

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670255

研究課題名(和文)耐性機序を標的とした抗HIV剤の基礎的研究

研究課題名(英文)Development of antiviral agents targeting ATP-mediated excision

研究代表者

児玉 栄一 (Kodama, Eiichi)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：50271151

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はexcisionによって耐性化した抗ウイルス剤の感受性を回復させる化合物を見出し、逆転写酵素における生化学・薬理学・構造生物学の3分野へ波及・拡大を目指す一方で、出口を臨床応用に定めるものである。本研究期間でアッセイ系の構築、5000超のスクリーニングから、ヒットを見出し、現在リード化合物の生成・取得を試みている。一方でこれらの知見からケミカルバイオロジーツールとしてレトロトランスポゾン活性の阻害効果についても検討し、細胞分化の調整に用いることができることを明らかとし、他分野への応用を実証した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to expand our findings of ATP-mediated nucleotide excision inhibition, to biochemical, pharmacological, and structural aspects of DNA polymerases, via HIV reverse transcriptase as a model enzyme. We have established a novel assay system and screened over 5000 chemical compounds developed in the Tohoku University. Employing the identified several hits, structure-activity relation analysis is now in progress. In addition, we demonstrated that inhibitors for HIV reverse transcriptase appear to be experimentally suitable candidate to control differentiation process of mouse oocyte. Here we demonstrate that antiviral agents are useful for wide-range chemical biology tools as well as medical purpose.

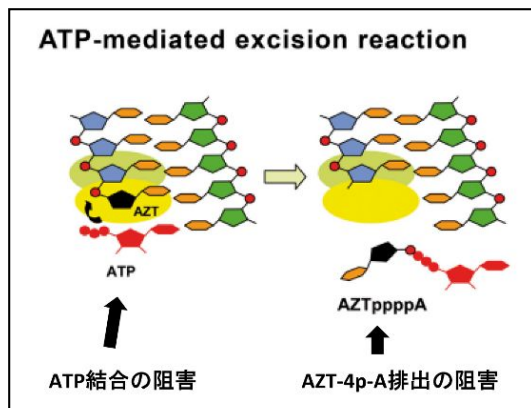
研究分野：ウイルス学

キーワード：HIV 薬物相互作用 耐性 核酸誘導体

1. 研究開始当初の背景

HIV 感染症に対してこれまでに 30 種類弱の治療薬が臨床応用され、これらの併用によって多くの感染者において HIV 複製を検出限界以下に抑えることが可能となってきている。しかし、その一方で依然として薬剤耐性ウイルスの出現はその治療効果を制限・減弱させてしまう。また、新規患者における薬剤耐性 HIV の伝播も大きな問題となりつつある。日本でも数%の新規感染者から分離される HIV において、治療前にも関わらず薬剤耐性、耐性関連変異が見出されている。その中でも治療において back-bone として使われる核酸系逆転写酵素阻害剤(NRTI)に対する耐性 HIV は早急な対応が求められている。

NRTI に対する耐性機序は大きく excision と excision の 2 つに分類され、前者は生理的核酸と NRTI の構造的差異を区別・取り込みを抑制する。一方で後者は一度 DNA 鎖に取り込まれた NRTI を主に細胞内 ATP を利用し除去する機序で耐性を付与する(下図に概略を示す)。実際の臨床分離株を調べていくと耐性 HIV の多くは後者を利用し、広範な交差耐性を示すことが複数の研究者から報告されている。しかし、これまで細胞レベルであっても excision 阻害剤は見出されていない。



2. 研究の目的

本研究は excision によって耐性化した薬剤の感受性を回復させることを介して、逆転写酵素における生化学・薬理学・構造生物学の 3 分野へ波及・拡大を目指す一方で、出口を臨床応用に定める。新規薬剤 excision 阻害剤を tool として excision 機構の詳細な解明の手助けになるだけでなく、この解析結果を創薬に応用する。さらに抗ガン剤などの標的でもある polymerase や DNA 修復酵素の機能解析にも応用することも目指す。

3. 研究の方法

ウイルスと細胞： ウイルスは標準株である HIV-1_{LAI} 株、分子クローンである HIV-1_{NL4-3} 株を用いた。Excision による耐性を有する変異体は HIV-1_{NL4-3} 株をベースに excision の程度に合わせて分子クローンを site directed mutagenesis 法で作製した。これらの分子クロー

ンウイルスは 293T 細胞に遺伝子導入して作製し、使用するまで-80 で保存した。抗ウイルス効果は MAGI 細胞を用いた。

アッセイ系の確立： HIV 感染をレポーター遺伝子で検知する細胞-ウイルス感染系 (MAGI 法) を用いて、excision で最も耐性化する核酸系 RT 阻害剤、azidothymidine (AZT) の感受性回復を指標にした。同時に AZT 非存在下で耐性クローンウイルスに対する活性を確認し、テスト薬剤が非特異的に RT を阻害しないことを確認した。

ATP アッセイ： 細胞内 ATP 測定キットはプロメガ社から購入し、その操作方法来準じて行った。

スクリーニング化合物： 東北大学化合物ライブラリーとこれまで収集した研究室化合物ライブラリーを用いた。

4. 研究成果

(1) 基礎アッセイ系の確立のためのウイルス調整： Excision で薬剤耐性を獲得する HIV 株を 4 種類作製した。293T 細胞に遺伝子導入し、ウイルスを回収し、その複製能を検討したところ、アッセイに問題のないレベルを維持していることを MAGI 細胞と MT-2 細胞を用いて確認した。

(2) スクリーニングにおける細胞株の確立： さらなる簡略化 high through-put 酵素アッセイ法を構築するために、当初計画ではレポータープラ スミドとして β -galactosidase (Gal) と secretory alkaline phosphatase (SEAP) を internal ribosomal entry site (IRES) でつなぎ、HIV-LTR を detector promoter として構築する予定であった。しかしプロメガ社より新しいレポーターとして nano-luciferase が発売され、そのレポーター効果を検討したところ、SEAP よりも感度良く測れること、サイズが小さいため取り扱いが簡便であるため、LTR-Gal-IRES-Nano-luciferase によるベクターを構築した。

(3) 確立したアッセイ系での検討： 作製した excision で薬剤耐性を獲得する HIV 変異株を用いてアッセイ系の最適化を行った。AZT の最適な濃度はウイルス複製を 20% 程度阻害する 1 μ M がシグナル/ノイズ比で最適であった。

(4) スクリーニング： これまでに購入した ATP 類似化合物およびに東北大学化合物ライブラリーの検討を行った。これまでに約 5000 化合物をスクリーニングした。現在も新規化合物に関してはスクリーニングを継続している。これまでに弱いながら目的的效果を有する化合物を複数見出してきた。しかし細胞毒性域と交差する濃度であったため、これらの化合物の類縁化合物を購入し、2 次スクリーニングを行い、現在も効果の向上を継続させている。酵素構造学的には、活性中心を含めて ATP 結合部位の検討を行い、ATP と競合する化合物取得への足掛かりを得ている。また、同様にレトロトランスポゾンに逆転写酵

素活性があることから、既存の NRTI を利用してこの活性阻害を検討したところ、マウス胚細胞において細胞分化能が変化することを見出して Proc Natl Acad Sci USA 誌に報告した。既存および新規薬剤の効果から、これまで知られている主な逆転写酵素に関する酵素学的な特徴を詳細に捉えることができ、耐性を克服することが期待される今後の新規化合物合成展開の方針決定に役立つ情報を得たと同時に胚細胞分化という異分野の研究にも貢献することができた。

(5) 細胞内 ATP 量の測定: Excision は ATP 存在下で起こるため、種々の細胞において細胞内 ATP 濃度とその細胞における excision との関連を検討した。相関性はあまり高くないものの、ATP が多い細胞ほど excision の効率が高い傾向があった。おそらくは細胞内 ATP の局在の問題もあり、平均的な ATP 濃度だけでは検討が困難ではないかと考えられた。今後も検討細胞種を増やし、その相関を明らかにすることを計画している。

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 14 件)

1. Hisayoshi T, Shinomura M, Yokokawa K, Kuze I, Konishi A, Kawaji K, Kodama EN, Hata K, Takahashi S, Nirasawa S, Sakuda S, Yasukawa K. Inhibition of the DNA polymerase and RNase H activities of HIV-1 reverse transcriptase and HIV-1 replication by *Brasenia schreberi* (Junsai) and *Petasites japonicus* (Fuki) components. *Journal of Natural Medicines*. 査読有,69:432-40, 2015. doi: 10.1007/s11418-015-0885-9. Epub 2015 Feb 8.
2. Teigo Asai, Kento Tsukada, Satomi Ise, Naoki Shirata, Makoto Hashimoto, Isao Fujii, Katsuya Gomi, Kosuke Nakagawara, Eiichi N. Kodama, Yoshiteru Oshima. Use of a biosynthetic intermediate to explore the chemical diversity of pseudo-natural fungal polyketides. *Nature Chemistry*, 査読有,7: 737-43, 2015. doi: 10.1038/nchem.2308. Epub 2015 Aug 3.
3. Fusako Miyamoto, Kumi Kawaji, Shinya Oishi, Nobutaka Fujii, Mitsuo Kaku, Eiichi N. Kodama. Anti-HIV-1 activity determined by beta-galactosidase activity in the multinuclear activation of an indicator assay is comparable with that by a conventional focus counting method. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 査読有,24:77-82, 2015. doi: 10.1177/2040206615614164. Epub 2015 Nov 2.
4. Yuki Hatanaka, Kimiko Inoue, Mami Oikawa, Satoshi Kamimura, Narumi Ogonuki, Eiichi N. Kodama, Yasuyuki Ohkawa, Yu-ichi Tsukada, Atsuo Ogura. Histone chaperone CAF-1 mediates repressive histone modifications to protect preimplantation mouse embryos from endogenous retrotransposons. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 査読有,112:14641-6, 2015. doi: 10.1073/pnas.1512775112. Epub 2015 Nov 6.
5. Kyoji Hagiwara, Hideki Ishii, Tomoyuki Murakami, Shin-nosuke Takeshima, Nopporn Chutiwitoonchai, Eiichi N. Kodama, Kumi Kawaji, Yasumitsu Kondoh, Kaori Honda, Hiroyuki Osada, Yasuko Tsunetsugu-Yokota, Masaaki Suzuki, Yoko Aida. Synthesis of a Vpr-binding derivative for use as a novel HIV-1 inhibitor. *PLoS One*, 査読有,10:e0145573, doi: 10.1371/journal.pone.0145573. eCollection 2015.
6. Kenji Maeda, Darshan V Desai, Manabu Aoki, Hiroto Nakata, Eiichi N Kodama, Hiroaki Mitsuya. Delayed emergence of HIV-1 variants resistant to 4'-ethynyl-2'-fluoro-2'-deoxyadenosine: comparative sequential passage study with lamivudine, tenofovir, emtricitabine and BMS-986001. *Antiviral Therapy*, 査読有,19:179-89, 2014. doi: 10.3851/IMP2697. Epub 2013 Oct 25.
7. Michailidis E, Huber AD, Ryan EM, Ong YT, Leslie MD, Matzek KB, Singh K, Marchand B, Hagedorn AN, Kirby KA, Rohan LC, Kodama EN, Mitsuya H, Parniak MA, Sarafianos SG. 4'-Ethynyl-2'-fluoro-2'-deoxyadenosine (EFdA) inhibits HIV-1 reverse transcriptase with multiple mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, 査読有,289:24533-48, 2014. doi: 10.1074/jbc.M114.562694. Epub 2014 Jun 26.
8. Shigeyoshi Fujiwara, Hiroshi Kimura, Ken-ichi Imadome, Ayako Arai, Eiichi Kodama, Tomohiro Morio, Norio Shimizu, Hiroshi Wakiguchi. Current Research on Chronic Active Epstein-Barr virus Infection in Japan. *Pediatrics International*, 査読有,56: 159-166, 2014, doi: 10.1111/ped.12314
9. Kazuki Izumi, Kumi Kawaji, Fusako Miyamoto, Kazuki Shimane, Kazuya Shimura, Yasuko Sakagami, Toshio Hattori, Kentaro Watanabe, Shinya Oishi, Nobutaka Fujii, Masao Matsuoka, Mitsuo Kaku, Stefan G. Sarafianos, and Eiichi N. Kodama. Mechanism of Resistance to S138A Substituted Enfuvirtide and its Application to Peptide Design. *Intl J Biochem Cell Biol*, 査読有,45:908-915, 2013. doi: 10.1016/j.biocel.2013.01.015. Epub 2013 Jan 26.
10. Kazuki Shimane, Kumi Kawaji, Fusako

- Miyamoto, Shinya Oishi, Kentaro Watanabe, Yasuko Sakagami, Nobutaka Fujii, Kazuya Shimura, Masao Matsuoka, Mitsuo Kaku, Stefan Sarafianos, and Eiichi Kodama. HIV-1 resistance mechanism to an electrostatically constrained peptide fusion inhibitor that is active against T-20-resistant strains. *Antimicrob Agents Chemother*, 査読有, 57:4035-4038, 2013, doi: 10.1128/AAC.00237-13. Epub 2013 May 20.
11. Eleftherios Michailidis, Emily M Ryan, Atsuko Hachiya, Karen A Kirby, Bruno Marchand, Maxwell D Leslie, Andrew D Huber, Yee T Ong, Jacob C Jackson, Kamalendra Singh, Eiichi N Kodama, Hiroaki Mitsuya, Michael A Parniak and Stefan G Sarafianos. Hypersusceptibility Mechanism of Tenofovir-Resistant HIV to EFdA. *Retrovirology*, 査読有, 10:65, 2013, doi: 10.1186/1742-4690-10-65.
 12. Atsuko Hachiya, Aaron Reeve, Bruno Marchand, Eleftherios Michailidis, Yee Ong, Karen Kirby, Maxwell Leslie, Shinichi Oka, Eiichi Kodama, Lisa Rohan, Hiroaki Mitsuya, Michael Parniak, and Stefan Sarafianos. Evaluation of combinations of 4'-ethynyl-2'-fluoro-2'-deoxyadenosine with clinically used antiretroviral drugs. *Antimicrob Agents Chemother*, 査読有, 57:4554-4558, 2013, PMID:23796932.
 13. Kirby KA, Michailidis E, Fetterly TL, Steinbach MA, Singh K, Marchand B, Leslie MD, Hagedorn AN, Kodama EN, Marquez VE, Hughes SH, Mitsuya H, Parniak MA, Sarafianos SG. Effects of substitutions at the 4' and 2' positions on the bioactivity of 4'-ethynyl-2'-fluoro-2'-deoxyadenosine. *Antimicrob Agents Chemother*, 査読有, 7:6254-64, 2013. doi: 10.1128/AAC.01703-13. Epub 2013 Oct 7.
 14. Fusako Miyamoto and Eiichi N Kodama. Development of small molecule HIV-1 fusioninhibitors: linking Biology to Chemistry. *Current Pharmaceutical Design* 19:1827-34, 2013, PMID:23092276
- [学会発表](計 7件)
1. Lowela Siarot, Hirotaka Sato, Kyoji Hagiwara, Nopporn Chutiwitoonchai, Eiichi N. Kodama, Kazumichi Kuroda, Masami takei, Tatsuo Yamamoto, Toshihiro Anono, Yoko Aida. Small molecule inhibition of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) viral replication by targeting Gag-Tsg101 interaction. **第29回日本エイズ学会学術集会** 平成27年11月29日-12月1日, 東京, 東京ドームホテル.
 2. 畑中勇輝, 井上貴美子, 及川真実, 上村悟, 越後貴成美, 児玉栄一, 大川恭行, 東田裕一, 小倉淳郎, マウス着床前胚におけるレトロトランスポゾン抑制制御機構の解明. **第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学大会 合同大会**, 平成27年12月1-4日, 神戸, 神戸ポートアイランド.
 3. Fusako Miyamoto, Fumiko Tomiyama, Kumi Kawaji, Mitsuo Kaku, Eiichi Kodama. Profile of a novel HIV reverse transcriptase inhibitor. NIH Tohoku University JSPS Symposium, Sendai, Japan, May 9-11, 2013, 民陵会館.
 4. Zhe Li, Karen Kirby, Bruno Marchand, Michailidis Eleftherios, Eiichi Kodama, Hiroaki Mitsuya, Michael Parniak, Stefan Sarafianos. Structural Basis of Inhibition and Resistance Mechanism to EFdA, a Highly Potent NRTI. The annual Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Seattle, USA, Feb. 23-26, 2015.
 5. 富山史子, 宮本総子, 河治久実, 鎌田伸好, 天野将之, 青木学, 満屋裕明, 賀来満夫, 児玉栄一. 抗B型肝炎ウイルス(HBV)創薬に寄与するアッセイ系の確立 第23回抗ウイルス療法研究会総会 東京リーガロイヤルホテル東京 2013.06.13-14
 6. 児玉栄一. MAGI細胞による薬剤 screening において酵素法がヒット化合物検出に優れる. 第27回日本エイズ学会学術集会. 熊本, 市民会館 崇城大学ホール, 2013. 11. 20-22.
 7. 久好哲郎, 篠原まゆ, 横川貫太, 久世郁実, 小西篤, 児玉栄一, 河治久実, 畠恵司, 高橋砂織, 保川清. ジュンサイとフキの成分による HIV-1 逆転写酵素の活性阻害と HIV-1 の複製阻害 2014 年度日本農芸化学会関西支部大会 (第 486 回講演会) 日本農芸化学会創立 90 周年・関西支部創立 80 周年記念大会, 東大寺総合文化センター他, 奈良 2014.9.19-20
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
 児玉 栄一 (KODAMA, Eiichi)
 東北大学・医学系研究科・講師
 研究者番号: 50271151