

# HIV-1 の Tat 蛋白を標的とした HIV-1 関連神経認知障害の 予防/治療薬の開発

所属： 熊本大学病院 血液・膠原病・感染症内科

助成対象者：天野将之

## 概要

多剤併用化学療法（ART）の進歩により HIV-1 感染者の余命は著しく延長したが、反面感染者の高齢化等を主因とする、以前は認めなかった副作用や病態が表在化している。認知障害・運動障害・異常行動を 3 主徴とする HIV-1 関連神経認知障害（HAND）といった中枢神経系合併症は HIV-1 感染者の半数に認められ、その対応は喫緊の課題である。本研究では、HIV-1 の効果的な増殖に必須の転写促進因子であり、HAND 発症の主因となる HIV-1 Tat を標的とした薬剤開発を進める事により、HAND の予防/治療薬というユニークな特徴および新しい機序/標的を有する HIV-1 感染症治療薬開発へと展開していく事を目的とする。

## abstract

Current studies have shown that the life expectancy of the HIV-1-infected population has been fairly close to that of HIV-1-uninfected population, with the development of combination antiretroviral therapy (cART). However, we have encountered to an additional challenge: HIV-1-associated neurocognitive disorders (HAND) and other central nervous system (CNS) complications as a result of the prolonged patient's survival and insufficient anti-HIV-1 drug penetration into the CNS. The HAND is typically characterized by the clinical triad of cognitive, behavioral, and motor impairment, has been reported to continuously increase in spite of the success of cART, and the CNS abnormalities

have been identified in approximately 50% of HIV-1 infected individuals over their life, and there are no specific remedies for the HAND-related CNS disorders. Therefore, effective anti-HIV-1 agents against HAND and HAND-related CNS-complications urgently needed. In this project, we focused on the HIV-1 Tat protein, a viral transcription-activator and major neurotoxicity-inducing protein, for the development of HAND therapeutic/preventive agents which possess unique and novel target/mechanism(s).

## 研究内容

### 【研究背景】

多剤併用化学療法（ART）の進歩により HIV-1 感染者の余命は著しく延長したが、反面感染者の高齢化等を主因とする、以前は認めなかった副作用や病態が表在化している。認知障害・運動障害・異常行動を3主徴とする HIV-1 関連神経認知障害（HIV Associated Neurocognitive Disorders: HAND）といった中枢神経系（Central Nervous System: CNS）の合併症は、程度の差こそあれ HIV-1 感染者の半数以上において認められるとの報告があり、その対応は喫緊の課題となっている。HIV-1 感染者の予後が改善され今後も感染者の高齢化が進むと考えられる事から、今後この問題は更に重大なものとなると予測される。

HAND の病因に関しては、HIV-1 の持つ蛋白で HIV-1 感染細胞遺伝子に組み込まれた HIV-1 ゲノムの転写促進因子であり、HIV-1 の効果的な増殖に必須である Tat 蛋白による神経細胞への直接の毒性、および HIV-1 の長期感染に伴う CNS での慢性的な炎症による微小血管の変性とそれに伴う脳血管関門（Blood Brain Barrier : BBB）の改変が主体であると考えられている。Tat による神経細胞障害に関する最新の研究では、Tat がアミロイドの  $\beta$  ペプチドと重合構造を形成することで神経毒性を引き起こすという報告がある（<sup>1</sup>Hategan *et al.* *Nat Struct Mol Biol.* 2017）が、HIV-1 Tat を標的とした HIV-1 感染症治療薬は未だ開発されていない。

### 【研究目的】

我々は、これまでに米国の研究グループと共同で、“(i) 既存抗 HIV-1 剤耐性株に有効・(ii) HIV-1 の薬剤耐性獲得が困難・(iii) かつ良好な CNS 透過性を有する”と期待される HAND 予防/治療薬の開発を進め、現在臨床使用されている HIV-1 感染症治療薬の抗

HIV-1 活性を上回る HIV-1 増殖抑制効果を示し、かつ *in vitro* での CNS 移行性に優れた複数の HIV-1 プロテアーゼ阻害剤を開発し、国際科学雑誌に発表してきた (<sup>2</sup>Miguel, Amano *et al. Antimicrob Agents Chemother.* 2013, <sup>3</sup>Amano *et al. Antimicrob Agents Chemother.* 2015, <sup>4</sup>Amano *et al. Antimicrob Agents Chemother.* 2016)。

本研究では、HIV-1 Tat を標的とした薬剤開発戦略を進める事により、HAND の予防/治療薬というユニークな特徴を持ち、かつ新しい機序/標的を有する HIV-1 感染症治療薬開発へと展開していく事を目的とする。HIV-1 感染者の QOL のみならず生命予後の悪化につながる HAND などの CNS 障害に有効な予防/治療薬の開発は、HIV-1 感染者に福音をもたらす戦略の一つとして期待し得るものと考えられる。

### 【研究方法】

詳細な X 線結晶構造解析より得られた HIV-1 Tat 蛋白の表面構造を解析する事で、Tat の細胞膜透過性を寄与する配列を含む RNA 結合主要ドメインに、低分子化合物が結合し得る十分な空間を有する疎水性 cavity を同定した。次に実際に購入可能な 800 万個超の化合物の構造データを、学術・商用の化合物データベースより入手し、各化合物が実際に生体に経口投与された場合、化合物の生体内での ADME に影響を及ぼし得る分子特性（各化合物における、水素結合供与原子数：5 個以下、水素結合受容原子数：10 個以下、分子量：200 Da 以上かつ 600 Da 未満、cLogP 値：5 以下、回転可能軸の数：10 個以下）を考慮した上で約 700 万個の化合物を抽出、各化合物データについてエネルギー極小化計算を行い、溶媒中における各化合物の構造を最適化した上で、*in silico docking simulation* の手法により各化合物の Tat 上の標的 cavity との結合スコアを計算、スコアの良い化合物に関しては実際に購入し、各化合物の Tat 阻害活性及び HIV-1 増殖阻害活性、CNS 移行性を評価する。化合物の Tat 阻害活性評価に関しては、Tat が作用する HIV-1 LTR 配列の下流に大腸菌 *lacZ* 配列を融合させた遺伝子を導入した U373-Magi<sup>CD4+/CXCR4+</sup> 細胞を用いる。U373-Magi<sup>CD4+/CXCR4+</sup> 細胞は HIV-1 が新規に細胞へ感染する際に利用する必須のレセプターおよびコレセプターである CD4 と CXCR4 を発現させた細胞であり、Tat が U373-Magi<sup>CD4+/CXCR4+</sup> 細胞内の HIV-1 LTR に作用した場合、*lacZ* の転写が促進され、 $\beta$ -galactosidase の産生が上昇し X-gal 添加により濃青染した陽性細胞として観察される。陽性細胞率は  $\beta$ -galactosidase の高感度基質である CPRG を用いることにより吸光度計で定量化が可能である。精製した Tat 蛋白もしくは HIV-1 を U373-Magi<sup>CD4+/CXCR4+</sup> 培養培地に各化合物と共に加える事により、Tat の細胞内浸透や蛋白機能を

阻害する化合物の効率的なスクリーニングが可能である。また、化合物の抗 HIV-1 活性の評価には以下の手法を用いる。

【化合物の HIV-1 増殖阻害活性の評価】スクリーニング法：化合物の抗 HIV-1 活性の評価として、MT-2 細胞と野生型実験室株である HIV-1<sub>LAI</sub> による MTT assay 法を用いる。96 well plate 上で各化合物を培地に段階希釈し、100 TCID<sub>50</sub> の濃度となる virus と MT-2 細胞の混和溶液を well に加え、対照として MT-2 細胞のみを加えた well を作成し 7 日間培養後、各 well に MTT 試薬を加え、37℃ の培養庫で呈色反応を行う。各 well に MTT 可溶化溶液を加えホルマザンの結晶を溶かした後、各 well の吸光度を測定、細胞のみを培養した control well での吸光度と比較することで、(抗 HIV-1 活性があった場合) HIV-1 感染による細胞障害を 50% 阻害する濃度である EC<sub>50</sub> 値を算定する。スクリーニングにおいて明らかな抗 HIV-1 活性が認められた化合物については、MT-4 細胞や末梢血単核球 (PBMC) を用いた p24 アッセイ (HIV-1 の増殖阻害能を評価) により臨床分離株や高度薬剤耐性株に対する抗ウイルス活性を検討し、また MTT assay 法にて化合物の細胞毒性を評価する。また有望な化合物については 更に試験管内で耐性変異株の誘導を試みる。

#### 【研究結果および今後の方針】

これまでに我々が独自の手法 (HIV-1 の固有構造蛋白質を標的とした *in silico/in vitro* スクリーニング) により新規に同定した抗 HIV-1 活性を有する 40 種類以上の化合物の中で、U373-Magi<sup>CD4<sup>+</sup>/CXCR4<sup>+</sup></sup> 細胞を用いた評価系により Tat の活性を阻害しウイルスの増殖を抑制する可能性のある化合物群を複数同定した。同定した化合物群 ACAi-028, -032, -038 は、MT-2 細胞を標的細胞とした MTT assay において、HIV-1<sub>LAI</sub> 株感染による細胞死を 0.3, 6.5, 0.9 μM の EC<sub>50</sub> 値でそれぞれ阻害した。また、ACAi-028 は PBMC を標的細胞とした p24 assay において、HIV-1 感染患者由来の臨床分離株 HIV-1<sub>104pre</sub> 株の増殖を 0.5 μM の EC<sub>50</sub> 値で阻害し、更に治療不応性 AIDS 患者由来高度多剤耐性 HIV-1 株 (MDR 株) の 8 種混合株を、既存の HIV-1 感染症治療薬であるダルナビル存在下で、我々が試験管内耐性誘導する事により得られた、超高度多剤耐性株 HIV-1<sub>MDRmixDRV20P</sub> 株 (5koh, Amano *et al.* *J Virol.* 2010) の増殖を 1.1 μM の EC<sub>50</sub> 値で阻害した。また、これら化合物群 ACAi-028, -032, -038 は、U373-Magi<sup>CD4<sup>+</sup>/CXCR4<sup>+</sup></sup> 細胞を用いた Magi assay において、10 μM 化合物存在下で化合物不添加の well と比較し、HIV-1 感染後の陽性細胞数がそれぞれ 0%, 15%, 35% (細胞毒性無し) と著しい減少を認め、化合物添加による HIV-1 転写因子 Tat の機能阻害の可能性が示唆された。

また HIV-1 Tat 蛋白の詳細な表面構造を解析する事で、Tat の細胞膜透過性を寄与する配列を含む RNA 結合主要ドメインに存在する疎水性 cavity を我々は同定、約七百万個の化合物データを用いた *in silico* docking simulation により Tat に結合しその機能を阻害する化合物の検索を続けている。助成期間中において約三百万個の化合物と HIV-1 Tat の標的 cavity との *in silico* docking simulation を終了、結合スコアの良好な約 90 化合物を実際に購入し、HIV-1<sub>NL4-3</sub> 株と U373-Magi<sup>CD4<sup>+</sup>/CXCR4<sup>+</sup></sup> 細胞を用いた Magi assay で評価したところ、複数の化合物において未添加 well と比較し陽性細胞数の減少を認め、Tat 阻害活性を有する事が示唆された。本研究で同定し得た化合物に関しては、今後も更なる機能解析・構造活性相関解析・合成展開を行い、更に *in silico* docking simulation/*in vitro* screening を継続する事により Tat 阻害剤の開発を継続していく。

更に我々は助成期間中に、*in vitro* で強力な抗 HIV-1 活性とかつ良好な CNS 透過性を有する HAND 予防/治療薬候補化合物である新規化合物群を同定し、その詳細な作用機序等の報告を、アメリカ微生物学会 (ASM: The American Society for Microbiology) 発行の *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 誌に発表した (Amano *et al.* *Antimicrob Agents Chemother.* 2019. in press)。

#### 引用文献(太字：助成対象者)

1. Alina Hategan, Mario A Bianchet, Joseph Steiner, Elena Karnaukhova, Eliezer Masliah, Adam Fields, Myoung-Hwa Lee, Alex M Dickens, Norman Haughey, Emilios K Dimitriadis, Avindra Nath. HIV Tat protein and amyloid- $\beta$  peptide form multifibrillar structures that cause neurotoxicity. *Nat Struct Mol Biol.* 24(4): 379-386. 2017.
2. Pedro Miguel Salcedo Gómez, **Masayuki Amano\*** (\*Corresponding author), Sofiya Yashchuk, Akira Mizuno, Debananda Das, Arun K. Ghosh, Hiroaki Mitsuya. GRL-04810 and GRL-05010, Difluoride-Containing Nonpeptidic HIV-1 Protease Inhibitors (PIs) That Inhibit the Replication of Multi-PI-Resistant HIV-1 In Vitro and Possess Favorable Lipophilicity That May Allow Blood-Brain Barrier Penetration. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 57(12):6110-6121. 2013.
3. **Masayuki Amano**, Yasushi Tojo, Pedro Miguel Salcedo-Gómez, Garth L. Parham, Prasanth R. Nyalapatla, Debananda Das, Arun K. Ghosh, Hiroaki Mitsuya. A Novel

Tricyclic Ligand-Containing Nonpeptidic HIV-1 Protease Inhibitor, GRL-0739, Effectively Inhibits the Replication of Multidrug-Resistant HIV-1 Variants and Has a Desirable Central Nervous System Penetration Property In Vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 59(5):2625-35. 2015.

4. Masayuki Amano, Pedro Miguel Salcedo-Gómez, Rui Zhao, Ravikiran S. Yedidi, Debananda Das, Haydar Bulut, Nicole S. Delino, Venkata Reddy Sheri, Arun K. Ghosh, Hiroaki Mitsuya. 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. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 60(12):7046-7059. 2016.
5. Yasuhiro Koh, Masayuki Amano, Tomomi Towata, Matthew Danish, Sofiya, Leshchenko-Yashchuk, Debananda Das, Maki Nakayama, Yasushi Tojo, Arun K. Ghosh, Hiroaki Mitsuya. 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. *Journal of Virology*. 84(22):11961-11969. 2010.

本助成に関わる成果物

[論文発表]

1. Masayuki Amano, Pedro Miguel Salcedo-Gómez, Ravikiran S. Yedidi, Rui Zhao, Hironori Hayashi, Kazuya Hasegawa, Tomofumi Nakamura, Cuthbert D. Martyr, Arun K. Ghosh, Hiroaki Mitsuya. Novel Central Nervous System (CNS)-Targeting Protease Inhibitors for Drug-Resistant HIV Infection and HIV-Associated CNS Complications. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2019. *In press*.

[口頭発表]

1. Masayuki Amano, Rui Zhao, Tomofumi Nakamura, Hiroto Nakata, Toshikazu Miyakawa, Masao Matsuoka, Hiroaki Mitsuya. “The fragment of 9 amino acids at the C-terminal domain of HIV-1 Capsid protein (CA) induces structural fragility of CA, and is possibly essential for the uncoating/replication of HIV-1” (Oral/Poster presentations), 18th Kumamoto AIDS Seminar, Oct-30th ~ Nov-1st,

2017, Kumamoto.

2. 天野 将之、趙 睿、中村 朋文、中田 浩智、宮川 寿一、田宮 貞宏、松岡 雅雄、満屋 裕明、「HIV-1 Capsid 蛋白質不安定性の脱殻/ウイルス複製における意義」、第 31 回日本エイズ学会学術集会・総会、2017 年 11 月 24-26 日、東京（中野サンプラザ）
3. 天野 将之、中村 朋文、Salcedo Gomez Pedro Miguel、趙 睿、中田 浩智、宮川 寿一、松岡 雅雄、満屋 裕明、「HIV-1 capsid 構造蛋白 (CA) の安定性を変化させる事で抗ウイルス作用を発揮する、CA 自己崩壊誘導化合物 (CA decomposers) 及び CA 安定化過剰促進化合物 (CA hyper-stabilizers) の開発」、第 20 回白馬シンポジウム、2018 年 9 月 4-6 日、鹿児島・屋久島

[ポスター発表]

1. Masayuki Amano, Rui Zhao, Tomofumi Nakamura, Hiroto Nakata, Toshikazu Miyakawa, Masao Matsuoka, Hiroaki Mitsuya. “The fragment of 9 amino acids at the C-terminal domain of HIV-1 Capsid protein (CA) induces structural fragility of CA, and is possibly essential for the uncoating/replication of HIV-1”, 18th Kumamoto AIDS Seminar, Oct-30th ~ Nov-1st, 2017, Kumamoto.
2. 天野 将之、Salcedo Gomez Pedro Miguel、中村 朋文、趙 睿、松岡 雅雄、満屋 裕明、「HIV-1 構造蛋白を過剰に安定化させる事で、CD4 陽性免疫細胞へのウイルスの感染および増殖を抑制する、新規 HIV-1 感染症治療薬の開発」、日本医療研究開発機構・革新的医療技術創出拠点プロジェクト・第 5 回 TR 推進合同フォーラム・ライフサイエンス技術交流会、2017 年 11 月 1 日、福岡（九州大学）
3. 天野 将之、趙 睿、中村 朋文、中田 浩智、宮川 寿一、松岡 雅雄、満屋 裕明、「HIV-1 capsid (CA) 構造蛋白において、C 末端アミノ酸が寄与する CA 蛋白不安定性に関するウイルス学的考察」、第 32 回日本エイズ学会学術集会・総会、2018 年 12 月 2-4 日、大阪（大阪国際会議場）

[その他]

1. 天野 将之、「Identification and Development of Novel Anti-HIV-1 Compounds which Induce Hyper-stabilization of HIV-1's Capsid Structural Protein (CA)/ HIV-1 キャプシド構造蛋白の過剰安定化を促進させる事でウイルス増殖を抑制する、新規抗 HIV-1 化合物の開発」BioJapan2018、2018 年 10 月 10-12 日、神奈川（パシフィコ横浜）