

201319034A

厚生労働省科学研究費補助金エイズ対策研究事業

多剤耐性HIV変異株に 強力で高い中枢神経系透過性を有する 新規抗HIV薬の開発

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者： 満屋 裕明

(独) 国立国際医療研究センター 臨床研究センター

平成26(2014)年3月

厚生労働科学研究費補助金
エイズ対策研究事業

**多剤耐性 HIV 変異株に
強力で高い中枢神経系透過性を有する
新規抗 HIV 薬の開発**

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 満屋 裕明

(独) 国立国際医療研究センター 臨床研究センター 理事

平成 26 (2014) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

「多剤耐性 HIV 変異株に強力で高い中枢神経系透過性を有する新規抗 HIV 薬の開発」班

平成 25 年度 班の構成

満屋 裕明 (独) 国立国際医療研究センター 臨床研究センター 理事

岡 慎一 (独) 国立国際医療研究センター エイズ治療・研究開発センター センター長

宮川 寿一 熊本大学医学部附属病院 感染免疫診療部 助教

目 次

I. 総括研究報告

多剤耐性 HIV 変異株に強力で高い中枢神経系透過性を有する新規抗 HIV 薬の開発 満屋 裕明	1
---	---

II. 分担研究報告

1. 新薬開発基礎領域	6
満屋 裕明	
2. 新薬開発臨床領域	10
岡 慎一	
3. 新薬開発臨床領域	14
宮川 寿一	

III. 研究成果に関連した刊行物	16
-------------------------	----

総括研究報告書

多剤耐性 HIV 変異株に強力で高い中枢神経系透過性を有する
新規抗 HIV 薬の開発

研究代表者 満屋 裕明

(独) 国立国際医療センター 臨床研究センター 理事

研究要旨

多剤併用療法 (ART) は長足の進歩を遂げ、HIV 感染者と AIDS 発症者の余命は飛躍的に伸長した。一方、長期の ART に伴う副作用や薬剤耐性変異株の出現はこれまで以上に大きな問題となった。特に、感染者・発症者の高齢化に伴う HIV 関連神経認知障害 (HAND) や人格障害発現といった HIV 関連中枢神経系 (CNS) 障害への対策は急務である。本研究は、(1) HIV 関連 CNS 障害の診断法の確立 (岡担当)、(2) HIV の薬剤耐性獲得に高い抵抗性を示し良好な CNS 透過性を有する治療薬の開発 (申請者、宮川担当) を目的とする。本年度は、HAND の診断のために行う日本での共通の心理検査バッテリーを決定、CNS 透過性が期待される HIV プロテアーゼ阻害剤の同定・最適化を行った。また、薬剤候補化合物と HIV プロテアーゼ (PR) の共結晶の作製に成功した。

研究分担者氏名、所属研究機関及び役職

岡 慎一：(独) 国立国際医療研究センター
エイズ治療・研究開発センター
センター長

宮川 寿一：熊本大学医学部附属病院
感染免疫診療部 助教

A. 研究目的

ヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) 感染に対する化学療法 (ART) 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。一方で、長期の ART に伴う副作用や薬剤耐性変異株の出現はこれまで以上に大きな問題となっている。耐性株出現が極めて低いとされていた darunavir (DRV) に対する耐性株の出現も確認され、何れ大きな課題となる事が予測されている。また、先進工業国の感染・発症者の高齢化に伴う HIV 中枢神経系 (CNS) 障害も重大な問題となっている。取分け HIV 関連神経認知障害 (HAND) や人格障害発現に対

する対応は急務である。他方、世界的にも現在 HAND の診断基準はあるものの診断法は確立されていない。CNS 障害の改善が確認されている抗 HIV 剤は AZT のみで、比較的良好な CNS 透過性があるとされる stavudine、indinavir、abacavir の内、abacavir 以外は臨床で使用されなくなっている。脳脊髄液中の HIV (CSF-HIV) は血漿中の HIV とは異なった薬剤耐性パターンを有する事から、多種多様な多剤耐性変異株に強力な阻害作用を示し、良好な CNS 透過性を有する新規薬剤の開発が必要である。

本研究では、企業への早期導出を要に応じて図るが、申請者らによる前臨床・早期臨床試験 (第 1 相・2a 相) の国内での推進を前提とし、多施設共同臨床試験を実施する為の HAND の診断法の確立、基盤を構築すると共に、DRV を含む種々の抗 HIV 剤に対して耐性を獲得した変異株に阻害効果を発揮、HIV の薬剤耐性獲得に高い抵抗性をし、かつ良好な CNS 透過性を示す安全性の高い治療薬の開発を目的とする。

B. 研究方法

満屋裕明 (研究総括者)

1) 多剤耐性HIV変異体に対する抗HIV活性の評価：初期スクリーニングとして野生株のHIV-1を用いてMTT、MAGIアッセイなどによる抗HIV活性の評価を行い、有望なものについては耐性株を含む複数のウィルス株を用いて、p24アッセイを行う。P24アッセイは全自動化学発光度測定機：Lumipulse Fを用いる。

2) CNS移行性評価として、経口投与された化合物の生体膜通過性に影響を与える脂溶性の指標であるLogPow (octanol-water partition coefficients)を測定、また脳毛細血管内皮細胞 (サル由来)、血管周皮細胞および星状神経膠細胞 (ラット由来) を用いたin vitro BBB再構築システム (Nakagawa *et al*, 2007) を用いて、各候補化合物のBBB透過性の評価を進める。

3) 新規化合物が示す抗HIV効果の作用機序の解明：新規化合物がHIV野生株及び多剤耐性変異株のプロテアーゼに、どのような相互作用形式で結合しているのかをX線結晶構造解析を用いて分子・原子レベルで解明する。得られた三次元構造及び相互作用形式を既存の薬剤と比較して、薬剤耐性HIV変異株に効果を発揮する為に重要となる相互作用部位を明らかにする。

4) HIV-1 が薬剤耐性を獲得するメカニズムの解析：過去に我々は、DRV について試験管内耐性誘導実験を行い DRV に対して高い耐性を有する HIV-1 変異株 ($HIV_{DRV}^R_{P20}$, $HIV_{DRV}^R_{P30}$ 及び $HIV_{DRV}^R_{P51}$) の誘導に成功している。特に $HIV_{DRV}^R_{P51}$ は ART に使用されるほとんどのプロテアーゼ阻害剤に対し耐性を示す事が明らかとなっている (Koh *et al*, 2010)。この DRV 耐性 HIV 株に由来するプロテアーゼ変異体と DRV の複合体を結晶化し、X 線結晶構造解析を行うことで、HIV-1 がどのようにして DRV に対する耐性を獲得するかを構造学的に明らかにする。

岡慎一 (研究分担者)

1) ブロック拠点病院を中心とした全国 12 施設に対し、HAND 診断のためにどのような神経心理テストを使用しているのかアンケートを行うと共に、文献検索サイト PubMed において、キーワード「HIV associated neurocognitive disorder × neurocognitive test or neuropsychological test」で、Frascati Criteria 提唱以降 (Antinori *et al*, 2007) の論文検索を行い、包括的な神経心理検査が施行されていた 30 件の論文 (症例報告以外の無料閲覧可能なもの) から、各認知ドメインの使用頻度が高い検査を調べた。その結果をふまえ、国内で施行可能な検査であり、患者への負担や検査施行時間などを主な選定基準として協議を行い、7 つの認知ドメインをカバーできる神経心理検査の選定を行った。

宮川寿一 (研究分担者)

満屋研究班と同様に in vitro BBB 再構築システム (Nakagawa *et al*, 2007) を用いて、各化合物の BBB 透過性の評価を進める。

(倫理面への配慮)

開発した化合物の臨床試験導入に際し動物実験でその安全性を確認する。動物実験においては、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」に準拠し実施する。医学部内の IRB で倫理適合性の許可を申請し認可後試験を開始する。

C. 研究結果

満屋裕明 (研究総括者)

これまでに我々の研究グループは、米国 Purdue University の Dr. Ghosh グループとの共同研究により既に米国 FDA に認可、本邦でも臨床に供されているプロテアーゼ阻害剤 (PI), darunavir/Prezista® (DRV) の初期開発に成功した。更に、試験管内での DRV 耐性誘導実験か

ら DRV 耐性獲得に重要な変異 (V32I, L33F, I54M 及び I84V) の特定を行った (Koh *et al*, 2010; Koh *et al*, 2011)。我々は、これ等の変異が DRV による治療に不応性となった臨床症例においても認められることを確認した。V32I/L33F/I54M/I84V の変異を全て有する HIV_{DRV P51}^R は ART に使用される PI や我々が同定した薬剤候補化合物のほとんどに対して強い耐性を示す。近年我々は、Dr. Ghosh グループと共同して、この特に HIV_{DRV P51}^R に対しても阻害効果を示す強力な化合物 GRL-085-11A の同定に成功、HIV_{DRV P51}^R に由来する DRV 耐性プロテアーゼ (PR_{DRV P51}^R) との複合体の結晶構造解析を行い、GRL-085-11A が耐性株に対して効果を発揮する機構を解明した。

更に DRV の持つ部分構造 bis-THF にフッ素原子を修飾した bis-THF-difluoride 構造を有するリード化合物群、GRL-048, -050 を新たに同定・報告した (Miguel, *et al*, 2013)。*in vitro* BBB 再構築システムで測定した GRL-048, -050 の脳血管透過係数 (Papp) は 47.8 ~ 61.8 cm⁶/s であり、DRV (Papp=9.9 cm⁶/s) を超える値を示し、且つ現時点で AIDS 脳症の第一選択とされる AZT (Papp=22.7 cm⁶/s), IDV (Papp=36.7 cm⁶/s) よりも高い値を示した。Papp はその値が 20 以上ならば試験化合物は容易に脳内に移行、2 以上 10 未満でごくわずかに脳内に移行するとされている事から、これら 2 化合物は非常に良好な CNS 移行性を有し得ることが示唆された。現在、新たに 5 種類の CNS 標的化合物群を新たに同定、高い Papp 値を示す化合物の同定に成功している (Amano, Miguel, Mitsuya, 未発表データ)。これらの新規化合物は既存の薬剤に比して抗ウイルス活性が高く、細胞毒性が低い事から HAND の有望な予防/治療薬候補と成り得る可能性を示す。

岡慎一 (研究分担者)

神経心理検査 の選定 (研究方法参照) を行っ

た後、神経心理検査を精力的に行っている全国 18 施設の心理士による検討会及び、琉球大学の富永教授の監修を経て、下記の神経心理検査を、今後日本で行う HAND 診断のための神経心理コア

バッテリーとすることに決定した (表 1 参照)。このコアバッテリーは、あくまでもスクリーニングのためであり、症例ごとに必要な場合には、適宜各施設で検査を追加することが推奨される。このスクリーニングに要する時間は、心理検査に習熟した心理士が行った場合約 45 分である。

宮川寿一 (研究分担者)

核酸系逆転写阻害剤 (NRTI) として AZT, ABC, プロテアーゼ阻害剤 (PI) として IDV, SQV, ATV, LPV, DRV を用いて *in vitro* BBB 再構築システムにおける脳血管移行係数 (apparent permeability coefficient ; Papp) を測定し、各薬剤の CNS 移行性を定量的に評価した。また 3TC, TDF (NRTI), APV (PI), EFV (非核酸系逆転写酵素阻害剤), RAL (インテグラーゼ阻害剤) について現在 CNS 移行性の評価を進めている。今後も全ての臨床使用されている抗 HIV 剤に対して CNS 移行性を定量化していく。

D. 考察

満屋裕明 (研究総括者)

多剤耐性ウイルスによる初期感染や ART 治療抵抗性を示す症例数の増加しており、多剤耐性ウイルスに効果を発揮、HIV の薬剤耐性獲得に高い抵抗性を示す薬剤開発は HIV 治療にお

表 1 HAND 診断のための神経心理コアバッテリー

神経心理検査バッテリー	
認知ドメイン	検査
運動	Grooved Pegboard
注意/作動記憶	数唱 (WAIS-III)
情報処理速度	符号 (WAIS-III) Trail Making Test - A
言語	言語流暢性検査
実行機能	Trail Making Test - B
学習/記憶	物語 (RBMT) ; 即時・遅延再生 Rey複雑図形検査 ; 3分後、30分後再生
視空間構成	Rey複雑図形検査 ; 模写
精神症状	日本語版POMS短縮版

ける重要な命題である。また、感染・発症者の生活の質(QOL)のみならず生命予後の悪化につながる HAND などの CNS 障害に有効な HIV 新薬が開発されれば、日本と世界の感染・発症者に大きな福音をもたらす。研究代表者らは米国研究グループとの共同研究で GRL-085 などの種々の耐性株に有効で、耐性株の出現が著しく遅延する薬剤を開発・同定し、更に GRL-048, -050 といった良好な CNS 透過性を有するリード化合物の開発・同定に成功した (Miguel, *et al*, *AAC*. 2013)。既にこれら化合物に対して構造の最適化を行い、より有望な化合物を複数同定していることから、前臨床・早期臨床試験に用いられる候補化合物は遅くとも次年度中期までに確定すると強く期待される。

岡慎一 (研究分担者)

従来、施設ごとの HAND の罹患率などにも大きな相違があったが、これは、診断法が異なっていることに起因していた。多施設共同臨床試験の効果判定に用いるためには、最低限の診断のためのコアとなるバッテリーを決めておく必要があり、その意味で、本研究の成果の意義は大きいといえる。

今回、HAND スクリーニングのための神経心理バッテリーは、心理検査に習熟した心理士が実施した場合でも 45 分を要する。この点は、画像や血液検査などで HAND の診断を補完する検査を研究し、心理士がいない施設においても HAND の診断ができるような診断補助法を作成していく必要がある。また、心理士の習熟度による結果の乖離が出ないように、今回決定したバッテリーに関しては、心理士の研修などを行うことにより、検査方法の標準化を行う必要がある。この点に関しては、次年度以降速やかに実施していきたい。

宮川寿一 (研究分担者)

臨床使用されている各抗 HIV 剤の CNS 移行

性を網羅的に定量化して評価することは、感染・発症者の生活の質(QOL)のみならず生命予後の悪化につながり、また今後さらに増加するであろう HAND 症例に対して、最適な治療薬選択に貢献しうるものと期待される。

E. 結論

満屋裕明 (研究総括者)

本研究では、DRV に対しても耐性を示す多剤耐性 HIV に対して効果を発揮する新規化合物の同定の成功し、その化合物と PR 変異体の複合体を結晶化する事に成功した。更に、強力な抗 HIV-1 活性と良好な CNS 移行性を発揮する新規抗 HIV 剤のデザイン・合成・評価を行った。今後も結晶構造解析等の研究手法を用いて薬剤の構造の最適化を継続し、動物実験および臨床試験に移行し得る化合物の開発を進める。

岡慎一 (研究分担者)

HAND の診断のために行う日本での共通の心理検査バッテリーが決定できたことから、今年度設定した目標を 100%達成できたといえる。本年度の成果をもとに、今後日本における HAND の疫学等が明らかになる。また、中枢神経系透過性を有する新規抗 HIV 薬を開発する時の多施設共同臨床試験時に、共通の物差しで HAND の評価が行えるようになった。

宮川寿一 (研究分担者)

今年度の研究で LogPow (octanol-water partition coefficients) の測定と脳毛細血管内皮細胞 (サル由来)、血管周皮細胞および星状神経膠細胞 (ラット由来) を用いた *in vitro* BBB (脳血管関門) 再構築システムを用いて、脳血管移行係数を測定し、各候補化合物の BBB 透過性を同定した。今後は、多剤を投与した際の各薬剤の濃度を LC-MS/MS 等を用いて測定する系を立ち上げ、より臨床に即したアッセイ系の構築を目指す。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

各研究分担者の頁参照

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

新薬開発基礎領域

研究分担者 満屋 裕明

(独) 国立国際医療研究センター 臨床研究センター 理事

研究協力者 天野 将之

熊本大学大学院 生命科学研究部・血液内科学分野

研究要旨 本研究の目的として、①良好な CNS 移行性、すなわち良好な blood-brain barrier (BBB: 脳血管関門) 透過性を有し②薬剤耐性株に強力な活性を有し③耐性出現が遅延し④毒性の低い (安全性が高い) 治療薬開発を主眼とする。研究代表者らは米国研究グループとの共同研究で、*bis*-THF-difluoride といった新規構造を有する抗 HIV 化合物群、GRL-048, -050 を新たに同定、*in vitro*での脳血管関門 (BBB) 再構築システムを用いて、同化合物群が DRV を含む既存の抗 HIV-1 剤群と比較して著しく良好な BBB 透過性を有し得る事を見出した。更に研究代表者らは既に種々の耐性株に有効で、かつ良好な CNS 透過性を有する複数のリード化合物の開発・同定に成功しており、今後前臨床・早期臨床試験の国内での推進を図る。

A. 研究目的

cART の進歩により感染者余命が延長した事による今日の問題点として HIV 関連神経認知障害 (HAND) があり、その対応が求められている。HAND の病因に関しては、HIV 感染による神経細胞への直接の毒性および長期感染に伴う中枢神経系 (CNS) での慢性的な炎症が主体である。この事より本研究の目的として、①良好な CNS 移行性、すなわち良好な blood-brain barrier (BBB: 脳血管関門) 透過性を有し②薬剤耐性株に強力な活性を有し③耐性出現が遅延し④毒性の低い (安全性が高い)、治療薬開発を主眼とする。本研究では、企業への早期導出を要に応じて図るが、申請者らによる前臨床・早期臨床試験 (第 1 相・2a 相) の国内での推進を前提とする。

B. 研究方法

研究代表者らは米国 Purdue 大学の研究グループと共同で、①既存抗 HIV 剤耐性株に有効で、②

耐性発現が著明に遅延、かつ③良好な CNS 移行性を有すると期待されるリード化合物を既に複数同定・報告しているが (Miguel, Amano, Mitsuya, AAC. 2013)、これら3点について更にデザイン・合成を続けて最適化を進める。

1) CNS 移行性評価として、経口投与された化合物の生体膜透過性に影響を与える脂溶性の指標である LogPow (octanol-water partition coefficients) を測定、また脳毛細血管内皮細胞 (サル由来)、血管周皮細胞および星状神経膠細胞 (ラット由来) を用いた *in vitro* BBB 再構築システム (Nakagawa, 2007) を用いて、各候補化合物の BBB 透過性の評価を進める。

2) 検討中の化合物の抗 HIV-1 活性評価: 抗 HIV-1 活性の評価には実験室内野生株である HIV-1_{LAI} 株およびヒト T 細胞由来 MT2 細胞を用いた MTT アッセイ法を用いた。また有望な化合物については MT4 細胞や PBMC を用いた p24 アッセイにより臨床分離株や多剤耐性株に対する抗ウイルス活性を検討

し、更に試験管内で耐性変異株の誘導を試み、誘導された耐性株においてウイルス学・遺伝子学的解析や結晶解析による耐性発現メカニズムの解析を行う。

(倫理面への配慮)

本プロジェクトにおいて開発予定の良好な CNS 移行性を有すると期待される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。動物実験においては、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」に準拠し実施する。

C. 研究結果

フッ素原子を付加する事により化合物の安定性や脂溶性が向上するとされており、この知見を鍵とした合成展開を行う事で複数の化合物を新たに合成し詳細な検討を行った結果、前述したように多剤耐性 HIV-1 株に有効でかつ良好な CNS 移行性を発揮すると考えられる *bis*-THF-difluoride 構造を有するリード化合物群、GRL-048, -050 を新たに同定・報告した (Miguel, Amano, Mitsuya, AAC. 2013)。現時点で AIDS 脳症の第一選択とされる AZT, IDV の、*in vitro* BBB 再構築システムで測定した脳血管透過係数 (Papp) がそれぞれ 22.7, 36.7 cm^6/s (Papp が 20 以上ならば試験化合物は容易に脳内に移行、2 以上 10 未満でごくわずかに脳内に移行する)、また DRV の Papp 値が 9.9 cm^6/s であったのに対し、これら 2 化合物の Papp 値は 47.8 ~ 61.8 cm^6/s であり、非常に良好な CNS 移行性を有し得ることが示唆された。更に、既存薬の抗 HIV-1 活性を凌ぐウイルス増殖抑制効果および低い細胞毒性を示す 5 種類の CNS 標的化合物群を新たに同定、これら化合物の BBB 透過性は既存抗 HIV 剤において優れた脳内移行性を示すとされる AZT, ABC, IDV より良好であった (Amano,

Miguel, Mitsuya, 未発表データ)。これらの結果は新規に合成した化合物群が HAND の有望な予防/治療薬候補と成り得る可能性を示す。

D. 考察

感染・発症者の生活の質 (QOL) のみならず生命予後の悪化につながる HAND などの CNS 障害に有効な HIV 新薬が開発されれば、日本と世界の感染・発症者に大きな福音をもたらすのみならず、医療分野における日本の成長戦略の一つとして大きく期待される。研究代表者らは米国研究グループとの共同研究で既に種々の耐性株に有効で、耐性株の出現が著しく遅延し、かつ良好な CNS 透過性を有するリード化合物の開発・同定に成功しており (Miguel, Amano, Mitsuya, AAC. 2013)、更に構造最適化を進め有望な化合物を複数同定している事から、前臨床・早期臨床試験に用いられる候補化合物は遅くとも次年度中期までに確定すると強く期待される。

E. 結論

本研究では強力な抗 HIV-1 活性と良好な CNS 移行性を発揮する新規抗 HIV 剤のデザイン・合成・評価を進めた。今後も最適化を継続し、動物実験および臨床試験に移行し得る化合物の開発を進める。

F. 研究発表

1. Gómez PMS, Amano M, Yashchuk S, Mizuno A, Das D, Ghosh, AK and Mitsuya H, GRL-04810 AND GRL-05010; DIFLUORIDE-CONTAINING NONPEPTIDIC HIV-1 PROTEASE INHIBITORS (PIs) THAT INHIBIT THE REPLICATION OF MULTI-PI-RESISTANT HIV-1 IN VITRO AND POSSESS FAVORABLE LIPOPHILICITY THAT MAY ALLOW BLOOD-BRAIN BARRIER PENETRATION,

- Antimicrob. Agents Chemother. (in print)
2. Hachiya A, Reeve AR, Marchand B, Michailadis E, Ong YT, Kirby KA, Leslie MD, Oka S, Kodama EN, Rohan LC, Mitsuya H, Parniak MA, and Sarafianos SG, Evaluation of Combinations of 4' -Ethynyl-2-Fluoro-2' -Deoxyadenosine with Clinically Used Antiretroviral Drugs, *Antimicrob. Agents Chemother.* 57: 4554, 2013
 3. Taura M, Kariya R, Kudo E, Goto H, Iwawaki T, Amano M, Suico MA, Kai H, Mitsuya H, and Okada S, Comparative analysis of ER stress response into HIV protease inhibitors: Lopinavir but not darunavir induces potent ER stress response via ROS/JNK pathway, *Free Radical Biology and Medicine*, 65; 778, 2013
 4. Yarchoan R, and Mitsuya H, *Development of the First AIDS Drugs: AZT and Other Dideoxynucleosides*, Springer, "Human Immunodeficiency Virus Reverse Transcriptase", pp1, 2013
 5. Amano M, Tojo Y, Gómez PMS, 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 Replication of a Wide Spectrum of Multi-PI-Resistant HIV-1 Variants In Vitro, *Antimicrob. Agents Chemother.* 57; 2036, 2013
 6. Feng L, Sharma A, Slaughter A, Jena N, Koh Y, Shkriabai N, Larue RC, Patel PA, Mitsuya H, Kessler JJ, Engelman A, Fuchs JR, and Kvaratskhelia M, The A128T Resistance Mutation Reveals Aberrant Protein Multimerization as the Primary Mechanism of Action of Allosteric HIV-1 Integrase Inhibitors, *J. Biol. Chem.* 288; 15813, 2013
 7. Yedidi RS, Maeda K, Fyvie WS, Steffey M, Davis DA, Palmer I, Aoki M, Kaufman JD, Stahl SJ, Garimella H, Das D, Wingfield PT, Ghosh AK, and Mitsuya H, P2' Benzene Carboxylic Acid Moiety Is Associated with Decrease in Cellular Uptake: Evaluation of Novel Nonpeptidic HIV-1 Protease Inhibitors Containing P2 bis-Tetrahydrofuran Moiety, *Antimicrob. Agents Chemother.* 57; 4920, 2013
 8. Matsuzawa T, Kawamura T, Ogawa Y, Blauvelt A, Mitsuya H, and Shimada S, Novel nucleoside reverse transcriptase inhibitor (4' -Ethynyl-2-Fluoro-2' -Deoxyadenosine) completely blocks HIV Infection of Langerhans Cells, *Journal of Dermatological Science*, 69; e30, 2013
 9. Ghosh A, Partham GL, Martyr CD, Nyalapatla PR, Osswald HL, Agniswamy J, Wang YF, Amano M, Weber IT, Mitsuya H, Highly Potent HIV-1 Protease Inhibitors with Novel Tricyclic P2 Ligands: Design, Synthesis, and Protein-Ligand X-ray Studies, *J. Med. Chem.* 56; 6792, 2013
 10. Zhang W, Parniak MA, Mitsuya H, Sarafianos SG, Greabing PW, Rohan LC, Preformulation studies of EFdA, a novel nucleoside reverse transcriptase inhibitor for HIV prevention, *Drug Dev. Ind. Pharm.* (in print)
 11. Nishijima T, Takano M, Ishisaka M, Komastu

H, Gatanaga H, Kikuchi Y, Endo T, Horiba M, Kaneda S, Uchiumi H, Koibuchi T, Naito T, Yoshida M, Tachikawa N, Ueda M, Yokomaku Y, Fujii T, Higasa S, Takada K, Yamamoto M, Matsushita S, Tateyama M, Tanabe Y, Mistuya H, and Oka S on behalf of the Epzicom-Truvada study team.

Abacavir/Lamivudine versus Tenofovir/Emtricitabine with Atazanavir/Ritonavir for treatment naïve HIV-infected Japanese: a randomized multisite trial. Intern Med 52: 735-744, 2013.

12. Nishijima T, Gatanaga H, Shimbo T, Komatsu H, Ishisaka M, Tsukada K, Endo T, Horiba M, Koga M, Naito T, Itoda I, Tei M, Fujii T, Takada K, Yamamoto M, Miyakawa T, Tanabe Y, Mitsuya H, and Oka S on behalf of the SPARE study team. Switching tenofovir/emtricitabine plus lopinavir/r to raltegravir plus darunavir/r in patients with suppressed viral load does not result in recovery of renal function but could sustain viral suppression: A randomized multicenter trial. PLOS One 8 (8): e73639, 2013.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

新薬開発臨床領域

研究分担者 岡 慎一

(独) 国立国際医療研究センター エイズ治療・研究開発センター センター長

研究要旨 今年度の研究により、HAND の診断のために行う日本での共通の心理検査バッテリーが決定できた。本年度の成果をもとに、今後日本における HAND の疫学等が明らかになる。また、中枢神経系透過性を有する新規抗 HIV 薬を開発する時の多施設共同臨床試験時に、共通の物差しで HAND の評価が行えるようになった。

研究目的

感染者の予後の改善に伴う感染者の高齢化に伴い、HIV 関連認知症 (HAND) の問題は、今後大きくなることが予想される。本研究で開発される薬剤は、HAND への治療という観点から重要であるが、世界的にも現在 HAND の診断基準はあるものの診断法は確立されていない。今年度の本研究の目的は、HAND 治療に対する多施設共同臨床試験を実施するにあたり、少なくとも日本における HAND の診断法を統一することを目的としている。

A. 研究方法

ブロック拠点病院を中心とした全国 12 施設に対し、HAND 診断のためにどのような神経心理テストを使用しているのかアンケートを行うと共に、文献検索サイト PubMed において、キーワード「HIV associated neurocognitive disorder × neurocognitive test or neuropsychological test」で、Frascati Criteria 提唱以降 (Antinori et al, 2007) の論文検索を行い、包括的な神経心理検査が施行されていた 30 件の論文 (症例報告以外の無料閲覧可能なもの) から、各認知ドメインの使用頻度が高い検査を調べた。その結果をふまえて、国内で施行可能な検査であり、患者への負担や検査施行時間などを主な選定基準として協議を行い、7 つの認知ドメインをカバーできる神経心理検査の選定を行った。

(倫理面への配慮)

今年度の研究では、倫理的な問題はない。

B. 研究結果

B で示した方法で神経心理検査の選定を行った後、神経心理検査を精力的に行っている全国 18 施設の心理士による検討会及び、琉球大学の富永教授の監修を経て、下記の神経心理検査を、今後日本で行う HAND 診断のための神経心理コアバッテリーとすることに決定した。

神経心理検査バッテリー

認知ドメイン	検査
運動	Grooved Pegboard
注意/作動記憶	数唱 (WAIS-III)
情報処理速度	符号 (WAIS-III) Trail Making Test - A
言語	言語流暢性検査
実行機能	Trail Making Test - B
学習/記憶	物語 (RBMT) ; 即時・遅延再生 Rey複雑図形検査 ; 3分後、30分後再生
視空間構成	Rey複雑図形検査 ; 模写
精神症状	日本語版POMS短縮版

このコアバッテリーは、あくまでもスクリーニングのためであり、症例ごとに必要な場合には、適宜各施設で検査を追加することが推奨される。このスクリーニングに要する時間は、心理検査に習熟した心理士が行った場合約 45 分である。

C. 考察

従来、施設ごとの HAND の罹患率などにも大きな相違があったが、これは、診断法が異なっていることに起因していた。多施設共同臨床試験の効果判定に用いるためには、最低限の診断のためのコアとなるバッテリーを決めておく必要があり、その意味で、本研究の成果の意義は大きいといえる。

今回、HAND スクリーニングのための神経心理バッテリーは、心理検査に習熟した心理士が実施した場合でも 45 分を要する。この点は、画像や血液検査などで HAND の診断を補完する検査を研究し、心理士がいない施設においても HAND の診断ができるような診断補助法を作成していく必要がある。また、心理士の習熟度による結果の乖離が出ないように、今回決定したバッテリーに関しては、心理士の研修などを行うことにより、検査方法の標準化を行う必要がある。この点に関しては、次年度以降速やかに実施していきたい。

D. 結論

HAND の診断のために行う日本での共通の心理検査バッテリーが決定できたことから、今年度設定した目標を 100%達成できたといえる。本年度の成果をもとに、今後日本における HAND の疫学等が明らかになる。また、中枢神経系透過性を有する新規抗 HIV 薬を開発する時の多施設共同臨床試験時に、共通の物差しで HAND の評価が行えるようになった。

E. 研究発表

1. Nishijima T, Takano M, Ishisaka M, Komastu H, Gatanaga H, Kikuchi Y, Endo T, Horiba M,

Kaneda S, Uchiumi H, Koibuchi T, Naito T, Yoshida M, Tachikawa N, Ueda M, Yokomaku Y, Fujii T, Higasa S, Takada K, Yamamoto M, Matsushita S, Tateyama M, Tanabe Y, Mistuya H, and Oka S on behalf of the Epzicom-Truvada study team. Abacavir/Lamivudine versus Tenofovir/Emtricitabine with Atazanavir/Ritonavir for treatment naïve HIV-infected Japanese: a randomized multisite trial. *Intern Med* 52: 735-744, 2013.

2. Gatanaga H, Hayashida T, Tanuma J, and Oka S. Protective effect of antiretroviral treatment for HIV infection against HBV infection. *Clin Infect Dis* 56 (12): 1812-1819, 2013.
3. Hamada Y, Nagata N, Shimbo T, Igari T, Nakashima R, Asayama N, Nishimura S, Yazaki H, Teruya K, Gatanaga H, Kikuchi Y, Akiyama J, Ohmagari N, Uemura N and Oka S. Assessment of the antigenemia assay for the diagnosis of cytomegalovirus gastrointestinal diseases in HIV-infected patients. *AIDS Patient Care STD* 27 (7) 387-391, 2013.
4. Tanuma J, Sano K, Teruya K, Watanabe K, Aoki T, Honda H, Yazaki H, Tsukada K, Gatanaga H, Kikuchi Y, and Oka S. Pharmacokinetics of rifabutin in Japanese HIV-infected patients with or without antiretroviral therapy. *PLoS One* 8 (8): e70611, 2013.
5. Mizushima D, Nishijima T, Gatanaga H, Tsukada K, Teruya K, Kikuchi Y, Oka S. Preemptive therapy prevents cytomegalovirus end-organ disease in treatment-naïve patients with advanced

- HIV-1 Infection in the HAART era. *PLoS One* 8 (5): e65348, 2013.
6. Tsuchiya K, Ode H, Hayashida T, Kakizawa J, Sato H, **Oka S**, and Gatanaga H. Arginine Insertion at Position 11 and Loss of N-linked Glycosylation Site in HIV-1 Env V3 Region Confer CXCR4-tropism. *Scientific Report* 3: 2389, 2013
 7. Gatanaga H, Murakoshi H, Hachiya A, Hayashida T, Ode H, Sugiura W, Takiguchi M, and **Oka S**. Rilpivirine-Resistant HIV-1 Naturally Selected by Host Cellular Immunity. *Clin Infect Dis* 57 (7) 1051-1055, 2013.
 8. Hamada Y, Nishijima T, Watanabe K, Komatsu H, Teruya K, Gatanaga H, Kikuchi Y, and **Oka S**. Does ritonavir-boosted atazanavir increase the risk of complicated cholelithiasis compared to other protease inhibitors? *PLoS One* 8 (7): e69845, 2013.
 9. Nishijima T, Gatanaga H, Komatsu H, Takano M, Ogane M, Ikeda K, and **Oka S**. Illicit drug use is a significant risk factor for loss to follow up in patients with HIV-1 infection at a large urban HIV clinic in Tokyo. *PLoS One* 8 (8): e72310, 2013.
 10. Nishijima T, Gatanaga H, Shimbo T, Komatsu H, Ishisaka M, Tsukada K, Endo T, Horiba M, Koga M, Naito T, Itoda I, Tei M, Fujii T, Takada K, Yamamoto M, Miyakawa T, Tanabe Y, Mitsuya H, and **Oka S** on behalf of the SPARE study team. Switching tenofovir/emtricitabine plus lopinavir/r to raltegravir plus darunavir/r in patients with suppressed viral load does not result in recovery of renal function but could sustain viral suppression: A randomized multicenter trial. *PLoS One* 8 (8): e73639, 2013.
 11. Watanabe K, Murakoshi H, Tamura Y, Koyanagi M, Chikata T, Gatanaga H, **Oka S**, and Takiguchi M. Identification of cross-clade CTL epitopes in HIV-1 clade A/E-infected individuals by using the clade B overlapping peptides. *Microb Infect* 15: 874-886, 2013.
 12. Nishijima T, Gatanaga H, Komatsu H, Takano M, Ogane M, Ikeda K, **Oka S**. High prevalence of illicit drug use in men who have sex with men with HIV-1 infection in Japan. *PLoS One* 8 (12) e81960, 2013.
 13. Mizushima D, Tanuma J, Kanaya F, Watanabe K, Nishijima T, Gatanaga H, Lam NT, Dung NTH, Kinh NV, and **Oka S**. WHO antiretroviral therapy guidelines 2010 and impact of tenofovir on chronic kidney disease in Vietnamese HIV-infected patients. *PLoS One* 8 (11) e79885, 2013.
 14. Nishijima T, Hamada Y, Watanabe K, Komatsu H, Kinai E, Tsukada K, Teruya K, Gatanaga H, Kikuchi Y, and **Oka S**. Ritonavir-boosted darunavir is rarely associated with nephrolithiasis compared with ritonavir-boosted atazanavir in HIV-infected patients. *PLoS One* 8 (10) e77268, 2013.
 15. Nishijima T, Shimbo T, Komatsu H, Hamada Y, Gatanaga H, and **Oka S**. Incidence and risk factors for incident hepatitis C infection among men who have sex with men with HIV-1 infection in a large urban HIV clinic in Tokyo. *JAIDS* 65 (2): 213-217, 2014.

16. Nishijima T, Gatanaga H, and **Oka S**. [Epub ahead of print]
 Traditional but not HIV-related factors are associated with nonalcoholic fatty liver disease in Asian patients with HIV-1 infection. *PLOS One* 9 (1) e87596, 2014.
17. Hamada Y, Nagata N, Nishijima T, Shinbo T, Asayama N, Kishida Y, Sekine K, Tanaka S, Aoki T, Watanabe K, Akiyama J, Igari T, Mizokami M, Uemura N, and **Oka S**. Impact of HIV Infection on Colorectal Tumors, Prospective Colonoscopic Study in Asia. *JAIDS* 65 (3): 312-317, 2014.
18. Matsunaga A, Hishima T, Tanaka N, Yamazaki M, Mochizuki M, Tanuma J, **Oka S**, Ishizaka Y, Shimura M and Hagiwara S. DNA methylation profiling can classify HIV-associated lymphomas. *AIDS* 28(4):503-510, 2014.
19. Suzuki Y, Tachikawa N, Gatanaga H, and **Oka S**. Slow turnover of HIV-1 receptors on quiescent CD4+ T cells causes prolonged surface retention of gp120 immune complexes in vivo. *PLOS One* 9 (2): e86479, 2014.
20. Watanabe K, Aoki T, Nagata N, Tanuma J, Kikuchi Y, **Oka S** and Gatanaga H. Clinical significance of high anti-Entamoeba histolytica antibody titer in asymptomatic HIV-1-infected individuals. *J Infect Dis* 2013, Dec 13. [Epub ahead of print]
21. Nishijima T, Shimbo T, Komatsu H, Hamada Y, Gatanaga H, and **Oka S**. Cumulative exposure of ritonavir-boosted atazanavir is associated with cholelithiasis formation in patients with HIV-1 infection. *J Antimicrob Chemothera* 2013 Dec 29.
22. Kinai E, Nishijima T, Mizushima D, Watanabe K, Aoki T, Honda H, Yazaki H, Genka I, Tanuma J, Teruya K, Tsukada K, Gatanaga H, Kikuchi Y, and **Oka S**. Prevalence and risk factors of bone mineral density abnormalities in Japanese HIV-infected patients. *AIDS Res Hum Retrovirol* (in press)
- G. 知的財産権の出願・登録状況
 なし

新薬開発臨床領域

研究分担者 宮川 寿一

熊本大学医学部附属病院 感染免疫診療部 助教

研究要旨 今年度の研究では、LogPow (octanol-water partition coefficients)の測定と脳毛細血管内皮細胞 (サル由来)、血管周皮細胞および星状神経膠細胞 (ラット由来) を用いた *in vitro* BBB (脳血管関門) 再構築システムを用いて、脳血管移行係数を測定し、各候補化合物の BBB 透過性を定量的に測定するアッセイ系を確立した。

A. 研究目的

強力な抗 HIV 薬の出現により、HIV 感染患者の予後は改善したが、HIV 関連認知障害 (HAND) は無症候の者を含めると、半数以上の患者で認められるとされ、社会への適応性の低下が認められる、更には今後の患者の高齢化とともに、症状の顕在化により大きな問題となると考えられる。現在、抗 HIV 剤の中枢神経系 (CNS) 移行指数として CPE スコアが用いられているが、あくまでもこれは薬剤の中枢移行性を 4 段階に分類した指標であり、各抗 HIV 剤の中枢移行性に関する定量的な評価が今後必要となる。

B. 研究方法

CNS 移行性評価として、経口投与された化合物の生体膜透過性に影響を与える脂溶性の指標である LogPow (octanol-water partition coefficients) を測定、また脳毛細血管内皮細胞 (サル由来)、血管周皮細胞および星状神経膠細胞 (ラット由来) を用いた *in vitro* BBB (脳血管関門) 再構築システム (Nakagawa, 2007) を用いて、各候補化合物の BBB 透過性の評価を進める。(倫理面への配慮)
今年度の研究では、倫理的な問題はない。

C. 研究結果

核酸系逆転写阻害剤 (NRTI) として AZT, ABC, プロテアーゼ阻害剤 (PI) として IDV, SQV, ATV, LPV, DRV を用いて *in vitro* BBB 再構築システムにおける脳血管移行係数 (apparent permeability coefficient; Papp) を測定し、各薬剤の CNS 移行性を定量的に評価した。また 3TC, TDF (NRTI), APV (PI), EFV (非核酸系逆転写酵素阻害剤), RAL (インテグラーゼ阻害剤) について現在 CNS 移行性の評価を進めている。今後も全ての臨床使用されている抗 HIV 剤に対して CNS 移行性を定量化していく。

D. 考察

臨床使用されている各抗 HIV 剤の CNS 移行性を網羅的に定量化して評価することは、感染・発症者の生活の質 (QOL) のみならず生命予後の悪化につながり、また今後さらに増加するであろう HAND 症例に対して、最適な治療薬選択に貢献するものと期待される。

E. 結論

今年度の研究で LogPow (octanol-water partition coefficients) の測定と脳毛細血管内皮細胞 (サル由来)、血管周皮細胞および星状神

経膠細胞（ラット由来）を用いた *in vitro* BBB（脳血管関門）再構築システムを用いて、脳血管移行係数を測定し、各候補化合物の BBB 透過性を同定した。今後は、多剤を投与した際の各薬剤の濃度を MS masa を用いて測定する系を立ち上げ、より臨床に即したアッセイ系の構築を目指す。

F. 研究発表

1. Nishijima T, Gatanaga H, Shimbo T, Komatsu H, Ishisaka M, Tsukada K, Endo T, Horiba M, Koga M, Naito T, Itoda I, Tei M, Fujii T, Takada K, Yamamoto M, **Miyakawa T**, Tanabe Y, Mitsuya H, and **Oka S** on behalf of the SPARE study team. Switching tenofovir/emtricitabine plus lopinavir/r to raltegravir plus darunavir/r in patients with suppressed viral load does not result in recovery of renal function but could sustain viral suppression: A randomized multicenter trial. *PLoS One* 8 (8): e73639, 2013.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

業績一覧

研究代表者 満屋裕明

1. Gómez PMS, Amano M, Yashchuk S, Mizuno A, Das D, Ghosh AK and Mitsuya H, GRL-04810 AND GRL-05010; DIFLUORIDE-CONTAINING NONPEPTIDIC HIV-1 PROTEASE INHIBITORS (PIs) THAT INHIBIT THE REPLICATION OF MULTI-PI-RESISTANT HIV-1 *IN VITRO* AND POSSESS FAVORABLE LIPOPHILICITY THAT MAY ALLOW BLOOD-BRAIN BARRIER PENETRATION, *Antimicrob. Agents Chemother.* 57(12): 6110-6121, 2013
2. Hachiya A, Reeve AB, Marchand B, Michailidis E, Ong YT, Kirby KA, Leslie MD, Oka S, Kodama EN, Rohan LC, Mitsuya H, Parniak MA, and Sarafianos SG, Evaluation of Combinations of 4'-Ethylnyl-2-Fluoro-2'-Deoxyadenosine with Clinically Used Antiretroviral Drugs, *Antimicrob. Agents Chemother.* 57: 4554, 2013
3. Taura M, Kariya R, Kudo E, Goto H, Iwawaki T, Amano M, Suico MA, Kai H, Mitsuya H, and Okada S, Comparative analysis of ER stress response into HIV protease inhibitors: Lopinavir but not darunavir induces potent ER stress response via ROS/JNK pathway, *Free Radical Biology and Medicine*, 65; 778, 2013
4. Yarchoan R, and Mitsuya H, Development of the First AIDS Drugs: AZT and Other Dideoxynucleosides, Springer, "Human Immunodeficiency Virus Reverse Transcriptase", pp1, 2013
5. Amano M, Tojo Y, Gómez PMS, 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 Replication of a Wide Spectrum of Multi-PI-Resistant HIV-1 Variants *In Vitro*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 57; 2036, 2013
6. Feng L, Sharma A, Slaughter A, Jena N, Koh Y, Shkriabai N, Larue RC, Patel PA, Mitsuya H, Kessl JJ, Engelman A, Fuchs JR, and Kvaratskhelia M, The A128T Resistance Mutation Reveals Aberrant Protein Multimerization as the Primary Mechanism of Action of Allosteric HIV-1 Integrase Inhibitors, *J. Biol. Chem.* 288; 15813, 2013
7. Yedidi RS, Maeda K, Fyvie WS, Steffey M, Davis DA, Palmer I, Aoki M, Kaufman JD, Stahl SJ, Garimella H, Das D, Wingfield PT, Ghosh AK, and Mitsuya H, P2' Benzene Carboxylic Acid Moiety Is Associated with Decrease in Cellular Uptake: Evaluation of Novel Nonpeptidic HIV-1 Protease Inhibitors Containing P2 *bis*-Tetrahydrofuran Moiety, *Antimicrob. Agents Chemother.* 57; 4920, 2013
8. Matsuzawa T, Kawamura T, Ogawa Y, Blauvelt A, Mitsuya H, and Shimada S, Novel nucleoside reverse transcriptase inhibitor (4'-Ethylnyl-2-Fluoro-2'-Deoxyadenosine) completely blocks HIV Infection of Langerhans Cells, *Journal of Dermatological Science*, 69; e30, 2013
9. Ghosh A, Partham GL, Martyr CD, Nyalapatla PR, Osswald HL, Agniswamy J, Wang YF, Amano M, Weber IT, Mitsuya H, Highly Potent HIV-1 Protease Inhibitors with Novel Tricyclic P2 Ligands: Design, Synthesis, and Protein-Ligand X-ray Studies, *J. Med. Chem.* 56; 6792, 2013
10. Zhang W, Parniak MA, Mitsuya H, Sarafianos SG, Greabling PW, Rohan LC, Preformulation studies of EFdA, a novel nucleoside reverse transcriptase inhibitor for HIV prevention, *Drug Dev. Ind. Pharm.* (in print)
11. Nishijima T, Takano M, Ishisaka M, Komastu H, Gatanaga H, Kikuchi Y, Endo T, Horiba M, Kaneda S, Uchiumi H, Koibuchi T, Naito T, Yoshida M, Tachikawa N, Ueda M, Yokomaku Y, Fujii T, Higasa S, Takada K, Yamamoto M, Matsushita S, Tateyama M, Tanabe Y, Mitsuya H, and Oka S on behalf of the Epzicom- Truvada study team. Abacavir/Lamivudine versus Tenofovir/Emtricitabine with Atazanavir/Ritonavir for treatment naive HIV-infected Japanese Patients with HIV-1 Infection: A Randomized Multicenter Trial. *Intern Med* 52;735-744, 2013.
12. Nishijima T, Gatanaga H, Shimbo T, Komatsu H, Ishisaka M, Tsukada K, Endo T, Horiba M, Koga M, Naito T, Itoda I, Tei M, Fujii T, Takada K, Yamamoto M, Miyakawa T, Tanabe Y, Mitsuya H, and Oka S on behalf of the SPARE study team. Switching tenofovir/emtricitabine plus lopinavir/r to raltegravir plus darunavir/r in patients with suppressed viral load does not result in recovery of renal function but could sustain viral suppression: A randomized multicenter trial. *PLOS One* 8 (8); e73639, 2013.