

厚生労働科学研究費補助金

政策創薬総合研究事業

「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 18 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 杉浦 亙

平成 19 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 互

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 6
国立感染症研究所エイズ研究センター・杉浦 互
2. 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 20
～マウスHIV感染モデルを用いた新規抗HIV薬剤の評価系確立に関する研究～
国立感染症研究所エイズ研究センター・杉浦 互
3. Vif 機能を応用した新規抗 HIV 薬開発のための基礎研究 25
(独) 医薬基盤研究所・霊長類医学研究センター・明里宏文
4. ヒト樹状細胞を標的とした HIV-1 感染評価系の確立 28
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イルス薬の開発 32
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 37
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 44
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 48
富山化学工業株式会社総合研究所・野村伸彦
9. 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 49
～pol遺伝子をHIV-1由来にした新規SHIVとサルを用いた薬剤評価系の開発研究～
協力研究者：京都大学ウイルス研究所振興ウイルス感染症研究センター・井戸栄治

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 52

I. 総括研究報告書

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

既存の治療薬剤に対して多剤耐性を獲得した症例を救済するために、新規な機序でHIV-1の増殖を抑制する薬剤の開発に取り組んだ。低分子化合物ライブラリ、放線菌の培養上清抽出産物のインテグラーゼ阻害活性、抗HIV活性についてランダムスクリーニングを行った。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に取り組むとともに、実用化に向けて抗HIV活性の増強と毒性の軽減に取り組んでいる。

分担研究者

明里宏文（（独）医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター）

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) SIVを用いた新規抗レトロウイルス薬の開発（駒野）

既存の治療標的とは異なるHIVの増殖を阻害するリード化合物探索のためSIVによる実験系を構築した。

(2) ヒト樹状細胞を標的としたHIV-1 感染評価系の確立（木村）

マウス樹状細胞XS106そしてFlt3/IL-6によってラット骨髓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。

(3) MaRBLE細胞を用いた低分子化合物ライブラリのスクリーニング（杉浦）

新規な作用機序による新薬探求のため、特定の標的（Tat, vif）に限定したスクリーニングではなく、抗HIV活性の有無を評価することとした。評価系としては我々が開発したMaRBLE細胞を用いた。

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No.1~3)、インテグラーゼ阻害性を示した化合物2群から1化合物(No.4)を選び、M8166細胞、SupT1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))

本研究では、生体内で機能しかつ多剤耐性HIV-1の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主な目的とした。また、スクリーニングによりヒットした2つの化合物XとYについてhu-PBL-SCIDでの評価を行った。

(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ヒビン(AH)は、gp120の高マンノース型糖鎖の $\alpha(1-2)$ mannobiose及び $\alpha(1-2)$ 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シンシチウム形成系で、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。

(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はウイルス粒子にパッケージされ、Gag p2/NCプロセッシングを特異的に制御する一方、過剰なVifパッケージングによりウイルス成熟過程を阻

害し、結果としてウイルス感染性を抑制する。本研究ではこの作用機序について詳細な解析を行った。

(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) pol遺伝子をHIV-1由来にした新規SHIVとサルを用いた薬剤評価系の開発研究

抗HIV薬をin vivoレベルで評価できる系を確立することを目的として、薬剤の多くが標的とするpol遺伝子をHIV-1由来にした種々の新規SHIVを作成し、それらのサル感染実験を行った。

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た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Tat評価系の確認を行ったが、平成18年度より個別の標的にスクリーニングの前に抗HI活性の評価を実施するように変更したため、tatを標的にした大規模なスクリーニングは実施していない。

(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。平成18年度より個別の標的にスクリーニングの前に抗HI活性の評価を実施するように変更したため、Vifを標的にした大規模なスクリーニングは実施していない。

(4) SIVを用いた新規抗レトロウイルス薬の開発

スクリーニングの結果レンチウイルス複製後期過程を阻害する新たなリード化合物を4種類同定した。

(5) 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。

(6) MaRBLE細胞を用いた低分子化合物ライブラリのスクリーニング(杉浦)

21000個の低分子化合物についてMaRBLE細胞を用いてスクリーニングを実施した、その結果全体の0.5%に相当する115個の化合物を見出した。

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)

阻害活性の増強と毒性の軽減を目的にスクリーニングを行った化合物の総数は192化合物でIC₅₀の値が0.001μM未満、0.001μM以上0.01μM未満、0.01μM以上0.1μM未満、0.1μM以上1μM未満、1μM以上5μM未満、5μM以上を示すものがそれぞれ20(10.4%)、32(16.7%)、36(18.8%)、37(19.3%)、14(7.3%)、53(27.6%)化合物であった。また総数192化合物の内44(22.9%)化合物に細胞毒性が認められた。

(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、インテグラーゼ阻害活性を示した化合物2群からは1化合物を選び、それについてin vitroでの薬剤耐性HIV-1の誘導を試した。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))

CXCR4指向性HIV-1の多剤耐性HIV-1株の制御はCXCR4アンタゴニストで可能であることを試験管

内およびヒト化マウス(hu-PBL-SCID)で検証することに成功した。

二つの候補化合物XとY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XとYいずれも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))

アクチノヒビン (AH)は、HIV エンベロープ蛋白質gp120 の高マンノース型糖鎖末端の $\alpha(1-2)$ マンノピオースと結合することで、ウイルスの細胞への接着・侵入を阻害することを明らかにした。また AH と gp120 の結合様式について詳細な解析を行った。AH の患者分離 HIV 株に対する活性を調べた結果、耐性マーカーに関係なく活性を示すことが分かった。*Streptomyces griseus* を用いて AH の生産系を確立した。イノシンモノフォスフェートデヒドロゲナーゼの阻害剤であるマイコフェノール酸 (MPA)は、逆転写酵素を阻害するのみならず、gp120 の発現を減少させることにより接着・侵入を阻害することを示した。

(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)

Vif Trp11およびGln12がGag p2/NC processing阻害およびそれによるウイルス感染性抑制作用に係る determinantであること、また本作用はAPOBEC3の制御作用とは独立したVif機能であることが明らかとなった。これらの結果は、抗自然免疫活性を排除し、かつウイルス成熟過程を阻害するといったVif機能をベースとした創薬へと繋がるものと期待される。

(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) pol遺伝子をHIV-1由来にした新規SHIVとサルを用いた薬剤評価系の開発研究

RTとINT遺伝子のみをHIV-1由来にしたSHIV-rti、並びにPRからINT遺伝子まではほぼpol遺伝子の全領域をHIV-1由来にしたSHIV-prtiについて検討した結果、両ウイルスはサル個体において基本的に感染増殖能があることが明らかとなった。

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。我々はそこに新たな治療標的を見いだせる可能性があるかと期待し、3年にわたり約21,000の化合物ライブラリのランダムスクリーニングを行い複数の候補化合物の同定に成功した。見出した候補化合物は現時点では作用機序が明確ではないが、in vitroとin vivoのどちらにおいても既存の薬剤に匹敵する強い抗HIV-1阻害活性を呈しており、今後の実用化が期待される。研究班では当初tatとVifについてもスクリーニングを計画しており評価系の構築を行ったが、スクリーニングの効率を考慮して個別の標的に対してのスクリーニングの前段階としてMaRBLE細胞の評価系によるスクリーニングを実施することとした。平成18年でMaRBLE細胞による候補化合物の探索をほぼ終了し、今後はそれぞれの作用機序の解明と抗HIV活性の増強と毒性の軽減に取り組む予定である。

E. 結論

平成18年度は候補化合物の抗HIV活性の増強と毒性の軽減を達成することが出来、新薬実用化に向けて大きく前進した。その一方で阻害機序については

まだ必ずしも明確ではなく、早急の解明が必要である。

F.健康危険情報

HIV-1の感染実験、ウイルスの保管は全て国立感染症研究所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

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

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）

研究協力者 西澤雅子、武田 哲、三浦秀佳、巖 驊（エイズ研究センター）、村田大悟（富山化学工業株式会社総合研究所）

研究要旨

本研究では新規抗 HIV 薬剤開発のための研究に取り組んだ。今までの取り組みで見出したリード化合物の類縁化合物を中心にスクリーニングと構造展開を行い、平成 18 年度は 192 検体の評価を行った。新薬の HIV 阻害機序に関しては解析中である。また低分子化合物ライブラリの HIV 阻害活性のスクリーニングを MaRBLE 細胞アッセイで実施した。その結果合計 115 個の候補化合物に絞込むことが出来た。

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。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をスクリーニングし、平成 16 年の時点で 4 種類の新たなリード化合物を見出した。本研究ではこのリード化合物を基盤にして新薬開発のための以下の研究に取り組んだ。

(1) リード類縁化合物のスクリーニングによる同定とその構造展開

低分子化合物ライブラリ 12,000 検体から、抗 HIV-1 活性の一次スクリーニング(抗 Integrase strand transfer 阻害活性測定)、二次スクリーニング(MaRBLE 細胞でのアッセイ)を経て得られた 4 種類の新規リード化合物をもとに、HIV 阻害活性の増強と、毒性の軽減を目的に、リード化合物の側鎖修飾および類縁化合物の HIV 阻害活性を評価した。さらに得られた候補化合物の HIV

阻害機序を解明のための基礎的研究に取り組んだ。

(2) 低分子化合物ライブラリの抗 HIV 活性スクリーニング

新たな抗 HIV 剤の開発を目的として、低分子化合物ライブラリ約 21,000 検体を対象に、*in vitro* における抗 HIV 活性を指標にしたランダム・スクリーニングを行った。

B. 研究方法

(1) リード類縁化合物のスクリーニングによる同定とその構造展開

リード化合物の類縁化合物の HIV 阻害活性を我々が独自に開発した薬物評価系である MaRBLE 細胞アッセイを実施した。MaRBLE 細胞はヒト T-cell 由来 HPB-M(a)細胞に、HIV-1 の LTR で firefly luciferase と DsRED の発現が制御されるように構築した遺伝子と、CMV のプロモーターによって renilla luciferase が細胞内で常に発現する遺伝子を導入した細胞で、細胞内の firefly luciferase 活性を測定する事でウイルスの増殖を定量化でき、renilla luciferase 活性を測定することによって培養条件による細胞増殖の変動(細胞毒性等)を評価することができる。この

MaRBLE 細胞に HIV-1(HXB2)を感染させた後、2 時間後に対象とする化合物を 5、1、0.2、0.04、0.008、0.0016、0.00032、0.000064、0.0000128 μ M の濃度で添加し、培養 7 日後の細胞内 firefly luciferase 活性ならびに renilla luciferase 活性を測定した。ウイルスを感染させていない培養細胞の firefly luciferase 活性を 0%、ウイルスを感染させて且つ薬剤を添加していない培養細胞の firefly luciferase 活性を 100%としてそれぞれの薬剤濃度における相対的 firefly luciferase 活性 (%)を算出し、カーブフィッティングソフトウェア Xlfit ver.4 を用いて各化合物の HIV-1 増殖に対する IC₅₀ 値を求めた(計算式: $f(x) = A + (B - A) / (1 + (C/x)^D$)。また、薬剤を添加していない培養細胞の renilla luciferase 活性値を指標に細胞毒性の評価を行った。

リード化合物に対する薬剤耐性ウイルスの誘導を 3 種類の細胞(M8166、SupT1、PBMC)と 2 種類のウイルス(HXB2、JR-CSF)を用いて行った。組み合わせは M8166/HXB2、SupT1/HXB2、PBMC/HXB2、PBMC/JR-CSF の 4 種類である。培養上清中の RT 活性を指標に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た。添加薬剤濃度がある程度高くなったところで獲得した薬剤耐性レベルおよび薬剤耐性変異のパターンについて解析を行った。

(2)低分子化合物ライブラリの抗 HIV 活性スクリーニング

抗 HIV 活性の評価には、我々が開発した in house の系である MaRBLE cell assay を用いた。すなわち、 1×10^5 /well の MaRBLE 細胞に HIV-1 HXB2 を 100 TCID₅₀ で感染させ、感染 2 時間後に化合物を添加し一週間培養した後、抗 HIV 活性の評価を行った。まず、それぞれの終濃度が 1 μ M になるように 5 化合物ずつプーリングし、一次スクリーニングを行った。次に、混合化合物中の活性を示す化合物を特定するため、一次スクリーニングで 30%以上の増殖抑制効果を示した混合化合物、及び毒性が認められた混合化合物を一つ一つ別々にアッセイし、二次スクリーニング

を行った。さらに、三次スクリーニングとして、50%以上の増殖抑制効果を示した化合物、及び毒性が認められた化合物に対して dose response assay を行い、ヒット化合物の IC₅₀ 値を算出した。

C. 研究結果

(1)リード類縁化合物のスクリーニングによる同定とその構造展開

平成18年度にスクリーニングを行った化合物の総数は192化合物でIC₅₀の値が0.001 μ M未満、0.001 μ M以上0.01 μ M未満、0.01 μ M以上0.1 μ M未満、0.1 μ M以上1 μ M未満、1 μ M以上5 μ M未満、5 μ M以上を示すものがそれぞれ20(10.4%)、32(16.7%)、36(18.8%)、37(19.3%)、14(7.3%)、53(27.6%)化合物であった(図1)。

また総数192化合物の内44(22.9%)化合物に細胞毒性が認められた(図1)。

見出したリード化合物の阻害機序を明らかにするために薬剤耐性ウイルスの誘導を試みた。薬剤濃度を徐々に増加させながら培養を1年以上にわたって続けた。M8166細胞(図2)及びSupT1細胞(図3)では、それぞれ最終的にIC₅₀の6400倍の濃度でも増殖するウイルスが誘導でき、PBMC細胞を用いた場合、1000倍の濃度でも増殖するウイルスが誘導できた(図4)。誘導された薬剤耐性変異を確認するために回収されたウイルス全長について塩基配列の決定を行った。その結果、コントロールとして薬剤非存在下で培養を続けたウイルスでは見られないアミノ酸変異が多数み認められた。それらの変異のうち、M8166細胞、SupT1細胞、PBMCすべてにおいてgagのCAに変異が認められた(図5)。

(2)低分子化合物ライブラリの抗 HIV 活性スクリーニング

5種類の化合物をプールして実施した一次スクリーニングでは、30%以上の増殖抑制効果を示し、かつ細胞毒性が見られなかった混合化合物が、全体の8.6%(368/4240混合化合物)存在した(図6)。また、全体の5.4%に相当する229混合

化合物に細胞毒性が見られた(図 6)。次に、二次スクリーニングでこれらの混合化合物を別々にアッセイしたところ、全 21,000 化合物のうち 115 化合物が 50%以上の増殖抑制効果($IC_{50}=1\mu M$ 以下)を示し、これらの化合物は細胞毒性も認められなかった(図 7)。また、細胞毒性が見られた化合物は全体の 1.17%であった(図 7)。これらのヒット化合物は、その化学構造から A, B, C 並びにその他の 4 つのグループに分類され、 $0.005\mu M$ 以下の IC_{50} 値を示す化合物も見られた(図 8)。

D. 考察

研究期間中に我々が新たに見出したリード化合物の改良、毒性の軽減と HIV 阻害活性の増強に成功した。3 年間の取り組みで IC_{50} 値でみると 10 倍以上阻害活性を増強することに成功した。同定した化合物は構造的にも作用機序についても従来にはない新規なものであり、実際に既存の薬剤に対して耐性を呈する HIV 株にも阻害効果を呈した。今回我々が新規の作用機序に基づく薬剤の同定に成功した理由の一つとして独自に開発した MaRBLE 細胞とそれによる薬剤のスクリーニング系を活用したことあげられる。多くの場合 HeLa 細胞を基に構築したレポーター細胞を用いた single round のスクリーニング法がその迅速性のために好んで行われているが、HIV 生活環の後半を阻害する薬剤の検出には適していない。我々はこの問題点を克服し HIV 生活環の前期から後期まで漏れなく評価できるように MaRBLE 細胞という独自の細胞を本研究のために構築し、敢えて時間のかかる multiple replication によるスクリーニングを実施した。その結果、既存の薬とはまったく作用機序の異なる抗 HIV 化成分を持つリード化合物の同定に成功した。見出したリード化合物に対してはどの標的部位を同定するために薬剤耐性ウイルスの誘導、定量 PCR, time over addition など様々な解析を行ったが、現時点ではまだ何処を阻害しているのか解明できていない。今後宿主因子の関与も含めより緻密に作用点と機序を明らかにしていくこと

が必要であると考えている。

先行する化合物の成功にもとづき、新たに標的を絞らずに大枠でウイルス阻害活性の有無を判定基準にしたランダム・スクリーニングを実施した。その結果 $IC_{50}=1\mu M$ 以下の化合物を 115 化合物(0.5%)見出すことに成功した。一般的にランダム・スクリーニングで生理活性を示すヒット化合物を見出す確率は 0.1%以下であることから、本研究で抗 HIV 活性を示したヒット化合物は比較的多く、ここから構造の異なる何種類かのリード化合物が出てくることが期待される。今後、既存の抗 HIV 剤に耐性を示すウイルスを用いて、ヒット化合物の感受性試験を行う予定である。

E. 結論

本研究班では新規な抗 HIV 薬剤の開発に取り組んできた。先行している新規抗 HIV 薬剤開発では毒性の軽減と抗 HIV 活性の増強に成功し、実用化に向けて大きく前進した。抗 HIV 活性の視点から新たに開始したスクリーニングでは強い抗 HIV 活性を呈する化合物の同定に成功した。今後の計画として耐性が交差せず、新規作用機序を有する可能性の高い化合物の作用メカニズムを優先的に解析するとともに、新規性、物性、毒性、合成展開性といった観点から有望なリード化合物の選出し実用化へ研究を進展させていく予定である。

F. 研究発表

(1) 論文発表

- 1) Tomoko Chiba-Mizutani, Hideka Miura, Masakazu Matsuda, Zene Matsuda, Yoshiyuki Yokomaku, Kosuke Miyauchi, Masako Nishizawa, Naoki Yamamoto, Wataru Sugiura: New T-Cell-Based Lines with Two Luciferases for Accurately Evaluating Susceptibility to HIV-1 Drugs. *J Clinical Microbiology*, 45(2):477-487, 2007.

- 2) Hiroyuki Gatanaga, Shiro Ibe, Masakazu Matsuda, Shigeru Yoshida, Tsukasa Asagi, Makiko Kondo, Kenji Sadamasu, Hiroki Tsukada, Aki Masakane, Haruyo Mori, Noboru Takata, Itsuhiro Nakagiri, Rumi Minami, Masao Tateyama, Takao Koike, Toshihiro Itoh, Mitsunobu Imai, Fumitake Gejyo, Mikio Ueda, Motohiro Hamaguchi, Yoko Kojima, Takuma Shirasaka, Akiro Kimura, Masahiro Yamamoto, Jiro Fujita, Shinichi Oka, and Wataru Sugiura: Nationwide Survey of Drug-Resistant HIV-1 Prevalence in Patients Newly Diagnosed with HIV/AIDS in Japan. *Antiviral Research*, in press.
- 3) Afework Kassu, Masayuki Fujino, Masakazu Matsuda, Masako Nishizawa, Fusao Ota, Wataru Sugiura: Molecular Epidemiology of HIV-1 in Treatment Naive Patients in North Ethiopia. *AIDS Research and Human Retroviruses*, in press.
- 4) Kousuke Miyauchi, Jun Komano, Lay Myint, Yuko Futahashi, Emiko Urano, Zene Matsuda, Tomoko Chiba, Hideka Miura, Wataru Sugiura and Naoki Yamamoto: Rapid propagation of low-fitness drug-resistant mutants of human immunodeficiency virus type 1 by a streptococcal metaboite sparsomycin. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, 17(4):167-174, 2006.
- 5) Hirotaka Ode, Saburo Neya, Masayuki Hata, Wataru Sugiura, Tyuji Hoshino: Computational Simulations of HIV-1 Proteases-Multi-drug Resistance Due to Nonactive Site Mutation L90M. *J. AM.Chem.Soc.*, 128:7887-7895, 2006.
- 6) 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, Françoise 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.
- 7) Deforche K, Camacho R, Grossman Z, Silander T, Soares MA, Moreau Y, Shafer RW, Van Laethem K, Carvalho AP, Wynhoven B, Cane P, Snoeck J, Clarke J, Sirivichayakul S, Ariyoshi K, Holguin A, Rudich H, Rodrigues R, Bouzas MB, Cahn P, Brigido LF, Soriano V, Sugiura W, Phanuphak P, Morris L, Weber J, Pillay D, Tanuri A, Harrigan PR, Shapiro JM, Katzenstein DA, Kantor R, Vandamme AM. : Bayesian network analysis of resistance pathways against protease inhibitors., *Infect Genet Evol.* 2006 Nov 24.
- 8) Koga I, Odawara T, Matsuda M, Sugiura W, Goto M, Nakamura T, Iwamoto A.: Analysis of HIV-1 sequences before and after co-infecting syphilis., *Microbes Infect.* 2006 Oct 23.
- 9) Omura M, Furuya K, Kudo S, Sugiura W, Azuma H.: Detecting IgM antibodies against microsporidian *Encephalitozoon cuniculi* polar tubes in sera from healthy

- and HIV-infected Japanese., *Clin Vaccine Immunol.* 2006 Nov 15.
- 10) 西澤雅子, 柴田潤子, 杉浦 互: ウィルス感染制御における ncRNA の役割. *実験医学* 24(6):805-809, 2006.
 - (2)学会発表
 - 1) Wataru Sugiura: Drug Resistance assays. International Conference on Molecular and Cellular Biology of Therapeutics of HIV and Associated Viral Infections. Jan.12-14, 2007, Hyderabad, India.
 - 2) Hua Yan, Kazuro Shiomi Nobuhiko Nomura, Tomoko Chiba-Mizutani, Hideka Miura, Tadakazu Takakura, Haruo Tanaka Wataru Sugiura: New HIV-1 integrase inhibitors identified from small molecule chemical library and microbial metabolites. International Workshop on Discovery of antiviral compounds. Apr. 26-29, 2006, Lubeck, Germany.
 - 3) T Ueda, M Itaya, K Tusge, K Fujita, M Matsuda, M Nishizawa, W Sugiura: Reconstruction of HIV-1 full genome clones with *Bacillus subtilis*. HIV Drug Resistance Workshop. Jun 13-17, 2006, Spain.
 - 4) Rajintha M. Bandaranayake, Moses Prabu-Jeyabalan, Junko Kakizawa, Wataru Sugiura, Celia Shiffer: Structural Analysis of HIV-1 CRF01_ Protease in Complex with the Substrate p1-p6. 7th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance. Nov.12-15, 2006, Virginia.
 - 5) Junko Shibata, Masako Nishizawa, Masakazu Matsuda, Wataru Sugiura, Fengrong Ren, Hiroshi Tanaka: Analysis of Co-Evolution Between Mutations in Protease Inhibitor Resistance and in Gag. 7th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance. Nov.12-15, 2006, 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) Hua Yan, Nobuhiko Nomura, Tomoko Chiba-Mizutani, Hideka Miura, Tadakazu Takakura, Satoshi Takeda, Wataru Sugiura: New HIV-1 integrase inhibitors identified from small molecule chemical library. 第 16 回抗ウィルス化学療法研究会. 2006 年 5 月 26-27 日, 福島.
 - 9) 岩谷靖雅, レビンジュディス, 杉浦 互: APOBEC3G の HIV-1 の逆転写阻害メカニズム. 第 54 回日本ウィルス学会学術集会. 2006 年 11 月 19 日~21 日, 名古屋.
 - 10) 三浦秀佳, 千葉智子, 滝澤万里, 松田昌和, 西澤雅子, 本多三男, 杉浦 互: ヒト細胞由来レポーター細胞 MARRBLE を用いた臨床分離株薬剤感受性検査の評価. 第 54 回日本ウィルス学会学術集会. 2006 年 11 月 19 日~21 日, 名古屋.
 - 11) 柴田潤子, 西澤雅子, 松田昌和, 長谷川直紀, 吉田いづみ, 杉浦 互, 任鳳蓉, 田中博: 抗 HIV 剤治療下における Protease と Gag の相互干渉と共進化に関する解析. 第 54 回日本ウィルス学会学術集会. 2006 年 11 月 19 日~21 日, 名古屋.
 - 12) 杉浦 互: HIV 遺伝子検査の進歩と今後の課題-本邦における薬剤耐性検査の現状と今後の展望-. 第 20 回日本エイズ学会学術集会. シンポジウム 1, 2006 年 11 月 30 日, 東京.
 - 13) 小池 満, 三好 洋, 山口洋子, 奥瀬千晃, 中

島由紀子, 井上靖之, 鈴木貴雄, 高橋正知,
三浦偉久男, 杉浦 互, 中島秀喜: HIV/HIB
重複感染例の検討. 第 20 回日本エイズ学会
学術集会. 2006 年 11 月 30 日-12 月 2 日, 東
京

- 14) 古賀一郎, 小田原 隆, 松田昌和, 杉浦 互,
後藤美江子, 中村哲也, 岩本愛吉: 良好な
HIV 治療中に合併した梅毒感染前後での
HIV プロウィルス塩基配列の変化. 第 20 回
日本エイズ学会学術集会. 2006 年 11 月 30 日
-12 月 2 日, 東京.
- 15) 大出裕高, 松山 翔, 柿澤淳子, 杉浦 互, 星
野忠次: CRF01_AE HIV-1 における NFV 耐
性変異 N88S の出現メカニズムに関する構造
学的知見. 第 20 回日本エイズ学会学術集会.
2006 年 11 月 30 日-12 月 2 日, 東京.
- 16) 藤崎誠一郎, 藤崎彩恵子, 伊部史朗, 浅黄 司,
吉田 繁, 正兼重季, 大家正泰, 渡邊香奈子,
瀧永博之, 松田昌和, 貞升健志, 岡田清美,
近藤真規子, 奏 眞美, 溝上泰司, 森 治代,
南 留美, 杉浦 互, 金田次弘: HIV-1 遺伝子
型薬剤耐性検査のバリデーション. 第 20 回
日本エイズ学会学術集会. 2006 年 11 月 30 日
-12 月 2 日, 東京.
- 17) 西澤雅子, 加藤真吾, 三浦秀佳, 山本直樹,
杉浦 互: 細胞内における抗 HIV 薬 (プロテ
アーゼ阻害剤) の薬剤濃度のモニタリング.
第 20 回日本エイズ学会学術集会. 2006 年 11
月 30 日-12 月 2 日, 東京.

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

図1. 平成18年度スクリーニング結果

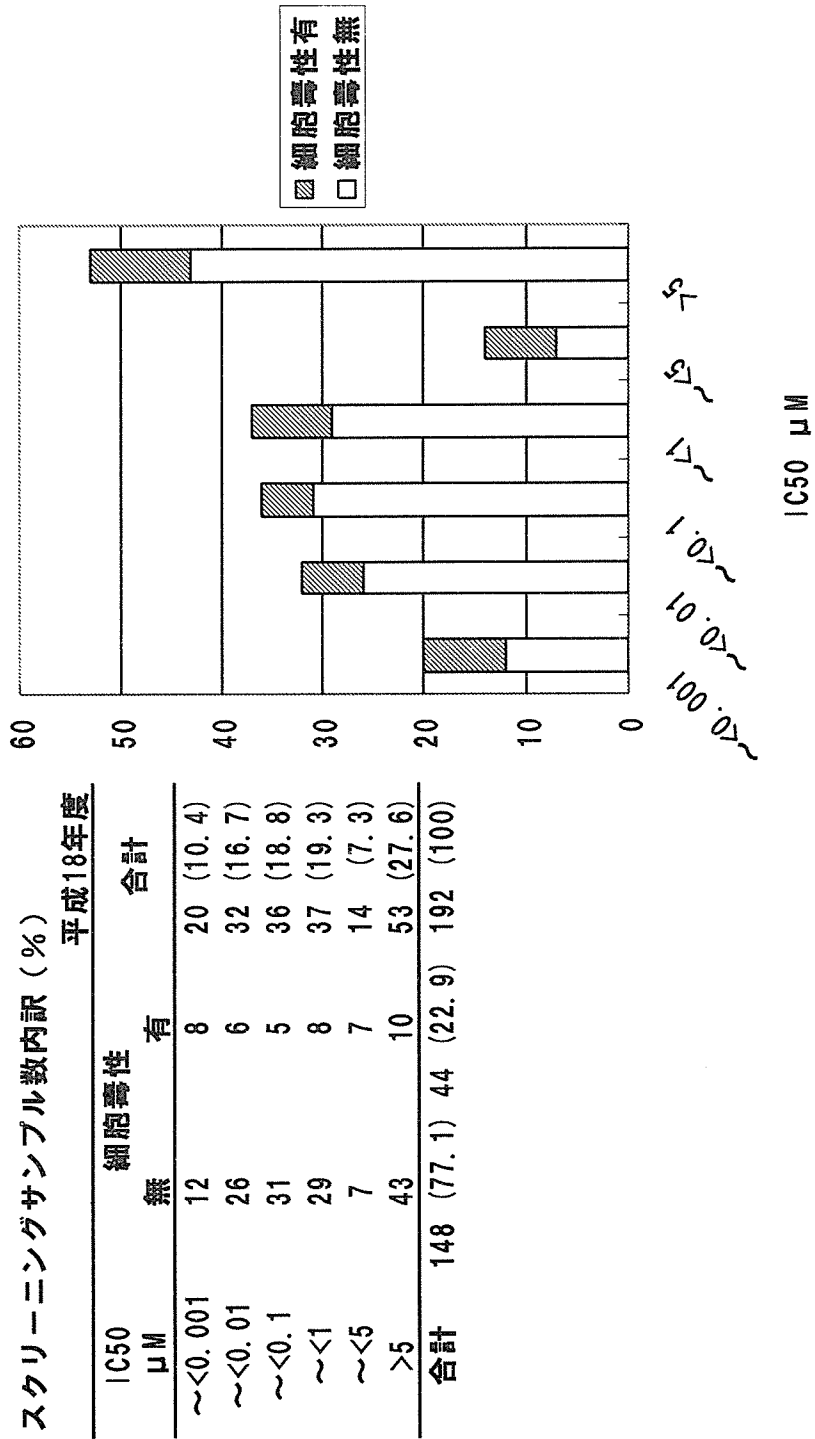


図2. M8166細胞における候補化合物耐性ウイルスの誘導

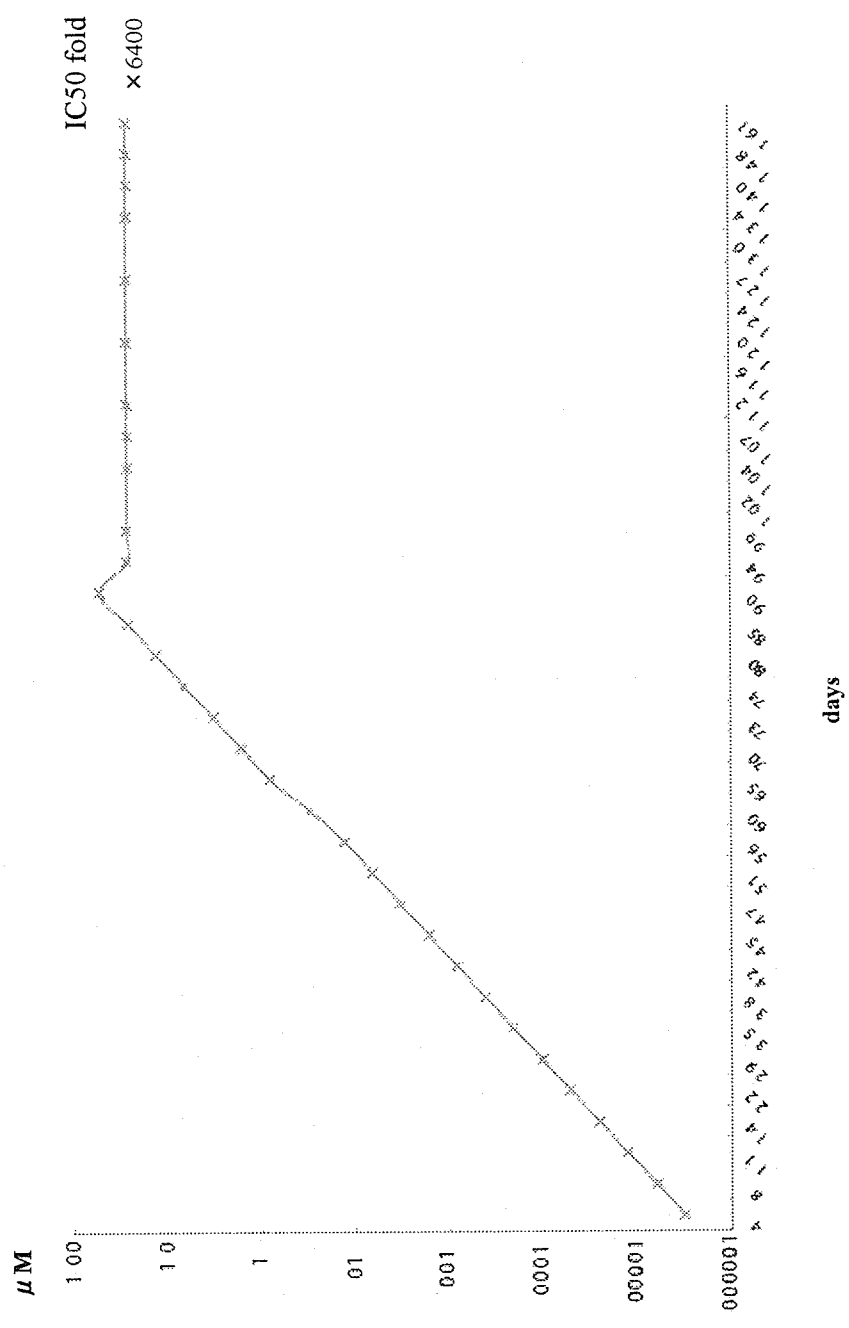


図3. SupT1細胞における候補化合物耐性ウイルスの誘導

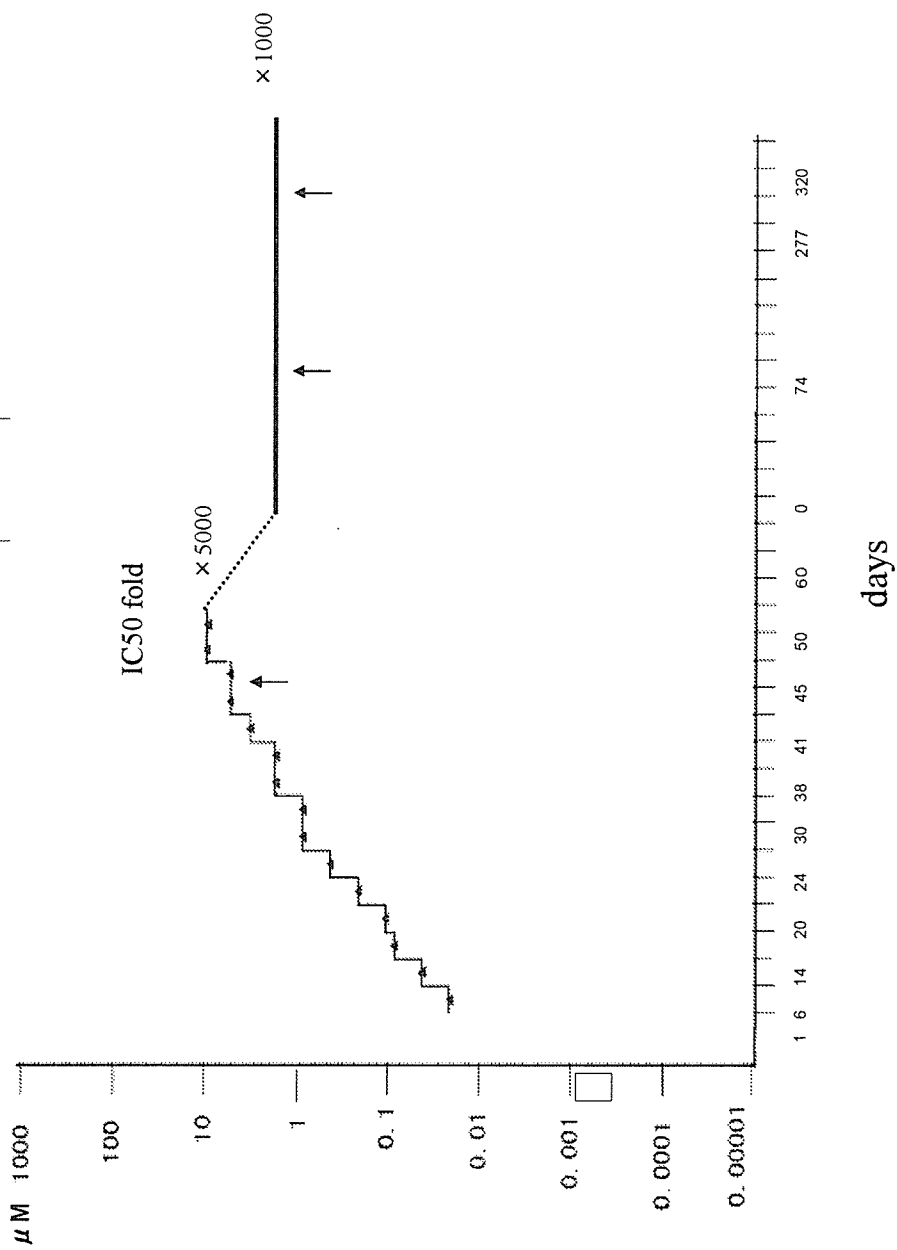


図4. PBMCにおける候補化合物耐性ウイルスの誘導

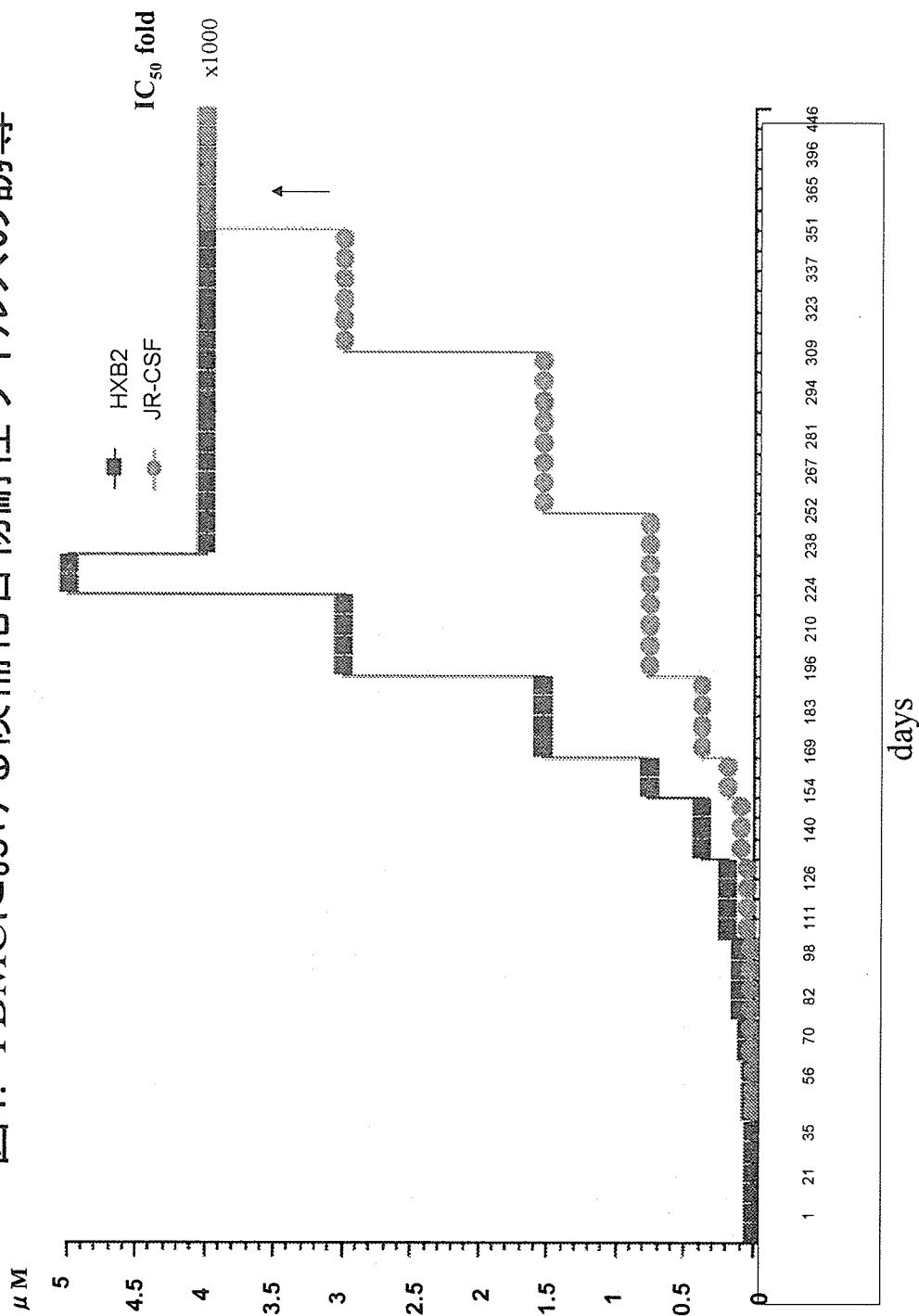


図5. 候補化合物耐性ウイルスの変異出現部位のまとめ

