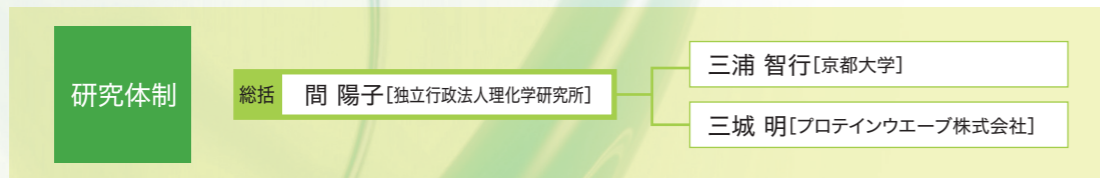


# HIV-1複製を阻害する低分子化合物の開発とそれをプローブに用いた分子イメージング技術によるウイルスの動態解析

研究期間 平成18年度～平成22年度(予定)



※平成21年度における研究体制

## 新規エイズ治療薬の開発へ大きく前進

Project KeyWord  
キーワード

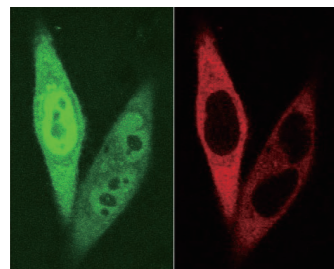
HIV-1 Vprの 新規核移行機序	エイズの原因ウイルスであるヒト免疫不全ウイルス1型(HIV-1)を特徴付けているアクセサリ-蛋白質の一つであるVprが核輸送担体Importin $\alpha$ を介して核移行する新規核移行機序を有することを発見しました。
核移行を阻害する 新規抗HIV-1薬創製	VprとImp $\alpha$ の結合を阻害し、さらに核移行過程を阻害する新しい作用点を有する抗HIV-1薬の開発を進めています。医薬に適した医薬品候補化合物は霊長類モデルにより治療効果を検証します。
分子イメージング技術 の開発	Vpr認識低分子化合物を放射性炭素( $^{11}\text{C}$ )で標識したPositron Emission Tomography(PET)プローブおよび蛍光色素で標識した蛍光プローブを用いたイメージング技術によるウイルスの細胞内および体内動態解析と診断技術開発

## 1 研究の背景・意義

### Vprの新規核移行機序とエイズ治療薬の創製

HAART療法の確立によりエイズ発症を遅らせることが可能となりましたが、耐性ウイルスの出現を抑えられないことがエイズの根治を不可能にしています。エイズを根絶するためには新たな作用点を標的とした薬剤を開発することによって耐性ウイルス出現を克服することが必須です。そこで、HIV-1の特徴であるアクセサリ-蛋白質群の一つVprに焦点を当て、核輸送担体Importin $\alpha$ (Imp $\alpha$ )と結合して核内に移行するVprの新規核移行機序を発見しました。さらに、Imp $\alpha$ との結合能が消失したVpr変異体は核移行能を失い、それを組み込んだウイルスはマクロファージにおけるウイルス複製が阻害されました。以上の結果は、VprとImp $\alpha$ との結合を標的とした新しい抗HIV-1薬の開発への可能性を強く示唆しています。

HAART療法のもう一つの問題は潜伏感染細胞を排除できない点です。そのためには、これまで成功していないHIV-1感染細胞の体内動態およびHIV-1の感染過程を可視的・動的に解析することにより、HIV-1感染細胞の集積部位、潜伏・再活性化部位を明らかにすることが必要です。ウイルス粒子に取り込まれるVprを認識する低分子化合物を蛍光色素・短寿命放射性炭素でマーキングした検出プローブによって、HIV-1の動態をin vitro及びin vivoレベルで検出できるイメージング技術の開発が望まれます。



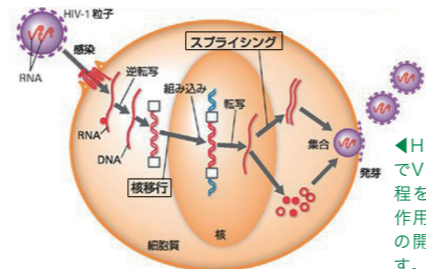
◀蛍光蛋白質を融合させたHIV-1 Vpr(緑)を細胞質に注入すると速やかに核へと移動した。赤色色素はインジェクションマーカー。

## 2 研究プロジェクトの目標

### エイズ治療薬の開発と分子イメージング診断

新しい作用点を有する抗HIV-1薬の開発を目指し、Vprと核輸送担体Imp $\alpha$ との結合がマクロファージにおけるHIV-1複製に必須であるという申請者が独自に発見した現象を根幹にし、VprとImp $\alpha$ の結合を標的としたウイルス阻害薬を創製します。得られたヒット化合物を出発点として、より一層効果の高い阻害剤を設計するために、Vpr-化合物複合体のNMRを用いた立体構造解析およびImp $\alpha$ -Vpr複合体のX線結晶構造解析、ならびに光親和性標識誘導体によるVprと化合物の結合部位の同定を行い、その情報をもとに構造最適化を行います。最終的に、医薬品候補化合物の治療効果をHIV-1 Vpr遺伝子を有するサル・ヒト免疫不全組換えウイルス(SHIV)モデルにより検証します。

潜伏感染細胞の排除を目指したHIV-1の細胞内・体内動態、感染標的の部位、集積部位、潜伏・再活性化部位の検出プローブを開発します。Vprを認識する低分子化合物を $^{11}\text{C}$ で標識したPositron Emission Tomography(PET)プローブを用いたイメージング法により、これまで不可能であったHIV-1感染細胞の体内動態解析を世界に先駆けて行います。さらに、ウイルス粒子に取り込まれるVprに強く結合する低分子化合物に蛍光色素を導入した蛍光プローブを合成し、蛍光バイオイメージングによりHIV-1感染過程を可視的かつ動的に解析することを目指します。



◀HIV-1の生活環の中でVprの新規核移行過程を標的とした新しい作用点を有する阻害薬の開発を目指しています。

## 3 研究プロジェクトの成果

### 医薬品候補化合物の創製

マクロファージにおけるHIV-1複製に必要なVprとImp $\alpha$ の結合を阻害するヒット化合物を同定しました。この化合物はImp $\alpha$ ではなく、HIV-1の株間で高度に保存されたVprの変異の無い領域に結合し、ウイルス複製を核移行過程で阻止する新しい作用機構を有することから、耐性ウイルスの出現を軽減できる可能性が考えられました。分子内に5つの水酸基を有する天然化合物であったため、数段階の化学反応を用いて水酸基の除去または修飾反応を行い誘導体を合成した

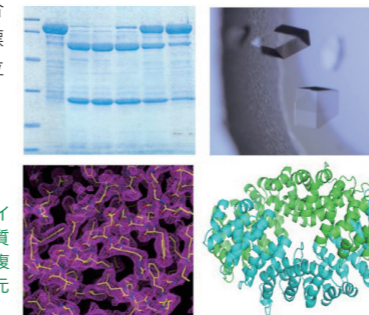


ところ、細胞毒性が低く、ナノmolレベルでウイルス増殖を阻害するリード最適化合物を得る事に成功しました。

◀天然から得られた物質を化学反応によって修飾している様子

### 構造最適化のためのドラッグデザイン研究

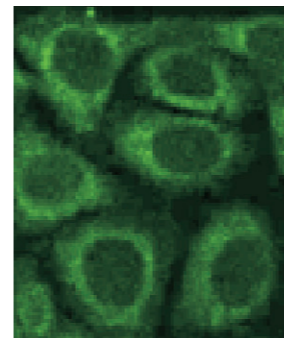
医薬品候補化合物の創出を目指して、構造最適化により、より一層阻害効果の高い阻害剤の設計を進めています。阻害剤の化学構造を最適化するために、標的となるVprとImp $\alpha$ の大量発現と精製を行っています。次にこれらを用いて、阻害剤-蛋白質、蛋白質-蛋白質複合体の共結晶化とX線結晶構造解析ならびに溶液状態でのNMR解析を行い、複合体の詳細な三次元立体構造情報を求めます。また独自に化学合成された光標識化合物を用いて、阻害剤の標的蛋白質への結合部位の同定を試みています。



▶阻害物質のドラッグデザインに必要な標的蛋白質の大量発現と精製、蛋白質複合体等の共結晶化と三次元立体構造解析

### 分子イメージング技術開発

Vpr認識化合物に蛍光色素を導入した蛍光プローブを合成し、細胞内に取り込まれたVprを簡便に検出できる蛍光イメージングキットの作成を試みています。Vprと化合物との結合を阻害しないと思われる位置に蛍光色素としてフォルオレセインを導入した誘導体を合成し、Vpr発現細胞に添加すると発現部位でのフォルオレセインの蛍光の検出に成功しました。次に、関連化合物を放射性炭素 $^{11}\text{C}$ で標識したPETプローブを健康なラットとサルに投与したところ、投与した化合物は肝臓への吸着が見られたものの、肝臓から腸管、腎臓へと排泄され、良好な体内動態を示しました。



◀蛍光色素を導入したVpr認識化合物(緑)の細胞内における動態観察

## 4 実用化にあたっての今後の課題及び研究方針

### サルエイズモデルの開発と効果の解析

HIV-1はヒトとチンパンジーにしか感染しません。そこで、モデル動物として有用なアカゲザルで感染実験を行うため、SIVのゲノムのうち外皮蛋白(env)遺伝子を中心とした約4割程度をHIV-1由来のゲノムに組換えしたSHIVを作成し、エイズの感染実験動物モデル系を開発しました。しかし、本プロジェクトによってこのSHIVはHIV-1のVprを発現しないことが判明したため、最近報告された新世代SHIV(gag遺伝子の一部とvif遺伝子のみがSIV由来であり、ゲノムの9割以上がHIV-1由来)が、HIV-1のVprを発現することを確認し、モデルとして使用することにしました。一方、HIV-1のenv遺伝子により決定されるセカンドレセプター指向性(CCR5型やCXCR4型)の違いによって感染個体における標的細胞や病態が大きく異なることが最近明らかになり、ヒトのエイズ病態に重要なのはCCR5型であると考えられるようになりました。新世代SHIVは、まだサルへの順化が不十分であり、envがCXCR4型であることから、CCR5型HIV-1株のenv遺伝子を新世代SHIVのバックボーンに組み込んだものを新規に構築し、アカゲザルに順化させることにより、有効な新世代SHIVサル感染モデル系を確立し、医薬品候補化合物の感染個体における薬効評価を行います。



▲感染サルの腸管内視鏡検査。CCR5指向性SHIVは腸管のメモリーCD4陽性T細胞を主な標的としている。

### 分子イメージングへの展開

医薬品候補化合物が開発されれば前臨床から臨床段階へと移行しますが、ほとんどの化合物はこの過程で脱落してしまいます。それは動物実験のデータがそのまま人に適用できないことに起因します。これを解消するために事前に人の薬物の体内での動きを観察し、その結果を基に副作用がなく、疾患に選択的に効力を発揮する薬の開発を行うことが必要です。それを可能にするのがPETによる分子イメージング技術です。医薬品候補化合物を厚さ10cmの鉛で囲まれたホットセルの中でコンピュータ制御の自動合成装置を用いて短寿命放射性化合物で標識化し、これを生体内に薬効発現の100分の1以下の極微量投与し、体内の動きを観察するものです。すでにモデル化合物での標識化に成功しており、医薬品候補化合物が確定次第、研究を開始する予定です。



▲ホットセル(銀色の入れ物)と自動合成装置(扉の中の装置)。合成開始時には扉を開けて反応を行う。

### 参考文献

Suzuki T, Yamamoto N, Nonaka M, Takeshima S, Hashimoto Y, Matsuda G, Matsuyama M, Igarashi T, Miura T, Tanaka R, Kato S, and Aida Y. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) nuclear import via Vpr-Importin  $\alpha$  interactions as a novel HIV-1 therapy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 380:838-843, 2009.

Nitahara-Kasahara Y, Kamata M, Yamamoto T, Zhang X, Miyamoto Y, Muneta K, Iijima S, Yoneda Y, Tsunetsugu-Yokota Y, and Aida Y. Novel nuclear import of Vpr promoted by importin $\alpha$  is crucial for human immunodeficiency virus type 1 replication in macrophages, *J. Virol.*, 81:5284-5293, 2007.

Aida Y and Matsuda G. Role of Vpr in HIV-1 nuclear import; therapeutic implications, *Current HIV-1 Research*, 7: 136-143, 2009