

20030877

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

新規HIV侵入阻害剤の前臨床試験と遺伝子発現制御型の  
新しい抗HIV剤の開発に関する研究

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山本直彦

平成16(2004)年4月

## 目次

I.	総括研究報告書	
	新規 HIV 侵入阻害剤の前臨床試験と遺伝子発現制御型の新しい抗 HIV 剤 の開発に関する研究	
	山本直彦	1
II.	分担研究報告書	
	1. 芳香族ペンダント型亜鉛サイクレン錯体亜鉛錯体の作用メカニズムと 前臨床試験について	
	大竹徹	6
	2. 芳香族ペンダント型亜鉛サイクレン錯体の作用機序に関する解析	
	金田次弘	8
	3. 金属錯体の構造活性相関の評価と新規合成に関する研究	
	塩谷光彦	10
	4. 新規化合物における抗 HIV 活性の評価に関する研究	
	森下高行	12
	5. 新薬開発にむけての分析と評価	
	北里健二	13
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	14
IV.	研究成果の刊行物・別冊	15

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）  
総括研究報告書

新規 HIV 侵入阻害剤の前臨床試験と遺伝子発現制御型の  
新しい抗 HIV 剤の開発

主任研究者 山本 直彦 名古屋大学大学院医学研究科助教授

研究要旨

新規 HIV 侵入阻害剤の前臨床試験として、強い抗 HIV 活性のみられた二量体（Hiro-02 dimer）による小動物を用いた毒性実験を行なった結果、主として神経系への毒性を認め、致死毒性を認めない最大用量を 100mg/Kg と設定した。

芳香族ペンダント型亜鉛サイクレン錯体(Hiro-02)のエイズウイルス増殖抑制作用に関する作用点を time of addition により検討した結果、HIV 感染初期において、HIV 粒子の細胞膜への吸着レベルである事が確認された。さらに詳細に作用機序を解明するために、この化合物に対する耐性ウイルスの点変異（276 番目の AGA (R) が AAA (K) に）をもつ recombinant virus を作成し、種々の薬剤における抗 HIV 活性 (EC<sub>50</sub>) を検討した。その結果、この点変異がこの薬剤の HIV 感染初期の吸着過程における阻害機序に多に関与している事が示された。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 感染初期の吸着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。

また、核酸関連酵素をターゲットとする新規人工核酸ユニットを開発すべく、核酸塩基部分を化学修飾した人工 DNA を 100 種類新規合成した。この他、新しい抗エイズ薬のリード化合物を探索すべく、種々の金属配位子や金属錯体のエイズウイルス増殖抑制作用を検討した。その結果、4 種類の化合物に抗 HIV 活性がみられたが、エイズウイルスに対する選択性 (Selectivity Index) は弱く、5 倍程度であったため、今後さらにエイズウイルス増殖抑制作用との構造活性相関を検討していく。

分担研究者

- (1) 大竹徹  
大阪府立公衆衛生研究所主任研究員
- (2) 金田次弘  
国立名古屋病院臨床研究部室長
- (3) 塩谷光彦  
東京大学大学院理科系研究科教授
- (4) 森下高行  
愛知県衛生研究所主任研究員
- (5) 北里健二・大鵬薬品工業株式会社  
創薬センター化学研究所所長

制作用との構造活性相関を検討し、より有効で新しい作用機序に基づく抗エイズ薬を開発することにある。すなわち、これまでの本研究事業の研究成果によって得られた成果をもとに、選択性の高い複核亜鉛サイクレン錯体を構築し、リード化合物を選定し、その作用メカニズムの詳細な検討を行いつつ、臨床応用に向けた前臨床試験として、動物における毒性試験を行ない、加えてこれら薬剤の生体内の環境における抗ウイルス活性を調べる。さらに、独自に開発した技術を用い、細胞内および核内において作用する遺伝子制御型の抗 HIV 剤の可能性を検討する。

A. 研究目的

本研究の目的は、金属錯体による核酸分子認識に関する研究過程で合成された亜鉛サイクレン錯体を様々に化学修飾し、HIV 増殖抑

B. 研究方法

I. 臨床応用に向けた前臨床試験

**毒性試験**：AZT と同等の抗 HIV 活性を示した二量体 (Hiro-02 dimer) を 30, 100, 300mg/kg の用量でマウスの皮下に投与し、毒性試験を行なった。投与後、一般状態の観察、体重および摂餌量の測定を行ない、死亡動物は直後にその他の動物は 14 日目に剖検した。

## II. 新規合成化合物の抗ウイルス活性試験とその作用機序

**抗ウイルス活性**：新規合成化合物を 96 well microplate 上に triplicate で 5 段階希釈し、 $2 \times 10^5$  /ml に調整した MT-4 細胞に Mock あるいは  $100 \times \text{CCID}_{50}$ /ml の HIV-1(IIIB)を感染し、5 日間培養後、MTT ; 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipheyltetrazolium bromide を加え、生細胞がこの MTT を取り込み、発色した割合を ELISA で測定し、 $\text{EC}_{50}$  (50% Effective Concentration ; 50%ウイルス増殖抑制濃度) および  $\text{CC}_{50}$  (50% Cytotoxic Concentration; 50%細胞増殖抑制濃度) を測定した。

**薬剤の作用点を特定するための time of addition 試験**： $2 \times 10^5$  cells の MT-4 細胞に M.O.I.=0.5 にて HIV-1 の LAI 株を 4C にて 1 時間反応させた。未反応のウイルスを 4C で洗浄の後 37C にてインキュベートした。薬剤は 4C での反応時、37C にシフト後、0 分、10 分、20 分、30 分、60 分、120 分後にそれぞれ加えた。反応開始後 12 時間後に細胞を回収し、HIV-1 の gag DNA を標的に PCR 法にて検出した。内部対照として細胞のヒト  $\beta$ -グロビン遺伝子を増幅した。添加した薬剤濃度は Hiro-02、DS8000、バイサイラム (JM3100) それぞれ、 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  であった。

**耐性ウイルスによる解析**：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'TTTTC GTCTCTTTTTTCTTGTATTGTTGTTGGG -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  $1 \times 10^5$ /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、Hiro-02 の類似化合物である Hiro-02, Hiro-03, Hiro-10, Hiro-02 dimer, また CXCR4 の阻害剤である AMD3100 における抗 HIV 活性を MTT 法で調べた。

III. 新技術を用いた新規抗 HIV 剤の開発：新規亜鉛錯体や亜鉛イオンキャリア分子を合成し、溶液内構造や亜鉛イオン捕捉能について核磁気共鳴スペクトル法や pH 滴定法により検討した。また、新たな人工核酸塩基を設計・合成し、各種 DNA ポリメラーゼへの取り込みを検討し、抗 HIV 活性化合物の設計にフィードバックさせた。

(倫理面への配慮)

本研究における前臨床試験は、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、名古屋大学動物実験指針を遵守して研究にあたることとする。また、ヒトゲノム・遺伝子解析研究については、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成 13 年 3 月 29 日 文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号)を遵守する。

### C. 研究成果

I. 臨床応用に向けた前臨床試験(毒性試験): Hiro-02 Dimer は 30mg/kg 群では死亡例は認められなかった。一般状態、体重および剖検所見にも被験物質投与の影響と考えられる変化は認められなかった。100 mg/kg 群では死亡例は認められなかった。一般状態の観察で自発運動低下、呼吸数減少、体温低下、閉眼、被毛の汚れが全例に認められ、一例に一時的な振戦が認められた。6 日目以降 2 例に外傷が認められたが、fighting による咬傷で、被験物質投与によるものではないと考えられた。体重はおよそ 3 日目まで減少し、以降増加し 7 日目で投与前程度に回復した。300 mg/kg 群では、全例が投与後 1 時間以内に死亡した。一般状態の観察では、自発運動低下および不整呼吸が認められ、強直性痙攣の後直ちに死亡した。剖検では被験物質投与の影響と考えられる変化は認められなかった。

### II. 新規合成化合物の抗ウイルス活性試験とその作用機序

抗 HIV 活性: 今年度新規合成された 100 種類の化合物の抗 HIV 活性を検討した結果、4 種類の化合物に抗 HIV 活性がみられた。すなわち、HAR011 ( $EC_{50}$ : 24.6  $\mu$ g/ml,  $CC_{50}$ : 124.4  $\mu$ g/ml), HAR029 ( $EC_{50}$ : 7.2  $\mu$ g/ml,  $CC_{50}$ : 51.7  $\mu$ g/ml), HAR032 ( $EC_{50}$ : 8.4  $\mu$ g/ml,  $CC_{50}$ : 40.8  $\mu$ g/ml), HAR033 ( $EC_{50}$ :

0.9  $\mu$ g/ml,  $CC_{50}$ : 6.2  $\mu$ g/ml)であり、エイズウイルスに対する選択性 (Selectivity Index) はそれぞれ、5.1, 7.2, 4.6, 6.9 であった。

薬剤の作用点を特定するための time of addition 試験: Hiro-02 の作用点を特定するための time of addition 試験: Hiro-2 はウイルス吸着後 10 分までの間に作用し、DS8000 と同時期であった。これに対し、バイサイクラム (JM3100) は侵入開始後 10 分以降、20 分までの間に作用していた。

耐性ウイルスによる解析: Hiro-02 に対する耐性 HIV 株の Env 領域のアミノ酸 276 番目の R(AGA)から K(AAA)への点変異をもつ recombinant virus (Hiro-02R) を作成し、Hiro-02 に対する抗 HIV 活性を調べたところ、 $EC_{50}$  は 36.5  $\mu$ g/ml であり、点変異をもたない virus(pPMN2)のそれは 9.5  $\mu$ g/ml、野生株 (HXB2) のそれは 2.95  $\mu$ g/ml と、それぞれ約 4 倍、12 倍の耐性度を認めた。Hiro-02 と同様な作用機序と思われる Hiro-03、Hiro-10、Hiro-02 dimer も Hiro-02R に対して抗 HIV 活性が低下しており、一方、CXCR4 の阻害剤と考えられている AMD3100 や既存の亜鉛サイクレン錯体は Hiro-02R に対して野生株と同程度の抗 HIV 活性を示していた。

### III. 新技術を用いた新規抗 HIV 剤の開発:

亜鉛サイクレン錯体の多核化および芳香族リンカーの導入が抗 HIV 活性を増強する事が本研究グループにより明らかにされている。ナフタレンをスパーサーにもつ新規亜鉛二核錯体は単核に比して、約 10 倍の抗 HIV 活性を示しその Selectivity Index: 2548 倍は、対照として用いた AZT の 3485 倍に匹敵するものである。この新規亜鉛二核錯体による小動物による毒性実験を行なうために大量合成を行った。また、核酸関連酵素反応をターゲットとする新規人工核酸ユニットを開発すべく、核酸塩基部分を化学修飾し、ウイルスが関連する諸過程に阻害的な効果を及ぼす可

能性を秘めている人工DNAを種々合成した。

#### D. 考察

強い抗 HIV 効果がみられた芳香族ペンダント型亜鉛サイクレン錯体の二核錯体 (Hiro-02 Dimer) について、マウスを用いた皮下投与毒性試験の結果から、10 日経過の段階で Hiro-002031206 のマウスに対する概略の致死量は、100 から 300 mg/kg と判断され、致死毒性を認めない最大用量を 100mg/Kg と設定した。

Hiro シリーズ (Hiro-02、Hiro-03、Hiro-10) は T-tropic ウイルスに対してのみ抗ウイルス活性を持つことから、おそらくウイルスの細胞への吸着侵入過程を抑制するものと考えられた。今回作用点を明らかにするために、時間を追って時間を追ってウイルス増殖過程の各ステップに薬剤 (Hiro-02) を加えるいわゆる time of addition 試験を行った。その結果、Hiro-2 はウイルス吸着後 10 分までの間に作用し、DS8000 と同時期であった。CXCR4 に作用しウイルスの細胞侵入過程を抑制することが知られているバイサイクラムは侵入開始後 10 分以降、20 分までの間に作用していた。これらのことから Hiro-02 はウイルスの細胞への吸着過程の時期に作用することが判明した。

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で 276 番目の AGA (R) が AAA (K) に置換されているのみであったので、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 倍の耐性度を獲得しており、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 感染初期の吸着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。

ナフタレンペンダント亜鉛サイクレン、および芳香族スパーサーをもつ亜鉛二核錯体が強いウイルス侵入阻害作用を示すことが以前の研究で明らかになっている。また、サイクレンを側鎖にもつアミノ酸は、天然のペプチドに導入することができる。したがって、核内に取り込まれることが知られているペプチドをキャリアとしてサイクレンを核内に移行させることが可能になる。

今年度新規に合成された 100 種類の化合物の抗 HIV 活性を検討したが、エイズウイルスに対する選択性 (Selectivity Index) は弱く、5 倍程度であったため、今後さらにエイズウイルス増殖抑制作用との構造活性相関を検討していく必要がある。

#### E. 結論

強い抗 HIV 効果がみられた芳香族ペンダント型亜鉛サイクレン錯体の二核錯体 (Hiro-02 Dimer) の致死毒性を認めない最大用量を 100mg/Kg と設定した。

Hiro-02 の作用点はウイルスの細胞への吸着過程、特に DS8000 の作用時点とほぼ同時期に作用して抗ウイルス活性を示すことが判明した。さらに耐性ウイルスの解析から、Env 領域のアミノ酸 276 番目の R(AGA) から K(AAA) への置換が HIV 感染初期の吸着過程における阻害機序に多いに関与している事が示された。

#### F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 発表論文

研究成果の刊行に関する一覧参照

2. 学会発表

山本直彦、和田かおる、伊部史朗、金田次弘、  
内海真、森下高行、佐藤克彦、大竹徹、  
森治代、川畑拓也、北里健二、塩谷光彦

『ペンダント型亜鉛サイクレン錯体の HIV 増  
殖抑制作用機序に関する研究』

(第17回日本エイズ学会、2003年)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

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の作用メカニズムと前臨床試験について

分担研究者 大竹 徹（大阪府立公衆衛生研究所病理課）  
研究協力者 川畑拓也 小島洋子 森 治代（同上）

研究要旨

芳香族ペンダント型亜鉛サイクレン錯体(Hiro-02)のエイズウイルス増殖抑制作用に関する作用点を time of addition により検討した結果、HIV 感染初期において、HIV 粒子の細胞膜への吸着レベルである事が確認された。また、強い抗 HIV 活性のみられた二量体(Hiro-02 dimer)による小動物を用いた毒性実験を行なった結果、主として神経系への毒性を認め、致死毒性を認めない最大用量を 100mg/Kg と設定した。

A. 研究目的

高い抗 HIV 活性が見られた芳香族ペンダント型亜鉛サイクレン錯体(Hiro-02)の抗ウイルス作用メカニズムについて解明するとともに、臨床応用に向けての前臨床試験を行なう。

B. 研究方法

薬剤の作用点を特定するための time of addition 試験：  $2 \times 10^5$  cells の MT-4 細胞に M.O.I.=0.5 にて HIV-1 の LAI 株を 4C にて 1 時間反応させた。未反応のウイルスを 4C で洗浄の後 37C にてインキュベートした。薬剤は 4C での反応時、37C にシフト後、0 分、10 分、20 分、30 分、60 分、120 分後にそれぞれ加えた。反応開始後 12 時間後に細胞を回収し、HIV-1 の gag DNA を標的に PCR 法にて検出した。内部対照として細胞のヒト  $\beta$ -グロビン遺伝子を増幅した。添加した薬剤濃度は Hiro-02、DS8000、バイサイクラム (JM3100) それぞれ、 $100 \mu\text{g/mL}$ 、 $100 \mu\text{g/mL}$ 、 $10 \mu\text{g/mL}$  であった。

臨床応用に向けた毒性試験：AZT と同等の抗 HIV 活性を示した二量体 (Hiro-02

dimer) を 30, 100, 300mg/kg の用量でマウスの皮下に投与し、毒性試験を行なった。投与後、一般状態の観察、体重および摂餌量の測定を行ない、死亡動物は直後にその他の動物は 14 日目に剖検した。

C. 研究結果

薬剤の作用点を特定するための time of addition 試験：Hiro-02 の作用点を特定するための time of addition 試験：Hiro-2 はウイルス吸着後 10 分までの間に作用し、DS8000 と同時期であった。これに対し、バイサイクラム (JM3100) は侵入開始後 10 分以降、20 分までの間に作用していた。

臨床応用に向けた毒性試験：30mg/kg 群では死亡例は認められなかった。一般状態、体重および剖検所見にも被験物質投与の影響と考えられる変化は認められなかった。100 mg/kg 群では死亡例は認められなかった。一般状態の観察で自発運動低下、呼吸数減少、体温低下、閉眼、被毛の汚れが全例に認められ、一例に一時的な振戦が認められた。6 日目を降 2 例に外傷が認められたが、fighting による咬傷で、被験物質投与によるものではな



いと考えられた。体重はおよそ 3 日目まで減少し、以降増加し 7 日目で投与前程度に回復した。300 mg/kg 群では、全例が投与後 1 時間以内に死亡した。一般状態の観察では、自発運動低下および不整呼吸が認められ、強直性痙攣の後直ちに死亡した。剖検では被験物質投与の影響と考えられる変化は認められなかった。

#### D. 考察

Hiro シリーズ（Hiro-02、Hiro-03、Hiro-10）は T-tropic ウイルスに対してのみ抗ウイルス活性を持つことから、おそらくウイルスの細胞への吸着侵入過程を抑制するものと考えられた。今回作用点を明らかにするために、時間を追って時間を追ってウイルス増殖過程の各ステップに薬剤（Hiro-02）を加えるいわゆる time of addition 試験を行った。その結果、Hiro-2 はウイルス吸着後 10 分までの間に作用し、DS8000 と同時期であった。CXCR4 に作用しウイルスの細胞侵入過程を抑制することが知られているバイサイクリムは侵入開始後 10 分以降、20 分までの間に作用していた。これらのことから Hiro-02 はウイルスの細胞への吸着過程の時期に作用することが判明した。

強い抗 HIV 効果がみられた芳香族ペンダン

ト型亜鉛サイクレン錯体の二核錯体（Hiro-02 Dimer）について、マウスを用いた皮下投与毒性試験の結果から、10 日経過の段階で Hiro-002031206 のマウスに対する概略の致死量は、100 から 300 mg/kg と判断され、致死毒性を認めない最大用量を 100mg/Kg と設定した

#### E. 結論

Hiro-02 の作用点はウイルスの細胞への吸着過程、特に DS8000 の作用時点とほぼ同時期に作用して抗ウイルス活性を示すことが判明した。強い抗 HIV 効果がみられた芳香族ペンダン型亜鉛サイクレン錯体の二核錯体（Hiro-02 Dimer）の致死毒性を認めない最大用量を 100mg/Kg と設定した。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 発表論文

研究成果の刊行に関する一覧参照

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

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の作用機序に関する解析

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

従来にない新しい作用機序が考えられる芳香族ペンダント型亜鉛サイクレン錯体（Hiro compounds）の作用機序を解明するために、この化合物に対する耐性ウイルスの点変異（276番目の AGA（R）が AAA（K）に）をもつ recombinant virus を作成し、種々の薬剤における抗 HIV 活性（EC<sub>50</sub>）を検討した。その結果、この点変異がこの薬剤の HIV 感染初期の巨細胞形成および細胞侵入過程における阻害機序に多岐に亘って関与している事が示された。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。

A. 研究目的

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、種々の薬剤における抗 HIV 活性を検討した。

B. 研究方法

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'-TTTTTCTCTCTTTTTTCTTGTATTGTTGTTGGG-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、1cycle of pre-PCR（45sec at 94℃）、15 cycle of PCR

（15sec at 94℃, 40sec at 50℃, and 120sec at 72℃）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<sup>5</sup>/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、Hiro-02 の類似化合物である Hiro-02, Hiro-03, Hiro-10, Hiro-02 dimer, また CXCR4 の阻害剤である AMD3100 における抗 HIV 活性を MTT 法で調べた。

（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。

### C. 研究結果

Hiro-02 に対する耐性 HIV 株の Env 領域のアミノ酸 276 番目の R(AGA)から K(AAA)への点変異をもつ recombinant virus (Hiro-02R) を作成し、Hiro-02 に対する抗 HIV 活性を調べたところ、EC<sub>50</sub> は 36.5 μg/ml であり、点変異をもたない virus(pPMN2)のそれは 9.5 μg/ml、野生株(HXB2)のそれは 2.95 μg/ml と、それぞれ約 4 倍、12 倍の耐性度を認めた。Hiro-02 と同様な作用機序と思われる Hiro-03、Hiro-10、Hiro-02 dimer も Hiro-02R に対して抗 HIV 活性が低下しており、一方、CXCR4 の阻害剤と考えられている AMD3100 や既存の亜鉛サイクレン錯体は Hiro-02R に対して野生株と同程度の抗 HIV 活性を示していた。

### D. 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で 276 番目の AGA (R) が AAA (K) に置換されているのみであったので、この点変異をもつ recombinant virus を作成し、抗 HIV 活性

(EC<sub>50</sub>) を検討したところ、約 4 倍の耐性度を獲得しており、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。

### E. 結論

新規化合物、芳香族ペンダント型亜鉛サイクレン錯体 (Hiro compounds) の作用点として、Env 領域のアミノ酸 276 番目の R(AGA)から K(AAA)への置換が HIV 感染初期の巨細胞形成および細胞侵入過程における阻害機序に多に関与している事が示された。

### F. 健康危険情報

特になし

### G. 発表論文

研究成果の刊行に関する一覧参照

### H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

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

金属錯体の構造活性相関の評価と新規合成に関する研究

分担研究者 塩谷 光彦 東京大学大学院理学系研究科

研究要旨

本年度も、亜鉛サイクレン錯体の多核化および芳香族スペーサーの導入が抗 HIV 活性を増強することに注目し、ウイルス増殖抑制作用を有する多核亜鉛サイクレン錯体の再分子設計を行い、新規芳香環スペ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高効率合成法の確立を図った。特に、強い抗 HIV 活性を持つナフタレンをスペーサーにもつペンダント型亜鉛錯体の二核体による小動物による毒性実験を行なうための大量合成を行なった。また、核酸関連酵素をターゲットとする新規人工核酸ユニットを開発すべく、核酸塩基部分を化学修飾した人工 DNA を 100 種類合成した。その他、新しい抗エイズ薬のリード化合物を探索すべく、種々の金属配位子や金属錯体の HIV ウイルス増殖抑制作用を検討した。

A. 研究目的

ウイルス増殖抑制作用を有する多核亜鉛サイクレン錯体の再分子設計を行い、多核亜鉛サイクレン錯体の高効率合成法および大量合成法の確立を目指した。また、人工核酸が核酸関連酵素反応に及ぼす効果を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

新規亜鉛錯体や亜鉛イオンキャリア分子を合成し、溶液内構造や亜鉛イオン捕捉能について核磁気共鳴スペクトル法や pH 滴定法により検討した。また、新たな人工核酸塩基を設計・合成し、各種 DNA(RNA)ポリメラーゼへの取り込み、DNA 加水分解酵素反応に及ぼす効果を検討し、抗 HIV 活性化合物の設計にフィードバックさせた。

(倫理面への配慮)

本研究は化合物の合成が目的であり、人および動物を研究対象としていないため、倫理面に問題ない。

C. 研究結果

亜鉛サイクレン錯体の多核化および芳香族

リンカーの導入が抗 HIV 活性を増強する事が本研究グループにより明らかにされている。ナフタレンをスペーサーにもつ新規亜鉛二核錯体は単核に比して、約 10 倍の抗 HIV 活性を示しその Selectivity Index : 2548 倍は、対照として用いた AZT の 3485 倍に匹敵するものである。この新規亜鉛二核錯体による小動物による毒性実験を行なうために大量合成を行った。

また、核酸関連酵素反応をターゲットとする新規人工核酸ユニットを開発すべく、核酸塩基部分を化学修飾し、ウイルスが関連する諸過程に阻害的な効果を及ぼす可能性を秘めている人工 DNA を種々合成した。

尚、これらのサンプルの抗 HIV 活性の検討および作用機序の評価については分担研究者の森下らに依頼した（森下分担報告書：Table 1, 2）。大量合成したサンプルについては、動物実験を依頼した。

D. 考察

ナフタレンペンダント亜鉛サイクレン、および芳香族スペーサーをもつ亜鉛二核錯体が強いウイルス侵入阻害作用を示すことが以前の研究で明らかになっている。また、サイ

クレンを側鎖にもつアミノ酸は、天然のペプチドに導入することができる。したがって、核内に取り込まれることが知られているペプチドをキャリアとしてサイクレンを核内に移行させることが可能になる。例えば、核局在（核移行）シグナルとして最近発見された P r o - A r g - L y s - L y s - A r g - P r o - A r g というアミノ酸配列を我々のサイクレンを側鎖にもつアミノ酸を導入すれば、核に移行しやすくなると考えられ、現在その準備を行っている。さらに、その構造体に HIV-1 の特異的な塩基配列に対応する peptide nucleic acid (15 - 20 ベースで特異性が確保できる) をつなぐ事ができれば核内の HIV-1 プロウイルスに結合して機能を発揮することが期待される。

#### E. 結論

強い抗 HIV 活性を持つナフタレンをスパーサーにもつペンダント型亜鉛錯体の二核体による小動物による毒性実験を行なうための大量合成を行なった。また、核酸関連酵素をターゲットとする新規人工核酸ユニットを開発すべく、核酸塩基部分を化学修飾した人工 DNA を 100 種類合成した。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 発表論文

研究成果の刊行に関する一覧参照

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

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

新規化合物における抗 HIV 活性の評価に関する研究

分担研究者 森下 高行（愛知県衛生研究所）

研究協力者 佐藤 克彦（愛知県衛生研究所）

研究要旨

今年度新規に合成された 100 種類の化合物の抗 HIV 活性を検討した。その結果、4 種類の化合物に抗 HIV 活性がみられたが、エイズウイルスに対する選択性 (Selectivity Index) は弱く、5 倍程度であったため、今後さらにエイズウイルス増殖抑制作用との構造活性相関を検討していく。

A. 研究目的

分担研究者である塩谷光彦博士（東京大学大学院理学系研究科）および北里健二博士（大鵬薬品工業）において新規に合成された金属錯体、核酸塩基部分を化学修飾した人工 DNA、その他化合物、計 100 種類についてエイズウイルス増殖抑制作用の有無を評価する。

B. 研究方法

新規合成化合物を 96 well microplate 上に triplicate で 5 段階希釈し、 $2 \times 10^5$  /ml に調整した MT-4 細胞に Mock あるいは  $100 \times \text{CCID}_{50}$ /ml の HIV-1(IIIB)を感染し、5 日間培養後、MTT ; 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipheyltetrazolium 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、 $\text{EC}_{50}$ （50% Effective Concentration ; 50%ウイルス増殖抑制濃度）および  $\text{CC}_{50}$ （50% Cytotoxic Concentration; 50%細胞増殖抑制濃度）を測定した。

C. 研究結果

上記新規化合物の抗 HIV 活性を検討した結果、4 種類の化合物に抗 HIV 活性がみられた。すなわち、HAR011 ( $\text{EC}_{50}$ :  $24.6 \mu\text{g/ml}$ ,  $\text{CC}_{50}$ :  $124.4 \mu\text{g/ml}$ ), HAR029 ( $\text{EC}_{50}$ :  $7.2 \mu\text{g/ml}$ ,  $\text{CC}_{50}$ :  $51.7 \mu\text{g/ml}$ ), HAR032 ( $\text{EC}_{50}$ :  $8.4 \mu$

$\text{g/ml}$ ,  $\text{CC}_{50}$ :  $40.8 \mu\text{g/ml}$ ), HAR033 ( $\text{EC}_{50}$ :  $0.9 \mu\text{g/ml}$ ,  $\text{CC}_{50}$ :  $6.2 \mu\text{g/ml}$ )であり、エイズウイルスに対する選択性 (Selectivity Index) はそれぞれ、5.1, 7.2, 4.6, 6.9 であった。

D. 考察

今年度新規に合成された 100 種類の化合物の抗 HIV 活性を検討したが、エイズウイルスに対する選択性 (Selectivity Index) は弱く、5 倍程度であったため、今後さらにエイズウイルス増殖抑制作用との構造活性相関を検討していく必要がある。

E. 結論

今年度新規に合成された 100 種類の化合物の抗 HIV 活性を検討した。その結果、4 種類の化合物に抗 HIV 活性がみられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 発表論文

研究成果の刊行に関する一覧参照

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

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、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 活性が見い出されたため、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。

A. 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。

B. 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。

C. 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、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 活性が見い出されたため、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。

D. 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、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。

E. 結論

ペンダント型亜鉛サイクレン錯体のうち、ナフタレンをスペーサーとする二核錯体（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。

F. 健康危険情報

特になし

G. 発表論文

研究成果の刊行に関する一覧参照

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

## 研究成果の刊行に関する一覧表

- (1) K. Tanaka, A. Tengeiji, T. Kato, N. Toyama, and M. Shionoya "A Discrete Self-Assembled Metal Array in Artificial DNA" *Science*, 299, 1212-1213 (2003)
- (2) 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).
- (3) S. Hirapka, K. Harano, T. Tanaka, M. Shiro and M. Shionoya. "Quantitative formation of sandwich-shaped trinuclear silver(I) complex and dynamic nature of their  $P \rightleftharpoons M$  flip motion in solution" *Angewandte Chemie International Edition* 42, 5182-5185 (2003)
- (4) S. Aketani, K. Tanaka, K. Yamamoto, A. Ishihama, H. Cao, A. Tengeiji, M. Shionoya "Role of a non-natural  $\beta$ -C-nucleotide unit DNA as a template for DNA and RNA syntheses and as a substrate for nucleolytic digestion" *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 20, 43-51 (2003)
- (5) Shirou Ibe, Naomi Shibata, Makoto Utsumi and Tsuguhiro Kaneda: "Selection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Variants with an Insertion Mutation in the P6<sup>gag</sup> and P6<sup>pol</sup> Genes under Highly Active Antiretroviral Therapy." *Microbiol. Immunol.*, 47, 71-79 (2003).
- (6) Yoshiko Usami, Tsuyoshi Oki, Masahiko Nakai, Masafumi Sagisaka and Tsuguhiro Kaneda. "A Simple HPLC Method for Simultaneous Determination of Lopinavir, Ritonavir and Efavirenz." *Chem. Pharm. Bull.* 51, 715-718 (2003).
- (7) Shirou Ibe, Naoe Hotta, Uta Takeo, Yukio Tawada, Naoto Mamiya, Katsuo Yamanaka, Makoto Utsumi and Tsuguhiro Kaneda "Prevalence of Drug-resistant Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Therapy-naive Patient and Usefulness of Genotype Testing." *Microbiol. Immunol.* 47, 499-505 (2003).
- (8) Junko Hattori, Shiro Ibe, Hiromi Nagai, Kaoru Wada, Takayuki Morishita, Katsuhiko Sato, Makoto Utsumi and Tsuguhiro Kaneda "Prevalence of infection and genotypes of GBV-C/HGV among homosexual men." *Microbiol. Immunol.*, 47, 759-763 (2003)
- (9) T. Tewtrakul, H. Niyashiro, N. Nakamura, M. Hattori, T. Kawahata, T. Otake, T. Yoshinaga, T. Fujiwara, T. Supavita, S. Yuenongsaward, P. Rattansuwon, S. Dej-Adisai "HIV-1 integrase inhibitory substances from *Coleus parvifolius*." *Phytotherapy Research*, 17, 232-238, (2003)
- (10) S. Hiraoka, M. Shiro and M. Shionoya "Heterotopic assemblage of two different disk-shaped ligands through trinuclear silver(I) complexation: ligand exchange-driven molecular motion" *Journal of the American Chemical Society*, 126, 1214-1218 (2004)
- (11) Hidehito Urata, Tetsuya Kumashiro, Takuya Kawahata, Toru Otake, and Masao Akagi "Anti-HIV-1 activity and mode of action of mirror image oligodeoxynucleotide analogue of zintevir" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313, 55-61 (2004)



20030877

以降は雑誌/図書等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。