

201210005A

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）平成24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25(2013)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24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24年度 総括・分担研究報告書—

研究代表者 杉浦 互

平成25(2013)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

新規HIV-1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

抗HIVタンパク質アクチノヒビンの実用化研究 18

抗HIVタンパク質アクチノヒビンのHIV/AIDS感染予防薬・治療薬としての開発研究

研究分担者：田中 晴雄

いわき明星大学薬学部薬学科 教授

新規抗HIV薬剤の合成展開および安全性の評価 24

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二つの化合物の実用化に取り組んだ。一つは低分子化合物群T-Yであり、 IC_{50} 値が10nM以下でかつ高い選択性を示す。この化合物の作用機序は既存薬剤と異なることは明白であるが、分子標的の特定はできておらず、解析の結果、HIVの「初期転写」を阻害することまでは確認することができた。今までのところ小動物を用いた反復投与実験では重篤な毒性は観察されていない。もう一つの化合物はHIV envelope gp120に作用して強力なHIV侵入阻害活性を呈する化合物アクチノヒビン (AH) であり、カニクイザルの経直腸SHIV感染モデルでの感染予防効果の確認を行った。

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薬剤の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向けた取り組みを実施する。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)) を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)

AHの感染予防効果の評価を昨年度構築したカニクイザルの経直腸SHIV感染モデルを用いて行う。1%ヒドロキシエチルセルロース (HEC) のみのプラセボ群 (3頭) と1%HEC+1%AH投与を行ったAH群 (3頭) それぞれにSHI-KS661を2000TCID₅₀の攻撃接種を行い、その後26週まで血中SHIV量とCD4⁺細胞数の推移を観察する。

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

今年度新たに合成した15化合物のうち、3化合物にIC₅₀<10nMの抗HIV活性が認められた。このうちの一つの化合物 (化合物G) について、ラットにて2週間反復投与したが、血液学、血液生化学検査結果含めて、とくに重篤な毒性所見は認められなかった。(野村)

T-Y化合物の阻害機序に関しては今までの解析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が明らかとなっている。本年度

はより理解を深めるため、昨年度より濃度幅を広げ、既存の薬剤との比較も併せて行った。その結果T-YおよびT-Y3は転写因子の活性化からマチュレーションが起こるまでの過程に作用ポイントがある事が確認された。

(2) AH実用化研究 (田中)

AHの直腸感染予防実験の準備を行った。成熟型AHの調整法の改良を行いN末にリンカーが残っているAHの除去に成功した。PEG化修飾AHの調整、さらに抗HCV活性についても評価を行った結果AHはHCVにも阻害効果を示すことが明らかになった。

(3) 霊長類評価研究 (明里)

AHによる感染予防効果をサルモデルにおいて評価をおこなった。プラセボ群 (3頭) およびAH投与群 (3頭) にSHIVを攻撃接種したところ、プラセボ群では全個体がSHIVに感染したが、AH投与群の一部の個体で感染防御が認められた。

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

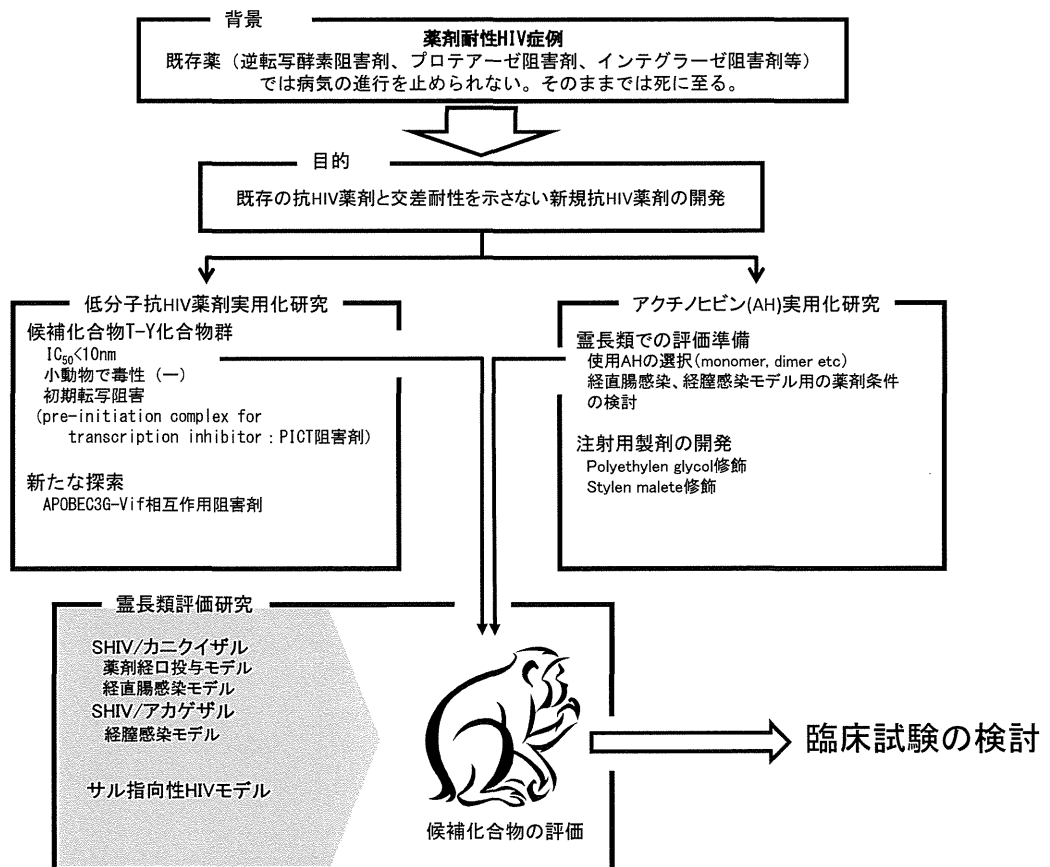


図1 新規な機序による抗HIV薬剤の開発研究

耐性により治療困難に陥っている症例に新たな選択肢を提供できると期待される。本年度は今まで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その立証を行ったが、特定の分子標的の同定には至らなかった。その強力なHIV複製阻害活性と高い選択性は間違いなく初期転写に関わる因子に作用しており、かつ複数の標的が存在していることを示唆している。今後実用化に駒を進める上で最も重要なことは毒性の評価であり、複数の動物種での反復投与による確認が必要である。

AHに関しては標的はHIVのenvelope gp120の高マンノース型糖鎖であることがはっきりしており、その構造学的な作用機序も仔細に解析され明らかにされている。AHの実用化に向けての課題は、AHをどのような目的で用いるかということであり、予防剤として使用するのかあるいは治療薬剤として用いるのか熟考が必要である。本年度実施したサル感染モデルによる経直腸SHIV感染予防実験はAHの予防剤としての可能性を指示するものである。

今、国際エイズ連盟は「AIDS Free Generation (エイズ無き世代)」を実現しようということで、HIV感染症の「cure (根治)」と「eradication (根絶)」を目標に掲げて活発な啓発活動と研究支援に乗り出しているが、我々の研究班が取り組んでいる二つの候補化合物、T-Y化合物とAH、はそれぞれ「cure」と「eradication」を実現させる可能性を秘めた今までに無い新規な化合物であり、今後も引き続き実用化を目指して研究を進めていきたいと考えている。

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 (予定を含む)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

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

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

前島 雅美

名古屋医療センター臨床研究センター感染・免疫研究部 研究補助員

長期化するHIV感染症治療において既存薬とは異なる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が必要である。本分担研究では、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化合物の作用メカニズムの解析を行った。潜伏感染細胞を用いた解析を行った結果、候補化合物T-Yおよび類縁化合物T-Y3は抗HIV効果を示し、候補化合物の作用ポイントがTNF α による転写因子の活性化から転写初期までの間にあることが示唆された。

A. 研究目的

これまで、本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。本分担研究では、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きた。

これまでの研究から、作用ポイント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が明らかになっている。本年度は、引き続き作用点の絞り込み作業を行った。

B. 研究方法

(1) HIV-1 潜伏感染細胞株を用いたウイルス抑制効果の評価

TNF α 刺激によりウイルス産生が活性化されるHIV-1潜伏感染細胞株OM10.1細胞 (HL-60細胞由来)、U1細胞 (U937細胞由来)を用いた。TNF α 、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。

(2) HDAC活性の測定

ヒストンの脱アセチル化により転写制御を行うHistone Deacetylase (HDAC)の活性に対する影響を調べるため、HDAC-Glo I/II assay Kit、SIRT-Glo assay Kit (Promega社)を使用し、クラスI&IIおよびクラスIIIのHDACの活性を測定した。

C. 研究結果

(1) 潜伏感染細胞株における薬剤効果の検討

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、昨年度に引き続き、潜伏感染細胞株OM10.1細胞、U1細胞を用いて解析を行った。この細胞株は、TNF α 刺激によりシグナルが活性化され転写が促進されることにより、ウイルス産生が活性化される。本年度はより理解を深めるため、昨年度より濃度幅を広げ、既存の薬剤との比較も併せて行った。刺激を与えた潜伏感染細胞に候補化合物および既存の抗HIV薬を添加した結果、T-Yおよび類縁化合物T-Y3は濃度依存的にp24の産生を抑制していた (図1)。既存の薬剤では、NRTIであるAZT、NNRTIであるEFV、INSTIであるRALはp24産生を抑制しないのに対して、PIであるDRVは濃度依存的に抑制効果を示した。これはTNF α 刺激により活性化される潜伏感染細胞株におけるウイルス産生が、TNF α による転写因子の活性化からマチュレーションの過程に対する影響のみを反映する事に起因する。このような特性から、T-YおよびT-Y3は転写因子の活性化からマチュレーションが起るまでの過程に作用ポイントがある事が確認された。

(2) HDAC活性に対する薬剤効果の検討

HDACは4つのクラスに分類されるヒストンの脱アセチル化酵素であり、HDAC阻害剤は潜伏感染細胞株において再活性化を示す。T-Y化合物のエピジ

エネティックな働きを確認するため、HDACの活性を測定し影響を調べた。その結果、HDACクラスI&II (図2)、クラスIII (図3) 共に、HDAC阻害剤

SAHAが抑制効果を示したのに対し、T-Y化合物および類縁化合物T-Y3は高濃度においても抑制効果を示さなかった。

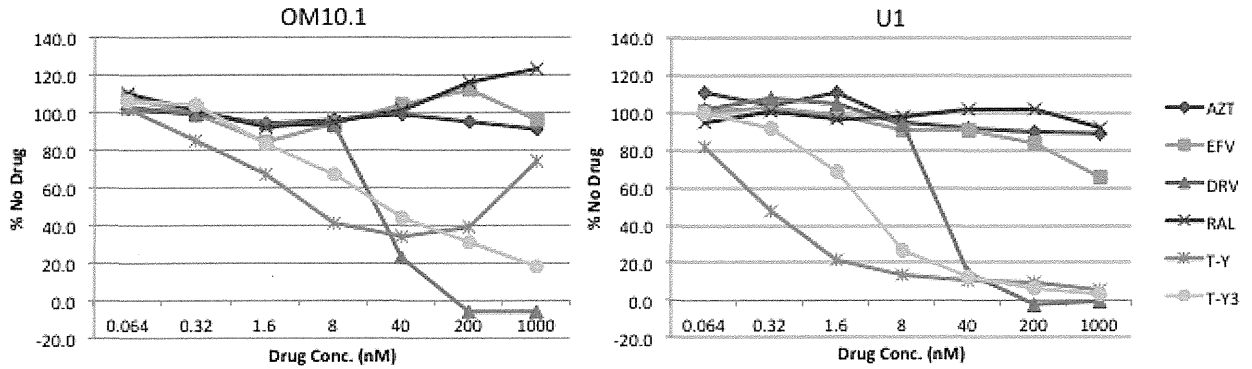


図1 TNF α 刺激により活性化されたHIV-1 潜伏感染細胞株におけるウイルス産生抑制効果

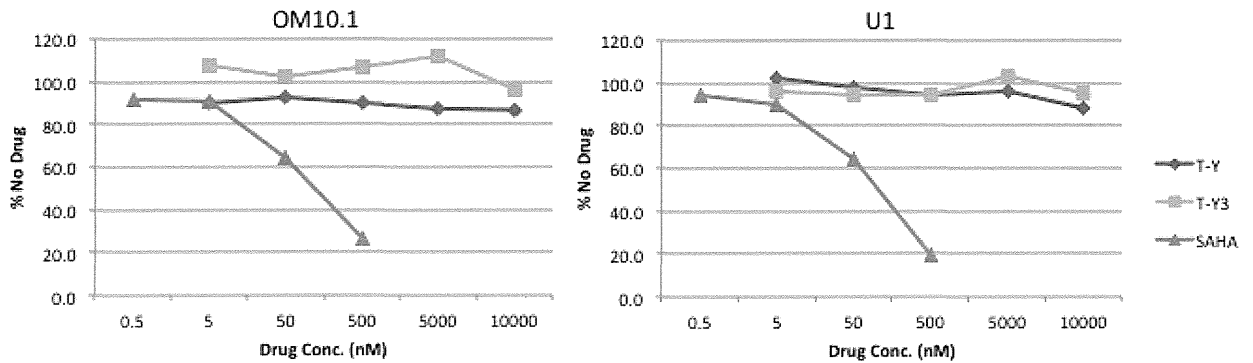


図2 HDAC クラスI&II の活性抑制効果

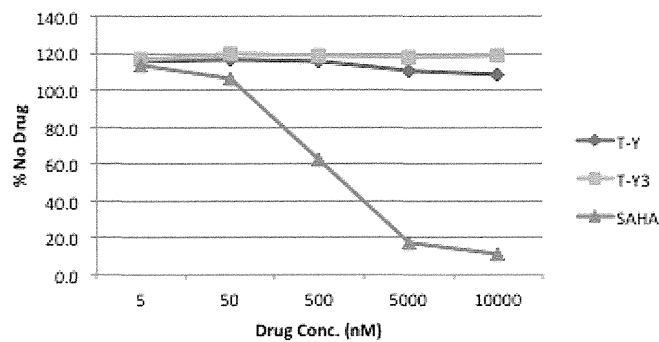


図3 HDAC クラスIII (SIRT) の活性抑制効果

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のメカニズムを解明するために研究を行った。これまでの解析で、T-Y化合物の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が明らかとなっている。また、T-Y化合物のリード化合物においては、Gagのプロセシングやウイルス粒子のパッケージングに影響しない事が示唆されている。さらなる標的部位の絞り込みのため、潜伏感染細胞株を用いて検討を行った。その結果、候補化合物はDRVと同様に濃度依存的にウイルス増殖抑制効果を示し、転写因子の活性化からマチュレーションが起こるまでの過程に作用ポイントがあることが確認された。HDAC活性を測定したが、クラスI、IIおよびIIIのHDACにおいてその影響は示されなかった。以上の結果から、作用ポイントは転写因子の活性化からパッケージング前のステップにある事が再確認され、HDACとは関係しない事が示唆された。

今後、さらにターゲットを絞り込むため、転写因子やその働きに関係するシグナル伝達関連物質への影響を、エピジェネシスを含め明らかにしたいと考えている。また、プロセシングやパッケージングを含めたステップについてはリード化合物を用いたデータのみであるため、T-Y化合物においても確認する必要がある。さらに、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。よって、抗HIV効果と同時に、この再活性化効果についてもメカニズムを明らかにする必要があると考えている。

E. 結論

候補化合物T-Yおよび類縁化合物T-Y3が、転写因子の活性化から転写初期のステップにおいて作用するが、HDACとは関係しない事が示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 原著論文

- 1) Jahanbakhsh F, Ibe S, Hattori J, Monavari SHR, Matsuda M, Maejima M, Iwatani Y, Memarnejadian A, Keyvani H, Azadmanesh K, Sugiura W. Molecular epidemiology of HIV-1 infection in Iran: genomic evidence of CRF35_AD predominance and CRF01_AE infection among individuals associated with injection drug use. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 29: 198-203.2013
- 2) Bunupuradah T, Imahashi M, Iampornsin T, Matsuoka K, Iwatani Y, Puthanakit T, Ananworanich J, Sophonphan J, Mahanontharit A, Naoe T, Vonthanak S, Phanuphak P, Sugiura W: On Behalf Of The Predict Study Team. Association of APOBEC3G genotypes and CD4 decline in Thai and Cambodian HIV-infected children with moderate immune deficiency. *AIDS Res Ther*. 24;9(1):34. 2012.
- 3) Tsuzuki T, Iwase H, Shimada M, Hirashima N, Hibino Y, Ryuge N, Saito M, Tamaki D, Kamiya A, Yokoi M, Yokomaku Y, Fujisaki S, Sugiura W, Goto H: Clinical evaluation of peginterferon alpha plus ribavirin for patients co-infected with HIV and HCV at Nagoya Medical Center. *Nihon Shokakibyō Gakkai zasshi = The Japanese journal of gastroenterology*. 109(7): 1186-1196.2012.
- 4) Ode H, Nakashima M, Kitamura S, Sugiura W, Sato H. Molecular dynamics simulation in virus research. *Frontiers in microbiology*. 3:258. 2012.
- 5) Miyamoto T, Nakayama EE, Yokoyama M, Ibe S, Takehara S, Kono K, Yokomaku Y, Pizzato M, Luban J, Sugiura W, Sato H, Shioda T: The Carboxyl-Terminus of Human Immunodeficiency Virus Type 2 Circulating Recombinant form 01_AB Capsid Protein Affects Sensitivity to Human TRIM5α. *PLoS one*. 7(10):e47757. 2012.
- 6) Matsunaga S, Sawasaki T, Ode H, Morishita R, Furukawa A, Sakuma R, Sugiura W, Sato H, Katahira M, Takaori-Kondo A, Yamamoto N, Ryo A. Molecular and enzymatic characterization of XMRV protease by a cell-free proteolytic analysis. *Journal of proteomics*. 75(15):4863-4873. 2012.
- 7) Kitamura S, Ode H, Nakashima M, Imahashi M, Naganawa Y, Kurosawa T, Yokomaku Y, Yamane T, Watanabe N, Suzuki A, Sugiura W, Iwatani Y. The APOBEC3C crystal structure and the interface for HIV-1 *Vif* binding. *Nature structural & molecular biology*. 19(10):1005-1010. 2012.
- 8) Hirano A, Ikemura K, Takahashi M, Shibata M, Amioka K, Nomura T, Yokomaku Y, Sugiura W. Short communication: lack of correlation between UGT1A1*6, *28 genotypes, and plasma raltegravir concentrations in Japanese HIV type 1-infected patients. *AIDS research and human retroviruses*. 28(8):776-779. 2012.

- 9) 都築智之、岩瀬弘明、島田昌明、平嶋昇、日比野祐介、龍華庸光、齋藤雅之、玉置大、神谷麻子、横井美咲、横幕能行、藤崎誠一郎、杉浦互、後藤秀実：当院におけるhiv、Hcv重複感染症例に対するペグインターフェロン、リバビリン併用療法の治療成績。日本消化器病学会雑誌。109(7):1186-1196. 2012.
- ## 2. 口頭発表
- 1) J. Hattori, U. Shigemi, M. Hosaka, R. Okazaki, Y. Iwatani Y. Yokomaku, W. Sugiura. Socio-demographic analysis of treatment-naïve HIV-1-POSITIVE POPULATIONS WITH RECENT OR LONG-TERM INFECTION ESTIMATED BY BED assay in Japan. XIX International AIDS Conference, Seattle, Washington, USA, Jul 22-27, 2012.
 - 2) K Suzuki, H Ode, M Fujino, T Masaoka J, Hattori, Y Yokomaku, Y Iwatani, A Suzuki, N Watanabe, W Sugiura. Molecular and Structural analysis of darunavirresistant HIV-1 protease. International Workshop on HIV&Hepatitis Virus Drug Resistance and Curative Strategies, Sitges, Spain, Jun 5-9, 2012.
 - 3) S. Kitamura, H. Ode, M. Nakashima, A. Suzuki, N. Watanabe, W. Sugiura, Y. Iwatani. Conformational Conservation of the HIV-1 *Vif*-Binding Interface on APOBEC3C, DE, and F. Cold Spring Harbor Laboratory Meetings - Retroviruses, New York, USA, May 21-26, 2012.
 - 4) S. Kitamura, H. Ode, M. Nakashima, M. Imahashi, Y. Naganawa, Y. Yokomaku, A. Suzuki, N. Watanabe, W. Sugiura aYI. The APOBEC3C Crystal Structure and the Interface for HIV-1 *Vif* Interaction. Cold Spring Harbor Laboratory Meetings - Retroviruses, New York, USA, May 21-26, 2012.
 - 5) 松岡和弘、田邊史子、重見麗、服部純子、正岡崇志、森下了、澤崎達也、横幕能行、岩谷靖雅、杉浦互：コムギ無細胞蛋白質合成系を利用したHIV-1逆転写酵素の*in vitro*薬剤感受性解析法の開発。第26回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2012年11月24-26日。
 - 6) 大出裕高、鈴木康二、藤野真之、前島雅美、木村雄貴、正岡崇志、服部純子、横幕能行、鈴木淳巨、渡邊信久、岩谷靖雅、杉浦互：耐性誘導により得た高度ダルナビル耐性HIV-1プロテアーゼの構造学的解析。第26回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2012年11月24-26日。
 - 7) 今橋真弓、泉泰輔、今村淳治、松岡和弘、金子典代、市川誠一、高折晃史、内海真、横幕能行、直江知樹、杉浦互、岩谷靖雅：HIV-1感染伝播・病勢に対するAPOBEC3B遺伝子型の影響に関する解析。第26回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2012年11月24-26日。
 - 8) 松田昌和、服部純子、今村淳治、横幕能行、岩谷靖雅、杉浦互：Plasma RNAとProviral DNAによるHIV指向性遺伝子型の比較解析。第26回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2012年11月24-26日。
 - 9) 鬼頭優美子、松田昌和、服部純子、伊部史朗、大出裕高、松岡和弘、今村淳治、岩谷靖雅、杉浦互、横幕能行：臨床検体由来env全長組み換えHIV-1による指向性検査法の確立。第26回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2012年11月24-26日。
 - 10) 服部純子、渦永博之、渡邊大、長島真美、貞升健志、近藤真規子、南留美、吉田繁、森治代、内田和江、椎野禎一郎、加藤真吾、千葉仁志、佐藤典宏、伊藤俊広、佐藤武幸、上田敦久、石ヶ坪良明、古賀一郎、太田康男、山元泰之、福武勝幸、古賀道子、岩本愛吉、西澤雅子、岡慎一、伊部史朗、松田昌和、林田庸総、横幕能行、上田幹夫、大家正義、田邊嘉也、白阪琢磨、小島洋子、藤井輝久、高田昇、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26回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2012年11月24-26日。
 - 11) 伊部史朗、横幕能行、前島雅美、松岡和弘、正岡崇志、岩谷靖雅、杉浦互：薬剤感受性プロファイリングに裏づけされた新規HIV-2組換え流行株CRF01_AB感染例の良好な治療経過。第26回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2012年11月24-26日。
 - 12) 羽柴知恵子、福山由美、伊藤明日美、長谷川真奈美、渡邊智子、藤谷和美、小川恵子、杉浦互、横幕能行：HIV陽性者への外来トリアージの必要性に向けて。第66回国立病院総合医学会、神戸、2012年11月16-17日。
 - 13) 永見芳子、塚本弥生、杉本香織、杉浦互、福山由美、横幕能行：長期に療養が必要となったHIV感染症患者への支援体制の現状と課題。第66回国立病院総合医学会、神戸、2012年11月16-17日。
 - 14) 丸山笑里佳、羽柴知恵子、福山由美、杉浦互、横幕能行：違法薬物使用歴を持つHIV陽性者に

- 対する内科外来での心理的支援の検討. 第66回国立病院総合医学会、神戸、2012年11月16-17日.
- 15) 榊原美穂、福山由美、羽柴知恵子、長谷川真奈美、伊藤明日美、渡邊智子、藤谷和美、小川恵子、杉浦 互、横幕能行：外来看護師によるHIV陽性者受診継続のための看護介入判断基準の標準化に向けて. 第66回国立病院総合医学会、神戸、2012年11月16-17日.
- 16) 渡邊英恵、福山由美、羽柴知恵子、伊藤明日美、長谷川真奈美、渡邊智子、藤谷和美、小川恵子、杉浦 互、横幕能行：HIV陽性女性が安心して将来の妊娠について考えられる外来看護支援に向けて. 第66回国立病院総合医学会、神戸、2012年11月16-17日.
- 17) 福山由美、大林由美子、杉浦 互、横幕能行：医療機関からみる愛知県内HIV陽性判明の動向～いきなりエイズ減少に向けて～. 第66回国立病院総合医学会、神戸、2012年11月16-17日.
- 18) 北村紳悟、大出裕高、中島雅晶、今橋真弓、長縄由里子、黒沢哲平、横幕能行、山根 隆、渡邊信久、鈴木 淳巨、杉浦 互、岩谷靖雅：APOBEC3Cの構造解析とHIV-1 *Vif*結合インターフェイスの同定. 第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012年11月13-15日.
- 19) 大出裕高、鈴木康二、藤野真之、前島雅美、木村雄貴、正岡崇志、服部純子、横幕能行、鈴木 淳巨、渡邊信久、岩谷靖雅、杉浦 互：高度ダルナビル耐性HIV-1の分子機序の解明. 第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012年11月13-15日.
- 20) 中島雅晶、北村紳悟、大出裕高、今橋真弓、長縄由里子、黒沢哲平、横幕能行、山根 隆、渡邊信久、鈴木 淳巨、杉浦 互、岩谷靖雅：APOBEC3間におけるHIV-1 *Vif*結合インターフェイスの違い. 第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012年11月13-15日.
- 21) 岩谷靖雅、前島雅美、北村紳悟、大出裕高、中島雅晶、今橋真弓、長縄由里子、黒沢哲平、伊部史朗、横幕能行、杉浦 互：APOBEC3Gの酵素活性非依存的な抗HIV-1作用メカニズム. 第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012年11月13-15日.
- 22) 北村紳悟、大出裕高、中島雅晶、今橋真弓、長縄由里子、横幕能行、鈴木 淳巨、渡邊信久、杉浦 互、岩谷靖雅：APOBEC3Cの結晶構造解析とHIV-1 *Vif*結合インターフェイスの同定. 第12回日本蛋白質科学会年会、名古屋、2012年6月20-22日.
- 23) 伊部史朗、横幕能行、前島雅美、松岡和弘、正岡崇志、岩谷靖雅、杉浦 互：新規HIV-2組換え流行株CRF01_AB感染例の治療経過と薬剤感受性ポロファイリング. 第14回白馬シンポジウム in 京都、京都、2012年6月7-8日.
- 24) 松田昌和、服部純子、今村淳治、横幕能行、杉浦 互：遺伝子配列解析によるHIV-1指向性の判定とその動向. 第86回日本感染症学会総会、長崎、2012年4月25-26日.
- 25) 今村淳治、横幕能行、服部純子、伊部史朗、天羽清子、塩見正司、杉浦 互：enofovir + Darunavir/r + Etravirineによるサルベージ療法が著効した多剤耐性HIV感染児の一例. 第86回日本感染症学会総会、長崎、2012年4月25-26日.
- 26) 今村淳治、横幕能行、片野晴隆、安岡 彰、杉浦 互：名古屋医療センターにおけるカポジ肉腫発症エイズ患者数の動向. 第86回日本感染症学会総会、長崎、2012年4月25-26日.
- 27) 伊部史朗、近藤真規子、今村淳治、横幕能行、杉浦 互：HIV-1/HIV-2重複感染疑い例における血清学および遺伝子学的精査解析. 第86回日本感染症学会総会、長崎、2012年4月25-26日.

H. 知的財産権の出願・登録（予定を含む）

1. 特許取得

該当なし

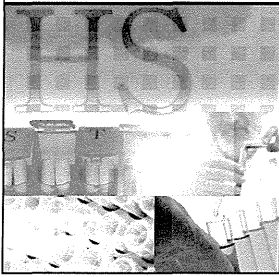
2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

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

新規HIV-1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

研究協力者

齊藤 暁 京都大学霊長類研究所人類進化モデル研究センター 特定研究員

本分担研究では、現在開発を進めているマイクロビサイド（アクチノヒビン：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、AHの小動物における毒性試験などが行われ、*in vitro*において強力な抗HIV-1作用効果をもつことを明らかにしてきた。本年度は、サル感染モデルにおけるAH直腸投与のための基剤の検討と経直腸粘膜実験系を用いて、AHのマイクロビサイドとしての薬効評価を行った。プラセボ群およびAH投与群にSHIVを攻撃接種したところ、プラセボ群では全個体がSHIVに感染したが、AH投与群の一部の個体で感染防御が認められた。経直腸サル感染モデルを用いたAH有効性評価システムの基盤を構築することができた。

A. 研究目的

本年度は、これまで研究班で取り組んできた抗HIV薬剤であるアクチノヒビン（AH）のマイクロビサイドとして薬効評価を目的に研究を行った。AH化合物は*in vitro*において強力な抗HIV-1/SIV作用効果を示すが、細胞毒性が陰性であることは十分確認されてきた。さらに、小動物における毒性検査等は陰性であったことも明らかになった。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が必要不可欠である。本分担研究では、サルモデル動物を用いて、AHのマイクロビサイドとして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) 基剤によるAHの抗SHIV作用への影響についての確認実験

AHを基剤の候補である1%ヒドロキシエチルセルロース（HEC）in PBSに最終濃度1%になるように調製した。レポーター細胞であるLuSIV細胞に添加し、1時間後にSHIV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。この実験を

行うことでサル直腸投与のために、投薬基剤（1% HEC）によるAHの抗ウイルス作用に対する影響がないことを確認した。

(2) サル直腸感染実験

カニクイザル（個体ID C07-010、05-042、C02-162、C09-024、C05-039、C03-043）は（独）医薬基盤研究所・霊長類医学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6頭を用いた。使用個体の投与時の情報は表1に示す。薬剤（AH）投与群（3頭）においては、1%HECに溶解した1%AH（pH7.0）を6mlずつ、プラセボ群（3頭）に基剤のみ（1% HEC）を6mlずつ投与した。薬剤AH投与後、20分後に、ウイルス接種を行った。ウイルス接種ではSHIV-KS661c（Lot#010124）を生食で2,000 TCID₅₀/3mlに調製し、各個体に3mlずつ直腸に接種を行った。接種後、0、7、10、14、21、28、42日後に採血を行った。薬効が認められない場合には原則として実験を終了することとした。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。SHIV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。

(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SHIVに対する抗ウイルス効果と基剤の抗ウイルス効果への影響が無いことの確認実験

AHの抗HIV-1/SIVmac作用効果は認められたが、サル感染実験に用いるSHIV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 IC_{50} は、AH dimerが2~110 nM、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30 nM、AH dimerでは2 nM以下である。SHIVに対してもPEG化したAH (5K-PEG-AHと10K-PEG-AH) では700 nM、AH-PEG-AHでは1nM以下、AH単体では1nMに達し、HIV-1やSIVmacに対する効果と同様に強力な抗ウイルス効果を示すことが分かった (図1)。

基剤としては、瀉下効果が比較的低いと考えられる1% HEC (pH7.0) を用いて、AHの抗ウイルス効果を検討した。基剤1%HEC自身による細胞毒性は観察されなかった。一方、SHIVに対する抗ウイルス効果には影響は無かった。

(2) サル感染モデルを用いたAHによる防御実験

健康なカニクイザル6頭 (薬剤投与群3頭、プラセボ群3頭) を用いてAHによる感染防御試験を行った。薬剤もしくは基剤 (1% HEC) を直腸内に投与し、20分間静置後、攻撃接種としてSHIV-KS661c (Lot#010124) を直腸内接種した。その後経時的に採血を行い、血漿中ウイルスRNA量を測定したところ、プラセボ群3頭はすべてウイルスに感染したが、薬剤投与群3頭のうち1頭 (個体ID:C02-162) ではウイルス感染が完全に防御された (図2)。なお、当該個体では末梢血中CD4Tリンパ球数に変化が認められなかったが、ウイルス感染が成立した残りの5頭では急激なCD4Tリンパ球の減少が認められた (図3および4)。感染6週後まで観察を継続したが、当該個体 (個体ID:C02-162) において血漿中ウイルスRNAが検出されることはなく、また、CD4Tリンパ球数の減少も認められなかった。

表1 感染実験に用いた個体情報

(グループ)	(略称)	(動物番号)	(体重 kg)	(TRIM5遺伝子型)
薬剤投与群	C07-010	1310701010	3.05	TRIMCyp homozygote
	C05-042	1010502042	3.54	heterozygote
	C02-162	1320211162	4.74	TRIM5 α homozygote
Placebo群 (溶媒投与群)	C09-024	1420903024	3.25	TRIMCyp homozygote
	C05-039	1010502039	3.06	TRIMCyp homozygote
	C03-043	1320304043	5.07	TRIM5 α homozygote

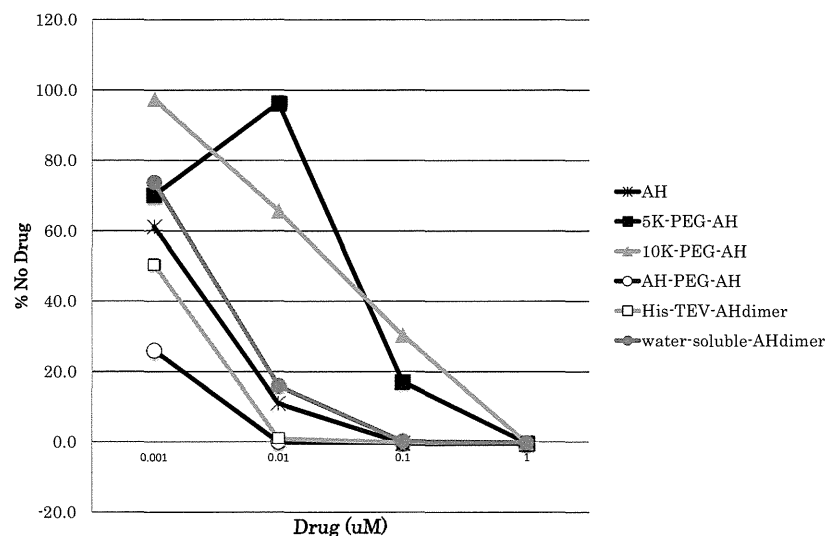


図1 AHのSHIVに対する抗ウイルス効果

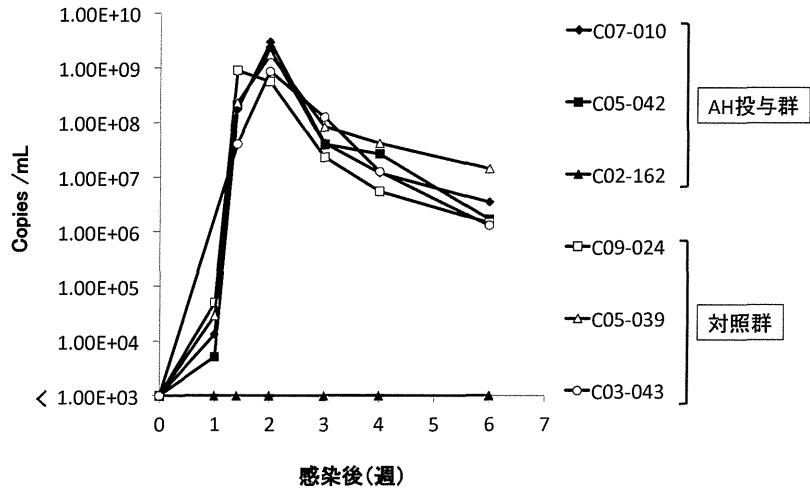


図2 血漿中ウイルスRNA量の推移

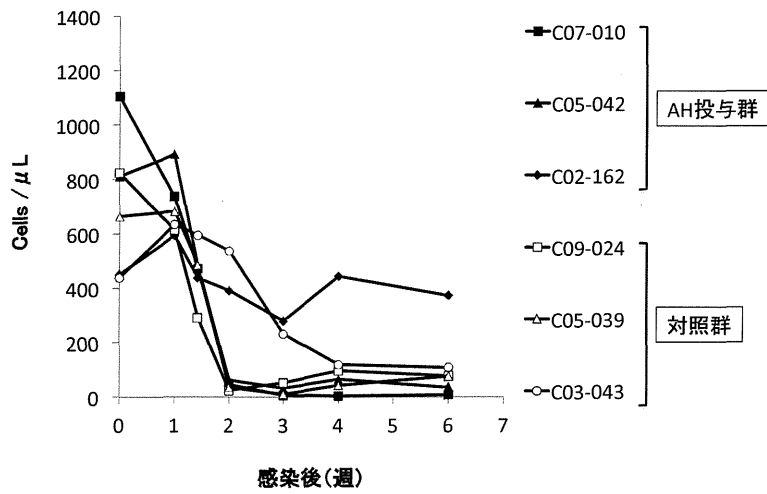


図3 末梢血におけるCD4陽性T細胞数の推移

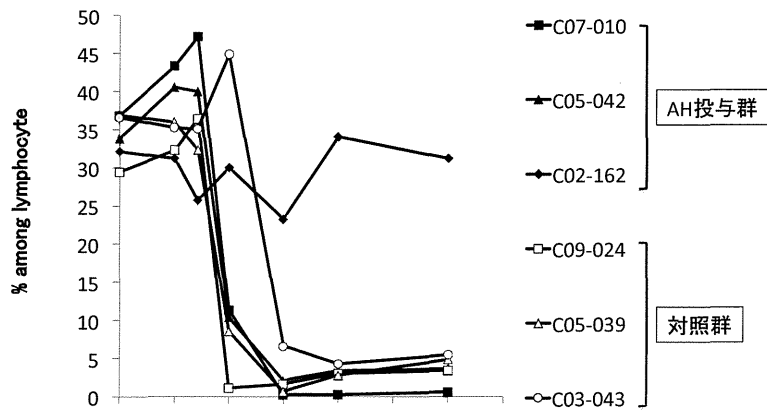


図4 末梢血リンパ球中のCD4陽性T細胞の割合

D. 考察

昨年度までに、経粘膜感染サルモデルを用いたAH薬効評価実験の条件の検討が完了していたため、今年度は*in vitro*でのSHIVに対する抗ウイルス効果の評価実験を行うとともに、実際にサルに薬剤を投与後、SHIVで攻撃接種することでAHの感染防御能を評価した。*in vitro*での評価の結果、AHはSHIVに対して、HIV-1やSIVmac239に対する作用とほぼ同等の強力な抗ウイルス活性を持つことが明らかとなった。また、経直腸投与に適した基材（1% HEC）に溶解した場合においても十分にその効果が保持されることが明らかとなった。個体でのAH薬効評価実験では、プラセボ群の3頭はいずれもSHIVに感染した一方で、AH投与群では3頭中1頭でSHIV感染が完全に防御された。上述したように、AHは*in vitro*で強力な抗SHIV活性を示すことから、今回得られた結果は*in vitro*での結果を反映している可能性があると考えている。一方で、薬剤投与群の3頭中2頭ではウイルス感染の防御ができなかった。この結果に対する説明として、粘膜部位での薬剤濃度の維持が低下していた可能性が考えられる。また、別の可能性として、今回行った薬剤およびSHIVの投与方法が最適化されていなかった可能性も考慮される。今後、より適切なAHマイクロピ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、最適なウイルス接種法の策定が求められる。また、より効率よい薬剤デリバリーを可能とするため、マイクロカプセルなどの新規技術を応用することも重要な検討課題となると考えている。これらの作業を通じて粘膜部位における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、有望なマイクロピサイド候補であるAHについて、薬効評価系の最適化を進めていきたいと考えている。

E. 結論

本分担研究で行ったサルエイズモデルを用いた経直腸感染防御実験により、AHのサル個体での有効性評価に関して重要な知見が得られた。今後さらなる検討が必要ではあるもののサル個体でのAHの有効性が示され、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に適用されることなく、他のマイクロピサイド開発研究、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. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nomaguchi M, Doi N, Fujiwara S, Saito A, Akari H, Nakayama E E, Shioda T, Yokoyama M, Sato H, Adachi A. Systemic biological analysis of the mutations in two distinct HIV-1mt genomes occurred during replication in macaque cells. *Microbes and infection*, 2013. (in press)
- 2) Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, Nakayama E E, Shioda T, Saito A, Akari H, Yasutomi Y, Matano T, Sato H, Adachi A. Gag-CA Q110D mutation elicits TRIM5-independent enhancement of HIV-1mt replication in macaque cells. *Microbes and infection*, 2013; 15: 56-65.
- 3) Iijima S, Lee Y-J, Ode H, Arold ST, Kimura N, Yokoyama M, Sato H, Tanaka Y, Strelbel 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, 3944-51, 2012.
- 4) Ohtani H, Naruse TK, Iwasaki Y, Akari H, Ishida T, Matano T, Kimura A: Lineage-specific evolution of T-cell immunoglobulin and mucin domain 1 gene in the primates. *Immunogenetics* 64, 669-678, 2012.
- 5) Saito A, Kawamoto Y, Higashino A, Yoshida T, Ikoma T, Suzaki Y, Ami Y, Shioda T, Nakayama EE, Akari H: Allele Frequency of Antiretroviral Host Factor TRIMCyp in Wild-caught Cynomolgus Macaques (*Macaca fascicularis*). *Frontiers in Microbiology* 3, 314, 2012.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) Saito Y, Naruse TK, Akari H, Matano T, Kimura A: Diversity of MHC class I haplotypes in cynomolgus macaques. *Immunogenetics* 64, 131-141, 2012.

2. 学会発表

- 1) Akatsuki Saito, Ken Kono, Masako Nomaguchi, Masaru Yokoyama, Yasuhiro Yasutomi, Tetsuro Matano, Hironori Sato, Tatsuo Shioda, Akio Adachi,

Hirofumi Akari, Emi E Nakayama: Genetic Diversity of TRIM5 Gene and HIV-1 Susceptibility in Cynomolgus Macaque (*Macaca fascicularis*). Cold Spring Harbor Laboratory 37th annual meeting, May 21 - 26, 2012

- 2) 齊藤 暁、河野 健、中山英美、日柳章彦、保富康宏、塩田達雄、吉田友教、東濃篤徳、生駒智子、川本 芳、鳥居隆三、明里宏文：レトロウイルス感受性を規定するカニクイザルTRIM5遺伝子型の地理的多様性, 第59回日本実験動物学会総会, (大分) 平成24年5月24日-26日
- 3) 齊藤 暁、河野 健、中山英美、保富康宏、塩田達雄、吉田友教、東濃篤徳、川本芳、鳥居隆三、明里宏文：アジアに生息するマカク属サルで認められるTRIM5遺伝子の多様性, 第26回日本エイズ学会学術集会・総会 (神奈川) 平成24年11月24日-26日
- 4) 齊藤 暁、河野 健、中山英美、塩田達雄、川本芳、鳥居隆三、吉田友教、東濃篤徳、鈴木紗織、保富康宏、明里宏文：マカク属サルTRIM5遺伝子における種間および種内の多様性, 第60回日本ウイルス学会学術集会 (大阪) 平成24年11月13日-15日
- 5) 野村拓志、山本浩之、明里宏文、俣野哲朗：SIV複製抑制マカクサルにおけるCTL逃避変異体の選択による複製抑制破綻機構の解析, 第60回日本ウイルス学会学術集会 (大阪) 平成24年11月13日-15日
- 6) 明里宏文：ヒト免疫不全ウイルスによるMHC-1発現制御機構の分子構造学的解析, 第21回日本組織適合性学会大会 (東京) 平成24年9月15日-17日

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし