

検討し、20% (w/v) polyethylene glycol 1000、0.2 M NaCl、0.1 M Na/K リン酸緩衝液 (pH 6.2) の溶液中で20~30日でX線実験と構造決定に適した結晶が得られた。X線データは、つくば市のPhoton FactoryのBL-NW12で波長1.00 Åでシンクロトン放射光を用いてX線データを収集した。

〈AHのプロテアーゼに対する安定性〉

AHに5種類のプロテアーゼ (Asp-N、Arg-C、Glu-C、トリプシン及びキモトリプシン) をそれぞれ添加し、0.5、1、3時間、37°Cで反応を行った。その後、SDS-PAGE (CBB染色) により分解パターンを調べた。AH dimerについては、トリプシン及びキモトリプシンを用い、AHと同様な方法で試験した。コントロールとしてbovine serum albumin (BSA) と糖鎖結合タンパク質であるコンカナバリンA (Con A) を用いた。

〈AHの溶解基剤の検討〉

ハイドロキシエチルセルロース (HEC) とカルボキシメチルセルロース (CMC) の2種類で検討した。AHを0.5、1% HEC及び0.5% CMCに15 mg/mlとなるよう加えて、一時間室温でインキュベートした。その後、遠心上清のUV吸収 (O.D.280) により溶解度を算出した。

〈放線菌由来AHのPEG化によるAH 2量体 (AH-5K PEG-AH) の調製及び評価〉

PEG化反応液 (1.2 mM AH、20 mM 酢酸ナトリウム/30%アセトニトリル (pH 5.0)、20 mM シアノ水素化ホウ素ナトリウム、1.2 mM aldehyde-5K PEG-aldehyde) を室温で一晩反応後、逆相クロマトグラフィー (ODS、Protonavi、資生堂) で精製した。得られたAH-5K PEG-AHについては、合胞体形成阻害活性及びリン酸緩衝液 (pH7) における溶解性を測定した。

C/D. 研究結果と考察

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

AHとMBの複合体の結晶化に成功し、X線結晶構造解析の結果、下記のことが明らかとなった。

- (1) AHは3つの繰り返し構造を持ち、これらが3つの糖鎖結合ポケットを形成している。それぞれのポケットにMBが結合している (図2a)。
- (2) MBは、コの字型になっていて、例えばモジュール3では、コの字型の中にTyr108がフィットしている。 $\alpha(1-3)$ や $\alpha(1-6)$ のmannoibioseでは、この形は作られないので、 $\alpha(1-2)$ MBのみに選択的な親和性を示すことが明らかとなった (図2b, c)。この状況は、モジュール1、2でも

[1-38] ASVTIRNAQTGRLLDSNYNGNVYTL PANGGNYQRWTGP
 [39-76] GGGTVRNAQTGRCLDSNYDGA VYTLPCNGGSYQKWL FY
 [77-114] SNGYIQNVE TGRV LDSNYNGNVYTL PANGGNYQK WYTG

図1 AHのアミノ酸配列
 灰色部分がセグメント間で一致するアミノ酸配列であり、LD-QXW間で3つの糖鎖結合ポケットを構成している

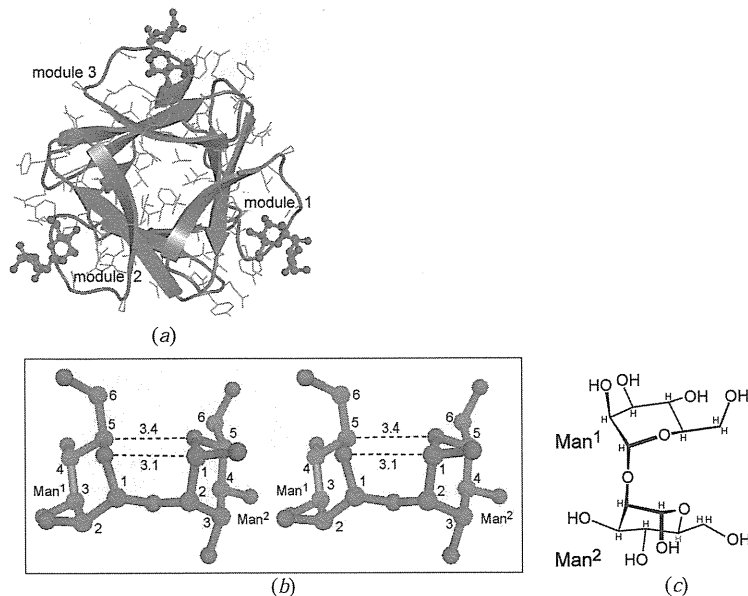


図2

- (a) AHの3つの糖鎖結合ポケットに3分子の $\alpha(1-2)$ mannoibiose (MB) が結合していることを示す
 (b) MBは、コの字型を形成している(stereo-pair diagram)
 (c) MBの化学構造

全く同様である。

- (3) 第2 mannose (Man2) のequatorial 配置のO³とO⁴のOH基がAsp91、Tyr99及びAsn104残基と水素結合している。Tyrの側鎖は、C⁵及びC⁶と疎水結合している。Leu101とTyr99は、MB分子の動きをブロックしているように見える。Man2のaxial 配置のO¹は、ポケットから突き出ているHMのD1のMan3と結合することによりAH-gp120の結合をさらに強固にする役割を担っている(図3a)。
- (4) 3つのポケットの空いている部分に3つのAsn残基が接近して存在し、HMのD3との関連が示唆された(図3b)。
- (5) 3分子のHMと1分子のAHの結合モデルとして図4が提出された。

以上のX線結晶構造解析の結果から、これまでに報告された他のレクチン、例えばシアノビリン-Nは細胞毒性、ミトジェン活性、サイトカイン誘導活性などを示すが、AHはこのような副作用を示さないという選択性の根拠が明確に示された。

Sigal Aら(Nature, 477, 95-98, 2011)は、現在用いられている抗HIV薬では、HIVの複製は抑制できるが、cell-to-cellのウイルス感染を阻止できないことを示し、これが体内からウイルスを除去できない原因ではないかと推定している。AHは、合胞体形成

阻害剤として発見されたものであり、cell-to-cellのHIV感染を阻止できると考えられるので、AHを素材とした注射剤が開発できれば体内からのHIVの除去が可能になるものと推定される。

〈AHのプロテアーゼに対する安定性〉

一般的に知られている5種類のプロテアーゼ(Glu-C、トリプシン、キモトリプシン、Asp-N及びArg-C)をAH溶液に添加し、0.5、1、3時間反応後SDS-PAGE(CBB染色)で評価した結果、図6に示したように、疎水性アミノ酸残基のC末端側を切断するキモトリプシンでは、BSA及びCoAは反応30分後に分解が認められたが、AHは3時間後でも分解産物は検出されず、安定であることが確認された。その他のプロテアーゼでも、キモトリプシンと同様にコントロールタンパクで分解が進んでいたが、AHでの分解は確認できなかった。また、AH dimerについてもトリプシン及びキモトリプシンを用いて同様に安定性を調べたが、両プロテアーゼにより30の間に既に分解が進んでおり、AH dimerはAHよりプロテアーゼに対して不安定であることが明らかとなった。上記の結果から、カニクイザルを用いるSHIVの感染予報試験ではAHを用いるのが妥当であると考えられる。

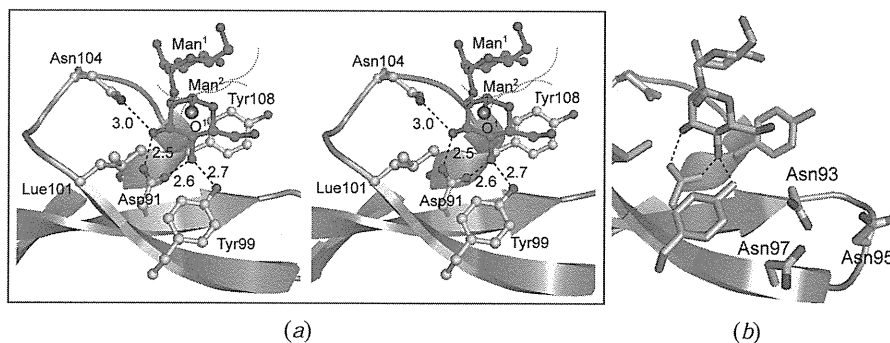


図3

(a)糖鎖結合ポケットに結合したMBのstereo-pair diagram

(b)ポケットの右端には3分子のAsnが存在する。D3(図5)のMBと結合していると推定される

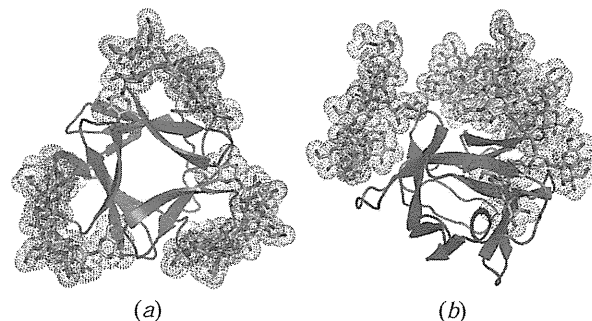


図4 3分子のHMと1分子のAHの結合モデル

(a)上から見た図 (b)横から見た図

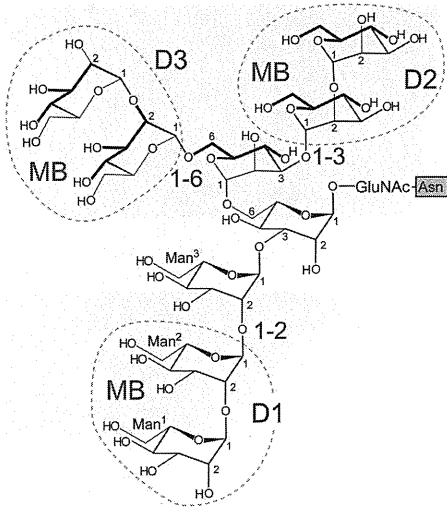


図5 高マンノース型糖鎖 (HM) の化学構造GlcNAcが gp120のAsnと結合している

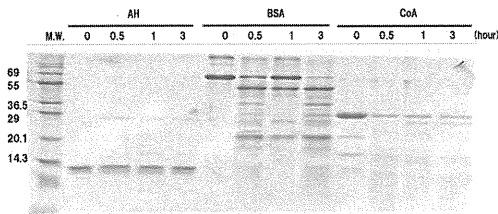


図6 AHに対するトリプシンの影響

〈AHのHIV感染予防薬としての溶解基剤の検討〉

カニクイザルを用いるSHIV感染予防試験では、ウサギでの安全性試験が終了し、プロテアーゼに対する安定性が優れているAHを用いるのが妥当であると考えられる。その際、AHを高濃度に溶解できる基剤が必要であり、その基剤の種類と濃度について検討した。基剤の種類としては、カニクイザルを用いたシアノピリン-Nの直腸感染予防試験 (Tsai CC *et al.*, AIDS Res. Human Retrovirol. 7, 535-541, 2003) で用いられたハイドロキシエチルセルロース (HEC) と以前ウサギ膺刺激試験で使用したカルボキシメチルセルロース (CMC) の2種類で検討した。その結果、0.5及び1%HECでは、それぞれ8.8、9.2 mg/mlと比較的高濃度で溶解した。一方、0.5% CMCでは、0.8 mg/mlとなり、溶解性は低かった。従って、HECが基剤として適していることが明らかとなった。濃度に関しては、0.5%と1%の溶解度に差はあまりなかったが、直腸注入の場合、ある程度の粘性がサンプルの排出を防ぐのに有利であると考え、1% HECを用いることとしている。

〈放線菌由来AHのPEG化2量体〉

HIV/AIDS 治療薬として、AHの静脈注射投与による適用を目的とした場合、AHは中性付近の溶解性が低いため、血中での沈殿の可能性が考えられる。また、免疫原性の出現も考えられる。そこで、親水性高分子であるPEGでの修飾を試みている。これまでに調製した5K PEG-AH及び10K PEG-AHでは、溶解性の上昇が認められたが、合胞体形成阻害活性は約1/5に低下していた。そこで、今回は阻害活性の低下を改善するために、PEGの両端にAHを付加したAH-5K PEG-AH誘導體 (AH-5K PEG-AH) の調製を試みた。PEGは、タンパク質のN末端のアミノ基に特異的に結合するアルデヒド基を両端に持つ aldehyde-5K PEG-aldehydeを用いた。反応は、AHとPEGを1:1のモル比で行い、その後ODSカラムで精製した。得られた誘導體の合胞体形成阻害活性を調べた結果、AHのIC50値が41nMに対して、AH-5K PEG-AHは15 nMとなり、約3倍強い阻害活性を示した。次に、pH7における溶解性を調べたところ、AHの溶解度が3.3 mg/mlに対し、AH-5K PEG-AHでは、0.33 mg/mlとなり、約1/10まで低下してしまった (表1)。従って、静脈注射に適した治療薬の候補の開発については今後さらに検討が必要である。

表1 AH及びAH-5KPEG-AHの合胞体形成阻害活性と溶解度

	合胞体形成阻害活性 (IC50:nM)	溶解度 pH7 (mg/ml)
AH	41	3.3
AH-5K PEG-AH	15	0.33

E. 結論

- (1) 抗HIVレクチンであるAHはHIV-1gp120のように多くのHMを持つ糖タンパク質にのみ親和性を示し、細胞毒性、マイトジェン活性、サイトカイン分泌促進活性を示さないことが分かっていたが、その選択性のメカニズムが、AHとMBの複合体のX線結晶構造解析によりかなり明快に示された。
- (2) AHの中性付近の緩衝液への溶解性は低かったが、HECに対する高溶解性が確認され、カニクイザルでの直腸SHIV感染予防試験用基剤として有望であることが確認された。
- (3) HIVのcell-to-cell感染を阻止できる注射薬の開発を目指して調製されたAH-5K PEG-AHはAHの約3倍の合胞体形成阻害活性を示した。

以上の結果をもとに、カニクイザルを用いるSHIV感染予防試験の実施、並びに新しく得られた

高活性誘導体 (AH-5K PEG-AH) の溶解性の改善が期待される。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takahashi A, Inokoshi J, Hachiya A, Oka S, Omura S, Tanaka H. The high mannose-type glycan binding lectin actinohivin: dimerization greatly improves anti-HIV activity. *J Antibiot (Tokyo)*. 64(8):551-557, 2011.

2. 学会発表

1. 張曉雪、大林尚美、高橋淳、野原幸男、菊池雄士、田中晴雄：抗HIVレクチン アクチノヒビンの高分子修飾体の構築. 第132年会日本薬学会. 札幌. 2012年3月30日
2. Hoque MM, Jiandong J, Suzuki K, Tsunoda M, Takahashi A, Sekiguchi T, Tanaka H and Takénaka A. Specificity and efficiency in activity of anti-HIV actinohivin for sugar binding. *Acta Cryst.* (2011) A67, C286, the XXII Congress of the International Union of Crystallography, Aug 23, 24, 2011, Spain
3. Jiandong J, Hoque MM, Suzuki K, Tsunoda M, Takahashi A, Sekiguchi T, Tanaka H and Takénaka A. Structure determination of anti-HIV actinohivin in complex with mannobioses. *Acta Cryst.* (2011) A67, C296-C297, the XXII Congress of the International Union of Crystallography, Aug 23, 24, 2011, Spain

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

日本特許：No. 3962772 (2007年6月)

U.S. Patent: 6,482,412B (2002年11月)

Australian Patent: 750,914 (2002年11月)

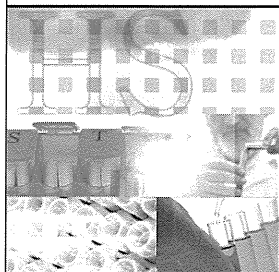
European Patent: No. 10760658 (2008年7月)

発明の名称：抗ヒト免疫不全ウイルス活性を有するポリペプチド、ポリペプチドをコード化する遺伝子、ポリペプチドの製造方法

発明者：田中晴雄、大村 智

出願人：(有) キイム・ファーマ・ラボ

分担研究課題



新規抗HIV薬剤の合成展開および安全性の評価

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

既存の抗HIV薬剤耐性を克服するための新規な阻害機序による抗HIV薬剤の創製を目的とする。昨年度に引き続きヒット化合物からの誘導体合成・評価を行い、新たに合成した56化合物のうち、9化合物に $IC_{50} < 10nM$ の抗HIV活性が認められた。作用機序解析においては、ウイルスの初期転写過程に関与すること並びに宿主因子をターゲットとする可能性は低いことが示された。また、昨年度見出した体内動態及び遺伝毒性面が改善した化合物Gについて、マウスにて1ヶ月間の反復投与毒性試験を行ったところ、とくに重篤な毒性は認められなかった。今後、大動物を用いた安全性試験を行い抗HIV剤としての可能性を見極めていく予定である。

A. 研究目的

HIV/AIDS症は、Antiretroviral Therapy (ART) の確立と近年の新薬の開発により治療可能な慢性疾患と位置付けられつつある。しかし、薬剤の組み合わせやアドヒランスが悪い場合は容易に耐性ウイルスが出現することに加え、特定の薬剤に耐性となったウイルスは、同系統の薬剤に対しても交差耐性を示すことが多いため、新規な作用機序を有する新薬の開発が望まれている。

我々は、これまでに新規な作用機序と強い抗HIV活性を有し、マウスにおいて経口吸収性を示す化合物を見出している。現在、作用機序解析と共に臨床可能な薬剤の開発を目標として様々な検討を行っている。

B. 研究方法

i) 新規化合物の合成

前年度に見出されたヒット化合物からの誘導体を、有機化学的手法を用いて合成した。

ii) 新規合成化合物の *in vitro* 抗HIV活性測定

名古屋医療センターの杉浦らが樹立したHIV-1感受性レポーター細胞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、対象とする化合物を1, 0.2, 0.04, 0.008, 0.0016, 0.00032, 0.000064 μ Mの濃度で添加し培養し

た。感染7日後に細胞内firefly luciferase活性を測定し、 IC_{50} を算出した。

iii) 代表化合物の作用機序解析

① Time of addition 試験

名古屋医療センターの杉浦らが樹立したHIV-1感受性レポーター細胞X4-MaRBLE細胞を用いた。X4-MaRBLE細胞にNL4-3を感染させた。感染後0, 3, 6, 9, 15, 18, 21, 24時間後に化合物Gを IC_{50} 付近の濃度で添加し、感染24時間後に細胞内firefly luciferase活性を測定した。

対照薬として非核酸系酵素阻害剤efavirenz (EFV)、インテグラーゼ阻害剤raltegravir (RAL) についても同様に測定を行った。

② LTR-Luc阻害試験

X4-MaRBLE細胞に化合物GをTop濃度1 μ Mもしくは0.5 μ Mにて公比10, 4段階で希釈し添加した。培養24時間後に、LTRを活性化することが知られている宿主因子(TNF- α , PMA, TSA)やウイルス因子(Tat)を添加した。更に24時間培養後に細胞内firefly luciferase活性を測定し、その値から IC_{50} を求めた。

また、細胞毒性をMTS assayにて評価し、 CC_{50} を求めた。

iv) 代表化合物の毒性評価

① マウス1ヶ月反復毒性試験

6週齢のICR系雄性マウスを用いた。0.5%メチルセルロースに懸濁させた化合物Gを6, 20, 60 mg/kg 経口投与した。1日1回1ヶ月反復投与した後、血液学、血液生化学検査を行った。

v) 倫理面への配慮

試験は、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

今年度新たに合成した56化合物のうち、9化合物に $IC_{50} < 10nM$ の抗HIV活性が認められた(表1)。作用機序解析においては、Time of addition試験におい

てEFV, RALが感染9時間以降に薬剤を添加すると抗ウイルス効果が減弱するのに対し、化合物Gは9時間後に添加しても感染同時添加と同等の抗ウイルス効果を示した(図1)。LTR-Luc阻害試験ではTNF- α 刺激、PMA刺激、TSA刺激によるLTRの活性化には弱い阻害活性しか示さなかったのに対し、Tat刺激において抗ウイルス活性と同程度の阻害活性を示した(図2)。更に、化合物Gについて、マウスにて1ヶ月間反復投与し、血液学、血液生化学検査を行った結果、とくに重篤な毒性所見は認められなかった。

表1 スクリーニングサンプルの *in vitro* 抗HIV活性内訳

IC ₅₀ (nM)	>300	100 - 300	30 - 100	10 - 30	10>
化合物数	5	16	10	16	9

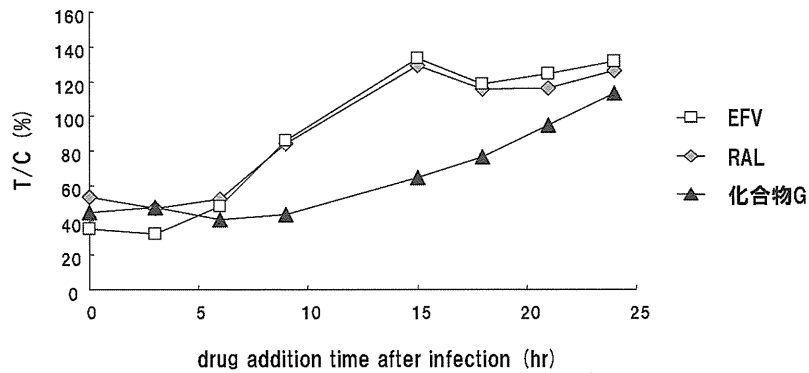


図1 X4-MaRBLE細胞を用いた化合物GのTime of addition 試験結果

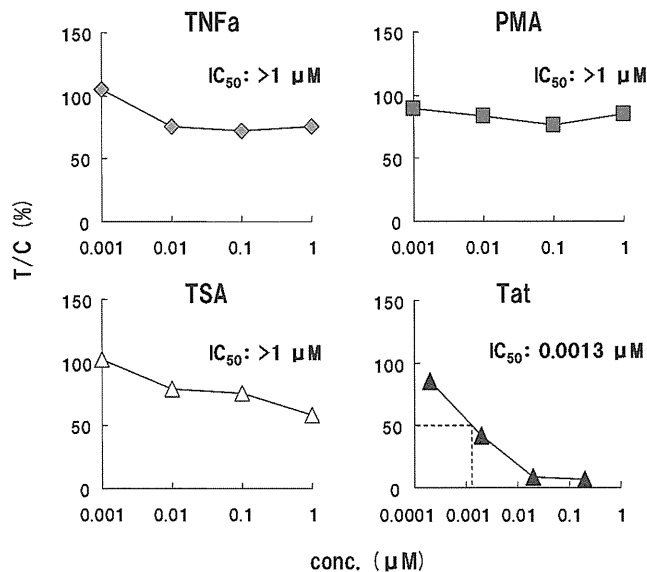


図2 X4-MaRBLE細胞を用いた各種刺激因子でのLTR-Luc阻害試験結果

D. 考察

本研究において新規合成品の評価により、より詳細な抗ウイルス活性の構造活性相関を検証できた。作用機序解析においてはレポーター細胞であるX4-MaRBLE細胞を用いたTime of addition試験によりインテグレーション以降～転写過程に作用点があることを確認した。更に、LTR-Luc阻害試験において刺激因子の違いにより化合物Gの阻害活性が変化した。TNF- α やPMAは宿主因子であるNF κ Bを活性化することでLTRからの転写を誘導する。またTSAはHDAC阻害剤であり、クロマチンリモデリングを抑制する事でLTRからの転写活性を上昇させる。これらの刺激因子によるLTRの転写活性化に対し化合物Gは弱い阻害活性しか示さなかったことは、化合物Gが宿主の普遍的な転写調節機構をターゲットとする可能性が低いことを示していると考えている。実際に宿主の転写調節機構に作用することで抗HIV活性を示すことが知られているIKK β 阻害剤（PS-1145）、Sp1阻害剤（Mithramycin A）、P-TEFb阻害剤（Flavopiridol）と化合物GのLTR-Luc阻害評価系における阻害活性と細胞毒性の開き（選択比）を比較すると、宿主因子を阻害する上記の薬剤に比べ、化合物Gの選択比は有意に大きい（表2）。今後は、LTR活性化のウイルス側因子であるTatに対する作用について検討していく。

マウスにおける1ヶ月反復投与毒性試験においては、とくに重篤な毒性所見は認められなかったことから、今後、大動物を用いた安全性試験を行い抗HIV剤としての可能性を見極めていく。

E. 健康危険情報

特記事項なし

F. 研究発表

特に無し

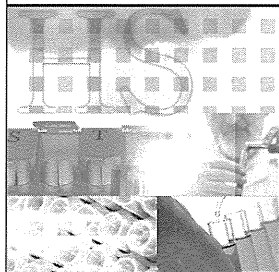
G. 知的財産権の出願・登録予定

特に無し

表2 Tat刺激下のLTR-Luc阻害評価系における各阻害剤の選択比

	LTR-Luc 阻害活性 IC ₅₀ (μ M)	細胞毒性 CC ₅₀ (μ M)	選択比 CC ₅₀ / IC ₅₀
化合物 G	0.0013	>20	>15385
化合物 J	0.0017	16	9412
IKK β 阻害剤 (PS-1145)	0.29	14	48
Sp1 阻害剤 (Mithramycin A)	0.0039	0.046	12
P-TEFb 阻害剤 (Flavopiridol)	0.0035	0.12	34

分担研究課題



宿主因子を標的にした新薬開発研究

—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感染・免疫研究部 室長

HIV感染症に対する多剤併用療法の進歩により治療の長期化が一層進み、終生服薬の継続が求められている。このような状況の中、作用機序が既存のメカニズムと異なる新規抗HIV薬の開発を強力に推進することは効果的で、かつ重要であると考えられる。本分担研究では、先に開発を進めているT-Y化合物およびその類縁化合物の作用機序を解明することを目的に研究を行っている。これまでの研究から、T-Y化合物の作用点は、HIVが細胞内に侵入後から遺伝子発現の間の過程であることまで絞り込んできた。本年度は、Real-Time PCRを駆使して、逆転写過程およびインテグレーションまでの過程に対する薬剤の阻害効果を精査した。その結果、新規薬剤はいずれの過程も阻害しなかった。一方、TNF α 刺激による潜伏感染細胞からのウイルス産生を強く抑制することが認められた。以上のことから、新規薬剤の作用点は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ことが明らかになった。

A. 研究目的

HIV感染治療において、多剤併用療法の定着が感染予後の改善に大きな成果を挙げている。しかし、根治には至っておらず、現状では今後治療が増々長期化することが想定される。そのため、副作用の問題や薬剤耐性ウイルスの出現の懸念も増大している。そのため、新たな機序をもつ治療薬の開発が切望されている。作用点が異なる新規薬剤は、多剤耐性症例の救済のみならず、それ以外の症例に対しても治療の選択の幅を広げ、副作用の回避や薬剤耐性ウイルスの出現を低下させることが期待される。

本研究班では先に、HIV-1に対する強力な阻害活性をもつ ($IC_{50} = 0.6 \sim 10$ nM) T-Y化合物およびその類縁化合物の開発を行ってきた。しかし、その作用機序あるいは分子標的の特定には至っていない。Time-Of-Additionの結果などから、作用点はインテグレーション過程前後であることを絞り込み、報告してきた。本年度は、さらに逆転写過程やインテグレーション過程に対する影響を精査し、作用点の絞り込み作業を行った。

B. 研究方法

(1) 内在性逆転写反応 (Natural Endogenous Reverse Transcriptase Assay : NERT)

逆転写反応に対する新規薬剤の抗ウイルス効果を検討するため、薬剤存在下におけるNERT反応を解析した。HIV-1 (NL43由来) 感染H9細胞より、ウイルス上清を回収し、ショ糖密度勾配法を用いた超遠心分離によりウイルス粒子を濃縮した。濃縮したウイルス粒子に、dNTPsとTritonX-100を添加し粒子内にて逆転写反応を行わせた。得られた逆転写中間産物を定量PCR法により定量した。反応時に、抗ウイルス薬剤を添加することにより、その阻害効果を解析した。

(2) Real-Time PCR法を用いた逆転写およびインテグレーション中間産物の定量

NERTおよび感染細胞より、Total DNAを抽出し、Real-Time PCR法により、逆転写初期 (Early RT) と後期 (Late RT)、2LTR、インテグレーション産物 (IF) を定量した。Primerセットは、Thomas et al. (Virology 353. 41-, (2006)) を改変したものを用いた。

(3) TNF α 刺激によるHIV-1 潜伏感染細胞からのウイルス産生実験

HIV-1 潜伏感染細胞株OM10.1とACH2、U1細胞を用いた。TNF α 添加後、24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。薬剤は、予め、TNF α 添加1時間前に加えた。

C. 研究結果

複製前期過程における T-Y 化合物の抑制作用点を絞りこむために、逆転写あるいはインテグレーション産物 DNA を (Early RT と Late RT、2LTR、IF) を定量する系を構築した。まず、HIV-1 を MT-2 細胞に感染し、12 時間後の中間産物 (DNA) を抽出・定量し、既存薬との比較実験を行った (図1)。

逆転写酵素阻害剤 (AZT) では、Late RT および 2LTR が容量依存的に減少した。また、インテグラーゼ阻害剤 (RAL) では、2LTR 産物が 1.5 倍程度に増加する現象が認められた。一方、T-Y 化合物は、逆転写産物量の低下あるいは 2LTR 産物量の増加は認められず、逆転写過程とインテグレーション (Strand-transfer 反応) 過程が作用点でないことが示

された。さらに詳細にインテグレーション過程に関する抑制効果を解析するため、インテグレーションされた Proviral DNA 産物 (IF) を定量した (図2)。

図2に示すように、感染24時間後、いずれの薬剤濃度においても Early RT と Late RT、2LTR、IF の減少は認められなかった。むしろ、この系において、高濃度の T-Y 化合物では逆転写産物が微増する傾向が見られた。以上の結果から、T-Y 化合物によるウイルス増殖抑制作用点は、インテグレーションまでの前期過程ではないことが考えられた。また、NERT においても T-Y 化合物が逆転写反応に優位な差を与えないことが裏付けられた (図3)。高濃度 (100 μ M) における若干の逆転写抑制効果は認められた (10 μ M では効果なし) もの、T-Y 化合物の IC₅₀ (=0.6~11nM) のレンジでは抑制効果は認められなかった。

先に、pNL43 プラスミドを HeLa 細胞に導入し、T-Y 化合物存在下で産生ウイルス量の抑制効果を調べた結果、ウイルス産生量には影響を与えなかったという報告をした。しかし、TNF α 刺激による HIV-1 潜伏感染細胞を用いた実験から異なった結果が得

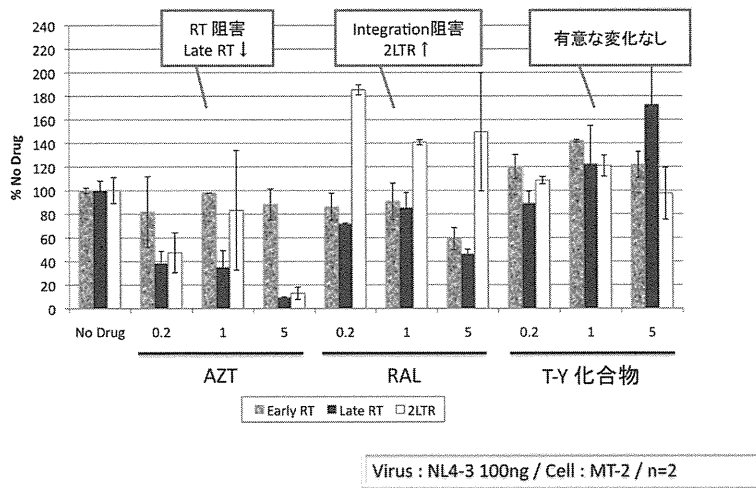


図1 HIV-1 感染における逆転写およびインテグレーションに対する抑制効果は認められない

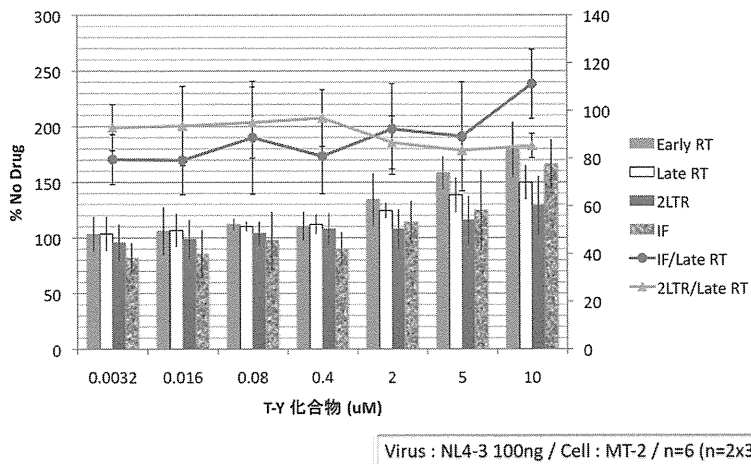


図2 HIV-1 のインテグレーションに対する抑制効果は認められない

られた。HIV-1 潜伏感染細胞株 OM10.1 と ACH2、U1 細胞に TNF α 添加24時間後の産生ウイルス量を定量した (図4)。T-Y 化合物の濃度依存的にウイルス産生量は減少し、抑制効果が認められた。以上のことから、T-Y 化合物の作用点は、インテグレーション直後からウイルス遺伝子発現 (転写初期) までの過程であり、pNL43 のようなプラスミドからのウイルス遺伝子発現過程には影響を与えないことが考えられた。

ン直後からウイルス遺伝子発現 (転写初期) までの過程であり、pNL43 のようなプラスミドからのウイルス遺伝子発現過程には影響を与えないことが考えられた。

D. 考察

HIV の複製において、前期過程は多くの宿主防御因子の標的になっている。つまり、宿主とウイルスとの間に最も差異が生じ、宿主が異物 (ウイルス) として認識しやすい過程でもある。そのため、宿主因子がターゲットである可能性も想定し、T-Y 化合物の作用機序を解明する上で、複製前期過程に対する抑制効果を検証すべきと考え研究を行った。既存薬に対する耐性ウイルスにおいても、T-Y 化合物は抑制効果を示し、今回得られた結果は妥当であると考えられる。今後、さらにインテグレーション後の Proviral DNA の修復 (宿主による修復機構) あるいは染色体に組み込まれた Proviral DNA 遺伝子の初期発現に対する T-Y 化合物の阻害効果を解析し、分子作用機序を明らかにしたいと考えている。特に、Proviral DNA のLTR 領域の Epigenesis は、ウイルスにとって初期遺伝子発現の制御に重要なポイントでもあり、詳細な解析が必要であると考えている。

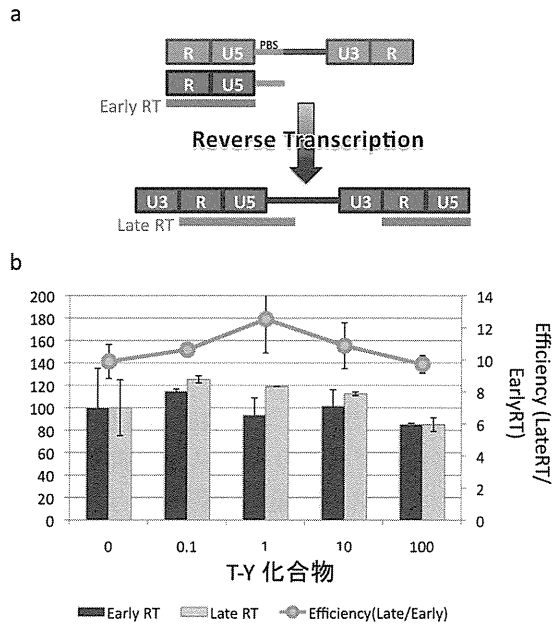


図3 NERTにおける抑制効果は認められない

E. 結論

T-Y 化合物の作用点を絞り込むために、Real-Time PCR を駆使して、逆転写過程およびインテグレーション過程に対する阻害効果を詳細に検証した。その結果、新規薬剤はいずれの過程も抑制しなかったが、TNF α 刺激による潜伏感染細胞からのウイルス産生を強く抑制することが認められた。これらのことから、新規薬剤の作用点は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ことが示された。今後、インテグレーション後の Proviral DNA の修復あるいは染色体に組み込まれた Proviral DNA 遺伝子の初期発現における薬剤の阻害効果を解析し、T-Y 化合物の分子作用機序を解明したいと考えている。

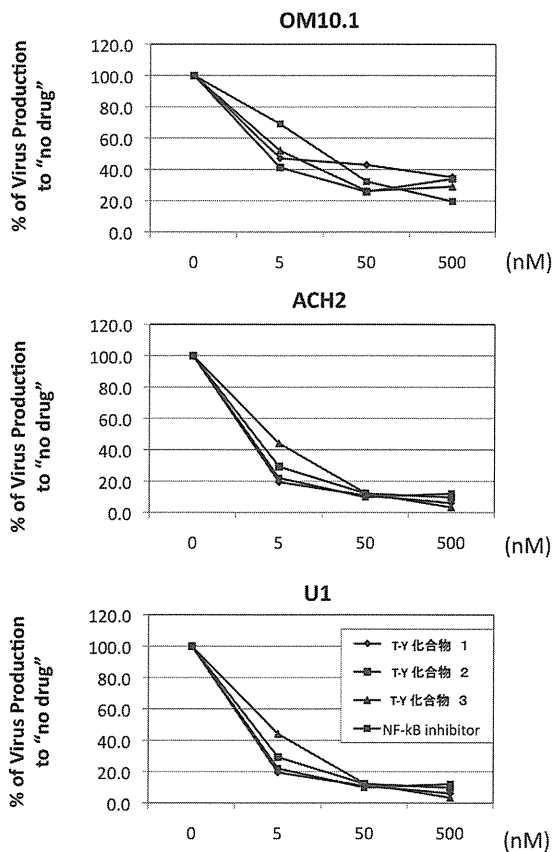


図4 HIV-1 潜伏感染細胞における TNF- α 刺激によるウイルス産生抑制効果

F. 研究発表

1. 論文発表

- Li J, Hakata Y, Takeda E, Liu Q, Iwatani, Y, Kozak CA, and Miyazawa M. Two genetic determinants acquired late in Mus evolution regulate the inclusion of exon5, which alters mouse APOBEC3 translation efficiency. PLoS Pathogens. 8:e1002478,2012
- Kitamura S, Ode H, and Iwatani Y. Structural features of antiviral APOBEC3 proteins are linked to their functional activities. Frontiers in Microbiology. 2:258, 2011.

3. 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 D30N/N88D demonstrates virological advantage in a highly protease inhibitor-exposed HIV-1 case. *Antiviral Research*. 90:33-41, 2011.
 4. Fujisaki S, Yokomaku Y, Shiino T, Koibuchi T, Hattori J, Ibe S, Iwatani Y, Iwamoto A, Shirasaka T, Hamaguchi M, and Sugiura W. Outbreak of infections by hepatitis B virus genotype A and transmission of genetic drug resistance in patients coinfecting with HIV-1 in Japan. *Journal of Clinical Microbiology*. 49:1017-1024, 2011.
 5. 徳永研三、足立昭夫、高折晃史、中山英美、岩部幸枝、岩谷靖雅：HIV-1 感染阻害因子. *日本エイズ学会誌*. 13:56-62, 2011.
 6. 岩谷靖雅：宿主防御因子APOBEC3 ファミリーと抗レトロウイルス機序. *ウイルス*. 61:61-72, 2011.
2. 学会等発表
1. 岩谷靖雅、北村紳悟、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.
 2. 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.
 3. 伊部史朗、近藤真規子、今村淳治、岩谷靖雅、横幕能行、杉浦互：ウェスタンブロット法により HIV-1/HIV-2 重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.
 4. 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.
 5. 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.
 6. 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回日本エイズ学会・年会. (横浜) 2011年12月.
 7. 松岡和弘、正岡崇志、田邊史子、森下了、澤崎達也、岩谷靖雅、杉浦互：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回日本エイズ学会・年会. (横浜) 2011年12月.
 8. Iwatani Y, Kitamura S, Nakashima M, Ode H, Saito A, Ibe S, Yokomaku Y, Sugiura W. HIV-1 NC Facilitates Formation of Efficient Initiation Complex for Reverse Transcription. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. (Sapporo) Sep. 2011.
 9. Kitamura S, Nakashima M, Ode H, Saito A, Yoshii H, Yokomaku Y, Sugiura W, Iwatani Y. Identification of Critical Residues in APOBEC3C/F for HIV-1 Vif-mediated degradation, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (Sapporo) Sep. 2011.
 10. Hattori J, Shigemi U, Hosaka M, Okazaki R, Iwatani Y, Yokomaku Y, Sugiura W. Characteristics of drug-resistant HIV-1 transmission, Analysis of drug resistance in recently and not-recently infected treatment naïve patients in Japan. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. (Sapporo) Sep. 2011.
 11. 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, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. (Sapporo) Sep. 2011.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

研究成果の刊行物に関する一覧

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	In press		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*. (* RDI Study Groupのメンバとして参加)	The development of an expert system to predict virological response to HIV therapy as part of an online treatment support tool	AIDS	25(15)	1855-63	2011
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	17(6)	863-5	2011
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	Antiviral 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
Takahashi A, Inokoshi J, Hachiya A, Oka S, Omura S, Tanaka H	The high mannose-type glycan binding lectin actinohivin: dimerization greatly improves anti-HIV activity	J Antibiot (Tokyo)	64(8)	551-557	2011
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
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
Kitamura S, Ode H, and Iwatani Y	Structural features of antiviral APOBEC3 proteins are linked to their functional activities	Frontiers in Microbiology	2	258	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
徳永 研三、足立 昭夫、高折 晃史、中山 英美、岩部 幸枝、岩谷 靖雅	HIV-1 感染阻害因子	日本エイズ学会誌	13	56-62	2011
岩谷 靖雅	宿主防御因子 APOBEC3 ファミリーと抗レトロウイルス機序	ウイルス	61	61-72	2011
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 antiretroviral host factor TRIMCyp in Cynomolgus macaque (<i>Macaca fascicularis</i>)	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
Li J, Hakata Y, Takeda E, Liu Q, Iwatani Y, Kozak CA, and Miyazawa M	Two genetic determinants acquired late in <i>Mus</i> evolution regulate the inclusion of exon5, which alters mouse APOBEC3 translation efficiency	PLoS Pathogens	8	e1002478	2012

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」班
平成23年度 総括・分担研究報告書

発行日 2012年3月31日

発行者 研究代表者 杉浦 互

発行所 研究班事務局
独立行政法人国立病院機構
名古屋医療センター臨床研究センター感染・免疫研究部
〒460-0001 名古屋市中区三の丸4丁目1番1号

