

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670053

研究課題名(和文) ウイルスの複製機構の弱点をターゲットとした抗HIV剤の創製

研究課題名(英文) Development of anti-HIV agents targeting weak points of viral replication mechanism

研究代表者

玉村 啓和 (Tamamura, Hirokazu)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授

研究者番号：80217182

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、全く新たな概念に基づく戦略により、新規抗HIV薬の創製を目指した。HIV構成タンパク質においては多量体形成等の機能維持に必須な構造があり、それらは変異しにくい(変異すると機能をもたない)と考えられ、そのような標的を探ることが、治療薬シード創出において重要である。すなわち、多量体形成に関わるカプシドタンパク質(CA)やエンベロープタンパク質gp41は立体構造的に変異に弱い領域を持つと思われ、これらの領域を探索した。このような弱点をターゲットとして、ペプチドライブラリーを用いて抗エイズ薬を探索した。最終的に、治療標的を解明し、抗HIV剤の創出のブレイクスルーを達成した。

研究成果の概要(英文)：In this study we tried to develop novel anti-HIV agents based on our new concept. HIV proteins have some structures required for function maintenance involving oligomerization, which might be difficult to mutate. It is important to search these targets in the development of drug seeds. Capsid proteins and an envelope protein gp41 relevant to oligomer formation might have conformationally weak regions against mutation. We tried to search these regions. In consideration of these weak points as our targets, anti-HIV leads were found using peptide libraries. Finally, treatment targets were elucidated and breakthrough for creation of anti-HIV agents was accomplished.

研究分野：創薬化学

キーワード：抗HIV薬 多量体形成 カプシドタンパク質 エンベロープタンパク質gp41 ペプチドライブラリー 治療標的

1. 研究開始当初の背景

HIV 感染症、エイズに対する有効な阻害剤や治療法も開発されてきているが、完璧な治療法は未だ確立されていない。従来、ヒトになく HIV にのみ存在する酵素や構造タンパク質をターゲットして、その阻害剤を探索していた。すなわち、逆転写酵素やプロテアーゼ、インテグラーゼなどを標的分子として設定して、阻害剤をデザイン、合成していた。本法により非常に有用な抗エイズ薬が開発され、臨床で多大な成果を挙げた。しかし、それらを治療薬として臨床使用したとき、ある期間の後にいずれは必ず HIV が変異を起こし、薬剤耐性ウイルスが出現するという問題点も生じている。これは HIV の複製サイクルにおいて、変異に弱そうな標的を探るのではなく、ヒトには存在しない HIV 固有のものを標的分子として選んだことにも原因がある。申請者は、このような従来の固定概念を脱却し、HIV がもつ複製上の弱点をターゲットとして、抗エイズ薬を探索しようと考えた。HIV の構造タンパク質において、カプシドタンパク質(CA)やエンベロープタンパク質 gp41 は、多量体形成が構造や機能維持に重要であり、ウイルスゲノムが変異すると多量体がうまく形成されず、機能を維持できないと考えられる。すなわち、CA、gp41 は立体構造的に変異に弱い領域を持つと思われる。これらの領域を探索することは有用な治療標的の解明につながる。CA は、CA 同士の相互作用により、多量体を形成し、さらに、他のいくつかのタンパク質との相互作用により、ウイルスゲノムを包む殻を形成する。gp41 は HIV の細胞への侵入時に 3 量体形成から 6 量体形成へダイナミックに構造変化する。これらは、立体構造形成を考えた時、変異に対する弱点になりうる。また、HIV のようなウイルスには進化的な弱点があると考えられ、申請者は最近、HIV 自身の生命システムから抗 HIV 剤を探索した (Suzuki S., et al. *J. Med. Chem.*, **53**, 5356, 2010; Narumi T., et al. *Bioorg. Med. Chem.*, **20**, 1468, 2012)。これは HIV 自身の生命システムに、急激なウイルス数の増加を抑制するフィードバックシステムが備わっていることを利用した創薬リードの発見である。すなわち、HIV は急性感染を抑制するフィードバックシステムをウイルス進化的に装備している。本研究では進化的弱点だけでなく、複製上の変異や構造変化に対する弱点をターゲットとする。

2. 研究の目的

1) 抗エイズ薬の治療標的の解明: まず、HIV の構造タンパク質において多量体形成が構造や機能維持に重要である、CA や gp41 にフォーカスをあて、ケミカルバイオロジー技術を用いて、標的分子をターゲットとして、ライブラリーを作製し、阻害剤

を探索する。これによって抗エイズ薬の治療標的を見出す。2) リード化合物からの展開: ペプチド性のリード化合物から、低分子化、非ペプチド化、高活性化を行う。

3 当該分野における本研究の学術的な特色・予想される結果と意義: 本研究は HIV に内在する複製上の変異や構造変化に対する弱点をターゲットとして、新規の抗エイズ薬の治療標的を探索するので、抗 HIV 剤の創出のブレークスルーになる可能性がある。本研究により見出された阻害剤は、変異に弱いところに作用するので、ウイルス変異に抵抗する、薬剤耐性が生じにくい、有用な抗エイズ薬候補品になる可能性がある。本研究はウイルス進化にも関連する治療標的の探索であり、抗ウイルス創薬のための一般的な概念を創出できる可能性がある。

3. 研究の方法

1) カプシドタンパク質(CA)由来の部分ペプチドライブラリーからの抗 HIV 剤の探索 CA に関して、CA 同士の相互作用や他のタンパク質との相互作用をターゲットとし、多量体形成を阻害するペプチド配列を探索する。まず、CA 由来の合成部分ペプチドライブラリーを構築した。申請者は以前にマトリックスタンパク質(MA)由来の部分ペプチドライブラリーを構築し、抗 HIV 活性化化合物を見出しており、この手法を参考にする (Narumi T., et al. *Bioorg. Med. Chem.*, **20**, 1468, 2012)。CA は 231 個のアミノ酸残基からなるタンパク質であり、いくつかの α -ヘリックス構造等から構成されていることから、部分ペプチドは二次構造を保持できるように 15 残基のアミノ酸ごとに分割し、また、分割点に活性配列が含まれる可能性を危惧し、部分ペプチドごとに 5 残基のオーバーラップ領域をもうけ、計 23 個の部分ペプチドとして設計した。さらに、各部分ペプチドの C 末端に Gly-Cys 配列を導入し、クロロアセチル基を有する細胞膜透過シグナル Octa-Arg を付加し、細胞膜透過性部分ペプチドライブラリーを構築した。また、コントロールとして、Cys の SH 基をキャッピングした部分ペプチドライブラリーを調製し、細胞内に入らないコントロールペプチドとする。これらの抗 HIV 活性を評価し、多量体形成を阻害するかどうか検討した(図 1)。

2) エンベロープタンパク質 gp41 の断片ペプチドの 2 量体、3 量体のミミックからの抗 HIV 剤の探索

申請者は以前に、gp41 の C 末端側のヘリックス領域ペプチド C34(CHR)、および N 末端側のヘリックス領域ペプチド N36 の 3 量体ミミック(3 本鎖を全く等価)を合成し、高い抗 HIV 活性を有すること、およびこれらの免疫により中和抗体が誘導されることを報告している (Nakahara T., et al.

Bioconjugate Chem., **21**, 709, 2010; Hashimoto C., et al. *Bioorg. Med. Chem.*, **20**, 3287, 2012)。とくに、C34 の 3 量体ミミックは C34 の約 100 倍の抗 HIV 活性を有し (Nomura W., et al. *ChemMedChem*, **7**, 205, 2012)、また、その 2 量体が最低必要な構造単位であることを確認している (Fig. 5, Nomura W., et al. *Bioorg. Med. Chem.*, **21**, 4452, 2013)。これらの合成法を参考にして、2 量体、3 量体のペプチドミミック誘導体を多数合成し、抗 HIV 活性を評価し、多量体形成を阻害するかどうか検討した (図 2)。

3) CA 由来のライブラリーから得られたリード化合物の標的探索と創薬展開

1)でライブラリーから得られたリード化合物を基にして、多量体構造上でのその作用点を解析した。その際、最近報告された CA の X 線結晶構造解析を参考にした (Zhao G., et al. *Nature*, **497**, 643, 2013)。このようにして、治療標的が明らかになれば、これらのリード化合物を使用した *in vitro* の耐性誘導実験により、耐性ウイルスの出現の程度を調べた。その際、変異ウイルスがアミノ酸置換によって多量体を形成しにくい(変異すると多量体形成が崩れる)ものへ導くようにした。すなわち、その置換されたアミノ酸が変異に弱い点になる。また、その弱点をターゲットとして、申請者がこれまで培ってきたペプチド創薬の技術を活かし、創薬研究を展開した。具体的には、活性発現に不要なアミノ酸を削除、重要なアミノ酸を保持することによる低分子化、非ペプチド化による活性の上昇(100 nM レベル)、生体内安定性の向上を目指した。

4. 研究成果

HIV 感染症、およびエイズの治療において、薬剤耐性ウイルスの出現を完全に防ぐことは難しく、新しい薬剤の創出が望まれている。本研究では、全く新たな概念に基づく戦略により、新規抗エイズ薬の創製を目指した。HIV 構成タンパク質においては多量体形成等の機能維持に必須な構造があり、それらは変異しにくい(変異すると機能をもたない)と考えられ、そのような標的を探すが、治療において重要である。すなわち、多量体形成に関わるカプシドタンパク質(CA)やエンベロープタンパク質 gp41 は立体構造的に変異に弱い領域を持つと思われる、これらの領域を探索した。このような HIV に内在する変異や構造変化に対する弱点をターゲットとして、自らが創製するペプチドを中心としたライブラリーを用いて、フォワードケミカルゲノミクス的手法により抗エイズ薬を探索した。最終的に、ウイルス変異に抵抗する、薬剤耐性が生じにくい、抗エイズ薬の治療標的を解明し、抗 HIV 剤の創出のブレークスルーを達成した。

An H1 1 Active Evaluation of Cell Penetrating CA Peptides

CA	MT-4	PM1/CCR5	MT-4	CA	MT-4	PM1/CCR5	MT-4
	NL4-3	NL(AD8)	CC ₅₀ (μM)		NL4-3	NL(AD8)	CC ₅₀ (μM)
1L	4.5	6.2	> 50	14L	> 6.3	ND	6.3
2L	6.8	> 50	> 50	15L	6.6	1.2	18
3L	40	> 50	> 50	16L	33	> 50	> 50
4L	35	> 50	> 50	17L	> 15	ND	15
5L	35	> 50	> 50	18L	> 50	ND	> 50
6L	8.1	13	> 50	19L	46% inh. ^{a)}	19% inh. ^{a)}	> 50
7L	39% inh. ^{a)}	> 50	> 50	20L	36	> 50	> 50
8L	14	14% inh. ^{a)}	> 50	21L	> 50	ND	> 50
9L	45	ND	> 50	22L	26% inh. ^{a)}	> 50	> 50
10L	33	> 50	> 50	23L	21% inh. ^{a)}	ND	> 50
11L	44	ND	> 50	AZT	0.069	5.3	> 50
12L	> 50	ND	> 50	AMD	0.032	> 50	> 50
13L	> 30	ND	30	SCH-D	> 5	0.0081	> 5

a) The concentration of CA peptide was 50 μM.

図 1. CA 部分ペプチドの抗 HIV 活性評価

The C34 Trimer and Dimer Mimicked CHR Conformation

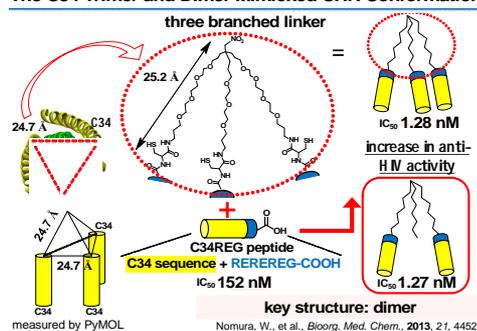


図 2. C34 の 2,3 量体ペプチドミミック

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 13 件)すべて査読有

- Hikaru Takano, Tetsuo, Narumi, Wataru Nomura, Toshiaki Furuta & **Hirokazu Tamamura**
Utilization of the Heavy Atom Effect for the Development of a Photosensitive 8-Azacoumarin-type Photolabile Protecting Group.
Org. Lett., 17(21), 5372-5375 (2015)
- Wataru Nomura, Haruo Aikawa, Shohei Taketomi, Miho Tanabe, Takaaki Mizuguchi & **Hirokazu Tamamura**
Exploration of Labeling of Near Infrared Dyes on the Polyproline Linker for Bivalent-Type CXCR4 Ligands.
Bioorg. Med. Chem., 23(21), 6967-6973 (2015)
- Wataru Nomura, Taisuke Koseki, Nami Ohashi, Takaaki Mizuguchi & **Hirokazu Tamamura**
Trivalent Ligands for CXCR4 Bearing Polyproline Linkers Show Specific Recognition for Cells with Increased CXCR4 Expression.
Org. Biomol. Chem., 13(32), 8734-8739 (2015)
- Takaaki Mizuguchi, Nami Ohashi, Wataru Nomura, Mao Komoriya, Chie Hashimoto, Naoki Yamamoto, Tsutomu Murakami & **Hirokazu Tamamura**
Anti-HIV Screening for Cell-Penetrating Peptides Using Chloroquine and

- Identification of Anti-HIV Peptides Derived from Matrix Proteins.
Bioorg. Med. Chem., 23(15), 4423-4427 (2015)
5. Wataru Nomura, Nami Ohashi, Atsumi Mori & **Hirokazu Tamamura**
An In-cell Fluorogenic Tag-probe System for Protein Dynamics Imaging Enabled by Cell-Penetrating Peptides.
Bioconjugate Chem., 26(6), 1080-1085 (2015)
 6. Takuya Kobayakawa, Tetsuo Narumi & **Hirokazu Tamamura**
Remote Stereinduction in the Organocuprate-Mediated Allylic Alkylation of Allylic gem-Dichlorides: Highly Diastereoselective Synthesis of (Z)-Chloroalkene Dipeptide Isosteres.
Org. Lett., 17(10), 2302-2305 (2015)
 7. Nami Ohashi, Wataru Nomura, Natsuki Minato & **Hirokazu Tamamura**
Screening for Protein Kinase C Ligands Using Fluorescence Resonance Energy Transfer.
Chem. Pharm. Bull., 62(10), 1019-1025 (2014)
 8. Maryna Masyuk, Aisha Abduelmula, Gabriela Morosan-Puopolo, Veysel Ödemis, Rizwan Rehimi, Nargis Khalida, Faisal Yusuf, Jürgen Engele, **Hirokazu Tamamura**, Carsten Theiss & Beate Brand-Saberi
Retrograde Migration of Pectoral Girdle Muscle Precursors Depends on CXCR4/SDF-1 Signaling.
Histochem. Cell. Biol., 142(5), 473-488 (2014)
 9. Jun Yamamoto, Nami Maeda, Chiaki Komiya, Tomohiro Tanaka, Masaya Denda, Koji Ebisuno, Wataru Nomura, **Hirokazu Tamamura**, Youichi Sato, Aiko Yamauchi, Akira Shigenaga & Akira Otaka
Development of a Fluoride-responsive Amide Bond Cleavage Device that is Potentially Applicable to a Traceable Linker.
Tetrahedron, 70(34), 5122-5127 (2014)
 10. Hikaru Takano, Tetsuo Narumi, Nami Ohashi, Akinobu Suzuki, Toshiaki Furuta, Wataru Nomura & **Hirokazu Tamamura**
Development of the 8-Aza-3-bromo-7-hydroxycoumarin-4-ylmethyl Group as a New Entry of Photolabile Protecting Groups.
Tetrahedron, 70(29), 4400-4404 (2014)
 11. Jun Yamamoto, Masaya Denda, Nami Maeda, Miku Kita, Chiaki Komiya, Tomohiro Tanaka, Wataru Nomura, **Hirokazu Tamamura**, Youichi Sato, Aiko Yamauchi, Akira Shigenaga & Akira Otaka
Development of a Traceable Linker Containing a Thiol-responsive Amino Acid for the Enrichment and Selective Labelling of Target Proteins.
Org. Biomol. Chem., 12(23), 3821-3826 (2014)
 12. Tetsuo Narumi, Seiji Tsuzuki & **Hirokazu Tamamura**
Imidazolium Salt-Catalyzed Friedel-Crafts-Type Conjugate Addition of Indoles: Analysis of Indole/Imidazolium Complex by High Level ab Initio Calculations.
Asian J. Org. Chem., 3(4), 497-503 (2014)
 13. Tetsuo Narumi, Hikaru Takano, Nami Ohashi, Akinobu Suzuki, Toshiaki Furuta & **Hirokazu Tamamura**
Isostere-Based Design of 8-Azacoumarin-type Photolabile Protecting Groups: A Hydrophilicity Increasing Strategy for Coumarin-4-ylmethyls.
Org. Lett., 16(4), 1184-1187 (2014)
- [学会発表](計5件)
1. **玉村啓和**: 2016年3月28日、日本薬学会第136年会シンポジウム「抗ウイルス感染症のフロンティア」、横浜、「HIV外被タンパク質gp41由来ペプチドC34の二量体を基盤とした膜融合阻害剤」
 2. **玉村啓和**: 2015年8月29日、第21回ペプチドフォーラム - ペプチドと創薬: ペプチド科学と創薬の新しい接点と可能性を探る -、東京、「ペプチドを基盤とした中分子創薬研究 - 抗HIV剤の創製」
 3. **玉村啓和**: 2015年3月28日、日本薬学会第135年会シンポジウム「中分子創薬研究のフロンティア」、神戸、「ペプチドミメティックを活用した中分子創薬研究」
 4. **玉村啓和**: 2015年2月20日、東京医科歯科大学 医学・歯学・工学連携セミナー、東京、「ケミカルバイオロジーの抗ウイルス剤への応用」
 5. **玉村啓和**: 2014年7月19日、東京医科歯科大学大学院 生命理工学系専攻「疾患予防科学コース」ミニシンポジウム「疾患予防科学で何を学ぶのか」疾患予防のための理工学: その魅力と大学院キャリアセミナー、「研究紹介セミナー」、東京、「エイズ発症防止と疾患予防科学」
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
玉村 啓和 (TAMAMURA, Hirokazu)
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授
研究者番号: 80217182