

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

## 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

所 属 日水製薬株式会社 研究本部 副本部長  
主任研究者 加藤英夫

### 要旨

エイズの原因ウイルスの分子生物学的基礎に基づく抗HIV薬の組み合わせによる多剤併用療法(HAART)はエイズの治療に輝かしい成果をもたらした。エイズを不治の病から制御可能な疾病として、患者に生きる希望を与えたことは疑いの余地のないところである。しかし、予期されていたこととは言え、多剤耐性ウイルスの出現により、HAART療法の著効しないエイズ患者が報告され始めている。

このような状況下において、HIV-1の爆発的増殖を抑えるために、HIV-1の転写因子HIV-1 transactivator (Tat)及び細胞の転写因子nuclear factor (NF- $\kappa$ B)を同時に抑える薬剤として*o, o'*-Bismyristoyl thiamine disulfide (BMT)を創製した。BMTの抗HIV活性を調べた結果、*in vitro*においてHIV-1実験室株、臨床単離株、及び多剤耐性株に有効であることがわかった。BMTの皮下投与による小動物に対する安全性試験、及び有効血中濃度試験を行った結果、マウスに対するLD<sub>50</sub>は、630 mg/kg、ラットの腹腔投与後血中、及びリンパ管中濃度はそれぞれ $\sim 2$ 及び $\sim 6$   $\mu$ Mで、投与後、2-4時間後に、最大血中・リンパ管濃度に達し、血中よりもリンパ管に速やかに移行することがわかった。一方経口投与による血液濃度をラジオアイソトープ標識BMTを用いて調べた結果、投与後15分後から血液中に有意の放射活性が確認された。

ARC期のSIV感染アカゲサル2頭に2週間BMTを皮下投与(32 mg/ml)したところ、いずれのサルにおいても、CD4、CD8リンパ球の上昇が見られ、血中SIV量の低下、感染リンパ球数の低下が見られた。しかしながら、感染初期における、BMTの長期(6週間)連続投与を行ったところ、3週間目から血中ウイルス量が次第に上昇し、感染6週間目には非投与群と同程度まで血中ウイルス量が上昇した。従って、BMTの長期連続投与時には本薬物が代謝され効力を失う可能性が示唆された。この問題を解決するために本化合物をリード化合物として最適化された化合物をコンピューター上で求め、実際に化学合成を行い、1-2の化合物がBMTの百数十倍有効であることがわかり、現在この化合物についてもさらに研究を続けている。

HIV-1新規感染者は毎年560~580万人で増加の一途をたどっている。HIV-1初感染を防止するために、従来のワクチンの基本概念に基づいて、ワクチン開発が行われているが、不幸にも成功に至っていない。エイズワクチンの困難さが再認識され、開発断念、絶望感さえ漂っている。そこで申請者等は新たにワクチンの基本概念を逸脱し、生体の守りを固め、ウイルス侵入を防止するためのデフェンスワクチンを提案している。HIV-1が侵入に利用するケモカインレセプターのうち、CCR5およびCXCR4の特殊立体構造を再構築したキメラ環状ドデカペプチド抗原がHIV-1侵入を防止する抗体を産生することを始めて明らかにした。この単クローン抗体の性質を調べHIV-1感染防止作用を明らかにするため研究が続行中である。

### 1. 研究組織

- (1) 日水製薬株式会社 研究本部 加藤英夫 副本部長
- (2) 熊本大学 薬学部 生化学研究室 庄司省三 教授
- (3) 国立感染症研究所 向井鏡三郎 研究室長

### 2. 研究目的

#### 2-1. 難薬剤耐性且つ多機能 Allo-Holo hybrid Drugの開発およびエイズ治療への試み

Allo-Holo hybrid drugとはHolo drugのprodrugにある種の官能基を導入することにより、本来の機能に立体構造的に新たな機能をallostericに導入し、本来の機能と新たな機能を兼ね備えた薬剤である。ここではthiamine (Holo drug)のprodrug (thiamine disulfide)に2モルのmyristoyl基を導入した*o, o'*-Bismyristoyl thiamine disulfide (BMT)がAllo-Holo hybrid drugである。本剤は反応性に富むdisulfide結合を有し、HIV-1 Tatのチオール及び細胞の転写因子NF- $\kappa$ Bのチオール基をターゲットとしている。NF- $\kappa$ Bによる細胞複製に伴うHIV-1プロウイルスの複製およびNF- $\kappa$ Bと連動して活性化するHIV-1 Tatによるウイルスの爆発的増加を阻止することを目標としている。

#### 2-2. BMTをリード化合物としてさらに有効な化合物の創製

BMTは種々のHIV-1に対し高い抗HIV活性を有することが明確になったが、さらに本化合物をリード化合物として、より最適化した化合物をスーパーコンピューターで求め、化学合成し種々の長さのメチレン鎖を持つ化合物および安定な化合物にするためにエステル結合をイミノ基に変え、数種の新規化合物について現在研究を続行している。

### 2-3. HIV-1 coreceptor (CXCR4, CCR5)由来のキメラ環状ドデカペプチドに基づくワクチンの開発

従来のワクチンの基本概念に基づくワクチンの開発は不幸なことに、必ずしも成功に至っていない。エイズワクチンの開発の困難さが改めて再認識されている。そこで申請者等は、**ワクチンの基本的な理論を逸脱し、生体の守りを固め、ウイルス侵入を防止する手段を次のように考えた。** HIV-1の侵入に必須なHIV-1のcoreceptor (CXCR4, CCR5)の第2細胞外ドメインの一部を構成する特異的立体特殊構造に注目した。この特殊構造は、HIV-1の吸着により膜表面に露出することが、コンピューター解析で推定され、この特殊構造をCXCR4およびCCR5由来の各々5アミノ酸残基およびスパーサーアームジペプチドからなるキメラ環状ドデカペプチドとして再構築した。本抗原を multiantigen peptide (MAP)に結合させ、免疫抗原およびワクチンとして用いた。

### 3. 研究方法

#### 3-1 基本的な考え及び研究の進め方の概略

基本的な考え・戦略をFig. 1に示した。HIV-1の固有の転写因子とそれに関する細胞側の固有の転写因子を1剤で同時に、あるいは別々に抑え、抗HIV効果が相乗的に期待できる薬剤、しかもその薬剤は生体成分あるいは生体反応に必要な成分で、本来の作用に新たな機能を持たせ、作用後は本来の機能にもどり、生命維持に携わる薬剤を考えた。まず始めに、HIV-1固有の転写因子としてHIV-1 Tat、それに関する細胞側の固有の転写因子NF-κBの両分子鎖中のチオール基に着目した。前者のHIV-1 Tatのチオール基はZn-フィンガーを形成し、核酸への結合に、またNF-κBのチオール基も核酸との結合に必須である。

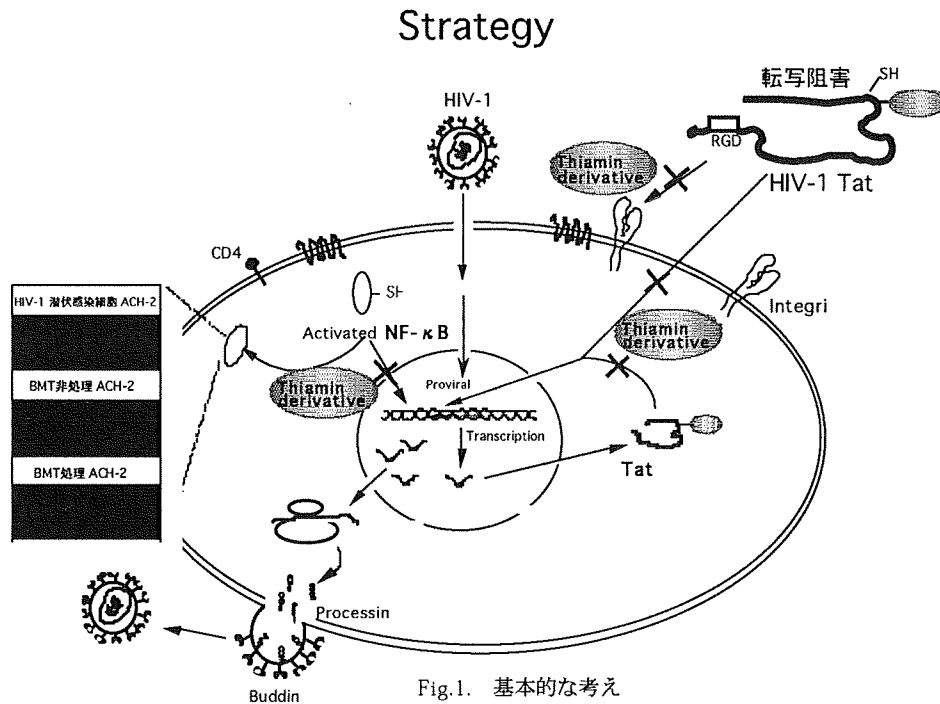


Fig.1. 基本的な考え

HIV-1 Tatのシステイン残基のチオール基をターゲットした薬剤にウイルスがさらされると、薬の攻撃から免れるために、ウイルスは易変異原性を巧みに利用し、他のアミノ酸残基に変異することが考えられる。Znと配位可能なイオウ原子とほぼ同じ2個のローンペア電子を持つ原子は酸素で、セリン残基に水酸化メチル基として存在する。ウイルスはセリン残基に変異し、薬の攻撃から逃れることが考えられるが、セリンの水酸基はもはやZnと配位することはできず、Zn-フィンガーは形成されることが物理化学的に述べられている。

これは今までは、ウイルスが変異により、薬の攻撃をかわし、種を死守してきたことを根本的に覆すことで、変異すればHIV-1にとって致命的になり、変異しなければ薬の執拗な攻撃にさらされることになる。一方、NF- $\kappa$ Bは宿主側の転写因子で、宿主の遺伝子支配であるので、当然変異は起こしにくい、たとえ変異したとしてもHIV-1 Tatと同じように核酸との結合能を消失すると考えられる。NF- $\kappa$ Bは細胞にとって、極めて重要な転写因子であるので、一時的に薬剤でその機能が抑えられ、作用が終了すると機能が回復することが望ましい。上記の考えに立脚し、両因子のチオール基に結合する薬剤の開発を試みた。その結果、thiamineのprodrugとして化学合成されたthiamine disulfide (TDS)及びこの化合物の2水酸基に長鎖脂肪酸を導入し、新たに創製した*o,o'*-Bismyristoyl thiamine disulfideが抗HIV活性を示すことを見出した。BMTは特異的立体構造をとり、油中では両myristoyl基が翼を開いた構造をとるが、水中では、逆に両myristoyl基が翼を閉じた構造をとり、可逆的に変動可能なことがスーパーコンピュータ解析により明らかになった。両myristoyl基が開いた構造では2モルのprothiamine構造を形成しているS-S結合は安定なトランス構造を形成するが、一方、水中では、両myristoyl基は相互の疎水親和力により、S-S結合は90度ねじれたトランス-シス構造を形成し、反応性が一段と増強する。このように、BMTはmyristoyl基の疎水性により、本来の機能に新たな機能をアロステリックに兼ね備えた薬である。新たな機能でHIV-1 Tat及びNF- $\kappa$ Bの作用を抑え、抗HIV効果を示し、作用終了後、本来の機能に戻り、免疫系等を間接的に賦活していると考えられるが、現在、その作用機構は、部分的に解明され始めている。

### 3-2 BMTの性質とBMTの抗HIV活性測定

#### (1) BMTの性質

BMTは常温ではペースト状で、やや取り扱いにくいですが、通常1~10%硬化ヒマシ油(60)を含むリン酸緩衝液(PBS(-)、pH 7.4)に適当な濃度に溶解し、培養液で適当濃度に、また、最終硬化ヒマシ油濃度が0.01%以下になるように希釈し、懸濁して用いる。

#### (2) BMTのHIV-1感染細胞及びSimian immunodeficiency virus (SIV)感染細胞に対する作用

本研究には、次に示すHIV-1及びSIVを用いた。

実験室単離株としてX4ウイルス(T細胞指向性): HTLV-III<sub>B</sub>, MN株, SIV<sub>mac251</sub>; R5ウイルス(マクロファージ指向性): JRFL, 臨床単離株としてX4ウイルス: KMT(両細胞指向性ウイルスの可能性もある); R5ウイルス: KMO標的細胞としてHIV-1感受性細胞: CEM, MT-4, ヒト健康成人末梢血リンパ球(PBMC); SIV感受性細胞: Hut78, CEMx174を用いた。

ウイルス持続産生細胞株としてHIV-1持続産生細胞CEM/LAV-1, HIV-1潜伏感染細胞ACH-2, SIV<sub>mac251</sub>感染細胞Hut78/SIV<sub>mac251</sub>, CEMx174/SIV<sub>mac251</sub>を用いた。

各種細胞( $2 \times 10^5$  cells/ml, 10 ml)にBMT(最終濃度0~100  $\mu$ M)存在下120時間培養し、24時間毎にトリパンブルー染色法により生細胞・死細胞数を計測し、上清を除去後(1200 rpm x 5 min)、新たに調製したBMT溶液を同様に投与し、BMTの細胞毒性を調べた。

HIV-1, SIVウイルス感染はHIV-1感受性細胞MT-4及びHut78細胞を用い、ウイルスによる細胞変性効果の1つである巨細胞形成の有無により判定し、Behrens-Kärber法により50% tissue culture infectious dose (TCID<sub>50</sub>/ml)を算出して求めた。

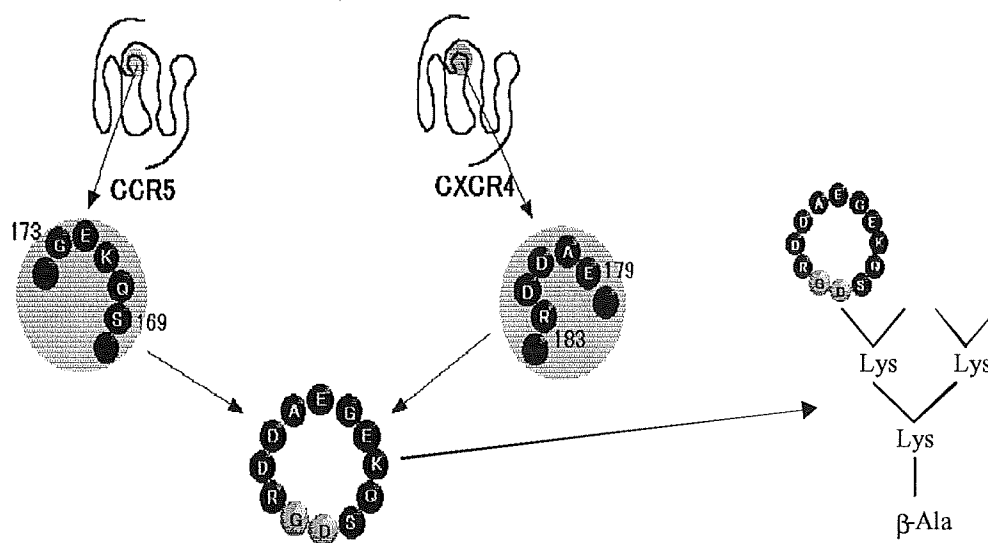
HIV-1 p24, SIV p27抗原は、培養上清中のHIV-1 p24及びSIV p27抗原量を定量的に検出できるキットも用いて行った。また、近年抗HIV活性測定法として一般的に用いられるようになったMAGI-CCR5(あるいはMAGIC-5)法を用いても行った。

### 3-3 キメラ環状「デカペプチド」に基づくワクチン開発の基礎

次のscheme Iに示すようにHIV-1 coreceptor (CXCR4, CCR5)の全一次構造から立体構造を推定し、第2細胞外ループ(ECL-2)膜貫通ドメインから細胞外の第1のアミノ酸残基、糖鎖修飾を受けたAsn (CXCR4)あるいはArg (CCR5)残基から11番目のECL-1とSS結合を形成しているCys残基の領域(undecapeptidyl loop, UPL)に注目した。UPLの構造解析の結果、UPLは特異的立体特殊構造であり、HIV-1侵入に関与すると推定され、CXCR4のアミノ酸配列EADDRおよびCCR5のSQKEGの5残基にGly-Aspのスペーサージペプチドを挿入してCXCR4とCCR5由来のキメラドデカペプチドを環状化することによって、この特異的立体特殊構造を再構築した。本抗原をMAPおよびMulti Pin樹脂に結合させ、前者を免疫抗原、後者をassay抗原とし、単クローン抗体を作出した。単クローン抗体のHIV-1感染防止実験はMAGIC-5法を用いて行った。

## Amino Acid Sequences of UPL in ECL-2 of HIV-1 Coreceptors (CXCR4 & CCR5)

CXCR family	CCR family
CXCR1 A <sub>177</sub> Y <sub>178</sub> H <sub>179</sub> P <sub>180</sub> N <sub>181</sub> N <sub>182</sub> S <sub>183</sub> S <sub>184</sub> P <sub>185</sub> V <sub>186</sub> C <sub>187</sub>	CCR1 K <sub>172</sub> T <sub>173</sub> Q <sub>174</sub> E <sub>175</sub> F <sub>177</sub> T <sub>178</sub> H <sub>179</sub> T <sub>180</sub> C <sub>182</sub>
CXCR2 T <sub>186</sub> V <sub>187</sub> Y <sub>188</sub> S <sub>189</sub> S <sub>190</sub> N <sub>191</sub> N <sub>192</sub> S <sub>193</sub> P <sub>194</sub> A <sub>195</sub> C <sub>196</sub>	CCR2 K <sub>180</sub> C <sub>181</sub> Q <sub>182</sub> K <sub>183</sub> E <sub>184</sub> D <sub>185</sub> S <sub>186</sub> V <sub>187</sub> Y <sub>188</sub> V <sub>189</sub> C <sub>190</sub>
CXCR3 H <sub>183</sub> H <sub>184</sub> D <sub>185</sub> E <sub>186</sub> R <sub>187</sub> L <sub>188</sub> N <sub>189</sub> A <sub>190</sub> T <sub>191</sub> H <sub>192</sub> C <sub>193</sub>	CCR3 E <sub>170</sub> T <sub>171</sub> E <sub>172</sub> L <sub>173</sub> F <sub>174</sub> E <sub>175</sub> T <sub>176</sub> I <sub>177</sub> C <sub>183</sub>
CXCR4 N <sub>175</sub> V <sub>177</sub> S <sub>178</sub> E <sub>179</sub> A <sub>180</sub> D <sub>181</sub> D <sub>182</sub> R <sub>183</sub> Y <sub>184</sub> I <sub>185</sub> C <sub>186</sub>	CCR4 T <sub>177</sub> C <sub>178</sub> Y <sub>179</sub> T <sub>180</sub> E <sub>181</sub> R <sub>182</sub> N <sub>183</sub> H <sub>184</sub> T <sub>185</sub> Y <sub>186</sub> C <sub>187</sub>
CXCR5 Q <sub>182</sub> G <sub>183</sub> H <sub>184</sub> H <sub>185</sub> N <sub>186</sub> N <sub>187</sub> S <sub>188</sub> L <sub>189</sub> P <sub>190</sub> R <sub>191</sub> C <sub>192</sub>	CCR5 R <sub>174</sub> S <sub>175</sub> Q <sub>176</sub> K <sub>177</sub> E <sub>178</sub> G <sub>179</sub> L <sub>180</sub> H <sub>181</sub> Y <sub>182</sub> T <sub>183</sub> C <sub>178</sub>





4. 研究成果

4-1 BMTの化学構造及び予想される生体内代謝

Fig. 2にBMTの化学構造とその生体内代謝を示した.

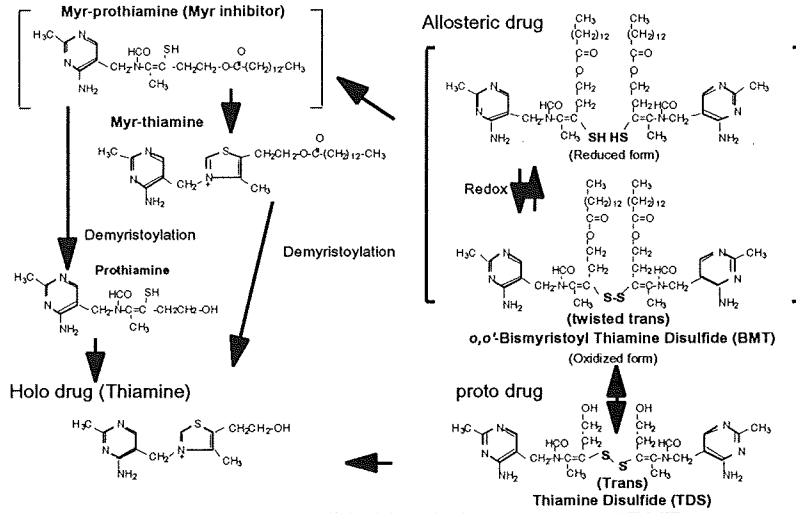


Fig. 2. Possible Metabolic Pathway of BMT

4-2 BMTをリード化合物として新規化合物の化学合成および構造式

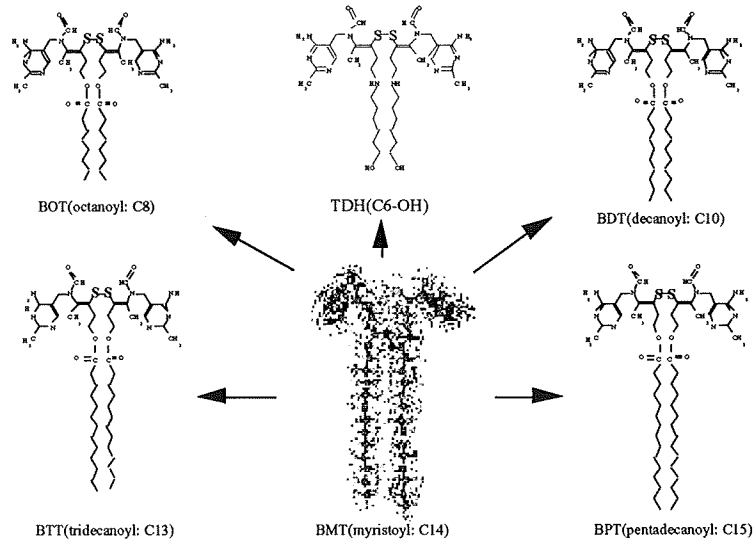


Fig. 3 Structure of Thiamine Derivatives

4-3 BMTおよびその誘導体のHIV-1及びSIV感染細胞に及ぼす抗HIV効果

4-3-1 BMTの抗HIV活性

BMTはCEM、CEM/LAV-1細胞に対し0~100 μM範囲で細胞毒性を示さなかった。一方、BMT処理によりその感染価TCID<sub>50</sub>/mlは著しく減少し、1.0 x 10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub>/ml (対照) から1 μM濃度で3.2 x 10<sup>3</sup>、50 μMで6.5 x 10<sup>2</sup> TCID<sub>50</sub>/mlに低下した。Hut78及びHut78/SIVmac251に対してもBMTは、同じ濃度範囲 (0~100 μM) で細胞毒性を示さず、50 μM濃度では1.0 x 10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub>/ml (対照) から3.2 x 10<sup>2</sup> TCID<sub>50</sub>/mlに低下し、SIVに対しても有効であることが確認された。次にウイルス (感染ウイルス量、m.o.i = 0.01~0.1) を予め各濃度のBMTで30分前処理を行い、そのウイルス感染価をMT-4細胞を用いて求めた。HIV-1ウイルスのTCID<sub>50</sub>/mlは、1.6 x 10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub>/ml (対照) から1 μM濃度で1.0 x 10<sup>2</sup> TCID<sub>50</sub>/mlに、またSIVmac251ウイルスでは、50 μMで2.5 x 10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub>/ml (対照) から4.0 x 10<sup>3</sup> TCID<sub>50</sub>/mlに著しく低下した。

次にp24、p27抗原量を調べた結果を、HIV-1 p24抗原量はBMTの濃度依存的に減少し、そのIC<sub>50</sub> = 14.7 μMであった。また、SIVmac251に対してはBMT単投与及び連続投与でIC<sub>50</sub> = 26.4 μMであった。Table 1にHIV-1の実験室株及び臨床単離株に対する抗HIV活性をまとめた。健康成人PBMCは常法により調製し、松下修三博士らが単離した臨床単離HIV-1株 (KMT、KMO) をBMT (1~100 μM) で37℃、30分間前処理をして、抗HIV活性を測定した。その結果、BMTは臨床単離株に対しても有効であった。但し、KMO株は感染力が弱く、またp24抗原産生量も少なく、この条件下ではPBMCへの感染の確認及びp24ウイルス抗原の検出もできなかった。

Table 1 Effects of BMT on HIV-1 infected PBMC and human T-cell line

I	Biological phenotype virus	Patient/isolate code	Targeting cell (second receptor) <sup>a)</sup>	Minimum effective dose (MED, μM) <sup>b)</sup>		p24 or p27 antigen IC <sub>50</sub> (μM) <sup>c)</sup>
Primary isolates				m.o.i <sup>d)</sup>		Infection dose (p24 pg/ml)
	R50 (NSI/MT) <sup>g)</sup>	KMO	PBMC (CXCR4, CCR5)			67 N.D. <sup>e)</sup>
	X40 (SI/TT) <sup>h)</sup>	KMT	PBMC (CXCR4, CCR5)	0.1	25	N.D.
				0.5	25	
Laboratory isolates						
	R5 (NSIMT)	JRFL	PBMC (CXCR4, CCR5)			14.7
	X4 (SI/TT)	MN	PBMC (CXCR4, CCR5)			667 N.D.
		HTLV-III <sub>B</sub>	CEM (CXCR4)	0.1	12.5	
				1.5	12.5	
	X4 (SI/TT)	SIVmac251	CEMx174 (CXCR4)	0.01	1	26.4 (p27)
			Hut78 (CXCR4)	0.01	1	

a) The second receptors (CXCR4, CCR5) (38) are represented in parentheses. b) The minimum effective dose for complete prevention of syncytium formation was defined as the MED. c) IC<sub>50</sub>: 50% inhibition concentration d) m.o.i., multiplicity of infection. e) N.D., not determined f) Abbreviations recommended by Berger, E. A. *et al.* (5). g) SI/TT: syncytium inducible/T-cell line tropic h) NSI/TT: non-syncytium inducible/macrophage tropic

Fig. 3. で示したBMT誘導体をMAGI-CCR5法で抗HIV活性を調べ、50%阻害活性 (IC<sub>50</sub>)、50%細胞毒性 (CC<sub>50</sub>) を求め、Table IIIに示した。

#### 4-3-2 BMT誘導体の抗 HIV活性

BMT誘導体のうち、BDT (C10) はBMTの約160倍活性が高く、SI (選択係数) 1612で極めて安全な化合物と考えられ、BOT、BDTは濃度依存的に抗HIV活性を示した (Table IIの添付左図)。

Table II Anti-HIV-1 Tat Activity of Thiamine Derivatives

Thiamine derivatives	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	CC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	SI	Potential energy (kcal)
TDH(C6-OH)	16.18	N.D	—	3.37
BOT(C8)	0.56	>282	>503	4.29
BDT(C10)	0.16	>258	>1612	5.24
BTT(C13)	2.54	N.D	—	7.31
BMT(C14)	25.12	N.C	—	9.09
BPT(C15)	12.61	N.C	—	9.81

N.D: not determined      N.C: not cytotoxic

#### 4-4 BMTの作用機構

##### 1) NF- $\kappa$ Bに対する作用

HIV-1潜伏感染細胞ACH-2細胞 ( $5 \times 10^5$  cells/ml) をBMT (12.5  $\mu$ M) 存在下及び非存在下3時間処理し、ボルボールミリスチルアセテート (PMA、1 ng/ml) で刺激し、経時的に細胞を回収した。NF- $\kappa$ Bの細胞内分布に及ぼすBMTの効果を間接蛍光抗体法及びレーザーサイトメーターを用いて調べ、また、CEM/LAV-1を同様に処理した細胞から核を分離し、核中のNF- $\kappa$ Bの分析をウエスタンブロット法により行った。BMTはPMAの刺激によるNF- $\kappa$ Bの核への移行を強力に阻害することが明らかになった。また、ウエスタンブロットの結果、BMT (250  $\mu$ M) 処理CEM/LAV-1細胞の核中NF- $\kappa$ Bは認められなかった。

レーザーサイトメーター分析の結果、BMT処理ACH-2細胞中の核にはほとんどNF- $\kappa$ Bは検出されず、間接蛍光抗体法の結果と一致した。

##### 2) HIV-1 Tatに対する作用

COS-7をHIV-1 Tatを発現するpBC12/HIV/Tat (アクティベータープラスミド) 及び分泌型アルカリフォスファターゼを発現するpBC12/HIV-LTR/SeAP (レポータープラスミド) をコトランスフェクションし、BMT存在下及び非存在下培養し、BMTの効果を調べた。BMTは100  $\mu$ M濃度で対照の約50%、250  $\mu$ M濃度で5.9%にHIV-1 Tatの作用を抑制したがHIV-1 Tatの発現そのものには影響を与えなかった。また、HIV-1 Tatの細胞内分布をBMT存在下及び非存在下レーザーサイトメーター分析法で調べた結果、HIV-1 Tatは核中にはほとんど存在せず、細胞質から膜への局在が観察され、BMTはTatの核への移行を阻害していることがわかった。

##### 3) Flow Cytometryによる解析

細胞表面へのrecombinant HIV-1 Tatタンパク質吸着に及ぼすBMTの影響。

各種BMT誘導体存在、非存在下でHIV-1 Tat をU937に37°Cで30分間暴露し、細胞表面に吸着したTat を、mouse anti-HIV-1 Tat monoclonal antibody、FITC conjugated anti-mouse IgGで処理し、Flow cytometer (EPICS XL) により解析した。その結果、BOTを除いた各種BMT誘導体の処理群は、非処理群と比較して蛍光強度は低く、Tatの細胞表面吸着の阻害が観察され、特にBTT、BPTによる阻害効果は著しかった (Fig. 4)。このことは、細胞外HIV-1 Tatがインテグリンを媒介したシグナルトランスダクション経路、つまりTatのC-末端配列であるRGD領域を介したTatのインテグリン( $\alpha v \beta 1$ )への結合が阻害されたことを示している。このことから、BMT誘導体がTatの転写活性化経路の一つであるインテグリンレ

セプターを媒介した経路上での細胞外Tatの転写活性化を阻害することが示唆された。Tatはエイズ患者血液中に約 3 ng/mlの濃度で存在し、HIV-1の病原性に深くかかわっていることが明らかにされ始めている。BMTは細胞外のTat（血中 Tat）にも作用し、TatのHIV-1病原性を抑制していると考えられる。

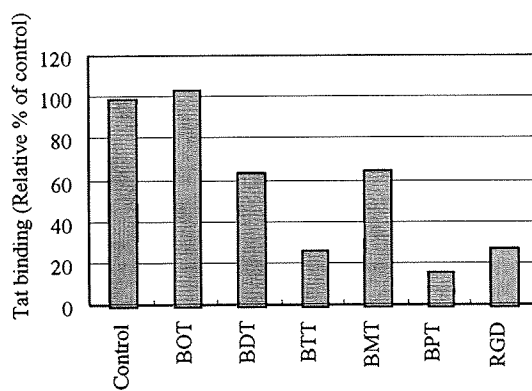
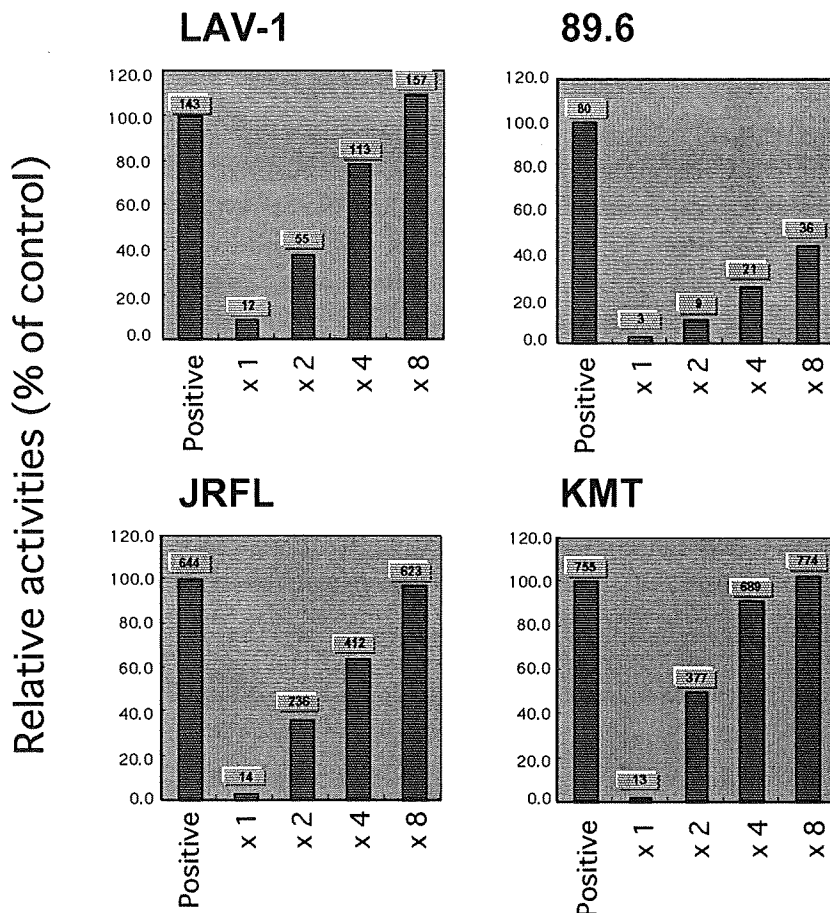


Fig. 4. Effect of Thiamine derivatives of Tat Binding to U937 Cells

4-5 抗CCR5-CXCR4キメラ環状ドデカペプチド抗体による感染防御

HIV-1 coreceptorを基礎にしたHIV-1感染防止ワクチン、CCR5-CXCR4のキメラ環状ドデカペプチド抗原は、HIV-1感染防止抗体を産生する能力を有したことからデフェンスワクチンとして期待され、今後大いに研究を進める必要がある。



5. 考察

HIV-1固有の転写因子としてHIV-1 Tat、それに関する細胞側の固有の転写因子 NF- $\kappa$ Bの両分子鎖中のチオール基に着目した。前者のHIV-1 Tatのチオール基はZn-フィンガーを形成し、核酸への結合に、またNF- $\kappa$ Bのチオール基も核酸との結合に必須である。HIV-1 Tatのシステイン残基のチオール基をターゲットした薬剤にウイルスがさらされると、薬の攻撃から免れるために、ウイルスは易変異原性を巧みに利用し、他のアミノ酸残基に変異することが考えられる。Znと配位可能なイオウ原子とほぼ同じ2個のローンペア電子を持つ原子は酸素で、セリン残基に水酸化メチル基として存在する。ウイルスはセリン残基に変異し、薬の攻撃から逃れることが考えられるが、セリンの水酸基はもはやZnと配位することはできず、Zn-フィンガーは形成されないことが物理化学的に明らかにされている。

これは今までは、ウイルスが変異により、薬の攻撃をかわし、種を死守してきたことを根本的に覆すことで、変異すればHIV-1にとって致命的になり、変異しなければ薬の執拗な攻撃にさらされることになる。一方、NF- $\kappa$ Bは宿主側の転写因子で、宿主の遺伝子支配であるので、当然変異は起こしにくい、たとえ変異したとしてもHIV-1 Tatと同じように核酸との結合能を消失すると考えられる。本剤は、今までには見られない、ウイルスが薬剤耐性を獲得しにくい全く新しい機能をもった抗HIV剤であると考えられる。また、HIV感染防止のために、今回提案した抗CCR5-CXCR4キメラ環状ドデカペプチド抗体は、種々のHIV-1の感染を防止し、所期の目的を達成することができることが期待される。

この抗原（ワクチン）は部分的には自己抗原であるので生体を免疫すると生体はこの自己抗原に対して自己抗体を産生すると考えられ、自己抗体に起因する自己免疫病が懸念されるが、本抗体の抗原となるCXCR4あるいはCCR5の特殊

構造部位はHIV-1あるいは他の因子が吸着してはじめて膜上に露出すると推定されているので重篤な自己免疫疾患は考えられない。

## 6. 結論

細胞側の転写因子NF- $\kappa$ B及びウイルスの転写因子HIV-1 Tatのチオール基に着目し、両因子の転写を抑制する化合物BMTを創製した。本薬剤の抗HIV活性をHIV-1の実験室株・臨床単離株、SIVを用いて詳しく調べた結果、種々のHIVに対して顕著な効果を示し、SIVに対しても有効であることがわかった。本剤は現在、多剤耐性ウイルス株に対し、その抗エイズ効果が調べられている。今回新たに提案したCCR5-CXCR4キメラ環状ドデカペプチドに対する自己抗体は、種々に変異したHIV-1感染をほぼ完全に防止したことから、生体が産生する自己抗体によってHIV-1の侵入を防止できる可能性が高まり、さらに安全性等を調べ、従来のワクチンの概念・考えを超越した新しい概念のワクチンとして期待され、エイズ克服の研究においてBreakthroughとなりうる。

## 7. 研究発表

### 1) 論文発表

- 1 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 suppresses HIV-1 replication through prevention of nuclear translocation of both HIV-1 Tat and NF- $\kappa$ B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **249**(3), 745-53 (1998).
- 2 庄司 省三: 難薬剤耐性抗HIV剤の開発, Development of anti-HIV-1 drug for drug-resistant HIV-1. *最新医学* (1998), 53, 2047-2060 (1998)
- 3 Akari H, Ono F, Sakakibara I, Murayama Y, Hiyaoka A, Terao K, Otani I, Mukai R, Adachi A, Yoshikawa Y.: Simian T cell leukemia virus type I-induced malignant adult T cell leukemia disease in a naturally infected African green monkey: implication of CD8+ T cell leukemia. *AIDS. Res. Hum. Retroviruses*, **14**, 367-371 (1998)
- 4 Fuji, Y., Mukai, R., Akari, H., Machida, M., Mori, K., Takasaka, M., Kojima, E., Murakami, K., and Yoshikawa, Y., Antiviral effects of 6-chloro-2',3'-dideoxy guanosine (6-Cl-ddG) in rhesus monkeys acutely infected with SIV. *Antiviral Chem. & Chemother* **9**: 85-92, (1998)
- 5 Blockage of HIV-1 production through inhibition of proviral DNA synthesis by N,O-didecanoyl serinal dimethylacetal. Nobutoki Takamune, Shogo Misumi, Kazuchika Furuishi, and Shozo Shoji *IUBMB Life*, **48**: 1-5 (1999)
- 6 A novel compound heterozygote (FAP ATTR Arg104His/ATTR Val30Met) with high serum transthyretin (TTR) and retinol binding protein (RBP) levels. Terazaki H, Ando Y, Misumi S, Nakamura M, Ando E, Matsunaga N, Shoji S, Okuyama M, Ideta H, Nakagawa K, Ishizaki T, Ando M, Saraiva MJ *Biochem Biophys Res Commun*, **264**(2), 365-70 (1999).
- 7 Suicide-inhibition of HIV-1 protease (PR) by its final processing p2 peptide is an important means of self-defense against the decay of viral particle. Shogo Misumi, Mitunori Tomonaga, Kouichoukma, Kazuhiro Kuroki, and Shozo Shoji. 6th CCGH Symposium, Abstracts, 98 (1999).
- 8 An African green monkey lacking peripheral CD4 lymphocytes that retains helper T cell activity and coexists with SIVagm. Murayama Y, Mukai R, Inoue-Murayama M, Yoshikawa Y. *Clin. Exp. Immunol.* **117**, 504-512 (1999).
- 9 Nobutoki Takamune, Shogo Misumi, and Shozo Shoji: Cyclic Zinc-Dithiocarbamate-S,S'-Dioxide Blocks CXCR4-mediated HIV-1 Infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **272**: 351-356 (2000)
- 10 Hirano M, Nakamura S, Okada M, Ueda M, and Mukai R: Rapid Discrimination of monkey B virus from human herpes simplex viruses by PCR in the presence of betain. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 1225-1257, (2000)
- 11 Shimizu N, Soda Y, Kanabe K, Liu HY, Mukai R, Kitamura T, and Hoshino H: A putative G protein-coupled receptor, RDC1, is a novel coreceptor for human and simian immunodeficiency viruses. *J. Virol.* **74**, 619-626 (2000).
- 12 Takatoshi Shiraishi, Shogo Misumi, Michiho Takama, Ichiro Takahashi, and Shozo Shoji: Myristoylation of human

immunodeficiency virus type 1 gag protein is required for efficient env protein transportation to the surface of cells.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* in press (2001)

## 2) 学会発表

- 1 HIV-1 coreceptor-based vaccineの開発のための生化学的基礎研究  
林辰一郎, 三隅将吾, 高宗暢暁, 庄司省三  
第1回熊本エイズセミナープログラム抄録集, 11 (2000)
- 2 Chemokine receptor, CCR5,の合成環状dodeca peptideに対する特異的  
単クローン抗体の調製及び本抗体によるHIV-1感染中和活性の検討  
中島玲奈, 三隅将吾, 高宗暢暁, 庄司省三  
生化学, 72, 1059 (2000)
- 3 HIV-1 coreceptor, CXCR4の特異的部位に対する単クローン抗体の調製  
遠藤昌史, 三隅将吾, 林辰一郎, 高宗暢暁, 庄司省三  
生化学, 72, 1059 (2000)
- 4 HIV-1 Tat Zn-finger domainを標的とした抗HIV薬の作用機構の検討  
鰐口和也, 山口雅典, 三隅将吾, 高宗暢暁, 橘囿臣, 庄司省三  
生化学, 72, 1060 (2000)
- 5 HIV-1 coreceptor-based vaccineの開発のための基礎研究  
林辰一郎, 向井鏡三郎, 橘囿臣, 猪井俊敬, 本田徹朗, 高宗暢暁, 三隅将  
吾, 庄司省三  
生化学, 72, 1060 (2000)
- 6 新規合成thiamine disulfide誘導体の抗HIV-1作用に関する生化学的基礎研究  
三隅将吾, 山口雅典, 橘囿臣, 加藤英夫, 猪井俊敬, 松下修三, 向井鏡三郎, 庄司省三  
生化学, 72, 1061 (2000)
- 7 CCR5由来合成環状dodeca peptideに対する特異的単クローン抗体の調製及びウイルス感染防御  
中島玲奈, 三隅将吾, 高宗暢暁, 庄司省三  
日本エイズ学会誌, vol.2 No.4 p305 (2000)
- 8 CXCR4の特異的部位をmimicした環状ペプチドに対する単クローン抗体の調製及び性質  
遠藤昌史, 三隅将吾, 林辰一郎, 高宗暢暁, 庄司省三  
日本エイズ学会誌, vol.2 No.4 p394 (2000)
- 10 HIV-1 coreceptor, CXCR4・CCR5, -based vaccineの開発  
庄司省三, 林辰一郎, 中島玲奈, 三隅将吾, 高宗暢暁, 遠藤昌文, 淵上貴  
司, 向井鏡三郎, 猪井俊敬, 橘囿臣, 加藤英夫  
第120回日本薬学会講演要旨集, (2000)

---

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



