

象から除外している。しかしながら、これらの因子も IL-6 の発現制御因子候補であることから創薬ターゲットとなり得る。これらの候補因子群については、スクリーニング結果の再現性を検討して、更なる解析により IL-6 の発現制御因子であることを確認することで、IL-6 の発現制御を中心とした炎症性疾患の病態メカニズムの解明につなげる。

(2) TGFβ シグナルを制御する因子のスクリーニング

TGFβ シグナルは炎症反応において重要な役割を持つサイトカインであり、その重要性は TGFβ1 のノックアウトマウスにおいて全身での炎症の亢進が報告されていることから明らかである

(Kulkarni AB et al. Proc Natl Acad Sci USA.15;90(2):770-4.)。また、TGFβ シグナルは血球細胞の分化やサイトカイン分泌を制御することも知られており、この面でも炎症反応への関わりは大きいと考えられる(Li MO and Flavell RA. Cell 134(3): 392-404)。しかし、TGFβ シグナルがどのようにリウマチをはじめとした炎症性疾患の病態に関わっているかは不明な点が多い。その理由の一つとして、TGFβ シグナルが組織あるいは細胞ごとに特異的な制御因子とともに働くことが挙げられる。すなわち、個々の組織の炎症における TGFβ シグナルの制御因子を同定することはこのシグナルの分子メカニズムの解明のみならず、リウマチのみならず様々な炎症性疾患の新規創薬ターゲットの発見にも繋がることを期待される。本研究のスクリーニングで得られた候補因子の中には、免疫系の血球細胞の分化を制御することが報告されているものや骨格系で発現することが知られているものもあり、興味深い結果と考えられる。今後はこれらの因子のリウマチをはじめとした炎症性疾患の病態への関わりについて検討する。

本研究では TGFβ シグナルを制御する因子を約 6,000 種類の発現プラスミドを使用してハイスループット遺伝子導入アッセイによりスクリーニングし、本年度までに複数の制御因子候補を見出した。今後は、3 次スクリーニングによる更なる絞り込みを行ない、TGFβ シグナルの生理的役割に対する制御活性を確認する。この過程で確定した制御因子は、その後、個々の因子の発現する細胞や予想される制御メカニズムに合わせた培養細胞を用いた検討により、この制御因子が炎症およびリウマチ病態に重要であるか等について検討し、炎症性疾患の病態に関わるか、またどのように関わるか調べる。

これらの解析によりリウマチ疾患をはじめとした炎症性疾患の病態メカニズムを明らかにすることを試みる。また、解析の上で病態に密接に

関係することが確認できた因子については創薬ターゲットとして同定を目指す。

E. 結論

ポストゲノム時代における、新たなアプローチである全長 cDNA 遺伝子導入による機能的スクリーニングのシステムを用いて、炎症性疾患に関わる遺伝子の発現を制御している遺伝子を探索するスクリーニングを行なった。この解析により、これまでに報告のない IL-6 の発現制御因子および TGFβ 制御因子候補が多数得られた。これら候補因子は、更なる *in vitro*、*in vivo* の解析を行い、リウマチや変形性関節症をはじめとした炎症性疾患の創薬ターゲットの同定を目指す。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamashita S, Miyaki S, Kato Y, Yokoyama S, Sato T, Barrionuevo F, Akiyama H, Scherer G, Takada S, Asahara H. L-Sox5 and Sox6 enhance chondrogenic miR-140 expression by strengthening dimeric Sox9 activity. *J Biol Chem.* 2012 **287**(26): 22206-15.
2. Yamashita S and Asahara H. miRNA functions in Arthritis. *Curr Rheumatol Rev.* 2012, **8**, 98-102.
3. Miyaki S, Asahara H. Macro view of microRNA function in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2012; **8**(9): 543-552.
4. Nishimasu, H., Ishizu, H., Saito, K., Fukuhara, S., Kamatani, MK., Matsumoto, N., Nishizawa, T., Bonnefond, L., Nakanaga, K., Aoki, J., Ishitani, R., Siomi, H., Siomi, MC., and Nureki, O. 2012. Structure and function of Zucchini endoribonuclease in piRNA biogenesis. *Nature* **491**: 284-287.
5. Nishida, KM., Miyoshi, K., Ogino, A., Miyoshi, T., Siomi, H. and Siomi, MC. 2013. Roles of R2D2, a cytoplasmic D2 body component, in the endogenous siRNA pathway in *Drosophila*. *Mol Cell* **49**: 680-691.
6. Sato, K., and Siomi, H. 2012. PIWI proteins and their Slicer activity in piRNA biogenesis and transposon silencing. *The Enzymes Vol. 32: Part B: RNA endonucleases in RNAi and microRNA metabolism and their partners* pp137-162 (eds., F. Tamanoi, F. Guo, and G. Chanfreau) Elsevier.
7. Miyoshi, K., Ogino, A., Siomi, MC. and Siomi, H. 2013. Purification of dFMR1-Containing Complexes Using Tandem Affinity Purification.

Methods in Mol Biol in press.

2. 学会発表

1. The 3rd Shanghai International Conference of Epigenetics in Development and Diseases/The 7th Annual Conference of Asian Epigenome Alliance/Genome Medicine Workshop on Epigenetic (-moic)s in Diseases, Shanghai, China, April 19-22, 2012
2. The 53rd Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology, Tokyo, May 23, 2012
3. Symposium on Epigenetic regulation of gene expression, Joint meeting of the 45th annual meeting of the Japanese Society of developmental Biologists & the 64th annual meeting of the Japan Society for Cell Biology, Kobe, May 28-31, 2012
4. The 22nd CDB meeting, RNA sciences in cell and developmental biology II, Kobe, Japan, June 11-13, 2012
5. ISSCR2012, 2012年6月13日～16日, 横浜
6. RNA学会, 2012, 2012年7月18日～20日, 仙台
7. 63rd Fujihara Seminar, “A new horizon of retroposon research”, Kyoto, July 31 – August 3, 2012
8. The 84th annual Meeting of the Genetics Society of Japan, Symposium: “Epigenomic regulation of cell fate determination and homeostasis”, Fukuoka, September 24, 2012
9. Cell Symposia: Functional RNAs, Sitges, Spain, December 2-4, 2012
10. 山下 聡、味八木 茂、加藤 義雄、横山 茂俊、佐藤 天平、Francisco Barrionuevo、秋山 治彦、Gerd Scherer、高田 修治、浅原 弘嗣 Sox trio (Sox5、Sox6、Sox9)による軟骨での miR-140 の発現制御 第 35 回日本分子生物学会年会、福岡、2012年12月11～14日
11. Institute for Genome Research, The University of Tokushima, Tokushima, December 21, 2012
12. 山下 聡、味八木 茂、加藤 義雄、横山 茂俊、佐藤 天平、Francisco Barrionuevo、秋山 治彦、Gerd Scherer、高田 修治、浅原 弘嗣 Sox trio による軟骨での miR-140 の発現制御 第 26 回日本軟骨代謝学会、大阪、2013年3月1～2日
13. Radiation Effects research Foundation,

International Workshop: RERF Radiation Research in the Post-genome Era, Hiroshima, March 7-8, 2013

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特許申請中
「miR-140 の発現を制御する DNA 及び該 DNA を利用した薬剤のスクリーニング方法」
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

HIVのインテグラーゼとプロテアーゼの多量体化の ダイナミクス解明とそれらの阻害剤の開発

熊本大学大学院生命科学研究部・血液内科学分野

満屋 裕明

平成22年4月～平成25年3月

研究要旨：HIV プロテアーゼ (PR) の酵素活性獲得には同一 PR2 分子の 2 量体形成が必須で、その過程は新規の抗 HIV 剤開発の標的と成りうる。本研究では PR2 量体化過程およびその阻止過程について、タンパク質の多分子間相互作用を HIV PR とレポータータンパクの融合タンパクの発現系と解析系 (FRET-HIV-1 expression assay system) 及び electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) を用いて解析した。併せて新規のプロテアーゼ阻害剤をデザイン・合成し、野生株および多剤耐性 HIV-1 株に対する抗 HIV 活性を測定すると共に、PR2 量体形成阻害効果を評価、複数の 2 量体阻止活性を有する化合物を同定した。また PR 同様に HIV 増殖に必須の酵素である HIV インテグラーゼ (IN) は、未だ HIV IN と DNA 或は IN 阻害剤との X 線結晶構造解析がなされておらず詳細な結合態様は不明であることから、本研究では BiFC 法 (蛍光蛋白再構成法) 等を用いて IN の多量体化の過程および IN の多量体化に必須の部位を検討、更には多量体化阻止の可能性についても検討した。

外国側研究者 (研究委託)

(1) Purdue University, Dept. of Chemistry and Medicinal

Chemistry Arun K. Ghosh

1. 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 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・構造生物学的な研究を進める。また、HIV のインテグラーゼ (IN) は、逆転写酵素に媒介されてウイルス RNA から生成された二重鎖プロウイルス DNA を標的細胞の DNA に組み込む役割を果たす、HIV の増殖に必須の酵素である。IN は、その多量体化に関連するとされる N 端 HH-CC zinc finger ドメイン、IN の酵素活性ドメイン、C 端ドメインの 3 ドメインから構成されている。酵素活性ドメインと C 端ドメインはウイルスと細胞の DNA に結合する事が示されているが、IN と DNA の複合体の構造解析データは未だ得られていない。更に臨床で用いられている IN 阻害剤 raltegravir についても IN との複合体の結晶が得られていないことから、その結合の態様は不明である。予

備的な生化学的及び構造学的データが、IN は二量体あるいは四量体となって初めてその酵素活性を發揮する事を示唆しているが、そのダイナミクスは不明のままである。本研究では HIV の IN の多量体化のダイナミクスを BiFC-based HIV expression assay と種々の mutated/truncated IN を用いて明らかにし、得られた知見を基に新規 IN 阻害剤開発へと進める。

2. 研究方法

1) 化合物の抗HIV-1活性評価：抗HIV-1活性の評価にはMTT assay、MAGI assayを用い野生型HIV-1に対する抗HIV-1活性についてスクリーニングを行う。

高い活性を有するものについては、更に複数の多剤耐性HIV-1変異株に対する活性を検討するためp24 assayを行う。このassayの評価には全自動化学発光度測定機であるLumipulse Fを用い、迅速に多検体を処理することが可能である。以上の方法により検討された有望な化合物については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：新規化合物がウイルス、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 Genetic Analyzer) を用いることにより迅速に実験データを解析する。

3) 薬剤耐性のメカニズム解析：野生 HIV-1 株や多剤耐性 HIV-1 変異株に対して高い活性を有する新規化合物については、試験管内で耐性 HIV-1 変異体の誘導を試みる。方法は cell free manner にて行い、徐々に薬剤濃度を上げながら培養を継続させる。誘導された HIV-1 変異体については、遺伝子解析により耐性関連変異を同定すると共にウイルスの増殖能や薬剤感受性への影響等、ウイルス学的解析を行う。加

えて X 線結晶構造解析等の構造学的解析を行い、耐性発現機序の分子並びに原子レベルでのメカニズムを解析する。

4) HIV-1 プロテアーゼ (PR) 2 量体化阻害効果の解析：我々は蛍光タンパク質である CFP もしくは YFP 遺伝子を HIV-1PR 遺伝子の後方に導入した full-length HIV-1 plasmid を構築し、その 2 種類の plasmids を COS7 細胞に cotransfection、細胞内で FRET (fluorescence resonance emission transfer) が起こるか否かで HIV-1PR の二量体化の有無を定量化出来る測定系を既に構築している (FRET-HIV-1 expression assay system; Koh & Mitsuya *et al*, *JBC*. 2007)。この測定系を用い、HIV-1PR に種々のアミノ酸置換を導入した変異体について二量体形成に与える影響を検討する。また新規に合成される化合物については、二量体化阻止能を測定する。

5) Electrospray ionization mass spectrometer (ESI-MS) を用いたプロテアーゼ二量体化の解析：大腸菌発現系を用いて発現させたプロテアーゼ (PR) を精製した後、一度ギ酸で変性させ、酢酸アンモニウムを用いて薬剤存在下又は非存在下でリフォールディングを行う。リフォールドした PR を ESI-MS により測定する。

6) HIV-1 インテグラーゼ (IN) 多量体の分子学的解析：我々は、BiFC-based HIV-1 expression assay の構築を行っている。この方法では、蛍光蛋白 YFP の改良型変異体である Venus 遺伝子の N 末端側 173 アミノ酸配列および C 末端側 83 アミノ酸配列を、それぞれ PCR による recombination により野生株 HIV-1 の IN に隣接する形で導入した plasmid を作成した。この plasmids を COS7 細胞もしくは HEK293 細胞に transfection、細胞中に共発現させ、IN が多量体を形成した場合に起こりうる N 末端側と C 末端側が補完された完全長 Venus 蛋白による蛍光を共焦点顕微鏡下で観察、評価を行う。また過去の報告および IN モノマー同士の docking model により導かれた

IN の多量体化に重要であると考えられる複数のアミノ酸置換を導入した mutated および truncated IN を用いて HIV IN の多量体化のダイナミクス解析を明らかにする。

7) 新規化合物のデザイン・合成：X線結晶構造解析等の構造学的データおよび実際に HIV を用いて得られる野生株や耐性株に対する抗 HIV-1 活性データ、二量体化阻止能のデータ、更には PR や IN のダイナミクス解析より得られたデータ等を基に、化合物のデザインおよび再デザインを行い、新規化合物の合成を進める。

(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。

3. 研究結果及び考察

我々は複数の多剤耐性 HIV-1 変異株に高い活性を発揮するプロテアーゼ阻害剤 (PI)、TMC114/darunavir/Prezista (DRV) を Ghosh グループとの共同研究で開発した (Koh & Mitsuya *et al*, *Antimicrob Agents Chemother.* 47: 3123-3129, 2003: 図 1)。DRV は 2006 年に米国 FDA に認可、本邦でも臨床に供されている。2008 年に 1 日 1 回投与の初回治療薬として認可されるに至り、今後の HAART の中心的な薬剤となる可能性が極めて高い。

図 1 に示すように DRV は二量体を形成した HIV プロテアーゼ (PR) の 29 番、30 番のアミノ酸の主鎖と水素結合を形成、強固に結合する。一方で、29 番のアミノ酸は HIVPR の二量体化に重要なアミノ酸であり、種々のアミノ酸置換体は二量体化が損なわれることが知られている。DRV の PR 二量体化への影響を我々が構築した FRET-HIV-1 expression assay system で解析し、DRV や後述する GRL-98065

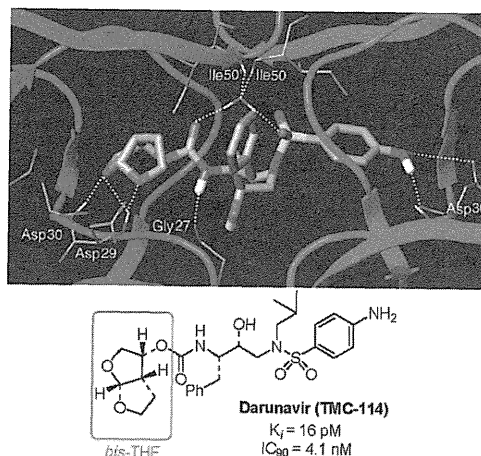


図 1. Darunavir の化学構造と PR との結合様式。

PR の酵素活性中心部位のアミノ酸 (Asp-29 と Asp-30) の主鎖と強力な水素結合を形成している。

等の bis-tetrahydrofuran-yl-urethane (bis-THF) 構造及びその類似構造を有する一連の化合物群が酵素活性阻止能に加えて HIV PR 二量体化阻止活性を有する bi-functional PI であることを報告した (Koh & Mitsuya *et al*, *JBC.* 2007)。このことは DRV が HIV の耐性獲得に対して high genetic barrier を示す要因であると考えられる。これまでに複数の研究グループが DRV に対する試験管内高度耐性 HIV-1 変異体の誘導を試みるものの成功しておらず、我々は既存の薬剤に耐性となった臨床分離株 8 種類を混合したウイルスを「出発株」として用い耐性を誘導、DRV 高度耐性 HIV-1 変異体を生成した。またこの変異体の生成は、ウイルス間の recombination が起こることにより促進されることを報告した (Koh & Mitsuya *et al*, *J Virol.* 2010)。この DRV 耐性 HIV-1 変異体の PR 領域の遺伝子解析より、V32I、L33F、I54M、I84V の 4 つのアミノ酸置換を同定し、この 4 つの変異を全て導入した変異体は、DRV に耐性を示すと同時に DRV の PR 二量体化阻止から免れることを報告した (Koh & Mitsuya *et al*, *J Virol.* 2011)。一方、米国 FDA に認可されている PI のうち、tipranavir (TPV) は DRV 以外に唯一二量体化阻止能を有する PI である。TPV も多剤耐性 HIV-1 変異株に高い活性を示す

ものの、TPVによる二量体化阻止はL33F/IやL24Mなど1アミノ酸置換により損なわれることを明らかにし、相対的にDRVのgenetic barrierが高いことを立証した(Aoki & Mitsuya *et al.* *J. Virol.* 2012)。他方、大腸菌発現系を用いて種々のPR変異体を発現・精製し、ギ酸により変性後、薬剤非存在下又は存在下でリフォールディングしたサンプルをelectrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS)を用いて解析した結果、DRVはPR単量体と1対1の複合体を形成する事で二量体の形成過程を阻害していることが示された。またDRV耐性に関連する4つのアミノ酸置換を導入したプロテアーゼモノマーPR^{32/33/54/82}はDRVが結合能を喪失している事を初めて明らかにした(図2)。また同様の方法を用いて、二量体化に関与するアミノ酸残基(T26, D29及びR87)に変異を有する変異体R^{T26A}, PR^{D29N}及びPR^{R87K}やC末端(96-99番)を削除した変異体PR^{1-C95A}の解析より、PRの二量体形成は(1)T26及びR87による分子間相互作用による不安定な二量体の形成、(2)N-末端及びC-末端の分子間相互作用による二量体の安定化の2段階を必要とする事が示唆された(Hayashi & Mitsuya *et al.*, 投稿準備中)。

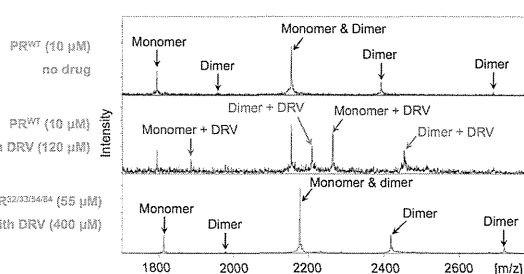


図2. 一旦変性させたHIV-PRを、DRV存在下又は非存在下でリフォールディングし、ESI-MSで解析した結果を示す。DRV非存在下(上段)に比べ、DRV存在下ではDRVとPR^{WT}のmonomer又はdimerの複合体に由来するピークが観測された(中段)。一方、高度DRV耐性変異を有するPR^{32/33/54/84}をDRV存在下でリフォールディングした結果、DRVとPR^{WT}の結合した分子種は確認されなかった(下段)。この事から、DRVはHIV-PRのmonomerとdimerの両方に結合し、PR^{32/33/54/84}はDRVのmonomer及びdimerの両方の結合に耐性を示す事が明らかとなった。

DRVの二量体化阻止能の発見以降もより強力な

抗HIV活性を有する2量体形成阻害剤(PRI dimerization inhibitors; PDIs)の開発を分担研究者のGhoshグループと継続しており、macrocylic構造という特徴的な構造を有し、多剤耐性HIV-1変異株に対して高い活性を発揮する一連の低分子化合物、GRL-0216A, -0286A等のPDIsを同定、詳細なX線結晶構造解析により同構造がHIV-PR flap部位に対し効果的に結合する事で強力な活性を発揮する事を見出した(Tojo & Mitsuya *et al.*, *Antimicrob Agents Chemother.* 2010)。更にtetrahydropyrano-tetrahydrofuran (Tp-THF)というbis-THFとは異なる基本骨格を有する2つのPis、GRL-1388および-1398を同定、DRV高度耐性HIV-1変異体を含む多剤耐性HIV-1株に対して極めて強力な活性を発揮する事を確認し、同化合物群に対するHIV-1の耐性獲得の機序について検討した。またモデリングによりGRL-1398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する事などを報告した(Ide & Mitsuya *et al.*, *Antimicrob Agents Chemother.* 2011)。これらに加え我々は、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)活性を発揮し、また既存の抗HIV剤に比べ試験管内でのHIV-1の耐性化に著しく抵抗する新規化合物、GRL-0519を開発・同定し(Ghosh, Amano & Mitsuya *et al.*, *ChemMedChem*, 2010, Amano & Mitsuya *et al.*, *Antimicrob Agents Chemother.* 2012)、X線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の複数の主要アミノ酸群と異なる相互作用を有しうる事を確認、GRL-0519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 3)。

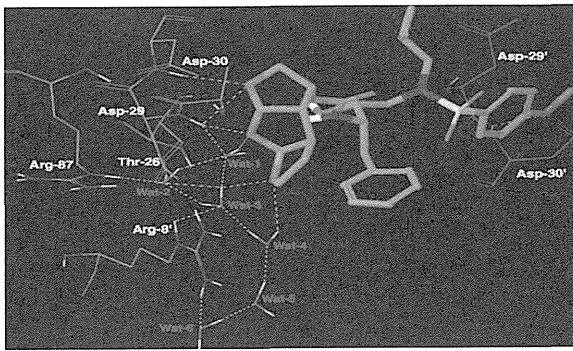


図 3. 結晶構造解析より得られた GRL-0519 と野生型 PR 間の相互作用を黄点線で示す。DRV の bis-THF 構造と比べ、GRL-0519 の tris-THF 構造は PR 主要アミノ酸群と水を介した相互作用をより多く有する事が判明した。

また、difluoride を付加した bis-THF 構造を有する GRL-016、-048、-050 といった一連の化合物を新たに同定、薬剤の脳内移行性を評価し得る *In Vitro* BBB (脳血管関門) 構築システムを用いて検討した結果、これら化合物群は現在 AIDS 脳症の第一選択とされる AZT、IDV などを含んだ既存の HIV-1 治療薬と比較しより良好な脳内移行性を発揮する可能性が示唆され、AIDS 脳症合併症例の有力な選択肢と成り得る可能性が考えられた (Miguel, Amano & Mitsuya *et al*, 論文執筆中)。これらの複数の PIs は臨床試験移行を前提に更なる検討中である。DRV が本邦でも臨床で用いられる様になり、多くの患者で高い臨床効果と耐性発現の著しい遅延 (或は耐性化しない) が確認されているが、複数の従来型 PIs 長期投与歴を有する患者群で既に DRV 耐性株が確認されており、更に高い抗 HIV 活性と耐性発現に抵抗する新規薬剤開発の必要性は論を待たない。

一方、インテグラーゼ (IN) 阻害剤 (INI) は既に本邦でも臨床導入されているが、HIV は比較的速やかに INI に対する耐性を獲得し治療に抵抗する事が知られており、耐性発現の分子機構の解明と耐性発現に抵抗する新規 INI の開発が急務である。我々は、BiFC-based expression assay によって HIV-1 IN の多量体形成及び HIV-IN と IBD (宿主因子である LEDGF/p75 の一部) の複合体が形成した際に生じる

Venus の発光を共焦点顕微鏡により観察した (図 4)。

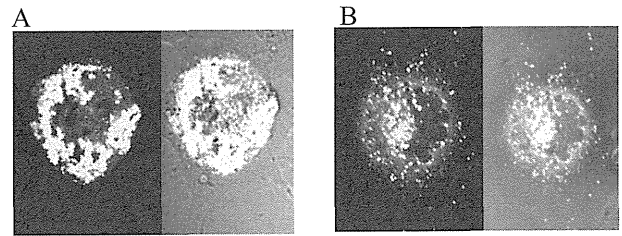


図 4:A. Cos7 細胞に pBiFC-VN-IN 及び pBiFC-VC-IN を共形質転換して得られた画像。IN は多量体を形成し核へ移行している。
B. pBiFC-VN-IN 及び pBiFC-IBD-VC (IBD:宿主因子である LEDGF/p75 の一部) を共形質転換して得られた画像。IN と LEDGF/p75 は細胞内で相互作用し、複合体を形成している。

次に IN の多量体形成が損なわれる変異 (Glu11、His12、Lys186 *etc*) においてその蛍光の低下を定量化し、ダイナミクス解析を行った (Nakamura & Mitsuya, 論文執筆中)。我々はこの手法を IN 多量体阻害や宿主因子と IN との結合を阻害するなどの新規作用機序を有する薬剤のスクリーニングに用いる予定であり、更なる最適化を進めている。本研究では現時点でも不明である IN と PR の多量体化のダイナミクスの解明を進めるが、得られるデータは HIV 増殖機構の基礎的理解を深める事となる。加えるに、酵素蛋白の分子間相互作用はいかなる種類の蛋白であっても殆ど不明なままであり、IN/PR モノマーの分子・原子レベルでの多量体化機構の理解は、ヒト・動物細胞や微生物の蛋白間での相互作用の基礎的理解を深める事となる。

4. 評価

1) 達成度について

満屋グループと Ghosh グループが共同で開発、2006 年に FDA に認可、臨床応用された DRV は、既存のプロテアーゼ阻害剤 (PI) が有する酵素活性阻止能に加え、HIV-1 PR の二量体化阻止能をも有する。DRV はこの 2 つの阻止活性により HIV の耐性発現に対して high genetic barrier を維持すると思われることから、本計画では、多量体化により機能を発揮する HIV の PR とインテグラーゼ (IN) の多量体

化ダイナミクスを明らかにすると共に、新規の標的部位の探索とその阻害剤の開発を目的とした。Ghosh グループにより新規にデザイン・合成された一連の PI (GRL-216A, -286A, -1398, -0519) はいずれも二量体化阻止能を保持し、野生型 HIV-1 だけではなく、多剤耐性 HIV-1 変異株にも強力な活性を発揮する。中でも GRL-0519 は DRV よりも低濃度で二量体化を阻止、抗 HIV 活性も強力で、且つ試験管内での耐性発現が著しく遅延する事を見出し報告した。一方、質量分析法である ESI-MS を屈指し、DRV が HIV-1 PR 単量体に結合することを初めて明らかにし、更に複数の変異体を用いた解析により、HIV-1 PR が二量対形成過程において、初めに分子間相互作用による不安定な二量体を形成し、次いで N-及び C-末端の分子間相互作用による二量体化の安定化の 2 段階を経ることを示唆するデータを得ている。HIV-1 IN においては、多量体形成阻害剤を評価するための BiFC-based expression assay を既に開発しており、IN の多量体および宿主因子との結合を阻害する化合物の開発を行っている。また一方で、これまでに報告されている多量体化が喪失する変異や宿主因子との相互作用が損なわれる変異等を導入した種々の変異体を解析し、HIV-1 遺伝子が細胞質から核に移行し宿主 DNA へ組み込まれるまでのダイナミクスを検討、併せて新規阻害剤開発の標的と成りうる部位の探索も進めている。

このように本計画において DRV よりも更に活性の高い PI の開発に成功しており、また PR と IN の多量体化のダイナミクス解析により、特に PR ではその単量体がフォールディングする過程が阻害剤開発の標的と成りうる可能性があり、Ghosh のグループとの更に密な情報交換と人的交流を通じ、より活性が高い阻害剤の開発が強力に推進されると思われる。

2) 研究成果の学術的、国際的、社会的意義につ

いて

このようなダイナミクス解析は、酵素学、構造生物学、ウイルス学等に対して新規の知見を齎すだけでなく、阻害剤の開発に関して新たなターゲットの探索にも重要である。また多量体を形成して活性を発揮する HIV の逆転者酵素や HIV 以外の病原体に対しても十分に応用可能である。HIV が耐性を発現しない、もしくは発現しても著しく遅延する、また他の薬剤との交差耐性を有しない新規の阻害剤の開発は、HIV-1 感染症患者において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可能となることによって、患者の QOL の改善および医療費の削減にも貢献するものと考えられる。

3) 今後の展望について

申請者が Ghosh のグループと共同で開発、2006 年に FDA に認可、臨床応用された DRV は、本邦でも第一選択薬として広く使用されており、その後も有望な PIs の開発を継続させている。これまでの十分な実績を示して来た Dr. Ghosh との共同研究が強化されれば、「耐」薬剤耐性 PIs のデザイン・開発が更に進むものと期待される。

5. 結論

本研究では広いスペクトラムで強力な抗 HIV-1 活性を発揮する新規 PIs のデザイン・合成を進めた。また HIV の増殖、複製に必須とされる HIV PR の 2 量体形成に注目し、2 量体形成過程における新規の分子機構の一端を解明した。また PR モノマー間の相互作用を HIV PR とレポータータンパクの融合タンパクの発現系と解析系により検討し、HIV PR 2 量体形成阻害効果を有する複数の新規化合物 PDI s を同定した。1 剤で 2 つの作用機序を有する新規抗 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。今後は

DRV 等の PDIs と PR モノマーサブユニットの構造解析等を通じて、PR モノマーサブユニットへの結合部位や結合様式等を解析する予定である。また、BiFC-based HIV expression assay による IN 多量体形成および宿主因子との相互作用等のダイナミクスを明らかにする。このようなダイナミクス解析は新規の薬剤開発のターゲット部位を齎すと考えられ、今後の阻害剤開発に重要である。

6. 研究発表

1. Amano M, Tojo Y, Salcedo-Gómez PM, Campbell JR, Das D, Aoki M, Xu CX, Rao KV, Ghosh AK, and Mitsuya H. GRL-0519, A Novel Oxatricyclic-Ligand-Containing Nonpeptidic HIV-1 Protease Inhibitor (PI), Potently Suppresses The Replication of a Wide Spectrum of Multi-PI-Resistant HIV-1 Variants In Vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013. *In press.*
2. Aoki M, Danish ML, Aoki-Ogata H, Amano M, Ide K, Das D, Koh Y, and Mitsuya H. Loss of protease dimerization inhibition activity of tipranavir (TPV) is associated with HIV-1 acquisition of resistance to TPV. *J. Virol.* 86(24):13384-13396. 2012.
3. Yarchoan R. and Mitsuya H. Development of the first AIDS drugs: AZT and other dideoxynucleosides. In Human Immuno deficiency Virus Reverse Transcriptase (ed. S.DeGrice) Springer 2012 (in press)
4. Ghosh AK, Chapsal BD, Steffey M, Agniswamy J, Wang YF, Amano M, Weber IT, Mitsuya H. Substituent effects on P2-cyclopentyltetrahydrofuranyl urethanes: Design, synthesis, and X-ray studies of potent HIV-1 protease inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 22(6): 2308-2311, 2012.
5. Ghosh AK, Anderson DD, Weber IT, Mitsuya H. Enhancing protein backbone binding--a fruitful concept for combating drug-resistant HIV. *Angew Chem Int Ed Engl.* 51(8): 1778-802. 2012.
6. Ghosh AK, Chapsal BD, Steffey M, Agniswamy J, Johnson Agniswamy Wang YF, Amano M, Weber IT, Mitsuya H. 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.
7. Ghosh AK, Martyr CD, Steffey M, Wang YF, Agniswamy J, Amano M, Weber IT, and Mitsuya H. (2011) 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 Med Chem, lett,* 2: 298-302,
8. Maeda K, Das D, and Mitsuya H. (2011) Development of antiviral therapeutics for HIV-1 infection and AIDS. In: *HIV/AIDS in the Post-HAART Era: Manifestations, Treatment & Epidemiology* (Ed.; Hall, J.C., Hall, B.J., and Cockerell, C.J.), People's Medical Publishing House – USA, Ltd., Shelton, CT. Chapter 40, p900-937.
9. Ide K, Aoki M, Amano M, Koh Y, Yedidi RS, Das D, Leschenko S, Chapsal B, Ghosh AK, Mitsuya H. (2011) Novel HIV-1 Protease Inhibitors (PIs) Containing a Bicyclic P2 Functional Moiety, Tetrahydropyrano-Tetrahydrofuran, That Are Potent against Multi-PI-Resistant HIV-1 Variants. *Antimicrob Agents Chemother.* 55: 1717-1787.
10. Ghosh AK, Chapsal BD, Baldrige A, Steffey MP, Walters DE, Koh Y, Amano M, Mitsuya H. (2011) Design and synthesis of potent HIV-1 protease inhibitors incorporating Hexahydrofuopyranol-derived high affinity P(2) ligands: structure-activity studies and biological

- evaluation. *J Med Chem.* 54(2): 622-634.
11. Koh Y, Aoki M, Danish ML, Ogata AH, Amano M, Das D, Shafer RW, Ghosh AK, Mitsuya H. (2011) Loss of Protease Dimerization Inhibition Activity of Duronavir Is Associated with the Acquisition of Resistance to Darunavir by HIV-1. *J Virol.* 85: 10079- 10089.
 12. Ghosh AK, Chapsal BD, Parham GL, Steffey M, Agniswamy J, Wang YF, Amano M, Weber IT, Mitsuya H. (2011) Design of HIV-1 Protease Inhibitors with C3-Substituted Hexahydrocyclopentafuranyl Urethane as P2-Ligands: Synthesis, Biological Evaluations, and Protein- Ligand X-ray Crystal Structure. *J Med Chem.* 54: 5890-5901.
 13. Ide K, Aoki M, Amano M, Koh Y, Yedidi RS, Das D, Leschenko S, Chapsal B, Ghosh AK, Mitsuya H (2011) Novel HIV-1 Protease Inhibitors (PIs) Containing a Bicyclic P2 Functional Moiety, Tetrahydropyrano- Tetrahydrofuran, That Are Potent against Multi-PI-Resistant HIV-1 Variants. *Antimicrob Agents Chemother.* 55:1717-1787.
 14. Ghosh AK, Chapsal BD, Baldrige A, Steffey MP, Walters DE, Koh Y, Amano M, Mitsuya H. (2011) Design and synthesis of potent HIV-1 protease inhibitors incorporating Hexahydrofuopyranol-derived high affinity P(2) ligands: structure-activity studies and biological evaluation. *J Med Chem.* 27;54(2):622-34.
 15. Ghosh AK, Xu CX, Rao KV, Baldrige A, Agniswamy J, Wang YF, Weber IT, Aoki M, Miguel SG, Amano M, Mitsuya H. (2010) Probing multidrug-resistance and protein-ligand interactions with oxatricyclic designed ligands in HIV-1 protease inhibitors. *ChemMedChem.* 5 :1850-1854
 16. Koh Y, Amano M, Towata T, Danish M, Leshchenko-Yashchuk S, Das D, Nakayama M, Tojo Y, Ghosh AK, Mitsuya H. (2010) 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. *J Virol.* 84: 11961–11969.
 17. Tojo Y, Koh Y, Amano M, Aoki M, Das D, Kulkarni S, Anderson DD, Ghosh AK, Mitsuya H. (2010) Novel protease inhibitors (PIs) containing macrocyclic components and 3(R),3a(S),6a(R)-bis-tetrahydrofuranlyurethane that are potent against multi-PI-resistant HIV-1 variants in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 54:3460-3470.
 18. Ghosh AK, Gemma S, Simoni E, Baldrige A, Walters DE, Ide K, Tojo Y, Koh Y, Amano M, Mitsuya H. (2010) Synthesis and biological evaluation of novel allophenylnorstatine-based HIV-1 protease inhibitors incorporating high affinity P2-ligands. *Bioorg Med Chem Lett.* 20:1241-6.
- G. 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-substituted-2-haloadenosine derivative

Date of Issuance: March 4, 2008

US Patent Number: 7,470,506

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

Hiroshi Ohruai, 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

HIVのインテグラーゼとプロテアーゼの多量体化のダイナミクス解明とそれらの阻害剤の開発

熊本大学大学院生命科学研究部・血液内科学分野
満屋 裕明

研究要旨：HIVプロテアーゼ(PR)の酵素活性獲得にはPR 2分子の2量体形成が必須で、その過程は新規の抗HIV剤開発の標的となる。本研究では2量体化過程の阻止の分子・原子レベルでの解析を進め、タンパクの多分子間相互作用をHIV PRとレポータータンパクの融合タンパクの発現系と解析系 (fluorescence resonance energy transfer/FRET法) 及び electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) を用いて検討、併せてHIV PR2量体形成阻害効果を有する複数の新規化合物をデザイン・合成・同定、加えてそれらの新規化合物に対する耐性HIV変異体を作製し耐性変異のメカニズムについて検討した。PR同様にHIV増殖に必須の酵素であるHIVインテグラーゼ(IN)については、HIV INとDNA或はIN阻害剤複合体結晶が得られておらず詳細な結合態様は不明である。ここではINの多量体化の過程について BiFC法 (蛍光蛋白再構成法) 等を用いて検討、INのどの部分が多量体化に重要であるかについて検討、多量体化阻止の可能性についても検討した。

外国側研究者 (研究委託)

(1) Purdue University Arun K. Ghosh

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重度の免疫不全によってもたらされ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)、また最近ではインテグラーゼ阻害剤などを組み合わせた多剤併用療法 (HAART) の導入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、またその多くが交差耐性であるため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く、発現しても他薬剤との交差耐性を有しない新規 PIs 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。また、HIV のインテグラーゼ (IN) は、逆転写酵素に媒介されてウイルス RNA から生成された二重鎖プロウイルス DNA を標的細胞の DNA に組み込む役割を果たす、HIV の増殖に必須の酵素である。IN は、その多量体化に関連するとされる N 端 HH-CC zinc finger ドメイン、IN の

酵素活性ドメイン、C 端ドメインの 3 ドメインから構成されている。酵素活性中心ドメインと C 端ドメインはウイルスと細胞の DNA に結合する事が示されているが、IN と DNA の複合体の結晶解析データは未だ得られていない。更に臨床で用いられている IN 阻害剤 *raltegravir* についても IN との複合体の結晶が得られていない事から、その結合の態様は不明である。予備的な生化学的及び構造学的データが、IN は二量体あるいは四量体となって初めてその酵素活性を発揮する事を示唆しているが、そのダイナミクスは不明のままである。本研究では HIV の IN の多量体化のダイナミクスを BiFC-based HIV expression assay と種々の mutated/truncated IN を用いて明らかにし、得られた知見を基に新規 IN 阻害剤開発へと進める。

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。このアッセイの評価には全自動化学発光度測定機：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：新規化合物がウイルス、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：AB3130 Genetic Analyzer を用いることにより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。新規化合物については、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・遺伝子的解析を用いて耐性発現のメカニズム解析を行う。加えて 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。

4) HIV-1 PR 2 量体形成阻害効果の解析：HIV PR の作用にはその 2 量体化が重要であり、結晶解析等によるタンパクの分子レベルでの詳細な解析に加えてこれらタンパクの多分子間の相互作用を検討することで新しい作用機序を持つ抗 HIV 薬開発の可能性が考えられる。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 2 量体形成を確認する系を確立した。PR 2 量体形成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 2 量体形成を阻害することを明らかとした。今後は変異 PR や新規にデザインした化合物が PR 2 量体形成に与える影響などを検討、2 量体形成に重要とされるアミノ酸の詳細な解析を進め、新たな HIV-1 PR 阻害の機序を明らかにする。

5) これまでに我々が開発してきた化合物群の構造活性相関から新規の化合物をデザイン・合成し、それらの HIV-1 PR に対する抑制活性を検討した

後、MT-2, MT-4, PHA 刺激ヒト末梢単核球などを標的細胞とした詳細な抗 HIV-1 活性を検討する。

6) HIV-1 IN 多量体の分子学的解析：本研究では HIV IN の多量体化のダイナミクスを BiFC-based HIV expression assay と種々の mutated/truncated IN を用いて明らかにし、耐性発現の分子的機序を明らかにするとともに新規の IN 阻害剤をデザイン・合成・同定して臨床開発へと進める。具体的には、IN 多量体形成機序に対する分子学的・構造学的解析を進めるために、我々は蛍光蛋白 YFP の改良型変異体である Venus 蛋白をコードする遺伝子の N 末端側 173 アミノ酸配列および C 末端側 83 アミノ酸配列を、それぞれ PMR (PCR mediated recombination) 法を用いることにより野生 HIV-1_{NL4-3} の IN に隣接する形で導入した変異 HIV 株を作成し、これらを COS7 細胞もしくは HEK293 細胞に共発現させ、細胞内で IN が多量体を形成した場合に起こりうる N 末端側と C 末端側が補完された (complement) 完全長 Venus 蛋白による蛍光を共焦点顕微鏡下で観察する手法である BiFC-based HIV (IN) expression assay の確立を現在我々は進めている。過去の報告および IN モノマー同士の docking model により導かれた IN の多量体化に重要であると考えられる複数のアミノ酸の変異を、N 末端側もしくは C 末端側 Venus を付与した IN を含む HIV-1 変異株にそれぞれ site directed mutagenesis 法を用い導入した複数の変異体を既に作成しており、これらを用いて BiFC-based HIV (IN) expression assay で継続的な解析を行っており、また本実験系の更なる optimization を同時に進めている。

(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。更

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。他方で臨床応用に必要な検討事項についても検討して、同時に大手製薬企業へのライセンス化を図る。

C. 研究結果

我々は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/Prezista (DRV) を分担研究者の米国 Purdue University の Dr. Ghosh グループとの共同研究で開発 (Koh & Mitsuya *et al*, *Antimicrob Agents Chemother*. 2003: 図 1) した。DRV は 2006 年に米国 FDA に認可、本邦でも臨床に供されている。2008 年に 1 日 1 回投与の初回治療薬として FDA に認可されるに至り、今後の HAART の中心的な薬剤となる可能性が極めて高い。

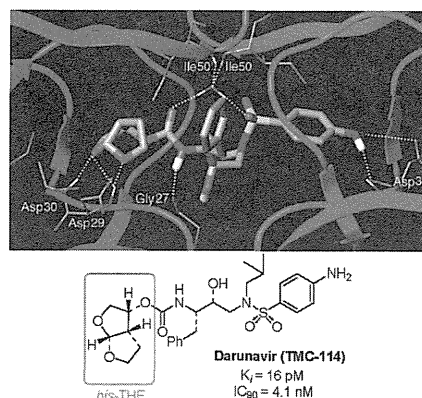


図 1. Darunavir の化学構造と PR との結合様式. PR の酵素活性中心部位のアミノ酸 (Asp-29 と Asp-30) の主鎖と強力な水素結合を形成している。

また、蛍光蛋白 GFP の誘導体である CFP/YFP を用いた FRET-HIV 発現系を用いて、HIV PR の作用に必須である PR の 2 量体化を阻害する一群の 2 量体形成阻害剤 (PR dimerization inhibitors; PDIs) を分担研究者の Dr. Ghosh らと開発、DRV や後述する GRL-98065 等の bis-tetrahydrofuranylethane (bis-THF) 構造及びその類似構造を有す

る一連の化合物群、また既存の PI である tipranvir が成熟 PR の酵素活性を阻害するのみならず、HIV PR 2 量体形成阻害活性を有する bi-functional PI であることを報告した (Koh & Mitsuya *et al*, *JBC*. 2007, Aoki & Mitsuya *et al*, *J. Virol*. 2012)。

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、DRV による治療に不応性となった臨床症例において、耐性 HIV-1 の PR 領域に V32I, L33F, I54M, I84V といった変異が認められ、これら 4 変異を全て同時に有する変異株では *in vitro* において DRV の PR 二量体形成阻害能が阻害される事を報告した (Koh & Mitsuya *et al*, *J Virol*. 2011)。また我々は海外研究者と共同で、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事で薬剤の結合を安定化させ、多剤耐性株に対して強力な活性を發揮する新規 PDI、GRL-98065 (Amano & Mitsuya *et al*, *Antimicrob Agents Chmeother*. 2007) や、macrocylic 構造という特徴的な構造を有し、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 PDIs を同定、詳細な結晶構造解析により同構造が HIV-PR flap 部位に対し効果的に結合する事で強力な活性を發揮する事を見出し (Tojo & Mitsuya *et al*, *Antimicrob Agents Chemother*. 2010)、更に tetrahydropyrano-tetrahydrofuran (Tp-THF) という *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 & Mitsuya *et al*, *Antimicrob Agents Chemother*. 2011)。

これらに加え、当該年度において我々は *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) 活性を發揮し、既存抗 HIV 剤に比べ試験管内での HIV-1 の耐性化に著しく抵抗する新規化合物、GRL-0519 を開発・同定し (Ghosh, Amano & Mitsuya *et al*, *ChemMedChem*, 2010, Amano & Mitsuya *et al*, *Antimicrob Agents Chmeother*. 2012)、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 の複数の主要アミノ酸群と更なる相互作用を有しうる事を確認、GRL-0519 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 2)。

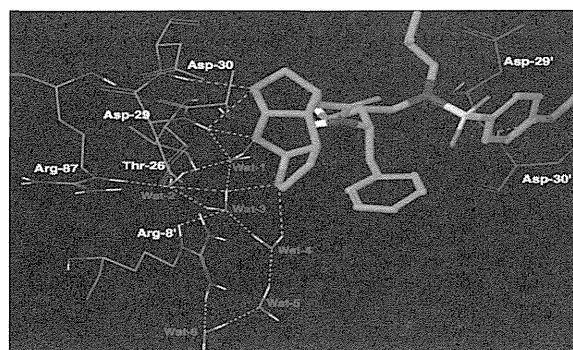


図 2: 結晶構造解析より得られた GRL-0519 と野生型 PR 間の相互作用を黄点線で示す。DRV の *bis*-THF 構造と比べ、GRL-0519 の *tris*-THF 構造は PR 主要アミノ酸群と水を介した相互作用をより多く有する事が判明した。

また、difluoride を付加した THF 構造を有する GRL-016, -048, -050 といった一連の化合物を新たに同定、薬剤の脳内移行性を評価し得る *In Vitro*

BBB (脳血管関門) 構築システムを用いて検討した結果、これら化合物群は現在 AIDS 脳症の第一選択とされる AZT, IDV などを含んだ既存 HIV-1 治療薬と比較し明らかにより良好な脳内移行性を発揮する可能性が示唆され、AIDS 脳症合併症例の有力な選択肢と成り得る可能性が考えられた (Miguel, Amano & Mitsuya *et al*, 論文執筆中)。

これらの複数の PIs は臨床試験移行を前提に更なる検討中である。

他方、大腸菌発現系を用いて種々の PR 変異体を発現・精製し、ギ酸により変性後、薬剤非存在下又は存在下でリフォールディングしたサンプルを electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) を用いて解析した結果、DRV は PR 単量体と 1 対 1 の複合体を形成する事で二量体の形成過程を阻害していることが示された。また高度 DRV 耐性 HIV-1 変異株のプロテアーゼの検討から耐性獲得に関与していると判断した 4 個のアミノ酸置換 (Koh & Mitsuya *et al*, *J. Virol.* 2011) のみを導入したプロテアーゼモノマー PR^{32/33/54/82} には DRV が結合能を喪失している事を初めて明らかにした (図 3)。

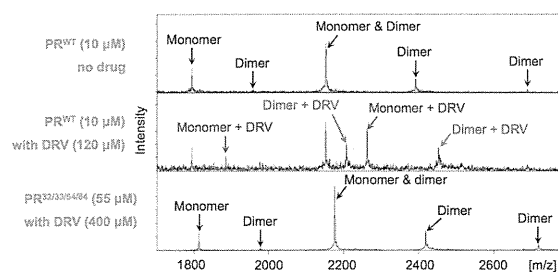


図 3. 一旦変性させた HIV-PR を、DRV 存在下又は非存在下でリフォールディングし、ESI-MS で解析した結果を示す。DRV 非存在下 (上段) に比べ、DRV 存在下では DRV と PR^{WT} の monomer 又は dimer の複合体に由来するピークが観測された(中段)。一方、高度 DRV 耐性変異を有する PR^{32/33/54/84} を DRV 存在下でリフォールディングした結果、DRV と PR^{WT} の結合した分子種は一切確認できなかった(下段)。この事から、DRV は HIV-PR の monomer と dimer の両方に結合し、PR^{32/33/54/84} は DRV の monomer 及び dimer の両方の結合に耐性を示す事が明らかとなった。

同様の方法を用いて、二量体化に関与するアミ

ノ酸残基 (T26, D29 及び R87) に変異を有する変異体 R^{T26A}, PR^{D29N} 及び PR^{R87K} や C 末端 (96-99 番) を削除した変異体 PR^{1-C95A} の質量分析を行い、PR の二量体形成は (1) T26 及び R87 による分子間相互作用による不安定な二量体の形成、(2) N-末端及び C-末端の分子間相互作用による二量体の安定化の 2 段階を必要とする事が示唆された (Hayashi & Mitsuya *et al*, 投稿準備中)。

一方、IN 阻害剤(INI)は既に本邦でも臨床導入されているが、HIV は比較的速やかに INI に対する耐性を獲得し治療に抵抗する事が知られており、耐性発現の分子機構の解明と耐性発現に抵抗する新規 INI 開発が急務である。また DRV が本邦でも臨床で用いられる様になり、多くの患者で高い臨床効果と耐性発現の著しい遅延 (或は耐性化しない) が確認されているが、複数の従来型 PIs 長期投与歴を有する患者群で既に DRV 耐性株が確認されており、更に高い抗 HIV 活性と耐性発現に抵抗する新規薬剤開発の必要性は論を待たない。我々は、BiFC-based expression assay によって HIV-1 IN の多量体形成及び HIV-IN と IBD の複合体が形成した際に生じる Venus の発光を共焦点顕微鏡により観察した (図 4)。

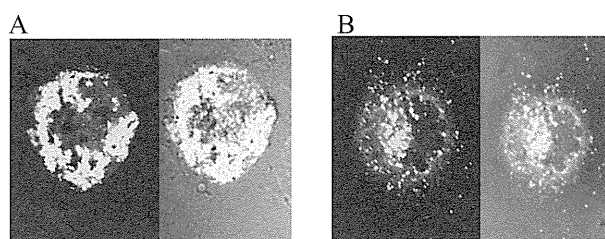


図 4:A. Cos7 細胞に pBiFC-VN-IN 及び pBiFC-VC-IN を共形質転換して得られた画像。IN は多量体を形成し核へ移行している。B. pBiFC-VN-IN 及び pBiFC-IBD-VC (IBD: 宿主因子である LEDGF/p75 の一部) を共形質転換して得られた画像。IN と LEDGF/p75 は細胞内で相互作用し、複合体を形成している。

次に IN の多量体形成が損なわれる変異 (Glu11, His12, Lys186 *etc*) においてその蛍光の低下を定量化し、そのダイナミクスの解析を行った。また、

IN 多量体形成を阻害する薬剤存在下において図 4-A での Venus 形成が阻害され、IN と IBD の相互作用を阻害する薬剤存在下では図 4-B での Venus 形成が阻害されることを利用して、我々はこの手法を新規作用機序 (IN 多量体阻害、宿主因子と IN との結合阻害) を有する薬剤のスクリーニングに今後用いる予定であり、最適化を進めている (Nakamura & Mitsuya, 論文執筆中)。

本研究では現時点でも不明である IN と PR の多量体化のダイナミクスの解明を進めるが、得られるデータは HIV 増殖機構の基礎的理解を深める事となる。加えるに、酵素蛋白の分子間相互作用はいかなる種類の蛋白であっても殆ど不明なままであり、IN/PR モノマーの分子・原子レベルでの多量体化機構の理解は、ヒト・動物細胞や微生物の蛋白間での相互作用の基礎的理解を深める事となる。

D. 考察

満屋グループと Ghosh グループが共同で開発、2006 年に FDA に認可、臨床応用された *bis*-THF を「核」として有する DRV は既存の PIs が主として PR 活性部位の側鎖に結合するのと異なり、主要活性部位である Asp-29/Asp-30 の主鎖と極めて強固な水素結合を形成し、多剤耐性株を含む広いスペクトラムの HIV に活性を発揮する。

本計画では、HIV-1 PR/IN の多量体形成過程での新規の分子機構を明らかにすることを目的とし、更に HIV 増殖抑制の標的となりうる新たな分子、構造の同定、治療法の確立を目指した。HIV の増殖、複製に必須である HIV PR の 2 量体化を検出する系として、HIV PR とレポータータンパクの融合タンパクの発現系とその解析系 (fluorescence resonance energy transfer/FRET 法) を申請者らは確立し、2 量体形成阻害効果を有する一連の低分子化合物 PDI_s を米国の Dr. Ghosh の

研究チームとの共同研究で同定・開発、今後も結晶構造解析学や質量分析学等を併用する事で PR の多量体化過程での dynamics や PDI_s に対する耐性発現の分子的機序の解析を行い、更に有望な候補薬の同定・開発へと繋げる。更に IN の多量体化のダイナミクスを BiFC-based HIV expression assay と種々の mutated/truncated IN を用いて明らかにし、耐性化に抵抗しうる新規の IN 阻害剤をデザイン・合成・同定して臨床開発へ進める。

また、DRV、GRL-0519 等の PDI_s 耐性 HIV-1 で PR 領域に蓄積を認めたアミノ酸変異の解析や HIV-1 PR 2 量体形成に重要とされるアミノ酸の詳細な解析を進める。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でき、阻害剤の基本骨格のデザイン・再デザインや、HIV への酵素学的・ウイルス学的解析が強化・スピードアップされ、更に密な情報交換と人的交流を通じ新しい世代の PDI、INI の開発が強力に推進されると思われる。

前述のように、我々は IN/PR 多量体化機構の解明を通して新規の IN/PR 阻害剤をデザイン・合成していくが、満屋/Ghosh グループのこれ迄のトランレーショナルリサーチの成果と業績からしてその実現性は極めて高い。そのような新規阻害剤が開発・臨床応用されれば、HIV/AIDS の診療領域にもたらされるインパクトは日本と世界で極めて高いものとなると強く期待される。

E. 結論

本研究では広いスペクトラムで強力な抗 HIV-1 活性を発揮する新規 PIs のデザイン・合成を進めた。また HIV の増殖、複製に必須とされる HIV PR の 2 量体形成に注目し、2 量体形成過程での新規の分子機構を結晶解析等によるタンパクの分子

レベルでの解析に加え、PR モノマー間の相互作用を HIV PR とレポータータンパクの融合タンパクの発現系と解析系により検討、HIV PR 2 量体形成阻害効果を有する一連の新規化合物 PDI_s を同定した。1 剤で 2 つの作用機序を有する新規抗 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。今後は DRV 等の PDI_s の複数の DRV 耐性関連変異等を有した PR モノマーサブユニットへの結合部位、結合様式に与える影響をウイルス学的・分子構造学的・結晶学的に解析、PR サブユニットによる 2 量体形成のダイナミクスおよび BiFC-based HIV expression assay により IN 多量体形成のダイナミクスを明らかにする予定である。

F. 研究発表

論文発表（当該年度のみ）

1. Masayuki Amano, Yasushi Tojo, Pedro Miguel Salcedo-Gómez, Joseph Richard Campbell, Debananda Das, Manabu Aoki, Chun-Xiao Xu, Kalapala Venkateswara Rao, Arun K. Ghosh, and **Hiroaki Mitsuya**. GRL-0519, A Novel Oxatricyclic-Ligand-Containing Nonpeptidic HIV-1 Protease Inhibitor (PI), Potently Suppresses The Replication of a Wide Spectrum of Multi-PI-Resistant HIV-1 Variants In Vitro. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013. *In press*.
2. Aoki, M., Danish, M.L., Aoki-Ogata, H., Amano, H., Ide, K., Koh, Y, and **Mitsuya, H.** Loss of protease dimerization inhibition activity of tipranavir (TPV) is associated with HIV-1 acquisition of resistance to TPV. *J. Virol.* 86(24):13384-13396. 2012.
3. Yarchoan, R. and **Mitsuya, H.** Development of the first AIDS drugs: AZT and other dideoxynucleosides. In Human Immuno deficiency Virus Reverse Transcriptase (ed.

S.DeGrice) Springer 2012 (in press)

4. Ghosh AK, Chapsal BD, Steffey M, Agniswamy J, Wang YF, Amano M, Weber IT, **Mitsuya H.** Substituent effects on P2-cyclopentyltetrahydrofuranyl urethanes: Design, synthesis, and X-ray studies of potent HIV-1 protease inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 22(6): 2308-2311, 2012.
5. Ghosh AK, Anderson DD, Weber IT, **Mitsuya H.** Enhancing protein backbone binding--a fruitful concept for combating drug-resistant HIV. *Angew Chem Int Ed Engl.* 51(8): 1778-802. 2012.
6. Ghosh AK, Chapsal BD, Steffey M, Agniswamy J, Johnson Agniswamy Wang YF, Amano M, Weber IT, **Mitsuya H.** 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.

G. 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-substituted-2-haloadenosine derivative

Date of Issuance: March 4, 2008

US Patent Number: 7,470,506

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

Hiroshi Ohrui, 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

2. 実用新案登録

該当なし

アデノウイルスベクターを駆使した 薬物誘発性肝障害モデル動物の開発

独立行政法人医薬基盤研究所

幹細胞制御プロジェクト

水口 裕之

平成22年4月～平成25年3月

本研究では、アデノウイルス (Ad) ベクターを用いた遺伝子発現制御系を駆使して、薬物誘発性肝障害予測を可能にする簡便なモデル動物作成法の開発を試みた。さらに作製したモデル動物へ肝障害を誘発する化合物を作用させ、肝障害の度合いを評価した。その結果、①本研究においてマウス体内で代謝活性を有するヒト CYP3A4 を発現させることに世界で初めて成功した。②遺伝子発現抑制能の高い Ad ベクターの開発に成功するとともに、Ad ゲノムにコードされている small RNA が Ad ベクターによる遺伝子発現抑制に関与していることを証明した。③モデル動物へ肝障害を誘発する種々の化合物を作用させたが、現段階ではいずれの薬物においても肝障害の明確な増悪・緩和は認められず、評価系を確立するには至らなかった。今後は、被験薬やウイルスベクター投与条件のさらなる変更等により継続して検討を進める必要がある。

研究分担者

- (1) 金沢大学医薬保健研究域薬学系 教授
横井 毅
- (2) 大阪大学大学院薬学研究科 准教授
櫻井 文教
- (3) 小野薬品工業株式会社薬物動態グループ
松村 直哉

A. 研究目的

本研究では、アデノウイルス (Ad) ベクターを用いた遺伝子発現制御系を駆使して、薬物誘発性肝障害予測を可能にする簡便なモデル動物作成法を開発を行う。具体的には、(1) *in vivo* 肝臓で簡便かつ効率良く候補遺伝子の発現抑制 (ノックダウン) を達成するための RNA 干渉 (RNAi) 誘導 Ad ベクターを開発し、(2) ヒトと齧歯類の肝薬物代謝活性の種差 (ヒト << 齧歯類) をなくすために、関連酵素の高効率ノックダウンあるいは強制発現が可能な Ad ベクターを開発する。これにより、ヒトと同程度の解毒能を有するげっ歯類を簡便に作成することが可能となれば、ヒト肝におけ

る代謝的活性化による毒性発現を実験動物で再現することが可能となり、新薬開発のスピード化ならびにコスト削減につながることを期待される。

B. 研究方法

B-1. ShRNA 発現 Ad ベクターの作成

VA-RNA を発現しない Ad ベクター (Ad Δ VA ベクター)、全ウイルスゲノムを除いたヘルパー依存 Ad ベクター (HD-Ad ベクター) を作製し、遺伝子発現抑制能を評価した。また、shRNA 発現カセットを 4 つ搭載した Ad ベクターの開発を行った。

B-2. 新規 Ad 発現ベクターの *in vitro* および *in vivo* 動態学的評価

HepG2 細胞へ AdCYP3A4 ベクターを作用させ、その後薬剤を作用させることにより *in vitro* 薬物評価系の構築を試みた。

B-3. CYP3A4 発現改良型 Ad ベクターの作製と機能評価

肝障害誘導能の低い Ad-CYP3A4 を作製し、*in*