

CCR5 阻害作用を介して R5-HIV-1 感染を抑制する低分子
spirodiketopiperazine 誘導体 (E913) の研究

(Novel low molecular weight spirodiketopiperazine
derivatives potently inhibit R5 HIV-1 infection
through their antagonistic effects on CCR5)

前田 賢次
Kenji Maeda

指導教官： 免疫病態学教授 満屋 裕明

審査委員： 感染防御学講座教授 原田 信志
神経生化学講座教授 中西 宏之
病態制御分野講座教授 松下 修三

2003 年 3 月

Table of Contents/ 目次

- 1) 要旨
- 2) 発表論文リスト
- 3) 謝辞
- 4) 略語一覧

- 5) 研究の背景と目的
 - 1 現在の抗 HIV 療法の問題点
 - 2 抗 HIV 剤開発の歴史
 - 3 新規抗 HIV 剤開発の方向性
 - 4 HIV 接着・侵入阻害剤
 - 5 低分子 CCR5 阻害剤の研究・開発

- 6) 実験方法
 - 1 試薬 (新規化合物の合成)
 - 2 ウイルスと細胞
 - 3 ケモカイン結合阻害実験
 - 4 細胞内カルシウム移行阻害実験
 - 1 抗 CCR5 モノクローナル抗体と化合物の競合阻害実験

- 7) 実験結果
 - 1 CCR5 阻害剤 : SDP 誘導体の同定
 - 2 SDP 誘導体の強力な抗 HIV 活性
 - 3 E913 と CXCR4 阻害剤の併用効果
 - 4 E913 の CCR5 への結合部位解析

- 8) 表および図
- 9) 考察・結語
- 10) 参考文献

1) 要旨

[目的] 現在、後天性免疫不全症候群 (acquired immunodeficiency syndrome: AIDS) に対する化学療法は、逆転写酵素阻害剤(reverse transcriptase inhibitors: RTIs)とプロテアーゼ阻害剤(protease inhibitors: PIs)を組み合わせた多剤併用療法 (highly active antiretroviral therapy: HAART) が主流となり臨床的に大きな効果をもたらしているが、その一方で薬剤耐性 HIV の出現が大きな問題となっている。本研究で我々は耐性 HIV にも強力な活性を發揮する新規薬剤の開発を目的とし、既存の抗 HIV 剤とは全く異なる作用機序を持つケモカイン受容体阻害剤 (CCR5 阻害剤) の研究を行った。

[方法] CCR5 とその生理的リガンドである cc-chemokine との結合を阻害する化合物のスクリーニングをケモカインの binding assay および Ca^{2+} flux inhibition assay で行った。さらに見いだされた化合物について、抗 HIV 活性の有無を MAGI/CCR5 細胞を用いた MAGI assay およびヒト末梢血リンパ球 (PBM) を用いた p24 assay で検討した。

[結果] 我々は CCR5 結合能を有する一連の化合物 : spirodiketopiperazine (SDP) 誘導体を同定、その 1 つである E913 (分子量 : 484) は実験室および臨床分離 R5 HIV-1 (CCR5 をレセプターとして用いる HIV-1 株) に対して強力な感染抑制効果を持ち、その作用は既存の抗 HIV 剤 (RTIs, PIs) に高度耐性を示す HIV-1 株に対しても同様に強力であった (IC_{50} 値: 0.03~0.06 μ M)。CCR5 と共に HIV-1 の主なコレセプターである CXCR4 をコレセプターとする X4 HIV-1 に対しては全く抑制効果を示さなかったが、同時に CCR5 阻害剤によると思われる X4 HIV-1 の増強作用もなかった。HIV-1 は生体内ではきわめて多種類の HIV-1 が存在しており (quasispecies)、その中には X4 · R5 やその他の指向性の HIV-1 が混在しているとされ、それらの割合は患者及びその病期により大きく異なる。従って多くの AIDS 患者に対しては CXCR4 阻害剤または CCR5 阻害剤単独では十分な増殖の抑制は得られないと考えられる。そこで E913 と CXCR4 阻害剤である AMD-3100 とを併用した時の抗 HIV 活性を検討したところ、CCR5 · CXCR4 両方を用いる dual tropic HIV-1 や X4 · R5 HIV-1 が混在した状態の HIV-1 の増殖も強力に抑制した。さらに、E913 は CCR5 の細胞外ドメインである第 2 細胞外ループ (extracellular loop) の C 端側 (ECL2B) に結合部位を持つことが抗 CCR5 モノクローナル抗体との結合競合阻害実験で明らかとなった。

[考察・結論] 本研究で示した一連の SDP 誘導体はいずれもプロトタイプであるが、より抗 HIV 活性に優れ、毒性が低く、経口吸収・薬物動態に勝る新規化合物を見いだすための足がかりとなるものと評価できる。さらに CCR5 阻害剤の作用機序解明、ケモカイン阻害作用が少ない抗 HIV 活性に特化した CCR5 阻害剤研究のための基礎的データとしても重要と考えられる。

2) 発表論文リスト

(1) 関連論文

1. Maeda, K., Yoshimura, K., Shibayama, S., Habashita, H., Tada, H., Sagawa, K., Miyakawa, T., Aoki, M., Fukushima, D., and Mitsuya, H. Novel low molecular weight spirodiketopiperazine derivatives potently inhibit R5 HIV-1 infection through their antagonistic effects on CCR5. *J. Biol. Chem* 276: 35194-35200. 2001

(2) その他の論文

- 2 Miyakawa, T., Obaru, K., Maeda, K., Harada, S., and Mitsuya, H. Identification of amino acid residues critical for LD78 β , a variant of human macrophage inflammatory protein-1 α , binding to CCR5 and inhibition of R5 human immunodeficiency virus type 1 replication. *J. Biol. Chem* 277: 4649-465555. 2002
- 3 Yoshimura, K., Kato, R., Kavlick, M.F., Nguyen, A., Maroun, V., Maeda, K., Hussain, K.A., Ghosh, A.K., Gulnik, S. V., Erickson, J. W., and Mitsuya, H. : A potent human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor, UIC-94003 (TMC-126), and selection of a novel (A28S) mutation in the protease active site. *J. Virology*. 76: 1349-1358. 2002
- 4 前田賢次, 吉村和久, 満屋裕明. 新規抗 HIV 薬の開発状況と今後の展望. カレントセラピー. 19 (2): 41-46. 2001
- 5 前田賢次, 満屋裕明. 検査計画法 IX 感染症編 AIDS. 総合臨床 増刊号. 51: 678-684. 2002
- 6 吉村和久, 前田賢次. 新しいプロテアーゼ阻害剤. 日本臨床. 60 (4): 780-783. 2002

3) 謝辞

本研究の機会を賜り、ご指導頂きました熊本大学医学部免疫病態学内科学第二講座教授満屋裕明先生に深く感謝いたします。

実験手技・実験計画などについてご指導頂きました熊本大学医学部エイズ学研究センター一助手吉村和久先生、熊本大学医学部感染防御学講座助教授前田洋助先生および熊本大学医学部感染免疫診療部助手宮川寿一先生に深謝致します。

実験手技指導・実験補助を頂いた熊本大学医学部免疫病態学内科学第二講座原田恵嘉先生、こう康博先生、中田浩智先生、緒方宏美技官および一ノ宮麻紀技官に深謝致します。

4) 略語一覽

HIV-1:	human immunodeficiency virus type 1
AIDS :	acquired immunodeficiency syndrome
HAART :	highly active antiretroviral therapy
RTIs :	reverse transcriptase inhibitors
PIs :	protease inhibitors
SDP :	spirodiketopiperazine
RANTES :	regulated upon activation, normal T expressed and secreted
AOP-RANTES :	aminooxypentane -RANTES
NNY-RANTES :	N-nonanoyl -RANTES
MIP-1 :	macrophage inflammatory protein-1
SDF-1 :	stromal-derived factor-1
MCP-1 :	monocyte chemotactic protein-1
MDC :	macrophage-derived chemokine
MAGI/CCR5 cells :	Hela-CD4-LTR- β -gal indicator cells expressing human CCR5
CHO cells :	Chinese hamster ovary cells
PBM :	Peripheral blood mononuclear cells
DMEM :	Dulbecco's modified Eagle's medium
PBS :	phosphate-buffered saline
CPRG :	chlorophenolred β -D-galactopyranoside
MTT :	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
PHA :	phytohemagglutinin
MFI :	mean fluorescence intensity
TCID ₅₀ :	50% tissue culture infectious doses
SI :	selectivity index
ECL :	extracellular loop

5) 研究の背景と目的

1 現在の抗 HIV 療法の問題点

AIDS に対する化学療法は、逆転写酵素阻害剤(RTIs)とプロテアーゼ阻害剤(PIs)を組み合わせた多剤併用療法 (HAART)により長足の進歩を遂げた。しかし一方で、現在の治療法の有する「限界」も明らかになってきている。HIV-1 が耐性を獲得して治療抵抗性となった症例数の増大、また耐性ウイルスによる初感染症例増多の報告が続いている。さらに副作用、不良なコンプライアンスといった問題も大きい。そのような中で、野生 HIV 株と多剤耐性株の双方に強力な活性を発揮し、副作用が少なく、服用しやすい新しい薬剤の開発が文字通り急務の課題となっている(1, 2)。

2 抗 HIV 剤開発の歴史

最初の抗 HIV 剤である3種の抗 HIV 剤[azidothymidine (AZT), dideoxyinosine (ddI), dideoxycytidine (ddC)] (3, 4, 5, 6) はウイルス由来の逆転写酵素 (RT) を阻害することで抗 HIV 効果を発揮する。これらは五炭糖の 3'の水酸基 (3'-OH) を欠く構造を有しており、細胞内では HIV-1 の RT (RNA-dependent DNA polymerase) の基質として認識され RT の dNTP 結合部位で DNA 鎖に組み込まれて DNA 鎖の伸長を止める (DNA chain termination)。これらはヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤 (NRTIs) と呼ばれ、その後開発された nevirapine などの非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤 (NNRTIs) などと共に、現在の抗 HIV 療法でも重要な役割を果たしている。

既存の抗 HIV 剤のもう一方のターゲットになっているのが HIV プロテアーゼであり、プロテアーゼが HIV の遺伝子産物 (ウイルス構成タンパク) を決められた部位 (cleavage site) で切断する作用を阻害して正常のウイルス粒子形成を阻害するものがプロテアーゼ阻害剤 (PIs) である。現在用いられている PIs は HIV 由来のプロテアーゼのみを選択的に阻害するようにデザインされている (6)。

3 新規抗 HIV 剤開発の方向性

現在の新規抗 HIV 剤開発の方向性は、1) 既存の薬剤で耐性プロフィールの違うものを作るか (新規 RTIs と PIs の開発)、2) 全く作用点の違うものを目指すかの大きく2つの流れに別れていると考えて良い。

1) については既存の薬剤 (RTIs、PIs) がもたらす耐性のメカニズムの詳細な検討、さらにはこれらの耐性 HIV に対して試験管内で抗 HIV 活性を有する新規化合物の開発が必要である。たとえばプロテアーゼ阻害剤では既存の薬剤耐性 HIV に対しても野生株と同様な

活性を示し（交差耐性を持たない）、且つそれ自身の耐性株が試験管内で出現しにくい化合物の開発および機序解明を進める検討がなされている（7, 8, 9）。

2) の既存のものとは異なる作用機序を有する新規抗 HIV 剤開発については、現在いくつかの作用点がターゲットとして有望視され、研究・開発が進んでいる。その例としてウイルス DNA の宿主 DNA への組み込みの過程を阻害するインテグラーゼ阻害剤 (S-1360, 10) などが挙げられる。さらに HIV が細胞に結合（接着）・侵入する過程を阻害するいわゆる接着・侵入阻害剤の研究が進められている。HIV-1 のエンベロープは糖蛋白である gp120 と gp41 からなるが、HIV 感染過程はこの gp120 が、細胞膜上に表現されている CD4 分子と結合することで始動する。1996 年になってこの過程には更にケモカイン受容体である CCR5 と CXCR4 の存在が不可欠であることが明らかになった（11-15）。ケモカイン受容体が HIV-1 のコレセプターとして同定されたことによって、これら CCR5 と CXCR4 をターゲットとした薬剤開発を進める流れが特にここ数年で大きなものとなっている。

4 HIV 接着・侵入阻害剤

上述のように HIV の細胞内への侵入は HIV-1 の gp120 が細胞膜上に発現している CD4 分子と結合することから始まる。CD4 分子との結合により構造変化を来した gp120 はケモカイン受容体 (CCR5 もしくは CXCR4) と結合、この結合により gp41 が関与する細胞膜-ウイルス膜の融合・ウイルス遺伝子 (RNA) の細胞内への侵入をもたらす。可溶性 CD4 (sCD4) は競合的に HIV gp120 と結合することで試験管内で抗 HIV 活性を示した（16）。また HIV の gp41 の融合ペプチド (FP) と膜貫通部分 (TM) の間に存在するヘリックス領域 (C 端側) と同じ構造を有する低分子ペプチドである：T-20 / T-1249 は gp41 分子と結合し、HIV の侵入の過程をブロックする（17）。

ケモカイン受容体についてはその生理的リガンドである SDF-1 あるいは RANTES、MIP-1 などが抗 HIV 作用を持つことが、ケモカイン受容体と HIV の関連が分かった段階で既に報告されており、更にこれらの変異体 (AOP-RANTES など) ではより強力な抗 HIV 作用を持つことが認められている（18）。さらにリガンドとは異なる分子、例えば抗 CCR5 モノクローナル抗体などでも抗 HIV 活性を有するものがあることが報告がなされている（19 - 21）。一方ケモカイン受容体に作用する低分子化合物として、AMD-3100 のようにコレセプター発見以前に X4 (T-tropic) HIV-1 に有効であることがすでに明らかになっており、後になって CXCR4 阻害作用が抗 HIV 効果の機序であると分かったものもある（22）。AMD-3100 同様に CXCR4 に結合して X4 HIV-1 阻害作用を持つものとして T22（23, 24）などが挙げられる。

CXCR4 と CCR5 との関連については HIV-1 の細胞指向性 (T tropic/M tropic/dual tropic) がウイルス株のケモカイン受容体への親和性の違いによって決定されることが明らかにされ、このようなケモカイン受容体をターゲットとする治療 (薬) はその他の受容体を用いるウイルスの増殖を助長するのではないかとの懸念が当然のごとくもたれた。しかしこれらはその作用機序から鑑み既存の薬剤との交差耐性が無いことが期待され、さらに試験管内での検討ではこのようなケモカイン受容体阻害剤を用いても HIV は容易には細胞指向性を変えない (25, 26) ことなどが明らかとなり、抗 HIV 剤として経口投与可能な低分子 CXCR4/CCR5 阻害剤の開発が大きくクローズアップされてきた。

5 低分子 CCR5 阻害剤の研究・開発

1999 年に最初の低分子 CCR5 阻害剤である TAK779 が報告された (27)。TAK779 は試験管内で R5 HIV-1 を強力に抑制したが経口吸収率が低いなどいくつかの問題点があり、臨床試験導入はなされなかった。同年、我々は国内の製薬会社 (小野薬品工業) と共同研究を開始、既存のあらゆる薬剤と全く異なる骨格を有する一連の低分子化合物 (spirodiketopiperazine (SDP) 誘導体) を同定、これらが CCR5 との結合能を有することを明らかとし、抗 HIV 剤としての応用の可能性を考え、本研究をスタートさせた。本研究の目的として、リード化合物が実際に抗 HIV 活性を持つことの示す評価 (アッセイ) 系の確立、アッセイ系を用いて抗 HIV 活性を持つ化合物の選択 (スクリーニング) を初期の目的とし、次にこれらの化合物の試験管内での毒性・細胞への影響の検討、抗 HIV 活性の詳細な検討 (薬剤耐性株・あるいは指向性の異なる株への活性などを含む) を進めた。さらにこれらの結果をより強力な活性の化合物開発へとつなげ、臨床試験・臨床応用可能な化合物開発を最終目標とした。

6) 実験方法

1 試薬 (新規化合物の合成)

E913 その他の SDP 誘導体は共同研究施設 (小野薬品工業) との共同研究で新規にデザインされ合成された。今回検討された E913 とその他の化合物の構造は図 1 に示す。各化合物の構造名は以下の通りである。

E910: 1-butyl- 2,5-dioxo-3-(2-methylpropyl)-9-(6-phenylhexyl)-1,4,9-triazaspiro[5,5]undecane.

E913: 1-butyl-2,5-dioxo-3-cyclohexylmethyl-9-(1,4-benzodioxan-6-ylmethyl)-1,4,9-triazaspiro [5.5]undecane.

E916: 1-butyl-2,5-dioxo-3-cyclohexylmethyl-9-(2-phenylimidazol-5-ylmethyl)-1,4,9-triazaspiro[5.5]undecane.

E917: 1-butyl-2,5-dioxo-3-(2-methylpropyl)-9-[(4-phenoxyphenyl)methyl]-1,4,9-triazaspiro[5.5] undecane.

2 ウイルスと細胞

各種の HIV-1 株を薬剤感受性試験に用いた。HIV-1_{LAI} (28)、HIV-1_{NI4-3} (29)、HIV-1_{BAL} (30)、HIV-1_{89.6} (31)、HIV-1_{ERS104pre} (32) および HIV-1_{MOKW} [化学療法を受けていない AIDS 患者より分離された HIV-1 臨床分離株]、さらに 3 種類の薬剤耐性 HIV-1 臨床分離株: HIV-1_{JSL}, HIV-1_{MM} および HIV-1_{TM} を用いた。HIV-1_{JSL}, HIV-1_{MM} と HIV-1_{TM} は過去 32~83 ヶ月に亘り 9~11 種類の抗 HIV 剤の投与を受け臨床的に高度の多剤耐性を獲得しているエイズ患者から分離され *in vitro* でも多数の抗 HIV 剤に高度耐性を示す HIV-1 株である (7, 8)。これらの HIV-1 株は PHA 刺激した抗 HIV-1 抗体陰性のドナー由来の PBM を用いて増殖、培養上清を回収し、使用時まで -80°C にて保存した。

HIV-1 感染性を有する CCR5 発現細胞株として MAGI/CCR5 細胞 (Hela-CD4-LTR- β -gal indicator cells expressing human CCR5) を用いた。MAGI/CCR5 細胞は熊本大学医学部感染防御学講座助教授、前田洋助先生より供与を受け (26)、培養条件としては Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (15% FCS、200 μ g/ml G418、100 μ g/ml hygromycin B および 100 μ g/ml zeomycin を含む) にて培養した。

CCR5 高発現 CHO (Chinese hamster ovary) 細胞作成法として、ヒトの胎盤 cDNA ライブラリーを用いて得られた cDNA を組み込んだ哺乳類発現ベクター (pEF6/V5-His : Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いて CHO 細胞に形質導入した。さらに 5 μ g/ml の blasticidin S hydrochloride 存在下で選択的に培養、CCR5-CHO 細胞を得た。

Peripheral blood mononuclear cells (PBM) は抗 HIV-1 抗体陰性のドナー由来の buffy coat から Ficol 法を用いて分離、 10^6 細胞/ml の濃度で 10% FCS および 10 μ g/ml の phytohemagglutinin (PHA) を含む RPMI 1640 培地を用いて 3 日間培養した。

3 ケモカイン結合阻害実験

CCR5-CHO 細胞 (1.2×10^5 /細胞) を 48-well 平底プレートに播き、24 時間培養した後、20 mM HEPES と 0.5% BSA を含む Ham's F-12 培地で 1 回洗浄、付着している CCR5-CHO 細胞に 0.1 nM の 125 I でラベルした MIP-1 α (125 I]-labeled MIP-1 α) および異なる濃度の化合物 (CCR5 阻害剤) を混合して加え、室温で 40 分静置、その後 well を phosphate-buffered saline (PBS) で洗浄後、0.5 ml の 1N NaOH で細胞を溶解、細胞溶解液を回収し、その放射線量を COBRA γ -counter (#5010; Packard, Tokyo) を用いて測定した。ラベル化ケモカインの細胞・プレートへの非特異結合は過剰量 (100nM) の非ラベル化ケモカインをラベル化ケモカインと同時に加えたときの線量より求め、この値を引いた値をそれぞれの特異的結合量とした。化合物を含まないときの 125 I]-labeled MIP-1 α 結合量との比から化合物のケモカイン (MIP-1 α) 結合阻害能を求

めた。 [¹²⁵I]-labeled MCP-1 と CCR2-CHO の結合を用いた結合阻害実験も同様にして行った。

4 細胞内カルシウム移行阻害実験

CCR5-CHO 細胞 (3 x 10⁴細胞/well) を 96-well の平底プレートに播き、24 時間培養、20 mM HEPES と 2.5 mM probenecid を含む Ham's F-12 培地を用いて調整した 5 mM の Fura-2/AM (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) を 37°C で 60 分加えた後、1 回洗浄した。各種濃度の化合物と 30nM の MIP-1α を加え、ケモカイン添加の 3 分後の細胞内カルシウム濃度の増加量を Spectrofluorometer FDSS-2000 および 4000 (Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japan) を用いて測定、化合物を含まないときのカルシウム増加量との比から化合物のカルシウム移行阻害能を求めた。その他のケモカイン (MCP-1: 30 nM、MDC: 10 nM および SDF-1α: 30 nM) についても同様に測定した。

5 抗 CCR5 モノクローナル抗体と化合物の競合阻害実験

CCR5-CHO を回収し洗浄、その後 0.75% の FCS を含む F-12 培地 (FACS staining buffer) に浮遊させた。各濃度に調整した化合物の存在下、on ice で 15 分静置、FITC でラベルされた (fluorescein-conjugated) 抗 CCR5 モノクローナル抗体 45523 および 45531 (20) (R&D Systems, Minneapolis, MN) を終濃度 13.3 μg/ml で添加、on ice で 30 分静置の後洗浄、回収した細胞を用いて細胞表面マーカー解析を行った。解析は Becton Dickinson FACSort flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) を用いて行った。化合物非存在下での平均蛍光強度 (mean fluorescence intensity, MFI) と化合物存在下での MFI との比較から化合物とモノクローナル抗体の競合阻害の程度を比較した。

6 抗 HIV-1 活性測定及び細胞毒性の評価

抗 HIV 活性評価は MAGI/CCR5 細胞を用いた MAGI アッセイと PBM を用いた p24 アッセイで評価した。MAGI アッセイ (33) の方法として、96 well 平底プレートに播かれた MAGI/CCR5 細胞(10^4 細胞/well)を 24 時間培養後、各濃度に調整した化合物及び凍結保存されていた HIV-1 を含む溶液を加え、さらに 48 時間の培養の後、chlorophenolred β -D-galactopyranoside (CPRG)を用いて感染細胞数 (量) の評価を行った(34, 35)。具体的には well の上清を除去した後、1% Triton X-100 を含む PBS 100 μ l で細胞を溶解、さらに染色溶液 (CPRG 液: 10 mM CPRG、2 mM $MgCl_2$ および 0.1 M KH_2PO_4) 100 μ l を添加し、室温で静置 (30 分~1 時間)、各 well の吸光度 (波長: 570 nm)を microplate reader (Vmax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) で測定した。アッセイに用いるウイルス量としては上記方法にて (化合物非存在下で) OD=1.5 程度を得られるウイルス (HIV-1) 量を基準とした。これは通常の X-gal を用いた blue cell 法で約 100~150 細胞/96well のウイルス量に相当する。コントロール (化合物非存在) での β -ガラクトシダーゼ活性 (OD 値) と比べて 50%の OD 値の減少を来す化合物濃度を IC_{50} とした。

P24 アッセイの方法は 96 well の PHA-PBM (1×10^5 細胞/well)に各濃度の化合物存在下で 50 $TCID_{50}$ の HIV-1 を感染させ 7 日間培養、培養後に上清を回収し、上清中の p24 (HIV-1 gag)抗原量を測定した。p24 抗原の測定には全自動化学発光酵素免疫システム (ルミパルス f, 富士レビオ社, 東京) を用いた。コントロールの p24 値の 50% の p24 値となる化合物濃度を IC_{50} とした(36 - 38)。

化合物の細胞毒性の評価は PHA-PBM に対する毒性で評価した。方法は 96well の PHA-PBM (1×10^5 細胞/well)に各濃度の化合物を加え、p24 アッセイと同様 7 日間培養、100 μ l の培養上清を除去した後、10 μ l の MTT 試薬 (3-(4,5-dimethylthiazol-

2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, 7.5 mg/ml) を加え 37°Cにて 3 時間培養、イソプロパノールを 100 μ l、各 well に加え攪拌し、570nm の OD 値を microplate reader で測定した。コントロールと比べて 50%の OD 値となる化合物濃度を CC_{50} とした。

7) 実験結果

1 CCR5 阻害剤 : SDP 誘導体の同定

本研究ではまず多数の SDP 誘導体について、細胞内カルシウム移行阻害実験と ^{125}I -ラベル化 MIP-1 α を用いたケモカイン結合阻害実験で CCR5 結合能の有無を検討した。

その結果、表 1 に示すように E910、E913、E916、E917 の 4 化合物についてケモカインの起こす細胞内カルシウム移行とケモカインの結合を IC_{50} 値 : 0.002 ~ 0.1 μM の範囲で阻害した。図 2 に示すとおり、E910、E913 のいずれも MIP-1 α の CCR5-CHO 細胞への結合を阻害したが MCP-1 の CCR2 発現細胞への結合には影響を与えなかった。一方細胞内カルシウム移行阻害能について、E913 は MIP-1 α (CCR5) の起こす反応は阻害したが、MDC (CCR4)、SDF-1 α (CXCR4)、さらに MCP-1 (CCR2) によって引き起こされるカルシウム移行には影響を与えなかった (図 3)。一方、SDP 誘導体自身のアゴニスト作用の有無について、chemotaxis 誘発能、とカルシウム細胞内移行能で検討したがいずれもアゴニスト作用を認めなかった (データ示さず)。

2 SDP 誘導体の強力な抗 HIV 活性

我々は E913 その他の化合物について、まず HIV-1_{BaL} (R5 HIV-1) and HIV-1_{LAI} (X4 HIV-1) などの HIV-1 実験室株での活性の検討を行った。活性を求める方法として MAGI/CCR5 細胞を用いる MAGI アッセイおよび PHA で刺激した PBM を用いる p24 アッセイを行った。E913、E916 および E917 は R5 ウイルスである HIV-1_{BaL} に対して抗 HIV 効果を認め、その活性の程度は MAGI アッセイの IC_{50} 値でそれぞれ 0.03、0.07、および 0.06 μM であった。(表 2)。

一方、PHA-PBM を用いた p24 アッセイでは E913 は HIV-1_{BaL} に対して IC₅₀ 値で 0.04 μM と MAGI アッセイと同様に強力な活性を認めた。それに対して他の化合物 (E910、E916、E917) の活性は IC₅₀ 値で 0.1~0.5μM と MAGI アッセイよりやや高い値を示した (表 2)。さらに E913 はこれらの化合物の中で最も PHA-PBM に対する細胞毒性が低く、薬剤としての有効濃度の範囲を示す selectivity index (SI) は 1295 であった。しかしいずれの SDP 誘導体も X4 ウイルスである HIV-1_{LAI} および HIV-1_{NL4-3} に対してはアッセイ法にかかわらず抗 HIV 活性を示さなかった。それに対して CXCR4 阻害剤である AMD-3100 は HIV-1_{LAI} と HIV-1_{NL4-3} に活性を認めた。ケモカインと HIV の関連について CC-chemokine が X4 ウイルスの増殖を促進、あるいは SDF-1 が R5 ウイルスの増殖を助長するとの報告がある (39 - 41) が E913 および他の SDP 誘導体は 1μM まで濃度を上げて増殖促進効果は認めなかった。

今回検討した中で最も強力に細胞毒性の低かった E913 についてその抗 HIV 活性をより詳細に検討した。R5 もしくは X4 ウイルスの臨床分離株は米国で 2~7 年に渡り多数 (9~11 種類) の抗 HIV 剤を含む多剤併用療法を受け、すでにあらゆる治療に対して効果を示さなくなった AIDS 患者より分離された。これら分離されたウイルス株はいずれも RT 領域、PR 領域に多数の耐性変異を有しており、*in vitro* でも各種の抗 HIV 剤に耐性を示した (7, 8)。これら薬剤耐性株はいずれも AZT (didanosine)、ddI (stavudine)、SQV (saquinavir)、NFV (nelfinavir) に対して耐性を認めたが E913 は R5 の耐性ウイルスである HIV-1_{JSL} と HIV-1_{MM} について、薬剤感受性を示す臨床分離株である R5 HIV-1_{MOKW} とほぼ同様の活性を維持していることが明らかとなった。一方で E913 は実験室株と同様、X4 HIV-1_{TM} (薬剤耐性株) には効果を認めなかった。それとは逆に AMD-3100 は HIV-1_{TM} を抑制したが R5 の各種 HIV-1 株の抑制効果はなかった (表 3)。

3 E913 と CXCR4 阻害剤の併用効果

AIDS 患者の生体内には（患者により割合は異なるが）、X4・R5・dual tropic をはじめとする極めて多種類の HIV が混在しており (quasispecies)、CXCR4 阻害剤または CCR5 阻害剤単独では十分な増殖の抑制は得られないと考えられる。そこで E913 と CXCR4 阻害剤である AMD-3100 とを併用した時に各種のウイルス株に対してどのような効果をもたらすか検討を行った。まずは R5 HIV-1 (HIV-1_{BaL}、HIV-1_{MM}) および X4 HIV-1 (HIV-1_{NL4-3}、HIV-1_{TM}) に対して両化合物を併用で用いた時の活性を検討したところ、それぞれ CCR5 阻害剤、CXCR4 阻害剤の活性を増強することも減弱させる（拮抗する）こともなかった（図 4-A, B）。一方で、（図 4-C）に示すように CCR5・CXCR4 両方を用いる dual tropic HIV-1 である、HIV-1_{89.6} や HIV-1_{ERS104pre} についてその効果を見たところ併用による活性の上昇が認められた。具体的に（図 4-C）を見てみると HIV-1_{89.6}、HIV-1_{ERS104pre} のいずれも dual tropic であるが X4 に近い特徴を有していることもあり高濃度（5 μ M）の E913 存在下でもそれぞれ完全には抑制されない（コントロール比で 29% および 55% のウイルス増殖が見られた）。一方、CXCR4 阻害剤の AMD-3100 は 0.1 μ M の濃度で大部分のウイルス（95% 程度）を抑制するが、その濃度の AMD-3100 に加えて E913 を併用するとほぼ 100% のウイルス増殖を抑制した。さらに HIV-1_{89.6} については 2 種類の阻害剤を各種濃度で併用して活性を検討し、この抗ウイルス活性のデータを Prichard らの解析法（図 5-A, 42, 43）で検討した。その結果、2 種類は相乗的な活性を示したことが明らかとなった。HIV-1_{89.6}、HIV-1_{ERS104pre} の 2 種類の HIV-1 株は上述の通り X4 HIV-1 に近い性質を有していると考えられたため R5 HIV-1_{BaL} と X4 HIV-1_{NL4-3} を TCID₅₀ 比で 1:1 に混合させたウイルスへの E913、AMD-3100 の併用効果を検

討した。その結果これら混合ウイルスに対して E913、AMD-3100 のいずれも 1 剤では完全な抑制ができなかったものの 2 剤の併用でほぼ完全にウイルスの増殖を抑制、上述の方法での解析でも相乗効果であることが認められた (図 5-B)。E913 と既存の抗 HIV 剤である RTI (AZT) や PI (NFV) とを併用すると相加作用が見られたが、拮抗作用は観察されなかった (データ示さず)。

4 E913 の CCR5 への結合部位解析

E913 が CCR5 のどの部位に結合して HIV-1 の増殖を抑制しているかという検討を抗 CCR5 モノクローナル抗体を用いた実験で行った。具体的には各種の抗 CCR5 モノクローナル抗体を E913 存在下で CCR5 陽性細胞に反応させ Facs でその蛍光度の変化を比較した (図 6)。その結果、E913 は第 2 細胞外ドメインの C 末端側 (ECL2B, 図 7-A) のエピトープを認識する抗 CCR5 抗体 (45531) と CCR5 の複数の細胞外ドメインの構造 (conformation) を認識して結合するとされる (45523) の 2 つのモノクローナル抗体の蛍光度を減少させる、すなわちこれらの抗体の CCR5 への結合を競合的に阻害することが分かった。この結果より E913 は ECL2B に重要な結合部位を有していることが考えられた。一方、ケモカインと強く競合し、抗 HIV 活性も有するモノクローナル抗体として 2D7 (ECL2 の N 末端側 / ECL2A を認識, 図 7-A) があるが、E913 および TAK779 はこの 2D7 とは全く競合しなかった。一方、E913 は上述の通り自身が CCR5 にシグナルを入れることはないため、ケモカインが起こすような CCR5 の internalization を起こすことも見られなかった (データ示さず)。以上より E913 は CCR5 の細胞外ドメイン (ECL2B) に結合し、HIV (gp120) の CCR5 への結合を立体構造的に阻害することで HIV の吸着を阻害、感染抑制効果を示すことが考えられた。

8) 表および図

表 1. Inhibitory activity of novel CCR5 antagonists in the Ca²⁺ assay and the chemokine-chemokine receptor binding assay

Compound	Binding assay				Ca ²⁺ assay			
	MIP-1 α	MCP-1	MIP-1 α /CCR5	MCP-1/CCR2	MDC/CCR4	SDF-1 α /CXCR4	(IC ₅₀ , μ M)	
E910	0.03 \pm 0.005	> 30	0.1 \pm 0.03	17 \pm 0.5	17 \pm 3	24 \pm 2		
E913	0.002 \pm 0.0005	> 30	0.02 \pm 0.003	> 30	> 30	> 30		
E916	0.007 \pm 0.001	> 30	0.07 \pm 0.03	> 30	> 30	> 30		
E917	0.009 \pm 0.0007	> 30	0.08 \pm 0.02	> 30	> 30	> 30		

表 2. Anti-HIV-1 activity against HIV-1 laboratory isolates and cytotoxicity of spirodiketopiperazine derivatives

Compound	IC ₅₀ (μM) ^a				CC ₅₀ (μM)	SI ^b
	HIV-1 _{BaL} (R5)	HIV-1 _{LaI} (X4)	HIV-1 _{BaL} (R5)	HIV-1 _{NL+3} (X4)		
	MAGI (CCR5-MAGI)		p24 (PBM)		MTT (PBM)	
E910	>1	>1	0.54 ± 0.03	>1	11.7 ± 2.7	22
E913	0.03 ± 0.008	>1	0.04 ± 0.04	>1	51.8 ± 5.6	1295
E916	0.07 ± 0.03	>1	0.24 ± 0.09	>1	12.0 ± 0.8	50
E917	0.06 ± 0.03	>1	0.16 ± 0.04	>1	10.8 ± 0.9	68
AMD-3100	>1	0.001 ± 0.0001	>1	0.007 ± 0.0003	>100	>14286
AZT	0.06 ± 0.02	0.076 ± 0.023	0.004 ± 0.001	0.013 ± 0.003	>100	>25000

^a The IC₅₀ values were determined with the MAGI assay and p24 assay. Cytotoxicity of the test compounds to PBM was determined with the MTT assay.

^b SI: selectivity index, CC₅₀/IC₅₀.

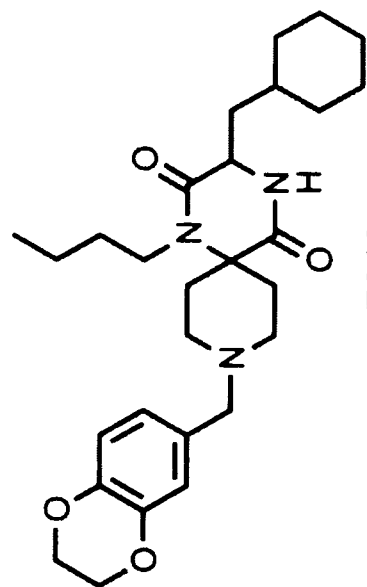
表 3. Anti-HIV-1 activity of E913 and AMD-3100 against HIV-1 clinical isolates in PBM

	IC ₅₀ (μM) ^a			
	wild-type R5	HIV-1 _{MDR4}	HIV-1 _{JSU}	HIV-1 _{MDR5}
AZT	0.001 ± 0.002 (1x)	0.03 ± 0.19 (28x) ^b	0.04 ± 0.007 (41x)	0.1 ± 0.06 (98x)
ddI	0.48 ± 0.12 (1x)	2.50 ± 0.35 (5x)	3.9 ± 1.1 (8x)	2.50 ± 0.25 (5x)
d4T	0.015 ± 0.004 (1x)	0.10 ± 0.07 (9x)	0.09 ± 0.06 (6x)	0.05 ± 0.02 (3x)
SQV	0.004 ± 0.004 (1x)	0.08 ± 0.04 (19x)	0.37 ± 0.065 (93x)	0.07 ± 0.04 (18x)
NFV	0.014 ± 0.004 (1x)	>1 (>71x)	>1 (>71x)	>1 (>71x)
E913	0.04 ± 0.03 (1x)	0.06 ± 0.01 (1x)	0.05 ± 0.06 (1x)	>1 (>25x)
AMD-3100	>1	>1	>1	0.008 ± 0.0006

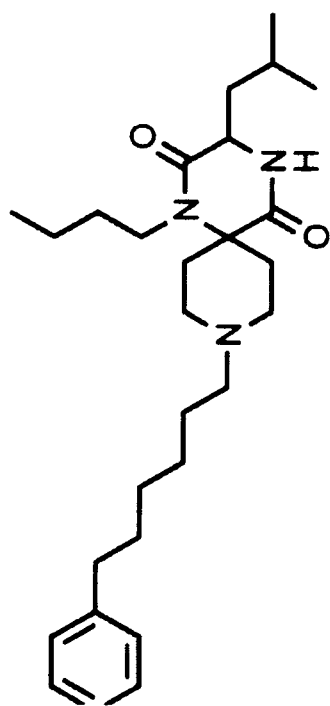
^a The IC₅₀ values were determined with the p24 assay.

^b Numbers in parentheses represent fold-changes of IC₅₀ values against each isolate compared to IC₅₀ values against the wild-type HIV-1_{MDR4}.

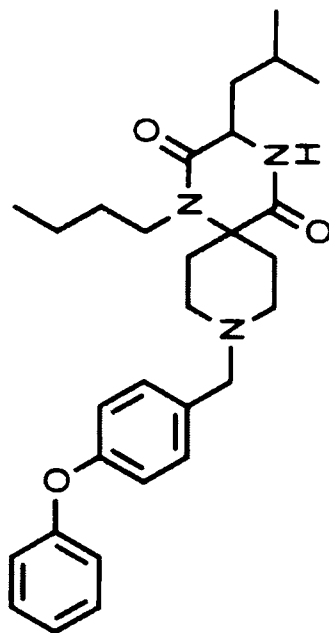
図1 新規SDP誘導体の構造



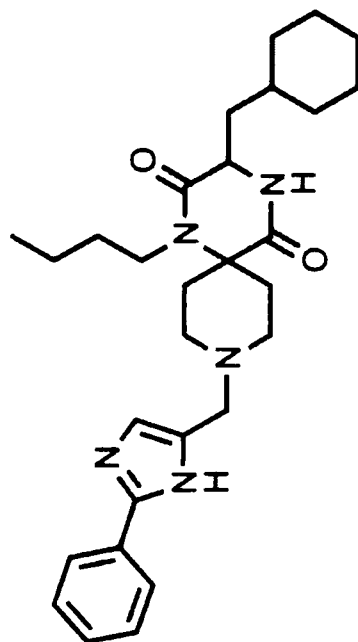
E913



E910

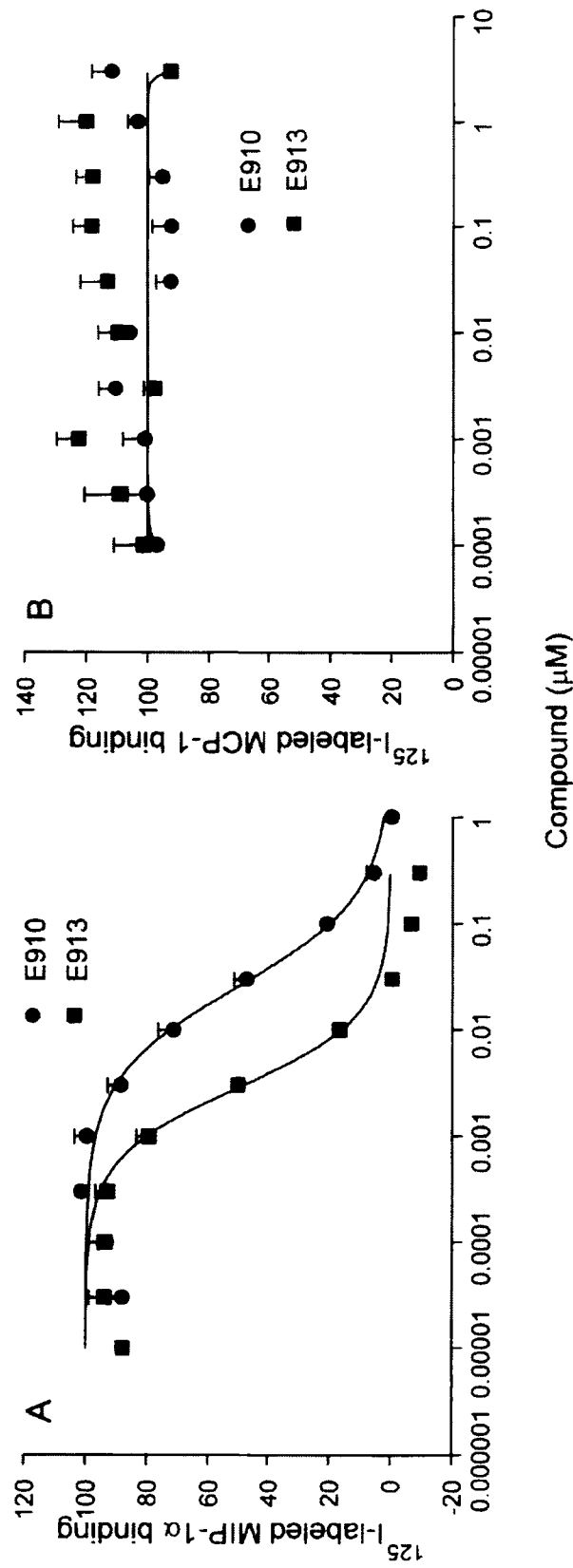


E917



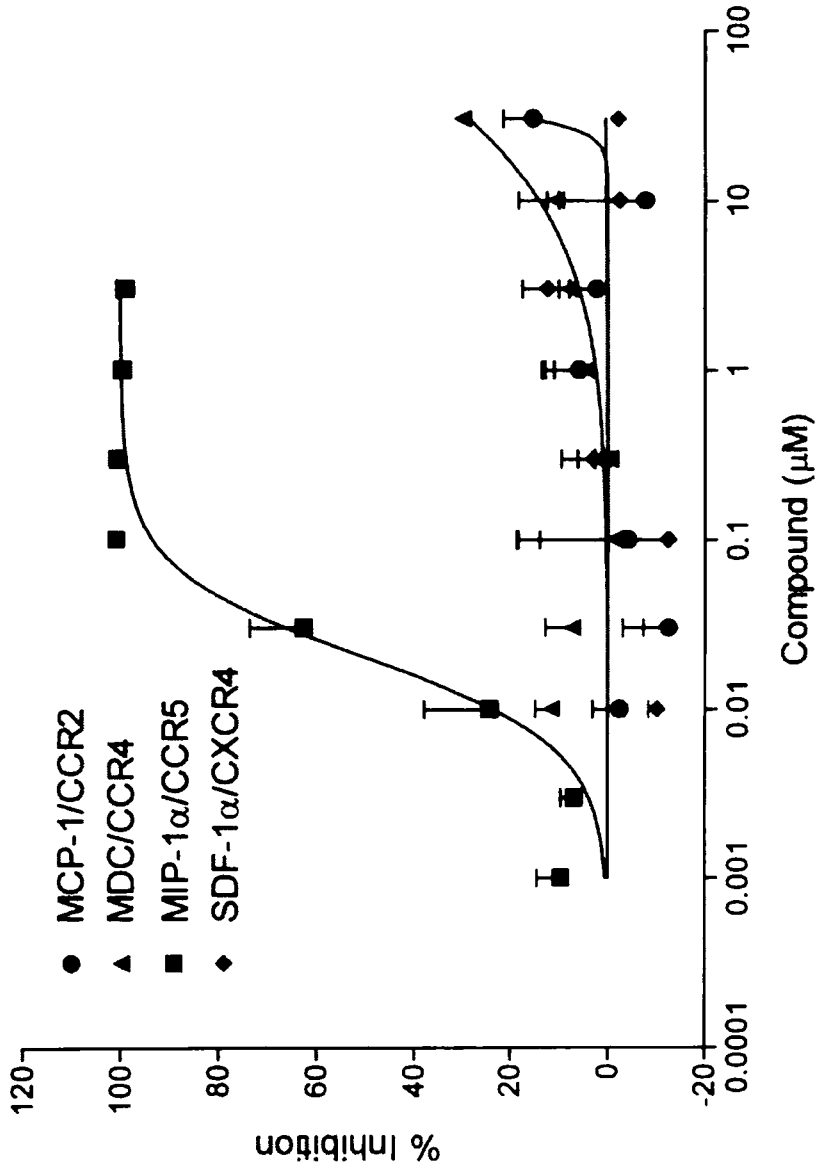
E916

図2 SDP誘導体によるケモカイン結合阻害作用



Inhibition of MIP-1 α binding to CCR5 and MCP-1 binding to CCR2 by E910 and E913. CCR5-CHO cells and CCR2-CHO cells were exposed to 0.1 nM [^{125}I]-labeled MIP-1 α (Panel A) and 0.1 nM [^{125}I]-labeled MCP-1 (Panel B), respectively, and incubated for 40 min in the presence of increasing concentrations of E910 or E913. The results shown are the mean values (\pm S.D.) from three independent assays.

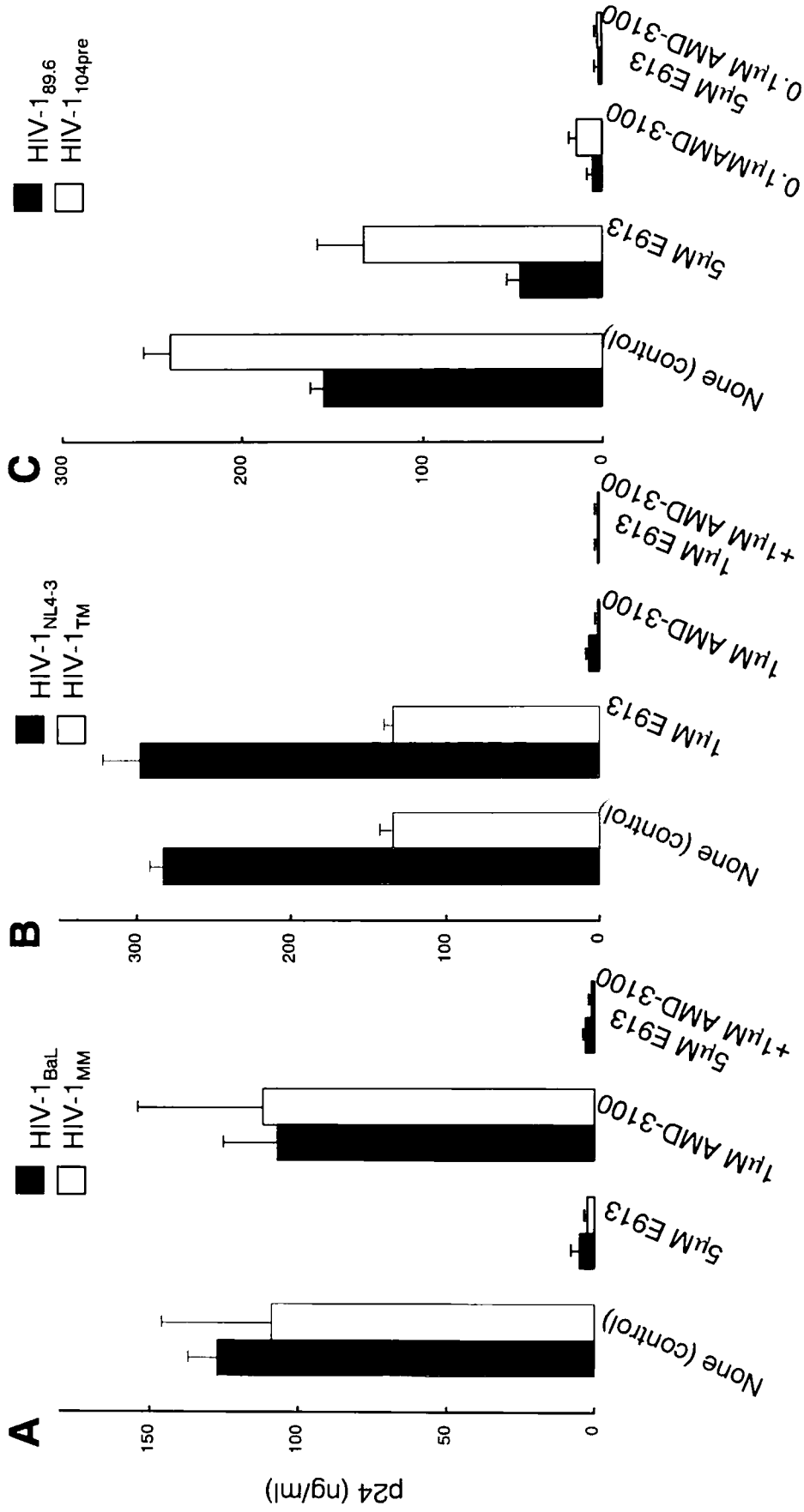
図3 E913を用いたカルシウム濃度上昇阻害試験



E913 blocks MIP-1α-induced intracellular Ca^{2+} mobilization but fails to block MCP-1, MDC and SDF-1-induced intracellular Ca^{2+} mobilization.

E913 blocked MIP-1α-induced intracellular Ca^{2+} mobilization in CCR5-CHO cells, but failed to block Ca^{2+} mobilization induced by MCP-1, MDC, or SDF-1α in CCR2-CHO, CCR4-CHO and CXCR4-CHO cells.

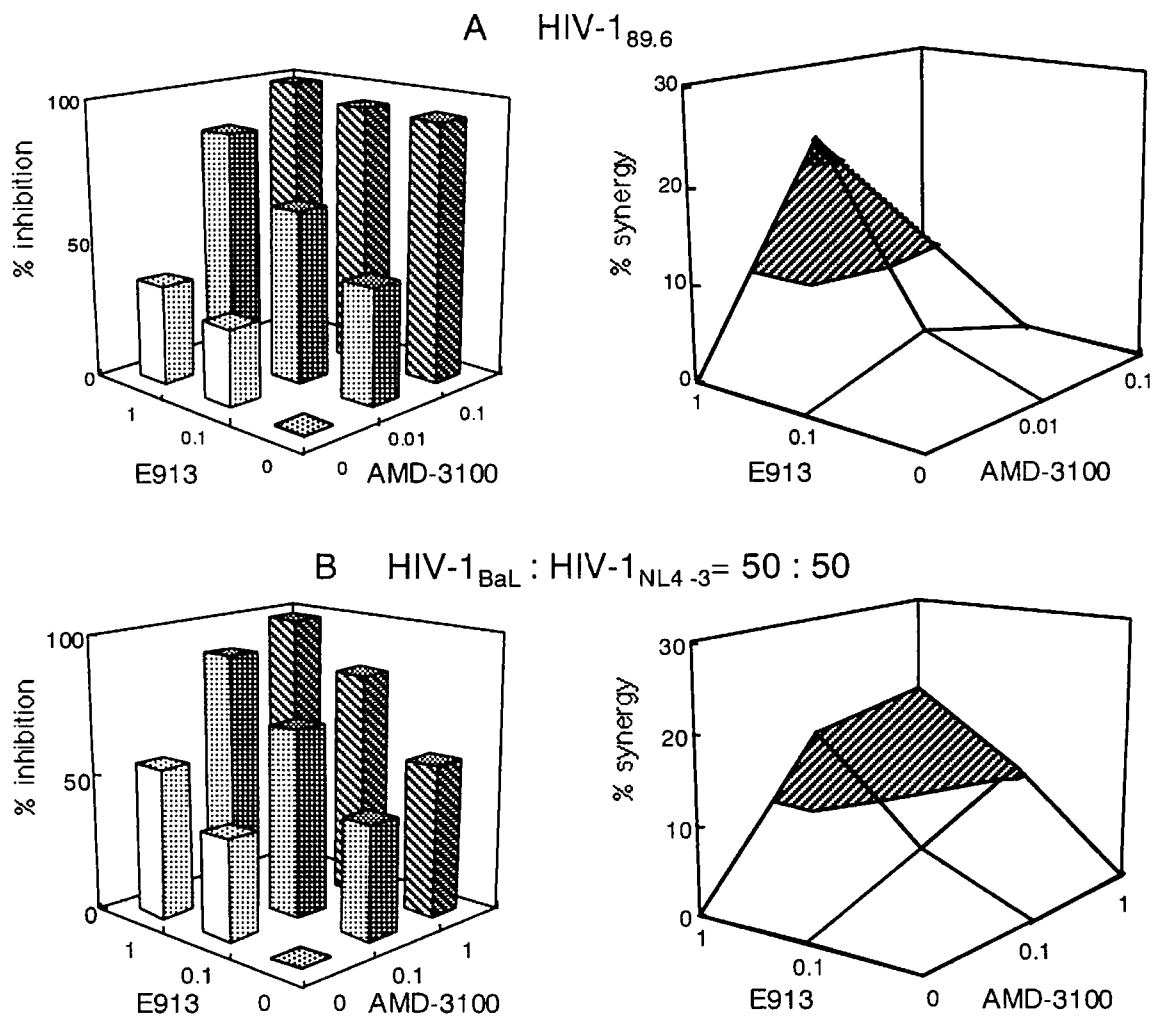
図4 R5, X4, dual tropic HIV-1に対するE913とAMD-3100の併用効果



Effects of E913 combined with AMD-3100 on the replication of R5, X4, and dualtropic HIV-1.

Panel A: E913 (5 μ M) completely blocked R5 HIV-1 replication but AMD-3100 (1 μ M) totally failed, and no obvious antagonistic effect was seen. Panel B: AMD-3100 (1 μ M) completely blocked X4 HIV-1 replication while E913 (1 μ M) totally failed, and no obvious antagonistic effect was seen. Panel C: E913 (5 μ M) and AMD-3100 (0.1 μ M) partially blocked the replication of dualtropic HIV-1, while the combination of E913 and AMD-3100 completely suppressed its replication.

図 5 E913とAMD-3100の併用効果

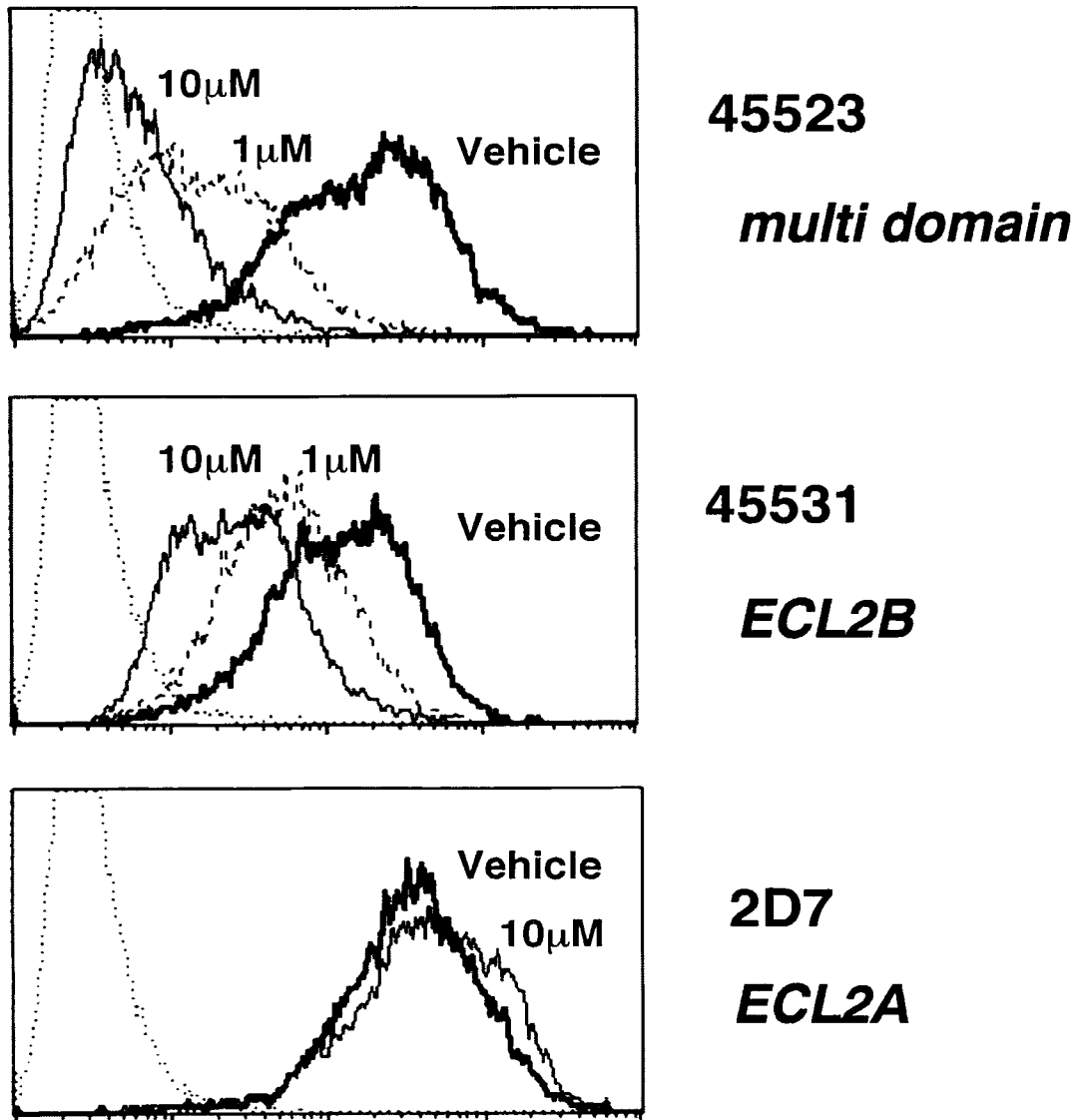


Effects of E913 combined with AMD-3100 on the replication of dualtropic HIV-1 and mixed HIV-1 populations.

Panel A: E913, combined with AMD-3100, effectively blocked the replication of dualtropic HIV-1_{89.6} (50 TCID₅₀) (left). The antiviral activity of the combined drugs was analyzed using the method by Prichard *et al.* (right) and found to be synergistic.

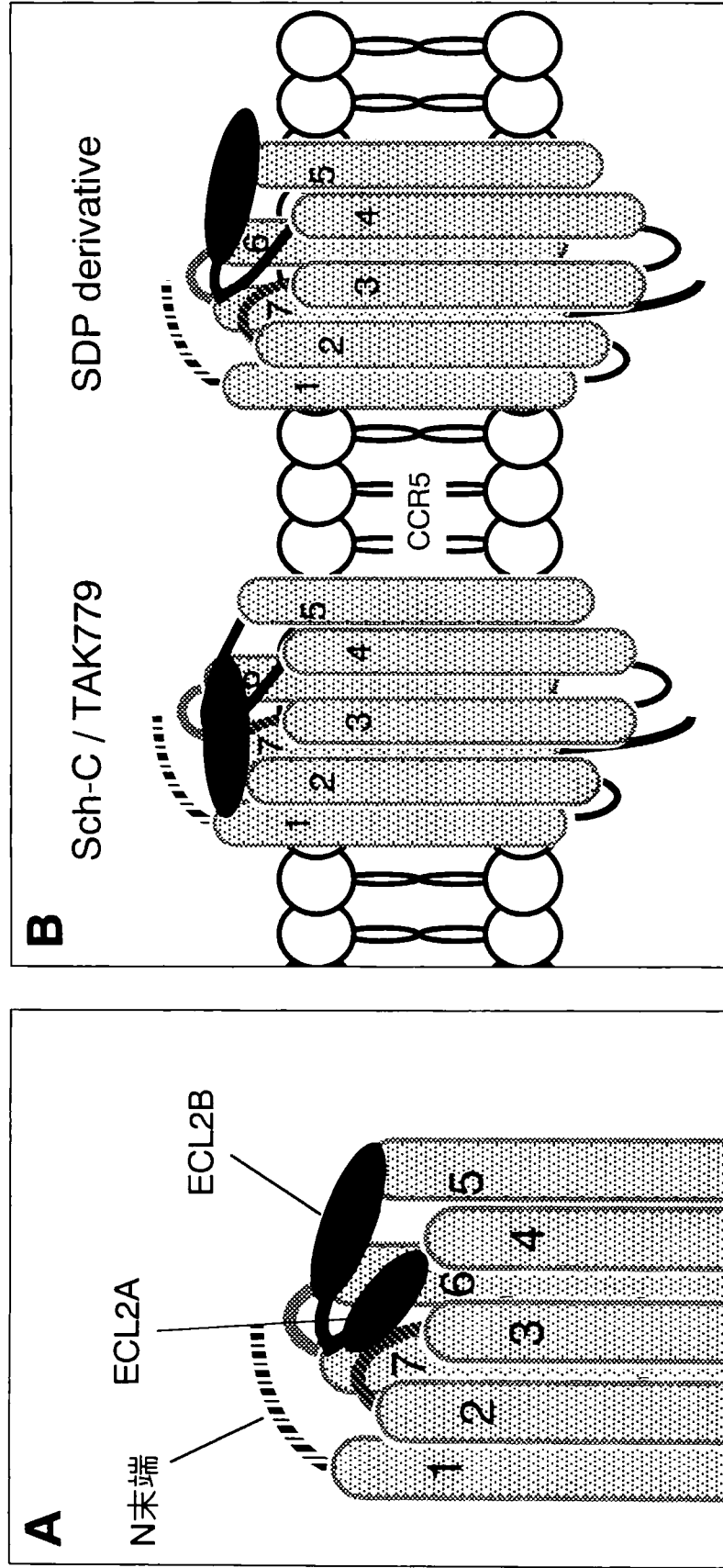
Panel B: E913, combined with AMD-3100, completely blocked the replication of the 50:50 mixture of R5 HIV-1_{BaL} (25 TCID₅₀) and X4 HIV-1_{NL4-3} (25 TCID₅₀) (left). The antiviral activity of the combination was also synergistic (right).

図 6 抗CCR5モノクローナル抗体に対する競合阻害



E913 binds to the domain B of the second extracellular loop of CCR5 (ECL2B). E913 competitively blocked the binding of two monoclonal antibodies, 45523 reactive against multidomain epitopes of CCR5 and 45531 specific for ECL2B of CCR5. Note that there was no E913 inhibition of the binding of a monoclonal antibody 2D7 which binds to the domain A of the second extracellular loop (ECL2A) of CCR5.

図7 CCR5とCCR5阻害剤の結合モデル



9) 考察・結語

AIDS の進行に伴い患者の HIV ウイルスは R5 (NSI)から X4 (SI) へ変化する (phenotypic shift)ことがいわれている (44 - 46)。しかし進行期の AIDS 患者でも R5 ウイルスは存在しており、AIDS の各病期で R5・X4 を含む多種類のウイルスが患者の体内では混在して存在している (47)。HIV のコレセプターとしてのケモカインレセプターを阻害して抗 HIV 作用を発揮するケモカインレセプター阻害剤を抗 HIV 剤として用いる際には当然、*in vitro* での検討とは異なり、このような R5 ウイルス以外の HIV も混ざり合った状態のウイルスも押さえることができるような (治療の) 方法を考える必要がある。今回の検討では、我々がその R5 HIV-1 への活性を同定した新規の CCR5 阻害剤 : E913 について、CXCR4 阻害剤として報告されている AMD-3100 との併用することで *in vitro* でも R5、X4 のいずれも用いる dual tropic HIV-1 である HIV-1_{89.6} や R5 HIV-1 と X4 HIV-1 を人工的に 1:1 に混合した状態のウイルスに対しても非常に強力な抑制効果をもたらすことが明らかになった。一方で RANTES、MIP-1 α 、MIP-1 β などの CC-chemokine での今までの検討ではこれらが X4 ウイルスの増殖を促進したり、さらには X4 ウイルスへの phenotypic shift の引き金になる可能性があるとの報告が見られていた(39 - 41, 48 - 51)。X4 および dual tropic ウイルスに対する増殖促進効果は今回の検討では E913 およびその他の SDP 誘導体では認められなかった。まず X4 ウイルス増殖促進効果に関して Kinter らは CC-chemokine の引き起こす signal transduction が CD4 と CXCR4 の局在化 (co-localization) を来すと報告しておりこれが X4 ウイルスの増殖を促進させているとしている (49)。E913 とその誘導体は化合物自身にケモカインのようにシグナル (Ca²⁺ flux など) を起こす作用がないため、このような X4 ウイル

スの増殖促進作用が見られなかったと思われる。次に R5 から dual tropic、さらに X4 ウイルスへのシフトについて、Mosier らは RANTES の変異体である aminooxypentane (AOP)-RANTES や N-nonanoyl (NNY)-RANTES が human PBL-SCID マウスの系で速やかに X4 ウイルスだけを選択し増殖させる結果となると報告した (50)。その一方で *in vitro* の実験で R5 と X4 ウイルス両方を含む臨床株で CXCR4 阻害剤の AMD-3100 を用いると X4 ウイルスを抑制し、R5 ウイルスだけの増殖を許したとの報告もあり (51)、このような結果はケモカインレセプター阻害剤を CCR5 のみ、あるいは CXCR4 のみで用いても臨床的に完全なウイルス抑制が困難である可能性を示すと同時に、やはりこの 2 者 (CCR5 / CXCR4) が HIV のコレセプターとしての割合は極端に高いために、この 2 者を抑制する治療が非常に有効な治療法となり得ることを示している。今回の E913 と AMD-3100 の併用は *in vitro* で非常に有効であることが示されたがこれら両者の存在下でもウイルスのシフトがおこり得るか、さらには耐性獲得 (遺伝子変異) の過程で R5→X4 あるいは X4→R5 へのシフトを来すことがあるのかなどは今後の検討を要する。

薬剤の併用効果の検討として、それらの作用が相加的か、あるいは相乗的・拮抗的かを検討する方法が今まで幾つか報告されている。抗 HIV 剤でも RTIs と PIs などではこれらの検討をした論文が多く報告されている。我々も E913 と AMD-3100 の併用効果を検討するために Prichard らの報告した方法と Chou / Talalay の提唱した方法などで検討した (42, 43, 53)。図には Prichard らの方法に基づいた結果を示したが、R5+X4 の混合ウイルス、あるいは dual tropic ウイルスのいずれも検討した大部分の濃度で相乗効果であった。最近臨床分離 HIV 株に対して CXC-hemokine (SDF-1 α) と CC-chemokine(AOP-RANTES)を併用した効果を見た報告があったが (52)、これでも両者の効果は相乗効果であるとされている。E913 と AMD-3100 の併用効果 (相乗作用) の

機序については今後検討する必要がある。その可能性の1つとして、Singer らが最近電顕レベルで見た細胞表面上の CCR5、CXCR4 と CD4 の局在化のデータを示しているが、その中で彼らはこの3者が細胞表面上でそれぞれ同種類のレセプターで成り立つクラスターを形成しており、その CD4 のクラスターとケモカインレセプターのクラスターは大変近いところに（HIV 粒子の直径未満）存在しているとしている（54）。このようなレセプターの局在化が HIV の感染（効率）に大きな影響を与えていると考えられ、さらには異なるケモカインレセプターを同時に押さえることでこのようなクラスター間でのレセプター/レセプターの相互作用に影響を与え相乗的にウイルス感染が抑制されている可能性が考えられる。

その一方で我々は E913 が既存の抗 HIV 剤と併用したときの効果も併せて検討した。E913 と AMD-3100 を解析したものと同様の方法で解析したところ、いずれも相加的〜わずかな相乗効果となったが E913 と AMD-3100 ほどの相乗効果は認められなかった。これから CCR5 阻害剤と既存の薬剤については *in vitro* では明らかな拮抗作用を認めず、これらを併用して用いる治療法が可能であることが示唆された。

E913 以外のここに示した SDP 誘導体は抗 HIV 活性が E913 に劣り、細胞毒性も E913 より強かったが、これら SDP 誘導体の細胞毒性の機序は今のところはっきりしない。しかし、より強力に CCR5 阻害する E913 の方が毒性が少ない (CC_{50} 値: 51.8 μ M、SI: 1295) ことなどから、その毒性がケモカインレセプターを押さえることからくるものではないと考えられる。しかし、*in vivo* でのケモカインレセプター阻害剤の使用に関しては *in vitro* では明らかとならない影響が当然考えられ、これらについては今後とも十分な検討と注意が必要であることが考えられる。その一つの根拠として Salazar-Mather らは MIP-1 α の機能を欠損させたマウスモデルで、サイトメガロウイルスに対する免疫応答が低下するこ

と、その原因が NK 活性の低下によるものであることを示している (55)。さらに CCR5 欠損マウスではマクロファージ機能の欠損、遅延型免疫応答能の上昇など、幾つかの免疫系の異常が起こるとの報告がある (56)。ヒトでの検討については以前より CCR5 欠損 ($\delta 32$) でも明らかな異常が見られないとの知見があったが(57, 58)、最近 Woitas らがこれら CCR5 $\delta 32$ の homozygous では HCV 感染時の HCV ウイルス量が有意に高くなると報告された (59)。さらに腎移植後の移植片拒絶反応が $\delta 32(+)$ のヒトで有意に低いとの報告もある (60)。これらは一見、正常に見える CCR5 $\delta 32$ を有する生体でも詳細な検討では幾つかの免疫系の異常が起きている可能性を示している。ケモカインレセプター阻害剤を用いてレセプター機能を抑制した場合にも同様の変化を来すかはまだ明らかではない。CXCR4 阻害剤・CCR5 阻害剤の生体への影響として、CXCR4 阻害剤の AMD-3100 および最近報告された新しい CCR5 阻害剤である Sch-C (Sch-351125)については既に臨床試験が始まっており、その効果および毒性(副作用)についての幾つかの情報がある (61 - 63)。Sch-C については R5 のウイルスを有する患者に対して臨床的にウイルス量の減少をもたらすことに成功したが、心毒性(QT 延長)が認められている。また AMD-3100 では白血球減少、消化器症状、心毒性などが報告されている。しかしこれらの毒性がケモカイン機能を阻害することで起こった毒性かどうかは明らかでなく、より長期な観察がさらに必要と思われる。

E913 の CCR5 阻害剤としての作用機序解明の一環として、E913 が CCR5 にどのように結合してケモカインや HIV-1 (gp120)を阻害しているかを検討する方法として、我々は抗 CCR5 モノクローナル抗体と E913 の結合競合阻害を見る系を確立し、その抗体の CCR5 認識部位から E913 の結合部位の検討を行った。この手法は既に CC-chemokine と CCR5 あるいは CXC-chemokine と CXCR4 との結合を検討するのに用いられており

ECL2 の N 末端側 (ECL2A, 図 7-A) を認識するモノクローナル抗体(2D7)が非常に強いケモカインとの競合阻害を示す特徴を有しており、さらに抗体自身の抗 HIV 活性も強いことなどが分かっている (19 - 21)。このようなデータから当初、低分子 CCR5 阻害剤のターゲットとして ECL2A が有望と考えられていたが、1999 年に報告されていた TAK779 は 2D7 との競合阻害の作用はほとんどなく、TAK779 は ECL2A 以外の部分に結合していることが考えられた (27)。今回の検討では N 末端や ECL を認識する多数のモノクローナル抗体について検討、2D7 については TAK779 同様、E913 もほとんど競合しなかったが、その他の 2 種類のモノクローナル抗体 (mAb 45523, および mAb 45531) が E913 と競合阻害をすることが明らかとなった (図 6)。そのうちの 45523 については上述の通り CCR5 の細胞外ドメインの複数の部分の構造を認識するといわれており (20)、この抗体は Sch-C と競合、TAK779 も軽度競合することが分かった (データ示さず)。45531 については ECL2B を特異的に認識するとされ (具体的にはアミノ酸: 184~189 の範囲, 図 7-A)、E913 の結合にこの部分が非常に重要であると思われる。しかしこの部分の立体構造が E913 と CCR5 の結合に必須かどうかは明らかでない。その前後も含むドメインの構造全体が (アミノ酸の荷電などの性質も含めて) 重要であり、この数アミノ酸自体が他に置換されても結合が維持できる可能性もある。しかしおおよその結合部位として、E913 あるいはその他の SDP 誘導体が ECL2 の C 末端側に近い部分 (第 5 膜貫通ドメインの近傍) の細胞外ループの構造を認識している可能性が示唆された (図 7-B)。それに対して TAK779 あるいは Sch-C などはこの部分はそれほど結合部位として重要でなく、その他の結合様式をとっていることが考えられる (図 7-B, 27, 64)。

本研究で報告した E913 およびその他の SDP 誘導体はいずれもプロトタイプであるが経口吸収が可能 (3~30%) であり、さらに CCR2b と結合する TAK779 より CCR5 に

特異的な結合力を持つと考えられる。これらの知見は、より抗 HIV 活性に優れ、毒性が低く、経口吸収・薬物動態に勝る新規化合物を見いだすための足がかりとなるものとして評価される。さらに本研究の過程で生じた幾つかの課題、例えば CCR5 阻害剤のより詳細な作用機序解明、さらには抗 HIV 活性を持ちながらケモカイン阻害作用が少ない新規化合物開発の可能性など、より新たな課題に対する研究の基礎的データとしても重要と考えられる。

10) 参考文献

1. Fauci, A. S. (1999) *N Engl J Med* 341, 1046-50.
2. Mitsuya, H. & Erickson, J. (1999) *Textbook of AIDS Medicine, Second Edition* (Merigan, T.C., Bartlet, J.G. & Bolognesi, D., eds) pp751-780, Williams & Wilkins, Baltimore.
3. Mitsuya, H., Weinhold, K.J., Furman, P.A., St. Clair, M.H., Lehrman, S.N., Gallo, R.C., Bolognesi, D., Barry, D.W., & Broder, S. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 096-100.
4. Mitsuya, H., & Broder, S. (1986) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83:1911-15.
5. Mitsuya, H., & Broder, S. (1987) *Nature.* 325:773-778
6. Mitsuya, H., Yarchoan, R., & Broder, S. (1990) *Science.* 249:1533-44
7. Yoshimura, K., Kato, R., Kavlick, M.F., Nguyen, A., Maroun, V., Maeda, K., Hussain, K.A., Ghosh, A.K., Erickson, J., & Mitsuya, H. (2002) *J. Virology.* 76: 1349-1358
8. Yoshimura, K., Kato, R., Yusa, K., Kavlick, M.F., Maroun, V., Nguyen, A., Mimoto, T., Ueno, T., Shintani, M., Falloon, J., Masur, H., Hayashi, H., Erickson, J., & Mitsuya, H. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:8675-80.
9. Sham, H. L., D. J. Kempf, A. Molla, K. C. Marsh, G. N. Kumar, C. M. Chen, W. Kati, K. Stewart, R. Lal, A. Hsu, D. Betebenner, M. Korneyeva, S. Vasavanonda, E. McDonald, A. Saldivar, N. Wideburg, X. Chen, P. Niu, C. Park, V. Jayanti, B. Grabowski, G. R. Granneman, E. Sun, A. J. Japour, & D. W. Norbeck. (1998) *Antimicrob Agents Chemother.* 42:3218-24.
10. Yoshinaga, T., Sato, A., Fujishita, T., & Fujiwara, T. (2002) *The 9th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections.*, Seattle, WA., February 24-28, 2002 (Abstr. 8)
11. Alkhatib, G., C. Combadiere, C. C. Broder, Y. Feng, P. E. Kennedy, P. M. Murphy, & E. A. Berger (1996) *Science.* 272:1955-8.
12. Bleul, C. C., M. Farzan, H. Choe, C. Parolin, I. Clark-Lewis, J. Sodroski, & T. A. Springer (1996) *Nature.* 382:829-33.
13. Choe, H., M. Farzan, Y. Sun, N. Sullivan, B. Rollins, P. D. Ponath, L. Wu, C. R. Mackay, G. LaRosa, W. Newman, N. Gerard, C. Gerard, & J. Sodroski (1996) *Cell.* 85:1135-48.

14. Cocchi, F., A. L. DeVico, A. Garzino-Demo, S. K. Arya, R. C. Gallo, & P. Lusso (1995) *Science*. 270:1811-5.
15. Feng, Y., C. C. Broder, P. E. Kennedy, & E. A. Berger (1996) *Science*. 272:872-7.
16. Layne, S. P., M. J. Merges, M. Dembo, J. L. Spouge, & P. L. Nara (1990) *Nature*. 346:277-9.
17. Kilby, J. M., S. Hopkins, T. M. Venetta, B. DiMassimo, G. A. Cloud, J. Y. Lee, L. Alldredge, E. Hunter, D. Lambert, D. Bolognesi, T. Matthews, M. R. Johnson, M. A. Nowak, G. M. Shaw, & M. S. Saag (1998) *Nat Med*. 4:1302-7.
18. Simmons, G., P. R. Clapham, L. Picard, R. E. Offord, M. M. Rosenkilde, T. W. Schwartz, R. Buser, T. N. C. Wells, & A. E. Proudfoot (1997) *Science*. 276:276-9.
19. Wu, L., G. LaRosa, N. Kassam, C. J. Gordon, H. Heath, N. Ruffing, H. Chen, J. Humblias, M. Samson, M. Parmentier, J. P. Moore, & C. R. Mackay (1997) *J Exp Med*. 186:1373-81.
20. Lee, B., M. Sharron, C. Blanpain, B. J. Doranz, J. Vakili, P. Setoh, E. Berg, G. Liu, H. R. Guy, S. R. Durell, M. Parmentier, C. N. Chang, K. Price, M. Tsang, & R. W. Doms (1999) *J Biol Chem*. 274:9617-26.
21. Olson, W. C., G. E. Rabut, K. A. Nagashima, D. N. Tran, D. J. Anselma, S. P. Monard, J. P. Segal, D. A. Thompson, F. Kajumo, Y. Guo, J. P. Moore, P. J. Maddon, & T. Dragic (1999) *J Virol*. 73:4145-55.
22. De Clercq, E., Yamamoto, N., Pauwels, R., Balzarini, J., Witvrouw, M., De Vreese, K., Debyser, Z., Rosenwirth, B., Peichl, P., & Datema, R. (1994) *Antimicrob Agents Chemother* 38, 668-74.
23. Murakami, T., T. Nakajima, Y. Koyanagi, K. Tachibana, N. Fujii, H. Tamamura, N. Yoshida, M. Waki, A. Matsumoto, O. Yoshie, T. Kishimoto, N. Yamamoto, & T. Nagasawa (1997) *J Exp Med*. 186:1389-93.
24. Tamamura, H., R. Arakaki, H. Funakoshi, M. Imai, A. Otaka, T. Ibuka, H. Nakashima, T. Murakami, M. Waki, A. Matsumoto, N. Yamamoto, & N. Fujii (1998) *Bioorg Med Chem*. 6:231-8.
25. de Vreese, K., V. Kofler-Mongold, C. Leutgeb, V. Weber, K. Vermeire, S. Schacht, J. Anne, E. de Clercq, R. Datema, & G. Werner (1996) *J Virol*.

70:689-96.

26. Maeda, Y., M. Foda, S. Matsushita, & S. Harada (2000) *J Virol* 74:1787-93.
27. Baba, M., Nishimura, O., Kanzaki, N., Okamoto, M., Sawada, H., Iizawa, Y., Shiraishi, M., Aramaki, Y., Okonogi, K., Ogawa, Y., Meguro, K. & Fujino, M. (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 5698-703.
28. Clavel, F., Guetard, D., Brun-Vezinet, F., Chamaret, S., Rey, M. A., Santos-Ferreira, M. O., Laurent, A. G., Dauguet, C., Katlama, C., & Rouzioux, C. (1986) *Science* 233, 343-6.
29. Westervelt, P., Gendelman, H. E. & Ratner, L. (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 3097-101.
30. Gartner, S., Markovits, P., Markovitz, D. M., Kaplan, M. H., Gallo, R. C. & Popovic, M. (1986) *Science* 233, 215-9.
31. Collman, R., Balliet, J. W., Gregory, S. A., Friedman, H., Kolson, D. L., Nathanson, N. & Srinivasan, A. (1992) *J Virol* 66, 7517-21.
32. Shirasaka, T., Yarchoan, R., O'Brien, M. C., Husson, R. N., Anderson, B. D., Kojima, E., Shimada, T., Broder, S. & Mitsuya, H. (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 562-6.
33. Uchida, H., Maeda, Y. & Mitsuya, H. (1997) *Antiviral Res* 36, 107-13.
34. Felgner, J. H., Kumar, R., Sridhar, C. N., Wheeler, C. J., Tsai, Y. J., Border, R., Ramsey, P., Martin, M. & Felgner, P. L. (1994) *J Biol Chem* 269, 2550-61.
35. Floch, V., Audrezet, M. P., Guillaume, C., Gobin, E., Le Bolch, G., Clement, J. C., Yaouanc, J. J., Des Abbayes, H., Mercier, B., Leroy, J. P., Abgrall, J. F. & Ferec, C. (1998) *Biochim Biophys Acta* 1371, 53-70.
36. Sakai, A., Hirabayashi, Y., Aizawa, S., Tanaka, M., Ida, S. & Oka, S. (1999) *Kansenshogaku Zasshi* 73, 205-12.
37. Shirasaka, T., Kavlick, M. F., Ueno, T., Gao, W. Y., Kojima, E., Alcaide, M. L., Chokekijchai, S., Roy, B. M., Arnold, E., Yarchoan, R. & Mitsuya, H. (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 2398-402.
38. Tanaka, M., Srinivas, R. V., Ueno, T., Kavlick, M. F., Hui, F. K., Fridland, A., Driscoll, J. S. & Mitsuya, H. (1997) *Antimicrob Agents Chemother* 41, 1313-8.
39. Schols, D., Proost, P., Van Damme, J. & De Clercq, E. (1997) *J Virol* 71, 7300-4.

40. Moriuchi, H., Moriuchi, M. & Fauci, A. S. (1998) *J Exp Med* 187, 1689-97.
41. Marechal, V., Arenzana-Seisdedos, F., Heard, J. M. & Schwartz, O. (1999) *J Virol* 73, 3608-15.
42. Prichard, M. N., Prichard, L. E. & Shipman, C., Jr. (1993) *Antimicrob Agents Chemother* 37, 540-5.
43. Greco, W. R., Bravo, G. & Parsons, J. C. (1995) *Pharmacol Rev* 47, 331-85.
44. Tersmette, M., Gruters, R. A., de Wolf, F., de Goede, R. E., Lange, J. M., Schellekens, P. T., Goudsmit, J., Huisman, H. G. & Miedema, F. (1989) *J Virol* 63, 2118-25.
45. Schuitemaker, H., Kootstra, N. A., de Goede, R. E., de Wolf, F., Miedema, F. & Tersmette, M. (1991) *J Virol* 65, 356-63.
46. Connor, R. I., K. E. Sheridan, D. Ceradini, S. Choe, & N. R. Landau (1997) *J Exp Med.* 185:621-8.
47. Singh, A. & Collman, R. G. (2000) *J Virol* 74, 10229-35.
48. Margolis, L. B., Glushakova, S., Grivel, J. C. & Murphy, P. M. (1998) *J Clin Invest* 101, 1876-80.
49. Kinter, A., Catanzaro, A., Monaco, J., Ruiz, M., Justement, J., Moir, S., Arthos, J., Oliva, A., Ehler, L., Mizell, S., Jackson, R., Ostrowski, M., Hoxie, J., Offord, R. & Fauci, A. S. (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 11880-5.
50. Mosier, D. E., Picchio, G. R., Gulizia, R. J., Sabbe, R., Pognard, P., Picard, L., Offord, R. E., Thompson, D. A. & Wilken, J. (1999) *J Virol* 73, 3544-50.
51. Este, J. A., Cabrera, C., Blanco, J., Gutierrez, A., Bridger, G., Henson, G., Clotet, B., Schols, D. & De Clercq, E. (1999) *J Virol* 73, 5577-85.
52. Rusconi, S., La Seta Catamancio, S., Citterio, P., Bulgheroni, E., Croce, F., Herrmann, S. H., Offord, R. E., Galli, M. & Hirsch, M. S. (2000) *J Virol* 74, 9328-32.
53. Chou, T. C. & Talalay, P. (1984) *Adv Enzyme Regul* 22, 27-55.
54. Singer, I. I., Scott, S., Kawka, D. W., Chin, J., Daugherty, B. L., DeMartino, J. A., DiSalvo, J., Gould, S. L., Lineberger, J. E., Malkowitz, L., Miller, M. D., Mitnaul, L., Siciliano, S. J., Staruch, M. J., Williams, H. R., Zweerink, H. J. & Springer, M. S. (2001) *J Virol* 75, 3779-90.
55. Salazar-Mather, T. P., Orange, J. S. & Biron, C. A. (1998) *J Exp Med* 187, 1-14.

56. Zhou, Y., Kurihara, T., Ryseck, R. P., Yang, Y., Ryan, C., Loy, J., Warr, G. & Bravo, R. (1998) *J Immunol* 160, 4018-25.
57. Liu, R., Paxton, W. A., Choe, S., Ceradini, D., Martin, S. R., Horuk, R., MacDonald, M. E., Stuhlmann, H., Koup, R. A. & Landau, N. R. (1996) *Cell* 86, 367-77.
58. Samson, M., Libert, F., Doranz, B. J., Rucker, J., Liesnard, C., Farber, C. M., Saragosti, S., Lapoumeroulie, C., Cognaux, J., Forceille, C., Muyldermans, G., Verhofstede, C., Burtonboy, G., Georges, M., Imai, T., Rana, S., Yi, Y., Smyth, R. J., Collman, R. G., Doms, R. W., Vassart, G. & Parmentier, M. (1996) *Nature* 382, 722-5.
59. Woitas, R. P., G. Ahlenstiel, A. Iwan, J. K. Rockstroh, H. H. Brackmann, B. Kupfer, B. Matz, R. Offergeld, T. Sauerbruch, & U. Spengler (2002) *Gastroenterology*. 122:1721-8.
60. Fischereder, M., B. Luckow, B. Hoher, R. P. Wuthrich, U. Rothenpieler, H. Schneeberger, U. Panzer, R. A. Stahl, I. A. Hauser, K. Budde, H. Neumayer, B. K. Kramer, W. Land, & D. Schlondorff (2001) *Lancet*. 357:1758-61.
61. Schols, D., Claes, S., De Clercq, E., Hendrix, C., Bridger, G., Calandra, G., Henson, W., Fransen, S., Huang, W., Whitcomb, J. M., Petropoulos, C. J., & AMD-3100 HIV Study Group. (2002) *The 9th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections.*, Seattle, WA., February 24-28, 2002 (Abstr. 2)
62. Reynes, J., Rouzier, R., Kanouni, T., Baillat, V., Baroudy, B., Keung, A., Hogan, C., Markowitz, M., & Laughlin, M. (2002) *The 9th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections.*, Seattle, WA., February 24-28, 2002 (Abstr. 1)
63. Hendrix, C. W., Flexner, C., MacFarland, R. T., Giandomenico, C., Fuchs, E. J., Redpath, E., Bridger, G. & Henson, G. W. (2000) *Antimicrob Agents Chemother* 44, 1667-73.
64. Dragic, T., A. Trkola, D. A. Thompson, E. G. Cormier, F. A. Kajumo, E. Maxwell, S. W. Lin, W. Ying, S. O. Smith, T. P. Sakmar, & J. P. Moore (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:5639-44.