

図4 CD4陽性CEM細胞とgp120の結合に対するAH (A)、変異体AH (B) およびCV-N (C) の影響

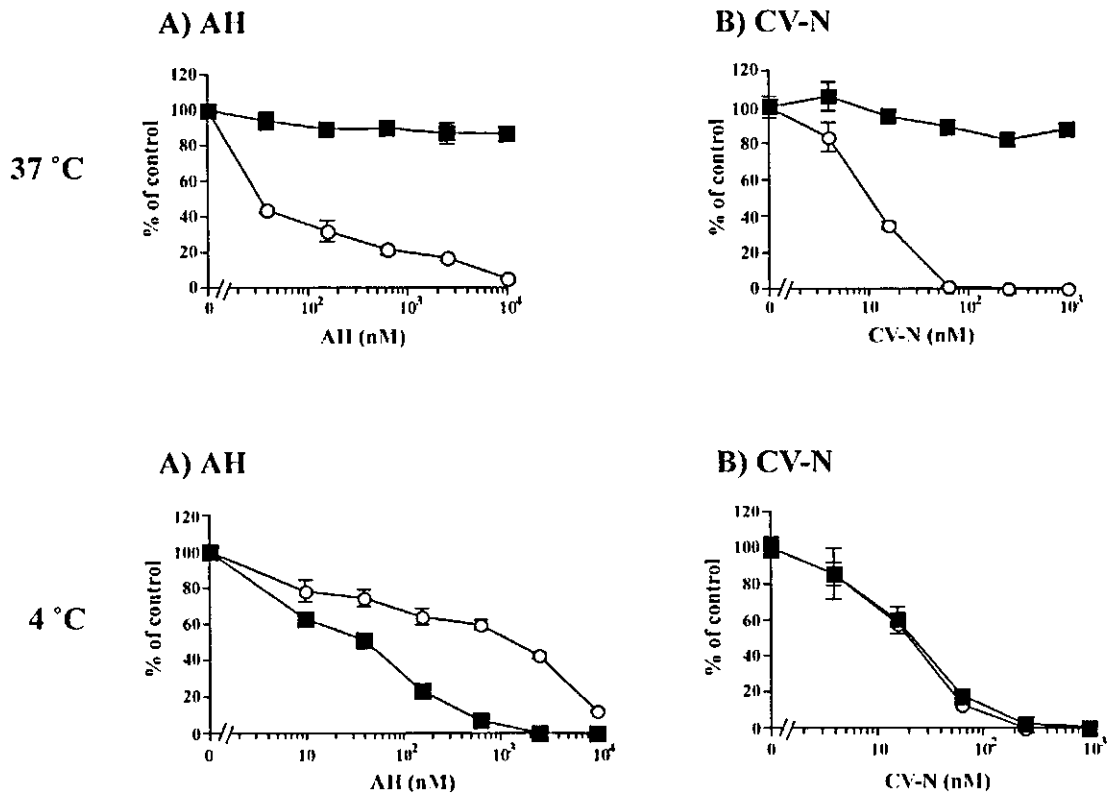


図5 ルシフェラーゼ発現シュードタイプHIVを用いた感染実験

■：ウイルスを37°Cまたは4°Cで1時間細胞と接触後、細胞を2回洗浄し、薬剤添加培地で3日間培養した後のルシフェラーゼ活性。

○：薬剤存在下でウイルスを37°Cまたは4°Cで1時間細胞に接触後、細胞を2回洗浄し、薬剤無添加培地で3日間培養した後のルシフェラーゼ活性。

Protein name	His Tag	Segment 1	Segment 2	Segment 3	IC ₅₀ (μM)
His-AH					0.54
His-AH dimer					0.24

表2 AH dimerの合胞体形成阻害活性

表3 アミノ酸置換変異AHの合胞体形成阻害活性

Protein name	IC ₅₀ (μM)
His-actinohivin (AH)	0.52 ± 0.05
His-AH(Q33A)	9.04 ± 0.81
His-AH(Q71A)	4.96 ± 0.49
His-AH(Q109A)	15.0 ± 1.63
His-AH(Y23A)	12.2 ± 0.73
His-AH(Y61A)	6.23 ± 0.54
His-AH(Y99A)	10.1 ± 0.88

表3 AHセグメントトリマーの合胞体形成阻害活性

Protein	Amino acid sequence	IC ₅₀ (μM)
His-AH	ASVTIRNAQTGRLLDSNYNGNVYILPANGGNYQRWIGP GDGIVRNAQTGRCLDSNYDGAVYILPCNGGSYQWLFY SNGYIQNVETGRVLDSDNYNGNVYILPANGGNYQKWITG	0.56 ± 0.03
HisSeg-1 trimer	ASVTIRNAQTGRLLDSNYNGNVYILPANGGNYQRWIGP GDGIVRNAQTGRLLDSNYNGNVYILPANGGNYQWLFY SNGYIQNVETGRLLDSNYNGNVYILPANGGNYQKWITG	0.28 ± 0.02
HisSeg-2 trimer	ASVTIRNAQTGRLLDSNYNGNVYILPANGGNYQRWIGP GDGIVRNAQTGRCLDSNYDGAVYILPCNGGSYQWLFY SNGYIQNVETGRVLDSDNYNGNVYILPANGGNYQKWITG	2.71 ± 0.19
HisSeg-3 trimer	ASVTIRNAQTGRVLDSDNYNGNVYILPANGGNYQRWIGP GDGIVRNAQTGRVLDSDNYNGNVYILPANGGNYQWLFY SNGYIQNVETGRVLDSDNYNGNVYILPANGGNYQKWITG	0.48 ± 0.04

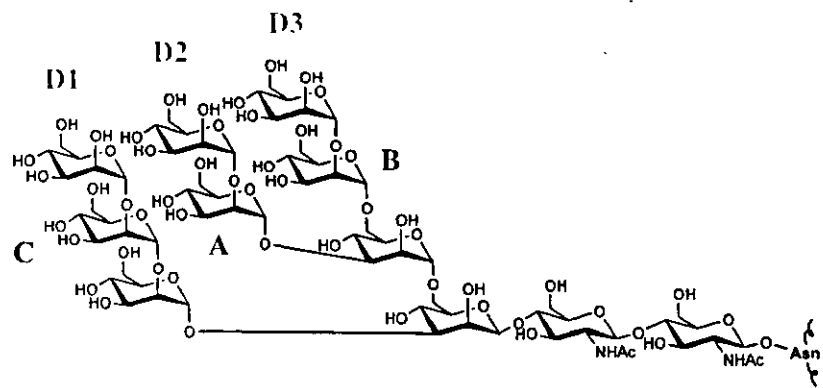


図7 高マンノース型糖鎖 (Man9) の構造

「hu - PBL SCID マウス系での薬剤の抗 HIV-1 活性の評価」

分担研究者 田中勇悦 琉球大学大学院医学研究科免疫学分野 教授

研究要旨：本研究では、生体内で機能し、しかも多剤耐性 HIV-1 を制御を可能とする新たな治療戦略の候補として、HIV-1 の coreceptor アンタゴニストおよびヒトの CD4+T 細胞が産生する R5 HIV-1 抑制因子（CD4 因子）に着目しその有効性を検討することを目的としている。平成 16 年度は、hu-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 SCH-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。

A. 研究目的

HIV-1 はヒト以外の動物にエイズを起こさない。霊長類を用いる感染実験では、人工的に病原性を付加したサルエイズウイルス（SIV-1）と HIV-1 の合の子ウイルスが用いられること、またこれらの動物入手が困難であることなどかなりの制限があるのが現状である。そこで本研究では、これらヒトや猿の代わりに、HIV-1 生体感染実験をシュミレーションできるモデルである hu-PBL-SCID マウスを用いて HIV-1 感染実験を行い、個体内における種々の薬剤耐性 HIV-1 の感染病態を解明し、その制御法について研究開発を進めることを目的とする。具体的には、薬剤耐性 HIV-1 に対する HIV-1 coreceptor アンタゴニストの抗 HIV-1 効果、および樹状細胞免疫法を用いて誘導されるヒトの抗 R5 HIV-1 抑制因子の抑制効果について十分な検討をすることを目的とする。

B. 研究方法（倫理面への配慮）

成人 PBMC を移植した hu-PBL-SCID マウスに、R5 HIV-1JR-CSF 株分子クローンを感染させて 3 日後、バイレミアが起きた状態で CCR5 アンタゴニストである SCH-C を 5 日間連続投与し、

CXCR4 を使う変異株が出現するかどうか、回収血清、腹腔洗浄液、回収細胞に含まれるウイルスを試験管内で MT-2 細胞に感染させた。

ヒトの抗 R5 HIV-1 抑制因子の誘導のために、培養樹状細胞を不活化 HIV-1 抗原で感作し、hu-PBL-SCID マウスを免疫した。応答する CD4+T 細胞がどのような抗原を認識するのかについては、500 種余の HIV-1 のペプチドを用いて検討した。

この動物実験計画は、琉球大学の動物実験倫理委員会で審査され、許可されている。また供血者には十分な説明をして了解を得た上で協力をいただいた。

C. 研究結果：

現在日本で入手可能な 3 系統の hu-PBL-SCID マウス（C.B-17、NOG、RAG2/γc-系統）に、R5 HIV-1JR-CSF を感染させバイレミアが起きている状態のマウスに、CCR5 アンタゴニスト SCH-C を接種直後に体内濃度が 10 μM になるように（腹腔内接種）、1 日 1 回、5 日間連続投与した。このマウスで CCR5 アンタゴニストを回避し、その代用として CXCR4 を使う変異株が出現するかどうかを、回収血清、腹腔洗浄

液、回収細胞について調べた。CXCR4 を使う HIV-1 は効率良く MT-2 細胞で増殖することから、上記サンプルを MT-2 細胞に加え、一ヶ月継代培養を行った。培養上清中のウイルス p24 を定期的にモニターしたが、X4 ウイルスの存在は観察できなかった。

RAG2/ γ c-系統 SCID マウスにヒト PBMC と不活化 HIV-1 感作培養樹状細胞を移植した hu-PBL-SCID マウスには、R5 HIV-1 特異的抑制因子が誘導できる。この因子はどのようなウイルス蛋白に反応するヒト CD4+T 細胞が産生するのかを検討するため、免疫 CD4+T 細胞を種々の HIV-1 ペプチドで再刺激し、培養上清中の R5 HIV-1 抑制活性能を測定した。抗原性を持つ HIV-1 ペプチドには多様性があり、複数のウイルス抗原が認識された。HLA 拘束性と思われるドナー間の差違も観察された。

D. 考察：

感染初期からエイズ期において感染者内に寄生する R5 HIV-1 の増殖抑制とその CXCR4 指向性 HIV-1 への変異を予防する治療法を開発することは、エイズ発症阻止につながる大きな目標である。

今回、R5 HIV-1 感染 hu-PBL-SCID マウスの CCR5 antagonist SCH-C 投与実験では CXCR4 指向性 HIV-1 が回収されなかった。この観察は、以前の報告で変異が起きるとされている別の CCR5 antagonist AOP-RANTES よりも SCH-C が変異予防に優れていることを示唆する。あるいは、今回の hu-PBL-SCID マウス実験系が CXCR4 指向性 HIV-1 への変異に対し抑制的に働く生体内環境なのかもしれない。何れにせよ、本薬剤および CXCR4 アンタゴニストが、薬剤耐性の R5 HIV-1 に効果があるかどうかの検討をしてゆきたい。

一方、R5 HIV-1 特異的抑制因子を産生する免疫ヒト CD4+T 細胞は、複数の HIV-1 およびその中でも複数の HIV-1 ペプチドを認識することから、薬剤耐性の R5 HIV-1 がエピトープ抗原を保持していれば、樹状細胞免疫で制御が可能かもしれない。薬剤耐性 R5 HIV-1 がこの因子で制御できるかを今後検討してゆきたい。

E. 結論

R5 HIV-1 感染後バイレミアになった hu-PBL-SCID マウスでは、短期間の CCR5 アンタゴニスト SCH-C 投与によって X4 HIV-1 が出現しないこと、ヒト 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明らかにした。

F. 健康危険情報

HIV-1 の感染実験、ウイルスの保管は全て琉球大学医学部で定める感染微生物取り扱い安全管理委員会の規定に基づき、P3 実験施設で行われている。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Yoshida A, Kodama A, Tanaka R, Yamamoto N, Ansari AA and Tanaka Y. Identification of HIV-lepitopes that induce the synthesis of a R5 HIV-1 suppressor factor by human CD4+T cells isolated from HIV-1 immunized hu-PBL SCID mice. *Clinical and Developmental Immunology*, 2005. in press.

2. 学会発表

(1) Tanaka Y., Yoshida A, Tanaka R, Murakami T, Yamamoto N. Heterogeneity of HIV-1

epitopes recognized by a novel HIV-1 suppression factor-producing human CD4+ T cells derived from hu-PBL-SCID mice immunized with HIV-1-loaded autologous DC. XV international AIDS conference, Bangkok 11-16 July 2004, abstract vol 2, p 319.

- (2) Murakami T, Yoshida A, Kumakura S, Tanaka R, Mitsuhashi S, Hirose K, Yanaka M, Yamamoto N, and Tanaka Y. KRH-2731-5HCl: A new potent and orally bioavailable X4 HIV-1-inhibiting CXCR4 antagonist in vivo. XV international AIDS conference, Bangkok 11-16 July 2004, Program supplement p 30.

H. 知的所有権の出願・取得状況
なし

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

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

分担研究者 野村 伸彦
富山化学工業株式会社 総合研究所 主任研究員

研究要旨

約 12000 検体の低分子化合物ライブラリーの評価を行い、HIV-1 インテグラーゼ阻害活性を有し、抗 HIV-1 活性を示す新規カルバゾール化合物を見出した。更に、同誘導体 23 化合物について検討した結果、置換基の種類と阻害活性に相関が認められた。今後、更に検討を重ね、カルバゾール化合物の新規薬剤としての可能性を見極めていく。

A. 研究目的

約 12000 検体の低分子化合物ライブラリーの評価を行い、HIV-1 インテグラーゼ阻害活性を有し、抗 HIV-1 活性を示す新規カルバゾール化合物を見出した。更に、同誘導体 23 化合物について検討した結果、置換基の種類と阻害活性に相関が認められた。今後、更に検討を重ね、カルバゾール化合物の新規薬剤としての可能性を見極めていく。

B. 研究方法

IGEN 社 M8 analyzer を用いて、約 12000 検体の低分子化合物の IN 阻害活性を評価した。0.1mM で 90%以上の阻害活性を示す 72 化合物に関して、既に報告している *in vitro* strand transfer assay 並びにヒト T 細胞株 HPB-M(a) レポーター細胞を宿主とした HIV-1(HXB2) に対する阻害活性（抗 HIV-1 活性）を指標に化合物の絞込みを行った。また、ヒット化合物の分子構造の相同性を検討するために、SYBYL software Version6.9.1(Tripos 社)を用いて解析を行った。

（倫理面への配慮）特になし

C. 研究結果

約 12000 検体の化合物ライブラリーを評価した結果、IN 阻害活性並びに抗 HIV-1 活性を示す新規カルバゾール化合物を見出した（CA-0 : Fig.1）。同ヒット化合物の IN 阻害及び抗 HIV-1 活性は、各々 $IC_{50}=1\sim 5\mu\text{M}$ 及び $0.48\mu\text{M}$ であった。カルバゾール母核を有する 23 化合物について更に検討したところ、6 化合

物に強い阻害活性（ $IN:IC_{50}<10\mu\text{M}$ ）を見出した。活性と構造に関して詳細に検討するために、強い阻害活性を示す 6 化合物及び活性を示さない（ $IN:IC_{50}>100\mu\text{M}$ ）5 化合物に関して分子モデリングを行ったところ、活性を示す化合物群に構造の高い相同性が認められた（Fig.2）。

D. 考察

カルバゾール化合物の置換基と IN 阻害活性の関係についてして考察した結果、1) 2 位ジメチルアミノエチル基は活性に必須である、2) 5,6,7 位へのメチル基の修飾は活性上昇に寄与するが、それ以上の嵩高い分子の存在は活性低下を招くことから、カルバゾールの IN への結合サイトは空間的に限定されている可能性が示唆された、3) 水酸基で修飾された 8,9 位は活性上昇することから、これらの置換基は IN 結合サイトへ水素結合するアクセプターとして機能している可能性が示唆された。今後、更にカルバゾール化合物の構造と IN 阻害活性との関係を明らかにすることによって、新しい薬剤の開発のみならず、IN の構造と機能に関する知見も得られるものと考えている。

E. 結論

約 12000 検体の化合物ライブラリーを評価した結果、IN 阻害活性を有し抗 HIV-1 活性を示す新規カルバゾール化合物を見出した。今後、周辺化合物の合成ならびに評価を進め、新規薬剤としての可能性を見極めていくのみならず、IN の構造と機能についても検討していく。

F.健康危険情報

特になし

G.研究発表

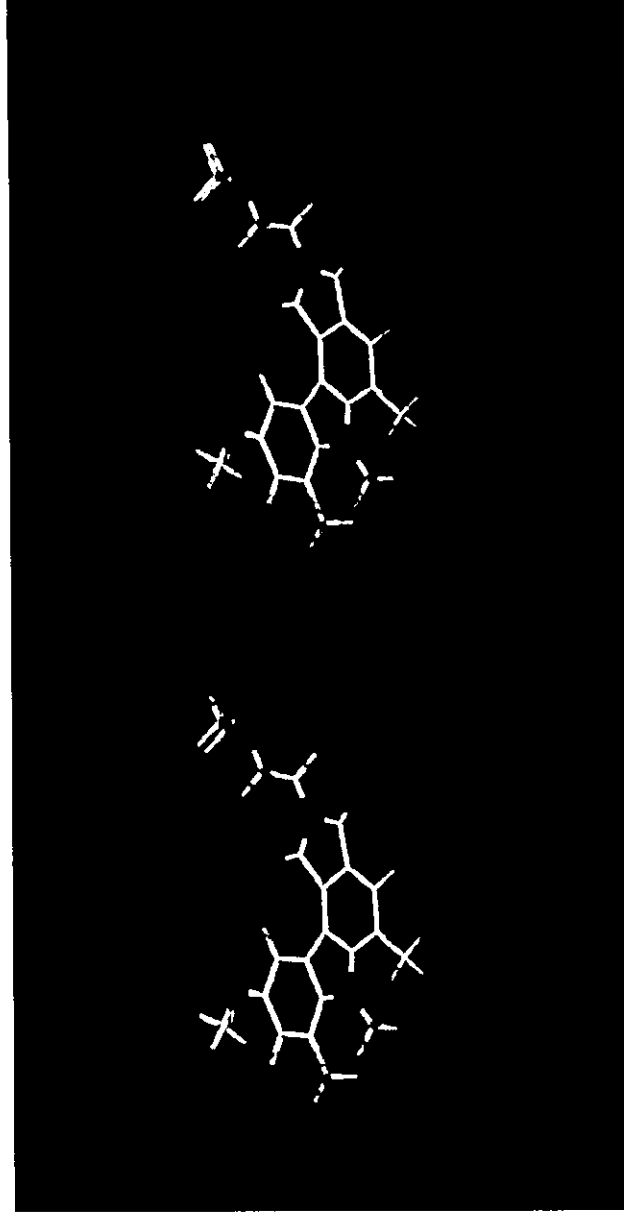
学会発表

1) 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

H.知的財産権の出願・登録状況

特許出願中

(A)



(B)

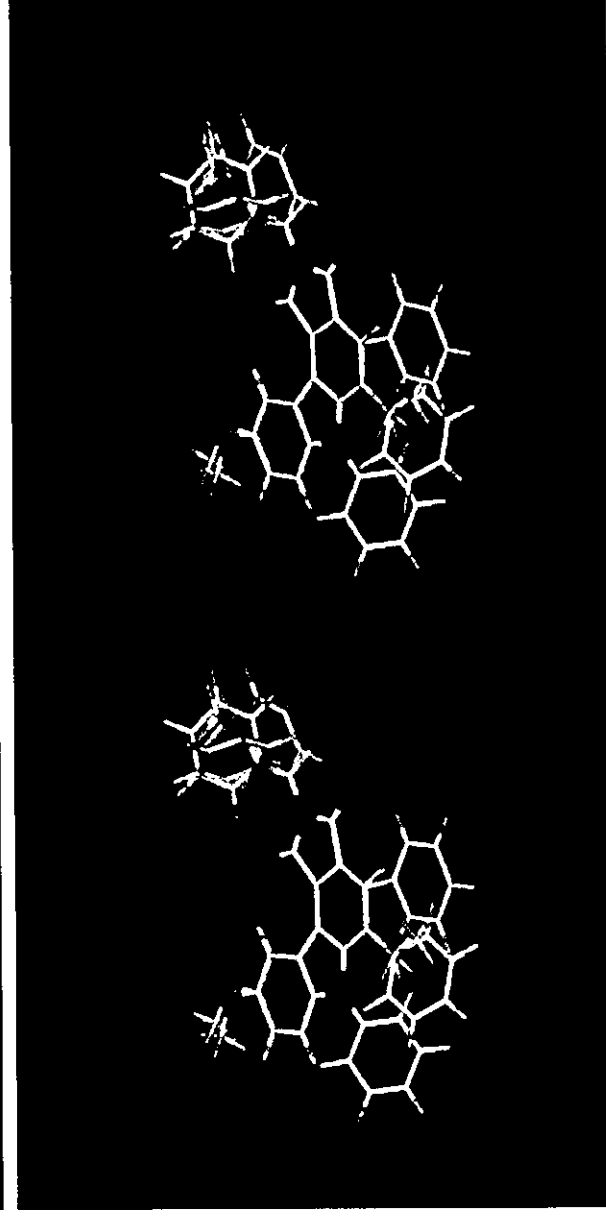


Fig.2. カルバゾール化合物の重ね合わせ

(A) 6 化合物:IN 阻害活性 $IC_{50} < 10 \mu M$, (B) 5 化合物:IN 阻害活性 $IC_{50} > 100 \mu M$

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Saeng – Aroon S, Wichukchinda N, Myint L, Pathipvanich P, Ariyoshi K, Rojanawitwat A, Matsuda M, Sawanpanyalert P, Sugiura W, Auwanit W	Study of Antiretroviral Drug Resistant HIV-1 Genotypes in Northern Thailand and 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
Hua Yan, Tohko Miyagi, Eigo Satoh, Wataru Sugiura, Naoki Yamamoto, Hiromitsu Kimura.	Phenotype and function of GM-CSF independent dendritic cells generated by long-term propagation of rat bone marrow cells.	Cellular Immunology	229 (2)	117-129	2004
Hirotsuka Ode, Masami Ota, Saburo Neyama, Msayuki Hata, Wataru Sugiura, and Tetsuji Hoshino	Resistant Mechanism against Nelfinavir of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Proteases.	J phys Chem B	109	564-574	2005

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
W Sugiura, M Matsuda, T Chiba, J Kakizawa, M Nishizawa, H Miura, M Hamatake, 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
K. Shiomi, R. Matsuji, 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(1)	65-68	2005
Miyauchi K, Komano J, Yokomaku Y, Sugiura W, Yamamoto N and 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		
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
Akari H, Fujita M, Kato 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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
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
Furutsuki T, Hosoya N, Kawana-Tachikawa A, Tomizawa M, Odawara T, Goto M, Kitamura Y, Nakamura T, Kelleher AD, Cooper DA, Iwamoto A.	Frequent transmission of cytotoxic-T-lymphocyte escape mutants of human immunodeficiency virus type 1 in the highly HIV-1 A-A24-positive Japanese population.	J Virol	78	8437-8445	2004
Funeshima N, Fujino M, Kitazawa Y, Hara Y, Hayakawa K, Okuyama T, Kimura H, Li XK.	Inhibition of allogeneic T-cell responses by dendritic cells expressing transduced indoleamine 2,3-dioxygenase.	J Gene Medicine	in press		
Masui N, Nishikawa T, Takagi Y, Kimura H, Mori M, Yokose S, Asai H, Gonda T, Yanabe M, Sato K.	Establishment of a set of combined immunodeficient DA/Slc-Foxn1(rnu) Lyst(bg) congenic rat strains.	Exp Anim	53	399-407	2004
Guo L, Li XK, Enosawa S, Funeshima N, Suzuki S, Kimura H, Sugawara Y, Tezuka K, Makuuchi M.	Significant enhancement by anti-ICOS antibody of suboptimal tacrolimus immunosuppression in rat liver transplantation	Liver Transpl	10	743-747	2004

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Fujino M, Kitazawa Y, Kawasaki M, Funeshima N, Kimura H, Nakajima T, Saito H, Li XK.	Differences in lymphocyte gene expression between tolerant and syngeneic liver grafted rats.	Liver Transpl	10	379-391	2004
Komano J, Miyauchi K, Matsuda Z, Yamamoto N.	Inhibiting the Arp2/3 Complex Limits Infection of Both Intracellular Mature Vaccinia Virus and Primate Lentiviruses.	Mol Biol Cell	15	5197-207	2004
H. Chiba, J. Inokoshi, H. Nakashima, S. Omura and H. Tanaka	Actinohivin, a novel anti-human immunodeficiency virus protein from an actinomycete, inhibits viral entry to cells by binding high-mannose type sugar chains of gp120.	Biochem Biophys Res Commun	316	203-210	2004
Yoshida A, Kodama A, Tanaka R, Yamamoto N, Ansari AA and Tanaka Y.	Identification of HIV-1 epitopes that induce the synthesis of a R5 HIV-1 suppressor factor by human CD4+T cells isolated from HIV-1 immunized human PBL SCID mice.	Clinical and Developmental Immunology	in press		