

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590636

研究課題名(和文) Translocation defective 逆転写酵素阻害剤に対する耐性機序

研究課題名(英文) Mechanism of resistance to translocation defective reverse transcriptase inhibitors

研究代表者

芦野 有悟 (ASHINO, Yugo)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20361082

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：核酸系逆転写酵素阻害剤4'-ethynyl-2-fluoro-deoxyadenosine (EFdA)はtranslocation活性を阻害する。作用機序解明のためEFdA耐性HIVを誘導し、耐性責任変異M184I/V、2次変異A158T、T165M/Rを同定した。M184I/Vは複製能を低下させたが、2次変異の一部は複製能を回復させた。逆転写酵素アッセイの結果はウイルスアッセイのそれに一致した。複数作製した多剤耐性HIVに対してEFdAは非常に強い活性を有していた。本研究ではtranslocation阻害に必要な逆転写酵素アミノ酸の同定、分子レベルでの薬剤のデザインのための基盤を形成した。

研究成果の概要(英文)：A novel nucleoside reverse transcriptase (RT) inhibitor, 4'-ethynyl-2-fluoro-deoxyadenosine (EFdA) inhibits translocation activity of RT. To elucidate mechanism of the action in detail, resistant HIV-1 and -2 variants to EFdA were induced in vitro. M184I/V in the RT was identified as the primary mutation, while A158T and T165M/R were considered as the secondary mutations. M184I/V much reduced replication kinetics of HIV, but some of the secondary mutations improved the reduced replication. Data obtained from enzymatic assays with recombinant RT well supported those from viral assays. In this study, we provide crucial information of key amino acids for translocation activity and of drug design for novel inhibitors.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：ウイルス HIV 薬剤耐性 逆転写酵素 多剤耐性

1. 研究開始当初の背景

HIV 感染症に対する多剤併用療法により、コントロールが良好であれば感染後 30 年程度は効果を持続させることが可能ではないかとまで試算されている。しかしながら、backbone として使用される核酸系逆転写酵素阻害剤 (NRTI) はテノフォビル、ラミブジン(3TC)の誘導体の FTC の発売以降、新しい薬剤は出てきていない。そのためゆっくりではあっても HIV は耐性を獲得し、最終的には backbone として選択できる薬剤は限られてしまう。しかし key drug として使用できるプロテアーゼ阻害剤やインテグラーゼ阻害剤の開発は続いているが、backbone としての NRTI の機序は滞っている。理由のひとつとして新しい作用機序を持つ薬剤が少ないことがあげられる。

共同研究者の児玉らによって新規 NRTI の 4'-ethynyl-2-fluoro-deoxyadenosine (EFdA) がこれまでにない新しい作用機序によって効果を示すことが明らかにされた(J. Biol. Chem., 2009)。これまでのすべての NRTI は 3'-OH 基が改変または欠落しており、伸長している DNA の取り込まれると次に取り込まれる dNTP がリン酸ジエステル結合できない (chain terminator)。一方で EFdA は 3'-OH 基を有しており、EFdA は取り込まれたあと、強固に逆転写酵素活性中心の Ala-114, Tyr-115, Phe-160, Met-184, Asp-185 と結合し、伸長している RNA/DNA ハイブリッド鎖上の酵素移動 (translocation) を阻害する。これはこれまでのリン酸ジエステル結合阻害から起こる chain termination と全く異なる作用機序である。そのため EFdA はこれまで報告されて来ているすべての耐性ウイルスに対して野生株と同等の活性を保持している。児玉らは EFdA の母核となる 4'-ethynyl-deoxyadenosine (EdA) の耐性ウイルスを分離し、逆転写酵素領域に I142V, T165R, M184V という新しい変異を同定しているが、この耐性導入後であっても EFdA は AZT の野生型に対する効果と同等の効果依然有している (Intl J Biochem Cell Biol, 2009)。

2. 研究の目的

本邦で開発された核酸系逆転写酵素阻害剤 4'-ethynyl-2-fluoro-deoxyadenosine (EFdA) はこれまでにない逆転写酵素阻害機序、translocation 阻害を有する。この機序の詳細な解明のために EFdA に対する耐性 HIV を試験管内で誘導し、そのウイルス学的、酵素学的解析を行う。これらの結果から translocation 阻害に必要な逆転写酵素アミノ酸を同定し、分子レベルでの interaction を利用した薬剤のデザインを可能とする。分子標的を明確とすることで開発費用を削減させ、「よい薬をより安く」を感染症治療薬のみならず他の薬剤開発に発展させたい。

3. 研究の方法

(1) EFdA 耐性ウイルスの誘導

EFdA 耐性ウイルス誘導には HIV-1IIIIB 株を使用した dose escalating 法を用いる。細胞は MT-2 を宿主細胞として薬剤濃度は EC₅₀ 値から開始する。出現してきた変異を有する感染性ウイルスを順次作製する。感染性ウイルスは pNL101-RT を改変したベクターを用いる。このベクターは RT の前半部分のみだけでなく個別に後半部分を組替えることができ、この vector を鋳型として耐性 molecular clone を作製する。変異は、RT 領域に site directed mutagenesis で導入、その遺伝子断片を組み替えることで作製する。Molecular clone は 293T 細胞に pNL プラスミドを遺伝子導入することで感染性ウイルスを回収し、同様に MAGI 細胞で感染性を確認する。

耐性誘導は耐性変異の確定のため 2 回行う。また、HIV-2_{EHO} を使用した耐性誘導も行い、background の異なるウイルスからの耐性変異の出現に違いがあるかを検討する。

(2) 薬剤耐性度と複製速度の解析

上記で作製した感染性ウイルスを用いてまず 4-5 種類の細胞でその耐性度と複製能の変化を観察する。コントロールとして薬剤取り込み抑制を耐性機序とする Q151M, M184V 単一変異を有するウイルスおよび薬剤除去機能を有する finger subdomain insertion 変異体ウイルスでも同様な検討を行う。薬剤感受性は MTT 色素法および MAGI 細胞によって決定する (Kodama et al, Antimicrob Agents Chemother, 2001)。複製速度は培養上清中に含まれる p24 抗原量の測定 (市販キットを使用) と我々が確立した competitive HIV replication assay を用いる。

(3) 細胞内 dNTP、ATP 量測定

まず、細胞内 dNTP 量は研究代表者が以前に確立した細胞からメタノール抽出によって dNTP を溶出し、それを DNA polymerase を用いた測定法にて有効 dNTP 量を 4 種類に分けて測定する (Kodama et al, Biochem Pharmacol, 2000)。ATP 測定には市販されている ATP 測定キットを用いて行う。これらが耐性に及ぼす影響を検討する。

(4) 耐性変異を有する RT の作製

平成 23 年度内に作製した pNL4-3 を改変したカセットベクターを PCR の template として用いて RT 領域すべてを含むリコンビナントタンパクを大腸菌で発現するベクターを構築する。耐性変異を有するフラグメントをこのベクターに組換え、同様にリコンビナント酵素を作製・精製する。これらの精製酵素を用いて RT 反応を行い、その活性の変化を検討する。さらにこれら変異の性格を調べたのち、この変異の逆転写酵素に対する影響を逆転写酵素レベルで生化学的に検討を行う。ここでは変異を有する逆転写酵素を分離・精製

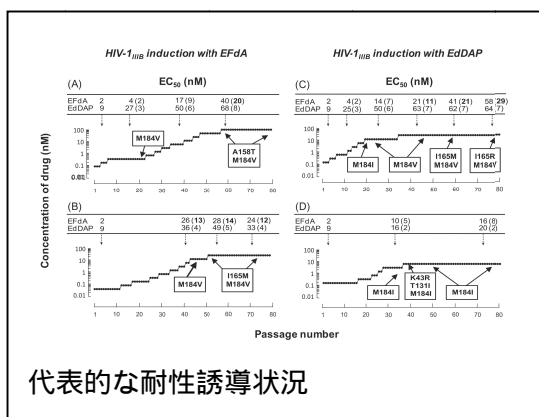
し、酵素学的に EFdA の活性型である EFdA3リン酸化体(EFdA-TP)との親和性や競合する dA-TP との比較を行う。また RNA/DNA ハイブリッドとの結合親和性を gel shift 法で検討する。同様に EFdA-TP が DNA 末端に取り込まれている RNA/DNA ハイブリッドと逆転写酵素を結合させ、さらに新たに dNTP が結合し、逆転写酵素の translocation がおこるかを検討する。

4. 研究成果

(1) 耐性誘導

EFdA 耐性誘導には HIV-1_{IIIIB} 株と MT-2 細胞を使用した dose escalating 法で行った。薬剤存在下で 80 passage まで行い、M184I/V 変異が出現してきた。また A158T、T165M/R 等の変異も見られたが大きな感受性変化はみられていない。出現してきた変異を有する感染性ウイルスクローンを作製、検討したところ、M184V が 1 次変異として同定された。HIV-2_{EHO} を使用した耐性誘導でも HIV-1 と同様に M184V が誘導されてきた。

EFdA の誘導体である 4'-ethynyl-2'- deoxyribose-2,6-diaminopurine (EdDAP)でも同様の検討を行い、M184I/V が 1 次変異として誘導された。しかし、EdDAP は M184V が導入されても耐性度が大きく増加せず、耐性が誘導しにくい状況であった。EdDAP は EFdA と比べ adenosine deaminase (ADA) の影響を受けやすいが、ADA による脱アミノ化反応が細胞内で起こったとしても活性が同等の 4'-ethynyl-2'-deoxyguanosine に変換され、依然活性を維持することを明らかとした。



(2) 耐性ウイルスの複製能

これらの変異を有するウイルス複製能を検討するために各々の変異を有する感染性ウイルスクローンの経時的 p24 産生を検討した。M184I/V では複製能が低下していたが、2 次変異の一部は複製能の回復にも寄与していた。ウイルスの複製能を詳細に調べ、耐性度と複製度の 2 次元での相関性を解析した。通常は耐性度と複製能は逆相関を示すことが多いが、EFdA の耐性変異の場合、耐性度をあまり獲得できないままに複製能を失う傾向にあり、耐性を獲得するにせよ、ウイル

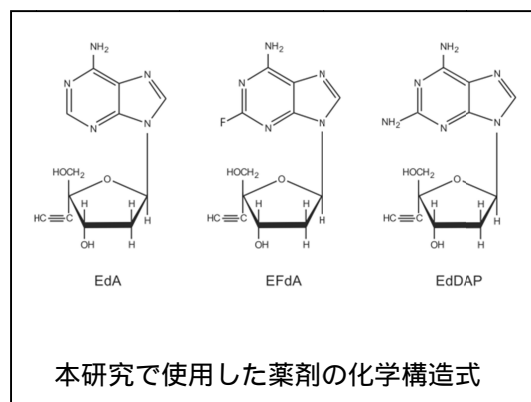
スにとってのコストがかなり大きくなることが予想された。

(3) 高度多剤耐性 HIV に対する EFdA の効果

Excision 機序によって耐性化する HIV や exclusion によって耐性化するウイルスの両方を複数作製し、EFdA に対する耐性度を検討したが、すべて EFdA 耐性ウイルスと同程度であり、この絶対値は野生型ウイルスに対する AZT の感受性とほぼ同等であった。つまり、耐性ウイルスに対しても非常に強い活性を有することになる。これらを併せもつウイルスに対しても同等の効果を EFdA は示した。

(4) 組換えタンパクを利用した酵素アッセイ

二次変異として同定された A158T や T165M/R のリコンビナント酵素を使用し、解析したところ、酵素学的にも活性の低下、速度の低下が認められるが、耐性度の対して大きな影響を示さない点は、ウイルスの場合と一致した。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 20 件)

① Potent anti-HIV-1 activity of N-HR-derived peptides including a deep pocket-forming region without antagonistic effects on T-20. Izumi K, Watanabe K, Oishi S, Fujii N, Matsuoka M, Sarafianos SG, Kodama EN. Antivir Chem Chemother. 査読有, 2011 Aug 23;22(1):51-55. doi: 10.3851/IMP1836

K70Q adds high-level tenofovir resistance to "Q151M complex" HIV reverse transcriptase through the enhanced discrimination mechanism. Hachiya A, Kodama EN, Schuckmann MM, Kirby KA, Michailidis E, Sakagami Y, Oka S, Singh K, Sarafianos SG. PLoS One. 査読有, 2011 Jan 13;6(1):e16242. doi:10.1371

Michailidis E, Singh K, Ryan EM, Hachiya A, Ong YT, Kirby KA, Marchand B, Kodama EN, Mitsuya H, Parniak MA, Sarafianos SG.

Effect of translocation defective reverse transcriptase inhibitors on the activity of N348I, a connection subdomain drug resistant HIV-1 reverse transcriptase mutant. *Cell Mol Biol*. (Noisy-le-grand), 査読有, 2012;58:187-95. doi.10.1155/2012/586401

Elevated anti-tuberculous glycolipid antibody titres in healthy adults and tuberculosis patients in Thailand. Siddiqi UR, Punpunich W, Chuchottaworn C, Jindakul S, Ashino Y, Saitoh H, Okada M, Chotpittayasunondh T, Hattori T. *Int J Tuberc Lung Dis*. 査読有, 2012 Apr;16(4):532-538. doi: 10.5588/ijtld.10.0764

Hachiya A, Marchand B, Kirby KA, Michailidis E, Tu X, Palczewski K, Ong YT, Li Z, Griffin DT, Schuckmann MM, Tanuma J, Oka S, Singh K, Kodama EN, Sarafianos SG. HIV-1 reverse transcriptase (RT) polymorphism 172K suppresses the effect of clinically relevant drug resistance mutations to both nucleoside and non-nucleoside RT inhibitors. *J Biol Chem*. 査読有, 2012;287(35):29988-99. doi: 10.1074/jbc.M112.351551.

Kirby KA, Singh K, Michailidis E, Marchand B, Kodama EN, Ashida N, Mitsuya H, Parniak MA, Sarafianos SG. The sugar ring conformation of 4'-ethynyl-2'-fluoro-2'-deoxyadenosine and its recognition by the polymerase active site of HIV reverse transcriptase. *Cell Mol Biol* (Noisy-le-grand). 査読有, 2011;57(1):40-6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3119259/>

Ndongwe TP, Adedeji AO, Michailidis E, Ong YT, Hachiya A, Marchand B, Ryan EM, Rai DK, Kirby KA, Whatley AS, Burke DH, Johnson M, Ding S, Zheng YM, Liu SL, Kodama E, Delviks-Frankenberry KA, Pathak VK, Mitsuya H, Parniak MA, Singh K, Sarafianos SG. Biochemical, inhibition and inhibitor resistance studies of xenotropic murine leukemia virus-related virus reverse transcriptase. *Nucleic Acids Res*. 査読有, 2012;40(1):345-59. doi: 10.1093/nar/gkr694. Epub 2011 Sep 8.

〔学会発表〕(計 10 件)

Fusako Miyamoto, Kumi Kawaji, Toshio Hattori, Hiroaki Mitsuya, Stefan G Sarafianos is, Eiichi N Kodama. Sustained Activity of 4'-Ethynyl Nucleosides to Variants with M184V Mutation in HIV-1 Reverse Transcriptase. 25th In-

ternational Conference on Antiviral Research. Sapporo, Japan, April 16 – 19, 2012

Eleftherios Michailidis, Jordan Wilkins, Emily M. Ryan, Atsuko Hachiya, Eiichi N. Kodama, Hiroaki Mitsuya, Michael A. Parniak, Stefan G. Sarafianos. Effect of 4'- and 2'-NRTI Substitutions on the Inhibition Mechanism of HIV Reverse Transcriptase and Toxicity. 25th International Conference on Antiviral Research. Sapporo, Japan, April 16 – 19, 2012

③Atsuko Hachiya, Bruno Marchand, Eleftherios Michailidis, Eiichi N Kodama, Michael A Parniak, Hiroaki Mitsuya, Shinichi Oka, Stefan G Sarafianos. The Combination of 4'-Ethynyl-2'-Fluoro-2'-Deoxyadenosine with Rilpivirine Shows Synergistic Anti-HIV-1 Activity In Vitro. 25th International Conference on Antiviral Research. Sapporo, Japan, April 16 – 19, 2012

芦野有悟、宇佐美修、齊藤弘樹、服部俊夫、賀来満夫、MINICICLIN 投与によるヒト免疫不全ウイルス (HIV) 持続感染への効果、第 26 回日本エイズ学会学術集会、神奈川、日本、2012 年 11 月 24 日 ~ 26 日。

6 . 研究組織

(1)研究代表者

芦野 有悟 (ASHINO, Yugo)
東北大学大学院医学系研究科・准教授
研究者番号 : 20361082

(2)研究分担者

児玉 栄一 (KODAMA, Eiichi)
東北大学大学院医学系研究科・講師
研究者番号 : 50271151