

## 研究要旨

放線菌由来の抗 HIV 蛋白質アクチノヒビン (AH) は、114 アミノ酸残基で構成される蛋白質であり、HIV gp120 の高マンノース型糖鎖と結合することで、HIV の接着・侵入を低濃度 ( $IC_{50} = 2\sim 110$  nM) で阻害する。AH は分子内に 3 つの糖鎖結合ポケットを持ち、AH 1 分子が gp120 上の 3 本の高マンノース型糖鎖を捕らえることで、いわゆるレクチンのクラスター効果により、gp120 と強力に結合し、強力で選択的な抗 HIV 活性を示すと考えられている。AH の患者分離 HIV 株に対する活性を調べた結果、抗 HIV 薬耐性株を含む、様々な株に対して有効であったが、阻害活性が弱い株 (AH 非感受性株) も存在し、AH の活性の強さは gp120 上の糖鎖数に依存する傾向が見られた。AH 非感受性株対策として、AH を 2 量体とした結果、HIV の接着・侵入の過程をモデル化した合胞体形成の阻害活性は 20 倍上昇し、患者分離株に対する抗 HIV 活性は 2~20 に倍上昇したのみならず、AH 単量体では活性を示さなかった株に対しても、ある程度の阻害活性を示すようになった。

今後、AH の多量体化による非感受性株の完全なる克服、AH 誘導体の大量生産系の確立並びに前臨床試験を進める予定である。

### A. 研究目的

新属新種の放線菌 *Longispora albida* が生産するアクチノヒビン (AH, 図 1) は、HIV gp120 の高マンノース型糖鎖と結合することにより、HIV の細胞への接着・侵入を阻害し、T-及び M-指向性の両方の HIV 株に対して抗 HIV 活性を示すことが、これまでの研究により明らかになっている (図 1)。

AH は 114 アミノ酸残基で構成される蛋白質であり、分子内に 38 アミノ酸残基で構成される 3 つのセグメントを持つ。各セグメントには LD モチーフと QXW モチーフと呼ばれる保存された配列が存在し (図 1)、このような特徴から AH は carbohydrate binding module family 13 (CBM13) に属すると考えられる。AH の立体構造は不明であるが、CBM13 に属する Ricin B 鎖 (図 2) の結晶構造を基に、AH の立体構造を推測したところ、3 つのセグメント (糖鎖結合ポケット) が 3 つ葉のクローバー様に配置されている状態が観察され (図 3)、また、高マンノース型糖

鎖とのドッキングモデルでは、ポケット 1 つに糖鎖 1 本が収容されている状態が観察された。AH のポケット 1 つと糖鎖 1 本の親和性は弱いものであるが、gp120 に対する親和性は非常に強い。これは、1 分子の AH が gp120 上の 3 本の高マンノース型糖鎖を捕らえることで (図 3)、いわゆるレクチンのクラスター効果によって、gp120 への親和性が相乗的に高まり、gp120 に強く結合することで、AH は強力な抗 HIV 活性を示すと考えられている。

AH は糖鎖を標的としているため、様々な患者分離 HIV 株に対しても強い抗 HIV 活性を示し、臨床で使用されている逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤耐性株にも有効である (表 1)。しかし、AH の阻害効果が弱い株も存在し、このような株は gp120 上の糖鎖数が少なくなっていることが確認された (表 1)。すなわち、AH の活性の強さは gp120 上の糖鎖数に依存していると考えられた。

本研究では、種々の AH 誘導体を調製し、強

力で幅広い抗 HIV スペクトルを持つ HIV/AIDS 感染予防薬・治療薬を開発することを目的とする。

## B. 研究方法

### <AH 誘導体の調製>

誘導体の遺伝子を PCR 法により作成し、すでに確立された大腸菌での AH 生産系を用いて誘導体を調製した。また、誘導体の活性は、HIV の接着・侵入の過程をモデル化した合胞体形成系を用いて評価した。

### <患者分離株に対する抗 HIV 活性>

MAGIC5 assay により岡ら（国際医療センター）により測定された。

## C/D. 研究結果と考察

AH 非感受性株では、gp120 上の高マンノース型糖鎖数が減少していると考えられ、結果として AH が捕まえられる糖鎖数が減少してクラスター効果が十分に発揮できず、gp120 に強く結合できなくなり、強い抗 HIV 活性を示せなくなると考えられた。従って、このような株を克服するためには、AH の糖鎖結合ポケットの数を増やすことで、AH が捕らえる糖鎖数を増やし、gp120 と強く結合できるようにさせることが効果的であると考へた。そこで、AH を 2 量体とすることにしたが、2 量体とするうえで、AH 2 分子を直結させた His-TEV-AH dimer を作成し、その合胞体形成阻害活性を測定したところ、活性が失われたことから（図 4）、AH を 2 量体とするならば適切なリンカーを介する必要があると判断した。リンカーとして、黄色ブドウ球菌プロテイン A 由来の fragment B を用いた AH 2 量体 (AH dimer/FB) と、Ricin B 鎖において 2 単位のクローバー構造を繋いでいるペプチド（図 2）を用いた AH 2 量体 (AH dimer/RTB-L) の 2 種類を作成した（図 4）。それらの合胞体形成阻害活性は、His-TEV-AH dimer/FB で 5 倍、His-TEV-AH dimer/RTB-L で 20 倍に上昇した（図 4）。2 種類の 2 量体で活性上昇の程度が異な

っていたが、各 2 量体で AH の立体的配置により糖鎖への結合のし易さが異なり、合胞体形成阻害活性が異なると推定された。最も活性上昇の大きかった His-TEV-AH dimer/RTB-L について、様々な臨床分離株に対する抗 HIV 活性を測定したところ、株によって程度は異なるが 2~20 倍程度の活性上昇が見られ、特に AH 単量体で効果の無かった株に対しても、ある程度効果を示すようになった（表 2）。今後、AH 非感受性株の完全なる克服を目的として、AH のさらなる多量体化（3 量体又は 4 量体）を検討する。

## E. 結論

今回作成した His-TEV-AH dimer/RTB-L は、様々な臨床分離株に対し AH 単量体の 2~20 倍強力な抗 HIV 活性を示した。特に AH 単量体では、まったく効果が無かった株に対しても強い抗 HIV 活性を示すようになった。今後、AH 非感受性株の完全なる克服を目的とし、AH のさらなる多量体化（3 量体又は 4 量体）を検討し、また、植物や放線菌、大腸菌を用いて、これら AH 多量体の安価で簡便な大量生産系を確立する必要がある。また、His-TEV-AH dimer/RTB-L を用いて HIV 感染予防薬を目指した前臨床試験（免疫原性、抗原性、粘膜刺激性など）や、サルを用いた SIV の感染阻害実験の実施についても検討する。さらに、注射可能な HIV/AIDS 治療薬の開発を目的として、抗 HIV 活性を保持したスチレン・マレエート誘導体の調製を試みる予定である。

## F. 健康危険情報

該当無し

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

無し

### 2. 学会発表

(1) H. Tanaka, H. Chiba, A. Takahashi, J. Inokoshi, S. Omura. Actinohivin, a Promising

Anti-HIV Protein of Microbial Origin. Natural Products Discovery and Production: New Challenges; New Opportunities (Santafe, USA) 2006. 6. 4-8.

(2) H. Tanaka, H. Chiba, J. inokoshi, A. Takahashi, S. Omura. Actinohivin, a Promising Anti-HIV Protein of Microbial Origin. World AIDS Day (Tianjin, China) 2006. 12. 1-3

(3) 高橋淳、猪腰淳嗣、岡慎一、蜂谷敦子、大村智、田中晴雄 抗 HIV 蛋白質アクチノヒビンの多量体化による高活性変異体の調製 日本薬学会 127 年会 (富山) 2007.3.28-30

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

##### 1. 特許取得

(1) 特願 2004-346644、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) 特願 2006-323043

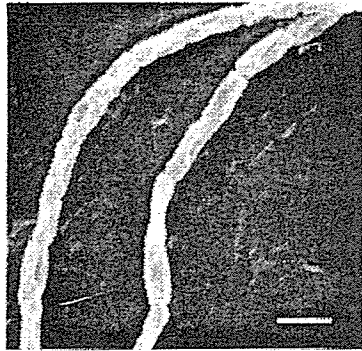
発明の名称：アクチノヒビン多量体を含む融合タンパク質からなる抗HIV薬、これを構成するポリペプチド、ポリペプチドをコードする遺伝子および抗 HIVの製造法

発明者：田中晴雄、猪腰淳嗣、高橋淳、大村智  
出願人：有限会社キイム・ファーマ・ラボ

##### 2. 実用新案登録

該当無し

1- 38 ASVTIRNAQTGRLLDSNYNGNVYTLPANGGNYQRWTGP  
 39- 76 GDGTVRNAQTGRCLDSNYDGAVYTLPCNGGSYQKWLFLY  
 77-114 SNGYIQNVETGRVLDSDNYNGNVYTLPANGGNYQKWYTG  
 — : LD motif                      ----- : QXW motif



*Longispora albida* gen. nov., sp. nov.  
 (Scale: 1 μm)

Virus strain	IC <sub>50</sub> (nM)
<b>T-tropic HIV-1</b>	
IIIB	2
NL4-3	16
O18A (Primary isolate)	110
<b>M-tropic HIV-1</b>	
JR-CFS	38
<b>HIV-2</b>	
ROD	14
EHO	3.7

図 1. AH の生産菌、AH のアミノ酸配列及び AH の抗 HIV 活性

Protein (binding specificity)	Amino acid sequence
<i>Longispora albida</i> Actinohivin (high mannose type oligosaccharide)	1 ASVTIRNAQTGRLLDSNYNGNVYTLPANGGNYQRWTGP 38 segment 1
	39 GDGTVRNAQTGRCLDSNYDGAVYTLPCNGGSYQKWLFLY 76 segment 2
	77 SNGYIQNVETGRVLDSDNYNGNVYTLPANGGNYQKWYTG 114 segment 3
<i>Ricinus communis</i> Ricin B chain (lactose, galactose)	11 --VRIVG--RNGLCVDVDRGRFHNGNAIQLWPCKSNTDANQLWILK
	53 RDNTIRS--NG-KCLTTY--GYSPGVYVMIYDCNTAATDATRWQIW
	94 DNGTIINP-RSSIVLAAT--SGNSGTTLTVQTNI--YAVSQGWLPTNNTOP
	140 EVTTIVG--LYGICLOAN--S----GQVWIEDCSS-EKAEQQWALY
	177 ADGSIRPQONRDNCLTS-DSN-IRETVVKILSCGPA-SSGQRVMEK
224 NDGTIILNL-YSGLVLDVRA-SDPSLKQIILYPLH--GDPNQIWLPLF	

□: sugar binding pocket                      —: linker

図 2. CBM13 に属する AH と Ricin B 鎖のアミノ酸配列

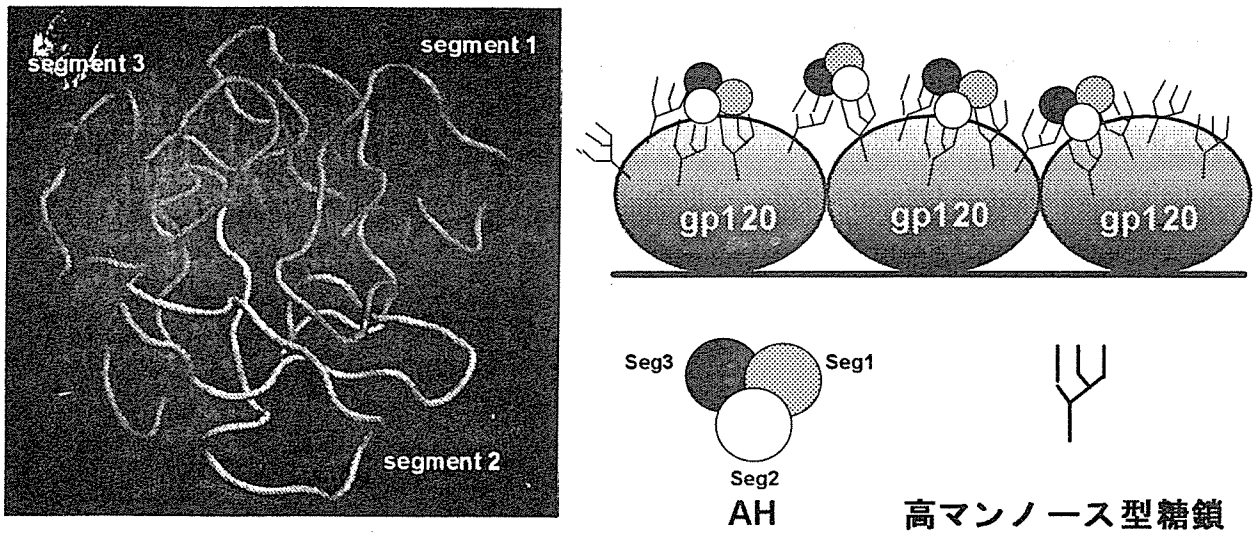


図 3. AH の推定立体構造と gp120 との結合様式

Protein	Structure	IC <sub>50</sub> (nM) (fold)
His-TEV-AH		127 (1.0)
His-TEV-AH/dimer		>1000 (-)
His-TEV-AH dimer /FB	<p style="text-align: center;">-Q-K-W-Y-T-G-A-K-K-L-N-D-A-Q-A-P-K-S-D-A-S-V-T-I-R-N-A-</p>	24 (5.3)
His-TEV-AH dimer /RTB-L	<p style="text-align: center;">-Q-K-W-L-P-T-N-N-T-Q-P-F-V-T-T-I-R-N-A-</p>	7 (18.6)
Recombinant AH		113 (1.0)
AH dimer/FB		53 (2.4)
AH dimer/RTB-L		14 (8.9)

\*1 TEV : TEV protease recognition sequence  
 \*2 FB: fragment B of *Staphylococcus aureus*  
 \*3 RTB: residues 132-143 of ricin B chain

図 4. 各種 AH 2 量体の構造と合胞体形成阻害活性

表 1. 臨床分離株を含む種々の HIV 株に対する AH の抗 HIV 活性

表 1-1. 実験室株に対する AH の抗 HIV 活性

Laboratory strain	IC <sub>50</sub> (nM)
NL432	64
BaL	35
IIIB	26

表 1-2. 臨床分離株に対する AH の抗 HIV 活性

Subtype	ACC No	Resistance	IC <sub>50</sub> (nM)
B	158	RTI/NNRTI/PI	<10
	182	NNRTI/PI	68
	242	RTI/NNRTI/PI	700
	307	Sensitive	840
	37	NNRTI	>10000
AE	251	RTI/PI	28
	214	Sensitive	56
	36	Sensitive	>10000

表 1-3. AH の抗 HIV 活性と gp120 の糖鎖数

Subtype	ACC No	IC <sub>50</sub> (nM)	Number of N-glycosilation
B	37	>10000	14
B	307	840	15
AE	36	>10000	16
B	BaL	35	17
AE	214	56	17
AE	251	28	17
B	NL	64	18
B	IIIB	26	18
B	182	68	18
B	242	700	19
B	158	<10	20

表 2. His-TEV-AH dimer/RTB-L の臨床分離 HIV 株に対する抗 HIV 活性

HIV strain	IC <sub>50</sub> (nM)		Fold	Nnumber of N-glycosilation
	AH	His-TEV-AH dimer/RTB-L		
37	>10000	>1000	-	14
307	620	35	18	15
36	>10000	4	>2500	16
Bal	34	4	8	17
214	44	6	8	17
251	23	7	3	17
NL	34	2	16	18
182	30	9	3	18
242	140	76	2	19
158	10	2	5	20

分担研究者 田中勇悦 琉球大学・大学院医学研究科・教授

研究要旨：多剤耐性 HIV-1 株の中で強い病原性を持つ CXCR4 使用 HIV-1 (X4 HIV-1) が、CXCR4 アンタゴニスト (KRH-1636) に対して *in vivo* でも感受性を示すかどうかを新たに開発された hu-PBL-SCID マウスを用いて検討した。活性化 PBMC を標的とした *in vitro* での感染系で感受性を示した 3 株の多剤耐性 HIV-1 を混合して、予め KRH-1636 を腹腔内に投与した hu-PBL-SCID マウスに感染させた。一週間後にウイルスの感染程度を腹腔細胞の p24 染色、培養後の p24 産生で調べた。感染させた一群 4 匹マウス中、コントロール薬剤投与群では 4 匹に顕著な感染が見られたが、KRH-1636 投与群では感染が抑制された。したがって、新規 HIV-1 感染抑制・治療剤の候補である coreceptor アンタゴニストは *in vivo* でも HIV-1 抑制活性をもつことが示唆された。

#### A. 研究目的

多剤耐性 HIV-1 に対する新たな治療薬開発の候補として、エイズの臨床病態に重要と言われる HIV-1 の受容体である CXCR4 と CCR5 アンタゴニスト剤が挙げられる。特に CXCR4 アンタゴニストの多剤耐性 HIV-1 に対する感染防御効果はこれまで検討されていなかった。そこで平成 18 年度の研究では、hu-PBL-SCID マウスを用いる *in vivo* の評価においてこれらの治療薬候補の活性を評価することを目的とした。

#### B. 研究方法（倫理面への配慮）

用いた多剤耐性 HIV-1 株は、国立感染症研究所の杉浦博士、西澤博士らより供与された。ウイルスの受領においては双方の研究機関間の感染性微生物の取り扱いに関する規程に従った。標準 HIV-1 には、HIV-1 NL4-3 (X4) の分子クローン株を使用した。正常ドナーの PBMC を 10 mg/ml PHA-P、20 U/ml IL-2 を含む 5% FCS-RPMI 培地で 3 日間刺激培養した細胞群を標的細胞とした。CXCR4 アンタゴニストは株式会社クレハから供与された

T-1636 (10 $\mu$ M) を用いた。96 well plate に播いた標的細胞 25 万個/100  $\mu$ l/well に種々の阻害剤を添加し、1 時間反応後、ウイルスを 1000 TCID<sub>50</sub> U 感染させ 2 時間培養した。3 回洗浄後、20 U/ml IL-2 培地で 5 日間培養し、培養上清の p24 を ELISA で測定し、感染抑制の度合いを検討した。顕著な抑制効果のあった多剤耐性 HIV-1 株 3 株を選び、hu-PBL-SCID マウスの感染に用いた。

今回用いた新規マウスは、実中研の伊藤博士らとの共同研究により開発された免疫不全マウスであり、ヒト IL-4 を構成的に発現するマウスである。このマウスに予めスクリーニングしたドナーの PBMC を 1 千万個移植して hu-PBL-SCID とした。移植翌日に 10 mM の薬剤を 0.1 ml/マウス投与し、その直後、多剤耐性 HIV-1 株の混合液を腹腔内に投与した。翌日、さらに同量の薬剤を追加投与した。陰性コントロールとして、薬剤の溶媒である酒石酸溶液を用いた。感染後 7 日目にマウスをネンブタール麻酔死させ、血液、腹腔洗浄液を採取した。腹腔洗浄液は遠心し、上清と細胞に分離した。細胞は一部を細胞表面マーカーの染色に用い、



残りを 20 U/ml の IL-2 培地で培養した。培養上清、またはそれぞれのサンプル中の HIV-1 量は、p24 ELISA で測定した。

この内容を含む動物実験計画は、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

今回、多剤耐性 HIV-1 株の中で活性化 PBMC で良く増殖し、かつ CXCR4 アンタゴニスト KRH-1636 に感染抑制感受性を示す 3 株を選んで hu-PBL-SCID マウスの感染に用いた。腹腔洗浄液、血清中の p24 のレベルで比較するとコントロールの酒石酸投与群では、4 匹中 4 匹に感染が認められた。しかし、KRH-1636 投与群では、4 匹中 3 匹が p24 陰性、残りの一匹も p24 値は低い値であった。また、コントロール群の腹腔細胞をヒト CD3 抗体で染色し、その後に HIV-1 p24 の細胞内染色を試したところ 4 匹中 4 匹に高い陽性率で感染細胞群が認められた。しかし、薬剤投与群での陽性率は低かった。

### D. 考察

今回の実験により、多剤耐性 HIV-1 株の中でも強い病原性を持つ CXCR4 使用 HIV-1 (X4 HIV-1) が、CXCR4 アンタゴニスト (KRH-1636) に対して *in vivo* でも感受性を示すことが明らかにされた。このような成果は、新たに開発されたヒト IL-4 を産生する免疫不全マウスを用いて作製した hu-PBL-SCID マウスを用いたことにより明らかにされた事実である。臨床分離 HIV-1 が CXCR4 の指向性を獲得することは強い病原性と相関することから、薬剤耐性 HIV-1 が CXCR4 使用性にシフトすることは病態の悪化につながると強く懸念さ

れる。そこで CXCR4 指向性へのシフトを避けるためにも今回のような CXCR4 アンタゴニストの臨床応用に期待がかけられる。同様に CCR5 アンタゴニストの抗ウイルス活性にも新たな期待がかけられており、毒性の少ないかつ少量で効果を示す新たな薬剤の開発が必須である。なお、以上の成果をまとめた論文は現在作成中である。

### E. 結論

多剤耐性でも CXCR4 指向性の HIV-1 は、*in vitro* および hu-PBL-SCID マウスを用いる *in vivo* の系でも CXCR4 アンタゴニストに感受性を示すことが明らかとなった。この成果は、今後のアンタゴニストのさらなる研究開発に弾みをつけることが期待される。

### 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) K. Okuma and Y. Tanaka et al.: 投稿準備中

国際学会発表

- 1) Okuma K, Tanaka R, Ito M, Yamamoto N, and Tanaka Y. Human IL-4-Transgenic SCID Mice: A Novel Animal Model for X4 HIV-1 Infection. 1<sup>st</sup> International Workshop on Humanized Mice. International house of Japan. October 11-12, 2006, Roppongi, Tokyo, Japan.

国内学会発表

- 1) 佐藤佳, 青木淳, 大黒恵里子, 佐藤浩一, 田中勇悦, 小柳義夫: テトラスパニン分子の過剰発現による HIV-1 の感染価抑制. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会, 2006. 名古屋.
- 2) 吉居廣朗, 神山陽香, 大石和徳, 田中勇悦, 佐藤裕徳, 山本直樹, 久保嘉直: HeLa 細胞における CD4 非依存性 HIV-1 の細胞侵入抑制機構. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会, 2006. 名古屋.
- 3) 久保嘉直, 横山勝, 吉居廣朗, 神山陽香, 田中勇悦, 佐藤裕徳, 山本直樹: CXCR4 糖鎖付加による HIV-1 感染防御と、その回避機構. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会, 2006. 名古屋.
- 4) 張險峰, 山本典生, 田中勇悦, 山本直樹, 間 陽 子 : Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 pre-mRNA splicing by Vpr enhances viral production. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会, 2006. 名古屋.
- 5) 三沢彩, 鴨居功樹, 山本啓裕, 三宅在子, 石田尚臣, 田中勇悦, 望月學, 渡邊俊樹: Tax-SUV39H1 相互作用による HTLV-1 LTR プロモーター活性抑制機構の解析. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会, 2006. 名古屋.
- 6) 篠田康彦, 田中勇悦, 三浦義治, 鈴木陽一, 小柳義夫: CCR5 指向性 HIV-1 感染防御因子 (CD4 因子) 産生細胞株に特異的な発現遺伝子の探索. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会, 2006. 名古屋.
- 7) 山本啓裕, 石田尚臣, 古河洋一, 田中勇悦, 中村祐輔, 渡邊俊樹: HTLV-1 Tax とヒストン H3K4 メチル化酵素 SMYD3 の相互作用の解析. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会, 2006. 名古屋.
- 8) 神山陽香, 吉居廣朗, 田中勇悦, 佐藤裕徳, 山本直樹, 四童子好廣, 久保嘉直: ビタミン A 類似体 Geranylgeranoic acid (GGA) による HIV-1 感染の抑制. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会, 2006. 名古屋.
- 9) 大隈和, 田中礼子, 山本直樹, 田中勇悦: CXCR4 コレセプター使用 HIV-1 株の感染を阻害する新規 CXCR4 アンタゴニスト KRH-3140 の hu-PBL-SCID マウスにおける経口投与効果. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会, 2006. 名古屋.
- 10) 村上努, 大隈和, 熊倉成, 田中礼子, 谷中幹郎, 田中勇悦, 山本直樹: 新規 CXCR4 アンタゴニスト KRH-3166 は経口投与可能な高活性抗 HIV-1 剤である. 第 20 回日本エイズ学会学術集会, 2006. 東京.
- 11) 大隈和, 田中礼子, 伊藤守, 田中勇悦: ヒト IL-4 産生 SCID マウスの X4 HIV-1 感染への応用. 第 20 回日本エイズ学会学術集会, 2006. 東京.
- 12) 佐藤佳, 青木淳, 大黒恵理子, 佐野浩一, 田中勇悦, 小柳義夫: テトラスパニン分子の過剰発現による HIV-1 感染抑制作用. 第 20 回日本エイズ学会学術集会, 2006. 東京.
- 13) 近藤佳代, 張麗峰, 児玉晃, 田中礼子, 大隈和, 田中勇悦: T 細胞の OX40L による HIV-1 増殖調節. 第 20 回日本エイズ学会学術集会, 2006. 東京.
- 14) 田中勇悦, 田中礼子, 大隈和: CCR5, CXCR4 架橋による R5 及び X4 HIV-1 の感染制御. 第 20 回日本エイズ学会学術集会, 2006. 東京.

京.

- 15) 児玉晃, 近藤佳代, 張麗峰, 田中礼子, 大隈和, 田中勇悦: HIV-1 による樹状細胞の分化誘導阻害. 第 20 回日本エイズ学会学術集会, 2006. 東京.
- 16) 山下篤哉, 照沼裕, トウ学文, 高嶋能文, 三間屋純一, 花房秀次, 岡慎一, 酒井道生, 白幡聡, 藤井輝久, 石川正明, 高橋義博, 池田柗一, 三浦琢磨, 松田重三, 田中勇悦, 葛西宏威, 加藤伊陽子, 山本直樹, 伊藤正彦: HIV-1 感染者由来 CD4 陽性 T 細胞株の産生する抗 HIV-1 液性因子. 第 20 回日本エイズ学会学術集会, 2006. 東京.
- 17) 張麗峰, 児玉晃, 近藤佳代, 田中礼子, 大隈和, 田中勇悦: 樹状細胞を用いて誘導した IL-10 産生 Treg 細胞のマクロファージへの R5 HIV-1 感染抑制. 第 20 回日本エイズ学会学術集会, 2006. 東京.

#### H. 知的所有権の出願・取得状況

なし

「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 主幹研究員）

研究要旨

前年度に引き続き、低分子化合物ライブラリーの評価から得られたヒット化合物の誘導体を合成し評価した。約 40 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ると共に優れた活性を示す化合物を見出した ( $IC_{50}:0.0002\mu M$ )。また、マウスを用いた検討では、良好な経口吸収性及び安全性を示す化合物も認められた。今後、更に検討を重ね、新規薬剤としての可能性を見極めていく。

A. 研究目的

前年度に引き続き、低分子化合物ライブラリーの評価から得られた抗 HIV-1 活性を示すヒット化合物を基に、新たな誘導体を合成評価した。また、マウスにおける経口吸収性及び単回の毒性試験を実施し、新規薬剤としての可能性を見極める。

B. 研究方法

前年度から継続して誘導体を合成し評価した。約40検体の合成化合物に関しては、既に報告しているヒト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）並びに細胞毒性を指標に1次評価を行った。また、幾つかの抗HIV活性が確認された化合物に関しては、マウスを用いて、経口吸収性並びに単回の毒性試験を実施した。

（倫理面への配慮）特になし

C. 研究結果

今回合成した化合物の抗 HIV 活性は、 $0.01 < IC_{50} < 0.1\mu M$ : 8 化合物,  $0.001 < IC_{50} < 0.01\mu M$ : 10 化合物,  $IC_{50} < 0.001\mu M$ : 6 化合物であった。最も強い抗 HIV 活性を示した化合物 1 の  $IC_{50}$  は  $0.0002\mu M$  であり、同化合物は  $1\mu M$  でも明確な細胞毒性を示さなかった。 $IC_{50}=0.001\mu M$  の抗 HIV 活性を示す化合物 2 をマウスに経口投与したところ、生物学的利用率 (B.A.) は 50%以上であった。また、経口投与時の致死量は  $500 \text{ mg/kg}$  以上であったことから、安全性上も

(B.A.) は 50%以上であり、経口投与時の致死量は  $500 \text{ mg/kg}$  以上であったことから、経口吸収性、安全性上も優れていると考えられた。他にも同様な性質を示す化合物があることから、各種安全性試験を今後実施すると共に更なる化合物の最適化を進めていく。

D. 考察

これまでの検討の結果、構造と活性の相関について、幾つかの知見を蓄積できた。また、幾つかの化合物については良好な経口吸収性や安全性を確認した。今後、各種動物における経口吸収性や安全性試験の結果を踏まえて、候補化合物を絞り込んでいく予定である。

E. 結論

低分子化合物ライブラリーを評価して得られたヒット化合物から新たに誘導体を合成し、抗 HIV 活性、経口吸収性、マウス単回投与毒性に優れた化合物を見出した。今後、類縁化合物の合成並びに評価を進め、新規薬剤としての可能性を見極めていく。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

出願準備中

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  
～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：井戸栄治（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・助教授）

## 研究要旨

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。本年度は特に、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。

### A. 研究目的

目覚ましい成果を示す HAART 療法も、近年多剤耐性株出現や長期薬剤服用による副作用など新たな難問が続出しており、今後さらに思い切った薬剤の組み合わせや多少ともリスクを伴う新規メカニズムの薬剤による治療法の開拓が望まれている。しかし、そうした実験的治療法を直ちにヒトへ試みることは倫理的に問題があつて望ましいことではない。その意味で新規治療法を動物モデルによって検討する意義と必要性に異存がある人は少ないであろう。しかし、ではどのような動物モデルが使用出来るのであろうか。従来サルに感染するウイルスとしては、SIV もしくは SHIV と呼ばれる HIV-1 と SIV のキメラウイルスが知られている。ところが、これらのウイルスはいずれもウイルス固有の酵素群をコードする pol 遺伝子部分が SIV 由来であり、HIV-1 用に開発された薬剤の評価には必ずしも適さないという問題が存在していた。そこで我々は、新たに pol 遺伝子中の PR、RT、INT 各遺伝子が HIV-1 由来の一連の新規 SHIV を作成し、そのサル感染実験を行うことにより、抗 HIV 薬のサルを用いた *in vivo* 評価系を確立することを目的とする。

### B. 研究方法

本年度は、先ず HIV-1 と SIV の分子クローンを出発材料に、RT と INT 遺伝子のみを HIV-1 由来に

した SHIV-rti を、次にほぼ pol の全領域（即ち PR と RT および INT 遺伝子）のみを HIV-1 由来にした SHIV-prti を作成し、それらの細胞培養レベルにおける増殖能を確認する実験とアカゲザルへの接種実験を行った。

### C. 研究結果

SHIV-rti および SHIV-prti は、共にサル由来の樹立細胞株 HSC-F 細胞並びにアカゲザル PBMC で増殖可能であることが確かめられた。そこで SHIV-rti を 2 頭のアカゲザルに静脈内接種したところ、2 頭共にウイルスが分離され、それが比較的長期間持続した。抗体応答は特に 1 頭の MM402 で顕著に見られ、このサルからは現在もウイルスがよく分離されている。一方、SHIV-prti についてはプラスミドのトランスフェクション上清をそのままを使うとサル細胞での増殖が必ずしも良好ではなかったため（ピークが 20 日目前後）、HSC-F 細胞を用いた細胞培養による継代を 10 代続け、さらにサル細胞への馴化を計った。その結果増殖の立ち上がりが早くなったので（ピークが 10 日目前後になった）、これを 2 頭のアカゲザルに静脈内接種したところ、特に内 1 頭の MM333 からのウイルス分離の成績が良好であった。しかし抗体応答は 2 頭共に低いままで、血中ウイルス量の価も  $10^3$ – $10^4$  copies/ml の程度であった。なお CD4/8 比については、今のところ両 SHIV

が接種されたサル of のいずれにも特に顕著な変動は見られていない。

#### D. 考察

上記の成績より、SHIV-rti と SHIV-prti は基本的にサル個体において感染増殖が可能であると考えられた。しかし初代の感染は決して強いとは言えず、今後個体レベルで薬剤評価に使用できるような高い血中ウイルス量を維持できる持続感染成立を目指すには、さらに一段のサル個体への馴化が必要と思われた。現在接種後分離されたウイルスやプラズマの *in vivo* 継代を検討したいと考えている。

#### E. 結論

抗エイズ薬の多くが標的とする HIV-1 のウイルス酵素をエンコードする *pol* 遺伝子を HIV-1 由来にした新規 SHIV は、基本的にサル個体において感染増殖することが判った。今後これらの SHIV を用いて新規薬剤を *in vivo* レベルで評価する研究に発展させたいと考えている。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Ishimatsu, M., Suzuki, H., Akiyama, H., Miura, T., Hayami, M., Ido, E.: Construction of a novel SHIV having an HIV-1-derived protease gene and its infection to rhesus macaques: a useful tool for *in vivo* efficacy tests of protease inhibitors. *Microbes Infection*, in press.

Horiuchi, R., Akahata, W., Kuwata, T., Enose, Y., Ido, E., Suzuki, H., Miyake, A., Saito, N., Ibuki, K., Goto, T., Miura, T., Hayami, M.: DNA vaccination of macaques by a full-genome SHIV plasmid that has an IL-2 gene and produces non-infectious virus particles. *Vaccine*, 24(17):3677-85, 2006.

##### 2. 学会発表

Ido, E., Ishimatsu, M., Akiyama, H., Ibuki, K., Miura, T., Hayami, M.: Generation of a novel SHIV that possesses HIV-1-derived integrase gene in addition to reverse transcriptase

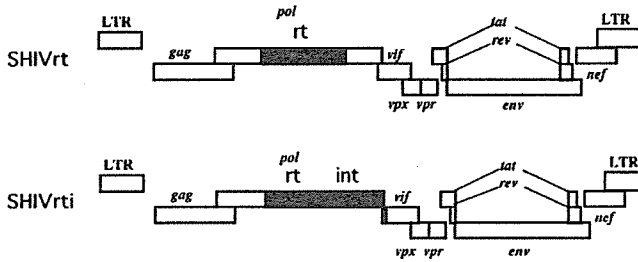
gene and its infection to macaque monkeys. 24th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, Atlanta, USA, October 4-7, 2006.

Ido, E., Ishimatsu, M., Akiyama, H., Ibuki, K., Miura, T., Hayami, M.: Generation of a novel SHIV that possesses HIV-1-derived integrase gene in addition to reverse transcriptase gene and its infection to macaque monkeys. US-Japan Cooperative Medical Science Program, 19th Joint Meeting of the AIDS Panels, Kagoshima, December 6-7, 2006.

井戸栄治、石松美沙、速水正憲、三浦智行：プロテアーゼ、逆転写酵素、およびインテグラーゼの各遺伝子が HIV-1 由来である新規 SHIV のサル感染実験、第 20 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、11 月 30 日-12 月 2 日、2006。

F. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし。

polのPR以外の遺伝子領域をHIV-1のそれと置き換える



### SHIV-rtiのサル感染実験

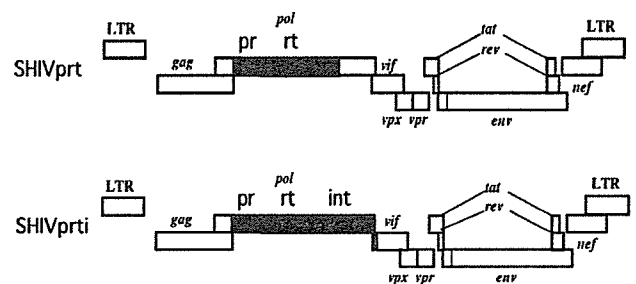
SHIV-pr ( $2 \times 10^5 \text{TCID}_{50}$ ) was intravenously injected into two rhesus macaques [MM402(male) and MM403(male)]

- Virus isolation
- Plasma viral RNA load
- PA antibody
- CD4/8

#### Virus isolation and PA antibody titers in SHIV-rti-infected rhesus monkeys

Week	0	1	2	3	4	6	8	10	12	16	21	25	34	39	43	53
<b>Virus isolation</b>																
MM402	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	ND
MM403	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	ND
<b>PA antibody (Genedia HIV-1/2)</b>																
MM402	<32	<32	<32	<32	<32	32	256	1024	2048	4096	4096	4096	4096	4096	4096	4096
MM403	<32	<32	<32	<32	<32	<32	<32	<32	32	64	32	32	32	32	32	32

PRからINTまで pol 遺伝子領域ほぼ全体をHIV-1のものに置換する



### SHIV-prti(P)のサル感染実験

SHIV-prti(P) ( $2 \times 10^4 \text{TCID}_{50}$ ) was intravenously injected into two rhesus macaques [MM317(male) and MM333(male)]

- Virus isolation
- Plasma viral RNA load
- PA antibody
- CD4/8

#### Virus isolation and PA antibody titers in SHIV-prti(P)-infected rhesus monkeys

Week	0	1	2	3	4	6	8	13	18	22	26	31
<b>Virus isolation</b>												
MM317	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	ND
MM333	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	ND
<b>PA antibody (Genedia HIV-1/2)</b>												
MM317	<32	<32	<32	<32	<32	<32	32	32	32	32	32	32
MM333	<32	<32	<32	<32	<32	<32	32	32	32	32	32	32

### 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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
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.
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.
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 metabolite sparsomycin.	Antiviral Chemistry & Chemotherapy.	17	167-174	2006
T Ueda, M Itaya, K Tusge, K Fujita, M Matsuda, M Nishizawa, W Sugiura.	Reconstruction of HIV-1 full genome clones with Bacillus subtilis.	Antiviral Therapy.	11	S192	2006
Hiroataka 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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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.	<i>Discordances between Interpretation Algorithms for Genotypic of Human Immunodeficiency Virus Are Subtype Dependent.</i>	<i>Antimicrobial Agents &amp; Chemotherapy.</i>	50(2)	694-701	2006
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.	<i>Bayesian network analysis of resistance pathways against protease inhibitors.</i>	<i>Infect Genet Evol.</i>	Nov 24		2006
Ichiro Koga, Takashi Odawara, Masakazu Matsuda, Wataru Sugiura, Mieko Goto, Tetsuya Nakamura, Aikichi Iwamoto.	<i>Analysis of HIV-1 sequences before and after co-infecting syphilis.</i>	<i>Microbes and Infection.</i>	8	2872-2879	2006
Mako Omura, Koji Furuya, Shinichi Kudo, Wataru Sugiura, Hiroshi Azuma.	<i>Detecting Immunoglobulin M Antibodies against Microsporidian Encephalitozoon cuniculi Polar Tubes in Sera from Healthy and Human Immunodeficiency Virus-Infected Persons in Japan.</i>	<i>Clinical and Vaccine Immunology.</i>	14(2)	168-172	2007
西澤雅子, 柴田潤子, 杉浦 互.	ウイルス感染制御における ncRNA の役割.	実験医学.	24(6)	805-809	2006

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	<i>Virology.</i>	344	263-266	2006
Kawasaki M, Iwasaki M, Koshihara 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.	<i>Int Surg.</i>			<i>In press.</i>
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.	<i>Transplantation.</i>			<i>In press</i>
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.	<i>Int Immunopharmacol.</i>	6	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 <i>Lactobacillus casei</i> (Shirota).	<i>J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.</i>	5	240-50	2006
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.	<i>AIDS.</i>			<i>In Press.</i>
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.	<i>Cancer Science.</i>			<i>In Press.</i>
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.	<i>Jpn J Infect Dis</i>	59(2)	77-84	2006
Nimura F, Zhang L, Okuma K, Tanaka R, Sunakawa H, Yamamoto N, and Tanaka Y.	Cross-linking cell surface chemokine receptors leads to isolation, activation and differentiation of monocytes into potent DC's.	<i>Exp. Biol. Med.</i>	231	431-443	2006

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<i>Ishimatsu, M., Suzuki, H., Akiyama, H., Miura, T., Hayami, M., Ido, E.</i>	<i>Construction of a novel SHIV having an HIV-1-derived protease gene and its infection to rhesus macaques: a useful tool for in vivo efficacy tests of protease inhibitors.</i>	<i>Microbes Infection.</i>			<i>Inpress.</i>
<i>Horiuchi, R., Akahata, W., Kuwata, T., Enose, Y., Ido, E., Suzuki, H., Miyake, A., Saito, N., Ibuki, K., Goto, T., Miura, T., Hayami, M.</i>	<i>DNA vaccination of macaques by a full-genome SHIV plasmid that has an IL-2 gene and produces non-infectious virus particles.</i>	<i>Vaccine.</i>	<i>24(17)</i>	<i>3677-85</i>	<i>2006</i>