

課題番号 : 29指1010
研究課題名 : HIV潜伏感染除去を可能とする新規抗HIV併用療法の開発
主任研究者名 : 前田賢次 国立国際医療研究センター研究所 室長
分担研究者名 : 玉村 啓和 東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 教授
土屋 亮人 国立国際医療研究センター エイズ治療・研究開発センター 治療開発専門職
原田 恵嘉 国立感染症研究所 エイズ研究センター 主任研究官
キーワード : HIV、リザーバー、抗ウイルス療法、治癒、潜伏感染、latency-reversing agent
研究成果 :

(背景・目的)

抗ウイルス療法の進歩によりHIV感染症の治療効果は劇的に改善したが、治癒に至る治療法は確立されていない。それに対して最近、HIVリザーバー（潜伏感染細胞）の減少・駆逐を目指す試みの一つとして潜伏感染再活性化剤（latency-reversing agent:LRA）を用いて潜伏感染を活性化させて治療する方法（Shock & Kill）が検討されている。一方でこれらの薬剤のみでは通常の感染細胞からのウイルス産生を阻害できないために既存の抗HIV薬との併用療法による治療が必須となる。本研究では、HIVに持続的に感染・産生を繰り返し、かつ潜伏感染状態（ウイルスDNAを持ちながらウイルスを産生しない）にある細胞群も含む慢性HIV感染細胞培養系を樹立、その系を用いてLRAと既存の作用機序の薬剤（逆転写酵素阻害剤NRTIやプロテアーゼ阻害剤PIなど）との併用によるウイルス産生抑制と細胞内のウイルスDNAの減少を評価、HIV Cureを目指すための新しい抗ウイルス療法の確立に向けた研究を行った。

(方法)

1. HIV-1 (NL4-3)をT細胞系細胞株（Jurkat細胞）に感染させ、1. ウイルス産生・2. 潜伏感染・3. 非感染の異なる状態にある細胞群が長期間維持される慢性感染系を樹立、薬剤評価を行う（前田）。
2. PKC活性化剤の一部にLRA活性が有することが報告されており、玉村分担研究者の合成したPKC活性化剤のHIV再活性化能（LRA活性）を評価、リード化合物からの合成展開を図る。
3. 活性のあるLRAについてはエイズ治療・研究開発センター（ACC）の患者検体を用いた解析、さらにはマウスなどの動物モデルでの解析を行う（土屋・原田）。

(結果・考察)

1. HIV潜伏感染再活性化能（LRA活性）を有する一連のPKC活性化剤の同定

本年度、まずHIV潜伏感染細胞株（ACH2など）を用いてPKC活性化剤を中心とした候補薬のHIV潜伏感染再活性化能の評価を行った。玉村分担研究者のグループでは以前より他疾患（アルツハイマー病など）に対する治療薬開発の一環としてPKC活性化剤の研究を行ってきたが、今回これらの化合物の一部にHIV潜伏感染細胞再活性化能（LRA活性）があることを見出した。本研究班では良好な結果を示したPKC活性化剤（DAG-lactone誘導体やbenzolactam誘導体等）をもとに、さらに有用な化合物を合成し、再活性化作用の検定試験と構造活性相関研究を推進中である。

2. 既存の抗HIV薬とLRAの併用評価系の樹立と薬剤の活性評価

HIV-1 (NL4-3)を感染させたT細胞系細胞株（Jurkat細胞）由来の慢性HIV感染系を樹立、この細胞群には、1. ウイルス産生・2. 潜伏感染・3. 非感染の異なる状態にある細胞群が長期間存在し続けることが分かった。つまりこの感染細胞系を用いれば既存薬によるウイルスの非感染細胞への新規の感染阻害と共にLRAによる潜伏感染細胞の活性化（つまり潜伏感染状態にある細胞の減少）を見ることができると考えられた。そこで既知の強力なLRAであるPEP005（PKC活性化剤）と臨床試験段階にあり同じく強力な逆転写酵素阻害剤であるEFdAとの併用効果の評価を行った。その結果、PEP005などの免疫賦活薬はいずれも単独では全く抗ウイルス効果を示さず、その一方でEFdAは本評価系でも単独で強力なウイルス産生阻害効果を認めた。しかし本評価系には既に細胞内に組み込まれたウイルスDNAを持つ細胞が含まれるためEFdA単独では治療を中断した後、比較的速やかにウイルスの再上昇を認めた。それに対して、EFdA+PEP005併用群では治療中断後、約60日間の観察でも全く上清ウイルスおよび細胞内HIV-DNAの再上昇を認めなかった。以上より、本評価系はin vitroで既存の抗HIV薬と免疫賦活薬の併用での抗ウイルス効果および残存HIV-DNA除去能を評価する系として有用であると考えられた（投稿準備中）。現在、本評価系を用いた強力なウイルス抑制効果と潜伏感染細胞除去能を示す薬剤の組み合わせの評価が進行中である。

3. 有望候補薬の臨床検体や動物モデルを用いた活性評価

上述の通り、本研究班では既にLRA活性を有するいくつかの化合物（PKC活性化剤）の同定に成功しているがその一部については当センター・ACCのHIV感染患者からの末梢リンパ球を用いたHIV感染細胞活性化能の評価を行う体制が構築されている。今後同定される有望化合物での活性評価を続けると共にマウスモデルなどでの評価を次年度は新たに行う予定である。

Subject No. : 29 指 1010
Title : Research on the development of novel anti-HIV drugs to cure HIV
Researchers : Kenji Maeda (National Center for Global Health and Medicine)^{[1][2]}
Hirokazu Tamamura (Tokyo Medical and Dental University)
Kiyoto Tsuchiya (National Center for Global Health and Medicine)
Shigeyoshi Harada (National Institute of Infectious Diseases)
Key word : HIV, HIV reservoirs, antiretroviral therapy, cure, latent infection,
latency-reversing agents (LRA)

Abstract :

Advances in antiviral therapy dramatically improved the therapeutic effect on HIV infection. However, even with most potent cART, AIDS patients need to take medications for the lifetime. Thus, research aiming for HIV cure is one the most important theme for current HIV research. In this regard, “Shock & Kill” method to activate HIV-1 latent infection using small molecule agents, called HIV latent-reversing agent (LRA) is a possible strategy to cure HIV.

In this research project, we made a research group to search drug seeds as LRAs. During the first year of this research project, we found a panel of compounds, which Dr. Tamamura's group synthesized, with potent activity as LRAs. It is also expected that further lead compounds that have different structures will be identified in the next year. In addition, by structural optimization (design and synthesis), more powerful LRAs will be development.

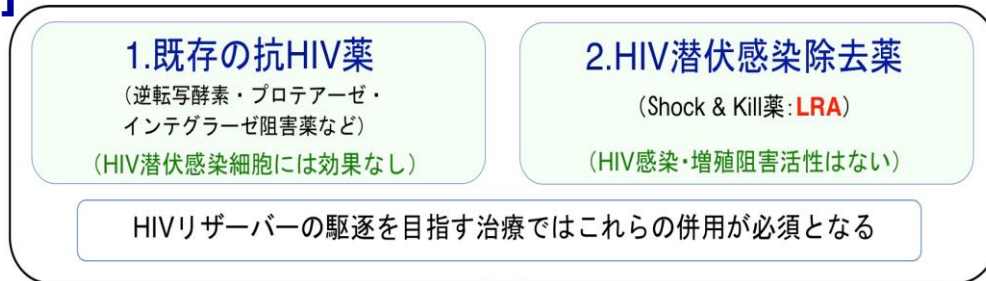
Meanwhile, if LRAs alone are used for the treatment of HIV infected patients, infectious viruses will be produced from reactivated reservoir cells and subsequent infection to uninfected cells will occur. Thus, it is considered to be essential to combine LRAs with existing anti-HIV drugs. Here, we established a novel *in vitro* infection assay system to evaluate efficacies of these drugs simultaneously. In this system, treatment with a potent reverse transcriptase inhibitor (NRTI) strongly suppressed viral replication, but viruses started to grow after treatment interruption. However, combined treatment of an NRTI with an LRA (PEP005) successfully prevented viral recurrence, suggesting an achievement of an "experimental cure".

The results suggest that this *in vitro* drug treatment model is useful for predicting effective drug combination(s) against HIV-reservoirs and for examining mechanisms by which HIV-reservoir cells survive from the attack of LRAs. Further experiments and analyses using primary CD4+ T cell from ART-treated HIV-infected patients and animal models (i.e., HIV-infected humanized mice) will be necessary to determine if such drugs can actually reduce the size of the reservoirs.

HIV潜伏感染除去を可能とする新規抗HIV併用療法の開発

前田賢次(主任研究者) 国立国際医療研究センター研究所

[1]



既存の抗HIV薬とLRAの併用効果のin vitro評価系確立

新規LRA開発に向けた開発グループの構築

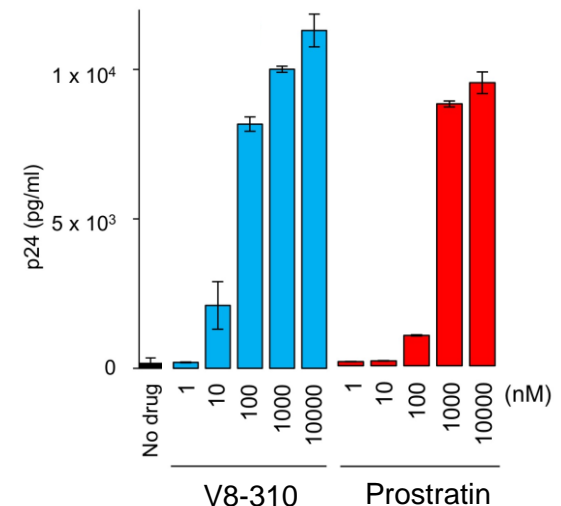
HIV完治を目指す新規治療法の開発

[1] 本研究班の研究内容. 既知の作用機序の抗HIV薬にHIV潜伏感染細胞を再活性化される作用の新しい薬剤を併用することでHIV Cureを目指す.

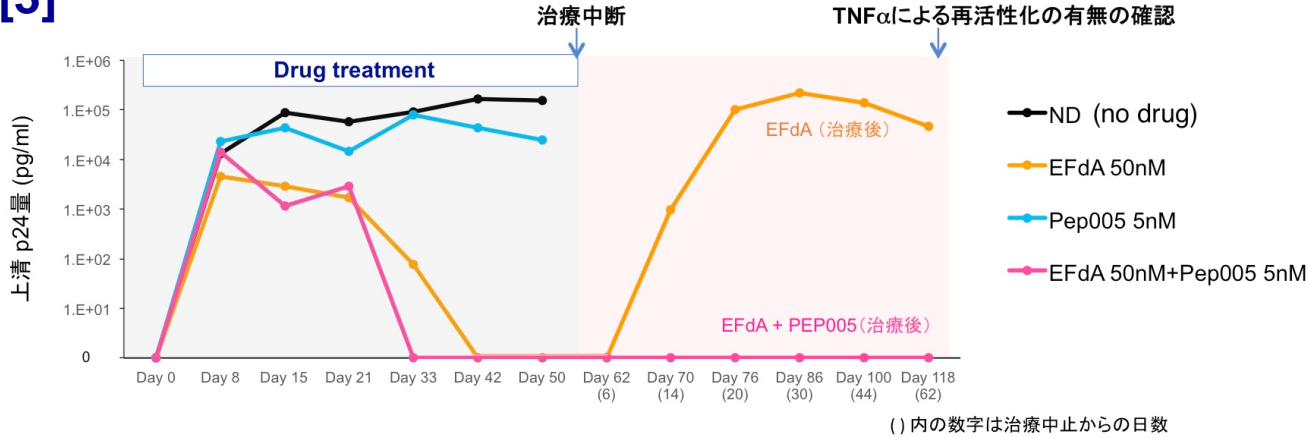
[2] 本研究班で新たに同定されたLRA活性を有する一連の化合物. いずれもPKC活性化剤に属し、特にV8-310は既報の対照薬よりも強力なLRA活性を示した.

[2]

Drug	EC ₅₀ (μM)	
	ACH-2	U1
V8-310	0.026	0.039
EV8-310	0.445	2.959
V8-23TM	2.975	>10.00
EV9-310	1.579	4.685
YS028	0.59	2.06
YO058E	8.56	>10.0
Prostratin (対照薬)	0.302	0.312

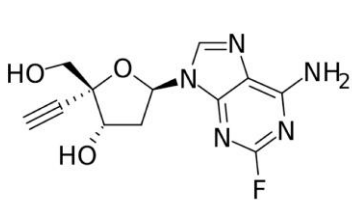
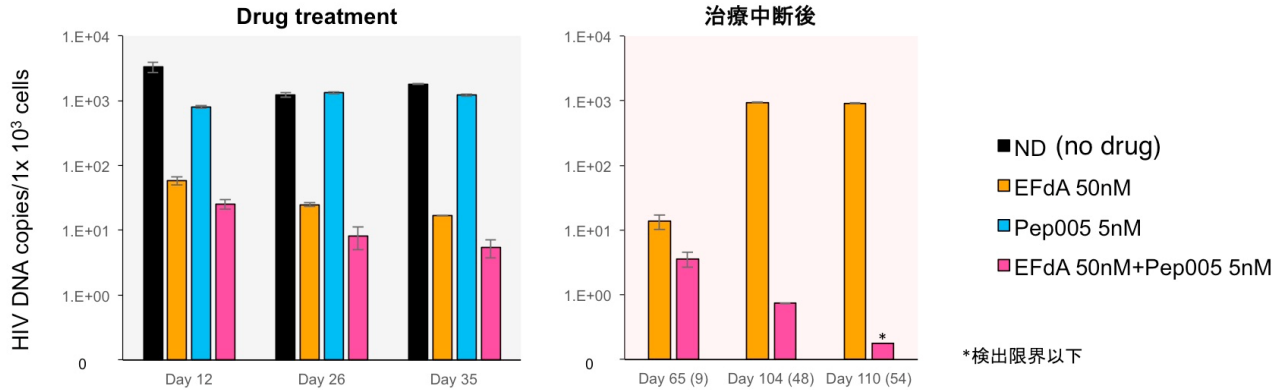


[3]



[3] 本研究班で開発された新しい潜伏感染治療薬のin vitro評価系.

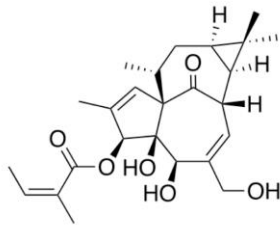
EFdA(下図:逆転写酵素阻害剤)単独では治療終了後にウイルスが再上昇するのに対して, PEP005(下図:LRA)を併用したものでは治療終了後もウイルスの再上昇が認められなかった.



EFdA /MK-8591

HIV-1 IC₅₀ (MT4, NL43) : 0.3 nM

既存の作用機序(逆転写酵素阻害)の抗HIV薬



PEP005 (PKC activator)

CC₅₀ (MT4) : 48 μM
CC₅₀ (ACH2) : 1 nM

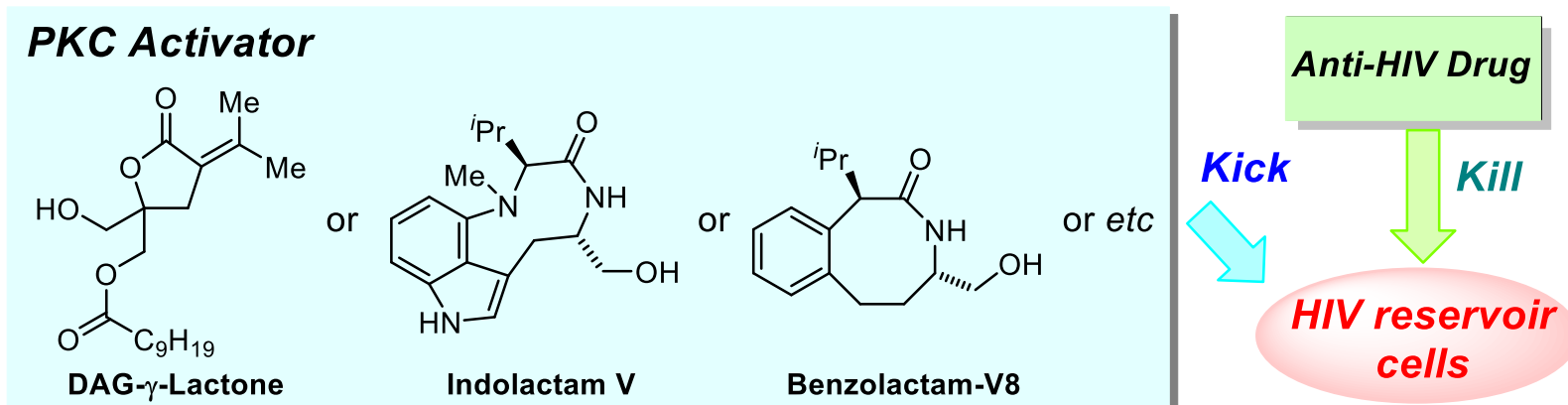
潜伏感染細胞を殺傷する(Kick & Kill)薬剤

[結語] 本研究班では、HIV Cureを可能とする新しい治療法開発に向けて、1.LRA活性を有する新規の低分子化合物の同定に成功、2.LRAと既存の作用機序の抗HIV薬の併用効果をin vitroで評価できる新しい評価系の確立に成功した。

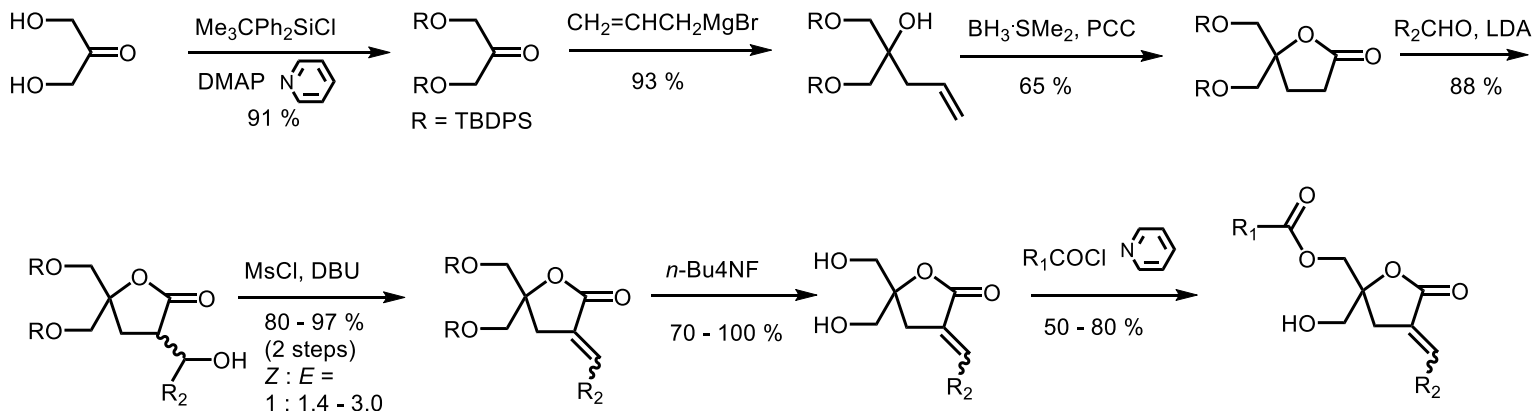
(分担研究課題) HIV潜伏感染細胞の活性化に関する免疫賦活剤の創製

玉村 啓和(分担研究者) 東京医科歯科大学 生体材料工学研究所

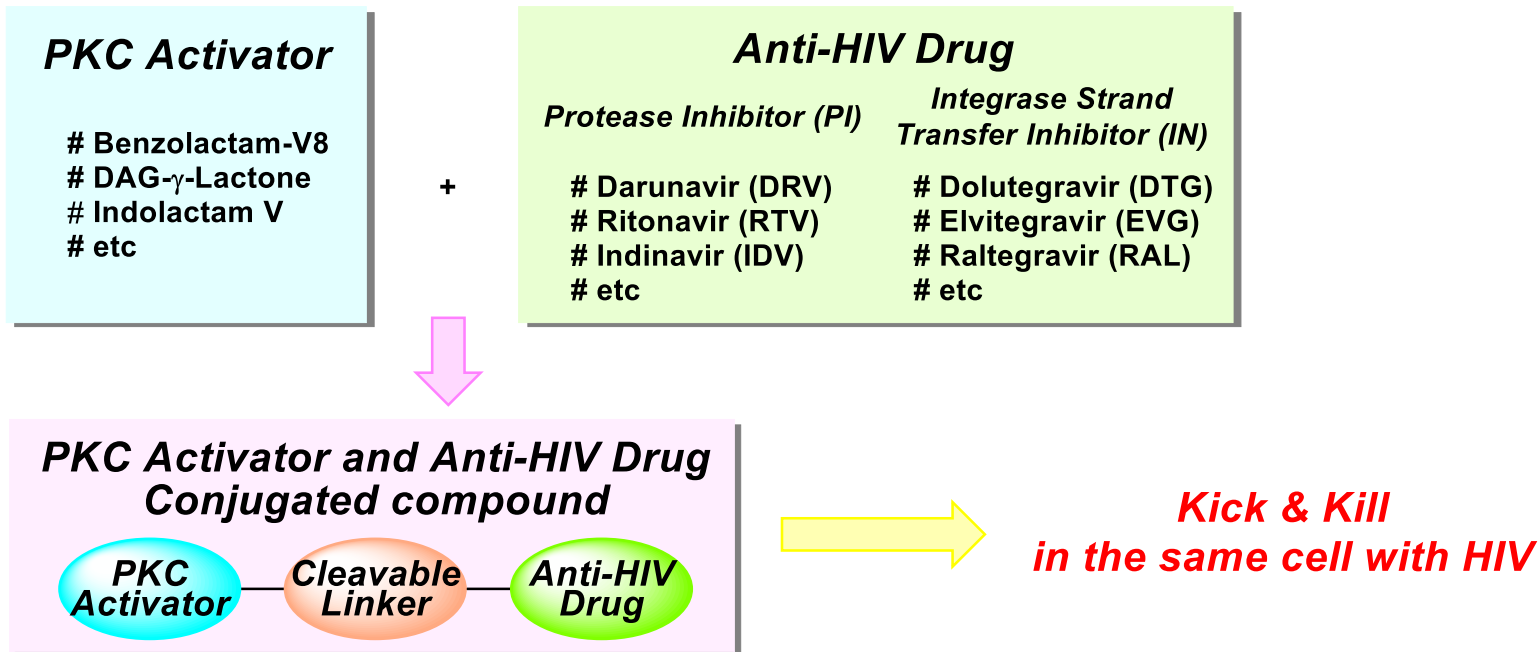
1. 多様なLRA活性化剤(PKC活性化剤)の合成



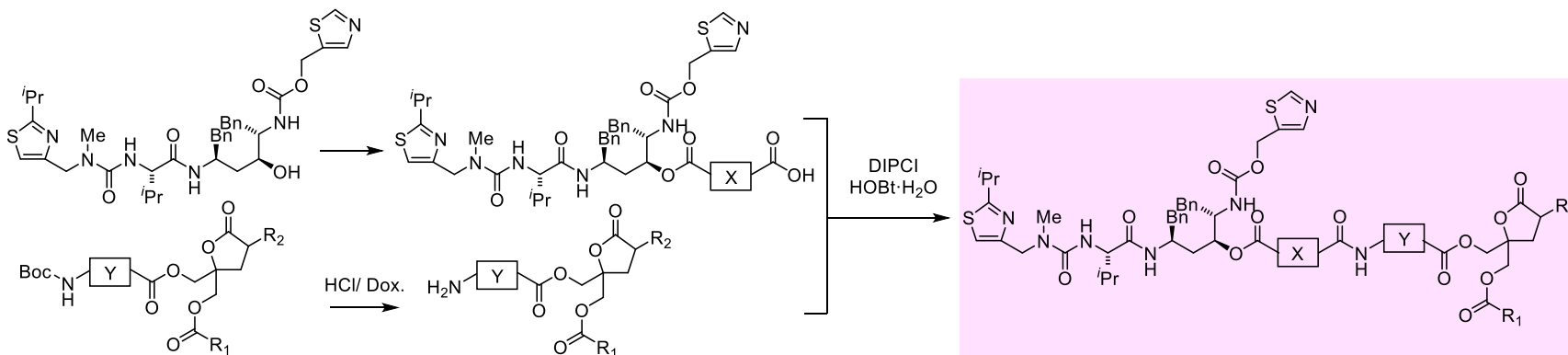
DAG- γ -lactoneの合成)



2. 抗HIV剤と種々のPKC活性化剤を組み合わせたハイブリット分子の合成



例)



(分担研究課題) HIV感染細胞のHIV潜伏感染と活性化の機序についての解析

土屋 亮人(分担研究者) 国立国際医療研究センター エイズ治療・研究開発センター(ACC)

目的

本研究ではHIV患者の末梢血単核球(PBMC)を用いてHIV感染細胞のHIV潜伏感染と活性化の機序について解析する。

対象患者

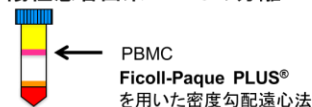
国立国際医療研究センター病院 エイズ治療・研究開発センターに来院し、同意説明文書に基づいてインフォームド・コンセントにて同意を文章で取得した、血漿HIV-RNA量が十分に抑えられている抗HIV療法中のHIV患者30例。精神的・知的障害等により本人からインフォームド・コンセントが得られない者、未成年者からは試料の提供を受けない(倫理審査委員会承認番号: NCGM-G-002259-00)。

試料としての検体の内容

上記の対象患者からEDTA採血管で10ml程度採血し、PBMCを分離する。

臨床サンプルを用いた実験

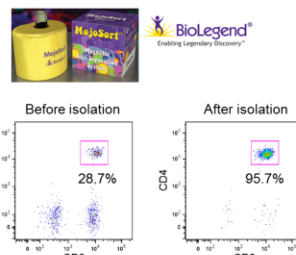
1. HIV陽性患者由来PBMCの分離



48 h incubation

2. CD4+ T細胞の分離

CD4 T cell isolation kitを用いて細胞を分取



3. LRAIによるHIV再活性化の確認

CD4+ T cell: 2.5 x 10⁶ cells/ml in 96 wells plate

新規LRA or PMA/Ionomycinによる刺激

Incubate for 24h

細胞の回収

RNA抽出

DNA抽出

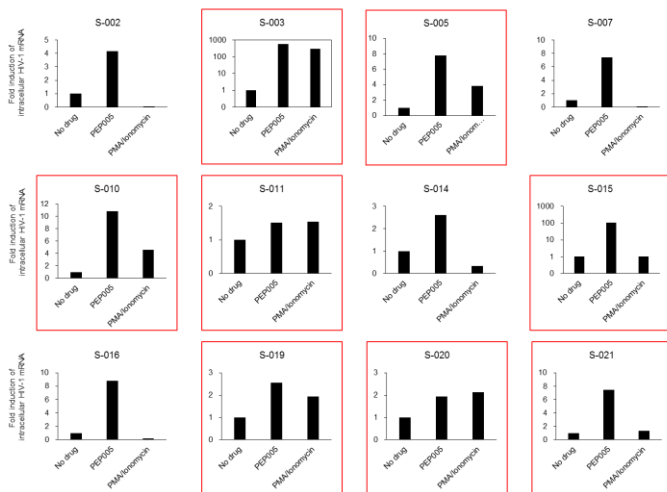
細胞内HIV mRNA

Proviral DNA

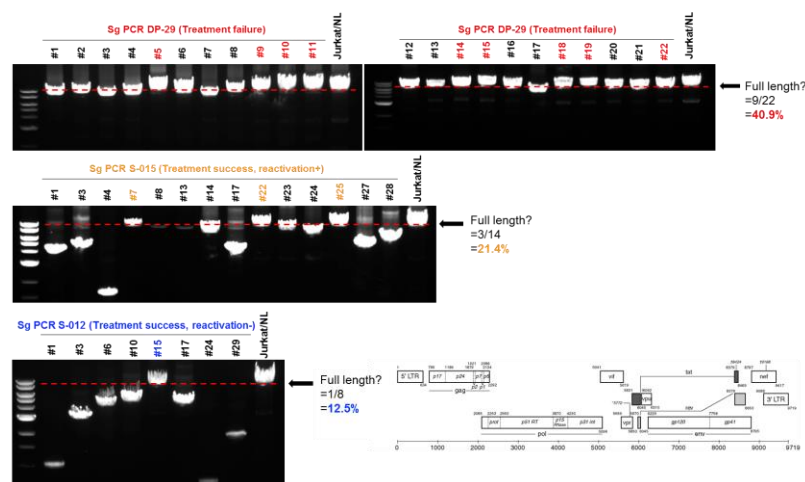
q-PCR

SG-PCR
q-PCR

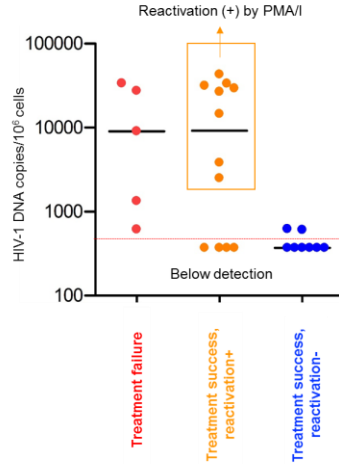
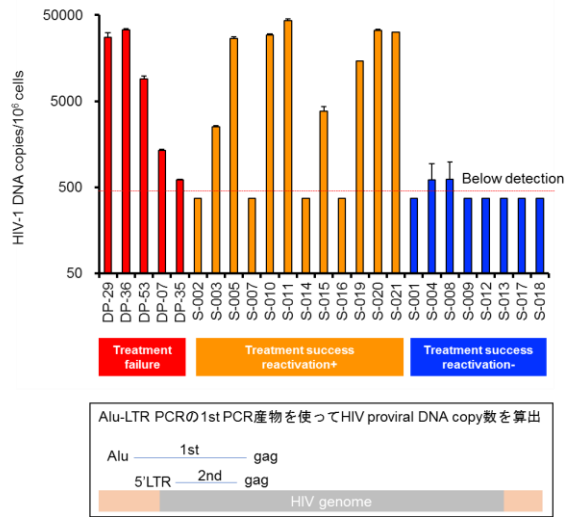
Treatment success, reactivation+ (Birapant Exp: Donor1-12)



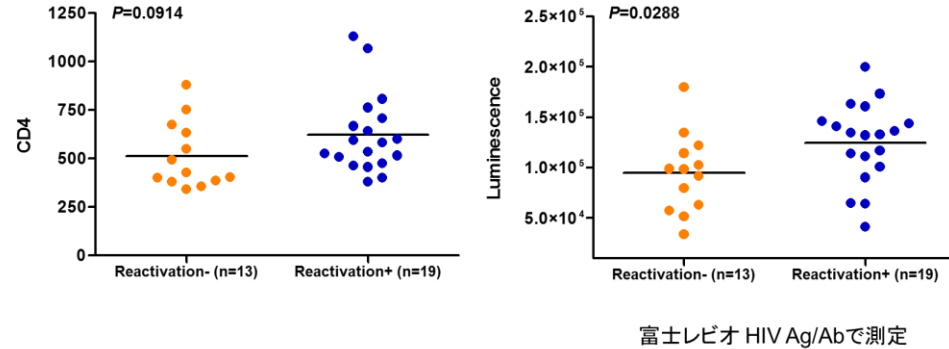
Single genome PCR



**Nested q-PCR for HIV-1 DNA copies/10⁶ cells
(use ACH2/A3.01 standard: detection DNA limit = 500 copies/10⁶ cells)**



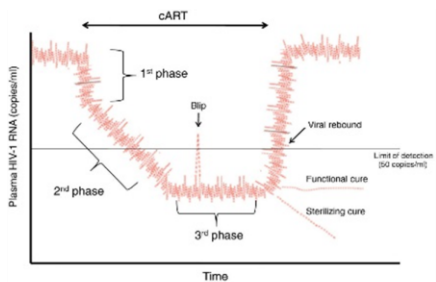
**Comparison of amounts of CD4 and HIV Ag/Ab
Non-reactivator vs Reactivator (n=13 vs 19)**



富士レビオ HIV Ag/Abで測定

まとめ

**cART中にBlipが見られた群での比較
Non-reactivator vs Reactivator (n=13 vs 19)**



Van Lint C, et al. Retrovirology. 2013 10:67.

VL<20 copies/ml以降のBlip

Blip+, Reactivation-
=5/13 (38.5%)

Blip+, Reactivation+
=13/19 (68.4%)

- 一部の患者PBMCで再活性化薬によるHIV-1 mRNAの発現が確認できた。
- Single genome PCRでHIV-1潜伏感染を確認し、完全長のHIV-1遺伝子は治療失敗例でより多く、また、再活性化例でも多く見られた。
- HIV-1 DNA量は再活性化例で高かった。
- 非再活性化例と再活性化例のCD4数とHIV抗原・抗体価を比較したところ、HIV抗原・抗体価で再活性化例の方が有意に高かった(P=0.0288)。
- 非再活性化例と再活性化例のVL<20 copies/ml以降のBlipを比較したところ、非再活性化例38.5%に対して再活性化例68.4%と再活性化例の方が高かった。

今後の予定

HIVの潜伏感染と活性化の機序を明らかにし、各患者のウイルス再上昇のリスクを判断できるような知見を得る。

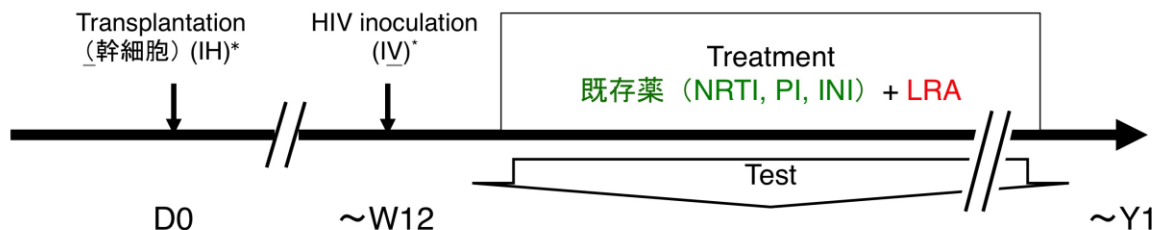
(分担研究課題)HIV潜伏感染評価系の構築

原田 恵嘉(分担研究者) 国立感染症研究所エイズ研究センター

[本研究の目的] 本研究班ではHIV Cureを可能とする新しい治療法開発に向けてLRA活性を有する新規の低分子化合物の開発を進めている。分担研究者は、1.研究班で開発された有望化合物の動物モデルでの活性評価、および2.HIV潜伏感染細胞の除去に有効なLRA以外の治療法の検討を進めている。

[1] ヒトCD34⁺造血幹細胞移植マウスを用いた HIV感染・治療実験

- X4, R5-HIVどちらでも感染可
- ウイルス感染が持続しながらマウスが長期間生存する
- 免疫系が一部再構築されており免疫応答の解析も可能

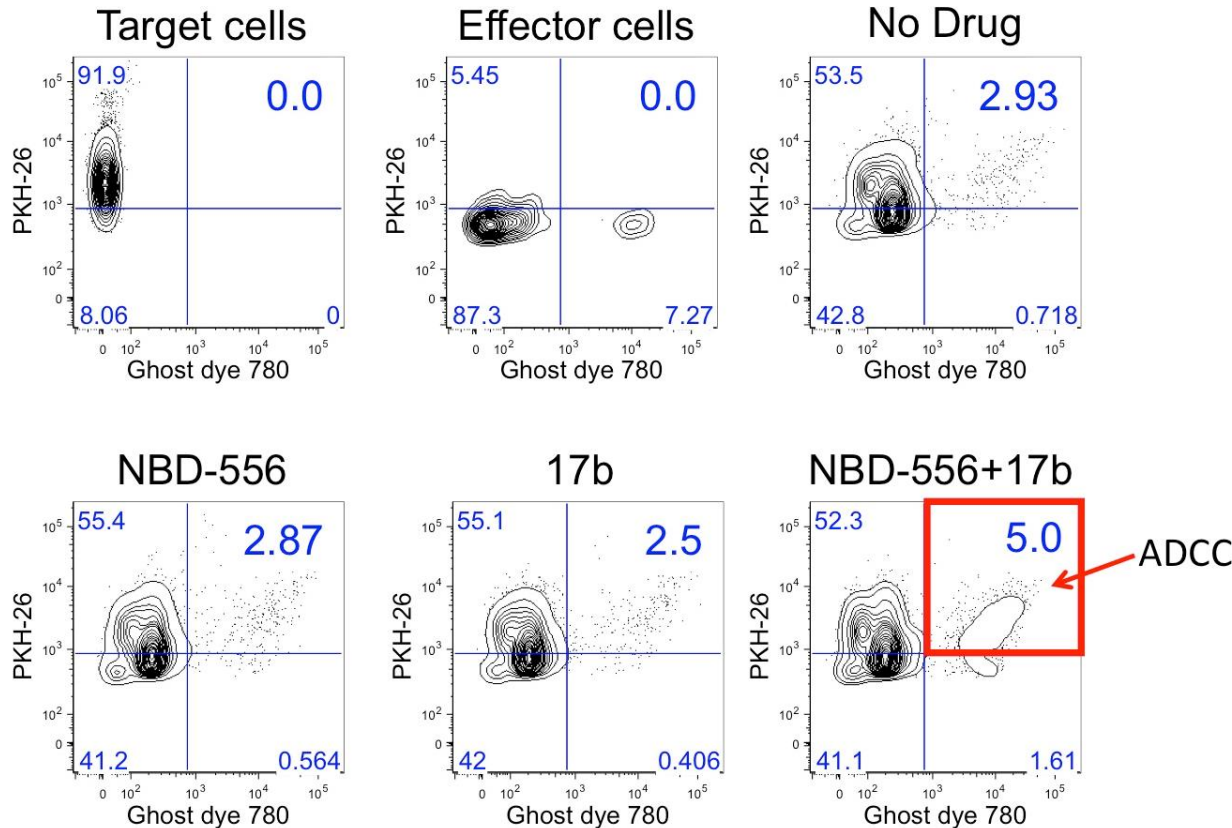


* IH, intrahepatically; IV, intravenously

[1] ヒトCD34⁺造血幹細胞移植マウスを用いた薬剤活性評価。免疫不全マウスを用いた薬剤活性評価では通常はHIV感染と同時に薬剤投与を開始するが、今回は感染(潜伏)細胞を含むHIV感染細胞への治療を目的とするため、治療開始前(2週以上)にウイルスを感染させる。

[2]

ADCC (抗体依存性細胞障害) の解析と抗HIV併用療法への応用



(17b : 抗gp120抗体、NBD-556:低分子gp120阻害剤)

[2] 低分子化合物(LRA)による潜伏感染細胞活性化と除去以外の新たな治療戦略として、HIVに対する抗体が有する細胞障害作用:抗体依存性細胞障害(ADCC)の応用を検討する。現在までに抗体(17b)が低分子侵入阻害剤(NBD-556)と併用することで強力なADCCを惹起することが分かっている。

[結語] HIV Cureに向けた新しい治療法開発に向けて本研究班で開発された新規LRA候補薬の動物モデルでの活性評価を目的とした、ヒト幹細胞移植マウスモデルを用いた新しい薬剤評価モデルの開発を行った。またADCCなど低分子LRA以外でHIVリザーバー除去に効果を発揮する可能性のある新しい治療法の検討を行った。

研究発表及び特許取得報告について

課題番号： 29指1010

研究課題名： HIV潜伏感染除去を可能とする新規抗HIV併用療法の開発

主任研究者名： 前田賢次

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
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.	Takamatsu Y, Das D, Kohgo S, Hayashi H, Delino NS, Sarafianos SG, Mitsuya H, and <u>Maeda K.</u>	Cell Chem. Biol.	in press	2018
Synthesis of 4' -Substituted Purine 2' -Deoxyucleosides and Their Activity against Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis B Virus.	Kohgo S, Imoto S, Tokuda R, Takamatsu Y, Higashi-Kuwata N, Aoki M, Amano M, Kansui H, Onitsuka K, <u>Maeda K.</u> , and Mitsuya H.	ChemistrySelect	in press	2018
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.	Yasutake Y, Hattori S, Hayashi H, Matsuda K, Tamura N, <u>Maeda K.</u> , and Mitsuya H.	Sci Rep.	8, 1624	2018
Synthesis and Evaluation of Dimeric Derivatives of Diacylglycerol-Lactones as Protein Kinase C Ligands.	Ohashi, N, R. Kobayashi, W. Nomura, T. Kobayakawa, A. Czikora, B. K. Herold, N. E. Lewin, P. M. Blumberg, H. <u>Tamamura</u>	Bioconjugate Chem.	28:2135-2144	2017
High Plasma Concentrations of Dolutegravir in Patients with ABCG2 Genetic Variants.	<u>Tsuchiya K.</u> , Hayashida T, Hamada A, Oki S, Oka S, Gatanaga H.	Pharmacogenet Genomics	27, 416-419	2017

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
HIV潜伏感染細胞を標的とした新規治療薬開発に有効なin vitro評価系の開発	松田 幸樹、服部 真一郎、土屋 亮人、小早川 拓也、大橋 南美、野村 渉、原田 恵嘉、佐藤 賢文、吉村 和久、玉村 啓和、満屋 裕明、前田 賢次	第31回日本エイズ学会学術集会・総会	東京	2017/11/24-26
Analysis of molecular mechanism of HIV-1 latent infection & reactivation and development of novel therapeutics active against latent HIV-1 infection.	Kouki Matsuda, Shin-ichiro Hattori, Kiyoto Tsuchiya, Takuya Kobayakawa, Nami Ohashi, Wataru Nomura, Shigeyoshi Harada, Yorifumi Satou, Kazuhisa Yoshimura, Hirokazu Tamamura, Hiroaki Mitsuya, and Kenji Maeda	第65回日本ウイルス学会学術集会	大阪	2017/10/24-26
新規PKC activatorによるHIV潜伏感染細胞の活性化及び治癒を目指した新規抗HIV療法の開発	松田幸樹、服部真一郎、土屋亮人、大橋南美、野村渉、原田恵嘉、吉村和久、玉村啓和、満屋裕明、前田賢次。	第27回抗ウイルス療法学会学術集会・総会	熊本	2017/5/18-20
Molecular simulation of EFdA and related analogs to determine the structural basis of HIV-1 drug resistance	Debananda Das, Yuki Takamatsu, Satoru Kohgo, Shinichiro Hattori, Hironori Hayashi, Kouki Matsuda, Stefan G. Sarafianos, Hiroaki Mitsuya, and Kenji Maeda	ACS' 253rd National Meeting & Exposition	San Francisco, California	2017/4/2-6

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
該当なし				

研究発表及び特許取得報告について

特許取得状況について ※出願申請中のものは()記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
該当なし				

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。
※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと。