耐性 HIV を発現させない低毒性 逆転写酵素阻害ヌクレオシドの 創製研究

大類 洋^{1*}
早川 弘之²
向後 悟²
松岡 雅雄³
児玉 栄一³
満屋 裕明^{4,5}

Creation of Low Toxic Reverse-transcriptase Inhibitory Nucleosides that Prevent the Emergence of Drug-resistant HIV Variants

Hiroshi Ohrui^{1*}, Hiroyuki Hayakawa², Satoru Kohgo², Masao Matsuoka³,
Eiichi Kodama³, and Hiroaki Mitsuya^{4,5}

Although the Highly Active Anti-Retroviral Therapy (HAART) has dramatically improved the quality of life and the prognosis of patients infected with HIV, development of more active and less toxic drugs that prevent the emergence of drug-resistant HIV variants is strongly required, due to the emergence of new drug-resistant HIV variants, need of taking a large quantity of drugs, and side effects of the drugs.

The principal author has proposed a concept to prevent the emergence of the HIV variants resistant to reverse-transcriptase (RT) inhibitory nucleosides. Based on the concept, 4'-C-substituted-2'-deoxynucleoside (4'Sd-N)^{*1} was designed as the *anti*-HIV nucleoside that could prevent the emergence of resistant HIV variants. Various kinds of 4'Sd-N were synthesized and evaluated for biological activity.

2'-Deoxy-4'-C-ethynyl-2-fluoroadenosine (4'Ed-2FA) which is stable to adenosine deaminase turned out to be highly active against all HIV-1 including multi-drug resistant variants and very lowly toxic, and so far no HIV-1 variants resistant to it emerged. These results suggest that once-daily-dosing schedule of 4'Ed-2FA is possible presumably with few side effects and warrant that 4'Ed-2FA be further developed as a potential therapeutic for HIV-1 infection.

Key words: AIDS, HIV, *anti*-HIV-1 drug free from emergence of resistant HIV-1 variant, RT-inhibitory nucleoside, drug-resistant HIV, prevention of the emergence of drug-resistant HIV, highly active *anti*-retroviral therapy (HAART), 4'-C-substituted-2'-deoxynucleoside

はじめに

1980年代の初頭、現代の黒死病と言われたエイズが出現した。その原因がレトロウイルス(HIV)であるとわかり、1985年にNIHの満屋裕明博士によってAZT(3'-azido-3'-deoxythymidine: アジドチミジン)がエイズ治療に有効であることが見出された。それを機に、抗HIV-1薬としてAZTと同様3'-OHを持たない2',3'-ジデオキシヌクレオシド類(ddN)、および2',3'-ジデオキシヌクレオシド類(d4N)が次々と開発されている(図1)^{*2}。

しかし、これらすべてのヌクレオシドには短期間で耐性HIV-1が発現している。HIV-1のライフサイクルが解明されると、プロテアーゼ阻害薬をはじめとする

Fig. 1 Structures of clinical nucleoside reverse-transcriptase inhibitors.

HIV-1の感染・再生機構阻害薬が次々と開発された。しかし、いずれの薬にも短期間で耐性HIV-1が発現している。それゆえ、エイズ治療は非常に難しいと考えられたが、1996年頃に耐性メカニズムが交叉しない複数の薬を混合して投与する多剤併用療法(HAART: カクテル療法)が開発され、HIV-1感染者の生活の質(QOL: quality of life)と生命予後が著しく改善された。

しかし、新しい耐性HIV-1の発現、大量の薬剤を服用しなければならないこと、薬剤による副作用、さらに

¹横浜薬科大学, ²ヤマサ醤油株式会社, ³京大ウイルス研究所, ⁴熊本大学医学部, ⁵NIH, NCI

¹Yokohama Pharmaceutical College, ²Yamasa Corporation, ³Institute for Virus Research, Kyoto University, ⁴Kumamoto University, School of Medicine, ⁵NIH, NCI

* ()

* ()

ワクチン開発が困難であること、などから、耐性 HIV-1 を発現させない、副作用の少ない、少量服用で済む薬理作用が優れた薬剤の開発が強く望まれている。

以下、筆頭著者が有機化学の基本と理研時代に得た経験^{*3}に則って、耐性ウイルスを発現させない毒性の低い抗 HIV ヌクレオシドの分子構造の概念(仮説)を提唱し、共同研究者と、合成、生物活性試験を繰り返し、概念(仮説)の妥当性の検証を行い、多剤耐性株を含むすべての HIV-1 に高い活性を有し、かつ毒性の低い 2'-deoxy-4'-C-ethynyl-2-fluoroadenosine (4'Ed-2FA)^{*1} に到達した研究の経緯を紹介したい(図 2)。

Fig. 2 Structure of 2'-deoxy-4'-C-ethynyl-2-fluoroadenosine (4'Ed-2FA).

1. 耐性を発現させない抗 HIV-1 ヌクレオシドの設計

筆頭著者は AZT を初めとする 3'-OH を持たない ddN, d4N に耐性 HIV-1 が発現する理由は、「HIV-1 がプロウイルス DNA 生合成の生理的基質である 3'-OH を持つ 2'-デオキシヌクレオシド類(dN)と 3'-OH を持たない ddN, d4N を識別し、ddN, d4N を逆転写酵素(RT)の活性中心へ取り込まない能力、または(さらに)ddN, d4N がプロウイルス DNA に取り込まれても、それらを選択的に切り離す能力を獲得する、すなわち、HIV-1 が ddN, d4N を dN と識別する能力を獲得するため」と考えた。

それゆえ、耐性 HIV-1 を発現させない抗 HIV-1 ヌクレオシドは、

- ① HIV-1 が dN と識別できないように、dN と非常に良く似た構造である必要があるため、3'-OH を持

つことが必須である。

- ② 3'-OH を持つにもかかわらず RT の阻害(プロウイルス DNA 生合成のチェインターミネーター)活性を持つこと^{*2}。さらに、

- ③ 低毒性であること、の 3 条件を満足しなければならない。

これらの条件を満足し得るヌクレオシドとして、4'-C-置換-2'-デオキシヌクレオシド(4'Sd-N)を以下の(1)-(3)の仮説を基に設計した(図 3)。

Fig. 3 Structures of 2'-deoxynucleoside (dN) and 4'-C-substituted-2'-deoxynucleoside (4'Sd-N).

- (1) 4'Sd-N は dN のすべての官能基を持ち dN と非常に類似しているため、HIV-1 は 4'Sd-N を dN として認識する。
- (2) 4'-位炭素の 4 級化は、3'-OH を 2 級のネオペンチルアルコールとし、その反応性を著しく低下させるため、DNA 生合成がここで停止する可能性がある。すなわち、4'Sd-N はプロウイルス DNA 生合成のチェインターミネーターとなり得る。
- (3) 毒性に関しては、ヒトの DNA ポリメラーゼも 4'Sd-N を dN として認識すれば 4'Sd-N は当然毒性を持つことになるが、ヒトが HIV-1 より精巧に作られており、ヒトの DNA ポリメラーゼが 4'Sd-N を dN と識別できることを期待して^{*3}、あとは運を天に任せる。以上が本研究の概念(仮説)である。毒性の点で問題が予想されるが、耐性 HIV-1 を発現させないために 3'-OH の存在が必須であることを検証した。

2. 4'-C-メチル-デオキシヌクレオシド類(4'Md-N)による研究概念(仮説)の妥当性の検証

研究を開始するにあたって、合成が最も容易と考えられた 4'-位にメチル基を持つ 2'-デオキシヌクレオシド類で上記の概念(仮説)の妥当性を検証した。

合成は Moffatt らの方法¹⁾で D-グルコースから 4-C-ヒドロキシメチル-D-リボフラノース誘導体を合成し、それを 4-C-メチル-D-リボースに変換し、核酸塩基と縮合させて 4'-C-メチルヌクレオシド類を合成した(スキーム 1)³⁾。

4'-C-メチルヌクレオシド類では 3'-OH を持つ 2'-デオキシ体(4'Md-N)が生物活性を持つが、[中でもシチジン体(4'Md-C)が強い抗 HIV-1 活性(EC₅₀)と強い細胞毒

^{*1} 4'-位置置換ヌクレオシドの略名は糖部と核酸塩基との間にハイフンを入れてある。例えば、4'Sd-N の 4'Sd は 4'-位に置換基を持つ 2'-デオキシ体を表し、N はヌクレオシドを表し、4'Ed-2FA の 4'Ed は 4'-位に ethynyl 基を持つ 2'-デオキシ体を示し、2FA は 2'-位に F を持つアデニンを表す。

^{*2} ヌクレオシドがプロウイルス DNA 生合成のチェインターミネーターとなるためには、3'-OH を持たない 2',3'-ジデオキシ(dd-)構造が必須であると考えられていた。

^{*3} 1960-70 年代、多くの有機化学者は、より優れた活性を求めて核酸系抗生物質(生理的ヌクレオシドが一箇所だけ修飾されたものがほとんど)の修飾を行ったが、すべて元の抗生物質の活性すらを失う結果に終わった。これが当時、核酸有機化学の活性を低下させた主要原因である。しかし、この結果は、生理的ヌクレオシドを二箇所以上修飾すると生体酵素はこれをヌクレオシドとして認識しなくなるためであり、逆に、2箇所以上修飾するとヌクレオシドの毒性を軽減できることを示唆している。

4'Md-Cは強い抗 HIV-1 活性を持つが、細胞毒性が強いので抗ウイルス薬としては使えない。しかし、抗腫瘍薬としての可能性はある。そこで研究を進めたところ、4'Md-CはDNAポリメラーゼのチェインターミネーターであること、マウス実験では白血病の治療薬であるAraCより若干優れた延命効果をもつことがわかった⁴⁾。

次に、4'Sd-N の抗 HIV-1 活性と毒性に対する 4' 位

Structure	Base	EC ₅₀ (μM)*	CC ₅₀ (μM)	S.I.=CC ₅₀ /EC ₅₀
4'Md-N	Ad	2.6	2.6	1.0
	Th	7.2	104	14
	Cy	0.072	0.13	1.8
	Pu	1.9	>200	>100
4'Md4-N	Ad	>500	>500	~1
	Th	21	330	16
	Cy	350	350	1
4'Mdd-N	Ad	30	400	13
	Th	>500	>500	~1
	Cy	27	27	1
AZT		0.001	>20	>2020
ddA		47	>500	>11
ddT		4.1	>500	>120

*Anti-HIV activity was determined by MTT assay. MT-4 cells and HIV-1_{LA1} were employed.

Compound	EC ₅₀ (μ M) ^a	CC ₅₀ (μ M)	S.I.
4'-C-Cyanothymidine	0.002	1	500
4'-C-azidothymidine	0.01	8	300
4'-C-ethynylthymidine	0.83	>400	>482
4'-C-ethynylarabinofuranosylthymine	119	>400	>3.4
4'-C-azidomethylthymidine	2.1	333	159
4'-C-methylthymidine	7.2	104	14
4'-C-ethylthymidine	>400	400	ND ^b
4'-C-methoxythymidine	8.49	200	24
4'-C-vinylthymidine	>400	>400	ND
4'-C-hydroxymethylthymidine	7.0	>400	>57
4'-C-propylthymidine	>100	>100	ND
4'-C-Cyano-2'-deoxycytidine	0.0012	0.17	142
4'-C-azido-2'-deoxycytidine	0.004	0.21	52
4'-C-ethynyl-2'-deoxycytidine	0.0048	2.2	458
L-4'-C-ethynyl-2'-deoxycytidine	>400	>400	ND
4'-C-ethynyl-2'-deoxy-5-fluorocytidined	0.02	5.0	250
4'-C-ethynylarabinofuranosylcytidine	0.043	2.0	46.5
4'-C-methyl-2'-deoxycytidine	0.015	1.0	66.7
4'-C-fluoromethyl-2'-deoxycytidine	0.0068	0.12	18
4'-C-methyl-2'-deoxyadenosine	2.6	2.6	1
4'-C-azido-2'-deoxyadenosine	0.13	50	385
4'-C-ethynyl-2'-deoxyadenosine	0.098	16	1630
2',3'-dideoxy-3'-thia-L-cytidine (3TC)	0.10	>100	>1000
3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT)	0.0032	29.4	9190

^a Anti-HIV activity was determined by MTT assay. MT-4 cells and HIV-1_{LAI} were employed
^b not determined

Scheme 2 Synthetic pathway of 4'Ed-pN and 4'CNd-pN from 2'-deoxypurine nucleoside.

Table 3 Anti-HIV activity of 4'CNd-pN.

Structure	Base	EC ₅₀ (μM) ^a	CC ₅₀ (μM)	S.I.=CC ₅₀ /EC ₅₀
	A	0.051	12	235
	I	0.051	23	451
	2AA ^b	0.00079	>0.034	>43
	G	0.000188	>0.034	>181
AZT		0.0032	29.4	9188

^a Anti-HIV activity was determined by MTT assay. MT-4 cells and HIV-1_{LAI} were employed

^b 2-aminoadenine

の置換基の役割を知り、より優れた抗 HIV-1 ヌクレオシドを創出する目的で、4'位の置換基と核酸塩基の種類、それらの組み合わせを変えたヌクレオシド類を合成し、生物活性を研究した(表 2)*⁴。

この研究により、4'-位の置換基は立体的にかさ高くないものほど、また塩基はプリンがピリミジンより優れた選択性指数(S.I.=CC₅₀/EC₅₀)を持つという傾向を掴んだ。そこで、4'-位の置換基としてニトリルとエチニル基を選び、種々の塩基をもつ4'Sd-N誘導体を合成して、再度それらの生物活性を調べた。

上述のD-グルコースを4-C-置換-D-リボースに変換して核酸塩基と縮合する方法は多種類の4'Sd-Nを合成する目的には優れた方法であるが、経路が長く、塩基との縮合反応*⁵や2'-OHのデオキシ化など困難な反応があり、収率が悪い^{10,11}。それゆえ、4'-ニトリルプリン

体(4'CNd-pN)と4'-エチニルプリン体(4'Ed-pN)の合成は、2'-デオキシヌクレオシドを原料とする方法^{12,13}を採った(スキーム 2)。

4'CNd-pNは優れた抗 HIV-1 活性を持つものもあるが、いずれも毒性が高く抗ウイルス薬にはなり得ないと判断した(表 3)。

一方、4'Ed-Nではシトシン体が高い抗 HIV-1 活性を有していたが、毒性も高かった。その5-F体(4'Ed-5FC)は、若干抗 HIV-1 活性が低下したがT細胞に対する毒性非常に低くなり、優れた選択性指数を示した(表 4)。これは、核酸塩基の5位と糖の4'位の2箇所を修飾したことの効果によると思われる*³。しかし、他の細胞系では毒性を示した(ヤマサからの私信)ので抗 HIV-1 薬としての研究を断念した。プリン誘導体は抗 HIV-1 活性が高く、かつ毒性も低く、S.I.も満足できるものであった。さらに、耐性 HIV-1 に対しても高い活性を示した(表 5)。4'Ed-GはHela細胞に対して毒性を示した(CC₅₀=52 μM)ので毒性が予想されたが、4'-エチニル-2'-デオキシプリン誘導体(4'Ed-pN)のマウス毒性試験を実行した。

4. 4'Ed-pNのマウス毒性試験結果¹⁰

4'Ed-pNのマウス毒性試験の結果を図 4 に示す。2-

*⁴ 我々とほぼ同時にシンテックスグループ¹²が、かなり遅れて北大グループ¹³が同様の研究を行っている。

*⁵ 4'-位に置換基を持つD-リボフラノース誘導体のアノマー位は反応性が低い、4'-位にCN基を持つD-リボフラノースは、その電子吸引性のため特に反応性が低い。一方、4'Sd-Nは、酸、フォスホリラーゼに対して安定である。それゆえ、酵素を用いた塩基の交換反応による4'Sd-Nの合成は難しいと思われる。これは、4'Sd-Nは4'-位の置換基と3'-OHとの立体障害をさけるため、フラノース環が3'-エンド型(N-type)コンフォメーションをとるためと考えられる。

Table 4 Anti-HIV activity of 4'Ed-N.

Structure	Base	EC ₅₀ (μ M) ^a	CC ₅₀ (μ M)	S.I.
	T	0.61	>380	>623
	5IU	0.34	>260	>765
	5MeC	0.011	0.70	63
	AraC	0.0048	1.74	363
	C	0.0048	0.92	192
	5FC	0.030	>100	>3333
	A	0.012	11.7	1071
	I	0.15	216	1440
	2AA ^b	0.0003	0.82	2733
	G	0.0014	1.5	975
AZT		0.01	>20	>2000
ddA		47	>500	>11
ddT		4.1	>500	>120

^aAnti-HIV activity was determined by MTT assay. MT-4 cells and HIV-1_{LA1} were employed.^b2-aminoadenine

Table 5 Anti-HIV activity of 4'Ed-N.

Compound	EC ₅₀ (μ M)*									CC ₅₀ (μ M)
	HXB2	KH65R	L74V	41/215	M184V	M184I	41/69/125/SG	MDR	Y181C	
4'Ed-C	0.0012	0.0008	0.0013	0.006	0.024	0.0026	0.015	0.0012	0.0021	> 200
4'Eara-C	0.0071	0.015	0.026	0.026	0.71	0.48	0.17	0.0079	0.016	> 200
4'Md-C	0.0058	0.0071	0.0062	ND	0.2	0.74	ND	0.0033	ND	> 200
4'Ed-I	0.81	0.25	0.61	1.3	16.6	1.5	2.2	0.51	ND	> 200
4'Ed-A	0.008	0.0033	0.004	0.012	0.047	0.022	0.065	0.0062	0.011	> 200
4'Ed-2AA	0.0014	0.00035	0.0007	0.0017	0.0059	0.0027	0.0041	0.001	0.0008	> 200
4'Ed-G	0.007	0.001	0.0012	0.019	0.008	0.0041	0.0068	0.0048	0.01	52
AZT	0.022	0.02	0.02	0.3	0.01	0.017	1.6	15.3	0.014	> 100
3TC	0.71	ND	ND	ND	> 100	> 100	9.9	1.1	ND	> 100

*Anti-HIV activity was determined with the MAGI assay. *HeLa*-CD4-LTR- β -gal cells were employed.
ND; not determined.

アミノアデニン体(4'Ed-2AA)とグアニン体(4'Ed-G)は非常に毒性が高く、経口、静注とも 3 mg/kg でマウスが 4 日以内で死亡した。一方、アデニン体(4'Ed-A)とヒポキサンチン体(4'Ed-I)は経口、静注とも 100 mg/kg まですべてのマウスが生存した。

このマウス毒性試験中に、これらアデニン誘導体は生体中のアデノシンデアミナーゼの作用を受け、4'Ed-

Fig. 4

2AA は 4'Ed-G に、4'Ed-A は 4'Ed-I に容易に変換されることを見出した(図 4)。これは 4'Ed-2AA および 4'Ed-A などのアデニン誘導体の生体への毒性は、動物実験では明らかにできないことを意味する。

5. アデノシンデアミナーゼに安定な 4'Ed-A 誘導体の調製とその抗 HIV-1 活性¹⁵⁾

4'Ed-A は生体中でアデノシンデアミナーゼにより抗 HIV-1 活性の低い 4'Ed-I に変換されるが、マウス毒性

a: Ac₂O, Et₃N, DMAP, MeCN, b: for X=F; tert-BuONO, HF-Py, c: for X=Cl; benzyltriethylammoniumnitrite, AcCl, CH₂Cl₂, d: NH₄OH, MeOH

Scheme 3 Synthetic pathway of 4'Ed-2haloA from 4'Ed-2AA.

Table 6 Anti-HIV activity of 4'Ed-2FA.

HIV	Compound	EC ₅₀ (nM)	CC ₅₀ (nM)	S.I.
Wild-type	4'Ed-2AA	0.34	900	2,600
	4'Ed-2FA	0.068	7,500	110,000
	AZT	3.2	29,400	9,190
M184V	4'Ed-2FA	3.1
	AZT	16.0		
MDR	4'Ed-2FA	0.15		
	AZT	15,300.00		

を示さなかったことがアデノシンデアミナーゼに安定な 4'Ed-A 誘導体の生物学的評価研究を行うきっかけとなった。

2 位がハロゲン置換されたアデニン誘導体はアデノシンデアミナーゼに安定であることが知られている¹⁴⁾。そこで 2'-deoxy-4'-C-ethynyl-2-fluoroadenosine (4'Ed-2FA) を合成し、それらの抗 HIV-1 活性、アデノシンデアミナーゼに対する安定性とマウス毒性を研究することにした。合成は 4'Ed-2AA から行った(スキーム 3)^{14b)}。

4'Ed-2FA は 4'Ed-2AA をしのぐ非常に優れた抗 HIV-1 活性を有しており、多剤耐性 HIV-1 (MDR) を含

Fig. 5 Stability of 4'Ed-2FA against adenosine deaminase.

Fig. 6 Stability of 4'Ed-2FA under acidic conditions (pH 1.06 at 24 °C).

むすべての HIV-1 に対して非常に高い活性を示し、S.I.は 110,000 という素晴らしいものであった(表 6)。これは 4'Ed-2FA がアデニンの 2'-位と糖の 4'-位の 2 箇所修飾されているためと考えられる^{*3}。

さらに、アデノシンデアミナーゼに対して 4'Ed-A が完全にデアミネーションされる条件でも全く安定であり(図 5)、胃中での

酸性条件(pH 1.06)にかなり安定であった(図 6)^{*3}。

筆頭著者はマウス毒性も低いと期待したが、共同研究者らは先のプリン誘導体の毒性試験結果と 2-fluoroadenosine (2FA) 自身が毒性をもつこと(ソリブジン事件が頭にあり^{*6})、さらに、以下に記述する 3'-OH の生物活性に対する役割に関する 2 つの論文の出現などを理由にマウス毒性試験を躊躇した。

6. “3'-OH は抗 HIV-1 ヌクレオシドの毒性の原因である”という論文^{16), 17)}の出現

そうこうしている間に、3'-OH の生物活性への役割に関する非常に重要な 2 つの論文が現れた。1 つは昭和大学薬学部の田中先生らによる「3'-OH を持たない 2', 3'-didehydro-3'-deoxy-4'-C-ethynylthymidine (4'Ed4-T) が、d4T より優れた抗 HIV-1 活性と低い毒性を持つ(表 7)」という報告である¹⁶⁾。

これは、上述した我々の 3'-OH を持つ 4'Md-T は抗 HIV-1 活性を持つが、3'-OH を持たない 4'Mdd-T と 4'Md4-T は抗 HIV-1 活性を持たないという結果³⁾や、シンテックスグループの 4'-C-azidothymidine (4'N₃-T) は強い抗 HIV-1 活性を持つが 4'-C-azido-3'-deoxythymidine (4'N₃dd-T) と 4'-C-azido-2', 3'-didehydro-3'-deoxythymidine (4'N₃d4-T) は抗 HIV-1 活性を持たないという結果^{13a)}、つまり、いずれも抗 HIV-1 活性には 3'-OH が必要という結果、と異なるものであり、4'Sd-N の抗 HIV-1 活性への 3'-OH の役割に大きな問題を投げ掛けた重要な研究である。しかし、論文には記載されていない、「4'Ed4-T に耐性 HIV-1 が発現するか否か?」また「4'Ed4-T の現存する耐性 HIV-1 に対する活性はどのようなか?」、が非常に興味深く重要な点である。

他の論文¹⁷⁾は V. E. Marquez と H. Mitsuya らによる「細胞系で 3'-OH を持つ 4'Ed-C は強い抗 HIV-1 活性と強い細胞毒性を示すが、3'-OH を持たない 4'Edd-C は抗 HIV-1 活性も毒性も示さない。しかし 4'Edd-C の

*6 帯状疱疹の治療薬ソリブジン [SRV, β-D-arabinofuranosyl-5-(2-trans-bromovinyl)uracil] を投与した 5FU 使用がん患者が死亡した事件。ソリブジンの代謝物である 5-プロモビニルウラシルが 5FU の代謝酵素を阻害するため、過剰となった 5FU の毒性により死亡したもの。

Table 7 Anti-HIV activity of 4'Ed4-T¹⁶⁾

	EC ₅₀ (μg)	CC ₅₀ (μg)
4'Ed4-T	0.20	>100
d4T	2.8	100
4'Edd-T	>100	>100

5'-O-トリリン酸体(4'Edd-C-TP)は、酵素系では野生 HIV-1 の RT を強く阻害することを見出し、3'-OH は 5'-OH のキナーゼによるリン酸化に重要な役割を果たしているが、3'-OH を持つ 4'Ed-C-TP は DNA ポリメラーゼの基質となるため、強い毒性をもつ、すなわち 3'-OH は毒性の原因であるという報告である。

いずれの研究も 3'-OH は毒性の原因であるので不必要というものである。筆頭著者の概念(仮説)からすると、これら 3'-OH を持たない 4'E 体には耐性 HIV-1 の発現が予想されるが、これら 2つの研究は 3'-OH の生物活性への役割に問題を投げ掛けた非常に重要な研究である。

7. 4'Edd-2F, 4'Ed4-2FA, 4'Ed-2CIA の合成と耐性 HIV-1 に対する活性評価¹⁵⁾

上記の 2 論文に触発されて、これまでに最も優れた抗 HIV-1 活性を持つ 4'Ed-2FA の d4-体(4'Ed4-2FA), dd-体(4'Edd-2FA), さらに、2-クロロアナログ(4'Ed-2CIA)の合成と生物活性試験を行った。

4'Ed4-2FA, 4'Edd-2FA とともに抗 HIV-1 活性を有しているが、4'Ed-2FA と比べるとはるかに低く、特に耐性 HIV-1 に対する活性は低かった(表 8)。これは 3'-OH があるか否かによる生体キナーゼによる 5'-OH のリン酸化の差と、HIV-1 によるトリリン酸体(TP)の識別の

Table 8 Anti-HIV activity of 4'E-2haloA.

4'Ed-2FA	4'Ed-2CIA	4'Ed4-2FA	4'Edd-2FA
Compounds	Anti-HIV activity (μM)*		
	HIV-1 _{wild}	HIV-1 _{MDR}	HIV-1 _{M184V}
4'Ed-2FA	0.00020	0.00014	0.0031
4'Ed-2CIA	0.0019	0.0084	0.01
4'Ed4-2FA	0.80	0.15	1.8
4'Edd-2FA	0.94	8.7	97
AZT	0.022	15.3	0.01
3TC	0.71	1.1	>100

*Anti-HIV activity was determined with the MAGI assay.

差によると思われる。4'Ed-2CIA は 4'Ed-2FA と比べると抗 HIV-1 活性は低下したが、耐性 HIV-1 に対しても十分な活性を有しており(表 8), S.I. は 330,000 であった。これらの結果は、概念(仮説)の妥当性を支持しており、4'Ed-2CIA が 4'Ed-2FA と同様に優れた抗 HIV 薬としての可能性を持つことを示している。

8. 4'Ed-2FA のマウス毒性試験結果¹⁵⁾

4'Ed-2FA のマウス毒性は経口、静注とも 100 mg/kg まですべてのマウス(8 匹)が生存し、プラセボと全く変わらず、下痢や体重の減少なども見られず、急性毒性は皆無であった。抗 HIV-1 活性、S.I., アデノシンデアミナーゼおよび酸に対する安定性に加えて、このマウス毒性試験結果は 4'Ed-2FA の臨床薬としての可能性を強く示唆するものである。

4'Ed-2FA の細胞内動態¹⁸⁾

核酸系逆転写酵素阻害剤の毒性の主要原因は、DNA ポリメラーゼ、特に γ に対する阻害であることが知られている。臨床試験に先立って DNA ポリメラーゼの阻害と細胞内動態の研究が必要である。4'Ed-2FA-TP は DNA ポリメラーゼ α, β に対しては EC₅₀ が 200 μM 以上、γ に対しても 10 μM(ddA-TP の 0.2 μM に比べてはるかに高い)であり、毒性は低いと予想させた。トリチウム標識 4'Ed-2FA を用いた細胞内動態研究の結果、4'Ed-2FA-TP の血漿半減期は 18 時間であり、AZT-TP の 3 時間に比べてはるかに長かった。これは 4'Ed-2FA が生体中で安定であるためと考えられる^{*3,5)}。

おわりに

4'Ed-2FA は多剤耐性 HIV-1 を含むすべての HIV-1 に対して高い活性を有し、マウス急性毒性がなく、DNA ポリメラーゼ γ の阻害活性が低い、血漿半減期も長いので、1 日 1 回の少量投与が可能で、かつ副作用が低い薬剤である可能性を持っている。臨床試験の結果が待たれる。

筆頭著者を中心とする研究概念(仮説)の妥当性を検証する研究はこれまでである。さらなる研究と、より優れた抗 HIV 薬の開発研究は皆さんにお任せしたい。

謝 辞 本研究は参考文献に名前が記載されている多くの研究者との共同研究で遂行されたものである。共同研究者に心から感謝申し上げます。

(2006 年 1 月 5 日受理)

文 献

- 1) R. D. Youssefyeh, J. P. Verheyden, I. G. Moffatt, *J. Org. Chem.*, **44**, 1301 (1979)
- 2) T. Waga, T. Nishizaki, I. Miyakawa, H. Ohru, H. Meguro, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 1433 (1993)

- 3) T. Waga, H. Ohri, H. Meguro, *Nucleosides & Nucleotides*, **15**, 287 (1996)
- 4) T. Yamaguchi, A. Tomikawa, T. Hirai, T. Kawaguchi, H. Ohri, M. Saneyoshi, *Nucleosides & Nucleotides*, **62**, 736 (1997)
- 5) R. Yamaguchi, T. Imanishi, S. Kohgo, H. Horie, H. Ohri, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 736 (1999)
- 6) S. Kohgo, H. Horie, H. Ohri, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 1146 (1999)
- 7) H. Ohri, S. Kohgo, K. Kitano, S. Sakata, E. Kodama, K. Yoshimura, M. Matsuoka, S. Shigeta, H. Mitsuya, *J. Med. Chem.*, **44**, 4516 (2000)
- 8) E. Kodama, S. Kohgo, K. Kitano, H. Machida, H. Gatanaga, S. Shigeta, M. Matsuoka, H. Ohri, H. Mitsuya, *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, **45**, 1539 (2001)
- 9) H. Ohri, H. Mitsuya, *Current Drug Targets-Infectious Disorders*, **1**, 1 (2001)
- 10) S. Kohgo, K. Yamada, K. Kitano, Y. Iwai, S. Sakata, N. Ashida, H. Hayakawa, D. Namei, E. Kodama, M. Matsuoka, H. Mitsuya, H. Ohri, *Nucleosides, Nucleotides, & Nucleic Acids*, **23**, 671 (2004)
- 11) H. Hayakawa, S. Kohgo, K. Kitano, N. Ashida, E. Kodama, H. Mitsuya, H. Ohri, *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, **15**, 169 (2004)
- 12) (a) C. Oyang, H. Wu, E. B. Frasersmith, K. Walker, *Tetrahedron Lett.*, **33**, 37 (1992); (b) H. Maag, R. M. Rydzewski, M. J. Mcroberts, D. Crawfordruth, J. Verheyden, E. J. Prisbe, *J. Med. Chem.*, **35**, 1440 (1992); (c) C. Oyang, W. Kurz, E. M. Eugui, M. J. McRoberts, J. Verheyden, L. J. Kurz, K. Walker, *Tetrahedron Lett.*, **33**, 41 (1992)
- 13) (a) I. Sugimoto, S. Shuto, S. Mori, S. Shigeta, A. Matsuda, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9**, 385 (1999); (b) M. Nomura, S. Shuto, M. Tanaka, T. Sasaki, S. Shigeta, A. Matsuda, *J. Med. Chem.*, **42**, 2901 (1999)
- 14) (a) J. A. Montgomery, K. Hewson, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 4559 (1957); (b) R. W. Brockman, F. M. Schsbel, Jr., J. A. Montgomery, *Biochemical Pharmacology*, **26**, 2193 (1977); (c) S. Shuto, T. Obara, H. Itoh, Y. Kosugi, Y. Saito, M. Toriya, S. Yaginuma, S. Shigeta, A. Matsuda, *Chem. Pharm. Bull.*, **42**, 1688 (1994)
- 15) 向後悟, 大類洋, 児玉栄一, 松岡雅雄, 満屋裕明, 特開平, WO 2005/090349
- 16) K. Haraguchi, S. Takeda, H. Tanaka, T. Nitanda, M. Baba, G. E. Dutschman, Y-C. Cheng, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13**, 3775 (2003)
- 17) M. A. Siddiqui, S. H. Hughes, P. L. Boyer, H. Mitsuya, Q. N. Van. C. George, S. G. Sarafinanos, V. E. Marquez, *J. Med. Hem.*, **47**, 5042 (2004)
- 18) (a) 中田浩智, 天野将之, 関康博, 児玉栄一, G. Yang, 向後悟, 早川弘之, 大類洋, 松岡雅雄, Y-C. Chen, 満屋裕明, 日本エイズ学会誌, **7**, 201 (2005)

PROFILE

大類 洋 横浜薬科大学・教授(東北大学名誉教授)

〔経歴〕1965年東京大学農学部農芸化学学科卒業, 1965年宇部興産株式会社入社, 1966年理化学研究所入所, 1981年東北大学農学部食糧化学科助教授, 1998年東北大学大学院農学研究科教授, 2001年東北大学大学院生命科学科教授, 2005年東北大学停年退職, 2006年横浜薬科大学教授。〔専門〕生物有機化学, 分析化学。〔連絡先〕e-mail: [redacted]

他機関賞のお知らせ

徳山科学技術振興財団 平成 19 年度研究助成の募集

(財)徳山科学技術振興財団は平成 19 年度(第 19 回)研究助成の募集をしています。詳細は下記ホームページをご参照, あるいは下記連絡先へお問い合わせ下さい。

1. 助成対象: 無機材料, 有機材料, 高分子材料, 複合材料, その他の分野で, 新規材料開発の基礎ならびに応用を指向する独創的な研究。大学等に常勤する 45 歳未満の研究者。
2. 助成額: 1 件最高 200 万円(15 件程度)
3. 応募方法: 所定の申請書に必要事項記載。学長, 学部長または研究所長の推薦が必要。
4. 応募締切: 平成 18 年 8 月 1 日～9 月 30 日必着
5. ホームページ: <http://www.tokuyama.co.jp/zaidan/>

連絡先: 150-8383 東京都渋谷区渋谷 3-3-1 渋谷金王ビル (財)徳山科学技術振興財団

(TEL 03-3499-8483, FAX 03-3499-8958, e-mail: zaidan@tokuyama.co.jp)