

学 位 論 文 題 名

Studies on the inhibitory activity of 5'-end modified
guanine-rich oligodeoxynucleotides against human
immunodeficiency virus type-1 infection *in vitro*

(グアニン塩基に富む5'末端修飾オリゴ核酸の
抗ヒト免疫不全ウイルス1型活性に関する研究)

学位論文内容の要旨

本論文は、エイズ治療の一助となる新規抗ヒト免疫不全ウイルス (H I V) 剤の開発を目指し、修飾オリゴ核酸の *in vitro* での抗H I V活性を評価しつつ活性向上に向けた誘導体の改良およびそのウイルス増殖阻害メカニズムを探索した研究をまとめたものであり、以下の三章からなる。

第一章では修飾オリゴ核酸S A - 1 0 4 2の抗H I V活性に関する研究をまとめた。本探索研究の当初の目的は、ウイルス由来のDNAおよびRNA、更にウイルス蛋白質の翻訳レベルでのウイルス増殖阻害効果を示すアンチセンス核酸の同定であった。標的部位としてウイルスの転写を強く促進させるT a tタンパクをコードする遺伝子に着目し、オリゴ核酸分子保護の目的で、同分子内5'末端にジメトキシトリチル (D m T r) 基の修飾を施したアンチセンスオリゴ核酸を設計した。t a t遺伝子上の標的部位に対して相補鎖を有する配列の異なる様々な5'末端修飾オリゴ核酸を合成し、感染M T - 4細胞の細胞変性効果の阻害を指標とした抗H I V活性測定法を用いて評価した。その結果、抗H I V活性が強くかつ細胞毒性が弱い修飾オリゴ核酸S A - 1 0 4 2 (5'-DmTr-TGGGAGGTGGGTCTG-

3') が選択された。この S A - 1 0 4 2 の抗 H I V 活性は、その 5' 側のグアニン塩基に富む配列(5'-TGGG-3')に依存していた。さらに S A - 1 0 4 2 の抗 H I V 活性には D m T r 基が必須であった。そこで活性増強の目的で様々な 5' 末端修飾基を用いて S A - 1 0 4 2 誘導体を合成し、母化合物である S A - 1 0 4 2 との活性を比較した所、D m T r 基で修飾された S A - 1 0 4 2 より強い活性を示す誘導体は認められなかった。次に S A - 1 0 4 2 の阻害作用機序を探る目的で本物質のウイルスの増殖サイクルにおける阻害ステップを調べた。しかしながら、期待されたアンチセンス効果による阻害は認められず、本物質はウイルス増殖サイクルの初期段階である吸着侵入ー融合段階で阻害することが示唆された。一般にデキストラン硫酸に代表されるウイルスの吸着侵入に関与する吸着阻害剤は、異なるウイルス株間での感受性低下が問題視されている。そこで、シンシチューム形成能の異なる新鮮臨床分離株 1 0 株と実験室標準株 5 株に対する S A - 1 0 4 2 の感受性を、ヒト活性化リンパ球と H e L a C D 4 陽性細胞を用いて評価したところ、一株を除き高い抗 H I V 活性が認められた。従って本物質は、異種株間に於ても、またトロピズムの異なる株間に於ても十分な効果が発揮されるものと期待された。

第二章では修飾オリゴ核酸 S A - 1 0 4 2 の抗 H I V 作用メカニズムに関する研究をまとめた。第一章の結果より、S A - 1 0 4 2 の阻害作用点はアンチセンス効果とは異なり、H I V の増殖過程の初期段階の阻害が示唆されたことから、そのうち、吸着から宿主細胞染色体への挿入までの過程を中心に探った。薬剤接触時間に対する影響を調べた所、ウイルス吸着時に S A - 1 0 4 2 を共存させた場合には 9 5 % 以上の感染が抑制されたが、ウイルス吸着 1 時間後に S A - 1 0 4 2 を感染細胞に接触させてもプロウイルス D N A のシグナルに変化みられなかった。そこでウイルス

吸着時に働くウイルスエンベロープタンパクの g p 1 2 0 とその宿主側受容体である C D 4 タンパクとの相互作用に及ぼす S A - 1 0 4 2 の影響を、抗体を用いた結合阻害試験により調べた。その結果、S A - 1 0 4 2 は g p 1 2 0 に働き C D 4 に対する作用を阻害することが示唆された。

また、S A - 1 0 4 2 がグアニン塩基に富む (G - r i c h) 配列を有していることに注目し、相補鎖とは無関係なグアニン三連続塩基配列を有する D m T r 修飾 1 5 量体について活性を検討した結果、S A - 1 0 4 2 と同等な活性が認められ、さらにこのような G - r i c h 配列はある高次構造をとることが示唆された。

第三章ではグアニン四重鎖構造を形成する 5'末端修飾抗 H I V 活性の至適最小配列の同定に関する研究をまとめた。第一章の研究から、S A - 1 0 4 2 の活性は 5'末端修 D m T r 修飾基に隣接している三連続したグアニン塩基配列からなる特異的なコア配列 (5'-T G G G-3') に依存した活性が示された。そこで本章では、S A - 1 0 4 2 の活性に必要な至適最小配列を求めるため、コア配列を含む 5'末端修飾六量体 (5'-DmTr-TGGGAG-3') に、S A - 1 0 4 2 と同等な活性が示された。第一章と同様に活性増強のため、5'末端修飾基の最適化を行った。5'末端修飾を施した 1 9 種の置換基のうち、3,5-ジベンジルオキシベンジル (D B B) 基が最も優れ、その抗 H I V 活性は S A - 1 0 4 2 の約 2 倍であった。次に活性に必須な最小配列を求めるため、最適修飾基を含む六量体 (5'-DBB-TGGGAG-3') の 3'側を削ったオリゴマーについて検討した所、母六量体よりも活性は劣るが四量体のコア配列 (5'-DBB-TGGG-3') が最小鎖長であることが判明した。

至適最小配列を有し最適 5'末端修飾基 (D B B) と 3'末端修飾基の 2 -ヒ

ドロキシエチルフォスホリル基 (p-HE)で両末端を保護された六量体 R-95288 (5'-DBB-TGGGAG-pHE-3')について、NMR, CDスペクトル解析を行いコンピューターグラフィックにより平行な四重鎖構造を有する三次構造モデルを推定した。また5'末端修飾基を含む六量体(5'-DBB-TGGGAG-3')に於いても、五面のグアニン四量体と一面のアデニン四量体からなる平行な四重鎖構造が予想された。しかし5'末端修飾基を持たない六量体、d (T G G G A G) では四重鎖構造も形成せず抗H I V活性も示さなかったので、5'末端修飾基は活性と高次構造形成に必須であると考えられる。これらの構造活性相関の研究により、本誘導体の活性には、四重鎖構造とその5'末端に修飾を施した疎水基の両者が必須であることが示唆された。

以上の結果から、5'末端修飾 G-r i c hオリゴマーは、特異的な高次構造を形成することによりH I Vの g p 1 2 0と相互作用してC D 4やその他のH I V受容体への結合を阻害し、ウイルス増殖の初期過程である細胞への吸着侵入-融合段階を阻止するものと結論した。このように5'末端修飾 G-r i c hオリゴマーは、ユニークな作用メカニズムを有する新規抗H I V活性物質であり、今後の臨床応用が期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 齊 藤 昌 之

副 査 教 授 小 沼 操

副 査 教 授 高 島 郁 夫

副 査 教 授 大 塚 栄 子 (薬学研究科)

学 位 論 文 題 名

Studies on the inhibitory activity of 5'-end modified guanine-rich oligodeoxynucleotides against human immunodeficiency virus type-1 infection *in vitro*

(グアニン塩基に富む5'末端修飾オリゴ核酸の
抗ヒト免疫不全ウイルス1型活性に関する研究)

本論文は、ヒト免疫不全ウイルス (H I V) に対する薬剤の開発を目指して、各種のオリゴヌクレオチドの抗H I V活性とその作用機構を調べた研究成果をまとめたもので、全体で3章から構成されている。

第1章では、H I Vウイルスの転写を促進するT a t蛋白質をコードする遺伝子に着目し、これに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを合成して、その活性を調べた。その結果、グアニン塩基に富む15量体の5'末端をジメトキシトリチル基で保護したもの (S A-1 0 4 2) が、細胞毒性が弱くかつ抗H I V活性が強いことが示された。

第2章では、S A-1 0 4 2の抗H I V作用のメカニズムについて検討した。しかし、当初予想していたアンチセンス効果による阻害は認められず、むしろウイルスの増殖サイクルの初期段階である吸着侵入-融合段階で作用することが明らかとなった。更に詳細な解析によって、S A-1 0 4 2はウイルスエンベロープ蛋白質g p 1 2 0に働き、宿主側受容体C D 4との相互作用を阻害するとの結論を得た。この考えは、S A-1 0 4 2と同様にグアニン塩基に富むジメトキシトリチル基修飾15量体であれば、相補鎖とは無関係であっても同様の阻害活性があるという事実からも裏付けられた。

そこで第3章では、これらの修飾オリゴヌクレオチドの構造と活性の関係について、Nuclear magnetic resonanceやCircular dichroism分析、コンピューターグラフィックスによるモデル化等の手法を用いて解析した。その結果、これらのオリゴヌクレオチドがグアニン四重鎖構造を形成ししかも5'末端に疎水基を持っていることが、活性に必須であるとの結論に達した。

このように、本論文は、5'末端が修飾されたグアニン塩基に富むオリゴヌクレオチドが、特異的な高次構造をとることによってH I V増殖の初期過程を阻害することを明

らかにしたものであり、ユニークな作用メカニズムの解明と併せて新規抗H I V薬剤開発へと発展することが期待される。よって、審査員一同は百田憲司氏が博士（獣医学）の学位を受ける資格が十分あると認めた。