

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

ランダムアプローチによるエイズおよび
エイズ関連疾患に対する新規治療標的の
網羅的探索および新規治療薬開発

- I. 平成20年度 総括・分担研究報告書
- II. 平成18年度～20年度 総合研究報告書

研究代表者

武 部 豊

平成21（2009）年3月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

ランダムアプローチによるエイズおよび
エイズ関連疾患に対する新規治療標的の
網羅的探索および新規治療薬開発

II. 平成18年度～20年度 総合研究報告書

研究代表者

武 部 豊

平成21（2009）年3月

厚生科学研究費補助金総合研究報告書目次

I. 総合研究報告書	研究代表者：武部 豊	
	ランダムアプローチによるエイズおよびエイズ関連疾患に 対する新規治療標的の網羅的探索および新規治療薬開発	1 - 7
II. 研究成果の刊行に関する一覧表		9 - 12
III. 別刷（抜粋）		13 - 110

I. 総合研究報告書

ランダムアプローチによるエイズおよびエイズ関連疾患
に対する新規治療標的の網羅的探索および新規治療薬開発

研究分担者：武部 豊（国立感染症研究所エイズ研究センター・室長）
駒野 淳（国立感染症研究所エイズ研究センター・主任研究官）
村上 努（国立感染症研究所エイズ研究センター・室長）
山越 智（国立感染症研究所生物活性物質部・主任研究官）
森川裕子（（社）北里生命化学研究所・教授）
高橋信弘（東京農工大学農学部応用生物科学科・教授）
岡田誠治（熊本大学エイズ学研究センター・教授）
程 久美子（東京大学大学院理学系研究科・准教授）
菅 裕明（東大先端科学技術研究センター・教授）
広野 修一（北里大薬学部・教授）

研究要旨

多剤併用療法 (HAART) はエイズ治療に多大の福音をもたらしているが、副作用による治療中断や薬剤耐性ウイルスの出現の問題に加えて、エイズに関連する HCV や EBV などのウイルス感染症による肝疾患や悪性リンパ腫に対する治療が大きな問題になりつつある。そこで、われわれは、エイズおよびエイズ関連ウイルス感染症 (HCV および EBV) に対する治療薬シーズ・新規治療標的の探索、新規の薬剤スクリーニング・創薬技術開発を目指して研究を進め、次に示すような研究成果を得た。

1) JFH-1 株を用いた HCVcc assay による化合物ライブラリーのスクリーニングによって、このクラスはじめて (first-in-class) と考えられる 2 種の低分子性 HCV エントリー阻害剤 A, B を同定した。また、既知の生物活性物質の focused screen の結果、低 nM 濃度の EC50 をもつ強力な抗ウイルス活性 (抗 HIV-1, 抗 HCV 活性双方) を示す糖鎖結合タンパク質 N02, N03 を同定した。N02, N03 はウイルスエンベロープタンパク質に豊富に見いだされ、動物細胞にはほとんど存在しない高マンノース型 N-グリカンに対する結合タンパク質で、ウイルスの標的細胞表面への吸着過程を阻害する活性をもつ (武部班員)。2) 合胞体形成阻害を指標とする抗 HIV-1 アッセイの結果、IC50 = ~100 nM の HIV-1 阻害剤 (3G11) を同定した。3G11 はウイルス感染初期過程を標的にしているが、逆転写酵素、インテグラーゼ、RNaseH 活性を阻害しない (駒野班員)。3) HIV-1 マトリックスタンパク質の細胞導入型部分ペプチドを合成し、その中に抗 HIV-1 活性を示すものを見いだした (村上班員)。4) 酵母 CytoTrap two hybrid 法を利用して Gag-Gag 相互作用阻害剤の探索のためのスクリーニング系を確立し、ヒット化合物 (172A6) を同定した。172A6 は Gag タンパク質の細胞内輸送は阻害しないが、濃度依存的に粒子産生を阻害し、また試験管内アッセイ反応をわずかに阻害する (森川班員)。4) エイズ関連悪性リンパ腫の原因となる EBV の EBNA1 タンパク質およびカボジ肉腫・非ホジキン肉腫の原因である HHV-8 LANA タンパク質の DNA 結合を利用した高感度の in vitro ELISA 系を確立し、DNA intercalator としての性質をもついくつかの阻害剤候補 (Ethiomycin および Nogalamycin) を同定した。(山越班員)。10) Nef 活性化誘導型細胞株 (TF-1-fms-Nef) を用いたバイオアッセイによる Nef 阻害剤探索のためのスクリーニング系を開発し、阻害活性物質 2C を同定した。2C は Nef タンパク質と Hck への結合を阻害することで、Nef 機能を阻害する (岡田班員)。6) プロテオミクス的手法を用いて宿主細胞で Rev が関わり得るタンパク質間ネットワークを明らかにし、その結果に基づき、Rev が標的とする宿主タンパク質間相互作用を特定し、新たな抗 HIV-1 治療標的の可能性を示した (高橋班員)。7) HIV-1 および HCV に代表される高度の遺伝的多様性をもつ病原体ゲノムに対する至適 siRNA 設計のためのアルゴリズムを開発し、siVirus (<http://siVirus.RNAi.jp/>) という Web サーバーを構築し、公開した。これを用いて HIV-1 および HCV ゲノム上の高度保存領域に対する siRNA を設計し、その細胞培養系での有効性を検証した (菅班員)。8) 独自に開発した RaPID ディスプレー法を用いて、 10^{12} を超える多様性をもつ特殊環状ペプチドライブラリーを構築し、CD81 GST-LEL-biotin ドメインに対して結合能をもつ特殊環状ペプチドの探索システムを確立した (菅班員)。9) 独自に開発した特殊ペプチド合成法 (RaPID システム) を用いて、新規標的に対する阻害剤探索の手法を樹立した (菅班員)。4) HCV 受容体であるヒト CD81 の Long external loop (LEL) の X 線結晶構造に対するドッキング計算の結果、3 箇所の結合サイトを同定し、そのうち 1 カ所が、先に本研究班で同定されたヒット化合物が結合することを、独立に再確認した (広野班員)。

本研究によって同定されたヒット化合物は、これまでと作用機序の異なる抗 HIV-1/抗 HCV 薬のリードとして期待される。

A. 研究目的

多剤併用療法 (HAART) が導入されて以来、我が国を含む先進工業国においては、エイズ死亡率が激減し、エイズ患者の予後の画期的な改善を見ている。しかし、副作用による治療中断や薬剤耐性ウイルスの出現は依然治療上の大きな問題である。従って多剤併用療法が確立した現在においても新しいエイズ治療薬の開発に向けた不断の研究努力が必要である。

一方、HAART によりエイズ患者の予後が大幅に改善された結果、エイズに関連する HCV や EBV などのウイルス感染症による重篤な肝疾患や悪性リンパ腫による死亡率が高まっている。HCV や悪性リンパ腫に対する治療の選択肢は限られており、安全で且つ有効性の高い治療薬の開発が待ち望まれている。

そこで、われわれは、エイズおよびエイズ関連疾患 (HCV および悪性リンパ腫などの原因となる EBV, HHV-8 感染症) に対する治療薬と新規治療標的の探索・同定に向けて研究を行った。

B. 研究方法

(1) 新規 HIV-1 阻害剤探索のためのスクリーニングおよびスクリーニング系の開発：

低分子ランダム・ケミカル・ライブラリーを用いて、次の述べるいくつかのアッセイ系によって阻害剤探索を進めた。

1) NL432/MT2 細胞 (あるいは C8166 細胞) の系を用いた conventional な cell-based assay による探索。合胞体形成阻害 (駒野班員)、培養上清中の p24 あるいは RT 量測定によるスクリーニング (武部班員)。2) 酵母 CytoTrap two hybrid 法を利用した Gag-Gag 相互作用反応系を用いた阻害剤スクリーニング法を開発 (森川班員)。3) Nef 活性化誘導型細胞株 (TF-1-fms-Nef) を用いたバイオアッセイによる Nef 阻害剤スクリーニング法を開発 (岡田班員)。4) 細胞導入型 MA 部分ペプチドの合成とそれによる抗 HIV-1 活性ペプチドの同定 (村上班員)。

(2) 既得 HIV-1 阻害剤候補の作用機構解析：

1) *in vitro* の酵素反応系 (逆転写酵素、インテグラーゼ、RNase H 活性) に対する阻害効果の測定 (駒野班員)。2) 細胞内 Gag タンパク質を Western blot で解析または試験管内 CA アッセンブリー反応への阻害効果の評価 (森川班員)。4) GST-Nef タンパク質との pull down による Hck, M-CSF 受容体タンパク質との結合阻害を指標とした 2 次スクリーニング系を樹立し、ヒット化合物の作用機構を解析 (岡田班員)。

(3) 抗 HCV 阻害剤探索・評価：

JFH-1 HCV cell-culture (HCVcc) assay を用い、各種化合物ライブラリーをスクリーニング。また既存の生物活性物質の focused screen による HCV 阻害剤探索。

HCV レプリコン・アッセイ、Time of addition 実験、HCV pseudoparticle (HCVpp) アッセイによって、その作用機能を解析した。また

HCV/HIV dual inhibitor の可能性を HIV-1 replication assay によって検討した (武部班員)。

(3) 抗 EBV 阻害剤探索：

EBV EBNA-1, HHV-8 LANA タンパク質の DNA 結合能を利用した高感度の *in vitro* ELISA 系を確立し、低分子化合物・天然物ライブラリーを用いて、阻害剤スクリーニングを行った (山越班員)。

(4) プロテオミックスの手法を用いた新規治療標的の探索：

Rev を釣り餌 Bait として相互作用するタンパク質をプルダウン法により回収し、それを質量分析によって同定し、さらに Mascot 検索、既存情報を加えた Osprey 解析によって rev 相互作用タンパク質ネットワークを解明した (高橋班員)。

(5) 高いゲノム多様性をもつウイルスゲノムを標的とする至適 siRNA 設計とその評価：

HIV-1, HCV に代表される遺伝学的多様性の高い病原体ゲノム中での保存領域に対して有効な siRNA 配列を探索するプログラムを開発し、設計された siRNA の効果評価を行った (程班員)。

(6) 特殊ペプチドライブラリー創製とそれによる阻害剤探索系の開発：

独自に開発された RaPID (Random Peptide Integrated Discovery) システムを駆使し、翻訳系を用いて特殊ペプチドライブラリーを構築した。RaPID システムは、Flexizyme (tRNA アミノアシル化 RNA 触媒) を用いて、普遍暗号表を改変し、特殊アミノ酸に対応させた暗号表を基に特殊ペプチドを合成する手法である。このようにして創製した特殊ペプチドライブラリーを用いて、CD81 LEL に対する結合能をもつペプチド探索の系の確立を行った (菅班員)。

(7) *in silico* 創薬技術に基づく抗ウイルス (HCV) 剤探索：

CD81 LEL のアポ体 X 線結晶構造に対して疎水性サイト探索プログラム (HBOP) を用いてリガンド結合サイト候補を探索。Glide (Schrodinger 社) を用いて、タンパク質の柔軟性も考慮する induced fit モードで精密ドッキング計算を行い、スコアの良い上位化合物を選択した (広野班員)。

(倫理面への配慮)

該当事項なし

C. 研究結果

(1) 抗 HIV 阻害剤探索と作用機序の解明：

1) 合胞体形成阻害を指標として、2 万種の化合物ライブラリーから見いだされた抗 HIV-1 ヒット化合物 (3G11) (IC₅₀=0.1 μM) を同定した。3G11 はウイルス感染初期過程に作用するが、逆転写酵素、インテグラーゼ、RNase H 活性は阻害しない (駒野班員)。

2) 酵母 CytoTrap two hybrid 法を利用した Gag-Gag 相互作用反応系を用いたスクリーニングによって化合物 172A6 などを同定した。172A6 は細胞培養系で HIV-1 増殖阻害効果を示した (IC₅₀=25-50 μM)。172A6 は Gag タンパク

質の細胞内輸送は阻害しないが、濃度依存的に粒子産生を阻害し、また試験管内アッセムブリ反応をわずかに阻害する(森川班員)。

3) Nef 活性化誘導型細胞株 (TF-1-fms-Nef) を用いたバイオアッセイによるスクリーニングによって阻害活性物質 2C を同定した。GST-Nef タンパク質を用いた pull-down assay によって Nef タンパク質の Hck に対する結合阻害活性をもつことを確認した(岡田班員)。

4) 細胞導入型 MA 部分ペプチドの中で、3 番目の 15-mer が EC50=3.5 μ M の抗ウイルス活性を示した(村上班員)。

(2) HCV 阻害剤探索 :

1) 多様性指向 低分子ランダム化合物ライブラリー (n=8,000) を用いた HCVcc assay に基づくスクリーニングの結果得られた 5 種の化合物の中に、HCV エントリー阻害剤候補 (A, A0, B) を見いだした。A, A0 は類縁構造をもつが、B 共に既知のいかなる HCV 阻害剤と構造的類似性を持たない。A, B はともに HCV pseudoparticle の感染を阻害することからエントリー阻害剤であることが確認された(武部班員)。

A, A0 は HCV エントリー受容体 CD81 の Long external loop (LEL) と相互作用をもつことが molecular dynamics simulation によって明らかになった(武部班員)。この結果は広野班員による独立の解析によっても追認された(後述)。しかし、両者の相互作用に関する直接の証明はまだ得られていない。

2) 既知の生物活性物質に関する focused screen の結果、高マンノース型糖鎖に対する結合タンパク質 N02, N03 が HCV, HIV-1 双方に対して強い抗ウイルス作用をもつことを明らかにした。抗ウイルス活性 (EC50) はそれぞれ、HCV に対して、16.9 nM (SI=1,400), 1.8 nM (SI=90,000); HIV-1 に対しては 0.3 nM, 0.04 nM であった。特に N03 の抗 HCV/HIV-1 活性は、これまでに見いだされた抗ウイルス性物質の中で最も強力なものである。N02, N03 の抗ウイルス活性はいずれもウイルスの標的細胞表面への吸着阻害による(武部班員)。

3) 抗 EBV 阻害剤探索のためのスクリーニング系の樹立とその同定 :

EBNA-1 と oriP EBS (EBNA1 結合配列) DNA との結合アッセイ (in vitro ELISA) を構築し、種々の化合物ライブラリーのスクリーニングの結果、ヒット化合物として Ethiomycin および Nogalamycin を見いだした (IC50=2.5 μ M)。いずれも DNA intercalator としての活性をもつ物質であった(山越班員)。

4) プロテオミックスの手法を用いた新規治療標的の探索 :

Rev タンパク質に結合する複合体の構成タンパク質を質量分析-Mascot 検索で解析した結果、既存のタンパク質 3 種 (SF2p32, NPM1, CKII) を含む合計 13 種類のタンパク質を Rev 相互作用タンパク質として同定した。さらに、これらのタンパク質を bait として RNA 依存性、非依存性に相互

作用する複合体を回収し、既存情報を加えた Osprey 解析を行った結果、614 種類のタンパク質 (Nodes) と 778 種類のタンパク質間相互作用ネットワークを明らかにし、新規治療薬標的としての可能性を考察した(高橋班員)。

5) 高いゲノム多様性をもつウイルスゲノムを標的とする至適 siRNA 設計とその評価 : HIV-1, HCV に対する siRNA 設計アルゴリズムを開発し、siVirus (<http://siVirus.RNAi.jp/>) という Web サーバーを構築し、公開した。これによって、HIV-1 および HCV ゲノム上の高度保存領域に対する siRNA を設計し、その細胞培養系での有効性を検証した(程班員)。

6) 特殊ペプチドライブラリー創製とそれによる阻害剤探索系の開発 :

独自に開発された RaPID ディスプレー法を用いて、 10^{12} を超える多様性をもつ特殊環状ペプチドライブラリーを構築し、CD81 GST-LEL-biotin ドメインに対して結合能をもつ特殊環状ペプチドの探索システムを確立した(菅班員)。

7) in silico 創薬技術に基づく抗ウイルス (HCV) 剤探索 :

HBOP 計算の結果、3 カ所の異なる結合サイトを同定した。この中で、HCV エンベロープタンパク質が結合すると推定される領域に最も近いサイトが既得の HCV 阻害活性をもつヒット化合物 A, A0 (武部班員) の結合サイトであることを推定・追認した。またその類縁化合物の抗 HCV 活性と、計算された DGbind の間にある程度の相関関係があることを明らかにした(広野班員)。

D. 考察

(1) 特に HIV/HCV 共感染率が 97% 以上にも達する薬剤エイズ患者では、HAART の普及によってその死亡率が 1996 年以來激減しているが、近年共感染している HCV による肝不全死が死亡原因の半数を占めるようになっており、安全で有効性の高い HCV 治療薬の開発は、エイズ患者治療という視点からも、極めて重要性が高いと考えられる。

(2) 本研究班で同定された新規の HCV 阻害剤は、世界でも類例のない新しいタイプの HCV エントリー阻害剤であり、今後の創薬展開、作用機序の詳細の解明が待たれる。

(3) 様々な原理の抗ウイルス剤スクリーニングによって、いくつかの新しい作用点をもつと考えられるヒット化合物が同定された。しかし、ヒット化合物の多くは高濃度でしか有効でなく、細胞毒性が出現する濃度との差が狭く、最適化あるいはさらなる探索が必要と考えられる。

(2) プロテオミックスの手法を用いたウイルスタンパク質と相互作用をもつ宿主タンパク質を組織的に探索する技術や、特殊ペプチドライブラリーを用いた独自の阻害剤探索技術、また抗ウイルス核酸医薬開発のための基盤的手法の開発が進んだ。今後、具体的な薬剤開発に向けた創薬展開の可能性が期待される。

E. 結論

新規阻害剤アッセイ系の開発と、それによるスクリーニングによって、エイズおよびエイズ関連疾患に対するいくつかのシーズ化合物が同定された。また、特殊ペプチド・ライブラリーを用いた新規の抗ウイルス剤スクリーニング・創薬技術、プロテオミクスを用いた新規治療標的の探索や、抗ウイルス核酸医薬創製のための至適 siRNA 設計に向けた基盤的技術の研究開発が進んだ。

F. 健康危険情報

本研究に関連して、該当事項なし

G. 研究発表 (2006-2008)

1. 論文発表

研究代表者

武部 豊

- 1) Kondo M, Sudo K, Tanaka R, Sano T, Sagara H, Iwamuro S, Takebe Y, Imai M, Kato S. Quantitation of HIV-1 group M proviral DNA using TaqMan MGB real-time PCR. *J Virol Methods*. 2009 Jan 3. [Epub ahead of print]
- 2) Tee KK, Takebe Y, Kamarulzaman A. Emerging and re-emerging viruses in Malaysia, 1997-2007. *Int J Infect Dis*. 2008 Nov 13. [Epub ahead of print]
- 3) Xia X, Lu L, Tee K. K., Zhao W., Wu J., Yu J., Li X., Lin Y., Mukhtar MM., Hagedorn CH., Takebe Y. (2008). The unique HCV genotype distribution and the discovery of a novel subtype 6u among IDUs co-infected with HIV-1 in Yunnan, China. *J. Med Virol*. 80 (7): 1142-52.
- 4) Tee, K. K., Pybus, OG., X-J, Li., Han, X., Shang, H., Kamarulzaman, A., and Takebe, Y. (2008). Temporal and spatial dynamics of human immunodeficiency virus type 1 circulating recombinant forms 08_BC and 07_BC in Asia. *J. Virol* 82: 9206-9215.
- 5) Shimizu, N., Tanaka, A., Mori, T., Ohtsuki, T., Hoque, A., Jinno-Oue, A., Apichartpiyakul, C., Kusagawa, S., Takebe, Y, and Hoshino, H. (2008). A formylpeptide receptor, FPRL1, acts as an efficient coreceptor for primary isolates of human immunodeficiency virus. *Retrovirology* 5: 52
- 6) Xia X, Lu L, Tee KK, Zhao W, Wu J, Yu J, Li X, Lin Y, Mukhtar MM, Hagedorn CH, Takebe Y. (2008). The unique HCV genotype distribution and the discovery of a novel subtype 6u among IDUs co-infected with HIV-1 in Yunnan, China. *J Med Virol*. 2008 Jul;80(7):1142-52.
- 7) Liu P, Xiang K, Tang H, Zhang W, Wang X, Tong X, Takebe Y, Yang R. (2008). Molecular epidemiology of human immunodeficiency

virus type 1 and hepatitis C virus in former blood donors in central China. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2008 Jan;24(1):1-6.

- 8) Louisirothanakul S, Sutthent R, Wasi C, Chuenchitra T, Nitayaphan S, Brown AE, Polonis VR, Nakayama EE, Shioda T, Liu H, Takebe Y. (2008). Host genetic analysis of HIV type 1 subtype CRF01_AE (E)-infected Thai patients with different rates of disease progression. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2007 Dec;23(12):1605-8.
- 9) Tee, K. K., Pybus, OG., Liao, H., Uenishi, R., Hase, S., Kamarulzaman, A., Li, X-J., and Takebe, Y. (2008). Chronology of the HIV-1 CRF07_BC expansion in East-Asia. *AIDS* 22: 156-158, 2008.
- 10) Takebe, Y, Uenishi, R., and Li X-J. (2008). Global molecular epidemiology of HIV: Understanding the genesis of AIDS pandemic. "HIV-1: Molecular biology and pathogenesis" (ed. Kuan Teh Jeang). *Advances in Pharmacology* vol. 56: 1-25, 2008.

和文

- 1) 武部 豊 (2009). エイズワクチンの開発動向: アデノウイルスワクチン国際臨床試験頓挫の波紋とその意味 (特集: 各医療機関における国際共同治験の取り組み) *PHARM STAGE* Vol.8, No.10: 1-6, 2009
- 2) 武部 豊, 上西理恵 (2008). HCV エントリー・粒子形成阻害剤: 新規クラス薬剤スクリーニング. *C型肝炎のすべて・2009 新規治療法*. 肝胆臓 57(5): 1047-1056, 2008.
- 3) 武部 豊. 「エイズワクチン開発の最新動向」 Challenges to AIDS vaccine development 細胞, Sept. 2008.
- 4) 武部 豊, 長谷彩希, 廖 華南, 上西理恵. (2008). アジアにおけるエイズ危機と日本: 危険水域に入った我が国. 感染・炎症・免疫 2008 Vol.38 (3): 182-193, 2008.
- 5) 廖 華南, 長谷彩希, 上西理恵, 武部 豊 (2008). エイズに対する新規治療薬の開発動向. *Pharmastage ファームステージ* 2008年8月号.
- 6) 武部 豊, 山本直樹. 「エイズワクチン (メルク・アデノウイルスワクチン)・トライアルの失敗の意味すること」. 病原微生物検出情報 *Infectious Agents Surveillance Report (IASR)* [http://idsc.nih.go.jp/iasr/index-j.html] June, 2008.
- 7) 上西理恵, 長谷彩希, Liao Huanan, 武部 豊. (2008). C型肝炎ウイルスに対する新規治療薬の開発動向. *PHARM STAGE* Vol.8, No.3: 1-5, 2008.

研究分担者

駒野 淳

- 1) Miyauchi K, *Komano J, Myint L, Futahashi Y, Urano E, Matsuda Z, Chiba T, Miura H, Sugiura W, Yamamoto N. Rapid propagation of low-fitness drug resistant mutants of human immunodeficiency virus type 1 by a streptococcal metabolite sparsomycin. *Antivir Chem Chemother.* 2006;17(4): 167-174.
- 2) Miyauchi K, Curran R, Matthews E, Komano J, Hoshino T, Engelman DM, *Matsuda Z. Mutations of conserved glycine residues within the membrane-spanning domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 can inhibit membrane fusion and incorporation of Env onto virions. *Jpn J Infect Dis.* 2006 Apr;59(2):77-84.
- 3) 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. *AIDS.* 2007 Mar 12;21(5):575-82.
- 4) Futahashi Y, *Komano J, Urano E, Aoki T, Hamatake M, Miyauchi K, Yoshida T, Koyanagi Y, Matsuda Z, Yamamoto N. Separate elements are required for ligand-dependent and -independent internalization of metastatic potentiator CXCR4. *Cancer Sci.* 2007 Mar;98(3):373-9.
- 5) Kameoka M, Kitagawa Y, Utachee P, Jinnapat P, Dhepakson P, Isarangkura-na-ayuthaya P, Tokunaga K, Sato H, Komano J, Yamamoto N, Oguchi S, Natori Y, Ikuta K. Identification of the suppressive factors for human immunodeficiency virus type-1 replication using the siRNA mini-library directed against host cellular genes. *Biochem Biophys Res Commun.* Aug 3; 359(3):729-34, 2007.
- 6) Emiko Urano, Saki Shimizu, Yuko Futahashi, Makiko Hamatake, Yuko Morikawa, Naoko Takahashi, Hidesuke Fukazawa, Naoki Yamamoto, Jun Komano. Cyclin K/CPR4 inhibits primate lentiviral replication by inactivating Tat/P-TEFb-dependent LTR transcription. (in submission)
- 7) Akihiko Ryo, Naomi Tsurutani, Kenji Ohba, Ryuichiro Kimura, Jun Komano, Mayuko Nishi, Hiromi Soeda, Shinichiro Hattori, Kilian Perrem, Mikio Yamamoto, Joh Chiba, Jun-ichi Mimaya, Kazuhisa Yoshimura, Shuzo Matsushita, Mitsuo Honda, Akihiko Yoshimura, Ichiro Aoki, Yuko Morikawa and Naoki Yamamoto. SOCS1 is an inducible host factor during HIV-1 infection and regulates the intracellular trafficking and stability of HIV-1 Gag. (PNAS, in press)

村上 努

- 1) T. Murakami, and N. Yamamoto. (2007) AIDS: How do we overcome this social or biodisaster. *J. Disaster Res.* 2 (2): 71-80.
- 2) Urano, E., T. Aoki, Y. Futahashi, T. Murakami, Y. Morikawa, N. Yamamoto, and J. Komano. Substitution of the myristoylation signal of human immunodeficiency virus type 1 Pr55^{Gag} with the phospholipase C delta 1 pleckstrin homology domain results in infectious pseudovirion production. *J. Gen. Virol.* 89(Pt 12): 4374-4377, 2008.
- 3) Tanaka, T., H. Tsutsumi, W. Nomura, Y. Tanabe, N. Ohashi, A. Esaka, C. Ochiai, J. Sato, K. Itotani, T. Murakami, K. Ohba, N. Yamamoto, N. Fujii, and H. Tamamura. Structure-activity relationship study of CXCR4 antagonists bearing the cyclic pentapeptide scaffold: identification of the new pharmacophore. *Org. Biomol. Chem.* 6:4374-4377, 2008.
- 4) T. Murakami. Roles of the interactions between Env and Gag proteins in the HIV-1 replication cycle? *Microbiol. Immunol.* 52:287-295, 2008.
- 5) 村上 努 HIVの粒子形成のメカニズム— Gag蛋白に関する最新の知見— Confronting HIV2009. In press.

山越 智

- 1) Murakami Y, Yamagoe S, Noguchi K, Takebe Y, Takahashi N, Uehara Y, Fukazawa H. Ets-1-dependent expression of vascular endothelial growth factor receptors is activated by latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus through interaction with Daxx. *J Biol Chem.* 281:28113-28121, 2006.
- 2) Noguchi K, Fukazawa H, Murakami Y, Takahashi N, Yamagoe S, Uehara Y. g-Herpesviruses and cellular signaling in AIDS-associated malignancies. *Cancer Sci.* 98:1288-1296, 2007.

森川 裕子

- 1) S. Sakuragi, J.-I. Sakuragi, Y. Morikawa, & T. Shioda. Development of a rapid and convenient method for the quantitation of HIV-1 budding. *Microbes Infect.* 8: 1875-1881 (2006)
- 2) 森川裕子 酵母を用いた動物ウイルスの研究 *ウイルス* 56: 9-16 (2006)
- 3) Y. Morikawa, T. Goto, D. Yasuoka, F. Momose, & T. Matano. Defect of human immunodeficiency virus type 2 Gag assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Virol.* 81: 9911-9921 (2007)
- 4) F. Momose, Y. Kikuchi, K. Komase, & Y. Morikawa Visualization of microtubule-mediated transport of influenza viral progeny ribonucleoprotein. *Microbes Infect.* 9: 1422-1433 (2007)
- 5) 森川裕子、鶴谷直美 HIVの粒子形成と成熟機構蛋白質核酸酵素 *52: 1181-1186 (2007)*

- 6) A. Ryo, N. Tsurutani, K. Ohba, R. Kimura, J. Komano, M. Nishi, H. Soeda, S. Hattori, K. Perrem, M. Yamamoto, J. Chiba, J. Mimaya, K. Yoshimura, S. Matsushita, M. Honda, A. Yoshimura, T. Sawasaki, I. Aoki, Y. Morikawa, & N. Yamamoto. SOCS1 is an inducible host factor during HIV-1 infection and regulates the intracellular trafficking and stability of HIV-1 Gag. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 294-299 (2008)

高橋 信弘

- 1) Sekiguchi, T., Hayano, T., Yanagida, M., Takahashi, N., Nishimoto, T. (2006) NOP132 is required for proper nucleolus localization of DEAD-box RNA helicase DDX47. *Nucleic Acids Res.* 34(16):4593-4608.
- 2) Oda, T., Hayano, T., Miyaso, H., Takahashi, N., and Yamashita, T. (2007) Hsp90 regulates the Fanconi anemia DNA damage response pathway. *Blood* (in press)
- 3) Takahashi, N., and Isobe, T. (2007) *Proteomic Biology using LC-MS*, Wiley Interscience, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey USA, p1-254.
- 4) Kaji, H., Kamiie, J., Kawakami, H., Kido, K., Yamauchi, Y., Shinkawa, T., Taoka, T., Takahashi, N., and Isobe, T. (2007) Large-scale analysis of N-glycoproteins in *C. elegans* suggests atypical translocation mechanism of type III integral membrane proteins. *Mol. Cell. Proteomics*, in press
- 5) 高橋信弘、藤山沙理、千葉一裕 (2007) アフィニティークロマトグラフィー法、分子間相互作用解析ハンドブック、羊土社、p45-52.

岡田 誠治

- 1) Suzu S., Hiyoshi M, Yoshidomi Y, Harada H, Takeya M, Kimura F, Motoyoshi K, and Okada S.; M-CSF-mediated macrophage differentiation but not proliferation is correlated with increased and prolonged ERK activation. *J Cell Physiol* 212(2): 519-525, 2007
- 2) Hiyoshi M*, Suzu S*, Yoshidomi Y, Hassan R, Harada H, Sakashita N, Akari H, Motoyoshi K, and Okada S.; Interaction between Hck and HIV-1 Nef negatively regulates cell surface expression of M-CSF receptor. *Blood* 111(1): 52-58, 2008 (*Equal contribution)
- 3) Murakami T, Harada H, Suico MA, Shuto T Suzu S., Kai H, and Okada S.; Ephedrae herba, a component of Japanese herbal medicine *Mao-to*, efficiently activates the replication of latent HIV-1 in a monocytic cell line. *Biol Pharm Bull* 31(12): 2334-2337, 2008
- 4) 鈴伸也、岡田誠治. Src キナーゼの新たな役割—ゴルジ体を通して. *血液・腫瘍科* 57(3):326-329, 2008.

程 久美子

- 1) Uji-Tei K., Naito Y, Saigo K. Guidelines for the selection of effective short-interfering RNA sequences for functional genomics. *Methods Mol. Biol.* 361, 201-216 (2006).
- 2) Uji-Tei K., Naito Y, Saigo K. Essential notes regarding the design of functional siRNAs for efficient mammalian RNAi. *J. Biomed. Biotechnol.* 2006, 65052 (2006).
- 3) Naito Y, Uji-Tei K., Nishikawa T, Takebe Y, Saigo K. siVirus: web-based antiviral siRNA design software for highly divergent viral sequences. *Nucleic Acids Res.* 34, W448-W450 (2006).
- 4) Naito, Y., Nohtomi, K., Onogi, T., Uenishi, R., Uji-Tei, K., Saigo, K., and Takebe, Y. (2007). Optimal design and validation of antiviral siRNA for targeting HIV-1. *Retrovirology*. 4(1): 80.
- 5) Uji-Tei, K., Naito, Y., Zenno, S., Nishi, K., Yamato, K., Takahashi, F., Juni, A., Saigo, K. Functional dissection of siRNA sequence by systematic DNA substitution: modified siRNA with a DNA seed arm is a powerful tool for mammalian gene silencing with significantly reduced off-target effect. *Nucleic Acids Res.* In press.
- 6) Naito, Y., Saigo, K., Uji-Tei, K. Evaluation of published rational siRNA design algorithms using firefly luciferase gene as a reporter. *RNA interference research progress*. In press.

菅 裕明

- 1) T. Kawakami, H. Murakami, H. Suga "Ribosomal synthesis of polypeptoids and peptoid-peptide hybrids" *Journal of American Chemical Society* 130, 16861-16863 (2008).
- 2) T.-J. Kang, S. Yuzawa, H. Suga "Combinatorial lysine modifications of histone H3 tails under the reprogrammed genetic code suggest crosstalk between epigenetic markers upon HP1 chromo domain binding" *Chemistry & Biology* 15, 1166-1174 (2008).
- 3) A. Ohta, H. Murakami, H. Suga "Polymerization of a-hydroxy acids by ribosomes" *ChemBioChem* 9, 2773-2778 (2008).
- 4) H. Xiao, H. Murakami, H. Suga, A. R. Ferre-D'Amare "Structural basis of specific tRNA aminoacylation by a small in vitro selected ribozyme" *Nature* 454, 358-361 (2008).
- 5) Y. Goto, H. Murakami, H. Suga* "Initiating translation with D-amino acids" *RNA* 14, 1399-1410 (2008).
- 6) Y. Sako, J. Morimoto, H. Murakami, H. Suga* "Ribosomal synthesis of bicyclic peptides with two orthogonal inter-sidechain reactions" *Journal of American Chemical Society* 130, 7932-7934 (2008).

- 7) T.-J. Kang, H. Suga* "Ribosomal synthesis of nonstandard peptides" *Biochemistry and Cell Biology* 86, 92-99 (2008).
- 8) A. Ohta, Y. Yamagishi, H. Suga* "Synthesis of biopolymers using genetic code reprogramming" *Current Opinion in Chemical Biology* 12, 159-167 (2008).
- 9) Y. Sako, Y. Goto, H. Murakami, H. Suga* "Ribosomal synthesis of peptidase-resistant peptides closed by a non-reducible inter-sidechain bond" *ACS Chemical Biology* 3, 241-249 (2008).
- 10) Y. Goto, A. Ohta, Y. Sako, Y. Yamagishi, H. Murakami, H. Suga* "Reprogramming the initiation event in translation for the synthesis of physiologically stable cyclic peptides" *ACS Chemical Biology* 3, 120-129 (2008).
- 11) T. Kawakami, H. Murakami, H. Suga* "Messenger RNA-directed incorporation of multiple N-methyl-amino acids into linear and cyclic peptides" *Chemistry & Biology* 15, 32-42 (2008).

広野 修一

- 1) H. Gouda, Y. Yanai, A. Sugawara, T. Sunazuka, S. Omura, S. Hirono. (2008) Computational analysis of the binding affinities of the natural-product cyclopentapeptides argifin and argadin to chitinase B from *Serratia marcescens*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16: 3565-3579.
- 2) M. Lohitnavy, Y. Lu, O. Lohitnavy, L. S. Chubb, S. Hirono, R. S. H. Yang. (2008). A Possible Role of Multidrug-Resistance-Associated Protein 2 (Mrp2) in Hepatic Excretion of PCB126, an Environmental Contaminant: PBPK/PD Modeling *Toxicological Sciences*. 104(1): 27-39.
- 3) T. Fujimoto, Y. Matsushita, H. Gouda, N. Yamaotsu, S. Hirono (2008). In silico multi-filter screening approaches for developing novel b-secretase inhibitors *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letter*, 18(9): 2771-2775.
- 4) Y. Aikawa, K. Morimoto, T. Yamamoto, H. Chaki, A. Hashiramoto, H. Narita, S. Hirono, S. Shiozawa (2008). Selective c-Fos/activator protein-1 inhibitor designed by molecular dynamics simulation resolves arthritis. *Nature Biotechnology*, 26(7): 817-823.
- 5) Yamaotsu N., Oda A., Hirono S. (2008). Determination of Ligand-Binding Sites on Proteins Using Long-Range Hydrophobic Potential. *Biol. Pharm. Bull.* 31(8): 1552-1558.
- 6) A. Oda, N. Yamaotsu, S. Hirono, O. Takahashi (2008). Brownian dynamics simulations of a wild type and mutants of bovine pancreatic trypsin inhibitors. *Biol. Pharm. Bull.*, 31: (in press)
- 7) H. Nagase, N. Yamamoto, T. Nemoto, K. Yoza, K. Kamiya, S. Hirono, S. Momen, N. Izumimoto, K.

Hasebe, H. Mochizuki, H. Fujii (2008). Synthesis of a Stable Iminium Salt and Propellane Derivatives. *The Journal of Organic Chemistry*, 73, 8093-8096.

- 8) 広野修一. 「イン・シリコ創薬技術に基づく合理的薬剤分子設計」、*薬剤学*, 68: 107-115(2008)
- 9) 合田浩明, 柳井雄一, 広野修一. 「MM-PBSA法を用いたキチナーゼ阻害剤ArgadinおよびArgifinの結合自由エネルギー計算」 *Pharma VISION NEWS*, No.11(March): 7-11 (2008)
- 10) 広野修一, 土田圭一, 相川幸彦. 「In Silico創薬技術に基づくStructure-Based Drug Design (SBDD)の実際」 *ファルマシア*, 44(4):327-332 (2008)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (2006-2008)

研究代表者

武部 豊

- 1) 「C型肝炎ウイルス侵入阻害剤」(出願準備中)
- 2) 「新規 HIV 阻害剤」(特願 2008-333922、2008年12月26日)
- 3) 「HCV 阻害剤」(特願 2008-115873、2008年4月25日)
- 4) 「新規 HCV エントリー阻害剤」(特願 2008-33598、2008年2月14日)
- 5) 「HIV-1 特異的 RNA 干渉分子」(特願 2007-156767、2007年6月13日)
- 6) 「C型肝炎ウイルス (HCV) 増殖阻害剤」(特願 2007- 018145) [PCT 出願 : PCT/JP2008/51086]

研究分担者

程 久美子

1. 「RNA干渉ポリヌクレオチド混合物の設計方法、RNA干渉ポリヌクレオチド混合物の設計装置、RNA干渉ポリヌクレオチド混合物の作製方法、RNA干渉ポリヌクレオチド混合物の設計プログラム」武部豊, 内藤 雄樹, 西郷 薫, 名取 幸和, 特開 2006-238724.
2. 武部 豊, 内藤 雄樹, 西郷 薫, 程 久美子, 特願 2007-156767. 「HIV-1 特異的 RNA 干渉分子」

II. 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 (抜粋)

研究代表者

武部 豊

- Naito, Y., Nohtomi, K., Onogi, T., Uenishi, R., Ui-Tei, K., Saigo, K., and Takebe, Y. Optimal design and validation of antiviral siRNA for targeting HIV-1. *Retrovirology* **4**(1): 80, 2007.
- Shimizu, S., Urano, E., Futahashi, Y., Miyauchi, K., Isogai, M., Matsuda, Z., Notomi, K., Onogi, T., Takebe, Y., Yamamoto, N., and Komano, J. Inhibiting lentiviral replication by HEXIM1, a cellular negative regulator of the CDK9/cyclin T complex. *AIDS* **21**: 575-582, 2007.
- Tee, K. K., Li, X.-J., Nohtomi, K., Ng, K. P., Kamarulzaman, A., and Takebe, Y. Identification of a novel circulating recombinant form (CRF33_01B) disseminating widely among various risk populations in Kuala Lumpur, Malaysia. *J. AIDS* **43**(5): 523-9, 2006.
- Murakami, Y., Yamagoe, S., Noguchi, K., Takebe, Y., Uehara, Y. and Fukazawa, H. Ets-1-dependent expression of vascular endothelial growth factor receptors is activated by Latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus through interaction with Daxx. *J. Biol. Chem.* **281**(38): 28113-28121, 2006.
- Takebe, Y. and Telesnitsky, A. Evidence for the acquisition of multidrug resistance by an HIV clinical isolate via human sequence transduction. *Virology* **351**: 1-6, 2006.
- Naito, Y., Ui-Tei, K., Nishikawa, T., Takebe, Y., Saigo, K. siVirus: web-based antiviral siRNA design software for highly divergent viral sequences. *Nucl. Acid Res. (Web Server issue)* **W448-W450**, 2006.
- Tee, K. K., Pybus, O.G., Liao, H., Uenishi, R., Hase, S., Kamarulzaman, A., Li, X.-J., and Takebe, Y. Chronology of the HIV-1 CRF07_BC expansion in East-Asia. *AIDS* **22**: 156-158, 2007.
- Li, X.-J., Uenishi, R., Hase, S., Liao, H., Tee, K. K., Kusagawa, S., and Takebe, Y. HIV/AIDS in Asia: The shape of epidemics and their molecular epidemiology. *Virologica Sinica* **22**(6): 426-433, 2007.

和文

- 上西理恵、長谷彩希、Liao Huanan、武部豊。C型肝炎ウイルスに対する新規治療薬の開発動向。 *Pharm Stage* **8**(3): 1-5, 2008.
- 武部豊、上西理恵。HCV エントリー・粒子形成阻害剤：新規クラス薬剤スクリーニング。 *肝胆膵 (アークメディア)* **57**:1047-1056, 2008.
- 武部豊。「エイズワクチン開発の最新動向」 *Challenges to AIDS vaccine development 細胞*, Sept. 2008.
- 上西理恵、長谷彩希、Liao Huanan、武部豊。(2008)。C型肝炎ウイルスに対する新規治療薬の開発動向。 *PHARM STAGE* Vol.8, No.3: 1-5, 2008.

研究分担者

駒野 淳

- Miyauchi K, *Komano J., Myint L, Futahashi Y, Urano E, Matsuda Z, Chiba T, Miura H, Sugiura W, Yamamoto N. Rapid propagation of low-fitness drug resistant mutants of human immunodeficiency virus type 1 by a streptococcal metabolite sparsomycin. *Antivir Chem Chemother*. 2006;17(4): 167-174.
- Miyauchi K, Curran R, Matthews E, Komano J., Hoshino T, Engelman DM, *Matsuda Z. Mutations of conserved glycine residues within the membrane-spanning domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 can inhibit membrane fusion and incorporation of Env onto virions. *Jpn J Infect Dis*. 2006 Apr;59(2):77-84.
- 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 negative regulator of CDK9/cyclinT complex. *AIDS*. 2007 Mar 12;21(5):575-82.
- Futahashi Y, *Komano J., Urano E, Aoki T, Hamatake M, Miyauchi K, Yoshida T, Koyanagi Y, Matsuda Z, Yamamoto N. Separate elements are required for ligand-dependent and -independent internalization of metastatic potentiator CXCR4. *Cancer Sci*. 2007 Mar;98(3):373-9.
- Kameoka M, Kitagawa Y, Utachee P, Jinnopat P, Dhepakson P, Isarangkura-na-ayuthaya P, Tokunaga K, Sato H, Komano J., Yamamoto N, Oguchi S, Natori Y, Ikuta K. Identification of the suppressive factors for human immunodeficiency virus type-1 replication using the siRNA mini-library directed against host cellular genes. *Biochem Biophys Res Commun*. Aug 3; 359(3):729-34, 2007.
- Urano, E., T. Aoki, Y. Futahashi, T. Murakami. Y. Morikawa, N. Yamamoto, and J. Komano. Substitution of the myristoylation signal of human immunodeficiency virus type 1 Pr55^{Gag} with the phospholipase C delta 1 pleckstrin homology domain results in infectious pseudovirion production. *J. Gen.*

Viol. 89(Pt 12): 4374-4377, 2008.

19. Emiko Urano, Saki Shimizu, Yuko Futahashi, Makiko Hamatake, Yuko Morikawa, Naoko Takahashi, Hidesuke Fukazawa, Naoki Yamamoto, Jun Komano. Cyclin K/CPR4 inhibits primate lentiviral replication by inactivating Tat/P-TEFb-dependent LTR transcription. (in submission)
20. Akihide Ryo, Naomi Tsurutani, Kenji Ohba, Ryuichiro Kimura, Jun Komano, Mayuko Nishi, Hiromi Soeda, Shinichiro Hattori, Kilian Perrem, Mikio Yamamoto, Joh Chiba, Jun-ichi Mimaya, Kazuhisa Yoshimura, Shuzo Matsushita, Mitsuo Honda, Akihiko Yoshimura, Ichiro Aoki, Yuko Morikawa and Naoki Yamamoto. SOCS1 is an inducible host factor during HIV-1 infection and regulates the intracellular trafficking and stability of HIV-1 Gag. (PNAS, in press)

村上 努

21. T. Murakami, and N. Yamamoto. (2007) AIDS: How do we overcome this social or biodisaster? J. Disaster Res. 2 (2): 71-80.
22. Urano, E., T. Aoki, Y. Futahashi, T. Murakami, Y. Morikawa, N. Yamamoto, and J. Komano. Substitution of the myristoylation signal of human immunodeficiency virus type 1 Pr55^{Gag} with the phospholipase C delta 1 pleckstrin homology domain results in infectious pseudovirion production. J. Gen. Virol. 89(Pt 12): 4374-4377, 2008.
23. Tanaka, T., H. Tsutsumi, W. Nomura, Y. Tanabe, N. Ohashi, A. Esaka, C. Ochiai, J. Sato, K. Itotani, T. Murakami, K. Ohba, N. Yamamoto, N. Fujii, and H. Tamamura. Structure-activity relationship study of CXCR4 antagonists bearing the cyclic pentapeptide scaffold: identification of the new pharmacophore. Org. Biomol. Chem. 6:4374-4377, 2008.
24. T. Murakami. Roles of the interactions between Env and Gag proteins in the HIV-1 replication cycle. Microbiol. Immunol. 52:287-295, 2008.
25. 村上 努 HIV の粒子形成のメカニズム—Gag 蛋白に関する最新の知見— Confronting HIV2009. In press.

山越 智

26. Murakami Y, Yamagoe S, Noguchi K, Takebe Y, Takahashi N, Uehara Y, Fukazawa H. Ets-1-dependent expression of vascular endothelial growth factor receptors is activated by latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus through interaction with Daxx. J Biol Chem. 281:28113-28121, 2006.
27. Noguchi K, Fukazawa H, Murakami Y, Takahashi N, Yamagoe S, Uehara Y. γ -Herpesviruses and cellular signaling in AIDS-associated malignancies. *Cancer Sci*. 98:1288-1296, 2007.

森川 裕子

28. S. Sakuragi, J.-I. Sakuragi, Y. Morikawa, & T. Shioda. Development of a rapid and convenient method for the quantitation of HIV-1 budding. *Microbes Infect*. 8: 1875-1881 (2006)
29. 森川裕子 酵母を用いた動物ウイルスの研究. ウイルス 56: 9-16 (2006)
30. Y. Morikawa, T. Goto, D. Yasuoka, F. Momose, & T. Matano. Defect of human immunodeficiency virus type 2 Gag assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Virol*. 81: 9911-9921 (2007)
31. F. Momose, Y. Kikuchi, K. Komase, & Y. Morikawa Visualization of microtubule-mediated transport of influenza viral progeny ribonucleoprotein. *Microbes Infect*. 9: 1422-1433 (2007)
32. 森川裕子, 鶴谷直美 HIV の粒子形成と成熟機構蛋白質核酸酵素 52: 1181-1186 (2007)
33. A. Ryo, N. Tsurutani, K. Ohba, R. Kimura, J. Komano, M. Nishi, H. Soeda, S. Hattori, K. Perrem, M. Yamamoto, J. Chiba, J. Mimaya, K. Yoshimura, S. Matsushita, M. Honda, A. Yoshimura, T. Sawasaki, I. Aoki, Y. Morikawa, & N. Yamamoto. SOCS1 is an inducible host factor during HIV-1 infection and regulates the intracellular trafficking and stability of HIV-1 Gag. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 294-299 (2008)

高橋 信弘

34. Sekiguchi, T., Hayano, T., Yanagida, M., Takahashi, N., Nishimoto, T. (2006) NOP132 is required for proper nucleolus localization of DEAD-box RNA helicase DDX47. *Nucleic Acids Res*. 34(16):4593-4608.
35. Oda, T., Hayano, T., Miyaso, H., Takahashi, N., and Yamashita, T. (2007) Hsp90 regulates the Fanconi anemia DNA damage response pathway. *Blood* (in press)
36. Takahashi, N., and Isobe, T. (2007) *Proteomic Biology using LC-MS*, Wiley Interscience, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey USA, p1-254.
37. Kaji, H., Kamiie, J., Kawakami, H., Kido, K., Yamauchi, Y., Shinkawa, T., Taoka, M., Takahashi, N., and Isobe, T. (2007) Proteomics reveals N-linked glycoprotein diversity in *Caenorhabditis elegans* and suggests

an atypical translocation mechanism for integral membrane proteins. *Mol. Cell. Proteomics* 6:2100-2109.

38. 高橋信弘、藤山沙理、千葉一裕 (2007) アフィニティークロマトグラフィー法、分子間相互作用解析ハンドブック、羊土社、p45-52.

岡田 誠治

39. Suzu S, Hiyoshi M, Yoshidomi Y, Harada H, Takeya M, Kimura F, Motoyoshi K, and Okada S; M-CSF-mediated macrophage differentiation but not proliferation is correlated with increased and prolonged ERK activation. *J Cell Physiol* 212(2): 519-525, 2007
40. Hiyoshi M*, Suzu S*, Yoshidomi Y, Hassan R, Harada H, Sakashita N, Akari H, Motoyoshi K, and Okada S; Interaction between Hck and HIV-1 Nef negatively regulates cell surface expression of M-CSF receptor. *Blood* 111(1): 52-58, 2008(*Equal contribution)
41. Murakami T, Harada H, Suico MA, Shuto T, Suzu S, Kai H, and Okada S; Ephedrae herba, a component of Japanese herbal medicine *Mao-to*, efficiently activates the replication of latent HIV-1 in a monocytic cell line. *Biol Pharm Bull* 31(12): 2334-2337, 2008.
42. 鈴木伸也、岡田誠治. Src キナーゼの新たな役割—ゴルジ体を通して. *血液・腫瘍科* 57(3):326- 329, 2008.

程 久美子

43. Ui-Tei K, Naito Y, Saigo K. Guidelines for the selection of effective short-interfering RNA sequences for functional genomics. *Methods Mol. Biol.* 361, 201-216 (2006).
44. Ui-Tei K, Naito Y, Saigo K. Essential notes regarding the design of functional siRNAs for efficient mammalian RNAi. *J. Biomed. Biotechnol.* 2006, 65052 (2006).
45. Naito Y, Ui-Tei K, Nishikawa T, Takebe Y, Saigo K. siVirus: web-based antiviral siRNA design software for highly divergent viral sequences. *Nucleic Acids Res.* 34, W448-W450 (2006).
46. Naito, Y., Nohtomi, K., Onogi, T., Uenishi, R., Ui-Tei K., Saigo, K., and Takebe, Y. (2007). Optimal design and validation of antiviral siRNA for targeting HIV-1. *Retrovirology*. 4(1): 80.
47. Ui-Tei K., Naito, Y., Zenno, S., Nishi, K., Yamato, K., Takahashi, F., Juni, A., Saigo, K. Functional dissection of siRNA sequence by systematic DNA substitution: modified siRNA with a DNA seed arm is a powerful tool for mammalian gene silencing with significantly reduced off-target effect. *Nucleic Acids Res.* In press.
48. Naito, Y., Saigo, K., Ui-Tei K. Evaluation of published rational siRNA design algorithms using firefly luciferase gene as a reporter. *RNA interference research progress*. In press.

菅 裕明

49. T. Kawakami, H. Murakami, H. Suga "Ribosomal synthesis of polypeptoids and peptoid-peptide hybrids" *Journal of American Chemical Society* 130, 16861-16863 (2008).
50. T.-J. Kang, S. Yuzawa, H. Suga "Combinatorial lysine modifications of histone H3 tails under the reprogrammed genetic code suggest crosstalk between epigenetic markers upon HPI chromo domain binding" *Chemistry & Biology* 15, 1166-1174 (2008).
51. A. Ohta, H. Murakami, H. Suga "Polymerization of α -hydroxy acids by ribosomes" *ChemBioChem* 9, 2773-2778 (2008).
52. H. Xiao, H. Murakami, H. Suga, A. R. Ferre-D'Amare "Structural basis of specific tRNA aminoacylation by a small in vitro selected ribozyme" *Nature* 454, 358-361 (2008).
53. Y. Goto, H. Murakami, H. Suga* "Initiating translation with D-amino acids" *RNA* 14, 1399-1410 (2008).
54. Y. Sako, J. Morimoto, H. Murakami, H. Suga* "Ribosomal synthesis of bicyclic peptides with two orthogonal inter-sidechain reactions" *Journal of American Chemical Society* 130, 7932-7934 (2008).
55. T.-J. Kang, H. Suga* "Ribosomal synthesis of nonstandard peptides" *Biochemistry and Cell Biology* 86, 92-99 (2008).
56. A. Ohta, Y. Yamagishi, H. Suga* "Synthesis of biopolymers using genetic code reprogramming" *Current Opinion in Chemical Biology* 12, 159-167 (2008).
57. Y. Sako, Y. Goto, H. Murakami, H. Suga* "Ribosomal synthesis of peptidase-resistant peptides closed by a non-reducible inter-sidechain bond" *ACS Chemical Biology* 3, 241-249 (2008).
58. Y. Goto, A. Ohta, Y. Sako, Y. Yamagishi, H. Murakami, H. Suga* "Reprogramming the initiation event in translation for the synthesis of physiologically stable cyclic peptides" *ACS Chemical Biology* 3, 120-129 (2008).
59. T. Kawakami, H. Murakami, H. Suga* "Messenger RNA-directed incorporation of multiple N-methyl-amino acids into linear and cyclic peptides" *Chemistry & Biology* 15, 32-42 (2008).

広野 修一

60. M. Lohitnavy, Y. Lu, O. Lohitnavy, L. S. Chubb, S. Hirono, R. S. H. Yang. (2008). A Possible Role of Multidrug-Resistance-Associated Protein 2 (Mrp2) in Hepatic Excretion of PCB126, an Environmental Contaminant: PBPK/PD Modeling Toxicological Sciences. 104(1): 27-39.
61. H. Gouda, Y. Yanai, A. Sugawara, T. Sunazuka, S. Omura, S. Hirono. (2008) Computational analysis of the binding affinities of the natural-product cyclopentapeptides argifin and argadin to chitinase B from *Serratia marcescens*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 16: 3565-3579.
62. T. Fujimoto, Y. Matsushita, H. Gouda, N. Yamaotsu, S. Hirono (2008). In silico multi-filter screening approaches for developing novel b-secretase inhibitors Bioorganic & Medicinal Chemistry Letter, 18(9): 2771-2775.
63. Y. Aikawa, K. Morimoto, T. Yamamoto, H. Chaki, A. Hashiramoto, H. Narita, S. Hirono, S. Shiozawa (2008). Selective c-Fos/activator protein-1 inhibitor designed by molecular dynamics simulation resolves arthritis. Nature Biotechnology, 26(7): 817-823.
64. Yamaotsu N., Oda A., Hirono S. (2008). Determination of Ligand-Binding Sites on Proteins Using Long-Range Hydrophobic Potential. Biol. Pharm. Bull. 31(8): 1552-1558.
65. A. Oda, N. Yamaotsu, S. Hirono, O. Takahashi (2008). Brownian dynamics simulations of a wild type and mutants of bovine pancreatic trypsin inhibitors. Biol. Pharm. Bull., 31: (in press)
66. H. Nagase, N. Yamamoto, T. Nemoto, K. Yoza, K. Kamiya, S. Hirono, S. Momen, N. Izumimoto, K. Hasebe, H. Mochizuki, H. Fujii (2008). Synthesis of a Stable Iminium Salt and Propellane Derivatives. The Journal of Organic Chemistry, 73, 8093-8096.
67. 広野修一. 「イン・シリコ創薬技術に基づく合理的薬剤分子設計」、薬剤学, 68: 107-115(2008)
68. 合田浩明, 柳井雄一, 広野修一. 「MM-PBSA 法を用いたキチナーゼ阻害剤 Argadin および Argifin の結合自由エネルギー計算」Pharma VISION NEWS, No.11(March): 7-11 (2008)
69. 広野修一、土田圭一、相川幸彦. 「In Silico 創薬技術に基づく Structure-Based Drug Design (SBDD) の実際」ファルマシア, 44(4):327-332 (2008)

Ⅲ. 別刷（抜粹）

C型肝炎ウイルスに対する新規治療薬の開発動向

上西 理恵, 長谷 彩希, Liao Huanan, 武部 豊*

国立感染症研究所 エイズ研究センター 室長

〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1 Tel: 03-5285-1111 Fax: 03-5285-1258 E-mail: takebe@nih.go.jp

1 はじめに

C型肝炎ウイルス(HCV)は慢性肝炎、肝硬変、肝がんの最も主要な原因ウイルスである。全世界では1億2千万人、我が国においても2百万人もの感染者が存在するものと推定されている。HCV感染症に対する現行の標準療法はペグ・インターフェロン(Pegylated interferon)とリバビリン(ribavirin)の併用療法であるが、その有効率はHCVゲノタイプ2感染患者では約80%であるのに対し、ゲノタイプ1感染患者では50%未満と低い。ゲノタイプ1は、米国における慢性HCV肝炎患者の70-80%、ヨーロッパ・アジアでは60%以上を占めるため、多くの患者ではこの併用療法は満足な治療効果を上げることができないのが現状である。しかもこの療法は薬価も高く、長期投与が必要であり、発熱、貧血、精神症状など比較的重篤な副作用がある。そのため、より安全で有効性の高い治療薬の開発が求められている。

一方、関連するウイルス感染症としてヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染症がある。HCVとHIVは共通する感染経路(特に経血液感染)によって伝播するため、血友病や注射薬物乱用者(IDU)(特にアジアにおける)では、極めて高い共感染率を示す。例えば我が国のHIV感染血友病患者でのHCV感染率は97%を超える。1996年に多剤併用療法(HAART)が導入されて以来、エイズ患者の死亡率はピーク時に比べ60%以上も減少しているが、その一方で、エイズに関連するその他の疾患、特にHCV重複感染による肝不全死が、エイズ

患者の死亡原因の重要な位置を占めるようになってきており、HCV感染症の克服は今後のエイズ患者治療の最も大きな課題の一つとなりつつある。

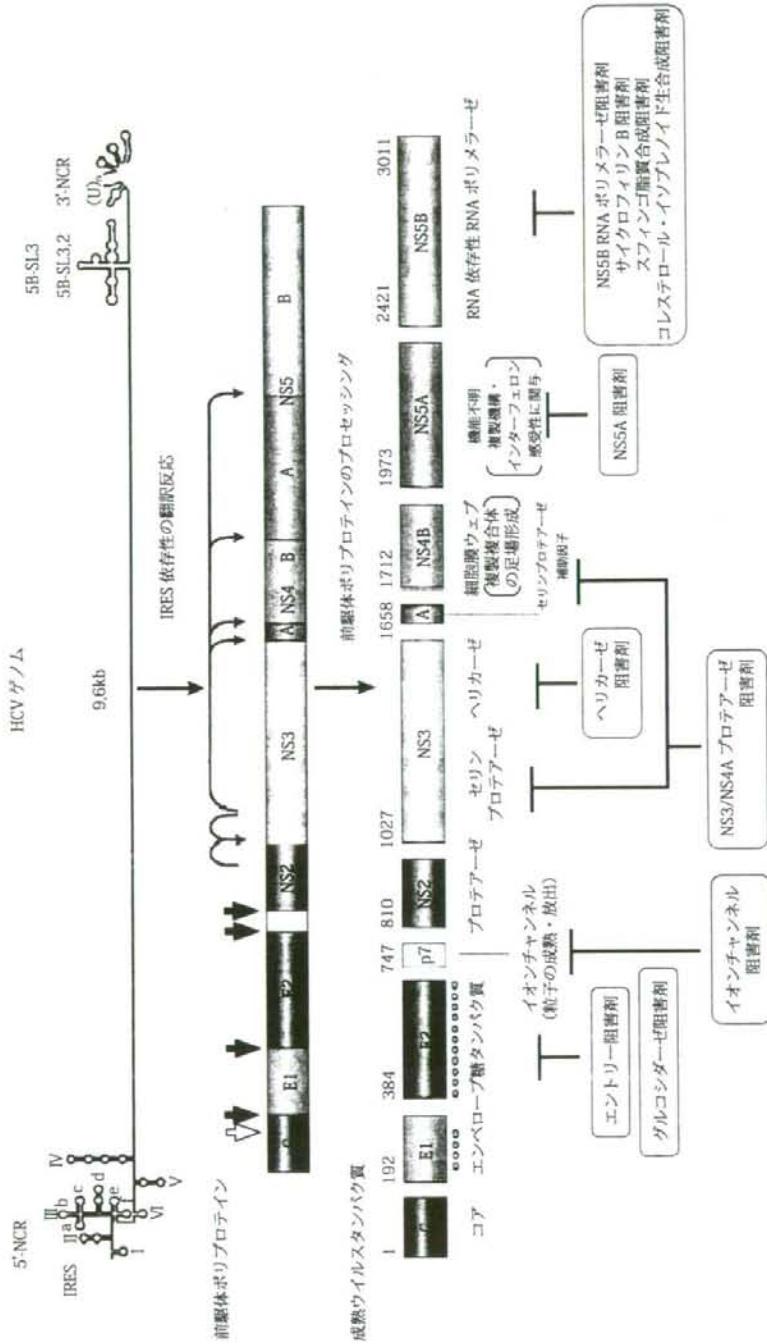
HCV感染症に対する治療薬開発は、従って、単にC型肝炎患者の治療という問題だけでなく、公衆衛生上HCVと並んで重要なHIV/エイズ治療と言う側面でも、今後益々その重要性を増すことが予測される。紙幅も限られているので、本稿ではHCV治療薬の開発の現状とその展望に絞って概説したいと考える。

(注:本誌は、もともと「エイズおよびエイズ関連疾患に対する新規治療薬の開発動向」として規格されたが、紙幅の関係から「HCV治療薬の開発動向」に関しては本誌8月号に分けて掲載される予定であるので、興味のある方は参照されたい。)

2 ウイルスタンパク質を標的とする HCV 治療薬開発の現状

HCV治療薬開発の最も直接的なアプローチは、HCVゲノムにコードされ、且つHCV増殖に必須な機能(酵素活性)をもつウイルスタンパク質を標的にすることである。そのようなウイルスタンパク質としてNS3/4A(セリン)プロテアーゼとNS5B RNAポリメラーゼがある。

図1にHCVのゲノム構造と阻害剤ターゲットの概要を示す。



HCVは9.6kbの(+)鎖RNAゲノムからなる。5'-末端、3'-末端にはそれぞれ非翻訳領域 (non-coding region, NCR) (5'-NCR および、3'-NCR) がある。NS5BのC末端域には複製に関与するcis領域であるNS5B stem-loop 3 cis-acting replication element (5B-SL3) が存在する。5'-NCRに存在する複雑なRNA2次構造からなるinternal ribosome entry site (IRES) はHCVゲノムの翻訳開始信号として機能し、約3,000アミノ酸からなる前駆体HCVポリプロテインが生成する。ついで、ウイルス(NS2-3プロテアーゼおよびNS3/4Aセリンプロテアーゼ)と宿主由来プロテアーゼ(▼ERシグナルペプチダーゼ、▽シグナルペプチダーゼ)によって開裂し、成熟HCVタンパク質が生成する。数字はHCV標準株(H株)のアミノ酸の位置を示す。エンペローブタンパク質E1, E2はH株の場合、それぞれ4個、11個のN-糖鎖付加部位(○)を持つ。下に開発中の主な阻害剤の作用点を示す。(参照文献3を改変)

図1 HCVのゲノム構造と阻害剤ターゲット

2.1 NS3/4A プロテアーゼ阻害剤

HCV プロテアーゼは NS3 と NS4A とよばれる 2 種類のウイルスタンパク質からなるヘテロダイマーで、活性中心は NS3 にあり、NS4A は補助因子として働くことが知られている。

最初に開発されたプロテアーゼ阻害剤は、プロテアーゼの基質ペプチドの構造に類似性をもつ化合物としてデザインされた BILN2061 (Boehringer-Ingelheim) である。この化合物は HCV 感染者の血中ウイルス量を強力に低下させる能力をもつが、霊長類を用いた動物実験で心筋毒性がみられたために開発は中止されている。

現在最も期待をもたれているプロテアーゼ阻害剤は VX-950 (Telaprevir) (Vertex) と SCH503034 (Schering-Plough) で、フェーズ II 臨床試験が進行中である。共に良好な血中ウイルス量の抑制効果をもつが、薬剤投与の 2 週間後にはすでに耐性ウイルスが出現することが観察されている。PROVE 1 (PROtease inhibitors for Virus Evaluation) とよばれる臨床試験で、既存の Peg-IFN + リバビリンに加えた併用療法の効果の評価が進行中である。

ACH-906/GS-9132 (Achillion Pharmaceutical) は、NS4A の NS3 への結合をブロックすることでプロテアーゼ活性を阻害するというユニークな作用機構を持つ化合物である。腎毒性のため、治療薬としての開発は現在中止されているが、NS4A と NS3 との相互作用を遮断することでプロテアーゼ活性を阻害するという新しい作用メカニズムを示したという意味で、その開発の意義は大きく、継続した開発研究が進行中である。

2.2 NSSB RNA ポリメラーゼ阻害剤

ポリメラーゼ阻害剤は、酵素の基質アナログとして働き、RNA 鎖伸長反応を阻害する (chain terminator) 核酸系阻害剤 (nucleoside/nucleotide inhibitor) と、酵素の活性中心とは異なるサイトに作用してアロステリックに阻害効果を及ぼす非核酸系阻害剤 (non-nucleoside inhibitor) の 2 つのカテゴリーに分類される。

(1) 核酸系ポリメラーゼ阻害剤

核酸系ポリメラーゼ阻害剤としては、NM107

(2-C-methyl-cytidine のアナログ) のプロドラッグ NM283 (valopicitabine) (Index Pharmaceutical/Novartis) や、R1626 (4 azido-cytidine nucleoside アナログ) (Roche) がある。

(2) 非核酸系ポリメラーゼ阻害剤

非核酸系ポリメラーゼ阻害剤としては、HCV-796 (ViroPharma/Wyeth) (Benzofuran 系)、XTL2125 (XTL Pharmaceuticals), R7128 (経口 cytidine アナログ PSI-6130 のプロドラッグ) (Pharmasset) などが開発中である。いずれも *in vitro* および *in vivo* において強力な阻害効果を示すが、プロテアーゼ阻害剤と同様、耐性ウイルスが容易に出現することが大きな問題となっている。

(3) サクロフィリン B を標的とするポリメラーゼ阻害剤

第 3 のカテゴリーのポリメラーゼ阻害剤として、ポリメラーゼ複合体に関与する宿主因子を標的とするものがある (後節 3.1 参照)。そのような阻害剤として同定されたのが、シクロスポリン A (cyclosporine A) とその誘導体である DEBIO-025 (DebioPharm) である。シクロスポリン A (cyclosporine A) は免疫抑制剤として知られているものであるが、HCV ポリメラーゼの補助因子である宿主ファクター、サクロフィリン B (cyclophilin B) を阻害することによって、HCV ポリメラーゼ活性を抑制する。DEBIO-025 はシクロスポリン A のもつ免疫抑制効果をなくし、しかもより強い HCV 増殖阻害作用をもつ化合物である。試験が進行中で、良好な抗ウイルス効果が観察されているが、高ビリルビン症や血小板減少症の出現が問題となっている。その他のサクロフィリン B 阻害剤として NIM811 (Novartis) が第 1 相試験中にある。

2.3 その他のウイルスタンパク質を標的とする阻害剤の開発

(1) NSSA 阻害剤

NS5A はインターフェロン感受性や複製メカニズムとの関連が示唆されているが、その役割は依然明確ではない。NS5A を標的にすると考えられている A-689, A-831 (Arrow Therapeutics/AstraZeneca) が前臨床試験に入っている。

(2) ヘリカーゼ阻害剤