

図2 低CCR5馴化ウイルスとMVC高度耐性ウイルスのEnvをもつ感染性クローンウイルスの作製

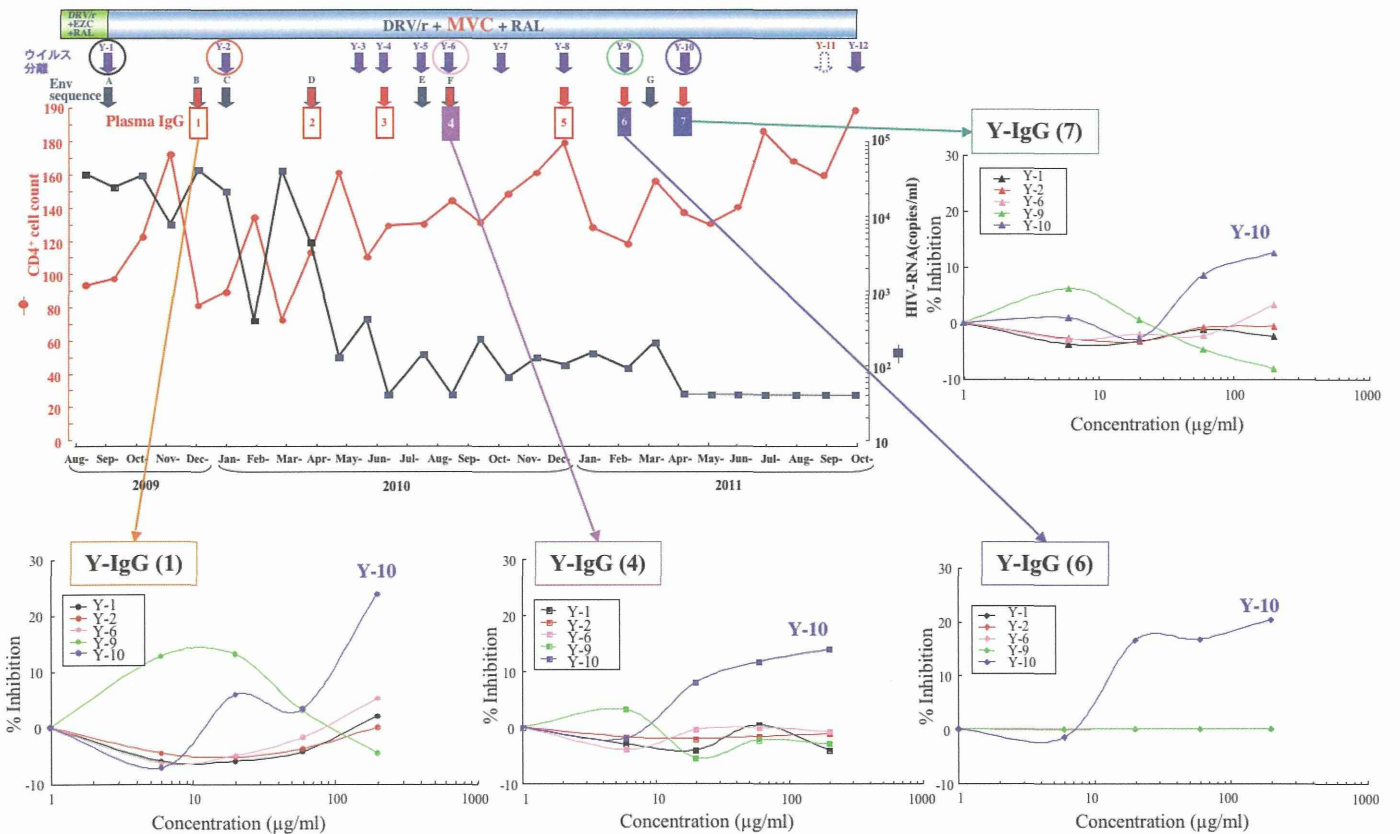


図3 MVC長期投与による抗体感受性ウイルスの出現

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

- 1) Harada S, Yoshimura K*, Yamaguchi A, Yusa K, Matsushita S. Impact of antiretroviral pressure on selection of primary HIV-1 envelope sequences *in vitro*. J Gen Virol, 94:933-943, 2013.

- 2) Kuwata T, Takaki K, Yoshimura K, Enomoto I, Wu F, Ourmanov KI, Hirsch VM, Yokoyama M, Sato H, Matsushita S. Conformational Epitope Consisting of the V3 and V4 Loops as a Target for Potent and Broad Neutralization of Simian Immunodeficiency Viruses. *J Virol*, 87: 5424-5436, 2013.
 - 3) Narumi T, Arai H, Yoshimura K, Harada S, Hirota Y, Ohashi N, Hashimoto C, Nomura W, Matsushita S, Tamamura H.: CD4 mimics as HIV entry inhibitors: lead optimization studies of the aromatic substituents. *Bioorg Med Chem*, 21:2518-2526, 2013.
 - 4) Kuwata T, Takaki K, Enomoto I, Yoshimura K, Matsushita S. Increased infectivity in human cells and resistance to antibody-mediated neutralization by truncation of the SIV gp41 cytoplasmic tail. *Frontiers in Microbiology/Virology*, 4:1-7, 2013.
 - 5) Hashimoto C, Narumi T, Otsuki H, Hirota Y, Arai H, Yoshimura K, Harada S, Ohashi N, Nomura W, Miura T, Igarashi T, Matsushita S, and Tamamura H. A CD4 mimic as an HIV entry inhibitor: Pharmacokinetics. *Bioorg Med Chem*, 21: 7884-7889, 2013.
 - 6) Otsuki H, Hishiki T, Miura T, Hashimoto C, Narumi T, Tamamura H, Yoshimura K, Matsushita S, and Igarashi T. Generation of a replication-competent simian human immunodeficiency virus, the neutralisation sensitivity of which can be enhanced in the presence of a small molecule CD4 mimic. *J Gen Virol*, 94: 2710-2716, 2013.
 - 7) Ong YT, Kirby KA, Hachiya A, Chiang LA, Marchand B, Yoshimura K, Murakami T, Singh K, Matsushita S, Sarafianos SG. Preparation of biologically active single-chain variable antibody fragments that target the HIV-1 gp120 V3 loop. *Cell Mol Biol*, 2012, 58:71-9.
 - 8) Yokoyama M, Naganawa S, Yoshimura K, Matsushita S, Sato H. Structural Dynamics of HIV-1 Envelope Gp120 Outer Domain with V3 Loop. *PLoS ONE*, 2012, 7: e37530.
 - 9) Maeda, Y., Yoshimura, K., Kodama, E., Miyamoto, F., Harada, S., Yuan, Y., Harada, S., Yusa, K. Acquisition of resistance to HIV-1 entry inhibitors *in vitro and in vivo*. *J AIDS & Clinical Research*, in press, 2012.
 - 10) Narumi, T., Arai, H., Yoshimura, K., Harada, S., Nomura, W., Matsushita, S., Tamamura, H. Small Molecular CD4 Mimics as HIV Entry Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, 19:6735-6742, 2011.
- 学会発表
- 海外
- 1) Shigeyoshi Harada, Samatchaya Boonchawalit, Tetsuo Narumi, Hirokazu Tamamura, Shuzo Matsushita, Kazuhisa Yoshimura. Impact of CD4 mimetics-resistant mutations on susceptibilities to anti-Env nMAbs. 21th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI2014), Boston, MA, U.S.A., 2014.
 - 2) Shigeyoshi Harada, Samatchaya Boonchawalit, Tetsuo Narumi, Hirokazu Tamamura, Shuzo Matsushita, Kazuhisa Yoshimura. *In vitro* selection of bifunctional CD4 mimic small compounds (NBD analogues) using bulk and cloned primary isolates. 14th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 2013.
 - 3) Samatchaya Boonchawalit, Shigeyoshi Harada, Shuzo Matsushita, Kazuhisa Yoshimura. Analysis of relationships between Maraviroc (MVC) resistant mutations and sensitivity to antibody-mediated neutralization. 14th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 2013.
 - 4) Yuki Hirota, Tetsuo Narumi, Kazuhisa Yoshimura, Shigeyoshi Harada, Chie Hashimoto, Wataru Nomura, Tatsuhiko Igarashi, Shuzo Matsushita, Hirokazu Tamamura. Indole-type small CD4 mimic molecules targeting an HIV envelope protein gp120. 14th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 2013.
 - 5) Shigeyoshi Harada, Samatchaya Boonchawalit, Shuzo Matsushita, Kazuhisa Yoshimura. Analysis of interaction between gp120 and CD4 mimic small compounds that enhance the activity of anti-HIV neutralizing antibodies. AIDS Vaccine 2013, Barcelona, Spain, 2013.
 - 6) Samatchaya Boonchawalit, Shigeyoshi Harada, Shuzo Matsushita, Kazuhisa Yoshimura. Characterization of highly neutralizing antibody sensitive HIV-1 gp120 induced under high concentrations of maraviroc (MVC) *in vitro*. AIDS Vaccine 2013, Barcelona, Spain, 2013.
 - 7) Shigeyoshi Harada, Samatchaya Boonchawalit, Tetsuo Narumi, Hirokazu Tamamura, Shuzo Matsushita, Kazuhisa Yoshimura. CD4 mimic small compounds, NBD-556 and its analogues bind at 3 amino acid positions in the gp120 CD4 cavity. 20th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI 2013), Atlanta, GA, U.S.A., 2013.
 - 8) Kazuhisa Yoshimura, Shigeyoshi Harada, Samatchaya Boonchawalit, Shuzo Matsushita. Impact of maraviroc-resistant and low CCR5-adapted mutations induced *in vitro* passage on sensitivity to anti-Env neutralizing antibodies. 20th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI 2013), Atlanta, GA, U.S.A., 2013.
 - 9) Shigeyoshi Harada, Samatchaya Boonchawalit, Tetsuo Narumi, Hirokazu Tamamura, Shuzo Matsushita, Kazuhisa Yoshimura. *In vitro* induction of twelve CD4 mimic small compounds, NBD-556 and its analogues, resistant variants using primary R5 HIV-1. 13th Kumamoto AIDS Seminar GCOE

- Joint International Symposium, Kumamoto, Japan, Oct.24-26, 2012.
- 10) Shigeyoshi Harada, Hiroshi Arai, Tetsuo Narumi, Hirokazu Tamamura, Shuzo Matsushita, Kazuhisa Yoshimura. *In vitro* induction of ten CD4 mimic small compounds, NBD-556 and its analogues, resistant variants using primary R5 HIV-1. 19th International AIDS Conference, Washington, D.C., U.S.A., 7.22-28, 2012.
 - 11) Kazuhisa Yoshimura, Shigeyoshi Harada, Aki Hamji, Shuzo Matsushita. Two-step escape pathway of the HIV-1 primary isolates induced by the *in vitro* selection of maraviroc. 12th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, Kumamoto, Japan, 2011, 10. 19-21.
 - 12) Shigeyoshi Harada, Tetsuya Ishikawa, Aki Hamji, Shuzo Matsushita, Kazuhisa Yoshimura. Impact of raltegravir pressure on the selection of HIV-1 envelope sequences *in vitro*. 12th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, Kumamoto, Japan, 2011, 10. 19-21.
 - 13) Kazuhisa Yoshimura, Shigeyoshi Harada, Aki Hamji, Shuzo Matsushita. Maraviroc-resistant subtype B primary HIV-1 induced *in vitro* selection became highly sensitive to anti-gp120 neutralizing antibodies and autologous plasma IgG under high concentrations of the CCR5 inhibitor. 6th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention, Roma, Italy, 2011, 7. 17-20.
- 6) 原田恵嘉、Samatchaya Boonchawalit、松下修三、吉村和久. *In vitro* selection of bifunctional CD4 mimic small compounds (NBD analogues) using bulk and cloned primary isolates. 第15回白馬シンポジウム、2013、名古屋.
 - 7) 五領舞衣、原田恵嘉、石井 洋、俣野哲朗、吉村和久. Impact of deletion in cytoplasmic tail on Env incorporation into HIV/SIV particles. 第15回白馬シンポジウム、2013、名古屋.
 - 8) 原田 恵嘉、鳴海哲夫、玉村啓和、松下修三、吉村和久. R5臨床分離株を用いたCD4類似低分子化合物誘導体に対する*in vitro*耐性ウイルス誘導. 第26回日本エイズ学会学術集会・総会、2012年11月24日-11月26日[O35-165]、神奈川.
 - 9) 桑田岳夫、吉村和久、松下修三. SIV感染サルから分離された中和抗体B404はV3,V4ループを含むEnv立体構造を認識する. 第26回日本エイズ学会学術集会・総会、2012年11月24日-11月26日[O13-062]、神奈川.
 - 10) 廣田雄樹、鳴海哲夫、橋本智恵、吉村和久、原田恵嘉、大附寛幸、三浦智行、五十嵐樹彦、相川春夫、野村 渉、松下修三、玉村啓和. HIV外被タンパク質gp120を標的とするインドール型低分子CD4ミミックの創製研究. 第26回日本エイズ学会学術集会・総会、2012年11月24日-11月26日[WS2-007]、神奈川.
 - 11) 原田恵嘉、新井啓之、鳴海哲夫、玉村啓和、松下修三、吉村和久. R5臨床分離株を用いた10種のCD4類似低分子化合物に対する*in vitro*耐性ウイルス誘導. 第14回白馬シンポジウム、2012年6月7日-8日、京都.

国内

- 1) 原田恵嘉、鳴海哲夫、Samatchaya Boonchawalit、玉村啓和、松下修三、吉村和久. バルクおよびクローンウイルスを用いたCD4類似低分子化合物誘導体に対する*in vitro*耐性ウイルス誘導. 第27回日本エイズ学会学術集会・総会、2013、熊本.
- 2) 大附寛幸、丸田泰広、橋本智恵、鳴海哲夫、廣田雄樹、原田恵嘉、三浦智行、吉村和久、玉村啓和、松下修三、五十嵐樹彦. 抗V3抗体および低分子CD4ミミック曝露後投与によるアカゲザルでのSHIV複製抑制. 第27回日本エイズ学会学術集会・総会、2013、熊本.
- 3) Samatchaya Boonchawalit、原田恵嘉、松下修三、吉村和久. Analysis of relationships between Maraviroc (MVC) resistant mutations and sensitivity to antibody-mediated neutralization. 第27回日本エイズ学会学術集会・総会、2013、熊本.
- 4) 五領舞衣、原田恵嘉、石井 洋、吉村和久、俣野哲朗. 細胞内ドメイン欠損Envを有するHV/SIV粒子の作製. 第27回日本エイズ学会学術集会・総会、2013、熊本.
- 5) 原田恵嘉、Samatchaya Boonchawalit、松下修三、吉村和久. インテグラーゼ阻害剤ラルテグラビルがMVC耐性HIV-1 Env領域に与える影響. 第60回日本ウイルス学会学術集会、2013、神戸.
- 12) 吉村和久. CCR5阻害剤による耐性変異と中和抗体感受性. 第14回白馬シンポジウム、2012年6月7日-8日、京都.
- 13) 吉村和久、原田恵嘉、濱治有希、松下修三. 臨床分離HIVを用いたマラビロック (MVC) 耐性誘導のメカニズムの解析. 第25回日本エイズ学会学術集会・総会、2010年11月30日-12月2日、東京.
- 14) 原田恵嘉、濱治有希、遊佐敬介、松下修三、吉村和久. 抗HIV剤がEnv多様性に与える影響. 第25回日本エイズ学会学術集会・総会、2010年11月30日-12月2日、東京.
- 15) 吉村和久. CCR5阻害剤がエンベロープ三量体形成に及ぼす影響. 第13回白馬シンポジウム、2011年5月19日-20日、北海道.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

抗HIV薬の感染予防効果の解析

研究分担者

川村 龍吉 山梨大学医学部附属病院 皮膚科 講師

研究要旨

世界における新たなHIV感染者数は現在でも年間約220万人に上り、その約90%が性行為による感染である。HIVの世界的流行を阻止すべく、性行為HIV感染を予防する新たなマイクロビサイドの開発が世界中で精力的に行われている。今回の我々の研究結果から、CCR5阻害薬であるマラビロックおよび新規NRTIであるEFdAがマイクロビサイドとして有用である可能性が強く示唆された。

A. 研究目的

HIV感染症は世界で毎年約220万人もの新規感染者が発生しており、その約90%が性行為による感染である。世界的なHIVの流行を阻止すべく、新たなマイクロビサイドの開発が全世界で精力的に推し進められている。2010年までに11種類のマイクロビサイド（PRO2000、Carraguard、cellulose sulfate、BufferGel、C31Gなど）の臨床試験が終了したが、残念なことにいずれのマイクロビサイドも有意に性行為HIV感染を抑制することができず、むしろ感染を助長してしまうというものもあった。しかし最近、抗HIV薬（NRTI）Tenofovirゲルの性行為前の膣内外用によって性行為HIV感染が約40%予防できるという臨床試験結果が報告され（Karim QA *et al.* Science 329:1168-1174, 2010）、現在Tenofovirゲルを凌ぐ予防効果を持つマイクロビサイドの開発が世界中で競われている。一方、異性間性行為におけるHIVの生体内メカニズムとして、「HIVは皮膚・粘膜表皮内ランゲルハンス細胞（以下LCs）の感染を介して生体内に侵入する」というこれまで我々が提唱してきた仮説が世界的に認められつつある（論文発表4参照）。本研究の目的は、*ex vivo* 経表皮HIV感染モデルを用いて、LCsのHIV感染に対する新規NRTIであるEFdAおよびCCR5阻害剤Maraviroc（MVC）の感染阻害効果をTenofovirと比較検討し、両薬剤が性行為HIV感染に対する新たなHIV侵入予

防薬（マイクロビサイド）として臨床応用可能であるかを検討することにある。

B. 研究方法

本研究では、単球由来ランゲルハンス細胞（mLC; monocyte-derived LC）を用いて、抗HIV薬（NRTI）：EFdA、Tenofovirおよび新規CCR5阻害剤：Maraviroc（MVC）のHIV感染阻害効果を比較検討した。

まず、健常ボランティアから末梢血を採取して、単球をGM-CSF/IL-4/TGF- β 存在下で一週間培養することでmLCを作製した。次にmLCをEFdA、TenofovirおよびMVC（100-5000 nM）と30分間培養後、各々のmLCにHIV（HIV BaL; R5 HIV）を曝露し、2時間後にmLCを3回PBSにて洗浄し、培養した。HIV曝露7日後にmLCを回収し、PE標識抗lan-gerin抗体およびAPC標識抗CD11c抗体（LCマーカー）で染色後、FITC標識抗HIVp24抗体でintracellular stainingし、フローサイトメトリーにてmLCのHIV感染率を比較解析した。さらに、同一ボランティアから得た末梢血よりCD4陽性T細胞を調整し、それぞれのDrug/HIV曝露後mLCと共培養し（mLC: CD4⁺ T cells = 1 : 100）、培養上製中のHIVp24をELISAにて定量し、CD4陽性T細胞からのHIV産生量、すなわちHIV感染mLCからCD4陽性T細胞へのHIV播種能を比較検討した。

また、上記の実験において、各種抗HIV薬を30分間曝露後、24, 48, 72時間の間隔をあけてHIVを曝露することによって、各種抗HIV薬の薬効持続時間についても比較検討した。

さらに、EFdAおよびMVC併用によるLCsのHIV感染阻害効果を比較検討した。

(倫理面への配慮)

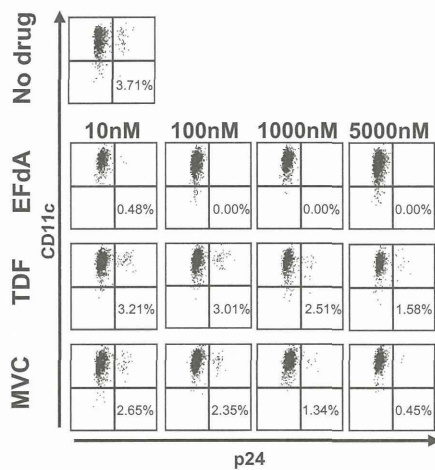
健康ボランティアから採取した血液を用いる研究は山梨大学倫理委員会の了承を得ている（承認番号598）。本研究において用いられるmLCは、ボランティア本人のインフォームドコンセントを得てから使用している。また、ヒト皮膚を用いた*ex vivo* HIV感染に関しても、同倫理委員会の了承を得ている（承認番号：237）。

C. 研究結果

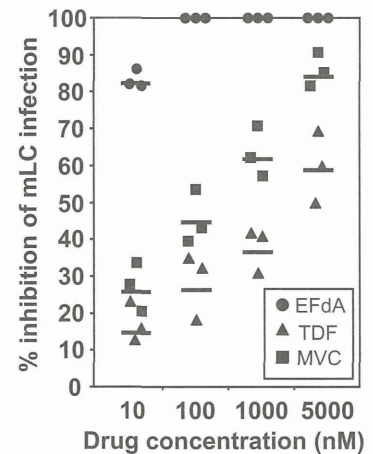
図1Aに示す如く、EFdA、TenofovirおよびMVCの各薬剤の前処置は、mLCのHIV感染を有意に抑制した。さらに、図1Bに示す如く、3人のボランティアから樹立したmLCいずれの感染抑制実験においても同様の結果が得られた。図1C, Dに示す如く、この各薬剤前処置によるmLCのHIV感染効果はHIV感染mLCからCD4陽性T細胞へのHIV播種能との相関が認められた。

また、図2A, Bに示す如く、各種抗HIV薬(1000 nM)を曝露後、すべての薬剤を除去した後に24, 48, 72時間の間隔をあけてHIV曝露した実験においても、EFdA 100-5000nMではほぼ100%の抑制効果が得られた。TenofovirおよびMVCは曝露後3日でその感染抑制効果をほとんど失うのに対し、EFdAは曝露

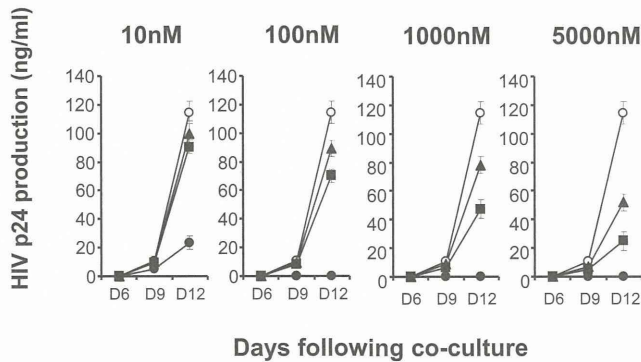
A



B



C



D

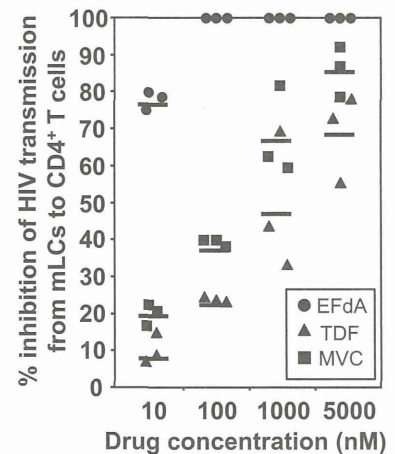


図1 EFdA、TenofovirおよびMVCによるmLCのHIV感染抑制

後3日でもその感染抑制効果を保持することがわかった。HIV感染mLCからCD4陽性T細胞へのHIV播種能試験においても同様の結果が得られた(図2C, D)。

図3に示す如く、subeffective doseのEFdA (0.1, 1 nM) にMVCを1-5000nMで加えると、MVCの濃度依存性にEFdAによる抑制効果のさらなる抑制増強効果が観察された。

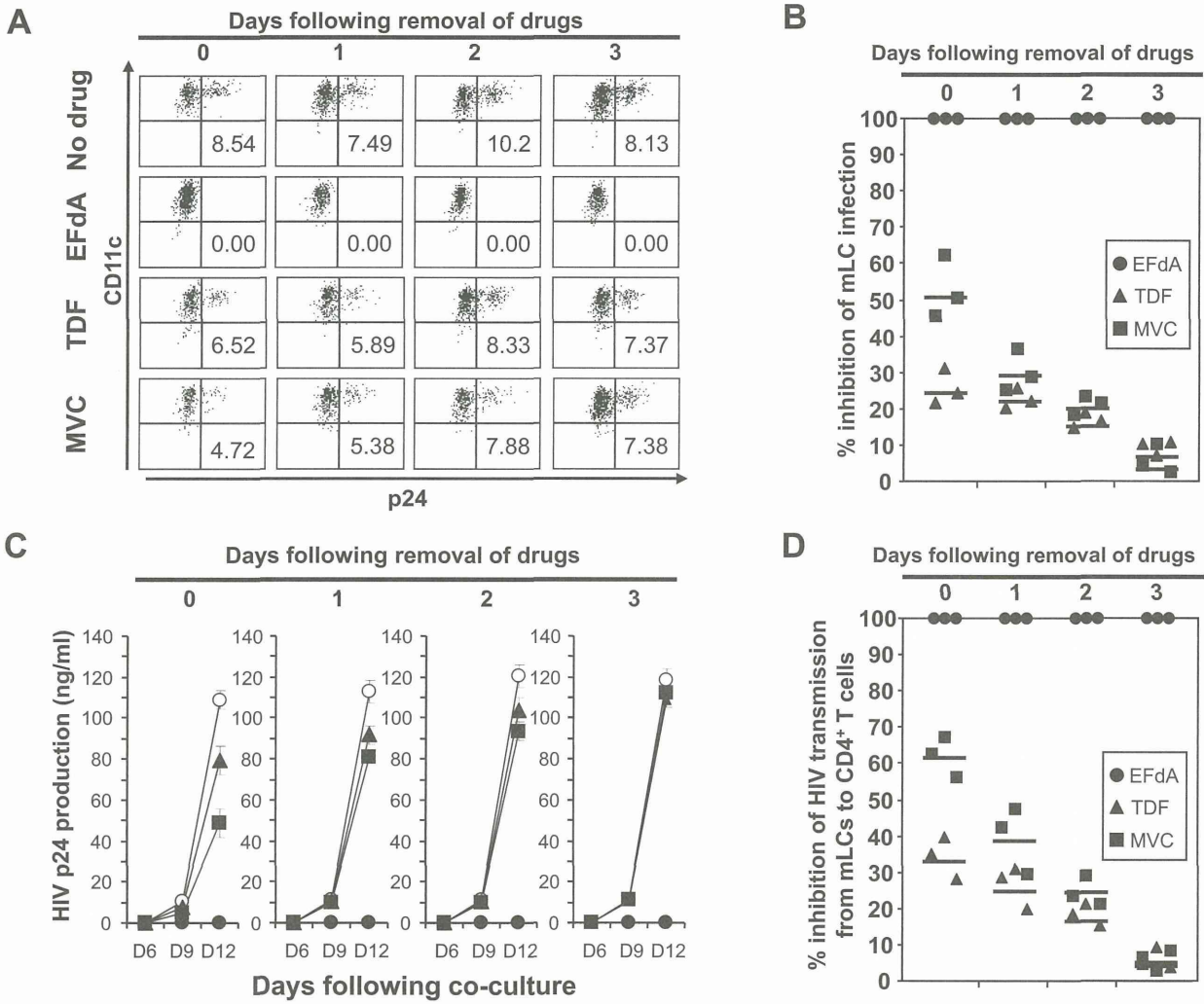


図2 EFdA、TenofovirおよびMVCによるmLCのHIV感染抑制効果の持続時間

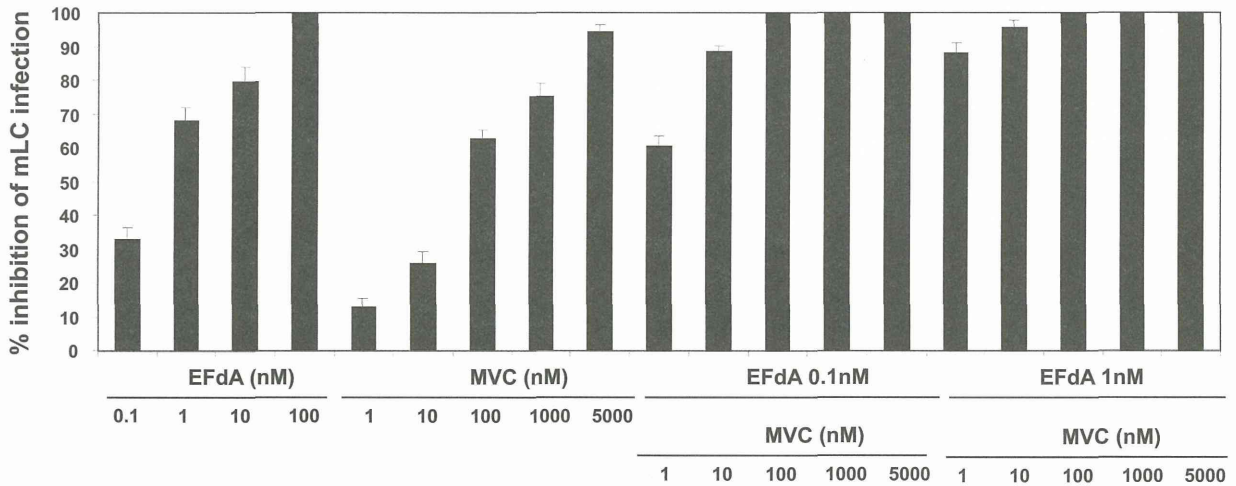


図3 EFdAおよびMVCによるmLCのHIV感染抑制

D. 考察

今回の研究結果より、mLCのHIV感染抑制実験において、EFdAおよびMVCがTenofovirに比べて有意に優れたHIV感染抑制効果を持つことが示唆された。性行為HIV感染において性器粘膜内LCがHIV侵入の重要なターゲットであることより、今回の結果はEFdAあるいはMVCがマイクロビサイドとして有用であることを示唆しており、両薬剤の併用によって感染抑制効果が増強されたことより、両マイクロビサイドを併用することによって、性行為HIV感染をより確実に予防できる可能性も示唆された。また、EFdAが3日間その感染抑制効果を保持することから、一回の外用で数日間その感染予防効果が持続することも期待される。

E. 結論

マイクロビサイドとして、EFdAおよびMVCはTenofovirよりも優れた性行為HIV感染予防効果が期待され、両薬剤の併用によりさらなる感染予防効果の増強が期待されることも示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) EFdA, a Reverse Transcriptase Inhibitor, Potently Blocks HIV-1 *Ex Vivo* Infection of Langerhans Cells within Epithelium. Matsuzawa T, Kawamura T (Corresponding Author), Ogawa Y, Maeda K, Nakata H, Moriishi K, Koyanagi Y, Gatanaga H, Shimada S, Mitsuya H. *J Invest Dermatol*. 2014 In press
- 2) Oral administration of the CCR5 inhibitor, maraviroc, blocks HIV *ex vivo* infection of Langerhans cells within the epithelium. Matsuzawa T, Kawamura T (Corresponding Author), Ogawa Y, Takahashi M, Aoki R, Moriishi K, Koyanagi Y, Gatanaga H, Blauvelt A, Shimada S. *J Invest Dermatol*. 2013 133(12):2803-5.
- 3) Mast cells play a key role in host defense against herpes simplex virus infection through TNF- α and IL-6 production. Aoki R, Kawamura T (Corresponding Author), Goshima F, Ogawa Y, Nakae S, Nakao A, Moriishi K, Nishiyama Y, Shimada S. *J Invest Dermatol*. 2013 133(9):2170-9.
- 4) Antimicrobial peptide LL-37 produced by HSV-2-infected keratinocytes enhances HIV infection of Langerhans cells. Ogawa Y, Kawamura T (Corresponding Author), Matsuzawa T, Aoki R, Gee P, Yamashita A, Moriishi K, Yamasaki K, Koyanagi Y, Blauvelt A, Shimada S. *Cell Host Microbe*. 2013 Jan 16;13(1):77-86.

- 5) Severe dermatitis with loss of epidermal Langerhans cells in human and mouse zinc deficiency. Kawamura T (Corresponding Author), Ogawa Y, Nakamura Y, Nakamizo S, Ohta Y, Nakano H, Kabashima K, Katayama I, Koizumi S, Kodama T, Nakao A, Shimada S. *J Clin Invest*. 2012 122(2):722-32.

2. 学会発表

- 1) T. Matsuzawa, T. Kawamura, R. Aoki, Y. Ogawa, M. Takahashi, Y. Koyanagi, A. Blauvelt, H. Gatanaga and S. Shimada. A novel strategy to prevent sexual transmission of HIV-1 by oral administration of CCR5 inhibitor. The 36th Japanese Society for Investigative Dermatology Annual Meeting. 2011 Dec, Kyoto.
- 2) T. Kawamura, Strategies for preventing sexual transmission of HIV. 13th KUMAMOTO AIDS Seminar, 2012, Oct, Kumamoto
- 3) T. Kawamura, The roles of Langerhans cell in acrodermatitis enteropathica and HIV infection. The 11th International Symposium of the Cutaneous Biology Research Institute. 2013 Sep, Seoul

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

耐性HIVを克服する新規薬剤の開発

研究分担者

兎玉 栄一 東北大学大学院 医学系研究科・宮城地域医療支援寄附講座
東北大学病院 内科総合感染症科
東北大学 メディカルメガバンク機構・地域医療支援部門

研究要旨

本研究は、耐性HIVを克服するための耐性機序解明と創薬を目的としている。平成23年度はラット腹腔内に抗HIV剤を投与し、経時採血サンプルに含まれる薬剤をMAGI法で評価した。この方法は感染性HIVの動物への感染が不要であり、簡便・迅速かつ安全な実験である。我々が開発に関連した阻害剤をこの方法で検討したところすべての動態・活性が検討できた。平成24年度は耐性機序の解明を検討した。まず逆転写酵素阻害剤に対する耐性度に影響を与えるポリモルフィズム172Kがthymidine associated mutationsの効果を減弱させることを明らかとした。さらに耐性HIV抑制効果を有する4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine (EFdA) に対する耐性変異の同定を行った。M184VにT165R/Mなどの変異を伴うことで耐性を獲得するが、実際の活性値はAZTのそれよりも低く、耐性が出てても十分に抑制しうる薬剤であることが明らかとなった。最終年度はhigh through-put screening法の確立のためにレポーター酵素反応法の感度と精度が同程度であることを明らかとした。これらの成果は今後の薬剤開発に資すると思われる。

A. 研究目的

近年、既存の薬剤とは異なるカテゴリーの薬剤、CCR5アンタゴニスト、融合阻害剤、インテグラーゼ阻害剤が開発され、これらの併用により従来の治療薬に抵抗性となった患者においても検出限界以下までウイルス量を低下させることが報告されている。しかし、HIVは個々の薬剤に対して耐性を獲得するだけでなく、複数の薬剤に対し同時に耐性化することがある。このような多剤耐性株の出現は、使用歴のない薬剤に対しても交差耐性を起こし、治療薬の選択を大きく狭めてしまう。そのため新しい多剤耐性株の出現状況を把握し、その解析を行うことは新薬開発にも大きな意義がある。我々のグループはこれまでの耐性ウイルスに効果を示すものを中心に開発を行ってきた。現在、本邦でもスタリビルドの1成分として使用されているelvitegravirは新しい阻害標的であるインテグラーゼを阻害することで耐性ウイルスを抑制する。他にも、1日1回投与の可能性をもつ薬剤4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadeno-

sine (EFdA) の開発にも携わっている。EFdAは、新しい作用機序である逆転写酵素translocationを阻害し、多剤耐性株にも効果を示す。EFdAは2012年夏米国メルク社にライセンスされており、現在前臨床試験が終了して今後臨床試験が行われる予定である。

今後も新薬の必要性は依然残されているため、現在臨床で問題になるであろう新規耐性変異の解析はもちろん、新薬開発のための評価系の確立が重要である。現在、新規薬剤の動物実験評価系としてはSIVとHIVのキメラウイルスであるS-HIVを用いたサル実験しかない。この評価には高額な研究費や特殊施設だけでなく、使用する薬剤も大量に必要となる。そのため大学や研究機関だけでなく、企業においてもハードルは高い。したがってどの薬剤をサル実験に持ち込むべきかの迅速簡便な小動物モデルは必須であり、今後の薬剤開発に対して有用な情報を提供すると考えられる。また、アッセイ系の開発も併せて行う必要性があり、これまで細胞変性効果

(cytopathic effect; CPE) を応用したMTT法やレポーター遺伝子を組み込み、感染をモニターするMAGI法などが開発されてきている。MTTは低CPEウイルスに対して対応が難しく、一方でレポーター法では、感染細胞をカウントする煩雑な作業や酵素活性の測定コストがかかるという問題点がある。そこで我々はMAGI法を改良し、測定コストが低いまま、その精度と感度が同等以上のものを確立させた。我々は研究期間内に現在出現している薬剤耐性情報の解析、安価なスクリーニング法の確立、そしてやはり簡便な動物モデルの確立を行った。これらの成果は今後の新薬開発や耐性におけるHIVの進化を検討するに資する結果となると考えられる。

B. 研究方法

1) 細胞とウイルス：MT-2とPM1-CCR5細胞はRPMI1640培地を用いて培養した。HeLa-CD4-CCR5/ β -galactosidase (MAGI) 細胞はDMEM培地を使用した。ウイルスはそれぞれCXCR4またはCCR5をレセプターとするHIV-1_{IIIb}株とHIV-1_{Ba-L}株を用いた。これらのウイルスはそれぞれMT-2とPM1-CCR5細胞で継代し、使用するまで-80℃で保存した。

2) 抗ウイルス剤：EFdAはヤマサ醤油株式会社にて合成した。AZT等のコントロール薬剤はSigma社から購入もしくはNIH AIDS Research and Reference Reagent Programから分与を受けた。吸着阻害剤であるDS5000、AZT等のコントロール薬剤はSigma社から購入した。融合阻害ペプチドは京都大学薬学部の藤井博士・大石博士らのグループから供与を受けた。ペプチド製剤は京都大学薬学研究科においてFmoc法によって化学合成した。動物実験にコントロール薬剤としてFuzeon (T-20) を用いた。非核酸系逆転写酵素阻害剤はNIH AIDS Research and Reference Reagent Programから分与を受けた。

3) 薬剤感受性試験：薬剤感受性はMAGI細胞を用いたsingle round replicationに対する抗ウイルス活性として測定した。具体的には、96ウェルプレートに10⁴/wellで細胞を加え、24時間培養したのちに薬剤とウイルスを添加し、48時間後にX-Gal添加で感染細胞を計測（カウント法）もしくはCPRGの添加で酵素活性の測定（酵素法）を行った。

4) 動物実験：7週齢SDラットを使用した。ラット腹腔内に薬剤を投与し、その後30分、1、2、4、8、12時間後に採血し、血清を回収した。薬剤投与量はT-20の成人1回投与量200 mgを基準として投与した。

(倫理面への配慮)

耐性機序の解析と創薬への応用を含めたシステム構築を主とする基礎研究であり、臨床分離株など患者由来の情報は氏名、年齢、性別も含めて一切を研究に利用していないため特に配慮は要らないと考えられた。また、ヒトゲノム・遺伝子解析やヒト幹細胞を用いた実験は行っていない。動物実験は研究機関の倫理指針に準じて行った。

C. 結果

1) 172K/R polymorphism：我々は172K polymorphismを有するウイルスBH10株由来のウイルスにsite directed mutagenesis法でthymidine associated mutations (TAMs)を導入すると、M41L/T215YやN348Iなどの臨床分離株にみられる高度AZT耐性が得られないことを経験していた。172KのTAMに対する影響はAZTに限らず、excisionによって排泄される薬剤すべてに共通して見られた (Fig. 1)。一方でQ151MやM184Vは172K/Rでほとんど差がなく、exclusionに関連したAZT耐性には影響を与えなかった。Stanford University HIV drug resistance databaseにおいてもQ151M変異を有するウイルスでは172Kが導入されていることがあるが、TAMsを有するウイルスでは172Rが有意に増加していた。

N348IがNNRTIに対しても交差耐性を示すことから、172K/RのNNRTI耐性関連変異に対する影響を検討した。172KはNNRTI耐性に関しても減弱させることが明らかとなった (Fig. 2)。つまり、治療開始前に逆転写酵素領域に172Kを有するHIVは耐性が遅くなる可能性があると考えられる。

2) EFdA耐性変異の同定：EFdAとその誘導体のEdDAPについて耐性誘導を行った。この誘導を約1年半程度行い、M184Vとともに、A158T、T165R/Mを見出した (Fig. 3)。興味深いことにこの変異は、上記した172K/Rと同様に α -helix Eの同一面に位置し、M184Vが位置する β -sheetとの関連が疑われた。これらから今後EFdAが臨床試験に入った場合の耐性の獲得状況を推定することが可能になると思われる。EFdAはこれまで想定される多剤耐性ウイルスに対しても十分な効果を示すことと予想される。Excisionで耐性化する変異としては69近傍での2アミノ酸の挿入変異、TAMの蓄積、N348I導入などがあり、これらお互いに追加されるとよりその耐性度を増強する。そのため我々はこれらの耐性変異をすべて併せもつウイルスに対する効果を判定したが、その活性はAZTの野生型に対するものよりも依然低いままであることを確認している。Exclusionに関してもQ151Mを有する耐性ウイルスにM184Vを導入

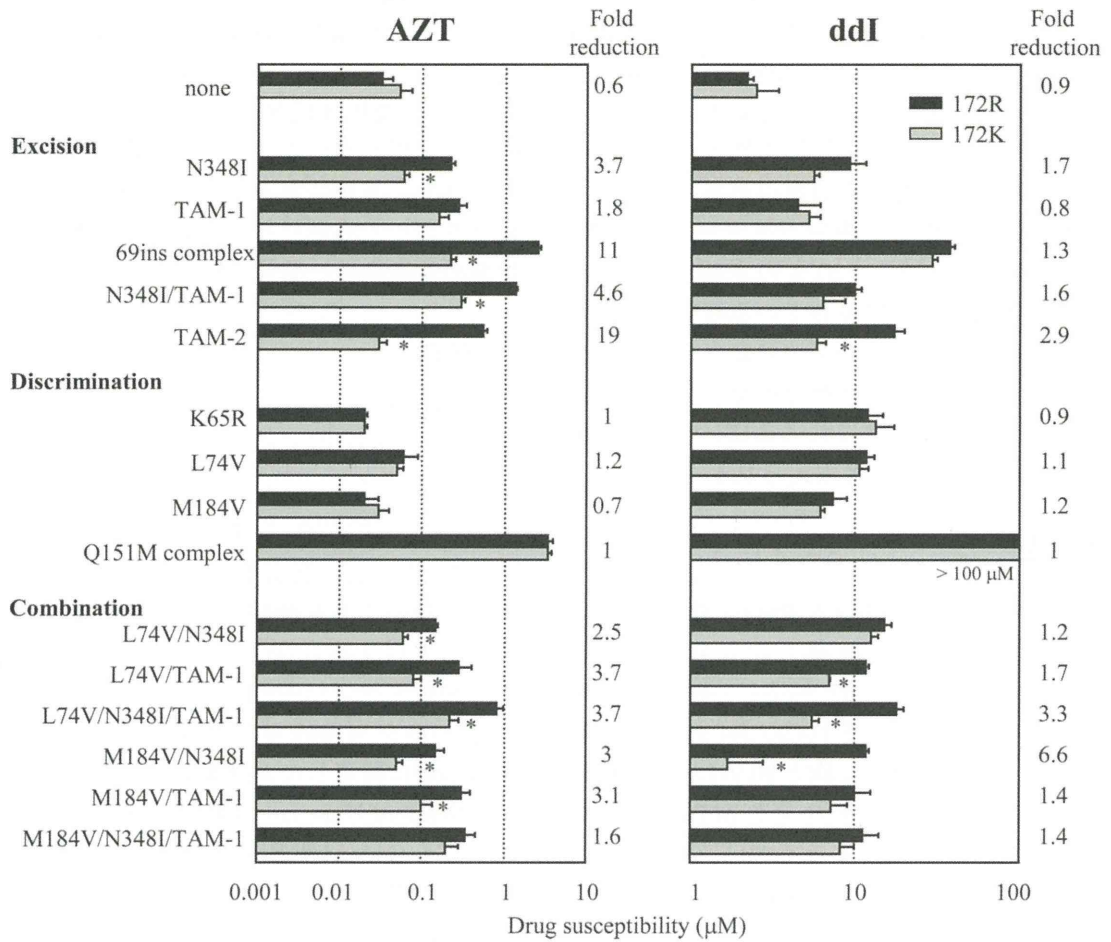


Fig.1 Effect of the 172K polymorphism on HIV-1 susceptibility to AZT and ddI.

Antiviral activities of HIV-1 carrying NRTI resistance mutations with 172R (black bars) or 172K (gray bars) were determined by MAGIC-5 cell-based assay and shown as the concentration required for 50% inhibition of virus infection (EC_{50}). "TAM-1 and -2" have the "M41L and T215Y" and "D67N, K70R, T215F, and K219Q" mutations, respectively. 69ins complex carries 69 insertion and TAM-1. Q151Mc complex carries Q151M, A62V, V75I, F77L, and F116V. Error bars represent standard deviations from at least three independent experiments. Asterisks mark statistically significant differences ($p < 0.05$ by t test) in EC_{50} values comparing 172K with 172R in the background of NRTI-resistant mutations. Susceptibility of the Q151Mc complex with 172R or 172K to ddI was not assessed because the EC_{50} values were over the detection limit for this assay ($>100 \mu M$).

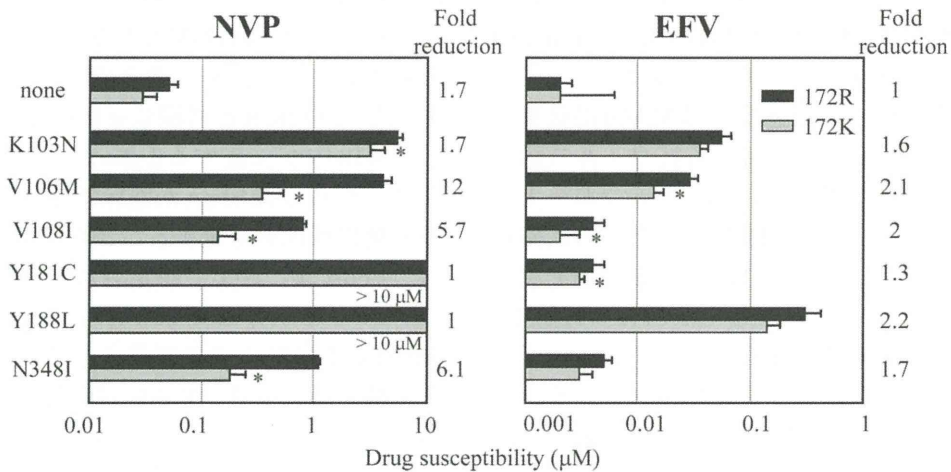


Fig.2 Effect of the 172 polymorphism on HIV-1 susceptibility to NVP and EFV.

Antiviral activities of HIV-1 carrying NNRTI resistance mutations with 172R (black bars) or 172K (gray bars) were determined by MAGIC-5 cell-based assay and shown as the concentration required for 50% inhibition of virus infection (EC_{50}). Error bars represent standard deviations from at least three independent experiments. Asterisks mark statistically significant differences ($p < 0.05$ by t test) in EC_{50} values comparing 172K with 172R in the background of NNRTI-resistant mutations. Susceptibilities of Y181C or Y188L with 172R or 172K to NVP were not assessed because their EC_{50} values were over the detection limit for this assay ($>10 \mu M$).