

厚生労働科学研究研究費補助金

こころの健康科学研究事業

HTLV-I プロテアーゼ阻害剤による HAM 治療法
の開発ならびに HAM 発症予防に関する研究

平成 18 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 納 光弘

平成 19(2007)年 3 月

目 次

	頁
I. 総括研究報告	1
HTLV-I プロテアーゼ阻害剤による HAM 治療法の開発ならびに HAM 発症予防に関する研究 主任研究者： 鹿児島大学大学院 納 光弘	3
II. 分担研究報告	7
1. HTLV-I 特異的 CTL の浸潤による HAM 脊髄の bystander damage 鹿児島大学大学院 納 光弘	9
2. ヒドロキシメチルカルボニル(HMC)イソスターを含む HTLV-I プロテアーゼ阻害剤の合成 京都薬科大学 木曾良明	11
3. 抗 HTLV-I プロテアーゼ候補薬剤の効果 徳島大学大学院 足立昭夫	17
4. HTLV-I 感染ラットにおける脊髄症の発症にはニューロンでの IL-12 を介した IFN- γ の 産生不応答が関与する 北海道大学大学院 外丸詩野	21
5. HTLV-I 関連脊髄症(HAM)患者に対するプロスルチアミン治療の臨床試験 長崎大学大学院 中村龍文	30
6. HTLV-I 感染に伴う封入体筋炎の病態解明 鹿児島大学大学院 梅原藤雄	33
7. HTLV-I 感染細胞では TCR/CD3 発現と TCR シグナルが低下している 鹿児島大学大学院 久保田龍二	35
8. 高い HAM 発症率を示すイラン型 Tax/Rex の機能解析 金沢医科大学医学部 齊藤峰輝	38
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	41
IV. 研究成果の刊行物・別冊	49

I . 総括研究報告書

HTLV-I プロテアーゼ阻害剤による HAM 治療法の開発ならびに HAM 発症予防に関する研究

主任研究者 納 光弘
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科先端治療学専攻神経病学講座 教授

研究要旨：成人 T 細胞白血病ウイルス関連ミエロパチー(HAM)の治療のため HTLV-I 特異的プロテアーゼ阻害剤の開発に取り組み、また HAM 発症予防のための研究を行なった。平成 18 年度は平成 17 年度までに得られたプロテアーゼ阻害剤である KNI-10455 を、HTLV-I プロテアーゼの結晶構造をもとに分子モデリングを行った。その結果主構造を変化させる必要はなく、N 末端アセチル基が阻害作用に重要であることが判明し側鎖の構造変換を推し進めた。酵素阻害活性を低下させずに、生体内で安定で、物性の優れた新規化合物 KNI-10584、KNI-10605 を、さらに 5uM で強い酵素阻害活性をもつ KNI-10562、KNI-10573、KNI-10617 を得た。また、HAM の発症機序に関して、脊髄内に HTLV-I 感染リンパ球と HTLV-I 特異的細胞傷害性リンパ球が浸潤し、その炎症過程で周りの神経系細胞がアポトーシスを起していることが判明した。さらに、プロスルチアミンによる臨床試験を行い、有効性を確認した。

分担研究者：

木曾 良明・京都薬科大学薬品化学教室・創薬科学フロンティア研究センター 教授

足立 昭夫・徳島大学大学院医学研究科ウイルス病原学分野 教授

外丸 詩野・北海道大学大学院医学研究科病態制御学専攻病態解析学講座 講師

中村 龍文・長崎大学大学院医学研究科感染分子病態学・神経免疫学/神経内科 助教授

梅原藤雄・鹿児島大学大学院医歯学総合研究科神経内科・老年病学 講師

久保田龍二・鹿児島大学大学院医歯学総合研究科難治ウイルス病態制御研究センター 助教授

斎藤峰輝・金沢医科大学生態感染防御学 助教授

A. 研究目的

慢性難治性神経疾患、成人 T 細胞白血病ウイルス(HTLV-I)関連ミエロパチー(HTLV-I-associated myelopathy: HAM)は HTLV-I 感染により発症し、痙性対麻痺および膀胱直腸障害を引き起こす。HAM 患者では HTLV-I プロウイルス DNA 量が HTLV-I 感染未発症者の約 16 倍と顕著に増加しているのが特徴である。しかしながら、HTLV-I プロウイルス量を特異的に減少させる治療法は確立されてい

ない。本研究ではこれを可能にする HTLV-I ウイルス特異的プロテアーゼ阻害剤の開発を目指す。また、患者個人に対してより適切な治療時期を選択し、HTLV-I 感染者からの HAM 発症を予防するための、詳細な HAM の病態解明と発症予測に関する研究も行う。

B. 研究方法

(1) HTLV-I 特異的プロテアーゼ阻害剤の開発

HTLV-I プロテアーゼのアミノ酸配列に基づいて現在までに得られた合成阻害剤を昨 year 明らかとなった HTLV-I プロテアーゼの結晶構造をもとに分子モデリングを行い、阻害剤の構造設計の見直しを行い、酵素阻害活性が高く生体に投与可能な化合物の創成を目指す。

(2) HTLV-I ウイルス感染価定量法の開発

HTLV-I の感染力価を測定する測定法は確立されていなかったが、HTLV-I プロテアーゼ阻害剤の酵素阻害活性の評価のためのウイルス感染価定量法の開発を行い感染細胞より放出されたウイルス蛋白を測定する系を既に確立した。この系を用いて合成した化合物の活性測定を行う。

(3) HAM 疾患モデルの開発、解析

HTLV-I 感染による脊髄症発症ラット(WKAH 系)の発症機構を、脊髄症発症抵抗性ラットと比較することにより、発症に関与する宿主遺伝子の発現を解析する。

(4) HAM 病態の解明、治療法の開発

昨年度の研究で試験管内でプロスルチアミン（アリナミン）の感染細胞の減少効果が明らかになったが、本年度は本薬剤を用いて臨床試験を行い、HAM 患者に有効な治療となりえるか検証する。HAM 患者剖検脊髄を用いて、脊髄の炎症に関与する細胞を明らかにする。HAM の生体内 HTLV-I 感染細胞性状の詳細な検討を行い、免疫不全との関連を検討する。HTLV-I 感染封入体筋炎(IBM)の発症機序を明らかにし、HAM 発症の機序と比較検討する。

(5) HAM発症関連遺伝子の同定並びに発症予測システムの開発

イランと日本の HTLV-I ウイルスの遺伝子配列が異なり、イラン型のウイルスでは低いウイルス量で HAM を発症することが昨年明らかとなった。本年はイラン型の HTLV-I ウイルスがなぜ HAM 発症を促進するのかを分子生物学的に検討する。

(倫理面への配慮)

今回の研究で開発された新薬剤は学内倫理委員会の承認を得たのち、インフォームドコンセントの得られた HAM 患者で、新治療薬の効果判定を行う予定である。動物の使用にあたっては感染動物実験施設で行い、各研究施設の「動物実験に関する指針」を遵守する。発症要因解析については学内倫理委員会の承認を得て行う。

C. 研究結果

(1) HTLV-I特異的プロテアーゼ阻害剤の開発

- ① HTLV-I と HIV のプロテアーゼの結晶構造とを比較したところ HTLV-I プロテアーゼはフラップ部分が大きく異なっていた。平成 17 年度までに得られたプロテアーゼ阻害剤である KNI-10455 を、HTLV-I プロテアーゼの結晶構造をもとに分子モデリングを行った。
- ② KNI-10455 の主構造はプロテアーゼと無理なくフィットしており、主構造を変化させる必要はなく、側鎖の構造変換を押し進めた。
- ③ HTLV-I の大きなフラップ部分に KNI-10455 の N 末端アセチル基が阻害作用に重要であることが分子モデリングによって判明し、これを他の構造に変換することで安定で物性の高い化合物を得ることができた。
- ④ 他の側鎖の検討も行い酵素阻害活性を低下させずに、生体内で安定で、物性の優れた新規化合物 KNI-10584、KNI-10605 を、さらに 5 μ M で強い酵素阻害活性をもつ

KNI-10562、KNI-10573、KNI-10617 を得た。

(2) HTLV-Iウイルス感染価定量法の開発

- ① HTLV-I 蛋白が添加した細胞で産生されたときにのみルシフェラーゼを産生する細胞培養システムを樹立した。
- ② この細胞株は感染細胞内でのプロテアーゼ阻害活性測定に適している。
- ③ このシステムを用いて現在までに合成したいくつかの化合物のウイルス増殖抑制効果を効果判定したところ、酵素阻害作用が強い化合物も有意な増殖抑制作用は示さなかった。このことより酵素阻害活性を保ちながら、膜透過性等を改善する必要性が示唆された。

(3) HAM疾患モデルの開発・解析

- ① HTLV-I 感染による WKAH 系ラットの脊髄傷害機構の原因を HAM 発症抵抗性ラットの脊髄と比較した。ニューロンにおける IFN- γ の発現亢進が認められ、これは IL-12R β 2 遺伝子の発現低下に関連したものと考えられた。
- ② HAM ラットでは IL-12R β 2 遺伝子の転写に抑制的に働く GATA-3 の結合部位に遺伝子多型をみとめ、GATA-3 の結合部位が増加することで、IL-12R β 2 遺伝子の発現低下に関与している可能性が示された。

(4) HAM病態の解明、治療法の開発

- ① プロスルチアミンを HAM 患者に点滴投与を行い、軽度ながら神経症状の改善と、30-50%もの末梢血中 HTLV-I ウイルス量の低減を認めた。HAM の新たな治療法として今後の検討が必要である。
- ② HAM 脊髄の詳細な検討を行い、脊髄内に HTLV-I 感染リンパ球と HTLV-I 特異的細胞傷害性リンパ球が浸潤し、その炎症過程で周りの神経系細胞がアポトーシスを起し HAM の神経傷害が発生していることが判明した。
- ③ 感染細胞では細胞シグナルに関与する TCR/CD3 分子の発現が著明に低下し、実際細胞内への TCR よりのシグナルが低下しており、免疫不全に関与している可能性が示された。
- ④ HTLV-I 陽性 IBM 患者の障害筋肉内に HTLV-I 感染 CD4 陽性細胞と HTLV-I 特異的 CTL の浸潤が認められ、HAM の脊髄と同様な機序で発症していることが推察された。

(5) HAM発症関連宿主遺伝子の同定並びに発症予測システムの開発

- ① イラン型 Tax (Tax Ir) は NF- κ B 転写活性化能に対する LTR 転写活性化能の比

率 (LTR/NF- κ B) が有意に高かった。イラン株 Rex では非スプライス型 RNA の核外輸送能が低下していた。低スプライシング調節能が HAM 発症リスクに及ぼす可能性が考えられた。

D. 考察

HTLV-I 感染者の一部に HAM は発症し、その発症および症状増悪には HTLV-I ウイルスの増加が最大のリスクである。そのため HAM 発症予防ないし症状軽減にはウイルス量の減少ないしはウイルス除去が最も重要である。本研究では HTLV-I 特異的プロテアーゼ阻害剤の開発を中心に研究を行っている。本年度は昨年度までの研究により得られたプロテアーゼ阻害化合物を昨年明らかとなった HTLV-I プロテアーゼの結晶構造と比較検討を行った。プロテアーゼと化合物の分子モデリングを行い、現在までに得られた化合物の主構造は変更する必要はなく、N 末端アセチル基が阻害作用に重要であることが判明し、さらに側鎖の置換を行った。その結果、生体内で投与可能と考えられる 5 μ M の低濃度で強い酵素阻害作用を持つ新規化合物が得られた。本年の研究によりプロテアーゼ阻害剤の開発は格段に進歩したが、人体投与が可能となるためには細胞内への移行の問題等さらに解決すべき問題がある。

さらに、細胞系を用いた HTLV-I ウイルス増殖の適切な測定系が現在まではなかったが、本研究により、感度の高い *in vitro* の実験系が確立された。本測定系は無細胞ウイルスによる影響は受けないことより、感染細胞内のウイルス活性を測定できることを明らかにした。

HAM 感受性動物モデルは前年度までの研究によりすでに確立されているが、本年度は発症ラットと発症抵抗性ラットの詳細な比較検討を行い、HAM 発症抵抗性に脊髄内での IFN- γ の産生低下が関与し、その原因に IL-2R β 2 遺伝子の発現低下が関与していること、さらにこの IL-2R β の低下は、HAM ラットの遺伝子多型に関与した転写活性低下に関連したものである可能性が明らかとなった。なぜ HTLV-I 感染者の一部にのみ HAM が発症するのかにつき示唆を与える研究結果である。

HAM 治療のための新たな試みとして、プロスルチアミン (アリナミン) を HAM 患者への投与することにより HAM 患者末梢血中のウイルス量が減少することが明らかとなった。プロスルチアミンはすでに、薬剤として使用されている化合物であり、HAM への新たな治療法の一つになる可能性がある。また、HAM の発症について我々は、中枢神経系への HTLV-I

感染細胞の流入と、それに続く HTLV-I 特異的 CTL によって起こる炎症症状の結果サイトカイン等により周囲の神経系細胞が障害を受ける bystander damage モデルを提唱してきた。HAM 中枢神経系内の HTLV-I の局在については CD4 陽性リンパ球であることはすでに報告していたが、本年度の研究により HTLV-I 特異的 CTL も中枢神経系に浸潤しその周囲の神経系細胞にアポトーシスが起きていることを明らかにした。この発症機序より、HAM 治療の第一はもちろんウイルス量を減らすことであるが、感染細胞および HTLV-I 特異的 T 細胞の中枢神経系への浸潤を阻止することで、HAM の新たな治療法を確立できる可能性が考えられた。

E. 結論

平成 18 年度の研究により、HTLV-I プロテアーゼ阻害剤の開発は、HTLV-I プロテアーゼ結晶構造と化合物の分子モデリングにより飛躍的に進歩した。構造解析に基づいた側鎖分子の検討により、生体内投与時の許容範囲である 5 μ M で強い酵素阻害活性のある化合物が得られた。しかし細胞レベルでの感染実験では効果が低く、膜透過性などの改善が必要である。薬剤検定のための細胞株を用いた実験系の整備とモデル動物の HAM 発症に関与する因子の詳細な解析も行われた。発症予防、発症予測、治療開始時期選定のための HAM の病態解明、HAM 発症関連ウイルス要因、宿主要因研究も進展した。今回の研究を今後さらに発展させることで、当初の目標が達成できるところまで来ている。

F. 健康危険情報

特記すべきものはない。

G. 研究発表

主たるものを記載する。

1. 論文発表

1. Nose H, Saito M, Usuku K, Sabouri AH, Matsuzaki T, Kubota R, Eiraku N, Furukawa Y, Izumo S, Arimura K, Osame M. Clinical symptoms and the odds of human T-cell lymphotropic virus type1-associated myelopathy/ tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in healthy virus carriers: application of best-fit logistic regression equation based on hostgenotype, age, and provirus load.

J Neurovirol. 2006 Jun;12(3):171-7.

2. Nobuhara Y, Usuku K, Saito M, Izumo S, Arimura K, Bangham CR, Osame M. Genetic variability in the extracellular matrix protein as a determinant of risk for developing HTLV-I-associated neurological disease. *Immunogenetics*. 2006 Jan;57(12):944-52.
 3. Youhei Sohma, Atsuhiko Taniguchi, Mariusz Skwarczynski, Taku Yoshiya, Fukue Fukao, Tooru Kimura, Yoshio Hayashi, Yoshiaki Kiso. "O-Acyl isopeptide method" for the efficient synthesis of difficult sequence-containing peptides: use of "O-acyl isodipeptide unit". *Tetrahedron Letters*, 47 (18), 3013-3017 (2006).
 4. Magne O. Sydnes, Yoshio Hayashi, Vinay K. Sharma, Takashi Hamda, Usman Bacha, Jennifer Barrila, Ernesto Freire, Yoshiaki Kiso. Synthesis of glutamic acid and glutamine peptides possessing a trifluoromethyl ketone group as SARS-CoV 3CL protease inhibitors. *Tetrahedron*, 62 (36), 8601-8609 (2006).
 5. Fukushima N, Nishiura Y, Nakamura T, Kohno S, Eguchi K. Blockade of IL-2 receptor suppresses HTLV-I and IFN- γ expression in patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Intern Med*, 2006, in press.
2. 学会発表
1. Nose H, Saito M, Sabouri AH, Usuku K, Kubota R, Izumo S, Arimura K, Osame M. In vivo selection of T-cell receptor junction region sequences by HLA-DRB1-0101 human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) envelope gp21 peptide complexes in HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis(HAM/TSP) 8th International Congress of Neuroimmunology (Nagoya, Japan) 2006.Oct.
 2. Matsuura E, Kubota R, Saito M, Suehara M, Matsuzaki T, Arimura K, Osame M, Izumo S. Visualization of HTLV-I Tax-specific cytotoxic T lymphocytes in the central nervous system of HTLV-I-associated myelopathy. 8th International Congress of Neuroimmunology (Nagoya, Japan) 2006.Oct.
 3. J-T. Nguyen, A. Itami, H. Maegawa, K. Nishiyama, T. Kimura, Y. Kiso. From peptidic substrate to small inhibitor possessing non-natural amino acids: a summary on HTLV-1 protease inhibitor optimization studies. 2nd International Symposium on Biomolecules and Related Compounds (Kyoto, Japan) 2006.11.
 4. Yoshihiro Nishiura, Tatsufumi Nakamura, Naomi, Fukushima, Hiroaki Ida, Katsumi Eguchi. Allicin and its derivative induce apoptosis of HTLV-I-infected cells derived from patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). The 8th International Congress of Neuroimmunology October 15~19, 2006 The 8th International Congress of Neuroimmunology October 15~19, 2006 , Nagoya
- H. 知的所有権の出願・登録状況
(予定を含む。)
1. 特許取得
なし。
 2. 実用新案登録
なし。
 3. その他
なし。

Ⅱ. 分担研究報告書

HTLV-I 特異的 CTL の浸潤による HAM 脊髄の bystander damage

主任研究者 納 光弘 鹿児島大学教授

共同研究者：松浦英治¹、久保田龍二²、齋藤峰輝³、松崎敏男¹、末原雅人⁴、有村公良¹、出雲周二²
¹鹿児島大学神経内科・老年病学、²鹿児島大学難治ウイルス研、
³金沢医科大学生体感染防御学、⁴国立療養所沖縄病院神経内科

研究要旨：HAM の発症に HTLV-1 特異的 CTL が関与しているかよくわかっていない。HAM 患者の脊髄に HTLV-1 特異的 CTL が浸潤しているかを検討した。HLA-A2 陽性の HAM 患者の剖検脊髄 2 例を Tax11-19/HLA-A*02 五量体を用いて免疫染色を行った。脊髄内に浸潤している細胞は主に CD8 が陽性であり、その多くが Tax11-19 特異的 CTL であった。アポトーシス細胞は浸潤細胞の多い血管周囲の、主に希突起膠細胞に認められた。我々は既に HAM 脊髄の HTLV-I 陽性細胞は浸潤 CD4+細胞であることを報告しており、本研究の結果とあわせて、HTLV-I 感染 CD4+細胞と HTLV-I 特異的 CD8+CTL の中枢神経系への浸潤による炎症と、それに続く神経系細胞の bystander damage が HAM の発症機序と考えられた。

A. 研究目的

HAM 患者末梢血中では HTLV-I プロウイルスと HTLV-I 特異的細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) が増加し、HTLV-I 特異的 CTL は抗原特異的に IFN- α や TNF- α などのサイトカインを産生することが報告されている。また剖検脊髄では HTLV-I 感染 CD4 陽性 T 細胞と長期に渡り浸潤し続ける CD8 陽性 T 細胞が認められている。これらのことから HAM の中枢神経系において、HTLV-I 感染 CD4+細胞と HTLV-I 特異的 CD8+CTL の免疫反応が HAM 発症に深く関与していると類推されている。我々はすでに中枢神経系における HTLV-I 感染細胞は浸潤 CD4+細胞であることを報告しているが、HAM 脊髄に HTLV-I 特異的 CTL が浸潤しているのかは未だ不明である。今回我々は中枢神経系での HTLV-I 特異的 CTL の HAM 発症への関与を明らかにするために、HAM 脊髄をもちいて免疫組織学的に HTLV-I 特異的 CTL の同定を試みた。

B. 研究方法

HLA-A2 陽性の HAM 患者においては、主要なウイルスエピトープは Tax11-19 (LLFGYPVYV) であることが報告されている。剖検 9 例の脊髄より DNA を抽出し、PCR にて HLA-A2 を同定した。HLA-A2 陽性であった 2 例の凍結脊髄を用いて検討した。Tax11-19 ペプチド/HLA-A*02 五量体を用いて免疫染色を行い、HTLV-I Tax11-19 特異的 CTL を同定した。陽性細胞は CD8 と二重染色

を行った。CD4+細胞、CD8+細胞、Tax11-19 特異的 CTL の浸潤細胞数を比較検討した。あわせて細胞傷害性分子である perforin、granzyme B を、増殖関連分子である Ki-67 を染色した。さらに脊髄内のアポトーシス細胞を活性型 caspase 3 で同定し、神経系細胞マーカーと二重染色した。

C. 研究結果

胸髄に炎症細胞浸潤が強く、脊髄内の血管周囲を中心として CD4 陽性細胞および CD8 陽性細胞の浸潤を認めた。脊髄内に浸潤している細胞は主に CD8 が陽性であり、CD4 陽性細胞と CD8 陽性細胞の比はおおよそ 1 : 6 であった。脊髄内に同定された Tax11-19 特異的 CTL は、二重染色で CD8 陽性であり、CD8 陽性細胞のうち Tax11-19 特異的 CTL は約 20% であった。浸潤している HTLV-I 特異的 CTL は granzyme B を発現し、一部は Ki-67 を発現していた。アポトーシス細胞は細胞浸潤が著明な血管周囲に見られ、主に希突起膠細胞であった。

D. 考察

HAM 患者においては末梢血中の HTLV-I 特異的 CTL の解析により CTL が病態に関与していることが考えられてきたが、HTLV-I 特異的 CTL が中枢神経内に存在するかわかっていなかった。今回の研究により実際に中枢神経系に浸潤しており、加えてその割合は非常に高いことが明らかとなった。HAM におい

て HTLV-1 特異的 CTL が末梢血中に出現する割合は数%であり、今回の結果は、HTLV-1 特異的 CTL が HAM 患者の中枢神経系に集積していることを示唆し、この細胞が HAM の病態に深く関わっていると考えられた。またアポトーシスは、細胞浸潤の著明な血管周囲の、主に希突起膠細胞におこっていた。我々は既に中枢神経系での HTLV-I 感染細胞は浸潤 CD4 陽性細胞であることを報告しており、本研究の結果とあわせて、HAM の脊髄では HTLV-I 感染 CD4+細胞と HTLV-I 特異的 CTL の浸潤が血管周囲におこり、その周囲の神経系細胞の bystander damage がおこることによって神経障害が起こっていると考えられた。

E. 結論

HAM 患者脊髄内に HTLV-I 特異的 CTL が多数浸潤していることを組織学的に証明した。HTLV-I 感染 CD4+細胞と HTLV-I 特異的 CD8+CTL の中枢神経系への浸潤による炎症と、それに続く神経系細胞の bystander damage が HAM の発症機序と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1: Taylor GP, Goon P, Furukawa Y, Green H, Barfield A, Mosley A, Nose H, Babiker A, Rudge P, Usuku K, Osame M, Bangham CR, Weber JN. Zidovudine plus lamivudine in Human T-Lymphotropic Virus type-I-associated myelopathy: a randomised trial. *Retrovirology*. 2006 Sep 19;3:63.
2. Nose H, Saito M, Usuku K, Sabouri AH, Matsuzaki T, Kubota R, Eiraku N, Furukawa Y, Izumo S, Arimura K, Osame M. Clinical symptoms and the odds of human T-cell lymphotropic virus type1-associated myelopathy/ tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in healthy virus carriers: application of best-fit logistic regression equation based on hostgenotype, age, and provirus load. *J Neurovirol*. 2006 Jun;12(3):171-7.
3. Nobuhara Y, Usuku K, Saito M, Izumo S, Arimura K, Bangham CR, Osame M. Genetic variability in the extracellular matrix protein as a determinant of risk for developing HTLV-I-associated neurological disease. *Immunogenetics*. 2006 Jan;57(12):944-52.

2. 学会発表

1. Hayashi D, Kubota R, Nose H, Arimura K, Izumo S, Osame M. Increased CTL responses to CMV in HAM/TSP patients: A relation of FOXP3 regulatory Tcells. 8th International Congress of Neuroimmunology (Nagoya, Japan) 2006.Oct.
2. Nose H, Saito M, Sabouri AH, Usuku K, Kubota R, Izumo S, Arimura K, Osame M. In vivo selection of T-cell receptor junction region sequences by HLA-DRB1-0101 human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) envelope gp21 peptide complexes in HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis(HAM/TSP) 8th International Congress of Neuroimmunology (Nagoya, Japan) 2006.Oct.
3. Matsuura E, Kubota R, Saito M, Suehara M, Matsuzaki T, Arimura K, Osame M, Izumo S. Visualization of HTLV-I Tax-specific cytotoxic T lymphocytes in the central nervous system of HTLV-I-associated myelopathy. 8th International Congress of Neuroimmunology (Nagoya, Japan) 2006.Oct.

G. 知的財産権の出題・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

基質遷移状態アナログとしてアロフェニルノルスタチンを含む HTLV-I プロテアーゼ阻害剤の合成

分担研究者 木曾良明 京都薬科大学 教授

研究要旨：我々は HTLV-I の増殖阻害薬を目指して、HTLV-I 固有プロテアーゼの阻害剤創製を試みている。我々は基質構造に基づく論理的な阻害剤デザインにより低分子のテトラペプチド型阻害剤を見出している。今回これらをリードとし N 末端, P3, P1, P1', P2' の各々の部位で構造活性相関研究を行い、生体内安定性が高く細胞透過性を改善できる構造を有する阻害剤合成を試みた。その結果、安定性及び物性に置いて優れた誘導体を見出すことが出来た。

A. 研究目的

我々は HAM 治療あるいは発症予防を目的とした、HTLV-I の増殖抑制効果を有する化学療法剤の創製を目指す。化学療法のターゲットとして HTLV-I が自ら産生しその増殖に必須な HTLV-I プロテアーゼに着目し、その阻害剤創製を試みている。本年度も HTLV-I プロテアーゼの基質のアミノ酸配列に基づいてデザイン・合成した阻害剤をさらに低分子化したテトラペプチド型阻害剤をリード化合物として、非ペプチド化、膜透過性向上を目指した物性の改善について検討を行い、活性の増強および薬物として適当な物性を有する化合物の創成をめざす。

B. 研究方法

本年度も我々が既に構築した *in vitro* の阻害剤評価系を用いて、新規にデザイン・合成した阻害剤の活性を測定する。

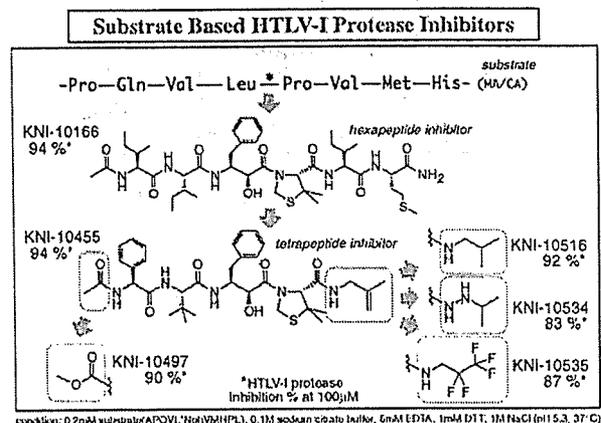
阻害剤評価

酵素として組み替え型 HTLV-I プロテアーゼを、基質には MA/CA 部位のアミノ酸配列に基づく合成基質 (Ala-Pro-Gln-Val-Leu*Nph-Val-Met-His-Pro-Leu, 0.2 mM) を用い、1 mM DTT, 1 M NaCl, 5mM EDTA, 0.1 M citrate buffer (pH 5.3) 中で 6h インキュベートし、RP-HPLC にて切断された基質断片の定量を行った。上記のアッセイ系に 0.1 mM あるいは 0.005 mM の阻害剤を添加し、基質の切断量の低下を測定し阻害活性を測定した。

阻害剤のデザインと合成

我々は基質遷移状態概念誘導体としてヒドロキシメチルカルボニル(HMC)イソスターを用いたアスパラギン酸プロテアーゼの阻害剤設計およびその合成を行ってきており、HIV プロテアーゼや、マラリア原虫プロテアーゼ (プラスメピン)、 β -セクレターゼに対する選択的で強力な阻害剤合成に成功している。

我々は既に MA/CA 部位のアミノ酸配列 (-Pro-Gln-Val-Leu*Pro-Val-Met-His-) と HMC を有する β -アミノ酸アロフェニルノルスタチン(Apns) を組み合わせた阻害剤が強い酵素阻害活性を有することを見いだしている。さらに本化合物を基に低分子化、非天然アミノ酸の導入、非ペプチド化等を行って、テトラペプチド型阻害剤 KNI-10455, KNI-10497, KNI-10516 等を見いだした。これらはヘキサペプチド型阻害剤と比べても見劣りしない強い酵素阻害活性を有していた。



今回阻害剤の設計に際し、これらをリード化合

物として用い各部位の修飾を行うことにした。また Wlodawer らが世界で初めて成功した HTLV-I プロテアーゼの結晶構造解析 [PNAS, 18332-18337, 102, (2005); pdb: 2B7F] を利用して KNI-10455 とプロテアーゼ複合体の分子モデリングを行い、その結果を設計に利用した。

各ポジションの構造変換は、酵素との相互作用の質を高めつつ生体内安定性と細胞膜透過性向上に寄与できることに重点を置いてデザインすることとした。

化合物の合成は、Boc 基を一時的アミノ保護基に用いる一般的な液相法にて行い、すべて逆相 HPLC にて精製を行った後、活性の評価に用いた。

(倫理面への配慮)

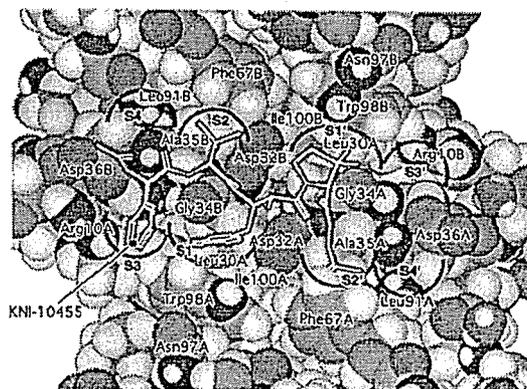
特に必要としない。

C. 研究結果

1) KNI-10455 とプロテアーゼ複合体の分子モデリング

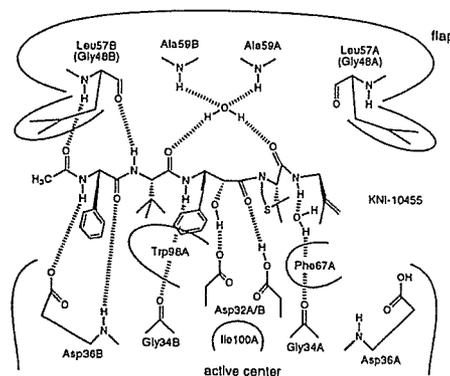
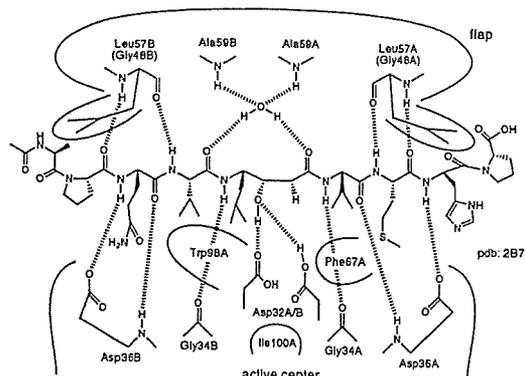
Wlodawer らはフェニルスタチンを有する阻害剤を用いて HTLV-I プロテアーゼ誘導体の結晶化に成功している。その結晶構造は HIV-1 プロテアーゼとおおむね同じと言えるが、細部にはかなりの違いが認められた。特にフラップ部分と S3 部位の構造は HIV のものと大いに異なっていた。このプロテアーゼと我々の設計した阻害剤 KNI-10455 の結合様式を分子モデリングにより解析した。

Modeled Structure of a Complex of HTLV-I Protease with KNI-10455



KNI-10455 の主鎖を構成するペプチド結合は、それぞれ水素結合を形成すると予想され、側鎖官能基は対応するサブサイトに無理なくフィットし、大きなボイドも見られない。これは HIV プロテアーゼとその阻害剤の結合様式と相似であり、KNI-10455 が強い阻害活性を有することと矛盾し

ない。よって KNI-10455 の構造を大きく変えることは大幅な活性低下をもたらすことが予想される。この結果を基に各ポジションの更なる構造変換、最適化を行った。

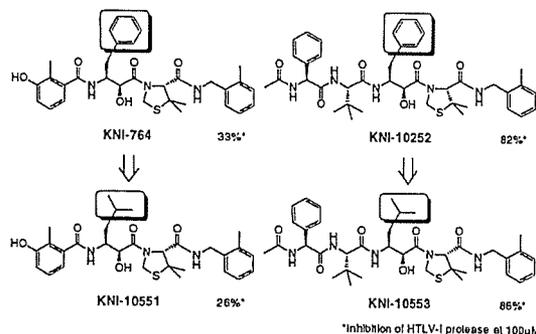


Hydrogen Bonding Pattern between HTLV-I Protease and Inhibitor

2) P1 位構造活性相関

KNI-10455 と HTLV-I プロテアーゼの複合体モデルによると、P1 位のベンゼン環が多少大きすぎる様に見える。そこで P1 位側鎖ベンジル基をイソブチル基 (ロイシントイプ) に変換した化合物 KNI-10551, KNI-10553 を合成した。しかしプロテアーゼ阻害活性はイソブチル基でもベンジル基でも同等の直を示した。

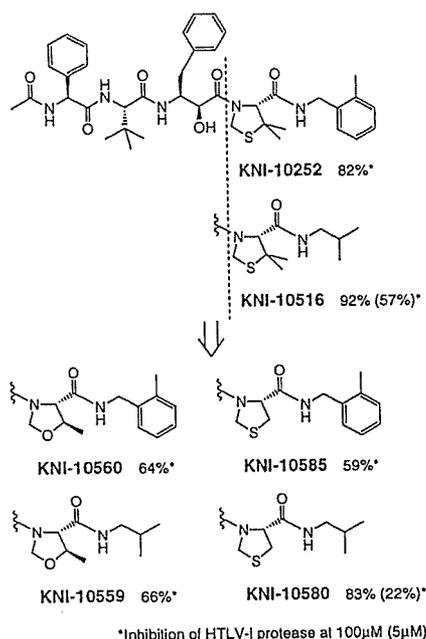
Structure Activity Relationship at P1 Position of HTLV-I Protease Inhibitor



3) P1'-P2'位構造活性相関

P2'位が比較的大きい KNI-10252 より、小さめの官能基を持つ KNI-10516 の方が活性が高い。そこで P1'位に比較的小さいユニットを組み合わせて、より活性が高いものが得られるか試みた。Dmt よりサイズの小さい P1'ユニットと大きめの P2'ユニットを組み合わせた阻害剤を合成したが、元の化合物より阻害活性は低下した。

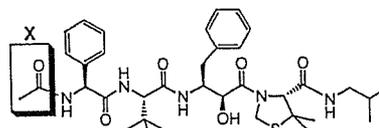
Structure Activity Relationship at P1'-P2' Positions of HTLV-I Protease Inhibitor



4) N 末端部位の構造変換

KNI-10455 の N 末端アセチル基は、膜透過性や生体内安定性の点でも有利とは言えない。そこでこの部位の構造変換を行った。HIV ではこの部分は完全に酵素の外側に位置するのに対し、HTLV-I ではフラップに覆われており相互作用が期待できる。そこで種々脂肪族カルボン酸を導入したところ、いずれも強い阻害活性を示した。とくに KNI-10573, KNI-10574, KNI-10633 等はかなりの活性上昇を示した。またウレタン構造を有する KNI-10584 は物性等の点でも期待できると考えられる。

Structure Activity Relationship at N-terminal of HTLV-I Protease Inhibitor

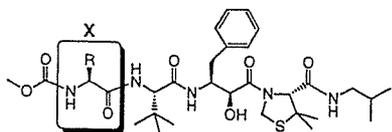


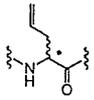
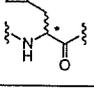
KNI-number	X	Inhibition of HTLV-I protease at 100μM (at 5μM)
KNI-10516		92% (57%)
KNI-10584		92% (67%)
KNI-10570		98% (90%)
KNI-10571		97% (76%)
KNI-10572		93% (84%)
KNI-10573		98% (93%)
KNI-10574		96% (87%)
KNI-10575		93% (81%)
KNI-10614		93% (88%)
KNI-10615		91% (81%) * R and/or S
KNI-10616		95% (88%)
KNI-10617		95% (87%)
KNI-10618		95% (86%) * R and/or S
KNI-10633		96%
KNI-10634		89%

5) P3 位構造活性相関

P3 位のフェニルグリシンの側鎖ベンゼン環を低分子化すべく、構造変換を行った。アリルグリシンやシクロペンチルアラニンを導入したが、良好な結果は得られなかった。

Structure Activity Relationship at P3 Position of HTLV-I Protease Inhibitor

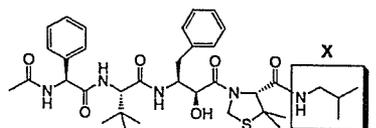


KNI-number	X	Inhibition of HTLV-I protease at 100 μ M (at 5 μ M)
KNI-10584		92% (67%)
KNI-10609	 *R or S	74%
KNI-10584		54%
KNI-10584	 *R and S	65%

6) P2'位構造活性相関

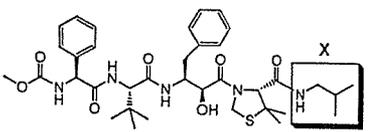
活性上昇とともに物性改善を考慮した P2'位の構造活性相関研究を行った. P2'位のイソブチル基をさらに脂溶性の高いものに変換した KNI-10586, KNI-10600, KNI-10627 等はより強い阻害活性を有していた. 一方親水性を増やすため酸素原子を導入したものは活性が低下した. その中で tert-ブチルヒドロジドを有する KNI-10605 は比較的活性が高く, かつ疎水性, 親水性共に有するため膜透過に有利ではないかと考えられる.

Structure Activity Relationship at P2' Position of HTLV-I Protease Inhibitor (1)



KNI-number	X	Inhibition of HTLV-I protease at 100 μ M (at 5 μ M)
KNI-10156		92% (57%)
KNI-10536		48%
KNI-10537		57%
KNI-10542		84% (41%)
KNI-10586		85% (63%)
KNI-10592		84% (26%)
KNI-10600		98% (77%)
KNI-10627		98%

Structure Activity Relationship at P2' Position of HTLV-I Protease Inhibitor (2)



KNI-number	X	Inhibition of HTLV-I protease at 100 μ M (at 5 μ M)
KNI-10584		92% (67%)
KNI-10558		12%
KNI-10561	 *R or S	92% (74%)
KNI-10562		97% (88%)
KNI-10581		79% (44%)
KNI-10583		75% (46%)
KNI-10605		98% (68%)
KNI-10606		21%
KNI-10607		72%
KNI-10608		81% (21%)
KNI-10624	 *mixture	90%

D. 考察

HTLV-I プロテアーゼと KNI-10455 の分子モデリング解析により, 我々の阻害剤はおおむね理想的な結合様式を有していることが予想できた.

P1 位 Apns の側鎖ベンゼン環はモデリングによると少し大きい様に思える. しかしイソブチル基に変換しても活性はほとんど変化しなかった. これらの中間のサイズを持つ側鎖 (ネオペンチル等) が導入できると面白いだろう.

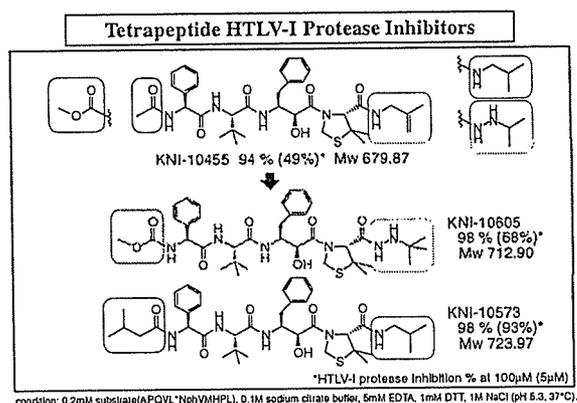
KNI-10455 の N 末端アセチル基は活性に非常に重要な役割を有していた. その理由として HTLV-I プロテアーゼが HIV に比べ大きなフラップを有しているため, HIV では外部に露出するこの部位が相互作用に寄与できるためであることが, HTLV-I プロテアーゼの X 線結晶構造解析により解った. アセトアミドの様な構造は生体内安定性, 膜透過性の点でも望ましいとは言えないが, これを安定性の高いと考えられるウレタン構造や, 末端分岐脂肪酸カルボン酸に変換することが出来た.

P3 位のフェニルグリシンを低分子化しようと試みたが, いずれも活性の低下を伴った. アリルグリシンではなくフェニルグリシンにより近い構造を持つビニルグリシンの誘導体を用いれば良かったかもしれない.

P2'位のイソブチル、 β -メタリル、2-メチルペンジルといった構造を元に構造変換を行った結果、より活性の高い化合物を見いだすことが出来た。しかしこれらはより疎水性が高い官能基を有しており、薬物として有利かどうか問題がある。S2'位はもともと疎水性のポケットであり、親水性の官能基が望ましく無いのは当然とも言える。しかし一方で、tert-ブチルヒドラジドの様な疎水性、親水性共に有する官能基が高い阻害活性をもたらすことも見いだすことが出来た。この知見は薬物としての阻害剤設計に極めて有用であろう。

E. 結論

テトラペプチド型 HTLV-I プロテアーゼ阻害剤 KNI-10455 等をリード化合物として、生体内安定性、膜透過性向上を目指した阻害剤の設計、合成を試みた。その結果としてリード化合物より安定性や物性の点で進歩した部分構造をもち、同等の酵素阻害活性を有する阻害剤 KNI-10584, KNI-10605 を見いだした。さらに KNI-10562, KNI-10573, KNI-10617 はリード化合物より強い酵素阻害活性を有していた。



F. 研究発表

1. 論文発表

- * Youhei Sohma, Atsuhiko Taniguchi, Mariusz Skwarczynski, Taku Yoshiya, Fukue Fukao, Tooru Kimura, Yoshio Hayashi, Yoshiaki Kiso. "O-Acyl isopeptide method" for the efficient synthesis of difficult sequence-containing peptides: use of "O-acyl isodipeptide unit". *Tetrahedron Letters*, 47 (18), 3013-3017 (2006).
- * 日高興士, 木曾良明. 今エイズ薬研究はどうなっているか. *化学*, 61 (5), 25-29, (2006).
- * Yoshio Hamada, Naoto Igawa, Hayato Ikari, Zyta Ziora, Abdellah Yamani, Koushi Hidaka,

Tooru Kimura, Kazuki Saito, Yoshio Hayashi, Shoichi Ishiura, Yoshiaki Kiso. β -Secretase inhibitors: Modification at the P4 position and improvement of inhibitory activity in cultured cell. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 16 (16), 4354-4359 (2006).

* Mariusz Skwarczynski, Mayo Noguchi, Shun Hirota, Youhei Sohma, Tooru Kimura, Yoshio Hayashi, Yoshiaki Kiso. Development of first photoresponsive prodrug of paclitaxel. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 16 (17), 4492-4496 (2006).

* Magne O. Sydnes, Yoshio Hayashi, Vinay K. Sharma, Takashi Hamda, Usman Bacha, Jennifer Barrila, Ernesto Freire, Yoshiaki Kiso. Synthesis of glutamic acid and glutamine peptides possessing a trifluoromethyl ketone group as SARS-CoV 3CL protease inhibitors. *Tetrahedron*, 62 (36), 8601-8609 (2006).

* Taku Yoshiya, Youhei Sohma, Tooru Kimura, Yoshio Hayashi, Yoshiaki Kiso. "O-Acyl isopeptide method": racemization-free segment condensation in solid phase peptide synthesis. *Tetrahedron Letters*, 47(45), 7905-7909 (2006).

* Youhei Sohma, Yoshiaki Kiso "Click peptide": Chemical biology-oriented synthesis of Alzheimer's disease-related amyloid β peptide (A β) analogues based on the "O-acyl isopeptide method". *ChemBioChem*, 7(10), 1549-1557 (2006).

* Youhei Sohma, Atsuhiko Taniguchi, Taku Yoshiya, Yousuke Chiyomori, Fukue Fukao, Setsuko Nakamura, Mariusz Skwarczynski, Takuma Okada, Keisuke Ikeda, Yoshio Hayashi, Tooru Kimura, Shun Hirota, Katsumi Matsuzaki, Yoshiaki Kiso. "Click peptide": a novel "O-acyl isopeptide method" for peptide synthesis and chemical biology-oriented synthesis of amyloid β peptide analogues. *J. Peptide Science*, 12 (12), 823-828 (2006).

2. 学会発表

- * 木曾良明: 蛋白質の最適空間の探求: 分子認識を基盤とする阻害剤のデザイン. 第6回日本蛋白質科学会年会ランチョンセミナー(京都)、2006.4.
- * Yoshiaki Kiso: Defying difficult diseases: design of protease inhibitors and prodrug forms.

ICOB-5 & ISCNP -25 IUPAC International Conference on Biodiversity and Natural Products (Kyoto, Japan) 2006.7.

* Yoshiaki Kiso: Challenging intractable diseases: protease inhibitors and O-N acyl migration-type prodrug forms. 9th Chinese International Peptide Symposium (CPS-9) - New Age of Peptide Biology and Chemistry (Shanghai, China) 2006.7.

* J-T. Nguyen, A. Itami, H. Maegawa, K. Nishiyama, T. Kimura, Y. Kiso. From peptidic substrate to small inhibitor possessing non-natural amino acids: a summary on HTLV-1 protease inhibitor optimization studies. 2nd International Symposium on Biomolecules and Related Compounds (Kyoto, Japan) 2006.11.

* Yoshiaki Kiso. Challenging difficult diseases: peptide mimetic inhibitors and click peptides. 10th Korean Peptide Symposium (Seoul, Korea) 2006.11-12.

G. 知的財産権の出題・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得：該当無し
2. 実用新案登録：該当無し
3. その他：該当無し

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

分担研究報告書

HTLV-1 感染価及び HTLV-1 複製阻害剤評価システムの研究

分担研究者 足立昭夫

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部ウイルス病原学分野 教授

研究要旨 HTLV-1 感染に対するインジケータ細胞として樹立したヒトリンパ球株化細胞 H9/K30*luc* を用いて、HTLV-1 プロテアーゼ阻害剤のスクリーニングを行なった。H9/K30*luc* 細胞はゲノム内に HTLV-1 LTR の支配下におかれたルシフェラーゼ遺伝子を持ち、MT-2 細胞等の HTLV-1 産生細胞と混合培養すると大量のルシフェラーゼを産生する。候補薬剤存在下で H9/K30*luc* 細胞と MT-2 細胞とを混合培養し、2 日後に細胞中で産生されるルシフェラーゼ量を測定した。試験管内でヒトレトロウイルスプロテアーゼ阻害能を持つ候補薬剤（KNI 化合物）は京都薬科大学の木曾良明教授の研究室でデザイン・合成され、当研究室に提供された。調べた全ての KNI 化合物（KNI-272、-279、-727、-764、-1167、-1276、-1432、-1595b、-10162、-10166、-10220、-10221、-10252、-10270、-10277、-10340、-10375、-10388、-10455b、-10478、-10491、-10496、-10512 および-10516）は細胞毒性の無い薬剤濃度（5 μ M）で顕著な抗 HTLV-1 活性を示さなかった。さらに、KNI-10535、-10542、-10561a、-10562、-10570、-10571、-10572、-10573、-10574、-10575、-10578、-10581、-10583、-10584、-10586、-10588 および -10590 の抗 HTLV-1 効果について検討中である。

A. 研究目的

感染価を迅速に定量するシステムがないため、HTLV-1 のウイルス学的解析は極めて困難であった。本研究では、HAM の制御のためにウイルス複製を指標にした複製阻害剤の開発を目指し、抗 HTLV-1 プロテアーゼ薬の検索システムとしても利用可能な、二種類の細胞の混合培養による評価系（H9/K30*luc* [インジケータ

細胞] と MT2 [HTLV-1 産生細胞] との混合培養) を確立した (Microbes and Infect. 7:820-824, 2005)。

B. 研究方法

(1) 細胞 細胞株は H9/K30*luc* (HTLV-1 イン

ジケーター細胞)、H9/H1*Luc*(HIV-1 インジケーター細胞)、MT-2(HTLV-1 産生細胞)、および H9/NL432(HIV-1 産生細胞)を使用した(Int. J. Mol. Med. 14: 1073-1076, 2004; Microbes Infect. 7: 820-824, 2005)。

(2) ルシフェラーゼ活性の測定 ルシフェラーゼ活性は Luciferase Assay System (プロメガ社、米国) で測定した。

(3) DNA クローン HTLV-1 完全長クローン pK30 は米国 National Institutes of Health の AIDS Research and Reference Reagent Program (カタログ番号 2817) から入手した。HIV-1 完全長クローンは pNL432 (J. Virol. 59: 284-291, 1986) を使用した。ルシフェラーゼクローンは GL3 Basic Vector(プロメガ社)を使用した。

(倫理面への配慮)

本研究では、ヒトと動物を用いた研究は行っていない。

C. 研究結果

HTLV-1 感染に対するインジケーター細胞として樹立したヒトリンパ球株化細胞 H9/K30*Luc* を用いて、HTLV-1 プロテアーゼ阻害剤のスクリーニングを行なった。H9/K30*Luc* 細胞はゲノム内に HTLV-1 LTR の支配下におかれたルシフェラーゼ遺伝子を持ち、MT-2 細胞等の HTLV-1 産生細胞と混合培養すると大量のルシフェラーゼを産生する。候補薬剤存在下で H9/K30*Luc* 細胞と MT-2 細胞とを混合培養し、2 日後に細胞中で産生されるルシフェラーゼ量を測定した。試験管内で抗ヒトレトロウイルスプロテアーゼ阻害能を持つ候補薬剤 (KNI 化合物) は

京都薬科大学の木曾良明教授の研究室でデザイン・合成され、当研究室に提供された。調べた全ての KNI 化合物(KNI-272 [C33H41N5O6S2], -279 [C34H43N5O6S], -727 [C30H41N3O5S], -764 [C32H37N3O5S], -1167 [C33H33N3O6], -1276 [C33H33N3O6], -1432 [C34H41N3O5S], -1595b [C38H46N4O6S], -10162 [C47H71N11O11S2], -10166 [C41H67N7O8S2], -10220 [C43H63N7O8S2], -10221 [C43H62N8O9S], -10252 [C40H51N5O6S], -10270 [C41H53N5O6S], -10277 [C41H51N5O6S], -10340 [C38H53N5O7S], -10375 [C37H47N5O8S2], -10388 [C38H48N4O5S], -10455b [C36H49N5O6S], -10478 [C30H49N5O6], -10491 [C49H63N7O7], -10496 [C35H47N5O6S], -10512 [C53H69N11O13S] および -10516 [C36H51N5O6S]) は細胞毒性の無い薬剤濃度 (5 μ M) で顕著な抗 HTLV-1 活性を示さなかった。さらに、他の KNI 化合物 (KNI-10535 [C35H44F5N5O6S], -10542 [C34H44F3N5O6S], -10561a [C37H53N5O7S], -10562 [C37H53N5O7S], -10570 [C38H55N5O6S], -10571 [C37H53N5O6S], -10572 [C39H57N5O6S], -10573 [C39H57N5O6S], -10574 [C38H55N5O6S], -10575 [C38H53N5O6S], -10578 [C39H57N5O6S], -10581 [C34H44F3N5O7S], -10583 [C35H44F5N5O7S], -10584 [C36H51N5O7S], -10586 [C37H53N5O6S], -10588 [C40H59N5O6S] および -10590 [C40H59N5O6S]) についてその抗 HTLV-1 効果について検討中である。なお、上記と同様の HIV-1 複製評価細胞システム (Int. J. Mol. Med. 14: 1073-1076, 2004; Microbes Infect. 7: 820-824, 2005) を用いて行なったコントロール実験で、SQV および KNI-764 はこの濃度でほぼ完全に HIV-1 プロテアーゼ活性を阻害した。

D. 考察

本研究で HTLV-1 感染を効率良く検出するインジケータ細胞株 H9/K30*luc* を樹立した (Microbes Infect. 7: 820-824, 2005)。H9/K30*luc* は HTLV-1 の無細胞サンプルに対しては感受性がなく、MT-2 等のような HTLV-1 産生細胞との混合培養によってのみ高レベルのルシフェラーゼを産生する。H9/K30*luc* 細胞のこの活性化は、MT-2 細胞表面に存在する開裂型 HTLV-1 Gag/Env を介した細胞融合によって、MT-2 細胞から H9/K30*luc* 細胞へ移行した HTLV-1 Tax によって起こると考えられる。本研究では、また、HIV-1 についても H9/K30*luc* vs. MT-2 と同様の H9/H1*luc* vs. H9/NL432 システムを構築した (Int. J. Mol. Med. 14: 1073-1076, 2004; Microbes Infect. 7: 820-824, 2005)。これらのシステムは細胞融合に関わる種々の薬剤や因子の評価に適していると考えられる。しかし、現在までに検討・検索した範囲内では、有効な HIV-1 阻害剤は容易に見出されるものの、有意の HTLV-1 プロテアーゼ阻害効果を示す薬剤は見つかっていない。ごく最近、HTLV-1 プロテアーゼの立体構造が決定された (Li, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 18332-18337, 2005)。これから得られる情報に基づいて新しくデザイン・合成された様々な HTLV-1 プロテアーゼ阻害候補薬剤を本研究で確立されたシステムで検証する必要がある。また、全ての KNI 化合物の HIV-1 プロテアーゼ阻害効果についても細胞レベルで詳細に検証し、HTLV-1 プロテアーゼ阻害効果と比較対照して考察する必要があると思われる。

E. 結論

HTLV-1 感染価を検出する簡便で迅速な定量法を確立したとの報告は未だない。また、HIV-1 プロテアーゼに顕著な阻害効果を示す抗 HIV-1 薬は HTLV-1 プロテアーゼには効果がない。したがって、インジケータ細胞 H9/K30*luc* と MT-2 等のウイルス産生細胞との混合培養による HTLV-1 プロテアーゼ阻害剤の検索システムは極めて重要であると考えられ、さらに研究を進めていく必要があると思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kamada, K., Igarashi, T., Martin M.A., Khamsri, B., Hatcho, K., Yamashita, T., Fujita, M., Uchiyama, T., and Adachi, A. Generation of HIV-1 derivatives that productively infect macaque monkey lymphoid cells. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 103: 16959-16964, 2006.
- 2) Khamsri, B., Fujita, M., Kamada, K., Piroozmand, A., Yamashita, T., Uchiyama, T., and Adachi, A. Effects of lysine to arginine mutations in HIV-1 Vif on its expression and viral infectivity. International Journal of Molecular Medicine 18: 679-683, 2006.
- 3) Piroozmand, A., Khamsri, B., Fujita, M., Adachi, A., and Uchiyama, T. Morphological study on biologically distinct *vpx/vpr* mutants of HIV-2. Journal of Medical Investigation 53: 271-276, 2006.
- 4) Kamada, K., Yoshida, A., Khamsri, B., Piroozmand, A., Yamashita, T., Uchiyama, T., Fujita, M., and Adachi, A.

Construction of *gag*-chimeric viruses between HIV-1 and SIVmac that are capable of productive multi-cycle infection. *Microbes and Infection* 8: 1075-1081, 2006.

2006 年、東京、日本エイズ学会誌 8: 397, 2006.

- 5) Khamsri, B., Murao, F., Yoshida, A., Sakurai, A., Uchiyama, T., Shirai, H., Matsuo, Y., Fujita, M., and Adachi, A. Comparative study on the structure and cytopathogenic activity of HIV Vpx/Vpr proteins. *Microbes and Infection* 8: 10-15, 2006.

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

2. 学会発表

- 1) 山下知輝、鎌田和弥、Boonruang Khamsri、八町和樹、藤田美歌子、内山恒夫、足立昭夫. HIV-1 Vif と宿主因子 APOBEC3G との結合機能部位の解析. 日本ウイルス学会、2006 年、名古屋、第 54 回日本ウイルス学会学術集会プログラム・抄録集、162、2006.
- 2) 藤田美歌子、Boonruang Khamsri、山下知輝、鎌田和弥、Ahmad Piroozmand、長尾多美子、土肥直哉、足立昭夫. マクロファージでのゲノム逆転写/核移行過程における HIV-1 Vpr と HIV-2 Vpx の役割の相違. 日本ウイルス学会、2006 年、名古屋、第 54 回日本ウイルス学会学術集会プログラム・抄録集、178、2006.
- 3) Boonruang Khamsri、山下知輝、藤田美歌子、鎌田和弥、内山恒夫、足立昭夫. The Vpu 124 D and RK30AA mutations impair virus release from infected macrophages. 日本ウイルス学会、2006 年、名古屋、第 54 回日本ウイルス学会学術集会プログラム・抄録集、274、2006.
- 4) 藤田美歌子、長尾多美子、足立昭夫. HIV-2 Vpx の機能領域解析. 日本エイズ学会、