

2000/034 ~ 1050

創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業

平成12年度

エイズ医薬品等開発研究

研究報告書

財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

平成12年度

エイズ医薬品等開発研究

研究報告書

目 次

課題番号

第1分野 抗エイズウイルス薬、エイズ不随症状に対する治療薬の開発に関する研究

10101	国内未承認エイズ治療薬等を用いたHIV感染症治療薬及びHIV感染症至適治療法の開発に係る応用研究	福武 勝幸	……	1
10102	エイズ医薬品候補物質のスクリーニング研究	棚元 憲一	……	13
10103	HIV第二受容体拮抗剤を基盤分子とする戦略的抗エイズ剤の創製と実用化	藤井 信孝	……	16
10104	HIVインテグラーゼおよび複製を制御する蛋白質を標的とする抗ウイルス剤の開発	藤原 民雄	……	22
10105	アポトーシス抑制作用を有する新規抗エイズ薬の開発	吉野公一郎	……	28
10106	細胞性因子を標的にした抗HIV薬の開発研究	金岡 昌治	……	35
10107	カリニ肺炎のゲノム創薬研究	西村 暹	……	46
10108	逆転写酵素阻害剤の併用療法に関する研究	湯浅 聡	……	51
10109	難薬剤耐性且つ多機能を指向した抗エイズ薬の開発及び抗CCR5-CXCR4キメラ環状テトラデカペプチド抗体による感染防御	加藤 英夫	……	61
10110	遺伝子発現制御機能を持つ亜鉛サイクレン錯体による抗エイズ薬の研究	山本 直彦	……	72
10111	HIV-1の細胞侵入機構の解析による抗エイズウイルス薬の開発	鈴木 達夫	……	77
10113	新規クロニング翻訳調節蛋白やIL-15、IL-16、CD26阻害剤によるエイズおよびエイズ付随症状の治療・診断研究	岩倉洋一郎	……	88

第2分野 エイズワクチン等エイズ発症防止薬の開発に関する研究

10201	HIV日本人株及び東南アジア株に対するワクチンの開発とAIDS予防法に関する研究	小室 勝利	……	99
10202	HIV-1vpr遺伝子を用いたHIV感染細胞のアポトーシスによる排除技術の開発	森田 裕	……	115
10204	HIVによる免疫機能不全を治療・予防する新規ワクチンの開発	金子有太郎	……	121

第3分野 抗エイズ薬開発のための基盤技術の開発等に関する研究

10301	エイズ治療薬開発のための評価スクリーニング系の開発	永井 美之	……	133
10303	HIVの病原性遺伝子Nefを標的とした抗AIDS薬開発のための基盤研究	松田 道行	……	144

第1分野

抗エイズウイルス薬、エイズ不随症状
に対する治療薬の開発に関する研究

遺伝子発現制御機能を持つ亜鉛サイクレン錯体による 抗エイズ薬の研究

所 属：名古屋大学大学院医学研究科
国際保健医療学
主任研究者：山本 直彦

要旨

亜鉛サイクレン錯体の抗 HIV 活性の増強には、錯体の多核化が重要な役割を持っていることが判明した。そこで、亜鉛サイクレン錯体の多量化を行う際に、前年度のように、ベンゼン環だけでなく、二環性あるいはそれ以上の大きなサイズの芳香族化合物もスパーサーとして有効であることが、新たに分かり、そのうち、3種類の芳香族ペンダント型亜鉛サイクレン錯体 (Hiro-02, 03, 10) に高い抗 HIV 活性がみられた。この化合物は M-tropic の HIV には活性を示さず、T-tropic の HIV のみ増殖を抑制した。しかし、T-tropic HIV の感染に関わっているとされる細胞表面のセカンドレセプター CXCR4 分子に対するモノクロナール抗体、4種類について、その阻害作用を検討したところ、いずれも影響はみられなかった。このことは、従来にはない新しい作用メカニズムによる抗 HIV 活性の可能性も否定できない。その後、この化合物に対する耐性 HIV 株を分離し得たので、現在、その耐性ウイルスの遺伝子を解析中である。

また、これら新規化合物の臨床応用に向けて、より臨床に近い状態での効果をみるために、臨床分離株や臨床耐性株の迅速かつ高効率な分離法を見出し、現在それらに対する効果を検討中である。さらにリード化合物を設定し、臨床治療薬の開発に向けて、小動物を用いた前臨床試験を計画している。

1. 研究組織

- (1) 名古屋大学大学院医学研究科 国際保健医療学 山本直彦 助教授
- (2) 東京大学大学院理科系研究科 化学専攻 塩谷光彦 教授
- (3) 大鵬薬品工業株式会社 創薬センター化学研究所 浅尾哲次 所長
- (4) 愛知県衛生研究所 ウイルス部 森下高行 主任研究員
- (5) 国立名古屋病院 臨床研究部、金田次弘 専任研究員
- (6) 大阪府立公衆衛生研究所、大竹徹、主任研究員

2. 研究目的

核酸分子を選択的に認識する金属錯体および金属配位能をもつ新規人工ヌクレオシド誘導体と、エイズウイルス増殖抑制作用との構造活性相関を調べ、より有効な抗エイズ薬を開発することを目的とする。核酸分子を選択的に認識する化合物は HIV の増殖過程において従来の薬剤にない新規の段階で作用する事が期待される。

3. 研究方法

亜鉛サイクレン錯体および人工ヌクレオチドを有機合成し、構造解析、溶液内平衡を分析し、pH 滴定性法によりこれら合成物とチミンあるいはウラシル塩基の核酸分子との総合作用の程度を評価する。

(1) 抗 HIV 活性の評価：MTT 法により、EC50 (50% Effective Concentration ; 50%ウイルス増殖抑制濃度) および CC50 (50% Cytotoxic Concentration; 50%細胞増殖抑制濃度) を測定した。すなわち、新規合成された化合物を 96 well microplate 上に triplicate で 5段階希釈し、 2×10^5 /ml に調整した MT-4 細胞に Mock あるいは $100 \times$ CCID50/ml の HIV-1(IIIB) を感染し、5日間培養後、MTT ; 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide を加え、生細胞がこの MTT を取り込み、発色した度合を ELISA で測定した。

上記アッセイで抗 HIV 活性のみられた化合物についてさらに、他のウイルス株 (RF, NL432) やマクロファージ好性分離株 (Ba-L), AZT 耐性分離株 (A018C, A012D), HIV 感染患者からの多剤耐性臨床分離株 (KK-36-5, KK-81-3) に対する活性を測定した。

(2) 逆転写酵素 (RT) に及ぼす影響：非放射性 RT 活性測定法 (旭化成) を応用し、RT 反応におよぼす薬剤の影響を測定した。

(3) 巨細胞形成に及ぼす影響：HIV-1(LAI 株) に持続感染している MOLT-4 細胞と非感染の MOLT-4 細胞を混合培養し、巨細胞形成に対する薬剤の影響を調べた。

(4) MAGIC-5A 細胞における T-tropic (T 細胞好性) および M-tropic (マクロファージ好性) ウイルスの

影響：CCR5 遺伝子を CD4 陽性 HeLa 細胞に導入した MAGIC-5A 細胞を用いた。2 種の T-tropic HIV-1 株 (LAI, NL432) および 5 種の M-tropic HIV-1 株 (Ba-L, JR-FL, KK-20, KK-23, KK-27) を薬剤存在下で MAGIC-5A 細胞へ感染させ、b-galactosidase を発現し青色を呈する細胞数を指標に抗ウイルス活性を測定した。

(5) 細胞のセカンドレセプターに及ぼす影響：細胞表面の CD4、CXCR4、CCR5 分子とそれぞれに対するモノクロナル抗体の結合に及ぼす薬剤の影響をフローサイトメーターを用いて調べた。すなわち、CD4 の HIV 結合部位に対する抗体(抗 Leu3a)と MT-4 細胞、4 種の抗 CXCR4 抗体(12G5, 44708.111, 44716.111, 44717.111)と MOLT-4 細胞、4 種の抗 CCR5 抗体(2D7/CCR5, CCR5-529, 3A9, 45531.111)と MAGI-CCR5 細胞。

(6) HIV-1 のエンベロープ蛋白に及ぼす影響：HIV-1 の gp120 の V3 領域に対するモノクロナル抗体(0.5b) と gp120 を細胞表面に表出している HIV-1(LAI)に持続感染している MOLT-4 細胞との反応に及ぼす影響をフローサイトメーターを用いて調べた。

(7) MAGIC-5A 細胞における硫酸化修飾シクロデキストリン (mCDS71) 耐性ウイルスの増殖に及ぼす影響：3 種の硫酸化修飾シクロデキストリン (mCDS71) 耐性ウイルスおよび野性株 (NL432, A018C, KK-1 およびそれぞれの mCDS71 耐性株) を薬剤存在下で MAGIC-5A 細胞へ感染させ、2 日後に b-galactosidase を発現し青色を呈する細胞数を指標に抗ウイルス活性を測定した。

3. 研究成果

(1) 抗 HIV 活性

3 種類の芳香族ペンダント型亜鉛サイクレン錯体に高い抗 HIV 活性が見られた。すなわち Hiro-02; EC₅₀ :0.8 μg/ml, CC₅₀ :635.3 μg/ml, Selectivity Index :794.1 倍, Hiro-03; EC₅₀ :3.2 μg/ml, CC₅₀ :>1000 μg/ml, Selectivity Index: >312.5 倍, Hiro-10; EC₅₀ :2.1 μg/ml, CC₅₀ :315.3 μg/ml, Selectivity Index :150 倍であった。

(2) HIV-1 の逆転写酵素活性に及ぼす影響

3 種の Hiro 化合物は RT 反応の抑制作用は示さなかった (Table 1)

(3) 巨細胞形成抑制能

3 種類の化合物は共に、デキストラン硫酸(DS8000)とほぼ同等に HIV-1 による巨細胞形成を抑制した (Table 1)。

(4) MAGIC-5A 細胞における T-tropic および M-tropic HIV の影響

3 種の Hiro 化合物は bicyclam(AMD3100)と同様、2 種の T-tropic HIV-1 株の増殖を抑制したが、5 種の M-tropic HIV-1 株の増殖には影響を及ぼさなかった。CCR5 を抑制する TAK-779 は 5 種の M-tropic HIV-1 株のみ増殖を抑制し、AZT は T-tropic および M-tropic 全てのウイルスに対して効果を示した (Table 2)。

(5) セカンドレセプターとそれらに対するモノクロナル抗体に及ぼす影響

Hiro 化合物は抗 CXCR4 モノクローナル抗体の結合を抑制しなかった (Table 3)。また抗 CCR5 モノクローナル抗体の細胞への結合は Hiro 化合物によりいくつかの抗体の結合が阻止された。すなわち、Hiro-02 は CCR5-529 と 3A9 を、Hiro-03 は 3A9 を、また Hiro-10 は CCR5-529 と 45531.111 をそれぞれ強く抑制した。CCR5 のアンタゴニストである TAK-779 は Hiro-10 と同じく CCR5-529 と 45531.111 の結合を強く抑制した (Table 4)。Hiro 化合物は細胞表面の CD4 分子に対するモノクローナル抗体 (抗 Leu3a) の MT-4 細胞との結合を抑制しなかった (Table 5)

(6) HIV-1 のエンベロープ蛋白に及ぼす影響

Hiro 化合物は HIV-1 の gp120 の V3 領域に対するモノクロナル抗体 (0.5b) と、gp120 を細胞表面に表出している HIV-1 (LAI) に持続感染している MOLT-4 細胞との反応に影響を及ぼさなかった (Table 5)

4. 考察

抗 HIV 作用との構造活性相関の解析から、亜鉛サイクレン錯体による抗 HIV 効果の増強には、錯体の多核化が重要な役割を持っていること明らかとなったため、新規設計、合成の際、亜鉛サイクレン錯体の多量化を行うにあたって、前年度のように、ベンゼン環だけでなく、二環性あるいはそれ以上の大きなサイズの芳香族化合物をスパーサーとして用いたところ、3 種類の芳香族ペンダント型亜鉛サイクレン錯体 (Hiro-02, 03, 10) に高い抗 HIV 活性がみられた。この化合物は T-tropic の HIV に対してのみ活性を示したにもかかわらず、T-tropic HIV

の感染に関わっているとされる CXCR4 分子に対するモノクローナル抗体、4種類について、その阻害作用を検討したところ、いずれも影響はみられなかった。その後、この化合物に対する耐性 HIV 株を分離したので、現在、その耐性ウイルスの遺伝子を解析中であるが、新しい作用メカニズムによる増殖抑制の可能性も否定できない。

また、より臨床に近い状態での効果をみるために、臨床分離株や臨床耐性株の迅速かつ高効率な分離法を見出し、現在それらに対する効果を検討中である。さらに、これら新規化合物の臨床応用に向けて、リード化合物を設定し、小動物を用いた前臨床試験を予定している。

今後は、

- (1) ウイルス侵入阻害作用を有する多核亜鉛サイクレン錯体の再分子設計
 - ①芳香環スパーサーや芳香族ペンダントを用いる多核亜鉛サイクレン錯体の構築
 - ②亜鉛サイクレン錯体を側鎖にもつペプチドを用いる多核亜鉛サイクレン錯体の構築
 - (2) 亜鉛サイクレン錯体の細胞内および細胞核内移行
 - ①亜鉛キャリア錯体を用いるサイクレン化合物の細胞内移入
 - ②ペプチドキャリアを用いる亜鉛サイクレン錯体の核内移行
 - (3) 他の金属イオンの効果
 - (4) 逆転写酵素をターゲットとする新規人工核酸ユニットの開発
- などにより、より有効な抗エイズ薬を見出すことができると期待される。

6. 結論

亜鉛サイクレン錯体の抗 HIV 活性の増強には、錯体の多核化が重要な役割を持っていることが判明した。そのうち、特に3種類の芳香族ペンダント型亜鉛サイクレン錯体 (Hiro-02, 03, 10) に高い抗 HIV 活性がみられた。現在、リード化合物を設定し、これら新規化合物の臨床応用に向けて、小動物を用いた前臨床試験を計画している。

7. 研究発表等

(1) 学会発表

「新規低分子化合物；ペンダント型亜鉛サイクレン錯体の抗 HIV 作用」

山本直彦、森下高行、佐藤克彦、内海真、金田次広、村上高哉、大竹徹、川畑拓也、森治代、浅尾哲次、塩谷光彦 第14回日本エイズ学会総会、2000年、京都

(2) 論文発表

1. N.Yamamoto, T.Otake, T.Kawahata, H.Mori, T.Morishita, K.Sato, M.Utsumi, T.Kaneda, T.Murakami, K.Tanaka, T.Koike, E.Kimura, T.Asao and M.Shionoya: Effect of Aromatic Pendant Zn-Cyclen Complex on Human Immunodeficiency Virus Replication . *Antiviral Chem. Chemother in preparation*
2. H. Kurosaki, K Hayashi, M. Goto, M. Shionoya, and E. Kimura : Synthesis and Characterization of Zn(II) Complex of A Bleomycin Analogue *Inorg. Chem. Commun.* **3**, 107-110 (2000).
3. X. H. Bu, H. Morishita, K. Tanaka, K. Biradha, and M. Shionoya : Spontaneously Resolved Chiral Molecular Box: A Cyclic Tetranuclear Zn^{II} Complex with DPTZ (DPTZ = 3,6-Di-2-pyridyl-1,2,4,5-tetrazine) *Chem. Commun.* 971-972 (2000).
4. M. Shionoya and K. Tanaka: Synthetic Incorporation of Metal Complexes into Nucleic Acids and Peptides Directed toward Functionalized Molecules *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **73**, 1945-1954 (2000).
5. Hatano, K. Tanaka, M. Shiro, and M. Shionoya: Self-Assembly of Chelator-Type Adenine Mimics into a Single-Stranded Zn^{II} Coordination Polymer *Chem. Lett.* 822-823 (2000).
6. X.-H. Bu, M. Du, Z.-L. Shang, R.-H. Zhang, D.-Z. Liao, M. Shionoya, and T. Clifford: Varying Coordination Modes and Magnetic Properties of Copper(II) Complexes with Diazamesocyclic Ligands by Altering Additional Donor Pendants on 1,5-Diazacyclooctane (DACO) *Inorg. Chem.* **39**, 4190-4199 (2000).
7. H. Cao, K. Tanaka, and M. Shionoya: An Alternative Base Pairing of Catechol-Bearing Nucleosides by Borate Formation *Chem. Pharm. Bull.* **48**(11) 1745-1748 (2000).
8. X.-H. Bu, K. Biradha, T. Yamaguchi, M. Nishimura, T. Ito, K. Tanaka, and M. Shionoya
Novel Polymeric AgI Complex Consisting of Two Three-Dimensional Networks Which Are Enantiometric and Interpenetrating *Chem. Commun.* 1953-1954 (2000).

9. K. Yamaguchi, F. Akagi, S. Fujinami, M. Suzuki, M. Shionoya, and S. Suzuki Hydrolysis of Phosphodiester with Hydroxo- or Carboxylate-Bridged Dinuclear Ni(ii) and Cu(II) Complexes *Chem. Commun.* 375-376 (2001).
10. H. Kurosaki, H. Yoshida, A. Fujimoto, M. Goto, M. Shionoya, E. Kimura, E. Espinosa, J.-M. Barbe, and R. Guilard : Synthesis and crystal structures of palladium(II) complexes of 1,11-bis(2-pyridylmethyl)-1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane-5,7-dione *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 441-447 (2001).
11. X.-H. Bu , M. Du , L. Zhang , D.-Z. Liao , J.-K. Tang , R.-H. Zhang, and M. Shionoya: Novel Nickel(II) Complexes with Diazamesocyclic Ligands Functionalized by Additional Phenol Donor Pendant(s): Synthesis, Characterization, Crystal Structures and Magnetic Properties *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 593-598 (2001).
12. X.-H. Bu, M. Du, L. Zhang, Z.-L. Shang, R.-H. Zhang, and M. Shionoya: Novel Copper(II) Complexes with Diazamesocyclic Ligands Functionalized by Additional Donor Group(s): Syntheses, Crystal Structures and Magnetic Properties *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 729-735 (2001).
13. K. Tanaka, M. Tasaka, H. Cao, and M. Shionoya: An Approach to Metal-Assisted DNA Base Pairing; Novel b-C-Nucleosides with a 2-Aminophenol or a Catechol as the Nucleobase *Eur. J. Pharm. Sci.* in press.
14. X.-H. Bu, M. Du, K. Tanaka, M. Shionoya, and M. Shiro: Nickel-Mediated Alcoholysis Reaction of Carbon-Nitrogen Triple Bond: Structural Characterization of an Unprecedented Moisture Stable Imido Ester with a Single E-Configuration *Inorg. Chem. Commun.* in press.
15. X.-H. Bu, M. Du, Z.-L. Shang, L. Zhang, Q.-H. Zhao, R.-H. Zhang, and M. Shionoya
Novel Diazamesocyclic Ligands Functionalized by Pyridyl Donor Group(s): Synthesis, Crystal Structure and Properties of their Copper(II) Complexes *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* in press.
16. X.-H. Bu, W. Chen, S.-L. Lu, R.-H. Zhang, W.-M. Bu, M. Shionoya, and F. Brisse: Flexible meso- Bis(disulfinyl) Ligands as Building Blockes for Novel Copper(II) Coordination Polymers with Unique Multi-Dimensional Networks. Cavity Control by Varing the Chain Length of the Ligands *Angew. Chem. Int. Ed.*, in press.
17. X.-H. Bu, H. Liu, and M. Du, K. M.-C. Wong, V. W.-W. Yam, M. Shionoya : Novel Silver(I) Complexes with Polypyridyl Bridging Ligands: Synthesis, Crystal Structure, Spectroscopic and Electrochemical Properties *Inorg. Chem.*, in press.

Table 1 The effects of Hiro compounds on giant cell formation and RT activity in vitro

Compounds	IC50(micro g/mL)of giant cell formation (10micro g/mL)	%Inhibition of RT activity
Hiro-02	16	0
Hiro-03	57	0
Hiro-10	40	0
DS8000	12	98.5

Table 2 The effect of Hiro compounds on the replication of T-tropic and M-tropic HIV-1 in MAGIC-5a cells

Compounds	IC50						
	T-tropic virus		M-tropic virus				
	LAI	NL432	Ba-L	JR-FL	KK-20	KK-23	KK-27
Hiro-02*	0.8	0.21	>50	>50	>50	>50	>50
Hiro-03*	3.2	0.62	>50	>50	>50	>50	>50
Hiro-10*	2.1	1.29	>50	>50	>50	>50	>50
Bicyclam*	0.002	0.001	>50	>50	>50	>50	>50
TAK-779**	>10	>10	0.051	0.032	0.11	0.091	0.041
AZT**	0.001	0.0029	0.002	0.0059	0.011	0.005	0.007

*µg/mL **µM

Table 3 The inhibitory effect of the compounds on the binding of anti-CXCR4 mAb to the MOLT-4 cells

anti-CXCR4 mAb	% inhibition				
	Hiro-02*	Hiro-03*	Hiro-10*	Bicyclam **	DS8000*
12G5	-8.2	-1.5	20.9	95.1	-3.6
44708.111	-1.4	-0.5	4.5	81.1	6.5
44716.111	-9.0	11.9	28.2	88.2	30.5
44717.111	-1.0	-0.5	2.7	83.1	13.5

* 100µg/mL **10µg/mL

Table 4 The inhibitory effect of the compounds on the binding of anti-CCR5 mAb to the MAGIC-5a cells

anti-CCR5 mAb	% inhibition			
	Hiro-02*	Hiro-03*	Hiro-10*	TAK-779**
2D7	0.9	0.7	7.5	2.9
CCR5-529	52.3	22	89.6	77.2
3A9	95.4	90.1	54.5	-19.2
45531.111	2.6	-0.3	37.6	55.9

* 100µg/mL **10µg/mL

Table 5 The inhibitory effect of the compounds on the binding of anti-gp-120 and anti-CD4 mAb to the cells

mAb	% inhibition			
	Hiro-02*	Hiro-03*	Hiro-10*	DS8000*
anti-gp120(0.5β)	13.1	11.5	0.9	76.9
anti-CD4 (anti Leu3a)	-10.4	7.2	7.0	28.5

*100µg/mL

平成12年度

エイズ医薬品等開発研究
研究報告書

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社

