

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
モーハン・シャレード Mohan Sharad	主査 教授 佐野 浩 一 副査 教授 林 秀 行 副査 教授 古谷 榮 助 副査 教授 清水 章 副査 教授 森 浩 志
主論文題名 Evidence for the cellular uptake of anti-HIV-1 double drug KNI-1039 (抗 HIV-1 ダブルドラッグ KNI-1039 の細胞内取り込みについて)	
学位論文内容の要旨	
<p>《研究の目的》</p> <p>Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) 感染症の標準的な治療は多剤併用療法 (Highly active antiretroviral therapy: HAART) である。HAART はウイルス増殖過程の複数点を阻害することによって耐性ウイルスの出現を抑制するために考案されたものである。しかし、臨床的には複数の薬剤を併用することの負担や副作用の増強などにより服用し続けることに困難を生じることが問題となっている。そこで、逆転写酵素阻害剤 (RTI) とプロテアーゼ阻害剤 (PRI) を glutaryl-glycine で結合したダブルドラッグが設計・合成されたが、設計どおりに細胞に取り込まれ、細胞内で元の化合物に分解され、それぞれの作用を発揮するか否かは不明である。</p> <p>そこで本研究では Liquid chromatography / mass spectrometry (LC/MS) を用いて、ダブルドラッグが細胞内に入り、細胞内で分解されて元の化合物を生成しているか否か、そして HIV-1 急性感染系と持続感染系それぞれの系で逆転写酵素とプロテアーゼが阻害されているか否かを明らかにすることを目的とした。</p> <p>《材料と方法》</p> <p>ヒト Tリンパ球樹立培養細胞に PRI である KNI-727、RTI である AZT、両者の混合物および両者の架橋化合物である KNI-1039 をそれぞれ加えて培養し、冷蒸留水にて溶解した超遠心上清を LC/MS のサンプルとした。KNI-1039、KNI-727、AZT の分子量は各化合物をメタノール・5 mM 酢酸アンモニウム 3:7 混合液に溶解して測定し、測定条件を決定した。</p>	

細胞に KNI-727、AZT、両者の混合物、両者の架橋化合物 KNI-1039 をそれぞれ接種し、HIV-1 LAV 株を感染させ 3 日間培養した。遠心洗浄した培養細胞を溶解液にて処理し PCR にて proviral DNA を検出し、逆転写産物の有無を検討した。

HIV-1 持続感染細胞に KNI-727、AZT、両者の混合物、両者の架橋化合物 KNI-1039 をそれぞれ加えて 4 日間培養し、常法にて電子顕微鏡観察しウイルスの成熟過程を観察した。

《結果と考察》

KNI-1039、KNI-727、AZT で処理した細胞内にそれぞれの化合物を検出できるか否かを明らかにするために、細胞の可溶化超遠心上清を LC/MS にて測定した。その結果、KNI-727 で処理した細胞には分子イオンピーク m/z 556 および 578 のピーク、AZT 単剤の場合には m/z 223 および 266 のピークが、そして混合物の場合これらのピークがすべて検出された。またダブルドラッグ KNI-1039 で処理した細胞には m/z 976 および 998 のピークが認められた。さらに KNI-1039 で処理した細胞には AZT と KNI-727 特異ピークが観察された。これらの結果より、KNI-1039 接種細胞内にはダブルドラッグ KNI-1039 及び元の化合物 AZT と KNI-727 のすべてが存在することが明らかとなり、ダブルドラッグが効率よく細胞内に取り込まれ、細胞内で元の化合物に分解されていることが示された。

KNI-1039 で処理した細胞内で生成した AZT が RTI として働いているか否かを明らかにするため、急性感染系にてプロウイルス DNA 合成阻害の有無を PCR 法で調べた。その結果、細胞毒性を示す濃度以下である 30 μ M の KNI-1039 を作用させたときプロウイルス DNA の合成が認められなかった。これは AZT を単剤、あるいは AZT・KNI-727 混合物として作用させた場合と同様であり、ダブルドラッグから生成した AZT が逆転写酵素を阻害しウイルスの増殖を抑制するものと考えた。

さらに KNI-1039 を接種した細胞内で分解された KNI-727 がプロテアーゼ阻害剤として働いているか否かを明らかにするため、HIV 持続感染系を用い、ウイルス粒子内プロテアーゼの作用によって起こるウイルス成熟過程を電子顕微鏡で解析した。その結果、KNI-727、KNI-727・AZT 混合物と同様に KNI-1039 を接種した細胞外には成熟 HIV 粒子は観察されず、そのほとんどが未熟粒子であった。AZT を接種した細胞では 90% 以上のウイルス粒子は成熟粒子であった。これらの結果は細胞内で KNI-1039 から KNI-727 が生成し、プロテアーゼ阻害剤として作用していることを示しているものと考えた。

今回の LC/MS 解析の結果より、ダブルドラッグは設計目的のとおり細胞に取り込まれ、細胞内で元の化合物に分解されることが明らかとなった。KNI-1039 は無細胞系では逆転写酵素阻害作用は有さないが、KNI-727 に比べ弱いプロテアーゼ阻害作用をもつ。従って細胞内でみられた強い逆転写酵素阻害活性は KNI-1039 から AZT が生成していることを示すものと考えられると同時に、強いプロテアーゼ阻害活性は KNI-1039 から生成した KNI-727 によるものであると考えられる。これらのことから、ダブルドラッグが drug delivery system として有効に働くものと考えられ、さらに他の逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤を用いたダブルドラッグの設計とその有効性の検討が望まれる。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	モーハン・シャレード Mohan Sharad
論文審査担当者		主 査 教授 佐 野 浩 一	
		副 査 教授 林 秀 行	
		副 査 教授 古 谷 榮 助	
		副 査 教授 清 水 章 志	
		副 査 教授 森 浩 志	
主論文題名 Evidence for the cellular uptake of anti-HIV-1 double drug KNI-1039 (抗 HIV-1 ダブルドラッグ KNI-1039 の細胞内取り込みについて)			
論文審査結果の要旨			
<p>HIV 逆転写酵素阻害剤と HIV プロテアーゼ阻害剤をリンカーにて結合させたダブルドラッグが最近開発されたが、リンパ球内への取り込みや細胞内での変化、HIV-1 感染細胞における抗ウイルス作用に関する研究は未だ行なわれていない。</p> <p>申請者は glutaryl-glycine リンカーで逆転写酵素阻害剤 AZT とプロテアーゼ阻害剤 KNI-727 を結合させた KNI-1039 存在下で培養したリンパ球の細胞質内容物中に KNI-1039 および元の物質である AZT と KNI-727 が存在することをクロマトグラフィーにて証明した。また、HIV 感染細胞内で、KNI-1039 が逆転写酵素によるプロウイルス DNA の合成とプロテアーゼによる HIV 粒子の成熟を阻害することを示し、ダブルドラッグ KNI-1039 が細胞内に取り込まれ、分解されて元の物質になりそれぞれの作用を発揮していることを明らかにした。</p> <p>以上、ダブルドラッグ KNI-1039 が細胞内に取り込まれ元の物質を生成してそれぞれの抗 HIV 作用を示すことから、ダブルドラッグの理論を実用化できる可能性があるとしている。</p> <p>本研究は無細胞系で構築されたダブルドラッグの理論に、細胞培養系での知見を加えることによって、実用化への可能性を明らかにしたもので、今後の抗 HIV 薬開発に重要な示唆を与えるものである。</p> <p>以上により、本論文は本学大学院学則第 9 条に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p> <p>(主論文公表誌) Bulletin of the Osaka Medical College 51(2): 50-60, 2005</p>			