

細胞毒性を利用した HIV-1 プロテアーゼ阻害剤 新規評価法の確立

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科新興感染症病態制御学系専攻 布施 隆行

【目的】 HIV 治療は、ウイルス増殖に必須な逆転写酵素とプロテアーゼ (PR) を標的とした阻害剤による多剤併用療法 (HAART) の確立によって AIDS 進行および死亡率が劇的に減少した。特に HIV-1 PR 阻害剤の使用は、血中ウイルス量の減少や免疫細胞である CD4, CD8 陽性 T 細胞の増加が有意に認められて、非常に効果的である。しかしながら、これらの治療薬は HIV 感染症の根本的な治療には至らず、HIV を体内なら排除する事ができない。そのため患者は治療薬を長期間服用し続ける必要があり、副作用などの問題が残されている。さらに HIV 患者の体内では、阻害剤に耐性を示すウイルス株が高頻度に出現している事から、新規阻害剤の開発が依然として極めて重要な課題となっている。

迅速な阻害剤の開発には、その活性を簡便に評価できる方法の確立が重要である。現在の HIV PR 阻害剤評価法は、大きく細胞培養系と無細胞系に別けられる。一般的な方法は、生ウイルスを使用した HIV 感染実験であり、阻害剤活性の検出感度が非常に高い。しかし、その安全性の問題からウイルスを使用しない簡便な評価系の開発が求められている。近年、より安全な実験として大腸菌や哺乳類細胞系を利用した簡便な評価法が報告された。しかし、これらの方法は阻害剤の検出感度が極めて低く、十分な評価法の開発には至らなかった。このような観点から、本研究では、より高感度に阻害剤活性を評価する事が可能な HIV-1 PR 阻害剤評価法の確立を目的に研究を行った。

【方法】

1. HIV-1 PR 発現細胞株の樹立: HIV-1 PR は、PCR 法により遺伝子を増幅し、EGFP との融合蛋白質として構築した。EGFP-PR は Tet-off system を利用して発現誘導型 HIV-1 PR 細胞株, E-PR293 細胞を樹立した。この細胞における遺伝子発現は、ドキシサイクリン (Dox) によって制御されており、培養液中に Dox が存在する事で EGFP-PR の発現が抑制される。
2. EGFP を利用した評価法の確立: E-PR293 細胞は、Dox 非存在下で種々の濃度の PR 阻害剤 (Saquinavir (SQV), Nelfinavir (NFV), pepstatin A, and PMSF) を細胞に加えた。48 時間培養後、単位面積あたりの EGFP 蛍光を測定し、

各阻害剤における HIV-1 PR への阻害活性を検討した (Fig. 1A)。 また、同条件において、細胞に WST-1 試薬を加え、2 時間 37°C で反応させた後、OD450-650 nm における吸収波長を測定し、細胞増殖量を検討した (Fig. 1B)。

3. 細胞毒性を利用した評価法の確立: E-PR293 細胞は、Dish よりはがし DMEM で洗浄して Dox を除いた後、種々の濃度の PR 阻害剤の入った well に Re-plate した。 48 時間後、WST-1 assay により細胞増殖量を測定した。各阻害剤の活性は Dox 処理した細胞における WST-1 反応量を 100% とした相対値により算出した。

【結果および考察】

1. 樹立した E-PR293 細胞は、Tet-off system で遺伝子発現が制御されており、細胞から Dox を除くと速やかに HIV-1 PR の発現が誘導された。
2. EGFP 蛍光は、HIV-1 PR 特異的な阻害剤である SQV、NFV を処理した細胞でのみ検出され、阻害剤濃度依存的に蛍光強度が強くなった (Fig. 1A)。 各阻害剤における EGFP 蛍光は、HIV-1 PR 阻害剤 1 μ M 以上で有意差を得た。EGFP 蛍光は、SQV 10 μ M において最も高く検出され、20 μ M において若干の減少が見られた。 また、NFV では、20 μ M 処理によって大きく蛍光が減少した。 この原因は、HIV-1 PR 阻害剤による細胞毒性であり、5~10 μ M 以上の HIV-1 PR 阻害剤によって細胞毒性が誘導された (Fig. 1B)。

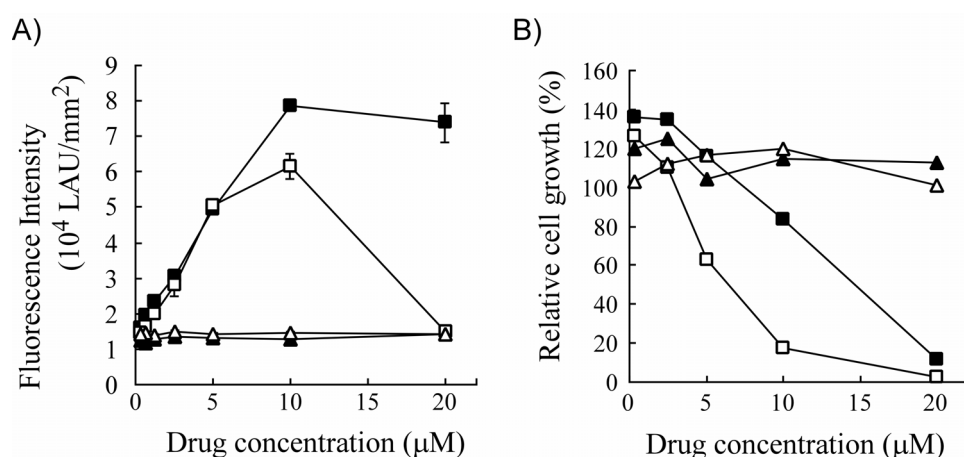


Fig. 1 EGFP 蛍光を利用した阻害剤評価法について。 (A) EGFP 蛍光による阻害剤評価法。 LAU/mm²: 単位面積あたりの蛍光強度。 (B) HIV-1 PR 阻害剤による E-PR293 細胞への細胞毒性。 シンボルは共に SQV (■), NFV (□), Pepstatin A (▲), PMSF (△)を示す。

3. E-PR293 細胞は HIV-1 PR の発現を誘導した状態で Dish に Re-plate する事で、顕著な細胞毒性が誘導された (Fig. 2A)。この細胞毒性は、HIV-1 PR 特異的な阻害剤によってのみ強く抑えられ、濃度依存的に生細胞量が増加した (Fig. 2B)。それぞれの阻害剤における 50%細胞毒性抑制濃度 (IC_{50}) を算出した結果、SQV, NFV において阻害剤の活性が 30~40 nM で検出された。

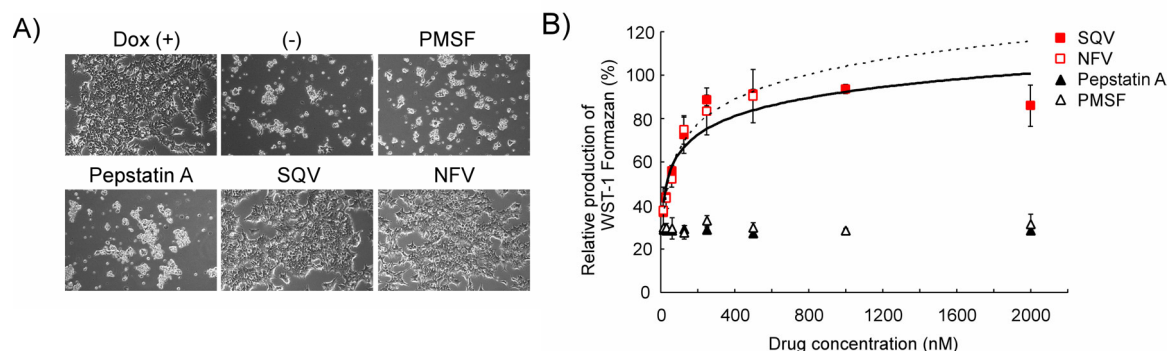


Fig. 2. 細胞毒性を利用した阻害剤評価法について。(A) HIV-1 PR による細胞毒性の誘導。写真は各阻害剤 (2 μ M), Dox (100 ng/ml) を処理し 48 時間後の細胞形態。(B) 細胞毒性を利用した HIV-1 PR 阻害剤評価法。

【まとめ】

本研究では、従来困難であった HIV-1 PR 発現細胞株の樹立を、Tet-off system を利用し、遺伝子発現がドキシサイクリンによって制御される誘導発現型細胞株として初めて成功した。EGFP を利用した評価法は、阻害剤活性の検出範囲が μ M レベルであり、従来報告されたものと同程度であった。一方、細胞毒性を利用した HIV-1 PR 阻害剤評価法は、活性の検出感度が nM レベルに達し、従来法で最も高感度な測定法である HIV-1 感染実験に匹敵した。本評価法は、多種多様なサンプルに対して迅速に評価できる High through-put な評価系として応用ができ、ウイルスを使用しない利点は、多くの研究分野で精力的な HIV-1 PR 阻害剤開発へつながると期待している。