

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

HTLV-I プロテアーゼ阻害剤による HAM 治療法  
の開発ならびに HAM 発症予防に関する研究

平成 16 年度 総括研究報告書

主任研究者 納 光弘

平成 17(2005)年 3 月

## 目 次

	頁
I. 総括研究報告	1
HTLV-I プロテアーゼ阻害剤による HAM 治療法の開発ならびに HAM 発症予防に関する研究 主任研究者：鹿児島大学大学院 納 光弘	3
II. 分担研究報告	7
1. HAM 患者に対する <i>Lactobacillus casei shirota</i> 株の治療効果 鹿児島大学大学院 納 光弘	9
2. 基質遷移状態アナログとして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 京都薬科大学 木曾良明	13
3. HTLV-I 感染価及び HTLV-I 複製阻害剤評価システムの研究 徳島大学大学院 足立昭夫	17
4. 疾患発症モデルの作製、解析とそれを用いた治療実験 北海道大学大学院 外丸詩野	21
5. Allicin による HAM 患者由来 HTLV-I 感染 T 細胞株に対する障害性の検討 長崎大学大学院 中村龍文	27
6. HTLV-I 特異的細胞傷害性 T リンパ球の多様性が HTLV-I 感染におよぼす影響 鹿児島大学大学院 久保田龍二	31
7. HAM/TSP 発症を規定するウイルス因子・宿主因子の異なる民族間での比較検討 鹿児島大学大学院 宇宿功市郎	33
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	37
IV. 研究成果の刊行物・別冊	45

# I. 総括研究報告書



HTLV-I プロテアーゼ阻害剤による HAM 治療法の開発ならびに HAM 発症予防に関する研究

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 HTLV-I 特異的プロテアーゼ阻害剤の開発に取り組み、また HAM 発症予防のための研究を行なった。平成 16年度の研究で、昨年開発されたプロテアーゼ阻害剤の基本骨格を基に側鎖の検討を行い、さらに阻害活性が強く、分子量が小さい化合物を得た。新規薬剤の抗ウイルス効果判定のための、ウイルス複製に対する阻害活性測定系を確立した。治験実験のためのモデル動物を確立し、神経症状発現に与える宿主因子のいくつかを明らかにした。また、日本人とイラン人との間で HAM 患者の疾患感受性宿主遺伝子の比較検討を行い、共通する重要な発症促進因子を同定した。本年度の研究で HTLV-I プロテアーゼ阻害剤の薬剤開発を進展させ、また病態解明、発症予測、発症関連因子の研究より HAM 発症予防の基盤をさらに推し進めることができた。

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

外丸 詩野・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 講師

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 助教授

久保田龍二・鹿児島大学大学院医歯学総合研究科難治ウイルス病態制御研究センター 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の開発を目指す。また、患者

個々人に対してより適切な治療時期を選択し、HTLV-I 感染者からの 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) HTLV-I 特異的プロテアーゼ阻害剤の開発

現在までに HTLV-I プロテアーゼのアミノ酸配列に基づいて得られた合成阻害剤をさらに低分子化したテトラペプチド型阻害剤を得ている。これをもとにして、側鎖の構造変換を行い、より力価が高く、低分子の化合物の合成を目指した。

(2) HTLV-I ウイルス感染価定量法の開発

HTLV-I プロテアーゼ阻害剤の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。開発した感染価測定用の細胞で無細胞ウイルスによる影響ではなく、感染細胞での感染価測定を正確に行いうる系を樹立する。

(3) HAM 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、脊髄症発症抵抗性ラットと比較することにより、発症に関与する宿主遺伝子の発現を解析する。

(4) HAM 病態の解明、治療法の開発

NK 活性を増強する作用をもつ菌株を HAM 患者に投与し、治療効果を検討する。また、アリシンの HTLV-I 感染細胞のウイルス複製に対する抑制作用を検討する。HAM 患者の生体内でウイルス排除に働く、HTLV-I 特異的な細胞傷害性 T リンパ球の機能解析を行い、ウイルス減少に関与する因子を同定する。

#### (5) HAM 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

現在までに同定した HAM 発症疾患感受性宿主因子のうち、異なる民族的背景によっても共通する HAM 発症促進ないし抑制因子を同定することで、HAM 発症のための重要な宿主因子を明らかにする。

#### (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) HTLV-I 特異的プロテアーゼ阻害剤の開発

- ① 既に得られた化合物 KNI-10252, KNI-10267 を基本骨格とし、構造活性相関研究を行なった。側鎖の置換の検討より、さらに分子量が小さく、HTLV-I プロテアーゼ阻害活性の強いテトラペプチド型阻害剤 KNI-10455 が得られた。
- ② この分子は代謝安定性も高かった。
- ③ P2 部位の構造は他のレトロウイルスのプロテアーゼ阻害剤のデザインにも応用できる可能性がある。
- ④ これらの構造の特徴を生かし、組み合わせたプロテアーゼ阻害剤をデザインすることで、より高活性で効果的な HTLV-I 特異的プロテアーゼ阻害剤を創製できる。

#### (2) HTLV-I ウイルス感染価定量法の開発

- ① 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。
- ② この細胞株は無細胞ウイルスでは感受性がなく、HTLV-I ウイルス産生株との混合培養で感受性が認められ、感染細胞内でのプロテアーゼ阻害活性測定に適している。

#### (3) HAM 疾患モデルの開発

- ① HTLV-I 感染による WKAH 系ラットの脊髄傷害機構の一部を解明した。
- ② HAM 疾患抵抗性を示すラットの脊髄内と疾患感受性ラットとを比べ、IFN- $\gamma$  の発現亢進が認められた。この差が脊髄症状発症の感受性に関与している可能性がある。

#### (4) HAM 病態の解明、治療法の開発

- ① *Lactobacillus casei* Shirota 株を HAM 患者に投与し、HAM の神経症状の改善および NK 活性の上昇を認めた。今回はパイロットスタディであり、今後二重盲検試験が必要である。

- ② Garlic の抽出成分である allicin が HTLV-I 感染細胞株のカスパーゼ依存性アポトーシスを介して HTLV-I ウイルス量を減らすことを見出した。HAM の治療に有用である可能性がある。

- ③ 細胞傷害性 T リンパ球はオリゴクローナルな集団よりポリクローナルな集団の方が生体内でより有効にウイルスを排除していることを示し、HAM の免疫細胞治療開発への基礎となりえると考えられた。

#### (5) HAM 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

- ① 新たに IL-10 のプロモーター領域の多型性およびメタプロモテイナーゼ9のプロモーターの CA リピート長が、HAM 発症に関与する因子であることを明らかにした。
- ② 日本人の HAM とイラン人の HAM 発症因子を比較検討した。HLA-A\*02、Cw\*08 は日本人 HAM の発症抑制因子であるが、イラン人では抑制因子とはならず、両民族に共通する発症促進因子は HLA-DRB1\*0101 であった。ウイルスのサブタイプは疾患感受性の高い HTLV-I サブタイプに類似していた。

### D. 考察

HTLV-I 感染者の一部に HAM は発症し、その発症および症状増悪には HTLV-I ウイルスの増加が最大のリスクである。そのため HAM 発症予防ないし症状軽減にはウイルス量の減少ないしはウイルス除去が最も重要である。本研究では HTLV-I 特異的プロテアーゼ阻害剤の開発を中心に研究を行っている。本年度は昨年度までの研究により得られたプロテアーゼ阻害化合物をリード化合物として、さらに側鎖の詳細な検討を行い、高力価で分子量が小さい化合物が得られた。薬剤開発目標のもう一步のところまで到達したと思われる。

さらに、HTLV-I ウイルス増殖の適切な測定系が現在まではなかったが、本研究により、感度の高い *in vitro* の実験系が確立された。本測定系は無細胞ウイルスによる影響は受けないことより、感染細胞内のウイルス活性を測定できることを明らかにした。

HAM 感受性動物モデルは前年度までの研究によりすでに確立されているが、本年度の研究により、発症抵抗性動物との比較検討により IFN- $\gamma$  等の分子が発症に関与していることが明らかとなった。治療実験の際の有用なマーカーになりえると考えられた。

新たな HAM 治療の試みとして、*Lactobacillus casei* Shirota 株を HAM 患者に投与し、神経症状の改善を認めた。また、garlic の抽出成分である allicin により、HTLV-I 感染細胞のウイルスの

減少効果が見出された。これらは新たな HAM の治療法として期待できると考えられた。また、生体内における細胞傷害性 T リンパ球を利用する免疫細胞治療開発も重要と考えられる。

HAM は一部の HTLV-I 感染者に主に成人期以降に発症するため、その発症因子を明らかにし、発症予測により治療介入を行うことが HAM 発症予防に重要である。本年度も新たな HAM 発症に関与する宿主感受性遺伝子を同定した。また、日本人とイラン人の HAM の比較検討により両者に共通する発症促進因子として特定の HLA クラス II 因子を同定した。両民族に共通する HAM 発症を促進する HLA に関連した免疫学的解析は、HAM の発症機序の解明に有用であると考えられた。

#### E. 結論

平成 16 年度の研究により、HTLV-I プロテアーゼ阻害剤の開発は、より効果的で生体投与に耐える化合物の合成を目指し、さらに進展した。薬剤検定のための細胞株を用いた実験系の整備とモデル動物の HAM 発症に関与する因子の詳細な解析も行われた。発症予防、発症予測、治療開始時期選定のための HAM の病態解明、HAM 発症関連ウイルス要因、宿主要因研究も進展した。今回の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。

#### 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) H. Maegawa, T. Kimura, Y. Arii, Y. Matsui, S. Kasai, Y. Hayashi, Y. Kiso: Identification of peptidomimetic HTLV-1 protease inhibitors containing hydroxymethylcarbonyl (HMC) isostere as the transition-state mimic. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14 (23), 5925-5929 (2004).
- 2) Sabouri AH, Saito M, Lloyd AL, Vine AM, Witkover AW, Furukawa Y, Izumo S, Arimura K, Marshall SE, Usuku K, Bangham CR, Osame M. Polymorphism in the interleukin-10 promoter affects both provirus load and the risk of human T lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Infect Dis.* 190(7):1279-85. 2004
- 3) Kodama D, Saito M, Matsumoto W, Sabouri AH, Izumo S, Arimura K, Usuku K, Bangham CR, Osame M. Longer dinucleotide repeat polymorphism in matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) gene promoter which correlates with higher HTLV-I Tax mediated transcriptional

activity influences the risk of HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *J Neuroimmunol.* 156(1-2):188-94. 2004

- 4) Tsuchikawa T, Ikeda H, Kikuchi K, Tsuji T, Baba T, Ishizu A, Tanaka Y, Kato H, Yoshiki T. : Hematopoietic progenitor cells as possible origins of epithelial thymoma in a human T lymphocyte virus type I pX gene transgenic rat model. *Lab Invest.* 2004 Feb;84(2):245-52.

##### 2. 学会発表

- 1) K. Hidaka, T. Kimura, A. Kiso, Y. Tsuchiya, H. Maegawa, K. Nishiyama, Y. Hayashi, A. Nezami, E. Freire, Y. Kiso: Usefulness of allophenylnorstatine-dimethylthioprolin scaffold to aspartic protease inhibitors. 3rd International and 28th European Peptide Symposium: Bridges Between Disciplines (Prague, Czech Republic), 2004.9.
- 2) 木村徹, 前川彦一郎, 西山啓史, 日高興士, 板見綾子, 有井康博, 林良雄, 木曾良明: 基質構造に基づいた HTLV-1 プロテアーゼ阻害剤の設計と合成. 難治性疾患の克服をめざした創薬科学研究発表会(京都)2005.2.

#### 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



## HAM 患者に対する *Lactobacillus casei shirota* 株の治療効果

主任研究者 納 光弘 鹿児島大学教授

共同研究者:松崎敏男、斉藤峰輝、能勢裕久、有村公良、宇宿功市郎、出雲周二

研究要旨: HAM ではNK 活性が低く、*Lactobacillus casei* Shirota 株にNK 活性を増加させる作用があるため、HAM に対する治療効果を検討した。HAM 10 例につき *Lactobacillus casei* Shirota 株 400 億個を含む乳製品を 2 本/日、4 週間飲用し、投与前後で臨床及び検査所見を比較検討した。HAM に関し、HTLV-I プロウイルス量及び抗 HTLV-I 抗体価、リンパ球サブセット、NK 活性を投与前後で検査した。HAM10 例中全例排尿障害スコアが改善( $p=0.0085$ )、5 例で運動障害度の改善を認め、そのほか瘻性の改善も認めた。抗 HTLV-I 抗体価、HTLV-I プロウイルス量、リンパ球サブセットに有意な変化はなかったが、NK 活性が有意に増加( $p=0.015$ )した。*Lactobacillus casei* Shirota 株は HAM に対し治療効果があるものと考えられた。

### A. 研究目的

HAM に対する治療はステロイド療法、 $\alpha$  インターフェロン療法、ビタミン C 大量療法など種々施行されてきたが、根治治療はなく、慢性期における治療法に苦慮している。HTLV-I 感染細胞は HTLV-I 特異的細胞障害性 T リンパ球(CTL)と NK 細胞で抑制される。HAM 患者の 83% は NK 活性が低い事が報告されている。*Lactobacillus casei* Shirota 株(LcS)に NK 活性を増加させる作用があるため、HAM に対する治療効果を検討した。

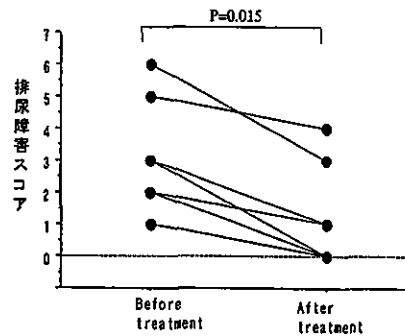
### B. 研究方法

対象は HAM 患者 10 名(男 3 名、女 7 名)で、年齢  $49.7 \pm 8.8$  歳、罹病期間  $15.4 \pm 4.8$  (10-20 年)である。現行の治療を変更しない状態でヤクルト 400(LcS 400 億個含有)を 2 本/日を飲用させた。飲用前、飲用 4 週後、神経学的診察をし、臨床所見及び検査所見を比較検討した。運動障害スコアは納の運動障害度 13 段階を用い、排尿障害スコアは頻尿、残尿、尿失禁について 0:正常、1:わずかに存在、2:明らかに存在、3:著明に存在を用い、その合計点数を示した。HAM に関し、血清抗 HTLV-I 抗体価(PA 法)、リンパ球サブセット(CD4、CD8、CXCR3<sup>+</sup>、NK 細胞、 $\gamma \delta$  T、NKG2A<sup>+</sup>、CD56)、NK 活性、HTLV-I プロウイルス量の測定を施行した。HTLV-I プロウイルス量は末梢血リンパ球から DNA を抽出し、multiplex PCR 法を用い、ABIprism7700 で測定した。臨床試験は鹿児島大学臨床倫理委員会の認可をうけ、全例インフォームドコンセントを行った。統計解析は Wilcoxon ランクテストを用いた。(倫理面への配慮)

臨床検体を扱うため、患者よりの採血に関しては十分なインフォームドコンセントのもと、書面による研究協力承諾書を頂いた。本研究は鹿児島大学倫理委員会の承諾を得た。また、患者とサンプルの非連結匿名化を行った。

### C. 研究結果

HAM10 例中全例で排尿障害スコアが改善し( $p=0.0085$ ) (図 1)、5 例で運動障害スコアが改善した(表 1)。瘻性スコアは 8 例が改善した。 $(p=0.021)$ 。全体の運動機能、排尿障害、神経学的所見の評価は有効から著効が 7 例に認めた(表 2)。



Lactobacillus casei Shirota 株投与前後の排尿障害スコアの変化

図 1 LcS 投与前後の排尿障害スコアの変化

Patient	Age years	Sex	Disease duration year	IFTLV-1 antibody titer	Provirus load Before Tx	Provirus load After Tx	OMDS Before Tx	OMDS After Tx	UDS Before Tx	UDS After Tx	Overall evaluation of efficacy
HAM1	34	F	19	x 131072	1757	1397	4	3	2	0	good
HAM2	62	M	14	x 32768	634	777	6	6	3	0	good
HAM3	50	F	7	x 2048	907	779	5	4	3	0	good
HAM4	45	F	15	x 16384	2942	471	5	3	6	3	excellent
HAM5	60	F	7	x 8192	204	194	4	4	1	0	fair
HAM6	47	M	16	x 2048	716	849	6	6	5	4	fair
HAM7	46	F	24	x 16384	276	361	4	3	2	0	good
HAM8	55	F	10	x 65536	2882	524	4	3	6	3	good
HAM9	41	F	17	x 65536	1073	1283	2	2	3	1	good
HAM10	57	F	13	x 32768	245	387	4	4	2	1	fair

LcS: *Lactobacillus casei* Shirota, OMDS: Osame's motor disability score UDS: urinary disturbance score

Tx: therapy

A: LcS投与4週後のHTLV-I proviral loadの変化 p=0.401 Wilcoxon signed rank test

B: 評価は神経内科医が診察にて運動機能、排尿障害、神経学的所見において主に改善したことを基にしている

表 1 HAM10 例に対する LcS の臨床効果

検査所見では抗 HTLV-I 抗体価、リンパ球サブセット、HTLV-I プロウイルス量に有意な変化はなかった。NK 活性が有意に増加(p=0.015)した(表 2)。

cell type	before treatment		after treatment		P	
	Absolute count cells x 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	Frequency %	Absolute count cells x 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	Frequency %	Absolute count	Frequency
CD4*	5.78±4.54	26.38±12.71	5.66±3.16	27.13±11.09	0.674	0.575
CD8 <sup>Na</sup> **	3.89±1.61	20.47±6.93	4.72±2.02	22.60±9.01	0.208	0.327
naïve in CD8 <sup>Na</sup> **	1.13±1.71	5.24±7.11	0.91±1.08	4.25±4.08	1.000	0.674
memory in CD8 <sup>Na</sup> **	4.84±2.80	24.05±6.44	5.25±2.13	24.47±7.37	0.401	0.889
effector in CD8 <sup>Na</sup> **	7.56±4.46	37.35±10.81	7.57±2.56	36.10±9.93	1.000	0.674
effector/memory in CD8 <sup>Na</sup> **	5.99±2.36	33.38±14.54	7.21±3.47	34.07±13.78	0.283	0.889
CXCR3*	4.38±2.38	21.07±4.28	3.93±1.18	18.78±6.57	0.735	0.388
CXCR3* in CD4*	2.03±2.13	6.26±5.06	1.80±0.75	7.46±3.28	0.886	0.612
γ δ T*	0.40±0.25	2.28±1.46	0.47±0.34	2.35±1.83	0.208	0.674
NKG2A*	0.72±0.43	3.88±1.84	0.74±0.37	3.84±2.39	0.674	0.889
CD56*	3.14±1.32	16.63±11.33	3.38±1.73	16.13±8.81	0.575	0.635
NK cell activity (%)	26.54±16.13		39.43±15.48			0.015
HTLV-I provirus load	867.38±874.62		641.75±343.12			0.401

P: Wilcoxon signed rank test

表 2 LcS4 週間投与前後の末梢血リンパ球の細胞成分、HTLV-I プロウイルス量

#### D. 考察

臨床的に痙性、排便障害、頻尿、筋力増強に有効で、運動障害(5/10)及び、排尿障害スコアの改善(10/10)を認め、同時に NK 活性を有意に増加させた。特に NK 活性が低い症例ほど増加の変化は大きかった。今回の結果は LcS が NK 活性を増加させる作用があることを支持している。LcS には細胞性障害性 T 細胞やマクロファージを活性化したり、単純ヘルペスウイルスやインフルエンザウイルスに対する抑制効果が知られている。HAM に対する LcS の作用メカニズムは不明だが、LcS の NK 活性増加が細胞障害性分子を調節した可能性がある。LcS が HAM に対し治療効果があったことは、今後、副作用のない治療薬として、慢性期の HAM で使える可能性がある。今回、オープン試験のため、今後、二重盲検試験で更に効能を検討し、メカニズムについての検討が必要であると考えられた。

#### E. 結論

*Lactobacillus casei* Shirota 株は HAM に対し治療効果があるものと考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Saito M, Usuku K, Nobuhara Y, Matsumoto W, Kodama D, Sabouri AH, Izumo S, Arimura K, Osame M.

Serum concentration and genetic polymorphism in the 5'-untranslated region of VEGF is not associated with susceptibility to HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in HTLV-I infected individuals. J Neurol Sci. 219(1-2):157-61. 2004 Apr 15

2) Sabouri AH, Saito M, Lloyd AL, Vine AM, Witkovar AW, Furukawa Y, Izumo S, Arimura K, Marshall SE, Usuku K, Bangham CR, Osame M. Polymorphism in the interleukin-10 promoter affects both provirus load and the risk of human T lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. J Infect Dis. 190(7):1279-85. 2004 Oct 1

3) Kodama D, Saito M, Matsumoto W, Sabouri AH, Izumo S, Arimura K, Usuku K, Bangham CR, Osame M. Longer dinucleotide repeat polymorphism in matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) gene promoter which correlates with higher HTLV-I Tax mediated transcriptional activity influences the risk of HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). J Neuroimmunol. 156(1-2):188-94. 2004 Nov

4) Umehara F, Nagatomo S, Yoshishige K, Saito M, Furukawa Y, Usuku K, Osame M. Chronic progressive cervical myelopathy with HTLV-I infection: Variant form of HAM/TSP? Neurology. 63(7):1276-80. 2004 Oct 12

5) Furukawa Y, Usuku K, Izumo S, Osame M. Human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) p12I is dispensable for HTLV-I transmission and maintenance of infection in vivo. AIDS Res Hum Retroviruses. 20(10):1092-9. 2004 Oct

##### 2. 学会発表

1) 古川良尚, 納 光弘. HTLV-I p12I 遺伝子の変異と HTLV-I 関連疾患. 第 45 回日本神経学会総会 2004. 5. 東京

2) 久保田龍二, 古川良尚, 出雲周二, 納 光弘.

HAM における CTL による正の選択圧とウイルスの安定性。第 45 回日本神経学会総会 2004. 5. 東京

3) 松崎敏男, 齊藤峰輝, 早川 仁, 納 光弘, Xing Huiqin, 宇宿功市郎, 出雲周二。HAM における EB ウイルスの慢性活動性持続感染の影響。第 45 回日本神経学会総会 2004. 5. 東京

4) 齊藤峰輝, 宇宿功市郎, 久保田龍二, 出雲周二, 有村公良, 納 光弘。HAM/TSP の IFN- $\alpha$  治療に伴う末梢血 T 細胞サブセット・HTLV-I ウイルス量の変動と臨床症状。第 45 回日本神経学会総会 2004. 5. 東京

5) 児玉大介, 齊藤峰輝, 池上眞由美, 梅原藤雄, 出雲周二, 宇宿功市郎, 納 光弘。HAM 患者における MMP-9 (Matrix metalloproteinase-9) promoter 領域 d(CA)n repeat 長と CD4+T 細胞遊走能。第 45 回日本神経学会総会 2004. 5. 東京

6) 延原康幸, 齊藤峰輝, Amir H. Sabouri, 出雲周二, 有村公良, 宇宿功市郎, 納 光弘。HAM における VEGF promoter 634C/G 多型の検討。第 45 回日本神経学会総会 2004. 5. 東京

#### 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。



基質遷移状態アナログとして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創製を試みている。我々は既に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・合成した阻害剤を低分子化することによりテトラペプチド型阻害剤KNI-10252を見いだしている。今回P3, P2, P2', P3'の各々の部位の構造変換を行った結果、テトラペプチド型阻害剤でKNI-10252より分子量が小さく活性の強い化合物KNI-10455を見いだすことができた。

#### A. 研究目的

我々はHAM治療あるいは発症予防を目的とした、HTLV-Iの増殖抑制効果を有する化学療法剤の創製を目指す。化学療法ターゲットとしてHTLV-Iが自ら産生しその増殖に必須なHTLV-Iプロテアーゼに着目し、その阻害剤創製を試みている。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・合成した阻害剤をさらに低分子化したテトラペプチド型阻害剤KNI-10252をリード化合物として、さらなる低分子化および非ペプチド化の検討を行い、活性の増強と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

我々が既に構築したin vitroの阻害剤評価系を用いて、今回デザイン・合成した阻害剤の活性を測定する。

##### 阻害剤評価

酵素としては組み替え型HTLV-Iプロテアーゼあるいはケミカルリグーションを用いて合成したHTLV-Iプロテアーゼ誘導体を用い、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合成基質(Ala-Pro-Gln-Val-Leu\*Nph-Val-Met-His-Pro-Leu, 0.2 mM)を用いた。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うものとし、上記のアッセイ系に0.1 mMあるいは0.005 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。

##### 阻害剤のデザインと合成

我々は既に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HIVプロテアーゼ阻害剤で実績のある、ヒドロキシメチルカルボニル(HMC)イソスターを有するallophenyl-norstatine (Apsns)を用いた。本化合物を基に低分子化、非天然アミノ酸の導入、非ペプチド化を行った結果、テトラペプチド型阻害剤KNI-10252を見いだした。KNI-10252はペンタあるいはヘキサペプチド型阻害剤に比べると若干活性が弱い、ペプチド結合の数が少なく、分子量も比較的小さめであるため、リード化合物として適当であると判断し、主にP2'の構造活性相関研究の基本骨格として用いた。またトリペプチド型の阻害剤KNI-10267は活性は強いとはいえないが、合成および活性評価の点で便利である為、P3, P2の構造活性相関のリード化合物として用いることにした。

各ポジションの構造変換は、酵素との相互作用を維持しながらペプチド結合の数を減らすことを主たる目標とした。また活性を維持できる範囲で分子サイズを小型化することにも重点を置いた。

化合物の合成は、Boc基を一時的アミノ保護基に用いる一般的な液相法にて行い、すべて逆相HPLCにて精製を行った後、活性の評価に用いた

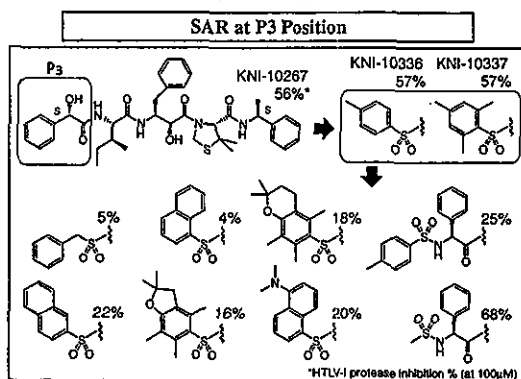
(倫理面への配慮)

特に必要としない。

#### C. 研究結果

1) P3位を変換したトリペプチド型阻害剤の合成  
トリペプチド型阻害剤KNI-10267のP3位マン

デル酸ユニットを他の置換基に変換した化合物を合成した。ベンゼンスルホン酸誘導体に置換した化合物KNI-10336やKNI-10337がマンデル酸と同等の活性を有していることから、他のスルホン化合物を導入し、P3の最適化を試みた。ペプチド結合をスルホンアミドに変換することで、生体内安定性の向上した阻害剤を得ることができると考えたが、今回KNI-10267を上回る活性を持つものを見いだすことはできなかった。この結果からP3位には比較的小さめのアロマチックな官能基が望ましいと考えられ、これに続く構造変換の指針が示された。一方P3位をメタンスルホンフェニルグリシンに置換したものはリード化合物より若干優れた活性を示した。



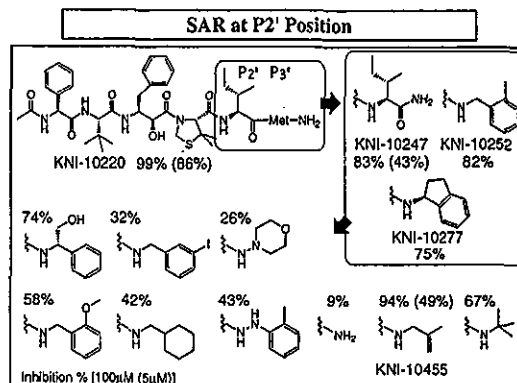
## 2) P2'位にD型アミノ酸を有する阻害剤の合成

我々は既にP2'位がD-フェニルアラニンで置換された化合物に、KNI-10267に匹敵する阻害活性を有するものがあることを見いだしている。D型アミノ酸を導入したペプチド性化合物は生体の酵素に対する安定性が優れたものになるため、医薬品として適用する際有利に働くことが期待できる。そこでD-フェニルアラニンやD-ロイシン、D-tert-ロイシン等を導入した化合物を合成した。結果としてリード化合物より優れたものは見いだせなかったが、これらは弱いながらも活性を維持しており、構造最適化による活性強化の可能性があったことが分かった。

## 3) テトラペプチド型阻害剤を用いたP2'位の構造活性相関

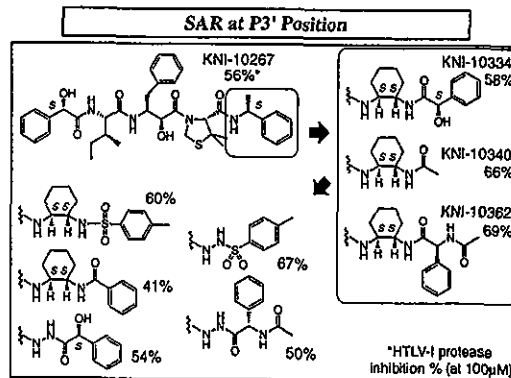
テトラペプチド型阻害剤KNI-10252は分子サイズが小さめで、比較的強い活性を有する化合物である。この化合物のP2'位は2-メチルベンジルアミンが導入されており、これを他の官能基に置換することで更なる活性の上昇を目指した。P2'位での疎水結合を維持したうえで、分子サイズの縮小、新たな特異的相互作用基の導入、代謝安定性等を考慮し阻害剤をデザイン・合成した。その結果、P2'位は比較的小型の疎水性官能基でも相互作用を維持できることが分かり、 $\beta$ -メタリルアミンを導入した化合物KNI-10455

が、分子量を低減した上でより強い酵素阻害活性を有していることを見いだした。本化合物を見いだせたことは更なる低分子化の為にリード化合物創出として、非常に高い価値のあるものと考えられる。



## 4) P3'位を導入した阻害剤の合成

トリペプチド型の阻害剤KNI-10267のC末側を延長し、新たにP3'位を導入した化合物の合成を行った。このようなデザインは分子量の増大を招き、医薬品化合物としては不利にならざるを得ないが、相互作用部位の増加による親和性上昇、すなわち活性強化が期待できる。種々の官能基を含む阻害剤の合成を行ったところ、シクロヘキサンジアミンあるいはヒドラジンを有し、末端の窒素原子をアシル化、スルホン化したものが、リード化合物より強い活性を有していることが確認できた。今回合成した化合物では、活性の上昇は期待したほどではなく、分子量増加に伴うデメリットを上回るほどではなかったと考えられるが、さらに構造変換を行うことで活性の上昇が期待できることが分かった。



## D. 考察

トリペプチド型阻害剤KNI-10267をリードとしたP3位の構造活性相関から、HTLV-IプロテアーゼのP3位には比較的小さめのアロマチック環が望ましいことが分かった。このことは酵素のS3ポケットがHIVプロテアーゼと比べると小さめであるが、性質は似ていることを示唆する。S3ポケットが小さくなった原因はS3を構成するアミノ酸がHTLV-IではValからTrpに変化していることが原



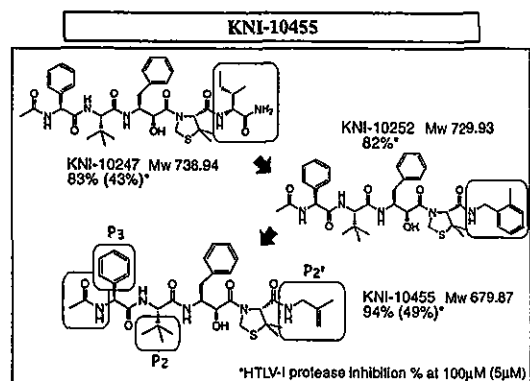
因であろうと考えられる。この結果よりP3位には単環のアロマチック基を持つ阻害剤が有望であり、さらに今後はヘテロ原子を有する様な化合物をデザイン・合成したい。

一方、P2'位の構造活性相関研究では、 $\beta$ -メタリルアミンを導入した化合物KNI-10455が強い酵素阻害活性を有することを見いだすことができた。この化合物は分子サイズの縮小、代謝安定性の面でも高く評価できると考えており、本物質類似の官能基をサーチすることでより有用な化合物が創製できると期待する。また比較的合成容易な本化合物は、P3、P2の構造活性相関研究のリード化合物としても有用である。さらに本化合物の有するアリル型構造は特徴的であり、レトロウイルスのプロテアーゼがC2対称であることを考慮すると、P2位のデザインにも応用できると考えられる。

今後は上記2点を考慮した上で、膜透過性等の動態学的パラメーターも改善した阻害剤の設計・合成を進めていきたい。

## E. 結論

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・合成した阻害剤を基に、低分子化した化合物KNI-10252, KNI-10267をリードとし、構造活性相関研究を行った。P3, P2, P2', P3'の各々の部位の構造変換を行った結果、リード化合物KNI-10252より分子量が小さく活性の強いテトラペプチド型阻害剤KNI-10455を見いだすことができた。本化合物は、今後の阻害剤設計のリードとなるだけでなく、デザイン上の重要な指針を与えた。



## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) T. Kotake, S. Rajesh, Y. Hayashi, Y. Mukai, M. Ueda, T. Kimura, Y. Kiso: A new polymer-supported Evans-type chiral auxiliary derived from  $\alpha$ -hydroxy- $\beta$ -amino

acid, phenylnorstatine: Synthesis and application in solid-phase asymmetric alkylation reactions. *Tetrahedron Letters*, 45 (18), 3651-3654 (2004).

- 2) S. Vega, L.-W. Kang, A. Velazquez-Campoy, Y. Kiso, M. Amzel, E. Freire: A structural and thermodynamic escape mechanism from a drug resistant mutation of the HIV-1 protease. *Proteins: Str., Funct. & Bioinformatics*, 55 (3), 594-602 (2004).
- 3) Y. Sohma, M. Sasaki, Y. Hayashi, T. Kimura, Y. Kiso: Design and synthesis of a novel water-soluble A $\beta$  1-42 isopeptide: an efficient strategy for the preparation of Alzheimer's disease-related peptide, A $\beta$ 1-42, via O-N intramolecular acyl migration reaction. *Tetrahedron Letters*, 45 (31), 5965-5968 (2004).
- 4) M. Doi, T. Kimura, T. Ishida, Y. Kiso: Rigid backbone moiety of KNI-272, a highly selective HIV protease inhibitor: methanol, acetone and dimethylsulfoxide solvated forms of 3-[3-benzyl-2-hydroxy-9-(isoquinolin-5-yl oxy)-6-methylsulfanylmethyl-5,8-dioxo-4,7-diazanonanoyl]-N-tert-butyl-1,3-thiazolidine-4-carboxamide. *Acta Crystallographica Sect. B*, B60 (4), 433-437 (2004).
- 5) Y. Sohma, Y. Hayashi, M. Skwarczynski, Y. Hamada, M. Sasaki, T. Kimura, Y. Kiso: O-N Intramolecular acyl migration reaction in the development of prodrugs and the synthesis of difficult sequence-containing bioactive peptides. *Biopolymers Peptide Science*, 76 (4), 344-356 (2004).
- 6) H. Maegawa, T. Kimura, Y. Arai, Y. Matsui, S. Kasai, Y. Hayashi, Y. Kiso: Identification of peptidomimetic HTLV-1 protease inhibitors containing hydroxymethylcarbonyl (HMC) isostere as the transition-state mimic. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14 (23), 5925-5929 (2004).
- 7) A. Kiso, K. Hidaka, T. Kimura, Y. Hayashi, A. Nezami, E. Freire, Y. Kiso: Search for substrate-based inhibitors fitting the S2' space of malarial aspartic protease plasmepsin II. *J. Peptide Sci.*, 10 (11), 641-647 (2004)
- 8) H. M. Abdel-Rahman, T. Kimura, K. Hidaka, A. Kiso, A. Nezami, E. Freire, Y. Hayashi, Y. Kiso: Design of inhibitors against HIV, HTLV-I, and *Plasmodium falciparum*

aspartic proteases. *Biological Chemistry*, 385 (11), 1035-1039 (2004).

- 9) H. M. Abdel-Rahman, N. A. El-Koussi, G. S. Alkaramany, A. F. Youssef, Y. Kiso: A novel dipeptide-based HIV protease inhibitor containing allophenylnorstatine. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* 337 (11), 587-598 (2004).
- 10) T. Kimura, D. Shuto, Y. Hamada, N. Igawa, S. Kasai, P. Liu, K. Hidaka, T. Hamada, Y. Hayashi, Y. Kiso: Design and synthesis of highly active Alzheimer's  $\beta$ -secretase (BACE1) inhibitors, KMI-420 and KMI-429, with enhanced chemical stability. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 15 (1), 211-215 (2005).

## 2. 学会発表

- 1) K. Hidaka, T. Kimura, A. Kiso, Y. Tsuchiya, H. Maegawa, K. Nishiyama, Y. Hayashi, A. Nezami, E. Freire, Y. Kiso: Aspartic protease inhibitors containing allophenylnorstatine-dimethylthioprolin scaffold. 8th Chinese International Peptide Symposium (Kunming, China), 2004.7.
- 2) K. Hidaka, T. Kimura, A. Kiso, Y. Tsuchiya, H. Maegawa, K. Nishiyama, Y. Hayashi, A. Nezami, E. Freire, Y. Kiso: Usefulness of allophenylnorstatine-dimethylthioprolin scaffold to aspartic protease inhibitors. 3rd International and 28th European Peptide Symposium: Bridges Between Disciplines (Prague, Czech Republic), 2004.9.
- 3) 木村徹, 前川彦一郎, 西山啓史, 日高興士, 板見綾子, 有井康博, 林良雄, 木曾良明: 基質構造に基づいたHTLV-1プロテアーゼ阻害剤の設計と合成. 難治性疾患の克服をめざした創薬科学研究発表会(京都)2005.2.

## 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

分担研究報告書

HTLV-1 感染価及び HTLV-1 複製阻害剤評価システムの研究

分担研究者 足立昭夫(徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部ウイルス病原学分野)

研究要旨 HTLV-1 に対するインジケータ細胞を得るため、HTLV-1 LTR の下流にルシフェラーゼ遺伝子を挿入した pK30 $luc$  をヒトリンパ球株化細胞 H9 に *neo* 遺伝子発現ベクターと共導入し、G418 抵抗性の細胞クローンを選択した。このクローン化細胞 (H9/K30 $luc$ ) は HTLV-1 産生細胞である MT-2 細胞と混合培養すると大量のルシフェラーゼを産生した。HIV-1 に対しても同様のシステムを確立するため、既に保有しているインジケータ細胞 (H9/H1 $luc$  細胞) に加えて、低いレベルで安定にウイルスを産生する持続感染細胞 H9/NL432 を樹立した。これらのシステムは HTLV-1 および HIV-1 に対するウイルス阻害剤の効果を迅速かつ感度良く検出すると予測された。実際、HIV-1 のみに有効であるプロテアーゼ阻害剤サキナピルの評価を行ったところ、HIV-1 に対しては高い阻害効果があり、HTLV-1 に対しては効果がないことが確認された。

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-1 のウイルス学的解析は極めて困難であった。本研究では HAM の制御のために、ウイルス複製を指標にした複製阻害剤の開発を目指し、適切な細胞評価系の確立を試みた。

B. 研究方法

- (1) 細胞 細胞株は 293T、H9、H9/H1 $luc$ 、MT-2、MT-4 および M8166 を使用した。
- (2) トランスフェクション 293T 細胞へのトランスフェクションはリン酸カルシウム法で行った。
- (3) ルシフェラーゼおよび逆転写酵素 (RT) 活性の測定 ルシフェラーゼ活性は Luciferase Assay System (Promega Co., USA) で測定した。RT 活性は  $^{32}P$ -dTTP を用い常法により測定した。

- (4) DNA クローン *neo* 遺伝子発現ベクターとして pRVSVneo を用いた。HTLV-1 完全長クローン pK30 は NIH AIDS Research and Reference Reagent Program (カタログ番号 2817) により入手した。HIV-1 完全長クローンは pNL432 を使用した。ルシフェラーゼレポーターベクター pK30 $luc$  は pK30 の LTR 領域を PCR 法で増幅し、GL3-Basic Vector (Promega Co.) の *Xho* I と *Hind* III 部位に挿入して作製した。

C. 研究結果

- (1) HTLV-1 感染性測定用ルシフェラーゼシステム リンパ球系細胞株 H9 に pK30 $luc$  と pRVSVneo とを 10:1 (モル比) の割合で電気穿孔法で共導入し、G418 (1mg/ml) 存在下で培養した。その結果、安定な細胞株 6 クローンを得た。各細胞株と HTLV-1 産生細胞 MT-2 とを混合

培養すると、クローン 1 番は最も高いルシフェラーゼ活性を示したので、この細胞クローンを H9/K30*luc* と名付けその後の実験に使用した。MT-2 との混合培養による H9/K30*luc* の活性化が無細胞ウイルスによるものか否か、また、混合培養によって新しく合成された HTLV-1 Tax によるものか否かを検討した。無細胞ウイルスは HTLV-1 陽性 (MT-2)、HTLV-1 DNA 陽性 (MT-4 および M8166)、あるいは HTLV-1 DNA 陰性 (H9) 細胞の培養上清から調整した。無細胞液を H9/K30*luc* に接種し、翌日ルシフェラーゼ産生量を測定した。その結果、観察されていた H9/K30*luc* の活性化は無細胞ウイルスの感染によるものではないことが明らかになった。次に、アジドチミジン (AZT) 存在下で H9/K30*luc* と MT-2 とを混合培養しルシフェラーゼ産生量を調べた。AZT はルシフェラーゼ産生量にほとんど影響しなかったため、観察されていた活性化に新たに合成された Tax が不要でないことが判明した。

- (2) ルシフェラーゼシステムによる HTLV-1 と HIV-1 に対するサキナビル(SQV)の効果の検討  
(1)の結果から、このシステムでのルシフェラーゼ産生は、ウイルス Env を介した細胞融合により MT-2 から H9/K30*luc* へ移行した Tax によるものであると仮定した。プロセッシングされていない Gag と Env-gp41 の C 末端との相互作用が細胞融合を抑制するという HIV-1 に関する報告があることから、プロテアーゼ阻害剤サキナビル (SQV) の効果をこのシステムで検討した。SQV は HIV-1 プロテアーゼを効率的に阻害するが、HTLV-1 Gag のプロセッシングを抑制しないことが報告されている。HIV-1 に関して MT-2 と同様に低レベルのウイルスが産生され続ける持続感染細胞を樹立するため、H9 に pNL432 を電気穿孔法で導入し、数ヶ月培養した。その結果、

目的とする HIV-1 持続感染細胞 (H9/NL432) が樹立できた。この細胞株は低レベルのウイルスを産生していることを RT 活性で確認した。インジケーター細胞 (H9/K30*luc* および H9/H1*luc*) とウイルス産生細胞 (MT-2 および H9/NL432) とを SQV 存在下で 2 日間混合培養し、細胞中のルシフェラーゼ活性を測定した。HIV-1 システムの場合はルシフェラーゼ産生量が SQV により顕著に抑制されるが、HTLV-1 システムの場合は抑制されないことがわかった。これらの結果は上記の仮説および報告と良く一致した。

#### D. 考察

本研究で HTLV-1 感染を効率良く検出するインジケーター細胞株 H9/K30*luc* を樹立した。H9/K30*luc* は無細胞ウイルスに対しては感受性がなく、ウイルス産生細胞 MT-2 との混合培養によって高レベルのルシフェラーゼを産生する。インジケーター細胞のこの活性化は、Env を介した細胞融合によって移行した Tax によって起こると考えられる。本研究では、また、HIV-1 に関しても H9/K30*luc*—MT-2 と同様の H9/H1*luc*—H9/NL432 システムを構築した。これらのシステムは細胞融合に関わる種々の薬剤や因子の評価に適していると思われる。実際、SQV は HIV-1 に対して抑制効果があることが示された。

#### E. 結論

HTLV-1 感染価を検出する迅速定量法は未だ報告されていない。また、HIV-1 プロテアーゼ阻害剤は HTLV-1 プロテアーゼには効果がない。したがって、H9/K30*luc*—MT-2 システムによる HTLV-1 プロテアーゼ阻害剤のスクリーニングは極めて重要であると思われる。

#### F. 健康危険情報

該当事項なし。

#### G. 研究発表