

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

「HIV-1 の遺伝子発現とウィルス増殖を制御する

新たな治療薬剤開発のための研究」

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 杉浦 互

平成16年3月

目 次

I.	総括研究報告書	
	HIV-1 の遺伝子発現とウイルス増殖を制御する新たな治療薬開発のための研究 ……………	1
	国立感染症研究所 エイズ研究センター	杉浦 互
II.	分担研究報告書	
1.	候補阻害物質による HIV-1 感染増殖抑制能の解析 ……………	4
	国立感染症研究所 エイズ研究センター	杉浦 互
	富山化学工業株式会社 総合研究所	野村伸彦
2.	インテグラーゼ阻害剤の探索 ～組み換え酵素の構造と機能に関する研究～ ……………	18
	東京大学医科学研究所 先端医療研究センター	北村義浩
3.	薬物毒性の解析 ……………	21
	～抗 HIV-1 薬剤を評価するための小動物実験系の確立～	
	国立成育医療センター研究所	木村廣光
4.	微生物由来のインテグラーゼ阻害剤の探索 ……………	25
	北里大学薬学部微生物薬品製造学教室	田中晴雄
5.	化合物の選定及び合成 ～新規合胞体形成阻害剤の検索～ ……………	28
	富山化学工業株式会社 総合研究所	野村伸彦
6.	プロテアーゼ阻害剤の探索 ……………	31
	国立感染症研究所 エイズ研究センター	松田善衛
III.	研究成果の刊行に関する一覧表 ……………	34

I. 総括研究報告書

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）
HIV-1 遺伝子発現とウイルス増殖を制御する新たな治療薬開発のための研究
総括研究報告書

主任研究者 杉浦 互 国立感染症研究所 エイズ研究センター 第2研究グループ長

研究要旨

この研究では HIV-1 感染症を治療するための新たな薬開発を試みる。1996 年以降多剤併用療法が実施されるようになり、HIV-1 感染症の治療状況は大きく好転した。しかしながら薬耐性ウイルスの出現が新たな難問として浮上しており、薬耐性症例を救済するための新たな治療薬が求められている。このような背景から、我々は既存の治療薬とは交叉耐性を持たない薬の開発を目指してきた。低分子化合物ライブラリおよび放線菌・真菌ライブラリを対象にインテグラーゼ阻害剤、プロテアーゼ阻害剤、合胞体阻害剤などを検索した結果、インテグラーゼ阻害化合物 14 種類、合胞体形成阻害化合物 6 種類、作用機序は明確ではないが *in vitro* で HIV-1 の増殖を阻害する化合物 12 種類を見出した。これらの化合物の中には細胞毒性が低く、治療への応用の可能性が期待されるものがあり、今後はこれらの化合物をリードとしてさらに薬開発を進め、ヒトへの実用化を目指していく。

分担研究者

北村義浩 東京大学医科学研究所
先端医療研究センター 感染症分野
助教授

木村廣光 国立成育医療センター研究所
共同研究管理室 室長

田中晴雄 北里大学
薬学部微生物薬品製造学 教授

野村伸彦 富山化学工業株式会社
総合研究部第3研究部 主任研究員

松田善衛 国立感染症研究所
エイズ研究センター 第3室長

抑制が十分にコントロールされていない症例では治療の経過とともに耐性変異が集積され、耐性の度合いが高まると共に、最終的に既存の薬のほとんどに対して耐性を獲得し、薬治療を進めるのに困難な状況に陥る。このような治療困難症例を救済するためには新たな治療薬、今までとはまったく異なる作用機序をもち、既存の薬と交叉耐性を示さないような薬を開発する必要がある。このような背景からこの研究では HIV-1 感染症を治療するための新たな薬を開発することを目的とする。開発する薬は次の 3 つである。これらは (1) 既存のプロテアーゼ阻害剤に対して耐性を獲得した HIV-1 が感受性を示し、仮に薬耐性を獲得した場合は増殖能力が著しく低下してしまうようなプロテアーゼ阻害物質、(2) HIV-1 特異的遺伝子組み込み酵素（インテグラーゼ）、そして (3) HIV-1 の宿主細胞への侵入を阻害する薬である。

A. 研究の背景および研究目的

今日、逆転写酵素阻害剤とプロテアーゼ阻害剤を組み合わせた多剤併用療法が標準的な HIV-1 感染症の治療として行われているが、その成功率は 50~60% 程度といわれている。治療に失敗する主要な原因は薬に対してウイルスが抵抗性を獲得することにある（薬耐性）。抗 HIV-1 薬によりウイルスの増殖

B. 研究方法

平成 14 年度までのスクリーニングの結果見出され

たヒット化合物（インテグラーゼ、プロテアーゼ、接着・侵入）について類縁化合物の選択、合成を行い構造と阻害活性の関連を探る。土壌放線菌培養上清の場合は分離精製による更なる阻害物質の絞り込みを試みる。各阻害物質の特性について詳細な解析を行なう。いずれの阻害剤ヒット化合物についても *in vitro* 感染実験の結果、選択性が高い化合物であれば小動物モデルを用いた *in vivo* HIV-1 感染阻止実験を試みる。付随する基礎的研究を推進する。

詳細なスクリーニング方法、研究方法については各分担研究者の報告書を参照のこと。

C. 結果

(1) 低分子化合物ライブラリの IN 阻害活性検索結果：

Strand transfer assay および *in vitro* 感染実験によりインテグラーゼ阻害活性を持つ化合物 3 種類（TIN-1~3）、インテグラーゼ活性を持たないが HIV-1 の増殖を抑制する化合物 11 種類を見出した（TUN1~11）。これらの化合物は何れも過去に報告のない新規化合物である。

(2) 低分子化合物ライブラリの合胞体形成阻害活性の検索の結果：

M-tropic 系 5 化合物（TCM1~5）、T-tropic 系 1 化合物（TCT-1）が見出された。

(3) 放線菌 2000 株および糸状菌 160 株の培養上清の IN 阻害活性について検索の結果：

その結果 *Penicillium sp.* FKI-1463 の培養上清中に IN 阻害活性が認められた。阻害物質を精製単離の結果、atrovenetinone methyl acetal と同定された。類似した化合物 erabulenol B および funalenone も IN 阻害活性を示した。放線菌 01-77D5 株の培養上清にも HIV-1 増殖抑制効果があることが明らかになった。この化合物の精製・同定は現在取り組んでいる。

(4) アクチノヒビン（AH）の阻害機序の解析研究：アクチノヒビン（AH）が gp120 の高マンノース糖鎖に結合する事が明らかになった。さらに構造活性相関の解析を行った結果、AH を構成する 3 つのセグメントすべてが gp120 の結合に必要であることが明らかにされた。

(5) 低分子化合物ライブラリのプロテアーゼ阻害剤の検索結果：

迅速プロテアーゼアッセイ系 VLP-ELISA 法を用いて低分子化合物ライブラリの検索を行ってきたが、平成 14 年度までにヒットした 10 化合物についてその作用機序を解析した結果、プロテアーゼ以外のウイルス複製サイクル後期過程を阻害している可能性が高いことが明らかになった。

(6) インテグラーゼの基礎研究：

逆転写以後の核移行・組み込みにウイルス中央プリン配列（cPPT）が重要であることを明らかにした。

(7) 樹状細胞の分化誘導系の確立

ヒト末梢血 CD34 細胞より樹状細胞を分化・誘導する系の確立を行った。

D. 考察および E. 結論：

平成 15 年度は過去 2 年間の成果を踏まえて新規薬剤開発に結びつく大きな進展があった。低分子化合物および放線菌・真菌培養上清いずれのライブラリからも抗 HIV-1 活性を示す新規化合物が複数見出された。このうち幾つかのものは *in vitro* での選択性が高いことから、小動物における毒性検査、薬物代謝解析、さらに hu-PBL-SCID マウスを用いた HIV-1 感染実験を計画している。この研究班は本年度が最終年度であるが、研究班で見出した候補化合物を元にさらに改良を重ね、実用化を目指していくことを計画している。

G. 研究発表

分担研究者報告書 参照

H.知的財産権の出願・登録状況

1.特許取得:

カルバゾール誘導体またはその塩を有効成分とする
インテグラーゼ阻害薬および抗レトロウイルス剤
申請中

2.実用新案登録: 該当なし

3.その他: 該当なし

II. 分担研究報告書

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

候補阻害物質による HIV-1 感染増殖抑制能の解析

分担研究者 杉浦 亙 国立感染症研究所 エイズ研究センター 第2研究グループ長

分担研究者 野村伸彦 富山化学工業株式会社 主任研究員

研究要旨

インテグラーゼ (IN) は新たな治療薬剤の標的として注目されている HIV-1 の増殖に必須の酵素である。我々は 12000 検体の小分子化合物を対象に strand transfer による阻害剤候補物質検索を行い 26 種類の化合物を同定した。26 種類の化合物中には Carbazole 構造を持つ化合物があり、類縁化合物も含め IN 阻害活性を示す 8 種類の Carbazole 誘導体を見出した。更に 26 種類の化合物の類縁化合物 123 種について独自に開発したレポーター細胞 (MARBLE cell) を用いて *in vitro* での HIV-1 増殖抑制効果の検索を行った。最終的に 2 種類の IN 阻害活性を呈する化合物 (化合物 1 群) と 2 種類の IN 阻害活性を呈さない HIV-1 増殖抑制化合物 (化合物 2 群) を同定した。いずれの化合物も新規の化合物であり、これらを母核に合成展開を行い実用化の可能性のある化合物の探索を進めた。その結果、何れの群からも新規薬剤として実用化が期待できる候補化合物の合成に成功した。見出した化合物に関して更に側鎖などの修飾を行い阻害効果の増強と安全性の更なる改善を目指すとともに、生体内における HIV-1 阻害効果を確認するために、hu-PBL-SCID マウスを用いた *in vivo* 感染抑制実験を計画している。

A. 研究目的

HIV-1 感染症の薬剤治療が普及するに伴い治療薬剤に対して薬剤耐性を獲得した治療困難症例の増加が問題となっている。このような薬剤耐性を獲得した症例を救済するために mega HAART, structured treatment interruption (STI) などのさまざまな変則的な治療法が試みられてきたが、その成功率は低く、既存の薬剤の範疇で克服することは困難と考えられる。現状を打開するためには (残念ながら問題の根本的な解決策ではないが) 既存の薬剤と交叉耐性を示すことの無い新規薬剤の開発が不可欠と考えられる。このような背景からこの研究では HIV-1 の宿主ゲノムに組み込まれる過程に必須の酵素インテグラーゼ (IN) を阻害し、ウイルスゲノムの組み込みの成立を阻止する新たな薬剤開発を目指す。

B. 研究方法

(1) IN 酵素 :

分担研究者北村義浩より供給。HXB2 の IN を Craigie 等の方法に従い大腸菌で大量に発現させ精製した。精製した IN 酵素の活性の測定には IGEN 社の M8 による strand transfer assay システムを使用した。

(2) 検索化合物 :

分担研究者野村伸彦が所属する富山化学工業が保有する低分子化合物ライブラリの 12000 検体およびその類縁化合物を対象にした。

(3) IN 阻害剤 1 次スクリーニング :

IN 阻害剤の 1 次スクリーニングには IGEN 社の M8 測定装置と *in vitro* strand transfer assay kit を使用した (図 1)。このシステムはマグネットビーズに固層化したドナー DNA に IN を結合させた後に、ルテニウムで標識したターゲット DNA を加えて組み

替え反応を起こさせるもので、この反応系に検索化合物を添加することにより IN 阻害活性の評価を行った。1 次スクリーニングではすべて 100 μ M の一濃度で行った。さらに IN 阻害活性の再現性を確認するために、*in vitro* strand transfer assay を開発し(図 2)、薬剤濃度を変えて dose response 曲線を作成し、IC₅₀ 値を求めた。In house system のプロトコルは下記のとおりである。

- 1 biotin で 3'端を標識した DNA2 本鎖 (donor DNA-1,-2 下記配列参照) と IN 酵素を室温で 1 時間反応させ、複合体を形成させる。

DonorDNA-1:

5'-ACTGCTAGAGATTTTCCACACTGACTAAAA
G

DonorDNA-2:

biotin-5'-CTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTA
GCA

2. 3'端をジゴキシゲニン(DIG)標識した 2 本鎖 DNA(target DNA-1,-2 下記配列参照)を加え、37°C、1 時間反応させる。

Target DNA-1:

5'-TGCTAGAGATTTTCCACACTGACTAAAAG-3'
-DIG

Target DNA-2:

5'-CTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCA-3'
-DIG.

反応条件

Donor DNA(1.0 pmol)	2.0 μ l
Reciepiant DNA (0.75 pmol)	1.5 μ l
IN(15pmol)	1.0 μ l
Test compound (2mM)	5.0 μ l
Buffer*	90.5 μ l
Total	100 μ l

3. 反応産物をストレプトアビジンコート 96 穴プレートに添加し、37°C、1 時間の反応で吸着させる。
4. 洗浄により未反応物、非結合物を除去した後、アルカリフォスファターゼ標識抗 DIG 抗体を添加し 37°C、1 時間反応させる。
5. 洗浄後発光基質を添加し、ルミノメーターで測定する。

(4) アイソトープ標識した DNA を用いたゲルアッセイ:

[γ -³²P]ATP (3000 Ci/mmol, NEN NEG-002A) で標識した Target DNA を用いて前述と同じ条件で strand transfer assay をおこなう。産物を 12% SDS-PAGE で泳動し、X 線フィルムに写して組み替え産物の有無を判定する。

(5) MARBLE 細胞を用いた HIV-1 増殖阻止の評価:

1 次スクリーニングでヒットした化合物はさらに絞り込むための 2 次スクリーニングとして HIV-1 感染実験による HIV-1 増殖阻害効果および細胞毒性の評価を行った。感染実験には我々が新たに樹立したヒト T 細胞由来のレポーター細胞 HPB-M(a)/LTR-RFP-firefly-luciferase/CMV-renilla-luciferase (MARBLE cell) を使用した。MARBLE cell はヒト T リンパ球由来 HPB-M(a)に HIV-1 LTR で発現を制御した赤色蛍光タンパク DsRed と firefly luciferase 遺伝子および CMV プロモーターで細胞内に発現するように構築した renilla luciferase 遺伝子を電気穿孔法により導入した細胞株である。HIV-1 感染によって産生される luciferase 量が感染により産生される p24 抗原量と高い相関を示すことからルシフェラーゼ活性により、HIV-1 発現量を正確に評価することが可能であり、また多検体処理にも適した細胞株である。MARBLE cell を用いた感染実験プロト

コルは以下のとおりである (図 3)。

1. 1×10^5 個の MARBLE Cell に、 $20TCID_{50}$ の HXB2 を添加し、 $37^{\circ}C$ 、 CO_2 5.0% で 2 時間感染させる。
2. 感染 2 時間後、5 倍希釈系列で作成した薬剤 ($5\mu M$ 、 $1\mu M$ 、 $0.2\mu M$ 、 $0.04\mu M$ 、 $0.008\mu M$ 、 $0.0016\mu M$ 、 $0.00032\mu M$ 、 $0.000064\mu M$) を添加し、7 日間 $37^{\circ}C$ 、 CO_2 5.0% で培養する。
3. 感染培養 7 日目で、培養細胞を回収し、Dual-Glo™ Luciferase Assay System (Promega) を用いて細胞内の firefly luciferase および renilla luciferase 活性を測定する。
4. 各薬剤濃度における%阻止率は以下の計算式に従い算出した。

$\%阻止率 = 1 - (\text{薬剤を添加された培養細胞の luciferase 活性}) \div (\text{薬剤不添加培養細胞の luciferase 活性})$

%阻止率から 4 parameter logistic model を使用し IC_{50} を求めた。

(6)HOS/CCR5 を用いた R5 ウイルス感染実験：
MARBLE 細胞を用いた 2 次および 3 次スクリーニングで強い阻害効果を示した化合物については hu-PBL/NOD-SCID での小動物実験に進む前に CCR5 ウイルス株 JR-CSF を用いた感染実験で最終的な評価を行った。感染宿主細胞としては CCR5 遺伝子を導入した HOS 細胞を用いた。感染実験プロトコルは下記のとおりである (図 4)。

1. 96well-plate に HOS 細胞を $5 \times 10^3/200\mu l$ Dulbecco's Modified Eagle medium (10%FCS, Penicillin-Streptomycin) を感染前日に蒔いて培養を開始する。
2. 24 時間後、 $20TCID_{50}$ の JR-CSF を培養上清中に添加し感染させる。

3. 感染 2 時間後、5 倍希釈系列の薬剤 ($5\mu M$ 、 $1\mu M$ 、 $0.2\mu M$ 、 $0.04\mu M$ 、 $0.008\mu M$ 、 $0.0016\mu M$ 、 $0.00032\mu M$ 、 $0.000064\mu M$) を添加した。
4. 96 時間培養後、培養上清を回収し、p24 抗原量を測定する。
5. 各薬剤濃度における%阻止率は以下の計算式に従い算出した。

$\%阻止率 = 1 - (\text{薬剤を添加された培養細胞の luciferase 活性}) \div (\text{薬剤不添加培養細胞の luciferase 活性})$

(7)候補薬物の作用機序：

ヒット化合物の阻害が拮抗阻害か非拮抗阻害かを判定するために IN 組み換え反応の基質である標的 DNA の量を変えて反応を観察した。

1. 96 穴マイクロタイタープレートに下記反応液を添加する。

assay buffer	87 μl
Donor DNA (1pmol)	2 μl
IN	1 μl
target DNA*	5 μl
Compound**	5 μl
Total	100 μl

*DNA の濃度は 10nM, 5nM, 2.5nM, 1.67nM

**薬剤濃度は最終濃度を 0 μM , 1 μM , 5 μM , 10 μM に調整

2. $37^{\circ}C$ にて反応開始。反応開始後 1min, 2min, 3min, 4min, 5min, 10min, 20min の time point で 100 μl の 停止液を加え、この反応産物を streptavidin coated plate に移し、1 時間反応させ組み換え反応産物を吸着させる。

3. 洗浄液 (0.05% tween/PBS) で 3 回洗浄後 0.1% BSA/PBS で blocking する。各 well に 100 μl の anti-DIG-AP (0.1% BSA/PBS にて 1:1000 に希釈)

を分注し、37°Cで1時間反応させる。

4. 洗浄液で5回洗浄後、100 μ lのCPSD(0.1% BSA/PBSにて1:100に希釈)を各wellに加え、室温で5分反応させ発光させる。ルミノメーター(Lmax Molecular Device)にて発光量を測定し、各target DNA濃度における発光値の経時変化をplotして組み替え反応の初速度(V_0 値)を算出する。各target DNA濃度(基質濃度)の逆数($1/S$)と初速度の逆数($1/V_0$)からLineweaver-burk plotを作成し、各target DNA濃度における V_{max} 値と K_m 値(親和定数)を求める。この値から、各化合物の阻害機構が拮抗か非拮抗かを判定する。

(8) 小動物感染実験モデルの構築：

ヒット化合物を臨床治験まで持ち込む上での指標として、hu-PBL-SCIDマウスによる*in vivo*感染実験を計画している。感染実験プロトコルは下記のとおりである(図5)。

1. NOD-SCIDマウス腹腔内にNK活性を抑制するために抗IL2レセプター抗体TM β -1を1mg投与する。投与後 3×10^7 個のヒトPBMCを腹腔内に注射する。
2. 2週間後にヒトPBMCの生着を末梢血中のヒトCD45陽性細胞率から確認し、確認後JR-CSFを1000TCID₅₀腹腔内注射する。ウイルス投与後薬剤投与を開始する。12時間ごとに経口により化合物の投与を始める。
3. ウイルス投与後7日目と14日目に血中のウイルス量を定量し、化合物による増殖抑制効果を評価する。

C.結果

(1)平成15年度スクリーニングのまとめ(図6)：
富山化学12000の低分子化合物をM8-analyzerを

用いたstrand transfer assayでスクリーニングをし、阻害活性の強い72の候補化合物を選んだ。平成14年度の時点ではこの72種類の化合物についてMARBLE cell assayを行いHIV-1の増殖を抑制する化合物をスクリーニングし、26種類の候補化合物を見出した。

この26種類の化合物の類縁化合物126種類をMARBLE cell assayによるスクリーニングを行った結果、最終的に4種類の化合物に絞り込まれた。この時点で再びstrand transfer assayでIN阻害効果を測定した結果、IN阻害活性を持つもの(化合物1群)が2化合物、IN活性が無いが、阻害活性を持つもの(化合物2群)が2化合物であった。

1次スクリーニングでstrand transferで絞り込んでいながらIN活性を持たない化合物がヒットした理由としては類縁化合物の検索の際に直接HIV-1感染実験を行ったことがあげられる。

化合物1群としてはTIN-2が $IC_{50}=0.01-0.11 \mu M$ 、TIN-1が $IC_{50}=0.08 \mu M$ であった(図7)。一方化合物2群の化合物はTUN-4が $IC_{50}=0.23 \mu M$ 、TUN-12が $IC_{50}=0.15 \mu M$ であった(図8)。

(2)化合物1群の類縁化合物の探索(図9)：

1群の化合物TIN-1とTIN-2について細胞毒性を測定した結果、2化合物ともVero細胞における細胞毒性が強いことが明らかになった。

特にTIN-2は強いIN阻害活性を示したが、同時に細胞毒性も強く、この化合物を基にした更なる合成展開は困難と考えられた。一方、TIN-1については側鎖等を修飾することにより毒性の軽減が期待されたため、類縁化合物の合成を行った。新たに合成した化合物を含めて合計140種類の化合物を解析した結果、IN阻害活性を増強し、細胞毒性を抑えた19化合物を見出した。これらのうちTIN-3はTIN-1に比べてほぼ同等のIN阻害活性、Vero細胞毒性では20倍以上の毒性の軽減を呈した。実際のHIV-1

増殖抑制効果については今後 MARBLE cell および HOS cell を用いて確認を予定している。現在更に 78 化合物を新たに合成し構造と IN 阻害活性に関する知見を集積している。また今後、良好な結果を呈した化合物については hu-SCID-PBL マウスによる HIV-1 感染実験を計画している。

(3) 化合物 2 群の類縁化合物の探索：

IN 阻害活性を呈しなかった 2 化合物については細胞毒性が低かったため、HIV-1 増殖抑制効果を増強するための類縁化合物合成が行われた。合計 184 種類の化合物を MARBLE cell を用いた感染実験で阻害効果の評価を行った。その結果ヒット化合物の TUN-4 を含めて 11 種類の化合物が選択された (図 10) ほとんどの化合物は IC_{50} が $0.1 \mu M$ 以下であり、最も阻害活性の強いものでは $0.001 \mu M$ であった。またいずれの化合物も *in vitro* で高い選択性が認められた。このように化合物 2 群に属する化合物は強い HIV-1 阻害効果、低い細胞毒性という理想的な結果を呈したが、その作用機序が明らかでは無く、今後これらの化合物のより詳細なメカニズム解析が必須と考えられた。

選択された 11 種類の化合物は今後 hu-PBL-SCID マウスを用いた *in vivo* 感染実験を計画している。

(4) Carbazole 誘導体群による IN 活性の抑制：

平成 14 年の研究で低分子合成化合物 12000 検体中より見出した 72 候補化合物中より縮合複素環系の構造をもつ Carbazole の誘導体が IN 活性を阻害することを見出した。Carbazole は Topoisomerase I, II 阻害剤、Protein Kinase C 阻害剤として知られており、また過去に抗がん剤の候補化合物として取り上げられたことがある化合物である。

今回 72 候補化合物中より見出した化合物の構造は図 11a に示した。赤い部分が Carbazole と呼ばれる構造である。*In vitro* strand transfer assay で IC_{50}

$= 1.18 \mu M$ と強い阻害活性を示したが、同時に細胞毒性も強く、selectivity index が 1 以下と極めて低くこのままでは実用化は困難と考えられた。細胞毒性の軽減と IN 阻害活性の増強の可能性を探るために Carbazole を母核にして側鎖を修飾した化合物を新たに合成した (MW 337.4~431.4)。結果のまとめを図 11b に示したが、残念ながら今回の試みでは毒性の軽減を達成することはできなかった。

Carbazole の阻害作用を薬剤濃度と target の量を振って解析した結果 Carbazole は IN による strand transfer 反応を拮抗阻害することが明らかになった。図 12 には阻害活性の最も強かった化合物 CA-8 の結果を示した。グラフが示すように、各薬剤濃度の回帰直線は Y 軸上で交差しており典型的な拮抗阻害パターンを呈しており、 $V_{max}=360.1RU/min$, $K_m=6.63 pM$ であった。

D. 考察

本年度は昨年度 1 次スクリーニングを通して見出された 11 化合物を元にさらにライブラリ中より選択あるいは合成した類縁化合物の検索を進め、IN 阻害活性を持つ化合物 2 種類 (1 群) と持たない化合物 2 種類 (2 群) を見出した。興味深いのは 1 次スクリーニングを strand transfer assay を用いて行ったにも関わらず、2 次スクリーニング以降の類縁化合物の評価の過程で IN 阻害活性を示さない HIV-1 増殖抑制作用を呈する 2 群化合物が見出された点である。これは 2 次スクリーニング以降では strand transfer assay ではなく感染実験を主体に抗ウイルス阻害効果の検索したためだが、類似した化合物の範疇に異なるウイルスタンパクを標的にした物質が存在していることを示している。化合物 2 群については現時点では HIV-1 の増殖阻害の作用機序が明確ではない。しかし、作用機序が明確で無いことは必ずしも治療薬剤としての実用化の可能性を否定するものではない。最近米国では阻害機序が明確

でないにもかかわらず臨床治験を開始した PA-457 という薬剤の例がある。この薬剤は p24 と p2 の切断を阻害すると考えられているが、厳密には標的が明らかにされていない。安全性が確保されており、ウイルス増殖の阻害効果が期待されるのであれば臨床治験に持ち込むことは可能と考えられる。我々の化合物 2 群は *in vitro* で高い選択性が確認されていることから、十分臨床治験に持ち込める可能性があるかと期待される。臨床治験の可能性を探るために、現在 hu-PBL-SCID マウス感染実験モデルを用いて *in vivo* での阻害活性の確認を計画している。さらに薬剤の作用機序を解明するための研究にも取り組んでいる。

興味深いことに Carbazole 化合物の細胞毒性のレベルは IN 阻害活性と連動しており、細胞毒性の低い化合物では IN 阻害活性の低下を呈した。このことは Carbazole 化合物による strand transfer 阻害機序が IN 特異的なものではなく、宿主細胞の DNA ポリメラーゼなどの致死酵素に作用している可能性が示唆された。

E.まとめ

平成 15 年度は昨年度に引き続き、IN を標的にした薬剤のスクリーニングを行った。本年度は新規薬剤のリードとなる可能性を持った化合物を 4 種類見出した。そのうち 2 種類は IN 活性阻害活性を呈し、他の 2 つは IN 阻害活性は示さなかったものの、強い抗 HIV-1 増殖抑制効果を呈した。これらの化合物について側鎖を置換、修飾した化合物を合成し、構造と HIV-1 阻害活性の関連について解析を行い知見の集積を行った。修飾した化合物の幾つかは、抗 HIV-1 活性の増強と細胞毒性の軽減に成功している。本年度で研究班は終了するが、見出した化合物をヒトに応用できるように小動物を用いた実験を含め、今後更に研究を続けていくことを検討している。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1.論文発表

- 1) Lay Myint, Masakazu Matsuda, Zene Matsuda, Yoshiyuki Yokomaku, Tomoko Chiba, Aiko Okano, Kaneo Yamada, Wataru Sugiura: Contribution of Gag Non-Cleavage Site Mutations for full Recovery of Viral Fitness in Protease Inhibitor Resistant HIV-1. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*. 2004, Vol.48, 444-452.
- 2) Koya Ariyoshi, Masakazu Matsuda, Hideka Miura, Sachiko Tateishi, Kaneo Yamada, Wataru Sugiura: Patterns of Point Mutations Associated With Antiretroviral Drug Treatment Failure CRF01_AE(Subtype E) Infection Differ From Subtype B Infection. *JAIDS*. 2003, Vol.33, 336-342
- 3) J Snoeck, R Kantor, RW Shafer, I Derdelinckx, AP Carvalho, B Wynhoven, MA Soares, P Cane, J Clarke, C Pillay, S Sirvichayakul, K Ariyoshi, A Holguin, Z Grossman, R Rodrigues, MB Bouzas, P Cahn, LF Brigido, V Soriano, W Sugiura, P Phanuphak, L Morris, J Weber, D Pillay, A Tanuri, PR Harrigan, R Camacho, JM Schapiro, D Katzenstein, AM Vandamme: Evaluation of Five Interpretation Algorithms for the Prediction of Drug Susceptibility in Non-B Subtype. *Antiviral Therapy* 2003, Vol.8, s111
- 4) Wataru Sugiura, Kazunori Shimada, Masakazu Matsuda, Tomoko Chiba, Lay Myint, Aiko Okano and Kaneo Yamada: Novel Genotyping Assay for Human Immunodeficiency Virus Type-1 Drug Resistance Using Enzyme

Linked Mini-Sequence Assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003, Vol.41, 4971-4979

5) 杉浦 互: HIV の薬剤耐性研究の現状と今後の課題. *現代医療* No.35 Vol.6:113-118

6) 杉浦 互: 日本における薬剤耐性 HIV-1 の現状. *臨床とウイルス* Vol.31, No.4, 272-282

7) 金田次弘、加藤真吾、山元泰之、千葉智子、杉浦 互: 抗 HIV 療法のモニタリング. *日本エイズ学会誌* Vol.5:109-112

2.学会発表

1) R Kantor, RW Shafer, B Efron, AP Carvalho, B Wynhoven, MA Soares, P Cane, J Clarke, J Snoeck, S Sirivichayakul, K Ariyoshi, A Holguin, C Pillay, H Rudich, R Rodrigues, MB Bouzas, P Cahn, LF Brigido, Z Grossman, L Morris, V Soriano, W Sugiura, P Phanuphak, AM Vandamme, J Weber, D Pillay, A Tanuri, PR Harrigan, R Camacho, JM Schapiro, and D Katzenstein: HIV-1 subtype-related differences in genotypic evolution: Analysis of subtypes B and C reverse transcriptase and protease sequences. 11th Conference on retrovirus and opportunistic infections. Feb.8-11, 2004, Sanfrancisco, USA

2) H. Yan, T Chiba, N Nomura, Y Kitamura, M Nishizawa, M Matsuda, N Yamamoto, and W Sugiura: Discovery of Novel Small-Molecule HIV-1 Integrase Inhibitory Compounds. Fourth HIV DRP Symposium ANTIVIRAL DRUG RESISTANCE. Dec.7-10, 2003, Virginia, USA

3) L Myint, M Matsuda, T Chiba, H Yan, J Kakizawa, A Okano, M Hamatake, M Nishizawa, W Sugiura: Analysis of Virion Morphology and Assembly Process in Protease Inhibitor Resistant HIV-1.

4) R Kantor, RW Shafer, AP Carvalho, B Wynhoven, MA Soares, P Cane, J Clarke, J Snoeck, C Pillay, S Sirivichayakul, K Ariyoshi, A Holguin, Z Grossman, R Rodrigues, MB Bouzas, P Cahn, LF Brigido, V Soriano, W Sugiura, P Phanuphak, L Morris, A-M Vandamme, J Weber, D Pillay, A Tanuri, D Katzenstein: Nucleic acid differences between HIV-1 non-B and reverse transcriptase and protease sequences at drug resistance positions. XII International HIV Drug Resistance Workshop. Jun.10-14, 2003, Cabo SanLucas, Mexico

5) J Snoeck, R Kantor, RW Shafer, I Derdelinckx, AP Carvalho, B Wynhoven, MA Soares, P Cane, J Clarke, C Pillay, S Sirivichayakul, K Ariyoshi, A Holguin, Z Grossman, R Rodrigues, MB Bouzas, P Cahn, LF Brigido, V Soriano, W Sugiura, P Phanuphak, L Morris, J Weber, D Pillay, A Tanuri, PR Harrigan, R Camacho, JM Schapiro, D Katzenstein, AM Vandamme: Evaluation of Five Interpretation Algorithms for the Prediction of Drug Susceptibility in Non-B Subtype. XII International HIV Drug Resistance workshop. Jun.10-14, 2003, Cabo SanLucas, Mexico

6) 松井良輔、菅井隆弘、千葉晴美、塩見和朗、山口裕一、増間 郎、供田 洋、千葉智子、杉浦 互、大村 智、田中晴雄. 糸菌状の生産する HIV-1 インテグラーゼ阻害物質の単離と生物活性. 第 124 回 日本薬学会 2004 年 3 月

7) 杉浦 互、駒野 淳、Lay Myint: HIV-1 複製サイクル初期あるいは後期過程における宿主細胞因子の機能的、形態学的解析. 第 6 回 白馬シンポジウム. 2003 年 8 月 1 日 長野県北安曇郡白馬村

8) 杉浦 互、Lay Myint、駒野 淳、松田昌和、松

田善衛、西澤雅子: 薬剤耐性 HIV-1 における粒子形成過程の形態学的解析. 第 51 回日本ウイルス学会学術集会 2003 年 10 月 27 日～29 日 京都

3.その他: 該当なし

9) 横幕能行、松田善衛、千葉智子、巖 馬華、松田昌和、杉浦 互: 抗 HIV-1 新規候補薬剤検索のための多検体処理可能なスクリーニングシステム構築. 第 17 回 日本エイズ学会学術集会 2003 年 11 月 27 日～11 月 29 日 神戸

10) 古賀一郎、小田原 隆、細谷紀章、後藤美江子、中村哲也、松田昌和、杉浦 互、岩本愛吉
HAART 下で良好な経過中、梅毒発症とともに抗 HIV 血症を呈した症例. 第 17 回 日本エイズ学会学術集会 2003 年 11 月 27 日～11 月 29 日 神戸

11) 松田昌和、千葉智子、佐藤裕徳、巖 馬華、Lay Myint、柿澤淳子、浜武牧子、植田知幸、西澤雅子、杉浦 互: 相同組み換えを用いた CRF01_AE 薬剤感受性の解析. 第 17 回 日本エイズ学会学術集会 2003 年 11 月 27 日～11 月 29 日 神戸

12) 植田知幸、有吉紅也、三浦秀佳、松田昌和、千葉智子、巖 馬華、Lay Myint、柿澤淳子、浜武牧子、西澤雅子、杉浦 互: CRF01_AE 感染症例に見出された新たな薬剤耐性獲得機序. 第 17 回 日本エイズ学会学術集会 2003 年 11 月 27 日～11 月 29 日 神戸

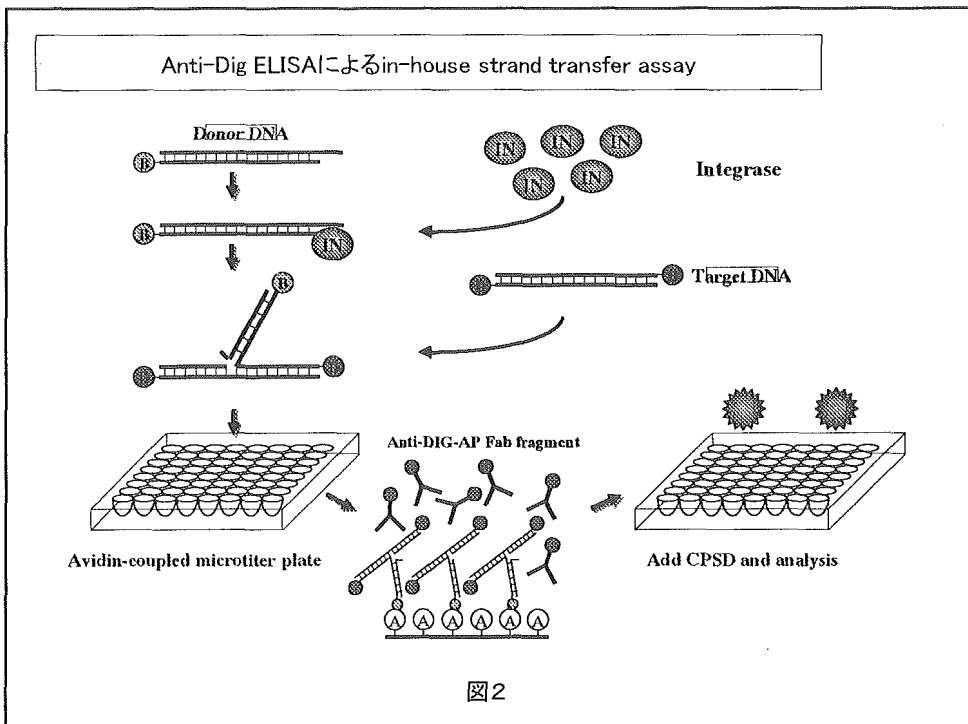
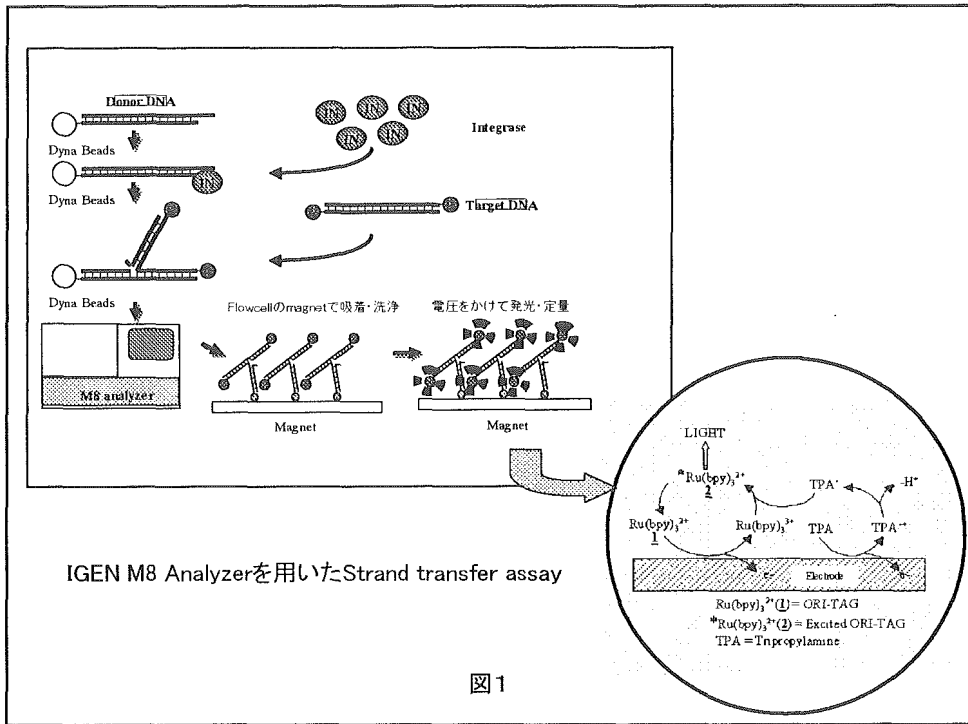
13) 大出裕高、星野忠次、杉浦 互: HIV-1protease 阻害剤耐性の分子動力的解析. 第 17 回 日本エイズ学会学術集会・シンポジウム 2003 年 11 月 27 日～11 月 29 日 神戸

14) 杉浦 互: HIV-1 治療における薬剤耐性の影響とその対策. 第 17 回 日本エイズ学会学術集会・シンポジウム 2003 年 11 月 27 日～11 月 29 日 神戸

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得: カルバゾール誘導体またはその塩を有効成分とするインテグラーゼ阻害薬および抗レトロウイルス剤 申請中

2. 実用新案登録: 該当なし



HPB-M(a)/LTR-RFP-FL/ CMRL細胞 (MARBLE cell)薬剤感受性検査の方法

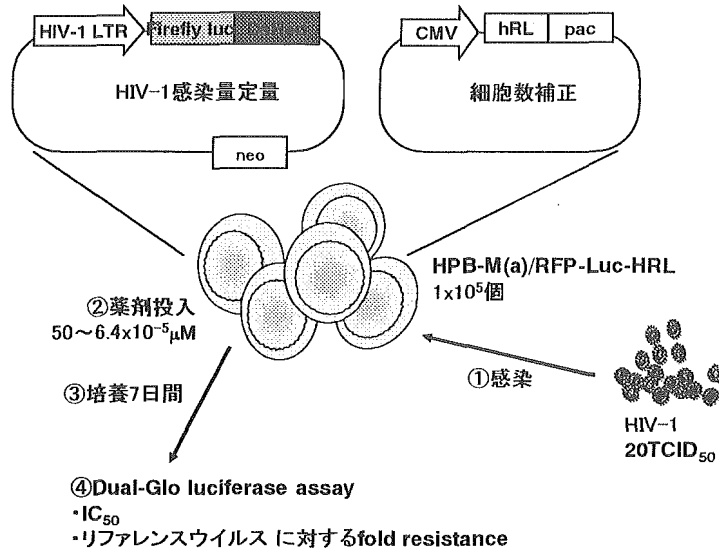


図3

HOSを用いたHIV-1(R5) 感染実験

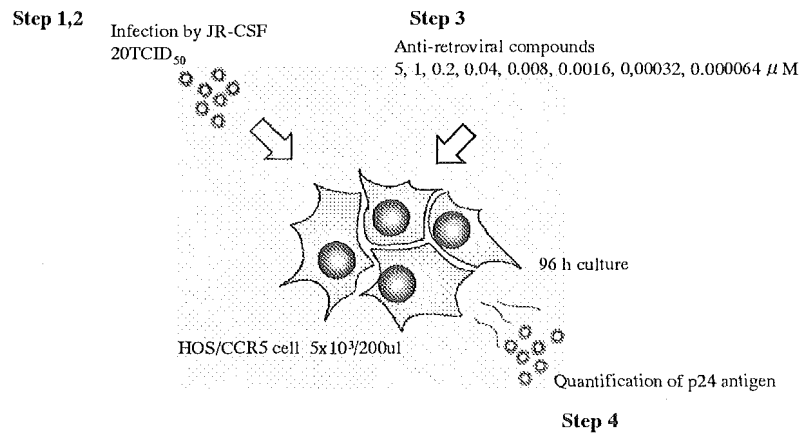
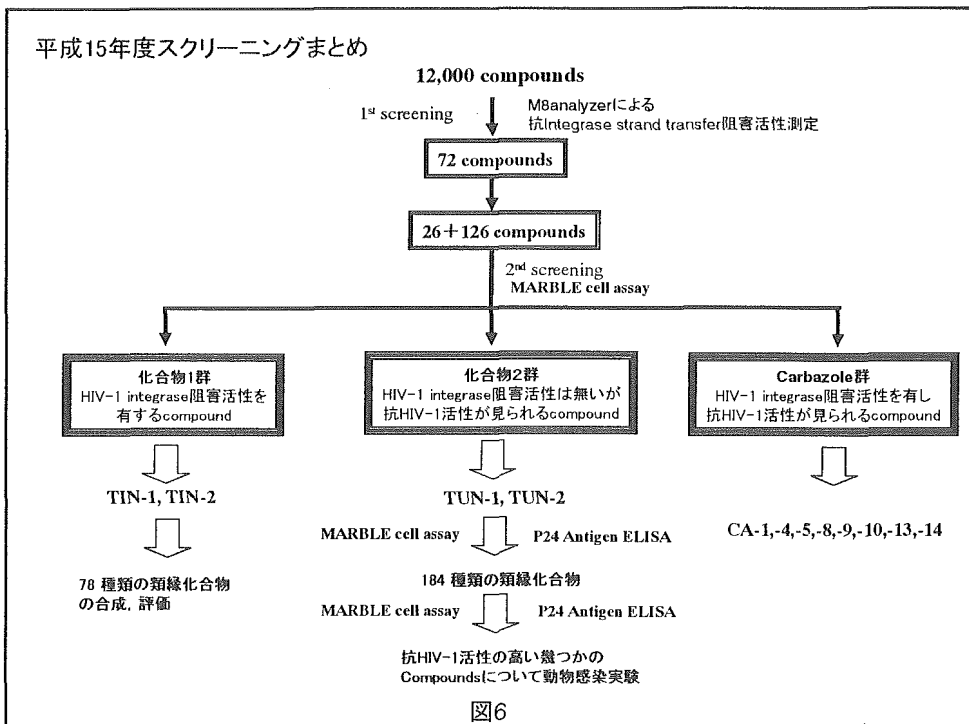
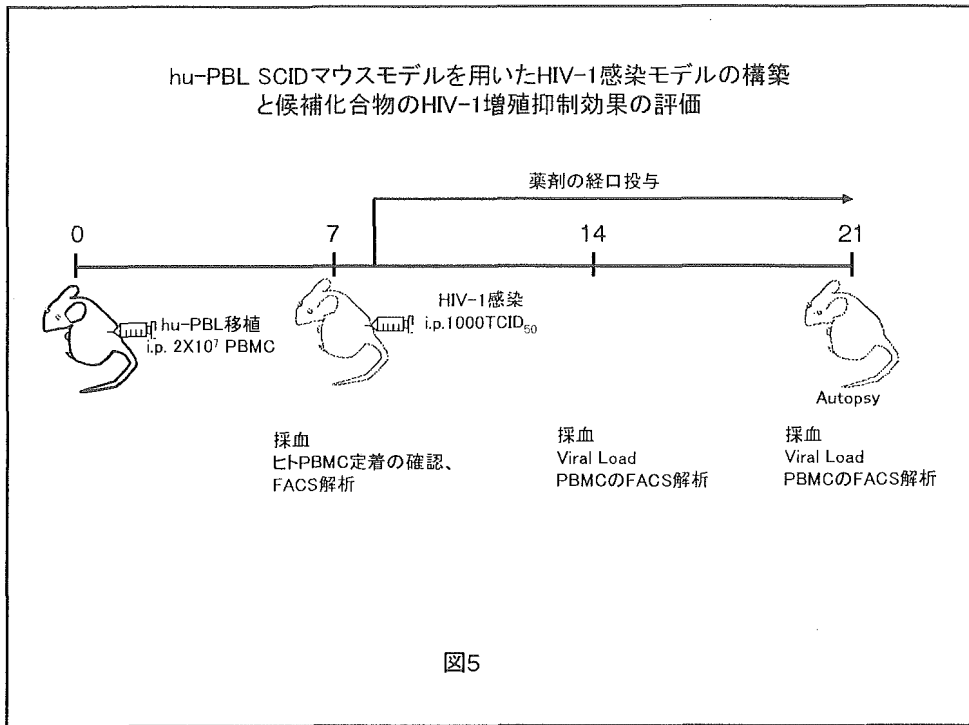
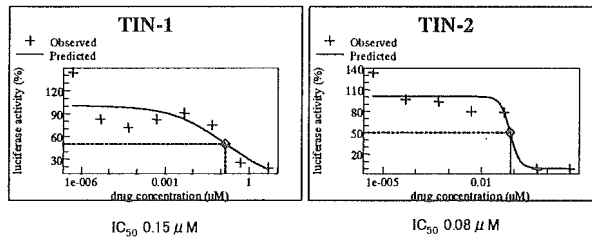


図4



化合物1群: HIV-1 integrase阻害活性を有する化合物群

Dual luciferase 発現レポーター細胞による抗HIV-1活性測定より求められるIC₅₀



P24 antigen ELISAによる抗HIV-1活性測定より求められるIC₅₀

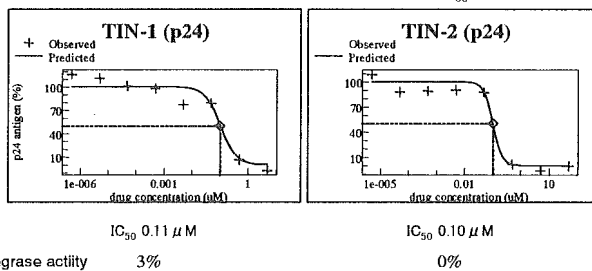
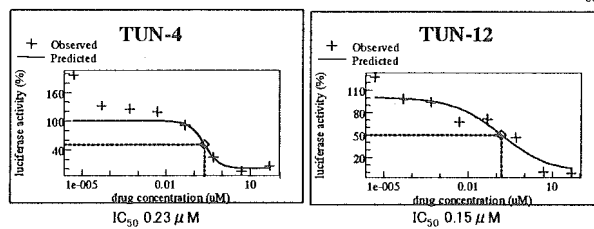


図7

化合物2群: HIV-1 integrase阻害活性は無いが抗HIV-1活性が見られる化合物群

Dual luciferase 発現レポーター細胞による抗HIV-1活性測定より求められるIC₅₀



P24 antigen ELISAによる抗HIV-1活性測定より求められるIC₅₀

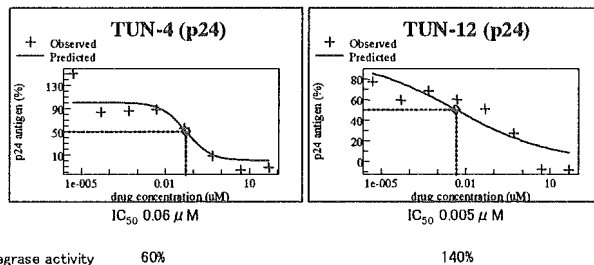


図8

化合物1群(インテグラーゼ阻害剤候補群)

	S-1360	TIN-1	TIN-2	TIN-3
抗HIV活性:IC ₅₀ (μ M)				
MARBLE cell assay	0.02-0.1	0.01-0.11	0.08	on going
p24定量による評価	0.14	0.2	0.10	on going
IN 阻害活性:IC ₅₀ (μ M)	6.2-18	6.3-13	2-2.4	17.8
細胞毒性(Vero):CC ₅₀ (μ M)	16	5.4	0.59	>100

図9

化合物2群の周辺化合物のまとめ

	anti HIV (X4) IC ₅₀ (μ M)	Cytotoxicity IC ₅₀ (μ M)	selectivity index
TUN-1	0.034	210	6200
TUN-2	0.118	>300	>2500
TUN-3	0.001	210	280000
TUN-4	0.012	5.7	480
TUN-5	0.001	>20	>20000
TUN-6	0.083	28	340
TUN-7	0.07	20	290
TUN-8	0.016	22	1400
TUN-9	0.132	ND	ND
TUN-10	0.003	2.4	800
TUN-11	0.004	5.6	1400

図10