

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15951

研究課題名(和文) HIV根治治療に向けたPKC C1aおよびC1bドメイン結合性リガンドの探索研究

研究課題名(英文) Explorational study in development of Protein Kinase C C1 domain-binding ligands for HIV cure

研究代表者

辻 耕平 (TSUJI, KOHEI)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・准教授

研究者番号：50866639

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではヒト免疫不全ウイルス(HIV)根治治療を指向したタンパク質リン酸化酵素C(PKC)C1bドメイン結合性リガンド探索のための活性評価系の確立および新規PKC活性化剤の探索研究を行った。その結果、化学合成により調製した蛍光色素導入型PKC C1bドメインなどを用いる、蛍光共鳴エネルギー移動を基盤とした新規PKC C1bドメイン結合活性評価法の開発に成功した。さらに、種々の合成展開を行い、6種類の新規PKC活性化剤の創出に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在用いられている多剤併用療法(Anti-Retroviral Therapy, ART)によるHIV治療はそのウイルス量を検出限界以下まで抑えることが可能である。しかし、HIVは投薬中、リザーバー細胞と呼ばれる細胞内で潜伏・休眠し、ARTを中止すると再び増殖を開始する。このため、HIVを完全に体内から除去する根治治療法の開発が望まれている。本研究によって見いだされたPKC活性化剤はHIV再活性化能を有しており、根治治療法開発に資することが期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to develop a novel screening system for exploration of Protein Kinase C (PKC) C1b-binding ligands. PKC activators can function as latency-reversing agents (LRAs) against Human Immunodeficiency Virus (HIV). In order to develop the HIV cure methods, LRAs are considered as a key player to completely eliminate the virus from the body. In this study, we developed a novel Forster resonance energy transfer (FRET)-based assay method to evaluate PKC C1b domain affinity of the test compounds. Additionally, we also conducted an SAR study of the PKC C1b-binding ligands and successfully found six novel PKC activators.

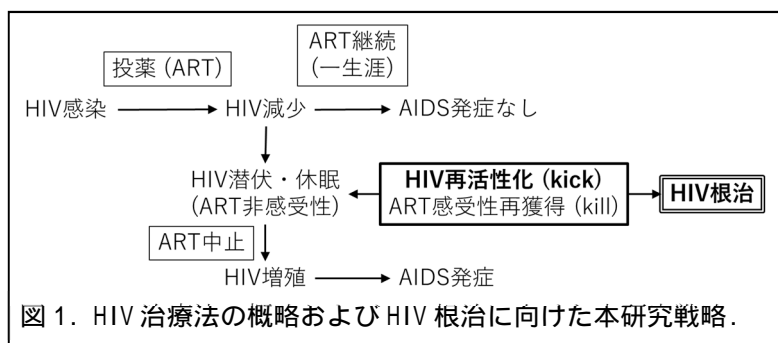
研究分野：創薬化学

キーワード：HIV エイズ(AIDS) タンパク質リン酸化酵素 スクリーニング Protein Kinase C (PKC) 潜伏感染 kick & kill ジアシルグリセロール

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

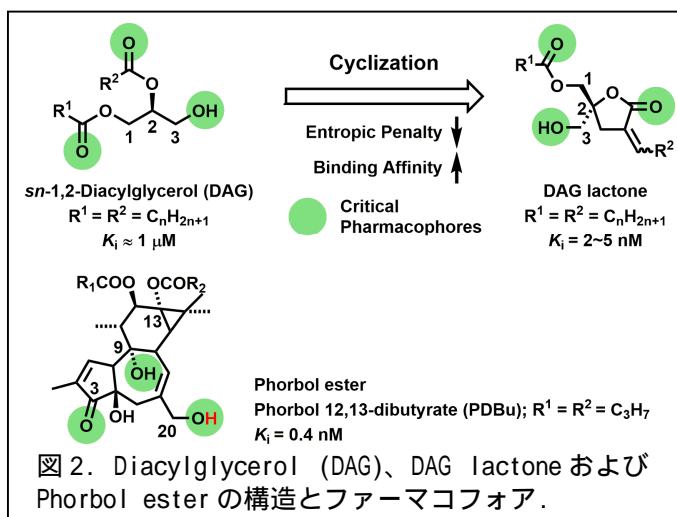
1. 研究開始当初の背景

1981年の後天性免疫不全症候群 (AIDS) に関する初の症例報告から近年に至るまでに Human Immunodeficiency Virus (HIV) の根治に至った例は一例のみであった。さらに本年三月、二例目となる根治例が報告されたがいずれも宿主由来の HIV 感染に関わる受容体に変異を持つドナーからの骨髄移植によるものであった。本変異型受容体を有するヒトは極めて稀であり、全世界に数千万人存在するとされる HIV 罹患者を対象とした治療法としては非現実的である。一方で、多剤併用療法 (Anti-Retroviral Therapy, ART) の飛躍的な進歩により今日では HIV に感染したとしても適切な投薬を継続すれば、AIDS を発症することなく健常人と同程度の寿命であることが報告されている (図 1)。しかし、これはあくまでも「適切な投薬を継続」した場合である。現在の ART においては一日一回以上の服薬を一生にわたり遵守する必要があり、患者のコンプライアンスや治療費の負担等により必ずしも十分な治療を受けることができない場合もある。更には、長期間の服薬による薬剤耐性ウイルスの出現も懸念される。このような背景から HIV の化学療法による根治治療を目指す本研究は大きな意義があると考えられる。



2. 研究の目的

HIV 根治治療を指向した Protein kinase C (PKC) C1a および C1b ドメイン結合性リガンド探索のための活性評価系の確立およびその応用を本研究の目的とする。HIV は AIDS の原因ウイルスである。ART による HIV 治療はそのウイルス量を検出限界以下まで抑えることが可能であるが、投薬中はリザーバー細胞と呼ばれる細胞内で潜伏・休眠してしまう。休眠中の HIV への ART は効果が低く、しかし、ART を中止すると再び増殖を開始してしまう。このため、その治療には毎日の服薬が必要であり、患者のコンプライアンス、経済的負担、医療費の増大等の観点から根治治療法の開発が望まれている。HIV 根治治療に向けたアプローチの一つに、この休眠中の HIV を叩き起こし (kick)、ART 感受性を高める (kill) 治療法 (kick & kill 法) がある (図 1)。現在、kick & kill 法について臨床・非臨床の場を問わず、世界中で研究が盛んに行われている。しかし、臨床試験において kick & kill 法の効果が確認されなかったことも報告されている。したがって、臨床の場においても効果の高い新規 HIV 再活性化薬の開発は HIV 根治治療に不可欠である。本治療法において鍵となる HIV 再活性化能を有する化合物群の一つが PKC 活性化剤である。PKC 活性化剤は PKC の C1 ドメイン (C1a もしくは C1b) に結合し、PKC を活性化する。申請者の所属する研究室ではこれまでに、PKCδ C1b 選択的アゴニストである Diacylglycerol (DAG) lactone の開発に成功し、本化合物が HIV 再活性化剤として機能することを見出している (図 2)。PKCδ は novel PKC (nPKC) に分類される PKC アイソフォームの一種であり、HIV 再活性化への関与が報告されている。したがって本研究では PKCδ を標的タンパク質として研究を展開する。さらに我々は種々の構造活性相関研究により、DAG lactone の各部位への置換基導入による効果についても精査している。その一環として、これまでに PKCδ C1b を対象とした蛍光色素標識型 DAG lactone 誘導体を用いた蛍光発光性および蛍光消光性リガンドスクリーニング法および Förster Resonance Energy Transfer (FRET) を用いたリガンドスクリーニング法を開発している (*Bioconjugate Chem.* 2011, 22, 923-930; *Bioconjugate Chem.* 2011, 22, 82-87, *Chem. Pharm. Bull.* 2014, 62, 1019-1025)。しかしながら、これらスクリーニング法においては、アッセイ感度、シグナル強度、偽陽性化合物の検出等の課題が残されていた。また、広く用いられている活性評価法として既知のリガンドである phorbol-12,13-dibutyrate (PDBu) の 20 位水酸基をトリチウム標識した [³H]PDBu を用いた結合競合阻害実験が挙げられ

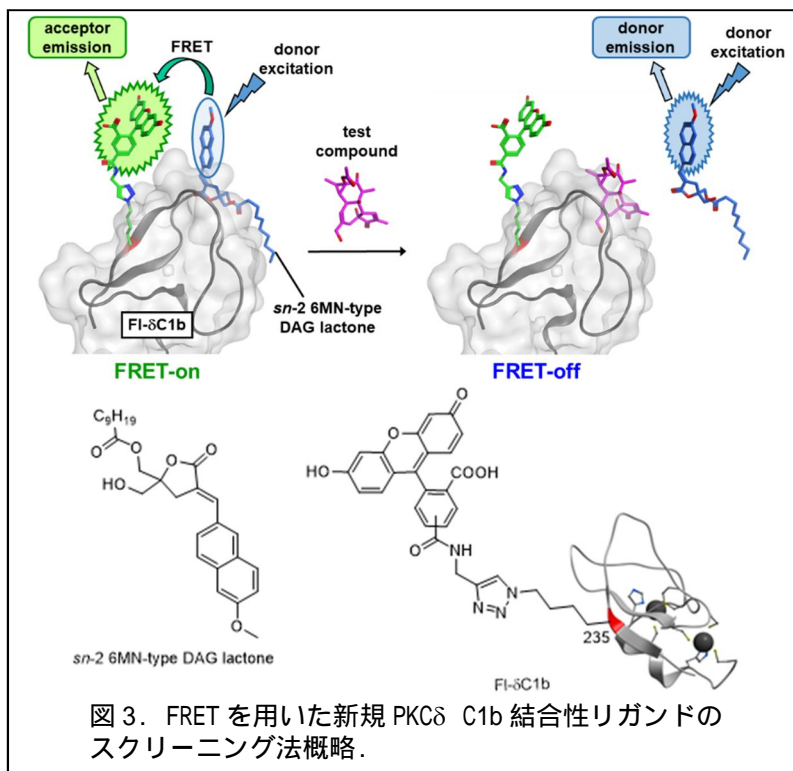


る。しかし本手法においては放射性核種を用いるため、その使用には場所、時間等厳しい制限が課せられる。

申請者はまず、これら C1b ドメインを用いたアッセイ系において FRET 効率の向上によるアッセイ感度、シグナル強度の改善を指向した FRET ドナー/アクセプターの組み合わせによる新規の FRET を用いたリガンドスクリーニング法の開発が PKC δ アゴニスト探索研究の一助になると考え、その開発を行うこととした。

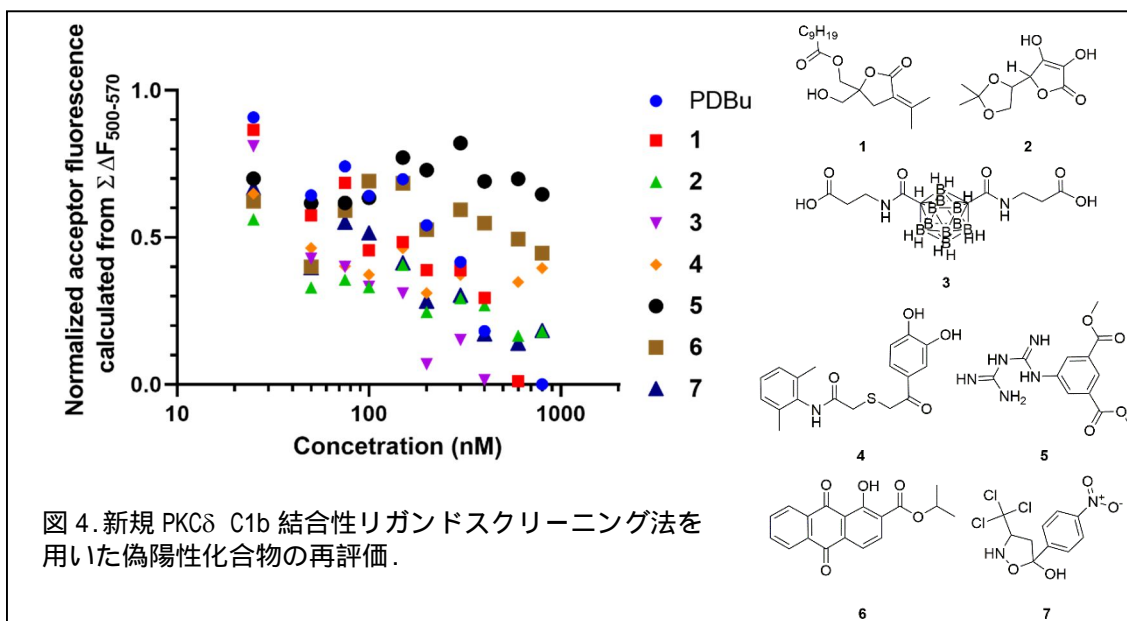
3. 研究の方法

FRET 効率向上を指向した蛍光色素 (6-methoxynaphthalene, 6-MN) を導入した DAG lactone (*sn*-2 6-MN-type DAG lactone) および蛍光色素 (fluorescein, FI) を導入した PKC δ C1b ドメイン (FI- δ C1b) を化学合成により調製した。得られた化合物について FRET 効率の検証およびアッセイ条件の最適化を行った (図 3)。開発したアッセイ系を用いて、これまでの方法では偽陽性であった化合物群について本手法を用いて精査した。さらに、DAG lactone に関し、図 2 中に示す R¹ 部位に種々の置換基を導入した DAG lactone 誘導体の合成、HIV 再活性化能の評価を行った。



4. 研究成果

PKC 活性化剤探索のための PKC δ C1b ドメインに対する新規リガンドスクリーニング法の開発を行った。FRET 効率の向上を期待した DAG lactone 誘導体 (ドナー) とフルオレセイン (アクセプター) の組み合わせを用いることにより、環境応答型蛍光団を利用した従来法において偽陽性を示した 6 種類の化合物のうち 4 種類を陰性化合物として排除することに成功し、従来法に比べ精度の高いリガンドスクリーニング法であることが明らかとなった (図 4)。研究期間中、本成果を含む関連研究成果に関して 1 件の講演および 1 件の国内学会発表を行い、国際学術誌 (査読あり) に報告した (*Org. Biomol. Chem.* 2021, 19, 8264-8271. (Inside Front Cover)).



さらに、DAG lactone のさらなる合成展開を行い、図 2 中に示す R¹ 部位に種々の置換基を導入し

た新規 DAG lactone 誘導体を合成、活性評価した。その結果、6種類の高い HIV-1 kick 作用を有する新規 PKC 活性化剤の創出に成功した。これまでに PKC の活性化がリザーバー細胞内に潜伏中の HIV の再活性化を惹起することが報告されている。現在、kick & kill 法に用いられている kick 作用を有する化合物としては PKC アゴニストを含むウイルス再活性化能を有する既存薬がほとんどであり、現行の ART と併用されている。しかし、臨床試験において kick & kill 法の効果が確認されなかったことも報告されている。したがって、*in vivo* においても効果の高い新規 HIV 再活性化薬 (PKC アゴニスト) の開発は HIV 根治治療に不可欠であり、本研究成果はその一助となることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件 / うち国際共著 5件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Tsuji Kohei, Ishii Takahiro, Kobayakawa Takuya, Ohashi Nami, Nomura Wataru, Tamamura Hirokazu	4. 巻 19
2. 論文標題 Fluorescence resonance energy transfer-based screening for protein kinase C ligands using 6-methoxynaphthalene-labeled 1,2-diacylglycerol-lactones	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Organic & Biomolecular Chemistry	6. 最初と最後の頁 8264 ~ 8271
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D10B00814E	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kobayakawa Takuya, Takano Hikaru, Ishii Takahiro, Tsuji Kohei, Ohashi Nami, Nomura Wataru, Furuta Toshiaki, Tamamura Hirokazu	4. 巻 18
2. 論文標題 Synthesis of hydrophilic caged DAG-lactones for chemical biology applications	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Organic & Biomolecular Chemistry	6. 最初と最後の頁 4217 ~ 4223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0ob00807a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kohei Tsuji, Takahiro Ishii, Takuya Kobayakawa, Nami Ohashi, Wataru Nomura, Hirokazu Tamamura
2. 発表標題 A FRET-BASED ASSAY SYSTEM FOR PROTEIN KINASE C LIGAND SCREENING USING 1,2-DIACYLGLYCEROL-LACTONE DERIVATIVE
3. 学会等名 第58回ペプチド討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 辻 耕平
2. 発表標題 細胞内リン酸化シグナル伝達の制御に基づく抗HIV剤、抗がん剤の創薬研究
3. 学会等名 2020年6月19日（金）医工連携セミナー（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 執筆者:101名、技術情報協会	4. 発行年 2021年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 602
3. 書名 創薬研究者がこれだけは知っておきたい最新のウイルス学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------