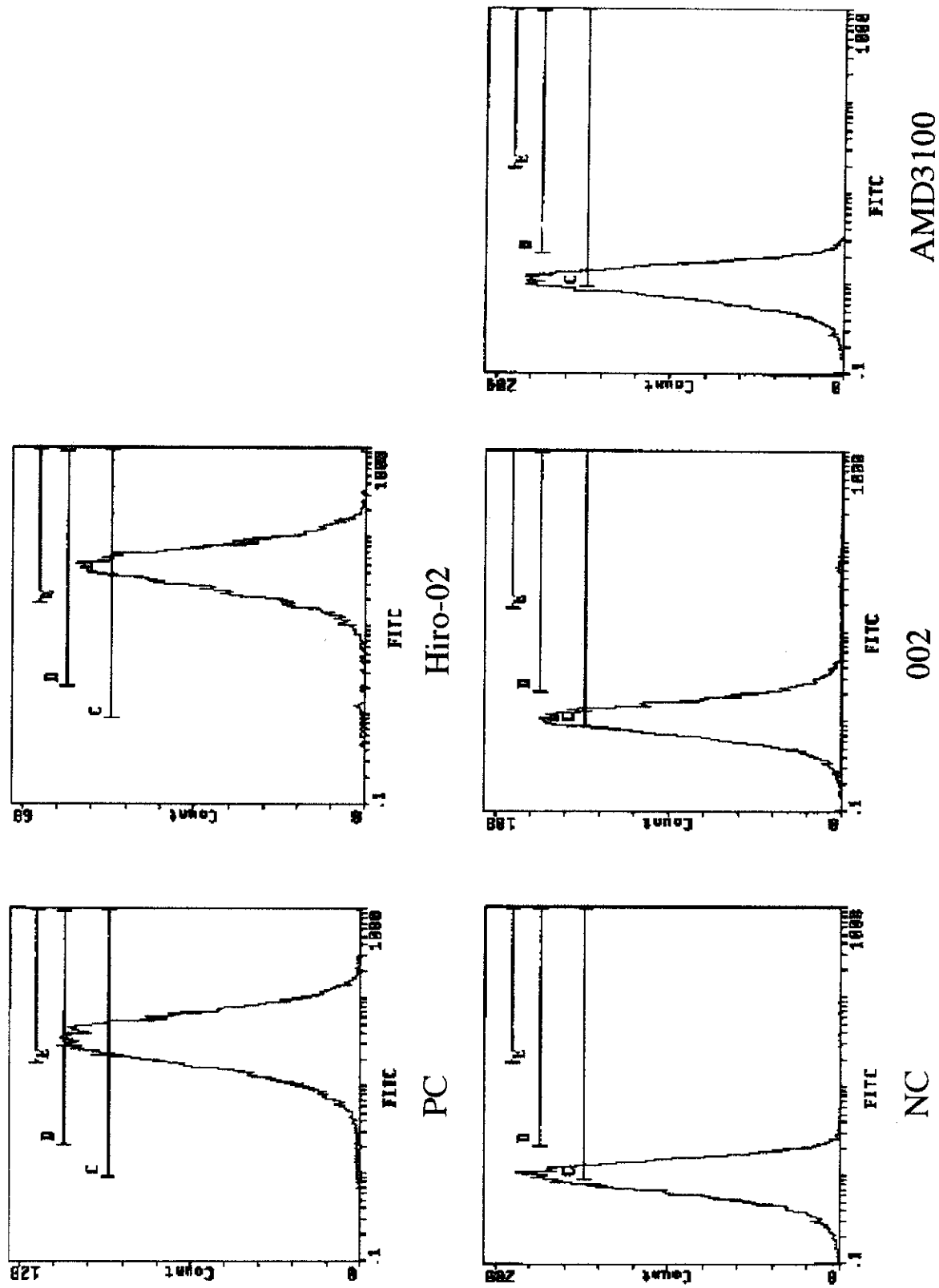


Figure 1: Binding activity of 12G5-for CXCR4 with samples

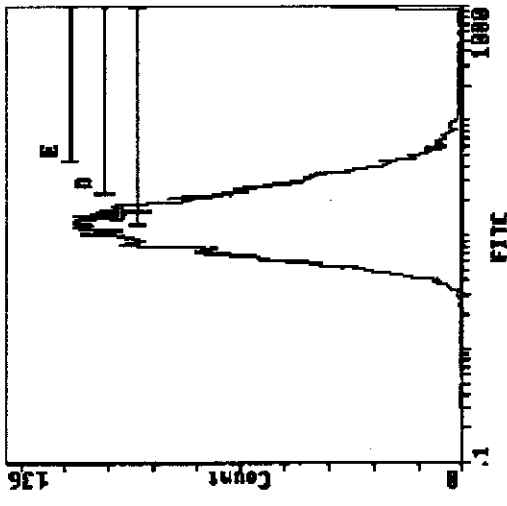


AMD3100

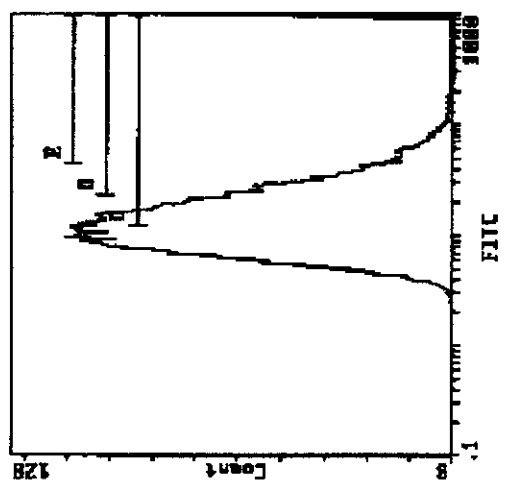
002

NC

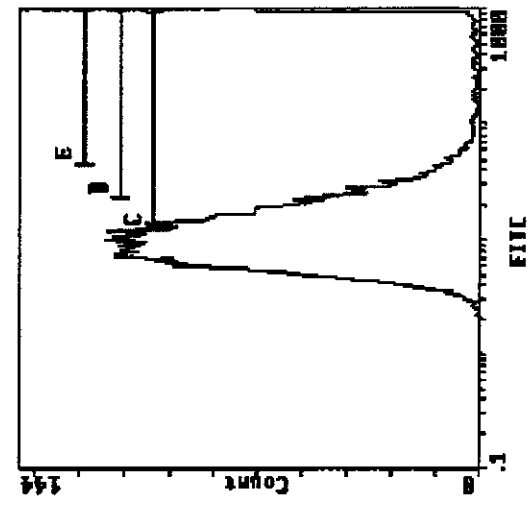
Figure 2. Binding activity of 0.5β for gp120 with samples



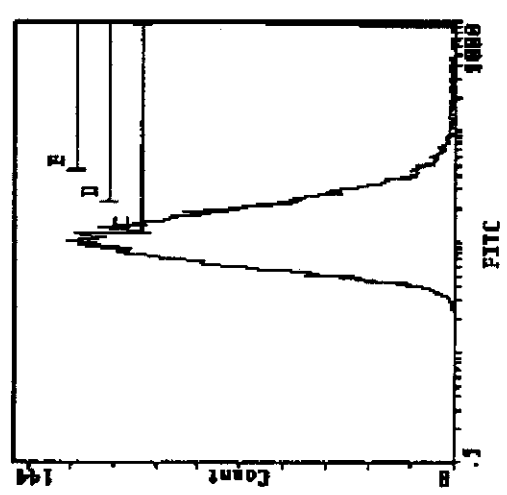
Hiro-02



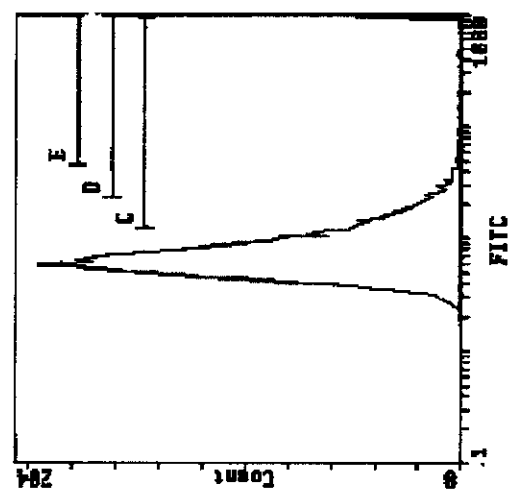
002



DS8000



PC



NC

厚生労働科学研究費補助金（創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業）
分担研究報告書

芳香族ペンダント型亜鉛サイクレン錯体に対する耐性 HIV 株の遺伝子解析

分担研究者 金田 次弘（国立名古屋病院）

研究協力者 伊部 史朗（国立名古屋病院）

研究要旨

新規抗 HIV 化合物、芳香族ペンダント型亜鉛サイクレン錯体（Hiro compounds）は T-tropic HIV に対して増殖抑制作用を示すものの、CXCR4 に対する種々の monoclonal 抗体に対して何ら影響を与えず、従来の CXCR4 阻害剤とは性質を異にしている。この化合物に対する耐性ウイルスを分離し、ENV 領域のアミノ酸配列を解析したところ、わずか 276 番目の AGA (R) が AAA (K) に置換されているのみであった。そこで、この点変異をもつ recombinant virus を作成し、抗 HIV 活性 (EC_{50}) を検討したところ、約 4 倍の耐性を獲得していた。この耐性度は、治療経過中に薬剤耐性を示した患者から得られたウイルスの耐性においても時にみられる程度である。この作用点における点変異をもつ recombinant virus の解析は他に例がなく、HIV 感染初期の巨細胞形成および細胞侵入過程における遺伝子レベルの解明に意義深いものであり、さらに、抗 HIV 活性と化合物の構造活性相関は新たな化合物の化学修飾に有用となるので、今回の結果の有意性と意義について、今後、解析を繰り返し、慎重に検討していく。

目的

新たに抗 HIV 活性のみられた芳香族ペンダント型亜鉛サイクレン錯体（Hiro compounds）の巨細胞形成および細胞侵入過程における遺伝子レベルの解明を行うため、この化合物（Hiro-02）に対する点変異をもつ recombinant virus を作成し、その抗 HIV 活性を検討した。

方法

サブタイプ B に属する HXB2 のプロウイルスが組込まれた感染性 HIV-1 クローン pPMN2 を鋳型とし、プライマー 7425F (5'-AAAACGTCTCAAAAAAATCCGTATCCA GAGAGGAC-3') と MK616 (5'-AATGGTG AATATCCCTGCCTAACTCTATT-3') または、プライマー 5318F (5'-GATATAGCA CACAAGTAGACC-3') と 7425R (5'-TTTTCTCTCTTTTTTCTTGTATTGTTGTTGGG-3') の組み合わせを用いて PCR を行なった。

DNA 合成酵素は、Pyrobest DNA polymerase (Takara, Osaka, Japan) を用いた。PCR のプログラムは、1 cycle of pre-PCR (45sec at 94°C), 15 cycle of PCR (15sec at 94°C, 40sec at 50°C, and 120sec at 72°C) で構成した。それぞれの PCR 産物を Sal I と BsmBI、または、Oli I と BsmBI を用いて制限酵素処理した後、この DNA 断片を pPMN2 の Sal I と Oli I 部位に組み込んだ。得られたプラスミドに目的の変異が導入されていることと目的以外の変異が生じていないことをシーケンシングにより確認した。

感染性クローンの発現は発現実験前夜に 24 穴プレートに MT-2 細胞を 1×10^5 /well 培養し、翌日、精製した感染性クローン DNA を、1well あたり 500ng をリポフェクタミンを用いてトランスフェクションした。2~3 日間培養し、ウイルス液を回収し、MTT 法で抗 HIV 活性を調べた。

(倫理面への配慮)

本研究は薬剤耐性株の遺伝子解析が目的であり、人および動物を対象としていないため、倫理面には問題ない。

結果

Hiro-02 の HIV-1 野生株に対する抗 HIV 活性 (EC_{50}) は $0.8 \mu\text{g/ml}$ であったのに対し、上記により得られた recombinant virus に対する EC_{50} は $3.5 \mu\text{g/ml}$ と約4倍の耐性を獲得していた。

考察

耐性 HIV-1 (IIIB 株)は T-tropic の HIV に対してのみ増殖抑制効果を示すものの、CXCR4 に対する種々の monoclonal 抗体に対して何ら影響を与えず、従来報告されている CXCR4 阻害剤とは性質を異にしている。この化合物に対する耐性ウイルスを分離し、ENV 領域のアミノ酸配列を解析したところ、わずか276番目のAGA (R) がAAA (K) に置換されているのみであった(Table 1)。そこで、この点変異をもつ recombinant virus を作成し、抗 HIV 活性 (EC_{50}) を検討したところ、約4倍の耐性を獲得していた。この耐性度は、治療経過中に薬剤耐性を示した患者から得られたウイルスの耐性においても時にみられる程度である。この作用点における点変異をもつ recombinant virus の解析は他に例がなく、HIV 感染初期の巨細胞形成および細胞侵入過程における遺伝子レベルの解明に意義深いものであり、さらに、抗 HIV 活性と化合物の構造活性相関は新たな化合物の化学修飾に有用となるので、今回の結果の有意性と意義については、今後、解析を繰り返し、慎重に検討していきたい。

発表論文

1. Selection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Variants with an Insertion Mutation in the P6^{gag} and P6^{pol} Genes Under Highly Active Antiretroviral Therapy. hirou Ibe, Naomi Shibata, Makoto Utsumi and Tsuguhiko Kaneda Microbiol. Immunol., 47, 71-79 (2003).
2. 金田次弘、和田かおる、萩原智子、永井裕美、白阪琢磨。
「プロウイルス DNA 量のマーカーとしての意義。」日本臨床、特集「HIV/AIDS 研究の進歩」60, 694-702 (2002).
3. 金田次弘、白阪琢磨。
「HIV-1 感染症/エイズ治療遂行のためのモニタリング・システムの構築の進展」医療 56, 727-728, 2002.
4. 浅黄 司、伊部史朗、金田次弘、鈴木博義、手塚文明、西村秀一、佐藤 功、山崎孝文。
「HIV-1 薬剤耐性検査の問題点とその克服。」医療 56, 734-735, 2002.
5. 金田次弘、萩原智子、服部純子、永井裕美、内海 眞、和田かおる。
「PNA-ISH 法による HIV-1 プロウイルス検出法の開発と応用。」医療 56, 738-740, 2002.
6. 長岡宏一、伊藤洋貴、大木 剛、中井正彦、鷺坂昌史、竹田信也、間宮均人、宇佐美好子、金田次弘。
「プロテアーゼ阻害剤血中濃度の測定」の実際。医療 56, 741-742, 2002.

知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む)

特になし

Table 1

Amino acid substitution in gp120 V3-C5 of Hiro-resistant strain

	V3 loop												V4 loop			CD4 binding domain							
	248	256	268	272	274	276	280	290	295	299	357	366	367	368	369	370	371	376	388	390	392	403	423
HXB2wt (x1)*	T	V	R	N	R	S	Q	I	N	A	S	F	N	S	T	W	S	N	P	R	K	K	L
Hiro-02 ^r (x375)	K
Hir0-03 ^r (x94)	K
Hir0-10 ^r (x71)	K	F
SID791 ^r (x300)	.	.	.	S	T	R	H	V	H	T	L

*Numbers in parenthesis represent the fold increase in EC₅₀ as compared with wild-type EC₅₀

厚生労働科学研究費補助金（創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業）
分担研究報告書

新薬開発にむけての分析と評価

分担研究者 北里 健二（大鵬薬品工業株式会社）

研究要旨

亜鉛サイクレン錯体と HIV 増殖抑制作用との構造活性相関を分析し、ペンダント型亜鉛サイクレン錯体のうち、今年度、新たにナフタレンをスペーサーとする二核錯体（Hiro-02 Dimer）に高い抗 HIV 活性が見いだされたため、この Hiro-02 Dimer をリード化合物として、臨床応用に向けての開発立案を行った。

研究目的

核酸分子を選択的に認識する亜鉛サイクレン錯体と HIV 増殖抑制作用との構造活性相関を調べることにより、より有効な新しい抗エイズ薬リード化合物を探索し、臨床応用に向けての開発立案を行うことを目的とする。

研究方法

より有効な新しい抗エイズ薬リード化合物について、毒性や ADME（吸収・分布・代謝・排泄）試験を行い、安全係数の高い化合物を選択して前臨床試験に移行する。

（倫理面への配慮）

本研究の複核亜鉛サイクレン錯体による前臨床試験は、臨床第 1 相試験開始までの非臨床試験であるので、研究対象者に対する倫理面には問題なく、実験動物に対して愛護上の配慮が必要となる。これに関しては、「動物の愛護及び管理に関する法律（法律第 105 号）」「実験動物の飼育及び保管等に関する基準（総理府告示第 6 号）」および大鵬薬品工業内の動物倫理規定を遵守して研究にあたることとする。

研究成果

亜鉛サイクレン錯体と HIV 増殖抑制作用との構造活性相関を分析し、ペンダント型亜鉛サイクレン錯体のうち、今年度、新たにナ

フタレンをスペーサーとする二核錯体（Hiro-02 Dimer）に高い抗 HIV 活性が見いだされたため、この Hiro-02 Dimer をリード化合物として、臨床応用に向けての開発立案を行った。

また、新たに新規化合物（49 種類）を合成し、抗 HIV 活性を分担研究者である森下高行博士（愛知県衛生研究所）に依頼した。

（森下分担研究報告書、Table 3, 4）

考察

これまでの研究結果により、抗 HIV 活性を示す亜鉛サイクレン錯体は単核よりも複核に強く、さらにスペーサーが meta の位置に架橋した複核亜鉛錯体により強い活性を示すことが明らかとなっており、今年度新規に合成された Hiro-02 Dimer はこの HIV 増殖抑制作用と構造活性相関を分析に基づくものである。今年度はこの Hiro-02 Dimer をリード化合物として、動物実験を行っていく予定であったが、今年度の研究事業採択決定（9 月）からの期間が短く、動物実験に必要な化合物の大量合成を行うにとどまった。次年度、小動物を対象に毒性および ADME（吸収・分布・代謝・排泄）試験を行う予定である。

なお、今年度新たに合成した化合物から、高い抗 HIV 活性を示すものは見いだされなかった。

発表論文

1. Nukatsuka M, Fijioka A, Nakagawa F, -fluoropyrimidine (DIF) and non-DIF alone or in combination with paclitaxel against orthotopically implanted human breast cancer. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2002 May;29(5):803-6.
2. Shibao K, Izumi H, Nakayama Y, Ohta R, Nagata N, Nomoto M, Matsuo K, Yamada Y, Kitazato K, Itoh H, Kohno K. Expression of UDP-N-acetyl-alpha-D Galactosamine-polypeptide galNAc N-acetylgalactosaminyl transferase-3 in relation to differentiation and
- Ohshimo H, Kitazato K, Fukushima M. The antitumor activity of DPD Inhibitory Prognosis in patients with colorectal carcinoma. *Cancer*. 2002 Apr 1;94(7):1939
3. Basaki Y, Miyadera K, Yonekura K, Aoyagi K, Chikahisa L, Okabe S, Hashimoto A, Kitazato K. Gamma-hydroxybutyric acid, a metabolite of UFT, shows antiangiogenic activities and antitumor effect. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2002 Jan;29(1):89-94.

研究成果の刊行に関する一覧表

1. K. Tanaka, M. Tasaka, H. Cao, and M. Shionoya, "Toward Nano-Assembly of Metals through Engineered DNAs" *Supramol. Chem.* **14**, 255-261 (2002).
2. A. Hatano, K. Tanaka, M. Shiro, and M. Shionoya, "Synthesis of Nucleic Acid Mimics Designed for Metal-Induced Strand Formation on DNA" *Tetrahedron* **58**, 2965-2972 (2002).
3. K. Tanaka, Y. Yamada, and M. Shionoya, "Formation of Silver(I)-Mediated DNA Duplex and Triplex through an Alternative Base Pair of Pyridine Nucleobases" *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 8802-8803 (2002).
4. S. Aketani, K. Tanaka, K. Yamamoto, A. Ishihama, H. Cao, A. Tengeji, S. Hiraoka, M. Shiro, and M. Shionoya, "Syntheses and Structure-Activity Relationships of Nonnatural β -C-Nucleoside 5'-Triphosphates Bearing an Aromatic Nucleobase with Phenolic Hydroxy Groups: Inhibitory Activities against DNA Polymerases" *J. Med. Chem.* **45**, 5594-5603 (2002).
5. K. Tanaka, A. Tengeji, T. Kato, N. Toyama, M. Shiro, and M. Shionoya, "Efficient Incorporation of A Copper Hydroxypyridone Base Pair in DNA" *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 12494-12498 (2002).
6. J. Chiba, K. Tanaka, Y. Ohshiro, R. Miyake, S. Hiraoka, M. Shiro, and M. Shionoya, "Artificial Nucleosides Possessing Metal Binding Sites at the 3' - and 5' -Positions of the Deoxyribose Moieties" *J. Org. Chem.* **68**, 331-338 (2003).
7. K. Tanaka, A. Tengeji, T. Kato, N. Toyama, and M. Shionoya, "A Discrete Self-Assembled Metal Array in Artificial DNA" *Science in press.*
8. Honkoshi H, Kinomoto M, Kurosu T, Komoto S, Shiraga M, Otake T, Mukai T, Ikuta K. Resting CD4+ T cells with CD38+CD62L+ produce interleukin-4 which contributes to enhanced replication of T-tropic human immunodeficiency virus type 1. *Virology*, 293,94-102,2002
9. El-Mekawy S, Meselhy MR, Abdel-Hafez A A M, Nakamura N, Hattori M, Kawahata T, Otake T. Inhibition of cytopathic effect of human immunodeficiency virus type-1 by various phorbol derivatives. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 50, 523-529, 2002
10. Komoto S, Kinomoto M, Honkoshi H, Shiraga M, Kurosu T, Mukai T, Auwanit W, Otake T, Oishi I, Ikuta K. Ability to induce p53 and caspase-mediated apoptosis in primary CD4+ T cells is variable among primary isolates of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 18, 435-446, 2002
11. Ma C, Nakamura N, Miyashiro H, Hattori M, Komatsu K, Kawahata T, Otake T. Screening of Chinese and Mongolian herbal drugs for anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) activity. *Phytotherapy Research*, 16, 186-189, 2002
12. Ma C, Nakamura N, Hattori M, Kawahata T, Otake T. Inhibition effects of triterpene-azidothymidine conjugates on proliferation of human immunodeficiency virus type 1 and its protease. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 50, 877-550, 2002
13. Shirou Ibe, Naomi Shibata, Makoto Utsumi and Tsuguhiko Kaneda: Selection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Variants with an Insertion Mutation in the P6^{pro} and P6^{td} Genes under Highly Active Antiretroviral Therapy. *Microbiol. Immunol.*, 47, 71-79 (2003).

20021237

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。