

平成13年度

若手研究者奨励研究報告書

エイズ医薬品等開発研究

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

薬剤耐性HIV克服のための分子基盤の確立

所 属 京都大学ウイルス研究所
研究者 児玉 栄一

要旨

4'-Ethynyl-nucleoside (4'-E-dN)が薬剤耐性 HIV 複製を野生株同様に阻害することを示し、さらにその耐性機序化に逆転写酵素領域の I142V/T165R/M184V 変異が関与することを明らかとした。

1. 研究目的

不治の病と考えられた後天性免疫不全症候群 (acquired immunodeficiency syndrome: AIDS) は、逆転写酵素 (reverse transcriptase: RT) 阻害剤とプロテアーゼ阻害剤の併用による多剤併用療法 (highly active anti-retroviral therapy: HAART) の著しい効果によりコントロール可能な疾患へと変貌しつつある。しかし、現時点では HAART によっても完全なヒト免疫不全症ウイルス (HIV) の駆逐は不可能であるばかりでなく、HAART 中にも持続する僅かなウイルス複製が薬剤耐性を付与しているという報告がある。耐性ウイルスの制圧には、新規の RT 阻害剤やプロテアーゼ阻害剤の開発および新しい分子標的に対する薬剤の開発が必要不可欠である。

今年度は、有効性が広く認められている核酸系 RT 阻害剤 (NRT 阻害剤) に関して薬剤耐性ウイルスに対してもその抗ウイルス活性を保持しうる薬剤のデザイン、合成を試みた。その結果 4'-ethynyl-2'-deoxynucleoside (4'-E-dN) が現在まで報告されたあらゆる薬剤耐性ウイルス複製を強力に阻害することを見出した。そこで 4'-E-dN に対し、HIV がどのように耐性化するかを明らかとし、既存の薬剤との耐性機序と比較することでさらなる耐性ウイルスを制圧しうる薬剤分子設計に役立たせることを研究目的とした。

2. 研究方法

1. 培養細胞と使用したウイルス

細胞には、MT-2, MT-4 細胞と COS-7, HeLa CD4/LTR-beta-Gal 細胞 (MAGI 細胞) を使用した。各々の細胞は、それぞれ 10% 牛胎児血清添加 RPMI 培地または同添加 DMEM 培地を用いた。抗生物質としてストレプトマイシンとペニシリンを培地に添加したが、MAGI 細胞を維持するときのみ、上記抗生剤に変えて G418 とハイグロマイシンを使用した。

ウイルスには実験室株である HIV-1_{LAI} を用いた。HIV-1_{LAI} はベルギー、ルーベン大学の Erik De Clercq 博士より分与された。NRT 阻害剤耐性ウイルスクローンは、全長の HIV-1 cDNA を組替えたプラスミド pNL101 を用いて作製した (以下参照)。

2. ウイルス効果を測定する方法

1) MTT 法

MTT 法には MT-4 細胞を使用した。細胞にウイルスを曝露するとほぼ同時に適当量に希釈した薬剤を加え、5 日間培養を続けた。その後、MTT 試薬 (7.5 mg/ml) を加え、3 時間さらに培養を続けた。ここに酸性化プロパノールを加え、生じたフォルマザンを可溶化し、その吸光度をプレートリーダーで測定した。

2) MAGI 法

アッセイの前日に MAGI 細胞を 96 well plate に移し、MTT 法と同様にアッセイを行った。培養 2 日後に培地を除き、X-Gal を加え、一時間インキュベートした後、青く染色された細胞を感染成立細胞として顕微鏡下で測定した。

3. 薬剤耐性株の誘導

薬剤に対する耐性変異を誘導するために MT-2 細胞と HIV-1_{LAI} を用いた。EC₅₀ の濃度から開始し、ウイルス感染によって多数のシンシチウムが観察されるようになったらその上清を回収し、2 倍濃度の薬剤を加えた新しい MT-2 細胞に回収した上清を加え、培養を続けることで耐性を誘導した。

4. 感染性 HIV-1 分子クローンの作製

感染性 HIV-1 の作製には、HIV-1 の全塩基配列を含むプラスミド pNL4-3 を改変し用いた。pNL4-3 の逆転写酵素活(RT)性中心を含む領域に変異を導入するために RT のアミノ酸 15 番と 267 番にサイレント変異を導入し、それぞれ制限酵素 Xma I と Nhe I サイトを導入した。この Xma I と Nhe I サイト間をクローニングベクターである pTZ に組み替え、PCR 法を応用した site directed mutagenesis 法を用いて目的の変異を導入した。目的の変異が導入されたかを塩基配列を決定し確認したのち、この Xma I-Nhe I 断片を再度 pNL4-3 に組み替え、感染性ウイルス遺伝子全長を含むプラスミド pNL4-3 を作製した。

作製した pNL4-3 は、Fugene transfection reagent (Roche 社) を用いて COS-7 細胞に遺伝子導入した。遺伝子導入 24 時間後に MT-2 細胞を加え、細胞融合を起こさせ、さらに 24 時間培養したのち、その上清をウイルス液として用いた。

3. 研究成果

1. 抗ウイルス効果

MT-4 細胞を用いたアッセイによって 4'-置換核酸誘導体の抗 HIV 効果を検討したところ、ethynyl 置換以外にも methyl 置換によっても強い抗 HIV 効果を示した。Thymidine 誘導体は抗ウイルス活性が弱かったが、その他のプリン、ピリミジン誘導体は nM オーダーの抗 HIV 活性を示した。一方で 4'-置換核酸誘導体であっても ribonucleoside 体は ara 体を除いて全く HIV 複製を阻害しなかった。

HIV-1 に効果を示した代表的な薬剤 5 剤を選択し、HIV-2 株である ROD と EHO に対する効果を MAGI 法をもちいて検討した。いずれの薬剤も HIV-1 に対するときと同様に HIV-2 である 2 株に対しても同様に強い抗 HIV 効果を示した。

これらの結果から、4'-位を置換した deoxynucleoside 誘導体は抗 HIV 効果を有することを示した。

2. 薬剤耐性株への効果

既存の薬剤に対する主な耐性ウイルスを site directed mutagenesis 法をもちいて作製し、それらに対する効果を MAGI 法を用いて測定した。作製したウイルスは 2',3'-dideoxycytidine (ddC) と 2',3'-dideoxyinosine (ddI) に対する耐性株である K65R、L74V、AZT に対する M41L/T215Y、3-TC に対する M184V、非核酸系逆転写酵素阻害剤に対する Y181C、多剤耐性株である MDR (A62V/V75I/F77L/F116Y/Q151M) と M41L/T69SSG/T215Y をもつ耐性ウイルスを作製した。4'-ethynyl 誘導体はこれら耐性株にも野生株と同様にその複製を効果的に阻害した (Table 1)。しかし、ethynyl 以外の置換を行った薬剤は 3-TC 耐性を示す M184V に対する抗 HIV 効果が著しく減弱していた。

これらの結果から、耐性株に効果を示すには 4'-ethynyl 置換が必須であること、HIV-2 と Y181C に効果を示したことから核酸系逆転写酵素阻害剤として作用していることを明らかとした。

3. 4'-E-dN 耐性ウイルスの誘導と塩基配列の決定

4'-ethynyl 誘導体が多剤耐性株を含めた種々の耐性ウイルスに効果を示したことから、この 4'-ethynyl 誘導体に対して HIV が耐性化するか否かを検討した。

Dose escalating 法にて 4'-methyl-2'-deoxycytidine (4'-Me-dC)、4'-ethynyl-2'-deoxyadenosine (4'-E-dA)、4'-ethynyl-2'-deoxycytidine (4'-E-dC)、4'-ethynyl-2'-deoxydiaminopurine (4'-E-dDAP) に対する耐性ウイルスを誘導した。薬剤濃度はそれぞれの EC₅₀ から始めた。4'-Me-dC は、passage 8 にて 1 μM でも複製できるウイルスが出現してきた (Figure 1)。この RT 領域塩基配列を調べたところ 165 番目のスレオニン(T)がイソロイシン(I)に、184 番目のメチオニン(M)がイソロイシン(I)に置換 (T165I/M184I) されていた。4'-Me-dC は M184I/V に対してその抗ウイルス効果が減弱することを昨年報告したが、その結果と一致した。4'-E-dC、4'-E-dDAP、4'-E-dA に対しても T165I/M184I 変異が RT 領域に導入されたが、その効果減弱は認められなかった。4'-E-dC と 4'-E-dDAP に関してはこの状態が passage 50 まで続き、耐性株の誘導はできなかった。一方 4'-E-dA を使用したウイルスはこの後、I142V 変異を導入していた。しかし、薬剤濃度を上昇させるとその複製はとまり、この変異が耐性化に大きな影響を及ぼしていないことが示唆された。その後 M184I から 184V に変化した。耐性度は大きく変化しなかった。その後 passage 50 にて T165I から 165R に変異したところで耐性度が上昇した。このまま passage 58 まで培養をつづけ、得られたウイルスを HIV-1_{IBB}/4'-E-dA^rP 58 とした。

4. 耐性度の検討

HIV-1_{IIIB}/4'-E-dA^rP 58 を MAGI 法にてアッセイしたところ、Table 2 に示したように 4'-E-dA に対して約 80 倍の耐性を示した。4'-E-dC や 4'-E-dDAP および 3TC に対しても交叉耐性を示した。しかし、AZT には交叉耐性を示さなかった。

4. 考 察

本年は、薬剤耐性 HIV を制圧するために、今まで報告のある主な薬剤耐性株に対しても強い抗ウイルス効果を維持し、さらに高度耐性化した臨床分離株に対してもその効果を維持することができる新規核酸系逆転写酵素阻害剤 4'-E-dN の同定および開発を行った。更に 4'-E-dN に対し、HIV が耐性化し得るかを合わせて解析した。

4'-E-dN の作用機序として、上記したとおり、NRT 阻害剤として作用していることを示した。このことから 4'-E-dN は新しい核酸系逆転写酵素阻害剤として多剤耐性株を含めて耐性 HIV にも効果を示すことを明らかにした。4'-E-dN が何故、現在までに報告されている主な耐性株に対して強い抗ウイルス効果を発揮するのかという点については未解決のままであった。今まで開発されてきた薬剤はすべて 3'位の置換や変更であり、HIV がこれらの薬剤に対して耐性化するためにはこれらの核酸誘導体を DNA 伸長中に取り込まないようにすることが必要である。事実、アミノ酸コドン 65、74、151、184 等はこの 3'位認識に重要な働きをしており、これらの変異によって耐性化がもたらされることが明らかにされている。しかしながら、今回我々の同定した 4'-E-dN は 4'位置換のみで 3'位の置換や変更はなく、3'位認識部位の変異によっても、HIV は 4'-E-dN を正常ヌクレオシドと区別することができないはずである。そのため耐性株に対しても野生株と同様の効果を有すると考えられた。このことを裏付けるように 4'-E-dN 耐性ウイルスでは 3'位認識部位ではなく酵素活性中心近傍にアミノ酸置換が導入されており、さらにそのアミノ酸の立体構造の予測から 3-TC などで見られた steric hindrance による耐性化と同様の機序が考えられた。この耐性機序の解明からさらにより耐性化しにくいドラッグデザインも可能になると予想される。

5. まとめ

本研究によって、耐性ウイルスに効果を示す RTI (4'-ethynyl deoxyadenosine, 4'-E-dA) を見出し、それに対する耐性機序が steric hindrance によることを薬剤耐性から解析することができた。また、今後の薬剤開発標的の決定に重要な情報を供したと考えられた。

6. 研究発表

著書

児玉栄一、松岡雅雄、満屋裕明：ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤「ウイルス感染症との戦い」医薬ジャーナル社 322-332.

論文発表

Kodama E, Kohgo S, Kitano K, Machida H, Gatanaga H, Shigeta S, Matsuoka M, Ohru H and Mitsuya H. 4'-Ethynyl Nucleoside Analogs: Potent inhibitors active against multi-drug resistant HIV variants in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45: 1539-1546, 2001.

Tamamura H, Omagari A, Hiromatsu K, Gotoh K, Kanamoto T, Xu Y, Kodama E, Matsuoka M, Hattori T, Yamamoto N, Nakashima H, Otaka A, Fujii N. Development of specific CXCR4 inhibitors possessing high selectivity indexes as well as complete stability on serum based on an anti-HIV peptide T140. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11: 1897-1902, 2001.

7. 知的所有権の取得状況

1) 特許取得

4'-C-エチニルピリミジンヌクレオシド化合物、整理番号 YP2000-007、特許願 2000-137975

4'-C-エチニルプリンヌクレオシド化合物、整理番号 YP2000-008、特許願 2000-137982

4'-C-シアノ-2'-デオキシプリンヌクレオシド、整理番号 YP2002-003、特許願 2002-038078

2) 実用新案登録

3) その他

Table 1. Antiviral activity of infectious clones that resistant to various reverse transcriptase inhibitors

Compound	HxB2	K65R	L74V	41/215	EC ₅₀ ¹ (μM)		41/69/215/SG	MDR ³	Y181C	CC ₅₀ ² (μM)
<i>Pyrimidine analog</i>										
4'-E-T	0.36	0.53	0.68	0.43	0.18	0.14	0.44	0.12	0.13	> 200
4'-E-dC	0.0012	0.0008	0.0013	0.006	0.0024	0.0026	0.015	0.0012	0.0021	>200
4'-E-araC	0.0071	0.015	0.026	0.026	0.71	0.48	0.17	0.0079	0.016	>200
4'-Me-dC	0.0058	0.0071	0.0062	ND	0.2	0.74	ND	0.0033	ND	>200
AZT	0.022	0.02	0.02	0.3	0.01	0.017	1.6	15.3	0.014	> 100
3TC	0.71	ND	ND	ND	> 100	> 100	9.9	1.1	ND	> 100
<i>Purine analog</i>										
4'-E-dA	0.008	0.0033	0.004	0.012	0.047	0.022	0.065	0.0062	0.011	> 200
4'-E-dDAP	0.0014	0.00035	0.0007	0.0017	0.0059	0.0027	0.0041	0.001	0.0008	> 200
4'-E-dI	0.81	0.25	0.61	1.3	16.6	1.5	2.2	0.51	ND	> 200
4'-E-dG	0.007	0.001	0.0012	0.019	0.008	0.0041	0.0068	0.0048	0.01	52
DDI	3.9	12.7	19.5	3.6	10.1	ND	12.2	25	ND	> 100

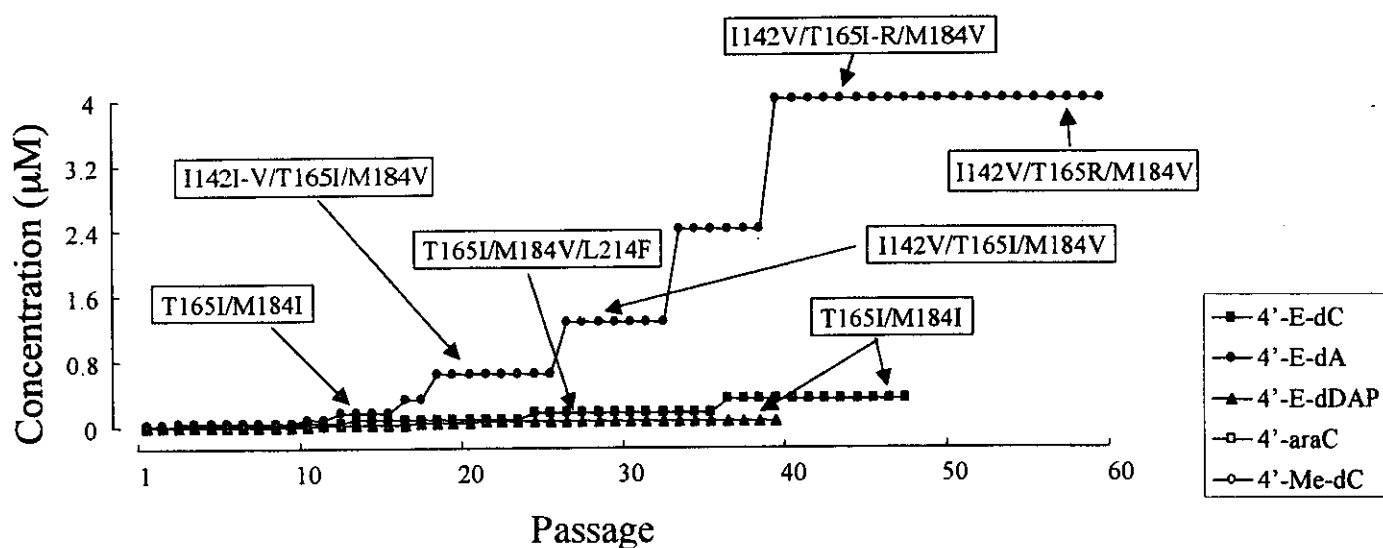
Anti-HIV activity was determined with MAGI assay as described in Materials and Method section. 1; 50 % effective concentration, 2; 50 % cytotoxic concentration, 3; multi-dideoxynucleoside reverse transcriptase resistant HIV which contain resistant mutations in RT region, Ala-62 to Val substitution (A62V), V75I, F77L, F116Y, and Q151M, 4; not determined.

Table 2. 4'-E-dA 耐性株に対する抗ウイルス効果

Compound	Virus		
	III _B	4'-E-dA ^R /P58	SI ¹
	μM		
AZT	0.032 ± 0.02	0.014 ± 0.003	0.4
3-TC	0.27 ± 0.13	> 100	> 370
4'-E-dC	0.0016 ± 0.00012	0.011 ± 0.01	7
4'-E-dA	0.0086 ± 0.0046	0.68 ± 0.4	80
4'-E-dDAP	0.0017 ± 0.0006	0.075 ± 0.034	43
4'-E-dG	0.014 ± 0.0058	0.27 ± 0.19	20

抗HIV 活性は MAGI 法を用いて測定した。
 1; selective index, NL_{WT} EC₅₀ と比較した。

Figure. 1



平成13年度

創業等ヒューマンサイエンス総合研究事業
若手研究者奨励研究報告書

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