

総 説

カプシド蛋白質 (CA) を標的とした抗 HIV-1 薬の最近の進歩

Recent Advances in HIV-1 Inhibitors Targeting the Capsid Protein

村上 努

Tutomu MURAKAMI

国立感染症研究所エイズ研究センター

National Institute of Infectious Diseases, AIDS Research Center

日本エイズ学会誌 24: 83-88, 2022

1. はじめに

2020年の時点で、全世界で約38億人のHIV感染者が存在し、2021年6月の時点で、約28億人が抗レトロウイルス療法(ART)を受けていると推定される¹⁾。HIV感染者数は依然として非常に多いが、多剤併用療法(Combination Antiretroviral Therapy: (c)ART)の発展と普及により、HIV感染症は以前の「死の病」から「制御可能な慢性疾患」へと変化した。

先進国では、ARTは高い抗ウイルス活性を示すインテグラーゼ阻害薬が中心となり、1日1回1錠レジメンも普及し、HIV感染患者のQOLの向上が図られている。しかし、ARTではHIV感染症を治癒することはできず、感染者は生涯服薬を継続しなければならない。そのため、長期服薬による腎機能低下や脂質異常などの副作用は避けられず、長期的な安全性に関する懸念も残っている。また、服薬率の低下に伴う薬剤耐性ウイルス出現の心配も依然として存在する。残念なことに、HIV感染に対する効果的な予防ワクチンもまだ開発されていない。

したがって、次善の対応は、これまでの抗HIV薬の標的(ウイルスの侵入、逆転写酵素、インテグラーゼ、プロテアーゼ)とは異なる部位や複製過程を標的とした薬剤の開発である。そのような薬剤の探索・開発研究は、今世紀に入ってからも精力的に行われてきた。その中の1つが、HIV-1の構造蛋白質であるGag蛋白質の主要構成成分であるカプシド蛋白質(CA)を標的とした薬剤である^{2,3)}。本総説では、これまでに発表された、CAを標的とした抗HIV-1薬候補から主なものを取り上げて、その作用点や作用機序などを解説する。

2. カプシド蛋白質 (CA) とカプシドコア

HIV-1カプシド蛋白質(CA)は、N末端領域(NTD)、C末端領域(CTD)、およびこの2つを連結するリンカー領域からなる(図1)。この単量体のCA(図2A)が集合して、六量体(図2B, C)と五量体(図2D, E)が形成され、さらにこれらが集合してカプシドコア(ウイルスコア)が形成される(図2F)。カプシドコアは、成熟HIV-1粒子中に釣り鐘型(または弾丸状)の形態で存在し、内部にウイルスRNAおよび逆転写酵素、インテグラーゼなどのウイルス蛋白質を包含している(図2G)。HIV-1複製後期過程において、Gag蛋白質前駆体がウイルスプロテアーゼの作用によりプロセッシングされ、図2Gに示すようなカプシドコアを有する成熟HIV-1粒子が形成され、ウイルス産生細胞から出芽・放出される。ひき続き起こる次の感染(複製前期)過程において、カプシドコアは、種々の宿主因子との相互作用を介した時間的・空間的に制御を受けた分解(脱殻)によって、逆転写および核移行過程の円滑な進行において重要な役割を果たしている⁴⁾。

3. これまでに発表された主なCA阻害剤

3-1. CAP-1

CAP-1(図3)は、CAを標的とした阻害剤として、最初(2003年)に報告された化合物で、CA-NTD領域に結合すると予想される化合物をパブリックドメイン化合物ライブラリーからコンピュータによってスクリーニングされた⁵⁾。CAP-1のCA-NTDへの結合は、NTDの高次構造を変化させた⁶⁾。CAP-1は、薬剤存在下で産生されたHIV-1の感染価を用量依存的に低下させるが、ウイルスの侵入、逆転写、組み込みなどの複製前期過程には影響を与えなかった。また、後期過程におけるGag蛋白質のプロセッシングやウイルス産生量に影響を与えないが、Gag蛋白質前駆体の細胞内分解を促進した。くわえて、産生ウイルスのコ

著者連絡先: 村上 努 (〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1
国立感染症研究所エイズ研究センター)

2022年7月4日受付

アの形態を変化させ、成熟コアのアセンブリー阻害を示した(表1)が、*in vitro*ではHIV-1 CA-NC複合体の安定性に影響を与えなかった⁷⁾。

3-2. Capsid Assembly Inhibitor (CAI)

CAI(図3)は、2005年に最初に報告された、ファージディスプレイスクリーニングによって見出されたCAに結合する12アミノ酸残基のペプチドである(表1)⁸⁾。CAの二量体化面に存在する疎水性の溝と相互作用して、*in vitro*における成熟および未成熟HIV-1双方のアセンブリーを阻害するが、ペプチドのため、細胞膜を透過しない。

3-3. NYAD-1

NYAD-1(図3)は、CAI分子内に架橋構造を形成させるステイプル化によって、らせん状ペプチドの二次構造を安定化させ、その生物活性を維持したまま、細胞膜透過性を

を顕著に向上させた化合物である⁹⁾。CAIと同様に、*in vitro*における成熟および未成熟HIV-1双方のアセンブリーを阻害するのみならず、細胞培養系においてもHIV-1の成熟を阻害する(表1)。標的細胞をこの化合物で処理することにより、侵入するHIV CAにも作用して、ウイルス感染を侵入後の過程で阻害することも可能である。また、NYAD-1は実験室株のみならず、種々のサブタイプの臨床分離HIV-1にも対してもほぼ同程度のウイルス複製阻害活性を示した。

3-4. Ebselen

Ebselen(図3)は、CA-CTD領域の相互作用を介したCA-CAの二量体化を測定する生化学的なアッセイ系を用いたハイスループットスクリーニングにより、CA二量体化を阻害する低分子化合物として見出された¹⁰⁾。化合物ライブラリーとして、生体内で薬理的に活性を有することが知られている1280化合物を使用した。物理化学的解析の結果から、Ebselenが直接HIV-1 CAに結合することが確認された。Ebselenは、標的細胞が培養細胞であってもヒト末梢血単核球であっても同程度の抗HIV-1活性を示した。その作用機序は、CAを安定化することにより、脱殻過程を抑制し、ひき続きまたは並行して起こる逆転写過程も阻害すると考えられている(表1)。HIV-1複製後期過程への影響を調べた結果、Tat依存的なHIV転写、Gag蛋白質の発現と成熟、産生ウイルスの量と感染価にはほとんど影響を与えなかった。Ebselenは、他のレトロウイルスである、モロニー白血病ウイルスやサル免疫不全ウイルスの感染も阻害したが、C型肝炎ウイルスやインフルエンザウイルスの感染は抑制しなかった。

3-5. ACAi-028

Amanoらは、HIV-1 CA-NTDの特定の領域に19アミノ酸残基を挿入すると、CAの自壊が誘導されることを見出

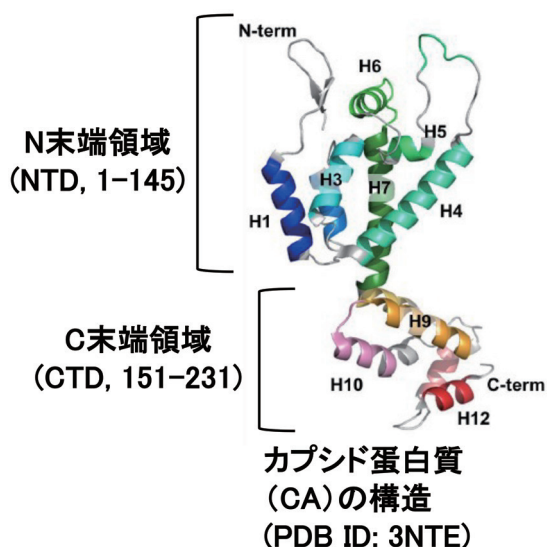


図1 HIV-1カプシド蛋白質(CA)の構造

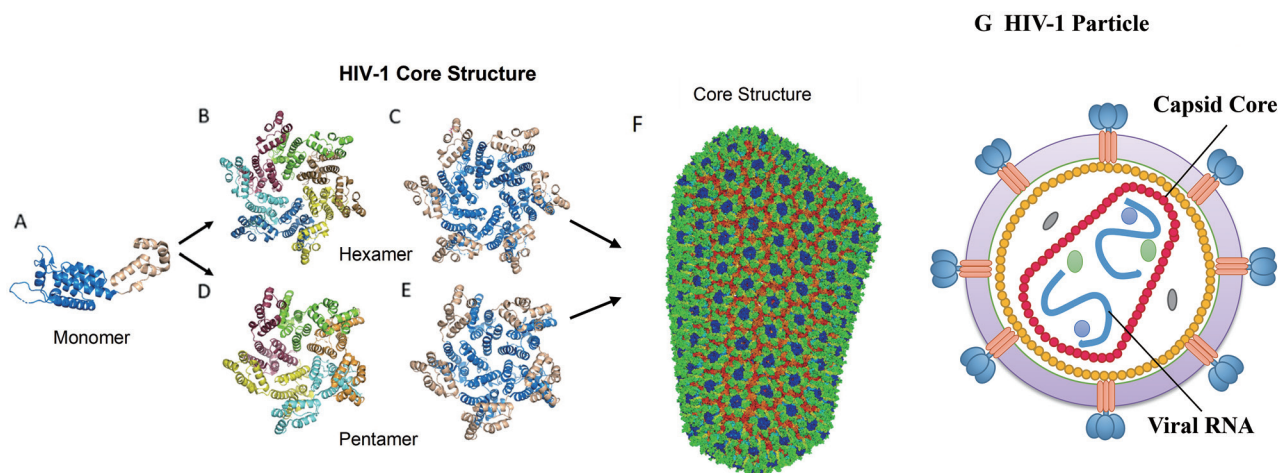


図2 HIV-1カプシド蛋白質(CA)の構造とコアの形成(A-F)⁴⁾およびHIV-1粒子

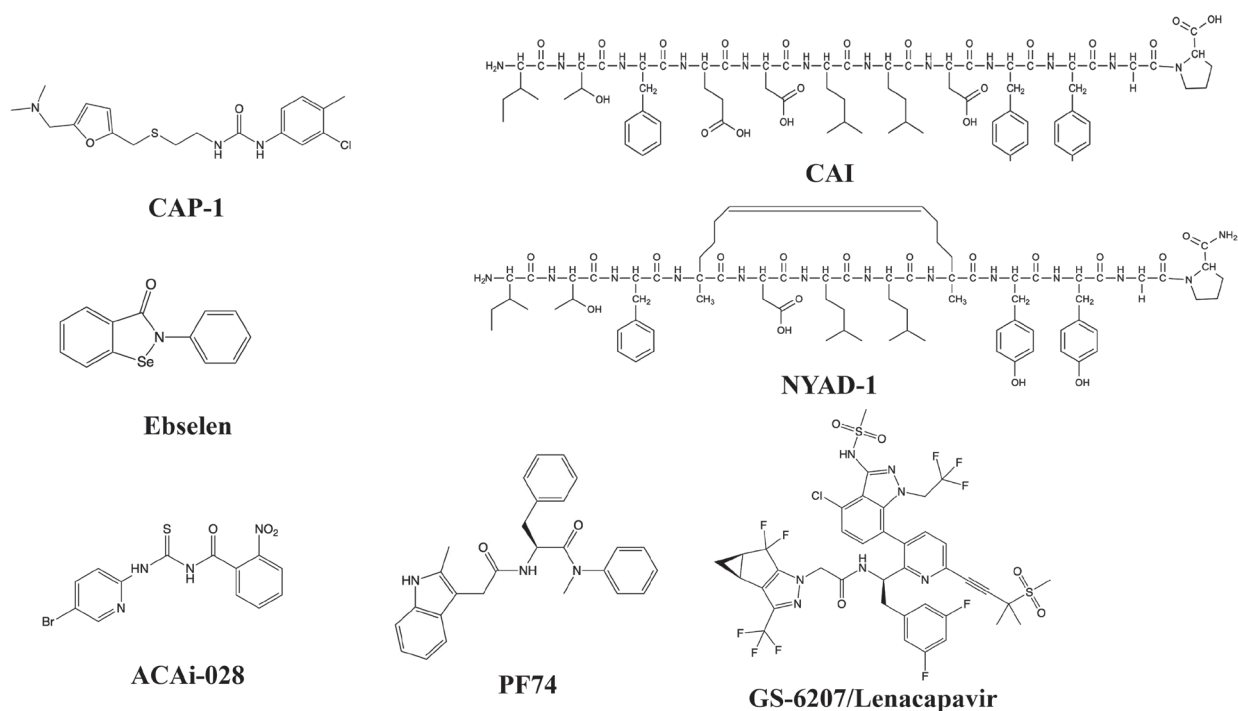


図 3 CA を標的とした主な抗 HIV-1 化合物の構造式³⁾

表 1 CA を標的とした主な抗 HIV-1 化合物の特徴

CA 阻害薬	スクリーニング方法	標的領域	CA 多量体化	阻害を示す複製過程
CAP-1	<i>in silico</i> スクリーニング	NTD/CTD	抑制	後期
CAI/NYAD-1	ファージディスプレイスクリーニング	NTD	抑制	前・後期
Ebselen	CA 二量体化試験	CTD	促進	前期
ACAi-028	<i>in silico</i> スクリーニング	NTD	抑制	前期
PF74	<i>in silico</i> スクリーニング	NTD/CTD	促進	前・後期
GS-6207/Lenacapavir	<i>in silico</i> スクリーニング	NTD/CTD	促進	前・後期

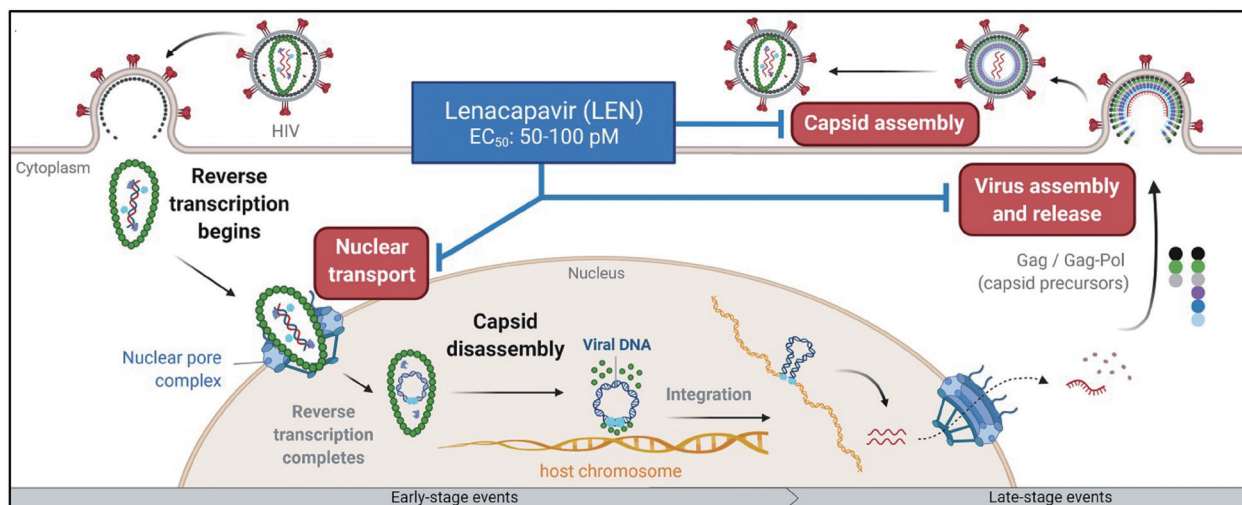


図 4 GS-6207/Lenacapavir (LEN) の HIV 複製過程における作用点²⁴⁾

した¹¹⁾。Chiaらは、この領域に低分子が結合することにより、カプシドコアの性質に影響を与えると仮説を立て、*In silico docking*によるスクリーニングにより、CA-NTDの疎水性のポケットに結合する化合物を選択した。細胞培養における抗 HIV-1 活性および細胞毒性の評価から 40 化合物を選定し、その中でもっともよいプロファイルを示した ACAi-028 ($EC_{50}=0.55 \mu\text{M}$, $CC_{50}>100 \mu\text{M}$) (図 3) について詳細に検討を行った¹²⁾。ACAi-028 は、CA-NTD の Q13, S16, T19 と相互作用することにより、脱殻過程に影響を与え、逆転写からウイルス DNA の組込みに至る過程を阻害する (表 1)。S16, T19 を介して CA の多量体化や熱安定性を低下させるが、Gag 蛋白質の発現と成熟、産生ウイルスの量と感染価にはほとんど影響を与えない、すなわち、複製後期過程へは影響をほとんど与えなかった。ACAi-028 の標的と考えられる CA-NTD の配列が HIV-1 とは異なる HIV-2 に対しては複製阻害活性を示さなかった。

3-6. PF74

PF-3450074 (PF74) (図 3) は、Pfizer 社によって開発された HIV-1 CA を標的とするペプチドを模したペプチドミメティックスで、HIV-1 の複製をの μM 未満の濃度で抑制した (Blair 2010)¹³⁾。複製前期過程の脱殻過程に影響し、逆転写過程を阻害した。複製後期過程では、産生ウイルス量にはほとんど影響を与えないが、産生ウイルスの感染価を大幅に低下させた (表 1)。PF74 存在下で産生された HIV-1 の形態を電子顕微鏡で観察すると、未処理のウイルスで顕著に観察される成熟カプシドコアがほとんど観察されなかった。PF74 は、CA 多量体化を促進し、アセンブリーしたカプシド内に存在する CA の六量体の中のポケットへ結合が観察された。興味深いことに、このポケットには HIV-1 の核移行やウイルス DNA の組込みの進行に関与することが知られている宿主因子 CPSF6 および NUP153 も結合した¹⁴⁾。

Saito らは、宿主因子との関係から、PF74 の作用機序には 2 つの異なる段階があることを明らかにした¹⁵⁾。すなわち、低濃度の PF74 は、CA に結合して安定化し、核移行に関与する宿主因子 NUP153 の CA への結合を阻害した。他の宿主因子 CPSF6 やサイクロフィリン A は CA の安定化に寄与して PF74 の作用を増強し、脱殻を遅らせ、核移行を抑制した。一方、高濃度の PF74 は、CA に大量に結合することにより CA 構造を不可逆的に崩壊させ、逆転写過程を阻害した。この現象は、上述の NUP 蛋白質群の関与の前に生じる。PF74 の HIV-1 粒子への結合を阻害する変異やウイルスコアを安定化する変異を CA に導入すると、PF74 に対して耐性を示すようになった¹⁶⁾。PF74 の抗 HIV-1 活性は宿主因子サイクロフィリン A の CA への結合によって促進された。したがって、PF74 の前期過程にお

ける作用は、未熟な脱殻を促進させることによっている。Rankovic らは原子間力顕微鏡による観察から、PF74 が CA を安定化することにより、逆転写によって誘導される脱殻を抑制していることを見出した¹⁷⁾。また、Dash の研究グループは、生化学的に精製したブレインテグレーション複合体 (PIC) を用いて、PF74 が、CA を安定化することにより、PIC を介した HIV-1 DNA のインテグレーションを阻害することを明らかにした¹⁸⁾。

PF74 に対する耐性 HIV-1 を T 細胞培養において誘導する実験から、PF74 が結合する CA 領域の変異が耐性に寄与すること、これらの変異によって減弱したウイルス複製能を回復させるために追加変異が必要なことが明らかになった。また、これらの PF74 耐性変異は、HIV-1 が核移行に必要としている宿主因子への依存性を変化させることも明らかになった。得られた PF74 耐性ウイルスは T 細胞のみならずマクロファージにおける複製能も低下しており、生体内でこのような耐性変異が出現することに対して機能的な制限がかかっていることを示唆している^{19,20)}。

PF74 の欠点の 1 つは、その代謝安定性が低いことである。その欠点を克服するために PF74 の誘導体が数多く合成され、その中には、抗 HIV-1 活性を維持または増強させつつ、生体内安定性を向上させることに成功した化合物も見出された^{3,21)}。

3-7. GS-6207 (Lenacapavir; LEN)

GS-6207 (Lenacapavir; LEN) (図 3) は、Gilead Sciences 社によって開発された、PF74 と構造が一部似ている複雑な構造を有する化合物である。ある種の宿主因子が CA 六量体と相互作用する CA-NTD 内領域を標的とし、HIV-1 複製前期過程では、侵入後 (おそらく核移行) の過程を、後期過程では、ウイルス産生および産生ウイルスの成熟を阻害することが明らかにされている (図 4) (表 1)^{22~24)}。

LEN の前期過程阻害活性はきわめて高く (標的細胞における EC_{50} は $\sim 30 \text{ pM}$)、その理由として LEN が CA と HIV-1 の核移行に関与している宿主因子である NUP153 や CPSF6 との相互作用を競争的に阻害していることがあげられる。一方、後期過程の阻害活性は、ウイルス産生細胞における EC_{50} は $\sim 440 \text{ pM}$ と前期過程に比べて低いものの、 nM オーダー以下の高い活性を示した²⁵⁾。また、LEN は、調べたすべてのサブタイプの臨床分離 HIV-1 株に対して pM オーダーでその複製を阻害し、既存の抗 HIV-1 薬とは交差耐性を示さなかった²⁶⁾。

多剤耐性 HIV-1 を有する患者を対象に、LEN の 6 カ月ごとの皮下投与に最適化治療を併用した際の有効性と安全性をプラセボと比較検討した第 3 相臨床試験 (CAPELLA 試験) において、1 回の皮下投与で 6 カ月の治療濃度持続を示し、26 週における血中ウイルス量も 80% 以上の患者で

<50 copies/mL 未満を達成した。また、重篤な副作用は観察されず、LEN の有効性と安定性の両方が示された^{27,28)}。

4. その他の CA 阻害剤

4-1. BMMP

Komano らの研究グループは、酵母ツーハイブリッドスクリーニングにより、膜結合型 Gag 蛋白質と相互作用する BMMP と呼ばれる低分子化合物を見出した。BMMP は、HIV-1 CA 特異的に結合し、脱殻過程の阻害が示唆された²⁹⁾。

4-2. Benzodiazepine (BD), benzimidazole (BM)

米国の Mason ラボらの研究グループは、*in vitro* の CA アセンブリーを測定する系を構築した。化合物ライブラリーをこのスクリーニング系にかけ、2つのグループに分けられる CA 阻害剤を見出した³⁰⁾。1つは、benzodiazepine (BD) で、HIV-1 の放出を阻害する。もう1つは、benzimidazole (BM) で、成熟カプシドの生成を阻害する。どちらの化合物も CA-NTD に存在する前述の CAP-1 結合部位とオーバーラップして CA に結合することが示された。

4-3. MKN-1A

筆者、Tamamura、および Sato らの研究グループは、多くの HIV-1 株間で高度に保存され、CA の二量体化に重要であると考えられている CTD の W184/M185 残基に着目した。*In silico* スクリーニングにより、この2アミノ酸をミミックして二量体化を阻害すると予想され、かつ合成が比較的容易と考えられるペプチドミメティックスを選出した。さらに、化学合成した化合物が実際に抗 HIV-1 活性を有するかを検討した。その結果、MKN-1A と命名した低分子量ペプチドミメティックスが1 μ M の EC₅₀ で HIV-1 の複製を阻害することが明らかになった³¹⁾。現在、同様の手法で選出した他の化合物についても詳細な検討を行っている。

5. おわりに

CA を標的とした HIV-1 阻害薬の探索研究の努力が最初に発表されてもうすぐ20年になろうとしている。その間、本稿で紹介したように、種々のアプローチによって、さまざまな作用機序と多様な構造を有する化合物が見出されてきたが、なかなか臨床試験までたどり着く化合物が現れなかった。しかし、最近見出された GS-6207 (Lenacapavir; LEN) は第3相臨床試験まで行われており、その高い抗ウイルス活性のみならず、長時間作用型製剤としての有効性および安全性が認められ、その臨床での使用が期待されている。

CA は、上述のように、HIV-1 複製の前期過程と後期過程の双方においてその機能を発揮しており、CA を標的とした化合物の中には LEN のように実際に双方の過程を阻

害する薬剤も開発されている。今後の継続した探索研究から LEN に続く臨床使用可能な CA 阻害薬が見出されることが期待される。

利益相反：筆者は低分子抗 HIV 活性化合物 (MKN-1A) の特許出願に関して共同発明者の一人である。その他本論文の内容に関して開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Global HIV&AIDS statistics—2021 fact. <https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>
- 2) Carnes SK, et al : Inhibitors of the HIV-1 capsid, a target of opportunity. *Curr Opin HIV AIDS* 13 : 359-365, 2018.
- 3) McFadden WM, et al : Rotten to the core: antivirals targeting the HIV-1 capsid core. *Retrovirology* 18 : 41, 2021.
- 4) Rossi E, et al : Structure, function, and interactions of the HIV-1 capsid protein. *Life (Basel)* 11 : 100, 2021.
- 5) Tang C, et al : Antiviral inhibition of the HIV-1 capsid protein. *J Mol Biol* 327 : 1013-1020, 2013.
- 6) Kelly BN, et al : Structure of the antiviral assembly inhibitor CAP-1 complex with the HIV-1 CA protein. *J Mol Biol* 373 : 355-366, 2007.
- 7) Fricke T, et al : Human cytosolic extracts stabilize the HIV-1 core. *J Virol* 87 : 10587-10597, 2013.
- 8) Sticht J, et al : A peptide inhibitor of HIV-1 assembly *in vitro*. *Nat Struct Mol Biol* 12 : 671-677, 2005.
- 9) Zhang H, et al : A cell-penetrating helical peptide as a potential HIV-1 inhibitor. *J Mol Biol* 378 : 565-580, 2008.
- 10) Thenin-Houssier S, et al : Ebselen, a small-molecule capsid inhibitor of HIV-1 replication. *Antimicrob Agents Chemother* 60 : 2195-2208, 2016.
- 11) Amano M, et al : Amino-acid inserts of HIV-1 capsid (CA) induce CA degradation and abrogate viral infectivity : insights for the dynamics and mechanisms of HIV-1 CA decomposition. *Sci Rep* 9 : 9806, 2019.
- 12) Chia T, et al : A small molecule, ACAi-028, with anti-HIV-1 activity targets a novel hydrophobic pocket on HIV-1 capsid. *Antimicrob Agents Chemother* 65 : e0103921, 2021.
- 13) Blair WS, et al : HIV capsid is a tractable target for small molecule therapeutic intervention. *PLoS Pathog* 6 : e1001220, 2010.
- 14) Bhattacharya A, et al : Structural basis of HIV-1 capsid recognition by PF74 and CPSF6. *Proc Natl Acad Sci USA* 111 : 18625-18630, 2014.
- 15) Saito A, et al : Roles of capsid-interacting host factors in multimodal inhibition of HIV-1 by PF74. *J Virol* 90 : 5808-

- 5823, 2016.
- 16) Shi J, et al : Small-molecule inhibition of human immunodeficiency virus type 1 infection by virus capsid destabilization. *J Virol* 85 : 542–549, 2011.
 - 17) Rankovic S, et al : PF74 reinforces the HIV-1 capsid to impair reverse transcription-induced uncoating. *J Virol* 92 : e0084518, 2018.
 - 18) Balasubramaniam M, et al : PF74 inhibits HIV-1 integration by altering the composition of the preintegration complex. *J Virol* 93 : e0174118, 2019.
 - 19) Shi J, et al : Compensatory substitutions in the HIV-1 capsid reduce the fitness cost associated with resistance to a capsid-targeting small-molecule inhibitor. *J Virol* 89 : 208–219, 2015.
 - 20) Zhou J, et al : HIV-1 resistance to the capsid-targeting inhibitor PF74 results in altered dependence on host factors required for virus nuclear entry. *J Virol* 89 : 9068–9079, 2015.
 - 21) Wang L, et al : Novel PF74-like small molecules targeting the HIV-1 capsid protein : balance of potency and metabolic stability. *Acta Pharm Sin B* 11 : 810–822, 2021.
 - 22) Price AJ, et al : CPSF6 defines a conserved capsid interface that modulates HIV-1 replication. *PLoS Pathog* 8 : e1002896, 2012.
 - 23) Yant SR, et al : A highly potent long-acting small-molecule HIV-1 capsid inhibitor with efficacy in a humanized mouse model. *Nat Med* 25 : 1377–1384, 2019.
 - 24) Dvory-Sobol, H, et al : Lenacapavir: a first-in-class HIV-1 capsid inhibitor. *Curr Opin HIV AIDS* 17 : 15–21, 2022.
 - 25) Bester SM, et al: Structural and mechanistic bases for a potent HIV-1 capsid inhibitor. *Science* 370 : 360–364, 2020.
 - 26) Link JO, et al : Clinical targeting of HIV capsid protein with a long-acting small molecule. *Nature* 584 : 614–618, 2020.
 - 27) 松村次郎 : 2 剤レジメン療法と長時間作用型製剤. *日本エイズ学会誌* 24 : 4–12, 2022.
 - 28) Segal-Maurer S, et al : Capsid inhibition with lenacapavir in multidrug-resistant HIV-1 infection. *N Engl J Med* 386 : 1793–1803, 2022.
 - 29) Urano E, et al : Novel postentry inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 replication screened by yeast membrane-associated two-hybrid system. *Antimicrob Agents Chemother* 55 : 4251–4260, 2011.
 - 30) Lemke CT, et al : Distinct effects of two HIV-1 capsid assembly inhibitor families that bind the same site within the N-terminal domain of the viral CA protein. *J Virol* 86 : 6643–6655, 2012.
 - 31) Kobayakawa T, et al : Small-molecule anti-HIV-1 agents based on HIV-1 capsid proteins. *Biomolecules* 11 : 208, 2021.