

論文の内容の要旨

論文題目 Studies on Antiretroviral Arylpiperazinyl Fluoroquinolones
(抗レトロウイルス活性を有するアリルピペラジニル
フルオロキノロン化合物に関する研究)

氏 名 柏 瀬 裕 人

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) は後天性免疫不全症候群 (AIDS) の病原体として知られ、その性状からレトロウイルス科レンチウイルス属に分類されている。HIV は、さらに表面糖タンパクの抗原型によって HIV-1 及び-2 に分類されている。AIDS は $CD4^+$ リンパ球数の減少を主徴とする病気であり、これに伴って宿主免疫機能が低下し、主にカリニ肺炎等の日和見感染症やカポシ肉腫、悪性リンパ腫等を併発する致死的な疾患である。HIV 感染は今や世界の人口に影響を与える脅威となっている。

HIV の同定以来、HIV 感染に対する化学療法剤の研究が精力的になされ、現在では核酸系逆転写酵素阻害剤 6 剤 (本邦では 5 剤)、非核酸系逆転写酵素阻害剤 3 剤 (本邦では 1 剤)、HIV プロテアーゼ阻害剤 5 剤が既に上市され、臨床で使用されている。特に複数の薬剤を同時に用いる HAART (highly active antiretroviral therapy) の導入以降、先進国では AIDS 関連疾患患者数及び AIDS による死亡者数は激減していることが報告されている。しかしながら、①HAART に要する費用は患者ひとり当り 12,000 米ドルと高価なため、発展途上国に住む大多数の患者 (全体の約 95%) が治療を受けられないこと、②薬剤耐性ウイル

スの出現、薬の副作用、複数の治療薬の服薬習慣遵守が困難なこと等が原因で治療効果が上がらない症例が多いこと、③現行の治療法では体内からのウイルス排除はできないこと等、現行の治療法には限界がある。このような背景から、新しい作用機作を有するか薬剤耐性ウイルスに対しても効果があり、安全で安価な治療薬の開発が待望されている。

キノロン系化合物は抗菌活性を持つ抗生物質として広く使用されている。最近、ある種のキノロン系抗生物質が抗 HIV 活性を併せ持つことが報告され、安価で新しいタイプの抗 HIV 剤として利用できる可能性が示された。

本研究は抗 HIV 活性を有するキノロン系化合物を HIV 感染症の治療薬に資することを最終目的として二部から構成され、第一部においてキノロン系化合物のスクリーニングにより抗 HIV 活性を有する新規化合物を発見し、化学修飾により抗 HIV 活性を増強させることを試みた。また、現状の抗 HIV 剤の開発では割愛されている生体内での薬効評価は、HIV に近縁の動物ウイルスを用いることにより成し得る可能性がある。そこで、第二部ではネコ免疫不全ウイルス (FIV) の定量系を確立した上で、キノロン系化合物の抗 FIV 活性を評価するとともにその作用機作の解析を行った。

第一部 新規抗 HIV アリルピペラジニルフルオロキノロンに関する研究

ある種のキノロン系抗生物質が抗 HIV 活性を有することが示されたことを受け、三共株式会社の有する化合物ライブラリーのうち、キノロン系化合物の抗 HIV 活性を調べた。本スクリーニングにより、アリルピペラジニルフルオロキノロンの一種である R-71762 が HIV 増殖阻害剤として選択できた。本化合物は、急性感染細胞及び持続感染細胞のいずれにおいても HIV 増殖を阻害した。また、先に報告のあったキノロン系抗生物質 (norfloxacin, ofloxacin, enoxacin, ciprofloxacin, levofloxacin) は、少なくとも同一実験条件では全く抗 HIV 活性を示さなかった。

次に、R-71762 の抗 HIV 活性に重要な構造を特定し、且つ構造に多様性を持たせる目的で本化合物の誘導体を種々合成し、それら化合物の抗 HIV 活性について検討した。本検討を通して、キノロン環の 7 位ピペラジン窒素のアリル基による修飾が抗 HIV 活性に重要であることが判明した。また、誘導体のうちいくつかの化合物は親化合物である R-71762 よりも強い抗 HIV 活性を有していた。

これらの化合物は全て持続感染細胞において HIV の増殖を阻害したことから、HIV ゲノムの宿主染色体上への組み込み以降に本剤の作用点があり、逆転写酵素阻害剤とは作用機作が異なることが示唆された。実際、これらの化合物は逆転写酵素及び HIV プロテアーゼに対する阻害活性は有しておらず、現在上市されている薬剤とは作用機作が異なる新しいタイプの抗 HIV 剤であることが示され

た。

第二部 抗 HIV アリルピペラジニルフルオロキノロンの FIV 増殖抑制活性に関する研究

これまでの抗 HIV 剤は、その開発の緊急性や動物モデルの信頼性の問題等から、動物を用いた薬効評価試験を経ていない。しかしながら、臨床における適切な投薬プロトコルを検討するためにも、動物での薬効評価は抗 HIV 剤開発において重要と考えられる。抗 HIV 剤に関しては HIV の宿主域が障害となり、HIV そのものを用いた生体内薬効評価は現時点では困難である。代替法として近縁の動物ウイルス（サル免疫不全ウイルス（SIV）、HIV/SIV キメラウイルス、FIV 等）を用いた試験法が検討されている。中でも、①動物の取り扱い・入手の簡便さ、②ウイルスの細胞特異性や宿主免疫反応に拘らず持続感染するなどの特徴が HIV と共通であること、③少なくとも急性感染期における抗 HIV 剤の評価実績があること等の理由から、FIV/ネコ実験感染モデル系は薬効評価系として有用であると考えられる。

第一部で見出した抗 HIV アリルピペラジニルフルオロキノロン剤の生体内薬効を、FIV/ネコ感染モデル系を用いて評価することを目指して、これら化合物の抗 FIV 活性を調べた。評価に用いるウイルス定量系を確立するため、FIV p24 抗原に対するモノクローナル抗体（mAb）を作製した。まず、組換え p24 抗原を大腸菌内で産生させ、それを精製した。培養液当り 40 mg/l もの精製 p24 抗原を非常に簡便に得られ、本方法が FIV 感染の免疫学的診断用抗原の調製に有用であることが示された。本抗原を BALB/c マウスに免疫して mAb を作製し、12 種の mAb を得た。その内のひとつの F2710 抗体は、FIV p24 蛋白中の 7 アミノ酸配列 SFIDRLF を認識した。本配列は FIV 株間で非常に良く保存されていた。F2710 抗体とウサギ抗 p24 ポリクローナル抗体を用いて、直線性良好に FIVp24 抗原を定量するサンドイッチ酵素結合免疫固相アッセイ（ELISA）を確立した。本系の検出限界は 40 pg/ml であり、放射性同位元素を用いた逆転写酵素活性検出とほぼ同程度の感度であった。

本 ELISA 系を用いて、抗 HIV アリルピペラジニルフルオロキノロン剤の抗 FIV 活性を調べた結果、これらの化合物は FIV 持続感染細胞におけるウイルス増殖を阻害することが明らかとなり、FIV に対する抗ウイルス活性を確認できた。また、これらの薬剤が抗 FIV 活性を発揮するために、①キノロン環の 3 位のカルボキシル基が未修飾であること、②キノロン環の 7 位に結合させたピペラジンの 4 位が芳香族で修飾されていることが構造上必須であることが明らかとなった。これらの構造は、抗 HIV 活性にも必須であり、抗 HIV・抗 FIV 両活性を発揮する際の薬剤の標的分子が共通である可能性が示唆された。

より活性が強く且つ毒性の低い化合物をデザインするためには、これら化合物の作用機作を正確に理解することが必要である。そこで、抗 HIV・FIV 活性を有する化合物のひとつ R-91650 の作用機作を、FIV を用いて検討した。R-91650 は急性感染系及び持続感染系の双方で FIV 増殖を阻害した。さらに、持続感染細胞内外の p24 蛋白レベルを減少させたことから、ウイルス蛋白の産生そのものを阻害していることが示唆された。ノーザンプロット法により FIV mRNA の細胞内蓄積について検討したところ、R-91650 は FIV mRNA 特異的且つ用量依存的にその蓄積を阻害した。しかしながら、FIV-long terminal repeat (LTR) プロモーターを用いたレポーター解析において、本剤は抗ウイルス活性を示す濃度においては FIV のプロモーター活性を阻害しないことが明らかとなった。これらの結果から、R-91650 は FIV-LTR プロモーターの転写開始以降の段階に作用して FIV 増殖を阻害する新しいタイプの薬剤であることが示唆された。

本研究の結果は、新しいタイプの抗 HIV 剤であるアリルピペラジニルフルオロキノロンの治療剤としての可能性を探る上で、重要な知見を与えるものと考えられる。特に抗ウイルス活性を発揮するために構造上必須な修飾に関する知見は、より高活性・低毒性の誘導体を創出する上で重要な方向性を与えるものと考えられる。また、本化合物が FIV に対しても有効であることは、現在有効な薬剤が上市されていない FIV 感染症の治療にも本剤が応用できる可能性を示すものである。FIV/ネコ感染モデル系を用いた本剤の評価は、今後の重要な課題である。これら化合物の抗ウイルス作用機作は既存の薬剤とは異なることが示唆されたものの、完全な解明には至っていない。また、化合物の標的分子の同定も未解決のままである。正確な作用機作の推定は、より良い誘導体の創出に直結するものと考えられ、今後更なる検討を要する。