

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業（政策創薬総合研究事業）

HIV感染を阻害する

シュードプロテオグリカン型薬剤の作用メカニズム

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小川 温子

平成21（2009）年 4月

## 目 次

## I. 総括研究報告

シュードプロテオグリカンの調製とウイルス接着因子との相互作用、----- 4

小川温子

- (資料) 図1 ヒアルロン酸シュードPG (H15P4)の合成とSEC-MALLSによる分子量推定  
 図2 ヒアルロン酸、低分子量ヒアルロン酸、硫酸化H15及びシュードPG(P4H15)の<sup>1</sup>H-NMR  
 図3 マクロファージ指向性ウイルスに対する有効性  
 図4 細胞またはウイルスへの処理によるシュードPGの感染抑制活性  
 図5 シュードPGのHIV-1吸着および侵入阻害効果  
 図6 シュードPGによるHIV-1 Env V3領域への結合阻害効果  
 図7 PPG感作ラテックスによるHIV-1感染細胞 (MOLT4/IIIB) の凝集能  
 表1 ヒアルロン酸、低分子量ヒアルロン酸、硫酸化H15及びシュードPG(P4H15)の化学シフト  
 表2 シュードPG(PLL-デキストラン)の組成と合成収率  
 表3 種々のシュードPGのアミノ基修飾による抗HIV活性変化  
 表4 NP-2/GFP細胞を用いたシュードPGの抗HIV-1活性と細胞融合抑制活性  
 表5 薬剤耐性ウイルスに対する抗HIV活性  
 表6 シュードPGのPre-treatment, Treatment, Post-treatmentにおける巨細胞形成への影響  
 表7 シュードPGのMOLT4/IIIB細胞からのHIV-1産生への影響  
 表8 シュードPGの逆転写酵素阻害活性

## II. 分担研究報告

1. シュードプロテオグリカンの抗HIVスクリーニング ----- 20

棚元憲一

- (資料) 表1 高分子ポリマー-多糖複合体の抗HIV活性  
 表2 高分子ポリマー-多糖複合体の抗HIV活性  
 表3 抗HIV活性に及ぼす、高分子ポリマー及び多糖の鎖長の影響

2. 種々のシュードプロテオグリカン型薬剤の抗HIV増殖抑制効果と作用機序 ----- 27

牛島廣治

- (資料) 表I デオキシノジリマイシン誘導体のIC50  
 表II-1) PPGのPre-treatment, Treatment, Post-treatmentでの巨細胞形成に関する効果  
 表III-1) 逆転写酵素阻害  
 表III-3) PLL-デキストランに対するモノクローナル抗体の作成  
 写真 PPG感作ラテックスによるHIV-1感染細胞 (MOLT4/IIIB) の凝集能

3. HIV感染のコレセプターとの関係解明 ----- 34

星野洪郎

(資料) 表1 シュードPGの抗ウイルス活性

表2 シュードPGのMOLT-4/ⅢB細胞からのHIV-I産生への影響

図1 細胞およびウイルスへの処理によるシュードPGの抗ウイルス活性

図2 シュードPGのHIV-I吸着および侵入阻害効果

図3 シュードPGによるHIV-I EnvV3領域への結合阻害効果

4. シュードプロテオグリカンの検定と構造解析 ----- 40

川崎ナナ

(資料) Fig. 1 ヒアルロン酸 (A) 及びポリ-L-リジン (PLL) (B) の構造

Fig. 2 ヒアルロン酸 (M. W. 130,000) (A)、低分子量ヒアルロン酸 (H15, M. W. 4700) (B)、硫酸化H15 (C) 及びシュードPG (PLL (M. W. 約20,000) +H15 (P4H15)) (D) の<sup>1</sup>H NMR

Fig. 3 ヒアルロン酸 (M. W. 130,000) のCOSYスペクトル (A) 及びHMQCスペクトル (B) .

Table 1 ヒアルロン酸 (HA, M. W. 130,000)、低分子量ヒアルロン酸 (H15, M. W. 4700)、硫酸化H15 (H15S)、シュードPG (PLL (M. W. 約20,000) +H15 (P4H15)) 及び過硫酸化ヒアルロン酸 (OSHA, M. W. 130,000) の化学シフト

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 47

IV. 研究成果の刊行物・別刷 (別冊)



厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業（政策創薬総合研究事業））  
総括研究報告書

HIV感染を阻害するシュードプロテオグリカン型薬剤の作用メカニズム

研究代表者 小川 温子 お茶の水女子大学大学院教授

研究要旨

我々が創成したシュードプロテオグリカン(シュードPG)は、天然のプロテオグリカンの分子構造を模倣して、直鎖高分子に複数のグリコサミノグリカン (GAG) などの糖鎖を共有結合させた人工複合体分子である。本研究では、シュードPGの構造的特徴と顕著な結合特性に着眼し、細胞膜上プロテオグリカンを必要とするHIV-1の初期感染機構をブロックし、かつHIV-1に対する宿主の抵抗性を回復する効果を併せ持つ感染阻害剤としての利用を目指し、シュードPGの抗HIV-1メカニズムを解明する。我々は19年度に、単独では活性を示さないデキストランをはじめとする非硫酸化糖類を用いて調製したシュードPGが、HIV-1感染に対して顕著な抑制効果を発揮することを発見した。その発見を基に、本年度は糖鎖構造、骨格分子構造、およびそれらの鎖長を変えて合成し、マクロファージ指向性あるいはT細胞指向性のHIV-1、種々の薬剤耐性ウイルスについて、種々の細胞系を用いて抗HIV活性と構造の関係を調べた。非硫酸化糖類-ポリリシン (PLL) は、特に硫酸化多糖耐性のウイルス株に対しても活性が認められ、その抗HIV活性は材料の糖鎖およびポリリシンの鎖長が長い物ほど向上する鎖長依存性を示した。デキストランのほか、ヒアルロン酸、マンノトリオースを用いて合成したシュードPGも活性を示した。シュードPG合成後のN-アセチル化または硫酸化によって活性は失われたことから、活性には遊離のアミノ基と水酸基が重要であることが示唆された。抗HIV活性をもつプローブについて感染抑制機序を解明するため、ウイルスのEnvを介した細胞融合抑制、ならびにウイルスの細胞吸着および侵入阻害実験も行った。デキストランシュードPGは主にウイルスと細胞の両方に作用することで細胞へのウイルス吸着および侵入を阻害することが明らかとなった。また、ヘパリンが結合するR5及びX4ウイルスのEnv V3の先端部分以外に結合して作用することから硫酸化多糖とは異なる新規な機構で感染抑制すると考えられ、特許出願した(特願2008-301811)。一方、二次元核磁気共鳴(二次元NMR)により、活性をもつ硫酸化した低分子量ヒアルロン酸(H15)の構造解析を行い硫酸基の位置を同定した。本プローブは新規抗HIV活性薬剤への発展が期待される。

研究分担者

棚元憲一 国立医薬品食品衛生研究所・部長  
牛島廣治 藍野大学藍野健康科学センター・教授  
星野洪郎 群馬大学大学院・教授  
川崎ナナ 国立医薬品食品衛生研究所・室長

A. 研究目的

シュードプロテオグリカン(シュードPG)は、天然のプロテオグリカン構造から着想を得て、コアタンパク質の代わりに直鎖高分子のpoly-L-lysine (PLL)またはpolyacrylamide (PAA)を用いて、複数のグリコサミノグリカン鎖 (GAG) を共有結合させて主



任研究者らが合成した人工分子である。われわれは、まずヘパリンを用いて合成したシュードPGに抗HIV活性を見出し、次にそのシュードPGのカラムに組織抽出物中のサイクロフィリンA (CypA) が結合することを見出した。HIV-1は、マクロファージ表面のヘパラン硫酸プロテオグリカン (HS-PG) への結合により、感染が促進されることが報告されている。一方、CypAは、宿主の制限因子によるレトロウイルス認識を回避してHIV-1の感染性を保護する効果を持つ。従ってシュードPGを活用すれば、HIV-1のマクロファージへの接着を有効に阻害し、かつCypAをブロックして宿主細胞の抵抗性を回復する効果を併せ持つ新規感染阻害薬に繋がることを期待される。本研究では、多糖鎖と骨格分子を変えてシュードPGを調製し、その抗HIV活性を検討し、抗HIV-1作用機構を明らかにすることを研究目的とする。今年度は特に、平成19年度に見出した、単独では活性を示さないデキストランやヒアルロン酸、マンノトリオース等の非硫酸化糖類を用いて調製したシュードPGを中心に、種々の細胞系を用いてシュードPGの構造と抗HIV活性の関係を解明することと、その作用機構についての手がかりを得ることを目的とした。

## B. 研究方法

### ①シュードPGの合成

19年度の本研究プロジェクトにおいて、PLL-非硫酸化デキストラン複合体を形成させた場合にその材料にはない優れた抗HIV-1活性が出現することを認めた。そこで、糖鎖と骨格分子の構造が活性に与える影響を調べるために、以下の3つの観点で構造の異なる複合体を合成した。

#### 1) 糖鎖構造の重要性

単糖D-グルコース、D-グルコース間の結合が $\alpha$ 1-6グリコシド結合で重合したデキストラン (10 kDa又は、20 kDa)、又は、 $\alpha$ 1-4グリコシド結合したマルトオリゴ糖 (2-7糖) を合成材料に用いて骨格分子と合成を行った。さらに多糖類または複合体の硫酸化を行い硫酸基が活性に与える影響について調べた。

硫酸化操作は、小型ナスフラスコ中で約 0.6 mg の多糖または複合体を3 mlのホルムアミドに溶かし、200  $\mu$ lのクロロ硫酸を氷上で滴下した。還流管を付

けて5°Cで5時間反応させた後、水に対して透析した。糖鎖部分の修飾を $^1\text{H}$ -または $^{13}\text{C}$ -NMRにより確認し、酵素消化によりオリゴ糖としてLC/MS/MSにて構造解析する方法も検討した。

#### 2) 骨格分子PLLの鎖長の重要性

4種類の鎖長の異なるPLL (40-60 kDa, 15-30 kDa, 4-15 kDa, 1-4 kDa) を骨格分子に用いて糖鎖との複合体を合成し、活性の鎖長依存性を調べた。

#### 3) 骨格分子のアミノ基の位置と修飾の影響

L-リジンの $\alpha$ 位、又は、 $\epsilon$ 位のアミノ基を介してペプチド結合した異性体PLL (以下、それぞれ $\alpha$ PLL、 $\epsilon$ PLLと略す) を骨格分子に用いて、デキストランとの複合体を合成した。さらにシュードPG合成後、無水酢酸を用いて残存遊離アミノ基のN-アセチル化を、またはNHS-LC-ビオチン (Pierce社) を用いてN-ビオチン化を行い、骨格分子の遊離アミノ基が抗HIV活性に必要なかどうかについて調べた。

反応温度、pH、時間については昨年までの結果から次の条件で合成した。構造と鎖長の異なる8種類のPLL又はPAAと、35種類の糖鎖を用いて合成した。各糖鎖と骨格分子を0.5 Mリン酸緩衝液 (pH 7.7) に溶解し、 $\text{NaCNBH}_3$ を還元剤として、40-45°Cで7-14日間振とうして還元アミノ化反応を行った。SEC-MALLSにより生成物分子量を測定した。反応液を純水透析後、ゲルろ過精製し、組成分析とNMRで複合体化を確認し抗HIV活性への影響を調べた。

#### ②合成物の分離・分析

##### 1) サイズ排除クロマトグラフィー-多角度光散

乱分析 (SEC-MALLS) : 材料の吸着の起こらないポリヒドロキシメタクリレート系充てん剤を用いたカラム (Waters Ultrahydrogel 250, Ultrahydrogel 500) を用いてサイズ排除HPLCを行った。HPLC分析は、1/15 Mリン酸緩衝液 (pH7.4)-2 M NaClをrunning bufferに用いて、試料100  $\mu$ lをインジェクトし、40°C、流速 1 ml/minで行い、生成物をサイズ分画により分離した。SECからの溶出液中に示差屈折率 (RI) と光散乱 (MALLS) により検出された各ピークについて、出発物質と生成物それぞれの $dn/dc$ 値を用いて絶対分子量を求めることができるソフトASTRA V (version 5.3) を利用して解析式により計算した。



## 2) ゲルろ過クロマトグラフィーによる大量精製

Toyopearl HW50のオープンカラム (22 mm×870 mm) を用いて、溶離液には1/15 M リン酸バッファー (pH7.4)+ 2 M NaCl を使用し、0.185 ml/minの流速でシュードPGの精製を行った。

### 3) シュードPG中の多糖とPLL濃度の定量

中性糖については主にフェノール-硫酸法により各糖溶液を標準として比色定量を行った。

PLLについてはPierce社のBicinonic acidキットを用いて、BCA法により既知濃度のPLL溶液を標準として定量した。

### 4) $^1\text{H-NMR}$ 及び $^{13}\text{C-NMR}$

NMR装置は日本電子 (JEOL) の JNM-ECA800 (800 MHz) を用いた。試料を重水0.5 ml に溶解し、凍結乾燥の繰り返しにより、交換可能なプロトンを除いた。乾燥した試料を0.55 ml の重水に溶かしNMR測定管に移した後に測定を行なった。温度は 303 K に設定した。データポイント数は32,768とし、観測幅は8 kHz ( $^1\text{H-NMR}$ ) 及び160 kHz ( $^{13}\text{C-NMR}$ ) とした。 $^1\text{H-NMR}$ の積算数は32~128回、パルス角は $45^\circ$  ( $^1\text{H-NMR}$ ) 及び $30^\circ$  ( $^{13}\text{C-NMR}$ )、繰り返しパルス待ち時間は1.5秒 ( $^1\text{H-NMR}$ ) 及び2秒 ( $^{13}\text{C-NMR}$ )、ダミースキャンは1回 ( $^1\text{H-NMR}$ ) 及び4回 ( $^{13}\text{C-NMR}$ ) とした。ウインドウ関数は指数関数 (Line broadening factor = 0.2 Hz) を用いた。

### 5) 二次元NMR

JNM-ECA800 (800 MHz) を用いて、 $^1\text{H-}^1\text{H}$  Correlation Spectroscopy (COSY) 及び $^1\text{H}$  Detected Multiple Quantum Coherence (HMQC) を測定した。COSY のデータポイント数は  $1,024 \times 512$ 、観測幅は4 kHz とした。HMQCのデータポイント数は  $1,024 \times 256$ 、観測幅は  $^1\text{H}$  側を4 kHz、 $^{13}\text{C}$  側を120 kHz とした。HMQCの JC-H 定数は140 Hz とした。測定温度を 303K、繰り返しパルス待ち時間を 1.5 秒と設定し、ダミースキャンを4回行った。HMQC及びCOSYの積算回数、それぞれ 64~128及び16~64回とした。データはゼロフィーリング(データマトリックスサイズ  $1,024 \times 1,024$ ) し、ウインドウ関数はサイン-ベル関数を使用した。得られたデータは、NMRデータ処理プログラムALICE 2 (JEOL) を用いて解析した。

## ③抗HIV活性と細胞毒性スクリーニング

### 1) マイクロプレート法

抗HIV物質の細胞毒性と抗HIV活性を測定するプレートを用意する。両プレートとも96穴平底培養プレートを使用し、左端8穴に10%FCS加RPMI1640培地で所定の濃度に希釈した試料溶液を加える。残りの穴には培地を100  $\mu\text{l}$  ずつ入れ、左端の穴から8連ピペットで2倍あるいは5倍段階希釈を11穴 (5倍希釈については8穴) まで行い、12穴目は薬剤濃度を0として細胞増殖及びHIV感染のコントロールとする。被検薬剤1種類につき細胞毒性と抗HIV活性測定プレートのそれぞれ2列を使用する。細胞毒性測定用には、対数増殖期にあるMT-4細胞を集め、その  $2 \times 10^6$  個を10 ml の培地に再浮遊し、被検薬剤をすでに加えたプレートのすべての穴に100  $\mu\text{l}$  ずつ加えた。一方、抗HIV測定用のプレートには遠心分離により集めた  $2 \times 10^6$  のMT-4細胞に100TCID<sub>50</sub> となるようにHIV (IIIB) のストック溶液を加え、37°C、1時間感染させた後、培地10 ml で再浮遊し抗HIV活性測定プレートのすべての穴に100  $\mu\text{l}$  加える。培養5日目に顕微鏡によりHIVによる細胞変性効果 (CPE) と細胞毒性を観察する。マイクロプレート法を終えたサンプルはさらに、MAGIC-5細胞を用いて測定した。

### 2) MAGIC-5アッセイ法

ウエルあたり10,000個のMAGIC-5A 細胞を96穴平底プレートにまき、細胞がプレート底面に張り付くまで37°Cインキュベーター内で培養する。培養液を取り除いた後、培養液で2段階希釈 (希釈倍数は5倍) した薬剤液を加える。その後HIV-1 Ba-L株を100~200BFU/50  $\mu\text{l}$  になるようにDEAE-dextran添加培養液で調整し加える。37°CのCO<sub>2</sub>インキュベーターで48時間培養する。培養液を取り除き固定液 (1% formaldehyde and 0.2% glutaraldehyde in PBS) を加えて室温で5分間インキュベートし、洗浄の後、染色液 (4 mM potassium ferrocyanide, 4 mM potassium ferricyanide, 2 mM MgCl<sub>2</sub> and 400  $\mu\text{g/ml}$  X-gal.) を加えて、37°Cで1時間インキュベートする。染色液を取り除き洗浄し、青く染まった細胞の数を顕微鏡下でカウントする。抗HIV活性陽性検体としてTAK-779 およびAZTを用いる。



### 3) NP-2/GFP細胞を用いるスクリーニング

本研究では、ヒトグリオーマ由来のNP-2細胞に、C D4、およびCCR5あるいはCXCR4を発現させたN4R5/GFP、およびN4X4/GFP細胞を用いた。これらの細胞はHIV-1 LTRの下流に核局在シグナルが融合したGFP遺伝子が導入されているがGFP発現の無いクローンを用いている。そのため感染により細胞核内にGFPの発現が誘導される。(表4の参考写真を参照)

ウイルス) マクロファージ指向性でCCR5を使用するHIV-1 (R5ウイルス)としてBaL株、T細胞株指向性でCXCR4を使用するHIV-1 (X4ウイルス)としてIIIB株を使用した。BaL株およびIIIB株は、C8166/CCR5細胞に感染させ、上清を回収し、0.45  $\mu$ mのフィルターでろ過滅菌し、-80°Cに凍結保存し、用いた。

薬剤) 骨格分子として分子量の異なるPAA、ヒドロジノ化PAA、 $\alpha$ -PLLあるいは $\epsilon$ -PLLを使用した。骨格分子に共有結合させるGAG鎖として、heparin、dextran sulfate (DS) (8 kD)、dextran T10、dextran T20、dextran DA10、hyaluronan、D-mannose、mannotriose、mannopentaose、およびmannanを使用してシュードPG合成を行った。また各骨格分子、GAGおよびシュードPGを硫酸化あるいはアセチル化処理した。抗HIV剤のコントロールとしてheparinおよびAZT、DS (8 kDまたは50 kD)を使用した。

抗ウイルス活性試験) N4R5/GFPまたはN4X4/GFP細胞を5,000個/100  $\mu$ lで96-well plateの各wellに播種した。翌日薬剤をEMEM/10%FBS培地で段階希釈して10  $\mu$ l各wellに加えた。37°Cで1時間反応後、HIV-1 BaL株あるいはIIIB株100  $\mu$ lを、GFP陽性細胞数が1 wellあたり50-200個出る濃度で感染させた。2日後GFP陽性細胞数をカウントし、薬剤を添加していない対照と比較し、感染を50%抑制する濃度 (IC<sub>50</sub>) を算出した。

細胞毒性試験) 薬剤の50%細胞毒性濃度 (CC<sub>50</sub>) は、N4R5/GFP、N4X4/GFP細胞に薬剤を添加し、培養2日後にTetracolor oneを加え、OD<sub>450</sub>を測定して算出した。また、IC<sub>50</sub>とCC<sub>50</sub>の比を指標としてselectivity index (SI) (CC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub>) を算出した。

p24 ELISA) p24の測定はELISA法で行った。すなわち、p24に対する単クローン抗体で、ELISAプレート

をコートし、ブロッキングの後にHIV-1抗原を加えた。HIV-1陽性ヒト血清を反応させ、次にHRP標識抗ヒトIgGの結合後、基質を加えて発色させた。OD<sub>450</sub>をプレートリーダーで測定した。

細胞融合抑制試験) N4R5/GFPあるいはN4X4/GFP細胞は、HIV-1 Envを発現している細胞と混合培養すると合胞体 (多核巨細胞) を形成しうる。さらに細胞がTatを発現していると合胞体の核がGFP陽性となるので、合胞体形成を判定しやすい。R5あるいはX4ウイルスのEnvおよびTatを発現している細胞としてHeLa/Menv/Tat細胞あるいはHeLaKS386細胞を用い、N4R5/GFP細胞あるいはN4X4/GFP細胞と薬剤存在下で混合培養し、合胞体形成への影響を検討した。

### ④作用メカニズムの検討

1) 薬剤の作用対象 細胞またはウイルスへの薬剤処理を行った後、感染性を測定して薬剤がどちらに作用して阻害するかを解明する。

ウイルス側への作用を解析するために、シュードPGとBaL株あるいはIIIB株を37°Cで1時間処理し、N4R5/GFPあるいはN4X4/GFP細胞に感染させた。細胞への作用を解析するために、シュードPGをN4R5/GFPまたはN4X4/GFP細胞に添加し、37°Cで1時間処理し、薬剤を洗浄除去後、BaL株あるいはIIIB株を感染させた。感染2日後にGFP陽性細胞をカウントして感染価を算出した。

### 2) HIV-1の細胞への吸着・侵入阻害試験

細胞へのウイルス吸着は、シュードPG薬剤と反応させたX4ウイルスをN4X4/GFP細胞と1時間4°Cで反応させ、未吸着のウイルスを洗浄除去後、細胞溶解液中に含まれるp24をELISA法で定量し判定した。細胞内に侵入したウイルスは、細胞、ウイルスおよび薬剤を37°Cで1時間培養し、未吸着のウイルスを洗浄除去後にELISAを行い定量した。吸着後、細胞内に侵入するウイルスの定量は、N4X4/GFP細胞にX4ウイルスを4°Cで1時間吸着後、薬剤を添加し、37°Cで1時間培養後、未吸着のウイルスを洗浄除去し、ELISA法で定量した。

### 3) ウイルスの接着・侵入過程への影響

HIV-1ウイルスのEnvおよびTatを発現している細胞



(HeLa/Menv/Tat, HeLaKS386, MOLT4/IIIB) を用い、N4R5/ GFP細胞あるいはN4X4/GFP細胞と混合培養し、経時的に薬剤添加し合胞体（多核巨細胞）形成への影響を測定した。また、薬剤処理のタイミングを変えて、4℃か37℃で感染実験を行い、細胞溶解液中のウイルスタンパク質p24をELISA法で定量し、接着と侵入に対する阻害効果を分けて測定した。

#### 4) ラテックス粒子を用いた結合実験

P4H18、P4H15を抗原としてマウス単クローン抗体を作成した。P4H18または抗P4H18抗体で被覆したラテックス粒子を、シュードPG特異的なモノクローナル抗体と反応させ凝集すること、同時にHIVとラテックス-シュードPGが反応し凝集することを確認する。さらにシュードPG-ラテックスがウイルスまたはMOLT4/IIIB, マクロファージ株化細胞、末梢血T細胞と混合し凝集の有無を観察した。HIVのWB（ダイナボット）を利用し、ビオチン化PPGがどの構成蛋白と結合するか調べた。

#### 5) HIV-1 Env V3領域への結合阻害実験

HIV-1 Env V3とシュードPGの結合を解析するため、HIV-1が持続感染しているMOLT-4/IIIB細胞を薬剤で処理し、マウス抗V3単クローン抗体と反応させ、FITC標識抗マウス抗体の結合後、flow cytometryでシュードPGのV3への結合を調べた。コントロールとしてV3に結合するheparinを用いた。

#### 6) 産生ウイルスの感染性への影響

シュードPGの感染後期過程における影響は以下のように検討した。MOLT-4/IIIB細胞に薬剤を添加し、3日培養後、培地交換して薬剤を添加し、さらに3日間培養し、培養上清中のウイルスの感染性をN4X4/GFP細胞に感染させて調べた。コントロールとして糖鎖修飾阻害剤のN-butyl deoxynojirimycin (N-buDNJ)を使用した。同時に薬剤によるMOLT-4/IIIB細胞への毒性効果をTetracolor oneにより検討した。

#### 7) 逆転写酵素活性に対するPPG作用

逆転写酵素活性測定キット (CAVIDI AB社) を用い、マウスレトロウイルスの逆転写酵素反応の段階にPLL (15-30K)、dextranT10(10K)、PLL(40-60K)-dextran T10(10K)を加え、100%逆転写酵素反応系が阻害されるかを調べた。

8) シュードPGの組換えヒト(rh)CypA結合性 ヒトCypA 遺伝子に特異的なプライマーを作成し、ヒト肝cDNAライブラリーから、high-fidelity DNApolym eraseを用いたPCRにより507bp CypA遺伝子(GenBank: Y00052)のクローニングを行った。pET15bプラスミドに組み込むことでN末にHisタグの付いたリコンビナントヒトCypAを大腸菌で発現させ、コバルトアフィニティーカラム(TALON metal affinity resins, Clontech)を用いて精製した。

各シュードPGをBiacore用センサーチップに固定化し、rhCypAとの相互作用をBiacore2000(GE Healthcare社)を用いてSPRにより測定した。リガンドの固定化はアミンカップリング法により7分間活性化した後、10 mMホウ酸buffer (pH8.5)で作成した20 µg/mlのシュードPG溶液を7分間インジェクトし固定化させた。残っているN-hydroxysuccinimide estersを1 M ethanalamine hydrochloride (pH8でブロックを行った。50 mM NaOH, 1M NaCl溶液で1分間3回洗浄後、フローセル内をPBS (pH7.4)に置換し、各濃度のアナライト (rhCypA, HSP90) の希釈系列を作成し、120秒間、20 µl/min、25℃でフローセルにインジェクトした。解離は120秒間行った。再生は25 mM NaOHで5 µlを流すことにより行った。親和定数は、得られたセンサーグラムを用いて、BIAevaluation software version 3.1の1:1 binding modelを使用したglobal analysisにより算出した。

9) 抗血液凝固活性への影響 IWAKI assay plateに50 µlの血液凝固試験用コントロールヒト血漿N(Dade Behring 社)と50 µlのサンプルを加え37度で1分間ブレインキューベーションした。その後、80 mM カルシウム溶液を25 µl加え37度で反応を行った。血液凝固反応の検出にはViento XS(DS Pharma Biochemical社)を用いて、経時的に波長350 nmで測定した。

(倫理面への配慮)すでに倫理委員会などの承諾を得て行政管理下でのHIVを用いた測定によって研究を進めている。病原微生物の取り扱い指針を遵守した。

#### C. 研究結果

① シュードPGの合成 これまでに87種類合成し、内57種類の抗HIV活性を測定した。硫酸化多糖



では高反応性のヒドラジノ化 PAA を骨格に用いても収率が低いことが 19 年度に判明した。一方、中性多糖である平均分子量 1 万の dextran (H7 および H18), mannotriose (H16)、非硫酸化多糖ヒアルロン酸 (H15)、重合度 1~7 糖のマルトオリゴ糖 Glc-Glc<sub>7</sub> を用いると、SEC-MALLS において材料よりも高分子量化したピークが 45°C、7-14 日間ではほぼ定量的に生成した。

図 1 にヒアルロン酸-PLL を例にとり、SEC-MALLS において RI で検出した溶出曲線と MALLS から算出したピークの分子量値を示す。H15P4 の平均分子量は約 5 万と求められ、約 15 k の PLL に約 5 k のヒアルロン酸鎖が約 7 本結合した複合体が生成したと推定される。図 2 (D) と表 1 に示す 800 MHz <sup>1</sup>H-NMR におけるシグナルの変化より、H15P4 では PLL とヒアルロン酸の両成分が共有結合して存在している。また、Dextran シュード PG について、化学的に組成分析により求めたアミノ酸と糖の含有比は、表 2 のように、分子量からの計算値とよく一致した。

② HIV 活性スクリーニングと細胞毒性 種々のシュード PG につき、マクロファージ系 MAGIC-5A 細胞を用いた抗 HIV 活性測定を行った (図 3, 表 3)。用いた多糖のうち、硫酸化 dextran (DexS または DS8000) は単独で抗 HIV 活性を示した。しかし興味深いことに、多糖鎖として単独では活性のない非硫酸化 dextran を用いて PLL と複合体を合成したとき、硫酸化 Dextran を超える顕著な活性発現が認められた。また鎖長の長い dextran および PLL を用いると、より強い抗 HIV 活性を示すことが明らかとなった。一方、合成後の PLL のアミノ基を N-アセチル化またはビオチン化により修飾すると活性が全く無くなることから、活性発現には骨格分子の遊離アミノ基が関与することが示唆された (図 3, 表 3)。

Dextran-PLL は、NP-12/GFP 細胞を用いたアッセイ系においても X4 および R5 ウイルス (表 4)、逆転写酵素阻害剤耐性およびプロテアーゼ阻害剤耐性株のウイルス (表 5) に対しても、低濃度で感染抑制効果を示した。やはり活性を持たないヒアルロン酸やマンノトリオースの H15、H16 を用いて合成したシュード PG は X4 ウイルスに対してのみ感染抑制効果を

示した (表 4, P4H15, P4H16)。一方、H15 を硫酸化すると単独で X4 ウイルスの感染抑制効果を示すようになり (表 4)、GlcNAc の 6 位と GlcA の 2 位が硫酸化されたことを NMR により確認した (表 1)。しかし、H15 をシュード PG 合成後に硫酸化すると失活した (表 4, sulfatedH15P4)。また、P4H18、P7H7 は、高濃度で R5 の Env を介した細胞融合を抑制した (表 4, Coculture 列)。なお毒性については、4-60kD の骨格分子、αPLL (P3, P4, P7) は高濃度で細胞毒性を示し、CC<sub>50</sub> は 25-55 μg/ml であったが、シュード PG に合成後は著しく細胞毒性が低下した (表 4)。

今回、硫酸基の無い dextran 誘導体で活性が見られたことは画期的であり、用いた PLL の骨格を毒性の低い物質に変えることによってより実用的な抗 HIV 化合物が期待できる。一方、α-PLL の異性体で毒性が無く食品添加剤にも使用される ε-PLL を用いて合成した dextran-PLL (P8H7) は抗 HIV 活性を示さなかった (表 4) ため、骨格分子のアミノ基の結合位置も活性発現に重要であることが示された。

### ③ Dextran シュード PG の作用メカニズム

R5 および X4 ウイルスの感染と R5 Env の合胞体形成を阻害する P4H18 を中心に検討した。

1) 作用対象はウイルスか、細胞か 薬剤を細胞側に処理した場合 (図 4A) よりも、ウイルス側に処理する方が感染を著しく抑制し、特に Bal ウイルスに対して顕著に抑制した (図 4B)。よって P4H18 は細胞とウイルスの両方に作用するが、特にウイルス側への感染抑制効果が大きいことが示唆された。

2) 作用段階 P4H18 は 4°C で濃度依存的にウイルス接着を阻害し、100 μg/ml ではヘパリンより高く阻害した (図 5A)。37°C ではウイルスの接着-細胞内侵入を通じて約 90% 抑制し (図 5B)、さらに侵入段階も抑制することが示唆された (図 5C)。また、持続感染している MALT4/IIIB 細胞と非感染 MALT4 の接着融合を抑制する作用を、薬剤処理のタイミングを変えて調べると、ウイルス吸着・融合段階に強く影響を与えていることが示された (表 6)。

3) 標的部位 Heparin は HIV-1 Env の V3 領域と結合してウイルス接着を阻害するが、P4H18 は MALT-4/IIIB 細胞と抗 V3 単クローン抗体の結合を



阻害せず(図6)、HIV-1との結合部位はV3領域ではないことが示唆された。

4) 被覆ラテックスを用いた結合実験 P4H18に対する単クローン抗体が得られ、P4H15に対しては得られなかった。P4H18で被覆したラテックス粒子は、HIV-1と感染MOLT-4/IIIB細胞を凝集し、マウスマクロファージ株化細胞RAW264.7とは弱く反応したが、末梢血T細胞には明確に反応しなかった。P4H18がウイルスおよび細胞表面へ結合することと、細胞による差が示された(図7)。

5) 産生ウイルスの感染性への影響 HIV-1持続感染MOLT-4/IIIB細胞から産生されたHIV-1ウイルスの感染性に対しては、シュードPGの明らかな影響は見られなかった(表7)。

6) rhCypAとの結合性 シュードPGをアミンカップリング法によりCM-5センサーチップに固定化して、大腸菌で発現し精製したrhCypAとの結合を測定した。P7に対しては $K_a=10^7 M^{-1}$ の有意な結合を示したが、P7H7に対してはHSP90存在下で $K_a=10^5 M^{-1}$ の弱い結合を示し、P7H15に対しては全く結合しなかった。

7) 逆転写酵素活性への影響 P4は100 $\mu g/ml$ 、P4H18は1 $\mu g/ml$ で酵素活性を100%抑制した。H18では抑制が無かった(表8)。

8) 血液凝固活性 P4H7やP7H15はヘパリンより多糖として2-3桁高い濃度で弱い凝固遅延が認められた。

以上の作用機構に関する結果をまとめると、P4H18は、R5及びX4ウイルスのEnv V3の先端以外に作用して、標的細胞へのHIV-1の接着および侵入を阻害することが示唆された。一方、インビトロで逆転写酵素阻害作用が示されHIVの保護作用をもつヒトrecCypAとの結合性もHSP90存在下で検出されたことから、接着侵入阻止以外の段階で作用することも考えられる。

さらに、本研究において、LC/MS<sup>n</sup>を利用してGAGの構成糖数、硫酸エステル基結合数及び結合位置を解析する方法も確立された。また二次元NMRを用いて硫酸化ヒアルロン酸およびヒアルロン酸シュード

PGの構造解析を行う事ができた。シュードPGの硫酸化が活性を失う理由ならびに詳細な複合体構造と抗HIV活性の関係解明に、今後本法を活用していく。

#### D. 考察

本研究成果として特筆すべき事は、当初の研究テーマである硫酸化多糖のシュードPGに見出された抗HIV活性の最適化研究を行っている中で、合成アミノ酸ポリマーとdextranという、全く抗エイズ活性とは関係のない物質同士の複合体形成により、新規の抗エイズ活性が出現したことである。当初、いろいろの化合物のスクリーニングに時間がかかったことと、硫酸化多糖を合成材料に使用した場合に、合成収率が非常に低かったため薬剂量が少なく抗HIV機構の解明に時間がかかった。しかし、結果として作用機構の全く異なる新規の抗エイズ活性化合物を見出し、その作用機構が見えてきつつある。

硫酸化多糖の抗HIV活性に関しては既に多くの研究がなされ、その新規性は少ないが、非硫酸化多糖誘導体による活性出現は画期的である。またその作用機作は本研究成果から示されたようにEnv V3の先端以外を標的としているらしく、硫酸化多糖とは全く異なるものと考えられ、新しいタイプの抗ウイルス剤の可能性はある。いくつかの有効な抗HIV薬が開発され、その複合投薬によりある程度の対処が可能となっている現在、最も期待されているのが従来とは異なった作用機作を持つ新たな化合物である。その意味で本研究により見出された新規抗HIV活性体は今後の創薬に向けての発展が大いに期待される。

今後の展望について 細胞へのHIV-1の接着阻害が作用の第一段階と考えられるので、今後はシュードPGが結合するHIV-1および細胞性因子を究明したい。また、細胞内移行の有無、およびHIV-1が粒子表面に取り込んだCypAとその受容体CD147を介した感染経路に対しても、シュードPGの影響を検討する。

#### E. 結論

抗HIV活性が見出された、天然由来多糖と合成高分子ポリマー複合体である種々のシュードPGにつ



き、抗HIV活性測定を行った。これらの複合体の中から、意外にも硫酸化多糖の代わりに、多糖として単独では活性を示さないdextran等の非硫酸化糖類を用いた複合体が顕著な活性を示した。これらのシュードPGのHIV感染抑制機序の一つとしてウイルスの接着侵入抑制があり、標的分子は硫酸化多糖とは異なることが示唆されたので、新たな抗HIV活性機構が期待される。

#### F. 健康危険情報 なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Nakagawa, K., Nakamura, K., Haishima, Y., Yamagami, M., Saito, K., Sakagami, H., Ogawa H. Pseudoproteoglycan (pseudoPG) probe that simulate PG macromolecular structure for screening and isolation of PG-binding proteins. *Glycoconj. J.*, in press
- 2) Sano K, Asahi M, Yanagibashi M, Hashii N, Itoh S, Kawasaki N, Ogawa H. Glycosylation and ligand-binding activities of rat plasma fibronectin during liver regeneration after partial hepatectomy. *Carbohydr Res*, 343, 23-29-35, 2008.
- 3) Ogawa, H. and Nakagawa, K. Development of neoglycoconjugate probes and detection of lectins. *Experimental Glycoscience, Glycochemistry*,
- 4) 佐野琴音 小川温子. ビトロネクチンのコラーゲンおよび線溶系因子との相互作用. 生体の科学 vol 59, No. 2, pp. 118-122 (2008).

##### 2. 学会発表

- 1) 大山真実、高原有未、佐野琴音、小川温子：血液凝固因子フィブリノーゲンとフィブリンに見出した糖結合性、糖質学会 (2008)
- 2) 齋藤泉、坂上ひろみ、小川温子：ウシトリプシノーゲンの活性化は、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同代会 (2008.12)
- 3) 樋上智子、中村公亮、竹川寛子、相川京子、小川温子、哺乳類膵臓リパーゼの糖結合性-レコンピナントヒト膵臓リパーゼの調製とその性質-、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同代会 (2008.12)
- 4) 中村公亮、坂上ひろみ、中原義昭、小川温子、Fmoc-アミノアシル糖鎖を用いる糖鎖-レクチン相互作用のSPR解析、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同代会 (2008.12)
- 5) 平島友里恵、加藤真利、坂上ひろみ、小川温子、抗体分子の持つ抗原認識とは異なる糖結合性の発見とその意義、第81回日本生化学会大会合同代会 (2008.12)
- 6) 佐野琴音、伊藤さつき、橋井則貴、川崎ナナ、安川然太、佐藤ちひろ、北島健、小川温子、組

織再生または繊維化に関わるビトロネクチンの活性調節と修復過程における糖鎖変化、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同代会 (2008.12)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

##### 1. 特許取得

- 1) 小川温子、中村公亮、坂上ひろみ、棚元憲一「抗ウイルス剤」(特願2008-301811)
- 2) 星野洪郎、B型肝炎ウイルスの感染性を容易に短期間に判定する方法 (国際出願: PCT/JP2006/317984)
- 3) 小川温子、齋藤泉、坂上ひろみ、「肺炎の予防・治療剤」(特願2008-301811)
- 4) 棚元 憲一「新規ペプチドおよびこれを用いたエンドトキシン由来疾患治療剤」(特願2006-21779、国内、PCT/JP2007/51439、国外)
- 5) 棚元 憲一「抗ウイルス剤」(特願2006-030248)

##### 2. 実用新案登録 なし

##### 3. その他 なし

図1 ヒアルロン酸シュートPG (H15P4) の合成と SEC-MALLSによる分子量測定

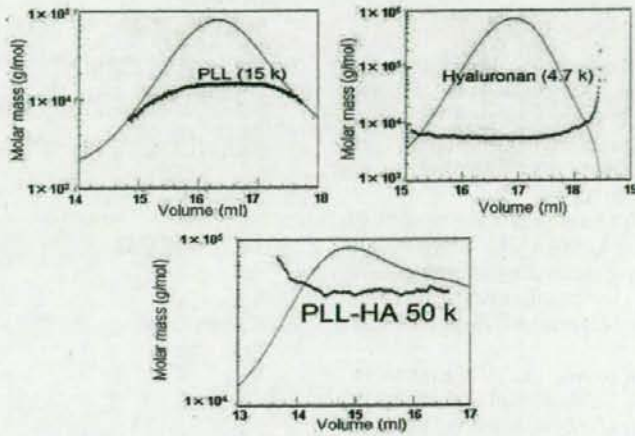
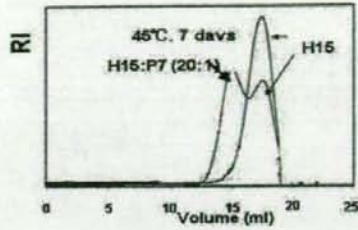


図2 ヒアルロン酸(M.W. 130,000) (A), 低分子量ヒアルロン酸(H15, M.W. 4,700) (B), 硫酸化H15(C) 及びシュートPG (PLL(M.W. 約20,000) + H15(P4H15))(D) の<sup>1</sup>H NMR. P4H15では, αGlcNAcのH1が観測されなかった. βGlcNAcのH1はDOHのピークと重なっている.

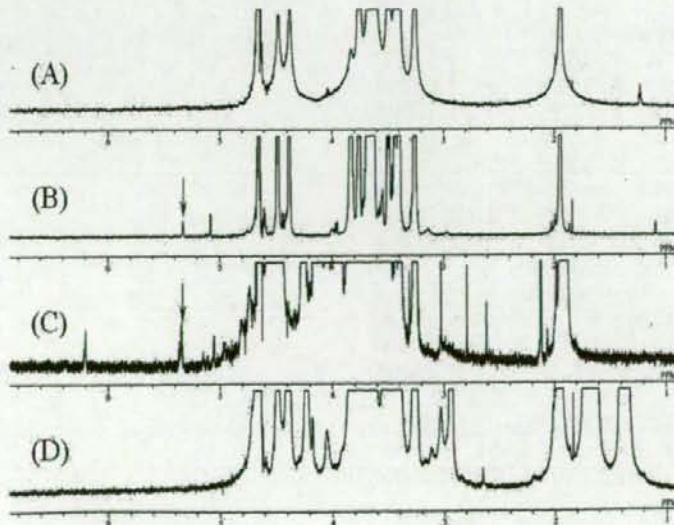




表1 ヒアルロン酸 (HA, MW 130,000), 低分子量ヒアルロン酸 (HL, MW 4,700, 硫酸化HI (HIS), シュールFG (FL, MW 約20,000) + HL (P4HL)) 及び硫酸化ヒアルロン酸 (CSHA, MW 130,000) の化学シフト

Residue	Proton	<sup>1</sup> H Chemical shift (ppm)					<sup>13</sup> C Chemical shift (ppm)					
		HA	HL5	HIS	P4HL5	CSHA	Carbon	HA	HL5	HIS	P4HL5	CSHA
GlcNAc	H1	① 4.48	4.48	4.51	④ 4.49	4.84	C1	① 102.9	102.9	① 101.3	④ 103.1	101.3
	H2	3.76	3.76	3.75	3.77	3.87	C2	53.2	56.5	57.2	57.0	56.6
	H3	3.63	3.62	3.63	3.64	4.39	C3	82.0	84.9	83.1	82.5	78.2
	H4	3.44	3.44	3.45	3.46	4.06	C4	67.0	70.9	71.2	71.4	70.5
	H5	3.41	3.41	3.39	3.40	3.87	C5	74.2	77.8	78.3	78.2	74.4
	H6a	3.66	3.68	3.65	3.69	4.17	C6	60.8	62.9	63.3	63.4	69.3
GlcA	H6b	3.84	3.84	3.81	3.84	4.54						
	H1	④ 4.38	④ 4.42	④ 4.46	④ 4.51	4.89	C1	④ 101.8	④ 105.4	④ 105.8	④ 106.0	108.9
	H2	3.26	3.29	3.26	3.27	4.45	C2	71.5	74.9	75.0	75.3	81.1
	H3	3.30	n.d.	3.55	n.d.	4.82	C3	72.4	75.9	76.7	75.9	78.2
	H4	3.66	3.68	3.71	3.67	4.47	C4	81.0	82.3	83.7	78.9	77.2
PLL	H5	3.41	3.63	3.68	3.64	4.22	C5	75.1	78.5	76.0	78.9	81.5
	H2				① 4.23	4.23	Cα				① 55.9	55.9
	H3				1.67	1.73	Cβ				33.4	33.4
	H4				1.55	1.40	Cγ				25.1	25.1
	H5				1.63	1.63	Cδ				20.1	29.1
	Hε				2.94	2.94	Cε				42.0	42.0

<sup>1</sup>H NMR のケミカルシフトは DOH を 4.65 ppm に設定して算出した。① 非硫酸化 GlcNAc (I) 非硫酸化 GlcA (II) 硫酸化 GlcA (III) 還元末端 GlcNAc (IV) 還元末端 GlcNAc に結合した GlcA (V) 6-O-硫酸化 GlcNAc (VI) 2-O-硫酸化 GlcA (VII) HA 及び HL5 と比較して大量に検出されたことを示す。

表2 シュードPG (PLL-デキストラン) の組成と合成収率

(Dex (S) = H7 or H18, PLL (S) = P4, PLL (L) = P7)

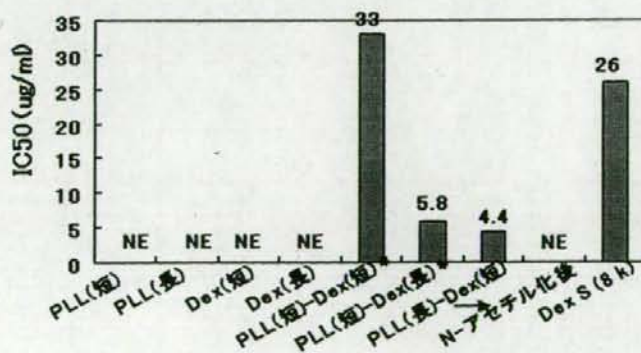
		Dex(S)	PLL(S)	PLL(S)-Dex(S)	PLL(L)	PLL(L)-Dex(S)
dn/dc		0.120	0.160	0.115	0.158	0.146
$\overline{Mw}$ (g/mol)		$1.09 \times 10^4$	$9.81 \times 10^3$	$9.78 \times 10^4$ (1:8)**	$2.14 \times 10^4$	$1.38 \times 10^5$ (1:11)**
化学組成	PLL (mg/ml)	—	0.45	0.65	0.98	1.26
	糖鎖 (mg/ml)	10	—	6.03	—	5.86
モル比 PLL:糖鎖		—	—	1:8	—	1:9
合成収率(%)		—	—	64	—	65

\*  $\overline{Mw}$ : SEC-MALLSにより算出.

\*\* 括弧内の (PLL:糖鎖) はSEC-MALLSから求めた $\overline{Mw}$ より算出した組成比.

図3 マクロファージ指向性ウイルスに対する有効性

(NE: not effected)





**表3 種々のシュードPGのアミノ基修飾による抗HIV活性変化**

サンプル	MAGIC5 アッセイ	
	CC	IC50
dextran	0	NE
acetylated dextran	0	NE
biotinylated dextran	0	NE
PLL1	7.6	NE
acetylated PLL1	>245	NE
biotinylated PLL1	15.9	NE
Acetylated/biotinylated PLL1	645	NE
PLL2	7.6	NE
acetylated PLL2	270	NE
biotinylated PLL2	1.76	NE
Acetylated/biotinylated PLL2	155	NE
PLL1-dextran	120	17.3
acetylated PLL1-dextran	>65	NE
biotinylated PLL1-dextran	>2.1	NE
Acetylated/biotinylated PLL1-dextran	>44.5	NE
PLL2-dextran	150	2.7
acetylated PLL2-dextran	>110	NE
biotinylated PLL2-dextran	95	NE
Acetylated/biotinylated PLL2-dextran	>46	NE
DS8000	>500 $\mu$ g/ml	45.0 $\mu$ g/ml
TAK779	>1 $\mu$ M	0.047 $\mu$ M

PLL1: 15-30K, PLL2: 40-60K, Dextran: 10K, DS8000: デキストラン硫酸 8K, NE: not effected

**表4の参考写真** NP-2/GFP細胞を用いた抗HIV活性検出（感染細胞でGFPが発現する）  
BaI株(左)およびIII B株(右)で、それぞれのパネルに添加した薬剤の種類と量は同一である。



表4 NP-2/GFP細胞を用いたシュードPGの抗HIV-1活性と細胞融合抑制活性

Code	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/ml) *1					Selectivity index CC <sub>50</sub> /IC <sub>50</sub>			
	Infection		Coculture		CC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/ml)	Infection		Coculture	
	BaL	IIIIB	HeLa/M- env/Tat	HeLaKS38 6		BaL	IIIIB	HeLa/M- env/Tat	HeLaKS386
H7	>100	>100	ND *2	ND	>100	<1	<1	ND	ND
H8	>147.5	>147.5	ND	ND	>100	<0.8	<0.8	ND	ND
H18	>100	>100	>100	>100	>100	<1	<1	<1	<1
P2	>100	>100	>100	>100	>100	<1	<1	<1	<1
P3	>1	>1	>1	>1	35	<35	<35	<35	<35
P4	>1	>1	>1	>1	25	<25	<25	<25	<25
P7	>6	>6	ND	ND	55	<16.7	<16.7	ND	ND
P8	>1300	>1300	ND	ND	>100	<0.08	<0.08	ND	ND
P2H18	>100	>100	>100	>100	>100	<1	<1	<1	<1
P3H18	3	3	>100	>100	>100	>33	>33	<1	<1
P4H18	2	0.5	60	>100	>100	>50	>200	>1.7	<1
P4H7	3.8	1.2	>100	>100	>100	>26	>83	<1	<1
P4H8	2	0.6	ND	ND	>100	>50	>167	ND	ND
P7H18	6	1.5	ND	ND	>100	>17	>67	ND	ND
P7H7	0.02	0.01	3	>100	>100	>5000	>10000	>33	<1
P8H7	>38.5	>38.5	ND	ND	>100	<2.6	<2.6	ND	ND
H19	>100	>100	ND	ND	>100	<1	<1	ND	ND
H16	>100	>100	ND	ND	>100	<1	<1	ND	ND
H17	>100	>100	ND	ND	>100	<1	<1	ND	ND
H13	>100	>100	ND	ND	>100	<1	<1	ND	ND
P4H16	>100	1	>100	>100	10-100	<1	10-100	<1	<1
P4H17	>100	>100	ND	ND	1-10	<0.1	<0.1	ND	ND
P4H13	>100	>100	ND	ND	10-100	<1	<1	ND	ND
H15	>100	>100	ND	ND	>100	<1	<1	ND	ND
SulfatedH15	5.7	1	>100	>100	>100	>18	>100	<1	<1
P4H15	21	7	>100	>100	>100	>5	>14	<1	<1
SulfatedP4H15	>100	>100	ND	ND	>100	<1	<1	ND	ND
P4 with sulfation step	>100	>100	ND	ND	10-100	<1	<1	ND	ND
High-sulfatedH7	>100	5.3	>100	>100	>100	<1	>19	<1	<1
Low-sulfatedH7	>100	10	>100	>100	>100	<1	>10	<1	<1
High-sulfatedP4H7	>100	>100	>100	>100	>100	<1	<1	<1	<1
Low-sulfatedP4H7	>100	33	>100	>100	>100	<1	>3	<1	<1
acetylatedP4H18	>100	50	ND	ND	>100	<1	>2	ND	ND
acetylatedP4H8	>28	20	ND	ND	>100	<4	>5	ND	ND
acetylatedP7H18	35	6	ND	ND	>100	>3	>17	ND	ND
acetylatedP8H7	>46.5	>46.5	ND	ND	>100	<2	<2	ND	ND
AZT	0.02	0.02	>100	>100	>100	>5000	>5000	<1	<1
Heparin	70.0	0.3	ND	ND	>100	>1	>333	ND	ND
DS50k	6.7	0.21	>100	4	>100	>15	>476	<1	>25
DS2k	0.14	0.02	>100	>100	>100	>714	>5000	<1	<1

\*1 PLLIは骨格分子濃度、GAG鎖及びシュードPGIは多糖濃度で算出。 \*2 N.D. (Not done)



表5 薬剤耐性ウイルスに対する抗-HIV活性

サンプル名	IC90 ( $\mu\text{g/ml}$ )		
	IIIB	RTr	PRr
P4	NE	NE	NE
P7	NE	NE	NE
H7	NE	NE	NE
H7P4	3.2	2.9	4.8
H7P7	0.64	0.54	0.77

RTr: 逆転写酵素阻害剤耐性ウイルス、PRr: プロテアーゼ阻害剤耐性ウイルス NE: 効果無し

図4 シュードPGの感染抑制活性

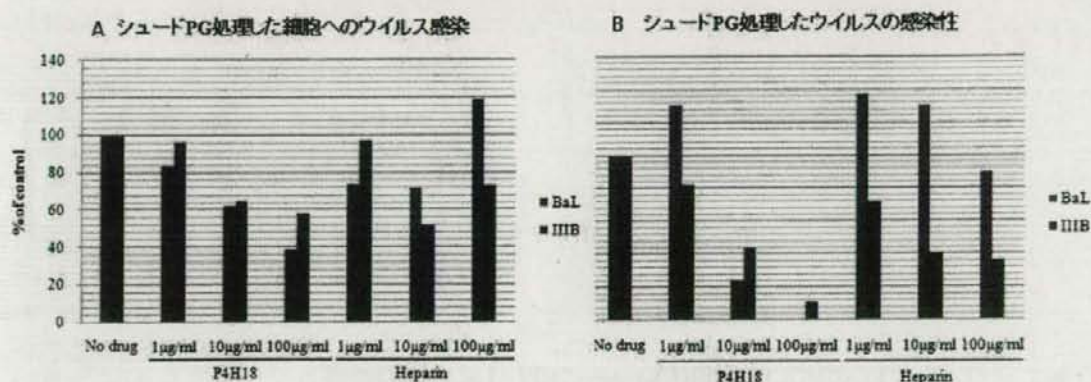


図5 シュードPGのHIV-1吸着および侵入阻害効果

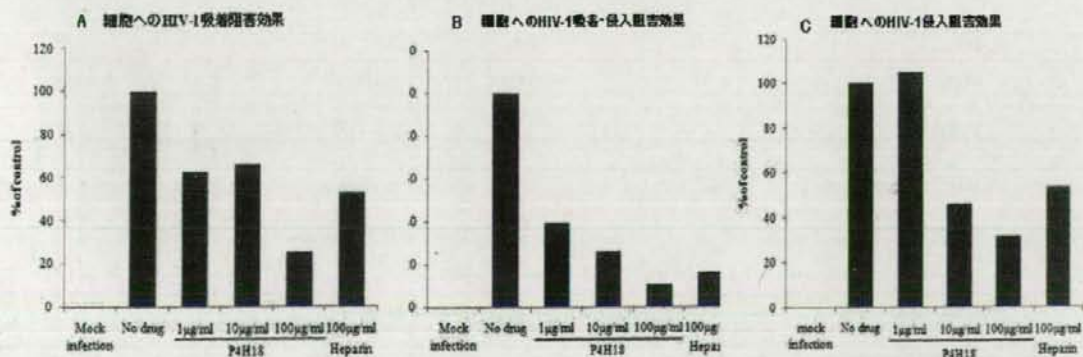


表6 シュードPGのPre-treatment, Treatment, Post-treatmentにおける巨細胞形成への影響

P4H18(1000 $\mu$ g/ml)	Giant cell formation
before 3days	2+
before 2days	2+
before 1day	2+
before 1hours	2+
at infection	—
after 4 hours	1+
control	2+

図6 シュードPGによるHIV-1 Env V3領域への結合阻害効果

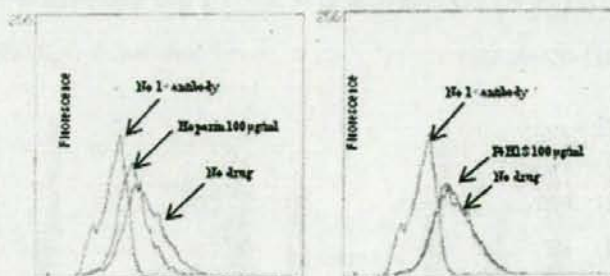


表7 シュードPGのMOLT4/IIIB細胞からのHIV-1産生への影響

Sample	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/ml)	CC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/ml)
P2	>100	>100
P3	10*1	25
P4	2.5*1	6
H18	>100	>100
P2H18	>1.4	>1.4
P3H18	>4.6	>4.6
P4H18	>15.4	>15.4
N-buDNJ N-butyl deoxyinosinmycin (positive control)	20	>100

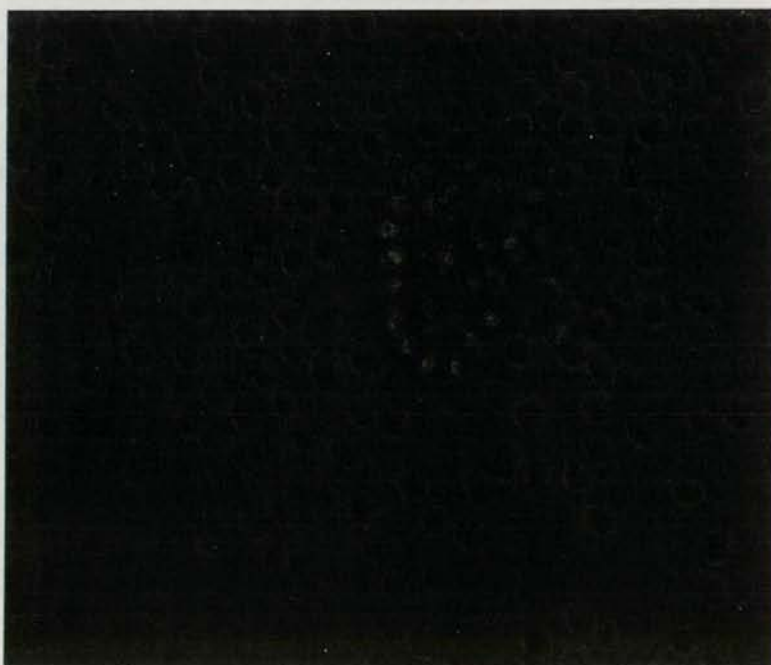
\*1 薬剤によるMOLT-4/IIIB細胞への毒性によりウイルス産生細胞数が減少し、HIV-1産生に影響が出た



表8 シュードPGの逆転写酵素阻害活性

Sample	100% inhibition
P4: PLL (15-30 k)	100 $\mu$ g/ml
H18: dextran10 (T10)	>1000 $\mu$ g/ml
P4H18: PLL(15-30 k)-dextran T10 (10 k) fraction 58-67	1 $\mu$ /ml

図7 PPG感作ラテックスによるHIV-1感染細胞 (MOLT4/IIIB) の凝集能 (40X)



## シュードプロテオグリカンの抗HIVスクリーニング

研究分担者 棚元 憲一

国立医薬品食品衛生研究所

研究協力者 森 治代、川畑 拓也

大阪府立公衆衛生研究所

### 研究要旨

単独では活性を示さないPoly-L-lysine (PLL)とデキストランの複合体が、MAGIC-5Aアッセイで顕著な抗HIV活性を示した。この複合体の活性は硫酸化およびアセチル化、ビオチン化によるアミノ基修飾で活性が完全に消失した。またPLLおよびデキストランのいずれも鎖長が長いものがより強い抗HIV活性を示した。この化合物群は、物性から考えて新たなHIV活性機構を持つことが予想されることから、新規抗HIV活性薬剤への発展が期待される。

### A. 研究目的

天然のプロテオグリカンの分子構造を模倣して人工的に作成した種々のグリコサミノグリカン (GAG) 鎖をもつ分子量数万から数十万に調製されたシュードPGを用い、それらの抗HIV活性スクリーニングを行う。スクリーニングはMT-4細胞によるT-tropic virusに対する抗HIV活性、及びMAGIC-5A細胞とM-tropic HIV-1を用いた抗ウイルス活性をスクリーニングした。

### B. 研究方法

#### 1) スクリーニング試験

a) マイクロプレート法：抗HIV物質の細胞毒性と抗HIV活性を測定するプレートを用意する。両プレートとも96穴平底培養プレートを使用し、左端8穴に10%FCS加RPMI1640培地で所定の濃度に希釈した試料溶液を加える。残りの穴には培地を100  $\mu$ lずつ入れ、左端の穴から8連ピペットで2倍あるいは5倍段階希釈を11穴（5倍希釈については8穴）まで行い、12穴目は薬剤濃度を0として細胞増殖及びHIV感染のコントロールとする。被検薬剤1種類につき細胞毒性と抗HIV活性測定プレートのそれぞれ2列を使用する。細胞毒性測定用には、対数増殖期にあるMT-4細胞を集め、その2  $\times 10^6$  個を10 mlの培地に再浮遊し、被

検薬剤をすでに加えたプレートのすべての穴に100  $\mu$ lずつ加えた。一方、抗HIV測定用のプレートには遠心分離により集めた2  $\times 10^6$  のMT-4細胞に100TCID<sub>50</sub>となるようにHIV (IIIB) のストック溶液を加え、37°C、1時間感染させた後、培地10 mlで再浮遊し抗HIV活性測定プレートのすべての穴に100  $\mu$ l加える。培養5日目に顕微鏡によりHIVによる細胞変性効果 (CPE) と細胞毒性を観察する。

b) MAGIC-5アッセイ法：ウエルあたり10,000個のMAGIC-5A細胞を96穴平底プレートにまき、細胞がプレート底面に張り付くまで37°Cインキュベーター内で培養する。培養液を取り除いた後、培養液で2段階希釈（希釈倍数は5倍）した薬剤液を加える。その後HIV-1 Ba-L株を100~200BFU/50  $\mu$ lになるようにDEAE-dextran添加培養液で調整し加える。37°CのO<sub>2</sub>インキュベーターで48時間培養する。培養液を取り除き固定液（1%formaldehyde and 0.2% glutaraldehyde in PBS）を加えて室温で5分間インキュベートし、洗浄の後、染色液（4 mM potassium ferrocyanide, 4 mM potassium ferricyanide, 2 mM MgCl<sub>2</sub> and 400  $\mu$ g/ml X-gal.）を加えて、37°Cで1時間インキュベートする。染色液を取り除き洗浄し、青く染まった細胞の数を顕微鏡下でカウントする。抗HIV