

分担研究報告書

分担研究者 玉村 啓和 東京医科歯科大学学生体材料工学研究所教授

研究要旨： 最近では HIV-1 の感染細胞や潜伏感染を標的にする新規治療薬の開発が求められている。我々は、中和抗体の臨床応用に向けた基礎研究の過程で HIV-1、gp120 の CD4 結合部位に作用してエンベロープ蛋白 (Env) 三量体の立体構造を変化させ、中和抗体の反応性及び中和活性を飛躍的に増強する低分子化合物、NBD-556 を同定し、その効果と新たな化合物の開発に焦点を絞って研究してきた。一連の研究で、NBD-556 の誘導体の一つである YYA-021 が活性はほぼ同等で、細胞毒性が低いことを見出した。本研究班を計画した目的は NBD 誘導体で Env に立体構造変化を起こし、中和抗体の臨床効果を増強させるという、これまでとは全く異なる発想の戦略が、in vivo でも有効かどうか動物モデルで検証することと、さらに多くの誘導体を探索し、非クレイド B ウイルスを含むさまざまな分離株にも有効な NBD 誘導体を作成することである。本年度は引き続き、NBD-556、YYA-021 誘導体を用いて構造活性相関研究を行い、それら化合物について抗 HIV 活性、細胞毒性、そして gp120 の構造変化誘起能について評価した。その結果、ペペリジン部位の窒素原子近傍の修飾や芳香環の置換基の変換が抗 HIV 活性、細胞毒性および gp120 の構造変化に影響を与えることを見出した。また、実用化に向け、YYA-021 のラットおよびサルを用いた YYA-021 の血中濃度測定および薬物動態解析を行った。

A. 研究目的

現在の HIV-1 感染症/AIDS の治療では、既存の抗ウイルス剤の長期使用による薬剤耐性、慢性毒性の蓄積などの問題を抱えている。一方、治療中断と再開を繰り返す SMART study の失敗から、現在の抗ウイルス薬による治療は一生継続しなければならないものと認識されるよ

うになった。よって、HIV の複製阻害ばかりでなく、HIV-1 感染細胞や HIV-1 の潜伏感染を標的にする新規治療薬の開発が求められる。

これまで我々は、中和抗体の臨床応用に向けた基礎研究の過程で HIV-1、gp120 の CD4 結合

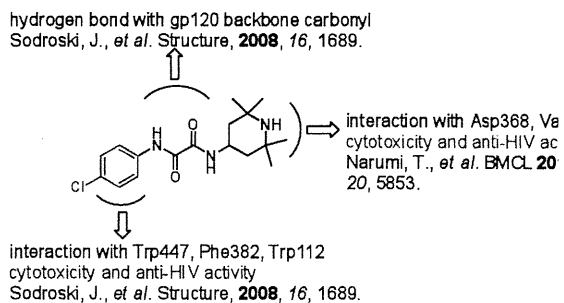


図 1 NBD-556 の構造と各領域の作用

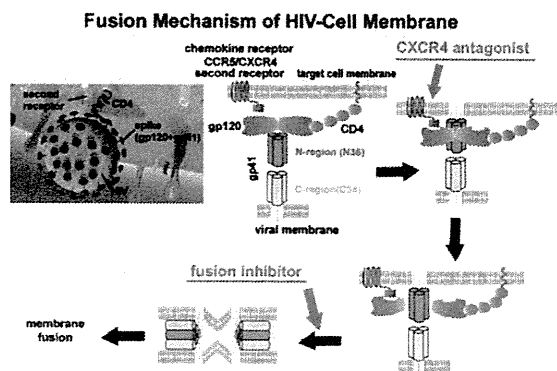


図 2 HIV-1 の 感染機構

部位に作用して Env 三量体の立体構造を変化させ、中和抗体の反応性及び中和活性を飛躍的に増強する低分子化合物、NBD-556 を同定し、その基本的性質と効果、新規化合物の創出に焦点を絞って研究してきた (図 1, 2)。

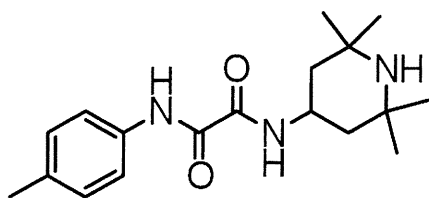


図 3 YYA-021 構造

HIV-1 に対する中和抗体の多くは、Env に反応エピトープが保存されているにもかかわらず、中和能がほとんど見られない。これは、Env が三量体を形成しその立体構造によりエピトープを遮蔽しているためと考えられている。この立体遮蔽を解除し中和抗体が中和エピトープに到達可能となれば、既に体内に存在する多くの抗体でウイルスを中和できるようになる。NBD-556 は、合包体形成阻害スクリーニングにより、Env と CD4 分子の相互作用を阻害する化合物候補として開発された分子である (Zhao Q, et al., *Virology*, 339:213-25, 2005, Schon A, *Biochemistry*, 45:10973-80, 2006) が、有効濃度と細胞毒性の差が小さいため臨床開発は行われてこなかった。我々は、NBD 誘導体を検討し、その一つである YYA-021 (図 3) が NBD-556 とほぼ同等の活性を持ち、細胞毒性が低いことを見出した。本研究班では、さらに多くの誘導体を探索し、より有効な NBD 誘導体を創出することと、このような新しい治療戦略が *in vivo* でも有効性であるかどうか、動物モデルで検証することを目的とする。また、中和抗体と NBD 誘導体の併用が、どの程度の臨床分離ウイルスに有効かを調べる。これらの効果が *in vivo* でも検証できれば、体内の感染細胞を最小まで減

小さめることが可能となり、長期間継続する現在の抗ウイルス療法とは異なる治療法開発が可能になる。

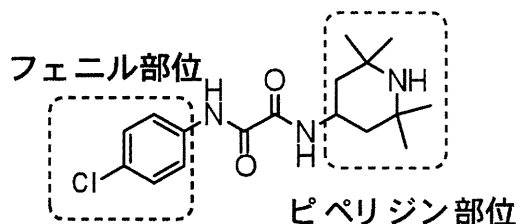
これまで、HIV-1 に対する侵入阻害剤は、gp120 の立体構造を変化させずに CD4 や co-receptor への結合を阻害するものを中心に進められてきた。その理由は、以前の臨床試験で sCD4 の治療効果が見られなかったという歴史的事実と、立体構造変化を誘導すると感染を促進してしまう危険性があると考えられてきたことによる。我々の、コンセプトは、むしろ立体構造変化を起こさせることで、中和抗体の効果を増強させるという、これまでとは異なる発想の戦略であるという点で独創的である。多くの感染者が gp120 単量体に反応する抗体を持っており、ウイルス上の反応エピトープが表出さえすれば自己のウイルスが中和可能になることがこのコンセプトの実現可能性を裏打ちしている。

本研究は、研究フィールドの異なる研究者が集まることにより、この戦略に関して総合的に検討を進めることを可能にする。第一のステップは、これまで、*in vitro* で研究してきた NBD 誘導体の効果を *in vivo* (霊長類モデル) で検証するために、どのようなシステムで行うかの検討である。これまでサルに感染可能な SHIV として用いられてきたウイルス及び臨床分離株に近い新たな SHIV を用いて、*in vitro* で効果を確認し、その結果をもとに、NBD 誘導体や中和抗体などを大量に準備する。これらの準備をしながら、動物モデルでの検討を計画するが、少数の個体を用いた予備的研究から、段階的に進んでいく。さらに、これまで作成してきた NBD 誘導体よりも低濃度で有効で、毒性が低く、さらに非クレイド B ウイルスなど、現在の NBD 誘導体が効きにくいウイルスにも有効な新規誘導体を探索する。

B. 研究方法

1) 低分子化合物 NBD 誘導体のピペリジン部位の構造活性相関

CD4 と gp120 の相互作用において、特に重要な働きをしているとされているのが 43 残基目のフェニルアラニン及び 59 残基目のアルギニンである。低分子化合物 NBD-556 はこの 2 つの重要なアミノ酸と類似した部位を有し、CD4 と gp120 との相互作用を阻害する HIV-1 侵入阻害剤である。また、本化合物は 1) F43Cavity 内のアミノ酸と相互作用し、2) コレセプターとの相互作用に必須である gp120 の構造変化を誘起することから低分子型 CD4 ミミックとしても期待されている (図 4)。本化合物は、構造上、フェニル部位、オキサアミド部位、ピペリジン部位の 3 つの部位に分類することが可能である。これまでの研究により、フェニル部位、オキサアミド部位の F43cavity 内における各アミノ酸との相互作用は明らかにされつつあるが、ピペリジン部位の相互作用に関する研究はまだあまりなされていない。そこで、ピペリジン部位に種々の置換基を導入し、構造活性相関研究を行った。



gp120 Phe43-cavity
に入り込む

図 4 NBD-556 のピペリジン部位とフェニル部位

合成した化合物の各種 HIV 株に対する抗ウイルス活性を PM1/CCR5 細胞を用いて WST assay で評価した。また、gp120 の構造変化によ

り露出される CD4i epitope を認識する CD4i 抗体を用いて、CD4 ミミック誘導体で処理した PM1/CCR5 細胞表面における gp120 の構造変化誘起能を評価した。また、細胞毒性を WST assay で調べた。

また、NBD-556 と HAR-171 をマルチラウンドアッセイにより、抗 HIV 活性の比較を行った。

2) NBD 誘導体のフェニル部位の構造活性相関

まず、パラ位の置換基を塩素原子、および比較的良い結果を与えたメチル基に固定して、メタ位の置換基について検討を行った。

2 個のシクロヘキシル環を有する誘導体も合成し生物活性について評価した。

活性の評価方法は上記 1) と同様に行った。

3) HIV-1 gp120 (Phe43-cavity) と NBD-556 および HAR-171 のドッキングシュミレーション

Phe43-cavity と NBD-556 および HAR-171 のドッキングシュミレーションの比較を行った。

NBD-556 および HAR-171 の構造は SYBYL 7.1 (Tripos, St. Louis) で構築し、力場 MMFF94 と部分荷電でエネルギー最小化した。SYBYL module/FlexSIS を使用し、gp120 の結晶構造 (PDB: 1RZJ) に対して、ドッキングシュミレーションを行った。

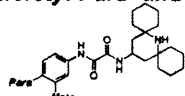
4) YYA-021 の血中濃度測定および薬物動態解析

YYA-021 のラットにおける静脈注射による血中濃度測定および体内薬物動態を解析した。生理食塩水に溶解した 2.5 mg/mL YYA-021 1ml を (投与量 2.5 mg) 投与後、数分、数時間後に少量 500 μ L (血液量 約 11 mL/体重 180 g) 採血し、YYA-021 の血中濃度を測定した。

また、サルにおける静脈注射による血中濃

有効であることが示唆された。

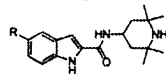
SAR of Aromatic Moiety: Para- and Meta-Substituents



Compound	Para	Meta	IC ₅₀ (μM) ^a	CC ₅₀ (μM) ^b	FACS ^c (MFI)	rel. FACS ^c
HAR-171	Cl	H	0.43	120	24.17	0.52
HAR-431	Cl	F	0.23	11	51.39	1.73
HAR-424	Cl	Cl	0.62	11	25.74	0.59
HAR-430	Cl	Me	2.6	15	24.51	0.54
HAR-480	CH ₃	H	—	—	—	—
HAR-427	CH ₃	F	0.54	91	30.27	0.79
HAR-429	CH ₃	Cl	6.2	11	28.41	0.71
HAR-428	CH ₃	Br	3.2	11	20.08	0.34
NBD-556	Cl	H	0.61	110	34.94	1.00

^aThe IC₅₀ values were determined using the WST-8 assay using PM1CCR5 cells. ^busing PM1CCR5 cells. ^cHAR 100 μM-4C11 (3.5 μg/mL), using YTA48P. ^dMadani, N., et al., Structure, 2008, 16, 1899. ^erel. FACS values were calculated as (MFI_{CD4 mimic} - MFI of 4C11) / (MFI_{NBD-556} - MFI of 4C11). 10.23

SAR of Aromatic Moiety: 5-Substituted Indole



Compd.	R	IC ₅₀ (μM) ^a	CC ₅₀ (μM) ^b	FACS ^c (MFI)	rel. FACS ^c
HAR-434	F	>100	115	10.38	0.01
HAR-437	Cl	15.6	31	11.20	0.07
HAR-438	Br	18.5	30	10.87	0.03
HAR-171		0.293	ND	19.43	0.52
JRC-II-191 ^d		0.32	94	39.06	1.18
NBD-556		ND	ND	24.88	1.00

^aThe IC₅₀ values were determined using the WST-8 assay using PM1CCR5 cells. ^busing PM1CCR5 cells. ^cHAR 100 μM-4C11 (3.5 μg/mL), using YTA48P. ^dMadani, N., et al., Structure, 2008, 16, 1899. ^erel. FACS values were calculated as (MFI_{CD4 mimic} - MFI of 4C11) / (MFI_{NBD-556} - MFI of 4C11). 10.23

図 7 フェニル部位の置換基の違いによる抗 HIV 活性と gp120 構造変化誘起能への影響(その 1)

3) HIV-1 gp120 (Phe43-cavity)と NBD-556 および HAR-171 のドッキングシュミレーション Phe43-cavity と NBD-556 および HAR-171 のドッキングシュミレーションの比較を行った。NBD-556 はピペリジンの窒素原子と Asp368 が静電相互作用しており、HAR-171 はピペリジン側鎖のシクロヘキシル基と Val430 が疎水性相互作用していることが示唆された(図 8)。これより、ピペリジン部位の構造により、相互作用するアミノ酸および化合物のドッキング様式が異なり、化合物の生理活性に影響を与えることが示唆された。

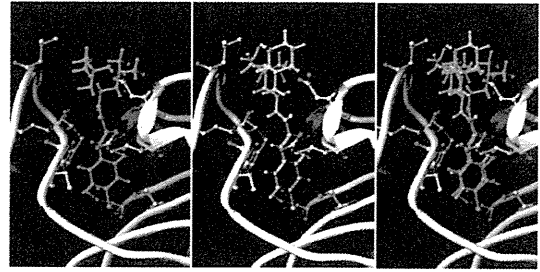


図 8 HIV-1 gp120 (Phe43-cavity) と NBD-556(左)および HAR-171(中)のドッキングシュミレーション。右図は NBD-556 と HAR-171 の両方の重ね合わせ

4) YYA-021 の血中濃度測定および薬物動態解析

YYA-021 のラットにおける静脈注射による血中濃度測定および体内薬物動態を解析した。生理食塩水に溶解した YYA-021 (投与量 2.5 mg) 投与群において、HPLC で検出した YYA-021 の最高濃度は約 6.0 μg/mL (15 min 後) であった (図 9, 10)。

投与した YYA-021 が 100%血中に循環していると仮定すると (YYA-021 含有量: 約 11.4 μg, 濃度: 230 μg/mL)、7-8 分後には血中濃度が半分になっていると考えられる。

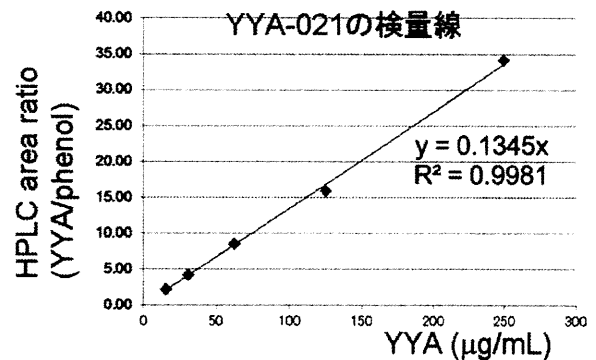


図 9 YYA-021 の血中濃度測定に用いた検量線

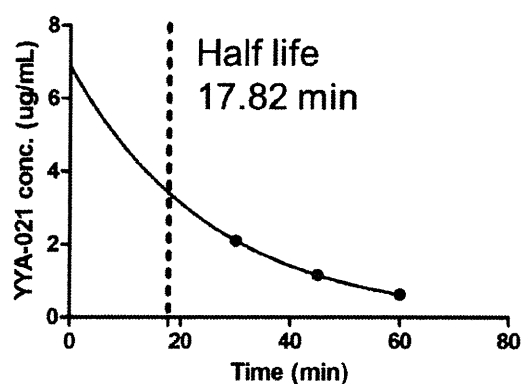


図 10 ラットにおける YYA-021 半減期の算出 (静脈投与)

また、サルにおける静脈注射による血中濃度測定および体内薬物動態を解析した。YYA-021 (投与量: 35.3 mg) 群、70.6 mg 投与群について、現在解析中である。

D. 考察

YYA-021、NBD 誘導体のピペリジン部位、およびフェニル部位の構造活性相関研究を行った。併せて、HIV-1 gp120 (Phe43-cavity) と NBD-556 および HAR-171 のドッキングシミュレーションを行い、今後の CD4 ミミックの分子設計に有用な情報を得た。

YYA-021 について、ラットでの血中濃度測定および薬物動態解析を行い、実用化に向け、サルへの解析を進めている。

E. 結論

今年度、YYA-021、NBD 誘導体のピペリジン部位、およびフェニル部位の構造活性相関を行った。ピペリジン環にテトラメチル基(上)、ジシクロヘキシル基(下)、どちらを有する誘導体でも、*meta*-F 基(*para*-CH₃, *para*-Cl のいずれでも)のものが高活性を示した(図 11)。

Phe43-cavity と NBD-556 および HAR-171 のドッキングシミュレーションの比較において、NBD-556 はピペリジンの窒素原子と cavity の

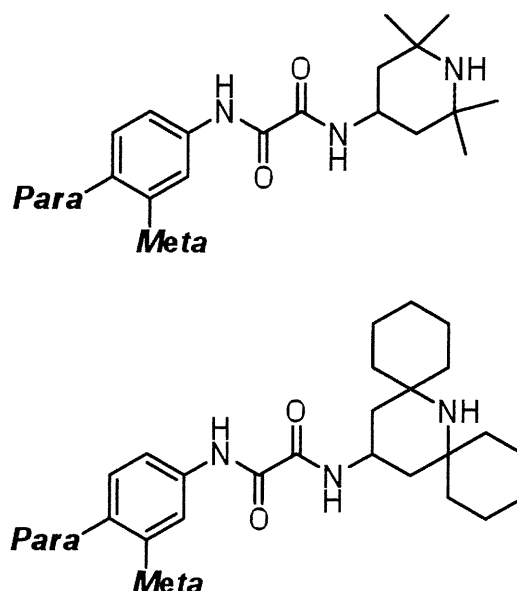


図 11 NBD 化合物のピペリジン部位、およびフェニル部位の置換誘導体

Asp368 が静電的相互作用しており、HAR-171 はピペリジン側鎖のシクロヘキシル基と Val430 が疎水性相互作用していることが示唆された。これより、ピペリジン部位の構造により、相互作用するアミノ酸および化合物のドッキング様式が異なり、化合物の生物活性に影響を与えることが示唆された。これらの情報からさらなる有用な CD4 mimic 誘導体を創製が可能であると考えられる。YYA-021 について、ラットを用いた YYA-021 の血中濃度測定および薬物動態解析を行い、実用化に向け、有用な知見を得た。

エイズワクチンの開発は大きな壁に突き当たっているが、NBD 誘導体の研究から、Env 3 量体の構造変化機構の解明が進めば、中和抗体誘導型ワクチンの作成も可能となり、HIV 感染症/エイズ治療の向上に役立つと期待できる。

F. 謝辞

抗体誘導の実験および抗ウイルス活性の測定実験に関して、熊本大学エイズ学研究センター、松下修三教授、吉村和久准教授、原田

恵嘉博士に、サルを用いた動物実験に関して、京都大学ウイルス研究所、五十嵐樹彦教授、三浦智行准教授、大附寛幸博士にお世話になりました。厚く御礼申し上げます。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nomura W, Masuda A, Ohba K, Urabe A, Ito N, Ryo A, Yamamoto N, Tamamura H. Effects of DNA Binding of Zinc Finger and Linkers for Domain Fusion on Catalytic Activity of Sequence-Specific Chimeric Recombinases Determined by a Facile Fluorescent System. *Biochemistry*, in press
- 2) 玉村啓和. ケミカルバイオロジーを基盤とした抗 HIV 剤の創製. *薬学雑誌* (日本薬学会)、131(1)巻 頁 69~78、2012 年
- 3) Nomura W, Hashimoto C, Ohya A, Miyauchi K, Urano E, Tanaka T, Narumi T, Nakahara T, Komano J, Yamamoto N, Tamamura H. Synthetic C34 Trimer of HIV-1 gp41 Shows Significant Increase of Inhibition Potency. *ChemMedChem*, 7 : 205–208, 2012.
- 4) Narumi T, Komoriya M, Hashimoto C, Wu H, Nomura W, Suzuki S, Tanaka T, Chiba J, Yamamoto N, Murakami T, Tamamura H. Conjugation of Cell-penetrating Peptides Leads to Identification of Anti-HIV Peptides from Matrix Proteins. *Bioorg. Med. Chem.*, 20: 1468-1474, 2012.
- 5) Narumi T, Arai H, Yoshimura K, Harada S, Nomura W, Matsushita S, Tamamura H. Small Molecular CD4 Mimics as HIV Entry Inhibitors. *Bioorg Med Chem* 19 : 6735-6742, 2011.
- 6) Nomura W, Narumi T, Ohashi N, Serizawa Y, Lewin NE, Blumberg PM, Furuta T, Tamamura H. Synthetic Caged DAG-lactones for Photochemically-controlled Activation of Protein Kinase C. *ChemBioChem* 12: 535–539, 2011.
- 7) Ohashi N, Wataru Nomura W, Narumi T, Lewin NE, Itotani K, Blumberg PM, Tamamura H. Fluorescent-responsive Synthetic C1b Domains of Protein Kinase C δ as Reporters of Specific High Affinity Ligand Binding. *Bioconjugate Chem* 22: 82–87, 2011.
- 8) Tsutsumi H, Abé S, Mino T, Nomura W, Tamamura H. Intense Blue Fluorescence in a Leucine Zipper Assembly. *ChemBioChem* 12: 691–694, 2011.
- 9) Tanaka T, Narumi T, Ozaki T, Sohma A, Ohashi N, Hashimoto C, Itotani K, Nomura W, Murakami T, Yamamoto N, Tamamura H. Azamacrocyclic-metal Complexes as CXCR4 Antagonists. *ChemMedChem* 6: 834–839, 2011.
- 10) Nomura W, Ohashi N, Okuda Y, Narumi T, Ikura T, Ito N, Tamamura H. Fluorescence-Quenching Screening of Protein Kinase C Ligands with an Environmentally Sensitive Fluorophore. *Bioconjugate Chem* 22: 923-930, 2011.
- 11) Hashimoto C, Tanaka T, Narumi T, Nomura W, Tamamura H. The Success and Failures of HIV Drug Discovery. *Expert Opin Drug Discovery* 6: 1067-1090, 2011.
- 12) Xu C, Liu J, Chen L, Liang S, Fujii N, Tamamura H, Xiong H. HIV-1 gp120 Enhances Outward Potassium Current via CXCR4 and cAMP-Dependent Protein Kinase a Signaling in Cultured Rat Microglia. *Glia* 59: 997-1007, 2011.
- 13) Yamada M, Kubo H, Kobayashi S, Ishizawa K, He M, Suzuki T, Fujino N, Kunishima H, Hatta M, Nishimaki K, Aoyagi T, Tokuda K, Kitagawa M, Yano H, Tamamura H, Fujii N, Kaku M. The Increase in Surface CXCR4 Expression on Lung Extravascular Neutrophils and its Effects on Neutrophils During Endotoxin-Induced Lung Injury. *Cell Mol Immunol* 8: 305-314, 2011.

著書

- 1) Masuda A, Nomura W, Ohba K, Yamamoto N, Tamamura H. Studies for Optimum Design of Artificial Zinc Finger Recombinases by Evaluation of Effects of DNA Binding Affinity and Linker Components on Recombination Efficiency. *Proceedings of the Twenty-Second American Peptide Symposium*, Michal Lebl (Eds.), American Peptide Society, San Diego, 130-131, 2011.
- 2) Nomura W, Nakahara T, Hashimoto C, Ohba K, Narumi T, Yamamoto N, Tamamura T. Synthesis of HIV Gp41 Trimer Mimics Inducing Neutralizing Antibodies Based on Remodeling of Dynamic Structures of HIV-1 Envelope Proteins. *Proceedings of the Twenty-Second American Peptide Symposium*, Michal Lebl (Eds.), American Peptide Society, San Diego, 132-133, 2011.
- 3) Nomura W, Tanaka T, Masuda A, Narumi T, Tamamura H. Development of Bivalent Ligands for CXCR4 with Rigid Linkers and Application to Detection of Cancer Cells. *Proceedings of the Twenty-Second American Peptide Symposium*, Michal Lebl (Eds.), American Peptide Society, San Diego, 134-135, 2011.
- 4) Nomura W, Ohashi N, Mori A, Narumi T, Tanaka T, Masuda A, Tsutsumi H, Tamamura H. Novel Tag-probe Pairs for Fluorescent Imaging of Proteins in Living Cells. *Proceedings of the*

- 5th International Peptide Symposium in conjunction with the 47th Japanese Peptide Symposium, Nobutaka Fujii and Yoshiaki Kiso (Eds.), The Japanese Peptide Society, Kyoto, Japan, 40, 2011.
- 5) Nomura W, Tanaka T, Masuda A, Narumi T, Tamamura H. Development of a Bivalent Ligand for a Chemokine Receptor CXCR4 by Utilizing Polypyrrolone Helix as a Linker. Proceedings of the 5th International Peptide Symposium in conjunction with the 47th Japanese Peptide Symposium, Nobutaka Fujii and Yoshiaki Kiso (Eds.), The Japanese Peptide Society, Kyoto, Japan, 220, 2011.
 - 6) Narumi T, Bode JW. α,α -Dichloroisoxazolidinones for The Synthesis and Chemoselective Peptide Ligation of α -Peptide α -Ketoacids. Proceedings of the 5th International Peptide Symposium in conjunction with the 47th Japanese Peptide Symposium, Nobutaka Fujii and Yoshiaki Kiso (Eds.), The Japanese Peptide Society, Kyoto, Japan, 178, 2011.
 - 7) Hashimoto C, Narumi T, Nomura W, Yamamoto N, Tamamura H. Synthesis and Evaluation of CXCR4-derived Peptides Targeting the Development of AIDS Vaccines. Proceedings of the 5th International Peptide Symposium in conjunction with the 47th Japanese Peptide Symposium, Nobutaka Fujii and Yoshiaki Kiso (Eds.), The Japanese Peptide Society, Kyoto, Japan, 103, 2011.
- ## 2. 学会発表
- 1) Yamamoto J, Tanaka T, Denda M, Shigenaga A, Nomura W, Tamamura H, Otaka A. Design and Synthesis of Traceable Linker for Efficient Enrichment and Specific Labeling of Target Proteins. 22nd American Peptide Symposium. Southern California, USA, June 25-30, 2011.
 - 2) Masuda A, Nomura W, Ohba K, Yamamoto N, Tamamura H. Studies for Optimum Design of Artificial Zinc Finger Recombinases by Evaluation of Effects of DNA Binding Affinity and Linker Components on Recombination Efficiency. 22nd American Peptide Symposium. Southern California, USA, June 25 -30, 2011.
 - 3) Nomura W, Nakahara T, Hashimoto C, Ohba K, Narumi T, Yamamoto N, Tamamura H. Synthesis of HIV Gp41 Trimer Mimics Inducing Neutralizing Antibodies Based on Remodeling of Dynamic Structures of HIV-1 Envelope Proteins. 22nd American Peptide Symposium. Southern California, USA, June 25- 30, 2011.
 - 4) Nomura W, Tanaka T, Masuda A, Narumi T, Tamamura H. Development of Bivalent Ligands for CXCR4 with Rigid Linkers and Application to Detection of Cancer Cells. 22nd American Peptide Symposium. Southern California, USA, June 25-30, 2011.
 - 5) Narumi T, Komoriya M, Hashimoto C, Wu H, Nomura W, Suzuki S, Yamamoto N, Chiba J, Tanaka T, Murakami T, Tamamura H. Identification of Anti-HIV Peptides Derived from Matrix Proteins. ACS Meeting Fall201, Denver, Colorado, USA, Aug 28 -Sep 1, 2011.
 - 6) Hashimoto C, Narumi T, Nomura W, Yamamoto N, Tamamura H. HIV-1 Co-Receptor CXCR4-Derived Peptides Targeting AIDS Vaccines. The 9th Australian Peptide Conference. Hamilton Island, Queensland, Australia, Oct 16-20, 2011.
 - 7) Nomura W, Ohashi N, Narumi T, Lewin NE, Blumberg PM, Tamamura H. Synthesis of C1b Domains of Protein Kinase C Having Solvatochromism and their Application to Bio-sensing. The 9th Australian Peptide Conference. Hamilton Island, Queensland, Australia, Oct 16-20, 2011.
 - 8) Urabe A, Nomura W, Masuda A, Tamamura H. Sequence-Specific Recombination Enabled by a Pair of Zinc Finger Recombinases. The 9th Australian Peptide Conference. Hamilton Island, Queensland, Australia, Oct 16-20, 2011.
 - 9) Narumi T, Arai H, Ochiai C, Yoshimura K, Harada S, Nomura W, Matsushita S, Tamamura H. SAR Study of Small Molecular CD4 Mimics Targeting the Dynamic Supramolecular Mechanism of HIV Entry and Their Hybrid Molecules with a CXCR4 Antagonist. The 12th Kumamoto AIDS Seminar · GCOE Joint International Symposium. Kumamoto, Japan, Oct 19-21, 2011.
 - 10) Arai H, Narumi T, Yoshimura K, Harada S, Aikawa H, Nomura W, Matsushita S, Tamamura H. Design, Synthesis and Biological Evaluation of CD4 Mimics Targeting the Interaction with Asp368 and Val430 in Gp120. The 12th Kumamoto AIDS Seminar · GCOE Joint International Symposium. Kumamoto, Japan, Oct 19-21, 2011.
 - 11) Matsushita S, Ramirez K, Maruta Y, Harada S, Yamada Y, Tamamura H, Kuwata T, Yoshimura K. Cross-Subtype Reactivity and Neutralization Activity of a Panel of Human Monoclonal Antibodies Obtained from a Single Donor. The 12th Kumamoto AIDS Seminar · GCOE Joint International Symposium. Kumamoto, Japan, Oct 19-21, 2011.
 - 12) Narumi T, Seike S, Tamamura H. Synthetic Studies on (*Z*) and (*E*)-Chloroalkene Skeltons As Amide Bond Equivalents. 8th AFMC

- International Medicinal Chemistry Symposium. Tokyo, Japan, Nov 29-Dec 2, 2011.
- 13) Narumi T, Arai H, Yoshimura K, Harada S, Nomura W, Matsushita S, Tamamura H. SAR Studies of Small Molecular CD4 Mimics Targeting the HIV Entry Mechanism. 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium. Tokyo, Japan, Nov 29-Dec 2, 2011.
 - 14) Narumi T, Shishido M, Tamamura H. *N*-(Benzoyloxy)sulfonamides-Mediated Aziridination of α , β -Unsaturated Enones. 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium. Tokyo, Japan, Nov 29-Dec 2, 2011.
 - 15) Masuda A, Nomura W, Ohba K, Yamamoto N, Tamamura H. Development of Artificial Recombinases for Genome Editing. 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium. Tokyo, Japan, Nov 29-Dec 2, 2011.
 - 16) Nomura W, Hashimoto C, Ohba K, Narumi T, Yamamoto N, Tamamura H. Synthetic Antigens for Induction of Structure-Specific Antibodies against Trimer-Form of gp41. 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium. Tokyo, Japan, Nov 29-Dec 2, 2011.
 - 17) Hashimoto C, Narumi T, Nomura W, Yamamoto N, Tamamura H. CXCR4-Derived Peptides Targeting AIDS Vaccines. 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium. Tokyo, Japan, Nov 29-Dec 2, 2011.
 - 18) Narumi T, Nomura W, Tamamura H. Several HIV Inhibitors Targeting Entry, Fusion, Integrase and Matrix. 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium. Tokyo, Japan, Nov 29-Dec 2, 2011.
 - 19) Narumi T, Kambe C, Nomura W, Tamamura H. Development of Photochemically Removable Protecting Groups in Hydrophilic Environments: Synthesis and Photochemical Property of 8-Azacoumarins. 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium. Tokyo, Japan, Nov 29-Dec 2, 2011.
 - 20) Yamamoto J, Tanaka T, Denda M, Ebisuno K, Shigenaga A, Nomura W, Tamamura H, Otaka A. Application of Stimulus-responsive Amino Acid to Traceable Linker for Efficient Enrichment and Specific Labeling of Target Proteins. 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium. Tokyo, Japan, Nov 29-Dec 2, 2011.
 - 21) 玉村啓和. ケミカルバイオロジーを基盤とした抗 HIV 剤の創製. シンポジウム「新しい抗感染症剤研究の最前線 - 発見、ケミカルバイオロジーそして創薬へ -」. 日本薬学会第 131 年会 (中止). 静岡, 2011 年 3 月 28-31 日.
 - 22) 鳴海哲夫, 新井啓之, 吉村和久, 原田恵嘉, 野村 渉, 松下修三, 玉村啓和. HIV-1 外被タンパク質 gp120 の構造変化誘起を指向した低分子 CD4 ミミックの創製研究. 日本薬学会第 131 年会 (中止). 静岡, 2011 年 3 月 28-31 日.
 - 23) 鳴海哲夫, 玉村啓和. イミダゾリウム塩の構造最適化を指向した構造活性相関研究. 日本薬学会第 131 年会 (中止). 静岡, 2011 年 3 月 28-31 日.
 - 24) 森 あつみ, 野村 渉, 鳴海哲夫, 大橋南美, 増田朱美, 玉村啓和. 新規タグ・プローブシステムの細胞内タンパク質イメージングへの応用. 日本薬学会第 131 年会 (中止). 静岡, 2011 年 3 月 28-31 日.
 - 25) 野村 渉, 卜部亜里沙, 近藤麻美, 増田朱美, 鳴海哲夫, 梁 明秀, 玉村啓和. ジンクフィンガーヌクレアーゼによる EB ウイルス複製阻害効果の検討. 日本薬学会第 131 年会 (中止). 静岡, 2011 年 3 月 28-31 日.
 - 26) 鳴海哲夫, 落合千裕, 吉村和久, 原田恵嘉, 田中智博, 野村 渉, 新井啓之, 尾崎太郎, 大橋南美, 松下修三, 玉村啓和. 新規 HIV 侵入阻害剤の創製研究: 低分子型 CD4 ミミック-CXCR4 アンタゴニストのハイブリッド分子の設計と合成. 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 23-25 日.
 - 27) 鳴海哲夫, 新井啓之, 吉村和久, 原田恵嘉, 野村 渉, 松下修三, 玉村啓和. HIV 外被タンパク質 gp120 の構造変化を誘起する低分子 CD4 ミミックの構造活性相関研究. 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 23-25 日.
 - 28) 野村 渉, 玉村啓和. 配列特異的 DNA 切断の化合物による制御法の開発. 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 23-25 日.
 - 29) 橋本知恵, 野村 渉, 大矢亜紀, 宮内浩典, 鳴海哲夫, 駒野 淳, 山本直樹, 玉村啓和. HIV 外被タンパク質 gp41-C34 3 量体の合成とその抗 HIV 作用. 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 23-25 日.
 - 30) 鳴海哲夫, 神戸千秋, 野村 渉, 玉村啓和. 水性環境下で効率的に反応する光分解性保護基の開発研究: 8-アザクマリン化合物の合成と光化学的特性. 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 23-25 日.
 - 31) 増田朱美, 野村 渉, 卜部亜里沙, 玉村啓和. 高い反応効率をもつ亜鉛フィンガー融合型 DNA 組換え酵素の構築. 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 23-25 日.
 - 32) 森 あつみ, 野村 渉, 大橋南美, 鳴海哲夫, 堤浩, 玉村啓和. 細胞内タンパク質可視化を目的としたタグ・プローブシステムの創製. 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 23-25 日.
 - 33) 大橋南美, 野村 渉, 鳴海哲夫, Nancy E. Lewin, 糸谷恭子, Peter M. Blumberg, 玉村啓和. 環境応答性蛍光基を導入した protein

- kinase C8 C1bドメインによるリガンド結合活性評価. 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 23-25 日.
- 34) 尾崎太郎, 田中智博, 鳴海哲夫, 相馬 晃, 橋本知恵, 野村 渉, 村上 努, 山本直樹, 玉村啓和. 二核亜鉛錯体型 CXCR4 アンタゴニストの構造活性相関研究. 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 23-25 日.
- 35) 鳴海哲夫, 清家俊輔, 玉村啓和. シスアミド等価体としての E 型クロロアルケン骨格の合成研究. 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 23-25 日.
- 36) 鳴海哲夫, 宍戸美華, 玉村啓和. N-(ベンゾイルオキシ)スルホンアミドを用いる α,β -不飽和エノンのアジリジン化反応. 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 23-25 日.
- 37) 野村 渉, 田中智博, 相馬 晃, 鳴海哲夫, 増田朱美, 玉村啓和. 細胞表面における CXCR4 二量体構造解析のための堅固なリンカーを有する二価型リガンドの開発. 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 23-25 日.
- 38) 大橋南美, 野村 渉, 鳴海哲夫, 奥田善章, 伊倉貞吉, 伊藤暢聡, Nancy E. Lewin, 糸谷恭子, Peter M. Blumberg, 玉村啓和. 環境応答性蛍光基を活用した PKC リガンドの orthogonal screening methods. 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 23-25 日.
- 39) 野村 渉, 近藤麻美, ト部亜里沙, 増田朱美, 梁 明秀, 玉村啓和. 亜鉛フィンガーヌクレアーゼを用いた EB ウイルス弱毒化に関する研究. 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 23-25 日.
- 40) 鳴海哲夫, 清家俊輔, 玉村啓和, Jeffrey W. Bode. 新規アミノ酸モノマーの設計と合成: 縮合剤を用いない α -ペプチド合成への展開. 第 9 回次世代を担う有機化学シンポジウム. 東京, 2011 年 5 月 27-28 日.
- 41) 大附寛幸, 三浦智行, 小林剛, 吉村和久, 玉村啓和, 松下修三, 五十嵐樹彦. HIV-1 エンベロープ蛋白質を標的とした治療を評価するためのサル/ヒト免疫不全ウイルスの作製と *in vitro* における中和感受性の評価. 第 25 回近畿エイズ研究会学術集会. 京都, 2011 年 6 月 18 日.
- 42) 野村 渉, 増田朱美, ト部亜里沙, 玉村啓和. 細胞内における配列特異的 DNA 組換え反応の定量的測定法開発. 第 11 回日本蛋白質科学会年会. 大阪, 2011 年 6 月 7-9 日.
- 43) 鳴海哲夫, 新井啓之, 野村 渉, 玉村啓和, 吉村和久, 原田恵嘉, 松下修三. HIV 外被タンパク質 gp120 の構造変化を誘起する低分子 CD4 ミミックの構造活性相関研究. 創薬懇話会. 岡山, 2011 年 7 月 6-7 日.
- 44) 玉村啓和. HIV-1 遺伝子産物由来のインテグラーゼ阻害剤. 第 16 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会. 大阪, 2011 年 8 月 26-27 日.
- 45) 野村 渉, 田中智博, 増田朱美, 鳴海哲夫, 玉村啓和. 2 価結合型リガンドの新規デザインによる CXCR4 の細胞表面における機能解析. 第 5 回バイオ関連化学シンポジウム, 筑波, 2011 年 9 月 12-14 日.
- 46) 増田朱美, 野村 渉, 大庭賢二, ト部亜里沙, 山本直樹, 玉村啓和. ジンクフィンガー融合 DNA 組換え酵素の反応効率最適化. 第 5 回バイオ関連化学シンポジウム. 筑波, 2011 年 9 月 12-14 日.
- 47) 関根綾太, 鈴木商信, 玉村啓和, 古田寿昭. 新規ケージドパクリタキセルの設計・合成と細胞骨格の光制御への応用. 2011 年光化学討論会. 宮崎, 2011 年 9 月 6-8 日.
- 48) 野村 渉, 田中智博, 青木 徹, 相馬 晃, 相川春夫, 鳴海哲夫, 玉村啓和. 2 価型 CXCR4 リガンドの開発と受容体結合機能の解析. 第 48 回ペプチド討論会. 札幌, 2011 年 9 月 27-29 日.
- 49) 野村 渉, 堤 浩, 阿部清一郎, 森 あつみ, 鳴海哲夫, 相川春夫, 玉村啓和. ロイシンジッパー構造を基にした青色蛍光を発するタグープローブシステム. 第 48 回ペプチド討論会. 札幌, 2011 年 9 月 27-29 日.
- 50) 野村 渉, 橋本知恵, 中原 徹, 大矢亜紀, 宮内浩典, 大庭賢二, 鳴海哲夫, 相川春夫, 駒野淳, 山本直樹, 玉村啓和. HIV ワクチンを指向した gp41 の動的構造変化を模倣した抗原ペプチドの開発研究. 第 48 回ペプチド討論会. 札幌, 2011 年 9 月 27-29 日.
- 51) 新井啓之, 鳴海哲夫, 野村 渉, 原田恵嘉, 吉村和久, 松下修三, 玉村啓和. HIV 外被タンパク質 gp120 の構造変化を誘起する低分子 CD4 ミミックの構造活性相関研究. 第 55 回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2011 年 10 月 8 日.
- 52) ト部亜里沙, 野村 渉, 増田朱美, 玉村啓和. 1 対で反応するジンクフィンガーリコンビナーゼの設計とその反応. 第 55 回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2011 年 10 月 8 日.
- 53) 尾崎太郎, 浦野恵美子, 鳴海哲夫, 野村 渉, Kasthuraiah Maddali, Yves Pommier, 山本直樹, 駒野淳, 玉村啓和. HIV タンパク質 Vpr を基にしたインテグラーゼ阻害剤の構造活性相関研究. 第 55 回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2011 年 10 月 8 日.
- 54) 宍戸美華, 鳴海哲夫, 相川春夫, 玉村啓和. N-(ベンゾイルオキシ)スルホンアミドによる α,β -不飽和エノンの アジリジン化反応. 第 55 回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2011 年 10 月 8 日.
- 55) 清家俊輔, 鳴海哲夫, 相川春夫, 玉村啓和. クロロアルケン型ジペプチドイソスターの立体選択的合成法の開発. 第 55 回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2011 年 10 月 8 日.

- 56) 相馬 晃, 野村 渉, 田中智博, 鳴海哲夫, 相川春夫, 玉村啓和. CXCR4 二量状態解析のための2価結合型リガンドの合成. 第55回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2011年10月8日.
- 57) 森 あつみ, 野村 渉, 大橋 南美, 鳴海 哲夫, 玉村 啓和. 細胞内蛋白質のタグ-プローブシステムを利用した蛍光イメージングツールの創製. 第55回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2011年10月8日.
- 58) 鳴海哲夫, 野村 渉, 神戸千秋, 相川春夫, 古田寿昭, 玉村啓和. 光制御型 PKCリガンドの創製と新規光分解性保護基の開発研究. 第37回反応と合成の進歩シンポジウム. 徳島, 2011年11月7-8日.
- 59) 相川春夫, 野村 渉, 鳴海哲夫, 田中智博, 玉村啓和. 蛍光ラベル化した二価結合型 CXCR4リガンドの創製と応用. 第37回反応と合成の進歩シンポジウム. 徳島, 2011年11月7-8日.
- 60) 鳴海哲夫, 新井啓之, 吉村和久, 原田恵嘉, 野村 渉, 松下修三, 玉村啓和. 低分子型 CD4 ミミック: HIV 外被タンパク質の構造変化を促す HIV 侵入阻害剤. 第25回日本エイズ学会学術集会・総会 日本エイズ学会. 東京, 2011年11月30日-12月2日.
- 61) 橋本知恵, 鳴海哲夫, 野村 渉, 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 日本エイズ学会. 東京, 2011年11月30日-12月2日.
- 62) 鳴海哲夫, 新井啓之, 吉村和久, 原田恵嘉, 野村 渉, 松下修三, 玉村啓和. HIV 外被タンパク質 gp120 の構造変化誘起を指向した低分子 CD4 ミミックの構造活性相関研究. 第25回日本エイズ学会学術集会・総会 日本エイズ学会. 東京, 2011年11月30日-12月2日.
- 63) 尾崎太郎, 浦野恵美子, 鳴海哲夫, 野村 渉, Kasthuraiah Maddali, Yves Pommier, 山本直樹, 駒野 淳, Vpr 由来インテグラーゼ阻害剤の構造活性相関. 第25回日本エイズ学会学術集会・総会 日本エイズ学会. 東京, 2011年11月30日-12月2日.
- 64) 玉村 啓和. ペプチド化学を基盤としたケミカルバイオロジー. 第14回ペプチドフォーラム. 鹿児島, 2011年12月16日.
- 2) HIV 立体構造認識抗体誘導ペプチド抗原、及びその合成方法：特願 2011-51432、
- 3) HIV 立体構造認識抗体誘導ペプチド抗原、及びその合成方法：米国出願番号：13/319,813
- 4) HIV 立体構造認識抗体誘導ペプチド抗原、及びその合成方法：EP 出願番号：10777543.9

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

- 1) HIV立体構造認識抗体誘導ペプチド：特願 2011-082813

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

NBD誘導体の効果の動物モデルを用いた研究
研究分担者 五十嵐 樹彦 京都大学ウイルス研究所 教授

研究要旨 相同組換え法により、新規SHIV(SHIV-MNA)を作製した。SHIV-MNAは、抗HIV-1 Env V3抗体KD-247に対する中和感受性がNBD誘導体存在下で上昇するHIV-1 MNA株の Envを持ち、親株と同様の中和プロファイルを示した。更にサル末梢血単核細胞で効率よく複製した。本ウイルスがサル個体で効率よく複製すれば、ウイルスタンパクの構造変化の誘導による中和抗体に基づく新規治療戦略の前臨床試験がサルで可能になる。

NBD誘導体による抗体媒介性ウイルス中和増強を個体感染で検証する前段階として、YYA-021の非ヒト霊長類における安全性をdose escalationにより検討したところ、12.5 mg/kgで急性左心不全が疑われる副作用を観察した。この投与量の1/5-1/10量が最大許容投与量と考えられた。

A. 研究目的

HIV-1 感染症の治療は、既存薬剤の長期投与により派生する様々な解決すべき問題を抱えており、HIV 生活環の阻害ばかりでなく、HIV-1 感染細胞を標的にする新規治療法が求められている。研究代表者は、中和抗体の臨床応用に向けた研究の過程で HIV-1 gp120 の CD4 結合部位に作用して ENV 三量体の立体構造を変化させ、中和抗体の反応性及び中和活性を飛躍的に増強する低分子化合物、NBD-556 を同定した。In vivo では、中和抗体の多くは、Env に反応エピトープが保存されているにもかかわらず、中和活性が見られない。これは、Env が三量体を形成しその立体構造によりエピトープを遮蔽しているためと考えられている。この立体遮蔽を解除し中和抗体が中和エピトープに到達可能となれば、既に体内に存在する抗体によるウイルス中和が可能となる。中和抗体はウイルス膜上の機能的 Env に結合できるばかりでなく、感染細胞の表面に結合し、ADCC などの作用でこれを攻撃する。これらの効果が in vivo で実証できれば、体内の感染細胞を減少させることが可能となり、現在の抗ウイルス療法との併用によりウイルス排除への道が開かれる。本分担研究では、このような新しい治療戦略の in vivo における有効性を動物モデルで検証することを目的

とする。

B. 研究方法

I. 既存 SHIV の中和感受性および NBD 誘導体存在下における感受性増強効果

HIV-1 89.6 株 (クレード B) 由来の Env を持つ SHIV-KS661 株の、中和抗体 KD-247 に対する感受性を TZM-bl 細胞を用いた中和試験で評価した。さらに、NBD 誘導体の一種 YYA-021 存在下における中和感受性の増強効果を評価した。

II. 新規SHIV-MNA15株の作出および性状の解析

KD-247 に低感受性であるものの、YYA-021 存在下で中和感受性が顕著に上昇する事が知られている HIV-1 MNA 株の env gp120 を含む遺伝子領域を PCR 増幅し、その断片を SHIV-KS661 の相当領域を含まない遺伝子断片と共にヒトリンパ球系細胞 C8166-CCR5 に遺伝子導入し、感染性ウイルス粒子を産生させた。ウイルス液調製後、ゲノム RNA を抽出し、cDNA に逆転写して塩基配列を決定した。このウイルスの KD-247 に対する感受性および YYA-021 存在下における中和感受性増強を評価した。さらに、SHIV-MNA のアカゲザル末梢血単核細胞における複製能を SIV239 と比較し

た。

III. YYA-021 のサルにおける安全性評価

サルを用いた proof of concept 実験に向けて、YYA-021 のアカゲザルにおける急性毒性を評価した。

i) 2.5 mg/kg の YYA-021 を筋肉内投与し、経時的に採血、臨床状態を観察した。

ii) 2.5 mg/kg の YYA-021 を静脈内投与し、経時的に採血、臨床状態を観察した。

その後、iii) 6.25 mg/kg、iv) 12.5 mg/kg に静脈内投与量を上げ、経時的採血、臨床状態の観察を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験に当たっては、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」に基づいた「京都大学における動物実験の実施に関する規定」を遵守する。当施設におけるアカゲザルの飼養については、「特定外来生物による生態系等に係わる被害の防止に関する法律」の規定に基づき、環境大臣より許可を受けている。また、「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」の輸入禁止地域等を定める省令に基づき輸入サル飼育施設の指定を受けている。「動物の愛護及び管理に関する法律」も遵守する。また、組換え SHIV 感染実験については第二種使用等をする間に執る拡散防止措置について大臣確認されている。

C. 研究結果

I. 既存 SHIV の中和感受性および NBD 誘導体存在下における感受性増強効果

SHIV-KS661 株の、中和抗体 KD-247 に対する感受性を TZM-bl 細胞を用いた中和試験によって評価したところ、 IC_{50} が 1-10 μ g/ml 程度であったことから、国際標準株との比較により Tier1B 相当であることが明らかとなった。さらに、NBD 誘導体の一種 YYA-021 存在下において KD-247 に対する中和感受性の増強効果が観察された。

II. 新規 SHIV-MNA 株の作出および性状の解析

HIV-1 MNA 株の env gp120 を含む遺伝子領域を PCR 増幅した断片を SHIV-KS661 の相当領域と入れ替えたウイルスを相同組換え法を用いて作製することに成功した。ウイルスの塩基配列を決

定し、このウイルスが HIV-1 MNA 株の env gp120 を含むことを確認した。このウイルス SHIV-MNA の KD-247 に対する感受性および YYA-021 存在下における中和感受性増強効果を評価したところ、親株と同様に KD-247 に対して低感受性 (Tier2,3 相当) であるものの、YYA-021 存在下で中和感受性が顕著に上昇することを確認した。さらに、SHIV-MNA のアカゲザル末梢血単核細胞における複製能を調べたところ SIV239 と同様に効率よく複製した。

III. YYA-021 のサルにおける安全性評価

i) はじめに比較的少量(2.5 mg/kg)の YYA-021 を筋肉内に投与し、極端な副反応が起ころうか検討した。カニクイザルにおける全血液量は体重の約 8%と見積もられている(Noor et al. Primates, 22:281, 1981)ので、これをアカゲザルに適用し、全ての薬剤が排泄・拡散せず血中に留まると仮定した場合の最大血中濃度は 96 μ M と見積もられる。これは試験管内において YYA-021 が KD-247 と相乗的にウイルス中和をする際に必要な 20 μ M を理論的に上回る値である。投薬後、サルに特記すべき臨床状態の変化はなかったため、当初計画通り、投与 0.5、1、2、4、12 および 24 時間後に採血し、血漿を分離し冷凍保存した。更に、投与 48 時間後に採血し血清を分離、投与前に調製、凍結保存した血清と合わせて血清生化学検査を依頼した。

ii) 筋肉内投与で目立った副作用がなかったため、同量を静脈内投与した。やはり特記すべき臨床状態の変化はなかったため、当初計画通り採血を行った。

iii) 6.25 mg/kg 静脈内投与 (最大血中濃度理論値: 236 μ M) において、投与終了直後に軽度の瞳孔散大、チアノーゼ、軽度の徐脈が認められたが短時間で回復したため、当初計画通り採血を行った。この実験では 30 分間で緩徐に静脈内投与を行ったため、投与中の覚醒を防ぐため通常の 2 倍量の追加麻酔を投与直前に行った事による深麻酔が投与直後に観察された異状の原因の可能性があった。

iv) そこで、12.5 mg/kg 静脈内投与 (最大血中濃度理論値: 460 μ M) においては追加麻酔量を通常

量に戻す代わりに所要時間を30分から20分に短縮して投与した。YYA-021 投与開始6分後より心拍数の低下(85-69 bpm)および瞳孔の散大が認められた。心拍数は更に低下を続け50 bpm近くまで低下したため、投与終了9分後にドブタミンを0.32 mg 静脈内投与した。投与終了0.5、1、2および4時間後に採血したが、4時間後採血の際に麻酔時にサルがふらついており、恰も麻酔から覚醒していないかの様に観察された。投与終了12時間後に観察をした所、ふらつき、顔面蒼白、若干の脱水を認めたため、麻酔・採血を割愛した。その後、投与24時間後にかけて状態は回復したため、24および48時間後に採血した。

iv)の実験で経時的に記録した心電図を解析した所、1.投与後の徐脈、2.右軸偏位、PR波の若干の延長が認められ、投与により急性左心不全が起った可能性が示唆された。

投与前後に採取した血清の生化学的検査から、i)ではASTおよびALTが、ii)、iii)およびiv)ではALTがそれぞれ投与48時間後に約2倍に上昇した。アカゲザルにおける正常値をやや上回る検査値異常であったが、一過性の上昇であった。

現在、血中薬物濃度について検討中である。

D. 考察

既存のSHIV/アカゲザルモデルとして使用されているSHIV-KS661は、Tier1B相当の中和感受性ウイルスであるが、YYA-021存在下でさらに中和感受性が増強されることから、SHIV-KS661を用いてサル個体におけるYYA-021による治療効果の評価を行うことは可能である。

今年度新規に作製したSHIV-MNAは、Tier2,3相当の中和抵抗性ウイルスであることから、SHIV-MNAがサル個体で効率よく複製すれば、中和抵抗性の臨床分離株においてウイルスタンパクの構造変化の誘導による中和抗体に基づく新規治療戦略の前臨床試験がサルで可能になる。

YYA-021は静脈内投与した場合、12.5 mg/kgの量で急性左心不全を疑わせる副作用が観察されたため、実際の実験には1/10-1/5量の化合物投与に制限するべきである。筋注でのみASTの上昇が見られたが、これは投与局所の組織傷害の可能

性が考えられる。現在、投与後の化合物血中濃度が不明であるが、血清肝酵素値(ALT)が上昇した事からも、肝に到達した事は明らかである。血中濃度がトランプ値で20 μ Mを超えるような投与量および間隔を見いだす事でproof of concept実験が可能となる。

E. 結論

- ・ NBD 誘導体によるウイルス中和抗体の中和活性増強効果を、既存の SHIV/アカゲザルモデルで検証出来る事を明らかにした。
- ・ 臨床分離株の中和感受性を再現し、初代サルリンパ球で効率よく複製する新規 SHIV を作出した。
- ・ サルを用いた NBD 誘導体による中和抗体活性増強の proof of concept 実験で用いる最大許容投与量を決定した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Morita, D., Igarashi, T., Horiike, M., Mori, N., and Sugita, M. T cells monitor N-myristoylation of the nef protein in simian immunodeficiency virus-infected monkeys. *J. Immunol.* 187:608-12, 2011.
- (2) Takahara, Y., Matsuoka, S., Kuwano, T., Tsukamoto, T., Yamamoto, H., Ishii, H., Nakasone, T., Takeda, A., Inoue, M., Iida, A., Hara, H., Shu, T., Hasegawa, M., Sakawaki, H., Horiike, M., Miura, T., Igarashi, T., Naruse, T.K., Kimura, A., and Matano, T. Dominant induction of vaccine antigen-specific cytotoxic T lymphocyte responses after simian immunodeficiency virus challenge. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 408:615-9, 2011.
- (3) Kuwata, T., Katsumata, Y., Takaki, K., Miura, T., and Igarashi, T. Isolation of potent neutralizing monoclonal antibodies from an SIV-infected rhesus macaque by phage display. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 27(5): 487-500, 2011.

(4) Nishimura, Y., Shingai, M., Lee, W. R., Sadjadpour, R., Donau, O. K., Willey, R., Brenchley, J. M., Iyengar, R., Buckler-White, A., Igarashi, T., and Martin, M. A. Recombination Mediated Changes in Coreceptor Usage Confers an Augmented Pathogenic Phenotype in a Non-human Primate Model of HIV-1 Induced AIDS. *J. Virol.* 85:10617-26, 2011.

(5) Nakamura, M., Takahara, Y., Ishii, H., Sakawaki, H., Horiike, M., Miura, T., Igarashi, T., Naruse, T.K., Kimura, A., Matano, T., and Matsuoka, S. Major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic T lymphocyte responses during primary simian immunodeficiency virus infection in Burmese rhesus macaques. *Microbiol. Immunol.* 55:768-773, 2011.

(6) Horiike, M., Iwami, S., Kodama, M., Sato, A., Watanabe, Y., Yasui, M., Ishida, Y., Kobayashi, T., Miura, T., and Igarashi T. Lymph nodes harbor viral reservoirs that cause rebound of plasma viremia in SIV-infected macaques upon cessation of combined antiretroviral therapy. *Virology.* 423:107-18, 2012.

2. 学会発表

(1) 中村碧、高原悠佑、阪脇廣美、堀池麻里子、三浦智行、五十嵐樹彦、成瀬妙子、木村彰方、俣野哲朗、松岡沙織 サルエイズモデル感染初期におけるMHCクラスIハプロタイプ別のCTL反応優位パターンの解析 第25回日本エイズ学会学術集会 11.30 東京

(2) 張陰峰、五十嵐樹彦、松尾和浩、堀端重男、横溝香里、三浦智行、大橋貴、山本直樹、志田壽利 高病原性SIVに対する組換えBCGと弱毒ワクシニア(m8Δ)エイズワクチンの防御効果 第25回日本エイズ学会学術集会 11.30 東京

(3) 森田大輔、五十嵐樹彦、堀池麻里子、森直樹、杉田昌彦 Nef蛋白質のミリスチン酸修飾をモニターする新たな免疫システム 第25回日本エイズ学会学術集会 11.30 東京

(4) 大附寛幸、三浦智行、小林剛、吉村和久、玉村啓和、松下修三、五十嵐樹彦 中和抵抗性のサル/ヒト免疫不全ウイルスの作製とin vitroにおける立体構造変化誘導剤による中和感受性増強効果の評価 第25回日本エイズ学会学術集会 11.30 東京

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

NBD誘導体の活性測定、NBD誘導体の最適化の研究

研究分担者・吉村和久・熊本大学エイズ学研究センター・准教授

研究要旨：

前年度に引き続き、平成 23 年度も、HIV-1 エンベロープの立体構造を変化させて、中和抗体の感受性を増強させる CD4 類似低分子化合物 (NBD-556) およびその誘導体に関する研究を行った。候補となる新規化合物を用いて *in vitro* 耐性誘導を行い、誘導された NBD 耐性ウイルスの Env gp120 領域のシークエンスを行い、化合物の構造と結合部位及び活性の相関を調べた。今回試した全ての化合物に対する耐性ウイルスを得ることができた。得られたそれぞれの耐性ウイルスは、すべての NBD 誘導体に対して交差耐性を示した。それらの耐性変異は、大きく 3 つに分類できることが分かった。すなわち、i) V255M 単独変異を持つグループ、ii) V255M+T375I を中心とした複数の変異を持つグループ、そして、iii) CD4 cavity の入り口付近に変異を持つグループであった。これらの知見をもとに、より立体構造変化誘導能に優れた化合物の開発に努めていきたいと考えている。

A. 研究目的

我々は、中和抗体の感受性増強能は NBD-556 並み、もしくはそれ以上に維持しつつ、細胞毒性の低い低分子化合物の検索を目的として研究を行っている。また、候補化合物による *in vitro* 耐性誘導により、予想される結合部位と立体構造変化誘導活性の相関を調べることを新たに今年度の目的とした。

B. 研究方法

前年度に引き続き、東京医科歯科大学生体材料工学研究所機能分子部門分子認識分野の玉村啓和教授に HIV-1 のエンベロープに立体構造変化を起こさせる低分子化合物(NBD-556 およびその誘導体)の合成を行っていただき、抗ウイルス効果と抗体の反応性の変化を WST-8 assay と FACS で解析した。また、候補となる新規化合物を用いて *in vitro* 耐性誘導を行い、誘導された NBD 耐性ウイルスの Env gp120 領域のシークエンスを行い、化合物の構造と結合部位及び活性の相関を検討した。

(倫理面での配慮)

研究の倫理的妥当性は熊本大学医学部先進医療審査会、倫理委員会にて承認されている。

C. 研究結果

昨年度までに行った結果で、NBD-556 が sCD4 と同様に CD4i 抗体の結合を増強することが確認されている。そこで、NBD-556 が gp120 のどの部位と結合しているかを詳細に知るために、我々が開発した *in vitro* 耐性誘導システムを用いて、この化合物の耐性ウイルスをとり、sCD4 耐性ウイルスのシークエンスと比較検討した。その結果、NBD-556 と sCD4 それぞれの耐性誘導で観察された変異部位を gp120 の 3 次元結晶解析図上にプロットすると、NBD-556 の変異部位は sCD4 のそれと非常に似通った部位に集中していることがわかった。つまり、NBD-556 が sCD4 の gp120 上の結合部位と非常に近い位置で結合していることが示唆された。このことは、我々の系で誘導された耐性ウイルスの gp120 の変異部位を調べることにより、NBD 誘導体の結合部位の推測ができる可能性を示唆している。

そこで、本年度我々は、引き続き東京

医科歯科大学の玉村啓和教授にお願いして合成していただいた数十個のNBD誘導体から、NBD-556以外に立体構造変化を惹起する11個の誘導体を選んで、sCD4とともに、in vitro耐性誘導実験を行った。前回は実験室株のX4ウイルスであるIIIBウイルス株を用いて実験を行ったが、今回はよりin vivoに近いウイルスを使用する目的で、熊本大学附属病院で経過を観察中の感染症例から樹立した臨床分離R5ウイルス株 (Y1) を用いて行った。

すべての化合物を5-9回パッセージし、最終濃度が20-100 μ M(CD4は5 μ g/ml)に到達するまで継代した。その結果、今回試した全ての化合物に対する耐性ウイルスを得ることができた。得られたそれぞれの耐性ウイルスは、すべてのNBD誘導体に対して交差耐性を示した。最終パッセージのウイルスのgp120のシーケンスを比較したところ、大きく3つに分類できることが分かった。それらは、i)V255M単独変異を持つグループ、ii)V255M+T375Iを中心とした複数の変異を持つグループ、そして、iii) CD4 cavityの入り口付近に変異を持つグループであった。

D. 考察

今回合成した中で、感染阻害能や立体構造変化誘導能がNBD-556に比べ大きなものがいくつか発見できた。これらの化合物は、基本骨格のregion Iのフェニル環のメタ位とパラ位の両方にClとFを持つものであったり、NBD-556のregion IIIをシクロヘキシル化したものだったりした。両者を含めた関係が、どのように感染阻害能や立体構造変化誘導能に関与しているかを詳細に検討することにより、より効果的な低分子化合物の開発につながると考えている。

また、より毒性が低くPKの良い化合物の探索も引き続き行っていく予定である。

E. 結論

NBD-556様の中和抗体増強物質の新規化合物を開発し、iv vitro耐性誘導によって、それらの結合様式を推定し、構造と結合様式の大まかな推定ができた。これらの知見をもとに、より立体構造変化誘導能に優れた化合物の開発に努めていきたいと考えている。

G. 研究発表

1. 論文発表

- ①. Maeda, Y., **Yoshimura, K.**, Kodama, E., Miyamoto, F., Harada, S., Yuan, Y., Harada, S., Yusa, K. Acquisition of resistance to HIV-1 entry inhibitors *in vitro and in vivo*. *J AIDS & Clinical Research*, in press, 2012.
- ②. Narumi, T., Arai, H., **Yoshimura, K.**, Harada, S., Nomura, W., Matsushita, S., Tamamura, H. Small Molecular CD4 Mimics as HIV Entry Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, 19:6735-6742, 2011.

2. 学会発表

- ①. **Yoshimura K.**, Harada S., Hamji A., Matsushita S. Two-step escape pathway of the HIV-1 primary isolates induced by the in vitro selection of maraviroc. 12th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, Kumamoto, Japan, 2011, 10. 19-21.
- ②. Harada S., Ishikawa T., Hamaji A., Matsushita S., **Yoshimura K.** Impact of raltegravir pressure on the selection of HIV-1 envelope sequences in vitro. 12th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, Kumamoto, Japan, 2011, 10. 19-21.
- ③. **Yoshimura K.**, Harada S., Hamji A., Matsushita S. Maraviroc-resistant subtype B primary HIV-1 induced in vitro selection became highly sensitive to anti-gp120 neutralizing antibodies and autologous plasma IgG under high concentrations of the CCR5 inhibitor. 6th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention, Roma, Italy, 2011, 7. 17-20.

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レイアウト

書籍 該当なし

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

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
Narumi, T., Arai, H., Yoshimura, K., Harada, S., Nomura, W. Matsushita, S., Tamamura, H.	Small Molecular CD4 Mimics as HIV Entry Inhibitors.	Bioorg. Med. Chem.	19	6735-6742	2011
Honda M, Ishisaka M, Ishizuka N, Satoshi Kimura S, Oka S and behalf of Japanese Anti-HIV-1 QD Therapy Study Group.	Open-Label Randomized Multicenter Selection Study of Once Daily Antiretroviral Treatment Regimen Comparing Ritonavir-Boosted Atazanavir to Efavirenz with Fixed-Dose Abacavir and Lamivudine.	Intern Med	50	699-705	2011

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Masuda A, Nomura W, Ohba K, Yamamoto N, Tamamura H.	Studies for Optimum Design of Artificial Zinc Finger Recombinases by Evaluation of Effects of DNA Binding Affinity and Linker Components on Recombination Efficiency.	Michal Lebl (Eds.)	Proceedings of the Twenty-Second American Peptide Symposium	American Peptide Society	San Diego	2011	130-131
Nomura W, Nakahara T, Hashimoto C, Ohba K, Narumi T, Yamamoto N, Tamamura T.	Synthesis of HIV Gp41 Trimer Mimics Inducing Neutralizing Antibodies Based on Remodeling of Dynamic Structures of HIV-1 Envelope Proteins.	Michal Lebl (Eds.)	Proceedings of the Twenty-Second American Peptide Symposium	American Peptide Society	San Diego	2011	132-133
Nomura W, Tanaka T, Masuda A, Narumi T, Tamamura H.	Development of Bivalent Ligands for CXCR4 with Rigid Linkers and Application to Detection of Cancer Cells.	Michal Lebl (Eds.)	Proceedings of the Twenty-Second American Peptide Symposium	American Peptide Society	San Diego	2011	134-135
Nomura W, Ohashi N, Mori A, Narumi T, Tanaka T, Masuda A, Tsutsumi H, Tamamura H.	Novel Tag-probe Pairs for Fluorescent Imaging of Proteins in Living Cells.	Nobutaka Fujii and Yoshiaki Kiso (Eds.)	Proceedings of the 5th International Peptide Symposium in conjunction with the 47th Japanese Peptide Symposium	The Japanese Peptide Society	Kyoto, Japan	2011	40
Nomura W, Tanaka T, Masuda A, Narumi T, Tamamura H.	Development of a Bivalent Ligand for a Chemokine Receptor CXCR4 by Utilizing Polyproline Helix as a Linker.	Nobutaka Fujii and Yoshiaki Kiso (Eds.)	Proceedings of the 5th International Peptide Symposium in conjunction with the 47th Japanese Peptide Symposium	The Japanese Peptide Society	Kyoto, Japan	2011	220
Narumi T, Bode JW.	α,α -Dichloroisoxazolidinones for The Synthesis and Chemoselective Peptide Ligation of α -Peptide α -Ketoacids.	Nobutaka Fujii and Yoshiaki Kiso (Eds.)	Proceedings of the 5th International Peptide Symposium in conjunction with the 47th Japanese Peptide Symposium	The Japanese Peptide Society	Kyoto, Japan	2011	178

Hashimoto C, Narumi T, Nomura W, Yamamoto N, Tamamura H.	Synthesis and Evaluation of CXCR4-derived Peptides Targeting the Development of AIDS Vaccines.	Nobutaka Fujii and Yoshiaki Kiso (Eds.)	Proceedings of the 5th International Peptide Symposium in conjunction with the 47th Japanese Peptide Symposium	The Japanese Peptide Society	Kyoto, Japan	2011	103
--	--	---	--	------------------------------	--------------	------	-----

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
Nomura W, Masuda A, Ohba K, Urabe A, Ito N, Ryo A, Yamamoto N, Tamamura H.	Effects of DNA Binding of Zinc Finger and Linkers for Domain Fusion on Catalytic Activity of Sequence-Specific Chimeric Recombinases Determined by a Facile Fluorescent System.	Biochemistry		in press	2012
Nomura W, Komano J, Yamamoto N, Tamamura H, et al.	Synthetic C34 Trimer of HIV-1 gp41 Shows Significant Increase of Inhibition Potency	ChemMedChem	7	205-208	2012
Narumi T, Yamamoto N, Murakami T, Tamamura H, et al.	Conjugation of Cell-penetrating Peptides Leads to Identification of Anti-HIV Peptides from Matrix Proteins	Bioorg. Med. Chem.	20	1468-1474	2012
玉村啓和	ケミカルバイオロジーを基盤とした抗HIV剤の創製	薬学雑誌 (日本薬学会)	131(1)	69~78	2012
Narumi T, Nomura W, Matsushita S, Tamamura H, et al.	Small Molecular CD4 Mimics as HIV Entry Inhibitors.	Bioorg Med Chem	19	6735-6742	2011
Nomura W, Narumi T, Lewin NE, Blumberg PM, Furuta T, Tamamura H, et al.	Synthetic Caged DAG-lactones for Photochemically-controlled Activation of Protein Kinase C	ChemBioChem	12	535-539	2011
Ohashi N, Wataru Nomura W, Narumi T, Lewin NE, Itotani K, Blumberg PM, Tamamura H.	Fluorescent-responsive Synthetic C1b Domains of Protein Kinase C δ as Reporters of Specific High Affinity Ligand Binding	Bioconjugate Chem	22	82-87	2011
Tsutsumi H, Abe S, Mino T, Nomura W, Tamamura H.	Intense Blue Fluorescence in a Leucine Zipper Assembly	ChemBioChem	12	691-694	2011
Tanaka T, Narumi T, Nomura W, Murakami T, Yamamoto N, Tamamura H, et al.	Azamacrocyclic-metal Complexes as CXCR4 Antagonists.	ChemMedChem	6	834-839	2011