

201108013A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

新規標的に対する小分子化合物を基盤とした抗HIV化学療法剤の開発
(H22-政策創薬-一般-005)

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者 松岡 雅雄
(京都大学ウイルス研究所・教授)

平成24 (2012) 年 3月

目 次

I. 総括研究報告

新規標的に対する小分子化合物を基盤とした抗 HIV 化学療法剤の開発 研究代表者・松岡 雅雄（京都大学ウイルス研究所・教授）	1
---	---

II. 分担研究報告

1. 藤井 信孝（京都大学薬学研究科・教授） 大石 真也（京都大学薬学研究科・講師）	5
2. 村上 努（国立感染症研究所エイズ研究センター・室長）	15

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・刊行物・別刷

1. 松岡 雅雄（京都大学ウイルス研究所・教授）	18
2. 藤井 信孝（京都大学薬学研究科・教授） 大石 真也（京都大学薬学研究科・講師）	34
3. 村上 努（国立感染症研究所エイズ研究センター・室長）	70

新規標的に対する小分子化合物を基盤とした抗 HIV 化学療法剤の開発

研究代表者：京都大学ウイルス研究所 教授 松岡雅雄

研究要旨

HIV 感染症や AIDS に対する抗 HIV 療法において、薬剤耐性 HIV の出現は効果的な治療を妨げる大きな要因であるため、新規作用点を標的とする抗 HIV 剤の開発は、耐性 HIV の制御に必要不可欠である。本研究ではこれまでに同定した新規骨格を有する小分子抗 HIV 化合物の構造最適化研究を行い、高活性化合物の創出を行った。また、HIV 以外のヒト病原性ウイルスに対しても活性を有することを明らかにした。CXCR4 阻害剤の研究では、高活性 CXCR4 拮抗剤の受容体への結合様式の解明、並びに、CXCR4 阻害剤耐性 HIV-1 のコレセプター利用性の変化を解析した。

A. 研究目的

HIV 感染症において、複数の抗 HIV 薬で構成される多剤併用療法の確立は、HIV 感染者の AIDS 発症率低下や AIDS 患者の死亡率低下に大きく寄与している。しかしながら、ウイルスの複製を検出限界以下に抑え、AIDS 発症を防ぐためには終生にわたる抗 HIV 薬の服用が不可欠であることから、必然的に副作用や薬剤耐性 HIV が出現しやすい状況下にある。したがって、既存の薬剤に対する耐性 HIV の制御が可能な新規作用点を標的とする阻害剤の同定や、副作用の出現頻度が低い治療薬の開発などを通じ、より効果的な抗 HIV 療法を確立することが必要である。

そこで本研究課題では、新規標的に対する小分子化合物を基盤とした抗 HIV 化学療法剤の開発を目的とする。具体的には、(1) 我々がこれまでの研究により見出した新規骨格を有する複数の抗 HIV 活性を示す小分子化合物について、富士フィルム株式会社と京都大学の連携により、効率的な構造最適化研究による高活性新規抗 HIV 剤の開発研究、(2) CXCR4 選択的阻害剤について、高活性誘導体開発や耐性プロファイルの解析を通して、CXCR4 阻害剤の実用化へ向けた研究を行う。これらの研究のうち、(1) では、すでにリード化合物 (PD 404182) を同定しており、本年度は、効率的な合成手

法により多くの誘導体を創出し、それらの抗 HIV 活性を解析することで、構造最適化に有用な構造活性相関研究を進めた。また、標的分子・作用機序の解明研究では、有機化学・分子細胞生物学の融合的手法による光プローブを用いた標的分子探索や、ウイルス学的アプローチによる作用機序解析を進めた結果、新規抗 HIV 活性小分子化合物は、ウイルスエンベロープを標的とする可能性を示唆する結果が得られている。また、(2) の研究では、高活性 CXCR4 拮抗剤の受容体への結合様式を解明し、さらには、経口投与可能な高活性 CXCR4 阻害剤の耐性 HIV を用いたコレセプター利用性の変化を解析した。これらの研究から、一連の新規標的小分子抗 HIV 薬を基盤とした新規化学療法剤の開発ならびに臨床応用を目指す。

B. 研究方法

細胞

HeLa-CD4/CCR5-LTR/beta-galactosidase (MAGI/CCR5) 細胞は 10% 熱不活化牛胎児血清 (FCS)、0.2 mg/mL G418、0.2 mg/mL ハイグロマイシン、および、0.05 mg/mL ピューロマイシンを含む Dulbecco's modified Eagle medium 中で培養した。

抗 HIV 活性の評価

抗 HIV 活性の評価には multinuclear activation of a galactosidase indicator

(MAGI) assay を用いた。抗 HIV 活性は、HIV の感染を 50%阻害する濃度 (EC₅₀) を算出し評価した。

抗 HIV 活性を有する小分子化合物の誘導体作製

構造活性相関研究を行うため、PD 404182 の構造をヘテロ原子部位、ベンゼン環部位、アミジン環部位の 3 つに細分化し、各々について検討を行った。昨年度までに得られた誘導体をベースに、さらに高活性化を図るため、種々の置換基の導入ならびに、今年度は特にアミジン環部位の修飾効果について検討した。

光プローブを用いた標的分子同定

HIV 持続感染細胞を、昨年度までに合成したビオチン標識基とベンゾフェノン光親和性官能基を有する光プローブで処理し、UV 照射により標的分子と共有結合させた。続いて、ストレプトアビジンビーズにより光プローブ-標的分子複合体を精製し、SDS-PAGE により分離後、HRP により検出した。

抗ウイルススペクトル解析

上記で合成した新規抗 HIV 活性小分子化合物の抗ウイルススペクトル解析を行った。対象ウイルスとして、インフルエンザ A ウイルス (PR8 株) [MTT 法]、アデノウイルス (Ad5) [luciferase 法]、ヒト単純ヘルペスウイルス 2 型 [プラーク法] を用いた。

新規 CXCR4 拮抗剤の受容体結合様式解析

高活性 CXCR4 拮抗剤である FC131 ならびにその誘導体の溶液中でのコンフォメーションは NMR により測定した。得られた結果と、近年報告された CXCR4 の X 線結晶構造解析情報をもとに、分子モデリングにより受容体との結合様式を解析した。

CXCR4 阻害剤耐性 HIV-1 のコレセプター利用能の検討

CXCR4 阻害剤耐性 HIV-1 由来の Env 組換え NL4-3 のコレセプター利用能を検討した。標的細胞として、U87.CD4 細胞に CXCR4 を発現させた U87.CD4.CXCR4、CCR5 を発現させた U87.CD4.CCR5 を用いた。ウイルスには、対照として、X4 指向性

野生型 NL4-3 株と、R5 指向性 NL(AD8) を用いた。ウイルス感染後、5 日目の培養上清を回収し、p24 濃度を測定することでコレセプター利用性を解析した。

(倫理面への配慮)

基礎的研究であり該当しない

C. 研究結果

抗 HIV 活性を有する小分子化合物の誘導体作製

昨年度までに、9 位及び 10 位に臭素原子を導入した化合物において、2 倍程度の抗 HIV-1 活性の向上が認められた。そこで、今年度はこの臭素基を利用して様々な官能基を導入した誘導体を作製した。その結果、ジメチルアミノ基やメトキシ基、スチリル基、ペンテニル基などを導入した種々の誘導体では、活性のさらなる向上は認められなかった。

一方、アミジン環の構造活性相関研究において、メチル基を導入した誘導体や、六員環の代わりに七員環としたアミジンでは、活性の向上が認められた。

光プローブを用いた標的分子同定

昨年度までに合成した、ビオチン標識基と光感受性官能基を有する種々の光プローブを用いて、抗 HIV 活性に必要な標的分子の同定を試みた。その結果、これまで合成した光プローブのうち、プローブ 1 を用いた場合のみ、8 つのバンドが検出された。これらのバンドは、より抗 HIV-1 活性が強い化合物との競合により消失したことから、これらのバンドで示されるタンパク質は、新規抗 HIV 活性小分子化合物と結合していることが示唆された。

抗ウイルススペクトル解析

現在までに開発されている抗ウイルス剤は、適用可能なウイルス種が比較的限られている。広範な抗ウイルス活性を示す薬剤は、現在の新興・再興ウイルス感染症に対抗可能な有効なツールとなり得る可能性を有する。そこで、本研究課題で扱う新規抗 HIV 活性小分子化合物の、HIV 以外のウイ

ルスに対する活性を解析し、得られた抗ウイルススペクトラムから対応可能なウイルス感染症を明らかにすると共に、感受性ウイルスに共通する分子を解析し、標的分子・作用機序解明に情報をフィードバックすることを目的として研究を行った。

新規抗 HIV 活性小分子化合物は、インフルエンザ A ウイルス (PR8 株) に、対照化合物として用いたリバビリンと同程度の活性を示した。また、ヒト単純ヘルペスウイルス 2 型に対しても、抗 HIV 活性より劣るが、ウイルスの複製を抑制した。しかしながら、アデノウイルスの感染は抑制しなかった。HIV やインフルエンザ A ウイルス、ヒト単純ヘルペスウイルスはエンベロープウイルスであるが、アデノウイルスはエンベロープを有しないことから、新規抗 HIV 活性小分子化合物はウイルスエンベロープを標的としている可能性が示唆された。

新規 CXCR4 拮抗剤の受容体結合様式解析

近年、X 線結晶構造解析により明らかとなった CVX15-CXCR4 複合体の結合様式をベースに、高活性 CXCR4 拮抗剤である FC131 およびその誘導体の結合様式を分子モデリングにより解析した。その結果、CVX15 の受容体結合に必要な Arg² および NaI³ は、FC131 の Arg³ および NaI⁴ に相当していた。今回得られた結果は、今後の小分子 CXCR4 阻害剤の開発に有用となると思われる。

CXCR4 阻害剤耐性 HIV-1 のコレセプター利用能の検討

CXCR4 阻害剤耐性 HIV から得られた Env 組換え NL4-3 は、U87. CD4. CXCR4 細胞でのみ感染・複製が認められ、U87. CD4 や U87. CD4. CCR5 細胞では複製不能であった。以上の結果は、CXCR4 阻害剤耐性 HIV-1 は親株である NL4-3 と同様の CXCR4 指向性を示し、CXCR4 阻害剤耐性によりコレセプター利用能の変化は起こらなかったことを示している。

D. 考察

抗 HIV 活性を有する新規小分子化合物に関する研究では、化合物の 9 位、10 位に

疎水性官能基を導入することで活性の上昇が認められたことから、ピリミドベンズチアジン骨格のベンゼン環周辺には標的物質との疎水性の相互作用が存在すると考えられる。新規小分子化合物は、HIV 以外の、エンベロープを有するヒト病原性ウイルスに対しても活性を示したことから、標的分子はウイルスエンベロープ中に存在することが強く示唆された。光プローブを用いた標的分子同定に関する研究では、昨年度までに合成されたプローブにより数種類のタンパク質が検出され、競合剤の存在により消失したことから、これらのタンパク質が PD 404182 と結合していることが示唆された。この結果から、PD 404182 は複数のタンパク質に作用して抗 HIV 活性を示す可能性が示唆された。

今回得られた CXCR4 阻害剤耐性 HIV-1 株の Env 領域の変異はコレセプター利用能の変化 (X4 から R5) を伴わないで数倍程度の薬剤耐性を可能にした。より高度な CXCR4 阻害剤耐性を獲得する場合にのみコレセプター利用能の変化が必要になる可能性が考えられる。

E. 結論

本年度の新規抗 HIV 活性小分子化合物の開発研究では、構造最適化研究をさらに展開した結果、リード化合物に比べ、4 倍強い活性値を示す誘導体を得た。標的分子・作用機序解明研究では、誘導体作製から得られた情報や、光プローブ法ならびに抗ウイルススペクトル解析により、ウイルスエンベロープ中における新規化合物との疎水性相互作用が重要である可能性が示されたが、標的分子は単一でない可能性も残されている。また、CXCR4 拮抗剤に関する研究では、分子モデリング解析やコレセプター利用能解析により、小分子 CXCR4 阻害剤開発に有用な知見や、耐性 HIV の性質に関する情報が得られ、今後の開発研究の進捗に繋がる成果が得られた。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Izumi K, Watanabe K, Oishi S, Fujii N, Matsuoka M, Sarafianos SG, Kodama EN. Potent anti-HIV-1 activity of N-HR-derived peptides including a deep pocket-forming region without antagonistic effects on T-20. Antivir. Chem. Chemother 22(1):51-5, 2011.
2. Inokuchi E, Oishi S, Kubo T, Ohno H, Shimura K, Matsuoka M, Fujii N. Potent CXCR4 antagonists containing amidine type peptide bond isosteres. ACS Med. Chem. Lett 2(6):477-80, 2011.
3. Sugata K, Satou Y, Yasunaga JI, Hara H, Ohshima K, Utsunomiya A, Mitsuyama M, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor impairs cell-mediated immunity by suppressing production of Th1 cytokines. Blood 119(2):434-444, 2011.

2. 学会発表

1. 志村和也、大石真也、藤井信孝、松岡雅雄：HIV-1 膜融合阻害剤に対する新規耐性メカニズムの解析：第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2011 年 11 月 30 日 - 12 月 2 日
2. Kenji Sugata, Yorifumi Satou, Jun-ichirou Yasunaga, Kisato Nosaka, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor perturbs immune response to the pathogens in vivo by inhibiting IFN-gamma production: 15th INTERNATIONAL CONFERENCE ON HUMAN RETROVIROLOGY HTLV AND RELATED VIRUSES. Leuven, Belgium. June 4-8, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

分担研究報告書（藤井信孝・大石真也）
「H. 知的財産権の出願・登録状況」
参照

2. 実用新案登録

該当事項なし

3. その他

該当事項なし

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

新規標的に対する小分子化合物を基盤とした抗 HIV 化学療法剤の開発

研究分担者：京都大学大学院薬学研究科 藤井 信孝
大石 真也

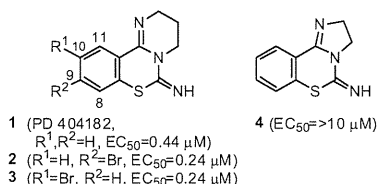
研究要旨 昨年度に引き続き、抗 HIV 活性を有する PD 404182 の構造最適化研究を行い、高い生物活性を有する誘導体の開発を行った。その結果、強力な抗 HIV 活性を有する化合物を獲得した。また、昨年度の研究において合成した光アフィニティープローブと、HIV の持続感染細胞もしくは MAGI 細胞を用いて、PD 404182 の標的物質の同定を目的とした実験を行った。さらに、CXCR4 拮抗剤 FC131 とその高活性誘導体の受容体結合様式を明らかにした。

分担研究項目 1：抗 HIV 活性小分子化合物の構造最適化

A. 研究目的

研究グループでは、新規抗 HIV 活性化合物の探索を目的としたランダムスクリーニングを行い、pyrimidobenzothiazin-6-imine 骨格を有する PD 404182 (1) が抗 HIV 活性を示すことを見出している。昨年度までに展開した構造活性相関研究により、1 の 9 位もしくは 10 位に臭素原子を導入した化合物 2 または 3 が 1 に比較して約 2 倍の活性を示すことを見出した。また、アミジン部位を五員環に変換すると活性が著しく低下するという興味深い結果を得た (Figure 1)。そこで本年度は、9 位もしくは 10 位の臭素基を利用して様々な官能基を導入することで、より高活性な化合物が得られると考え、構造最適化研究を行った。さらに、アミジン環の環拡大や置換基導入を含めた構造活性相関研究を行い、アミジン環の修飾の効果について精査した。

Figure. 1 Structure of PD 404182 (1), and the Potent anti-HIV Derivatives (2- 4).



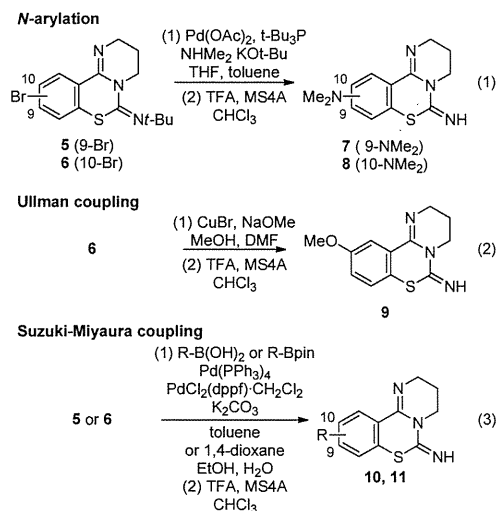
B-C. 研究方法・結果

PD 404182 の誘導体合成

まず、合成した化合物 5 及び 6 のそれぞれに対し、N-アリアル化 (式 1)、ウルマン

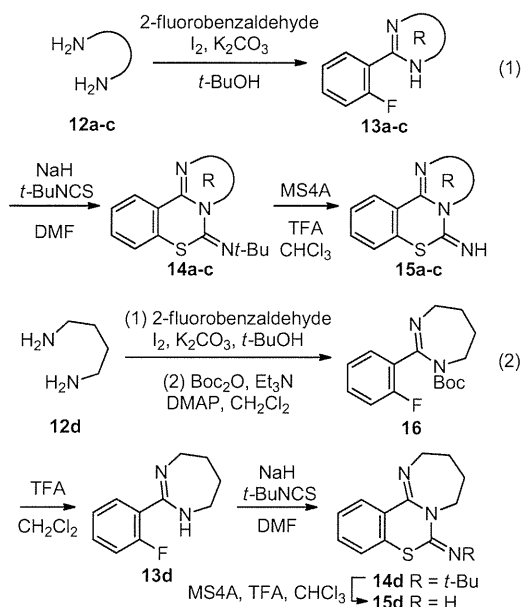
カップリング (式 2) もしくは鈴木宮浦カップリング (式 3) を行った。続いて TFA により *tert*-ブチル基を脱保護することで、目的とする PD 404182 誘導体 7-11 を高収率で得た (Scheme 1)。

Scheme 1. Synthesis of PD 404182 Derivatives.



続いて、アミジン環上に官能基を導入した化合物の合成を行った (Scheme 2)。六員環のアミジン 13a-c の形成は問題なく進行した (式 1) が、七員環のアミジンの形成は効率よく進行しなかった。そこで、反応混合物に対し、Boc₂O を作用させ Boc 保護体 16 として単離した (式 2)。引き続き、TFA により 16 の Boc 基の脱保護を行い、純粋な七員環のアミジン 13d を得た。*tert*-ブチルイソチオシアナートとの芳香族求核置換反応と続く *tert*-ブチル基の脱保護により PD 404182 誘導体 15a-d を合成した。

Scheme 2. Synthesis of PD 404182 Derivatives.



合成した化合物の抗 HIV 活性評価

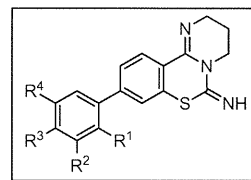
合成した化合物を、MAGI アッセイを用いて活性評価を行った (Table 1-4)。

Table 1. Anti-HIV Activity of PD 404182 Derivatives

entry	R ¹	R ²	EC ₅₀ (μM)
1	NMe ₂	H	4.74
2	H	NMe ₂	2.12
3	H	OMe	0.53
4	Ph	H	0.24
5	H	Ph	0.24
6	CH ₂ =CH	H	0.18
7	H	CH ₂ =CH	0.40
8	PhCH=CH	H	0.25
9	<i>n</i> -PrCH=CH	H	0.24
10	<i>n</i> -Bu	H	0.40

まず、*N*-アリアル化により 9、10 位にジメチルアミノ基を導入した化合物では、活性が著しく低下した (Table 1)。また、メトキシ基を 10 位に導入した場合は PD404182 に比較して、活性がやや低下した。続いて、Ph 基やビニル基などの疎水性官能基を導入した化合物を検討した。Ph 基の導入は 9 位でも 10 位でも対応する Br 体と同等の活性を示した。一方、9 位にビニル基を有する化合物はいくらか活性が上昇したものの、10 位にビニル基を導入した場合は活性がやや低下した。そこで、9 位にスチリル基、ペンテニル基を導入したが、活性は変化しなかった。ブチル基では活性がやや低下した。

Table 2. Anti-HIV Activity of PD 404182 Derivatives.



entry	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	EC ₅₀ (μM)
1	H	H	OMe	H	0.24
2	H	H	SMe	H	0.20
3	H	H	OCF ₃	H	0.38
4	H	H	CO ₂ Me	H	0.81
5	H	H	CN	H	0.44
6	H	H	CF ₃	H	0.55
7	H	H	NO ₂	H	0.46
8	H	H	CONH ₂	H	8.71
9	H	OMe	H	H	0.15
10	H	<i>Oi</i> -Pr	H	H	0.32
11	H	Ph	H	H	1.35
12	H	CH(OH)CH ₃	H	H	1.19
13	H	CO ₂ Me	H	H	0.39
14	H	CN	H	H	1.17
15	H	NO ₂	H	H	1.26
16	H	NHAc	H	H	>10
17	H	NHMs	H	H	>10
18	H	OH	H	H	2.62
19	OMe	H	H	H	0.41
20	Ph	H	H	H	0.32
21	H	OMe	OMe	H	0.27
22	H	Cl	OMe	H	0.32
23	H	OMe	OMe	OMe	0.25
24	OMe	H	H	Cl	0.48

続いて、置換基を有するフェニル基を 9 位に導入した化合物を検討した。パラ位、メタ位にかかわらず、電子供与性のメトキシ基やメチルチオ基を導入した化合物で活性の維持もしくは上昇が認められた (entry 1, 2, 9, Table 2)。一方で、電子求引性基を導入したすべての化合物において活性の低下が認められた。(entry 4-7, 13-15) また、親水性の置換基の導入も活性値を大きく低下させた (entry 8, 16, 17)。

次に、9 位に様々なアリアル基を導入した化合物の活性評価を行った (Table 3)。ナフチル基では置換位置によって活性の上昇と低下が観察された (entry 1, 2)。ベンゾジオキソールを導入した場合、最も高い活性を示した (entry 3)。また、ジヒドロベンゾジオキシンの活性は化合物 2 とほぼ同等であった (entry 4)。ピリジンを導入した場合、置換位置にかかわらず活性が低下し (entry 5, 6)、イソキノリンは活性を変化させなかった (entry 7)。インドール環を有する化合物では細胞毒性が認められた (entry 8, 9)。五員環複素環では、フラン、チオフェンを導入した場合に、活性の維持もしくは改善が認められた一方で、イミダゾール、ピラゾールでは活性が低下した (entry 10-15)。

Table 3. Anti-HIV Activity of PD 404182 Derivatives.

entry	Ar	EC ₅₀ (μM)
1		0.20
2		0.39
3		0.15
4		0.26
5		0.45
6		0.54
7		0.25
8		>1.00
9		>1.00
10		0.26
11		0.20
12		0.22
13		0.26
14		5.12
15		0.42

Table 4. Anti-HIV Activity of PD 404182 Derivatives.

entry	R	EC ₅₀ (μM)
1		3.78
2		0.35
3		0.24
4		0.31

続いて、アミジン環の構造活性相関研究を行った (Table 4)。まず、ベンゼン環の縮環により活性の大幅な低下が認められた (entry 1)。一方、六員環アミジンへのメチル基の導入により、活性は上昇し (entry 2, 3)、七員環アミジンに環拡大した誘導体でも活性がやや改善した (entry 4)。

(倫理面への配慮)

該当事項なし

D. 考察

9位、10位に疎水性官能基を導入することで活性の上昇が認められたことから、ピリドベンゾチアジン骨格のベンゼン環周辺には標的物質との疎水性の相互作用が存在すると考えられる。また、アミジン環は、五員環では活性が消失したのに対し、七員環のアミジン環を有する化合物では活性の上昇が認められた。この結果は、アミジン部位を五員環にすると活性に重要なベンゾチアジンイミン骨格に歪みが生じることで活性を消失させる一方で、六・七員環ではこの分子骨格の歪みが生じないことを示唆している。

E. 結論

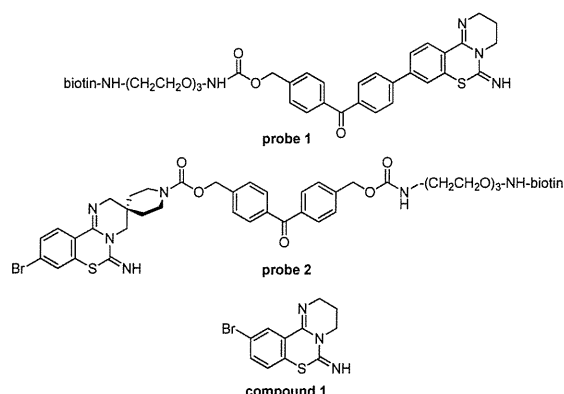
昨年度に見出した抗 HIV 活性化合物の構造最適化を更に展開し、PD 404182 に比べ 4 倍の活性値を示す誘導体を得た。また、さらなる構造最適化に有用な構造活性相関情報を取得した。

分担研究項目 2 : 抗 HIV 活性小分子化合物の光アフィニティープローブを用いた標的分子同定研究

A. 研究目的

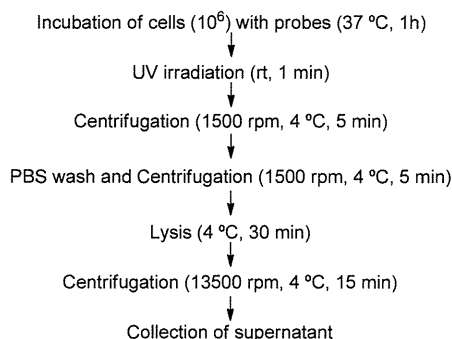
昨年度に開発したビオチン標識基とベンゾフェノン光親和性官能基を有するプローブ (1, 2, Figure 1) を用いて、PD 404182 の抗 HIV 作用における標的分子を同定する。

Figure 1. Structures of PD 404182-based probes and competitive compound.



B-C. 研究方法・研究結果

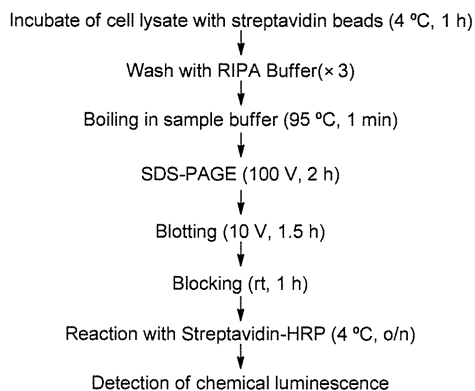
Scheme 1. Protocols for the preparation of cell lysate reacted with probes.



まず、標的分子同定実験を HIV の持続感染細胞である H9IIIB 細胞を用いて行った。細胞を上記のプローブ (20 μM) 存在下、37°C で 1 時間インキュベートし、続いて UV を 1 分間照射した。細胞を回収し、遠心分離と PBS での洗浄を繰り返した後、細胞を RIPA バッファーで可溶化した。遠心分離を行い、上清を取り、可溶化タンパク質を得た (Scheme 1)。

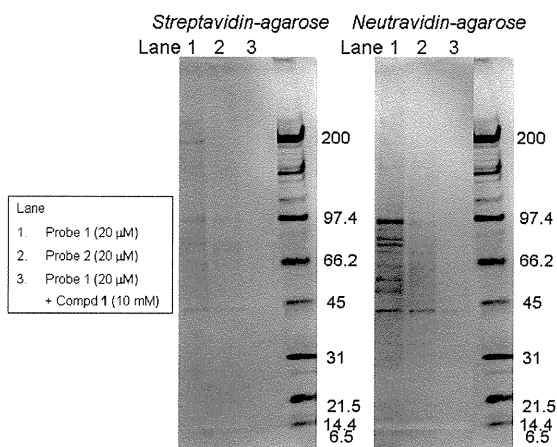
得られた可溶化タンパク質をストレプトアビジンビーズと反応させた後、RIPA バッファーで洗った。SDS サンプルバッファー中で 95°C に加熱して、ビオチン-ストレプトアビジン複合体を解離させ、SDS-PAGE

Scheme 2. Protocols for pull-down experiment and western blotting (Sav-HRP).



により結合タンパク質を分離した。PVDF 膜に転写後、ストレプトアビジン-Horseradish peroxidase (HRP) により、ビオチンが結合したタンパク質を検出した (Scheme 2)。

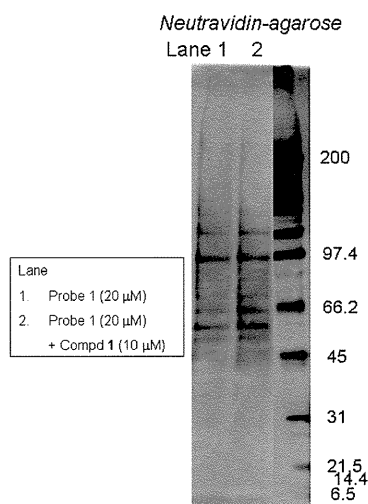
Figure 2. Western blotting of probe reacted cell lysate.



次に、プルダウン実験にストレプトアビジンアガロースビーズを用いて行った。プローブ 1 とプローブ 2 を用いた場合のどちらにおいても、ビオチン付加タンパク質のバンドは明確に検出されなかった (Figure 2)。そこで、様々なストレプトアビジン付加ビーズを用いて実験を行ったところ、ニュートロアビジンアガロースビーズを用いた場合にバンドが強く検出された。プローブ 1 を用いた場合は、8 つのバンドが検出されたが、プローブ 2 ではそれらのバンドは検出されなかった。また、プローブ 1 に加えてより高い結合親和性を持つ化合物 1 (10 μM) を用いた場合、プローブ 1 によって検出されたタンパク質が消失した (Figure 2)。

続いて、同様の実験を化合物の活性評価に用いる MAGI 細胞に対して行った (Figure 3)。その結果、プローブ **1** を用いた場合にタンパク質が検出された。しかしながら、競合剤として化合物 **1** を加えた場合にも、それらのバンドは検出され、H9III B 細胞を用いた場合と異なる結果となった。

Figure 3. Western blotting of probe-reacted cell lysate.



(倫理面への配慮)

該当事項なし

D. 考察

H9III B 細胞を用いたウエスタンブロットの実験結果から、プローブ **1** の光親和性官能基の配置は、プローブ **2** に比較して、タンパク質の検出において有利であることがわかった。また、プローブ **1** が多くのタンパク質を検出したこと、またそれらのタンパク質のバンドが競合剤の存在下において検出されなかったことから、これらのタンパク質が PD 404182 と結合していることが示唆された。この結果から、PD 404182 は複数のタンパク質に作用して抗 HIV 活性を示す可能性が示唆された。一方で、MAGI 細胞を用いて行った際に検出されたバンドが競合剤の存在下でも検出されたため、プローブがタンパク質と非特異的に結合している可能性も考えられる。

E. 結論

昨年度に開発したプローブを用いてタンパク質のビオチン標識化とウエスタンブロットによる検出を行った。その結果、数種類のタンパク質のバンドが検出された。今後、H9III B 細胞、MAGI 細胞のどちらの細

胞を用いても同様の実験結果が得られるように条件の検討を行う。また、ウイルス粒子のみに対しても同様の実験を行うなどして、検出されたタンパク質の特異性を調べ、標的タンパク質を同定する予定である。

F. 健康危険情報

該当事項なし

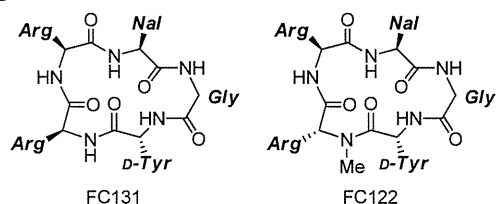
分担研究項目 3：新規 CXCR4 拮抗剤の合成と受容体結合様式の解明

A. 研究目的

ケモカイン受容体 CXCR4 は HIV-1 の宿主細胞への侵入時のコレセプターであることから、CXCR4 拮抗剤は HIV 関連疾患の有力な治療薬になるものと期待されている。

研究グループではこれまでに、強力な CXCR4 拮抗活性を示す環状ペプチド FC131 (**1**)を開発し、種々のペプチドミメティクスを導入した誘導体による構造活性相関研究を展開してきた (Figure 1)。

Figure 1. Structures of FC131 and FC122.

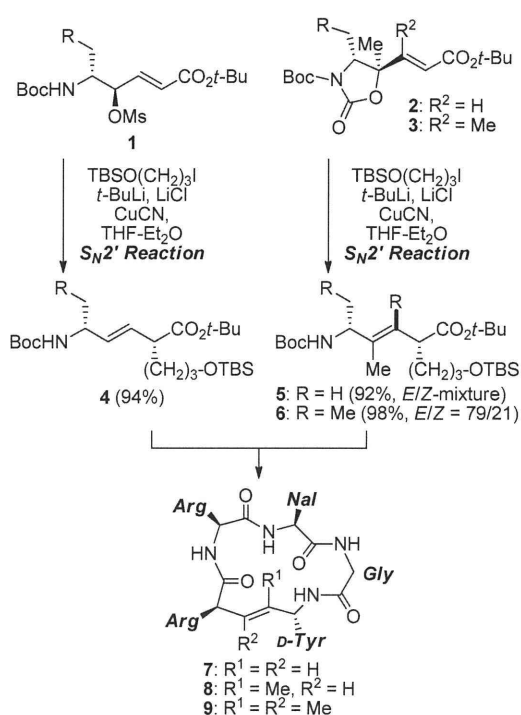


また、さらに詳細な FC131 の構造活性相関研究を行い、Arg² の *N*-メチル化及び立体配置の変換がその活性に影響を及ぼすことを報告した。しかしながら、FC122 の D-Tyr¹-D-MeArg² 間のペプチド結合の約 30%はシス配座で存在しており、その活性に寄与するコンフォメーションは明らかでなかった。研究グループでは、シス-トランス異性化を起こさないアルケン型ペプチドイソスターを導入した各種 FC131 誘導体の活性評価と構造解析を行い、FC131 及びその誘導体の活性コンフォメーションを精査した (Figure 1)。

B-C. 研究方法・研究結果

各種誘導体の合成：D-チロシンから誘導したメシラート **1** 及びオキサゾリジノン **2, 3** に対する有機銅試薬を用いた S_N2' 反応を鍵反応として FC131 の D-Tyr¹-Arg² ジペプチド部位に相当する 3 種類の (*E*)-アルケン型

Scheme 1. Synthesis of Alkene Isostere-containing FC131 Derivatives.



ジペプチドイソスター**4-6**を立体選択的に合成した (Scheme 1)。

つづいて、得られたジペプチドイソスターを Fmoc 固相合成法によりペプチド鎖へ導入後、一連の反応により FC131 誘導体 **7-9** へと導いた。Arg² に相当するアミノ酸残基部位のエピマー**10** は同様の合成経路により、イソスター部位を飽和炭素鎖とした誘導体 **11** はペプチド**7** を接触水素化反応に付すことにより、それぞれ合成した。

Table 1. Biological Activity of FC131 and the Derivatives.

Peptide	Sequence	IC ₅₀ (μM)
FC131	cyclo(-D-Tyr-Arg-Arg-Nal-Gly-)	0.084
7	cyclo(-D-Tyr-ψ[(<i>E</i>)-CH=CH]-Arg-Arg-Nal-Gly-)	0.33
8	cyclo(-D-Tyr-ψ[(<i>E</i>)-CMe=CH]-Arg-Arg-Nal-Gly-)	0.50
9	cyclo(-D-Tyr-ψ[(<i>E</i>)-CMe=CMe]-Arg-Arg-Nal-Gly-)	2.5
10	cyclo(-D-Tyr-ψ[(<i>E</i>)-CMe=CMe]-D-Arg-Arg-Nal-Gly-)	0.10
11	cyclo(-D-Tyr-ψ[CH ₂ -CH ₂]-Arg-Arg-Nal-Gly-)	>10
FC162	cyclo(-D-Tyr-MeArg-Arg-Nal-Gly-)	0.29
FC122	cyclo(-D-Tyr-D-MeArg-Arg-Nal-Gly-)	0.063

生物活性の評価：得られた各誘導体の生物活性は、放射標識 SDF-1 の CXCR4 への結合に対する阻害活性として評価した。イソスターを含むペプチドのうち、D-Tyr¹-D-MeArg² ジペプチドを変換したペプチド **10** が最も高い活性を示し、その他の誘導体も含めこれまでに得られた FC131 誘導体の構造活性相関と一致する結果が得られた。当該ペプチド結合部分が平面構造とならないペプチド **11** は、受容体結合阻害活性を示さなかった。四置換アルケン型イソスターが *N*-メチルペプチド結合等価体として機能していること、および、FC122 の活性コンフォメーションにおいて、D-Tyr¹-D-MeArg² 間のペプチド結合はトランス配座であることが示唆された (Table 1)。

溶液中でのコンフォメーション解析：FC131 とその誘導体の活性コンフォメーションを同定する目的で、ペプチド **7-10** の ¹H-NMR スペクトルを測定した。ペプチド **7-9** は、FC131 とよく似たイソスター部位周辺の NOE パターンを示した一方で、ペプチド **10** は DMSO 溶液中で 2 つのコンフォメーションをとっていることが示唆され

Figure 1. Superimposed low-energy structures of FC131 (gray) and the isostere-containing derivatives: (a) **7** (blue), (b) **8** (green), (c) **9** (yellow), (d) **10-A** (orange), and (e) **10-B** (pink).

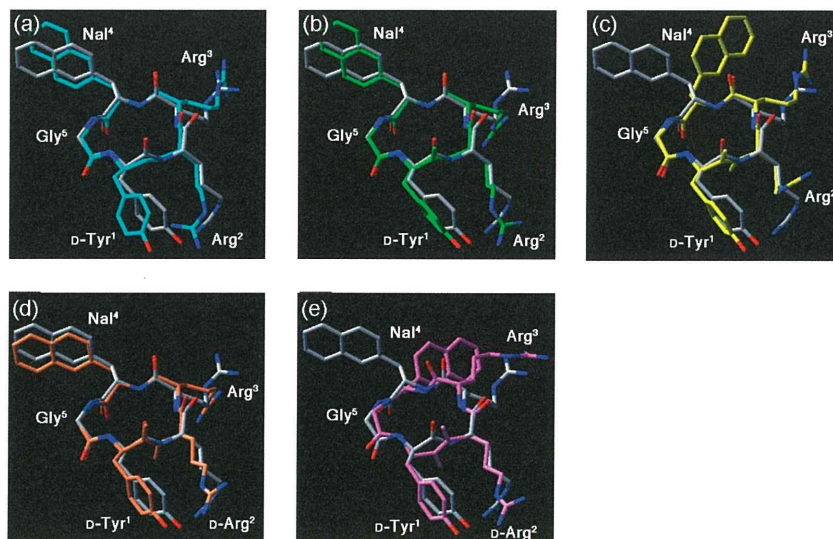


Figure 2. Binding modes of FC131 derivatives: (a) FC131, (b) 7, and (c) 8.

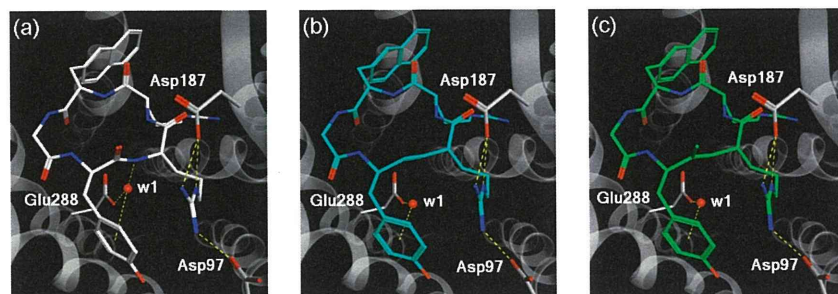


Figure 3. Binding modes of FC131 derivatives: (a) FC162 and (b) 9.

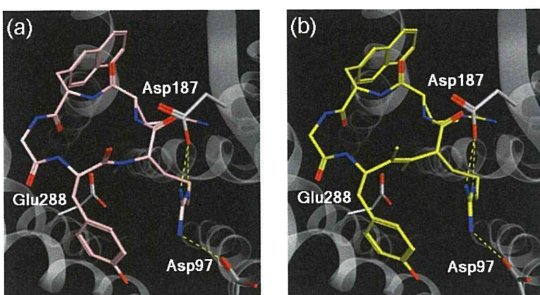
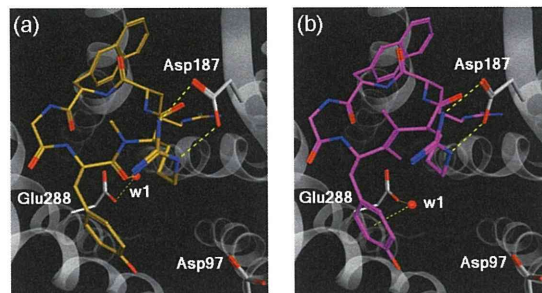


Figure 4. Binding modes of FC131 derivatives: (a) FC122 and (b) 10.



た (Figure 1)。このうち、コンフォメーション **10-A** の主鎖構造は FC131 とよく類似していた一方、**10-B** の主鎖構造は D-Tyr¹-D-MeArg² ジペプチド部位について FC131 とは異なっていた。

CXCR4 との結合様式の解明 : NMR 解析により得られた溶液中でのコンフォメーションと、近年報告された CXCR4 の X 線結晶構造解析の情報をもとに、分子モデリングによる FC131 とその誘導体の結合様式の解析を行った。

まず、FC131 では、Arg² のグアニジノ基が CXCR4 の Asp97 および Asp187 と相互作用しており、Arg² のアミド水素が結晶水を介して Glu288 と水素結合ネットワークを形成していることが示唆された (Figure 2a)。また、Arg³ のグアニジノ基は、CXCR4 の His113、Thr117、および Asp171 と相互作用しており、Nal⁴ のカルボニル基は Tyr255 および Glu288 の側鎖と結晶水を介する水素結合を形成していた。これらの FC131 のアミノ酸側鎖が関与する相互作用は、以下に示すイソスターを含むペプチド **7-10** においても共通して認められた。

CXCR4 結合時の二置換アルケン型イソスター含むペプチド **7** のコンフォメーションは FC131 とほぼ同等であり、側鎖の水素結合ネットワークも維持されていた (Fig-

ure 2b)。FC131 に比べて活性の低下が認められたのは、イソスターの導入により一部の水素結合が失われたことによるものと考えられる。ペプチド **8** においても、ペプチド **7** と同様の結合様式が得られ (Figure 2c)、FC131 の D-Tyr¹ のカルボニル酸素およびペプチド **8** のイソスター部位の γ -メチル基はいずれも受容体結合には寄与しないことが示唆された。

ペプチド **9** もまた、FC131 と同様の結合様式で受容体と相互作用していたが、イソスターの β -メチル基の存在により結晶水の位置に水分子を結合様式に含むことができず、水素結合ネットワークの一部が失われていることが示唆された (Figure 3b)。この β -メチル基は FC162 の MeArg² の *N*-メチル基に相当し、FC162 の低活性を裏付けるものである (Figure 3a)。

最後に、ペプチド **10** の結合様式について検討を行った。まず、FC131 と類似したコンフォメーションである **10-A** を初期構造としてモデリングを行ったところ、ペプチド **7-9** の結合様式とよく似たモデルを構築することができた。しかしながら、ペプチド **10** の優れた活性を裏付ける合理的な解釈を与えることができなかった。このため、もう 1 つのコンフォメーションである **10-B** を用いてモデリングを行ったところ、アルケン部位がフリップした別の結合様式で相

相互作用していることが示唆された (Figure 4b)。このモデルでは、Arg² のグアニジノ基が Asp187 と 2 つの相互作用をしており、また、イソスターの β-メチル基がペプチド結合の自由回転を抑制することで受容体への結合の際のエントロピーロスを減弱させていることが示唆された。

さらに、これまでの研究により得られたペプタペプチド骨格を有する CXCR4 拮抗剤のうち、最も高い活性を示した FC122 の結合様式は、ペプチド **10** の結合様式をもとに得られたモデルがより妥当なものであると評価できた (Figure 4a)。すなわち、FC122 の CXCR4 との結合時の構造は、溶液中のコンフォメーションとは異なるものであり、FC122 の D-Tyr¹-D-MeArg² ジペプチド周辺の部分構造は、ペプチド **10** とよく類似していた。

(倫理面への配慮)

該当事項なし

D. 考察

本研究では、近年 X 線結晶構造解析による受容体-リガンド複合体構造が報告された CVX15 (16 残基ペプチド) の結合様式をもとに、FC131 およびその誘導体の結合様式解析を行った。FC131 およびその誘導体は、CVX15 の受容体結合に必須と想定される相互作用をすべて共有していた。すなわち、FC131 の Arg³ と Nal⁴ は、CVX15 の Arg² および Nal³ に相当する。この結果は、これまで研究グループが実施してきた T140 の構造活性相関データとも一致するものであり、今後の小分子 CXCR4 拮抗剤の分子設計のための有用な指針を与える知見である。

E. 結論

本研究項目では、FC131 の活性コンフォメーションと受容体結合様式を解明する目的で、4 つのアルケン型ジペプチドイソスターを利用した構造活性相関研究を実施した。各誘導体の生物活性評価により、活性発現の鍵となる D-Tyr¹-Arg² ジペプチド部位がトランス配座で受容体と相互作用していることが示唆された。また、NMR による溶液中での構造解析により、ペプチド **10** が他のペプチドとは異なる特徴的なコンフォメーションをとることが明らかとなった。

これらの情報をもとに、最近 X 線結晶構

造が明らかにされた CXCR4 との結合様式を解析したところ、FC131 およびその誘導体はいずれもよく似た相互作用様式により受容体と結合している一方で、D-Tyr¹-D-MeArg²-ジペプチド構造もしくはその等価体部分構造を有する FC122 およびペプチド **10** は、当該ジペプチド部位の配座が異なる別の相互作用様式で受容体と結合していることが示唆された。

昨年度の本研究項目で得られたアミジンイソスターを有する新規高活性 CXCR4 拮抗剤とともに、本研究により得られた 2 つの特徴的な結合様式は、今後新たな CXCR4 拮抗剤を創製するための有用な知見になるものと期待される。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Izumi K, Watanabe K, Oishi S, Fujii N, Matsuoka M, Sarafianosc SG, Kodama E. Potent anti-HIV-1 activity of N-HR-derived peptides including a deep pocket-forming region without antagonistic effect on T-20. *Antivir. Chem. Chemother.* 22(1) 51-55 (2011)
2. Dar A, Schajnovitz A, Lapid K, Kalinkovich A, Itkin T, Ludin A, Kao W, Battista M, Tesio M, Kollet O, Cohen NN, Margalit R, Buss EC, Baleux F, Oishi S, Fujii N, Larochelle A, Dunbar CE, Broxmeyer HE, Frenette PS, Lapidot T. Rapid mobilization of hematopoietic progenitors by AMD3100 and catecholamines is mediated by CXCR4-dependent SDF-1 release from bone marrow stromal cells. *Leukemia*, 25(8) 1286-1296 (2011)
3. Kuil J, Yuan H, Buckle T, van den Berg NS, Oishi S, Fujii N, Josephson L, van Leeuwen FWB. Synthesis and evaluation of a bimodal CXCR4 antagonistic peptide. *Bioconj. Chem.* 22(5) 859-864 (2011)
4. Nishizawa K, Nishiyama H, Matsui Y, Kobayashi T, Kotani H, Masutani H, Oishi S, Saito R, Toda Y, Fujii N, Yodoi J, Ogawa O. Thioredoxin interacting protein suppresses bladder carcinogenesis. *Carcinogenesis*,

- 32(10) 1459-1466 (2011)
- Buckle T, Van den Berg NS, Kuil J, Bunschoten A, Oldenburg J, Borowsky AD, Wesseling J, Masada R, Oishi S, Fujii N, Van Leeuwen, F.B. Non-invasive longitudinal imaging of tumor progression using an ¹¹¹Indium labeled CXCR4 peptide antagonist. *Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 2(1) 99-109 (2012)
 - Yoshikawa Y, Kobayashi K, Oishi S, Fujii N, Furuya T. Molecular modeling study of cyclic pentapeptide CXCR4 antagonists: new insight into CXCR4-FC131 interactions. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22(6) 2146-2150 (2012)
 - Masuda R, Oishi S, Tanahara N, Ohno H, Hirasawa A, Tsujimoto G, Kodama E, Matsuoka M, Fujii N. Development and application of fluorescent SDF-1 derivatives. *Future Med. Chem.* in press.
 - Kobayashi K, Oishi S, Hayashi R, Tomita K, Kubo T, Tanahara N, Ohno H, Yoshikawa Y, Furuya T, Hoshino M, Fujii N. Structure-activity relationship study of a CXC chemokine receptor type 4 (CXCR4) antagonist FC131 using a series of alkene dipeptide isosteres. *J. Med. Chem.* 55(6) 2746-2757 (2012)
 - Oishi S, Fujii N. Peptide and peptidomimetic ligands for CXC chemokine receptor 4 (CXCR4). *Org. Biomol. Chem.* in press.
- ## 2. 学会発表
- 井ノ口恵利子、山田 愛、大石真也、久保達彦、大野浩章、保住健太郎、野水基義、志村和也、松岡雅雄、藤井信孝 アミジン型ペプチド結合等価体の合成と応用、日本ケミカルバイオロジー学会第6回年会、東京、2011年5月
 - Kobayashi K, Oishi S, Hayashi R, Tomita K, Kubo T, Tanahara N, Ohno H, Naito T, Matsuoka M, Fujii N. Structure-activity relationship study on a CXCR4 antagonist FC131 using alkene-type dipeptide isosteres 22nd American Peptide Symposium、サンディエゴ、2011年6月
 - Inokuchi E, Oishi S, Kubo T, Ohno H, Shimura K, Matsuoka M, Fujii N. Synthesis and biological evaluation of novel CXCR4 antagonists containing amidine-type peptide bond isosteres. 22nd American Peptide Symposium、サンディエゴ、2011年6月
 - Masuda R, Oishi S, Tanahara N, Ohno H, Hirasawa A, Gozoh Tsujimoto, Yoshiaki Yano, Katsumi Matsuzaki, and Nobutaka Fujii Synthesis and Application of Fluorescent SDF-1 Derivatives 22nd American Peptide Symposium、サンディエゴ、2011年6月
 - Masuda R, Oishi S, Tanahara N, Ohno H, Hirasawa A, Tsujimoto G, Yano Y, Matsuzaki K, Nakase I, Futaki S, Fujii N. Internalization of CXC chemokine receptor 4 (CXCR4) induced by polyphemusin II-derived antagonist peptides、第48回ペプチド討論会、札幌、2011年9月
 - Mizuhara T., Oishi S., Ohno H., Fujii N. Diversity-oriented synthesis of pyrimido [1,2-c][1,3]benzothiazin-6-imine and the related tricyclic heterocycles, Nature Chemical Biology Symposium 2011: Cancer Chemical Biology、ボストン、2011年10月
 - Oishi S, Masuda R, Tanahara N, Ohno H, Yano Y, Matsuzaki K, Hirasawa A, Tsujimoto G, Fujii N. Development and application of fluorescent probes for monitoring CXCR4 receptor internalization. Nature Chemical Biology Symposium 2011: Cancer Chemical Biology、ボストン、2011年10月
 - 小林数也、大石真也、井ノ口恵利子、林亮子、富田健嗣。久保達彦、棚原憲子、大野浩章、藤井信孝、吉川寧、古谷利夫、志村和也、松岡雅雄、アルケン型及びアミジン型ジペプチドイソスターの合成とCXCR4拮抗剤の構造活性相関研究への応用、第37回反応と合成の進歩シンポジウム、徳島、2011年11月
 - 水原司、大石真也、藤井信孝、大野浩章、C-H官能基化反応、及び芳香族求核置換反応によるピリミド [1,2-c] ベンゾチアジン-6-イミンとその誘導体の効率的合成法の開発、第31回有機合成若手セミナー「明日の有機合成を担う人のために」、京都、2011年11月
 - Mizuhara T, Oishi S, Fujii N, Ohno H. Efficient synthesis of pyrimido[1,2-c]benzothiazin-6-imine and related tricyclic hetero-

cycles bicyclic heterocycles by Cu(II)-mediated C-H functionalization and aromatic nucleophilic substitution、AIMECS11、東京、2011年12月

11. Kubo T, Inokuchi E, Oishi S, Ohno O, Shimura S, Matsuoka M, Fujii N. Potent CXCR4 antagonists containing amidine-type peptide bond isosteres、AIMECS11、東京、2011年12月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1. 特願 2011-105642：ピリミドベンゾチアジン-6-イミン誘導体またはその塩を含有するウイルス感染症の治療および／または予防のための薬剤
国内：出願（2011年5月10日）発明者：前田英樹、加藤貴之、松岡雅雄、志村和也、藤井信孝、大野浩章、大石真也、水原司；出願者：京都大学、富士フイルム
2. JP2012/055099：新規ケモカイン受容体拮抗剤
外国（PCT）：出願（2012年2月29日）
発明者：藤井信孝、大野浩章、大石真也、井ノ口恵利子、久保達彦、松岡雅雄、志村和也；出願者：京都大学
3. 特願 2012-50334：ピリミドベンゾチアジン-6-イミン誘導体またはその塩を含有するウイルス感染症の治療および／または予防のための薬剤
国内：優先権出願（2012年3月7日）
発明者：前田英樹、加藤貴之、松岡雅雄、志村和也、藤井信孝、大野浩章、大石真也、水原司；出願者：京都大学、富士フイルム；出願者：京都大学、富士フイルム

2. 実用新案登録

該当事項なし

3. その他

該当事項なし

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

新規標的に対する小分子化合物を基盤とした抗 HIV 化学療法剤の開発

研究分担者：国立感染症研究所エイズ研究センター 村上 努

研究要旨：本分担研究の最終目的は、新規 CXCR4 阻害剤 KRH-3955 を材料として試験管内で薬剤耐性誘導を行い、耐性変異のパターンや耐性機構を解析することにより、より耐性に出にくい薬剤を設計したり、耐性変異パターンを予測することである。H22年度はKRH-3955とKRH-3148（対照薬剤として、AMD3100とAMD070）を用いたPM1/CCR5-NL4-3の感染系による薬剤耐性誘導実験（耐性誘導約2年）で得られた感染細胞から抽出したDNAについてHIV-1Env領域全体をPCR法にて増幅し、この領域に蓄積された変異を解析した。その結果、得られた耐性HIV-1株のEnv領域中のV3、V4領域に共通した変異が認められ、いずれのCXCR4阻害剤から誘導された耐性HIV-1由来Env組換え株もすべてのCXCR4阻害剤に対して同時に耐性を獲得していることが判明した。今年度は、得られたCXCR4阻害剤耐性HIV-1株のHIV-1コレセプター利用能の変化の有無について検討した。今回得られた変異を有するCXCR4阻害剤耐性HIV-1についてはコレセプター利用能の変化は認められなかった。

A. 研究目的

本研究の目的は、新しい作用機序を有するHIV阻害剤として期待されるCXCR4阻害剤に対する耐性HIV-1を誘導し、その耐性変異のパターンや耐性機構を解析することによって、次世代の治療を考慮した耐性変異パターンの予測法を研究することである。材料としては、共同研究者（株）クレハが開発した経口吸収性を示す2種類の高活性CXCR4阻害剤KRH-3955、KRH-3148を、対照薬剤としてAMD3100とAMD070を使用した。標的細胞は、PM1/CCR5細胞を、HIV-1はNL4-3株を使用した。

B. 研究方法

(1) H22年度に作製したCXCR4阻害剤耐性HIV-1株由来のEnv組換えNL4-3のCXCR4阻害剤感受性を耐性誘導に使用したPM1/CCR5細胞(共同研究者 熊本大・前田先生分与)によって評価した。ウイルス複製抑制活性の評価は、MTT試験によって行った。

(2) CXCR4阻害剤耐性HIV-1株のコレセプター利用能の検討：

H22年度に作製したCXCR4阻害剤耐性HIV-1株由来のEnv組換えNL4-3のコレセプター利用能を標的細胞として、U87.CD4、U87.CD4.CXCR4、U87.CD4.CCR5をウイルス対照として、NL4-3とR5 HIV-1であるNL(AD8)を使用した。コレセプター利用能を評価するためのウイルス複製能の測定は、ウイルス感染後5日目の培養上清中のp24(CA)抗原濃度によって行った。

(倫理面での配慮)

本研究で使用を予定する複製可能な組換えウイルスは大臣確認を得ている(大19-6および大17-23)ほか、組換えDNA実験の申請は本研究所に機関承認されている(機19-63ほか)。

C. 研究結果

(1) H22年度に作製したCXCR4阻害剤耐性HIV-1株由来のEnv組換えNL4-3のCXCR4阻害剤感受性(PM1/CCR5細胞を用いた実験結果)：昨年度のMT4細胞を標的細胞として使用した場合とほぼ同様に、いずれのCXCR4阻害剤から誘導されたCXCR4阻害剤耐性HIV-1由来のEnv組換えNL4-3も4種すべてのCXCR4阻害剤に対して同時に薬剤耐性(数倍)を獲得していた。

(2) CXCR4 阻害剤耐性 HIV-1 株のコレセプター利用能の検討:

H22 年度に作製した CXCR4 阻害剤耐性 HIV-1 株由来の Env 組換え NL4-3 は、U87.CD4 や U87.CD4.CCR5 では感染・複製せず、U87.CD4.CXCR4 細胞においてのみその複製が認められた。すなわち、組換え NL4-3 はすべて親株である NL4-3 と同様 X4 コレセプター利用能表現系を示した (図 1)。

図1. CXCR4阻害剤耐性HIV-1のCoreceptor利用能

Virus	p24 (ng/ml) at day 5 after infection		
	U87.CD4	U87.CD4.CXCR4	U87.CD4.CCR5
NL4-3	<0.05	>50	<0.05
NL4-3 (passage control)	<0.05	>50	<0.05
NL(AD8)	<0.05	<0.5	>50
KRH-3955 ^R	<0.05	>50	<0.05
KRH-3148 ^R	<0.05	>50	<0.05
AMD3100 ^R	<0.05	>50	<0.05
AMD070 ^R	<0.05	>50	<0.05

D. 考察

今回得られた CXCR4 阻害剤耐性 HIV-1 株の Env 領域の変異はコレセプター利用能の変化 (X4 から R5) を伴わないで数倍程度の薬剤耐性を可能にした。より高度な CXCR4 阻害剤耐性を獲得する場合にのみコレセプター利用能の変化が必要になるのかもしれない。

E. 結論

今回検討している 4 種の CXCR4 阻害剤耐性 HIV-1 株の Env 領域中の V3, V4 領域に共通して認められた変異では、ウイルスのコレセプター利用能の変化をもたらすことはなかった。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yanagita, H., E. Urano, K. Mastumoto, R. Ichikawa, Y. Takaesu, M. Ogata, T. Murakami, H. Wu, J. Chiba, J. Komano, and T. Hosino. Structural and biochemical study on the inhibitory

activity of derivatives of 5-nitro-furan-2-carboxylic acid for RNase H function of HIV-1 reverse transcriptase. *Bioorg. Med. Chem.*, 19: 816-825, 2011.

- 2) Tanaka, T., T. Narumi, T. Ozaki, A. Sohma, N. Ohashi, C. Hashimoto, K. Itotani, W. Nomura, T. Murakami, N. Yamamoto, and H. Tamamura. Azamacrocyclic-metal complexes as CXCR4 antagonists. *Chem. Med. Chem.*, 6: 834-839, 2011.

- 3) Narumi, T., N. M. Komoriya, C. Hashimoto, H. Wu, W. Nomura, S. Suzuki, T. Tanaka, J. Chiba, N. Yamamoto, T. Murakami, and H. Tamamura. Conjugation of cell-penetrating peptides leads to identification of anti-HIV peptides from matrix proteins. *Bioorg. Med. Chem.*, 20: 1468-1474, 2012.

2. 学会発表

- 1) Murakami T., H. Wu, M. Kawamata, J. Chiba, and T. Takemura. Role of Rab11a in HIV-1 assembly. The 2011 Meeting on Retroviruses. Cold Spring Harbor, USA, 2011.
- 2) Takemura T., M. Kawamata, and T. Murakami. Selection and characterization of the mutant HIV-1 that can replicate without cypa in the cypa-dependent jurkat cell. The 2011 Meeting on Retroviruses. Cold Spring Harbor, USA, 2011.
- 3) Murakami T., H. Wu, M. Kawamata, J. Chiba, and T. Takemera. Role of Rab11a in Virus Assembly of HIV-1. XV International Congress of Virology, Sapporo, Japan, 2011.
- 4) Takemura T., M. Kawamata, and T. Murakami. Selection and Sequencing Anaysis of the Mutant HIV-1 that can Replicate without Cypa in Jurkat Cell. XV International Congress of Virology, Sapporo, Japan, 2011.

- 5) 竹村太地郎、川又美弥子、村上 努:サイクロフィリン A 非依存的に増殖可能な新規 HIV-1 変異株の解析 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2011 年 11 月 30-12 月 2 日
- 6) 橋本智恵、鳴海哲夫、野村 歩、村上 努、山本直樹、玉村啓和:HIV-1 第二受容体 CXCR4 の細胞外ドメインを基にしたエイズワクチンの開発研究 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2011 年 11 月 30-12 月 2 日
- 7) 呉 鴻規、竹村太地郎、川又美弥子、千葉 丈、村上 努:HIV-1 粒子形成過程における Rab11a 蛋白質の機能解析 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2011 年 11 月 30-12 月 2 日
- 8) 柳田浩志、横田瑞穂、尾瀨将一、浦野恵美子、市川玲子、村上 努、駒野 淳、星野忠次:HIV-1 逆転写酵素 RNase H 活性阻害剤の開発 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2011 年 11 月 30-12 月 2 日
- 9) Murakami, T., H. Wu, M. Kawamata, K. Hayashi, J. Chiba, and T. Takemura. Functional analysis of Rab11a in HIV-1 Replication 第 34 回日本分子生物学会年会、横浜、2011 年 12 月 13 日-16 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当事項なし

研究成果の刊行に関する一覧表

研究代表者：京都大学ウイルス研究所 松岡 雅雄

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Izumi K, Watanabe K, Oishi S, Fujii N, <u>Matsuoka M</u> , Sarafianos SG, Kodama EN.	Potent anti-HIV-1 activity of N-HR-derived peptides including a deep pocket-forming region without antagonistic effects on T-20.	Antivir. Chem. Chemother	22(1)	51-55	2011
Inokuchi E, Oishi S, Kubo T, Ohno H, Shimura K, <u>Matsuoka M</u> , Fujii N.	Potent CXCR4 antagonists containing amidine type peptide bond isosteres.	ACS Med. Chem. Lett	2(6)	477-480	2011
Sugata K, Sato Y, Yasunaga JI, Hara H, Ohshima K, Utsunomiya A, Mitsuyama M, <u>Matsuoka M</u> .	HTLV-1 bZIP factor impairs cell-mediated immunity by suppressing production of Th1 cytokines.	Blood	119(2)	434-444	2011