

201210004A

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24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25 (2013) 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 -----	1
研究代表者・松岡 雅雄（京都大学ウイルス研究所・教授）	

II. 分担研究報告

1. 藤井 信孝（京都大学薬学研究科・教授） -----	4
大石 真也（京都大学薬学研究科・講師）	
2. 村上 努（国立感染症研究所エイズ研究センター・室長） -----	13
3. 志村 和也（京都大学ウイルス研究所・助教） -----	17

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） -----	20
志村 和也（京都大学ウイルス研究所・助教）	
2. 藤井 信孝（京都大学薬学研究科・教授） -----	37
大石 真也（京都大学薬学研究科・講師）	
3. 村上 努（国立感染症研究所エイズ研究センター・室長） -----	79

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 優れた活性を有する抗 HIV 薬は、HIV 感染症に対する化学療法の根幹を成す。しかしながら、現時点では体内からの HIV 根絶は不可能であり、AIDS 発症を抑えるためには終生にわたる服薬が不可避である。このような状況から、HIV-1 は容易に薬剤耐性を獲得して治療抵抗性を示すだけでなく、近年では、初感染時に既に薬剤耐性変異を有する HIV の検出も報告されている。本研究では、これら既存の薬剤耐性 HIV にも活性を示す新規抗 HIV 薬の創出を目的としている。これまでに我々は多数の小分子化合物から候補化合物を同定している。本年度は高活性誘導体の創製を行った。また PD 404182 の作用点解明を行った。さらには、次世代の抗 HIV 薬として有望視されている CXCR4 阻害剤の開発に関して、耐性化メカニズムを解析した。

A. 研究目的

当研究グループでは、新規抗 HIV 活性化化合物の探索を目的としたランダムスクリーニングを新たに行い、ピラゾール骨格を有する化合物が高い抗 HIV 活性を示すことを見出した。本化合物の抗ウイルス活性はこれまで報告されておらず、新規高活性誘導体の創製を目指して構造活性相関研究を展開した。また、PD 404182 および高活性誘導体の作用機序を推測することを目的とし、種々の評価法を用いて解析した。さらに、PD 404182 のマウスに対する毒性を評価した。

新しい作用機序を有する HIV 阻害剤として期待される CXCR4 阻害剤に対する研究では、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の確立を目的とした。

B. 研究方法

高活性誘導体の創製

ピラゾール骨格を有する新規抗 HIV 化合物の様々な誘導体を作製し、構造活性相関研究を行った。

Time of drug addition assay

96-well プレートに播種した MAGI/CCR5 本細胞に、HIV-1_{IIIB} を感染させ、感染から 0、2、4、6、8、10、12、24、および 48 時間後に PD 404182 および高活性誘導体を添加した。作用点既知の各種抗 HIV 薬 [DS5000 (吸着阻害剤)、

T-20 (融合阻害剤)、AZT (核酸系逆転写酵素阻害剤)、NVP (非核酸系逆転写酵素阻害剤)、RAL (インテグラーゼ阻害剤)] を対照として用いた。上記の各種化合物は、予め算出した EC₉₀ 値 (HIV-1 の感染を 90% 阻止する濃度) で用い、抗 HIV 活性は、multinuclear activation of a galactosidase indicator (MAGI) 法により評価した。

作用点の解析

化合物の前処理群として、高タイターの HIV-1_{IIIB} 粒子と 100 μM の PD 404182 を混合し、37°C で静置した。90 分後、本混合物を 1000 倍希釈し、MAGI/CCR5 細胞に感染させた。一方、後処理群では、PD 404182 の代わりに終濃度を揃えた DMSO と同タイターのウイルス粒子を混合した。本混合物を細胞に添加する際に 100 nM の PD 404182 を加えた。両群とも感染 48 時間後に MAGI 法によりウイルス粒子の感染性を評価した。

PD 404182 のマウス毒性試験

日本クレアより入手した Jcl:ICR マウス (雌・6 週齢) に対して、PD 404182 を 30 mg/kg、10 mg/kg、3 mg/kg、あるいは 1 mg/kg で 1 日 1 回の腹腔内投与を行い、これを 3 日連続で行った。その後 1 週間にわたり、体重の増減を指標として評価した。溶媒コントロールとして、1% DMSO 溶液を用いた。

CXCR4 阻害剤耐性 HIV-1 株の中和抗体感受性

試験

CXCR4 阻害剤耐性 HIV-1 株由来の Env 組換え NL4-3 の中和抗体感受性を、447-52D および 2F5 について評価した。

(倫理面への配慮)

PD 404182 に関する動物実験は京都大学ウイルス研究所内で行い、京都大学が定める動物実験の指針に沿って行った。

C. 研究結果

高活性誘導体の創製

5-アミノピラゾール構造を有する誘導体はリード化合物に匹敵する活性を示した。そこで、より活性が高い本誘導体をもとに構造活性相関研究を展開した。その結果、ベンゼン環上やピラゾール環上の置換基およびアミド構造を検討したが、活性の向上につながる知見は得られなかった。次に、ピラゾール N-1 位のフェニル基上の置換基効果を検討した結果、ビフェニル体に高い活性が認められた。この誘導体を基に、さらなる高活性誘導体を創製するため、*m*-フェニル基の置換基効果を精査した結果、メタ位、もしくはパラ位にメチル基を導入した化合物やジクロロ体で活性の向上が認められ、最終的に約 6 倍活性が向上した高活性誘導体を得た。

Time of drug addition assay

本評価法では、作用点既知の抗 HIV 剤を用いて、ウイルス感染後の経時的な抗 HIV 活性プロファイルと比較することにより、標的化合物の作用点を推測するものである。本試験では、ウイルスのライフサイクル順に、吸着・融合・逆転写・インテグレーションの各ステップに対する阻害剤を対照に用いて、PD 404182 および高活性誘導体の作用機序解明を試みた。その結果、PD 404182 および試験に用いた全ての高活性誘導体は、いずれも吸着阻害剤である DS5000 に類似のプロファイルを示した。

作用点の解析

本解析では、PD 404182 の作用点がウイルス側に存在するのか、標的細胞側に存在するのかを明らかにすることを目的とした。PD 404182 の高濃度溶液 (100 μ M) で予め処理し

た HIV-1 (前処理群) は、溶媒コントロールの対照群と比較して、1%以下の感染性を示した。一方、細胞感染時に PD 404182 を加えた HIV-1 (後処理群) は、約 80%程度の感染性を有していた。AZT を用いて同様の実験を行ったが、前処理群、後処理群とも約 70~80%程度の感染性を有していた。

PD 404182 のマウス毒性試験

Jc1:ICR マウスに PD 404182 を 30 mg/kg の用量で 1 日 1 回、3 日間連続投与した結果、死亡例は認められなかった。また、その後の体重の増減も溶媒コントロールとの間に大きな差は認められなかった。

CXCR4 阻害剤耐性 HIV-1 株の中和抗体感受性試験

いずれの CXCR4 阻害剤耐性 HIV-1 株由来の Env 組換え NL4-3 も gp120 V3 ループをエピトープとする中和抗体である 447-52D および gp41 の膜貫通領域近傍をエピトープとする中和抗体である 2F5 に対する感受性が上昇していた。

D. 考察

PD 404182 の作用機序を明らかにするために種々の試験を行った。Time of drug addition の結果から、PD 404182 の作用点は、ウイルスの細胞への吸着過程を含む感染最初期であることが確認された。さらには、本化合物の標的は細胞側因子ではなく、ウイルス粒子中に存在するといった結果からも、本化合物が選択的にウイルス粒子に存在する分子に作用して抗ウイルス活性を示していることが推測された。また、本化合物は比較的高い耐容性を示した。さらには、CXCR4 阻害剤耐性 HIV-1 株の Env 領域の変異は、Env を標的とする中和抗体に対する感受性を高める変異であり、実際に HIV 感染者体内で今回使用した CXCR4 阻害剤を投与した場合は、出現しても淘汰される可能性が示唆された。

E. 結論

ランダムスクリーニングにより見出した抗 HIV 活性を有するピラゾール誘導体の構造最適化を展開し、リード化合物に比較して

約6倍強力な抗HIV活性を示す誘導体を見出した。また、今後のさらなる高活性誘導体の創製につながる興味深い構造活性相関情報を取得した。PD 404182はウイルス粒子に存在する分子に影響を与えることで、感染性を消失させていると推測された。また、抗ウイルス活性発揮のためには、予めウイルス粒子と接触している必要があるため、感染予防薬としての適用が考えられる。さらには、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は Env を標的とする中和抗体に対する感受性を高める変異でもあることが明らかになった。

F. 健康危険情報

該当事項無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Mizuhara T, Oishi S, Ohno H, Shimura K, Matsuoka M, Fujii N. Concise synthesis and anti-HIV activity of pyrimido [1,2-c][1,3]-benzothiazin-6-imines and related tricyclic heterocycles. *Org. Biomol. Chem.* 10(33) 6792-6802 (2012)
2. Mizuhara T, Oishi S, Ohno H, Shimura K, Matsuoka M, Fujii N. Structure-activity relationship study of pyrimido[1,2-c][1,3]-benzothiazin-6-imine derivatives for potent anti-HIV agents. *Bioorg. Med. Chem.* 20(21) 6434-6441 (2012)
3. Tanaka G, Nakase I, Fukuda Y, Masuda R, Oishi S, Shimura K, Kawaguchi Y, Takatani-Nakase T, Langel U, Gräslund A, Okawa K, Matsuoka M, Fujii N, Hatanaka Y, Futaki S. CXCR4 stimulates macropinocytosis: implications for cellular uptake of arginine-rich cell-penetrating peptides and HIV. *Chem Biol.* 19(11) 1437-1446 (2012)
4. Izumi K, Kawaji K, Miyamoto F, Shimane K, Shimura K, Sakagami Y, Hattori T, Watanabe K, Oishi S, Fujii N, Matsuoka M, Kaku M, Sarafianos SG, Kodama EN. Mechanism of resistance to S138A substituted enfuvirtide and its application to

peptide design. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45(4) 908-915 (2013)

5. Togami H, Shimura K, Okamoto M, Yoshikawa R, Miyazawa T, Matsuoka M. Comprehensive in vitro analysis of simian retrovirus type 4 susceptibility to antiretroviral agents. *J. Virol.* 87(8) 4322-4329 (2013)
6. Mizuhara T, Oishi S, Ohno H, Shimura K, Matsuoka M, Fujii N. Design and synthesis of biotin- or alkyne-conjugated photoaffinity probes for studying the target molecules of PD 404182. *Bioorg. Med. Chem.* 21(7) 2079-2087 (2013)

2. 学会発表

1. 戸上博昭、志村和也、宮沢孝幸、松岡雅雄：ニホンザルより検出された SRV-4 に対する抗 HIV 薬の効果：第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012 年 11 月 13 日-15 日
2. 志村和也、水原司、大石真也、藤井信孝、松岡雅雄：広範なスペクトルを有する新規抗 HIV 薬の同定とその開発：第 26 回日本エイズ学会学術集会、東京、2012 年 11 月 24 日-26 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1. 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
外国 (PCT) : JP2012/061890 : 出願 (2012 年 5 月 9 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. 実用新案登録

該当事項無し

3. その他

該当事項無し

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
研究分担者： 京都大学大学院薬学研究科 教授 藤井 信孝
京都大学大学院薬学研究科 講師 大石 真也

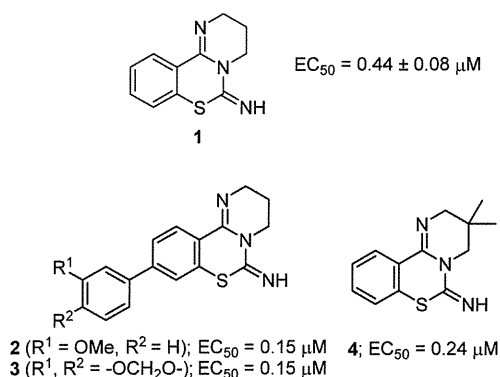
研究要旨 抗 HIV 活性を有する PD 404182 誘導体の安定性評価を行った結果、pyrimidobenzothiazin-6-imine 骨格が水溶液中において分解されることが判明した。また、ランダムスクリーニングによって見出した新規の抗 HIV 活性化合物について構造活性相関研究を行い、リード化合物に比べ6倍の活性を有する新規誘導体を創製した。また、新規 CXCR4 拮抗剤 FCA003 の薬物動態特性に関する知見を得た。

**分担研究項目 1：抗 HIV 活性小分子化合物
PD 404182 の安定性評価**

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** が強力な抗 HIV 活性を示すことを見出している。また、昨年度までに展開した構造活性相関研究により、**1** の 9 位に *m*-メトキシフェニル基やベンゾ[d][1,3]ジオキソ-5-イル基を導入した化合物 **2** 及び **3** が **1** に比較して約3倍の活性を有することを見出した。また、環状アミジン部位にジメチル基を導入した場合にも活性が約2倍向上することを報告している。(Figure 1)。本年度は、本化合物の *in vivo* 試験に向けて、細胞培養液中での安定性を評価した。

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



B-D. 研究方法・結果・考察

PD 404182 の細胞培養液中での安定性を調べるため、培養液 (10% FBS 含有) 500 μL に PD 404182 の DMSO 溶液 (100 mM) を 5 μL 加え、37°C でその経時変化を HPLC で確認した。その結果、徐々に HPLC 保持時間の異なる化合物に変換されていることが判明した (Figure 2, 23.4min→23.8min、室温での半減期: 約1日)。この化合物を回収し X 線結晶構造解析を行ったところ、その化学構造は 6-6-6 縮環構造を有する化合物 **5** であった (Figures 3,4)。

Figure 2. HPLC Analysis of PD 404182 in medium. HPLC conditions: 5-60% MeCN linear gradient in 0.1% NH₃ aq. over 30 min.

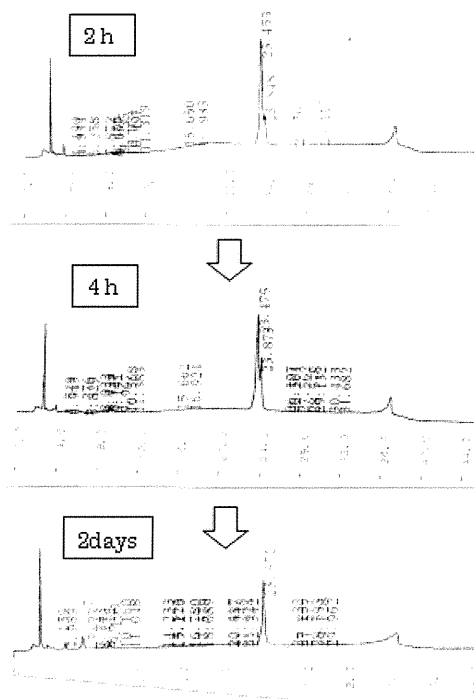


Figure 3 Structure of Compound **5**.

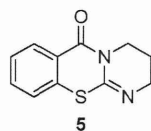
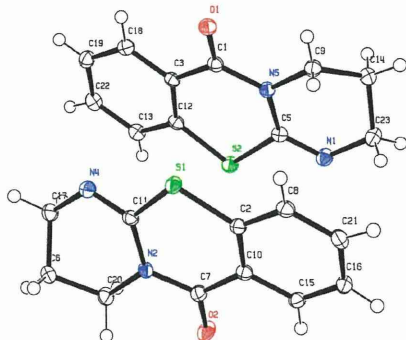


Figure 4. X-ray Crystal Structure of Compound 5.



生成した化合物 **5** の抗 HIV 活性を、MAGI アッセイを用いて評価した。その結果、化合物 **5** は全く抗 HIV 活性を示さなかった ($EC_{50} > 10 \mu\text{M}$)。

これらの結果から、PD 404182 の細胞培養液中での安定性は非常に悪く、本化合物の *in vivo* への応用では、化合物の連続もしくは頻回投与による血中濃度の維持が必要であることが示唆された。

(倫理面への配慮)

該当事項なし (ヒトや動物を用いた実験を含まない)

E. 結論

抗 HIV 活性化合物 PD 404182 の細胞培養液中での安定性を調べる研究を行ったところ、本化合物は容易に化合物 **5** に変換されて活性を消失することが判明した。今後、この変換プロセスを精査し、培養液中での安定性を高めることを目指すとともに、*in vivo* 評価のプロトコール作成に活用する。

F. 健康危険情報

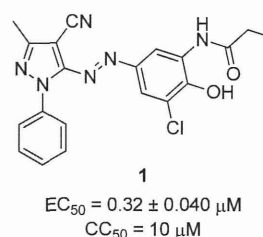
該当事項なし

分担研究項目 2：新規抗 HIV 活性小分子化合物構造最適化研究

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、ピラゾール骨格を有する化合物 **1** が高い抗 HIV 活性を示すことを見出した。本化合物の抗ウイルス活性はこれまで報告されておらず、新規高活性誘導体の創製を目指して構造活性相関研究を展開した。

Figure. 1 Structure of compound 1



B-D. 研究方法・結果・考察

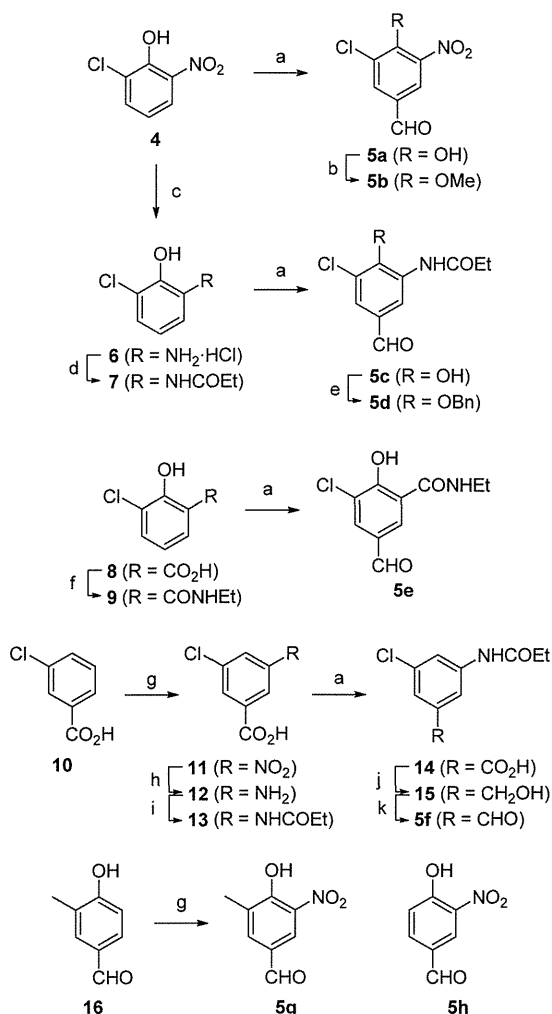
化合物の合成

まず、様々な置換基を有するベンズアルデヒド **5** の合成を行った (Scheme 1)。市販のフェノール **4** を Duff 法によりホルミル化して **5a** を得た。メトキシ体 **5b** は、**5a** のメチル化により得た。また、化合物 **5** のニトロ基を還元し、アミド化、ホルミル化を経て **5c** を得た。続いて、ベンジル化を行い、**5d** を合成した。化合物 **8** とエチルアミンの縮合、ホルミル化により **5e** を得た。3-クロロ安息香酸 **10** のニトロ化に続く、ニトロ基の還元、アミド化、カルボン酸の還元、PCC 酸化により、**5f** を得た。化合物 **16** をニトロ化し **5g** を得た。なお、化合物 **5h** は市販品である。

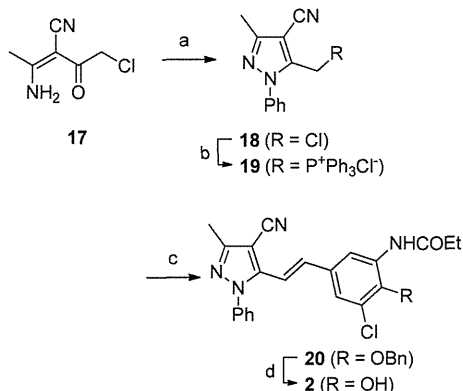
次に、スチレン誘導体 **2** の合成を行った (Scheme 2)。まず、化合物 **17** とフェニルヒドラジンの縮合によって、ピラゾール誘導体 **18** を得た。**18** から誘導したホウホニウム塩 **19** とアルデヒド **5d** の Wittig 反応により **20** を得た。続いて、ベンジル基の脱保護により目的とする誘導体 **2** を得た。

続いて、化合物 **3** の合成を行った (Scheme 3)。ニトリル **21** とアリールヒドラジンとの反応により **22** を得た後、アルデヒド **5** との還元的アミノ化により目的とする化合物 **3aa, 3ab, 3ai, 3b.3c** を得た。ニトロベン

Scheme 1. Synthesis of aldehydes **5**. *Reagents and conditions:* (a) hexamethylenetetramine, AcOH, 110 °C or 130 °C; (b) MeI, K₂CO₃, DMF, rt; (c) FeCl₃, NH₂NH₂·H₂O, activated carbon, *i*-PrOH, 80 °C, then 4M-HCl/1,4-dioxane; (d) EtCOCl, pyridine, THF, rt; (e) BnBr, K₂CO₃, 60 °C; (f) CBr₄, Et₃N, EtNH₂, PPh₃, CH₂Cl₂, rt; (g) H₂SO₄, HNO₃, 0 °C to rt; (h) Fe, NH₄Cl, *i*-PrOH, H₂O, 90 °C; (i) EtCOCl, Et₃N, THF, 0 °C to rt; (j) EtOCOCl, Et₃N, THF, -10 °C, then NaBH₄, MeOH, 0 °C to rt; (k) PCC, CH₂Cl₂, rt.

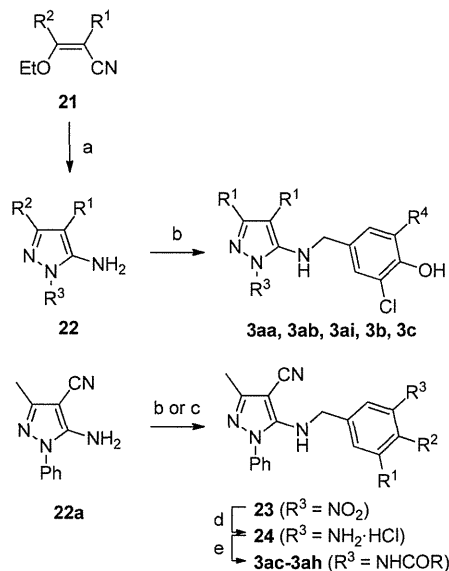


Scheme 2. Synthesis of compound **2**. *Reagents and conditions:* (a) PhNHNH₂, AcOH, MeOCH₂CH₂OH, 105 °C; (b) PPh₃, toluene, 110 °C; (c) *n*-BuLi, THF, 0 °C, then **5d**, THF, rt; (d) TMSI, MeCN, 80 °C.



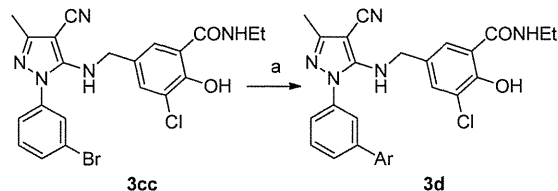
ズアルデヒド誘導体 **5a,5b,5g,5h** と **22a** との反応により得られた **23** は、ニトロ基の還元とアシル化により目的とする化合物 **3ac-3ah** へ誘導した。

Scheme 3. Synthesis of compounds **3a-3c**. *Reagents and conditions:* (a) R³-NHNH₂, EtOH, rt; (b) **5**, PPTS, toluene, reflux, LiBH₄, THF, 0 °C to rt; (c) **5**, TsOH, toluene, reflux, then NaBH₄, EtOH, 0 °C to rt; (d) FeCl₃, NH₂NH₂·H₂O, activated carbon, *i*-PrOH, 80 °C, then 4M-HCl/1,4-dioxane; (e) RCO₂H, EDC, HOBT, DIPEA, DMF, 45 °C.



化合物 1-ビアリール-1*H*-5-アミノピラゾール誘導体 **3d** は、化合物 **3cc** とアリールボロン酸 (ピナコールエステル) との反応により合成した (Scheme 4)。

Scheme 4. Synthesis of compound **3d**. *Reagents and conditions:* (a) Ar-B(OH)₂ or Ar-Bpin, Pd(dba)₂, PCy₃, K₃PO₄, 1,4-dioxane, H₂O, 80 °C.



抗 HIV 活性評価

合成した化合物について、NCK アッセイを用いて抗 HIV 活性の評価を行い、構造活性相関情報を取得した (Table 1-4)。

ジアゾ構造は、腸内細菌により容易に代謝・分解を受けることが知られている。そこで、まず、代謝安定性が高くジアゾ構造の等価体となる構造を探索することを目指し、スチレン誘導体 **2**、及び、ジアゾ構造をアミノメチレン基に変換した誘導体 **3aa**

Figure 2. Structures of compounds **2** and **3aa**.

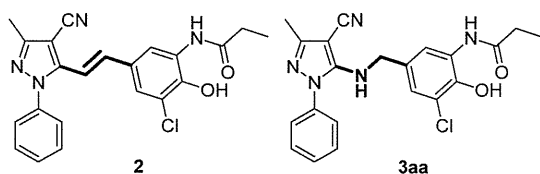


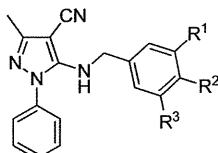
Table 1. SARs on linkage moiety.

compound	EC ₅₀ (μM) ^a
1	0.32 ± 0.04
2	0.44 ± 0.12
3aa	0.36 ± 0.11

^a EC₅₀ values represent the concentration of compound required to inhibit the HIV infection by 50%.

をデザインした (Figure 2)。スチレン誘導体 **2**、及び、5-アミノピラゾール構造を有する化合物 **3aa** はいずれもリード化合物 **1** に匹敵する活性を示し、これらの構造がジアゾ構造の等価体として利用可能であることが示唆された (Table 1)。そこで、より活性が高い **3aa** をもとに構造活性相関研究を展開した。

Table 2. SARs on benzyl group.



compound	R ¹	R ²	R ³	EC ₅₀ ^a (μM)
3aa	NHCOEt	OH	Cl	0.36 ± 0.11
3ab	NHCOEt	H	Cl	>10
3ac	NHCOEt	OMe	Cl	>10
3ad	NHCOEt	OH	H	>10
3ae	NHCOEt	OH	Me	>10
3af	NHCOMe	OH	Cl	>1.0 ^b
3ag	NHCON-propyl	OH	Cl	3.30 ± 0.89
3ah	NHCON-pentyl	OH	Cl	>10
3ai	CONHEt	OH	Cl	>1.0 ^b

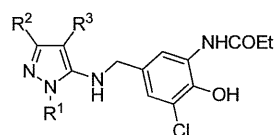
^a EC₅₀ values represent the concentration of compound required to inhibit the HIV-1 infection by 50%. ^b Cytotoxicity was observed at 10 μM

まず、右側のベンゼン環上の置換基の構造要求性を検討した (Table 2)。まず、水酸基やクロロ基を除去したところ、活性が消失した (**3ab**, **3ad**)。続いて、水酸基をメチル化、もしくは、クロロ基をメチル基に置換したが、いずれも活性は向上しなかった (**3ac**, **3ae**)。これらの結果は、水酸基やクロロ基が、標的分子との相互作用等において重要な役割を果たしていることを示唆している。続いて、アミド構造について検討した。しかしながら、アルキル鎖を短くした場合も、長くした場合でも活性は低下した (**3af-3ah**)。なお、化合物 **3af** と **3ai**

では 10 μM において細胞毒性が認められた。

次に、ピラゾール環上の置換基効果を検討した。3-メチル基や 4-シアノ基を除去したところ、活性が大幅に低下した (**3ba**, **3bb**)。また、ベンゼン環のメチル基やシクロヘキサン環への変換、3-メチル基のエチル基やフェニル基への変換、シアノ基のメトキシカルボニル基への変換等さまざまな検討を行ったが活性は向上しなかった (**3bc-3bg**)。

Table 3. SARs on pyrazole ring.



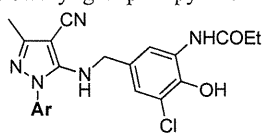
compound	R ¹	R ²	R ³	EC ₅₀ ^a (μM)
3aa	Ph	Me	CN	0.36 ± 0.11
3ba	Ph	H	CN	>1.0 ^b
3bb	Ph	Me	H	>10
3bc	Me	Me	CN	>10
3bd	<i>c</i> -hexyl	Me	CN	>1.0 ^b
3be	Ph	Et	CN	>10
3bf	Ph	Ph	CN	>10
3bg	Ph	Me	CO ₂ Me	>1.0 ^b


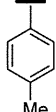

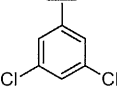
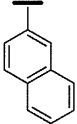



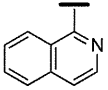
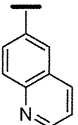
^a EC₅₀ values represent the concentration of compound required to inhibit the HIV-1 infection by 50%. ^b Cytotoxicity was observed at 10 μM

次に、ピラゾール N-1 位のフェニル基上の置換基効果を検討した (Table 4)。ベンゼン環のメタ位にメチル基やフルオロ基、フェニル基を導入したところ、**3aa** と同等か高い活性を有する誘導体が得られた (**3cb**, **3cd**, **3cg**)。一方で、メトキシ基やブロモ基、トリフルオロメチル基、ニトロ基、アセチルアミノ基を導入した場合には活性の低下が認められた (**3ca**, **3cc**, **3ce**, **3cf**, **3ch**)。パラ位、メタ位へのメチル基の導入も活性が低下した (**3ci**, **3cj**)。また、3位と5位をジクロロ化した化合物でも、活性の低下が認められた (**3ck**)。フェニル基を、ナフチル基、ピリジル基、キノリニル基に変換したところ活性は低下した (**3cl-3cq**)。

続いて、良好な活性を示したビフェニル体 **3cg** をもとにさらなる高活性誘導体を創製するため、*m*-フェニル基の置換基効果を精査した (Table 5)。オルト位、メタ位、パラ位にそれぞれメトキシ基、メチル基、クロロ基を導入した誘導体のうち、*o*-クロロ体 **3dc** では活性が維持され、メタ位、もしくはパラ位にメチル基を導入した化合物では活性の向上が認められた (**3de**, **3dh**)。また、ジクロロ体 **3dj** も高い活性を示した。

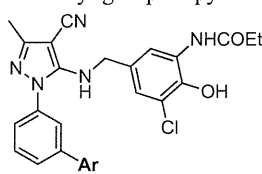
Table 4. SARs on aryl group on pyrazole moiety.




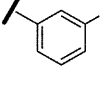
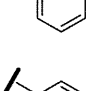
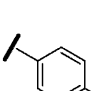
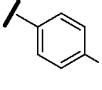
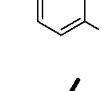
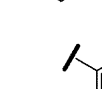
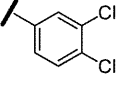
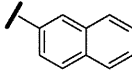

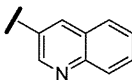


compound	Ar	EC ₅₀ ^a (μM)
		
3aa	R = H	0.36 ± 0.11
3ca	R = OMe	>10
3cb	R = Me	0.37 ± 0.11 ^b
3cc	R = Br	>0.1 ^c
3cd	R = F	0.33 ± 0.12 ^b
3ce	R = CF ₃	>0.1 ^c
3cf	R = NO ₂	>1.0 ^b
3cg	R = Ph	0.13 ± 0.03 ^c
3ch	R = NHCOCH ₃	>10
3ci		>1.0 ^b
3cj		>1.0 ^b
3ck		>1.0 ^b
3cl		>1.0 ^b
3cm		>1.0 ^b
3cn		>0.1 ^c
3co		>10
3cp		>1.0 ^b
3cq		>10

^a EC₅₀ values represent the concentration of compound required to inhibit the HIV-1 infection by 50%. ^b Cytotoxicity was observed at 10 μM. ^c Cytotoxicity was observed at 1.0 μM.

Table 5. SARs on biaryl group on pyrazole moiety.



compound	Ar	EC ₅₀ ^a (μM)
3da	 R = OMe	>0.1 ^c
3db	 R = Me	>0.1 ^c
3dc	 R = Cl	0.25 ± 0.13 ^b
3dd	 R = OMe	>0.1 ^c
3de	 R = Me	0.06 ± 0.01 ^c
3df	 R = Cl	>0.1 ^c
3dg	 R = OMe	>0.1 ^c
3dh	 R = Me	0.10 ± 0.04 ^c
3di	 R = Cl	>0.1 ^c
3dj		0.05 ± 0.01 ^c
3dk		>0.1 ^c
3dl		>1.0 ^b
3dm		>0.1 ^c

^a EC₅₀ values represent the concentration of compound required to inhibit the HIV-1 infection by 50%. ^b Cytotoxicity was observed at 10 μM. ^c Cytotoxicity was observed at 1.0 μM.

ナフチル基、ピリジル基、キノリル基を導入した場合は活性が低下した。

(倫理面への配慮)

該当事項なし (ヒトや動物を用いた実験を含まない)

E. 結論

ランダムスクリーニングにより見出した抗 HIV 活性を有するピラゾール誘導体 **1** の構造最適化を展開し、リード化合物に比較して約 6 倍強力な抗 HIV 活性を示す誘導体 **3dj** を見出した。また、今後のさらなる高活性誘導体の創製につながる興味深い構造活性相関情報を取得した。

F. 健康危険情報

該当事項なし

分担研究項目3：新規 CXCR4 拮抗剤の安定性・薬物動態評価

A. 研究目的

新規 CXCR4 拮抗剤の有効性評価の一環として、平成 22 年度までの研究において創製した FCA003 [cyclo (D-Tyr-Arg-Arg-Nal-Gly-ψ[-C(=NH)-NH-])] のラット血漿中での安定性評価を行うとともに、マウス尾静脈急速投与後の血中動態、肝臓及び腎臓内の薬剤量を測定することにより、薬物動態に関する知見を得る。

B. 研究方法

CXCR4 拮抗剤のラット血漿中での安定性評価

FCA003 を終濃度 100 µg/mL となるようにラット血漿に添加し、37°C で 30, 60, 120 分間インキュベーションした。各反応溶液に 100%TFA (トリフルオロ酢酸) を 5 mL 添加して混合後、4°C で 12,000 rpm で遠心し、上清を回収して HPLC 分析した。

CXCR4 拮抗剤のマウス投与後の血中濃度推移の評価

FCA003 を生理食塩水に 2 mg/mL となるように溶解し、マウスに投与した (0.2 mg/head)。ネンブタール麻酔下で、後大静脈腹部よりヘパリン処理した注射筒により投与後 5, 15, 30, 120, 180, 240 分後に採血した。ヘパリン処理したチューブに入れ遠心回収した上清 50 µL に 100%TFA を 5 µL 添加した。混合後 4°C で 12,000 rpm で遠心して上清を回収し、HPLC 分析した。

CXCR4 拮抗剤のマウス投与後の肝臓と腎臓内量測定試験

FCA003 を投与後、摘出・保存した肝臓と腎臓の各総重量を測定後、約 100 mg の大きさに切り取り細胞破碎用チューブに入れた。生理食塩水 900 µL を加え、ジリコニアビーズを添加 (1 ビーズ/チューブ) 後、TISSUE LYSER II (QIAGEN 社) にて破碎した (振動数 25 回/秒, 2 分間)。破碎後に 4°C で 40,000 g にて 30 分間遠心し、上清 100 µL を回収した。遠心回収した上清 100 µL に 100%TFA を 10 µL 添加し、混合後 4°C で 12,000 rpm で遠心して上清を回収し、HPLC 分析した。

C. 結果

CXCR4 拮抗剤のラット血漿中での安定性評価

各反応時間の FCA003 を HPLC 分析し、ピーク面積を算出して検量線より残存濃度を算出したところ、下記のような薬剤残存量の変遷が認められた。

時間 (min)	残存量 (µg/mL)	残存率 (%)
0	104.9	100.0
30	103.3	98.5
60	92.2	87.9
120	65.0	62.0

CXCR4 拮抗剤のマウス投与後の血中濃度推移の評価

各採血時間の FCA003 を HPLC 分析し、ピーク面積を算出して検量線より血中濃度を算出したところ、下記のような各時間の薬剤残存量の変遷が認められた。

時間 (min)	残存量 (µg/mL)
0	100.0±0.0
5	10.2±2.0
15	7.1±2.5
30	6.5±2.2
120	2.1±0.6
180	1.9±1.1
240	0.6±0.1

*マウス血液量を 2 mL として計算

片対数グラフによる濃度推移が一相性の減少直線を示したことから、FCA003 は静脈内急速投与後、速やかに全身へ比較的均一に分布することが推測された。そこで、one-compartment PK model による動態解析を実施した。理論曲線による実データへのカーブフィッティング、PK パラメータの算出には動態解析プログラム「MULTI」を使用した。実データと理論曲線との一致 (計算結果) は良好であり、FCA003 の血中濃度-時間推移は one-compartment model で再現できることが示唆された。

CXCR4 拮抗剤のマウス投与後の肝臓と腎臓内量測定試験

各採血時間に摘出した肝臓及び腎臓より調製したサンプルを HPLC 分析し、ピーク面積を算出して検量線より肝臓及び腎臓内の化合物量を算出した。時間の経過とともに、肝臓及び腎臓抽出液中に FCA003 の分布が認められた。

時間 (min)	肝臓中 (μg)	腎臓中 (μg)	血液中 (μg)
0	0.0	0.0	200.0*
5	-1.2	0.1	20.4
15	-1.1	0.5	14.4
30	0.1	1.0	13.0
120	1.7	3.3	4.2
180	1.3	4.3	3.8
240	1.3	3.4	1.2

*マウス血液量を2 mLとして計算

D. 考察

ラット血漿中安定性試験より、FCA003は120分の反応で62%の残存量を示したことから、ラット血漿中での半減期は約180分と推定された。各採血時間に対応する血中濃度に基づき、one-compartment PK modelによる動態解析を実施した。

代表的なPKパラメータは以下の通りである。投与量を200 $\mu\text{g}/30\text{ g}$ /匹とすると、Div = 6667 $\mu\text{g}/\text{kg}$ となる。推定された初期濃度(P1)が $C_0 = 9.7\ \mu\text{g}/\text{mL}$ なので、分布容積(V_d)は $\text{Div}/C_0 = 684\ \text{mL}/\text{kg}$ となる。この値はマウスの生理的なtotal body water space = 725 mL/kg と非常に近い値であることから、FCA003は投与後速やかに全身へ分布するものと推測された。

半減期($t_{1/2}$)は56.8分、平均滞留時間(MRT)は81.9分となり、約1時間で血中濃度が半減するという、静脈投与後の血中濃度推移を予測しやすい結果となった。

全身クリアランス(CL_{tot})は8.35 $\text{mL}/\text{min}/\text{kg}$ となり、マウスの肝臓血流速度(90 $\text{mL}/\text{min}/\text{kg}$)や腎臓血流速度(65 $\text{mL}/\text{min}/\text{kg}$)、糸球体濾過速度(14 $\text{mL}/\text{min}/\text{kg}$)と比較しても小さい数値であり、それほど極端に大きな全身クリアランス値ではなかった。

各採血時間でのHPLC-UV分析チャートから、5, 15, 30分ではFCA003のピークの減少は認められるが代謝物はほとんど観察されず、120, 180, 240分ではFCA003のピークの減少とともに代謝物と思われるピークの増加が観察された。これはin vitroラット血漿中安定性試験の結果と一致した。

FCA003の受容体結合阻害活性の IC_{50} 値は9.4 nMであり、これは分子量を約1,000とした場合0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に相当し、今回の血中濃度は十分に有効血中濃度を維持していると推察される。さらに、 $C_p(t) = C_0 \cdot \exp(-k_e \cdot t)$ の理論式から計算すると、 IC_{50} 値以上の血中濃度を維持する時間は投与後

約9時間であると予想された。

また、FCA003をマウス尾静脈急速投与し5, 15, 30, 120, 180分後に摘出した肝臓及び腎臓より調製したサンプルをHPLC分析した結果、時間の経過とともに腎臓及び肝臓にFCA003が検出された。この結果は、FCA003が静脈内急速投与後に速やかに全身へと比較的均一に分布することと矛盾しないと考えられる。

(倫理面への配慮)

動物実験は、研究協力先である京都薬科大学の同動物実験委員会によって規定された動物実験ガイドラインに基づいて適切に実施した。

E. 結論

FCA003をラット血漿中に添加してインキュベーション後、HPLC分析を行ったところ、120分後に約4割程度が分解されることが判明した。また、FCA003を静脈投与後、継時的に採血を行い、薬物の血中濃度の推移を精査したところ、速やかに全身へ比較的均一に分布することが推測された。さらに、FCA003を静脈投与し5, 15, 30, 120, 180分後の肝臓及び腎臓中の薬剤量を定量分析したところ、時間の経過とともに腎臓及び肝臓にFCA003が検出された。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Masuda R, Oishi S, Tanahara N, Ohno H, Hirasawa A, Tsujimoto G, Yano Y, Matsuzaki K, Navenot JM, Peiper SC, Fujii N. Paradoxical downregulation of CXCR4 chemokine receptor 4 induced by polyphemusin II-derived antagonists. *Bioconjug. Chem.* 23(6) 1259-1265 (2012)
- Murata K, Kitaori T, Oishi S, Watanabe N, Yoshitomi H, Tanida S, Ishikawa M, Kasahara T, Shibuya H, Fujii N, Nagasawa T, Nakamura T, Ito H. Stromal cell-derived factor 1 regulates the actin organization of chondrocytes and chondrocyte hypertrophy. *PLoS One.* 7(5) e37163 (2012)
- Li X, Qian H, Miyamoto F, Naito T, Kawaji K, Kajiwara K, Hattori T, Matsuoka M, Watanabe K, Oishi S, Fujii N, Kodama EN. A simple, rapid, and sensitive system for the evaluation of anti-viral drugs in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 424(2) 257-261 (2012)
- Mizuhara T, Oishi S, Ohno H, Shimura K, Matsuoka M, Fujii N. Concise synthesis and anti-HIV activity of pyrimido[1,2-c][1,3]-benzothiazin-6-imines and related tricyclic heterocycles. *Org. Biomol. Chem.* 10(33) 6792-6802 (2012)
- Otani Y, Kijima T, Kohmo S, Oishi S, Minami T, Nagatomo I, Takahashi R, Hirata H, Suzuki M, Inoue K, Takeda Y, Kida H, Tachibana I, Fujii N, Kumanogoh A. Suppression of metastases of small cell lung cancer cells in mice by a peptidic CXCR4 inhibitor TF14016. *FEBS Lett.* 586(20) 3639-3644 (2012)
- Zhang Y, Patel S, Abdelouahab H, Wittner M, Willekens C, Shen S, Betems A, Joulin V, Opolon P, Bawa O, Pasquier F, Ito M, Fujii N, Gonin P, Solary E, Vainchenker W, Coppo P, De Botton S, Louache F. CXCR4 inhibitors selectively eliminate CXCR4-expressing human acute myeloid leukemia cells in NOG mouse model. *Cell Death Dis.* 3, e396 (2012)
- Mizuhara T, Oishi S, Ohno H, Shimura K, Matsuoka M, Fujii N. Structure-activity relationship study of pyrimido[1,2-c][1,3]-benzothiazin-6-imine derivatives for potent anti-HIV agents. *Bioorg. Med. Chem.* 20(21) 6434-6441 (2012)
- Tanaka G, Nakase I, Fukuda Y, Masuda R, Oishi S, Shimura K, Kawaguchi Y, Takatani-Nakase T, Langel U, Gräslund A, Okawa K, Matsuoka M, Fujii N, Hatanaka Y, Futaki S. CXCR4 stimulates macropinocytosis: implications for cellular uptake of arginine-rich cell-penetrating peptides and HIV. *Chem Biol.* 19(11) 1437-1446 (2012)
- Izumi K, Kawaji K, Miyamoto F, Shimane K, Shimura K, Sakagami Y, Hattori T, Watanabe K, Oishi S, Fujii N, Matsuoka M, Kaku M, Sarafianos SG, Kodama EN. Mechanism of resistance to S138A substituted enfuvirtide and its application to peptide design. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45(4) 908-915 (2013)
- Mizuhara T, Oishi S, Ohno H, Shimura K, Matsuoka M, Fujii N. Design and synthesis of biotin- or alkyne-conjugated photoaffinity probes for studying the target molecules of PD 404182. *Bioorg. Med. Chem.* 21(7) 2079-2087 (2013)

2. 学会発表

- 水原 司、大石真也、大野浩章、志村和也、松岡雅雄、藤井信孝 Synthesis and structure-activity relationship study of pyrimido[1,2-c][1,3]benzothiazin-6-imine derivatives for development of anti-HIV agents The 7th SKO Joint Symposium for Young Scientists (京都) 2012年5月
- 水原 司、大石真也、大野浩章、志村和也、松岡雅雄、藤井信孝 ピリミドベンゾチアジン誘導体の新規合成法の開発と抗HIV剤を指向した構造活性相関研究 第6回日本ケミカルバイオロジー学会年会 (京都) 2012年6月
- Tsukasa Mizuhara, Shinya Oishi, Hiroaki Ohno, Kazuya Shimura, Masao Matsuoka, Nobutaka Fujii Efficient synthesis of pyrimido[1,2-c][1,3]benzothiazin-6-imine derivatives and its application to structure-activity relationship study of anti-HIV agents. The 6th Takeda Science Foundation Symposium on Pharma Science (大阪) 2012年9月

4. 水原 司、大石真也、大野浩章、志村和也、松岡雅雄、藤井信孝 ピリミドベンゾチアジン誘導体の合成法の開発と抗 HIV 剤の構造活性相関研究への応用 第 42 回複素環化学討論会 (京都) 2012 年 10 月
5. 水原 司、大石真也、大野浩章、志村和也、松岡雅雄、藤井信孝 ピリミドベンゾチアジン誘導体の新規合成法の開発と抗 HIV 剤を指向した構造活性相関研究 平成 24 年度日本薬学会近畿支部大会 (兵庫) 2012 年 10 月
6. 久保達彦、大石真也、大野浩章、藤井信孝 CXCR4 アンタゴニスト FC131 をリードとする新規 CXCR7 選択的リガンドの開発平成 24 年度日本薬学会近畿支部大会 (兵庫) 2012 年 10 月
7. Tsukasa Mizuhara, Shinya Oishi, Hiroaki Ohno, Kazuya Shimura, Masao Matsuoka, and Nobutaka Fujii. Synthesis and anti-HIV activity of pyrimido[1,2-c]-[1,3]benzothiazin-6-imine derivatives. IKCOC-12 (京都) 2012 年 11 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1. 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
外国 (PCT) : JP2012/061890 : 出願 (2012 年 5 月 9 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. 実用新案登録

該当事項なし

3. その他

該当事項なし

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 松岡雅雄

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、より耐性の出にくい薬剤の設計や耐性変異パターンの予測を行うことである。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-1 Env 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明らかになった。H23 年度では、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に変化がないことを示した。H24 年度では、1) 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を耐性誘導に使用した PM1/CCR5 細胞を用いて確認した。さらに、耐性 HIV-1 由来 Env 組換え株において特に gp120 V3 ループをエピトープとする中和抗体に対する感受性が著しく上昇しているという興味深い結果を得た。

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 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 株の中和抗体感受性試験：

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（および対照としての NL4-3）の中和抗体感受性試験を TZM-b1 細胞（NIH AIDS Reagent Program より分与）を標的細胞として、1) gp120 V3 ループをエピトープとする中和抗体である 447-52D（Polmum Scientific）、2) gp41 の膜貫通領域近傍をエピトープとする中和抗体である 2F5（NIH AIDS Reagent Program）についてウイルス感染価の中和能を測定した。

（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）：MT-4 細胞を標的細胞として使用した場合とほぼ同様に、PM1/CCR5 細胞においてもいずれの 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（表 1）。

（2）CXCR4 阻害剤耐性 HIV-1 株の中和抗体感受性試験：

いずれの CXCR4 阻害剤耐性 HIV-1 株由来の Env 組換え NL4-3 も gp120 V3 ループをエピトープとする中和抗体である 447-52D および gp41 の膜貫通領域近傍をエピトープとする中和抗体である 2F5 に対する感受性が上昇していた。特に、KRH-3955 と KRH-3148 耐性 HIV-1 株由来の Env 組換え NL4-3 は、447-52D に対して 5-40 倍、2F5 に対して 5 倍と顕著にその中和抗体感受性が上昇していた。（表 2）。

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、Env を標的とする中和抗体に対する感受性を高める変異であり、実際に HIV 感染者体内で今回使用した CXCR4 阻害剤を投与した場合は、出現しても淘汰される可能性が示唆された。

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は Env を標的とする中和抗体に対する感受性を高める変異でもあることが明らかになった。

F. 健康危険情報

該当なし

表 1. CXCR4阻害剤耐性HIV-1Env組換え株の各種CXCR4阻害剤に対する耐性度

Virus	EC ₅₀ (nM) in PM1/CCR5 cells				
	KRH-3955 (fold increase)	KRH-3148	AMD3100	AMD070	T141
NL4-3	1.1 (1.0)	4.5 (1.0)	54 (1.0)	22 (1.0)	25 (1.0)
NL4-3 (passage control)	1.4 (1.3)	9.2 (2.0)	87 (1.6)	50 (2.3)	44 (1.8)
KRH-3955 ^a	7.8 (7.1)	85 (19)	724 (13)	335 (15)	123 (4.9)
KRH-3148 ^a	11 (10)	129 (29)	834 (15)	451 (21)	172 (6.9)
AMD3100 ^a	6.3 (5.7)	67 (15)	670 (12)	263 (12)	107 (4.3)

表 2. CXCR4阻害剤耐性HIV-1Env組換え株の各種中和抗体に対する感受性の比較

Virus	IC ₅₀ (nM) in TZM-bl cells		
	447-52D (fold increase)-Exp1	447-52D (Exp2)	2F5
NL4-3	1.6 (1.0)	3.7 (1.0)	1.8 (1.0)
NL4-3 (passage control)	>10 (>6.3)	>10 (>2.7)	3.6 (2.0)
KRH-3955 ^a	0.04 (0.025)	0.076 (0.021)	0.28 (0.16)
KRH-3148 ^a	0.27 (0.17)	0.27 (0.073)	0.43 (0.24)
AMD3100 ^a	1.2 (0.75)	0.76 (0.21)	0.81 (0.45)
AMD070 ^a	3.9 (2.4)	1.4 (0.38)	0.96 (0.53)

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yanagita H, Fudo S, Urano E, Ichikawa R, Ogata M, Yokota Y, Murakami T, Wu H, Chiba J, Komano J, Hoshino T: Structural modulation study of inhibitory compounds for RNase H activity of HIV-1 reverse transcriptase. *Chem Pharm Bull* 60: 767-771, 2012.
2. Narumi T, Tanaka T, Hashimoto C, Nomura W, Aikawa W, Sohma A, Itotani K, Kawamata M, Murakami T, Yamamoto N, Tamamura H: Pharmacophore-based small molecule CXCR4 ligands. *Bioorg Med Chem Lett* 22: 4169-4172, 2012.
3. Nakasone T, Murakami T, Yamamoto N: Double oral administrations of emtricitabine/tenofovir prior to virus exposure protects against highly pathogenic SHIV infection in macaques. *Jpn J Infect Dis* 65: 345-349, 2012.
4. Nakasone T, Kumakura S, Yamamoto M, Murakami T, Yamamoto N: Single oral administration of the novel CXCR4 antagonist, KRH-3955, induces an efficient and long-lasting increase of white blood cell count in normal macaques, and prevents CD4 depletion in SHIV-infected macaques: A preliminary study. *Med Microbiol Immunol* doi 10.1007/s00430-012-0254-1, 2012.
5. Murakami T: Retroviral Env glycoprotein trafficking and incorporation into virions. *Mol Biol Int* doi: 10.1155/2012/682850, 2012.
6. Miyauchi K, Urano E, Takeda S, Murakami T, Okada Y, Cheng K, Yin H, Kubo M, Komano J: Toll-like receptor (TLR) 3 as a surrogate sensor of retroviral infection in human cells. *Biochem Biophys Res Commun* 424(3): 519-523, 2012.
7. Takemura T, Murakami T: Functional constraints on HIV-1 capsid: their impacts on the viral immune escape potency. *Front Microbiol* 3: 369. doi: 10.3389/fmicb, 2012.00369, 2012.
8. Narumi T, Aikawa H, Tanaka T, Hashimoto C, Ohashi N, Nomura W, Kobayakawa T, Takano H, Hirota Y, Murakami T, Yamamoto N,

Tamura H: Low-molecular-weight CXCR4 ligands with variable spacers. *Chem Med Chem* 8(1): 118-124, 2013.

9. Takemura T, Kawamata M, Urabe M, Murakami T: Cyclophilin A-dependent restriction to capsid N121K mutant human immunodeficiency virus type 1 in a broad range of cell lines. *J Virol* 87(7): 4086-4096, 2013.
10. M. A. Checkley, B. G. Luttge, P. Y. Mercredi, S. K. Kyere, J. Donlan, Murakami T, M. F. Summers, S. Cocklin, E. O. Freed: Reevaluation of the requirement for TIP47 in human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein incorporation. *J Virol* 87(6):3561-3570, 2013.

2. 学会発表

1. Murakami T, H. Wu, M. Kawamata, J. Chiba, and T. Takemura. R Functional analysis of Rab11a in HIV-1 assembly. The 2012 Meeting on Retroviruses. Cold Spring Harbor, USA, 2012.
2. Takemura T., M. Kawamata, M. Urabe, and T. Murakami. S A capsid mutation at Asn 121 induces the CypA dependent restriction in the cell lines in which CypA expression is not high. The 2012 Meeting on Retroviruses. Cold Spring Harbor, USA, 2012.
3. 村上 努、高野 皓、藤野 真之、鳴海 哲夫、相川 春夫、橋本 智恵、野村 渉、山本 直樹、玉村 啓和. HIV-1MA/CA 部分ペプチドの細胞内導入による新規 HIV-1 複製制御法の探索. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 2012 年 11 月 13 日 -15 日
4. 竹村 太地郎、川又 美弥子、ト部 美帆、才田 晴美、村上 努. キャプシド Asn 121 →Lys 変異による HIV-1 複製のサイクロフィリン A 依存性の変化. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 2012 年 11 月 13 日 -15 日
5. 高野 皓、鳴海 哲夫、相川 春夫、橋本 智恵、藤野 真之、野村 渉、村上 努、山本 直樹、玉村 啓和. HIV-1 MA, CA タンパク質を基にした新規抗 HIV-1 剤の創製研究. 第 26 回日本エイズ学会学術集

会・総会，横浜，2012年11月24日-26日

6. 相川 春夫、松本 大地、野末 愛美、浦野 恵美子、Mathieu Metifiot、Kasthuraiah Maddali、野村 渉、鳴海 哲夫、駒野 淳、村上 努、Yves Pommier、山本 直樹、玉村 啓和. ペプチドミメティック型インテグラーゼ阻害剤の構造活性相関研究. 第26回日本エイズ学会学術集会・総会，横浜，2012年11月24日-26日

- H. 知的財産権の出願・登録状況
該当事項なし

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
研究分担者：京都大学ウイルス研究所 助教 志村 和也

研究要旨 抗 HIV 活性を有する PD 404182 誘導体の作用機序を明らかにするために、time of drug addition assay を行った結果、吸着阻害剤である DS5000 と同様のプロファイルが確認されたことから、PD 404182 は HIV 感染最初期に作用点を有している可能性が高い。また、予めウイルスを PD 404182 で処理した時のみに抗 HIV 活性が認められたことから、本薬剤の作用点はウイルス側に存在することが明らかになった。さらに、マウスに対する毒性評価を行った結果、耐容性が高いことが判明した。

A. 研究目的

当研究グループでは、抗 HIV-1 活性を指標としたスクリーニングにより、PD 404182 を新規抗 HIV 薬候補化合物として見出している。本年度は、本化合物および高活性誘導体の作用機序を推測することを目的とし、種々の評価法を用いて検討した。さらに、本化合物のマウスに対する毒性を評価した。

B. 研究方法

Time of drug addition assay

本評価法においては、HeLa-CD4/CCR5-LTR/beta-galactosidase (MAGI/CCR5) 細胞を用いた。96-well プレートに播種した本細胞に、HIV-1_{IIIB} を感染させ、感染から 0、2、4、6、8、10、12、24、および 48 時間後に PD 404182 および高活性誘導体を添加した。作用点既知の各種抗 HIV 剤 [DS5000 (吸着阻害剤)、T-20 (融合阻害剤)、AZT (核酸系逆転写酵素阻害剤)、NVP (非核酸系逆転写酵素阻害剤)、RAL (インテグラーゼ阻害剤)] を対照として用いた。上記の各種化合物は、予め算出した EC₉₀ 値 (HIV-1 の感染を 90% 阻止する濃度) で用い、抗 HIV 活性は、multinuclear activation of a galactosidase indicator (MAGI) 法により評価した。

作用点の解析

化合物の前処理群として、高タイターの HIV-1_{IIIB} 粒子と 100 μM の PD 404182 を混合し、37°C で静置した。90 分後、本混合物を 1000 倍希釈し、MAGI/CCR5 細胞に感染させた。

一方、後処理群では、PD 404182 の代わりに終濃度を揃えた DMSO と同タイターのウイルス粒子を混合した。本混合物を細胞に添加する際に 100 nM の PD 404182 を加えた。両群とも感染 48 時間後に MAGI 法によりウイルス粒子の感染性を評価した。

化合物添加タイミングの抗 HSV-2 活性への影響

PD 404182 の高活性誘導体 10 μM で 60 分、30 分および 15 分処理した野生型 HSV-2 をそれぞれ Vero 細胞に感染させた。また、未処理野生型 HSV-2 を感染させた細胞に、感染後 0 分、15 分、30 分および 60 分後に同化合物を 10 μM になるように添加した。上記の処理による抗 HSV-2 活性は、プラーク法で評価した。

PD 404182 のマウス毒性試験

日本クレアより入手した Jcl:ICR マウス (雌・6 週齢) に対して、PD 404182 を 30 mg/kg、10 mg/kg、3 mg/kg あるいは 1 mg/kg で 1 日 1 回の腹腔内投与を行い、これを 3 日連続で行った。その後 1 週間にわたり、体重の増減を指標として評価した。溶媒コントロールとして、1%DMSO 溶液を用いた。

(倫理面への配慮)

本動物実験は京都大学ウイルス研究所内で行い、京都大学が定める動物実験の指針に沿って行った。

C. 研究結果

Time of drug addition assay

本評価法では、作用点既知の抗 HIV 剤を用いて、ウイルス感染後の経時的な抗 HIV 活性プロファイルと比較することにより、標的化合物の作用点を推測するものである。本試験では、ウイルスのライフサイクル順に、吸着・融合・逆転写・インテグレーションの各ステップに対する阻害剤を対照に用いて、PD 404182 および高活性誘導体の作用機序解明を試みた。その結果、PD 404182 および試験に用いた全ての高活性誘導体は、いずれも吸着阻害剤である DS5000 に類似のプロファイルを示した。

作用点の解析

本解析では、PD 404182 の作用点がウイルス側に存在するのか、標的細胞側に存在するのかを明らかにすることを目的とした。PD 404182 の高濃度溶液 (100 μ M) で予め処理した HIV-1 (前処理群) は、溶媒コントロールの対照群と比較して、1%以下の感染性を示した。一方、細胞感染時に PD 404182 を加えた HIV-1 (後処理群) は、約 80%程度の感染性を有していた。AZT を用いて同様の実験を行ったが、前処理群、後処理群とも約 70~80%程度の感染性を有していた。

化合物添加タイミングの抗 HSV-2 活性への影響

HSV-2 感染系を用いて、PD 404182 の高活性誘導体を添加するタイミングが抗 HSV-2 活性に与える影響を精査した。その結果、本化合物で予め 60 分、30 分、15 分処理した HSV-2 粒子は、いずれも感染性が失われていた (図 1)。一方、感染と同時に本化合物を添加した HSV-2 には、溶媒コントロールと同程度の感染性が認められた。また、感染から 15 分、30 分、60 分後に本化合物を添加しても、まったく抗 HSV-2 活性は認められなかった。

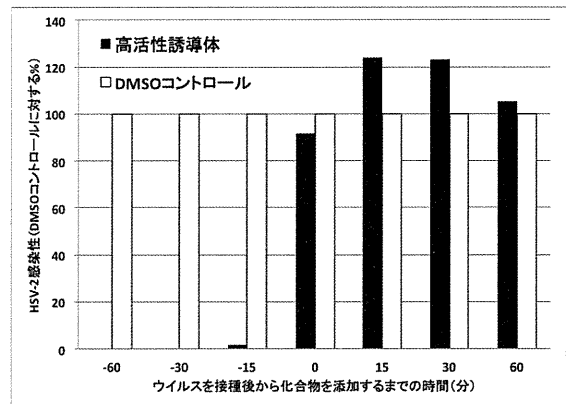


図 1. 化合物添加タイミングによる抗 HSV-2 活性変化

PD 404182 のマウス毒性試験

Jcl:ICR マウスに PD 404182 を 30 mg/kg の用量で 1 日 1 回、3 日間連続投与した結果、死亡例は認められなかった。また、その後の体重の増減も溶媒コントロールとの間に大きな差は認められなかった。

D. 考察

PD 404182 の作用機序を明らかにするために種々の試験を行った。Time of drug addition assay の結果から、PD 404182 の作用点は、ウイルスの細胞への吸着過程を含む感染最初期であることが確認された。さらには、HSV-2 を用いた試験において、感染成立後では化合物の抗ウイルス活性が認められないことや、本化合物の標的は細胞側因子ではなく、ウイルス粒子中に存在するといった結果からも、本化合物が選択的にウイルス粒子に存在する分子に作用して抗ウイルス活性を示していることが推測された。また、本化合物は比較的高い耐容性を示した。

E. 結論

PD 404182 はウイルス粒子に存在する分子に影響を与えることで、感染性を消失させていると推測された。また、抗ウイルス活性発揮のためには、予めウイルス粒子と接触している必要があるため、感染予防薬としての適用が考えられる。

F. 健康危険情報

該当事項無し