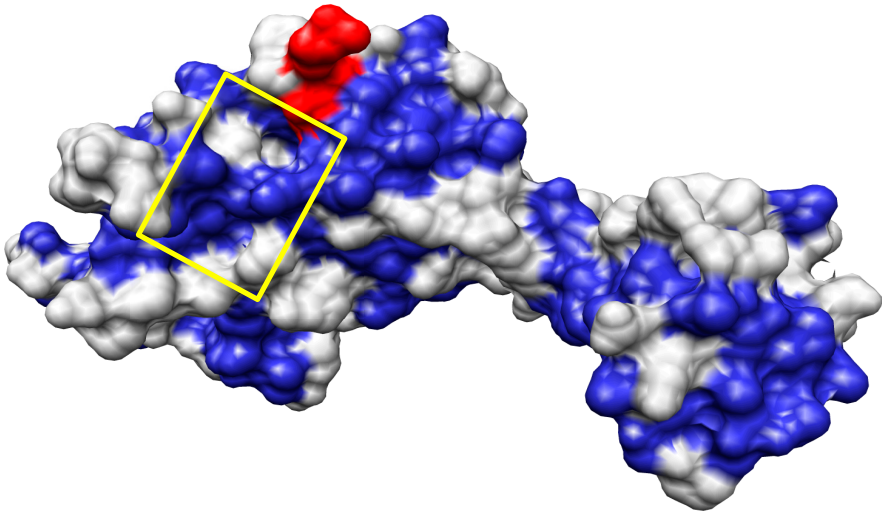
68　HIV Capsid蛋白の自己崩壊を誘導する新規抗HIV剤の開発	天野　将之

【目的】本研究は、HIV-1（HIV）粒子を形成する構造蛋白である capsid（CA）に結合し、更に CA の自己崩壊（自壊）を誘導する事で HIV の増殖を抑制する、全く新しい機序を有する抗 HIV 剤の開発を目指すものである。
【方法】HIV CA 結晶の表面構造を解析する事で CA の標的部位近傍に疎水性 cavity を同定（下図）、800 万個超の化合物データを基に docking simulation により各化合物と CA 間の結合スコアを計算、良スコアの化合物は購入し抗 HIV 活性を評価した。ELISA や WB により同定抗 HIV 化合物群の CA に対する作用の有無を評価した。また電顕で成熟 HIV 粒子に対する CA 自壊化合物の影響を観察した。欠損変異 CA を作製し CA-化合物間での結合部位の推測を行った。
【結果】筆者らは上記手法により 40 種超の抗 HIV 化合物を新規に同定した。更に HIV CA に直接作用して著明な蛋白自壊を誘導する事で抗 HIV 作用を発揮する 3 種類の化合物（CA 自壊化合物）を同定した。成熟 HIV 粒子浮遊液において、CA 自壊化合物の添加により著しい HIV 粒子の形態異常が誘導される事が判明、CA 自壊化合物は HIV 生活環での異なった phases で抗 HIV 作用を発揮する事が示唆された。部分欠損 CA を用いた実験の結果、CA 自壊化合物は CA の N 末端側に結合する事が示唆された。同定した CA 自壊化合物の合成展開を進め、更に同定した CA 自壊化合物に関して特許を出願した。

HIV CA 単量体の表面構造上に同定し、docking simulation の標的とした疎水性 cavity



68. HIV Capsid 蛋白の自己崩壊を誘導する新規抗 HIV 剤の開発

天野　将之

熊本大学 医学部附属病院 血液内科

Key words：HIV-1，capsid 蛋白，蛋白崩壊，新規抗 HIV-1 薬，創薬

緒　言

本研究は、HIV-1（HIV）粒子を形成する構造蛋白である capsid（CA）に対して特異的に結合し、更に CA の自己崩壊（自壊）を誘導する事で HIV の増殖を抑制する、これまで報告の無い機序を有する抗 HIV 剤の開発を目指すものである。HIV 感染に対する化学療法（ART）は長足の進歩を遂げたが、ART に対して HIV が薬剤耐性を獲得し、多くが交差耐性であるが故に治療抵抗性となった症例数の増大が続いており、これに対応し得る新規作用機序・標的を持つ薬剤の開発に関する基礎研究の重要性は増している。HIV の逆転写酵素に起因する高い変異発生率及び HIV 酵素群の持つ遺伝子変異への高い許容性により、薬剤耐性株出現の問題が惹起されている。対して CA は遺伝子的に HIV サブタイプ間でよく保存された領域であり［1, 2］、変異出現への許容性が低い事が示唆され、我々が開発を進めている CA 阻害剤に対し、HIV が薬剤耐性を獲得する事は困難であると推測される。

既存 ART は主に HIV の酵素を標的としているが、対して本研究の標的である CA は、HIV 内でウイルス遺伝子を包む殻を構成する蛋白であり、本研究は HIV の“本丸”を攻める戦略であると言える。我々は治療不応となった HIV 感染者由来株に認められる CA のアミノ酸挿入変異（AA）に注目、このような AA を有する変異株では今まで報告の無い CA の異常な自壊が起こる事を見出した。トランスポゾン法により CA に AA を導入した変異株を多数作製・検討した結果、本現象は変異株を培養する事で進行し、変異株では CA 殻の形成不全が起こり、著しく感染・複製能が低下する等多数のデータを得ている（Amano, *et al.* 論文投稿中）。以上より、挿入変異 CA 自体がその構造学的変化により自壊すると推測でき、この構造的不安定性が耐性株の低複製能に関連していると考えられる。本知見を基に、AA が入る事で CA の自壊を来す CA の標的部位へ強固に結合する化合物は同様の現象を誘発し得ると考え、新規治療法に繋がる化合物の検索・評価を行った。

HIV の骨格形成因子である Gag 蛋白群（HIV 最外層の膜を形成する Matrix 蛋白、CA、HIV 遺伝子のシャペロンである NC 蛋白等）の阻害は、ウイルス学・創薬学的に魅力的な標的であるが、未だ臨床応用に至っていない。HIV CA 阻害剤に関しては欧米で複数のグループによる開発が進められている（①～④）。① Bevirimat（BVM，PA457）は、前駆蛋白段階の CA と p2 間における、プロテアーゼによる開裂（切断）を阻害する CA 成熟化阻害剤として開発された［3］。現在誘導体が Bristol-Myers Squibb 社により開発中である［4］。② CAI は CA の C 末端側（CTD）に結合するペプチドであり、感染細胞から HIV の放出（出芽）を抑制する［5］。③ CAP-1 は CA の N 末端側（NTD）に結合する化合物である［6］。④ PF74 は Pfizer 社が開発中の化合物であり、CA 多量体安定化を過剰促進させる事で CA の機能を阻害する［7］。

このように複数の HIV CA 阻害剤が開発中であるが、いずれにおいても CA の自壊を誘導するとの報告はなく、また我々が同定した CA 自壊誘導化合物の構造は、①～④のいずれの化合物とも類似していない。前述した CA 阻害剤のうち、我々は BVM と PF74 を入手し CA 自壊誘導活性の有無を検討した所、これらは CA 自壊作用を持たない事が明らかになった。以上より、本研究は極めて独自性・新規性に富んだものであると言える。

方　法

我々はX線回析より得られたHIV CA結晶の表面構造を解析する事で、CAの標的部位近傍に化合物が結合し得る疎水性cavityを同定した（図1）。次に800万個超の化合物データを入手し、ADMEに影響を及ぼし得る分子特性を考慮しdruggableな化合物約700万個を抽出、更にエネルギー極小化計算を行い溶媒中での各化合物の構造を最適化した上で、docking simulationにより各化合物とCA間の結合スコアを計算、良スコアの化合物は購入し抗HIV活性を評価した。上記手法により我々は40種超の抗HIV-1活性を有するhit化合物群を新規同定した。CAもしくはHIVを強制発現させた細胞の溶解液やウイルス上清を超遠心する事で作製したHIV溶解液を用いて、同定化合物群のCAに対する作用の有無をELISA法・Western blotting（WB）法で評価した。またHIV-2株感染細胞を用いて、HIV-2のCAに対する化合物の作用を評価した。更に細胞から出芽後の成熟HIV粒子に対するCA自壊誘導化合物の作用を評価するため、超遠心により成熟HIV粒子浮遊液を作製し、CA自壊誘導化合物と反応後に電子顕微鏡でHIVの形態を観察した。加えて種々の欠損変異CAに対する化合物のCA自壊誘導能の変化を検討する事で、CA-化合物間での結合部位の推測を行った。

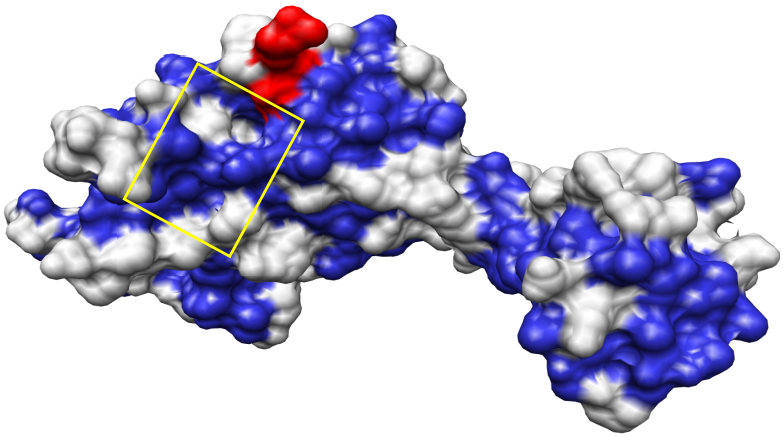


図1. HIV CA表面に同定し、docking simulationの標的とした疎水性cavity
HIV CA単量体の表面構造を示す。赤は標的アミノ酸部位、青は疎水性アミノ酸領域、黄枠は同定した疎水性cavity（docking simulationにおける標的cavityとして使用）をそれぞれ示す。

結　果

助成期間において我々は、① HIV CA表面に同定した疎水性標的cavityに対し特異的に結合する化合物のdocking simulationによる検索、② MTTアッセイやp24アッセイによる化合物の抗HIV-1活性の評価、③ 抗CA抗体を用いたELISA法やWB法により、抗HIV活性を有する同定化合物のCA自壊誘導作用の評価を行った。

CAを強制発現させたCOS-7細胞の溶解液に、同定した化合物を添加して持続培養した際のCA抗原性の変化を評価した結果、HIV CAに直接作用して著明な蛋白自壊を誘導する事で抗HIV作用を発揮する3種類の化合物（CA自壊誘導化合物）を新規に同定した（図2）。HIV強制発現細胞の溶解液やウイルス溶解液を用いて評価した結果、細胞内に強制発現させたCA単量体・細胞から出芽前のHIV・培養液中に出芽後のHIVの全てにおいてCA自壊誘導化合物は時間/濃度依存性にCAの自壊を誘導する事が判明した。また、HIV-1のみならずHIV-2株においてもCA自壊誘導化合物はCA自壊を誘導した。更に超遠心により成熟HIV粒子浮遊液を作製しCA自壊誘導化合物と反応させた後に電子顕微鏡で観察した結果、CA自壊誘導化合物の添加によりウイルス内のCA殻が消失し、粒子内にびまん性の沈殿物を認めるといったHIV粒子の著しい形態異常を来す事が判明、この結果よりCA自壊誘導化合物は感染細胞内で合成されたCA、および成熟HIV粒子内に侵入しHIV遺伝子を包む円錐状殻を形成したCAに直接作用する事、すな

わち HIV 生活環での異なった phases でその抗 HIV 作用を発揮する事が示唆された。また、アミノ酸配列を部分欠損させた CA 蛋白発現プラスミドを網羅的に作製し、CA 自壊誘導化合物と反応させ CA 自壊誘導能の変化を評価した結果、NTD を欠損させた変異 CA に対して CA 自壊誘導化合物の CA 自壊誘導能が損なわれるが、CTD を欠損させた変異 CA に対して CA 自壊誘導能は保たれており、この結果より CA 自壊誘導化合物の結合に必須な CA のアミノ酸領域は CA の NTD にある事が明らかになった。加えて、同定した CA 自壊誘導化合物の抗 HIV 活性に関する構造最適化を図るため、化合物の合成展開を熊本大学薬学部の化学合成研究者グループ並びに海外の化合物サプライヤーと共に積極的に進め、機能評価を行った（36 種類の化合物を新規に合成・評価した）。更に、同定した CA 自壊誘導化合物に関して、助成期間中に特許を出願した（出願番号：特願 2017-244763）。

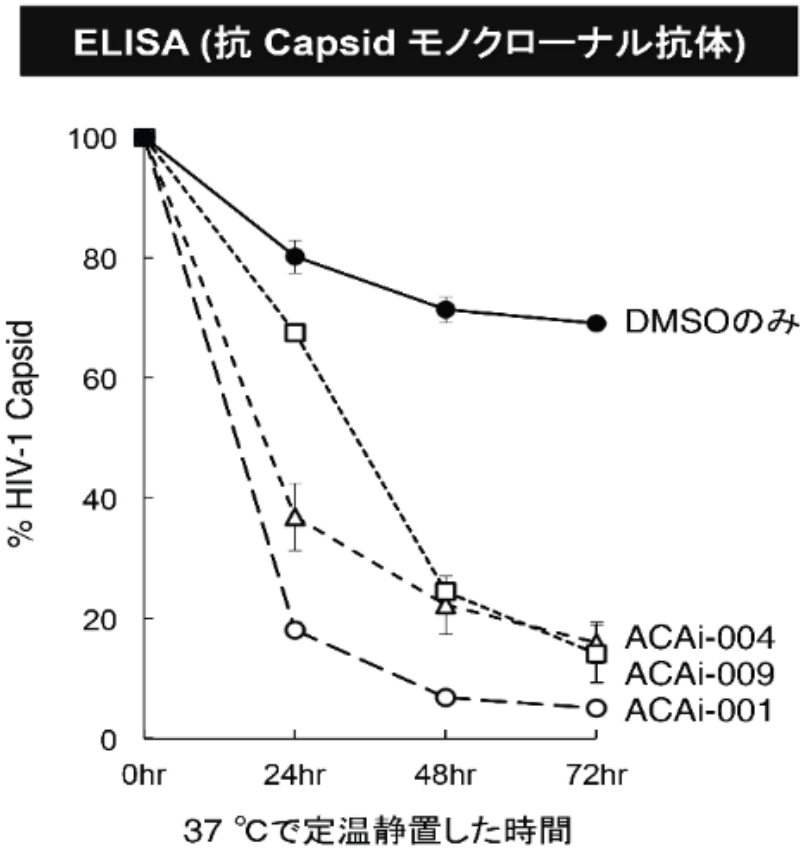


図 2. 新規に同定した抗 HIV 化合物が誘導する CA の抗原性の経時的変化 ～同定した 3 化合物は、HIV CA の経時的かつ著明な自壊を誘導した～

野生型 HIV CA 単独発現プラスミドを作製し、COS-7 細胞に野生型 CA を発現させた後細胞溶解液を作製し、各 hit 化合物（新規に同定した抗 HIV 活性を有する化合物）もしくはネガティブ・コントロールとして DMSO のみを添加した後、等量ずつ分注し任意の時間 37℃で定温静置した後に、抗 CA 抗体を用いた ELISA 法にて細胞溶解液中の CA 抗原量を測定した結果、検討した化合物中の 3 化合物を添加したサンプルにおいて、CA の抗原性が経時的に著しく低下する事が判明した。また同じサンプルを用いて抗 CA 抗体による WB を行なった結果、これら化合物を添加したサンプルにおいて、検出した CA のバンドは 37℃で静置後早期よりスメア状に変化し、signal intensity が著明に減衰していた（data not shown・論文投稿準備中）。これらの結果より、3 化合物が実際に CA の著しい自己崩壊を誘導している事が判明した。

考　察

本研究の背景である HIV CA の自壊現象は、未だ世界の他の研究グループによる報告が無く、極めて先駆的・先導的な課題であると言える。また本研究において進めていく、HIV CA の自壊誘導といった全く新しい作用標的・作用機序を有する抗 HIV 剤の開発は、ウイルスの薬剤耐性化や治療の長期化等多数の問題を含んだ現在の ART に新たな選択肢を寄与し得る、斬新かつチャレンジ性を有した研究である。本研究で得られたデータは、新規阻害薬の研究成果に HIV 構造蛋白の分子特性に関わる基礎研究成果を付与する事が期待でき、新規抗 HIV 剤のデザインや構造学的・ウイルス学的解析への応用が可能と考えられる。筆者は米国の研究グループと共同で新規 HIV プロテアーゼ阻害剤の開発を 2004 年より継続して行ってきたが［8～10］、本研究課題の様に今までに無いクラスの薬剤かつ HIV の耐性発現に抵抗し発現しても他薬剤との交差耐性を有しない新規薬剤の開発は、患者の予後や QOL の改善と医療・対費用効果の改善に大きく貢献し得る事が期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、熊本大学医学部・血液膠原病感染症内科の中村朋文博士、熊本大学大学院生命科学研究部・分子薬化学分野（現崇城大学薬学部）の杉浦正晴博士、熊本大学医学部附属病院・国立国際医療研究センター研究所の満屋裕明博士である。この場を借りて感謝の意を表したい。

文　献

1) Novitsky V, Smith UR, Gilbert P, McLane MF, Chigwedere P, Williamson C, Ndung'u T, Klein I, Chang SY, Peter T, Thior I, Foley BT, Gaolekwe S, Rybak N, Gaseitsiwe S, Vannberg F, Marlink R, Lee TH, Essex M. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype C Molecular Phylogeny: Consensus Sequence for an AIDS Vaccine Design? *J. Virol.* 2002. 76(11):5435-5451. PMID: 11991972

2) HIV Sequence Compendium. 2014. Los Alamos National Laboratory, USA.

3) Li F, Goila-Gaur R, Salzwedel K, Kilgore NR, Reddick M, Matallana C, Castillo A, Zoumplis D, Martin DE, Orenstein JM, Allaway GP, Freed EO, Wild CT. PA-457: a potent HIV inhibitor that disrupts core condensation by targeting a late step in Gag processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. 100(23):13555-13560. PMID: 14573704 DOI: 10.1073/pnas.2234683100

4) Nowicka-Sans B, Protack T, Lin Z, Li Z, Zhang S, Sun Y, Samanta H, Terry B, Liu Z, Chen Y, Sin N, Sit SY, Swidorski JJ, Chen J, Venables BL, Healy M, Meanwell NA, Cockett M, Hanumegowda U, Regueiro-Ren A, Krystal M, Dicker IB. Identification and Characterization of BMS-955176, a Second-Generation HIV-1 Maturation Inhibitor with Improved Potency, Antiviral Spectrum, and Gag Polymorphic Coverage. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016. 60(7):3956-3969. PMID: 27090171 DOI: 10.1128/AAC.02560-15

5) Sticht J, Humbert M, Findlow S, Bodem J, Müller B, Dietrich U, Werner J, Kräusslich HG. A peptide inhibitor of HIV-1 assembly in vitro. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2005. 12(8):671-677. PMID: 16041387.

6) Kelly BN, Kyere S, Kinde I, Tang C, Howard BR, Robinson H, Sundquist WI, Summers MF, Hill CP. (2007) Structure of the antiviral assembly inhibitor CAP-1 complex with the HIV-1 CA protein. *J. Mol. Biol.* 2007. 373(2):355-366. PMID: 17826792 DOI: 10.1016/j.jmb.2007.07.070

7) Blair WS, Pickford C, Irving SL, Brown DG, Anderson M, Bazin R, Cao J, Ciaramella G, Isaacson J, Jackson L, Hunt R, Kjerrstrom A, Nieman JA, Patick AK, Perros M, Scott AD, Whitby K, Wu H, Butler SL. HIV capsid is a tractable target for small molecule therapeutic intervention. *PLoS Pathog.* 2010. 6(12):e1001220. PMID: 21170360 DOI: 10.1371/journal.ppat.1001220

8) 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.* 2007. 51(6):2143-2155. PMID: 17371811 DOI: 10.1128/AAC.01413-06

9) Amano M, Salcedo-Gómez PM, Zhao R, Yedidi RS, Das D, Bulut H, Delino NS, Reddy SV, Ghosh AK, Mitsuya H. A Modified P1 Moiety Enhances in vitro Antiviral Activity against Various Multi-Drug-Resistant HIV-1 Variants and in vitro CNS Penetration Properties of a Novel Nonpeptidic Protease Inhibitor, GRL-10413. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016. 60(12):7046-7059. PMID: 27620483 DOI: 10.1128/AAC.01428-16

10) Amano M, Miguel Salcedo-Gómez P, Yedidi RS, Delino NS, Nakata H, Venkateswara Rao K, Ghosh AK, Mitsuya H. GRL-09510, a Unique P2-Crown-Tetrahydrofuranylurethane-Containing HIV-1 Protease Inhibitor, Maintains Its Favorable Antiviral Activity against Highly-Drug-Resistant HIV-1 Variants in vitro. *Scientific Reports.* 2017. 7(1): 12235. PMID: 28947797 DOI: 10.1038/s41598-017-12052-9