

(4)

氏名(本(国)籍)	小林 雅典(滋賀県)
推薦教員名	岐阜大学 教授 福士 秀人
学位の種類	博士(獣医)
学位記番号	獣医博乙第125号
学位授与年月日	平成25年9月24日
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学位論文題目	The Studies on Novel Integrase Inhibitor of Human Immunodeficiency Virus (ヒト免疫不全ウイルスの新規インテグラーゼ阻害剤に関する研究)
審査委員	主査 岐阜大学 教授 福士 秀人 副査 帯広畜産大学 准教授 小川 晴子 副査 岩手大学 教授 村上 賢二 副査 東京農工大学 教授 水谷 哲也 副査 岐阜大学 教授 石黒 直隆

学位論文の内容の要旨

抗ウイルス薬はウイルス感染症の治療に大きな役割を担っているが、現在までヘルペスウイルスやインフルエンザウイルスなど特定のウイルス感染症に適用されている。抗ウイルス薬による治療が可能なウイルス感染症にヒト免疫不全ウイルス(HIV)による後天性免疫不全症候群(AIDS)がある。本研究では、HIVのインテグラーゼに対する新規阻害剤の作用機序およびHIVの耐性に着目し、新規抗ウイルス薬の探索の基礎を得ることを目的とした。本論文は二章から構成されている。

第1章では、抗ウイルス薬存在下でHIVを増殖させ、インテグラーゼ阻害剤耐性変異株を分離する方法を開発した。さらに本法を用いてL-870,810, raltegravir, elvitegravir and S/GSK-364735化合物について耐性ウイルスを分離した。最初にHIV-1 IIIIB株及びインテグラーゼ阻害剤S-1360及び関連化合物を用い、耐性ウイルス分離率を各種細胞株で比較した。その結果、MT-2細胞を使用した場合耐性ウイルスが短期間の継代で出現し、多様性が見られることが判った。また、分離継代初頭の濃度を比較的高くすることで変異の多様性が認められた。本法を用い、S/GSK-364735, raltegravir, L-870,810及びelvitegravirの耐性ウイルス分離を実施した。S/GSK-364735を用いたところ13日まではアミノ酸変異は認められなかったが、変異体が確認された。raltegravirを用いた場合には、計13種の異なる単一及び複数変異が確認された。L-870,810存在下での分離培養では、計13種の異なる変異が検出された。L-870,810で認められたアミノ酸変異はraltegravirのそれとは異なっていた。elvitegravirでは、計15種の異なる変異が確認された。部位特異的変異導入により作製した40種のインテグラーゼ耐性変異分子クローンを対象に各インテグラーゼ阻害剤に対する感受性を調べたところ、S/GSK-364735は20種、raltegravirでは17種、elvitegravirでは27種、L-870,810では23種のウイルスで感受性が低下した。12種のウイルスは検索したすべてのインテグラーゼ阻害剤に高度耐性であった。本法を用いる

ことによって、インテグラーゼ高度耐性ウイルスが迅速に分離可能であり、その中に複数の変異が組み合わさった耐性ウイルスが含まれることが判った。

第2章では、次世代インテグラーゼ阻害剤 S/GSK1349572 の *in vitro* 抗ウイルス特性を作用機作、インテグラーゼ耐性変異分子クローンをを用いた耐性プロファイル及び耐性ウイルス分離の観点から解析した。S/GSK1349572 はウイルス DNA のインテグレーションを阻害していることが定量的 PCR 解析により明らかとなった。HIV-1 IIIB 株を用いた *in vitro* 耐性ウイルス分離を実施した。S/GSK1349572 を用いた実験では、4 種の変異が確認されたが、すべての変異は高度耐性を示さなかった。raltegravir では高度耐性変異が確認された。部位特異的変異導入により作製した 50 種のインテグラーゼ耐性変異分子クローンを対象に S/GSK1349572 を始めとする各インテグラーゼ阻害剤に対する感受性を調べた。2 種の変異ウイルスにおいて感受性が 10 倍以上低下したが、S/GSK1349572 は raltegravir 及び elvitegravir 耐性ウイルスに対し限られた交叉性を示すのみであった。他の異なるクラスの抗 HIV 薬との相互作用について検討したところ、アンタゴニズム活性や組み合わせによる毒性の増強も認められなかった。S/GSK1349572 は raltegravir 及び elvitegravir とは全く異なる耐性プロファイルを有し、インテグラーゼのストランドトランスファーを阻害することが示唆された。

以上の研究は、抗ウイルス薬の臨床開発に向けた候補化合物の選択に理論的根拠を提示し、さらに臨床研究継続に強力な礎を与える。

審査結果の要旨

本研究は、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) のインテグラーゼに対する新規阻害剤の作用機序および HIV の耐性に着目し、新規抗ウイルス薬の探索の基礎を得ることを目的としている。本論文は二章から構成されている。

第1章では、インテグラーゼ阻害剤 S-1360 および関連化合物の存在下で HIV を増殖させ、インテグラーゼ阻害剤耐性変異株を分離する方法を開発した。さらに本法を用いて L-870,810, raltegravir, elvitegravir and S/GSK-364735 化合物について耐性ウイルスを分離した。最初に HIV-1 IIIB 株及び インテグラーゼ阻害剤 S-1360 及び関連化合物を用い、耐性ウイルス分離率を各種細胞株で比較した。その結果、MT-2 細胞を使用した場合耐性ウイルスが短期間の継代で出現し、多様性が見られることが判った。また、分離継代初頭の濃度を比較的高くすることで変異の多様性が認められた。本法を用い、S/GSK-364735, raltegravir, L-870,810 及び elvitegravir の耐性ウイルス分離を実施した。S/GSK-364735 を用いたところ 13 日まではアミノ酸変異は認められなかったが、変異体が確認された。raltegravir を用いた場合には、計 13 種の異なる単一及び複数変異が確認された。L-870,810 存在下での分離培養では、計 13 種の異なる変異が検出された。L-870,810 で認められたアミノ酸変異は raltegravir のそれとは異なっていた。elvitegravir では、計 15 種の異なる変異が確認された。部位特異的変異導入により作製した 40 種のインテグラーゼ耐性変異分子クローンを対象に各インテグラーゼ阻害剤に対する感受性を調べたところ、S/GSK-364735 は 20 種、raltegravir では 17 種、elvitegravir では 27 種、L-870,810 では 23 種のウイルスで感受性が低下した。12 種のウイルスは検索したすべてのインテグラーゼ阻害剤に高度耐性であった。本法を用いることによって、インテグラーゼ高度耐性ウイルスが迅速に分離可能であり、その中に複数の変異が組み合わさった耐性ウイルスが含まれることが判った。

第2章では、次世代インテグラーゼ阻害剤である S/GSK1349572 の *in vitro* 抗ウイルス特性を作用機作、インテグラーゼ耐性変異分子クローンをを用いた耐性プロファイル及び耐

性ウイルス分離の観点から解析した。S/GSK1349572 はウイルス DNA のインテグレーションを阻害していることが定量的 PCR 解析により明らかとなった。HIV-1 IIIB 株を用いた *in vitro* 耐性ウイルス分離を実施した。S/GSK1349572 を用いた実験では、4 種の変異が確認されたが、すべての変異は高度耐性を示さなかった。raltegravir では EC₅₀ が 100 倍以上低下する高度耐性変異が確認された。部位特異的変異導入により作製した 50 種のインテグラーゼ耐性変異分子クローンを対象に S/GSK1349572 を始めとする各インテグラーゼ阻害剤に対する感受性を調べた。2 種の変異ウイルスにおいて感受性が 10 倍以上低下したが、S/GSK1349572 は raltegravir 及び elvitegravir 耐性ウイルスに対し限られた交叉性を示すのみであった。他の異なるクラスの抗 HIV 薬との相互作用について検討したところ、アンタゴニズム活性や組み合わせによる毒性の増強も認められなかった。

S/GSK1349572 は raltegravir 及び elvitegravir とは全く異なる耐性プロファイルを有し、インテグラーゼのストランドトランスファーを阻害することが示唆された。

以上の研究は、抗ウイルス薬の臨床開発に向けた候補化合物の選択に理論的根拠を提示し、さらに臨床研究継続に強力な礎を与えるものである。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Selection of diverse and clinically relevant integrase inhibitor-resistant human immunodeficiency virus type 1 mutants
著 者 名 : Kobayashi, T., Nakahara, K., Seki, T., Miki, S., Kawauchi, S., Suyama, A., Wakasa-Morimoto, C., Kodama, K., Endoh, T., Oosugi, E., Matsushita, Y., Murai, H., Fujishita, T., Yoshinaga, T., Garvey, E., Foster, S., Underwood, M., Johns, B., Sato, A. and Fujiwara, T.
学術雑誌名 : Antiviral Research
巻・号・頁・発行年 : 80(2):213-222, 2008
- 2) 題 目 : *In vitro* antiretroviral properties of S/GSK1349572, a next-generation HIV integrase inhibitor
著 者 名 : Kobayashi, M., Yoshinaga, T., Seki, T., Wakasa-Morimoto, C., Brown, K.W., Ferris, R., Foster, S.A., Hazen, R.J., Miki, S., Suyama-Kagitani, A., Kawauchi-Miki, S., Taishi, T., Kawasuji, T., Johns, B.A., Underwood, M.R., Garvey, E.P., Sato, A. and Fujiwara, T.
学術雑誌名 : Antimicrobial Agents and Chemotherapy
巻・号・頁・発行年 : 55(2):813-821, 2011

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Epitope mapping of capsid proteins VP2 and VP3 of infectious bursal disease virus
著 者 名 : Yamaguchi, T., Iwata, K., Kobayashi, M., Ogawa, M., Fukushi, H. and Hirai, K.
学術雑誌名 : Archives of Virology
巻・号・頁・発行年 : 141(8):1493-1507, 1996

- 2) 題 目 : Pseudotyped lentivirus vectors derived from simian immunodeficiency virus SIVagm with envelope glycoproteins from paramyxovirus
著 者 名 : Kobayashi, M., Iida, A., Ueda, Y. and Hasegawa, M.
学術雑誌名 : Journal of Virology
卷・号・頁・発行年 : 77(4):2607-2614, 2003
- 3) 題 目 : The naphthyridinone GSK364735 is a novel, potent human immunodeficiency virus type 1 integrase inhibitor and antiretroviral
著 者 名 : Garvey, E.P., Johns, B.A., Gartland, M.J., Foster, S.A., Miller, W.H., Ferris, R.G., Hazen, R.J., Underwood, M.R., Boros, E.E., Thompson, J.B., Weatherhead, J.G., Koble, C.S., Allen, S.H., Schaller, L.T., Sherrill, R.G., Yoshinaga, T., Kobayashi, M., Wakasa-Morimoto, C., Miki, S., Nakahara, K., Noshi, T., Sato, A. and Fujiwara, T.
学術雑誌名 : Antimicrobial Agents and Chemotherapy
卷・号・頁・発行年 : 52 (3): 901-908, 2008
- 4) 題 目 : Secondary mutations in viruses resistant to HIV-1 integrase inhibitors that restore viral infectivity and replication kinetics
著 者 名 : Nakahara, K., Wakasa-Morimoto, C., Kobayashi, M., Miki, S., Noshi, T., Seki, T., Kanamori-Koyama, M., Kawauchi, S., Suyama, A., Fujishita, T., Yoshinaga, T., Garvey, E.P., Johns, B.A., Foster, S.A., Underwood, M.R., Sato, A. and Fujiwara, T.
学術雑誌名 : Antiviral Research
卷・号・頁・発行年 : 81(2):141-146, 2009