

HIV の Capsid 構造蛋白に結合し、そ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・膠原病・感染症内科

【研究の背景】

研究代表者は治療不応となった HIV-1 (HIV) 感染者由来臨床株に認められる、キャプシド構造蛋白 (CA) 領域のアミノ酸挿入変異 (AA) に注目、AA を有する HIV では今まで報告の無い CA の異常な自己崩壊 (自壊) が起こる事を見出した。CA に AA を導入した変異株を網羅的に作成し検討した結果、CA 自壊は経時的に進行し、細胞/ウイルスの蛋白分解経路は関与せず、CA 挿入変異株では感染複製が著しく低下する事等を解明した。挿入変異 CA 自体がその構造学的変化により自壊していると推測、この構造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た。本知見を基に、挿入変異が入る事で CA を自壊に進める CA の特定部位へ強固に結合する化合物は本現象を誘発し得ると仮説立て研究を進めた。

【目 的】

本研究は、HIV CA に特異結合し CA の自壊を誘導する事で HIV の増殖を抑制する、世界で報告の無い新しい機序を有する抗 HIV 剤の開発を目指すものである。既存の抗 HIV 療法は主に HIV の酵素を標的としており、これら酵素の持つ遺伝子変異への高い許容性により薬剤耐性化が惹起されている。対して CA は遺伝子上高度に保存されており^{1, 2)}、CA 阻害剤に対し HIV が耐性を獲得する事は困難であると推測される。以上より CA 自己崩壊誘導剤の開発は、新たな治療選択への進展が期待される。

【方 法】

CA の表面構造を解析する事で、我々が同定した AA が入る事で著しい CA の自壊をもたらす CA N 末端側の特定部位近傍に十分な空間を有する疎水性 cavity を同定した。次に 800 万個超の化合物データを入手、ADME に影響を及ぼす分子特性を考慮し薬剤と成り得る化合物約 700 万個を抽出、各化合物データについてエネルギー極小化計算後、docking simulation により各化合物と CA との結合スコアを計算、良スコアの化合物は購入し試験管内での抗 HIV 活性を評価、抗 HIV 活性を有する化合物に関しては CA 自壊誘導作用を以下の手法で評価した。

【評価法】 COS 細胞に CA を強制発現させ細胞溶解液を作成し、各化合物を添加した後に等量ずつ分注・37℃で静置し、ELISA・WB 法により化合物が実際に CA の自壊を誘導し得るか検討する。更に HIV を発現させ同様の実験を行う。

またウイルス上清を超遠心後に作成した HIV 濃縮浮遊液を用い、成熟 HIV 内に存在する CA 殻に対して自壊誘導活性を維持し得るか電顕等にて検討する。様々な部位での欠損変異を導入した CA に対する 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う。

【結 果】

研究代表者は、上記手法を用いる事により 50 種以上の抗 HIV 活性を有する化合物を新規同定、更に 3 化合物が著しい CA 自壊を誘導する事を見出した。また同定した CA 自壊誘導化合物を成熟 HIV に反応させた結果、HIV 内の CA 殻が消失する等の著明な形態異常が起こる事を電顕上明らかにした。また、N 末端側を欠損させた変異 CA 単独発現プラスミドを作成し評価した結果、同定した CA 自壊誘導化合物は CA の N 末端側に結合している事が示唆された。

【考 察】

本研究の背景である HIV CA の自壊は、世界のいずれのグループによっても報告されておらず、極めて先駆的・先導的な課題であると言える。また HIV CA の自壊誘導といった全く新しい作用標的/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行の治療法に新たな選択肢を寄与し得るといふ、高インパクトかつ斬新なチャレンジ性を有した研究である。

HIV CA 阻害剤に関して、欧米で複数グループによる開発が進められている(①-④)。

- ① Bevirimat (BVM/PA-457) は、CA と p2 間での最終的な開裂(切断)を阻害する CA 成熟阻害剤として、Myriad Genetics 社により開発された³⁾。
- ② CAI は、CA の C 末端側に結合するペプチドで、感染細胞からウイルスの放出を抑制する作用を有する⁴⁾。
- ③ CAP-1 は CA の N 末端底部に結合する化合物である⁵⁾。
- ④ PF74 はファイザー社が開発中の化合物であり、CA 多量体を過剰に安定化させ正常な CA の機能を阻害する⁶⁾。

いずれの化合物も CA 自壊を誘導するとの報告は無く、また我々が同定した CA 自壊誘導化合物の構造はこれらと類似しない。BVM を入手し解析した所、BVM は CA 自壊を誘導しなかった。以上より、我々の研究は極めて独自性・新規性に富むものであると言える。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

CA の自壊誘導といった新しい標的・機序を有する薬剤の開発は、HIV の薬剤耐性化や治療の長期化等の問題を含んだ臨床治療において新たな選択肢を寄与する研究である。また本研究において用いられる手法は他のウイルス蛋白と結合する低分子化合物の同定にも応用でき、更なる新規作用機序の薬剤開発も期待される。

【参考・引用文献】

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*, 76(11):5435-51, 2002.
2. HIV Sequence Compendium, Los Alamos National Laboratory, USA, 2014.
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 U S A*. 100(23):13555-60, 2003.
4. 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*. 12(8):671-7, 2005.
5. Tang C, Loeliger E, Kinde I, Kyere S, Mayo K, Barklis E, Sun Y, Huang M, Summers MF. Antiviral inhibition of the HIV-1 capsid protein. *J Mol Biol*. 327(5):1013-20, 2003.
6. 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*. 6(12):e1001220, 2010.