

図 4: Pol283 変異エピトープの認識

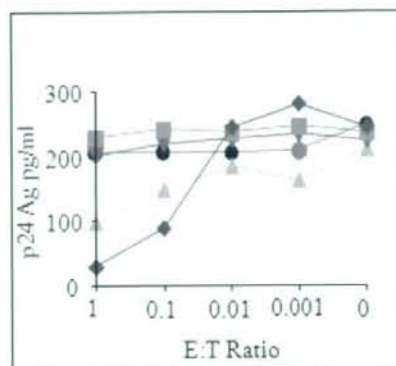


図 5: 世界9つのコホートでのI135X変異の出現頻度

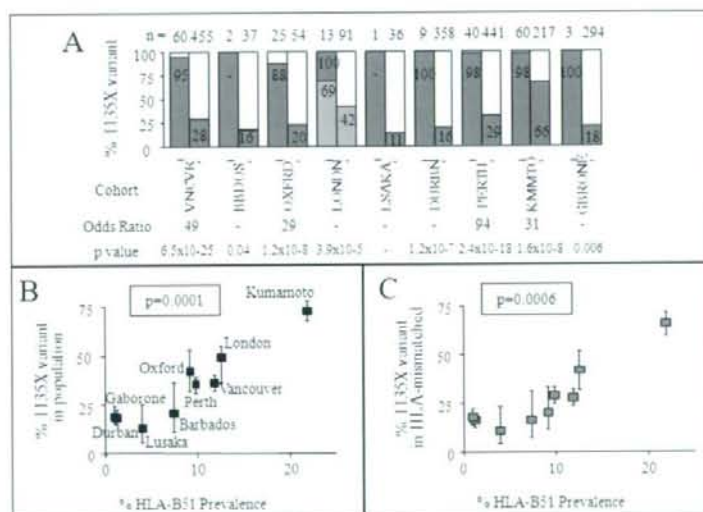
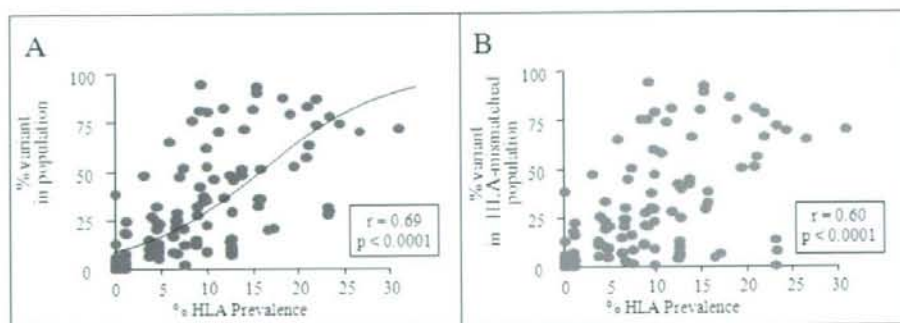


図 6: 世界9つのコホートでの14種類のエピトープの変異の出現頻度とHLAとの相関



テラーメイド治療ワクチンへ向けての基礎的・臨床的検討に関する研究

研究分担者：国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センター長 岡 慎一

研究協力者：国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センター 井田節子

研究要旨 当初 B51 を持つ患者のテラーメイド治療ワクチン開発へ向けての基礎検討を行っていたが、B51 患者では、LTNP 以外は既に全員が escape virus に変異していることがわかった。このため、他の HLA に関しても検討を加え、複数の immunodominant epitope が病状の進行阻止に関連している可能性があると考えられる結果を得た。

A. 研究目的

本研究の目的は、テラーメイド治療ワクチン開発である。

H18年度は、HLA-B51 もつ slow progressor に対する DC ワクチン療法を実現するために 1. 臨床研究の実施を目指した GMP グレードにおける DC 作成と CTL 誘導、2. 患者の選別とエピトープの数を含めた確定 (escape の有無などエピトープの解析) を行った。ところが、対処患者とするべき B51 患者の持つウイルスは、長期未発症者を除き対象となる CTL epitope はすべて escape していた。そこで、H19年度は、もう一度免疫賦活に適した HLA の選定を行い、治療ワクチンの対象者の再選定を行った。H20年度は、H19年度の選定で候補となった患者の病状コントロールに対する CTL の役割を確認する目的で、CTL エピトープの経時的解析を行った。また、この患者が持つ HLA B61 と病状の進行が早い患者に多い B60 に関し、nef にある共有エピトープ (KEKGGLEGL) の解析を行った。

B. 研究方法

1. mature DC(mDC)誘導：monocyte を全て GMP grade の試薬および培地を用いて培養し、mDC を得た。これらの細胞の表面マーカーは CD80、CD83、CD86、CCR7、DR の発現を FACS で解析した。CTL 誘導能の比較は、tetramer 解析により誘導された CTL の頻度を解析した。

2. 患者選別：対象となるエピトープの sequence を行った。特に、pol238-8 は、HLA B51 患者の強力な抗 HIV 活性を持つ CTL であることが従来の研究で明らかとなっているためこの部分に関し解析した。

3. 病状の進行に関連する HLA の選定：血友病 96 名について slow progressor とそれ以外の HLA 分布、及びエイズで死亡した患者の HLA 解析を行い対比した。Slow progressor の定義は、1) 98 年まで無治療でかつ 2) 98 年の CD4 数の median が 350/ μ l 以上で、VL の median が 10⁴/ml 以下とした。

4. CTL epitope : B51 に関しては pol, B61 に関しては nef 領域について sequence を行い、escape variant について検討した。

(倫理面への配慮)

臨床研究に関し通常の日常診療以外に採血が生じる患者からは、すべて文書による同意を得ている。また、患者のプライバシーが漏れないよう考慮した。

C. 研究結果

1. mature DC(mDC)誘導 : 全て GMP grade を用いた検討でも、表面マーカーおよび CTL 誘導能全てにおいて従来の方法と同じ mDC を誘導することができた。

2. 患者選定とエピトープ解析 : 長期未発症者 (LTNP) は、すべて HLA B51 であったが、特定の haplo type ではなかった。HLA B51 には、LTNP, slow progressor, normal progressor, rapid progressor のすべてが含まれた。LTNP においては、pol238-8 エピトープに対する強力な CTL を保有していた。しかし、血友病以外も含め B-51 患者 5 5 名のエピトープは、その 3 名を除くすべての患者において pol238-8 の 8 番目のアミノ酸は、escape mutant におき変わっていた。特に HLA とエピトープ解析を行った血友病 24 名では、B-51 陰性患者は、pol283-8 の 8 番目のアミノ酸は、14 例中 11 例が wild type であったが、B-51 の 10 名では全例他のアミノ酸に変異していた。

3. 新たな患者選定 : 96 名の血友病患者のうち slow progressor は 17 名であった。このうち HLA-B51 保有者が 8 名、B61 は 6 名であったが、4 名が B51/B61 保有者であった。B51 の allele 頻度は 23.5% で、日本人の allele 頻

度 7.9% に比べ有意に高かった。40 名のエイズによる死亡者の解析では、HLA-B60 が 16.3% と日本人の頻度 5.1% に比べ有意に高かった。HLA-B61 と B60 は、nef 92-100 の CTL epitope を共有していた。

4. Nef sequence : HLA-B51 の 33 名および HLA-B60 の 44 名に関し nef の sequence 解析を行った。HLA-B51 に関しては、B51/B61 の 10 名と B51 単独 23 名に関しては、差はなく、特に B61 の 10 名を見ると

Nef92-100 KEKGGLEGL 9 名
————— I 1 名

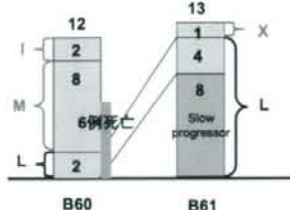
であったが、B60 保有者 44 名では、

Nef92-100 KEKGGLEGL 25 名
————— M 15 名 (34%)
————— I 1 名

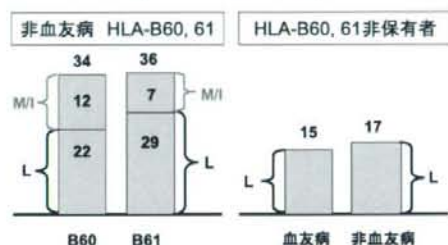
と L100M の変異を持つ患者が見られた。

B51 の nef epitope は、4 カ所あったが、一定の傾向は認められなかった。そこで、この部位の変異の意味をもう少し詳しく解析するために、血友病で B60 もしくは B61 を保有する 25 名、血友病以外の 70 名、血友病および非血友病の B60, B61 非保有者 32 名についてこの部位の遺伝子解析を行った。血友病患者においては、下図に示すとおりで、B60 には slow progressor は存在せず、12 例中 6 例が死亡、10 例が変異ウイルスであった。これに対し、B61 では 12 例が wild type であり 8 名が slow progressor であった。非血友病患者においては、B60, B61 共に変異株が存在した。これに対し、B60, B61 非保有者においては、変異株は存在しなかった。このことは、B60 においては、このモチーフは immunodominant epitope であることを強く示唆しているが、B61 における意味づけは明らかではなかった。

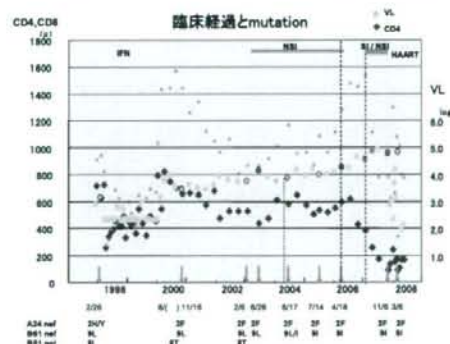
血友病 HLA-B*60, 61 epitope
(KEKGGLEGL-M/I)
のescapeと病状の進行



(KEKGGLEGL-M/I)



5. 長期未発症者で20年目に急激に病状が進行した患者のCTLエピトープの経時的解析



この患者においては、感染から15年目までは3つの epitope とも wild type であったが、肝炎に対する IFN 治療後より徐々に escape mutant が出現、これに相関してウイルス量は徐々に増加した。すべてが escape となった2006年以降 X4 ウイルスの出現とともに急激に CD4 の低下をみた。

D. 考察

H18年度の研究においてはGMP gradeで細胞を調整するために、新しく DC-medium (CellGro 社) の導入を検討した。この medium では本来血清成分無添加で DC の誘導が可能である。plasma を5%加えることにより、mDCの回収率が他の2法よりも上がる傾向を認め、また mDC の細胞表面マーカーがより安定して発現し、EBV lymphoma の治療に用いた DC に近い CTL 誘導が可能あることが in vitro において確認され、この培養法の臨床応用の可能性が示唆された。しかし、HLA B51 患者に対する DC ワクチン療法は、対象者のウイルスがすでに escape variant になっていることから難しいと考えられた。

H19年度の検討から、HLA B51/B61 を持っている患者に slow progressor が多く、B51 と B61 の double escape が fitness を落としている可能性が考えられた。このため、epitope の近い部位での解析が重要と考えられる。もう一点は、死亡者に B60 が多かったことであるが、B61 と B60 は、nef の epitope を共有しておりこの部位の解析から、エイズ患者に多い B60 では L100M が多かったことは、この変異が病状の進行に関連していた可能性を示唆している。今後この変異に関する検討が重要であろう。今回の検討の限界は、解析対象が厳密な意味でのコホートではないことと、N数が少ないこと、血友病での結果がそれ以外に適用できるかどうか不明な点である。特に厳密な意味でのコホートでない点に関しては、データの解釈に慎重になる必要がある。

H20年度の検討の、血友病の B60, B61 保有者の対比からは、B60 に関しては、この部位が immunodominant epitope であることを強く示唆している。しかし、B61 に関しては、2

つの可能性が残る。一つは、やはりこの部位も強力な immunodominant epitope であり、変異すら抑えている。もう一つは、全く CTL 活性を持たず、escape が起こらない、である。非血友病の B61 患者に変異株が見られることから、変異体か感染した場合には、B61 の immune pressure のためそのまま変異体で存在するが、B60,B61 非保有者には変異株が存在しないことから、この変異体は fitness が悪く wild type に戻ったことが推定される。今後この nef motif が B61 の immunodominant epitope であるかどうかに関し、解析した患者の臨床経過を裏付けるためにも、もう少し詰めていきたい。

E. 結論

テーラーメイド治療ワクチン開発を目指した 3 年間の解析から、CTL が病状のコントロールに関連していることは明らかである。しかし、通常の場合には、ほとんどの患者において既に CTL からの escape mutant になっており、免疫療法の難しさを再確認した。一方なぜ、slow progressor では長期にわたり escape が出現しないのかを、明らかにしていきたい。この点が明らかになれば、免疫療法への道が開かれてくると期待される。

F. 健康危険情報：なし

G. 研究発表

1. Hachiya A, Kodama E, Sarafianos SG, Schuckmann MM, Matsuoka M, Takiguchi M, Gatanaga H, and Oka S. Amino acid mutation, N348I, in the connection subdomain of HIV-1 reverse transcriptase confers multi-class

resistance to NRTIs and NNRTIs. *J Virol* 82: 3261-3270, 2008, Epub 2008 Jan 23.

2. Tanuma J, Fujiwara M, Teruya K, Matsuoka S, Yamanaka H, Gatanaga H, Tachikawa N, Kikuchi Y, Takiguchi M, and Oka S. HLA-A*2402-restricted HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and escape mutation after ART with structured treatment interruptions. *Microbes Infect* 10: 689-698, 2008, Epub 2008 Mar 29.
3. Davaalkham J, Unenchimeng P, Baigalmaa C, Oyunbileg B, Tsuchiya K, Hachiya A, Gatanaga H, Nyamkhuu D, and Oka S. High risk status of HIV-1 in the very low epidemic country, Mongolia, 2007. *Int J STD AIDS* (in press)
4. Bi X, Suzuki Y, Gatanaga H, and Oka S. High frequency and proliferation of CD4⁺FOXP3⁺ regulatory T cells in HIV-1 infected patients with low CD4 count. *Eur J Immunol* 39: 301-309, 2009, Epub 2008 Dec 16.

CCR5 阻害剤などの新規の機序で抗ウイルス効果を発揮する AIDS 治療薬の研究開発

研究分担者 満屋 裕明（熊本大学医学薬学研究部血液内科学・感染免疫診療部 教授）

研究要旨

我々は HIV-1 が耐性を獲得しにくく、獲得しても他薬剤との交差耐性を有しない新規のプロテアーゼ阻害剤(PIs)の研究開発を米国グループと共同で続けており、新規の HIV-1 PI である GRL-98065, GRL-02031 等の抗 HIV-1 活性や耐性獲得の機序について詳細な検討を行った。また、HIV-1 の増殖に重要である HIV-1 プロテアーゼ(PR)二量体形成を評価するために、CFP/YFP タグ付き PR を有する感染性組み換え HIV-1 クローンを用いた FRET (fluorescence resonance emission transfer)の系を確立し、一連の HIV-1 PR dimerization inhibitors (PR 二量体形成阻害剤: PDIs)を開発、新たな機序である PR 二量体形成阻害による HIV-1 複製阻害について考察を行った。また、新規開発中の HIV-1 逆転写酵素阻害剤である 4'-Ethynyl-2-Fluoro-2'-Deoxyadenosine における抗 HIV 活性について、NOG-SCID マウスや SIV 感染サルを用いて評価を行った。更に CCR5 の微細構造学的解析系の確立、CCR5 阻害剤の結合モデル、分子レベルでの機序解析の研究も進めており、これらの解析結果を基にして、CCR5 結合能のある新規低分子化合物のモデリングを行い、強力な抗 HIV 活性を有する新しい化合物の設計・同定を続けている。

A. 研究目的

ヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) 感染によって起こる後天性免疫不全症候群 (AIDS) に対する化学療法は長足の進歩を遂げ、かつて「死の病」とされた本疾患は「コントロール可能な慢性感染症」と再定義し得る程となった。この進歩は、逆転写酵素阻害剤 (RTIs) とプロテアーゼ阻害剤 (PIs) を組み合わせた多剤併用療法 (HAART) に負うところが大きい。しかし、HIV-1 が RTIs と PIs の両剤に対して耐性を獲得してその多くが交差耐性であって治療抵抗性となった症例数の増大、また耐性ウイルスによる初感染症例増多の報告が続いており、野生 HIV-1 株と多剤耐性株の双方に強力な活性を発揮し、薬剤耐性を誘導しにくく、副作用が少なく、服用しやすい新規の薬剤の開発が文字通り急務の課題となっている。本研究では、HIV-1 が耐性を発現しにくい薬剤、発現しても他薬剤との交差耐性を有しない新規の PIs や新しい機序から HIV-1 の感染を阻害する CCR5 阻害剤の開発を進めるとともに、その基礎となるウイルス学・酵素学・

細胞生物学・薬理学・結晶解析学的な基礎研究を進める。

更に今後問題となると思われる同剤への耐性発現機序の解明を進め、また、耐性に関わる HIV-1 プロテアーゼ (PR) の微細構造解析についても分子構造解析機器を用いた構造モデリング、X 線構造解析を進め、再デザインを行い、強力に優れた薬理動態を有する新規の PIs の研究を進める事により、HIV-1 が耐性を発現しにくい薬剤、発現しても他薬剤との交差耐性を有しないような新規 PIs の前臨床・臨床開発が期待できる。そのような新規 PIs および CCR5 阻害剤の開発は HIV-1 感染症患者において、長期間ウイルス量を測定感度以下にコントロールし、その結果外来通院による長期加療が可能となり、患者の QOL の改善および医療費の削減にも貢献するものと考えられる。

B. 研究方法

1) 検討中の化合物の抗 HIV-1 活性評価及びより有望な化合物の開発・評価: 抗 HIV-1 活性の

評価にはMTT、MAGIアッセイなどを用いるが、有望なものについては耐性株を含む複数のウイルス株での活性を更に検討するため、p24アッセイを行う。このアッセイには全自動化学発光度測定機：Lumipulse Fを用いる。このようにして見いだされたより有望な化合物について前臨床試験の準備を進める。

2) 抗 HIV-1 作用発現のメカニズム解析：PIs がウイルス、あるいは生体（細胞）へ与える変化、それがどのようにして抗 HIV-1 効果をもたらすかについて解析を進める。この研究には多数の HIV-1 クローンの作成・検討が必要で、しかも HIV-1 の広範な遺伝子部分についての検索が必要とされるが、high throughput の DNA sequencer：ABI-3130 を用いるので迅速な実験データの解析が可能となる。

3) 薬剤耐性のメカニズム解析：HIV-1 が極めて高い増殖能を有し、しかも逆転写酵素 (RT) が error-prone であるという特性のために、HIV-1 の薬剤耐性発現は不可避である。X 線結晶解析をはじめとするタンパクの微細構造研究の方法論を用いて、多剤耐性 HIV-1 株の発現機序の分子・原子レベルでの解析を行う。

その後、構造を基礎とした高い抗ウイルス活性を有しかつ耐性の発現に抵抗する薬剤のデザイン・再デザインを行う。新規の PI に対して試験管内で耐性 HIV-1 変異株の誘導を試み、更にそのようにして誘導された HIV-1 についてのウイルス学・生化学・遺伝子の解析や X 線結晶解析を用いて耐性発現のメカニズムの解析を行う。

4) HIV-1 PR 二量体形成 (dimerization) 阻害：我々は CFP/YFP タグ付き PR を有する感染性組み換え HIV-1 クローンと FRET (fluorescence resonance emission transfer) の系を用いて、HIV-1 PR の二量体形成を確認する系を確立した。dimerization に重要とされるアミノ酸 (Asp29, Arg87, Thr26 etc) 置換を有する種々の CFP/YFP タグ付き変異体を多数作成、FRET の系を用いてこれらのアミノ酸置換が

dimerization を阻害することを明らかとした。dimerization に重要とされるアミノ酸の詳細な解析を進め、新たな HIV-1 PR 阻害への機序を明らかにする。

5) CCR5 の微細構造学的解析・生理学的解析：コンピュータモデリングの手法を用いた CCR5 の微細構造学的解析の系を確立、CCR5 と阻害剤の結合モデル、HIV-1 感染（エンベロープとの結合）と CCR5 の生理作用（ケモカインによる作用）に重要な構造の解析など行っている。また、電子顕微鏡・蛍光/共焦点顕微鏡を用いた細胞表面の CCR5 の局在性・動態解析も行っている。

(倫理面への配慮)

開発中の化合物の臨床試験導入に際して、まず動物実験などでその安全性を十分に確認する。さらに医学部・大学内の該当する IRB で倫理面での適合性について許可を申請、認可された後で試験を開始する。

C. 研究結果

広いスペクトラムの薬剤耐性株に高い活性を発揮する PI, TMC114/darunavir (Koh & Mitsuya *et al*, *Antimicrob Agents Chemother*. 47: 3123-3129, 2003)を米国 Purdue University の Dr. Ghosh グループとの共同研究を開発、本剤は 2006 年 6 月に米国 FDA にて認可され、PrezistaTM として本邦でも臨床に供されることとなった。さらに我々のグループは試験管内における DRV の研究を続けており、複数の多剤耐性臨床分離 HIV-1 混合株を用いた耐性誘導実験において、複数の PI 耐性変異体の重感染と遺伝子相同組み換えが起こることで、HIV-1 が DRV に対する高度耐性を獲得する可能性があることを見出した (Koh, & Mitsuya *et al*, 投稿準備中)。また DRV は結晶構造解析において、P2 部位に bis-THF というユニークな構造を有し、HIV-1 PR 活性部位である Asp-29/Asp-30 の主鎖 (back bone) と極めて強

固な水素結合を形成することで強力な抗 HIV 活性を発揮するが、DRV と同様に P2 部位に *bis*-THF 構造を有し、野生型から多剤耐性株における広いスペクトラムでの強力な抗 HIV 活性を発揮する GRL-98065 を同定、本化合物の薬剤高度耐性変異株を含む各種 HIV-1, 2 株に対する抗 HIV 活性や細胞毒性を評価し、試験管内耐性誘導実験により HIV-1 の本化合物に対する耐性獲得機序を解明し、更に詳細な結晶構造解析により、*bis*-THF 構造が HIV PR 活性部位である Asp-29/Asp-30 の主鎖と強固な水素結合を有することに加えて、P2'部位の benzodioxole 構造が HIV PR の flap 領域と水素結合を持つことで薬剤の結合を安定化させる、といった本化合物における強力な抗 HIV 活性発揮の機序を明らかにした (Amano & Mitsuya *et al*, *Antimicrob Agents Chemother*. 51: 2143-2155, 2007)。最近では、DRV とは異なる基本骨格である cyclopentanyl-tetrahydrofuran (Cp-THF) を有し、多剤耐性臨床分離 HIV-1 株に対して、野生株と同等 (EC₅₀ 値で 2 倍以内) の高い活性を発揮する新規 PI, GRL-02031 を開発 (Koh, Deb & Mitsuya *et al*, *Antimicrob Agents Chemother*. 2008, in press)、結晶構造解析を用いた分子モデリングにて、本剤が HIV-1 PR の活性中心部位に 2 つの異なる結合様式 (bimodal binding mode) で結合することを明らかとし、このことが本剤の薬剤耐性 HIV-1 に対して高い活性を発揮する機序の一因と考えられた。

また我々は HIV-1 PR だけでなく PR の基質である HIV-1 Gag 蛋白や Gag 蛋白と相互作用 (結合) するとされるいくつかの細胞内因子についての構造学的検討も進めている。我々のグループは PIs 耐性と Gag の遺伝子変異についての構造学的検討も進めており、これらの分子を標的とする新規の化合物のデザインの検討も引き続き行っている (Tamiya & Mitsuya *et al*, *J Virol*. 78: 12030-12040, 2004;

Gatanaga & Mitsuya *et al*, *J Biol Chem*. 281: 1241-1250, 2006)。また最近では、APV で耐性誘導した HIV-1 において、PR 領域への APV 耐性関連変異に加え Gag 領域の非開裂部位にアミノ酸変異の蓄積を認め、これら Gag 領域のアミノ酸変異の存在は virus の fitness を改善することにより APV に対する早期の耐性獲得に関与するが、他の PIs に対しては耐性発現が遅延するという異なった影響を及ぼす事を報告した (Aoki & Mitsuya *et al*, *J Virol*. 2009, accepted for publication.)。

HIV-1 PR の二量体形成 (dimerization) は HIV-1 の増殖に重要であり、このことは dimerization の阻害が新規薬剤の標的部位となる可能性を示唆している。我々は CFP/YFP タグ付き PR を有する感染性組み換え HIV-1 クローンと FRET (fluorescence resonance emission transfer) の系を用いて、HIV-1 PR の二量体形成を確認する系を確立した。この系を用いて HIV-1 PR dimerization に重要とされるアミノ酸 (Asp29, Arg87, Thr26 *etc*) 置換が dimerization を阻害することを解明、更に我々が米国の研究グループと共同で開発した *bis*-THF 構造及びその類似構造を有する一連の化合物が HIV-1 PR dimerization 阻害活性を有することを明らかにした (Koh & Mitsuya *et al*, *J Biol Chem*. 282: 28709-20, 2007)。HIV-1 PR 二量体形成に重要とされるアミノ酸の詳細な解析を進め、新規の機序である HIV-1 PR 二量体形成阻害剤の開発・構造解析を米国の研究グループと共同で行っていく。

また、新規開発中の HIV-1 RTI である 4'-Ethynyl-2-Fluoro-2'-Deoxyadenosine (EFdA) における抗 HIV 活性及び同化合物の細胞内代謝を評価し、ヒト DNA ポリメラーゼに対する影響等を明らかにし (Nakata & Mitsuya *et al*, *Antimicrob Agents Chemother*. 51: 2701-2708, 2007)、EFdA の高い抗 HIV-1 活性を NOG-SCID マウスで証明、更に SIV 感染サルでの実験を進め (米国 Pittsburgh

University のグループとの共同研究)、末期 SIV 感染サルで高い抗 SIV 活性を確認し、また長期毒性についても検討した結果、サルでの安全性が確認された(投稿準備中)。

今後も EFdA の臨床開発へ向けた努力を米国のグループと共同で展開していく予定であり、既に極めて佳良な準備的データを得ている。

ケモカイン受容体である CCR5, CXCR4 は HIV-1 のコレセプターとして HIV-1 の細胞侵入過程に重要な役割を持っている。このようなウイルスの細胞への侵入過程は既存の主な抗 HIV 剤と作用機序の異なる新たな治療薬のターゲットとしても有望であり、満屋は 1999 年より国内の製薬会社との共同研究でケモカイン受容体 (CCR5) 阻害剤の開発に着手、現在までに米国での臨床試験で強力な抗 HIV-1 効果が確認された CCR5 阻害剤: Aplaviroc (AK602: 肝障害のため第三相臨床試験は休止中) を始め、複数の CCR5 阻害剤の同定に成功している (Maeda & Mitsuya *et al*, *J Biol Chem.* 276:35194-35200, 2001; Maeda & Mitsuya *et al*, *J Virol.* 78: 8654-8662, 2004; Nakata & Mitsuya *et al*, *J Virol.* 79:2087-2096, 2005)。一方で我々はこれらの阻害剤の作用機序の解明のための研究も進めており、結晶解析・コンピュータモデリングの手法を用いた CCR5 の微細構造学的解析の系を確立、CCR5 と阻害剤の結合モデル、HIV-1 感染(エンベロープとの結合)と CCR5 の生理作用(ケモカインによる作用)に重要な構造の解析などを既に報告している (Maeda & Mitsuya *et al*, *J Biol Chem.* 281:12688-12698, 2006, Maeda & Mitsuya *et al*, *J Mol Biol.* 381:956-974, 2008)。我々はケモカイン受容体阻害剤開発研究の過程で、CCR5 阻害剤分子が細胞表面の CCR5 のすべてに結合しなくても HIV-1 感染がほぼ完全に抑制されるという事象を見いだした。これに類似するデータとして、細胞表面に HIV 被感染性の無い(変異)CCR5 が一部(50%

程度)含まれるだけで HIV-1 感染性が著明に失われることを明らかにしており、これは HIV-1 と細胞の接着・融合の過程で形成される HIV-1 エンベロープ・CD4・ケモカイン受容体 (CCR5) 複合体が正常に形成されないと HIV の侵入・感染が成立しない、という機序を示唆しているものと思われる (Maeda, Nakata & Mitsuya, 投稿準備中)。一方では結晶解析・コンピュータモデリングの手法を用いた CCR5 の微細構造学的解析系の確立、CCR5 阻害剤の結合モデル、分子レベルでの機序解析の研究も進めており、現在ではこのモデルを応用して CCR5 結合能のある新規の低分子化合物のモデリングを行い、強力な抗 HIV-1 活性を有する新しい化合物の設計・同定にも成功している (Yin, Maeda & Mitsuya, 投稿準備中)。今後これらの知見を統合・発展させ、HIV-1 粒子が細胞へ侵入するのに必要な HIV-1 エンベロープ・CD4・CCR5 の量的解析とこれらの結合モデル作成を進めると同時に詳細な CCR5 の微細構造解析を進め、より強力且つ効果的に HIV 感染を阻害する低分子化合物の開発を続けていく。

細胞表面の HIV-1 受容体と HIV-1 エンベロープの相互作用と HIV-1 感染の関連をみる手法として、各種画像解析も行っている。具体的には電子顕微鏡・蛍光/共焦点顕微鏡を用いた細胞表面の HIV-1 受容体の局在性・動態解析の手法を確立し、ウイルス接着時のこれらの分子動態を解明することを目標とする。我々は既にレポータータンパク (YFP) を結合させた CCR5 のレーザー顕微鏡での解析により、細胞表面の CCR5 は非常に流動性に富むこと (Nakata & Mitsuya, 投稿準備中)、電子顕微鏡での解析により通常の状態 (HIV-1 感染に関与していない) での CCR5 は細胞表面に複数が集まって(クラスター形成)存在していることを明らかにしている。今後もこれらの基礎データ・手法を元にウイルス感染時の各タンパク (エンベロープ・受容体) の動

態解析の系の樹立を図る。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Aoki M, David JV, Koh Y, Aoki-Ogata H, Miyakawa T, Yoshimura K, Maeda K, and Mitsuya H. (2009) Non-cleavage Site Gag Mutations in Amprenavir-resistant HIV-1 Predispose HIV-1 to Rapid Acquisition of Amprenavir Resistance But Delays Development of Resistance to Other Protease Inhibitors. *J Virol.* accepted for publication.
2. Koh Y, Das D, Leschenko S, Nakata H, Ogata-Aoki H, Amano M, Nakayama M, Ghosh AK and Mitsuya H. (2009) GRL-02031: A Novel Nonpeptidic Protease Inhibitor (PI) Containing A Stereochemically Defined Fused Cyclopentanyltetrahydrofuran (Cp-THF) Potent Against Multi-PI-Resistant HIV-1 In Vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* accepted for publication. *Antimicrob Agents Chemother.* 53(3): 997-1006.
3. Ghosh AK, Chapsal BD, Baldrige A, Ide K, Koh Y and Mitsuya H. (2008) Design and Synthesis of Stereochemically Defined Novel Spirocyclic P2-Ligands for HIV-1 Protease Inhibitors. *Org Lett.* 10: 5135-8.
4. Ghosh AK, Gemma S, Takayama J, Baldrige A, Leshchenko-Yashchuk S, Miller HB, Wang YF, Kovalevsky AY, Koh Y, Weber IT and Mitsuya H. (2008) Potent HIV-1 protease inhibitors incorporating meso-bicyclic urethanes as P2-ligands: structure-based design, synthesis, biological evaluation and protein-ligand X-ray studies. *Org Biomol Chem.* 6: 3703-13.
5. Ghosh AK, Gemma S, Baldrige A, Wang YF, Kovalevsky AY, Koh Y, Weber IT and Mitsuya H. (2008) Flexible cyclic ethers/polyethers as novel P2-ligands for HIV-1 protease inhibitors: design, synthesis, biological evaluation, and protein-ligand X-ray studies. *J Med Chem.* 51: 6021-33.
6. Maeda K, Das D, Yin PD, Tsuchiya K, Ogata-Aoki H, Nakata H, Norman RB, Hackney LA, Takaoka Y and Mitsuya H. (2008) Involvement of the second extracellular loop and transmembrane residues of CCR5 in inhibitor binding and HIV-1 fusion: insights into the mechanism of allosteric inhibition. *J Mol Biol.* 381: 956-74.
7. Kawamoto A, Kodama E, Sarafianos SG, Sakagami Y, Kohgo S, Kitano K, Ashida N, Iwai Y, Hayakawa H, Nakata H, Mitsuya H, Arnold E, Matsuoka M. (2008) 2'-deoxy-4'-C-ethynyl-2-halo-adenosines active against drug-resistant human immunodeficiency virus type 1 variants. *Int J Biochem Cell Biol.* 40:2410-20.
8. Nakata H, Steinberg SM, Koh Y, Maeda K, Takaoka Y, Tamamura H, Fujii N and Mitsuya H. (2008) Potent synergistic anti-human immunodeficiency virus (HIV) effects using combinations of the CCR5 inhibitor aplaviroc with other anti-HIV drugs. *Antimicrob Agents Chemother.* 52: 2111-9.
9. Mitsuya H, Maeda K, Das D and Ghosh AK. (2008) Development of protease inhibitors and the fight with drug-resistant HIV-1 variants. *Adv Pharmacol.* 56: 169-97.
10. Ghosh AK, Chapsal BD, Weber IT and Mitsuya H. (2008) Design of HIV protease inhibitors targeting protein backbone: an

- effective strategy for combating drug resistance. *Acc Chem Res.* 41: 78-86.
11. Koh Y, Matsumi S, Das D, Amano M, Davis DA, Li J, Leschenko S, Baldrige A, Shioda T, Yarchoan R, Ghosh AK, Mitsuya H. (2007) Potent Inhibition of HIV-1 Replication by Novel Non-peptidyl Small Molecule Inhibitors of Protease Dimerization. *J Biol Chem.* 282: 28709-28720.
 12. Nakata H, Amano M, Koh Y, Kodama E, Yang G, Bailey CM, Kohgo S, Hayakawa H, Matsuoka M, Anderson KS, Cheng YC, Mitsuya H. (2007) Activity against human immunodeficiency virus type 1, intracellular metabolism, and effects on human DNA polymerases of 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine. *Antimicrob Agents Chemother.* 51: 2701-2708.
 13. Harada S, Hazra R, Tamiya S, Zeichner SL, Mitsuya H. (2007) Emergence of human immunodeficiency virus type 1 variants containing the Q151M complex in children receiving long-term antiretroviral chemotherapy. *Antiviral Res.* 75: 159-166.
 14. Amano M, Koh Y, Das D, Li J, Leschenko S, Wang YF, Boross PI, Weber IT, Ghosh AK, Mitsuya H. (2007) A novel bis-tetrahydrofuranylurethane-containing nonpeptidic protease inhibitor (PI), GRL-98065, is potent against multiple-PI-resistant human immunodeficiency virus in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 51: 2143-2155.
 15. Nishizawa R, Nishiyama T, Hisaichi K, Matsunaga N, Minamoto C, Habashita H, Takaoka Y, Toda M, Shibayama S, Tada H, Sagawa K, Fukushima D, Maeda K, Mitsuya H. (2007) Spirodiketopiperazine-based CCR5 antagonists: Lead optimization from biologically active metabolite. *Bioorg Med Chem Lett.* 17: 727-731.
 16. Ohru H, Kohgo S, Hayakawa H, Kodama E, Matsuoka M, Nakata T, Mitsuya H. (2007) 2'-deoxy-4'-C-ethynyl-2-fluoro-adenosine: a nucleoside reverse transcriptase inhibitor with highly potent activity against wide spectrum of HIV-1 strains, favorable toxic profiles, and stability in plasma. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 26(10-12): 1543-6.
 17. Ghosh AK, Dawson ZL, Mitsuya H. (2007) Darunavir, a conceptually new HIV-1 protease inhibitor for the treatment of drug-resistant HIV. *Bioorg Med Chem.* 15(24): 7576-80.
 18. Maeda K, Mitsuya H. (2007) Development of therapeutics for AIDS: structure-based molecular targeting. *Tuberculosis (Edinb).* 87 Suppl 1: S31-4.
 19. Maeda, K. and Mitsuya, H. (2007) Development of Therapeutics for AIDS: Structure-Based Molecular Targeting. In: Monograph: US-Japan AIDS Panel Meeting in Hanoi 2005.
 20. Gatanaga H, Das D, Suzuki Y, Yeh DD, Hussain KA, Ghosh AK, and Mitsuya H. (2006) Altered HIV-1 Gag Protein Interactions with Cyclophilin A(CypA) on the Acquisition of H219Q and H219P Substitutions in the CypA Binding Loop. *J Biol Chem.* 281: 1241-1250.
 21. Maeda K, Das D, Ogata-Aoki H, Nakata H, Miyakawa T, Tojo Y, Norman R, Takaoka Y, Ding J, Arnord GF, Arnold E, and Mitsuya H. (2006) Structural and molecular interactions of CCR5 inhibitors with CCR5. *J Biol Chem.* 281: 12688-12698.

22. Ohnishi H, Kohgo S, Hayakawa H, Kodama E, Matsuoka M, Nakata T, and Mitsuya H. (2006) 2'-Deoxy-4'-C-ethynyl-2-fluoroadenosine: A nucleoside reverse transcriptase inhibitor with highly potent activity against all HIV-1 strains, favorable toxic profiles and stability in plasma. *Nucleic Acids Symposium Series*. 50: 1-2
23. Davis DA, Brown CA, Wang V, Singer KE, Kaufman J, Stahl SJ, Wingfield P, Maeda K, Harada S, Yoshimura K, Kosalaraksa P, Mitsuya H, and Yarchoan R. (2006) Inhibition of HIV-1 replication by a peptide dimerization inhibitor of HIV-1 protease. *Antiviral Res.* 72: 89-99.
24. Ghosh AK, Schiltz G, Perali RS, Leshchenko S, Kay S, Walters DE, Koh Y, Maeda K, Mitsuya H. (2006) Design and synthesis of novel HIV-1 protease inhibitors incorporating oxyindoles as the P2'-ligands. *Bioorg Med Chem Lett*. 16: 1869-1873.
25. Yin PD, Das D, and Mitsuya H. (2006) Overcoming HIV Drug Resistance through Rational Drug Design Based on Molecular, Biochemical, and Structural Profiles of HIV Resistance. *Cell Mol Life Sci*. 63: 1706-1724
26. Habashita H, Kokubo M, Hamano S, Hamanaka N, Toda M, Shibayama S, Tada H, Sagawa K, Fukushima D, Maeda K, and Mitsuya H. (2006) Design, synthesis and biological evaluation of combinatorial library with new spirodiketopiperazine scaffold. Discovery of novel, potent and selective low-molecular weight CCR5 antagonists. *J Med Chem*. 49: 4140-4152
27. Ghosh AK, Sridhar P.R, Hussain AK, Leshchenko S, Li J, Kovalevsky AY, Walters DE, Wedekind JE, Tokars VL, Das D, Koh Y, Maeda K, Gatanaga H, Weber IT, and Mitsuya H. (2006) Structure-Based Design of HIV-1 Protease Inhibitors to Combat Drug Resistance. *J Med Chem*. 49: 5252-5261.
28. Zhou S, Kern ER, Gullen E, Cheng YC, Drach JC, Tamiya S, Mitsuya H, and Zemlicka J. (2006) 9-[[3-Fluoro-2-(hydroxymethyl)cyclopropylidene]methyl] adenines and guanines. Synthesis and Antiviral Activity of All Stereoisomers. *J Med Chem*. 49: 6120-6128
29. Yoshimura K, Shibata J, Kimura T, Honda A, Maeda Y, Koito A, Murakami T, Mitsuya H, and Matsushita S. (2006) Resistance profile of a novel broadly neutralizing anti-HIV monoclonal antibody, KD-247, that shows favorable synergism with anti-CCR5 inhibitors. *AIDS*. 20: 2065-2073
30. Ghosh AK, Sridhar PR, Kumaragurubaran N, Koh Y, Weber IT, and Mitsuya H. (2006) Bis-Tetrahydrofuran: A Privileged Ligand for Darunavir and a New Generation of HIV-Protease Inhibitors That Combat Drug Resistance. *Chem Med Chem*. 1: 939-950
2. 学会発表(国際学会のみ)
1. "Involvement of the Second Extracellular Loop (ECL2) and Transmembrane Residues of CCR5 in Inhibitor Binding and HIV-1 Fusion." (H-4041) K. Maeda K, Das D, Yin PD, Tsuchiya K, Ogata-Aoki H, Nakata H, Norman R, I, L. Hackley L, Takaoka Y and Mitsuya H. 48th Annual Interscience Conference on Antimicrobial

- Agents and Chemotherapy (ICAAC) / 46th Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America (IDSA), October, 25-28, 2008, Washington, DC, US.
2. "Study of Cellular CCR5 Dynamics and its Alterations by CCR5 Inhibitors Using YFP-Tagged CCR5-expressing Cells." (H-4043) Nakata H, Kamata W, Ogata-Aoki H, Maeda K and H. Mitsuya H. 48th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC) / 46th Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America (IDSA), October, 25-28, 2008, Washington, DC, US.
 3. "Bimodal Binding to HIV-1 Protease of GRL-02031 (G31), a Novel Protease Inhibitor (PI) Containing a Cyclopentanyl-tetrahydrofuran (Cp-THF)." (H-1267), Koh Y, Das D, Leschenko S, Nakata H, Ogata-Aoki H, Amano M, Nakayama M, Ghosh AK and Mitsuya H. 48th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC) / 46th Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America (IDSA), October, 25-28, 2008, Washington, DC, US.
 4. "Non-peptidyl Small Molecule Protease Dimerization Inhibitors: Molecular and Structural Analysis of Their HIV-1 Inhibition and Interactions with Protease Monomer Subunit." (Poster 733), Koh Y, Matsumi S, Das D, Amano M, Davis DA, Li J, Leschenko S, Baldrige A, Shioda T, Yarchoan R, Ghosh AK, Mitsuya H. 15th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Feb 3-6, 2008. Boston, MA, US.
 5. "Study of Dynamics of Cellular CCR5 and Its Alterations by CCR5 Inhibitors Using YFP-tagged CCR5-expressing Cells" Hirotomo Nakata, W Kamata, H Ogata-Aoki, K Maeda, and H Mitsuya, 14th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Feb 25-28, 2007, L.A., California, US. Program and abstracts CROI 2007 p494.
 6. "Structural/Molecular Analysis of HIV Inhibition by Small Molecule CCR5 Inhibitors" Kenji Maeda, D Das, K Tsuchiya, P Yin, H Ogata-Aoki, H Nakata, H Nakata, R Norman, Y Takaoka, and H Mitsuya, 14th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Feb 25-28, 2007, L.A., California, US. Program and abstracts CROI 2007 p493.
 7. "In-vitro Selection of HIV-1 Variants Highly Resistant to Darunavir (DRV) Using a Mixture of HIV-1 Isolates Resistant to Multiple Protease Inhibitors (PIs)" Yasuhiro Koh, T Towata, A Ghosh, and H Mitsuya, 14th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Feb 25-28, 2007, L.A., California, US. Program and abstracts CROI 2007 p606.
 8. "A Novel bis-Tetrahydrofranylurethane-Containing Nonpeptidic Protease Inhibitor (PI) GRL-98065 Potent Against Multi-PI-Resistant HIV In Vitro." Masayuki Amano, Y Koh, A Ghosh, and H Mitsuya, 14th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Feb 25-28, 2007, L.A., California, US. Program and abstracts CROI 2007 p492
 9. "TTNTRNS: An aminoacid insert near the p17/p24 Gag cleavage site associated with

resistance to protease inhibitors" Manabu Aoki, H Aoki, T Miyakawa, and H Mitsuya, 14th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Feb 25-28, 2007, L.A., California, US. Program and abstracts CROI 2007 p601

10. "Potent Inhibition of HIV-1 Replication By Novel Non-peptidyl Small Molecule Protease Dimerization Inhibitors" Koh Y., Matsumi S., Amano M., Das D., Davis D.A., Li J., Leschenko S., Baldrige A., Shioda T., Yarchoan R., Ghosh A.K., Mitsuya H. 4th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. Jul 22-25, 2007, Sydney, Australia, Abstract No. MOPDX04

F. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

(1) The Name of the Patent: Fitness assay and associated methods

Date of Issuance: December 30, 2008

US Patent Number: 7,470,506

Erickson; John W. (Frederick, MD), Gulnik; Sergei V. (Frederick, MD), Mitsuya; Hiroaki (Chevy Chase, MD), Ghosh; Arun K. (River Forest, IL)

Assignee: The United States of America as represented by the Department of Health and Human Services (Washington, DC) and Board of Trustees of the University of Illinois.

Appl. No.: 09/720,276

Filed: June 23, 1999

PCT Filed: June 23, 1999

PCT No.: PCT/US99/14119

371(c)(1),(2),(4) Date: March 07, 2001

PCT Pub. No.: WO99/67417

PCT Pub. Date: December 29, 1999

(2) The Name of the Patent: 4'-C-substituted-2-haloadenosine derivative

Date of Issuance: March 4, 2008

US Patent Number: 7,470,506

Erickson; Satoru Kohgo, Kashima-gun (JP); Hiroshi Ohru, Sendai (JP); Eiichi Kodama, Kyoto (JP); Masao Matsuoka, Otsu (JP); Hiroaki Mitsuya, Kumamoto (JP)

Assignee: Yamasa Corporation, Chiba (JP)

Appl. No.: 11/087,588

Filed: March 24, 2005

(3) The Name of Application: Methods and Compositions for Treating HIV Infections.

US PTO Application Number: 60866786 Arun K. Ghosh (West Lafayette; US); Hiroaki Mitsuya (Kumamoto JP); Yasuhiro Koh (Kumamoto, JP). Filed by Kevin L. McLaren/Joyce Hamilton on November 21, 2006.

2. 実用新案登録 特になし

逆転写酵素およびプロテアーゼ以外を標的とする新規抗エイズ薬の研究

研究分担者 馬場昌範 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 教授

研究協力者 濱崎隆之 エイズ予防財団 リサーチレジデント

研究要旨：既存の抗 HIV-1 薬の欠点である、薬剤耐性と長期使用による副作用の問題を解決することを目標として、この 3 年間に「逆転写酵素およびプロテアーゼ以外を標的とする新規抗エイズ薬の研究」に取り組んだ。具体的には、平成 18 年度は「新規 CCR5 拮抗薬 TAK-652 に対する耐性 HIV-1 の誘導とその解析」に関する研究、平成 19 年度は「新規ナフタレン誘導体のウイルス遺伝子発現阻害を介した抗 HIV-1 効果」に関する研究、そして平成 20 年度は、核酸系逆転写酵素阻害薬（NRTI）ではあるが、既存のものとはプロフィールが異なり、現在臨床試験を行っている 4'-ethynyl-d4T (4'-Ed4T) について、その薬剤耐性ウイルスの解析に取り組んだ。

A. 研究目的

HIV-1 は転写される DNA 10,000 塩基当たり 3 個と非常に高頻度で変異を起こすことから、薬剤耐性ウイルスの早期出現が highly active antiretroviral therapy (HAART) が確立された現在においても、治療失敗の大きな原因となっている。そこで、既存の抗エイズ薬、すなわち逆転写酵素阻害薬やプロテアーゼ阻害薬以外の作用機序を有する薬剤の開発研究が精力的に行われており、最近では HIV-1 のコレセプターである CCR5 を標的とした侵入阻害薬と、逆転写によって作られたプロウイルス DNA の宿主細胞の DNA への組み込みを阻害するインテグラーゼ阻害薬が相次いで認可された。

CCR5 拮抗薬である TAK-652 は *in vitro* において、R5 HIV-1 に対するきわめて強力な抗ウイルス効果を有するとともに、ヒトにおける単回投与試験において、優れた経口吸収性と長時間にわたって血中濃度を維持できることから、現在、米国の企業によって TBR-652 という名称で臨床開発が進められている。しかしながら、

TAK-652 についても臨床での使用に伴い、耐性ウイルスが出現することが予想される。従って、*in vitro* で TAK-652 に対する耐性ウイルスを分離し、その性状、特にコレセプター指向性、他の抗 HIV-1 薬との交叉耐性、および envelope 領域における変異を明らかにすることは非常に重要であると考えられる。そこで、平成 18 年度の研究においては、TAK-652 に対する耐性ウイルスを分離し、そのエンベロープ領域の遺伝子変異を明らかにすることを試みた。

一方、HIV-1 のライフサイクルの中で、宿主細胞に組み込まれたウイルス DNA からの遺伝子発現と転写は、ウイルス増殖にとって不可欠である。また、HIV-1 の遺伝子発現を阻害する薬剤は、ウイルスのリザーバーである単球/マクロファージやメモリー T 細胞の潜伏ウイルスからの遺伝子発現を抑制することができると考えられる。我々は過去に 100,000 以上の薬剤について、HIV-1 LTR で遺伝子発現がドライブされるレポーター細胞によるスクリーニングを行い、新規ナフタレン誘導体に JTK-101

に強い遺伝子発現の抑制を認めている。そこで、平成 19 年度は、JTK-101 について、詳細な抗 HIV-1 効果とその作用機序について検討した。

さらに、平成 20 年度においては、核酸系逆転写酵素阻害薬 (NRTIs) ではあるが、既存のものとはプロフィールが異なり、現在臨床試験を行っている 4'-ethynyl-d4T (4'-Ed4T) について検討した。本薬剤はミトコンドリアの DNA 合成に必要な DNA polymerase γ を含む全ての DNA polymerases に対してほとんど影響を与えないことから、*in vivo* においてきわめて安全性が高いと予想されてきた。実際、動物を用いた前臨床毒性試験においても、高い安全性を示したことから、現在は欧米において第 I 相臨床試験が実施されている。In vitro の培養によって分離した 4'-Ed4T 耐性ウイルスについて、遺伝子変異や他の薬剤との交叉耐性に関し詳しく検討を行った。

B. 研究方法

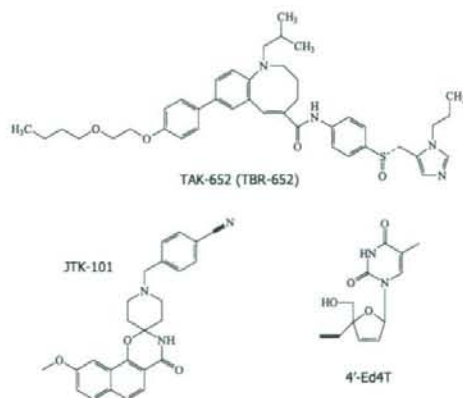


Fig. 1. Structures of compounds

薬剤： Fig. 1 に今回の研究に用いた主な薬剤の化学構造を示す。TAK-652 は分担研究者と武田薬品工業の共同研究により同定された CCR5 拮抗薬である。JTK-101 は、HIV-1 の long terminal repeat (LTR) で発現が制御されたレポーター遺伝子を、HeLa 細胞にトランスフェク

ションすることにより構築されたアッセイ系を用いて、日本たばこ産業が独自の薬剤ライブラリーの中から、100,000 薬剤以上をスクリーニングした結果、選びだされた新規物質である。4'-Ed4T は昭和大学薬学部の田中博道博士により合成された。4'-EFdA は本研究班の分担者研究者でもある、熊本大学医学薬学研究科の満屋裕明博士から分与して頂いた。また、lamivudine (3TC) は Sigma より購入した。

図 1. 薬剤の化学構造

細胞： 健常成人より末梢単核球 (PBMC) を分離後、10% DMSO 含有 RPMI 1640 培地に浮遊し、使用時まで -80°C で保存した。細胞は使用前に融解し、phytohemagglutinin (PHA) 刺激後、RPMI 1640 培地中で 3 日間培養し、ウイルスの継代培養及び薬剤感受性試験に用いた。U87.CD4.CCR5 と U87.CD4.CXCR4 細胞は Littman 博士 (ニューヨーク大医学部) より入手した。HIV-1 慢性感染細胞として、骨髄系細胞由来の OM-10.1 細胞およびリンパ系細胞由来の MOLT-4/III_B 細胞、単球系細胞由来の U937/III_B 細胞を用いた。HIV-1 非感染細胞としてはリンパ系細胞由来の MT-4 細胞と CEM 細胞、および単球系細胞由来の U937 細胞を用いた。ヒト初代培養マクロファージは、PBMCs から単球を分離し、7 日間培養して、マクロファージへと分化させたものを用いた。また、W-3 および KM-3 細胞は HIV-1 LTR にて発現が制御された分泌型アルカリホスファターゼ (SEAP) 遺伝子が安定的に組み込まれている CEM 細胞のクローンである。

ウイルス： 鹿児島大学において治療未経験の感染者から分離された R5 HIV-1 の KK 株、実験室内標準株として III_B 株 (X4) および Ba-L 株 (R5) を用いた。

TAK-652 耐性ウイルスの分離： PBMC にウイルスを加え 2 日間培養した。細胞に未吸着の

ウイルス粒子を洗浄除去し、TAK-652 存在下で培養した。TAK-652 の初期濃度は 0.2 nM とした。継代の際には TAK-652 存在下で PHA 刺激非感染 PBMCs に 1/4 量の感染細胞を加えた。また、各継代の 4 日後には継代時と同濃度の TAK-652 を含む新鮮培地で感染細胞浮遊液を 4 倍希釈した。TAK-652 添加群の p24 抗原量が薬剤非添加群と同様に推移、或いは薬剤非添加群の約 50% に増加後、そのレベルが 2 週間以上維持された場合に薬剤の濃度を上げた。この操作を繰り返し、継代ごとに培養上清を回収し、培養上清中の p24 抗原量を ELISA キットにて測定した。

コレセプター指向性の測定：プレートに U87.CD4.CCR5 あるいは U87.CD4.CXCR4 細胞を播種し、37°C で 1 晩培養した。培養上清を除去後、各ウェルにウイルスを加え、37°C で 1 晩培養した。培養後、細胞に未吸着のウイルス粒子を除去するために細胞を洗浄し、さらに新鮮培地中で 5 日間培養した。感染 6 日後に培養上清を回収し、培養上清中の p24 抗原量を ELISA キットにて測定した。

PBMC を用いた TAK-652 耐性ウイルスの感染実験：PHA 刺激 PBMC にウイルスを加え、37°C で 4 時間培養後、細胞に未吸着のウイルス粒子を洗浄除去した。感染細胞をプレートに播種し、種々の濃度の薬剤存在下で 4 日間培養した。感染 4 日後に同濃度の薬剤を含有する新鮮培地で培養液を 2 倍希釈し、さらに 3 日間培養した。感染 7 日後に培養上清を回収し、培養上清中の p24 抗原量を ELISA キットにて測定した。

抗ウイルスアッセイ：慢性感染細胞における薬剤の HIV-1 効果は、細胞からの培養上清中への p24 抗原産生の抑制により定量した。すなわち、腫瘍壊死因子 (TNF) - α (1 ng/mL) で刺激した OM-10.1 細胞、もしくは未刺激の MOLT-4/III_B および U937/III_B 細胞を調整し、種々の濃度の薬剤とともに 3 日間培養した。そ

の後上清を採取し、その中の p24 抗原量を ELISA 法により定量した。一方、薬剤の細胞毒性は培養 3 日目に生細胞数を MTT 法にて測定することにより調べた。また、慢性感染マクロファージにおけるアッセイでは、7 日間培養し、分化したマクロファージに HIV-1 を感染させ、24 時間後に細胞を洗浄し、さらに 9 日間培養した。その後、種々の濃度の薬剤とともに 4 日間培養した後、上清を採取し、その中の p24 抗原量を ELISA 法により定量した。一方、薬剤の細胞毒性は培養 4 日目に生細胞数を MTT 法にて測定することにより調べた。

薬剤の抗 HIV-1 効果は、上記の慢性感染細胞株に加えて、T リンパ球系培養細胞株の MT-4 および CEM 細胞と健常人 PBMCs を用いた急性感染系において評価を行った。MT-4 細胞に HIV-1 を感染させ、種々の濃度の薬剤とともに培養した。培養 4 日目に感染細胞の生細胞数を MTT 法にて定量した。また、CEM 細胞および PBMCs の場合は、HIV-1 を感染させ、途中 4 日目で 5 倍に継代した後、さらに 3 日間培養し、上清中の p24 量と生細胞数を測定した。

リアルタイム定量 RT-PCR 法：OM-10.1 細胞を種々の濃度の薬剤とともに 2 時間培養し、TNF- α で刺激後、さらに薬剤とともに 24 時間培養した。その後、細胞より total RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR 装置を用いて、HIV-1 mRNA の定量を行った。また、宿主遺伝子として glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA 量の定量も同時に行った。

レポーター細胞アッセイ：W-3 および KM-3 細胞に対し、TNF- α (10 ng/mL) を添加、もしくは Tat 発現プラスミド (1 μ g) をトランスフェクションし、種々の濃度の薬剤とともに 2 日間培養した後、培養上清中の SEAP 活性を定量した。

イムノプロット法：種々の細胞を溶解し、タンパク量を定量した後、sodium dodecyl sulfate (SDS) ポリアクリルアミドゲルを用いて電気

泳動を行った。次に、抗 CDK9 抗体および抗 cyclin T 抗体と反応させ、ケミルミネッセンス法にて、細胞中の CDK9 および cyclin T1 を同定した。

エンベロープおよび逆転写酵素領域の遺伝子シーケンス：感染細胞から DNA を抽出し、polymerase chain reaction (PCR) 法にてエンベロープの全領域もしくは逆転写酵素の全領域を増幅した。増幅産物を電気泳動により分離した後、直接シーケンスを行うことにより、遺伝子配列を決定した。

(倫理面への配慮について)

本研究では、健常人から PBMCs の供給を受けたが、その際にはその検体に関する遺伝子解析実験を一切行わないことを必ず説明し、提供者からの同意を得た。

C. 研究結果

TAK-652 耐性 HIV-1 の分離： TAK-652 は PBMC において R5 HIV-1 KK 株の感染を EC₅₀ 値 0.043 nM, EC₉₀ 値 0.19 nM で阻害する。そこで、EC₉₀ 値に相当する 0.2 nM の TAK-652 存在下で KK 株を PBMC に感染させ、継代ごとに p24 抗原量を測定した (Fig. 2)。TAK-652 添加群の p24 抗原量が薬剤非添加群と同様に推移或いは薬剤非添加群の約 50% に増加後、そのレベルが 2 週間以上維持された場合に薬剤の濃度を上げた。また、TAK-652 耐性 HIV-1 の表現型及び遺伝型の解析を行うための対照として薬剤非添加群を置き、同様に継代培養を行った (Fig. 2)。TAK-652 存在下で培養したウイルスの増殖は、感染 52 週後には TAK-652 10 nM 存在下でも薬剤非添加群と同程度となり、62 週後には 1,000 nM 存在下でも薬剤非添加群と同程度であった。最終的に 1,000 nM 存在下で安定的に増殖したウイルスを感染 67 週後に分離し、KK₆₅₂₋₆₇ として以降の実験に用いた。対照として薬剤非添加群において同時期に分

離したウイルスを KK_{C-67} として使用した。また、TAK-652 耐性 HIV-1 の表現型及び遺伝型の変化をモニターするために感染 8, 43, 及び 56 週後に TAK-652 0.4, 1.6, 及び 10 nM 存在下で増殖したウイルスをそれぞれ KK₆₅₂₋₈, KK₆₅₂₋₄₃, 及び KK₆₅₂₋₅₆ として分離した。さらにその対照として、薬剤非添加群において同時期に分離したウイルスをそれぞれ KK_{C-8}, KK_{C-43}, 及び KK_{C-56} として使用した。

TAK-652 耐性 HIV-1 のコレセプター指向性： TAK-652 耐性 HIV-1 のコレセプター指向性を U87.CD4.CCR5 及び U87.CD4.CXCR4 細胞への感染性を指標として決定した。KK₆₅₂₋₆₇ は U87.CD4.CCR5 細胞には感染したが、U87.CD4.CXCR4 細胞には感染しなかった。

TAK-652 耐性 HIV-1 の薬剤感受性： KK₆₅₂₋₈, KK₆₅₂₋₄₃, KK₆₅₂₋₅₆, 及び KK₆₅₂₋₆₇ に対する TAK-652 の抗 HIV-1 活性を調べた。KK₆₅₂₋₈ 及び KK₆₅₂₋₄₃ に対する TAK-652 の抗 HIV-1 活性はその対照ウイルスと同程度であったが、KK₆₅₂₋₅₆ に対する TAK-652 の抗 HIV-1 活性は KK_{C-56} より 100 倍以上低下していた。さらに、野生型の KK 株 (KK_{WT}) を対照にして KK₆₅₂₋₆₇ に対する TAK-652 の抗 HIV-1 活性を調べたところ、その活性は 200,000 倍以上低下していた (Table 1)。TAK-652 とは化学構造が異なる CCR5 拮抗薬 TAK-220 の KK₆₅₂₋₆₇ に対する抗 HIV-1 活性を調べたところ、TAK-220 の KK₆₅₂₋₆₇ に対する抗 HIV-1 活性は KK_{WT} に対するそれと同程度であった (Table 1)。

TAK-652 耐性 HIV-1 の env 遺伝子のシーケンス： KK₆₅₂₋₈, KK₆₅₂₋₄₃, KK₆₅₂₋₅₃ 及び KK₆₅₂₋₆₇ の env 遺伝子のシーケンスを行い、それぞれの対照ウイルス及び KK_{WT} のそれと比較した。TAK-652 に対する感受性が明らかに低下した KK₆₅₂₋₅₃ 及び KK₆₅₂₋₆₇ では V3 領域で 1 箇所 (T/P/K306K), C4 領域で 1 箇所 (A424T/N), gp41 で 1 箇所 (V766A) の変異がみられ、最も高度耐性化していた KK₆₅₂₋₆₇ ではさらに C2

領域で 1 箇所 (K221N), V3 領域で 1 箇所 (Q309E), gp41 で 1 箇所 (I769S) の変異がみられた。顕著な耐性化はみられていないものの, KK₆₅₂₋₄₃ では V4 領域で 2 箇所 (T401I, T403I),

C4 領域で 1 箇所 (M422X/I), gp41 で 3 箇所 (M506V, S637A, L690I) の変異がみられた。KK_{C-67} では V3 領域で 2 箇所 (P300X, I311L), C3 領域で 1 箇所 (K332R) の変異がみられた。

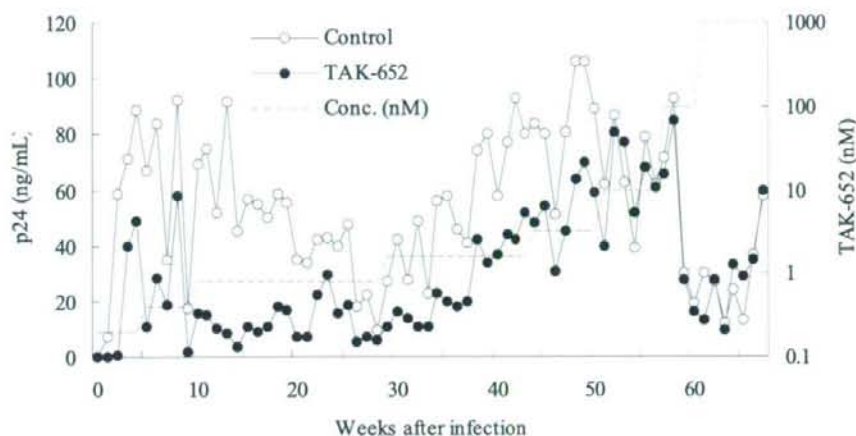


Fig. 2. Replication of the clinical isolate KK in PBMCs with escalating concentration of TAK-652. The R5 HIV-1 clinical isolate KK was passaged weekly in PHA-stimulated PBMCs with (●) or without (○) TAK-652. The solid and dotted lines indicate the p24 levels in the culture supernatants and the concentrations of TAK-652, respectively. In each passage, PBMCs obtained from the same healthy volunteer were used.

Table 1. Anti-HIV-1 activity of TAK-652 and TAK-220 against KK₆₅₂₋₆₇ in PBMCs^a

	KK _{WT}		KK ₆₅₂₋₆₇			
	EC ₅₀ (nM)	EC ₉₀ (nM)	Expt.1		Expt.2	
			EC ₅₀ (nM)	EC ₉₀ (nM)	EC ₅₀ (nM)	EC ₉₀ (nM)
TAK-220	1.2	12	1.9 (1.5-2.4)	18 (11-36)	1.3 (1.0-1.6)	38 (25-67)
TAK-652	0.043	0.19	>10,000		>10,000	

^a Cells from different donors were used in each experiment. Cells were infected with HIV-1 and incubated in the presence of various concentrations of test compounds. The anti-HIV-1 activity was determined by p24 antigen levels on day 7 after virus infection. Assays were performed in triplicate wells, and values in parenthesis represent 95% confidence interval.

JTK-101 の抗 HIV-1 活性: OM-10.1 細胞は通常の標準培養条件では、培養上清中に産生する HIV-1 や p24 抗原はごく僅か (1-2 ng/mL) であるが、1 ng/mL の TNF- α で刺激すると、短時間で大量 (約 100 ng/mL) の p24 抗原を産生するようになる。JTK-101 の OM-10.1 細胞における EC₅₀ および CC₅₀ の値は、それぞれ 0.0014

± 0.0005 および $3.8 \pm 0.2 \mu\text{M}$ であった。一方、逆転写酵素阻害薬の 3TC は、この系において全く抗 HIV-1 効果を示さなかった。

次に、JTK-101 の急性感染細胞における抗 HIV-1 効果について検討したところ、JTK-101 は CEM 細胞および PBMCs の何れの細胞においても、慢性感染細胞で認められたような、強

力かつ選択的な抗 HIV-1 効果を示さなかった。HIV-1 III_B 株感染 CEM 細胞における JTK-101 の EC₅₀ および CC₅₀ は、それぞれ 0.031 ± 0.007 および 1.0 ± 0.5 μM であり、さらに PBMCs における EC₅₀ および CC₅₀ は、それぞれ 0.39 ± 0.25 および 1.2 ± 0.9 μM であった。すなわち、細胞毒性も慢性感染細胞におけるそれと比較して、やや強い傾向にあった。ことから、本薬剤は PBMCs の急性感染細胞において、きわめて低い選択性しか示さないことが分かった。また、慢性感染細胞と異なり、急性感染細胞においては、逆転写酵素阻害薬は非常に強い抗ウイルス効果を発揮し、例えばコントロールに用いた AZT の CEM 細胞における EC₅₀ は 0.0026 ± 0.0005 μM であった。

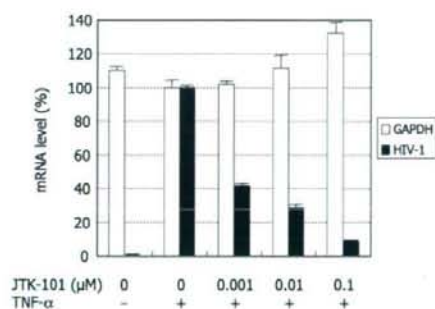


Fig. 3. Inhibitory effects of JTK-101 on HIV-1 mRNA synthesis in OM-10.1 cells. The cells were incubated with the compound for 2 h, stimulated (+) with TNF-α (1 ng/ml), and further incubated. After 24-h incubation, total RNA was extracted from the cells, and quantitative RT-PCR for HIV-1 mRNA was performed. The cytotoxic effects of the test compound on host cellular mRNA synthesis were determined by quantitative RT-PCR for GAPDH mRNA.

JTK-101 の遺伝子発現効果: JTK-101 が慢性感染細胞において、非常に強い抗 HIV-1 効果を発揮することから、本薬剤は HIV-1 増殖サイクルの後期課程、すなわち、プロウイルス DNA からの遺伝子発現より後の段階を阻害するものと推察された。そこで、JTK-101 の TNF-α 刺

激 OM-10.1 細胞における mRNA の産生 (ウイルス遺伝子の転写過程) に及ぼす影響について、リアルタイム定量 PCR 法を用いて検討した。JTK-101 は OM-10.1 細胞において、濃度依存性に HIV-1 mRNA の産生を抑制することが分かった (Fig. 3)。この効果は強く、0.001 μM の濃度においても、薬剤を加えないときと比較して、60% の mRNA 産生を抑制した。一方、JTK-101 はコントロールとして用いた宿主細胞の GAPDH mRNA レベルに対し、0.1 μM の濃度までほとんど影響を与えなかった。以上の結果から、本薬剤は HIV-1 の遺伝子発現、あるいは転写の過程を抑制することが明らかとなった。

JTK-101 の TNF-α もしくは Tat による transactivation に対する抑制効果: JTK-101 の遺伝子発現抑制効果のメカニズムを検討するため、レポーター細胞 W-3 および KM-3 細胞を用いて、TNF-α もしくは Tat による transactivation に対する抑制効果について調べた。KM-3 は HIV-1 LTR の NF-κB 結合領域が 2 つとも変異しており、Tat により SEAP 遺伝子の発現が誘導されるが、TNF-α などによる NF-κB を介したレポーター遺伝子の発現は誘導されない。このような系において、JTK-101 は W-3 および KM-3 のいずれの細胞においても、Tat による SEAP の発現を濃度依存的に抑制した。また、この抑制効果は KM-3 細胞において、より顕著であった。一方、JTK-101 は W-3 細胞における TNF-α の刺激による SEAP の発現を弱いながらも抑制することが分かった。このことから、JTK-101 は HIV-1 LTR を介した遺伝子発現を抑制するものと思われた。

CDK9/cyclin T1 と JTK-101 の活性との関係: JTK-101 は MOLT-4/III_B 細胞では強い抗 HIV-1 効果を示すが、単球系細胞由来の U937/III_B 細胞では弱い活性しか示さない。そこで、種々の細胞における CDK9 と cyclin T1 の発現レベルをウエスタンブロット法を用い