

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

逆転写酵素阻害剤の併用療法に関する研究

所 属 三菱東京製薬株式会社 医薬総合研究所 主管研究員
主任研究者 湯浅 聡

要 旨

非核酸系逆転写酵素阻害剤の MKC-442 (Emivirine) は臨床試験の最終段階にあり、近い将来に臨床使用が可能になる予定である。本剤の用法としては核酸系阻害剤との併用を基本とし、各組み合わせのポテンシャルを調べるための臨床試験が実施されている。本研究では、臨床試験の裏付けとなる抗ウイルス効果および耐性ウイルス出現抑制効果と、併用の組み合わせで生じる薬物相互作用について *in vitro* での基礎的な検討を行ってきた。最近得られた臨床試験の結果では、MKC-442 + d4T + 3TC および MKC-442 + d4T + ddI という3剤併用では血中ウイルス量が検出限界以下に減少した患者の割合が高く、これらの併用療法が非常に有望であることが分かった。そこで今年度は *in vitro* における長期培養実験系を用いて、上記薬剤の組み合わせによる耐性ウイルス出現抑制効果を比較し、臨床試験結果の根拠を考察した。その結果、d4T 単独、2 剤および 3 剤併用時には breakthrough virus は出現しなかったが、MKC-442、ddI、および 3TC の単独使用では breakthrough virus の出現がみられ、そのうち MKC-442 および 3TC 単独使用時に出現したウイルスが耐性を獲得していることが分かった。したがって上記併用療法の有用性が確認された。

抗 HIV 剤の薬物併用療法における非常に重要な問題点である薬剤間の耐性変異共存性について、HIV-1 由来の逆転写酵素へ各種の耐性変異を導入し、その組み合わせにおける各薬剤の感受性変化を検討した。本年度は多種の核酸系阻害剤に耐性となることが知られている V75I/F77L/F116Y/Q151M の変異について解析した結果、この四重変異は MKC-442 耐性変異 K103N との共存が可能であり、互いに相手の薬剤の感受性に影響を与えないことが分かった。しかしこれらの変異に PME A 耐性変異 K70E が共存すると 3TC に対する感受性が回復し、その原因として変異酵素の dCTP に対する親和性低下が考えられた。また、MKC-442 + d4T + 3TC の知験で新たに同定された変異 E138K が MKC-442 に対して中程度の耐性を示し、K103N と同時に存在すると高度の耐性を導くことが分かった。一方、3TC への感受性は野性型と変わらなかった。

薬物併用療法における別の問題点として薬物相互作用があげられる。MKC-442 については、AZT との併用時に AZT の血中濃度が高まることが分かっている。この両剤の薬物相互作用の可能性を検証するために、一昨年度から MKC-442 およびその代謝物が AZT のグルクロン酸抱合に与える影響を調べてきた。その結果、いずれの化合物も AZT のグルクロン酸抱合を阻害することが示され、MKC-442 がグルクロン酸抱合を介して AZT と薬物相互作用を生じることが示唆された。今年度は、MKC-442 自体がグルクロン酸抱合を受ける可能性についても検討し、MKC-442 が自らは基質とならずに、UDP-グルクロニルトランスフェラーゼの阻害剤として作用していることが示された。

薬剤併用療法の将来の問題点として、既存の核酸系阻害剤に対する耐性株が広まると、既存の併用療法そのものの有効性が減弱していく可能性が指摘されている。そこで新しいタイプの核酸系阻害剤の探索を一昨年度から開始し、耐性プロファイルが既存のものとは異なるとされる PME A をリード化合物に設定した。昨年度は PME A の持つ低経口吸収性という欠点を改善するために、そのリン酸部分をエステル体に置換し、動物に投与して経口吸収性の評価を行った。その結果、経口吸収性を高めたプロドラッグを得ることができたので今年度はその安全性について動物を用いた初期評価を行った。その結果、変異原性が陽性である可能性が示唆され、更なる化学構造の改善が必要なことが判明した。

1. 研究組織

- (1) 三菱東京製薬株式会社 医薬総合研究所 湯浅 聡 主管研究員
- (2) 鹿児島大学医学部附属難治性ウイルス疾患研究センター 馬場 昌範 教授
- (3) 国立感染症研究所 ウイルス第1部 森川 茂 室長

2. 研究目的

MKC-442 が臨床使用可能になる際には、耐性ウイルスの出現を抑えて十分な抗ウイルス効果を得ることが目標となり、他の抗 HIV 剤との併用療法が必須である。したがって、その併用療法に用いる優れた薬剤の組み合

わせを基礎研究で探索する必要がある。これまでの研究では、MKC-442 + d4T + 3TC および MKC-442 + d4T + ddI の 3 剤併用が強い相乗作用を示すことを明らかにした。そこで今年度はその結果に基づき、MKC-442, d4T, ddI および 3TC を用いて、これらの 2 剤もしくは 3 剤併用による感染細胞の長期培養を行うとともに、breakthrough virus の出現の有無やその時期などについて観察した。さらに得られた breakthrough virus については、各薬剤に対する感受性試験を実施すると共に、逆転写酵素領域のアミノ酸変異を調べ、既に臨床試験で得られている結果の裏付けと、将来予想される多剤耐性ウイルス出現の可能性について検討した。

これまでの臨床試験では MKC-442 に対する耐性変異として 103 位の変異 (K→N) が主な変異として認知されている。しかし MKC-442 + d4T + 3TC の臨床試験では、184 位の 3TC 耐性変異と同時に 103 位ではなく 138 位の変異 (E→K) が出現する症例が見出された。これらの耐性変異の共存性について詳細に検討するために、今年度はこれらの変異を組み合わせた HIV-1 由来の逆転写酵素を作成し、活性測定と薬剤感受性について検討した。また多種の核酸系阻害剤に耐性となる V75I/F77L/F116Y/Q151M の四重変異が临床上知られているので、この変異および PMEa 耐性を示す 70 位の変異 (K→E) と MKC-442 耐性変異を併せた四～六重変異に対する MKC-442 と各核酸系阻害剤の耐性度を調べた。

AIDS 治療における第一選択薬であり MKC-442 と併用が予想される AZT は、主としてグルクロン酸抱合により代謝される。そこで、本研究は MKC-442 と AZT とのグルクロン酸抱合を介する薬物相互作用の可能性を検討することを目的とした。また一昨年度から開始した PMEa 誘導体の合成と評価について、今年度は経口吸収性を高めたエステル体を選定してその安全性を検討することを目的とした。

3. 研究方法

(1) 感染細胞の長期培養試験と逆転写酵素領域のアミノ酸変異の解析 MT-4 細胞に HIV-1 (III_B 株) を細胞 (1×10^5 /ml) に、HIV-1 をそれぞれ感染多重度 (MOI) = 0.02 にて感染させ、昨年度の本研究で用いた薬剤の組み合わせと濃度比を採用し、それぞれ EC₅₀ 値の 10 もしくは 5 倍の濃度で 37°C にて培養した。培養 4 日目毎に培養上清を採取し、その中の p24 抗原量を ELISA 法にて定量するとともに、細胞数を 1×10^5 /ml に調整し、同じ濃度の薬剤存在下で培養を続けた。細胞は HIV-1 による細胞変性が出現し、継代が不可能になる時点まで培養を続けた。Breakthrough virus が認められたときは、新たな MT-4 細胞に感染させ、薬剤非存在下にて 4 日間培養し、その上清を薬剤感受性試験に供した。上清は薬剤感受性試験の前に MT-4 細胞を用いて感染価を定量した。薬剤感受性試験は MT-4 細胞を (1×10^5 /ml) に、HIV-1 を MOI = 0.02 にて感染させ、種々の濃度の薬剤と共に 37°C にて培養し、培養 4 日目に感染細胞の生細胞数を MTT 法を用いて定量することにより判定した。逆転写酵素領域のアミノ酸変異の解析時には、培養上清より breakthrough virus の RNA を抽出し、RT-PCR 法を用いて逆転写酵素領域を増幅した。PCR によって得られた産物を精製後、M13 forward および reverse 標準塩基配列を含む色素標識プライマーを用いて direct sequencing を行った。

(2) 逆転写酵素阻害剤に対する耐性変異の共存性

HIV-1 (pNL43: 感染性 HIV-1 クローン) の逆転写酵素遺伝子領域を含む SphI/EcoRI fragment を pGEM-7Zf(-) ベクター (Promega) の SphI/EcoRI 部位にクローニングした pGEM-NL(S/R) を作製し、これをテンプレートに PCR を行い、151 位のアミノ酸が Q から M へ変異する RT 遺伝子を作製した。この BglII/KpnI fragment (987bp) をそれぞれ pGEM-NL(S/R) の相同領域と入れ替えることにより、pGEM-NL(S/R)-Q151M を作製した。この領域に特異変異以外の変異が無いことは遺伝子配列を決定して確認した。昨年作製した K70E 変異を含む BglII/PstI fragment (743bp) を pGEM-NL(S/R)-Q151M の相同領域と入れ替えることにより、pGEM-NL(S/R)-Q151M/K70E を作製し、同様な方法で pGEM-NL(S/R)-Q151M/K70E/K103N を作製した。この方法を同様に適用して pGEM-NL(S/R)-V75I/F77L/F116Y/Q151M, -K70E/V75I/F77L/F116Y/Q151M, -V75I/F77L/F116Y/Q151M/K103N, -K70E/V75I/F77L/F116Y/Q151M/K103N を作製した。また、この PstI/EcoRV fragment (138bp) を pGEM-NL(S/R) の相同領域と入れ替えることにより pGEM-NL(S/R)-E138K を作製した。昨年までに作製した M184V, K103N, K103N/M184V 変異を導入した RT 遺伝子の相同領域と入れ替えることにより、pGEM-NL(S/R)-E138K/M184V, -E138K/K103N, -E138K/K103N/M184V をそれぞれ作製した。これらの pol 遺伝子領域のプロテアーゼ、逆転写酵素を含む DNA 断片 (BglII/EcoRI (nuc 2096-5743)) を、pGEX-1 プラスミドの BamHI/EcoRI 部位に挿入したものを作製した。これらの pGEX-1 に pol 遺伝子領域を含むプラスミドを大腸菌 BL21 株に transform し、IPTG 誘導により変異逆転写酵素を発現した。IPTG 誘導した大腸菌を凍結融解、超音波破碎により溶菌し、遠心上清を DEAE-sephacel カラム と heparin カラムにかけて、逆転写酵素フラクションを得た。この精製逆転写酵素を用いて、それぞれの薬剤に対する耐性度を解析した。

(3) AZT のグルクロン酸抱合に対する MKC-442 およびその代謝物の阻害作用

1mM UDP-GA、5mM MgCl₂、1mM EDTA、0.1M リン酸緩衝液 (pH7.4)、1mg/ml ヒト肝マイクロソーム、2.25% BSA を含む反応液に、基質 (¹⁴C-AZT) 濃度を 35, 70, 140 μM、被検薬物 (MKC-442) 濃度を 0, 2.5, 5, 10 μM となるように加え、37°C で 60 分間インキュベートして酵素反応に対する影響を測定した。アセトニトリルを加えて反応を停止した後、遠心分離した上清を窒素気流下で乾固させ、得られた残さを HPLC に注入した。RI デテクターを用いてラジオクロマトグラム作成し、生成した AZT-グルクロン酸抱合体を定量した。その測定結果から Lineweaver-Burk Plot により阻害形式を推定し、Dixon Plot により阻害定数をそれぞれ推定した。次に反応液中の遊離型 MKC-442 濃度を推定するため、UDP-GA を含まない反応液に 5 μM の MKC-442 を添加した。この溶液を限外遠心濾過器に移して 3000rpm で遠心分離し、得られた濾液中の MKC-442 濃度 (Cf) を HPLC により測定し、 $(5 \mu\text{M} - \text{Cf}) \times 100 / 5 \mu\text{M}$ により結合率 (%) を算出した。また、基質 (MKC-442, BHU, BIU, 002Mu-041) 濃度を 50 μM として UDP-GA 存在下、ヒト肝マイクロソームと 37°C でインキュベートした。アセトニトリルを加えて反応を停止した後、遠心分離した上清を窒素気流下で乾固させ、得られた残さに HPLC 移動相を加えて LC/MS に注入し、グルクロン酸抱合体の分子量 (親化合物の分子量 + 176) をモニターした。

(4) PMEА 誘導体の安全性評価

PMEA 誘導体としてトリフルオロエチルエステル体を充分量合成し、水系溶媒に懸濁してマウスあるいはラットに経口投与し、社内の定法に従って *in vivo* 小核試験および急性毒性試験を実施した。

4. 研究成果

(1) 感染細胞の長期培養試験と逆転写酵素領域のアミノ酸変異の解析

昨年度の結果に基づいて、併用時の濃度比を MKC-442 : d4T : 3TC : ddI = 1 : 100 : 100 : 400 とすることに決定した。次にそれぞれの薬剤の単独使用時、2 剤併用時 (MKC-442 + d4T, MKC-442 + 3TC, MKC-442 + ddI, d4T + 3TC, d4T + ddI) および 3 剤併用時 (MKC-442 + d4T + 3TC, MKC-442 + d4T + ddI) における抗 HIV-1 活性の結果から、EC₅₀ 値の 10 倍もしくは 5 倍の濃度を算出し、その濃度で感染細胞の長期培養を行ったところ、次の Fig. 1 に示すような結果を得た。薬剤単剤使用では、MKC-442, 3TC および ddI に数回の継代培養で HIV-1 の増殖が認められ、細胞が死滅した。一方、d4T 単独では、最初数回の数回の継代までではごく僅かなレベルで、上清中の p24 抗原が認められたが、その後それは消滅し、培養 40 日目に培養液から薬剤を取り去っても HIV-1 の増殖は認められなかった (Fig. 1A)。次に、2 剤併用時においては、d4T + ddI の組み合わせ以外は、継代培養とともに p24 抗原の速やかな消失が見られた。これに対して d4T + ddI の組み合わせでは上清中に p24 抗原がごく僅かながら持続的に検出され、培養 40 日目に薬剤を取り去るとすぐに、急激な HIV-1 の増殖が認められた (Fig. 1B)。EC₅₀ 値の 10 倍の濃度を用いて 3 剤を併用し継代培養を行うと、MKC-442 + d4T + 3TC および MKC-442 + d4T + ddI の何れの組み合わせにおいても、breakthrough virus の出現はまったく観察されなかった (Fig. 1C)。そこで、d4T + 3TC, d4T + ddI, MKC-442 + d4T + 3TC および MKC-442 + d4T + ddI の組み合わせにおいてそれぞれの EC₅₀ 値の 5 倍濃度より継代培養を開始したところ、d4T + 3TC を除く 3 種類の組み合わせにおいて HIV-1 の明らかな増殖が見られた (Fig. 1D)。そこで増殖してきたウイルスを回収し、MT-4 細胞にそれらを感染させ、同じ薬剤の組み合わせで濃度を EC₅₀ 値の 10 倍に上げて培養を繰り返したところ、この濃度では何れの組み合わせにおいても breakthrough virus の出現を認めなかった。しかしながら、d4T + ddI の組み合わせにおいては、培養 40 日目に上清より薬剤を除去すると、そこから 8 日目に明らかなウイルスの増殖が観察された (Fig. 1D)。

次に上記の継代培養によって出現した 7 種類のウイルスについて (# 1-7)、各薬剤に対する感受性を測定した。その結果、MKC-442 単独使用時に出現してきたウイルス (# 1) は wild-type (# 0) と比較して、MKC-442 に対する感受性が 215 倍程度低下していた。しかし d4T, 3TC, ddI に対しては感受性の低下がほとんど認められなかった。また 3TC 単独使用時に出現してきたウイルス (# 2) は 3TC に対して 77 倍以上の感受性の低下を示した。一方、3TC 以外の薬剤に対する感受性の低下はなかった。その他のウイルスについては、何れの薬剤に対しても wild-type とほぼ同様の感受性を示すことが分かった。# 1 と # 2 について、薬剤感受性低下の原因を明らかにするため、それぞれのウイルスより RNA を抽出し、逆転写酵素領域のアミノ酸変異について検討した。その結果、# 1 については 103 番目のコドン AAA が AAT に変化しており、その結果として K103N の変異を生じていることが明らかとなった。また # 2 については 184 番目のコドン ATG が ATA へと変化することにより、M184I の変異を生じていた。一方、その他のウイルス (# 3-7) についても逆転写酵素領域の変異を検索したが、何れのウイルスも特にアミノ酸の変異は認められなかった。

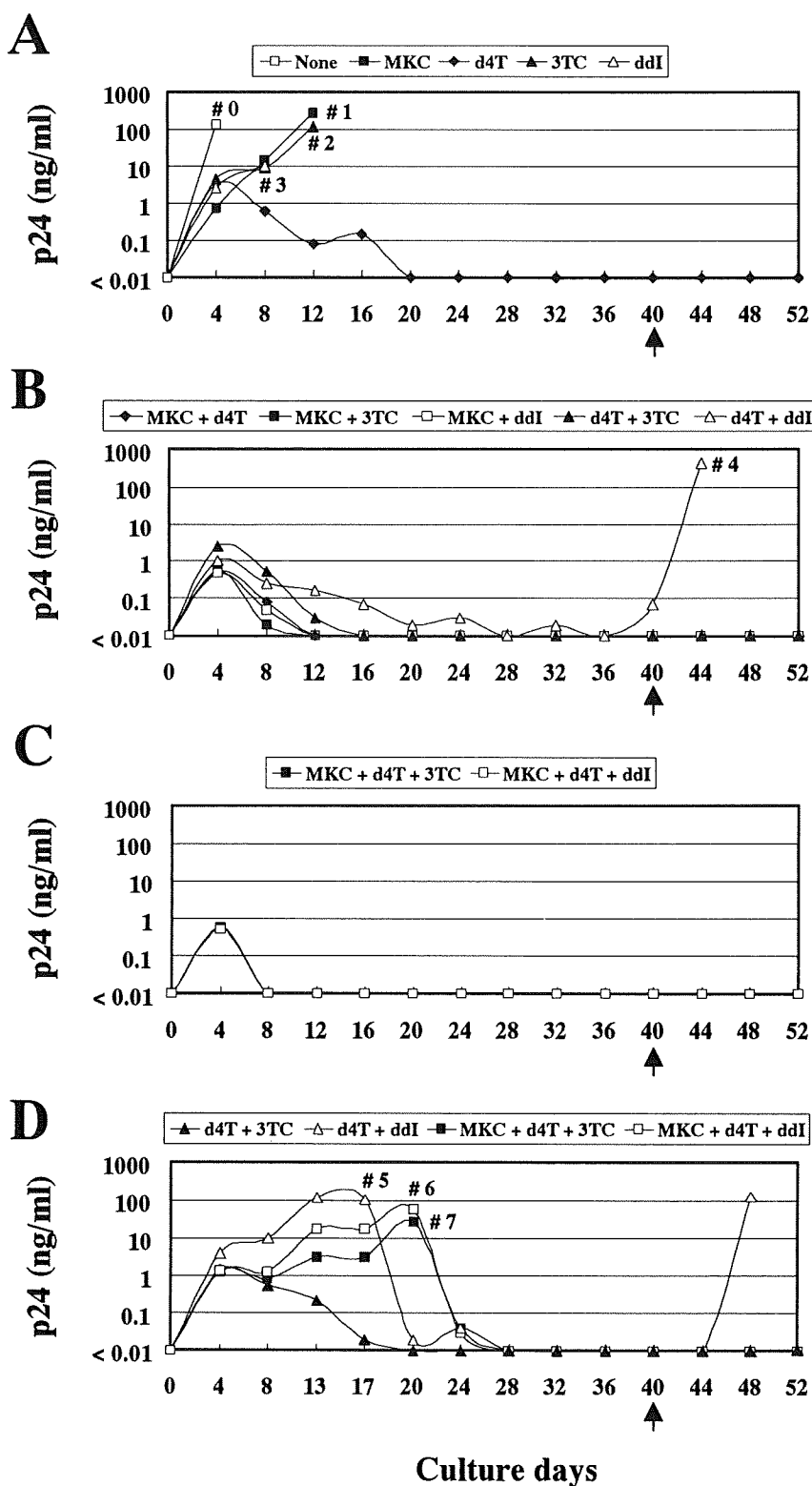


Fig. 1 Long-term culture of HIV-1-infected MT-4 cells in the presence of various combinations of MKC-442, d4T, 3TC, and ddI. The cells were incubated and cultured in the presence of compounds at the doses that were (A-C) 10-fold and (D) 5-fold higher than their EC_{50} values. Every 4 days, the cells were subcultured, and the culture supernatants were examined for their p24 antigen levels. When viral breakthrough was observed in the culture supernatants at $5 \times EC_{50}$ of each combination (in panel D), MT-4 cells were infected with the breakthrough virus and further cultured in the presence of $10 \times EC_{50}$ of each combination. The compounds were removed from culture medium on day 40 (arrow).

(2) 逆転写酵素阻害剤に対する耐性変異の共存性

核酸系阻害剤の複数に耐性を与える変異 (V75I/F77L/F116Y/Q151M) と MKC-442 耐性変異を同時に導入して、薬剤感受性の変化を調べた (Table 1 & 2)。Q151 単独では、AZT, d4T, 3TC に若干耐性度が高くなる傾向が見られた。Q151M/K70E の変異では、AZT, d4T に対する耐性度が、Q151 単独より更に数倍高くなった。75I/77L/116Y/151M の変異では、AZT, d4T, 3TC に対して、それぞれ 24 倍、12 倍、3 倍程度耐性度が高くなった。K70E がこれに加わると AZT, d4T に対する耐性度がそれぞれ 2 倍、3~4 倍上昇したが、3TC に対しては耐性を失った。一方、K103N の変異がこれらの変異に加わると、核酸系阻害剤に関しては耐性度に変化はないが MKC-442 に対してはどの場合でも耐性を獲得した。すなわち多剤耐性変異と MKC-442 耐性は両立すると考えられた。

Table 1 Inhibitory activities of MKC-442 and 3TC-TP against mutated reverse transcriptases

Reverse transcriptase	Inhibitor	MKC-442		3TC-TP	
	Substrate/Template	TTP/poly(rA)dT ₁₂₋₁₈		dCTP/poly(rI)dC ₁₆	
	Mutation	IC ₅₀ (μM)	× times	IC ₅₀ (μM)	× times
Wild Type		0.42		3.6	
151M	Multi	0.48	1.1	6.2	1.7
151M/70E	Multi/PMEA	0.99	2.4	2.9	0.8
151M/70E/103N	Multi/PMEA/MKC	>100	>240	4.1	1.1
75I/77L/116Y/151M	Multi	0.47	1.1	9.4	2.6
70E/75I/77L/116Y/151M	PMEA/Multi	0.87	2.1	4.4	1.2
75I/77L/116Y/151M/103N	Multi/MKC	74.9	177	15.2	4.2
70E/75I/77L/116Y/151M/103N	PMEA/Multi/MKC	>100	>240	2.6	0.7
138K	MKC	5.1	12.1	3.7	1.0
138K/184V	MKC/3TC	2.8	6.6	>1000	>200
138K/103N	MKC	>100	>240	4.0	1.1
138K/184V/103N	MKC/3TC	82.4	195	>1000	>200

Table 2 Inhibitory activities of AZT-TP and d4T-TP against mutated reverse transcriptases

Reverse transcriptase	Inhibitor	AZT-TP		d4T-TP	
	Substrate/Template	TTP/poly(rA)dT ₁₂₋₁₈		TTP/poly(rA)dT ₁₂₋₁₈	
	Mutation	IC ₅₀ (μM)	× times	IC ₅₀ (μM)	× times
Wild Type		19.7		21.9	
151M	Multi	28.9	1.5	41.0	1.9
151M/70E	Multi/PMEA	57.2	2.9	163.8	7.5
151M/70E/103N	Multi/PMEA/MKC	46.4	2.4	139.6	6.4
75I/77L/116Y/151M	Multi	487	24.8	245.4	11.2
70E/75I/77L/116Y/151M	PMEA/Multi	1019	51.8	984.8	45.0
75I/77L/116Y/151M/103N	Multi/MKC	460	23.4	273.8	12.5
70E/75I/77L/116Y/151M/103N	PMEA/Multi/MKC	819	41.7	803.6	36.2
138K	MKC	9.5	0.5	14.0	0.6
138K/184V	MKC/3TC	18.7	1.0	34.6	1.6
138K/103N	MKC	8.9	0.5	17.4	0.8
138K/184V/103N	MKC/3TC	16.8	0.9	38.6	1.8

一方、治験で新たに同定された E138K 変異は、K103N や過去に検討した Y181C の様な高度の薬剤耐性を与えないが、V108I のように数倍～10 倍程度の耐性を与えることが明らかになった。E138K 変異は K103N 変異と両立したことから、さらに MKC-442 投与を続けると 103, 181 位に変異が加わり高度に耐性なウイルスが出現すると考えられる。また、E138K 変異は M184V (3TC 高度耐性変異)と共存すると、3TC に対する耐性は変化しないが、MKC-442 に対する耐性度が約半分になった。同様な現象は E138K と K103N の二重変異についても観察された。AZT や d4T の薬剤感受性に関しては、E138K 変異あるいは E138K と K103N の二重変異では野生型よりも感受性が高まる傾向にあった。この時 M184V が追加されると逆に両剤とも感受性が低下し、AZT と d4T との各変異応答は極めて類似していた。

以上の変異導入酵素の各々について、RI ラベルされた基質が DNA 画分へ取り込まれる放射能カウントを TTP と dCTP の 2 種類で比較した (Table 3)。本実験条件では TTP を基質にした方が取り込み能は高いことが通常であった。逆転写酵素に Q151M 変異が入ると取り込み能の相対比 (dCTP / TTP) は低下したが、K70E 変異が加わると回復する傾向が見られた。しかし、多剤耐性の四重変異に K70E 変異を導入した酵素では DIG-dUTP/ poly(rA)dT₁₂₋₁₈ を基質/鋳型にした時の酵素活性そのものが低下しており、基質特異性が変化している可能性が示唆された (data not shown)。

Table 3 Comparison of enzyme activities between two substrates for wild-type and mutated reverse transcriptases

Reverse transcriptases	Mutation	CPM ratio (dCTP / TTP)
Wild Type		0.15
151M	Multi	0.06
151M/70E	Multi/PMEA	0.12
151M/70E/103N	Multi/PMEA/MKC	0.10
75I/77L/116Y/151M	Multi	0.07
70E/75I/77L/116Y/151M	PMEA/Multi	0.18
75I/77L/116Y/151M/103N	Multi/MKC	0.05
70E/75I/77L/116Y/151M/103N	PMEA/Multi/MKC	0.10
138K	MKC	0.11
138K/184V	MKC/3TC	0.07
138K/103N	MKC	0.11
138K/184V/103N	MKC/3TC	0.06

(3) AZT のグルクロン酸抱合に対する MKC-442 およびその代謝物の阻害作用

AZT のグルクロン酸抱合に対する MKC-442 の影響を測定した結果を、Lineweaver-Burk Plot の形式で Fig.2 に表示した。プロットパターンから、MKC-442 の AZT グルクロン酸抱合に対する阻害形式は混合型と推定された。Dixon Plot (Fig.3)から求めた阻害定数 K_i 値は $8.5 \mu\text{M}$ であった。次に、MKC-442 のマイクロソームあるいは BSA に対する結合について、限外遠心濾過法により検討した結果、MKC-442 濃度 $5 \mu\text{M}$ における結合率は 85.5% であった。この値で、 K_i 値 ($8.5 \mu\text{M}$) を補正し、遊離型濃度を基準とした K_i 値を算出したところ、 $1.2 \mu\text{M}$ となった。MKC-442, BHU, BIU, 002Mu-041 を UDPGA 存在下、ヒト肝マイクロソームとインキュベートした後、グルクロン酸抱合体を LC/MS により検索した。MKC-442, BHU, BIU の場合には、グルクロン酸抱合体を思われるピークを検出することは出来なかった。しかし 002Mu-041 の場合には、176 マス付加したピークが UDP-GA 存在下でのみ認められ、グルクロン酸抱合体の生成が示唆された (Fig.4)。

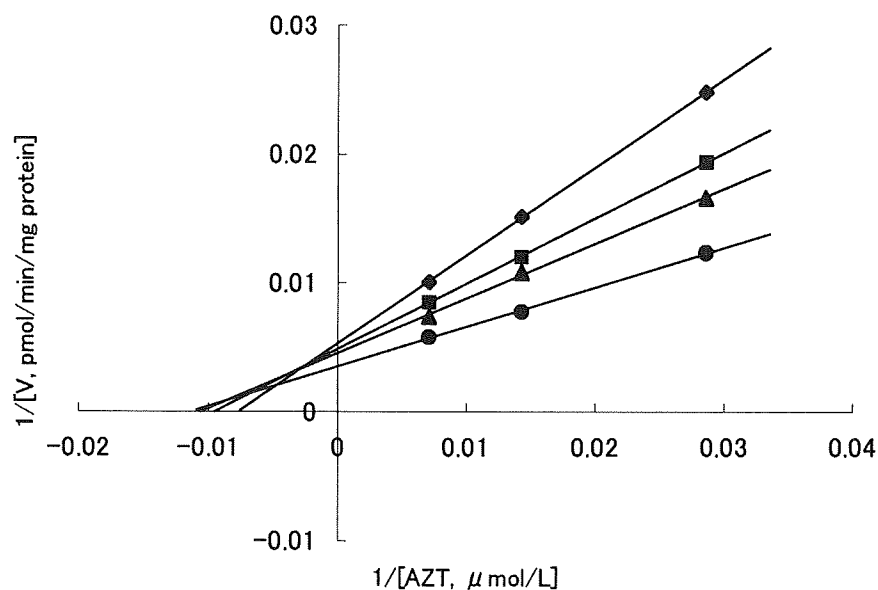


Fig. 2 Lineweaver- Burk plot of AZT-glucuronidation catalyzed by human liver microsomes
MKC-442 concentration : 0 μ mol/L(●), 2.5 μ mol/L(▲), 5 μ mol/L(■), 10 μ mol/L(◆).

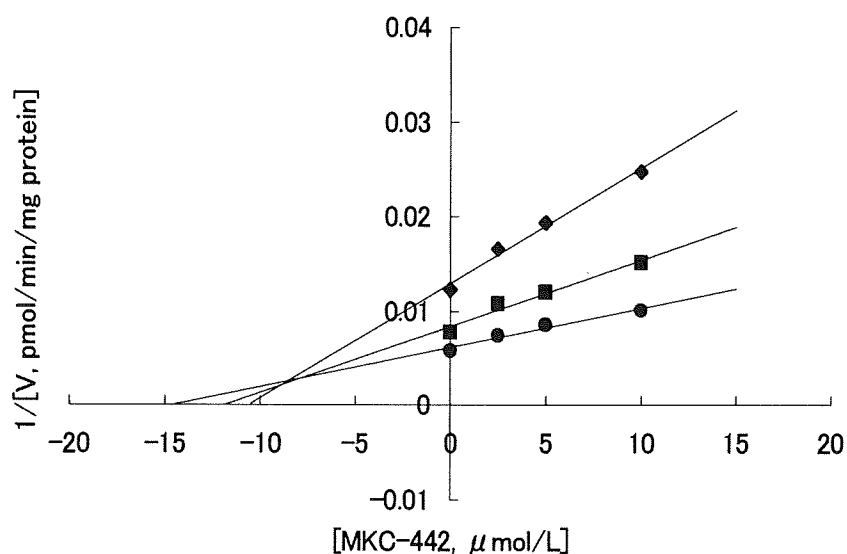


Fig. 3 Dixon plot of AZT-glucuronidation catalyzed by human liver microsomes.
AZT concentration : 35 μ mol/L(◆), 70 μ mol/L(■), 140 μ mol/L(●).

(4) PMEА誘導体の安全性評価

PMEA のリン酸部分の化学修飾を行った結果、最も経口吸収性の向上に寄与した置換基は CH_2CF_3 であったので、そのジエステル(化合物#112、Fig. 5)を合成し、小動物を用いた安全性の初期試験を行った。まず急性毒性試験では、ラット 3 匹に 670、1500 あるいは 2000mg/kg を経口投与し、投与後の一般症状と臓器変化を観察した。2000mg/kg 投与群で雌雄ともに3例中1例がそれぞれ投与後1日および20分後に死亡し、死亡するまでに赤色流涙、振戦、間代性痙攣、歩行異常が認められた。しかし解剖検査ではこれらの動物に異常は見られなかった。その他の動物は生存したが、一般状態の変化としては、雄 670mg/kg 以上、雌 1500mg/kg 以上で投与後3日目から軟便、4日目から粗毛が認められ、雌雄ともに2000mg/kg 以上では13日目から腹部膨満も見られた。体重は雄 670mg/kg 以上、雌 1500mg/kg 以上で投与後5日までに減少または増加抑制が認められた。解剖検査では、雄 1500mg/kg 以上、雌 2000mg/kg で脾臓の腫大、雌雄 2000mg/kg で胸腺の萎縮が見られた。これらの結果から、化合物#112の急性致死用量は雌雄ともに2000mg/kgであると結論した。

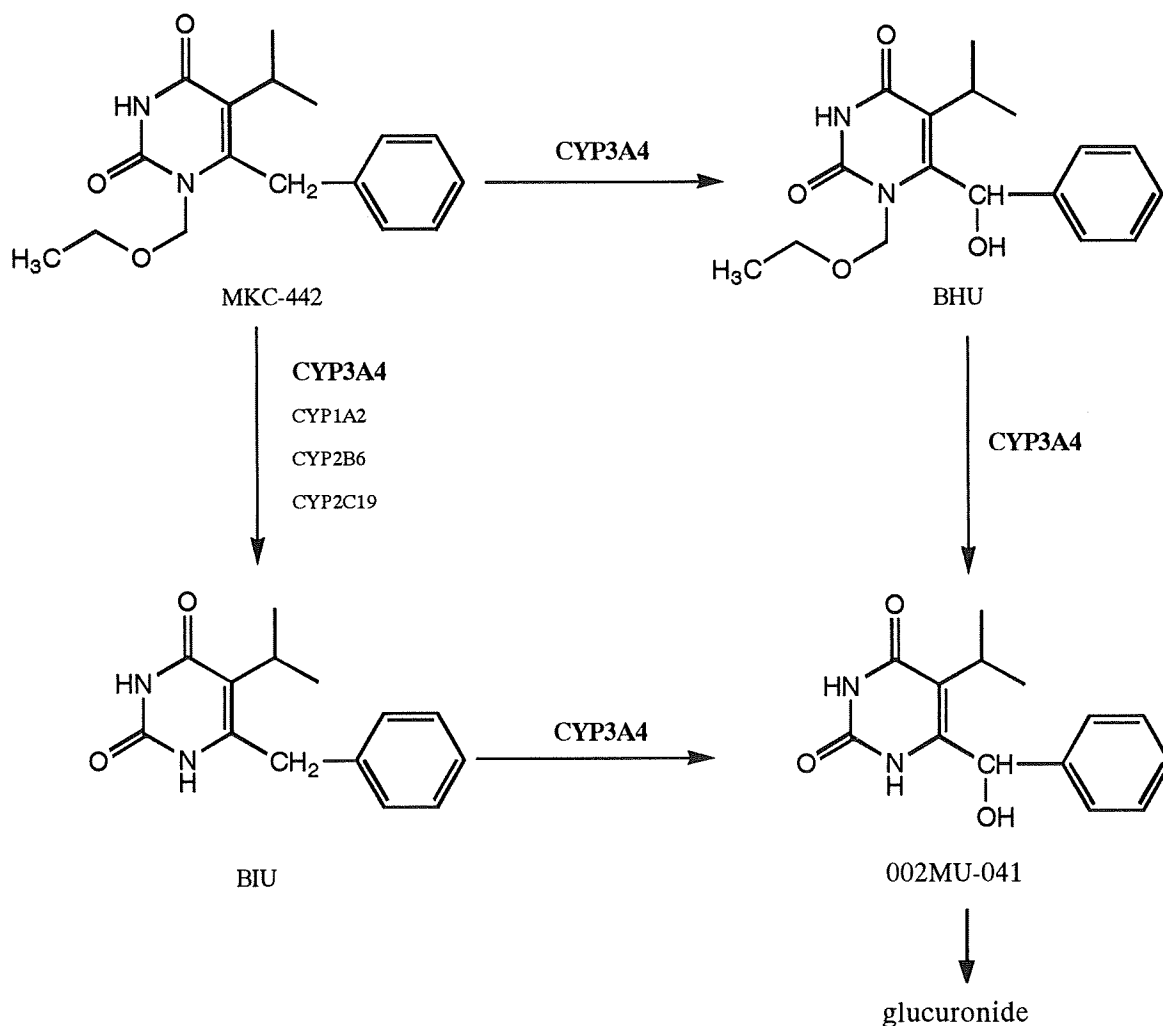


Fig. 4 Metabolic pathway of MKC-442

次に、マウスを用いて化合物#112の骨髄細胞における小核誘発性を調べた。1000mg/kgの用量で投与し、投与後24、30、48、72時間後に骨髄塗沫標本を作成し、小核を持つ多染性赤血球の出現頻度を調べた。その結果、多染性赤血球の個数については、24、48、72時間後の処理群で陰性対照群との間に統計学的な有意差をもって増大が認められた。また網状赤血球の出現頻度については48、72時間後の処理群で陰性対照群との間に統計学的な有意差があった。この結果から、本化合物はマウス骨髄に対して小核誘発性があり、変異原性が陽性である可能性が示唆された。

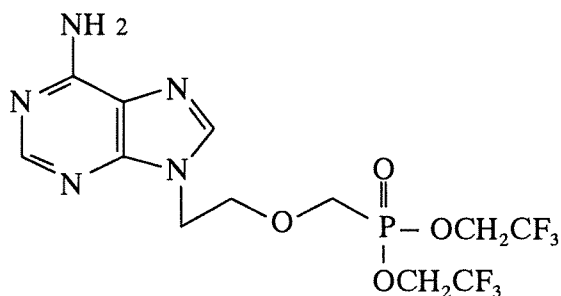


Fig. 5 Chemical structure of a PMEA derivative.

5. 考 察

MKC-442 (Coactinon™) は新規な非核酸逆転写酵素阻害剤として、現在米国 Triangle 社によって臨床試験が進行中であり、既にいくつかの試験結果がまとまりつつある。最近得られた結果では、MKC-442 + d4T + 3TC および MKC-442 + d4T + ddI という 3 剤併用により血中ウイルス量が検出限界以下に減少した患者の割合は既存の併用療法と同程度に高く、これらの併用療法が非常に有望であることが分かった。これまでの研究では、複数の逆転写酵素阻害剤による併用療法は、単に薬効強化のみならず非核酸逆転写酵素阻害剤や核酸系逆転写酵素阻害剤 3TC の欠点である早期な薬剤耐性ウイルスの出現を抑制することでもその有用性が強く示唆されている。すなわち MKC-442 は単独で治療に用いると、数週間で逆転写酵素上に K103N などの変異を有する耐性ウイルスが出現し、その薬効が減弱することが知られており、また 3TC も単独使用では MKC-442 と同様な短期間で逆転写酵素に M184I もしくは M184V の変異を有する耐性ウイルスを誘導することが分かっている。一方で、複数の逆転写酵素阻害剤を併用すると、このような薬剤耐性を賦与する変異が誘導されにくく、薬効が持続すると考えられている。今回、我々が行った研究では、*in vitro* においても MKC-442 を含む逆転写酵素阻害剤 3 剤の併用は、お互いの相乗効果に基づき高い抗 HIV-1 活性を発揮すると共に、薬剤耐性ウイルスの出現を抑制することが証明された。しかし今回の実験においては、併用薬剤の濃度を段階的に上昇させるような方法はとらず、EC₅₀ 値の 10 もしくは 5 倍の濃度で継代培養を続けたため、複数の逆転写酵素阻害剤に対して耐性を示すようないわゆる多剤耐性 HIV-1 株は得ることが出来なかった。今後は多剤耐性ウイルスの誘導という観点からも実験を進める予定である。

これまでに、MKC-442 耐性変異 (K103N)、3TC 耐性変異 (M184V)、d4T 耐性変異 (V75T)、ddI 耐性変異 (R65K, L74V)、PMEA 耐性変異 (K70E) に関して組み合わせによる薬剤感受性の変化を解析してきたが、本年度は、核酸系阻害剤に対して多剤耐性を引き起こす四重変異 (V75I/F77L/F116Y/Q151M) を導入して、種々の薬剤に対する耐性度を検討した。その結果、多剤耐性の中心的な変異であるとされている Q151M の変異は、MKC-442 の感受性に影響を与えず、Q151M の変異に V75I, F77L, F116Y の変異が共存しても MKC-442 には影響を及ぼさなかった。Q151M の変異や四重変異に K103N を加えると、MKC-442 に対して高度に耐性となり、核酸系阻害剤の多剤耐性獲得と非核酸系阻害剤の耐性獲得は互いに依存しないことが示唆された。一方、MKC-442 + d4T + 3TC の臨床試験において 184 位の 3TC 耐性変異と共存していることが見出された E138K の変異は、K103N と比べると耐性度は約 10 倍と弱かった。しかし M184V と共存させると、予想に反して MKC-442 の感受性は 2 倍程度回復した。今回の長期培養での基礎検討からも、今までの臨床試験結果からも、MKC-442 に対する耐性変異としては K103N が最初に出現するケースが多いことが分かっている。そこで、上記の 3 剤併用での臨床試験においては 3TC 耐性変異の M184V が初めて出現し、その後で MKC-442 に対する耐性変異として E138K が加わった可能性が考えられる。この仮説を検証するためには、M184V 変異を有する HIV-1 から長期培養を開始する必要がある。

これらの薬剤感受性試験の結果で最も興味深かったのは、Q151M の変異または V75I/F77L/F116Y/Q151M の四重変異に PMEa 耐性変異の K70E が加わると、3TC に対する耐性度が失われ、野性型と同じ感受性に回復することであった。その原因は正確には定量化されていないが、この変異酵素では dCTP を基質にした場合に取り込み能が上昇することが観察されたので、シトシン塩基に対する親和性の向上が 3TC 感受性の上昇へ結びついたものと考えられた。

核酸系阻害剤の中で、PMEA については、評価可能な酵素系が未確立であり感受性を測定できなかったもので、今後は変異を導入した HIV-1 を作製して薬剤感受性を測定する必要がある。しかしながらこのように、複数の薬剤に対する耐性を獲得した逆転写酵素について、他の薬剤に対する交差耐性の知見を直接的に求めることは、各耐性ウイルスが出現した患者での併用療法を考察する上で非常に重要と考えられる。

AIDS 治療の第一選択薬の一つである AZT は MKC-442 との併用時に高い相乗性を示すことが基礎研究により明らかにされている。一方、抗 HIV 剤では薬物相互作用に起因する副作用の発現について近年種々報告されている。そこで、MKC-442 と AZT との併用療法を効果的に実施する上で、薬物相互作用に関する情報は極めて重要と考えられる。この点については、健常人における相互作用試験で AZT の血漿中濃度が MKC-442 との併用により約 2 倍に上昇することが Triangle 社から報告されている。AZT の主代謝経路がグルクロン酸抱合であることから、MKC-442 が AZT のグルクロン酸抱合を阻害する可能性が想定されたので、昨年度は MKC-442 およびその代謝物が AZT のグルクロン酸抱合を阻害することを検討した。その結果、いずれの化合物も阻害を起こすことが明らかになったが、より定量的に議論するために今年度は阻害形式および阻害定数について検討した。阻害形式は混合型を示し、阻害定数も 1.2 μ M と妥当な値が得られたが、MKC-442 自体のグルクロン酸抱合体を見いだすことは出来なかった。したがって、MKC-442 が自らは基質とならずに、UDP-グルクロニルトランスフェラーゼの阻害剤として作用していることが示唆された。

通常、生体内においては蛋白等に結合していない非結合型の薬物のみが代謝や阻害に関与すると考えられている。肝ミクロソームを用いた *in vitro* 実験においても、代謝酵素以外の蛋白や脂質が種々含まれており、それらの成分に対する結合のために、反応液中で代謝あるいは阻害反応に関与しうる薬物濃度が設定濃度よりも低くなる可能性がある。このため、ミクロソームあるいは他の成分に対する結合が無視できない場合、阻害定数を過大に評価してしまい、阻害作用を小さく見積もる危険性があることが指摘されている。そこで、本研究では、MKC-442 の肝ミクロソームあるいは BSA に対する結合を測定し、反応液中の非結合型薬物濃度を基準として阻害定数を補正した。その結果、MKC-442 の AZT グルクロン酸抱合に対する阻害定数は $1.2 \mu\text{M}$ と算出された。臨床試験においては、AZT と MKC-442 とを併用した時の MKC-442 の最高血漿中濃度は $1.78 \mu\text{g/ml}$ (約 $6 \mu\text{M}$) であり、ヒト血清に対する蛋白結合率 (95.5%) を用いて換算すると、血漿中非結合型薬物濃度は約 $0.3 \mu\text{M}$ となる。この濃度は今回求めた阻害定数のおよそ 1/4 であり、AZT の血漿中濃度を 2 倍上昇させるには不十分ではあるものの、相互作用を生じさせ得る濃度であると思われた。

一方、MKC-442 の併用薬候補の探索に関する研究において、昨年までに既存の核酸系阻害剤とは耐性プロファイルが異なる PMEА を選んでその構造改良を試みた。その結果、エステル化によって経口吸収性が 10 倍に向上した化合物としてトリフルオロエチルジエステル体が得られた。そこで今年度はこの化合物を充分量合成し、水系溶媒に懸濁してラットあるいはマウスに経口投与して急性毒性試験と変異原性試験を実施した。

急性毒性試験での毒性発現に関しては、一般的な核酸系薬剤と比較して重度であるという印象は受けなかった。しかし小核試験では陽性の結果が得られ、発ガンリスクがある化合物であることが示された。したがって、今後は変異原性を陰性化する化合物展開を行うべきであると思われた。

PMEА 誘導体としては、Gilead Science 社によって #112 とは異なるエステル基を有する Adefovir Dipivoxil という薬剤が HIV および HBV 感染患者の治療を目的に臨床試験されている。しかし最近になって抗 HIV 剤としての開発が断念された。その理由として、HIV 用では HBV 用よりも必要薬剤用量が数倍高く、長期投与を行うと薬剤による腎毒性が高まり、治療上許容できる範囲を越えてしまうことが臨床的に判明したことが上げられている。その腎毒性の原因は、ある種のトランスポータータンパクが他の臓器よりも腎臓に高頻度に分布しており、細胞内で薬剤が濃縮されると細胞毒性が強化されることが示唆されている。動物試験でも長期に投与することによってこの腎毒性を再現できる可能性があるが、まずは充分量の化合物を合成することが必要である。

6. 結 論

MKC-442 + d4T + 3TC および MKC-442 + d4T + ddI という 3 剤併用療法について、ウイルスの長期培養試験を行った結果、MKC-442 や 3TC の単剤使用時には薬剤耐性ウイルスの出現が認められたが、2 剤ないし 3 剤併用時にはウイルス増殖は完全に抑制された。しかし、2 種類の 3 剤併用の組み合わせ間ではその効果の差異は見出せなかった。

MKC-442 + d4T + 3TC の治験で新たに出現した E138K 変異は、K103N や Y181C の様な非常に高い耐性度を与えないが、V108I と同程度の約 10 倍の耐性度を有した。この変異は K103N と同様に核酸系阻害剤を与える変異と両立できた。一方、多種の核酸系阻害剤に耐性となる V75I/F77L/F116Y/Q151M の変異は、MKC-442 に対しては野生型と同じ感受性があり、K103N の変異と両立できることが分かった。

一連の *in vitro* 薬物代謝実験の結果から、MKC-442 が AZT のグルクロン酸抱合を阻害することにより、薬物相互作用を生じさせることが示された。また新規な核酸系阻害剤の候補として PMEА のジエステル体を合成して動物での安全性評価を開始した結果、変異原性が陽性である可能性が示唆され、更なる化学構造の改善が必要なが判明した。

7. 研究発表

1) 論文発表

本研究に直接関係したものはなし。

2) 学会発表

- ① Nitanda T., Wang X., Somekawa K., Yuasa S., and Baba M. Three-Drug Combinations of Emivirine(MKC-442), d4T and 3TC versus MKC-442, d4T and ddI *in vitro*: Long-term culture of HIV-1-infected cells and breakthrough viruses. 14th International Conference on Antiviral Research, April 8-12, 2001, Seattle, Washington, USA Abstract in press.

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

