

200808012A

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
平成20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

研究代表者 杉浦 亙

名古屋医療センター 臨床研究センター

平成21(2009)年3月

平成20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20年度 総括・分担研究報告書—

研究代表者 杉浦 互

平成21(2009)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 互	研究代表者	名古屋医療センター 臨床研究センター	部長
明里 宏文	研究分担者	独立行政法人医薬基盤研究所 霊長類医学研究センター	室長
田中 晴雄	研究分担者	いわき明星大学 薬学部	教授
野村 伸彦	研究分担者	富山化学工業株式会社 総合研究所 第三研究部	主幹研究員
足立 昭夫	研究分担者	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	研究協力者	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
研究代表者：杉浦 互 独立行政法人国立病院機構 名古屋医療センター臨床研究センター 部長	
研究分担者：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 第三研究部 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	

分担研究報告書

新規な機序による抗HIV薬剤の開発とその阻害機序の解析	6
研究分担者：杉浦 互 独立行政法人国立病院機構 名古屋医療センター臨床研究センター 部長	
研究協力者：岩谷 靖雅 名古屋医療センター臨床研究センター 室長	
吉居 廣朗 名古屋医療センター臨床研究センター レジデント	
Vif機能を標的とした新規治療薬の開発研究	12
研究分担者 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	
抗HIVタンパク質アクチノヒピンの高活性化と抗HIV/AIDS薬としての開発研究	16
研究分担者：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
研究分担者：野村 伸彦 富山化学工業株式会社 総合研究所 第三研究部 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	24
研究分担者：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	
研究協力者：野間口雅子 徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部 講師	
HIV-1 のpol遺伝子を持つ新規SHIVを用いたサルHAARTモデルの開発	28
研究協力者：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

1. 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

研究代表者

杉浦 互 名古屋医療センター臨床研究センター 部長

研究分担者

明里 宏文 医薬基盤研究所霊長類医科学研究センター 室長

足立 昭夫 徳島大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 教授

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三研究部 主幹研究員

既存の抗HIV薬と交叉耐性を示さない、新規な機序でHIVの増殖を抑制する薬剤開発に取り組んだ。開発を進めている低分子候補化合物は、その作用点が絞り込まれpre-integration inhibitor (PIC阻害剤)と仮称することとした。ヒト血清アルブミンのHIV阻害活性に及ぼす影響の評価と化合物の最適化、小動物を用いた毒性試験を終了し、サル感染モデル実験の準備に取り組んでいる。アクチノヒピンはより強力な誘導体の開発に成功し、実用化に向けて確実に成果を上げている。前臨床試験としてのサル感染モデル開発も着実に進展しており、次年度の評価実験を計画している。

■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。

■B. 方法

本研究班では (i) 開発グループと (ii) 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)。開発グループでは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、抗HIV活性を指標とした *in vitro* 評価系での低分子化合物ライブラリの再評価、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等に取り組んだ。一方、実用化グループでは2系統の新薬候補化合物 (図2)、富山化学野村伸彦研究分担者/名古屋医療センター杉浦互等が開発した低分子候補化合物およびいわき明星大学田中晴雄研究分担者の開発した接合・侵入阻害剤アクチノヒピンの実用化に向けた開発研究、更に新規化合物の抗HIV効果を評価するためのサルモデルの開発に取り組んだ。低分子候補化合物については標的の同定と阻害機序の解明と阻害

活性に対するヒト血清の影響について評価を行った。融合阻害剤アクチノヒピンについては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に取り組んだ。サルを用いた評価系の開発ではサル細胞指向性HIV-1およびSIVを用いた *in vitro* 感染実験に取り組んだ。

■C. 結果

本年度は下記の研究成果を上げた。詳細については各研究者分担者の報告書を参照。

(i)開発グループ

(1)Vif阻害剤開発基盤技術の開発。(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)

(ii)実用化グループ

(1) 新規阻害剤候補化合物Dの阻害機序の解析を行った結果、pre-integration complexに作用していることが推測された。このことからこの化合物群をPIC阻害剤と仮称することとした。

(2) ヒト血清アルブミン(HSA)の影響を受けない化合物D類似化合物の探索を行った。146化合物の評価を行い、HSAの添加でもIC₅₀の変動が5

- 倍以下の化合物 28 個を同定した。(野村、杉浦)
- (3) ヒット化合物の誘導体として、新たに 84 化合物を合成・評価した。(野村、杉浦)
 - (4) 有効性、体内動態、安全性に関して優れた化合物を再合成し、ラット反復投与毒性試験を実施している。(野村)
 - (5) *in vitro* SIVmac239 感染実験での PIC 阻害剤の阻害活性を確認。(明里、足立、野村、杉浦)
 - (6) AH の 2 量体化により、抗 HIV 活性の上昇並びに AH 単量体非感受性株の克服に成功した。AH の結晶構造を解明した。(田中)
 - (7) AH は一般的なレクチンに見られるマイトジェ

- ン活性を示さないことを確認した。またウサギ膿に対して、副作用を示さないことを確認した(田中)。
- (8) カニクイザル細胞 (HSC-F) での増殖が著しく速い馴化型ウイルスの分子クローン (MN4 および MN5) の構築を行った。(足立)
 - (9) HSC-F での馴化により MN4 および MN5 のウイルスゲノム内に起こった変異を同定した。(足立)
 - (10) アカゲザル細胞 (HSR5.4) での馴化型ウイルスの出現と分子クローンの構築を行った。(足立)

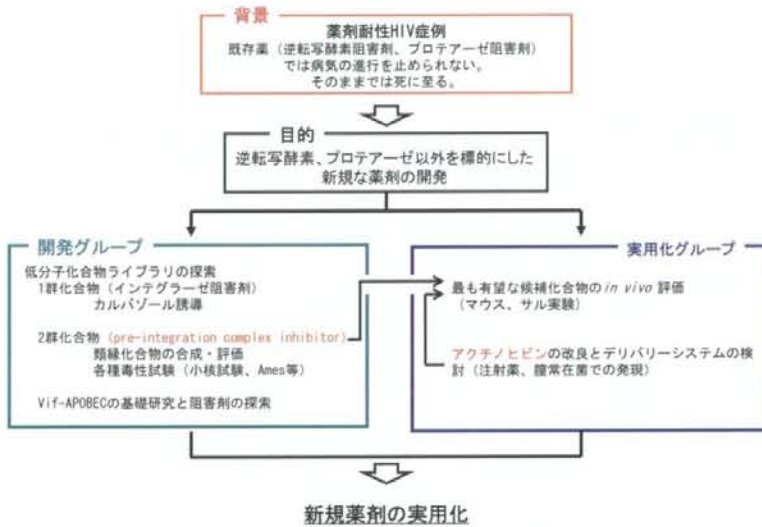


図 1 「薬剤耐性 HIV/AIDS 症例救済のための新規な機序による抗 HIV 薬剤の開発研究」流れ図

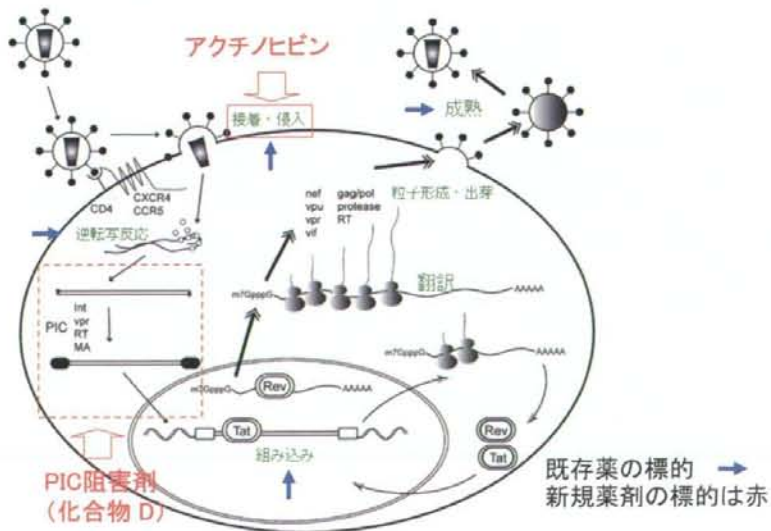


図 2 開発に取り組んでいる新規薬剤の作用機序

■D. 考察

今年度、我々の研究は大きく進展した。今まで作用機序が明確でなかった富山化学野村伸彦研究分担者/名古屋医療センター杉浦互等が開発した低分子候補化合物の作用機序がHIV複製サイクル前期過程の逆転写以降且つ組み込み以前に絞り込まれたことである。また直接の分子標的は同定されていないが、今後作用機序の解析を進めるにあたり重要な成果である。また、田中晴雄研究分担者の開発した接合・侵入阻害剤アクチノヒピンも結晶構造が解明され、より高活性の物質の開発にも成功した。これらの新規候補化合物を *in vivo* で評価するためのサル感染モデルの開発も研究も進んでおり、次年度以降のサル実験を計画している。

■E. 結論

低分子候補化合物の作用機序を明らかにし、その実用化研究に取り組んだ。AHの結晶構造が明らかになり、またより活性の高いdimer型AHの開発に成功した。

■F. 健康危険情報

該当なし

■G. 研究発表

各研究分担者の報告書を参照

■H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

II. 分担研究報告書

分担研究課題



新規な機序による抗HIV薬剤の開発とその阻害機序の解析

研究分担者

杉浦 互 名古屋医療センター臨床研究センター 部長

研究協力者

岩谷 靖雅 名古屋医療センター臨床研究センター 室長

吉居 廣朗 名古屋医療センター臨床研究センター レジデント

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に取り組んだ。平成19年度に開発した候補化合物のヒト血清タンパク存在下での最適化を行った。候補化合物の作用機序解明に取り組んだ結果pre-integration complexに作用している可能性が高いことが明らかになり、PIC阻害剤と仮称することとした

■ 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

平成19年度までに開発した候補化合物のヒト血清タンパク存在下での最適化を目的に類縁化合物を合成しヒト血清タンパクの影響の少ない化合物の探索を行う。候補化合物の阻害効果に対してヒト血清タンパクが及ぼす影響を株化された細胞ではなく、ヒト末梢血単核球を用いた評価系で評価を行う。これらの解析は候補化合物を臨床試験に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。

■ B. 研究方法

(i) 候補化合物実用化研究

a. 化合物D 類縁化合物の最適化

化合物D 類縁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活性の変動を測定し、ヒト血清アルブミンの影響を受けにくい化合物の探索を行った。

抗HIV活性の測定には我々が即時に開発したR5-MaRBLE細胞を用いた。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。

b. 化合物Dに対するヒトPBMCを用いた感受性検査でのヒト血清添加等の影響

健康人から採取した血液をリンホセパールに重層し、室温で30分間遠心分離した後、中間層に存在する末梢血単核球(peripheral blood mononuclear cell: PBMC)画分を得た。このPBMCをPHA存在下で3日間培養し芽球化させた。候補化合物化合物D、化合物FのBMC(1×10^6 cells/ml)にHIV-1 JRCSF株(0.4 ng/ml)を感染させ、一週間培養した。培養は3~4日おきに細胞とともに培地を3分の2交換した。また、タンパク結合の影響を調べるため、50%ヒト血清あ

るいは4%HSAを加え同様の実験を行なった。抗HIV効果は上清中のp24抗原量を測定することにより算出した。

(ii)阻害機序の解明

新規薬剤の作用メカニズムおよび標的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。このため、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、HIV-RNAが脱核から核移行・組み込むまでのどの過程に候補化合物が影響を及ぼしているかを明らかにするために定量PCRを用いて2LTR, integrated DNA等の評価を試みた。さらにバイオチンタグをつけた候補化合物を作成し、それによるウイルスあるいは宿主タンパクの共沈を試みた。

■C. 研究結果

(i) 候補化合物実用化研究

a.化合物D 類縁化合物の最適化

化合物Dは現時点で我々が有する化合物の中で実用化の最有力候補であるが、その阻害効果と血清タンパクの影響について表1にまとめた。表1に示すように化合物Dはefavirenzと同等の阻害活性をもつが、4%ヒト血清アルブミン(HSA)存在下での影響がefavirenzよりも大きく出てしまう。このことから、ヒト血清タンパクの影響を受けにくい化合物D類縁化合物の探索を行った。合計146化合物の評価を行ったが、図1および表2に示すように化合物D類縁化合物の多くはHSAの添加によりIC₅₀が高くなり、5倍以下の変化で抑えられている化合物は28個であった。その結果、IC₅₀の分布図では全体のピークが高濃度にシフトしている。それでもIC₅₀<0.001を呈する4化合物を見出された。

表1 化合物D およびコントロール薬剤のIC₅₀分布

	n数	control	4%HSA	fold shift
化合物D	32	0.00025	0.00138	6.1
NVP	20	0.01658	0.02582	1.7
EFV	31	0.00065	0.00246	3.5

表2 化合物D誘導体のHSA添加および非添加におけるIC₅₀の変化

fold shift	サンプル数
<1	2
≥1~<5	26
≥5~<10	41
≥10~<20	26
≥20~<30	8
≥30~<40	1
≥40~<50	2
≥50~<60	1
≥60~<70	2
>70	11
総数(延べ)	120*

*146個のうちIC₅₀が求められたもののみ

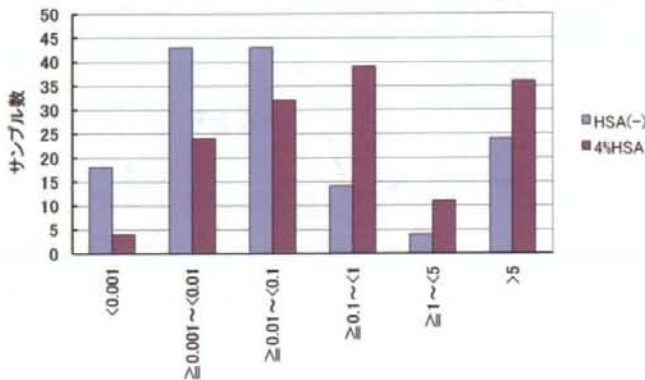


図1 化合物D誘導体のHSA添加および非添加におけるIC₅₀の分布

b. ヒトPBMCを用いた感受性検査でのヒト血清添加等の影響

10% FBS存在下において、化合物D、化合物Fの IC_{50} 値はそれぞれ6.5 nM、15.6 nMであった。この値はMaRBLE細胞での評価より若干高い値である。ヒト血清あるいはアルブミン添加が化合物の阻害効果に及ぼす影響の評価を行った。表3に示すように50%ヒト血清存在下において、化合物D、化合物Fの IC_{50} 値はそれぞれ18.9 nM、142 nMであり、これは添加しない場合の IC_{50} 値の2.9倍、8.9倍であり、有意な上昇が観察された。4%ヒト血清アルブミンHSA存在下では化合物D、化合物Fの IC_{50} 値はそれぞれ5.8 nM、12 nMであり、これは添加しない場合の IC_{50} 値の0.9倍、0.8倍であり添加の影響は認められなかった。尚、ヒト血清添加における化合物D、化合物Fの CC_{50} はともに 5μ M以上であり、細胞毒性は軽微であった。

(ii)阻害機序の解明(図2)

化合物Dの作用機序については、平成20年度までの研究により

- (1) VSV pseudo type ウイルスにも阻害活性を示す。
- (2) 定量PCRで2LTR、integrated provirusともに低下する。

(3) NL4-3 DNAのtransfection時に化合物を添加してもウイルス・タンパクの構成に影響を及ぼさない。

(4) 経時的に化合物を加えていくtime-of-addition試験で阻害剤の効果がintegrase阻害剤と類似のパターンを示す。

ことが明らかになっており、HIV複製サイクル前期課程の逆転写以降且つ組み込み完了前のpre-integration complexの段階に作用していることが強く推測される。分子標的が同定されていないことから、ビオチンタグを付けた化合物を合成した。その結果、ビオチン添付により阻害活性はやや低下した。平成20年度はこのタグ付き化合物を用いたウイルスおよび宿主タンパクの共沈の条件設定に取り組んだ。

■D. 考察

平成19年度から20年度にかけての解析により我々が開発を進める化合物の作用箇所はHIV複製サイクルの前期過程でpre-integration complexに作用しているとの結論に至った。

このことから本化合物をPIC阻害剤と仮称することとした。まだ、PICを構成するどのタンパクが直接の分子標的であるかは確定していない。現時点における実用化の最有力化合物である化合物Dの抗

表3 ヒトPBMCを用いた感受性試験において化合物D、化合物Fのヒト血清添加が IC_{50} に及ぼす影響

	MaRBLE assay	PBMC assay			
		10% FBS	50%HS (fold)	4%HSA (fold)	
化合物D	0.2	6.5	18.9 (2.9)	5.75 (0.9)	
化合物F	0.9	16	142 (8.9)	12 (0.8)	

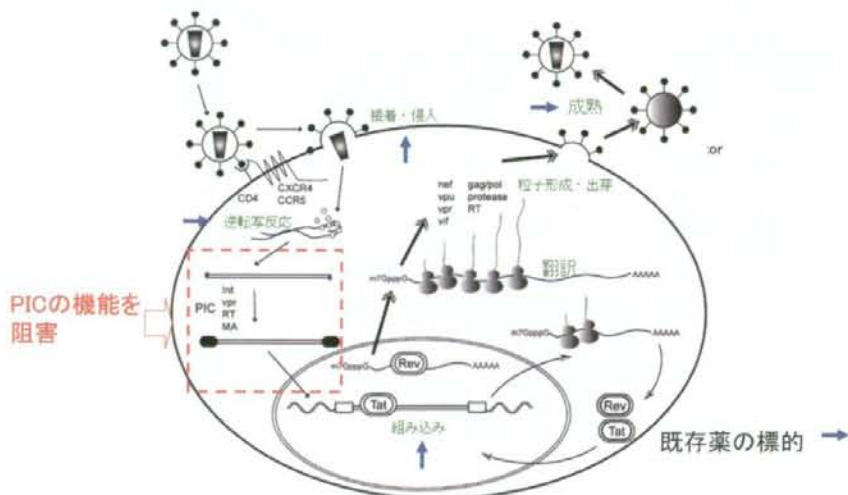


図2 新規抗HIV化合物Dの推測される作用機序

HIV 活性についてはレポーター細胞では0.25nM、PBMCでも6.5nMと極めて強く、既存の薬剤との相乗効果も確認されている。既に小動物を用いた毒性試験もクリアしており、次年度はサルを用いたSIV感染モデルでの評価を検討している。

■E. 結論

現時点における解析結果から、我々が開発を進める化合物をPIC阻害剤とした。また実用化の最有力候補である、化合物D化合物の最適化に取り組んだ。

■F. 健康危険情報

該当なし

■G. 研究発表

1.論文発表

- 1) Deforche K, Camacho RJ, Grossman Z, Soares MA, Van Laethem K, Katzenstein DA, Harrigan PR, Kantor R, Shafer R, Vandamme AM: non-B Workgroup. Bayesian network analyses of resistance pathways against efavirenz and nevirapine. AIDS. 18:22(16):2107-15. Oct 2008
- 2) Furuya K, Omura M, Kudo S, Sugiura W, Azuma H.: Recognition profiles of microsporidian Encephalitozoon cuniculi polar tube protein 1 with human immunoglobulin M antibodies. Parasite Immunol. 2008 Jan;30(1):13-21.
- 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) Rajintha M Bandaranayake, Moses Prabu-Jeyabalan, Junko Kakizawa, Wataru Sugiura, and Celia Schiffer. :Structural Analysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 CRF01_AE Protease in Complex with the Subtype p1-p6. Journal of Virology, 82(13), 2008

2.学会発表

- 1) Seiichiro Fujisaki, Y Yokomaku, J Hattori, S Ibe, M Utsumi, M Hamaguchi, and W Sugiura: New Outbreak of HBV Genotype A in HIV-1-co-infected Cases in Japan. 16th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Feb.8-11, 2009, Montreal, Canada
- 2) Junko Hattori, S Yoshida, H Gatanaga, M Kondo, K Sadamasu, T Shirasaka, H Mori, R Minami, W Sugiura, and the Japanese Drug Resistance HIV-1 Surveillance Network. Increasing Prevalence of Drug-resistance Mutations among Treatment-naïve HIV-infected Patients in Japan, 2003 to 2007. 16th

Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Feb.8-11, 2009, Montreal, Canada

- 3) S Yoshida, H Gatanaga, T Itoh, M Fujino, M Kondo, K Sadamasu, T Kaneda, F Gejyo, T Shirasaka, H Mori, M Ueda, N Takata, R Minami, W Sugiura and the Japanese Drug Resistance HIV-1 Surveillance Network.: Prevalence of drug resistance associated mutations in newly diagnosed HIV/AIDS patients in Japan from 2003-2007. XVII International HIV Drug Resistance Workshop. Jun. 10-14, 2008, Sitges, Spain.
- 4) Rajintha Bandaranayake, M Prabu-Jeyabalan, J Kakizawa, W Sugiura and C Schiffer.: The Effect of Sequence Polymorphisms on CRF01_AE Protease Structure. 15th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Feb.3-6,2008, Boston, USA.
- 5) 岩谷靖雅、吉居廣朗、武田 哲、杉浦 互: HIV-1 Vif 依存的な APOBEC3G のユビキチン化サイトの同定. 第56回日本ウイルス学会学術集会. 2008年10月26~28日, 岡山
- 6) 宮崎菜穂子、松下修三、藤井 毅、岩本愛吉、杉浦 互: 既治療患者における薬剤耐性(多剤耐性)HIVの現状調査. 第22回日本エイズ学会学術集会. 2008年11月26~28日, 大阪
- 7) 巽 正志、梅木優子、竹川菜穂、松田昌和、橋本修、西澤雅子、石古博昭、杉浦 互、山本直樹: 薬剤耐性ウイルスの感染性分子クローンを軸にした Genotype と Phenotype をつなぐ実験解析系. 第22回日本エイズ学会学術集会. 2008年11月26~28日, 大阪
- 8) 岩谷靖雅、吉居廣朗、武田 哲、杉浦 互: APOBEC3G の HIV-1 Vif に依存したユビキチン化サイトに関する研究. 第22回日本エイズ学会学術集会. 2008年11月26~28日, 大阪
- 9) 柴田潤子、岩谷靖雅、任 鳳蓉、田中 博、杉浦 互: HIV-1 ゲノム RNA における poly(A) 付加部位に関する研究. 第22回日本エイズ学会学術集会. 2008年11月26~28日, 大阪
- 10) 大出裕高、横山 勝、佐藤裕徳、伊部史朗、藤崎誠一郎、間宮均人、濱口元洋、杉浦 互、横幕能行: HIV-1 プロテアーゼにおける耐性変異 L89V の立体的影響. 第22回日本エイズ学会学術集会. 2008年11月26~28日, 大阪
- 11) 椎野禎一郎、貞升健志、長島真美、杉浦 互: HIV-1 薬剤耐性変異の感染者集団における固定/消失時間の解析. 第22回日本エイズ学会学術集会. 2008年11月26~28日, 大阪
- 12) 正岡崇志、梁明秀、巽 正志、杉浦 互、森下了、澤崎達也、山本直樹: 酵素活性を指標とした新規 HIV プロテアーゼ薬剤耐性検査法の開発. 第22回日本エイズ学会学術集会. 2008年11月26~28日, 大阪
- 13) 星野忠次、辰巳絢子、篠原祐子、大出裕高、杉浦 互: コンピューターによる薬剤耐性 HIV-1 に対する薬効予測の試み. 第22回日本エイズ学会

学術集会, 2008年11月26~28日,大阪

- 14) 横幕能行、大出裕高、間宮均人、濱口元洋、伊部史朗、藤崎誠一郎、藤崎菜恵子、金田次弘、杉浦 互: Enfuvirtide(T-20)+raltegravir(RAL)+darunavir(DRV)+etravirine(TMC125)+lamivudine(3TC)の多剤高度耐性HIV-1感染症に対する治療効果,第22回日本エイズ学会学術集会, 2008年11月26~28日,大阪
- 15) 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、近藤真規子、今井光信、貞升健志、長島真美、福武勝幸、山本泰之、田中理恵、加藤真吾、宮崎菜穂子、藤井 毅、岩本愛吉、藤野真之、仲宗根 正、巽 正志、椎野禎一郎、岡 慎一、林田庸総、服部純子、伊部史朗、藤崎誠一郎、金田次弘、濱口元洋、上田幹夫、大家正泰、田邊嘉也、渡辺香奈子、渡邊 大、白阪琢磨、栗原 健、森 治代、小島洋子、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: 2003-2007年の新規HIV-1感染者における薬剤耐性頻度の動向, 第22回日本エイズ学会学術集会, 2008年11月26~28日,大阪

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



研究分担者

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

Apobec3G/3F (A3G/F) 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により HIV-1 逆転写過程を阻害する。Vif は細胞内 A3G/F をプロテアソーム分解に誘導することにより、A3G/F のウイルス粒子取り込みを阻害する。しかしこの Vif 作用にも関わらず少量の A3G/F はウイルス粒子に取り込まれることから、HIV-1 はこのウイルス粒子内 A3G/F に拮抗する機構を持つものと考えられる。我々は昨年度までの研究において、HIV-1 粒子内 Vif 蛋白 (v-Vif) が Gag 前駆体の第一切断部位である 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、この Gag^{p33-INT} が CD4 陽性 T 細胞由来 HIV-1 の感染性を有意に増強することを見出した。今年度はこの分子機構について解析を行なった結果、Gag^{p33-INT} はウイルス粒子内 A3G/F の抗ウイルス活性を制御することによりウイルス感染性を増強することが示唆された。この知見は新規な機序による抗 HIV 創薬において有用な情報と考えられた。ところで過剰量の Vif は Gag p2/NC 切断阻害作用により HIV-1 感染性を顕著に低下させる。この機序を基に HIV-1 成熟阻害剤を開発する目的で、Vif・Gag 相互作用を定量的に評価するための簡便なアッセイ法を確立した。これを用いて抗 HIV 阻害活性が確認された化合物のスクリーニングを行なう予定である。

■ A. 研究目的

本研究班開発グループにおいて、低分子化合物ライブラリースクリーニングにより抗 HIV 阻害活性を有する化合物探索が進行中である。この中より Vif をターゲットとした化合物を同定するにあたり、そのスクリーニング手法を確立するとともにその作用機序を明らかにすることを本研究の目的とする。

Apobec3G/3F (A3G/F) 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 A3G/F 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 粒子あたり 30-100 分子程度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。我々はこの HIV-1 粒子内 Vif 蛋白 (v-Vif) に着目しこれまで解析を行なった結果、v-Vif が Gag 前駆体の第一切断部位である 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 を産生することを報告した。また昨年度

の本研究にて、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、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見出した。今年度はこの v-Vif 存在下で産生誘導される Gag^{p33-INT} による HIV-1 感染性増強効果について、特に A3G/3F との機能的関連性について解析を行なった。同時に、HIV-1 Gag 成熟を抑制する過剰量 v-Vif による効果を基に HIV-1 成熟阻害剤を開発する目的で、Vif・Gag 相互作用を定量的に評価するための簡便なアッセイ法の確立を試みた。

■ B. 研究方法

Gag^{p33-INT} による HIV-1 感染性増強効果の解析

HIV-1 Vif および Gag p2/NC cleavage 欠失変異体 pNL43-CA2.Vif(-) を基に、HIV-1 Vif, Env と Gag p2/NC cleavage 機能の欠失、さらに Nef 領域に luciferase 遺伝子を導入した変異体 pNL43-CA2.Vif(-) Env(-)-Luc を構築した。VSV-G 発現ベクターは pCMV-G、A3G/F 発現ベクターは pcDNA3.1-A3G、pcDNA-A3F-V5His をそれぞれ用いた。これらを 293T 細胞に遺伝子導入し、得られたウイルスについて Jurkat 細胞に感染 24 時間後のルシフェラーゼ活性

を測定することにより感染価を定量した。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。

Vif・Gag 相互作用の同定

GFP, Gag p2/NC, renilla Lucからなる融合蛋白発現ベクター-phGFP2-p2/NC-hRLucおよびProtease発現ベクターとしてGag-pol frameshit mutantであるpFS-1を293T細胞に共発現し、Vif発現ベクター-pNL-A1存在・非存在下におけるGag^{pol-INT}をウエスタンブロット法により解析した。

■C. 研究結果

HIV-1 Vif蛋白は宿主抗ウイルス因子A3G/Fとの相互作用によりA3G/Fを細胞内でプロテアソーム分解する。このVif機能はHIV-1の感染性保持に不可欠であり、従ってA3G/Fのプロテアソーム分解に必要なVif蛋白のsteady-state levelが維持されると考えられる。一方Vif蛋白は細胞内発現量に依存してウイルス粒子内に取り込まれ、通常より数倍程度以上のv-Vifが存在すると、Gag p2/NCプロセッシング抑制効果が負に作用しウイルス成熟過程を阻害する(Akari et al., J Biol Chem 2004)。このように、Vif蛋白による一見相反した作用のため、HIV-1が正常な感染性を維持するには細胞内Vif蛋白のsteady-state levelが最適量を維持するよう厳密に制御されなければならない。しかしHIV-1標的細胞であるTリンパ球のさまざまな細胞周期や活性化の変動に伴いこのような制御を維持するのは難しいと予想され、実際HIV-1粒子中には少量ながらA3G/Fが検出される。ところで、感染性HIV-1粒子にはA3G/Fのみならずほぼ一定量のv-Vifが存在し、Gag^{pol-INT}を形成することでPBMC由来HIV-1の感染性を増強することを昨年度の本研究で報告した。以上のことから我々は、細胞内でプロテアソーム分解されずにウイルス粒子内に取り込まれたA3G/Fを制御する目的で、v-Vifが何らかの役割を担っているのではないかと仮定し検討を行なった。

まずVif欠損による感染性低下(野生型ウイルスの1/30程度)と同程度のA3G/F効果を発現させる目的で、A3G/F発現ベクターの最適量を検討したところ、HIV-1クローン1 µgに対してA3Gでは0.01µg、A3Fでは0.2µgであった。そこで、この条件下のA3G/F発現293T細胞にpNL43-CA2.Vif(-)を共発現したところ、2-10ngのpNL43-CA2.Vif(-)を使用した場合にウイルス感染性を増強することが示された。遺伝子導入293T細胞および産生ウイルスにおけるA3G/F量は、pNL43-CA2.Vif(-)の用量に関わらず一

定であった。以上のことから、Gag p2/NC cleavage欠失、Gag^{pol-INT}形成自体はA3G/F steady-state levelや粒子取り込み効率に影響しないことが示されたとともに、ウイルス粒子内における少量のGag^{pol-INT}が何らかの機構によりA3G/FのHIV-1感染性抑制効果を阻害したものと考えられた。

上記のように、Vif蛋白によるHIV-1感染増強効果は微妙なバランスの上に成立していることから、これを創薬ターゲットとすることにより効果的なHIV-1制御が期待される。そこでHIV-1 Gag成熟を抑制する過剰量v-Vifによる効果を基にHIV-1成熟阻害剤を開発する目的で、Vif・Gag相互作用を定量的に評価するための簡便なアッセイ法の確立を試みた。GFP, Gag p2/NC, renilla Lucからなる融合蛋白発現ベクター-phGFP2-p2/NC-hRLucを293T細胞に導入すると約60kDの融合蛋白が発現した。これにpNL4-3を共発現すると、細胞内でのウイルスプロテアーゼ活性化は起こらないためGFP-p2は生じなかったが、pFS-1を共発現すると細胞内で活性化したウイルスプロテアーゼによりGag p2/NC部分で切断され、その結果切断産物であるGFP-p2が検出された。この結果より、本法を用いることでウイルス粒子を操作することなくVifと同様な活性を有する化合物若しくは合成ペプチドの解析が可能と考えられた。

■D. 考察

本研究では、HIV-1ライフサイクルにおけるv-VifのA3G/Fに与える意義について解析を行ない、その結果v-Vifが形成誘導する生理的レベルのGag^{pol-INT}がウイルス粒子内におけるA3G/FのHIV-1感染性抑制効果を阻害することが示された。このことは異なる2つの作用点(細胞内およびウイルス粒子)によりVif蛋白がA3G/Fの制御を司っていることを表わしており大変興味深い。昨年度までの成果で、Vif蛋白によるGag^{pol-INT}産生誘導を規定する領域はVif N末端領域のTrp11およびGln12であることが明らかとなっているが、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抗A3G/F作用は、HIV-1の本質的役割を担っていることが示唆される。我々の予備的実験では、SIVmacやHIV-2由来Vif蛋白でもHIV-1のそれと同様なGag成熟阻害活性が認められており、このことは本Vif機能が霊長類レンチウイルス間で保存されていることを示唆している。この領域はapobec familyの一つであるA3FのVifへの結合領域の近傍であるが、今回見出したv-Vif機能はVif蛋白によるA3G/Fによる直接的作用で

はなくGag^{p33-INT}による間接的な作用であることから、2つのVif機能は相互に独立したものであると考えられる。今後はGag^{p33-INT}がどのような分子機構によりA3G/Fの抗ウイルス効果を阻害しているのかを明らかにすることにより、分子創薬に貢献することが期待される。

上述のように、2段階の機序により抗A3G/F効果を発現する(必要のある)Vif蛋白の機能は、HIV-1ライフサイクルにおいて極めて重要なものであると考えられる。しかしその一方、Vif機能は非常に微妙なVif発現バランスの上に成立していることから、創薬ターゲットとしても大変有望と考えられる。本研究の結果、これまでウイルス粒子の解析が必須であったv-Vif機能の検討がウイルス自体の産生のない細胞系で解析が可能となったことから、Vif蛋白と同様な活性を有する化合物若しくは合成ペプチドの解析が可能と考えられる。また同時に、これまで構築したVif蛋白変異体発現ベクターを用いることで、Vif蛋白とGag p2/NC領域との結合様式について詳細な解析が可能となったことから、さらに詳細な検討を進めていきたい。

■ E. 結論

今年度はGag^{p33-INT}によるHIV-1感染性増強効果について、その分子機構について解析を行なった結果、Gag^{p33-INT}はウイルス粒子内A3G/Fの抗ウイルス活性を制御することによりウイルス感染性を増強することが明らかになった。またVif蛋白によるGag p2/NC切断阻害作用を基にHIV-1成熟阻害剤を開発する目的で、Vif・Gag相互作用を定量的に評価するための簡便なアッセイ法を確立した。これらの知見は、抗HIV阻害活性が確認された化合物のスクリーニングおよび新規な機序による抗HIV創薬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

1. 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* 111, 243-250, 2008.
2. Kawada M, Tsukamoto T, Iwamoto N, Kurihara K, Takeda A, Moriya C, Takeuchi H, Akari H, Matano T: Gag-specific cytotoxic T lymphocyte-based viral containment in a macaque AIDS model. *Journal of Virology* 82, 10199-10206, 2008.

3. Izumi T, Takaori-Kondo A, Shirakawa K, Higashitsuji H, Itoh K, Ito K, Matsui M, Iwai K, Kondoh H, Sato T, Tomonaga M, Ikeda S, Akari H, Koyanagi Y, Fujita J, Uchiyama T: Mdm2 is a novel E3 ligase for HIV-1 Vif. *Retrovirology* 6, 1, 2009.
4. Iwasaki Y, Akari H, Murakami T, Kumakura S, Dewan MZ, Yanaka M, Yamamoto N: Efficient inhibition of SDF-1 α -mediated chemotaxis and HIV-1 infection by novel CXCR4 antagonists. *Cancer Science*, in press.

2. 学会発表

1. Lee Y-J, Abudu A, Iijima S, Iwasaki Y, Strebler K, Akari H: HIV-1 Vif Protein Packaged in Virions Augments Viral Infectivity by a Novel Mechanism: Implication of p33 Gag Intermediate. Cold Spring Harbor meeting on Retroviruses, May 2008
2. 齊藤暁、飯島沙幸、岩崎優紀、海津雅彦、足立昭夫、野間口雅子、俣野哲朗、明里宏文 サルPBMCおよびサル個体内における新規サル細胞指向性HIV-1クローンの増殖 第56回日本ウイルス学会学術集会、平成20年10月
3. 海津雅彦、齊藤暁、飯島沙幸、岩崎優紀、足立昭夫、野間口雅子、俣野哲朗、明里宏文 サルPBMCおよびサル個体内における新規サル細胞指向性HIV-1クローンの増殖 第22回日本エイズ学会学術集会、平成20年11月

■ H. 知的財産権の出願・登録状況

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

研究分担者

田中 晴雄 いわき明星大学薬学部 教授

抗HIVタンパク質アクチノヒビン(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、HIVエンベロープタンパク質gp120の高マンノース型糖鎖(HM)と結合することで、HIVの細胞への接着・侵入を低濃度($IC_{50}=2-110$ nM)で阻止する。AHは、gp120のように多数のHMを持つ糖タンパク質にのみ強い親和性を示すことから、選択性の優れた薬剤として期待できる。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が、AHを2量体(His-TEV-AH dimer/RTB-L)としたところ、AH単量体と比べ20倍強い合胞体形成阻害活性を示し、AH単量体非感受性株の克服にも成功した。

His-TEV-AH dimer/RTB-Lは、大腸菌又は酵母を宿主として菌体内で発現させ、宿主細胞の破碎後、グアニジン塩酸存在下Niカラムで精製し、ODSカラムでグアニジン塩酸を除去させていた。しかし、この方法では試料の収率が5割程度であり、活性の上昇もAH単量体の5~20倍とぶれが大きく再現性が低い。そこで、グアニジン塩酸除去法をODSカラム法から、30%アセトニトリルを用いた透析法に変更したところ、収率が8割程に改善され、AH単量体と比べ、常に20倍強い合胞体形成阻害活性を示すHis-TEV-AH dimer/RTB-Lを調製できた。AHを血中投与可能なHIV/AIDS治療薬として開発するため、免疫原性の低下及び体内での安定性の改善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1/7の活性を有する)が得られた。

AHのX線結晶構造解析の結果、AHの立体構造が明らかとなり、AHの3つの糖鎖結合ポケットとそれを維持する立体的な構成を明示することができた。これによりAHのHIVとの結合の選択性を解明並びにさらなる改良の基盤が確立された。

■ 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(HM)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。

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。それらが3つ葉のクローバー様に配置されている。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、多くのHMを持つgp120に対する親和性は非常に強い。これは、AH 1分子がgp120上のHM 3本を捕らえることで、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と考えられる。そして、gp120と強く結合することで、強力な抗HIV活性を示すと考えられている。AHはgp120のように多数のHM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期待できる。また、HIV感染予防薬として期待されているシアノビリン-N(CV-N)はHM 1本のみでも強い親和性を示すため、CV-NよりAHの方が選択性において遙かに優れていると考えられる。

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活性は弱いが、AHを2量体(His-TEV-AH dimer/RTB-L, 図2)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

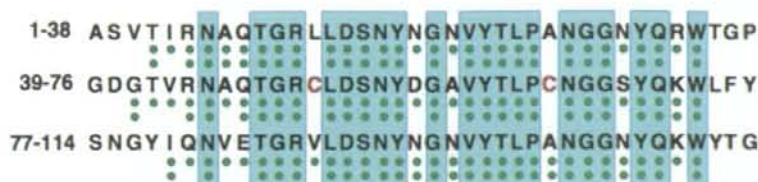
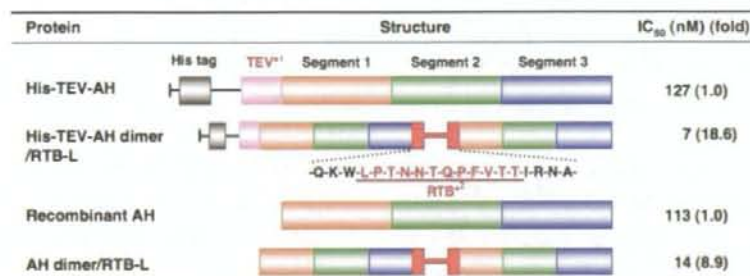


図1 AHのアミノ酸配列



*TEV : TEV protease recognition sequence
 **RTB : residues 132-143 of ricin B chain

図2 AH及びAH二量体の模式図

表1 His-TEV-AH dimer/RTB-Lの臨床分離 HIV 株に対する抗 HIV 活性

HIV strain	IC ₅₀ (nM)		fold	number of N-glycosylation
	AH	His-TEV-AH dimer/RTB-L		
37	>10000	>1000	-	14
307	620	35	18	15
36	>10000	4	>2500	16
Bal	34	4	8	17
214	44	6	8	17
251	23	7	3	17
NL	34	2	16	18
182	30	9	3	18
242	140	76	2	19
158	10	2	5	20

の例外を除いて)を克服することに成功した(表1)。

本研究では、His-TEV-AH dimer/RTB-LをHIV感染予防薬として開発するため、His-TEV-AH dimer/RTB-Lの大量調製系確立の検討及び血中投与可能なHIV/AIDS治療薬の開発を目的として、ポリエチレングリコール化による免疫原性低下を試みた。さらに、長年成功しなかったAHの結晶化に成功したので結晶構造解析結果を併せて報告する。

■ B. 研究方法

<His-TEV-AH dimer/RTB-Lの大量調製系確立に関する検討>

His-TEV-AH dimer/RTB-L発現宿主細胞を超音波又はフレンチプレスで破砕後、菌抽出液を遠心分離した。不溶性画分をグアニジン塩酸で可溶化し、Niカラムで精製した。Niカラム溶出液のpHを7~8に調整し、100 mM DTTを加え45℃で2時間保温した。その後、

30%アセトニトリルで透析し、不要な塩類を除いた。透析終了後、凍結乾燥して白色粉末を得た。白色粉末を1 mM HClに溶解させ、HIVの接着・侵入の過程をモデル化した合体形成系を用いて活性を評価した。

<AHのポリエチレングリコール化>

PEG化反応液(100 mM 酢酸ナトリウム(pH 5.0)、20 mM 水素化ホウ酸ナトリウム、12.3 mM AH、12.3 mM 10 kDa/20 kDa m-PEG aldehyde、30% アセトニトリル)を25℃で6時間インキュベートした。反応液をODSカラム及びゲル濾過でPEG化AHを単離した。AH及びPEG化AHの合体形成阻害活性を比較し、PEG化による活性への影響を検討した。

<AHの結晶化>

AHの単結晶は数ヶ月で得られた。結晶構造を単波長不規則散乱法によって決定した。

■C/D. 研究結果と考察

＜His-TEV-AH dimer/RTB-L の大量調製系確立に関する検討＞

既存のAH生産系として、AH単量体は放線菌で、AH変異体はHis Tagとの融合タンパク質として大腸菌或いは酵母で生産する系が存在する。放線菌ではnativeのAHのみ生産可能であるが、大腸菌においてはHis-TEV-AH dimer/RTB-Lをはじめとする種々の変異体の調製が簡便かつ迅速にできる。しかし、大腸菌を宿主として調製した試料には、LPSが混入している恐れがあるため、医薬品（注射剤）としての利用に適さない。そこで、医薬品用の生産系として酵母における発現系を確立した。

高活性を示すHis-TEV-AH dimer/RTB-Lは大腸菌或いは酵母の菌体内で不溶性タンパク質として発現される。従って、不溶性画分をグアニジン塩酸で可溶化させ、グアニジン塩酸存在下Niカラムで精製し、ODSカラムでグアニジン塩酸を除去することで、His-TEV-AH dimer/RTB-Lを取得していた。しかし、この方法では、ODSカラムでの脱塩時にHis-TEV-AH dimer/RTB-Lの回収率は、50%以下となり、大量調製は不向きであることがわかった。また、合胞体形成阻害活性もAH単量体と比べ2～20倍の上昇となり再現性が低い。原因として、タンパク質発現時

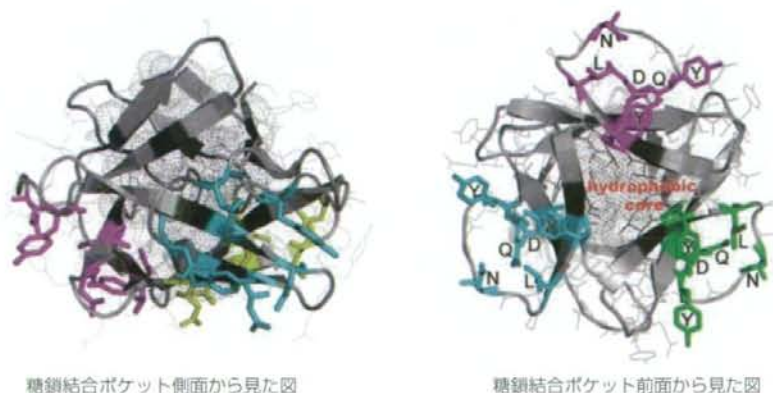
のS-S結合に由来するinclusion body及びNiカラムでの精製後、グアニジン塩酸除去時に起こるリフォールディングの不具合が考えられた。そこで、Niカラム溶出液にジチオスレイトールを加えて、S-S結合を切断し、また、30%アセトニトリルを用いた透析法でグアニジン塩酸の除去によるリフォールディングを行った結果、His-TEV-AH dimer/RTB-Lの収率が8割程にまで改善され、AH単量体と比べて常に20倍強い合胞体形成阻害活性を示すことが確認された。以上のようにして、His-TEV-AH dimer/RTB-Lの再現性のある大量調製法が確立された。また、今後His-TEV-AH dimer/RTB-Lをはじめとする種々のAH変異体を調製する場合、宿主によってはinclusion body及び精製方法が問題となるが、上記調製法を用いることで、いずれの宿主で発現させた場合でも、効率良く正確な試料が調製できると考えられる。

＜AHのポリエチレングリコール化＞

AHをHIV/AIDS治療薬として血中投与する場合、血中半減期や免疫原性が問題となる。しかし、PEGインターフェロンでは、タンパク質をポリエチレングリコール(PEG)で修飾することで、血中半減期を延長し、免疫原性を低下させることに成功している。そこでAHをPEG化することにより、血中投与でき

表2 AH及びPEG化AHの合胞体形成阻害活性

Protein	IC ₅₀ (nM)
AH	125
10 kDa-PEG-AH	870
20 kDa-PEG-AH	1200



糖鎖結合ポケット側面から見た図

糖鎖結合ポケット前面から見た図

図3 AHの立体構造