

主論文の要旨

**Discovery of 4-oxoquinolines, a new chemical class
of anti-HIV-1 compounds**

〔 抗 HIV-1 活性を有する新規 4 - オキソキノリン誘導体の発見 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
免疫不全統御学講座 免疫不全統御学分野

(指導：岩谷 靖雅 教授)

城石 智未

【緒言】

HIV-1 (Human immunodeficiency virus type 1) は後天性免疫不全症候群 (AIDS) の原因ウイルスである。この 30 年間で抗 HIV-薬として、核酸系逆転写酵素阻害剤 (NRTI)、非核酸系逆転写酵素阻害剤 (NNRTI)、プロテアーゼ阻害剤 (PI)、エントリー阻害剤、インテグラーゼ阻害剤 (INSTI) の 5 クラス約 40 剤の薬剤が承認されている。とりわけ近年では、強力な抗 HIV-1 活性と良好な認容性を持つラルテグラビル (RAL)、エルビテグラビル (EVG) 及びドルテグラビル (DTG) 等の INSTI を中心とした多剤併用療法 (ART) が標準治療法となっている。これらの治療効果と安全性が飛躍的に改善され、HIV-1 感染者の予後は飛躍的に改善した。しかし、現行の ART では根治には至らず、ART 下でも体内にはウイルスが潜伏することから、感染者は終生にわたる ART が余儀なくされている。本研究では、ART の長期化に伴う副作用や耐性ウイルスの出現を見据え、既存薬の代替となる新規作用機序をもつ抗 HIV 薬の探索を行った。

【方法】

HIV-1 の感染価の測定には、HIV-1 の転写制御配列である LTR (Long terminal repeat) の下流にルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだ R5-MaRBLE レポーター細胞を用いた。感染が成立し、HIV-1 が発現する転写制御因子 (Tat 蛋白質) 量に依存し細胞内ルシフェラーゼ発現量が増加する原理である。本細胞に HIV-1 JR-CSF 株を 2 時間感染し、各化合物の希釈系列を含む培養液を感染細胞に添加した。感染 7 日後に、細胞内ルシフェラーゼ活性を測定することで化合物の抗ウイルス活性 (EC₅₀: 50%阻害濃度) を評価した。同時に、本細胞に対する各化合物の細胞毒性 (CC₅₀: 50%毒性濃度) 及びインテグラーゼ酵素による遺伝子組込み活性 (INST) の阻害効果を測定した。さらに、ヒット化合物については、ICR マウスに 40 mg/kg 単回経口投与し、投与後 1 及び 4 時間後の血中の化合物濃度を高速液体クロマトグラフィーにて測定した。

良好な抗ウイルス活性及び体内動態を示した化合物について、ヒト初代細胞である末梢血単核細胞 (PBMC) にて抗 HIV-1 活性を評価した。PBMC に HIV-1 JR-CSF 株を 4 時間感染し、各希釈化合物を感染細胞に添加した。感染 11 日後に培養上清中の p24 抗原量を測定し、産生ウイルス量とした。

異なる遺伝子型 (サブタイプ) の HIV-1 株及び PI 耐性株、INSTI 耐性株、多剤耐性株に対する EC₅₀ を R5-MaRBLE 細胞を用いて解析した。

化合物の作用点を絞り込むために、感染細胞への化合物添加時間を変化させ、抗 HIV-1 活性を測定する、Time-of-addition 試験を実施した。TZM-bl レポーター細胞に HIV-1 NL4-3 株を 30 分間感染し、非感染ウイルスを洗浄除去した後、経時的 (1、2、4、6、8、10、12、14 及び 16 時間後) に各化合物 5 µM を添加した。感染から 24 時間後、ルシフェラーゼ活性を測定した。初期転写に対する影響については、HIV-1 潜伏感染細胞である OM10.1 細胞を用いた。各化合物存在下で TNF-α 刺激による上清へのウイルス産生量 (p24 抗原量) を測定し、初期転写に対する影響を評価した。

【結果】

12,058 種の低分子化合物ライブラリーから抗 HIV-1 活性及び抗 INST 活性を有する化合物を評価した。その結果、抗 INST 活性を示さないが抗ウイルス活性を示す ($EC_{50}=1\sim 54\ \mu\text{M}$) 4-オキソキノリン誘導体を見出した (Fig 1 及び Table 1)。本化合物群は選択比 (CC_{50} / EC_{50}) が >2500 と高く、マウスにおいて良好な薬物動態を示した (Table 1)。PBMC を用いた抗ウイルス評価においてもスクリーニング時と同様の抗ウイルス効果 ($EC_{50} = 7\ \mu\text{M}$) を示した。

異なるサブタイプの HIV-1 に対して抑制効果 ($EC_{50}=1\sim 981\ \mu\text{M}$) を示し、種々の耐性株に対する EC_{50} 値は野生株に対する EC_{50} 値とほぼ同等 (上昇比 0.5~5.0) であった (Table 2、3、及び 4)。

TZM-bl 細胞を用いた Time-of-addition 試験において、対照薬のアジドチミジン (AZT: NRTI)、エファビレンツ (EFV: NNRTI)、RAL 及び EVG は感染 6~12 時間以降の薬剤添加では抗ウイルス活性を示さないのに対し、本化合物は 16 時間でも抗ウイルス効果を示した (Fig 2)。TNF- α で誘導した OM10.1 細胞において、本化合物は対照薬の AZT、EVG 及び RAL と異なり用量依存に p24 抗原の産生量を低下させた。

【考察】

本研究において、4-オキソキノリン母格の 1 位にフルオロフェニルもしくはその誘導体、7 位に窒素含有ヘテロ環を有する新規な 4-オキソキノリン化合物群が強力な抗 HIV-1 効果を示すことを見出した。興味深いことに、3 位にカルボキシル基もつ 4-オキソキノリンの誘導体は EVG であるが、本研究で見出した化合物群は異なる化合物の構造要件を有していた。EVG は 3 位カルボキシル基と 4 位ケトンによる β -ジケト構造によりインテグラーゼの活性中心に存在する 2 価カチオン (Mg^{2+}) をキレートし、酵素活性を阻害するが、今回見出した化合物は 3 位カルボキシル基を必須とせず、抗 INST 効果を有さなかった。それを裏付けることとして、既知の EVG 耐性ウイルスに交叉耐性を示さなかった。

INSTI 以外の 4-オキソキノリン母格を有する抗 HIV 化合物の報告として、Tat を介した転写を阻害するフルオロキノロン誘導体の K-12、K-13 及び 6-デスフルオロキノロンが報告されている。今回見出した 4-オキソキノリンは、Time-of-addition 試験の結果から、インテグレーションより後期の過程に作用することが示唆された。さらに、OM10.1 細胞を用いた抗ウイルス活性評価では TNF- α によるウイルス遺伝子の転写活性もしくは既報と同様の Tat を介した転写活性化を阻害する可能性は否定できない。しかしながら、既報の化合物はいずれも生理活性を示すために 3 位カルボキシル基が必要であり、本研究で見出した化合物は新規の構造を有する低分子化合物群であった。

【結語】

本研究では、R5-MaRBLE 細胞を用いた抗ウイルス阻害効果の評価により低分子化

合物ライブラリーをスクリーニングした。その結果、強力な新規抗 HIV 化合物、4-オキソキノリン誘導体を見出した。化合物の分子標的タンパク質の同定には至っていないが、本化合物は HIV-1 潜伏感染細胞における p24 抗原の産生を有意に低下させることから、その作用点はウイルス遺伝子の初期転写過程にあることが考えられる。これらの知見は、新規作用機序をもつ抗 HIV-1 活性を有する新規化合物のさらなる開発にとって重要である。