

2002/236

厚生労働科学研究費補助金
創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業

「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」

平成 14 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 杉浦 亙
平成 15 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書

- HIV-1 の遺伝子発現とウィルス増殖を制御する新たな治療薬剤開発のための研究…………… 1
国立感染症研究所 エイズ研究センター 杉浦 互

II. 分担研究報告書

1. 候補阻害物質による HIV-1 感染増殖抑制能の解析…………… 6
国立感染症研究所 エイズ研究センター 杉浦 互
2. インテグラーゼ阻害剤の探索…………… 13
東京大学医科学研究所 先端医療研究センター 北村義浩
3. 薬物毒性の解析…………… 15
国立成育医療センター研究所 木村廣光
4. 微生物由来のインテグラーゼ阻害剤の探索…………… 18
北里大学薬学部微生物 田中晴雄
5. 化合物の選定及び合成…………… 26
富山化学工業株式会社 総合研究所 野村伸彦
6. プロテアーゼ阻害剤の探索…………… 29
国立感染症研究所 エイズ研究センター 松田善衛

III. 研究成果の刊行に関する一覧表…………… 34

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金(創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業)

総括研究報告書

HIV-1 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

主任研究者 杉浦 互

国立感染症研究所 エイズ研究センター 第2研究グループ長

研究要旨

多剤併用療法が標準的な治療方法として確立した今日、薬剤耐性 HIV-1 は治療失敗の原因として大きな問題となっている。この研究班では薬剤耐性を獲得した症例を救済するために、既存の治療薬剤とは交叉耐性を持たない薬剤の開発を目指している。探索する薬剤は(1)既存のプロテアーゼ阻害剤に対して耐性を獲得した HIV-1 が感受性を示し、仮に薬剤耐性を獲得した場合は増殖能力が著しく低下してしまうようなプロテアーゼ阻害物質、(2)HIV-1 インテグラーゼを標的にした HIV-1 遺伝子の組み込みを阻害する物質、そして(3)ケモカインレセプターあるいは HIV-1 envelope を標的にした HIV-1 の宿主への侵入を防ぐ薬剤である。これらの薬剤を探索するライブラリーは土壌放線菌培養上清と小分子合成化合物のライブラリーであり、いずれも過去に阻害物質の探索が行われたことがなく、新たな阻害物質の発見が期待される。平成 14 年度終了時点でプロテアーゼ阻害剤、インテグラーゼ阻害剤、そして侵入阻害剤それぞれ 13、24、10 個の合計 47 個の候補物質を見出した。

A. 研究目的

1987 年の zidovudine の登場以来、今日までに逆転写酵素阻害剤 9 種類、プロテアーゼ阻害剤 6 種類が開発実用化されてきた。多数の薬剤が開発され、積極的に薬物療法が行われるようになり疾患の予後は大幅に改善されたが、その一方で治療薬剤に抵抗性を持った薬剤耐性ウイルスが出現し、治療の成功を妨げる新たな脅威として問題となっている。初回治療症例の実に 30-40%が脱落するとされている。残念ながら現在使用されてい

る薬剤は例外なく薬剤耐性を誘導することが知られており、また薬剤間の交叉耐性が著しいため、一度何らかの薬剤に対して耐性を獲得してしまうと効果が期待できる次のプロトコルの選択肢は極めて少ないという現実がある。このような状況下、新薬、特に逆転写酵素やプロテアーゼ以外を標的にした全く新しい機序で阻害効果を発揮する新薬の登場が切望されている。このような背景から、研究班では HIV-1 複製過程の 3 つ新たなステップを標的にした薬剤の開発を目指

している。それは(1)インテグラーゼ阻害剤、(2)既存のプロテアーゼ耐性ウイルスにも有効な新たなプロテアーゼ阻害剤の開発(3)ケモカインレセプターあるいは gp120-41 複合体に結合し HIV-1 感染を防ぐ侵入阻害剤、である。

B. 研究方法

(i)スクリーニングライブラリ：

研究班では 2 つの異なるライブラリーの探索を行った。一つ目は分担研究者野村伸彦の所属する富山化学工業総合研究所が保有する約 25000 種類の小分子合成化合物ライブラリーであり、もう一つは分担研究者田中晴雄（北里大学）が保有する土壌放線菌と糸状菌の培養上清から作り出されたライブラリーである。

(ii)スクリーニング方法

分担研究者間での共同研究は極めてうまく機能しており（図 1）、以下のような作業分担を行った。

a. インテグラーゼ酵素の供給：北村義浩

b. インテグラーゼ阻害剤探索：

小分子化合物：杉浦亙、木村廣光

放線菌：田中晴雄

c. プロテアーゼ阻害剤探索：

松田善衛

d. 侵入阻害剤探索：野村伸彦

e. 候補物質の修飾：野村伸彦

尚、具体的な手法については各分担研究者報告書を参照のこと。

C. 研究成果（表 1）

(i)インテグラーゼ阻害剤のスクリーニング（小分子合成化合物）

小分子合成化合物 12000 検体の一次スクリーニングを strand transfer assay で行い、その結果 76 種類の物質が選別された。二次スクリーニングの結果さらに 11 種類までに絞り込まれた。

(ii)インテグラーゼ阻害剤探索（放線菌、糸状菌）

2000 株の放線菌、160 株の糸状菌の培養上製にたいして strand transfer assay による一次スクリーニングを実施した。その結果放線菌 180 株、糸状菌 25 株が選択された。二次スクリーニングの結果候補株は更に絞り込まれ、最終的に放線菌 7 株と糸状菌 6 株が有力な候補として見出された。

プロテアーゼ阻害剤のスクリーニング（小分子合成化合物）

小分子合成化合物 12000 検体の一次スクリーニングを VLP-ELISA で行い、その結果 123 種類の物質が選別された。二次スクリーニングの結果さらに 13 種類までに絞り込まれた。

(iii)侵入阻害剤探索（小分子合成化合物）

富山化学工業ライブラリー約 20000 検体について合胞体形成阻止アッセイを用いた一次スクリーニングを実施した。2 次スクリーニングの結果 10 種類の化合物が候補物質として見出された。見出された阻害剤の嗜好性は M-tropic 6 検体、T-tropic 1 検体、Dual-tropic 3 検体であった。

以上、最終的に合計 47 種類の薬剤候補物質を見出した。

D. 考察

二次スクリーニング終了時点で、目標としている3つの標的いずれに対しても10物質前後候補物質を見出しており、新規薬剤スクリーニングは成功した。今後は見出した化合物と類似した構造を持つ物質について集中的にスクリーニングを実施するとともに、見出されたものについては阻害効果の向上と毒性の軽減を目的に側鎖の修飾などを行うことを計画している。

また、見出された候補物質の作用機序を解析し、目的としている標的を間違いなく狙っていることを確認する必要がある。二次以降のスクリーニングについては実際に感染性をもつHIV-1を用いてIC50、IC90などの評価測定を行うことを計画している。

我々が取った方法は、タンパク高次構造を基にした酵素活性中心を狙い撃ちした3Dモデリングによる薬剤デザインではなく、巨大な化合物ライブラリーにたいしてランダムスクリーニングを実施していることから、全く新しい阻害物質を見出すか可能性が期待される。

E. 結論

薬剤候補物質のスクリーニングは多数のHIV-1増殖抑制物質を見出すことに成功した。研究は研究計画どおり順調に進行しており、新規薬剤開発が期待される。

F. 健康危惧情報

該当なし

G. 研究発表

分担研究報告書参照

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

インテグラーゼ阻害剤及び合胞体形成阻害剤について特許出願を予定している。

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図1 研究者間の協力関係と作業分担

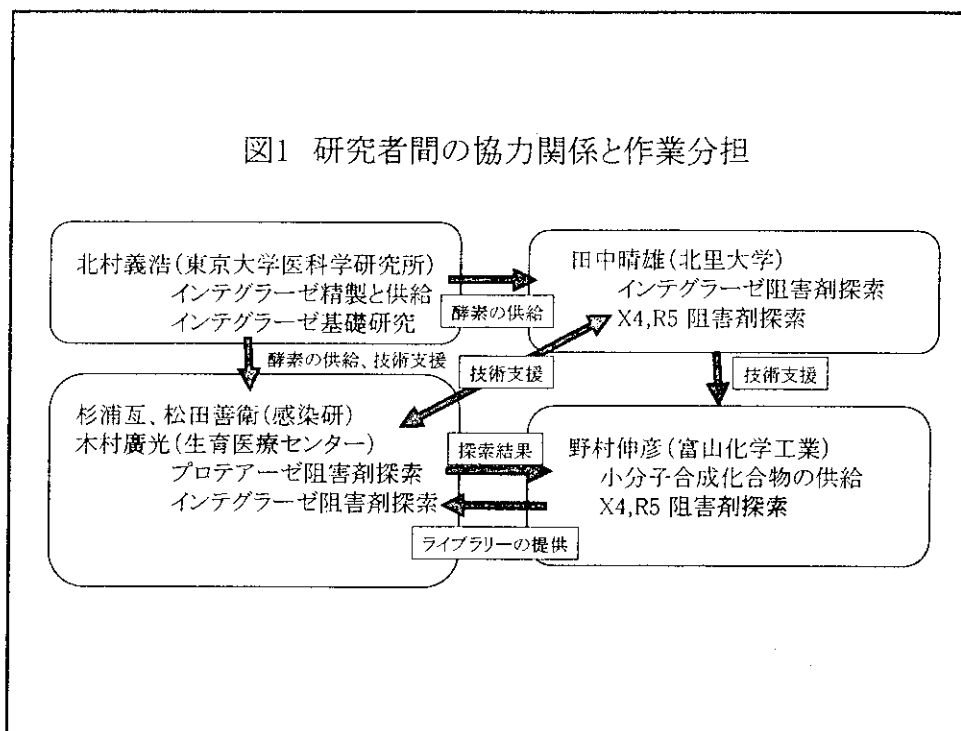


表1 新規抗HIV-1薬剤スクリーニングまとめ

標的	ライブラリー	一次結果	二次結果	平成14年度 終了時点での 候補薬剤数
プロテアーゼ	小分子合成化合物 12000検体	123検体	13検体	13
インテグラーゼ	小分子合成化合物 12000検体	70検体	11検体	11
インテグラーゼ	放線菌 2000株 糸状菌 160株	放線菌180株 糸状菌25株	放線菌7株 糸状菌6株	7 6
ケモカインレセプター	小分子合成化合物 20000検体		M-tropic 6検体 T-tropic 1検体 Dual-tropic 3検体	6 1 3
			合計	47

II. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（創薬等ヒューマンサイエンス総合研究 研究事業）

分担研究報告書

候補阻害物質による HIV-1 感染増殖抑制能の解析

分担研究者 杉浦 互

国立感染症研究所 エイズ研究センター 第2研究グループ長

研究要旨

HIV-1 インテグラーゼは新たな治療薬剤の標的となりうる酵素である。この研究では 12000 検体の小分子化合物を対象に strand transfer による阻害剤のスクリーニングを行い、候補物質の絞り込みを行った。絞り込まれた物質についてはさらに、HPB-M(a)/LTR-luc-HRL 細胞を用いた感受性検査を行いその HIV-1 増殖抑制効果の確認を行った。最終的に 11 種類のインテグラーゼ阻害剤候補化合物を見出した。これらの候補物質はさらに詳細に解析を行うと共に側鎖などの修飾を検討している。

A. 研究目的

薬剤治療の普及に伴い薬剤耐性を獲得した難治症例の増加が問題となっている。このような薬剤耐性を獲得した症例を救済するためにさまざまな変則的な治療法が試みられてきたが、その成功率は低く既存の薬剤と交叉耐性を示すことの無い新規薬剤の開発が切望されている。

このような背景からこの研究では HIV-1 の宿主ゲノムに組み込まれる過程に必須の酵素インテグラーゼを阻害し、組み込みの成立を阻止する新たな薬剤開発を目指す。

B. 研究方法

1) インテグラーゼ酵素

分担研究者北村義浩より供給。大腸菌で発現させた HXB2 インテグラーゼを精製し、in vitro strand transfer assay で用いた。

2) スクリーニングライブラリー

富山化学工業が保有する小分子化合物ライブラリーの 12000 検体を対象とした

3) インテグラーゼ阻害剤一次スクリーニング
一次スクリーニングには in vitro strand transfer assay を用いた。

high-through put 対応するためにルテニウムを用いた IGEN 社の M8 を用いた(図 1)。

マグネットビーズに固相化した受け手オリゴヌクレオチド (29bps) とインテグラーゼを予め混合し、複合体を形成させた。その後評価物質 100uM とルテニウムで標識した基質オリゴヌクレオチド (20bps) を添加し組み込み反応を行った。その後 M8 を用いてルテニウム活性を測定し組み込み効率に換算して阻害効果を評価した。

ii) インテグラーゼ阻害剤二次スクリーニング

二次スクリーニングは感染性を持つ HIV-1 (HXB2) を用いた感染実験で実施した。これには昨年度完成させたヒト T 細胞株 HPB-M(a)レポーター細胞を使用した (図 2)。この細胞には LTR 依存性のファイヤーフライルシフェラーゼと LTR 非依存のレニラルシフェラーゼという二つの異なるレポーターを持っており、ファイヤーフライルシフェラーゼ産生量で HIV-1 の感染量の評価を、レニラルシフェラーゼ産生量で細胞数の補正を行うことができる。この細胞株に HXB2 を感染させ、2 時間後にテスト化合物を添加し、5 日間培養後に各ルシフェラーゼ活性を測定し評価を行った。

C. 結果

小分子合成化合物 12000 検体について一次スクリーニングを実施した。その結果は図 1 に示すとおり組み替え活性平均 84% を中心に SD ± 24 の正規分布を示した (図 3)。このうち活性の低いほうから (すなわち阻害効果の強い) 約 0.5% に相当する 72 検体を二次スクリーニング候補薬剤として選択した。選ばれた 76 検体は HPB-M(a)細胞株と HXB2 を用いた *in vitro* 感染実験系によりウイルス増殖抑制効果の確認が行われた。テスト化合物の HIV-1 の阻害効果はファイヤーフライルシフェラーゼの産生量で、細胞毒性はレニラルシフェラーゼの産生量で評価を行った結果、ウイルス増殖阻害効果を示し、かつ細胞毒性の低い化合物を 11 種類見出すことに成功した。

D. 考察

インテグラーゼ阻害剤のスクリーニングは研究計画 2 年目が終了した時点で 11 種類のヒット化合物を得ること成功した。これらの化合物の幾つかは、過去に阻害効果が知られていない新規の化合物であり、新たなリード化合物となりうる可能性を秘めている。ただ現状では選ばれた化合物が実際にインテグレーションのみを阻害しているのかさらに検証をする必要がある。Strand transfer assay で選んできていることからインテグラーゼが標的のひとつであることはおそらく間違いの無い事実であろうが、それ以外のウイルス複製サイクルのそれ以外のステップも阻害している可能性がある。また宿主細胞そのものに対して作用している可能性も残されている。これらの可能性を除外するためには、追加の実験が必須である。また阻害活性を高め、毒性を抑えるためにはヒット化合物の修飾が必要であると考えられた。

E. まとめ

富山化学工業の小分子合成化合物ライブラリの 12000 検体をスクリーニングし、11 種類のインテグラーゼ阻害剤候補化合物を見出した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Fumihiko Yagyū, Yusei Ikeda, Koya Ariyoshi, Wataru Sugiura, Som-Arch Wongkhomthong, Michiaki Matsuda, 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 2002, 101:11-20

2) Aiko Okano, Masakazu Matsuda, Tomoko Chiba, Kenji Moriya, Kaneo Yamada and Wataru Sugiura
Discordant Movement of CD4-Positive T-Cell Count in HIV-1 Infected Patients with HARRT Failure.
Jpn. J. Infect. Dis., 2002, 55 : 62-65

3) Lay Myint, Koya Ariyoshi, Hua Yan, Alexander J. Frater, Wattana Auwanit, Panita Pathipvanith, Kaneo Yamada, Masakazu Matsuda, Tomoko Chiba, Kazunori Fujita, Myra McClure, Jonathan N.Weber, and Wataru Sugiura
Mutagenically Separated PCR Assay for Rapid Detection of M41L and K70R Zidovudine Resistance Mutations in CRF01_AE (Subtype E) Human Immunodeficiency Virus Type 1.
Antimicrobial Agents & Chemotherapy, 2002, Vol.46 : 3861-3868

4) Noriko Kobayashi, Hitomi Taguchi-Nakamura, Mieko Goto, Tetsuya Nakamura, Koichiro Nakamura, Wataru Sugiura, Aikichi Iwamoto and Yoshihiro

Kitamura
Polymorphisms and Haplotypes of the CD209L Gene and Their Association with the Clinical Courses of HIV-Positive Japanese Patients.
Jpn. J. Infect. Dis., 2002, Vol.55 : 131-133

5) L Myint, M Matsuda, Z Matsuda, Y Yokomaku, T Chiba, A Okano, and W Sugiura
HIV-1 Gag cleavage site mutations and non-cleavage site mutations are closely related in viral fitness recovery process.
Antiviral Therapy 2002, Vol.7: S63

6) K Ariyoshi, M Matsuda, H Miura, K Yamada, NS Hellmann, and W Sugiura
Unique drug resistant mutation patterns found in HIV-1 CRF01_AE (subtype E) with antiretroviral treatment failure.
Antiviral Therapy 2002, Vol.7: S150

7) Mutsunori Iga, Zene Matsuda, Akihiko Okayama, Wataru Sugiura, Seiichi Hashida, Kazuhiro Morishita, Yoshiyuki Nagai, Hirohito Tsubouchi
Rapid Phenotypic assay for human immunodeficiency virus type 1 protease using in vitro translation.
Journal of Virological Methods 2002, 106:25-37

8) 杉浦 互

HIV のゲノムと薬剤耐性

現代医療 Vo.34, No.5:153-159, 2002

9) 杉浦 互

HIV 診断技術と薬物治療の発展

ウィルス 第 52 巻 :83-87 2002

2. 学会発表

1) L Myint ,M Matsuda, Z Matsuda, Y Yokomaku, T Chiba, A Okano, K Yamada, W Sugiura

HIV-1 gag cleavage site mutations and non-cleavage site mutations are closely related in viral fitness recovery process

XI International HIV Drug Resistance Workshop. Jul.2-5,Seville-Spain

2) K Ariyoshi, M Matsuda, H Miura, K Yamada, NS Hellmann, W Sugiura

Unique Drug Resistant Mutation Patterns Found in HIV-1 CRF01_AE(subtype E) with Anti-Retroviral Treatment Failure.

XI International HIV Drug Resistance Workshop. Jul.2-5,Seville-Spain

3) W. Sugiura, F Ren, M. Matsuda, T. Chiba, M.Kakizawa, H. Tanaka.

Sequential Linking Analyses Of Within-Host Drug Resistance Evolution by Reconstructing The Serial Phylogenetic Tree Of HIV-1 Protease Under HAART

Third HIV DRP Symposium Antiviral Drug Resistance.Dec,8-11, Virginia,USA.2002

4) 杉浦 互

薬剤耐性 HIV-1 における gag の関与と薬剤耐性検査におけるその意義

第 5 回 白馬シンポジウム-最新エイズ研究 2002-白馬

5) 杉浦 互、松田昌和、千葉智子、岡野愛子、守谷研二、山田兼雄、山本直樹

多剤併用療法の導入による抗 HIV-1 薬剤耐性変異の動向

第 50 回日本ウィルス学会 2002 年 10 月 16-18 日、札幌

6) 杉浦 互

プロテアーゼ阻害剤耐性 HIV-1 で見られるプロテアーゼ領域外変異とその働き

第 16 回日本エイズ学会学術集会 2002 年 11 月 28-30 日、名古屋

7) 松田昌和、千葉智子、岡野愛子、守谷研二、富田康浩、佐藤裕徳、杉浦 互

相同組換えによる患者由来 CRF01_AE の再構築とその解析

第 16 回日本エイズ学会学術集会 2002 年 11 月 28-30 日、名古屋

8) 千葉智子、滝澤万里、松田昌和、松田善衛、横幕能行、岡野愛子、守谷研二、山田兼雄、本多三男、杉浦 互

ヒト T 細胞株を用いた新たな HIV-1 薬剤感受性検査法の確立の試み

第 16 回日本エイズ学会学術集会 2002 年 11 月 28-30 日、名古屋

9) 田中理恵、松田昌和、杉浦 互、花房秀次、
根岸昌功、加藤真吾

ジェノタイプ法とフェノタイプ法による抗レ
トロウイルス薬に対する HIV-1 の薬剤感受
性検査結果の比較

第 16 回日本エイズ学会学術集会 2002 年 11
月 28-30 日、名古屋

10) 岡野愛子、松田昌和、千葉智子、守谷研
二、山田兼雄、杉浦 互

多剤併用療法導入後の本邦における抗 HIV-1
薬剤耐性変異の動向

第 16 回日本エイズ学会学術集会 2002 年 11
月 28-30 日、名古屋

11) 須藤弘二、西澤雅子、嶋 貴子、近藤真規
子、向出雅一、蜂谷敦子、岡 慎一、加藤真吾、
伊藤 章、宇宿秀三、野口有三、相楽裕子、杉
浦 互、今井光信

同一患者検体を用いた薬剤体制感受性検査結
果の比較

第 16 回日本エイズ学会学術集会 2002 年 11
月 28-30 日、名古屋

12) 林 公一、戸谷良三、喜多恒和、稲葉憲之、
井村総一、大場 悟、葛西建郎、北村勝彦、杉
浦 互、高野政志、谷口晴記、外川正生、早川
智、塚原優己、箕浦茂樹、保田仁介、和田裕
一、大久保秀夫、長縄 聡、吉野直人

HIV 母子感染予防の臨床的研究 (1) この 3
年間における妊婦 HIV 抗体検査率の動向に
ついて

第 16 回日本エイズ学会学術集会 2002 年 11

月 28-30 日、名古屋

13) 和田裕一、戸谷良三、喜多恒和、稲葉憲
之、井村総一、大場 悟、葛西建郎、北村勝彦、
杉浦 互、高野政志、谷口晴記、塚原優己、外
川正生、早川 智、林 公一、箕浦茂樹、保田
仁介、大久保秀夫、長縄 聡、吉野直人

HIV 母子感染予防の臨床的研究 (2) 産婦人
科領域からの全国調査成績

第 16 回日本エイズ学会学術集会 2002 年 11
月 28-30 日、名古屋

14) 外川正生、戸谷良三、喜多恒和、稲葉憲
之、井村総一、大場 悟、葛西建郎、北村勝彦、
杉浦 互、高野政志、谷口晴記、塚原優己、林
公一、箕浦茂樹、保田仁介、和田裕一、大久
保秀夫、長縄 聡、吉野直人、早川 智

HIV 母子感染予防の臨床的研究 (3) 小児科
領域からの全国調査

第 16 回日本エイズ学会学術集会 2002 年 11
月 28-30 日、名古屋

15) 塚原優己、戸谷良三、喜多恒和、稲葉憲
之、井村総一、大場 悟、葛西建郎、北村勝彦、
杉浦 互、高野政志、谷口晴記、外川正生、早
川 智、林 公一、箕浦茂樹、保田仁介、大久
保秀夫、長縄 聡、吉野直人

HIV 母子感染予防の臨床的研究 (4) HIV 母
子感染予防対策の普及を目的としたマニユア
ルの改訂

第 16 回日本エイズ学会学術集会 2002 年 11
月 28-30 日、名古屋

図1 IGEN M8 を用いたstrand transfer assay

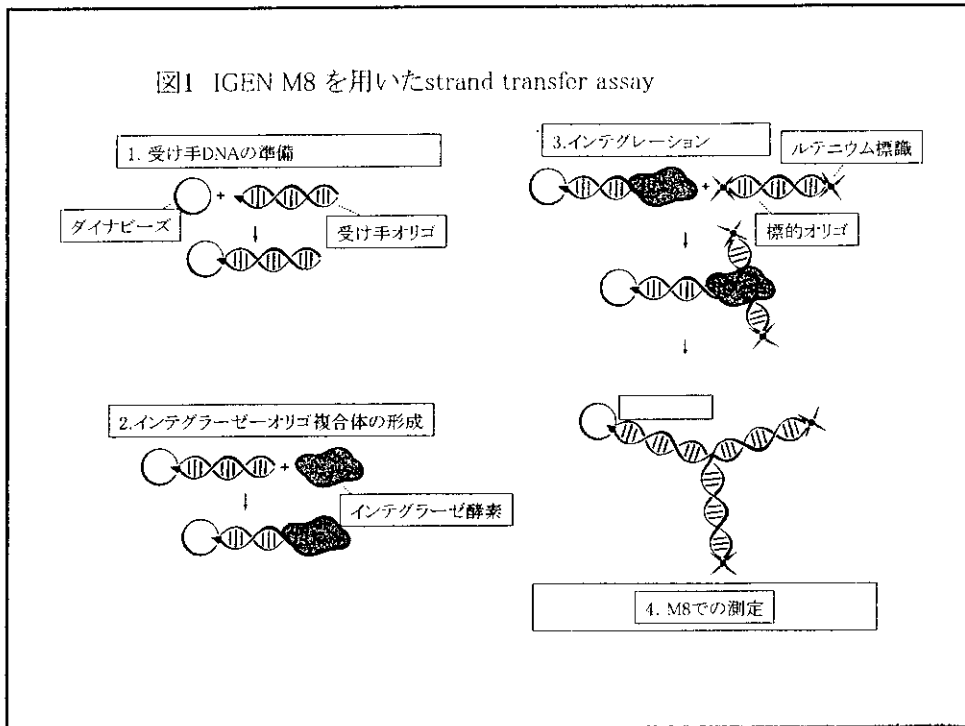


図2 レポーター細胞 HPB-M(a)/RFP-Luc-HRLの構築

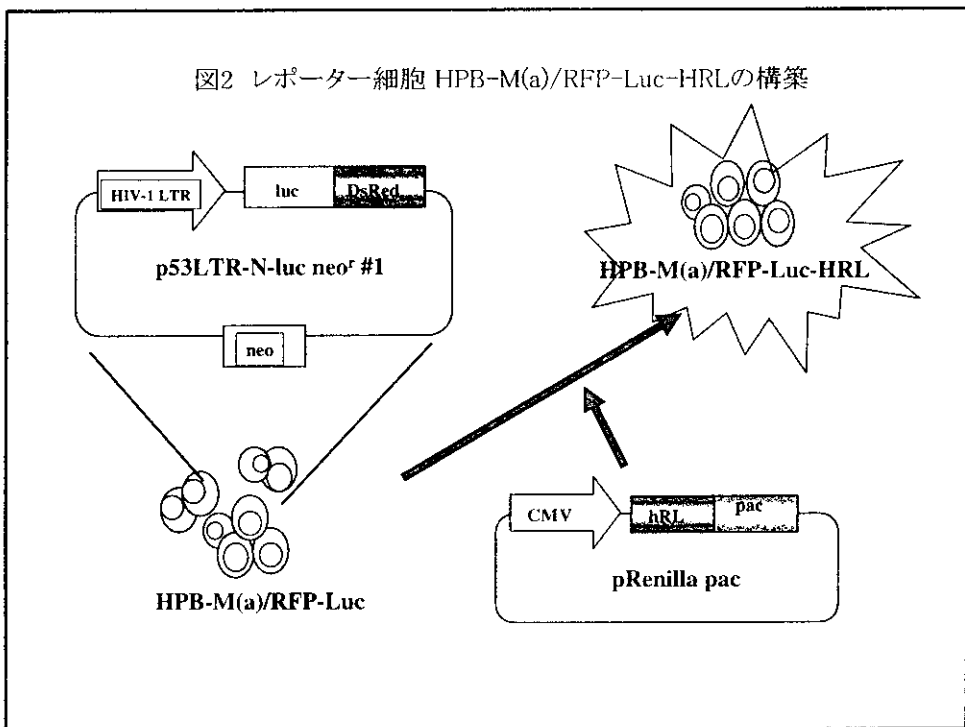
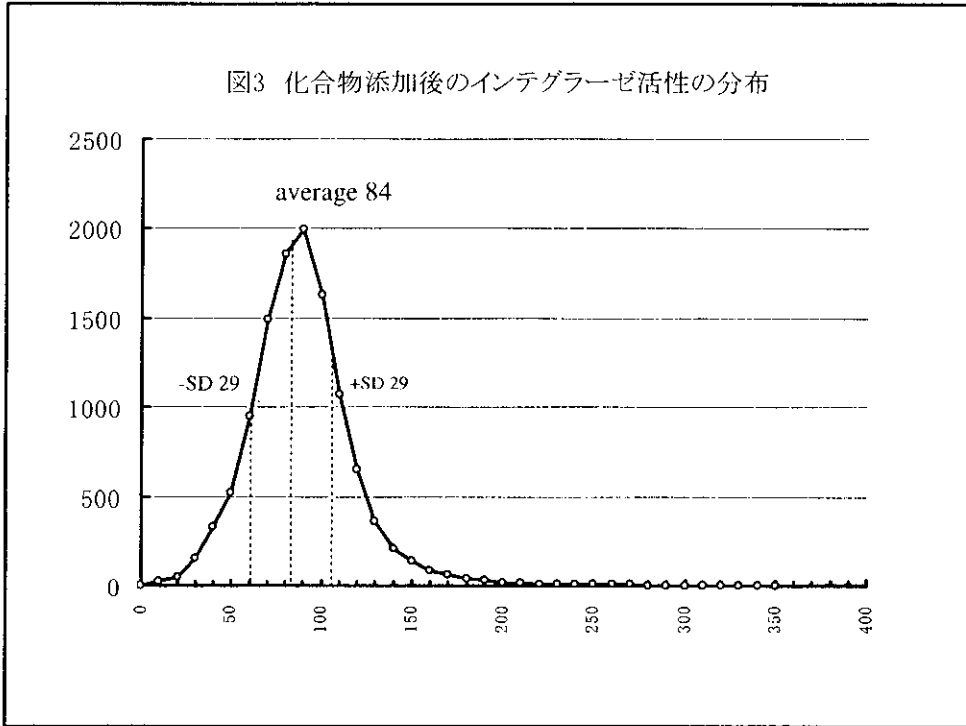


図3 化合物添加後のインテグラーゼ活性の分布



厚生科学研究費補助金（創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業）

分担研究報告書

インテグラーゼ阻害剤の探索

分担研究者 北村義浩

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 助教授

研究要旨

ヒト免疫不全ウイルス(HIV)のウイルス中央多プリン配列(cPPT)を有するHIVベクターではそうでないHIVベクターに比べて遺伝子導入効率が高いと一般には信じられてきた。しかし、逆に効率が低くなる場合が存在することを明らかにし、HIVゲノムには組み込みを抑制する塩基配列が存在することを示唆するデータを得た。この塩基配列が抑制を起こすメカニズムをさらに調べれば組み込み反応を抑制する技術の開発につながるだろう。また研究班において組み込み酵素の阻害剤のスクリーニングに必要な組み込み酵素を大腸菌で大量に合成し、精製した。

A. 研究目的

ヒト免疫不全ウイルス(HIV)は感染後細胞内でウイルスゲノムRNAを相補DNAに変換して核内に移行し宿主染色体に入り込む。このDNAへの変換以降のステップ(広義の組み込み反応)のメカニズムを明らかにし、これを制御する技術を開発することを目的とする。

B. 研究方法

(1) HIVが増殖しないように1サイクルの組み込みだけを解析するためにHIVをベースにしたベクターを作製した。従来HIVベクターにHIVのウイルス中央多プリン配列(cPPT)を挿入すると遺伝子導入効率が高まるとされてきた。そこで、HIVベクターでマーカーとしてネオマイシン耐性遺伝子を有す

るHXNベクターに従来報告されていた178塩基のcPPまたはそれよりも長い282塩基のcPPTを挿入したベクターを作製し、組み込み効率、核移行効率、遺伝子導入効率を調べた。ネオマイシン耐性細胞出現率を以て遺伝子導入効率とした。PCRで核移行のメルクマークである2LTR分子を増幅して定量し、これを以て核移行効率とした。Alu-PCR法によって宿主染色体に組み込まれた分子のみをPCRにて増幅・定量し、これを以て組み込み効率とした。

(2) 大腸菌BL21(DE3)RIL株でHIVHXB2株の組み込み酵素を発現させて精製した。N末端にMet-(His)₆-を融合してNi²⁺-affinityカラムを用いて精製した。本研究班での組み込み酵素阻害剤のスクリーニングに供した。

C. 研究成果

(1) HIVのウイルス中央多プリン配列(cPPT)を有するHIVベクターではそうでないHIVベクターに比べて遺伝子導入効率が高いと一般には信じられてきた。しかし、我々の系では282塩基のcPPT領域を挿入したHXNベクターでは逆に効率が20%に低下した。一方、従来cPPTと報告された178塩基の領域を挿入したベクターでは効率が200%程度になった。一方核移行効率はともにHXNと同じであった。さらに、遺伝子導入効率が低下した282塩基のcPPTを有するHXNベクターにおいては確かに組み込み効率が低下していた。また、上記結果は挿入したcPPT配列の向きには全く依存しなかった。

(2) スクリーニングに十分な量の組み込み酵素を精製した。

D. 考察および結論

cPPTを挿入すると遺伝子導入効率が高まる理由は核移行効率が高まるからで、各移行後の組み込み反応効率が高まるからではないとされてきた。しかし同じ系を使って、cPPTが核移行に必須であるという従来の見解は誤りで、各移行後のなんらかのステップに重要であることを明らかにした。

我々の用いた282塩基領域には存在するけれども従来の178塩基領域には存在しない場所に組み込みを抑制する領域があるというのがもっともシンプルな解釈である。そうすると、その領域にはヒトタンパク質が結合して組み込みを押さえていると予想する。今後この可能性を検証する予定である。

E. 研究発表

1) Sakuma S, Kobayashi N, Ae K, and Kitamura Y. Inhibitory and Enhancing Effects of Insertion of Central Polypurine Tract and Central Termination Sequence on Gene Expression with Vectors Derived from Human Immunodeficiency Virus Type 1. Biochemical and Biophysical Research Communications. in press. (2003)

厚生労働科学研究費補助金（創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業）

分担研究報告書

薬物毒性の解析

分担研究者 木村廣光

国立成育医療センター・研究所 共同研究管理室 室長

研究要旨：

ヒト臍帯血，並びに小動物（マウス・ラット）骨髄血液幹細胞から，HIV-1ウィルスの標的細胞の一つと考えられる，樹状細胞の大量純粋培養の確立を目的として，今日，広く使われてきた代表的サイトカインGM-CSFの樹状細胞前駆細胞への増殖・分化因子の役割を検討した。

A. 研究目的

ヒト臍帯血中のCD34陽性・血液幹細胞から，HIV-1の標的細胞である，T細胞，マクロファージ・樹状細胞を，それぞれ大量純粋培養・分離する培養技術を確立し，更に，小動物実験系の移植システムを確立する事により，抗HIV-1薬剤を評価するための実験系を確立する事を目的とする。

B. 研究方法

材料：ヒト臍帯血及び骨髄細胞由来CD34陽性細胞)及びマウス・ラット骨髄細胞を実験材料として用いた

細胞培養：GIT培地，各種サイトカイン（Flt3, SCF, IL-6, GM-CSF, IL-4, TNF- α ）を用い 1×10^5 /mlにて培養

（倫理面への配慮）：

1. ヒト由来細胞はBioWhittaker社：米国FDA

認可正常細胞提供プログラムにて調整されたものを実験材料とした。

2. 小動物の取り扱い並びに飼育・実験方法に関しては，国立成育医療センター・研究所・動物委員会・動物取り扱い規則に準じて，実験動物・実験方法に関する申請書関係類書の承諾を得て後，実験を行った。

C. 研究結果

GM-CSFリセプターノックアウトマウス骨髄細胞から，Flt3とIL-6を組み合わせる事により，GM-CSF非依存性に樹状細胞が大量培養出来ること。本細胞にNKR-P1A(CD161)のマーカ存在する事を証明

D. 考察

従来より，マウス樹状細胞の増殖因子・分化因子の必須なサイトカイン一つとして用いられ

てきたGM-CSFでは、ラット骨髄細胞から樹状細胞・前駆細胞を増殖・分化させる事は出来なかった。ヒト血液幹細胞も同様である。また樹状細胞固有の特異的細胞表面マーカーは未だ確立されているわけではないが、成熟樹状細胞がCD161を有する事は、今後の細胞分離に大いに有用な情報となると考えられた。

E. 結論

GM-CSFは樹状細胞前駆細胞の分化因子である事、一部の樹状細胞前駆細胞は、Flt3/IL-6のサイトカインの組み合わせにて、長期(2ヶ月間)に分裂増殖を繰り返し、これらの細胞は、IL-4/TNFにて、さらに成熟樹状細胞に分化できる。またこれらの樹状細胞は、従来NK細胞のマーカーと考えられてきたNKR-P1A (CD161)を表出している。

F. 健康危険情報

特記すべき事なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Guo L, Li XK, Funeshima N, Fujino M, Nagata Y, Kimura H, Amemiya H, Enosawa S, Tsuji T, Harihara Y, Makuuchi M, Suzuki S.

Prolonged survival in rat liver transplantation with mouse monoclonal antibody against an inducible co-stimulator (ICOS).

Transplantation 73(7): 1027-1032, 2002

2) Guo L, Li XK, Enosawa S, Harihara Y, Funeshima N, Kimura H, Fujino M, Makuuchi M, Suzuki S.

Prolongation of liver xenograft survival by adenovirus vector-mediated CTLA-4Ig gene transfer.

Transplant Immunology (in press)

学会発表

1) Hua Yan, Xiao-Kang Li, Tetsuo Taga, Hiroshi Amemiya, Seiichi Suzuki, Hirohisa Saito, Hiromitsu Kimura

Differential Expression of CD4 in GM-CSF Independent Human Dendritic Cells (DC) from CD34+ and CD133+ Umbilical Cord Blood Cells (UBC)

7th International Symposium on Dendritic Cells, Bamberg, Germany, September 19-24, 2002

2) Kenji Suzuki, Hiroshi Amemiya, Seiichi Suzuki, Hiromitsu Kimura

New Immunosuppressive Reagent FTY 720 Spares Autoimmune T Cells of Experimentally Induced Type 1 Diabetes In Rat

XIX International Congress of The Transplantation Society, Miami, USA, August 25-30, 2002

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録