

200908003A

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
平成21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  
(独)国立病院機構  
名古屋医療センター  
臨床研究センター

平成22(2010)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	(独)国立病院機構 名古屋医療センター臨床研究センター感染・免疫研究部 国立感染症研究所エイズ研究センター	部長 研究官
明里 宏文	研究分担者	京都大学霊長類研究所 人類進化モデル研究センター	教授
田中 晴雄	研究分担者	いわき明星大学薬学部薬学科	学部長
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3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

# 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

名古屋医療センター臨床研究センター感染・免疫研究部 部長

研究分担者：明里 宏文

京都大学霊長類研究所 教授

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

田中 晴雄

いわき明星大学薬学部 教授

野村 伸彦

富山化学工業株式会社総合研究所第3研究部 主幹研究員

## 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

名古屋医療センター臨床研究センター感染・免疫研究部 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感染・免疫研究部 室長

吉居 廣朗

名古屋医療センター臨床研究センター感染・免疫研究部 レジデント

### カニクイザルを用いた新規抗HIV-1薬剤の評価研究 ..... 12

研究分担者 明里 宏文

京都大学霊長類研究所 教授

### 抗HIVタンパク質アクチノヒビンのHIV/AIDS感染予防薬・治療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 ..... 26

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 准教授

### 研究成果の刊行物に関する一覧表 ..... 31

# I. 総括研究報告書

## 総括研究課題



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

研究代表者

杉浦 亘 名古屋医療センター臨床研究センター感染・免疫研究部 部長

研究分担者

明里 宏文 京都大学霊長類研究所 教授

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

田中 晴雄 いわき明星大学薬学部 教授

野村 伸彦 富山化学工業株式会社総合研究所第3研究部 主幹研究員

本研究班では既存の抗HIV薬剤に対する薬剤耐性症例の救済のため新規な阻害機序による抗HIV薬剤を開発・実用化することを目的として研究を進め、以下の研究成果を挙げた。(i)低分子化合物ライブラリ探索により複数の新規化合物の同定、合成展開による抗HIV活性の増強と毒性の軽減に成功した。(ii)有望な候補化合物T-Yはtat非依存的転写初期過程を阻害するPre-Initiation Complex for Transcription Inhibitor (PICT)阻害剤とした。(iii)候補化合物T-Yは小動物における毒性試験に合格した。(iv)接着阻害剤アクチノヒビンの立体構造を解明した。さらに抗HIV活性増強に成功した。(v)新薬開発の標的としてのAPOBEC3GとVifの構造解析を行い結合様式を解明した。(vi)サル指向性HIVのサル細胞における馴化に成功。MN4Rh-3とMN5Rh-3株の構築と、薬剤評価モデルの構築した。

### 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。

### B. 研究方法

本研究班では(1)開発グループと(2)実用化グループ

の2つのサブグループに分かれて研究を進めた(図1)。

#### (1)開発グループ

このグループは新規抗HIV薬の候補化合物の探索と最適化、作用機序の解明を担当する。以下の研究を実施した。

(i) 候補化合物の阻害活性の増強と毒性の軽減を目的に多数の誘導体を有機化学的手法により合成

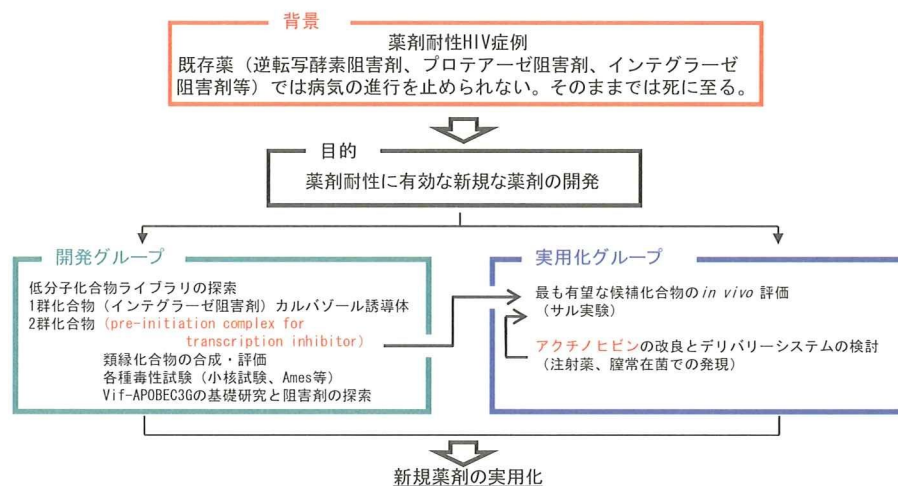


図1 「薬剤耐性HIV/AIDS症例救済のための新規な機序による抗HIV薬剤の開発研究」全体の流れ

展開した。合成した化合物は MaRBLE 細胞を用いて抗 HIV 活性の評価を行った。

- (ii) 新規薬剤の作用メカニズムおよびターゲット因子の解明のために定量 PCR 法による逆転写反応～インテグレーション産物の解析を行った。
- (iii) Vif-APOBEC の基礎研究と阻害剤の探索

① APOBEC3 発現の組織特異性確認のため、正常組織由来 total RNA パネル、各種細胞株における APOBEC3 ファミリーの mRNA 発現量を定量 PCR 法を用いて解析した。更にサイトカイン、ミトジェン、TLR リガンド等の刺激による APOBEC3 mRNA 発現量の変化を解析した。

## (2) 実用化グループ

このグループは低分子化合物ライブラリより同定した候補化合物及びいわき明星大学田中晴雄研究分担者の開発した接着・侵入阻害剤アクチノヒビン (AH) の実用化に向けた前臨床試験に取り組んだ。

### (i) 低分子候補化合物の抗 HIV 活性にヒト血清が及ぼす影響の評価

候補化合物のヒト血中における阻害活性を予測するために MaRBLE 細胞を用いた抗 HIV 活性評価系に 4% ヒト血漿由来アルブミン添加し、その IC<sub>50</sub> に及ぼす影響について評価した。

### (ii) 候補化合物の毒性評価

候補化合物について、①経口吸収性の検討、単回投与毒性試験、②2週間反復投与毒性試験(血液学、生化学検査)、③遺伝毒性試験(Ames 試験、マウス *in vivo* 小核試験)を実施した。④ラットを用いた2週間反復投与毒性試験と hERG 電流阻害試験を行った。

### (iii) 侵入阻害剤アクチノヒビンの解析

① AH の立体構造を明らかにするため AH の X 線構造解析を実施②抗 HIV 活性増強のために AH の二量体の作成とその合胞体形成阻害活性及び耐性株を含む各種患者分離株に対する抗 HIV 活性の評価を実施した。

### (iv) カニクイザルにおける新薬評価の実施

① 候補化合物について、カニクイザル PBMC を用いた SIVmac 阻害活性の確認と毒性評価を行う。最終候補化合物について、カニクイザルにおける体内薬物動態の解析、カニクイザル/SIVmac 感染モデルによる抗 HIV 活性の評価を実施する。

② AH 二量体の microbicide としての実用化を探るためにカニクイザル/SIVmac 感染モデルにおける経直腸感染阻止実験を医薬基盤研究所霊長類医学研究センターにおいて実施する。

## (倫理面への配慮)

国立感染症研究所動物実験委員会、医薬基盤研究所霊長類医学研究センター、名古屋医療センター動物実験委員会、富山化学工業株式会社が定めた「実験動物使用管理規定」に従って実施した。

## C. 研究結果及び考察

### (1) 開発グループ：以下の研究成果を挙げた

- (i) 現時点での候補化合物 T-Y は、マウス、ラットでの良好な経口吸収性、遺伝毒性 (Ames, *in vivo* 小核試験) 陰性、マウス、ラット反復投与毒性試験、hERG 試験において良好な結果を示した。
- (ii) 新規薬剤の阻害機序および標的因子の解明を試みた。定量 PCR 解析の結果、T-Y は RT 初期産物量、中間産物量、最終産物量のいずれにも影響を及ぼさないことが明らかになった。さらに 2-LTR DNA 量の増加も認められず、RT と組み込み反応自体は標的ではないと確認された。現在までの結果からは HIV のプロウイルス DNA 形成ステップが阻害されることが候補化合物の作用点であると結論づけられ、組み込み反応時のプロウイルス DNA の修復、あるいは Tat 依存的な転写がスタートする初期転写 (Pre-initiation Complex for Transcription (PICT) 形成) が作用点である可能性が強く示唆された (PICT 阻害剤と仮呼称) (図 2)。

### (iii) Vif-APOBEC の基礎研究と阻害剤の探索

① *in silico* 構造解析の結果、A3G の表面に露出しているユビキチン化 (Ub) の標的と予測された Lys は 14 (全 20 中) であることが分かった。解析の結果 2nd Zinc Finger ドメインにある 4 つの Lys を持つ変異型が Ub 化抵抗性を示した。この結果を基に Vif 抵抗性 A3G (S-A3G) を作成した。② Vif 非許容細胞では、抗 HIV 活性が高い A3F/A3G の他に A3C/A3DE/A3H の mRNA 発現も Vif 許容細胞に比べ高いことが明らかになった。A3G mRNA の発現は 1 型インターフェロンによる細胞刺激で約 10 ~ 25 倍の発現上昇が認められた。また組織由来 total RNA パネルを用いた実験では A3A と他の A3 ファミリーでは発現組織パターンが異なっていることが明らかになった。

### (2) 実用化グループ：以下の研究成果をあげた

- (i) 候補化合物の抗 HIV 活性にヒト血清が及ぼす影響の評価を合計 117 個の化合物について実施した。現在の T-Y では IC<sub>50</sub> の変位は 5 ~ 10 倍程度にとどまっていた。

- (ii) AHによる選択的な抗HIV活性発現のメカニズムを解明した。即ち、AHの3つの糖鎖結合ポケットにgp120上の3本の高マンノース糖鎖が結合した場合にのみ、レクチンのクラスター効果が発揮されて多くの高マンノース糖鎖を持つHIVに選択的で強い抗ウイルス活性を示すことが明らかとなった。現在スチレン・マレエートやポリエチレン・グリコールを結合させた誘導体を用いて、HIVの薬剤耐性株にも有効な注射薬の開発を目指した研究も進めている。
- (iii) カニクイザルにおける新薬評価の実施を目指して以下の研究を行った。①NL-DT5R及びそのR5ウイルスNL562をカニクイザルHSC-F細胞で馴化すると、Pol-IN及びEnv-SUに適応変異を持つウイルスが高頻度に出現した。更に、この馴化型ウイルスのCAを僅かに改変した(ヘリックス6/7間ループをSIVmac型に置換)ウイルス(MN4及びMN5)をアカゲザルHSR5.4細胞で馴化したところ、改変部近傍に適応変異を持ち増殖性が向上したウイルスが得られた。この適応変異の構造解析を基に作製したCA点変異体(MN4Rh-3及びMN5Rh-3)のサル細胞における増殖能は著しく向上し、SIVmac239に比肩できるレベルに達した。

#### D. 考察

低分子化合物からの新規抗HIV薬の探索はリード化合物Dの同定とその発展型候補化合物T-Y(PICT阻害剤)の開発に至り当初の目的を概ね達成したと考える。当初計画していたカニクイザル/SIVmac感染モデルを用いた前臨床試験に関しては、化合物の合成展開による最適化と阻害機序の解明に時間を費やしたため半年近く遅れており、平成22年1月に開

始を予定している。Vif-APOBEC3G阻害剤の探索に関しては、両分子の構造解析から研究を始めたこともあり、基盤技術・知見は得られたが、探索は実施していない。AHに関しては結晶構造解析、阻害活性の増強、小動物における毒性試験すべて当初の目標を達成しており、平成22年1月より開始するカニクイザル/SIVmac感染モデルでの感染阻止実験を残すのみである。サル指向性HIVを用いた感染モデルの構築に関しても概ね目標を達成している。

#### E. 結論

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抗HIV薬剤の開発を目指し、その結果、PICTを阻害する候補化合物T-Yの同定に成功した。AH研究では立体構造及び阻害機序の解明、二量体化による阻害活性の増強に成功した。いずれの化合物もカニクイザル/SIVmac感染モデルでの評価を予定している。

候補化合物Y、AH共に実用化の可能性が高く、今後臨床試験の実現を目指していく。サル指向性HIV感染モデルによる評価系の完成は今後の薬剤開発、HIVワクチン開発に革命をもたらす将来性の高い実験技術である。

#### F. 危険情報

該当無し

#### G. 研究発表

各分担研究者の報告書を参照

#### H. 知的所有権の出願・取得状況

各分担研究者の報告書を参照

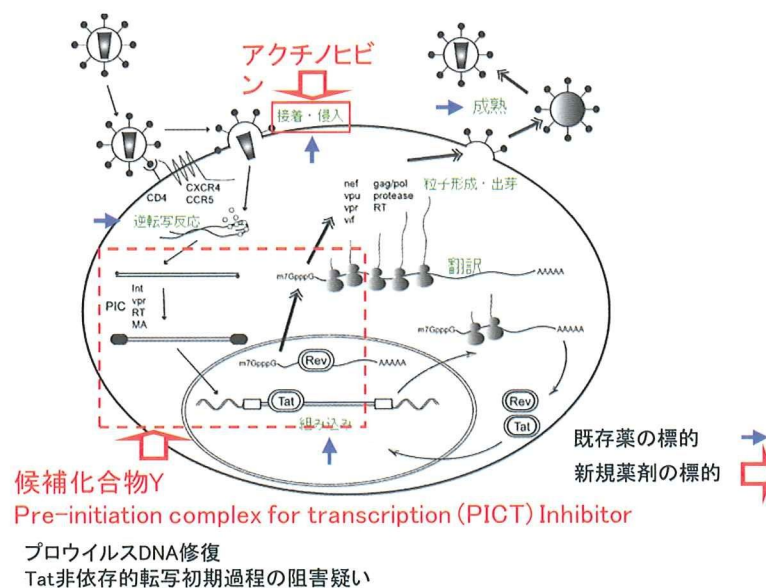


図2 研究班で実用化に取り組んでいる新規薬剤の作用機点

## 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

研究代表者

杉浦 亘 名古屋医療センター臨床研究センター感染・免疫研究部 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感染・免疫研究部 室長

吉居 廣朗 名古屋医療センター臨床研究センター感染・免疫研究部 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、(iii)新たな抗HIV薬剤の標的の探索に取り組んだ。平成20年度に引き続いて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転写早期の作用していることが示唆された頃から、pre-initiation complex for transcription (PICT)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20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、候補化合物の更なる最適化を推し進める

### (iii) 新たな抗HIV薬剤の標的の探索

シチジン脱アミノ酵素配列を有するAPOBEC3ファミリー(図1)のAPOBEC3F (A3F) やAPOBEC3G (A3G)は、HIV-1粒子中に取り込まれHIV複製を強

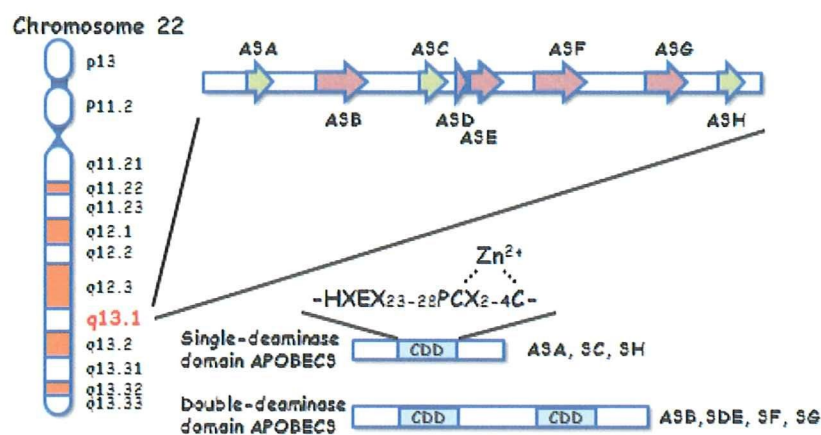


図1 APOBEC3ファミリー

く抑制する。APOBEC3 ファミリーの発現調節は、マイトジェンやサイトカインによる細胞依存的な発現誘導はみられるが詳細なメカニズムについてはわかっていない。本研究では、APOBEC3 ファミリーの発現機構とその意義の解明に向けて、細胞レベルでの APOBEC3 ファミリーの mRNA 発現パターンを網羅的に解析し、その新薬の標的の可能性について検討する。

## B. 研究方法

### (i) 候補化合物実用化研究

#### a. 候補化合物の最適化

化合物 T-Y とその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 T-Y とその類縁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、HSA 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  $\mu$  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  $IC_{50}$  を求め、HSA 添加時の  $IC_{50}$  を非添加時の  $IC_{50}$  と比較した。

#### (ii) 阻害機序の解明

前期過程の各 step について候補化合物 T-Y の影響を検討した。逆転写 (RT) 反応：候補化合物 T-Y を加えて NERT (Natural Endogenous Reverse Transcription) を行い、逆転写産物を精製した。定量 PCR 法によって RT 反応前後の特異的な領域 (Early RT, Late RT) を定量・比較した。また、細胞内因子の影響を確認するため、細胞抽出物の添加による差を観察した。

組み込み反応 (integration)：薬剤で処理した細胞から total DNA を抽出した。定量 PCR 法により Integration、非 integration で特異的に増幅される領域 (Integrated Form [IF], 2LTR) を定量・比較した。

転写反応：NF- $\kappa$ B が関与する転写経路について調べるため、薬剤処理した TPH-1, CD4 陽性マクロファージを TNF- $\alpha$  または LPS で刺激し、核抽出液を調製。NF- $\kappa$ B 関連タンパク質 (p65, p50, p52, RelB, c-Rel) との相互作用を観察した。

### (iii) 新たな抗 HIV 薬剤の標的の探索

血球由来培養細胞株、間質細胞由来培養細胞株および CD14 陽性単球由来マクロファージ (MDM) を用いて APOBEC3 ファミリーの mRNA とタンパク発現量を定量リアルタイム PCR 法とウェスタンブロット法でそれぞれ解析した。また、これら細胞にサイトカイン、マイトジェン、TLR リガンドで刺激を与え APOBEC3 ファミリー発現量の変化を解析した。組織特異的発現を確認するために、正常組織由来 total RNA パネルを用いて mRNA 定量解析を行った。

## C. 研究結果

### (i) 候補化合物実用化研究

化合物 T-Y 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図 1 と表 1 にまとめた。表 1 に示すように平成 21 年度は 117 の化合物について評価を行った。表 1 に示すように化合物 T-Y 類縁化合物の多くは HSA の添加により  $IC_{50}$  が高くなり、5 倍以下の変化で抑えられている化合物は 24 個であった。その結果、 $IC_{50}$  の分布図 2 では全体のピークが高濃度にシフトしている。それでも  $IC_{50} < 0.001$  を呈する 5 化合物を見いだした。

#### (ii) 阻害機序の解明

今回の検討では Early RT, Late RT 産物の比率に候補化合物の濃度依存的な変化は観察されなかった

表 1 解析サンプルまとめ

サンプル総数 IC50 $\mu$ M	平成19年		平成20年		平成21年		3年間の総計	
	HSA(-)	HSA(+)	HSA(-)	HSA(+)	HSA(-)	HSA(+)	HSA(-)	HSA(+)
~<0.0001	4	0	0	0	1	0	5	0
~<0.001	22	7	18	3	27	5	67	15
~<0.01	42	25	38	22	34	26	114	73
~<0.1	17	30	37	29	17	30	71	89
~<1	6	20	16	38	6	15	28	73
~<5	1	6	3	10	3	2	7	18
>5	9	13	47	57	29	39	85	109
総数	101	101	159	159	117	117	377	377

(図3)。細胞内因子の添加による影響も確認されなかった。Integration 反応により IF, 2LTR の量も薬剤の濃度依存的変化は観察されなかった (図4)。さらに候補化合物のNF- $\kappa$ B 関連タンパク質への影響は確認できなかった。

### (iii) 新たな抗 HIV 薬剤の標的の探索

培養細胞を用いた実験: *vif* 遺伝子欠損 HIV-1 の複製を抑制する「非許容細胞」では、抗 HIV-1 活性が高い APOBEC3F/G の発現の他に APOBEC3B/C/3DE/3H の mRNA 発現も「許容細胞」に比べ高いことが確認できた。またサイトカイン、ミトジェン、TLR リガンドでの刺激による発現誘導実験では、す

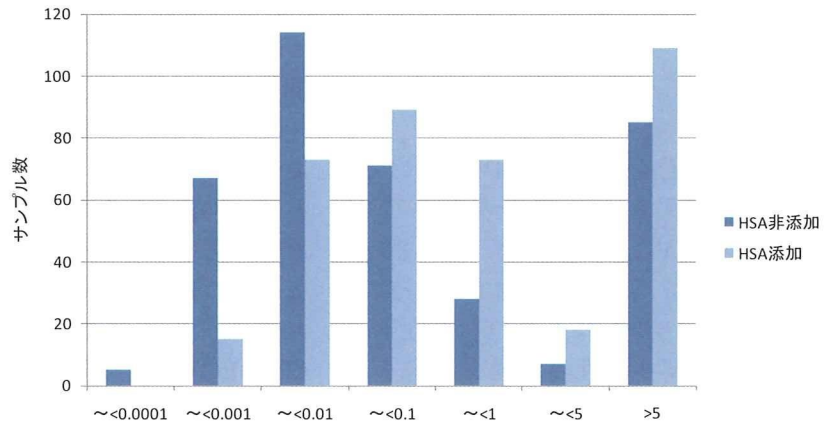


図2 HSA 添加・非添加における IC<sub>50</sub> の分布 (平成 19~21 年)

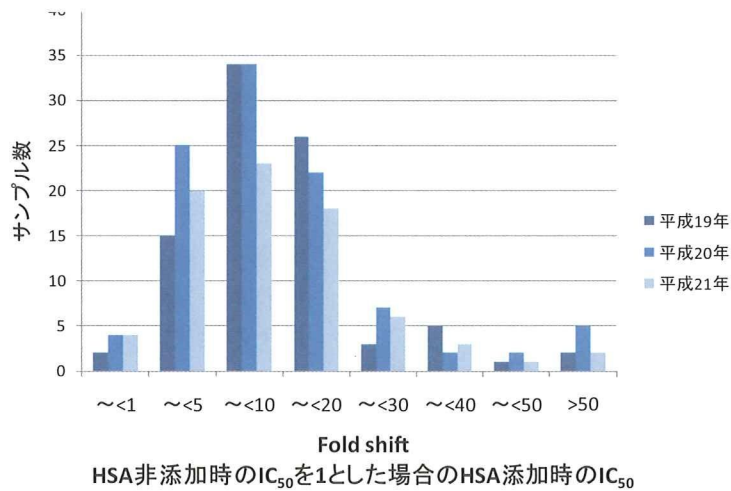


図3 HSA 添加による IC<sub>50</sub> の増加

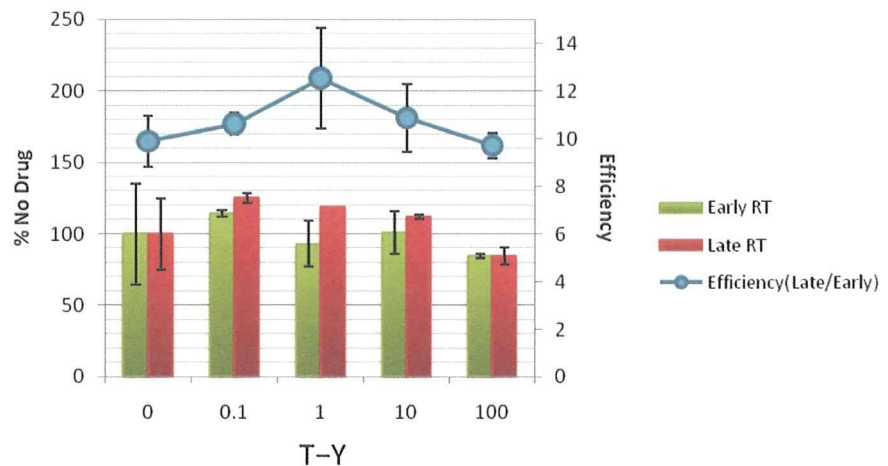


図4 逆転写反応は候補化合物 T-Y による影響を受けない

すべての APOBEC3 ファミリーが同調して増減することはなかった。

ヒト単球由来のマクロファージ (MDM) でも同様にサイトカイン、マイトジェン、TLR リガンドでの刺激による発現誘導実験を行った。TLR アゴニスト (9種) を MDM に作用させた実験では、TLR-3 リガンドで刺激をしたときに APOBEC3A/DE/F/G/H mRNA 発現量の著しい増加がみられた。TLR3 アゴニスト刺激により活性化されるシグナル伝達経路の転写因子の発現をリアルタイム PCR 法で検出した。この時発現が誘導された転写因子について、リンパ球由来培養細胞株を用いて解析した結果、「非許容

細胞」特異的に転写因子の mRNA および活性型タンパクの高発現が確認された。IFN- $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  で MDM を処理すると、いずれも APOBEC3 mRNA の発現増加が見られたが、それぞれの誘導パターンは異なっていた。これに対して、TNF- $\alpha$  で MDM を処理しても APOBEC3 mRNA の発現は誘導されなかった。

ヒト組織における APOBEC3 ファミリーの発現パターンを理解するために、ヒト組織由来 total RNA パネルにおける遺伝子発現量の測定を行った。その他、APOBEC3A は気道や肺に顕著に発現がみられ、ほかの APOBEC3 ファミリーは生殖組織に発現がみられた (図5)。

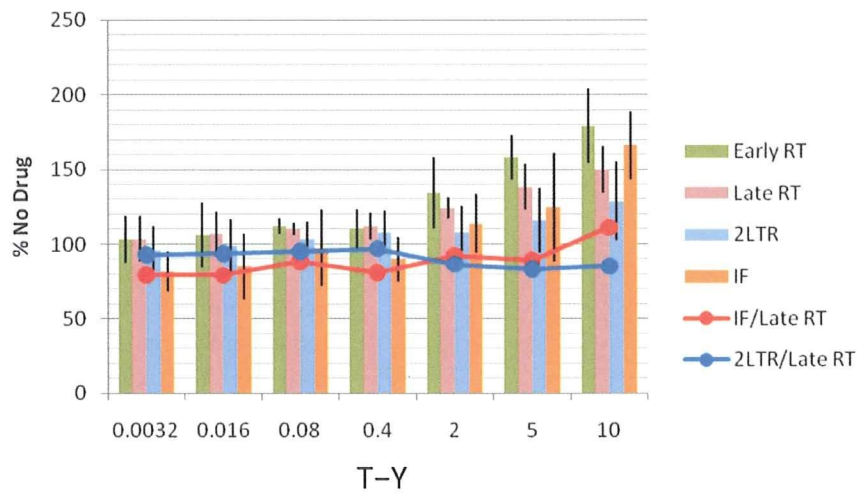


図5 組み込み反応は候補化合物 T-Y による影響を受けない

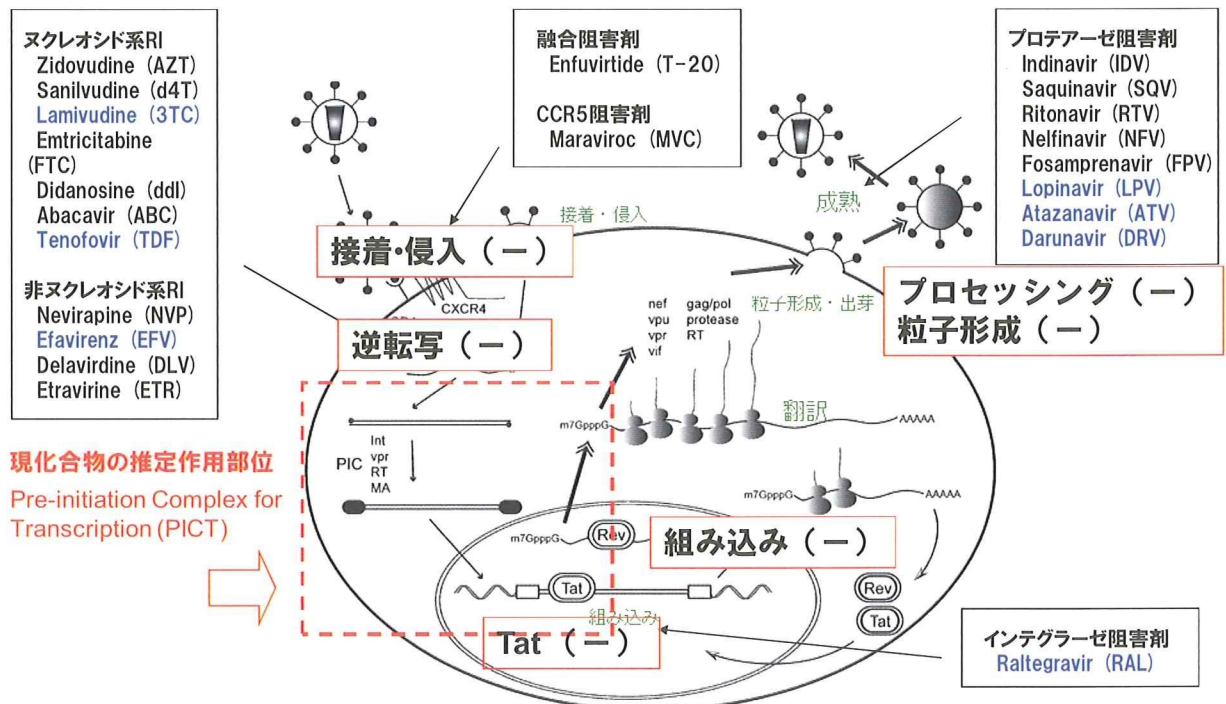


図6 既販抗 HIV 薬剤の標的と現化合物の推定される標的部位

## D. 考察

平成19年度から21年度にかけての作用機序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tat非依存性早期転写に参与していることが示唆された。

このことから本化合物をpre-initiation complex for transcription (PICT)阻害剤と仮称することとした(図6)。まだ、PICTにおけるタンパクが直接の分子標的であるかは確定していない。現時点における候補化合物の原型であるT-Yにおいてはレポーター細胞では0.25nM、PBMCでも6.5nMと極めて強い抗HIV活性を呈した。既存の薬剤との相乗効果も確認されている。

## 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T-Y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(英文)

- Shiro Ibe, Yoshiyuki Yokomaku, Teiichiro Shiino, Rie Tanaka, Junko Hattori, Seiichiro Fujisaki, Yasumasa Iwatani, Naoto Mamiya, Makoto Utsumi, Shingo Kato, Motohiro Hamaguchi, and Wataru Sugiura. HIV-2 CRF01\_AB: First Circulating Recombinant Form of HIV-2. JAIDS in press
- Matsuyama S, Shimizu A, Ode, H, Hata M, Sugiura W, Hoshino T. Structural and Energetic Analysis on the Complexes of Clinically-isolated Subtype C HIV-1 Proteases and Approved Inhibitors by Molecular Dynamics Simulation. The Journal of Physical Chemistry. 114(1):521-30
- Land S, Cunningham P, Zhou J, Frost K, Katzenstein D, Kantor R, Chen YM, Oka S, DeLong A, Sayer D, Smith J, Dax EM, Law M; TAQAS Laboratory Network. TREAT Asia Quality Assessment Scheme (TAQAS) to standardize the outcome of HIV genotypic resistance testing in a group of Asian laboratories. J Virol Methods. 2009 Aug;159(2):185-93.
- Hasegawa N, Sugiura W, Shibata J, Matsuda M, Ren F, Tanaka H. Inferring within-patient HIV-1 evolutionary dynamics under anti-HIV therapy using serial virus samples with vSPA. BMC Bioinformatics. 2009 Oct 29;10(1):360.
- Iwatani Y, Chan DS, Liu L, Yoshii H, Shibata J, Yamamoto N, Levin JG, Gronenborn AM, Sugiura W. HIV-1 Vif-mediated ubiquitination/degradation

of APOBEC3G involves four critical lysine residues in its C-terminal domain. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Nov 17;106(46):19539-44. Epub 2009 Nov 3.

### 2. 論文発表(和文)

- 杉浦 互: HIVの薬剤耐性獲得の分子機構、日本臨床 Vol.6No1 2009-1
- 服部純子、杉浦 互: 薬剤耐性の現状、Pharma Medica Vol.27 No.4 2009
- 宮崎菜穂子、松下修三、藤井 毅、杉浦 互: 抗HIV療法を受けている患者における薬剤耐性HIVの現状と問題点、The Journal of AIDS Research Vol.11 No.2 2009

### 3. 国際学会 (一般演題)

- Yasumasa Iwatani, D Chan, L Liu, H Yoshii, J Shibata, J Levin, A Gronenborn, and W Sugiura, Structure-guided Mutagenesis of APOBEC3G Reveals Critical Lysine Residues for HIV-1 Vif-mediated Ubiquitination/Degradation. 17<sup>th</sup> CROI San Francisco, 2010
- Takashi Masaoka, T Sawasaki, S Matsunaga, W Sugiura, Y Endo, M Tatsumi, N Yamamoto, and A Ryo. Novel High-throughput HIV-1 Protease-resistance Phenotypic Assay Using Cell-free Protein Production System. 17<sup>th</sup> CROI San Francisco, 2010
- Shiro Ibe, Y Yokomaku, T Shiino, R Tanaka, J Hattori, S Fujisaki, Y Iwatani, S Kato, M Hamaguchi, and W Sugiura. HIV-2 CRF01\_AB: First Circulating Recombinant Form of HIV-2. 17<sup>th</sup>CROI San Francisco, 2010
- M Fujino, H Miura, J Hattori, S Ibe, S Fujisaki, M Matsuda, M Nishizawa, Y Iwatani and W Sugiura: Mechanism of darunavir resistance acquisition in multi-protease inhibitor resistant HIV-1, XVIII international HIV Drug Resistance Workshop, June 9-13 2009, Fort Myers, Florida
- Junko Shibata, Fengrong Ren, Yasumasa, Iwatani, Hsiny Tsang, Masakazu Matsuda, Naoki Hasegawa, Hiroshi Tanaka, and Wataru Sugiura : Within-Host Coevolution of Gag P453L and Protease D30N/N88D Demonstrates virological Advantage in a Highly Protease Inhibitor-Exposed HIV-1 Case, 10<sup>th</sup> Annual symposium on Antiviral Drug Resistance, Nov15-18 2009, Richmond, VA
- Iwatani 10<sup>th</sup> Annual symposium on Antiviral Drug Resistance, Nov15-18 2009, Richmond, VA
- Masaoka, 10<sup>th</sup> Annual symposium on Antiviral Drug Resistance, Nov15-18 2009, Richmond, VA

### 4. 国内学会 (一般演題)

- 伊部 史朗、横幕 能行、服部 純子、間宮 均人、杉浦 互: 東海地域におけるHIV-2感染疑い症例の遺伝子学的解析、第83回日本感染症学会総会、2009年4月23日~24日、東京

2. 岩谷 靖雅、吉居 廣朗、柴田潤子、杉浦 互：APOBEC3Gのエピキチン化部位と抗レトロウイルス作用、第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月25日～27日、東京
3. 星野忠次、藍壇 愛、原田壮一郎、杉浦 互：ウイルス酵素の構造変形に関する系統解析、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
4. 正岡崇志、梁 明秀、巽 正志、杉浦 互、松永智子、森下 了、澤崎達也、山本直樹：酵素活性を指標とした新規のHIVプロテアーゼ阻害剤耐性検査法の基盤技術の開発、第23回日本エイズ学会学術集会・総会2009年11月26日～28日、名古屋
5. 柴田潤子、杉浦 互、岩谷靖雅、Hsinyi Tsang、松田昌和、長谷川直樹、任 鳳蓉、田中 博：宿主内HIV-1の共進化変異の解析：Protease阻害剤耐性変異D30N/N88Dとp1/p6切断領域のP453変異の相互干渉の意義、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
6. 鈴木寿子、服部純子、村田大悟、三浦秀佳、伊部史朗、藤野真之、西澤雅子、山本直樹、杉浦 互：インテグラーゼ阻害剤耐性化機序の分子生物学的解析、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
7. 服部純子、瀧永博之、吉田 繁、千葉仁志、小池隆夫、佐々木悟、伊藤俊広、内田和江、原孝、佐藤武幸、上田敦久、石ヶ坪良明、近藤真規子、今井光信、長島真美、貞升健志、古賀一郎、太田康男、山元康之、福武勝幸、田中理恵、加藤信吾、宮崎菜穂子、藤井 毅、岩本愛吉、西澤雅子、仲宗根正、巽 正志、椎野禎一郎、林田庸総、岡 慎一、伊部史朗、藤崎誠一郎、金田次弘、横幕能行、濱口元洋、上田幹夫、大家正義、田邊嘉也、渡辺香奈子、渡邊 大、矢倉裕輝、白阪琢磨、栗原 健、小島洋子、中桐、逸博、森 治代、中桐、逸博、高田 昇、木村昭郎、南 留美、山本政弘、松下修三、藤田次郎、健山正男、堀 成美、杉浦 互：003-2008年の新規HIV/AIDS診断症例における薬剤耐性頻度の動向、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
8. 須藤弘二、杉浦 互、加藤真吾：PCR-MS法を用いた新規感染者血漿中の薬剤耐性微小団の定量、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
9. 重見 麗、服部純子、保坂真澄、伊部史朗、藤崎誠一郎、横幕能行、濱口元洋、内海 眞、岩谷靖雅、杉浦 互：BEDアッセイを用いた名古屋医療センターにおける新規HIV感染者の動向調査、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
10. 椎野禎一郎、貞升健志、長島真美、服部純子、杉浦 互：国内感染者集団の大規模塩基配列データから推測されるHIV集団サイズの経時的変化、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
11. 藤崎誠一郎、横幕能行、服部純子、伊部史朗、濱口元洋、岩谷靖雅、杉浦 互：HIV/HBVy重複感染者におけるHBV genotype解析および薬剤耐性アミノ酸変異の検出、第23回日本エイズ学会学術集会・総会2009年11月26日～28日、名古屋
12. 伊部史朗、横幕能行、椎野禎一郎、田中理恵、服部純子、藤崎誠一郎、岩谷靖雅、間宮均人、内海 眞、加藤真吾、濱口元洋、杉浦 互：日本におけるHIV-2感染症の分子疫学的解析、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
13. 宮崎菜穂子、松下修三、藤井 毅、岩本愛吉、杉浦 互：多剤耐性症例治療を目的とした新規抗HIV薬使用症例に対する緊急全国調査、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
14. 石川晃一、山本典生、杉浦 互、服部純子、山岡昇司、：ガーナにおける抗レトロウイルス治療（ART）中HIV感染者のウイルス定量と薬剤耐性解析、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
15. 西澤雅子、Jeffery Johnson, Walid Heneine、山本直樹、杉浦 互：高感度薬剤耐性HIV検出法を用いた微小集族薬剤耐性HIVの検出と依存比率に関する研究、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
16. 横幕能行、大出裕高、藤崎誠一郎、服部純子、濱口元洋、杉浦 互：HIVプロテアーゼ阻害剤耐性関連変異蓄積症例の薬剤感受性評価に対するVLP ELISA法およびコンピューターシミュレーション法の有用性の検討、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
17. 岩谷靖雅、吉居廣朗、柴田潤子、杉浦 互：Vif依存的なAPOBEC3Gのエピキチン化部位と抗ウイルス作用、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋
18. 吉居廣朗、岩谷靖雅、杉浦 互：抗HIV-1宿主因子APOBEC3Gファミリーの発現調節に関する研究、第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年11月26日～28日、名古屋

## H. 知的所有権の出願・取得状況

特願2010-012557：アリアル基を有する複素環化合物

## 分担研究課題



# カニクイザルを用いた新規抗HIV-1 薬剤の評価研究

研究分担者

**明里 宏文** 京都大学霊長類研究所 教授

当研究班で開発を進めてきた新規抗HIV-1化合物およびAHについて、これらの臨床応用を目指しカニクイザルを用いた有効性、安全性評価ならびに薬剤動態研究を行なった。本研究の結果、前臨床試験実施のための準備が整ったことから、今後霊長類モデルを用いた感染阻止実験や治療効果評価実験等を行なう予定である。また、これまで困難であったHIV-1に選択性の高い薬剤の前臨床試験実施に向けて、第二世代サル指向性HIV-1を用いたカニクイザル感染実験を行なった。その結果、カニクイザルで良好なHIV-1感染増殖が認められたことから、SIVには無効なHIV-1特異的薬剤の有効性評価試験が本霊長類モデルにより可能となったものと判断された。今後、本研究を含む抗HIV-1薬剤開発における臨床試験への「橋渡し研究」がこれまでと比較し格段に迅速化されるものと期待される。

## ■ A. 研究目的

本研究班開発グループにおけるこれまでの抗HIV-1阻害活性を有する化合物探索の結果、その有効性が明らかな候補化合物が見出された。またそれと平行して、HIV-1 Env 蛋白の糖鎖に結合することによりHIV-1感染を協力に阻害するアクチノヒピン(AH)二量体の開発が進んでいる。これらの *in vitro* における有効性ならびに小動物を用いた安全性や薬物動態については昨年度及び今年度の他の分担研究者により確認されている(分担研究者の報告書を参照)。そこでこれら薬剤の臨床応用を目指し、本研究ではカニクイザルを用いた有効性、安全性評価ならびに薬剤動態研究を行なった。ところで、更なる探索により想定される、HIV-1特異的かつオルソログであるサル免疫不全ウイルス(SIV)には無効な新規化合物はこれまでサルエイズモデルでは評価できないといった問題があった。そこで本研究ではサル指向性HIV-1を用いたカニクイザル感染実験を行ない、果たしてHIV-1特異的薬剤がサル類により評価可能となりうるかを検討した。

## ■ B. 研究方法

新規抗HIV-1化合物の安全性・薬物動態に関する研究

2種類の新規抗HIV-1化合物(T-41655、T-41668)について、健康なカニクイザル(雄、2歳齢)2頭に30mg/kgで経口投与を行なった。その後経時的に採

血を行ない、臨床的变化について観察を行なうとともに、血液細胞数、血清生化学値(AST、ALT、ALP、LDH、TG、CK、BUN、Creatinine、Chol、A/G)および血中薬物濃度について測定を行なった。

AHの有効性評価に関する研究：SIVmac(アカゲザル由来免疫不全ウイルス; 1000TCID<sub>50</sub>)を2頭のカニクイザル(雄、2歳齢)の直腸にバルーンカテーテルを用いて接種した。その後経時的に採血を行ない、血中ウイルス値をreal-time PCR法にて、血中CD4陽性T細胞数をFACSにてそれぞれ解析を行なった。

サル類を用いたHIV-1特異的薬剤の前臨床評価系に関する研究

第2世代サル指向性HIV-1であるMN4-5Sに関して、接種実験用ウイルスストックをカニクイザル由来CD8(-)PBMCへの感染実験により得た。カニクイザルへのウイルス接種及び採血は、ケタミン麻酔下で行った。plasma viral RNAをリアルタイムRT-PCR法により血中CD4陽性T細胞数をFACSにてそれぞれ解析を行なった。

(倫理面への配慮)

医薬基盤研究所および国立感染症研究所の動物実験倫理規定に従い、動物実験委員会の承認を受けて実施した。

## ■C. 研究結果

### 新規抗HIV-1化合物の安全性・薬物動態に関する研究

本研究班開発グループにおける探索の結果見出された新規化合物を基に、その細胞毒性と抗ウイルス活性を高めた2種類の誘導体について、その単回投与による短期毒性と薬物動態をカニクイザルを用いて検証した。2種類の化合物（T-41655、T-41668）について、カニクイザル2頭へ経口投与し投与24時間後まで経時的に血液を採取し検討した。その結果、血液細胞数や血清生化学値に有為な変動は認められなかった。また薬物投与による臨床的な影響は特に見られなかった。

### AHの有効性評価に関する研究

AHは田中らが発見、開発した高マンノース型糖鎖結合性レクチンであり、高マンノース型糖鎖修飾蛋白であるHIV-1 Envに強い親和性を示すことによりHIV-1のリセプターへの結合を阻害する。また二量体化AHはその親和性、*in vitro*におけるHIV-1感染阻害活性が共に格段に向上することを見出した（本研究班の他の報告書を参照）。従って、AHはHIV-1感染予防薬（microbicide）としての臨床応用が期待される。そこでHIV-1の主要感染ルートである経粘膜感染におけるAHの感染阻害活性を検討するため、本研究ではその評価系としてのサルモデル確立を目指した。HIV-1と同様にAHにより感染が阻害されることを確認したSIVmacを2頭のカニクイザル（雄、2歳齢）の直腸にバルーンカテーテルを用いて接種した。その後経時的な血中ウイルス値およびCD4陽性T細胞数を測定中である。

### サル類を用いたHIV-1特異的薬剤の前臨床評価系に関する研究

本研究班では、上述の新規化合物に加え、異なる機序でHIV-1感染を阻害する化合物の探索を進めている。この際、HIV-1特異的かつオルソログであるサル免疫不全ウイルス（SIV）には無効な新規化合物に関しては、これまでサルエイズモデルでは評価できないといった問題があった。そこで本研究では、果たしてHIV-1特異的薬剤がサル類により評価可能となりうるかを検討する目的で、足立らのグループが初めて報告した（PNAS、2006）サル指向性HIV-1（monkey-tropic HIV-1; HIV-1mt）DT-5Rと比較してサル細胞における感染複製能が向上した第二世代HIV-1mtであるMN4-5Sクローン（本研究班の他の報告書を参照）を用いてカニクイザル感染実験を行なった。カニクイザル3頭に10ng p27 Core相当の

ウイルスを経静脈にて接種し、その後のウイルス動態を解析した。その結果、すべてのサル個体においてMN4-5Sウイルスの増殖が確認され、感染2週後で $10^4$  copies/ml以上のウイルスRNAが検出された。また同じく感染2週後に、感染ザルにおけるCD4陽性T細胞数の一過性減少が認められた。

## ■D. 考察

新規抗HIV-1化合物（T-41655、T-41668）は昨年度の小動物における結果と同様に良好な体内動態を示し、また少なくとも今回の単回投与実験ではカニクイザルに与える副作用等は認められなかった。今後は、中長期連続投与による安全性の検討とともに、カニクイザル/SIVmacもしくはHIV-1mtによる霊長類モデルを用いた感染阻止実験や治療効果評価実験等を行なう予定である。一方AHは、特に二量体化により高い抗HIV-1活性を示すことが明らかとなっている。HIV-1の主要感染ルートである経粘膜感染を阻害出来るHIV-1感染予防薬（microbicide）はまだ実用化されていないことから、AHの臨床応用が期待される。今回の検討により経直腸による感染条件設定が確立した後は、カニクイザル/SIVmac霊長類モデルを用いた感染阻止実験を行なう予定である。

今回の検討により、第二世代HIV-1mtであるMN4-5Sクローンがカニクイザル接種で良好に増殖することが示された。ピーク時での血中ウイルス量（感染2週後で $10^4$  copies/ml以上）は、ウイルス定量系の検出限界（ $10^2$  copies/ml）を考慮すれば充分薬剤による抗ウイルス効果を判定できるものと考えられる。現在、さらに第3世代HIV-1mt開発がほぼ完了し、カニクイザルへの接種実験を開始するところであるが、更なるウイルス増殖効率の向上が期待されることである。以上のことから、SIVには無効なHIV-1特異的薬剤の前臨床試験（有効性評価試験）は本霊長類モデルにより可能となったものと判断された。

## ■E. 結論

当研究班で開発を進めてきた新規抗HIV-1化合物およびAHについて、本研究により前臨床試験実施のための準備が整った。今後霊長類モデルを用いた感染阻止実験や治療効果評価実験等を行なう予定である。また、これまで困難であったHIV-1に選択性の高い薬剤の前臨床試験が、今回新たに確立されたサル指向性HIV-1/霊長類モデルにより可能となった。今後、本研究を含む抗HIV-1薬剤開発における臨床試験への「橋渡し研究」がこれまでと比較し格段に迅速化されるものと期待される。



## ■F. 健康危険情報

特になし

## ■G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Hohjoh H, Akari H, Fujiwara Y, Hirai H, Wada K: Molecular cloning and characterization of the common marmoset huntingtin gene. *Gene* 432, 60-66, 2009.
2. Izumi T, Takaori-Kondo A, Shirakawa K, Higashitsuji H, Itoh K, Io 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.
3. Akari H, Iwasaki Y, Yoshida T, Iijima S: Non-human primate surrogate model of hepatitis C virus infection. *Microbiology and Immunology* 53, 53-57, 2009.
4. Iwasaki Y, Akari H, Murakami T, Kumakura S, Dewan MZ, Yanaka M, Yamamoto N: Efficient inhibition of SDF-1 $\alpha$ -mediated chemotaxis and HIV-1 infection by novel CXCR4 antagonists. *Cancer Science* 100, 778-781, 2009.
5. Hassan R, Suzu S, Hiyoshi M, Takahashi-Makise N, Ueno T, Agatsuma T, Akari H, Komano J, Takebe Y, Motoyoshi K, Okada S: Dys-regulated activation of a Src tyrosine kinase Hck at the Golgi disturbs N-glycosylation of a cytokine receptor Fms. *Journal of Cellular Physiology* 221, 458-468, 2009.
6. Kuroishi A, Saito A, Shingai Y, Shioda T, Nomaguchi M, Adachi A, Akari A, Nakayama EE: Modification of a loop sequence between alpha-helices 6 and 7 of virus capsid (CA) protein in a human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) derivative that has simian immunodeficiency virus (SIVmac239) vif and CA alpha-helices 4 and 5 loop improves replication in cynomolgus monkey cells. *Retrovirology* 6, 70, 2009.

### 2. 学会発表

1. 齊藤暁、飯島沙幸、岩崎優紀、黒石歩、中山英美、塩田達雄、足立昭夫、野間口雅子、俣野哲朗、明里宏文 SIV由来CA h6/7 loopを持つ第2世代サル指向性HIV-1クローンはカニクイザル個体で効率よく増殖する 第57回ウイルス学会（東京）平成21年10月25-27日
2. 齊藤暁、飯島沙幸、岩崎優紀、明里宏文 第2世代サル指向性HIV-1クローンはカニクイザル

個体において効率良く増殖する 第23回日本エイズ学会学術集会（名古屋）平成21年11月26-28日

## ■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HIV/AIDS  
感染予防薬・治療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<sub>50</sub>=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上の糖鎖数に依存し、低糖鎖数株(AH非感受性株)に対する活性は弱い。AHを2量体(His-TEV-AH dimer/RTB-L)としたところ、抗HIV活性は2~20倍上昇し、AH単量体非感受性株の克服にも成功した。

本研究ではAHを、(1)HIV感染予防薬及び(2)HIV/AIDS治療薬として開発することを目的とした。(1)AHをHIV感染予防薬として活用するためには、AHを弱酸性~中性付近で、高濃度で溶解させる必要がある。この条件に適合するバッファーを探索したところ、座薬の基剤として用いられているマクロゴールで、AHが10 mg/mlまで溶解できることを見出した。これを基剤とし、AHのHIV感染予防薬としての活用が期待できる。

(2)AHをHIV/AIDS治療薬として血中投与する場合、免疫原性と血中での安定性が問題となる。そこで、免疫原性低下及び血中半減期延長効果のある化学修飾(ポリエチレングリコール(PEG)化及びスチレン-無水マレイン酸共重合(SMA)化)を検討することにした。その結果、合胞体形成阻害活性を保持しているPEG化AH及びSMA化AHを得ることができた。今後、免疫原性及び血中半減期の評価を行う予定である。

## ■ 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(図2)。昨年度明らかにされたAHの立体構造から、AHはgp120上のHM3本を捕らえることで、gp120と強く結合し、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

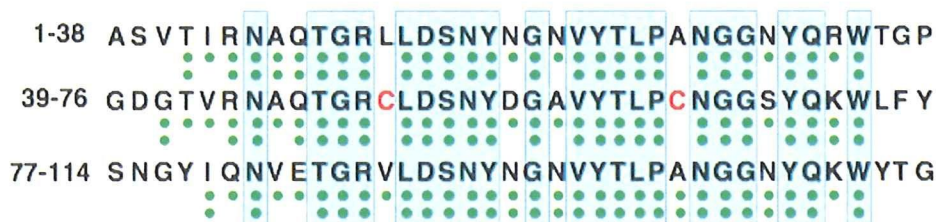


図1 AHのアミノ酸配列

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HM1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遥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。AHを2量体(His-TEV-AH dimer/RTB-L)とすることにより、抗HIV活性を2~20倍上昇させ、AH非感受性株(1株の例外を除いて)を克服することに成功した。

本年度の研究では、AHを(1)HIV感染予防薬、(2)AIDS治療薬として開発することを目的とした。

### (1) HIV感染予防薬

AH及びHis-TEV-AH dimer/RTB-Lは、人体に有害な有機溶媒系(アセトニトリルやアゼトン)の基剤には易溶であるが、水系の中性基剤(PBS等)に対しては、20~30 µg/ml以下程度しか溶けない。ただし、pHが低い(pH 2~3)場合に限り、水系のバッファーに対しても~5 mg/ml程度溶解する。AHをHIV感染予防薬/臍剤として用いる場合、弱酸性~中性付近で高濃度であることが必要である。従って、人体に無害である(害が少ない)有機溶媒系の基剤として、グリセロール、ポリエチレングリコール、エタノールやプロピレングリコール等を用い、また、溶解補助剤的な役割として、少量の酸を添加することで、なるべく中性に近い状態での高濃度溶液の調製を試みた。

### (2) HIV/AIDS治療薬

AHをHIV/AIDS治療薬として血中投与する場合、免疫原性及び血中での安定性が問題になる。一方、PEG-インターフェロンやSMANCSでは、各種タンパク質の化学修飾により、血中投与可能な薬剤とし

での開発に成功している。そこで、AHをポリエチレングリコール(PEG)やスチレン-無水マレイン酸共重合(SMA)を用いて化学修飾し、血中投与可能な薬剤耐性HIV/AIDS症例救済のための抗HIV薬の開発を目的として研究を進めた。

## ■B. 研究方法

### <His-TEV-AH dimer/RTB-Lの高濃度溶解バッファーの探索>

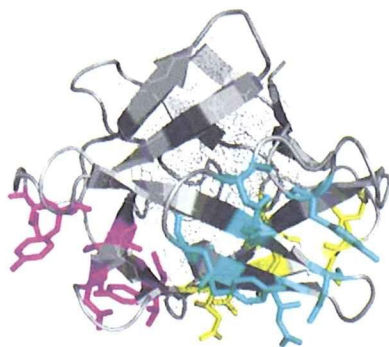
His-TEV-AH dimer/RTB-Lを重さで一定量取り、10 mg/mlになるように各種バッファーを加えた。溶けきらない部分を遠心分離及び、0.22 µmフィルターを通すことで除去し、溶け残った部分をO.D.<sub>280</sub>の吸光度を測定し、タンパク質の濃度を求めた。

### <放線菌由来AHのポリエチレングリコール(PEG)化>

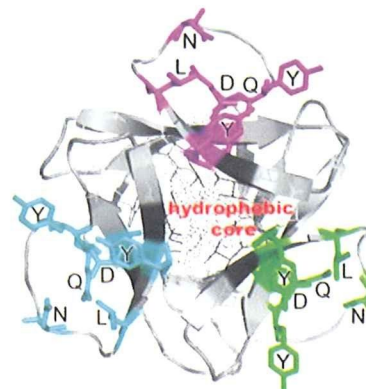
PEG化反応液(100mM酢酸ナトリウム(pH 5.0)、20 mM水素化ホウ酸ナトリウム、12.3 uM AH、12.3 uM 10 kDa m-PEG aldehyde)を室温で6時間インキュベートした。反応液のゲル濾過クロマトグラフィーを行い、PEG化AHを精製した。得られたPEG化誘導体の質量分析を東北大学医工学研究科分子構造解析医工学研究室村山先生に依頼した。

### <放線菌由来AHのスチレン-無水マレイン酸共重合(SMA)化>

AHを0.8M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8.1に溶解後、等量のSMAを添加し攪拌しながら一晩反応した。その反応液を限外濾過し高濃度まで濃縮した。再度、濃縮液にSMAを5回に分けて添加し、一晩反応させた。さらに、反応液から未反応SMAを除去するため透析し、ゲルろ過クロマトグラフィーでSMA修飾AHを精製した。得られたSMA化誘導体をHIVの接着・侵入の過程をモデル化した合胞体形成系を用いて活性を



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2 AHの立体構造