

平成13年度

# エイズ医薬品等開発研究

## 重点研究報告書

## 第1分野

抗エイズウイルス薬、エイズ付随症状  
に対する治療薬の開発に関する研究

## HIV-1の遺伝子発現とウイルス増殖を制御する新たな治療薬剤開発のための研究

所 属 国立感染症研究所 エイズ研究センター  
研究者 杉浦 亙

### 分担研究者

- |                               |      |
|-------------------------------|------|
| (1) 東京大学医科学研究所先端医療研究センター感染症分野 | 北村義浩 |
| (2) 国立小児医療研究センター実験外科          | 木村廣光 |
| (3) 北里大学薬学部微生物薬品製造学           | 田中晴雄 |
| (4) 富山化学工業総合研究所第3研究部          | 野村伸彦 |
| (5) 国立感染症研究所エイズ研究センター         | 松田善衛 |

### 要旨

HIV-1 感染症の薬剤治療が普及するにつれて薬剤体性ウイルスが治療の障害として大きな問題となっている。薬剤耐性を獲得した場合には薬剤の変更が求められるが、既存の治療薬剤では対応できないような難治症例もある。この研究では難治症例に対応できるような新たなプロテアーゼ阻害剤、インテグラーゼ阻害剤、そして合胞体形成を阻害する薬剤の開発を目指している。検索を実施するのは富山化学工業の保有する化合物ライブラリーと北里大学田中博士の保有する土壌放線菌ライブラリーである。富山化学工業化合物ライブラリーは過去に前記阻害剤の対象として検索されたことが無く、新たなリード化合物の発見同定が期待される。一方北里大学田中博士の土壌放線菌ライブラリーは合胞体形成阻害剤物質同定の実績を持ち、他の2つの阻害剤についても新規物質の同定が十分期待される。平成13年度は各標的酵素阻害剤を検索する耐性を整え、現時点でプロテアーゼ阻害剤候補物質を4個、合胞体形成阻害候補物質1個を見出している。インテグラーゼ阻害剤検索は検索手法の確立が成され、実際の薬剤検索は次年度から開始する予定である。

### 1. 研究目的

HIV-1 感染症を治療するための新たな薬剤を開発することを目的とする。開発する薬剤は次の3つである。

- 1) 既存のプロテアーゼ阻害剤に対して耐性を獲得したプロテアーゼに有効な新たな阻害剤
- 2) HIV-1 遺伝子が宿主細胞ゲノムに組み込まれる際に作用する組み込み酵素(インテグラーゼ)を阻害する薬剤
- 3) HIV-1 感染の開始段階である宿主細胞へのウイルス粒子結合とその後の合胞体形成を阻害する薬剤

## 2. 研究方法

### (1) 化合物ライブラリー

分担研究者田中春雄の保有する土壌放線菌 2000 株の成分ライブラリーと富山化学の保有する約 2 万個の合成化合物ライブラリーを対象とした。

### (2) プロテアーゼ-阻害剤検索法

分担研究者松田等の開発した迅速プロテアーゼ活性測定法 (VLP-ELISA) を用いて検索を実施した。遺伝子発現ベクター上に薬剤標的となるプロテアーゼ遺伝子とその基質である HIV-1 gag 遺伝子、遺伝子導入効率と遺伝子総発現量のマーカーとなるルシフェラーゼ遺伝子を直列に挿入し、Cos7 細胞にリポフェクタミンを用いて遺伝子導入する。導入後 48 時間後に、細胞内に発現し、かつプロテアーゼにより切り出された p24 タンパク量と、ルシフェラーゼの量を測定し、次式を用いて相対的プロテアーゼ活性量を算出し、検索物質の阻害効果を評価した。

$$\text{プロテアーゼ活性} = \frac{\text{切り出された p24 量}}{\text{ルシフェラーゼ活性}}$$

### (3) インテグラーゼ阻害剤検索

分担研究者北村等の手技に基づき標的となるインテグラーゼを作成し、strand transfer による活性の測定を行った。5' 末端を [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP で標識した 20 bps のオリゴ DNA と。3' 末端をビオチン標識した相補的オリゴ DNA をアニーリングさせたものを反応基質として作成した。この基質とインテグラーゼを反応溶液中で混合させ、1 時間 37°C で反応させた。反応を停止させた後 (1) 15% ポリアクリルアミド変性ゲルでの電気泳動(田中)、あるいは (2) ストレプトアビジン固層化 96 穴プレートに反応産物を吸着させシンチレーターで測定 (杉浦、木村)、することによりインテグレーション反応を確認、酵素活性の測定を行った。

### (4) 合胞体形成阻害剤検索

HIV-1 の外被タンパク (env) および tat を発現する HeLa 細胞と CD4 および LTR で制御された LacZ を発現する細胞を用いた合胞体形成反応を用いて検索を行った。T-tropic ウイルスに対しては NL4-3 env 発現 HeLa/T-env/Tat および HeLa/CD4/LacZ 細胞を、M-tropic ウイルスに対しては SF162env 発現 HeLa/M-env/Tat および HOS/CD4/CCR5/LacZ 細胞を用いた。LacZ 発現量は合胞体形成率に依存することから、検索物質存在下での LacZ 発現を定量することにより、その阻止率を評価した。

### (5) 抗 HIV-1 薬剤を評価する小動物実験系の確立

ヒト臍帯血から自動磁気分離システム (Auto MACS) を用いて造血幹細胞を分離し 2.5Gy

照射した NOD/SCID マウスに静注投与した。同時に抗 asialoGM1 抗体を腹腔内に投与した。一ヵ月後に骨髄および脾臓細胞の解析を行った。

### 3. 研究成果

#### (1) 化合物ライブラリーの整備

##### a. 土壌放線菌の分離

日本各地から採取した土壌サンプルより約 2000 株の放線菌を分離した。

##### b. 合成化合物ライブラリーの作成・整備

約 2 万個の合成化合物を一定の濃度で溶媒に溶かし、96 穴プレート上に 5ul 各分注し、速やかに検索系に投入できる体制を整えた。全てのプレート、化合物はバーコードおよび専用データベースで管理され一元管理できる体制を整えた。さらにヒット化合物のリードオペイマイゼーションを効率的に実施するために、従来の液相合成に代わり、固体合成樹脂をもちいた固相法合成の検討を開始した。

#### (2) プロテアーゼ阻害剤の検索

本年度は実際に検索物質を用いて VLP assay の条件設定を行い、多検体検索体制を整えた。富山化学より提供された 240 種類の化合物を検索し、プロテアーゼ活性を 70% 以上阻害する物質を 4 種同定した。

#### (3) インテグラーゼ阻害剤の検索

本年度は strand transfer assay の条件設定を中心に研究を進めた。標的となるインテグラーゼ酵素は分担研究者北村により 2 種類、N 末端にマルトース結合タンパク (MBP-IN) あるいは His-tag を持つもの (H6-IN)、が作成された。Strand transfer assay の条件設定はほぼ完了し一部検索を開始したが、その結果改善すべき事項がいくつか上げられており、検索と平行して反応条件の最適化を進めている。

#### (4) 合胞体形成阻害剤検索

土壌より分離した放線菌 2000 株の培養液を用い、合胞体形成率が 60% 以下、細胞生存率 80% 以上のもので、さらに、顕微鏡下での観察により実際に合胞体形成阻害活性が見られたものを選択した。その結果、放線菌 005D2 株より合胞体形成阻害活性を見出した。この合胞体形成阻害物質は、酢酸エチルで抽出可能であり、T-tropic 系では阻害が認められず、M-tropic 系のみ合胞体形成を阻害することが分かった。

富山化学工業 (株) 総合研究所より供給された 880 サンプルについて合胞体形成阻害活性を測定した。その結果、顕微鏡下での観察、及びレポーター遺伝子の酵素活性の両方において阻害活性を示した化合物が 1 つ同定された。この化合物についてリード化合物の候補になり得

るか検討を進めている。

#### (5)抗 HIV-1 薬剤を評価する小動物実験系の確立

ヒト臍帯血からの CD34 陽性造血幹細胞分離精製法を確立した。SOD/SCID マウスに移植した造血幹細胞は移植後一ヶ月、三ヶ月後に骨髄および脾臓の細胞をヒト CD45-PE で染色し解析した結果 20%強のヒトキメラ細胞を認め分化誘導されたヒト血球系細胞が確認された。

#### 4. 考察

プロテアーゼ阻害剤および合胞体形成阻害剤検索は本年度で多検体に対応する体性が整い、検索が進行しつつある。次年度以降の課題は一次検索の完了とリード化合物候補の絞り込みである。インテグラーゼ阻害剤に関しては strand transfer 反応を用いた検索系は確立されたが、多検体を処理するには更に改良する点があり、次年度早期に問題点を解決し検索を軌道に乗せる必要がある。

#### 5. まとめ

プロテアーゼ阻害剤、インテグラーゼ阻害剤、合胞体形成阻害剤各検索系の条件設定を行い、検索を開始した。合成化学物質ではプロテアーゼ活性を阻害するヒット化合物が 240 サンプル中 4 個、合胞体形成を阻害するヒット化合物が 880 サンプル中 1 個同定された。土壌放線菌ライブラリーからは約 2000 株中 1 株合胞体形成を阻害するものが同定された。

#### 6. 研究発表

杉浦 亙

HIV の薬剤耐性

BIO Clinica Vol.16(13) :47-51. 2001

守谷研二、杉浦 亙

抗 HIV 薬剤耐性検査の方法と解釈

Modern Physician Vol.22, No.3:313-316, 2001

杉浦 亙

HIV-1 の薬剤耐性検査と臨床的意義

日本臨床 第 60 巻第 4 号:703-710, 2001

Earl PL, Sugiura W, Montefiori DC, Broder CC, Lee SA, Wild C, Lifson, J Moss B

Immunogenicity and protective efficacy of oligomeric human immunodeficiency virus type 1 gp 140.

J Virol. Vol.75 :645-653. 2001

L Myint, Z Matsuda, Y Yokomaku, K Matsuo, T Iwasaki, K Yamada and W Sugiura

Contribution of accumulated Gag and protease mutations towards recovery of the fitness and the virus particle formation in the protease inhibitor –resistant HIV-1 with D30N and L90M.

Antiviral Therapy Vol.6 s-1 :55. 2001

Y Yokomaku, Z Matsuda, W Sugiura, M Matsuda, K Sakai, and Y Nagai  
Phenotypic analysis of HIV-1 protease by virus-like particle ELISA.  
*Antiviral Therapy* Vol.6 s-1 :135. 2001

Wataru Sugiura

Effect of introduction of highly active antiretroviral treatment and the changes in patterns of drug-resistant HIV-1 in Japan.  
*J Infect Chemother* Vol.7 :127-132. 2001

Fumihiko Yagyu, Yusei Ikeda, Koya Ariyoshi, Wataru Sugiura, Som-Arch Wongkhomthong, Michiaki Masuda, Hiroshi Ushijima  
Differentiation of subtype B and E of human immunodeficiency Virus Type 1 by polymerase chain reaction using novel env gene primers.  
*Journal of Virological Methods* 101 :11-20 2002

Wataru Sugiura, Zene Matsuda, Yoshiyuki Yokomaku, Kurt Hertogs, Brendan Larder, Tsuyoshi Oishi, Aiko Okano, Teichirou Shiino, Masashi Tatsumi, Masakazu Matsuda, Hanae Abumi, Noboru Takata, Satoshi Shirahata, Kaneo Yamada, Hiroshi and Yoshiyuki Nagai  
Interference Between D30N and L90M in Selection and Development of Protease Inhibitor Resistant Human Immunodeficiency Virus Type-1.  
*Antimicrobial Agents & Chemotherapy* Vol.46:708-715 2002

Sakuo Hoshi Takashi Odawara, Masamichi Oshima, Yoshihiro Kitamura, Hajime Takizawa, and Hiroshi Yoshikura.  
cis-Elements Involved in Expression of Unspliced RNA in Moloney Murine Leukemia Virus.  
*Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Jan 25;290(3):1139-1144.

Keisuke Ae, Noriko Kobayashi, Ryuta Sakuma, Toshihiko Ogata, Hiroshi Kuroda, Noriyoshi Kawaguchi, Kenichi Shinomiya, and Yoshihiro Kitamura.  
Chromatin remodelling factor encoded by in11 induces G1 arrest and apoptosis in in11-deficient cells. *Oncogene*, in press (2002)

Xin X, Nakamura K, Liu H, Nakayama EE, Goto M, Nagai Y, Kitamura Y, Shioda T, Iwamoto  
A novel polymorphism in human macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1alpha) gene. *Genes Immun.* 2001 May;2(3):156-158.

Fujino M, Li XK, Guo L, Kitazawa Y, Funeshima N, Fukuda S, Kimura H, Miyashita T, Okuyama T, Amano T, Suzuki S.  
T-cell apoptosis triggered by FTY720 via mitochondrial pathway.  
*Transplant Proc* 2001 Nov;33(7-8):3084-5

Yano Y, Hara M, Miyahara T, Shibata K, Onitsuka T, Nawa Y, Li XK, Suzuki S, Amemiya H, Kimura H.  
Microchimeric cells from the peripheral blood associated with cardiac grafts are bone marrow derived, long-lived and maintain acquired tolerance to minor histocompatibility antigen H-Y.  
*Transplantation* 2001 May 27;71(10):1456-62

Yan H, Kimura H, Moriyama M, Goto T, Kokubo T, Amemiya H, Suzuki S, Tanaka K.  
Defect of severe combined immunodeficiency (Scid) MPhi/DC in acquired tolerance induction following rat-into-scid xenogeneic bone marrow cell chimeras.  
*Transplant Proc* 2001 Feb-Mar;33(1-2):706-7

- Adachi K, Li X, Kimura H, Amemiya H, Suzuki S.  
Prolonged survival of rat liver allografts with CrmA gene transfer.  
Transplant Proc 2001 Feb-Mar;33(1-2):605
- Adachi K, Li X, Kimura H, Amemiya H, Suzuki S.  
HIV-1 Nef protein prolonged recipient survival in rat liver allografting.  
Transplant Proc 2001 Feb-Mar;33(1-2):284
- Li XK, Fujino M, Sugioka A, Morita M, Okuyama T, Guo L, Funeshima N, Kimura H, Enosawa S, Amemiya H, Suzuki S.  
Fulminant hepatitis by Fas-ligand expression in MRL-lpr/lpr mice grafted with Fas-positive livers and wild-type mice with Fas-mutant livers.  
Transplantation 2001 Feb 27;71(4):503-8
- Lei Guo, Xiao-Kang Li, Naoko Funeshima, Masayuki Fujino, Yuhko Nagata, Hiromitsu Kimura, Hiroshi Amemiya, Shin Enosawa, Yasushi Harihara, Masatoshi Makuuchi and Seiichi Suzuki  
Prolonged survival of rat hepatic allograft with mouse monoclonal antibody against inducible co-stimulator (ICOS)  
Transplantation (in press)
- Lei Guo, Xiao-Kang Li, Yasushi Harihara, Masayuki Fujino, Naoko Funeshima, Hiromitsu Kimura, Hiroshi Amemiya, Seiichi Suzuki and Masatoshi Makuuchi  
Prolonged survival of liver xenograft with AdCTLA-4Ig one dose tail vein injection  
Transplantation International (in press)
- H. Chiba, J. Inokoshi, M. Okamoto, S. Asanuma, K. Matsuzaki, M. Iwama, K. Mizumoto, H. Tanaka, M. Oheda, K. Fujita, H. Nakashima, M. Shinose, Y. Takahashi and S. Omura  
Actinohivin, a novel anti-HIV protein from an actinomycete that inhibits syncytium formation : isolation, characterization, and biological activities. Biochem. Biophys. Res. Commun., 282, 595-601(2001)
- J. Inokoshi, H. Chiba, S. Asanuma, A. Takahashi, S. Omura and H. Tanaka  
Molecular cloning of actinohivin, a novel anti-HIV protein from an actinomycete, and its expression in Escherichia coli. Biochem. Biophys. Res. Commun., 281, 1261-1265(2001)
- H. Chiba, S. Asanuma, M. Okamoto, J. Inokoshi, H. Tanaka, K. Fujita and S. Omura  
A simple screening system for anti-HIV drugs : syncytium formation assay using T-cell line tropic and macrophage tropic HIV env expressing cell lines – Establishment and validation – J. Antibiot., 54, No.10, 818-826(2001)
- Y Yokomaku, Z Matsuda, W Sugiura, M Matsuda, K Sakai, and Y Nagai  
Phenotypic analysis of HIV-1 protease by virus -like particle ELISA.  
Antiviral Therapy Vol.6 supplement 1 pp.135. 2001

#### 7. 知的所有権の取得状況

- 1) 特許取得 該当なし
- 2) 実用新案登録 該当なし
- 3) その他 なし



---

平成13年度

エイズ医薬品等開発研究  
重点研究報告書

平成14年9月10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