

研究課題：HIV 侵入の動的超分子機構を標的とするケミカルバイオロジー創薬研究

課題番号：H22-エイズ-若手-008

研究代表者：鳴海 哲夫（東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 助教）

研究分担者：なし

## 1. 研究目的

現在 HIV 感染症の化学療法では、多剤併用療法が有効な治療法として確立されているが、長期投与による毒性の軽減や耐性ウイルス抑制の観点から、新規治療薬の開発が求められている。また、感染予防や根本的治療を目指した HIV ワクチン研究においては、その方向性を抜本的に見直さなければならない状況にある。これら問題の解決には HIV の侵入から出芽に至る生命現象をこれまでとは異なる角度から改めて解析し、既存の情報を再構築する必要がある。そこで、本研究課題では HIV 側および宿主側タンパク質の機能を模倣した有機分子（低分子 CD4 模倣体 (CD4 ミミック) および gp120 の V3 loop ミミック) を創製し、それらを用いて HIV 外被タンパク質と細胞表面タンパク質の相互作用様式を両方向から解析し、その知見に基づいた合理的分子設計により新規 HIV 侵入阻害剤の開発を目指す。

## 2. 研究方法

平成 22 年度（初年度）は HIV の細胞侵入の第一段階である gp120 と CD4 の相互作用様式の解析を目的として、gp120 の構造変化を誘起する CD4 ミミック誘導体の設計・合成を行った。申請者が独自に見出した低分子 CD4 ミミック (図 1) を三つのフラグメント（芳香環部位、オキサミド部位、ピペリジン部位）に分割し、それぞれ化学修飾した CD4 ミミック誘導体を合成し、それら化合物の生物活性 (gp120 に与える構造変化、細胞毒性および抗 HIV 活性) を評価した。

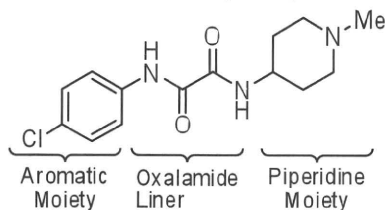


図 1 CD4 ミミックの構造

(倫理面への配慮)

実験動物に対する動物愛護上の配慮に関しては、日本学術会議による動物実験の適切な実施に向けたガイドライン及び厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針を厳密に遵守して、実験計画を綿密に検討した上で必要最小限の実験動物を

用いて効率的に実験を実施した。

## 3. 研究結果

### 【芳香環部位の構造活性相関研究】

アザインドールやアミノインダノール、キノリンなど様々な抗 HIV 活性を有する低分子化合物に含まれる多環性複素環を CD4 ミミックに導入したハイブリッド分子を合成し、生物活性評価したが、ほとんどの誘導体において顕著な生物活性を示さなかった。

### 【ピペリジン環部位の構造活性相関研究】

分子モデリングの結果、ピペリジン環部位は CD4 の<sup>59</sup>Arg の側鎖と対応するように、gp120 と相互作用することが示唆されたため、ピペリジン環に Arg の側鎖官能基であるグアニド基や、その類縁体であるウレア基やチオウレア基を導入した誘導体を合成した。また、テトラメチル基を更に嵩高くした二つのシクロヘキサン環を有する誘導体や、ピペリジン環の代わりに種々の芳香環を持つ誘導体も併せて合成した。生物活性評価の結果、グアニド基やウレア基を有する誘導体は gp120 の構造変化誘起能は維持するものの、顕著な抗 HIV 活性や細胞毒性の改善はみられなかったのに対し、二つのシクロヘキサン環を有する誘導体 (HAR-171 : 図 2) においては、リード化合物の一つ NBD-556 と同等の構造変化誘起能を有し、低毒性かつ顕著な抗 HIV 活性を有することが明らかとなった。

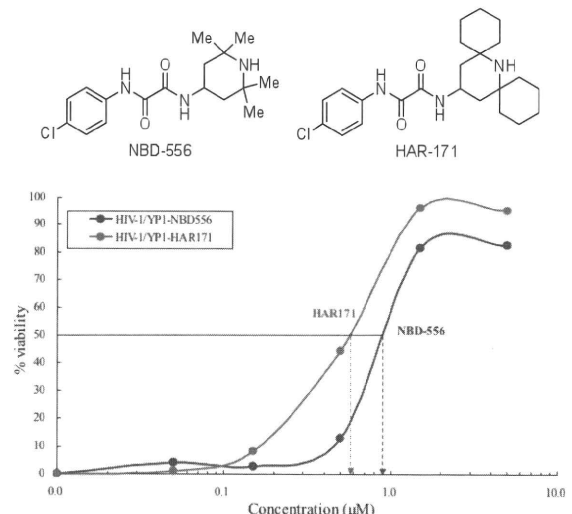


図 2 CD4 ミミック誘導体の構造と CCR5/PM1 細胞による MTT assay

## 【オキサミド部位の構造活性相関研究】

オキサミド部位が生物活性にどのように寄与するかを探る目的で、それぞれのアミド結合を不飽和結合に置換した誘導体を設計した(図3)。クロロアニリン側のアミド結合を置換した誘導体(MSB-020)の合成に成功した。現在、ピペリジン環側のアミド結合を不飽和結合に置換した誘導体(MSB-023)の合成について検討中である。

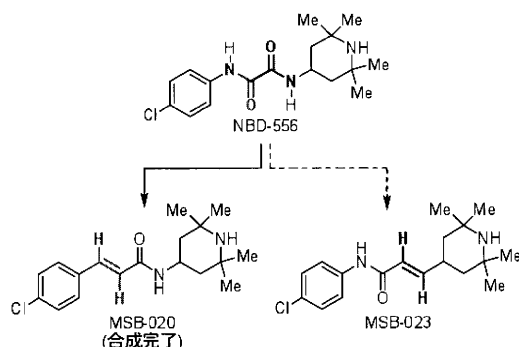


図3 アミド結合を不飽和結合に置換した誘導体の構造

## 4. 考察

新規 HIV 侵入阻害剤の開発のため、本研究では宿主側タンパク質 CD4 の機能を模倣した有機分子を用いるという革新的、斬新なアイデアに基づいている。有機合成化学の特長を活かして、多様な低分子 CD4 ミミック誘導体を合成した。これら化合物の gp120 に与える構造変化、細胞毒性および抗 HIV 活性など生物活性評価も行った。

芳香環部位の構造活性相関により、多環性複素環を導入した誘導体においては、生物活性が消失または減弱した。これにより、CD4 ミミックが相互作用する gp120 の Phe 43 cavity は、多環性複素環のように大きな置換基は適していないことが示唆された。また、ピペリジン環部位の構造活性相関により、ピペリジン環の窒素原子が毒性に大きく寄与していることが示唆された。窒素原子の  $\alpha$  位に高い疎水性官能基であるシクロヘキサン環を二つ導入した誘導体では、顕著な生物活性を有していたことから、CD4 ミミックは Phe 43 cavity 近傍と疎水性相互作用することが示唆された。

## 5. 自己評価

## 1) 達成度について

初年度は申請者らが見出した低分子 CD4 ミミックを化学修飾した CD4 ミミックライブラリーを構築し、リード化合物と同等の構造変化誘起能を有し、低毒性かつ顕著な抗 HIV 活性を有する HAR-171 を見出した。「3. 研究結果」で述べたように、初年度に予定していた gp120 の構造変化を誘起する CD4 ミミック誘導体の構造活性相関研

究は概ね計画的に進行していると判断される。

## 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

本研究課題で得られる HIV 外被タンパク質と細胞表面タンパク質の相互作用様式に関する詳細な情報は、現在 HIV ワクチン研究が直面している「有効なエピトープの枯渇」という問題に対して、重要なヒントを与えるものと考えられる。また、見出した HAR-171 をはじめとする新規リガンドに対し、有機化学的手法によって医薬品プロフィールを向上させることで、新規 HIV 侵入阻害剤の開発が期待できる。このように本研究課題で得られる研究成果は、新規治療薬の開発から HIV 感染予防や治療へ向けた創薬研究への展開が十分に期待され、多剤併用療法が抱える課題(薬剤耐性ウイルスの出現や長期投与による副作用、高額な医療費)の克服が期待できる。

## 3) 今後の展望について

【CD4 ミミック誘導体の構造活性相関研究】平成22年度に引き続き、CD4 ミミック誘導体の構造活性相関研究を進める。これまでの結果から、芳香環部位のクロロアニリン、ピペリジン環部位の高い置換基が生物活性発現に重要であることが明らかとなっている。そこで、初年度の研究によって見出した HAR-171 をリード化合物として、さらに化学修飾することで高活性化および低毒性化など医薬品プロフィールの向上をはかることで、新規 HIV 侵入阻害剤の創製が期待できる。

【V3 loop 領域を模倣した V3 loop ミミックの創製】 HIV 側タンパク質から宿主側への機能解析として、gp120 の V3 loop 領域を模倣した V3 loop ミミックを設計・合成する。V3 loop 領域はコレセプター CCR5/CXCR4 との相互作用に重要な役割を担っている。そこで、この35残基程度からなる V3 loop ペプチドを基に機能性分子を見出すことで、CCR5/CXCR4 の新規拮抗剤の創製が期待できる。

## 6. 結論

HIV の細胞侵入の第一段階である gp120 と CD4 の相互作用様式の解析を目的として、gp120 の構造変化を誘起する CD4 ミミック誘導体の設計・合成を行い、低毒性かつ顕著な抗 HIV 活性を有する HAR-171 を見出した。これらの結果は今後の HIV 侵入阻害剤の開発研究において、重要な基礎的知見を与えるものと思われる。

## 7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

東京医科歯科大学知的財産本部と特許出願要否について相談する予定である。

## 研究発表

## 研究代表者

鳴海 哲夫

- 1) Tanaka T., Nomura W., Narumi T., Masuda A., Tamamura H. Bivalent ligands of CXCR4 with rigid linkers for elucidation of dimerization state in cells. *J. Am. Chem. Soc.*, 130:15899-15901, 2010.
- 2) Nomura W., Mino T., Narumi T., Ohashi N., Masuda A., Hashimoto C., Tsutsumi H., Tamamura H. Development of crosslink-type tag-probe pairs for fluorescent imaging of proteins. *Biopolymers. (Pept. Sci.)*, 94:843-852, 2010.
- 3) Suzuki S., Urano E., Hashimoto C., Tsutsumi H., Nakahara T., Tanaka T., Nakanishi Y., Maddali K., Han Y., Hamatake M., Miyauchi K., Pommier Y., Beutler J. A., Sugiura W., Fuji H., Hoshino T., Itotani K., Nomura W., Narumi T., Yamamoto N., Komano J. A., Tamamura H. Peptide HIV-1 integrase inhibitors from HIV-1 gene products. *J. Med. Chem.*, 53:5356-5360, 2010.
- 4) Suzuki S., Maddali K., Hashimoto C., Urano E., Ohashi N., Tanaka T., Ozaki T., Arai H., Tsutsumi H., Narumi T., Nomura W., Yamamoto N., Pommier Y., Komano J. A., Tamamura H. Peptidic HIV integrase inhibitors derived from HIV gene products: structure-activity relationship studies. *Bioorg. Med. Chem.*, 18:6771-6775, 2010.
- 5) Narumi T., Ochiai C., Yoshimura K., Harada S., Tanaka T., Nomura W., Arai H., Ozaki T., Ohashi N., Matsushita S., Tamamura H. CD4 mimics targeting the HIV entry mechanism and their hybrid molecules with a CXCR4 antagonist. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 20:5853-5858, 2010.
- 6) Nakahara T., Nomura W., Ohba K., Ohya A., Tanaka T., Hashimoto C., Narumi T., Murakami T., Yamamoto N., Tamamura H. Remodeling of dynamic structures of HIV-1 envelope proteins leads to synthetic antigen molecules inducing neutralizing antibodies. *Bioconjugate Chem.*, 21:709-714, 2010.
- 7) Yamada Y., Ochiai C., Yoshimura K., Tanaka T., Ohashi N., Narumi T., Nomura W., Harada S., Matsushita S., Tamamura H. CD4 mimics targeting the mechanism of HIV. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 20:354-358, 2010.
- 8) Narumi, T., Bode, J. W.  $\alpha,\alpha$ -Dichloroisoxazolidinones for the synthesis and chemoselective peptide ligation of  $\alpha$ -peptide  $\alpha$ -ketoacids. *Heterocycles*, *in press*.
- 9) Ohashi N., Nomura W., Narumi T., Lewin N. E., Itotani K., Blumberg P. M., Tamamura H. Fluorescent-responsive synthetic C1b domains of protein kinase C delta as reporters of specific high affinity ligand binding. *Bioconjugate Chem.*, *in press*.
- 10) Nomura W., Narumi T., Serizawa Y., Ohashi N., Lewin N. E., Blumberg P. M., Furuta T., Tamamura H. Synthetic caged DAG-lactones for photochemically-controlled activation of protein kinase C. *ChemBioChem*, *in press*.
- 11) 鳴海 哲夫, 玉村啓和. ペプチドミメティックによる創薬研究. *生化学*. 82:515-523, 2010.

## 研究分担者

なし

