

論 文 要 旨

Anti-human immunodeficiency virus type 1 activity and resistance profile of 2',3'-didehydro-3'-deoxy-4'-ethynylthymidine in vitro

〔 2',3'-didehydro-3'-deoxy-4'-ethynylthymidine の in vitro における
抗ヒト免疫不全ウイルス 1 型に対する活性と薬剤耐性のプロフィール 〕

二反田 隆夫

【序論および目的】

既存の核酸系逆転写酵素阻害薬 (NRTI) の欠点である薬剤耐性ウイルスの誘導と毒性の問題を克服し、より有効かつ安全な抗 HIV-1 化学療法を確立するために、これまでに新しく合成された種々の新規核酸誘導体の抗 HIV-1 効果について検討してきた。その結果、既存の抗 HIV-1 薬である stavudine (d4T) よりも強い活性を有する新規化合物として、2',3'-didehydro-3'-deoxy-4'-ethynylthymidine (4'-Ed4T) を見いだした。そこで本研究においては、既存の NRTI に耐性を示す各種の薬剤耐性株に対する 4'-Ed4T の抗ウイルス効果を検討するとともに、4'-Ed4T の存在下に HIV-1 感染細胞の長期継代培養を行い、本薬剤に耐性を示す HIV-1 を分離することを目的とした

【材料および方法】

薬剤の抗 HIV-1 効果は、感染 MT-4 細胞における細胞変性効果出現の有無を調べることにより判定した。末梢培養単核球 (PBMC) における薬剤の抗 HIV-1 効果は、感染後 7 日目に培養上清中の p24 抗原量を ELISA 法にて定量することにより判定した。いずれの場合にも、薬剤の細胞毒性は、非感染細胞を用いて抗 HIV-1 アッセイと並行して行い、生細胞数を MTT 法にて測定することにより定量した。各種耐性株に対する薬剤の抗 HIV-1 効果は、MAGI-CCR5 細胞にウイルスを感染させ、種々の濃度の薬剤存在下において細胞を培養し、2 日目に青染した感染細胞数を、顕微鏡下で数えることにより定量した。4'-Ed4T に対する耐性ウイルスの誘導は、MT-4 細胞に HIV-1 を感染させ、薬剤の存在下にて培養した。感染細胞は 4 日ごとに同じ薬剤を含む新鮮な培養液にて継代を行った。細胞が HIV-1 による細胞変性効果により死滅した場合は、その時の培養上清を採取し、それを新たな細胞に感染させるとともに、薬剤の濃度を上昇させた条件にて培養を続けた。十分な薬剤濃度においても、ウイルスの増殖が認められるときは、それらの薬剤感受性と逆転写酵素のアミノ酸変異について検討した。

【結 果】

MT-4 細胞における本薬剤の 50% 有効濃度 (EC_{50}) は $0.070 \mu\text{M}$ であり、これは d4T の $0.31 \mu\text{M}$ よりも勝っていた。また 50% 細胞毒性値 (CC_{50}) は $100 \mu\text{M}$ 以上であった。その結果、選択係数 (SI) は 1400 を超えることから、4'-Ed4T は in vitro において非常に強力かつ選択的な抗 HIV-1 効果を有することが明らかとなった。また、4'-Ed4T は PBMC においても強力で選択的な抗 HIV-1 効果を発揮するとともに、多剤耐性臨床分離株を含む、既存の NRTI 耐性株に対して、強い抗 HIV-1 効果を保持していた。一方、誘導された 4'-Ed4T に対する耐性ウイルスの逆転写酵素には、lamivudine (3TC) に耐性を賦与する M184V のアミノ酸変異に加えて、P119S および T165A という 2 つのアミノ酸変異が認められた。

【結論及び考察】

新規核酸誘導体 4'-Ed4T を同定することに成功し、その抗 HIV-1 効果について詳しく解析したところ、4'-Ed4T は強い抗ウイルス効果だけでなく、既存の NRTI とは異なるきわめてユニークな薬剤耐性のパターンを示すことが明らかとなった。4'-Ed4T は宿主細胞に対する毒性も低いことから、今後、臨床応用が期待出来る。

論文審査の要旨

報告番号	医研第 681 号	氏名	二反田 隆夫
審査委員	主査	榮鶴 義人	
	副査	丸山 征郎	山田 勝士

Anti-human immunodeficiency virus type 1 activity and resistance profile of 2', 3'-didehydro-3'-deoxy-4'-ethynylthymidine in vitro

〔 2', 3'-didehydro-3'-deoxy-4'-ethynylthymidine の in vitro における ヒト免疫不全ウイルス 1 型に対する活性と薬剤耐性プロフィール 〕

薬剤耐性ウイルスの誘導や毒性を克服し、有効かつ安全な HIV-1 化学療法を確立するため、新たに合成された種々の新規核酸誘導体について抗 HIV-1 効果を検討した。その結果、既存の核酸系逆転写酵素阻害剤 (NRTI) の stavudine (d4T) より強い活性を示す新規化合物 2',3'-didehydro-3'-deoxy-4'-ethynylthymidine (4'-Ed4T) を見出した。本研究では、既存の NRTI に耐性を示す各種薬剤耐性株に対する 4'-Ed4T の効果を検討し、さらに 4'-Ed4T 存在下に HIV-1 感染細胞を長期継代培養し、耐性株の分離と変異の検索を行った。

【実験方法】

薬剤の抗ウイルス効果は、MT-4 細胞を用いた場合には MTT アッセイで、末梢リンパ球 (PBMC) を用いた場合には培養上清中の p24 の定量で、MAGI-CCR5 細胞の場合には青染した感染細胞数を顕微鏡下に数えることにより測定した。4'-Ed4T 耐性株は、MT-4 に III_B 株を感染させ 4 日毎に同じ濃度の薬剤を含む培養液で培養し、細胞が死滅した時は、その培養液を新たな細胞に感染させ薬剤の濃度を上げた条件で培養した。ウイルスの増殖が認められる時には、薬剤感受性と逆転写酵素のアミノ酸変異を調べた。

【結果】

- ① MT-4 細胞を用いた場合の HIV-1 に対する 4'-Ed4T の 50% 有効濃度 (EC₅₀) は、0.07 μM であり、50%細胞毒性 (CC₅₀) は 100 μM 以上であり、選択係数 (SI) は 1,400 倍以上であった。4'-Ed4T の EC₅₀ は、既存の NRTI の d4T の EC₅₀ 0.31 μM よりかなり低かった
- ② PBMC を用いた実験でも、X4 HIV-1 株および R5 HIV-1 株に対して 4'-Ed4T の EC₅₀ はそれぞれ 0.0019 μM および 0.0076 μM であり、d4T の EC₅₀ の約 1/10 であった。
- ③ 既存の NRTI 耐性 HIV-1 株、多剤耐性の Q151M complex 株、そして NNRTI であるネビラピン耐性株に対しても強い抗 HIV-1 作用を示した。
- ④ 4'-Ed4T 存在下に分離した 4'-Ed4T 耐性株は、ラミブジン (3TC) 耐性を賦与する逆転写酵素の M184V のアミノ酸変異に加えて、P119S および T165A の 2 つの変異を認めた。

【結論と考察】

新規 NRTI の 4'-Ed4T は、in vitro において既存の NRTI より優れた抗 HIV-1 活性を示し、既存の NRTI 耐性 HIV-1 株にもウイルス抑制作用を示した。毒性も低く今後の臨床応用が期待できる。

ほとんど合成展開され尽くしたと考えられる NRTI から新たに 4'-Ed4T を見出し、既存の NRTI 耐性株にも効果を示す事から、今後 HAART 療法の有力な薬剤となる可能性を示唆した論文であり、学位論文として十分な価値を有するものと認定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	医研第 681 号	氏名	二反田 隆夫
審査委員	主査	榮鶴 義人	
	副査	丸山 征郎	山田 勝士

主査および副査の3名は、平成21年6月17日、学位請求者の二反田隆夫君に対して、論文の内容について質疑応答を行うと共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のよう
な質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) M184V 変異は良く見られるようだが、P119S 変異および T165A 変異の出現はどうであるか？

(回答) P119S 変異および T165A 変異ともに、単独の変異は認められない。P119S 変異については、臨床分離株での発現は全く認められず、*in vitro* において F-ddA に対して発現が認められているのみである。T165A 変異については、薬剤耐性臨床分離株において T215Y 変異、または M184V 変異を伴って認められるケースがある。

質問2) HIV-1 K103N 変異株において、4'-Ed4T の抗ウイルス活性が上がっているが、他に例があるか？

(回答) HIV-1 K65R 変異株において、AZT に対して高感受性になることが知られている。

質問3) 多剤耐性 HIV-1 臨床分離株は、どこで分離されたものか？また、世界的にはこのような多剤耐性 HIV-1 臨床分離株が見られるか？

(回答) 多剤耐性 HIV-1 臨床分離株の出所は、国立国際医療センターにおいて分離された株である。また、世界的にも多剤耐性 HIV-1 臨床分離株は、多数認められている。

質問4) 黒人において、HIV-1 感染に対して抵抗性を示す事象が有るか？

(回答) CCR-5 の遺伝子の部分的欠損 ($\Delta 32/\Delta 32$ または $+/\Delta 32$) をもつヒトにおいて、HIV-1 感染に対して抵抗性を示すことが知られている。しかし、CCR-5 遺伝子の部分的欠損は白人においてのみ確認されており、黒人、黄色人種には認められていない。一方、黒人の HIV-1 感染ハイリスクグループ (sex workers) において、子宮頸部粘液中に HIV-1 抵抗性の分泌物が認められている。

質問5) 4'-Ed4T の合成は何処で行われたか？エチニル基を持つ 4'-Ed4T について、薬剤としての安定性はどうか？

(回答) 昭和大学薬学部薬品製造化学教室で合成された。4'-Ed4T は、薬剤として安定であり、第 I 相臨床試験 (Phase Ia) において胃酸の影響・食事の影響を受けないことが明らかになっている。

質問6) 薬剤の投薬方法は、単剤、または多剤で行うのか？

(回答) 健常者を対象とした第 I 相臨床試験 (Phase Ia) は、4'-Ed4T 単剤投与で行われた。臨床試験において患者を対象とした場合、単剤で投与期間は最長2週間である。これは、臨床試験における倫理性を背景にしており、2週間以上の単剤投与は、薬剤耐性ウイルスが誘導される可能性が有る為である。

質問7) d4T には乳酸アシドーシス副作用があり、臨床上問題となっている。4'-Ed4T では、どうか？

(回答) d4T の毒性による乳酸アシドーシスの発生機序は、ミトコンドリア DNA ポリメラーゼ γ への阻害により発生する。4'-Ed4T の毒性については、細胞毒性およびミトコンドリア DNA 合成阻害が見られない。

質問8) HIV-1 は、CD4⁺細胞にも樹状細胞にも組み込まれるが、CD4⁺細胞への 4'-Ed4T の取り込みについてはどうか？また、本剤は、樹状細胞にも取り込まれるか？

(回答) ヌクレオシド・トランスポーターにより、ヌクレオシド誘導体は細胞に取り込まれる。4'-Ed4T は、CD4⁺細胞のみならず樹状細胞にも取り込まれる。

質問 9) 抗 HCV 薬剤の開発状況についてはどうか？

(回答) リポースタイプのシトシン・ヌクレオシド誘導体が、HCV に有効である。

質問 10) 薬剤の抗 HIV-1 活性の定量を行う場合に、ウイルス株により異なる測定方法を行う理由は？

(回答) 異なる細胞を用いて薬剤の抗 HIV-1 活性測定を行った理由は、HIV-1 のウイルス自体の持つフィットネスに関係している。具体的には、遺伝子変異が起こると、場合によってはウイルスの複製能が低下するケースが有り、単一の方法のみでは、多剤耐性 HIV-1 変異株を含めたウイルス株に関する薬剤の抗ウイルス活性を調べることが出来ない。そのため検出方法を変えて実験を行う必要が有るからである。

質問 11) p24 抗原測定において PBMCs 細胞を 7 日間培養の途中 (3~4 日) で継代培養を行う必要性は何か？

(回答) 7 日間培養することにより p24 抗原の必要量を確保する目的と、培養を 7 日間継続するために培養の途中で継代を行う必要性からである。

質問 12) 細胞の種類により、HIV-1 活性が異なるが、この違いの要因は？

(回答) HIV-1 野生株を含めた各種の薬剤耐性変異株に対して用いた測定方法 (細胞の種類) によって異なる抗 HIV-1 活性を示すことは、基本的にはそれぞれの細胞によって代謝活性が異なっているためと考えられる。さらに検出対象物が、それぞれの測定方法により異なることに由来していると思われる。

質問 13) 今後のエイズ治療の方向性は？

(回答) 侵入阻害剤やインテグラーゼ阻害剤を積極的に用いて、出来る限り HIV-1 の複製を押しさえ込む。そうすることにより薬剤耐性株の出現を遅延させるという考え方と、これらの新規認可薬剤はサルベージ療法に用いるべきであるという考え方がある。

質問 14) 新規 HIV-1 感染者についての HIV-1 遺伝子検査の現状はどうなっているか？

(回答) 新規の HIV-1 感染者および AIDS 患者においては、薬剤耐性に関する遺伝子検査を行う必要がある。特定の機関で HIV-1 遺伝子検査が行われている。

以上の結果から、3 名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者としての学力と識見を十分に具備しているものと判断し、博士 (医学) の学位を与えるに足る資格を有するものと判定した。