

## 図6. 低分子化合物の抗HIV活性の一次スクリーニング結果

>2500の化合物を5個ずつまとめて一次スクリーニングを行った。

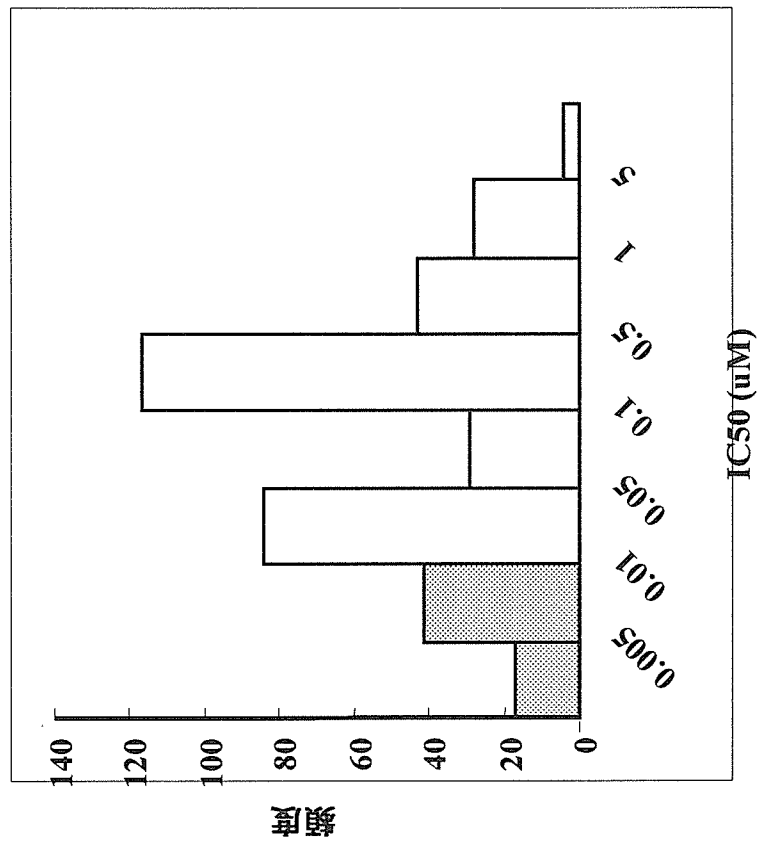
T/C (%)	ヒットしたwell 数
< 50	162 (3.8)
< 60	238 (5.6)
< 70	368 (8.6)
cytotoxicity	229 (5.4)
total	597 (14.1)

## 図7. 低分子化合物の抗HIV活性の二次スクリーニング結果

一次でヒットしたwellを分解し個別に阻害活性をスクリーニングした

T/C (%)	No. (%) of hit compounds
< 10	20 (0.094)
10 ~ 30	45 (0.21)
30 ~ 50	50 (0.23)
cytotoxicity	249 (1.17)
total	364 (1.70)

図8. 三次スクリーニングで測定した364検体のIC<sub>50</sub>値分布



「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」  
～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～

主任研究者 杉浦 亙（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 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

*in vitro*において抗 HIV 活性が確認できた新規低分子化合物を hu-PBL SCID マウスを用いた HIV 感染モデルで評価した。HIV-1 JR-CSF 株を感染させた hu-PBL SCID マウスにこの新規低分子化合物を経口投与した結果、血中の CD4 陽性細胞数は化合物投与群では投与開始後 7 日目で化合物非投与群に比べて有意に保たれていた。しかしマウス血漿中 HIV-1 RNA コピー数は化合物非投与群に比べて低下する傾向が見られたが統計学的有意差は見られなかった。

### A.研究目的

多剤併用療法(HAART)によって HIV 感染症による死亡数は激減した。しかしその一方で薬剤耐性 HIV の出現が HAART 療法の継続に大きな問題となってきた。HIV は一度薬剤耐性を獲得すると、同じクラスに属する他の抗 HIV 薬剤に対しても同程度の耐性を獲得してしまう事が特徴であり、この性質の為に一度薬剤治療に失敗すると次の薬剤選択が大幅に制限され治療困難に陥ることも稀ではない。このような薬剤耐性 HIV による症例を克服するには既存の抗 HIV 薬剤とは作用機序の異な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 活性について解析してきた。その結果抗 HIV 活性を持つ新規の低分子化合物を薬剤候補化合物として見出すことに成功した。本研究ではこの化合物の *in vivo*における抗 HIV 活性を評価するためにマウス HIV 感染モデルを構築し、化合物の抗 HIV 活性について評価した。

### B.研究方法

#### 1) マウス HIV 感染モデルの構築

RAG2 common  $\gamma$  鎖 K.O. SCID マウス(RAG2 マウス)の腹腔内に健常人 PBMC を  $5 \times 10^6$  個/head 移植して 60 匹の hu-PBL SCID マウスを構築した。PBMC 移植後 10 日後、全てのマウスから採血を行いマウス末梢血中のヒト CD45 陽性細胞を解析しヒト 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注入し HIV-1 を感染させた (図 1)。

#### 2) マウス薬剤投与

マウスは NVP 投与群、新規低分子化合物(Drug Y)投与群 (低容量)、Drug Y (高容量)、陰性対象群 (薬剤懸濁に用いた溶媒のみ投与) の 4 群に分け、各々のマウス匹数を 15 匹とした。マウスには HIV-1 感染 1 日前 (ヒト PBMC 移植後 13 日目)から、NVP 投与群では NVP を  $25\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ 、Drug Y は低容量群で  $2.5\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ 、高容量群は  $25\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ 、陰性対象群では溶媒のみを 1 日 2 回のレジメで経口投与した (図 1)。

#### 3) 抗 HIV 効果の評価

HIV-1 感染後 7 日目及び 14 日目の 2 ポイントでマウスの採血を行い血漿中 HIV-1 RNA copy 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。また血中ヒト CD45/CD4 陽性細胞数を各群で比較し統計学的差異について検討した (図 1)。

### C. 研究結果

HIV-1 感染 1 日前から NVP 及び Drug Y の低容量と高容量の 2 群でマウスへの投与を開始した。感染後 7 日目と 14 日目に採血し血漿中 HIV RNA コピー数を比較した結果、感染後 14 日目の時点で Drug Y の高容量投与群では非投与群と比較して血漿中 HIV RNA コピー数が低下する傾向が見られた。しかし統計学的な有意差は見られなかった ( $p=0.1528>0.05$ ) (図 2)。マウス血中のヒト CD45/CD4 陽性細胞数を解析した結果では、HIV 感染後 7 日後 (薬剤投与開始後 8 日後) では Drug Y 高容量投与群で、非投与群・低容量群・NVP 投与群と比較して有意に保たれていた ( $p=0.012<0.05$ ) (図 3)。

### D. 考察

本研究ではマウス HIV 感染モデルを用い、このマウスに HIV を感染させた状態で新規低分子化合物及び NVP を投与し、*in vivo* におけるこれらの化合物の抗 HIV 活性を検討した。HIV 感染後 7 日目の時点で、Drug Y を高容量 (25mg/kg/day) で投与した群で、血中のヒト CD45/CD4 陽性細胞数が非投与群に比べて有意に保たれていた。これは Drug Y がマウス体内で HIV の増殖を抑制した為に HIV の宿主細胞であるヒト CD45/CD4 陽性細胞の減少が抑制されたものと考えられた。またマウス血漿中の HIV RNA コピー数も HIV 感染後 14 日目の時点で Drug Y 高容量投与群では非投与群と比べて減少傾向にあり、これも Drug Y のマウス体内における抗 HIV 活性を裏付けるものと考えられる。Drug Y 高容量投与群における RNA コピー数低下は非投与群と比較して統計学的には有意ではなかったが、これはマウス血漿中の RNA コピー数が  $10^4$  レベルから  $10^6$  レベルまでと個体によっ

て非常にばらつきが大きく、このばらつきの大きさが抗 HIV 活性として血漿中 HIV RNA コピー数の減少を検出する際に障害になったと考えられた。また今回の研究では NVP 投与群においてヒト CD45/CD4 陽性細胞数の保持や HIV RNA コピー数減少といった抗 HIV 効果を確認する事が出来なかったが、これは NVP の投与量が 25mg/kg/day と以前の投与量の 1/4 であった為マウスの体内で十分な薬剤濃度を保てなかった可能性がある。今後マウス HIV 感染モデルによる新規低分子化合物評価の際に陽性対象群として NVP 投与群を利用するには NVP を以前の投与量である 100mg/kg/day の条件で投与する事が必要であると考えられる。

### E. 結論

hu-PBL SCID マウスを用いて構築したマウス HIV 感染モデルにより新規低分子化合物 (Drug Y) の抗 HIV 活性の評価を行った。その結果 Drug Y の高容量投与群ではマウス血中のヒト CD45/CD4 陽性細胞が HIV 感染後 7 日目の時点で有意に高く保たれていた。また Drug Y の高容量投与群では HIV 感染後 14 日目の時点で非投与群に比べて血漿中 HIV RNA コピー数が低下する傾向が見られ、マウス HIV 感染モデルで抗 HIV 薬の抗 HIV 活性を評価する事ができた。

### F. 研究発表

前項目 総合分担研究報告書 参照

### G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

図1. hu-PBL SCIDマウスによるマウスHIV感染モデルを用いた  
新規抗HIV薬剤の評価

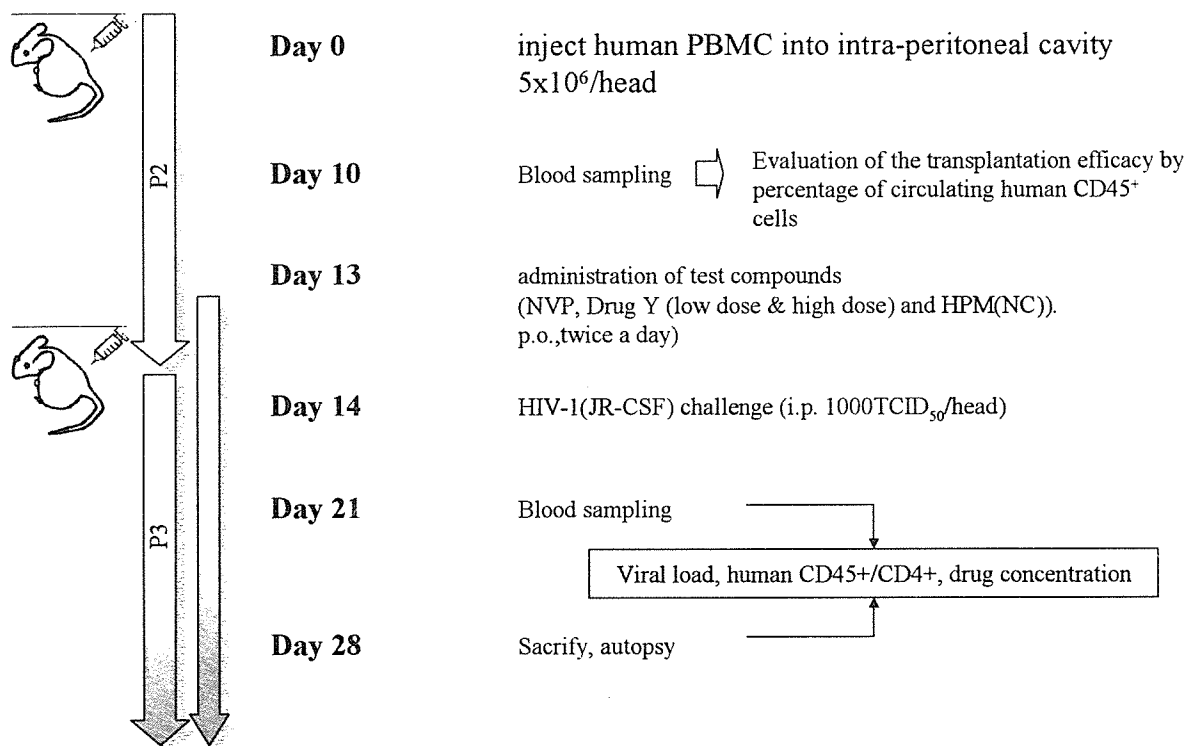


図2. マウス血漿中HIV-1 RNA量に与えるDrug Yの影響  
 ~HIV感染後7及び14日目の血漿中HIV-1 RNAコピー数の比較

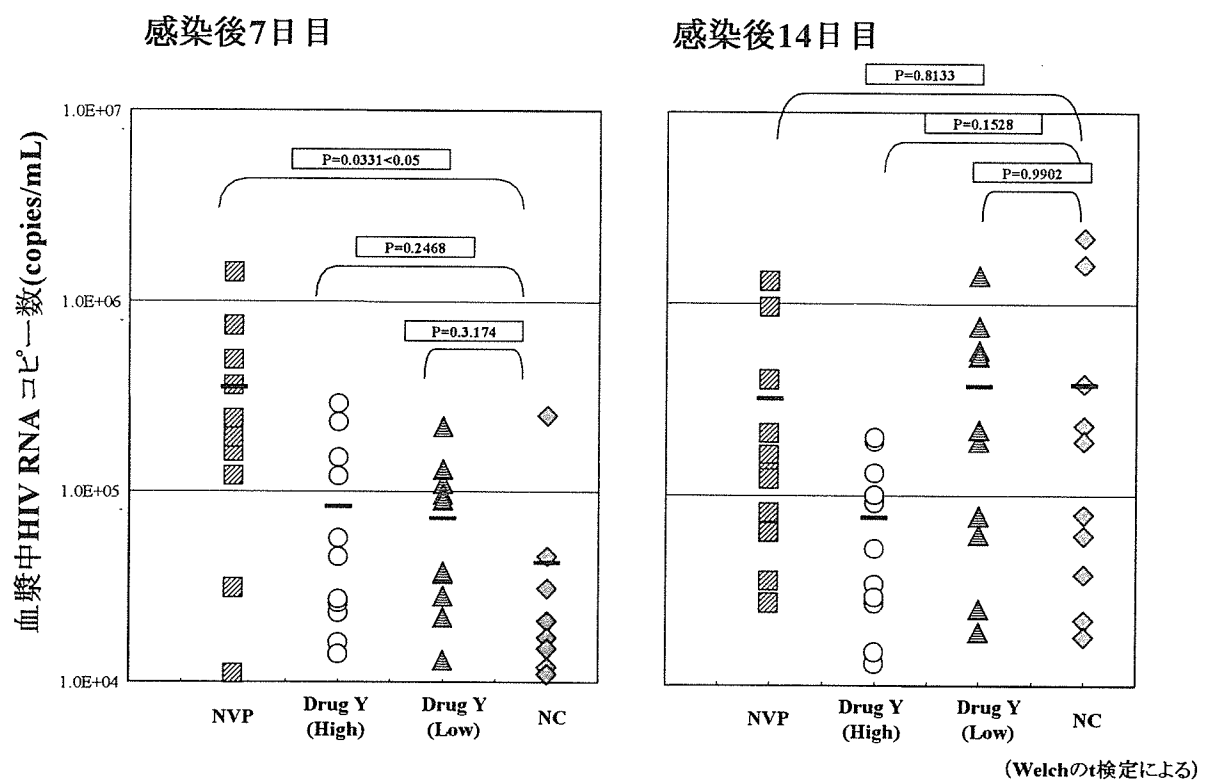
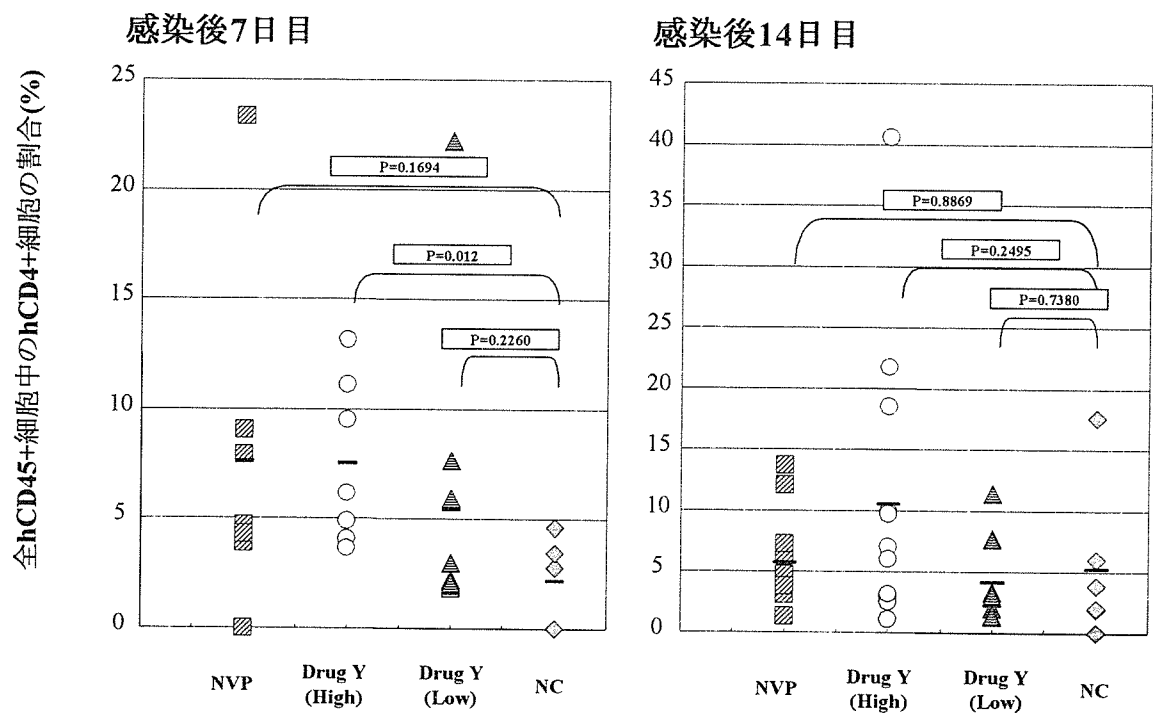


図3. Drug Yの血中hCD45/hCD4陽性細胞数に与える影響

(hCD45陽性細胞比率が1%以下のものを除外して計算)



(Welchのt検定による)



分担研究者 明里宏文（医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター リーダー）  
研究協力者 李永仲

研究要旨：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。今年度はこの作用機序について詳細な解析を行った。その結果、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。

#### A. 研究目的

ウイルス粒子内 Vif (v-Vif) は用量依存性に Gag p2/NC プロセッシングのみを特異的に抑制することでウイルス成熟過程を阻害し、その結果として HIV-1 の感染性を抑制する (Akari et al.: J Biol Chem (2004) 279, 12355)。一方、HIV-1 感染性ウイルス粒子形成のためには、Vif は宿主抗ウイルス因子 APOBEC3 のウイルス粒子への取り込みを阻害することが不可欠となる。この Vif による一見相反した作用のため、HIV-1 感染細胞における Vif 蛋白の steady-state level は厳密に制御されなければならない。

本研究においては、新規 Vif 機能である Gag 前駆体の成熟過程制御効果（以下 v-Vif 効果）を応用し、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 薬の開発に向けた基盤的解析を行うことを目的とする。そこで今年度は本作用を応用したウイルス制御法開発の可能性について検討することを目的として、Vif による APOBEC3 制御機能と v-Vif 効果との間における機能的関連性の有無について検討を行った。

さらに、昨年度に引き続き、Vif/Gag 蛋白間の結合様式や成熟阻害の分子機構を解明するためのステップとして、v-Vif 効果を規定するアミノ酸残基のファインマッピングを行なった。

#### B. 研究方法

HIV-1 Vif タンパク質発現ベクターである pNL41-43Vif を基に、site-directed mutagenesis 法により導入した一連の Vif N 末端欠失・点変異体発現ベクターを作成した。これらを HIV-1 分子クローンである pNL4-3Δenv もしくは pNL4-3Δenv Δvif と共に H9 細胞または HeLa 細胞へ遺伝子導入し、ウイルスおよび導入細胞を回収した。ウイルスタンパク質は Western blotting 法により解析を行った。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。

#### C. 研究結果

v-Vif 効果は APOBEC3 発現の有無に関わらず、細胞種非依存性に認められる。しかし v-Vif 効果が抗 APOBEC3 機能と全く独立したものなのか、それとも関連性があるのか、まだ明快な答えは得られていない。そこで、本研究において作成した各種 Vif 変異体を用いて検証を行なった。

APOBEC3 発現細胞である H9 細胞を用いて野生型 Vif を発現させると HIV-1vif(-) の感染性を約 40 倍上昇させる。一方 Vif N 末端領域欠失変異体を発現させたところ、M-1 を除き感染性増強効果が著しく低下していることが判明した (図 1A)。次に昨年度までの研究結果で、v-Vif 効果が欠失することが確認された M-3 領域における各種アラ

ニン点変異体について同様な検討を行なったところ、1アミノ酸残基置換では数倍程度の感染性増強効果がなお残存していたが、2アミノ酸残基置換ではどの残基の組み合わせにおいてもほぼ完全に感染性増強効果を失っていた(図1B)。

さらに、VifとAPOBEC3Gとの結合について免疫共沈降法を用いて検討したところ、全てのVif N末端領域欠失変異体はAPOBEC3Gと同程度に結合することが明らかとなった(図2)。従って、VifへのAPOBEC3Gとの結合には、少なくともVif N末端領域は関与していないが、僅かのアミノ酸残基欠失もしくはアラニン置換により抗APOBEC効果を失活してしまうことが明らかとなった。

ところで昨年度の研究成果より、v-Vif効果を決定する領域はN末端側のM-3領域、すなわち10-13アミノ酸残基にあることが示されたことから、今年度は引き続きこの領域の各種アラニン変異体を用いた解析を行なった。昨年度の予備的実験結果をより確証付けるため、各種変異体の用量依存性について検討したところ、どの変異体も細胞内発現レベルやウイルス粒子内取り込み効率は同程度であるにも関わらず、W11A/Q12A double mutantのみがv-Vif効果を欠失することが明らかとなった(図3)。

#### D. 考察

今回の結果より、v-Vif効果を規定する領域としてVif N末端領域、特にW11A/Q12Aがウイルス粒子成熟阻害活性に重要な役割を担っていることが明らかとなった。一方、Vif N末端の25アミノ残基はAPOBEC3Gとの結合に関与していなかった。この結果はこれまでの知見、すなわち抗APOBEC3効果に関わる領域(zinc-finger domain, BC box, Cul5 box)が全てC末端領域に存在することと一致する。従って、v-Vif効果と抗APOBEC3効果に関わる領域はお互い独立していると考えられる。このことは抗APOBEC3効果に関わる領域を欠失する一方、v-Vif効果に関わるN末端領域を保持することにより、HIV-1の成熟阻害活性のみが維持されたHIV-1抑制性Vifの構築が可能である事を示唆する。

今後はHIV自体の機能を利用して、ウイルス粒子成熟過程を特異的に阻害するという新たな発想によるエイズウイルス制御法開発への応用が期待される。特に今回明らかとなったVif機能を

規定する領域は、Pol-Integraseと遺伝子が重複しており、さらにIntegrase C末端側は機能的にも必須の領域であることから変異が生じ難いため、本効果を応用した新規抗HIV-1薬は耐性株の出現を抑える可能性が考えられ意義深いと考えられた。

#### E. 結論

本結果は、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。今後は本作用を応用した新規抗HIV薬への開発に向けてさらに研究を進めていきたい。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Shirakawa K, Takaori-Kondo A, Kobayashi M, Tomonaga M, Izumi T, Fukunaga K, Sasada A, Abudu A, Miyauchi Y, Akari H, Iwai K, Uchiyama T: Ubiquitination of APOBEC3 proteins by the Vif-Cullin5-ElonginB-ElonginC complex. *Virology* 344, 263-266, 2006.

##### 2. 学会発表

1) 李永仲、飯島沙幸、明里宏文: Identification of a new functional domain in the N-terminus of HIV-1 Vif for modulating Gag processing. 第54回日本ウイルス学会学術集会(平成18年11月)

2) 李永仲、飯島沙幸、明里宏文: HIV-1 Vif 蛋白におけるGag p2/NCプロセッシング制御に関わる新規機能ドメイン. 第20回日本エイズ学会学術集会(平成18年12月)

##### 3. 知的所有権の出願、登録状況

なし

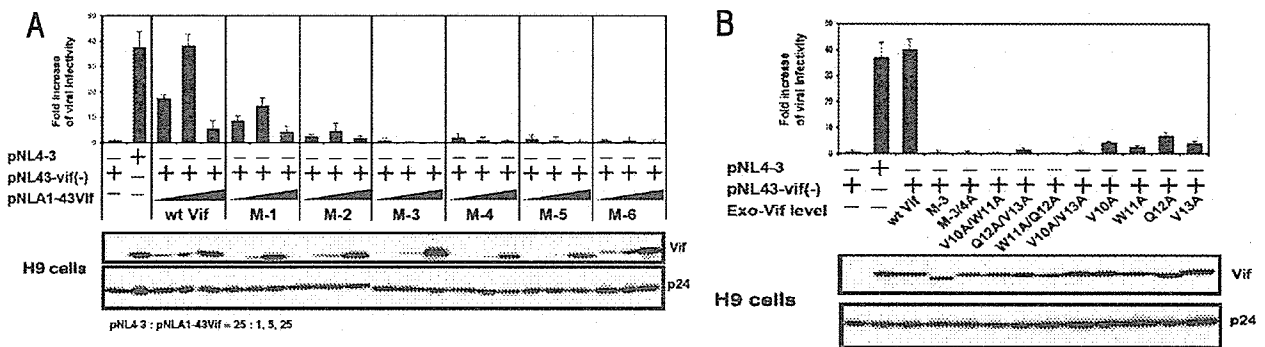


図 1 : Vif N 末端領域各種変異体におけるウイルス感染性増強効果に関する解析

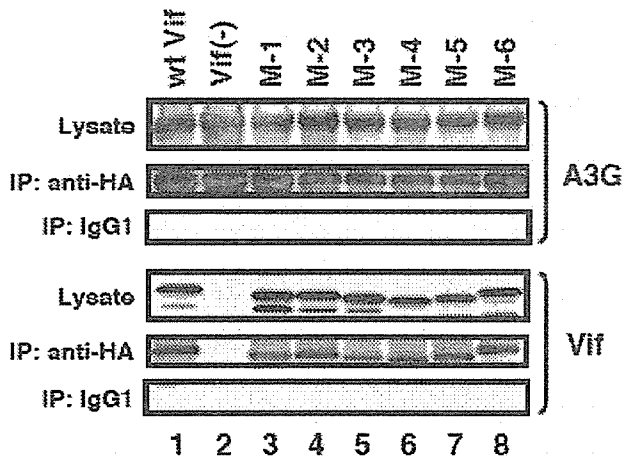


図 2 : 免疫共沈降法による A3G と Vif N 末端領域欠失変異体の結合解析

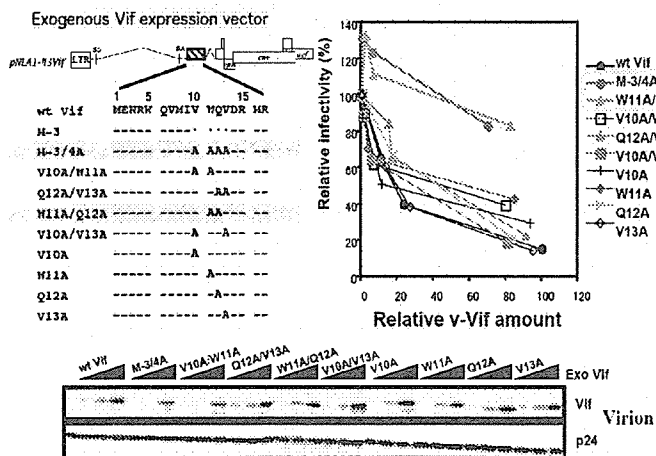


図 3 : Vif 各種アラニン点変異体を用いた v-Vif 効果決定領域の解析

分担研究者 木村 廣光 国立成育医療センター 研究所・共同研究管理室 室長

研究要旨：

ヒト臍帯血、ヒト樹状細胞株、小動物（マウス・ラット）骨髄血液幹細胞並びに、皮膚および皮膚由来樹状細胞株を用いて、HIV-1 ウィルスの標的細胞の一つと考えられる、樹状細胞の純粋培養方法の確立とワクチン治療開発を目的とする、各種ウィルスベクターの成熟樹状細胞ならびに樹状細胞前駆細胞への遺伝子導入の効率とその機能解析を行った。

A. 研究目的

これまでに報告されている、樹状細胞株（ヒト樹状細胞株：im-NMD、マウス新生児皮膚由来樹状細胞株：XS106）、正常ヒト臍帯血中のCD34陽性血液幹細胞、CD14陽性細胞、並びにマウス・ラット骨髄細胞、及び皮膚から、HIV-1の標的細胞である樹状細胞を、純粋培養・分離する培養精製技術を確立し、更に、同培養法によって得られる樹状細胞のウィルスワクチン治療開発、新規治療薬剤開発へ応用する事を目的として、各種ウィルスベクターの樹状細胞、樹状細胞前駆細胞への遺伝子導入の効率の解析とその機能解析を行い、小動物実験系への応用を確立する事により、抗HIV-1薬剤耐性を評価するための実験システムを確立する。

B. 研究方法

材料：動物は、近交系DA、F344ラットと、緑色蛍光蛋白（EGFP）発現DA、F344ラット、細胞として、ヒト樹状細胞株：im-NMD、ヒト臍帯血から分離精製して得られる、CD34、CD14陽性細胞、及びマウス新生児皮膚由来樹状細胞株XS106、正常マウス・ラット骨髄細胞、ラット腹腔マクロファージ

を実験材料として用いた。

細胞培養は、主として、GIT培地を使用、各種サイトカイン（Flt3, SCF, IL-6, GM-CSF, IL-4, TNF- $\alpha$ ）を組み合わせて培養。細胞表面マーカー分析には、マウス、ラット、ヒトに対する蛍光標識モノクローン抗体を使用。

遺伝子導入システムとして、緑色蛍光タンパク質（EGFP）を発現系とする従来型アデノウィルスベクター、並びにアデノウィルスのファイバー構造にアミノ酸3残基、RGDモチーフが挿入されたファイバー改変型アデノウィルスベクター、第三世代型レンチウィルスベクター、また、 $\beta$ -Galを発現するリジン7残基、K7モチーフが挿入されたファイバー改変型アデノウィルスベクターを使用。

（倫理面への配慮）：

1. ヒト由来細胞は BioWhittaker 社：米国 FDA 認可正常細胞提供プログラムにて調整されたものを実験材料とした。ヒト樹状細胞株は NEMOD Biotherapeutics GmbH & Co. KG（輸入元：フナコシ株）より購入

2. 遺伝子組み替え実験、並びに小動物の取り扱い並びに飼育・実験方法に関しては、国立成育医療センター 研究所・遺伝子組み替え実験委員会、

動物委員会、遺伝子組み替え実験指針・動物取り扱い規則に準じて、実験動物・実験方法に関する申請書関係類書の承諾を得て後、実験を行った。

### C. 研究結果

マウス新生児皮膚由来樹状細胞株XS106を標的細胞として、従来型アデノウイルスベクター(Adv/CMV/EGFP)とファイバー改変型アデノウイルスベクター(Adv/CMV/F-RGD/EGFP)による遺伝子導入効率をフローサイトメトリー解析により比較検討した結果、従来型アデノウイルスベクターの遺伝子導入効率がほぼ50%~70%に達するのに対し、ファイバー改変型では、20%~30%で、しかも発現は極めて弱い事が判明した。ヒト慢性骨髄性白血病由来樹状細胞株im-NMD細胞に対する同遺伝子ベクター、またHVJベクターによる、蛍光蛋白質の遺伝子導入は極めて困難である事が判明した。

一方、ラット腹腔マクロファージでは、従来型及び、ファイバー改変型アデノウイルスベクターともに、遺伝子導入効率がほぼ90%~100%に達する事、またラット心臓移植モデルを用いた緑色蛍光蛋白質に対する感作実験でも、樹状細胞、腹腔マクロファージへのアデノウイルスベクターによる遺伝子導入効率と感作状態が、比例する事を証明した。

### D. 考察

これまでマウス及びヒト樹状細胞を標的細胞とする、遺伝子導入システムが、特に、アデノウイルスベクターを中心に報告されてきた。我々は、GM-CSF非依存性樹状細胞培養法により、ラット骨髄細胞から樹状細胞の前駆細胞を増殖・分化させる事により、培養誘導した、樹状細胞(今日plasmacytoid DCと称せられる)、ヒト血液幹細胞から同様に培養誘導した樹状細胞を標的細胞と

して、各種遺伝子導入ベクターを用いて、遺伝子導入を試みたが、第三世代HIVウイルスベクター以外に、有効な遺伝子発現を確認する事はできなかった。アデノウイルスの標的細胞への吸着には、ウイルスが有するそのファイバー構造が特に重要と考えられ、従来型アデノウイルスベクターのファイバー部分は、標的細胞のコクサッキー・アデノウイルスリセプター(CAR)が本質的に関わっているとされている。CARのみならず、CD51, CD61のインテグリン分子を標的リセプター分子とした、アデノウイルスのファイバー構造の改変が試みられてきた。しかしながら、本研究結果からは、ファイバー改変型の優位性を確認する事は出来なかった。

成熟した樹状細胞が、真にHIV感染のprimary target となりうるか否かに関する基本的な疑問点に関する、本研究結果の答えは、否定的である。成熟した樹状細胞が、これまで知られた、全てのウイルスベクターによる遺伝子導入に対し、ことごとく抵抗性を示す事から、樹状細胞が、HIV感染症の第一義的な標的になっているというより、むしろHIV感染症に対するfirst defense(primary defense)に関わっている事の可能性がより強く示唆された。

未だ、樹状細胞の増殖と分化に関して、マクロファージとの関連性、相違性には不明の点が多い。両者を本質的に分離精製する、特異的なマーカーも、未だ確立されているとは言い難い。マクロファージを標的細胞とする場合、比較的遺伝子導入が容易である事から、マクロファージが、HIVの第一標的細胞となっている可能性が高く、これまでの樹状細胞研究も、このような立場から、再度見直されるべきであろう。

樹状細胞における、Toll like receptorの発現パターン、サイトカインプロファイルとHIV感染性とウイルス増殖の関係等、マクロファージとの

類似点・相違点を明らかにする事が極めて重要であると考えられた。

## E. 結論

これまで樹状細胞を標的細胞とする各種遺伝子ベクター、特にアデノウイルスを用いた遺伝子導入・発現システムが有効であるとの報告がなされて来たが、本研究は、これらの報告が、樹状細胞を含むマクロファージ細胞を標的細胞として実験が施行された可能性が高いことを強く示唆する。

免疫系において、HIVを含めたウイルス情報を免疫担当細胞であるリンパ球に最初にウイルス抗原情報を提示するのは、樹状細胞であるとされている。同細胞の果たしている免疫学的役割を更に詳細に解析する必要がある。ウイルスワクチン療法の観点からも、抗原提示細胞としての樹状細胞を再定義する必要性は明らかであろう。樹状細胞をより厳密に定義する事により、樹状細胞が、HIV感染のprimary target としてよりも、むしろHIV感染症に対するinnate immunityに関わっている事の重要性がより一層明らかになるものと考えられる

## F. 健康危険情報

特記すべき事なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Kitazawa Y, Fujino M, Wang QX, Kimura H, Azuma M, Kubo M, Abe R, Li X-K. Involvement of the PD-1/PD-L1 pathway in CD4+CD25+ regulatory T cells activity to suppress alloimmune responses. Transplantation (in press)

Kawasaki M, Iwasaki M, Koshiba T, Fujino M,

Hara Y, Kitazawa Y, Kimura H, Nomura K, Uemoto S, Li X-K, Koichi Tanaka. Gene-expression profile analysis of the peripheral blood mononuclear cells from tolerant living donor liver transplanted recipients. Int Surg (in press).

Hara Y, Kitazawa Y, Funeshima N, Kawasaki M, Sato Y, Tezuka K, Kimura H, Hatakeyama K, Li X-K. Anergic lymphocytes generated by blocking CD28 and ICOS pathways in vitro prolong rat cardiac graft survival. Int Immunopharmacol 6(7):1143-51;2006.

Hayakawa K, Guo L, Terentyeva EA, Li X-K, Kimura H, Hirano M, Yoshikawa K, Nagamine T, Katsumata N, Ogata T, Tanaka T. Determination of specific activities and kinetic constants of biotinidase and lipoamidase in LEW rat and Lactobacillus casei (Shirota). J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 5;844(2):240-50; 2006.

## 2 学会発表

### 国際学会

Naoko Fuji (Funeshima), Atsushi Tsuji, Li Xiaoj-Kang, and Hiromitsu Kimura. High expression of Foxp3 mRNA in rat dendritic cells (DCs) generated from a long-term culture of bone marrow cells (BMC). The 9th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy 2006, Baltimore, MD, May 31-June 4, 2006,

Kitazawa Y, Fujino M, Hara Y, Kimura H, Azuma M, Abe R and Li X-K. Involvement of PD-1/PD L1 pathway for induction of suppression to

alloantigen by CD4+CD25+ regulatory T cell.  
World Transplant Congress 2006; Boston, July  
22-27, 2006.

Kitazawa Y, Fujino M, Hara Y, Kimura H, Abe R,  
and Li X-K. Selective expansion of functional  
Foxp3-expressing regulatory T cells with CD28  
superagonist allows effective therapy for  
allograft rejection and GvHD. World Transplant  
Congress 2006; Boston, July 22-27, 2006.

Hara Y, Funeshima-Fuji N, Tokunaka K, Abe F,  
Sato Y, Hatakeyama K, Takahara S, Kimura H, and  
Li X-K. A Novel Chemical Compound NK026680  
Targets Dendritic Cell to Prolong Rat Hepatic  
Graft Survival. World Transplant Congress  
2006; Boston, July 22-27, 2006.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

「SIVを用いた新規抗レトロウイルス薬の開発」

分担研究者 駒野 淳 国立感染症研究所 エイズ研究センター 主任研究官

研究要旨

HIV-1 に最も近縁の HIV-2/SIV を用いて培養細胞レベルの複製系を樹立し、生物学的に安全なレンチウイルス複製阻害剤ハイスループットスクリーニング系 (HTS) を確立した。4,000 のランダムな構造を持つ小分子化合物ライブラリーのスクリーニングにより、数種の SIV 複製阻害剤を同定した。これらは複製初期過程を標的とするもの 1 種類、後期過程を標的とするもの 4 種類を同定することができた。とくに後者は IC<sub>50</sub> が 380-570nM と低い濃度で複製抑制が確認され、有望なリード化合物であることが示唆された。しかし、HIV-1 に対する抗ウイルス活性は検出されなかった。SIV の複製評価系は、当班研究でもたらされるリード化合物について、前臨床試験として位置づけられるサルを用いたエイズモデルで検討するかを決定するための評価基盤を提供し、班研究の推進に大きく貢献することが期待できる。

A. 研究目的

世界的に蔓延するエイズに対し、実用に足る有効なワクチンの開発は未だ報告されておらず、化学療法は薬剤耐性ウイルスの発生という難題に直面している。したがってエイズの完全抑止には新たな治療標的の検索が必須である。当研究は宿主因子を標的とする抗エイズウイルス薬を探索するものである。これは現存する化学療法 (HAART 療法) の重大な問題点である薬剤耐性ウイルスの発生を回避できるだけでなく、薬剤耐性ウイルスによる難治症例の治療をも可能にする。

HIV-1 複製系を用いた抗エイズ薬スクリーニングは、安全性という点で HTP 系構築の可塑性を妨げる。これに対し、HIV-1 に最も近縁の HIV-2/SIV の複製系は安全な HTS 系を構築してレンチウイルス複製阻害剤を探索することを可能にする。HIV-1/SIV の感染系は、当班研究で得られた抗 HIV 剤候補化合物について実際に前臨床段階としてのサルのエイズモデルで検討するかを決定する際の重要な判定材料を提供する。これは班研究におい

て重要な一側面であり、当研究が果たす役割は非常に大きいと考えられる。

B. 研究方法

昨年度、HIV-1 に最も近縁の HIV-2/SIV の中から、最も代表的なクローンである SIV<sub>mac239</sub> あるいは SIV<sub>agm</sub> を選び、感染に際してルシフェラーゼを発現するレポーター細胞 LuSIV を用いて安全なレンチウイルス複製阻害剤探索の HTS 系を樹立した。これを利用して分子量 500 以下のランダムな構造を持つケミカルライブラリー 4,000 個から SIV 複製阻害剤のスクリーニングを行った。1 次スクリーニングは 5 つの化合物をまとめて検査し、複製阻害作用が確認された場合 2 次スクリーニングで個別の化合物を検査する。それで SIV 複製阻害作用をみとめた化合物はさらに 3 次スクリーニングで IC<sub>50</sub> の測定および作用機序解明と HIV-1 複製阻害の有無の検索をそれぞれ行った。

(倫理面への配慮)

特記すべきことなし。



## C. 研究結果

複製阻害効果はDMSOをコントロールとしてレポーター活性が10倍、100倍、1000倍、10000倍以上高いものをスコアした。その結果、全体の約2%、1%、0.4%、0.03%がそれぞれのカテゴリーに適合することが判明した。それらをさらに2次スクリーニングすると、55%は細胞毒性であったが、残りの45%は抗SIV効果を確認し、それらは上記のカテゴリーにそれぞれ32%、6%、6%、1%となることがわかった。そのうち、特に活性が高いもの6種類を検査したところ、5種類はSIV産生過程を阻害し、1種類は感染初期過程を阻害することが判明した。活性の強かったものから4種類(図参照)はすべてウイルス産生過程に効くものであり、IC50は0.39-0.57nMであったことから、非常に有用なリードであることが期待された。一方これらが持つ抗HIV-1活性を調査すると、現時点での活性は検出限界以下であった。

## D. 考察

本リード化合物は現時点でレンチウイルスのなかでもSIVにしか有効ではないが、作用機序の解明及び最適化によってHIV-1に有効な新たな作用機序をもつ抗レトロウイルス剤が開発できることが期待される。レンチウイルスの複製後期過程をブロックするものはほとんど知られておらず、作用機序が新しい抗レトロウイルス薬の開発に繋がる可能性がある。これら候補化合物の構造は既存の抗レトロウイルス薬とは必ずしも共通する者ではなく、この点においても新規作用機序であることが推測される。本リード化合物がSIVにしか有効でなくても、複製後期過程の分子メカニズムを知る上で有用なツールになることが期待される。

SIV複製系は班研究にて同定されたリード化合物に対して、前臨床試験に位置づけられるサルモ

デルによる抗エイズ効果の評価にとって重要なものであり、班研究への寄与が期待される。

## E. 結論

SIVを利用した抗レンチウイルス剤のHTS系を樹立し、SIV複製を阻害する数種のリード化合物を同定した。最適化および機序解明により抗HIV薬開発の礎となることが期待される。

## F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Futahashi Y, \*Komano J, Urano E, Aoki T, Hamatake M, Miyauchi K, Yoshida T, Koyanagi Y, Matsuda Z, Yamamoto N. Separate elements are required for ligand-dependent and -independent internalization of metastatic potentiator CXCR4. *Cancer Science*. 2006. In press.

2) Shimizu S, Urano E, Futahashi Y, Miyauchi K, Isogai M, Matsuda Z, Nohtomi K, Onogi T, Takebe Y, Yamamoto N, Komano J. Inhibiting lentiviral replication by HEXIM1, a cellular inhibitor of cdk9/cyclinT complex. *AID S*. 2006. In press.

3) Miyauchi K, \*Komano J, Myint L, Futahashi Y, Urano E, Matsuda Z, Chiba T, Miura H, Sugiura W, Yamamoto N. Rapid propagation of low-fitness drug resistant mutants of human immunodeficiency virus type 1 by a streptococcal metabolite sparsomycin. *Antivir Chem Chemother*. 2006;17(4): 167-174

4) Miyauchi K, Curran R, Matthews E, Komano J, Hoshino T, Engelman DM, \*Matsuda Z. Mutations

of conserved glycine residues within the membrane-spanning domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 can inhibit membrane fusion and incorporation of Env onto virions. *Jpn J Infect Dis.* 2006 Apr;59(2):77-84.

## 2. 学会発表 (抜粋)

1) Shimizu S, Urano E, Futahashi Y, Miyauchi K, Isogai M, Matsuda Z, Nohtomi K, Onogi T, Takebe Y, Yamamoto N, Komano J. Inhibiting HIV-1 replication by HEXIM1, a cellular inhibitor of cdk9/cyclinT complex (P-TEFb). May 23-27, 2006. CSH Meeting on Retroviruses, Cold Spring Harbor, NY

2) Shimizu S, Urano E, Futahashi Y, Miyauchi K, Isogai M, Matsuda Z, Nohtomi K, Onogi T, Takebe Y, Yamamoto N, Komano J. Inhibiting HIV-1 replication by HEXIM1, a cellular inhibitor of cdk9/cyclinT complex (P-TEFb), Poster, 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress in conjunction with 79th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society and 29th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. Jun 18-23, 2006. Kyoto, Japan.

3) Miyauchi K, Curran R, Mathews E, Komano J., Murakami T, Yamamoto N, Engelman DM, \*Matsuda Z. Alteration of intracellular transport of the envelope protein of HIV-1 by a shift in a helical phase within its membrane-spanning domain. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress in conjunction with 79th Annual Meeting of the Japanese Biochemical

Society and 29th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. Jun 18-23, 2006. Kyoto, Japan.

4) Komano J. Characterization of neutralizing antibodies found in long-term non-progressors of Japanese hemophiliacs. 3<sup>rd</sup> Taiwan-Japan Symposium on HIV/AIDS. Sep 7-9, 2006. Center for Disease Control Department of Health, Taiwan, R.O.C.

5) Shimizu S, Urano E, Futahashi Y, Miyauchi K, Isogai M, Matsuda Z, Nohtomi K, Onogi T, Takebe Y, Yamamoto N, Komano J. Inhibiting HIV-1 replication by HEXIM1, a cellular inhibitor of CDK9/Cyclin T complex (P-TEFb). 7<sup>th</sup> AIDS Seminar in Kumamoto, Kumamoto. Sep 21-22, 2006. Japan.

6) Komano J., Futahashi Y, Isogai M, Hamatake M, Matsuda Z, Shiino T, Takebe Y, Sato H, Yamamoto N. Drug Resistance Mutations in the Polymerase Catalytic Domain Negatively Affect the RNase H Activity of HIV-1 Reverse Transcriptase. 7<sup>th</sup> Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance. 2006 Nov 12-15. Chantilly VA, USA

7) Murakami T, Yasutomi E, Ablan S, Miyakawa K, Komano J., Matsuda Z, Freed EO, Yamamoto N. Detailed analyses of HIV-1 matrix mutants: Effects on an early stage of infection. 7<sup>th</sup> Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance. 2006 Nov 12-15. Chantilly VA, USA

8) 青木徹, 貝の瀬由成, 二橋悠子, 清水佐紀, 松田善衛, 山本直樹, 駒野淳. HIV-1 GagN 末端のミリスチン酸化非依存的な分子集合・出芽およびVLPの性質に関する解析. 第54回日本ウイルス学会学術集会. Nov 19-21, 2006. 名古屋

9) 濱武牧子, 浦野恵美子, 花房忠次, 加藤真吾,

Tee Kok Keng, 武部豊, 山本直樹, 駒野淳. AIDS 長期未発症の HIV 感染血友病患者における高力価中和抗体の存在とその病期進行への寄与に関する解析. 第 5 4 回日本ウイルス学会学術集会. Nov 19-21, 2006. 名古屋

10) 駒野淳, 二橋悠子, 磯貝まや, 濱武牧子, 松田善衛, 佐藤裕徳, 椎野貞一郎, 武部豊, 山本直樹. 挿入変異を伴う多剤耐性 HIV-1 (CRF01\_AE) における薬剤耐性亢進のメカニズム—薬剤耐性獲得における RNase H 活性の関与. 第 5 4 回日本ウイルス学会学術集会. Nov 19-21, 2006. 名古屋

11) 駒野淳, 姉崎裕介, 二橋悠子, 磯貝まや, 藤義秀, 星野忠次, 武部豊, 山本直樹. HIV-1 の逆転写酵素が持つ RNase H 活性に対する特異的阻害剤の開発. 第 5 4 回日本ウイルス学会学術集会. Nov 19-21, 2006. 名古屋

12) Komano J. Myristoylation independent assembly, transport, and VLP formation of HIV-1 Gag. 第 2 0 回日本エイズ学会学術集会. Nov 30-Dec 2, 2006. 東京

13) 駒野淳, 姉崎裕介, 二橋悠子, 磯貝まや, 武部豊, 山本直樹. HIV-1 の逆転写酵素に内在する RNase H 活性阻害薬の開発 (1) —小分子化合物ライブラリーからのスクリーニング. 第 2 0 回日本エイズ学会学術集会. Nov 30-Dec 2, 2006. 東京

14) 濱武牧子, 浦野恵美子, 花房忠次, 加藤真吾, Tee Kok Keng, 武部豊, 山本直樹, 駒野淳. 血友病患者におけるエイズ長期未発症症例における高力価中和抗体の存在と標的部位の同定. 第 2 0 回日本エイズ学会学術集会. Nov 30-Dec 2, 2006. 東京

15) 駒野淳, 二橋悠子, 磯貝まや, 濱武牧子, 松田善衛, 佐藤裕徳, 椎野貞一郎, 武部豊, 山本直樹. HIV-1 逆転写酵素 polymerase active site への薬剤耐性変異が誘導する RNase H 活性の低下

と耐性亢進への寄与. 第 2 0 回日本エイズ学会学術集会. Nov 30-Dec 2, 2006. 東京

16) Jun Komano. Broadly reactive strong neutralizing antibody against HIV-1 in long-term survivors of HIV-1-infected haemophiliacs. The US-Japan Cooperative Medical Science Program 19th Joing Meeting of AIDS Panel. Dec 6-7, 2006. Kagoshima, Japan

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

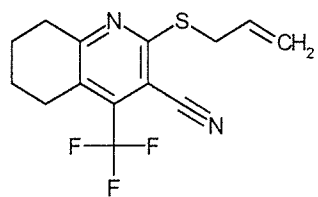
##### 2. 実用新案登録

なし

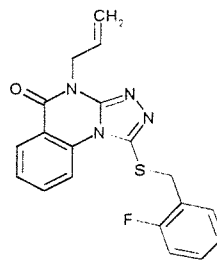
##### 3. その他

なし

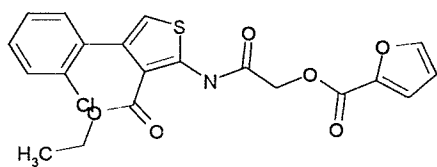
## 4つの候補化合物の構造



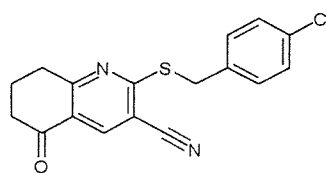
IC50            0.3871  $\mu$ M



IC50            0.5689  $\mu$ M



IC50            0.4712  $\mu$ M



IC50            0.4712  $\mu$ M