

第14回日本エイズ学会 ECC 山口メモリアルエイズ研究奨励賞受賞研究

HIV のプロテアーゼ阻害剤 (PI) 耐性獲得機構の解析と
新規 PI 開発への応用Analysis of the Mechanisms of HIV's Acquisition of Resistance to
Protease Inhibitors and Development of Novel Protease Inhibitors

青 木 学

Manabu AOKI

熊本保健科学大学保健科学部医学検査学科

Department of Medical Technology, Kumamoto Health Science University

日本エイズ学会誌 16: 77-83, 2014

はじめに

第14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, HIV のプロテアーゼ阻害剤 (PI) 耐性獲得機構の解析と新規 PI 開発への応用について概説する。

研究の背景

逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤などを組み合わせた多剤併用療法 (cART) の導入によって, HIV 感染症は「制御可能な慢性感染性疾患」へと変貌した。しかし一方で, HIV が抗 HIV 治療薬に対して耐性を獲得, しかもその多くが交叉耐性を示すことから治療に抵抗する症例が増加, さらには初感染時すでに薬剤耐性 HIV に感染している例が本邦でも増加しており, 結果として不完全なウイルス抑制による治療失敗がしばしば経験される。HIV の薬剤耐性発現機構の解析は, その薬剤のウイルス学的・薬理学的な特性を明らかにするのみならず, 次世代の治療薬のデザインに資する可能性があることから, このような解析を基に野生型 HIV だけではなく薬剤耐性 HIV にも強力な活性を発揮し, かつ耐性発現を著しく遅延させるような薬剤の開発が急務である。

プロテアーゼ阻害剤耐性獲得に伴う Gag 領域変異の解析

HIV のプロテアーゼ阻害剤 (protease inhibitor: PI) 耐性獲得過程に蓄積する Gag 領域のアミノ酸置換は, PI 耐性 HIV の減弱した複製を改善することが知られているが¹⁻³⁾, HIV の PI に対する耐性獲得過程にどのように影響するかは必

ずしも明らかにされていない。我々はまず, 試験管内で誘導した amprenavir (APV) 耐性 HIV-1 変異体の Gag およびプロテアーゼ領域のアミノ酸配列を解析した。3 継代目 (HIV_{APVp3}), プロテアーゼ領域にはアミノ酸変異は見られなかったが (図 1A), Gag 領域に 75 番のロイシンからアルギニンへの変異 (L75R) が 10 クロンのうち 5 クロンのみで認められた (図 1B)。12 継代目 (HIV_{APVp12}), 2 つの APV 耐性関連変異 (L10F および M46L) がプロテアーゼ領域に認められ, 219 番のヒスチジンからグルタミンへの変異 (H219Q) が Gag 領域に認められた (図 1A, B)。さらに 5 μ M の APV 存在下で複製可能となった HIV (HIV_{APVp33}) のプロテアーゼ領域に 6 つのアミノ酸置換 (L10F, V32I, M46L, I54M, A71V, I84V) (図 1A), Gag 領域には p1-p6 cleavage site 変異 (L449F) と 5 つの non-cleavage site 変異 (E12K, L75R, H219Q, V390D, R409K) を認めた (図 1B)。次に同定した Gag 変異が APV 耐性関連変異の獲得に優位に作用するかを確認するために, 野生株 HIV (HIV_{WT}) と Gag 変異を有する 3 つの感染性組換え HIV-1 クロノ (rHIV_{WTpro}^{75/219gag}, rHIV_{WTpro}^{219/409gag}, rHIV_{WTpro}^{12/75/219/390/409gag}) を用いて APV 耐性を試験管内で誘導した結果 (図 2), 5 つの Gag 変異を有するクロノ (rHIV_{WTpro}^{12/75/219/390/409gag}) は, HIV_{WT} よりも早期に APV 耐性関連変異をプロテアーゼ領域に獲得し⁴⁾, 用いた 2 つの CD4⁺T 細胞株 (MT-2, MT-4 細胞) で早く増殖した (図 2)。さらに, この 5 つの Gag 変異が APV 以外の PIs に対する耐性獲得にも影響を与えるかどうかを確認すると, saquinavir (SQV) もしくは indinavir (IDV) 存在下での selection profile に有意差は見られなかったが (図 3A, B), ritonavir (RTV) もしくは nelfinavir (NFV) 存在下での selection profile には有意差が見られた (図 3C, D)。以上の結果より, APV 高度耐性 HIV-1 変異体で同定した Gag 変異は APV 耐性の早期獲得に作用するが, 他の PIs に対する耐

著者連絡先: 青木 学 (〒861-5598 熊本市北区和泉町 325
熊本保健科学大学保健科学部医学検査学科)

2014 年 3 月 19 日受付

A

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	99	
HIV _{NI4-3}	PQITLWQRPL	VTIKIGGQLK	EALLDTGADD	TVLEEMNLPG	RWKPKMIGGI	GGFIKVRQYD	QILIEICGHK	AIGTVLVGPT	PVNIIGRNLL	TQIGCTLNF	
HIV _{APVp3}											10/10
HIV _{APVp12}											4/10
	F										4/10
				L							2/10
HIV _{APVp33}	F		I		I	M		V		V	9/10
	I		I	I	I	M		V	Q	V	1/10

B

	p17					p24					p7					p1		p6			
	11	20	71	80	121	130	191	200	211	220	381	390	401	410	411	420	441	450	461	470	
HIV _{NI4-3}	GELDKWEKIR	GSEELRSLYN	DTGNNSQVSQ	VGGHQAAMQM	EWDRLHPVHA	GNFRNQKTV	IAKNCRAPRK	KGCWKCGKEG	HKGRPGNFIQ	ESFRFGTEET											
HIV _{APVp3}																					5/10
			R.....																		5/10
HIV _{APVp12}			R.....							Q.....											7/10
										Q.....											1/10
			R.....																		1/10
										P.....		D.....									1/10
HIV _{APVp33}			R.....							Q.....		D.....		K.....				F.....			6/10
	K.....		R.....							Q.....		D.....		K.....				F.....			2/10
	K.....		R.....							Q.....		D.....		K.....				F.....		K.....	1/10
			R.....							Q.....		D.....		K.....				F.....		K.....	1/10

図 1 APV 耐性誘導中に認められたプロテアーゼおよび Gag 領域のアミノ酸置換

試験管内での APV 耐性誘導における 3 (HIV_{APVp3}, 0.04 μM APV), 12 (HIV_{APVp12}, 0.18 μM APV), 33 継代目 (HIV_{APVp33}, 10 μM APV) のプロテアーゼ (A) および Gag 領域 (Gag 領域は変異の蓄積が認められた部分のみを示した) (B) のアミノ酸配列を示す。野生株 HIV_{NI4-3} の配列と比較し相同のアミノ酸を点で示した。各継代のウイルス感染細胞より抽出した DNA を用いて gag とウイルスプロテアーゼ遺伝子領域を PCR で増幅し、クローニング後、10 クローンのアミノ酸配列を解析した。

性獲得には有利には作用せず、特に RTV および NFV においては遅延させることが示唆された。ここで得られたデータは、PI の曝露によって起こる Gag 領域の変異のあるものは PI 耐性獲得に伴う増殖能の低下を改善するだけではなく、HIV-1 の PI に対する耐性獲得に大きく関与することを示唆しており、PI 選択の最適化など治療法の開発に有用である可能性が考えられる⁴⁾。

Tipranavir の HIV プロテアーゼ二量体阻害機構の解明

我々は、darunavir (DRV) と tipranavir (TPV) が既存の PI に耐性を獲得した HIV にも活性を発揮し、従来の PI が有する酵素活性阻止能だけではなく、ウイルスプロテアーゼ (PR) の二量体形成をも阻害することを報告してきた^{5,6)}。この TPV による PR 二量体形成阻止機構を解明するために、まず 11 種類の多剤耐性臨床分離 HIV-1 株を混ぜて (HIV_{11MIX}) もしくは単一 (HIV_B, HIV_C, HIV_G, HIV_{TM}) で用いて試験管内で TPV 耐性 HIV-1 変異体を誘導した (図 4)。HIV_{11MIX}, HIV_B, HIV_C の 3 種類の HIV は 15 μM の TPV 存在下でも複製可能となり、プロテアーゼ領域のアミノ酸配列を確認すると HIV_{11MIX} は 5 継目 (HIV_{11MIX}^{P5}) には 20 クロー

ンすべてが HIV_B 由来のプロテアーゼを有しており、さらに 10 継目 (HIV_{11MIX}^{P10}) には I54V と V82T の 2 つのアミノ酸置換の蓄積が認められた (図 5A)。また HIV_B の 10 継目 (HIV_B^{P10}) では E34D, I54V, V82T の 3 つのアミノ酸置換 (図 5B), HIV_C の 15 継目 (HIV_C^{P15}) では L24M, E35D, V82T, I84V の 4 つのアミノ酸置換がそれぞれ確認された (図 5B)。TPV 耐性を誘導し得なかった HIV_G の 15 継目 (HIV_G^{P15}) では K45R と V82T (図 5B), HIV_{TM} の 15 継目 (HIV_{TM}^{P15}) では V82T がそれぞれ同定された (図 5B)。また HIV_C と HIV_{TM} は耐性を誘導する前から I54V を有していた (HIV_C^{P0}, HIV_{TM}^{P0}) (図 5B)。以上の結果より、I54V と V82T は TPV に対する耐性関連変異として報告されているものの⁷⁾、この 2 つのアミノ酸置換だけでは TPV に対する高度耐性には不十分であることが示唆された。

TPV 耐性 HIV-1 変異体より同定されたアミノ酸置換が TPV のプロテアーゼ二量体形成阻止能に対して影響するかどうかを FRET HIV-1 expression assay system⁵⁾ を用いて確認した。まず野生型プロテアーゼを有する HIV-1 に対して TPV は 0.1 μM では二量体形成阻害は見られなかったが、1 μM および 10 μM 存在下では濃度依存的な二量体形成阻

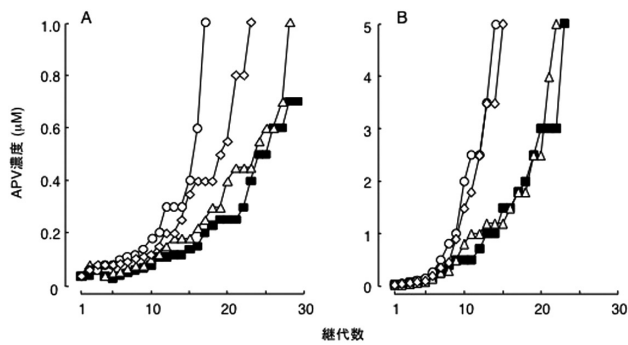


図 2 Gag 変異 HIV-1 クローンを用いた試験管内での APV 耐性変異株の誘導

野生株 HIV (HIV_{WT}) (■) および Gag 変異を有する 3 つの感染性 HIV-1 クローン, rHIV_{WTpro}^{75/219gag} (△), rHIV_{WTpro}^{219/409gag} (◇), rHIV_{WTpro}^{12/75/219/390/409gag} (○) を APV の存在下で MT-2 細胞 (A) もしくは MT-4 細胞 (B) を用いて APV 濃度を徐々に上げながら 14 から 29 回継代した。

APV 耐性誘導における各 selection profile の統計解析結果は次のとおりである。

Panel A, HIV_{WT} vs. rHIV_{WTpro}^{75/219gag}, $p=0.53$; HIV_{WT} vs. rHIV_{WTpro}^{12/75/219/390/409gag}, $p=0.0080$; HIV_{WT} vs. rHIV_{WTpro}^{219/409gag}, $p=0.22$; rHIV_{WTpro}^{75/219gag} vs. rHIV_{WTpro}^{12/75/219/390/409gag}, $p=0.0065$; rHIV_{WTpro}^{75/219gag} vs. rHIV_{WTpro}^{219/409gag}, $p=0.15$; rHIV_{WTpro}^{12/75/219/390/409gag} vs. rHIV_{WTpro}^{219/409gag}, $p=0.0018$.

Panel B, HIV_{WT} vs. rHIV_{WTpro}^{75/219gag}, $p=0.65$; HIV_{WT} vs. rHIV_{WTpro}^{12/75/219/390/409gag}, $p<0.0001$; HIV_{WT} vs. rHIV_{WTpro}^{219/409gag}, $p<0.0001$; rHIV_{WTpro}^{75/219gag} vs. rHIV_{WTpro}^{12/75/219/390/409gag}, $p<0.0001$; rHIV_{WTpro}^{75/219gag} vs. rHIV_{WTpro}^{219/409gag}, $p<0.0001$; rHIV_{WTpro}^{12/75/219/390/409gag} vs. rHIV_{WTpro}^{219/409gag}, $p=0.088$.

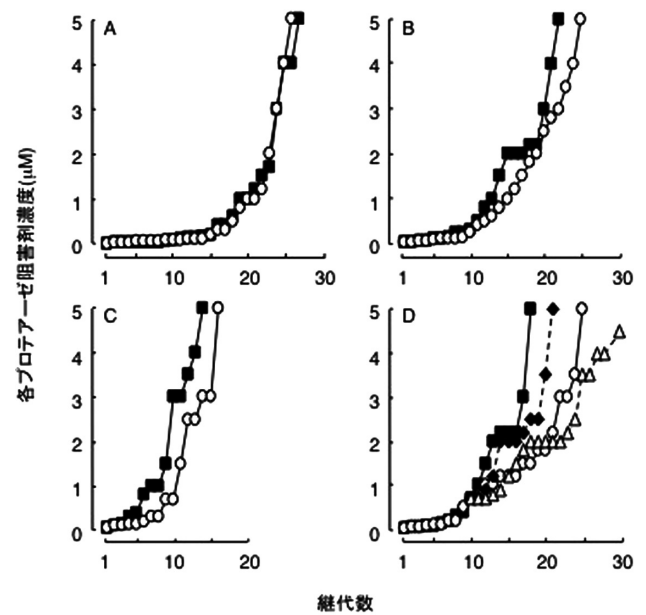
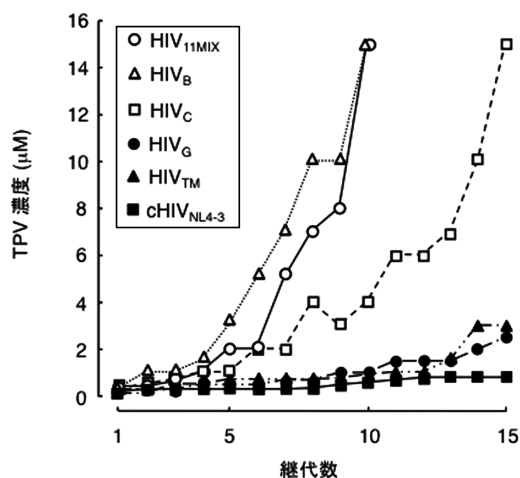


図 3 Gag 変異 HIV-1 クローンを用いた試験管内での各 PI 耐性変異株の誘導

HIV_{WT} (■, ◆) および rHIV_{WTpro}^{12/75/219/390/409gag} (○, △) を SQV (A), IDV (B), RTV (C), NFV (D) の存在下で MT-4 細胞を用いて 13 から 32 回継代した。NFV による耐性誘導は 2 回行い, 1 回目を実線, 2 回目を点線で示した。2 回目の耐性誘導は 1 回目の耐性誘導の 10 継代目 (0.7 μM) より開始した。

各 PIs 耐性誘導における各 selection profile の統計解析結果は次のとおりである。

Panel A, $p=0.80$; panel B, $p=0.22$; panel C, $p=0.0001$; and panel D, 1 回目, $p<0.0001$, and 2 回目, $p=0.0016$.

図 4 多剤耐性臨床分離株を用いた試験管内での TPV 耐性変異株の誘導

11 種類の多剤耐性臨床分離株を混せて (HIV_{11MIX}), もしくは単一で (HIV_B, HIV_C, HIV_G, HIV_{TM}) 用いて試験管内で TPV 耐性 HIV 変異体を誘導した。HIV_{11MIX}, HIV_B, HIV_C の 3 種の HIV は 15 μM の TPV 存在下でも増殖可能になったが, HIV_G は 3 μM, HIV_{TM} は 2 μM までしか到達しなかった。

A											apparently originated from
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	99	
CHIV _{NL4-3}	PQITLWQRPL	VTIKIGGQLK	EALLDTGADD	TVLEEMNLPG	RWKPKMIGGI	GGFIKVRQYD	QILIEICGHK	AIGTVLVGPT	PVNIIGRNLL	TQIGCTLNF	
HIV _{11MEX} ^{P0}	I	...V...R	...I.....	I....	L....	...V.....	.VP.....Q		.A.....M.		8/20 HIV _C
	I	IE..V...I.		I....	K...L....		.P.....	T.....	.A.....M		4/20 HIV _G
	I			..I..I...	I....	..L.R....	.VP.....	V.S.....	.A.....M	..L....	2/20 HIV _B
	I	...R.....		K...L.R.	...V.....		.P.....	V.....	.A.....M	..L....	2/20 HIV _{TM}
	I	IE..V...I.		I....	K...L....		R.P.....	T.....	.A.....M		1/20 HIV _G
	I	IE..V...I.		I....	K...RL..		.P.....	T.....	.A.....M		1/20 HIV _G
	I	...V...R	...I.....	...KI....	L....	...V.....	.VP.....Q		.A.....M.		1/20 HIV _C
	I			..I..I...	I....	..VR....	.VP.....	V.S.....	.A.....M	..L....	1/20 HIV _B
HIV _{11MEX} ^{P5}	I			..I..I...	I....	..VR....	.VP.....	V.S.....	.A.....M	..L....	13/20 HIV _B
	I		...P....	..I..I...	I....	..VR....	.VP.....	V.S.....	.A.....M	..L....	1/20 HIV _B
	I			..I..I...E	I....	..VR....	.VP.....	V.S.....	.A.....M	..L....	1/20 HIV _B
	I			..I..I...	...R..I....	..VR....	.VP.....	V.S.....	.A.....M	..L....	1/20 HIV _B
	I			..I..I...	I...V	..VR....	.VP.....	V.S.....	.A.....M	..L....	1/20 HIV _B
	I			..I..I...	I....	..VR....	.VPM....	V.S.....	.A.....M	..LE...	1/20 HIV _B
	I			..I..I...	I....	..VR....	.VP.....	V.S.A....	.A.....M	..L....	1/20 HIV _B
	I			..I..I...	I....	..VR....	.VP.....	V.S.....	.A.....M	..RL....	1/20 HIV _B
HIV _{11MEX} ^{P10}	I			..I..I...	I....	..VR....	.VP.....	V.S.....	.T.....M	..L....	16/20 HIV _B
	..T.....I			..I..I...	I....	..VR....	.VP.....	V.S.....	.T.....M	..L....	1/20 HIV _B
	I			..I..I...	...R..I....	..VR....	.VP.....	V.S.....	.T.....M	..L....	1/20 HIV _B
	I			..I..I...	IV...	..VR....	.VP.....	V.S.....	.T.....M	..L....	1/20 HIV _B
	I			..I..I...	I....	..S.VR...	.VP.....	V.S.....	.T.....M	..L....	1/20 HIV _B
B											apparently originated from
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	99	
CHIV _{NL4-3}	PQITLWQRPL	VTIKIGGQLK	EALLDTGADD	TVLEEMNLPG	RWKPKMIGGI	GGFIKVRQYD	QILIEICGHK	AIGTVLVGPT	PVNIIGRNLL	TQIGCTLNF	
HIV _B ^{P0}	I			..I..I...	I....	..L.R....	.VP.....	V.S.....	.A.....M	..L....	14/20
	I			..I..I...	I....	..VR....	.VP.....	V.S.....	.A.....M	..L....	4/20
	..T.....I			..I..I...	I....	..L.R....	.VP.....	V.S.....	.A.....M	..L....	1/20
	I			..I..I...	I...E	..L.R....	.VP.....	V.S.....	.A.....M	..L....	1/20
HIV _B ^{P10}	I			..I.DI...	I....	..VR....	.VP.....	V.S.....	.T.....M	..L....	18/20
	I		...E....	..I.DI...	I....	..VR....	.VP.....	V.S.....	.T.....M	..L....	1/20
	I			..I.DI...	I....	..VR....	.VP.....	V.S.A....	.T.....M	..L....	1/20
HIV _C ^{P0}	I	...V...R	...I.....	I....	L....	...V.....	.VP.....Q		.A.....M.		13/20
	..P.....I	...V...R	...I.....	I....	L....	...V.....	.VP.....Q		.A.....M.		1/20
	I	..T..V...R	...I.....	I....	L....	E..V....	.VP.....Q		.A.....M.		1/20
	I	...V...R	...I.....	I....	L....	...V.....	.VPV....Q		.A.....M.		1/20
	I	...V...R	...I.....	..I..I...	L....	...M....	.VP.....Q		..I.V...M.		2/20
	I	..VW...R	...I.....	..I..I...	L....	...M....	.VP.....Q		..I.V...M.		1/20
	I	...V...R	...I.....	..I..I...	L....	...M...R.	.VP.....Q		..I.V...M.		1/20
HIV _C ^{P15}	I	...V...R	...M....	...DI....	L....	...V.....	.VP.....Q		..T.V...M.		10/20
	I	...V...R	...M....	...GI....	L....	...V.....	.VP.....Q		..T.V...M.		6/20
	I	...V...R	...M....	...DI..L.	L....	...VE....	.VP.....Q		..T.V...M.		1/20
	I	...V...R	...M....	...EL....	L....	...V.....	.VP.....Q		..T.V...M.		1/20
	I	...V...R	...M....	...DI....	L....	...V.....	.VP...R.Q		..T.V...M.		1/20
	I	...V...R	...M....	...DI....	L....	...V.....	.VP.....Q		..T.V...DM.		1/20
HIV _G ^{P0}	I	IE..V...I.			K...L....		.P.....	T.....	.A.....M		14/20
	I	IE..V...I.			K...L....		.P.....R.	T.....	.A.....M		2/20
	..A.....I	IE..V...I.			K...L....		.P.....	T.....	.A.....M		1/20
	I	IE..V...I.			K...L....		.P.....	T.....	.A.....M		1/20
	I	IE..V...I.			K...L....		.P.....	T.....	.A.....M		1/20
	I	IE..V...I.			K...L....		.PL.....	T.....	.A.....M		1/20
HIV _G ^{P15}	I	IE..V...I.			K...RL..		.P.....	T.....	..T.....M		16/20
	..P.....I	IE..V...I.			K...RL..		.P.....	T.....	..T.....M	..R....	1/20
	I	IE..A...I.			K...RL..	L.R.	.P.....	T.....	..T.....M		1/20
	I	IE..V...I.	G....		K...RL..		.P.....	T.....	..T.....M		1/20
	I	IE..V...I.	G....		K...RL..		.P.....	T.....	..T.....QM		1/20
HIV _{TM} ^{P0}	I	...R.....			K...L....	...V.....	.P.....	V.....	.A..V...M	..L....	8/20
	I	...R.....			K...L....	...V.....	.P.....	V.....	.A.....M	..L....	6/20
	I	...R.....			K...L....	...M....	.P.....Q		..I.V...M	..L....	2/20
	...R...I	...R.....			K...L....	...V.....	.P.....	V.....	.A.....M	..L....	1/20
	I	...R.....			K...L....	...V.....	.P.....	V.....	.A.....M	..L....	1/20
	I	...R.....			K...LM...	...VR....	.P.....	V.....	.A..V...M	..L....	1/20
HIV _{TM} ^{P15}	I	...R.....			K...L....	...V.....	.P.....	V.....	..T.....M	..L....L	11/20
	I	...R.....			K...L....	...V.....	.P.....	V.....	..T.....M	..L....	6/20
	..A.....I	...R.....			K...L....	...V.....	.P.....	V.....	..T.....M	..L....L	1/20
	I	..A.R....			K...L....	...V.....	.P.....	V.....	..T.....M	..L....	1/20
	I	...R.....			K...L....	R..V....	.P.....	V.....	..T.....M	..L....L	1/20

図 5 TPV 耐性誘導後に認められたプロテアーゼ領域のアミノ酸置換

HIV_{MIX} (A) および HIV_B, HIV_C, HIV_G, HIV_{TM} (B) の試験管内での耐性誘導前 (HIV_{MIX}^{P0}, HIV_B^{P0}, HIV_C^{P0}, HIV_G^{P0}, HIV_{TM}^{P0}) および後 (HIV_{MIX}^{P10}, HIV_B^{P10}, HIV_C^{P15}, HIV_G^{P15}, HIV_{TM}^{P15}) のプロテアーゼ領域のアミノ酸配列を示す。感染細胞より抽出した DNA を用い、PCR でウイルスプロテアーゼ領域を増幅、クローニング後にアミノ酸配列を同定した。野生株 HIV_{NL4-3} の配列と比較し相同のアミノ酸を点で示した。

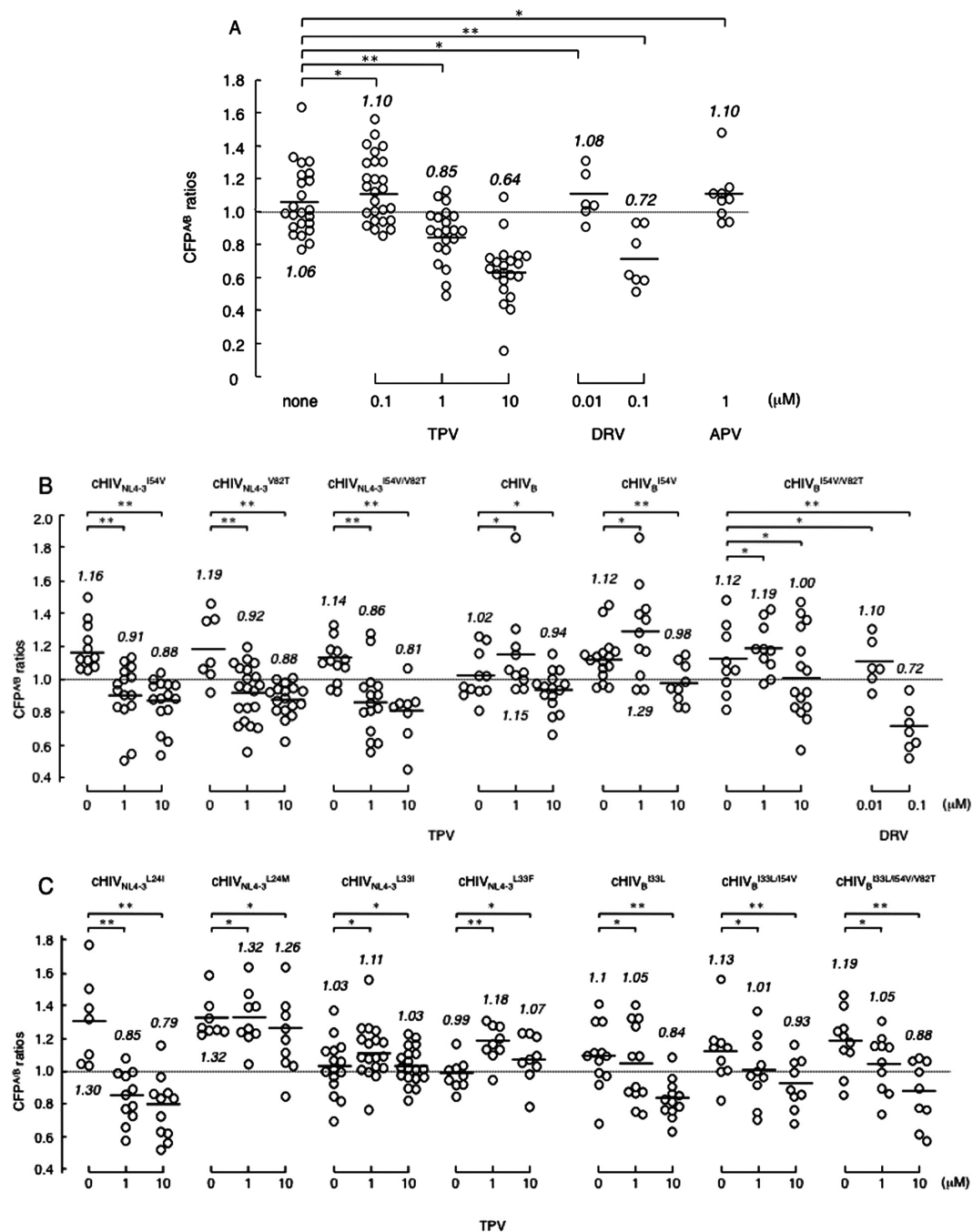


図 6 TPV 耐性変異体より同定したアミノ酸置換の TPV 二量体形成阻害に与える影響

FRET-HIV-1 expression assay system⁵⁾を用いて TPV の HIV プロテアーゼ二量体形成阻害に関与するアミノ酸置換を同定した。細胞内で発現させた CFP もしくは YFP 付き HIV-1 プロテアーゼについて、YFP のフォトブリーチング前後の CFP の蛍光強度の比 (CFP^{AB} ratio) が 1 以下であれば二量体形成が阻害されていることを示す⁵⁾。複数個の細胞を測定した結果の平均値を横線で示す。(A) 薬剤の非存在下では CFP^{AB} ratio は 1.06 を示し、二量体が形成されていることが確認された。TPV は野生型プロテアーゼに対して 0.1 μM では二量体形成阻害を示さないが (CFP^{AB} ratio は 1.10 を示した)、1 μM では二量体形成を阻害する (CFP^{AB} ratio は 0.85 を示した)。また DRV は 0.1 μM で二量体形成を阻害するが、APV は 1 μM でも二量体形成阻害が見られなかった。(B, C) TPV 耐性 HIV 変異体より同定したアミノ酸置換を HIV_{NL4-3} のプロテアーゼもしくは HIV_B 由来のプロテアーゼに導入し TPV の二量体形成阻止能を検討した。

* not significant ; ** $p < 0.05$.

害が確認された (図 6A)。次に同定したアミノ酸置換をプロテアーゼ領域に導入したクローンを作製し同様に確認すると、HIV_c が初めから有していた L24I では 0.1 μ M で二量体形成阻止が見られたが、TPV 耐性獲得後に見られた L24M では TPV の 10 μ M 存在下でも二量体形成阻止が見られなかった (図 6C)。また HIV_B は TPV 耐性関連変異として報告されている L33I を初めから有しており^{7,8)}、この変異を導入したクローンでは TPV の 10 μ M 存在下において二量体形成阻止がみられず、さらに TPV 耐性関連変異として報告されている L33F を導入しても同様にプロテアーゼの二量体形成が阻止されなかった (図 6C)。一方、I54V と V82T を単一でもしくは併せて導入したクローンでは TPV の 1 μ M 存在下でプロテアーゼ二量体形成阻止が確認された (図 6B)。これらの結果より、L24M、L33I、L33F が TPV による二量体形成阻止能の損失に、I54V と V82T は酵素活性阻止能の喪失に関連するアミノ酸置換であることが示唆された。

次に L33F もしくは I54V と V82T を HIV-1_{NL4-3} に導入したクローン (cHIV-1_{NL4-3}^{L33F}, cHIV-1_{NL4-3}^{I54V/V82T}) を用いて試験管内で TPV 耐性を誘導すると、野生株 HIV-1_{NL4-3} は 20 継代でも 1.5 μ M までしか到達しなかったが、cHIV-1_{NL4-3}^{I54V/V82T} は 10 継代で 5 μ M に達した (図 7)。一方、cHIV-1_{NL4-3}^{L33F} は

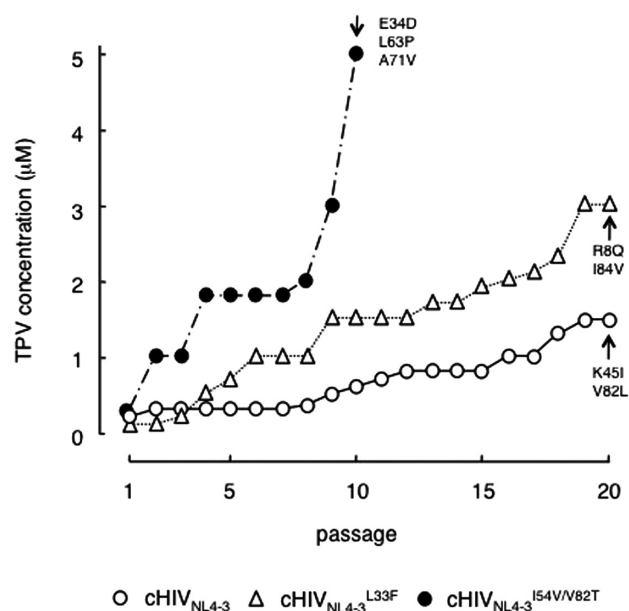


図 7 L33F もしくは I54V/V82T を導入した HIV の TPV 耐性獲得への影響

L33F もしくは I54V/V82T を HIV-1_{NL4-3} に導入した HIV クローンをを用いて試験管内で TPV 耐性を誘導した。矢印で示した継代で各クローンのウイルスプロテアーゼ領域に認められたアミノ酸置換を示した。

20 継代でも 3 μ M までしか到達しなかった (図 7)。また cHIV-1_{NL4-3}^{I54V/V82T} の 10 継代目のプロテアーゼ領域のアミノ酸配列を解析すると、E34D、L63P、A71V の 3 つのアミノ酸変異の蓄積が見られた (図 7)。これら 3 つのアミノ酸置換をそれぞれ導入したクローンについて、TPV の二量体形成阻止能に影響するかを確認すると、L63P と A71V は二量体形成が阻害されたが、E34D は二量体形成が阻害されなかった⁹⁾。以上の結果より、TPV は HIV プロテアーゼの二量体形成阻止能と酵素活性阻止能を有するが、二量体形成阻止能に比し酵素活性能が TPV の抗 HIV 活性により重要であることが示唆された。また DRV と TPV はともに高い genetic barrier を有するものの、TPV は 1 つのアミノ酸置換で二量体形成阻止能の損失が生じるが DRV には少なくとも 4 つのアミノ酸置換が必要であることから⁶⁾、総合的に判断すると DRV の genetic barrier は TPV よりも高いことが示唆された。

HIV プロテアーゼ二量体阻止能を有する新規プロテアーゼ阻害剤の開発

われわれは米国 Purdue 大学の Ghosh 博士のグループと共同で新規 HIV プロテアーゼ阻害剤の開発を行っており、野生株 HIV-1 に対して良好な抗 HIV-1 活性を示す化合物については、多剤耐性 HIV-1 変異体に対する活性を評価するなどさらに詳細な検討を行い、これまでに複数個の有望な新規 PIs を同定している^{10,11)}。そのなかで我々は、oxatricyclic 構造という 3 連の tetrahydrofuran 構造を持つ新規低分子化合物、GRL-0519 を同定した¹²⁾。

この化合物は野生株 HIV-1_{LA1} に対して強力な抗 HIV-1 活性を発揮 (*in vitro* の測定において DRV よりも約 5 倍高い活性を示す)、さらに多剤耐性臨床分離株に対してもその活性を維持し、かつ試験管内での耐性誘導実験においても著しく耐性の発現が遅延することを報告している¹³⁾。また GRL-0519 は DRV よりも低濃度で HIV-1 プロテアーゼの二量体形成を阻害することから¹²⁾、GRL-0519 の高い酵素活性阻止能と二量体阻止能が多剤耐性臨床分離 HIV-1 株に対する抗 HIV-1 活性と HIV-1 の耐性発現に対する高い genetic barrier を説明するものと思われる。

HIV のプロテアーゼ阻害剤に対する耐性発現機構の解明は、さらに強力かつ特異的な二量体阻害剤の開発に繋がるだけではなく、HIV の逆転写酵素やインテグラーゼなど二量体や多量体で機能するタンパク質に対する新しい作用機序を有する新規の薬剤の開発への応用、さらにはいまだ十分ではない HIV PR 二量体形成のダイナミクスの解明にも資すると思われる。加えて、DRV に対する耐性 HIV の出現が臨床的にもすでに報告されていることから、これらの耐性株の複製を強力に阻害する薬剤の開発も急務である。

謝辞

このたび、第14回ECC山口メモリアルエイズ研究奨励賞を受賞することになりましたことを深く感謝致します。これまでご指導いただ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) Doyon L, Croteau G, Thibeault D, Poulin F, Pilote L, Lamarre D : Second locus involved in human immunodeficiency virus type 1 resistance to protease inhibitors. *J Virol* 70 : 3763–3769, 1996.
- 2) Gatanaga H, Das D, Suzuki Y, Yeh DD, Hussain KA, Ghosh AK, Mitsuya H : Altered HIV-1 Gag protein interactions with cyclophilin A (CypA) on the acquisition of H219Q and H219P substitutions in the CypA binding loop. *J Biol Chem* 281 : 1241–1250, 2006.
- 3) 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.
- 4) Aoki M, Venzon DJ, Koh Y, Aoki-Ogata H, Miyakawa T, Yoshimura K, Maeda K, Mitsuya H : Non-cleavage site gag mutations in amprenavir-resistant human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) predispose HIV-1 to rapid acquisition of amprenavir resistance but delay development of resistance to other protease inhibitors. *J Virol* 83 : 3059–3068, 2009.
- 5) Koh Y, Matsumi S, Das D, Amano M, Davis DA, Li J, Leschenko S, Baldridge A, Shioda T, Yarchoan R, Ghosh AK, Mitsuya H : Potent inhibition of HIV-1 replication by novel non-peptidyl small molecule inhibitors of protease dimerization. *J Biol Chem* 282 : 28709–28720, 2007.
- 6) Koh Y, Aoki M, Danish ML, Aoki-Ogata H, Amano M, Das D, Shafer RW, Ghosh AK, Mitsuya H : Loss of protease dimerization inhibition activity of darunavir is associated with the acquisition of resistance to darunavir by HIV-1. *J Virol* 85 : 10079–10089, 2011.
- 7) Naeger LK, Struble KA : Food and drug administration analysis of tipranavir clinical resistance in HIV-1-infected treatment-experienced patients. *AIDS* 21 : 179–185, 2007.
- 8) Larder BA, Hertogs K, Bloor S, van den Eynde CH, DeCian W, Wang Y, Freimuth WW, Tarpley G : Tipranavir inhibits broadly protease inhibitor-resistant HIV-1 clinical samples. *AIDS* 14 : 1943–1948, 2000.
- 9) Aoki M, Danish ML, Aoki-Ogata H, Amano M, Ide K, Das D, Koh Y, Mitsuya H : Loss of the protease dimerization inhibition activity of tipranavir (TPV) and its association with the acquisition of resistance to TPV by HIV-1. *J Virol* 86 : 13384–13396, 2012.
- 10) 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. *Antimicrobial Agents Chemother* 54 : 3460–3470, 2010.
- 11) Ide K, Aoki M, Amano M, Koh Y, Yedidi RS, Das D, Leschenko S, Chapsal B, Ghosh AK, Mitsuya H : Novel HIV-1 protease inhibitors (PIs) containing a bicyclic P2 functional moiety, tetrahydropyrano-tetrahydrofuran, that are potent against multi-PI-resistant HIV-1 variants. *Antimicrobial Agents Chemother* 55 : 1717–1727, 2011.
- 12) Ghosh AK, Xu CX, Rao KV, Baldridge 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. *Chem Med Chem* 5 : 1850–1854, 2010.
- 13) Amano M, Tojo Y, Salcedo-Gomez PM, Campbell JR, Das D, Aoki M, Xu CX, Rao KV, Ghosh AK, Mitsuya H : GRL-0519, a novel oxatricyclic ligand-containing nonpeptidic HIV-1 protease inhibitor (PI), potently suppresses replication of a wide spectrum of multi-PI-resistant HIV-1 variants in vitro. *Antimicrobial Agents Chemother* 57 : 2036–2046, 2013.