

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）平成23年度総括・分担研究報告書

# 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 平成24(2012)年3月

(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23年度  
厚生労働科学研究費補助金創薬基盤推進研究事業

新規な機序による抗HIV薬剤の開発研究

—平成23年度 総括・分担研究報告書—

研究代表者 杉浦 互

平成24(2012)年3月

## 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	部 長
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	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	部 長
岩谷 靖雅	研究分担者	(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	室 長

# 目次

## 総括研究報告書

### 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)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 部長

研究分担者：明里 宏文

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

いわき明星大学薬学部薬学科 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 部長

岩谷 靖雅

(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 室長

## 分担研究報告書

### 新規抗HIV薬剤の開発と阻害機序の解析 .....6

研究分担者：杉浦 互

(独)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

### Vif機能を標的とした新規治療薬の開発研究 .....12

－サルモデルを用いた新規薬剤の評価－

研究分担者：明里 宏文

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

### 抗HIVタンパク質アクチノヒビンの実用化研究 .....16

研究分担者：田中 晴雄

いわき明星大学薬学部薬学科 教授

### 新規抗HIV薬剤の合成展開および安全性の評価 ..... 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 部長

### 宿主因子を標的にした新薬開発研究 ..... 26

－新規HIV薬剤の開発と阻害機序の解析－

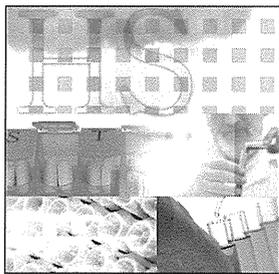
研究分担者：岩谷 靖雅

(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 室長

### 研究成果の刊行物に関する一覧 ..... 31

# I. 総括研究報告書

## 総括研究課題



## 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人類進化モデル研究センター 教授

田中 晴雄

いわき明星大学薬学部薬学科 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 部長

岩谷 靖雅

(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 室長

既存の抗HIV薬剤と交差耐性を呈さない新規薬剤の開発、感染予防薬剤として抗HIV薬剤の開発が求められている。本研究では新規な機序でHIVの増殖抑制と感染阻止をする薬剤の開発・実用化を目的とする。我々は $IC_{50}$ 値が10nM以下でHIVの初期転写を阻害するT-Y化合物群を見いだした。この化合物はHIVに対してGroupを越えて幅広いスペクトラムを有し、且つ既存の薬剤と交差耐性を示さない。小動物を用いた毒性検査は全て陰性であった。本研究班では強力なHIV侵入阻害活性を呈する化合物アクチノヒビン(AH)の実用化にも取り組んでおり、microbicideとして実用化を目的に直腸・膣局所投与可能な溶解溶媒の検討に取り組むとともに、注射薬としての応用も視野に入れたAH変異体の開発にも成功した。化合物T-Y、AHともに霊長類による評価実施を視野に入れている。

## A. 研究目的

現在多くの抗HIV薬剤が使用され優れた治療効果を挙げているが、既存の薬剤だけでは治療に難渋する薬剤耐性症例が少なからず存在する。このため既存の抗HIV薬剤と交差耐性を呈さない新規薬剤の需要は高い。更に予防ワクチンが実現しない現状を踏まえた新たな潮流として、抗HIV薬剤をmicrobicideとして使用することが検討され始めており、そのための薬剤開発も活発に行われている。本研究班では既存の抗HIV薬剤と交差耐性を示さない新規な抗HIV薬剤を開発とその実用化を目指す。

## B. 研究方法

本研究班では目的達成の為に以下の3つの研究を進める(図1)。

## (1) 低分子抗HIV薬剤実用化研究(野村、杉浦、岩谷)

我々が今までに同定したT-Y化合物群の作用機序の解明および実用化に向けての前臨床試験に取り組む。T-Y化合物は $IC_{50}$ 値が10nM以下でのHIVの複製を阻害する強力な抗HIV活性を呈する有望な化合物であり、今までの作用機序の解析から初期転写

(Pre-initiation Complex for Transcription (PICT))の阻害をすると推測されており、既存の逆転写酵素阻害剤、プロテアーゼ阻害剤と交差耐性を示さない。本年度はT-Y化合物の抗HIV活性の増強および毒性の軽減を目的に類縁化合物の探索を行うとともに、T-Y化合物の作用機序を解明するために詳細な解析を行う。また小動物における長期投与毒性評価、霊長類における薬物代謝の分析を行う。

## (2) アクチノヒビン(AH)実用化研究(田中)

AHの投与経路の検討とそれに対応したAH化合物の最適化に取り組む。霊長類を用いた感染予防効果の検討を行う。AHに関しては投与経路の検討とそれに対応した化合物の最適化が課題である。AHのmicrobicideとしての可能性については、カニクイザルを用いたSIV経直腸感染系を用いてAH二量体(AH dimer/RTB-L)の有効性を評価する。

## (3) 霊長類評価研究(明里、足立)

T-Y化合物群とAHの霊長類における抗HIV効果を評価するための実験系の確立を行う。

カニクイザルにおけるT-Y化合物群の単回経口投

与時の体内薬物動態を解析する。AHのSIVmac、SHIVに対する阻害活性の評価を *in vitro* で行う。カンクイザルを用いてAH経直腸感染実験を行うため、SHIVの経直腸感染モデルの構築を行う。

### C. 研究結果

詳細は各研究分担報告を参照されたし。結果の概要は以下の通りである。

#### (1) 低分子抗HIV薬剤実用化研究

候補化合物T-Yの類縁化合物56種類を新たに合成した。このうち9化合物が良好なHIV阻害活性を示した(野村)。T-Y化合物の阻害機序に関しては(i)阻害スペクトラムの解析としてintegrase strand transfer inhibitor であるraltegravirと薬剤耐性が交叉しないこと(杉浦)、内在性逆転写反応産物あるいはHIV感染細胞においてearly RT、late RT、2LTR、インテグレーション産物の解析を行った結果、いずれの産物も減少していないこと、すなわちT-Y化合物の作用点がHIV複製環の前期過程では無いことを裏付ける結果が得られた(岩谷)。またtime of addition試験ではT-Y化合物の作用がインテグラーゼ～転写の間にあることを確認した(野村)。TNF $\alpha$ による潜伏感染細胞の刺激試験ではT-Y化合物は濃度依存的

にウイルス産生を抑制しており、この結果もT-Y化合物の作用点が転写初期にあることを示している(野村、岩谷)。マウスを用いた一ヶ月の反復投与試験では重篤な副作用は認められなかった。

#### (2) AH実用化研究(田中)

AHのmicrobicideとしての使用を目指し、直腸・陰局所投与可能な溶解溶媒の検討に取り組んだ。更に注射薬を目指したpolyethyleneglycol (PEG) 化及びstyrene malete (SMA) 化に関しては、その低溶解性が障害であったが、アスパラギン(N)をアスパラギン酸(D)に置換した高溶解性変異体AH(6N→6D)により溶解性を改善する事に成功した。

#### (3) 霊長類評価研究(明里)

2頭のカンクイザルを用いてSHIV経粘膜感染に成功した。また4頭のカンクイザルによるT-YのPK解析および急性毒性解析を試みた。急性毒性は認められなかった。

### D. 考察

我々が見いだしたT-Y化合物は新規作用機序により既販薬耐性HIVに有効であることから、現在多剤耐性により治療困難に陥っている症例に新たな選択

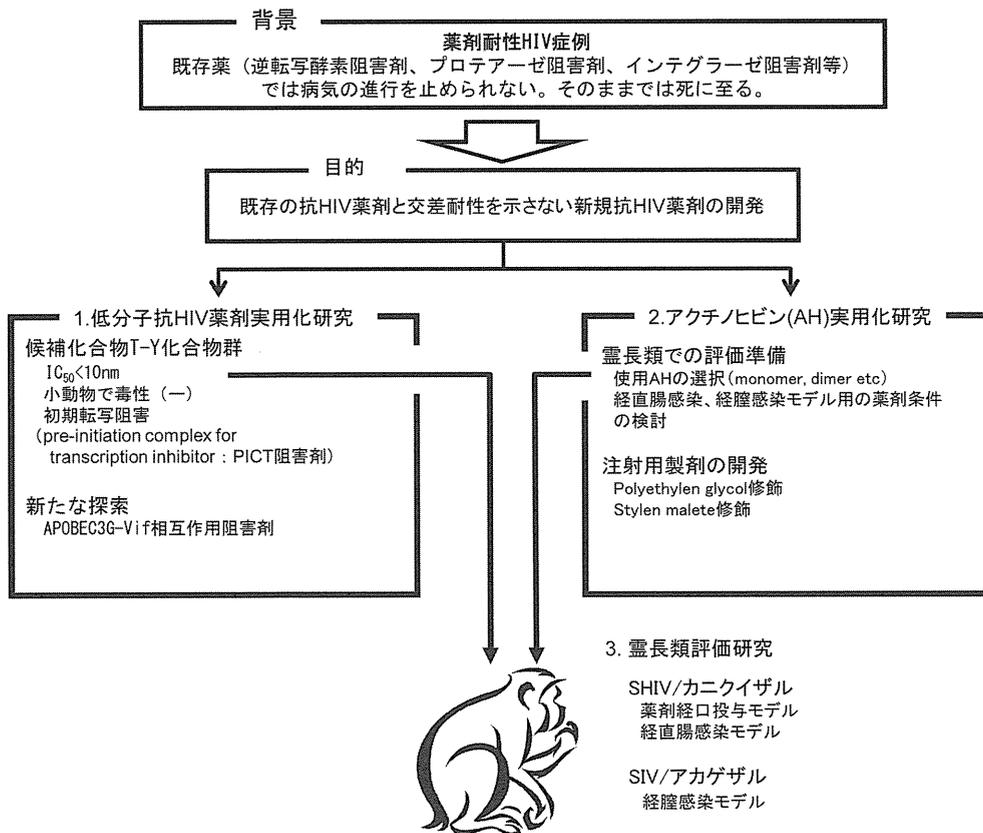


図1 新規な機序による抗HIV薬剤の開発研究

肢を提供できると期待される。本年度は平成22年度の解析結果から想定された作用起点「初期転写」について、多角的に解析を行い立証した。次年度は初期転写に関わる因子についてより詳細に解析を行い、分指標的の同定を目指したい。カニクイザルにおけるSHIV経粘膜感染に成功によりAHによる感染阻止実験が可能となった。次年度早々に実験を行う予定である。

#### **E. 結論**

T-Y化合物およびAHの実用化研究に取り組んだ。また新たな標的としていずれの研究も計画通りに進んでおり、早々に実用化の是非について結論を出したい。

#### **F. 健康危険情報**

特記事項なし

#### **G. 研究発表**

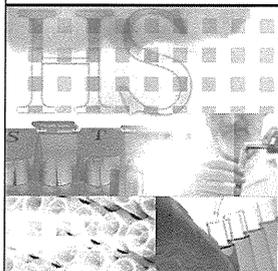
各研究分担者の報告書を参照

#### **H. 知的財産権の出願・登録予定**

各研究分担者の報告書を参照

## II. 分担研究報告書

## 分担研究課題



## 新規抗HIV薬剤の開発と阻害機序の解析

## 研究分担者

杉浦 亙 (独) 国立病院機構名古屋医療センター  
臨床研究センター感染・免疫研究部 部長

既存の抗HIV薬剤耐性を克服するための新規な作用機序による抗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、現在我々が有する化合物の中で実用化の最有力候補であるT-Y化合物の阻害スペクトラムについて調べた。さらに、化合物の作用メカニズムの解析を試みた。その結果、候補化合物T-Yおよび類縁化合物がRAL耐性と交叉しない事を明らかにした。また、潜伏感染細胞株を用いた解析により、作用メカニズムの解析を進めるための新たな知見を得る事が出来た。

## A. 研究目的

研究班では既存の抗HIV薬剤耐性を克服するための新規な作用機序による抗HIV薬剤を開発し実用化を目指して研究に取り組んでいる。本研究では、現在我々が有する化合物の中で実用化の最有力候補であるT-Y化合物およびその類縁化合物の作用機序の解明に取り組んでいる。

これまでの研究から、作用点がインテグレーション直後から遺伝子発現初期の過程である事を明らかにしてきた。また、HIV阻害スペクトラムの解析の結果、既存の抗HIV薬剤と重ならない、幅広い有効性を示す事を明らかにしてきた。本年度は、引き続きT-Y化合物の有効性の検討と、さらなる作用点の絞り込み作業を行った。

## B. 研究方法

## (1) Raltegravir 耐性変異導入した組換えウイルスに対する有効性の評価

HXB2 proviral DNA のインテグラーゼ領域に Integrase strand transfer inhibitor (INSTI) である Raltegravir (RAL) 耐性変異を獲得していない患者由来の同領域を導入した (7026株、1093株)。さらに、そこへ143C, 148H, 155H, 140S+148Hの4種類のRAL耐性メジャー変異を導入したproviral DNA クローンを作製した。コントロールを含めた15種類のproviral DNA クローンを293T細胞にトランスフェクションし、48時間後にウイルスを回収した。これらのウイルスに対する候補化合物の感受性を *in house*

MaRBLE アッセイにて評価を行った。MaRBLE アッセイは、MaRBLE細胞に導入したHIV-1 LTRにより発現制御する Firefly Luciferase レポーター・タンパクとCMVにより発現制御する Renilla Luciferase レポーター・タンパクによりHIV活性を測定するアッセイ系である。各ウイルスを感染させ、化合物を添加後7日後に細胞内 Firefly Luciferase を測定し、 $IC_{50}$  を求めた。

## (2) 潜伏感染細胞株における薬剤効果の検討

HIV-1 潜伏感染細胞株 OM10.1細胞を用いた。TNF $\alpha$ および候補化合物の添加後、72時間後の上清中に産生されたウイルス量を p24 ELISA により定量した。同時に薬剤の細胞毒性を調べるためにATP量を定量した。

## C. 結果

## (1) 候補化合物の阻害スペクトラムの解析

T-Y化合物およびその類縁化合物が既存の抗HIV薬剤耐性HIV株に対して野生株同等の阻害活性を示し、その阻害機序が既存の抗HIV薬剤と重ならない事、さらに異なるサブタイプに幅広く有効性を示す事を明らかにしてきた。さらなる解析のため、RAL耐性変異導入HXB2に対する有効性を検討した結果、どの耐性変異導入ウイルスクローン、RALに対して高度耐性である140S+148H変異を導入したウイルス、においても候補化合物はEFVやDRVと同等の抗HIV活性を示した。(図1) また、患者由来のproviral DNA のインテグラーゼ領域を導入した7026

株、1093株においても同様の結果を示した。特に、T-Y化合物と類縁体T-Y化合物2は高い感受性を示した。

(2) 作用メカニズムの解析

インテグレーション後のウイルス動態に対する化合物の効果を調べるため、潜伏感染細胞株OM10.1細胞を用いて解析を行った。この細胞株は、TNF $\alpha$ 刺激によりウイルス産生が活性化される。刺激を与えたOM10.1細胞に3化合物を添加した結果、T-Y化合物は500nMまではウイルス産生を抑制していたが、5000nM以上では再活性化を起こしていた。(図2) これは類縁化合物のT-Y化合物2でも同様であったが、T-Y化合物3は高濃度においても濃度依存的

に抑制効果を示した。細胞毒性については、T-Y化合物は10000nMで著しい毒性を示したが、他の2つの類縁化合物については高濃度でも細胞の生存に有意な影響を与えていなかった。

D. 考察

昨年度に引き続き、我々が実用化を目指している新規抗HIV化合物T-Yのスペクトラムについて評価を行った結果、RAL耐性HIV株に対して既存の抗HIV薬剤と同等の有効性を示した。新規薬剤として有用である事が改めて示されたが、これらの結果はすべてMaRBLE細胞を用いたものであり、T-Y化合物の標的が宿主因子である可能性を考慮すると他の

	HXB2		7026		1093		(uM)
	WT	140S+148H	WT	140S+148H	WT	140S+148H	
EFV	0.0130	0.0139	0.0239	0.0127	0.0138	0.0134	
DRV	0.0044	0.0065	0.0156	0.0078	0.0078	0.0068	
RAL	0.0029	2.2251	0.0081	1.5743	0.0035	4.6517	
T-Y	0.0016	0.0023	0.0072	0.0028	0.0029	0.0025	
T-Y 2	0.0046	0.0037	0.0153	0.0083	0.0080	0.0052	
T-Y 3	0.0108	0.0127	0.0389	0.0236	0.0193	0.0124	

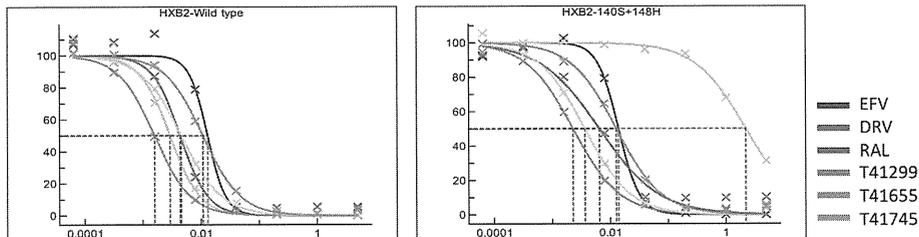


図1 T-Yおよびその類縁化合物はRAL耐性HIVに有効である

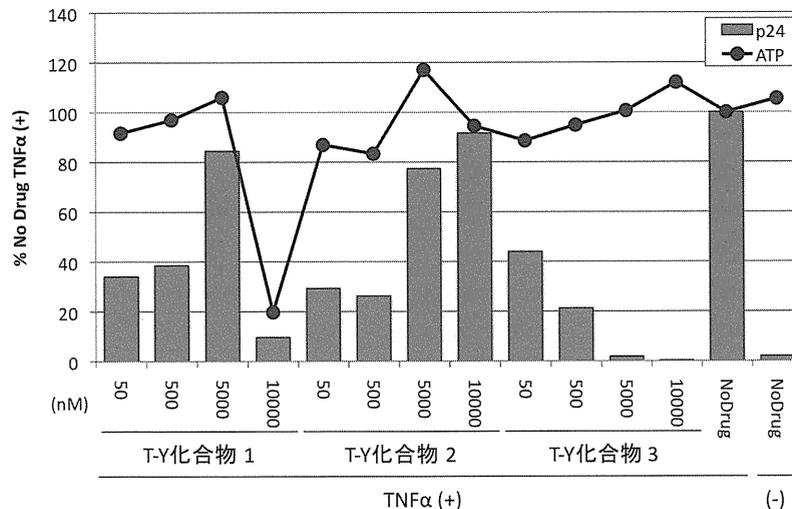


図2 T-Y化合物およびその類縁化合物の一部は潜伏感染細胞においてウイルス産生の抑制と活性化効果を示す

細胞種においても評価する必要があると考えられる。その評価を適切に行うためには、作用メカニズムの解析が必須である。昨年度までの解析において、T-Y化合物の作用点はウイルス複製前期であり、インテグレーション後の過程である事が明らかとなっている。評価するポイントを絞るため、潜伏感染細胞株を用いて実験を行った。その結果、3化合物はすべて抑制効果を示したが、T-Y化合物と類縁化合物2は過剰添加によりHIVを再活性化させていた。これまでにT-Y化合物は濃度依存的に抗HIV-1効果を示すが、過剰な添加は一転してHIVの産生を増加させる結果がMaRBLEアッセイを含めたいくつかの実験系で観察されていた。今回の潜伏感染細胞株を用いた結果によりその作用が裏付けられたが、類縁化合物3は高濃度におけるウイルス産生増強作用を起こさない。よって、T-Y化合物の基本構造は抗HIV効果を示すが、修飾の違いによりHIVに異なるメカニズムで作用する経路の有無、またはその働きの強さに違いがあることが示唆される。今後、抗HIV効果だけでなく、この再活性化効果についても構造活性相関を検証し、作用メカニズムを明らかにする必要があるだろう。

## E. 結論

候補化合物T-Yおよび類縁化合物がRAL耐性と交叉しない事を明らかにした。また、刺激を加え活性化された潜伏感染細胞株においてこれらの化合物が抗HIV効果を示し、T-Y化合物と類縁化合物の一部は高濃度の添加により再活性化を起こす事が示され、作用メカニズムの解析を進めるための新たな知見を得る事が出来た。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 原著論文

- Hirano A, Ikemura K, Takahashi M, Shibata M, Amioka K, Nomura T, Yokomaku Y, Sugiura W. Lack of Correlation Between UGT1A1\*6, \*28 Genotypes, and Plasma Raltegravir Concentrations in Japanese HIV Type 1-Infected Patients. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2011 Nov 9. 17(6):863-5, 2011.
- Revell AD, Wang D, Boyd MA, Emery S, Pozniak AL, De Wolf F, Harrigan R, Montaner JS, Lane C, Larder BA; RDI Study Group\*. The development of an expert system to predict virological response to HIV therapy as part of an online treatment support

- tool. *AIDS*. 2011 Sep 24;25(15):1855-63. (\* RDI Study Groupのメンバーとして参加)
- Yotsumoto M, Shinozawa K, Yamamoto Y, Sugiura W, Miura T, Fukutake K. Mutations to the probe of Cobas TaqMan HIV-1 ver. 1.0 assay causing undetectable viral load in a patient with acute HIV-1 infection. *J Infect Chemother*. [Epub ahead of print]
  - Yoshida I, Sugiura W, Shibata J, Ren F, Yang Z, Tanaka H. Change of positive selection pressure on HIV-1 envelope gene inferred by early and recent samples. *PLoS One*. 6(4):e18630, 2011.
  - Ibe S, Sugiura W. Clinical significance of HIV reverse transcriptase inhibitor-resistant mutations. *Future Microbiol*. 6(3):295-315, 2011.
  - Shibata J, Sugiura W, Ode H, Iwatani Y, Sato H, Tsang H, Matsuda M, Hasegawa N, Ren F, and Tanaka H. Within-host co-evolution of Gag P453L and protease D30 N/N88D demonstrates virological advantage in a highly protease inhibitor- exposed HIV-1 case: *Antivir. Res*. 90(1):33-41, 2011.
  - Fujisaki S, Yokomaku Y, Shiino T, Koibuchi T, Hattori J, Ibe S, Iwatani Y, Iwamoto A, Shirasaka T, Hamaguchi M, Sugiura W. Outbreak of hepatitis B virus genotype A and transmission of genetic drug resistance in cases coinfecting with HIV-1 in Japan. *J Clin Microbiol*. 49(3):1017-24, 2011.
  - 杉浦互：HIVの指向性検査(トロピズムアッセイ). *Confronting HIV*. 40:1-3, 2011.
  - 杉浦互、服部純子：HIV薬剤耐性変異の動向2003～2010年. *病原微生物検出情報*. 32(10):8-9, 2011.

### 2. 口頭発表

#### 国際学会

- Miyazaki N, Fujii T, Iwamoto A, Matsushita S, Sugiura W. Potential of recent antiretroviral treatments in controlling treatment-naive and drug-resistant HIV cases in Japan. *International Workshop on HIV& Hepatitis Virus Drug Resistance and Curative Strategies*. (Mexico) 2011.6
- Sugiura W. Effects of HIV integrase polymorphisms on raltegravir-resistance susceptibility. *6th IAS Conference on HIV Pathogenesis Treatment and Prevention*. (ROME, ITALY) 2011.7
- Hattori J, Shao W, Shigemi U, Hosaka M, Okazaki R, Yokomaku Y, Iwatani Y, Maldarelli F, Sugiura W. Molecular epidemiology of transmitted drug-resistant HIV among newly diagnosed individuals in Japan. *6th International Workshop on HIV*

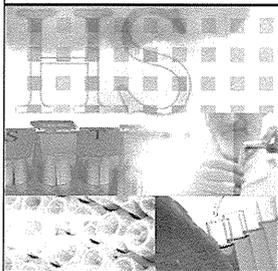
Transmission Principles of Intervention (ROME, ITALY) 2011.7

4. Hattori J, Shigemi U, Hosaka M, Okazaki R, Sugiura W. Characteristics of Drug-Resistant HIV-1 Transmission: Analysis of Drug Resistance in Recently and Not-Recently Infected Treatment-Naive Patients in Japan. XV International Congress of Virology (札幌) 2011.9
  5. Ibe S, Masaoka T, Yokomaku Y, Iwatani Y, Sugiura W. Identification of novel drug-resistance mutations selected during abacavir+ lamivudine+ lopinavir/r therapy in HIV-2 CRF01\_AB infection. XV International Congress of Virology (札幌) 2011.9
  6. Matsuoka K, Masaoka T, Tanabe F, Morishita R, Sawasaki T, Iwatani Y, Sugiura W. Development of *in vitro* enzymatic method for assessing susceptibility to HIV-1 reverse transcriptase inhibitors using a wheat-germ cell-free translation system. Protein Island Matsuyama International Symposium 2011 (愛媛・松山) 2011.9
  7. Ibe S, Yokomaku Y, Maejima M, Iwatani Y, Sugiura W. Drug-resistance profiles of HIV-2 CRF01\_AB-infected case during abacavir + lamivudine+lopinavir/r therapy. 6th German- Japanese HIV Symposium (Bochum, Germany) 2011.10
  8. Suzuki K, Ode H, Fujino M, Kimura Y, Masaoka T, Hattori J, Yokomaku Y, Iwatani Y, Suzuki A, Watanabe N, Sugiura W. Enzymatic and Structural Analyses of DRV-resistant HIV-1 Protease. The 12th SADR (Hershey, Pennsylvania, USA) 2011.11
- 国内学会
1. 伊部史朗、横幕能行、服部純子、杉浦互：抗レトロウイルス治療中の HIV-2CRF01\_AB 感染症例に認めた薬剤耐性変異. 第85回日本感染症学会総会 (東京) 2011年4月
  2. 今村淳治、横幕能行、服部純子、岩谷靖雅、杉浦互：新規 HIV/AIDS 診断症例におけるトロピズムに関する検討. 第85回日本感染症学会総会 (東京) 2011年4月
  3. 平野淳、池村健治、横幕能行、杉浦互：ラルテグラビル投与に伴う副作用発現並びに遺伝子多型と血中濃度に関する検討. 第85回日本感染症学会総会 (東京) 2011年4月
  4. 伊部史朗、正岡崇志、横幕能行、岩谷靖雅、杉浦互：抗レトロウイルス療法中の HIV-2CRF01\_AB 感染例に認めた薬剤耐性変異. 第13回白馬シンポジウム in 札幌—最先端のエイズ研究を徹底討論する— (札幌) 2011年5月
  5. 岩谷靖雅：HIV の逆転写・複製機構と APOBEC3 による抑制機序. 第13回白馬シンポジウム in 札幌—最先端のエイズ研究を徹底討論する— (札幌) 2011年5月
  6. 杉浦互：～難治性疾患の治療にむけて～「HIV/AIDS 治療の現状とこれからの課題」. 第3回富山ライフサイエンスシンポジウム (富山) 2011年7月
  7. 松永智子、澤崎達也、小島良績、森下了、佐藤裕徳、大出裕高、古川亜矢子、片平正人、杉浦互、梁明秀：コムギ無細胞タンパク質合成系を用いた Xenotropic murine leukemia virus-related virus (XMRV) プロテアーゼの解析. 日本ヒトプロテオーム機構第9回大会 (新潟) 2011年7月
  8. 横幕能行、鈴木奈緒子、杉浦互：医療現場における HIV 暴露事故への対策と課題. 第65回国立病院総合医学会 (岡山) 2011年10月
  9. 杉浦互：インテグラーゼ阻害剤の臨床における耐性発現の実際. 第25回日本エイズ学会学術集会・総会 (東京) 2011年11月30日～12月2日
  10. 杉浦互：HIV 薬剤耐性検査と耐性 HIV の現状. 第25回日本エイズ学会学術集会・総会 (東京) 2011年11月30日～12月2日
  11. 北村紳悟、中島雅晶、大出裕高、前島雅美、伊部史朗、横幕能行、渡邊信久、鈴木淳巨、杉浦互、岩谷靖雅：HIV-1 Vif 感受性に関する APOBEC3C/F のアミノ酸残基の同定. 第25回日本エイズ学会学術集会・総会 (東京) 2011年11月30日～12月2日
  12. 伊部史朗、近藤真規子、今村淳治、岩谷靖雅、横幕能行、杉浦互：ウエスタンブロット法により HIV-1/HIV-2 重複感染が疑われた症例の精査解析. 第25回日本エイズ学会学術集会・総会 (東京) 2011年11月30日～12月2日
  13. 岩谷靖雅、北村慎吾、前島雅美、伊部史朗、横幕能行、杉浦互：HIV-1 NC は逆転写開始反応を促進する. 第25回日本エイズ学会学術集会・総会 (東京) 2011年11月30日～12月2日
  14. 田中勇悦、児玉晃、西澤雅子、杉浦互、田中礼子：CXCR4 架橋による CXCR4 および CCR5 親和性 HIV-1 の感染制御. 第25回日本エイズ学会学術集会・総会 (東京) 2011年11月30日～12月2日
  15. 服部純子、椎野禎一郎、湯永博之、林田庸総、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、長島真美、貞升健志、古賀一郎、太田康男、山元泰之、福武勝幸、加藤真吾、藤井毅、岩本愛吉、西澤雅子、岡慎一、伊部史朗、横幕能行、上田幹夫、大家正義、田

- 邊嘉也、渡辺香奈子、渡邊大、白坂琢磨、小島洋子、森治代、中桐逸博、藤井輝久、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、杉浦互：新規HIV/AIDS診断症例における薬剤耐性HIVの動向. 第25回日本エイズ学会学術集会・総会 (東京) 2011年11月30日～12月2日
16. 椎野禎一郎、服部純子、瀧永博之、吉田繁、伊藤俊広、上田敦久、近藤真規子、貞升健志、藤井毅、横幕能行、上田幹夫、田邊嘉也、渡邊大、森治代、藤井輝久、南留美、健山正男、杉浦互：日本薬剤耐性HIV調査研究グループ 国内感染集団の大規模塩基配列解析2: Subtype Bの動向と微小系統群の同定. 第25回日本エイズ学会学術集会・総会 (東京) 2011年11月30日～12月2日
  17. 片野晴隆、横幕能行、菅野隆行、福本瞳、中山智之、新ヶ江章友、杉浦互、市川誠一、安岡彰：日本人MSMにおけるカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV/HHV-8) 抗体保有率について. 第25回日本エイズ学会学術集会・総会 (東京) 2011年11月30日～12月2日
  18. 渡邊綱正、横幕能行、今村淳治、杉浦互、田中靖人：HBV新規感染におけるHIV重感染の影響についての検討. 第25回日本エイズ学会学術集会・総会 (東京) 2011年11月30日～12月2日
  19. 吉田繁、伊部史朗、服部純子、松田昌和、橋本修、岡田清美、和山行正、巽正志、杉浦互：HIV薬剤耐性検査の外部精度管理. 第25回日本エイズ学会学術集会・総会 (東京) 2011年11月30日～12月2日
  20. 西澤雅子、Johnson Jeffrey、Heneine Walid、杉浦互：定量PCRを応用した高感度薬剤耐性検査法による抗HIV治療患者からの微小集族薬剤耐性変異検出の試み. 第25回日本エイズ学会学術集会・総会 (東京) 2011年11月30日～12月2日
  21. 今村淳治、横幕能行、服部純子、岩谷靖雅、杉浦互：薬剤耐性変異を認めた新規未治療HIV/AIDS症例の治療と予後の検討. 第25回日本エイズ学会学術集会・総会 (東京) 2011年11月30日～12月2日
  22. 柴田雅章、福島直子、高橋昌明、野村敏治、今村淳治、横幕能行、杉浦互：リトナビルソフトカプセルから錠剤への切り替えに伴うダルナビル血中濃度の変化に関する検討. 第25回日本エイズ学会学術集会・総会 (東京) 2011年11月30日～12月2日
  23. 大久保奈美、高橋昌明、木下枝里、柴田雅章、福島直子、野村敏治、泉田真生、今村淳治、横幕能行、杉浦互：抗結核薬リファンピシンが中止となった患者のラルグラビル (RAL) の血中濃度推移をみた一症例. 第25回日本エイズ学会学術集会・総会 (東京) 2011年11月30日～12月2日
  24. 横幕能行、鬼頭優美子、今村淳治、大出裕高、服部純子、伊部史朗、岩谷靖雅、杉浦互：HIVプロテアーゼ表現型検査法であるVLP ELISA法の実臨床への応用. 第25回日本エイズ学会学術集会・総会 (東京) 2011年11月30日～12月2日
  25. 福島直子、柴田雅章、木下枝里、大久保奈美、高橋昌明、野村敏治、横幕能行、杉浦互：薬剤師のためのHIV研修会開催に関するアンケート調査について. 第25回日本エイズ学会学術集会・総会 (東京) 2011年11月30日～12月2日
  26. 桑原健、矢倉裕輝、吉野宗宏、上平朝子、白坂琢磨、杉浦互：エトラビルン、ダルナビル、ラルテグラビルの血中トラフ値と海外データとの比較. 第25回日本エイズ学会学術集会・総会 (東京) 2011年11月30日～12月2日
  27. 丸山笑里佳、横幕能行、松岡亜由子、服部純子、杉浦互：服薬アドヒアランスの低さに関連する要因の検討. 第25回日本エイズ学会学術集会・総会 (東京) 2011年11月30日～12月2日
  28. 松下修三、杉浦互：「マラビロク、どう使う?」. 第25回日本エイズ学会学術集会・総会 (東京) 2011年11月30日～12月2日
  29. Matsuoka K, Masaoka T, Tanabe F, Morishita R, Sawasaki T, Iwatani Y, Sugiura W. Development of *in vitro* enzymatic method for assessing susceptibility to HIV-1 reverse transcriptase inhibitors using a wheat-germ cell-free translation system. 第34回日本分子生物学会年会 (横浜) 2011年12月13日～16日
  30. 北村紳悟、中島雅晶、大出裕高、前島雅美、伊部史朗、横幕能行、渡邊信久、鈴木淳巨、杉浦互、岩谷靖雅：Structure-Guided Mutagenesisを用いたAPOBEC3C/FのHIV-1 Vif感受性に関するアミノ酸残基の同定. 第34回日本分子生物学会年会 (横浜) 2011年12月13日～16日



## 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 —サルモデルを用いた新規薬剤の評価—

研究分担者

明里 宏文 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

本分担研究では、現在開発を進めている新規抗HIV-1薬剤(T-Y化合物)とマイクロビサイド(アクチノヒピン: AH)について、前臨床試験としてサルモデルにおける有効評価を進めている。既に、両薬剤とも小動物における毒性試験や薬物体内動態等の解析が行われてきた。本年度は、T-Y化合物に関しては、健常(SHIV非感染)サルにおける有効血中濃度に到達させるための投与方法等を検討した。一方、AH化合物に関する研究については、経粘膜感染における化合物の有効性を評価する系を確立した。サル感染モデル実験系における薬効評価の基盤を構築することができた。

## A. 研究目的

本研究班ではこれまで2つの抗HIV薬剤の開発に取り組んできた。その結果、感染・培養実験レベルで抗HIV阻害効果をもつT-Y化合物とAH化合物が見出されたこれらの化合物の*in vitro*における抗ウイルス効果の有効性ととも細胞毒性の陰性であることは十分確認されてきた。さらに、前年度まで、小動物における毒性検査等は陰性であったことが明らかになった。しかし、その有効性については小動物では評価できず、霊長類を用いた感染モデル実験系をもちいた薬効評価必要不可欠である。本分担研究では、サルモデル動物を用いて、これらの新規薬剤候補の臨床試験実施に向けた有効性評価を目的として研究を行った。

## B. 研究方法

### (1) AHのSIVmac に対する抗ウイルス効果の確認実験

各濃度のAHあるいはAH誘導体をレポーター細胞であるLuSIV細胞に添加し、1時間後にSIVmacを感染させた。感染後24時間後に、ルシフェラーゼ活性を測定した。サル直腸投与のために、投薬基剤のAHに対する抗ウイルス作用に対する影響も確認した。

### (2) サル直腸感染実験

カニクイザル(個体ID C95-005 と C95-015)は(独)医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センターで繁殖されている健康なアダルトSPF個体に2頭を用いた。ウイルス感染ではSHIV-KS661c(Lot#010124)を2,000 TCID<sub>50</sub>で経直腸感染を行った。血中ウイルス量とCD4Tリンパ球数などを指標に感染成立・病態進行について解析した。SHIVmac血中ウイルス量の定量は、in-houseでReal-Time PCR用いた系を確立し行った。

### (3) T-Y化合物のサルへの単回投与と実験

健常カニクイザルにおけるT-Y化合物の群の皮下単回接種実験(1.5mg/kg)を行った。接種後24時間の血中T-Y化合物濃度を定量した。

### (倫理面への配慮)

医薬基盤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

### (1) AHのSIVmac に対する抗ウイルス効果の確認実験

AHの抗HIV-1作用効果は認められたが、同族のSIVmacに対する抗ウイルス効果を*in vitro*において

確認実験を行った。HIV-1に対するIC50はサブタイプ間により異なるが、AH dimerでは2~110nMであることを以前、報告してきた。今回、LuSIV細胞を用いたSIVmac感染実験では、図1に示すように、AHでは30nM、AH dimerでは2nM以下とHIV-1に対する抗ウイルス効果と同等の強い効果が示された。

基剤としては、瀉下効果が比較的低いと考えられるマクロゴルド1540を用いて、AHの抗ウイルス効果を検討した。20%マクロゴルドでは、マクロゴルド自身の明らかに細胞毒性が認められ、Luciferase活性の値がほぼゼロであった。10%では、マクロゴルドによる細胞毒性は観察されなかったが、細胞の形態変化（LuSIV細胞は正常では、細胞同士が集合する性質があるが、認められない）があった。5%マクロゴルドでは、細胞毒性は認められず、AHのSIVの感染効率を低下(12%低下)した。以上のことから、基剤としてマクロゴルド1540の場合、5%以下が妥当であることが考えられた。

合、5%以下が妥当であることが考えられた。

(2) T-Y候補化合物の健常サルへの投与実験

2頭のカニクイザルによるT-Y化合物の単回投与実験を行った。有害事象は見当たらず、1.5mg/kgにおける急性毒性、あるいは皮下投与による薬剤の刺激性、皮膚壊死などは観察されなかった。24時間後の血中濃度も検出できた

(3) AH化合物の有効性を評価する  
サル経直腸感染系の確立

2頭のカニクイザルに経直腸感染を行った。その結果、2頭とも感染が成立した。図2に示すように、感染後2週目に血中ウイルス量が、各々、 $3 \times 10^8$ と $1.1 \times 10^9$ コピー/mlに達し、その後慢性期に移行した。血中ウイルスの推移とともにCD4T細胞数の減少が認められた。

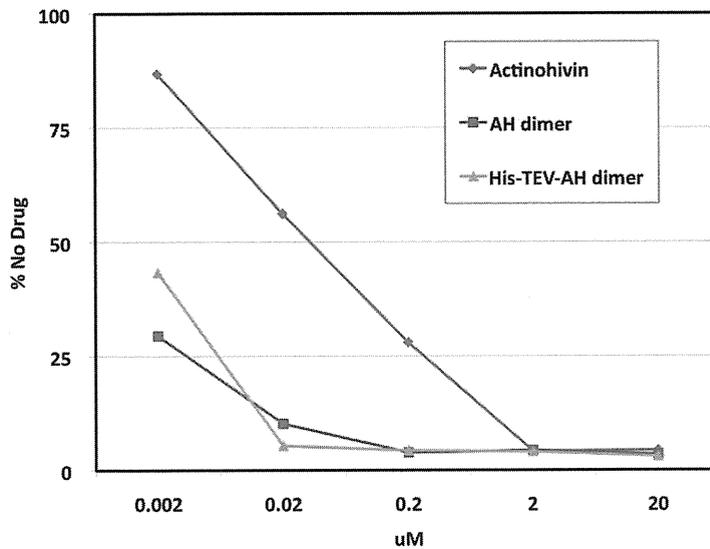


図1 AHのSIVmacに対する抗ウイルス効果

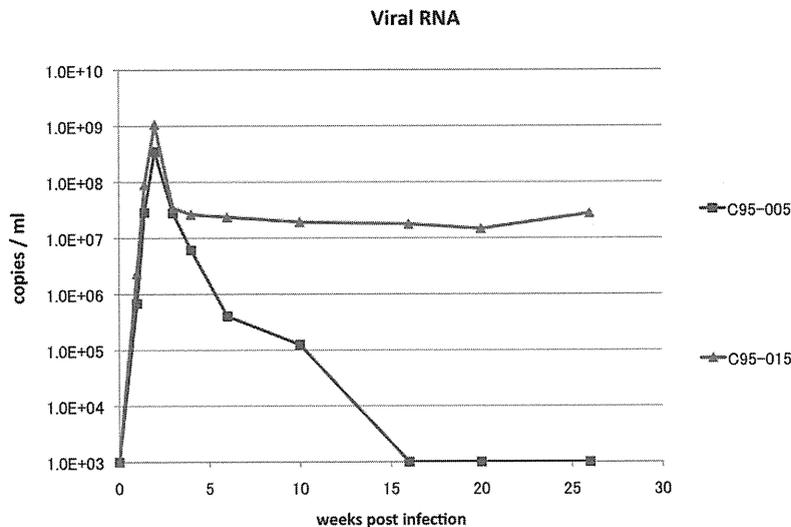


図2 血漿中ウイルスRNA量の推移

## D. 考察

AHの経粘膜感染実験における基剤の検討およびSIVmacに対する抗ウイルス効果の確認実験を完了した。さらに、サルへの経直腸感染も2頭中2頭という確率で成功した。今後、AHマイクロビサイドの有効性評価に向けて、最終的な（無刺激性）基剤の検討、および粘膜部位におけるAHの有効濃度の維持のための研究を着実に行うことにより、今回経直腸感染に成功した手法を用いてAHの感染防御効果を判定して行きたいと考えている。一方で、T-Y化合物に関しては、霊長類を用いた実験における倫理規定を遵守しながら、有効血中濃度に到達させるための単回投与容量の設定、あるいは連続投与による血中動態を解析しながら、詳細な条件設定を行って行く必要がある。その上で、ウイルス感染実験を行い、サル動物モデルにおける抗ウイルス効果を検討して行きたいと考えている。

## E. 結論

本年度は、AHとT-Y化合物について、サル動物モデル実験を用いた薬効評価に向けた基盤整備に取りかかることができた。今後は、安全な臨床試験に進むことができる裏付けとなる詳細なデータをさらに積み重ねる必要がある。これらの研究データは、本研究班で開発している薬剤にのみ適用されることなく、他のマイクロビサイド開発研究、あるいは後続の新規抗HIV薬剤の開発においても応用でき、貴重な橋渡し研究になると考えられる。

## F. 知的所有権の取得状況

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- Iijima S, Lee Y-J, Ode H, Arold ST, Kimura N, Yokoyama M, Sato H, Tanaka Y, Strebel K, Akari H. A non-canonical mu-1A-binding motif in the N-terminus of HIV-1 Nef determines its activity to down-regulate MHC-I in T lymphocytes. *Journal of Virology*. 86(7): 3944-3951, 2012.
- Takeuchi H, Ishii H, Kuwano T, Inagaki N, Akari H, Matano T. Host cell species-specific effect of cyclosporine A on simian immunodeficiency virus replication. *Retrovirology*. 9:3, 2012.
- Saito A, Kono K, Nomaguchi M, Yasutomi Y, Adachi A, Shioda T, Akari H, Nakayama EE. Geographic, genetic and functional diversity of anti-retroviral host factor TRIMCyp in *Cynomolgus macaque (Macaca fascicularis)*. *Journal of General Virology*. 93:594-602, 2012.
- Saito Y, Naruse TK, Akari H, Matano T, Kimura A. Diversity of MHC class I haplotypes in cynomolgus macaques. *Immunogenetics*. 64:131-141, 2012.
- Saito A, Nomaguchi M, Iijima S, Kuroishi A, Yoshida T, Lee YJ, Hayakawa T, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Yasutomi Y, Adachi A, Matano T, Akari H. Improved capacity of a monkey-tropic HIV-1 derivative to replicate in cynomolgus monkeys with minimal modifications. *Microbes and Infection*. 13:58-64, 2011.
- Ohtani H, Nakajima T, Akari H, Ishida T, Kimura A. Molecular evolution of immunoglobulin superfamily genes in primates. *Immunogenetics*. 63:417-428, 2011.

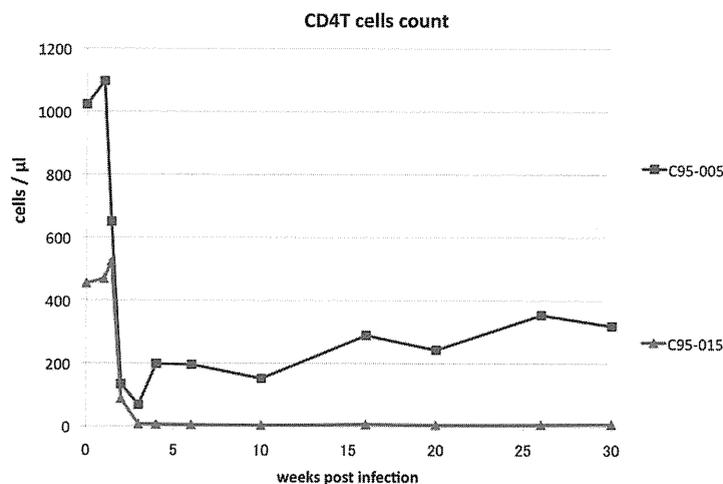


図3 末梢血におけるCD4T細胞数の推移

7. Naruse TK, Okuda Y, Mori K, Akari H, Matano T, Kimura A. ULBP4/RAET1E is highly polymorphic in the Old World monkey. *Immunogenetics*. 63:501-509, 2011.

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

なし

## 2. 学会発表

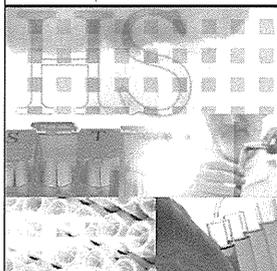
### 国際学会

1. Saito A, Nomaguchi M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Yoshida T, Yasutomi Y, Takahashi N, Matano T, Adachi A, Akari H. Susceptibility of cynomolgus monkeys to monkey-tropic HIV-1 infection is determined by TRIM5 $\alpha$  genotypes. 29<sup>th</sup> Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS. (Seattle) 25-28 October, 2011.

### 国内学会

1. 明里宏文：エイズウイルスの宿主適合戦略. 京都大学ウイルス研究所・ウイルス研究の潮流シリーズセミナー (京都) 平成23年6月22日
2. Saito A, Nomaguchi M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Yoshida T, Yasutomi Y, Matano T, Adachi A, Akari H. Genotypic variation of cynomolgus monkey TRIM5 $\alpha$  determines the susceptibility to monkey-tropic HIV-1 infection. International Union of Microbiological Society 2011 Congress. 11-16 September, (Sapporo) 2011.
3. Yoshida T, Okamoto M, Akari H, Suzuki J, Takako Miyabe-Nishiwaki, Hayakawa T, Imai H, Matsui A, Watanebe A, Kaneko A, Hirohisa H. Simian retrovirus-4-associated infectious thrombocytopenia in Japanese macaques. International Union of Microbiological Society 2011 Congress. (Sapporo) 11-16 September, 2011.
4. 明里宏文：霊長類モデル動物を用いたウイルス感染症研究. 東京医科歯科大学・難治疾患共同研究拠点研究集会 (東京) 平成23年10月7日
5. 高橋尚史、齊藤暁、野間口雅子、松岡佐織、足立昭夫、明里宏文、俣野哲朗：サル指向性HIV-1感染慢性潜伏期のカニクイサルからの感染性ウイルスの回収. 第25回日本エイズ学会学術集会 (東京) 平成23年11月30日-12月2日
6. 齊藤暁、河野健、中山英美、足立昭夫、野間口雅子、保富康宏、俣野哲朗、塩田達雄、明里宏文：サル指向性HIV-1への感受性に影響を与えるマカクサルTRIM5遺伝子の多様性. 第25回日本エイズ学会学術集会 (東京) 平成23年11月30日-12月2日

## 分担研究課題



## 抗HIVタンパク質アクチノヒビンの実用化研究

研究分担者

田中 晴雄 いわき明星大学薬学部薬学科 教授

抗HIVレクチンアクチノヒビン (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タンパク質である。AHは、HIV外套糖タンパク質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) で阻止し、しかも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されている。

本研究では、AHの分子レベルでの選択性のメカニズムの解明とHIV感染予防薬及びHIV/AIDS治療薬の開発を目指して研究を実施し、以下の成果を得た。(1) AHと $\alpha(1-2)$ mannobioseの複合体の結晶化とX線結晶構造解析により、AHの選択性の根拠を明らかにした。(2) AHがプロテアーゼに対して安定なタンパク質であることを確認した。(3) HIV感染予防実験で用いる基剤の種類と濃度を検討し、1% ハイドロキシエチルセルロース (HEC) を基剤の候補として選択した。(4) HIV/AIDS治療薬の候補としてPEG化により調製したAH 2量体は、強い合胞体形成阻害活性 (AHの約3倍) を示したが、溶解性がAHより低く、溶解性の改善が今後の課題である。

## 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) は、HIV-1gp120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に対する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1, 2a)。既に明らかにされた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 (Tanaka H, et al., PNAS, 106, 15633-15638, 2009)。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低感受性株) に対するAHの抗HIV活性は弱いですが、AHを2量体 (His-TEV-AH dimer/RTB-L) 化することにより、抗HIV活性を2~20倍上昇させ、AH低感受性株を克服することに成功した<sup>1)</sup>。本年度の研究では、AHの分子レベルでの選択性のメカニズムを明らかにするため、AHと $\alpha(1-2)$ mannobiose (MB) の複合体の結晶化とX線結晶構造解析を行った。また、AHのHIV感染予防薬及びHIV/AIDS治療薬としての開発を目的として、AHのプロテアーゼに対する安定性の評価、動物実験に用いる基剤の条件検討、さらに治療薬 (注射薬) 候補となる誘導体の調製及び評価を行った。

## B. 研究方法

〈AHと $\alpha(1-2)$ mannobiose (MB) の複合体の結晶化とX線結晶構造解析〉

放線菌 *Longispora albida*由来の114アミノ酸から成る成熟AHとMB (Sigma Chemical Co.) の複合体の結晶化を試みた。市販の結晶化キット (Hampton Res. Co.とEmerald Biosystems Inc.) を用いて条件を