



厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
平成19年度総括・分担研究報告書

薬剤耐性HIV/AIDS症例救済のための 新規な機序による抗HIV薬剤の開発研究

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

平成20(2008)年3月

平成19年度
厚生労働科学研究費補助金創薬基盤推進研究事業

薬剤耐性HIV/AIDS症例救済のための
新規な機序による抗HIV薬剤の開発研究

—平成19年度 総括・分担研究報告書—

主任研究者 杉浦 亙

平成20(2008)年3月

薬剤耐性HIV/AIDS症例救済のための新規な機序による抗HIV薬剤の開発研究

研究者名	分担	所属	役職
杉浦 亙	主任研究者	国立感染症研究所 エイズ研究センター	第2研究グループ長
明里 宏文	分担研究者	独立行政法人医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター	室長
田中 晴雄	分担研究者	いわき明星大学 薬学部	教授
野村 伸彦	分担研究者	富山化学工業株式会社 総合研究所 第3研究部	主幹研究員
足立 昭夫	分担研究者	徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部	教授
井戸 栄治	協力研究者	京都大学ウイルス研究所 新興ウイルス感染症研究センター	准教授

目 次

総括研究報告書

薬剤耐性HIV/AIDS症例救済のための新規な機序による抗HIV薬剤の開発研究2

主任研究者：杉浦 互 国立感染症研究所 エイズ研究センター 第2研究グループ長
分担研究者：明里 宏文 (独)国立病院機構 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター 室長
田中 晴雄 いわき明星大学 薬学部 教授
野村 伸彦 富山化学工業株式会社 総合研究所 第3研究部 主幹研究員
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 教授
協力研究者：井戸 栄治 京都大学ウイルス研究所 新興ウイルス感染症研究センター 准教授

分担研究報告書

新規な機序によるHIV薬剤の開発とその阻害機序の解析6

分担研究者：杉浦 互
国立感染症研究所 エイズ研究センター 第2研究グループ長

Vif機能を標的とした新規治療薬の開発研究12

分担研究者：明里 宏文
独立行政法人国立病院機構 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター 室長

抗HIVタンパク質アクチノヒビンの高活性化と抗HIV/AIDS薬としての開発研究16

分担研究者：田中 晴雄
いわき明星大学薬学部 教授

新規な機序による抗HIV薬剤の合成展開とその実用化22

分担研究者：野村 伸彦
富山化学工業株式会社 総合研究所 第3研究部 主幹研究員

HIV-1 各種変異体を用いた薬剤標的ウイルス蛋白質の解析26

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 教授

HIV-1 のpol遺伝子を持つ新規SHIVを用いたサルのHAARTモデルの開発30

協力研究者：井戸 栄治
京都大学ウイルス研究所 新興ウイルス感染症研究センター 准教授

研究成果の刊行物に関する一覧表33

I. 総括研究報告書

総括研究課題



薬剤耐性HIV/AIDS症例救済のための 新規な機序による抗HIV薬剤の開発研究

主任研究者

杉浦 亘 国立感染症研究所 エイズ研究センター 第2研究グループ長

分担研究者

明里 宏文 (独)国立病院機構 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター 室長

田中 晴雄 いわき明星大学 薬学部 教授

野村 伸彦 富山化学工業株式会社 総合研究所 第3研究部 主幹研究員

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 教授

協力研究者

井戸 栄治 京都大学ウィルス研究所 新興ウィルス感染症研究センター 准教授

我々は新たな抗HIV薬剤の開発を進めている。現在複数の候補化合物について実用化の可能性を検討している。抗ウイルス活性の増強と細胞毒性の軽減を目指して化合物の合成展開と修飾を進めてきた結果、IC₅₀がナノモルに達する強力なHIV阻害活性をもつ化合物の開発に成功した。この化合物の阻害機序の解明と実用化に向けてヒト血清の影響、毒性評価などを行うとともにHIV感染動物モデルでの評価の準備を進めている。接着・進入阻害剤アクチノヒピンは構造学的な解析が進み、AHの抗HIV活性増強とポリエチレングリコール化に成功した。

■ A. 研究目的

既存の抗HIV薬剤に対する薬剤耐性を克服するための新規な阻害機序による抗HIV薬剤を開発し実用化することを目的とする。薬剤開発の標的としてインテグラーゼ (IN)、構造蛋白のGag、エンヴェロープ、アクセサリタンパクVifなどを狙っている。*in vitro*および*in vivo* (hu-SCID、サルモデル等)での評価を行った後、最終的な到達目標として臨床への実用化まで持ち込むことを目指す。

■ B. 研究方法

本研究班では (1) 開発グループと (2) 実用化グループの2つのサブグループに分かれて研究を進めた (図1)

(1) 開発グループ

合成展開による阻害活性の増強と阻害活性の作用機序の解析に取り組む。

- ① 抗HIV活性を指標にした*in vitro*評価系での低分子化合物ライブラリの再評価
- ② Vif阻害剤スクリーニング系の開発とその基盤としての基礎的研究

(2) 実用化グループ

候補化合物の実用化の可能性を探る

- ① 候補化合物HIVの阻害活性に対するヒト血清の評価
- ② 候補化合物の標的の同定と阻害機序の解明
- ③ サル細胞指向性HIV-1およびSIVを用いた*in vitro*感染実験による候補化合物の阻害活性解析
- ④ アクチノヒピン2量体 (AH2) の大量生産系の確立とデリバリーシステムの検討

■ C. 研究結果

本年度は下記の研究成果を上げた。詳細については各分担研究者の報告書を参照。

(1) 開発グループ

Vif機能を標的とした新規治療薬の開発研究 (明里) 低分子ライブラリの抗HIV阻害活性による探索 (杉浦、野村)

(2) 実用化グループ

候補化合物の最適化 (杉浦、野村) 候補化合物の*in vivo*および*in vitro*毒性試験 (野村) AHの大量生産系確立に関する検討、安全性 (田中)

AHのポリエチレングリコール化（田中）
HIV-1のpol遺伝子を持つ新規SHIVを用いたサル
のHAARTモデルの開発（井戸）

■D. 考察

新薬開発の成否の要となるのは探索をするライブラリと探索方法の独自性であるが、この点に関して我々の研究グループは独自の低分子化合物（富山化学低分子化合物）と放線菌・真菌（北里大学／いわき明星大学）のライブラリを保有しており、また独自の*in vitro*抗HIV阻害活性評価系を構築・保有している。それ以外にもサル動物モデルによる抗HIV薬の評価技術の保有、SIVとHIVのキメラウイルスを多数保有している。そしてこれらの利点を生かして新薬の候補化合物を複数見出すことに成功した。本年度は幾つかの候補化合物について実用化に向けての研究に取り組み、確実にその駒を進めることに成功した。またvif-APOBEC3阻害剤開発のための基盤となる基礎研究、サル感染モデル構築のための基礎研究についても取り組み成果をあげた。

■E. 結論

新規薬剤開発研究、実用化研究いずれも研究計画に沿い本年度の目標を概ね達成した。

■F. 健康危険情報

無し

■G. 研究発表

各分担研究者報告書および巻末業績一覧を参照

■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、(有)キイム・ファーマ・ラボ

(2) PCT/JP2005/021981

発明の名称：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、(有)キイム・ファーマ・ラボ

(3) PCT/JP99/051199

発明の名称：抗ヒト免疫不全ウイルス活性を有するポリペプチド、ポリペプチドをコード化する遺伝子、ポリペプチドの製造方法

発明者：田中晴雄、大村 智、(有)キイム・ファーマ・ラボ

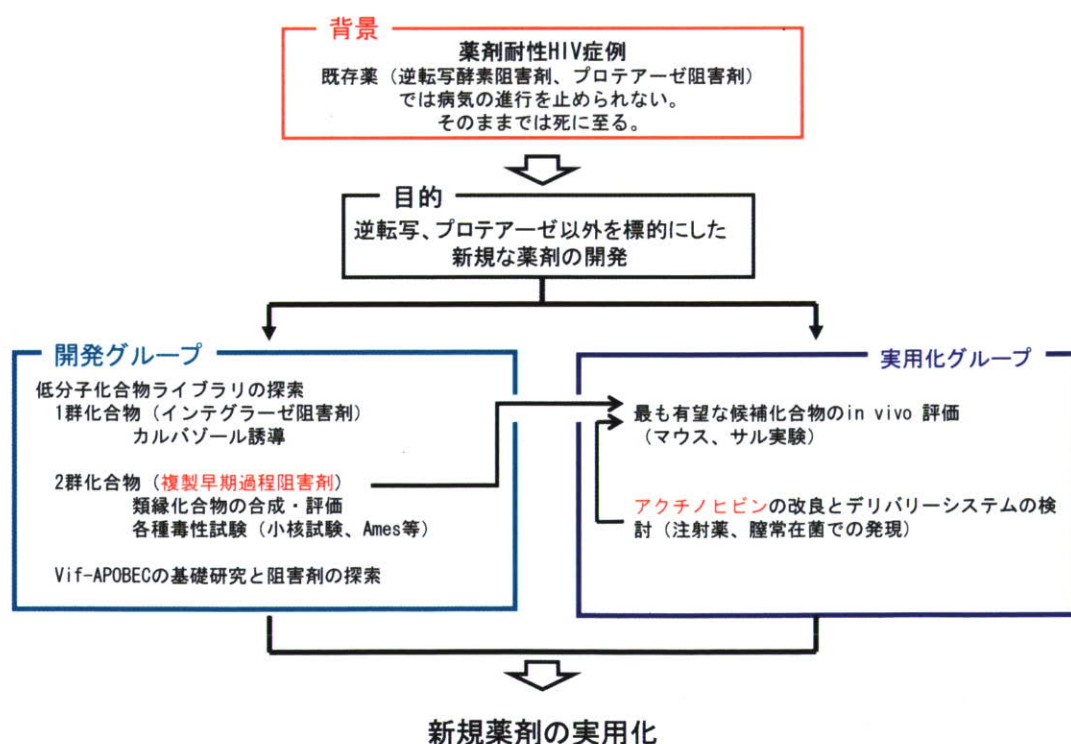


図1 「薬剤耐性HIV/AIDS症例救済のための新規の機序による抗HIV薬剤の開発研究」流れ図

II. 分担研究報告書

分担研究課題

新規な機序によるHIV薬剤の開発と
その阻害機序の解析

分担研究者
杉浦 亙

国立感染症研究所 エイズ研究センター 第2研究グループ長

既存の抗HIV薬剤に対する薬剤耐性を克服するための新規な阻害機序による抗HIV薬剤を開発し実用化することを目的とする。本研究では (i) 候補化合物実用化研究、(ii) メカニズム解析研究、(iii) *in vitro*評価系を用いた網羅的抗HIV活性の評価に取り組んだ。その結果、候補化合物のヒト血清アルブミンの影響は既販薬と同程度であることが確認された。また候補化合物の作用点はHIV複製前期過程であることが明らかになった。抗HIV活性を指標にライブラリー探索を行い多数のヒット化合物を同定した。

■ A. 研究目的

既存の抗HIV薬剤に対する薬剤耐性を克服するための新規な阻害機序による抗HIV薬剤を開発し実用化することを目的とする。本研究では以下の実験に取り組んだ。

(i) 候補化合物実用化研究

これまでのスクリーニングでヒットした化合物をもとに類縁化合物を合成して最適化を進めてきた候補化合物の抗HIV-1活性に及ぼすヒト血清タンパクの影響の解析を行う。この解析は新規薬剤として候補化合物を実用化に向けて駒を進める上で必要な研究である。

(ii) メカニズム解析研究

新規薬剤の抗ウイルス作用の分子メカニズムを解明し、その阻害メカニズムを解明することにより、さらに異なった母核構造をもつ化合物の探索につなげていく。

(iii) *in vitro*評価系を用いた網羅的抗HIV活性の評価

新規抗HIV薬剤の開発を目的として、標的特異的ではなくHIVの増幅過程全体に対して阻害活性の有無をスクリーニングする。HIVの増幅機序はまだ解明されていないことが多く、未知の標的を狙うにはこのような戦略をとることが必要である。

■ B. 研究方法

(i) 候補化合物実用化研究

候補化合物のヒト血中における阻害活性の予測と目標とする血中濃度を見極めるために、我々が樹立したHIV-1感受性リポーター細胞R5-MaRBLE細胞を用いて、候補化合物のヒト血清アルブミン(HSA)存在下、非存在下における抗HIV-1活性の変動を調べた。R5-MaRBLE細胞はヒトT細胞由来HPB-M (a)細胞(CD4⁺, CXCR4⁺)に、HIV-1のLTRでfirefly luciferaseとDsREDの発現が制御されるように構築した遺伝子と、CMVのプロモーターによってrenilla luciferaseが細胞内で常に発現する遺伝子、さらにCCR5を細胞膜に発現するように構築した遺伝子を導入した独自に樹立したT細胞株で、細胞内のfirefly luciferase活性を測定する事でX4ウイルス、R5ウイルス両方の増殖を定量化でき、renilla luciferase活性を測定することによって培養条件による細胞増殖の変動(細胞毒性等)を評価することができる。このR5-MaRBLE細胞にR5ウイルスであるJRCSFを感染させた後、HSA(4%：生理的濃度)添加、非添加の培地で培養し、2時間後に対象とする化合物を5、1、0.2、0.04、0.008、0.0016、0.00032、0.000064、0.0000128 μ Mの濃度で添加し、各培地で培養を続けた。感染7日後に細胞内firefly luciferase活性を測定し、その値からIC₅₀を求め、HSA添加時のIC₅₀を非添加時のIC₅₀と比較した。

(ii) メカニズム解析研究

新規薬剤の作用メカニズムおよびターゲット因子を見出すために、①HIV-1の複製過程における阻害ステップの同定、②化合物の標的がウイルス遺伝子産物なのか宿主細胞遺伝子産物なのかを決定する必要がある。

①阻害ステップの同定

感染性DNAクローンを細胞に遺伝子導入し、ウイルス産生時、あるいは感染時に薬剤を添加し、阻害作用が複製前期/後期のどちらに認められるのかレポーター細胞（LuSIV細胞）を用いたSingle-Round Replication Assayにより検討した。さらに、薬剤添加により、ウイルス粒子中の構造タンパクの組成などが変化していないか、ウェスタンブロットにより確認した。感染前期に阻害剤の作用点がある場合、Time-Of-Addition Assayなどにより、どの複製過程（侵入、逆転写、インテグレーション）が阻害されるのかを検討する。

②標的遺伝子の同定

HIV-1の感染性DNAクローンより作製した各遺伝子を欠失した変異型クローンを遺伝子導入し、変異ウイルスを作成した。これらのウイルスの薬剤の阻害効果を、LuSIV細胞を用いたSingle-Round Replication Assayで調べることにより、どのウイルス遺伝子が薬剤の阻害作用に関与するか調べた。さらに、Nef領域にルシフェラーゼ遺伝子を導入したVSV-G偽粒子のHIV-1を種々の培養細胞に感染させることにより、細胞依存的な薬剤の抗HIV効果を調べた。細胞依存的な効果がある場合には、薬剤の標的が宿主細胞側にあると示唆される。

(iii) *in vitro*評価系を用いた網羅的抗HIV活性の評価

本実験においても我々が開発したin houseの感受性評価系であるR5-MaRBLE細胞を用いた。すなわち、 1×10^5 /wellのR5-MaRBLE細胞にHIV-1 HXB2

を100 TCID₅₀で感染させ、感染2時間後に化合物を添加し一週間培養した後、抗HIV活性の評価を行った。まず、それぞれの終濃度が1 μ Mになるように5化合物を混合して一次スクリーニングを行った。次に、ヒットしたプール検体の活性を示す化合物を特定するため、一次スクリーニングで30%以上の増殖抑制効果を示したプール検体、及び毒性のために本当の阻害活性がマスクされた可能性のあるプール検体についてプールした化合物を個別に評価した（二次スクリーニング）。さらに、三次スクリーニングとして、二次スクリーニングで50%以上の増殖抑制効果を示した化合物、及び毒性が認められた化合物に対して添加化合物濃度を振ってdose response assayを行い、各化合物のIC₅₀値を算出した。

■C. 研究結果

(i) 候補化合物実用化研究

平成19年度に感受性を評価した化合物数は142検体であり（図1）、そのうちHSA添加影響を見るためにスクリーニングを行った化合物の総数は74であった。コントロール化合物としてネビラピン（NVP）、エファビレンツ（EFV）を用いた。NVP、EFVのIC₅₀はHSA非添加ではそれぞれ8.2 \pm 4.2nM、0.54 \pm 0.41nMで、HSA添加ではそれぞれ11.3 \pm 5.9nM、1.77 \pm 1.28nMであった。すなわちNVPはHSA添加による抗HIV-1活性低下がわずかしかなかったが、EFVはIC₅₀での比較で3.5倍程度抗HIV-1活性が低下した。テスト化合物のIC₅₀はHSA非添加では0.4nM～867.5nMの範囲で分布していたが、HSAを添加することにより、その分布は0.5nM～5000nM以上に達した。

各テスト化合物のHSA非添加、添加におけるIC₅₀値の分布を図2、表1に示した。予測どおりHSA添加により化合物のIC₅₀が高濃度側に推移していることがわかった。また、各化合物についてHSA非添加

IC ₅₀ μ M	16年度 (%)	17年度 (%)	18年度 (%)	19年度 (%)
~<0.0001	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (2.8)
~<0.001	6 (5.3)	8 (3.2)	20 (10.4)	16 (11.3)
~<0.01	23 (20.4)	11 (4.4)	32 (16.7)	43 (30.3)
~<0.1	19 (16.8)	36 (14.3)	36 (18.8)	36 (25.4)
~<1	12 (10.6)	32 (12.7)	37 (19.3)	20 (14.1)
~<5	9 (8)	21 (8.4)	14 (7.3)	5 (3.5)
>5	44 (38.9)	143 (57)	53 (27.6)	18 (12.7)
総数	113 (100)	251 (100)	192 (100)	142 (100)

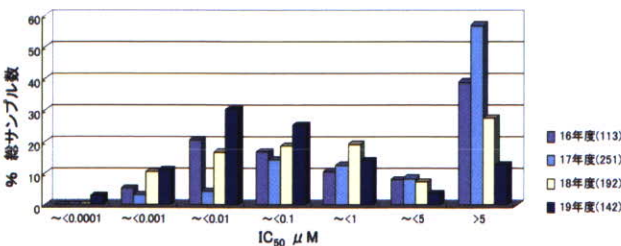


図1 スクリーニングサンプル内訳 (IC₅₀)

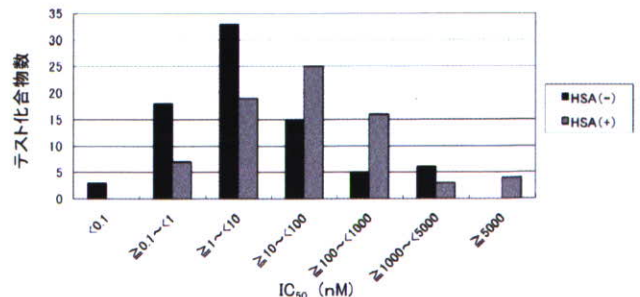


図2 HSA添加および非添加におけるIC₅₀の分布

時のIC₅₀に対するHSA添加のIC₅₀のfold shiftについて図3、表2に示した。評価した化合物の中ではHSA添加によって抗HIV-1活性が影響を受けないもの、反対に80倍近くIC₅₀が増加したのも各1化合物見出されたが、多くの評価化合物はIC₅₀が5倍から20倍の増加に留まっていた。

(ii) メカニズム解析研究

候補化合物の抗ウイルス効果は、ウイルス産生時に薬剤を添加しても認められなかったが、感染時に添加することにより（容量依存的に）阻害効果が認められた。このことから、作用はHIV-1複製の前期過程であることが明らかになった。また、ウイルス産生時に薬剤を添加したウイルス粒子を解析した結果、ウイルス構造タンパク、ゲノムRNA、Cyclophilin Aなどの組成には影響がないことが分かった。Gag/Pol以外の遺伝子を欠損させても、VSV-Gの偽粒子にすれば、薬剤の阻害効果が認められることから、作用点はウイルスの侵入からインテグレーションの過程であることが分かった。さらに、Time-Of-Addition Assayの結果から、薬剤の阻害時間がインテグラーゼ阻害薬のプロファイルに近いことが分かった。細胞外での逆転写酵素活性測定では、阻害効果が認められなかったことから、逆転写酵素阻害剤でないことが考えられた。*in vitro*のStrand-transfer Assay（インテグラーゼ阻害薬のスクリーニング）では、阻害効果が示さないことは、すでに報告済みである。一方、新規薬剤のHIV-1阻害効果の

差が細胞種依存的に認められた。これは候補化合物の作用点がHIV複製に関与する宿主細胞因子である可能性を示唆している。これを裏付ける結果としてVSV-G偽粒子のMuLVに対しても候補化合物は阻害効果を呈した。

(iii) *in vitro*評価系を用いた網羅的抗HIV活性の評価

5化合物のプール検体による一次スクリーニングでは、4240プールのうち368プール（8.6%）で30%以上の増殖抑制効果、かつ細胞毒性陰性が観察された。また全体の5.4%に相当する229混合化合物に有意の細胞毒性が見られた（図4）。二次スクリーニングでは、全21,000化合物のうち115化合物が50%以上の増殖抑制効果（IC₅₀=1μM以下）を示し、これらの化合物では細胞毒性も認められなかった（図5）。尚、二次スクリーニングで細胞毒性が観察された化合物は、全体の1.17%であった（図5）。これらのヒット化合物は、その化学構造からA、B、C並びにその他の4つのグループに分類され、0.005μM以下のIC₅₀値を示す化合物も見られた（図6）。

■D. 考察

現在開発を進めている候補化合物はインテグラーゼ阻害剤探索の過程で見出されたものであり、類縁化合物には実際にインテグラーゼ阻害活性を示す化合物が同定されている。このことから見ても候補化合物の作用点がHIV増殖過程前期にあり、且つ様々な解析の結果がインテグラーゼと重なってくること

表1 HSA添加および非添加におけるIC₅₀の分布

IC ₅₀ (nM)	テスト化合物数	
	HSA(-)	HSA(+)
<0.1	3	0
≥0.1~<1	18	7
≥1~<10	33	19
≥10~<100	15	25
≥100~<1000	5	16
≥1000~<5000	6	3
≥5000	0	4

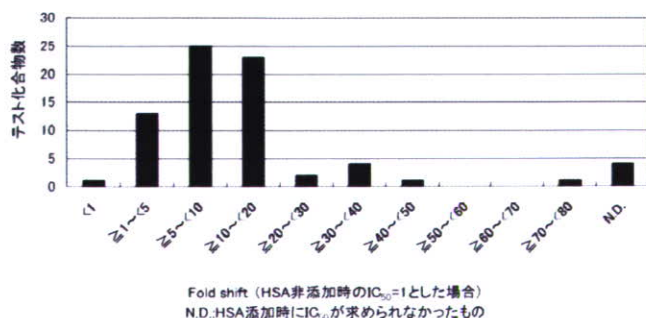


図3 HSA添加によるIC₅₀の増加 (fold shift)

表2 HSA添加によるIC₅₀の増加

fold shift (IC ₅₀)	テスト化合物数
<1	1
≥1~<5	13
≥5~<10	25
≥10~<20	23
≥20~<30	2
≥30~<40	4
≥40~<50	1
≥50~<60	0
≥60~<70	0
≥70~<80	1
N.D.	4

T/C (%)	No. (%) of hit compounds
< 50	162 (3.8)
< 60	238 (5.6)
< 70	368 (8.6)
cytotoxicity	229 (5.4)
total	597 (14.1)

図4 低分子化合物ライブラリー 1次スクリーニング結果 (5化合物プール)

は納得のできる結果である。まだピンポイントで標的が同定できていないが、次年度以降の詳細な解析により特定可能と期待している。本化合物の実用化の可能性については生体内における薬物動態解析、毒性評価などを進めているが、その一つとしてヒト血清アルブミン (HSA) の候補化合物への影響について評価を行った。その結果、HSA 存在下では5~20倍程度の活性低下が観察されたが、これは既販薬と同程度であり、候補化合物は実用化可能の範疇であることが確認された。

現在の候補化合物の実用化を進める一方で、われわれは改めて低分子化合物ライブラリー約21,000検体の抗 HIV 活性を指標とする探索を行った。これは今までの開発プロセスを見直した際に、多くの化合物が strand transfer assay による絞込みで振り落とされていることが明らかになったため、strand transfer 以外の HIV 阻害活性の可能性を確認することを目的に実施した。その結果、全体の約0.5%にあたる115化合物に抗 HIV 活性が確認された。一般的に、スクリーニングによるヒット化合物を同定する確率が0.1%以下であることを考えると今回のヒット率は有意に高いと思われる。これは探索した低分子化合物ライブラリーが抗微生物薬開発を目的長年積み上

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5 低分子化合物ライブラリー
2次スクリーニング結果 (個別測定)

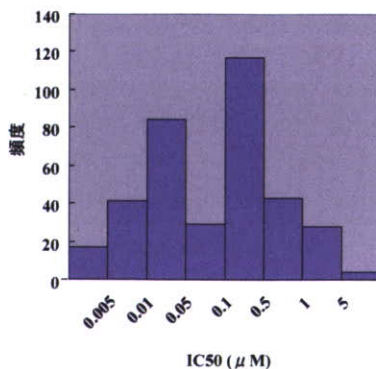


図6 低分子化合物ライブラリー
3次スクリーニング結果 (IC50 値の評価)

げられてきたものであるからと考えられる。

次年度以降、既存の抗 HIV 剤に耐性を示すウイルスを用いてヒット化合物の感受性試験を行い、新規作用機序を有する可能性の高い化合物に対して作用メカニズム解析を進めていくことを計画している。

■ E. 結論

候補化合物のヒト血清アルブミンの影響について評価を行い、実用化が射程に入ることを確認した。候補化合物の作用機序についてはレトロウイルスの複製前期過程であることが明らかになった。抗 HIV 活性を指標にライブラリー探索を行い多数のヒット化合物の同定に成功した。

■ F. 健康危険情報

該当なし

■ G. 研究発表

1. 論文発表

1. H Suzuki, M Fujino, M Matsuda, H Yan, Y Iwatani, W Sugiura.: Effects of Protease and reverse transcriptase inhibitor-resistance mutations on integrase polymorphism in multidrug resistance cases. *Antiviral Therapy*. 12(1):S4, 2007
2. J Shibata, F Ren, M Nishizawa, M Fujino, Y Iwatani, M Matsuda, H Miura, H Tanaka and W Sugiura.: Interference between Gag non-cleavage site mutation P453L and HIV-1 protease non-drug resistance mutation E35D. *Antiviral Therapy*. 12(1):S143, 2007
3. Okuma K, Tanaka R, Ogura T, Ito M, Kumakura S, Yanaka M, Nishizawa M, Sugiura W, Yamamoto N, Tanaka Y.: Interleukin-4-Transgenic hu-PBL-SCID Mice: A Model for the Screening of Antiviral Drugs and Immunotherapeutic Agents against X4 HIV-1 Viruses. *J Infect Dis*. Jan 1;197(1):134-41, 2008
4. Saeng-Aroon S, Yoshida LM, Ariyoshi K, Taguchi M, Pathipvanich P, Rojanawiwat A, Matsuda M, Kannagi M, Sawanpanyalert P, Sugiura W, Auwanit W.: An Efficient Tool for Surveying CRF01_AE HIV Type 1 Resistance in Thailand to Combined Stavudine-Lamivudine-Nevirapine Treatment: Mutagenically Separated PCR Targeting M184I/V. *AIDS Res Hum Retroviruses*. Dec;23(12):1461-8, 2007
5. Satoh E, Li XK, Hara Y, Ogata K, Guo L, Kitazawa Y, Funeshima-Fuji N, Satoh T, Miyagi T, Sugiura W, Yamamoto N, Teramoto K, Arai S, Kimura H.: Sensitization to enhanced green fluorescence protein minor histocompatibility antigen by gene transduction into dendritic cells and peritoneal exudate macrophages. *Transpl Immunol*. Nov;18(2):73-84, 2007

6. Iwatani Y, Chan DS, Wang F, Maynard KS, Sugiura W, Gronenborn AM, Rouzina I, Williams MC, Musier-Forsyth K, Levin JG.: Deaminase-independent inhibition of HIV-1 reverse transcription by APOBEC3G. *Nucleic Acids Res.* 35(21):7096-108, 2007
7. Seiichiro Fujisaki, Saeko Fujisaki, Shiro Ibe, Tsukasa Asagi, Toshihiro Itoh, Shigeru Yoshida, Takao Koike, Masayasu Oie, Makiko Kondo, Kenji Sadamasu, Mami Nagashima, Hiroyuki Gatanaga, Masakazu Matsuda, Mikio Ueda, Aki Masakane, Mami Hata, Yasushi Mizogami, Haruyo Mori, Rumi Minami, Kiyomi Okada, Kanako Watanabe, Takuma Shirasaka, Shinichi Oka, Wataru Suigura and Tsuguhiko Kaneda.: Performance and Quality Assurance of Genotypic Drug-Resistance Testing for Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 60:113-117, 2007
8. Ode H, Matsuyama S, Hata M, Hoshino T, Kakizawa J, Sugiura W.: Mechanism of drug resistance due to N88S in CRF01_AE HIV-1 protease, analyzed by molecular dynamics simulations. *J Med Chem.* 19;50(8):1768-77, 2007
9. Chiba-Mizutani T, Miura H, Matsuda M, Matsuda Z, Yokomaku Y, Miyauchi K, Nishizawa M, Yamamoto N, Sugiura W.: Use of new T-cell-based cell lines expressing two luciferase reporters for accurately evaluating susceptibility to anti-human immunodeficiency virus type 1 drugs. *J Clin Microbiol.* 45(2):477-87, 2007
10. Makiko Hamatake, Masako Nishizawa, Naoki Yamamoto, Shingo Kato, Wataru Sugiura.: A simple competitive RT-PCR assay for quantitation of HIV-1 subtype B and non-BRNA in plasma. *J Virol Methods.* 142:113-7, 2007
11. 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,* 75(1):75-82, 2007
12. K. Furuya, M. Omura, S. Kudo, W. Sugiura, H. Azuma.: Recognition Profiles of microsporidian Encephalitozoon cuniculi polar tube protein 1 with human immunoglobulin M antibodies. *Parasite Immunology.* 30:13-21, 2008
13. Mako Omura, Koji Furuya, Shinichi Kudo, Wataru Sugiura, Hiroshi Azuma.: Detecting Immunoglobulin M Antibodies against Microsporidian Encephalitozoon cuniculi Polar Tubes in Sera from Healthy and Human Immunodeficiency Virus-Infected Persons in Japan. *Clinical and Vaccine Immunology.* 14(2):168-172, 2007
14. 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,* 23(4):564-568, 2007
15. Deforche K, Camacho R, Grossman Z, Silander T, Soares MA, Moreau Y, Shafer RW, Van Laethem K, Carvalho AP, Wynhoven B, Cane P, Snoeck J, Clarke J, Sirivichayakul S, Ariyoshi K, Holguin A, Rudich H, Rodrigues R, Bouzas MB, Cahn P, Brigido LF, Soriano V, Sugiura W, Phanuphak P, Morris L, Weber J, Pillay D, Tanuri A, Harrigan PR, Shapiro JM, Katzenstein DA, Kantor R, Vandamme AM.: Bayesian network analysis of resistance pathways against protease inhibitors. *Infect Genet Evol.* 7(3):382-90, 2007
16. 今井光信、中瀬克己、小島弘敬、加藤真吾、杉浦 互、榎原 健、白阪琢磨：HIV検査および検査体制—技術の進歩と今後の課題—。第20回日本エイズ学会シンポジウム記録。9(3):202-208, 2007
17. 松田昌和、杉浦 互：HIV薬剤耐性検査。モダンメディア別冊53(11):319-322, 2007
18. 西澤雅子、杉浦 互：薬剤耐性HIVの抱える諸問題：Considerable Issues of Drug Resistance. *The Journal of AIDS Research.* 9(3):197-201, 2007
19. 杉浦 互：抗ウイルス薬耐性獲得のメカニズム—HIV。月刊薬事。49(11):31-36, 2007
20. 岩谷靖雅、杉浦 互：DNAマイクロアレイ法。(増刊号)臨床と微生物。34:479-481, 2007
21. 杉浦 互：薬剤耐性化と対策。薬剤耐性化。HIVの耐性化機序。日本臨床65増刊号2.487-492, 2007
22. 杉浦 互：感染症の治療と薬剤耐性。生体防御医学辞典。朝倉書店。66-71, 2007
23. 藤崎誠一郎、藤崎彩恵子、伊部史朗、浅黄 司、伊藤俊広、吉田 繁、小池隆夫、大家正泰、渡邊香奈子、正兼亜季、上田幹夫、湯永博之、松田昌和、貞升健志、長島真美、岡田清美、近藤真規子、奏 真美、溝上泰司、森 治代、南留美、白阪琢磨、岡 慎一、杉浦 互、金田次弘：日本におけるHIV-1遺伝子型薬剤耐性検査のコントロールサーベイ。日本エイズ学会誌(The Journal of AIDS Research). 9(2):136-146, 2007

2. 学会発表

1. H Suzuki, M Fujino, M Matsuda, H Yan, Y Iwatani, W Sugiura: Effects of Protease and reverse transcriptase inhibitor-resistance mutations on integrase polymorphism in multidrug resistance cases. XVI

- International HIV Drug Resistance Workshop. Jun. 12-16, 2007, Barbados, WestIndies.
2. J Shibata, F Ren, M Nishizawa, M Fujino, Y Iwatani, M Matsuda, H Miura, H Tanaka and W Sugiura: Interference between Gag non-cleavage site mutation P453L and HIV-1 protease non-drug resistance mutation E35D. XVI International HIV Drug Resistance Workshop. Jun. 12-16, 2007, Barbados, WestIndies.
 3. J Shibata, F Ren, M Nishizawa, H Tsang, Y Iwatani, M Matsuda, H Miura, H Tanaka, W Sugiura: Gag and Protease Interference Affect Acquisition and Selection of Resistance Viruses in Antiretroviral Treatment Failure Case. 8th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance. Nov. 11-14, 2007, USA.
 4. Wataru Sugiura: Drug Resistance assays. International Conference on Molecular and Cellular Biology of Therapeutics of HIV and Associated Viral Infections. Jan. 12-14, 2007, Hyderabad, India.
 5. 栗原 健、吉野宗宏、佐野俊彦、小島賢一、日笠 聡、杉浦 互、白阪琢磨: 拠点病院における抗HIV療法と薬剤関連アンケート調査結果(第4報)。第21回日本エイズ学会学術集会。2007.11.28-30, 広島
 6. 中里俊文、高村 斉、大出裕高、清水 愛、杉浦 互、星野忠次: L90M変異体に阻害作用をもつ抗HIV薬の設計・合成。第21回日本エイズ学会学術集会。2007.11.28-30, 広島
 7. 羽生勇一郎、山本紀生、日吉真照、黒崎直子、石川晃一、松田昌和、岡田誠治、杉浦 互、山本直樹、高久 洋: shRNA, decoy RNA共発現レンチウィルスベクターによるHIV-1複製阻害効果の検討。第21回日本エイズ学会学術集会。2007.11.28-30, 広島
 8. 田中理恵、栗原 健、杉浦 互、加藤真吾: HPLCによるダルナビルの血中濃度測定法の開発。
 9. 岩谷靖雅、杉浦 互: HIV-1 NCとAPOBEC3Gの逆転写反応への作用。第21回日本エイズ学会学術集会。2007.11.28-30, 広島
 10. 松山 翔、大出裕高、柿澤淳子、杉浦 互、星野忠次: 臨床検体由来Subtype C HIV-1 proteaseの薬剤耐性機構に関する構造化学的研究。第21回日本エイズ学会学術集会。2007.11.28-30, 広島
 11. 柿澤淳子、松山 翔、大出裕高、星野忠次、大高泰靖、岩谷靖雅、西澤雅子、Rajintha Bandaranayake、Celia A Sciffer、杉浦 互: CRF01_AEとサブタイプBのプロテアーゼの構造解析。第21回日本エイズ学会学術集会。2007.11.28-30, 広島
 12. 長谷川直紀、杉浦 互、任 鳳蓉、松田昌和、柴田潤子、田中 博: HARRT下における連続サンプルを用いた経時的なHIVの宿主内進化解析。第21回日本エイズ学会学術集会。2007.11.28-30, 広島
 13. 柴田潤子、任 鳳蓉、西澤雅子、藤野真之、松田昌和、岩谷靖雅、杉浦 互、田中 博: 抗HIV薬剤投与下におけるproteaseとGagの共進化に関する研究。第21回日本エイズ学会学術集会。2007.11.28-30, 広島
 14. 吉田いづみ、西澤雅子、藤野真之、仲宗根正、岩谷靖雅、長谷川直紀、柴田潤子、杉浦 互、任 鳳蓉、田中 博: HIV-1 env遺伝子の多様性進化。第21回日本エイズ学会学術集会。2007.11.28-30, 広島
 15. 近藤真規子、宮崎裕美、須藤弘二、佐野貴子、倉井華子、相楽裕子、岩室紳也、杉浦 互、武部 豊、今井光信: 日本で流行しているHIV-1サブタイプBのdiversity。第21回日本エイズ学会学術集会。2007.11.28-30, 広島
 16. 藤野真之、三浦秀佳、西澤雅子、松田昌和、鈴木寿子、杉浦 互: プロテアーゼ阻害剤耐性HIV-1株に対するダルナビルの有効性についての解析。第21回日本エイズ学会学術集会。2007.11.28-30, 広島
 17. 杉浦 互、湯永博之、吉田 繁、千葉仁志、小池隆夫、伊藤俊広、原 孝、佐藤武幸、石ヶ坪良明、上田敦久、近藤真紀子、今井光信、貞升健志、長島真美、福武勝幸、山元泰之、田中理恵、加藤真吾、宮崎菜穂子、岩本愛吉、藤野真之、仲宗根正、巽 正志、椎野禎一郎、岡 慎一、林田庸聡、服部純子、伊部史朗、藤崎誠一郎、金田次弘、浜口基洋、上田幹夫、正兼亜季、大家正義、下条文武、田邊嘉也、渡邊香奈子、白阪琢磨、栗原 健、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、松下修三、健山正男、藤田次郎: 2003-2006年の新規HIV-1感染者における薬剤耐性頻度の動向。第21回日本エイズ学会学術集会。2007.11.28-30, 広島

■ H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

該当なし

分担研究課題

Vif機能を標的とした新規治療薬の開発研究



分担研究者
明里 宏文

独立行政法人 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター 室長

現在開発グループにて進行中の低分子化合物ライブラリスクリーニングにより抗HIV阻害活性が確認された化合物について、Vifをターゲットとした化合物を抽出するためには、Vif機能に関わる分子機構を考慮した最適なスクリーニング法を選択する必要がある。我々は、これまでの研究において、Vif蛋白が感染性HIV-1粒子に一定量取り込まれGag前駆体の第一切断部位(p2/NC)におけるプロセッシングを特異的に制御することでGag中間体(Gag^{p33-INT})を形成することを明らかにした。そこで本研究ではHIV-1ライフサイクルにおけるその機能的意義について検討を行なった結果、v-Vifの存在下で形成される生理的レベルのGag^{p33-INT}がPBMC由来HIV-1の感染性を有意に増強することを新たに見出した。この知見は新規な機序による抗HIV薬剤開発において有用な情報と考えられた。

■ A. 研究目的

HIV感染症の克服を目指し、これまで逆転写酵素阻害剤を始めとする複数の抗HIV薬剤が開発され、これらを組み合わせたHighly active antiretroviral therapy (HAART)を行なうことでHIV感染症は不治の病では無くなりつつある。しかし既存薬剤に対して耐性を有するウイルスが出現・伝播しつつあり、今後のHIV感染者治療において大きな課題となっている。既存の抗HIV薬剤に対する薬剤耐性を克服するためには、新規な阻害機序による抗HIV薬剤開発が必要であることから、本研究ではエイズウイルス複製に必須であるVif蛋白を標的とした薬剤開発を念頭に、その基盤研究を行なうことを目的とする。

現在開発グループにて進行中の低分子化合物ライブラリスクリーニングにより抗HIV阻害活性が確認された化合物について、Vifをターゲットとした化合物を抽出するためには、Vif機能に関わる分子機構を考慮した最適なスクリーニング法を選択する必要がある。

Apobec3G/3Fは生体内におけるHIV標的細胞であるCD4陽性T細胞で発現しウイルス粒子に取り込まれることで抗HIV作用を有しており、Vif蛋白はこのApobec3G/3F粒子取り込みを阻害することでHIV-1感染性を維持する。一方Vif蛋白は感染性HIV-1粒子に一定量取り込まれることが知られているが、その機能的意義は不明であった。我々はHIV-1粒子内

Vif蛋白(v-Vif)に着目しこれまで解析を行ない、v-VifがGag前駆体の第一切断部位(p2/NC)におけるプロセッシングを特異的に制御することでGag中間体(Gag^{p33-INT})を形成すること、過剰量のGag^{p33-INT}により未成熟型の非感染性HIV-1を産生することを見出した。そこで本研究では、HIV-1ライフサイクルにおけるv-Vifの意義について解析を行なった結果、この生理的レベルのGag^{p33-INT}がHIV-1感染性を有意に増強することを新たに見出した。この知見は新規な機序による抗HIV薬剤開発において有用な情報と考えられた。

■ B. 研究方法

HIV-1 Vif欠失変異体pNL43Vif(-)およびGag p2/NC cleavage欠失変異体pNL43-CA2を基に、HIV-1 VifとGag p2/NC cleavage両機能の欠失変異体pNL43-CA2.Vif(-)を構築した。これらを種々の割合でH9細胞及びJurkat細胞にエレクトロポレーション法により遺伝子導入し、得られたウイルスをインジケータ細胞であるLuSIV細胞へ感染させ、24時間後のルシフェラーゼ活性を測定することによりウイルス感染性を解析した。同時に遺伝子導入した細胞におけるウイルス蛋白の発現をウエスタンブロット法により解析した。ヒトPBMCにおけるv-Vif効果解析に当たっては、(a)pNL43-vif(-)及びVSV-G発現ベクターpVSV-G、(b)HIV-1パッケージングベクターC-Help,

pNL43-CA2.vif(-)及びVSV-G発現ベクターpVSV-G、をそれぞれHeLa細胞に遺伝子導入し、得られたウイルスを種々の割合でPHA活性化ヒトPBMCに感染させた。感染36時間後に培養上清を回収し、これに含まれるウイルスをLuSIV細胞へ感染させウイルス感染性を解析した。

■C. 研究結果

ウイルス粒子内Vif (v-Vif) は至適量以上の取り込みにおいて、用量依存性にGag p2/NCプロセ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)。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感染性が保たれるためには細胞内Vif蛋白のsteady-state levelは最適量を維持するため厳密に制御されなければならない。ところで、感染性HIV-1粒子を解析すると少ないながらもほぼ一定量のVif蛋白が存在する (Kao and Akari et al., J Virol 2003)。従って、v-VifにはHIV-1ライフサイクルにおいて何らかの生理的意義があることが予想される。

我々はこれまでHIV-1粒子内Vif蛋白 (v-Vif) に

着目し解析を行なって来た。その結果、v-Vifがウイルス粒子コア内に特異的に取り込まれ、Gag前駆体の第一切断部位 (p2/NC) におけるプロセシングを特異的に制御することでGag中間体 (Gag^{p33-INT}) を形成すること、また過剰量のGag^{p33-INT}により未成熟型の非感染性HIV-1を生じることを見出した。このことから、v-VifにHIV-1ライフサイクルにおいて何らかの生理的意義があるとすれば、v-VifそのものもしくはGag^{p33-INT}がコア構造や機能等に影響していると推定される。そこで我々はGag^{p33-INT}に機能的意義があるとの仮説に基づき以下の解析を行なった。

これまでの予備的検討で、Gag p2/NC cleavage 欠失変異体pNL43-CA2由来ウイルスでは、過剰量v-Vifと同様にGag^{p33-INT}を形成することが確認されている (Fig.1A, B)。そこで、pNL43-Vif(-)およびpNL43-CA2.Vif(-)を種々の割合でH9細胞及びJurkat細胞にエレクトロポレーション法により遺伝子導入することにより、Vif非存在下で少量のGag^{p33-INT}を有するHIV粒子を得た。このウイルス粒子中には予想通りpNL43-Vif(-)に対するpNL43-CA2.Vif(-)比が高い場合においてGag^{p33-INT}が検出された。このウイルスをインジケータ細胞であるLuSIV細胞へ感染させ、24時間後のルシフェラーゼ活性を測定することによりウイルス感染性を解析したところ、Vif依存性細胞で

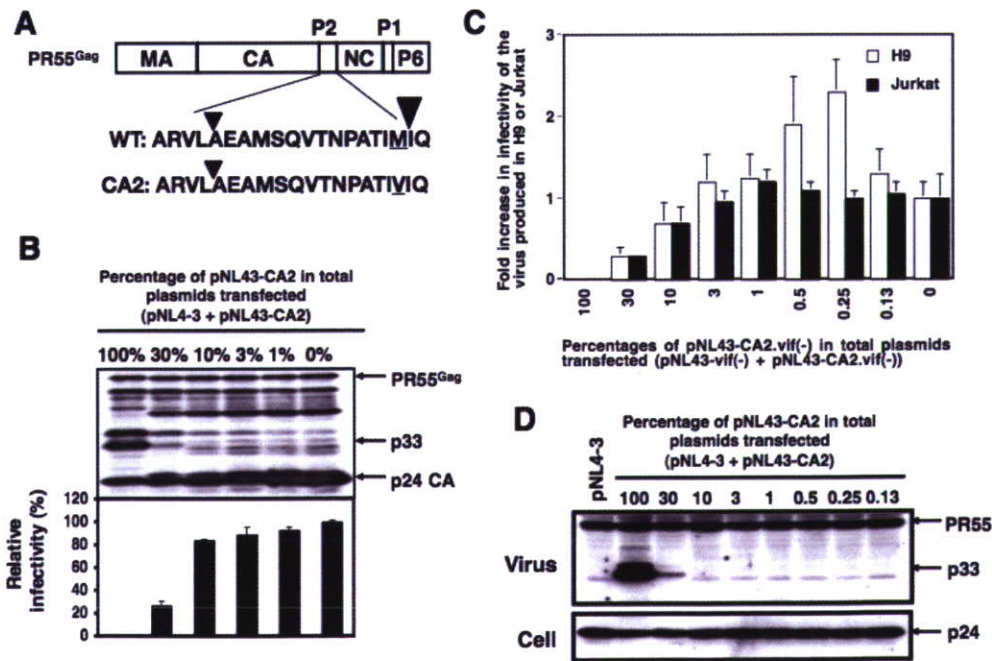


Fig. 1. The p33 Gag^{p33-INT} augmented the infectivity of Vif-defective HIV-1 produced in H9 cells.

あるH9細胞において、pNL43-Vif(-)に対するpNL43-CA2.Vif(-)比が0.5-0.25%で得られたウイルスにおいて、pNL43Vif(-)由来ウイルスと比較して2~3倍の感染性上昇効果が認められた。この現象はVif非依存性細胞であるJurkat細胞では見られなかった(Fig.1C, D)。この結果より、pNL43-CA2.Vif(-)により形成されるGag^{p33-INT}はごく低レベルでウイルス感染性を増強すること、この現象は細胞依存性を示すことが示唆された。

次に、この現象がHIV-1自然宿主細胞であるPBMCにおいても見られるかどうかを検討した。H9細胞と異なり、PBMCへのコトランスフェクションにより解析に必要な量のウイルスを得ることは困難であることから、まずHeLa細胞にてNL43-Vif(-)ウイルス (a) およびpNL43-CA2.Vif(-)由来ウイルスゲノム導入用ベクターウイルス (b) を作成し、これを種々の割合で正常人由来活性化PBMCに感染させることにより、36時間後にPBMCからVif非存在で少量のGag^{p33-INT}を含むHIV-1粒子を得た (Fig.2 左)。このウイルスについてLuSIV細胞にて感染性を評価したところ、ドナー1由来PBMCにおいてベクターウイルス a:b比が1 : 60において5倍以上の感染性増強効果が認められた。またドナー2由来PBMCにおいてベクターウイルス a:b比が1 : 240、1 : 480において3倍以上の感染性増強効果が認められた (Fig. 2 右)。以上の結果を総合すると、v-VifはGag^{p33-INT}を

形成することによりH9細胞やPBMCにおけるHIV-1感染性を増強することが初めて明らかとなった。

D. 考察

本研究では、HIV-1ライフサイクルにおけるv-Vifの意義について解析を行ない、v-Vifが形成誘導する生理的レベルのGag^{p33-INT}がHIV-1感染性を有意に増強することを新たに見出した。従って、Vifは本作用と抗apobec作用の両方によってHIV-1感染性増強に寄与していると考えられた。この知見は単に新規Vif機能を見出したという面のみならず、Vif機能を標的とした新規な機序による抗HIV薬剤開発において、その評価すべき作用点を明確に出来た点で重要な知見であると考えられた。

興味深いことに、この現象はVif非依存性細胞であるJurkat細胞では見られなかったことから、何らかの宿主因子の関与が示唆される。またGag^{p33-INT}による感染性増強効果を用いるPBMC由来ドナーによりその至適条件が異なったことは、前述の宿主因子の発現量に個人差があることを示している。この宿主因子の作用機序としては、Gag等の構造蛋白に結合する形でウイルス粒子に取り込まれた宿主因子がGag^{p33-INT}と共にコア内において感染初期過程に寄与する可能性が考えられる。この点に関してはさらに詳細な解析が必要であろう。

昨年までの我々のVif変異体解析研究において、

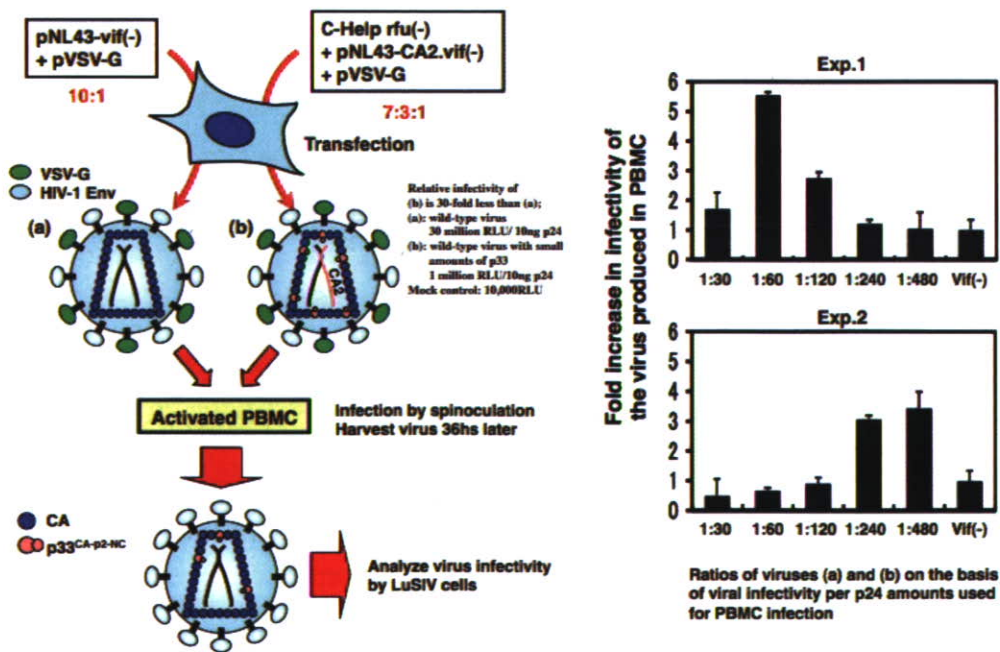


Fig. 2. The p33 Gag^{p33-INT} augmented the infectivity of Vif-defective HIV-1 produced in activated PBMCs.

Vif N 末端側 Trp11 および Gln12 が Gag^{p33-INT} 形成を規定する領域であることを既に明らかにしている（投稿準備中）。すなわち、W11Q12 ドメインは上記の新規感染性増強作用の規程領域であることと考えられる。この領域は、pol における integrase 遺伝子領域と重複（1 frame-shift）していること、および各種 HIV-1 サブタイプ間で非常に良く保存されていることから、今回新たに見出された Vif 機能は、HIV-1 の本質的かつ重要な役割を担っていることが示唆される。なおこの領域は apobec family の一つである apobec3F の Vif への結合領域の近傍であることから、抗 apobec3F 作用へ関与している可能性も否定できないため、今後の検討課題としたい。

今後は、現在開発グループにて進行中の低分子化合物ライブラリスクリーニングにより抗 HIV 阻害活性が確認された化合物について Vif をターゲットとしたスクリーニングを実施し、Vif 機能を阻害していると想定される化合物を得ると共に、その化合物の抗 Vif 作用機序について今回得られた新機能を含め同定していきたい。

■ E. 結論

現在開発グループにて進行中の低分子化合物ライブラリスクリーニングにより抗 HIV 阻害活性が確認された化合物について、Vif をターゲットとした化合物を抽出するためには、Vif 機能に関わる分子機構を考慮した最適なスクリーニング法を選択する必要がある。そこで本研究では、HIV-1 ライフサイクルにおける v-Vif の意義について解析を行なった結果、v-Vif の存在下で形成される生理的レベルの Gag^{p33-INT} が HIV-1 感染性を有意に増強することを新たに見出した。この知見は新規な機序による抗 HIV 薬剤開発において有用な情報と考えられた。

■ F. 健康危険情報

特になし

■ G. 研究発表

1. 論文発表

Hiyoshi M, Suzu S, Yoshidomi Y, Hassan R, Harada H, Sakashita N, Akari H, Motoyoshi K, Okada S: Interaction between Hck and HIV-1 Nef negatively regulates cell surface expression of M-CSF receptor. *Blood*, Sep 24 Epub, 2007.

2. 学会発表

1. 飯島沙幸、李永仲、明里宏文：HIV Nef N 末端の tryptophan-based motif は AP-1A の mu subunit との相互作用を介して MHC-I 発現を抑制する。第 55 回日本ウイルス学会学術集会、平成 19 年

11 月

2. 明里宏文、李永仲、飯島沙幸、アブドアルキン：HIV-1 粒子内 Vif 蛋白の生理的機能に関する解析。第 21 回日本エイズ学会学術集会、平成 19 年 11 月

■ H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

特になし

分担研究課題

抗HIVタンパク質アクチノヒビンの高活性化と抗HIV/AIDS薬としての開発研究



分担研究者

田中 晴雄

いわき明星大学薬学部 教授

HIV gp120の糖鎖はHIVの感染を予防するレクチンのターゲットとして注目されている。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、分子内に3つの糖鎖結合ポケットを持つレクチンである。AHは、その3つのポケットにgp120の3本の高マンノース型糖鎖と結合した場合にのみ、HIVの細胞への接着・侵入を低濃度 (IC₅₀ = 2 - 110 nM) で阻止することから、同様の作用を持つシアノピリン-Nよりはるかに選択性において優れている。AHの抗HIV活性はgp120上の糖鎖数に依存する傾向が見られ、低糖鎖数株 (AH非感受性株) に対する活性は弱い。AHを2量体とすることで、非感受性株を克服することに成功した。

AHをHIV/AIDS感染予防薬として開発するため、(1) 大量生産系の確立を検討した。これまでAH変異体は大腸菌を用いて生産していたが、試料にLPSが混入する恐れがあることから酵母での生産系を確立した。また、(2) AH及びAH変異体の安全性試験を行った。代表的なレクチンであるコンカナバリンA、フィトヘマグルチニン及びHIV感染予防薬として開発が進められているシアノピリン-Nでは強いマイトジェン活性が認められたが、AHでは高濃度でも見られないことを確認した。また、ウサギの膣に対する安全性を調べた結果、1.0mg/mlでも炎症効果などの副作用は認められなかった。(3) AHを血中投与可能なHIV/AIDS治療薬として開発するため、免疫原性の低下を目的としてポリエチレングリコール (PEG) 化を試みた。合胞体形成阻害活性を測定した結果、活性を保持したPEG-AH (AHの1/2の活性を有する) が得られた。

■ 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、逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤耐性株を含む臨床分離HIV株に対して、強い抗HIV活性を示すことが明らかになっている (表1)。

AHは114アミノ酸残基で構成されるマンノース結合レクチンの一種であり、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 (糖鎖結合ポケット) を持つ。AHの立体構造は、3つの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ことを示す (図1)。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 (図2)。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、AH 1分子

あたり gp120 上の高マンノース型糖鎖3本を捕らえることで (図1)、いわゆるレクチンのクラスター効果が働き、gp120への親和性が相乗的に高まることにより、強力な抗HIV活性を示すと考えられている。このように、AHはgp120のように多数の高マンノース型糖鎖を持つ糖タンパク質のみに作用することからgp120に対する選択性が非常に優れており、副作用の少ない薬剤としての開発が期待される。さらに、HIV感染予防薬として期待されているシアノピリン-Nは高マンノース型糖鎖1本のみでも強い親和性を示すことから考えても、シアノピリン-NよりAHの方が選択性においてはるかに優れているといえる。

AHの抗HIV活性は、gp120上の糖鎖数に依存する傾向が見られ、低糖鎖数株 (AH非感受性株) に対するAHの抗HIV活性は弱い (表1)、AHを2量体 (His-TEV-AH dimer/RTB-L、図3) とすることにより、抗HIV活性を2~20倍上昇させ、AH非感受性株 (1株の例外を除いて) を克服することに成功し

1 ASVTIRNAQTORLLDSNYHGNVITLPANGGNYQRWTGP 38 segment 1
 39 GDGTVRNAQTGRCLDSNYDGA VITLPCNGGSYQKMLFY 76 segment 2
 77 SNGYIQHVETGRVLDSDNYHGNVITLPANGGNYQKWITG 114 segment 3

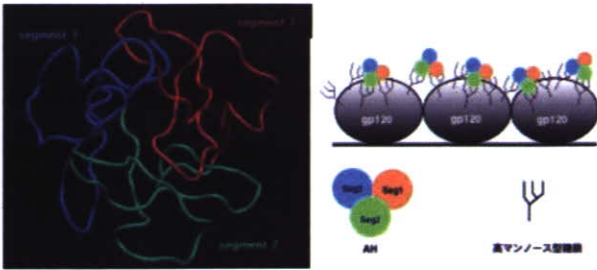


図1 AHのアミノ酸配列、推定構造及び HIV gp120との結合様式

表1 様々な臨床分離株に対するAHの抗HIV活性

laboratory strain	IC ₅₀ (μM)
NL432	0.064
NL432	0.067
BaL	0.035
IIIB	0.026

Table 2. Against clinical isolates

subtype	ACC No	Resistant	IC ₅₀ (μM)	fold resistance
B	158	RTI/NNRTI/PI	<0.01	<0.16
	182	NNRTI/PI	0.068	1.09
	242	RTI/NNRTI/PI	0.7	10.9
	307	sensitive	0.84	13.1
	37	NNRTI	>10	>161
AE	251	RTI /PI	0.028	0.45
	214	sensitive	0.056	0.87
	36	sensitive	>10	>161

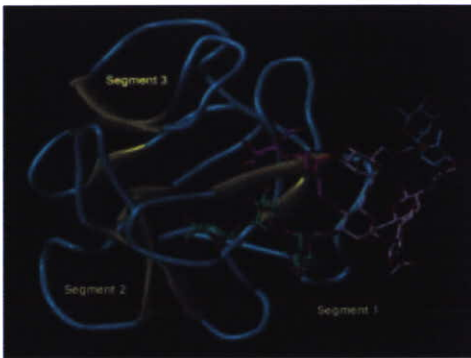
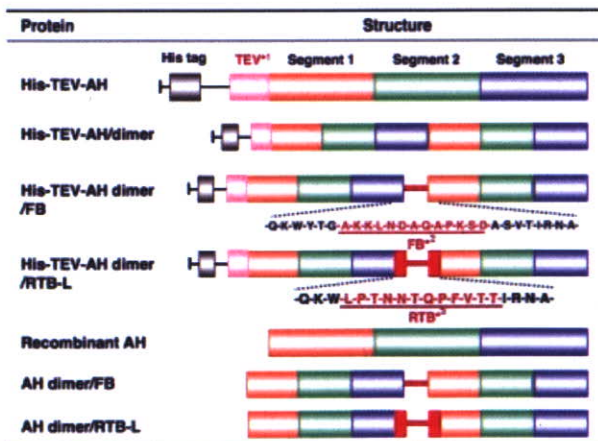


図2 AHと高マンノース型糖鎖とのドッキングモデル

Table 3. Anti-HIV activities and number of sugar chains

subtype	ACC No	IC ₅₀ (μM)	fold resistance	number of N-gly 6785-7745(gp120)
B	37	>10	>161	14
B	307	0.84	13.1	15
AE	36	>10	>161	16
B	BaL	0.035	-	17
AE	214	0.056	0.87	17
AE	251	0.028	0.45	17
B	NL	0.064	-	18
B	IIIB	0.026	-	18
B	182	0.068	1.09	18
B	242	0.7	10.9	19
B	158	<0.01	<0.16	20



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

図3 AH及び種々のAH変異体の模式図