

厚生労働科学研究研究費補助金
こころの健康科学 研究事業

成人T細胞白血病ウイルス関連ミエロパチーの
病態の解明及び治療法の開発に関する研究

平成15年度 総括研究報告書

主任研究者 納 光弘

平成16年(2004)年 3月

目 次

I.	総括研究報告	page 4
	成人T細胞白血病ウイルス関連ミエロパチーの病態の解明及び治療法の 開発に関する研究	
	納 光弘	page 6
II.	分担研究報告	page 10
1.	HTLV-I p12遺伝子の変異とHTLV-I関連疾患に関する研究	
	納 光弘	page 12
2.	アロフェニルノルスタチンを含む HTLV-I プロテアーゼ阻害剤の 合成に関する研究	
	木曾 良明	page16
3.	HTLV-I 感染価及び HTLV-I 複製阻害剤評価システムの開発 に関する研究	
	足立 昭夫	page20
4.	疾患発症モデルの作製、解析とそれを用いた治療実験に関する研究	
	吉木 敬	page24
5.	細胞接着分子を介した HTLV-I および IFN- γ 発現増強の検討に関する研究	
	中村 龍文	page28
6.	HAM/TSP における CTL による正の淘汰圧とウイルスの安定性に関する研究	
	久保田 龍二	page30
7.	HAM/TSP 発症を規定するウイルス因子、宿主因子と病態への作用機構	
	宇宿 功市郎	page32
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	page34
IV.	研究成果の刊行物・別冊	page38

I. 総括研究報告書

厚生科学研究費補助金(こころの健康科学研究事業)
総括研究報告書

成人T細胞白血病ウイルス関連ミエロパチーの病態の解明及び治療法の開発に関する研究

主任研究者 納 光弘

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科先端治療学専攻神経病学講座 教授

研究要旨: 成人T細胞白血病ウイルス関連ミエロパチーHAM の新治療法開発を目指して、発症病態解明、HTLV-I 特異的プロテアーゼ阻害剤の開発研究、開発後の新薬効果判定のための in vitro 実験系、感染モデル開発の研究、新薬剤の効果的投与のための発症予測システムの開発研究をおこなった。平成15年度の研究で抗 HTLV-I PI 開発の素地は出来上がり、開発後の効果判定のためのウイルス阻害活性測定系、モデル動物での治療実験系も完成に近づいた。発症予防、発症予測、治療開始時期選定のための HAM 病態解明、HAM 発症関連ウイルス要因、宿主要因研究でテーラーメイド医療の基盤が出来た。

分担研究者:

木曾 良明・京都薬科大学薬品化学教室・創薬科学
フロンティア研究センター 教授

足立 昭夫・徳島大学大学院医学研究科ウイルス病
原学分野 教授

吉木 敬・北海道大学大学院医学研究科病態制御
学専攻病態解析学講座 教授

中村 龍文・長崎大学大学院医学研究科感染分子
病態学・神経免疫学/神経内科学 助教授

久保田龍二・鹿児島大学医学部難治性ウイルス疾患
研究センター 助教授

宇宿功市郎・鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
健康科学専攻人間環境学講座 助教授

A. 研究目的

慢性難治性神経疾患、成人 T 細胞白血病ウイルス (HTLV-I) 関連ミエロパチー (HTLV-I-associated myelopathy: HAM) は HTLV-I 感染により発症し、痙性対麻痺および膀胱直腸障害を引き起こす。HAM 患者では HTLV-I プロウイルス DNA 量が HTLV-I 感染未発症者 (HC) の約 16 倍と顕著に増加しているのが特徴である。しかしながら、HTLV-I プロウイルス量を特異的に減少させる治療法は確立されていない。本研究ではこれを可能にする HTLV-I ウイルス特異的プロテアーゼ阻害剤 (PI) の開発を目指す。また、患者個人に対して適切な治療時期を選択、HC からの HAM 発症を予防するための、詳細な HAM の病態解明と発症予測に関する研究も行う。

B. 研究方法

①特異的 HTLV-I プロテアーゼ阻害剤の開発

合成アスパラギン酸 PI 中から、抗 HTLV-I PI 活性をスクリーニングし HTLV-I PI と既存 PI 間の特異性の差から、PI の中核となるコア構造を創製する。HTLV-I 自体から組み扱え天然型プロテアーゼの獲得を行い、高力価 HTLV-I PI を創薬する。

②HTLV-I ウイルス感染価定量法の開発

HTLV-I PI 酵素阻害活性の評価のためにウイルス感染価定量法の開発を行う。

③HAM 疾患モデルの開発、治療実験

HTLV-I 感染による脊髄症発症ラット (WKAH 系) の発症機構を、アポトーシス関連遺伝子発現変化を経時的、定量的に cDNA アレイを用いて網羅的に解析することで明らかにする。

④HAM 病態の解明、ウイルス要因の解析

HAM における HTLV-I プロウイルス量増加と細胞接着分子を介した HTLV-I 発現増強との関連の有無を検討し、HTLV-I 特異的な細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) の機能解析を行う。また、HTLV-I の特定の部位がプロウイルス量増加に関与している可能性を検討するため、ウイルス側要因の解析も行う。

⑤HAM 発症関連宿主遺伝子の同定並びに発症予測システムの開発

多変量解析を併用した HLA、non-HLA 宿主因子の解析から、HAM 発症予測と発症抑制手段を適応すべき HC の存在を明らかにする方法を開発する。

(倫理面への配慮)

今回の研究で開発された新薬剤は学内倫理委員会の承認を得たのち、インフォームドコンセントの得られた HAM 患者で、新治療薬の効果判定を行う予定である。動物の使用にあたっては感染動物実験施設で行い、各研究施設の「動物実験に関する指針」を

遵守する。発症要因解析については学内倫理委員会の承認を得て行う。

C. 研究結果及び考察

①特異的 HTLV-I プロテアーゼ阻害剤の開発

HTLV-I プロテアーゼの基質のアミノ酸配列に基づいてデザイン・合成したヘキサペプチド型阻害剤をリード化合物として、低分子化および非ペプチド化の検討を行った。その結果としてペントペプチドないしはテトラペプチド型の阻害剤 KNI-10247、KNI-10252 が強いプロテアーゼ阻害活性を有することを見いだした。

②HTLV-I ウイルス感染価定量法の開発

レポーター T 細胞株 (H9/K30Lcu1) は HTLV-I Tax に反応してルシフェラーゼを産生し、HTLV-I の細胞融合能を定量化できる。ウイルス産生細胞である MT-2 (HTLV-I) や H9/NL432 (HIV-1) 等を2種類のレポーター細胞株と混合培養することにより、信頼性の高いプロテアーゼ阻害剤スクリーニングを効率よく簡単に行えた。

③HAM 疾患モデルの開発

HTLV-I 感染脊髄症発症ラットをモデルとして疾患発症機構の解析を行い、今年度は、昨年度の感染・非感染 WKAH ラットの網羅的宿主遺伝子発現解析の結果を受けて、さらにいくつかのアポトーシス関連遺伝子の定量的リアルタイム RT-PCR を WKAH 系のみならず、非発症系感染・非感染ラット脊髄も含め検討し、SOCS-1 や IFN- γ さらには IGF-2 も疾患発症に関与する可能性を明らかにした。一方、HTLV-I 遺伝子導入ラット細胞を標的とした遺伝子治療実験も行った。

④HAM 病態の解明、ウイルス要因の解析

HAM の発症に関してウイルス側の要因として *tax* の subgroup が影響を与えていることを以前報告した。今回は *tax* に隣接した pX ORF I にコードされている p12 遺伝子の variant と HTLV-I 関連疾患との関連を調べた。p12 遺伝子のユビキチン化と関連している 88 番目の variant (88K) が HAM にみられたがその頻度は低く、また *tax* の subgroup との関連はなかった。しかし p12 の機能が低下・消失する変異が HAM に多くみられる傾向があり、p12 は感染の成立には必須でないが HTLV-I 関連疾患の発症に抑制的に働いている可能性が示唆された。

また HTLV-I Tax 領域の報告された 6 個の CTL エピトープのうち、3 個に正の選択圧を検出した。この正の選択圧部位での変異エピトープの集積は認めなかった。また、変異エピトープ特異的 T 細胞の増加も認めなかった。CTL から認識されなくなる変異エピト

ープもみられたが、この変異をもった変異ウイルスの増殖は認めず、Tax の変異自体がウイルスそのものの増殖に不利に働いている可能性が考えられた。以上の結果より、CTL は生体内でウイルス排除にはたらくており、主要なウイルスは安定しているため、これらのエピトープは CTL ワクチンのターゲットとなりえると考えられた。

⑤HAM 発症関連宿主遺伝子の同定並びに発症予測システムの開発

HAM 発症に関わる宿主の遺伝的背景とその病態への作用機構を明らかにするため、HAM 患者、無症候性キャリアー (HC) の HLA、non-HLA 遺伝子多型頻度を比較し、HLA、non-HLA 因子双方で HAM 発症抑制、HAM 発症促進に関連している複数の遺伝子を明らかにした。また、末梢血リンパ球中のプロウイルス量、プロウイルス塩基配列におよぼす宿主遺伝子型の影響を分子進化的に解析した。HAM 患者と HC で遺伝子多型頻度が異なる遺伝子については、その作用機構についても検討し、多型が HTLV-I Tax による転写活性化や血清中サイトカインの量に影響することを示した。HTLV-I 感染に対する宿主の応答効率の差が HAM 発症にかかわっている可能性が考えられた。

D. 考察

HAM 病態解明、発症予防、予後改善には HTLV-I ウイルス量制御が極めて重要である。今年度の研究では、生体内での防御機転を検討し、慢性感染症である HTLV-I 感染において、ウイルスは完全に除去されないものの、増殖した時にはウイルス排除に働いている事が示された。CTL ワクチン開発、CTL より逸脱するウイルスのメカニズムの解明は、HTLV-I 感染症撲滅のために有用であろうと考えられる。

HTLV-I プロテアーゼ阻害剤の開発の研究では、HTLV-I ウイルス感染価を評価するシステムが出来上がったこと、HTLV-I プロテアーゼ阻害剤開発において有用な物質がみいだされたことが報告された。

接着分子の機能亢進そのものが HTLV-I ウイルス発現を引き起こしていることをより詳細に解明し、HAM 疾患モデルでの発症機序の詳細をより詳しく検討できる DNA アレイシステムをもちいて更にこれまでの結果を支持する結論を得ている。

HLA を中心とした解析を行っていたが、今年度までに non-HLA 分子の解析も行ない、これらの因子を勘案すると、HAM 患者と HC を 9 割の確率で判別が可能となっている。

E. 結論

平成15年度は3年目の研究で、今年度の研究で①抗 HTLV-I PI 開発の紮地は出来、②開発後の効果判定のためのウイルス阻害活性測定系の完成、③モデル動物での治療実験系が目標達成に近づいた。④発症予防、発症予測、治療開始時期選定のための HAM 病態解明、HAM 発症関連ウイルス要因、宿主要因研究も進行がみられ、更に研究を今後さらに発展させることで、当初の目標が達成できるところまで来ているものと考えている。

F. 健康危険情報

特記すべきものはない。

G. 研究発表

主たるものを記載する

1. 論文発表

- (1) Tomaru, U., Ikeda, H., Yoshiki, T. et al. Provirus expansion and deregulation of apoptosis-regulated genes in the spinal cord of a rat model for human T lymphocyte virus type I-associated myeloneuropathy. *J Neurovirol* 9, 530-538, 2003.
- (2) Kubota R, Furukawa Y, Izumo S, et al. Degenerate specificity of HTLV-I-specific CD8+ T cells during viral replication in patients with HTLV-I-associated myelopathy (HAM/TSP). *Blood* 101, 3074-81, 2003.
- (3) Furukawa Y, Kubota R, Eiraku N, et al. Human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I)-related clinical and laboratory findings for HTLV-I-infected blood donors. *J Acquir Immune Defic Syndr* 32, 328-34, 2003.
- (4) Vine AM, Witkover AD, Lloyd AL, et al. Polygenic control of human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) provirus load and the risk of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Infect Dis*. 186:932-9, 2002.

2. 学会発表

- (1) K. Nishiyama, H. Maegawa, T. Kimura, K. Hidaka, Y. Arii, Y. Hayashi, Y. Kiso: Synthesis of Substrate-Based HTLV-1 Protease Inhibitors Containing Hydroxymethylcarbonyl (HMC) Isostere as the Transition-State Mimic. International Conference on Aspartic Proteases and Inhibitors 2003, Nov. 14-16, 2003, Kyoto, Japan

- (2) M. Saito, K. Hanada, D. Kodama, et al. Naturally Occurring Mutations of HTLV-1 Proviral Genome within HAM/TSP Patients and Asymptomatic Carriers: Relationship between Proviral Load, Host Genotype and Disease State. 11th International Conference on Human Retrovirology: HTLV. San Francisco, USA, 2003.

H. 知的所有権の出願・取得状況(予定も含む。)

現在のところ予定も含めない。

II. 分担研究報告書

HTLV-I p12遺伝子の変異とHTLV-I関連疾患

古川 良尚¹・納 光弘² 1. 鹿児島大学病院 輸血部 2. 鹿児島大学医歯学総合研究科
先進治療科学専攻 神経病学講座 神経内科・老年病学

研究要旨 HAM の発症に関してウイルス側の要因として *tax* の subgroup が影響を与えていることを以前報告した。今回は *tax* に隣接した pX ORF I にコードされている p12 遺伝子の variant と HTLV-I 関連疾患との関連を調べた。p12 遺伝子のユビキチン化と関連している 88 番目の variant (88K) が HAM にみられたがその頻度は低く、また *tax* の subgroup との関連はなかった。しかし p12 の機能が低下・消失する変異が HAM に多くみられる傾向があり、p12 は感染の成立には必須でないが HTLV-I 関連疾患の発症に抑制的に働いている可能性が示唆された。

A. 研究目的

これまで HAM の発症に関して宿主側の因子として HLA のタイプと疾患との関連が議論され、また HTLV-I ウイルス側の因子としては Trans-activator である HTLV-I の *tax* に subgroup があり、subgroup によって HAM 発症の risk が異なる事を指摘した。一方 HTLV-I p12 蛋白は HTLV-I pX 領域の *env*, Tax 遺伝子の間の open reading frame I にコードされている 99 アミノ酸からなる蛋白で、IL-2 R の β 鎖、および γ 鎖と結合出来る事、rabbit では in vivo で感染の継続に p12 が必要であること、MHC-Class I 分子と結合し、細胞上の MHC 分子の発現が低下することなどが報告されている。また p12 の 88 番目のアミノ酸は Arginine と Lysine の allele (88R/K) があり、Lysine の場合はユビキチン化されて分解が早い事が分かっている。そしてこの分解の早いリジンアシルの p12 の方が HAM で高頻度に見られるという報告もあり、今回は p12 遺伝子の変異と HTLV-I 関連疾患との関係を日本の HTLV-I について調べ、また 88R/K と *tax* の subgroup とに関係があるかを調べた。

B. 研究対象・方法

鹿児島在住の対象は HAM144 人・ATL41 人・無症候性キャリアー(AC)46 人について HTLV-I p12 遺伝子の全て(6834-7130 番)を含む塩基配列(ATK の 6801-7199 に相当する部位)を direct sequence 法にて解析しました。また以前に調べておいた Tax の subgroup との関係を見た。

また p12 は MHC-Class I 分子と結合し、細胞上の MHC 分子の発現が低下するとの報告もあるので、これまで HAM の発症リスクに影響を与えていると報告された A2, B54, Cw8 の有無と p12 遺伝子の変異との関係もみた。

C. 研究結果

図 1-1 に塩基置換を図 1-2 にアミノ酸置換を示す。

図 1-1. Alteration in pX nucleotide

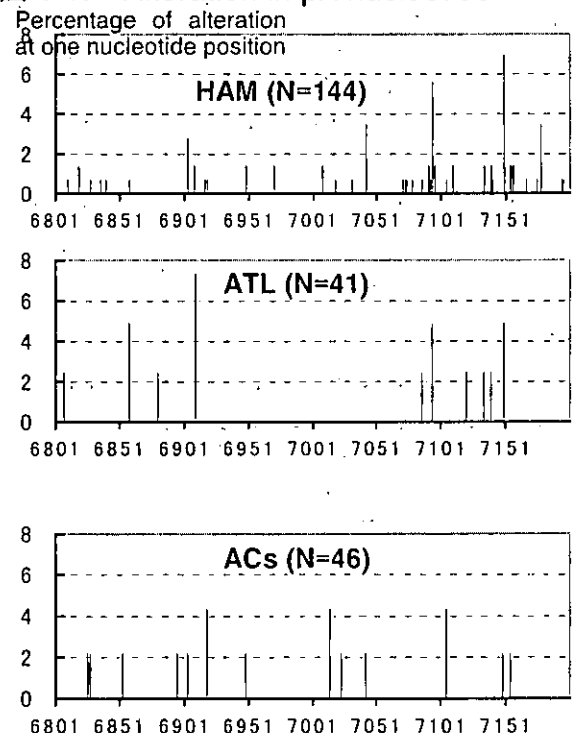
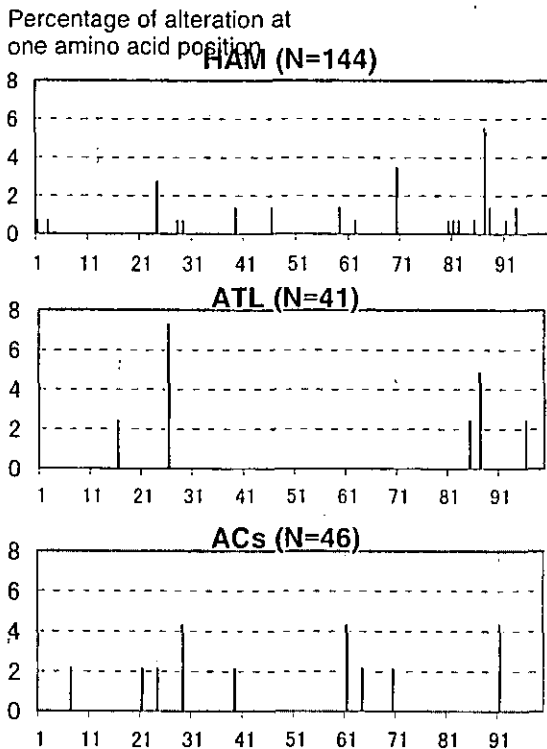


図 1-2. Alteration in p12¹ amino acid



HAM では p12 の 88 番目のアミノ酸が K である variant を 2 例に認めたが、ATL や AC では認めなかった。更に HAM では p12 の premature な stop codon を 8 例に認め、また p12 の開始 codon の変異を 1 例に認めた。ATL では p12 の premature な stop codon を 2 例に認めた。(表 1)

88 番目のアミノ酸の R/K variant と tax subgroup との関係は、K であった HTLV-I の tax は subgroup B であったが、他の tax B をもつ HTLV-I では R で、p12R/K は genotype 特異的な変化ではなかった。

表 1. Summary of amino acid changes in p12¹ protein that may influence the function

Amino acid position (Change in amino acid)	HAM/TSP (N=144)	ATL (N=41)	ACs (N=46)
1 (M to I)	1 (0.7%)	0	0
82 (W to Stop)	1 (0.7%)	0	0
87 (W to Stop)	7 (4.9%)	2 (4.9%)	0
88 (R to K)	2 (1.4%)	0	0
Total	11 (7.6%)	2 (4.9%)	0

Number of cases that have amino acid change at position described in the left column is stated. Amino acid change of p12¹ is shown in the parenthesis in the left column.

また同様に p12 に premature stop codon をもつ HTLV-I も tax subgroup との関係はなかった。

R/K アリルや stop codon が安定して存在するかを見てみると、8年から9年の経過を追ってみても安定して存在することがわかった。(表 2) また premature な stop codon をもつ HTLV-I が transmissible であるか調べるために、家族のキャリアーの HTLV-I p12 の sequence を見てみると、premature stop codon をもつ全く同一の p12 を有しており transmissible であることがわかった。(表 3)

さらに p12 の感染性に対する役割を確認する為に、p12 の開始コドンが壊れている HAM 症例の家族を調べてみた。すると同胞内にもう一人 HAM の患者がおり、他の無症候性キャリアーを含めて、この3人は p12 の開始コドンが壊れている同一の HTLV-I に感染しており、母親から感染したものと考えられ、p12 は感染の成立・維持には不要であることが強く示唆された。(表 3)

p12 が MHC の細胞上での発現を抑制するとの報告があったので、HAM の発症のリスクに影響を及ぼすと報告されている HLA-A2, HLA-B54, HLA-Cw08 の有無と p12 の stop codon の有無を HAM, ATL, AC について検討したが有為な相関は見られなかった。

Percentage of cases are shown in the parenthesis in HAM/TSP, ATL, and ACs column

表 2. 経時的に観察しても 88 番目の R/K, stop codon に変化が見られず、これらの変異をもった HTLV-I は安定に存在している。

	Date	Nucleotide change at position (Amino acid position)					
		6900(23)	6905(24)	7078(82)	7086(85)	7093(87)	7096(88)
Consensus		C (P)	T (P)	G (W)	C (L)	G (W)	G (R)
HAM 6	Jun 27 /1990	T (S)	G (S)				G (R)
	Feb 27 /1998	T (S)	G (S)				G (R)
HAM 57	Jul 4 /1990				T (F)		G (R)
	Aug 29 /1997				T (F)		G (R)
HAM 37	Apr 17 /1991					A (K)	
	Oct 11 /2000					A (K)	
HAM 217	Mar 27 /1991			A (Stop)			G (R)
	Jan 15 /2000			A (Stop)			G (R)
HAM 244	Mar 11 /1992					A (Stop)	G (R)
	Jul 12 /2001					A (Stop)	G (R)

括弧内()は p12¹ のアミノ酸を示している。

表 3. HTLV-I p12 に pre mature な stop codon をもつ HAM 患者とその家族のキャリアーの p12sequence の比較(HAM217, HAM269; HAM273) 及び p12 の開始コドンに変異を認めた HAM 患者(HAM271)とその家族のキャリアーの HTLV-I p12sequence の比較。

	Sex	Nucleotide change at position (Amino acid change at position)						
		6836(1)	6840(3)	6900(23)	6905(24)	7078(82)	7094(87)	7134
Consensus		G (M)	T (L)	C (P)	T (P)	G (W)	G (W)	G
HAM 217	F					A ¹ (Stop)		
Husband of HAM 217	M					A (Stop)		
HAM 269	M		C (L)	T (S)	G (S)		A (Stop)	C
Wife of HAM 269	F		C (L)	T (S)	G (S)		A (Stop)	C
HAM 273	F						A (Stop)	
Sister of HAM273	F						A (Stop)	
Mother of HAM273	F						A (Stop)	
HAM 271	F	A (I)						
Sister of HAM271 (AC)	F	A (I)						
Sister of HAM271 (HAM)	F	A (I)						

HAM271 家族では家族内にもう一人 HAM 患者の姉妹が見られ、また無症候性キャリアーの姉妹も見られ p12 の sequence は p12 開始コドンの変異を含めて全く同一であった。

括弧内()は p12¹ のアミノ酸を示している。

D. 考察

近年 HTLV-I p12 には 88 番目のアミノ酸に R と K の variant (p12R, p12K) が存在し、p12K は K でユビキチン化され不安定で早く分解されることが示されている。また p12K は HAM に特異的に見られるという報告や、そうではないという報告が見られている。そこで本研究ではまず日本の HTLV-I で p12R/K が HTLV-I 関連疾患でどのような頻度で見られるのかを検討し、更に我々が以前報告した HAM の発症リスクに影響を与えている tax の subgroup との関連を検討した。その結果 P12K は HAM の 2 例にしかみられずかなり低頻度であった。また p12R/K と tax の subgroup には関連がなかった。次に p12 の他の変異についてみると、表 1 にまとめたように HAM と ATL には premature な stop codon をそれぞれ 5.6% および 4.9% に認めた。これまで p12 は rabbit の感染モデルでは感染の維持に必要であるとの報告がなされてきた。そこで p12 が人の in vivo では本当に感染の成立・維持に必要であるのかを調べる目的で、premature stopcodon をもつ HAM 患者での p12 の sequence の経時的な変化、および p12 に premature stop codon をもつ HAM 患者の家族のキャリアーでの p12 の sequence を調べてみた。その結果 p12 の premature stop codon は 7-9 年見ても変化がなく感染の維持に不要であり、また HAM 家族のキャリアーでも全く HAM 患者と同じ premature stop codon が見られ、p12 に premature stop codon をもつ HTLV-I は transmissible である事が示唆された。HAM 患者の中に 1 例 p12 の開始コドンが壊れている症例があったので、さらに p12 の in vivo での役割が不可欠であるかを確かめる目的でこの HAM 患者の家族のキャリアーを調べた所、まず驚く事にもう 1 例 HAM の姉妹がおり、また一例無症候性キャリアーの姉妹がおり、これらの 3 人での HTLV-I p12 の sequence は開始コドンの変異を含めて全く同じであり、母親からこの 3 人へ感染し、感染が持続している事を示している。このことは HTLV-I p12 は人では in vivo で感染の成立・維持には不要である事を強く示している。一方ユビキチン化による HTLV-I p12 が不安定になる p12K を HAM に 2 例、premature stop codon を 8 例、開始コドンの変異を 1 例に認め、

(144 例中 11 例; 7.6%) 一方無症候性キャリアーにはこれらの変化を全く認めなかった事は、正常な p12 が HAM の発症に抑制的に働いている可能性がある。

HTLV-I p12 は in vivo ではその発現は殆ど認められないが、培養系では認められる。また HTLV-I p12 は IL-2receptor の β 鎖と γc 鎖に結合し、IL-2receptor の発現が低下する事が示されている。HTLV-I に感染した直後では HTLV-I p12 の発現が見られ、IL-2receptor の発現を低下させる事により感染細胞の増加に抑制的に働いているのかも知れない。そのため HTLV-I p12 の機能が低下・消失するような HTLV-I に感染した場合、HTLV-I が感染初期に増加してウイルス量が増え HAM などを発症しやすくなるのかも知れない。

E. 研究発表

学会発表

1. 第 65 回日本血液学会総会・第 45 回日本臨床血液学会総会 (同時期開催) 古川良尚, 納光弘 HTLV-I p12 遺伝子の p12R/K アリル及びその近傍の変異と HTLV-I 関連疾患

論文発表

1. Yoshitaka Furukawa, Ryuji Kubota, Nobutaka Eiraku, Masanori Nakagawa, Koichiro Usuku, Shuji Izumo, Mitsuhiro Osame. Human T-Cell lymphotropic virus type I (HTLV-I)-related clinical and laboratory findings for HTLV-I-infected blood donors. J Acquir Immune Defic Syndr 32: 328-334: 2003
2. Yoshitaka Furukawa, Mineki Saito, Wataru Matsumoto, Koichiro Usuku, Yuetsu Tanaka, Shuji Izumo, Mitsuhiro Osame. Different cytokine production in Tax-expressing cells between patients with human T cell lymphotropic virus type-I (HTLV-I)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis and asymptomatic HTLV-I carriers. J Infect Dis 187: 1116-1125: 2003

アロフェニルノルスタチンを含む HTLV-I プロテアーゼ阻害剤の合成

分担研究者 木曾良明 京都薬科大学教授

研究要旨：我々は HTLV-I の増殖阻害薬を目指して、HTLV-I 固有のプロテアーゼの阻害剤の創製を試みている。本年度は HTLV-I プロテアーゼの基質のアミノ酸配列に基づいてデザイン・合成したヘキサペプチド型阻害剤をリード化合物として、低分子化および非ペプチド化の検討を行った。その結果としてペンタペプチドないしはテトラペプチド型の阻害剤 KNI-10247, KNI-10252 が強いプロテアーゼ阻害活性を有することを見いだした。

A. 研究目的

我々は HTLV-I の増殖阻害薬を目指して、HTLV-I が自ら産生しその増殖に必須な HTLV-I プロテアーゼの阻害剤の創製を試みている。本年度は HTLV-I プロテアーゼの基質のアミノ酸配列に基づいてデザイン・合成したヘキサペプチド型阻害剤をリード化合物として、低分子化および非ペプチド化の検討を行い、薬物として適当な物性を有する化合物の創成をめざす。

B. 研究方法

我々は既に、組み替え型 HTLV-I プロテアーゼおよびケミカルリゲーションを用いた HTLV-I プロテアーゼ誘導体の合成に成功しており、これら酵素を用いた *in vitro* の阻害剤評価系を構築している。基質には HTLV-I プロテアーゼが切断する MA/CA 部位のアミノ酸配列に基づく人工基質 (Ala-Pro-Gln-Val-Leu*Nph-Val-Met-His-Pro-Leu, 0.2 mM) を用い 1 mM DTT, 1 M NaCl, 5mM EDTA, 0.1 M citrate buffer (pH 5.3) 中で 6h インキュベートし、HPLC にて切断された基質断片の定量を行った。上記のアッセイ系に 0.1 mM の阻害剤を添加し、基質の切断量の低下を測定することで阻害剤の評価を行った。

1) 非天然アミノ酸を導入したペンタペプチド型阻害剤の合成

昨年度の本研究において、MA/CA 部位のアミノ酸配列 (-Pro-Gln-Val-Leu*Pro-Val-Met-His-) に基づいた阻害剤の設計を行い、強い酵素阻害活性を有するヘキサペプチド型阻害剤 KNI-10166 を見いだしている。その際、基質遷移状態概念誘導体にはヒドロキシメチルカルボニル (HMC) イソスターを有する allophenylnorstatine (Aphns) を用いた。KNI-10166 の構造を基に、生体内での代謝安定性も考慮して非天然アミノ酸を含む阻害剤を設計・合成することで、さらに活性の強い誘導体

を見いだす。

2) ヘキサペプチド型阻害剤を基にした低分子型阻害剤のデザイン

昨年度の研究では、ヘキサペプチド型阻害剤が活性発現に必要な最小構造であると推定したが、阻害剤の活性上昇が実現すれば更なる低分子化が可能であるかも知れない。そこで高活性ヘキサペプチド型阻害剤をリードとし、ペンタペプチドないしはテトラペプチド型に変換した際の阻害活性を測定し、低分子化の可能性を探る。

3) 阻害剤の非ペプチド化の検討

阻害剤の代謝安定性、薬物動態等を満足できるものとするには、ペプチド骨格をできるだけ排除することで良い結果を与えることが多い。よって阻害剤を構成するアミノ酸成分を、アミノ酸以外の構造に置換して、非ペプチド化した阻害剤の創成をめざす。特に N 末端、C 末端のアミノ酸について重点的に検討を行う。その際、我々の有する HIV プロテアーゼ阻害剤群をスクリーニングして得られた情報を有効に利用する。

(倫理面への配慮)

特に必要としない。

C. 研究結果

1) 非天然アミノ酸を導入したペンタペプチド型阻害剤の合成

KNI-10166 の各ポジションのアミノ酸を、非天然アミノ酸を含む他のアミノ酸に置換した誘導体を合成した。その結果 P3 位ではフェニルグリシン、P2 位では tert ロイシンを導入した化合物が、良好な阻害活性を有することを見いだした。また P1'位は 5,5-ジメチルチアゾリジン-4-カルボキシリクアジッドが、P2'位には天然型のイソロイシン、P3'位はメチオニン、グルタミンが良いことが分かった。これらの結果を組み合わせで設

計した化合物, KNI-10220, KNI-10221 は KNI-10166 より強い HTLV-I プロテアーゼ阻害活性を有していた。

2) ヘキサペプチド型阻害剤を基にした低分子型阻害剤のデザイン

KNI-10166 の N 末端, C 末端のアミノ酸を切除した化合物を合成し, その活性を評価した。N 末 P3 位の Ile を除くと活性は大きく低下したが, C 末端 P3'位の Met を除去したものは若干の活性低下を認めるのみであった。また両端のアミノ酸を共に切除すると活性は完全に失われた。

3) 阻害剤の非ペプチド化の検討

HIV プロテアーゼ阻害剤の中で, いくつかの化合物は弱いながらも HTLV-I プロテアーゼを阻害した。これらはいずれも特徴的な P3 又は P2'/P3' リガンドを有していた。そこで HTLV-I プロテアーゼ阻害剤に上記の構造を組み込むことで, 非ペプチド化の進んだ化合物を設計・合成した。その結果 P3 位では s-マンデル酸や, フェニルコハク酸, ベンゼンスルホン酸が良好であることを見いだした。また P3/P2 を p-ヒドロキシフェニル乳酸-D-フェニルアラニンに置換したのも有望であることが分かった。一方 P2'位では, 2-メチルベンジルアミン, 1-アミノインダン有するものが比較的良好な活性を示し, P2'/P3'位では 1, 2-シクロヘキサジアミン誘導体に置換したものが強い活性を示した。

D. 考察

非天然アミノ酸を導入したペントペプチド型阻害剤として, KNI-10220, KNI-10221 を見いだすことができた。これらは KNI-10166 よりすぐれた活性を有しており, P3/P2 部位での酵素との疎水的な相互作用が増強されていると考えられる。阻害剤のサイズを小さく保ったまま活性を上昇させるには, 相互作用の質を高める必要が有るが, 上記の結果は阻害剤設計に有用な情報を与える。またこれら阻害剤は, 非天然のアミノ酸で β 位に枝分かれのあるアミノ酸を有するため, ペプチダーゼによる加水分解にかなり抵抗すると考えられる。

KNI-10166 を基にした阻害剤の低分子化の検討では, P3'位を持たないペントペプチド型阻害剤でも十分な活性を有する可能性を見いだした。しかしヘキサペプチド型阻害剤と比べると活性は若干低下しているため, 各ポジションでの相互作用を高めた阻害剤を創製する必要を認めた。

阻害剤の非ペプチド化については, いくつかの構造について良好な阻害活性を与えることを見いだした。これらを組み合わせて利用することで, 阻害剤の非ペプチド化, 特にペプチダーゼ活性に対する抵抗力を大きくできるものとする。またアミド結合の数を低減することで, 膜透過性等の

動態学的パラメーターも改善できるものと期待する。これは本質的な酵素阻害活性と共に, 抗ウイルス活性を高めるために必須な条件である。

E. 結論

HTLV-I プロテアーゼ阻害活性を増強し, 生体内安定性を考慮したヘキサペプチド型阻害剤を創製した。またこれを基に, さらに低分子化したペントペプチド相当の阻害剤の有用性を見いだした。薬物としての有用性を高めるため阻害剤の非ペプチド化を検討した結果, P3/P2 部位, P2'/P3' 部位の非ペプチド化ないしは非天然型構造へ置換した化合物に, 強い酵素阻害活性を有するものを見いだした。これらの構造の特徴を生かした, または組み合わせた阻害剤をデザインすることで, より高活性でかつより望ましい物性を持つ HTLV-I プロテアーゼ阻害剤が創製できると考える。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Y. Hamada, H. Matsumoto, T. Kimura, Y. Hayashi, Y. Kiso: Effect of the acyl groups on O-N acyl migration in the water-soluble prodrugs of HIV-1 protease inhibitor. *Biorg. Med. Chem. Lett.*, **13** (16) 2727-2730 (2003)
- 2) A. Nezami, T. Kimura, K. Hidaka, A. Kiso, J. Liu, Y. Kiso, D. E. Goldberg, E. Freire: High affinity inhibition of a family of Plasmodium falciparum proteases by a designed adaptive inhibitor. *Biochemistry*, **42** (28), 8459-8464 (2003).
- 3) Y. Kiso, S. Kasai, D. Shuto, P. Liu, S. Rajesh, T. Kotake, K. Hidaka, T. Hamada, S. Shibakawa, T. Kimura, Y. Hayashi: Design and synthesis of substrate-based β -secretase inhibitors. *Biopolymers*, **71** (3), 290 (2003)
- 4) Y. Hayashi, M. Skwarczynski, Y. Hamada, Y. Sohma, T. Kimura, Y. Kiso: A novel approach of water-soluble paclitaxel prodrug with no auxiliary and no byproduct: Design and synthesis of isotaxel. *J. Med. Chem.*, **46** (18), 3782-3784 (2003).
- 5) Y. Sohma, Y. Hayashi, T. Ito, H. Matsumoto, T. Kimura, Y. Kiso: Development of water-soluble prodrugs of the HIV-1 protease inhibitor KNI-727: Importance of the conversion time for higher gastrointestinal absorption of prodrugs based on spontaneous chemical cleavage. *J. Med. Chem.*, **46** (19), 4124-4135 (2003).
- 6) D. Shuto, S. Kasai, T. Kimura, P. Liu, K. Hidaka, T. Hamada, S. Shibakawa, Y. Hayashi, C. Hattori, B. Szabo, S. Ishiura, Y. Kiso: KMI-008, a novel β -secretase inhibitor containing a hydroxymethyl-

carbonyl isostere as a transition-state mimic: design and synthesis of substrate-based octapeptides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13** (24), 4273-4276 (2003).

- 7) M. Skwarczynski, Y. Sohma, M. Kimura, Y. Hayashi, T. Kimura, Y. Kiso: O-N Intramolecular acyl migration strategy in water-soluble prodrugs of taxoids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13** (24), 4441-4444 (2003).
- 8) 濱田芳男, 木曾良明: プロテアーゼインヒビターの設計と新機能. 新規治療薬創製のアプローチ. *化学と生物* **41** (12), 796-803 (2003).
- 9) Y. Sohma, M. Sasaki, Y. Hayashi, T. Kimura, Y. Kiso: Novel and efficient synthesis of difficult sequence-containing peptides through O-N intramolecular acyl migration reaction of O-acyl isopeptides. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, in press.
- 10) Y. Hamada, H. Matsumoto, S. Yamaguchi, T. Kimura, Y. Hayashi, Y. Kiso: Water-soluble prodrugs of dipeptide HIV protease inhibitors based on O-N intramolecular acyl migration: design, synthesis and kinetic study. *Bioorg. Med. Chem.*, in press.

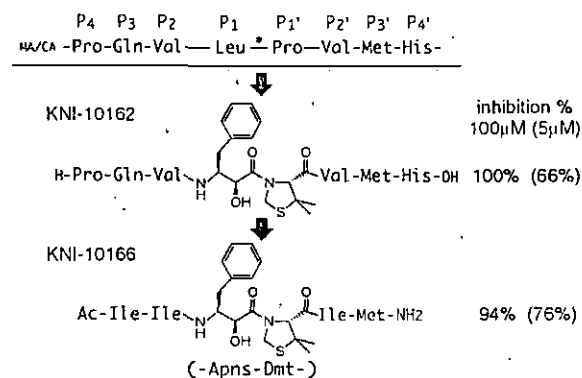
2. 学会発表

- 1) K. Nishiyama, H. Maegawa, T. Kimura, K. Hidaka, Y. Arij, Y. Hayashi, Y. Kiso: Synthesis of Substrate-Based HTLV-I Protease Inhibitors Containing Hydroxymethylcarbonyl (HMC) Isostere as the Transition-State Mimic. International Conference on Aspartic Proteases and Inhibitors 2003, Nov. 14-16, 2003, Kyoto, Japan.

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

Substrate Based HTLV-I Protease Inhibitors



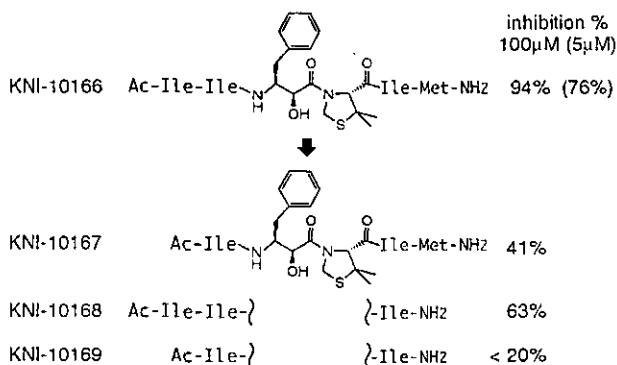
condition: 0.2mM substrate(APOVL¹(H₂NH₂PL)₂), 0.1M sodium cacrate, 5mM EDTA, 1mM DTT, 1M NaCl (pH 6.3, 37 °C).

SAR of Hexapeptide Type HTLV-I Protease Inhibitors

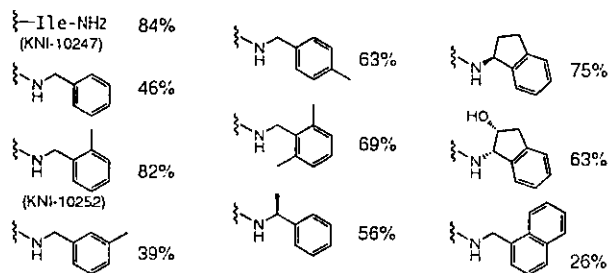
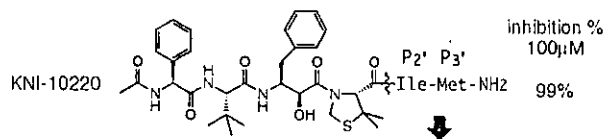
	P ₃	P ₂	P ₁	P ₁ '	P ₂ '	P ₃ '	inhibition % (100μM)
KNI-10166	Ac-Ile-Ile-	Apns-Dmt-	Ile-Met-NH ₂				94
KNI-10198	Ac-Ile-Ile-	Apns-Dmt-	Ile-Met-NH ₂				63
KNI-10199	Ac-Phe-Ile-	Apns-Dmt-	Ile-Met-NH ₂				96
KNI-10194	Ac-Ile-Ile-	Apns-Dmt-	Ile-Met-NH ₂				94
KNI-10195	Ac-Ile-Phe-	Apns-Dmt-	Ile-Met-NH ₂				37
KNI-10188	Ac-Ile-Ile-	Pns-Dmt-	Ile-Met-NH ₂				75
KNI-10189	Ac-Ile-Ile-	Pns-Val-	Ile-Met-NH ₂				55
KNI-10190	Ac-Ile-Ile-	Pns-Ile-	Ile-Met-NH ₂				35
KNI-10206	Ac-Ile-Ile-	Pns-Ile-	Ile-Met-NH ₂				70
KNI-10207	Ac-Ile-Ile-	Pns-Phe-	Ile-Met-NH ₂				67
KNI-10196	Ac-Ile-Ile-	Apns-Dmt-	Ile-Met-NH ₂				62
KNI-10197	Ac-Ile-Ile-	Apns-Dmt-	Phe-Met-NH ₂				87
KNI-10191	Ac-Ile-Ile-	Apns-Dmt-	Ile-Gln-NH ₂				97
KNI-10192	Ac-Ile-Ile-	Apns-Dmt-	Ile-Phe-NH ₂				90
KNI-10193	Ac-Ile-Ile-	Apns-Dmt-	Ile-Ala-NH ₂				91
KNI-10242	Ac-Ile-Ile-	Apns-Dmt-	Ile-Phe-NH ₂				83

Abbrev: Ile, L-leucine, Phe, phenylalanine, Pns, phenylisotaurine, Dmt, 5,5-dimethylthiazolidine-4-carboxylic acid.

Small-Sized HTLV-I Protease Inhibitors



SAR at P2' Position



分担研究報告書

HTLV-I 感染価及び HTLV-I 複製阻害剤評価システムの研究

分担研究者 足立昭夫（徳島大学大学院医学研究科ウイルス病原学分野）

研究要旨 HTLV-I プロテアーゼ阻害剤の迅速定量システムを確立した。レポーターT細胞株 (H9/K30Lcu1) は HTLV-I Tax に反応してルシフェラーゼを産生し、HTLV-I の細胞融合能を定量化できる。同様に確立された HIV-1 レポーターT細胞 (H9/H1Luc3) は、同じ原理で HIV-1 の細胞融合能を定量化できる。ウイルス産生細胞である MT-2 (HTLV-I) や H9/NL432 (HIV-1) 等を2種類のレポーター細胞株と混合培養することにより、信頼性の高いプロテアーゼ阻害剤スクリーニングを効率よく簡単に行える。

A. 研究目的

感染価を迅速に定量するシステムがないため、HTLV-I のウイルス学的解析は極めて困難である。HAM の制御のためにはウイルス複製を指標にした複製阻害剤の開発が必要であるが、適当な評価系は未だ報告されていない。本研究では HTLV-I の迅速感染価定量システムの確立を目指し、HTLV-I LTR 発現系を組み込んだリンパ球株を構築した。また、本システムの改良のため、研究が進んでいる HIV-1 の解析系を導入した。

B. 研究方法

1. ウイルス産生細胞：HTLV-I は MT-2 を、

HIV-1 は H9/NL432 を使用した。

2. レポーター細胞：HTLV-I 用に H9/K30Lcu1 を、HIV-1 用に H9/H1Luc3 を使用した。
3. 薬剤の効果の検討：感染性ウイルス産生細胞を候補薬剤（プロテアーゼ阻害剤）で1日前培養し、レポーター細胞と混合培養する。2日後の細胞内ルシフェラーゼ活性を常法により定量し、薬剤の抗ウイルス効果を検証した。
4. 細胞毒性：候補薬剤の細胞毒性は WST-8 法で調べた。
5. 薬剤コントロール：抗 HIV-1 プロテアーゼ活性があり抗 HTLV-I プロテアーゼ活性がないことが知られているサキナビルをコントロールとして用いた。