

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03727

研究課題名(和文) 高度STI耐性(STI-R)HIV発現機序の解明と新規抗STI-R-HIV剤開発

研究課題名(英文) Study of mechanism of HIV resistance to integrase strand transfer inhibitors (INSTI) aiming at development of INSTI-resistance-repellant therapeutics

研究代表者

満屋 裕明(MITSUYA, Hiroaki)

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・研究所長

研究者番号：20136724

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：5剤のインテグラーゼ阻害剤(INSTI)が本邦で承認されておりHIV感染症とAIDSの治療に広く用いられている。しかしHIVが1つのINSTIに耐性を獲得すると、他のINSTIsに対する耐性発現を促進、結果的に既存の全てのINSTIsにも広く交差耐性を発現する。一方、HIVのINSTIs耐性発現機序は未だ不明な部分が多く残されていることから、ウイルス学的、酵素学的、構造学的な手法を用いてINSTIsに対する耐性発現の機序を解明し、同時に既存の複数のINSTIsに耐性を有するHIV変異株にも高い活性を発揮し、耐性が発現しないか、もしくは著しく遅延する新規阻害剤の開発を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HIVの高度INSTI耐性の発現にはインテグラーゼ(IN)の酵素活性部位を構成する3つのアミノ酸と直接、間接的に相互作用する複数のアミノ酸置換の蓄積が必要である。本研究で明らかにしたINSTI耐性機序は耐性株にも効果のある新規INSTI開発に繋がると思われる。更に、開発中のHIVプロテアーゼ阻害剤GRL-142がINにも直接結合し、ウイルスcDNAの核移行を阻害する新規のHIV複製阻害メカニズムを明らかにした。GRL-142はINSTI耐性HIVに対しても高い活性を発揮することから、世界的な懸念材料となっているINSTI耐性HIVを有する感染者に対する治療薬開発に大きく資すると思われる。

研究成果の概要(英文)：Five integrase strand transfer inhibitors (INSTIs) have been used for treatment of HIV-1 infection/AIDS. Dolutegravir (DTG), a second-generation INSTI, has more potent antiviral activity with a high genetic barrier to development of drug resistance compared to first-generation INSTIs including raltegravir. Indeed, wild-type HIV-1 fails to develop highly DTG-resistant nature in vitro. However, Q148H/R/K mutations, which do not alter the susceptibility to DTG, facilitate HIV-1 to develop high-level resistance to DTG in patients who receive with DTG-containing regimens. The precise mechanisms by which HIV-1 acquires resistance to second-generation INSTIs such as DTG remain poorly understood. In this study, we attempted to clarify the mechanism of HIV-1's acquisition of resistance to second-generation INSTIs and to develop anti-HIV-1 drugs, which are highly effective to INSTI-resistant HIV-1 variants with a high genetic barrier to development of drug resistance.

研究分野：感染症内科学、血液内科学

キーワード：HIV-1 インテグラーゼ阻害剤 薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

HIV-1 感染症に対する抗レトロウイルス療法 (antiretroviral therapy; ART) は近年長足の進歩を遂げ、HIV-1 感染者の臨床症状と生命予後は大きく改善、死亡者・新規感染者数が激減、かつての「死に至る感染症」は「コントロール可能な慢性感染症」となり、更には治療を受けた感染者からの二次感染をも完全に予防できるとする『Undetectable=Untransmittable』が通念となった。しかし、現在の ART では、感染患者体内から HIV-1 を排除する事は現実的に不可能とされ、一旦感染すると複数の抗 HIV-1 剤を毎日、1 日 1 回 (QD) 又は 1 日 2 回 (BID) 服用しなくてはならない。抗 HIV-1 剤の副作用は抗癌剤等に比して比較的軽度ではあるが、長期内服に伴う副作用や、薬剤耐性 HIV-1 の出現は「治療の失敗」に結果し、予後不良となることが多い。インテグラーゼ阻害剤 (INSTIs) は、「大部分の HIV 感染者に対して推奨される組合せ」として広く治療に用いられているが、第一世代 INSTI である raltegravir (RAL) と elvitegravir は、INSTIs 耐性に関連するアミノ酸変異が 1 つでも生じると著しく抗 HIV-1 活性が損なわれ、またインテグラーゼ (IN) が野生型の HIV-1 株から比較的早期に試験管内で高度 RAL 耐性株が誘導される。一方、第二世代 INSTI である dolutegravir (DTG) は、1 アミノ酸置換の耐性 HIV-1 株に対して活性を維持し、且つ HIV-1 の耐性発現に対して比較的高い抵抗性を有するが、RAL 耐性株を「出発株」として耐性を誘導すると早期に高度 DTG 耐性株が出現する。また第二世代 INSTI である bictegravir と cabotegravir でも高度 DTG 耐性株に対して高い交差耐性が観察され、著しく治療効果が損なわれる。そうしたことから、高度 INSTIs 耐性 HIV-1 に対しても高い活性を示し、且つ薬剤耐性が発現しない、もしくは著しく遅延する新規の INSTIs の開発が喫緊の課題である。

2. 研究の目的

DTG は RAL と異なり野生 HIV-1 株の DTG に対する耐性発現に高い抵抗性を有するものの、一旦 RAL 耐性を獲得した HIV-1 株は容易に DTG に対する高度耐性を獲得する。しかし、HIV-1 の INSTIs、特に DTG に対する耐性発現メカニズムの理解と対応は一向に進んでいない。本研究では、HIV-1 の INSTIs 耐性発現メカニズムの解析を細胞生物学的、ウイルス学的、酵素学的、構造学的な研究領域での知識・技術・経験を駆使しながら進める。また高度 INSTIs 耐性 HIV-1 変異株にも高い活性を有し、且つ耐性発現が起こらない、もしくは著しく遅延する新規薬剤の開発を進める。

3. 研究の方法

(1) 試験管内における薬剤耐性 HIV-1 変異体の誘導

「出発株」となる HIV-1 を感染させた MT-4 細胞を、化合物を添加した培養液中で継代培養をすることで薬剤耐性 HIV-1 を誘導した。化合物濃度はウイルス複製を 50% 阻止する濃度 (IC₅₀) から開始し、ウイルス複製に応じて濃度を徐々に上げ、終濃度が 2 μM になるまで継代培養を繰り返して行った。ウイルス複製は培養上清中に産生される HIV-1 p24 タンパク質を測定することにより評価した。また適宜プロウイルスの塩基配列を確認した。

(2) 化合物の抗 HIV-1 活性の評価

96-well plate で化合物を 1 μM から 10 倍ずつ連続的に希釈を行ない、次に MT-4 細胞と HIV-1 を混ぜた混合液を添加、7 日間培養を行なった。培養後、上清中の HIV-1 p24 タンパク質を測定し、薬剤存在下と非存在下での p24 量を比較することで IC₅₀ 値を算出した。

(3) 結晶構造解析

精製後の IN_{KGD} 溶液 (5 mg/mL (約 300 μM)) に対し、GRL-142g が 600 μM となるように添加し、4°C で 1 時間インキュベート後、析出物が生じたので 12,000 rpm で 30 分間遠心し上清を回収した。48 well plate with raised cover (ハンプトン社; Cat#. HR3-275) の well に結晶化溶液 300 μL を添加する。結晶化には、ハンギングドロップ蒸気拡散法を使用した。タンパク溶液と結晶化溶液を混合したドロップが乗っているスライドを well にセットする。結晶化条件の特定にスクリーニングキットとして、Crystal screen、Crystal screen 2、Index、PEG/Ion screen、PEG/Ion 2 screen、Wizard Classic 1~4 を使用した。0.1 M Tris-HCl pH 8.5, 2% polyethylene glycol (PEG) 400, and 2 M Li₂SO₄ の条件で X 線回折に使用できる結晶が生成した。GRL-142 を確実に結合させるために、結晶をピックアップする前日に結晶が生じている液滴に 0.2 μL の 20 mM GRL-142 を添加した。添加後に液滴内に析出物が生じたが、そのまま一昼夜、室温でインキュベートした。インキュベート後の結晶をピックアップし、クライオ溶液に浸した後、液体窒素下で保存し SPring-8 に輸送、X 線回折実験を実施した。

4. 研究成果

(1) HIV の DTG 耐性獲得に重要な 3 つのアミノ酸置換 L74I、T97A、F121V を同定した。

RAL 耐性 HIV (HIVRALR) を出発株として試験管内で誘導した高度 DTG 耐性 HIV 変異体は未報告のアミノ酸置換 F121V を有していたため、更に DTG 耐性を 6 回繰返し F121V の出現頻度を確認した。6HIVRALRs は高濃度の DTG 存在下でも増殖可能となり、4DTG 耐性 HIVs が F121V を獲得、一方で F121V を含まない 2 つの変異体 (V72I/L74M/V79I の 3 つのアミノ酸置換を獲得した) も見られた。INSTIs に対する感受性試験の結果、F121V に L74I/M が加わると耐性度が高く、一方 F121V を含まない HIV は耐性度が低いことから、F121V が DTG 耐性に大きく関与していると解された。

更に RAL に高度耐性を示す 3 つの異なる HIV クローンを作製し同様に DTG 耐性を誘導した。DTG 耐性 HIV 変異体は、IN の酵素活性部位周辺に同定された 3 つのアミノ酸置換 L74I、T97A、F121V のうち、1 つもしくは 2 つを獲得していた。

(2) 分子シミュレーションを用いた構造学的解析により、DTG 耐性 HIVs で同定したアミノ酸置換が IN の酵素活性に重要なアミノ酸と直接/間接的に相互作用することが分かった。

Cryo-EMによるHIV-1及びSIVのインタソーム (HIV-1 インテグラーゼ、ウイルスDNA及び宿主DNAから成る複合体) 構造を元にして、活性部位近傍の構造を分子シミュレーションにより解析した (右図)。L74 と F121 は、酵素活性に重要な 3 つのアミノ酸 D64, D116, E152 のうち D64 およびもしくは D116 と直接相互作用し、T97 は F121 を介して D116 と接していた。Q148 (DTG 耐性誘導に用いた全ての RAL 耐性 HIV 変異体が Q148H/R を有していた) もまた D116 および E152 と直接相互作用していることから、HIV-1 の DTG に対する耐性獲得には、酵素活性部位のアミノ酸と直接もしくは間接的に相互作用する複数のアミノ酸置換の蓄積が必要であることが示唆された。

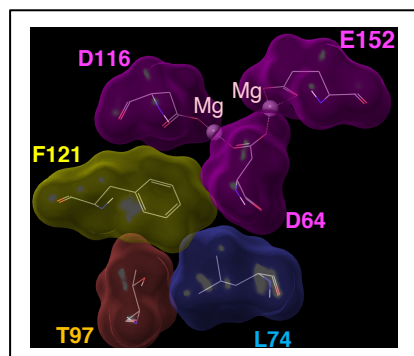


図 1. IN 活性部位近傍の分子シミュレーションによる構造解析
DTG 耐性 HIV 変異体に同定されたアミノ酸置換 L74I, T97A, F121V はインテグラーゼの酵素活性に重要な 3 つのアミノ酸 D64, D116, E152 と直接、間接的に結合する。

(3) INSTI 耐性を含む多剤耐性 HIV 変異体に高い活性を発揮する GRL-142 を同定した。

我々は INSTI を含む臨床で主に使用されている 4 クラスの薬剤全てに高度耐性を示す HIV_{KGD} を試験管内での耐性誘導実験で得る一方、我々のグループが開発した HIV プロテアーゼ (PR) 阻害剤 GRL-142 (Aoki & Mitsuya, *eLife*, 2017, e28020) が、HIV_{KGD} に対して極めて高い抗 HIV 活性 (IC₅₀=130 fM) を発揮することが分かった。

Viruses	IC ₅₀ , nM														
	NRTIs				NNRTIs				INSTIs				PIs		
	TDF	3TC	FTC	ABC	EFV	ETR	RPV	DOR	RAL	EVG	DTG	BIC	CAB	DRV	GRL-142
HIV _{NL4-3} ^{WT}	140	2,500	2,000	2,500	5.0	5.4	0.4	13	6.4	5.8	3.8	6.0	4.5	2.8	0.012
HIV _{KGD}	1,700	>50,000	>50,000	11,500	>1,000	405	>1,000	354	>1,000	>1,000	340	330	>1,000	410	0.00013 (130 fM)

表 1. HIV_{KGD} に対する 4 クラスの薬剤の抗 HIV-1 活性の評価
米国 FDA に認可されている 4 クラスの薬剤 (治療によく用いられている薬剤を試験に用いた) の野生株 HIV-1 (HIV_{NL4-3}^{WT}) および HIV_{KGD} に対する IC₅₀ (ウイルスの増殖を 50% 抑制する薬剤濃度) を示した。HIV_{KGD} は 4 クラス全ての薬剤に高度耐性を示したが、GRL-142 の HIV_{KGD} に対する抗 HIV-1 活性は HIV_{NL4-3}^{WT} に対してよりも 100 倍高かった。

(4) GRL-142 は IN_{KGD} に結合、IN NLS と直接相互作用する。またウイルス cDNA の核移行を阻害することが分かった。

GRL-142 は HIV_{KGD} のインテグラーゼ (IN) 領域のみを導入した感染性組換え HIV クローンに対しても高い活性を維持した。また HIV_{KGD} の IN の catalytic core domain (IN_{KGD}) との X 線結晶構造解析において、GRL-142 は IN_{KGD} のダイマーインターフェースに結合しており、その一部が結合部位近傍の核移行シグナル (NLS) と直接結合、相互作用することを確認した。

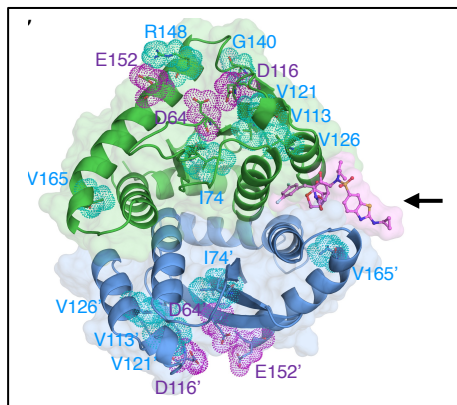


図 2. GRL-142 と IN_{KGD} (catalytic core domain) との X 線結晶構造解析
GRL-142 (矢印、スティックで示した) はダイマー (それぞれ緑と青のリボンで示した) を形成した IN_{KGD} のダイマーインターフェースに結合する。IN の 3 つの catalytic residues (D64, D116, E152) を赤で示した。

(5) GRL-142 はウイルス cDNA の核移行を阻害することが分かった。

GRL-142 の存在下で産生した感染性組換え HIV_{KGD} クローン (rHIV^{PR-KGD/RT-KGD/IN-KGD/142+}) を細胞に感染させると、細胞内で逆転写反応により生成するウイルス cDNA が核移行した際に形成される 2-LTR circular cDNA が著しく減少することが分かった。GRL-142 は PR だけではなく、特に INSTI に耐性を獲得した IN にも結合し、ウイルス cDNA の核移行を阻害することで HIV_{KGD} に対して極めて高い抗 HIV 活性を示すことが分かった (Aoki & Mitsuya. *Science Advances* in press 2023)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Aoki M, Aoki-Ogata H, Bulut H, Hayashi H, Takamune N, Kishimoto N, Tanaka H, Higashi-Kuwata N, Hattori S, Das D, Rao KV, Iwama K, Davis DA, Hasegawa K, Murayama K, Yarchoan R, Ghosh AK, Pau AK, Machida S, Misumi S, Mitsuya H	4. 巻 -
2. 論文標題 GRL-142 Binds to and Impairs HIV-1-Integrase-Nuclear Localizing Signal and Potently Suppresses Highly INSTI-Resistant HIV-1 Variants	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Manabu Aoki1, Hiromi Aoki-Ogata, Haydar Bulut1, Hironori Hayashi, Arun K. Ghosh, Alice K. Pau, and Hiroaki Mitsuya
2. 発表標題 GRL142 Binds to and Impairs HIV-1-Integrase-Nuclear Localizing Signal and Exerts Potent Activity against INSTI-Resistant HIV-1
3. 学会等名 HIV DART 2022（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 青木学, 青木宏美, Haydar Bulut, 林宏典, 長谷川和也, Arun K Ghosh, Alice K. Pau, 満屋裕明
2. 発表標題 HIV-1プロテアーゼ阻害剤GRL-142は、インテグラーゼのNLSに結合、HIV-1DNAの核移行を阻害し、インテグラーゼ阻害剤耐性HIV-1変異体を強力に阻害する
3. 学会等名 第30回日本抗ウイルス療法学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 青木学, 青木宏美, Haydar Bulut, 林宏典, 長谷川和也, Arun K Ghosh, Alice K. Pau, 満屋裕明
2. 発表標題 新規プロテアーゼ阻害剤GRL-142は、インテグラーゼのNLSに結合、HIV-1DNAの核移行を阻害し、インテグラーゼ阻害剤耐性HIV-1変異体を強力に阻害する
3. 学会等名 第36回日本エイズ学会学術集会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroaki Mitsuya
2. 発表標題 Discovery of Reverse Transcriptase Inhibitors for Treating HIV-1/AIDS
3. 学会等名 2022 Cold Spring Harbor biohistory meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	青木 学 (AOKI Manabu) (70389542)	熊本保健科学大学・保健科学部・教授 (37409)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	Purdue University	NCI/NIH	NIAID/NIH