

- いた薬剤耐性高速検査法の開発. 第24回日本エイズ学会学術集会. 東京. 2010年11月24日-26日
- 40) 椎野禎一郎、貞升健志、長島真美、服部純子、杉浦 互: 国内感染者集団の大規模塩基配列解析 1: CRF01_AEの動向と微小系統群の同定. 第24回日本エイズ学会学術集会. 東京. 2010年11月24日-26日
- 41) 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ヒスムに関する検討. 第24回日本エイズ学会学術集会. 東京. 2010年11月24日-26日
- 42) 谷 麗君、立川-川名 愛、椎野禎一郎、細谷紀彰、鯉渕智彦、藤井 毅、三浦聡之、杉浦 互、岩本愛吉: 配列特異的オリコフローを用いたHIV-1薬剤耐性変異検出法の開発. 第24回日本エイズ学会学術集会. 東京. 2010年11月24日-26日
- 43) 木村雄貴、藤野真之、正岡崇志、服部純子、横幕能行、岩谷靖雅、鈴木淳巨、渡邊信久、杉浦 互 HIV-1のダルナビル耐性獲得機構の酵素学的構造学的解明. 第24回日本エイズ学会学術集会. 東京. 2010年11月24日-26日
- 44) 岩谷靖雅、北村紳悟、吉居廣朗、前島雅美、横幕能行、杉浦 互: HIV-1 Vif感受性及びウイルス粒子への取り込みに関するAPOBEC3Cの機能ドメインの探索. 第24回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2010年11月24日-26日
- 45) 吉居廣朗、前島雅美、北村紳悟、横幕能行、杉浦 互、岩谷靖雅: 抗HIV宿主因子APOBEC3ファミリーの細胞依存的な発現調節機構の解明. 第24回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2010年11月24日-26日
- 46) 伊部史朗、横幕能行、服部純子、岩谷靖雅、加藤真吾、杉浦 互: 抗レトロウイルス療法のモニタリングのためのplasma HIV-2 viral load測定系の確立. 第24回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2010年11月24日-26日
- 47) 横幕能行、今村淳治、平野淳、木下枝理、柴田雅章、服部純子、伊部史朗、岩谷靖雅、杉浦 互: 名古屋医療センターにおけるetravirineの使用状況と効果および適応に関する検討. 第24回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2010年11月24日-26日
- 48) 奥村かおる、横幕能行、三和治美、山田由美子、杉浦 互、岩谷靖雅、平野 淳、木下枝理: ベナンボックス吸入時の苦味の軽減に対するハッカ飴の使用とその効果 第2報-他の有効な手段を探すためのハッカの有効性の検証-. 第24回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2010年11月24日-26日
- 49) 松永智子、小島良績、澤崎達也、森下了、佐久間龍太、岩谷靖雅、杉浦 互、山本直樹、梁明秀: コムギ無細胞タンパク質合成系を用いた新規ガンマレトロウイルスXMRVプロテアーゼの解析. 第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010年11月
- 50) 吉居廣朗、北村紳悟、前島雅美、杉浦 互、岩谷靖雅: リンパ球由来細胞株におけるvif欠損HIVに対する異なる感受性はStat1活性化状態に関する. 第58回日本ウイルス学会学術集会. 2010年11月9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

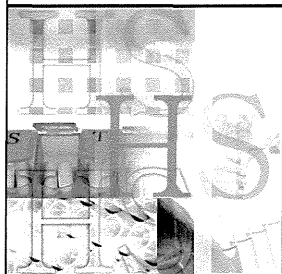
2. 実用新案登録

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

本分担研究においては、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性評価を進めた。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。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。これらにより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ことから、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。以上より、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。さらに小動物における毒性検査等は陰性である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。特に、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ピン（AH）のマイクロビサイドとして薬効評価を中心に研究を行った。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) 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個体に2頭を用いた。ウイルス感染ではSHIV-KS661c（Lot#010124）を2,000 TCID₅₀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。SHIV血中ウ

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。

(4) 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。

(5) 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

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	TRIM5α 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	TRIM5α homozygote

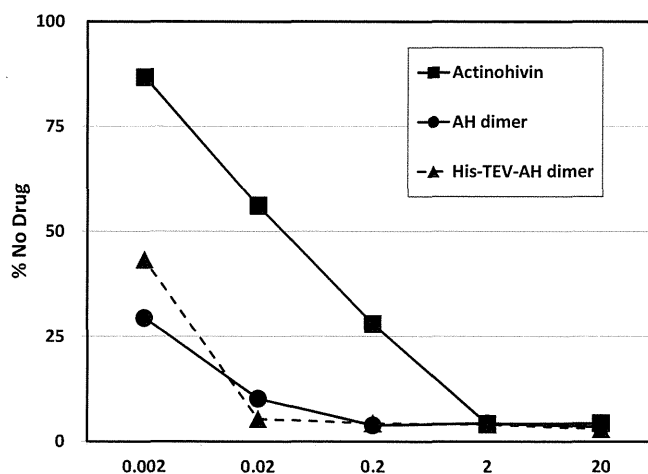


図1 AHのSIVmacに対する抗ウイルス効果

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、マクロゴルド自身による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。

(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

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、 3×10^8 と 1.1×10^9 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。

(4) 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

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3）。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認められなかった。

(5) 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4）。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5および6）。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。

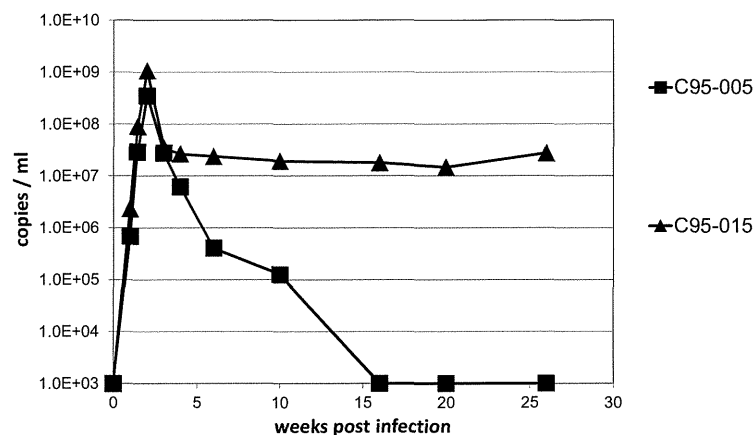


図2 血漿中ウイルスRNA量の推移

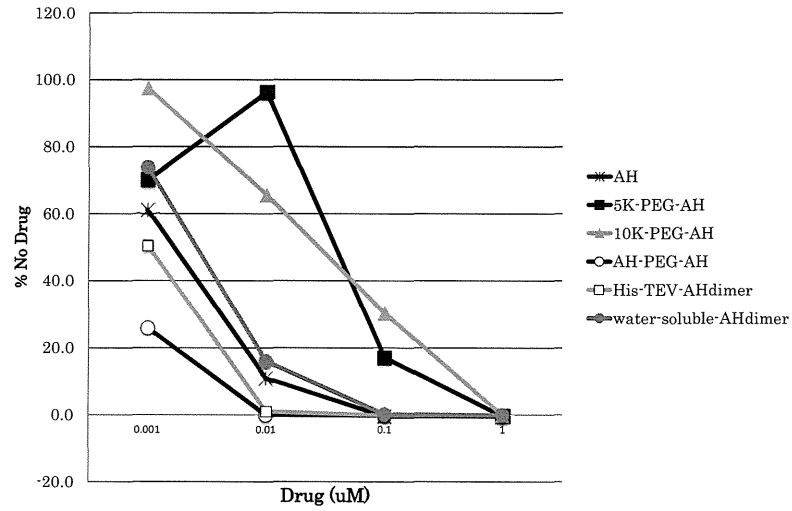


図3 AHのSHIVに対する抗ウイルス効果

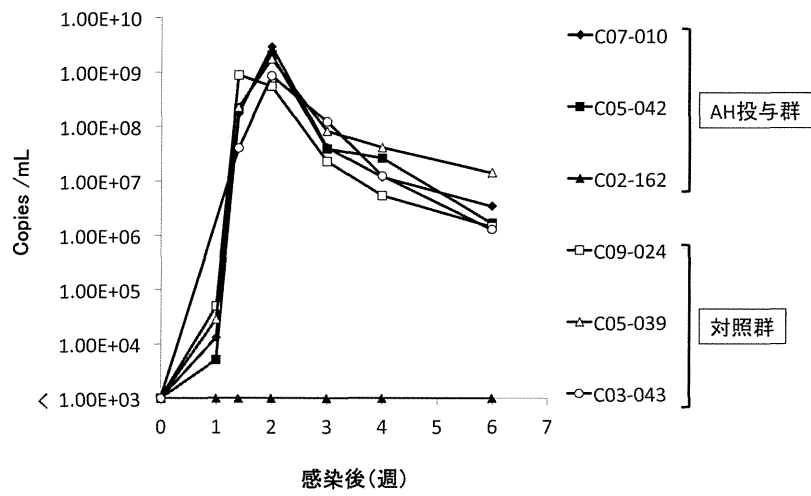


図4 血漿中ウイルスRNA量の推移

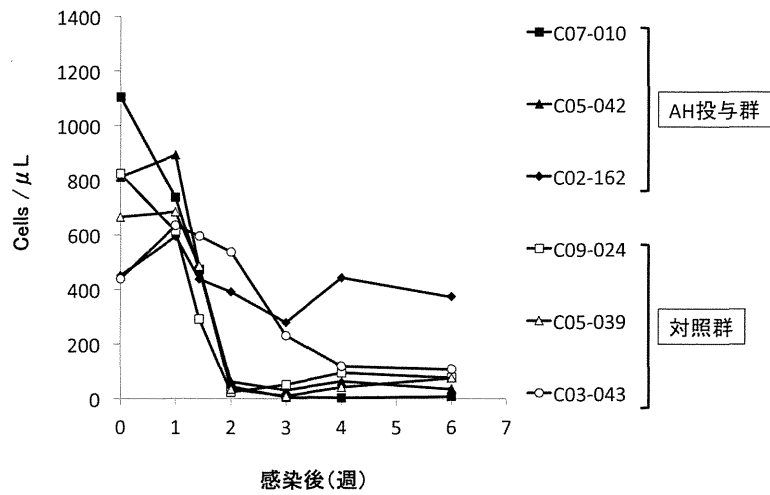


図5 末梢血におけるCD4陽性T細胞数の推移

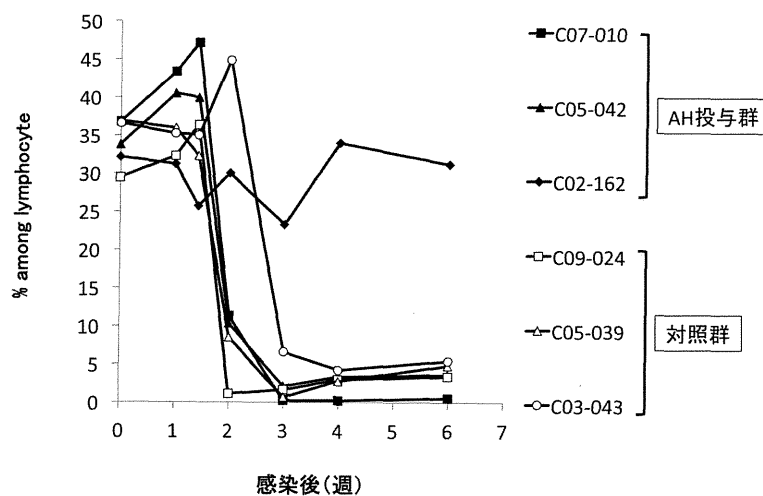


図6 末梢血リンパ球中のCD4陽性T細胞の割合

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を行うことにより、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。

次に、*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、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を行うことにより、有望なマイクロビサイド候補であるAHについて、薬効評価系の最適化を進めて行きたいと考えている。

E. 結論

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。また、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、サル個体にて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適用されるのみでなく、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. 健康危険情報

なし

G. 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.
- 9) 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.
- 10) Ohtani H, Nakajima T, Akari H, Ishida T, Kimura A: Molecular evolution of immunoglobulin superfamily genes in primates. *Immunogenetics* 63, 417-428, 2011.
- 11) 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.
- 12) Matsumoto Y, Miura T, Akari H, Goto Y, Haga T: Peripheral blood CD4 CD8 double-positive T cells of rhesus macaques become vulnerable to Simian Immunodeficiency Virus by in vitro stimulation due to the induction of CCR5. *Journal of Veterinary Medical Science* 72, 1057-1061, 2010.
- 13) Naruse TK, Chen Z, Yanagida R, Yamashita T, Saito Y, Mori K, Akari H, Yasutomi Y, Miyazawa M, Matano T, Kimura A: Diversity of MHC class I genes in Burmese-origin rhesus macaques. *Immunogenetics* 62, 601-611, 2010. (Epub July 17, 2010)
- 14) Yoshida T, Saito A, Iwasaki Y, Iijima S, Kurosawa T, Katakai Y, Yasutomi Y, Reimann KA, Hayakawa T, Akari H: Characterization of natural killer cells in tamarins: a technical basis for studies of innate immunity. *Frontiers in Microbiology* 1, 128, 2010.

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
- 7) 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
- 8) Akatsuki Saito, Masako Nomaguchi, Ken Kono, Emi E. Nakayama, Tatsuo Shioda, Tomoyuki Yoshida, Yasuhiro Yasutomi, Tetsuro Matano, Akio Adachi, Hirofumi Akari: Genotypic variation of cynomolgus monkey TRIM5 α determines the susceptibility to monkey-tropic HIV-1 infection. International Union of Microbiological Society 2011 Congress. 11-16 Septemver, 2011, Sapporo.
- 9) Tomoyuki Yoshida, Munehiro Okamoto, Hirofumi Akari, Juri Suzuki, Takako Miyabe-Nishiwaki, Toshiyuki Hayakawa, Hiroo Imai, Atsushi Matsui, Akino Watanebe, Akihisa Kaneko, Hirohisa Hirai: Simian retrovirus-4-associated infectious thrombocytopenia in Japanese macaques. International Union of Microbiological Society 2011 Congress. 11-16 Septemver, 2011, Sapporo.
- 10) 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
- 11) Akatsuki Saito, Masako Nomaguchi, Ken Kono, Emi E. Nakayama, Tatsuo Shioda, Tomoyuki Yoshida, Yasuhiro Yasutomi, Naofumi Takahashi, Tetsuro Matano, Akio Adachi, Hirofumi Akari: Susceptibility of cynomolgus monkeys to monkey-tropic HIV-1 infection is determined by TRIM5 genotypes. 29th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS. 25-28 October, 2011, Seattle.
- 12) 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
- 13) 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
- 14) 齊藤 暁、河野 健、中山英美、塩田達雄、足立昭夫、野間口雅子、保富康宏、俣野哲朗、明里宏文：カニクイザル TRIM5 allele がサル指向性 HIV-1 の増殖に与えるインパクト 第24回日本エイズ学会学術集会（東京），平成22年11月24日-11月26日
- 15) 齊藤 暁、河野 健、黒石 歩、中山英美、塩田達雄、足立昭夫、野間口雅子、保富康宏、俣野哲朗、明里宏文：カニクイザルにおける第3世代サル指向性 HIV-1 の増殖の解析 第24回日本エイズ学会学術集会（東京），平成22年11月24日-11月26日
- 16) 明里宏文：HIV-1 感染霊長類モデルの開発 第58回日本ウイルス学会学術集会（徳島），平成22年11月7日-9日

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定も含む）

1. 特許取得

該当なし

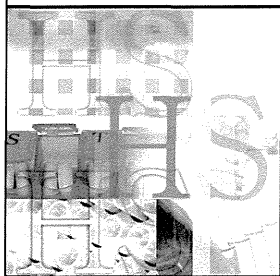
2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

分担研究課題



抗HIVタンパク質アクチノヒビンの実用化研究

抗HIVタンパク質実用化研究

研究分担者

田中 晴雄

いわき明星大学薬学部薬学科 教授

研究協力者

高橋 淳

いわき明星大学薬学部薬学科 研究助手 (平成22年度)

大林 尚美

いわき明星大学薬学部薬学科 研究助手 (平成24年度)

抗HIVタンパク質アクチノヒビン (AH) は、114アミノ酸残基で構成され、分子内に高マンノース型糖鎖を認識する3つの糖鎖結合ポケットを持つレクチンである。AHは、HIV gp120のHMと結合することで、HIVの細胞への接着・侵入を低濃度で阻止し、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3つの糖鎖結合ポケットのすべてにHMが結合した場合にのみ強い親和性を示すというAHの選択性の根拠を明らかにした。(2) AH耐性株のHM欠失部位が確定し、AHの抗HIV活性はHMへの結合によることが裏付けられた。(3) AHはシアノピリン・Nなどの他のマンノース結合レクチンと異なり、サイトカイン誘導性が低く、マイトジェン活性を示さないことから安全性が高いことが明らかとなった。(4) 従来法で調製したAHのサンプルには、N末にシグナルペプチドとAHの間のリンカー部位が残存した未成熟型AHが含まれていることが分かったので、114アミノ酸からなる成熟型AHの調製法を確立し、カニクイザルを用いるSHIV感染予防実験及びポリエチレングリコール (PEG) 修飾に用いる1グラムのサンプルを調製した。(5) 成熟型AHを用いて5kPEG-AH、10kPEG-AH及びAH-5kPEG-AHを調製した。(6) AH及びAH-5kPEG-AHは各種のプロテアーゼに対してほとんど分解されないことがSDS-PAGEで確認された。(7) 5kPEG-AH及び10kPEG-AHでは生理食塩水に対する溶解性は上昇するも、合胞体形成阻害活性、抗SHIV活性は大幅に低下した。一方、AH-5kPEG-AHでは、数倍高い活性を示すことが確認された。(8) マウスを用いる急性毒性試験で、尾静注 (25 mg/kg) 及び腹腔内投与 (59 mg/kg) で急性毒性が認められないことが確認された。

さらに、抗HCV活性を測定した結果、AH及びHis-TEV-AH dimer/RTB-L (AH2量体) の IC_{50} はそれぞれ300 nM及び60~70 nMであり、HCVの外套糖タンパク質にも多数のHMの存在が示唆されると共に抗HCV薬としての可能性が示された。

A. 研究目的

HIVの感染者は3千万人を超え、毎年新しく200万人以上が感染し、200万人近くが死亡している。新しい感染者数を減らすのが喫緊の課題である。

一方、HIVに特異的に存在する逆転写酵素、インテグラーゼ、又はプロテアーゼを阻害する抗HIV薬 (図1) の多剤併用療法により、HIV感染者の発症予防とエイズ患者の延命が可能になってきている。し

かし、この療法ではウイルスの複製は抑制できるが、細胞から細胞への感染を阻止できず、そのためにウイルスを体内から除去できないのではないかと考えられている (Sigal *et al.*, Nature, 477, 95-99, 2011)。

新属新種の放線菌 *Longispora albida* が生産する抗HIVレクチン・アクチノヒビン (AH、図2) は、3つの糖鎖結合ポケットを持ち (図3)、多くの高マンノース型糖鎖 (HM) を持つHIVgp120の3本のHM

に結合することにより選択的で強い親和性（レクチンのクラスター効果）を示す。AHはHIVの細胞への感染を阻止するだけでなく、HIVの細胞から細胞への感染をも阻止できるので、AHは体内からのHIV除去薬の可能性を秘めている。AHは他のマンノース結合レクチンとは異なり、多くのHMを持つ糖タンパク質にのみ結合する特徴を持つことから優れた安全性を有することが期待されている。また、C型肝炎ウイルス（HCV）が糖鎖を持つとの情報があり、AHが抗HCV活性を示す可能性がある。

本研究の目的は下記の通りである。

- (1) AHと $\alpha(1-2)$ mannobiose (MB)の複合体のAH結晶のX線結晶構造解析により、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。
- (2) 114アミノ酸残基からなる成熟型AHの調製法の確立、並びに安定で免疫原性が改善された注射薬の開発を目指した成熟型AHを用いるポリエチレングリコール(PEG)化AHの調製、
- (3) 得られたPEG修飾体の安定性と抗HIV、SIV、SHIV活性の確認、
- (4) 抗HCV活性の測定
- (5) AHの急性毒性の確認

B. 研究方法

放線菌 *Longispola albida*を用いるAHの調製

10 ml生産培地 [2.0% glucose, 0.4% polypepton, 0.1% yeast extract, 0.4% meat extract, 0.25% NaCl, pH 7.0] を分注した50 ml容試験管に種菌液（グリセロールストック）200 μ lを添加し、ロータリーシェーカーで6日間、27 $^{\circ}$ C、180 rpmで種培養を行った。本培養は、500 ml容三角フラスコに100 ml分注した生産培地に種培養液を1%植菌し、6日間、27 $^{\circ}$ C、180 rpmで培養した。培養液上清に45%飽和の硫酸を加えてタンパク質を沈殿させた後、タンパク画分からハイドロキシアパタイトカラムを用いてAHを精製した。

AH耐性HIV-1株の選択と分離

CEM細胞にHIV-1 (IIIB)を感染させ、AHの存在下で48穴プレートに接種した。AH濃度は EC_{50} 値の1~2倍濃度から始め、4、5日培養した後に、段階的に1.5倍以下の濃度のAHを添加して、passageを繰り返した。得られた耐性株のproviral DNAをDNeasy tissue kits (Qiugen)を用いて細胞から抽出し、gp120のgenotypeを決定した。

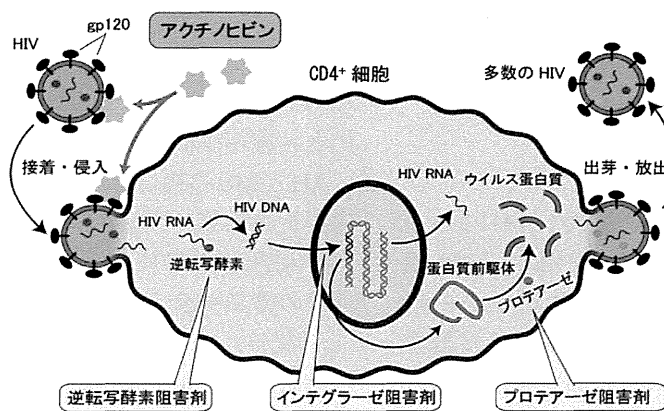


図1 HIVのライフサイクルと阻害剤

1-38 ASVTIRNAQTGRLLDSNYNGNVYTL PANGGNYQRW TGP
 39-76 GDGTVRNAQTGRCLDSNYDGA VYTLPCNGGSYQK WLFY
 77-114 SNGYIQNVETGRVLD SNYNGNVYTL PANGGNYQK WYTG

図2 AHのアミノ酸配列（相同性の高い3つのセグメントからなる）

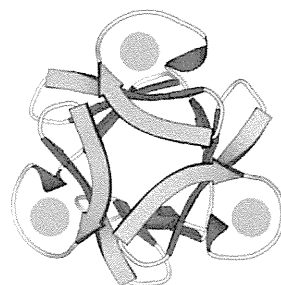


図3 AHの立体構造（3つの糖鎖結合ポケットを持つ）

各種サイトカイン及びケモカインの産生

1.6 μM AH存在下でPBMCを培養し、3日後の各種サイトカインの産生をBio-Plex 200 system (Bio-RAD) により調べた。

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 *Longspora 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 (HamptonRes. Co.とEmerald Biosystems Inc.) を用いて条件を検討し、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1.00Åでシンクロトロン放射光を用いてX線データを収集した。

合胞体形成阻害活性

Chiba Hら (J. Antibiot. 54, 818-826, 2001) の方法に従って測定した。

抗SHIV活性

杉浦 互博士ら ((独) 国立病院機構名古屋医療センター) に依頼し、HIVとSIVの両方に感染できるLuSIV細胞を用いて、抗SHIV活性を測定した。

抗HCV活性の測定

HuH7.5細胞へのHCVJFH1株の感染: JFH1をmoi約100で感染。**細胞:** 24穴プレートを用いて300 mlのDMEM中37°Cで培養。**感染実験:** 薬剤処理の前後でウイルスを感染させ、通常はその2日後に培養上清のウイルス量を測定。**薬剤の添加:** 薬剤を含む300 mlのDMEMを加えて2日間培養。**ウイルスの定量:** 培養上清のウイルス量をHCVコア蛋白質をELISAで測定。富士レビオのELISA測定キットを用いmanualに従った。実験は3回行い、値を平均化した。図11、12には薬剤を添加しない細胞上清の値を100として感染性を%で示した。

C/D. 研究結果及び考察

AH耐性株のgp160のジェノタイプ

AH耐性株は容易には得られなかったが、濃度を少しずつ上昇させたAHを含む培地で4、5日間隔でpassageを繰り返した後に、1/2~1/140に感受性が低下した耐性株が得られた。これらの株では、gp120上のHM結合部位である230NKT232、289NOS291、295NCT297、339NNT341、386NST388、392NST394

のうち、1~4か所が欠失していた。このことは、AHがHMに結合することにより抗HIV活性を示すことの傍証である。また、AHの高度耐性株が得られなかったことは、HIV-1の細胞への感染にはHMの存在が必須であることを示している。

PBMCのサイトカイン及びケモカイン産生に対するAHの影響

PBMCによる27種類のサイトカイン/ケモカインの誘導に対する影響を、AHと他の抗HIV活性を有するレクチンで比較した。その結果、AH (1.6 μM) はサイトカイン/ケモカインをほとんど誘導しなかったのに対して、PHA (0.016 μM 、サイトカイン誘導コントロール) やシアノピリン-N (0.18 μM) では各種のサイトカインやケモカインの強力な産生誘導が認められた。シアノピリン-NもAH同様、HMに結合することにより抗HIV活性を示すことが知られているが、1本だけのHMを持つRNase Bでも強く結合する。一方、AHは、gp120のように多くのHMを持つ糖タンパク質のみに結合することから、シアノピリン-Nより遥かに選択性が優れていて、サイトカイン/ケモカイン誘導においても大きな差となって現れたものと考えられる。従って、これらの結果は、AHの安全性を裏付けるものとして重要である。

AHと $\alpha(1-2)$ mannobiose (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4a)。
- (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mannobiose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4b, c)。この状況は、モジュール1、2でも全く同様である。
- (3) 第2mannose (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5a)。

- (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5b)。
- (5) 3分子のHMと1分子のAHの結合モデルとして図6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、マイトジェン活性、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。

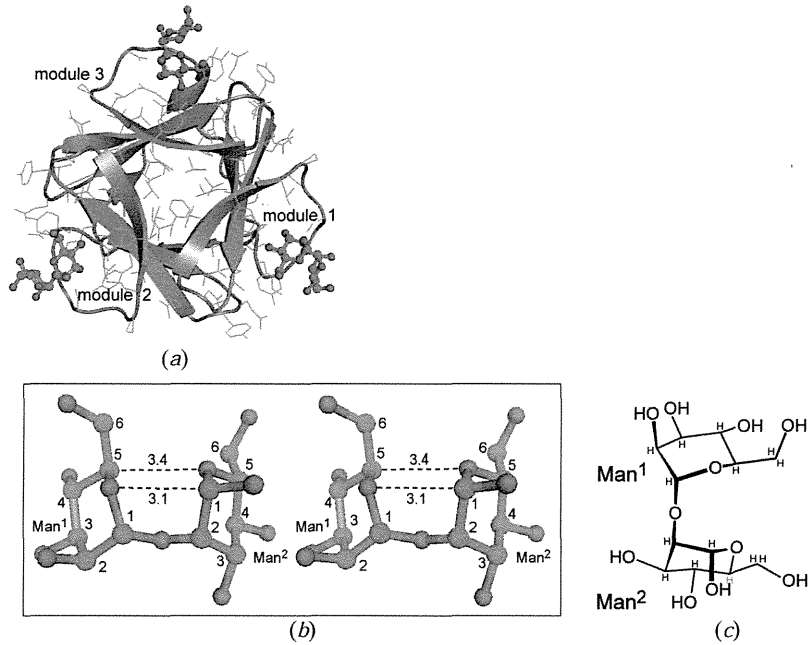


図4 (a) AHの3つの糖鎖結合ポケットに3分子の $\alpha(1-2)$ mannobiose (MB) が結合していることを示す (b) MBは、コの字型を形成している。(stereo-pair diagram) (c) MBの化学構造

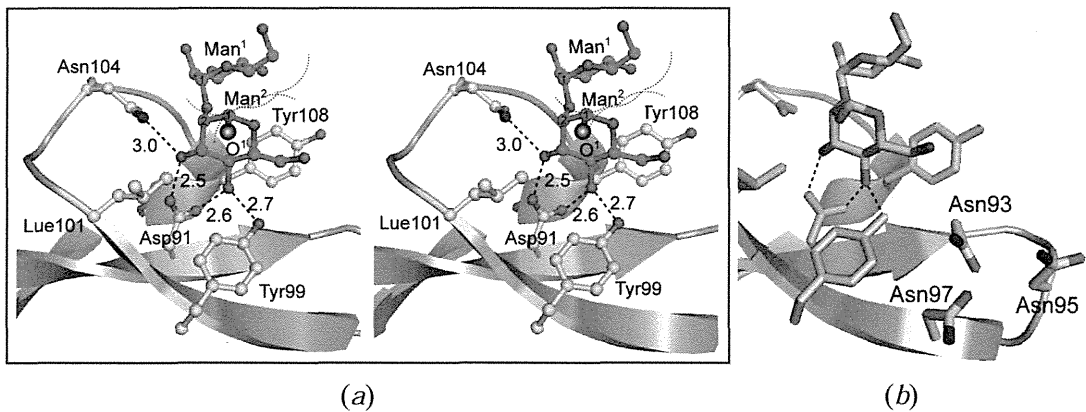


図5 (a) 糖鎖結合ポケットに結合したMBのstereo-pair diagram (b) ポケットの右端には3分子のAsnが存在する。D3のMBと結合していると推定される

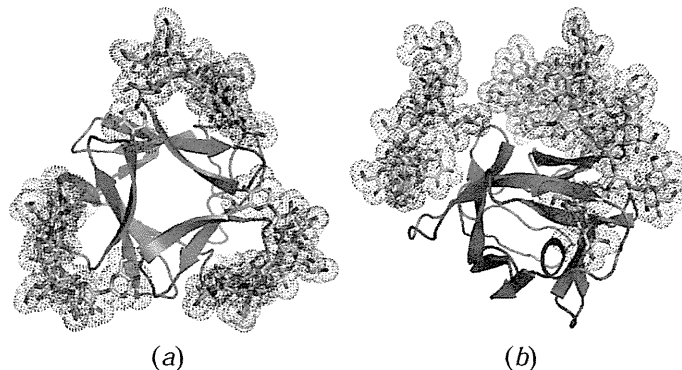


図6 3分子のMBとAHの結合モデル (a) 上から見た図 (b) 横から見た

成熟型AHの調製

従来の方法で調製したAHにはN末にシグナルペプチドとの結合部分（リンカー領域）のアミノ酸残基が残っているものが多く含まれていることが判明したので、114アミノ酸残基からなる成熟型AHの調製法を検討した。AH生産放線菌 *Longispora albida* の培養時間を延長することによりリンカー領域のアミノ酸残基が切断され、成熟型AHが生成することが分かった（図7）。また、27℃で5日間培養した後、37℃で3日間培養することにより未成熟型から成熟型に変換できることが分かった。精製法についても検討し、硫安沈殿とヒドロキシアパタイト・カラムクロマトグラフィーによる改良法を確立した。

上記の方法により、1グラムの成熟型AHを調製し、カニクイザルを用いるSHIV感染予防試験及びPEG修飾体の調製に供した。成熟型AHは未成熟型AHに比べてほぼ2倍の合法体形成阻害活性を示した。

PEG化修飾AHの調製

図8に示すように、還元剤として20 mM NaBH₃CNを用いる還元的アミノ化反応により、5kPEG及び10kPEGのアルデヒド基と成熟型AHの糖鎖結合ポケットの裏側に存在するN末Alaのアミノ基を反応させて、PEG化AHを調製した。反応液をそれぞれSuperdex 200及びSuperdex 75を用いるゲルろ過クロマトグラフィーにより精製し、5kPEG-AHの白色粉末12 mg（収率 21.5%）、及び10kPEG-AHの白色粉末16 mg（収率 41.1%）を得た。

さらに、両端に官能基を持つALD-5kPEG-ALDを用いて、図8に示すようにして2量体の調製を試みAH-5kPEG-AHを得ることができた。反応液をPEGASIL-300 C4Dを用いてODSカラムクロマトグラフィーにより精製し、2.8 mg（収率 13.4%）の白色粉末を得た。

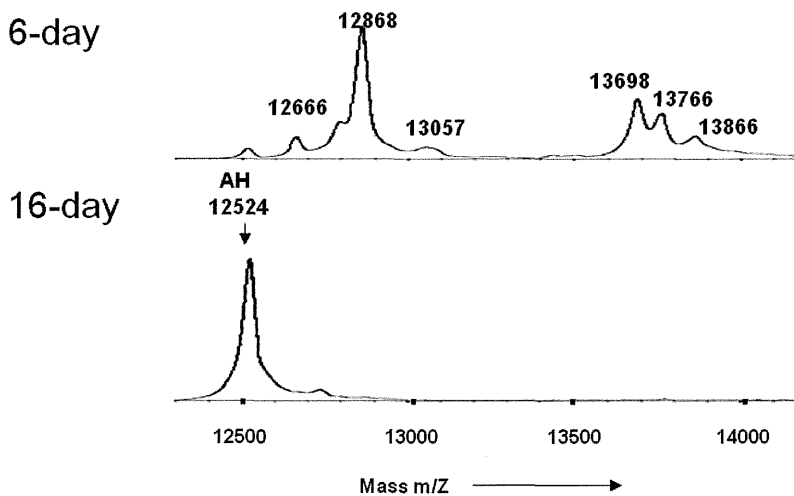


図7 AHの質量分析

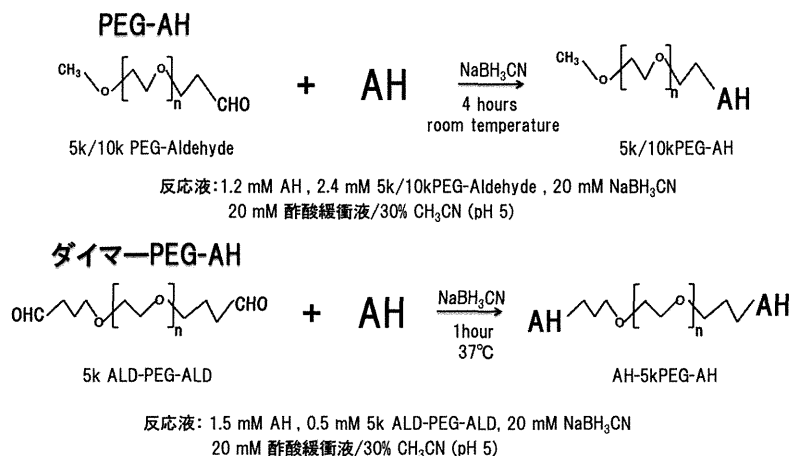


図8 PEG-AH及びAH-5kPEG-AH誘導体の調製

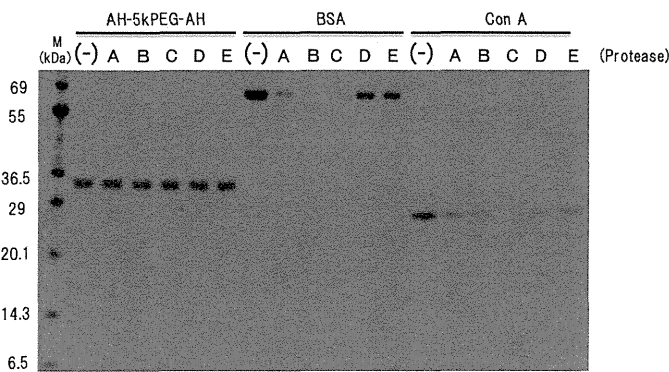
成熟型AH及び修飾体の諸性質

溶解性と安定性：成熟型AHは、pH 3以下及びpH 10以上で比較的高い溶解性を示し、中性付近では溶解性が低かったが、生理食塩水 (0.9% NaCl) に対しては9.8 mg/ml (この溶液のpHは3.4であり、pH 7.0に中和後の溶解性は2.0 mg/mlであった) の溶解性を示した。一方、含水有機溶媒 (30% CH₃CN、20% (CH₃)₂CO及び25% MeOH) に対しては、水よりも高い溶解性を示し、しかもこれらの溶液中で長時間保存しても安定であることが、合胞体形成阻害活性が保持されていること並びに円偏光二色性スペクトル分析でも変化が認められないことから明らかとなった。AH-5kPEG-AHは生理食塩水に対して6.1 mg/mlの溶解性を示した。

AH-5kPEG-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、Arg-C) をAH-5kPEG-AHに添加し、3時間反応後SDS-PAGE

(CBB染色) で評価した。コントロールとして、BSA (bovine serum albumin) と糖鎖結合タンパク質であるコンカナバリンAを用いた。その結果、BSA及びCoAでは分解が認められたが、AH-5kPEG-AHはAHと同様に (平成23年度報告) 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 (図9)。

溶解度と生物活性：合胞体形成阻害活性を調べた結果、成熟型AHのIC₅₀値が41 nMに対して、AH-5kPEG-AHでは15 nM、約3倍強い阻害活性を示した。5kPEG-AH及び10kPEG-AHでは、溶解性は改善されるものの合胞体形成阻害活性はAHの約1/5に低下していた。HIVとSIVの両方に感染できる組換え細胞であるLuSIV細胞を用いて、SHIV (HIVとSIVの組換えウイルス) に対する抗ウイルス活性を測定した結果、AH-5kPEG-AHが最も強く、次いでAHが強い活性を示した (表1、図10)。



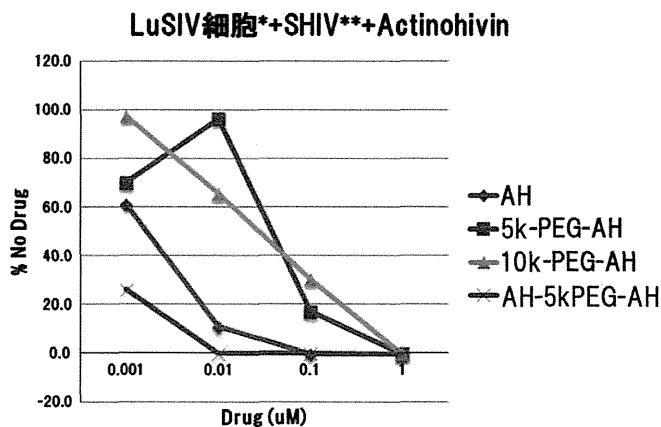
- A: α-Chymotrypsin (pH 8.0, 30°C)
- B: Proteinase K (pH 8.0, 37°C)
- C: Pepsin (pH 3.0, 37°C)
- D: Asp-N (pH 8.0, 37°C)
- E: Trypsin (pH 8.0, 37°C)

図9 AH-5kPEG-AHの各種プロテアーゼに対する安定性

表1 AH及び誘導体の溶解度と生物活性

	溶解度		生物活性	
	0.9% NaCl (mg/ml)	合胞体形成阻害活性 IC ₅₀ (nM)	抗SHIV活性* IC ₅₀ (nM)	
AH	9.8	41	1.8	
5kPEG-AH	≥ 18.6	280	85	
10kPEG-AH	≥ 29.4	330	87	
AH-5kPEG-AH	6.1	15	0.3	

* (独) 国立病院機構名古屋医療センター 杉浦らとの共同研究



* LuSIV 細胞： HIVとSIVの両方が感染できる組換え細胞
 **SHIV： HIVとSIVの組み換えウイルス
 (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 杉浦 互らとの共同研究、未発表

図10 AH及び誘導体の抗SHIV活性

AHの急性毒性

7周令ICR雄性マウス1群5匹（日本クレアから購入）に、AHを尾静脈注射（25 mg/kg）及び腹腔内注射（59 mg/ml）したが、注射後2時間以内においていずれも異常な行動や症状は観察されなかった。また、投与3日後においても体重減少などの症状は認められなかった。以上の結果から、上記の条件では急性毒性を示さないことが確認された。

AH及びAH誘導体の抗HCV活性

薬剤のHuH7.5細胞に対する毒性： 5×10^5 個の細胞をプレートに撒き、翌日培地を各濃度のAHまたはAH-TEV dimer/RTB-L（AH2量体）を含むDMEM 300 mlで置換し、4日間培養して細胞増殖をPOMECAのCellTiter-Glo™で測定した（ATP量をルシフェラーゼ活性で測定する）。その結果、AH、AH2量体ともに3000 nMまでルシフェラーゼ活性の低下は見られなかった（細胞毒性は観察できなかった）。

感染阻害活性： AH及びAH2量体を20～12,000 nMの濃度でウイルス粒子産生を測定した（図11）。その結果、AH2量体はAHの4～5倍の阻害活性を示した。

ウイルスを細胞に感染させる前に、細胞をAH2量体で12時間処理し、AH2量体を除いてからウイルスを細胞に感染させ、2日間37℃で培養した後に培養液上清のウイルス量を測定した結果、薬剤濃度を1200 nMまで上げて、感染性の変化は見られなかった（図12）。つまり、図11に示したAH2量体による阻害は、細胞に由来するものではなく、AH2量体がウイルスに作用した結果であることが明らかとなった。

次に、感染阻害の起こる時期を調べるために下記の実験を行った。細胞にウイルスを混ぜてすぐに4℃に冷却した後、AH2量体を加えて1時間処理した（この段階ではウイルス粒子は細胞に吸着するが侵入はしないと考えられている）後、薬剤の入っていないDMEMに置き換えてから37℃に戻して、2日間培養を続け、培養上清のウイルス量を測定した。その結果、4℃で処理している過程でAH2量体が存在していても、その後薬剤を除いて37℃に戻すと阻害は図11と同じように観察された。従って、AH2量体は、ウイルス粒子が細胞に吸着する段階で阻害効果を示すものと考えられる。

また、細胞にウイルスを感染させると同時にAH2量体を添加して1時間保温し、その後薬剤の入って

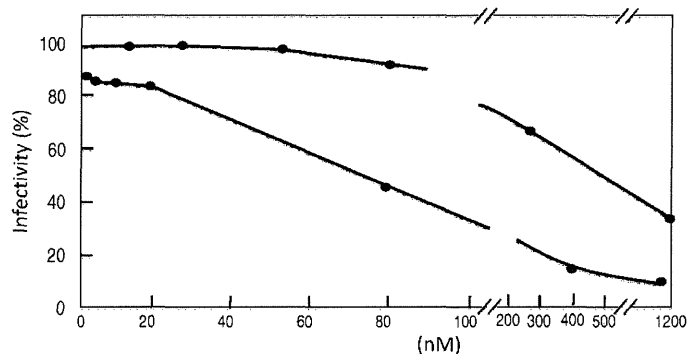


図11 AH単量体及びAH2量体の抗HCV活性（上側：AH、下側：AH2量体）

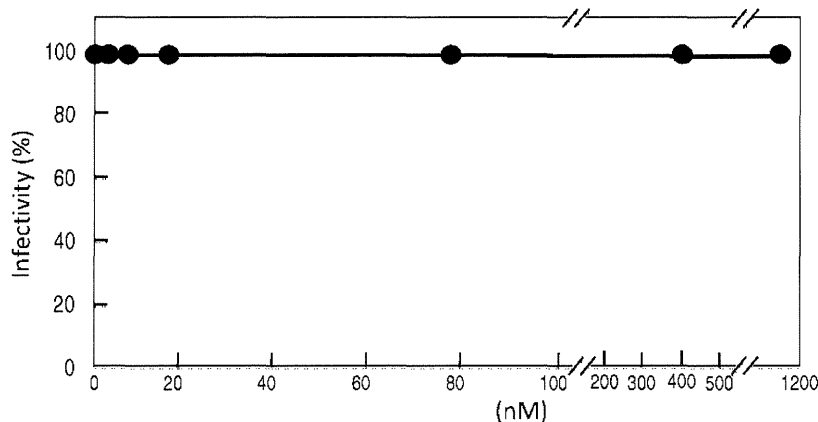


図12 AH2量体処理・洗浄後の細胞へのHCVの感染性

いない培地に置き換えて培養を続け、2日後に上清のウイルス量を測定した場合にも、阻害効果は図11に示したのと同様であった。

以上の結果をまとめると下記のようなになる。

- (1) AHおよびAH2量体はHCVに対して阻害効果を示した。AH2量体がAHに比べ高い阻害活性を示した。AH及びAH2量体の IC_{50} は、それぞれ300 nM、60~70 nMであった。
- (2) 感染阻害は薬剤の細胞への効果ではなく、ウイルス粒子に働いて引き起こす。
- (3) 抗HCV効果は感染の初期に働いて抗ウイルス作用を示す。特にウイルス粒子が細胞に接触する過程を阻害すると考えられる。
- (4) これらの薬剤が抗HCV効果を示す容量での細胞毒性は認められなかった。

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、ミトジェン活性、サイトカイン分泌促進活性を示さないことが示されたが、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明快に示された。 $\alpha(1-2)$ mannobioseの立体構造のこの字型構造が選択制において重要であり、 $\alpha(1-3)$ や $\alpha(1-6)$ では同様の構造をとりえないことが分かった。

(2) AH耐性株の解析結果から、これまでに推定されたAHの作用機構が正しかったことが証明された。

(3) 成熟型AHの調製法を確立した後、PEG修飾体を調製することができた。調製に成功したAH-5kPEG-AHは非常に強い抗SHIV活性を示し、プロテアーゼに対して安定であることがわかったので、AH及びAH-5kPEG-AHを用いるカニクイサルにおけるSHIV感染予防試験のみならず治療実験が期待される。

(4) マウスを用いる急性毒性試験で、尾静注 (25 mg/kg) 及び腹腔内投与 (59 mg/kg) で急性毒性が認められないことが確認された。

(5) これまでのAHの生化学的研究並びにX線結晶構造解析の結果から、AHは多くのHMを持つ糖タンパク質に対してのみ強い特異的な親和性を示すことが分かっているので、AHが抗HCV活性を示すという結果は、HCVの表面に存在するHMがHCVの細胞への感染に必須であることを示すものであると共に、AH及びAH修飾体を用いる抗HCV薬開発の可能性を示すものである。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

1. 原著論文

- 1) Hoque MM, Suzuki K, Tsunoda M, Jiang J, Zhang F, Takahashi A, Ohbayashi N, Zhang X, Tanaka H, Omura S, Takénaka A. Structural insights into the specific anti-HIV property of actinohivin: structure of its complex with the $\alpha(1-2)$ mannobiose moiety of gp120. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 68:1671-1679, 2012
- 2) Suzuki K, Ohbayashi N, Jiang J, Zhang X, Hoque MM, Tsunoda M, Murayama K, Tanaka H, Takénaka A. Crystallographic study of the interaction of the anti-HIV lectin actinohivin with the $\alpha(1-2)$ mannobiose moiety of gp120 HMTG. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. 68(Pt 9):1060-1063, 2012
- 3) 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)*. Aug; 64(8):551-7, 2011.
- 4) Hoorelbeke B, Huskens D, Férrir G, François KO, Takahashi A, Van Laethem K, Schols D, Tanaka H, Balzarini J. Actinohivin, a broadly neutralizing prokaryotic lectin, inhibits HIV-1 infection by specifically targeting high-mannose-type glycans on the gp120 envelope. *Antimicrob Agents Chemother*. 54:3287-3301, 2010
- 5) Matoba N, Husk AS, Barnett BW, Pickel MM, Arntzen CJ, Montefiori DC, Takahashi A, Tanno K, Omura S, Cao H, Mooney JP, Hanson CV, Tanaka H. HIV-1 neutralization profile and plant-based recombinant expression of actinohivin, an Env glycan-specific lectin devoid of T-cell mitogenic activity. *PLoS One*. 5:e11143, 2010
- 6) Takahashi A, Inokoshi J, Tsunoda M, Suzuki K, Takénaka, Sekiguchi T, Omura S, Tanaka H. Actinohivin: specific amino acid residues essential for anti-HIV activity. *J. Antibiot*. 63:661-665, 2010

2. 口頭発表

- 1) 下遠野久美子、高橋 淳、大林尚美、田中晴雄、下遠野邦忠：高マンノース型糖鎖を認識するレクチンによるC型肝炎ウイルスの増殖阻害. 日本薬学会第133年会, 横浜, 2013年3月

- 2) 大林尚美、張 曉雪、佐藤 陽、金容必、前島雅美、岩谷靖雅、杉浦 互、田中晴雄：抗HIVレクチン アクチノヒビンのペグ化誘導体の調製と諸性質 日本農芸化学会東北支部第147回大会、弘前、2012年10月
- 3) Hoque MM, 鈴木 薫, 角田 大, 江建東, 張放, 高橋敦, 大林尚美, 張 曉雪, 田中晴雄, 竹中章郎: Structural insights of a potent anti-HIV actinohivin upon binding specifically to the target oligomannose of HMTG attached to HIV-gp120. 平成24年度日本結晶学会年会, 仙台, 2012年10月
- 4) Tanaka H, Takahashi A, Obayashi N, Takenaka A, Omura S. The Anti-HIV Lectin Actinohivin Specific to a Glycoprotein Having Many High-mannose-type Glycans such as HIV gp120. BIT's 2nd Annual World Congress of Molecular & Cell Biology-2012, Beijing, China, May, 2012
- 5) 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 日本薬学会第132年会、札幌、2012年3月
- 6) Hoque MM, Jiandong J, Suzuki K, Tsunoda M, Takahashi A, Sekiguchi T, Tanaka H, Takénaka A. Specificity and efficiency in activity of anti-HIV actinohivin for sugar binding. *Acta Cryst.* A67, C286, the XXII Congress of the international Union of Crystallography, Spain, Aug 23,24, 2011
- 7) Jiandong J, Hoque MM, Suzuki K, Tsunoda M, Takahashi A, Sekiguchi T, Tanaka H, Takénaka A. Structure determination of anti-HIV actinohivin in complex with mannobioses. *Acta Cryst.* A67, C296-C297, the XXII Congress of the International Union of Crystallography, Spain, Aug 23,24, 2011,
- 8) Takahashi A, Inokoshi J, Hachiya A, Oka S, Murakami A, Azuma T, Tanno K, Omura S, Tanaka H. Actinohivin: derivatives with improved anti-HIV activity and better safety. Antiviral Congress, Amsterdam, Nov. 8, 2010
- る遺伝子、ポリペプチドの製造方法
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)
出願人：(有) キイム・ファーマ・ラボ
発明者：田中 晴雄、大村 智

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録 (予定を含む)

1. 特許取得

(1) 発明の名称：抗HCV薬

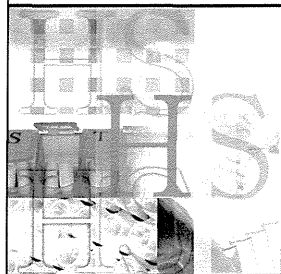
出願：特願2012-268884 (2012年12月8日)

出願人：明星学苑

発明者：田中晴雄、下遠野邦忠、高橋 淳、大林尚美、大村 智

(2) 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

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

新しい抗HIV-1剤の創製を目的として、これまでのヒット化合物からの合成展開並びに評価を行った。本期間内に新たに合成した107化合物のうち、26化合物に $IC_{50} < 10nM$ の抗HIV-1活性が認められた。これらの化合物の中で特許的に新規であり、良好なマウス経口吸収性を示した3化合物につき更なる検討を行ったところ、ラット及びイヌに対し、38～約100%の経口吸収性を示し、マウス以外の動物種に対しても良好な経口吸収性を示した。また、ラットを用いてマスバランスについて検討したところ、良好な回収率を示した。ラット及びイヌ血清に対する蛋白結合率は82～92%であった。微生物を用いた復帰突然変異試験及びマウス小核試験並びにhERG電流に及ぼす影響について検討したところいずれも陰性であった。更に、マウス1か月及びラット2週間反復投与とご毒性試験を実施したが重篤な毒性は認められなかった。今後、非げっ歯類（イヌ等）での反復毒性試験を実施していく予定である。

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へ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活性を有する新規化合物を見出している。臨床可能な薬剤の開発を目標として、新たな化合物の合成・評価に加え、これらの化合物の有効性並びに動態、安全性に関する基礎的な検討を行ったので報告する。

B. 研究方法

i) 新規化合物の合成

これまで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 μM 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) 新規化合物の動態に関する評価

・経口吸収性の検討

0.5%メチルセルロースに懸濁させた被験物質を6週齢のICR系雄性マウスに25 mg/kg単回経口投与し、1, 4及び12時間後に採血した。ラットについては雄7週齢のCtrl: CD (SD) を使用し、クレモホールにて溶解した被験物質を経口並びに静脈内投与した。イヌについてはビーグル犬を用い、ラットと同様に検討した。調製した血清と等量のアセトニトリルとの混合により除蛋白し、その遠心上清中の薬剤濃度をHPLC (島津製作所、Prominenceシリーズ、カラム: XTerra RP18 3.5 μm , 4.6 \times 100nm) にて測定した。経口吸収率 (BA: %) は、経口投与時のAUC/静脈内投与時のAUCによって算出した。

・血清蛋白結合率の検討

ラット及びイヌのPool血清と3 $\mu g/mL$ に調製した被験物質を60分以上反応させ、限外濾過法