

200908003B

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
平成19-21年度総合研究報告書

# 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

平成19-21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19-21年度 総合研究報告書－

研究代表者 杉浦 互

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 .....10

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

### Vif機能を標的とした新規創薬に関する研究 .....24

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高活性化と抗HIV/AIDS薬としての開発研究 .....30

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 .....38

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 ..... 42

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 .....47



# 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

杉浦 亙

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)Vif阻害剤開発基盤技術の開発した。(vii)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)。

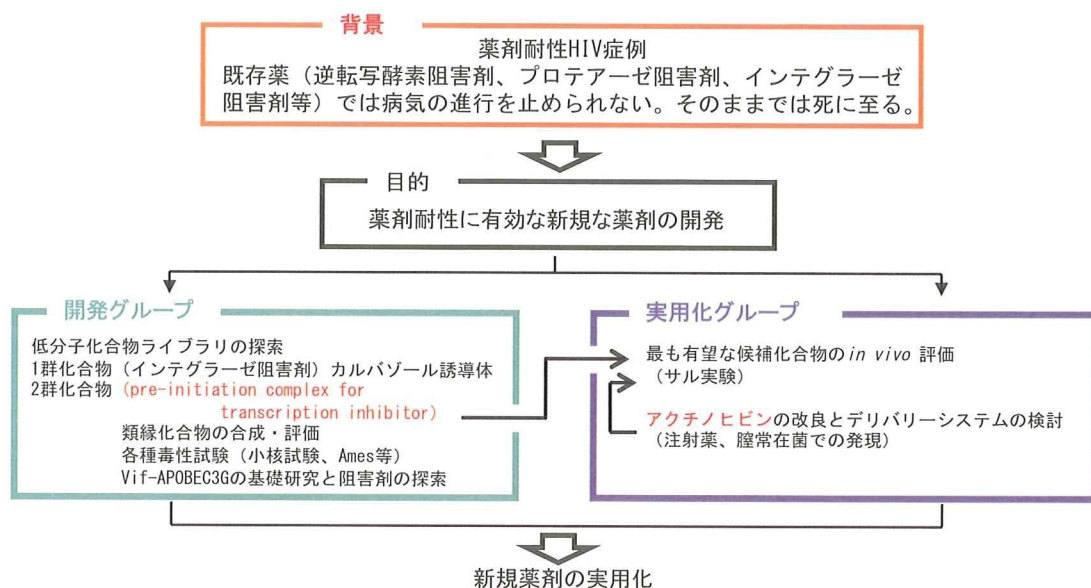


図1 「薬剤耐性HIV/AIDS症例救済のための新規な機序による抗HIV薬剤の開発研究」全体の流れ

(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) 新規化合物の合成と抗HIV活性の評価

MaRBLE細胞(Chiba-Mizutani, 2007)を用いた *in vitro* 抗HIV活性評価系で同定された候補化合物をもとに、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展開した。合成した化合物はMaRBLE細胞、ヒト末梢血単核細胞(PBMC)、MT-2細胞、H9細胞等を用いて抗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

候補化合物の作用機序を明らかにするために、①Time-Of-Addition Assayによる阻害複製過程の判定、②HIV-1 遺伝子欠失クローンに対する化合物の感受性の解析、③ウイルス粒子構造組成に及ぼす影響の解析、④各種培養細胞株に対する感受性スペクトラムの検索、⑤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抗Vif薬剤開発基盤技術開発としてVifが切断領域に与える影響について、Gag p2/NC切断領域欠損株 p NL43-CA2.Vif(-)Env(-)のウイルス学的解析を行った。

②APOBEC3G(A3G)を標的とした新薬開発の基盤技術開発としてVif依存的なA3Gのコピキチン部位の同定。A3Gのモデル構造を *in silico* で構築した。

③APOBEC3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、マイトジェン、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

①AH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。③マイトジェン活性測定及びウサギ臍刺激試験によるAH及びAH二量体の安全性試験を実施した。

(iv) カニクイザルにおける新薬評価の実施

①サル細胞指向性HIV-1(NL-DT5R)(J Virol 81, 2007; RMV 18, 2008)を用いる *in vivo* 新薬評価系構築のためにNL-DT5Rのカニクイザル由来HSC-Fへの細胞馴化によるウイルスゲノムの改良を行った。

②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。

③AH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決めた「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)我々は今までの低分子ライブラリの探索から1群化合物(インテグラーゼ阻害剤)と2群化合物(阻害機序不明)という2群の化合物を有していたが本研究では2群化合物をもとに142個以上の化合物を合成・展開し、その結果強い抗HIV活性を呈する化合物を同定した(図2, 5)。更に化合物を母核にして、4つの置換基群(A~D)から286の誘導体を合成した。その結果、抗HIV活性を10-100倍増強させる新たな置換基群A及び置換基群Bを含む新規化合物を見出



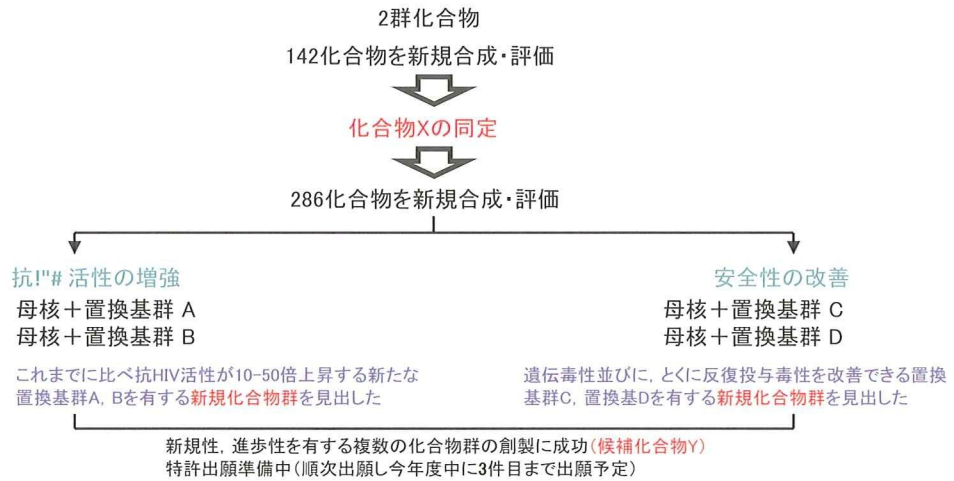


図2 低分子化合物ライブラリ探索のまとめ

テスト項目	母核 +置換基群 A	+置換基群 B	+置換基群 C	+置換基群 D
抗HIV-1活性 IC <sub>50</sub> (ng/mL)	0.07	0.11	0.15	0.46
マウス体内動態(経口, 25mg/kg)				
1hr ng/mL	5500	1640	5600	5500
4hr	5000	1380	2900	7300
12hr	1300	630	840	2000
マウス2W反復投与毒性 ALT/ALT ↑ 投与量(mg/kg)	2.5	>30	>20	30
遺伝毒性 Ames(TA98)	陰性	陰性	陰性	陰性
<i>in vivo</i> 小核試験	陰性	陰性	陰性	陰性
hERG 阻害: (IC <sub>50</sub> ; nM)	>1000	>1000	>1000	>1000
CYP3A4 阻害 (IC <sub>50</sub> ; nM)	>1000	>1000	>1000	>1000

図3 現時点での代表化合物の特性

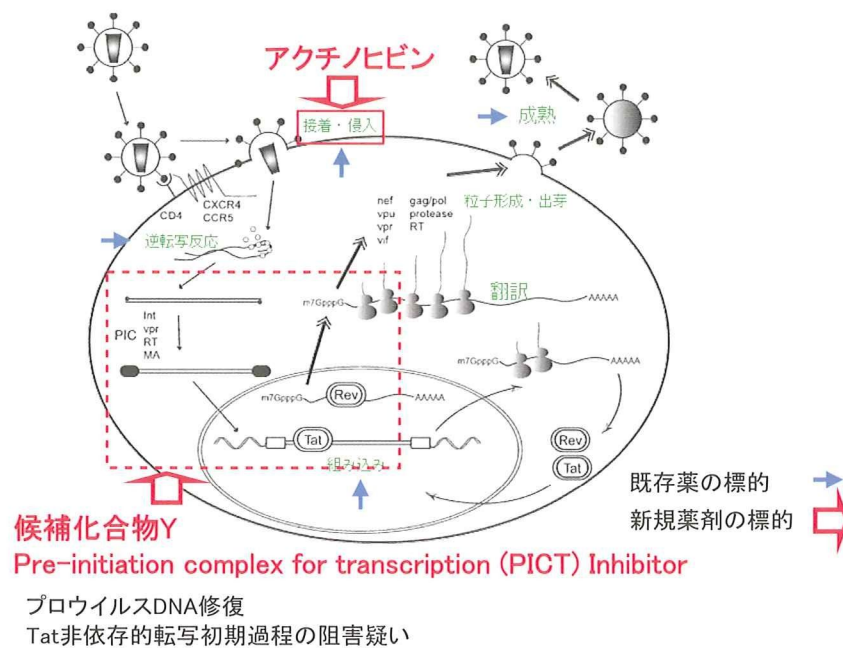


図4 研究班で実用化に取り組んでいる新規薬剤の作用機点

した。更に置換基群Cまたは置換基群Dの導入により遺伝毒性並びに特に反復投与毒性(肝毒性等)を大きく改善することに成功した。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(図3)。

(ii)新規薬剤の阻害機序および標的因子の解明を試みた(図4)。見出したT-Yは既存のプロテアーゼ阻害剤(PI)耐性HIV、逆転写酵素阻害剤(RTI)耐性HIVに対しても阻害活性を示すことから、新規な阻害機序を有することが確認された。T-Yはウイルス構造タンパク、ゲノムRNA、Cyclophilin Aなどの組成には影響しないことが明らかになった。Time-Of-Addition Assayの結果から、薬剤の阻害時間がインテグラーゼ阻害薬の作用点以降のプロファイルに近いことが分かった。VSV-G Pseudo Typed HIV-1に対して阻害効果を示し、接着融合侵入阻害剤でないことが確認された。Exogenous-RT活性測定ではT-Yの阻害効果を認めないことからRTIでないことが確認された。*in vitro*のStrand-transfer Assayでは阻害効果を示さず組み込み反応は標的ではないことが明らかになった。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ことが確認された。

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T-Y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)。

### (iii) Vif-APOBECの基礎研究と阻害剤の探索

①HIV-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<sup>p33-INT</sup>)を形成すること、このGag<sup>p33-INT</sup>がCD4陽性T細胞由来HIV-1の感染性を増強することを見出した。

②*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(図6)。

③Vif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377個の化合物について実施した。

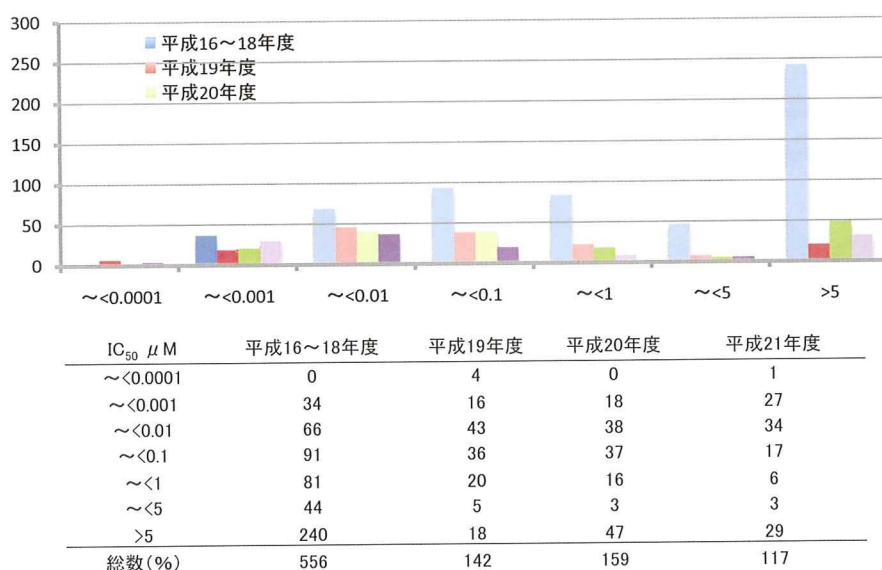
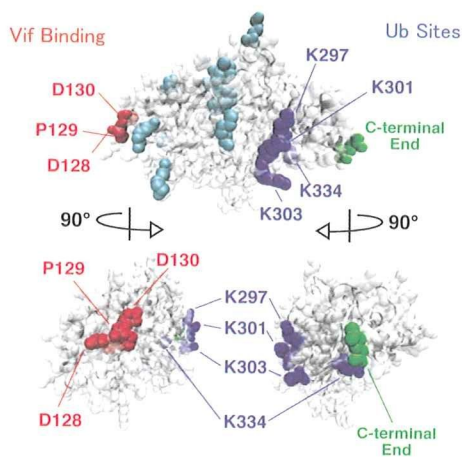


図5 合成化合物と探索数：そのIC<sub>50</sub>の分布(平成19~21年度)



ユビキチン化部位はC末近傍に隣接し、  
Vif 結合領域と対極的な位置関係に存在する

図6 APOBEC3Gユビキチン化部位とVif抵抗性APOBEC3G

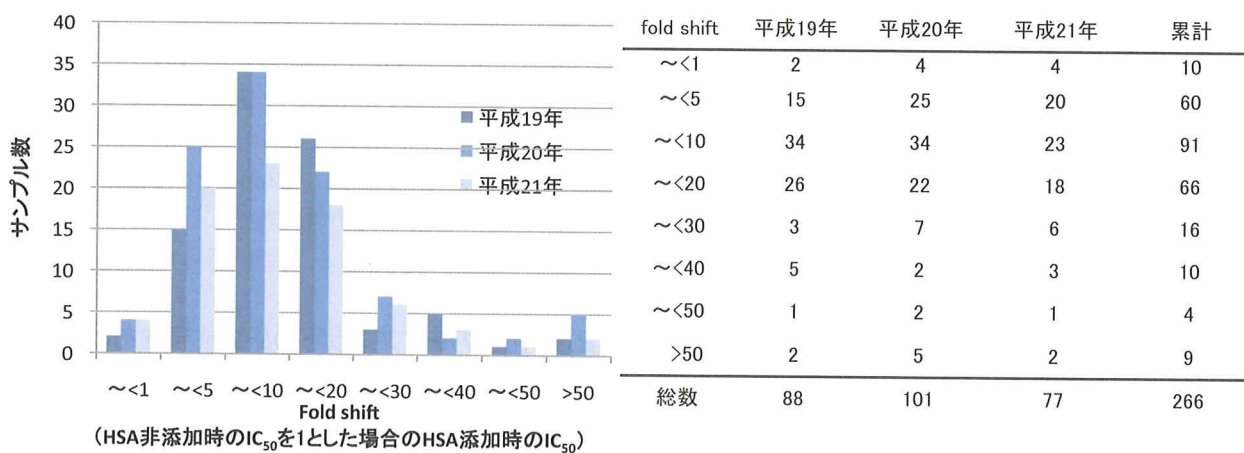


図7 探索化合物に対するHuman Serum Albumin (HSA) の影響



図8 アクチノビbinの立体構造とその阻害機序の解析

アクチノビbinは、互いに類似した三つのセグメントからなり、gp120の3本の高マンノース型糖鎖に結合することによりHIVの細胞への感染を阻止する



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(図7)。

(ii) AH が、HIV-1 gp120 上に存在し CD4 陽性細胞への接着に関与している高マンノース型糖鎖に結合することにより抗 HIV 活性を示すことを明らかにした後(図8)、AH を結晶化して立体構造を明らかにすることにより、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。また、抗 SIV 活性も確認され、ウサギ腔刺激試験での安全性を確認した。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。① NL-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(図9)。② T-Y のカニクイザル体内血中動態解析および抗 HIV 活性の評価、AH 二量体の経直腸感染阻止実験をカニクイザル/SIVmac 感染モデルを用いて平成22年1月より医薬基盤研究所霊長類医科学研究センターにおいて開始予定である。

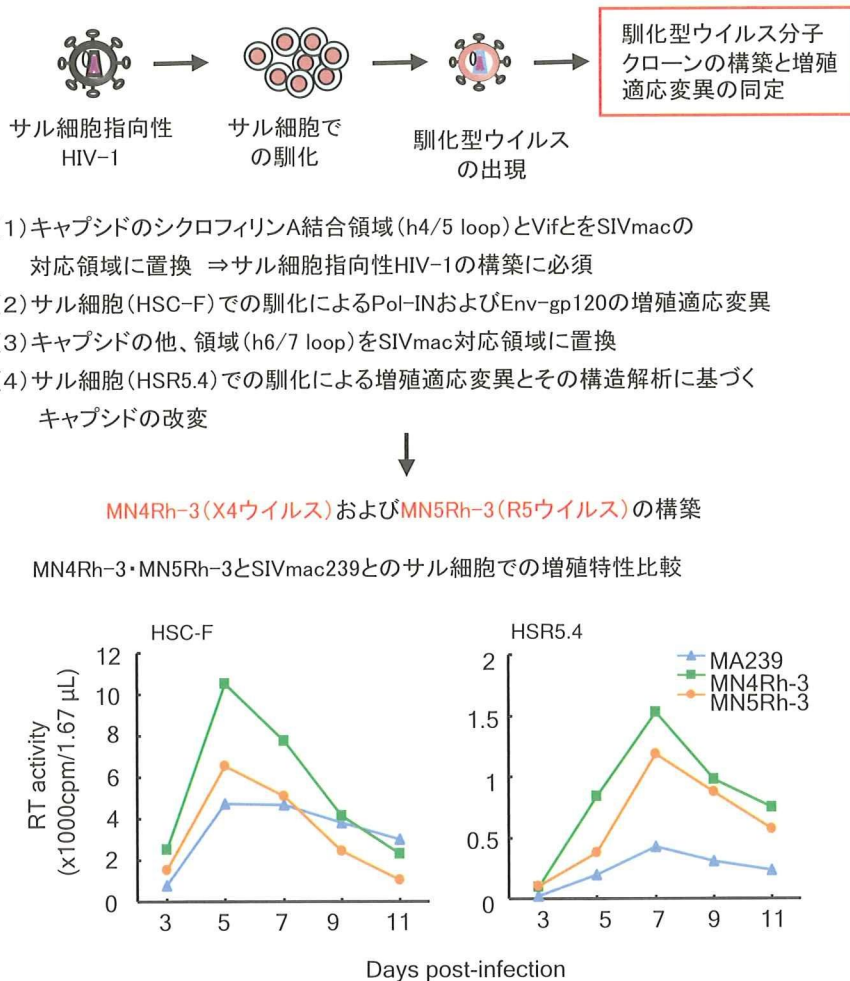


図9 サル細胞指向性 HIV-1 の馴化と改良



## D. 評価

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。

候補化合物T-Yは化学構造も抗HIV機序も全く新規であり、新薬としての期待だけでなく、HIVの複製機序の更なる解明に繋がるのが期待される。HIVのワクチン開発が滞っている現在、microbicideの重要性が高まっているが、AHはそのHIV選択性と強力な阻害活性から、WHOも注目する有望な化合物である。Vif-APOBECの研究で得られた成果は国際的にも注目を浴びている最先端の成果である。サル指向性HIV感染モデルの構築はHIVの病態に迫る国際的にトップクラスの研究成果である。

### (3)今後の展望について

## 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T-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

## 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 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

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、転写早期に作用している可能性が高いことが明らかになり、pre-initiation complex for transcription (PICT)阻害剤と仮称した。

## 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。

### (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

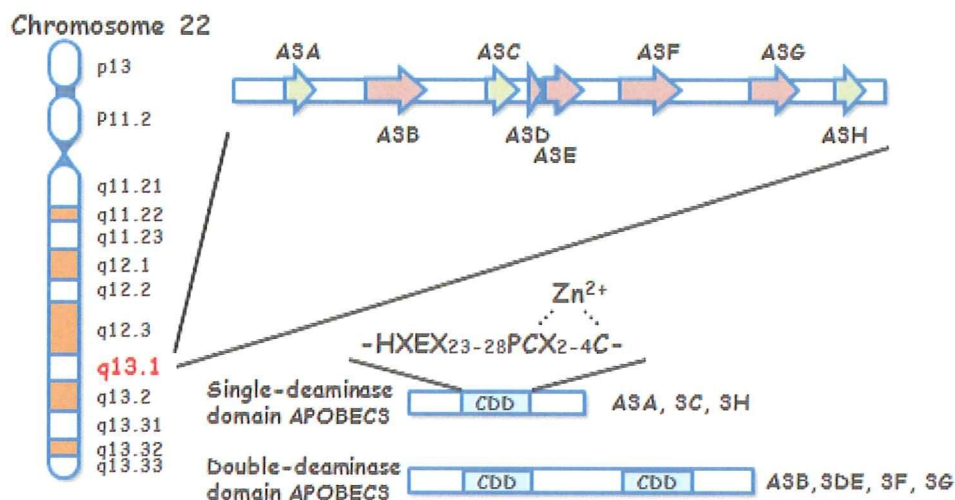


図1 APOBEC3ファミリー



(A3G)は、HIV-1粒子中に取り込まれHIV複製を強く抑制する。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

候補化合物および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 $\mu$ 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<sub>50</sub>を求め、HSA添加時のIC<sub>50</sub>を非添加時のIC<sub>50</sub>と比較した。

#### b. 候補化合物およびその類縁に対するヒト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( $1 \times 10^6$ 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、HIV-1の複製過程における阻害ステップの同定、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、以下の実験を行った。

①複製前期/後期の判定：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。

②候補化合物DのGagプロセッシング、サイクロフィリン取り込みに及ぼす影響について、候補化合物を添加した状態で粒子形成を行い、Western blottingにより判定した。

③候補化合物Dがウイルスの宿主細胞への接着・融合に影響を及ぼすか確認するためにVSV-G pseudo-typedウイルスを用いて感染実験を行った。

④候補化合物DがVprもしくはVpuを標的にしているか確認するために、各々を欠損させたウイルスを作成し、化合物の阻害活性を評価した。

⑤候補化合物DがRNAのパッケージングに作用するかみるために、薬剤添加下で作成したウイルス粒子のRNA/p24の比率を評価した。

⑥HIV以外のレトロウイルスへの作用を確認するためにSIVmacに対する阻害活性を評価した。

⑦逆転写(RT)反応：候補化合物T-Yを加えてNERT(Natural Endogenous Reverse Transcription)を行

表1 解析サンプルまとめ

サンプル総数		平成19年		平成20年		平成21年		3年間の総計	
IC50	$\mu$ M	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

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。

⑧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。

⑨転写反応：NF-κB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-αまたはLPSで刺激し、核抽出液を調製。NF-κB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

リアルタイムPCR法を用いてAPOBEC3ファミリーのmRNA定量系を確立した。PCRに用いたプライマーはそれぞれのAPOBEC3特異的な配列を選び、ゲノムDNA由来の増幅を防ぐ目的でエキソジャンクションを挟むように設計した。検量線作成に用いるStandardとして、*in vitro*転写で各APOBEC3のORF領域RNAを合成し、吸光度を利用してコピー数を概算して用いた。

## C. 研究結果

### (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。ヒト血清タンパクの影響を受けにくい化合物T-Y類縁化合物の探索を行った。合計377化合物の評価を行ったが、図2および表2に示すように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70個であった。 $IC_{50}$ 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 $IC_{50}<0.001$ を呈する5化合物を見出された。

#### 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2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5μM以上であり、細胞毒性は軽微であった。

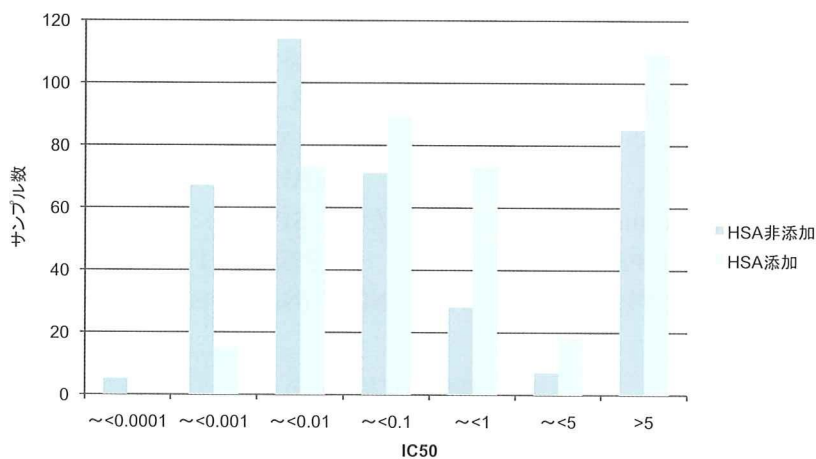


図2 HSA添加・非添加における $IC_{50}$ の分布（平成19～21年）

表2 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)	

(ii) 阻害機序の解明

候補化合物およびその類縁化合物の作用機序については①粒子形成時に薬剤候補薬剤を添加して作成したウイルスの感染性に変化がないことから複製後

期課程に作用していない(図4)。

② Single replication assay で明確な複製阻害活性を呈することから感染前期課程に作用をしている(図5)。

③ 粒子形成時に薬剤候補薬剤を添加して作成した

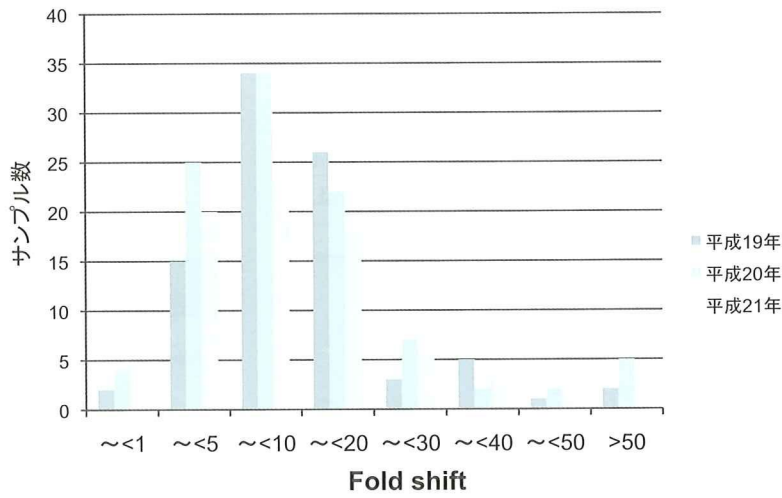


図3 HSA添加によるIC<sub>50</sub>の増加  
HSA非添加時のIC<sub>50</sub>を1とした場合のHSA添加時のIC<sub>50</sub>

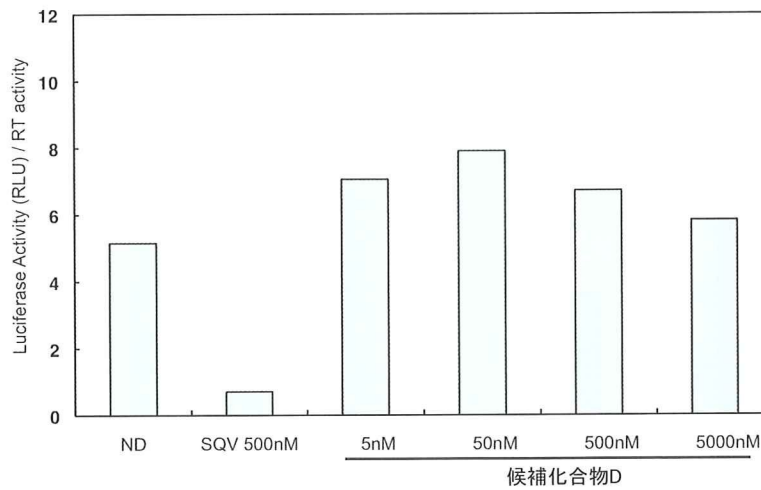


図4 候補化合物Dの標的は複製後期過程でない  
粒子形成時に候補化合物を添加しても、その感染性に影響は認められない

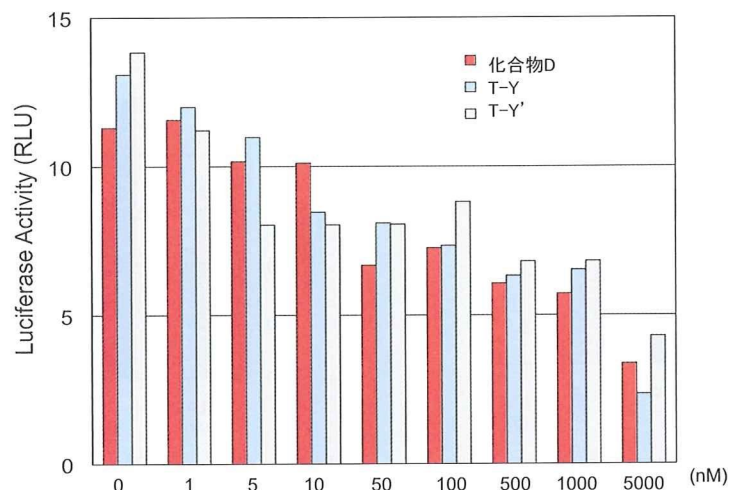


図5 候補化合物Dおよびその類縁化合物の標的は感染前期である  
Single round replication assay で明確な阻害活性を呈する



ウイルスのGag プロセッシングに影響が認められないことからプロテアーゼを標的にしたものではない。またCypの取り込みも影響を受けていないことから、Cypも標的ではない(図6)。

④ VSV pseudo type ウイルスにも阻害活性を示すことから、その標的は接着?融合ではない(図7)。

⑤ VprあるいはVpu欠損ウイルスに対しても阻害活性を呈することから、これらアクセサリーが標的となっていない(図8)。

⑥ 粒子形成時に薬剤候補薬剤を添加して作成したウイルスのRNA/p24に変化はないことからRNAのパッケージングに影響していない(図9)。

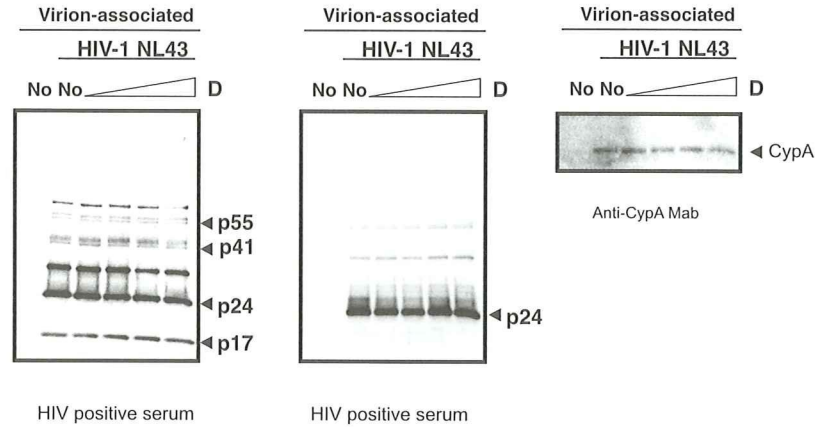


図6 候補化合物Dは、Gagのプロセッシング、およびウイルス粒子へのCypAのパッケージングには影響を与えない

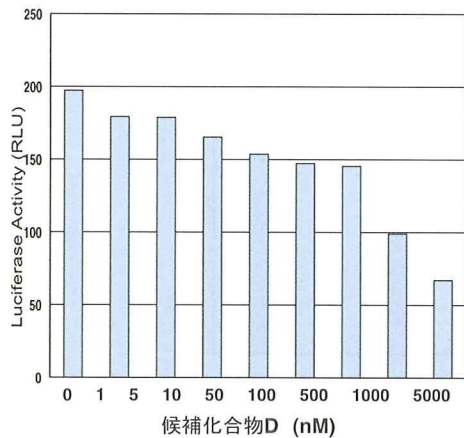


図7 新規薬剤の作用点はEnvではない  
候補化合物DはVSV-G pseudo-typed HIV-1に対しても阻害活性を呈する

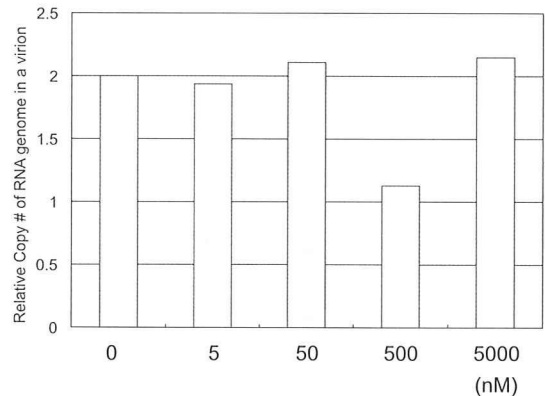


図9 候補化合物DはRNAのパッケージングを阻害しない

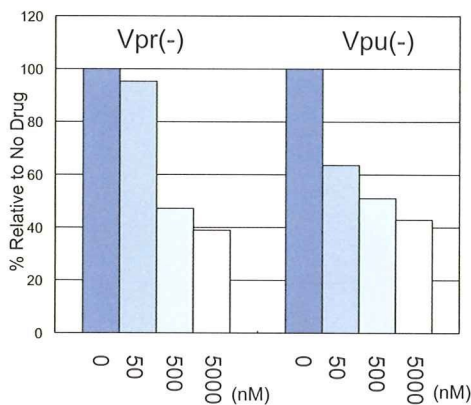


図8 新規薬剤の作用点は、VprおよびVpuではない  
候補化合物DはVpr欠損もしくはVpu欠損ウイルスに対しても阻害活性を呈する

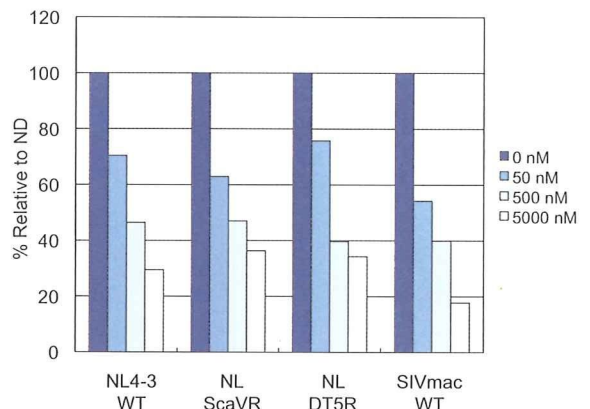


図10 候補化合物DはSIVmac に大しても阻害活性を呈する



⑦候補化合物はSIVmacに対しても阻害活性を呈することから、その標的はレトロウイルスの複製に共通して関与する因子である(図10)。

⑧Early 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(図11)。細胞内因子の添加による影響も確認されなかった。

⑨Integration 反応によりIF, 2LTRの量も薬剤の濃度依存的な変化は観察されなかった(図12)。

以上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から初期転写の段階に作用していることが強く推測され、pre-initiation complex for transcription (PICT)と仮称することとした(図13)。

(iii) 新たな抗HIV薬剤の標的の探索

我々が確立したAPOBEC3ファミリーのmRNA発現定量系を用いて、様々な細胞を使ったAPOBEC3

ファミリーの発現パターンを解析した。培養細胞を用いた実験では過去の報告にもあるように、*vif*欠損HIV-1の増殖を抑制する「非許容細胞」では、抗HIV-1活性をもつAPOBEC3F/GのmRNA発現が「許容細胞」に比べて高値を示した。その他にもAPOBEC3B/C/DE/HのmRNA発現が「非許容細胞」において高値を示した。

これに対して血球由来培養細胞を用いた実験において、サイトカイン類による発現誘導は見られなかった。肝がん由来細胞株HepG2細胞をIFN- $\alpha$ で処理をすると、APOBEC3F/G mRNAの一過的な発現増加がみられた。*vif*欠損HIV-1の複製許容性を決定する因子はAPOBEC3Gであるということは既知の事実であるが、リンパ球由来の培養細胞株におけるAPOBEC3Gの発現量の違いの原因については不明である。我々はIFN- $\alpha$ による刺激で発現誘導が確認されたことから、そのカスケード(図14)に関わる

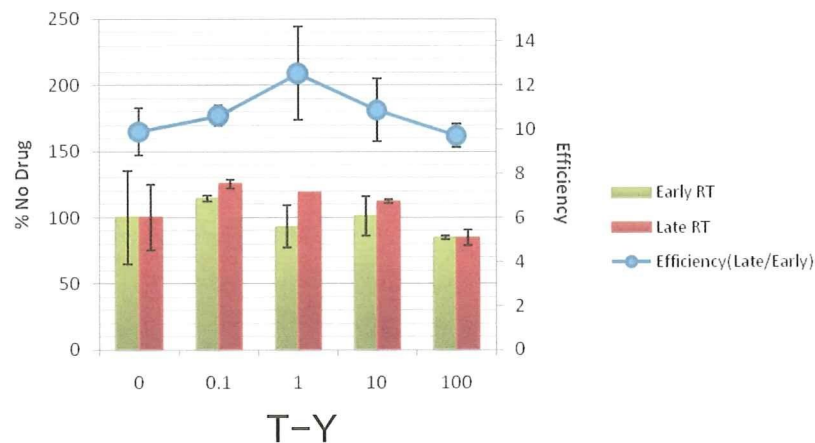


図11 逆転写反応は候補化合物T-Yによる影響を受けない  
薬剤非添加時の逆転写産物量を100としたときの相対的産生量を示す

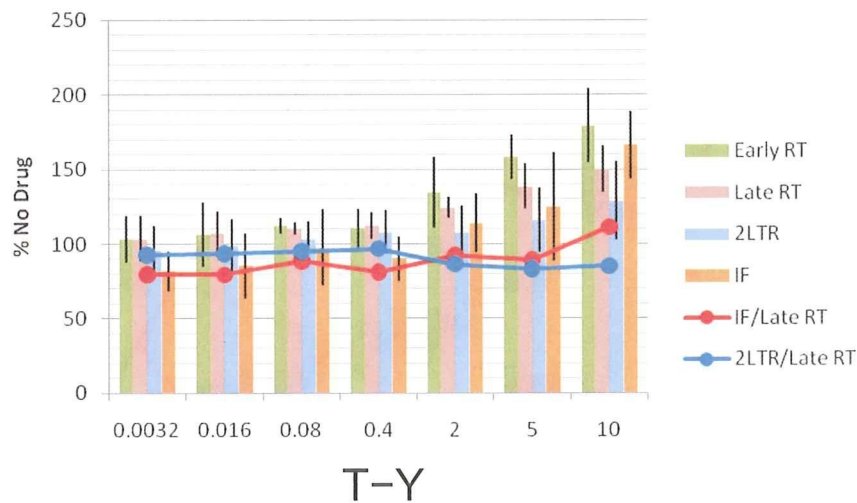


図12 組み込み反応は候補化合物T-Yによる影響を受けない  
薬剤非添加時の各産物量を100としたときの相対的産生量を示す。5 $\mu$ M以上の濃度で逆転写産物量、組み込みDNA量は増加したように見えるが、IF/2LTR、2LTR/Late RTの比率を見ると変化は観察されない。

転写因子の発現や活性化について分子生物学的手法を用いて検討した。その結果、「非許容細胞」においてのみ活性型の転写因子が高発現しており、それによってAPOBEC3ファミリーの発現が増強されていることが示唆された。ヒト単球由来のマクロファージ (MDM) を用いた実験ではMDMにToll様受容体のアゴニストを作用させた結果、TLR3, 4のアゴニスト(それぞれpoly(I:C), LPS)作用後APOBEC3ファミリーのmRNA発現増加がみられた。経時的に発現パターンを調べたところ、Poly(I:C)刺激によって

APOBEC3A mRNAは24時間後には3000倍以上コピー数が増加していた。TLR3, 4はI型IFNの産生を誘導し免疫応答をすることが知られているため、IFNのシグナル伝達を阻害するJAK inhibitorでMDMを処理した後にpoly(I:C)で刺激を加えるとAPOBEC3ファミリーのmRNA発現増加は起こらなかった。NF- $\kappa$ Bを活性化するTNF- $\alpha$ でMDMを刺激しても、24時間までにAPOBEC3ファミリーのmRNA発現に影響を示さなかった。

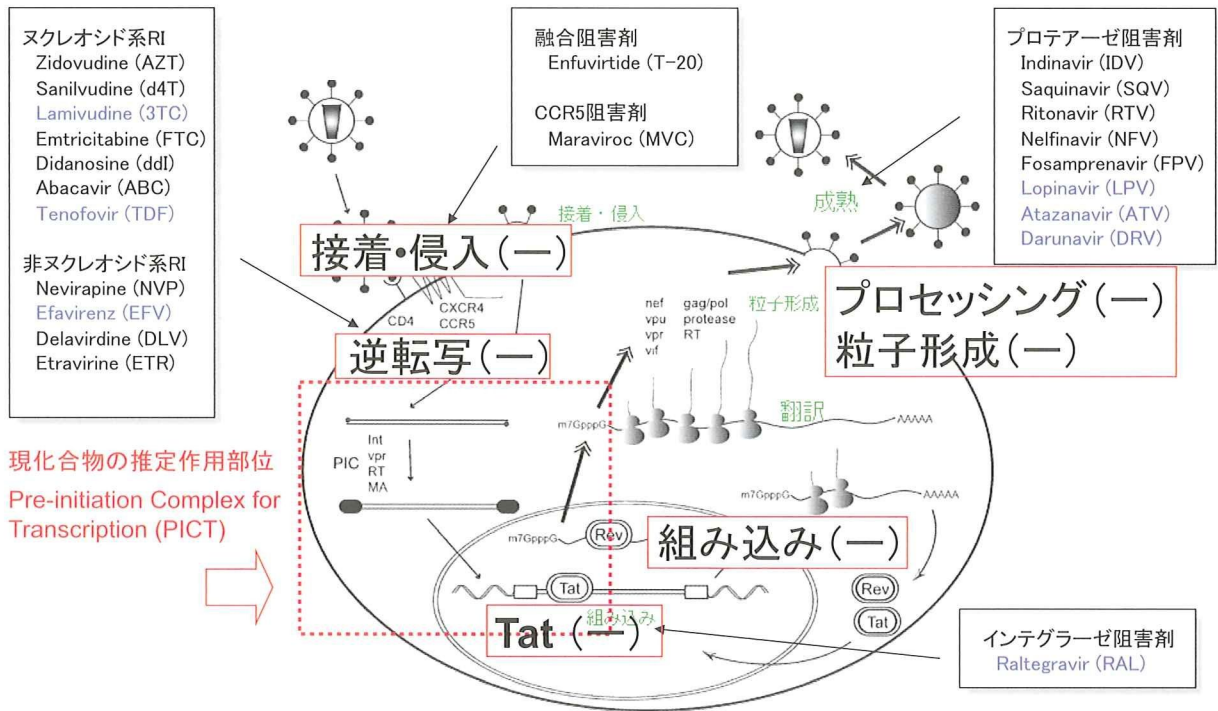


図13 既販抗HIV薬剤の標的と現化合物の推定される標的部位

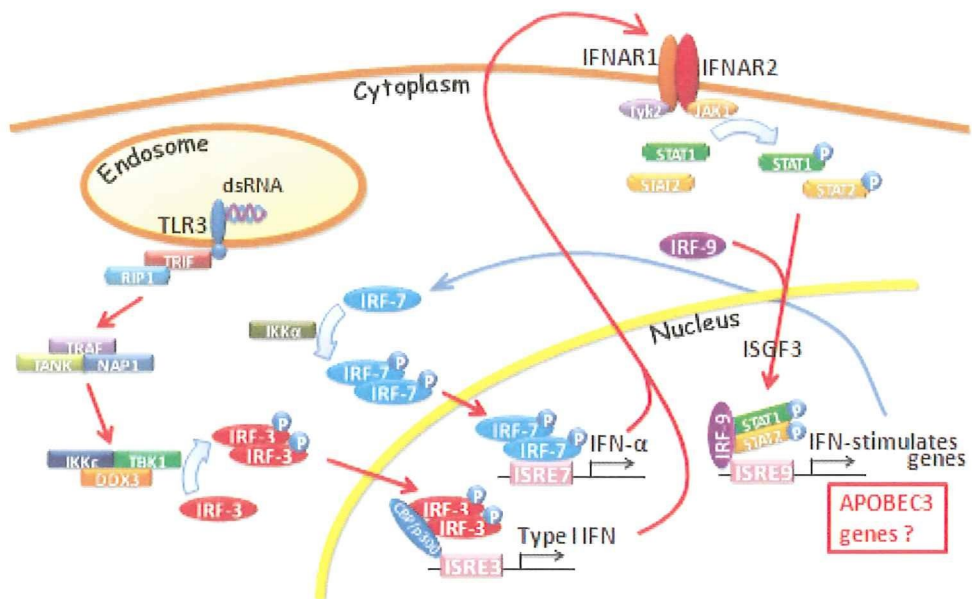


図14 APOBEC3ファミリー発現経路