

HIV-1 量と CD4 数の両面から病態の進行に protective な HLA は、B\*52:01, B\*67:01, C\*12:02、逆に両面から susceptible な HLA は、A\*02:07, B\*35:01 であった。Protective な HLA, susceptible な HLA とともに、HIV-1 量・CD4 数に対して相乗効果が認められた(図 5)。

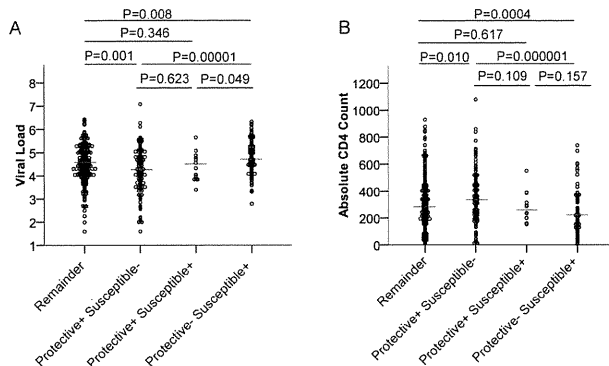


図 5. Protective なアレルと susceptible なアレルの相乗効果

#### D. 考察

日本人 HIV-1 感染者では pol 特異的 CTL が HIV-1 感染のコントロールに大きく影響していると考えられた。海外で報告されている HIV 感染症の病態に強く関与する HLA-B\*57, -B\*27 がほとんどいない日本人でも、病態に有意に関与する HLA アレルが存在することが明らかになった。しかし、他のコホートと比較し、これらのアレルの関与は弱かった。

#### E. 結論

日本人 HIV-1 感染者では pol 特異的 CTL が HIV-1 感染のコントロールに大きく影響していることを示した。HLA-B\*57, -B\*27 が極めて少ない日本人の HIV 感染者で、病態に有意に関与する HLA アレルが存在することを示した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kawashima Y, Pfafferott K, Frater J, Matthews P, Payne R, Addo M, Gatanaga H, Fujiwara M, Hachiya A, Koizumi H, Kuse N, Oka S, Duda A, Prendergast A, Crawford H,

Leslie A, Brumme Z, Brumme C, Allen T, Brander C, Kaslow R, Tang J, Hunter E, Allen S, Mulenga J, Branch S, Roach T, John M, Mallal S, Ogwu A, Shapiro R, Prado JG, Fidler S, Weber J, Pybus OG, Klenerman P, Ndung'u T, Phillips R, Heckerman D, Harrigan PR, Walker BD, Takiguchi M, Goulder P. Adaptation of HIV-1 to human leukocyte antigen class I. *Nature* 458: 641-645, 2009.

2. Tsukada K, Teruya K, Tasato D, Gatanaga H, Kikuchi Y, Oka S. Raltegravir-associated perihepatitis and peritonitis: a single case report. *AIDS* 24: 160-161, 2010.
3. Watanabe K, Honda M, Watanabe T, Tsukada K, Teruya K, Kikuchi Y, Oka S, Gatanaga H. Emergence of raltegravir-resistant HIV-1 in the central nervous system. *Int J STD AIDS* 21:840-841, 2010.
4. Gatanaga H, Ode H, Hachiya A, Hayashida T, Sato H, Takiguchi M, Oka S. Impact of human leukocyte antigen-B\*51-restricted cytotoxic T-lymphocyte pressure on mutation patterns of nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance. *AIDS* 24:F15-22, 2010.
5. Gatanaga H, Ode H, Hachiya A, Hayashida T, Sato H, Oka S. Combination of V106I and V179D polymorphic mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase confer resistance to efavirenz and nevirapine but no to etravirine. *Antimicrob Agents Chemother* 54:1596-1602, 2010.
6. Watanabe K, Gatanaga H, Escueta-de Cadiz A, Tanuma J, Nozaki T, Oka S. Amebiasis in HIV-1-infected Japanese men: clinical features and response to therapy. *PLoS Negl Trop Dis* 5:e1318, 2011.
7. Nishijima T, Komatsu H, Gatanaga H, Aoki T, Watanabe K, Kinai E, Honda H, Tanuma J, Yazaki H, Tsukada K, Honda M, Teruya K, Kikuchi Y, Oka S. Impact of small body weight on tenofovir-associated renal dysfunction in HIV-infected patients: a retrospective cohort study of Japanese patients. *PLoS One* 6:e22661, 2011.

8. Nakamura H, Teruya K, Takano M, Tsukada K, Tanuma J, Yazaki H, Honda H, Honda M, Gatanaga H, Kikuchi Y, Oka S. Clinical symptoms and courses of primary HIV-1 infection in recent years in Japan. Intern

Med 50:95-101, 2011.

G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）  
分担研究報告書

HIV の薬剤耐性発現に抵抗する強力な抗 HIV 阻害剤の研究・開発と、新規抗 HIV 阻  
害剤に対する薬剤耐性発現機序に関する研究

研究分担者 天野 将之（熊本大学エイズ学研究センター COE リサーチ・アソシエイト  
熊本大学生命科学研究部 血液内科学・感染免疫診療部）

研究要旨

我々のグループは HIV-1 が耐性を獲得しにくく、獲得しても他薬剤との交差耐性を有しない新規のプロテアーゼ阻害剤(PIs)の開発を米国の研究グループと共同で続けており、平成 21-23 年度において新規の HIV-1 PIs である GRL-216A, GRL-1398A, GRL-0519A 等を開発、これら化合物群における抗 HIV-1 活性発揮の機序や耐性獲得の機序について詳細な検討を行った。また、アミノ酸挿入変異によってもたらされる HIV-1 の構造学的・ウイルス学的特性の変容について詳細な解析を行なった

A. 研究目的

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

薬剤、発現しても他薬剤との交差耐性を有しない新規の PIs や RTI、新しい機序から HIV-1 の感染を阻害する CCR5 阻害剤の開発を進めるとともに、その基礎となるウイルス学・酵素学・細胞生物学・薬理学・結晶解析学的な基礎研究を進める。

B. 研究方法

1) 検討中の化合物の抗 HIV-1 活性評価及びより有望な化合物の開発・評価：抗 HIV-1 活性の評価には MTT、MAGI アッセイなどを用いるが、有望なものについては耐性株を含む複数のウイルス株での活性を更に検討するため、p24 アッセイを行う。このアッセイには全自動化学発光測定機：Lumipulse F を用いる。このようにして見いだされた、より有望な化合物について前臨床試験の準備を進める。  
2) 抗 HIV-1 作用発現のメカニズム解析：PIs がウイルス、あるいは生体（細胞）へ

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

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

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

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

HIV-1 PR 阻害への機序を明らかにする。

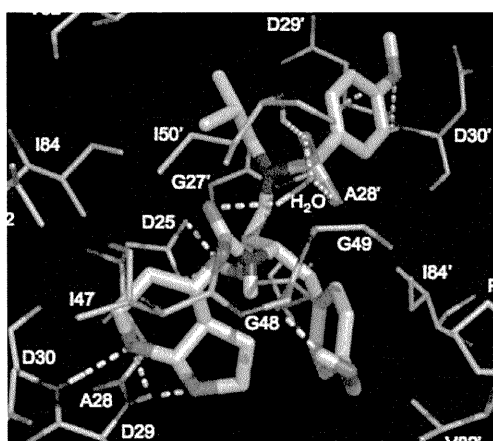
(倫理面への配慮)

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

### C. 研究結果

広いスペクトラムの薬剤耐性株に高い活性を発揮する PI, TMC114/darunavir (Koh & Mitsuya *et al*, *AAC*. 47: 3123-3129, 2003) を米国 Purdue University の Prof. Ghosh グループとの共同研究で開発、本剤は 2006 年 6 月に米国 FDA にて認可され、Prezista<sup>TM</sup> として本邦でも臨床に供されている。さらに我々のグループは試験管内における DRV の研究を続けており、複数の多剤耐性臨床分離 HIV-1 混合株を開始株とした耐性誘導実験において、複数の PI 耐性変異株の重感染と遺伝子相同組み換えが起こることで、HIV-1 が DRV に対する高度耐性を比較的早期に獲得する可能性があることを報告した (Koh, Amano & Mitsuya *et al*, *J Virol*. 84: 11961-11969, 2010)。また我々は Prof. Ghosh グループと共同で、構造解析学的データに基づき DRV と同様に P2 部位に bis-THF 構造を有し、更に P2' 部位の benzodioxole 構造が HIV-PR の flap 領域と水素結合を持つ新規 PDI、GRL-98065 (Amano, Koh & Mitsuya, *AAC*. 51:2143-55, 2007) や、DRV とは異なる基本骨格である cyclopentanyl- tetrahydrofuran (Cp-THF) を有し、HIV-1 PR の活性中心部位に 2 つの異なる結合様式 (bimodal binding

mode) で結合する新規 PI, GRL-02031 (Koh, Amano & Mitsuya *et al*, *AAC*. 53: 997-1006, 2009)、また macrocyclic 構造を有し、薬剤耐性 HIV に対して高い活性を發揮する一連の低分子化合物、GRL-0216A, -0286A 等の PDI を同定、詳細な結晶構造解析により同構造が HIV-PR flap 領域に広範に結合する事で強力な活性を發揮する事を報告 (Tojo, Amano & Mitsuya *et al*, *AAC*. 54: 3460-3470, 2010) し、更に tetrahydro pyrano-tetrahydrofuran (Tp-THF) といった bis-THF とは異なる基本骨格を有する PIs である 2 つの異性体、GRL-1388A, -1398A を同定、DRV 高度耐性株を含む多剤耐性株に対して極めて強力な活性を發揮する事を確認、同化合物群に対する HIV-1 の耐性獲得の機序について詳細に検討し、また結晶構造解析により GRL-1398A は DRV と比較して HIV PR との水素結合や hydrophobic contacts 等の相互作用をより多く有しうる事などを報告した (Ide, Amano & Mitsuya *et al*, *AAC*, 55 : 1717-1727, 2011)。



図では Tp-THF 構造を有し、薬剤耐性 HIV に対して高い活性を發揮する新規の低分子化合物、GRL-1398A における HIV-1 PR との結合様式を点線で示す。GRL-1398A は DRV と同様に HIV PR 活性中心部位である Asp-29, 30 の主鎖と強固に結合する。

更に我々は *oxatricyclic-THF* という全く新しい構造を有し、DRV 高度耐性株を含む複数の高度多剤耐性株に対し広いスペクトラムでの極めて高い抗ウイルス活性を維持、また DRV よりも低濃度でプロテアーゼ二量体化阻害 (PDI) 活性を發揮する新規化合物、GRL-0519A を開発・同定し (Ghosh, Amano & Mitsuya *et al*, *Chem Med Chem*, 5 :1850-1854, 2010, Amano & Mitsuya *et al*, 投稿準備中)、結晶構造解析を含む同化合物の詳細な検討を行い、*oxatricyclic-THF* 構造において bis-THF 基が DRV 等と同様に PR 活性中心部位のアミノ酸主鎖と強固に結合することに加え、3 番目の THF 基が HIV-1 PR の flap 領域、catalytic core 領域、dimer interface におけるアミノ酸群と異なる相互作用を有しうる事を確認、GRL-0519A の強力な PR 酵素活性阻害能および PR 二量体形成阻害能に寄与するものと解された (図 1)。これらの複数の PIs は臨床試験移行を前提に異なる検討中である。

更に、我々のグループは PIs 耐性と Gag の遺伝子変異についてのウイルス学的・構造学的検討も推し進めており、HIV-1 Gag 領域の開裂部位周辺の挿入変異が Gag 前駆蛋白に対する耐性変異 HIV-1 PR の酵素活性を代償する事を以前報告しているが (Tamiya & Mitsuya, *J Virol*. 78: 12030-40, 2004)、このような挿入変異による代償は完全ではなく、薬剤耐性株の複製能は野生株と比し依然劣ったままである事が多い。このため我々は Gag 挿入変異が Gag 前駆蛋白の processing や変異株の感染性および複製能に対し影響を及ぼし得ると仮定、詳細な解析を行うため Gag 領域の様々な位置にアミノ酸配列を

挿入した変異株を多数作成し、挿入変異による HIV-1 の構造学的特性の変容について検討を行なった結果、挿入変異を有する Gag 蛋白自体がその構造学的変化により自壊し易くなっている事が推測された。挿入変異が成熟した Gag 多量体構造に与える影響を詳細に検討する事により、将来的に Gag 構造蛋白の成熟化を阻害し分解方向へと進める新しい HIV-1 複製阻害物質の同定、治療法の開発へと進展し得ると考えられる (Amano & Mitsuya, 投稿準備中)。

#### D. 考察

我々は米国の研究グループとの精力的な共同研究を継続しており、*macrocycle* 構造を有する新規 HIV PDI 群である GRL-216A 等や, Tp-THF といった *bis*-THF とは異なる基本骨格を有する PI である GRL-1398A 等について報告してきた。現時点においても GRL-0519A 等強力な新規抗 HIV-1 PDI 群について詳細な検討を行なっている。また、成熟 Gag 多量体構造にアミノ酸挿入変異が与える影響に関して詳細な検討を行なった。以上より研究達成度は高いと考えられる。これらの研究の特色として、抗 HIV-1 薬開発に必要なウイルス学的研究手技に加えて、独自の新規低分子化合物の合成や結晶構造解析など、1 研究施設では通常施行困難な多岐にわたる研究領域をカバーする研究体制が、国内外のグループとの共同研究として整えられていることが挙げられる。今後もこれらの研究を継続し、新興再興感染症の予防・治療薬開発を進める。

#### E. 結論

本計画で得られると思われるデータは、

臨床試験段階にある阻害薬の研究成果に耐性発現機序に関わる基礎研究の成果を付与することなどが期待され、新規抗 HIV 剤の骨格のデザイン・再デザイン、酵素学的・ウイルス学的解析が強化・スピードアップされ、国内外の研究者との活発な情報交換と人的交流を通じて新しい世代の抗 HIV 剤の開発が強力に推進されると思われる。HIV の耐性発現に抵抗し、発現しても他薬剤との交差耐性を有しない新規薬剤の開発は、HIV 感染症患者で長期間ウイルス量を測定感度以下にコントロールし、その結果外来通院による長期加療が更に容易となって、患者の QOL 改善と医療・対費用効果の改善にも大きく貢献すると期待される。

今後も HIV-1 PR 二量体形成に重要とされるアミノ酸の詳細な解析を進め、新しい作用機序である HIV-1 PR 二量体形成阻害剤の開発・構造解析を米国の研究グループと共同で行っていく。また新規 RTI の開発についても同様に米国のグループと共同で継続していく。1 剤で 2 つの作用機序を有する DRV, GRL-98065, -02031, -0216A, -1398A, -0519A といった複数の新規抗 HIV 剤への耐性発現の *genetic barrier* は極めて高く、薬剤耐性 HIV への新たな対応策と考えられる。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表 (2009年度以降)

1. Arun K. Ghosh, Bruno D. Chapsal, Melinda Steffey, Johnson Agniswamy, Yuan-Fang Wang, Masayuki Amano, Irene T. Weber, Hiroaki Mitsuya. Substituent effects on P2-cyclopentyltetrahydrofuranyl urethanes: Design, synthesis, and X-ray

- studies of potent HIV-1 protease inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 22(6): 2308-2311. 2012.
2. Arun K. Ghosh, Bruno D. Chapsal, Garth L. Parham, Melinda Steffey, Johnson Agniswamy, Yuan-Fang Wang, Masayuki Amano, Irene T. Weber, Hiroaki Mitsuya. Design of HIV-1 Protease Inhibitors with C3-Substituted Hexahydrocyclopentafuranyl Urethane as P2-Ligands: Synthesis, Biological Evaluations, and Protein-Ligand X-ray Crystal Structure. *Journal of Medicinal Chemistry*. 54(16): 5890-5901. 2011.
  3. Yasuhiro Koh, Manabu Aoki, Matthew L. Danish, Hiromi Aoki-Ogata, Masayuki Amano, Debananda Das, Robert W. Shafer, Arun K. Ghosh, Hiroaki Mitsuya. Loss of Protease Dimerization Inhibition Activity of Duronavir Is Associated with the Acquisition of Resistance to Darunavir by HIV-1. *Journal of Virology*. 85(19): 10079-10089. 2011
  4. Arun K. Ghosh, Cuthbert D. Martyr, Melinda Steffey, Yuan-Fang Wang, Johnson Agniswamy, Masayuki Amano, Irene T. Weber, Hiroaki Mitsuya. Design of Substituted Bis-tetrahydrofuran (Bis-THF)- Derived Potent HIV-1 Protease Inhibitors, Protein-Ligand X-ray Structure, and Convenient Syntheses of Bis-THF and Substituted Bis-THF Ligands. *ACS Medicinal Chemistry Letters*. 2(4): 298-302. 2011.
  5. Kazuhiko Ide, Manabu Aoki, Masayuki Amano, Yasuhiro Koh, Ravikiran S. Yedidi, Debananda Das, Sofiya Leschenko, Bruno Chapsal, Arun K. Ghosh, Hiroaki Mitsuya. Novel HIV-1 protease inhibitors (PIs) containing a bicyclic P2 functional moiety, tetrahydropyrano-tetrahydrofuran, that are potent against multi-PI-resistant HIV-1 variants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 55(4): 1717-1727. 2011.
  6. Arun K. Ghosh, Bruno D. Chapsal, Abigail Baldrige, Melinda P. Steffey, D. Eric Walters, Yasuhiro Koh, Masayuki Amano, Hiroaki Mitsuya. Design and Synthesis of Potent HIV-1 Protease Inhibitors Incorporating Hexahydrofuropyranol -Derived High Affinity P2 Ligands: Structure-Activity Studies and Biological Evaluation. *Journal of Medicinal Chemistry*. 54(2): 622-634. 2011.
  7. Arun K. Ghosh, Chun-Xiao Xu, Kalapala Venkateswara Rao, Abigail Baldrige, Johnson Agniswamy, Yuan-Fang Wang, Irene T. Weber, Manabu Aoki, Salcedo Gomez Pedro Miguel, Masayuki Amano, Hiroaki Mitsuya. Probing Multidrug-Resistance and

- Protein-Ligand Interactions with Oxatricyclic Designed Ligands in HIV-1 Protease Inhibitors. *ChemMedChem*. 5(11):1850-1854. 2010.
8. Yasuhiro Koh, Masayuki Amano, Tomomi Towata, Matthew Danish, Sofiya, Leshchenko-Yashchuk, Debananda Das, Maki Nakayama, Yasushi Tojo<sup>1</sup>, Arun K. Ghosh, Hiroaki Mitsuya. In Vitro Selection of Highly Darunavir-Resistant and Replication -Competent HIV-1 Variants Using a Mixture of Clinical HIV-1 Isolates Resistant To Multiple Conventional Protease Inhibitors. *Journal of Virology*. 84(22):11961-11969. 2010.
  9. Yasushi Tojo, Yasuhiro Koh, Masayuki Amano, Manabu Aoki, Debananda Das, Sarang Kulkarni, David D. Anderson, Arun K. Ghosh, Hiroaki Mitsuya. Novel protease inhibitors (PIs) containing macrocyclic components and 3(R),3a(S),6a(R)-bis-tetrahydrofuranylurethane that are potent against multi-PI-resistant HIV-1 variants in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 54(8):3460-3470. 2010.
  10. Arun K. Ghosh, Sandra Gemma, Elena Simoni, Abigail Baldrige, D. Eric Walters, Kazuhiko Ide, Yasushi Tojo, Yasuhiro Koh, Masayuki Amano, Hiroaki Mitsuya. Synthesis and biological evaluation of novel allophenylnorstatine-based HIV-1 protease inhibitors incorporating high affinity P2-ligands. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 20(3):1241-1246. 2010.
  11. Arun K. Ghosh, Sarang Kulkarni, David D. Anderson, Lin Hong, Abigail Baldrige, Yuan-Fang Wang, Alexander A. Chumanevich, Andrey Y. Kovalevsky, Yasushi Tojo, Masayuki Amano, Yasuhiro Koh, Jordan Tang, Irene T. Weber, Hiroaki Mitsuya. Design, synthesis, protein-ligand X-ray structure, and biological evaluation of a series of novel macrocyclic human immunodeficiency virus-1 protease inhibitors to combat drug resistance. *Journal of Medicinal Chemistry*. 52(23): 7689-7705. 2009.
  12. Yasuhiro Koh, Debananda Das, Sofiya Leschenko, Hirotomo Nakata, Hiromi Ogata-Aoki, Masayuki Amano, Maki Nakayama, Arun K. Ghosh, Hiroaki Mitsuya. GRL-02031, a novel nonpeptidic protease inhibitor (PI) containing a stereochemically defined fused



cyclopentanyltetrahydrofuran  
potent against multi-PI-resistant  
human immunodeficiency virus  
type 1 in vitro. *Antimicrobial Agents  
and Chemotherapy*. 53(3): 997-1006.  
2009.

2. 学会発表 (2009年度以降・国際学会の  
み)

1. Yasuhiro Koh, M Aoki, M Amano, H  
Ogata-Aoki, S Leschenko-Yashchuk, A  
Ghosh, and H Mitsuya, "The Binary  
Protease Inhibitor, Darunavir, Has a  
High Genetic Barrier to the Emergence  
of Resistant HIV-1 Variants" 17th  
Conference on Retroviruses and  
Opportunistic Infections. February 27 -  
March 2, 2010 in San Francisco, CA No.  
p559.
2. Kazuhiko Ide, Manabu Aoki, Yasuhiro  
Koh, Masayuki Amano, Sarang  
Kulkarni, David D. Anderson, Bruno  
Chapsal, Arun K. Ghosh, and Hiroaki  
Mitsuya, "Novel HIV-1 protease  
inhibitors (PIs) containing  
bis-tetrahydrofuran (*bis*-THF) and a  
novel polycyclic ligand" XVIII  
International AIDS conference, July  
18-23, 2010 in Vienna, Austria, No.  
MOAA0102.
3. Masayuki Amano, Yasuhiro Koh,  
Sadahiro Tamiya, Hiroaki Mitsuya.  
"Degradation of Gag Proteins in Multi-  
-drug-resistant HIV Variants Containing  
Insertions in Gag Proteins" 49th Annual  
Interscience Conference on  
Antimicrobial Agents and  
Chemotherapy (ICAAC), September,  
12-15, 2009, The Moscone Center, San

Francisco, CA, USA.

4. Yasushi Tojo, Yasuhiro Koh, Debananda  
Das, Masayuki Amano, Sarang  
Kulkarni, David Anderson, Arun K.  
Ghosh, Hiroaki Mitsuya. "Macrocyclic  
Component-containing Protease  
Inhibitors (PIs) Active Against  
Multi-PI-Resistant HIV-1 In Vitro" 49th  
Annual Interscience Conference on  
Antimicrobial Agents and  
Chemotherapy (ICAAC), September,  
12-15, 2009, The Moscone Center, San  
Francisco, CA, USA.

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

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

Date of Issuance: December 30, 2008

US Patent Number: 7,470,506

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

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

Appl. No.: 09/720,276

Filed: June 23, 1999

PCT Filed: June 23, 1999

PCT No.: PCT/US99/14119

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

PCT Pub. No.: WO99/67417

PCT Pub. Date: December 29, 1999

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

Date of Issuance: March 4, 2008

US Patent Number: 7,470,506

Erickson; Satoru Kohgo, Kashima-gun (JP);

Hiroshi Ohrai, Sendai (JP); Eiichi Kodama,

Kyoto (JP); Masao Matsuoka, Otsu (JP);

Hiroaki Mitsuya, Kumamoto (JP)

Assignee: Yamasa Corporation, Chiba (JP)

Appl. No.: 11/087,588

Filed: March 24, 2005

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）  
分担研究報告書

新規作用機序，特にウイルス遺伝子発現機構を標的とした抗エイズ薬に関する研究  
‘Cyclin T1 を標的とした抗 HIV-1 阻害剤の *in silico* スクリーニング’

研究分担者 馬場昌範 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 教授  
研究協力者 濱崎隆之 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 プロジェクト研究員

研究要旨：既存の抗エイズ薬における近年の問題点である，薬剤耐性の出現を解決することを目標として，この3年間「Cyclin T1 を標的とした抗 HIV-1 阻害剤の *in silico* スクリーニング」に取り組んだ。平成 21 年度は「Cyclin T1 に対する *in silico* スクリーニングと *in vitro* における抗 HIV-1 活性の評価」に関する研究，平成 22 年度は「Tat と TAR と複合体を形成した cyclin T1 の構造に対する *in silico* スクリーニングと *in vitro* における抗 HIV-1 活性の評価」に関する研究，そして平成 23 年度は「*in silico* スクリーニングにより得られた抗 HIV-1 阻害剤の作用メカニズムの解析」に関する研究を実施した。その結果，HIV-1 の転写過程を阻害する，新規抗 HIV-1 阻害薬のリード化合物の同定に成功した。

#### A. 研究目的

現在，米国 FDA が認可している抗エイズ治療薬は，侵入阻害薬 2 剤，核酸系逆転写酵素阻害薬 7 剤，非核酸系逆転写酵素阻害薬 5 剤，プロテアーゼ阻害薬 10 剤，そしてインテグラーゼ阻害薬 1 剤の合計 25 剤に達する。これらの薬剤を組み合わせたエイズ治療（antiretroviral therapy）により，エイズ患者の予後は著しく改善した。

しかしながら，HIV-1 は，高頻度に変異を起こすことから，これらのほとんどの抗 HIV-1 薬において，耐性ウイルスの出現が報告されている。また，HIV-1 がある薬剤に耐性を獲得すると，その薬剤と同じクラスの薬剤に対しても交叉耐性を示すケースが多い。さらに，既存の抗 HIV-1 薬は感染者の体内からウイルスを完全に除去することができず，HIV-1 産生を抑制するために患者は長期間の治療を必要とし，これが薬剤の慢性毒性を引き起こしている。この

ような理由から，今後とも抗エイズ治療において，新たな作用機序を有する抗 HIV-1 薬の開発が必要である。

HIV-1 の転写過程は，プロウイルス DNA からウイルスゲノム RNA が増幅するステップであり，これは HIV-1 の複製に必須である。しかしながら，この過程を阻害する薬剤はまだ開発されていない。HIV-1 の転写過程は，宿主細胞因子の cyclin T1/CDK9 と HIV-1 由来の Tat タンパク質が複合体を形成し，その後，この複合体が HIV-1 プロウイルスから生成された TAR RNA に移行し，RNA ポリメラーゼ II がリン酸化されることで開始される。さらに近年，この宿主因子とウイルス因子から成る複合体構造が解明され，それらの interface が分子レベルで明らかされた。以上のことから，cyclin T1/CDK9/Tat/TAR RNA 複合体形成阻害は，HIV-1 転写を阻害するための重要な標的の 1 つである。その中でも，cyclin T1 は Tat と TAR

RNA 両方と相互作用し、これらの結合サイトは cyclin T1 上で近接するので、Tat/TAR RNA 結合サイトを標的とした薬剤の開発は、2つの HIV-1 因子の結合を同時に阻害できる可能性を秘めている点で有望であると考えられる。そこで、本研究では、cyclin T1 の Tat/TAR RNA 相互作用領域を標的とした化合物の *in silico* スクリーニングを行い、HIV-1 の転写過程を阻害する、新規作用機序を有する化合物を同定することを目的とした。

## B. 研究方法

**ウイルスおよび細胞株：**HIV-1 として III<sub>B</sub> 株を用いた。急性感染系における抗 HIV-1 アッセイでは、CEM 細胞を用いた。慢性感染系における抗 HIV-1 アッセイでは、HIV-1 慢性感染細胞株である OM-10.1 と U1 細胞を用い、レポーターアッセイには、W-3 細胞と KM-3 細胞を用いた。W-3 細胞と KM-3 細胞は HIV-1 LTR の下流に分泌型アルカリフォスファターゼのレポーター遺伝子が組み込まれている。W-3 細胞における LTR 上の NF- $\kappa$ B 結合サイトは野生型であるが、KM-3 細胞のそれは変異している。細胞は 10% ウシ胎仔血清 (FBS) および抗生物質添加 RPMI 1640 メジウムを用いて継代維持した。

**ヒト cyclin T1 モデルの構築：***In silico* スクリーニングに用いる cyclin T1 の構造は、cyclin T1 が HIV-1 Tat/TAR RNA と複合体を形成した状態を考慮し、equine cyclin T1/equine infectious anemia virus (EIAV) Tat/EIAV TAR RNA 複合体の結晶構造 [Protein Data Bank (PDB) #: 2w2h] を基に、ホモロジー・モデリングを行うことにより構築した。モデリングは、統合計算化学システム Molecular Operating Environment (MOE, Chemical Computing Group Inc.) を用いて実施した。

***In silico* スクリーニング：**コンピュータソフト MOE を用いて 3,000,000 化合物からなる薬

剤データベースから、薬剤として好ましい条件 (分子量：350-600, 水素結合数：< 13, 回転可能な結合数：< 7, logP：0-6) を有する化合物を選別した。ヒト cyclin T1 の結晶構造 (PDB #: 2pk2) と複合体構造 (PDB #: 2w2h) を基に作成したヒト cyclin T1 モデル構造を *in silico* スクリーニングに用いた。それぞれの cyclin T1 構造における Tat/TAR RNA 結合サイトにおいて、低分子化合物が結合すると想定される標的サイトを探索し、そのサイトに対して先に選別した化合物の *in silico* ドッキングを行った。次に、高いドッキングスコアが得られた化合物について、それらの *in vitro* における抗 HIV-1 活性を評価した。

**急性感染系における抗 HIV-1 アッセイ：**薬剤の抗 HIV-1 効果は、感染細胞における細胞変性効果抑制の有無を調べることにより判定した。CEM に HIV-1 を感染させ、種々の濃度の薬剤存在下で培養した。培養 4 日目に、培養液を同じ濃度の薬剤を含む新しい培地で継代し、さらに 3 日間培養した後に、感染細胞の生細胞数を MTT 法にて定量した。

**慢性感染系における抗 HIV-1 アッセイ：**薬剤の抗 HIV-1 効果は、TNF- $\alpha$  刺激された OM-10.1 細胞のウイルス産生を調べることにより判定した。具体的には、種々の濃度の薬剤存在下で OM-10.1 細胞を培養した。24 時間後に TNF- $\alpha$  を培養液に加え、さらに 72 時間培養した。ウイルス産生量は、培養上清中における HIV-1 p24 を ELISA 法により測定した。また、薬剤の細胞毒性は、生細胞数を色素 (MTT) 法にて定量した。

**レポーターアッセイ：**薬剤の HIV-1 転写活性化に与える影響は、TNF- $\alpha$  刺激または Tat 発現プラスミドを導入した W-3 と KM-3 細胞の転写活性化を調べることにより判定した。具体的には、TNF- $\alpha$  刺激または Tat 発現プラスミドを導入した W-3 と KM-3 細胞を、種々の濃度の薬剤存在下で培養した。24 時間後、培養上清

中におけるアルカリフォスファターゼ活性を化学発光法により定量した。また、薬剤の細胞毒性は、生細胞数を色素 (MTT) 法にて定量した。

化合物のドッキングポーズ解析: ドッキングポーズの解析は、コンピュータソフト MOE を用いて実施した。さらに、化合物 1-10 の配座解析を行うとともに、cyclin T1 の Tat/TAR RNA 結合サイトを標的とする docking study を行い、結合エネルギーを算出した。Student t-test により統計解析を行い、p 値を算出した。

#### (倫理面への配慮について)

本研究では、個人が特定出来るようなヒトのサンプルは一切用いていない。

### C. 研究結果

**In silico** スクリーニングに用いた cyclin T1 構造の比較: 本研究では、cyclin T1 の Tat/TAR RNA 結合サイトを標的とする化合物の *in silico* スクリーニングを行うために、2 種類の cyclin T1 構造を用いた。平成 21 年度は、Tat と TAR RNA が結合していない cyclin T1 の構造 (図 1 A, PDB #: 2pk2) を、平成 22 年度は、Tat と TAR RNA と複合体を形成した状態の cyclin T1 の構造 (図 1 B) を用いた。複合体を形成したヒト cyclin T1 の構造が明らかにされていないので、既に構造が解析されている equine cyclin T1/EIAV Tat/TAR RNA (PDB #: 2w2h) を基に、ヒト cyclin T1 の構造を作成した (図 1 C)。*In silico* スクリーニングの標的サイトは、図 1 A と B に赤色と白色の球で示している。いずれの標的サイトも Tat と TAR RNA との結合に必要なアミノ酸残基を含んでいる。図 1 C は、ヒト cyclin T1/Tat/TAR RNA 複合体構造を示し、図 1 B と同方向から見た構造であり、これらの図を比較してもわかるとおり、平成 22 年度に用いた標的サイトは、Tat と TAR RNA が結合するサイトを含んでいる。図 1 D は、Tat と TAR

RNA と結合時または非結合時における cyclin T1 の立体構造の違いを示している。赤の円で示すように、Tat と TAR RNA が結合することで、標的サイトに大きな構造変化が観察された。

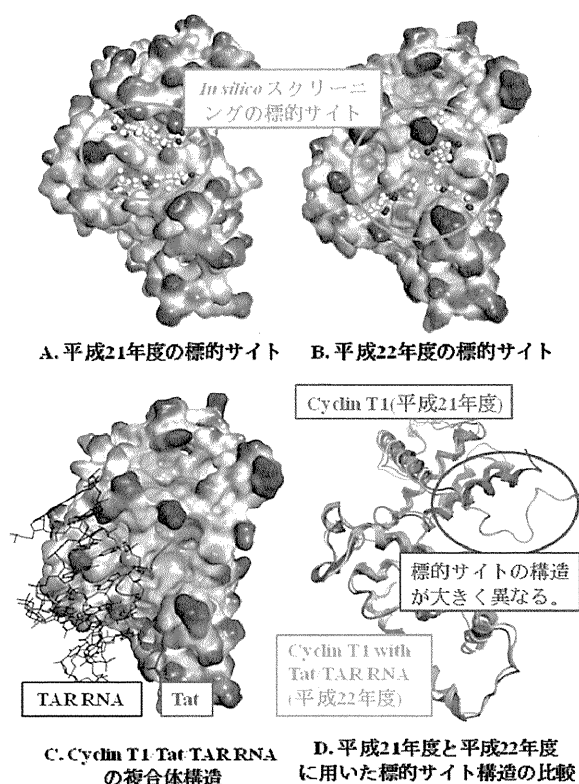


図 1. *In silico* スクリーニングの標的サイト

**Tat と TAR RNA 非結合時における cyclin T1 に対する *in silico* スクリーニングと抗 HIV-1 活性の評価:** 図 1 A の標的サイトに対して化合物ライブラリの *in silico* スクリーニングを行い、結合エネルギーが最適な 254 化合物を合成し、*in vitro* における抗 HIV-1 活性を CEM 細胞を用いた HIV-1 III<sub>B</sub> 急性感染系で評価したところ、3 種の化合物 (化合物 A, B と C) において抗 HIV-1 活性が見られた (図 2)。一方で、これらの化合物の抗 HIV-1 活性を慢性感染系で評価したところ、これらの化合物は、抗 HIV-1 活性を示さなかった (data not shown)。このことから、これらの化合物は、慢性感染系では活性が弱いか、あるいは転写以外のステップを阻

害している可能性が考えられた。

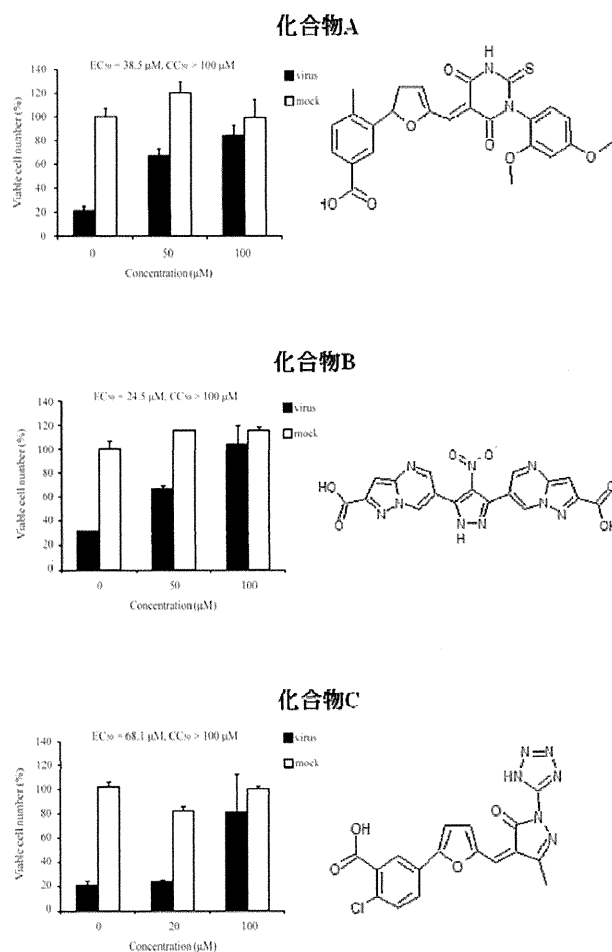


図 2. Tat/TAR RNA 非結合時における cyclin T1 に対する *in silico* スクリーニングにより得られた化合物の抗 HIV-1 活性と化学構造

Tat と TAR RNA 結合時における cyclin T1 に対する *in silico* スクリーニングと抗 HIV-1 活性の評価: 図 1 B の標的サイトに対して化合物ライブラリの *in silico* スクリーニングを行い、結合エネルギーが最適な 124 化合物を合成し、*in vitro* における抗 HIV-1 活性を急性感染系の OM-10.1 細胞で評価したところ、3 種の化合物 (化合物 1, 2 と 3) において抗 HIV-1 活性が見られた (図 3)。

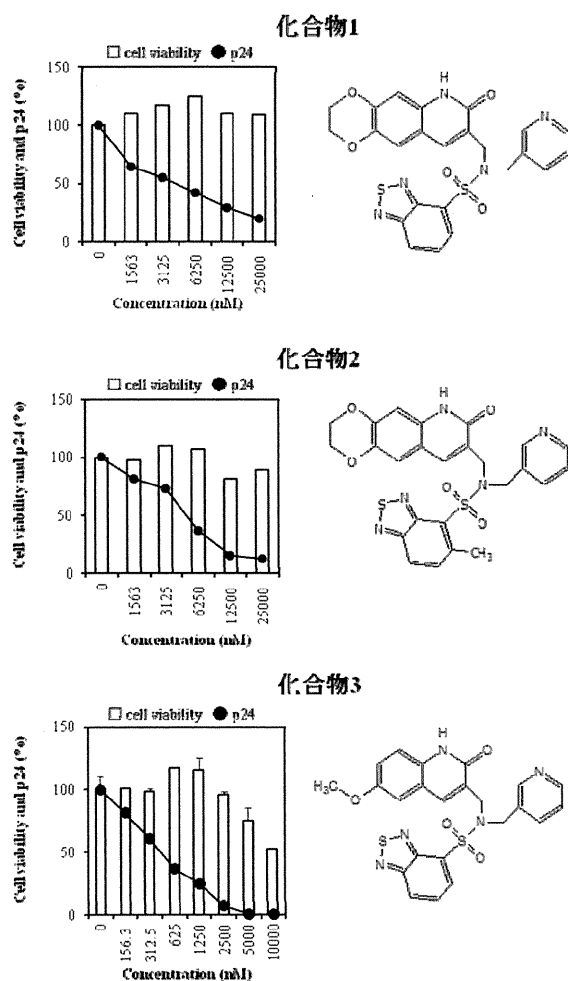


図 3. Tat/TAR RNA 結合時における cyclin T1 に対する *in silico* スクリーニングにより得られた化合物の抗 HIV-1 活性と化学構造

さらに、抗 HIV-1 活性が最も強かった化合物 3 について、TNF- $\alpha$  または Tat による HIV-1 LTR の転写活性化に対する効果をレポーターアッセイにより調べたところ、化合物 3 は W-3 細胞と KM-3 細胞において、TNF- $\alpha$  によるアルカリフォスファターゼ産生に影響を与えなかったが、Tat の導入によるアルカリフォスファターゼ産生を減少させた (図 4)。これらの結果から、化合物 3 は Tat により誘導される HIV-1 LTR の転写活性化を選択的に阻害することを示している。

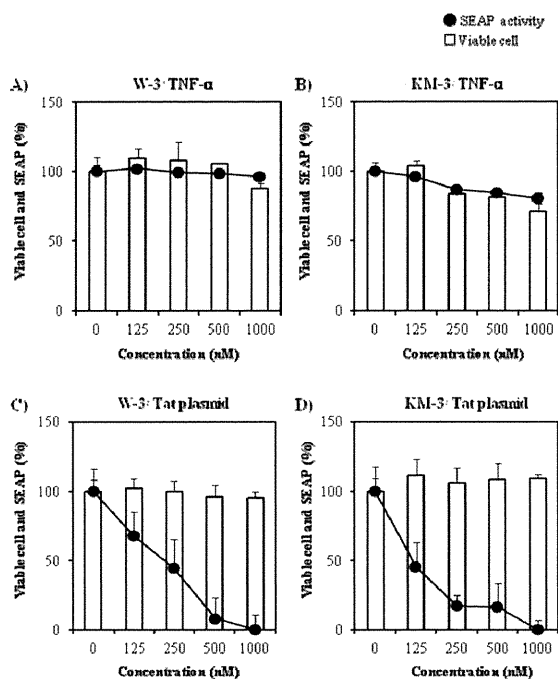


図 4. TNF- $\alpha$  または Tat による HIV-1 LTR 転写活性化に対して化合物 3 が与える影響

化合物 3 とその類似体の構造活性相関: 化合物 1, 2, 3 と 7 種類の類似体の化学構造と抗 HIV-1 活性をまとめた (図 5)。図 5 の化合物 2 と C-5 の構造を比較すると、化合物 2 のオレンジ色で示した pyridine 基が C-5 のように置換すると抗 HIV-1 活性が失われることから、この位置における pyridine 基が必要であることが分かる。また、化合物 3 と C-2, C-3, C-4 の比較において、青色で示した benzothiadiazole 基が置換することでも、抗 HIV-1 活性が失われることから、この位置における benzothiadiazole 基も必要である。また、化合物 1, 2 から化合物 3 の緑色で示した methoxyquinolin 基に変換することで抗 HIV-1 活性が増加した。以上のことから、化合物 3 の合成展開には、pyridine 基と benzothiadiazole 基を保持しつつ、methoxyquinolin 基を置換した合成展開を行うことで、化合物 3 の抗 HIV-1 活性の改善が期待される。

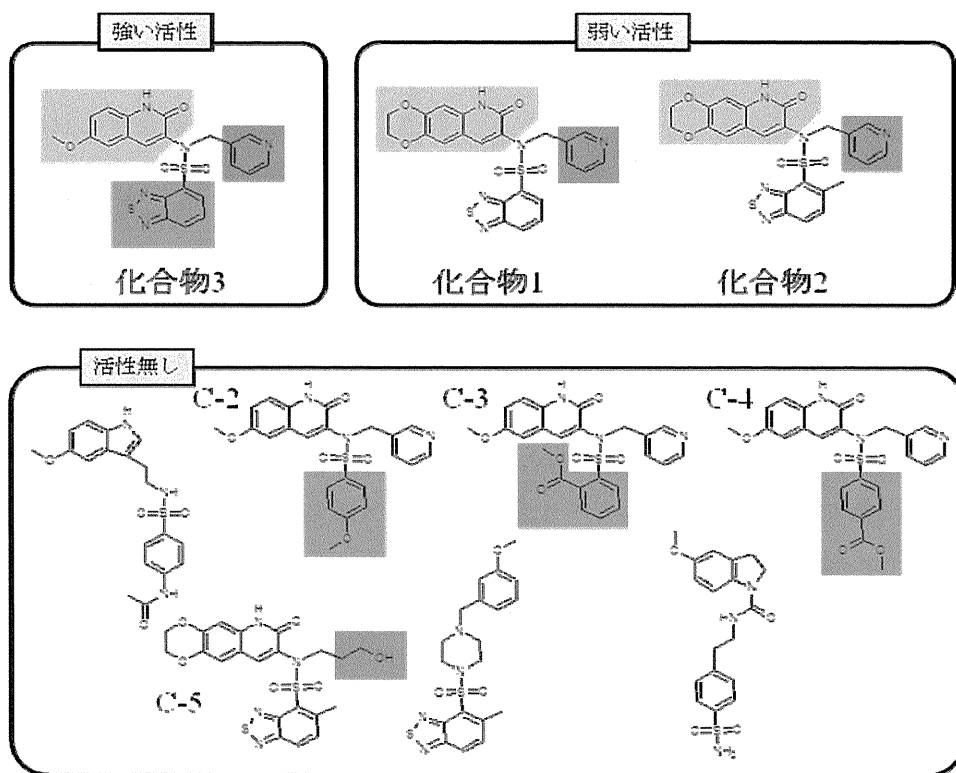


図 5 本研究で同定されたシリーズの構造活性相関のまとめ

化合物 3 のドッキングポーズ解析: 化合物 3 のドッキングポーズを推測するために, 化合物 3 と化合物 1, 2 と活性が見られなかった 7 種の構造類似体の *in silico* における結合エネルギーを比較したところ, 図 6 に示すように化合物 3 は, 2 種類のドッキングポーズをとることが示された。さらに, これらの結果と *in vitro* における抗 HIV-1 活性を比較したところ, ドッキングポーズ 1 が化合物 3 とその類似体の結合エネルギーと抗 HIV-1 活性において相関性が見られた。

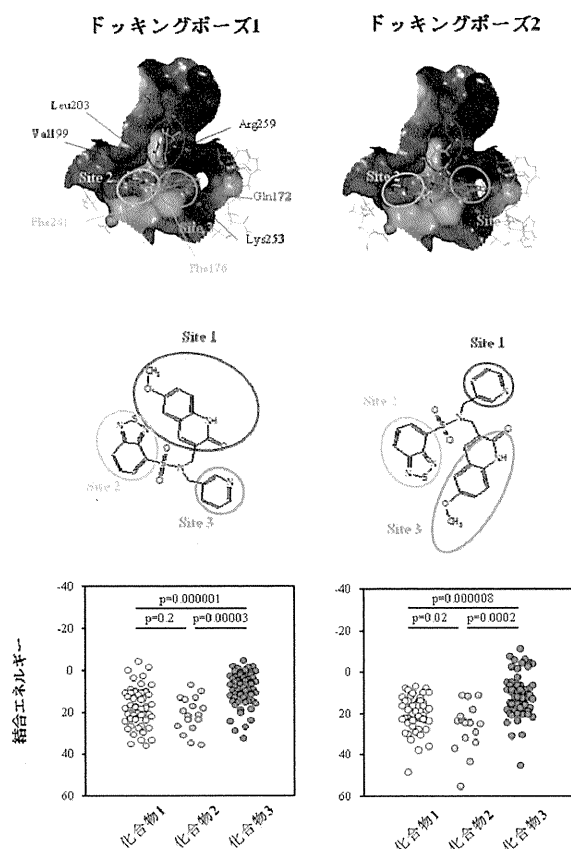


図 6. 化合物 3 と cyclinT1 のドッキングポーズ

#### D. 考察

現在, 抗エイズ治療で用いられている薬剤のほとんどは, 耐性ウイルスの出現が報告されており, 今後の抗エイズ治療において新たな作用機序を有する薬剤の開発が必要である。そこで, 本研究は, 既存の耐性 HIV-1 に対しても有効な

新規薬剤を開発するために, これまで成功していない HIV-1 の転写を標的とした薬剤開発の基礎研究を行うことを目的としている。

これまでの研究において, HIV-1 Tat/TAR RNA との複合体を形成していない, または形成した cyclin T1 の構造を標的として, 3,000,000 化合物の *in silico* スクリーニングを行い, ドッキングスコアの良い化合物の *in vitro* での抗 HIV-1 活性を評価した。複合体を形成していない cyclin T1 からは, HIV-1 急性感染系において抗 HIV-1 活性を示す化合物が得られたが, これらの化合物は, HIV-1 慢性感染系では活性を示さなかった。一方で, 複合体を形成した cyclin T1 の構造からは, 慢性感染系において, 抗 HIV-1 活性を示す化合物が得られ, さらにそれらの化合物のうち, 化合物 3 は, Tat による HIV-1 LTR の転写活性化を選択的に阻害することも示された。従って, HIV-1 Tat/TAR RNA と複合体を形成した際の cyclin T1 の構造は, 複合体非形成時の cyclin T1 より *in silico* スクリーニングの標的構造として適していると思われる。

また, 本研究では cyclin T1 を標的とした抗 HIV-1 転写阻害剤を開発するためのリード化合物の構造活性相関とドッキングポーズを検討した。構造活性相関のデータから, 化合物 3 の pyridine 基と benzothiadiazole 基は, 特にその抗 HIV-1 活性に重要であることが考えられ, ドッキングポーズ 1 において, それぞれ標的サイトの Site 3 と Site 2 にはまり込んでいた。また相互作用解析から, 化合物 3 の pyridine 基と benzothiadiazole 基は, それぞれ cyclin T1 の F241 と K253 と結合することが示された。一方で, 化合物 3 の methoxyquinolin 基は, 化合物 3 を合成展開していく上で, 置換可能な側鎖であるが, ドッキングポーズ 1 において, methoxyquinolin 基は, Tat との相互作用に重要な cyclin T1 の R259 と直接相互作用していた。以上のことから, 本研究が同定した化合物 3



は、cyclin T1 の Tat/TAR RNA 相互作用サイトに結合し、Tat による HIV-1 LTR の転写活性を阻害し、HIV-1 産生を抑制する新規抗 HIV-1 転写阻害剤であると考えられる。今後は、より活性の優れた抗 HIV-1 転写阻害剤を開発するために、今後、これらの相互作用も考慮しつつ、合成展開を進めていく必要がある。

## E. 結論

3 年間にわたる研究において、cyclin T1 を標的とした *in silico* スクリーニングにより、HIV-1 の Tat 依存型の抗 HIV-1 転写阻害剤の開発を試みてきた。そのうち、化合物 3 は、慢性感染系からの HIV-1 産生を阻害し、Tat による HIV-1 LTR の転写活性化を抑制した。さらに、化合物 3 を基にした三次元的な構造活性相関を明らかにした。本研究において得られたこれらの研究データは、HIV-1 転写阻害剤開発において有用な情報を与えるとともに、今後の新規抗エイズ薬の開発に貢献すると思われる。

## F. 研究発表

### (論文発表)

1. Baba M. Entry inhibitors of human immunodeficiency virus. In: LaFemina RL (Ed), *Antiviral Research: Strategies in Antiviral Drug Discovery*, pp. 19-32, ASM Press, Washington, DC (2009).
2. Wang X, Tanaka H, Baba M, Cheng Y-C. Study of the retention of metabolites of 4'-Ed4T, a novel anti-HIV-1 thymidine analog, in cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**: 3317-3324 (2009).
3. Kubota Y, Ishizaki N, Kaneda Y, Haraguchi K, Odanaka Y, Tanaka H, Kato N, Baba M, Balzarini J. Synthesis and antiviral evaluation of 4'-alkoxy analogues of 9-( $\beta$ -D-xylofuranosyl)adenine. *Antiviral Chem. Chemother.* **19**: 201-212 (2009).
4. Yang G, Paintsil E, Dutschman GE, Grill SP, Wang C-J, Wang J, Tanaka H, Hamasaki T, Baba M, Cheng Y-C. Impact of novel human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase mutations P119S and T165A on 4'-ethynylthymidine analog resistance profile. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**: 4640-4646 (2009).
5. Kumamoto H, Haraguchi K, Ida M, Nakamura KT, Kitagawa Y, Hamasaki T, Baba M, Shimbara-Matsubayashi S, Tanaka H. Synthesis of ( $\pm$ )-4'-ethynyl-5',5'-difluoro-2',3'-dehydro-3'-deoxycarbocyclic thymidine: a difluoromethylidene analogue of promising anti-HIV agent Ed4T. *Tetrahedron* **65**: 7630-7636, (2009).
6. 馬場昌範. 逆転写酵素阻害薬とプロテアーゼ阻害薬. 満屋裕明 (編集)「HIV 感染症と AIDS」pp141-148, 最新医学別冊 (2010).
7. 馬場昌範. 新薬の開発状況. 特集「エイズの現状 ; 社会的影響への考察も含めて」. *Pharma Medica* **27**: 45-49 (2009)
8. 馬場昌範. HIV 感染症/AIDS 治療の進歩の展望—HIV のアキレス腱は他にもあるか—. *血液フロンティア* **20**: 2167-2173 (2010).
9. Aoyama H, Sugita K, Nakamura M, Aoyama A, Salim MTA, Okamoto M, Baba M, Hashimoto Y. Fused heterocyclic amino compounds as anti-hepatitis C virus agents. *Bioorg. Med. Chem.* **19**:2675-2687 (2011).
10. Hamasaki T, Toyama M, Aoyama H, White Y, Okamoto M, Arima N, Hashimoto Y, Baba M. Selective inhibition of HTLV-1-infected cell proliferation by a novel tetramethylnaphthalene derivative. *Anticancer Res.* **31**:2241-2248 (2011).
11. Nishioka H, Uesugi K, Ueda N, Kondo Y,

- Ysuji M, Abe H, Harayama T, Hamasaki T, Baba M, Takeuchi Y. Synthesis and anti-human immunodeficiency virus activity of the skeleton isomers of 3',4'-di-(O)-(-)-camphanoyl-(+)-khellactone. *Chem. Pharm. Bull.* 59:1075-1076 (2011).
12. Haraguchi K, Shimada H, Kimura K, Akutsu G, Tanaka H, Abe H, Hamasaki T, Baba M, Gullen EA, Dutschman GE, Cheng Y-C, Balzarini J. Synthesis of 4'-ethynyl-2'-deoxy-4'-thioribonucleosides and discovery of a highly potent and less toxic NRTI. *ACS Med. Chem. Lett.* 2:692-697 (2011).
  13. Isono Y, Sakakibara N, Ordonez P, Hamasaki T, Baba M, Ikejiri M, Maruyama T. Synthesis of 1-benzyl-3-(3,5-dimethylbenzyl)uracil derivatives with potential anti-HIV activity. *Antiviral Chem. Chemother.* 22: 57-65 (2011).
  14. Salim MTA, Aoyama H, Sugita K, Watashi K, Wakita T, Hamasaki T, Okamoto M, Urata Y, Hashimoto Y, Baba M. Potent and selective inhibition of hepatitis C virus replication by novel phenanthridinone derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 415:7140719 (2011).
  15. Ordonez P, Hamasaki T, Isono Y, Sakakibara N, Ikejiri M, Maruyama T, Baba M. Anti-human immunodeficiency virus type 1 activity of novel 6-substituted 1-benzyl-3-(3,5-dimethylbenzyl)uracil derivatives. *Antimicrob Agents Chemother.* in press.
- 月 4 日, 東京.
2. Hamasaki T, Baba M. In silico screening for anti-HIV-1 compounds targeting cyclin T1. *49th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, September 15, 2009, San Francisco, USA.
  3. Baba M, Wang X, Cheng Y-C, Matsuda T, Urata Y, Tanaka H. 4'-Ethynyl-d4T (4'-Ed4T), a nucleoside reverse transcriptase inhibitor with favorable safety and pharmacokinetic profiles in vitro and in vivo. *10th Kumamoto AIDS Seminar, GCOE Joint International Symposium*, September 28, 2009, Kumamoto, Japan.
  4. 濱崎隆之, 馬場昌範. Cyclin T1 を標的とした HIV-1 転写阻害剤のスクリーニング. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 2009 年 10 月 26 日, 東京.
  5. Ordonez P, Hamasaki T, Isono Y, Ikejiri M, Sakakibara N, Maruyama T, Baba M. Design, synthesis and anti-HIV-1 evaluation of novel substituted uracil derivatives as potent NNRTIs. *5th German-Japanese HIV-Symposium*, May 10 2010, Tokyo, Japan.
  6. 馬場昌範. 新しいクラスの逆転写酵素阻害薬 4'-ethynyl-d4T. 第 19 回抗ウイルス療法研究会シンポジウム「HIV 感染症/AIDS 治療の最前線」, 2010 年 5 月 20 日, 熊本.
  7. Ordonez P, Hamasaki T, Isono Y, Ikejiri M, Sakakibara N, Maruyama T, Baba M. Design and synthesis of novel substituted uracil derivatives as potential reverse transcriptase inhibitors for therapy and prevention against HIV-1 infection. *18th International AIDS Congress*. July 19, 2010, Vienna, Austria.
  8. Ordonez Paula, Takayuki Hamasaki, Masanori Baba, Mika Okamoto. Identification of cellular factors differentially expressed during HIV-1 latency and reactivation. 第 24 回日本エイズ

(学会発表)

1. 原口一広, 島田 央, 阿久津源太, 木村圭吾, 田中博道, 濱崎隆之, 馬場昌範, Gullen EA, Dutschman GE, Cheng Y-C, Balzarini J. 4'-C-エチニル-2'-デオキシ-4'-チオヌクレオシドの合成とその抗 HIV 活性. 第 19 回抗ウイルス療法研究会, 2009 年 6

- 学会学術集会, 2010年11月25日, 東京
9. 濱崎隆之, 岡本実佳, 馬場昌範. Cyclin T1/Tat/TAR RNA 複合体中の cyclin T1 を標的とした薬剤の *in silico* スクリーニング. 第24回日本エイズ学会学術集会, 2010年11月25日, 東京.
  10. Hamasaki T, Okamoto M, Baba M. *In silico* screening of compounds targeting human cyclin T1 and in vitro evaluation of their anti-HIV-1 activity. *24th International Conference on Antiviral Research*, May 9, 2011, Sofia, Bulgaria.
  11. Okamoto M, Chono H, Tsuda H, Inoue K, Mineno J, Baba M. Long-Term Inhibition of HIV-1 Replication in CD4<sup>+</sup> T cells transduced with a retroviral vector conditionally expressing the *Escherichia Coli* endoribonuclease MazF. *24th International Conference on Antiviral Research*, May 9, 2011, Sofia, Bulgaria.
  12. Ordonez P, Hamasaki T, Baba M., Okamoto M. Differential expression of host cellular factors upon HIV-1 reactivation. *24th International Conference on Antiviral Research*, May 9, 2011, Sofia, Bulgaria.
  13. 馬場昌範. 核酸系逆転写酵素阻害薬フェステイナビル. 第25回日本エイズ学会学術集会, 2011年12月2日, 東京.
- G. 知的財産権の出願・登録状況**
1. 馬場昌範, 濱崎隆之. 抗 HIV 薬とその用途. 出願人: 鹿児島大学, 特願 2011-07084, 2011年2月28日出願.

HIV の薬剤耐性機構

研究分担者 松岡 雅雄 京都大学ウイルス研究所 教授

研究要旨

T20 耐性ウイルスにも効果を示す次世代融合阻害剤である SC34 や SC34EK の耐性プロファイルを解析した結果、これまで特に重要であると考えられてきた gp41 C-HR や N-HR に加えて、gp41 のより C 末端側に位置する cytoplasmic tail (CT) や gp120 領域に変異が導入されていた。耐性度解析の結果、gp41 C-HR や N-HR 内の変異は主に耐性度に関与し、gp120 領域内の変異は複製能の改善に働いていることを明らかにした。また、CT 領域内の変異により T-20 や SC34EK に約 3~8 倍の耐性を付与する結果が得られたことから、CT 変異は直接融合阻害剤の耐性に関与していることが明らかとなった。以上の結果から、次世代融合阻害剤の耐性獲得機序は多岐にわたることが示された。

A. 研究目的

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) のエンベロープタンパクである gp120 および gp41 は、HIV が標的細胞に感染する際の初期ステップである吸着・侵入・融合反応において重要な役割を果たしている。HIV gp120 は標的細胞表面上に発現している CD4 を主受容体として認識し、続いて CXCR4 や CCR5 等のケモカインレセプターとの相互作用を経て、自身の構造変化を誘導する。その結果、折りたたまれていた HIV gp41 が露出し、gp41 の N 末端に位置する疎水性アミノ酸領域が細胞膜に貫通する。続けて起こる HIV と標的細胞との膜融合反応では、gp41 の N 末端ヘリックス領域 (N-terminal heptad repeat: N-HR) と C 末端ヘリックス領域 (C-terminal heptad repeat: C-HR) が安定的な六量体を形成することにより、HIV エンベロープと標的細胞膜が近接し、膜融合反応が進行すると考えられている。

HIV と標的細胞の膜融合反応を標的とした融合阻害剤 enfuvirtide (T-20) は、主にサルベージ療法で広く臨床使用されている。T-20 は gp41 C-HR のアミノ酸配列を由来とするペプチド製剤であり、N-HR と C-HR の相互作用時に、T-20 がデコイとしてウイル

ス C-HR と競合することにより膜融合反応を阻害し、抗 HIV-1 活性を示す。T-20 は既存のクラスの薬剤に耐性を示す変異株に対しても優れた効果を発揮しているが、他の抗 HIV 薬と同様、長期にわたる使用により耐性ウイルスが出現し、治療上の大きな障害となっている。また、現在臨床で使用できる融合阻害剤は T-20 のみであることから、T-20 耐性株の出現により、他のクラスの薬剤に変更せざるを得ない。このような背景から、T-20 耐性 HIV-1 にも効果を示す次世代の融合阻害剤の開発が強く望まれている。

もう一つの C-HR 由来ペプチドである C34 は *in vitro* において T-20 より効果的にウイルスの融合を阻害することが知られている。そこで分担研究者らはこの C34 を基盤に、アミノ酸置換を導入することによって、SC34 や SC34EK といった、高活性の誘導体を創製することに成功した。これらの融合阻害剤は優れた抗 HIV-1 活性を示し、T-20 に対する耐性 HIV-1 を効果的に抑制することを明らかにしてきた。この結果から、第一世代融合阻害剤の T-20 と、次世代融合阻害剤の SC34 や SC34EK では耐性プロファイルが異なることが推測される。そこで、本研究では、*in vitro* における SC34 や SC34EK