

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460133

研究課題名(和文) 次世代抗HIV薬の創製を目指すダフナン型ジテルペノイドの植物化学的研究

研究課題名(英文) Phytochemical investigation of Daphnane-type diterpenoids aiming to discover next generation anti-HIV drugs

研究代表者

李 巍 (LI, Wei)

東邦大学・薬学部・准教授

研究者番号：90328633

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：潜伏期HIVを除去する抗HIV薬は次世代のHIV感染症の根治薬として期待される。本研究はジンチョウゲ科植物瑞香狼毒から発見した極めて強力な潜伏期HIV除去作用を示すダフナン型ジテルペノイドGnidimacrin(GM)の単離精製法を確立した。さらに、HIV感染症患者の末梢血単核細胞を用いたex vivoモデルにおいて、潜伏HIV-1除去に対するGMの有効性を明らかにした。一方、化学合成したGM誘導体のin vitro抗HIV活性を評価した結果、GMの3位アシル基置換基は活性発現に極めて重要である一方、2'位水酸基は今後GMの作用機序を検討するための重要な官能基であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：HIV agents which can eliminate latent HIV virus, are expected as the next generation anti-HIV drug. In this study, we established the isolation and purification method of Gnidimacrin, a daphnane-type diterpenoid from *Stellera chamaejasme*, which shows extremely potent anti-HIV activity against latent HIV virus. In addition, we clarified the effectiveness of Gnidimacrin for the elimination of latent HIV-1 in an ex vivo model using peripheral blood mononuclear cells from patients with HIV infection. Furthermore, the chemically synthesized derivatives of Gnidimacrin were evaluated for their in vitro anti-HIV activities. As a result, the acyl group at the 3-position of gidimacrin is important for the anti-HIV activity, whereas the 2'-position hydroxyl group is an important functional group for further investigation of the mechanism of Gnidimacrin action.

研究分野：天然物化学

キーワード：HIV感染症 Gnidimacrin ダフナン 抗HIV薬

1. 研究開始当初の背景

現在5千万人の患者数を有するヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染症はアジア、アフリカ地域において急速に拡大し社会的問題になっている。その治療は、逆転写酵素阻害薬、プロテアーゼ阻害薬、インテグラーゼ阻害薬および CCR5 阻害薬など抗ウイルス薬の多剤併用療法 (HAART 療法) にて行われる。しかし HAART 療法では潜伏期の HIV ウイルスが体内に残存し、体内から完全に駆除することは出来ないため、生涯に渡って抗ウイルス薬の継続が必要である。これに付随する抗ウイルス薬の慢性毒性や副作用、薬物耐性ウイルスの出現、および治療に要する高額な医療費がいずれも大きな問題点となっている。

HIV 感染症の急速な蔓延および既存抗 HIV 薬の問題点により、新しい抗 HIV 薬の研究と開発が盛んに行われる。しかし、HIV 感染症の根治薬の開発には難点がある。まず、HIV ウイルスが変異しやすいため、実用化できる特異的なワクチンの開発は難しい。更に、HIV ウイルスのライフサイクルの各過程を標的として開発された抗 HIV 薬は HIV ウイルスの増殖を抑え出来るが、HIV ウイルスの潜伏期が非常に長いため、わずかな潜伏期のウイルスが残ることにより再発症してしまうことから、HIV 感染症を根治することが出来ない。そこで、潜伏期の HIV ウイルスを活性化することは HIV 感染症を完治できる抗 HIV 薬の創製の重要なポイントである。

このような潜伏期の HIV ウイルスを活性化する作用を持つ化合物としてまず挙げられるのはサモア島に原産するジンチョウゲ科植物ママラ (*Homalanthus nutans*) の木から単離された微量成分プロストラチン (prostratin) である。プロストラチンは現在臨床試験中であるが、HIV の変異による薬物耐性を考えると、プロストラチンの後継薬の研究開発が急務である。

2. 研究の目的

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) による感染症が急速に蔓延している中、既存の抗 HIV 薬による治療法では HIV を根絶できないため、新しい抗 HIV 薬の創製が急務である。本研究は HIV 感染症を完治できる次世代の抗 HIV 薬の創製を研究目標として、ネパール原産のジンチョウゲ科植物瑞香狼毒 *Stellera chamaejasme* から発見した潜伏期の HIV ウイルス活性化作用を有し、極めて強力な抗 HIV 活性を示すダフナン型ジテルペノイド Gnidimacrin (図 1) をリード化合物として、植物資源の化学成分の分析と単離、天然物誘導体の化学合成など植物化学の研究手法を用いて、ダフナン型ジテルペノイドの抗 HIV 作用の構造活性相関を明らかにすることを研究目的とする。

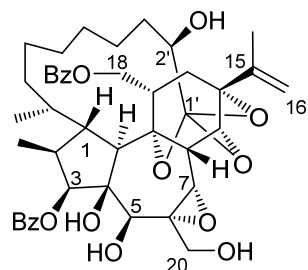


図 1 Gnidimacrin の化学構造

3. 研究の方法

(1)植物材料の採集:Gnidimacrin の抽出単離に使用した瑞香狼毒 *Stellera chamaejasme* はネパールの Mustang 地区 Chele ~ Shyammochem 高地で採取した。一方、中国産の瑞香狼毒は甘粛省産のものを使用した。

(2)Gnidimacrin の単離:植物材料をメタノールにて常温下で抽出し、抽出液をさらに Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィー、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、ODS カラムクロマトグラフィーを使用して分離後、最後に分取 HPLC を用いて Gnidimacrin を単離精製した。Gnidimacrin の化学構造は MS, NMR スペクトル解析により同定し、純度は HPLC - PDA 分析により決定した。

(3)抗 HIV 活性の評価: In vitro 抗 HIV 活性は HIV (NL4-3) を感染した CD4 陽性ヒト T 細胞 (MT4) を用いて、ELISA 法で p24 を指標として HIV の複製を測定した。HIV 感染症患者の末梢血単核細胞の HIV-1 DNA レベルは RT-PCR 法により測定した。プロテインキナーゼ C の発現量は CD4 細胞を用いてウエスタン・ブロットング法により測定した。

(4)Gnidimacrin の化学誘導体の合成: Gnidimacrin の 3 位脱アシル誘導体および 3, 18 位脱アシル誘導体は弱アルカリ条件下のエステル交換反応により合成した。20 位アシル化誘導体は有機酸無水物を利用したエステル化反応により合成した。5 位 acetyl 誘導体は 20 位の一級水酸基を保護した後合成した。5 位コハク酸エステル誘導体は 20 位コハク酸エステル誘導体のアシル転移により合成した。一方、5, 20 位 diol を保護した後、2' 位にアセチル基の導入および Dess-Martin 酸化によりカルボニル基の導入を行った。

4. 研究成果

(1)Gnidimacrin の単離法の確立:ネパールで採取した瑞香狼毒の根から 4 工程で gnidimacrin を単離精製する方法を確立した。単離収率は 0.0033%であった。即ち、瑞香狼毒の根を MeOH で抽出し、抽出液を水で薄め、Diaion HP-20column に吸着したあと、acetone で Gnidimacrin を溶出した。Acetone 溶出画

分、更にシリカゲルクロマトグラフィーにて分離した。溶出液としてクロロホルム、クロロホルム：メタノール(96：4)、クロロホルム：メタノール(6：4)で順次溶出し、クロロホルム：メタノール(96：4)溶出部にて Gnidimacrin を回収した。Gnidimacrin を含む画分をさらに ODS カラムクロマトグラフィーを行い、75%、90% MeOH および MeOH で順次溶出し、90% MeOH 溶出液は粗 Gnidimacrin 画分とした。最後に HPLC にて単離精製を行い、Gnidimacrin 単品 1g を得た。一方、中国甘肅省産の瑞香狼毒を LC-MS を用いて分析したところ、ネパール産の瑞香狼毒とほぼ同様な Gnidimacrin 含量を有することを明らかにした。

(2) Gnidimacrin の抗 HIV 活性作用の評価：HIV 感染症患者の末梢血単核細胞を用いた *ex vivo* モデルにおいて、Gnidimacrin が潜伏 HIV-1 DNA レベルおよび潜伏感染細胞の頻度を顕著に減少させたことを示した。更に、Gnidimacrin は HDAC1 SAHA またはロミデプシンより約 10 倍多くの HIV-1 産生を誘導した。Gnidimacrin はピコモルの濃度でこれらの効果を達成した。更に、Gnidimacrin はプロテインキナーゼ C I および II の選択的活性化し、その抗 HIV 作用に関与すると考えられる。特に、Gnidimacrin は HIV-1 潜伏感染細胞の頻度を減少させる有効濃度では、T 細胞の活性化または炎症性サイトカイン産生を刺激することなかった。これら結果は Gnidimacrin が潜伏 HIV の除去に有効であることを明らかにした。

(3) 化学誘導体の合成：Gnidimacrin は daphnane 型ジテルペン骨格に orthoester 結合をした脂肪酸が環状構造を取り、更に高度酸化を受けて polyhydroxy 基と acyl 基を有している。本研究においては、Gnidimacrin の重要な官能基、すなわち、3 位および 18 位 benzoyl 基、6,7 位 epoxy 基、20 位および 2□位水酸基、15(16)位二重結合に注目し誘導体の合成を行った。

3 位及び 18 位 benzoyl 基の活性発現における役割を調べるために、弱アルカリ条件下のエステル交換反応により、それぞれ 3 位脱アシル誘導体(GM33)および 3,18 位脱アシル誘導体(GM21)を得た。20 位水酸基は Gnidimacrin の polyhydroxy 基の中に、唯一の一級水酸基である。反応性が高いため、有機酸無水物を利用したエステル化反応により、新たなアシル基を導入した(GM31, GM16, GM25, GM14a, GM15a)。さらに、20 位の一級水酸基を保護し、選択的に 5 位 acetyl 誘導体(GM33)を得た。また 5 位コハク酸エステル誘導体(GM34a)は 20 位コハク酸エステル誘導体(GM25)のアシル転移により得た。一方、Gnimacrin の 2□位水酸基は抗 HIV 活性に必要な官能基であることが明らかにされている。今回は、5,20 位 diol を保護し

た後、2' 位にアセチル基の導入(GM27) および Dess-Martin 酸化によりカルボニル基の導入(GM28)を行った。ほかは、polyhydroxy 基にエステル化反応によりアセチル基および benzoyl 基の導入を行った。

(4) 構造活性相関解析：上記化学合成した Gnimacrin の化学誘導体について、HIV(NL4-3) を感染した CD4 陽性ヒト T 細胞(MT4)を用いて *in vitro* 抗 HIV 活性を評価した。その結果、Gnimacrin の 2' 位アセチル化誘導体(GM27) および 2' 位カルボニル化誘導体(GM28) は Gnimacrin に匹敵する抗 HIV 活性を示した。ほかの誘導体は活性の減少(IC₅₀>1ng/mL)が見られた。この結果は gnidimacrin の 3 位のアシル基置換基は活性発現に極めて重要であることを示す一方、2' 位水酸基は今後 Gnimacrin の作用機序を検討するための重要な官能基であることを示唆した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Weihong Lai, Li Huang, Lei Zhu, Guido Ferrari, Cliburn Chan, Wei Li, Kuo-Hsiung Lee, Chin-Ho Chen: Gnidimacrin, the potent anti-HIV diterpene can eliminate latent HIV-1 *Ex Vivo* by activation of PKC Beta. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(21), 8638-8646 (2015). 査読有.
DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b01233.

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

李 巍 (LI, Wei)

東邦大学・薬学部・准教授

研究者番号：90328633

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

LEE Kuo-Hsiung (LEE, Kuo-Hsiung)

CHEN Chin-Ho (CHEN, Chin-Ho)