

## Highly potent inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by TAK-220, an orally bioavailable small-molecule CCR5 antagonist.

(抗 HIV-1 活性を有する新規経口低分子 CCR5 拮抗薬 TAK-220 に関する研究)

高 島 勝 典

### 【背景】

核酸系逆転写酵素阻害薬 (NRTI) 2 剤と非核酸系逆転写酵素阻害薬 (NNRTI) あるいはプロテアーゼ阻害薬 (PI) を併用する highly active antiretroviral therapy は HIV-1 感染患者における AIDS 発症頻度を劇的に減少させたが、最近では薬剤耐性ウイルスの出現による治療の失敗が大きな問題となっており、既存薬とは作用が異なる新規抗 HIV-1 薬の開発が望まれている。こうした新規抗 HIV-1 薬の作用標的として HIV-1 のコレセプターである CCR5 に着目し、CCR5 拮抗薬の研究を行ってきた。その過程で定量的な膜融合試験を構築してスクリーニングの効率化を実現し、本試験を含む各種スクリーニングにより低分子化合物であるピペリジン誘導体 TAK-220 を見出した。本研究では TAK-220 のレセプター結合特性、各種 *in vitro* 感染実験系における抗 HIV-1 活性および各種動物における体内動態プロファイルについて検討した。

### 【実験材料および方法】

TAK-220 のレセプター結合特性はケモカインレセプター発現細胞とそのリガンドを用いたリガンド結合阻害試験および細胞内  $Ca^{2+}$  流入試験により調べた。TAK-220 の膜融合阻害活性は CD4 およびコレセプターを発現する細胞と一過性に HIV-1 の envelope 蛋白を発現する細胞を用いて調べ、抗 HIV-1 活性は U87.CD4.CCR5 細胞およびヒト末梢血単核細胞 (PBMCs) に組換えウイルスあるいは臨床分離株を感染させて調べた。また、CCR5 発現細胞および各種抗 CCR5 抗体を用いてこれらの抗体の CCR5 への結合に及ぼす TAK-220 の影響を調べた。TAK-220 の動物における薬物動態は本薬剤をラットおよびサルに経口および静脈内投与し、投与後 24 時間までの血漿中 TAK-220 濃度を測定して調べた。

### 【結果】

TAK-220 は CCR1、CCR2b、CCR3、CCR4、CCR5、CCR7 発現細胞とそのリガンドを用いた結合阻害試験において CCR5 へのリガンドの結合を選択的に阻害し、CCR5 に対するリガンドの中では RANTES、MIP-1 $\alpha$  の CCR5 への結合をそれぞれ IC<sub>50</sub> 値 3.5、1.4 nM と強く阻害したが、MIP-1 $\beta$  の結合は 10  $\mu$ M の濃度でも阻害しなかった。さらに、細胞内  $Ca^{2+}$  流入試験において TAK-220 はリガンドの RANTES ではなく、レセプターの CCR5 に拮抗的に作用することが示された。TAK-220 は CCR5 を介したウイルス侵入を選択的に阻害し、PBMCs における 3 株の多剤耐性ウイルスを含む計 6 株の臨床分離 CCR5-using (R5) HIV-1 感染を平均 EC<sub>90</sub> 値 13 nM と強く阻害したが、CXCR4-using HIV-1 および dual-tropic HIV-1 の感染は 10  $\mu$ M の濃度でも阻害

しなかった。一方で、高濃度ヒト血清添加や PBMC ドナーの違いは本薬剤の抗 HIV-1 活性には影響しなかった。さらに、各種組換え HIV-1 を用いた実験において TAK-220 の抗 HIV-1 活性はウイルスの envelope のサブタイプには依存しないことが示された。TAK-220 は CCR5 の internalization を誘導しなかった。一方で、TAK-220 は CCR5 の細胞外第二ループ(ECL2)を認識する二つの抗 CCR5 抗体の CCR5 への結合を阻害した。動物における薬物動態試験において TAK-220 は 5 mg/kg 経口投与でラットおよびサルにおいてそれぞれ 9.5 および 28.9% の oral bioavailability を示した。

#### 【まとめ】

TAK-220 は CCR5 特異的な拮抗薬であることが明らかとなった。TAK-220 は CCR5 を介したウイルス侵入および感染を選択的に阻害し、HIV-1 感染に関与する他の因子には作用しなかった。TAK-220 の作用メカニズムは既存の抗 HIV-1 薬と異なっており、既存薬との併用は臨床において良好な併用効果を示す可能性がある。事実、TAK-220 は *in vitro* 併用試験において zidovudine、lamivudine (NRTI)、efavirenz (NNRTI)、indinavir (PI) および enfuvirtide (gp41 阻害薬) と良好な併用効果を示した<sup>2)</sup>。TAK-220 は PBMCs において 3 株の多剤耐性ウイルスを含む 6 株の臨床分離 R5 HIV-1 感染を平均 EC<sub>90</sub> 値 13 nM (7 ng/mL) と強く阻害した。TAK-220 は現在問題となっている多剤耐性ウイルスにも有効と考えられる。また、TAK-220 の抗 HIV-1 活性はウイルスの envelope のサブタイプに影響されなかった。さらに、高濃度ヒト血清添加や PBMC ドナーの違いは本薬剤の抗 HIV-1 活性に影響しなかった。従って、TAK-220 は平均 EC<sub>90</sub> 値である 7 ng/ml 以上の濃度を血漿中で維持できれば臨床において有効と考えられた。また、TAK-220 はラットおよびサルにおいて経口吸収されたことから、この濃度はヒトでも経口投与で達成可能と考えられた。TAK-220 は各種抗 CCR5 抗体を用いた実験から CCR5 の ECL2 周辺に作用していることが示唆された。そこで、TAK-220 の抗 HIV-1 活性発現に寄与する CCR5 における結合部位を詳細に調べたところ、TAK-220 は ECL2 に直接結合するのではなく、CCR5 の 4~7 番目の膜貫通ドメインにより形成されるポケットに結合後、ECL2 に直接的あるいは間接的に作用していると推察された<sup>3)</sup>。薬剤耐性ウイルスの問題を考える上で、*in vitro* で TAK-220 に対する耐性ウイルスを分離し、その性状を解析することは非常に重要であることから、R5 HIV-1 臨床分離株を TAK-220 存在下で PBMCs において長期間培養することによりその耐性ウイルスの分離を試みているが、培養開始から約 2 年が経過した現在も TAK-220 に対する感受性が明らかに低下したウイルスは分離できていない (未発表データ)。

以上、低分子 CCR5 拮抗薬 TAK-220 のレセプター結合特性、*in vitro* 抗 HIV-1 活性およびその作用機序を明らかにした。TAK-220 は CCR5 を標的とする経口投与可能な新規抗 HIV-1 薬として有望であると思われる。

#### 【文献】

- 1) Takashima et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001, 45: 3538.
- 2) Tremblay et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005, 49: 3483.
- 3) Nishikawa et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005, 49: 4708.

(*Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49 巻, 8 月号, 3474-3482 頁, 2005 年掲載)

# 論 文 審 査 の 要 旨

報 告 番 号	医 論 第 1 4 2 6 号	氏 名	高 島 勝 典
審 査 委 員	主 査	山 田 勝 士	
	副 査	栄 鶴 義 人	丸 山 征 郎

## Highly potent inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by TAK-220, an orally bioavailable small-molecule CCR5 antagonist

(抗 HIV-1 活性を有する新規経口低分子 CCR5 拮抗薬 TAK-220 に関する研究)

核酸系逆転写酵素阻害薬 2 剤と非核酸系逆転写酵素阻害薬あるいはプロテアーゼ阻害薬を併用する highly active antiretroviral therapy は HIV-1 感染者における AIDS 発症頻度を劇的に減少させた。しかしながら、最近では薬剤耐性ウイルスの出現による治療の失敗が大きな問題となっており、既存の薬剤とは作用が異なる新規抗 HIV-1 薬の開発が望まれている。学位申請者は新規抗 HIV-1 薬の作用標的として HIV-1 のコレセプターである CCR5 に着目し、CCR5 拮抗薬の研究を行って来た。本研究はその研究過程で見出した低分子化合物であるピペリジン誘導体 TAK-220 の抗 HIV-1 活性を中心とした薬効プロファイルを明らかにすることを目的とした。

本研究では、ケモカインレセプター発現細胞とそのリガンドを用いたリガンド結合試験および細胞内  $Ca^{2+}$  流入試験により TAK-220 のレセプター結合特性を検討した。抗 HIV-1 活性については CD4 と CCR5 あるいは CD4 と CXCR4 を発現させた U87 細胞、およびヒト末梢血単核細胞 (PBMCs) に組換えウイルスもしくは臨床分離株を感染させ、ヒト血清添加、PBMCs のドナー、そして envelope 蛋白のサブタイプについて、TAK-220 の抗 HIV-1 活性に及ぼす影響について検討した。また、本薬剤をラットおよびサルに経口および静脈内投与し、体内動態を調べた。

その結果、本研究で得られた重要な知見は以下の通りである。

- ① TAK-220 は CCR5 特異的に作用し、その作用が拮抗作用であった。
- ② TAK-220 は CCR5 を介した HIV-1 感染を選択的に阻害し、PBMCs において 3 株の多剤耐性ウイルスを含む計 6 株の臨床分離株の感染を、平均  $EC_{90}$  値 13 nM (7 ng/ml) ときわめて強く阻害した。
- ③ TAK-220 の抗 HIV-1 活性は高濃度ヒト血清添加、PBMCs のドナーおよびウイルスの envelope のサブタイプにより影響されなかった。
- ④ TAK-220 は 5 mg/kg 経口投与でラットおよびサルにおいて、それぞれ 9.5 および 28.9% の oral bioavailability を示した。
- ⑤ TAK-220 は CCR5 の 4~7 番目の膜貫通ドメインによって形成されるポケット部分への作用を介して抗 HIV-1 活性を示した。

本研究は、低分子 CCR5 拮抗薬 TAK-220 のレセプター結合特性、*in vitro* 抗 HIV-1 活性、その作用機序、そして臨床での推定有効濃度などを明らかにし、本薬剤が CCR5 を標的とする経口投与可能な新規抗 HIV-1 薬として有望でありことを証明した。本研究で得られた知見から、TAK-220 の臨床での使用は HIV-1 感染症の治療に大きく貢献できるものと考えられ、よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

## 試験（学力確認）の結果の要旨

報告番号	医論第 1426号	氏名	高島 勝典
審査委員	主査	山田 勝士	
	副査	栄鶴 義人	丸山 征郎
<p>主査および副査の3名は、平成18年5月23日、学位申請者 高島勝典に面接し、学位請求論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問1) TAK-220はTAK-779の側鎖を変換して合成されたものか？          回答) TAK-220はTAK-779と基本骨格が異なる別系統の化合物である。</p> <p>質問2) TAK-220はCCR5の4~7番目の膜貫通ドメインによって形成されるポケットに結合するとのことであるが、その結合によりCCR5を発現しているマクロファージは活性化されないか？          回答) CCR5発現細胞を用いた細胞内カルシウム流入試験において、TAK-220自体はRANTESのように細胞内カルシウム流入を誘導せず、RANTES刺激による細胞内カルシウム流入を阻害する。すなわち、その作用は拮抗的であり、作動薬のようにCCR5発現細胞を活性化しない。</p> <p>質問3) CCR5欠損者(CCR5Δ32)のCCR5では具体的にどの部分に変異が起こっているのか？          回答) CCR5Δ32のCCR5は細胞外第二ループ以降を欠損しており、細胞表面には発現されない。</p> <p>質問4) CCR5へのリガンドの結合を阻害した場合の副作用としてはどのようなことが想定されるか？          回答) CCR5はケモカインレセプターであることから、CCR5へのリガンドの結合阻害は何らかの免疫異常をもたらす可能性がある。事実、CCR5のノックアウトマウスではある種の病原体に対する易感染化がみられている。但し、CCR5欠損者(CCR5Δ32)で明確に易感染化がみられたとの報告はほとんどない。また、一部のCCR5拮抗薬で臨床試験において肝毒性がみられたとの報告はあるが、CCR5阻害との関連は不明であり、他のCCR5拮抗薬の臨床試験でもこうした報告はない。いずれにせよ、副作用については臨床での使用に伴って注意深く観察する必要がある。</p> <p>質問5) HIV-1侵入阻害薬としてはCCR5拮抗薬以外にどのようなものがあるか？          回答) ケモカインレセプター拮抗薬としては他にCXCR4拮抗薬があり、現在Phase2のステージにある。また、融合阻害薬としてはgp41阻害薬がすでに上市されている。</p> <p>質問6) CCR5やCXCR4以外にも幾つかのケモカインレセプターがコレセプターとして機能しているとのことであるが、CCR5やCXCR4とその他のケモカインレセプターとの違いは？          回答) 初感染を引き起こし、無症候性期に分離されるHIV-1はコレセプターとしてCCR5を利用し、AIDS期に分離されるHIV-1はコレセプターとしてCXCR4を利用するなど、CCR5やCXCR4は感染時における役割・意義が明確であるが、その他のケモカインレセプターについては臨床病態との具体的な関連性は不明であり、あくまでもマイナーなコレセプターという位置付けである。</p> <p>質問7) TAK-220の抗HIV-1活性はサブタイプ非依存的とのことであるが、個々のケースを見ると、30倍程度の活性差がある。この違いの背景は？          回答) 個々の株のEnvのアミノ酸配列を比較することによりTAK-220の活性差に関する情報を得られる可能性があるが、現時点ではそのデータを持っていない。但し、活性差があるとはいえ、最も感受性が低い株でも約30nMのIC<sub>50</sub>値で感染を阻害しており、経口投与でこの濃度は十分維持されるので、臨床での有効性という観点からみた場合、この程度の活性差は特に問題ないと考えられる。</p> <p>質問8) TAK-220の血中半減期は？          回答) サルにおいて約6時間である。</p>			

質問 9) TAK-220 はサブタイプ B 以外に有効とのことであるが、サブタイプ B に対する有効性には問題があるのか？

回答) サブタイプ B も含めて有効であるということである。TAK-220 には欧米で多く分離されるサブタイプ B への有効性に加えて、中央アフリカや東南アジアで多く分離されるサブタイプ C や E にも有効性を期待できるというメリットがある。

質問 10) 耐性ウイルスを分離する実験において、TAK-220 の場合は 2 年以上培養を続けても高度耐性ウイルスが分離できないとのことであるが、CXCR4 拮抗薬 AMD-3100 の場合はどうか？

回答) *In vitro* で AMD-3100 に対する耐性ウイルスが分離されたとの報告はある。但し、実験条件などが異なるので単純に耐性ウイルスの出現のしやすさについては議論できない。

質問 11) 無症候性期には R5 HIV-1 が感染者の体内に優位に存在するので、R5 HIV-1 の増殖を抑制すれば、AIDS 発症を遅延させることができるという理解でよいのか？

回答) その通りである。CCR5 拮抗薬は AIDS 発症抑制というコンセプトの抗 HIV-1 薬である。

質問 12) AIDS 期に HIV-1 のコレセプター指向性が CCR5 から CXCR4 へ変化するのなぜか？

回答) そのメカニズムは不明であるが、病態の進展に伴い、何らかの選択圧がコレセプター指向性の変化に影響していると考えられる。

質問 13) CXCR4 ではなく、CCR5 をターゲットにした理由は？

回答) R5 HIV-1 は初感染を引き起こし、無症候性期の感染者の体内に存在するので、CCR5 拮抗薬によりその増殖を抑制することができれば AIDS 発症を抑制できると考えられる。一方で、X4 HIV-1 は無症候性には分離されず、AIDS 期に分離されるので、CXCR4 拮抗薬の投薬時期はすでに AIDS を発症し、病態が悪化した時点となる。また、AIDS 期には X4 HIV-1 だけではなく、R5 HIV-1 も活発に増殖を繰り返しており、CCR5 拮抗薬は AIDS 期の感染者にもある程度有効性を示す可能性がある。こうした背景から、CCR5 拮抗薬の方がよりクリアな有効性を期待できると考え、CCR5 をターゲットに選択した。

質問 14) 別の CCR5 拮抗薬である SCH-C が無効である RU570 株に対しても、TAK-220 は抗 HIV-1 活性を示すとのことであるが、TAK-220 に対する耐性ウイルスが出現した場合、どのような耐性メカニズムが考えられるか？

回答) *In vitro* の試験で TAK-220 に対する耐性ウイルスを分離できていないので、そのメカニズムは推測の域を出ないが、Env に変異が入ることにより、ウイルスの CCR5 への結合様式が変化するものと考えられる。また、SCH-C に対する耐性ウイルス RU570 株に対して TAK-220 は抗 HIV-1 活性を示すことから、TAK-220 に対する耐性ウイルスの Env における変異箇所は SCH-C に対する耐性ウイルスのそれとは異なる可能性がある。

質問 15) TAK-220 は CCR5 への RANTES と MIP-1 $\alpha$  の結合は阻害するが、MIP-1 $\beta$  の結合は阻害しない。その理由は？

回答) CCR5 においてこれらのリガンドは細胞外第 2 ループに作用しているといわれているが、詳細な結合部位は不明である。個々のリガンドの結合部位は重複している部分はあっても微妙に異なっていると考えられ、今回の結果はこうしたことを反映していると考えられる。

質問 16) TAK-220 をサルに経口投与した時の AUC<sub>0-24h</sub> は 538 ng·h/ml であるが、経口吸収性は良いとみるか？

回答) 経口吸収性の一つの目安は oral bioavailability 10% であるが、サルにおいてその値は約 30% であり、経口吸収性が良い、悪いということは別にして、経口吸収されるという点では問題ないと考えている。また、抗 HIV-1 薬の場合には薬効を期待できる濃度を血中で維持できるかということが重要であり、この点も経口投与で十分にクリアされることを確認している。

質問 17) TAK-220 の排泄経路は？

回答) ほとんどが糞便中に排泄される。

質問 18) CCR5  $\Delta$  32 のホモ接合体では感染に抵抗性を示すということであるが、ヘテロ接合体の場合は？

回答) 感染抵抗性はほとんど示さないが、AIDS の発症は遅延することが報告されている。

以上の結果から、3 名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者と同等あるいはそれ以上の学力と識見を有しているものと認め、博士 (医学) の学位を与えるに十分な資格を有するものと判定した。