。そこで、これら各トランスフェクタント  $10^6$  個を C57BL/6 マウスの皮下に移入し、経時的に腫瘍径を測定した結果、何れのトランスフェクタントも親株である B16 と比較して退縮していることが明らかとなった。また、この時、B16/FasL、B16/ $\Delta$ 110-134 FasL、および B16/IL-6-FasL の腫瘍径との間に有為な差は認められなかった。すなわち、*in vivo* において可溶性 FasL が炎症を惹起する能力を有することが明らかとなり、可溶性 FasL も膜型 FasL 同様、*in vivo* において機能的であることが証明された。

#### (5) FasL shedding 酵素のクローニング

DPPⅢの Wild type (wt) および dominant negative (450H $\rightarrow$ A, 451E $\rightarrow$ A) を、哺乳動物発現ベクターである pcDNA3.1/Hygro(+) に組み込み、FasL/BHK-21 トランスフェクタントに遺伝子導入した。DPPⅢが FasL shedding の酵素活性を有するか否かを検討する為に、トランスフェクション後の培養上清中の sFasL 量を ELISA にて測定した。その結果、DPPⅢwt, DPPⅢ450H $\rightarrow$ A, DPPⅢ451E $\rightarrow$ A のいずれを強制発現させてもベクターのみを導入した pcDNA3.1/Hygro(+) と同程度しか可溶性 FasL は検出されず、DPPⅢ導入による FasL shedding の亢進は認められなかった。また、この検討で用いたトランスフェクタントの cell lysate を調製し、導入した DPPⅢの発現をウエスタンブロット法により確認した。さらに、wild type の DPPⅢの lysate に Arg-Arg-MCA を切断する活性が PolarStar (偏光蛍光プレートリーダー) で確認できたことより、DPPⅢには FasL を shedding する酵素活性は認められないとの結論に至った。

## 5. 考 察

これまでに、sFasL の機能については、様々な説があったが、今回の検討で機能的な蛋白であることが確認された。また、SIV 感染サルに今回新たに見いだされた経口投与可能な新規 FasL shedding 阻害薬 OJ-R8898 を 10mg/kg の割合で 2 週間連続経口投与して、血中の sFasL 量、CD4<sup>+</sup>T 細胞数に与える影響を評価した結果、sFasL の低下にともなって CD4<sup>+</sup>T 細胞レベルの上昇が認められた。これら増加する CD4<sup>+</sup>T 細胞の表面マーカーを解析すると、Fas または CD29 陽性の CD4<sup>+</sup>T 細胞が増加していることが明らかとなった。この結果からも、SIV ではマクロファージやリンパ球から遊離される機能的な sFasL が Fas 陽性 CD4<sup>+</sup>T 細胞を破壊していることが裏付けられた。以上の結果より、FasL shedding 阻害薬が、HIV 感染者の免疫能を保つ新しいエイズ治療薬となる可能性が示唆された。一方、この数年の間に、細胞膜からの蛋白の切り出し (shedding) に関する知見が急速に集積され、FasL のような TNF ファミリーサイトカインのみならず、接着分子や増殖因子など多くの膜タンパクが、似たような酵素により shedding を受けることが明らかとなり、FasL shedding 酵素阻害薬を安全に用いるためには、FasL shedding 酵素を選択的に阻害する薬物を見出すことが重要であることが益々確かとなると同時に、選択的な阻害薬を見出すことは、当初予想されていたよりも遙かに難しい課題であることも明らかになってきた。FasL の shedding を選択的に抑制する薬物を開発するためには、FasL の shedding を行っている酵素を単離し、それを用いてドラッグデザイン、評価を行うのが最も有力な手段である。そこで、FasL の shedding 阻害作用を有する薬物を探索子としてクローニングを試みた結果、メタロプロテアーゼ DPPIII が単離された。ドミナントネガティブ法により DPPIII が FasL を切断するか否か検討した結果、DPPIII は FasL を切断しないことが明らかとなった。現時点では、FasL を特異的に阻害する薬物を得るのはきわめて難しく、ブロード～ミドルスペクトル阻害薬しか得られなかった。このような阻害薬が、生体のどのような機能を抑制し、どのような副作用を発現するのか現時点では全く不明である。しかしながら、この点が今後実用的な FasL shedding 阻害薬を早期に開発する際のポイントとなる。そこで、阻害薬のグローバルな副作用を簡便に評価する系として、ADAM 型メタロプロテアーゼが発生時に重要な役割を演じているショウジョウバエを用いる評価系を確立した。今後、様々なスペクトル有する阻害薬をこの系で評価し、阻害と副作用の相関が明らかになれば、ミドルスペクトル化合物の中から実用的な化合物を選ぶことができる可能性

がある。

## 6. 結 論

本年度の研究で、SIV ではマクロファージやリンパ球から遊離される機能的な sFasL が Fas 陽性 CD4<sup>+</sup>T 細胞を破壊していることが裏付けられ、FasL の shedding 阻害薬が、HIV 感染者の免疫能を保つ新しいエイズ治療薬となる可能性が確認された。一方、FasL の shedding だけを選択的に阻害する薬物を得ることはきわめて難しいことが明らかとなった。今後は、阻害スペクトルが少しでも狭い薬物を合成する努力を続けるとともに、ミドルスペクトル阻害薬が、生体のどのような機能を抑制し、どのような副作用を発現するのを見極める努力も必要である。今後、本プロジェクトで蓄積された知見、開発されたハイスループットスクリーニング系、副作用評価システムを活用して、早期に実用的な FasL shedding 阻害薬が開発されることを期待する。

## 7. 研究発表等

### (1) 論文発表

- 1) Tokumaru S, Higashiyama S, Endo T, Nakagawa T, Miyagawa JI, Yamamori K, Hanakawa Y, Ohmoto H, Yoshino K, Shirakata Y, Matsuzawa Y, Hashimoto K, Taniguchi N., Ectodomain shedding of epidermal growth factor receptor ligands is required for keratinocyte migration in cutaneous wound healing., *J Cell Biol.* 2000 ;151:209-20.
- 2) Kanda S, Kuzuya M, Ramos MA, Koike T, Yoshino K, Ikeda S, Iguchi A, Matrix metalloproteinase and alphavbeta3 integrin-dependent vascular smooth muscle cell invasion through a type I collagen lattice., *Arterioscler Thromb Vasc Biol* ,2000 ;20:998-1005
- 3) Hattori, K., T. Hirano, K. Oshimi, H. Yagita, and K. Okumura. 2000. A metalloproteinase inhibitor prevents acute graft-versus-host disease while preserving the graft-versus-leukaemia effect of allogeneic bone marrow transplantation. *Leuk Lymphoma* 38:553.
- 4) Saitoh, A., T. Kawanabe, H. Weidong, N. Kayagaki, T. Kawamura, H. Yagita, K. Okumura, and S. Shimada. 2000. Selective upregulation of fibroblast Fas ligand expression, and prolongation of Fas/Fas ligand-mediated skin allograft survival, by retinoic acid: the skin as a retinoide-inducible immune privilege site. *J Invest Dermatol* 115:154.
- 5) Nakajima, A., H. Hirai, N. Kayagaki, S. Yoshino, S. Hirose, H. Yagita, and K. Okumura. 2000. Treatment of lupus in NZB/W F1 mice with monoclonal antibody against Fas ligand. *J Autoimmun* 14:151.
- 6) Kawamura, T., M. Azuma, N. Kayagaki, S. Shimada, H. Yagita, and K. Okumura. 2000. Fas/Fas ligand-mediated apoptosis of murine Langerhans cells. *J Dermatol Sci* 22:96.
- 7) Takeda, K., Y. Hayakawa, M. J. Smyth, N. Kayagaki, N. Yamaguchi, S. Kakuta, Y. Iwakura, H. Yagita, and K. Okumura. 2001. Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. *Nat Med* 7:94.
- 8) Matsumoto, J., Kawai, S., Terao, K., Kirinoki, M., Yasutomi, Y. and Matuda, H. Malaria infection induces rapid elevation of soluble Fas ligand level in serum and subsequent T lymphocyteopenia: possible factors responsible for the differences in susceptibility of two species of Macaca monkeys to Plasmodium coatneyi infection. *INFECTION and IMMUNITY*, 68:1183-1188 (2000)
- 9) Wakao, K., Matsuzaki, I., Terao, K., Inoue-Murayama, M., Shimojo, N. and Murayama, Y. Involvement of granzyme B expression in the enhancement of natural killer activity by  $\beta$ -endorphin. *BRAIN, BEHAVIOR, AND IMMUNITY*, 14: 27-40 (2000)
- 10) Yoshino, N., Ami, Y., Terao, K., Tashiro, F. and Honda, M. Upgrading of flow cytometric analysis for absolute counts, cytokines and other antigenic molecules of cynomolgus monkeys using anti-human crossreactive antibodies. *EXPERIMENTAL ANIMALS*, 49: 97-110 (2000)
- 11) Murayama, Y., Terao, K. and Inoue-murayama, M. Molecular cloning and characterization of cynomolgus monkey Fas. *HUMAN IMMUNOLOGY*, 61: 474-485 (2000)

- 12) Nam, KH., Illes, Z., Terao, K., Yoshikawa, Y. and Yamamura, T. Characterization of expanded T cell clones in healthy macaque: ontogeny, distribution and stability. DEVELOPMENTAL AND COMPARATIVE IMMUNOLOGY, 24: 703-715 (2000)
- 13) Nam, KH., Akari, H., Shibata, H., Terao, K. and Yoshikawa, Y. Unique peripheral blood extrathymic CD4+ CD8+ T cells in cynomolgus monkeys. INTERNATIONAL IMMUNOLOGY, 12: 1095-1103 (2000)
- 14) Suzuki, J., Gotoh, S., Miwa, N., Terao, K. and Nakayama, H. Autoimmune hemolytic anemia (AIHA) in an infant rhesus macaque (*Macaca mulatta*). JOURNAL OF MEDICAL PRIMATOLOGY, 29: 88-94 (2000)
- 15) Terao, K., Fujimoto, K., Shimozuru, Y., Nagai, Y. and Yoshikawa, Y. Possible role of peripheral CD14 low monocytes in the development of collagen-induced arthritis in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). EXPERIMENTAL ANIMALS, 50: 9-18 (2001)
- 16) Takahashi, K., Miyake, S., Kondo, T., Terao, K., Hatakenaka, M., Hashimoto, S. and Yamamura, T. Natural killer type 2 (NK2) bias in remission of multiple sclerosis. JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, 107: R23-R29 (2001)
- 17) Kitagawa, M., Oyama, T., Kawashima, T., Yedvobnic, B., Matsuno, K., Harigaya, K. Mastermind coordinates the nuclear form of Notch and a CSL protein to bind a transcriptional activator complex on target promoters. Mol. Cel. Biol. in press (2001).
- 18) Kishi, N., Tang, Z., Maeda, Y., Hirai, A., Mo, R., Ito, M., Suzuki, S., Kakao, K., Kinoshita, T., Kadesch, T., Hui, C.-c., Artavanis-Tsakonas, S., Okano, H. and Matsuno, K. Murin homologs of deltex define a novel gene family involved in vertebrate Notch signaling and neurogenesis. Int. J. Dev. Neurosci., 19, 21-35 (2001).

(2) 学会発表

- 1) 榎垣伸彦、山口典子、阿倍雅明、広瀬幸子、八木田秀雄、奥村 康、TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) による自己抗体産生制御、第30回日本免疫学会(仙台)
- 2) 小原井朋成、中野裕康、多田久里守、左近幸子、北村俊雄、八木田秀雄、TNF 刺激により誘導される細胞死に対する抵抗性のメカニズムの解析、第30回日本免疫学会(仙台)
- 3) 寺尾恵治、桐井康行、柴田宏昭、吉野公一郎、カニクイザル FasL 遺伝子のクローニング、リコンビナント FasL 発現系および FasL 測定系の開発、第47回日本実験動物学会、2000年5月、徳島
- 4) Matsumoto, J., kawai, S., Terao, K., Kirinoki, M., Yasutomi, Y., Aikawa, M. and Matsuda, H. A study of immunological factors causing malaria-associated T lymphopenia using two species of *Macaca* monkeys with different susceptibilities to *Plasmodium coatneyi* The 35th Joint Conference on Parasitic Diseases, JAPAN-U.S. COOPERATIVE MEDICAL SCIENCE PROGRAM, 2000, July 26-28, Inuyama, Aichi

---

平成12年度

エイズ医薬品等開発研究  
研究報告書

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社

