

- 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 1-3 日, 熊本.
- 40) 杉浦 互, 瀧永博之, 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 1-3 日, 熊本.
- 41) 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 1-3 日, 熊本.
- 42) 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 1-3 日, 熊本.
- 43) 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 1-3 日, 熊本.
- 44) 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 1-3 日, 熊本.
- 45) 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.
- 46) 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 1-3 日, 熊本.
- 47) 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 1-3 日, 熊本.
- 48) 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 1-3 日, 熊本.
- 49) 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 1-3 日, 熊本.
- 50) 三浦秀佳, 千葉智子, 滝澤万里, 松田善衛, 松田昌和, 本多三男, 杉浦 互: ヒト細胞由来の新たなレポーター細胞による HIV-1 薬剤感受性検査法の確立. 第 52 回ウイルス学会学術集会. 2004.11.21-23. 横浜.
- 51) 任 鳳蓉, 杉浦 互, 田中 博, 長谷川直樹: 抗レトロウイルス治療下の HIV-1 の宿主内進化と薬剤耐性予測 1. 第 52 回ウイルス学会学術集会. 2004.11.21-23. 横浜.
- 52) 駒野 淳, 宮内浩典, 二橋悠子, 浦野恵美子, 松田善衛, 千葉智子, 三浦秀佳, Lay Myint, 杉浦 互, 山本直樹: ヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) 複製を特異的に増強する小分子化合物 sparsomycin 1. 第 52 回ウイルス

ス学会学術集会. 2004.11.21-23. 横浜.

- 53) 杉浦 互: 本邦における薬剤耐性 HIV-1 の現状と今後の課題. 第 18 回 日本エイズ学会学術集会. 2004.12.9-11. 静岡.
- 54) 奈良妙美, 西尾信博, 高嶋能文, 堀越泰雄, 三間屋純一, 杉浦 互: 抗 HIV 薬による様々な副作用を呈し, 多剤耐性を獲得した HIV 感染血友病患者の 1 例. 第 18 回 日本エイズ学会学術集会. 2004.12.9-11. 静岡.
- 55) 植田知幸, 有吉紅也, 三浦秀佳, 松田昌和, 千葉智子, 巖 驊, Lay Myint, 柿澤淳子, 濱武牧子, 西澤雅子, 杉浦 互: プロテアーゼ阻害剤耐性変異と Gag 基質領域の相互干渉に関する解析. 第 18 回 日本エイズ学会学術集会. 2004.12.9-11. 静岡.
- 56) 任 鳳蓉, 松田昌和, 長谷川直樹, 杉浦 互, 田中 博: HAART 治療下の HIV pol 遺伝子の宿主内進化と薬剤耐性予測. 第 18 回 日本エイズ学会学術集会. 2004.12.9-11. 静岡.
- 57) 太田雅美, 簾 貴士, 大出裕高, 畑 晶之, 佐藤武幸, 横幕能行, 布施 晃, 杉浦 互, 星野忠次: 臨床応用に向けたコンピューターによるエイズ治療薬の適正予測. 第 18 回 日本エイズ学会学術集会. 2004.12.9-11. 静岡.
- 58) 築地謙治, 根岸昌功, 長谷川直樹, 木内 英, 花房秀次, 杉浦 互, 加藤真吾: PI 服用患者における毛髪内 PI 定量法の検討. 第 18 回 日本エイズ学会学術集会. 2004.12.9-11. 静岡.
- 59) 加藤真吾, 田中理恵, 杉浦 互: LC-MS/MS による AZT の細胞内薬物動態の解析. 第 18 回 日本エイズ学会学術集会. 2004.12.9-11. 静岡.
- 60) 巖 驊, 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.

2004.12.9-11. 静岡.

- 61) 松田昌和, Yan Hua, 植田知幸, Urivi Parikh, 柿澤淳子, 西澤雅子, 濱武牧子, 藤野真之, 三浦秀佳, Lay Myint, 山本直樹, 杉浦 互: 本邦における薬剤耐性 HIV-1 の動向と変遷に関する考察. 第 18 回 日本エイズ学会学術集会. 2004.12.9-11. 静岡.
- 62) 松井良輔, 菅井隆弘, 千葉晴美, 塩見和朗, 山口裕一, 増間碌郎, 供田 洋, 千葉智子, 杉浦 互, 大村 智, 田中晴雄: 糸菌状の生産する HIV-1 インテグラーゼ阻害物質の単離と生物活性. 第 124 回 日本薬学会. 2004.3.29-31. 大阪.

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし



図2. スクリーニング結果まとめ(H16-18)

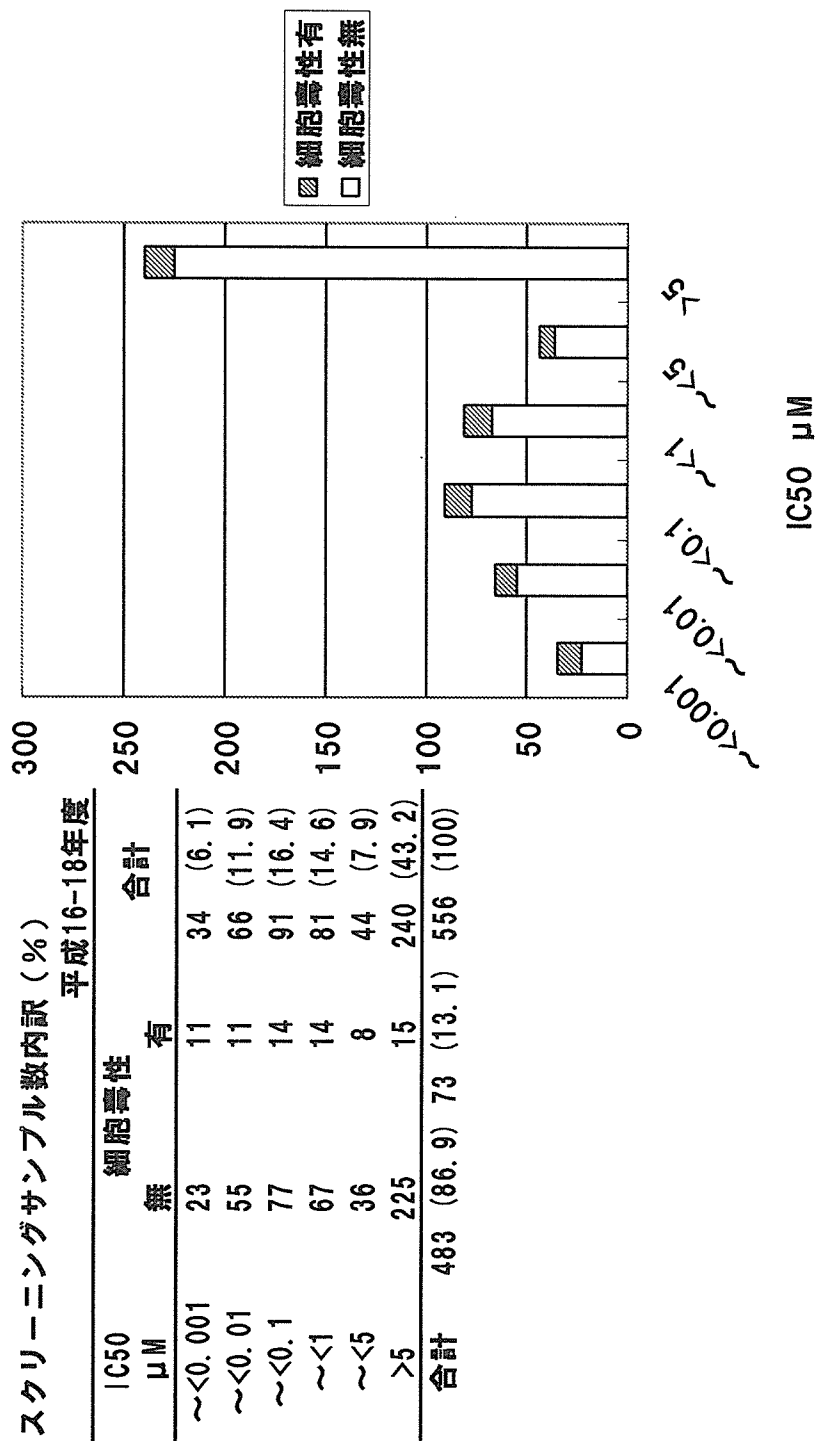


図3. 年度別スクリーニング数の推移

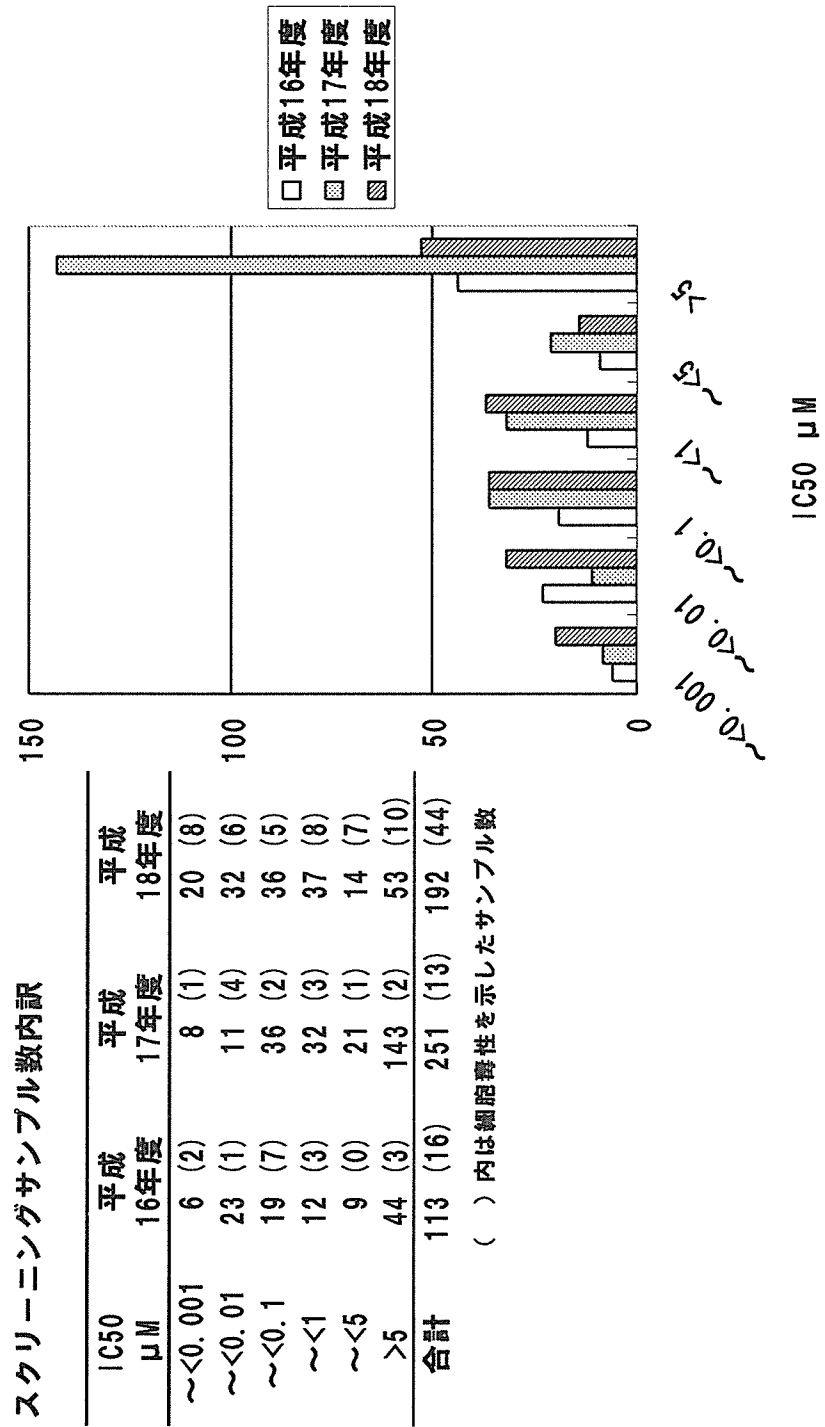


図4. M8166細胞における候補化合物耐性ウイルスの誘導

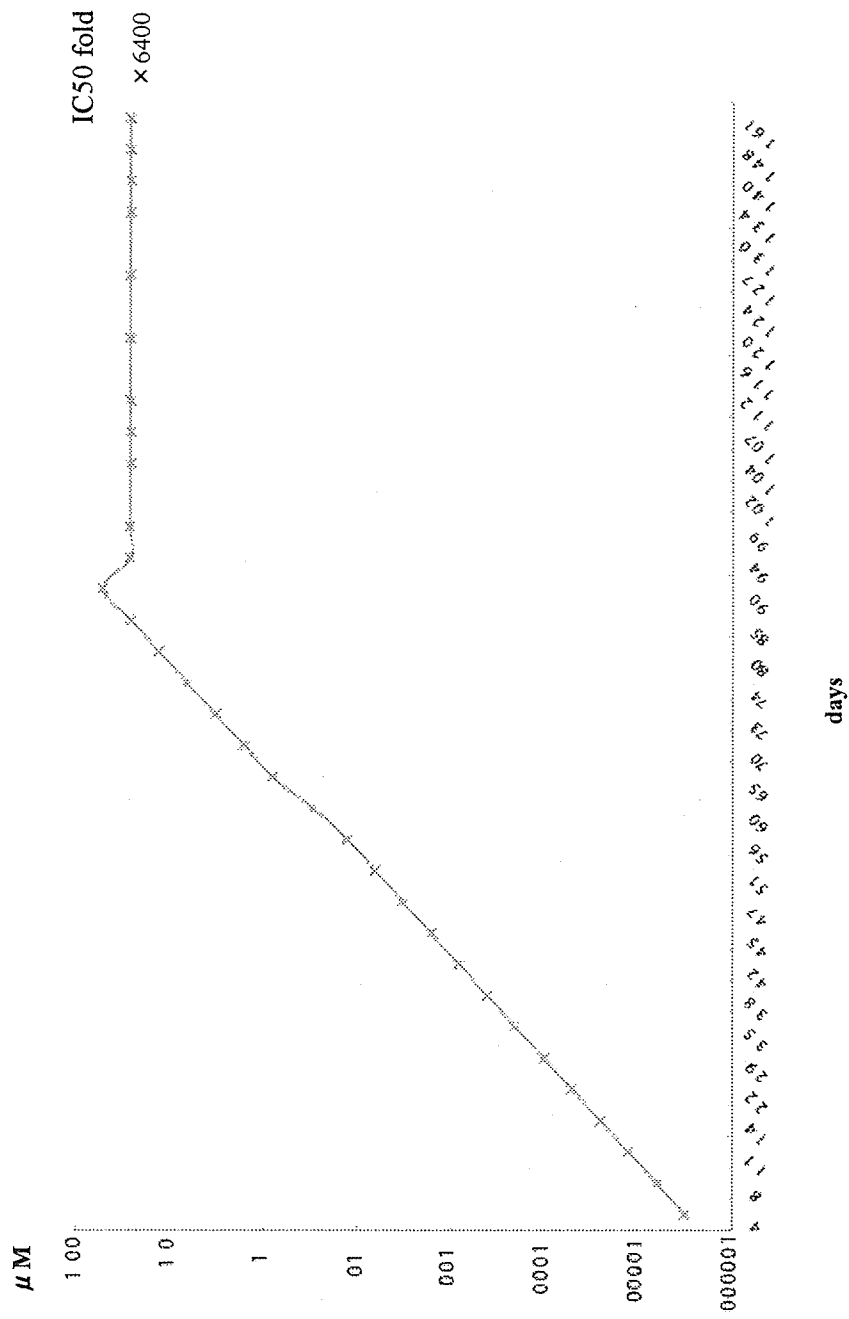


図5. SupT1細胞における候補化合物耐性ウイルスの誘導

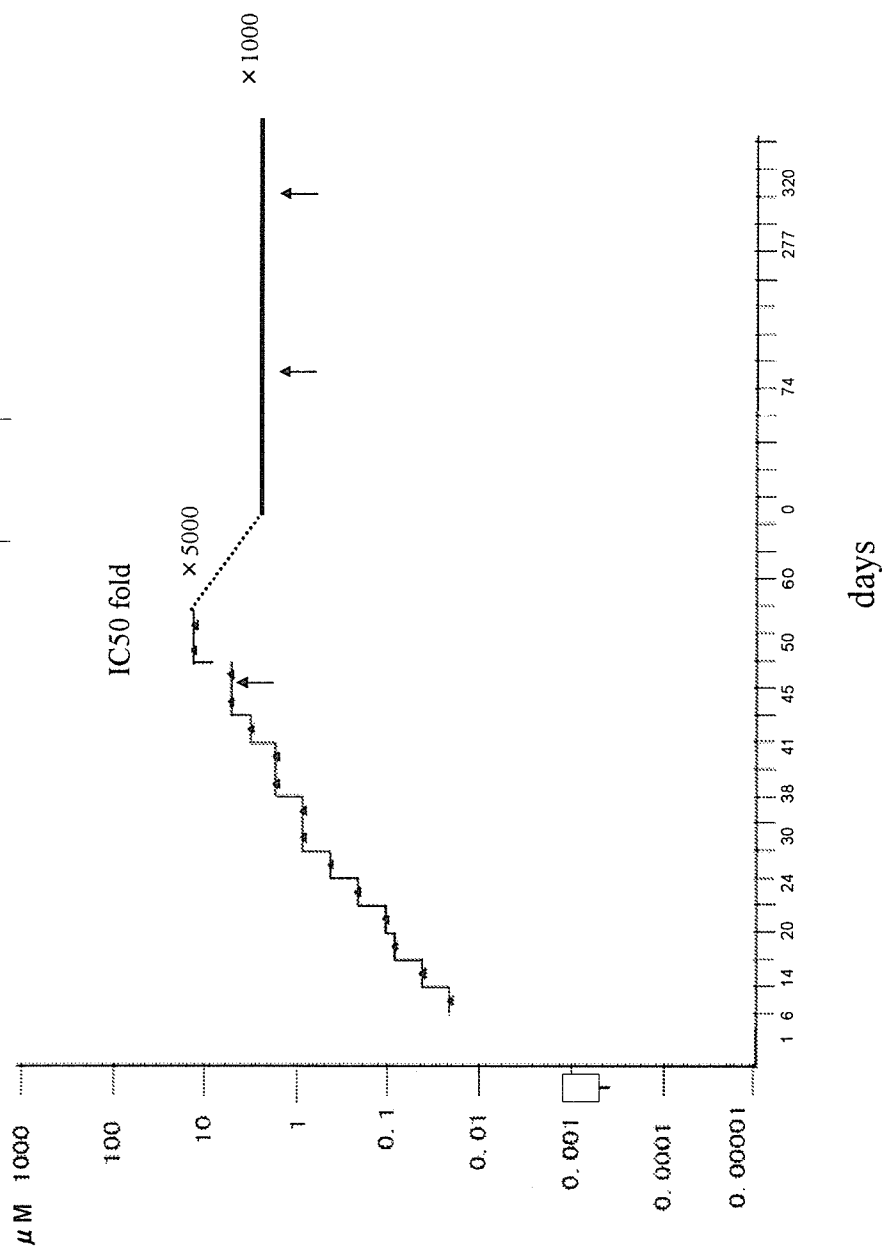


図6. PBMCIにおける候補化合物耐性ウイルスの誘導

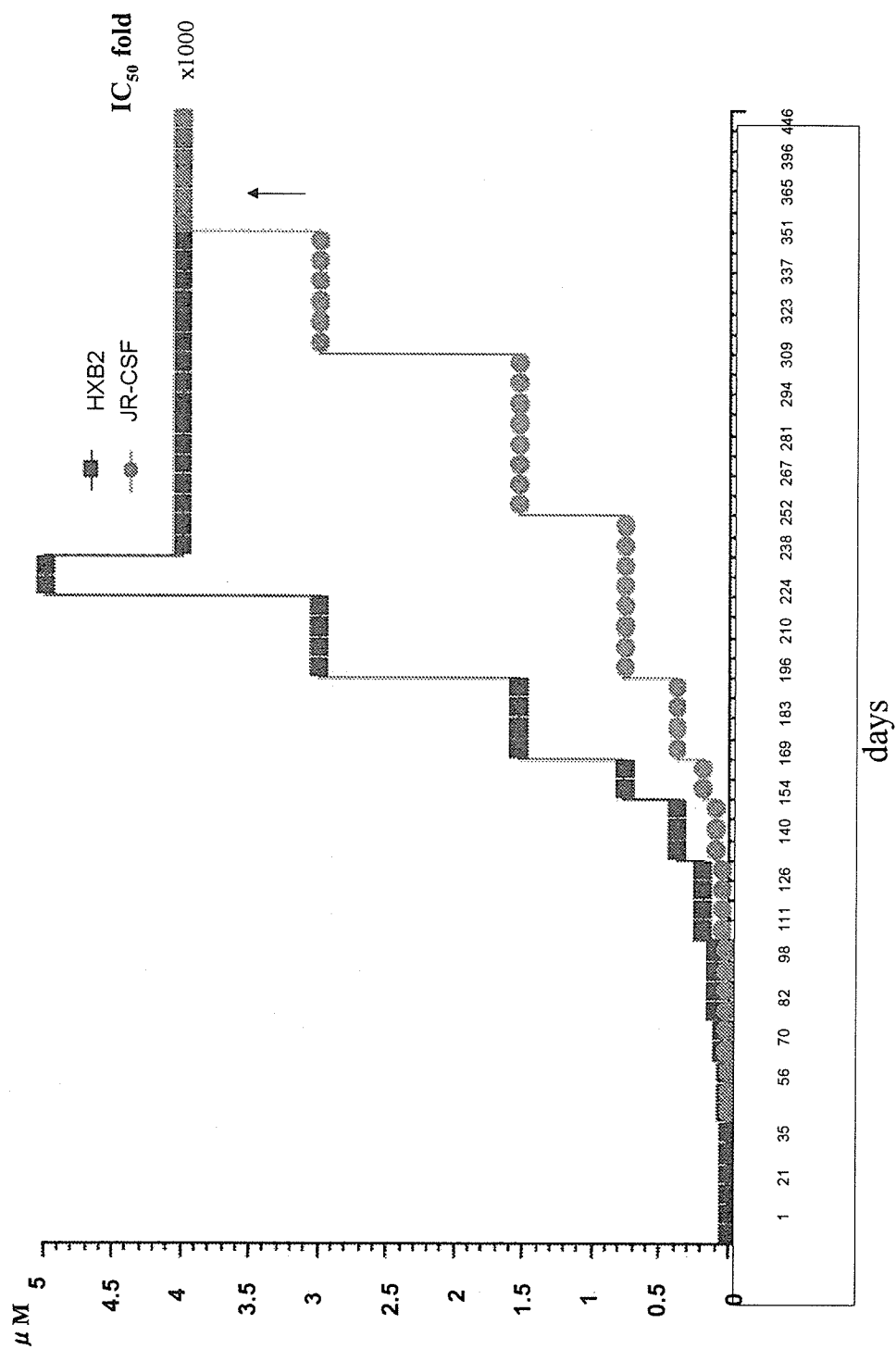




図7. 候補化合物耐性ウイルスの変異出現部位のまとめ

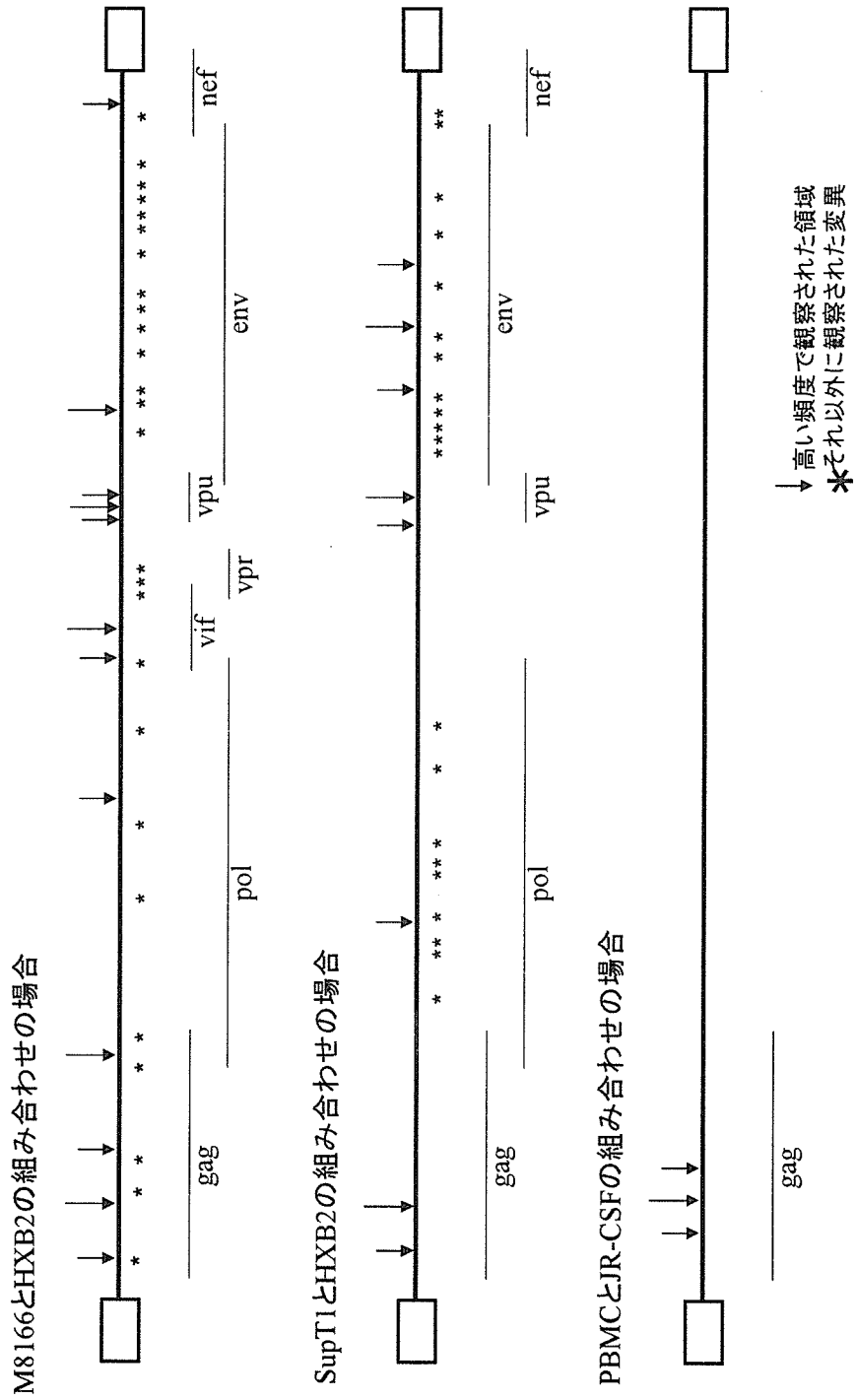
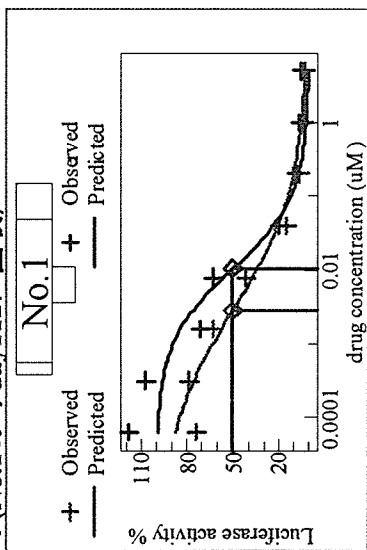


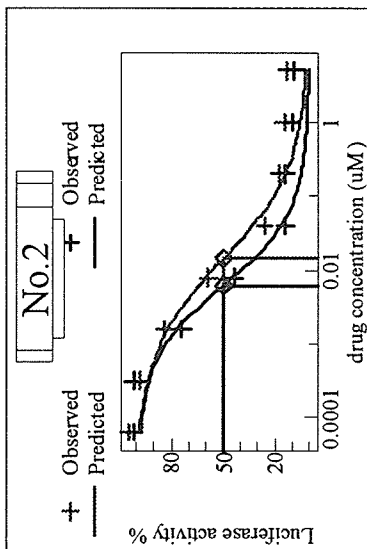
図8. 誘導ウイルスのそれぞれの薬剤に対する耐性度

day94 (No.1のみday112に回収)



Fold resistance (IC50)

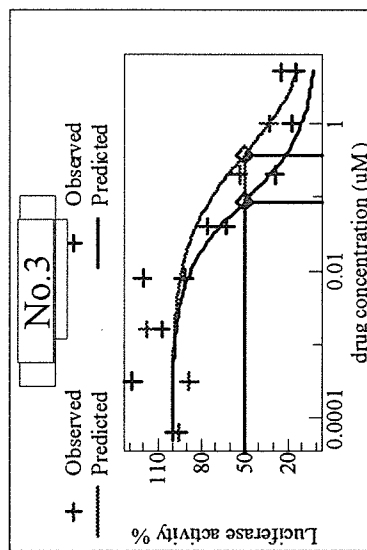
0.27



誘導ウイルス

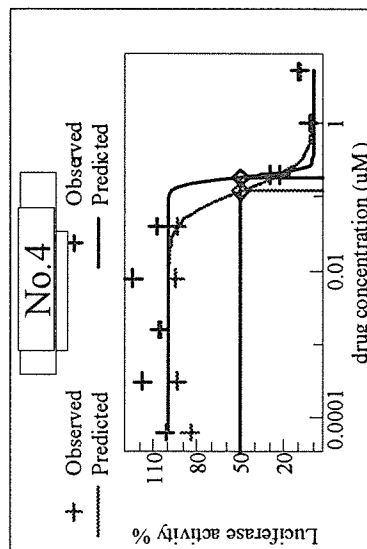
WTウイルス

2.3



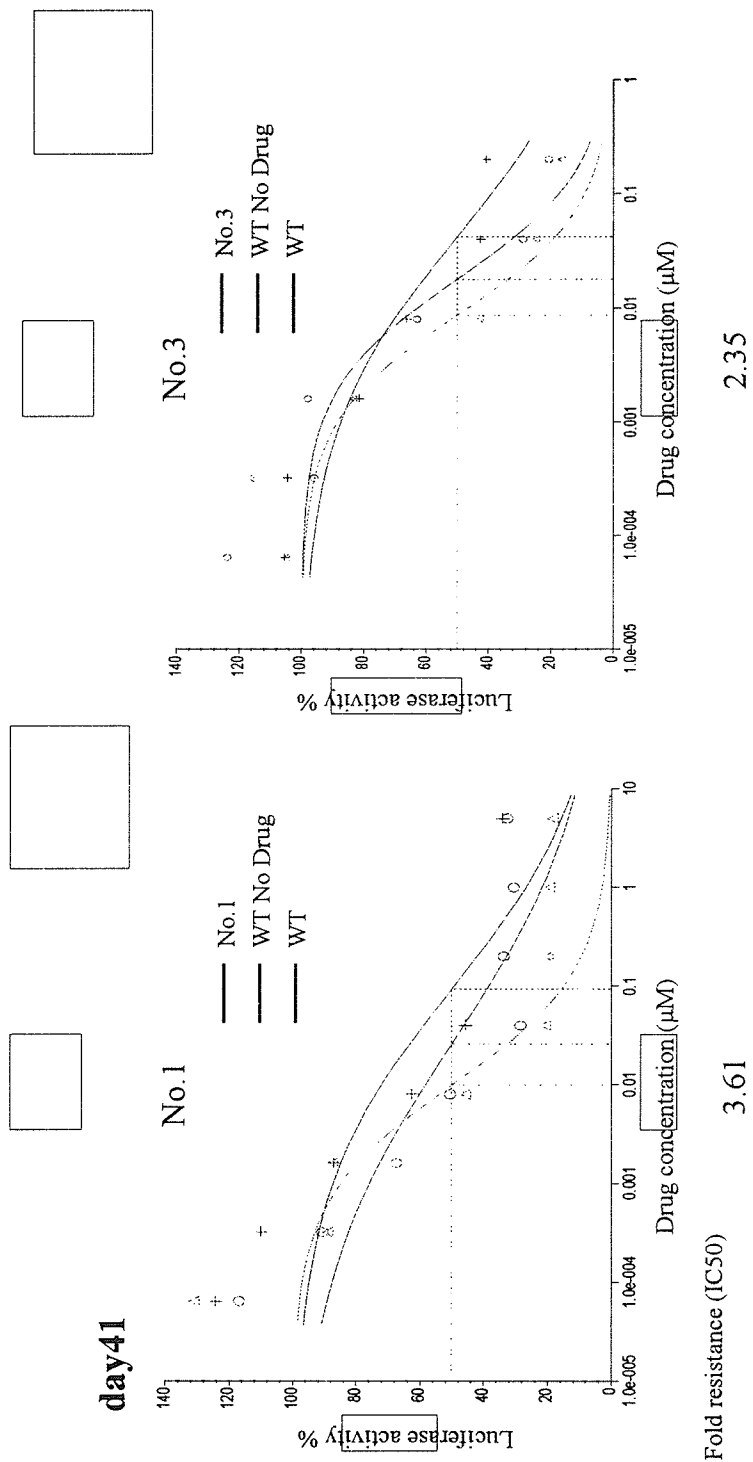
Fold resistance (IC50)

4.34



0.66

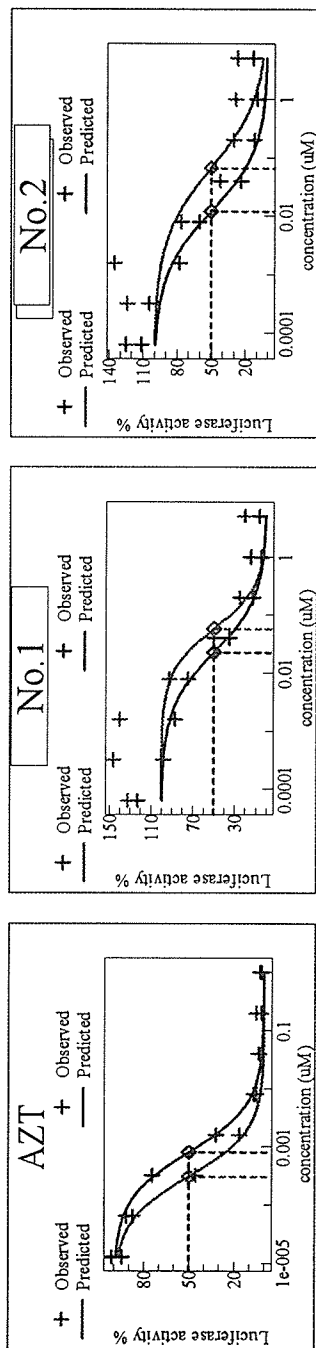
図9. 誘導ウイルスのそれぞれの薬剤に対する耐性度



No.2: ウイルス増殖せず

No.4: ウイルス増殖するも、耐性は認められず

図10. 耐性ウイルスの他の薬剤に対する耐性度

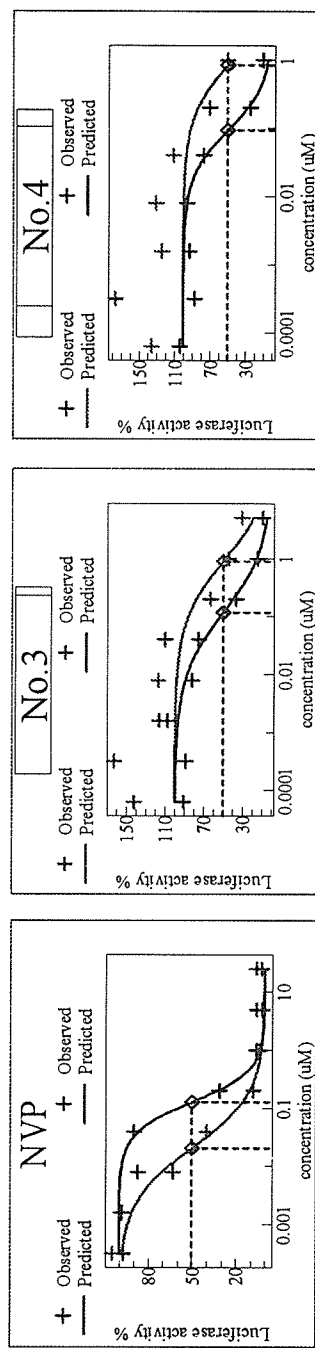


Fold resistance (IC50)

0.383

2.578

5.544



Fold resistance (IC50)

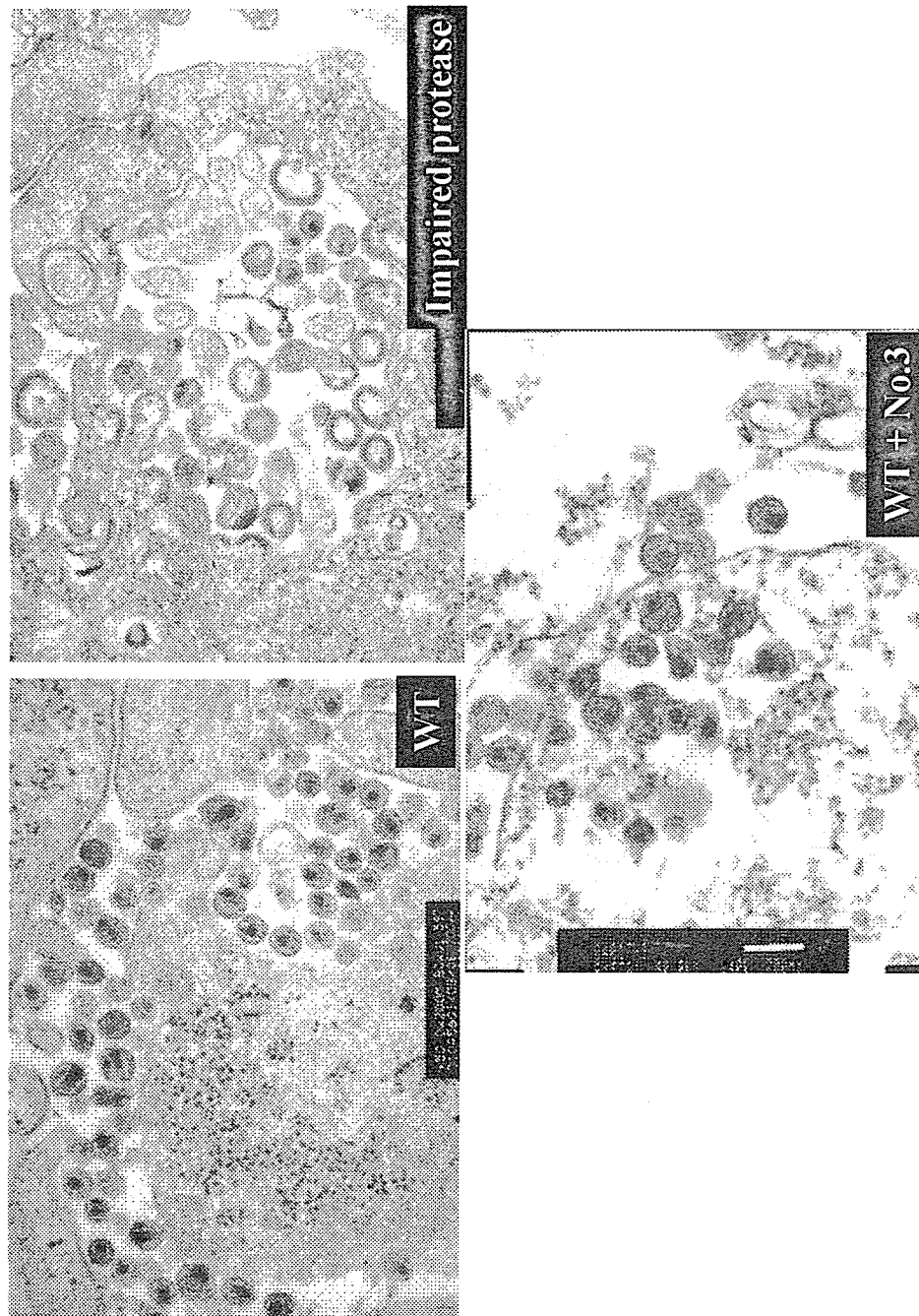
0.162

7.643

9.073

—+— No.3耐性ウイルス      —+— WT ウイルス (HXB2)

图11. 候補薬剤がHIV粒子形成に与える影響



## 図12. 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。

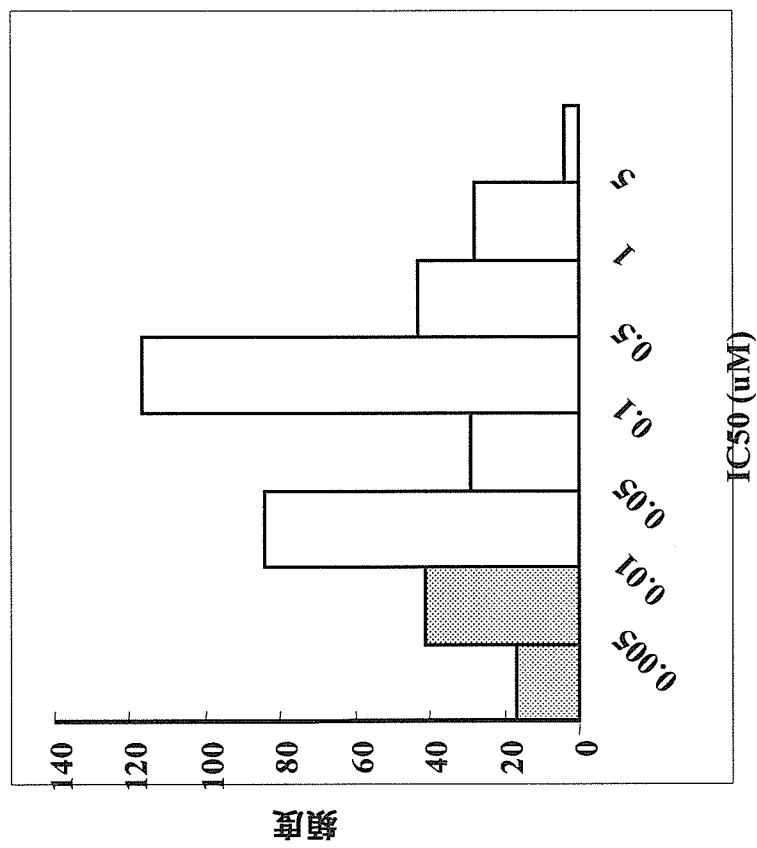
T/C (%)	ヒットしたwell数
< 50	162 (3.8)
< 60	238 (5.6)
< 70	368 (8.6)
cytotoxicity	229 (5.4)
total	597 (14.1)

### 図13. 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14. 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 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 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

レポーター細胞を用いた *in vitro* のスクリーニングの結果抗 HIV 活性を持つ事が確認された新規低分子化合物を *in vivo* でさらに評価することを目的として、hu-PBL SCID マウスを用いた HIV 感染モデルを構築した。スクリーニングされた2種類の新規低分子化合物(Drug X, Drug Y)を HIV-1 JR-CSF 株を感染させたマウス HIV 感染モデルに経口投与した結果、Drug X でマウス血漿中 HIV-1 RNA コピー数の有意な低下が確認できた。また、Drug Y ではマウス血中のヒト CD4 陽性細胞が有意に保たれた事が確認され、本研究で構築したマウス HIV 感染モデルで抗 HIV 薬剤の評価が可能だった。

### A. 研究目的

多剤併用療法の導入は HIV 感染症治療に大きな効果をもたらしてきたが、その一方で薬剤耐性ウイルスの出現がこの多剤併用療法を継続していく上で大きな障害となってきた。臨床で使用されている抗 HIV 薬は現在 17 種類あるが、薬剤耐性 HIV は多くの場合同じ作用機序を持つ他の薬剤に対しても同様の耐性を獲得しており、1つの薬剤に対して HIV が耐性を獲得すると複数の薬剤が使用できなくなる。このため、HIV 感染症治療を成功させるためには既存の抗 HIV 薬剤とは作用機序の異なる新たな治療薬の開発が必須である。我々はこれまでに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、2種類の抗 HIV 活性を持つ新規低分子化合物を見出した。これらの化合物の *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、このモデルを用いて既存の抗 HIV 薬と共にこの2種類の新規低分子化合物の抗 HIV 活性を評価した。

### B. 研究方法

#### 1) 新規低分子化合物のスクリーニング

富山化学（株）から提供された低分子化合物ライブラリーを、レポーター細胞として開発した MaRBLE 細胞で抗 HIV 活性を評価し、その中で特に抗 HIV 活性が低く細胞毒性も低かった2種類の低分子化合物を Drug X、Drug Y としてマウス HIV 感染モデルでの評価対象とした。

#### 2) 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)の腹腔内に健常人から調製した PBMC を移植して hu-PBL SCID マウスを作製した。Drug X の評価の際には2人の健常人ドナー(Dn1, Dn2)から PBMC を調製し、30匹ずつ1人のドナーから調製した PBMC を  $7.5 \times 10^6$  個/head で移植し、60匹の hu-PBL SCID マウスを作製した。Drug Y の評価の際には1人の健常人ドナー(Dn3)から調製した PBMC を  $5 \times 10^7$  個/head で60匹のマウスに移植して hu-PBL SCID マウスを作製した。PBMC 移植後 10～11 日後、マウス末梢血中のヒト CD45 陽性細胞を FACS で解析しヒト 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

1000TCID<sub>50</sub>/head の力価でマウス腹腔内に注入し HIV-1 を感染させ、マウス HIV 感染モデルを構築した (図 1)。

### 3) マウス薬剤投与

Drug X 評価では 60 匹の hu-PBL SCID マウスをドナー毎に 2 群 30 匹ずつに分け、これをさらに陽性対象群の NVP 投与群、陰性対象群 (薬剤懸濁に用いた溶媒のみを投与) 及び Drug X 投与群の 10 匹ずつ 3 群に群分けした。陽性対象群の NVP 投与量は 100mg/kg/day、Drug X 投与群では Drug X を 100mg/kg/day とした。これらの薬剤を 1 日 2 回のレジメで経口投与した。

Drug Y 評価では NVP 投与群、Drug Y 低容量投与群、Drug Y 高容量投与群及び陰性対象群の 4 群各 15 匹ずつに群分けした。薬剤投与は HIV-1 感染 1 日前 (ヒト PBMC 移植後 13 日目) から開始した。陽性対象群の NVP 投与量は 25mg/kg/day、Drug Y 低容量投与群は 2.5mg/kg/day、Drug Y 高容量投与群は 25mg/kg/day とした。これらの薬剤を 1 日 2 回のレジメで経口投与した。

### 4) 抗 HIV 効果の評価

HIV-1 感染後 7 日目と 13~14 日目の 2 ポイントで採血を行い、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。またマウス血中のヒト CD45/CD4 陽性細胞数を FACS で解析し薬剤投与群と非投与群で比較した。

## C. 研究結果

### 1) Drug X 評価結果

Dn1、Dn2 の PBMC を移植した hu-PBL SCID マウスに Drug X を投与し、投与開始後 1 日目に HIV をマウスに感染させた。HIV 感染後 7 日目及び 14 日目に採血しその血漿中 HIV RNA コピー数を比較した。その結果、Dn2 の PBMC を移植した群では HIV 感染後 14 日目の血漿中 HIV RNA コピー数は NVP 投与群と Drug X 投与群で有意に減少した (NVP :  $p < 0.01$ , Drug X :  $p < 0.01$ ) (図 2)。また Dn1 の PBMC を移植した群では HIV

感染後 7 日目と 14 日目の血中ヒト CD45/CD4 陽性細胞数を解析した結果、ヒト CD45/CD4 陽性細胞が HIV 感染後 7 日目の時点で NVP 投与群と Drug X 投与群では陰性対象群に比べて有意に保たれていた (NVP :  $p < 0.01$ , Drug X :  $p < 0.05$ ) (図 3)。

### 2) Drug Y 評価結果

Dn3 の PBMC を移植した hu-PBL SCID マウスに Drug X を投与し、投与開始後 1 日目に HIV をマウスに感染させた。HIV 感染後 7 日目及び 14 日目に採血しその血漿中 HIV RNA コピー数を比較した。その結果、Drug Y 高容量投与群では HIV 感染後 14 日目の血漿中 HIV RNA コピー数は減少傾向にはあったものの統計学的には有意差は認められなかった ( $p = 0.1528 > 0.05$ ) (図 4)。NVP 投与群、Drug Y 低容量投与群では血漿中 HIV RNA コピー数の減少傾向は見られなかった。HIV 感染後 7 日目と 14 日目の血中ヒト CD45/CD4 陽性細胞数を解析した結果、ヒト CD45/CD4 陽性細胞が HIV 感染後 7 日目の時点で Drug Y 高容量投与群は陰性対象群に比べて有意に保たれていた ( $p = 0.012 < 0.05$ ) (図 5) NVP 投与群及び Drug Y 投与群ではその傾向は見られなかった。しかし HIV 感染後 14 日目の時点では、ヒト CD45/CD4 陽性細胞数の優位な保持は NVP 投与群、Drug Y 低容量投与群、Drug Y 高容量投与群のいずれでも見られなかった。

## D. 考察

本研究で構築したマウス HIV 感染モデルで、NVP 及び抗 HIV 候補薬剤 Drug X、Drug Y の抗 HIV 活性をマウス血漿中の HIV-1 RNA コピー数低下や血中のヒト CD45/CD4 陽性細胞数から評価することが可能だった。しかし Drug X 評価の際の NVP 投与群及び Drug X 投与群の RNA コピー数低下は非投与群のコピー数の約 50%程度にとどまった。これはマウス血漿中の RNA コピー数のセットポイントが  $10^6 \sim 10^7$  オーダーと実際の臨床のセットポイントより 10~100 倍と非常に高く、実際の臨床における NVP の抗 HIV 活性

を正確に再現する事が難しい為と考えられた。またマウス個体ごとの HIV RNA コピー数には 100 倍程度のばらつきが見られたが、このような RNA コピー数のばらつきが生じる原因は現在のところ明らかではない。また PBMC ドナーによっても結果がばらつくことから、血漿中 HIV RNA コピー数の減少を抗 HIV 候補薬剤の唯一の指標にするのは難しいと考えられる。Drug X では血漿中 HIV RNA コピー数の有意な減少を認めなかった Dn1 群で血中のヒト CD45/CD4 陽性細胞数が陰性対象群に比べて有意に保たれていたが、これは Drug X の抗 HIV 活性により HIV の標的細胞であるヒト CD45/CD4 陽性細胞が保たれた結果と考えられた。これらの結果から、Drug X は既存の抗 HIV 薬剤である NVP と同程度の抗 HIV 活性を有すると考えられた。Drug Y の抗 HIV 活性評価でも、血漿中 HIV RNA コピー数の減少傾向は見られたものの統計学的な有意差は認められなかった。しかし血中のヒト CD45/CD4 陽性細胞数が陰性対象群に比べて有意に保たれていたことから、Drug Y は抗 HIV 活性を *in vivo* でも有すると考えられる。Drug Y 抗 HIV 活性評価では、陽性対象群である NVP 投与群で明確な抗 HIV 活性が見られなかったことから、今後は NVP の投与量を増加させた解析を検討している。

#### E. 結論

hu-PBL SCID マウスを用いたマウス HIV 感染モデルの構築に成功した。マウスに HIV-1 を感染させた系で、新規抗 HIV 候補薬剤である Drug X、Drug Y 及び NVP 投与を行ったところ、NVP 投与群と Drug X 投与群で陰性対象群と比べて血漿中 HIV RNA コピー数が有意に低下した。NVP 投与群と Drug X 投与群では血中のヒト CD45/CD4 陽性細胞数が有意に高く保たれていた。Drug Y の評価では、高容量投与群でのみだったが血中のヒト CD45/CD4 陽性細胞数の有意な保持が確認できた。これらの結果から、マウス HIV 感染モデルで抗 HIV 薬の評価が可能であることが示された。

#### 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

