

薬剤耐性HIV克服のための分子基盤の確立に関する研究

所 属 京都大学ウイルス研究所 感染免疫研究領域
研究者 児玉 栄一

要旨

薬剤耐性克服のために、耐性 HIV に効果を示す RT 阻害剤を見出し、その耐性機序(steric hindrance)を明らかとした。HIV 細胞融合阻害剤を用いて融合機序の解析を行い、耐性を克服するペプチドのデザインを確立した。

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。薬剤耐性 HIV 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。

このことを踏まえて平成 13、14 年度、以下の 2 点を明らかにすることを目標とした。第一に薬剤耐性 HIV に対してもその抗 HIV 活性を保持しうる核酸系 RT 阻害剤のデザイン、合成が可能であるのか、その薬剤に対して HIV は耐性化するのか、第二に、HIV 細胞融合は新規治療標的として有用であるのか、これら 2 点を解明して、得られた成果を基に現在治療において最大の問題となっている薬剤耐性 HIV 克服のための戦略を構築する。

2. 研究方法

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-β-Gal 細胞(MAGI 細胞)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。薬剤耐性 HIV クローンは、全長 HIV-1 cDNA を組替えたプラスミド pNL101 を用いて作製した。

抗 HIV 効果の測定

1) MTT 法

MTT 法には MT-4 細胞を使用した。細胞に HIV 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、酸性化プロパノールによって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

MAGI 細胞を用いて 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、1 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。

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 RT 阻害剤に対しては HIV-1_{LAI}、HIV 細胞融合阻害剤に対しては NL101 株を用いた。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。

3. 研究成果

1 耐性克服をめざした核酸系 RT 阻害剤の開発とその耐性機序

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 法にて検討した。いずれの薬剤も HIV-1 に対するときと同様に強い抗 HIV 効果を示した。

2) 薬剤耐性株への効果

既存の薬剤に対する耐性ウイルスを site directed mutagenesis 法をもちいて作製し、それらに対する効果を MAGI 法にて測定した。2',3'-Dideoxycytide (ddC)と 2',3'-dideoxyinosine (ddI)に対して耐性を示す K65R と L74V, AZT に対する M41L/T215Y, 3-TC に対する M184V、非核酸系 RT 阻害剤に対する Y181C、多剤耐性を示す 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。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 (表 1)。

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 RT 阻害剤として作用していることを明らかとした。

3) 作用機序の解明

Time of drug addition では吸着阻害剤であるデキストラン硫酸 (分子量 5000)、核酸系 RT 阻害剤である AZT、非核酸系 RT 阻害剤である MKC442 を使用し、それらの効果 4'-E-dN と 4'-E-dC、4'-E-araC のそれを比較した。その結果 4'-E 誘導体の効果 profile は AZT のそれと酷似しており、核酸系 RT 阻害剤として作用していることが考えられた。Nucleoside competition assay においては競合する生理的核酸、サイミジンによって 4'-E-dT、デオキシシチジンによって 4'-E-dC の抗 HIV 効果が低下し、この実験からも核酸系 RT 阻害剤として作用していることが考えられた。

4) 4'-E 誘導体耐性ウイルスの誘導と塩基配列の決定

Dose escalating 法にて 4'-methyl-2'-deoxycytidine (4'-Me-dC)、4'-ethynyl-2'-deoxyadenosine (4'-E-dA)、4'-E-2'-deoxycytidine (4'-E-dC)、4'-E-2'-deoxydiaminopurine (4'-E-dDAP) に対する耐性ウイルスを誘導した。4'-Me-dC は、passage 8 にて 1 μ M でも複製できるウイルスが出現してきた。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'-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。一方 4'-E-dA を使用したウイルスはこの後、I142V 変異が導入されたが耐性度に大きな影響はみられなかった。Passage 50 にて 165R 変異がみられ耐性度が上昇した。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_{IIIb}/4'-E-dA'P 58 とした。このウイルスは RT 領域に I142V/T165R/M184V といった新規の変異の組み合わせを有していた。

5) 耐性度の検討

HIV-1_{IIIb}/4'-E-dA'P 58 を MAGI 法にてアッセイしたところ、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。

HIV-1_{IIIb}/4'-E-dA'P 58 は I142V/T165R/M184V の 3 つの変異を有していたが、これらのうち、どの変異が耐性を付与するのかを明らかとするために site directed mutagenesis 法を用いて検討した。各々 1 つのみの変異では 4'-E-dA に対する感受性に変化は認められなかった。しかし、T165R/M184V の 2 つの変異が加わると感受性が低下した。更に I142V が加わることで HIV-1_{IIIb}/4'-E-dA'P 58 で見られたような感受性の低下が再現できた。よって 4'-E-dA 耐性にこれら 3 つの変異が必須であることを明らかとした。

II HIV 細胞融合機序の解明と治療標的への応用

抗ウイルス活性

HIVの細胞融合は、HIVの膜タンパクであるgp120が標的細胞膜上に存在するレセプターに結合、その構造変化を受けるとgp41のfusion peptideが細胞膜に貫通し、さらにgp41のN末側とC末側に存在する2つの α -helix構造同士が結合することで引き起こされると考えられている。NおよびC末側の2つの α -helix同士が結合するため、この部位と同じアミノ酸配列を持つペプチドは競合阻害を起こすことが知られている。そのため我々はNおよびC末側の2つの α -helixと同じ配列を有するN36とC34の抗HIV活性をMAGI法にて検討した。N36の抗HIV活性はC34と比較するとやや低い(6倍)ものの、いずれも抗HIV活性を有していた。C34はnMオーダーで効果を示し、非常に有効なペプチドであった。

C34 耐性誘導

強い効果を示したC34を用いて耐性HIVの誘導をNL101株にて試みた。C34存在下で培養を続け、passage 14にてgp41領域にQ40H変異が導入された。更にpassageを続けたところ、A31V、D37G、I38T、N127Kといった変異が導入されたが、その後A31VとQ40H変異は野生型へ戻り、I38T変異は最終的にI38Kに変化した。Passage 90まで続けたところgp41変異はD37G/I38K/N127K/L205Iとなった。

HIV 細胞融合阻害剤に対する耐性度の検討

今回分離したC34耐性HIVはD37G/I38K/N127K/L205Iを有しており、C34に対して54倍感受性が低下していた。またC34誘導体であるT-20に対しても10倍耐性化しており、交叉耐性が認められた。しかし、N36に対してはその感受性低下は見られなかった。

これらの変異のうちどの変異がC34耐性を付与するのかを検討するために各々の変異を有するHIVクローンをsite directed mutagenesis法を用いて検討した。A31V、D37G、Q40Hはpolymorphismとして報告されており、予想どおり薬剤感受性に変化はみられなかった。I38TまたはK変異が導入されていたHIVクローンはC34に対して感受性が13倍低下していた。一方N127Kを有するHIVクローンでも7倍の感受性低下が認められ、耐性にはI38とN127変異が重要な役割を果たしていることが示唆された(表2)。

変異の組み合わせでは、I38K/N127K変異を持つ組み合わせがC34感受性を有意に低下させており、特にD37G/I38K/N127Kの組み合わせのときに72倍の感受性低下を引き起こした。逆に最終的に出現したD37G/I38K/N127K/L205Iは感受性が若干回復していた。このことから、L205Iはvirus fitness (replication kinetics)に関与すると考えられた。

C34 誘導体の合成

C34誘導体を合成し、その抗HIV活性を検討した(表3)。誘導体は疎水性であるC34のアミノ酸の一部を α -helix構造を変化させない範囲で酸性(グルタミン酸:E)もしくはアルカリ性(リジン:K)に変更した(SC34)。この変更によってC34の親水性が増し、その結果、抗HIV活性が約4倍上昇した。C34耐性(54倍)であるD37G/I38K/N127K/L205Iに対しても7倍程度の感受性低下しか示さなかった。更にSC34の α -helix構造をより強固にするためにSC34アミノ酸配列を変更したSC34EKは、C34と比較し、HIVに対して12倍感受性が向上し、D37G/I38K/N127K/L205I変異HIVに対してもC34と比べ耐性度を低く抑えることが可能であった。

これらの結果からC34の親水性および α -helicityがその抗HIV活性に重要な働きをしていることが明らかとなった。

4. 考察・まとめ

平成13、14年度に渡り、研究代表者は上に述べたRT阻害剤と細胞融合阻害剤に関して研究を行った。本研究期間においてRT阻害剤に関しては多剤耐性株を含めた耐性ウイルスに対して強い抗HIV活性を有する母核同定することに成功したのみならず、その耐性機序に関して検討を加えている。また、細胞融合阻害剤に関しては、耐性機序を明らかにし、新たな耐性化しにくいペプチドの同定に成功した。

はじめにRT阻害剤に関してであるが、4'-E誘導体が何故、現在までに報告されている主な耐性株に対して強い抗HIV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 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い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。平成 14 年度から 4'-ethynyl-dDAP の 3 リン酸化体の合成を行い、酵素学的解析について熊本大学医学部と共同研究を行ない、今後、酵素学的な知見を加えることが可能となるものとする。こうした耐性機序の解明からさらに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。

次に HIV 細胞融合阻害剤に関しては、その耐性変異導入から、I38 と N127 アミノ酸が細胞融合阻害ペプチド感受性に重要な働きをしていることを明らかとしたが、興味深いことに X 線構造解析の結果から、これらのアミノ酸は阻害ペプチドが結合する部位に存在しておらず、結合面の反対側に位置している。さらに現在米国で臨床治療研究が進められている T-20 に対する *in vitro* 耐性変異に関して現在 2 つの報告 (D37V/V39M と L45K) があるが、本研究で得られた結果と同様にこれらの変異も結合面に存在していない。これらの結果から、C34 は decoy として細胞融合を阻害するという当初考えられた仮説は疑わしいといわざるを得ない。つまり、未だ提唱されていない細胞融合機序が存在する可能性がある。来年度はこの直接結合に関与しないアミノ酸変異の意義について解明を進め、あらたな細胞融合機序を提唱したい。これと併せて新規ペプチドのデザインも継続する。本研究結果から水溶性を増加させること、 α -helix 構造を強固にすることによって抗 HIV 活性を増加させることが可能であることを明らかとなった。この結果を有効に利用し、更に有効なペプチドを合成する。

本邦において現在 T-20 による HIV 感染症治療には月額約 200 万円の治療費がかかると推定されている。本研究で得られた SC34EK は T-20 の 70 倍効果があることから、投与量を大幅に減らすことが可能であり、医療費を劇的に低下させることが可能となろう。また、耐性化を抑えることも可能となり、さらに新規治療標的であることから現在問題となっている RT 阻害剤やプロテアーゼ阻害剤耐性ウイルスに対しても効果を示すはずである。平成 15 年度はこの点に関して実験データを取る予定である。

本研究によって、耐性 HIV に効果を示す RTI (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、HIV 細胞融合阻害剤の耐性機序の解析から新しい融合機序が存在することを示唆し、耐性を克服するペプチドのデザイン法を確立した。

5. 研究発表

1) 原著

Kodama E-I, Kogo S, Kitano K, Machida H, Gatanaga H, Shigeta S, Masao Matsuoka M, Ohru H, and Mitsuya H. 4'-Ethynyl nucleoside analogs: potent inhibitors active against multi-drug-resistant HIV variants *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 1539-1546, 2001.

Tamamura H, Omagari A, Hiramatsu 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 in serum based on an anti-HIV peptide T140. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11:1897-902, 2001.

Otaka A, Nakamura M, Nameki D, Kodama E, Uchiyama S, Nakamura S, Nakano H, Tamamura H, Kobayashi Y, Matsuoka M, Fujii N. Remodeling of gp41-C34 peptide leads to highly effective inhibitors of the fusion of HIV-1 with target cells. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 41:2937-2940, 2002

2) 総説

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, 2001

3) 学会発表

Kodama E, Ohru H, Gatanaga H, Shigeta S, Matsuoka M, Mitsuya H. 4'-Ethynyl nucleoside analogs: potent inhibitors active against multi-drug-resistant HIV variants *in vitro*. Eighth Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Chicago, IL. Feb, 2001.

Kodama E, Ikeuchi M, Matsuoka M, Mitsuya M. Generation of HIV variants resistant to 4'-ethynyl-2'-deoxynucleosides: A role of T165 and M184 in reverse transcriptase (RT) function. Ninth Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Seattle, WA, 2002.

児玉栄一、満屋裕明、松岡雅雄：新規の核酸系逆転写酵素阻害剤 (4'-ethynyl nucleoside) に対する HIV-1 の耐性化機序の解明：第 15 回日本エイズ学会、東京、2001 年 11 月

行木大輔、児玉栄一、松岡雅雄：HIV-1 gp41 N 末端由来のペプチド N36 に対する耐性化機序の解明：第 15 回日本エイズ学会、東京、2001 年 11 月

児玉栄一、松岡雅雄、原田恵嘉、満屋裕明：新規阻害剤 (Fusion and RT Inhibitors) に対する耐性機序：第 5 回白馬シンポジウム、長野、2002 年 7 月 26 日

蜂谷敦子、児玉栄一、池内美恵子、松岡佐織、土屋亮人、立川夏夫、安岡彰、満屋裕明、松岡雅雄、木村哲、岡慎一：新規感染患者から検出された新たなネビラピン(NVP)耐性変異について：第 5 回白馬シンポジウム、長野、2002 年 7 月 26 日

行木大輔、児玉栄一、松岡雅雄：HIV-1 gp41 N 末端由来のペプチド N36 に対する耐性化機序の解明：第 16 回日本エイズ学会、愛知、2002 年 11 月 28-30 日

蜂谷敦子、児玉栄一、池内美恵子、松岡佐織、土屋亮人、立川夏夫、安岡彰、満屋裕明、松岡雅雄、木村哲、岡慎一：新規感染患者から検出された新たなネビラピン(NVP)耐性変異について：第 16 回日本エイズ学会、愛知、2002 年 11 月 28-30 日

児玉栄一、行木大輔、池内美恵子、松岡雅雄：HIV fusion inhibitor に対する耐性機序の解明：第 13 回抗ウイルス化学療法研究会、千葉、2003 年 1 月 27-29 日

蜂谷敦子、児玉栄一、池内美恵子、松岡佐織、土屋亮人、立川夏夫、安岡彰、満屋裕明、松岡雅雄、木村哲、岡慎一：新規感染患者から検出された新たなネビラピン(NVP)耐性変異について：第 13 回抗ウイルス化学療法研究会、千葉、2003 年 1 月 27-29 日

6. 知的所有権の取得状況

特願 2000-137975 発明の名称：4'-C-エチニルピリミジンヌクレオチド化合物

特願 2000-137982 発明の名称：4'-C-エチニルプリンヌクレオチド

特願 2002-038078 発明の名称：4'-C-シアノ-2'-デオキシプリンヌクレオチド

表 2. HIV gp41由来ペプチドの抗HIV活性

Virus	Polymorphism	ddC	T-20	N36	C34	μM
WT (NL101)		0.26	0.012	0.067	0.002	
A31V	(+)	x 0.8	x 0.5	x 0.7	x 3.4] Fold of resistance
D37G	(+)	x 0.7	x 0.1	x 1.7	x 0.8	
I38T		x 1	x 13	x 0.9	x 13	
I38K		x 1.2	x 212	x 2	x 13	
Q40H		x 1	x 0.2	x 3.2	x 2	
N127K	(+)	x 1	x 2	x 2.7	x 7	
L205I		x 0.9	x 1.1	x 2	x 2	
I38T/N127K		x 1	x 14	x 0.7	x 15	
I38K/N127K		x 1.2	x 185	x 0.9	x 34	
A31V/I38T/N127K		x 1.5	x 17	x 2.3	x 11	
D37G/I38K/N127K		x 1.2	x 23	x 3	x 72	
D37G/I38K/N127K/L205I		x 0.8	x 10	x 1.2	x 54	
D37S/V39M (T-20 ^o)		x 1.1	x 5.1	x 0.9	x 7.7	
D37G/I38K/N127K/L205I		x 0.8	x 10	x 1.2	x 54	

Controlとして逆転写酵素阻害剤であるddCおよびN末端由来ペプチドN36を用いた。10倍以上の耐性を示したものを太字で示した。

表 3. C34誘導体の抗HIV効果

C34	WMEWDREINNNTSLIHSLEESQNQEKNEQELL
SC34	-----K-EE--KK-KK-----E-----K--K
SC34EK	-N-----K-EE--KK-EE--KK--E-----K--K

virus	EC ₅₀ (nM)						Fold of resistance
	ddC	T-20	C34	SC34	SC34EK	nM	
WT	264	12	2.1	0.49	0.17]	
D37S/V39M	x 1.1	x 5.1	x 7.7	x 5.2	x 8.1]	
D37G/I38K/N127K/L205I	x 0.8	x 10	x 54	x 7	x 14]	

Controlとして逆転写酵素阻害剤であるddCおよびN末端由来ペプチドN36を用いた。10倍以上の耐性を示したものを太字で示した。