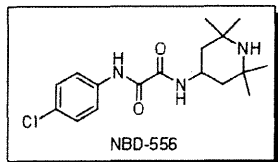


様式 A (8)

別紙 3

et al., J Virol 80:5563-5570, 2006)がこのコンセプトの実現可能性を裏打ちしている。

What is NBD-556 ?



Q. Zhao et al. *Virology*, 339, 213 (2005)
A. Schön et al. *Biochemistry*, 45, 10973 (2006)
N. Madani et al. *Structure*, 16, 1689 (2008)

・gp120とCD4の結合を阻害

・gp120と結合し、soluble CD4(sCD4)と同様の構造変化を誘起

低分子CD4ミミックとして注目!!

図1 NBD-556の構造

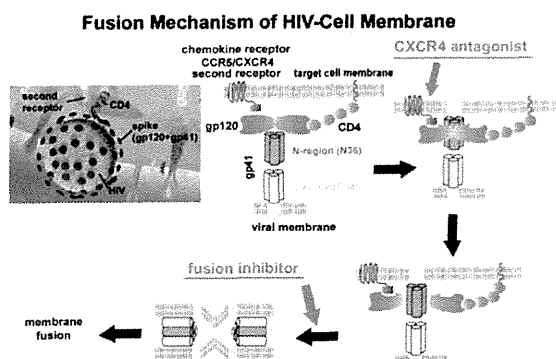


図2 HIV-1の感染メカニズム

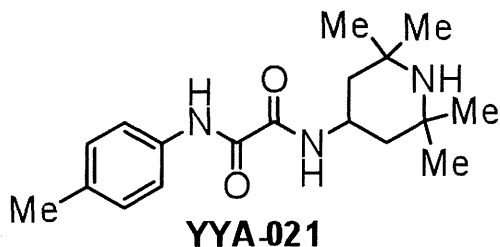


図3 YYA-021(NBD-559)の構造

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ことを目的とした。芳香環部位のパラ位およびメタ位への塩素原子およびフッ素原子の導入が抗 HIV 活性の向上に寄与し (HAR 171)、ピペリジン環部位への疎水性基の導入が細胞毒性の低減に寄与する (HAR-431) ことを、前年度までに報告している (図4)。今年度は、さらに有効な新規誘導

体を探索した。また、実用化に向け、YYA-021のラットおよびサルを用いた血中濃度測定および薬物動態解析を行った。

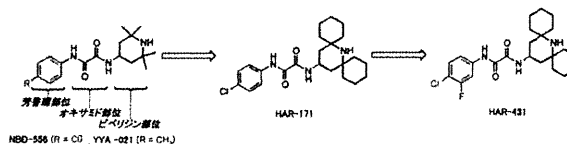


図4 前年度までの化合物の創製展開

B. 研究方法

1) 分子モデリングをもとにした新規骨格の構築

CD4 ミミックと gp120 の結合モデル (図5) の結果を精査すると、芳香環部位の環の平面性がオキサミド部位まで続いており、CD4 ミミックは高い平面性を保って gp120 と相互作用していることが示唆された。そこで、芳香環とオキサミドの一部をインドール骨格に置換する事で平面性を付与しつつ、分子全体としてのエントロピーの減少を目指し、インドール骨格含有化合物群をデザインした (図6)。芳香環への塩素原子およびフッ素原子の導入も行い、置換位置とその効果について検討した。また電荷をもった化合物は毒性を示すことが一般的である為、無保護でのインドール上の二級アミンの酸性度に留意し、メチル基で保護したインドール誘導体も合成した。ピペリジン部位にはリード化合物由来の基本骨格や、高活性を示した上述の疎水性置換基を有する骨格を組み合わせた。

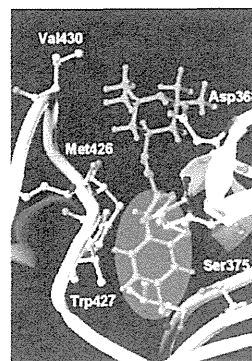


図5 CD4 ミミックと gp120 のドッキングモデル

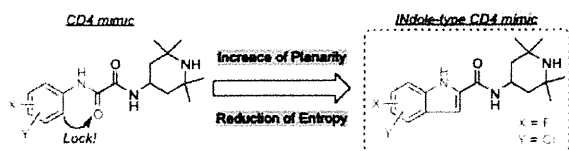


図 6 インドール型 CD4 ミミックのデザイン

2) 候補化合物群の合成

フルオロアニリンを出発原料とし NCS によるクロロ化を行い、次いでアミノ基を Boc 保護することで Boc アニリンへと誘導した。Boc アニリンに対し、ノルマルブチルリチウムとヨウ素を用い位置選択的にヨウ素化を行った後に、Boc を脱保護する事で三置換アニリンへと誘導した。三置換アニリンに酢酸パラジウム触媒のもとでピルビン酸と (DABCO): Diazabicyclo[2,2,2]octane: を作用させてインドール合成を行い、インドール-2-カルボン酸誘導体を誘導した。最後にインドール-2-カルボン酸誘導体に HOBt: 1-hydroxybenzotriazole と EDCI:1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide を塩基性条件下で作用させ、そこに一級アミノ基を有する種々のピペリジン部位を加えることでアミド結合を形成させ、インドール型 CD4 ミミックを合成した。

3) YYA-021 の血中薬物動態解析

前年度に引き続き、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度測定および体内薬物動態を解析した。15 mL および 30 mL (70.6 mg in 30 mL $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{NaCl}$ pH 7.4 のうち 15 mL および 30 mL を投与) YYA-021 溶液投与後 (投与量: 35.3 mg および 70.6 mg) 数分、数時間後に採血 3.0 mL (体重: 5.32 kg) し、YYA-021 の血中濃度を測定した(ラット、サルともに前年と同条件)。また、YYA-021 の血球吸着試験、および血球から血漿への再分布の

試験をおこなった。

4) 皮下投与用の YYA-021 の可溶化条件の検討

YYA-021 の 6.25mg/kg の静脈内投与では、血中濃度が測定できなかったため、有効濃度到達を目指して、皮下投与を考えた。種々の溶剤を組み合わせて、可溶化条件を検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、各施設の諸内規や作業方式に従って、動物愛護の精神で動物に与える苦痛の軽減と排除に努めた。

C. 研究結果

1) インドール型 CD4 ミミックの活性評価と構造活性相関

合成した一連のインドール型化合物の抗 HIV 活性および細胞毒性を評価した。いくつかの化合物を表 1 に示した。化合物 7, 11 で中程度の抗 HIV 活性が見られた。しかしそれらインドールの窒素原子をメチル化した化合物 10, 12 で、抗 HIV 活性が消失した(表 1)。全体的に活性が見られなかったことと、メチル化で抗 HIV 活性の消失が起きたことから、もう一度インドール骨格のモデリングを観察した(図 7)。するとリード化合物 NBD-556 とパラ Cl (5-Cl) のインドール体を重ねたモデリング図で塩素原子のズレが見て取れた(図 7)。この事実は環構造の導入により置換基の配置が固定化され、パラ位の塩素原子のずれや、分子から真横に飛び出す形になるインドール窒素原子のメチル化が、cavity との相互作用の障害になっている可能性を示唆すると考えられる。

表 1 5-Cl-インドール型インドール型 CD4 ミミックの抗 HIV 活性と細胞毒性

NBD-556	IC ₅₀ : 0.44 μ M CC ₅₀ : 70.4 μ M		Compd. cYTA48Pisp IC ₅₀ (μ M) ^a CC ₅₀ (μ M) ^a		Compd. cYTA48Pisp IC ₅₀ (μ M) ^b CC ₅₀ (μ M) ^b		Compd. cYTA48Pisp IC ₅₀ (μ M) ^c CC ₅₀ (μ M) ^c	
	5	6	7	8	9	10	11	12
	>10.0	19.4	>100	>200	3.6	11.4		
	>100	>20	>100	>20	100	13.5		
	15.6	31.2	-	-	-	-		
	>100	>20	-	-	-	-		

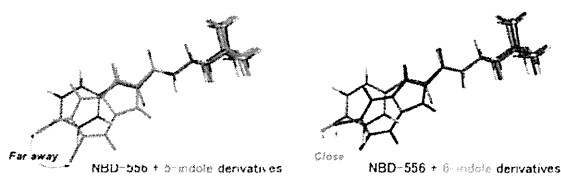


図 7 NBD-556 とインドール型 CD4 ミミックの重ね合わせ

2) 6-Cl-インドール型 CD4 ミミックの活性評価と構造活性相関

図 7 の NBD-556 とインドール型 CD4 ミミックのモデリングによる重ね合わせにより、表 1 の 5-Cl-インドール型 CD4 ミミックよりも、6-Cl-インドール型のほうが元のリード化合物 NBD-556 に近い構造をとっていると推定されるため、6-Cl-インドール型 CD4 ミミックを合成し、抗 HIV 活性および細胞毒性を評価した(表 2)。結果的には、このしりーでは高活性の化合物は見出せなかった。

表 2 6-Cl-インドール型 CD4 ミミックの抗 HIV 活性と細胞毒性

Structure	cYTAAR2Pep IC ₅₀ (μM) ^a		cYTAAR2Pep IC ₅₀ (μM) ^b		cYTAAR2Pep IC ₅₀ (μM) ^a	
	>100	CC ₅₀ (μM) ^b	>100	CC ₅₀ (μM) ^b	>100	CC ₅₀ (μM) ^b
	>100	37.4	>100	52.6	>100	10.7
	>100	33.2	>100	78.4	>100	33.9
	88.7	102.7	>100	121.4	>100	11.3
	>100	18.7	>100	41.1	>100	29.4

3) YYA-021 の体内動態解析

静脈注射によるラットの体内半減期は 17.8 分であった(前年度報告)。サルに関して同様な実験を行い 30 min 以降のデータを用いて GraphPad Prism で半減期を計算したところ、98.4 min となった(図 8)。時間が十分経っても血中に残っているということから考えると、組織分布が高いと考えられた。

4) YYA-021 の血球吸着試験

YYA-021 の血球吸着の可逆性、再分布を調べたところ、可逆的であり、また血球から血漿に再分布する可能性が示唆された。

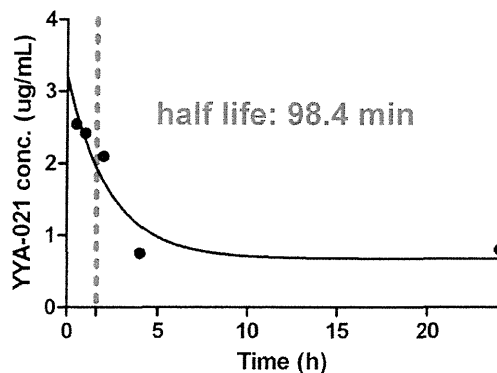


図 8 YYA-021 の血中濃度測定

5) 皮下投与用の YYA-021 の可溶化条件の検討

皮下投与用の YYA-021 の可溶化条件を種々検討したところ、8% ベンジルアルコール/12% エタノール (50 μL/75 μL)/ヒマシ油が最適であることがわかった。この条件で、サルに皮下注射したところ、30 分で中枢系に影響が生じた。したがって、容量を下げ静脈注射することとした。

D. 考察

NBD 誘導体の芳香環部位とオキサミド部位の一部を平面構造に保ちつつ構造固定化によるエントロピーの減少を図るためにインドール骨格をデザインし、化合物群を合成した。HIV-1 gp120 (Phe43-cavity) とのドッキングシュミレーションも行い、構造活性相関研究を行うことにより、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、サル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、解析を進めた。

E. 結論

Phe43-cavity と CD4 ミミックのドッキングシュミレーションより、NBD 誘導体の各部位が cavity のアミノ酸残基と静電的相互作用および疎水性相互作用していることが示唆された。このドッキングモデルを基にした構造活性相関研究により、さらなる有用な CD4 mimic 誘導体の創製が可能であると考えられる。YYA-021 の血中濃度測定および薬物動態解析により、静脈投与による中和抗体との併用が有望である可能性が示唆された。

F. 謝辞

抗体の作用解析の実験に関して、熊本大学

様式 A (8)

別紙 3

エイズ学研究センター、松下修三教授に、抗ウイルス活性の測定実験に関して、国立感染症研究所エイズ研究センター、吉村和久室長、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、大附寛幸修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) 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
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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*, 51: 1510–1517, 2012.
- 5) Hashimoto C, Nomura W, Ohya A, Urano E, Miyauchi K, Narumi T, Aikawa H, Komano JA, Yamamoto, N, Tamamura, H. Evaluation of a Synthetic C34 Trimer of HIV-1 gp41 as AIDS Vaccines. *Bioorg Med Chem* 20: 3287–3291, 2012.
- 6) Narumi T, Tanaka T, Hashimoto C, Nomura W, Aikawa H, 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.
- 7) Narumi T, Kobayakawa T, Aikawa H, Seike S, Tamamura H. Stereoselective Formation of Trisubstituted (Z)-Chloroalkenes Adjacent to a Tertiary Carbon Stereogenic Center by Organocuprate-Mediated Reduction/Alkylation. *Org Lett* 14: 4490-4493, 2012.
- 8) Narumi T, Arai H, Yoshimura K, Harada S, Hirota Y, Ohashi N, Hashimoto C, Nomura W, Matsushita S, Tamamura H. CD4 Mimics as HIV Entry Inhibitors: Lead Optimization

Studies of the Aromatic Substituents. *Bioorg Med Chem* in press.

著書

- 1) Nomura W, Tanaka T, Aoki T, Soma A, Aikawa H, Narumi T, and Tamamura H. Development of Designed Bivalent Ligands for CXCR4 and their Function on Receptor Binding. *Peptide Science 2011*, Sakaguchi, K., (Eds.), The Japanese Peptide Society, Sapporo, 79, 2012.
 - 2) Nomura W, Hashimoto C, Nakahara T, Ohya A, Miyauchi K, Ohba K, Narumi T, Aikawa H, Komano J, Yamamoto N, and Tamamura H. Designed Antigens Based on the Dynamic Structural Changes of GP41 for Development of Effective HIV-1 Vaccines. *Peptide Science 2011*, Sakaguchi, K., (Eds.), The Japanese Peptide Society, Sapporo, 295, 2012.
 - 3) Nomura W, Tsutsumi H, Abe S, Mori A, Narumi T, Aikawa H, Tamamura H. Intense Blue Fluorescence of Tag-probe Systems Based on a Leucine Zipper Assembly. *Peptide Science 2011*, Sakaguchi, K. (Eds.), The Japanese Peptide Society, Sapporo, 317, 2012.
 - 4) 野村 渉, 田中智博, 相川春夫, 玉村啓和. 「多価結合型GPCRリガンドの合成とがん細胞イメージングへの応用」, 最新ペプチド合成技術とその創薬研究への応用 (株式会社 メディカルドゥ), 267-273, 2012.
 - 5) 野村 渉, 田中智博, 玉村啓和. 「HIV阻害剤・腫瘍認識プローブとしてのケモカイン受容体リガンド」, ペプチド医薬の最前線「監修 木曾良明・向井秀仁」(株式会社 シーエムシー出版 東京)、101-107, 2012.
- ### 2. 学会発表
- 1) Narumi T, Tanaka T, Nomura W, Aikawa H, Tamamura H. HIV Inhibitors Targeting Entry, Fusion and Integrase. 244th American Chemical Society National Meeting & Exposition Fall 2012, Philadelphia, USA, Aug19-23, 2012.
 - 2) Nomura W, Tanaka T, Aikawa H, Narumi T, Tamamura H. Bivalent Ligands for the Chemokine Receptor CXCR4 Dimer and Their Function. 32nd European Peptide Symposium 2012, Athens, Greek, Sep2-7, 2012.
 - 3) Nomura W, Tamamura H. Recognition Probes Specific to Target Proteins. The 14th Akabori Conference: Japanese-German Symposium on Peptide Science. Niseko, Hokkaido, Japan, Sep12-13, 2012.
 - 4) Nomura W, Masuda A, Kondo A, Ohba K, Yamamoto N, Tamamura H. Studies of Designer Zinc Finger Enzymes and

様式 A (8)

別紙 3

- Applications for Genome Editing and Modification. The 26th Annual Symposium of the Protein Society. San Diego, USA, Aug 5-8, 2012.
- 5) Nomura W, Kondo A, Masuda A, Ryo A, Tamamura H. Development of zinc finger nucleases targeting Epstein-Barr virus genome for suppression of viral production in B cells. FASEB SRC, Genome Engineering: Research & Applications. Lucca, Italy, Sep 2-7, 2012.
 - 6) Narumi T, Seike S, Aikawa H, Tamamura H. Stereoselective Formation of Trisubstituted (Z)-Chloroalkenes Flanking two Stereogenic Centers by Organocopper-Mediated Reduction/Alkylation of Allylic gem-Dichlorides. 244th American Chemical Society National Meeting & Exposition Fall 2012, Philadelphia, USA, Aug19-23, 2012.
 - 7) Hashimoto C, Nomura W, Komano JA, Tamamura H. An Artificial gp41-C34 Trimer Mimetic Targeting the Membrane Fusion Mechanism of HIV-1. The 13th Kumamoto AIDS Seminar・GCOE Joint International Symposium. Kumamoto, Japan, Oct 24-26, 2012.
 - 8) Aikawa H, Matsumoto D, Nozue A, Urano E, Metifiot M, Maddai K, Nomura W, Narumi T, Komano JA, Murakami T, Pommier Y, Yamamoto N, Tamamura H. Structure-activity Relationship Studies of Peptidic HIV Integrase Inhibitors. The 13th Kumamoto AIDS Seminar・GCOE Joint International Symposium. Kumamoto, Japan, Oct 24-26, 2012.
 - 9) Nomura W, Masuda A, Tamamura H. Development of Zinc Finger Enzymes for Genome Engineering. The First International Symposium on Biofunctional Chemistry. Tokyo, Japan, Nov 28-30, 2012.
 - 10) 鳴海哲夫, 相川春夫, 玉村啓和. 高活性イミダゾールカルベンの創製研究: 窒素原子上の置換基と触媒活性の相関. 日本化学会第 92 春季年会. 横浜, 2012 年 3 月 25-28 日.
 - 11) 紺野 誠, 野村 渉, 鳴海哲夫, 相川春夫, 田中智博, 橋本知恵, 大橋南美, 尾崎太郎, 相馬 晃, 糸谷恭子, 村上 努, 山本直樹, 玉村啓和. ジピコリルアミンおよびアザマクロサイクル環を有する二核金属錯体型 CXCR4 アンタゴニストの構造活性相関研究. 日本化学会第 92 春季年会. 横浜, 2012 年 3 月 25-28 日.
 - 12) 相川春夫, 野村 渉, 鳴海哲夫, 田中智博, 玉村啓和. 長さの調節が可能な二価結合型 CXCR4 リガンドの創製・蛍光ラベル化と応用. 日本化学会第 92 春季年会. 横浜, 2012 年 3 月 25-28 日.
 - 13) 橋本知恵, 野村 渉, 鳴海哲夫, 相川春夫, 山本直樹, 玉村啓和. 宿主タンパク質を基にしたエイズワクチン候補の探索. 日本薬学会第 132 年会. 札幌, 2012 年 3 月 28-31 日.
 - 14) 野村 渉, 湊 夏来, 奥田善章, 大橋南美, 鳴海哲夫, 相川春夫, 玉村啓和. 蛍光性 DAG lactone 誘導体の合成と PKC リガンドの新規スクリーニング法の開発. 日本薬学会第 132 年会. 札幌, 2012 年 3 月 28-31 日.
 - 15) 野村 渉, 近藤麻美, 卜部亜里沙, 大庭賢二, 増田朱美, 山本直樹, 梁 明秀, 玉村啓和. ウイルスゲノムを標的としたジンクフィンガーヌクレアーゼの構築戦略. 日本薬学会第 132 年会. 札幌, 2012 年 3 月 28-31 日.
 - 16) 山本 純, 田中智博, 傳田将也, 戎野紘司, 野村 渉, 重永 章, 玉村啓和, 大高 章. フッ化物イオン応答型アミノ酸の開発と標的タンパク質精製ツールへの応用. 日本薬学会第 132 年会. 札幌, 2012 年 3 月 28-31 日.
 - 17) 野村 渉, 森 あつみ, 大橋南美, 相川春夫, 鳴海哲夫, 玉村啓和. プローブ導入型タグ付加標的タンパク質融合体による細胞内動態解析方法の開発. 日本ケミカルバイオロジー学会 第 7 回年会. 京都, 2012 年 6 月 7-9 日.
 - 18) 野村 渉, 増田朱美, 卜部亜里沙, 玉村啓和. ジンクフィンガー融合型酵素によるゲノム編集法の開発. 日本ケミカルバイオロジー学会 第 7 回年会. 京都, 2012 年 6 月 7-9 日.
 - 19) 橋本知恵, 野村 渉, 鈴木貴晴, 大矢亜紀, 浦野恵美子, 鳴海哲夫, 相川春夫, 駒野 淳, 山本直樹, 玉村啓和. HIV 侵入阻害剤としての外被タンパク質 gp41-C34 3 量体. 日本ケミカルバイオロジー学会 第 7 回年会. 京都, 2012 年 6 月 7-9 日.
 - 20) 鳴海哲夫. 高活性イミダゾールカルベンの創製研究: 窒素原子上の置換基と触媒活性の相関. 第一回全体班会議「有機分子触媒による未来型分子変換」. 京都, 2012 年 6 月 8-9 日.
 - 21) 鳴海哲夫, 相川春夫, 玉村啓和. 高活性イミダゾールカルベンの創製を目指した構造活性相関研究. 第 56 回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2012 年 10 月 13 日.
 - 22) 相川春夫, 野村 渉, 玉村啓和. 近赤外蛍光色素でラベル化した二価結合型 CXCR4 アンタゴニストの創製. 第 56 回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2012 年 10 月 13 日.
 - 23) 湊 夏来, 野村 渉, 相川春夫, 玉村啓和. PKC リガンドの探索を目的とした蛍光性 DAG ラクトンの創製. 第 56 回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2012 年 10 月 13 日.
 - 24) 紺野 誠, 鳴海哲夫, 野村 渉, 玉村啓和. 二核亜鉛錯体型 CXCR4 アンタゴニストの創製. 第 56 回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2012 年 10 月 13 日.

- 25) 鈴木貴晴, 橋本知恵, 野村 渉, 玉村啓和. HIV-gp41 のヘリックスバンドル形成を基にした膜融合阻害作用ペプチドの開発. 第56回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2012年10月13日.
- 26) 鳴海哲夫, 相川春夫, 玉村啓和. アゾリウム塩によるインドール類の Friedel-Crafts 型共役付加反応. 第5回有機触媒シンポジウム. 東京, 2012年10月26-27日.
- 27) 野村 渉, 大橋南美, 玉村啓和. ターゲットタンパク質特異的プローブの合成と応用. 第38回反応と合成の進歩シンポジウム. 東京, 2012年11月5-6日.
- 28) 鳴海哲夫, 相川春夫, 玉村啓和. アゾリウム塩を酸触媒とするインドール類の Friedel-Crafts 型共役付加反応の開発. 第38回反応と合成の進歩シンポジウム. 東京, 2012年11月5-6日.
- 29) 小早川拓也, 鳴海哲夫, 相川春夫, 玉村啓和. 有機銅試薬によるアリル位アルキル化反応を基軸とする Z 型クロロアルケン骨格の立体選択的合成法の開発. 第38回反応と合成の進歩シンポジウム. 東京, 2012年11月5-6日.
- 30) 湊 夏来, 野村 渉, 相川春夫, 玉村啓和. 蛍光性 PKC リガンドの合成と新規スクリーニング法の開発. 第38回反応と合成の進歩シンポジウム. 東京, 2012年11月5-6日.
- 31) 橋本知恵, 野村 渉, 駒野 淳, 玉村啓和. HIV-1 膜融合阻害剤としての gp41-C34 三量体ミミックの合成. 第49回ペプチド討論会. 鹿児島, 2012年11月7-9日.
- 32) 増田朱美, 野村 渉, 玉村啓和. 設計型 DNA 組換え酵素の配列特異的反応に関する定量的解析. 第49回ペプチド討論会. 鹿児島, 2012年11月7-9日.
- 33) 野村 渉, 鳴海哲夫, 相川春夫, 玉村啓和. 細胞内でのタンパク質動態イメージングのための細胞膜透過型 ZIP タグプローブシステムの創製. 第49回ペプチド討論会. 鹿児島, 2012年11月7-9日.
- 34) 大附寛幸, 一瀬裕太郎, 小林 剛, 原田恵嘉, 吉村和久, 鳴海哲夫, 玉村啓和, 松下修三, 五十嵐樹彦, 三浦智行. 中和感受性を増強する薬剤による抗 HIV-1 治療戦略に向けた新規 SHIV/アカゲザル評価モデルの開発. 第60回日本ウイルス学会学術集会. 大阪, 2012年11月13-15日.
- 35) 村上 努, 高野 皓, 藤野真之, 鳴海哲夫, 相川春夫, 橋本知恵, 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13-15日.
- 36) 廣田雄樹, 鳴海哲夫, 橋本知恵, 吉村和久, 原田恵嘉, 大附寛幸, 三浦智行, 五十嵐樹彦, 相川春夫, 野村 渉, 松下修三, 玉村啓和. HIV 外被タンパク質 gp120 を標的とするインドール型低分子 CD4 ミミックの創製研究. 第26回日本エイズ学会学術集会・総会. 東京, 2012年11月24-26日.
- 37) 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. 東京, 2012年11月24-26日.
- 38) 高野 皓, 鳴海哲夫, 相川春夫, 橋本知恵, 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. 東京, 2012年11月24-26日.
- 39) 原田恵嘉, 鳴海哲夫, 玉村啓和, 松下修三, 吉村和久. R5 臨床分離株を用いた CD4 類似低分子化合物誘導体に対する *in vitro* 耐性ウイルス誘導. 第26回日本エイズ学会学術集会・総会. 東京, 2012年11月24-26日.
- 40) 鳴海哲夫, 廣田雄樹, 吉村和久, 原田恵嘉, 橋本知恵, 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30回メディスナルケミストリーシンポジウム. 東京, 2012年11月28-30日.
- 41) 松本大地, 相川春夫, 浦野恵美子, 駒野 淳, 村上 努, 野村 渉, 山本直樹, 玉村啓和. インテグラーゼ阻害活性を有するステイブルペプチドの構造活性相関研究. 第30回メディスナルケミストリーシンポジウム. 東京, 2012年11月28-30日.
- 42) 小関泰輔, 相川春夫, 野村 渉, 玉村啓和. CXCR4 の多量化状態の解析を目指した多価結合型リガンドの創製研究. 第30回メディスナルケミストリーシンポジウム. 東京, 2012年11月28-30日.
- 43) 高野 皓, 鳴海哲夫, 相川春夫, 野村 渉, 玉村啓和. 水性環境下で効率的に反応する 8-アザクマリニルメチル型光分解性保護基の開発. 日本薬学会第133年会. 横浜, 2013年3月27-30日.
- 44) 大橋南美, 野村 渉, 湊夏来, 玉村啓和. 蛍光性 PKC リガンドの合成と C1b ドメインへの蛍光基導入研究. 日本薬学会第133年会. 横浜, 2013年3月27-30日.
- 45) 小関泰輔, 相川春夫, 野村 渉, 玉村啓和. CXCR4 の多量化状態の解析を目指した多価結合型リガンドの創製研究. 日本薬学会第133年会. 横浜, 2013年3月27-30日.
- 46) 相川春夫, 野村 渉, 玉村啓和. 二価結合型 CXCR4 リガンドにおける近赤外蛍光色素導入位置の検討. 日本薬学会第133年会. 横浜, 2013年3月27-30日.

様式 A (8)

別紙 3

- 47) 小早川拓也, 鳴海哲夫, 相川春夫, 玉村啓和.
E 型クロロアルケン骨格の立体選択的合成法の開発. 日本薬学会第 133 年会. 横浜, 2013 年 3 月 27-30 日.
- 48) 鳴海哲夫, 相川春夫, 玉村啓和. 新規アゾリウム塩によるインドール類の Friedel-Crafts 型共役付加反応. 日本薬学会第 133 年会. 横浜, 2013 年 3 月 27-30 日.
- 49) 廣田雄樹, 鳴海哲夫, 橋本知恵, 吉村和久, 原田恵嘉, 大附寛幸, 三浦智行, 五十嵐樹彦, 相川春夫, 野村 渉, 松下修三, 玉村啓和.
HIV 外被タンパク質 gp120 を標的としたインドール型低分子 CD4 ミミックの創製. 日本薬学会第 133 年会. 横浜, 2013 年 3 月 27-30 日.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

- 1) 出願番号:特願 2011-082813
発明者:玉村啓和、鳴海哲夫、野村渉、橋本知恵、駒野淳、宮内浩典
発明の名称:HIV 立体構造認識抗体誘導ペプチド
出願人:国立大学法人東京医科歯科大学
出願日:平成 23 年 4 月 4 日
以後、
国際公開番号:WO2012/137479(公開日:2012/10/11)
国際出願番号:PCT/JP2012/002312(出願日:2012 年 4 月 3 日)
- 2) 出願番号:特願 2009-120352
発明者:玉村啓和、中原徹、野村渉
発明の名称: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
出願人:国立大学法人東京医科歯科大学
出願日:平成 21 年 5 月 18 日
以後、
PCT 出願番号:PCT/JP2010/003280(出願日:2010/05/14)
国際公開番号 WO2010/134305A1(公開日:2010 年 11 月 25 日)
国内出願番号:特願 2011-514322(移行日:2011/11/04)
EP 出願番号:10777543.9(移行日:2011 年 11 月 11 日)
EP 公開番号:EP2444414(公開日:2012 年 4 月 25 日)
米国出願番号:13/319,813
米国公開番号:US20120052090(公開日:2012 年 3 月 1 日)

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

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

1. 抗Env V3単クローン抗体KD-247に抵抗性かつNBD誘導体YYA-021と相互作用するHIV-1 MNA株のEnvを持つSHIV MNAがサル個体で複製能を有することを明らかにした。
2. 個体レベルのPOC試験に供するNBD誘導体の新たな候補としてMTA1-03を選抜した。
3. 皮下経路はYYA-021を安全かつ大量に投与する代替経路としては不適當であることを明らかにした。
4. SHIV KS661攻撃接種後のKD-247およびYYA-021投与は血中ウイルス量を対照群と比較して有意に抑制することを明らかにした。

A. 研究目的

HIV 感染症は多剤併用療法の確立により不治の病から制御可能な慢性感染症になった。しかし、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を組み合わせた「機能的治癒」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。

昨年度までに本研究計画の作業仮説を動物モデル系により検証するため、以下の取り組みを行ってきた、

1. SHIV KS661 (単クローン抗体KD-247 に感受性) が YYA-021 存在下で中和感受性が上昇することを明らかにし、本ウイルスを第一段階 Proof of concept (POC) 試験に用いることを決定した。
2. 第1段階 POC 試験における YYA-021 の最大投与可能量を静脈内投与では 6.25 mg/kg と決定した。
3. 第2段階の POC 試験に用いるウイルスとして、中和抗体非感受性であるが、NBD 誘導体の一種 YYA-021 の存在下で中和感受性が顕著に上昇する HIV-1 MNA 株の env 遺伝子を持つ SHIV MNA 株を細胞内相同組換え機構を利用して作製し、本ウイルスが試験管内において SIV239

株と同様に効率よくアカゲザル末梢血単核細胞で複製することを明らかにした。

昨年度得られた成績から、

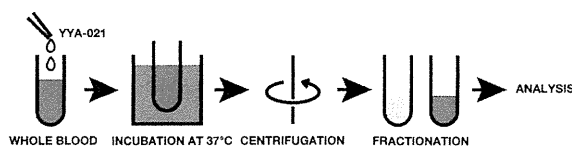
1. YYA-021 が血中で検出できない理由として、尿中への速やかな排泄、または細胞膜への速やかな吸着/細胞内への取り込みにより見かけ上化合物が検出されない可能性が考えられる
2. 静脈内接種による最大接種許容量の YYA-021 では血中濃度が測定できないが、これを上回る量を静脈内投与すると、急性の心臓毒性を疑わせる所見が出現する。そこでより多量の化合物を安全に投与する代替投与経路の探索が必要である
3. もし YYA-021 を用いた POC 試験が毒性の点から不可能な場合、代替の化合物を選抜する必要がある
4. これらの可能性を検討した後、速やかに第 1 段階 POC 試験を実施する必要がある
5. 第 2 段階 POC 試験に備えて SHIV MNA のサル感染性を検索する必要がある

といった課題が明らかになった。そこで、本年度はこれらの課題について検討を行った。

B. 研究方法

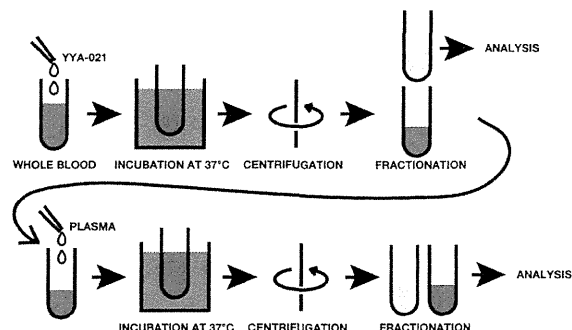
1. YYA-021 の尿中への速やかな排泄の可能性を検討するため、正常サルに麻醉下で許容量 (2.5 mg/kg) の化合物を静脈内投与し、投与中 (投与開始 10 分後)、投与終了時および投与終了 30 分後に採尿し、遠沈後凍結し、玉村博士に分析を依頼した。

YYA-021 の細胞膜への吸着を検討するため、以下の実験を行った (図参照)。正常アカゲザルの EDTA 添加血液に YYA-021 を加え、37°C で 0, 30, 60 分間温浴後血漿および血球に遠心分離し、各画分を凍結し玉村博士に分析を依頼した (下図参照)。

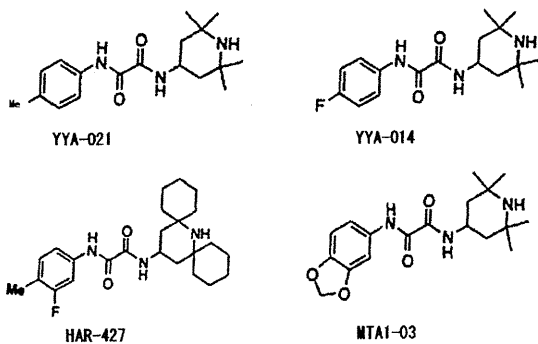


また、YYA-021 の細胞内への取り込みを検

討するため、上記の操作後、血球に正常サル血漿を加え 37°C で 0, 30, 60 分間温浴後血漿および血球に遠心分離し、各画分を凍結し玉村博士に分析を依頼した (下図参照)。



2. 静脈内接種に比較して化合物血中濃度が緩徐に上昇することが期待される皮下投与の可能性を検討した。昨年度静脈内投与に用いた YYA-021 は水溶性を付与するために塩酸塩であったが、非塩酸塩を有機溶媒に溶解し、高濃度の溶液を投与する事とした。溶媒としてヒマシ油 (80) : ベンジルアルコール (8) : エタノール (12) 混合液を用い、YYA-021 を溶解した。この溶液を 11.23 mg/kg (12.5 mg/kg YYA-021 塩酸塩相当量) を麻醉下で正常アカゲザルの皮下 4 か所 (左右上腕および大腿) に投与し、15, 30, 60, 120 および 180 分後に採血を行った。血液は遠心分離後血漿を採取、凍結した。投与 15, 30 および 60 分後に採尿も行い試料を凍結した。血漿および尿試料は本研究計画分担研究者玉村啓和博士に分析を依頼した。
3. YYA-021 の代替化合物候補として YYA-014, HAR-427 および MTA1-03 (図参照) の SHIV KS661 複製抑制活性を検討した。YYA-021 および上記 3 化合物 6.25, 12.5, 25, 50, 100 および 200 μM 存在下における TZM-b1 細胞の細胞生存率および同細胞への SHIV KS661 の感染性を検討した。また、これら化合物 5 および 10 μM 存在下における SHIV KS661 の KD-247 感受性を TZM-b1 を指標細胞にして検索した。



4. 1×10^4 TCID₅₀ の SHIV KS661 を 6 頭のアカゲザルに静脈内接種し 24 時間、8 日および 15 日後に 16 mg/kg の KD247 および 6.25 mg/kg の YYA-021 を静脈内投与し、血漿中ウイルス RNA 量および末梢血 CD4 陽性 T 細胞サブセット数の推移を非投与群サル 4 頭のそれらパラメータと比較した。
5. 1.75×10^6 TCID₅₀ の SHIV MNA を 1 頭のアカゲザルに静脈内接種し、血漿中ウイルス RNA 量および末梢血 CD4 陽性 T 細胞サブセット数を 10 週間にわたり追跡した。また、抗体応答を精製 HIV-1 Env を抗原としたウェスタンブロッティング法及び SHIV MNA を用いた中和試験により検索した。

(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

1-1. YYA-021 の尿中への排泄

玉村博士の分析から、採取した尿試料のいずれ

も検出可能量の YYA-021 を含まないことが明らかとなった。

1-2. 試験管内での全血への YYA-021 添加およびその後の分画実験から、YYA-021 は経過時間に伴い血漿画分から血球画分に移行することが示された。

画分	ふ置時間 (分)		
	0	30	60
血漿	0.680	0.576	0.527
細胞	0.435	0.452	0.535
計	1.115	1.028	1.062

単位 mg/ml

分画した血球に新鮮血漿を加えてふ置後、再度分画すると血漿中に YYA-021 が溶出することが明らかとなった。

2. YYA-021 皮下投与による薬物動態および生体反応

塩酸塩 YYA-021 12.5 mg/kg 相当量の非塩酸塩 YYA-021 皮下投与により、投与 1 時間後より瞳孔散大、顔面蒼白、姿勢維持困難、麻酔からの覚醒の遅延および体温の低下といった同量の化合物静脈内投与時と同様の症状が観察されたが、蘇生を必要とするような状態には至らなかった。一方で、心拍数は投与開始前から投与後まで、80 bpm で安定した。投与 48 時間後に投与箇所 (4 か所) を観察したところ、無反応から発赤、皮下に膨潤感を伴った出血斑、直下の筋肉の硬直を伴う出血斑の形成といった個所ごとに異なる反応が見られた。投与当日にはこれら反応は観察されなかった。

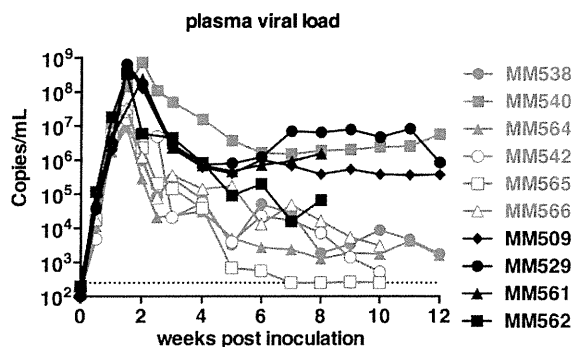
3. YYA-021 代替化合物の探索

YYA-014, HAR-427 および MTA1-03 の細胞毒性を TZM-bl 細胞を指標に YYA-021 と比較したところ、HAR-427 はより毒性が高く、YYA-014 および MTA1-03 はより毒性が低く両者はほぼ同様であった。また、いずれの化合物もそれ自体では SHIV KS661 に対する複製抑制効果は見られなかった。これら化合物 5 および 10 μM 存在下に KD-247 を加えると SHIV KS661 の中和感受性はいずれも上昇した。増強効果は HAR-427 で最も大きく、次いで YYA-021, YYA-014/MTA1-03 の順であった。

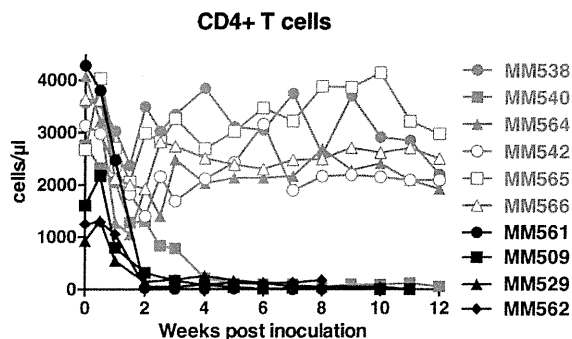
4. 第 1 段階 POC 試験

1×10^4 TCID₅₀ の SHIV KS661 静脈内接種 24 時間、8 日および 15 日後に 6 頭のサルに対して 16

mg/kg の KD-247 および 6.25 mg/kg の YYA-021 を静脈内投与したところ、MM540 を除く 5 頭の血漿中ウイルス RNA 量が非投与対照群と比較して接種 10 日後以降統計的に有意な差を以て抑制された。MM540 の血漿中ウイルス RNA 量は非投与対照群と同等であった (図参照)。

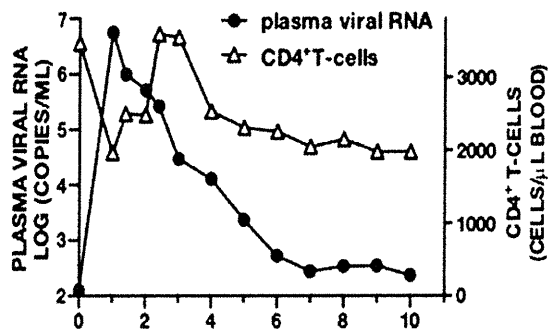


末梢血 CD4 T 細胞サブセットは MM540 を除く 5 頭の「治療群」において攻撃接種 4 週以降 2000 細胞/ μ l 血液を維持したが、治療個体 MM540 および非投与対照群では急激かつ非可逆的な減少を呈し、攻撃接種 4 週以降枯渇状態になった (図参照)。



5. SHIV MNA のサルにおける複製能

SHIV MNA は接種 1 週後には 1×10^7 コピー/ml の血漿中 RNA 量を達成して複製したが、その後、ウイルス RNA は減少を続け接種 7 週後以降 10^2 コピー/ml 台で安定した。末梢血 CD4T 細胞数も接種直後に一過性の減少、続いて一過性の増加がみられたが、その後接種前の 60%程度のレベルで安定化した。観察期間中接種サルはレンチウイルス感染によると考えられる臨床的な異常を示さなかった (図参照)。



SHIV MNA 感染サルはウェスタンブロッティングで検索すると低力価の抗 Env 抗体応答が観察されたが、本ウイルスを中和する抗体は観察期間中には誘導されなかった。しかし、観察期間最後 (24 週後) の血漿から調製した IgG に YYA-021 を加えることで、ウイルス中和活性が観察された。

D. 考察

1. YYA-021 の体内動態

本化合物はサルに静脈内投与した直後から血中濃度が測定限界以下であったが、体外に (尿中に) 排泄されることはなかったため、何らかの形で体内とどまっていると考えられる。試験管内の血液への添加実験から、速やかに液性成分と細胞成分の間で平衡に達することが示されたことから、体内でも血球や血管内皮細胞等に浸透し、体液との間で平衡化することが予想される。化合物が実際に体内にどれくらい存在するか知ることができない問題があるものの、細胞に浸透する事で比較的長期間体内にとどまることが予想される。この性質は薬剤として考えた場合、安全な濃度の範囲内であればむしろ望ましいともいえる。

2. YYA-021 皮内投与の有効性

本年度の検討から皮下投与により心臓毒性を回避できる可能性が示唆されたものの、一般状態の悪化は再現され、更に投与箇所副反応が見られたことから、皮下投与は代替経路として不適当と考えられた。

3. YYA-021 の代替化合物の探索

SHIV KS661 において KD-247 による中和増強効果が YYA-021 より大きかった HAR-427 は細胞毒性も強かったことから、代替化合物としては不適当

と考えられた。YYA-014 および MTA1-03 は YYA-021 より細胞毒性が低かったものの、同時に中和増強効果も低かった。YYA-021 は試験管内では予想できない副反応をサルにおいて示したことから、YYA-021 とは分子構造の類似性が比較的低い MTA1-03 を代替化合物候補として選抜した。この化合物に関してもサルを用いて少量からの薬物動態および急性毒性の検討を行い、性状が好ましい（長い血中半減期および低毒性）ものであれば、POC 試験へ応用したい。

4. 第1段階 POC 試験

本実験において予想される最善の結果は感染成立の阻止であったが、今回採用したレジメンではそれは達成できなかった。しかし、投与群では6頭中5頭で血中ウイルス RNA 量を優位に抑制し、それに伴って末梢血 CD4T 細胞の減少を抑制したこと、さらに、投与を終了した攻撃接種15日後以降もウイルス RNA 量の抑制および CD4T 細胞数が維持されたことは特筆すべき成果といえる。CXCR4 を共受容体として用いるいわゆる X4-SHIV にあっては急性期のウイルス複製をある程度抑制する事でその後のウイルス複製を効率的に制御できることがすでに知られており、本実験の成果もその一例といえるが、第1段階 POC 試験としてはよい結果といえる。本実験では NBD 誘導体を加えたことが得られたウイルス複製抑制に貢献しているか判定ができないため、今後は KD-247 単独投与群においてウイルス RNA 量を比較する必要がある。また、1頭だけではあるが、ウイルス複製抑制が全く見られない個体があったことはこのアイデアを推し進めるうえで caveat である。この個体で中和回避突然変異体が急性期に出現した、ヒト抗体である KD-247 を「中和」してしまう抗ヒト IgG 抗体が急性期に誘導された可能性が考えられるため、現在それらについて検討を進めている。

6. SHIV MNA の感染性

本ウイルスは急性感染期に高力価で複製したものの、その後速やかに血漿中ウイルス量は減少したことから、個体での複製のは未だ至適化されていないと考えられる。ただし、接種7週以降も低値ながらウイルス血漿が持続したことから、動物継代などを行うことでより複製能の高いウイルス

変異体を誘導できる可能性がある。一方、急性期のウイルス複製はそれなりに強力であることから、急性期に標的を絞った形で NBD 誘導体による抗体中和増強の効果を評価が可能と考えられる。

E. 結論

中和抗体と CD4 ミミックの投与により、霊長類レンチウイルスの個体レベルでの複製を効果的に抑制することを明らかにした。今後は実際に適用が想定される持続感染期でこのアイデアの有効性を検証する。

F. 研究発表

(論文発表)

1. Iwami, S., Holder, B.P., Beauchemin, C.A., Morita, S., Tada, T., Sato, K., Igarashi, T., and Miura, T. Quantification system for the viral dynamics of a highly pathogenic simian/human immunodeficiency virus based on an in vitro experiment and a mathematical model. *Retrovirology* 9:18, 2012.
2. Morita, D., Yamamoto, Y., Suzuki, J., Mori, N., Igarashi, T., and Sugita, M. Molecular requirements for T cell recognition of N-myristoylated peptides derived from the simian immunodeficiency virus Nef protein. *J. Virol.* 87:482-8, 2013.
3. Fujita, Y., Otsuki, H., Watanabe, Y., Yasui, M., Kobayashi, T., Miura, T., and Igarashi, T. Generation of a replication-competent chimeric simian-human immunodeficiency virus carrying *env* from subtype C clinical isolate through intracellular homologous recombination. *Virology* 436:100-111, 2013.
4. Takahashi, N., Nomura, T., Takahara, Y., Yamamoto, H., Shiino, T., Takeda, A., Inoue, M., Iida, A., Hara, H., Shu, T., Hasegawa, M., Sakawaki, H., Miura, T., Igarashi, T., Koyanagi, Y., Naruse, T.K., Kimura, A., and Matano, T. A novel protective MHC-I haplotype not associated with dominant Gag-specific CD8⁺ T-cell responses in SIVmac239 infection of Burmese rhesus macaques. *PLoS ONE* 8:e54300, 2013.
5. Oue, M., Sakabe, S., Horiike, M., Yasui, M., Miura, T., and Igarashi, T. No viral evolution in the lymph nodes of SIV-infected rhesus macaques during

combined antiretroviral therapy. J. Virol.
87:4749-4793,2013.

(学会発表)

1. 五十嵐樹彦：抗 HIV 多剤併用療法に抵抗するウイルスリザーバーの探索（動物モデルからのアプローチ） 第 27 回中国四国ウイルス研究会、米子、2012 年 6 月 23-24 日
 2. 五十嵐樹彦：サルから学ぶエイズ 東京大学医科学研究所公開セミナー「ラブラボ」、東京、2012 年 8 月 20 日
 3. Hiroyuki Otsuki, Takeshi Kobayashi, Tatsuhiko Igarashi, Tomoyuki Miura: Generation of monkey-tropic human immunodeficiency virus strains carrying a variety of CCR5-utilizing env genes from HIV-1 subtype C clinical isolates through intracellular homologous recombination 19th East Asia Joint Symposium on Biomedical Research, Seoul, Korea, 2012.8.22-25
 4. 三浦智行、大附寛幸、米田舞、一瀬裕太郎、小林剛、五十嵐樹彦：霊長類エイズモデル感染病態に関わるウイルスゲノム基盤に関する研究 第 154 回日本獣医学会、岩手、2012 年 9 月 14-16 日
 5. 岩見真吾、de Boer Rob、五十嵐樹彦、三浦智行：培養細胞実験と数理モデルによるウイルス感染動態の定量化—ウイルス病原性の解明への応用— 第 60 回日本ウイルス学会、大阪、2012 年 11 月 13-15 日
 6. 大附寛幸、一瀬裕太郎、小林剛、原田恵嘉、吉村和久、鳴海哲夫、玉村啓和、松下修三、五十嵐樹彦、三浦智行：中和感受性を増強する薬剤による抗 HIV-1 治療戦略に向けた新規 SHIV/アカゲザル評価モデルの開発 第 60 回日本ウイルス学会、大阪、2012 年 11 月 13-15 日
 7. 米田舞、一瀬裕太郎、大附寛幸、松田健太、松下修三、五十嵐樹彦、三浦智行：サルに順化した CCR5 指向性 SHIV-MK38 の中和抗体に対する抵抗性 第 60 回日本ウイルス学会、大阪、2012 年 11 月 13-15 日
 8. 渡部 祐司、岩見 真吾、西山 由利子、森 ひろみ、三浦 智行、五十嵐 樹彦：高病原性 SHIV 感染サルにおける感染マクロファージの半減期の推定 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
 9. 岩見真吾、Rob de Boer、三浦智行、西村佳哲、五十嵐樹彦：SHIV 感染アカゲザルにおいて病原性を決定づけるウイルス感染動態の探索—数理モデルによるデータ解析の視点から— 第 26 回日本エイズ学会、神奈川、2012 年 11 月 24-26 日
 10. 大附寛幸、一瀬裕太郎、小林剛、五十嵐樹彦、三浦智行：細胞内相同組換えを利用した CCR5 指向性サブタイプ C HIV-1 由来 env を持つサル指向性 HIV-1 の作出 第 26 回日本エイズ学会、神奈川、2012 年 11 月 24-26 日
 11. 中村碧、高原悠佑、松岡佐織、阪脇廣美、三浦智行、五十嵐樹彦、小柳義夫、成瀬妙子、木村彰方、俣野哲朗：サルエイズモデルにおける抗 HIV 薬投与下の CTL 誘導治療ワクチン接種効果の解析 第 26 回日本エイズ学会、神奈川、2012 年 11 月 24-26 日
 12. 廣田雄樹、鳴海哲夫、橋本知恵、吉村和久、原田恵嘉、大附寛幸、三浦智行、五十嵐樹彦、相川春夫、野村渉、松下修三、玉村啓和：HIV 外被タンパク質 gp120 を標的とするインドール型低分子 CD4 ミミックの創製研究 第 26 回日本エイズ学会、神奈川、2012 年 11 月 24-26 日
 13. 五十嵐樹彦：抗 HIV 多剤併用療法に抵抗するウイルスリザーバーの探索—動物モデルからのアプローチ— 第 8 回霊長類医科学フォーラム、筑波、2012 年 11 月 29 日
 14. 米田舞、大附寛幸、一瀬裕太郎、松田健太、松下修三、五十嵐樹彦、三浦智行：新規 CCR5 指向性 SHIV のサルへの順化と中和抵抗性の解析 第 155 回日本獣医学会、東京、2013 年 3 月 28-30 日
- 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

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

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・国立感染症研究所エイズ研究センター第一室・室長

研究要旨：

昨年度に引き続き、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。本年度は、NBD誘導体の芳香環部位とオキサミド部位をインドール骨格に置換することで平面構造を付与しつつ、分子全体としてのエントロピーの減少を目指したインドール骨格含有化合物群を中心に約40種類の化合物に対してウイルス学的解析を行った。インドール骨格含有化合物群の中で弱いながらも抗HIV活性を示す化合物はいずれも5

位に塩素、臭素、またはフッ素原子を有するものであり、昨年度までに得られた芳香環部位誘導体の構造活性相関と一致した。他方、昨年度の*in vitro*耐性誘導実験を発展させ、新たに構築したクローンウイルスを用いて*in vitro*耐性誘導を行い、*de novo*変異をはじめとする耐性変異機序の更なる検討を行った。昨年度のバルクウイルス同様に(i) V255M変異、(ii) T375I変異、または(iii) M426I変異、の3通りに大別され、これらの変異が*de novo*変異として獲得されることが明らかになった。これらの知見をもとに、芳香環部位のパラ・メタ位（5・6位）およびgp120のV255, T375およびM426残基が、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。

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。本年度はそれに加えて、クローンウイルスを用いた候補化合物に対する*in vitro*耐性誘導を行い、結合部位および耐性獲得機序に関して更なる検討をした。

B. 研究方法

昨年度に引き続き、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（Env）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、新たに

構築したクローンウイルスを用いて *in vitro* 耐性誘導を行い、誘導された NBD 耐性ウイルスの Env gp120 領域のシーケンスを行い、化合物の構造と結合部位および耐性獲得機序に関して更なる検討を行った。

（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

本年度は、NBD誘導体の芳香環部位とオキサミド部位をインドール骨格に置換することで平面構造を付与しつつ、分子全体としてのエントロピーの減少を目指したインドール骨格含有化合物群を中心に約40種類の化合物を東京医科

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。インドール骨格含有化合物群の中で弱いながらも抗HIV活性を示す化合物はいずれも5位に塩素、臭素、またはフッ素原子を有するものであり、昨年度までに得られた芳香環部位誘導体の構造活性相関と一致したが、殆どのインドール骨格を含む誘導体群では顕著な抗HIV活性およびgp120構造変化誘起能を示さなかった。

他方、昨年度行った臨床分離R5ウイルス株 (Y1) を用いたin vitro耐性誘導実験により、NBD誘導体の耐性獲得機序には、(i)V255M変異、(ii)T375I変異、または (iii)M426I変異、の3通りに大別されることが明らかになった。

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NBD誘導体から、NBD-556以外に立体構造変化を惹起する7個の誘導体を選んで、新たにin vitro耐性誘導実験を行った。前回はバルクの臨床分離R5ウイルス株 (Y1) を用いて実験を行ったが、今回は、de novo変異をはじめとする耐性変異機序の更なる検討を目的に、昨年度用いた臨床分離R5ウイルス株 (Y1) の全env領域をNL4-3 backboneに組換えたクローンウイルス (Y1c) を用いて行った。

すべての化合物を5回パッセージし、最終濃度が20-100 μ M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、昨年度のバルクウイルス同様にすべての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のシークエンスを比較したところ、de novo変異として獲得される主要変異が、(i)V255M変異、(ii)T375I変異、または (iii)M426I変異、の3通りに大別されることが明らかになった。

D. 考察

今回合成したインドール骨格含有化

合物群の中で、弱いながらも抗HIV活性を示す化合物はいずれも5位に塩素、臭素、またはフッ素原子を有するものであり、昨年度までに得られた芳香環部位誘導体の構造活性相関と一致した。

他方、クローンウイルスを用いたin vitro耐性誘導実験により、de novo変異として獲得される主要変異が、(i)V255M変異、(ii)T375I変異、または (iii)M426I変異、の3通りに大別されることが明らかになった。

これらの結果から、芳香環部位のパラ・メタ位 (5・6位) およびgp120のV255, T375, およびM426残基が、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

昨年度から引き続き、NBD-556様の中和抗体増強物質の新規化合物を開発し、in vitro耐性誘導によって、それらの結合様式および耐性機序を推定し、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) 原著論文による発表

- ①. Harada S, Yoshimura K*, Yamaguchi A, Boonchawalit S, Yusa K, and Matsushita S. Impact of antiretroviral pressure on selection of primary HIV-1 envelope sequences in vitro. J Gen Virol, 94: 933-943, 2013.
- ②. Ong YT, Kirby KA, Hachiya A, Chiang LA, Marchand B, Yoshimura K, Murakami T, Singh K, Matsushita S, Sarafianos SG. Preparation of biologically active single-chain variable antibody fragments that target the HIV-1 gp120 V3 loop. Cell Mol Biol, 2012, 58:71-9.

- ③. Yokoyama M, Naganawa S, Yoshimura K, Matsushita S, Sato H. Structural Dynamics of HIV-1 Envelope Gp120 Outer Domain with V3 Loop. PLoS One, 2012, 7: e37530.

2) 学会発表

(国際学会)

- ①. Yoshimura K, Harada S, Boonchawalit S, and Matsushita S. Impact of Maraviroc-resistant and low CCR5-adapted mutations induced in vitro passage on sensitivity to anti-Env neutralizing antibodies. 20th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI 2013), Atlanta, U.S.A., 3.3-6, 2013.
- ②. Harada S, Boonchawalit S, Narumi T, Tamamura H, Matsushita S, Yoshimura K. CD4 mimic small compounds, NBD-556 and its analogues bind at three amino acid positions in the gp120 CD4 cavity. 20th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI 2013), Atlanta, U.S.A., 3.3-6, 2013.
- ③. Harada S, Boonchawalit S, Narumi T, Tamamura H, Matsushita S, Yoshimura K. In vitro induction of twelve CD4 mimic small compounds, NBD-556 and its analogues, resistant variants using primary R5 HIV-1. 13th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, Kumamoto, Japan, Oct.24-26, 2012.
- ④. Harada S, Arai H, Narumi T, Tamamura H, Matsushita S, Yoshimura K. In vitro induction of ten CD4 mimic small compounds, NBD-556 and its analogues, resistant variants using primary R5 HIV-1. 19th International AIDS Conference, Washington, D.C., U.S.A., 7.22-28, 2012.

(国内学会)

- ①. 原田 恵嘉、鳴海 哲夫、玉村 啓和、松下 修三、吉村 和久. R5 臨床分離株を用いた CD4 類似低分子化合物誘導体に対する in vitro 耐性ウイルス誘導. 第26回日本エイズ学会学術集会・総会、神奈川、2012年11月24日-11月26日 [O35-165]
- ②. 桑田 岳夫、吉村 和久、松下 修三. SIV 感染サルから分離された中和抗体 B404はV3,V4ループを含むEnv立体構造を認識する. 第26回日本エイズ学会学術集会・総会、神奈川、2012年11月24日-11月26日 [O13-062]
- ③. 廣田 雄樹、鳴海 哲夫、橋本 智恵、吉村 和久、原田 恵嘉、大附 寛幸、三浦 智行、五十嵐 樹彦、相川 春夫、野村 渉、松下 修三、玉村 啓和. HIV外被タンパク質gp120を標的とするインドール型低分子CD4ミミックの創製研究. 第26回日本エイズ学会学術集会・総会、神奈川、2012年11月24日-11月26日 [WS2-007]
- ④. 原田 恵嘉、新井 啓之、鳴海 哲夫、玉村 啓和、松下 修三、吉村 和久. R5 臨床分離株を用いた10種のCD4類似低分子化合物に対するin vitro 耐性ウイルス誘導. 第14回白馬シンポジウム、京都、2012.6.7-8.
- ⑤. 吉村 和久. CCR5阻害剤による耐性変異と中和抗体感受性. 第14回白馬シンポジウム、京都、2012.6.7-8.

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

別紙 4

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

該当なし

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
Yokoyama M, Naganawa S, Yoshimura K, Matsushita S, Sato H.	Structural Dynamics of HIV-1 Envelope Gp120 Outer Domain with V3 Loop.	PLoS ONE	7(5)	e37530.	2012
Ong Y T, Kirby K A, Hachiya A, Chiang L A, Marchand B, Yoshimura K, Murakami T, Singh K, Matsushita S, Sarafianos, S G.	Preparation of biological active single-chain variable antibody fragments that target the HIV-1 gp120 v3 loop.	Cellular and molecular biology	58	71-79	2012
Mind Exchange Working Group (Antinori A, Arendt G, Grant I, Matsushita S, et al.)	A Consensus Report of the Mind Exchange Program.	Clin Infect Dis.	56	1004-1017	2013
Nishijima T, Takano M, Ishisaka M, Komatsu H, Gatanaga H, Kikuchi Y, Endo T, Horiba M, Kaneda S, Uchiumi H, Koibuchi T, Naito T,	Abacavir/Lamivudine versus Tenofovir/Emtricitabine with Atazanavir/Ritonavir for Treatment-naïve Japanese	Internal Medicine	52	735-744	2013
Harada S., Yoshimura K., Yamaguchi A., Yusa K., Matsushita S.	Impact of antiretroviral pressure on selection of primary HIV-1 envelope sequences in vitro.	J. Gen. Virol.	94	933-943	2013
Narumi T, Arai H, Yoshimura K, Harada S, Hirota Y, Ohashi N, Hashimoto C, Nomura W, Matsushita S, Tamamura H.	CD4 mimics as HIV entry inhibitors: lead optimization studies of the aromatic substituents.	Bioorganic & Medicinal Chemistry.	21	2518-2526	2013
Kuwata T., Takaki K., Yoshimura K., Enomoto I., Wu F., Hirsch V.M., Yokoyama M., Sato H., Matsushita S.	Conformational epitope consisting of the V3 and V4 loops is a target for potent and broad neutralization of simian immunodeficiency viruses	J.Virol.	87	5424-5346	2013
Kuwata T, Takaki K, Enomoto I, Kazuhisa Y, and Matsushita S.	Increased infectivity in human cells and resistance to antibody-mediated neutralization by truncation of the SIV gp41 cytoplasmic tail.	Frontiers in Microbiology /Virology	4	article 117(1-9)	2013

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
Nomura W, Tanaka T, Narumi T, Tamamura H, et al.	Development of Designed Bivalent Ligands for CXCR4 and their Function on Receptor Binding	Sakaguchi, K., (Eds.)	<i>Peptide Science 2011</i>	The Japanese Peptide Society	Sapporo	2012	79
Nomura W, Hashimoto C, Tamamura H, et al.	Designed Antigens Based on the Dynamic Structural Changes of GP41 for Development of Effective HIV-1 Vaccines	Sakaguchi, K., (Eds.)	<i>Peptide Science 2011</i>	The Japanese Peptide Society	Sapporo	2012	295
Nomura W, Tsutsumi H, Tamamura H, et al.	Intense Blue Fluorescence of Tag-probe Systems Based on a Leucine Zipper Assembly	Sakaguchi, K., (Eds.)	<i>Peptide Science 2011</i>	The Japanese Peptide Society	Sapporo	2012	317
野村 渉, 田中智博, 相川春夫, 玉村啓和	多価結合型GPCRリガンドの合成とがん細胞イメージングへの応用	木曾良明	最新ペプチド合成技術とその創薬研究への応用	株式会社メディカルドゥ	大阪	2012	267-273
野村 渉, 田中智博, 玉村啓和	HIV阻害剤・腫瘍認識プローブとしてのケモカイン受容体リガンド	木曾良明・向井秀仁(監修)	ペプチド医薬の最前線	株式会社シーエムシー出版	東京	2012	101-107

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, Hashimoto C, Yamamoto N, Tamamura H, et al.	Synthetic C34 Trimer of HIV-1 gp41 Shows Significant Increase of Inhibition Potency	<i>ChemMedChem</i>	7	205-208	2012
Narumi T, Komoriya M, Tamamura H, et al.	Conjugation of Cell-penetrating Peptides Leads to Identification of Anti-HIV Peptides from Matrix Proteins	<i>Bioorg. Med. Chem.</i>	20	1468-1474	2012
Nomura W, Masuda A, Yamamoto N, Tamamura H, et al.	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	<i>Biochemistry</i>	51	1510-1517	2012

Hashimoto C, Nomura W, Yamamoto N, Tamamura H, et al.	Evaluation of a Synthetic C34 Trimer of HIV-1 gp41 as AIDS Vaccines	<i>Bioorg. Med. Chem.</i>	20	3287-3291	2012
Narumi T, Tanaka T, Yamamoto N, Tamamura H, et al.	Pharmacophore-based Small Molecule CXCR4 Ligands	<i>Bioorg. Med. Chem. Lett.</i>	22	4169-4172	2012
Narumi T, Kobayakawa T, Aikawa H, Seike S, and Tamamura H	Stereoselective Formation of Trisubstituted (Z)-Chloroalkenes Adjacent to a Tertiary Carbon Stereogenic Center by Organocuprate-Mediated Reduction/Alkylation	<i>Org. Lett.</i>		in press	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」	薬学雑誌レビュー	132(1)	69-78	2012
Narumi T, Arai H, Yoshimura K, Harada S, Hirota Y, Ohashi N, Hashimoto C, Nomura W, Matsushita S, and Tamamura H	CD4 Mimics as HIV Entry Inhibitors: Lead Optimization Studies of the Aromatic Substituents.	<i>Bioorg. Med. Chem.</i>	in press		

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

該当なし

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
Iwami, S., Holder, B.P., Beauchemin, C.A., Morita, S., Tada, T., Sato, K., <u>Igarashi, T.</u> , and Miura, T.	Quantification system for the viral dynamics of a highly pathogenic simian/human immunodeficiency virus based on an in vitro experiment and a mathematical model	Retrovirology	9	18	2012
Morita, D., Yamamoto, Y., Suzuki, J., Mori, N., <u>Igarashi, T.</u> , and Sugita, M	Molecular requirements for T cell recognition of N-myristoylated peptides derived from the simian immunodeficiency virus Nef protein	J. Virol.	87	482-8	2013
Fujita, Y., Otsuki, H., Watanabe, Y., Yasui, M., Kobayashi, T., Miura, T., and <u>Igarashi, T.</u>	Generation of a replication-competent chimeric simian-human immunodeficiency virus carrying <i>env</i> from subtype C clinical isolate through intracellular homologous recombination	Virology	436	100-111	2013
Takahashi, N., Nomura, T., Takahara, Y., Yamamoto, H., Shiino, T., Takeda, A., Inoue, M., Iida, A., Hara, H., Shu, T., Hasegawa, M., Sakawaki, H., Miura, T., <u>Igarashi, T.</u> , Koyanagi, Y., Naruse, T.K., Kimura, A., and Matano, T.	A novel protective MHC-I haplotype not associated with dominant Gag-specific CD8 ⁺ T-cell responses in SIVmac239 infection of Burmese rhesus macaques	PLoS ONE	8	E54300	2013
Oue, M., Sakabe, S., Horiike, M., Yasui, M., Miura, T., and <u>Igarashi, T.</u>	No viral evolution in the lymph nodes of SIV-infected rhesus macaques during combined antiretroviral therapy	J. Virol	87	4749-4793	2013