

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 7 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590591

研究課題名（和文） 本邦で見出された新規多剤耐性変異 N348I の HIV 逆転写酵素に及ぼす影響に関する研究

研究課題名（英文） Effect of a novel resistance associated mutation, N348I, which has been identified in Japanese HIV-1 infected patients, on the reverse transcriptase activity.

研究代表者

児玉 栄一 (KODAMA EIICHI)

東北大学・病院・助教

研究者番号：50271151

研究成果の概要（和文）：

HIV逆転写酵素 (RT) の多剤耐性変異N348Iは取り込まれた核酸系RT阻害剤を除去し、他の変異と組み合わせでさらなる高度耐性をもたらす。非核酸系RT阻害剤に対しては、酵素への結合能低下が耐性機序であった。さらに新たな耐性変異K70QやA376Sを同定した。新規RT阻害剤がこれらのウイルスを阻害できることを見出した。本研究は、臨床サンプル解析、新規変異の獲得状況、耐性メカニズム解析、有用な薬剤の同定から、難治性HIV感染症のさらなる治療効果の増強に役立つと思われる。

研究成果の概要（英文）：

N348I, a mutation in the HIV-1 reverse transcriptase (RT), confers multi-class resistance to nucleoside/non-nucleoside RT inhibitors through excision and attenuated binding of inhibitors for nucleoside and non-nucleoside RT inhibitors, respectively. In addition, K70Q and A376S also showed multi-drug resistance. A novel new RT inhibitor successfully inhibits resistant variants. The present study may provide useful information both for diagnosis and therapy, and, thus improve quality of life in patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：応用薬理学

科研費の分科・細目：薬理学一般

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-1 感染症は現在本邦において増加しており、その対策が急務である。既感染者に対する治療として多剤併用療法が

導入されているが、薬剤耐性 HIV の出現とともに治療成績を著しく損なうことが明らかとなっている。

現在臨床使用されている逆転写酵素

(RT)阻害剤には核酸を模し競合阻害を示す核酸系RT阻害剤と化学構造的に核酸と異なりアロステリック阻害を示す非核酸系RT阻害剤の2種類がある。核酸系RT阻害剤に対する耐性機序として取り込み効率の低下と取り込まれた薬剤の除去(excision)という2つの耐性機序が報告されている。一方、非核酸系RT阻害剤は共通の非核酸系RT阻害剤結合部位に結合するため基本的に交差耐性になりやすい。このように核酸系と非核酸系RT阻害剤は阻害機序が完全に異なり、これまで単一の変異で交叉耐性は起こらないと考えられてきた。

研究代表者は、日本人症例からこれらの作用機序の異なるRT阻害剤に対して交差耐性を示すRT変異N348Iを学会報告した。同学会でオーストラリア/カナダ/米国の共同グループも同様の報告をしているがいまだ解明されていない点が多く残されている。またこの変異はいままで行われてきた耐性変異試験では見いだされない、もしくは見出されにくい位置に存在しており、今後耐性変異試験のあり方も問われる変異である。

2. 研究の目的

本研究では新規多剤耐性変異N348Iの意義を解明する。このN348Iが他の耐性変異とどのような相互作用をするのか、そしてN348Iを有するHIV-1が細胞株によって複製能が異なる機序について、これまで報告されている酵素活性中心近傍の耐性変異と比較・検討し、RTの酵素学に留まらず治療薬の選択に重要な情報を提供する。

3. 研究の方法

N348Iを含む種々の組換えウイルスを作製し、その薬剤耐性度および複製能を細胞株ごとに解析する。耐性度はp24抗原産生量またはMTT色素法を用いる。ウイルス複製能はp24抗原産生量と複製競合法で検討する。細胞株の細胞内dNTPとATPを酵素法で測定する。RTのリコンビナントタンパクを作製し、*in vitro*でのdNTP、ATPの酵素活性に及ぼす影響を確認する。

4. 研究成果

N348I近傍のアミノ酸変異を症例数を増やして解析することによってN348Iは稀な変異ではないだけでなく、A376Sなど他の変異も同様に耐性を付与することを見出した。N348Iの耐性機序は一度取り込まれた核酸系

RT阻害剤のexcisionであり、T215Yに代表されるthymidine associated mutationsと組み合わせることによってさらなる高度耐性がもたらされる。一方、米国ミズーリ大学との共同研究によって非核酸系RT阻害剤に対してはそれらの酵素への結合能低下が耐性機序であることを見出している。これらの実験はリコンビナントRTを用いたアッセイで明らかとした。

上記の解析に併せて新たな耐性変異K70Qも同定することができた。この耐性変異はQ151Mという高度多剤耐性変異に加わることで、Q151Mに効果を示すtenofovirに対しても耐性を示してしまう。この変異が出現した場合、核酸系としてはlamivudineまたは非核酸系RT阻害剤を用いることが望ましいと考えられる。

一方で、研究代表者がこれまで開発してきた新規RT阻害剤は、これらのウイルスに対しても非常に強い感受性を有することから、今後の治療法の改善に役立たせることができると思われる。

この一連の研究では、臨床サンプルにおける新たな耐性変異の獲得状況を調べるとともにその耐性メカニズムを解析、さらに目的の変異以外にも新たな耐性変異を同定し、有用な薬剤候補を見出した。これらの知見は今後の耐性変異同定解析範囲を明確にし、臨床効果のモニターに役立つ。これらの耐性ウイルスに効果を示す薬剤候補の同定も今後ますます増えると思われる耐性HIVの抑制に大きな意味を持つものである。今後は本研究期間内に作製した耐性ウイルスクローンやリコンビナントタンパクを用いて、新規薬剤のスクリーニングや作用機序の解明に役立たせたい。

この研究を介して国際共同研究を行う素地が出来、今後、多方面に応用する。事実23年度に新たなRT阻害剤の他のウイルスに対する効果を論文発表することができた。この成果は難治性疾患であるHIV感染症のさらなる治療効果の増強に役立つと思われる。

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. Tanyaradzwa P. Ndongwe, Adeyemi O. Adedeji, Eleftherios Michailidis, Yee Tsuey Ong, Atsuko Hachiya, Bruno Marchand, Emily M. Ryan, Devendra K. Rai, Karen A. Kirby, Angela S. Whatley, Donald H. Burke, Marc Johnson, Shilei Ding, Yi-Min Zheng, Shan-Lu Liu, Ei-Ichi Kodama, Krista A. Delviks-Frankenberry, Vinay

- K. Pathak, Hiroaki Mitsuya, Michael A. Parniak, Kamalendra Singh, Stefan G. Sarafianos. Biochemical, inhibition, and inhibitor resistance studies of xenotropic murine leukemia virus-related virus reverse transcriptase. *Nucleic Acids Research* 40:345-359, 2012 (査読有)
- 2 Kazuki Izumi, Kentaro Watanabe, Shinya Oishi, Nobutaka Fujii, Masao Matsuoka, Stefan G. Sarafianos and Eiichi N. Kodama Potent anti-HIV-1 activity of N-HR-derived peptides including a deep pocket-forming region without antagonistic effect on T-20. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 22:51-55, 2011 (査読有)
- 3 Shenwei Li, Toshio Hattori, Eiichi N. Kodama. Epigallocatechin gallate inhibits HIV reverse transcription step. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 21:239-243, 2011 (査読有)
- 4 Karen A. Kirby, Kamalendra Singh, Eleftherios Michailidis, Bruno Marchand, Eiichi N. Kodama, Noriyuki Ashida, Hiroaki Mitsuya, Michael A. Parniak, Stefan G. Sarafianos. The sugar ring conformation of 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine and its recognition by the polymerase active site of HIV reverse transcriptase. *Cellular and Molecular Biology* 57: 39-44, 2011 (査読有)
- 5 Atsuko Hachiya, Eiichi N. Kodama, Matthew M. Schuckmann, Karen A. Kirby, Eleftherios Michailidis, Yasuko Sakagami, Shinichi Oka, Kamalendra Singh, Stefan G. Sarafianos. K70Q adds high-level tenofovir resistance to "Q151M complex" HIV reverse transcriptase through the enhanced discrimination mechanism. *PLoS One* 6:e16242, 2011 (査読有)
- 6 Kazuya Shimura, Daisuke Nameki, Keiko Kajiwara, Kentaro Watanabe, Yasuko Sakagami, Shinya Oishi, Nobutaka Fujii, Masao Matsuoka, Stefan G. Sarafianos, Eiichi N. Kodama. Resistance profiles of novel electrostatically constrained HIV-1 fusion inhibitors. *Journal of Biological Chemistry* 285: 39471-39480, 2010 (査読有)
- 7 Matthew Michael Schuckmann, Bruno Marchand, Atsuko Hachiya, Eiichi N. Kodama, Karen A. Kirby, Kamalendra Singh, Stefan G. Sarafianos. The N348I mutation at the connection subdomain of HIV-1 reverse transcriptase decreases binding to nevirapine. *Journal of Biological Chemistry* 285:38700-38709, 2010 (査読有)
- 8 Shinya Oishi, Kentaro Watanabe, Saori Ito, Michinori Tanaka, Hiroki Nishikawa, Hiroaki Ohno, Kazuki Shimane, Kazuki Izumi, Yasuko Sakagami, Eiichi N. Kodama, Masao Matsuoka, Akira Asai and Nobutaka Fujii. Affinity selection and sequence-activity relationships of HIV-1 membrane fusion inhibitors directed at the drug-resistant variants. *Medicinal Chemistry Communications* 1: 276-281, 2010 (査読有)
- 9 Kazuki Shimane, Eiichi N. Kodama, Ikuhiko Nakase, Shiroh Futaki, Yasuteru Sakurai, Yasuko Sakagami, Xiaoguang Li, Toshio Hattori, Stefan G. Sarafianos, Masao Matsuoka. Rev-derived peptides inhibit HIV-1 replication by antagonism of Rev and a co-receptor, CXCR4. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 42:1482-1488, 2010 (査読有)
- 10 Kazuki Izumi, Shota Nakamura, Hiroaki Nakano, Kazuya Shimura, Yasuko Sakagami, Shinya Oishi, Susumu Uchiyama, Tadayasu Ohkubo, Yuji Kobayashi, Nobutaka Fujii, Masao Matsuoka, Eiichi N. Kodama. Characterization of HIV-1 resistance to a fusion inhibitor, N36, derived from the gp41 amino terminal heptad repeat. *Antiviral Research* 87:179-186, 2010 (査読有)
- 11 Shenwei Li, Eiichi N. Kodama, Yuuki Inoue, Hideki Tani, Yoshiharu Matsuura, Jing Zhang, Takashi Tanaka, Toshio Hattori. Procyanidin B-1 purified from Cinnamomi Cortex suppresses HCV replication. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 20:239-248, 2010 (査読有)
- 12 Kenji Watanabe, Shigeru Negi, Yukio Sugiura, Akiko Kiriya, Akino Honbo, Katsumi Iga, Eiichi N. Kodama, Takeshi Naitoh, Masao Matsuoka, and Koji Kano. Binding of Multivalent Anionic Porphyrins to V3 Loop Fragments of HIV-1 gp120 and Their Antiviral Activity. *Chemistry-An Asian Journal* 5:825-834, 2010 (査読有)
- 13 Tetsuo Narumi, Ryoko Hayashi, Kenji Tomita, Kazuya Kobayashi, Noriko Tanahara, Hiroaki Ohno, Takeshi Naito, Eiichi Kodama, Masao Matsuoka, Shinya Oishi, and Nobutaka Fujii. Synthesis and Biological Evaluation of Selective CXCR4 Antagonists Containing Alkene Dipeptide Isosteres. *Organic & Biomolecular Chemistry* 8:616-621, 2010 (査読有)
- 14 Eleftherios Michailidis, Bruno Marchand, Eiichi N. Kodama, Kamalendra Singh, Masao Matsuoka, Karen A. Kirby, Emily M. Ryan, Ali M. Sawani, Eva Nagy, Noriyuki Ashida, Hiroaki Mitsuya, Michael A. Parniak, and Stefan G. Sarafianos. Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine triphosphate, a translocation defective reverse transcriptase inhibitor. *Journal of Biological Chemistry* 284:35681-35691, 2009 (査読有)
- 15 Kazumi Kajiwara, Kentaro Watanabe, Rei Tokiwa, Tomoko Kurose, Hiroaki Ohno, Hiroko

Tsutsumi, Yoji Hata, Kazuki Izumi, Eiichi Kodama, Masao Matsuoka, Shinya Oishi, and Nobutaka Fujii. Bioorganic Synthesis of a Recombinant HIV-1 Fusion Inhibitor, SC35EK, with an N-Terminal Pyroglutamate Capping Group. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17:7964-7970, 2009 (査読有)

16 Michinori Tanaka, Kazumi Kajiwara, Rei Tokiwa, Kentaro Watanabe, Hiroaki Ohno, Hiroko Tsutsumi, Yoji Hata, Kazuki Izumi, Eiichi Kodama, Masao Matsuoka, Shinya Oishi, Nobutaka Fujii. Bioorganic Synthesis of End-capped Anti-HIV Peptides by Simultaneous Cyanocysteine-mediated Cleavages of Recombinant Proteins. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17:7487-7492, 2009 (査読有)

17 Tsuyoshi Watabe, Yukihiko Terakawa, Kentaro Watanabe, Hiroaki Ohno, Hiroaki Nakano, Toru Nakatsu, Hiroaki Kato, Kazuki Izumi, Eiichi Kodama, Masao Matsuoka, Kazuo Kitaura, Shinya Oishi, Nobutaka Fujii. X-ray Crystallographic Study of an HIV-1 Fusion Inhibitor with the gp41 S138A Substitution. *Journal of Molecular Biology* 392:657-665, 2009 (査読有)

18 Shinya Oishi, Yasuyo Koderu, Hiroki Nishikawa, Kamitani H, Tsuyoshi Watabe, Hiroaki Ohno, Tadafumi Tochikura, Kazuki Shimane, Eiichi Kodama, Masao Matsuoka, Fuminori Mizukoshi, Hajime Tsujimoto H, Nobutaka Fujii. Design and synthesis of membrane fusion inhibitors against the feline immunodeficiency virus. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17:4916-4920, 2009 (査読有)

19 Shinya Oishi, Hirotaka Kamitani, Yasuyo Koderu, Kentaro Watanabe, Kazuya Kobayashi, Tetsuo Narumi, Kenji Tomita, Hiroaki Ohno, Takeshi Naito, Eiichi Kodama, Masao Matsuoka and Nobutaka Fujii. Peptide bond mimicry by (E)-alkene and (Z)-fluoroalkene peptide isosteres: synthesis and bioevaluation of alpha-helical anti-HIV peptide analogues. *Organic & Biomolecular Chemistry* 7:2872-2877, 2009 (査読有)

20 Atsuko Hachiya, Kazuki Shimane, Stefan G. Sarafianos, Eiichi N. Kodama, Yasuko Sakagami, Fujie Negishi, Hirokazu Koizumi, Hiroyuki Gatanaga, Masao Matsuoka, Masafumi Takiguchi, Shinichi Oka. Clinical relevance of substitutions in the connection subdomain and RNase H domains of HIV-1 reverse transcriptase from a cohort of antiretroviral treatment-naïve patients. *Antiviral Research* 82:115-121, 2009 (査読有)

[学会発表] (計 9 件)

1. Eleftherios Michailidis, Stephen H. Hughes, Emily M. Ryan, Atsuko Hachiya, Devendra Rai, Jordan Wilkins, Kamendra Singh, Bruno Marchand, Mark Hannink, B. Christie Vu, Victor Marquez, Ei-Ichi Kodama, Hiroaki Mitsuya, Michael A. Parniak, and Stefan G. Sarafianos. Effect of 4'- and 2-NRTI Substitutions on the Inhibition Mechanism of HIV Reverse Transcriptase. 12th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance, Hershey, Pennsylvania, USA Nov 6-9, 2011
2. Atsuko Hachiya, Bruno Marchand, Karen A. Kirby, Eleftherios Michailidis, Xiongying Tu, Yee Tsuey Ong, Daniel T. Griffin, Matthew M. Schuckmann, Junko Tanuma, Shinichi Oka, Kamalendra Singh, Eiichi N. Kodama and Stefan G. Sarafianos. HIV-1 Reverse Transcriptase (RT) Polymorphism 172K Suppresses the Effect of Clinically Relevant Drug Resistance Mutations to Both Nucleoside and Nonnucleoside RT Inhibitors. 12th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance, Hershey, Pennsylvania, USA Nov 6-9, 2011
3. Atsuko Hachiya, Matthew M. Schuckmann, D Griffin, Karen A. Kirby, YT Ong Junko Tanuma, Shinichi Oka, Kamendra Singh, Eiichi N. Kodama, Stefan G. Sarafianos. HIV-1 Reverse Transcriptase Polymorphism 172K Suppresses the Effect of Clinical Resistance Mutations to both NRTI and NNRTI. 18th conference on retroviruses and opportunistic infections Boston, MA, USA Feb 27-Mar 2, 2011
4. Eiichi N. Kodama. Development of HIV-1 fusion inhibitors active to enfuvirtide resistant variants. US-Japan Joint AIDS Panel: Resistance Meeting, Singapore, Dec 8-10, 2010 (Invited)
5. Atsuko Hachiya, Eiichi N. Kodama, Matthew M. Schuckmann, Karen A. Kirby, Eleftherios Michailidis, Yasuko Sakagami, Kamendra Singh, Shinichi Oka, and Stefan G. Sarafianos. K70Q expands multi-drug resistance (MDR) of HIV-1 containing "Q151M complex" reverse transcriptase mutations. 10th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance, Richmond, VA, USA Nov 15-18, 2009.
6. Yee Tsuey Ong, Eleftherios Michailidis, Bruno Marchand, Matthew S. Schuckmann, Kamendra Singh, Ei-Ichi Kodama, Masao Matsuoka, Hiroaki Mitsuya, Eva Nagy, Michael A. Parniak, and Stefan G. Sarafianos. The NNRTI-resistant Y181C HIV-1 reverse transcriptase is hyper-susceptible to 4'-ethynyl-2-fluoro deoxyadenosine (EFDA).

10th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance, Richmond, VA, USA Nov15-18, 2009

7. .Matthew Schuckmann, Atsuko Hachiya, Ei-ichi N. Kodama, Bruno Marchand, Eleftherios Michailidis, Kamendra Singh, Yasuko Sakagami, Shinichi Oka, and Stefan G Sarafianos. Biochemical characterization of the HIV reverse transcriptase connection domain multi-class drug resistance mutation N348I. 10th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance, Richmond, VA, USA Nov15-18, 2009.
8. .Hiroaki Mitsuya, Stefan G. Sarafianos, Eiichi Kodama, Hirotomo Nakata, Seiji Okada, and Michael A. Parniak 4'-Ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine (EFDA), a translocation defective reverse transcriptase inhibitor with highly potent activity against diverse multi-drug-resistant HIV-1 variants. 10th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance, Richmond, VA, USA Nov15-18, 2009.
9. .Kodama E. Drug design for resistant HIV. 10th Kumamoto AIDS seminar/AIDS GCOE International Symposium Satellite symposium, Kumamoto, Japan, Sep 30, 2009 (Invited)

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.rid.med.tohoku.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

児玉 栄一 (KODAMA EIICHI)

東北大学・病院・助教

研究者番号：50271151

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者