

Z00500901A

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17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 杉浦 亙

平成18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 1 8
(独) 医薬基盤研究所・霊長類医学研究センター 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 2 3
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 2 5
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 2 9
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 3 5
北里研究所 基礎研究所 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 4 5
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 4 8
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 4 9

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

新規抗HIV-1薬剤開発のために①HIV-1の宿主細胞への接着・侵入、②HIV-1ゲノムの宿主ゲノムへの組み込み、③Tat活性、④Vif機能そして⑤ウイルス・宿主因子相互作用の5つの標的を選び、これらの機能およびHIV-1の増殖を抑制する低分子化合物の探索を実施した。その結果、現在までに複数のリード化合物の同定に成功した。同定した化合物についてその阻害機序の詳細な解析を行った。

分担研究者

明里宏文（独立行政法人医薬基盤研究所

・ 霊長類医科学研究センター）

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（北里研究所 基礎研究所）

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）

A.研究目的

既存の抗HIV-1薬剤に対して多剤耐性を獲得した難治症例を救済するために、既存の薬剤とは標的および阻害機序が異なり交叉耐性を示さない新規薬剤の開発を目的としている。また新規薬剤を探索するための新たな評価系の確立も目標としている。

B.研究方法（詳細は各分担研究者報告書を参照）

研究班では検索グループと評価グループの2グループに分かれて研究開発を進めている。

検索グループ：新たな標的を探索するための評価系の構築と、富山化学の保有する低分子化合物ライブラリを対象に抗HIV-1 阻害活性を呈する新

規化合物の検索を実施した。

(1)組み込み阻害剤の探索（杉浦、野村、北村、駒野）

a.インテグラーゼ精製法の改良：インテグラーゼ精製の難点に疎水性タンパクであることが挙げられる。そこで酵素の親水性を向上させ、大量かつ安定に供給するための改良を試みた。データベースよりインテグラーゼ遺伝子配列中の疎水性残基が親水性残基に置換されている自然変異体を探索し、その変異体インテグラーゼを大腸菌で作製し、溶解度とその組み込み活性を調べた。

b.低分子化合物のスクリーニング：一次スクリーニングを*in vitro* strand transfer assayで行い、候補化合物を絞りこんだ後にHIV-1と培養細胞を用いたHIV増殖抑制効果と細胞毒性の評価を実施した。

c.インテグラーゼ組み込み活性を評価する細胞培養系の確立：ヒト培養細胞にマウス白血病ウイルス（MLV）を感染させ、組み込み相対活性を評価する新たな培養系の開発を試みた。

d.組み込み酵素を阻害するHIV由来ペプチドライブラリの探索：HIV-1がコードする9種類のタンパク質をそれぞれN末端から10～15アミノ酸の長さで重複かつ連続した配列のペプチドを合成し、それを20～50種類ずつ含む16のプールに分割し、*in vitro* strand transfer assayによるインテグラーゼ阻害活性を評価した。阻害活性が認められたものについてはプールを構成する個々のペプチ

ドについてインテグラーゼ阻害活性を評価した。

(2) Tat阻害剤の探索 (野村、杉浦)

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組み込んだパッケージ細胞に導入し、Tat/TAR阻害活性を示す薬剤のスクリーニング系 (永井ら J.Virol.2003, 3238-3246) をもちいて低分子化合物の阻害活性を探索する。

(3) Vif阻害剤探索系の確立 (明里)

APOBEC-3G欠損細胞と正常細胞を用いたVif阻害剤スクリーニング系の確立を行った。

(4) 新たな標的細胞としての樹状細胞由来レポーター細胞株の樹立 (木村)

マウス樹状細胞XS106そしてFlt3/IL-6によってラット骨髄細胞より誘導した樹状細胞の2種類に対してアデノウイルスベクターを用いた indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) の導入、HVJウイルスベクターあるいはHIV改変第三世代レンチウイルスベクターによるEGFP遺伝子の導入を試みた。IDOの導入判定には抗原提示機能の評価を、EGFP導入効率の判定にはFlow-cytometerを用いた。

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。また、新たなスクリーニング系の確立に繋がる薬剤開発標的タンパクの機能的解析研究を行う。

(1) 候補化合物の化学的修飾による阻害活性の増強と毒性の軽減 (野村、杉浦)

富山化学の低分子ライブラリ12000化合物のスクリーニングから見いだした非インテグラーゼ阻害剤 (化合物1群) 3種類とインテグラーゼ阻害剤 (化合物2群) 2種類について類縁化合物の評価および側鎖の修飾による阻害活性の増強と細胞毒性の軽減を試みた。

(2) 候補化合物の作用機序の解析 (野村、杉浦)

IN以外の機序で阻害活性を呈した化合物1群から3化合物 (化合物1-a、1-b、1-c)、インテグラーゼ阻害活性を示した化合物2群よからは1化合

物 (2-d) 選び、M8166細胞、およびヒトPBMCでの薬剤耐性ウイルスの誘導を試みた。

(3) hu-PBL-SCIDでの阻害効果の確認 (野村、杉浦、田中 (勇))

化合物2群より小動物への毒性がないことを確認した化合物を1種類選び、in vivoにおける抗HIV活性の評価をhu-PBL-SCIDを用いた小動物実験系で試みた。ヒトPBMC 1×10^7 個を移植して構築したhu-PBL-SCIDにJR-CSFを1000TCID₅₀感染させた後、1群の化合物1-eあるいはnevirapineをそれぞれ100mg/kg/dayの容量で14日間経口投与し、7日と14日の2点において血中ウイルス量の変動を観察した。

(4) 接着・侵入阻害物質アクチノビンの構造化学的解析 (田中 (晴))

北里大学で開発したHIV接着・侵入阻害剤アクチノビン (AH) は、gp120の高マンノース型糖鎖の α (1-2)mannobiose及び α (1-2)mannotrioseに結合することによりHIVのすることが明らかとなっている。本研究では、AHの選択的な糖鎖認識機構を明らかにすると共に、阻害活性の高い変異AHの作成、臨床分離株への阻害活性の評価を行った。AHは新属新種の放線菌 *Longispora albida* gen. nov., sp. nov. の培養液上清から精製したものをを用いた。AHの阻害活性の評価は当研究室で開発したin vitroシンシウム形成系で、gp120に対するAHの親和性はELISA法により、糖鎖に対する親和性は分子間相互作用解析装置IASysを用いて測定した。患者分離株に対する抗HIV活性の測定は国際医療センター岡慎一博士に依頼した。

(5) Vif機能を応用した新規抗HIV薬開発のための基盤的研究 (明里)

HIV-1 Vifおよび各種Vif欠失変異体の発現ベクターであるpNLA1-43Vif/Vif mutantsをHIV-1分子クローンであるpNL4-3Denv, 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SIVの感染によりluciferaseを発現する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。

(6)CD4因子の多剤耐性HIV-1に対する阻害効果の解析 (田中 (勇))

多剤耐性HIV-1に対する新たな治療薬の候補としてCXCR4、CCR5そして田中 (勇) らが発見したCD4因子が期待される。この研究では多剤耐性HIV-1株に対してCD4因子の有効性について評価を行った (田中勇)。正常ドナーのPBMCをanti-CD3/anti-CD28抗体コートビーズと1:1の比率で混合し、20U/mlのIL2を含む5% FCS-RPMI1640で3日間刺激培養し、標的細胞とした。CXCR4アンタゴニストは呉羽化学のT-1636(10uM)、CCR5アンタゴニストはSCH-C(10uM)、CD4因子はHTLV-1とトランスフォーム細胞TM#8の培養上清を10%で用いた。標的細胞25万個/0.1mlに種々の阻害剤を添加し、一時間後にウイルスを1000TCID50感染させ2時間培養した。3回洗浄後20U/ml IL2培地で5日間培養し、培養上清のp24をELISAで測定し、抑制の度合いを評価した。

(7)カルバゾール誘導体のインテグラーゼ阻害機序の解析 (野村、杉浦)

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。

C.研究成果

検索グループ

(1)組み込み阻害剤の探索

a.インテグラーゼ精製法の改良：185番目のフェニルアラニンがリシンに置換された変異F185Kを獲得したインテグラーゼは親水性が高まり溶解度が増すことが明らかになった。しかしF185Kでは組み込み活性が低下してしまうことから、同部に他の親水性アミ

ノ酸を置換した変異体を作成し解析した結果、ヒスチジンに置換したF185H変異体であると組み込み活性を保持しながら親水性を高めることができることを明らかにした。

b.低分子化合物のスクリーニング：富山化学の低分子化合物ライブラリのうち今までに評価をしてこなかった残り約8800検体についてin vitro strand transfer assayによるスクリーニングを実施した。その結果100uMでの一次スクリーニングで76検体(4.3%)がヒットし、これらについては個別にIC50を求めた結果、IC50<30uMのものが32検体(0.36%)同定された。インテグラーゼ阻害剤に関してはライブラリのスクリーニングは完了した。

c.インテグラーゼ組み込み活性を評価する細胞培養系の確立：富山化学から供与されたHIVの組み込み酵素阻害薬化合物1、化合物2について、MLVの組み込み活性を阻害できるかどうか解析した結果、化合物1、2とも10uMの濃度でインテグラーゼ活性を10%以下にまで抑えた。化合物2は0.3uMでも10%の抑制効果を呈した。

d.組み込み酵素を阻害するHIV由来ペプチドライブラリの探索：評価した16プールのうちNo11とNo15の2つでそれぞれ20%と40%の阻害活性を認めた。更に個別ペプチドについて阻害活性を測定した結果、No11では2つの、No15では1つのペプチド配列が同定された。これらのペプチドのIC₅₀は5uMと推定された。現在同定されたペプチド配列を元にした化合物合成を試みている。

(2) Tat阻害剤の探索：

少数の化合物を用いて評価系の確認を行った。現時点ではTat阻害剤のスクリーニングは進展していない。本年度後半から次年度にかけてのスクリーニングを予定している。

(3) Vif阻害剤探索系の確立

少数の化合物を用いて評価系の確認を行った。現時点ではTat阻害剤のスクリーニングは進展していない。本年度後半から次年度にかけてのスクリーニングを予定している。

(4)新たな標的細胞としての樹状細胞由来レポー

ター細胞の確立。

マウス細胞株XS106ではアデノウイルスベクターを用いたIDO遺伝子導入による抗原提示能の抑制効果が確認された。またマウス・ラット・骨髄細胞由来樹状細胞ではウイルスベクターによる遺伝子導入と発現はできなかった。しかし骨髄細胞培養初期から、毒性の低い第三世代HIVウイルスベクターを用いてEGFPの導入を試みたものでは最終的にCD161陽性樹状細胞にEGFPの発現が確認された。

評価グループ

(1) 候補化合物の化学的修飾による阻害活性の増強と毒性の軽減 (野村、杉浦)

今までのスクリーニングの結果、大まかに分類して2群の化合物が見いだされている。一つは阻害機序の明らかでないHIV-1阻害化合物(化合物1群)が3種類、もう一つはin vitro strand transfer assay で組み込みの阻害を呈した化合物(化合物2群)で2種類の化合物が発見されている。これらの化合物の阻害活性を既存の抗HIV-1阻害剤と比較してみると、ほぼ同等もしくはより強い阻害活性を呈することが明らかになった。

我々は更に抗HIV阻害効果を増強させることを目的に第1群、第2群あわせて380種類の類縁化合物について抗HIV阻害活性の評価をMaRBLE細胞による評価系で実施した。特に1群のリード化合物については阻害活性の増強と毒性の軽減を目的に母核を固定し側鎖を置換した101個の類縁化合物について評価を行った。この101化合物は側鎖の位置と化学的正常に基づいて大きく5グループ分類された。その結果、21の化合物において抗HIV阻害活性は10-100倍の増強を認めた。残念ながら修飾によりむしろ毒性の増強してしまった化合物も少数ながら認められた。

(2) 候補化合物の作用機序の解析 (野村、杉浦)
インテグラーゼ以外の化合物3種類(化合物1-a、1-b、1-c)、インテグラーゼ阻害活性を示した化合物2群よからは1化合物(2-d)を選び、それについてin vitroでの薬剤耐性HIV-1の誘導を試た。

その結果化合物1群の1-cについて薬剤耐性HIVの誘導に成功した。継代培養ではIC₅₀の170倍の濃度まで薬剤濃度を上げることに成功したが、分離されたウイルスによる感受性検査では10倍程度の耐性しか示さなかった。現在遺伝子配列などの解析に取り組んでいる。

(3) hu-PBL-SCIDでの阻害効果の確認 (野村、杉浦、田中(勇))

化合物1群の1-Dのin vivo阻害効果の評価をhu-PBL-SCIDマウスモデルで行った。コントロールとして既に臨床で用いられているnevirapineを用いた。Hu-PBL-マウスにJR-CSF感染させ14日間の薬剤経口投与を実施し、7日目と14日目に血中ウイルス量の測定を行った。その結果1-D投与マウスでは血中ウイルス量の有意の低下が認められた。また、その抑制の度合いはnevirapineと同程度であることが明らかになった。

(4) 接着・侵入阻害物質アクチノビン(AH)の構造化学的解析 (田中(晴))

AHはgp120の高マンノース型糖鎖に含まれる α (1-2)mannobiose及び α (1-2)mannotrioseに特異的に結合するが、その親和性は弱かった。またAHの親和性は糖鎖の数に影響を受け、Man9や高マンノース型糖鎖を1本のみ持つ糖タンパク(RNaseBなど)に対するAHの親和性は弱い、多くの高マンノース型糖鎖を含むgp120に対しては強い親和性を示すことが明らかになった。一方、AHと同様に糖鎖に結合してHIV-1を阻害することが知られているシアノピリン-NではMan9やRNaseBに対してもgp120と同等の強い親和性を示した。AHは、逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤に耐性となった患者分離株にも強い抗ウイルス活性を呈したが、糖鎖数が少ない株に対する活性は弱かった。gp120の糖鎖を認識する抗体2G12との競合関係を調べた結果、AHは2G12とgp120の結合を阻害するが、一方2G12はAHとgp120の結合を阻害しなかった。AHの各種変異体の合胞体形成阻害活性を調べた結果、活性発現に

は3つのセグメントが必要であり、LD-QXW配列中の6種類のアミノ酸が阻害活性の発現に必須であることが明らかとなった。親和性の高いAHを作るために3量体および2量体のAHの作成を行った。その結果3量体では2倍、2量体では4倍の阻害活性の上昇を認めた。計算化学的手法による解析の結果、各セグメントには高マンノース糖鎖の3本の側鎖のうち2本が配位することがわかった。

(5)Vif機能を応用した新規抗HIV薬開発のための基盤的研究 (明里)

HIV粒子へ過剰に取り込まれたVif(virion Vif; v-Vif)は、ウイルスプロテアーゼによるGag前駆体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。Vif 10-13アミノ酸残基を中心とする領域はこのプロセッシング阻害に必須であり、この4アミノ残基の欠損によりGag前駆体のプロセッシング阻害効果は失われることが明らかになった。また、Vif 22-25アミノ酸残基は本機能の負の調節に関与しており、この領域を欠損することによりGag前駆体のプロセッシング阻害効果はむしろ増強されることも明らかになった。これらの現象は細胞種に非依存性であり、Vifの抗ApoBec作用とは独立していると考えられた。

(6)CD4因子の多剤耐性HIV-1に対する阻害効果の解析 (田中 (勇))

患者分離ウイルス11株について解析を行った。感染価をそろえて活性化PBMCに感染させCXCR4アンタゴニスト、CCR5アンタゴニスト、CD4因子前処理の阻害効果を評価した結果、11株中4株がCCR5およびCD4前処理により抑制された。これら4株ではCXCR5とCD4因子の相乗効果は認められなかった。

(7)カルバゾール誘導体のインテグラーゼ阻害機序の解析 (野村、杉浦)

インテグラーゼ阻害活性をしめしたカルバゾール誘導体23化合物についてその責任構造について解析を行った。その結果R2位の2-demethylaminoethyl残基と平坦な構造が阻害

活性の発現に重要であることが明らかになった。カルバゾール化合物に関しては強いインテグラーゼ阻害活性を呈したものの、細胞毒性が強く、側鎖などの修飾では毒性の軽減は期待できないことから、現時点ではカルバゾールを母核とする薬剤開発は一旦中断することとした。

D.考察

コンピューターによるドラッグデザインが主流である今日、我々は敢えてランダムスクリーニングという手法による新薬開発に挑戦した。ドラッグデザインは構造・機能が解明された標的にしか対応できないが、周知のようにHIV-1の病態にはまだ未解明の事実が多数ある。我々はそのに新たな治療標的を見いだせる可能性があるを期待し、1年半(創薬二期のプロジェクト期間も加えれば4年半)にわたり約25000の化合物ライブラリのランダムスクリーニングを行ってきた。ランダムスクリーニングを効率よく進めるために、接着・侵入、インテグラーゼ、TatそしてVifというある程度標的を絞った標的特異的な評価系と、MaRBLE細胞およびヒト細胞で増殖可能なSIVを用いたHIVあるいはSIVの感染性全般を標的にした非特異的な評価系の両方を併用した。現在までにインテグラーゼ阻害活性、接着侵入阻害活性のスクリーニングについては全て終了し、複数の候補化合物の同定に成功している。また現時点では作用機序が明確ではないが(RT阻害剤疑い)強い抗HIV-1阻害活性を呈する化合物群を同定しており(化合物1群)、今後の阻害機序の解明が急務となっている。一方TatおよびVif機能の阻害については評価系に構築を終了したところまでで、スクリーニング自体は今後の実施となるが、過去2年間の開発経験を踏まえて、個別の標的に対するスクリーニングの前段階としてMaRBLE細胞の評価系による一次スクリーニングを実施することとした。その上でヒット化合物を個別の標的に対する評価系で解析し、薬剤の作用機序を同定することとした。

E.結論

研究班では複数のリード化合物の同定に成功し、プロジェクト期間内に臨床実用化の可能性について結論をつけることを目標に阻害機序等の解明に取り組んでいる。開発計画は申請書に記載した当初計画に沿って進捗しており概ね順調であるが、先にも記載したようにTatとvif機能阻害剤のスクリーニングが遅れ気味となっている。平成18年度はこの二つの阻害化合物開発を目指してスクリーニングを行っていく。

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

PCT/IP2005/021981

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

II. 分担研究報告書

研究要旨

新規抗HIV-1薬を開発することを目的として、化合物のスクリーニング、および効果の認められた化合物に関して、作用メカニズムの解明を行った。異なる2通りの方法でのスクリーニングの結果、抗HIV-1効果を示す化合物が153種類検出され、それらのうちの4種類に対する耐性ウイルスが誘導できた。今後このウイルスの解析等を行うことにより、薬剤の作用点を明らかにしていく。

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上げてきたが、その一方で薬剤耐性ウイルスの出現という新たな問題が注目されるようになった。この問題を克服するには、既存の抗HIV-1薬とは作用機序の異なる、あるいは作用機序は同じでも耐性を獲得したウイルスにも効果のある新たな治療薬の開発が急務である。第一に、我々は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た。さらに、抗HIV-1活性の認められた薬剤のうちNo.1～4の4種類について、薬剤耐性誘導、耐性獲得ウイルスの薬剤感受性試験を行った。

B.研究方法

1) 候補抗HIV-1薬のスクリーニング

まずはじめに、約12000種類の化合物についてM8 analyzerによる、抗integrase strand transfer阻害活性を測定した。さらに抗HIV-1活性の認められたものとその類縁化合物について二次スクリーニングとして我々が独自に開発したin-houseの系であるMARBLE cell assayを実施した。ヒットした化合物については再度M8 analyzerによるstrand transfer阻害活性の有無を評価した。integrase阻害活性を呈するもの、呈さないが抗HIV-1活性を示すもの各々についてさらに類縁化合

物を合成し、今回合計364種類の化合物についてMARBLE cell assayにより抗HIV-1活性の評価を行った。

2) 薬剤耐性ウイルスの誘導

抗HIV-1活性を有していた4種類について薬剤耐性ウイルスの誘導を行った。2 x 10⁶個のM8166細胞に800 TCID₅₀のHIV-1 HXB2を感染させ、薬剤の濃度はIC₅₀の4分の1の濃度で培養を始めた。RT活性をモニタリングしながら培養し、ウイルスの増殖が確認された時点で薬剤の濃度を増やして継代を続け、経時的にウイルスを回収した。また、SupT1細胞でも同様の誘導を試みた。1 x 10⁶個のSupT1細胞に1000 TCID₅₀のHIV-1 HXB2を感染させ、薬剤の濃度はIC₅₀の10倍の濃度で培養を始めた。培養上清中のRT活性をモニタリングしながら薬剤濃度を上げ、培養上清は継代の際に回収した。

3) 薬剤感受性試験

回収した上清の中で耐性ウイルスの誘導が疑われるサンプルについてMARBLE cell assayによる感受性測定を行った。さらに、No.3に対する耐性ウイルスについては、他の薬剤との交差耐性をMARBLE cell assayを用い確認した。

4) ウイルス粒子の電子顕微鏡像

HIV-1 HXB2を感染させたSupT1を薬剤存在下で培養し、産生されたウイルスを透過型電子顕微鏡で観察した。

C. 研究結果

1) 候補抗 HIV 薬のスクリーニング

HIV-1 integrase阻害活性を呈する化合物、呈さないが抗HIV-1活性を有する化合物から、それぞれ78種類、184種類の類縁化合物を合成し、さらに抗HIV-1活性のあった化合物の類縁化合物を合成し、最終的に364種類についてMARBLE cell assayにより抗HIV-1活性の測定を行った(図1)。364種類のうち毒性の認められず、なおかつIC₅₀が5 μM以下のものが153種類見つかった。既存の薬剤のIC₅₀は、ほとんどが0.001~1μMの範囲内にある(<0.001μM; AZT: 0.001~0.01μM; ddC, EFV, IDV, SQV, NFV, LPV: 0.01~0.1μM; 3TC, d4T: 0.1~1μM; ABC, NVP: 1~5μM; ddI) が、今回のスクリーニングでは、IC₅₀が0.001μM以下というかなり効果の強いものが11種類確認された(図2)。

2) 薬剤耐性ウイルスの誘導

IC₅₀が0.001μM以下の11種類のうち4種類について薬剤耐性ウイルスの誘導を試みた。2 x 10⁶個のM8166細胞あるいは1 x 10⁶個のSupT1細胞にそれぞれ800、あるいは1000 TCID₅₀のHIV-1 HXB2を感染させ、薬剤濃度を徐々に増加させながら培養を続けた。M8166細胞では、最終的にIC₅₀の40~128000倍の耐性ウイルスが誘導され(図3A)、SupT1細胞でも40~5000倍の耐性ウイルスが誘導された(図3B)。No.4の薬剤に関してはMARBLE cellに対する毒性が見られ、薬剤の濃度をほかの薬剤に比べあまり増加させられなかった。

3) 耐性誘導ウイルスの薬剤感受性試験

M8166細胞では、94日目(No.1のみ112日目)および161日目に回収したウイルスで、SupT1細胞では41日目に回収したウイルスで、それぞれの薬剤感受性をMARBLE cell assayにて調べた。M8166細胞では、94日目に回収したNo.3で耐性誘導したウイルスで、SupT1細胞ではNo.1とNo.3で耐性誘導したウイルスが、MARBLE cell assayを用いた薬剤感受性試験でそれぞれの薬剤に対して耐性を示した(図4A,B,C)。また、94日目にM8166細胞から回収したNo.3耐性ウイルスの、他の

薬剤への交差耐性を調べたところ、No.1、2、4に対しても耐性を示し交差耐性が認められた(図5)。ただ、AZTやNVPに対しては逆に感受性になっていた(図5)。

4) 電子顕微鏡像

HIV-1 HXB2をSupT1に感染させ、No.3、No.4の薬剤存在下で培養し、透過型電子顕微鏡で観察したところ、No.3、No.4では、粒子のサイズが不均一で、また内部core構造が明瞭でない未熟な粒子が観察された。このNo.3、No.4で観察された形態はproteaseを欠損したウイルスにみる厚い外皮に囲まれ、内部にcoreのない像とは異なっており、薬剤の阻害機序の異なることを強く示唆した(図6)。

D. 考察

本研究で抗HIV活性の認められる化合物が153種類ヒットした。さらにそのうちの4化合物はリードとして有望であり、これらについて高濃度薬剤存在下でも増加することのできる耐性ウイルスの分離を試み、回収に成功した。M8166細胞培養ではNo.3に対する耐性ウイルスしか、SupT1細胞を用いた場合はNo.1とNo.3に対する耐性ウイルスしか分離できなかった。但し、今回の実験では十分量のウイルスを得るため回収したウイルスを一度、薬剤非存在下で培養増殖させていることから、非薬剤耐性ウイルスが優位に増殖してしまった可能性は否定できない。今後はウイルスを増殖させる際に、薬剤存在下で増殖させることを検討する。興味深いことに、M8166細胞で分離されたNo.3に対する耐性ウイルスはAZTやNVPに対して感受性になっていたことから、これらの薬剤との併用により、より高い効果を示すことも示唆された。作用メカニズムについては、今後さらに研究を行っていくが、電子顕微鏡像よりprotease阻害能はないことが確認された。今後、耐性を示したウイルスについてウイルス遺伝子配列の確認を行うこと等から、薬剤のターゲットがウイルスのどこにあるのかを推測し、作用メカニズムを

明らかにすることを目標に研究を行っていく。

E. 結論

この実験系では、今まで実用化されていない integrase に効果を示す薬剤を見つけることを目標としてスクリーニングを行い、抗HIV-1効果を示す化合物を見つけることができた。さらに、4種類については耐性を示すウイルスが分離された。また、耐性誘導されたウイルスが既存の薬剤に対して感受性になっていた。まだ作用メカニズムは確定していないが、これらのことから、integrase も薬剤開発の標的とすることが可能であることが示唆されると同時に、HAARTの選択の幅を大きく広げることのできる化合物の開発が期待できることが示された。

F. 研究危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

(1) 論文発表

- 1) Joke Snoeck, Rami Kantor, Robert W. Shafer, Kristel Van Laethem, Koen Deforche, Ana Patricia Carvalho, Brian Wynhoven, Marcel A. Soares, Patricia Cane, John Clarke, Candice Pillay, Sunee Sirivichayakul, Koya Ariyoshi, Africa Holguin, Hagit Rudich, Rosangela Rodrigues, Maria Belen Bouzas, Francoise Brun-Vezinet, Caroline Reid, Pedro Cahn, Luis Fernando Brigido, Zehava Grossman, Vincent Soriano, Wataru Sugiura, Praphan Phanuphak, Lynn Morris, Jonathan Weber, Deenan Pillay, Amilcar Tanuri, Richard P. Harrigan, Ricardo Camacho, Jonathan M. Schapiro, David Katzenstein, and Anne-Mieke Vandamme: Discordances between Interpretation Algorithms for Genotypic of Human Immunodeficiency Virus Are Subtype Dependent. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 50(2): 694-701, 2006
- 2) Hua Yan, Tomoko Chiba Mizutani, Nobuhiko Nomura, Tadakazu Takakura, Yoshihiro Kitamura, Hideka Miura, Masako Nishizawa, Masashi Tatsumi, Naoki Yamamoto, Wataru Sugiura: A novel small molecular weight compound with a carbazole structure that demonstrates potent human immunodeficiency virus type-1 integrase inhibitory activity. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*. Vol.16: 363-373, 2005
- 3) T Ueda, L Myint, M Nishizawa, M Matsuda, W Sugiura: Analysis of interference and co-evolution between protease inhibitor resistant mutations and gag mutations. *Antiviral Therapy*. Vol.10:s116, 2005
- 4) N Hasegawa, W Sugiura, M Matsuda, K Mogushi, H Tanaka, F Ren: Inference of evolutionary forces driving HIV-1 drug-resistance acquisition under HAART using longitudinal HIV-1 protease gene samples. *Antiviral Therapy*. Vol.10:s114, 2005
- 5) 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.* Vol.58: 65-68, 2005
- 6) Hirotaka Ode, 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*. Vol.109: 564-574, 2005
- 7) 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.* Vol 79,4720-4729, 2005
- 8) Rami Kantor, David A. Katzenstein, Brad Efron, Ana Patricia Carvalho, Brian Wynhoven, Patricia Cane, John Clarke, Sunee Sirivichayakul, Marcelo A. Soares, Joke Snoeck, Candice Pillay, Hagit Rudich, Rosangela Rodrigues, Africa Holguin, Koya Ariyoshi, Maria Belen Bouzas, Pedro Cahn, Wataru Sugiura, Vincent Soriano, Luis F. Brigido, Zehava Grossman, Lynn Morris, Anne-Mieke Vandamme, Amilcar Tanuri, Praphan Phanuphak, Jonathan N. Weber, Deenan Pillay, P. Richard Harrigan, Ricardo Camacho, Jonathan M. Schapiro, Robert W. Shafer. Impact of HIV-1 Subtype and Antiretroviral Therapy on Protease and Reverse Transcriptase Genotype : Results of a Global Collaboration. *PLoS Medicine.* Vol. 2: 325-337, 2005
 - 9) 杉浦 互 : 抗 HIV-1 薬剤の現状と薬剤開発の新たな展開. *ウイルス第 55:* 85-94,2005
 - 10) 西澤雅子, 杉浦 互 : HIV-1 の薬剤耐性についての知見. *BIO Clinica.* Vol.20:51-57,2005
 - 11) 杉浦 互: 新規感染者における薬剤耐性 HIV 拡散の危機~Alert for Outbreak of Drug Resisitance HIV-1 Newly Infected Population~ *日本エイズ学会誌* Vol. 7: 117-120, 2005
 - 12) 杉浦 互、潟永博之、田宮貞宏、松田昌和、松見信太郎、蜂谷敦子、John Coffin、満屋裕明: シンポジウム 7.「薬剤耐性の知見、基礎から臨床へ」を終えて. *日本エイズ学会誌.*7(3),2005
- (2)学会発表
- 1) Kato Shingo, Tsuji Kenji, Tanaka Rie, Kinai Ei, Hanabusa Hideji, Negishi Masayoshi, Sugiura Wataru: Quantitation of Antiretroviral Drugs in Hair with LC/MS/MS for Assessment of Medication Adherence. 7th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific. July 1-5. 2005, Kobe.
 - 2) Saeng-aroon Siriphan, Myint Lay, Pathipvanich Panita, BAriyoshi Koya, Wichukchinda Nuanjun, Rojanawiwat Archawin, Matsuda Masakazu, Sawanpanyalert Pathom, Sugiura Wataru, Auwanit Wattana: Mutagenically-Separated PCR as a Tool for Monitoring Lamivudine (GPOvir) Resistant CRF01_AE in Thailand(GPOvir). 7th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific. July 1-5. 2005, Kobe.
 - 3) N Hasegawa, W Sugiura, M Matsuda, K Mogushi, H Tanaka, F Ren: Inference of evolutionary forces driving HIV-1 drug -resistance acquisition under HAART using longitudinal HIV-1 protease gene samples. 14th International HIV Drug Resistance Workshop. June 7-11. 2005, Quebec, Canada.
 - 4) T Ueda, L Myint, M Nishizawa, M Matsuda, W Sugiura: Analysis of interference and co-evolution between protease inhibitor resistant mutations and gag mutations. 14th Internatioal HIV Drug Resistance Workshop. June 7-11. 2005, Quebec, Canada.
 - 5) Wataru Sugiura, Masakazu Matsuda, Junko Kakizawa, Hideka Miura, Satoshi Takeda, Masayuki Fujino, Masako Nishizawa, Naoki Yamamoto: Changes in Prevalence and Patterns of Drug Resistant Mutations in JAPAN-Summary of Nine Years Nationwide HIV-1 Drug Resistance Monitoring Study (1996-2004) . 6th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance.

Nov.13-16, 2005, Virginia

- 6) Wataru Sugiura: Virological and Statistical Analyses of Interference between Protease Inhibitor Resistant Mutations and Gag Mutations. 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Feb. 5-9. 2006, Denver, USA
- 7) Wataru Sugiura: Multi-Center Nationwide Survey of Drug Resistant HIV-1 in Newly Diagnosed HIV/AIDS Patients in Japan from 2003 to 2004. 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Feb 5-9. 2006, Denver, USA
- 8) 杉浦 互: 日本における薬剤耐性 HIV-1 の動向と対策. 第62回岡山HIV診療ネットワーク 2005年5月31日岡山
- 9) Wataru Sugiura, Masakazu Matsuda, Junko Kakizawa, Hideka Miura, Satoshi Takeda, Masayuki Fujino, Masako Nishizawa and Naoki Yamamoto: Changes in Prevalence and Patterns of Drug Resistant Mutations in Japan - Summary of Nine Years Nationwide HIV-1 Drug Resistance Monitoring Study from 1996 to 2004. 第1回日独エイズ公開シンポジウム. 2005年11月9日名古屋
- 10) 杉浦 互: HIV-1 CRF01_AE における Nelfinavir 耐性変異 N88S の耐性化機序の解析. 第53回日本ウイルス学会学術集会. 2005年11月20日~22日, 横浜
- 11) Myint Lay, 植田知幸, 西澤雅子, 松田昌和, 三浦秀佳, 杉浦 互: プロテアーゼ阻害剤耐性変異と Gag 変異間に見る相互干渉と共進化の解析. 第53回日本ウイルス学会学術集会. 2005年11月20日~22日, 横浜
- 12) 杉浦 互: 薬剤耐性の獲得に見る Gag と Protease の共進化. 第7回白馬シンポジウム. 2005年11月3日~4日, 鹿児島
- 13) 小池 満, 三好 洋, 井上靖之, 高橋正知, 山口洋子, 奥瀬千晃, 杉浦 互, 中島秀喜: HIV/HIB Coinfection における HBV 耐性の検討. 第19回日本エイズ学会学術集会. 2005年12月1日~3日, 熊本
- 14) 浅黄 司, 金田次弘, 伊部史朗, 松田昌和, 吉田 繁, 津畑千佳子, 大家正泰, 近藤真規子, 貞升健志, 潟永博之, 正兼亜季, 佐藤克彦, 奏 眞美, 溝上康司, 森 治代, 南 留美, 渡邊香奈子, 岡田清美, 杉浦 互: HIV-1 薬剤耐性遺伝子検査法に関するアンケート調査. 第19回日本エイズ学会学術集会. 2005年12月1日~3日, 熊本
- 15) 西澤雅子, Urvi Parikh, 藤野真之, 松田昌和, 三浦秀佳, 加藤真吾, 山本直樹, 杉浦 互: ヒト末梢血単核球を用いた K65R 獲得 HIV-1 の逆転写酵素阻害剤に対する感受性の解析. 第19回日本エイズ学会学術集会. 2005年12月1日~3日, 熊本
- 16) 石川暢恒, 高田 昇, 河部康子, 喜花伸子, 大江昌恵, 大下由美, 畝井浩子, 藤井輝久, 木村昭郎, 杉浦 互: 半年以内に感染したと推定される HIV 感染症の9例. 第19回日本エイズ学会学術集会. 2005年12月1日~3日, 熊本
- 17) 杉浦 互, 潟永博之, 吉田 繁, 千葉仁志, 浅黄 司, 松田昌和, 岡 慎一, 近藤真規子, 今井光信, 貞升健志, 長島真美, 伊部史朗, 金田次弘, 浜口元洋, 上田幹夫, 正兼亜季, 大家正義, 渡邊香奈子, 白阪琢磨, 山本善彦, 森 治代, 小島洋子, 中桐逸博, 高田 昇, 木村昭郎, 南 留美, 山本政弘, 健山正男, 藤田次郎: 新規 HIV-1 感染者における薬剤耐性の頻度に関する全国疫学調査 - 2003 年から 2004 年にかけての報告 -. 第19回日本エイズ学会学術集会. 2005年12月1日~3日, 熊本
- 18) 大出裕高, 杉浦 互, 星野忠次: コンピューター・シミュレーションによる CRF01_AE NH1 N88S HIV-1 PR の NFV 耐性機構の解明. 第19回日本エイズ学会学術集会. 2005年12月1日~3日, 熊本
- 19) 仲宗根 正, 高松純樹, 杉浦 互, 佐藤裕徳,

- 山本伸二、Heneine Walid、山本直樹: HIV-RT 薬剤感受性迅速試験法 (半日) の開発. 第 19 回日本エイズ学会学術集会. 2005 年 12 月 1 日～3 日, 熊本
- 20) 駒野 淳、宮内浩典、Lay Myint、二橋悠子、浦野恵美子、松田善衛、千葉智子、三浦秀佳、杉浦 互、山本直樹: Rapid propagation of low-fitness drug resistant mutants of HIV-1 by a-1 frameshift enhancer sparsomycin. 第 19 回日本エイズ学会学術集会. 2005 年 12 月 1 日～3 日, 熊本
- 21) 加藤真吾、田中理恵、根岸昌功、杉浦 互: AZT は血漿中及び細胞内において確かに d4T に変換される. 第 19 回日本エイズ学会学術集会. 2005 年 12 月 1 日～3 日, 熊本
- 22) 小池 満、鈴木貴雄、井上靖之、山口洋子、小池淳樹、杉浦 互、高橋正知: HIV 関連リンパ腫における自己造血幹細胞採取の経験. 第 19 回日本エイズ学会学術集会. 2005 年 12 月 1 日～3 日, 熊本
- 23) 小池 満、高橋正知、井上靖之、山口洋子、杉浦 互、中島秀喜: 当院における新規受診者の検討. 第 19 回日本エイズ学会学術集会. 2005 年 12 月 1 日～3 日, 熊本
- 24) 山元泰之、山中 晃、内田泰斗、尾形享一、福武勝幸、杉浦 互: 判定保留 HIV-1 抗体確認検査で確定し得ないとき. 第 19 回日本エイズ学会学術集会. 2005 年 12 月 1 日～3 日, 熊本
- 25) Wataru Sugiura: Changes in prevalence and patterns of drug resistant mutations in Japan-Summary of nationwide HIV-1 drug resistance monitoring study (1996-2004) in Japan. 第 19 回日本エイズ学会学術集会. 2005 年 12 月 1 日～3 日, 熊本
- 26) 杉浦 互、瀧永博之、田宮貞宏、松田昌和、松見信太郎、蜂谷敦子、John Coffin、満屋裕明: シンポジウム 7. 「薬剤耐性の新知見、基礎から臨床へ」を終えて. 第 19 回日本エイズ学会学術集会. 2005 年 12 月 1 日～3 日, 熊本

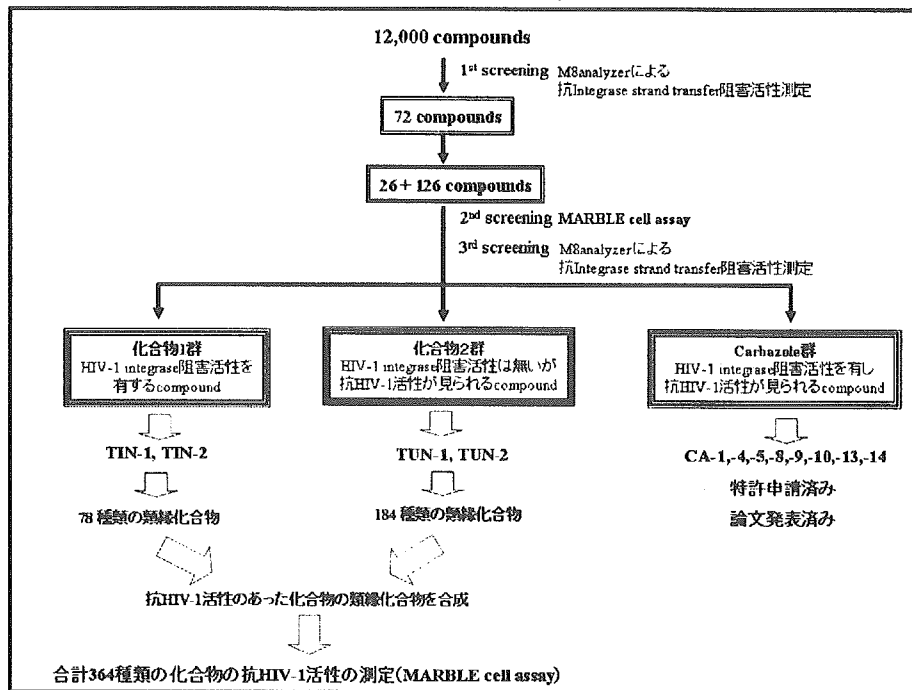


図 1

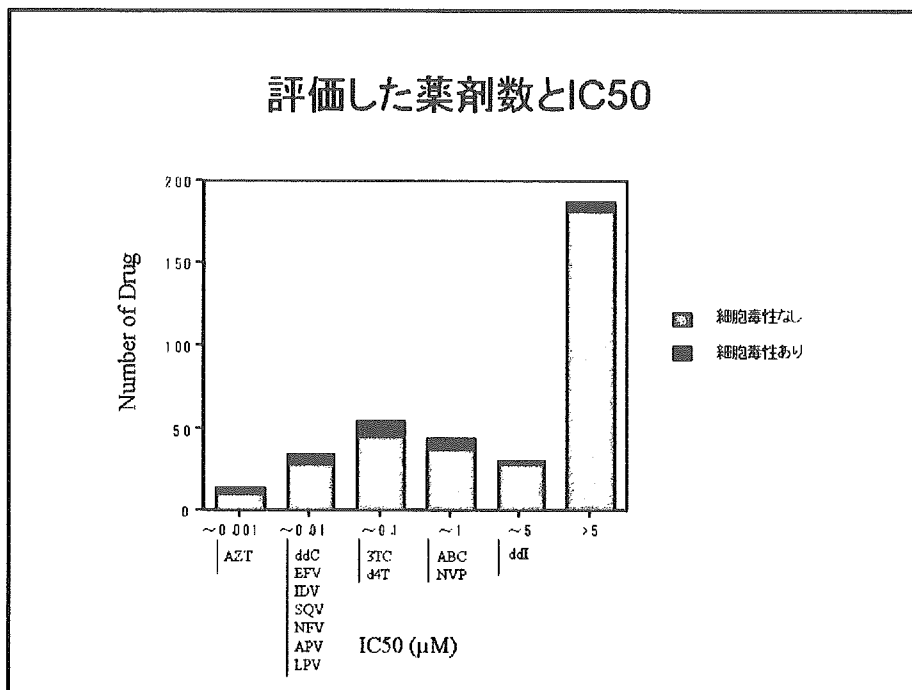


図 2

M8166細胞を用いた薬剤耐性ウイルスの誘導

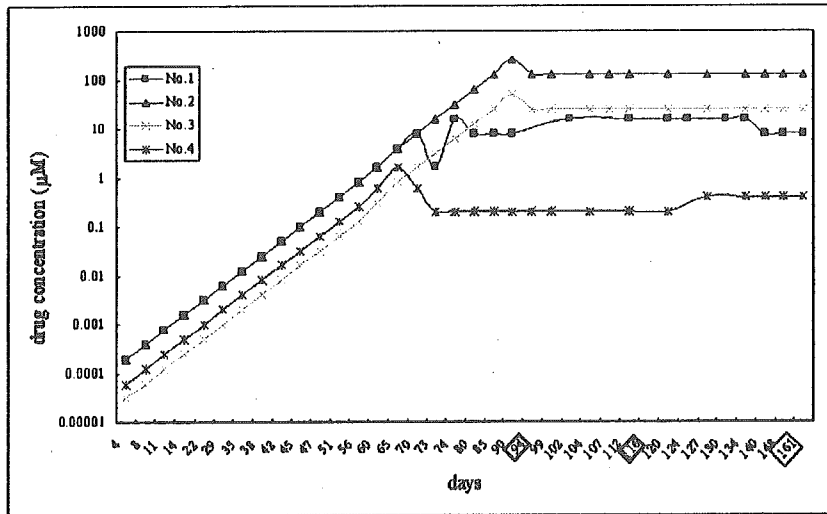


図 3 A

SupT1細胞を用いた薬剤耐性ウイルスの誘導

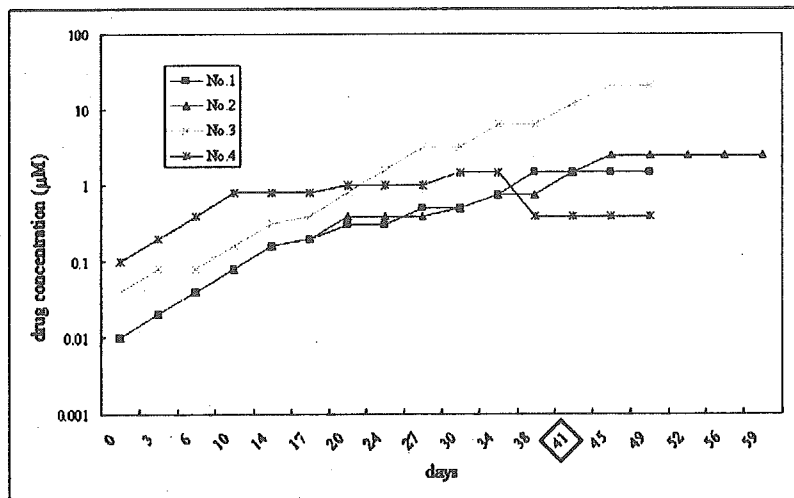


図 3 B

誘導ウイルスのそれぞれの薬剤に対する耐性度

day94 (No.1のみ day112に回収)

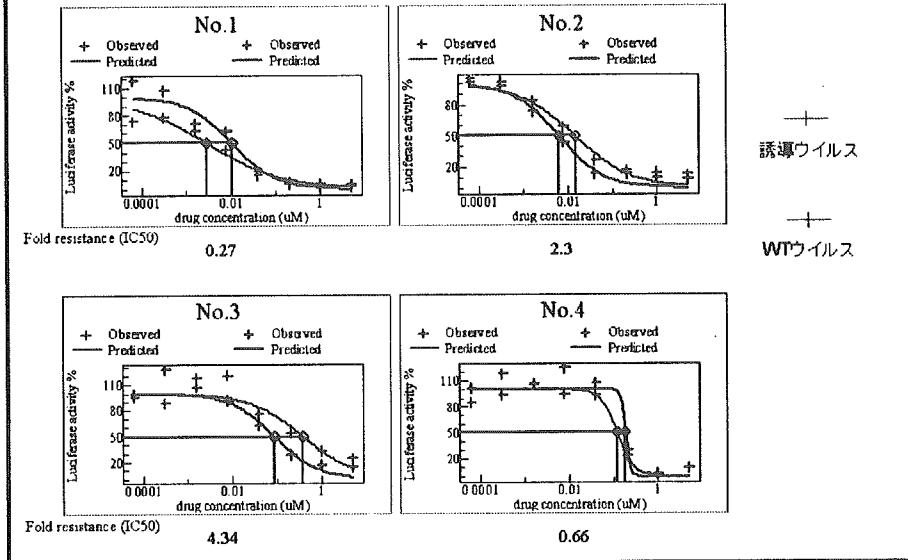


図 4A

誘導ウイルスのそれぞれの薬剤に対する耐性度

day161

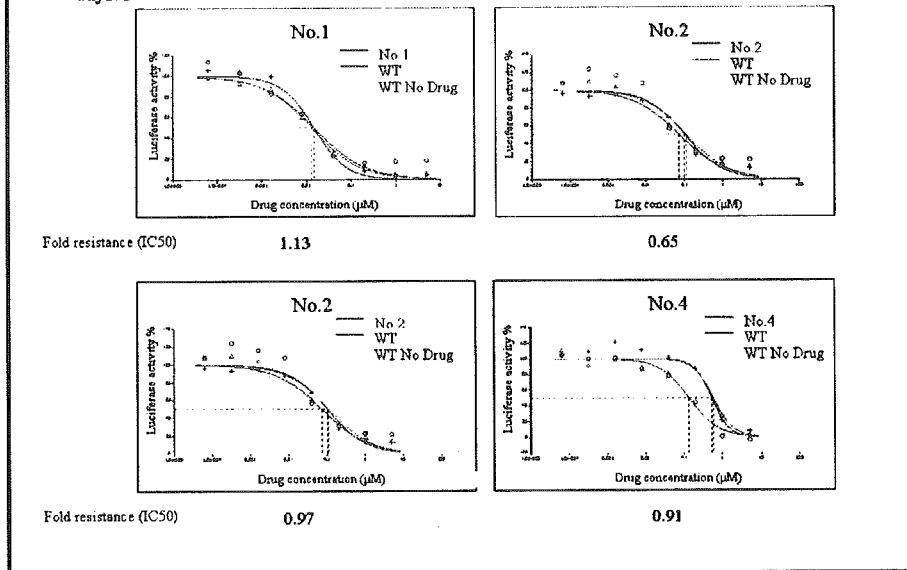


図 4B

誘導ウイルスのそれぞれの薬剤に対する耐性度

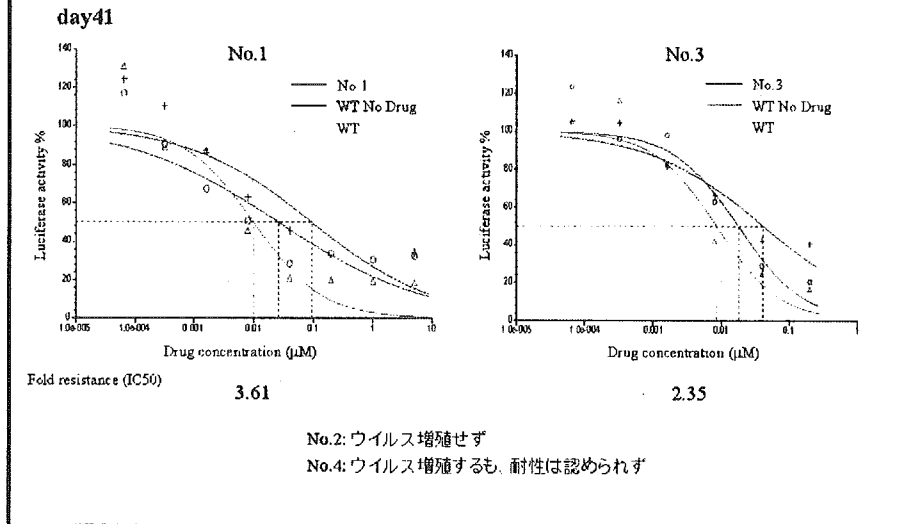


図 4C

No.3耐性ウイルスの他の薬剤に対する耐性度

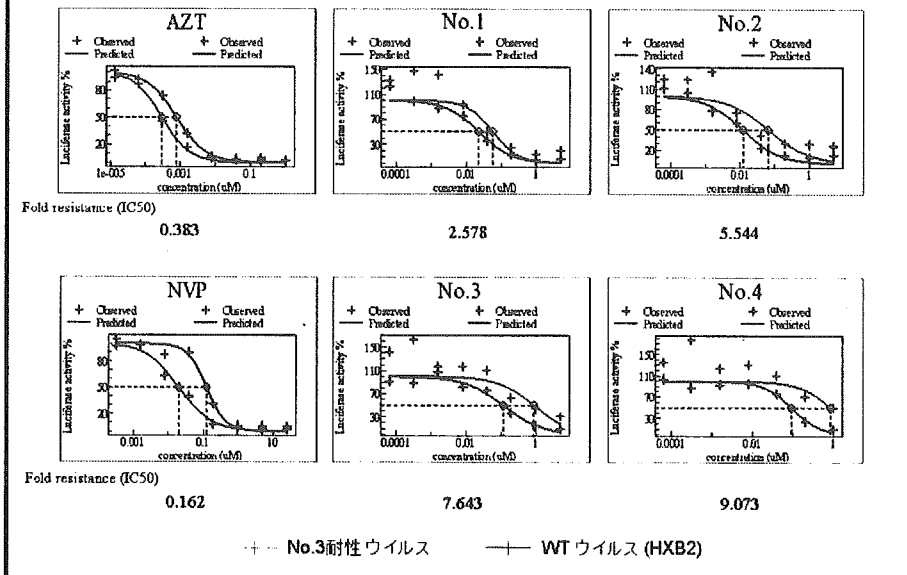


図 5