

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

「多剤耐性 HIV-1 による治療困難症例を克服するための
新規治療薬剤・治療法開発研究」

平成 16 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 杉浦 亙 平成 17 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書

- 多剤耐性 HIV-1 による治療困難症例を克服するための新規治療薬剤・治療法開発研究..... 1
国立感染症研究所 エイズ研究センター 杉浦 亙

II. 分担研究報告書

1. 多剤耐性 HIV-1 による治療困難症例を克服するための新規治療薬剤・治療法開発研究..... 7
国立感染症研究所 エイズ研究センター 杉浦 亙
2. vif 機能を応用した新規抗 HIV 薬開発のための基礎研究..... 15
国立感染症研究所 筑波医学実験用霊長類センター 明里宏文
3. 粒子破壊物質および si RNA による HIV-1 の増殖の制御技術の開発..... 19
東京大学医科学研究所 先端医療研究センター 北村義浩
4. ヒト樹状細胞を標的にした HIV-1 感染評価系の確立..... 21
国立成育医療センター研究所・共同研究管理室 木村廣光
5. SIV を用いた新規抗レトロウィルス薬の開発..... 24
国立感染症研究所 エイズ研究センター 駒野 淳
6. 接着・侵入阻害剤及びインテグラーゼ阻害剤の開発..... 29
北里大学薬学部微生物薬品製造学 田中晴雄
7. hu-PBL-SCID マウス系での薬剤の抗 HIV-1 活性の評価..... 40
琉球大学大学院医学研究科免疫学分野 田中勇悦
8. 化合物ライブラリーの供給及び合成、体内動態、代謝、安全性試験の実施..... 43
富山化学工業株式会社 総合研究所 野村伸彦

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表..... 47

I. 総括研究報告書

多剤耐性HIV-1による治療困難症例を克服するための新規治療薬剤・治療法開発研究
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

抗HIV-1治療薬剤に対して耐性を獲得した治療困難症例の救済には既知の耐性と交叉を示さない新規薬剤が必要であり、その開発が切望されている。我々は新たな抗HIV-1治療薬剤の開発を目指して、低分子化合物ライブラリと放線菌・真菌ライブラリの検索に取り組んできた。その成果として14個のインテグラーゼ阻害剤候補化合物、6個の合胞体阻害剤候補化合物、そして13個のHIV-1増殖阻害剤候補化合物の発見に成功した。この研究班ではこれら33種類の候補化合物と放線菌・真菌ライブラリより発見されたアクチノヒピンについて、治療薬剤としての開発を推し進め、実用化への道を探っていく。平成16年度は見出した化合物の抗HIV-1効果の増強と毒性を軽減するため側鎖の置換・修飾を試みた。またhu-PBL-SCIDによるin vivo評価系を確立した。研究班では、さらに新たな候補化合物を見出すために、分担研究者各々が開発した独自のスクリーニング系を用いた新規薬剤の検索を試みた。平成16年度は①インテグラーゼ阻害剤、②接着・侵入阻害剤、③Tat活性阻害剤、④vif機能阻害剤、⑤ウイルス・宿主因子相互作用阻害剤のスクリーニング系の確立およびスクリーニングに取り組んだ。

分担研究者

明里宏文（国立感染症研究所
・筑波医学実験用霊長類センター）
北村義浩（東京大学医科学研究所
先端医療研究センター）
木村廣光（国立成育医療センター研究所
・共同研究管理室）
駒野 淳（国立感染症研究所
エイズ研究センター）
田中晴雄（北里大学薬学部微生物薬品製造学）
田中勇悦（琉球大学大学院医学研究科
免疫学分野）
野村伸彦（富山化学工業株式会社総合研究所）

剤耐性ウイルスの誘導などの問題が障害となりHAARTを始めた患者の20%~40%が治療から脱落しているとされている。特に、治療薬剤に対する耐性ウイルスの出現はその後の治療薬剤の選択を著しく制限するという点において極めて深刻な問題である。既存の薬剤に対して耐性を獲得してしまった症例を救済するために、新規薬剤の開発が切望されている。本研究では既存の薬剤が標的にしている逆転写酵素(RT)、プロテアーゼ(PR)だけではなく、その他の酵素(インテグラーゼ(IN)、RNaseH)、転写因子、ウイルスの複製に必須のアクセサリータンパクに作用してウイルスの増殖を抑制する新規化合物を見出し、*in vitro* および*in vivo*での評価を行った後、最終的な到達目標として臨床への実用化まで持ち込むことを目指す。

A.研究目的

今日わが国では17種類の抗HIV-1感染症治療薬剤が認可されており、これらを複数組み合わせる使用するHighly active antiretroviral therapy (HAART) が標準的な治療法として行われ、大きな成果を挙げている。しかし、HAARTの恩恵を得るのは容易ではなく、高いアドヒアランスを維持するための患者の負担、深刻な副作用、そして薬

B.研究方法

研究班では新薬の開発を、(1)検索グループと(2)評価グループの2グループに分けて進めていく。検索グループでヒットした化合物を評価グループで実用化の可能性について評価を行う(図)。

検索グループ

富山化学の保有する低分子化合物ライブラリあるいは北里大学田中研究室の保有する放線菌・真菌ライブラリを対象に抗HIV-1 阻害活性を呈する新規化合物の検索を進める。また、SIVを用いた*in vitro*スクリーニング法、樹状細胞を用いたスクリーニング法の開発を行う。タイムテーブルに示すように研究2年目までにライブラリ探索は終了し、3年目以降は実用化の評価を中心に進める(図)。

検索グループの研究内容概略は下記のとおりである。各々の詳細は分担研究者報告書を参照のこと。

- ① IN阻害剤のスクリーニングには strand transfer assay、接着・侵入阻害剤のスクリーニングには env 発現細胞および CD4 発現細胞を用いた fusion assay を、tat 阻害剤等については Tat 発現 F 遺伝子欠損型センダイウイルスと LTR 制御のルシフェラーゼ遺伝子を導入したレポーター細胞を用いた。(野村、杉浦、北村)。
- ② Vif を標的にした治療法・阻害剤開発に関しては Vif 機能の解明を中心に研究を進める。M6 変異体(N 末 22・25 アミノ酸欠損、Apobec-3G 抑制活性(-))をベースに Apobec-3G 抑制活性 (-) /ウイルス粒子取り込み(+)/p2・NC プロセッシング阻害活性(+)の Vif 最小領域 (min Vif) を明らかにする。異なるサブタイプの Vif への minVif の dominant negative 効果について検討をする。
- ③ SIVでのスクリーニング系では一次 /二次スクリーニングまでを目指す(駒野)。
- ④ HVJ ベクターシステムを用いた遺伝子導入法により DC細胞内への遺伝子の導入とその後の遺伝子発現に関する解析を行い、DC 細胞を用いたスクリーニング系へつなげていく(木村)。

評価グループ

検索グループで見出した候補化合物が臨床応用できるかその可能性を探る。有望な化合物については臨床治験に持ち込む上で必要なデータの収集を進める。タイムテーブルに示すように、検

討が先行している33化合物(表)について研究初年度より評価グループでの開発研究を中心に進めていく(野村・杉浦)。アクチノヒビンについては更に進んでおり、実用化の検討を進めていく(田中晴)。

評価グループの研究内容概略は下記のとおりである。各々の詳細は分担研究者報告書を参照のこと。

- ①見出した候補化合物の側鎖等の修飾を続け、抗 HIV 活性の更なる増強を目指す(野村・杉浦)。
- ②*in vivo*の小動物モデルでは多剤耐性R5tropic HIV-1および多剤耐性X4 HIV-1も感染・増殖可能なhu-PBL-SCID系で候補化合物の効果を評価する(田中勇、杉浦)。
- ③アクチノヒビンについては変異アクチノヒビンの患者分離HIV株に対する抗HIV活性の測定を行う。スチレン・マレエート及びポリエチレン・グリコール付加体の調製と抗HIV活性の測定を行う。実際の薬剤投与経路のひとつとして腔内常在細菌(Streptococcus)へのアクチノヒビン遺伝子の導入を検討する(田中晴)。さらにSCIDマウスにおける抗HIV活性の測定を行う(田中晴、田中勇)。

C.研究成果

総括報告書では研究班全体としての成果と各分担研究者の成果の概要について記載する。分担研究者の詳細な内容については夫々の分担研究報告書を参照のこと。

検索グループ

既存の薬剤標的である逆転写酵素、プロテアーゼ以外を標的にする新たな抗HIV薬剤を検索するためのアッセイ系の開発とスクリーニングに取り組んだ。

- ① 新たなインテグラーゼ阻害剤開発の標的として、strand transferではなく、組み込み前複合体に作用し核移行を抑制する薬剤の開発を検討した。インテグラーゼ中央多プリン配列(cPPT)上流にあるdZ領域に注目して、その働きについて解析を行った。

- ② 抗tat活性阻害剤の検索に関しては永井ら (J.Virol.2003, 3238-3246) によって作成されたHIV-1由来Tat遺伝子をクローニングしたF遺伝子欠損型センダイウイルスを、LTR領域の下流にルシフェラーゼ遺伝子を連結した断片を形質転換した細胞に導入し、Tat/TAR阻害活性を示す薬剤のスクリーニング系の予備試験を終了し化合物の評価を開始した(野村)。
- ③ vifを標的にした阻害剤の検索に関しては、スクリーニング法を確立する為vifの機能についての詳細な機能解析を行った。その結果ウイルス粒子中のvifがGag p2/NCのプロセッシングを特異的に阻害することを明らかにした。また細胞内に過剰にvifを発現させると感染性が低下することを示した。22-25アミノ酸欠損変異vif (M-6変異体) では野生型に比してv-vifが増加することを明らかにした(明里)。
- ④ ルシフェラーゼをもつ組み替えSIV \square nefLucを作出し、その複製能を検証した。その結果、ウイルス複製をルシフェラーゼ発現量として評価できることが判明した。ヒトCD4とCCR5を共に発現する感染標的細胞株として、ヒト腎臓由来の上皮細胞293あるいはヒトパーキットリンパ腫由来のBJAB細胞をもとに293/CCiC細胞とBJAB/CCiCをそれぞれ樹立し、組み替えSIVによる被感染性を有すること、ルシフェラーゼ発現効率がHeLa細胞に由来する指示細胞株や、ヒトとサル由来の複数のT細胞株 (H9, SupT1, PM1, M8166など) より優れていることを確認した(駒野)。
- ⑤ 樹状細胞を用いたスクリーニング系開発のためにラット骨髄由来DCの分離・培養法の確立に成功した。さらにマウスDC株NSC-1細胞への遺伝子導入法について検討した(木村)。

評価グループ

研究成果の概略は下記のとおりである。詳細は各分担研究者報告書を参照のこと。

- ① 低分子化合物ヒット化合物の類縁化合

物検索と新たな阻害剤の開発

我々は今までの新薬開発研究で低分子化合物ライブラリより11個のインテグラーゼ阻害化合物、6個の合胞体形成阻害剤、そして11個のインテグラーゼ以外を標的にしている化合物を見出したが、研究班初年度の平成16年度にはこれら28の候補化合物についてHIV-1阻害効果の増強、毒性の軽減のため側鎖等の修飾を行い(野村)、新たに149個の類縁化合物について阻害活性と毒性の評価を行った(杉浦)。IN阻害活性を示した化合物より代表的な化合物を一つ、IN以外の機序で阻害活性を呈した化合物からは代表的なものを3化合物選び出し、薬剤耐性の誘導を試みているが現時点では明らかな薬剤耐性ウイルスは誘導されていない(野村、杉浦)。

②代表化合物の抗HIV活性をin vivoで評価することを目的に、hu-PBL-SCIDを用いた小動物実験系の確立を試みた。構築したhu-PBL-SCIDを用いて、既に臨床で用いられているnevirapineを用いてR5 tropic HIV-1の阻害活性の評価を行った。その結果、hu-PBL-SCIDが薬剤のin vivoにおける効果を評価するモデルとして活用できることが確認された(杉浦)。

③hu-PBL-SCIDマウスでバイレミアを起こしたR5 HIV-1は5日間の連続CCR5アンタゴニストSHC-C投与ではX4 HIV-1へ変異しないこと、CD4因子は複数のHIV-1抗原の種々のエピトープを認識してCD4+T細胞が産生することを見いだした(田中勇)。

④カルバゾール誘導体のインテグラーゼ阻害機序の解析

低分子化合物ライブラリより見出した、IN阻害活性を呈するカルバゾール誘導体の作用機序の解析を進めた。側鎖を換えた合計23の誘導体のstrand transfer assay阻害活性を評価して、責任構造について検討を行った(野村・杉浦)。

⑤侵入阻害剤の開発研究

接着侵入阻害剤であるアクチノヒピンは化合物としては完成しており、どのような経路で薬物を投与するべきかを検討する段階にまでに到達し

ている。アクチノヒビンの作用機序についてはまだ不明の点が多く、構造学的解析と阻害機構の解析を中心に研究を進めている。その結果アクチノヒビンは高マンノース型糖鎖の末端に存在する α (1:2) 結合のmannose残基を認識してgp-120に結合することが明らかになった。またアクチノヒビンが持つ3つの糖鎖結合部位が糖たんぱく質上の複数の高マンノース型糖鎖に結合することによる強い親和性を示し、gp120のように糖鎖に富む糖タンパクに選択的に結合することが明らかになった。さらにアクチノヒビンを二量体にし、糖鎖結合領域にアミノ酸配列を改良することにより合胞体形成阻害活性が2倍に増強された。(田中晴)。

D.考察

HIV-1感染症の新薬開発には大きく2つのアプローチがあり、ひとつは既存の薬剤と同じ酵素(RT、PRO)を標的に、既存の耐性変異と交叉しない薬剤の開発であり、もうひとつはこれまでと異なる標的を狙った新薬開発である。前者の開発は既に薬剤の作用機序および結合部位等が明らかなたため、コンピューター上での薬剤デザインが可能である。一方後者の開発はスクリーニング段階では標的部位が必ずしも明らかでないため、化合物をランダムスクリーニングすることが必要となる。この研究班では既存の薬剤とは異なる作用機序の新薬の開発に重心をおいていることから、後者のランダムスクリーニングによる化合物探索を進めている。ランダムスクリーニングによる新規薬剤開発の成功には効率の良い化合物検索系が必要であり、研究班では試験系の開発も合わせて取り組んでいる。

検討が先行している臨床応用が有望な化合物については小動物を用いた実験系でのin vivo評価を進めているが、次年度以降は人材と資金の投入を集中させ開発スピードの上げていくことを計画している。

E.結論

創薬二期での研究成果を踏まえ、平成16年度より班構成を改めて新規薬剤開発に取り組んでいる。今回の班では薬剤開発の標的を広げてスクリーニングに取り組むとともに、創薬二期で見いだした化合物については前臨床での評価を中心に研究を進めている。平成16年度は当初の研究計画をほぼ達成した。

F.健康危険情報

該当なし

G.研究発表

各分担研究者の項参照

H.知的財産権の出願・登録状況

1.特許取得

特願2003-395859

カルバゾール誘導体またはその塩を有効成分とするインテグラーゼ阻害剤および抗レトロウイルス剤

発明者：千葉智子、巖馬華、杉浦 互

出願人：中野克彦、杉浦 互

特願2004-346644

抗HIV薬、これを構成するポリペプチド、ポリペプチドをコードする遺伝子、抗HIV薬の製造方法

発明者：田中晴雄、猪腰淳嗣、大村 智

出願人：北里学園

2. 実用新案登録

該当なし

研究班の構成およびタイムテーブル

		16年			17年			18年					
		4-6	7-9	10-12	1-3	4-6	7-9	10-12	1-3	4-6	7-9	10-12	1-3
チーム総集	IN阻害活性の検索												
	接着・侵入阻害剤の検索												
	抗Tat活性阻害剤の検索												
	Vifを標的にした増殖抑制剤の検索												
	SIVを用いた抗レトロウイルス剤の検索												
チーム専攻	in vitro感染実験												
	候補化合物の修飾												
	マウスを用いた毒性評価												
	小動物実験モデルによるHIV増殖阻害活性の評価												
	臨床実用化の可能性の検討												
アクチノヒビンの構造科学的解析研究													

新規化合物スクリーニングまとめ

ライブラリ	クラス	化合物名	抗HIV-1 IC ₅₀ (μ M)	抗IN活性 IC ₅₀ (μ M)	Vero毒性 CC ₅₀ (μ M)	S.I.	
低分子化合物 12000 種類	インテグラーゼ 阻害剤候補	カルバゾール 誘導体 CA-1	0.92	1.98	2.93	3.18	
		CA-4	1.52	5.21	5.04	3.32	
		CA-5	0.48	1.18	2.81	5.85	
		CA-8	0.51	2.18	2.55	5.00	
		CA-9	0.79	2.28	3.76	4.76	
		CA-10	0.80	1.80	2.23	2.78	
		CA-13	0.69	1.78	3.78	5.48	
		CA-14	0.51	0.79	1.97	3.86	
		新規化合物	TIN-1	0.08	2.0-2.4	0.59	7.38
		TIN-2	0.01-0.11	6.2-18.4	5.4	50-540	
	TIN-3	ND	17.8	>100	ND		
	HIV-1増殖 阻害剤候補	新規化合物	TUN-1	0.034	(-)	210	6200
		TUN-2	0.001	(-)	210	>10000	
		TUN-3	0.118	(-)	>300	>2500	
		TUN-4	0.012	(-)	5.7	480	
		TUN-5	0.001	(-)	>20	>10000	
		TUN-6	0.083	(-)	28	340	
		TUN-7	0.070	(-)	20	290	
		TUN-8	0.016	(-)	22	1400	
		TUN-9	0.132	(-)	ND	ND	
		TUN-10	0.003	(-)	2.4	800	
		TUN-11	0.004	(-)	5.6	1400	
	合胞体形成 阻害剤候補	新規M-tropic	TCM-1	0.340	(-)	25	73
		TCM-2	0.430	(-)	21	49	
		TCM-3	0.420	(-)	15	36	
		TCM-4	0.310	(-)	>100	>322	
		TCM-5	0.040	(-)	>100	>2500	
		新規T-tropic	TCT-1	0.800	(-)	>100	>125
	放線菌・糸状菌 放線菌2000株 糸状菌160株	インテグラーゼ阻 害剤候補	Atrovenetinone methyl acetal (<i>Penicillium sp.</i> FKI-1463)	7	19	35*	5.00
			Erabulenol B	ND	8.4	71*	ND
			Funalenone	ND	10	120*	ND
		HIV-1増殖 阻害剤候補	放線菌01-77D5培養上清	ND	0.6*	>12.0*	
				ND			
合胞体形成		Actinohivin**	0.002-0.110	(-)	>80	>700	

* HeLa細胞による測定

** 本プロジェクト開始前に発見されたものである(特許出願済み)。現在WHOとの共同研究でHIV感染予防薬としての

開発を目指している

粗物質での結果

II. 分担研究報告書

分担研究者 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 杉浦 亙

研究要旨

*in vitro*において抗 HIV-1 活性を持つ事が確認されている新規低分子化合物を *in vivo*で評価することを目的として、hu-PBL SCID マウスを用いた HIV-1 感染モデルを構築した。既存の抗 HIV-1 薬剤として nevirapine をこのマウスモデルに経口投与した結果、マウス血液中の nevirapine 濃度の上昇が確認できた。HIV-1 JR-CSF 株を感染させた hu-PBL SCID マウスに nevirapine を経口投与した結果、マウス血漿中 HIV-1 RNA コピー数は薬剤非投与群に比べて有意に低下し、nevirapine の有効性が確認された。このように本研究で構築した hu-PBL SCID マウスによる HIV-1 感染モデルは抗 HIV-1 薬剤の *in vivo*評価系として有効である事が示された。

A.研究目的

1995 年の多剤併用療法(HAART)導入は HIV-1 感染症治療に大きな効果をもたらしてきたが、その一方で薬剤耐性 HIV-1 の出現が治療を進める際の問題となってきた。この問題を克服するには、既存の抗 HIV-1 薬剤とは作用機所の異なる新たな治療薬剤が必要であり、その開発が急務となっている。我々はこれまでに、新規作用機序を持つ化合物の探索を目的として低分子化合物ライブラリーをスクリーニングし、これらの化合物の *in vitro*における抗 HIV-1 活性について解析してきた。その結果、18 個の抗 HIV 活性を持つ新規薬剤候補化合物を見出した。本研究ではこれらの化合物の *in vivo*における抗 HIV-1 活性を評価するためにマウス HIV-1 感染モデルを構築し既存の抗 HIV-1 薬をこのモデルで評価し実験系の最適化を行った。

B.研究方法

1) マウス HIV-1 感染モデルの構築

RAG2 common γ 鎖 KO SCID マウス(RAG2 マウス)の腹腔内に、健常人 PBMC を 5×10^6 個 $\sim 1 \times 10^7$ 個/頭 を移植して hu-PBL SCID マウスを構築した。PBMC 移植後 7~12 日後の時

点でマウス末梢血中のヒト CD45 陽性細胞数を FACS で解析・測定し、ヒト PBMC がマウスに定着している事を確認した。ヒト PBMC 移植後 14 日目に、HIV-1 JR-CSF 株を $1000\text{TCID}_{50}/\text{head}$ の力価でマウス腹腔内に投与し感染させた。

2) マウスへの薬剤投与

HIV-1 投与 1 日前(ヒト PBMC 移植後 13 日目)より nevirapine を $25\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ あるいは $100\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ で 1 日 2 回専用ゾンデを用いて経口投与した。

3) 投与薬剤の抗 HIV 効果の評価

HIV-1 投与後 7 日目と 13~14 日目の 2 ポイントで採血を行い、血漿中 HIV-1 RNA コピー数をアンプリコア ver.1.5 を用いて測定し、薬剤投与群と非投与群で比較した。

4) 血中薬剤濃度の測定

$25\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ あるいは $100\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ の投与量で nevirapine を投与したマウスから、30 分後、1 時間後、4 時間後に採血し nevirapine 血中濃度を HPLC で測定した。

C.研究結果

1) マウス HIV-1 感染モデルの構築

RAG2 マウスに3名の健常人ボランティアから供与されたヒト PBMC を各々移植後、マウス末梢血中のヒト CD45 陽性細胞の割合を経時的に解析した。その結果、ヒト CD45 陽性細胞の割合は移植後 28 日目まで上昇し、その後減少する傾向が観察された。また移植したヒト PBMC 数とヒト CD45 陽性細胞の割合の間には相関は認められなかった (図 1)。PBMC 供与ドナー毎にマウス生存率を観察した結果、マウスの生存曲線に供与ドナーによる差が明確に認められた (図 2)。ヒト PBMC 移植後 28 日目に HIV-1 JR-CSF 株を 1000TCID₅₀/head で投与し感染させた結果、投与後 7 日目では血漿中 HIV-1 RNA コピー数は 1.7×10^5 コピーから 4.8×10^7 コピーの範囲で測定値にばらつきが見られたが、14 日目には 1.6×10^6 から 1.7×10^7 コピーの範囲に測定値が収束する傾向が観察された (図 3)。また HIV-1 投与後 14 日目に採取したマウス脾臓内ヒト PBMC からは HIV-1 が分離され、HIV-1 感染している事が確認された。

2) マウス HIV-1 感染モデルを用いた nevirapine の抗 HIV 活性の評価

HIV-1 投与 1 日前から、nevirapine を 25mg/kg/日と 100mg/kg/日 の投与量でマウスへの経口投与を開始した。HIV-1 投与後 13 日目に採血し血漿中 HIV-1 RNA コピー数を比較した結果、25mg/kg/日の投与量では nevirapine 投与群・非投与群の間に有意差は見られなかった ($p=0.11$, 図 4)。しかし 100mg/kg/日の投与量では nevirapine 投与群の RNA コピー数は非投与群と比較して有意に低下していた ($p=0.0031$, 図 4)。マウスへの nevirapine 単回投与試験を行った結果、100mg/kg を投与したマウスでは、25mg/kg を投与したマウスよりも nevirapine の血中濃度が長時間にわたり高濃度で維持されていた事が確認された。このことから、nevirapine が抗 HIV-1 効果を呈するには 100mg/kg/day の投与量が必要である事が示された (図 5)。

D. 考察

今回の研究より、hu-PBL-SCID マウスを用いた HIV-1 感染モデルで抗 HIV-1 薬剤の評価が可能であることが確認された。しかし薬剤の効果は我々が予想していたよりも低く、nevirapine 投与群の RNA コピー数低下は非投与群のコピー数の約 50%程度にとどまった。この原因としては、①マウス血漿中の HIV-1 RNA コピー数の基線が $10^5 \sim 10^7$ コピー/ml と実際の臨床で観察されるものより 10~100 倍と高いため効果が現れにくかった、②マウス体内における薬物動態がヒトに比して早く、一日 2 回の投与では十分な血中濃度が維持できなかった可能性、③2 週間の投与期間が短すぎた、などが原因として考えられる。HIV-1 を感染させた hu-PBL SCID マウス血中の HIV RNA コピー数には個体により 100 倍程度のばらつきが見られたが、このような RNA コピー数のばらつきが生じる原因は今回の検討では明らかに出来なかった。今後の課題としてマウス血漿中の RNA コピー数の基線が実際の臨床値に近づく条件について検討するとともにマウス個体ごとの RNA コピー数のばらつきの原因についても追求し、安定した系の確立を試みる。このようにして hu-PBL SCID マウスを用いた HIV-1 感染モデルを最適化し、新規抗 HIV-1 薬剤の評価を今後予定している。

E. 結論

hu-PBL SCID マウスを用いたマウス HIV-1 感染モデルの構築に成功した。既存の抗 HIV 薬の nevirapine をマウスに経口投与し、血中薬物動態の解析を行った。マウスに HIV-1 をチャレンジした系で nevirapine 投与を行ったところ、nevirapine 投与群では nevirapine 非投与群に比べて血漿中 HIV-1 RNA コピー数が有意に低下し、マウス HIV 感染モデルで抗 HIV-1 薬の評価が可能であることが示された。

F.健康危険情報

該当なし

G.研究発表

1.論文発表

- 1) Saeng – Aroon S, Wichukchinda N, Myint L, Pathipvanich P, Ariyoshi K, Rojanawiwat A, Matsuda M, Sawanpanyalert P, Sugiura W, Auwanit W: Study of Antiretroviral Drug Resistant HIV-1 Genotypes in Northern Thailand :Role of Mutagenically Separated Polymerase Chain Reaction as a Tool for Monitoring Zidovudine – Resistant HIV-1 in Resource – Limited Settings. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 36, 1051-1056, 2004
- 2) Hua Yan, Tohko Miyagi, Eigo Satoh, Wataru Sugiura, Noki Yamamoto, Hiromitsu Kimura.: Phenotype and function of GM-CSF independent dendritic cells generated by long-term propagation of rat bone marrow cells. *Cellular Immunology.* Vol.229, No2, pp.117-129, 2004
- 3) Hirotaka Ota, Masami Ota, Saburo Neya, Msayuki Hata, Wataru Sugiura, and Tyuji Hoshino: Resistant Mechanism against Nelfinavir of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Proteases. *J phys Chem B.* 109, 564-574, 2004
- 4) H Yan, T Chiba, Y Kitamura, M Nishizawa, M Fujino, N Yamamoto and W Sugiura: Novel Small – Molecule Compounds which inhibit strand transfer activity of HIV-1 integrase. *Antiviral Therapy.* 9:S6, 2004
- 5) W Sugiura, M Matsuda, T Chiba, J Kakizawa, M Nishizawa, H Miura, M Hamatakem, T Ueda, M Fujino, K Yamamda and N Yamamoto: Changes in Prevalence and Patterns of Drug Resistant Mutations in Japan-Summary of Nationwide HIV-1 Drug Resistance Surveillance Study (1996 to 2003) in Japan. *Antiviral Therapy.* 9:S6, 2004
- 6) K. Shiomi, R. Matsui, M. Isozaki, H. Chiba, T. Sugai, Y. Yamaguchi, R. Masuma, H. Tomoda, T. Chiba, H. Yan, Y. Kitamura, W. Sugiura, S. Omura, H. Tanaka: Fungal phenalenones inhibit HIV-1 integrase. *J. Antibiot.* 58, 65-68, 2005
- 7) Zhu D, Taguchi Nakamura H, Goto M, Odawara T, Nakamura T, Yamada H, Kotaki H, Sugiura W, Iwamoto A and Kitamura Y. Influence of single-nucleotide polymorphisms in the multidrug resistance-1 gene on the cellular export of nelfinavir and its clinical implication for highly-active antiretroviral therapy. *Antiviral Therapy* S9, 929-935, 2004
- 8) Miyauchi K, Komano J, Yokomaku Y, Sugiura W, Yamamoto N, Matsuda Z: Role of the specific amino acid sequence of the membrane-spanning domain of human immunodeficiency virus type 1 in membrane fusion. *J Virol.* (in press)

2.学会発表

- 9) H Yan, T Chiba, Y Kitamura, M Nishizawa, M Fujino, N Yamamoto and W Sugiura: Novel Small – Molecule Compounds which inhibit strand transfer activity of HIV-1 integrase. 13th Internatioal HIV Drug Resistance Workshop. Tenerife, Canary Islands, Spain. 2004.6.8-6.12
- 10) W Sugiura, M Matsuda, T Chiba, J Kakizawa, M Nishizawa, H Miura, M Hamatakem, T Ueda, M Fujino, K Yamamda and N Yamamoto: Changes in Prevalence and Patterns of Drug Resistant Mutations in Japan-Summary of Nationwide HIV-1 Drug Resistance Surveillance Study (1996 to 2003)

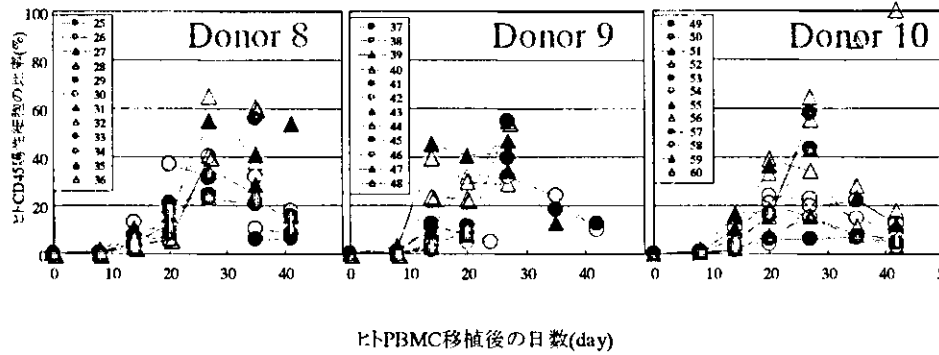
- in Japan. 13th International HIV Drug Resistance Workshop. Tenerife, Canary Islands, Spain. 2004.6.8-6.12
- 11) R Kantor, D Katzenstein, S Y Rhee, A P Carvalho, B Wynhoven, M A Soares, P Cane, J Clarke, J Snoeck, S Ssirivichayakaul, K Ariyoshi, A Holguin, C Pillay, H Rudich, R Rodrigues, M B Bouzas, P Cahn, L Brigido, Z Grossman, L Morris, V Soriano, W Sugiura, P Phanuphak, A M Vandamme, J Weber, D Pillay, A Tanuri, P R Harrigan, R Camacho, J M Schapiro, R W Shafer: HIV-1 Protease and RT mutations according to subtype and antiretroviral therapy : A watch list for epidemiologic studies using a web - based application. 15th International AIDS Conference. Bangkok, THAILAND. 2004.7.11-7.16
- 12) W Sugiura, M Matsuda, T Chiba, M Nishizawa, J Kakizawa, T Ueda, M Hamatake, M Fujino, K Yamamda, N Yamamoto: Changes in Prevalence and Patterns of Drug Resistant Mutations in Japan-Summary of Nationwide HIV-1 Drug Resistance Surveillance Study (1996 to 2002) in Japan. 15th International AIDS Conference. Bangkok, THAILAND. 2004.7.11-7.16
- 13) H Yan, T Chiba, M Nishizawa, Y Kitamura, N Yamamoto, W Sugiura: Inhibition of HIV-1 integrase strand transfer activity by Carbazole derivatives. 15th International AIDS Conference. Bangkok, THAILAND. 2004.7.11-7.16
- 14) T Chiba, M Takizawa, M Matsuda, M Honda, M Nishizawa, Z Matsuda, N Yamamoto, W Sugiura: A novel HIV-1 reporter cell line for rapid and accurate drug resistance phenotyping. 15th International AIDS Conference. Bangkok, THAILAND. 2004.7.11-7.16
- 15) M Nishizawa, S Kato, H Miura, M Fujino, Y Yamamoto, W Sugiura: Comparison of Intracellular Protease Inhibitor Concentration and Kinetics in Different Cell Types. Fifth HIV DRP Symposium Antiviral Drug Resistance. Virginia, USA. 2004.11.14 - 11.17
- 16) D Zhu, H Taguchi - Nakamura, M Goto, T Odawara, T Nakamura, H Yamada, H Kotaki, W Sugiura, A Iwamoto, and Y Kitamura: Influence of Single - Nucleotide, Polymorphisms in the Multidrug Resistance - 1 Gene on the Cellular Export of Nelfinavir and its Clinical Implication For Highly - Active Antiretroviral Therapy. Fifth HIV DRP Symposium Antiviral Drug Resistance. Virginia, USA. 2004.11.14 - 11.17
- 17) 三浦秀佳、千葉智子、滝澤万里、松田善衛、松田昌和、本多三男、杉浦 互: ヒト細胞由来の新たなレポーター細胞による HIV-1 薬剤感受性検査法の確立. 第 52 回ウイルス学会学術集会. 2004.11.21-11.23.神奈川県横浜市
- 18) 任 鳳蓉、杉浦 互、田中 博、長谷川直樹: 抗レトロウイルス治療下の HIV-1 の宿主内進化と薬剤耐性予測 1. 第 52 回ウイルス学会学術集会. 2004.11.21-11.23.神奈川県横浜市
- 19) 駒野 淳、宮内浩典、二橋悠子、浦野恵美子、松田善衛、千葉智子、三浦秀佳、Lay Myint、杉浦 互、山本直樹: ヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) 複製を特異的に増強する小分子化合物 sparsomycin 1. 第 52 回ウイルス学会学術集会. 2004.11.21-11.23. 神奈川県横浜市
- 20) 杉浦 互
本邦における薬剤耐性 HIV-1 の現状と今後の課題. 第 18 回 日本エイズ学会学術集会. 2004.12.9-12-11. 静岡県静岡市
- 21) 奈良妙美、西尾信博、高嶋能文、堀越泰雄、三間屋純一、杉浦 互: 抗 HIV 薬による様々な副作用を呈し、多剤耐性を獲得した HIV

- 感染血友病患者の1例.第18回日本エイズ学会学術集会. 2004.12.9-12-11. 静岡県静岡市
- 22) 植田知幸、有吉紅也、三浦秀佳、松田昌和、千葉智子、巖馬華、Lay Myint、柿澤淳子、濱武牧子、西澤雅子、杉浦 互: プロテアーゼ阻害剤耐性変異と Gag 基質領域の相互干渉に関する解析.第18回日本エイズ学会学術集会. 2004.12.9-12-11. 静岡県静岡市
- 23) 任鳳蓉、松田昌和、長谷川直樹、杉浦互、田中 博: HAART 治療下の HIV pol 遺伝子の宿主内進化と薬剤耐性予測.第18回日本エイズ学会学術集会. 2004.12.9-12-11. 静岡県静岡市
- 24) 太田雅美、簾貴士、大出裕高、畑晶之、佐藤武幸、横幕能行、布施晃、杉浦互、星野忠次: 臨床応用に向けたコンピューターによるエイズ治療薬の適正予測. 第18回日本エイズ学会学術集会. 2004.12.9-12-11. 静岡県静岡市
- 25) 築地謙治、根岸昌功、長谷川直樹、木内英、花房秀次、杉浦 互、加藤真吾: PI 服用患者における毛髪内 PI 定量法の検討.第18回日本エイズ学会学術集会. 2004.12.9-12-11. 静岡県静岡市
- 26) 加藤真吾、田中理恵、杉浦 互: LC-MS/MS による AZT の細胞内薬物動態の解析. 第18回日本エイズ学会学術集会. 2004.12.9-12-11. 静岡県静岡市
- 27) 巖馬華、千葉智子、三浦秀佳、西澤雅子、野村伸彦、北村義浩、山本直樹、杉浦 互: 新規化合物カルバゾール誘導体による HIV-1 インテグラーゼ活性抑制機序の解析. 第18回日本エイズ学会学術集会. 2004.12.9-12-11. 静岡県静岡市
- 28) 松田昌和、Yan Hua、植田知幸、Urivi Parikh、柿澤淳子、西澤雅子、濱武牧子、藤野真之、三浦秀佳、Lay Myint、山本直樹、杉浦 互: 本邦における薬剤耐性 HIV-1 の動向と変遷に関する考察.第18回日本エイズ学会学術集会. 2004.12.9-12-11. 静岡県静岡市

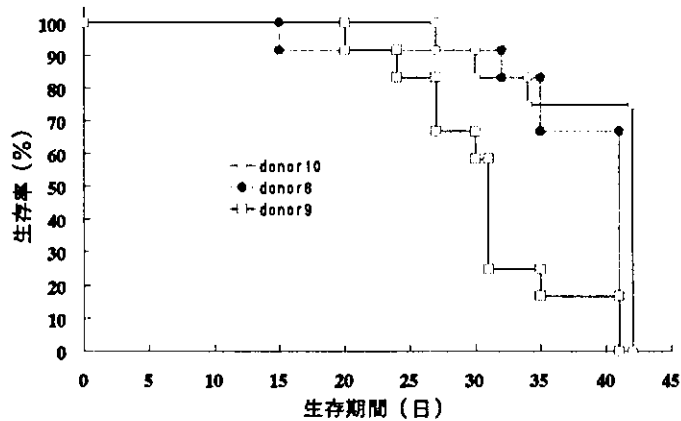
H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

マウス血液中でのヒトCD45陽性細胞の比率

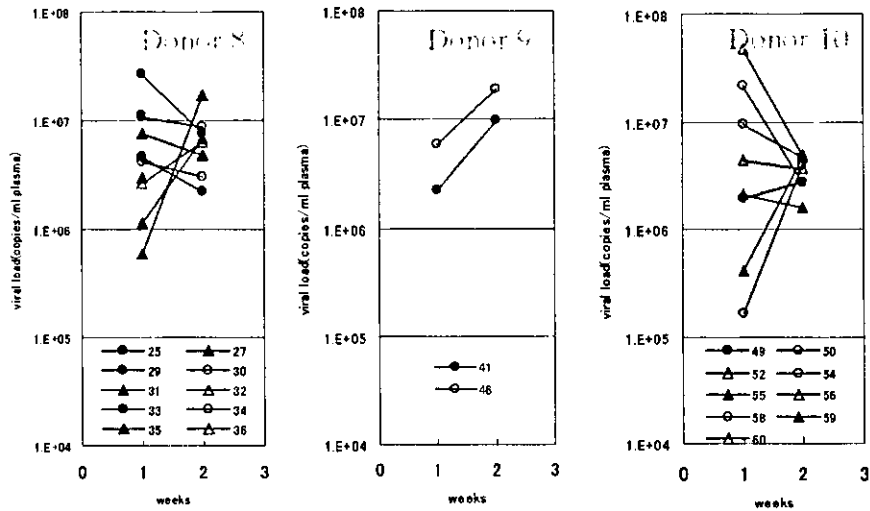


PBMCドナーの選択は移植の成否を決める大きな因子である

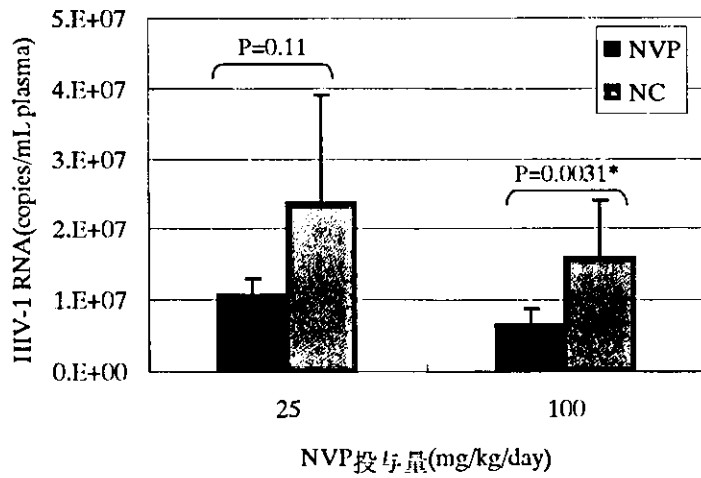


		ログランク法		一般化ワイルコクソン法			
		χ^2 value	p value	有意差	Z ² value	p value	有意差
donor10	V.S. donor8	1.1934E-01	7.3638E-01	有意差なし	8.2715E-02	7.7365E-01	有意差なし
donor10	V.S. donor9	6.9985E+00	8.1668E-03	p < 0.01	7.0253E+00	8.0367E-03	p < 0.01
donor8	V.S. donor9	6.5173E+00	1.0683E-02	p < 0.05	7.0013E+00	8.1453E-03	p < 0.01

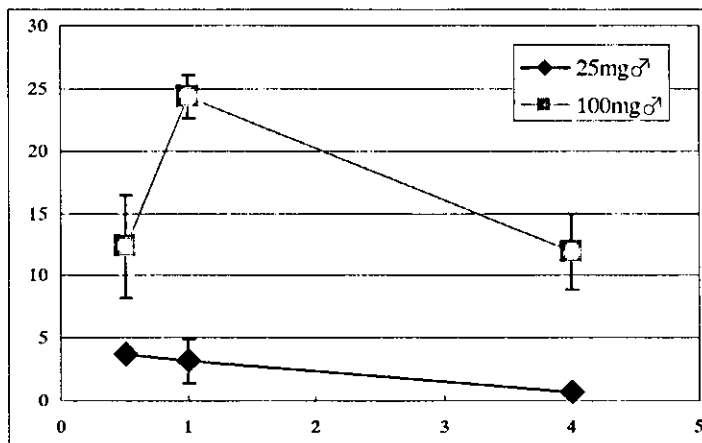
感染後1,2週間後の血中ウイルス量



血漿中HIV RNAコピー数とNVP投与量



NVPのマウス血中濃度の経時的推移



vif 機能を応用した新規抗 HIV 薬開発のための基礎的研究

分担研究者 明里宏文（国立感染症研究所 筑波霊長類センター）
研究協力者 李永仲、飯島沙幸

研究要旨：我々はこれまでに、HIV 粒子にパッケージされる Vif (virion Vif; v-Vif) がウイルスプロテアーゼによる p2/NC 間のプロセッシングを特異的に阻害すること、過剰 Vif を細胞に発現させるとそれに比例して v-Vif 量も増加し、その結果感染性が低下することを示した。本研究ではこの現象を応用することにより、既存のプロテアーゼ阻害剤とは異なる機序でウイルス成熟を阻害する新規抗 HIV 薬の開発を目指し、その基礎的解析を行った。その結果、Vif 22-25 アミノ酸残基の欠失変異を導入した M-6 変異体は、野生型 Vif に比べ顕著に steady-state level が増強することにより v-Vif 量が増大し、それに伴って強い HIV 感染性抑制効果を示した。またその抑制効果は生理的レベルの野生型 Vif を発現した H9 細胞でも認められたことから、M-6 変異体は強力なドミナントネガティブ作用を有することが明らかとなった。これらの知見はウイルス粒子成熟過程の新規制御法開発に有用であると考えられた。

A. 研究目的

これまでに開発・臨床応用されてきた抗 HIV 薬の作用機序は、逆転写酵素やプロテアーゼといったウイルス酵素の作用を阻害することでウイルス複製を抑えるものであるが、これらの薬剤に耐性を示す変異ウイルスの出現が抗 AIDS 戦略上問題となっている。本研究ではこれまでとは異なる戦略、すなわちウイルス調節蛋白の本来持つ機能を部分的に拡大することでウイルス複製を阻害することにより、抵抗性変異ウイルスの出現を誘導しにくい新規抗 HIV 薬を開発することをコンセプトとした。

これまでの研究で我々は、HIV 粒子にパッケージされる Vif (virion Vif; v-Vif) がウイルスプロテアーゼによる p2/NC 間のプロセッシングを特異的に阻害すること、通常の数倍程度過剰な Vif を細胞に発現させるとそれに比例して v-Vif 量も増加し、その結果感染性が低下することを示した。本研究ではこの現象を応用することにより、既存のプロテアーゼ阻害剤とは異なる機序でウイルス成熟を阻害する新規抗 HIV 薬の開発を目標として、そのための基礎的解析を行なった。

B. 研究方法

HIV-1 Vif および各種 Vif 欠失変異体の発現ベクターである pNL4-43Vif/Vif mutants を HIV-1 分子クローンである pNL4-3Δenv, VSV-G 発現ベクターと共に H9 細胞または HeLa 細胞へ遺伝子導入し、24 時間後ウイルスおよび導入細胞を回収した。ウイルス感染性は LuSIV 細胞を用いた single-round infectivity assay により評価した。得られたウイルス及びウイルス発現細胞について、Western blotting 法によりウイルスタンパク質の解析を行った。

C. 研究結果

これまでの研究で、HIV 粒子に過剰量パッケージされた Vif が p2/NC プロセッシングを特異的に阻害することによりウイルス成熟が障害され、ウイルス感染性が低下すること、また Vif N 末端側を欠失すると感染性抑制効果が増強されることを報告した (J Biol Chem, 2004)。

今年度は本 Vif 作用に関してさらに詳細な解析を行うため、HIV-1 Vif タンパク質発現ベクターである pNL4-43Vif を基に一連の Vif N 末端欠失変異体発現ベクターを作成した (図 1A)。これらを HIV-1 分子クローンである pNL4-3Δenv, VSV-G 発現ベクタ

一と共に non-permissive 細胞である H9 細胞へ遺伝子導入し、24 時間後得られたウイルスの感染性を LuSIV 法により測定した (図 1B)。以前報告したとおり、pNLAI-43Vif により野生型 Vif を過剰発現すると得られるウイルスの感染性は正常なウイルスの 1/5 程度に低下した。ところが 22-25 アミノ酸残基の欠失変異 (M-6) では野生型 Vif よりもさらに強い感染性抑制効果が認められた (図 1C)。

この現象が細胞依存性をしめすかどうかを検討するため、permissive 細胞である HeLa 細胞を用いて上記と同様に遺伝子導入してウイルスを回収し、その感染性を検討した。その結果、H9 細胞と同様に、M-6 変異体では野生型 Vif よりも強い感染性抑制効果が認められた (図 1D)。このように、この領域が司る感染性制御は細胞非依存性に作用することから、本 Vif 作用は apobec3G 等の宿主因子に依存していないことが強く示唆された。

次に、これらの現象がどのような機構によるのかを明らかにするため、遺伝子導入して得られた細胞およびウイルスについて Western blotting 法により解析を行った。野生型 Vif よりも強い感染抑制効果が認められた M-6 変異体では野生型 Vif に比べ顕著な発現増強が認められ、同時にウイルス粒子へのパッケージングも増加していた (図 2)。以上のことより、この領域は Vif 発現を負に制御することが示された。

D. 考察

本研究では、抵抗性変異ウイルスの出現を誘導しにくい新規抗 HIV 薬を開発する一環として、我々が新規に見出した過剰 v-Vif による HIV 成熟阻害作用のメカニズムをより詳細に明らかにすることを目的とした。その結果、22-25 アミノ酸残基の欠失変異を導入された M-6 Vif 変異体は野生型 Vif よりも強い感染抑制効果を示した。またその効果は生理的なレベルの野生型 Vif を発現した H9 細胞でも認められた。このことは、M-6 変異体が強いドミナントネガティブ作用を有することを意味する。

このメカニズムを探るため生化学的解析を行った結果、M-6 変異体は野生型 Vif に比べ顕著に

steady-state level が増強したために、ウイルス粒子へのパッケージングが増大することが示された。予備的実験結果から、M-6 変異体の発現量を低下させても感染性増強効果は見られなかった (data not shown)。従って、M-6 変異体は HIV にとって正の作用が欠失し、且つ負の作用が増強されていることから、このドミナントネガティブ変異体をベースとした HIV 阻害システムの可能性を示唆するものである。今後は抗 APO 活性を消失し、且つ細胞内発現・パッケージング効率がより優れた “minimum i-Vif” の開発を目指していきたい。

E. 結論

Vif 22-25 アミノ酸残基を欠失することにより Vif 発現量およびパッケージング効率が上昇し、その結果野生型 Vif に対して dominant-negative に作用した。これらの知見を応用することで、今後ウイルス粒子成熟過程の新規制御法開発に有用であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Nguyen KL, Llano M, Akari M, Miyagi M, Poeschla EM, Strebel K, Bour S: Codon optimization of the HIV-1 *vpu* and *vif* genes stabilizes their messenger RNA and allows for highly efficient Rev- independent expression. *Virology*, 319, 163-175, 2004.

(2) Akari H, Fujita M, Kao S, Khan MA, Shehu-Xhilaga M, Adachi A, Strebel K: High level expression of Human immunodeficiency virus type 1 Vif inhibits viral infectivity by modulating proteolytic processing of Gag precursor at the p2/NC processing site. *Journal of Biological Chemistry* 279, 12355-12362, 2004.

(3) Fujita M, Akari H, Sakurai A, Yoshida A, Chiba T, Tanaka K, Strebel K, Adachi A: Expression of the HIV-1 accessory protein Vif is controlled uniquely to be low and optimal by proteasome-degradation. *Microbes and Infection* 6, 791-798, 2004.