

令和元年6月13日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08826

研究課題名(和文) 逆転写酵素阻害剤EFdAに対するHIVの耐性発現機序の構造学的解析と新薬開発

研究課題名(英文) Structural analysis of a reverse transcriptase inhibitor, EFdA, potent against drug-resistant HIV

研究代表者

前田 賢次 (MAEDA, KENJI)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・室長

研究者番号：50758323

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では新規の抗HIV核酸系逆転写酵素阻害剤(NRTI)であるEFdA/MK-8591(現在海外にて臨床試験中)に関する薬剤耐性機序の構造学的解析を進めた。EFdAのように糖の4'位にエチニル基を有する化合物は薬剤耐性RT(逆転写酵素)に対しても強固な結合を維持していたが、4'位にその他の構造を有する類似化合物は薬剤耐性RTに対しては結合を維持できないことをEFdAとHIV-RTとの結晶構造および構造モデリングにより明らかにした(Takamatsu et al. Cell Chem. Biol. 2018)。本研究成果は薬剤耐性HIV株に有効な新規抗HIV薬のデザインに有効な所見である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で行われた強力な逆転写酵素阻害剤(EFdA)の薬剤耐性メカニズムに対する構造学的研究から得られた知見は薬剤耐性HIVに対して有効な新規抗HIV薬の設計・開発に寄与するものであり、構造学的エビデンスに基づいた効率的な薬剤開発の有効性を示唆するものである。

さらに本研究で得られた阻害剤のHIV薬剤耐性に関わる構造についてはHIV逆転写酵素(HIV-RT)とB型肝炎ウイルスのHBV-RTに対する阻害剤の親和性の違いにも関連していることが分かってきており、今後各種のRT(およびDNAポリメラーゼ)とその阻害剤に関する構造・活性比較解析研究の進展と新たな治療薬開発が期待される。

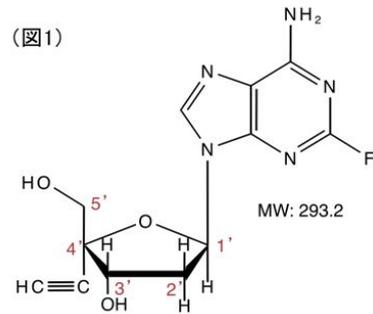
研究成果の概要(英文)：EFdA/MK-8591, a nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NRTI), is a potent and promising long-acting anti-HIV-1 agent. EFdA and its derivatives possess a modified 4'-moiety and potently inhibit the replication of HIV-1 strains resistant to existing NRTIs. Here, we report that EFdA and NRTIs with a 4'-ethynyl-moiety exerted activity against HIV-1 with an M184V mutation and multiple NRTI-resistant HIV-1s, whereas NRTIs with other moieties (e.g., 4'-methyl) did not show this activity. Structural analysis indicated that EFdA and 4'-ethynyl-NRTIs (but not other 4'-modified NRTIs), formed strong van der Waals interactions with critical amino acid residues of reverse transcriptase. Such interactions were maintained even in the presence of a broad resistance-endowing M184V substitution, thus potently inhibiting drug-resistant HIV-1 strains. These findings also explain the mechanism for the potency of EFdA and provide insights for further design of anti-HIV-1 therapeutics.

研究分野：HIV感染症

キーワード：HIV 逆転写酵素阻害剤 薬剤耐性 構造解析 新薬開発

## 1. 研究開始当初の背景

抗 HIV 療法 (ART) により HIV-1 感染者の予後は大幅に改善、全世界での AIDS 関連死は着実に減少傾向にあるが、このような強力な治療が可能となったのは、最初の抗 HIV 薬である AZT などの核酸系逆転写酵素阻害剤 (NRTI) に加えて 1990 年代にプロテアーゼ阻害剤 (PIs) が臨床に導入され、NRTI との多剤併用療法 (cART) が可能となってからである。しかし、より新たな作用機序を有する抗 HIV 剤 (インテグラーゼ阻害剤など) が臨床応用されて薬剤の選択肢が増えた現在でも、逆転写酵素阻害剤はエイズの治療に対する多剤併用療法を構成する重要な一員としての位置づけを保っている。さらに、HIV 感染症に対する NRTI の開発から B 型肝炎ウイルス (HBV) に対して効果を有する NRTI が文字通り「副産物」として誕生、現在も複数の HBV に対する治療薬が開発のパイプラインにある。その一方で、ウイルスが治療薬に対して耐性を獲得して治療抵抗性となる、いわゆる薬剤耐性の問題の克服は HIV 感染症、慢性 HBV 感染症の両方で文字通り急務の課題である。現在、HIV 感染症及び慢性 B 型肝炎に対して用いられている TDF (tenofovir disoproxil fumarate) は初期の NRTI との交差耐性を有しないが、腎障害などの副作用や TDF に対する薬剤耐性 HIV の出現が問題視されている。国内外の幾つかのグループから TDF を含む既存の NRTI との交差耐性がない新規の NRTI が報告されており、申請者のグループから報告された 4'-Ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine (EFdA) もその一つである (*Antimicrob Agents Chemother* 51:2701-8, 2007; *Int J Biochem Cell Biol*.40:2410-20, 2008)。



EFdA (4'-Ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine)

EFdA は第三世代ともいえる新規の NRTI で従来の NRTI と異なりリボースの 3' の位置の水酸基 (-OH) は保ったままで 4' (4 プライム) の位置にユニークなエチニル基を有している (図 1)。これにより既存の NRTI とは異なる耐性発現パターンを有し、野生株だけでなく既存の NRTI 耐性変異株に対して極めて強力な抗 HIV 効果を発揮する。EFdA は 2010 年に本邦のヤマサ醤油から Merck 社へ臨床応用を前提に導出、現在臨床試験が進められている。

研究者はこれまでに EFdA に対する耐性 HIV の検討を行ってきた。EFdA は TDF を含むすべての既存の NRTI と交差耐性を有さず、その高い genetic barrier のために試験管内での野生株 HIV を用いた薬剤耐性誘導実験でも EFdA 耐性 HIV 株の樹立は極めて困難であった。そこで既存の NRTI に対する薬剤耐性変異を既に有する複数の薬剤耐性 HIV 株を混在させた状態で耐性誘導を行ったところ、逆転写酵素領域に多数の薬剤耐性関連変異 (M41L/D67deletion/T69G/K70R/L74I/V75T/ M184V/T215F/K219Q) の蓄積した EFdA 耐性 HIV 株の誘導に成功した。この EFdA 耐性株に対して TDF や AZT といった既存のすべての NRTI は完全耐性を示し、EFdA も 100 倍程度活性が低下した (*Maeda et al. Antiviral Therapy* 19:179-89,2014)。

一方、上述の通り NRTI には HBV に対して活性を持つものがあることが知られている。そこで、研究者は EFdA を起点として、その基本骨格を維持したまま一部の側鎖を変化させることで、HIV のみに活性を有する EFdA の活性スペクトラムを HBV にシフトさせることができるか検討を行った。その結果、EFdA で見られる強力な抗 HIV 活性を維持したまま、極めて強力な抗 HBV 活性を有する新規の NRTI : CAdA, CdG の同定に成功した (*Takamatsu, Maeda et al. Hepatology* 62:1024-36,2015)。

## 2. 研究の目的

研究者は強力な抗 HIV 薬としての EFdA の研究・開発を進め、現在までにその耐性ウイルスの検討と、誘導体の抗 HBV 化合物への応用に成功している。本研究ではこれらの成果を基盤として、新たに合成した複数の EFdA 誘導体の構造-抗 HIV 活性相関の検討、HIV-RT の結晶構造を元にした結合様式解析のためのコンピューターモデリング解析、野生株 HIV、薬剤耐性 HIV の RT (逆転写酵素) に加え、HBV-RT の構造も加味した構造学的比較研究を進め、構造学的エビデンスに基づき強度耐性 HIV 株に有効な新規薬剤の設計・開発を進めた。

## 3. 研究の方法

### 1. 新規 EFdA 誘導体の抗 HIV 活性評価

研究者らは今までに EFdA と同様に糖の 4' 位に修飾基を有する多数の EFdA 誘導体の開発

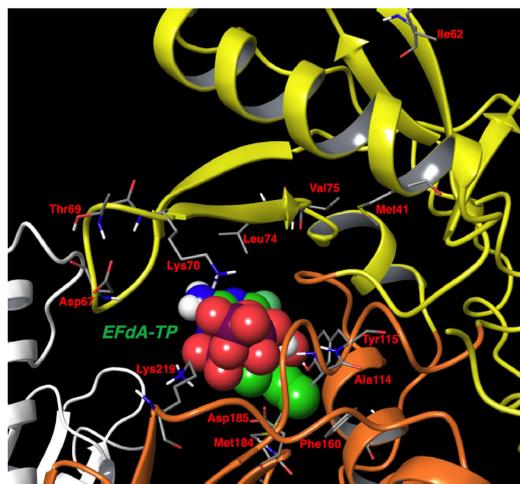
に成功している。現在までの preliminary な検討により、前項で述べた EFdA 耐性株を含む各種の薬剤耐性 HIV 株に対して活性を有するにはエチニル基 (-C≡CH) やシアノ基 (-C≡N) など、特定の構造が糖の 4' 位に存在することが重要であるという事が分かっており、これらの抗 HIV 活性と構造、特に 4' 位の構造のいわゆる構造-活性相関を見るために多数の誘導体の野生株 HIV 株と薬剤耐性 HIV 株に対する抗ウイルス活性の評価を行なった。

## 2. HIV-RT の結晶構造を元にしたコンピューターモデリングによる結合様式解析

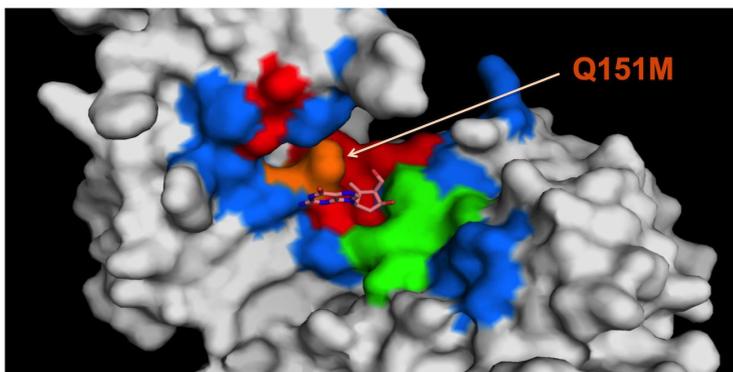
複数の EFdA 誘導体のうち、薬剤耐性 HIV に対して効果の強い化合物、あるいは逆に活性を示さなかった化合物に対して逆転写酵素と化合物の結合様式の解明を結晶解析コンピューターモデリングの手法を用いて進めた。

## 4 . 研究成果

本研究では現在臨床開発段階にある強力な HIV 逆転写酵素阻害剤 (NRTI): EFdA/MK8591 を出発点として薬剤耐性に関わる構造学的解析を行った。EFdA は薬剤耐性 HIV に対して極めて強力な効果を維持しているが、その一方で構造的に似た構造を有する類似体には薬剤耐性株に対して活性のないものも存在する。EFdA と野生株 HIV-RT との結晶構造 (右図) を鋳型とした構造モデリングの検討では、EFdA のように 4' 位にエチニル基を有する化合物は M184V などの薬剤耐性変異を有する HIV-RT に対しても非常に強力な親和性を有することが分かった。それに対して 4' 位にその他の構造を有する類似化合物は薬剤耐性 RT に対しては結合を維持できないことを



EFdA と HIV-RT との結晶構造および構造モデリングにより明らかにした (Cell Chem. Biol. 2018)。その一方で HIV-RT と同じく RT (DNA ポリメラーゼ) が治療のターゲットとして有効である B 型肝炎ウイルス (HBV) の RT の構造学的比較解析研究も進めた。HIV-RT の Q151M 変異は HIV の薬剤耐性関連変異であるであるが、それと同時に M (メチオニン) は HBV の RT の対応する (171 番) アミノ酸 (M) に対応する変異である。しかも Q151M 変異を有する HIV-RT に対して本来は HBV にしか活性を有しないエンテカビル (ETV) が強い活性を持つことが明らかとなった。この機序について Q151M 変異を有する HIV-RT の結晶構造解析を行いその活性獲得機序を構造学的に説明することに成功した (下図) (Sci. Rep. 2018)。本研究で得られた成果は、薬剤耐性 HIV 株に有効な新規抗 HIV 薬のデザインに有効であるとともに、異なるウイルスの RT および DNA ポリメラーゼとその阻害剤に関する構造・活性比較解析研究の進展と新たな治療薬開発が期待される。



橙: Q151M  
 赤: HBV-RTとHIV-RT間で異なるアミノ酸  
 緑: 触媒配列のYMDD(同一(保存)残基)  
 青: HIV RTと HIV-1 RT間で同一の(保存されている)アミノ酸

(Yasutake et al. Sci. Rep. 2018)

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Yasutake Y\*, Hattori, SI, Tamura N, Matsuda K, Kohgo S, Maeda K\*, Mitsuya H. Active-site deformation in the structure of HIV-1 RT with HBV-associated septuple amino acid substitutions rationalizes the differential susceptibility of HIV-1 and HBV against 4'-modified nucleoside RT inhibitors. *BBRC* 509:943-948.2019.
2. Matsuda K, Kobayakawa T, Tsuchiya K, Hattori SI, Nomura W, Gatanaga H, Yoshimura K, Oka S, Endo Y, Tamamura H, Mitsuya H, and Maeda K\*. Benzolactam-related compounds promote apoptosis of HIV-infected human cells via protein kinase C-induced HIV latency reversal. *J. Biol. Chem.* 2019, 294:116-129.
3. Hattori S, Matsuda K, Tsuchiya K, Gatanaga H, Oka S, Yoshimura K, Mitsuya H, and Maeda K\*.

Combination of a latency-reversing agent with a Smac mimetic minimizes secondary HIV-1 infection *in vitro*. *Frontiers in Microbiology*. 2018; 9:2022.

4. Takamatsu Y, Das D, Kohgo S, Hayashi H, Delino NS, Sarafianos SG, Mitsuya H, and Maeda K\*. The high genetic barrier of 4'-ethynyl-2'-fluoro-2'-deoxyadenosine (EFdA/MK-8591) stems from strong interactions with the active site of drug-resistant HIV-1 reverse transcriptase. *Cell Chem Biol*. 2018; S2451-9456(18)30266-6.
5. Kohgo S, Imoto S, Tokuda R, Takamatsu Y, Higashi-Kuwata N, Aoki M, Amano M, Kansui H, Onitsuka K, Maeda K, and Mitsuya H. Synthesis of 4'-substituted purine 2'-deoxynucleosides and their activity against human immunodeficiency virus and hepatitis B virus. *ChemistrySelect*. 2018, 3:3313-3317.
6. Yasutake Y\*, Hattori S, Hayashi H, Matsuda K, Tamura N, Maeda K\*, and Mitsuya H. HIV-1 with HBV-associated Q151M substitution in RT becomes highly susceptible to an anti-HBV inhibitor, entecavir: structural insights into HBV-RT inhibition by entecavir. *Sci Rep*. 2018, 8:1624.
7. Takamatsu Y, Tanaka Y, Kohgo S, Murakami S, Singh K, Das D, Venzon DJ, Amano M, Kuwata N, Aoki M, Delino NS, Hayashi S, Takahashi S, Sukenaga Y, Haraguchi K, Sarafianos SG, Maeda K\*, Mitsuya H. 4'-Modified nucleoside analogs: potent inhibitors active against entecavir-resistant HBV. *HEPATOLOGY* 2015, 62:1024-1036.

\*Corresponding author

〔学会発表〕(計 17件)

前田 賢次. HIV リザーバー細胞の除去を目的とした新規治療法開発に向けた研究. シンポジウム S31: 抗ウイルス感染症研究のフロンティア. 日本薬学会 139 年会.(招待講演)2019/3/20-23, 千葉.

前田 賢次. 新規 HIV 逆転写酵素阻害剤の開発と次世代 ART に向けた新しい治療法への応用. シンポジウム 12 [ART の現状: 基礎研究者への発信] 第 32 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2018/12/2-4, 大阪.

前田 賢次、服部 真一郎、松田 幸樹、土屋 亮人、瀧永 博之、岡 慎一、吉村 和久、満屋 裕明. HIV リザーバー再活性化後のウイルス産生を最小限に抑制しつつ潜伏感染細胞を強力に除去する新しい"Shock & Kill"療法の開発. 第 28 回抗ウイルス療法学会学術集会・総会. 2018/6/7-9, 札幌.

Matsuda K, Hattori SI, Tsuchiya K, Kobayakawa T, Ohashi N, Nomura W, Harada S, Satou Y, Yoshimura K, Tamamura H, Mitsuya H, and Maeda K. Analysis of molecular mechanism of HIV-1 latent infection & reactivation and development of novel therapeutics active against latent HIV-1 infection. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会. 2017/10/24-26, 大阪.

Debananda Das, Yuki Takamatsu, Satoru Kohgo, Shinichiro Hattori, Hironori Hayashi, Kouki Matsuda, Stefan G. Sarafianos, Hiroaki Mitsuya, and Kenji Maeda. Molecular simulation of EFdA and related analogs to determine the structural basis of HIV-1 drug resistance. ACS' 253rd National Meeting & Exposition. 2017/4/2-6. San Francisco, California, USA.

Takamatsu Y, Das D, Kohgo S, Hattori S, Hayashi H, Matsuda K, Stefan G. Sarafianos SG, Hiroaki Mitsuya H, and Maeda K. 4'-Modified NRTIs' Potent Anti-HIV Activity Stems from Strong RT Active Site Binding. 2017 Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI). Feb 12-16, 2017, Seattle WA.

前田賢次、高松悠樹、向後悟、服部真一郎、鎌田伸好、林宏典、Debananda Das、満屋裕明. 逆転写酵素阻害剤 EFdA(MK-8591)に対する薬剤耐性機序の構造学的解析と耐性株に有効な新規薬剤の設計・開発. 第 30 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2016/11/24-26, 鹿児島.

Maeda K, and Mitsuya H. Progress in the therapy for HIV/AIDS: development of molecular-targeting approach for antiretroviral drugs. 2nd Kumamoto IRCMS International Symposium and 17th Kumamoto AIDS Seminar. Oct 31-Nov 2, 2016, Kumamoto, Japan.

前田賢次、高松悠樹、向後悟、服部真一郎、鎌田伸好、林宏典、松田幸樹、Debananda Das、Stefan G. Sarafianos、満屋裕明. 新規の逆転写酵素阻害剤 EFdA(MK-8591)に対する薬剤耐性機序の構造学的解析と耐性株に有効な新規薬剤の設計・開発. 白馬シンポジウム in 山梨.

2016/10/7-8, 山梨.

Maeda K, Takamatsu Y, Kohgo S, Das D, Hattori S, Hayashi H, Stefan G. Sarafianos SG, and Mitsuya H. Development of novel nucleoside reverse transcriptase inhibitors active against 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine (EFdA/MK-8591)-resistant HIV-1s. The 15th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Sep 6-9, 2016. Hyogo, Japan.

前田賢次、高松悠樹、向後悟、服部真一郎、楢田伸好、林宏典、Debananda Das、満屋裕明. 新規の逆転写酵素阻害剤 EFdA(MK-8591)に対する薬剤耐性機序の構造学的解析と耐性株に有効な新規薬剤の設計・開発. 第26回抗ウイルス療法学会総会, 2016/5/13-15, 名古屋.

エンテカビル耐性 HBV に有効な新規の逆転写酵素阻害剤の開発. 前田賢次、満屋裕明 25 回抗ウイルス療法学会総会, 2015/5/22-5/24.

HIV と HBV の両方に活性を有する新規逆転写酵素阻害剤の開発. 前田賢次、満屋裕明 第17回白馬シンポジウム in 米子, 2015/6/19-6/20.

Development of novel nucleoside reverse transcriptase inhibitors potent against HIV and HBV. Kenji Maeda & Hiroaki Mitsuya. 16th Kumamoto AIDS Seminar. Oct. 7-9, 2015. Kumamoto.

4'-Modified Nucleoside Analogs: □Potent Inhibitors Active against Entecavir-resistant Hepatitis B Virus. Kenji Maeda, Yuki Takamatsu, Yasuhito Tanaka, Nobuyo Higashi-Kuwata, and Hiroaki Mitsuya. 第63回日本ウイルス学会学術集会, 2015/11/22-11/24.

Development of novel nucleoside reverse transcriptase inhibitors active against 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine (EFdA)-resistant HIV-1s. Kenji Maeda, Yuki Takamatsu, and Hiroaki Mitsuya. 第29回日本エイズ学会学術集会, 2015/11/30-12/1.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

なし

### (2)研究協力者

なし