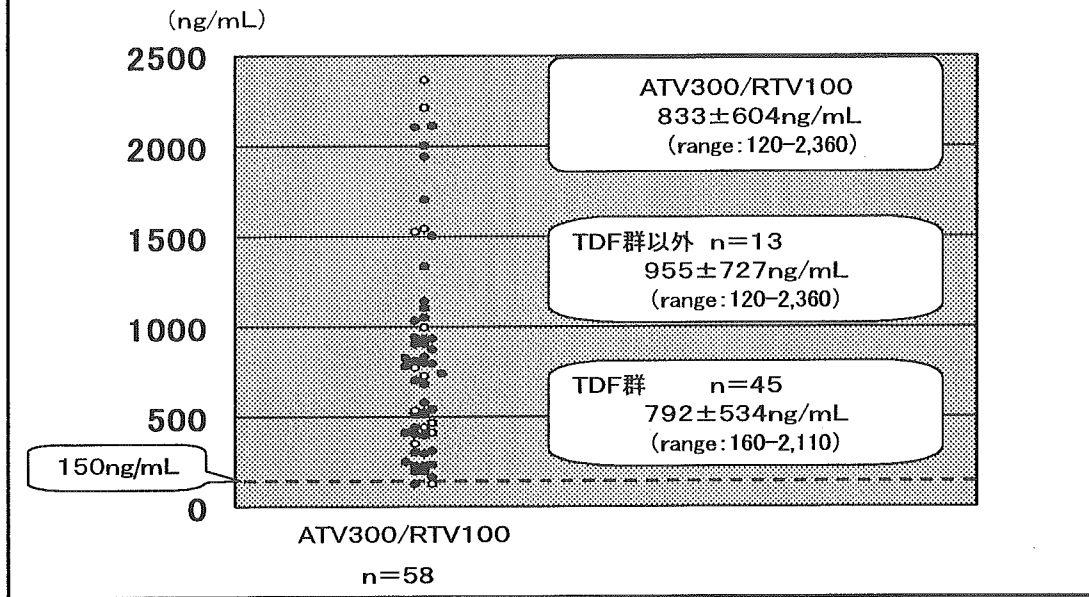


(図9)

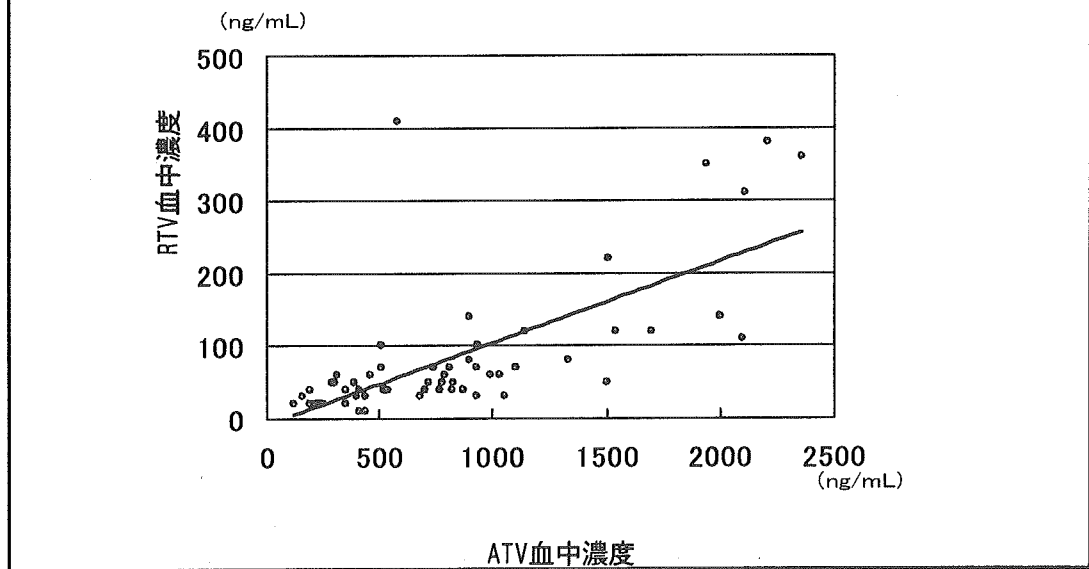
### 薬剤別 ATV血中濃度



(図10)

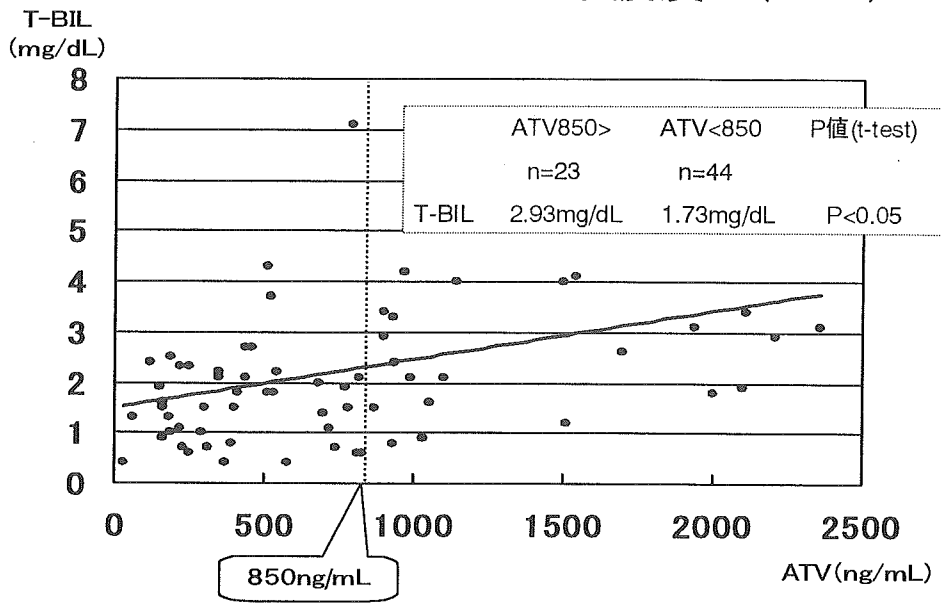
### ATV血中濃度とRTV血中濃度の関係

(n=58)



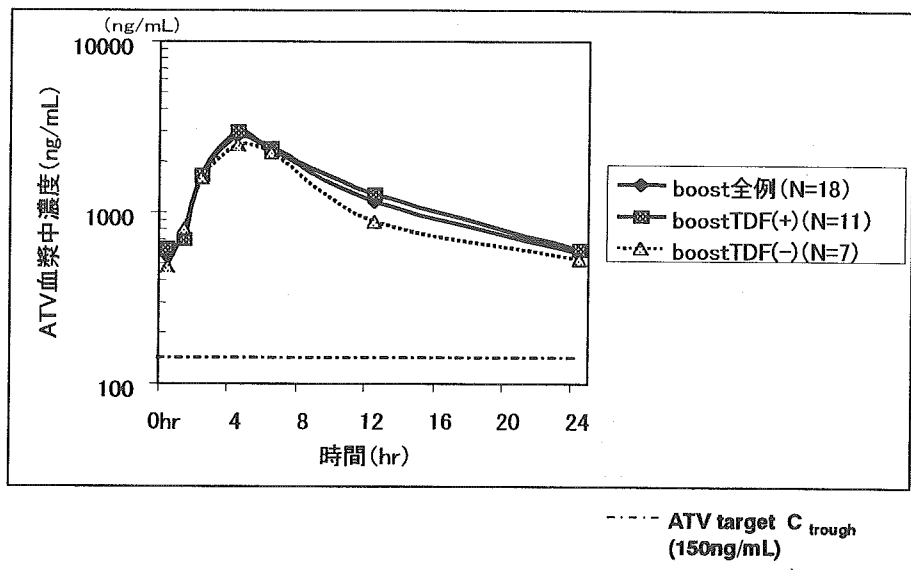
(図11)

### 総ビリルビンと血中濃度 (n=67)



(図12)

### RTV boost (N=18)のATV血中濃度とTDFによる影響



(表1)

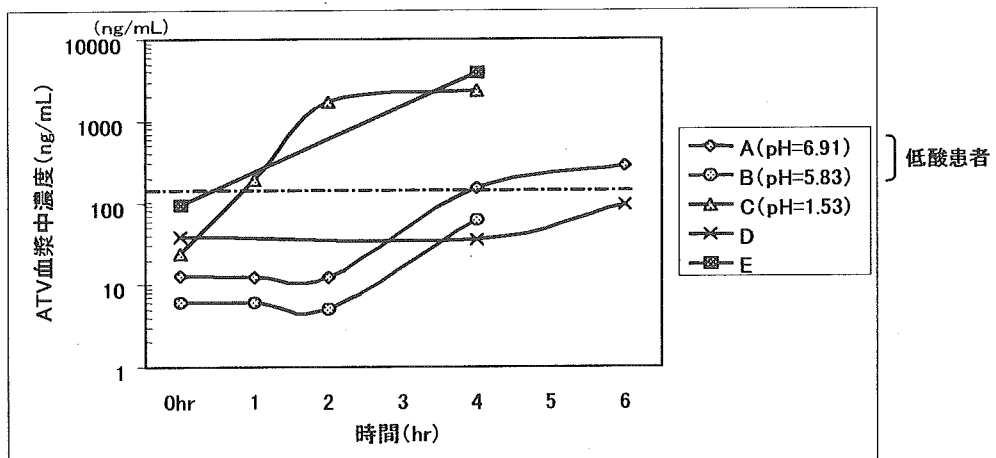
## ATV400mgQDデータと本報告の比較

	Cmax (ng/mL)	AUC (ng·hr/mL)	Cmin (ng/mL)	Tmax (hr)	T1/2(hr)
①ATV400mgQD*	3152	22262	273	2	6.5
②本報告 boost 18例 平均 ・TDF(+) 11例 ・TDF(-) 7例	3037	40211	560.9	4.3	9.3
本報告 /400mgQD比 (②/①)	0.96	1.81	2.05	2.15	1.43

\*ATV製品情報概要データ

[算術平均値による]

(図13) RTV boost (-) ATV400mg例の血中濃度 (N=5)

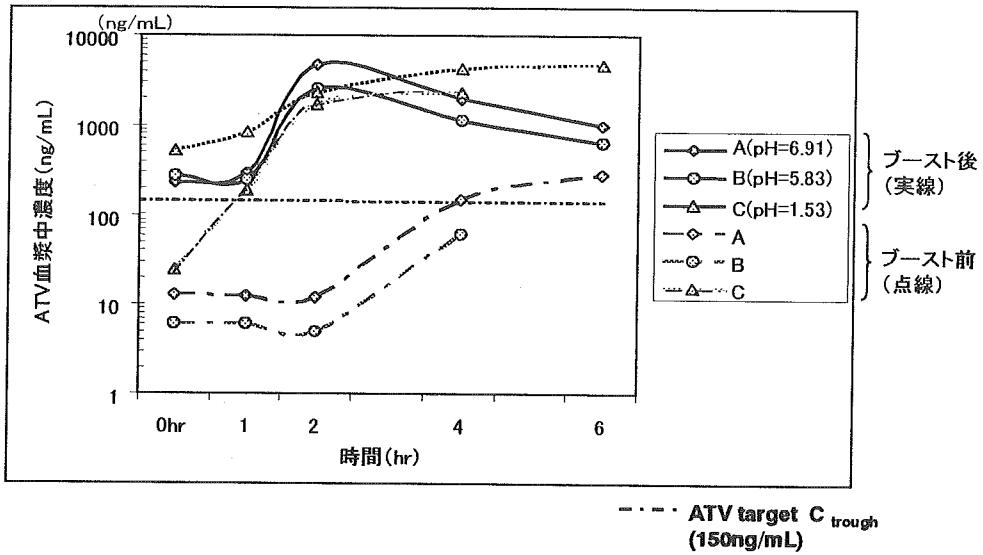


\*患者A,B,Cについてはブーストデータあり

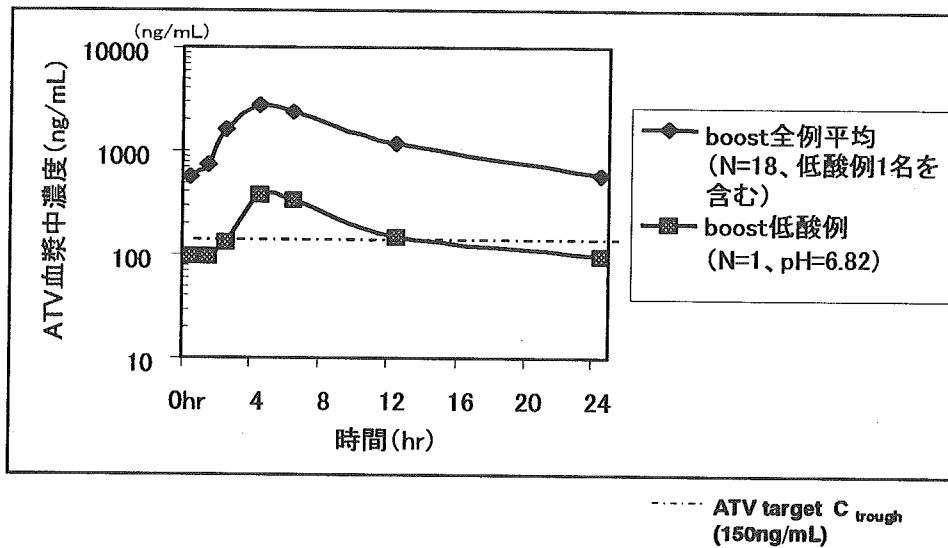
- - - - ATV target C<sub>trough</sub>  
(150ng/mL)

(図14)

同一患者における RTV boost前後の血漿中濃度推移



(図15) RTV boost 全例と低酸患者 (pH=6.82) の比較



(表2)

## ATVの pH別 溶解度

pH	溶解度(mg/mL)
0.8	3.2
1.1	3.7
1.7	4.3
1.9	5.2
3	0.77
3.1	0.37
4.3	0.001
5.4	0.002
8.7	0.002
12.1	0.001

厚生労働科学研究費補助金（エイズ研究事業）  
分担研究報告書

逆転写酵素 d4T の薬剤耐性機序の解明

分担研究者：児玉 栄一 京都大学ウイルス研究所附属エイズ研究施設感染免疫研究領域 助手

**研究要旨**

NP-2 細胞を用いた簡便な phenotype assay 系を樹立した。また、薬剤耐性 HIV に有効な核酸系 RT 阻害剤、4'-ethynyl-2'-fluoro-2'-deoxyadenosine と非核酸系 RT 阻害剤 thiazole 誘導体を開発した。

**A. 研究目的**

本邦においてもヒト免疫不全症ウイルス (HIV) 感染症に対して多剤併用療法 (HAART) が導入され、その治療成績は著しく向上したが、依然、薬剤耐性や多剤併用によって引き起こされる副作用の問題は残されたままである。本研究では薬剤耐性 HIV の克服を目的とし、耐性機序の解明と新規薬剤の開発を行っている。薬剤耐性 HIV の検出においては genotype/phenotype assay によって早期検出が可能になりつつあるが、比較的簡便な genotype assay では既存の耐性変異以外が検出された場合、その意義を解明することは困難である。また HAART によって RT 阻害剤に対する耐性ウイルス、いわゆる多剤耐性株の出現パターンが年々変化してきている。そのため分担研究者は臨床分離 HIV における HAART 中に誘導される RT 阻害剤に対する耐性機序の詳細な解明という基礎的解析から新しい phenotype assay 法の確立、併せて、新規 RT 阻害剤開発およびそれらに対する耐性機序の解析を行い、臨床応用を視野に入れた研究を推進する。

**B. 研究方法**

細胞とウイルス

ヒト T 細胞株である MT-2 細胞、ヒトグリア由来細胞である NP-2 細胞、HeLa-CD4/β-galactosidase (MAGI) 細胞を使用した。野生型と組換えウイルスはプラスミドクローンである pNL4-3 とその組換え体を 293T 細胞に遺伝子導入して作製した。健常ヒト末梢リンパ球 (PBM) は PHA で刺激したのちに臨床 HIV 株の分離に用いた。

新しい phenotype assay の確立

NP-2 細胞に HIV receptor である CD4, CXCR4, CCR5 を発現するプラスミドを遺伝子導入した

(NCK45 細胞)。この NCK45 細胞を使用し、MTT を利用した色素法で HIV 感染を検出し、薬剤感受性試験法の確立を試みた。また reporter gene として (β-galactosidase: β-Gal および secretary alkaline phosphatase: SEAP) を同様に導入し、β-Gal/SEAP による検出法の確立も試みた。新規 RT 阻害剤のスクリーニング

研究代表者らは、4'-ethynyl-2'-deoxynucleoside が耐性 HIV に対しても強い抗 HIV 活性を有することを報告しているが、その誘導体の抗 HIV 作用を MAGI 法にて検討した。また、非核酸系逆転写酵素阻害剤に関してもスクリーニングを行った。

(倫理面への配慮)

基礎研究であり、特に配慮は要らないと考えられた。臨床分離株の患者情報に関しては薬剤使用歴を除いて氏名、年齢、性別も含めて一切を研究に利用していない。

**C. 研究結果**

1) NCK45 細胞の樹立

平成 16 年度より樹立を試みていた CD4, CXCR4, CCR5 を安定的に高発現する NCK45 細胞を樹立した。これらのレセプター遺伝子を IRES (internal ribosomal entry site) で薬剤耐性遺伝子と融合させ、遺伝子のサイレンシングがおこりにくくなるようにした。これらレセプターの発現レベルは 6 ヶ月培養を続けても低下しないことを FACScan 解析で明らかにした。HIV 感染に対する感受性も約 90% 維持しており、これはさらに 6 ヶ月培養してもほとんど低下しなかった。コントロールとして用いた MAGI 細胞は CD4 発現がほとんど認められなくなり、HIV 感染に対する感受性をほとんど失っていた。

この NCK45 細胞を用いて MTT 色素法を応用した抗 HIV スクリーニング法の確立を試みた。

種々の条件を検討し、7日間培養で結果が得られる MTT 法を確立した。この方法を用いて、CXCR4 をコレセプターとする HIV-1<sub>IIIb</sub> と CCR5 をそれとする HIV-1<sub>BaL</sub> を用いて実際に臨床応用されている薬剤を含めて、種々の薬剤の効果を検討した。プロテアーゼ阻害剤の活性が従来報告されている値よりも低く評価されたが、それ以外の薬剤の活性は従来法と同様の値を得ることができた。プロテアーゼ阻害剤は多剤耐性遺伝子 MDR とその関連遺伝子でコードされる ABC トランスポーターによって細胞から efflux され、その効果が減弱することが報告されている。そのため、代表的な MDR 関連遺伝子 10 種を RT-PCR 法で検討したが、NCK45 細胞に特異的に発現している MDR 遺伝子は見出せなかった。

今回確立した MTT 法では結果が得られるまでに7日間かかること、さらに臨床分離株を用いた試験では個々のウイルスによって複製速度が異なることから同一条件で薬剤感受性を測定することが困難である。そのため、レポーター遺伝子発現を利用し、短期間に結果を得る方法を確認することを目的とし、 $\beta$ -Gal と SEAP 遺伝子を上記したように IRES で結合させ、形態学的、経時的に HIV 感染を測定することを試みた。この方法では single round の感染を検出することができ、複性能の相違による影響をほとんど受けずに検討することが可能であった。また、現在6株の臨床分離株で薬剤感受性試験を行ったが、MAGI 法で得られた結果と関連していた。

## 2) 新規 RT 阻害剤

a) NRTI: 新規 RT 阻害剤のスクリーニングから 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine (4'-E-2F-dA) を同定した。この薬剤は MT-4 を用いた MTT 法で 60pM という非常に強い活性を有していた。耐性 HIV に関して M184V 変異と AZT 耐性変異である M41L/T215Y と 69-70 番目のアミノ酸の間に 2 アミノ酸挿入変異を併せ持つ多剤耐性 HIV に対して感受性がやや低下するが、他の主な耐性変異ウイルスには感受性を維持していた。また、臨床分離多剤耐性 HIV に対して 1nM 前後という極めて低い濃度で効果を示した。4'-E-2F-dA は adenosine deaminase 耐性であり、deoxycytidine kinase によって 1 リン酸化されることを見出した。

b) NNRTI: NRTI と同様にスクリーニングから NNRTI 交差耐性株にも効果を示す thiazole 誘導体を見出した。これらの誘導体はほとんどすべての NNRTI に対して交叉耐性を示す K103N に対しても現在臨床使用されているエファビレ

ンツよりも交差耐性が少なく、Y181C に対してはその感受性がほとんど変化しなかった。

## D. 考察

臨床分離株を効率的に培養そして薬剤感受性試験を簡便に測定しうる方法として HIV レセプターを発現させた HeLa 細胞 (MAGIC5 細胞) を使用するものが報告されている。しかしこの細胞は培養を継続していくと次第に CD4 の発現が低下してしまう欠点を有している。また、CXCR4 以外の種々のコレセプターを発現しているため、厳密に分離株がどのコレセプターを使用するのかを観察することは難しい。そのため現在臨床開発が行われているコレセプターアンタゴニストを正確に評価することができないと考えられる。これらの問題点を改善する方法を早期に確立する必要がある。本年度樹立した NCK45 細胞は今までに報告された細胞と比べ、長期培養によってもそのウイルス感受性に変化が少ない細胞として有用であると考えられた。MAGI 細胞は世界中でもっとも汎用されている細胞ではあるが、長期培養によってそのウイルス感受性が低下することが問題である。また、PBM を用いたアッセイはドナーによって細胞の性格が異なるためサンプル間での比較が難しく、また、時間がかかることや p24 量を測るといった費用・煩雑さの問題がある。NCK45 細胞を用いた試験では、これらの問題点をすべて改善していると考えられたが、プロテアーゼ阻害剤の評価には向いていないことが判明した。

今年度は、新規薬剤として、NRTI では 4'-E-2F-dA、NNRTI では thiazole 誘導体を同定することができた。4'-E-2F-dA は種々の耐性 HIV に対しても効果を示すだけでなく、adenosine deaminase 耐性であることから、生体内でも安定性が高いと考えられる。さらに 1 リン酸化反応を静止/活性化リンパ球の両方で活性が高い deoxycytidine kinase を介することから、生体内で 95% 以上を占め、HIV の潜伏感染に重要な働きをしている resting 細胞にも有効であると考えられる。これらのことから、4'-E-2F-dA は有望な薬剤の 1 つであると考えられた。

一方、NNRTI である thiazole 誘導体も耐性 HIV に効果を示し、有望な誘導体であるが、現在同定しているものは生体内での分解が早く、十分に薬剤濃度を維持することができなかった。そのため現在の抗 HIV 効果を維持したまま、臨床応用可能な誘導体の合成が待たれる。

## E. 結論

NP2 細胞に HIV レセプターを発現させた NCK45 細胞は MTT 法としてもレポーター法としても薬剤感受性を測定する方法として優れていたが、プロテアーゼの評価には向かないことが判明した。また、耐性 HIV を抑制する薬剤の基本骨格、4'-ethynyl-deoxyadenosine と thiazole 誘導体を同定した。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Nameki D, Kodama E, Ikeuchi M, Mabuchi N, Otaka A, Tamamura H, Ohno M, Fujii N, Matsuoka M. Mutations Conferring Resistance to HIV-1 Fusion Inhibitors are Restricted by gp41 and Rev Responsive Element Functions. *J Virol.* 79:764-770, 2005
2. Masuda N, Yamamoto O, Fujii M, Ohgami T, Fujiyasu J, Kontani T, Moritomo A, Orita M, Kurihara H, Koga H, Kageyama S, Ohta M, Inoue H, Hatta T, Shintani M, Suzuki H, Sudo K, Shimizu Y, Kodama E, Matsuoka M, Fujiwara M, Yokota T, Shigeta S, Baba M. Studies of non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. Part 2: synthesis and structure-activity relationships of 2-cyano and 2-hydroxy thiazolidenebenzenesulfonamide derivatives. *Bioorg Med Chem.*13:949-961, 2005.
3. Fan J, Kodama E, Koh Y, Nakao M, Matsuoka M. Halogenated thymidine analogues restore the expression of silenced genes without demethylation. *Cancer Res.* 65:6927-33, 2005.

### 2. 学会発表

1. Kodama E, Masuda N, Orita M, Yamamoto O, Fujii M, Kageyama S, Ohta M, Hatta T, Inoue H, Suzuki H, Sudo K, Shimizu Y, and Matsuoka M. HIV-1 Acquires Resistance to New NNRTI, Thiazol Derivatives, through Steric Hindrance with Multiple Mutations. 12th Conference on retroviruses and opportunistic infections. Boston, MA, 2005. Feb. 22-25
2. Kodama E, Mabuchi N, Otaka A, Ohno M, Fujii N, Matsuoka M. Mutations Conferring Resistance to HIV-1 Fusion Inhibitors are Restricted by gp41 and Rev Responsive Element Functions. 7th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific. Kobe, Japan 2005 July 1-5

3. 上野真理子、梶原慶子、志村和也、児玉栄一、松岡雅雄：融合阻害剤 T-20 (Fuzeon) に対する耐性 HIV の解析：第 19 回日本エイズ学会学術集会・総会、熊本、2005 年 12 月 1-3 日
4. 梶原慶子、児玉栄一、松岡雅雄：MTT 法を用いた CXCR4 および CCR5 トロピック HIV-1 に対する薬剤感受性試験法：第 19 回日本エイズ学会学術集会・総会、熊本、2005 年 12 月 1-3 日
5. 児玉栄一、梶原慶子、大高章、藤井信孝、松岡雅雄：水溶性 C34 誘導体の抗 HIV 効果：第 19 回日本エイズ学会学術集会・総会、熊本、2005 年 12 月 1-3 日
6. 川本敦司、児玉栄一、大類洋、満屋裕明、松岡雅雄：核酸系逆転写酵素阻害剤 4'-ethynyl-2-halo-deoxyadenosine 誘導体の耐性 HIV 複製阻害活性の検討：第 19 回日本エイズ学会学術集会・総会、熊本、2005 年 12 月 1-3 日

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

特願 2004-007 発明の名称：4'-C-置換-2-ハロアデノシン誘導体

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし



厚生労働科学研究費補助金（エイズ研究事業）

分担研究報告書

薬剤耐性ウイルスの Genotyping 実験系の確立

分担研究者： 巽 正志 （国立感染症研究所エイズ研究センター）

研究要旨 MAGIC-5A 細胞と Long PCR を用いた「HIV Trapping System」による効率的感染性分子クローン樹立法を邦人感染者由来 Subtype B あるいは CRF01\_AE 組換え薬剤耐性ウイルスおよび Naive ウイルスに適用したところ、総計 822 個の Full-genome clone のうち 40%以上の高率で 391 個の感染性分子クローンが得られ、その内 101 クローンの全ゲノム配列を決定した。2名の患者から継時的に分離したウイルスの pol 領域の薬剤耐性関連変異は時の経過に伴って蓄積していくが、env V1/V2 領域はいずれの時期も多様性を保持していることが判明した。これらの感染性分子クローンにより今後耐性変異獲得機序と耐性ウイルスの進化を解析しえる基盤が整備された。

A. 研究目的

現在 HIV-1 の薬剤耐性試験は Genotyping と Phenotyping に大別されるが、両者を総合的に繋ぐ有効な方法論はいまだ確立されていない。何故なら感染者体内での HIV-1 の存在様式が高度の多様性を示していることから、Genotyping あるいは Phenotyping といっても患者末梢血中のウイルスをバルクで解析するしか方法論がないためであった。分担研究者はこれまで HIV-1 ウイルス感染性分子クローン樹立法として HIV 感染価測定細胞株 MAGIC-5A と Long PCR を用いた「HIV-1 Trapping System」を開発し、世界に先駆けて Clade C, A, G および AG 組換え体などの感染性分子クローンの樹立を報告し、また樹立の効率を高めるべく改良に努めてきた。一方、MAGIC-5A 細胞に新たに

HIV-LTR 駆動分泌型アルカリフォスファターゼを組み込み、迅速簡便な Phenotyping 薬剤耐性試験法を開発し、多検体処理が可能な High Through-put 実験系の実用化を目指している。

本研究では Genotyping と Phenotyping 薬剤耐性試験法を有機的に統合し得る薬剤耐性試験法を開発すべく、先に述べた 2 方法を結合して邦人の薬剤耐性ウイルス解析に応用し、もって将来の薬剤耐性獲得機序と病原性解析の分子基盤を整備することを目的とした。本年度は 2 名の選定した HAART 治療歴がある患者から継時的に分離したウイルスの感染性分子クローンを多数樹立し、全ゲノム塩基配列を決定し、その進化過程を解析することと本邦感染者から Recombinant Virus Assay 用に Prototype Clone を作成するこ

とを試みた。

## B. 研究方法

HIV-1 ウイルスのクローニングおよび Long PCR と全長ゲノム Plasmid 構築は先に報告した HIV 感染価測定系 Indicator 細胞 MAGIC-5/HeLa4.5 nEGFP 細胞株を用いた HIV ウイルスクローニングと感染性クローンの構築系(HIV Trapping System ; HIV 捕捉実験系)により行った。対象としたウイルスは、長期にわたり薬剤治療を受けている 2 名の患者(コード番号 NH2000-0001 および NH19-203)から、国立感染症研究所エイズ研究センター第 2 グループにより、それぞれ 4 時点で分離された計 8 株の薬剤耐性ウイルスと 1 名の未治療感染者から分離した CRF01\_AE 組換え体ウイルスである。また CRF01\_AE 組換え体ウイルスのプロトタイプとして米国 NIH AIDS Reagents Programme から 1993 年にタイ国で分離された 6 株のウイルスも含めた。さらに本邦で流行する subtype B のプロトタイプクローンを樹立する目的で、2 名の未治療感染者から分離したウイルスをも含めた。

まず末梢血リンパ球の共培養で分離したウイルスを直接感染させた MAGIC-5A 細胞からゲノム DNA を抽出し、それを鋳型として Long PCR を行い 5'-および 3'-側のプロウイルスゲノムを増幅、それらを連結することによって完全長の DNA クローンを得た。完全長 DNA クローン作製の戦略は患者ウイルスの RT-PCR 法によって得られていた pol 領域における Rare

cutter の制限酵素を選定し、その塩基配列を含む Primer で HIV-1 genome pol 下流領域を増幅し pMT1 に組込み、しかる後に pol 上流領域を増幅した断片を酵素処理後組込む Half & Half 戦略を用いて全長クローンを得た。得られたクローンは HeLa4.5nEGFP 細胞に Transfection しその培養上澄を MAGIC-5A 細胞にかけ感染性を確認した。

本研究では、血液などヒト臨床材料が使用される場合には、材料提供者の個人情報が出漏らないよう厳格なプライバシー保護に努める。このためヒト材料を用いた研究は連結不可能匿名化 (unlinked anonymous) の手法を行って個人情報の漏洩を防ぎ、患者の非特定性を保つ。また、研究方法および研究により生じうる研究対象者に対する不利益、危険性の排除について十分な説明を加え、守秘義務を守る。以上を遵守することで倫理面の問題は無いと判断した。

## C. 研究結果

本年度に樹立した感染性分子クローンの成績を表に示す。クローン樹立戦略は次の如く行った。分離ウイルス感染 MAGIC-5A 細胞ゲノムを鋳型に HIV genome 右半分を EcoR I site を含む Pol Forward Primer と 3' LTR poly A signal 下流領域に Not I site を附加した Reverse Primer で約 5.5Kbp の Amplicon を増幅し電気泳動後精製し制限酵素処理後該当酵素で切断されないことを確認後 HIV-1 Cloning Vector pMT1 へ組込み、LacZ 発

現選択により組込み陽性クローンを5クローン選別した。同じ Primer 領域の Complementary な Reverse Primer と各 subtype consensus 5' LTR 領域上流に Sal I site を附加した Forward Primer で HIV genome 左半分を増幅後精製し該当酵素にて処理後精製し、酵素処理した先の右半分を組込んだクローンに組込み全長クローンを得た。得られたクローンは HeLa4.5nEGFP 細胞に Transfection しその Tat 活性と Syncytium 形成を確認後、その培養上澄を MAGIC-5A 細胞にかけ感染性を確認した。全長クローン総数 822 個のうち 391 個 48%のクローンが MAGIC-5A 細胞で感染性を示した。この感染性分子クローンの取得率は今までになく高いものであった。得られた感染性分子クローンのうち2名の長期治療患者から分離した薬剤耐性ウイルスについては各分離ウイルスについて計46個、未治療 naïve ウイルスについては各1から2クローン総計105個を選定し、全ウイルスゲノムの塩基配列を決定した。全てのウイルスゲノム塩基配列は全長に亘って該当 subtype もしくは CRF 組換体の特性を示していた。部分塩基配列から subtype B と subtype F の組換体であることが予測された DR0769 ウイルスは Bootstrap 解析から CFR12\_BF 組換体であることが判明した。

患者 NH19-203 ウイルスの直接塩基配列によれば PR 領域には L10F, K20T, N88S の耐性変異が検出されたが、部分塩基配列を

決定した殆どの感染性分子クローンで同様な耐性変異が認められた。このことから PCR Amplification による misincorporation による塩基変異は想定より低いものと考えられた。次に RT 領域には直接塩基配列では M41L, 挿入変異 67STST68, T69T/A, L74V, V106L, Y188L, L210L/W, T215Y などの多様な耐性変異が検出されていた。各感染時期に分離したウイルスから樹立した感染性分子クローンの RT 領域には各時期のウイルスから RT-PCR により直接塩基配列と同様な耐性変異が認められたが、感染時期を経るに従って耐性変異が蓄積される蛍光が認められた。gag, pol 領域と env 領域についてウイルスの個体内進化を辿る目的で、分離した44感染性分子クローンの系統樹を作成したところ、各感染時期のウイルスはクラスター群を形成しつつ進化していることが示された。もう一名の患者検体 NH2000-0001 についても概略同様な傾向が認められた。現在分離した感染性分子クローンの薬剤耐性プロファイルを決定の途上であるが、得られた感染性分子クローンの薬剤耐性 Phenotype とウイルスゲノム全長にわたる Genotype がどのように関連するか解明し得るものと期待される。

#### D. 考察

本年度は、Half & Half Strategy により「HIV trapping System」のさらなる効率化を実現し、2名の本邦感染者から分離した薬剤耐性 CRF01\_AE 組換体ウイルス

から 271 クローンに及ぶ感染性分子クローンは樹立された。これらのクローンのうち選定した 88 クローンの全長塩基配列の解析から、今までの患者ウイルスのバルクでの直接解析では見えなかった塩基配列の異なるパターンの組合せの薬剤耐性ウイルスが存在することが判明した。この成績は、これら全ゲノムの感染性分子クローンの高効率樹立法が、患者ウイルスの多様性の解明に有力な解析手段を提供し、今まで成しえなかった Phenotyping と Genotyping を統合した薬剤耐性試験法の開発が可能であり、薬剤耐性獲得機序の解明に有用であることが十分に期待できることを示している。

また今回樹立した CRF01\_AE 組換え体の感染性クローンは同組換え体のプロトタイプとして現在異性間性交渉により本邦でも感染者が増加している CRF01\_AE 組換え体ウイルスの薬剤耐性ウイルスの解析にとって Recombinant Virus Assay などの Prototype Clone として応用できることからその有用性は幅広く考えられる。

また本年度は、邦人未治療感染者から分離した Naïve ウイルスと 1993 年度にタイにて分離されたウイルスより、我が国で感染者が覆い subtype B と CRF01\_AE 組換え体の感染性分子クローンを 102 個樹立し、その内 in vitro での増殖効率に優れているクローンを選別し、11 クローンの全ゲノム塩基配列を決定した。これらのクローンは今後、邦人治療感染者の耐性ウイルスの効率的な Recombinant Virus

Assay 系の構築のために有用であることが期待される。

また今回部分塩基配列から subtype B と subtype F の組換え体であることが予測された DR0769 ウイルスは Bootstrap 解析から CFR12\_BF 組換え体であることが判明した。このことはいまだ数は少ないとはいえ、南米に感染者の増加が認められる本組換え体ウイルスが本邦に既に侵淫していることを示している。その感染拡大に注意を促す事実である。これらのクローンはこの組換え体では世界で初めての感染性分子クローンである。

今後は得られた各患者の系列クローンの薬剤耐性プロファイルの解析を進め、pol 領域のみならず他の領域の耐性ウイルスの Fitness に関わる領域を特定する必要がある。さらに多くの患者の時系列にそった分離ウイルスの感染性分子クローンの樹立と解析を行い、さらに CRF01\_AE 組換え体のみならず、本邦で感染者数が多い subtype B の薬剤耐性ウイルス感染性分子クローンの樹立を試みたい。

今年度に達成されたクローン樹立率の向上は更に改善され得ると考えられるが実用化の段階に達したと考えられる。多様な遺伝子構造を持つ HIV-1 の研究はさらに多くの感染性クローンを必要とするが、その取り掛かる基盤が整備された。

## E. 結論

感染性クローン樹立法をより効率的に進化させ様々な耐性パターンをもつ CRF01\_AE 組換え体の感染性クローンを樹立

した。併せて邦人感染者に多い subtype B と CRF01\_AE 組換体の Prototype Clone を整備した。

#### F. 健康危険情報

該当する事項はない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Yan H, Mizutani TC, Nomura N, Takakura T, Kitamura Y, Miura H, Nishizawa M, Tatsumi M, Yamamoto N and Sugiura W. A novel small molecular weight compound with a carbazole structure that demonstrates potent human immunodeficiency virus type-1 integrase inhibitory activity. *Antiviral Chem. Chemother.* 16:363 - 373, 2005.

M A. Rodriguez, Y Chen, J K. Craigo, R Chatterjee, D Ratner, M Tatsumi, P Roy, D

Neogi and P Gupta. Construction and characterization of an infectious molecular clone of HIV-1 subtype A of Indian origin. *Virology*, in press.

##### 2. 学会発表

橋本 修、吉田隆史、林 明男、蜂谷敦子、巽 正志、岡 慎一、山崎修道、青木 学  
実用的な抗 HIV-1 薬剤耐性フェノタイプ測定法の確立。第 19 回日本エイズ学会、熊本、2005 年 12 月 1 日 3 日

Tokunaga K, Kinomoto M, Sakamoto Y, Tatsumi M, Shimura M, Ishizaka Y, Kurata T, and Sata T Differential anti-APOBEC3G activity of HIV-1 Vif in a subtype-dependent manner 2nd  
Dominique Dormont International Conference on "Host pathogen interactions in chronic infections" Paris Dec 1 3, 2005

**Infectious Molecular Clones from Drug-resistant or Naïve Virus**

As of '05.12.14

Subtype	Patient	Virus code	Number of full-length clones	Number of AZTIC-5A positive clones		Number of sequenced clones
CRF01_AE	NH 19.203	DR0492	70	26	37.1%	12
		DR1216	142	42	29.6%	10
		DR2194	42	25	59.5%	12
		DR5032	78	10	12.8%	10
	NH 2005-8091	DR1741	28	17	60.7%	12
		DR1873	62	57	91.9%	12
		DR2584	87	32	36.8%	10
	NH2047-1706444	DR0524	10	5	50.0%	12
		93TH051	24	3	12.5%	1
	From Thailandians	93TH054	24	1	4.2%	1
		93TH057	24	5	20.8%	12
		93TH060	29	7	24.1%	1
		93TH062	51	37	72.5%	1
93TH063		37	13	35.1%	1	
Subtype B	NH	DR0073	18	8	44.4%	2
	NH	DR0075	50	23	46.0%	2
CRF12_BF	NH0001-1077	DR0789	32	18	56.2%	2
Total			822	397	48.3%	107 (13)

Drug Resistant Virus

Naïve Virus

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）  
分担研究報告書

薬剤耐性ウイルスの Genotype と薬剤耐性 RT Phenotype  
および RT Structural Type との相関解析

分担研究者 仲宗根正 国立感染症研究所・エイズ研究センター・主任研究官

研究要旨：日本の薬剤耐性 HIV-1 の動態を酵素学・遺伝子学・構造学の面から把握し、薬剤耐性克服に向けた研究に資することを目的とする。そのため、昨年度より酵素学的な HIV-1 薬剤耐性動態把握のための検査体制確立を目指している。今年度は、以下の知見を得た。

- ① 超高感度 RT 活性測定法：Real-Time Amp-RT Assay:RTA2 を用いて HIV-RT 薬剤感受性迅速試験法を開発した。
- ② 同検査法にて人為的変異 HIV-RT の AZT-TP と 3TC-TP 耐性が測定可能であった。
- ③ しかしながら d4T-TP 耐性は確認できなかった。
- ④ HIV-1 感染者血漿中のいわゆる臨床 HIV-RT について、3TC-TP に対して非耐性から高度耐性まで様々な感受性が測定可能であった。

協力研究者

佐藤裕徳 国立感染症研究所・遺伝子解析室  
杉浦互 国立感染症研究所・エイズ研究センター

/215Y,103N) を用いた。さらに CRF\_01 由来合成 RT (wild-E, mutant-E) も用いた。これらの HIV-RT と薬剤を用いて RTARTA を応用した HIV-RT 薬剤感受性迅速試験法開発を行った。最後にこの試験法により実際に HIV-1 感染者血漿中の HIV-RT 薬剤感受性を測定した。

A. 研究目的

日本の薬剤耐性 HIV-1 の動態を酵素学・遺伝子学・構造学の面から把握し、薬剤耐性克服に向けた研究に資することを目的とする。そのため、酵素学的な HIV-1 薬剤耐性動態把握のための検査体制確立を目指した。

C. 研究結果

1. AZT-TPと3TC-TP耐性が確認できたが、d4T-TP耐性は確認できなかった。（図1，表1）
2. HIV-1感染者血漿8検体では、3TC-TPに対して非耐性から高度耐性まで様々な感受性を確認した。（HIVmn-RTに比較して1.4倍 250倍以上のIC50）（表2）

B. 研究方法

酵素学的な薬剤耐性動態把握のために、昨年度までに開発した超高感度 RT 活性測定法による RT 薬剤感受性テストの開発を行った。まず HIV-RT 薬剤として RT インヒビターの細胞内活性体 AZT-TP、d4T-TP、3TC-TP を用いた。HIV-RT では野生株として HIVmn-RT を、変異株として人為的に変異させた 5 株（41L/184V/215Y, 41L/67N/70R/215Y, 184V, 41L

D. 考察

簡便で大量検体処理が可能な HIV-RT 薬剤感受性迅速試験法が確立された。本法では測定時間が半日（約7時間）であり、培養を基本とした既存の測定法に比べて極めて迅速である。また、既存の方法が血漿中のウイルスを選別してしまうのに対して、本法では総体として把握す

厚生科学研究費補助金 (エイズ対策研究事業)  
分担研究報告書

る事が可能である。

今後、薬剤耐性の有用な指標と成り得るか、gentotype や phenotype との相関関係の検討等のさらなる検討が必要である。そのために次年度は、臨床検体を数多く検査する予定である。特に 3TC 耐性については、その耐性を数値として臨床サイドに提供することにより、薬剤選定の判断に役立つ事も想定している。昨年度の報告書で述べたように、本研究の成果を HIV 感染者に還元して行きたい。

さらに、現在測定可能な薬剤は AZT, d4t, 3TC の3剤のみであるが、Nevirapin や Tenofovir についても検査ができるよう準備を進める。

#### E. 結論

- ① 超高感度 RT 活性測定法：Real-Time Amp-RT Assay:RTA2 を用いて HIV-RT 薬剤感受性迅速試験法を開発した。
- ② 同検査法にて人為的変異 HIV-RT の AZT-TP と 3TC-TP 耐性が測定可能であった。
- ③ しかしながら d4T-TP 耐性は確認できなかった。
- ④ HIV-1 感染者血漿中のいわゆる臨床 HIV-RT について、3TC-TP に対して非耐性から高度耐性まで様々な感受性が測定可能であった。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Misumi S, Nakayama D, Kusaba M, Iiboshi T, Mukai R, Tachibana K, Nakasone T, Umeda M, Shibata H, Endo M, Takamune N, Shoji S. Effects of immunization with CCR5-based cycloimmunogen on simian/HIVSF162P3 challenge. J Immunol. 2006 176:463-71.
- 2) Someya K, Cecilia D, Ami Y, Nakasone T, Matsuo K, Burda S, Yamamoto H, Yoshino N,

Kaizu M, Ando S, Okuda K, Zolla-Pazner S, Yamazaki S, Yamamoto N, Honda M. Vaccination of rhesus macaques with recombinant Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin Env V3 elicits neutralizing antibody-mediated protection against simian-human immunodeficiency virus with a homologous but not a heterologous V3 motif. J Virol. 2005 Feb;79(3):1452-62.

- 3) Usami O, Xiao P, Ling H, Liu Y, Nakasone T, Hattori T. Properties of anti-gp41 core structure antibodies, which compete with sera of HIV-1 infected patients. Microbes & Infection. 2005, 7;650-657
- 4) 仲宗根正. 日本伝播 HIV 集団の遺伝子・分子生物学的解析及び分子力学的構造解析 東北医学雑誌 117;27-31, 2005
- 5) 仲宗根正、山本直樹 ワクチンはまだか！ 感染・炎症・免疫 2005;35:2-11

##### 2. 学会発表

- 1) 仲宗根正、高松純樹、杉浦亙、佐藤裕徳、山本伸二、Walid Heneine、山本直樹：HIV-RT 薬剤感受性迅速試験法(半日)の開発 第19回日本エイズ学会 (12/1-3, 2005, 熊本)
- 2) 元原麻貴子、伊吹謙太郎、三宅荘子、深澤嘉伯、稲葉一寿、鈴木元、横田恭子、河本宏、仲宗根正、本多三男、速水正憲、三浦智行：弱毒・強毒 SHIV の感染初期における胸腺組織及び胸腺内 T 前駆細胞の解析 第19回日本エイズ学会 (12/1-3, 2005, 熊本)
- 3) 宇佐美修、肖鵬、斉藤弘樹、服部俊夫、三木祐、佐藤功、服部真一郎、仲宗根正、原敬志：東北地方の HIV 感染者の臨床症状とウイルス特性 第19回日本エイズ学会 (12/1-3, 2005, 熊本)
- 4) 徳永恵一、中山大介。三隅将吾、仲宗根正、向井録三郎、橘園臣、梅田衛、柴田英明、高宗暢暁、庄司省三：Human CCR5 を基にした環状抗原の免疫により得られたカニクイ

サル抗血清の macaque CCR5 に対する交差反  
 応性の検討 第 19 回日本エイズ学会  
 (12/1-3, 2005, 熊本)

H. 知的財産権の出願・登録状況  
 特になし

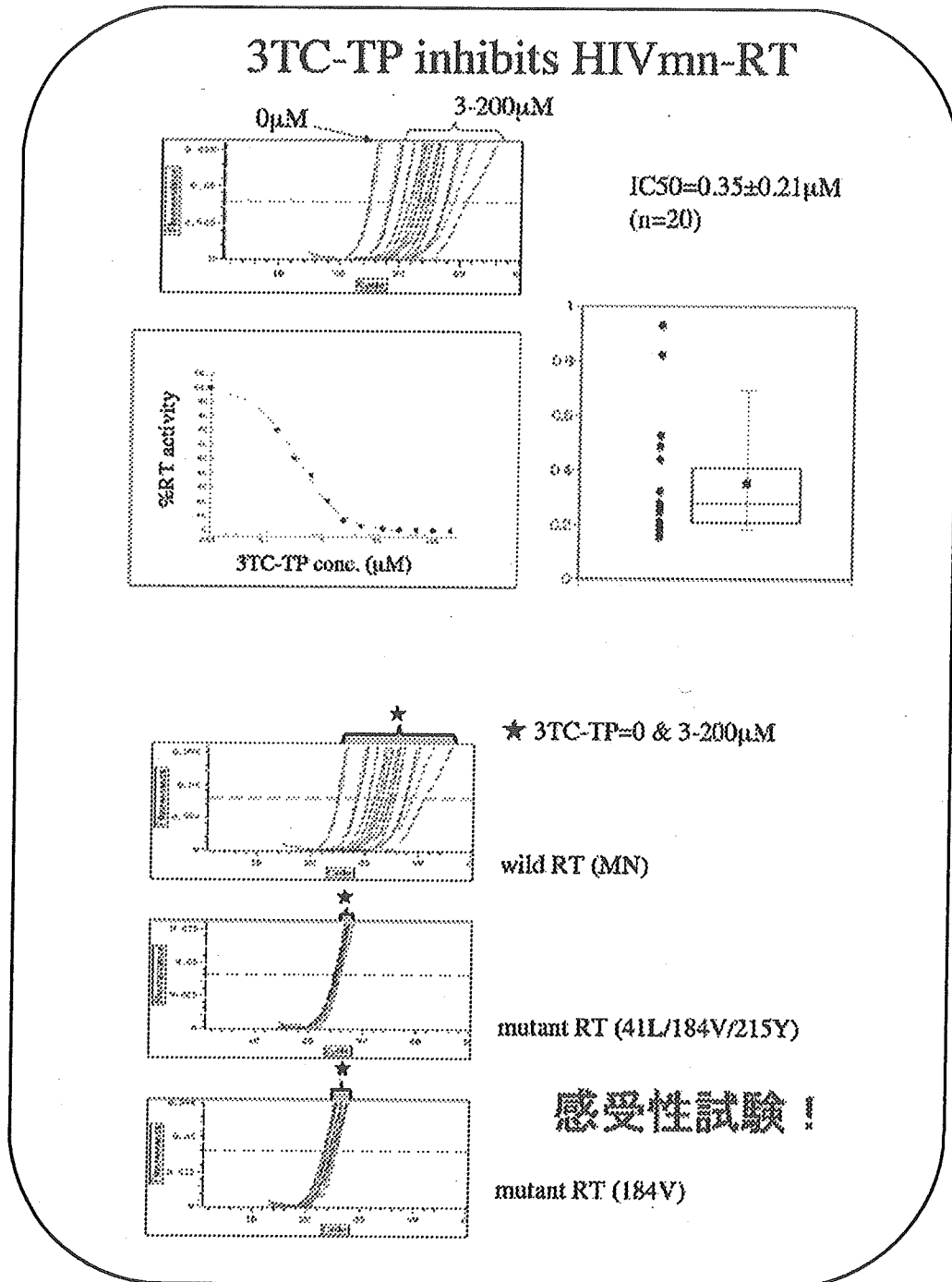


図 1 . HIV-RT(mn) の 3TC-TP に対する IC<sub>50</sub> (上段) と 3TC-TP 耐性 mutant RT (下段)  
 HIV-RT(mn) の 3TC-TP に対する IC<sub>50</sub> は 0.35 μM であった。3TC-TP 耐性 mutant RT は 3TC-TP の  
 濃度に関わらず全く阻害されず、その IC<sub>50</sub> は 200 μM 以上であった。



厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）  
分担研究報告書

表 1. 酵素学的 HIV-RT 薬剤感受性試験による AZT-TP と 3TC-TP 耐性検査  
人為的変異 HIV-RT の AZT-TP と 3TC-TP 耐性が測定可能であった。

mutant RT	IC50 (fold to HIVmn-RT)		
	3TC	AZT	d4T
41L/184V/215Y	>571	5.55	0.56
41L/67N/70R/215Y	3.00	7.46	1.11
184V	307	3.55	0.21
41L/215Y	1.06	<1.55	0.83
103N	not done	0.18	0.73

表 2. 酵素学的 HIV-RT 薬剤感受性試験による 3TC-TP 耐性検査  
HIV-1 感染者血漿中のいわゆる臨床 HIV-RT について、3TC-TP に対して非耐性から高度耐性まで様々な感受性が測定可能であった。

Sample ID	IC50 to 3TC (fold to HIVmn-RT)
NIH4022	>27.8
NIH4027	7.3
NIH4031	1.4
NIH4034	11.8
NIH4036	>255.8
NIH4040	>167.5
NIH4054	>108.1
NIH4062	>147.7

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）  
分担研究報告書

HAART の最適化のための研究（治療のモニタリングと適正処方の研究）

分担研究者 松下修三 熊本大学エイズ学研究センター・病態制御分野

**研究要旨：**我々は HAART の最適化を目指した研究の過程で、長期間最適化が可能であった症例においても、PBMC 中のプロウイルスが少ないながら存在し続けることを報告した。HAART 療法下で長期に亘り残存するウイルスと、そのインテグレーション部位の関連を明らかにすることは、今後の治療戦略に重要な知見を与える。本年度の成果として 7 名の HIV 慢性感染症例から 168 のインテグレーション部位を同定した。そのうち 97% が遺伝子のイントロンに蓄積し、それらの遺伝子は resting CD4<sup>+</sup>T 細胞でも発現の観察される遺伝子であった。解析症例の中に *BACH2* 遺伝子への HIV のインテグレーションが優先的に行われている症例を観察した。また、臨床経過の異なる時期に同じインテグレーション部位が観察され、HIV DNA を保持している感染細胞が増殖しながら残存していることを示唆すると考えられた。

**研究目的：**昨年度まで我々は HAART 最適化を目指して RTV+SQV もしくは LPV/r を含む多剤併用療法で良好な治療効果が認められた症例の SQV と LPV の血中濃度と PK について報告して来た。その過程で、十分な血中薬剤濃度を維持し 6 年以上 HAART が継続可能であった症例においても、PBMC 中のプロウイルスが少ないながら存在し続けていたことがわかった。長期に亘る HAART で残存するウイルスと、インテグレーション部位の関連をモニターすることが今後 HAART の最適化をはかる上で重要な知見となると考え、HAART により血中のウイルス量が 6 年から 8 年間、検出感度以下に抑えられていて、プロウイルスの減少も観察される 7 人の HIV 感染症例のインテグレーション部位を解析した。

**研究方法：**(1) HIV のインテグレーション部位を同定するため、inverse PCR 法を用いた。この方法により増幅した DNA 断片の配列を決定し、それを基にデータベースを使って、インテグレーション部位を同定した。(2) 次に 3 症例に関して、臨床経過に従い、時系列に沿ってインテグレーション部位を解析した。(3) HIV のインテグレーションが起こっていた遺伝子が、resting CD4 で発現しているかどうかを RT-PCR

によって検討した。(4) これらの症例から単離した末梢血単核球 (PBMC) において、活性化刺激により HIV が再び増殖できるかどうかを調べた。

**（倫理面への配慮）**

本研究を行うに当たり各症例には研究の概要を説明し同意を得た上で採血し解析した。なお本研究の倫理的・科学的妥当性は熊本大学付属病院の先進医療審査委員会で審査され、了承されている。

**研究結果：**7 人の HIV 感染症例から 168 のインテグレーション部位を同定した。そのうち 97% が遺伝子のイントロンに蓄積していた。また、7 人症例のうち 5 人において、ほとんどの HIV のインテグレーション部位はランダムに異なった遺伝子に存在していた。次に 3 人の症例に関して、経時的にインテグレーション部位の解析を行った。その結果、その 3 症例とも、HAART を開始してから最近までに亘りインテグレーションサイトのほとんどが遺伝子のイントロンに蓄積しており、しかも全体的な分布には変化はみられなかった。しかしながら、わずかな頻度ながら、ヘテロクロマチンへのインテグレ

ーションも観察された。その一方、7人中2人の症例に関してBACH2遺伝子にそのイベントが集中していた。そのうちの一症例において特にその割合が高く(31%)、HAARTの開始から現在に至るまでBACH2遺伝子に存在しているHIVの割合はほとんど変化していなかった。また、同一症例で臨床経過の異なる時期に採取したサンプルから同じインテグレーション部位をもった感染細胞が観察されている。これは、解析した全ての症例において共通してみられた現象である。HIVがインテグレーションしている遺伝子がresting CD4 T細胞で発現しているかどうかを、HIV非感染者のPBMCを用いRT-PCRにより検討した。その結果、解析した17の遺伝子全てにおいてresting CD4における遺伝子発現が確認された。さらに、BACH2遺伝子にインテグレーション部位が蓄積していた症例においても、BACH2遺伝子の発現が認められた。しかしながら、この症例では、in vitroの刺激により複製可能なHIVを分離することはできなかった。

**考察：**本研究では、HAARTにより血中のウイルス量がうまくコントロールできている7人のHIV陽性症例のintegration siteを解析した。その結果、多くの残存しているHIVはresting CD4でも発現している遺伝子のイントロンに入っていることがわかった。すなわち、ほとんどのHIVは転写に対して抑制的とはいえない場所に存在していた。しかし、一部の集団ではヘテロクロマチンのような転写に対して抑制的な場所が、HIVの潜伏感染に関与している可能性も考えられる。中でもBACH2遺伝子にHIVのインテグレーションが集中している症例を発見したことは驚きであった。なぜなら、これほどの強いクラスターは、これまでに報告されていないからである。この症例ではBACH2遺伝子へのHIVのintegrationが優先的に行われていると考えられる。一方でこの遺伝子は、resting CD4でも発現していることから、HIVの転写も十分に行えるところであると考えられる。臨床的な側面から見ると、この症例がHAART開始以

前からウイルスのセットポイントが低くCD4の低下もあまり認められなかったことを考えると、全integration eventの31%を占めるこの領域が実際にはHIVの転写に関して抑制的な場所であり、潜伏感染に関与している可能性も否定できない。また本研究では、臨床経過の異なる時期に同じインテグレーション部位をもった感染細胞がしばしば観察されており、HIV DNAを保持している感染細胞が増殖しながら残存していることを示唆している。

**結論：**本研究では、長期に亘るHAART後も残存しているHIVのほとんどが転写を十分に行える場所に存在していることを示した。また、HIV感染細胞が増殖しながら残存する新たなメカニズムを示した。また、BACH2遺伝子におけるHIVインテグレーションの集中は、新たな潜伏感染あるいはインテグレーションメカニズムが存在していることを示唆させた。

**健康危惧情報：**なし

## 研究発表

### 1. 論文発表

1. Matsushita, S., Yoshimura, K., Kimura T., Kamihira, A., Takano, M., Eto, K., Shirasaka, T., Mitsuya, H., Oka, S.: Spontaneous recovery of hemoglobin and neutrophil levels in Japanese patients on a long-term Combivir® containing regimen. J.Clin.Virol. 33: 188-193, 2005.
2. Sakaguchi, N., Kimura T., Matsushita, S., Fujimura S., Shibata J., Araki M., Sakamoto T., Minoda S., and Kuwahara K. Generation of high-affinity antibody against T cell- dependent antigen in ganp gene- transgenic mouse. J. Immunol. 174: 4485-4494, 2005.

### 2. 学会発表 (国際学会)

1. Shibata, J., Yoshimura, K., Honda A., Murakami, T., Koito, A., and Matsushita S.: A Role of Mutations in Non-V3 Envelope Regions for Escape from a Broad Neutralizing Anti-V3 Monoclonal Antibody, KD-247, during *in vitro* Selection. 13<sup>th</sup> Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Denver, USA, Feb.4-9, 2006.
2. Yoshimura, K., Shibata, J., Honda A., Murakami, T., Mitsuya, H., Koito, A., and Matsushita S.: Resistance Profile of A Novel Broadly Neutralizing Anti-HIV Monoclonal Antibody, KD-247 That Has Favorable Synergism with Anti-CCR5 Inhibitors *In Vitro*. 13<sup>th</sup> Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Denver, USA, Feb.4-9, 2006.
3. Matsushita S., Honda A., Shibata, J., Kimura T., Ikeda, T., Koito, A., Yoshimura, K.: HIV-1 proviral DNA dynamics in patients with long-term successful HAART. 2<sup>nd</sup> International Workshop on HIV Persistence during Therapy. 12. 6-9, 2005, Saint Martin, FWI.
4. Matsushita S., Shibata, J., Yoshimura, K., Maeda, Y., Murakami, T., Atsushi Koito, Honda, M., Mitsuya, H., Eda, Y. : Development of broadly reactive neutralizing monoclonal antibody KD247: implication for passive immunotherapy. The cooperative research project on clinical and epidemiological studies of emerging and re-emerging infectious diseases, Aso, Japan, Sep. 15-16, 2005.
5. Yoshimura K., Shibata, J., Ikeda, T., Honda A., Koito, A., Matsushita, S.: HIV-1 proviral DNA dynamics in patients with long-term successful HAART. International Symposium, The Cooperative research Project on Clinical and Epidemiological Studies of Emerging and Re-emerging Infectious Diseases, 2005. 9.15-16. Kumamoto.
6. Shibata, J., Yoshimura K., Maeda, Y., Murakami, T., Eda, Y., Koito, A., Matsushita, S.: In vitro induction of human immunodeficiency virus type 1 variants resistant to a novel broad neutralizing anti-HIV monoclonal antibody, KD-247. International Symposium, The Cooperative research Project on Clinical and Epidemiological Studies of Emerging and Re-emerging Infectious Diseases, 2005. 9.15-16. Kumamoto.
7. Ikeda, T., Shibata, J., Honda A., Yoshimura K., Koito, A., Matsushita, S.: Relationship of residual HIV-1 and the integration sites in patients on prolonged and effective HAART. International Symposium, The Cooperative research Project on Clinical and Epidemiological Studies of Emerging and Re-emerging Infectious Diseases, 2005. 9.15-16.