

第 11 回 ECC 山口メモリアルエイズ研究奨励賞受賞研究

多剤耐性株に高い抗ウイルス活性を発揮する新規抗 HIV プロテアーゼ阻害剤
の同定・開発と Gag capsid 蛋白挿入変異と CA 自壊の分子機構の研究Development of Novel Protease Inhibitors Potent against Multi-Drug-Resistant
HIV-1 Variants In Vitro/Study of the Mechanism of Spontaneous Gag Protein
Degradation in Multi-Drug Resistant HIV-1 Variants containing
Amino Acids Insertion in Gag Region

天 野 将 之

Masayuki AMANO

熊本大学医学部 血液内科・膠原病内科・感染免疫診療部

Departments of Hematology, Rheumatology and Clinical Immunology,
Infectious Diseases, Kumamoto University

序 文

第 11 回日本エイズ学会 ECC 山口メモリアルエイズ研究奨励賞の受賞内容である、新規抗 HIV 薬の開発および Gag 挿入変異によって引き起こされる capsid 構造蛋白の自壊に関する研究について概説する。

研究の背景

ヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) 感染によって起こる後天性免疫不全症候群 (AIDS) に対する化学療法は長足の進歩を遂げ、かつて「死の病」とされた本疾患は「コントロール可能な慢性感染症」と再定義し得る程となった。この進歩は、逆転写酵素阻害剤 (RTIs) とプロテアーゼ阻害剤 (PIs) を組み合わせた多剤併用療法 (HAART) に負うところが大きい。

しかし、HIV-1 が RTIs と PIs の両剤に対して耐性を獲得し、またその多くが交差耐性である故に治療抵抗性となった症例数の増大、また耐性ウイルスによる初感染症例増多の報告が続いており、これらに対応しうる新たな抗ウイルス薬の開発研究に加えて、HIV-1 の薬剤耐性獲得機序の検討、および薬剤耐性 HIV-1 感染細胞内における proviral DNA からの耐性ウイルス複製・伝播に至る過程についての詳細な基礎的研究の重要性は増している。

多剤耐性株に高い抗ウイルス活性を発揮する新規抗 HIV プロテアーゼ阻害剤の同定・開発

筆者らは米国の研究グループと共同で新規 HIV-1 プロテアーゼ阻害剤の開発を継続して行っており、多数の候補化合物のスクリーニングおよび同定した有望な化合物に対する詳細な検討を遂行している。これまでに、構造解析学的データに基づき合成・開発した新規 PI である GRL-98065 (図 1) が、野生型実験室 HIV-1 株や様々な subtype の臨床分離株に対して subnanomolar の濃度でウイルスの複製を効果的に阻害し、また 2 種類の HIV-2 株や複数の試験管内誘導既存 PI 高度耐性株、さらには治療不応性となった患者由来の複数の多剤耐性臨床分離株に対しても broad-spectrum かつ非常に強力な抗ウイルス活性を発揮する事や、GRL-98065 と HIV-1 PR 複合体の詳細な結晶構造解析の結果、同化合物における P2 部位の bis-THF 構造が HIV-1 プロテアーゼ (PR) 活性中心部位のアミノ酸主鎖と強固に結合し、加えて対側 P2' 部位に存在する benzodioxole 構造が PR 活性中心部位のアミノ酸 (Asp 30') および可動性に富んだ PR flap 領域のアミノ酸 (Gly 48') と水素結合を有する事によって GRL-98065 の PR への結合が安定化する結果、PR とその本来の基質である Gag 前駆蛋白間の相互作用に近づき、同化合物の高い抗ウイルス活性に関連すると推測される事 (図 2)、また同化合物を用いた耐性誘導実験の結果、対照化合物である既存 HIV PIs (amprenavir, atazanavir, lopinavir) と比較して GRL-98065 に対する HIV-1 の耐性化は遅延し、誘導した GRL-98065 耐性株は複数の既存 PIs に対して依然感受性を保つ事等を報告した¹⁾。更に

著者連絡先：〒860-8556 熊本県熊本市本荘 1-1-1 熊本大学医学部 血液内科・膠原病内科・感染免疫診療部

2011 年 5 月 15 日受付

GRL-98065

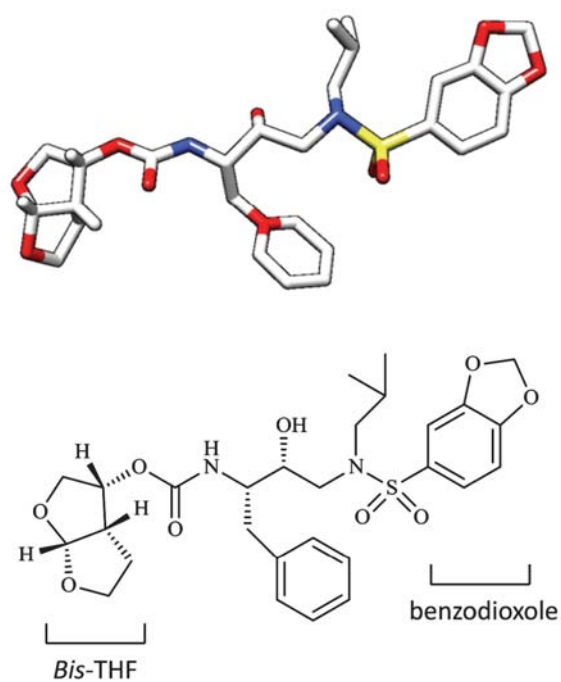


図 1 新規 HIV-1 プロテアーゼ阻害剤 (PI) である GRL-98065 の構造
GRL-98065 は P2 部位に *bis*-THF 構造, P2' 部位に benzodioxole 構造を有する。

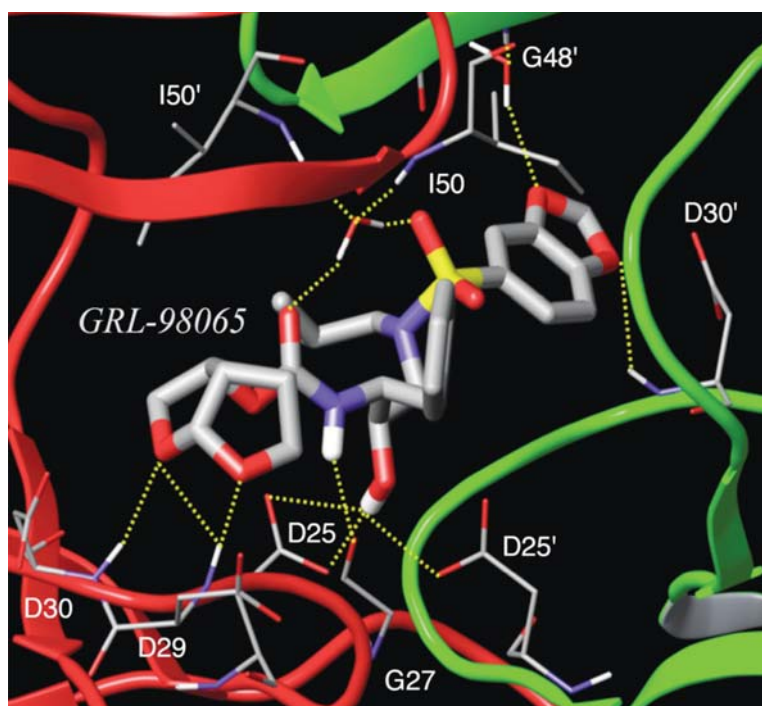
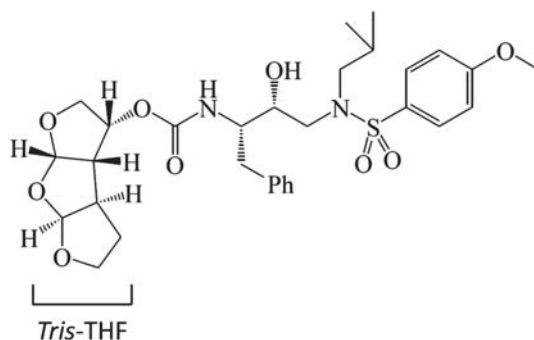
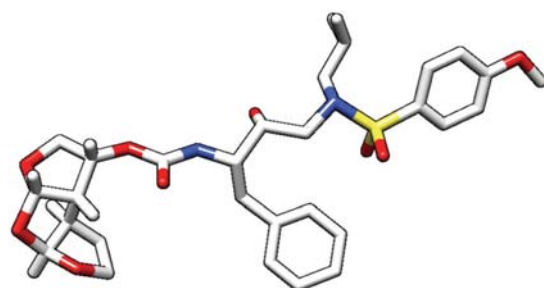


図 2 GRL-98065 と HIV-1 PR 間の結合様式

GRL-98065 と野生型 HIV-1 PR 間の水素結合を黄色の点線で示す。同化合物において P2 部位の *bis*-THF 構造が PR 活性中心部位のアミノ酸主鎖 (Asp 29, Asp 30) と強固に結合, 更に対側 P2' 部位の benzodioxole 構造が PR 活性中心部位のアミノ酸 (Asp 30) および PR flap 領域のアミノ酸 Gly 48 と水素結合を有し得る事が判った。

GRL-0519A



MW: 604.7

図 3 新規 HIV-1 PI である GRL-0519A の構造

GRL-0519A は P2 部位に特徴的な oxatricyclic (*tris*-THF) 構造を有する。

表 1 GRL-0519A の野生 HIV-1 株に対する抗ウイルス活性と細胞毒性

Compound	EC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)	Selectivity index
GRL-0519A	0.0007	44.6	63,714
APV	0.0327	84.7	2,590
SQV	0.0256	19.8	773
DRV	0.0042	152.7	36,357

MT-2 細胞を用いた MTT assay によって測定した, GRL-0519A および対照 compound の HIV-1_{LAI} に対する抗ウイルス活性 (EC₅₀) と, MT-2 細胞に対する細胞毒性 (CC₅₀) の値を示す。安全性の指標である selectivity index は各 compound の CC₅₀ 値を EC₅₀ 値で除することで算定した。

macrocycle という特徴的構造を持ち, 薬剤耐性 HIV に対して高い活性を発揮する一連の低分子化合物, GRL-0216A, -0286A 等の PIs を同定, 同化合物群の詳細な抗ウイルス活性を検討し, 結晶構造解析により同構造が PR flap 領域に広範かつ効果的に作用する事等を報告した²⁾。

最近筆者らは oxatricyclic (*tris*-THF) 構造という 3 連の THF 構造を持つ有望な新規低分子化合物である GRL-0519A を同定し (図 3)³⁾, 同化合物の抗 HIV 活性等について詳細な検討を行っている。GRL-0519A は MT-2 細胞を用いた MTT assay において, 野生型実験室株 HIV-1_{LAI} に対し

強力な活性を発揮し (EC₅₀: 0.7 nM), ヒト由来細胞株である MT-2 細胞に対する細胞毒性は軽度 (CC₅₀: 44.6 μM) であり (表 1), PR の塩基配列の相違性から HIV-1 PIs に対して natural resistant と成り得る HIV-2 株に対しても良好な活性 (EC₅₀: 0.4 nM) を示した (表 2)。PHA 刺激 PBMC を標的細胞とした p24 assay において, 複数の多剤耐性臨床分離株に対して強力な抗 HIV 活性を示し (EC₅₀: 0.9~4.3 nM), 試験管内で誘導した高度 DRV 耐性株⁴⁾に対しても同様に高い活性 (EC₅₀: 5.6~30.0 nM) を維持した (表 3)。GRL-0519A と HIV-1 PR との結合様式を調べるため詳細な

表 2 GRL-0519A の HIV-2 株に対する抗ウイルス活性

Virus	EC ₅₀ (μM)					
	GRL-0519A	APV	SQV	ATV	LPV	DRV
HIV-1 _{LAI}	0.0007	0.0327	0.0256	0.0048	0.0066	0.0042
HIV-2 _{ROD}	0.0004	0.3734	0.0030	0.0077	0.0085	0.0088

MT-2 細胞を用いた MTT assay によって測定した, 各 compound の HIV-1_{LAI} 株および HIV-2_{ROD} 株に対する抗ウイルス活性 (EC₅₀) を示す。

表 3 GRL-0519A の各種多剤耐性株に対する抗ウイルス活性

virus	EC ₅₀ (nM)					
	GRL-0519A	APV	ATV	LPV	DRV	
HIV-1 _{ERS104pre} (WT : X4)	0.6	31.5	2.7	31.4	3.9	
HIV-1 _{MDR/B} (X4)	4.3 (7)	521.1 (16)	469.7 (174)	618.6 (20)	27.8 (7)	
HIV-1 _{MDR/C} (X4)	0.9 (2)	356.9 (11)	38.8 (14)	436.5 (14)	11.1 (3)	
HIV-1 _{MDR/G} (X4)	2.7 (5)	485.3 (15)	24.7 (9)	160.2 (5)	30.8 (8)	
HIV-1 _{MDR/TM} (X4)	2.2 (4)	488.3 (15)	74.5 (28)	364.9 (12)	31.0 (8)	
HIV-1 _{MDR/MM} (R5)	2.7 (5)	291.2 (9)	204.8 (76)	762.1 (24)	15.6 (4)	
HIV-1 _{MDR/JSL} (R5)	2.8 (5)	418.7 (13)	211.3 (78)	>1,000	23.9 (6)	
HIV-1 _{MDRmix DRV^R10P}	5.6 (9)	>1,000	322.9 (77)	>1,000	45.7 (12)	
HIV-1 _{MDRmix DRV^R20P}	30.0 (50)	>1,000	>1,000	>1,000	255.2 (64)	

PHA 刺激 PBMC を用いた p24 assay によって測定した, HIV-1_{ERS104pre} 株 (未治療患者由来の野生株) および 6 種類の多剤耐性臨床分離株 (MDR 株) に対する各 compound の抗ウイルス活性 (EC₅₀) を示す。括弧内の数字は、野生 HIV-1_{ERS104pre} 株に対する活性と比較して何倍活性が低下したかを示す。下 2 段は MT-4 細胞を用いた p24 assay により測定した, 8 種類の多剤耐性臨床分離株の混合物を開始株とした耐性誘導により試験管内で DRV 高度耐性を獲得した耐性株に対する, 各 compound の抗ウイルス活性を示す。

結晶構造解析を行った結果, *tris*-THF 構造における 2 つの THF 環 (*bis*-THF 部分) が PR 活性中心部位 (Asp 29, Asp 30) のアミノ酸主鎖と強固に結合する事に加え, 3 番目の THF 環が PR の flap 領域 (Gly 48), catalytic core 領域 (Thr 26, Gly 27), dimer interface (Arg 8, Asp 29, Arg 87) における複数のアミノ酸群と相互作用を有し得る事が判明 (図 4), GRL-0519A が発揮する高い抗 HIV 活性に関与しているものと解された。また筆者らは試験管内で GRL-0519A に対する耐性誘導実験を続けているが, 現時点では既存の PIs と比較して GRL-0519A への HIV-1 の耐性化は著しく遅延する事が判明している。

以上の結果をまとめると, GRL-0519A の *tris*-THF 構造における 2 つの THF 環が PR 活性中心部位の主鎖と結合し, 更に 3 番目の THF 環が PR 内の異なる領域の重要アミノ酸群と相互作用を有する事が, 同化合物において認められる多剤耐性変異株を含めた多種の HIV への強力な抗ウイルス活性発揮に関連すると考えられた。このように抗ウイルス作用が強力な HIV が耐性を発現しにくい薬剤,

発現しても他薬剤との交差耐性を有しない新規抗 HIV 剤の開発は, HIV 感染症患者において長期間ウイルス量を測定感度以下にコントロールし得るため, その結果外来通院による長期加療が可能となり, 患者の QOL の改善および医療費の削減にも貢献し得ると考えられる。

Gag capsid (CA) 蛋白の挿入変異と CA 自壊の分子機構の研究

HIV-1 ではその life cycle 後期に, 宿主 DNA に組み込まれた provirus を鋳型として Gag/Gag-Pol 前駆蛋白が合成され形質膜へ送られる。Env および RNA を組み込み粒子として出芽する間に, PR によって Gag 前駆蛋白が切断 (開裂) され成熟した virus 粒子となる⁵⁾。筆者らのグループは以前, 長期間の HAART 療法後に治療不応性となった患者由来の多剤耐性臨床株において, Gag 領域の開裂部位近傍にアミノ酸挿入変異が入る事で, 薬剤耐性関連変異の蓄積により減衰した HIV-1 PR の Gag 前駆蛋白に対する酵素活性が改善する事を報告したが⁶⁾, しかしながら挿入変異に

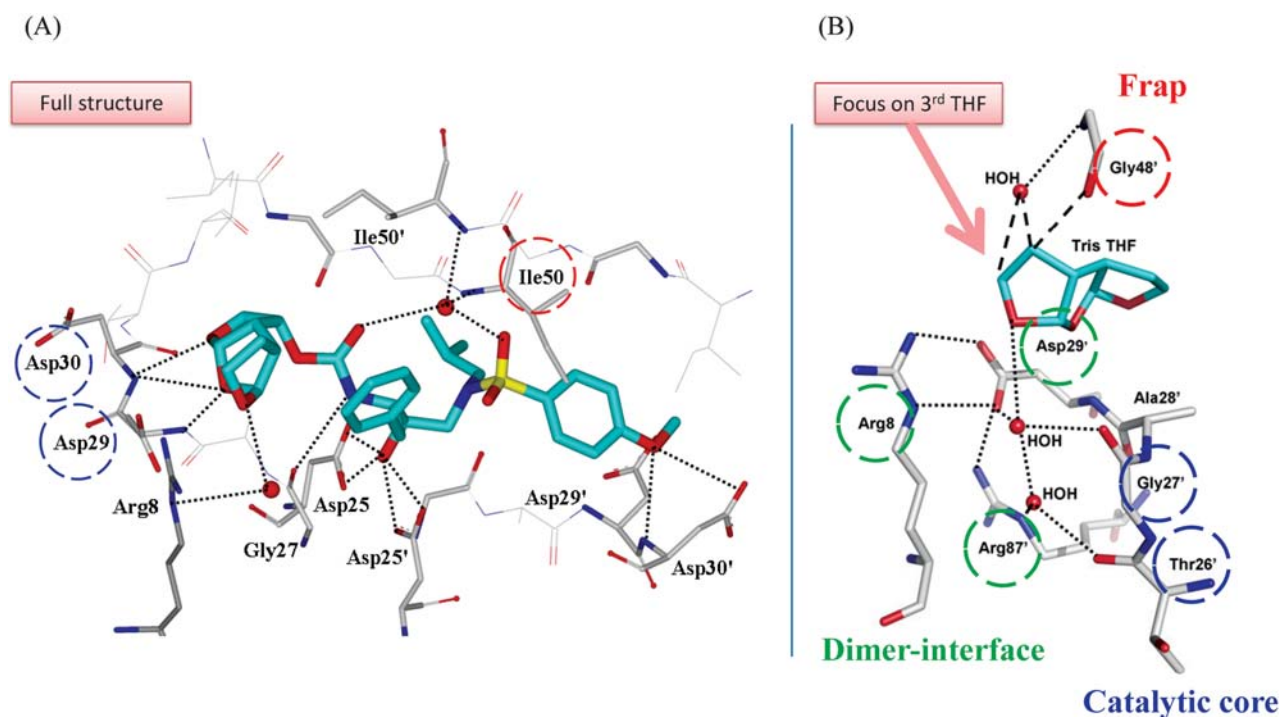


図 4 GRL-0519A と HIV-1 PR 間の結合様式

GRL-0519A が結合した野生型 HIV-1 PR の結晶構造解析の結果を示す。(A) *tris*-THF 構造における 2 つの THF 環 (*bis*-THF 部分) が PR 活性中心部位 (Asp 29, Asp 30) のアミノ酸主鎖と強固に結合する。(B) 加えて, 3 番目の THF 環が PR の flap 領域 (Gly 48), catalytic core 領域 (Thr 26, Gly 27), dimer interface (Arg 8, Asp 29, Arg 87) における複数のアミノ酸群と相互作用を有し得る事が判明した。

よる代償は完全ではなく, 耐性株の複製能は野生株と比し依然劣ったままである事が多い。そのため筆者らは, Gag 挿入変異が Gag 前駆蛋白の processing や, 変異株の感染性および複製能に対し代償的ではない何らかの影響を及ぼし得ると仮定, 詳細な解析を行うため Gag 領域の様々な位置にアミノ酸配列を挿入した変異株を多数作成し, 挿入変異による HIV-1 の構造学的・ウイルス学的特性の変容について検討した。各変異株をサル由来 COS7 細胞やヒト由来 HEK293 細胞に transfection (TF) 後 cell lysates を作成し, Gag p24 (CA) 特異抗体による Western blotting (WB) を行った結果, 野生株では認められない Gag 蛋白の異常な degradation 産物が出現する事を確認した (論文未発表)。この degradation 産物は, CA 領域の挿入変異株において強く認められ, 更に virion lysates においても顕著に認められた。これらから挿入変異を有する Gag 蛋白を分解方向に進ませる何らかの機序の存在が示唆されたため, 本現象の詳細な解析を行った。まず Gag degradation の経時的変化を調べるため, 各変異株を細胞に TF 後に得た cell/virion lysates を 37℃ で定温静置し CA 抗原量の変化を測定した結果, 野生株では lysates 中の CA 抗原量にほぼ変化を認めない

のに対して, 変異株では特に CA 領域の挿入変異株において顕著な degradation の経時的進行を認めた。次にウイルス上清と MT-4 細胞を用いて挿入変異がウイルスの複製能に及ぼす影響や, CD4⁺CXCR4⁺Magi 細胞を用いて各変異株の single-round infectivity を評価した結果, いずれも変異株, 特に CA 領域の挿入変異株で感染性および複製能の著しい低下を認め, これら挿入変異株の増殖障害は Gag degradation に起因するものと考えられた (未発表データ)。

次に, 哺乳類細胞での主要な蛋白分解経路⁷⁾である ubiquitin/proteasome 系や autophagy 系, 複数の PR, またウイルス側の蛋白分解酵素である HIV-1 PR による本現象への関与の有無を調べるため, 各種阻害剤 (proteasome 阻害剤の MG-132⁸⁾, autophagy 阻害剤の 3-MeA⁹⁾ 付, 7 種類の哺乳類 PIs, またウイルス側 PI の saquinavir) を十分な濃度で加え詳細な検討を重ねた結果, いずれの蛋白分解経路も Gag degradation に関与しない事が判明, 挿入変異を有する Gag 蛋白自体が脆弱化し自壊する機序が示唆された (未発表データ)。

成熟 CA 蛋白は通常 6 量体として存在し, その内側に位置する CA N 末端側 (NTD) が 6 量体形成に寄与する。ま

た隣接する6量体同士は6量体外側に位置するC末端側(CTD)間での相互作用により、HIVのゲノムを包む成熟した円錐状CA殻を形成する^{10,11)}。このCA蛋白上の異なったepitopeを認識する複数のHIV p24モノクローナル抗体(mAb)を用いて、Gag degradationの責任領域検索を行った。CA NTDの挿入変異株をTF後作成したcell lysatesを用いてWBを行った結果、CA CTD上のepitopeを認識するmAbにおいてのみ顕著なdegradation産物を認めた。この結果よりdegradation産物はCA CTD由来であると考えられ、CA NTDに挿入変異が入る事による構造形態学的変化により、CA CTDが脆弱化し自壊する機序が考えられた(未発表データ)。更にGag degradationに起因する感染性や複製能の低下が、野生株の複製に影響を及ぼし得るかを検討するため、野生株とGag挿入変異株を等量のプラスミドDNA量で細胞にco-TFし各上清中のHIV-1発現量を測定、更に得られた等量のウイルスを含む各上清とMT-4細胞を用いて複製能に及ぼす影響を解析した結果、野生株の発現および複製はCA挿入変異株の共発現により著しく阻害される事が判った。この結果より、野生型CAと挿入変異を有するCAがキメラを形成する事で、正常な成熟CA構造の形成を障害し得ると考えられた(未発表データ)。

以上の結果をまとめると、挿入変異を有するGag蛋白自身が構造形態学的変化により脆弱化し自壊へ進む事が推測され、本現象が薬剤耐性変異株の低複製能に関連していると考えられた。更にCA挿入変異が、CA6量体および成熟CA殻の形成を阻害し得る事が示唆された。本現象に関して検討を重ねていく事で、将来的にGag構造蛋白の成熟化を阻害し分解方向へ進める全く新しいHIV-1複製阻害物質の同定、治療法の開発へとつながる可能性がある。今後もHIV-1コンポーネントの自壊をもたらす機序を解明し、その現象を誘導する方法の確立を目指す。

謝辞

このたび第11回ECC山口メモリアルエイズ研究奨励賞を受賞致しました事を深く感謝いたします。これまで御指導頂きました満屋裕明先生をはじめとした諸先生方、また本賞の選考にあたられました選考委員の先生方に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Amano M, Koh Y, Das D, Li J, Leschenko S, Wang YF, Boross PI, Weber IT, Ghosh AK, Mitsuya H : A novel bis-tetrahydrofuranylurethane-containing nonpeptidic protease inhibitor (PI), GRL-98065, is potent against multiple-PI-resistant human immunodeficiency virus in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 51 : 2143-2155, 2007.
- 2) Tojo Y, Koh Y, Amano M, Aoki M, Das D, Kulkarni S, Anderson DD, Ghosh AK, Mitsuya H : Novel protease inhibitors (PIs) containing macrocyclic components and 3 (R), 3a (S), 6a (R)-bis-tetrahydrofuranylurethane that are potent against multi-PI-resistant HIV-1 variants in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 54 : 3460-3470, 2010.
- 3) Ghosh AK, Xu CX, Rao KV, Baldrige A, Agniswamy J, Wang YF, Weber IT, Aoki M, Miguel SG, Amano M, Mitsuya H : Probing multidrug-resistance and protein-ligand interactions with oxatricyclic designed ligands in HIV-1 protease inhibitors. *ChemMedChem* 5 : 1850-1854, 2010.
- 4) Koh Y, Amano M, Towata T, Danish M, Leshchenko-Yashchuk S, Das D, Nakayama M, Tojo Y, Ghosh AK, Mitsuya H : In vitro selection of highly darunavir-resistant and replication-competent HIV-1 variants using a mixture of clinical HIV-1 isolates resistant to multiple conventional protease inhibitors. *J Virol* 84 : 11961-11969, 2010.
- 5) Freed EO : HIV-1 Gag proteins : diverse functions in the virus life cycle. *Virology* 251 : 1-15, 1998.
- 6) Tamiya S, Mardy S, Kavlick MF, Yoshimura K, Mitsuya H : Amino Acid Insertions near Gag cleavage sites restore the otherwise compromised replication of human immunodeficiency virus type 1 variants resistant to protease inhibitors. *J Virol* 78 : 12030-12040, 2004.
- 7) 田中啓二編 : タンパク質の分解機構. 実験医学 26 (2), 羊土社刊, 2008.
- 8) Lee DH, Goldberg AL : Proteasome inhibitors : valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol.* 8, 397-403.
- 9) Seglen PO, Gordon PB : 3-Methyladenine : Specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *PNAS* 79 : 1889-1892, 1982.
- 10) Ganser-Pornillos BK, Cheng A, Yeager M : Structure of full-length HIV-1 CA : a model for the mature capsid lattice. *Cell* 131 : 70-79, 2007.
- 11) Pornillos O, Ganser-Pornillos BK, Kelly BN, Hua Y, Whitby FG, Stout CD, Sundquist WI, Hill CP, Yeager M : X-Ray structures of the hexameric building block of the HIV capsid. *Cell* 137 : 1282-1292, 2009.